

转 *AtPAP15* 基因大豆种植对根际土壤养分及酶活性的影响*

吴 凡 林桂潮 吴坚文 姚涓 周峰 姜大刚 梅曼彤 穆 虹[†]

(农业部转基因植物及植物用微生物环境安全监督检验测试中心(广州),华南农业大学,广州 510642)

摘 要 以转入 *AtPAP15* 基因的两个磷养分高效转基因大豆株系 AP15-1、AP15-3 及其各自受体 YC03-3、YC04-5 为材料,在大田连续种植两季,通过在苗期、盛花期和成熟期采集根际土,对其进行 pH 和全磷、速效磷、有机磷、全氮、碱解氮、全钾、速效钾、及钼等八种微量元素含量的测定,并分析了盛花期 AP15-1 与其受体 YC03-3 根际土中酸性磷酸酶、过氧化氢酶、蔗糖酶和脲酶的活性变化,从而了解上述磷高效转基因大豆的种植是否会对根际土中主要养分和酶活性产生影响。研究结果显示:秋春两季根际土中除全钾和微量元素含量外,其他养分含量在个别时期,转基因大豆 AP15-1 或 AP15-3 与其受体之间,均存在显著性的差异,但这些显著性差异大部分出现在苗期,成熟期仅有机磷含量在 AP15-1 与其受体 YC03-3、速效钾含量在 AP15-3 与其受体 YC04-5 之间呈显著差异,并且这些差异在两季中均未重复出现。根际土中四种土壤酶活性测定结果显示:同季转基因大豆与其受体之间差异不显著。总体结果表明,上述转 *AtPAP15* 基因磷高效大豆种植对根际土中磷、氮、钾等养分和四种土壤酶活性均未产生显著的影响。

关键词 大豆; *AtPAP15*; 转基因; 土壤养分; 土壤酶; 根际土

中图分类号 S154.1 **文献标识码** A

磷是作物生长和发育所必需的大量元素之一,磷的吸收和利用对作物的产量起着关键的作用。但是土壤中大部分磷不能被作物直接吸收利用,通过施用磷化肥和畜粪,可以缓解土壤缺磷与农作物生长的矛盾,但作物对磷养分的利用效率低,过量磷肥通过水的冲蚀进入水体,使水富营养化。提高作物磷养分的利用效率,对于减少磷肥的施用,减轻环境污染,提高经济效益,促进农业的可持续发展,具有重要的意义^[1-2]。目前,通过转基因技术将柠檬酸合成酶、植酸酶、磷酸酶基因转入烟草、拟南芥等植物,在提高植物根系分泌柠檬酸、植酸酶和磷酸酶的同时,植株在低磷条件下,利用不可溶磷和有机磷的能力明显提高^[3-9],这些研究结果显示通过转基因培育磷养分高效利用的作物具有潜在的应用前景。

随着转基因植物进入商品化生产,转基因植物涉及的环境和生态安全问题日益受到关注。转基因植株地上凋落物和根的残体、植物根系分泌物组

成的改变、外源基因表达产物的残留、农艺性状和植株化学组成的改变等,均可能对土壤生态系统包括土壤养分、土壤酶、微生物群落结构和组成等产生影响^[10]。至今,转基因作物种植对土壤生态影响的研究,主要集中在对土壤微生物数量种类和结构组成方面^[11-14],而对土壤养分影响的研究报道较少,已有的研究也主要是关于转 Bt 抗虫棉花、玉米等转基因抗虫作物对土壤养分和酶活性的影响^[15-18],养分高效利用转基因植物种植对土壤养分的影响尚未见报道。

拟南芥紫色酸性磷酸酶 *AtPAP15* 基因表达产物具有较强的植酸酶活性^[19-20],王秀荣等^[9]将 *AtPAP15* 基因转入大豆中过量表达,获得了三个纯合稳定转基因大豆株系,其利用外源植酸磷和植物体内有机磷的能力明显增加,在酸性土壤中种植的单株结荚量和每株的粒数均高于野生型受体,是具有一定应用前景的磷素高效利用转基因大豆新材料。本研究选用上述转基因大豆中的两个株系 1-8 和 3-

* 转基因生物新品种培育重大专项(2009ZX08011-024B)资助

[†] 通讯作者, E-mail: mhong@scau.edu.cn

作者简介:吴 凡(1986—),男,山西人,硕士研究生,主要研究方向:转基因生物检测技术与安全评价。E-mail: wufan3070@163.com

收稿日期:2012-07-13;收到修改稿日期:2013-01-17

4(分别重新命名为 AP15-1 和 AP15-3),于 2010 年秋和 2011 年春在大田种植两季上述转基因大豆及其受体,通过分析苗期、盛花期和成熟期根际土中 P、N、K 三种大量元素,及钼等八种微量元素的含量,同时测定盛花期 AP15-1 根际土中磷酸酶、蔗糖酶、过氧化氢酶和脲酶的活性变化,了解该磷养分高效利用的转基因材料种植是否会对土壤主要养分和酶活性产生影响,从而为该磷高效转基因大豆乃至其他养分高效转基因材料种植,从土壤生态(土壤养分)方面进行安全评价相关方法和体系的建立提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 试验设计与材料

