

梁晋刚, 张正光. 转基因高蛋氨酸大豆对根际真菌群落碳代谢功能的影响[J]. 江苏农业学报, 2017, 33(5): 993-997.
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2017.05.006

转基因高蛋氨酸大豆对根际真菌群落碳代谢功能的影响

梁晋刚^{1,2} 张正光²

(1.农业部科技发展中心, 北京 100122; 2.南京农业大学植物保护学院, 江苏 南京 210095)

摘要: 尽管转基因作物在农业上的推广为人们提供了许多好处, 但其对生态环境的影响也越来越引起人们的广泛关注。本研究采用 Biolog FF 微平板法, 调查了转基因高蛋氨酸大豆 ZD91 对根际真菌群落碳代谢功能的影响。结果表明, 转基因大豆 ZD91 与其受体大豆 ZD 的根际真菌群落功能没有显著差异。本研究为转基因作物的环境安全性评价提供了基础。

关键词: 转基因高蛋氨酸大豆 ZD91; 根际真菌群落; 功能多样性

中图分类号: S565.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2017)05-0993-05

Effect of a high-methionine transgenic soybean line on functional diversity of rhizosphere fungal communities

LIANG Jin-gang^{1,2}, ZHANG Zheng-guang²

(1. Development Center of Science and Technology, Ministry of Agriculture, Beijing 100122, China; 2. College of Plant Protection, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: The use of transgenic plants in agriculture provides many economic benefits, but it also raises people's attention to the potential impact of transgenic plants on the environment. The Biolog FF system was used to evaluate the potential negative impact of a high-methionine soybean ZD91 on the rhizosphere fungal communities. The results showed that transgenic soybean ZD91 had no apparent impact on functional diversity of rhizosphere fungal communities. This study provides a basis for assessing the biosafety of transgenic plants.

Key words: a high-methionine transgenic soybean ZD91; rhizosphere fungal communities; functional diversity

全球转基因作物种植面积从 1996 年的 $1.700 \times 10^6 \text{ hm}^2$ 增加到了 2015 年的 $1.797 \times 10^8 \text{ hm}^2$ ^[1], 利用转基因技术可改良作物的农艺性状, 如抗虫、抗病、抗逆境及抗除草剂等, 还可以改善农作物品质, 如提

高大豆蛋氨酸含量和改善营养结构等^[2-7]。然而, 转基因作物种植之后可能会对土壤生态系统产生不利影响^[8-9]。随着转基因作物新品种的不断涌现, 评价转基因作物对土壤生态系统的生物安全性变得十分必要^[10]。

转基因作物可以通过直接或者间接的方式对土壤中的非靶标微生物产生影响^[11]。土壤生物化学和微生物特性的检测结果可作为评估生态扰动的早期指标, 也是用于评价转基因作物潜在环境风险的必要数据^[12]。根系周围的微生物群落对维持作物健康和生态系统功能稳定是非常重要的。作者前期

收稿日期: 2017-04-04

基金项目: 转基因生物新品种培育科技重大专项 (2016ZX08011-003)

作者简介: 梁晋刚 (1987-), 男, 山西阳泉人, 博士, 农艺师, 主要从事转基因生物安全评价与检测研究。(E-mail) 382408162@qq.com

