

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*  
55 (3) :358 – 365; 4 March 2015  
ISSN 0001 – 6209; CN 11 – 1995/Q  
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn  
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.20140270

## 转 BT + CPTI 基因抗虫棉的种植对土壤根际反硝化菌丰度和多样性影响

董莲华<sup>1</sup>, 孟盈<sup>2</sup>, 王晶<sup>1</sup>

<sup>1</sup>中国计量科学研究院, 北京 100013

<sup>2</sup>湖北省计量研究院, 湖北 武汉 430223

**摘要:** 【目的】为评价转基因棉花的种植对根际土壤反硝化细菌丰度和多样性的影响, 【方法】以转 Bt + CpTI 基因抗虫棉 (SGK321) 及非转基因亲本棉花石远 321 (SY321) 根际土壤反硝化细菌为研究对象, 分别在种植前和棉花的不同生长时期 (蕾期、花期、铃期和絮期) 取样。采用实时荧光定量 PCR 方法和末端标记限制性片段多态性 (T-RFLP) 技术对土壤中反硝化细菌的功能基因 *nosZ* 基因进行定量和多样性分析。【结果】结果发现随棉花不同生长时期两种棉花根际土壤中的反硝化细菌丰度均发生显著变化, 但变化趋势不同。转基因棉花根际土壤反硝化细菌从种植前的  $3.12 \times 10^6$  copies/g dry soil 一直增加到铃期的  $2.81 \times 10^7$  copies/g dry soil, 增加了 8 倍。非转基因棉花根际土壤反硝化细菌丰度变化受生长周期影响更为显著, 表现为蕾期增加, 花期降低, 铃期又增加的趋势。典范相关及部分典范相关分析反硝化细菌多样性结果表明其多样性受环境因素 pH、硝酸根浓度以及棉花生长时期 (蕾期和花期) 影响最为显著, 但此外棉花品种也起到了非常重要的作用, 【结论】反硝化细菌的丰度和多样性既受棉花生长时期的影响, 同时也受棉花品种的影响, 转基因棉花通过调节根际土壤中的 pH 和硝酸根浓度, 来影响其多样性和丰度。转 Bt + CpTI 基因抗虫棉的种植增加了土壤 pH, 从而导致根际土壤反硝化细菌的多样性和丰度增加。

**关键词:** 实时荧光定量 PCR, 反硝化细菌, 转 Bt + CpTI 基因棉花, 石远 321, *nosZ* 基因, 末端标记限制性片段多态性 (T-RFLP)

中图分类号: Q938 文章编号: 0001-6209 (2015) 03-0358-08

随着转基因棉花的大面积种植, 转基因棉花对土壤微生物群落结构的影响逐渐成为研究热点。已有研究报道转基因棉花的多个品系其残体可以改变土壤微生物的群落组成, 表现为导致土壤细菌、真菌的数量增加<sup>[1-2]</sup>, 也有研究报道转基因作物对土壤

微生物群落结构没有显著影响<sup>[3]</sup>。然而, 要全面评价转基因植物对土壤微生物的影响, 在研究整体微生物群落的基础上, 还应选取指示性微生物种群或生物过程作为代表来研究转基因植物对其影响, 如参与氮循环的氨氧化细菌和反硝化菌, 可作为指示

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31100084); 中国计量科学研究院基本科研业务费 (AKY1323-13)

作者简介: 董莲华 (1981 -), 女, 河北保定人, 博士, 副研究员, 主要从事环境微生物与生物计量研究。Tel/Fax: +86-10-64525069; E-mail: donglh@nim.ac.cn

收稿日期: 2014-05-22; 修回日期: 2014-09-25

性微生物加以研究, 这样可以更加准确和快速的判断转基因植物对土壤微生物是否有影响。

反硝化细菌是参与反硝化作用的重要功能微生物, 氧化二氮还原酶 (nitrous oxidere ductase, *nosZ*) 反硝化细菌的关键酶, 目前多数研究者通过研究 *nosZ* 基因多样性来探讨反硝化细菌的群落结构和多样性。研究 *nosZ* 基因丰度多采用实时荧光定量 PCR 技术<sup>[4]</sup>, 研究 *nosZ* 基因多样性多采用的技术包括基因克隆文库<sup>[5]</sup>、PCR-RFLP<sup>[6-7]</sup>、T-RFLP<sup>[8]</sup> 和 PCR-DGGE<sup>[9]</sup> 等, 这些研究对不同环境中的 *nosZ* 基因进行了分析, 例如森林土壤<sup>[10]</sup>、草地<sup>[11]</sup>、耕地<sup>[9-12]</sup> 和湿地<sup>[8]</sup> 等, 研究发现反硝化细菌具有明显的多样性。但是利用这些技术研究转基因棉花根际土壤中反硝化细菌的丰度和多样性还未见报道。

