

转 *BcWRKY1* 基因玉米对根际土壤酶活性及土壤理化性质的影响

邸 宏, 王术敏, 朱仲佳, 曾 兴, 王振华

(东北农业大学农学院, 哈尔滨 150030)

摘 要: 采用盐碱土壤盆栽方法, 以 T₇ 代转 *BcWRKY1* 基因玉米株系 WL-1、受体自交系 LH1037、常规自交系 K10 为试材, 分析其不同生长时期对土壤酶活性和土壤理化性质的影响。结果表明, 在播种后 20、40、60、80 d 对根际土壤进行检测, 转 *BcWRKY1* 基因玉米与受体亲本自交系和普通玉米自交系对照相比, 土壤碱性磷酸酶的活性不存在差异显著性, 个别取样点对土壤蔗糖酶、脱氢酶和脲酶活性存在显著差异; 土壤电导率均无显著差异, 在个别取样时期对土壤 pH 值和 SAR 值存在显著差异。这些显著性差异只在个别取样时期短暂存在, 没有持续出现, 且受体自交系与普通自交系不同品种间也具有显著差异, 很难确定说明这些差异是由转基因玉米本身造成。

关键词: 玉米; *BcWRKY1* 基因; 土壤理化性质; 土壤酶活性

中图分类号: S513.035.3

文献标识码: A

Effects of Transgenic Salt-tolerant Maize with *BcWRKY1* Gene on Rhizosphere Soil Enzyme Activities and Physicochemical Properties

DI Hong, WANG Shu-min, ZHU Zhong-jia, ZENG Xing, WANG Zhen-hua

(Agricultural College, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: A transgenic salt-tolerant maize line with *BcWRKY1* gene in T₇-generation was used to analyze the effects on rhizosphere saline soil enzyme activities and physicochemical properties in different growth stages by pot experiment. The results showed that there were no significant differences on soil alkaline phosphatase activity among transgenic line, acceptor line and common control inbred line at four sampling time. The significant differences were detected in soil sucrase, dehydrogenase and urease activities at individual sampling time. There was no significant impact of transgenic line on soil conductivity at all four sampling time. The significant differences were obtained in pH value and sodium adsorption value at individual sampling time. The above significant differences appeared at some sampling time briefly and there was no long-time effect on the soil. Due to significant differences between receptor and common inbred line, the effects were not caused by transgene.

Key words: Maize; *BcWRKY1* gene; Soil physicochemical property; Soil enzyme activity

土壤盐渍化是制约农业生产的一个全球性问题。随着分子生物技术的快速发展, 通过转化耐盐

相关基因提高作物的耐盐性, 已成为创制耐盐碱作物新品种的重要途径^[1]。由于转基因技术存在一定的风险, 在转基因作物商品化生产以前, 必须对其进行环境安全性评价, 评估其释放到田间以后, 是否会对生态系统的物种多样性、生物群落结构和种群动态等产生影响。土壤是生态系统中物质循环和能量转化的重要场所, 转基因作物的外源蛋白如果通过根系分泌物等进入土壤, 可能对土壤理化性质及土壤酶活性等产生影响^[2,3], 进而可能直接或间接地影响土壤微生物种类和数量、群落生理特性和代谢活性变化, 最终对土壤微生物营养转化过程产生难以

收稿日期: 2014-07-08

基金项目: 黑龙江省留学归国人员科学基金(LC201411)、转基因重大专项“转基因玉米小麦大豆环境安全评价技术”(2014ZX08011003)

作者简介: 邸 宏(1974-), 博士, 副教授, 硕士研究生导师, 现主要从事玉米分子育种的研究。E-mail: dihongdh@163.com
王振华为本文通讯作者。
E-mail: zhenhuawang_2006@163.com

