

转基因抗虫玉米 CM8101 对根际微生物群落功能的影响

张旭冬¹, 肖冰², 张秀杰¹, 栾颖³, 周晓莉³, 张正光³, 宋新元⁴, 陈红^{1*}, 梁晋刚^{1*}

(1. 农业农村部科技发展中心, 北京 100176; 2. 中国农业科学院农业资源与农业区划研究所, 北京 100081; 3. 南京农业大学植物保护学院, 南京 210095; 4. 吉林省农业科学院农业生物技术研究所, 长春 130033)

摘要:评价对根际微生物群落结构和多样性的影响是转基因植物环境安全评价的重要内容。本文采用 Biolog-ECO 微平板法对转 *Cry1Ab-Ma* 基因抗虫玉米 CM8101 和其对应的非转基因玉米郑 58 的根际微生物群落碳代谢功能进行了比较研究, 结果发现抗虫玉米 CM8101 与郑 58 之间, 在平均颜色变化率、微生物多样性指数和碳源利用率等方面均没有显著性差异。本文为转基因抗虫玉米 CM8101 的环境安全性提供了新的依据。

关键词:转基因玉米; Biolog-ECO 微平板; 根际微生物; 功能多样性

中图分类号: S513

文献标识码: A

文章编号: 2096-5877(2023)03-0048-04

Effect of GM Maize CM8101 on Functional Diversity of Rhizosphere Microorganisms

ZHANG Xudong¹, XIAO Bing², ZHANG Xiujie¹, LUAN Ying³, ZHOU Xiaoli³, ZHANG Zhengguang³, SONG Xinyuan⁴, CHEN Hong^{1*}, LIANG Jingang^{1*}

(1. Development Center of Science and Technology, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Beijing 100176; 2. Institute of Agricultural Resources and Regional Planning, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081; 3. College of Plant Protection, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095; 4. Agro-Biotechnology Research Institute, Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130033, China)

Abstract: The potential impact on the rhizosphere microbial community composition, diversity, and structure is an important part of the environmental risk assessment of genetically modified (GM) plants. In this study, the Biolog ECO microplate method was employed to explore the potential impact of GM maize CM8101 with *Cry1Ab-Ma* on the functional diversity of rhizosphere microbial communities. The results demonstrated that there were no significant differences in average color change rate, microbial diversity indices, and carbon source utilization rates between GM maize CM8101 and its near-isogenic non-GM maize Zheng 58. This study provides new evidence for the environmental safety of GM maize CM8101.

Key words: GM maize; Biolog-ECO microplate; Rhizosphere microorganisms; Functional diversity

转基因玉米自 1996 年商业化以来, 其在全球范围得到了广泛种植和应用, 商业化 23 年来累计种植面积 7.5 亿公顷^[1]。在转基因玉米产业化快速发展的形势下, 其对生态环境安全性的影响一

直是人们关注的热点^[2-4]。土壤微生物是土壤生态系统的重要组成部分, 在土壤生物化学过程和养分循环中起着不可替代的驱动作用^[5-6]。在转基因作物生长过程中, 植株残体和根系分泌物是外源基因表达产物进入土壤生态系统的重要途径之一。外源基因的表达产物通过与根际土壤生态系统直接接触, 有可能使根际微生物群落结构和多样性发生变化。另外, 外源基因的转入可能改变作物代谢途径, 植物的根系分泌物组成及含量也可能因此发生变化, 从而对根际微生物群落的代谢活性产生影响^[7]。《转基因植物安全评价指南》规定, 在

收稿日期: 2020-08-04

基金项目: 农业农村部农业生物育种重大项目(2022ZD0401909)