转 *AtPAP15* 基因大豆两株系 AP15-1、AP15-3 及其受体 YC03-3 和 YC04-5,由华南农业大学资源环境学院根系生物学中心王秀荣教授提供。转入的 *AtPAP15* 基因由 35S 启动子驱动,表达产物 N 端连有胡萝卜根分泌导肽^[9]。转基因大豆在本中心的增城宁西转基因安全评价田间试验基地进行大田种植,大田土壤表层 0~20 cm 土壤肥力:全氮 0.72 g kg⁻¹,全磷 0.61 g kg⁻¹,全钾 19.45 g kg⁻¹,碱解氮 47.05 mg kg⁻¹,速效磷 66.03 mg kg⁻¹,速效钾 54.22 mg kg⁻¹,有机质 12.95 g kg⁻¹,pH 6.32;20~40 cm 土壤肥力:全氮 0.54 g kg⁻¹,全磷 0.48 g kg⁻¹,全钾 19.85 g kg⁻¹,碱解氮 36.2 mg kg⁻¹,速效磷 53.06 mg kg⁻¹,速效钾 48.78 mg kg⁻¹,有机质 9.78 g kg⁻¹,pH 5.78。大田规划为 12 个小区(3.6 m × 9 m),各小区表土肥力调查显示全磷 0.67 g kg⁻¹、速效磷 74.94 mg kg⁻¹、有机磷 82.61 mg kg⁻¹。试验设三个重复,每个重复 4 个小区随机区组分布分别种植 AP15-1、AP15-3、YC03-3 和 YC04-5。2010 年秋季大豆是 2010 年 8 月 5 日播种,10 月 10 日收获;2011 年春季大豆是 2011 年 3 月 14 日播种,2011 年 6 月 29 日收获。大豆种植有专人管理,期间未施肥也未使用杀虫剂和除草剂,其他种植和管理按常规措施进行。

1.2 土壤样品采集与制备

土样采集于大豆生长苗期、盛花期和成熟期。根际土取样方法:每小区按五点法随机选取 10~15 株大豆,用铁铲沿以大豆植株为中心半径约 20 cm 的圆深挖,将整株大豆连根完整挖起,仔细去除附

着的大块土,之后将根系上粘着的土壤,抖入塑料封口袋密封。每个小区采集的根际土混合在一起作为这个小区根际土样。采回的土样自然风干,剔除石块、植物根系等杂物,全部过 2 mm 筛,装瓶备用。此外,过 2 mm 筛的土样按四分法取 100 g,再用 IKA 研磨机研磨后,过 100 目筛,用于全磷、有机磷和微量元素等的分析测定。

1.3 土壤养分和 pH 的测定方法

土壤全磷、速效磷和有机磷等养分含量的测定参照鲍士旦^[21]的方法进行。全磷采用硫酸、高氯酸消煮—钼蓝比色法;速效磷采用 0.05 mol L⁻¹盐酸—0.025 mol L⁻¹硫酸浸提—钼锑抗比色法;有机磷采用高温灼烧—钼锑抗比色法;全氮采用硫酸加速剂消煮—蒸馏法;碱解氮采用碱解扩散法;全钾采用氢氧化钠熔融—火焰光度法;速效钾采用醋酸铵浸提—火焰光度法;有机质采用高温外加热重铬酸钾氧化—容量法;pH 测定采用电位法(水/土 = 2.5/1);微量元素铜、锌、铁、锰、钴、钒(有效态)采用 DTPA 浸提-ICP-AES 法;有效硼:按土壤有效硼测定方法农业行业标准 NY/T149-1990 进行;有效钼采用草酸-草酸铵提取-极谱法。每个样品设三个重复。

1.4 土壤酶活性测定方法

土壤酶活性的测定参照关松荫的方法^[22]进行。其中,土壤酸性磷酸酶活性的测定采用磷酸苯二钠比色法;土壤过氧化氢酶活性测定采用高锰酸钾滴定法;土壤蔗糖酶活性的测定采用 3,5-二硝基水杨酸比色法;土壤脲酶活性测定采用苯酚-次氯酸钠比色法。每个样品设三个重复。

1.5 数据分析

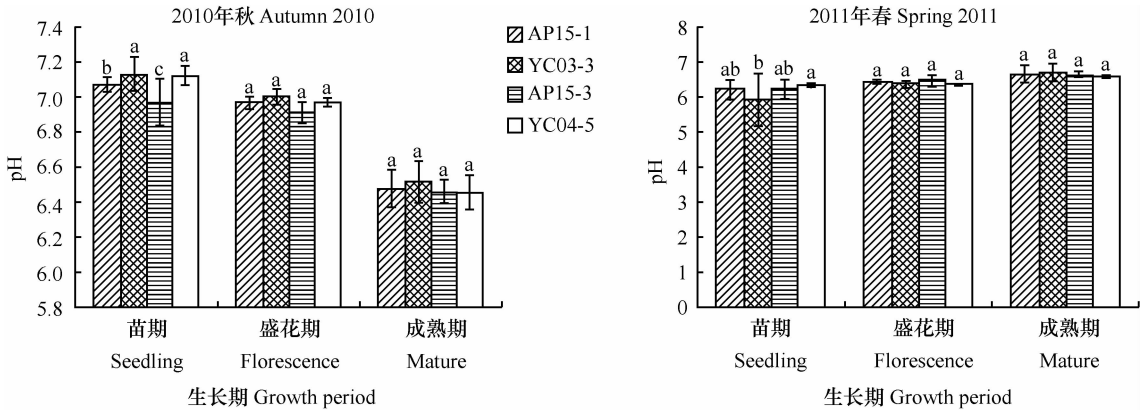
所有数据的统计分析及柱状图的绘制采用 Excel 2003 软件进行。试验数据差异显著性分析采用 SPSS Statistics 17 统计软件进行,采用单因素方差分析法,两个均数间差异性分析采用 T 检验,多个均数间的差异性比较采用 Duncan(邓肯)新复极差法。

2 结果

2.1 转 *AtPAP15* 基因大豆种植对根际土壤 pH 的影响

pH 与土壤养分的有效性有一定的相关性,转 *AtPAP15* 基因大豆根际分泌物组成的改变对根际土壤 pH 可能会产生影响,因此本研究测定了大豆三

个生长期根际 pH 变化。如图 1, 2010 年秋从苗期到成熟, 土壤 pH 变化范围在 6.45 ~ 7.13, 大豆根际土 pH 在三个生长期呈现出下降的趋势; 而 2011 年春, 三个生长期根际土 pH 在 6.5 左右平稳波动。



注: AP15-1与YC03-3、AP15-3与YC04-5: 两转基因大豆及其受体(对照)。图中误差线表示标准偏差, 同一生长期误差线上标有相同字母表示数据间差异不显著($p \geq 0.05$), 下同。Note: AP15-1 and YC03-3, AP15-3 and YC04-5: Two transgenic varieties of soybean and their receptors (control). Bars represent standard deviation. The same lowercase letters on top of the bars indicate no significant difference between the treatments at the same growth stage ($p \geq 0.05$). The same below

