

# 转双价抗真菌病害基因大豆对根际土壤微生物群落结构的影响\*

周琳<sup>1</sup> 束长龙<sup>1</sup> 黄文坤<sup>1</sup> 朱延明<sup>2</sup> 宋福平<sup>1</sup> 张杰<sup>1\*\*</sup>

(<sup>1</sup>中国农业科学院植物病虫害生物学国家重点实验室 100193)

(<sup>2</sup>东北农业大学生命科学院 哈尔滨 150030)

**摘要** 采用传统的平板计数法和变性梯度凝胶电泳技术,对转 $chi+rip$ (几丁质酶和核糖体失活蛋白)双价抗真菌基因大豆转基因G0431以及其亲本非转基因大豆黑农35种植后的根部土壤可培养细菌(含芽胞杆菌、产荧光假单胞菌)、真菌、放线菌进行平板计数及细菌和真菌的群落结构分析。结果表明,二者根部土壤可培养细菌(含芽胞杆菌和产荧光假单胞菌)、真菌和放线菌的数量并无显著差异;此外,变性梯度凝胶电泳图谱的聚类分析结果显示,时间变化是造成根部土壤细菌和真菌群落结构变化的主要因素,而同一时间内转基因G0431和黑农35根部土壤的细菌和真菌群落结构之间并无显著不同。在大豆的整个生长期中,根部土壤细菌群落多样性指数为5.32~5.37,群落分布均匀度指数为0.91~0.95;根部土壤真菌群落多样性指数为4.78~4.91,群落分布均匀度指数为0.81~0.89。以上结果说明,几丁质酶和核糖体失活蛋白双价基因的导入并没有对大豆根际可培养细菌(含芽胞杆菌和产荧光假单胞菌)、真菌和放线菌的数量以及细菌和真菌的群落结构产生显著影响。图4 表2 参22

**关键词** 转基因大豆;变性梯度凝胶电泳;土壤微生物;群落结构

CLC S565.103.4 : S154.36

## Community Structure of Microbes in Rhizosphere Soil of Transgenic Soybean Carrying Two Fungus-resistant Genes\*

ZHOU Lin<sup>1</sup>, SHU Changlong<sup>1</sup>, HUANG Wenkun<sup>1</sup>, ZHU Yanming<sup>2</sup>, SONG Fuping<sup>1</sup> & ZHANG Jie<sup>1\*\*</sup>

(<sup>1</sup>State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)  
(<sup>2</sup>College of Life Sciences, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, Heilongjiang, China)

**Abstract** G0431 is the genetically modified soybean by transformation of two anti-fungus genes, “*chi*” (chitinase gene from bean) and “*rip*” (barley ribosome-inactivating protein gene) into the natural strain, Heinnong 35. The methods of classical plate counting and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) were employed to analyze the amounts of culture microbes in rhizosphere soil and the community structure of bacteria (including *Bacillus* and fluorescent *Pseudomonas*), fungi and actinomycetes. The results showed that there was no significant difference between the amounts of culture soil microorganisms in the rhizosphere soil of the transgenic G0431 and Heinnong 35. Moreover, the results of cluster analysis of DGGE profile of bacteria and fungi indicated that the time was the main factor which affected the community structure of rhizosphere soil microbes. For the two investigations, the Shannon’s index of the bacterial community in the rhizosphere soil was 5.32~5.37 and the evenness index was 0.91~0.95; the Shannon’s index of the fungal community in the rhizosphere soil was 4.78~4.91 and the evenness index was 0.81~0.89. The same as the community structure of bacteria and fungi, there was no remarkable difference in the rhizosphere soil between the transgenic and non-transgenic soybean in the numbers of culture bacteria (including *Bacillus* and fluorescent *Pseudomonas*), fungi and actinomycetes. It implied that the transformation of the two extra anti-fungus genes into soybean didn’t cause any significant effect on the amounts and community structure of its rhizosphere soil microbes. Fig 4, Tab 2, Ref 22

**Keywords** transgenic soybean; denaturing gradient gel electrophoresis; soil microorganism; community structure

CLC S565.103.4 : S154.36

自从1988年Hinchee报道第一例转基因大豆植株诞生以

来,转基因大豆的研究和发展尤为迅速。1996年转基因大豆被批准进行商业化生产,到2008年,全球转基因大豆的种植面积已达到 $6.58 \times 10^7$  hm<sup>2</sup>。目前,抗草甘膦大豆是种植最为广泛的转基因大豆,而近年来国内外对抗草甘膦转基因大豆的安全性进行了较多的研究,包括对非靶标节肢动物群落结构<sup>[1]</sup>、大鼠生理代谢<sup>[2]</sup>、土壤环境<sup>[3]</sup>的影响以及基因漂移情况<sup>[4]</sup>等。然而,大豆作为世界上主要的粮食和油料作物,是重要的植物蛋白和植物油来源,除受杂草危害外,也受到细菌、

收稿日期: 2009-12-01 接受日期: 2009-12-31

\*国家重点基础研究发展项目(“973”计划, No. 2007CB109203)、高技术研究发展项目(“863”计划, No. 2008AA10Z153)和国家转基因生物新品种培育重大专项(No. 2008ZX08011-003)资助 Supported by the “973” Program (No. 2007CB109203), “863” Program (No. 2008AA10Z153) and the National Major Special Project of China on New Varieties Cultivation for Transgenic Organisms (No. 2008ZX08011-003)

