

抗草甘膦转基因大豆对根际土壤细菌多样性的影响

李刚,赵建宁,杨殿林

(农业部环境保护科研监测所,农业部转基因生物生态环境安全监督检验测试中心,天津 300191)

摘要:采用 DGGE-cloning 测序技术研究抗草甘膦转基因大豆在生长期对根际土壤细菌多样性的影响。结果分析表明,不同生长期内抗草甘膦转基因大豆与非转基因大豆根际土壤细菌 16S rDNA DGGE 指纹图谱谱形相似,仅在出苗期和鼓粒期出现两条差异带,分别属于芽单胞菌门(Uncultured *Gemmatimonadetes* bacterium clone, 缺失)和壁厚菌门(Uncultured *Firmicutes* bacterium clone GASP-KC3W1_H04, 增加);不同生长期内抗草甘膦转基因大豆与非转基因大豆根际土壤细菌 16S rDNA DGGE 指纹图谱的多样性指数和均匀度指数无显著差异。因此,抗草甘膦转基因大豆对土壤细菌多样性无显著影响。

关键词:抗草甘膦转基因大豆;根际土壤;细菌多样性;DGGE-cloning 测序技术

中图分类号:S154.36

文献标志码:A

论文编号:2010-2048

Effects of Glyphosate Resistant Transgenic Soybean on Bacterial Diversity in Rhizospheric Soil

Li Gang, Zhao Jianing, Yang Dianlin

(Ecological Environment Safety Supervision, Inspection and Testing Center of GMOs,

Agro-Environmental Protection Institute, Ministry of Agriculture, Tianjin 300191)

Abstract: DGGE-cloning sequencing method was chosen to study the effects of the planting of glyphosate resistant transgenic soybean (Roundup Ready Soybean, RRS) on bacterial diversity in the rhizospheric soil during the growing period. The results showed that the rhizospheric bacterial 16S rDNA DGGE fingerprintings between glyphosate resistant transgenic soybean and non-transgenic soybean were similar within different growing stages, with only two different bands in the stages of emerging and feed filling, the two bands belonged to uncultured *Gemmatimonadetes* bacterium clone (vanished) and uncultured *Firmicutes* bacterium clone GASP-KC3W1_H04 (appeared) respectively; the diversity index and evenness index of 16S rDNA DGGE fingerprintings between glyphosate resistant transgenic soybean and non-transgenic soybean were with no significant differences. The glyphosate resistant transgenic soybean had no significant effects on the soil bacteria.

Key words: glyphosate resistant transgenic soybean; rhizospheric soil; bacterial diversity; DGGE-cloning sequencing method

0 引言

近年来,全球农业生物技术产业取得了巨大发展,转基因作物种植面积逐年上升。2009年,全球有25个国家种植转基因作物,主要集中在美国、阿根廷和巴

西,种植总面积达到1.34亿公顷。转基因大豆为主要种植的转基因作物,2009年种植面积达到6920万公顷,占全世界转基因作物种植面积的52%,其中以抗草甘膦转基因大豆(Roundup Ready Soybean, RRS)种植

基金项目:转基因生物新品种培育重大专项课题(2008ZX08012-004);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)资助项目。

第一作者简介:李刚,男,1981年出生,辽宁辽阳人,硕士,研究实习员,主要从事生物多样性与生物安全研究,E-mail: gangli1981@gmail.com。

通讯作者:杨殿林,男,博士,研究员,主要从事生物多样性与生态农业研究,通信地址:300191天津市南开区复康路31号农业部环境保护科研监测所,Tel: 022-23003120, E-mail: dianlinyang@yahoo.com。

收稿日期:2010-07-07, **修回日期:**2010-7-20。

为主^[1]。

抗草甘膦转基因大豆由美国孟山都公司于1994年推出,1996年正式上市。抗草甘膦转基因大豆是通过农杆菌介导方法,将矮牵牛Ti质粒(CaMy)中35S启动子控制epsps基因导入到大豆植株,培育成的新大豆品种^[3],其含有的4个来源于土壤细菌(*Agrobacterium spp.* CP4)的5-烯醇丙酮莽草酸-3-磷酸合成酶(epsps)基因,是草甘膦抗性的主要来源^[4]。抗草甘膦转基因大豆的种植可以大大降低大豆生产成本,在关注抗草甘膦转基因大豆所带来的巨大社会、经济和生态效益的同时,其安全性问题也引起了世界范围内的广泛关注。