转 Bt + CpTI 基因双价抗虫棉, 与单价抗虫棉花相比, 由于其抗性更持久, 因此逐渐取代了单价抗虫棉的种植, 成为我国种植面积最广的转基因棉花。我们在前期的研究中发现转 Bt + CpTI 基因棉花对土壤总细菌数量没有显著影响, 但是对土壤中氨氧化细菌丰度有显著影响<sup>[13]</sup>, 表明转基因棉花的种植可能对丰度低的功能菌产生影响, 从而影响土壤生态系统的功能。本研究从功能微生物反硝化细菌入手, 目的在于研究转 Bt + CpTI 基因抗虫棉的种植对土壤根际反硝化细菌的丰度和多样性的影响, 进而揭示其对氮循环的作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要试剂和仪器

土壤 DNA 提取试剂盒购自美国 MOBIO 公司;

实时荧光定量 PCR 扩增试剂盒购自美国 AB 公司; 引物和探针均由上海英俊公司合成。PCR 仪 (AB9700)、离心机 (Sigma 3k-15)、微量分析天平 (Metler toledo xp205)、NanoDrop2000、水浴摇床等。

### 1.2 土壤样品采集

土壤样品采自中国农业科学院北京平谷区棉花生物技术育种试验基地, 选取种植转 Bt + CpTI 基因抗虫棉花 (SGK321) 及非转基因亲本棉花石远 321 (SY321) 2 个大田, 每个棉田面积约 20 m × 30 m。于 2012 年 5 月 11 日播种。采用 3 点取样法, 分别在棉田的两端和中间取样。采样时间设置为棉花种植前 (对照)、蕾期、花期、铃期和絮期。非根际土壤的采集: 取土壤表层以下 5 cm - 15 cm, 去除根系后土壤作为非根际土。根际土壤采集: 在棉田的每个点取 3 株棉花, 将根系挖出, 抖落大块土, 收集附着在根系上的土壤混合均匀作为根际土壤装入保鲜袋中带回实验室, 放于 -20℃ 保存。

### 1.3 土壤理化性质

供试土壤的理化性质, 包括全氮、有机碳、有效磷、硝态氮和铵态氮的测定方法及测定结果见前期的相关研究和表 1<sup>[13]</sup>。土壤 pH 测定方法: 将不同时期采取的根际土壤自然风干后, 取 0.5 g 根际土加入 5 mL 水, 充分混匀, 测定悬浊液的 pH 值。

### 1.4 DNA 提取

采用土壤 DNA 提取试剂盒 (MOBIO DNA Extraction kit, MOBIO Laboratories Inc., Carlsbad, CA) 提取根际土壤基因组 DNA, 最终溶于 TE<sub>0.1</sub> (10 mmol/L Tris, 0.1 mmol/L EDTA, pH 8.0)。提取的土壤 DNA 用 Nanodrop2000 (Thermo Fisher) 初步测定 DNA 浓度, 通过测定 A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> 的比值来判断 DNA 的纯度。

表 1. 供试土壤理化性质

Table 1. Soil physical and chemical property

Sample	Total N / (g/kg)	Organic carbon / (g/kg)	Available phosphate / (mg/kg)	pH
SY1	1.65	13.0	233.67	6.1
SGK1	1.00	10.2	72.80	6.3

表 2. 荧光定量 PCR 扩增的引物和探针序列

Table 2. Primer and probe sequence and concentration for quantitative PCR

Primers/Probe	Target/Aim	Sequence (5'→3')	Concentration / (nmol/L)	Product size / bp	Reference
nosZ-F	qPCR	WCSYGTTCMTCGACAGCCAG	200	259	[3]
nosZ-R	qPCR	ATGTCGATCARCTGVKCRTTYTC	400		
nosZ-F	T-RFLP	FAM-CGYGTTCMTCGACAGCCAG	400	700	[14]
nosZ-R	T-RFLP	CATGTGCAGNGCRTGGCAGAA	600		

## 1.5 实时荧光定量 PCR 定量分析 *nosZ* 基因拷贝数

采用 SYBR Green 实时荧光定量 PCR 方法对反硝化细菌中的一氧化二氮还原酶基因 *nosZ* 进行扩增。25  $\mu\text{L}$  反应体系中包括 12.5  $\mu\text{L}$  的 2  $\times$  Fast SYBR Green Master Mix (Life technology), 正向引物和反向引物 (浓度和序列见表 2), 以及 5  $\mu\text{L}$  的 DNA 模板。PCR 扩增的热循环条件为第一步预变性: 95 $^{\circ}\text{C}$ , 5 min。第二步是 6 个循环的降落 PCR: 95 $^{\circ}\text{C}$ , 15 s; 67–62 $^{\circ}\text{C}$ , 30 s; 2 $^{\circ}\text{C}$ , 45 s; 80 $^{\circ}\text{C}$ , 15 s。第三步 39 个循环: 95 $^{\circ}\text{C}$ , 15 s; 62 $^{\circ}\text{C}$ , 20 s; 72 $^{\circ}\text{C}$ , 30 s; 80 $^{\circ}\text{C}$ , 15 s。第四步溶解曲线: 95 $^{\circ}\text{C}$ , 15 s; 60 $^{\circ}\text{C}$ , 20 s。