\*\*通讯作者 Corresponding author (E-mail: jzhang@ippcaas.cn)

真菌以及病毒等多种病害的严重影响,每年都造成不同程度的减产,在病害大流行的年份可造成大面积减产甚至绝收。因此,近年来利用基因工程手段培育抗病大豆新品种的研究工作得到了迅速开展,并取得了一定的进展<sup>[5-8]</sup>。

土壤是农业生产中物质转化与能量交换的重要场所,在农业生态系统中处于核心地位。土壤微生物是土壤生态系统的重要组成部分,因此,评价转基因作物对土壤微生物的影响意义重大<sup>[9]</sup>。Means等(2007)发现在抗草甘膦大豆田中大量喷施草甘膦,导致土壤根际微生物种群发生变化,促进了大豆田中镰孢菌和腐霉菌的生长,从而延缓和减少了抗草甘膦大豆苗根部的生长<sup>[3]</sup>; Donegan等在研究转基因Bt棉花和转基因马铃薯的根系分泌物对土壤中细菌的影响时,发现根系细菌数量短期内在转基因植物与对照组之间并无明显差异<sup>[10-11]</sup>。而沈法富等(2004)发现转*cry1Ac*基因抗虫棉在苗期和吐絮期,根际土壤微生物的数量与非转基因棉花差异不显著,在棉花龄期,转基因棉花根际土壤中细菌比对照增加,但差异也未达到显著性水平<sup>[12]</sup>。Schmalenberger也发现转基因玉米的根部细菌组成与其非转基因亲本对照没有明显差异<sup>[13]</sup>。本实验室在转基因生物对土壤微生物的影响方面也作了诸多研究工作<sup>[14-15]</sup>。本试验以转*chi+rip*双价抗真菌病基因大豆为材料,以不依赖于培养的变性梯度凝胶电泳(Denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)为主要手段,进行转基因抗真菌病害大豆对根际微生物群落影响的相关研究,以期对转基因大豆的生产性试验以及产业化提供重要的理论依据和技术支撑。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂和仪器

rTaq聚合酶、pMD19-T Vector购自TaKaRa公司; KOD Plus DNA聚合酶购自北京百灵克生物科技有限责任公司; SYBR Green I购自Amresco公司,其它生化试剂均为分析纯;土壤总DNA提取试剂盒(E.Z.N.A.™ Soil DNA Kit)购自美科美(北京)生物医学研究中心; PCR产物纯化试剂盒为AxyPrep™ PCR Clean Kit。

PCR引物及序列测定由上海生工生物技术有限公司提供和完成。PCR仪为Thermocycle,购自德国Biometra公司。DGGE仪为DCode™ Universal Mutation Detection System(Bio-Rad Laboratories, USA)。DGGE凝胶成像系统为Universal Hood II(Bio-Rad Laboratories, USA)。

### 1.2 供试大豆及栽培方法

供试大豆为经农杆菌转化获得的转*chi+rip*双价抗真菌病基因大豆G0431(*chi*为来源于菜豆的几丁质酶基因,*rip*为来自于大麦的核糖体失活蛋白基因)以及其亲本非转基因大豆黑农35。

试验地点位于河北省廊坊市农业部廊坊有害生物防治重点野外科学观测试验站,试验地为农业生态类型。试验小区总面积为42.8 m<sup>2</sup>,东西长4 m,南北长10.7 m,中间保留1 m过道,播种量12 000 g/hm<sup>2</sup>;分别种植转基因G0431及转基因亲本对照品种黑农35大豆品系,每个处理3次重复。

### 1.3 供试土壤的采集和处理

分别于播种前(0 d)及播种15 d、30 d、90 d、180 d后,以

各小区对角线五点取样。首先铲除大豆根部地表约2~3 cm左右的浮土以避免地面微生物与土样混杂,每个小区取约2 kg的土壤样品,迅速装入塑料袋内,带回室内,充分混匀后分别取2 g和0.5 g进行可培养微生物的平板计数分析和进行总DNA提取。

### 1.4 微生物的培养与计数方法

1.4.1 培养基 细菌及芽胞杆菌计数采用牛肉膏蛋白胨培养基,产荧光假单胞菌计数采用Kings'B培养基<sup>[16]</sup>,真菌计数采用马丁氏培养基,放线菌计数采用高氏1号培养基<sup>[17]</sup>。

