第 51 卷 第 5 期
2014 年 9 月

土 壤 学 报
ACTA PEDOLOGICA SINICA

Vol. 51, No. 5
Sep., 2014

DOI: 10.11766/trxb201401240049

转植酸酶玉米大田种植对根际土壤磷含量及组成的影响*

郑加为[1] 陈法军[2] 刘满强[1†] 赵宗潮[2] 范珍珍[1] 周诗竹[1] 胡 锋[1]

（1 南京农业大学资源与环境科学学院土壤生态实验室，南京 210095）
（2 南京农业大学植物保护学院，南京 210095）

摘 要 转基因作物种植推广中的生态风险是广泛关注的焦点。转植酸酶玉米可以提高动物对玉米籽粒的磷素利用率，但是对土壤磷素的影响尚未见报道。本研究基于 2011 年开始的田间实验，通过 2012 年和 2013 年玉米生长季的动态采样，研究转植酸酶玉米种植对土壤磷含量和组成的影响。结果表明，与亲本相比，转植酸酶玉米对土壤磷的影响强烈依赖于采样时间和磷形态，2012 年玉米播种前和 2013 年抽穗期土壤水溶态磷（H_2O-Pi）、氢氧化钠提取态无机磷（NaOH-Pi）和氢氧化钠提取态有机磷（NaOH-Po）含量均显著低于对照；碳酸氢钠提取态有机磷（$NaHCO_3$-Po）在 2012 年播种前和 2013 年成熟期显著低于对照，而微生物生物量磷（MBP）只在 2013 年成熟期有显著差异。种植转植酸酶玉米没有影响土壤全磷（TP）、稀盐酸提取态无机磷（Dil. HCl-Pi）、浓盐酸提取态无机磷（Conc. HCl-Pi）、浓盐酸提取态有机磷（Conc. HCl-Po）和残留态磷（Residual-P）含量。总之，连续 3 年种植转植酸酶玉米仅在某些采样期对土壤高活性和中等活性磷产生影响。转植酸酶玉米种植对土壤磷素影响的评价和影响机制研究需要结合植物和土壤，并在不同地点开展长期监测。

关键词 转基因作物；植酸酶；大田试验；磷分级；生态评估

中图分类号 S154 **文献标识码** A

玉米作为动物的主要能量饲料来源，尽管有机磷含量高，但 65% 以上以植酸的形式存在。由于单胃动物体内缺乏内源植酸酶，造成有机磷利用率仅在 0%～40%[1]，未利用的有机磷随粪便直接排除体外，造成土壤和水源的污染。同时植酸也是抗营养因子，严重影响动物对钙、铁、锌等元素的吸收[2]。目前饲料中大多通过添加微生物发酵外源植酸酶以提高植酸磷的利用率，但微生物发酵提取植酸酶生产成本较高。Chen 等将黑曲霉产生的植酸酶基因导入玉米胚乳，得到含有产生黑曲霉植酸酶的玉米籽粒，研制出转植酸酶基因玉米[3]，提高了猪和鸡等单胃动物对磷的利用率，减少了粪便中磷的含量[4-6]，从而减轻了环境中的磷污染[7]。

经中国农业部综合评价，转植酸酶基因玉米在 2009 年获得山东省生产应用安全证书[8]。转基因作物带来巨大的经济和社会效益的同时，其对生态环境的影响一直是国内外关注的焦点。虽然与同期获得安全证书的转 Bt 水稻相比，转植酸酶基因玉米是从营养角度对玉米基因进行调控，因此可能对生态环境及人类的影响相对较少。然而，磷是植物主要的营养元素之一，同时也是水环境恶化的重要污染元素[8]。一方面，转植酸酶玉米通过向土壤释放植酸酶而直接影响土壤磷水平[9-10]；另一方面，转植酸酶玉米的根系、秸秆等作物残体化学组成或质量的变化会进一步影响土壤生物群落和土壤生化活性，进而影响包括土壤无机和有机磷的固定和矿化释放过程[11-12]。因此，种植转植酸酶玉米理论上会对土壤磷的转化过程产生影响，这种影响可能进一步改变农田土壤肥力和周边水体的质量。

近来，有关转植酸酶玉米种植的生态风险评价多集中于土壤动物[13]、非靶标害虫及捕食天敌[14]，单胃动物的消化利用[4]及植物对磷的利用方面[15]。

---

* 转基因生物新品种培育重大专项（2013ZX08012－005，2014ZX08012－005）、南京农业大学 SRT 项目（201313）及江苏省高校优势学科建设工程项目（PAPD）资助

† 通讯作者，E-mail：liumq@njau.edu.cn

作者简介：郑加为（1988— ），男，安徽人，硕士研究生，主要研究方向为转基因作物的生态风险评价。E-mail：ahhqzjw2008@163.com

收稿日期：2014－01－24；收到修改稿日期：2014－04－08

侯文通等[16]报道遗传转化的黑曲霉植酸酶基因（*phyA*2）玉米提高利用土壤有机磷的能力，增加玉米体内磷的积累，改善玉米的生长状况；Richardson 等[17]将黑曲霉产生的植酸酶基因导入拟南芥，通过室内试验研究发现拟南芥分泌的外源植酸酶是提高土壤磷素利用率的主要因素。迄今为止，基于田间实验进行有关种植转植酸酶玉米对土壤磷素含量及其组成的研究尚未见报道。

土壤磷素分级的目的是评价土壤有效磷库大小和土壤磷素供应状况。本研究基于种植 1 年以上的转植酸酶玉米田间种植试验，通过连续两年对玉米不同生长期的土壤磷素组分含量的动态调查，探讨转植酸酶玉米的种植对土壤磷素水平含量的动态影响，为进一步了解转植酸酶玉米种植对土壤肥力影响的评价提供基础。

1　材料与方法

1.1　试验区概况

田间试验从 2011 年 6 月开始，在山东省宁津县（37°38′N，116°48′E）进行，分别种植转植酸酶玉米及其亲本非转植酸酶玉米。该地区土壤类型为蒙淤砂白土，属于潮砂土，耕作层（0 ～ 20 cm）土壤 pH、有机碳、全氮、全磷、速效磷和速效钾含量分别为 7.96 g kg^{-1}、6.63 g kg^{-1}、0.67 g kg^{-1}、0.76 g kg^{-1}、28.97 mg kg^{-1}和 99.84 mg kg^{-1}。

