

DOI: 10.13758/j.cnki.tr.2020.01.017

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. 土壤, 2020, 52(1): 119–126

铜胁迫对抗虫转基因水稻根际土壤微生物的影响^①

王宵宵^{1,2}, 钟文辉¹, 李磊^{1,2}, 洪鑫^{1,2}, 刘标³, 韩成^{1*}

(1 南京师范大学地理科学学院, 江苏省物质循环与污染控制重点实验室, 南京 210023; 2 南京师范大学环境学院, 南京 210023; 3 生态环境部南京环境科学研究所, 国家环境保护生物安全重点实验室, 南京 210042)

摘要: 根际土壤微生物群落是联系土壤环境与作物生长的重要纽带, 也是转基因作物环境安全评价的主要指标, 而 Cu 胁迫对抗虫转基因水稻根际土壤微生物的影响目前尚不清楚。本研究基于盆栽试验, 采用高通量测序等技术研究 Cu 胁迫(Cu 含量 100 mg/kg)对抗虫转基因水稻华恢 1 号(HH)及其亲本非转基因水稻明恢 63(MH)农艺性状及成熟期根际土壤微生物的影响, 并以不施加 Cu 胁迫处理为对照。结果显示: Cu 胁迫显著降低了水稻株高、生物量及产量; Cu 胁迫改变了水稻根际土壤总氮、铵态氮含量及氧化还原电位值, 而种植转基因水稻仅降低了根际土壤氧化还原电位值; Cu 胁迫没有影响水稻根际土壤细菌丰度, 但降低了细菌群落 Alpha-多样性, 改变了水稻根际土壤细菌群落组成和群落结构; 相同 Cu 含量胁迫下, HH 和 MH 水稻生长指标及根际土壤细菌群落结构及组成差异较小。上述研究表明, Cu 胁迫抑制了水稻农艺性状及根际土壤细菌群落, 但种植抗虫转基因水稻没有影响水稻植株及根际土壤细菌群落对 Cu 胁迫的抗性。

关键词: 铜胁迫; 细菌群落; 转基因水稻; 根际土壤; 环境安全评价

中图分类号: S154.3; Q938.1 **文献标志码:** A

Effects of Cu Stress on Rhizosphere Soil Microorganisms of Insect-resistant Transgenic Rice

WANG Xiaoxiao^{1,2}, ZHONG Wenhui¹, LI Lei^{1,2}, HONG Xin^{1,2}, LIU Biao³, HAN Cheng^{1*}

(1 *Jiangsu Provincial Key Laboratory of Materials Cycling and Pollution Control, School of Geography Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, China*; 2 *School of Environment, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, China*; 3 *State Environmental Protection Key Laboratory of Biosafety, Nanjing Institute of Environmental Sciences, Ministry of Ecology and Environment of the People's Republic of China, Nanjing 210042, China*)

Abstract: Soil environment and crop growth can be connected in rhizosphere soil, which is also the main indicator of the environmental safety assessment of the transgenic rice, but the effect of Cu stress on rhizosphere microorganisms of insect-resistant transgenic rice is still unclear. A pot experiment was conducted in this study and the Illumina Hiseq pyrosequencing technology was carried out to investigate the rhizosphere microbial community of insect-resistant transgenic rice Huahui1 (HH) and its non-transgenic parent line Minghui63 (MH) with or without 100 mg/kg Cu stress (abbreviated as Cu100 and Cu0, respectively). Results showed that Cu stress significantly reduced rice height, biomass and yield, and changed total N content, ammonium content and redox potential value in rice rhizosphere soil. Cu stress did not change the bacterial community abundance, but altered the composition and structure of bacterial community and decreased the Alpha-diversity of bacterial community. No effect on the rice growth and composition and structure of bacterial community was observed between HH and MH varieties with or without Cu stress. These findings indicate that Cu stress can suppress the agronomic traits of rice and the rhizosphere bacterial community, but planting insect-resistant transgenic rice does not change the resistance of rice and rhizosphere bacteria to Cu stress.

Key words: Cu; Bacterial community; Transgenic rice; Rhizosphere soil; Environmental safety

近年来, 含 Cu 矿产的开采、冶炼厂三废的排放, 使土壤含 Cu 量达到原始土壤的几倍甚至几十倍^[1]。我国含 Cu 杀菌剂的长期大量使用和城市污泥的堆肥利用, 我国农田土壤 Cu 污染现象日益严重, 已威胁到环境生

①基金项目: 农业部转基因生物新品种培育重大专项项目(2016ZX08012005)资助。

* 通讯作者(chenghan@njnu.edu.cn)

作者简介: 王宵宵(1994—), 女, 江苏徐州人, 硕士研究生, 主要从事土壤生态与环境微生物多样性研究。E-mail: 151302147@stu.njnu.edu.cn

态的稳定及人类的安全,甚至对植物、动物及土壤微生物产生危害,引起了国内外很多科研人员的关注。Cu 是水稻生长发育所必需的营养元素。但当土壤中 Cu 含量超过一定量时,将对水稻生长发育及产量产生影响^[2]。赵江宁等^[3]的研究表明,水稻成熟期土壤可交换态 Cu 含量与 Cu 胁迫下水稻抽穗和成熟期推迟的天数以及茎蘖发生、单位面积穗数、每穗颖花数和产量的下降幅度均呈显著或极显著正相关。因此,提高水稻的耐 Cu 性是应对农田土壤 Cu 污染的重要育种方向。土壤微生物活性和群落结构的变化能敏感地反映土壤质量和健康状况,是土壤环境质量评价不可缺少的重要生物学指标^[4]。当 Cu 含量超过一定量时,微生物的生长代谢将会受到抑制,土壤微生物数量和群落结构发生改变。Wang 等^[5]利用 DGGE 图谱分析发现,土壤中重金属 Cu 不同提取态的含量与微生物多样性 Shannon 指数呈负相关,且由于生物可利用的重金属含量超过土壤微生物的忍耐极限而导致微生物基因突变及种群更新。Liu 等^[6]采用 PLFAs 分析发现,高含量的 Cu 胁迫下,土壤总细菌数量、微生物生物量碳及酶活性显著降低。Cu 胁迫下,李月灵等^[7]发现接种土壤微生物可以减轻 Cu 胁迫对植株造成的伤害,提高植株耐受 Cu 胁迫的能力。目前应用较多的分子生物学技术为 PCR-DGGE 技术、RFLP 分析及定量 PCR 分析等^[8],这些手段往往通量低、信息量小,本研究采用 Illumina Hiseq 测序技术,可以更加全面准确地分析 Cu 胁迫下水稻根际土壤微生物群落结构。