1.4.2 微生物计数方法 采用传统的系列稀释法对可培养细菌(包括芽胞杆菌和产荧光假单胞菌)、真菌和放线菌进行平板计数<sup>[17]</sup>。

1.5 数据分析 平板计数结果数据采用统计分析软件SPSS 11.5进行处理。

### 1.6 分子生态学分析

1.6.1 土壤样品总DNA提取 土壤样品总DNA提取步骤和方法参照试剂盒说明书。

1.6.2 细菌16S rRNA V3区和真菌18S rRNA (V1+V2)区的PCR扩增 16S rDNA V3区扩增所用引物为P2(5'-ACT CCT ACG GGA GGC AGC AG-3')和P3(5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3')在正向引物的5'端添加“GC-clamp”(5'-CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCC CGG GGG-3')<sup>[18]</sup>,目的是为了阻止PCR产物在变性梯度凝胶电泳中完全解链。50 μL的PCR反应体系为:5 μL 10×PCR Buffer(Mg<sup>2+</sup> Plus),4 μL dNTP Mixture(各2.5 mmol/L),引物(20 μmol/L)各1 μL,DNA模板1 μL(10 ng),0.4 μL Taq DNA polymerase(2 U),无菌超纯水补足50 μL,同时以无菌超纯水为模板作阴性对照。PCR采用Touch-down扩增程序:94 °C预变性5 min;94 °C变性1 min,65 °C退火1 min,依次每两个循环降1 °C,72 °C延伸2 min,共20个循环;94 °C变性1 min,55 °C退火1 min,72 °C延伸2 min,5个循环,72 °C延伸10 min。为去除PCR过程中产生的异源双链,将PCR产物作为模板进行Reconditioning PCR,反应程序为:94 °C预变性5 min,94 °C变性1 min,55 °C退火1 min,72 °C延伸2 min,循环5次,72 °C延伸10 min。PCR产物过柱纯化。

18S rRNA (V1+V2)区所用扩增引物为NS1(5'-GTA GTC ATA TGC TTG TCT C-3')和FungGC(5'-CGC CCG CCGCGC CCC GCG CCC GGC CCG CCG CCC CCG CCC CATTCC CCG TTA CCC GTT G-3')<sup>[19]</sup>。50 μL的PCR反应体系为:5 μL 10×KOD-Plus Buffer,5 μL dNTPs(2 mmol/L),2 μL MgSO<sub>4</sub>(25 mmol/L),引物(20 μmol/L)各1 μL,DNA模板1 μL(10 ng),2 μL KOD Plus DNA polymerase(2 U),无菌超纯水补足50 μL,同时以无菌超纯水为模板作阴性对照。PCR扩增程序为:94 °C预变性5 min,94 °C变性1 min,50 °C退火1 min,68 °C延伸1 min,28个循环,68 °C延伸7 min。Reconditioning PCR与16S rDNA V3区处理相同,PCR产物过柱纯化。

1.6.3 变性梯度凝胶电泳分析(DGGE) 丙烯酰胺(37.5:1)浓度为8%,16S rDNA V3区所用变性剂梯度为37.5%~60%(100%的变性剂溶液包含40%(V/V)的甲酰胺与7 mol/L的尿素),18S rRNA (V1+V2)区所用变性剂梯度为15%~35%,PCR产物上样量均为500 ng,电泳参数为60 °C恒温、200 V恒

压下电泳 240 min, SYBR Green I 染色 30 min, 拍照. DGGE 三次重复, 均得到相同的图谱.

**1.6.4 DGGE图谱分析** DGGE图谱结合Image J和PAST软件进行分析. 香农指数 (Shannon's index) 反映群落组成的多样性,  $H = -\sum P_i \ln P_i$ , 其中  $P_i$  指图谱中第  $i$  条带的相对丰度; 均匀度 (Evenness) 即群落中不同类群分布的均匀程度, 是表述群落多样性的另一个基本参数,  $E = H / \ln S$ , 其中  $H$  为香农指数,  $S$  为每条泳道的条带数目.

**1.6.5 特异条带克隆与序列分析** 将DGGE图谱中的优势条带和特异性条带分别切下, 置于1.5 mL灭菌的离心管中, 用tip捣碎, 加入100  $\mu$ L超纯水, 4  $^{\circ}$ C浸泡过夜, 离心, 取1  $\mu$ L上清作为模板进行PCR扩增, 体系同1.4, 但所用的引物不含GC-clamp. 纯化PCR产物连接到pMD19-T载体 (TaKaRa), 转化大肠杆菌JM110, 得到克隆文库. 克隆经M13通用引物PCR鉴定和酶切鉴定后, 每个条带随机挑3个克隆进行测序. 测序结果去载体序列处理, 与NCBI数据库中的序列进行比对, 寻找同源性最高的序列, 同源性以一致序列所占的百分比作为标准.

## 2 结果与分析

### 2.1 根部土壤样品中可培养微生物的平板计数统计分析

采用传统的平板计数法对不同品系大豆根部可培养细菌 (含芽胞杆菌、产荧光假单胞菌)、真菌和放线菌的研究结果 (表1) 表明, 可培养细菌总数为  $3.68 \times 10^6 \sim 13.10 \times 10^6$  cells/g(土), 可培养芽胞杆菌总数为  $0.73 \times 10^6 \sim 2.60 \times 10^6$  cells/g(土), 可培养产荧光假单胞菌总数为  $1.49 \times 10^5 \sim 3.43 \times 10^5$  cells/g(土), 可培养真菌总数为  $6.75 \times 10^4 \sim 12.28 \times 10^4$  cells/g(土), 可培养放线菌总数为  $1.51 \times 10^5 \sim 6.83 \times 10^5$  cells/g(土). 根部土壤中可培养微生物的数量随时间的变化呈现出一定的消长变化. 但是, 转基因大豆G0431根部土壤无论是可培养细菌 (含芽胞杆菌、产荧光假单胞菌), 还是真菌和放线菌的数量, 与亲本对照的非转基因大豆黑农35均无显著性差异.

