

转基因棉花对根际土壤微生物多样性的影响

李长林¹, 张欣², 吴建波², 刘惠芬³

(1. 农业部环境保护科研监测所, 天津 300191; 2. 南开大学生命科学学院, 天津 300071; 3. 天津农学院, 天津 300384)

摘要:本研究应用 PCR、T/A 克隆、RFLP 等分子生物学研究方法分析了两种大田栽培的转基因抗虫棉(SGK321、中棉所 41)苗期、花铃期、衰老期根际土壤微生物特异性 DNA 序列变化,探讨转基因棉花种植对根际土壤微生物区系组成多样性的影响。16S rDNA 和 5.8S ITS PCR 扩增产物经 T/A 克隆分别得到 1 066、563 个阳性克隆,根据酶切图谱进行聚类分析。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转基因棉花根际微生物间的相似性。这表明转基因棉花对根际土壤微生物的影响不明显,棉花根际土壤微生物区系差异主要受生育期影响。

关键词:转基因棉花;根际土壤微生物;RFLP;T/A 克隆

中图分类号:S154.36 **文献标识码:**A **文章编号:**1672-2043(2008)05-1857-03

Effect of Transgenic Cotton on Microbial Community Diversity in Rhizosphere Soil

LI Chang-lin¹, ZHANG Xin², WU Jian-bo², LIU Hui-fen³

(1. Agro-environmental Protection Institute, Ministry of Agriculture, Tianjin 300191, China; 2. College of Life Science, Nankai University, Tianjin 300071, China; 3. Tianjin Agricultural University, Tianjin 300384, China)

Abstract: In order to evaluate effect of transgenic cotton on microbial community diversity in rhizosphere soil, 16S rDNA and 5.8S ITS gene-based molecular analysis of DNA directly extracted from rhizosphere soil of two transgenic cotton cultivars (SGK321 and ZHMIAN41) growing in field was studied by PCR, T/A clone and RFLP techniques at different growth period, compared to the non-transgenic parental cultivars (SHYUAN321 and ZHMIAN23). The PCR products of 16S rDNA and 5.8S ITS amplified with universal primers of bacteria and fungi were cloned by T/A clone techniques, and 16S rDNA and 5.8S ITS clones were 1 066 and 563, respectively. Both 16S rDNA and 5.8S ITS of each clone were digested with two restriction endoenzymes. Analysis of fingerprinting using the UPGMA clustering algorithm showed that the similarity of the microbial community composition of cotton at same growth period was much higher than that of transgenic cotton. It may be concluded there was little difference in terms of impacts between the two transgenic cotton cultivars and their non-transgenic parental cultivars, while the main impacts on microbial community composition in rhizosphere soils were likely due to different growth period.

Keywords: transgenic cotton; rhizosphere soil microorganisms; RFLP; T/A clone

随着生物技术的不断发展与完善,转基因植物及其产业化研究取得了令人瞩目的成就。2006 年,生物技术作物 (genetically modified or transgenic crops) 全球种植面积为 10 200 万 hm²,种植国家增至 22 个,全球市场价值为 61.5 亿美元^[1]。转基因植物的飞速发展,为人们带来了巨大的经济效益,但与此同时,也加剧了人们对转基因植物的潜在生态风险的担忧。

植物根际土壤(Rhizosphere soil)是植物能量和物质代谢最活跃的部位之一。植物根际土壤中的微生物

数量远高于非根际土壤,在土壤的生物化学过程中发挥着重要作用,影响着植物的生长、发育、分布^[2],因此开展转基因植物对土壤微生物影响方面的研究对科学评价转基因植物潜在的生态风险具有重要意义。近年来,诸多学者在这方面进行了大量而卓有成效的研究^[3-7],转基因植物对土壤微生物的影响已经成为继转基因逃逸、转基因对非目标生物、生物多样性影响以及杂草化之后的又一个研究热点。

转基因棉花是我国目前惟一批准的商品化生产的转基因作物,2006 年种植面积为 350 万 hm²,占全球转基因棉花种植面积的 22.12%^[1],且种植面积逐年扩大。转基因棉花的大面积种植引发了人们对其生物安全的担忧。本研究应用非培养依赖法,在大田栽培

收稿日期:2007-09-26

基金项目:农业部环境保护科研监测所所长基金(2006aepi-04)

