

转 *crylAb* 基因克螟稻对根际可培养细菌类群的影响

杨保军¹, 唐健¹, 江云珠¹, 彭于发²

(1. 中国水稻研究所, 杭州 310006; 2. 中国农业科学院植物保护研究所, 北京 100094)

摘要:田间栽培条件下, 研究了转 *crylAb* 基因克螟稻 1(KMD1)、克螟稻 2(KMD2) 及其亲本常规晚粳秀水 11(XS11) 不同生育期、不同根际部位(包括根际土壤、根表面和根内)可培养细菌类群数量、组成和动态变化。结果表明, 各品种不同生育期根际平均细菌数量以拔节期最多, 抽穗期最少; 转 Bt 稻 KMD1 和 KMD2 根际平均细菌数量均显著高于 XS11, 且根表面和根内平均细菌数量也显著高于 XS11, 而根际土壤中平均细菌数量则低于 XS11; 试验共纯化菌株 303 个, 经鉴定归于 20 个属, 各品种根际出现的细菌类群大多为相同属, 但数量有异, 其中 KMD1、KMD2 根际的葡萄球菌属(*Staphylococcus*)、棒杆菌属(*Corynebacterium*)和壤霉菌属(*Agromyces*)均显著高于 XS11, 而 XS11 根际的束毛球菌属(*Trichococcus*)显著高于 KMD1、KMD2; 群落多样性分析表明, 各水稻品种根际细菌群落的优势度指数 C、多样性指数 H' 和均匀度指数 J 差异均不显著, 表明转 *crylAb* 基因水稻对土壤细菌群落有一定影响, 与水稻生育期和根际部位有关。

关键词: Bt 水稻; 根际; 细菌区系; 群落多样性

文章编号: 1000-0933(2009)06-3036-08 中图分类号: Q143, Q145, Q938, S314 文献标识码: A

The effects of *crylAb* transgenic rice on the culturable bacterial flora in the rhizospheres

YANG Bao-Jun¹, TANG Jian¹, JANG Yun-Zhu¹, PENG Yu-Fa²

1 China National Rice Research Institute, Hangzhou 310006, China

2 Plant Protection Institute of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100094, China

Acta Ecologica Sinica, 2009, 29(6): 3036 ~ 3043.

Abstract: In order to investigate the effects of transgenic *Bacillus thuringiensis* rice (Bt rice, carrying *crylAb* gene) on the rhizosphere bacterial flora under paddy field conditions, the community structure and its quantitative variations of bacteria in different rhizosphere areas (root surface, the rhizosphere, inner root) of two Bt rice lines (KMD1 and KMD2) and the parent XiuShui11 (XS11) under different developmental stages were compared. For three lines, the average bacteria number reached the peak at shooting stage and the bottom at heading stage. The average bacteria number in the root surface and inner root, but not in the rhizosphere, of KMD1 or KMD2 was significantly higher than that of XS11. Twenty genera were classified from 303 strains. The strains isolated from three lines mostly belonged to same genus, but the bacteria number were different, in which the quantities of *Staphylococcus*, *Corynebacterium* and *Agromyces* of two Bt rice lines were higher than those of XS11, whereas *Trichococcus* of two Bt rice lines were less than that of XS11. There were no significant differences of Shannon-wiener, Simpson and Pielou indexes for the total bacterial community among three lines. This work demonstrated that Bt rice would lead to the quantitative variations of bacteria in rice soil rhizosphere, dependent on the rice developmental stages and rhizosphere areas.

Key Words: Bt rice; rhizosphere; bacterial flora; community biodiversity

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(973)资助项目(2001CB109004)

收稿日期: 2008-03-16; 修订日期: 2008-09-12

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: ybjhz@yahoo.com.cn

近年转基因作物培育及评估其商品化种植潜在风险一直受到国内外学者共同关注。已有报道多集中在转基因植物的遗传转化、基因漂流、对靶标害虫的抗性风险以及对非靶标生物的影响等方面^[1~6]。土壤生态系统是作物赖以生存并进行物质循环和能量转化过程的重要场所,转基因作物携带外源基因(如Bt杀虫晶体蛋白基因、蛋白酶抑制剂基因、抗生素基因等)所表达产物可通过植物残渣、根系分泌物和花粉进入土壤生态系统,致使土壤生物多样性以及特异生物功能类群都有可能改变^[7,8]。因此,作为评价转基因作物土壤环境安全性的重要组成部分,有关转基因作物表达产物在土壤中的残留特性^[9~11]、外源产物对土壤土壤酶活性^[12]和对土壤生物群落的影响^[13,14]等研究,已经成为近年来的研究热点。

迄今,世界范围内已成功培育出了多个转基因水稻品种(系)^[15]。国内外也有关于转基因水稻对根际土壤微生物安全性研究也有报道^[16,17],但其研究多为人工模拟条件下一次取样或局部取样的结果。从空间格局来看,根际微生物分布的部位应包括根际土壤、根表面和根内,而有关转Bt基因水稻对根际不同部位微生物影响研究未见有报道。细菌是土壤微生物中数量最多的类群,本研究比较了田间种植条件下转Bt水稻与其亲本在不同生育期其根表面、根际土壤和根内细菌群落类群的组成和变化差异,旨在探明转Bt基因水稻对根际不同部位细菌类群的影响,为转基因水稻安全性评价提供依据。

