

转 *CpTI* 基因对棉花根际土壤中微生物的影响

朱荷琴, 冯自力, 刘雪英

(中国农业科学院棉花研究所, 农业部棉花遗传改良重点实验室, 河南 安阳 455000)

摘要: 2006—2007年, 采用4个转 *CpTI* 基因棉花材料及其受体, 于棉花不同生育期取根际土壤, 研究了转 *CpTI* 基因对棉花根际细菌、放线菌及真菌数量的影响。结果表明: 转 *CpTI* 基因及其受体材料根际土壤中细菌、放线菌和真菌的数量均随着棉花的生长发育变化, 细菌在棉花的花铃期达到高峰, 放线菌和真菌在蕾期至花铃期达到高峰, 之后随着棉花的衰老均减少。转 *CpTI* 基因对棉花根际土壤中细菌、放线菌和真菌的数量有显著影响, 细菌和放线菌的数量均比对应受体材料显著增加, 而真菌的数量显著减少; 从棉花的不同生育时期看, 细菌的数量在苗期和花铃期显著高于受体材料, 放线菌在不同时期均显著高于受体材料, 尤以苗期和花铃期更明显, 而真菌的数量在吐絮期显著低于受体材料。

关键词: 转 *CpTI* 基因棉花; 根际微生物; 风险评估

中图分类号: S435.621 **文献标识码:** A

文章编号: 1002-7807(2009)05-0366-05

The Effect of *CpTI* Cotton to Microbial Flora in Rhizosphere Soil

ZHU He-qin, FENG Zi-li, LIU Xue-ying

(Cotton Research Institute of CAAS, Key Laboratory of Cotton Genetic Improvement, MOA, Anyang, Henan 455000, China)

Abstract: Widely growing of transgenic plant may be accompanied by ecological effects including changes in plant-associated with micro-flora. People pay more attention to environment risk assessment of transgenic plant. Most researches on Bt cotton have focused on invasiveness, gene flow to indigenous organisms, development of resistance in target pests, and direct or indirect effects on non-target organisms and ecosystem. Some research have focused on the evaluation of ecological effects of Bt cotton on microbial flora. But a few studies have been published to evaluate the ecological effects of *CpTI* cotton on microbial flora. Four *CpTI* cotton lines and their contrasts (non-*CpTI* cotton) were monitored for changes in total bacterial, actinomycetic and fungal population in 2006 and 2007. The results showed that the total bacterial, actinomycetic and fungal population of *CpTI* cotton and non-*CpTI* cotton changed in different growing period. The total bacterial population reached the maximum in flowering-bolling stage. So did the total actinomycetic and fungal population between budding stage and flowering-bolling stage. After that they declined gradually along with the decrepitude of cotton. The total bacterial population of *CpTI* cotton was significantly higher than that of non-*CpTI* cotton, especially in seedling stage and flowering-bolling stage. So did the total actinomycetic population of *CpTI* cotton from seedling stage to boll-opening stage. But the total fungal population was remarkably lower than that of non-*CpTI* cotton, especially in boll-opening stage.

Key words: *CpTI* cotton; rhizosphere microbes; risk assessment

收稿日期: 2008-09-03 作者简介: 朱荷琴(1966-), 女, 副研究员, zhuhq@cricaas.com.cn

基金项目: 国家“十一五”支撑计划项目(2006BAD08A07)

土壤微生物是维持土壤生物活性的重要组成部分,参与有机质分解、腐殖质形成、养分转化和循环等多种土壤生化过程,且对外界干扰比较灵敏。微生物活性和群落结构的变化是土壤环境评价不可缺少的重要生物学指标^[1]。转基因作物通过残枝落叶和根系分泌物引起土壤微生物种类、数量的变化,同时也可能改变微生物群落生理特性和代谢活性,对土壤中作物残茬分解和 C、N 等养分循环过程产生负面效应,进而影响土壤生物、生态过程和肥力^[2]。随着转基因作物的大面积种植,转基因植物的风险评价倍受人们的关注^[3]。目前,转基因植物风险评价主要集中在转基因植物与近缘物种的基因流、目标害虫的抗性以及对非目标动植物的多样性和生态系统的影响,而转基因植物对土壤微生物的影响还未引起足够的重视^[3]。国内外就转 Bt 基因棉对土壤微生物影响的研究表明,转 Bt 基因抗虫棉土壤微生物的数量和种类与常规棉花差异显著,比较一致的结论是转基因棉花可以提高根际土壤中细菌的数量,而就放线菌和真菌的研究结论不一致^[3-5]。

