

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*

54 (3) :309 – 318; 4 March 2014

ISSN 0001 – 6209; CN 11 – 1995/Q

http://journals.im.ac.cn/actamicrocn

doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.2014.03.008

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

董莲华¹, 孟盈², 王晶¹

¹ 中国计量科学研究院, 北京 100013

² 湖北省计量研究院, 湖北 武汉 430223

摘要: 转基因棉花对根际土壤微生物的影响在转基因作物风险评估中具有重要意义。【目的】通过研究转基因棉花根际微生物群落变化来评估转基因棉花的生态风险。【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) 根际土壤总细菌和氨氧化细菌为研究对象, 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。采用微滴数码 PCR 方法对土壤中总细菌 16S rRNA 和氨氧化细菌的功能基因 *amoA* 基因进行定量分析。【结果】结果发现两种棉花根际土壤中的总细菌数量随棉花生长的不同时期没有显著差异。但是对氨氧化细菌的定量结果表明随棉花不同生长时期, 两种棉花根际土壤中的氨氧化细菌数量均发生显著变化, 但变化趋势不同: 在蕾期, SY321 和 SGK321 根际土壤中的氨氧化细菌数量分别增加了 4 倍和 2 倍; 在花期, SY321 根际氨氧化细菌与蕾期相比显著降低至 5.96×10^5 copies/g dry soil, 而 SGK321 根际氨氧化细菌则显著增加至 1.25×10^6 copies/g dry soil; 在铃期, SY321 根际氨氧化细菌显著增加至 1.49×10^6 copies/g dry soil, 而 SGK321 根际土壤中氨氧化细菌数量没有发生显著变化; 絮期两者均表现为降低, 但差异显著。与非转基因棉花相比, 转基因棉花根际土壤中的氨氧化细菌变化相对较为平缓。【结论】这表明氨氧化细菌数量既受棉花生长时期的影响, 同时也受转基因棉花的影响, 转基因棉花通过影响氨氧化细菌的数量减缓氨的转化速度, 这在一定程度上有利于植物生长。

关键词: 微滴数码 PCR, 氨氧化细菌, 转 Bt + CpTI 基因棉花 (SKG321), 石远 321, *amoA*, 16S rRNA

中图分类号: Q938 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2014) 03-0309-10

转基因植物的商业化种植为人们带来巨大经济效益的同时, 也加剧了人们对转基因植物潜在生态风险的担忧。转基因植物的大面积种植有可能对农业生态系统产生多方面的危害, 因此对其释放后的生态风险评价极为必要。土壤是农业生产中物质转

化与能量交换的重要场所, 土壤微生物是土壤生态系统的重要组成部分, 土壤微生物的多样性和活性是保持农业生态系统健康和稳定的基础^[1-2]。研究表明转基因外源基因及其表达产物通过植物根系分泌物或植物残体进入土壤生态系统, 进而对土壤微

基金项目: 国家自然科学基金 (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: 2013-06-25; **修回日期:** 2013-09-22

生物功能种群和多样性产生影响,从而影响整个土壤生态系统的功能和农业生态系统的健康与稳定^[3-5]。因此,土壤微生物在转基因风险评估中占有重要地位^[3-6]。

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^[7-8],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^[9]。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,如对环境非常敏感的氨氧化细菌,可作为指示性微生物加以研究,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,目前这方面的研究还未见报道。

前期的相关研究多采用培养法^[7]或实时荧光定量 PCR 方法^[9-10]来研究土壤微生物的数量变化。由于并不是所有的微生物都可培养,所以使用培养法不可能得出全面的结论,此外,应用实时荧光定量 PCR 方法定量依赖于具有准确含量的 DNA 分子标准,在目前缺乏 DNA 含量标准物质的情况下,大多数实验室采用紫外吸收方法对构建的质粒 DNA 或纯菌基因组 DNA 进行定量测量,然后作为标准曲线使用。紫外吸收法的缺点是不能够区分在 260 nm 处有吸收的杂质^[10],所以这种方法所测定结果一般会偏高,因此应用由紫外法定量的 DNA 分子作为标准对土壤样品进行定量时,会导致定量结果的不准确以及实验室间的不可比。

