

DOI: 10.3969/j.issn.2095-1787.2015.01.011

转 *cry1Ie* 基因抗虫玉米对土壤中 细菌群落结构的影响

叶慧香¹, 崔跃原¹, 宋新元², 马 娟¹, 万 虎¹, 李建洪^{1*}

¹华中农业大学植物科学与技术学院, 湖北 武汉 430070; ²吉林省农业科学院,
农业部转基因植物环境安全监督检验检测中心, 吉林 长春 130124

摘要:【背景】土壤微生物是维持土壤生态系统中生物活性的重要组成部分,土壤细菌作为土壤中数量最丰富、分布最广泛的微生物类群,其结构多样性和动态分布对土壤生态系统的稳定具有重要意义。因此,评价转基因作物的安全性必须考虑转基因产物对土壤细菌的影响。【方法】在大田条件下,连续2年以转 *cry1Ie* 基因抗虫玉米和受体对照玉米为研究材料,采用变性梯度凝胶电泳(PCR-DGGE)和磷脂脂肪酸(PLFA)研究转 *cry1Ie* 基因抗虫玉米和受体对照玉米不同生育期根际土壤中细菌群落结构的变化。【结果】PLFA 分析结果显示,2012年,转 *cry1Ie* 基因抗虫玉米和受体对照玉米间微生物总量在拔节期有显著性差异,其他时期无显著性差异;然而,土壤中细菌微生物总量和革兰氏阳性菌与革兰氏阴性菌微生物量比值在检测的4个时期均无显著性差异;其中,革兰氏阳性菌与革兰氏阴性菌比值均大于1。2013年的整个生育期内,转 *cry1Ie* 基因抗虫玉米和受体对照的微生物总量、细菌微生物量、革兰氏阳性菌与革兰氏阴性菌微生物量比值均无显著性差异。DGGE 结果显示,2012年和2013年玉米的4个生育时期内,玉米根际土壤细菌群落结构相对较稳定,同一生育期转 *cry1Ie* 基因抗虫玉米和受体对照玉米间无显著性差异,且根际细菌群落结构相似性均达到较高水平,与 PLFA 检测结果大体一致。【结论与意义】2年的数据均表明,转 *cry1Ie* 基因抗虫玉米对土壤中细菌群落结构无显著性差异,可为转 *cry1Ie* 基因抗虫玉米安全性评价提供理论依据。

关键词: 磷脂脂肪酸分析; 变性梯度凝胶电泳; 根际; 细菌总量; 革兰氏阳性菌与革兰氏阴性菌生物量比值

The effect of transgenic maize with *cry1Ie* gene on rhizosphere bacteria community structure

Hui-xiang YE¹, Yue-yuan CUI¹, Xin-yuan SONG², Juan MA¹, Hu WAN¹, Jian-hong LI^{1*}

¹College of Plant Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hubei 430070, China;

²National Center for Environmental Safety Inspection of Transgenic Plants, Ministry of Agriculture,
Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun, Jilin 130124, China

Abstract:【Background】Soil microbes are an important part for maintaining biological activities. Soil bacteria are diverse, widely distributed and their structural diversity and dynamic distribution are important for the stability of the lithosphere. In this study, the safety of genetically modified crops on soil bacteria was examined.【Method】The community structure of the rhizosphere in fields of transgenic *cry1Ie* maize and its parental non-Bt maize (the control) were measured at different growth stages. This was assessed using culture-independent technique polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE) and Phospholipids fatty acid (PLFA) assays.【Result】PLFA analysis showed that the bacteria biomass and G+/G- of transgenic *cry1Ie* maize and maize receptors control of 2012 had no significant difference at the same growth stage, but significant differences were detected for microbial biomass at different following stages. The values of G+/G- were greater than one, suggesting that at each growth stage, microbial biomass of Gram-positive bacteria was greater than Gram-negative bacteria. During the entire growing period, insect-resistant corn with *cry1Ie* receptor gene control was not a significant different than control corn. It was no significant difference in 2013 in the total amount of microbial and bacterial biomass and the ratio of Gram-positive bacteria and gram-negative bacteria between both

收稿日期(Received): 2014-10-07 接受日期(Accepted): 2014-11-04

基金项目: 转基因生物新品种培育重大专项资助(2011ZX08011-003)

作者简介: 叶慧香,女,硕士研究生。研究方向: 转基因玉米环境安全性评价

* 通讯作者(Author for correspondence), E-mail: jianhl@mail.hzau.edu.cn

corn types. The cluster analysis results showed no remarkable difference in DGGE profile of bacteria at the same growth stage. Corn rhizosphere bacterial community structure was relatively stable and similar in both 2012 and 2013. 【Conclusion and significance】 Two years of data showed that insect-resistant *cry1Ie* transgenic maize had no significant effects on soil bacterial community structure. The study can provide a theoretical basis to evaluate the safety of transgenic maize with *cry1Ie* gene.