1.2　供试材料与试验设计

种植的玉米品种包括转植酸酶玉米 BVLA430101（Phytase transgenic corn，简写 PTC）和其亲本非转植酸酶玉米蠡玉 35（简写 CK），种子由北京奥瑞金种业有限公司提供。田间试验开始于 2011 年 6 月，每个处理重复 5 次，随机排列，共计 10 个小区。各区组间设置高粱隔离带，小区面积 6 m × 30 m，株距 20 cm，行距 40 cm。2011 年 6 月 14 日播种，10 月 3 日收获；2012 年 6 月 22 日播种，10 月 17 日收获；2013 年 6 月 13 日播种，9 月 25 日收获。在玉米播种时施复合肥 600 kg hm^{-2}（N∶P_2O_5∶K_2O 质量比 = 15∶10∶10），生育期内不施肥不喷洒农药，灌溉和人工除草等田间管理按当地常规玉米管理措施。长期定位试验每年尽量采用相同的农田管理措施，以便于评价转植酸酶玉米的土壤生态效应。按照转基因玉米环境安全管理要求，该试验区在转基因玉米生长季节之外休耕，休耕期不种植任何其他作物，也不进行施肥等其他农田管理活动。

在田间试验进行 1 a 后进行本研究，分别于 2012 年 6 月 22 日（播种前）、9 月 14 日（抽穗期）、10 月 17 日（成熟期）、2013 年 6 月 13 日（播种前）、8 月 13 日（抽穗期）和 9 月 17 日（成熟期）进行 6 次土壤样品采集。每个小区取 8 次，采样时将玉米植株整株拔出，取贴近根系的土壤，混合成一个根际土壤样品。除去根系和有机残体后，一部分鲜土过 2 mm 筛，用于测定土壤微生物生物量磷、碱性磷酸酶和植酸酶活性；剩余土壤在室内风干，过 100 目筛测定全磷和磷素分级。

1.3　测定指标及方法

土壤磷素形态分级采用 Tiessen 和 Mior 等[18]修正后的 Hedley 等[19]磷素分级方法。Hedley 磷素分级方法是按照土壤磷素活性的高低，提取出不同形态的磷，克服了以往分级方法无法兼顾无机磷和有机磷分级的缺点[20]。该分级方法采用具有不同溶解特性和提取能力的提取剂进行连续浸提，逐级加入去离子水、0.5 mol L^{-1} $NaHCO_3$（pH8.5）溶液、0.1 mol L^{-1} NaOH 溶液、1.0 mol L^{-1}稀 HCl 溶液和浓 HCl 提出土壤稳定性由弱到强的各级磷素形态，其中 $NaHCO_3$、NaOH、浓 HCl 提取态磷又分为无机态和有机态磷，依次为水溶态磷（H_2O-Pi）、碳酸氢钠提取态无机磷（$NaHCO_3$-Pi）、碳酸氢钠提取态有机磷（$NaHCO_3$-Po）、氢氧化钠提取态无机磷（NaOH-Pi）、氢氧化钠提取态有机磷（NaOH-Po）、稀盐酸提取态无机磷（Dil. HCl-Pi）、浓盐酸提取态无机磷（Conc. HCl-Pi）、浓盐酸提取态有机磷（Conc. HCl-Po）和残留态磷（Residual-P），分级中土壤无机磷含量的测定采用钼蓝比色法[21]，各级全磷量用过硫酸钾消解后钼蓝比色法测定，有机磷用各级全磷量减去无机磷量求得。微生物生物量磷采用氯仿熏蒸 – $NaHCO_3$浸提法[22]，全磷用 H_2SO_4 – $HClO_4$消煮法[21]。碱性磷酸酶测定用磷酸苯二钠法[23]；植酸酶活性采用植酸钠为底物，钒钼法测定[15]，在温度 37℃、pH 5.5 条件下，每分钟从浓度为 5 mmol L^{-1}植酸钠溶液中释放 1 μmol 无机磷，即为一个植酸酶活性单位（以 U 表示）。

1.4　数据处理

采用重复测量方差分析（RM-ANOVA）分析时间及其与品种之间的交互影响。基于时间的影响一般达到显著水平，因此在每一采样时间采用 t 检验分析玉米品种对土壤不同磷素形态的影响。如不特别说明，显著水平均为 $p < 0.05$。

2 结 果

2.1 种植转植酸酶玉米对土壤碱性磷酸酶和植酸酶活性的影响

转植酸酶玉米在整个生育期内明显提高植酸酶的活性（图 1a），在 2012 年播种前、2013 年生长季显著提高碱性磷酸酶的活性（图 1b），二者均随采样时间发生显著变化（$p < 0.05$，表 1）。

2.2 种植转植酸酶玉米对土壤微生物生物量磷及不同形态无机磷的影响

与亲本相比，转植酸酶玉米在 2013 年成熟期显著提高了土壤微生物生物量磷（MBP）含量（图 2a），MBP 含量受品种和采样期的显著影响（$p < 0.05$，表 1）。

在多数采样期具有降低水溶态磷（H_2O-Pi）和碳酸氢钠提取态无机磷（$NaHCO_3$-Pi）含量的趋势，尤其在 2012 年播种前和 2013 年抽穗期种植转植酸酶玉米土壤两种形态磷含量显著低于亲本（图 2b 和图 2c）。H_2O-Pi 和 $NaHCO_3$-Pi 含量均随采样时间发生显著变化（$p < 0.05$，表 1）。

种植转植酸酶玉米总体上降低了土壤氢氧化钠提取态无机磷（NaOH-Pi）含量，2012 年播种前和 2013 年抽穗期含量显著低于亲本含量（图 2d），NaOH-Pi 含量随采样时间发生极显著变化（$p < 0.01$，表 1）。

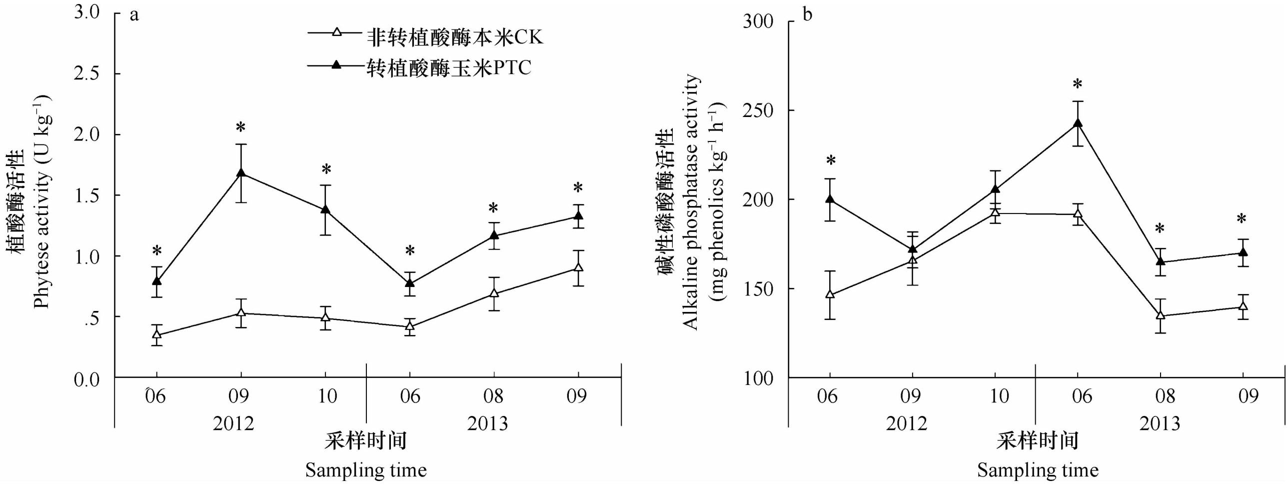

图 1 在不同生长季转植酸酶玉米（PTC）和亲本（CK）种植对植酸酶（a）和土壤碱性磷酸酶（b）活性的影响（平均值 ± 标准误）（$* p < 0.05$，下同）