在环境恶化及水稻可种植面积缩小等农业问题的挑战下,转基因技术成为增产增收的重要手段和途径^[9]。转基因水稻具有较强的抗逆性,崔荣荣等^[10]研究发现,无论在适宜季节或非适宜季节,转基因水稻的生存竞争能力和繁育能力高于亲本。转基因技术带来经济利益的同时,其环境安全评价备受关注。土壤生态研究是转基因作物环境安全评价中的重要内容,目前证明转基因作物对生物多样性的潜在影响与非转基因作物存在本质不同的科学依据较少^[11]。吴立成等^[12]研究表明抗虫转基因水稻对根际土壤微生物的影响较小,且不持续。相比于外源基因的插入,生长环境的变化更易引起转基因水稻性状的变化^[13]。然而,Cu 胁迫是否会影响抗虫转基因水稻根际土壤微生物群落尚不清楚。根据我国土壤环境质量标准(GB15618—2008),一级、二级、三级农田土壤的 Cu 含量标准分别为 35、100、400 mg/kg,且目前 Cu 污染稻田土壤 Cu 含量可高达 101.2 mg/kg^[14]。由此,本

研究以抗虫转基因水稻华恢 1 号及其亲本水稻明恢 63 为研究材料,施加 Cu 含量 100 mg/kg 的 Cu 胁迫,测定不同处理下水稻的农艺性状,并采用定量 PCR 和 Illumina Hiseq 高通量测序技术对水稻根际土壤细菌群落丰度和结构变化情况进行探究,以明确 Cu 胁迫对抗虫转基因水稻农艺性状及根际土壤微生物群落结构的影响。

1 材料与amp;方法

1.1 供试土壤及水稻种子

供试土壤为南京师范大学仙林校区(118°55'E, 32°06'N)内未经人为干扰的自然土壤,去除表面植被、落叶及颗粒物后,采集 0~15 cm 深度土壤,室内自然风干后研磨过筛(2 mm),混匀后备用。土壤基本理化性质为:pH 7.77,全氮 0.41 g/kg,总有机碳 2.7 g/kg,有机质 4.65 g/kg,有效磷 3.53 mg/kg,铵态氮 0.28 mg/kg。该土壤未检测到 Cu 等重金属污染。供试水稻品种为明恢 63(简称 MH)和华恢 1 号(简称 HH),其中明恢 63 为非转基因水稻,华恢 1 号是将抗虫基因 *cryAb/cryAc* 转入明恢 63 中获得的转基因水稻。水稻种子由华中农业大学植物科学技术学院提供。

1.2 试验设置及样品采集

本试验选用 15 cm × 25 cm PVC 塑料桶作为水稻盆栽用桶,每桶称取相当于 5.0 kg 干土重的风干土壤,添加自来水使得盆栽桶中淹水 4~5 cm,并添加不同量 Cu 对土壤进行为期 30 d 的预处理。盆栽桶口覆膜以减少水分挥发,膜上有孔以维持通气状态。试验设置 2 个 Cu 含量胁迫处理,为 Cu0 和 Cu100 处理,Cu(II)添加形态为 $\text{CuCl}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$,添加量分别为 0、100 mg/kg(以 Cu(II)含量计),每个处理设置 4 个重复。

重金属预处理后,每桶施入 N:P:K 为 1:1:1 的复合肥作基肥,添加量为 0.5 g/kg。将培养 30 d 后的 HH 和 MH 水稻幼苗分别移栽至桶中,每桶 3 株。水稻生长期间桶内保持 4~5 cm 淹水层,于移栽后 12 d 追施氮肥(尿素,0.05 g/kg),于移栽后 30~37 d(水稻分蘖后期)进行晒田,其他管理措施与田间相同。

于移栽后 112 d(水稻成熟期)对水稻植株进行破坏性采样,并测定株高、生物量、籽粒重金属含量等水稻农艺性状。水稻成熟期破坏性采样后,根据土壤在水稻根系表面抖落和粘着的程度区分根际土壤及非根际土壤^[15]。采集时仔细地土壤中移出水稻根系,剧烈、快速抖动根系以将非根际土壤抖落,直至无法抖落土壤且可看清水稻根系;用无菌刮板轻轻刮取粘着在根系上的土壤(<2 mm),尽可能剔除植物残留碎片及根系后混

匀作为一个根际土壤样品。一部分根际土立即装入 2 ml 的离心管中于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存, 用于微生物分子生态学分析; 一部分根际土用于土壤理化性质分析。

1.3 土壤理化指标的测定

土壤无机氮采用 2 mol/L KCl 溶液按 $5:1(V/m)$ 的水土比浸提, 在 $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 200 r/min 条件下振荡 1 h 过滤, 滤液用流动分析仪(Skalar San Plus, Netherlands)测定; 土壤 pH 用蒸馏水按 $2.5:1(V/m)$ 的水土比浸提, 振荡 10 min, 静置 30 min, 采用台式 pH 计(Mettler-Toledo)测定; 土壤有效磷采用盐酸-氟化铵按 $10:1(V/m)$ 的水土比浸提, 钼锑抗比色法测定; 土壤全氮采用凯氏消煮法测定; 土壤总有机碳采用 TOC 分析仪(岛津 TOC-L)测定。成熟期破坏性采样前, 采用微电极分析仪(Unisense Microsensor Multimeter Version 2.01)测定水稻盆栽水-土界面下 3.8 cm 处水稻根际土壤氧化还原电位值, 测定方法参考文献[16]。

1.4 土壤及植物各器官 Cu 含量的测定

土壤样品采用 0.1 mol/L 盐酸溶液按 $5:1(V/m)$ 的水土比浸提, 在 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 250 r/min 条件下振荡 1 h 过滤, 滤液由 ICP-AES 测定; 植物样品采用浓硝酸-高氯酸消煮, ICP-AES 测定, 测定方法参考文献[17]。

