

种植转双价抗真菌基因水稻对根际微生物群落及酶活性的影响*

袁红旭¹ 张建中¹ 郭建夫¹ 许新萍² 李玥仁³

(1 湛江海洋大学农学院, 广东湛江 524088)

(2 中山大学生物工程中心, 广州 510275)

(3 福建农业科学院植物保护所, 福州 350013)

摘要 对转几丁质酶和葡聚糖酶双价抗真菌基因抗病水稻七转 39 种植后的根际土壤微生物群落和酶活性进行了分析。研究表明, 七转 39 根内生真菌和细菌数量显著低于非转基因阴性对照七丝软粘和常规水稻竹籼 B, 根际土壤中真菌和细菌数量也少于七丝软粘, 与竹籼 B 数量接近。在水稻抽穗期测定, 转基因水稻根际土壤过氧化氢酶、多酚氧化酶、蔗糖酶和脲酶活性以及可溶性有机质、氮、磷含量均与对照无显著差异。转基因水稻残体腐解过程中土壤腐殖酸含量变化与七丝软粘一致。与对照相比, 种植七转 39 未对下茬水稻的生长产生显著影响。

关键词 转基因水稻; 土壤; 微生物; 酶

中图分类号 S154 文献标识码 A

水稻是重要粮食作物, 水稻真菌性病害如稻瘟病、纹枯病给农业生产造成严重的损失, 成为水稻生产可持续发展的主要限制因素之一。由中山大学和湛江海洋大学等单位合作研究的转基因抗病水稻七转 39 是通过基因枪法将串联的抗真菌基因水稻碱性几丁质酶基因(RC24)和苜蓿葡聚糖基因(β -1, 3-Glu)导入籼稻七丝软粘中, 经多代(R8代)选育, 证实外源基因能稳定遗传并对稻瘟病和纹枯病具有优良抗性的转双价抗真菌基因水稻新品系^[1]。种植转抗真菌基因水稻具有生态风险, 其中包括可能对土壤微生物群落和土壤生态环境的影响, 如对土壤生物种群的影响、对土壤肥力和理化性质的影响以及是否影响下茬作物生长等多个方面^[2,3]。本研究针对转基因水稻七转 39 种植后根系的微生物种群变化、部分酶活性和营养元素构成变化以及残茬对下茬水稻生长可能产生的影响展开了初步研究。

1 材料与方法

1.1 供试水稻的栽培方法

供试水稻品种为转基因水稻七转 39、籼稻品种七丝软粘和竹籼 B。其中七丝软粘为七转 39 的非

转基因阴性对照, 竹籼 B 为常规栽培稻。

水稻栽培方法: 在隔离试验区, 选择水肥条件一致的稻田, 分成 9 个试验小区, 每小区面积为 $2 \times 4 \text{ m}^2$, 将各小区表层 20 cm 土层充分翻耕混合后, 再铺于田表, 使各小区 0~20 cm 土层均匀一致。该土层有机质(碳)量 16.3 g kg^{-1} ; 全 N 量 1.2 g kg^{-1} ; 速效 N 量 189.6 mg kg^{-1} ; 全 P 量 373.8 mg kg^{-1} ; 速效 P 量 49.9 mg kg^{-1} 。

水稻种子经催芽播于秧田, 将供试水稻四叶期秧苗插入试验小区, 每品种 3 个小区重复, 随机排列。按常规大田管理的方法管理, 每公顷施入 N 101 kg、 P_2O_5 105 kg 和 K_2O 105 kg。

水稻根际土壤取样方法: 将 0~20 cm 表层土中根围 0.5 cm 范围内的土壤作为根际土壤。水稻抽穗期挖取水稻根系, 收集距根 0~0.5 cm 土壤, 小区中部随机取 30 株水稻的根际土壤充分混合。

1.2 转基因水稻根系微生物群落分析

根内微生物群落分析^[4]: 水稻抽穗期挖取水稻根, 去掉老根和死亡根, 每小区 30 株。根样经表面消毒后, 研磨, 无菌水稀释, 制成根组织悬浮液。采用平板培养法分析真菌和细菌群落^[4]。真菌、细菌和放线菌分别采用 PDA、牛肉汁蛋白胨和改良高氏

* 国家 863 高新技术发展计划项目(1010F0202)、广东省教育厅自然科学基金项目(200040)、湛江海洋大学自然科学基金(2001年)资助
作者简介: 袁红旭(1964~), 女, 博士, 副教授, 主要从事植物免疫学研究。E-mail: yuanhx588@sohu.com

