

抗盐碱转基因大豆对根际土壤固氮细菌多样性的影响

周洁, 于崧, 王珊珊, 焦彦东, 刘志华, 王宏燕

(东北农业大学 资源与环境学院, 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要:以抗盐碱转基因大豆(SRTS)为主要研究对象,应用PCR-DGGE技术分析种植大豆后土壤细菌固氮酶 *nifH* 基因的分子多样性,从而为在盐碱地建立转基因作物土壤生态安全评价技术体系和监测提供基础研究资料。结果表明:SRTS的DGGE多样性指数、均匀度指数均高于其受体亲本黑农35,但差异不显著;而显著高于抗线王和野生大豆。聚类分析显示,SRTS与黑农35和合丰50的相似性最大。总体表明种植转基因大豆对土壤固氮细菌多样性无显著影响。

关键词:抗盐碱;转基因大豆;*nifH*;多样性;DGGE

中图分类号:S154.3

文献标识码:A

文章编号:1000-9841(2013)06-0801-05

Effects of Salinization Resistance Transgenic Soybeans on Rhizosphere Soil Nitrogen-fixing Bacterial Diversity

ZHOU Jie, YU Song, WANG Shan-shan, JIAO Yan-dong, LIU Zhi-hua, WANG Hong-yan

(Resources and Environment Sciences College, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: The molecular diversity of soil bacteria nitrogenase *nifH* gene after planting the salt tolerance of transgenic soybean, (SRTS), its recipient parent Heinong 35, as well as Hefeng 50, Kangxianwang and Yesheng 21 was analyzed by polymerase chain reaction - denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE), so as to provide technical basis for establishing soil ecological security assessment system for transgenic crops in saline soil. The Shannon - Wiener diversity indexes (*Dsh*) and evenness indexes (*Jsh*) of SRTS were higher than Heinong 35 without significant difference, while significantly higher than Kangxianwang and Yesheng 21. Cluster analysis of DGGE bands showed SRTS had higher similarity with Heinong 35 and Hefeng 50. Results suggest planting genetically modified soybeans has no obvious influence on diversity of soil nitrogen-fixing bacteria.

Key words: Salinization resistance; Transgenic soybeans; *nifH*; Diversity; DGGE

大豆是一种中度耐盐碱的植物^[1],尚未发现其能够合成甜菜碱,因此,通过甜菜碱醛脱氢酶基因(*BADH*)的转入,可以提高大豆的抗盐碱性,从而提高产量,这在粮食安全日益紧张的今天显得尤为重要。而目前关于*BADH*基因的研究多集中在菠菜、苜蓿等植物上,关于*BADH*转入大豆的研究还比较少,但研究表明其具有提高大豆耐盐性的潜力^[2]。抗盐碱转基因大豆品系(salinization resistance transgenic soybeans, SRTS)是由黑龙江省农业科学院生物技术研究所将*BADH*转化栽培大豆黑农35培育而成,在安达地区试验种植产量高达2 250 kg·hm⁻²。但是种植转基因作物是否存在风险,这一问题不容忽视。根系特殊分泌物成分是转基因作物安全性评价的一个重要方面。Fang等^[3]发现种植转基因作物的土壤中根系分泌物会对细菌多样性带来影响

响,徐广惠等^[4]研究表明抗草甘膦转基因大豆不仅降低了根际土壤细菌的数量,而且降低了土壤细菌的多样性,而宋立娟等^[5]发现SRTS的根系分泌物只是微弱地改变了根际土壤中AOA和AOB群落多样性。

PCR-DGGE方法是基于从土壤样品中直接提取出微生物群体的基因组DNA后,选择对大多数细菌的16S rRNA基因都能有效扩增的引物进行特异性的PCR扩增,然后对PCR产物运用DGGE进行分离和鉴定,从而得出土壤微生物群体多样性的信息。本研究采用PCR与DGGE相结合的方法,对种植抗盐碱转基因大豆(SRTS)的土壤根际固氮菌多样性进行研究,以期对盐碱地转基因作物土壤生态安全评价技术体系的建立提供基础研究资料,为抗盐碱转基因大豆的研究、应用和推广奠定基础。

