

ISSN 1000-0933
CN 11-2031/Q

生态学报

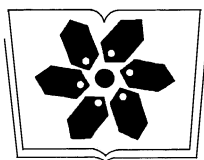
Acta Ecologica Sinica



第33卷 第4期 Vol.33 No.4 **2013**

中国生态学会
中国科学院生态环境研究中心
科学出版社

主办
出版



中国科学院科学出版基金资助出版

生态学报

(SHENGTAI XUEBAO)

第 33 卷 第 4 期 2013 年 2 月 (半月刊)

目次

前沿理论与学科综述

- 森林水源涵养功能的多尺度内涵、过程及计量方法 王晓学,沈会涛,李叙勇,等 (1019)
- 植物叶片水稳定同位素研究进展 罗伦,余武生,万诗敏,等 (1031)
- 城市景观格局演变的生态环境效应研究进展 陈利顶,孙然好,刘海莲 (1042)
- 城市生物多样性分布格局研究进展 毛齐正,马克明,邬建国,等 (1051)
- 基于福祉视角的生态补偿研究 李惠梅,张安录 (1065)

个体与基础生态

- 土著菌根真菌和混生植物对羊草生长和磷营养的影响 雷垚,郝志鹏,陈保冬 (1071)
- 干旱条件下 AM 真菌对植物生长和土壤水稳定性团聚体的影响 叶佳舒,李涛,胡亚军,等 (1080)
- 转 *mapk* 双链 RNA 干扰表达载体黄瓜对根际土壤细菌多样性的影响 ... 陈国华,弭宝彬,李莹,等 (1091)
- 北京远郊区臭氧污染及其对敏感植物叶片的伤害 万五星,夏亚军,张红星,等 (1098)
- 茅苍术叶片可培养内生细菌多样性及其促生潜力 周佳宇,贾永,王宏伟,等 (1106)
- 低温对蝶蛹金小蜂卵成熟及其数量动态的影响 夏诗洋,孟玲,李保平 (1118)
- 六星黑点豹蠹蛾求偶行为与性信息素产生和释放的时辰节律 刘金龙,荆小院,杨美红,等 (1126)
- 氟化物对家蚕血液羧酸酯酶及全酯酶活性的影响 米智,阮成龙,李姣蓉,等 (1134)
- 不同温度对脊尾白虾胚胎发育与幼体变态存活的影响 梁俊平,李健,李吉涛,等 (1142)

种群、群落和生态系统

- 生态系统服务多样性与景观多功能性——从科学理念到综合评估 吕一河,马志敏,傅伯杰,等 (1153)
- 不同端元模型下湿地植被覆盖度的提取方法——以北京市野鸭湖湿地自然保护区为例 崔天翔,官兆宁,赵文吉,等 (1160)
- 基于光谱特征变量的湿地典型植物生态类型识别方法——以北京野鸭湖湿地为例 林川,官兆宁,赵文吉,等 (1172)
- 浮游植物群落对海南小水电建设的响应 林彰文,林生,顾继光,等 (1186)
- 菹草种群内外水质日变化 王锦旗,郑有飞,王国祥 (1195)
- 南方红壤区 3 种典型森林恢复方式对植物群落多样性的影响 王芸,欧阳志云,郑华,等 (1204)
- 人工油松林恢复过程中土壤理化性质及有机碳含量的变化特征 胡会峰,刘国华 (1212)
- 不同区域森林火灾对生态因子的响应及其概率模型 李晓炜,赵刚,于秀波,等 (1219)

景观、区域和全球生态

- 快速城市化地区景观生态安全时空演化过程分析——以东莞市为例 杨青生,乔纪纲,艾彬 (1230)
- 海岸带生态系统健康评价中能质和生物多样性的差异——以江苏海岸带为例 唐得昊,邹欣庆,刘兴健 (1240)
- 干湿交替频率对不同土壤 CO₂ 和 N₂O 释放的影响 欧阳扬,李叙勇 (1251)

西部地区低碳竞争力评价..... 金小琴,杜受祜 (1260)

基于 HEC-HMS 模型的八一水库流域洪水重现期研究 郑 鹏,林 韵,潘文斌,等 (1268)

基于修正的 Gash 模型模拟小兴安岭原始红松林降雨截留过程 柴汝杉,蔡体久,满秀玲,等 (1276)

长白山北坡不同林型内红松年表特征及其与气候因子的关系..... 陈 列,高露双,张 赞,等 (1285)

资源与产业生态

河西走廊绿洲灌区循环模式“农田-食用菌”生产系统氮素流动特征 李瑞琴,于安芬,赵有彪,等 (1292)

施肥对旱地花生主要土壤肥力指标及产量的影响..... 王才斌,郑亚萍,梁晓艳,等 (1300)

耕作措施对土壤水热特性和微生物生物量碳的影响..... 庞 绪,何文清,严昌荣,等 (1308)

基于改进 SPA 法的耕地占补平衡生态安全评价 施开放,刁承泰,孙秀锋,等 (1317)

学术争鸣

基于生态-产业共生关系的林业生态安全测度方法构想 张智光 (1326)

中国生态学会 2013 年学术年会征稿须知 (I)

期刊基本参数:CN 11-2031/Q * 1981 * m * 16 * 318 * zh * P * ¥90.00 * 1510 * 34 * 2013-02



封面图说: 石羊河——石羊河流域属大陆性温带干旱气候,气候特点是:日照充足、温差大、降水少、蒸发强、空气干燥。石羊河源出祁连山东段,河系以雨水补给为主,兼有冰雪融水成分。上游的祁连山区降水丰富,有雪山冰川和残留林木,是河流的水源补给地。中游流经河西走廊平地,形成武威和永昌等绿洲,下游是民勤,石羊河最后消失在腾格里沙漠中。随着石羊河流域人水矛盾的不断加剧,水资源开发利用严重过度,荒漠化日趋严重,民勤县的生态环境已经相当恶化,继续下去将有可能变成第二个“罗布泊”。

彩图及图说提供: 陈建伟教授 北京林业大学 E-mail: cites.chenjw@163.com

DOI: 10.5846/stxb201208141141

陈国华, 弭宝彬, 李莹, 李春月. 转 *mapk* 双链 RNA 干扰表达载体黄瓜对根际土壤细菌多样性的影响. 生态学报, 2013, 33(4): 1091-1097.