作者简介: 张旭冬(1989-), 女, 农艺师, 硕士, 研究方向: 农业转基因生物安全检测和管理。

通讯作者: 梁晋刚, 男, 博士, 高级农艺师, E-mail: liangjingang@agri.gov.cn

陈红, 男, 博士, 研究员, E-mail: chen1975hong@163.com

评价转基因植物环境安全性时,需有选择地提供对相关微生物群落结构和多样性的影响。

土壤微生物群落中有很多不可培养的微生物,传统的微生物培养难以反映出土壤中真实的微生物种类、数量和代谢情况。Biolog-ECO微平板法可以反映出微生物群落原始的代谢情况,由于该方法不需要分离培养微生物,测定方法简单,已被广泛应用于转基因作物对根际微生物功能影响的研究^[8-10]。

目前,我国转基因玉米的研究主要集中在抗逆玉米及抗逆机制的研究、抗虫玉米的研究和作物性状改良等方面^[11]。转*CryIAb-Ma*基因抗虫玉米CM8101是由中国农业科学院作物科学研究所研发,对亚洲玉米螟具有显著的杀虫效果^[12]。研究表明,转基因抗虫玉米CM8101对根际土壤主要理化性质和功能酶活性、白符跳和赤子爱胜蚓、节肢动物群落均无显著影响^[13-15]。本文以转基因抗虫玉米CM8101为研究对象,利用Biolog-ECO微平板法分析了其对不同生育期根际微生物碳代谢功能的影响,以期对转基因抗虫玉米CM8101的环境安全性提供新的依据。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

试验材料为中国农业科学院作物科学研究所提供的转*CryIAb-Ma*基因抗虫玉米CM8101(CM)和其对应的非转基因玉米郑58(CMCK)。

1.2 试验设计及土壤采集

试验于2017年在吉林省农业科学院转基因植物环境安全研究试验圃开展。玉米播种时采用随机区组设计,每个品种设置3个小区作为重复。玉米种植期间按照当地普通农事操作进行管理。

在玉米的不同生育期,包括苗期(Seedling Stage, SS)、花期(Flowering Stage, FS)和成熟期(Maturing Stage, MS),采集每个品种的根际土壤样品,参考梁晋刚等^[14]的方法采样。采用五点取样法进行取样,将每个小区5点的土壤样品混合为1个重复,过2 mm筛,-20 °C冻存备用。

1.3 根际微生物碳代谢活性测定

采用Biolog-ECO微平板法测定根际微生物碳代谢活性,具体操作参考梁晋刚等^[8]的方法。取5 g土壤样品至装有45 mL无菌生理盐水的三角瓶中,于旋转振荡器上振荡30 min,得1:10提取液。待瓶中液体澄清后,取上清液5 mL加入灭菌的100 mL三角瓶中,再加入45 mL无菌生理盐水,混合

均匀,得1:100提取液。重复上一步骤,得1:1 000的提取液。

Biolog-ECO微平板(Biolog, Hayward, USA)从冰箱中取出,将根际微生物提取液加入微平板中,并置于25 °C黑暗条件下温育168 h,每隔24 h使用酶标仪(SpectraMax M5, MD, USA)在590 nm和750 nm处读数,记录各个微孔的吸光度变化。

1.4 数据处理

Biolog-ECO微平板用于评判玉米根际微生物群落对碳源利用的整体能力时,采用每孔颜色平均变化率(Average Well Color Development, AWCD)来进行表述,其可以反映不同样本的微生物群落间平均活性差异^[16-17]。丰富度指数(R)、Shannon多样性指数(H)、Pielou均匀度指数(J)和不同碳源利用情况的计算以孵育了72 h的Biolog-ECO微平板数据进行计算^[18]。各指数的计算方法如下:

$AWCD_{590-750} = \sum(C_{590-750})/n$, $C_{590-750}$ 为单孔颜色变化率,其中,小于0.06的数值计为0, n为Biolog-ECO微平板碳源数, n=31。

$H = -\sum(P_i \times \ln P_i)$, P_i 为第*i*孔吸光度 $C_{590-750}$ 所占总吸光度的比例。

$J = H/\ln R$, R为被利用的碳源数目。

Microsoft Excel 2016 (Microsoft Redmond, WA, USA)对Biolog-ECO微平板数据结果进行统计,样品之间的显著性差异用SPSS 17.0软件进行单因素方差分析,对于那些呈显著意义的方差分析再进行LSD Post Hoc检验。