### 2.2 DGGE图谱分析

**2.2.1 细菌DGGE图谱分析** 16S rDNA V3区DGGE图谱 (图1) 显示了转基因大豆G0431和非转基因大豆黑农35不同取样时间根部土壤的细菌群落结构组成. 聚类分析结果 (图2) 显示, 取样时间相同或相近的土壤样品细菌群落结构组成

相似性较高. 在整个大豆生长期, 细菌群落结构组成比较稳定, 不同取样时期的相似性均在90%以上; 而相同时间取样的两种大豆根部土壤细菌群落结构组成没有明显差别, d 180两种大豆根部土壤细菌群落结构组成相似性最低, 约为93%; 在d 30两种大豆根部土壤细菌群落结构相似性最高, 约为97.6%. 不同取样时间转基因大豆G0431和非转基因大豆黑农35的根部土壤细菌群落多样性指数 (Shannon's index) 在5.32~5.37之间, 细菌群落分布的均匀度在0.91~0.95 (表2), 多样性和均匀度都非常稳定, 并且没有显著差异. 由此可以看出, 双价抗真菌病害基因的转入并没有引起根部土壤细菌群落结构发生明显的变化.

对细菌DGGE图谱 (图1) 中所标示条带回收和克隆, 经PCR鉴定后, 每条条带随机选取3个克隆进行测序. 测序结果显示, 大部分为未知细菌和不可培养菌. 其中的B1中包含3个不同序列, 分属于厚壁菌门 (Firmicutes)、未知种类 (Unknown) 和杆菌类 (Bacilli); B2中包含两个不同的序列分属于厚壁菌门 (Firmicutes) 和杆菌类 (Bacilli); B3只包含一种属于杆菌类 (Bacilli) 的 *Lactococcus lactis*; B4中包含两个不同的序列, 分属于未知种类 (Unknown) 和  $\gamma$ -变形杆菌 ( $\gamma$ -proteobacteria); B5包含两种分属于放线菌类 (Actinobacteria) 和嗜酸杆菌类 (Acidobacteria); B6在d 0天和d 15的土壤样品图谱中存在比较明显, 只包含属于脂鞘菌类 (Gemmatimonadetes) 的一个序列; B7与B5类似, 同时包含分属于放线菌类 (Actinobacteria) 和嗜酸杆菌类 (Acidobacteria) 的两个序列; B8只在d 90的土壤样品图谱中存在, 包含分属于  $\gamma$ -变形杆菌 ( $\gamma$ -proteobacteria)、 $\delta$ -变形杆菌 ( $\delta$ -proteobacteria) 和未知菌类 (Unknown) 3个序列; B9只在d 90和d 180的土壤样品图谱中存在, 同时包含分属于未知菌类 (Unknown)、放线菌类 (Actinobacteria) 和脂鞘菌类 (Gemmatimonadetes) 的两个序列; B10与B9类似, 但包含了4个不同的序列, 分属于未知菌类 (Unknown)、放线菌类 (Actinobacteria)、 $\alpha$ -变形杆菌 ( $\alpha$ -proteobacteria) 和拟杆菌类 (Bacteroidetes).

**2.2.2 真菌DGGE图谱分析** 18S rDNA V1+V2区DGGE图谱 (图3) 显示了转基因大豆G0431和其亲本对照非转基因大豆黑农35不同取样时间根部土壤的真菌群落结构组成. 每组条

表1 转基因大豆和非转基因大豆根际可培养细菌、真菌和放线菌的数量 ( $n/10^6$  cells  $g^{-1}$  soil,  $\bar{x} \pm s$ )

Table 1 Amounts of culture bacteria, fungi and actinomycetes in rhizosphere soil of GM and non GM soybean varieties ( $n/10^6$  cells  $g^{-1}$  soil,  $\bar{x} \pm s$ )

微生物区系 Microbial flora	处理 Treatment	d 0	d 15	d 30	d 90	d 180
细菌 Bacteria	转基因G0431 Transgenic G0431	7.63 $\pm$ 3.00a	4.20 $\pm$ 1.15a	3.68 $\pm$ 1.00a	8.92 $\pm$ 1.15a	12.20 $\pm$ 1.40a
	黑农35 Heinong 35	6.01 $\pm$ 2.42a	4.78 $\pm$ 1.75a	4.43 $\pm$ 1.45a	8.10 $\pm$ 1.05a	13.10 $\pm$ 1.5a
芽胞杆菌 Bacillus	转基因G0431 Transgenic G0431	1.25 $\pm$ 0.29a	0.73 $\pm$ 0.17a	1.33 $\pm$ 0.39a	1.53 $\pm$ 0.13a	2.60 $\pm$ 0.98a
	黑农35 Heinong 35	1.53 $\pm$ 0.17a	0.87 $\pm$ 0.20a	1.40 $\pm$ 0.22a	1.65 $\pm$ 0.21a	2.60 $\pm$ 0.48a
产荧光假单胞菌 Fluorescent Pseudomonas	转基因G0431 Transgenic G0431	3.43 $\pm$ 0.96a	2.50 $\pm$ 0.23a	2.53 $\pm$ 0.77a	1.78 $\pm$ 0.83a	1.80 $\pm$ 0.63a
	黑农35 Heinong 35	2.93 $\pm$ 0.47a	2.60 $\pm$ 0.32a	2.60 $\pm$ 0.74a	2.03 $\pm$ 0.47a	1.49 $\pm$ 0.49a
真菌 Fungi	转基因G0431 Transgenic G0431	10.38 $\pm$ 1.11a	12.28 $\pm$ 1.23a	7.08 $\pm$ 0.40a	9.90 $\pm$ 1.04a	7.60 $\pm$ 0.95a
	黑农35 Heinong 35	10.98 $\pm$ 1.41a	10.28 $\pm$ 1.70a	7.90 $\pm$ 0.90a	9.40 $\pm$ 1.14a	6.75 $\pm$ 0.93a
放线菌 Actinomycetes	转基因G0431 Transgenic G0431	2.19 $\pm$ 1.20a	5.69 $\pm$ 1.14a	1.89 $\pm$ 0.21a	1.55 $\pm$ 0.40a	2.60 $\pm$ 0.45a
	黑农35 Heinong 35	2.50 $\pm$ 0.33a	6.83 $\pm$ 1.43a	2.06 $\pm$ 0.77a	1.51 $\pm$ 0.18a	2.00 $\pm$ 0.42a

