

转基因大豆种植对根际土壤酶活性和养分的影响

章秋艳^{1,2}, 李刚¹, 杨志国^{1,2}, 王丽娟^{1,3}, 王慧¹, 常泓², 杨殿林¹, 赵建宁^{1*}

(1. 农业部环境保护科研监测所, 天津, 300191; 2. 山西农业大学生命科学院, 山西 太原, 030801;

3. 内蒙古师范大学生命科学与技术学院, 内蒙古 呼和浩特, 010022)

摘要: 采用盆栽试验, 以耐草甘膦大豆 M88、抗虫耐草甘膦大豆 ZB 及常规大豆中黄 13 为研究对象, 比较分析转基因大豆对根际土壤酶活性和养分含量的影响。结果表明, 在大豆成熟期时, 与常规大豆中黄 13 相比, M88、ZB 根际土壤碱性磷酸酶活性、过氧化氢酶活性、速效磷含量无显著差异, 硝态氮含量显著下降。根际土壤脲酶活性、铵态氮含量则表现不同, 其变化随大豆品种的不同而不同。相较于常规大豆中黄 13, M88 根际土壤脲酶活性和铵态氮含量无显著差异; ZB 根际土壤脲酶活性显著下降, 而铵态氮含量则显著上升。

关键词: 转基因大豆; *CP4 epsps* 耐草甘膦基因; *Bt cry1Ab* 抗虫基因; 酶活性; 氮含量

中图分类号: S565.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1007-9084(2014)03-0409-05

Effects of transgenic soybean on enzyme activities and nutrients in rhizosphere soil

ZHANG Qiu-yan^{1,2}, LI Gang¹, YANG Zhi-guo^{1,2}, WANG Li-juan^{1,3},

WANG Hui¹, CHANG Hong², YANG Dian-lin¹, ZHAO Jian-ning^{1*}

(1. Agro-Environmental Protection Institute, Ministry of Agriculture, Tianjin 300191, China;

2. College of Life Science, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China;

3. College of Life Science and Technology, Inner Mongolia Normal University, Hohhot 010022, China)

Abstract: Transgenic crops were grown in an increasingly large scale around world, and accompanied by public concern about their potential ecological and environmental impacts. Evaluation of the effect of genetically modified crops on soil enzyme activity and nutrient content is critical for the soil ecosystem. In order to investigate the effects of planting transgenic soybean on enzyme activities and nutrient contents of rhizosphere soil, the changes of the enzyme activities (urease, alkaline phosphatase and hydrogen peroxidase) and nutrient contents (nitrate nitrogen, ammonium nitrogen, available phosphorus) in rhizosphere soil were examined in microcosm experiments. Two varieties of transgenic soybean M88 (*CP4 epsps*), ZB (*Bt cry1Ab* + *CP4 epsps*) and a conventional soybean Zhonghuang 13 were selected. Compared with the conventional variety, the soil enzyme activities (alkaline phosphatase and hydrogen peroxidase) and available phosphorus content of transgenic soybean had no significant difference, but the nitrate content decreased significantly. However, remarkable differences existed between M88 and ZB in terms of ammonium nitrogen and urease activity in rhizosphere soil. Compared with the conventional variety, the urease activity and ammonium nitrogen content of transgenic soybean M88 had no significant difference. In transgenic soybean ZB, the urease activity decreased significantly, and the ammonium nitrogen content increased significantly.