通讯作者: 张正光, (E-mail) zhgzhang@njau.edu.cn

研究发现,转基因大豆 ZD91 对根际土壤中的细菌和丛枝菌根真菌群落结构没有显著影响^[13-14]。

为评价转基因作物对土壤微生物的影响,科学家探索了很多方法^[15]。Biolog 微平板法^[16-17]通过对微生物群落代谢活性的检测,反映出微生物群落的变化,代谢多样性的变化与所培养的微生物的群落组成和生理活性相关,该方法已广泛应用到转基因作物对土壤微生物影响的研究中。作者利用 Biolog ECO 微平板研究发现,转基因大豆 ZD91 对根际微生物碳代谢功能无显著影响^[16]。本研究拟进一步评价转基因大豆 ZD91 在连续两年田间种植过程中,是否会对真菌群落碳代谢功能产生影响。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本研究以转胱硫醚-γ-合成酶基因高蛋氨酸大豆 ZD91 及其受体自贡冬豆 ZD 为研究对象^[7],种植于四川省南充市农业科学院试验基地(30°48'N, 106°04'E),于 2012-2013 年采集根际土样。大豆种子由中国农业科学院作物科学研究所提供。采用随机区组设计,每个品种设置 4 个重复。在大豆生长苗期(Seedling stage, SS)、花期(Flowering stage, FS)、鼓粒期(Pod-setting stage, PS)和成熟期(Maturity-setting stage, MS)采用五点取样法进行取样,并用抖落法采集根际土壤^[14]。

1.2 试验方法

取 5 g 新鲜土样至装有 45 ml 无菌生理盐水的三角瓶(含玻璃珠)中,于旋转振荡器上 180 r/min 振荡 30 min,之后静置一段时间,得 1:10 提取液。待瓶中液体澄清后,取上清液 5 ml 加入灭过菌的 100 ml 三角瓶中,再加入 45 ml 无菌生理盐水,混合均匀,得 1:100 提取液。重复上一步骤,得 1:1 000 的提取液。将 Biolog FF 微平板从冰箱中取出,用 200 ml 多通道移液器移取土壤微生物提取液于 Biolog FF 微平板中。将加好样的 Biolog FF 微平板于 25℃ 黑暗条件下温育 168 h,每隔 24 h 使用酶标仪在 590 nm 和 750 nm 处读数,记录各个微孔的吸光度变化,计算单孔平均颜色变化率。

1.3 数据分析

参照 Lassen 等^[18-19]的研究方法计算 Biolog FF 微平板真菌的单孔颜色平均变化率(Average Well

Color Development, $AWCD$),即 $AWCD_{590-750} = \Sigma(C_{590-750})/95$ 。其中,数值小于 0.06 时按 0 处理,分母表示 Biolog FF 微平板上供试碳源的种类数。

参照 Garland 和 Mills^[20]的方法对土壤微生物群落功能多样性进行分析。其中,丰富度指数为底物碳源利用数 S ; Shannon 多样性指数 H , $H = -\Sigma(P_i \times \ln P_i)$, P_i 为单孔相对光密度值,即 $P_i = C_{590-750} / \Sigma(C_{590-750})$; Pielou 均匀度指数 E , $E = H / \ln S$ 。

所有数据通过 SPSS 17.0 软件进行统计分析,多处理间差异采用单因素方差分析(ANOVA)比较,并对多样性指数在不同年份、不同生育时期及不同栽培品种间进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 根际真菌群落碳代谢活性

平均颜色变化率($AWCD$)是根际真菌群落碳代谢整体活性的有效指标,反映了真菌群落利用单一碳源的能力^[21]。在对 Biolog FF 微平板培养过程中,每隔 24 h 使用酶标仪记录一次数据。从图 1 中可以发现,随着培养时间的延长,转基因高蛋氨酸大豆 ZD91 及其受体大豆 ZD 根际土壤中真菌群落对碳源的利用活性均在逐渐增加,说明真菌群落在持续不断的利用碳源。从接种到 24 h, $AWCD$ 值无明显变化,说明在 0~24 h 碳源基本未被利用。在 24~72 h 转基因大豆及其受体大豆的 $AWCD$ 值增长较快,这说明根际真菌群落利用碳源速率增加,微生物生长处于对数生长期。转基因高蛋氨酸大豆和其受体大豆相比,在根际真菌群落活性上没有显著性差异。

72 h 后转基因大豆及其受体大豆 $AWCD$ 值趋于平缓,表明真菌生长减缓进入稳定期。由此确定培养时间 72 h 是所研究根际真菌生长对数期和稳定期的临界值^[21-22],采用此时的光密度值进行功能多样性指标的计算。

2.2 根际真菌群落功能多样性指数

多样性指数表征根际真菌群落的功能多样性,不同的多样性指数反映根际真菌群落多样性的不同方面。对培养 72 h 时的光密度值进行丰富度、多样性和均匀度指数计算,统计结果见表 1。通过比较发现,转基因大豆及其受体大豆在丰富度指数(S)、多样性指数(H)和均匀度指数(E)上均没有显著性差异。