## 1.6 末端标记限制性片段多态性分析 (T-RFLP) *nosZ* 基因多样性

通过对一氧化二氮还原酶基因 *nosZ* 基因的末端标记限制性片段多态性分析 (T-RFLP) 来揭示反硝化细菌的多样性。50  $\mu\text{L}$  反应体系中包括 25  $\mu\text{L}$  的 2  $\times$  Environmental Master Mix (Life technology), 正向引物和反向引物 (浓度和序列见表 1), 以及 10  $\mu\text{L}$  的 DNA 模板。PCR 扩增的热循环条件为降落 PCR: 第一步预变性: 95 $^{\circ}\text{C}$ , 5 min; 第二步是 10 个循环的降落 PCR: 变性 95 $^{\circ}\text{C}$ , 30 s, 退火 58–53 $^{\circ}\text{C}$ , 1 min, 延伸 72 $^{\circ}\text{C}$ , 1 min; 第三步 25 个循环: 变性 95 $^{\circ}\text{C}$ , 30 s, 退火 53 $^{\circ}\text{C}$ , 1 min, 延伸 72 $^{\circ}\text{C}$ , 1 min。扩增产物 4  $\mu\text{L}$  进行 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳。每个样品进行 3 个 PCR 重复, 扩增完成后将 3 个重复共 150  $\mu\text{L}$  混匀, 利用天根生化的胶回收试剂盒进行 PCR 产物纯化, 最后溶解至 50  $\mu\text{L}$  的无菌水中。

纯化的 PCR 产物利用 *Hha* I (GCG' C) 于 37 度酶解 3 h。50  $\mu\text{L}$  酶解体系: 15  $\mu\text{L}$  PCR 产物, 0.5  $\mu\text{L}$  的 10 U/ $\mu\text{L}$  的酶, 5  $\mu\text{L}$  10  $\times$  酶解缓冲液, 用无菌水补足。酶解产物经过纯化后与 0.3 mL GeneScan ROX 500 分子量标准 (Applied Biosystems, NJ, USA) 和 10 mL 甲酰胺混合后, 利用 ABI PRISM 3100-Avant 基因分析仪的 (Applied Biosystems, NJ, USA) GeneScan 功能进行片段长度分析。得到的数据结果利用软件 GENE MAPPER (version 1.6, Applied Biosystems, NJ, USA) 进行分析, 以峰面积为纵坐标, 以片段长度为横坐标, 对样品中的标记片段 (TRF) 进行分析。只有在 45–600 bp 的 TRFs 且峰高大于 80 个荧光单位的峰才被看做目标峰进行分析<sup>[15]</sup>。

## 1.7 统计结果分析

采用生态分析软件 CANOCO (Microcomputer Power, Ithaca, N. Y.) 分析反硝化细菌多样性以及与环境因素的相关性。分别利用相关性分析 (correspondence analysis, CA)、典范相关性分析 (canonical correspondence analysis, CCA) 和部分典范相关性分析 (partial CCA, pCCA)<sup>[16–17]</sup> 对 *nosZ* 基因的多样性与环境因素进行分析。为了降低环境噪声, 只有超过 10% 的样品中均含有的 TRFs 才用于 CA、CCA 和 pCCA 分析。Monte Carlo permutation 测试用于检验环境与反硝化细菌多样性之间相关性的显著程度<sup>[17]</sup>。

## 2 结果分析

### 2.1 反硝化细菌丰度变化

通过定量分析棉花不同生长时期的根际反硝化细菌中的 *nosZ* 基因拷贝数来反映反硝化细菌的丰度变化, 结果见图 1-A。在种植前期 (Pre-planting) 两者土壤中的反硝化细菌数量差异显著, 种植非转基因棉花 (SY321) 的土壤中反硝化细菌数量为  $5.98 \times 10^6$  copies/g dry soil, 种植转基因棉花 (SGK321) 的土壤中反硝化细菌的数量为  $3.12 \times 10^6$  copies/g dry soil。在芽期 (Budding), 两者土壤中的反硝化细菌数量均增加了, SY321 增加至  $1.63 \times 10^7$  copies/g dry soil, 而 SGK321 增加至  $7.28 \times 10^6$  copies/g dry soil。在花期 (Flowering), SY321 显著降低至  $2.72 \times 10^6$  copies/g dry soil, 而 SGK321 继续增加至  $9.53 \times 10^6$  copies/g dry soil。在铃期 (Belling), SY321 又显著增加了 4.5 倍, 增加至  $1.52 \times 10^7$  copies/g dry soil, 而 SGK321 继续增加至  $2.81 \times 10^7$  copies/g dry soil。在絮期 (Boll opening), SY321 根际反硝化细菌数量没有显著变化, 而 SGK321 的数量显著降低至  $1.54 \times 10^7$  copies/g dry soil。具体变化见图 1。由此可见, 转基因棉花和非转基因棉花根际反硝化细菌数量变化趋势不同: 种植非转基因棉花的根际土壤中反硝化细菌数量先增加后降低, 之后又增加, 随棉花生长周期变化比较显著, 而转基因棉花根际土壤中反硝化细菌的数量从种植前至铃期一直呈增加的趋势, 但在絮期显著降低了 1 倍左右。