收稿日期:2013-03-08

基金项目:转基因生物新品种培育重大专项(2009ZX08011-025B);黑龙江省2012年研究生创新科研基金(YJSCX2012-045HLJ)。

第一作者简介:周洁(1985-),女,在读硕士,主要从事转基因大豆对土壤生态系统安全性影响的研究。E-mail:524957819@qq.com。

通讯作者:王宏燕(1962-),女,教授,主要从事农业生态学领域研究。E-mail:741254505@qq.com。

1 材料与方法

1.1 试验设计

试验地点位于黑龙江省安达市 (E 125°21'781", N 46°23'916"), 是世界上三大片苏打盐碱地集中分布区域之一。供试土壤为盐碱土, 有机质 0.66 mg·kg⁻¹, 全氮 1.675 g·kg⁻¹, 全磷 0.025 mg·kg⁻¹, 速效磷 26.683 mg·kg⁻¹, 速效钾 158.443 mg·kg⁻¹, 钠吸附比 0.382, 水溶性碳酸氢根 0.002 cmol·kg⁻¹, 碱化度 0.040, pH8.439, 阳离子交换量 13.938 cmol·kg⁻¹, 交换性钠 0.552 cmol·kg⁻¹。

供试大豆材料为抗盐碱转基因大豆 (SRTS) 及其受体亲本黑农 35、合丰 50、抗线王和野生 21。

各材料按株距 10 cm 散播, 10 行区、行长 7 m, 行距 0.7 m, 小区面积 49 m²。3 次重复, 随机区组设计。种植及管理过程中均不施用化肥和农药。在大豆的花荚期采集根际土壤样品, 每个小区内 5 点法取样, 采用抖落法收集根际土壤, 混匀作为 1 个土壤样品, 3 次重复。用无菌塑料袋封好放入冰盒内带回实验室待分析。

1.2 土壤固氮菌群多样性分析

1.2.1 土壤总 DNA 的提取 采用 OMEGA 公司的 E. Z. N. A. Soil DNA Kit 试剂盒, 按操作说明对土壤样品进行 DNA 的提取与纯化。DNA 样品用 0.7% 的琼脂糖凝胶电泳进行检测, 利用 Maker λ-Hind III 作为标准, 选择条带出现在 Maker 23 ~ 130 bp 处, 清晰明亮无拖尾、长度一致的样品储存于 -20℃ 保存备用。

1.2.2 PCR 扩增 使用表 1 中的引物 (由博仕生物公司合成) 对提取纯化的 DNA 进行巢式 PCR 扩增土壤中固氮细菌 *nifH* 基因。第一轮 PCR 反应体系: DNA 模板 2 μL, 每种引物 1 μL (10 μmol·L⁻¹), 1 U TaqDNA 聚合酶, 5 μL 10 × buffer (free MgCl₂), 200 μmol·L⁻¹ dNTP (每种 4 μL), 3 μL MgCl₂ (1.5 mmol·L⁻¹), 终体积为 50 μL。第二轮反应体系与第一轮相同, 只是用第一轮的 PCR 产物 2 μL 为模板。反应条件: 94℃, 4 min; 94℃, 1 min; 55℃ (第二轮为 48℃), 1 min; 72℃, 40 s; 30 个循环 (第二轮采用 35 个循环); 72℃, 7 min。

1.2.3 变性梯度凝胶电泳 (DGGE) 及染色 采用 Bio-Rad 公司 Dcode™ 的基因突变检测系统对 PCR 反应产物进行电泳分离, 丙烯酰胺凝胶的浓度为 8%, 变性剂梯度为 40% ~ 60%, 电泳缓冲液为 1 ×