估量的影响^[4]。土壤酶是土壤重要组成部分,是物质循环中不可或缺的成员,主要参与土壤有机质积累、矿化过程、影响土壤养分循环和土壤养分的有效性,对植物生长起着重要的作用,其活性大小可较敏感地反映土壤中各种生物化学过程的强度和方向^[5]。关于转 *Bt* 基因作物对土壤酶活性和土壤理化性质的报道相对较多^[6-9],但关于耐盐碱转基因玉米则鲜有报道。

本实验以转 *BcWRKY1* 基因玉米T₇代株系WL-1、亲本对照LH1037和常规玉米自交系K10为试材,采用盆栽方法研究转基因玉米种植对盐碱土壤理化性质和土壤酶活性的影响,为评价转 *BcWRKY1* 基因玉米环境安全评价提供基础理论数据,并为同类研究提供可借鉴的方法。

1 材料与方法

1.1 供试材料

BcWRKY1 基因来自耐旱植物厚叶旋蒴苣苔,由北京大学林忠平教授提供,东北农业大学玉米研究所采用农杆菌介导法获得转基因玉米株系,采用苗期耐盐碱性鉴定方法筛选出耐盐碱性比受体显著提高的株系WL-73^[10],加代繁殖至T₇代;受体对照玉米自交系LH1037和常规玉米自交系K10,均由东北农业大学玉米研究所提供。

1.2 播种和土壤样品采集

取PCR检测呈阳性的转基因株系种子和对照自交系种子各200粒,催芽后在可控环境早棚内进行盆栽试验,每份材料共60盆,每盆保苗2株,在3叶期每盆定苗1株。所用土壤为取自黑龙江省肇东市的中度盐碱土,其基础肥力速效氮107.20 mg/kg,速效磷2.69 mg/kg,速效钾143.02 mg/kg, pH值8.65。

分别于播种后的20、40、60、80 d取土样,取样方法参照陶波等^[11]的方法,每份材料每次随机取10株,将植株带根一起挖出,采用抖落法采集土壤样品,将采集的土壤样品充分混匀分成3份,去除土壤中的根、残渣等,风干、研磨后过1 mm筛后作为试验的土壤样品,每个时期设置3次重复。

1.3 土壤酶活性测定方法

土壤碱性磷酸酶活性参照周礼恺的方法;土壤蔗糖酶活性、土壤脲酶活性、土壤脱氢酶活性均参照关荫松^[12]的方法测定。

1.4 土壤理化性质的测定方法

参照鲍士旦^[13]方法,土壤pH值采用电位计法测定;电导率采用电导仪测定;SAR值中Na⁺、Ca²⁺、Mg²⁺浓度采用原子吸收法测定。

1.5 数据分析方法

数据取3次处理重复的平均值,经Excel整理后,统计分析采用SAS9.1.3软件,数据差异显著性采用邓肯氏新复极差法进行检测。

2 结果与分析

2.1 转 *BcWRKY1* 基因玉米对根际土壤酶活性的影响

在播种后20、40、60、80 d时,分别取土样检测转基因株系(WL-1)、受体对照自交系(LH1037)和普通对照自交系(K10)对土壤蔗糖酶、脱氢酶、脲酶和碱性磷酸酶活性的影响(图1)。播种后20 d和80 d时,3份玉米材料的种植对土壤蔗糖酶活性的影响差异不显著;在播种后40 d和60 d时,转基因株系WL-1与受体自交系LH1037对土壤蔗糖酶的活性的影响差异显著,WL-1比对照LH1037分别低48.88%和高25.43%,但是与普通自交系K10不存在显著性差异。

播种后20 d和40 d时,3份玉米材料的种植对土壤脱氢酶活性的影响差异不显著;播种后60 d和80 d时转基因株系与受体自交系相比对土壤脱氢酶的活性的影响差异不显著,在播种后60 d受体自交系LH1037与普通自交系K10对土壤脱氢酶活性的影响存在差异显著性,LH1037比K10低60.93%;播种后80 d时,转基因株系WL-1对土壤脱氢酶活性的影响与普通自交系K10相比存在显著差异,WL-1比K10低41.04%。