收稿日期: 2004-03-29; 收到修改稿日期: 2004-07-23

1 号培养基培养。微生物数量均以单位根鲜重产生的菌落数表示: 真菌(细菌、放线菌)数=菌落数/根鲜重(cfu g^{-1})。

根际微生物群落分析^[4]: 水稻抽穗期取根际土壤, 采用平板培养法分析土壤真菌和细菌群落^[4]; 真菌和细菌的数量以单位土壤(干重)产生的菌落数量表示: 真菌(细菌)数=菌落数/土干重(cfu g^{-1})。

1.3 转基因水稻根际土壤酶活性分析

参见文献[4, 5]。水稻抽穗期取根际土壤分析土壤酶活性: 过氧化氢酶活性测定采用高锰酸钾滴定法; 多酚氧化酶活性测定采用邻苯三酚比色法; 蔗糖酶活性测定采用磷钼酸比色法; 脲酶活性测定采用奈氏比色法。

1.4 转基因水稻根际土壤有机质及 N、P 分析

参见文献[5]。水稻抽穗期取根际土壤, 进行成分分析。有机质(碳)测定采用重铬酸钾法; 全 N 量测定采用高氯酸-硫酸消化法; 可溶 N 量测定采用扩散吸收法; 全 P 量测定采用氢氧化钠碱熔-钼锑抗比色法; 速效 P 量测定采用碳酸氢钠法^[6]。

1.5 水稻残体腐解进程

水稻收获后, 田间残体自然腐解(2002 年 11 月至 2003 年 4 月)。2003 年 1 月 15 日开始, 每 15 d 取土样, 取样方法为每小区中部大五点取样, 每点取表层 0~20 cm 土层 1 kg, 将五点土样混合, 过 200 目

筛。采用焦磷酸钠提取-重铬酸钾法测定腐殖酸量^[5]。

1.6 水稻残体腐解过程对下茬水稻生长的影响

水稻收割后, 五点取样法, 在水稻田里采集成熟期收割后的各品种水稻秸秆、土壤, 将秸秆 30g 与相应水稻品种的土壤(干重) 120 g 充分混合, 倒入 1000 ml 烧杯中, 再加入 600 ml 蒸馏水, 置于 27℃温箱中, 分别在 20 d 和 35 d 后取湿土 50 g, 加入的蒸馏水 50 ml, 浸提 12 h 后离心(1000 r min^{-1}), 弃沉淀。上清液浸泡露白的水稻种子(水稻品种为竹籼 B), 25℃培养 7 d, 测定水稻胚根和胚芽长度。

第二年春季各实验小区种植常规水稻竹籼 B (2004 年 4 月插秧), 观察水稻生长情况并测定产量。

2 结果与分析

2.1 转基因水稻根系微生物群落

采用分离培养法研究水稻根际微生物结果表明(表 1), 转基因水稻七转 39 的根内生真菌和细菌数量远低于两个非转基因水稻品系, 其内生真菌和细菌数量仅为非转基因对照七丝软粘的 21.0% 和 4.1%, 竹籼 B 的 30.3% 和 6.5%。研究结果还表明, 两个非转基因水稻根内菌群数量也存在差异, 其中七丝软粘真菌数量和细菌数量高于竹籼 B。

表 1 转基因水稻和对照常规水稻根系真菌和细菌数量

Table 1 Numbers of fungi and bacteria in root systems of rice plants different in strain

水稻品系 Rice strain	根内微生物 Microbe in root		根际微生物 Microbe in rhizospheral soil	
	真菌 Fungi (cfu g^{-1})	细菌 Bacteria ($\times 10^3 \text{ cfu g}^{-1}$)	真菌 Fungi ($\times 10^3 \text{ cfu g}^{-1}$)	细菌 Bacteria (10^3 cfu g^{-1})
七转 39 Qizhuan 39	19.2 ± 2.1 a	2.0 ± 1.1 a	5.2 ± 0.41 a	3.2 ± 0.58 a
七丝软粘 Qisirananzhan	91.4 ± 13.1 c	22.1 ± 4.5 b	7.3 ± 1.2 b	5.3 ± 1.2 b
竹籼 B Zhuxian B	63.4 ± 6.6 b	17.5 ± 2.8 b	5.7 ± 1.0 a	3.6 ± 0.54 a

注: 同一栏中数据后小写字母不相同者表示处理间差异在 5% 水平显著 Note: Means in a column followed by the different small letters represent significant difference at 5% level