Key words: Transgenic soybean; *CP4 epsps* gene; *Bt cry1Ab* gene; Enzyme activities; Nitrogen nutrients

收稿日期: 2013-05-08

基金项目: 转基因生物新品种培育重大专项(2014ZX08012-005); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(2012szjjwh); 农业部产地环境质量重点实验室/天津市农业环境与农产品安全重点实验室开放基金

作者简介: 章秋艳(1989-), 女, 硕士, 研究方向为转基因作物生态安全评价, E-mail: zhangqiuyan147@163.com

* 通讯作者: 赵建宁(1981-), 男, 博士, 副研究员, 主要从事生物多样性与生态农业及转基因生物环境安全评价研究, E-mail: zhaojianning@

caas.cn

根据国际农业生物技术应用服务组织 (ISAAA) 的最新报道,2012 年全球转基因作物种植面积达 1.703 亿公顷,较 2011 年增长了 6%。在转基因作物商业化种植的 17 年间,转基因作物种植面积由 170 万公顷增长至 1.7 亿公顷,增长了 100 倍,这是前所未有的突破^[1]。转基因大豆作为主要种植的转基因作物,2011 年种植面积达到 7 540 万公顷,占全球转基因作物种植面积的 47%,其中耐草甘膦大豆是种植最为广泛的转基因大豆^[2]。值得关注的是,转基因复合性状作物已经成为一个非常重要的发展趋势,2012 年复合性状转基因作物的种植面积是 4 370 万公顷,占全球转基因作物种植面积的 26%,其中抗虫耐除草剂作物是增长最快的复合性状作物^[1]。在关注转基因大豆所带来的社会经济和环境效益的同时,其生态安全问题也受到了世界范围内的广泛关注。

土壤是生态系统中物质循环和能量转换的重要场所,在农业生态系统中居于核心地位^[3],因此转基因作物种植对土壤安全的影响是不容忽视的,它关系到农业的可持续发展。土壤酶是土壤代谢的动力,既参与包括土壤生物化学过程在内的自然界物质循环,又是植物营养元素的活性库^[4],其活性能较敏感地反映土壤中各种生物化学过程的强度和方向^[5];土壤速效养分是植物生长发育过程中养分的重要来源,可以在土壤全量养分变化之前反映土壤的微小变化^[6],又直接参与土壤生物化学转化过程^[7],它还是影响土壤酶活性高低的重要因素^[8]。因而,土壤酶活性和速效养分含量已成为评价土壤养分平衡和土壤化学、生物化学肥力保持的重要指标。研究表明,转基因作物种植过程中外源基因及其表达产物可能通过根系分泌物、植物残体、花粉飘落等途径进入土壤生态系统而引起土壤微生物、酶活性的改变,进而引发一系列土壤生化过程的变化,最终影响土壤养分转化过程及养分的有效性^[9]。

目前国内外关于转基因耐草甘膦大豆的环境安全评价进行了较多的研究,但是主要集中在外源基因漂移^[10]、基因降解^[11]及对土壤微生物^[12]、非靶标节肢动物群落结构^[13]的影响和耐草甘膦杂草的产生^[14]等方面,针对耐草甘膦大豆对土壤酶活性和速效养分含量的影响报道较少。鉴于此,本研究以耐草甘膦大豆 M88、抗虫耐草甘膦大豆 ZB 及非转基因常规大豆中黄 13 为材料,通过比较盆栽种植后转基因与非转基因大豆根际土壤酶活性和养分含量的变化,揭示转基因大豆对土壤酶活性和养分含量的影响,为转基因大豆生态风险评价提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

土壤取自中国农业科学院武清转基因生物农田生态系统影响野外科学观测试验站,试验前常年种植普通小麦和玉米。质地为潮土,有机质含量为 $11.11\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$,全氮 $0.56\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$,全磷 $0.65\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。播种前过 2mm 筛并充分混匀。

大豆品种为耐草甘膦转基因大豆 M88 (CP4 *epsps*)、抗虫耐草甘膦转基因大豆 ZB (*Bt cry1Ab* + CP4 *epsps*) 和常规非转基因大豆中黄 13。