蛋白酶抑制剂基因(*CpTI*) 在植物基因工程中的应用已有十余年,转 *CpTI* 基因棉花的获得使棉花的抗虫能力和抗虫范围有了新的扩展。和其它基因一样,*CpTI* 基因的安全性也同样受到人们的关注,而目前还没有关于转 *CpTI* 基因对土壤中微生物影响的报道。本研究以 4 个转 *CpTI* 基因材料及其受体为材料,研究比较了不同发育时期的转 *CpTI* 棉花和常规棉花根际土壤中细菌、放线菌和真菌数量的变化,以期建立转 *CpTI* 基因植物对土壤生态风险评价体系提供参考。

1 材料和方法

1.1 材料

受体棉花:受体 A(05B1)、受体 B(中 1525)、受体 C(中 287)、受体 D(中 36),对应转 *CpTI* 基因棉花:转基因 A(转 *CpTI* 基因 05B1)、转基因 B(转 *CpTI* 基因中 1525)、转基因 C(转 *CpTI* 基因中 287)、转基因 D(转 *CpTI* 基因中 36)。转基因棉花及受体棉花材料由中国农业科学院棉花研究所转基因课题组、抗逆育种课题组、早熟棉育种课题组提供。

1.2 田间试验与土壤采集

2006—2007 年在同一棉田进行试验,随机区组排列,3 次重复,每小区 2 行。2006 年于 4 月

30 日播种,2007 年于 4 月 25 日播种。两年均于苗期、蕾期、花铃期和吐絮期取样,每次每小区随机取 2 株棉花,收集距根 0.5 cm 范围内土壤作为根际土样,除去杂质,装入保鲜袋中,于 4℃ 冰箱中保存。

1.3 测定方法

均采用平板稀释分离培养法。细菌用牛肉浸膏蛋白胨琼脂培养基;放线菌用改良高氏 1 号琼脂培养基,加 0.01% 的重铬酸钾;真菌用马铃薯葡萄糖琼脂培养基,加 0.003% 的链霉素。

2 结果与分析

2.1 转 *CpTI* 基因对棉花根际土壤中细菌的影响

2006 年测得的转 *CpTI* 基因材料及其受体材料根际土壤中细菌的含量均高于 2007 年(表 1)。两年的结果均表明:土壤中细菌的数量随着棉花的生长发育而逐渐增加,转基因棉花和受体棉花根际土壤(干土样,下同)中的细菌数量(可培养活菌落数,下同)均在花铃期达到高峰(其中 2006 年,转基因 A 及其受体材料最高,分别达到 5.50×10^7 个 $\cdot g^{-1}$ 和 4.68×10^7 个 $\cdot g^{-1}$),然后均逐渐减少。两年 4 个转基因材料根际土壤中细菌数量平均为 2.49×10^7 个 $\cdot g^{-1}$ 和 2.09×10^7 个 $\cdot g^{-1}$,受体材料分别为 2.12×10^7 个 $\cdot g^{-1}$ 和 1.70×10^7 个 $\cdot g^{-1}$,转基因材料与其对应的受体材料相比,差异均达极显著水平。2006 年转基因材料 A 和转基因材料 C 分别较受体提高 21.7% 和 16.4%,差异达极显著水平,转基因 B 和转基因 D 均显著高于受体材料;2007 年转基因材料 B 较受体提高 24.3%,差异达极显著水平,转基因 A、转基因 C 和转基因 D 均显著高于受体材料。从棉花的不同生育时期看,2006 年除花铃期外,苗期、蕾期和吐絮期,转基因材料均显著高于其受体材料;2007 年苗期和吐絮期显著高于受体材料,蕾期和花铃期差异不显著。