微滴数码 PCR 技术(ddPCR)通过把稀释到一定浓度的 DNA 分子分布在 10000 - 20000 个微滴中,使大部分微滴中的 DNA 分子数目为 1 或 0,然后通过 PCR 扩增和荧光信号的累计来读取阳性微滴数目,在根据泊松分布计算出样本中的 DNA 分子数^[11-13]。该方法无需依赖外部核酸标准,因此可实现对核酸分子的绝对定量分析。目前有研究报道该技术用于 DNA 拷贝数的准确定量^[14]和转基因含量的测定^[15]。本研究采用微滴数码 PCR 方法针对转 Bt + CpTI 基因棉花根际土壤中总细菌 16S rRNA 基因和氨氧化细菌的功能基因 *amoA* 基因进行定量分析,在棉花生长的不同时期进行取样,同时结合铵态

氮、硝态氮和硝化强度等指标的测定进行综合分析,以期揭示转 Bt + CpTI 基因棉花对根际土壤微生物的影响。

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;微滴数码 PCR 扩增试剂盒购自美国 BioRad 公司;引物和探针均由上海英俊公司合成。PCR 仪(AB9700)、微滴数码 PCR 仪(QX100)、离心机(Sigma 3k-15)、微量分析天平(Metler xp205、流动分析仪、pH 计、NanoDrop (2000)、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。两块棉田前期种植作物均为玉米。土壤类型为褐土,土壤质地为砾壤。于 2012 年 5 月 11 日播种,6 月 20 日施肥。采用三点取样法,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(2012 年 6 月 17 日)、花期(2012 年 7 月 19 日)、铃期(2012 年 8 月 31 日)和絮期(2012 年 10 月 16 日),分别标记为 SY1、SGK1、SY2、SGK2、SY3、SGK3、SY4、SGK4、SY5、SGK5(SY 为石远 321,SGK 为转 Bt + CpTI 基因抗虫棉)。非根际土壤的采集:取土壤表层以下 5 - 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 土壤理化性质测定

土壤全氮的测定方法采用行业标准方法 NY/T53-1987《土壤全氮测定法》进行测定,有机碳采用行业标准方法 NY/T 1121.6-2006《土壤有机质的测定》的操作进行测定,土壤有效磷采用行业标准方法 NY/T149-1990《石灰性土壤有效磷测定方法》进行测定。土壤 pH 测定方法:将土壤自然风干 24 h 后,取 0.5 g 土样加入 5 mL 水,充分混匀,测定悬浊液的 pH 值。

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 |

1.4 DNA 提取

土壤基因组 DNA 的提取采用土壤 DNA 提取试剂盒 (MOBIO DNA Extraction kit, MOBIO Laboratories Inc., Carlsbad, CA) 进行提取,最终溶于 TE_{0.1} (10 mmol/L Tris, 0.1 mmol/L EDTA, pH 8.0)。提取的土壤 DNA 用琼脂糖凝胶电泳检测,并用 Nanodrop 2000 (Thermo Fisher) 初步测定 DNA 浓度,通过测定 A₂₆₀/A₂₈₀ 的比值来判断 DNA 的纯度。

1.5 微滴数码 PCR 定量总细菌 16S rRNA 和氨氧化细菌 amoA

DNA 样品的准备:为满足泊松分布,得到重复性较好的结果,将模板 DNA 稀释至 531 – 32402 copies/μL (unpublished data) 范围内,取 4 μL 稀释好的 DNA 加入混合好的 PCR 混合液中,其中包括 10 μL 的 droplet digital PCR master mix, 0.8 μL 的正向引物 Bact1369, 0.8 μL 反向引物 Prok1492, 0.4 μL 探针 TM1389^[19], 4 μL ddH₂O 补足 20 μL。微滴的生成:将 DG8 卡 (BioRad) 放入卡槽中卡好,向 DG8 卡一侧标有“oil”的孔中加入 60 μL 微滴生成油;向 DG8 卡中间标有“sample”的孔中加入 20 μL PCR 反应液。在加样品过程中,枪头需贴着孔底侧面加,避免底部的气泡,影响微滴的生成。在加好样品后,装上 DG8 卡的橡胶垫。将加有样品的 DG8 卡放入微滴生成仪 (BioRad),自动生成微滴,直到 3 个绿灯常亮表明微滴生成完毕。取出 DG8 卡,弃橡胶条,从微滴孔中吸出 40 μL 微滴转移至 96 孔板。缓慢操作避免损伤微滴,枪头呈 30°角约用 5 s 吸出,然后枪头垂直约用 5 s 转入 96 孔板。提前 10 – 15 min 打开封膜仪 (Eppendorf) 预热,将封板膜 (Thermo Fisher) 较暗的一面朝向 96 孔板盖上,放入封膜仪按住 3 s,再将 96 孔板旋转 180°放好再封 3 s。将 96 孔板放入 PCR 仪上进行热循环反应。PCR 扩增条件为 95℃, 10 min, 40 个循环:95℃, 15 s, 56℃, 60 s, 最后一步为 98℃, 10 min。PCR 结束后,将 96 孔板转移入微滴阅读器 (BioRad),进行微滴读取。采用 Quantasoft version 1.2.10.0 软件分