图 1 两季大豆三个生长期根际土 pH 变化

Fig. 1 Changes in pH of the rhizosphere soil of the two crops of soybeans during three growth stages

2.2 转 *AtPAP15* 基因大豆种植根际土壤全磷、速效磷和有机磷含量的变化

拟南芥 *AtPAP15* 基因转入大豆过量表达, 在根系分泌的酸性磷酸酶, 可分解根际土中植酸等有机磷, 有可能引起根际土磷库水平产生新的动态变化, 因此本研究着重对两个转基因大豆 AP15-1、AP15-3 及其受体在大田种植后, 对其苗期、盛花期和成熟期根际土中的全磷、速效磷和有机磷含量进行了测定分析。2010 年秋和 2011 年春, 两季根际土中磷含量测定结果(图 2)显示: 两季根际土全磷含量从苗期、盛花期至成熟期的变化态势不完全一致; 速效磷从苗期、盛花期至成熟期变化不大; 有机磷含量呈上升趋势。差异显著性分析显示: 全磷、速效磷和有机磷含量, 在苗期和盛花期均曾出现转基因大豆与受体之间差异显著的情况, 但这些差异均未持续至成熟期。成熟期, 仅发现 2011 年春 AP15-1 根际土有机磷含量显著高于其受体 YC03-3。两季中不同生长期转基因与其受体根际土中磷含量表现出的显著性差异均未重复出现。综合两季磷含量的分析结果, 本研究认为种植转 *AtPAP15* 基因大豆与其非转基因的受体,

差异显著性分析显示: 根际土 pH 仅在 2010 秋苗期 AP15-1 和 AP15-3 均显著低于各自的受体, 其余日期转基因大豆 AP15-1, AP15-3 与其受体及两转基因大豆之间根际土的 pH 均无明显差异。

对土壤全磷、速效磷和有机磷含量产生的影响均没有实质性的差异。

2.3 转 *AtPAP15* 基因大豆种植对根际土壤氮、钾和微量元素含量的影响

N、P、K 等养分吸收是相互协同相互促进的, 为了解转 *AtPAP15* 基因大豆种植是否会对根际土中另外两大主要营养元素 N、K 及大豆生长必需的微量元素含量产生间接影响, 本研究对 AP15-1、AP15-3 及其受体, 在苗期、盛花期和成熟期根际土中的全氮、碱解氮、全钾、速效钾及钼等八种微量元素的含量也进行了测定分析。从 2010 年秋季根际土测定结果(图 3)可以看出, 转基因大豆 AP15-1、AP15-3 与其各自受体的变化趋势一致。差异显著性分析显示: 相同生长期转基因大豆与其受体根际土中全氮、碱解氮、全钾、速效钾含量的差异均不显著。2011 年春季根际土氮钾含量分析(结果未示)显示, 至成熟期只有速效钾含量 AP15-3 与其受体 YC04-5 间存在显著差异。两季大豆根际土中全氮、碱解氮、全钾、速效钾含量变化虽然不尽相同, 但总体上转基因大豆 AP15-1、AP15-3 的种植未对根际土中 N、K 含量产生明显的影响。

