

利用 PLFA 方法研究转 *Bt* 基因棉花对土壤微生物群落结构变化的影响

李永山, 范巧兰, 陈耕, 柴永峰, 张冬梅, 李燕娥

(山西省农业科学院棉花研究所, 运城 044000)

摘要:在大田条件下,用3个转 *Bt* 基因棉花品种和一个常规品种,利用磷脂脂肪酸(PLFA)方法研究转 *Bt* 基因棉花对土壤微生物群落结构变化的影响。试验结果表明,转基因棉花增加了土壤微生物 PLFA 的含量。转基因棉花降低了棉田土壤格兰氏阳性细菌的比例,提高棉田土壤的真核生物、真菌和放线菌的比例;转基因棉花在蕾期提高了土壤原生动物比例,在吐絮期比例反而降低;转基因棉花在蕾期提高了棉田土壤格兰氏阴性细菌的比例,吐絮期则降低了格兰氏阴性细菌的比例。主成分分析和聚类分析表明,转 *Bt* 基因棉花对土壤微生物群落结构变化有明显影响。PLFA 方法可作为转基因生态安全评价的一种方法。

关键词:转 *Bt* 基因棉花;土壤微生物;群落结构;磷脂脂肪酸

中图分类号:S562 **文献标识码:**A

文章编号:1002-7807(2009)06-0503-05

Soil Microbial Community Structure Change Analysis of Transgenic *Bt* Cotton Based on Phospholipid Fatty Acid Method

LI Yong-shan, FAN Qiao-lan, LI Yan-e Geng, CHAI Yong-feng, ZHANG Dong-mei, LI yan-e

(Cotton Research Institute, Shanxi Academy of Agricultural Sciences, Yuncheng, Shanxi 044000, China)

Abstract: The experiment was conducted to evaluate the effects of transgenic *Bt* cotton on soil microbial community in 2006 under the field based on phospholipid fatty acid (PFLA) method. Three transgenic *Bt* cotton lines (JM26, JM44 and CCRI41) and one non-*Bt* cotton line were used. The results showed transgenic *Bt* cotton increased amount of PFLA for soil microbe. *Bt*-cotton soils were characterized by the predominance of actinomycetes, fungi and eukaryotes in comparison with non-*Bt* cotton soil. In contrast, the microbial community was characterized by the predominance of Gram-positive bacteria in non-*Bt* cotton soil. Soil microbial community were characterized by the predominance of protozoa and Gram-negative bacteria for *Bt*-cotton soils in square growth stage, and for non-*Bt* cotton soil in the open boll stage. PFLA analysis was accepted as indicator for risk evaluation of transgenic *Bt* cotton on soil microbial community.

Key words: transgenic *Bt* cotton; soil microbe; community structure; PLFA

自从 Perlak 等^[1]首次成功地将苏云金杆菌的杀虫基因(*Bt*)转入棉花获得抗虫植株以后,抗虫棉进入应用阶段。转 *Bt* 基因抗虫棉是我国批准进行大规模商品化种植的转基因植物,2004 年全国转基因抗虫棉种植面积达 310.4 万 hm^2 ,占棉花总面积一半以上,而国产转基因抗虫棉种植面

积占 70% 左右^[2]。随着转基因植物商品化进程的加快,转基因植物的风险评价倍受人们的关注^[3-5]。转基因的评价主要集中在地上生态系统^[6-10],而对土壤微生物的影响还未引起足够的重视。国内外对转 *Bt* 基因抗虫棉土壤微生物的数量与种类研究甚少^[11-17],而且采用传统的微生

收稿日期:2009-01-19 作者简介:李永山(1965-),男,博士,研究员, sxysli@126.com

基金项目:国家自然科学基金(30871601),山西省自然科学基金(2007011092)和山西省农业科学院博士基金(YBSJJ0602)

物的培养方法,这些传统方法培养的微生物只占总数的0.1%~10%,不能全面反映土壤微生物多样性信息。磷脂脂肪酸(Phospholipid Fatty Acid, PLFA)图谱分析是近几年来发展的研究土壤微生物群落结构的一种新方法,它可定量分析微生物群落的生物量和群落结构,能不通过微生物的纯培养,在属的水平上鉴别微生物种类,是一种快速、可靠的检测方法。因此,本研究采用磷脂脂肪酸图谱分析转 Bt 棉花对土壤微生物多样性的影响,旨在为转基因安全评价提供依据和方法。