转基因株系与受体自交系在播种后的20 d对土壤脲酶活性的影响无显著差异,但与普通自交系K10存在显著差异,WL-1比对照K10高12.73%;播种后40 d和60 d,转基因株系、受体自交系和普通自交系K10对土壤脲酶活性的影响具有显著性差异,WL-1比对照LH1037分别高18.07%和17.61%,比对照K10分别高19.66%和22.74%;在播种后80 d时,3份玉米材料对土壤脲酶的活性的影响不存在显著性差异;3份玉米材料在播种后4个取样时间对土壤碱性磷酸酶的活性的影响均不存在差异显著性。

2.2 转 *BcWRKY1* 基因耐盐碱玉米对根际土壤理化性质的影响

土壤pH值是土壤理化性质指标之一,影响土壤中营养元素的转化与释放、酶的活性和土壤发生过程中元素的迁移等;土壤电导率及pH的测定可以反映土壤中水溶性盐的含量,对了解盐分对作物生长的影响以及拟定土壤改良措施有着重要的意义;钠吸附比(Sodium adsorption ratio, SAR)是表征钠离子

和其他阳离子相对含量的简化指标,土壤溶液液固相平衡时,土壤溶液的钠吸附比只有达到一定数值,土壤才会碱化。影响土壤碱化的钠吸附比值,对治理碱土和预防次生碱化具有重要意义。

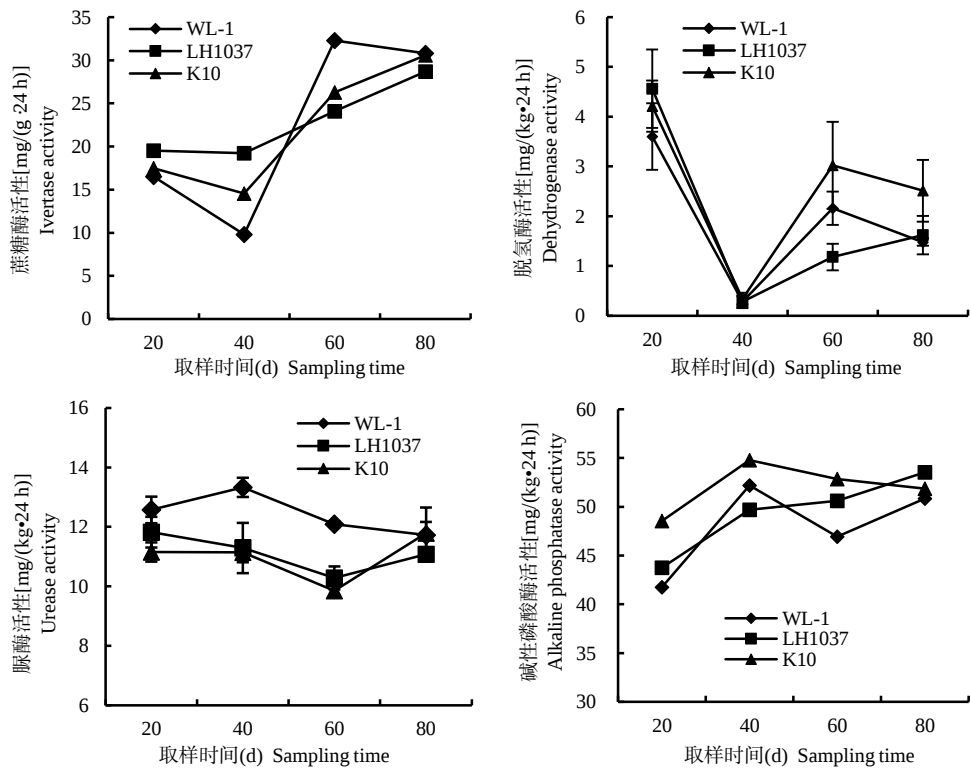


图1 转 *BcWRKY1* 基因玉米对土壤酶活性的影响
Fig.1 Effect of transgenic maize with *BcWRKY1* gene on soil enzyme activities