### 2.2 土壤 pH 变化

棉花不同生长时期的土壤 pH 值测定结果见图

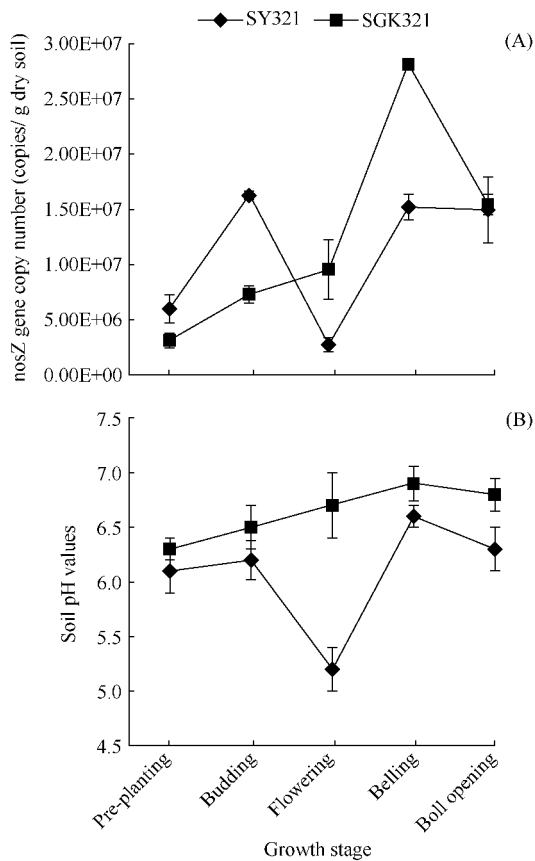


图 1. 转基因棉花 (SGK321) 与非转基因棉花 (SY321) 根际土壤中反硝化细菌的氧化亚氮还原酶基因拷贝数变化 (A) 及土壤 pH 变化 (B)

Figure 1. Changes of *nosZ* gene copy number of denitrifier (A) and soil pH (B) in rhizosphere of transgenic cotton (SGK321) and non-transgenic cotton (SY321).

1-B. 在种植前两种土壤的 pH 没有显著差异。在蕾期, 转基因棉花 (SGK321) 根际土壤中的 pH 增加, 但与非转基因棉花 (SY321) 根际土壤中 pH 还没有达到显著差异。在花期, SY321 根际土壤中 pH 显著降低, 而 SGK321 根际土壤中的 pH 继续增加, 两种棉花根际土壤中的 pH 达到显著差异。在铃期, SGK321 根际土壤中 pH 继续增加至最高值, SY321 根际土壤中的 pH 也显著增加, 但仍然显著低于 SGK321 根际土壤 pH。在絮期, 两种根际土壤中的 pH 均降低了, 但 SGK321 根际土壤 pH 仍显著高于 SY321 根际土壤中的 pH。

### 2.3 反硝化细菌多样性变化

采用典范相关性分析 (CCA) 反硝化细菌的群落结构多样性结果见图 2。CCA 分析中, 第一个轴解释了 49% 的总变量, 前两个轴解释了大部分

(65.9%) 的总变量。从样品分布图 (图 2-A) 可以看出, 非转基因棉花 SY321 (NON-GM) 根际土壤反硝化细菌的多样性在种植前 (Pre)、蕾期 (Bud) 和花期 (Flower) 与其他时期以及转基因棉花 SGK321 (GM) 所有时期的多样性显著不同。从 TRF 分布图 (图 2-B) 也可以看出: 多数的 TRF 都分布在 SGK321 根际土壤中以及 SY321 的铃期和絮期根际土壤中, 而在种植前、蕾期和花期, 可检测到的 TRF 非常少, 即多样性低。