1.5 土壤总 DNA 提取

本研究采用试剂盒(FastDNA[®] Spin Kit for Soil, MP, Biomedicals, USA)提取土壤总 DNA, 按试剂盒的说明, 每个土壤样品称取鲜土 0.5 g。DNA 溶液的质量和浓度采用 NanoDrop 2000(Thermo, USA)进行测定, 提取好的 DNA 样品稀释 10 倍后保存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

1.6 实时荧光定量 PCR 分析

采用基于 SYBR green 染料法的实时荧光定量 PCR 技术测定土壤细菌 16S rRNA 基因丰度来表征细菌群落丰度。测定机器为 Biorad CFX96 Real-time PCR system(Biorad, USA), SYBR green 试剂选用 $2\times$ SYBR Premix Ex Taq(Takara, Japan), 采用通用引物 515F(5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3')/907R(5'-CGTCAATTCMTTTRAGTTT-3')从土壤微生物 DNA 中扩增 16S rRNA 基因。qPCR 反应体系为 $20.0\text{ }\mu\text{l}$, 包括 $10.0\text{ }\mu\text{l}$ 的 $2\times$ SYBR Premix Ex Taq、上下游引物 ($20\text{ pmol}/\mu\text{l}$)各 0.3、 $1.0\text{ }\mu\text{l}$ 样品 DNA 模版($9.3\sim 23.9\text{ ng}/\mu\text{l}$)及 $8.4\text{ }\mu\text{l}$ 灭菌超纯水。反应程序为: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性, 5 min; 40 个循环($94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s; $52\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s), 每循环结束后采集荧光数据; 40 轮扩增后, 采用溶解曲线分析扩增产物的特异性, 分析程序为: 温度从 $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ 上升到 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$, 此期间每上升 $0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 便采集荧光数据。以含有细菌 16S rRNA

基因的重组质粒作为标准 DNA 模版, 根据质粒浓度和阿伏伽德罗常数计算该基因的拷贝数, 分别以 10 倍梯度稀释各模板制作标准曲线, 其浓度范围为 $9.61\times 10^2\sim 9.61\times 10^8\text{ copies}/\mu\text{l}$ 。每个样品 3 个技术重复, 扩增效率为 99.6%(R^2 为 0.992), 同时设置 3 个无模板样品为阴性对照。

1.7 高通量测序分析

以提取的基因组 DNA 为模板, 采用 V4~V5 区引物(515F/907R)扩增 16S rRNA 基因以鉴定细菌群落组成及多样性, 高通量测序分析委托广东美格基因科技有限公司采用 Illumina Hiseq 2500 平台进行分析。利用 Trimmomatic 软件对 Raw Reads 数据进行质量过滤, 得到质控后的 pair-end clean reads, 采用 FLASH 拼接 Hiseq 测序产生的 pair-end 数据, 最小 overlap 长度设置为 10 bp, 拼接序列最大错配比率为 0.1, 过滤后得到有效的拼接片段 Clean Tags^[18]。利用 usearch 软件(<http://www.drive5.com/usearch/>)对所有 Clean Tags 进行聚类, 默认以 97% 的一致性将序列聚类成为 OTU, 在门(Phylum)水平上将相对丰度小于 1% 细菌类群和无法分类的细菌类群合并并在 Others。进行 Alpha-多样性、Beta 多样性分析, 其中 Chao1 指数反映样品中群落的丰富度, Shannon 指数综合考虑群落中物种的丰富度和均匀度。

1.8 数据处理

本研究采用 SPSS 16.0(IBM, USA)进行数据分析, 采用独立样本 T 检验分析比较同一水稻品种各处理间的显著性差异; 采用双因素方差分析比较不同处理及不同品种水稻农艺性状、根际土壤理化性质、根际土壤细菌微生物群落组成及结构的差异; 采用 Bray-Curtis 距离及多变量统计学方法主坐标分析(PCoA, Principal coordinates Analysis)比较不同样品间细菌群落结构差异。

2 结果与分析

2.1 Cu 胁迫对水稻根际土壤理化性质及水稻农艺性状的影响

Cu 胁迫处理下水稻根际土壤理化性质发生明显改变(表 1)。与 Cu0 处理相比, Cu100 处理下水稻根际土壤全氮、铵态氮含量显著降低, 水稻根际土壤有效 Cu 含量显著升高, MH 水稻根际土壤氧化还原电位值显著上升; 但水稻根际土壤 pH、总有机碳含量无显著性差异。相同 Cu 胁迫处理下, HH 及 MH 水稻根际土壤 pH、全氮、总有机碳、铵态氮及有效 Cu 含量均无显著性差异, 但 HH 水稻根际土壤氧化还原

