

转 *Chi+Glu* 双价基因棉对土壤微生物群落功能多样性的影响

魏 锋¹, 朱荷琴², 肖 蕊¹, 杨家荣^{1*}

(1.西北农林科技大学植保学院旱区作物逆境生物学国家重点实验室, 陕西 杨凌 712100; 2.中国农科院棉花研究所, 河南 安阳 455000)

摘 要:为研究转 *Chi+Glu* 双价基因棉对土壤微生物群落功能多样性的影响,揭示其对土壤生态系统的安全性,在大田试验条件下,利用 Biolog 代谢指纹方法分析了种植转 *Chi+Glu* 双价基因棉、转 *Bt* 基因棉和常规棉不同生育期土壤微生物群落功能多样性。结果表明,两个转基因棉花土壤微生物数量差异不显著,而转基因棉花土壤细菌和放线菌数量在花期和铃期显著高于常规棉花($P<0.05$),真菌数量在花期和铃期却显著低于常规棉花($P<0.05$)。与非转基因棉花相比,转基因棉花土壤微生物群落碳源利用能力在花期和铃期显著增加,转基因棉花土壤微生物群落的 Shannon 指数和 McIntosh 指数在花期、铃期和吐絮期显著高于常规棉花, Simpson 指数在花期和铃期则显著低于常规棉花。主成分分析结果显示,花期转基因棉花和常规棉花对 31 种碳源的利用差异较大。转基因棉花在苗期和蕾期对羧酸类、氨基酸类和多胺类,花期和铃期对糖类、羧酸类和双亲化合物类的利用分别较常规棉高;吐絮期转基因和常规棉花对所有碳源的利用均较低,其中转基因棉花对糖类和羧酸类的利用高于常规棉花。研究结果显示,种植转 *Chi+Glu* 双价基因棉花在花期和铃期对土壤微生物群落影响显著,其与转 *Bt* 基因棉花无明显差异。

关键词:棉花;土壤微生物群落;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(2011)10-2081-10

Effects of Transgenic *Chi+Glu* Cotton on Functional Diversity of Soil Microbial Community

WEI Feng¹, ZHU He-qin², XIAO Rui¹, YANG Jia-rong^{1*}

(1.College of Plant Protection and State Key Laboratory of Crop Stress Biology for Arid Region, Northwest A&F University, Yangling 712100, China; 2.Cotton Research Institute of CAAS, Anyang 455000, China)

Abstract:Through studying effects of transgenic *Chi+Glu* cotton on functional diversity of soil microbial community, we aimed to reveal the safety of transgenic cottons on the soil ecology environment. The functional diversity of soil microorganism community of transgenic *Chi+Glu* cotton, transgenic *Bt* cotton and un-transgenic cotton in different growing stages were analyzed by Biolog Metabolic Fingerprinting method. Although there was no significant difference in the number of soil microorganism community between two transgenic cottons, the number of soil bacteria and actinomycetes of transgenic cotton were significantly higher than that of un-transgenic cotton in stages of flowering and boll-forming stages, while the number of soil fungi was significantly lower than un-transgenic cotton. Compared with un-transgenic cotton, transgenic cotton had less effects on the carbon source utilization ability, Shannon functional diversity index, Simpson index and McIntosh index of soil microbes at sowing, seeding, squaring and boll-opening stages, but increased the carbon source utilization ability, Shannon functional diversity index and McIntosh index at flowering and boll-forming stage significantly, while its Simpson index was significantly lower in the flowering and squaring stages. The principal component analysis showed that the 31 carbon sources utilized by the transgenic and un-transgenic cottons had significant difference in the flowering stage. In the squaring stages, the transgenic cotton had a higher utilization of carboxylic acids, amino acids and amines than that in un-transgenic cotton. It also indicated that in the boll-opening stage, the transgenic cotton had a higher utilization of carbohydrates and carboxylic than un-transgenic cotton and the two transgenic cottons had a low utilization of car-

收稿日期:2011-03-09

基金项目:国家转基因专项“转基因抗病棉花环境安全评价技术研究”(2009ZX08011-026B);高等学校学科创新引智计划项目(B07049)

作者简介:魏 锋(1985—),男,内蒙古赤峰人,博士研究生,主要从事转基因作物生态环境安全性评价研究。E-mail:weifeng0108@163.com

* 通讯作者:杨家荣 E-mail:yljryang@tom.com

bon sources. The result revealed that transgenic *Chi+Glu* cotton had significant effects on the soil microorganism community in the flowering and boll-forming stages, while, had no significant difference with transgenic *Bt* cotton.

Keywords: cotton; soil microbial community; Biolog; principal component analysis

全球转基因植物种植面积已由 1996 年的 170 万 hm^2 猛增到 2009 年的 1.34 亿 hm^2 , 增长了 78 倍, 种植国家已经增加到 25 个, 其中转基因棉花的种植面积在 2009 年达到了 0.162 亿 hm^2 , 占棉花总种植面积 (0.33 亿 hm^2) 的 49%^[1]。随着转基因作物的不断释放, 在给人们带来巨大收益的同时, 其潜在生态风险也引起了人们的高度关注。土壤微生物在农业生态系统中不仅影响植物生长发育的好坏、土传植物病原菌的定殖与存活, 而且在生态系统中化学元素矿化、土壤肥力保持与改善、能量转化和物质循环等方面发挥着至关重要的作用^[2-3]。因此, 土壤微生物多样性与土壤生态系统的动态平衡关系密切^[4], 特别是在转基因作物生态风险性评价中具有重要作用^[5-6]。目前, 关于转基因棉花抗虫基因对非靶标生物的影响, 以及种植转基因棉花对土壤微生物的影响国内外已有相关研究报道^[7-10], 但是关于种植转 *Chi+Glu* 双价基因抗病棉花对土壤微生物群落多样性的影响, 国内外尚未见报道。

自 1991 年 Garland 和 Mills 将 Biolog 检测技术首次用于土壤微生物群落多样性分析以来^[11], Biolog 技术已被广泛应用于对环境微生物群落的检测与分析。因此, 本研究以种植转 *Chi+Glu* 双价基因抗病棉、非转基因常规棉和转 *Bt* 基因抗虫棉为研究试材, 利用 Biolog 检测技术揭示大田条件下转基因棉花与非转基因棉花对土壤微生物群落多样性影响的变化规律, 为评价种植转 *Chi+Glu* 双价基因抗病棉对土壤微生物群落影响的潜在风险提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试棉花为转 *Chi+Glu* 双价基因抗病棉中棉所 24 和常规棉中棉所 24, 均由中国农科院棉花研究所提供; 转 *Bt* 基因华农抗虫棉 1 号, 由西北农林科技大学植保学院经济作物病害研究室提供。