Fig. 1 Effects of planting phytase transgenic corn (PTC) and isogenic corn (CK) on activites of soil phytase (a) and soil alkaline phosphatase (b) at different growth stages (mean ± SE) ($* p < 0.05$, the same below)

注：2012 年 6 月 - 播种前，2012 年 9 月 - 抽穗期，2012 年 10 月 - 成熟期；2013 年 6 月 - 播种前，2013 年 8 月 - 抽穗期，2013 年 9 月 - 成熟期，下同 Note: June 2012-Before seeding; September 2012-Heading stage; October 2012-Maturity stage; June 2013-Before seeding; August 2013-Heading stage; September 2013-Maturity stage. The same below

表 1 转植酸酶玉米（PTC）和亲本（CK）对土壤植酸酶、磷酸酶、微生物生物量磷和无机磷含量影响的重复测量方差分析结果

Table 1 Repeated-measure ANOVA of the effect of planting phytase transgenic corn (PTC) and isogenic corn (CK) on phytase, alkaline phosphatase activities and contents of MBP, soil inorganic phosphorus ($* p < 0.05$; $** p < 0.01$)

效应 Effect	自由度 df	植酸酶 Phytase	磷酸酶 Phosphatase	微生物生物量磷 MBP	水溶态磷 H_2O-Pi	碳酸氢钠提取态无机磷 $NaHCO_3$-Pi	氢氧化钠提取态无机磷 NaOH-Pi	稀盐酸提取态无机磷 Dil. HCl-Pi	浓盐酸提取态无机磷 Conc. HCl-Pi
品种 Variety	1	38.54**	12.95**	9.88*	1.46	0.70	11.42**	0.53	0.95
采样期 Sampling time	5	33.76**	10.51**	18.59**	8.74**	11.68**	113.2**	27.05**	47.80**
交互作用 Interaction	5	14.65**	12.02**	1.48	1.30	1.45	0.99	1.88	0.33

稀盐酸提取态无机磷（Dil. HCl-Pi）和浓盐酸提取态无机磷（Conc. HCl-Pi）含量与亲本相比没有显著差异（图 2e 和图 2f）；但均随采样时间发生极显著变化（$p < 0.01$，表 1）。两种无机磷含量的年际间变化较大，Dil. HCl-Pi 含量 2013 年明显高于 2012 年，Conc. HCl-Pi 表现则刚好相反，但均未受到转植酸酶玉米的影响。

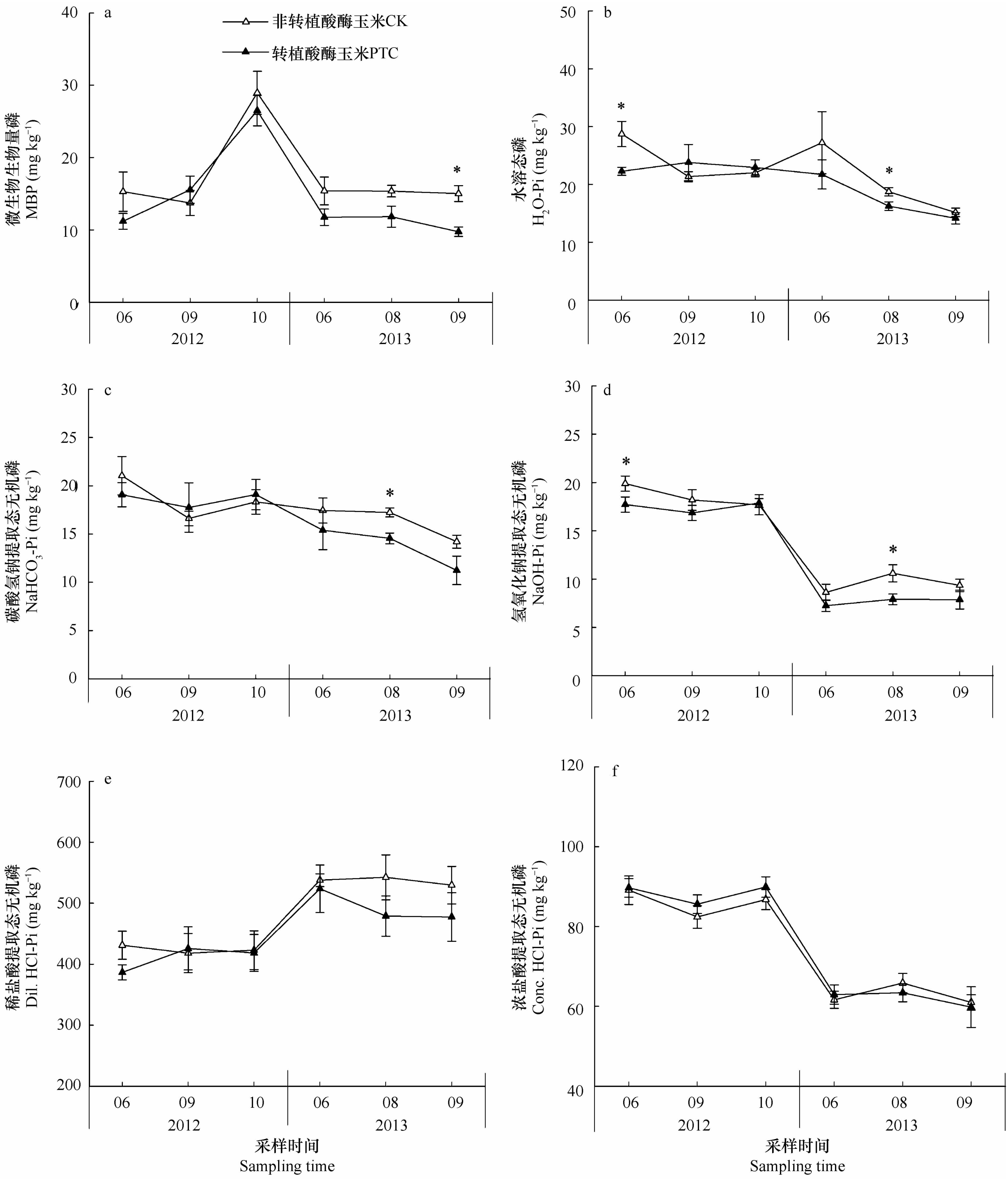

图 2　在不同生长季转植酸酶玉米（PTC）和亲本（CK）种植对微生物生物量磷（a）和土壤无机态磷（b、c、d、e、f）含量的影响（平均值 ± 标准误）

Fig. 2　Effects of planting phytase transgenic corn (PTC) and isogenic corn (CK) on contents of soil MBP (a) and inorganic phosphorus (b, c, d, e, f) at different growth stages (mean ± SE)