2.2 转 *CpTI* 基因对棉花根际土壤中放线菌的影响

2006 年测得土壤中放线菌的含量均低于 2007 年(表 2)。转基因与受体棉花根际土壤中放线菌的数量在棉花的苗期到蕾期迅速增加,后期随着棉花的衰老而逐渐减少。两年转基因和受体棉花根际土壤中放线菌数量均在蕾期达到高峰。转基因 B 及其受体材料根际放线菌数量最高,可培养活菌落数分别达到 6.25×10^6 个 $\cdot g^{-1}$ 、 5.97

$\times 10^6$ 个 $\cdot g^{-1}$ 和 6.92×10^6 个 $\cdot g^{-1}$ 、 5.90×10^6 个 $\cdot g^{-1}$ 。4 个转 *CpTI* 基因材料根际土壤中放线菌的平均数量分别为 3.21×10^6 个 $\cdot g^{-1}$ 和 5.30×10^6 个 $\cdot g^{-1}$ ，均极显著高于其受体材料 3.02×10^6 个 $\cdot g^{-1}$ 和 4.70×10^6 个 $\cdot g^{-1}$ 。2006 年转基因 B、转基因 A 和转基因 D 均极显著或显著高于其对应的受体材料；2007 年转基因 A 较受体材料提高 19.8%，差异达极显著水平，其它 3 个材料均显著

高于其对应的受体材料。在棉花的不同生育时期，转基因材料根际土壤中放线菌的数量均高于受体材料，并达显著或极显著水平，以苗期和花铃期表现更明显。

2.3 转 *CpTI* 基因对棉花根际土壤中真菌的影响

转基因与受体棉花根际土壤中真菌的数量变化规律基本一致，苗期至蕾期逐渐增加，花铃期达到高峰，吐絮期真菌数量减少(表 3)。以受体材料

表 1 *CpTI* 棉花及其受体材料根际土壤中细菌的变化

Table 1 Changes in total bacterial population of rhizosphere soil of *CpTI* cotton and non-*CpTI* cotton $\times 10^7$ 个 $\cdot g^{-1}$

材料名称	2006 年					2007 年				
	苗期	蕾期	花铃期	吐絮期	平均	苗期	蕾期	花铃期	吐絮期	平均
转基因 A	2.86	3.82	5.50	1.75	3.48**	1.11	1.69	3.00	2.09	1.97*
受体 A	2.47	3.25	4.68	1.04	2.86	0.94	1.37	2.34	1.55	1.55
转基因 B	1.76	2.58	2.94	2.50	2.45*	1.42	1.89	2.85	2.26	2.10**
受体 B	1.59	2.18	2.81	2.07	2.16	1.12	1.46	2.42	1.75	1.69
转基因 C	1.45	2.21	2.68	1.33	1.92**	1.51	2.56	2.42	2.07	2.14*
受体 C	1.08	1.99	2.51	1.01	1.65	1.01	1.90	2.26	1.77	1.73
转基因 D	1.44	2.69	2.93	1.32	2.10*	1.57	2.20	2.76	2.02	2.14*
受体 D	1.24	2.16	2.67	1.20	1.82	1.24	1.77	2.63	1.62	1.82
转基因材料平均	1.88*	2.83*	3.51	1.73*	2.49**	1.40*	2.09	2.76	2.11*	2.09**
受体材料平均	1.60	2.40	3.17	1.33	2.12	1.08	1.63	2.41	1.67	1.70

注：“*”表示 t 测验差异显著，“**”表示 t 测验差异极显著。

表 2 *CpTI* 棉花及其受体材料根际土壤中放线菌的数量

Table 2 Changes in total actinomycetic population of rhizosphere soil of *CpTI* cotton and non-*CpTI* cotton $\times 10^6$ 个 $\cdot g^{-1}$