电位显著低于 MH 水稻。双因素方差分析显示, 水稻根际土壤全氮、铵态氮含量仅受 Cu 胁迫显著影响, 根际土壤氧化还原电位值受水稻品种与 Cu 胁迫的交

互影响显著。可见, Cu 胁迫改变了水稻根际土壤全氮、铵态氮含量及氧化还原电位值, 而种植转基因水稻仅降低了根际土壤氧化还原电位值。

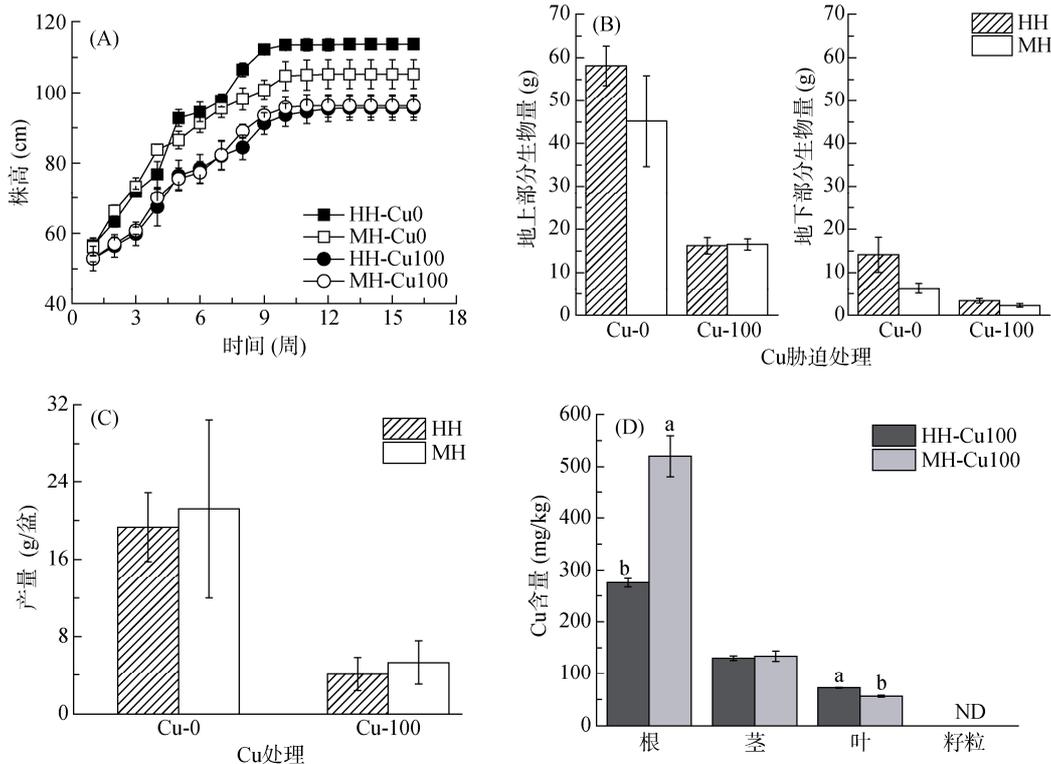
表 1 不同处理水稻根际土壤理化性质
Table 1 Physicochemical properties of rice rhizosphere soils under different treatments

Cu 处理	水稻品种	pH	氧化还原电位(mV)	全氮(g/kg)	总有机碳(g/kg)	铵态氮(mg/kg)	有效 Cu(mg/kg)
Cu0	HH-Cu0	6.82 ± 0.11 a	189 ± 2.61 b	0.41 ± 0.02 b	3.93 ± 0.04 a	4.52 ± 0.38 b	ND
	MH-Cu0	6.40 ± 0.09 A	259 ± 37.3 B	0.44 ± 0.00 B	3.85 ± 0.08 A	7.98 ± 0.49 B	ND
Cu100	HH-Cu100	6.95 ± 0.02 a	123 ± 67.0 b	0.57 ± 0.04 a	3.58 ± 0.01 a	19.3 ± 3.98 a	56.3 ± 4.18
	MH-Cu100	6.88 ± 0.00 A	384 ± 21.3 A	0.64 ± 0.02 A	4.16 ± 0.70 A	23.9 ± 5.12 A	57.4 ± 3.65
双因素方差 分析 <i>F</i>	Cu 胁迫处理	9.50	1.68	58.4**	0.00	52.3**	-
	水稻品种	10.8	51.8**	4.24	0.50	0.86	0.03
	Cu 胁迫处理×品种	6.33	17.4**	0.87	0.87	0.29	-

注: 表中数据均为平均值 ± 标准误($n = 4$); 同列不同小写、大写字母分别表示 HH 水稻和 MH 水稻各指标独立样本 T 检验结果显著($P < 0.05$); ND 表示未检测到 Cu(II); *和**分别代表在 $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$ 水平影响显著。

各处理水稻农艺性状显著不同(图 1)。与 Cu0 处理相比, Cu100 处理水稻株高、产量、生物量均显著性降低。在 Cu0 处理下, 移栽 7 周后 HH 水稻株高均显著高于 MH 水稻, 但 HH 与 MH 水稻成熟期生物量及产量无显著差异; 而 Cu100 处理下, HH 与 MH 水稻株高、生物量及产量均无显著差异。Cu 胁迫下, 两

种水稻各器官重金属含量分布规律均为: 根>茎>叶>籽粒(未检测到), 无 Cu 胁迫处理水稻各器官中未检测到 Cu。HH 水稻根部 Cu 含量显著低于 MH 水稻, 而叶中 Cu 含量显著高于 MH 水稻。可见, Cu 胁迫显著降低了水稻株高、生物量及产量, 品种对水稻生长影响较小; HH 和 MH 水稻对 Cu 的吸收富集程度不同。



(图中误差线用标准误表示, $n = 4$; 图 1D 中同一簇不同字母表示 Cu 胁迫下两种水稻同一器官内 Cu 含量具有显著性差异, $P < 0.05$)

图 1 成熟期水稻农艺性状及各器官 Cu 含量

Fig. 1 Agronomic traits and Cu contents of rice at mature stage

2.2 Cu 胁迫对水稻根际土壤细菌群落丰度及 Alpha-多样性的影响

土壤 16S rRNA 基因数量可反映土壤中细菌群落丰度。HH-Cu0、MH-Cu0、HH-Cu100 和 MH-Cu100 处理下水稻根际土壤细菌 16S rRNA 基因丰度分别为 2.05×10^{10} 、 1.80×10^{10} 、 1.65×10^{10} 和 1.95×10^{10} 拷贝数/g。不同含量 Cu 胁迫处理下，水稻根际土壤细菌群落丰度无显著差异；同一处理下，HH 与 MH 水稻根际土壤细菌群落丰度也无显著差异。可见，Cu 胁迫及水稻品种对水稻根际土壤细菌群落丰度无显著影响。

细菌群落 OTU 数量的稀释曲线能够反映细菌群落的多样性。Cu100 处理下水稻 Chao1 指数及 Shannon 指数显著低于 Cu0 处理，同一处理下，两种水稻 Chao1 指数及 Shannon 指数无显著性差异(图 2)。说明无 Cu 胁迫水稻根际土壤细菌群落多样性、丰富度及均匀度显著高于 Cu 胁迫处理水稻。双因素方差分析显示，水稻根际土壤细菌群落多样性仅受 Cu 处理的显著影响。可见，Cu 胁迫没有影响水稻根际土