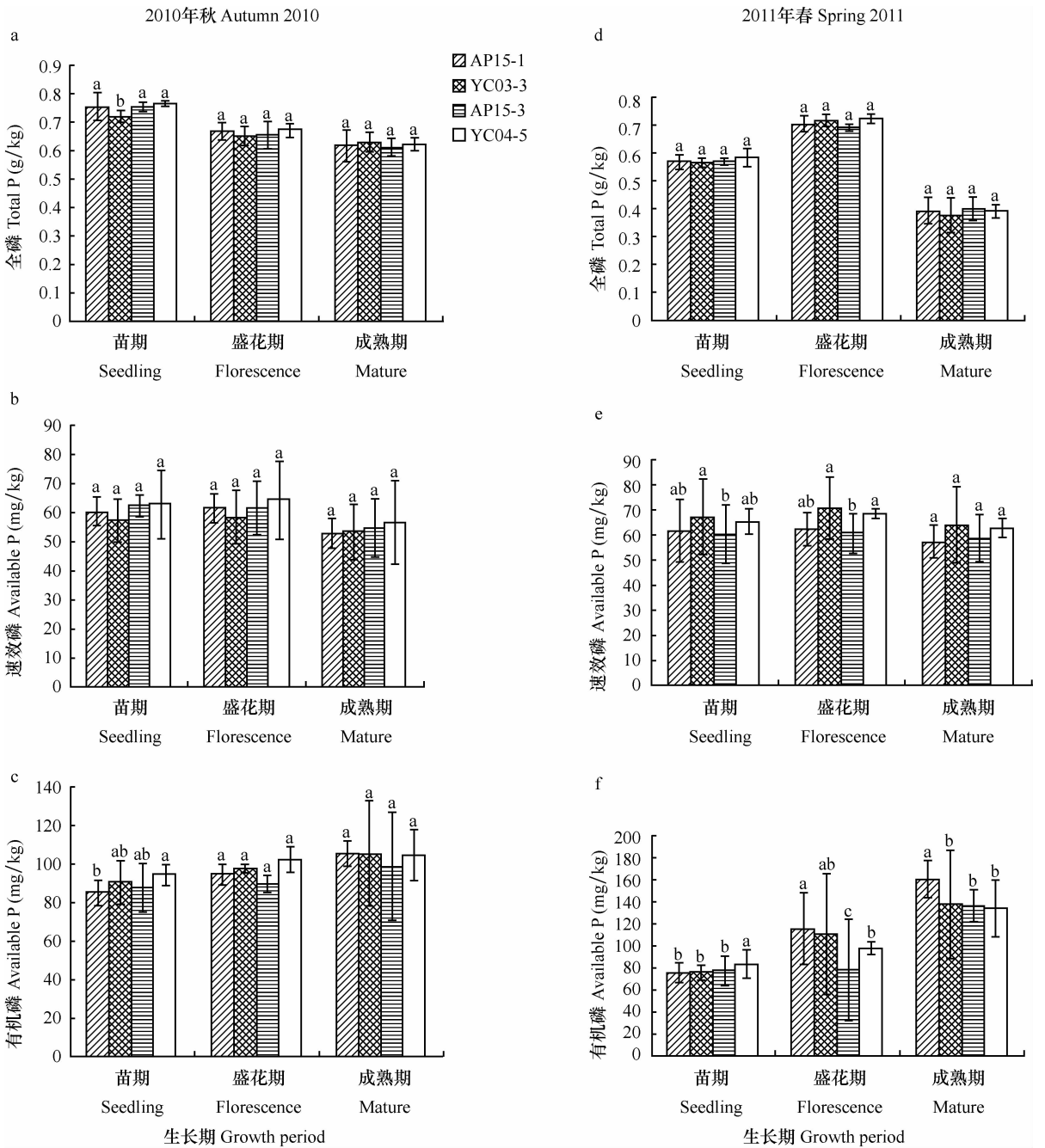


图 2 两季大豆三个生长期根际土中全磷、速效磷和有机磷含量的变化

Fig. 2 Changes in contents of total, available, and organic phosphorus in the rhizosphere soil of the two crops of soybeans during the three growth periods

从上述三个生长期大豆根际土中 8 种微量元素测定结果(表 1)可以看出,八种微量元素在大豆三个生长期的变化态势存在一定的差异。将三个生长期微量元素含量的数据进行方差分析结果显示:两季转基因大豆 AP15-1 与其受体 YC03-3、AP15-3

与其受体 YC04-5 之间在苗期、盛花期和成熟期的 p 值均大于 0.05,除 Zn 外,各种微量元素含量变化差异不显著。表明总体上种植转基因大豆 AP15-1 和 AP15-3,不会对土壤中的微量元素含量产生较大的影响。

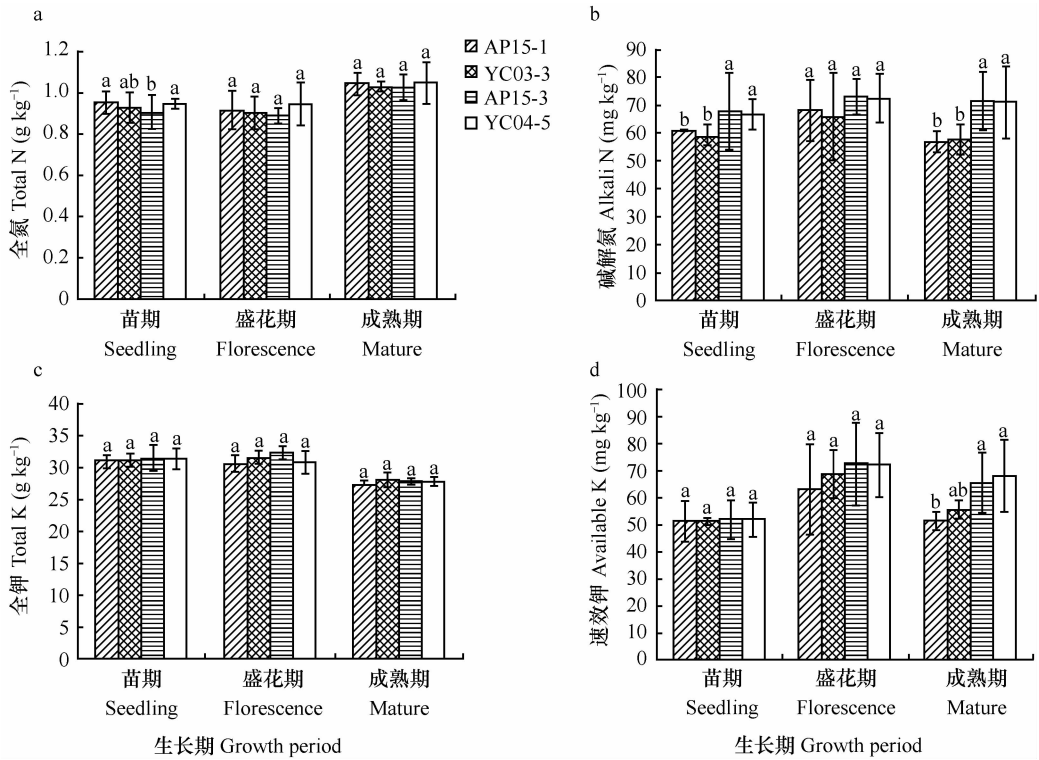


图3 2010年秋季大豆三个生长期根际土中氮、钾养分含量变化

Fig. 3 Changes in contents of N and K in the rhizosphere soil of the soybeans during the three growth periods in autumn 2010

表1 2010年秋季大豆生长期根际土中微量元素含量的变化

Table 1 Changes in contents of trace elements in the rhizosphere soil of soybeans planted in autumn 2010