环境因素分布图 (图 2-C) 中, 箭头越长, 代表该因素的作用越显著。由图可知, pH、蕾期 (Bud)、花期 (Flower) 和硝酸根浓度 ( $\text{NO}_3^-$ ) 是 CCA 分析中最显著的环境因素。反硝化细菌的数量 (*nosZ*) 与 pH 正相关: pH 越高, 反硝化细菌的丰度越高。从 TRF 分布图还可看出 pH 越高, 反硝化细菌的多样性也越丰富。因此 pH 是决定反硝化细菌数量和丰度的一个重要环境因素。反硝化细菌的丰度与花期以及硝酸根离子浓度负相关, 这与上述花期时, SY321 根际土壤中反硝化细菌数量最低的结果一致。反硝化细菌的数量与硝酸根离子浓度负相关, 表明反硝化细菌的数量增加, 加快了硝酸根的转化, 从而导致硝酸根浓度的降低。此外, 转基因棉花 (GM) 与非转基因棉花 (NON-GM) 作用负相关, 表明两种棉花对根际土壤反硝化细菌的作用相反, 但由于 pH、硝酸根浓度以及蕾期和花期对反硝化细菌的影响作用更大, 从而掩盖了棉花品种的影响。

将棉花的生长周期中作用最显著的蕾期 (Bud) 和花期 (Flower) 作为共变量, 进行部分典范相关分析 (pCCA), 可以进一步揭示一些被掩盖的环境因素的作用。部分典范相关分析反硝化细菌的多样性结果见图 3。pCCA 分析中, 第一个轴解释了 53% 的总变量, 比 CCA 分析中增加了 4%, 而第二个轴解释的与 CCA 分析的第二个轴解释的总变量基本一致。由样品分布图 (图 3-A) 可知, 所有的样品被显著分成了两组, 一组是 SGK321 转基因棉花 (GM) 根际土壤样品, 另外一组是 SY321 非转基因棉花 (NON-GM) 根际土壤样品。这表明转基因棉花与非转基因棉花根际土壤中的反硝化细菌多样性差异显著。从 TRF 分布图 (图 3-B) 可知, 非转基因棉花根际土壤中的反硝化细菌多样性较低, 而转基因棉花根际土壤中的反硝化细菌多样性丰富。

进一步分析环境因素对反硝化细菌的影响 (图

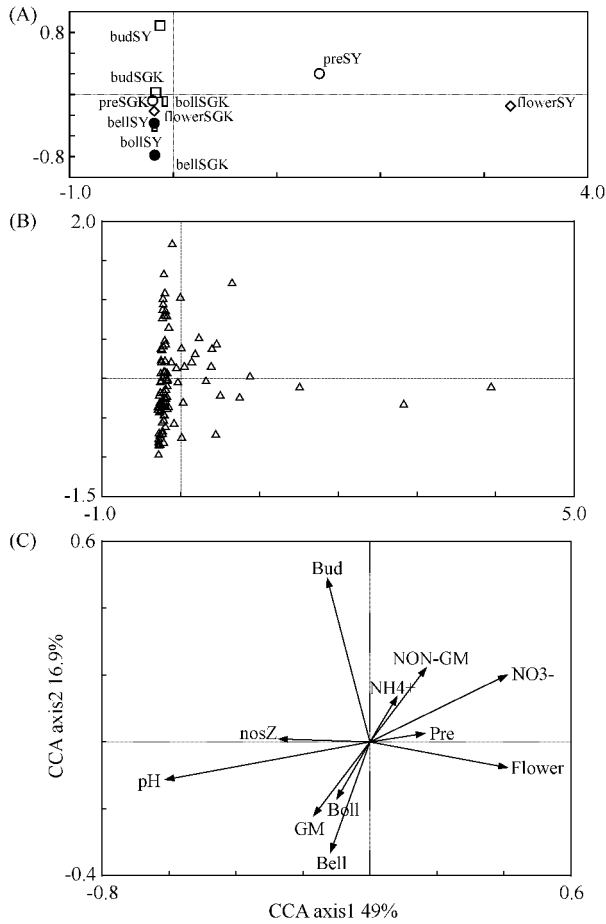


图 2. 典范相关分析转基因棉花 (SGK321) 与非转基因棉花 (SY321) 根际土壤中反硝化细菌的末端标记限制性片段长度多样性

Figure 2. Canonical correspondence analysis (CCA) of *nosZ* TRFLP profile of denitrifier in rhizosphere of transgenic cotton (SGK321) and non-transgenic cotton (SY321). A: sample plot; B: T-RF plot; C: environmental variable plot.

3-C)可以看出,将蕾期和花期作为共变量后,棉花品种的影响作用凸显出来了,转基因 (GM) 和非转基因 (NON-GM) 两个因素变成了最为显著的因素,并且彼此严格负相关。这表明转基因棉花的种植对土壤反硝化细菌的多样性产生了显著影响,并且与非转基因棉花的作用不同。

### 3 讨论

转基因棉花对土壤微生物的影响这方面的报道很多<sup>[1-2]</sup>,但从功能微生物角度去揭示转基因棉花对土壤微生物的真正影响的研究还未多见<sup>[13]</sup>。从对整体微生物的关注逐渐向对功能微生物的关注,