供试大田土壤为壤土, 呈弱碱性 (pH 值 7.24), 土壤 0~20 cm 耕层含有机质 1.21%、全氮 0.85 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、有效氮 52.6 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 、速效磷 10.4 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 、速效钾 272 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 、稳渗率为 0.72 $\text{mm}\cdot\text{s}^{-1}$ 。

1.2 实验试剂

Eco 生态板购自美国 Biolog 公司 (Biolog Eco Mi-

croPlate, Biolog, Hayward, USA), 试验所用其他试剂均为市售分析纯。

1.3 仪器设备

美国 Biolog 自动微生物鉴定系统; 上海 101A-2ET 电热鼓风干燥箱; 上海 PHS-3C 型实验室 pH 计。

1.4 试验设计

采用大田试验, 试验地位于陕西杨凌西北农林科技大学第一试验站。大田试验设转 *Chi+Glu* 双价基因抗病棉中棉所 24 号, 转 *Bt* 基因华农抗虫棉 1 号和常规棉中棉所 24 号 3 个处理, 每个处理设 3 次重复, 共 9 个小区, 每个小区面积为 4 m $\times$ 10 m, 并进行随机区组排列。供试棉花于 2010 年 4 月 18 日露地直接播种, 试验地棉花生长期未使用任何化学农药, 肥水管理与大田棉花常规管理相同。

1.5 取样方法

在棉花播种期 (2010-04-18)、苗期 (2010-05-07)、蕾期 (2010-06-21)、花期 (2010-07-15)、铃期 (2010-08-10)、吐絮期 (2010-09-09) 6 个不同生育期用土钻采取各处理小区土样。每个小区采用五点法取样, 先挖去表面 1 cm 表层土, 在根围 (紧贴棉花主根) 用土钻采集 1~15 cm 深的土样, 然后将每个小区的土样混合为 1 个土样, 迅速装入已灭菌的聚乙烯密封袋中。每个小区取样前, 土钻表面用 75% 酒精进行消毒处理, 避免小区间土样污染。大田采集土样编号后带回实验室剔除杂物, 过 1 mm 细筛后保存于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱, 并于 24 h 内进行处理、检测。

1.6 试验方法

1.6.1 土壤微生物数量测定

采用土壤稀释涂布平板法, 检测土壤微生物群落数量。细菌用牛肉膏蛋白胨琼脂培养基; 放线菌用改良高氏 1 号琼脂培养基, 加 0.01% 重铬酸钾; 真菌用马丁氏琼脂培养基, 加孟加拉红和 0.003% 硫酸链霉素^[12]。土壤稀释分离平板置 28 $^{\circ}\text{C}$ 恒温下培养, 细菌培养 2~3 d, 真菌培养 3~5 d, 放线菌培养 5~7 d 后分别观察计数。

1.6.2 土壤含水量测定

土壤含水量采用烘干称重法测定。每个土样称取 10 g (10 $\pm$ 0.5) 新鲜土样, 记录准确数值, 在 105 $^{\circ}\text{C}$ 的烘箱内将土样烘 6~8 h 至恒重, 再称量烘干后土壤重

量,计算出土壤含水量。

1.6.3 土壤微生物群落功能多样性测定

土壤微生物群落功能多样性采用 Biolog 检测法测定。称取相当于 10 g 烘干土壤的新鲜棉花根区土样,在超净工作台上将其置于装有 90 mL0.85%NaCl 无菌溶液的 250 mL 三角瓶中,制成 10⁻¹ 的土壤悬浮液,摇床振荡(200 r·min⁻¹)30 min 后,在超净工作台上采用 10 倍稀释法,用 0.85%的无菌生理盐水将土壤悬浮液稀释至 10⁻³,然后将其倒入已灭菌的点样槽内。用八道枪吸取土样液接种于 Biolog-Eco 微平板的各孔中,每孔接种 150 μL。将接种好的 Eco 微平板放置到装有无菌湿毛巾的保鲜盒中,并置于(25±1)℃下暗箱连续培养 240 h,培养期间每隔 12 h 用 ELISA 反应微平板读数仪在 590 nm 下测定光密度值^[13],计算孔平均颜色变化率、Shannon 指数和 McIntosh 指数。

孔平均颜色变化率(Average Well-Color Development,AWCD)是反映土壤微生物利用单一碳源能力的重要指标,AWCD 的计算方法如下:

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

式中: C_i 为在 590 nm 下第 i 个反应孔的光密度值; R 为对照孔 A1 的光密度值; n 为培养基碳源种类数目,本试验中 n 为 31。 C_i-R 小于 0 的孔,计算中记为 0,即: $C_i-R\geq 0$ 。

Shannon 指数(H)用于评估丰富度,计算方法如下:

$$H=-\sum P_i\cdot\ln(P_i)$$

式中: $P_i=(C_i-R)/\sum(C_i-R)$,表示有碳源孔与对照孔 A1 的光密度值之差与整板总差的比值。

Simpson(D)指数用于评估优势度,计算方法如下:

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

McIntosh 指数(U)是基于群落物种多维空间距离的多样性指数,反应土壤中微生物群落的均匀度,计算方法如下:

$$U=\sqrt{\sum n_i^2}$$

式中, n_i 是第 i 孔的相对光密度值。

1.7 数据处理

本研究采用 Biolog-Eco 微平板培养 96 h 的数据来进行微生物代谢多样性分析。采用 Excel(V2003)和 SPSS(V16.0)进行统计分析,主成分分析具体指标为:停止迭代的最大迭代次数为 25,旋转方法选择 Varimax 最大方差旋转。

2 结果与分析

2.1 转基因棉花对土壤微生物数量的影响

在棉花生长的整个生育期内,3 个供试棉花品种土壤微生物群体数量在棉花生育期中呈现先增后降的趋势,其中各生育期土壤微生物群体数量的差异显著(表 1);但在同一生育期内,3 个供试棉花品种在播种期、苗期、蕾期和吐絮期土壤微生物细菌、放线菌和真菌数量的差异不显著,在花期和铃期转基因棉花的细菌和放线菌数量显著高于常规棉花,而铃期转基因棉花的真菌数量却显著低于常规棉花。

2.2 土壤微生物群落平均颜色变化率(AWCD)的变化

在棉花整个生育期间,3 个供试棉花品种土壤微

表 1 不同生育期转基因棉花与常规棉花土壤微生物数量

Table 1 The number of soil microbial community of transgenic and non-transgenic cotton at different growing stages