Chen G H, Mi B B, Li Y, Li C Y. The effect of transgenic cucumber with double strands RNA of *mapk* on diversity of rhizosphere bacteria. Acta Ecologica Sinica, 2013, 33(4): 1091-1097.

转 *mapk* 双链 RNA 干扰表达载体黄瓜对 根际土壤细菌多样性的影响

陈国华^{1,*}, 弭宝彬², 李莹³, 李春月⁴

(1. 中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081; 2. 中南大学研究生院隆平分院, 长沙 410125;

3. 北华大学林学院, 吉林 132013; 4. 吉林省白山市靖宇县第一中学, 白山 134300)

摘要:随着 RNA 干扰技术的发展, 通过植物表达病原物特异的 dsRNA 来防治植物病害的转基因作物越来越多。转根结线虫 *mapk* 双链 RNA 表达载体的黄瓜能够通过 RNA 干扰作用沉默线虫的 *mapk* 基因, 对根结线虫具有良好的防治效果。为了评价该转基因黄瓜的安全性, 明确 *mapk* 双链 RNA 干扰表达载体转基因黄瓜植株对根际土壤细菌多样性的影响, 采用 16S rRNA 基因克隆文库方法对非转基因黄瓜和转基因黄瓜土壤细菌群落多样性进行分析。结果表明, 非转基因黄瓜土壤细菌文库包含 124 个 OTU (可操作分类单元), 转基因黄瓜土壤细菌文库包含 122 个 OTU。2 个文库共同拥有的 OTU 为 115 个。2 个文库都包含 13 个类群细菌, *Acidobacteria*、*Actinobacteria*、*Armatimonadetes*、*Bacteroidetes*、*candidate division BRC1*、*Chloroflexi*、*Firmicutes*、*Gemmatimonadetes*、*Nitrospira*、*Planctomycetes*、*Proteobacteria*、*Verrucomicrobia*、*unclassified _ Bacteria*。其中 *Proteobacteria*、*Bacteroidetes*、*Chloroflexi* 和 *Acidobacteria* 是优势菌群。其他细菌类群数量相对较少。在纲分类水平上, 两个文库包含的细菌类群一致, 且各类群细菌比例差异不大。在 *Acidobacteria* 门中, *Acidobacteria_Gp6* 为优势菌群。在 *Bacteroidetes* 门中, *Sphingobacteria* 纲细菌数量最多。在 *Chloroflexi* 门中, *unclassified Chloroflexi* 细菌最多。在 *Proteobacteria* 门中, 其中 *Betaproteobacteria* 纲的细菌数量最多。从多样性指数角度分析, 两种土壤细菌群落的 Shannon、Simpson 和 Chao 值差异不大。总体来看, 两种土壤细菌类群差异不显著, 转基因黄瓜未对根际土壤细菌群落产生明显影响。

关键词:土壤细菌; 16S rRNA; 克隆文库; 转基因黄瓜

The effect of transgenic cucumber with double strands RNA of *mapk* on diversity of rhizosphere bacteria

CHEN Guohua^{1,*}, MI Baobin², LI Ying³, LI Chunyue⁴

1 Institute of Vegetable and flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China

2 Longping Branch of Graduate School, Central South University, Changsha 410125, China

3 College of Forestry, Beihua University, Jilin 132013, China

4 The Number One middle School in Jingyu, Baishan 134300, China

Abstract: With the development of RNA interference, transgenic crops with double strands RNA to control plant disease are more and more. The transgenic cucumber with *mapk* (Mitogen-activated protein kinase) dsRNA could inhibit expression of *mapk* gene of root knot nematode, and had good control efficiency to the nematode. In order to evaluate the ecological safety of this transgenic cucumber and to reveal the effect on the community of soil bacteria, the diversity of soil bacteria in non-transgenic cucumber and transgenic cucumber were revealed by 16S rRNA gene clone library. The result showed that

基金项目:国家自然科学基金项目(30900926); 转基因生物新品种培育重大专项重点资助项目(2009ZX08009-034B)

收稿日期:2012-08-14; **修订日期:**2012-12-24

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: chengh@caas.net.cn

124 OTUs were obtained from the library of non-transgenic cucumber soil, and 122 OTUs were found from the library of transgenic cucumber soil. 115 OTUs were shared by two libraries. The bacteria in two libraries were belonged to Acidobacteria, Actinobacteria, Armatimonadetes, Bacteroidetes, candidate division BRC1, Chloroflexi, Firmicutes, Gemmatimonadetes, Nitrospira, Planctomycetes, Proteobacteria, Verrucomicrobia and unclassified_Bacteria. The bacteria of Proteobacteria, Bacteroidetes, Chloroflexi and Acidobacteria were dominant groups, and others groups were minority. At class level, the dominant bacteria groups obtained from two libraries were no difference, and the percentage of clones in each class was similar. In the phyla of Acidobacteria and Bacteroidetes, the dominant groups were Acidobacteria_Gp6 and Sphingobacteria. The bacteria of unclassified Chloroflexi and Betaproteobacteria were majority in the phyla of Chloroflexi and Proteobacteria. From the index of diversity, there was no difference in two types of soil. On the whole, the bacterial communities of two types of soil were no difference, and not markedly affected by transgenic cucumber.