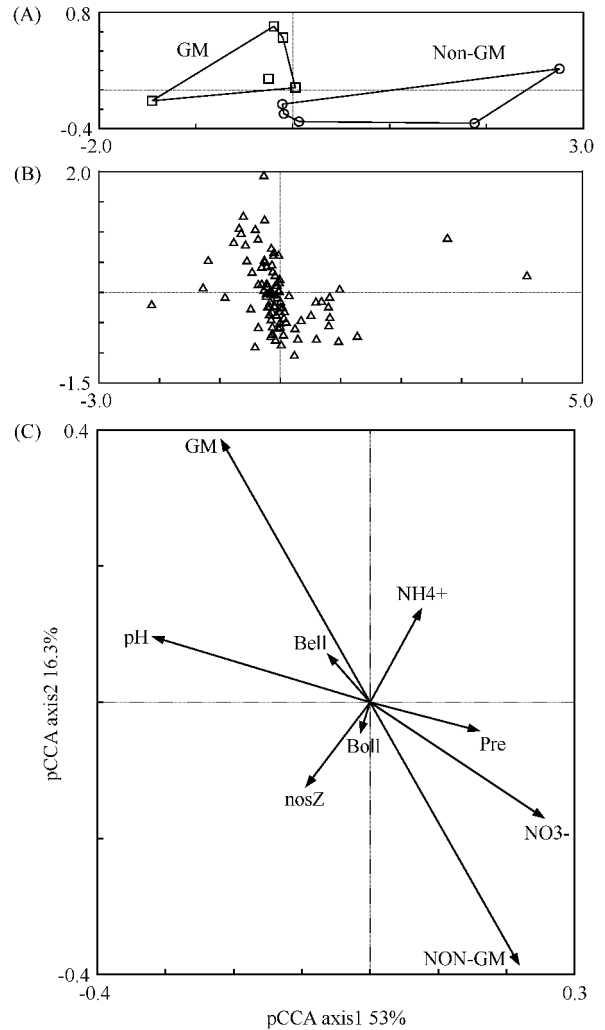


图 3. 部分典范相关分析转基因棉花 (SGK321) 与非转基因棉花 (SY321) 根际土壤中反硝化细菌的末端标记限制性片段长度多样性

Figure 3. Partial canonical correspondence analysis (pCCA) of *nosZ* TRFLP profile of denitrifier in rhizosphere of transgenic cotton (SGK321) and non-transgenic cotton (SY321). A: sample plot; B: T-RF plot; C: environmental variable plot.

这也是对转基因作物生态风险评价研究的进一步深化和提升。之前的一些研究结果表明转基因作物对整体微生物数量没有显著影响,但并不代表转基因作物对一些功能微生物也没有影响。如董莲华等<sup>[13]</sup>报道转基因棉花对土壤中总细菌数量没有明显作用,但是对参与氮循环的氨氧化细菌的数量影响作用显著。导致这一矛盾的原因是氨氧化细菌占总细菌的丰度非常低,约为 0.01% - 0.1%,因此氨氧化细菌这样低的丰度的变化很难直接表现为总细菌丰度的变化,因此如果仅针对总细菌的丰度进行

检测,就有可能忽略丰度低但作用非常关键的功能微生物的变化。

本研究中参与氮循环中反硝化作用的关键微生物反硝化细菌的氧化二氮还原酶的功能基因 *nosZ* 的丰度进行监测,发现在棉花的不同生长期, *nosZ* 基因的丰度均会发生显著变化,但转基因棉花与非转基因棉花根际土壤中的反硝化细菌 *nosZ* 基因丰度变化趋势不同。这表明转基因棉花的种植对反硝化细菌丰度的变化起到了一定的作用。李孝刚<sup>[18]</sup> 研究发现转基因抗虫棉对土壤微生物群落数量影响随着棉花生长期的不同,反硝化细菌数量呈显著的季节性变化。但是,与常规棉田相比,连续多年种植转基因抗虫棉对土壤反硝化细菌数量没有显著影响。此外,王成鹏<sup>[19]</sup> 采用可培养法研究转基因棉花土壤中反硝化细菌数量时发现转基因抗虫棉对土壤反硝化细菌数量没有显著影响。这与本研究中采用实时荧光定量 PCR 方法的结果不完全一致,笔者认为采用方法的不同可能是导致得出结论不一致的主要原因。本研究中采用的是实时荧光定量 PCR 方法,而李孝刚<sup>[18]</sup> 和王成鹏<sup>[19]</sup> 均采用了培养法来研究反硝化细菌的数量变化。由于土壤中的大部分微生物都不可培养,能够被培养的反硝化细菌所占比例非常小,所以可培养的反硝化细菌的数量的变化并不能真实反映反硝化细菌的丰度变化。而实时荧光定量 PCR 方法所检测的是所有含有 *nosZ* 基因的反硝化细菌的丰度,并且该方法与培养法相比灵敏度非常高,所得结果应该更具全面性和接近真实情况,所以两者得出的结论不可能完全一致。