仅对在同一时间取样的G0431和黑农35的根部土壤样品间的数据进行比较, 同列字母相同的表示差异不显著

The difference between the samplings of G0431 and Heinong 35 obtained at the same time is tested only. The same letters in one column show the differences between G0431 and Heinong 35 are not statically significant ( $P < 0.05$ ;  $N = 3$ )

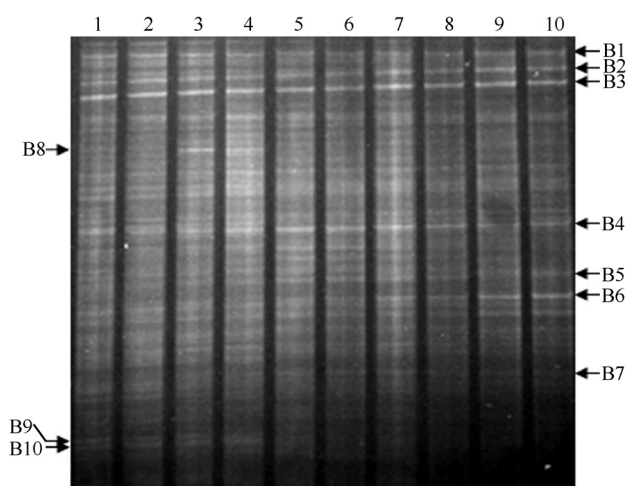


图1 不同时期大豆根部土壤总DNA 细菌群落结构DGGE图谱分析  
Fig. 1 DGGE image of bacterial community structure in soil sampled in different periods

1: G0431 180 d; 2: 黑农35 180 d; 3: G0431 90 d; 4: 黑农35 90 d; 5: G0431 30 d; 6: 黑农35 30 d; 7: G0431 15 d; 8: 黑农35 15 d; 9: G0431 0 d; 10: 黑农35 0 d

1: G0431 180 d; 2: Heihong 35 180 d; 3: G0431 90 d; 4: Heihong 35 90 d; 5: G0431 30 d; 6: Heihong 35 30 d; 7: G0431 15 d; 8: Heihong 35 15 d; 9: G0431 0 d; 10: Heihong 35 0 d

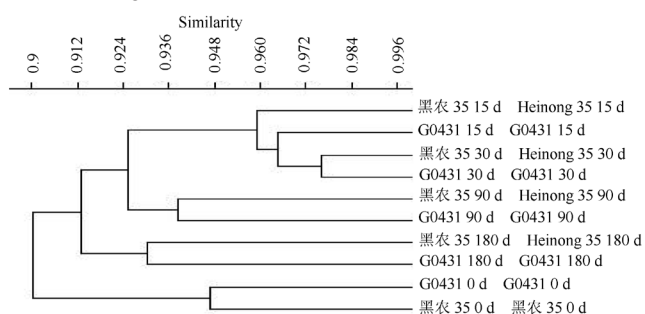


图2 大豆根部土壤细菌群落结构聚类分析

Fig. 2 Cluster analysis of bacterial community structure in soybean rhizosphere soil

带分布情况相似,与细菌群落结构组成变化相似,聚类分析结果(图4)显示:取样时间相同或相近的土壤样品真菌群落结构组成相似性较高;在整个大豆生长期,真菌群落结构组成也比较稳定,不同取样时期相似性均在93%以上;而相同时间取样的两种大豆根部土壤真菌群落结构组成没有明显差别,d 15两种大豆根部土壤真菌群落结构组成相似性高达约98%。不同取样时间转基因大豆G0431和非转基因大豆黑农35的根部土壤真菌群落多样性指数(Shannon's index)在4.78~4.91之间,真菌群落分布的均匀度在0.81~0.89(表2),多样性和均匀度都非常稳定,并且没有显著差异。由此可以看出,双价抗真菌病害基因的转入并没有引起根部土壤真菌群落结构发生明显的变化。