壤细菌丰度，但降低了细菌群落 Alpha-多样性；水稻品种对土壤微生物无显著影响。

2.3 Cu 胁迫对水稻根际土壤细菌群落组成及群落结构的影响

土壤 16S rRNA 基因在分类水平上的相对丰度能反映土壤中细菌群落结构和组成。本研究 4 个处理共获取 15 个相对丰度高于 1% 的门水平上的细菌类群(图 3)。各处理中 Proteobacteria(变形菌门)、Chloroflexi(绿弯菌门)、Acidobacteria(酸杆菌门)、Actinobacteria(放线菌门)、Bacteroidetes(拟杆菌门)共 5 个优势细菌群落，占总细菌群落的 70% 以上。其中 Proteobacteria 相对丰度最高，占总细菌群落的 29.8%~49.7%；Chloroflexi 其次，占 7.1%~23.2%。与 Cu0 处理相比，Cu100 处理下 HH 水稻 Nitrospirae(硝化螺旋菌门)相对丰度显著下降，根际土壤 Bacteroidetes 相对丰度显著上升；与 Cu0 处理相比，Cu100 处理下 MH 水稻根际土壤 Actinobacteria 相对丰度显著下降，Bacteroidetes、OP11、TM7 相对丰度显著上升；同一处理下，两种水稻根际土壤门水平上

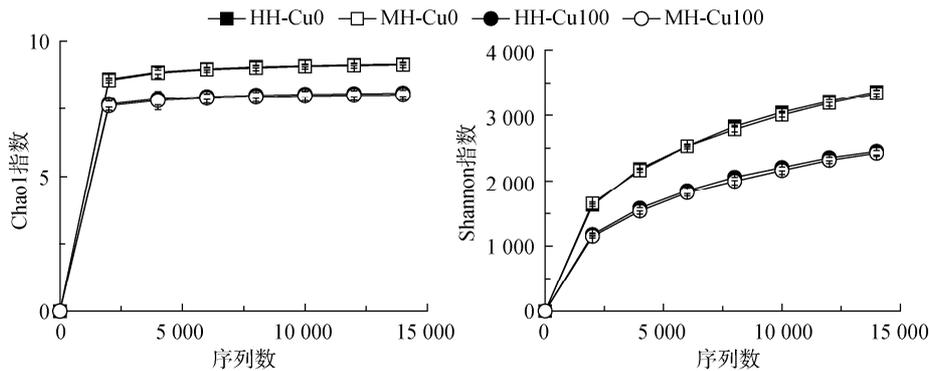
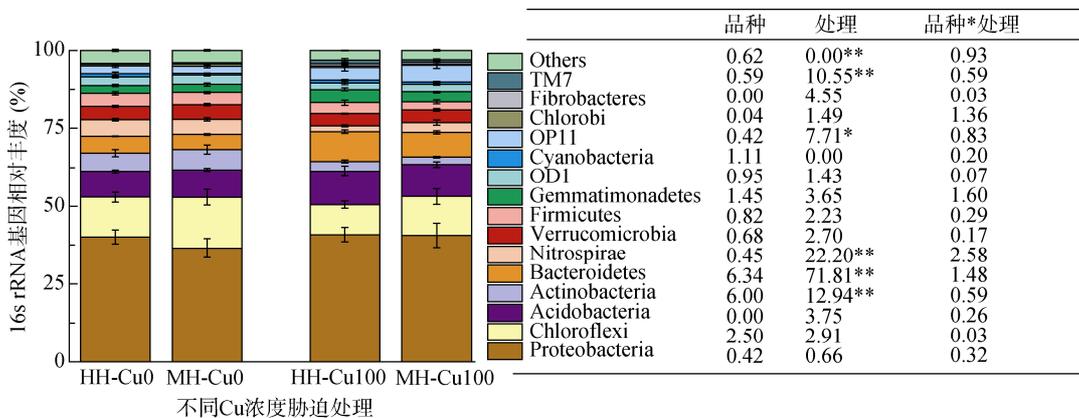


图 2 成熟期水稻根际土壤细菌群落丰富度和多样性指数稀释曲线

Fig. 2 Rarefaction curves of bacterial community richness and diversity indexes in rice rhizosphere soils at mature stage



(右表显示 Cu 胁迫处理和水稻品种对细菌各门类群相对丰度影响的双因素方差分析结果，*和**分别代表在 $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$ 水平影响显著)

图 3 成熟期水稻根际土壤细菌群落组成

Fig. 3 Bacterial community composition of rice rhizosphere soils at mature stage

的细菌类群相对丰度无显著差异。双因素方差分析显示, 水稻根际土壤 Actinobacteria、Bacteroidetes、Nitrospirae、OP11、TM7 细菌门的相对丰度仅受 Cu 胁迫的显著影响。上述结果表明, Cu 胁迫并没有改变水稻根际土壤中 Proteobacteria、Chloroflexi、Acidobacteria 等类群的相对丰度, 但改变了 Actinobacteria、Bacteroidetes、Nitrospirae、OP11、TM7 等类群的相对丰度。可见, Cu 胁迫改变了水稻根际土壤细菌群落组成, 且 Cu 胁迫下 HH 与 MH 水稻根际细菌群落相对丰度显著改变的门类不同; 相同重金属处理下, 水稻品种没有影响细菌群落组成。