1.2 试验设计及样品采集

盆栽试验在农业部环境保护科研监测研究所 ($39^{\circ}5'N, 117^{\circ}8'E$) 网室中进行。气候属于温带大陆性季风气候,年平均降水量 360 ~ 970mm,年平均气温约 $11.6 \sim 13.9^{\circ}\text{C}$ 。试验始于 2011 年 8 月,设 3 个处理,分别为 M88、ZB 和中黄 13。盆中各装 5.6kg 供试土壤,每种大豆分别种植 20 盆。每盆播 5 粒大豆种子,待四叶期时,留苗 3 株。在种植及管理过程中均不施农药,施肥量为 N、P、K 各 $30\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,以 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 和 KH_2PO_4 配成液体形式施入。2011 年 11 月大豆成熟期采集根际土壤样品。各处理随机选取 5 盆共 15 株植株,采用抖落法收集根际土壤并混匀,作为 1 个土壤样品,共 4 个重复。土壤样品装入灭菌封口袋中做好标记,放于低温冰盒中带回实验室。一部分土壤鲜样置于 -20°C 冰箱保存,剩余土壤除去根系后,经风干、磨碎和过筛后测定相应指标。鲜样用于土壤铵态氮、硝态氮含量的测定,风干土样用于测定土壤速效磷和酶活性(脲酶、过氧化氢酶、碱性磷酸酶)。

1.3 测定指标及方法

1.3.1 土壤酶活性的测定 土壤酶活性指标测定参照关松荫《土壤酶及其研究方法》^[15]进行。土壤脲酶活性采用苯酚-次氯酸钠比色法测定,以每小时每克风干土经尿素水解释放出的 $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 的微克数来表示;碱性磷酸酶活性采用磷酸苯二钠比色法测定,以 2h 培养后 100g 土壤中 P_2O_5 的毫克数表示;过氧化氢酶活性采用高锰酸钾滴定法测定,以每克风干土壤滴定所需 $0.1\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{KMnO}_4$ 的毫升数来表示。

1.3.2 土壤养分含量的测定 土壤养分含量的测定参照鲍士旦《土壤农化分析》^[16]的方法进行。土壤硝态氮采用 $0.01\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{CaCl}_2$ 浸提-紫外分光光度法;铵态氮采用 $0.01\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{CaCl}_2$ 浸提-靛酚蓝比色法;速效磷采用 $0.5\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{NaHCO}_3$ 浸

提-钼锑抗比色法。

1.4 数据分析

采用 Microsoft Excel 2003 和 SPSS 16.0 软件对试验数据进行统计分析(Duncan 法)。

2 结果与分析

2.1 转基因大豆种植对根际土壤酶活性的影响

脲酶是土壤中的主要酶类,它直接参与土壤中含 N 有机化合物的转化,其活性的高低在一定程度上反映了土壤的供氮水平^[17]。由表 1 可见,与非转

基因大豆中黄 13 相比,M88 脲酶活性下降 4.28%,差异不显著($P>0.05$);ZB 脲酶活性显著下降 19.17% ($P<0.05$)。

磷酸酶是土壤中广泛分布的一类催化有机磷化合物的水解酶,其活性的高低直接影响着土壤中有机的生物有效性,对土壤磷素循环起重要作用^[18]。与非转基因大豆中黄 13 相比,M88 和抗虫耐草甘膦大豆 ZB 碱性磷酸酶活性分别升高 10.95% 和 17.12%,但差异均不显著($P>0.05$)(表 1)。

表 1 不同品种大豆根际土壤酶活性的变化
Table 1 Activities of some soil enzymes in rhizosphere of different soybean

处理 Treatment	脲酶活性/($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) Urease activity	碱性磷酸酶活性/($\text{mg}\cdot\text{hg}^{-1}\cdot2\text{h}^{-1}$) Alkaline phosphatase activity	过氧化氢酶活性/($\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}\cdot20\text{min}^{-1}$) Hydrogen peroxidase activity
中黄 13(CK)	25.04±2.81a	15.71±3.70a	2.46±0.04a
M88	23.96±2.08a	17.43±1.12a	2.44±0.06a
ZB	20.24±1.65b	18.40±4.13a	2.39±0.15a

注:表中数据为平均数±标准差;同一列不同字母表示差异显著水平($P<0.05$)。下同
Note;CK, Zhonghunang 13. Data in the tablewere Mean±SE, different letters in the same column following data indicated significant difference among treatments at $P<0.05$. Same as below