Key words: phospholipids fatty acid assay; polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis; rhizosphere; soil bacterial; the value of G+/G-

自 20 世纪 70 年代重组 DNA 技术建立并于 1983 年首次获得转基因植物以来(Lal & Lal, 1991; Zambrysk, 1983), 转基因作物的开发和应用取得了突飞猛进的发展。根据国际农业生物技术应用服务组织(ISA)最新报道, 2013 年全球转基因作物种植面积达 1.75 亿 hm^2 , 较 2012 年增长 3%, 在转基因作物商业化种植的 18 年间, 其种植面积增长了 100 倍(James, 2013)。其中转基因玉米种植面积达 5800 万 hm^2 , 转 *Bt* 玉米种植面积占 1/4。随着转 *Bt* 玉米的长期种植, 其中的 Bt 蛋白可通过根系分泌物、秸秆还田、残茬分解及花粉飘落等方式在土壤中积累和富集, 可能影响土壤微生物区系的组成和结构, 改变微生物的多样性(Fan *et al.*, 2001; Gaughey & Whalon, 1992)。研究发现, Bt 蛋白进入土壤后, 可与土壤粘粒和腐殖酸迅速结合且不易分离, 并可抵抗土壤微生物的降解(Tapp, 1994; Tapp & stotzky, 1998, 1999)。

微生物种类多、生长繁殖快、代谢能力强、对环境影响敏感、与其他生物具有同一套遗传密码, 上述特性决定了微生物是环境中最敏感的指示生物之一(昌艳萍等, 2011), 其活性和群落结构的变化能反映土壤生态系统的质量和健康状况(黎宁等, 2006; Knight *et al.*, 1997; Zelles, 1999)。因此, 研究转基因作物对土壤微生物的影响对转基因作物的安全性具有重要意义。一些学者提出并研究了转基因植物环境释放后土壤微生物群落的变化(Angle, 1994; Jepson *et al.*, 1994), Fang *et al.* (2005) 通过变性梯度凝胶电泳(Denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE) 和 Biolog 分子生物学方法研究发现, 转 *Bt* 基因玉米显著影响土壤微生物群落结构。Liu *et al.* (2008) 应用 DGGE 和末端限制性片段长度多态性(Terminal restriction fragment length polymorphism, T-PRLP) 技术, 通过 3 年的田间试验, 检测了转 *Bt* 基因和非转基因水稻根际细菌、真菌群落多样性, 结果表明, 水稻生育期显著影响根际微生物多样性, 但转 *cry1Ab* 基因水稻对土壤

中细菌、真菌无显著影响。刘丽等(2010)通过随机扩增多态性 DNA(Random amplified polymorphic DNA, RAPD) 分子标记技术结合传统的平板计数培养等方法研究发现, 转抗菌肽 D 烟草可能抑制病原细菌及其根围相关的微生物的繁殖, 但不影响微生物的遗传多样性。李长林等(2008)通过 PCR、T/A 克隆、RFLP 等技术发现, 转基因棉花对根际土壤微生物多样性无影响, 棉花根际土壤微生物区系差异主要受生育期影响。

目前, 国内外研究转 *Bt* 玉米对土壤微生物的影响多数在温室内或人工培养的条件下进行, 田间研究相对较少, 难以真实反映转 *Bt* 玉米与根际微生物间的关系。本研究通过连续 2 年田间试验, 以转 *cry1Ie* 基因抗虫玉米和受体对照玉米为研究材料, 分析和比较了 2 种玉米在同 1 个生育期内以及整个生育期内对土壤细菌的影响, 为研究转 *cry1Ie* 基因抗虫玉米对土壤细菌群落结构影响提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

转 *cry1Ie* 基因抗虫玉米和对照玉米由中国农业科学院提供, 于 2012 年和 2013 年连续 2 年种植。

1.2 试验小区设计

试验地设在中国农业科学院河北省廊坊转基因植物环境安全检测试验基地。基地地势平坦, 小区面积 225 m^2 (15 $\text{m} \times 15 \text{m}$), 随机区组排列, 小区间设有 1 m 走道和 3 m 保护行。试验设 3 次重复。常规耕作管理, 整个生育期内不使用杀虫剂。

1.3 样品采集

在玉米的播种前期、拔节期、抽丝期和成熟期分别采集土壤样品。播种前取地表下 15~20 cm 土壤; 其他各时期以抖落法取根际土壤(Watrud & Seidler, 1998)。每个小区采用 S 型取样法选取 6 点, 剔除土表杂物, 每点分别取土样约 300 g (若因单株的根系抖落法难以取到 300 g, 可在每点同时

取几棵植株的混合土壤作为样本)。取样后立即分样放入冰盒中并储存于实验室。土样平均分成 2 份,一份储存于 4 ℃ 冰箱用于 PCR-DGGE 检测,另一份储存于 -80 ℃ 用于测定 PLFA。

1.4 土壤总 DNA 的提取

采用 Soil DNA Kit 试剂盒 (Omega 公司),分别称取混合好的土样 0.5 g,按照操作说明书进行提取,土壤 DNA 经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测样品质量后置于 -20 ℃ 保存备用。

1.5 土壤总 DNA 的聚合酶链式反应 (PCR)

采用巢式 PCR 扩增细菌 16S rRNA V3 区,第 1 次 PCR 所用引物 P0 (5'-GAGAGTTTGATCCTGGCT-CAG-3') 和反向引物 P6 (5'-CTACGGCTACCTTGT-TACGA-3'),片段长度 1500 bp,第 2 次 PCR 所用引物 338F (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3') 和反向引物 518R (5'-ATTACCGCGGCTG5'CTGG-3'),在正向引物的 5' 端添加 “GC-clamp” (5'-CGCCCGC-CGCGCGCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGCCCCGGGGG-3') (Hare *et al.*, 2005; Thompson *et al.*, 2002),片段长度 230 bp。50 μL 的 PCR 反应体系: 0.25 μL Ex Tag polymerase, 5 μL 10×PCR Buffer (Mg²⁺ Plus), 4 μL dNTP Mixture (各 2.5 mmol · L⁻¹), 引物 (20 μmol · L⁻¹) 各 1 μL,第 1 次 PCR 所用模板为 DNA 1 μL,第 2 次 PCR 所用模板为第 1 次 PCR 产物 1 μL,无菌超纯水补足 50 μL。PCR 采用 touch-down 扩增程序: 94 ℃ 预变性 5 min, 94 ℃ 变性 1 min, 68 ℃ 退火 1 min, 依次每个循环降 1 ℃, 72 ℃ 延伸 2 min, 共 10 个循环; 94 ℃ 变性 1 min, 58 ℃ 退火 1 min, 72 ℃ 延伸 2 min, 共 20 个循环, 72 ℃ 延伸 10 min。