微生物 Microorganisms	棉花品种 Cotton variety	播种期 Sowing	苗期 Seeding	蕾期 Squaring	花期 Flowering	铃期 Boll-forming	吐絮期 Boll-opening
细菌 Bacteria ($\times 10^6\text{cfu}\cdot\text{g}^{-1}$)	Chi+Glu	61.73±1.94a	97.88±2.30a	128.86±3.12ab	170.25±3.23a	246.10±2.25a	94.19±1.92a
	ZHM24	61.49±1.48a	93.42±2.26a	122.82±2.20b	156.90±2.42b	237.69±1.98b	92.66±1.99a
	Bt	61.10±1.63a	94.85±2.34a	134.73±1.76a	161.71±3.66ab	248.14±2.97a	94.69±2.00a
放线菌 Actinomycete ($\times 10^5\text{cfu}\cdot\text{g}^{-1}$)	Chi+Glu	85.47±1.66a	80.80±2.22a	107.28±2.51ab	160.56±5.83a	122.23±2.49a	90.40±2.05a
	ZHM24	86.54±1.38a	80.64±1.82a	100.45±2.49b	147.54±4.28a	111.77±2.95b	88.25±1.71a
	Bt	85.42±1.31a	76.34±0.68a	109.69±2.66a	153.08±2.81a	122.00±1.79a	91.27±3.59a
真菌 Fungi ($\times 10^3\text{cfu}\cdot\text{g}^{-1}$)	Chi+Glu	6.37±0.37a	8.66±0.41a	13.60±0.91a	21.91±0.63a	25.56±1.16ab	13.02±0.66a
	ZHM24	6.51±0.41a	9.30±0.37a	14.24±0.75a	22.72±0.87a	27.15±1.06a	13.76±0.88a
	Bt	6.64±0.58a	8.27±0.27a	12.64±0.64a	20.64±0.59a	23.29±0.64b	13.81±0.54a

注:Chi+Glu 为转 Chi+Glu 双价基因中棉所 24,ZHM24 为中棉所 24,Bt 为华农抗虫棉 1 号;同一微生物同列中不同字母代表同一生长时期不同品种间该微生物数量存在显著差异($P<0.05$)。

Note: To the same microorganism, different letters following the figures in the same column means significant difference at 0.05 level among different varieties at the same growth period.

生物群落平均颜色变化率(*AWCD*)均呈现出先增后降的趋势,且在铃期达到最大值。在播种期、苗期和蕾期,转基因棉花与常规棉花土壤微生物培养 96 h 的平均颜色变化率(*AWCD*)差异不显著,而在花期和铃期 3 个供试棉花品种 *AWCD* 的差异显著(华农抗虫棉 1 号>转 *Chi+Glu* 双价基因中棉所 24 号>常规棉中棉所 24 号)。在吐絮期,3 个供试棉花品种中,转 *Chi+Glu* 双价基因棉与常规棉中棉所 24 号 *AWCD* 的差异不显著,而且二者显著低于华农抗虫棉 1 号的 *AWCD*(表 2)。考察各类碳源的平均利用强度可以看出,3 个供试棉花品种在苗期对羧酸类和多聚物类碳源的利用均呈下降趋势(图 1)。整个生育期内土壤微生物对 6 类碳源的利用强度存在较大差异,在苗期和蕾期土

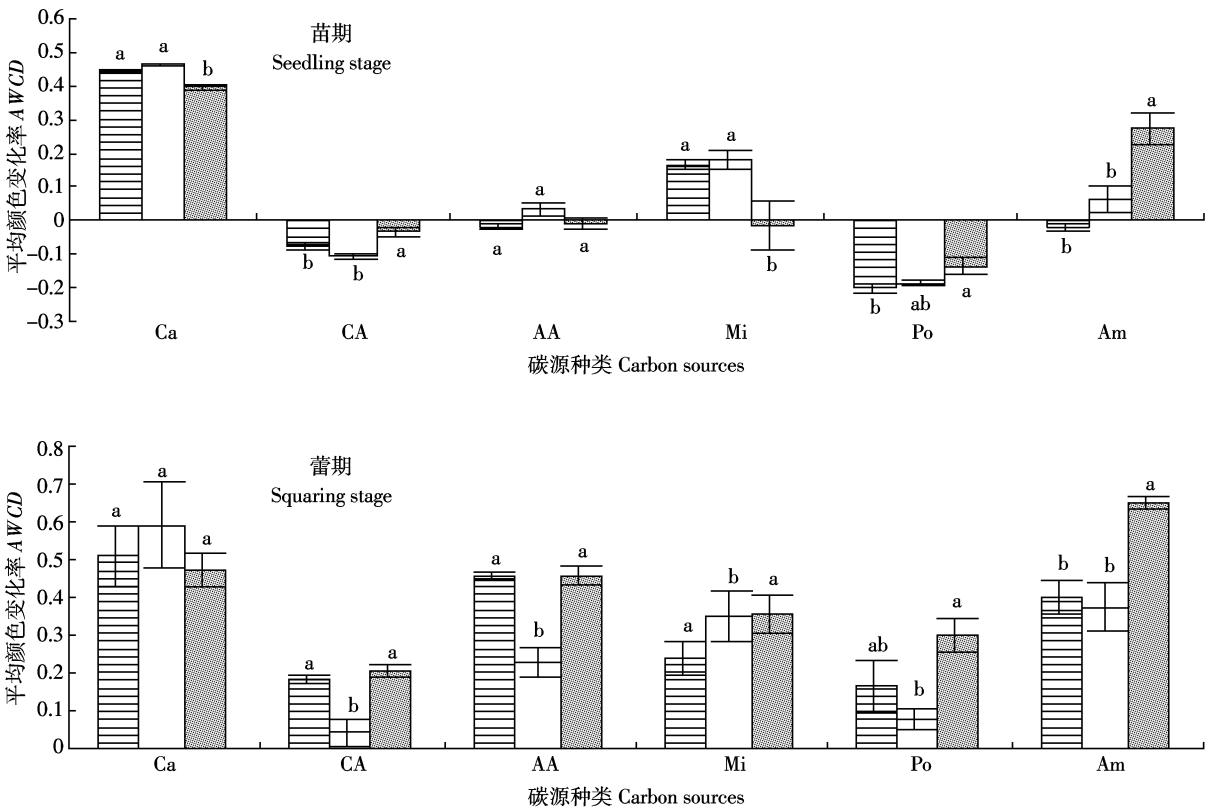
壤微生物对糖类、多胺类、双亲化合物利用较多,其中转基因棉花主要是对羧酸类、氨基酸类和多胺类的利用率较常规棉花高(图 1)。在花期和铃期土壤微生物对糖类、多胺类、氨基酸类、多聚物类的利用率高于对羧酸类和双氢化合物类的利用率,其中转基因棉花对糖类、羧酸类和双亲化合物类的利用率比常规棉高(图1)。在吐絮期土壤微生物对所有碳源的利用率均较低,其中对多胺类、糖类、羧酸类的利用率下降幅度较大(图 1)。