TAE, 凝胶板制作好后静置使其充分凝固, 然后将组装板放到电泳槽中预热, 预热温度 60℃, 将 20 μL 产物与 10 μL 6 × loading buffer 混合好后, 用微量进样器加入胶孔中, 电压为 60 V, 电泳温度为 60℃, 电泳时间为 14 h, 电泳结束后, 待温度降到室温时, 取出凝胶, 用银染法染色, 在凝胶成像仪下观察结果并拍照。

表 1 用于固氮细菌 PCR 扩增的引物及其序列

Table 1 Nitrogen-fixing bacteria PCR amplification primers and their sequence

引物 Primer	引物序列 Primer sequence
FGPH19	TAC GGCAAR GGT GGN ATH G
PolR	ATS GCC ATC ATY NTC RCC GGA
PolF-GC	CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GGC CCG CCG CCC CCG CCC C TGC GAY CCS AAR GCB GAC TC
AQER	GAC GAT GTA GAT YTC CTG

R = A/G; Y = C/T; S = G/C; H = T/C/A; N = A/T/C/G; B = G/C/T.

1.3 数据分析

采用 Quantity One 对 DGGE 图谱中条带的位置和亮度进行数字化处理; 采用 Excel 2003 对试验数据进行处理; SPSS18.0 进行单因素方差分析和差异显著性检验。采用 Quantity One 软件对不同样品进行聚类分析, 多样性和均匀度用 *Dsh* 和 *Jsh* 来表示, 其表达式为:

$$Dsh = - \sum P_i \ln P_i = - \sum (N_i/N) \ln (N_i/N)$$

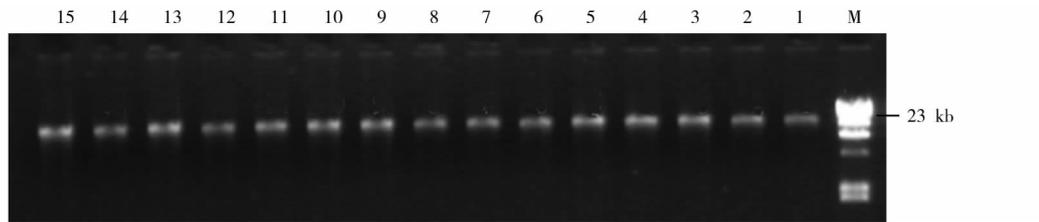
$$Jsh = Dsh / \ln S$$

式中: *Dsh* 计算是基于 DGGE 胶条带的位置和条带的强度, 而条带的强度则通过条带的峰面积来表示, 其中 *P_i* 为第 *i* 条带灰度占该样品总灰度的比率, *N_i* 为峰面积, *N* 为所有峰的总面积; *S* 为条带数。

2 结果与分析

2.1 土壤微生物总 DNA 的提取

提取的土壤总 DNA 的质量关系到能否全面真实地反应土壤中微生物的多样性。从图 1 可见, 所提取的 DNA 质量较好, 长度约为 23 kb, 条带清晰, 可用于 PCR 扩增。



M 为 Marker λ -Hind III; 1~3, 4~6, 7~9, 10~12 和 13~15 分别为 SRTS、黑农 35、合丰 50、抗线王和野生 21 的 3 次重复样品。下同。

M is Marker λ -Hind III; 1-3, 4-6, 7-9, 10-12 and 13-15 are three replicates of SRTS, Heinnong 35, Hefeng 50, Kangxianwang and Yesheng 21, respectively. The same below.

图 1 不同基因型大豆根际土壤微生物总 DNA 的提取

Fig. 1 Total DNA of microorganism extracted from rhizosphere soil planting different genotype soybeans

2.2 固氮菌 *nifH* 基因的 PCR 扩增

固氮酶的铁蛋白亚基是由相对保守的 *nifH* 基因表达得到, 它的保守性与 16SrRNA 基因相似, 因此适宜用来研究细菌分子多样性。因为土壤中 *nifH*