1 材料和方法

试验于 2006 年在山西省农业科学院棉花研究所试验农场进行。试验地为黄壤土,肥力中等偏上,土壤有机质含量为 0.89%,速效氮、磷、钾含量分别为 $65 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、 $7 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 和 $86 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。土壤的 pH 值为 7.12。

供试品种:转 Bt 基因抗虫棉晋棉 26 号、晋棉 44 号、中棉所 41 和常规棉品种晋棉 7 号。4 月 18 日播种,地膜覆盖。于蕾期和吐絮期在窄行取 0~15 cm 耕层土壤进行微生物分析。

1.1 PLFA 试验方法

1.1.1 PLFA 的提取。参考 Frostegard^[18] 等方法。

1.1.2 试验方法。称 2 g 冷冻干燥土壤,用单氯氟仿-甲醇-磷酸钾缓冲液(1:2:0.8, v/v/v)进行总脂类提取,并将提取液在硅胶上进行磷脂分离,将得到的磷脂进行甲脂化,然后用气相色谱进行分析。

PLFA 的命名一般采用以下原则, X:Y ω Z(c/t), 其中 X 表示总碳数,后面跟一个: Y 表示双键数, ω 表示甲基末端, Z 表示距离甲基端的距离, c 表示顺式, t 表示反式, a 和 i 分别表示支链的反异构和异构, 10 Me 表示一个甲基团在距分子末端第 10 个碳原子上, 环丙烷脂肪酸用 cy 表示。

表 2 不同转基因棉花土壤微生物 PLFA 的分布

Table 2 Distribution of phospholipid fatty acids of Bt cotton in soil microbes

	晋棉 44		晋棉 26		晋棉 7		中棉所 41	
	蕾期	吐絮期	蕾期	吐絮期	蕾期	吐絮期	蕾期	吐絮期
单链饱和 PLFA	19.59	14.63	16.89	16.35	19.76	15.63	21.29	17.95
单链不饱和 PLFA	32.23	29.32	33.82	33.47	31.74	34.77	36.07	33.91
单链多不饱和 PLFA	7.94	5.25	4.77	5.97	4.51	5.91	9.16	7.09
支链 PLFA	10.65	11.25	11.93	10.86	12.38	15.81	8.89	11.19
环丙烷 PLFA	8.74	7.03	8.55	9.04	9.90	8.39	7.75	8.11
10 甲基类 PLFA	12.73	11.25	15.12	15.15	12.67	11.85	10.11	13.43
羟基类 PLFA	1.47	1.70	1.80	2.15	2.65	1.85	1.27	1.48

1.2 统计分析

所有数据用 DPS 统计软件进行分析。

2 结果和分析

2.1 转基因棉花对土壤微生物磷脂脂肪酸(PLFA)含量的影响

试验结果表明,转基因棉花对土壤微生物的 PLFA 总含量有明显影响(表 1)。据蕾期测定,转基因棉花的晋棉 26 号比具有相似血缘的非转基因棉花晋棉 7 号 PLFA 含量提高 13.56%,转基因棉花的晋棉 44 号和中棉所 41 比非转基因棉花晋棉 7 号分别提高 30.1% 和 3.25%;在吐絮期,晋棉 26 号比晋棉 7 号 PLFA 含量提高 56.44%,晋棉 44 号和中棉所 41 比晋棉 7 号分别提高 98.97% 和 98.18%。

表 1 不同时期土壤微生物 PLFA 总含量

Table 1 Contents of phospholipid fatty acids of Bt cotton

品 种	in soil microbes	
	蕾期	吐絮期
中棉所 41	19.04	34.80
晋棉 44	23.99	34.94
晋棉 26	20.94	27.47
晋棉 7	18.44	17.56

2.2 转基因棉花对土壤微生物各种磷脂脂肪酸(PLFA)分布的影响

在 4 个品种 2 期测定的土壤微生物群落结构成分中,优势种群有 a15:0、i15:0、16:0、10 Me16:0、i16:0、16:1 ω 7c、18:1 ω 7c、18:1 ω 9c、18:2 ω 6,9c、cy19:0 ω 8c、i17:0、cy17:0、a17:0、20:1 ω 9c、10 Me18:0。其中 16:00 为最大的优势种群,占总 PLFA 含量的 10.2%~15.9%,其次为 18:1 ω 7c,占 8.3%~10.7%。另外 10 Me16:0 占 7.4%~12.1%,18:1 ω 9c 占 7.1%~10.4%,cy19:0 ω 8c 占 5.7%~7.7% 和 18:2 ω 6,9c 占 3.5%~7.2%。