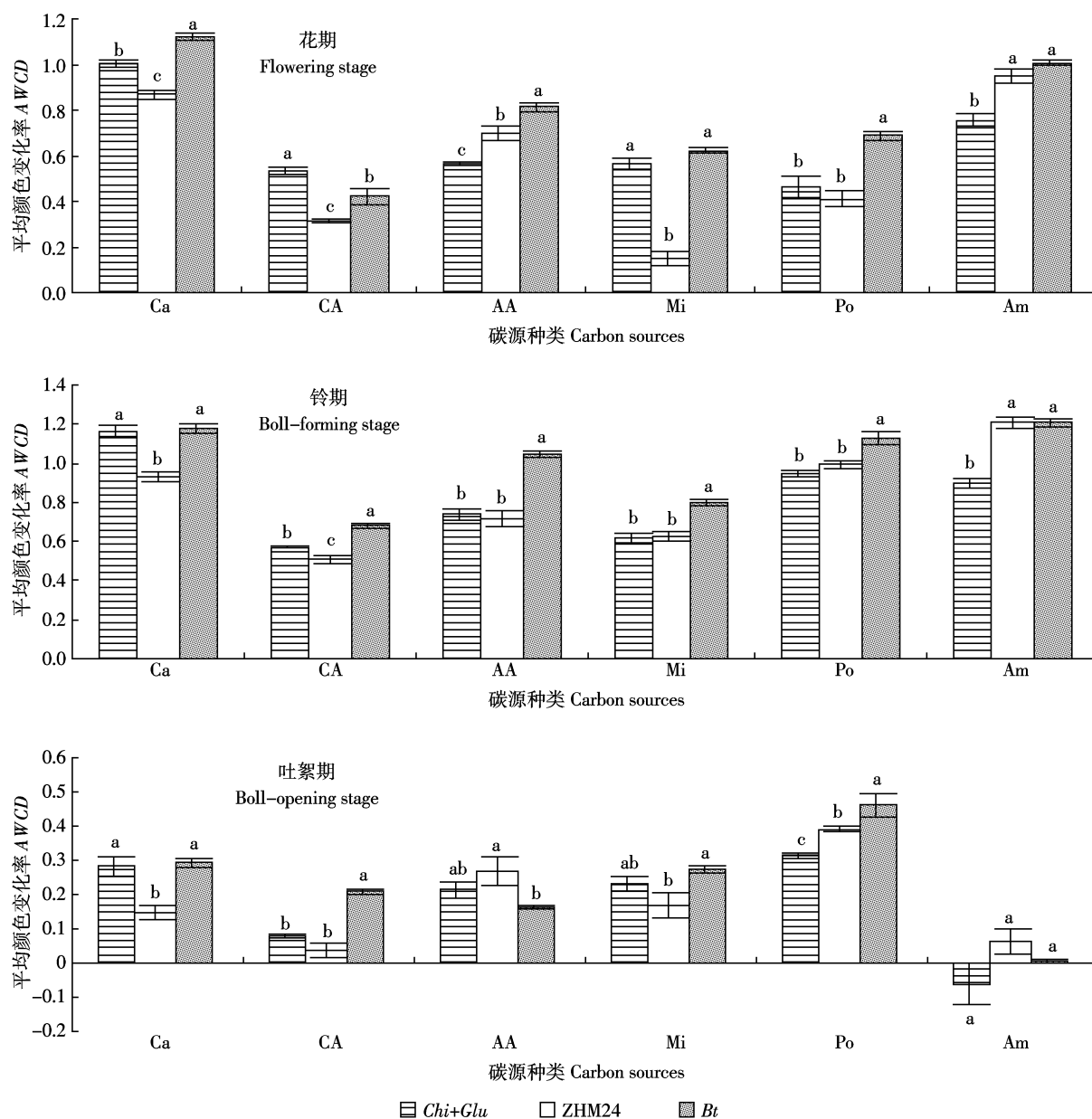
2.3 土壤微生物群落多样性指数

3 个供试棉花品种在播种期、苗期和蕾期土壤微生物群落的 Shannon 指数、Simpson 指数、McIntosh 指数的差异不显著,而在花期、铃期和吐絮期的 Shan-

表 2 转基因棉花和常规棉花土壤微生物群落 96 h 平均颜色变化率						
Table 2 96 h average well color development(<i>AWCD</i>)of soil microbial community of transgenic and no-transgenic cottons						
棉花品种 Cotton variety	播种期 Sowing	苗期 Seeding	蕾期 Squaring	花期 Flowering	铃期 Boll-forming	吐絮期 Boll-opening
<i>Chi+Glu</i>	0.644±0.007a	0.708±0.005a	0.971±0.022a	1.299±0.014b	1.455±0.016b	0.840±0.013b
ZHM24	0.635±0.005a	0.713±0.007a	0.893±0.046a	1.178±0.015c	1.399±0.014c	0.821±0.013b
<i>Bt</i>	0.627±0.002a	0.704±0.004a	0.999±0.022a	1.372±0.017a	1.594±0.010a	0.892±0.009a

注:同一列中不同字母代表在同一生育期不同棉花品种间的 *AWCD* 存在显著性差异($P<0.05$)。
Note: Different letters following the figures in the same column means significant difference at 0.05 level of *AWCD* among different varieties at the same growth stage.





Ca 糖类 Carbohydrates; CA 羧酸类 Carboxylic acids; AA 氨基酸类 Amino acids; Mi 双亲化合物类 Miscellaneous; Po 多聚物类; Am 多胺类 Amines。

图中各个时期的 AWCD 均为每孔的测定值减去播种期对应孔测定值后计算所得。

The data, AWCD at all stages, are means calculation after determination value of every hole minus its data at sowing time respectively.

