

转基因大豆对根际土壤微生物群落功能多样性的影响

王丽娟¹, 李刚², 赵建宁², 修伟明², 章秋艳³, 杨殿林^{2*}, 王慧², 红雨¹

(1.内蒙古师范大学生命科学与技术学院, 呼和浩特 010022; 2.农业部环境保护科研监测所, 农业部产地环境质量重点实验室/天津市农业环境与农产品安全重点实验室, 天津 300191; 3.山西农业大学生命科学院, 山西 太谷 030801)

摘要:采用大田试验结合 Biolog 技术比较分析了种植转基因大豆 PAT 与其亲本 PAT1、转基因大豆 ALS 与其亲本 ALS1 及当地主栽大豆中黄 13 对根际土壤微生物群落功能多样性的影响。结果表明, 由平均颜色变化率(AWCD)反映的土壤微生物活性呈现以下变化规律: 在整个温育过程中, 两种转基因大豆根际土壤微生物活性均高于相应亲本, 当地品种中黄 13 根际土壤微生物活性介于转基因大豆和非转基因亲本大豆之间; 两种转基因大豆根际土壤微生物群落物种均一度(J)和优势度指数(D)较对应亲本均无显著差异($P>0.05$), 转基因大豆 PAT 根际土壤微生物群落香农-维纳指数(H)与亲本相比差异不显著($P>0.05$), 而转基因大豆 ALS 根际土壤微生物群落香农-维纳指数(H)显著高于其亲本 ALS1($P<0.05$)。主成分分析结果表明, 转基因大豆 PAT、亲本 PAT1、非转基因亲本大豆 ALS1 以及中黄 13 土壤微生物群落碳源利用类型相似, 仅转基因大豆 ALS 土壤微生物碳源利用类型表现出差异。对不同碳源的分析结果表明, 土壤微生物利用的主要碳源为糖类、氨基酸类、羧酸类和聚合物。

关键词:转基因大豆; 土壤微生物; 功能多样性; Biolog; 主成分分析

中图分类号:S154.36 文献标志码:A 文章编号:1672-2043(2013)02-0290-09 doi:10.11654/jaes.2013.02.012

Effects of Transgenic Soybeans on the Microbial Functional Diversity in the Rhizosphere

WANG Li-juan¹, LI Gang², ZHAO Jian-ning², XIU Wei-ming², ZHANG Qiu-yan³, YANG Dian-lin^{2*}, WANG Hui², HONG Yu¹

(1.College of Life Science and Technology, Inner Mongolia Normal University, Hohhot 010022, China; 2.Key Laboratory of Original Agro-environment Quality of Ministry of Agriculture/Tianjin Key Laboratory of Agro-Environment and Agro-Product Safety, Agro-Environmental Protection Institute, Ministry of Agriculture, Tianjin 300191, China; 3.College of Life Science, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China)

Abstract: Transgenic crops are grown on an increasingly large scale throughout the world, and their increased use has been accompanied by public concern about their potential ecological and environmental impacts. The persistence and interaction of proteins derived from transgenic crops in soil and their effects on soil microbial are essential information when investigating their effects within the soil ecosystem. The functional diversity of microbial communities in the rhizosphere of transgenic soybean PAT and its parental isoline PAT1, transgenic soybean ALS and its parental isoline ALS1, and local major soybean zhonghuang13 was analyzed under field experiment by Biolog-ECO technique. Soil samples at the depth of 0~20 cm were collected in September 2011 at mature stage. The functional diversity of the soil microbial communities from the different samples was further analyzed by different techniques, such as statistical analysis and diversity index evaluation of the soil microbia. The results showed that the average well color development (AWCD) which directly reflected the microbial activities of changed in the following variation: All the treatments exhibited the elevation of AWCD during the first 48 hours of incubation, but the differences among the treatments were obvious. Both transgenic soybean PAT and ALS caused high increase of the AWCD while the corresponding non-transgenic parental isoline and local major soybean zhonghuang13 had less affection on the AWCD. During the whole incubation process, the soil microbial activity of transgenic soybean PAT and ALS was higher than the corresponding non-transgenic parental isoline, and

收稿日期: 2012-08-29

基金项目: 转基因生物新品种培育重大专项(2011ZX08012-005); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(农业部环境保护科研监测所)和农业部产地环境质量重点实验室/天津市农业环境与农产品安全重点实验室开放基金项目; 内蒙古师范大学 2011 年度研究生科研创新基金项目(CXJJS11053)

作者简介: 王丽娟(1987—), 女, 内蒙古包头人, 硕士研究生在读, 主要从事转基因植物生态环境安全研究。E-mail: hiimnu@163.com

* 通信作者: 杨殿林 E-mail: yangdianlin@caas.cn

the local major soybean zhonghuang 13 was between the transgenic soybeans and non-transgenic parental isolines. The species evenness(J) and dominance index(D) of the soil microbial communities of transgenic soybeans showed no significant difference($P>0.05$) compared with the non-transgenic parental isolines. The Shannon-Wiener index(H) of the soil microbial communities of the transgenic soybean ALS was higher than the its parental isolate ALS1, with no difference between the transgenic soybean PAT and its parental isolate PAT1. The principal component analysis(PCA) indicated that the variance contribution rate of PC1 and PC2 were 37.28% and 17.19%, respectively. The correlation coefficients between main substrates and PC1 or PC2 indicated that the main carbon sources for soil microbes were carbohydrates, amino acids, carboxylic acids and polymers in all treatments. The carbon source utilization mode and metabolic function of the microbial communities were similar among the transgenic soybean PAT, the parental isolate PAT1, the parental isolate ALS1 and local major soybean zhonghuang13, unless the transgenic soybean ALS.