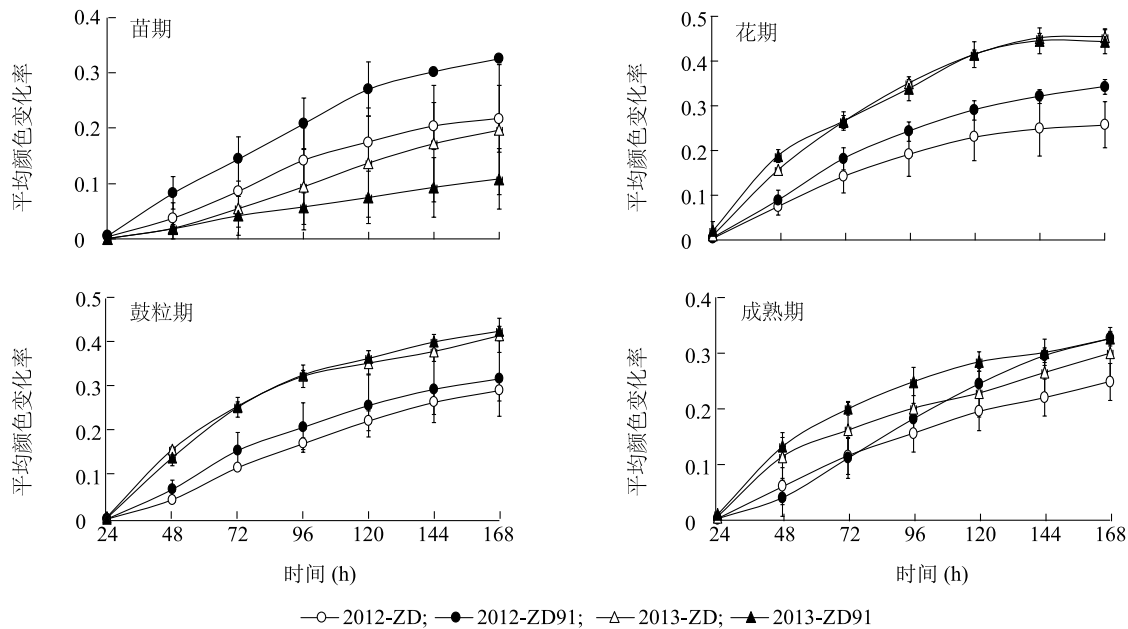


图1 Biolog FF 板底物碳源利用的平均颜色变化率曲线

Fig.1 Average well color development (590–750 nm) of substrate utilization patterns in Biolog FF microplate

表1 Biolog FF 板培育 72 h 时真菌的丰富度 (S), Shannon 多样性指数 (H) 和底物利用均匀度指数 (E) (平均值 \pm 标准差)Table 1 Substrate richness (S), Shannon's diversity index (H) and substrate evenness (E) of fungal community in the Biolog FF microplate incubated for 72 h (means \pm standard errors)

年份		苗期		花期		鼓粒期		成熟期	
		ZD	ZD91	ZD	ZD91	ZD	ZD91	ZD	ZD91
2012	丰富度	63.33 \pm 4.93	77.67 \pm 3.21	72.67 \pm 8.33	78.33 \pm 8.14	82.33 \pm 5.86	75.33 \pm 11.06	69.00 \pm 2.00	78.00 \pm 5.29
	多样性	3.49 \pm 0.44	3.73 \pm 0.12	3.79 \pm 0.35	3.90 \pm 0.06	3.71 \pm 0.08	3.73 \pm 0.08	3.55 \pm 0.49	3.48 \pm 0.22
	均匀度	0.84 \pm 0.09	0.86 \pm 0.03	0.88 \pm 0.07	0.89 \pm 0.02	0.84 \pm 0.02	0.86 \pm 0.02	0.84 \pm 0.09	0.80 \pm 0.05
2013	丰富度	42.33 \pm 5.13	41.67 \pm 1.53	85.00 \pm 6.08	74.00 \pm 8.89	80.00 \pm 3.61	86.00 \pm 4.36	74.33 \pm 5.03	81.67 \pm 1.15
	多样性	2.60 \pm 0.49	2.52 \pm 0.52	4.10 \pm 0.03	4.07 \pm 0.08	3.87 \pm 0.04	3.91 \pm 0.07	3.48 \pm 0.31	3.80 \pm 0.01
	均匀度	0.69 \pm 0.11	0.68 \pm 0.14	0.92 \pm 0.01	0.95 \pm 0.01	0.88 \pm 0.00	0.88 \pm 0.01	0.81 \pm 0.07	0.86 \pm 0.00