对真菌DGGE图谱(图3)中所标示条带回收和克隆,经PCR鉴定后,每条条带随机选取3个克隆进行测序。测序结果显示,主要为担子菌、半知菌、子囊菌和一些未知真菌类。其中的F1中包含两个不同序列,分属于半知菌(Deuteromycetes)的镰孢菌属(*Fusarium* sp.)和子囊菌(Ascomycota)的球座菌属(*Guignardia* sp.);F2中包含3个不

表2 大豆根部土壤细菌、真菌群落结构特征  
Table 2 Community structure characteristics of bacteria and fungi in soybean rhizosphere soil

土壤样品 Soil sample	细菌 Bacteria		真菌 Fungi	
	香农指数 Shannon's index	均匀度 Evenness	香农指数 Shannon's index	均匀度 Evenness
黑农35 0 d Heinong 35 0 d	5.35±0.09a	0.93±0.05a	4.79±0.07a	0.83±0.03a
G0431 0 d Transgenic G0431 0 d	5.32±0.10a	0.91±0.06a	4.86±0.05a	0.86±0.04a
黑农35 15 d Heinong 35 15 d	5.36±0.09a	0.94±0.05a	4.80±0.06a	0.81±0.05a
G0431 15 d Transgenic G0431 15 d	5.37±0.08a	0.94±0.04a	4.78±0.06a	0.84±0.06a
黑农35 30 d Heinong 35 30 d	5.35±0.09a	0.93±0.05a	4.90±0.05a	0.89±0.05a
G0431 30 d Transgenic G0431 30 d	5.36±0.09a	0.94±0.06a	4.85±0.05a	0.86±0.05a
黑农35 90 d Heinong 35 90 d	5.33±0.08a	0.91±0.04a	4.91±0.05a	0.89±0.04a
G0431 90 d Transgenic G0431 90 d	5.37±0.08a	0.95±0.05a	4.82±0.08a	0.83±0.07a
黑农35 180 d Heinong 35 180 d	5.37±0.08a	0.95±0.05a	4.78±0.10a	0.82±0.06a
G0431 180 d Transgenic G0431 180 d	5.37±0.08a	0.95±0.04a	4.78±0.10a	0.83±0.05a

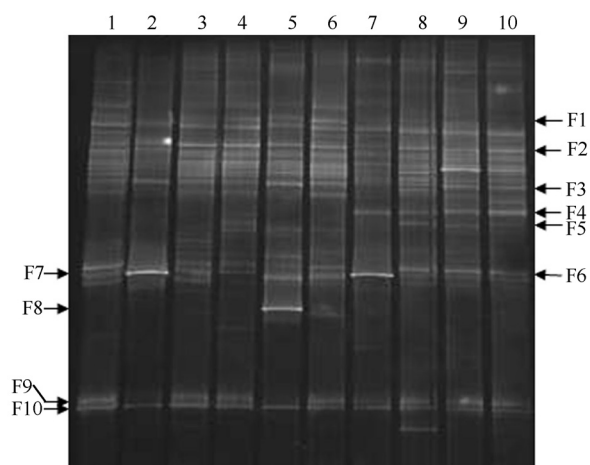


图3 不同时期大豆根部土壤总DNA真菌群落结构DGGE图谱分析

Fig. 3 DGGE image of fungal community structure in soil sampled in different periods

1: 黑农35 0 d; 2: G0431 0 d; 3: 黑农35 15 d; 4: G0431 15 d; 5: 黑农35 30 d; 6: G0431 30 d; 7: 黑农35 90 d; 8: G0431 90 d; 9: 黑农35 180 d; 10: G0431 180 d

1: Heihong35 0 d; 2: G0431 0 d; 3: Heihong35 15 d; 4: G0431 15 d; 5: Heihong35 30 d; 6: G0431 30 d; 7: Heihong 35 90 d; 8: G0431 90 d; 9: Heihong35 180 d; 10: G0431 180 d G0431 180 d

同的序列分属于半知菌、未知真菌(Unknown fungi)和子囊菌;F3包含4个不同序列,分属于Kickxellomyces、子囊菌、半知菌和壶菌(Chytridiomycota);F4中包含3个不同的序列,分属于子囊菌、半知菌、未知真菌;F5包含了分属于子囊菌、壶菌和担子菌(Basidiomycota)的3个不同的序列;F6、F7经测序比对结果显示分别为原生动物和后生动物;而F8也为不可培养的真核生物(Uncultured eukaryote);F9仅包含了属于

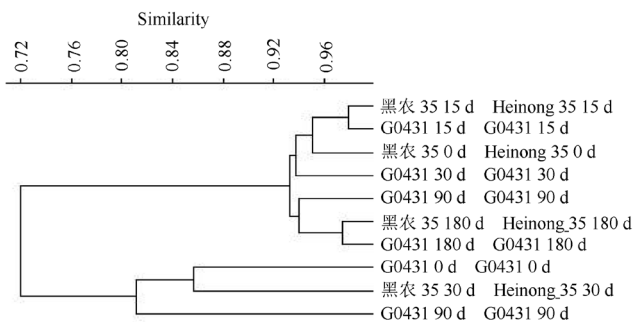


图4 大豆根部土壤真菌群落结构聚类分析  
Fig. 4 Cluster analysis of fungal community structure in soybean rhizosphere soil