材料名称	2006 年					2007 年				
	苗期	蕾期	花铃期	吐絮期	平均	苗期	蕾期	花铃期	吐絮期	平均
转基因 A	1.20	4.84	2.53	2.05	2.66*	3.98	6.14	5.85	4.86	5.21**
受体 A	1.11	4.52	2.23	1.84	2.43	3.40	5.18	4.81	4.02	4.35
转基因 B	2.94	6.25	4.72	1.98	3.97**	3.90	6.92	6.38	4.19	5.35*
受体 B	2.77	5.97	4.54	1.75	3.76	3.56	5.90	5.56	3.69	4.68
转基因 C	2.47	4.64	4.61	2.39	3.53	4.18	6.50	6.14	5.43	5.56*
受体 C	2.32	4.21	4.52	2.21	3.32	4.04	5.73	5.52	4.72	5.00
转基因 D	2.00	2.50	4.37	1.84	2.68*	4.25	5.84	6.36	3.83	5.07*
受体 D	1.84	2.41	4.26	1.79	2.58	4.00	5.70	5.79	3.53	4.75
转基因材料平均	2.15**	4.56*	4.06*	2.07*	3.21**	4.08*	6.35*	6.18**	4.58*	5.30**
受体材料平均	2.01	4.28	3.89	1.90	3.02	3.75	5.63	5.42	3.99	4.70

注：“*”表示 t 测验差异显著，“**”表示 t 测验差异极显著。

表 3 *CpTI* 棉花及其受体材料根际土壤中真菌的数量

Table 3 Changes in total fungal population of rhizosphere soil of *CpTI* cotton and non-*CpTI* cotton $\times 10^4$ 个 $\cdot g^{-1}$

材料名称	2006 年					2007 年				
	苗期	蕾期	花铃期	吐絮期	平均	苗期	蕾期	花铃期	吐絮期	平均
转基因 A	2.8	4.7	5.8	3.8	4.3	6.9	9.4	10.3	8.9	8.9**
受体 A	3.4	5.8	6.0	4.0	4.8	7.2	9.8	10.7	9.1	9.2
转基因 B	6.8	7.4	8.5	6.1	7.2*	7.4	8.5	9.3	8.8	8.5*
受体 B	7.2	8.7	9.3	6.5	7.9	7.7	9.8	10.1	9.9	9.4
转基因 C	3.1	5.0	7.4	6.0	5.4**	7.7	8.9	10.1	8.1	8.7**
受体 C	3.6	5.4	7.6	6.4	5.8	8.5	9.5	10.7	8.6	9.3
转基因 D	4.2	7.9	7.6	4.4	6.0	8.5	8.7	10.6	9.2	9.2
受体 D	5.5	8.2	7.9	5.2	6.7	8.7	9.2	12.1	10.1	10.0
转基因材料平均	4.2*	6.3	7.3	5.1*	5.7**	7.6	8.9*	10.1*	8.8*	8.8**
受体材料平均	4.9	7.0	7.7	5.5	6.3	8.0	9.6	10.9	9.4	9.5

注：“*”表示 t 测验差异显著，“**”表示 t 测验差异极显著。

D 根际土壤中真菌数量最高,2006 年花铃期达到 8.2×10^4 个 $\cdot g^{-1}$,2007 年花铃期达到 12.1×10^4 个 $\cdot g^{-1}$ 。两年 4 个转基因材料根际中真菌的平均数量分别为 5.7×10^4 个 $\cdot g^{-1}$ 和 8.8×10^4 个 $\cdot g^{-1}$,均极显著低于其受体材料 6.3×10^4 个 $\cdot g^{-1}$ 和 9.5×10^4 个 $\cdot g^{-1}$ 。转基因材料 C 根际土壤中的真菌数量两年均极显著低于受体材料,转基因材料 B 两年均显著低于受体材料,转基因材料 A 于 2007 年显著低于受体材料,2006 年差异不显著,转基因材料 D 两年差异均不显著。从棉花的不同生育时期看,两年 4 个转基因材料在棉花的不同生育期根际土壤中的真菌数量均极显著或显著低于受体材料,2006 年苗期和吐絮期显著低于受体材料,蕾期和花铃期差异不显著。2007 年除苗期差异不显著外,蕾期、花铃期和吐絮期,转基因材料根际土壤中细菌数量均显著低于其受体材料。