1 材料和方法

1.1 供试水稻及其栽培

供试转Bt基因水稻品种为克螟稻1号(KMD1)、克螟稻2号(KMD2)和常规晚粳稻秀水11(XS11,为KMD1、KMD2的亲本)均由浙江大学农业与生物技术学院提供。克螟稻(KMD)是舒庆尧等^[18]将Bt(*Bacillus thuriengensis*)杀虫蛋白基因(*cry1Ab*)导入晚粳稻秀水11后选育出的Bt水稻,其对8种鳞翅目害虫具有高抗,已于1998年通过我国农业部的批准进行环境释放试验^[18~20]。

试验于2002年在中国水稻研究所富阳基地试验田中进行。共设计相邻排列小区3个,分别种植KMD1、KMD2和XS113个水稻品种,小区面积均为443.7m²(长25.5m,宽17.4m),小区间不做田埂,外围有水泥田埂隔离,并种植阔叶类蔬菜作为隔离带。5月20日播种,6月15日移栽,单本插秧,株行距15cm×20cm,田间肥水管理按常规,试验期间未施用任何杀虫剂和杀菌剂。

1.2 田间取样

水稻移栽后各生育期每6~16d取样1次,共取样10次。分蘖期取样3次:7月18日、7月22日和8月5日;拔节期取样2次:8月11日和8月27日;孕穗期取样1次:9月3日;抽穗期取样1次:9月10日;灌浆期1次:9月17日;乳熟期1次:9月24日;腊熟期1次:9月30日。取样时沿各小区对角线取5丛水稻,挖取整株根系。小区内各次取样对角线方向交替。

1.3 水稻根际细菌群落的分离方法

1.3.1 样本预处理

本研究将根围0.5cm范围内的土壤作为根际土壤。1.2采集的根系样品用适量无菌水浸泡,使其软化除去多余土壤,无菌剪刀随机剪取预留紧密附着、不易脱落的带泥土须根30根,用于进一步分离细菌。

1.3.2 细菌分离方法

(1)根际土壤细菌分离 对预处理好的根系称重(质量为W₀),置与盛100ml无菌水的250ml三角瓶中,振荡15min,洗液为根际土壤菌悬液。取出根系,吸干,称重(质量为W₁)。W₀-W₁为根际土壤样品质量。

(2)根表面细菌分离 上步骤所得根系(质量为W₁),移至盛有无菌石英砂的250ml三角瓶中,加入50ml无菌水,充分振荡15min,取出根系,吸干、称重(质量为W₂)。所得震荡液即为根面菌悬液。W₁-W₂为根表面样品质量。

(3)根内细菌的分离 上步骤所得根系(质量为W₂),放入20%次氯酸钠消毒30s后,用无菌水洗涤3~5次,吸干、秤重(质量为W₃)。剪碎根系,加入少许石英沙和10ml无菌水,研钵至碎,即为根内菌悬液。W₂-W₃为根内样品质量。

1.3.3 菌液稀释倍数确定和培养

预先获得的3种菌悬液,以10倍稀释法稀释成一系列稀释菌悬液,采用平板培养法培养。吸取300 μl 菌液,平板涂布,筛选其最佳稀释浓度。细菌培养基为土浸液琼脂培养基^[21]。

将筛选的最佳稀释倍数作为各次分离根际样品的依据,按上述相同方法分离不同水稻根际细菌,培养平板均设10个重复。培养条件:28℃,RH:60%~70%,光:暗=14h:10h。24h、48h、72h后观察菌落的形状、大小、颜色、隆起度、光滑度、透明度等培养特征,编号,计相似菌落的数量。平均细菌数量=菌落数/根样品质量(g-1),其中根样品包括根际土壤、表面和根内样品,其质量依次以 W_0-W_1 、 W_1-W_2 和 W_2-W_3 计。对各平均细菌数量求自然对数,所得值更能直观表征不同处理的细菌数量。

1.4 菌株纯化和保存

将编号的菌落转平板2~3次,获得纯培养(菌株)。制备菌液移入Eppendorf管,硅胶密封,4℃保存。

1.5 鉴定方法

参照东秀珠《常见细菌系统鉴定手册》^[22]检测各菌株纯培养物的形态特征、生理和生化特征,对各菌株进行鉴定。

1.6 分析方法

采用Statistica 6.0统计软件分析不同处理下细菌群落的演变和动态变化。

细菌群落多样性分析采用如下公式:

Shannon-Winener 公式

$$H' = - \sum_{i=1}^S P_i \log_2 P_i$$

优势方式指数 Simpson

$$C = \sum P^2$$

均匀度指数 Pielou

$$J = H'/\ln S$$

式中, $P_i = N_i/N$ 表示群落中第 i 个物种的个体数(N_i)占群落中总个体(N)的比例; S 为群落中物种数。

2 结果与分析

2.1 转Bt基因水稻不同生育期对根际细菌数量影响

转Bt基因水稻KMD1、KMD2及对照品种XS11不同生育期根际细菌数量均以拔节期最多(图1),KMD1每克样品所得菌落数量为(933.2±476.4)个、KMD2为(4191.3±488.6)个、XS11为(1501.6±517.2)个,孕穗期、灌浆期、乳熟期和成熟期含菌量次之,抽穗期含菌量最少。这可能是由于拔节期水稻生长最活跃,因而根际细菌数量最多。比较不同生育期品种间根际平均细菌数量差异,KMD1、KMD2生长至分蘖期、孕穗期、灌浆期和乳熟期均高于其亲本XS11,而抽穗期和腊熟期均低于XS11,另外XS11拔节期根际细菌数量则居中。说明转Bt基因水稻对根际细菌数量有影响,这一影响与生育期有关。