析采集的数据。样品中目标 DNA 拷贝数的计算根据公式 (1) 进行计算。其中, *D* 为 DNA 模板的稀释倍数, *V_p* 为微滴的体积, *P* 为阳性微滴数, *N* 为读取的微滴总数。

$$T = \frac{-D}{V_p} \times \ln\left(1 - \frac{P}{N}\right)$$

公式 (1)

对氨氧化细菌的定量,操作步骤同上,但 PCR 体系和扩增条件不同。20 μL PCR 体系包括 10 μL 的 droplet digital PCR master mix, 0.4 μL 的正向引物 A137^[20], 0.4 μL 反向引物 amoA-2R”, 0.2 μL 探针 A337, 4 μL DNA 模板, 5 μL ddH₂O 补足 20 μL。PCR 扩增条件为 95℃, 10 min, 45 个循环:95℃, 30 s, 55℃, 60 s, 72℃, 45 s, 最后一步为 98℃, 10 min。

1.6 土壤硝化强度测定

具体测定过程参考王晓娟等 (2006)^[21]。收集的溶液采用流动分析仪进行硝酸根离子的测定。

1.7 铵态氮和硝态氮的测定

向 10 g 土中加入 100 mL 0.01 mol/L 的 CaCl₂ 溶液,置于摇床上培养 1 h (180 r/min), 滤纸过滤,用 10 mL 离心管收集 2 管, -20℃ 保存待测。采用流动分析仪进行测定。

2 结果

2.1 微滴数码 PCR (ddPCR) 定量分析土壤中总细菌 16S rRNA 基因

ddPCR 对 10 个样品的 16S rRNA 基因的定量结果见图 1。从各个反应的微滴总数来看 (图 1-A), 除其中一个反应 (如图中箭头标注) 外, 其余 31 个反应的微滴数目均在 10000 以上, 32 个反应的微滴数平均值及其标准偏差为 13212 ± 1290, 微滴数目的多少决定定量实验的成功与否, 如果微滴数目过低, 微滴阅读器会显示 “No call”。根据厂家要求, 微滴数应该达到 14000, 但在实际操作很难达到这个数值, 根据单分子扩增数字 PCR 原理, 对总微滴数的要求会受到阳性微滴数目的限制, 如果阳性微滴数足够多, 既需要检测的目标 DNA 分子浓度相对较高, 那么所检测的总微滴数只要有足够的代表性, 既通过阅读足够多的微滴, 而判断出阳性微滴的比例即可。只有在目标 DNA 分子浓度很低时, 才需要有至少 14000 个的微滴数来保证能够检测到为数很

田并不是相邻的,之间间隔了玉米田,相隔约 0.8 km,从测定的含水量和全氮、有机碳等理化性质看(表 1),两块土壤的理化性质存在较为显著的差异。除了种植之前,在棉花的 4 个生长时期(蕾期、花期、铃期和絮期),并未发现转基因棉花根际土壤中的总细菌数量与非转基因棉花根际土壤中总细菌数量有显著差异,这表明转基因棉花不会导致根际土壤中总细菌数量的显著变化。棉花生长的不同时期对土壤根际总细菌的影响也没有显著作用。与蕾期相比,两种棉花花期的细菌数量均降低了,但并未达到统计学显著差异(SY321: $P = 0.15$; SGK321: $P = 0.36$),而在铃期和絮期,数量都有所回升,但仍未达到显著差异(SY321: 蕾期与铃期 T 检验, $P = 0.25$, 蕾期与絮期 T 检验, $P = 0.45$; SGK321: 蕾期与铃期 T 检验, $P = 0.94$, 蕾期与絮期的 T 检验, $P = 0.73$)。