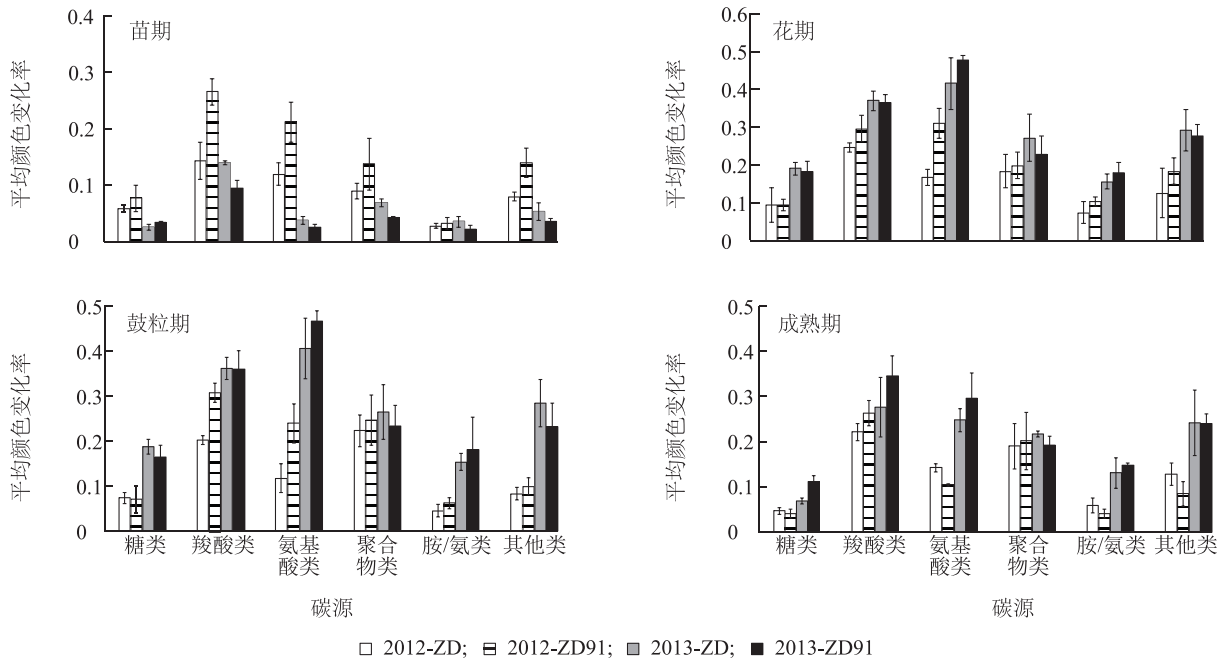
2.3 根际真菌群落对不同种类碳源的利用率

Biolog FF 微平板含有 95 种不同的碳源,其中糖类 44 种,羧酸类 17 种,氨基酸类 13 种,聚合物类 5 种,胺/氨类 6 种,其他类 10 种^[23]。研究根际真菌群落对不同种类碳源的利用率差异,能够更全面地了解真菌群落代谢功能特征以及真菌群落的结构组成^[24]。图 2 为转基因大豆 ZD91 与受体大豆 ZD 在 2012 年和 2013 年对不同种类碳源的利用率,分析发现转基因大豆与受体大豆对不同种类碳源的利用率没有显著差异。根际真菌群落对羧酸类、氨基酸类、聚合物类和其他类碳源的利用率较多,对糖类和