2.3 种植转植酸酶玉米对土壤不同形态有机磷的影响

碳酸氢钠提取态有机磷（$NaHCO_3$-Po）含量在 2012 年播种前和 2013 年成熟期显著低于对照（图 3a），氢氧化钠提取态有机磷（NaOH-Po）含量在 2012 年和 2013 年播种前显著低于对照（图 3b）。浓盐酸提取态有机磷（Conc. HCl-Po）在多数采样期有升高的趋势（图 3c）。三种形态的有机磷随采样时间发生显著变化（$p < 0.05$），转植酸酶玉米对土壤 $NaHCO_3$-Po 和 NaOH-Po 含量的影响总体达显著水平，且依赖于采样时间（表 2）。

表 2 转植酸酶玉米（PTC）和亲本（CK）对有机态磷、残留态磷和全磷含量影响的重复测量方差分析结果

Table 2 Repeated-measure ANOVA of the effect of planting phytase transgenic corn (PTC) and isogenic corn (CK) on content of soil organic phosphorus, residual-P and TP content ($* p < 0.05$; $** p < 0.01$)

效应 Effect	自由度 df	碳酸氢钠提取态有机磷 $NaHCO_3$-Po	氢氧化钠提取态有机磷 NaOH-Po	浓盐酸提取态有机磷 Conc. HCl-Po	残留态磷 Residual-P	全磷 TP
品种 Variety	1	9.26*	29.06**	0.13	0.67	0.67
采样期 Sampling time	5	12.10**	127.9**	41.58**	34.01**	28.86**
交互作用 Interaction	5	1.35	5.53**	1.97	3.46*	2.02

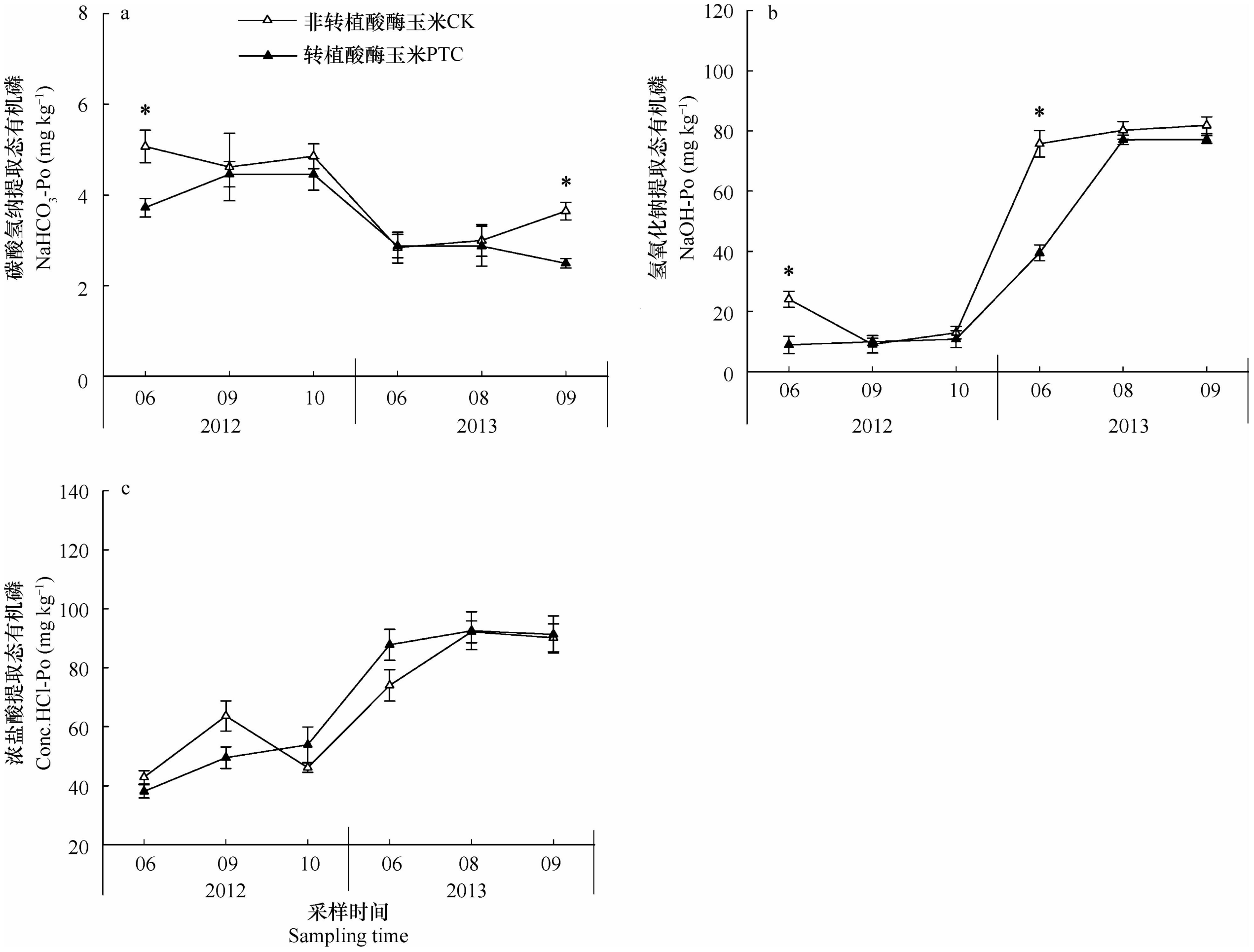

图 3 在不同生长季转植酸酶玉米（PTC）和亲本（CK）种植对土壤有机态磷含量的影响（平均值 ± 标准误）

Fig. 3 Effects of planting phytase transgenic corn (PTC) and isogenic corn (CK) on content of soil organic phosphorus at different growth stages (mean ± SE)

2.4　种植转植酸酶玉米对土壤残留态磷和全磷的影响

残留态磷（Residual-P）含量总体呈降低的趋势（图4a）。随采样时间发生显著变化（$p < 0.05$），处理和采样期的交互作用对 Residual-P 有显著影响（$p < 0.05$，表2）。全磷含量在整个生育期无显著差异，采样期对全磷有显著影响（表2），全磷在整个生育期总体上升高（图4b）。