Key Words: soil bacteria; 16S rRNA gene; clone library; transgenic cucumber

土壤细菌是土壤中数量最丰富、分布最广泛的微生物类群,它占土壤微生物总量的 70%—90%。土壤细菌广泛参与土壤有机质积累、营养元素循环过程,其多样性和活性是保持土壤生态系统稳定的基础。土壤细菌对外界干扰比较敏感,是土壤生态系统变化的预警指标,常用于研究转基因作物对土壤生态系统的影响,评价转基因作物的安全性。目前,很多科学家针对转 Bt 基因作物对土壤微生物多样性和生物活性的影响进行大量研究^[1-4],以揭示 Bt 蛋白对土壤生态系统的安全性。转基因作物对土壤微生物的影响由转基因作物释放到土壤中的外源蛋白的化学和生物学特性引起的,或者由转基因植株的生理生化特性改变造成的^[5]。随着 RNAi 技术的发展,利用表达双链 RNA 的 RNA 干扰作用来防治病虫害的转基因作物越来越多。相对于表达外源蛋白的转基因作物来说,表达双链 RNA 的转基因植物对土壤微生物的影响可能会通过分泌 RNA 对土壤微生物起作用。目前,针对表达双链 RNA 的转基因作物对土壤生态系统安全性的研究未见报道。

陈国华等利用 RNAi 技术成功地沉默了线虫 *mapk* 基因,致使南方根结线虫的生长发育受阻而导致死亡,并成功的构建了表达 *mapk* 双链 RNA 的转基因黄瓜植株,通过黄瓜表达 *mapk* 的双链 RNA 沉默根结线虫的 *mapk* 基因,对根结线虫具有良好的防治效果^[6]。MAPK 信号途径在生物中广泛存在,为了明确 *mapk* 双链 RNA 的转基因黄瓜植株是否对根际土壤细菌具有影响,本研究采用细菌 16S rRNA 基因克隆文库方法对种植转基因黄瓜根际土壤和非转基因黄瓜根际土壤的细菌群落类群多样性进行分析,以期对转基因植物对土壤微生物的风险评价提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验地点及材料

试验田位于中国农业科学院蔬菜花卉研究所温室基地。供试黄瓜品种为新泰密刺,转基因黄瓜材料转入 *MiMPK1* 基因片段 dsRNA 表达载体,非转基因黄瓜为普通新泰密刺。试验田连续种植转基因黄瓜和非转基因黄瓜 3a,种植方式为一年两茬轮作。黄瓜正常管理施肥。

1.2 土壤取样方法

土壤取样时间为 2012 年 6 月 14 日和下半年 9 月 14 旬,为黄瓜结果期。两次土壤样品混合在一起。土壤取样采用五点采样法,用土壤采样器采集 10 株黄瓜根系 5cm 范围内黄瓜根际土壤,采集深度为 0—15 cm 的土样,混合后用密封袋带回,土样用 2 mm 孔径筛网过筛,去除颗粒硬物和黄瓜根系。

1.3 土壤微生物 DNA 提取

采用土壤总 DNA 提取试剂盒(美国 MOBIO 公司)提取土壤微生物 DNA。按照试剂盒说明书,分别提取转基因黄瓜土壤和非转基因黄瓜土壤 DNA,每个处理分别提取 5 份土壤微生物 DNA,分别混合,经电泳和分光光度计检测 DNA 质量,−20 °C 保存。

1.4 16S rRNA 基因克隆文库构建

采用通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-TACTTGTACG ACTT-3')^[7] 从土壤微生物 DNA 中扩增 16S rRNA 基因。PCR 反应体系 20 μ L, 具体如下: 1 μ L DNA 模板 (100ng), 0.5 μ mol/L 引物, 0.2 mmol dNTPs, 5 units of EasyTaq DNA 聚合酶, 1 $\times$ 反应缓冲液, 13.7 μ L dd 水。为了减少扩增偏嗜性, 采用梯度 PCR 程序进行扩增, 且重复 5 次, 将 PCR 产物混合。PCR 反应程序如下: 95 $^{\circ}$ C 4 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 52 $^{\circ}$ C 至 58 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。

将 PCR 产物经电泳检测, 割胶纯化, 连接入 PGM-T 载体 (天根生化科技有限公司), 转化 Top10 感受态细胞 (北京全式金生物技术有限公司), 在涂有 IPTG 和 X-gal 的安苄青霉素 LB 平板上进行蓝白斑筛选, 随机 200 个挑取白色克隆构成 16S rRNA 基因文库, 将克隆培养于 LB 液体培养基 (安苄青霉素 50 μ g/mL) 中振荡培养 8 h, 菌液 PCR 进行阳性克隆鉴定, 采用引物为 T7 和 SP6。随机挑取 150 个阳性克隆送诺塞基因公司测序。

1.5 数据分析

用 Chimera Check 程序将所得 16S rRNA 基因序列在 RDP (Ribosomal Database Project) 数据库进行嵌合体检验, 去除嵌合体序列。以 97% 为划定阈值, 用 DOTUR 软件包对 16S 序列划分操作分类单元 (OTU), 并构建稀缺性曲线^[8]。

多样性指数依据下列公式进行计算^[9]:

$$H = \sum (p_i) (\log_2 p - i)$$

式中, p_i 代表每个物种样本数量占总样本数量的比例。

均匀度: $(E) = H/H_{\max}, H_{\max} = \log_2(S)$

式中, 丰富度 (S) 是样本中物种的数量, 这里等同 OTU 的数量。

2 结果与分析

2.1 转基因黄瓜土壤和非转基因黄瓜土壤细菌类群

非转基因黄瓜根际土壤细菌 16S rRNA 克隆文库测序 150 个克隆, 以 97% 划分 OTU, 获得 124 个 OTU。转基因黄瓜土壤细菌 16S rRNA 克隆文库测序 150 个克隆, 获得 122 个 OTU。两个文库共同包含的克隆共有 115 个, 这表明两个文库细菌类群比较一致。

转基因黄瓜根际土壤细菌分为 13 个类群 (图 1A): Acidobacteria、Actinobacteria、Armatimonadetes、Bacteroidetes、candidate division BRC1、Chloroflexi、Firmicutes、Gemmatimonadetes、Nitrospira、Planctomycetes、Proteobacteria、Verrucomicrobia、unclassified _ Bacteria。Proteobacteria 为优势种群, 占 24.1%; 其次为 Bacteroidetes, 占 19.0%, 再次为 Chloroflexi, 占 16.8%; Acidobacteria 占 11.7%, 其他种群比例相对较低。这表明转基因黄瓜土壤中, 优势细菌类群为 Proteobacteria、Bacteroidetes、Chloroflexi 和 Acidobacteria, 而其他细菌类群为非优势菌群。