胺类的利用率相对较少。

3 讨论

作物与其根际微生物的关系错综复杂,转基因作物对其根际微生物可能产生的抑制作用引起了人们的广泛关注^[17,25]。生物学参数可作为衡量土壤特性改变的早期且敏感的指标^[26]。基于 Biolog FF 微平板系统的研究表明,转基因大豆 ZD91 与其相应的非转基因大豆根际真菌群落功能多样性没有显著差异。目前,该技术已被广泛应用于解析微生物农药、转基因作物等对根际土壤微生物的影响^[27-28]。



对不同种类碳源的利用率 ($P < 0.01$)。

图 2 转基因大豆 ZD91 及其受体 ZD 根际土壤中真菌群落

Fig.2 The fungal communities of transgenic soybean ZD91 and ZD in the rhizosphere soil

影响土壤微生物群落因素很多,比如,土壤的性状,作物群落组成以及农事活动等。根据之前的研究结果,自然因素对土壤微生物数量的影响要大于转基因品种的影响。例如,Velasco 等^[29]报道,在相同采样时间点,转基因玉米与非转基因玉米根际土壤微生物代谢活性没有差异,但不同采样时间点的根际微生物功能有显著差异,说明微生物功能的差异主要是由采样时间不同引起的。陈丰等^[30]在网室栽培条件下,分析富含硫氨基酸的转基因大豆对土壤生态系统的影响,结果表明转基因大豆与非转基因大豆相比,真菌代谢活性没有显著差异。在本研究中,转基因大豆 ZD91 与非转基因大豆 ZD 对底物碳源的利用没有显著差异。

总体而言,基于两年的田间试验结果,转基因大豆 ZD91 对根际真菌群落碳代谢功能没有产生影响。另外,今后需采用更细化的不依赖微生物培养的方法(如高通量测序技术)研究转基因大豆对根际真菌群落及其他微生物群落结构的潜在影响。

参考文献:

[1] JAMES C. Global status of commercialized biotech/GM crops; 2015[M]. Ithaca, NY:ISAAA Briefs, 2015.

[2] 杨悦,张兴梅,孙壮,等.转 *ICE1* 基因水稻耐冷性与膜脂过氧化和抗氧化酶活性的关系[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(8): 71-74.

[3] 孙全喜,王云云,王秀贞,等.黄曲霉漆酶基因 HIGS 载体的构建及对花生的转化[J]. 山东农业科学, 2015, 47(10): 8-12.

[4] 宋君,王东. 实时荧光定量 PCR 检测转基因玉米 MON88017[J]. 江苏农业学报, 2016, 32(5): 992-998.

[5] 崔彦芹,李尚伟,张丽萍,等. 双价抗虫转基因水稻的育成及初步鉴定[J]. 南方农业学报, 2016, 47(2): 169-173.

[6] 主楚杰,王爱云. 基因工程技术在杨树抗逆境方面的研究进展[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(2): 10-13.

[7] SONG S, HOU W, GODO I, et al. Soybean seeds expressing feedback-insensitive cystathionine γ -synthase exhibit a higher content of methionine[J]. J Exp Bot, 2013, 64(7): 1917-1926.

[8] SINGH A K, DUBEY S K. Chapter 8: Transgenic plants and soil microbes[M]. Elsevier, Amsterdam, Netherlands; Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Crop Modification, Nutrition, and Food Production, 2016: 163-185.

[9] GUAN Z J, LU S B, HUO Y L, et al. Do genetically modified plants affect adversely on soil microbial communities[J]. Agr Ecosyst Environ, 2016, 235: 289-305.

[10] LIU B, ZENG Q, YAN F, et al. Effects of transgenic plants on soil microorganisms[J]. Plant Soil, 2005, 271(1/2): 1-13.

[11] SINGH A K, DUBEY S K. Current trends in Bt crops and their fate on associated microbial community dynamics: a review[J]. Protoplasma, 2016, 253(3): 663-681.