水稻根际微生物研究表明, 七丝软粘根际真菌和细菌的数量最高, 其次为竹籼 B 和七转 39。虽然七转 39 根际真菌和细菌数量均小于非转基因对照七丝软粘, 但其与竹籼 B 无显著差异。两个非转基因常规水稻根际菌群数量存在显著差异。

综上所述, 转抗基因水稻七转 39 根际微生物群落变化集中表现在内生细菌和真菌数量的减少, 而

根际土壤真菌和细菌数量虽然较非转基因阴性对照七丝软粘少, 但接近另一常规稻竹籼 B 的水平。

2.2 转基因水稻根际土壤酶活性和土壤有机质及 N、P

对水稻根际土壤四种常见酶活性分析结果表明(表 2), 转基因水稻七转 39 根际土壤除脲酶活性略高于其他两个对照外, 过氧化氢酶、多酚氧化酶和

表 2 不同水稻品系根际土壤过氧化氢酶、多酚氧化酶、蔗糖酶和脲酶活性

Table 2 Activities of some soil enzymes in the rhizospheres of rice plants different in strain ($U\ g^{-1}\ h^{-1}$)

水稻品系 Rice strain	过氧化氢酶 Hydrogen peroxidase	多酚氧化酶 Polyphenol oxidase	蔗糖酶 Sucrase	脲酶 Urease
七转 39 Qizhuan 39	0.21 ± 0.03	0.15 ± 0.09	42.53 ± 3.11	0.23 ± 0.05
七丝软粘 Qisiruanzhan	0.16 ± 0.03	0.15 ± 0.07	40.41 ± 1.12	0.16 ± 0.01
竹籼 B Zhuxian B	0.23 ± 0.05	0.08 ± 0.04	43.22 ± 4.38	0.18 ± 0.03

注: U 表示酶活性单位注 Note: "U" is unite for activity of enzymes

蔗糖酶活性均在两个非转基因对照之间。对试验数据进行差异显著性检验表明, 供试 3 个水稻品系根际土壤中过氧化氢酶、多酚氧化酶、蔗糖酶和脲酶活性没有显著差异。

试验结果表明(表 3), 转基因水稻七转 39 的根

际有机碳含量略低于七丝软粘但高于竹籼 B; 全 N 和全 P 量略低于另外两个品系, 速效 N 和速效 P 量均高于七丝软粘而略低于竹籼 B。试验数据进行差异显著性检验表明, 3 个水稻品系根际土壤中上述指标也不存在显著差异。

表 3 不同水稻品系根际土壤有机质及 N、P 含量

Table 3 Organic matter, nitrogen and phosphate contents in the rhizospheres of rice plants different in strain

水稻品系 Rice strain	有机质 Organic matter ($g\ kg^{-1}$)	全 N Total N ($g\ kg^{-1}$)	速效 N Available N ($mg\ kg^{-1}$)	全 P Total P ($mg\ kg^{-1}$)	速效 P Available P ($mg\ kg^{-1}$)
七转 39 Qizhuan 39	19.75 ± 0.48	1.48 ± 0.20	258.59 ± 21.58	477.84 ± 14.35	60.25 ± 11.32
七丝软粘 Qisiruanzhan	20.12 ± 1.14	1.74 ± 0.22	249.10 ± 5.10	485.30 ± 20.41	56.60 ± 9.42
竹籼 B Zhuxian B	19.67 ± 0.91	1.65 ± 0.12	268.71 ± 15.51	508.13 ± 17.03	66.86 ± 13.13

2.3 转基因水稻残体腐解过程中土壤腐殖酸量分析

试验结果见图 1。转基因水稻七转 39 和对照七丝软粘残体的腐殖化进程中土壤腐殖酸含量变化的趋势基本一致, 两水稻品系在 1 月 15 日第一次取样时达到高峰, 七转 39 的平均值为 $10.53\ g\ kg^{-1}$, 而七丝软粘为 $9.35\ g\ kg^{-1}$ 两者不存在显著差异。由 1 月 15 日至 2 月 28 日, 土壤中的腐殖酸含量一直保持稳定的水平, 且转基因水稻和对照间不存在显著差异。

2.4 转基因水稻残体腐解过程对下茬水稻生长的影响

表 4 的实验结果表明, 七丝软粘和竹籼 B 的残体腐殖 20 d, 其土壤浸提液对水稻幼根生长有抑制作用, 但至 36 d 时, 两处理均与蒸馏水对照无显著差异。腐解 20 天和 36 天的转基因水稻七转 39 残体腐解浸提液处理的水稻生长情况与蒸馏水对照无