2.2 转Bt基因水稻对根际细菌数量的影响

试验结果表明(图2),转Bt基因水稻KMD1、KMD2根际细菌数量均显著高于亲本品种XS11,KMD2高于KMD1,但差异不显著,说明转Bt基因稻可导致根际细菌数量增加。

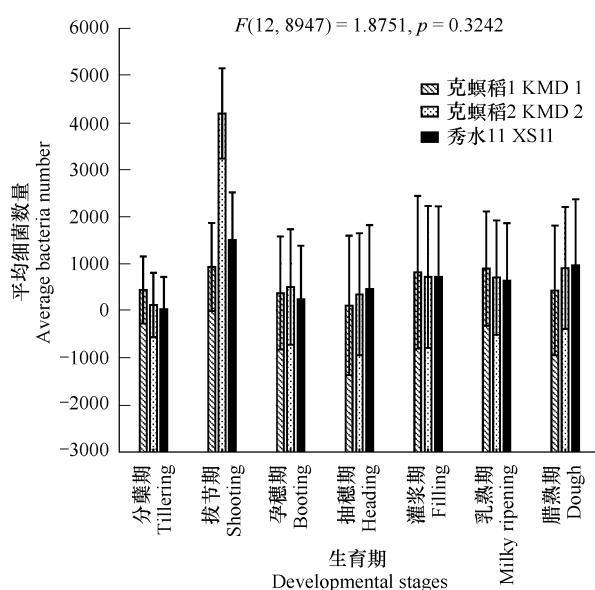


图1 水稻不同生育期根际平均细菌数量比较

Fig. 1 Comparison of average bacteria number in the rhizospheres of rice lines at different developmental stages

2.3 转 Bt 基因水稻不同根际部位对细菌数量的影响

根际不同部位细菌数量根表面 > 根内 > 土壤,三者差异均达极显著(图 3)。不同部位细菌数量因品种而异,根系表面菌数量 KMD2 > KMD1 > XS11,根内菌数量 KMD1 > KMD2 > XS11,土壤中菌数量 XS11 > KMD2 > KMD1,其差异均极显著。转 Bt 基因水稻 KMD1、KMD2 根表面和根内细菌数量均高于 XS11,而 KMD1、KMD2 根际土壤中细菌数量则低于 XS11,说明虽然 KMD 根际土壤细菌数量减少,但根表面和根内细菌活动加剧,使得根际细菌总数量多于 XS11 成为可能。

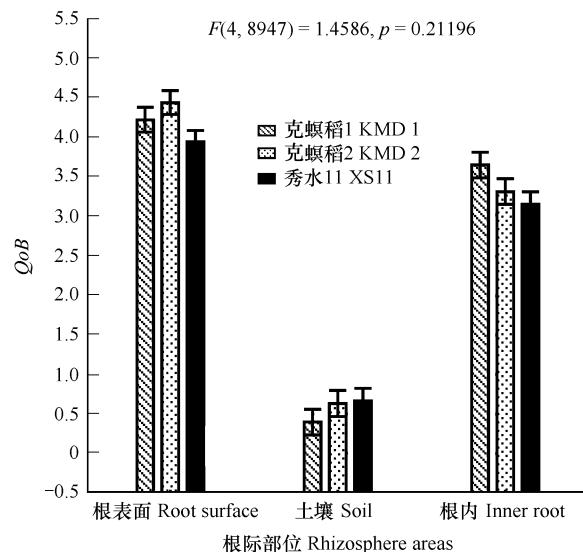
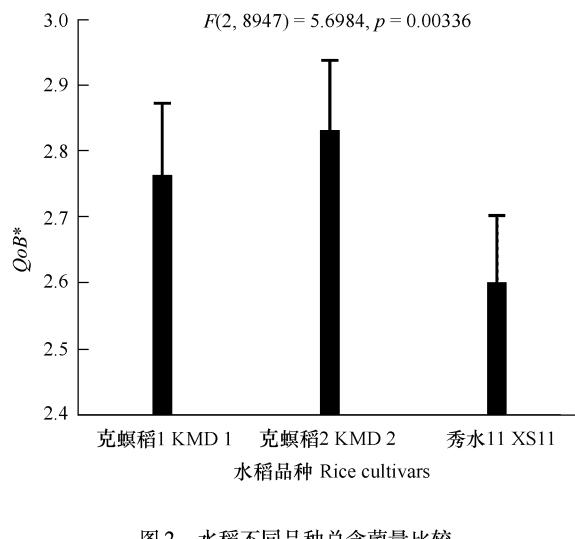


图 2 水稻不同品种总含菌量比较

Fig. 2 Comparison of quantity of bacteria in the rhizospheres of rice cultivars

* QoB 代表细菌数量,为平均细菌数量的自然对数值 QoB the quantity of bacteria, which was the nature logarithms number of average bacteria number;下同, the same blow