1.6 16S rDNA V3 区 DGGE 检测

采用 Bio-Rad DGGE 电泳系统,配制聚丙烯酰胺 (37.5 : 1) 浓度 8%、变性剂浓度分别为 0% 和 100% 的胶,借助旋转进样器配制成梯度浓度为 40%~60% 的胶,并插入梳子,凝胶 3~4 h (可在空调下加热加速凝胶),同时预热缓冲液 1×TAE (Tris-Ace-tata-EDTA) 到 60 ℃ 以上 (周小奇等, 2007)。将纯化后的 16S rDNA V3 区 PCR 产物 20 μL 点样,电泳温度 60 ℃, 200 V 电泳 5 min,待样品进入凝胶后 60 V 电泳 16 h。电泳结束后,凝胶加入固定液 (10% 乙醇, 0.5% 冰乙酸) 固定 15 min,蒸馏水漂洗 3 次;加入染色液 (0.2% 硝酸银, 0.1% 甲醛) 银染 15 min,

蒸馏水漂洗 3 次;加入显色液 (15% 氢氧化钠, 0.5% 甲醛) 显色 10 min 并摄像 (梁宏伟等, 2008) 得到 DGGE 图谱。

1.7 PLFA 分析

取 8 g 土样,利用 FAMEs 法进行提取,将含有磷脂的提取液过柱分析,并将得到的磷脂甲酯化处理,以酯化 C19 : 0 为内标,Agilent6890 气相色谱仪检测分析,PLFA 的鉴定采用 Sherlock MIS 4.5 系统 (Bligh & Dyer, 1959; Bossio *et al.*, 1998; Frostegård *et al.*, 2010)。

1.8 数据分析

采用 Sigmaplot 12.0 和 SPSS19.0 软件对试验数据进行方差分析 (LSD 法)。DGGE 指纹图谱应用 Quantity One 软件分析,构建聚类树状图。应用 SAS 18 进行主成分分析。

2 结果与分析

2.1 玉米根际土壤微生物的磷脂脂肪酸分析

2.1.1 玉米根际微生物磷脂脂肪酸含量及组成
对 2 年的玉米根际微生物总磷脂脂肪酸分析表明,2012 年共分离了 27 种碳链长度在 14~22 的 PLFAs,转 *cry1Ie* 基因抗虫玉米和对照根际 PLFA 总量均呈现先降低后升高再降低的趋势,在播前期、抽丝期和成熟期,转 *cry1Ie* 基因抗虫玉米和对照玉米土壤总微生物量无显著差异,但在拔节期显著低于对照 31.56% (图 1A)。2013 年共分离出了 51 种碳链长度在 14~22 的 PLFAs,转 *cry1Ie* 基因抗虫玉米和对照玉米的主峰相似,在整个生育期内,两者的间根际土壤总 PLFA 含量变化趋势与 2012 年一致,但在拔节期,两者无显著差异,且转 *cry1Ie* 基因抗虫玉米 PLFA 含量均高于对照玉米 (图 1B)。

2.1.2 土壤细菌 PLFA 总量分析
2012 年细菌微生物量变化趋势与总微生物量变化趋势一致,最低值均出现在拔节期,且拔节期的转 *cry1Ie* 基因抗虫玉米细菌生物量低于对照,但差异不显著。选取的代表细菌生物量指标: 14 : 0 iso, 15 : 1 iso G, 15 : 0 iso, 15 : 0 anteiso, 15 : 00, 16 : 1 iso G, C16 N alcohol, 16 : 0 iso, 16 : 1 ω9c, 16 : 1 ω7c, 16 : 1 ω5c, 16 : 00, iso 17 : 1G, 17 : 0 iso, 17 : 0 anteiso, 17 : 1 ω8c, 17 : 0 cyclo, 16 : 1 2OH, 18 : 1 ω5c, 18 : 00, 19 : 1 (ω8?) alcohol, 19 : 0 cyclo c1-12, 21 : 1 ω3c。革兰氏阳性菌通过 PLFA 总含量估算: 14 : 0 iso, 15 : 1 iso G, 15

: 0 iso, 15 : 0 anteiso, 16 : 1 iso G, 16 : 0 iso, iso 17 : 1G, 17 : 0 iso, 17 : 0 anteiso。革兰氏阴性菌通过以下指标估算: C 16N alcohol, 16 : 1 ω5c, 16 : 1 ω9c, 16 : 1 ω7c, 17 : 1 ω8c, 17 : 0 cyclo, 16 : 1 20H, 18 : 1 ω5c, 19 : 1 (ω8?) alcohol, 19 : 0 cyclo c1-12, 21 : 1 ω3c (Fang *et al.*, 2000; Yu *et al.*, 2009)。在除拔节期外的整个生育期内, 转 *cry1Ie* 基因抗虫玉米的细菌生物量高于对照, 但无显著差异 (图 2A)。在拔节期, 转 *cry1Ie* 基因玉米根际土壤中革兰氏阳性细菌的比例较低, 在抽丝期, 转 *cry1Ie* 基因玉米 G+/G- 比值较高, 但差异未达到显著水平 (图 3A)。2013 年转 *cry1Ie* 基因玉米和对照根际土壤细菌生物量以及 G+/G- 比值见图 2B 和图 3B。2013 年的细菌生物量通过 12 : 00, 13 : 0 iso, 14 : 1 iso E, 12 : 0 30H, 14 : 1 ω5c, 14 : 00, 15 : 1 iso G, 15 : 1 anteiso A, 5 : 0 iso, 15 : 0 anteiso, 15 : 00, 16 : 0 N alcohol, 16 : 0 iso, 16 : 0 anteiso, 16 : 1 ω5c, 16 : 00, 15 : 0 iso 30H, 17 : 0 iso, 17 : 0 anteiso, 17 : 1 ω8c, 17 : 0 cy-