2.2 ddPCR 分析根际土壤中氨氧化细菌 *amoA* 基因

ddPCR 定量测定氨氧化细菌 *amoA* 基因的结果见图 2。由对 *amoA* 基因扩增的所有样品微滴数目结果图(图 2-A)可知,30 个反应的微滴数均在 10000 以上,平均微滴数及其标准偏差为 12464 ± 1316 ,因此微滴数目可满足后面准确定量的要求。由图 2-B 所选样品孔微滴荧光强度一维散点图可知,阳性微滴的荧光信号显著高于阴性微滴的荧光信号,且阳性和阴性微滴分别聚成一行,中间区域的微滴数量很少,表明针对 *amoA* 基因定量的 PCR 方法特异性好,PCR 延迟扩增的微滴很少,从而使荧光信号处于中间区域的微滴数量很少。此外,从所选样品孔微滴荧光强度直方图(图 2-C)也可证明阳性微滴和阴性微滴明显聚成了 2 个峰,中间区域的微滴数比例非常低,因此同 ddPCR 对 16S rRNA 基因定量方法相似,无论基线位置放置在中间的任何区域,都不会导致阳性微滴数产生显著变化,从而保证了定量结果的准确可靠。

对氨氧化细菌的数量影响结果见图 3-B,两个对照土壤中的氨氧化细菌数量分别在 4.61×10^5 copies/g dry soil 和 3.81×10^5 copies/g dry soil,两者之间存在显著性差异($P = 0.0002$),在蕾期,SY321 和 SGK321 根际土壤中的氨氧化细菌数量分别为 1.94×10^6 copies/g dry soil 和 7.73×10^5 copies/g dry soil,分别增加了 4 倍和 2 倍,此时两种棉花根际

土壤中氨氧化细菌数量也表现为差异极显著($P = 1.5 \times 10^{-6}$)。在花期,SY321 根际氨氧化细菌与蕾期相比显著降低(5.96×10^5 copies/g dry soil, $P = 1.1 \times 10^{-6}$),而 SGK321 根际氨氧化细菌则显著增加至 1.25×10^6 copies/g dry soil ($P = 1.2 \times 10^{-5}$),两种棉花根际土壤中氨氧化细菌数量仍表现为差异极显著($P = 6.0 \times 10^{-6}$)。铃期与花期相比,SY321 根际氨氧化细菌显著增加至 1.49×10^6 copies/g dry soil ($P = 6.2 \times 10^{-6}$),而 SGK321 根际土壤中氨氧化细菌数量没有发生显著变化(1.28×10^6 copies/g dry soil, $P = 0.37$),但两者之间仍然存在显著性差异($P = 0.002$)。絮期的 SY321 根际土壤中氨氧化细菌数量降低至 1.06×10^6 copies/g dry soil,而 SGK321 根际土壤中氨氧化细菌数量也显著降低至 7.53×10^5 copies/g dry soil,在絮期,两种棉花根际土壤中的氨氧化细菌数量差异又显著增加了($P = 0.0002$)。

从整体趋势看,转基因棉花(SGK321)根际土壤中氨氧化细菌数量表现为从蕾期到花期一直增加,在花期和铃期相对较为稳定,而到了絮期又显著降低,变化趋势相对比较平缓,而非转基因棉花(SY321)根际土壤中氨氧化细菌数量则表现出的变化趋势较为剧烈,在蕾期数量增加,到花期又显著降低,在铃期又显著增加,到絮期则又明显降低,即受棉花生长时期的影响较为明显。可见棉花生长时期对根际土壤中氨氧化细菌的数量影响很重要,植物的不同生长时期,对土壤中养分的需求不同,致使根际土壤中的微环境不同,从而导致氨氧化细菌数量不同;但两种棉花根际土壤中的氨氧化细菌变化趋势不同,可能是由于生长周期和棉花种类共同作用的结果。不同种棉花所分泌的根系分泌物或吸收营养物质的速率会存在差异,因而也可以改变土壤微环境,从而导致变化趋势不尽相同。由于氨氧化细菌以铵为底物进行代谢,铵浓度的高低会直接影响到氨氧化细菌数量的变化,因此不同生长时期和棉花种类很可能导致土壤中的铵浓度发生变化。