基因含量并不是很高, 所以采用巢式 PCR 方法进行扩增是比较好的选择, 在对试剂盒提取的 DNA 进行巢式 PCR 后, 第一轮产物不可见, 而在进行第二轮 PCR 后, 得到长度约 320 bp 的片段(图 2)。

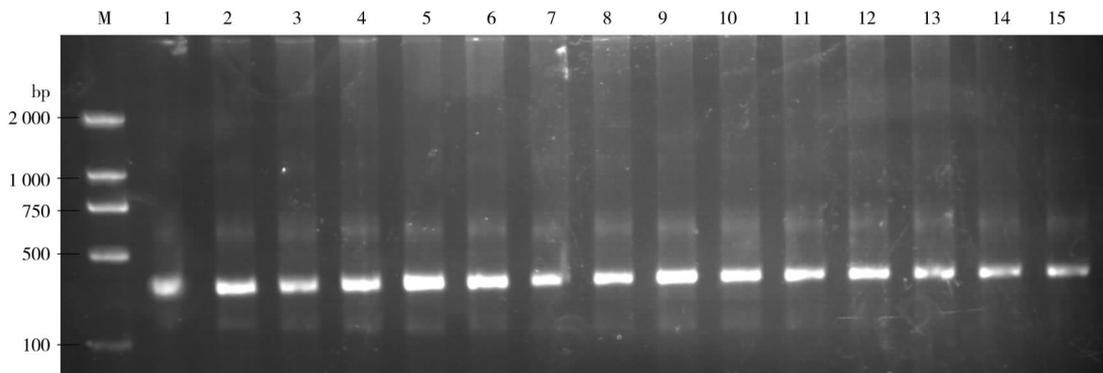


图 2 不同基因型大豆根际土壤 *nifH* 基因 PCR 扩增产物电泳图谱

Fig. 2 The electrophoresis map of *nifH* gene PCR product with the rhizospheric soils of different genotype soybeans (M-Maker DL2000)

2.3 *nifH* 基因 PCR 产物的 DGGE 图谱分析

对 *nifH* 基因扩增产物进行 DGGE 指纹图谱分析, 结果不同基因型间条带数目、强度和迁移位置存在差异(图 3)。图 4 是以第一条泳道为标准做出的泳道比较图。由图 4 可知, 不同基因型大豆间存在一定的相似性, 如条带 6、7、18 和 21 为共有条带, 而条带 22 为野生 21 所特有。与亲本相比, SRTS 条带 9、17 缺失, 而条带 25 为特有。

固氮菌多样性的影响不显著。

对不同品种大豆的 DGGE 条带统计分析表明, SRTS 根际土壤固氮菌 DGGE 条带数为 21, 不同品种中相差不大, 只有抗线王与 SRTS 相比有差异性; SRTS 多样性指数 (*Dsh*) 为 2.28, 均匀度指数为 0.75, 与黑农 35、合丰 50 差异不显著, 显著高于野生 21 和抗线王(表 2)。总体来说 SRTS 对根际土壤

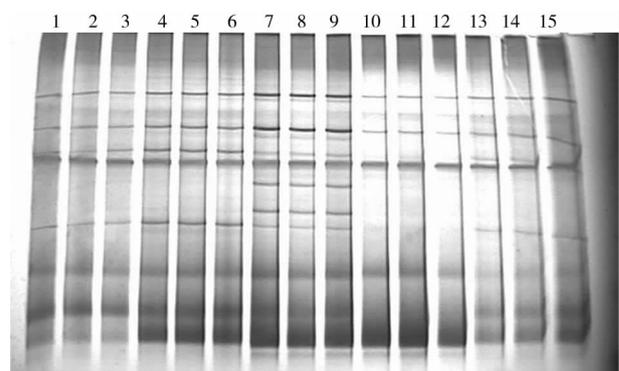
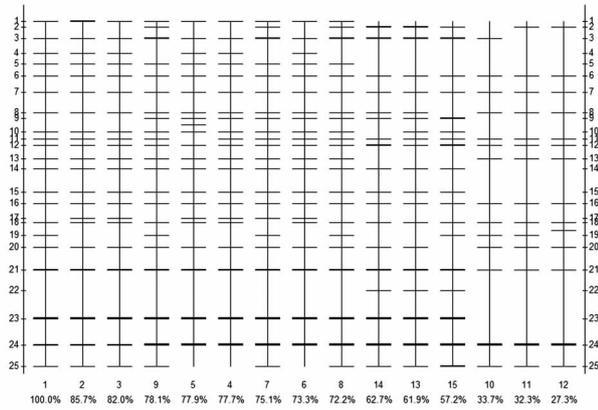