2 结果与分析

2.1 根际微生物群落AWCD值变化

根际微生物群落通过AWCD变化特征反映其代谢活性强度^[8]。如图1所示,AWCD值在24 h之内很小,从24 h左右开始升高。随着培养时间的延长,转基因抗虫玉米CM8101和其对应的非转基因玉米郑58的根际微生物群落对碳源的利用活性逐渐增加,最终在168 h趋于平缓。在同一时间点,转基因抗虫玉米CM8101和其对应的非转基因玉米郑58的AWCD值没有观察到显著性差异,表明转基因抗虫玉米CM8101对根际微生物群落碳代谢活性没有显著性影响。

2.2 根际微生物群落功能多样性指数变化

多样性指数可用来反映根际微生物群落组成、数量和结构多样性^[8]。如表1所示,三个多样性指数在转基因抗虫玉米CM8101和其对应的非

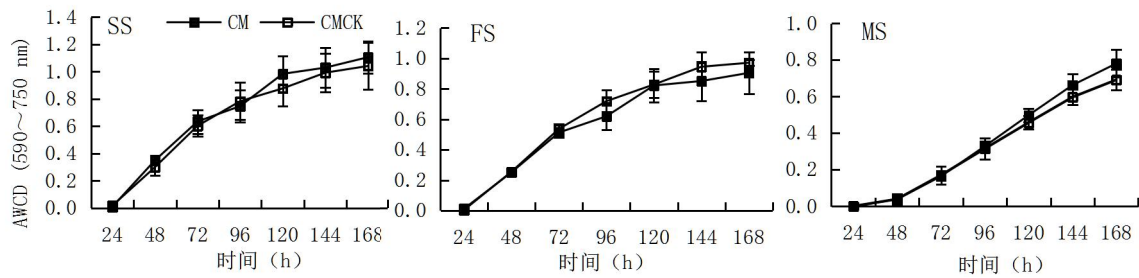


图1 Biolog-ECO板底物碳源利用的平均颜色变化率曲线 ($P<0.01$)

表1 Biolog-ECO板微生物多样性指数 ($P<0.01$)

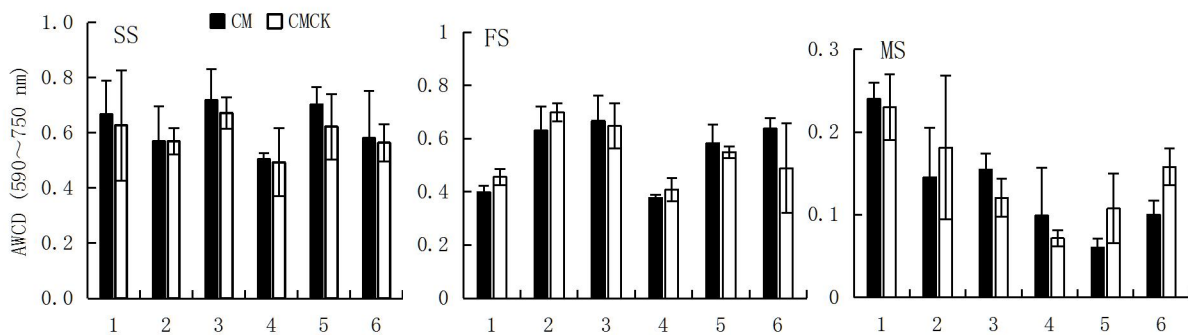
多样性指数	苗期(SS)		花期(FS)		成熟期(MS)	
	CM	CMCK	CM	CMCK	CM	CMCK
丰富度指数(R)	29.66±0.58	28.33±2.08	26.67±3.21	29.67±0.58	18.67±1.15	17.33±1.15
Shannon多样性指数(H)	3.14±0.08	3.12±0.12	3.02±0.09	3.17±0.03	2.99±0.04	2.93±0.06
Pielou均匀度指数(J)	0.93±0.02	0.93±0.02	0.92±0.01	0.93±0.00	1.02±0.01	1.03±0.03