非转基因黄瓜根际土壤细菌分为 14 个类群 (图 1B): Acidobacteria、Actinobacteria、Armatimonadetes、Bacteroidetes、BRC1、Chloroflexi、Cyanobacteria/Chloroplast、Firmicutes、Gemmatimonadetes、Nitrospira、Planctomycetes、Proteobacteria、Verrucomicrobia、unclassified _ Bacteria。其中 Proteobacteria 是优势菌群, 占 22.8%; 其次为 Bacteroidetes, 占 19.9%; Chloroflexi 占 17.6%, Acidobacteria 占 10.3%, 其他类群数量相对较少。这表明在非转基因黄瓜土壤中, 优势细菌类群为 Proteobacteria、Bacteroidetes、Chloroflexi 和 Acidobacteria, 而其他细菌类群为非优势菌群。

2.2 转基因黄瓜土壤和非转基因黄瓜土壤细菌多样性比较

转基因黄瓜土壤和非转基因黄瓜土壤细菌类群差别不大, 13 个类群细菌为两种土壤所共有, 转基因黄瓜土壤缺少 Cyanobacteria/Chloroplast 细菌类群, 而该类群细菌在非转基因黄瓜土壤比例很低, 仅为 0.7%。在优势细菌类群上, 转基因黄瓜土壤和非转基因黄瓜土壤基本一致, Proteobacteria、Bacteroidetes、Chloroflexi 和

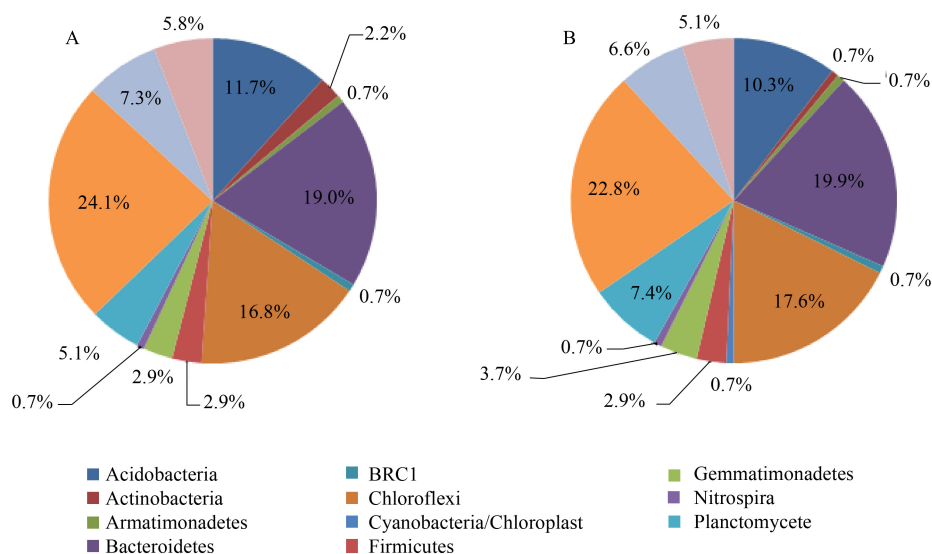


图1 文库各门细菌比例

Fig. 1 Proportions of bacteria in two libraries at phylum

A 为转基因黄瓜土壤细菌文库, B 为非转基因黄瓜土壤细菌文库

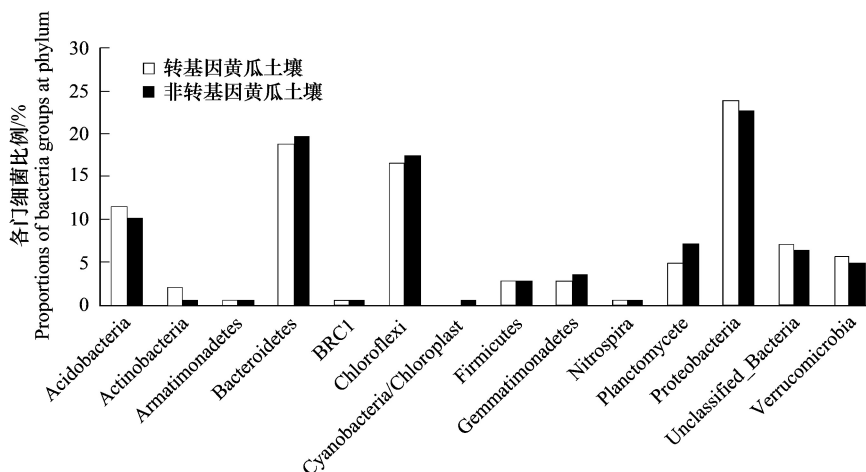


图2 转基因黄瓜土壤和非转基因黄瓜土壤细菌类群比较

Fig. 2 Comparison of bacteria groups between transgenic cucumber soil and non-transgenic cucumber soil

Acidobacteria 均为优势细菌类群,但在比例上存在细微差别。转基因黄瓜土壤中, Proteobacteria 和 Acidobacteria 的比例略高于非转基因黄瓜土壤,而 Bacteroidetes 和 Chloroflexi 的比例略低于非转基因黄瓜土壤。总体来看,两种土壤细菌类群无显著差异。