土壤微生物是土壤中重要而又活跃的部分,它通过参与土壤有机质积累、矿化过程,影响土壤养分循环及其有效性,对植物生长有重要的作用,其多样性和活性是保持农业生态系统稳定的基础。目前,针对抗草甘膦转基因大豆的研究主要集中在抗性基因成分、含量及营养成分等检测新方法的开发,如新型荧光定量PCR检测方法^[2,5]、PNA探针检测法^[6-7]、CE-ECL^[8]、LAMP^[9-10]、芯片检测法^[11-12]、质谱检测法^[13]、GC/MS^[14]等,在环境安全方面主要研究抗性基因漂移^[15],土壤中抗性基因降解特性^[16-17],抗草甘膦转基因大豆种植对节肢动物的影响^[18-19],及以抗草甘膦转基因大豆为饲料对鱼类代谢影响^[20-21]等方面,国际上研究抗草甘膦转基因大豆对根际土壤微生物影响的报道较少,在中国仅在北方一年一熟春大豆栽培区进行研究,而未见在其他大豆主要栽培区的相关报道。

此研究以黄淮流域夏大豆栽培区为代表的山东省为研究地点,采用DGGE-cloing测序技术,研究抗草甘膦转基因大豆在生长期对根际土壤细菌多样性的影响,以期对转基因大豆生物安全性评价提供基础研究资料。

1 材料和方法

1.1 供试土壤

研究地点位于山东省农业科学院植物保护研究所试验基地(36°42'59.32" N; 117°05'06.41" E),属于中国五大大豆栽培区之一的黄淮流域夏大豆栽培区,气候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°C。供试土壤为褐土,部分理化性质如下:有机质含量22.09 g/kg,碱解氮含量32.44 mg/kg,速效磷含量9.82 mg/kg,速效钾含量90.56 mg/kg,阳离子交换量7.211 cmol/kg,pH值为8.3。

1.2 试验设计及样品采集

试验始于2009年,随机区组设计,设抗草甘膦转基因大豆(GTS-40-3-2)和非转基因大豆(荷豆12)2个

处理,各重复3次。小区面积20 m×20 m,各品种按照行距20 cm均匀撒播。大豆生长过程中不施用农药和化肥,其它按常规管理。

大豆于2009年6月5日播种,2009年11月22日收获,在大豆的不同生长期(即出苗期、幼苗期、开花结荚期、鼓粒期和成熟期)采集根际土壤样品。每个试验区随机取25株植株,采用抖落法收集根际土壤并混匀,作为1个土壤样品。土壤样品装入灭菌封口袋中做好标记,放于低温冰盒中带回实验室,于-70°C冰箱中保存。

1.3 土壤细菌多样性分析

1.3.1 土壤DNA提取 采用BBI公司的EZ-10 Spin Soil DNA Extraction kit(型号为ST82316),按操作说明从土壤中提取DNA,提取获得的DNA使用Biophotometer(Eppendorf, Germany)进行定量分析。

1.3.2 PCR扩增 获得的DNA使用细菌16S rDNA V3可变区通用引物341f-GC和534r进行扩增^[23],引物序列分别为:341f-GC(5'-CGCCCGCCGCGCGGGCGGCGCGGGCGGGGGCACGGGGGGCCTACGGGAG-GCAGCAG-3'); 534r(5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3')。每个样品做3次重复,反应体系:25 pmol每种引物,1.25 U的Ex Taq polymerase(Takara),5 μL的10× Ex Taq Buffer(with MgCl₂),4 μL dNTP(各10 mmol/L),50 ng的模板DNA,终体积为50 μL。PCR反应采用touchdown方法,反应条件:94°C,5 min;94°C,1 min,65°C,1 min,72°C,1 min,20个循环,每个循环降低0.5°C;94°C,1 min,55°C,1 min,72°C,1 min,10个循环,72°C,7 min。扩增产物用于DGGE分析。