而且,通过对反硝化细菌多样性进一步分析发现,除了 pH、硝酸根浓度、蕾期和花期外,棉花品种即转基因棉花与非转基因棉花的种植对反硝化细菌的多样性影响最为显著,且两者的影响作用呈相反趋势。此外,转基因棉花与 pH 正相关,而非转基因棉花与硝酸根浓度正相关,由此我们推测转基因棉花根际土壤中 pH 较高,而非转基因棉花根际土壤中硝酸根离子浓度较高。这与我们测定得到的土壤 pH 和硝酸根离子浓度结果一致:即从种植前一直到铃期(包括种植前、蕾期、花期和铃期),转基因棉花根际土壤中的 pH 一直在增加,且相比非转基因棉

花根际土壤中的 pH 高,而转基因棉花根际土壤中的硝酸根浓度比非转基因棉花根际土壤中的硝酸根浓度显著偏低。到絮期,转基因棉花根际土壤 pH 略有降低。这可以解释转基因棉花根际土壤反硝化细菌丰度从种植前到铃期一直增加,而到絮期有所降低。同时,非转基因棉花根际土壤中 pH 在花期最低,而此时的反硝化细菌丰度和多样性均达到最低。这表明转基因棉花的种植可以调节根际土壤微环境的 pH 和硝酸根离子浓度,从而影响反硝化细菌的丰度和多样性。

因此,我们推测通过转基因棉花的种植,其根系分泌物改变了转基因棉花根际土壤的微环境,可能是通过调节 pH 和硝酸根浓度,从而导致反硝化细菌的多样性发生变化。本研究中没有发现转基因棉花的种植会对反硝化细菌产生不良影响,而且从检测到的 TRF 个数看,转基因棉花的反硝化细菌的多样性显著高于非转基因棉花的多样性。这一发现将为转基因棉花的生态安全评价提供更全面的依据。

**致谢:** 本研究在取样过程中得到了中国农业科学院生物技术研究所孙国清博士的大力帮助,在此特表感谢!

## 参考文献

- [1] Donegan KK, Palm CJ, Fieland VJ, Porteous LA, Ganio LM, Schaller DL, Bucuo LQ, Seidler RJ. Changes in levels, species and DNA fingerprints of soil microorganisms associated with cotton expressing the *Bacillus thuringiensis* var. kurstaki endotoxin. *Applied Soil Ecology*, 1995, 2(2): 111-124.
- [2] Yudina T, Burtseva L. Activity of deltaendotoxins of the four *Bacillus thuringiensis* subspecies against rokaryotes. *Microbiology*, 1997, 66: 25-31.
- [3] Henry S, Bru D, Stres B, Hallet S, Philippot L. Quantitative detection of the *nosZ* gene, encoding nitrous oxide reductase, and comparison of the abundances of 16S rRNA, *narG*, *nirK*, and *nosZ* genes in soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72: 5181-5189.
- [4] Barrett M, Jahangir MM, Lee C, Smith CJ, Bhreathnach, N, Collins G, Karl G. Richards, O'Flaherty V. Abundance of denitrification genes under different peizometer depths in four Irish agricultural