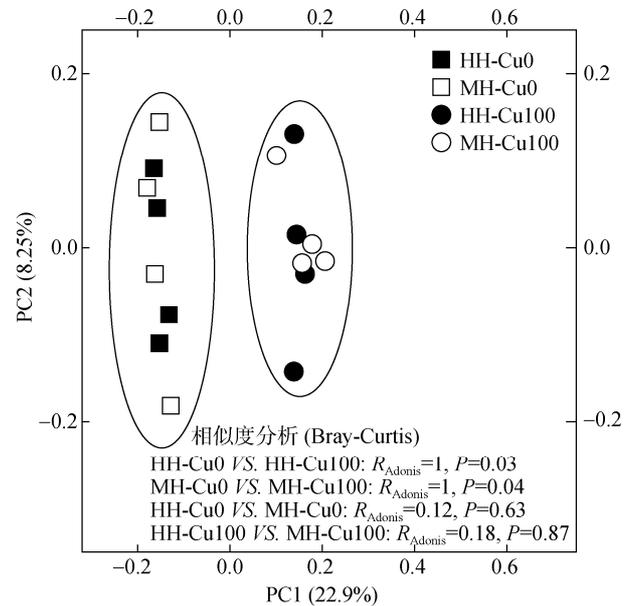
PCoA 图中每个点(样品)间的空间距离表示细菌群落结构的差异程度(图 4)。其中, 第 1、2 主坐标的方差贡献率分别为 22.92% 和 8.25%。样品在第 1、2 主坐标排序中分为两类, HH-Cu0 和 MH-Cu0 处理样品明显聚为一组, 两者的 Bray-Curtis 相似度指数为 0.12($P=0.63$); HH-Cu100 和 MH-Cu100 处理样品明显聚为一组, 两者的 Bray-Curtis 相似度指数为 0.18($P=0.87$)。这两组样品点显著分开, 其中 HH-Cu0 与 HH-Cu100 处理的 Bray-Curtis 相似度指数为 1($P<0.05$), MH-Cu0 与 MH-Cu100 处理的 Bray-Curtis 相似度指数为 1($P<0.05$), 显示 Cu0 与 Cu100 处理水稻根际土壤细菌群落结构差异显著。而同一 Cu 胁迫处理下, 两种水稻根际土壤细菌群落结构相似。可见, Cu 胁迫改变了水稻根际土壤细菌群落结构; 相同重金属处理下, 水稻品种没有影响根际土壤细菌群落结构。

3 讨论

Cu 是水稻生长必需的微量元素, 它在蛋白质构成、光合电子转移、线粒体呼吸和细胞壁新陈代谢等方面起着重要作用, 但过量的 Cu 会对水稻产生毒害作用。Cu 胁迫对水稻的影响主要包括以下两个方面: ①Cu 胁迫对水稻农艺性状的影响; ②Cu 胁迫对水稻根际土壤理化性质、土壤微生物群落组成、结构及多样性的影响。本研究以转基因水稻华恢 1 号(HH)及其亲本水稻明恢 63(MH)为材料, 根据我国土壤环境质量标准中规定的二级农田土壤 Cu 含量标准, 添加 100 mg/kg Cu(II)进行胁迫处理, 发现 Cu 胁迫改变了根际土壤理化性质, 降低了水稻农艺性状、根际土壤微生物多样性、群落结构及组成, 但 HH 和 MH 水稻上述指标无显著差异。

3.1 Cu 胁迫对水稻农艺性状的影响

本研究结果显示 Cu 胁迫后, 水稻株高、产量、



(R_{Adonis} 代表非参数多因素方差分析(nonparametric MANOVA)指数, 由基于 Bray-Curtis 距离计算而来; P 值指示两两处理间的显著差异)

图 4 成熟期水稻根际土壤细菌群落结构的 PCoA 分析
 Fig. 4 Principal coordinate analysis (PCoA) of bacterial community structure in rice rhizosphere soils at mature stage

生物量均显著降低, 且两种水稻各器官重金属含量分布规律均为: 根>茎>叶>籽粒(未检测到)。徐加宽等^[19]研究表明, 土壤 Cu 处理使水稻产量显著低于对照, 且随着土壤 Cu 含量的提高水稻产量及生物量下降幅度显著增大; 与本研究不同的是, Cu 含量 100 mg/kg 处理对水稻株高几乎没有影响。Yan 等^[2]研究发现, Cu 含量 100 mg/kg 处理下几种水稻的平均产量均显著降低, 且水稻产量与水稻穗数和每穗花颖数呈正相关; 与本研究不同的是, 其检测到水稻籽粒中 Cu 含量显著高于对照, 但未超过绿色大米 Cu 含量限制(10 mg/kg)^[20], 表明 Cu 含量 100 mg/kg 的水稻土不会通过食物链影响人类食品安全。颜士敏等^[21]研究显示, 施加 400 mg/kg Cu 胁迫对不同品种水稻产量及结实率影响差异很大。Xu 等^[22]研究发现, Cu 含量 100、300~500、1 000 mg/kg 胁迫下, 水稻产量分别下降 10%、50%、90%, 高浓度的 Cu 严重抑制了水稻的生长, 且受 Cu 胁迫危害最大的水稻器官为根部; 与本研究结果不同的是, 其发现当 Cu 含量低于 150~200 mg/kg 时, 水稻籽粒中 Cu 含量随土壤 Cu 含量上升而升高。刘光荣等^[23]研究显示, Cu 在水稻植株各部分的富集情况是: 根>茎叶>籽粒, 这与本研究结果相同。郭家文等^[24]研究表明甘蔗根、茎、枯叶、梢头对 Cu 的积累能力总体表现为根>茎>枯叶>梢头。杨桂芬和李德波^[25]的研究表明, 高浓度 Cu 在水

稻根部累积, 会使水稻根系变粗, 根毛变少, 影响根系对养分的吸收, 谷粒不饱满, 造成减产; 水稻各器官 Cu 累积量随土壤施 Cu 量的增加而增加, 其分配规律为: 根>茎叶>籽粒。转基因植物由于外源基因的导入, 对重金属积累模式会有深远的影响^[26]。本研究中 Cu 胁迫降低了水稻的农艺性状, 两种水稻对 Cu 的吸收富集程度不同, 其中 HH 水稻根部 Cu 含量显著低于 MH 水稻, 造成两种水稻根部对 Cu 吸收富集程度差异的机制, 及其是否与外源基因的转入、根际土壤微环境不同有关等相关问题有待于进一步研究。

3.2 Cu 胁迫对水稻根际土壤理化性质、微生物群落组成及结构的影响

本研究结果显示, Cu 胁迫后 MH 水稻根际土壤氧化还原电位值显著上升, 根际土壤理化性质发生变化, 这与 Ben 等^[27]及 Song 等^[28]的研究结果相似, Song 等^[28]认为这可能与海藻糖的净化机制相关。徐家宽等^[29]研究发现, 随着土壤 Cu 含量的增加, 水稻拔节期、抽穗期和成熟期吸氮量均显著下降, 本研究中 Cu 胁迫后水稻根际土壤全氮含量显著上升, 是否与水稻受 Cu 胁迫后吸氮量降低相关? 这有待进一步对水稻植株氮素吸收利用等问题进行论证。