显著差异。

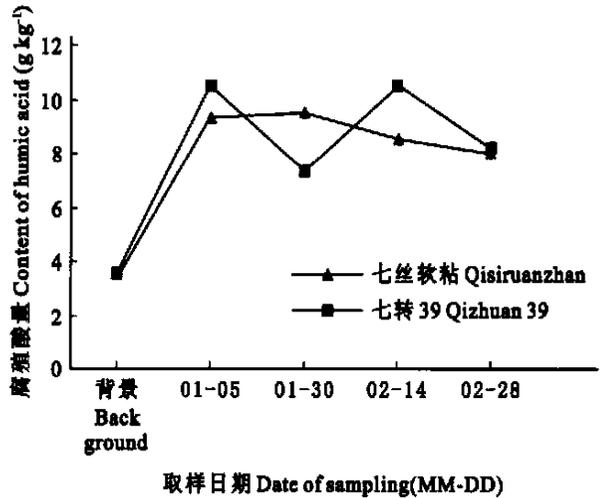


图 1 七转 39 和七丝软粘腐殖化过程土壤腐殖酸量
Fig 1 Humic acid in soil during rotting process of rice residue

表 4 不同水稻品系残体腐解浸提液处理后水稻根长和芽长

Table 4 Length of roots and shoots of rice seedlings treated with liquid from decomposing rice residues different in strain (cm)

水稻品系 Rice strains	腐解时间 Time of decomposition			
	20 d		36 d	
	根长 Root length	芽长 Shoot length	根长 Root length	芽长 Shoot length
七转 39 Qizhuan 39	2.7 ± 0.7 ab	3.2 ± 1.1	2.9 ± 1.3	3.4 ± 1.6
七丝软粘 Qisimanzhan	2.1 ± 1.1 a	3.0 ± 1.4	2.8 ± 1.7	3.0 ± 1.5
竹籼 B Zhuxian B	2.1 ± 1.1 a	3.0 ± 1.8	3.1 ± 1.8	2.8 ± 1.7
CK	3.1 ± 1.5 b	3.4 ± 1.5	3.2 ± 1.8	3.0 ± 1.8

注: 同一栏中数据后小写字母不相同者表示处理间差异在 5% 水平显著 Note: Means in a column followed by the different small letters represent significant difference at 5% level

第二年春季各小区种植水稻实验结果表明, 种植转基因水稻七转 39 后, 下茬水稻的生长状况和产量均与非转基因对照无显著差异(经折算三处理水稻的平均产量无显著差异, 为 6447 ~ 6573 kg hm⁻²)。

3 讨论

转基因植物种植对土壤的潜在影响的核心内容是其可能影响土壤的生态过程^[3,6]。一些研究证明转基因植物种植后确实引起土壤微生物群落和土壤酶活性甚至土壤营养特性的变化。如转甘露碱基因烟根际土壤以甘露碱为底物的细菌数量增加 80 倍^[7], 转几丁质酶基因马铃薯土壤脱氢酶活性增加^[6]。但也有研究表明转基因植物对土壤没有产生显著影响^[3,8,9]。转基因植物对土壤的影响, 除与导入的外源基因密切相关外, 不同的转基因个体因为外源基因导入位点和拷贝数等不同, 造成的变异不同, 其产生的生态效应也会有所差异, 因此即使是导入同一外源基因的同类转基因植物, 其生态效应也并不完全一致。另外, 在对土壤生态过程研究时, 针对不同的研究指标也会得到不同的研究结果。转双价抗真菌基因的转基因水稻种植后对土壤最可能的直接效应就是引起土壤的微生物群落变化, 进而影响一系列的生态过程。本研究表明, 转基因水稻七转 39 根内真菌和细菌数量显著低于非转基因阴性对照及常规稻竹籼 B, 根际土壤真菌和细菌数量显著小于非转基因阴性对照, 接近常规水稻竹籼 B。说明外源抗真菌基因的表达, 确实引起了水稻体内和根际土壤微生物群落的变化, 但是土壤微生物具有多样性和复杂性, 作物不同品种之间常存在显著差异, 转基因水稻导致的土壤微生态的变化, 对农业

生产造成何种影响值得深入研究。本研究以最为敏感的根际土壤为主要研究对象的研究结果表明, 在抽穗期, 七转 39 的土壤有机质、可溶性 N、P 以及土壤部分酶活性指标与非转基因对照均无显著差异。另外, 七转 39 残体腐解过程中土壤腐殖酸量的变化与对照一致。种植七转 39 也未对下茬水稻生长产生显著影响。但是, 本研究仅就种植七转 39 的个别时期和少数指标进行了初步研究, 对于长期种植七转 39 对土壤微生物种类和数量的影响以及对土壤各种理化性质的影响的研究仍然有待深入展开。