氨氧化细菌与土壤中总细菌数量的比值结果见图 3-C,在两种棉花对照土壤中,氨氧化细菌占总细菌的比例为 0.02%,在蕾期,SY321 根际土壤中的氨氧化细菌占总细菌的比值增加至 0.08%,在花期又降低至 0.03%,而在铃期和絮期分别占 0.07% 和 0.05%。SGK321 根际土壤中的氨氧化细菌占总细

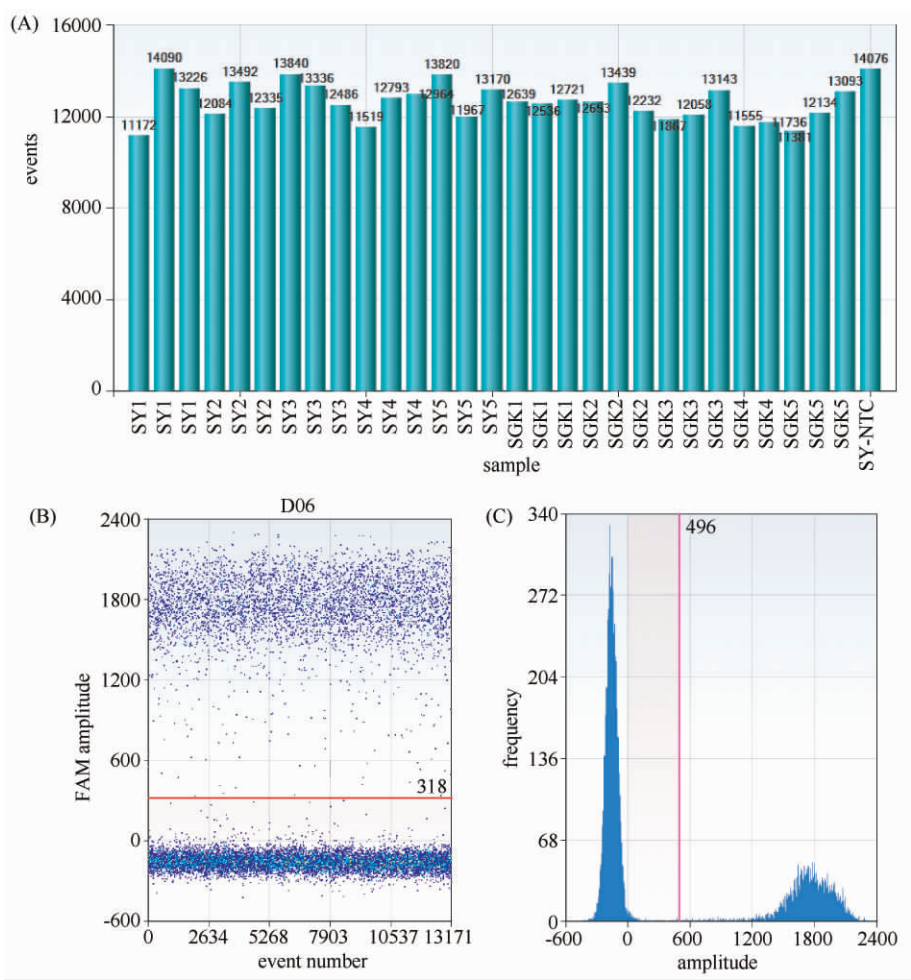


图 2. 微滴数码 PCR 测定转基因棉花根际土壤中氨氧化细菌 *amoA* 基因的数量

Figure 2. Quantification of *amoA* gene representing of ammonia oxidizing bacteria population size in rhizosphere of cotton by droplet digital PCR. A: The number of droplet events counted for selected wells/samples for quantifying ammonia oxidizing bacterial *amoA* gene; B: One-dimensional scatter plots for selected wells/samples fluorescent droplet amplitudes; C. Histograms for selected wells/samples fluorescent droplet amplitudes.