Keywords: transgenic soybean; soil microbe; functional diversity; Biolog; principal component analysis

根据国际农业生物技术应用服务组织(ISAAA)的最新报道,2011年全球转基因作物种植面积达1.6亿 hm^2 ,较2010年增长8%,在转基因作物商业化种植的16年间,转基因作物种植面积增长近94倍^[1]。自1994年美国孟山都公司推出第一代抗草甘磷转基因大豆被批准商业化生产以来,转基因大豆种植面积逐年增加,2011年达到7540万 hm^2 ,占全球转基因作物种植面积的47%,为种植面积最大的转基因作物。在转基因作物生产实践不断发展和完善的同时,其安全性问题也越来越引起人们的重视。

土壤微生物是维持土壤生物活性的重要组成部分,参与有机质分解、养分转化和循环等多种土壤生化过程,微生物活性和群落结构的变化是评价土壤环境的重要生物学指标^[2]。土壤微生物多样性研究主要包括遗传多样性、结构多样性和功能多样性,其中功能多样性是指微生物群落利用碳源的模式或作用的过程^[3]。转基因大豆影响土壤的途径主要靠根际分泌物和一些落叶等植物残体,这些物质进入土壤,与土壤中的微生物发生相互作用从而影响土壤微生物群落结构^[4]。但目前转基因大豆的种植对土壤微生物功能多样性的影响多集中于同一种转基因大豆不同时期对土壤微生物功能多样性的影响^[5],而同一时期不同转基因大豆的种植对土壤微生物功能多样性的影响相关报道较少。因此,研究不同转基因大豆的种植对根际土壤微生物群落功能多样性的影响,对评价转基因作物对土壤微生物影响具有重要意义^[6-7]。Biolog法可以获得有关微生物群落总体活性与代谢功能的信息,可以弥补基于生物标志物的测定方法(微生物醌法,脂肪酸法等)和分子生物学方法(FISH、TGGE、DGGE等)无法获得微生物群体活性信息的不足^[8]。本研究采用Biolog-Eco技术,以转基因大豆PAT与其亲本大豆PAT1、转基因大豆ALS与其亲本大豆

ALS1作为研究对象,并与当地主栽大豆品种中黄13进行比较,对根际土壤微生物群落代谢功能多样性的变化进行研究,为转基因大豆生物安全性评价提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 样地概况与试验设计

土壤样品采自山东省济南市农业科学研究院植物保护研究所试验基地(36°42′59.32″N;117°05′06.41″E),属于暖温带大陆性季风气候区,年平均降雨量650~700 mm,年平均气温14℃,平均有效积温4500℃。供试土壤为褐土,部分理化性质如下:有机质含量22.09 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$,碱解氮含量32.44 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,速效磷含量9.82 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,速效钾含量90.56 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,阳离子交换量7.211 $\text{cmol}\cdot\text{kg}^{-1}$,pH值为8.3。试验前长期种植作物为普通大豆。

试验采用随机区组设计,每个品种各3次重复,小区面积3 m×20 m。大豆于2011年5月23日种植,按行距20 cm均匀撒播,大豆生长过程中不施用农药和化肥,其他按常规管理。

1.2 土壤样品采集

于大豆盛花期采集根际土壤样品,采集时选择长势一致的植株,采用“抖落法”收集根际土,每小区随机选取10株大豆,将其根际土壤混合均匀作为1个土壤样品,置于低温冰盒中带回实验室。

1.3 试验材料

供试大豆品种为转基因大豆PAT及其亲本PAT1、转基因大豆ALS及其亲本ALS1、当地主栽品种中黄13(CK),均由山东省农业科学院植物保护研究所提供。其中转基因大豆PAT具有耐草铵膦铵盐除草剂的特性,转基因大豆ALS有耐乙酰乳酸合成酶(ALS)抑制剂除草剂的特性。

表 1 供试土壤的基本理化性质
Table 1 Soil physicochemical characteristics

处理 Treatments	全磷/g·kg ⁻¹	全氮/g·kg ⁻¹	速效磷/mg·kg ⁻¹	铵态氮/mg·kg ⁻¹	硝态氮/mg·kg ⁻¹	有机质/g·kg ⁻¹	pH
CK	0.76±0.10a	0.88±0.23a	20.80±0.34b	1.16±0.02b	12.68±0.16a	13.54±0.36a	7.68±0.01a
PAT	0.67±0.24b	0.82±0.32b	12.59±0.20e	2.46±0.12a	7.90±0.44c	12.78±0.10a	7.76±0.04a
PAT1	0.73±0.13a	0.83±0.21b	15.45±0.11d	2.44±0.06a	9.04±0.78c	12.69±0.68a	7.65±0.01a
ALS	0.68±0.21b	0.89±0.32a	16.86±0.45c	1.41±0.17b	11.44±0.21ab	12.65±0.98a	7.68±0.02a
ALS1	0.74±0.16a	0.88±0.27a	24.29±0.29a	1.49±0.24b	9.45±0.22bc	13.28±0.66a	7.65±0.08a

注:表中数据为平均数±标准误差,n=3;表中不同字母表示差异显著水平。
Note: Different letters in the same column indicate significant differences at $P<0.05$.