参考文献

- [1] 冯道荣, 许新萍, 魏建伟, 等. 转双价抗真菌基因抗病水稻的获得. 植物学报, 1999, 41(11): 1187~1191. Feng D R, Xu X P, Wei J W, *et al.* Enhancement of rice disease resistance by two antifungal protein genes (In Chinese). *Acta Botanica Sinica*, 1999, 41(11): 1187~1191
- [2] 孙彩霞, 陈利军, 武志杰. 转 Bt 基因作物毒素土壤存活特性及与土壤性质的关系研究进展. 应用生态学报, 2002, 13(11): 1478~1482. Sun C X, Chen L J, Wu Z J. Research advances in soil persistence characteristics of toxins released by transgenic Bt crops and their relationships with soil properties (In Chinese). *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2002, 13(11): 1478~1482
- [3] 王建武, 冯远娇, 骆世明. 转基因作物对土壤生态系统的影响. 应用生态学报, 2002, 13(4): 491~494. Wang J W, Feng Y J, Luo S M. Effects of transgenic crops on soil ecosystem (In Chinese). *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2002, 13(4): 491~494
- [4] 中国科学院南京土壤研究所主编. 土壤微生物研究法. 北京: 科学出版社, 1985. 67~75, 260~269. Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences. ed. *Research Methods for Microbe in Soil* (In Chinese). Beijing: Science Press, 1985. 67~75, 260~269
- [5] 许光辉, 郑洪元. 土壤微生物分析方法手册. 北京: 农业出版社, 1986. 91~109, 183~189, 249~289. Xu G H, Zheng H Y. *Analysis Methods for Microbe in Soil* (In Chinese). Beijing: Agricultural Press, 1986. 91~109, 183~189, 249~289

- [6] Jepson P C, Croft B A, Pratt G E. Test systems to determine the ecological risks posed by toxin release from *Bacillus thuringiensis* genes in crop plants. *Mol. Ecol.*, 1994, 3: 81~ 89
- [7] Oger P, Pefit A, Dessauxiy. Genetically engineered plants producing gopins alter their biological environment. *Natural Biotechnol.*, 1997, 15: 369~ 372
- [8] Donegan K K, Palm C J, Fieland V J. *et al.* Changes in levels species and DNA finger prints of soil micro organisms associated with cotton expressing the *Bacillus thuringiensis* var. *kaustaki* endotoxins. *Appl. Soil. Ecol.*, 1995, 2: 111~ 124
- [9] Donegan K K, Schaller D L, Stone J K, *et al.* Microbial populations, fungal species diversity and plant pathogen levels in fields plots of potato plants expressing the *Bacillus thuringiensis* var. *tenbrionis* endotoxin. *Transgenic Res.*, 1996, (5): 25~ 35

ACTIVITIES OF MICROBES AND ENZYMES IN SOIL AFTER GROWING TRANSGENIC RICE WITH TWO EXTRA ANTI FUNGUS GENES

Yuan Hongxu¹ Zhang Jianzhong¹ Guo Jianfu¹ Xu Xinping² Li Yueren³

(1 Agricultural College of Zhanjiang Ocean University, Zhanjiang, Guangdong 524088, China)

(2 Biotechnology Research Center of Zhongshan University, Guangzhou 510275, China)

(3 Plant Protection Division of Fujian Agriculture Institute, Fuzhou 350013, China)

Abstract Qizhuan 39 was a genetically modified strain of rice stemming from an indica rice cultivar, Qisiruanzhan, by accepting 2 anti fungus genes, "RC24" (a rice chinase gene) and " β -1, 3-Glu" (a alfalfa β -1, 3-Glucanase gene). Preliminary analysis showed that there were fewer endophytic bacteria and endophytic fungi in the roots of Qizhuan 39. The numbers of bacteria and fungi in the rhizosphere of Qizhuan 39 were markedly lower than of Qisiruanzhan, but near to those of Zhuxian B (another non-transgenic control). In the earing period, there was no remarkable difference in the rhizospheric soil between Qizhuan 39 and the controls in concentration of soluble organic matter, nitrogen, phosphorus, and the activities of polyphenol oxidase, hydrogen peroxidase, sucrase and urease. The amount of humic acid in the soil during the rotting process of transgenic rice residue was the same as in the non-transgenic control. There was no remarkable detrimental effect on growth of rice in next season after growing Qizhuan 39.

Key words Transgenic rice; Soil; Microbe; Enzyme