在纲分类水平上,两种土壤的优势细菌类群差异也不大(图3)。在 Acidobacteria 门细菌中,两种土壤包含 6 个纲的细菌, Acidobacteria_Gp3、Acidobacteria_Gp4、Acidobacteria_Gp5、Acidobacteria_Gp6、Acidobacteria_Gp25 和 unclassified Acidobacteria,其中 Acidobacteria_Gp6 为优势菌群。在 Bacteroidetes 门中,包含 Bacteroidetes_incertain_sedis、Flavobacteria、Sphingobacteria 和 unclassified Bacteroidetes,其中 Sphingobacteria 纲细菌数量最多。在 Chloroflexi 门细菌中,两种土壤的 unclassified Chloroflexi 细菌最多,这表明土壤中存在大量的细菌新类群。在 Proteobacteria 门细菌类群中,两种土壤细菌分属于 Alphaproteobacteria、Betaproteobacteria、Deltaproteobacteria 和 Gammaproteobacteria,其中 Betaproteobacteria 纲的细菌数量最多, Deltaproteobacteria 细菌数最少。

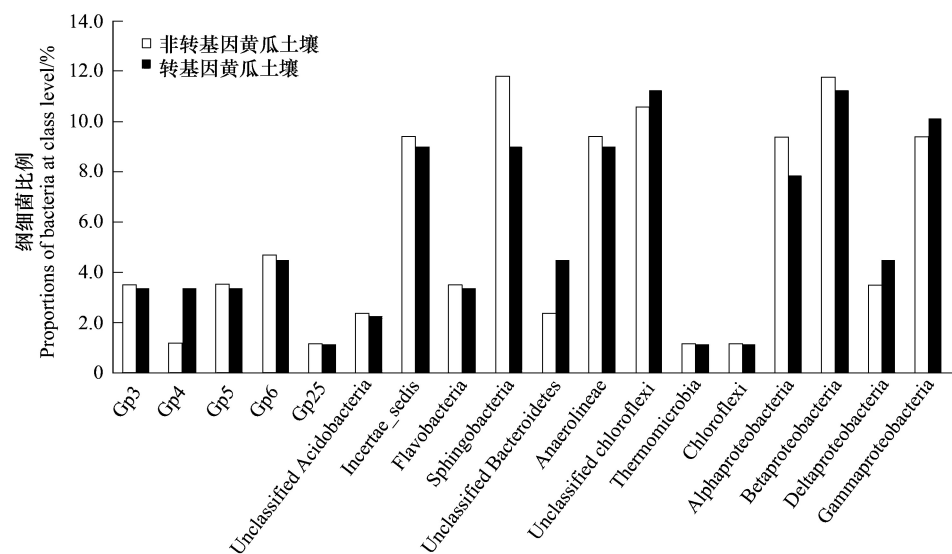


图3 纲分类水平上两种土壤优势细菌类群比较

Fig.3 Comparison of the dominant bacteria groups in two libraries at class level

从多样性指数来看(表1),转基因黄瓜土壤和非转基因黄瓜土壤的细菌群落差异不大。Shannon 评价一个群落物种多样性,其值越高,表明群落的物种多样性越高。两种土壤的 Shannon 指数均为 4.6,这表明两种土壤细菌多样性无显著差别。Simpson 也是描述群落物种多样性的指数,两种土壤细菌的 Simpson 指数差异不大,也反映出两种土壤细菌的多样性差异不大。Chao 是描述群落丰富度的指数,其值越高表明群落物种的丰富度越高。非转基因黄瓜土壤细菌群落的 Chao 高于转基因黄瓜土壤,这表明非转基因黄瓜土壤细菌的丰度略高于转基因土壤。

表1 转基因黄瓜土壤和非转基因黄瓜土壤细菌多样性指数

Table 1 The index of diversity of two libraries

多样性指数 Index of diversity	转基因黄瓜土壤 Transgenic cucumber soil	非转基因黄瓜土壤 Non-transgenic cucumber soil
Shannon	4.623	4.609
Simpson	0.002	0.003
Chao	392.182	466.803
S	122	124

3 讨论

随着基因工程技术的不断发展,利用 RNAi 技术培育抗病新品种更是有效的植物病害防治方法。Yadav 等将编码根结线虫特异联接因子和整合酶的管家基因的双链 RNA 表达载体转入烟草,表达 dsRNA 的转基因烟草对根结线虫具有很高抗性,证实利用 RNAi 方法控制植物寄生害虫是一个十分有效的策略^[10]。本研究采用的转基因黄瓜材料能够表达 *mapk* 的双链 RNA,能够靶向的抑制根结线虫 *mapk* 基因的表达,有效控制根结线虫的侵染,具有广阔的应用前景^[6]。然而,针对该转基因植物的生态安全性还未进行研究。

土壤细菌作为土壤中最丰富的微生物,其种群多样性和功能多样性对土壤生态系统的稳定具有重要意义。因此,评价转基因作物的安全性必须考虑转基因产物对土壤细菌的影响。目前,针对转 Bt 和抗除草剂基因的转基因作物安全性进行了大量研究^[11-12],有些研究表明转基因作物对土壤微生物群落产生了显著影响^[13],有些研究得出相反的结论^[14]。转 Bt 植物在生长过程中产生的 Bt 蛋白会以根系分泌物的形式进入到土壤中,并牢牢结合在土壤颗粒中难以降解,最终对土壤微生物造成影响。迄今为止,针对双链 RNA 在土壤中的残留动态情况和双链 RNA 转基因植物的生态安全性研究未见报道。

从本研究结果来看,转 *mapk* 双链 RNA 黄瓜并未对根际土壤细菌群落产生明显的影响。造成这种情况,可能基于 4 个方面的原因:(1)外源的双链 RNA 表达特异性,它们只能在植物的细胞内表达^[15]。未有研究表明双链 RNA 能够分泌到植物体表。(2)双链 RNA 发挥作用需要依赖真核生物的 Dicer 酶^[16],而细菌不具有 Dicer 酶,双链 RNA 无法对细菌起作用。(3)双链 RNA 只针对同源性较高的靶基因起 RNA 干扰作用^[16],细菌不具有与 *mapk* 同源的基因。(4)土壤环境样品中 RNA 酶含量丰富,RNA 易被降解^[17]。即使分泌到植物体外的双链 RNA 也会很快被土壤 RNA 酶降解。由于转基因黄瓜的 *mapk* 双链 RNA 特性和土壤环境的影响,使得转基因黄瓜对根际土壤细菌群落的影响较小,而温室的特殊环境对土壤细菌的影响可能更大。