表1 转 *BcWRKY1* 基因玉米对土壤理化性质的影响
Table 1 Effect of transgenic maize with *BcWRKY1* gene on soil physicochemical properties

测定指标 Index	取样时间(d) Sampling time	转基因株系 Transgenic line	受体对照自交系 Acceptor line	常规对照自交系 Common control inbred line
pH 值 pH value	20	8.59±0.03 A	8.58±0.02 A	8.62±0.02 A
	40	8.49±0.03 A	8.48±0.02 A	8.52±0.03 A
	60	8.63±0.03 A	8.58±0.02 A	8.62±0.06 A
	80	8.59±0.03 A	8.61±0.02 A	8.44±0.03 B
电导率 Conductivity	20	0.21±0.02 A	0.22±0.01 A	0.22±0.01 A
	40	0.23±0.01 A	0.24±0.02 A	0.24±0.01 A
	60	0.18±0.01 A	0.19±0.02 A	0.19±0.01 A
	80	0.26±0.02 A	0.26±0.01 A	0.27±0.01 A
SAR 值 SAR value	20	4.29±0.20 A	4.34±0.33 A	4.08±0.05 A
	40	4.44±0.48 A	4.51±0.33 A	4.07±0.10 A
	60	4.59±0.12 A	4.21±0.11 B	4.15±0.14 B
	80	4.53±0.10 A	4.25±0.20 AB	4.14±0.12 B

注:表中大写字母为0.01水平差异。
Note: Capital letters indicated the significant difference($P<0.01$).

从表1可以看出,转 *BcWRKY1* 基因耐盐碱玉米播种后20、40、60 d时,土壤pH值与受体对照自交系和常规对照自交系相比无显著性差异;在播种后80 d时,比常规对照自交系高1.74%,差异极显著($P<0.01$),与受体对照自交系不存在差异显著性。种植3份材料的土壤在4个不同取样时期电导率均无

显著性差异。土壤 SAR 值在播种后 20、40 d 取样时,转基因株系与受体对照自交系和常规对照自交系不存在显著性差异;在播种后 60 d 取样时与受体对照自交系 LH1037 和常规对照自交系 K10 存在极显著性差异($P<0.01$),比 LH1037、K10 分别高 8.3% 和 9.4%;在 80 d 取样时转基因株系与受体对照自交系无显著差异,但与常规对照自交系存在显著性差异,且 SAR 值比常规对照自交系高 8.6%。

从上述试验结果可以看出,转 *BcWRKY1* 基因玉米的种植与受体自交系 LH1037 和普通自交系 K10 相比,对土壤 pH、电导率均无显著性影响;对土壤 SAR 值、土壤脲酶、脱氢酶、蔗糖酶、和碱性磷酸酶活性虽然可能存在短暂的显著差异,但是没有持续出现,并且受体自交系 LH1037 和普通自交系 K10 间也存在显著差异,很难确定说明这些差异是由转基因玉米本身造成,可能的原因是由采样点的误差造成的,由于盆栽苗的灌溉等管理措施、植物不同生长期引起土壤微环境的动态变化等,采样点稍有不同就可能影响上述土壤易变指标的变动。