1.4 试验方法

1.4.1 土壤理化性质测定

各处理的理化性质见表 1,土壤有机质含量测定采用重铬酸钾容量法,土壤全氮测定采用凯氏定氮法,土壤硝态氮测定采用 KCl 浸提-紫外分光光度法,土壤铵态氮测定采用 KCl 浸提-靛酚蓝比色法,土壤全磷测定采用硫酸-高氯酸消煮法,土壤速效磷测定采用碳酸氢钠浸提-钼锑抗比色法^[9]。

1.4.2 微生物群落功能多样性测定

称取相当于 10 g 烘干土的新鲜土样加入到已装有 100 mL 灭菌生理盐水(0.85%)的 250 mL 三角瓶中,在摇床上振荡 30 min。静置 10 min 后将浸提液稀释 1000 倍,加入微平板中,每孔加 150 μL。将接种的微平板在 28 ℃培养。分别于第 24、48、72、96、120、144、168 h 在自动快速微生物鉴定仪(Biolog 公司,美国)上读数并记录。

1.5 数据分析

选取 0~2 范围内的 OD 值进行分析^[10]。微平板孔中溶液吸光值平均颜色变化率 AWCD 用于描述土壤微生物代谢活性,计算公式如下^[11]:

$$AWCD=\sum(C_i-R_i)/n$$

式中: C_i 为每个有培养基孔的吸光值; R_i 为对照孔的吸光值; n 为培养基孔数,Biolog Eco 板 n 值为 31。

根据 Biolog ECO 板不同反应孔的吸光值大小,采用香农-维纳(Shannon-Wiener)指数、物种均一度(Species Evenness)和 Simpson 优势度指数来表征土壤微生物群落代谢功能多样性^[12-13]。

香农-维纳(Shannon-Wiener)指数 H 用来估算群落多样性的 高低,计算公式如下:

$$H=-\sum_{i=1}^S P_i \ln P_i$$

式中: S 表示总的物种数; P_i 表示第 i 个种占总数的比例。

当群落中只有一个居群存在时,香农指数达最小

值 0;当群落中有两个以上的居群存在,且每个居群仅有一个成员时,香农指数达到最大值 $\ln k$ 。

物种均一度用来描述物种中的个体的相对丰富度或所占比例。群落的均一度可以用 Pielou 均一度指数 J 表示(Pielou's evenness index, J),计算公式如下:

$$J=\frac{H'}{H'_{\max}}$$

其中 H' 为香农指数, $H'_{\max}$ 是 H' 的最大值:

$$H'_{\max}=-\sum_{i=1}^S \frac{1}{S} \ln \frac{1}{S} =\ln S$$

Simpson 优势度指数 D 用于评估某些最常见种的 优势度,计算公式如下:

$$D=1-\sum P_i^2$$

土壤理化性质和微生物多样性指数的显著性分析采用单因素方差分析,选取 96 h 的平均颜色变化率 AWCD 对微生物碳源利用进行主成分分析(PCA),方差分析和主成分分析采用 SPSS16.0 软件进行。

2 结果与分析

2.1 不同转基因大豆根际土壤微生物群落平均吸光值(AWCD)变化

自培养开始每隔 24 h 测定 AWCD 值,得到该值随时间的动态变化图(图 1)。

对不同转基因大豆根际土壤微生物群落的代谢活性进行分析发现,两种转基因大豆根际土壤微生物活性在整个培养过程中均高于相应亲本,当地主栽品种中黄 13 根际土壤微生物活性介于转基因大豆和亲本大豆之间。随着培养时间的增长,转基因大豆及其亲本和当地主栽品种的土壤微生物群落 AWCD 值均呈增长趋势,说明随着培养时间的增长,土壤微生物群落碳源利用量逐渐增加。从接种到培养 24 h,各处理样品平均吸光值无明显变化,微生物几乎没有代谢碳源。在 24~48 h 之间,两种转基因大豆的 AWCD 值

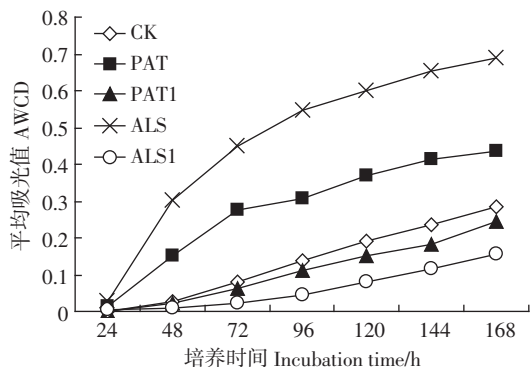


图 1 土壤微生物群落 AWCD 值随时间的动态变化

Figure 1 AWCD dynamics with incubation time

增长较快,这说明根际土壤微生物利用碳源速率增加。而两种非转基因亲本及当地品种的 AWCD 值增长缓慢,说明根际土壤微生物活性较低。培养 48 h 后,不同土壤中的微生物利用碳源的情况均明显增加,但增长趋势有所不同。两种转基因大豆呈先逐渐增加后趋于平稳的趋势,随着培养时间的增长,转基因大豆能够利用单一碳源底物的微生物数量逐渐增加,导致单一碳源底物的消耗量增加。两种非转基因亲本及当地对照呈持续增长趋势,但增长幅度较小,其根际土壤微生物利用单一碳源底物的微生物数量增加缓慢。各处理的土壤平均吸光值在任意时间点均表现出转基因品种 ALS、PAT 土壤微生物活性最高,当地主栽品种 CK 次之,非转基因亲本 PAT1、ALS1 最小。

2.2 土壤微生物群落代谢功能多样性分析

微生物多样性指数表示在颜色变化率一致的情况下,整个生态系统土壤微生物群落利用碳源类型的多与少,即功能多样性。土壤微生物的代谢功能多样性是通过土壤微生物群落物种香农-维纳 (Shannon-Wiener) 指数 (H)、物种均一度 (Species Evenness) (J) 和优势度指数 (D) 分别来表征的。本研究采用培养