1.3.3 DGGE分析 采用Dcode™通用突变检测系统(Bio-Rad, USA)按照操作说明进行DGGE分析。丙烯酰胺凝胶(37.5:1)浓度为8%,变性剂梯度为40%~60%(100%变性剂含有7 mol/L尿素和40%(v/v)去离子甲酰胺),电泳缓冲液为1×TAE。将25 μL PCR产物和5 μL 6×loading buffer用微量进样器加入胶孔中,200 V、60°C条件下电泳5.5 h。电泳结束后,小心取出凝胶,放在SYBR™ Green I(1:10000)(Invitrogen)染液中染色30 min,然后用Gel Dox XR凝胶成像系统(Bio-Rad, USA)观察与拍照。

1.3.4 DGGE条带的回收和测序 采用Quantity One凝胶成像图像处理软件(Bio-Rad, USA)对DGGE图谱中条带的迁移位置进行数字化处理,根据其迁移率,在紫外灯下从凝胶上切取差异条带。采用Liu等^[23]的方法回收DGGE条带并进行重新扩增,采用pGEM-T Easy Vector System(Promega, USA)进行克隆,由上海生工

生物工程技术有限公司测定条带序列,并且登录 GenBank 获取序列信息。

1.4 数据分析

采用 Excel(2007)和 SPSS16.0 统计软件进行试验数据处理和单因素方差(One-Way ANOVA)分析($P < 0.05$);采用 Quantity One 凝胶成像图像处理系统对 DGGE 图谱中的条带的位置和亮度进行数字化处理;采用 Shannon-Winner index(H')和均匀度指数(EH')评价细菌多样性的变化,其计算公式为:

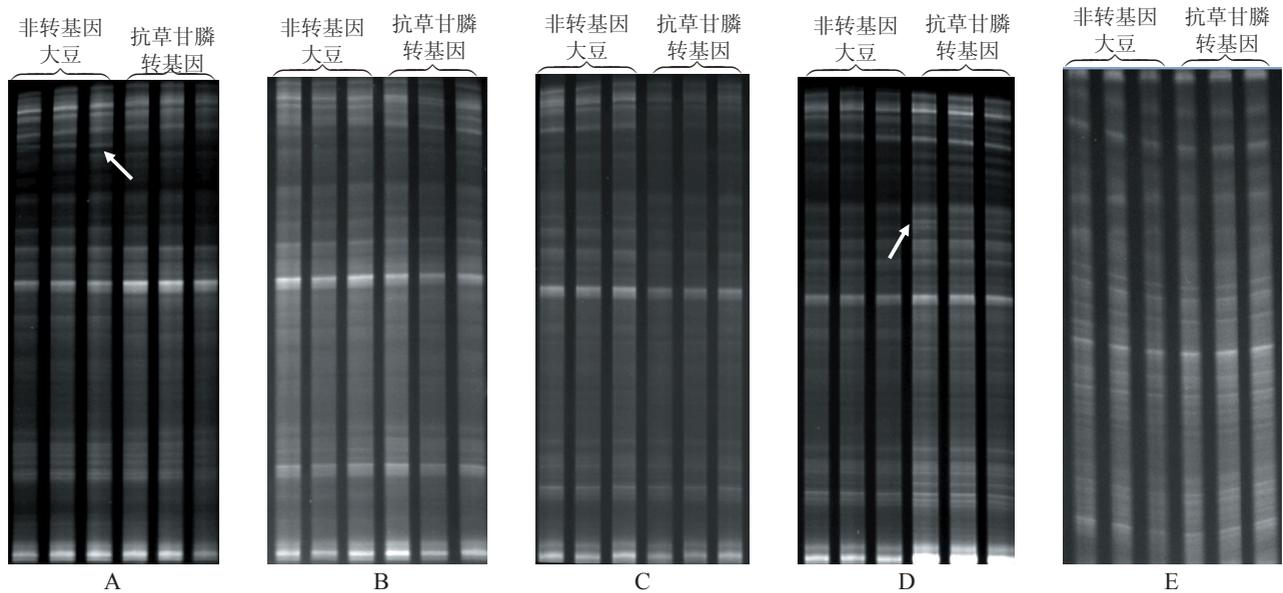
$$H' = -\sum_{i=1}^S p_i \ln p_i; EH' = H' / \ln S$$