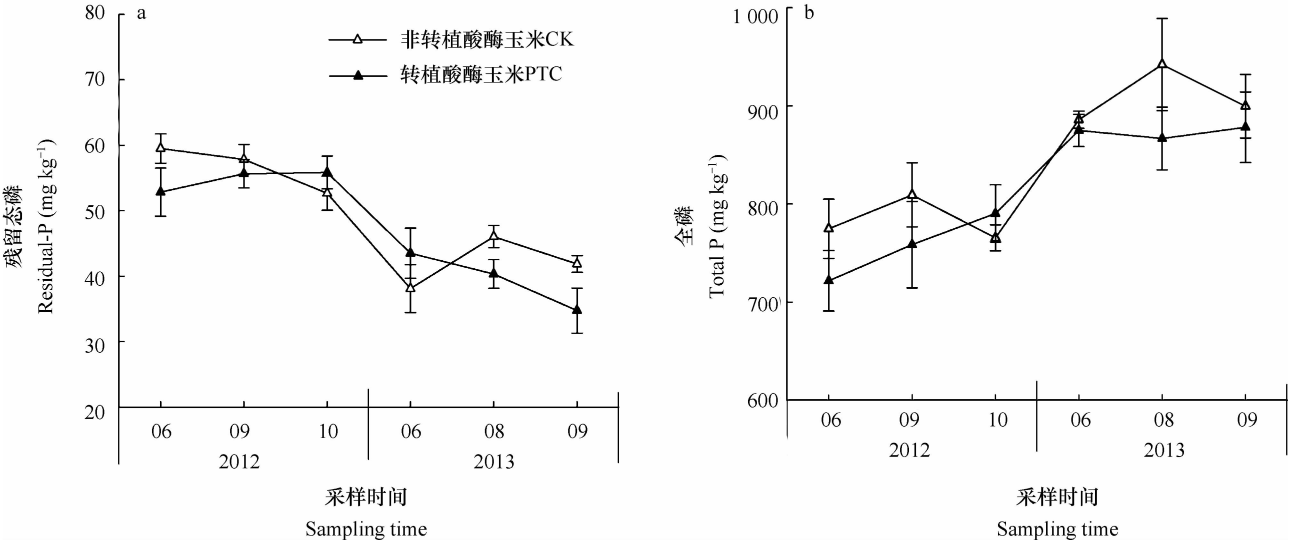

图4　在不同生长季转植酸酶玉米（PTC）和亲本（CK）种植对土壤残留态磷（a）和全磷（b）含量的影响（平均值 ± 标准误）

Fig. 4　Effects of planting phytase transgenic corn and isogenic corn on contents of soil residual-P (a) and total phosphorus (b) at different growth stages (mean ± SE)

3　讨　论

3.1　种植转植酸酶玉米对土壤活性磷的影响

水溶态磷是土壤中活性最高的磷组分，碳酸氢钠提取态无机磷主要是吸附在土壤表面的磷，而碳酸氢钠提取态有机磷主要是易于矿化的有机磷[24]，这3种形态的磷是土壤中生物有效磷的主要部分[24]。本研究中多数采样期转植酸酶玉米均有降低上述高活性磷的趋势，说明这3种形态的植物有效磷是易被转植酸酶玉米吸收或其释放的植酸酶活化。在2012年播种前和2013年抽穗期种植转植酸酶玉米后上述形态磷的含量显著降低，可能是由于转植酸酶玉米自身转入的植酸酶基因，使得植株吸磷量高于亲本，本研究发现转植酸酶玉米在两年田间试验产量均显著高于其亲本产量，如 PTC 在2012年和2013年的产量（平均值 ± 标准误）分别为 9 167 ± 162 kg hm^{-2}和 9 600 ± 115 kg hm^{-2}，而亲本对应的产量分别为 8 179 ± 129 kg hm^{-2}和 8 836 ± 45 kg hm^{-2}，间接证明转植酸酶玉米吸磷量高于亲本，从而导致种植转植酸酶玉米土壤活性磷含量低于亲本土壤含量。在抽穗期转植酸酶玉米通过根系分泌植酸酶旺盛，也会对 $NaHCO_3$-Pi 和 $NaHCO_3$-Po 含量产生显著影响。在自然条件下，由于微生物分解或矿物固定等原因，植酸酶作用不稳定，需要进一步研究克服土壤中的限制因素，才能使转基因植物充分发挥作用[25]。

土壤微生物生物量磷是指土壤中所有活体微生物中所含有的磷，尽管在土壤中含量很低，但是由于周转速度快，因此对调控土壤磷的植物有效性具有十分重要的意义[26]。本研究中转植酸酶玉米土壤微生物生物量磷含量在2012年成熟期大幅度升高，只在2013年成熟期显著低于亲本，可能是由于在玉米生长后期，土壤有效磷含量减少，低磷胁迫会提高植物根系分泌物的活性[27]，其他形态的磷素向 MBP 转化。有研究指出，MBP 含量与土壤 Al-P[28]和磷酸酶活性[29]呈显著的正相关关系。本研究成熟期 MBP 含量低于亲本可能是由于种植转植酸酶玉米和亲本土壤在玉米成熟期碱性磷酸酶活性和中等活性磷含量差异所致。同样，Sarkar 等[30]研究发现 MBP 含量随着转 *Bt* 棉花的生长逐渐升高，并在成熟期达极值。

3.2　种植转植酸酶玉米对土壤中等活性磷的影响

氢氧化钠提取态无机磷和有机磷分别是化学作用吸附于土壤 Fe、Al 表面[19]及腐殖酸和褐菌素等有机磷组成[31]，属于潜在的植物有效磷[32]。本

试验中上述 2 种磷的含量在 2012 年播种前和 2013 年抽穗期受到转植酸酶玉米的显著影响。上一季残留的转植酸酶玉米根系和凋落物在微生物作用下分解释放植酸酶。抽穗期是玉米吸收磷素的最大效率期,玉米对磷素的需求量最大,吸收速度快,这个时期转植酸酶玉米根系分泌释放植酸酶也较多。有报道表明植酸酶对中等活性有机磷有活化作用[16],本试验转植酸酶玉米分泌的植酸酶增加了对土壤有机磷的活化,从而造成中等活性磷的减少,这可能是转植酸酶玉米土壤中等活性磷含量低于亲本的原因之一,与其他转植酸酶基因作物土壤磷素 Hedley 分级结果类似[33]。碱性磷酸酶能显著提高与 Fe、Al 结合的磷素活性[34],且向外分泌植酸酶的多少直接影响根际土壤中磷酸酶的活性[16],本试验种植转植酸酶玉米土壤碱性磷酸酶活性高于亲本活性,这也是种植转植酸酶玉米土壤氢氧化钠提取态磷含量低于亲本含量的另一原因。有研究表明,植物根际有机磷的含量与磷酸酶活性密切相关,根际磷酸酶活性越强,有机磷的含量越低[35]。Subbarao 等[36]研究表明根系分泌物能够溶解 Fe、Al 结合态磷,使其转化为活性较高的磷。种植转植酸酶玉米总体上降低了土壤 NaOH-Pi 含量,增加了土壤 NaOH-Po 含量,可能是由于 NaOH-Pi 作为潜在植物有效磷活化为植物可利用的活性磷形态,而施用化学磷肥可以提高土壤中等活性有机磷的积累[37]。2013 年土壤磷含量较 2012 年增多,其他形态的磷转化为 NaOH-Po 固定在土壤中,这与施用化肥可引起潜在活性有机磷(NaOH-Po)增加的机制相似[38]。