3 小结与讨论

3.1 棉花根际土壤中微生物的数量与棉花的生育期相关

4 个转 *CpTI* 基因材料及其受体材料根际土壤中细菌、放线菌和真菌的数量均随着棉花的生长发育而变化,细菌在棉花的花铃期达到高峰,放线菌和真菌在蕾期至花铃期达到高峰,之后随着棉花的衰老而减少。

3.2 转 *CpTI* 基因棉花对根际土壤中细菌、放线菌和真菌的数量有显著影响

转基因作物外源基因及其表达产物通过根系分泌物或作物残茬进入土壤生态系统,可能影响到植物分解速率和 C、N 水平,进而影响土壤生物、生态过程和肥力,或通过与土壤微生物相互作用,改变土壤微生物对外来底物的利用,影响微生物的活动过程,改变微生物的数量、种类和组成^[6]。随着转基因农作物种植面积的逐年扩大,转基因生物的安全已成为全球关注的焦点问题。国外发达国家和国际组织十分重视农业转基因生物安全研究,将获得尽可能充分的转基因生物安全知识和发展有效的安全使用技术放在比转基因生物产品研发更加重要的优先位置。转基因生物对生态环境和生物多样性的影响是转基因植物环境安全评价工作的重要内容^[7]。本研究表明,转 *CpTI* 基因棉花对根际土壤中细菌、放线菌和真菌的数量有显著影响,细菌和放线菌的数量均比

对应受体材料明显增加,而真菌的数量明显减少。从棉花的不同生育时期看,细菌的数量在苗期和花铃期差异显著,放线菌在不同时期均差异显著,也是以苗期和花铃期更明显,而真菌是以吐絮期表现明显,该研究将为转 *CpTI* 基因棉花的环境安全评价提供信息和帮助。

3.3 转基因抗虫棉对土壤生态系统的影响及其风险评估有待进一步研究

转基因抗虫棉最常用的外源基因是 *Bt* 基因和 *CpTI* 基因。这两种基因已被分别或同时导入棉株中并获得了一批有发展前景的转基因棉花品种^[8]。至 2007 年,我国转基因抗虫棉的面积已占棉花总面积的 69%。其中,黄河流域棉区转基因抗虫棉的面积占 98% 以上,长江流域棉区转基因抗虫棉的面积占 70% 以上,新疆棉区抗虫棉的面积占 30% 左右。黄河流域和长江中下游棉区转基因抗虫棉已基本取代常规棉,使我国棉花生产实现了新一轮的品种更换^[9]。目前对于转基因抗虫棉花环境安全的评价主要是针对其对靶标害虫、非靶标害虫及天敌种群动态的影响,而转基因抗虫棉对土壤微生物种类、数量及土壤生态系统影响的研究不多,对可能产生的土壤生态系统风险的评估也缺少系统资料。Donegan 等的研究结果表明:3 个转 *Bt* 基因棉花品系中 2 个品系处理小区的细菌和真菌的数量显著高于其它处理,而另一个转 *Bt* 基因棉花品系及纯化的 *Bt* 蛋白对土壤细菌和真菌数量的影响不显著,进一步研究认为该 2 个转 *Bt* 棉花的细菌群落物种组成也发生了明显的变化,并认为转 *Bt* 基因棉可能是由于遗传修饰后的植株的生理生化特性发生了变化,从而对土壤微生物产生影响,而不是表达产物的直接影响^[4]。沈法富等以转 *Bt* 基因抗虫棉 CK-12 和常规棉花泗棉 3 号作为材料,连续两年测定棉花根际土壤细菌、放线菌和真菌数量的变化,结果表明:虽然不同年份和生育期棉花根际微生物数量存在差异,但是,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。在棉花的苗期和吐絮期,转 *Bt* 基因抗虫棉根际微生物的数量与对照差异不显著;在棉花的花铃期,转 *Bt* 基因抗虫棉根际细菌的数量比对照增加,放线菌的数量差异不显著,而真菌的数量变化没有规律^[3]。张美俊等研究转 *Bt* 基因棉对根际土壤细菌、放线菌、真菌的影响,认为转 *Bt* 基因棉对细菌和真菌生长繁殖有促进作用,对放线菌数量没有显著影