S 代表条带总数或丰度, p_i 代表第*i*条带占总密度的比例,代表自然对数。

2 结果与分析

2.1 抗草甘膦转基因大豆对根际土壤细菌多样性的影响

2.1.1 DGGE 图谱分析 对 16S rDNA 扩增产物 DGGE



(A)出苗期;(B)幼苗期;(C)开花结荚期;(D)鼓粒期;(E)成熟期。

图1 不同生长期非转基因大豆和抗草甘膦转基因大豆根际土壤中细菌的 DGGE 指纹图谱

表1 不同生长期所有样品 DGGE 条带的 Shannon-Wiener 指数(H')和均匀度指数(EH')

生长期	处理	Shannon-Wiener 指数 (H')	均匀度指数
出苗期	非转基因大豆	1.76±0.15	0.56±0.05
	抗草甘膦转基因大豆	1.61±0.05	0.52±0.01
幼苗期	非转基因大豆	2.04±0.12	0.62±0.04
	抗草甘膦转基因大豆	1.83±0.27	0.58±0.07
开花结荚期	非转基因大豆	1.72±0.06	0.56±0.02
	抗草甘膦转基因大豆	1.63±0.02	0.54±0.01
鼓粒期	非转基因大豆	2.13±0.14	0.63±0.04
	抗草甘膦转基因大豆	2.11±0.04	0.62±0.01
成熟期	非转基因大豆	1.55±0.08	0.52±0.02
	抗草甘膦转基因大豆	1.52±0.03	0.51±0.01

指纹图谱(图1)分析表明,在不同生长期内,种植抗草甘膦转基因大豆和非转基因大豆的 DGGE 指纹图谱间有较强的相似性,大多数均为共有条带,说明这些条带所代表的土壤细菌很稳定,不受大豆品种的影响。仅在出苗期抗草甘膦转基因大豆泳道中出现 1 条带缺失(箭头所示)(图 A),在鼓粒期抗草甘膦转基因大豆泳道中出现 1 条带增加(箭头所示)(图 D)。

在不同生长期内,抗草甘膦转基因大豆与非转基因大豆根际土壤细菌 DGGE 条带多样性指数和均匀度指数无显著差异(表 1)。土壤细菌多样性指数在抗草甘膦转基因大豆和非转基因大豆不同生长期均呈现升—降—升—降的变化趋势,在成熟期达到最低值,表明土壤细菌多样性主要受季节变化和生长期期的影响。

2.2.2 DGGE-cloning 测序分析 根据根际土壤细菌

DGGE 图谱条带位置和亮度的数字化结果,从图谱上选择切取 2 条差异条带,对 DGGE 图谱切取的条带进行克隆测序,在 NCBI 中对序列进行比对分析。具体每条带的近源菌见表 2。抗草甘膦转基因大豆缺失条带为条带 1 (Uncultured *Gemmatimonadetes* bacterium),属芽单胞菌门;增加条带为条带 2 (Uncultured *Firmicutes* bacterium clone

GASP-KC3W1_H04),属壁厚菌门,这两条带均属于未培养细菌。

3 讨论

近年来,转基因作物的种植对根际土壤微生物群落结构和功能的影响倍受国内外学者的普遍关注。转基因作物在农业土壤中大面积种植后,与土壤中整个微生物区系相互作用,对土壤中微生物的种类、数量以

表 2 DGGE 条带的确认及根据测序结果推测的 DGGE 条带代表的细菌

序号	GeneBank 中最匹配菌株或克隆	同一性	登录号
1	Uncultured <i>Gemmatimonadetes</i> bacterium clone g55	100%	EU979064.1
2	Uncultured <i>Firmicutes</i> bacterium clone GASP-KC3W1_H04	93%	EU300445.1

及生命活动状况施加影响。一些研究表明,转基因作物对土壤微生物多样性组成没有显著影响,Icoz 等^[24]经过连续 4 年转基因玉米种植试验未发现对土壤细菌多样性组成造成显著影响。Liu Wei 等^[25]经过连续两年转 *Bt* 基因水稻种植试验发现转 *Bt* 基因水稻在不同生长期对土壤细菌及真菌多样性无显著影响。这些研究结果与此研究的结果一致。