图 3 不同基因型大豆根际土壤中固氮菌的 PCR-DGGE 指纹图谱

Fig. 3 DGGE fingerprinting of nitrogen-fixing bacteria in rhizospheric soil of different genotype soybeans



图下方百分比是以第一条条带为基准作为标准,其它条带与之相比得到的相似值。

The percentage values below chart are similarities with the first groups as standard.

图4 PCR-DGGE 指纹图谱数字比分析图

Fig. 4 Digital comparative analysis chart of PCR-DGGE fingerprinting

表2 不同品种大豆根际土壤固氮菌 DGGE 图谱条带数、多样性指数和均匀度指数

Table 2 The number of DGGE bands, Shannon-Wiener diversity indexes (*Dsh*) and evenness indexes (*Jsh*) of the soil nitrogen-fixing bacteria influenced by different soybeans

品种 Variety	条带数 Band number	多样性指数 <i>Dsh</i>	均匀度指数 <i>Jsh</i>
SRTS	21	2.28 ± 0.18 a	0.75 ± 0.027 a
黑农 35 Heinong 35	21	2.25 ± 0.07 a	0.74 ± 0.022 a
合丰 50 Hefeng 50	22	2.31 ± 0.07 a	0.74 ± 0.018 a
抗线王 Kangxianwang	14	1.18 ± 0.08 c	0.45 ± 0.003 c
野生 21 Yesheng 21	19	2.02 ± 0.04 b	0.70 ± 0.016 b

表中数据为平均数 ± 标准误;不同字母表示 5% 差异显著水平。

Data in the table are Mean ± SE; Different letters represent the significant difference at $P < 0.05$.

应用 Quantity one 将 DGGE 指纹图谱进行聚类分析(图 5)。5 个品种中,合丰 50 与黑农 35 大豆根际土壤固氮菌相似性为 84%,SRTS 与黑农 35 的相似性为 78%,Y-21 与 SRTS 的相似性为 69%,而抗线王与这些品种的相似性最低,为 45%。整体来看 SRTS 与受体亲本黑农 35 和合丰 50 的相似性最大。

3 讨论

就土壤稳定性来说,土壤中的微生物种群越多,多样性越大,土壤生态系统稳定性越高。因此转基因植物对土壤微生物的群落结构和多样性的影响备受关注。Cowgill 等^[6]的研究表明转基因马铃薯抑制了土壤细菌和真菌的生长,降低了其丰富

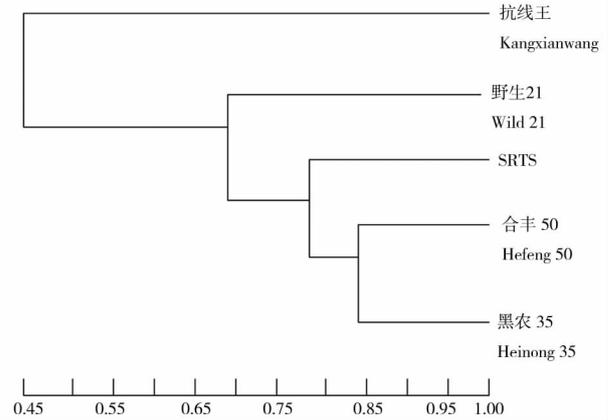


图5 不同基因型大豆根际土壤固氮菌 DGGE 图谱聚类分析

Fig. 5 Cluster analysis of different genotype soybeans' nitrogen-fixing bacteria in rhizosphere soil