本研究中土壤取自黄瓜连作温室,温室环境特殊,如高温高湿、高有机质含量、高复种指数,这会对土壤微生物群落产生一定的影响。黄瓜连作田土壤微生态环境产生显著改变,导致微生物种群平衡遭受破坏,根际微生物生态平衡的失调^[18],且黄瓜根际细菌种类和数量变化与黄瓜根分泌物密切相关^[19]。本研究发现,转基因黄瓜土壤和非转基因黄瓜土壤中 *Proteobacteria* 为优势菌群。这与他人的研究结果基本一致^[20-22]。另外,在本研究两种土壤中,*Bacteroidetes* 和 *Acidobacteria* 的比例也相对较高,也与他人研究结果基本符合^[20-22]。此外,*Chloroflexi* 的比例也较高。Janssen 通过 16S rRNA 基因克隆技术发现 *Chloroflexi* 在土壤中数量丰富,由于该类细菌生长缓慢,很难用培养法分离获得^[23-24]。*Chloroflexi* 是海绵中大量存在,与海绵形成共生体,对于海绵来说具有重要的生态功能^[25]。在土壤生态系统中,该类细菌的生态功能还有待深入研究。

总体来看,双链 RNA 转基因黄瓜并未对土壤细菌群落产生明显影响,但后续的长期观察以及对根际土壤真核生物群落的影响还需深入研究。

References:

- [1] Stotzky G. Persistence and biological activity in soil of insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis* and of bacterial DNA bound on clays and humic acids. *Journal of Environmental Quality*, 2000, 29(3): 691-705.
- [2] Philip J. Dale B C, Eliana M G F. Potential for the environmental impact of transgenic crops. *Nature Biotechnology*, 2002, 20: 567-574.
- [3] Devare M H, Jones C M, Thies J E. Effect of Cry3Bb Transgenic Corn and Tefluthrin on the Soil Microbial Community. *Journal of Environmental Quality*, 2004, 33(3): 837-843.
- [4] Susanne B, Christoph C T. Field studies on the environmental fate of the Cry1Ab Bt-toxin produced by transgenic maize (MON810) and its effect on bacterial communities in the maize rhizosphere. *Molecular Ecology*, 2005, 14(8): 2539-2551.
- [5] Yang Y H. Advances on the effects of genetically modified crops on soil microbial community and main countermeasures of their approaches. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2011, 19(1): 1-8.
- [6] Chen G H, Xiao L, Zhang S Q, Xie B Y. Analysis of silencing MAPK by RNA interference of root-knot nematode. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2008, 38(5): 509-513.
- [7] Lane, D. J. 16S/23S rRNA sequencing. In: *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. Stackebrandt, E., and Goodfellow, M., eds., John Wiley and Sons, New York, NY, 1991, pp. 115-175.
- [8] Schloss P D, Handelsman J. Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(3): 1501-1506.
- [9] Rani A, Porwal S, Sharma R, Kapley A, Purohit H J, Kalia V C. Assessing microbial diversity by culture-dependent and independent approaches for efficient functioning of effluent treatment plants. *Bioresource Technology*, 2008, 99: 7098-7107.
- [10] Yadav B C, Veluthambi K, Subramaniam K. Host-generated double stranded RNA induces RNAi in plant-parasitic nematodes and protects the host from infection. *Molecular & Biochemical Parasitology*, 2006, 148: 219-222.
- [11] Lu X M, Zhu L Q, Cao Y P. Recent Advances of Bt Crops and Its Safety Assessment. *Journal of Shanghai Jiaotong University (Agricultural Science)*, 2006, 24(2): 214-220.
- [12] Means N E, Kremer R J, Ramsier C. Effects of glyphosate and foliar amendments on activity of microorganisms in the soybean rhizosphere. *Journal of Environmental Science and Health, Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 2007, 42(2): 125-132.
- [13] Baumgarte S, Tebbe C C. Field studies on the environmental fate of the Cry1 Ab Bt-toxin produced by transgenic maize (MON810) and its effect on bacterial communities in the maize rhizosphere. *Molecular Ecology*, 2005, 14(8): 2539-2551.
- [14] Shen R F, Cai H, Gong W H. Transgenic Bt cotton has no apparent effect on enzymatic activities or functional diversity of microbial communities in

- rhizosphere soil. *Plant and Soil*, 2006, 285(1/2): 149-159.
- [15] Urwin P E, Catherine J L, Howard J A. Ingestion of Double-Stranded RNA by Preparasitic Juvenile Cyst Nematodes Leads to RNA Interference. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2002, 15(8): 747-752.
- [16] Phillip D Z, Thomas T, Phillip A S, David P B. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell*, 2000, 101: 25-33.
- [17] Tom A M, R. Elizabeth S, Penny R H. The detection of Gram-negative bacterial mRNA from soil by RT-PCR. *FEMS Microbiology Letters*, 1998, 164(2): 369-373.
- [18] Hu Y S, Liy Y F, Wu K, Dou H J, Jia X C. Variation of Microbial Community Structure in Relation to Successive Cucumber Cropping Soil. *Chinese Journal of Soil Science*, 2006, 37(1): 126-129.
- [19] Hu Y S, Wu K, Li C X, Jia X C. Effect of Continuous Cropping of Cucumber on Soil Microbial Population II — Variation Analysis Based on DGGE Approach. *Scientia Agricultura Sinica*, 2007, 40(10): 2267-2273.
- [20] Liu W Q, Mao Z C, Yang Y H, Xie B Y. Microbial Community Structure in Greenhouse Field Soil Infested with Root-Knot Nematodes. *Chinese Journal of Biological Control*, 2008, 24(4): 318-324.
- [21] Liu W Q, Mao Z C, Yang Y H, Xie B Y. Analysis of soil bacterial diversity by Using the 16S rRNA gene Library. *Acta Microbiologica Sinica*, 2008, 48(10): 1344-1350.
- [22] Schloss PD, Handelsman J. Status of the microbial census. *Microbiology and molecular biology Review*, 2004, 68(4): 686-691.
- [23] Janssen P H. Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72: 1719-1728.
- [24] Kathryn E R, Davis, P S, Peter H J. Acidobacteria, Rubrobacteridae and Chloroflexi are abundant among very slow-growing and mini-colony-forming soil bacteria. *Environmental Microbiology*, 2011, 13(3): 798-805.
- [25] Susanne S, Peter D, Faris B, Michael W, Michael W T. Chloroflexi bacteria are more diverse, abundant, and similar in high than in low microbial abundance sponges. *FEMS Microbiol Ecol*, 2011, 78: 497-510.