96 h 的数据计算土壤微生物多样性指数,由表 2 可见,不同的转基因品种与其相对应的亲本相比根际土壤微生物群落的物种均一度 (J) 和优势度指数 (D) 均无显著差异 ($P>0.05$),转基因品种 ALS 根际土壤微生物群落香农-维纳指数 (H) 显著高于其亲本 ALS1 ($P<0.05$),而转基因品种 PAT 根际土壤微生物群落香农-维纳指数 (H) 与亲本相比差异不显著 ($P>0.05$)。两种非转基因亲本与中黄 13 相比,根际土壤微生物群落香农-维纳指数 (H)、物种均一度 (J) 和优势度指数 (D) 均无显著差异,但两种转基因品种根际土壤微生物群落香农-维纳指数 (H) 显著高于当地品种中黄 13 ($P<0.05$)。

2.3 主成分分析

2.3.1 主成分分析

利用培养 96 h 后测定的 AWCD 值数据,采用 SPSS 16.0 软件对数据进行主成分分析。共提取得到 8 个主成分,累计贡献率达 93.30%。其中第一主成分 (PC1) 贡献率是 37.28%,权重最大;第二主成分 (PC2) 贡献率是 17.19%;第 3 至 8 主成分贡献率分别是 10.56%、8.34%、7.03%、5.95%、3.65% 和 3.30%,因其贡献率较小,所以本文只解释第一主成分和第二主成分。由图 2 可见,不同处理在 PC 轴上表现出明显的分布差异:在 PC1 轴上,转基因大豆 ALS 分布在正方向上,其余品种均分布在负向上;在 PC2 轴上,几乎所有的点均分布在负向上。不同转基因大豆及其相应的亲本以及当地对照品种根际土壤微生物群落的碳源利用模式分为两类,转基因大豆 ALS 为一类,其余为一类。分析表明转基因品种 PAT、对应亲本 PAT1、非转基因亲本 ALS1 以及当地主栽品种中黄 13 土壤微生物群落碳源利用类型相似,仅转

表 2 土壤微生物群落多样性指数

Table 2 Diversity indices for soil microbial communities

品种	香农-维纳指数 (H)	物种均一度 (J)	优势度指数 (D)
中黄 13	2.21±0.24c	0.64±0.07a	0.85±0.04ab
PAT	2.49±0.16ab	0.65±0.04a	0.86±0.05ab
PAT1	2.30±0.17bc	0.71±0.05a	0.87±0.02b
ALS	2.85±0.04a	0.69±0.01a	0.84±0.01ab
ALS1	1.93±0.29c	0.78±0.12a	0.76±0.09b

注:表中数据为平均数±标准误差, $n=3$;表中不同字母表示 5% 差异显著水平。

Note: Different letters in the same column indicate significant differences at $P<0.05$.

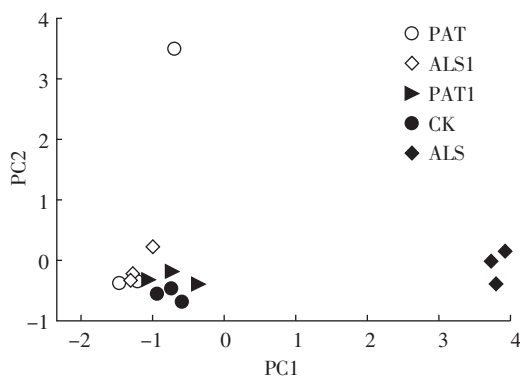


图 2 不同处理土壤微生物碳源利用主成分分析

Figure 2 Principal component analysis for carbon utilization of soil microbial communities in different treatments

基因大豆 ALS 根际土壤微生物碳源利用类型出现差异。

2.3.2 不同碳源在主成分上的载荷值

初始载荷值能反映主成分与碳源利用的相关系数,载荷值越高,表示该种碳源对主成分的影响越大。Biolog-Eco 板上 31 种碳源在前 2 个主成分上的载荷值见表 3,将 Biolog-Eco 板的 31 种碳源底物分为 6 大类^[12]:糖类(7 种)、氨基酸类(6 种)、羧酸类(9 种)、聚合物(4 种)、胺类(2 种)、代谢中产物和次生代谢物(3 种)。由表 3 可见,第一主成分(PC1)具有较高相关性的碳源有 15 种,其中糖类 5 种、氨基酸

类 2 种、羧酸类 3 种、聚合物 2 种、其他 3 种,表明影响第一主成分的碳源主要有糖类、氨基酸类、羧酸类和聚合物。而与第二主成分(PC2)具有较高相关性的碳源有 6 种,其中氨基酸 3 种、羧酸类 2 种、聚合物 1 种,表明影响第二主成分的碳源主要有氨基酸和羧酸类。

2.4 土壤理化因子的相关分析

对不同处理间各理化因子进行相关分析的结果发现(表 4):硝态氮($\text{NO}_3\text{-N}$)与全氮(TN),全磷(TP)与速效磷(AP),全氮(TN)、硝态氮($\text{NO}_3\text{-N}$)、速效磷(AP)与铵态氮($\text{NH}_4\text{-N}$)的含量均极显著相关;pH 和