作者简介:李长林(1975—),男,硕士,助理研究员,主要从事土壤微生物方面的研究。E-mail:changlinli@eyou.com

条件下,探讨转基因棉花种植对根际土壤微生物区系组成的影响,旨在为转基因棉花的生态安全评价提供理论基础。

1 材料和方法

1.1 试验设计

试验田位于天津市武清区,土壤状况见表 1,所试棉花为转基因棉花 SGK321、中棉所 41(ZHM41)以及其亲本非转基因棉石远 321(SHY321)、中棉所 23(ZHM23),均由中国农科院棉花所提供。试验采用随机区组设计,设转基因棉花、非转基因亲本棉花不同处理,每个处理 3 个重复,小区面积 10 m×10 m。2006 年 4 月 27 日播种,水肥管理采用常规管理^[8]。

表 1 供试土壤理化性状

Table 1 Physical-chemical characteristics of the study soil

pH (1 : 2.5 H ₂ O)	有机碳 / g·kg ⁻¹	全氮 / g·kg ⁻¹	全磷 / g·kg ⁻¹	速效钾 / mg·kg ⁻¹	速效磷 / mg·kg ⁻¹
8.29	10.786	0.950	1.752	80.9	11.776

1.2 样品采集

根际土壤分别于棉花苗期、花铃期、衰老期取样,每次取样每个处理取棉花 3 株,抖落根周土,然后将带有根际土的棉花根系包裹好放入液氮,带回实验室转入-70 ℃冰箱保存^[3]。

1.3 根际土壤 DNA 提取与纯化

根际土壤 DNA 提取与纯化按李长林等方法进行^[9]。

1.4 PCR 扩增反应

细菌扩增采用 16S rDNA 的通用引物 BSF 和 BSR,片段大小为 1 500 kb 左右。真菌扩增采用 5.8S ITS 通用引物 ITS4 和 ITS5,片段大小为 800 kb 左右。

1.4.1 土壤微生物特异性序列表达文库的构建

PCR 扩增产物用 0.75%的琼脂糖进行电泳分离,经 3s spin DNA Purification Kit 回收纯化,与 pUCm-T 载体进行体外基因重组,转化到处于感受态的 E.coli DH5a 中,在含有 X-gal/IPTG 的 Ampr LB 平板培养基中培养,进行蓝白斑筛选,挑取阳性克隆子,建立 16S rDNA、5.8S ITS 克隆文库,克隆文库通过 Ampr 平板保藏。

1.4.2 RFLP 分析

通过 T7 和 SP6 对阳性克隆进行菌体 PCR,扩增目的序列。用限制性内切酶 *Hif*I、*Msp* I 和 *Hinf*I、*Hae* III 分别对 16S rDNA、5.8S ITS 菌体 PCR 扩增产物进行酶切。酶切产物在非变性聚丙烯酰胺电泳检测,用

银染法检测电泳结果。

1.4.3 RFLP 条带分析

统计各个酶切图谱上酶切片段的条带,有电泳带记为 1,无电泳带记为 0。采用 UPGMA 方法进行聚类分析。根据 Nei 和 Li^[10]的公式计算两样品间的遗传相似度 S , $S=2N_{xy}/(N_x+N_y)$, N_{xy} 为本两个样品共有的 RFLP 标记数, N_x 、 N_y 分别为 X 样品和 Y 样品分别具有的酶切条带,进行聚类分析。

2 结果与分析

2.1 转基因棉花和非转基因亲本根际土壤细菌的区系组成多样性比较

对两个不同品种的转基因棉花 (SGK321、ZHM41) 和非转基因亲本 (SHY321、ZHM23) 苗期、花铃期、衰老期根际土壤微生物 16S rDNA 序列 PCR 产物进行克隆,构建表达文库,共得到 1 066 个阳性克隆,用限制性内切酶 *Hif*I、*Msp* I 进行 RFLP 分析,聚类分析表明,相同生育期的棉花根际土壤细菌 RFLP 带型具有较高相似性,不同生育期间差异明显 (图 1)。花铃期根际土壤微生物首先聚在一起,相似性最高 (0.84),明显不同于苗期和衰老期。其次是衰老期、苗期的 SGK321、ZHM41、SHY321 根际土壤微生物相似性较高首先各自聚在一起,再相互聚在一起,最后与 ZHM23 聚在一起。