图1 不同棉花品种在各个生育期对土壤微生物利用不同碳源类型的影响

Figure 1 Effects of different cotton variety on utilization of different carbon sources by soil microbes at different cotton growing stages

non 指数和 McIntosh 指数, 华农抗虫棉 1 号>转 Chi+Glu 双价基因中棉所 24 号>常规棉中棉所 24 号;在花期和铃期的 Simpson 指数则表现为, 常规棉中棉所 24 号>转 Chi+Glu 双价基因棉中棉所 24 号>华农抗虫棉 1 号 (表 3)。表 3 结果说明在棉花生长的中后期, 转基因棉花土壤微生物群落多样性和丰富度高于常规棉, 而常规棉的土壤微生物群落优势度却高于转基因棉花。

2.4 整个生育期土壤微生物群落代谢的主成分(PCA)分析

整个生育期土壤微生物群落利用 Biolog-Eco 微平板中 6 类碳源培养 96 h 的利用情况的微生物群落功能主成分(PCA)分析结果表明, 31 个主成分因子中前 5 个的方差贡献率分别为 55.611%、13.704%、6.450%、5.145%和 4.169%, 其累积方差贡献率达到 85.106% (表 4), 其中 PC1 (第一主成分, principal

表 3 不同棉花品种土壤微生物群落多样性、优势度与均匀度指数

Table 3 Microbial community diversity, dominance and evenness indices of different cotton varieties

指数 Index	棉花品种 Cotton variety	播种期 Sowing	苗期 Seeding	蕾期 Squaring	花期 Flowering	铃期 Boll-forming	吐絮期 Boll-opening
Shannon 指数	<i>Chi+Glu</i>	3.239±0.005a	2.922±0.054a	3.218±0.008a	3.387±0.020b	3.184±0.024b	3.230±0.055b
Shannon Index	ZHM24	3.236±0.014a	2.883±0.025a	3.210±0.011a	2.965±0.047c	2.863±0.028c	2.936±0.023c
	<i>Bt</i>	3.201±0.012a	3.017±0.086a	3.210±0.006a	3.611±0.020a	3.407±0.025a	3.533±0.033a
Simpson 指数	<i>Chi+Glu</i>	0.957±0.000a	0.943±0.003a	0.955±0.000a	0.955±0.000b	0.964±0.001b	0.953±0.002b
Simpson Index	ZHM24	0.956±0.001ab	0.949±0.001a	0.954±0.001a	0.966±0.002a	0.975±0.001a	0.965±0.001a
	<i>Bt</i>	0.954±0.001b	0.944±0.005a	0.955±0.000a	0.945±0.001c	0.961±0.001c	0.951±0.001b
McIntosh 指数	<i>Chi+Glu</i>	4.163±0.039a	5.323±0.025a	6.377±0.127a	8.206±0.078b	8.957±0.088b	5.543±0.072a
McIntosh Index	ZHM24	4.141±0.012a	5.281±0.061a	5.958±0.257a	7.607±0.096c	8.433±0.081c	5.376±0.085a
	<i>Bt</i>	4.132±0.009a	5.188±0.029a	6.589±0.127a	8.674±0.091a	9.503±0.065a	5.523±0.069a

注:同一指数同列中不同字母代表同一生长时期不同品种间该指数存在显著差异($P<0.05$)。
Note: To the same index, different letters following the figures in the same column means significant difference at 0.05 level among different varieties at same growth period($P<0.05$).

component 1)和 PC2(第二主成分, principal component 2)的特征根分别为 17.239 和 4.248, PC1 和 PC2 能反映整个系统的变异情况。

表 4 整个生育期主成分特征根
Table 4 Principal components characteristic vector for whole cotton growing stages

项目 Item	特征根 Latent root	方差贡献率/% Percent of variance	累计方差贡献率/% Percent of total variance
PC1	17.239	55.611	55.611
PC2	4.248	13.704	69.315
PC3	1.999	6.450	75.765
PC4	1.595	5.145	80.910
PC5	1.301	4.196	85.106

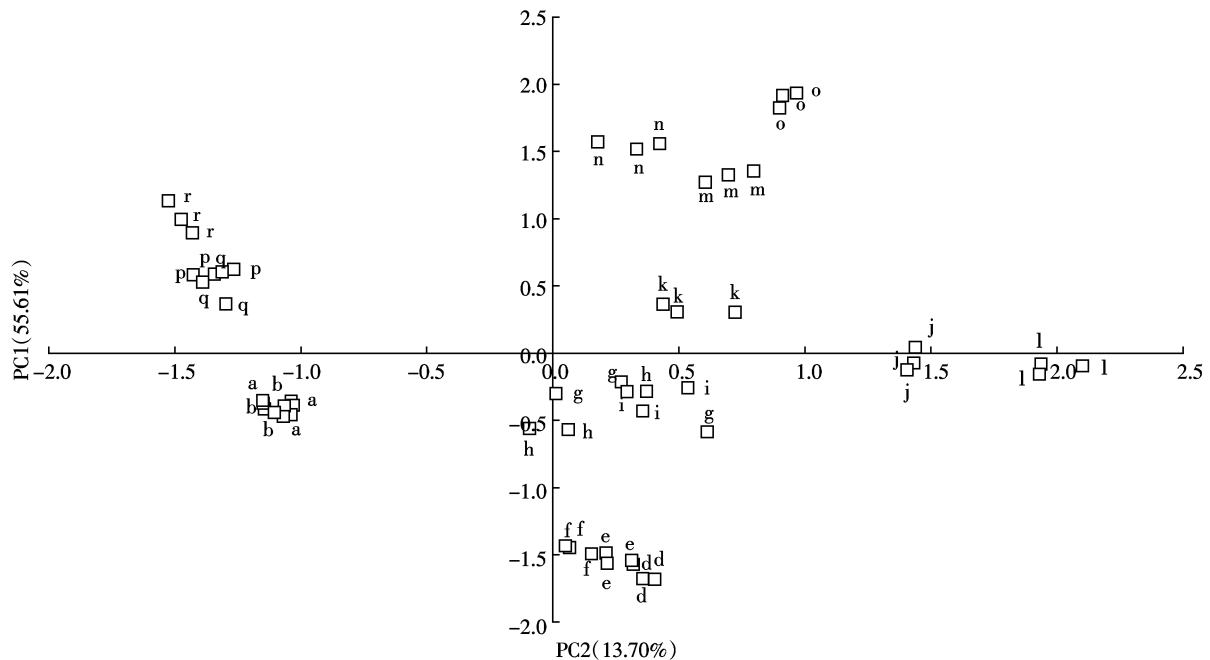
分析结果显示,不同生育期之间土壤微生物群落碳源利用模式差异明显,PC1 将播种期、吐絮期和其他 4 个时期区分开,播种期和吐絮期分布在 PC1 的负方向上,其他 4 个时期分布在 PC1 正方向上。PC2 将铃期、吐絮期和其他 4 个时期区分开,铃期和吐絮期分布在 PC2 的正方向上,其他时期分布在 PC2 的负方向上。在播种期、苗期、蕾期、铃期和吐絮期,转基因棉花与常规棉花土壤微生物群落的碳源利用模式相似,而在花期转基因棉花与常规棉花土壤微生物碳源利用模式存在显著差异,PC2 可以把它们区分开,常规棉中棉所 24 号分布在 PC2 的正轴方向上,而转基因棉花则主要分布在 PC2 的负轴方向上(图 2、图 3)。考察 PCA 的相关系数矩阵,对 PC1 和 PC2 贡献的特征向量系数大于等于 0.5 的碳源类型进行考察(表 5),由表 5 可见,对 PC1 贡献大的碳源有 20 种,