2.4 转 Bt 基因水稻不同生育期和不同根际部位对细菌数量的影响

各品种根表面和根内细菌数量随生长期不同增减交替明显,而土壤细菌数量随生长期呈“U”型波动(如图 4)。分析品种间各生育期和不同根际部位差异,KMD1 和 KMD2 的根表面细菌数量仅在分蘖期高于 XS11,抽穗期则低于 XS11;KMD1 和 KMD2 根内细菌数量在分蘖期、孕穗期和乳熟期均高于 XS11,而拔节期和腊熟期则低于 XS11;KMD1 和 KMD2 根际土壤细菌数量在抽穗期和乳熟期均高于 XS11,而分蘖期、孕穗期和灌浆期均低于 XS11。可见各品种不同生育期细菌数量量因根际部位而异。

2.5 转 Bt 克螟稻对根际细菌类群的影响

从 KMD1、KMD2 和 XS11 根际分离和纯化到的菌株共 303 个,对其鉴定归类到 20 个属。不同品种根际出现的细菌类群,大多为相同属,但细菌数量有异(图 5),如 KMD1、KMD2 根际的棒杆菌属(*Corynebacterium*)和蜜蜂球菌属(*Melissococcus*)显著高于 XS11,而 XS11 根际的束毛球菌属(*Trichococcus*)和变形菌属(*Proteus*)显著高于 KMD1、KMD2。

结合水稻不同根际部位进行分析表明(表 1),3 个水稻品种共有菌种包括,可从根内、根表面、根际土壤分离的葡萄球菌属(*Staphylococcus*)、棒杆菌属(*Corynebacterium*)、束毛球菌属(*Trichococcus*)、微小杆菌属(*Exiguobacterium*)和微球菌属(*Micrococcus*);仅从根面分离到的欧文氏菌属(*Erwinia*)、柠檬酸杆菌属(*Citrobacter*)和盐芽孢杆菌属(*Halobacillus*);仅从根内分离到的杀雄菌属(*Arsenophonus*)、变形菌属(*Proteus*)、埃希氏菌属(*Escherichia*)和稀有杆菌属(*Rarobacter*)和壤霉菌属(*Agromyces*);仅从土壤中分离到的肠杆菌属(*Enterobacter*)和芽孢八叠球菌属(*Sporosarcina*)。另外,纤维单孢菌属(*Cellulomonas*)仅能从 KMD1 根表面分

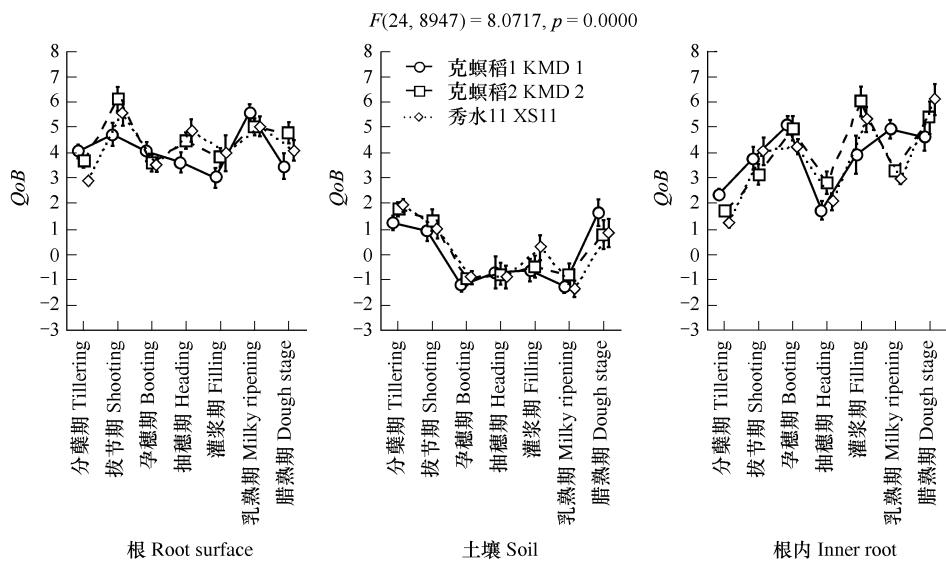


图4 水稻不同品种、不同生育期和不同根际部位细菌数量比较

Fig. 4 Comparison of quantity of bacteria in rhizosphere areas of rice cultivars at different developmental stages