表 3 31 种碳源的主成分载荷因子

Table 3 Loading factors of principle components of 31 sole-carbon sources

序号	碳源类型	PC1	PC2
A2	β -甲基-D-葡萄糖苷(糖类) β -Methyl-D-Glucoside	0.95	-0.06
A3	D-半乳糖酸 γ -内酯(羧酸类)D-Galactonic Acid γ -Lactone	0.69	-0.38
A4	L-精氨酸(氨基酸类)L-Arginine	0.37	-0.01
B1	丙酮酸甲酯(其他)Pyruvic Acid Methyl Ester	0.60	-0.51
B2	D-木糖(糖类)D-Xylose	0.91	-0.29
B3	D-半乳糖醛酸(羧酸类)D-Galacturonic Acid	0.77	0.17
B4	L-天门冬酰胺(氨基酸类)L-Asparagine	0.63	0.09
C1	吐温 40(聚合物)Tween 40	0.76	0.40
C2	i-赤藓糖醇(糖类)i-Erythritol	0.08	-0.03
C3	2-羟基苯甲酸(羧酸类)2-Hydroxy Benzoic Acid	-0.18	0.12
C4	L-苯丙氨酸(氨基酸类)L-Phenylalanine	0.26	0.69
D1	吐温 80(聚合物)Tween 80	0.49	-0.42
D2	D-甘露醇(糖类)D-Mannitol	0.91	0.21
D3	4-羟基苯甲酸(羧酸类)4-Hydroxy Benzoic Acid	0.53	0.24
D4	L-丝氨酸(氨基酸类)L-Serine	0.83	-0.23
E1	α -环式糊精(聚合物) α -Cyclodextrin	0.89	0.30
E2	N-乙酰-D-葡萄糖氨(糖类)N-Acetyl-D-Glucosamine	0.74	0.26
E3	γ -羟丁酸(羧酸类) γ -Hydroxybutyric Acid	0.27	0.92
E4	L-苏氨酸(氨基酸类)L-Threonine	0.12	0.95
F1	肝糖(聚合物)Glycogen	-0.08	0.67
F2	D-葡萄糖胺酸(羧酸类)D-Glucosaminic Acid	0.90	0.25
F3	衣康酸(羧酸类)Itaconic Acid	-0.07	-0.10
F4	甘氨酸-L-谷氨酸(氨基酸类)Glycyl-L-Glutamic Acid	0.50	0.79
G1	D-纤维二糖(糖类)D-Cellobiose	0.88	-0.29
G2	1-磷酸葡萄糖(其他)Glucose-1-Phosphate	0.83	-0.27
G3	α -丁酮酸(羧酸类) α -Ketobutyric Acid	0.10	0.69
G4	苯乙胺(胺类)Phenylethylamine	0.44	-0.25
H1	α -D-乳糖(糖类) α -D-Lactose	-0.33	-0.05
H2	D,L- α -磷酸甘油(其他)D,L- α -Glycerol Phosphate	0.88	-0.33
H3	D-苹果酸(羧酸类)D-Malic Acid	-0.08	-0.11
H4	腐胺(胺类)Putrescine	0.29	-0.20

表 4 土壤理化因子之间的相关系数

Table 4 Correlation coefficients(r -values) for relationships between soil physico-chemical factors

土壤理化因子	全氮(TN)	硝态氮(NO ₃ -N)	铵态氮(NH ₄ -N)	全磷(TP)	速效磷(AP)
全氮(TN)	1.000	0.702**	-0.873**	0.244	0.636*
硝态氮(NO ₃ -N)		1.000	-0.753**	0.378	0.423
铵态氮(NH ₄ -N)			1.000	-0.346	-0.689**
全磷(TP)				1.000	0.685**
速效磷(AP)					1.000

注:两尾检验,**表示 $P<0.01$,*表示 $P<0.05$ 。

Note: 2-tailed test, **: Correlation is significant at the 0.01 level; *: Correlation is significant at the 0.05 level.

有机质与其他理化性质没有显著相关关系。

3 讨论

土壤微生物是土壤生态系统变化的敏感指标之一,其活性和群落结构的变化能敏感地反映出土壤生态系统的质量和健康状况^[14-16]。研究表明,土壤微生物参与了土壤的氧化、硝化、氨化、固氮、硫化等过程,促进土壤有机质的分解和养分的转化^[17]。微生物在土壤中的分布和活动是土壤环境与微生物群落相互影响与适应的综合作用结果^[18],植物对土壤环境的重要影响之一是改变土壤微生物群落特征。研究证实不同作物对土壤微生物群落的影响不同^[19],其根系分泌物在塑造土壤微生物群落中起着重要的作用,不同作物根系分泌物的成分和含量不同,从而改变了土壤微生物群落的生长代谢^[20]。转基因作物通过残枝落叶和根系分泌物等影响土壤微生物种类及数量的变化^[21-22]。

Biolog 碳源利用法是一种较为先进的研究不同环境下的土壤微生物群落结构和多样性的方法,其在微生物生态研究及环境检测方面应用十分广泛。王建武和冯远娇^[23]采用 Biolog 分析方法研究转 Bt 基因玉米秸秆的添加对土壤微生物群落多样性的影响,发现 AWCD 值在添加 Bt 玉米和非 Bt 玉米的土壤中无显著差异,仅碳源利用方式的主成分分析显示存在显著差异。一些转基因作物的种植未对根际土壤微生物群落结构产生影响,决定其微生物群落功能多样性的主要因素是生长周期、耕作方式以及环境气候因素等^[24]。本文比较研究了不同转基因大豆及其相应的亲本和当地主栽品种根际土壤微生物群落代谢功能多样性的变化,结果表明,不同转基因大豆根际土壤微生物群落代谢活性有所不同。转基因大豆的土壤微生物活性在整个培养过程中均高于相应亲本,其中转基因大豆 ALS 达到显著差异水平($P<0.05$),当地品种中黄 13 根际土壤微生物活性居中,两种非转基因亲本

均低于当地品种,但未达到显著水平($P>0.05$)。分析认为,转基因大豆的种植可能造成土壤理化性质的改变从而导致土壤微生物活性改变。已有研究表明,不同磷浓度条件下大豆根系分泌物种类及根系脱落物成分有所差异,是造成微生物群落功能变化的原因^[25],并且不同的转基因作物根系分泌物成分不同,可能对根际微生物产生不同的影响。Kremer 和 Means^[26]研究了抗草甘膦转基因大豆与传统大豆根系分泌物成分的区别,表明前者根系分泌物中有更高量的氨基酸和碳水化合物,进而对根际微生物有一定影响。本研究结果说明,转基因大豆 ALS 提高了土壤微生物的活性,很可能是受到其根系分泌物的影响,但转基因大豆 PAT 未对土壤微生物活性造成显著影响,李长林等^[27]研究了转基因棉花对根际土壤微生物区系组成多样性的影响,结果表明相同生育期的棉花根际土壤微生物区系相似性远高于不同时期转基因棉花根际微生物间的相似性,转基因棉花对根际土壤微生物的影响不明显,说明棉花根际土壤微生物区系差异主要受生育期影响。这表明转基因作物对土壤微生物群落的影响比较复杂,不同类型转基因作物或转基因作物生长的不同时期均可对土壤微生物造成不同的影响。