其中氨基酸类占 25%,糖类占 25%,羧酸类占 20%,对 PC2 贡献大的碳源有 17 种,其中氨基酸类占 35.3%,羧酸类占 23.5%。相关性分析表明,与 PC1 正相关程度较高的碳源有吐温 80 (0.935)、苯乙胺 (0.930)、L-天门冬酰胺(0.896)、L-丝氨酸(0.890)、L-精氨酸(0.876),负相关的碳源为 γ -羟丁酸(-0.077);与 PC2 正相关程度较高的碳源有肝糖 (0.922)、 α -环式糊精(0.916)、D-苹果酸(0.836),负相关的碳源为 D-半乳糖醛酸(-0.087)。

对 3 个供试棉花品种每个生育期土壤微生物培养 96 h 的群落代谢分别进行主成分(PCA)分析结果表明,转基因棉花与常规棉花在苗期、蕾期、花期、铃期 4 个生长时期分别被各自的 PC1 分开,常规棉花分布在 PC1 负轴方向,两个转基因棉花分布在 PC1 正轴方向(图 2)。考察 PCA 的相关系数矩阵,不同生育期对 PC1 和 PC2 贡献的特征向量系数大于等于 0.5 的碳源类型(表 5),对苗期、蕾期、花期、铃期和吐絮期 PC1 贡献较大的碳源分别有 12、20、20、19、19 种,它们主要是糖类、羧酸类和氨基酸类。对苗期、蕾期、花期、铃期和吐絮期 PC2 贡献较大的碳源分别有 13、10、13、17、8 种。

3 讨论

几丁质酶和 β -1,3-葡聚糖酶具有降解真菌细胞壁的作用,并且在抑制真菌生长过程中二者具有协同的抗真菌作用^[14-15]。把这两种酶的基因构建在统一表达载体上导入棉花中使其表达,从而获得抗病的转 *Chi+Glu* 双价基因棉花。土壤根际微生物对土壤根围



同一字母的3个不同点代表3次重复。The same letters represent different points of three different duplicate.

a、b、c 分别代表播种期的 *Chi+Glu*、ZHM24 和 *Bt*。a, b, c represented *Chi+Glu*, ZHM24 and *Bt* at sowing stage respectively; d、e、f 分别代表苗期的 *Chi+Glu*、ZHM24 和 *Bt*。d, e, f represented *Chi+Glu*, ZHM24 and *Bt* at seedling stage respectively; g、h、i 分别代表蕾期的 *Chi+Glu*、ZHM24 和 *Bt*。g, h, i represented *Chi+Glu*, ZHM24 and *Bt* at squaring stage respectively; j、k、l 分别代表花期的 *Chi+Glu*、ZHM24 和 *Bt*。j, k, l represented *Chi+Glu*, ZHM24 and *Bt* at flowering stage respectively; m、n、o 分别代表铃期的 *Chi+Glu*、ZHM24 和 *Bt*。m, n, o represented *Chi+Glu*, ZHM24 and *Bt* at boll-forming stage respectively; p、q、r 分别代表吐絮期的 *Chi+Glu*、ZHM24 和 *Bt*。p, q, r represented *Chi+Glu*, ZHM24 and *Bt* at boll-opening stage respectively.

图2 整个生育期96 h土壤微生物群落主成分分析

Figure 2 Principal component analysis of soil microbial community after 96 h culturing for whole cotton growing stages

环境变化非常敏感,种植不同作物品种、采取不同的农艺管理措施以及气候条件的变化等,均会对根际微生物多样性产生一定影响^[6]。外源基因导入植物后必将打破其固有基因的连锁群和蛋白质群,表现出一些新的性状,合成一些新的物质,导致植物根系分泌物发生变化,进而影响根系、土壤结构、土壤微生物群落及土壤酶系的平衡,从整体上对土壤生态环境产生影响^[17]。

土壤微生物是土壤生物的重要组成部分之一,几乎所有的土壤过程都直接或间接地与土壤微生物有关^[8],研究转基因棉花对土壤微生物群落多样性的影响具有重要意义。朱荷琴等采用平板稀释培养法检测转基因棉花对土壤微生物群落变化的影响结果表明,转 *CpTI* 基因棉花土壤细菌和放线菌数量比其受体材料明显增加,而真菌数量明显减少^[7]。叶飞等采用 Biolog 技术检测土壤微生物群落变化的结果指出,转 *Bt* 基因棉花土壤微生物群落多样性显著低于其受体材料,并且在花期转基因棉花与常规棉花碳源的利用模式差异显著^[8]。Adilia 等研究显示,转 *Bt* 基因玉米对土

壤微生物群落变化没有明显影响^[9],而 Watrud 和 Seidier 研究指出转 *Bt* 基因棉花可以提高土壤中细菌和真菌数量^[10]。本文研究结果显示,转基因棉花在花期和铃期的土壤细菌和放线菌数量显著高于常规棉花,真菌数量却显著低于常规棉花,这与朱荷琴和 Watrud 的研究结果一致,但与叶飞等的研究结果稍有不同,可能是外源基因的差异,或土壤条件和土壤微生物区系的不同所致。另外,多样性指数分析表明,转基因棉花土壤微生物群落的 Shannon 指数和 McIntosh 指数在花期、铃期和吐絮期显著高于常规棉花, Simpson 指数在花期和铃期则显著低于常规棉花,表明转基因棉花在花期和铃期增加了土壤微生物的功能多样性。