clo, 17 : 00, 16 : 0 20H, 18 : 1 ω5c, 18 : 00, 19 : 0 iso, 19 : 0 cyclo ω8c, 18 : 1 20H, 20 : 1 ω9c, 20 : 00, 16 : 1 ω6c, 17 : 1 iso I, 18 : 1 ω8c 来估算。革兰氏阳性菌通过以下 PLFA 总含量估算: 12 : 00, 13 : 0 iso, 14 : 1 iso E, 14 : 0 iso, 16 : 0 iso, 16 : 0 anteiso, 16 : 00, 17 : 0 iso, 17 : 0 anteiso, 17 : 00, 18 : 00, 19 : 0 iso, 20 : 00, 17 : 1 iso I。革兰氏阴性菌通过以下 PLFA 的总含量估算: 12 : 0 30H, 14 : 1 ω5c, 16 : 0 N alcohol, 16 : 1 ω5c, 15 : 0 iso 30H, 17 : 1 ω8c, 17 : 0 cyclo, 16 : 0 20H, 18 : 1 ω5c, 19 : 0 cyclo ω8c, 18 : 1 20H, 20 : 1 ω9c, 16 : 1 ω6c, 18 : 1 ω6c (Fang *et al.*, 2000; Yu *et al.*, 2009)。2013 年玉米的细菌 PLFA 总含量和 G+/G- 比值变化趋势与 2012 年变化趋势相一致, 均为先减少后升高再减少, 细菌 PLFA 总含量在拔节期最低, G+/G- 比值在成熟期最低 (图 2B)。在播前期和拔节期, 转 *cry1Ie* 基因玉米的比值均小于对照, 但在抽丝期和成熟期, 转 *cry1Ie* 基因玉米的比值高于对照, 但二者也无显著差异 (图 3B)。

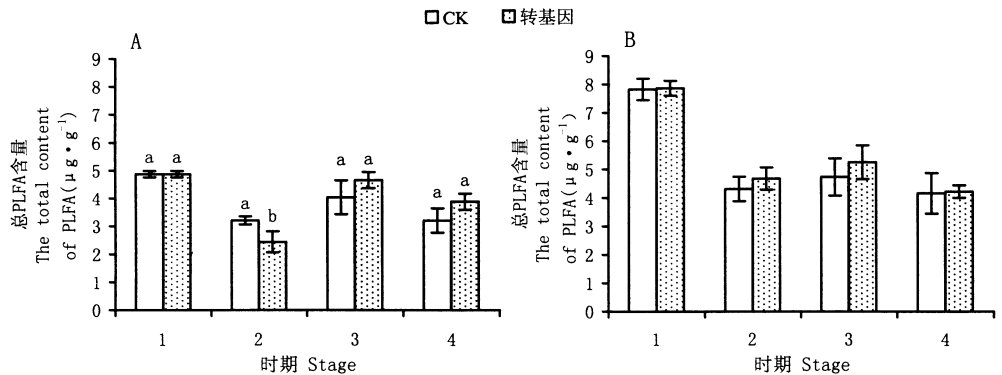


图 1 2 年中转 *cry1Ie* 基因抗虫玉米和对照对根际土壤磷脂脂肪酸 (PLFA) 的影响

Fig.1 Effect of transgenic *cry1Ie* gene insect-resistant maize and the control maize on soil PLFA content in both 2012 and 2013
A. 2012 年; B. 2013 年。1: 播前期; 2: 拔节期; 3: 抽丝期; 4: 成熟期。
A. 2012; B. 2013. 1: Pre-seed stage; 2: Joint stage; 3: Ladder stage; 4: Mature stage.

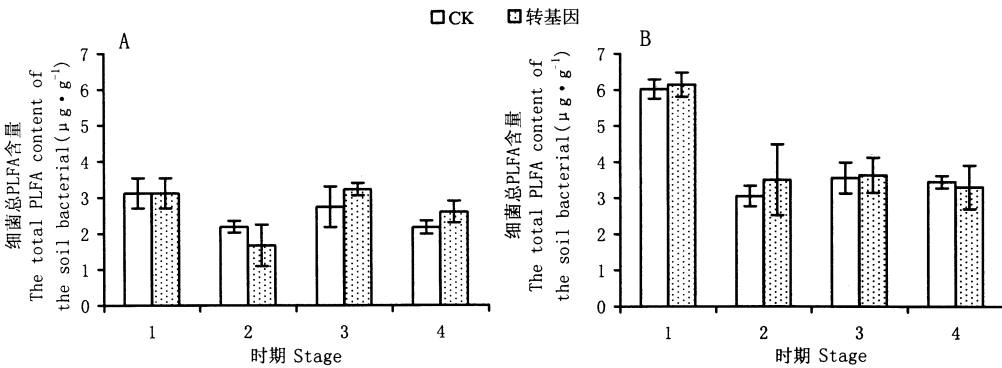


图 2 2 年转 *cry1Ie* 基因抗虫玉米和对照对根际土壤细菌微生物量的变化

Fig.2 The PLFAs dynamics of soil bacteria of transgenic *cry1Ie* gene insect-resistant maize and control maize in 2012 and 2013
A. 2012 年; B. 2013 年。1: 播前期; 2: 拔节期; 3: 抽丝期; 4: 成熟期。
A. 2012; B. 2013. 1: Pre-seed stage; 2: Joint stage; 3: Ladder stage; 4: Mature stage.