1993 年 Muzyer 首次将 DGGE 技术成功地应用于土壤细菌群落多样性分析^[22],目前此技术已经广泛应用于对土壤中细菌、真菌及功能基因多样性等分析。由于 DGGE 图谱条带复杂,有很多条带肉眼难以识别,并且不同条带分别代表何种菌类,缺失或发生改变的条带是哪种微生物,这些问题常常使得不同处理间的差异难以深入比较,所以 DGGE 与克隆测序相结合的方法常被用来明确不同处理对根际土壤何种微生物产生影响,已为广大科研人员利用,成为微生物生态学研究的主要方法。此试验利用 DGGE-cloning 测序技术结合的方法研究发现,抗草甘膦转基因大豆与非转基因大豆 DGGE 图谱仅在苗期和鼓粒期存在两条差异条带,从 DGGE 图谱切取的条带进行克隆测序,在 NCBI 中对序列进行比对分析,结果表明,抗草甘膦转基因大豆缺失条带为条带 1 (Uncultured *Gemmatimonadetes* bacterium),增加条带为条带 2 (Uncultured *Firmicutes* bacterium clone GASP-KC3W1_H04),这些条带均属于未培养细菌。对 DGGE 图谱进行数字化分析发现,抗草甘膦转基因大豆与非转基因大豆根际土壤细菌 DGGE 条数多样性指数和均匀度指无显著差异。抗草甘膦转基因大豆和非转基因大豆不同生长期根际土壤微生物多样性指数均呈现升一降一升一降的变化趋势,在成熟期达到最低值,这主要与季节变化和大豆的生长期相关,与

Liu Wei 等^[25]研究认为转基因水稻根际土壤微生物多样性与季节变化和水稻生长相关的结果一致。大豆出苗期环境温度较低,微生物活性弱,微生物多样性指数较低;随着环境温度迅速升高,在幼苗期时微生物生长迅速,微生物多样性指数增加;大豆在开花结荚期时需吸收大量养分以保证种子成熟,此时期大豆与微生物竞争土壤养分,造成土壤微生物多样性指数降低;在鼓粒期时,大豆对土壤养分的需求达到平衡,供微生物利用的养分增加,微生物多样性指数增加;随着气候的变化,环境温度逐渐降低,在大豆成熟期时,环境温度严重限制了微生物的活性,微生物多样性指数达到最低值。

4 结论

此试验以黄淮流域夏大豆栽培区的山东省为代表的研究地点,采用 DGGE-cloning 测序技术对抗草甘膦转基因大豆在不同生长期对根际土壤细菌多样性的影响进行了研究,结果表明在不同生长期内抗草甘膦转基因大豆与非转基因大豆根际土壤细菌 16S rDNA DGGE 指纹图谱谱形相似,多样性指数和均匀度指数无显著差异,土壤细菌多样性主要受季节变化和大豆生长期的影响,由此可见抗草甘膦转基因大豆种植对土壤细菌多样性无显著影响,但长期种植抗草甘膦转基因大豆是否会对土壤微生物乃至农业生态环境产生潜在影响,仍需要对其潜在的生态风险进行长期的研究和监测。

参考文献

- [1] James C. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2009. ISAAA Brief No. 41, 2009. ISAAA: Ithaca, NY.
- [2] Zhang H, Yang L, Guo J, et al. Development of one novel multiple-target plasmid for duplex quantitative PCR analysis of