本研究比较分析了不同转基因大豆、对应亲本和当地主栽品种根际土壤微生物的物种香农-维纳指数(H)、物种均一度(J)和优势度指数(D)的差异。结果表明,转基因大豆 ALS 的种植提高了根际土壤微生物的物种香农-维纳指数(H)。但并未对土壤微生物群落的物种均一度(J)和其常见物种的优势度产生显著影响。转基因品种 PAT 的种植对根际土壤微生物主要功能类群的物种香农-维纳指数(H)、物种均一度(J)和优势度指数(D)均没有产生显著影响。乌兰图雅等^[28]以转双价(Bt+CpTI)基因抗虫棉 SGK321 及其非转基因亲本棉石远 321 为对象,研究了不同生长时期其根际土壤微生物群落功能多样性的变化,结果表明,棉

花播种后 30 d 转双价棉根际土壤微生物群落丰富度指数(H)和优势度指数(D)显著高于亲本常规棉($P < 0.05$), 播种后 90 d 转双价基因抗虫棉根际土壤微生物群落丰富度指数和优势度指数则显著低于亲本常规棉($P < 0.05$), 而 60、120 d 无显著差异, 两种棉花根际土壤微生物群落丰富度和优势度随棉花生长时期的不同而异。然而, 阮妙鸿等^[29]在研究转 ScMV-CP 基因甘蔗对根际土壤酶活性及微生物的影响发现, 转基因甘蔗和非转基因甘蔗根际细菌的 Simpson 指数(D)、Shannon-Wiener 指数(H)、均匀度(E)、McIntosh 指数(DMc)差异不明显, 说明转基因甘蔗对土壤细菌多样性无显著影响。转基因作物的种植对土壤细菌多样性的影响在研究过程中存在差异, 因此仍需进一步研究。

Biolog 数据的因子载荷通常反映微生物群落的生理轮廓, 是其群落结构和功能多样性的具体表现^[30], 同时结合主成分分析可以解释不同处理土壤微生物碳源利用模式的不同。研究发现转基因大豆 PAT 及其亲本 PAT1、非转基因亲本 ALS1 和当地品种中黄 13, 均具有非常相似的碳源利用模式, 主要集中在 PC1 和 PC2 的负轴上。而 ALS 在 PC1 轴上出现了明显的分异, 在碳源的利用上发生了明显的改变。可能是由于转基因大豆 ALS 的种植对土壤环境的改变迫使其根际微生物在碳源的利用上发生了改变, 转基因大豆 ALS 的种植增加了微生物群落的不稳定性。PAT 的一个点出现在 PC2 的正轴上属于异常值。

转基因大豆 ALS 与其相对应的亲本 ALS1 相比土壤微生物群落 AWCD 值、丰富度显著增加($P < 0.05$), 碳源利用模式出现显著差异; 转基因品种 PAT 与其相对应的亲本 PAT1 相比土壤微生物群落 AWCD 值、物种丰富度指数(H)、均匀度指数(E)和优势度指数(D)差异不显著, 碳源利用类型相似。以上结果表明, 土壤微生物功能多样性改变受到多种因素的影响。桂恒等^[31]研究认为产生这种影响的原因可能与外源基因插入有关, 指出不同品系的转基因大豆的土壤微生物群落与受体非转基因大豆相比有较大的差异; 也有人认为与外源基因插入无关, 如 Kremer 等^[26]在研究中发现造成土壤微生物活性改变的主要因素并非外源基因的插入, 而是不同生育期等因素的影响。在大田条件下, 种植转基因抗虫玉米和抗虫棉花对土壤各种微生物数量都无显著影响, 但是在不同生长时期却有显著变化。另一方面, Ariosa 和 Kennedy 研究指出不仅不同的根系分泌物会影响根际微生

物群落结构的变化, 土壤养分含量的改变也会使土壤微生物群落结构发生改变^[32-33]。通过土壤理化性质的研究发现, 不同的转基因品种之间, TP 、 NH_4-N 和 NO_3-N 差异显著。且在土壤理化相关分析中发现 NH_4-N 的含量与 TN 、 NO_3-N 、 AP 均极显著相关。侯晓杰等^[34]在研究中指出, 速效氮含量和土壤碳氮比对土壤微生物群落功能多样性有决定性影响。除此之外, 还有许多研究表明转基因作物的种植对土壤微生物群落没有显著影响。叶飞等^[35]在研究中指出, 在苗期、蕾期、吐絮期和衰老期转基因棉花与非转基因亲本棉花根际土壤微生物群落功能多样性差异不显著。分析认为转基因棉花的种植达不到影响微生物群落功能的程度, 也有可能是由于生育期等因素对土壤微生物群落功能的影响远大于性状改变造成的影响。Saxena 等^[36]也指出转基因作物在种植过程中对主要的微生物群落不会产生明显的影响, 转 Bt 基因玉米根际和残茬分解土壤与对照相比土壤可培养的细菌、放线菌和真菌数量均无显著差异。转基因作物对土壤微生物群落的影响尚无明确定论, 仍需要进行长期深入的研究。

4 结论

本试验通过大田试验结合 Biolog 技术比较分析了种植转基因大豆 PAT 及其亲本 PAT1、ALS 及其亲本 ALS1 和当地主栽大豆中黄 13 对根际土壤微生物功能多样性的影响。