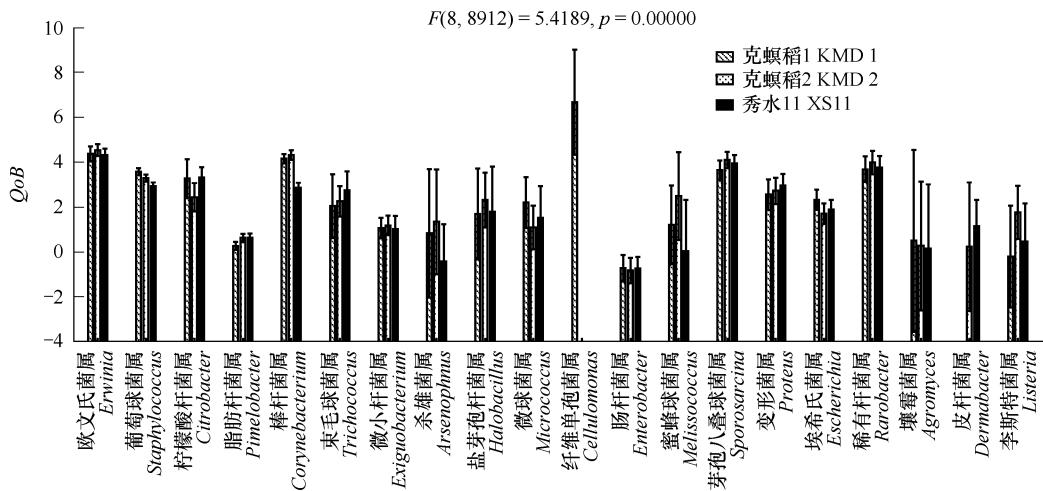


图5 不同水稻品种根际各类细菌数量比较

Fig. 5 Comparison of rhizosphere bacterial variety and quantity of different rice cultivars

离到,皮杆菌属(*Dermabacter*)仅能从KMD2和秀水11根内分离到。比较转Bt水稻与常规水稻不同根际部位细菌数量,KMD1、KMD2各根际部位的葡萄球菌属(*Staphylococcus*)、棒杆菌属(*Corynebacterium*)和壤霉菌属(*Agromyces*)细菌类群数量均高于常规对照XS11,而KMD1、KMD2根表面的束毛球菌属(*Trichococcus*)和根内的变形菌属(*Proteus*)细菌数量则低于XS11。可见转Bt基因水稻无论从数量还是类群上均对其根际细菌类群有影响。蜜蜂球菌属(*Melissococcus*)和李斯特菌属(*Listeria*)均可以从3个水稻品种根际分离,但不同根际部位情况不一,说明转Bt基因水稻对根际细菌类群的影响因根际部位有差异。

2.6 群落多样性分析

对各水稻品种根际细菌群落的优势度指数C、多样性指数H'和均匀度指数J进行分析表明品种间有差异,但不显著。进一步分析各品种不同根际部位细菌群落多样性,结果表明,细菌群落优势度指数C、多样性指数H'和均匀度指数J各不相同(表2),其中虽然KMD1根面细菌群落优势度指数C显著高于其根际土壤以及KMD2和XS11土壤细菌群落,KMD1根面细菌群落多样性指数H'显著低于KMD2土壤群落,KMD1根面

表1 不同水稻品种不同根际部位细菌类群数量分布

Table 1 Distribution of soil bacteria in rhizosphere areas of different rice cultivars

根际部位 Rhizosphere areas	属 Genus	KMD1		KMD2		XS11	
		QoB	N	QoB	N	QoB	N
根表面 Root surface	<i>Erwinia</i>	4.39 ± 0.17	142	4.55 ± 0.14	235	4.33 ± 0.15	184
	<i>Staphylococcus</i>	5.07 ± 0.13	260	5.16 ± 0.12	306	4.48 ± 0.12	287
	<i>Citrobacter</i>	3.29 ± 0.44	22	2.44 ± 0.32	41	3.33 ± 0.24	75
	<i>Pimelobacter</i>	2.98 ± 0.11	351	3.63 ± 0.12	304	3.56 ± 0.11	336
	<i>Corynebacterium</i>	6.62 ± 0.21	98	6.52 ± 0.24	74	3.54 ± 0.29	52
	<i>Trichococcus</i>	3.51 ± 2.07	1	4.75 ± 0.85	6	5.45 ± 1.04	4
	<i>Exiguobacterium</i>	3.74 ± 0.28	55	3.84 ± 0.25	66	3.87 ± 0.24	73
	<i>Halobacillus</i>	1.7 ± 1.04	4	2.32 ± 0.62	11	1.8 ± 1.04	4
	<i>Micrococcus</i>	4.62 ± 1.46	2	1.87 ± 0.85	6	2.13 ± 0.57	13
	<i>Cellulomonas</i>	6.69 ± 1.2	3				
土壤 Soil	<i>Melissococcus</i>			5.34 ± 2.07	1	-0.2 ± 2.07	1
	<i>Listeria</i>			2.53 ± 1.04	4	3.3 ± 1.46	2
	<i>Staphylococcus</i>	0.33 ± 0.18	136	0.14 ± 0.18	132	-0.09 ± 0.21	102
	<i>Pimelobacter</i>	-2.44 ± 0.14	208	-2.36 ± 0.15	193	-2.29 ± 0.16	163
	<i>Corynebacterium</i>	1.56 ± 0.14	211	1.86 ± 0.14	209	1.48 ± 0.12	300
	<i>Trichococcus</i>	1.33 ± 0.18	136	0.94 ± 0.17	157	1.25 ± 0.18	134
	<i>Exiguobacterium</i>	-1.66 ± 0.62	11	-1.36 ± 0.6	12	-1.7 ± 0.85	6
	<i>Micrococcus</i>	0.4 ± 0.2	108	0.42 ± 0.21	97	0.27 ± 0.2	103
	<i>Enterobacter</i>	-0.72 ± 0.3	47	-0.81 ± 0.29	52	-0.73 ± 0.26	63
	<i>Melissococcus</i>	1.2 ± 1.04	4	0.6 ± 0.65	10	0.29 ± 1.04	4
根内 Inner root	<i>Sporosarcina</i>	3.67 ± 0.22	90	4.11 ± 0.18	130	3.96 ± 0.19	114
	<i>Listeria</i>	-1.58 ± 2.07	1			-2.28 ± 2.07	1
	<i>Staphylococcus</i>	5.4 ± 0.1	436	4.63 ± 0.1	412	4.42 ± 0.1	405
	<i>Corynebacterium</i>	4.34 ± 0.18	127	4.62 ± 0.17	155	3.58 ± 0.17	156
	<i>Trichococcus</i>	1.32 ± 0.69	9	1.1 ± 0.57	13	1.54 ± 0.78	7
	<i>Exiguobacterium</i>	1.12 ± 0.13	261	1.08 ± 0.13	250	0.93 ± 0.15	181
	<i>Arsenophonus</i>	0.84 ± 1.46	2	1.36 ± 1.2	3	-0.41 ± 0.85	6
	<i>Micrococcus</i>	1.59 ± 0.93	5	1.01 ± 1.2	3	2.18 ± 2.07	1
	<i>Melissococcus</i>	1.23 ± 1.46	2	1.56 ± 2.07	1		
	<i>Proteus</i>	2.56 ± 0.36	34	2.74 ± 0.3	47	2.97 ± 0.27	61
根内 Inner root	<i>Escherichia</i>	2.33 ± 0.23	82	1.71 ± 0.23	80	1.9 ± 0.21	93
	<i>Rarobacter</i>	3.7 ± 0.29	50	4 ± 0.27	61	3.78 ± 0.26	64
	<i>Agromyces</i>	0.51 ± 2.07	1	0.28 ± 1.46	2	0.16 ± 1.46	2
	<i>Dermabacter</i>			0.25 ± 1.46	2	1.16 ± 0.6	12
	<i>Listeria</i>	1.19 ± 1.04	4	1.01 ± 0.62	11	0.38 ± 0.6	12