生长期 Growth period	大豆 Soybean	微量元素 Trace elements							Fe (mg kg ⁻¹)
		Cu	Zn	Mo	Mn	Co	V	B	
		(×10 ⁻² mg kg ⁻¹)							
苗期 Seedling	AP15-1	95.5 ± 9.2a	187.7 ± 28.4ab	12.3 ± 4.1a	1553 ± 169a	3.1 ± 0.2ab	6.2 ± 1.2a	10.4 ± 3.2a	144.0 ± 18.0ab
	YC03-3	87.9 ± 6.2abc	201.7 ± 33.6a	12.2 ± 4.3a	1613 ± 91a	2.8 ± 0.2abc	5.4 ± 1.5a	13.7 ± 2.5a	128.0 ± 13.0b
	AP15-3	96.3 ± 5.5a	163.7 ± 18.0abcd	7.8 ± 3.4a	1737 ± 142a	3.3 ± 0.7a	5.9 ± 1.3a	10.9 ± 2.1a	144.0 ± 19.0ab
	YC04-5	97.1 ± 1.7a	173.3 ± 21.4abc	6.7 ± 2.1a	1623 ± 220a	2.8 ± 0.5abc	6.2 ± 1.1a	11.0 ± 4.3a	154.0 ± 16.0ab
盛花期 Florescence	AP15-1	86.8 ± 6.6abc	137.3 ± 13.5cde	6.3 ± 2.7a	1049 ± 117b	1.7 ± 0.4d	6.3 ± 1.0a	12.6 ± 2.6a	148.7 ± 16.0ab
	YC03-3	79.0 ± 3.7bc	120.0 ± 8.5e	11.1 ± 3.3a	1009 ± 143b	1.8 ± 0.3d	5.9 ± 0.8a	9.4 ± 1.9a	126.3 ± 7.6b
	AP15-3	84.7 ± 4.5abc	128.3 ± 12.7de	7.4 ± 4.8a	1067 ± 6b	1.9 ± 0.1d	6.3 ± 0.8a	9.0 ± 1.7a	141.7 ± 26.1ab
	YC04-5	89.4 ± 7.3abc	151.7 ± 24.7bede	7.1 ± 3.6a	1075 ± 200b	2.0 ± 0.3d	6.8 ± 0.6a	10.0 ± 0.9a	153.7 ± 17.5ab
成熟期 Mature	AP15-1	95.6 ± 7.6a	167.7 ± 14.3abcd	10.5 ± 1.2a	1112 ± 112b	2.5 ± 0.3abcd	6.3 ± 0.7a	13.3 ± 1.2a	178.0 ± 24.6a
	YC03-3	89.5 ± 3.7abc	143.7 ± 1.5cde	11.9 ± 6.2a	1120 ± 187b	2.3 ± 0.4bcd	6.0 ± 1.2a	10.6 ± 4.3a	156.7 ± 23.1ab
	AP15-3	72.6 ± 20.9bc	145.3 ± 16.8cde	11.1 ± 8.6a	1099 ± 150b	2.4 ± 0.4bcd	5.9 ± 1.6a	10.8 ± 1.3a	162.0 ± 29.8ab
	YC04-5	94.3 ± 6.7ab	153.7 ± 14.6bede	10.5 ± 5.8a	1070 ± 199b	2.2 ± 0.3cd	6.6 ± 0.9a	11.4 ± 4.0a	179.0 ± 11.3a

注:同一列数据有相同字母表示数据间用新复极差测验多重比较(Duncan's) $p \geq 0.05$ 水平无显著性差异。Note: The same letters affixed to the data in the same column mean no significant difference according to Duncan's test ($p \geq 0.05$).

2.4 转 *AtPAP15* 基因大豆种植对根际土壤酶活性的影响

土壤酶参与了包括土壤生物化学过程在内的自然界物质循环,是土壤中生物学活性的总体现,它表征了土壤的综合肥力特征及土壤养分转化进程,且对环境等外界因素引起的变化较敏感^[22]。为了反映转 *AtPAP15* 基因大豆种植是否会对土壤的肥力状况造成影响,本研究对 2010 年秋和 2011 年

春两季种植的 AP15-1 及其受体 YC03-3 盛花期根际土中四种土壤酶,包括酸性磷酸酶、过氧化氢酶、蔗糖酶和脲酶的活性分别进行了测定。测定结果(图 4)显示:同一季 AP15-1 与其受体 YC03-3 大豆根际土中的土壤酸性磷酸酶、过氧化氢酶、蔗糖酶和脲酶活性变化较小,酶活性的水平非常接近,差异均不显著。但两季之间除脲酶外,其余三种土壤酶的活性差异显著($p < 0.05$)。

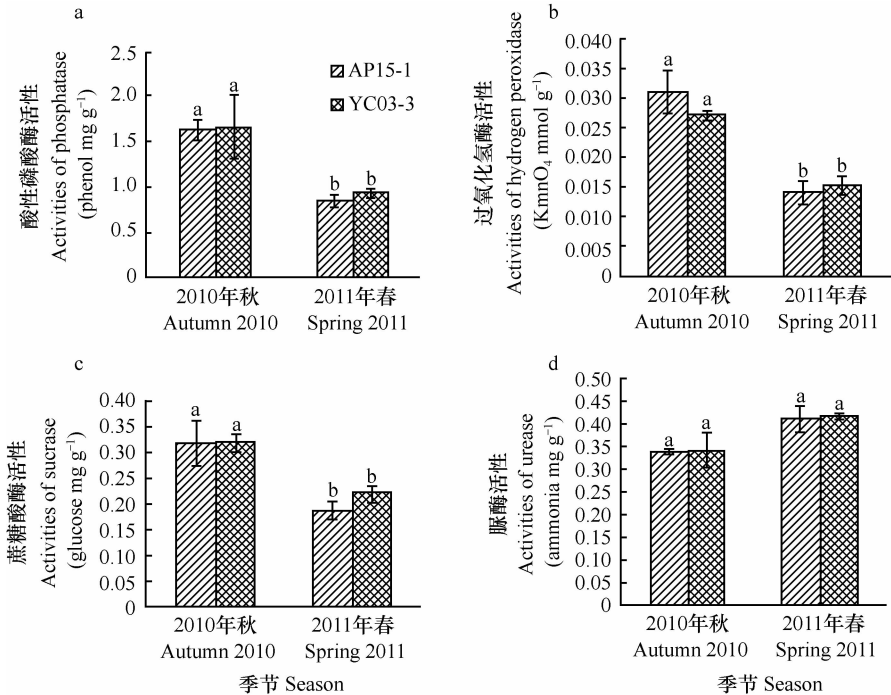


图 4 两季盛花期 AP15-1 及其受体 YC03-3 大豆根际土四种土壤酶活性的变化

Fig. 4 Changes in activities of phosphatase, hydrogen peroxidase, sucrose, and urease in the rhizosphere soil of the two crops of soybeans, AP15-1 and YC03-3, at the full bloom stage