转基因物质本身具有一定的生化特性,可以直接调节植物根系发育,并对土壤动物、细菌、真菌具有一定的趋化作用^[16]。转 *Chi+Glu* 双价基因棉为抗棉花黄萎病和枯萎病棉花,棉花枯萎病菌为尖镰孢萎蔫专化型,属于镰刀菌属;棉花黄萎病菌属于淡色孢科,轮枝菌属^[18],二者都属于真菌,几丁质酶和 β -1,3-葡聚糖

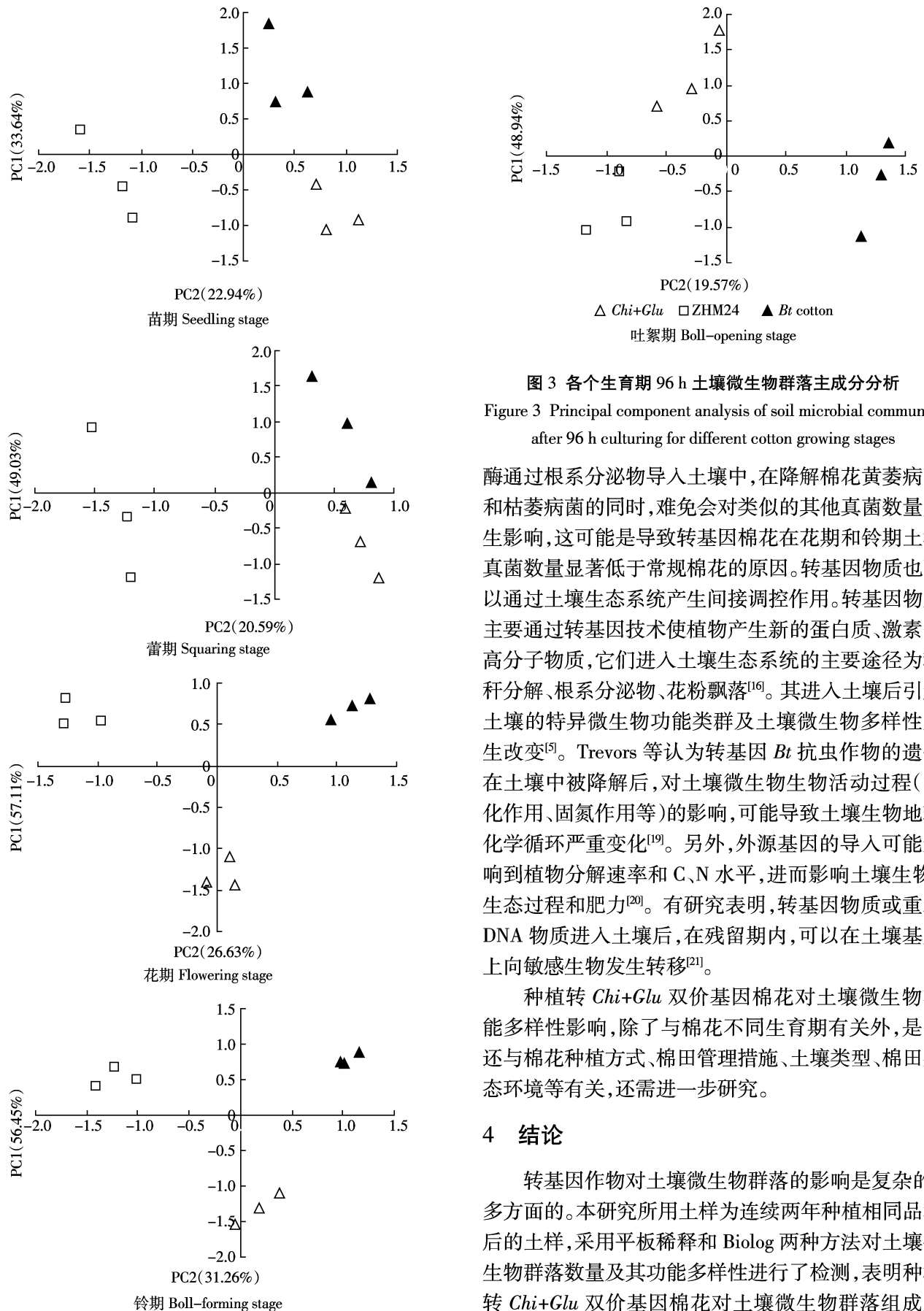


图 3 各个生育期 96 h 土壤微生物群落主成分分析
Figure 3 Principal component analysis of soil microbial community after 96 h culturing for different cotton growing stages

酶通过根系分泌物导入土壤中,在降解棉花黄萎病菌和枯萎病菌的同时,难免会对类似的其他真菌数量产生影响,这可能是导致转基因棉花在花期和铃期土壤真菌数量显著低于常规棉花的原因。转基因物质也可以通过土壤生态系统产生间接调控作用。转基因物质主要通过转基因技术使植物产生新的蛋白质、激素等高分子物质,它们进入土壤生态系统的主要途径为秸秆分解、根系分泌物、花粉飘落^[16]。其进入土壤后引起土壤的特异微生物功能类群及土壤微生物多样性发生改变^[5]。Trevors 等认为转基因 *Bt* 抗虫作物的遗体在土壤中被降解后,对土壤微生物生物活动过程(消化作用、固氮作用等)的影响,可能导致土壤生物地球化学循环严重变化^[19]。另外,外源基因的导入可能影响到植物分解速率和 C/N 水平,进而影响土壤生物、生态过程和肥力^[20]。有研究表明,转基因物质或重组 DNA 物质进入土壤后,在残留期内,可以在土壤基质上向敏感生物发生转移^[21]。

种植转 *Chi+Glu* 双价基因棉花对土壤微生物功能多样性影响,除了与棉花不同生育期有关外,是否还与棉花种植方式、棉田管理措施、土壤类型、棉田生态环境等有关,还需进一步研究。

4 结论

转基因作物对土壤微生物群落的影响是复杂的、多方面的。本研究所用土样为连续两年种植相同品种后的土样,采用平板稀释和 Biolog 两种方法对土壤微生物群落数量及其功能多样性进行了检测,表明种植转 *Chi+Glu* 双价基因棉花对土壤微生物群落组成及

表 5 不同生育期主成分因子载荷特征向量≥0.50 的碳源数目

Table 5 The Number of carbon sources with loadings≥0.50 grouped at different cotton growing stages