N:从样品中分离到同属菌落频次 The frequency of congener colonies isolated from the samples

表2 水稻不同根际部位细菌多样性指数分析*

Table 2 The analyses of bacteria community diversity indexes in rhizosphere areas of different rice cultivars

品种 Cultivars	根际部位 Rhizosphere areas	优势度指数 C		多样性指数 H'		均匀度指数 J	
		Simpson	Shannon-Wiener			Pielou	
克螟稻 1 KMD1	根面 Root surface	0.456 ± 0.076 a		1.506 ± 0.220 a		0.673 ± 0.070 a	
	土壤 Soil	0.288 ± 0.044 b		2.160 ± 0.141 bc		0.802 ± 0.038 ab	
	根内 Inner root	0.400 ± 0.040 ab		1.661 ± 0.160 ab		0.740 ± 0.046 ab	
克螟稻 2 KMD2	根面 Root surface	0.343 ± 0.037 ab		1.848 ± 0.128 abc		0.759 ± 0.034 ab	
	土壤 Soil	0.259 ± 0.028 b		2.204 ± 0.131 c		0.835 ± 0.017 b	
	根内 Inner root	0.375 ± 0.041 ab		1.744 ± 0.176 abc		0.711 ± 0.036 ab	
秀水 11XS11	根面 Root surface	0.365 ± 0.042 ab		1.762 ± 0.145 abc		0.716 ± 0.038 ab	
	土壤 Soil	0.300 ± 0.039 b		2.129 ± 0.155 bc		0.770 ± 0.034 ab	
	根内 Inner root	0.337 ± 0.037 ab		1.880 ± 0.190 abc		0.789 ± 0.035 ab	

* 表中各栏数据后的小写字母分别表示差异显著性 p < 0.05, 含有相同字母的结果间不存在显著差异 The data followed by small letter above the column represents significantly different at 0.05 level, and same letter refers to no significant difference

细菌均匀度指数 J 显著低于 KMD2 根际土壤细菌群落,但是就不同品种间同一根际部位来看,差异其差异均不显著,这说明转 Bt 水稻对根际细菌群落多样性影响不明显。

3 讨论

转基因作物栽培后引起土壤微生物类群和生物量改变主要由两方面原因造成:(1)外源基因获得直接表达后通过作物残茬、根系分泌物和花粉等途径进入土壤,经过一系列复杂的物理化学代谢活动后对土壤微生物产生影响^[23];(2)外源基因在染色体中的插入引发基因表达的多效性效应,进而引起作物在田间生理生化特征发生特异变化,导致土壤微生物种群数量、种群结构和组成的变化^[13,24]。本研究是在田间条件下,对水稻各生长期根际土壤、根表面和根内细菌进行分离,结果表明,转 Bt 基因水稻 KMD1、KMD2 根际细菌数量均显著高于亲本品种 XS11,且分蘖期、孕穗期、灌浆期和乳熟期根际细菌数量均高于其亲本 XS11,而抽穗期和腊熟期根际细菌数量均低于 XS11,说明转 Bt 基因稻对根际细菌数量有影响与水稻生育期有关。KMD1、KMD2 根表面和根内细菌数量均高于 XS11,而根际土壤中细菌数量则低于 XS11,说明转 Bt 基因稻对根际细菌数量的影响还与根际部位有关。从 KMD1、KMD2 和 XS11 根际分离到的菌株共 303 个,对其鉴定归类到 20 个属。不同品种根际出现的细菌类群,大多为相同属,但同一细菌类群在转 Bt 稻根际的数量有高于常规 XS11,也有低于常规 XS11。陈敏^[25]研究认为转 Bt 水稻根际土壤的细菌数量高于常规水稻,不同培养方法可能产生不同结果,本文研究结果与之吻合。ERIC-PCR 指纹图谱分析显示,细菌生理类群结构组成上均不同于常规水稻,而本研究对各水稻品种根际总细菌群落的优势度指数 C 、多样性指数 H' 和均匀度指数 J 进行分析表明品种间有差异,但不显著。另有报道对转 Bt 基因克螟稻对土壤细菌群落的影响,与本结果不同^[26,27],这与研究所采用试验条件或方法不同有关。本试验部分数据变异度较大,可能与大田取样天气条件、取样点重复设置次数等因素有关,部分结果尚需重复。