3 讨论

土壤生物活性、土壤养分和水分的平衡状况及其影响等,是土壤生态系统研究的主要内容。至今,转基因植物对土壤生态影响的研究主要集中在对土壤微生物的影响方面,对土壤养分影响的研究有少量报道,主要是关于转 *Bt* 基因棉花和玉米等种植对土壤肥力和土壤酶活性的影响,但是所得到的研究结果不尽相同。有报道两种转 *Bt* 玉米种植 82d 后,根际土中有机质、N、P、K 全量与速效养分含量均未出现显著差异^[15];有研究显示转 *Bt* 基因棉花盆栽种植一季对土壤全氮、碱解氮、速效磷、有效硫的影响是微小的^[17];还有研究发现转 *Bt* 基因棉花在大田连续种植 5 年、甚至 10 年,土壤黏粒、pH、

有机质、氮磷钾全量和有效量等土壤肥力质量理化性质均没有显著差异^[23]。而也有研究报道在进行转 *Bt* 基因棉盆栽种植后发现,转 *Bt* 棉根际土有机质、全氮、碱解氮、速效钾的含量在苗期和花期均未变化,但速效磷含量在花期显著降低^[18]。在转 *Bt* 玉米不同生育期和秸秆还田后,对大田表土有机质、碱解氮、速效磷和速效钾的含量在连续两年研究的个别时期中均观测到显著性差异^[24]。从上述已有研究结果可以看出,目前对 *Bt* 转基因作物种植是否会直接或间接对土壤养分产生正面或负面的影响及其可能的原因,尚未有完全一致的答案。

养分高效利用转基因作物与转 *Bt* 抗虫转基因作物比较而言,对土壤养分产生影响的途径应更直接。本研究在大田种植转 *AtPAP15* 基因磷高效大豆,除个别时期外,分析结果总体显示转基因大豆

AP15-1、AP15-3 与其各自的受体(对照)之间,及转基因大豆 AP15-1 与 AP15-3 之间,在苗期、盛花期和成熟期根际土中全氮、碱解氮、全磷、速效磷、有机磷、钼等八种微量元素含量及土壤 pH 变化方面,均未见明显的差异。上述土壤养分相关指标的分析发现,显著差异更多出现在根际土与非根际土之间。王秀荣等^[9]认为该转基因大豆磷高效的可能机制在于:(1)根分泌酸性磷酸酶对外界植酸磷的利用能力提高;(2)叶片中磷酸酶对枝叶中磷循环再利用效率的提高。本研究结果显示,该磷高效转基因大豆的种植未显著改变根际土主要营养元素、特别是磷的含量。鉴于该材料磷高效的机制,本研究推测可能的原因,一是该转基因大豆根系分泌过量表达的酸性磷酸酶,虽然可以通过 Western 杂交和酶活性检测出^[9],但该材料分泌的酸性磷酸酶数量和活性可能还不够高,而大田有机磷含量(82.61 mg kg^{-1})相对较高,使得酸性磷酸酶分解大田土壤有机磷的量显现不出明显的差异;其次,本研究转基因大豆种植大田土壤速效磷含量在 60 mg kg^{-1} 左右,较高水平的速效磷,可能会对大豆自身内源的酸性磷酸酶的分泌有影响,而外源 *AtPAP15* 是由 35S 组成型启动子驱动表达,其转录水平的表达应该不受影响,但通过胡萝卜根导肽分泌到根表面也有可能受到影响;第三是大田种植的大豆植株收获后,秸秆没有归田,因此转基因大豆植株根和叶片中多累积磷量也不会对土壤磷产生明显的影响。总体而言,基于该转基因大豆磷高效的可能机制,该材料在低磷的条件下应该能更有效发挥磷高效的性能。然而,王秀荣等^[9]在酸性土壤(pH 5.43,速效磷含量 50.5 mg kg^{-1})进行的小规模的田间试验中,虽然未测定根分泌酸性磷酸酶的情况,但转基因大豆单株结荚数和籽粒数(30株均数)明显高于对照,显示该转基因大豆在土壤速效磷含量达 50.5 mg kg^{-1} 时,磷高效的效应仍存在。而本研究进行的大田产量性状调查(80株),发现总荚数,单株粒数和单株产量在 AP15-1 与其受体 YC03-3 之间差异不显著,而在 AP15-3 与其受体 YC04-5 之间呈极显著的差异,表明在本研究的磷养分充足土壤条件下,转基因的效应确实存在,但上述两个独立转化株系的磷高效性能却显现出差异。

土壤酶直接参与了土壤营养元素的有效化过程,它表征了土壤的综合肥力特征及土壤养分转化进程,是土壤肥力的生物学指标^[25-26]。在转基因植物对土壤环境的影响研究中,土壤酶活性的变化也

经常用于反应转基因植物对土壤的影响。颜世磊^[24]比较了 Bt 玉米不同生育期和秸秆还田后的土壤酶活性变化,发现转 Bt 基因玉米与亲本玉米对土壤酶活性影响的变化趋势及差异基本一致,未发现 Bt 玉米对蔗糖酶、蛋白酶、磷酸酶和脲酶四种土壤酶的不利影响。转 *DREB3* 基因抗旱大豆和非转基因大豆(对照)在正常土壤水分管理下,根际土壤中脲酶、纤维素酶、磷酸酶和过氧化氢酶活性无显著差异;在干旱胁迫下,转基因抗旱大豆和非转基因大豆根际土脲酶、纤维素酶和磷酸酶活性变化呈显著性差异,而对土壤过氧化氢酶活性无显著影响^[27]。土壤蔗糖酶、脲酶、磷酸酶常用来表征土壤 C、N、P 肥力状况,过氧化氢酶的活性可以表征土壤总的生物学活性和肥力状况。本研究取大田连续两季种植的转基因磷高效大豆 AP15-1 与受体盛花期根际土,测定了蔗糖酶、脲酶、磷酸酶和过氧化氢酶活性,发现 AP15-1 与受体之间同季四种土壤酶活性差异不明显,不同季节之间除脲酶外,蔗糖酶、磷酸酶和过氧化氢酶第二季活性均显著低于第一季,该结果与 2010 年秋、2011 年春大田连续种植大豆未进行施肥,综合肥力下降的变化趋势是一致的。