转基因玉米郑58之间没有观察到显著性差异,表明转基因抗虫玉米CM8101对根际微生物群落功能多样性没有产生显著性影响。

2.3 根际微生物群落对不同类型碳源的利用率变化

根据碳源官能团,将Biolog-ECO微平板中的

31种碳源划分为6类,即糖类及其衍生物、氨基酸类、羧酸类、聚合物类、酚酸类和胺类^[8]。这6类碳源的利用情况在转基因抗虫玉米CM8101和其对应的非转基因玉米郑58之间没有出现显著性差异(图2),表明转基因抗虫玉米CM8101对根际微生物群落碳源利用率无显著性影响。



注:横坐标中的1、2、3、4、5、6分别表示糖类及其衍生物、氨基酸类、羧酸类、聚合物类、酚酸类、胺类

图2 根际微生物碳源利用情况 ($P<0.01$)

3 讨论

转基因玉米的种植在带来巨大经济效益的同时,其对环境安全性的潜在风险也受到广泛关注^[19]。根际微生物是植物-土壤生态系统中的重要组成部分,其群落结构和多样性易受根际微环境和植物生长的影响,是转基因作物环境安全评价的重要指标之一^[20]。目前,很少有研究发现转基因作物对生物多样性具有潜在影响^[21]。本文以转基因抗虫玉米CM8101为研究对象,通过Biolog-ECO微平板法分析了其在不同生育期的根际微生物群落碳代谢活性,测定了微生物群落整体代谢活性(AWCD值)、多样性指数(R、H、J)和

对6类碳源的利用率等3个指标,发现这3个指标在转基因抗虫玉米CM8101和其对应的非转基因玉米郑58之间没有呈现显著性差异。此外,已有研究表明,相比于转基因作物产生的影响,作物的生育期、生长季节、施肥条件以及田间管理等对土壤微生物的影响更大^[22]。

根际作为植物与土壤生态系统作用的核心,其微生物群落功能的多样性变化十分重要^[23]。迄今为止,许多利用Biolog-ECO微平板法的研究表明,转基因作物的种植对根际微生物群落的丰度及功能多样性不会产生显著性影响,如转酸性磷酸酶基因的磷高效转基因大豆AP15-1、转基因玉米双抗12-5、转基因高蛋氨酸大豆ZD91和转

cryIIe 基因抗虫玉米 IE09S034 等转化体, 均对根际微生物群落碳代谢活性没有显著性影响^[8-9,24-25]。另外, 植物根际微生物的变化是复杂且长期的过程, 因此评估转基因作物对根际微生物的影响时, 应该同时对转基因作物和其对应的非转基因作物的根际微生物群落组成、结构、多样性及相对丰度差异进行长期监测^[20]。本试验结果为转基因抗虫玉米 CM8101 的环境安全性评价提供了重要依据。

参考文献:

- [1] 国际农业生物技术应用服务组织. 2019 年全球生物技术/转基因作物商业化发展态势[J]. 中国生物工程杂志, 2021, 41(1): 114-119.
- [2] 梁晋刚, 张正光. 转基因作物种植对土壤生态系统影响的研究进展[J]. 作物杂志, 2017(4): 1-6.
- [3] 张富丽, 尹全, 毛建霏, 等. 转 *Bt* 基因棉秸秆还田利用对土壤肥力的影响[J]. 中国生态农业学报, 2020, 28(5): 734-744.
- [4] 贾士荣. 转基因作物的环境风险分析研究进展[J]. 中国农业科学, 2004(2): 175-187.
- [5] 梁晋刚, 张秀杰. 转基因作物对土壤微生物多样性影响的研究方法[J]. 生物技术通报, 2017, 33(10): 111-116.
- [6] 刘慧璐, 范巧兰, 王慧, 等. 转基因大豆对土壤微生物区系的影响[J]. 山西农业科学, 2019, 47(9): 1585-1587, 1608.
- [7] 洪鑫, 韩成, 孔帆, 等. 抗虫-耐除草剂转基因玉米种植对根际土壤细菌和真菌群落的影响[J]. 生态与农村环境学报, 2020, 36(3): 358-366.
- [8] 梁晋刚, 辛龙涛, 栾颖, 等. 转 *cryIIe* 基因抗虫玉米对根际微生物群落碳代谢的影响[J]. 中国农业科技导报, 2019, 21(2): 104-110.
- [9] 孙红炜, 张永鑫, 徐晓辉, 等. 转基因玉米双抗 12-5 对根际土壤酶活性及微生物多样性的影响[J]. 土壤, 2019, 51(1): 61-67.
- [10] 唐雪明, 魏曼曼, 朱宏, 等. 一种应用于转基因作物土壤微生态安全性评价的 Biolog-ECO 微平板技术[P]. 中国专利: CN102251016A, 2011-11-23.
- [11] 叶绵圳, 黄芩, 邓贵仲, 等. 基于文献计量学的中国转基因玉米研究进展[J]. 贵州农业科学, 2020, 48(3): 169-172.
- [12] 张爽, 鲁鑫, 张嘉月, 等. 转 *CryIAb-Ma* 基因玉米 CM8101 对亚洲玉米螟抗性研究[J]. 玉米科学, 2020, 28(1): 59-64.
- [13] 鲁鑫, 宋新元, 武奉慈, 等. 转 *CryIAb-Ma* 基因抗虫玉米 CM8101 对白符跳和赤子爱胜蚓的影响[J]. 环境昆虫学报, 2018, 40(2): 390-397.
- [14] 梁晋刚, 栾颖, 宋新元, 等. 转基因抗虫玉米 CM8101 对根际土壤主要理化性质和功能酶活性的影响[J]. 浙江农业科学, 2019, 60(12): 2248-2252.
- [15] 范春苗. 节肢动物群落对转 *CryIAb-Ma* 基因抗虫玉米 CM8101 种植响应[D]. 长春: 吉林农业大学, 2019.
- [16] 陈正培, 熊建文, 沈方科, 等. Biolog-ECO 技术及其应用研究进展[J]. 轻工科技, 2018, 34(6): 97-98, 156.
- [17] Lv Y P, Cai H S, Yu J P, et al. Biosafety assessment of GFP transplastomic tobacco to rhizosphere microbial community [J]. Ecotoxicology, 2014, 23(4): 718-725.
- [18] Wang G H, Jin J, Chen X L, et al. Biomass and catabolic diversity of microbial communities with long-term restoration, bare fallow and cropping history in Chinese Mollisols [J]. Plant, Soil and Environment, 2007, 53(4): 177-185.
- [19] 柳青, 刘洋, 郭嘉, 等. 新型高抗玉米螟虫、耐除草剂转基因玉米和非转基因玉米营养成分的比较分析[J]. 东北农业科学, 2018, 43(4): 27-31.
- [20] 李磊, 韩成, 王宵宵, 等. 镉胁迫下转基因水稻对根际土壤微生物的影响[J]. 江苏农业科学, 2019, 47(14): 282-287.
- [21] 王宵宵, 钟文辉, 李磊, 等. 铜胁迫对抗虫转基因水稻根际土壤微生物的影响[J]. 土壤, 2020, 52(1): 119-126.
- [22] 陈静怡, 刘瑞华, 王丽丽, 等. 磷高效转基因水稻连续种植对土壤微生物功能多样性的影响[J]. 天津农学院学报, 2019, 26(2): 1-7.
- [23] 陆雅海, 张福锁. 根际微生物研究进展[J]. 土壤, 2006, 38(2): 113-121.
- [24] 金陵波, 周峰, 姚涓, 等. 磷高效转基因大豆对根际微生物群落的影响[J]. 生态学报, 2012, 32(7): 2082-2090.
- [25] Liang J G, Xin L T, Meng F, et al. High-methionine soybean has no adverse effect on functional diversity of rhizosphere microorganisms[J]. Plant, Soil and Environment, 2016, 62(10): 441-446.

(责任编辑: 刘洪霞)