- [12] WEI X D, ZOU H L, CHU L M, et al. Field released transgenic papaya effect on soil microbial communities and enzyme activities [J]. *J Environ Sci*, 2006, 18: 734-740.
- [13] LIANG J, MENG F, SUN S, et al. Community structure of arbuscular mycorrhizal fungi in rhizospheric soil of a transgenic high-methionine soybean and a near isogenic variety [J]. *PLoS One*, 2015, 10(12): e0145001.
- [14] LIANG J, SUN S, JI J, et al. Comparison of the rhizosphere bacterial communities of Zigongdongdou soybean and a high-methionine transgenic line of this cultivar [J]. *PLoS One*, 2014, 9(7): e103343.
- [15] GIOVANNETTI M, SBRANA C, TURRINI A. The impact of genetically modified crops on soil microbial communities [J]. *Riv Biol*, 2005, 98(3): 393-417.
- [16] LIANG J G, XIN L T, MENG F, et al. High-methionine soybean has no adverse effect on functional diversity of rhizosphere microorganisms [J]. *Plant Soil Environ*, 2016, 62(10): 441-446.
- [17] LV Y, CAI H, YU J, et al. Biosafety assessment of GFP transplastomic tobacco to rhizosphere microbial community [J]. *Eco-toxicology*, 2014, 23(4): 718-725.
- [18] LASSEN A T, BOYLE S I, HASKINS K E, et al. Community-level physiological profiles of bacteria and fungi: plate type and incubation temperature influences on contrasting soils [J]. *FEMS Microbiol Ecol*, 2003, 44(3): 319-328.
- [19] WANG G, JIN J, CHEN X, et al. Biomass and catabolic diversity of microbial communities with long-term restoration, bare fallow and cropping history in Chinese Mollisols [J]. *Plant Soil Environ*, 2007, 53(4): 177-185.
- [20] 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]. *Appl Environ Microb*, 1991, 57(8): 2351-2359.
- [21] 邵元元,王志英,邹莉,等. 百菌清对落叶松人工防护林土壤微生物群落的影响 [J]. *生态学报*, 2011, 31(3): 819-829.
- [22] 曹成有,姚金冬,韩晓姝,等. 科尔沁沙地小叶锦鸡儿固沙群落土壤微生物功能多样性 [J]. *应用生态学报*, 2011, 22(9): 2309-2315.
- [23] PRESTON-MAFHAM J, BODDY L, RANDERSON P F. Analysis of microbial community functional diversity using sole-carbon-source utilisation profiles-a critique [J]. *FEMS Microbiol Ecol*, 2002, 42(1): 1-14.
- [24] 杨莺莺,李卓佳,梁晓华,等. 芽胞杆菌对鱼池微生物群落代谢功能的影响 [J]. *微生物学杂志*, 2009, 29(3): 11-17.
- [25] SHEN R, CAI H, GONG W. Transgenic Bt cotton has no apparent effect on enzymatic activities or functional diversity of microbial communities in rhizosphere soil [J]. *Plant Soil*, 2006, 285: 149-159.
- [26] OPRICA L, OLTEANU Z, DUNCA S I, et al. The tillage effect on the soil acid and alkaline phosphatase activity [J]. *Analele Stiintifice ale Universitatii "Alexandru Ioan Cuza", Sectiunea Genetica-si Biologie Moleculara*, 2011, 12:103-110.
- [27] 查仙芳,南宁丽,张华普,等. 用 Biolog-FF 解析木霉制剂对番茄根际土壤微生物的影响 [J]. *宁夏大学学报(自然科学版)*, 2010, 31(2): 165-168.
- [28] 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.
- [29] VELASCO A G-V, KOWALCHUK G A, MAÑERO F J G, et al. Increased microbial activity and nitrogen mineralization coupled to changes in microbial community structure in the rhizosphere of Bt corn [J]. *Appl Soil Ecol*, 2013, 68(2): 46-56.
- [30] 陈丰,彭欣,华小梅,等. 富含硫氨基酸转基因大豆对根际土壤有机元素含量和微生物群落多样性的影响 [J]. *大豆科学*, 2012, 31(2): 259-265.

(责任编辑:姜华珏)