3.3 种植转植酸酶玉米对土壤难溶性磷、残留态磷和全磷的影响

稀盐酸提取态无机磷和有机磷含量在转植酸酶玉米和亲本间无显著差异,2013 年明显高于 2012 年,这可能与上一年度施肥的残余影响有关,即多余的磷肥被固定至稳定形态,这部分磷主要由难溶性的碳酸钙矿物组成,一般不被植物吸收利用,在土壤中也不易被溶解释放,在碱性条件下尤为稳定,碱性磷酸酶和植酸酶很难对其形态产生影响,或作用很小,这与李文华等[39]的结果相似。浓盐酸提取态无机磷与钙结合的比较稳定的无机态磷,主要是一些化学性质十分稳定的有机磷[24],对植物有效性很低。残留态磷在转植酸酶玉米与亲本间无显著差异,但与采样时间有显著交互作用,总体呈下降的趋势,可能是 Residual-P 转变为其他形式的磷,而现有磷分级方法难以检测这种形态的磷[40]。全磷含量在转植酸酶玉米和亲本间没有显著差异,总体呈升高的趋势,可能由于连年磷肥施用产生的影响[41]。其他研究也表明种植转基因作物一般不会对土壤全磷产生明显影响,如王建武等[42]对转 *Bt* 玉米及吴凡等[43]对转 *AtPAP*15 基因大豆的研究。

4 结 论

与亲本相比,种植转植酸酶玉米对土壤磷的影响强烈依赖于采样时间和磷素形态,在特定的玉米生长季种植转植酸酶玉米土壤活性磷(微生物生物量磷、水溶态磷、碳酸氢钠提取态无机磷、碳酸氢钠提取态有机磷)和中等活性磷(氢氧化钠提取态无机磷和有机磷)含量显著低于亲本,而对难溶性磷(稀盐酸提取态无机磷、浓盐酸提取态无机磷和有机磷)和残留态磷、全磷含量没有显著影响。评价转植酸酶玉米种植对土壤磷的影响及机制还需要结合植物和土壤的总体分析及长期定位研究来进一步确定。

参 考 文 献

[1] Peeler H T. Biological availability of nutrients in feeds: Availability of major mineralions. Journal of Animal Science, 1972, 35(3): 695—712

[2] Raboy V. Seeds for a better future: ‘low phytate’ grains help to overcome malnutrition and reduce pollution. Trends in Plant Science, 2001, 6(10): 458—462

[3] Chen R M, Xue G X, Fan Y L, et al. Transgenic maize plants expressing a fungal phytase gene. Transgenic Research, 2008, 17(4): 633—643

[4] Wang S, Tang C H, Zhang J M. The effect of dietary supplementation with phytase transgenic maize and different concentrations of non-phytate phosphorus on the performance of laying hens. British Poultry Science, 2013, 54(4): 466—470

[5] 张军民, 邓丽青, 陈茹梅, 等. 转植酸酶基因玉米对肉仔鸡生长性能及钙磷代谢的影响. 中国兽医学报, 2011, 31(2): 283—287. Zhang J M, Deng L Q, Chen R M, et al. Effect of transgenic phytase corn on growth performance and Ca-P metabolism in broiler (In Chinese). Chinese Journal of Veterinary Science, 2011, 31(2): 283—287

[6] Wang X Q, Wang S, Zhang J M, et al. The effect of dietary supplementation with phytase transgenic corn on growth performance, phosphorus utilization and excretion in growing pigs. Agricultural Science in China, 2011, 10(5): 769—776

[7] 张梦晗, 吴丹, 张军民, 等. 转植酸酶基因玉米植酸酶稳定性的研究. 饲料工程, 2012, 33(10): 32—34. Zhang M H,

Wu D, Zhang J M, et al. Study on the stability of phytase in phytase maize (In Chinese). Feed Industry Magazine, 2012, 33 (10): 32—34

[8] 熊建文，彭瑞，王继瑞，等．转植酸酶基因玉米的研究与安全评价．基因组学与应用生物学，2011，30(2)：251—256. Xiong J W, Peng R, Wang J R, et al. Research progress and safety evaluation of phytase transgenic maize (In Chinese). Genomics and Applied Biology, 2011, 30(2): 251—256

[9] Carpenter S R. Eutrophication of aquatic ecosystems: Bistability and soil phosphorus. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005, 102 (29): 10002—10005

[10] Gomez-Galera S, Rojas E, Sudhakar D, et al. Critical evaluation of strategies for mineral fortification of staple food crops. Transgenic Research, 2010, 19(2): 165—180

[11] 张琪，陈茹梅，范云六，等．组成型表达转植酸酶基因(*phyA*2)玉米的获得．农业生物技术学报，2010，18(4)：623—629. Zhang Q, Chen R M, Fan Y L, et al. The obtaining of transgenic maize plants with *phyA*2 gene constitutive express phytase (In Chinese). Journal of Agricultural Biotechnology, 2010, 18(4): 623—629

[12] George T S, Richardson A E, Li S S, et al. Extracellular release of a heterologous phytase from roots of transgenic plants: Does manipulation of rhizosphere biochemistry impact microbial community structure? FEMS Microbiology Ecology, 2009, 70(3): 433—445

[13] 赵彩云，肖能文，李俊生，等．转植酸酶基因玉米对步甲群落动态的影响．昆虫学报，2013，56(6)：680—688. Zhao C Y, Xiao N W, Li J S, et al. Effect of phytase transgenic maize on the community dynamics of carabid beetles (Coleoptera: Carabidae) (In Chinese). Acta Entomologica Sinica, 2013, 56(6): 680—688

[14] Zhang Y, Liu C X, Wu K M, et al. Phytase transgenic maize does not affect the development and nutrition utilization of *Ostrinia furnacalis* and *Helicoverpa armigera*. Enviromental Entomology, 2010, 39(3): 1051—1057