- roundup ready soybean[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*,2008,56(14):5514-5520.
- [3] 徐广惠,王宏燕,刘佳.抗草甘膦转基因大豆(RRS)对根际土壤细菌数量和多样性的影响[J].*生态学报*,2009,29(8):4535-4541.
- [4] Levy-Booth D J, Capmbell R G, Gulden R H, et al. Real-time polymerase chain reaction monitoring of recombinant DNA entry into soil from decomposing roundup ready leaf biomass[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*,2008,56(15):6339-6347.
- [5] Harikai N, Saito S, Abe M, et al. Real-time PCR method using capturing oligo-immobilized PCR tubes to determine the specific gene for soybean and genetically modified soybean in food matrices [J]. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*,2008,72(11):2953-2958.
- [6] Kerman K, Saito M, Tamiya E. Electroactive chitosan nanoparticles for the detection of single-nucleotide polymorphisms using peptide nucleic acids[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*,2008,391(8):2759-2767.
- [7] Rossi S, Lesignoli F, Germini A, et al. Identification of PCR-amplified genetically modified organisms (GMOs) DNA by peptide nucleic acid (PNA) probes in anion-exchange chromatographic analysis[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*,2007,55(7):2509-2516.
- [8] Guo L, Yang H, Qiu B, et al. Capillary electrophoresis with electrochemiluminescent detection for highly sensitive assay of genetically modified organisms[J]. *Analytical Chemistry*, 2009, 81(23):9578-9584.
- [9] Liu M, Luo Y, Tao R, et al. Sensitive and rapid detection of genetic modified soybean (Roundup Ready) by loop-mediated isothermal amplification[J]. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*,2009, 73(11):2365-2369.
- [10] 刘彩霞,梁成珠,徐彪,等.抗草甘膦转基因大豆及加工品 LAMP 检测研究[J].*大豆科学*,28(2):305-309.
- [11] Zhou P P, Zhang J Z, You Y H, et al. Detection of genetically modified crops by combination of multiplex PCR and low-density DNA microarray[J]. *Biomedical and Environmental Sciences*,2008, 21(1):53-62.
- [12] Prins T W, van Dijk J P, Beenen H G, et al. Optimised padlock probe ligation and microarray detection of multiple (non-authorized) GMOs in a single reaction[J]. *BMC Genomics*, 2008,9:584.
- [13] Ocana M F, Fraser P D, Patel R K, et al. Mass spectrometric detection of CP4 EPSPS in genetically modified soya and maize[J]. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*,2007,21(3):319-328.
- [14] Berna J L, Nozal M J, Toribio L, et al. Use of supercritical fluid extraction and gas chromatography-mass spectrometry to obtain amino acid profiles from several genetically modified varieties of maize and soybean[J]. *Journal of Chromatography A*,2008,1192(2):266-272.
- [15] Abud S, de Souza P I, Vianna G R, et al. Gene flow from transgenic to nontransgenic soybean plants in the Cerrado region of Brazil[J]. *Genetics and Molecular Research*,2007,6(2):445-452.
- [16] Lerat S, Gulden R H, Hart M M et al. Quantification and persistence of recombinant DNA of Roundup Ready corn and soybean in rotation[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007,55(25):10226-10231.
- [17] Levy-Booth D J, Gulden R H, Campbell R G, et al. Roundup Ready soybean gene concentrations in field soil aggregate size classes[J]. *FEMS Microbiology Letters*,2009,291(2):175-179.
- [18] Benamu M A, Schneider M I, Sanchez N E. Effects of the herbicide glyphosate on biological attributes of *Alpaida veniliae* (Araneae, Araneidae), in laboratory[J]. *Chemosphere*,2010,78(7):871-876.
- [19] 吴奇,彭德良,彭于发.抗草甘膦转基因大豆对非靶标节肢动物群落多样性的影响[J].*生态学报*,2008,28(6):2622-2628.
- [20] Bakke-McKellep A M, Koppang E O, Gunnes G, et al. Histological, digestive, metabolic, hormonal and some immune factor responses in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., fed genetically modified soybeans[J]. *Journal of Fish Diseases*,2007,30(2):65-79.
- [21] Bakke-McKellep A M, Sanden M, Danieli A, et al. Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) parr fed genetically modified soybeans and maize: Histological, digestive, metabolic, and immunological investigations [J]. *Research in Veterinary Science*,2008,84(3):395-408.
- [22] Muyzer G, De Waal E C, Uitierlinden A G. Profiling of Complex Microbial Populations by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis of Polymerase Chain Reaction-Amplified Genes Coding for 16S rRNA[J]. *Applied and Environmental Microbiology*,1993,59(3):695-700.
- [23] Liu F H, Wang S B, Zhang JS, 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.
- [24] Icoz I, Saxena D, Andow D A, et al. Microbial populations and enzyme activities in soil in situ under transgenic corn expressing cry proteins from *Bacillus thuringiensis*[J]. *Journal of Environmental Quality*,2008,37:647-662.
- [25] Liu W, Lu H H, Wu W X, et al. Transgenic *Bt* rice does not affect enzyme activities and microbial composition in the rhizosphere during crop development[J]. *Soil Biology and Biochemistry*,2008, 40:475-486.