本研究还发现 Cu 胁迫没有影响水稻根际土壤细菌丰度。然而, 王秀丽等^[30]研究表明, 冶炼厂周围农田土壤的全 Cu 含量随离厂区距离的增加而渐降, 土壤微生物生物量则随离厂区距离的增加而增大; Ellis 等^[31]也报道, 随着土壤中全 Cu 含量的提高, 土壤中的可培养微生物总量显著减少, 研究结果的差异可能与供试土壤、Cu 胁迫浓度不同有关。本研究采用 Illumina Hiseq 高通量测序技术发现 Cu 胁迫降低了水稻根际土壤细菌多样性, 相似地, Mao 等^[32]通过向水稻根际土壤中添加 Cu(II)胁迫, 土壤中产甲烷菌及甲烷氧化菌群落多样性和丰富度显著降低; Li 等^[33]研究发现在 Cu、Zn 冶炼厂周围, 土壤微生物多样性随重金属浓度增加而降低; 张雪晴^[34]利用 PCR-DGGE 研究发现, 随着土壤 Cu 污染程度的加大, 细菌群落丰富度及 Shannon 指数降低, 细菌群落多样性下降; Li 等^[35]利用 T-RFLP 技术研究 Cu 含量 0~3 200 mg/kg 胁迫下土壤微生物群落组成及多样性, 其中 Cu 含量 100 mg/kg 胁迫下, 土壤 16S rRNA 基因、氨氧化古菌和细菌群落数量显著下降; 微生物群落 PCoA 多样性分析结果显示, 同一含量 Cu 胁迫样品明显聚为一组, 且低 Cu 胁迫与高 Cu 胁迫样品显著分开, Cu 胁迫改变了土壤微生物数量及多样性。这

些研究均表明, 一定的 Cu 胁迫会降低土壤细菌群落多样性。

本研究中, Cu 胁迫改变了水稻根际土壤细菌群落组成及群落结构。Choudhary 等^[36]研究发现, 在 Cu 等重金属的胁迫下, 由于净化机制, 脯氨酸、丙二醛和超氧化物歧化酶含量上升, 藻青菌(Cyanobacterium)的生长受到抑制。Wang 等^[5]研究发现在距离 Cu 冶炼厂 200 m 处土壤磷酸酶活性明显降低, 通过 PCR-DGGE 分析证明重金属影响土壤细菌及放线菌的群落结构。本研究 Cu 胁迫下, HH 水稻根际土壤细菌中 Nitrospirae(硝化螺旋菌门)相对丰度显著下降, 根际土壤 Bacteroidetes(拟杆菌门)相对丰度显著上升; MH 水稻根际土壤 Actinobacteria(放线菌门)相对丰度显著下降, Bacteroidetes、OP11、TM7 相对丰度显著上升。谢家辉等^[37]利用 DGGE 技术对采集的 Cu 矿污染土壤样品进行微生物分子生态多样性进行研究, 表明不同重金属浓度对微生物多样性的影响不是简单的线性关系, 重金属污染可能改变原有微生物群落内种群间的关系, 新的耐受菌种产生, 而原优势种群失去优势作用。本研究中 HH 与 MH 水稻根际土壤细菌群落相对丰度显著改变的门类不同, 说明两种水稻根际土壤内 Cu 胁迫影响的优势种群不同, 新的耐受菌种也不同, 而造成这种差异的原因, 及其是否与水稻品种、水稻根际土壤微环境的变化有关等问题还有待进一步研究。另外, 土壤微生物的演变是长期且复杂的过程, Cu 胁迫对抗虫转基因水稻根际土壤微生物的影响需要长期连续种植后进行验证, 且其影响机制也需要进一步探究。

4 结论

相比于不施加 Cu 胁迫对照, Cu 胁迫显著抑制了水稻株高、生物量及产量, 降低了根际土壤细菌群落 Alpha-多样性, 改变了水稻根际土壤细菌群落组成和群落结构; 相比于亲本非转基因水稻, 种植抗虫转基因水稻仅影响了水稻根际土壤氧化还原电位, 改变了重金属在水稻各器官的吸收富集程度。即 Cu 胁迫抑制了水稻农艺性状及根际土壤细菌群落, 抗虫转基因水稻和亲本非转基因水稻在 Cu 胁迫抗性上无明显差异。本研究可为抗虫转基因水稻生态安全评价提供实验数据。

参考文献:

- [1] 陈卫平, 杨阳, 谢天, 等. 中国农田土壤重金属污染防治挑战与对策[J]. 土壤学报, 2018, 55(2): 261-272.