参考文献:

- [5] 杨永华. 转基因作物对土壤微生物群落的影响及主要研究策略. *农业生物技术学报*, 2011, 19(1): 1-8.
- [6] 陈国华, 肖罗, 张双庆, 等. 南方根结线虫促分裂原活化蛋白激酶(MAPK)基因的 RNAi 效应分析. *植物病理学报*, 2008, 38(5): 509-513.
- [11] 陆小毛, 朱路青, 曹越平. 转 B1 基因作物及其安全性研究. *上海交通大学学报(农业科学版)*, 2006, 24(2): 214-220.
- [18] 胡元森, 刘亚峰, 吴坤, 宴会娟, 贾新成. 黄瓜连作土壤微生物区系变化研究. *土壤通报*, 2006, 37(1): 126-129.
- [19] 胡元森, 吴坤, 李翠香, 贾新成. 黄瓜连作对土壤微生物区系影响 II——基于 DGGE 方法对微生物种群的变化分析. *中国农业科学*, 2007, 40(10): 2267-2273.
- [20] 刘玮琦, 茹振川, 杨宇红, 谢丙炎. 保护地根结线虫发生地土壤微生物群落多样性的研究. *中国生物防治*, 2008, 24(4): 318-324.
- [21] 刘玮琦, 茹振川, 杨宇红, 谢丙炎. 应用 16S rRNA 基因文库技术分析土壤细菌群落的多样性. *微生物学报*, 2008, 48(10): 1344-1350.

ACTA ECOLOGICA SINICA Vol. 33, No. 4 February, 2013 (Semimonthly)

CONTENTS

Frontiers and Comprehensive Review

- Concepts, processes and quantification methods of the forest water conservation at the multiple scales WANG Xiaoxue, SHEN Huitao, LI Xuyong, et al (1019)
- Advances in the study of stable isotope composition of leaf water in plants LUO Lun, YU Wusheng, WAN Shimin, et al (1031)
- Eco-environmental effects of urban landscape pattern changes: progresses, problems, and perspectives CHEN Liding, SUN Ranhao, LIU Hailian (1042)
- An overview of advances in distributional pattern of urban biodiversity MAO Qizheng, MA Keming, WU Jianguo, et al (1051)
- Ecological compensation boosted ecological protection and human well-being improvement LI Huimei, ZHANG Anlu (1065)

Autecology & Fundamentals

- Effects of indigenous AM fungi and neighboring plants on the growth and phosphorus nutrition of *Leymus chinensis* LEI Yao, HAO Zhipeng, CHEN Baodong (1071)
- Influences of AM fungi on plant growth and water-stable soil aggregates under drought stresses YE Jiashu, LI Tao, HU Yajun, et al (1080)
- The effect of transgenic cucumber with double strands RNA of *mapk* on diversity of rhizosphere bacteria CHEN Guohua, MI Baobin, LI Ying, et al (1091)
- The ambient ozone pollution and foliar injury of the sensitive woody plants in Beijing exurban region WAN Wuxing, XIA Yajun, ZHANG Hongxing, et al (1098)
- Diversity and plant growth-promoting potential of culturable endophytic bacteria isolated from the leaves of *Atractylodes lancea* ZHOU Jiayu, JIA Yong, WANG Hongwei, et al (1106)
- Effects of the low temperature treatment on egg maturation and its numerical dynamics in the parasitoid *Pteromalus puparum* (Hymenoptera: Pteromalidae) XIA Shiyang, MENG Ling, LI Baoping (1118)
- Circadian rhythm of calling behavior and sexual pheromone production and release of the female *Zeuzera leuconotum* Butler (Lepidoptera: Cossidae) LIU Jinlong, JING Xiaoyuan, YANG Meihong, et al (1126)
- Influence of fluoride on activity of carboxylesterase and esterase in hemolymph of *Bombyx mori* MI Zhi, RUAN Chenglong, LI Jiaorong, et al (1134)
- Effects of water temperature on the embryonic development, survival and development period of larvae of ridgetail white prawn (*Exopalaemon carinicauda*) reared in the laboratory LIANG Junping, LI Jian, LI Jitao, et al (1142)

Population, Community and Ecosystem

- Diversity of ecosystem services and landscape multi-functionality: from scientific concepts to integrative assessment LÜ Yihe, MA Zhimin, FU Bojie, et al (1153)
- Research on estimating wetland vegetation abundance based on spectral mixture analysis with different endmember model: a case study in Wild Duck Lake wetland, Beijing CUI Tianxiang, GONG Zhaoning, ZHAO Wenji, et al (1160)
- Identifying typical plant ecological types based on spectral characteristic variables: a case study in Wild Duck Lake wetland, Beijing LIN Chuan, GONG Zhaoning, ZHAO Wenji, et al (1172)
- Responses of phytoplankton community to the construction of small hydropower stations in Hainan Province LIN Zhangwen, LIN Sheng, GU Jiguang, et al (1186)
- Diurnal variation of water quality around *Potamogeton crispus* population WANG Jinqi, ZHENG Youfei, WANG Guoxiang (1195)
- Effects of three forest restoration approaches on plant diversity in red soil region, southern China WANG Yun, OUYANG Zhiyun, ZHENG Hua, et al (1204)
- Dynamics of soil physical-chemical properties and organic carbon content along a restoration chronosequence in *Pinus tabulaeformis* plantations HU Huifeng, LIU Guohua (1212)
- Probability models of forest fire risk based on ecology factors in different vegetation regions over China LI Xiaowei, ZHAO Gang, YU Xiubo, et al (1219)