[15] Lazali M, Zaman-Allah M, Amenc L, et al. A phytase gene is overexpressed in root nodules cortex of *Phaseolus vulgaris*-rhizobia symbiosis under phosphorus deficiency. Planta, 2013, 238: 317—324

[16] 侯文通，陈茹梅，张少军，等．遗传转化的黑曲霉植酸酶基因（*phyA*2）对玉米利用土壤有机磷能力的影响．作物学报，2013，39(8)：1360—1365. Hou W T, Chen R M, Zhang S J, et al. Effect of *Aspergillus niger phyA*2 transgenic maize on utilization of organic phosphorus in soil (In Chinese). Acta Agronomica Sinica, 2013, 39(8): 1360—1365

[17] Richardson A E, Hadobas P A, Hayes J E. Extracellular secretion of *Aspergillus* phytase from *Arabidopsis* roots enables plants to obtain phosphorus from phytate. The Plant Journal, 2011, 25 (6): 641—649

[18] Tiessen H, Mior J Q. Characterization of available P by sequential extraction//Carter M R. Soil sampling and methods of analysis. Boca Raton: CRC Press, 1993: 75—86

[19] Hedley M J, Stewart J W B, Chauhan B S. Changes in inorganic and organic soil phosphorus fraction induced by cultivation practices and by laboratory incubation. Soil Science Society of America Journal, 1982, 46(5): 970—976

[20] 杨芳，何园球，李成亮．不同施肥条件下红壤旱地磷素形态及有效性分析．土壤学报，2006，43(5)：793—799. Yang F, He Y Q, Li C L. Effect of fertilization on phosphorus forms and its availabity in upland red soil (In Chinese). Acta Pedologica Sinica, 2006, 43(5): 793—799

[21] 鲍士旦．土壤农化分析．第 3 版．北京：中国农业出版社，2000. Bao S D. Agricultural chemistry analysis of soil (In Chinese). 3rd ed. Beijing: China Agriculture Press, 2000

[22] Brookes P C, Powlson D S, Jenkinson D S. Measurement of microbial biomass phosphorus in soil. Soil Biology & Biochemistry, 1982, 14(4): 319—329

[23] 杨艳菊，王改兰，张海鹏，等．长期施肥条件下栗褐土碱性磷酸酶活性及其与磷形态的关系．土壤，2013，45(4)：678—682. Yang Y J, Wang G L, Zhang H P, et al. Effects of long-term fertilization on relationship among phosphorus forms in loess Hilly-gully Region (In Chinese). Soils, 2013, 45(4): 678—682

[24] Nwoke O C, Vanlauwe B, Diels J. Assessment of labile phosphorus fractions and adsorption characteristics in relation to soil properties of West-African savanna soils. Agriculture, Ecosystems and Environment, 2003, 100(2): 285—294

[25] 孔凡利，林文量，廖红，等．转枯草芽孢杆菌植酸酶基因烟草对不同介质中植酸磷的吸收利用．应用生态学报，2005，16(12)：2389—2393. Kong F L, Lin W L, Liao H, et al. Phytate-phosphorus uptake and utilization by transgenic tobacco carrying *Bacillus subtilis* phytase gene (In Chinese). Chinese Journal of Applied Ecology, 2005, 16(12): 2389—2393

[26] Kenji K, Yasuhiro T, Tadao A. Measurement of soil microbial biomass phosphorus by an anion exchange membrane method. Soil Biology & Biochemistry, 1995, 27(10): 1353—1357

[27] 李永夫，罗安程，吴良欢．两个基因型水稻利用有机磷的差异及其与根系分泌酸性磷酸酶活性的关系．应用生态学报，2009，20(5)：1072—1078. Li Y F, Luo A C, Wu L H. Difference in P utilization from orgnic phosohate between two rice genotype and its relations with root-secreted acid phosphatase activity (In Chinese). Chinese Journal of Applied Ecology, 2009, 20 (5): 1072—1078

[28] 陈安雷，王凯荣，谢小立，等．不同施肥模式下稻田土壤微生物生物量磷对土壤有机碳和磷素变化的响应．应用生态学报，2007，18(12)：2733—2738. Chen A L, Wang K R, Xie X L, et al. Responses of microbial biomass P to the changes of organic C and P in paddy soils under different fertilization systems (In Chinese). Chinese Journal of Applied Ecology, 2007, 18(12): 2733—2738

[29] 王旭熙，吴福忠，杨万勤，等．栽植生姜对不同种植模式下紫色土微生物生物量及水解酶活性的影响．应用生态学报，2012，23(2)：433—438. Wang X X, Wu F Z, Yang W Q, et al. Variations of microbial biomass and hydrolase in purple soil under different cropping modes sa affected by ginger planting (In

Chinese). Chinese Journal of Applied Ecology, 2012, 23(2): 433—438

[30] Sarkar B, Patra A K, Purakayastha T J. Assessment of biological and biochemical indicators in soil under transgenic Bt and non-Bt cotton crop in a sub-tropical environment. Environmental Monitoring and Assessment, 2009, 156(1/4): 595—604

[31] Wang G P, Liu J S, Wang J D. Soil phosphorus forms and their variations in depressional and ripapian fresh-water wetlands (Sanjiang Plain, Northeast China). Geoderma, 2006, 132(12): 59—74

[32] Zhang T Q, Kenzie A F, Liang B C. Soil test phosphorus and phosphorus fractions with long-term phosphorus addition and depletion. Soil Science Society of America Journal, 2004, 68(2): 519—528

[33] George T S, Simpson R J, Hadobas P A, et al. Expression of a fungal phytase gene in Nicotiana tabacum improves phosphorus nutrition of plants grown in amended soils. Plant Biotechnology Journal, 2005, 3: 129—140

[34] Waldrip H M, He Z, Erich M S. Effects of poultry manure amendment on phosphorus uptake by ryegrass, soil phosphorus fractions and phosphatase activity. Biology and Fertility of Soils, 2011, 47: 407—418

[35] Tarafdar J C, Jungk A. Phosphate activity in the rhizosphere and its relation to the depletion of soil organic phosphorus. Biology and Fertility of Soils, 1987, 3: 199—204

[36] Subbarao G V, Ae N, Otani T. Genotypic variation in iron-, and aluminum-phosphate solubilizing activity of pigeonpea root exudates under P deficient conditions. Soil Science and Plant Nutrition, 1997, 43(2): 295—305

[37] 李想, 刘艳霞, 徐阳春, 等. 无机有机肥磷配施对作物产量及土壤磷形态的影响. 土壤, 2013, 45(4): 641—647. Li X, Liu Y X, Xu Y C, et al. Interactive effects of combining inorganic and organic fertilizers on grain yields and phosphorus forms (In Chinese). Soils, 2013, 45(4): 641—647