养分高效利用转基因作物种植对土壤养分的影响,应该是该类转基因材料安全评价的重要内容之一。目前相关的研究还很少,本试验以一个转拟南芥紫色酸性磷酸酶的磷高效转基因大豆为材料,在速效磷含量较高大田连续种植两季进行的研究结果显示,该磷高效转基因大豆的种植对土壤主要营养元素 N、P、K 和八种必需微量元素的含量及四种土壤酶活性的影响,与受体之间的差异总体不显著,说明该磷高效转基因大豆种植并不会显著改变土壤主要营养元素的循环和平衡。但是,对于低磷条件下,该材料种植对土壤养分的影响还有待进一步的研究。通过本研究也说明对于养分高效的转基因材料,其种植土壤养分条件的选择是进行安全评价需要考虑的一个重要因素。至今对转基因材料进行土壤主要养分含量和土壤酶活性的研究,在材料的选用、种植的方法(盆栽或大田种植)、种植的时间(一季或连续几年)、取土方式(根际土或大田表土)、研究的内容等方面不尽相同,得到的结果相互间缺少可比性。因此,如何监测转基因作物,特别是养分高效转基因作物的种植对土壤中主要养分含量的影响,仍需通过进一步试验,针对不同的转基因植物及其目标性状的特性,确定具体的种植条件、检测内容和方法,为建立转基因作物对土

壤生态、土壤养分安全的评价体系提供科学的方法和依据。

4 结 论

总体上,与非转基因的受体相比,转 *AtPAP15* 基因磷高效大豆在速效磷含量较高的大田中连续种植两季,对根际土中全磷、速效磷、有机磷、全氮、碱解氮、全钾、速效钾和微量元素的含量变化,及酸性磷酸酶、过氧化氢酶、蔗糖酶和脲酶的活性均未产生显著的影响。在对养分高效利用转基因材料进行土壤养分影响的安全评价时,最好选择具有不同养分背景的土壤,以利于更全面评价转基因材料养分高效特性对土壤养分产生的影响。

致 谢 感谢华南农业大学资源环境学院根系生物学中心王秀荣教授、廖红教授为本研究提供转基因大豆材料,并为本试验提供相关的指导和帮助。感谢华南农业大学资源环境学院郑少玲高级实验师在肥力调查及 N、K、P 等土壤理化指标分析中提供的帮助。

参 考 文 献

- [1] Shen J B, Yuan L X, Zhang J L, et al. Phosphorus dynamics: From soil to plant. *Plant Physiology*, 2011, 156 (3): 997—1005
- [2] Stutter M I, Shand C A, George T S, et al. Recovering phosphorus from soil: A root solution? *Environmental Science & Technology*, 2012, 46(4):1977—1978
- [3] José L B, Octavio M V, Arturo G G, et al. Enhanced phosphorus uptake in transgenic tobacco plants that overproduce citrate. *Nature Biotechnology*, 2000, 18(4):450—453
- [4] Richardson A E, Hadobas P A, Hayes J E. Extracellular secretion of *Aspergillus* phytase from *Arabidopsis* roots enables plants to obtain phosphorus from phytate. *Plant Journal*, 2001, 25(6): 641—649
- [5] Mudge S R, Smith F W, Richardson A E. Root-specific and phosphate-regulated expression of phytase under the control of a phosphate transporter promoter enables *Arabidopsis* to grow on phytate as a sole P source. *Plant Science*, 2003, 165 (4): 871—878
- [6] George T S, Richardson A E, Hadobas P A, et al. Characterization of transgenic *Trifolium subterraneum* L. which expresses *phyA* and releases extracellular phytase: Growth and P nutrition in laboratory media and soil. *Plant Cell and Environment*, 2004, 27(11): 1351—1361
- [7] Xiao K, Harrison M, Wang Z Y. Transgenic expression of a novel *M. truncatula* phytase gene results in improved acquisition of organic phosphorus by *Arabidopsis*. *Planta*, 2005, 222 (1): 27—36
- [8] Xiao K, Katagi H, Harrison M, et al. Improved phosphorus acquisition and biomass production in *Arabidopsis* by transgenic expression of a purple acid phosphatase gene from *M. truncatula*. *Plant Science*, 2006, 170(2): 191—202
- [9] Wang X R, W Y X, Tian J, et al. Overexpressing *AtPAP15* enhances phosphorus efficiency in soybean. *Plant Physiology*, 2009, 151(1): 233—240
- [10] 吴迪, 王秋玉. 转基因植物对根际土壤生态系统的影响. *中国生物工程杂志*, 2007, 27(2): 113—118. Wu D, Wang Q Y. The effect of transgenic plants on rhizospheric soil ecosystems (In Chinese). *Chinese Biotechnology*. 2007, 27(2): 113—118
- [11] Dunfield K E, Germida J J. Impact of genetically modified crops on soil-and plant-associated microbial communities. *Journal of Environmental Quality*, 2004, 33(3): 806—815
- [12] Becker R, Behrendt U, Hommel B, et al. Effects of transgenic fructan-producing potatoes on the community structure of rhizosphere and phyllosphere bacteria. *FEMS Microbiology Ecology*, 2008, 66(2): 411—425
- [13] Oliveira A P, Pampulha M E, Bennett J P. A two-year field study with transgenic *Bacillus thuringiensis* maize: Effects on soil microorganisms. *Science of the Total Environment*, 2008, 405 (1 / 3): 351—357
- [14] George T S, Richardson A E, Li SS, et al. Extracellular release of a heterologous phytase from roots of transgenic plants: Does manipulation of rhizosphere biochemistry impact microbial community structure? *FEMS Microbiology Ecology*, 2009, 70(3): 433—445
- [15] 王建武, 冯远娇. 种植 Bt 玉米对土壤微生物活性和肥力的影响. *生态学报*, 2005, 25(5): 1213—1220. Wang J W, Feng Y J. Effects of planting Bt corn on soil microbial activity and soil fertility (In Chinese). *Acta Ecologica Sinica*, 2005, 25(5): 1213—1220
- [16] 王建武, 冯远娇, 骆世明. Bt 玉米秸秆分解对土壤酶活性和土壤肥力的影响. *应用生态学报*, 2005, 16(3): 524—528. Wang J W, Feng Y J, Luo S M. Effects of Bt corn straw decomposition on soil enzyme activities and soil fertility (In Chinese). *Journal of Applied Ecology*, 2005, 16(3): 524—528
- [17] 孙彩霞, 张玉兰, 缪璐, 等. 转 Bt 基因作物种植对土壤养分含量的影响. *应用生态学报*, 2006, 17(5): 943—946. Sun C X, Zhang Y L, Miao L, et al. Changes of nutrients in soil of transgenic Bt crops (In Chinese). *Journal of Applied Ecology*, 2006, 17(5): 943—946
- [18] 张美俊, 杨武德. 转 Bt 基因棉种植对根际土壤生物学特性和养分含量的影响. *植物营养与肥料学报*, 2008, 14(1): 162—166. Zhang M J, Yang W D. Effect of transgenic Bt cotton planting on biological characteristics and nutrient content in rhizosphere soil (In Chinese). *Plant Nutrition and Fertilizer Science*, 2008, 14(1): 162—166
- [19] Zhang W Y, Gruszewski H A, Chevone B, et al. An *Arabidopsis* purple acid phosphatase with phytase activity increases foliar ascorbate. *Plant Physiology*, 2008, 146(2): 431—440
- [20] Kuang R, Chan K H, Yeung E, et al. Molecular and biochemical characterization of *AtPAP15*, a purple acid phosphatase with