担子菌的一个序列; F10与F8类似为不可培养的真核生物。

### 3 讨论

芽胞杆菌和荧光假单胞菌作为土壤中细菌的重要组成成员,在土壤微生物群落结构中占有重要的地位,这些细菌分泌的某些特定的次生代谢物质,能够抑制植物病原菌的生长<sup>[20-21]</sup>,对植物的健康生长起着尤为重要的作用。它们与真菌和放线菌都在一定程度上维持着土壤生态系统的动态平衡,因此,实验中对可培养的芽胞杆菌和产荧光假单胞菌进行了单独的分离培养计数分析。结果显示,不论是可培养细菌总数(包括可培养芽胞杆菌和产荧光假单胞菌单独计数)、真菌和放线菌,转基因大豆与非转基因大豆之间均未发现显著差异,从传统的分离培养技术上明确了外源基因的导入对土壤微生物是安全的,对大豆根部可培养微生物的数量没有显著影响。这与之前的有关转基因棉花<sup>[10]</sup>、转基因马铃薯<sup>[11]</sup>和转基因玉米<sup>[13]</sup>等转基因作物对根部土壤微生物没有显著影响的结果是一致的。

另一方面,由于传统培养方法的局限性,不能对土壤中的微生物进行全面、系统的分析。本试验通过变性梯度凝胶电泳技术,对大豆根部土壤中的细菌和真菌群落结构进行分析,发现大豆生长期是引起根部土壤细菌和真菌群落结构变化的主要因素。本试验从分子生态学角度证明了外源基因的导入没有引起大豆根部细菌、真菌群落组成结构的变化,该遗传操作是安全的。DGGE图谱中特异性条带的回收克隆测序结果表明,大豆根部的细菌主要由不可培养菌和未知菌类组成,而大豆根部真菌则主要分属于担子菌、半知菌、子囊菌和一些未知真菌类。另外,图4中,转基因大豆 G0431 大豆 d0与黑农 35在d 30和d 90的土壤样品中真菌群落结构组成聚集在一个分支内,可能是由于 F7 和 F8 两条条带所致,但测序结果表明,这两条带分别代表的是后生动物和不可培养的真核生物,并非真菌类群。Kim以 DGGE 和 PLFA (Profile of phospholipid fatty acids, PLFA) 的方法对两个抗草甘膦转基因水稻品系 Iksan 483 和 Milyang 204 根部土壤细菌群落研究时,发现转基因水稻和非转基因水稻根部细菌群落也没有明显不同<sup>[22]</sup>。

综上所述,本试验结合传统的平板培养法和不依赖于培养的 DGGE 技术,对转基因大豆根部土壤中可培养微生物的数量及细菌、真菌的群落结构组成进行了全面系统的研究。结果说明,菜豆几丁质酶基因和大麦核糖体失活蛋白基

因两个外源基因的导入,并没有引起大豆根部土壤可培养微生物的数量和细菌、真菌群落结构的显著变化,说明这两个外源基因的转入对于大豆根部土壤微生物的环境来说是安全的。本研究为该转基因抗病大豆的商业化种植提供了科学依据和理论基础,也为其他转基因植物根部土壤微生物安全性研究提供了可靠的参考。

### References

- 1 Wu Q (吴奇), Peng DL (彭德良), Peng YF (彭于发). Effects of herbicide tolerant soybean on biodiversity of non-target arthropods communities. *Acata Ecol Sin* (生态学报), 2008, **28** (6): 2622-2628
- 2 Zhao ZH (赵志辉), Yang LT (杨立桃), Ai XJ (艾晓杰), Zhang DB (张大兵), Zou SX (邹思湘). Analysis of the influence on physiological metabolism and genetic horizontal transformation of rats fed Roundup Ready soybean meal. *J Nanjing Agric Univ* (南京农业大学学报), 2006, **29**(1): 77-80
- 3 Means NE, Kremer RJ, Ramsier C. Effects of glyphosate and foliar amendments on activity of microorganisms in the soybean rhizosphere. *J Environ Sci Health B*, 2007, **42** (2): 125-132
- 4 Liu Q (刘琦), Li XC (李希臣), Liu ZJ (刘昭军), Li Tie (李铁), Lei BJ (雷勃钧). Study on roundup ready soybean's round up ready gene flowing I: Study on roundup ready gene move to soybean by anemophily. *Heilongjiang Agric Sci* (黑龙江农业科学), 2008, **1**: 14-16
- 5 Guo YS (郭玉双), Zhang YJ (张艳菊), Zhu YM (朱延明), Li J (李杰), Bai X (柏锡), Zhang SZ (张淑珍), Wu SY (吴书音), Li HY (李海燕). Obtainment of transgenic soybean plants with chitinase and ribosome inactivating protein genes and their resistance identification. *Acta Agron Sin* (作物学报), 2006, **32**(12): 1841-1847
- 6 Salehi A, Mohammadi M, Okhovvat SM, Omid M. Chitinase gene transformation through *Agrobacterium* and its explanation in soybean in order to induce resistance to root rot caused by *Rhizoctonia solani*. *Commun Agric Appl Biol Sci*, 2005, **70** (3): 399-406
- 7 Tougou M, Furutani N, Yamagishi N, Shizukawa Y, Takahata Y, Hidaka S. Development of resistant transgenic soybeans with inverted repeat-coat protein genes of soybean dwarf virus. *Plant Cell Rep*, 2006, **25** (11): 1213-1218
- 8 Tougou M, Yamagishi N, Furutani N, Shizukawa Y, Takahata Y, Hidaka S. Soybean dwarf virus-resistant transgenic soybeans with the sense coat protein gene. *Plant Cell Rep*, 2007, **26** (11): 1967-1975
- 9 Tang Y (唐影), Li SD (李世东), Miao ZQ (缪作清). Impact of transgenic crops on soil microbial community. *Chin J Biol Control* (中国生物防治), 2007, **23** (4): 383-390
- 10 Donegan KK, Palm CJ, Fieland VJ, Porteous LA, Ganio LM, Schaller DL, Bucuo LQ, Seidler RJ. Changes in levels, species, and DNA finger prints of soil microorganisms associated with cotton expressing the *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* endotoxin. *Appl Soil Ecol*, 1995, **2** (2): 111-124
- 11 Donegan KK, Schaller DL, Stone JK, Ganio LM, Reed G, Hamm PB. Microbial populations, fungal species diversity and plant pathogen levels in field plots of potato plants expressing the *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis* endotoxin. *Transgenic Res*, 1996, **5** (1): 25-35