- groundwater sites. *Environmental Science and Pollution Research International*, 2013, 20 (9) : 6646-6657.
- [5] 李少正. 渤海沉积物反硝化细菌多样性研究. 中国石油大学硕士学位论文, 2011.
- [6] 李文绪. 水稻浮床对水体微生物中功能基因 *nifH*、*amoA*、*nirK* 及 *nosZ* 多样性的影响. 南京农业大学硕士学位论文, 2012.
- [7] Ma Y, Chen Z. Effects of enrofloxacin on molecular diversity of nitrous oxide reductase genes (*nosZ*). *Acta Ecologica Sinica*, 2010, 30 (4) : 1011-1017. (in Chinese)
- 马驿, 陈杖榴. 恩诺沙星残留对土壤中反硝化细菌氧化二氮还原酶基因 (*nosZ*) 多样性的影响. *生态学报*, 2010, 30 (4) : 1011-1017.
- [8] 白玉涛. 基于 T-RFLP 技术的内蒙古高原河湖湿地反硝化细菌群落分析. 内蒙古大学硕士学位论文, 2012.
- [9] 刘永卓. 重金属污染稻田土壤温室气体产生相关的微生物群落结构及活性变化. 南京农业大学博士学位论文, 2012.
- [10] Lin N, Guo C, Guo Y, Ke L, Dang Z, Tan F. Community structure and denitrification ability of aerobic and anaerobic denitrifying bacteria from mangrove wetland. *Acta Sinica Circumstance*, 2012, 32 (1) : 173-181. (in Chinese)
- 林娜, 郭楚玲, 郭延萍, 柯林, 党志, 谭凤仪. 红树林湿地中好氧-厌氧反硝化菌脱氮特性及其种群结构分析. *环境科学学报*, 2012, 32 (1) : 173-181.
- [11] Zhang Y, Li D, Wang H, Xiao Q, Liu X. Research on the diversity of denitrifying bacteria in alpine meadow soil in Sanjiangyuan region of Qinghai-Tibet plateau. *Science Bulletin*, 2006, 51 (6) : 715-723. (in Chinese)
- 张于光, 李迪强, 王慧敏, 肖启明, 刘学端. 青藏高原三江源地区高寒草甸土反硝化细菌多样性的初步研究. *科学通报*, 2006, 51 (6) : 715-723.
- [12] Pereira EIP, Chung H, Scow K, Six J. Microbial communities and soil structure are affected by reduced precipitation, but not by elevated carbon dioxide. *Soil Science Society of America Journal*, 2013, 77 (2) : 482-488.
- [13] Dong L, Meng Y, wang J. Effects of transgenic Bt + CpTI cotton on rhizosphere bacteria and ammonia oxidizing bacteria population. *Acta Micorbiologica Sinica*, 2014, 54 (3) : 309-318 (in Chinese).
- 董莲花, 孟盈, 王晶. 转 Bt + CpTI 基因棉花对根际土壤细菌及氨氧化细菌数量的影响. *微生物学报*, 2014, 54 (3) : 309-318.
- [14] Throbäck IN, Enwall K, Jarvis Å, Hallin S. Reassessing PCR primers targeting *nirS*, *nirK* and *nosZ* genes for community surveys of denitrifying bacteria with DGGE. *FEMS Microbiology Ecology*, 2004, 49 (3) : 401-417.
- [15] Park HD, Noguera DR. Evaluating the effect of dissolved oxygen on ammonia-oxidizing bacterial communities in activated sludge. *Water Research*, 2004, 38: 3275-3286.
- [16] Córdova-Kreylos AL, Cao Y, Green GP, Hwang H-M, Kuivila KM, LaMontagne MG, Werfhorst LCVD, Holden PA, Scow KM. Diversity, composition, and geographical distribution of microbial communities in California salt marsh sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72: 3357-3366.
- [17] Dong L, Córdova-Kreylos AL, Yang J, Yuan H, Scow KM. Humic acids buffer the effects of urea on soil ammonia oxidizers and potential nitrification. *Soil Biology and Biochemistry*, 2009, 41: 1612-1621.
- [18] 李孝刚. 转基因抗虫棉对土壤生态系统影响的研究. 南京林业大学硕士学位论文, 2011.
- [19] 王成鹏. 转 Bt 和 Bt + CpTI 基因棉对土壤微生物群落影响的研究. 南京林业大学硕士学位论文, 2012.

# Effects of planting transgenic Bt + CpTI cotton on rhizosphere denitrifier abundance and diversity

Lianhua Dong<sup>1\*</sup>, Ying Meng<sup>2</sup>, Jing Wang<sup>1</sup>

<sup>1</sup>National Institute of Metrology, Beijing 100013, China

<sup>2</sup>Hubei Institute of Measurement and Testing Technology, 430223 Wuhan, Hubei Province, China

**Abstract:** [Objective] To evaluate the effect of planting genetically modified cotton on soil denitrifier. [Methods] The impact of transgenic Bt + CpTI cotton (SGK321) and its receptor cotton (SY321) on rhizosphere denitrifier abundance and diversity were investigated by using quantitative PCR (qPCR) and terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP). We collected rhizosphere soil before cotton planting (Pre) and along with the cotton growth stage (budding, flowering, belling and boll opening). [Results] The abundance of denitrifier in both cottons changed significantly across the growth stage, but the variation tendency was different. In the rhizosphere of transgenic cotton, the denitrifier abundance increased from  $3.12 \times 10^6$  copies/g dry soil (Pre) to  $2.81 \times 10^7$  copies/g dry soil (belling). The denitrifier abundance in non-transgenic cotton was significantly affected by the growth stage: increased at budding, decreased at flowering, and then increased at belling. Canonical correspondence analysis and partial canonical correspondence analysis show that the denitrifier diversity was more correlated with pH, concentration of  $\text{NO}_3^-$  and budding and flowering. Additionally, cotton genotype was an important factor of influencing the diversity of denitrifier. [Conclusions] This indicates the abundance and diversity were influenced by both the cotton growth stage and the cotton genotype by adjusting the soil pH and concentration of  $\text{NO}_3^-$ . Planting of transgenic Bt + CpTI cotton leads an increase in the soil pH, which results in an increase in abundance and diversity of denitrifier.

**Keywords:** quantitative real time PCR, denitrifier, transgenic Bt + CpTI cotton, Shiyuan321, *nosZ* gene, terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP)

(本文责编: 张晓丽)

Support by the Natural National Science foundation of China (31100084) and by the National Institute of Metrology (AKY1323-13)

\* Corresponding author. Tel/Fax: +86-10-64525069; E-mail: donglh@nim.ac.cn

Received: 22 May 2014/Revised: 25 September 2014