3 结论与讨论

根际是植物与土壤最主要的相互作用区域,而根际土壤中含有许多难溶性的养分元素,植物可通过根系分泌物的作用而转化为有效养分。由于外源基因的插入,转基因植物的根系分泌物化学组成和数量就有可能发生变化^[14],这种差异就会对土壤理化性质如团聚体大小和分布、酸碱度、阳离子交换量、吸附性能和化学成分等有不同的影响。俞元春等研究发现,转基因抗虫棉花在大量采集期,土壤全氮和速效钾含量有所降低,而土壤 pH 值、有机质含量有所升高。宋亚娜等^[15]研究发现,转 *cry1Ac/cpti* 基因水稻对土壤 pH 值、有机质、有效氮、有效磷和速效钾等土壤理化指标与对照相比无显著性差异,转基因耐盐碱作物对土壤电导率和钠吸附比的影响尚未见报道。土壤酶在土壤中累积的具有催化活性的物质,它推动着土壤生态系统中物质的循环和能量的流动,其活性大小可以较敏感地反映土壤中各种生物化学过程的强度和方向。孙彩霞等研究发现,转 *Bt* 植物的种植可能改变土壤脲酶、脱氢酶、磷酸酶的活性。Shen 等^[16]研究发现,转基因棉花土壤磷酸酶活性与非转基因受体相比没有显著性差异。Liu 等^[17]研究表明,转 *Bt* 基因水稻对根际土壤脱氢酶活性没有显著差别。sun 等^[18]的研究发现,转 *Bt* 基因棉花对土壤脲酶、纤维素酶和蔗糖酶的活性高于非转基因棉花,对土壤芳基硫酸酯酶活性有抑制作

用。袁红旭等^[19]研究表明,种植转几丁质酶基因水稻与非转基因水稻相比对土壤蔗糖酶、过氧化氢酶、多酚氧化酶和脲酶活性无显著差异。以上研究显示,转基因作物对土壤酶活性和 pH 值的影响没有明确统一的结论,同时转基因耐盐碱作物对土壤电导率和钠吸附比的影响尚未见报道。目前,关于这方面的报道大多集中在转 *Bt* 基因,关于转 *BcWRKY1* 基因耐盐碱玉米对土壤酶的影响鲜有报道,因此,转基因作物对土壤理化性质和酶活性的影响机制还需进一步的探究。

本研究表明,与非转基因受体自交系相比,转基因玉米的种植对土壤 pH 值、电导率与受体对照自交系相比无显著性差异,与俞元春等的试验结果不同;对土壤 SAR 值与受体对照自交系只有取样 60 d 时存在极显著性差异($P<0.01$);转基因玉米在播种后 20、40、60 d 土壤脲酶活性与亲本相比有所提高,这与 sun 等的研究结果不同;转基因玉米在 4 个取样时期与非转基因亲本相比土壤磷酸酶和脱氢酶活性没有显著性差异,与 Shen 等和 Liu 等研究结果相同;蔗糖酶活性在 40、60 d,转基因与亲本差异显著,与袁红旭等的研究不同。王建武等认为,土壤酶是一个非常敏感的指标,施肥种类、管理与耕作方式、作物种类、土壤水分和环境条件等均可能影响土壤中酶的活性。转基因作物对土壤理化性质和酶活性的影响是一个长期的过程,有必要在进行长期观测,并分析与耕作方式、水分管理和肥料管理等农业管理措施对其的综合影响,才有可能探明其机理,并对转 *BcWRKY1* 基因耐盐碱玉米环境安全性作出全面、科学的评价。

参考文献:

- [1] 王志春,梁正伟.植物耐盐研究概况与展望[J].生态环境,2003,12(1):106-109.
Wang Z C, Liang Z W. Advances of salt tolerance in plants[J]. Ecology and Environment, 2003, 12(1): 106-109. (in Chinese)
- [2] Liu B, Zeng Q, Yan F, et al. Effects of transgenic plants on soil microorganisms[J]. Plant and soil, 2005, 271: 1-13.
- [3] Wei M, Tan F, Zhu H, et al. Impact of Bt-transgenic rice(SHK601) on soil ecosystems in the rhizosphere during crop development[J]. Plant Soil and Environment, 2012, 58(5): 217-223.
- [4] Motavalli P P, Kremer P J, Fang M, et al. Impact of genetically modified crops and their management on soil microbial mediated plant nutrient transformations[J]. Journal of Environmental Quality, 2004, 33(3): 816-824.
- [5] 周礼恺.土壤酶学[M].北京:科学出版社,1987.
- [6] 俞元春,冷春龙,舒洪岚,等.转基因抗虫棉对土壤养分和酶活性的影响[J].南京农业大学学报(自然科学版),2011,35(5):21-24.
Yu Y C, Leng C L, Shu H L, et al. Effects of insect-resistant transgen-