- 12 Shen FF (沈法富), Han XL (韩秀兰), Fan SL (范术丽). Changes in microbial flora and bacterial physiological group diversity in rhizosphere soil of transgenic Bt cotton. *Acta Ecol Sin* (生态学报), 2004, **24** (3): 432-437
- 13 Schmalenberger A, Tebbe CC. Bacterial community composition in the rhizosphere of a transgenic, herbicide-resistant maize (*Zea mays*) and comparison to its non-transgenic cultivar Bosphore. *FEMS Microbiol Ecol*, 2002, **40** (1): 29-37
- 14 Zhang X (张霞), Zhang J (张杰), Peng YF (彭于发), Chen ZY (陈中义), Li GX (李国勋), Huang DF (黄大昉). On dynamics of colonization and biosafety assessment of genetically modified *Pseudomonas fluorescens* BioP8 in different environments. *J Saf Environ* (安全与环境学报), 2004, **4** (6): 7-10
- 15 Wang GJ (王广君). Construction of *Bacillus thuringiensis* engineered strains and study on insecticidal crystal proteins: [Degree Dissertation]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences (北京: 中国农业科学院), 2005. 43-53
- 16 King EO, Ward MK, Raney DE. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *J Lab Clin Med*, 1954, **44** (2): 301-307
- 17 Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences (中国科学院南京土壤研究所) ed. Research Methods for Microbe in Soil. Beijing, China: Science Press (北京: 科学出版社), 1985. 40-69
- 18 Muyzer G, de Waal EC, Uitterlinden AG. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol*, 1993, **59** (3): 695-700
- 19 May LA, Smiley B, Schmidt MG. Comparative denaturing gradient gel electrophoresis analysis of fungal communities associated with whole plant corn silage. *Can J Microbiol*, 2001, **47** ((9): 829-841
- 20 Dowling DN, O'Gara F. Metabolites of *Pseudomonas* involved in the biocontrol of plant disease. *Trends Biotechnol*, 1994, **12** (4): 133-141
- 21 Howell CR, Stipanovic RD. Control of *Rhizoctonia solani* on cotton seedlings with *Pseudomonas fluorescens* and with an antibiotic produced by the bacteria. *Phytopathology*, 1979, **69** (5): 480-482
- 22 Kim MC, Ahn JH, Shin HC, Kim T, Ryu TH, Kim DH, Song HG, Lee GH, Ka JO. 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. *J Microbiol Biotechnol*, 2008, **18** (2): 207-218

## 欢迎订阅2011年《中国生态农业学报》

《中国生态农业学报》由中国科学院遗传与发育生物学研究所和中国生态经济学会主办,中国科学院主管,科学出版社出版。系中文核心期刊、中国科技核心期刊,被美国化学文摘、国际农业生物学文摘、哥白尼索引、美国乌利希国际期刊指南以及中国科学引文数据库、中国学术期刊网络出版总库等检索系统和数据库收录。荣获第三届、四届全国农业优秀期刊一等奖和首届北方优秀期刊奖,被评为2009年中国北方优秀期刊,连续三届获得河北省优秀期刊奖。

《中国生态农业学报》主要报道农业生态学、生态学、农业资源与环境保护、农业生态经济学及生态农业建设等领域创新性研究成果。适于从事农业生态学、生态学、生态经济学以及环境保护等领域科技人员、高等院校有关专业师生,农业及环境管理工作者和基层从事生态农业建设的技术人员阅读与投稿。

《中国生态农业学报》国内外公开发行,国内刊号CN13-1315/S,国际刊号ISSN1671-3990。双月刊,国际标准大16开本,192页,每期定价35元,全年210元。邮发代号:82-973,全国各地邮局均可订阅。漏订者可直接汇款至编辑部补订(需另加邮资24.00元)。

地址: (050021) 河北省石家庄市槐中路286号 《中国生态农业学报》编辑部  
电话: (0311) 85818007 传真: (0311) 85815093  
网址: <http://www.ecoagri.ac.cn> E-mail: [editor@sjziam.ac.cn](mailto:editor@sjziam.ac.cn)