- [2] 陈杰, 宋靖珂, 张晶, 等. 不同钝化剂对铜污染土壤原位钝化修复[J]. 土壤, 2016, 48(4): 742-747.
- [3] 赵江宁, 王云霞, 沈春晓, 等. 土壤铜污染对水稻产量形成的影响: 5 年定位试验[J]. 农业环境保护, 2012(11): 2073-2081.
- [4] Maarit N R, Heiskanen I, Wallenius K, et al. Extraction and purification of DNA in rhizosphere soil samples for PCR-DGGE analysis of bacterial consortia[J]. Journal of microbiological methods, 2001, 45(3): 155-165.
- [5] Wang Y P, Shi J Y, Wang H L, et al. The influence of soil heavy metals pollution on soil microbial biomass, enzyme activity, and community composition near a copper smelter[J]. Ecotoxicology and environmental safety, 2007, 67(1): 75-81.
- [6] Liu A, Cao H, Yang Y, et al. Combinational effects of sulfamethoxazole and copper on soil microbial community and function[J]. Environmental Science and Pollution Research, 2016, 23(5): 4235-4241.
- [7] 李月灵, 金则新, 李钧敏, 等. 接种土壤微生物对铜胁迫下海州香薷生长及光合生理的影响[J]. 生态学报, 2015, 35(12): 3926-3937.
- [8] 纪洋, 于海洋, Conrad R, 等. 间隙灌溉和控释肥施用对稻田土壤产甲烷微生物的影响[J]. 土壤, 2017, 48(6): 1132-1139.
- [9] 汪魏, 许汀, 卢宝荣. 抗除草剂转基因植物的商品化应用及环境生物安全管理[J]. 杂草科学, 2010, (4): 1-9.
- [10] 崔荣荣, 韦颖, 孟攀潘, 等. 抗草铵膦转基因水稻明恢 86B 杂草化潜力评价[J]. 中国水稻科学, 2012, 26(4): 467-475.
- [11] Dale P J, Clarke B, Fontes E M. Potential for the environmental impact of transgenic crops[J]. Nature Biotechnology, 2002, 20(6): 567-574.
- [12] 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[J]. 环境科学, 2004, 25(5): 116-121.
- [13] Wang Y, Xu W T, Zhao W W, et al. Comparative analysis of the proteomic and nutritional composition of transgenic rice seeds with *Cry1 ab/ac* genes and their non-transgenic counterparts[J]. Journal of Cereal Science, 2012, 55(2): 226-233.
- [14] Cao Z H, Hu Z Y, Wong M H. Copper contamination in paddy soils irrigated with wastewater[J]. Chemosphere, 2000, 41(1/2): 3-6.
- [15] 刘微, 王树涛, 陈英旭, 等. 转 Bt 基因水稻根际土壤微生物多样性的磷脂脂肪酸(PLFAs)表征[J]. 应用生态学报, 2011, 22(3): 727-733.
- [16] Wang Z, Deng H, Chen L, et al. In situ measurements of dissolved oxygen, pH and redox potential of biocathode microenvironments using microelectrodes[J]. Bioresource Technology, 2013, 132(2): 387-390.
- [17] 白如霞, 刘海, 王玉书, 等. 四川省凉山州紫茎泽兰的重金属含量及其肥用安全性评价[J]. 土壤学报, 2018, 55(2): 432-442.
- [18] 徐白璐, 钟文辉, 黄欠如, 等. 长期施肥酸性旱地土壤硝化活性及自养硝化微生物特征[J]. 环境科学, 2017, 38(8): 3473-3482.
- [19] 徐加宽, 杨连新, 王志强, 等. 土壤铜含量对水稻生长发育和产量形成的影响[J]. 中国水稻科学, 2005, 19(3): 262-268.
- [20] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 食品中铜限量卫生标准: GB 15199-1994[S]. 北京: 中国标准出版社, 1994.
- [21] 颜士敏, 杨洪建, 杨连新, 等. 铜污染对不同水稻品种产量及其构成因子的影响[J]. 安徽农学通报, 2008, 14(6): 67-70.
- [22] Xu J K, Yang L X, Wang Z Q, et al. Toxicity of copper on rice growth and accumulation of copper in rice grain in copper contaminated soil[J]. Chemosphere, 2006, 62(4): 602-607.
- [23] 刘光荣, 魏林根, 周荣娇, 等. 水稻品种间对铜的富集和分布差异性特征初探[J]. 江西农业大学学报, 2006, 28(1): 12-15.
- [24] 郭家文, 崔雄维, 张跃彬, 等. 重金属铜在甘蔗体内的吸收及对甘蔗产量和品质的影响[J]. 土壤, 2010, 42(4): 606-610.
- [25] 杨桂芬, 李德波. 我国南方某些铜矿附近水稻土铜污染的调查研究[J]. 农村生态环境, 1990(4): 55-58.
- [26] Pavlikova D, Macek T, Mackova M, et al. The evaluation of cadmium, zinc and nickel accumulation ability of transgenic tobacco bearing different transgenes[J]. Plant, Soil and Environment - UZPI(Czech Republic), 2004, 50(12): 513-517.
- [27] Ben M M, Sakouhi L, Karmous I, et al. Protective role of exogenous phytohormones on redox status in pea seedlings under copper stress[J]. Journal of Plant Physiology, 2017, 221: 51-61.
- [28] Song Y F, Cui J, Zhang H X, et al. Proteomic analysis of copper stress responses in the roots of two rice (*Oryza sativa* L.) varieties differing in Cu tolerance[J]. Plant and Soil, 2013, 366(1-2): 647-658.
- [29] 徐加宽, 杨连新, 王志强, 等. 土壤铜含量对水稻氮素吸收利用及其产量的影响[J]. 扬州大学学报(农业与生命科学版), 2008, 29(2): 72-76.
- [30] 王秀丽, 徐建民, 谢正苗, 等. 重金属铜和锌污染对土壤环境质量生物学指标的影响[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2002, 28(2): 190-194.
- [31] Ellis R J, Neish B, Trett M W, et al. Comparison of microbial and meiofaunal community analyses for determining impact of heavy metal contamination. J Microbiol Methods[J]. Journal of Microbiological Methods, 2001, 45(3): 171-185.
- [32] Mao T T, Yin R, Deng H. Effects of copper on methane emission, methanogens and methanotrophs in the rhizosphere and bulk soil of rice paddy[J]. Catena, 2015, 133: 233-240.
- [33] Li Z J, Xu J M, Tang C X, et al. Application of 16 S rDNA-PCR amplification and DGGE fingerprinting for detection of shift in microbial community diversity in Cu-, Zn-, and Cd-contaminated paddy soils[J]. Chemosphere, 2006, 62(8): 1374-1380.
- [34] 张雪晴. 铜矿重金属污染对土壤微生物群落多样性和酶活性的影响[J]. 生态环境学报, 2016, 25(3): 517-522.
- [35] Li J, Zheng Y M, Liu Y R, et al. Initial Copper Stress Strengthens the Resistance of Soil Microorganisms to a Subsequent Copper Stress[J]. Microbial Ecology, 2014, 67(4): 931-941.
- [36] Choudhary M, Jetley U K, Abash K M, et al. Effect of heavy metal stress on proline, malondialdehyde, and superoxide dismutase activity in the cyanobacterium *Spirulina platensis*-S5[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2007, 66(2): 204-209.
- [37] 谢学辉, 范凤霞, 袁学武, 等. 德兴铜矿尾矿重金属污染对土壤中微生物多样性的影响[J]. 微生物学通报, 2012, 39(5): 624-637.