[38] 梁宏玲, 石磊, 徐芳森. 甘蓝型油菜不同磷效率基因型对土壤难溶性磷吸收利用的差异. 中国油料作物学报, 2007, 29(3): 297—301. Liang H L, Shi L, Xu F S. The difference in uptake and utilization of soil insoluble phosphorus for various P efficient genotypes in Brassica napus (In Chinese). Chinese Journal of Oil Crop Science, 2007, 29(3): 297—301

[39] 李文华, 邵学明, 吴明, 等. 杭州湾潮滩湿地土壤碱性磷酸酶活性分布及其与磷形态的关系. 环境科学学报, 2013, 33(12): 3341—3349. Li W H, Shao X M, Wu M, et al. Soil alkaline phosphatase activity and its relationship with phosphorus forms of Hangzhou Bay Intertidal Wetland (In Chinese). Acta Scientiae Circumstantiae, 2013, 33(12): 3341—3349

[40] Alamgir M, McNeill A, Tang C. Changes in soil P pools during legume residue decomposition. Soil Biology & Biochemistry, 2012, 49: 70—77

[41] 陈波浪, 盛建东, 蒋平安. 磷肥种类和用量对土壤磷素有效性和棉花产量的影响. 棉花学报, 2010, 22(1): 49—56. Chen B L, Sheng J D, Jiang P A. Effect of applying different forms and rates of phosphoric fertilizer on phosphorus efficiency and cotton yield (In Chinese). Cotton Science, 2010, 22(1): 49—56

[42] 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. 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 (In Chinese). Chinese Journal of Applied Ecology, 2005, 16(3): 524—528

[43] 吴凡, 林桂潮, 吴坚文. 转 *AtPAP*15 基因大豆种植对根际土壤养分及酶活性的影响. 土壤学报, 2013, 50(3): 600—608. Wu F, Lin G C, Wu J W. Effect of planting *AtPAP*15 transgenic soybeans on soil nutrients and enzyme activities in rhizosphere (In Chinese). Acta Pedologica Sinica, 2013, 50(3): 600—608

EFFECTS OF PHYTASE TRANSGENIC CORN ON CONTENT AND COMPOSITION OF PHOSPHORUS IN RHIZOSPHERE SOIL UNDER FIELD CONDITIONS

Zheng Jiawei[1] Chen Fajun[2] Liu Manqiang[1†] Zhao Zongchao[2] Fan Zhenzhen[1] Zhou Shizhu[1] Hu Feng[1]

(1 *Soil Ecology Lab*, *College of Resources and Environmental Sciences*, *Nanjing Agricultural University*, *Nanjing* 210095, *China*)

(2 *College of Plant Protection*, *Nanjing Agricultural University*, *Nanjing* 210095, *China*)

Abstract Phosphorus (P) is one of the mineral elements essential to growth of all animals. However, corn as a major source of energy and feed to animals, is fairly low in content of P available to monogastric animals and about 80% of the phosphorus in corn is phytate-P. In monogastric animals, phytate-P is very low in utilization rate because the animals lack endogenous phytase. Therefore, inorganic P is routinely added to the feed of the animals to satisfy their requirement for P, As a result, a unutilized portion of the dietry P is excreted with faeces of the animals, thus polluting the soil and water sources. Moreover, phytic acid is also a kind of anti-nutritional factor that seriously affects animal uptake of Ca, Fe, Zn, and some other nutrient elements. Supplementation of exogenous phytase extracted from microbial fementation into feed has been considered to be one of the most effective ways to reduce P output. However, the extraction of phytase is rather costly, thus limiting its extensive commercial use. Phytase genes of *Aspergillus niger* were transferred into the endosperm of corn, turning out corn seeds that contain *Aspergillus niger* phytase. After generations of breeding and screening, obtained was a corn homozygous line of phytase transgenic corn (PTC) that is able to stably express phytase and inherite stably generation after generation. Feeding this kind of corn can improve P utilization rate of monogastric animals and reduce P content in their faeces, thus eliminating P pollution of the environment. Compared with conventional corn, PTC planted in the field may have some potential risks. However, phosphorus is a nutrient element essential to crops and an important pollutant as well deteriorating water environments. Commercial plantation of PTC has aroused ecological concerns with respect to potential effect on content and composition of soil P. On the one hand, PTC may directly affect soil P level through release of phytase into the soil, and on the other hand, the changes in chemical composition or quality of crop residues, like roots and straw left in the soil may have some effect on soil biological communities and biocheminca1 activity of the soil, thus in the end affecting the processes of fixation and mineralization-release of soil inorganic and organic P. Therefore, theoretically planting PTC will generate some effect on soil P transformation processes, and in turn further alter soil fertility of the field and quality of its surrounding water bodies. Nevertheless, to our knowledge, little has been reported on effects of planting PTC on soil P. A field experiment started in 2011, planting phytase transgenic corn (BVLA430101) and isogenic corn (Yingyu 35), separately, as Treatment PTC and Treatment CK, each of which has 5 replicates, making up a total of 10 plots. Soil samples were collected at different corn growing stages in 2012 and 2013 for analysis using the modified Hedley phosphorus fractionation method to investigate effects of planting PTC on content and compositions of soil P. Results show that the effects of PTC on soil P varied with timing of sampling and fraction of P. The soil in Treatment PTC was much lower than the soil in Treatment CK in content of water soluble P (H_2O-Pi), NaOH extractable inorganic P (NaOH-Pi) and NaOH extractable organic P (NaOH-Po) before seeding in 2012 and at the heading stage in 2013, and in content of $NaHCO_3$ extractable organic P ($NaHCO_3$-Po) before seeding in 2012 and at the maturing stage in 2013. However, the two soils differed significantly in content of microbial biomass P (MBP) only at the maturing stage in 2013. Growing PTC had no significant effects on the contents of total P (TP), diluted HCl extractable inorganic P (Dil. HCl-Pi), concentrated HCl extractable inorganic P (Conc. HCl-Pi), concentrated HCl extractable organic P (Conc. HCl-Po) and residual P (Residual-P). The soil in Treatment PTC was much higher than the soil in Treatment CK in phytase activity throughout the two corn growing seasons, and in alkaline phosphatase activity as well before seeding in 2012 and during the whole corn growing season in 2013. Anyway, growing PTC three years in row had some effects on contents of labile P and moderately labile P and activity of alkaline phosphatase in the soil only at certain growth stages, and significant effects on phytase activity during the two corn growing seasons. It is, therefore, necessary to take into account the crop and the soil related in evaluating effects of planting PTC on soil P and studying mechanisms of the effects, and what is more, to maintain long term monitoring at different sites.

Key words Transgenic crops; Phytase; Field experiment; Soil phosphorus fractionation; Ecological assessment

（**责任编辑**：汪枞生）