度。王洪兴等^[7]发现转 *Bt* 基因水稻稻秆降解的土壤细菌数量比非转基因处理少。吕晓波等^[8]的研究得出,种植抗草甘膦转基因大豆的根际土壤细菌多样性指数与均匀度指数均低于亲本受体。而 Watrud 和 Seidler^[9]的研究指出种植转 *Bt* 基因棉花土壤细菌和真菌的数量明显提高。刘玲等^[10]的研究结果表明转基因玉米和非转基因玉米各根区细菌遗传多样性没有显著差异。也有研究表明不同的植物、基因型及试验条件下,转基因植物对微生物数量的影响也不同^[11]。赖欣等^[12]利用 PCR-DGGE 的研究方法,得出在种植时期不同的情况下,种植转基因大豆、亲本非转基因大豆和普通大豆之间的差异并不明显,这表明种植转基因大豆对土壤固氮细菌没有明显的影响,与本文研究结果相似。

本试验利用 PCR-DGGE 的方法,研究抗盐碱转基因大豆对花荚期根际土壤固氮菌群落多样性的影响。结果表明,抗盐碱转基因大豆、受体非转基因大豆、合丰 50 固氮菌种群结构没有显著的变化,对野生品种有些影响,可能是由于野生品种自身对利用固氮菌的能力稍差,而抗线王品种明显低于其余品种,这可能是由于根际分泌物的不同所引起的。整体上看,种植抗盐碱转基因大豆对土壤固氮细菌多样性无显著影响。

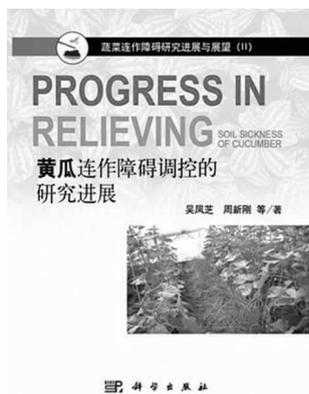
参考文献

- [1] Ayers R S, Westcot D W. Water quality for agriculture[M]. Rome: Food and Agriculture Organization, 1989: 13-58.
- [2] 左艳婷. 耐盐基因胆碱单加氧酶基因和甜菜碱醛脱氢酶基因转化大豆的研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2006. (Zuo Y T. Research on transformation of choline monooxygenase gene and betaine aldehyde dehydrogenase gene into soybean[D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2006.)