研究采用的转 Bt 基因克螟稻田间农艺性状已表现出不同于亲本变化,如植株高度降低、分蘖力增强、穗长、穗粒数、千粒重明显下降,且秸秆含碳量和速效钾含量的下降以及氮和磷含量的上升等^[28]。在水稻的分蘖始期至成熟期地上部和根部中均可检测到 *Cry1Ab* 毒蛋白,而根际土壤中未检测到,根际土及其提取液也未表现出杀虫活性^[29]。可见从根系分泌 *Cry1Ab* 毒蛋白及其在土壤中的残留特性来看,克螟稻其对土壤生态系统的不利影响要比转 Bt 玉米小^[30],尽管如此,试验所采用转 *cry1Ab* 基因水稻根际细菌总量比亲本对照显著增加,就细菌类群而言,有增加有减少,推测其主要原因是转基因引起水稻生理生化以及栽培特征改变,进而造成对根际可培养细菌在生物量和类群上产生影响。土壤微生物具有多样性和复杂性,根际是植物、土壤和微生物密切相关的区域,有关转基因作物释放的杀虫晶体蛋白进入土壤后对根际土壤理化性质(如:pH、CEC、机械组成、腐殖质组分及总酸度)和土壤生物活性(如:土壤中与营养物质转化密切相关的酶活性变化)的影响;对土壤微生物种群类群、生物量以及引起特定类群的生理特性和代谢活动改变,进而影响土壤生物、生态过程和肥力等方面的研究仍需长期进行,阐明这些规律的意义在于将为转 Bt 水稻产业化道路上的安全性问题提供必要借鉴。

References:

- [1] Qian Y Q, Ma K P. Progress in the studies on genetically modified organism, and the impact of its release on environment. *Acta Ecologia Sinica*, 1998, 18(1):1—9.
- [2] Wolfenbarger L L, Phifer P R. The ecological risks and benefits of genetically engineered plants. *Science*, 2000, 290:2088—2093.
- [3] Angle J S. Release of transgenic plants: biodiversity and population considerations. *Mol. Ecol.*, 1994, 3:45—50.
- [4] Wei W, Qian Y Q, Ma K P. Gene flow between transgenic crops and their wild relative species. *Acta Bot. Sin.*, 1999, 41(4):343—348.
- [5] Hilder V A, Boulter D. Genetic engineering of crop plants for insect resistance: a critical review. *Crop Prot.*, 1999, 18:177—191.
- [6] Qian Y Q, Wei W, Sang W G, et al. Effects of transgenic crop on biodiversity. *Acta Ecologica Sinica*, 2001, 21(3):337—343.
- [7] Grayston S J, Wang S, Campbell C D, et al. Selective influence of plant species on microbial diversity in the rhizosphere. *Soil Biol Biochem*, 1998, 30:369—378.
- [8] Angle J S. Release of transgenic plants: Biodiversity and population level consideration. *Mol Ecol*, 1994, 3:45—50.
- [9] Tapp H, Calamai I, Stotzky G. Adsorption and binding of the insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis* subsp. Kurstaki and subsp.