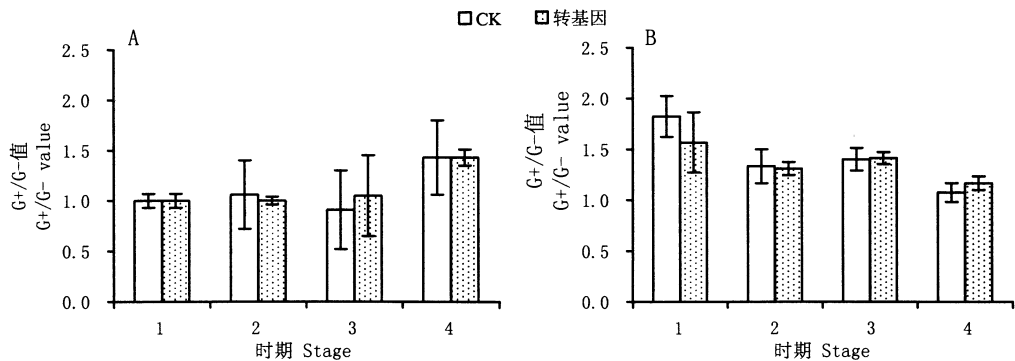


图 3 2 年转 *cry1Ie* 基因抗虫玉米和对照对根际土壤革兰氏阳性菌/革兰氏阴性菌动态变化

Fig. 3 Temporal variation of soil G+/G- in transgenic *cry1Ie* gene insect-resistant maize and control maize fields in 2012 and 2013

A.2012 年;B.2013 年。1:播前期;2:拔节期;3:抽丝期;4:成熟期。

A. 2012; B. 2013. 1: Pre-seed stage; 2: Joint stage; 3: Ladder stage; 4: Mature stage.

2.1.3 土壤微生物群落结构 2012 年 PCA 分析结果表明,与微生物 PLFA 生物标记多样性相关的主成分 1 和主成分 2 分别解释变量方差的 73.51%和 16.96%(图 4)。不同生育期的 PLFA 在图中各占不同的空间,表明不同生育期玉米根际土壤微生物群落组成差异较大。同一时期,转 *cry1Ie* 基因抗虫玉米和对照分布较集中,说明 2 种玉米的根际土壤

微生物群落结构较相似(图 4)。2013 年主成分 1 解释变量方差的 69.37%,主成分 2 解释变量方差的 15.84%,播前期玉米的 PLFA 在图中与其他 3 个时期相距较远,表明播前期玉米根际土壤微生物群落组成与其他 3 个时期相差较大,同一时期,转 *cry1Ie* 基因抗虫玉米和对照在图中分布较集中,说明两者的根际土壤微生物群落结构无显著差异(图 5)。

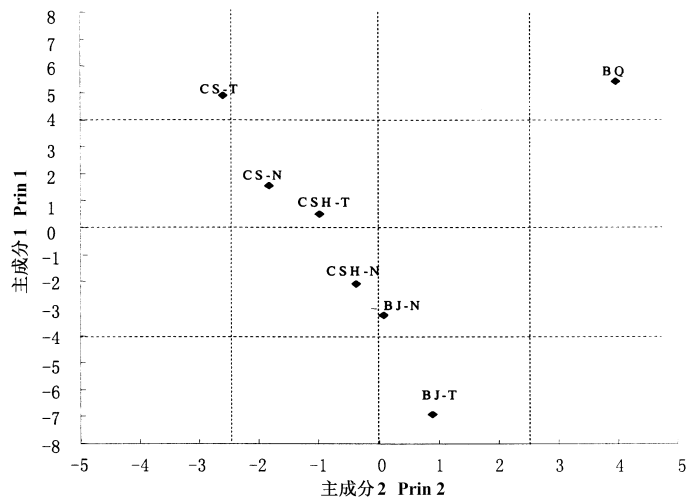


图 4 2012 年转 *cry1Ie* 基因抗虫玉米和对照对根际土壤磷脂脂肪酸 (PLFA) 主成分分析

Fig.4 The principal component analysis of transgenic *cry1Ie* gene insect-resistant maize and control maize in 2012

BQ:播前期;BJ-T:拔节期转基因玉米;BJ-N:拔节期非转基因玉米;CS-T:抽丝期转基因玉米;CS-N:抽丝期非转基因玉米;

CSH-T:成熟期转基因玉米;CSH-N:成熟期非转基因玉米。

BQ: Pre-seed stage; BJ-T: Transgenic maize in joint stage; BJ-N: Non-transgenic maize in joint stage; CS-T: Transgenic maize in ladder stage;

CS-N: Non-transgenic maize in ladder stage; CSH-T: Transgenic maize in mature stage; CSH-N: Non-transgenic maize in mature stage.