Landscape, Regional and Global Ecology

- Landscape ecological security dynamics in a fast growing urban district: the case of Dongguan City YANG Qingsheng, QIAO Jigang, AI Bin (1230)
- The difference between exergy and biodiversity in ecosystem health assessment: a case study of Jiangsu coastal zone TANG Dehao, ZOU Xinqing, LIU Xingjian (1240)
- Impacts of drying-wetting cycles on CO₂ and N₂O emissions from soils in different ecosystems OUYANG Yang, LI Xuyong (1251)
- Evaluation of low-carbon competitiveness in Western China JIN Xiaoqin, DU Shouhu (1260)
- Flood return period analysis of the Bayi Reservoir Watershed based on HEC-HMS Model ZHENG Peng, LIN Yun, PAN Wenbin, et al (1268)
- Simulation of rainfall interception process of primary korean pine forest in Xiaoxing'an Mountains by using the modified Gash model CHAI Rushan, CAI Tiju, MAN Xiuling, et al (1276)
- Characteristics of tree-ring chronology of *Pinus koraiensis* and its relationship with climate factors on the northern slope of Changbai Mountain CHEN Lie, GAO Lushuang, ZHANG Yun, et al (1285)

Resource and Industrial Ecology

- Nitrogen flows in "crop -edible mushroom" production systems in Hexi Corridor Oasis Irrigation Area LI Ruiqin, YU Anfen, ZHAO Youbiao, et al (1292)
- Effects of fertilization on soil fertility indices and yield of dry-land peanut WANG Caibin, ZHENG Yaping, LIANG Xiaoyan, et al (1300)
- Effect of tillage and residue management on dynamic of soil microbial biomass carbon PANG Xu, HE Wenqing, YAN Changrong, et al (1308)
- Evaluation of eco-security of cultivated land requisition-compensation balance based on improved set pair analysis SHI Kaifang, DIAO Chengtai, SUN Xiufeng, et al (1317)

Opinions

- Methodology for measuring forestry ecological security based on ecology-industry symbiosis: a research framework ZHANG Zhiguang (1326)

《生态学报》2013 年征订启事

《生态学报》是由中国科学技术协会主管,中国生态学学会、中国科学院生态环境研究中心主办的生态学高级专业学术期刊,创刊于 1981 年,报道生态学领域前沿理论和原始创新性研究成果。坚持“百花齐放,百家争鸣”的方针,依靠和团结广大生态学科工作者,探索自然奥秘,为生态学基础理论研究搭建交流平台,促进生态学研究深入发展,为我国培养和造就生态学科人才和知识创新服务、为国民经济建设和发展服务。

《生态学报》主要报道生态学及各分支学科的重要基础理论和应用研究的原始创新性科研成果。特别欢迎能反映现代生态学发展方向的优秀综述性文章;研究简报;生态学新理论、新方法、新技术介绍;新书评价和学术、科研动态及开放实验室介绍等。

《生态学报》为半月刊,大 16 开本,300 页,国内定价 90 元/册,全年定价 2160 元。

国内邮发代号:82-7,国外邮发代号:M670

标准刊号:ISSN 1000-0933 CN 11-2031/Q

全国各地邮局均可订阅,也可直接与编辑部联系购买。欢迎广大科技工作者、科研单位、高等院校、图书馆等订阅。

通讯地址:100085 北京海淀区双清路 18 号 电 话:(010)62941099; 62843362

E-mail: shengtaixuebao@rcees.ac.cn 网 址: www.ecologica.cn

编辑部主任 孔红梅 执行编辑 刘天星 段 靖

生 态 学 报

(SHENGTAI XUEBAO)

(半月刊 1981 年 3 月创刊)

第 33 卷 第 4 期 (2013 年 2 月)

ACTA ECOLOGICA SINICA

(Semimonthly, Started in 1981)

Vol. 33 No. 4 (February, 2013)

编 辑	《生态学报》编辑部 地址:北京海淀区双清路 18 号 邮政编码:100085 电话:(010)62941099 www.ecologica.cn shengtaixuebao@rcees.ac.cn	Edited by	Editorial board of ACTA ECOLOGICA SINICA Add:18, Shuangqing Street, Haidian, Beijing 100085, China Tel:(010)62941099 www.ecologica.cn shengtaixuebao@rcees.ac.cn
主 编	王如松	Editor-in-chief	WANG Rusong
主 管	中国科学技术协会	Supervised by	China Association for Science and Technology
主 办	中国生态学学会 中国科学院生态环境研究中心 地址:北京海淀区双清路 18 号 邮政编码:100085	Sponsored by	Ecological Society of China Research Center for Eco-environmental Sciences, CAS Add:18, Shuangqing Street, Haidian, Beijing 100085, China
出 版	科 学 出 版 社 地址:北京东黄城根北街 16 号 邮政编码:100717	Published by	Science Press Add:16 Donghuangchenggen North Street, Beijing 100717, China
印 刷	北京北林印刷厂	Printed by	Beijing Bei Lin Printing House, Beijing 100083, China
发 行	科 学 出 版 社 地址:东黄城根北街 16 号 邮政编码:100717 电话:(010)64034563 E-mail:journal@cspg.net	Distributed by	Science Press Add:16 Donghuangchenggen North Street, Beijing 100717, China Tel:(010)64034563 E-mail:journal@cspg.net
订 购	全国各地邮局	Domestic	All Local Post Offices in China
国外发行	中国国际图书贸易总公司 地址:北京 399 信箱 邮政编码:100044	Foreign	China International Book Trading Corporation Add:P. O. Box 399 Beijing 100044, China
广告经营 许 可 证	京海工商广字第 8013 号		



ISSN 1000-0933
CN 11-2031/Q

国内外公开发行

国内邮发代号 82-7

国外发行代号 M670

定价 90.00 元