过氧化氢酶能够促进土壤中过氧化氢分解为水和氧气,有利于防止过氧化氢对植物体的毒害作用。过氧化氢酶的活性在一定程度上可以表征土壤生物氧化过程和氧化还原能力的强弱^[19]。由表 1 可得,与非转基因大豆中黄 13 相比,M88 和 ZB 过氧化氢酶活性分别降低 0.81%、3.09%,但差异不显著($P>0.05$)。

2.2 转基因大豆种植对根际土壤速效养分含量的影响

土壤速效磷是土壤磷库中对作物最为有效的成分之一,是表征土壤供磷能力、确定磷肥用量和农田磷环境风险的重要指标^[20]。由表 2 可见,与常规大

豆中黄 13 相比,M88、ZB 速效磷含量分别下降 6%、16%,差异均不显著($P>0.05$)。

土壤是植物氮素的主要来源,硝态氮和铵态氮作为有效氮素,可被植物直接吸收利用,其含量变化显著影响着土壤氮素的迁移转化和植物生产力。两种转基因大豆对土壤硝态氮和铵态氮含量的影响因大豆品种而异(表 2)。相比于非转基因大豆中黄 13,M88 铵态氮含量下降 9.11%,差异不显著($P>0.05$);ZB 铵态氮含量升高 21.8%,差异显著($P<0.05$)。由表 2 可得,与常规大豆中黄 13 相比,M88、ZB 硝态氮含量分别下降 36.59%、30.64%,且差异显著($P<0.05$)。

表 2 不同大豆品种根际土壤速效养分含量变化
Table 2 Soil available nutrients in rhizosphere of different soybean

处理 Treatment	硝态氮/($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) Nitrate nitrogen	铵态氮/($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) Ammonium nitrogen	速效磷/($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) Available phosphorus
中黄 13(CK)	6.56±1.803a	8.12±1.084b	24.33±2.242a
M88	4.16±0.603b	7.38±0.973b	22.87±7.116a
ZB	4.55±0.358b	9.89±1.157a	20.44±3.251a

3 讨论

转基因作物种植对土壤潜在影响的核心是其可能影响土壤生态系统的功能^[21]。土壤酶活性可以反映土壤的生态功能、各种生物化学过程的强度和动向,是土壤重要的生物学特性,在土壤营养物质的循环和能量的转移中起关键性作用,是评价土壤肥力、土壤健康状况的重要指标^[22]。本研究发现转基因大豆 M88、ZB 对土壤碱性磷酸酶和过氧化氢酶活

性无显著影响,这与乔琦^[23]、刘玲^[24]、马丽颖^[25]等研究结果相一致,表明转基因大豆的种植短期内未对土壤酶活性造成明显变化。研究还发现相比于常规大豆中黄 13,耐草甘膦大豆 M88 对土壤脲酶活性无显著影响,但抗虫耐草甘膦大豆 ZB 土壤脲酶活性显著下降。本试验中 ZB(*Bt cry1Ab* + *CP4 epsps*)成熟期时根际土壤脲酶活性下降的原因可能由以下两个方面引起:一是导入土壤中的 Bt 杀虫蛋白晶体可通过与土壤酶竞争土壤颗粒活跃表面的结合位点

而对土壤酶活性产生影响^[26],从而导致土壤脲酶活性下降;二是由于转基因大豆种植影响了土壤微生物而间接导致土壤脲酶活性下降。

研究表明转基因作物的种植可能通过根系分泌物组成和质量的改变,直接或间接地影响土壤养分的含量和有效性^[27]。赵哲等研究发现转 *DREB3* 基因抗旱大豆对根际土壤速效磷无显著影响^[28];刘红梅等研究结果表明与同源常规棉相比,转双价棉根际土壤速效磷含量在同一时期均无显著差异^[29];孙彩霞等通过转 *Bt* 基因棉花和水稻的盆栽种植试验结果表明,与非转 *Bt* 基因对照相比,转 *Bt* 基因作物速效磷含量均无显著差异^[7]。本研究结果发现 M88、ZB 和常规大豆中黄 13 根际土壤速效磷含量无显著差异。这一结果与上述研究结果一致,表明转基因大豆种植短期内对土壤速效磷含量的扰动是微小的。