- [3] Fang M, Robert J K, Peter P M, et al. Bacterial diversity in rhizospheres of non-transgenic and transgenic corn [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71:4132-4136.
- [4] 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与多样性的影响[J]. *生态学报*, 2009, 29(8):4535-4541. (Xu G H, Wang H Y, Liu J. Effects of RRS on the amount and diversity of bacteria in rhizosphere soil [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2009, 29(8):4535-4541.)
- [5] 宋立娟,王宏燕,李传宝,等. 抗盐碱转基因大豆对根际与非根际土壤氨氧化古菌多样性的影响[J]. *农业环境科学学报*, 2011, 30(10):2091-2098. (Song L J, Wang H Y, Li C B, et al. Effects of salinization resistance transgenic soybeans (SRTS) on the diversity of ammonia-oxidizing archaea (AOA) in rhizosphere soil and non-rhizosphere soil [J]. *Agricultural Environmental Science*, 2011, 30(10):2091-2098.)
- [6] Cowgill S E, Bardgett R D, Kiezebrink D T, et al. The effect of transgenic nematode resistance on nontarget organisms in the potato rhizosphere [J]. *Journal of Applied Ecology*, 2002, 39:915-923.
- [7] 王洪兴,陈欣,唐建军,等. 转 *Bt* 基因水稻秸秆降解对土壤微生物可培养类群的影响[J]. *生态学报*, 2004, 24(1):89-94. (Wang H X, Chen X, Tang J J, et al. Influence of the straw decomposition of *Bt* transgenic rice on soil culturable microbial flora [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2004, 24(1):89-94.)
- [8] 吕晓波,王宏燕,刘琦,等. 抗草甘膦转基因大豆(RRS)在黑土生态系统种植的安全性研究[J]. *大豆科学*, 2009, 28(2):260-265. (Lyu X B, Wang H Y, Liu Q, et al. Biosafety of roundup ready soybean (RRS) planted in black soil ecosystem [J]. *Soybean Science*, 2009, 28(2):260-265.)
- [9] Watrud L S, Seidler R J. Nontarget ecological effects of plant, microbial, and chemical introductions to terrestrial systems [M]//*Soil chemistry and ecosystem health*. Wisconsin: Soil Science Society of America, 1998:313-340.
- [10] 刘玲,杨殿林,王生荣,等. 转 *Bt* 基因玉米种植对土壤细菌数量及多样性的影响[J]. *生态与农村环境学报*, 2011, 27(3):42-47. (Liu L, Yang D L, Wang S R, et al. Effects of transgenic *Bt* maize on populations and diversity of soil bacteria [J]. *Ecology and Rural Environment*, 2011, 27(3):42-47.)
- [11] 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):432-436. (Shen F F, Han X L, Fan S L. Changes in microbial flora and bacterial physiological group diversity in rhizosphere soil of transgenic *Bt* cotton [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2004, 24(3):432-436.)
- [12] 赖欣,张永生,赵帅,等. 转基因大豆对根际固氮细菌群落多样性的影响[J]. *生态学杂志*, 2010, 29(9):1736-1742. (Lai X, Zhang Y S, Zhao S, et al. Effects of transgenic soybean on the diversity of nitrogen-fixing bacteria in rhizosphere soil [J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2010, 29(9):1736-1742.)

新书推介

黄瓜连作障碍研究进展



作者:吴凤芝,周新刚等
 出版时间:11/1/2013
 页码:248
 装帧:平装
 定价:90
 作者简介:东北农业大学园艺学院教授,博导,2006年以来先后主持国家自然科学基金项目、国家“863”、“973”、国家支撑计划和农业部行业计划子专题等国家

文 19 篇,出版《蔬菜作物连作障碍研究进展》等著作 2 部。

内容简介:设施蔬菜连作障碍已成为制约我国设施蔬菜产业发展的瓶颈问题,连作造成的土壤质量和产品品质下降,严重威胁着设施蔬菜可持续发展、环境安全和人类健康。近年来,利用作物化感作用原理合理安排间作、轮作、套作等栽培模式解决连作障碍问题已成为研究热点之一。《黄瓜连作障碍研究进展》较系统地总结了课题组自 2007 年以来开展的黄瓜连作障碍调控相关研究工作,主要内容包括分蘖洋葱和小麦等作物对黄瓜的化感作用及其在调控黄瓜连作障碍中的应用,并对今后该方面的研究工作提出了一些设想和展望。

编辑推荐:连作障碍是影响我国设施蔬菜产业发展的重要瓶颈。黄瓜是一种重要的设施作物,其连作障碍现象严重。利用化感作用原理开发和利用对黄瓜具有促生抗病效果的作物,通过轮作、伴生等方式可以有效缓解设施黄瓜连作障碍。本书可以作为从事蔬菜连作障碍研究工作者的参考书,可以推动相关学科的发展。

级项目 10 余项。黄瓜连作障碍各因子的交互作用及其调控,973 计划项目子专题;轮作方式对黄瓜土传病害及土壤微生物多样性的影响,国家自然科学基金;黄瓜分蘖洋葱套作体系中的化感作用及其生态效应,国家自然科学基金。2008.01 至今,“龙江学者”特聘教授。在“FEMS MICROBIAL ECOLOGY”、“plant and soil”、“Physiological and Molecular Plant Pathology”、“园艺学报”、“生态学报”“土壤学报”和“中国农业科学”等刊物发表科研论文 70 余篇,其中 SCI 论