(1) 单孔颜色变化率(AWCD)的变化趋势为: 两种转基因大豆根际土壤微生物活性在整个培养过程中均高于相应亲本。

(2) 不同的转基因大豆与其相对应的亲本相比根际土壤微生物群落的物种均一度(J)和优势度指数(D)均无显著差异($P > 0.05$)。仅转基因品种 ALS 根际土壤微生物群落香农-维纳指数(H)显著高于其亲本 ALS1($P < 0.05$)。

(3) 转基因大豆品种 PAT 及其亲本 PAT1、非转基因亲本 ALS1 以及当地主栽大豆品种中黄 13 土壤微生物群落碳源利用类型相似, 仅转基因大豆 ALS 根际土壤微生物碳源利用类型出现差异。

(4) 土壤微生物主要利用的碳源为糖类、氨基酸类、羧酸类和聚合物。

结果表明: 转基因大豆 PAT 与其亲本 PAT1 相比根际土壤微生物群落的功能多样性没有显著差异, 而转基因大豆 ALS 与其亲本 ALS1 相比土壤微生物群

落活性和丰富度发生改变,但其均匀度和优势度差异不显著。

参考文献:

- [1] James C. Global status of commercialized Biotech/GM crops [R]. 2011, ISAAA Brief No. 42, ISAAA: Ithaca, NY, 2011.
- [2] 李孝刚, 刘 标, 韩正敏, 等. 转基因植物对土壤生态系统的影响[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(5): 1957-1960.
LI Xiao-gang, LIU Biao, HAN Zheng-min, et al. Impact of transgenic plants on soil ecosystems[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2008, 36(5): 1957-1960.
- [3] 李玉新, 赵 忠, 陈金泉, 等. 沙棘林土壤微生物多样性研究[J]. 西北农林科技大学学报, 2010, 38(8): 71-74.
LI Yu-xin, ZHAO Zhong, CHEN Jin-quan, et al. Study on soil microbial diversity of seabuckthorn forest [J]. *Journal of Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry*, 2010, 38(8): 71-74.
- [4] Bruinsma M, Kowalchuk G A, VAN Veen J A. Effects of genetically modified plants on microbial communities and processes in soil[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2003, 37(6): 329-337.
- [5] 陶 波, 蒋凌雪, 沈晓峰, 等. 抗草甘膦转基因大豆对根际和非根际土壤可培养菌的影响[J]. 东北农业大学学报, 2011, 42(1): 10-16.
TAO Bo, JIANG Ling-xue, SHEN Xiao-feng, et al. Effect of genetic modified glyphosate resistant soybean on soil culturable microorganisms in rhizosphere and non-rhizosphere[J]. *Journal of Northeast Agricultural University*, 2011, 42(1): 10-16.
- [6] Motavalli P P, Kremer R J, Fang M, et al. Impact of genetically modified crops and their management on soil microbially mediated plant nutrient transformations[J]. *Journal of Environmental Quality*, 2004, 33: 816-824.
- [7] 李瑞峰, 王 莹, 胡宝忠, 等. 转基因作物及其生物安全性[J]. 东北农业大学学报, 2007, 38(3): 405-410.
LI Rui-feng, WANG Ying, HU Bao-zhong, et al. Genetically modified crops and its biosafety[J]. *Journal of Northeast Agricultural University*, 2007, 38(3): 405-410.
- [8] Garland J L, Lehman R M. Dilution/extinction of community phenotypic characters to estimate relative structural diversity in mixed communities [J]. *Fems Microbiology Ecology*, 1999, 30: 333-343.
- [9] 鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 第3版. 北京: 中国农业出版社, 2008: 39-89.
BAO Shi-dan. Soil and agriculture chemistry analysis[M]. 3rd ed. Beijing: China Agriculture Press, 2008: 39-89.
- [10] Grove J A, Kautola H, Javadpour S, et al. Assessment of changes in the microorganism community in a biofilter[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2004, 18(2): 111-114.
- [11] Garland J L, Mills A L. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole carbon source utilization[J]. *Applied Environmental Microbiology*, 1991, 57(8): 2351-2359.
- [12] Schutter M E, Dick R P. Shifts in substrate utilization potential and structure of soil microbial communities in response to carbon substrates [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2001, 33(1): 1481-1491.
- [13] 时 鹏, 高 强, 王淑平, 等. 玉米连作及其施肥对土壤生物群落功能多样性的影响[J]. 生态学报, 2010, 30(22): 6173-6182.
SHI Peng, GAO Qiang, WANG Shu-ping, et al. Effects of continuous cropping of corn and fertilization on soil microbial community functional diversity[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2010, 30(22): 6173-6182.
- [14] Knight B P, McGrath S P, Chaudri A M. Biomass carbon measurements and substrate utilization patterns of microbial populations from soil amended with cadmium, copper, or zinc[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63: 39-43.
- [15] Zelles L. Fatty acid patterns of phospholipids and lipopolysaccharides in the characterization of microbial communities in soil: A review[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 1999, 29: 111-129.
- [16] 黎 宁, 李华兴, 朱凤娇, 等. 菜园土壤微生物生态特征与土壤理化性质的关系[J]. 应用生态学报, 2006, 17(2): 285-290.
LI Ning, LI Hua-xing, ZHU Feng-jiao, et al. Relationships between soil microbial ecological characteristics and physical-chemical properties of vegetable garden soil[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2006, 17(2): 285-290.
- [17] Coleman D C, Crossley D A, Hendrix P F. Fundamentals of soil ecology [M]. London: Academic Press, 1996: 48-77.
- [18] Zelles, Bai Q Y. Signature fatty acids in phospholipids and lipopolysaccharides as indicators of microbial biomass and community structure in agricultural soils[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 1992, 24(4): 317-323.
- [19] Bronwyn D H, Raymond L C. Using the Gini coefficient with Biolog substrate utilization data to provide an alternative quantitative measure for comparing bacterial soil communities[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 1997, 30: 91-101.
- [20] Nayyar A, Hamel C, Lafond G, et al. Soil microbial quality associated with yield reduction in continuous-pea[J]. *Applied Soil Ecology*, 2009, 43(1): 115-121.
- [21] 陈振华, 陈利军, 武志杰. 转基因作物对土壤生物学特性的影响[J]. 土壤通报, 2008, 39(4): 971-976.
CHEN Zhen-hua, CHEN Li-jun, WU Zhi-jie. Effect of transgenic crops on soil biological characteristics[J]. *Chinese Journal of Soil Science*, 2008, 39(4): 971-976.
- [22] 娜布其, 红 雨, 杨殿林, 等. 利用根箱法解析转双价(Bt + CpTI)基因棉花对土壤微生物数量及细菌多样性的影响[J]. 棉花学报, 2011, 23(2): 160-166.
NA Bu-qi, HONG Yu, YANG Dian-lin, et al. Effects of transgenic Bt + cpTI cotton on the soil microbial amount and bacterial diversity by rhizobox method[J]. *Cotton Science*, 2011, 23(2): 160-166.
- [23] 王建树, 冯远娇. 种植 Bt 玉米对土壤微生物活性和肥力的影响[J]. 生态学报, 2005, 25(5): 1214-1219.
WANG Jian-wu, FENG Yuan-jiao. Effects of planting Bt corn on soil microbial activity and soil fertility[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2005, 25(5): 1214-1219.
- [24] Liu F H, Wang S B, Zhang J S, et al. The structure of the bacterial and archaeal community in a biogas digester as revealed by denaturing gradient gel electrophoresis and 16S rDNA sequencing analysis[J]. *Journal*