响^[5]。国内外就转 *CpTI* 基因对土壤微生物影响方面的研究不多。Donegan 等就转蛋白酶抑制剂基因烟草对土壤微生物种类和数量的潜在影响进行了研究, 结果发现转基因植物根际土壤中存在更多的线虫, 而弹尾目昆虫的数量则显著降低^[4]。本研究表明, 转 *CpTI* 基因棉花对根际土壤中细菌数量有促进作用, 这与上述关于转 *Bt* 基因棉花的研究结论一致, 而对放线菌和真菌的影响有所不同。上述研究表明转 *Bt* 基因及转 *CpTI* 基因抗虫棉的种植均对土壤中微生物的数量有明显影响, 而长期种植由此产生的对土壤生态系统的影响等风险研究还有待进一步深入, 以推动转基因抗虫棉的健康发展。

参考文献:

- [1] 滕 应, 黄昌勇, 骆永明, 等. 重金属污染土壤的微生物生态效应及其修复研究进展[J]. 土壤与环境, 2002, 11(1): 85-89.
TENG Ying, Huang Chang-yong, Luo Yong-ming, et al. Kinetic characteristics for functional diversity of microbial communities in soils polluted with mixed heavy metal[J]. Acta Pedologica Sinica, 2002, 11(1): 85-89.
- [2] 王忠华, 叶庆富, 舒庆尧, 等. 转基因植物根系分泌物对土壤微生态的影响[J]. 应用生态学报, 2002, 13(3): 373-375.
WANG Zhong-hua, Ye Qing-fu, Shu Qing-yao, et al. Impact of root exudates from transgenic plants on soil micro-ecosystems[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2002, 13(3): 373-375.
- [3] 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.
SHNE 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.
- [4] DONEGAN K K, Palm C J, Field V J, et al. Changes in levels, species and DNA fingerprints of soil microorganisms associated with cotton expressing the *Bacillus thuringiensis* var. Kurstaki δ -endotoxin[J]. Applied Soil Ecology, 1995, 2(2): 111-124.
- [5] 张美俊, 杨武德, 李燕娥. 不同生育期转 *Bt* 基因棉种植对根际土壤微生物的影响[J]. 植物生态学报, 2008, 32(1): 197-203.
ZHANG Mei-jun, Yang Wu-de, Li Yan-e. Effect of *Bt* transgenic cottons planting on rhizosphere soil microorganisms at different growth stages[J]. Journal of Plant Ecology, 2008, 32(1): 197-203.
- [6] 聂呈荣, 王建武, 骆世明. 转基因植物对农业生物多样性的影响[J]. 应用生态学报, 2003, 14(8): 1369-1373.
NIE Cheng-rong, Wang Jian-wu, Luo Shi-ming. Effect of transgenic plants on biodiversity[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2003, 14(8): 1369-1373.
- [7] 崔金杰, 雒珺瑜, 王春义, 等. 转双价基因棉田主要害虫及其天敌的种群动态[J]. 棉花学报, 2004, 16(2): 94-101.
CUI Jin-jie, Luo Jun-yu, Wang Chun-yi, et al. Population dynamics of main pests and enemies in the transgenic *CryIAc + CpTI* cotton field[J]. Cotton Science, 2004, 16(2): 94-101.
- [8] 王仁祥. 中国转基因抗虫棉的应用及发展对策[J]. 棉花学报, 2003, 15(3): 180-184.
WANG Ren-xiang. The development and application of transgenic insect-resistant cotton in China[J]. Cotton Science, 2003, 15(3): 180-184.
- [9] 朱荷琴, 冯自力, 宋晓轩, 等. 去早蕾对转基因抗虫棉黄萎病及早衰的影响[J]. 棉花学报, 2008, 20(6): 414-417.
ZHU He-qin, Feng Zi-li, Song Xiao-xuan, et al. Effect of removal of early squares on *Verticillium* wilt and premature senescence in *Bt* transgenic cotton[J]. Cotton Science, 2008, 20(6): 414-417. ●