土壤硝态氮是植物能直接吸收利用的速效氮,土壤硝态氮残留量的多少主要取决于作物根系对土壤硝态氮的吸收^[30]。成熟期时 M88 和 ZB 根际土壤硝态氮含量显著下降,说明外源基因的导入造成大豆植株生理生化特性的改变,促进大豆根系更多地吸收土壤中的氮素并转移到大豆植株和籽粒中,从而造成根际土壤硝态氮含量的变化^[31,32]。土壤铵态氮来源于土壤含氮有机物的矿化和所施入的氮肥,可被土壤胶体吸附,一般不易流失。本研究发现与非转基因大豆中黄 13 相比,ZB 根际土壤铵态氮含量显著升高,这与风春^[33]等研究发现的抗虫抗除草剂棉花根际土壤铵态氮含量显著下降的结果不同。ZB 种植后根系分泌的 *Bt* 外源基因及其表达产物可能通过影响土壤微生物的氨化强度或改变根系分泌物化学成分两个途径来影响根际土壤的铵态氮含量^[34]。具体的影响机制还有待于进一步研究。

本文初步探讨了转基因大豆对根际土壤酶活性及养分含量的影响,试验选用了两个转基因大豆品种,分别是耐草甘膦大豆 M88 和抗虫耐草甘膦大豆 ZB。由于所采用的转基因大豆的亲本难寻,本试验中对照采用了当地的普通大豆品种,在研究转基因大豆对土壤生态安全的影响时对照最好选用转基因大豆的亲本。再者本文只是在一年盆栽条件下对成熟期转基因大豆种植对根际土壤酶活性与养分含量的影响进行了初步研究,很难说明积累效应。对以上所涉及的不足在今后的试验中会进一步深入研究,以便更科学地评价转基因大豆对土壤酶活性及养分含量的影响。

参考文献:

[1] James C. 2012 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,2013,33(2): 1-8.

[2] James C. 2011 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,2012,32(1): 1-14.

[3] 唐影,李世东,缪作清. 转基因作物对土壤微生物的影响[J]. 中国生物防治,2007,23(4): 383-390.

[4] 薛立,邝立刚,陈红跃,等. 不同林分土壤养分、微生物与酶活性的研究[J]. 土壤学报,2003,40(2): 280-285.

[5] 周礼恺. 土壤酶学[M]. 北京:科学出版社,1987. 263-281.

[6] 乌兰图雅,李刚,赵建宁,等. 不同生育期转双价(*Bt* + *CpTI*) 基因抗虫棉根际土壤酶活性和养分含量变化[J]. 生态学杂志,2012,31(7): 1733-1737.

[7] 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[J]. 应用生态学报,2006,17(5): 943-946.

[8] 张夫道. 氮素营养研究中几个热点问题[J]. 植物营养与肥料学报,1998,4(4): 331-338.

[9] Motavalli P P, Kremer R J, Fang M, et al. Impact of genetically modified crops and their management on soil microbially mediated plant nutrient transformations [J]. Journal Environmental Quality, 2004,33(3): 816-824.

[10] 刘琦,李希晨,刘昭军,等. 抗草甘膦转基因大豆基因漂移的研究 I 大豆风媒介传粉的基因漂移研究[J]. 黑龙江农业科学,2008(1), 14-16.

[11] Levy-Booth D J, Gulden R H, Campbell R G, et al. Roundup Ready® soybean gene concentrations in field soil aggregate size classes[J]. FEMS Microbiology Letters, 2009,291(2): 175-179.

[12] Means N E, Kremer R J, Ramsier C. Effects of glyphosate and foliar amendments on activity of microorganisms in the soybean rhizosphere [J]. Environmental Science and Health B, 2007,42(2): 125-132.