2.2 转基因棉花和非转基因亲本根际土壤真菌的区系组成多样性比较

采用同样方法对两个不同品种的转基因棉花 (SGK321、ZHM41) 和非转基因亲本 (SHY321、ZHM23) 苗期、花铃期、衰老期根际土壤微生物 5.8 ITS 序列进行分析,通过对 PCR 产物进行克隆,共得到 563 个阳性克隆,用限制性内切酶 *Hinf*I、*Hae* III 进

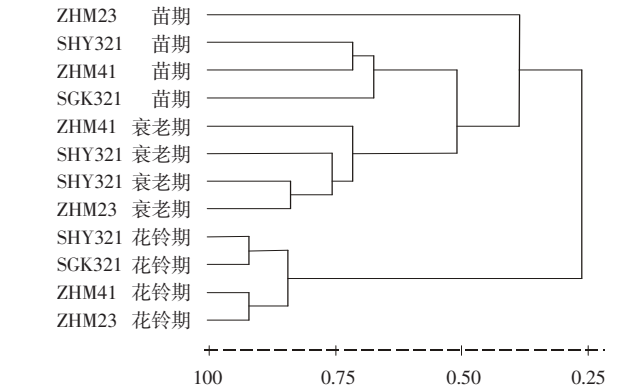


图 1 根际土壤细菌 16S rDNA PCR-RFLP 图谱相似性聚类图
Figure1 Dendrogram based on the similarity of PCR-RFLP patterns using clustering analysis

行 RFLP 分析,聚类分析表明,与转基因棉花和非转基因亲本根际土壤细菌的区系组成多样性比较结果相似,花铃期根际土壤微生物首先聚在一起,相似性最高(0.73),明显不同于苗期和衰老期。其次是衰老期、苗期的根际土壤微生物相似性较高聚在一起(相似系数为 0.56),衰老期和苗期部分棉花对根际土壤微生物区系组成较为相似,有部分重叠。与非转基因亲本相比,转基因棉花对根际土壤微生物的区系组成多样性影响不大,根际土壤微生物的区系组成受棉花生育期影响较大(图 2)。

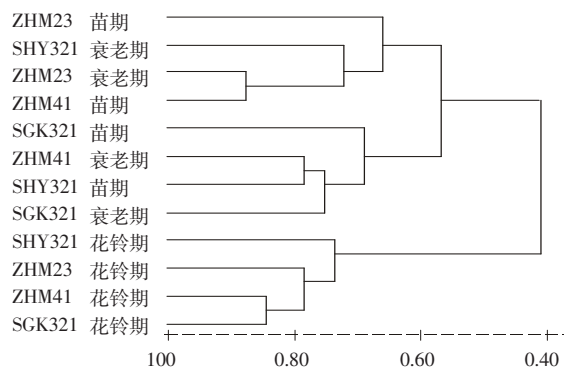


图 2 根际土壤真菌 5.8S ITS PCR-RFLP 图谱相似性聚类图

Figure 2 Dendrogram based on the similarity of PCR-RFLP patterns using clustering analysis

3 讨论

Donegan 等^[11]通过 DNA 指纹分析等发现美国两种 Bt 抗虫棉土壤中的微生物数量、种类和组成与常规棉差异显著。沈法富等^[12]发现在棉花发育的花铃期和吐絮期,Bt 棉根际可培养细菌生理群的总数量比常规棉增加,但年度间和相同的发育时期棉花根际微生物的数量变化趋势一致。Yu 等^[8]研究表明,在棉花生长过程中,8 月 27 日前,石远 321 与 NuCOTN 99B 根际土壤解磷、固氮功能菌差异显著,而生育后期差异不显著,棉花根际 Bt 含量与功能菌的数量相关不显著,推测根际细菌的变化可能是由于不同品种具有不同的根特性,根分泌物所致。裴克全^[13]通过对 16S rDNA 全序列进行分析,也没有发现抗虫棉田与非抗虫棉田间棉根际土壤微生物的多样性有显著的差异。本研究中,相同生育期的棉花根际土壤微生物区系组成的相似性最高,转基因棉根际土壤微生物区系组成的相似性最小(图 1,图 2)。这表明转基因棉花对根际土壤微生物的影响不显著,这与裴克全研究结果一致,棉花生育期是导致根际土壤微生物多样性变化的重要因素。Heuer 等^[14](2002)应用多种方法研究转基因马铃薯对根际土壤细菌的影响时,也发现与土壤类