- ic cotton on soil nutrients and enzyme activities[J]. Journal Nanjing Forestry University(Natural Science Edition), 2011, 35(5): 21–24. (in Chinese)
- [7] 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): 2261–2264.
- Sun C X, Chen L J, Wu Z J, et al. Effect of transgenic *Bt* rice planting on soil enzyme activities[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2003, 14(12): 2261–2264. (in Chinese)
- [8] 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[J]. 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[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2005, 16(3): 524–528. (in Chinese)
- [9] 吴刚,李俊生,肖能文,等. 转基因水稻对土壤理化性质的影响研究[J]. 湖北植保, 2012(6): 22–25.
- Wu G, Li J S, Xiao N W, et al. Effect of transgenic rice on soil physicochemical properties[J]. Hubei Plant Protection, 2012(6): 22–25. (in Chinese)
- [10] 单长健,刘学,刘思言,等. 转 *BcWRKY1* 转录因子基因玉米耐盐碱性鉴定方法的建立及高耐盐株系的筛选[J]. 玉米科学, 2012, 20(2): 27–32.
- Shan C J, Liu X, Liu S Y, et al. Identification of salt-tolerance of transgenic maize with *BcWRKY1* gene[J]. Journal of Maize Sciences, 2012, 20(2): 27–32. (in Chinese)
- [11] 陶波,蒋凌雪,沈晓峰,等. 抗草甘膦转基因大豆对根际和非根际土壤酶活性的影响[J]. 作物杂志, 2011(1): 45–49.
- Tao Bo, Jiang L X, Shen X F, et al. Effects of genetic modified glyphosate resistant soybean on soil enzymes activities in rhizosphere and non-rhizosphere[J]. Crops, 2011(1): 45–49. (in Chinese)
- [12] 关荫松. 土壤酶及其研究方法[M]. 北京: 中国农业出版社, 1986.
- [13] 鲍士旦. 土壤农化分析(第三版)[M]. 北京: 中国农业出版社, 2005.
- [14] 李孝刚,刘标,韩正敏,等. 转基因植物对土壤生态系统的影晌[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(5): 1957–1960.
- Li X G, Liu B, Han Z M, et al. Impact of transgenic plants soil ecosystems[J]. Journal of Anhui Agri Sci., 2008, 36(5): 1957–1960. (in Chinese)
- [15] 宋亚娜,苏军,陈睿,等. 转 *cryAc/cpti* 基因水稻对土壤酶活性和养分有效性的影响[J]. 生物安全学报, 2012, 20(3): 243–248.
- Song Y N, Su J, Chen R, et al. Effects of *cryIac/cpti* transgenic rice on enzyme activity and nutrients availability in paddy soil[J]. Journal of Biosafety, 2012, 20(3): 243–248. (in Chinese)
- [16] 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[J]. Plant and Soil, 2006, 285: 149–159.
- [17] Liu Wei, Lu H H, Wu W X, et al. Transgenic *Bt* rice does not affect enzyme activities and microbial composition in the rhizosphere during crop development[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2008, 40 (2): 475–486.
- [18] Sun C X, Chen L J, Wu Z J, et al. Soil persistence of *Bacillus thuringiensis(Bt)* toxin from transgenic *Bt* cotton tissues and its effect on soil enzyme activities[J]. Biology and fertility of soils, 2007, 43(5): 617–620.
- [19] 袁红旭,郭建夫,杨毓峰,等. 转几丁质酶基因水稻对土壤化学性状及酶活性的影响研究[J]. 中国生态农业学报, 2005, 13(1): 98–100.
- Yang H X, Guo J F, Yang Y F, et al. Influence of transgenic rice expressing modified chitinase gene on some chemical characteristics and enzymes activity of soil[J]. Chinese Journal of Eco-Agriculture, 2005, 13(1): 98–100. (in Chinese)

(责任编辑:朴红梅)