[13] 吴奇,彭德良,彭于发. 抗草甘膦转基因大豆对非靶标节肢动物群落多样性的影响[J]. 生态学报, 2008,28(6): 2622-2628.

[14] Nandula V K, Reddy K N, Duke S O, et al. Glyphosate resistant weeds: current status and future outlook [J]. Outlooks on Pest Management, 2005, 16: 183-187.

[15] 关松荫. 土壤酶及其研究方法[M]. 北京:中国农业出版社,1986.

[16] 鲍士旦. 土壤农化分析(第三版)[M]. 北京:中国农业出版社,2000.

[17] 王娟,谷雪景,赵吉. 羊草草原土壤酶活性对土壤肥力的指示作用[J]. 农业环境科学学报,2006,25(4): 934-938.

- [18] 舒世燕,王克林,张 伟,等.喀斯特峰丛洼地植被不同演替阶段土壤磷酸酶活性[J].生态学报,2010,29(9):1 722 - 1 728.
- [19] 顾美英,徐万里,茆 军,等.连作对新疆绿洲棉田土壤微生物数量及酶活性的影响[J].干旱地区农业研究,2009,27(1):1 - 5.
- [20] Maguire R O, Sims J T. Soil testing to predict phosphorus-leaching[J]. Journal of Environment Quality, 2002, 31(5):1 601 - 1 609.
- [21] 王建武,冯远娇,骆世明.转基因作物对土壤生态系统的影响[J].应用生态学报,2002,13(4):491 - 494.
- [22] 车明超,黄占斌,王晓茜,等.施用保水剂对土壤氮素淋溶及脲酶活性的影响[J].农业环境科学学报,2010,29(Suppl. 1):93 - 97.
- [23] 乔 琦,丁 伟,李新海,等.转基因抗旱大豆对土壤酶活性的影响[J].东北农业大学学报,2010,41(12):11 - 14.
- [24] 刘 玲,赵建宁,李 刚,等.转 *Bt* 玉米对土壤酶活性及速效养分的影响[J].土壤,2012,44(1):167 - 171.
- [25] 马丽颖,崔金杰,陈海燕.种植转基因棉对4种土壤酶活性的影响[J].棉花学报,2009,21(5):383 - 387.
- [26] 孙彩霞,陈利军,武志杰,等.种植转 *Bt* 基因水稻对土壤酶活性的影响[J].应用生态学报,2003,14(12):2 261 - 2 264.
- [27] 沈法富,韩秀兰,范术丽.转 *Bt* 基因抗虫棉根际微生物区系和细菌生理群多样性的变化[J].生态学报,2004,24(3):432 - 437.
- [28] 赵 哲,丁 伟,马有志,等.转 *DREB3* 基因抗旱大豆对土壤理化性状的影响[J].作物杂志,2012,04,62 - 64.
- [29] 刘红梅,赵建宁,黄永春,等.种植转双价基因(*Bt* + *CpTI*)棉对主要土壤养分和酶活性的影响[J].棉花学报,2012,24(2):133 - 139.
- [30] 朱兆良,文启孝.中国土壤氮素[M].南京:江苏科技出版社,1992.
- [31] Alexei M, Peter L, Inge B, et al. Pyrolysis - field ionization mass spectrometry of genetically modified plants on soil - organisms[J]. Environmental Biosafety Research, 2006, 5:37 - 46.
- [32] 娜布其,赵建宁,李 刚,等.转双价(*Bt* + *CpTI*)棉种植对土壤速效养分和酶活性的影响[J].农业环境科学学报,2011,30(5):930 - 937.
- [33] 风 春,赵建宁,李 刚,等.转双价基因棉花对根际土壤酶活性和养分含量的影响[J].棉花学报,2013,25(2):178 - 183.
- [34] 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[J].生态学报,2005,25(5):1 213 - 1 220.

(责任编辑:王丽芳)