型、栽培条件等自然因素相比较,转基因马铃薯种植对根际土壤细菌的影响是微小的。

参考文献:

- [1] James C. Global status of commercialized biotech[R]. GM Crops. 2006, ISAAA Briefs, 24: 1-11.
- [2] Joan G E. Effects of exotic plant invasions on soil nutrient cycling processes[J]. *Ecosystems*, 2003, 6(6): 503-523.
- [3] Milling A, Smalla K, Franz X M, et al. Effects of transgenic potatoes with an altered starch composition on the diversity of soil and rhizosphere bacteria and fungi[J]. *plants on soil*, 2005, 266(12): 23-39.
- [4] Brusetti L, Francia P, Bertolini C, et al. Bacterial communities associated with the rhizosphere of transgenic Bt 176 maize (*Zea mays*) and its non-transgenic counterpart[J]. *Plant and Soil*, 2005, 266(12): 11-21.
- [5] Tesfayea M, Dufault N S, Dornbusch M R, et al. Influence of enhanced malate dehydrogenase expression by alfalfa on diversity of rhizobacteria and soil nutrient availability[J]. *Soil Biol Biochem*. 2003; 35, 1103-1113.
- [6] Schmalenberger A, Tebbe C C. Genetic profiling of noncultivated bacteria from the rhizospheres of sugar beet (*Beta vulgaris*) reveal field and annual variability but no effect of transgenic herbicide resistance[J]. *Can J Microbiol*, 2003, 49: 1-8.
- [7] Sessitsch A, Kan F Y, Pfeifer U. Diversity and community structure of culturable *Bacillus* spp. populations in the rhizospheres of transgenic potatoes expressing the lytic peptide cecropin B[J]. *Appl Soil Ecol*, 2003, 22: 149-158.
- [8] Yu K R, Guo X Y. Changes Bt toxin in the rhizosphere of transgenic Bt cotton and its influence on soil functional bacteria [J]. *World journal of microbiology & biotechnology*, 2005, 21: 1279-1284.
- [9] 李长林, 吴建波. 转基因棉花根际土壤 DNA 的提取方法研究 [J]. *微生物学通报*, 2007, 34(4): 65-71.
- LI Chang-lin, WU Jian-bo. Study on DNA extraction method in rhizosphere soil of transgenic cotton[J]. *Microbiology*, 2007, 34(4): 65-71.
- [10] Nei M, Li W H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases[J]. *Proc Natl Acad Sci US*, 1979, 76: 5269-5273.
- [11] Donegan K K, Palm C J, Fieland V J, et al. Changes in levels, species and DNA fingerprinting of soil microorganisms associated with cotton expressing the *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* endotoxin[J]. *Appl Soil Ecol*, 1995, 2: 111-124.
- [12] 沈法富, 韩秀兰, 范术丽. 转 Bt 基因抗虫棉根际微生物区系和细菌生理群多样性的变化[J]. *生态学报*, 2004, 24(3): 432-437.
- SHEN Fa-fu, HAN Xiu-lan, FAN Shu-li. Changes in microbial flora and bacterial physiological group diversity in rhizosphere soil of transgenic Bt cotton[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2004, 24 (3): 432-437.
- [13] 裴克全. 转基因棉根际微生物的生物安全信息及其分子生态学的初步研究 [D]. 博士后工作报告. 北京: 中国科学院植物研究所, 2001.
- PEI Ke-quan. Biosafety information construction and preliminary study of molecular ecology of transgenic cotton rhizospheric microbes[D]. Postdoctoral report. Beijing: Institute of Botany, CAS, 2001.
- [14] Heuer H, Kroppenstedt R M, Lottmann J, et al. Effects of T4 lysozyme release from transgenic potato roots on bacterial rhizosphere communities are negligible relative to natural factors[J]. *Appl Environ Microbiol*. 2002, 68: 1325-1335.

致谢: 本研究主要实验是在南开大学生命科学学院高玉葆教授实验室完成, 谨此感谢!