项目 Item		氨基酸类 Amino acids	糖类 Carbohydrates	羧酸类 Carboxylic acids	多聚物类 Polymers	双亲化合物类 Miscellaneous	多胺类 Amines	合计 Total
苗期 Seeding	PC1	3	5	3	0	0	1	12
	PC2	1	2	4	2	3	1	13
蕾期 Squaring	PC1	5	6	6	1	1	1	20
	PC2	0	3	1	3	2	1	10
花期 Flowering	PC1	2	6	6	3	2	1	20
	PC2	4	2	4	1	1	1	13
铃期 Boll-forming	PC1	5	3	7	2	1	1	19
	PC2	2	4	4	4	2	1	17
吐絮期 Boll-opening	PC1	4	4	5	3	3	0	19
	PC2	2	2	1	1	1	1	8
整个生育期 Whole stage	PC1	5	5	4	2	2	2	20
	PC2	6	1	4	3	2	1	17

其功能多样性有一定影响，其与转 *Bt* 基因棉花无明显差异。

参考文献：

[1] Clive James. 2009 年全球生物技术/转基因作物商业化发展态势[J]. 中国生物工程杂志, 2010, 30(2):1-22.
Clive James. Global biotechnology/commercial development of GM crops situation in 2009[J]. *China Biotechnology*, 2010, 30(2):1-22.

[2] Stefanowicz A. The Biolog Plates technique as a tool in ecological studies of microbial communities[J]. *Polish J of Environ Stud*, 2006, 5 (15):669-676.

[3] 王 振, 赵廷昌, 刘学敏, 等. 转基因作物对土壤微生物多样性的影响[J]. 植物保护, 2007, 3(4):15-20.
WANG Zhen, ZHAO Ting-chang, LIU Xue-min, et al. Advances in re-search on the impacts of transgenic crops on soil microbes[J]. *Plant Protection*, 2007, 3(4):15-20.

[4] Nannipieri P, Ascher J, Ceccherini M T, et al. Microbial diversity and soil functions[J]. *European Journal of Soil Science*, 2003, 54(4):655-670.

[5] Angle J S. Release of transgenic plants:biodiversity and population-level considerations[J]. *Mol Ecol*, 1994, 3:45-50.

[6] 王洪兴, 陈 欣, 唐建军, 等. 释放后的转抗病虫基因作物对土壤生物群落的影响[J]. 生物多样性, 2002, 10(2):232-237.
WANG Hong-xing, CHEN Xin, TANG Jian-jun, et al. Influence of re-leased transgenic pest and disease-resistant crops on plant-associated microorganism in soil[J]. *Chinese Biodiversity*, 2002, 10(2):232-237.

[7] 朱荷琴, 冯自力, 刘雪英. 转 *CpTI* 对棉花根际土壤中微生物的影响[J]. 棉花学报, 2009, 21(5):366-370.
ZHU He-qin, FENG Zi-li, LIU Xue-ying. The effect of *CpTI* cotton to microbial flora in rhizosphere soil[J]. *Cotton Science*, 2009, 21(5):366-370.

[8] 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.

[9] Adilia P Oliveira, Maria E pampulha, et al. A two-year field study with transgenic *Bacillus thuringiensis* maize: Effects on soil microorganisms[J]. *Science of the Total Environment*, 2008, 405:353-357.

[10] Watrud L S, Seidler R J. Nontarget ecological effects of plant, micro-bial, and chemical introductions to terrestrial systems, soil chemistry and ecosystem health[C]. Wisconsin: Special Publication 52. Soil Sci-ence Society of America, 1998:313-340.

[11] Garland J L, Mills A L. Classification and characterization of het-erotrophic microbial communities on the basis of patterns of communi-ty-level sole-carbon-source utilization[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1991, 57(8):2351-2359.

[12] 沈 萍, 范秀容, 李广武. 微生物学实验 [M]. 北京: 高等教育出版社, 1999:50-54.
SHEN Ping, FAN Xiu-rong, LI Guang-wu. Microbiology experiment [M]. Beijing: Higher Education Press, 1999:50-54.

[13] 张海涵, 唐 明, 陈 辉, 等. 不同生态条件下油松(*Pinus tabulaeformis*) 菌根根际土壤微生物群落[J]. 生态学报, 2007, 27(12):5465-5470.
ZHANG Hai-han, TANG Ming, CHEN Hui, et al. Microbial communi-ties in *Pinus tabulaeformis* mycorrhizosphere under different ecological conditions[J]. *Acta Ecological Sinica*, 2007, 27(12):5465-5470.

[14] Felix Mauch, Brigitte Mauch-Mani, Thomas Boller. Antifungal hydro-lases in pea tissue II :Inhibition of fungal growth by combination of chitinase and β -1, 3-Glucanase[J]. *Plant Physiology*, 1988, 88(3):936-942.

[15] 李春娟, 单世华, 许婷婷, 等. 几丁质酶和 β -1, 3-葡聚糖酶基因研究进展[J]. 生物技术通讯, 2004, 15(5):502-505.
LI Chun-juan, SHAN Shi-hua, XU Ting-ting, et al. Research develop-ment of Chitinase and β -1, 3-Glucanase genes[J]. *Letters in Biotech-nology*, 2004, 15(5):502-505.

- [16] 徐 征. 农业转基因生物对土壤生态系统功能影响的研究进展[J]. 中国农学通报, 2004, 20(4):47-50.
- XU Zheng. Studies on the effects influenced the function of soil-e-cosystem by transgenic[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2004, 20(4):47-50.
- [17] 张美俊, 杨武德. 转 *Bt* 基因作物毒蛋白对根际土壤生态系统影响研究进展[J]. 山西农业大学学报, 2005, 25(3):302-305.
- ZHANG Mei-jun, YANG Wu-de. Advances in research on effects of transgenic *Bt* crops on rhizospheric soil ecosystem[J]. *Journal of Shanxi Agricultural University*, 2005, 25(3):302-305.
- [18] 马 存, 简桂良, 杨家荣, 等. 棉花枯萎病和黄萎病的研究 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2007:20-86.
- MA Cun, JIAN Gui-liang, YANG Jia-rong, et al. The research of cotton blights and verticillium wilt[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2007:20-86.
- [19] Trevors J T, Kuikman P, Watson B. Transgenic plants and bio-geo-chemical cycle[J]. *Molecular Ecology*, 1994, 3:57-64.
- [20] Donegan K K, Palm C J, Fieland V J, et al. A field study with genetically engineered alfalfa inoculated with recombinant sinorhizobium meliloti; Effects on the soil ecosystem [J]. *J Appl Ecol*, 1999, 36:920-936.
- [21] Hoffman T C, Golz, Schieder O. Foreign DNA sequence are received by a wild-type strain of *Aspergillus niger* after co-culture with transgenic higher plants[J]. *Current Gentic*, 1994, 27:70-76.