2.2 玉米根际土壤微生物 DGGE 分析

16S rDNA V3 区 DGGE 图谱显示了转 *cry1Ie* 基因抗虫玉米和对照在不同时期根部土壤的细菌群落结构组成(图 6~7)。2012 年,播前期二者相似性高达 100%,拔节期 86%,抽丝期 83%,成熟期 86%(图 6);2013 年,播前期转 *cry1Ie* 基因玉米和对照根际细

菌群落结构相似性为 99%,拔节期 95%,抽丝期和成熟期均高达 96%(图 7)。因此,在同一时期内二者的土壤样品细菌群落结构组成相似性较高,在整个生育期内,细菌群落结构组成比较稳定。2 年结果均显示土壤中细菌菌群类别丰富,且同一年的玉米整个生育期内所有优势种群均未发生较大变化。

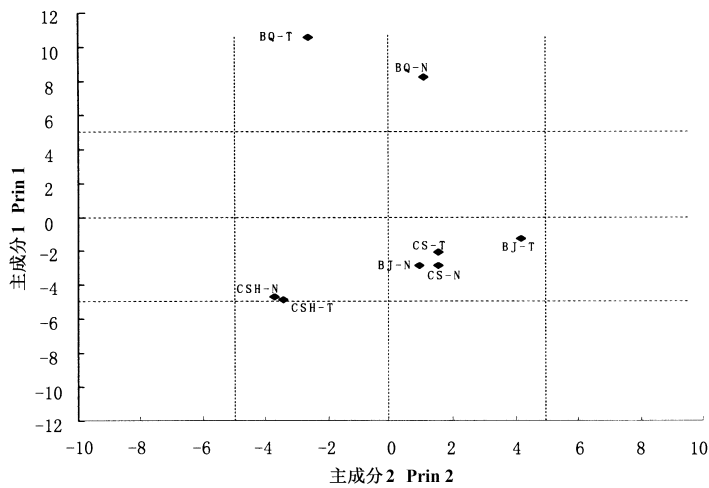


图 5 2013 年转 *cry1Ie* 基因抗虫玉米和对照根际土壤磷脂脂肪酸 (PLFA) 主成分分析

Fig.5 The principal component analysis of transgenic *cry1Ie* gene insect-resistant maize and control maize in 2013

BQ:播前期;BJ-T:拔节期转基因玉米;BJ-N:拔节期非转基因玉米;CS-T:抽丝期转基因玉米;CS-N:抽丝期非转基因玉米;
CSH-T:成熟期转基因玉米;CSH-N:成熟期非转基因玉米。
BQ: Pre-seed stage; BJ-T: Transgenic maize in joint stage; BJ-N: Non-transgenic maize in joint stage; CS-T: Transgenic maize in ladder stage;
CS-N: Non-transgenic maize in ladder stage; CSH-T: Transgenic maize in mature stage; CSH-N: Non-transgenic maize in mature stage.

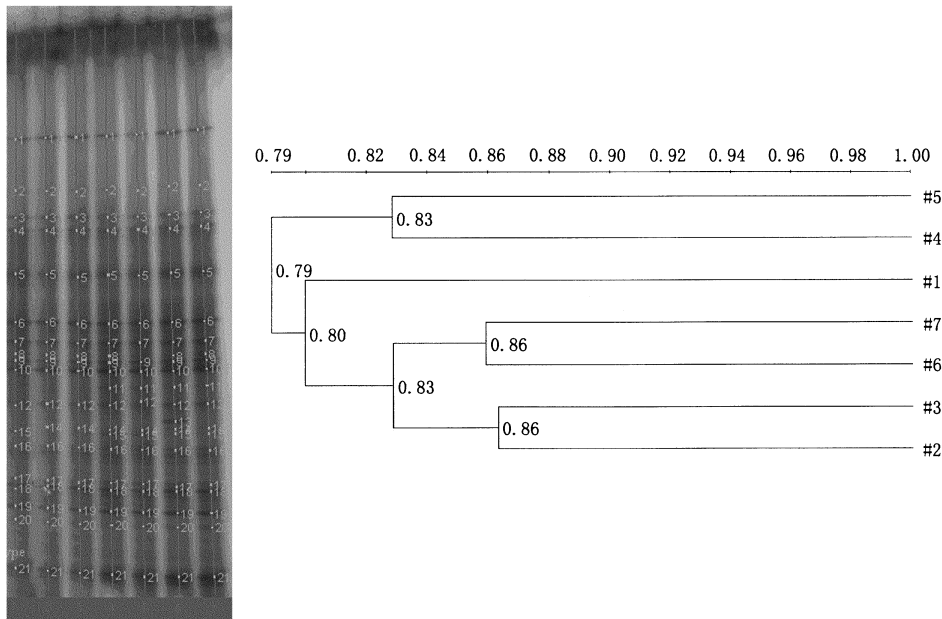


图 6 2012 年转 *cry1Ie* 基因抗虫玉米和对照 DGGE 图谱分析结果

Fig.6 The DGGE profile of transgenic *cry1Ie* gene insect-resistant maize and control in 2012

1:播前期;2:拔节期转基因玉米;3:拔节期对照玉米;4:抽丝期转基因玉米;5:抽丝期对照;6:成熟期转基因玉米;7:成熟期对照玉米。
1: Pre-seed stage; 2: Transgenic maize in joint stage; 3: Control maize in joint stage; 4: Transgenic maize in ladder stage;
5: Control maize in ladder stage; 6: Transgenic maize in mature stage; 7: Control maize in mature stage.

3 讨论

土壤微生物是维持土壤生态系统中生物活性的重要组成部分(Wardle *et al.*, 2004),土壤细菌作为土壤中数量最丰富、分布最广泛的微生物类群,其结构多样性和动态分布对土壤生态系统的稳定具有重要意义。因此,评价转基因作物的安全性必须考虑转基因作物对土壤细菌的影响。

在本研究中,2012 年,除了在拔节期转 *cry1Ie* 基因抗虫玉米土壤 PLFA 总量较对照玉米显著降低以外,在其他同一时期二者均无显著差异。出现差异的可能原因是在第 1 年玉米种植时,有些植物残体进入土壤生态系统,在拔节期造成土壤微生物群体结构产生一些变化,造成二者之间出现差异,还有待进一步深入研究。细菌微生物量以及