- of *Applied Microbiology*, 2009, 106:952-966.
- [25] 刘俊杰. 磷浓度对大豆根际微生物群落结构及功能的影响[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2009.
- LIU Jun-jie. Effects of different phosphorous concentration on microbial community structure and function in soybean rhizosphere [D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2009.
- [26] Kremer R J, Means N E. Glyphosate affects soybean root exudation and rhizosphere microorganisms[J]. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 2005, 85:1165-1174.
- [27] 李长林, 张欣, 吴建波, 等. 转基因棉花对根际土壤微生物多样性的影响[J]. 农业环境科学学报, 2008, 27(5):1857-1859.
- LI Chang-lin, ZHANG Xin, WU Jian-bo, et al. Effect of transgenic cotton on microbial community diversity in rhizosphere soil[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2008, 27(5):1857-1859.
- [28] 乌兰图雅, 赵建宁, 李刚, 等. 转双价基因抗虫棉对土壤微生物群落多样性的影响[J]. 生态学杂志, 2012, 31(10):2486-2492.
- WULAN Tu-ya, ZHAO Jian-ning, LI Gang, et al. Effect of transgenic Bt+CpTI insect-resistant cotton on the microbial functional diversity in the rhizosphere soil[J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2012, 31(10):2486-2492.
- [29] 阮妙鸿, 许燕, 郑瑶, 等. 转ScMV-CP基因甘蔗对根际土壤酶活性及微生物的影响[J]. 中国农学通报, 2007, 23(4):381-386.
- RUAN Miao-hong, XU Yan, ZHENG Yao, et al. Effects on enzyme activities and microbe in rhizosphere soil of ScMV-CP transgenic sugarcane[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2007, 23(4):381-386.
- [30] 龙健, 黄昌勇, 滕应, 等. 铜矿尾矿库土壤-海洲香薷(*Elsholtzia harchowensis*)植物体系的微生物特征研究[J]. 土壤学报, 2004, 41(1):120-125.
- LONG Jian, HUANG Chang-yong, TENG Ying, et al. Research on soil microbial characteristics of soil *Elsholtzia Harchowensis* system in copper mine tailings[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2004, 41(1):120-125.
- [31] 桂恒, 张培培, 华小梅, 等. 富含硫氨基酸转基因大豆对根际土壤微生物群落结构的影响[J]. 中国油料作物学报, 2012, 34(2):181-187.
- GUI Heng, ZHANG Pei-pei, HUA Xiao-mei, et al. Effect of transgenic soybean with sulfur-rich amino acids on soil microbial population structure [J]. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences*, 2012, 34(2):181-187.
- [32] Ariosa Y, Carrasco D, Legane's F, et al. Development of cyanobacterial blooms in Valencian rice fields[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2005, 41:129-133.
- [33] Kennedy I R, Choudhury A T M A, Kecske's M L. Non symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: Can their potential for plant growth promotion be better exploited[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2004, 36:1229-1244.
- [34] 侯晓杰, 汪景宽, 李世朋. 不同施肥处理与地膜覆盖对土壤微生物群落功能多样性的影响[J]. 生态学报, 2007, 27(2):655-661.
- HOU Xiao-jie, WANG Jing-kuan, LI Shi-peng. Effects of different fertilization and plastic mulching on functional diversity of soil microbial community[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2007, 27(2):655-661.
- [35] 叶飞, 宋存江, 陶剑, 等. 转基因棉花种植对根际土壤微生物群落功能多样性的影响[J]. 应用生态学报, 2010, 21(2):386-390.
- YE Fei, SONG Cun-jiang, TAO Jian, et al. Effects of planting transgenic cotton on functional diversity of rhizosphere soil microbial community[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2010, 21(2):386-390.
- [36] Saxena D, Florest S, Stotzky G. Bt toxin is released in root exudates from 12 transgenic corn hybrids representing three transformation events[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2002, 34:133-137.