- phytase activity, in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 2009, 151(1): 199—209
- [21] 鲍士旦. 土壤农化分析. 第3版. 北京: 中国农业出版社, 2000: 14—24, 70—97. Bao S D. Agricultural chemistry analysis of soil (In Chinese). 3rd ed. Beijing: China Agriculture Press, 2000: 14—24, 70—97
- [22] 关松荫. 土壤酶及其研究法. 北京: 农业出版社, 1986: 260—344. Guan S Y. Soil enzyme and its research methods (In Chinese). Beijing: China Agriculture Press, 1986: 260—344
- [23] 冷春龙. 转基因抗虫棉对土壤肥力质量的影响. 南京: 南京林业大学, 2007. Leng C L. Effects of transgenic resistant-pest cotton on soil fertility quality (In Chinese). Nanjing: Nanjing Forestry University, 2007
- [24] 颜世磊. 转 Bt 基因玉米对土壤微生物活性和肥力的影响. 济南: 山东师范大学, 2011. Yan S L. Effects of Bt maize on soil microbial activity and fertility (In Chinese). Jinan: Shandong Normal University, 2011
- [25] 万忠梅, 宋长春. 土壤酶活性对生态环境的响应研究进展. 土壤通报, 2009, 40(4): 951—956. Wan Z M, Song C C. Advance on response of soil enzyme activity to ecological environment (In Chinese). *Chinese Journal of Soil Science*, 2009, 4(4): 951—956
- [26] 符裕红, 黄宗胜, 俞理飞. 岩溶区典型根系地下生境类型中土壤酶活性研究. 土壤学报, 2012, 49(6): 1202—1209. Fu Y H, Huang Z S, Yu L F. Soil enzyme activities in the type of root underground habitat typical of karst areas (In Chinese). *Acta Pedologica Sinica*, 2012, 49(6): 1202—1209
- [27] 乔琦, 丁伟, 李新海, 等. 转基因抗旱大豆对土壤酶活性的影响. 东北农业大学学报, 2010, 41(12): 11—14. Qiao Q, Ding W, Li X H, et al. Effect of transgenic drought resistant soybean on soil enzyme activity (In Chinese). *Journal of Northeast Agricultural University*, 2010, 41(12): 11—14

EFFECTS OF PLANTING *ATPAP15* TRANSGENIC SOYBEANS ON SOIL NUTRIENTS AND ENZYME ACTIVITIES IN RHIZOSPHERE

Wu Fan LinGuichao Wu Jianwen Yao Juan Zhou Feng Jiang Dagang Mei Mantong Mu Hong[†]

(*Environmental Safety Monitoring and Testing Center for Genetically-Modified Plants and Microorganisms used in plants (Guangzhou), Ministry of Agriculture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China*)

Abstract In a field experiment, where two successive crops of soybeans, including 2 P-efficient transgenic soybeans AP15-1 and AP15-3, and their receptors YC03-3 and YC04-5, were planted. Samples of rhizosphere soils were collected at the seedling, florescence, and mature stages for analyses of pH, total P, available P, organic P, total N, alkali N, total K, available K and eight trace elements, and the activities of four soil enzymes, including sucrose, phosphatase, hydrogen peroxidase and urease, in the rhizosphere soils of AP15-1 and YC03-3 at the full bloom stage, to explore effects of planting of the transgenic soybeans on soil nutrients and enzyme activities in the rhizosphere soil. Results showed that the significant differences were found at certain stages between AP15-1 and YC03-3 and between AP15-3 and YC04-5 in nutrient content, except for total K and trace elements. However, the differences were observed mostly at the seedling stage, and at the mature stage, the difference existed only in content of organic P between AP15-1 and YC03-3, and in content of available K between AP15-3 and YC04-5. Moreover, such differences were no longer detected any time of the two seasons. The determination of activities of the four soil enzymes indicated that there was no significant difference between the transgenic varieties and their respective receptors in the same season. To sum up, the findings demonstrate that planting P-efficient transgenic soybeans is likely to have no significant effects on contents of the main soil nutrients or activities of the four soil enzymes in rhizosphere.

Key words Soybean; *AtPAP15*; Transgenic; Soil nutrient; Soil enzyme; Rhizosphere soil

(责任编辑: 檀满枝)