- tenbrionides on clayminerals. *Soil Biology and Biochemistry*, 1994, 26: 663—679.
- [10] Saxena D, Stotzky G. Insecticidal toxin from *Bacillus thuringiensis* is released from roots of transgenic Bt corn in Vitro and in Situ. *FEMS Microb. Ecol.*, 2000, 33:35—39.
- [11] Crecchio C, Stotzky G. Biodegradation and insecticidal activity of the toxin from *Bacillus thuringiensis* sub sp. kurstaki bound on complexes of montmorillonite-humic acids-Al hydroxypolymers. *Soil Biology & Biochemistry*, 33(4):573—581.
- [12] 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.
- [13] 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. *App1. Soil Eco1.*, 1995, 2:111—124.
- [14] Donegan K K, Schaller D L, Stone J K, et al. Microbial populations, fungal species diversity and plant pathogen levels in field plots of potato plants expressing the *Bacillus thuringiensis* var. tenebrionis endotoxin. *Transgen. Res.*, 1996, 5:25—35.
- [15] Han L Z, Wu K M, PENG Y F, et al. Research advances in ecological safety of insect-resistant transgenic rice. *Chin J Appl Ecol.*, 2006, 12(3): 431—436.
- [16] Oger P, Petit A and Dessaix Y. Genetically engineered plants producing opines alter their biological environment. *Nature Biotechnol*, 1997, 15(4): 369—372.
- [17] Yuan H X, Zhang J Z, Guo J F, et al. Activities of microbes and enzymes in soil after growing transgenic rice with two extra anti-fungus genes. *Acta Pedologica Sinica*, 2005, 42(1): 122—126.
- [18] Shu Q Y, Ye G Y, Cui H R, et al. Development of transgenic *Bacillus thuriengensis* rice resistant to rice stem borers and leaf folders. *J. Zhejiang Agric. Univ.*, 1998, 24 (6): 579—580.
- [19] Wu G, Cui H R, Shu Q Y, et al. Inheritance stability and expression of *cry1Ab* gene in progenies of transgenic “Kemingdao”. *J. Agric. Biotech.*, 2000, 8 (3): 253—256.
- [20] Shu Q Y, Ye Q Y, Cui H R, et al. Transgenic rice plants with a synthetic *cry1Ab* gene from *Bacillus thuringensis* were highly resistant to eight lepidopteran rice pest species. *Mol. Breed.*, 2000, 6: 433—439.
- [21] Compiled by Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences. *Research Method Of Soil Microbe*. Beijing: Science Press, 1985.
- [22] Dong X Z, Cai M Y. *Manual of Determinative Bacteriology*. Beijing: Science Press, 2001.
- [23] Yao Y L, Cui H R, Lu M Z, et al. Environmental behavior and biological effects of Bt toxins released from Bt-transgenic plants in soil. *Acta Pedologica Sinica*, 2005, 42(6):1024—1028.
- [24] MacGregor AN, Turner MA. Soil effects of transgenic agriculture: biological processes and ecological consequences. *Soil News*, 2000, 48(6):166—169.
- [25] Chen M, Ying W H. Study of the effect of transgenic Bt rice on the composition of bacterial populations in the rhizosphere soil. *Journal of Hangzhou Teachers College (Natural Science Edition)*, 2005, 4(4): 290—292.
- [26] Xu X Y, Ye Q F, Wu W X, et al. Effect of transgenic Bt rice straw on an aerobic microbial populations and enzyme activities in paddy soil. *Plant Nutr. Fertil. Sci.*, 2004, 10(1):63—67.
- [27] Wang H X, Chen X, Tang J J, et al. Influence of the straw decomposition of Bt transgenic rice on soil culturable microbial flora. *Acta Ecologica Sinica*, 2004, 24(1):89—94.
- [28] Cui H R, Shu Q R, Xiang Y B. Field performances of transgenic rice with a *cry1Ab* gene. In: Zhu M Y and Li Y N, eds. *Exploration and Investigation on Life Science*. Hangzhou: Hangzhou University Press, 1998. 810—816.
- [29] Wu L C, Li X F, Ye Q F, et al. Expression and root exudation of *cry1Ab* toxin protein in *cry1Ab* transgenic rice and its residue in rhizosphere soil. *Environmental Science*, 2004, 9(5): 116—121.
- [30] Saxena D, Flores S, Stotzky G. Insecticidal toxin in root exudates from Bt corn. *Nature*, 1999, 402:445—562.

参考文献:

- [15] 韩兰芝, 吴孔明, 彭于发, 等. 转基因抗虫水稻生态安全性研究进展. *应用与环境生物学报*, 2006, 12 (3): 431~436.
- [17] 袁红旭, 张建中, 郭建夫, 等. 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. *土壤学报*, 2005, 42(1):122~126.
- [18] 舒庆尧, 叶恭银, 崔海瑞, 等. 转基因水稻“克螟稻”选育. *浙江农业大学学报*, 1998, 24 (6): 579~580.
- [19] 吴刚, 崔海瑞, 舒庆尧, 等, *cry1Ab* 基因在转基因“克螟稻”后代中的遗传稳定性及表达. *农业生物技术学报*, 2000, 8 (3): 253~256.
- [21] 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. 67~70.
- [22] 东秀珠, 蔡妙英. *常见细菌系统鉴定手册*. 北京:科学出版社, 2001.
- [23] 姚艳玲, 崔海瑞, 卢美贞, 等. 转基因植物释放 Bt 毒素的土壤环境行为与生物学效应. *土壤学报*, 2005, 42(6):1024~1028.
- [25] 陈敏, 应文荷. 转 Bt 水稻与常规水稻根际土壤细菌类群的比较研究. *杭州师范学院学报(自然科学版)*, 2005, 4(4): 290~292.
- [26] 徐晓宇, 叶庆富, 吴伟祥, 等. 转 Bt 基因“克螟稻”秸秆还田对稻田厌氧微生物种群和酶活性的影响. *植物营养与肥料学报*, 2004, 10 (1):63~67.
- [27] 王洪兴, 陈欣, 唐建军, 等. 转 Bt 基因水稻秸秆降解对土壤微生物可培养类群的影响. *生态学报*, 2004, 24(1): 89~94.
- [28] 崔海瑞, 舒庆尧, 项友斌. 具有 *cry1Ab* 基因的转基因水稻的田间特性. 见: 朱睦元, 李亚南主编. *生命科学探索与研究*. 杭州: 杭州大学出版社, 1998. 810~816.
- [29] 吴立成, 李啸风, 叶庆富, 等. 转 *cry1Ab* 基因水稻中毒蛋白的表达、分泌及其在土壤中的残留. *环境科学*, 2004, 9(5): 116~121.