单链饱和 PLFA 占总 PLFA 的 14.63%~21.29%

(表 2)。蕾期 4 个品种的单链饱和 PLFA 的百分数依次为中棉所 41>晋棉 7>晋棉 44>晋棉 26;吐絮期依次为中棉所 41>晋棉 26>晋棉 7>晋棉 44。

单链不饱和磷脂脂肪酸,占总 PLFA 29.32%~36.07%,它被认为是格兰氏阴性细菌的生物标记。在蕾期,单链不饱和磷脂脂肪酸的百分数依次为中棉所 41>晋棉 26>晋棉 44>晋棉 7,说明转基因棉花在蕾期提高了棉田土壤格兰氏阴性细菌的比例。在吐絮期,单链不饱和磷脂脂肪酸的百分数依次为晋棉 7>中棉所 41>晋棉 26>晋棉 44,说明转基因棉花在吐絮期降低了棉田土壤格兰氏阴性细菌的比例。

单链多不饱和磷脂脂肪酸,占总 PLFA 的 4.5%~9.1%,它被认为是真核生物的生物标记。在蕾期,单链多不饱和磷脂脂肪酸的百分数依次为中棉所 41>晋棉 44>晋棉 26>晋棉 7;在吐絮期,单链多不饱和磷脂脂肪酸的百分数依次为中棉所 41>晋棉 26>晋棉 7>晋棉 44。说明转基因棉花可提高棉田土壤的真核生物比例。

支链磷脂脂肪酸,占总 PLFA 的 8.9%~15.8%,它被认为是格兰氏阳性细菌的生物标记。在蕾期,支链磷脂脂肪酸的百分数依次为晋棉 7>晋棉 26>晋棉 44>中棉所 41。在吐絮期,支链多不饱和磷脂脂肪酸的百分数依次为晋棉 7>晋棉 44>中棉所 41>晋棉 26。说明转基因棉花降低了棉田土壤格兰氏阳性细菌的比例。

甲脂类磷脂脂肪酸可表示放线菌特征的生物标记。甲脂类磷脂脂肪酸占总 PLFA 的 10.1%~15.2%。在蕾期,甲脂类磷脂脂肪酸的百分数依次为晋棉 26>晋棉 44>晋棉 7>中棉所 41。在吐絮期,晋棉 26>中棉所 41>晋棉 7>晋棉 44,说明转基因的棉花可提高棉田土壤放线菌的比例。

18:2 ω 6c 被认为是真菌的生物标记,占总 PLFA 的 3.48%~7.22%。在蕾期,18:2 ω 6c 所占 PLFA 的百分数依次为中棉所 41>晋棉 44>晋棉 7>晋棉 26;在吐絮期,中棉所 41>晋棉 44>晋棉 26>晋棉 7。因此可说明转基因的棉花可提高棉田土壤真菌的比例。

20:4 ω 6c 被认为是原生动物的生物标记,占总 PLFA 的 0.23%~0.94%。在蕾期,20:4 ω 6c 所占 PLFA 的百分数依次为中棉所 41>晋棉 44

>晋棉 26>晋棉 7;在吐絮期,晋棉 7 号>中棉所 41>晋棉 26>晋棉 44。说明在蕾期转基因棉花的土壤原生动物的比例高,在吐絮期比例反而降低。

2.3 主成分和聚类分析

对 4 个品种两个时期的 PLFA 百分数进行主成分分析,结果表明,前 6 个主成分可解释 95.4% 的 PLFA 变异。第一主成分可解释 PLFA 30.2% 的变异。第二主成分可解释 PLFA 21.7% 的变异,第三主成分可解释 PLFA 17.5% 的变异。第四主成分可解释 PLFA 13.5% 的变异。从图 1 可看出,4 个品种 2 个时期各个点分布较分散,说明转 Bt 基因晋棉 26 号、晋棉 44 号和中棉所 41 与非转基因晋棉 7 号土壤微生物 PLFA 差异明显。