G+/G-比值在同一生育期内,转 *cry1Ie* 基因抗虫玉米和对照玉米均未出现显著差异。2013 年的研究结果表明,同一时期内,转 *cry1Ie* 基因抗虫玉米和对照玉米的总 PLFA 量、细菌微生物量以及 G+/G-比值均无显著差异。且 2 年的结果均表明,在不同生育期内玉米根际土壤微生物群落结构差异也不显著。Kai *et al.*(2005)利用 PLFA 技术,以转 *Bt* 基因玉米和转 *Bt* 基因马铃薯为材料进行研究,结果

表明,转基因作物提高了细菌 PLFA 含量,但二者之间差异不显著,G+/G-比值也无显著差异。Kim *et al.*(2008)研究 2 个抗草甘膦转基因水稻品系 Ik-san 483 和 Milyang 204 对根部土壤细菌群落影响,发现转基因水稻和非转基因水稻根部细菌群落也无明显差异。刘微等(2011)研究表明,各个生育期,转 *Bt* 基因水稻的种植没有造成根际土壤细菌、真菌、放线菌磷脂脂肪酸含量发生显著改变。

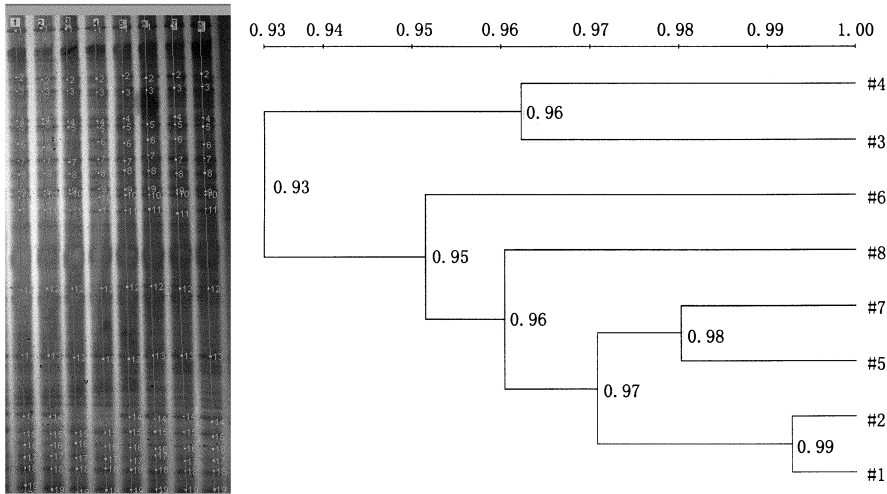


图 7 2013 年转 *cry1Ie* 基因抗虫玉米和对照玉米 DGGE 图谱分析结果

Fig.7 The DGGE profile of transgenic *cry1Ie* gene insect-resistant maize and control maize in 2013

1:播前期转基因玉米;2:播前期对照玉米;3:拔节期转基因玉米;4:拔节期对照玉米;5:抽丝期转基因玉米;
6:抽丝期对照玉米;7:成熟期转基因玉米;8:成熟期对照玉米。

1: Transgenic maize in pre-seed stage; 2: Control maize in pre-seed stage; 3: Transgenic maize in joint stage; 4: Control maize in joint stage;
5: Transgenic maize in ladder stage; 6: Control maize in ladder stage; 7: Transgenic maize in mature stage; 8: Control maize in mature stage.

关于 PLFA 方法也存在一些争议,如环境温度以及营养元素可能会影响结果,另外土壤中的植物组织也可能含有与微生物相同的脂肪酸(张洪勋等,2003)。本文同时采用 PCR-DGGE 技术来探讨土壤细菌微生物群落结构以揭示转 *cry1Ie* 基因抗虫玉米对根际微生物的影响。2 年的 DGGE 结果均显示,在同一玉米生育期,转 *cry1Ie* 基因抗虫玉米和对照玉米细菌群落结构相似性均很高。邹雨坤等(2011)和刘玲等(2012)利用 DGGE 技术分析转 *Bt* 基因玉米对土壤细菌群落的影响,结果无显著差异;Liu *et al.*(2008)用 PCR-DGGE 在分析转 *Bt* 基因水稻对酶活性和微生物区系组成影响时指出,转 *Bt* 基因水稻与亲本之间无显著性差异,不同生育期土壤细菌群落结构变化也较稳定。本研究以 PLFA 法和 DGGE 法分析了转 *cry1Ie* 基因抗虫玉米对土壤微生物群落结构的影响,与 PLFA 研究结果基本一致,2 种方法均表明转 *cry1Ie* 基因抗虫玉米

对土壤微生物群落结构无明显影响。

参考文献

昌艳萍, 杨亮, 李春青, 王华芳. 2011. 转基因植物对环境微生物的影响及其检测技术的研究进展. 河北大学学报: 自然科学版, 31(3): 331-336.

樊龙江, 周雪平, 胡秉民, 石春海, 吴建国. 2001. 转基因植物的基因漂流风险. 应用生态学报, 12(4): 630-632.

李长林, 张欣, 吴建波, 刘惠芬. 2008. 转基因棉花对根际土壤微生物多样性的影响. 农业环境科学学报, 27(5): 1857-1859.

梁宏伟, 长忠, 李忠, 罗相忠, 邹桂伟. 2008. 聚丙烯酰胺凝胶快速、高效银染方法的建立. 遗传, 30(10): 1379-1382.

黎宁, 李华兴, 朱凤娇, 刘远金, 邝培锐. 2006. 菜园土壤微生物生态特征与土壤理化性质的关系. 应用生态学报, 17(2): 285- 290.

刘丽, 鲁国东, 唐乐尘, 周杰珑, 王宗华. 2010. 转抗菌肽 D 烟草对土壤微生物群落的影响. 生态学报, 30(2): 364-370.