菌的比值在花期也从对照的 0.02% 增加至 0.06%，而在絮期又降低至 0.03%，与非转基因棉花 SY321 比值的变化趋势不尽相同。

2.3 土壤中铵根和硝酸根浓度变化

由于上述结果中发现转基因棉花对土壤中的氮素代谢的功能微生物氨氧化细菌数量变化有一定影响，为了能够从机理上解释这一影响，我们同时对各个生长时期的土壤中的铵根离子浓度、硝酸根离子浓度和硝化作用强度进行了测定，结果见图 4。SY321 土壤中铵根离子浓度随着棉花生长的持续，一直呈现降低趋势：种植前（对照）为 7.2 mg N/g dry soil，在蕾期显著降低至 1.1 mg N/g dry soil，之后降低的趋势变缓，直到絮期降低至 0.3 mg N/g

dry soil。SGK321 土壤中的铵根离子变化趋势相对较平缓，但在蕾期也由种植前的浓度为 5.6 mg N/g dry soil 显著降低至 3.5 mg N/g dry soil，到花期显著降低至 1.5 mg N/g dry soil，到絮期降低至 0.4 mg N/g dry soil。硝酸根离子浓度变化见图 4-B，SY321 土壤中硝酸根离子浓度变化趋势表现为先增加，后降低，从种植前直到花期呈现显著增加趋势，而从花期到絮期又呈现直线下降趋势。根据铵根离子浓度变化趋势和氨氧化细菌变化趋势，我们推测：氨氧化菌的大量增加将铵根离子转化亚硝酸根，由于亚硝酸根不稳定，所以迅速转变为硝酸根离子，导致硝酸根离子的大量累积，而当硝酸根离子浓度累积后，会刺激反硝化作用的加强，进而加快硝酸根的转化。

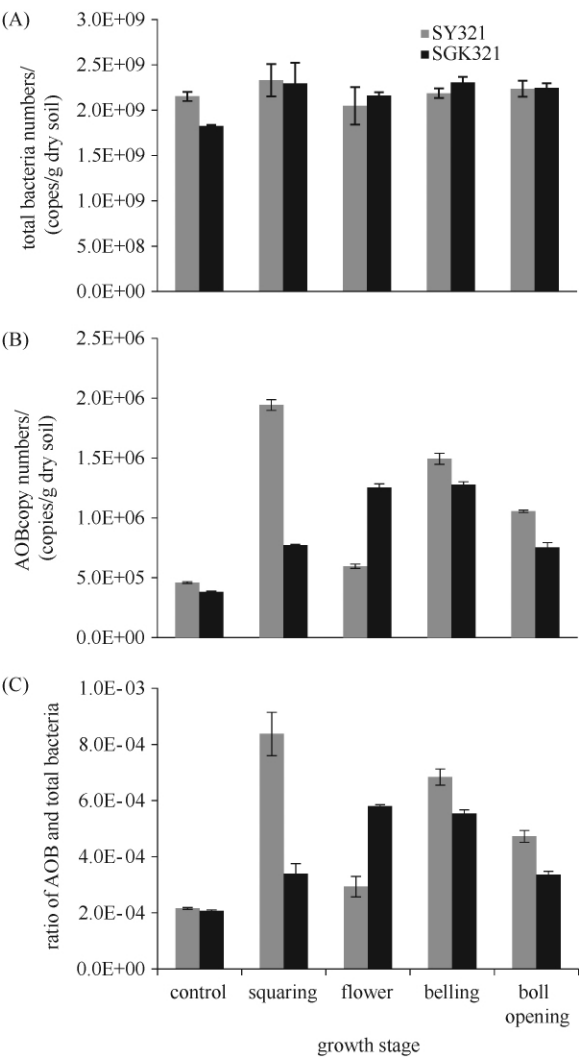


图 3. 转基因棉花 (SGK321) 及其受体棉花 (SY321) 根际土壤中总细菌数量变化 (A)、氨氧化细菌数量变化 (B) 和氨氧化细菌与总细菌比值变化 (C)

Figure 3. The changes of total bacterial (A), ammonia oxidizing bacteria population size (B) and theratio of *amoA* to 16S rRNA (C) in the rhizosphere of genetically modified (SGK321) and non-genetically modified cotton (SY321).