1.JM44 0629,2.JM44 1008,3.JM26 0629,4.JM26 1008,5.JM7 0629,6.JM7 1008,7.CCR141 0629,8.CCR141 1008。

图 1 转 Bt 基因棉花土壤 PLFA 主成分分布图

Fig. 1 Principal component analysis of PFLA composition of soil microbe in transgenic Bt cotton

对 4 个品种 2 个取样时期的土壤微生物 PLFA 百分数聚类分析,结果表明,以 7.04 可划分为 6 个系统(图 2):I 类:6 月 29 日晋棉 44 号和 10 月 8 号中棉所 41;II 类:6 月 29 日和 10 月 8 号的晋棉 26 号;III 类:10 月 8 号的晋棉 7 号;IV 类:6 月 29 号晋棉 7 号;V 类:6 月 29 日中棉所 41;VI 类:10 月 8 号的晋棉 44 号。

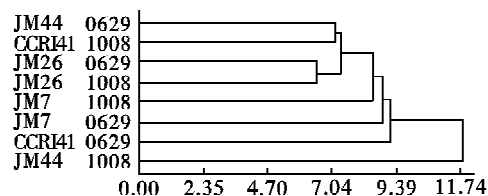


图 2 转基因棉花土壤微生物 PLFA 分布的系统聚类分析

Fig. 2 Systemic cluster analysis of PFLA patterns of soil microbes in Bt cotton

3 讨论

转基因抗虫棉对土壤中微生物数量的影响,主要是 Bt 棉的外源基因表达产物 Bt 杀虫晶体蛋白通过根系分泌物或作物残茬进入土壤生态系统^[19-20]。Donegan 等^[11]研究发现,美国种植的转

Bt 基因抗虫棉土壤微生物的数量与种类在不同品种中表现不一致,有的品种与常规棉花差异显著,有的不显著。Watrud 等^[12]也报道转 Bt 基因棉花提高了土壤细菌和真菌的数量。也有学者认为转 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^[11]。

我们通过 PFLA 分析,转 Bt 基因棉花增加了 PFLA 的种类和含量,改变了土壤微生物群落结构,主成分分析和聚类分析表明,转基因棉花对土壤微生物有明显的影响。PFLA 分析法可作为转基因植物对土壤微生物生态安全评价的一种方法。

参考文献:

- [1] PERLAK F J, Deaton R W, Armstrong T A, et al. Insect resistant cotton plants [J]. *Bio/Technology*, 1990, 8: 939-942.
- [2] 汪若海, 李秀兰. 我国转基因抗虫棉应用现状及建议 [J]. *生物技术通报*, 2000(5): 1-6.
WANG Ruo-hai, Li Xiu-lan. Present situation and proposals for the application of transgenic insect-resistant cotton in China [J]. *Biotechnology Information*, 2000(5): 1-6.
- [3] 钱迎倩, 马克平. 经遗传修饰生物体的研究进展及其释放后对环境的影响 [J]. *生态学报*, 1998, 18(1): 1-9.
QIAN Ying-qian, Ma Ke-ping. Progress in the studies on genetically modified organisms, and the impact of its release on environment [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 1998, 18(1): 1-9.
- [4] WOLFENBARGER L L, Phifer P R. The ecological risks and benefits of genetically engineered plants [J]. *Science*, 2000, 290: 2088-2093.
- [5] ANGLE J S. Release of transgenic plants; biodiversity and population considerations [J]. *Mol Ecol*, 1994, 3: 45-50.
- [6] 沈法富, 于元杰, 张学坤, 等. 转基因抗虫棉的基因流 [J]. *遗传学报*, 2001, 28(6): 562-567.
SHEN Fa-fu, Yu Yuan-jie, Zhang Xue-kun, et al. Bt gene flow of transgenic cotton [J]. *Acta Genetica Sinica*, 2001, 28(6): 562-567.
- [7] 李汝忠, 沈法富, 王宗文, 等. 转 Bt 基因抗虫棉抗性遗传研究 [J]. *棉花学报*, 2001, 13(5): 268-272.
LI Ru-zhong, Shen Fa-fu, Wang Zong-wen, et al. Study on the inheritance of bollworm resistance in transgenic Bt cotton [J]. *Cotton Science*, 2001, 13(5): 268-272.
- [8] 王留明, 王家宝, 沈法富, 等. 渍涝与干旱对不同转 Bt 基因抗虫棉的影响 [J]. *棉花学报*, 2001, 13(2): 87-90.
WANG Liu-ming, Wang Jia-bao, Shen Fa-fu, et al. Influences of waterlogging and drought on different transgenic Bt cotton cultivars [J]. *Cotton Science*, 2001, 13(2): 87-90.
- [9] 丁志勇, 许崇任, 王戎疆. 转基因抗虫棉与常规棉几种同工酶的比较 [J]. *生态学报*, 2001, 21(2): 332-336.
DING Zhi-yong, Xu Chong-ren, Wang Rong-jiang. Comparison of several important isoenzymes between Bt cotton and regular cotton [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2001, 21(2): 332-336.
- [10] 阎凤鸣, 许崇任, Marie B, 等. 转 Bt 基因棉挥发性气味的化学成分及其对棉铃虫的电生理活性 [J]. *昆虫学报*, 2002, 45(4): 425-429.
YAN Feng-ming, Xu Chong-ren, Marie B, et al. Volatile compositions of transgenic Bt cotton and their electrophysiological effects on the cotton bollworm [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2002, 45(4): 425-429.
- [11] DONEGAN K K, Palm C J, Fieland V J, et al. Changes in levels, species, and DNA fingerprints of soil microorganisms associated with cotton expressing the *Bacillus thuringiensis* var. *Kurstaki* endotoxin [J]. *Applied Soil Ecology*, 1995, 2: 111-124.
- [12] WATRUD L S, Seidler R J. Nontarget ecological effects of plant, microbial, and chemical introductions to terrestrial system [C]. *Soil Chemistry and Ecosystem Health*. Special Publication 52. Madison, Wisconsin: Soil science society of America, 1988: 313-340.
- [13] 崔金杰, 雒珺瑜, 李树红, 等. 转基因抗虫棉对土壤微生物影响的初步研究 [J]. *河北农业大学学报*, 2005, 28(6): 73-75.
CUI Jin-jie, Luo Jun-yu, Li Shu-hong, et al. Preliminary study in the effects of transgenic cotton fields on the soil microbe [J]. *Journal of Agricultural University of Hebei*, 2005, 28(6): 73-75.
- [14] 张金国, 刘翔, 崔金杰, 等. 转基因 (*Cry1Ac*) 抗虫棉对土壤微生物的影响 [J]. *中国生物工程杂志*, 2006, 26(5): 78-80.
ZHANG Jin-guo, Liu Xiang, Cui Jin-jie, et al. Effects of transgenic *Cry1Ac* cotton on soil microbes [J]. *China Biotechnology*, 2006, 26(5): 78-80.
- [15] 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.
- SHEN 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.
- [16] 李永山, 范巧兰, 陈耕, 等. 转 Bt 基因棉花对土壤微生物的影响[J]. 农业环境科学学报, 2007, 26(增刊): 533-536.
- LI Yong-shan, Fan Qiao-lan, Chen Geng, et al. Effects of transgenic Bt cotton on soil microbial population [J]. Journal of Agro-Environment Science, 2007, 26(S): 533-536.
- [17] 雒珺瑜, 崔金杰, 李树红, 等. 不同棉花品种对土壤微生物的影响[J]. 中国棉花, 2005, 32(9): 10.
- LUO Jun-yu, Cui Jin-jie, LI Shu-hong, et al. Effects of different cotton varieties on soil microbe [J]. China Cottons, 2005, 32(9): 10.
- [18] ROSTEGARD A, Tunlid A, Baath E. Microbial biomass measured as total lipid phosphate in soils of different organic content [J]. J Microbiol Methods, 1991, 14: 151-163.
- [19] 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.
- [20] 孙彩霞, 陈利军, 武志杰. Bt 杀虫晶体蛋白的土壤残留及其对土壤磷酸酶活性的影响[J]. 土壤学报, 2004, 41(5): 761-765.
- SUN Cai-xia, Chen Li-jun, Wu Zhi-jie. Persistence of Bt toxin in soil and its effects on soil phosphatase activity [J]. Acta Pedologica Sinica, 2004, 41(5): 761-765. ●