刘微, 王树涛, 陈英旭, 吴伟祥, 王璟. 2011. 转 *Bt* 基因水

- 稻根际土壤微生物多样性的磷脂脂肪酸 (PLFAs) 表征. 应用生态学报, 22(3): 727-733.
- 刘玲, 赵建宁, 李刚, 杨殿林, 王生荣, 娜布其, 娜日苏. 2012. 转 Bt 玉米对土壤酶活性及速效养分的影响. 土壤, 44(1): 167-171.
- 张洪勋, 王晓谊, 齐鸿雁. 2003. 微生物生态学研究方法进展. 生态学报, 23(5): 988-995.
- 周小奇, 王艳芬, 蔡莹, 黄祥忠, 郝彦宾, 田建卿, 柴团耀. 2007. 内蒙古典型草原细菌群落结构的 PCR-DGGE 检测. 生态学报, 27(5): 1684-1689.
- 邹雨坤, 张静妮, 杨殿林, 陈秀蓉. 2011. 转 Bt 基因玉米对根际土壤细菌群落结构的影响. 生态学杂志, 30(1): 98-105.
- Angle J S. 1994. Release of transgenic plants: biodiversity and population level considerations. *Molecular Ecology*, 3: 45-50.
- Bligh E G and Dyer W J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37: 911-917.
- Bossio D A, Scow K M and Gunapala N. 1998. Determinants of soil microbial communities: effects of agricultural management, season, and soil type on Phospholipid Fatty Acid Profiles. *Microbiology Ecology*, 36: 1-12.
- Fang M, Kremer R J, Motavalli P P and Davis G. 2005. Bacterial diversity in rhizospheres of nontransgenic and transgenic corn. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 4132-4136.
- Fang J, Barcelona M J and Alvarez P J. 2000. A direct comparison between fatty acid and intact phospholipid profiling for microbial identification. *Organic Geochemistry*, 31: 881-887.
- Frostegård Å, Tunlid A and Bååth E. 2010. Use and misuse of PLFA measurements in soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 40: 1-5.
- Hare C E, Demir E and Coyne K J. 2005. A bacterium that inhibits the growth of *Pfiesteria piscicida* and other dinoflagellates. *Harmful Algae*, 4: 221-234.
- James C. 2013. Global status of commercialized Biotech/GM crops. ISAAA Brief No. 42, ISAAA: Ithaca, NY.
- Jepson P C, Croft B A and Prattg E. 1994. Test systems to determine the ecological risks posed by toxin release from *Bacillus thuringiensis* Genes in crop plants. *Molecular Ecology*, 3: 81-89.
- Kim M C, Ahn J H, Shin H C, Kim T, Ryu T H, Kim D H, Song H G, Lee G H and Ka J O. 2008. Molecular analysis of bacterial community structures in paddy soils for environmental risk assessment with two varieties of genetically modified rice, Iksan 483 and Milyang 204. *Journal of Microbiol Biotechnol*, 18: 207-218.
- Knight B P, McGrath S P and Chaudri A M. 1997. Biomass carbon measurements and substrate utilization patterns of microbial populations from soil amended with cadmium, copper, or zinc. *Applied and Environmental Microbiology*, 63: 39-43.
- Lal R and Lal S. 1993. *Genetic Engineering of Plants for Crop Improvement*. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Liu W, Lu H H, Wu W X, Wei Q K, Chen Y X and Thies J E. 2008. Transgenic Bt rice does not affect enzyme activities and microbial composition in the rhizosphere during crop development. *Soil Biology and Biochemistry*, 40: 475-486.
- McGaughey W H and Whalon M E. 1992. Managing insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin. *Science*, 258: 1451-1455.
- Tapp H, Calamai L and Stotzky G. 1994. Adsorption and binding of the insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* and subsp. *tenbriones* on clay minerals. *Soil Biology and Biochemistry*, 26: 663-679.
- Tapp H and Stotzky G. 1999. Insecticidal activity of the toxins from *Bacillus thuringiensis* subspecies *kurstaki* and *tenebrionis* adsorbed and bound on pure and soil clays. *Applied and Environmental Microbiology*, 61: 1786-1790.
- Tapp H and Stotzky G. 1998. Persistence of the insecticidal toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *Kurstaki* in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 30: 471-476.
- Thompson J R, Marcelino L A and Polzm F. 2002. Heteroduplexes in mixed-template amplifications: formation, consequence and elimination by reconditioning PCR. *Nucleic Acids Research*, 30: 2083-2088.
- Watrud L S and Seidler R J. 1998. Nontarget ecological effects of plant, microbial, and chemical introductions to terrestrial systems // *Soil Chemistry and Ecosystem Health Special Publication* 52. Soil Science Society of America Madison: Wisconsin, 313-340.
- Wardle D A, Bardgett R D, Klironomos J N, Setälä H, Putten W H and Wall D H. 2004. Ecological linkages between aboveground and belowground biota. *Science*, 304: 1629-1633.
- Xue K, Luo H F, Qi H Y and Zhang H X. 2005. Changes in soil microbial community structure associated with two types of genetically engineered plants analyzed by PLFA. *Environment Science*, 17: 130-134.
- Yu M, Zeng G M and Chen Y N. 2009. Microbial communities responsible for the solid-state fermentation of rice straw estimated by phospholipid fatty acid (PLFA) analysis. *Process Biochemistry*, 44: 17-22.
- Zambryske P. Tiplasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regulation capacity. 1983. *EMBO Journal*, 2: 21-431.
- Zelles L. 1999. Fatty acid patterns of phospholipids and lipopolysaccharides in the characterization of microbial communities in soil: A review. *Biology and Fertility of Soils*, 29: 111-129.