2.4 土壤硝化强度变化

硝化强度是反映硝化细菌活性的一个重要指标,因此对硝化强度的测定可以一定程度反映出氨氧化细菌的活性变化。硝化强度的变化趋势图见图 4-C,SY321 与 SGK321 棉花土壤中硝化强度变化趋势均为先增加,后降低,但不同的是,SY321 土壤中,硝化强度与种植前相比,在蕾期呈增加趋势,而到花期开始降低,铃期和絮期则一直呈线性降低趋势。SGK321 土壤中,在蕾期和花期均呈增加趋势,到铃期开始降低,直至絮期呈线性降低趋势。这表明

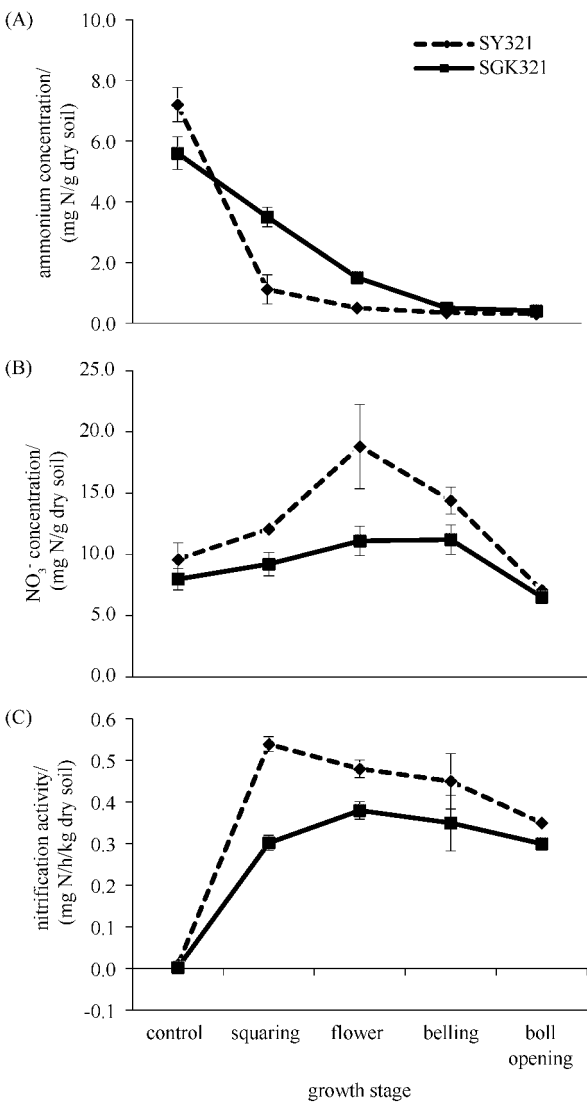


图 4. 转基因棉花 (SGK321) 及其受体棉花 (SY321) 土壤中铵根离子浓度 (A)、硝酸根离子浓度 (B) 和硝化强度 (C)

Figure 4. The changes of ammonium (A), nitrate concentration (B) and the nitrification rate (C) in the rhizosphere of genetically modified (SGK321) and non-genetically modified cotton (SY321).

3 讨论

转基因棉花 SGK321 对根际土壤细菌数量未产

生显著影响,这与之前报道的转基因棉花 SGK321 并没有明显改变土壤细菌多样性一致^[22],此外本研究中的总细菌数量在 10^9 数量级,与相似土壤中报道的总细菌数量相当^[23],表明 ddPCR 方法可用于土壤中总细菌 16S rRNA 基因的准确定量。本研究中由于氨氧化细菌所占总细菌的比值很低 ($<0.1\%$),所以在整个生长周期中,不同棉花种类的根际氨氧化细菌的变化,并不能表现为总细菌的数量变化。因此研究转基因棉花对土壤微生物影响不能只停留在研究总细菌的数量变化,而应该更多的关注具有生态学意义的功能微生物群落的变化,才能全面的评价转基因棉花对土壤微生物多样性的影响。

SGK321 土壤中铵浓度变化趋势相对平缓,与氨氧化细菌增加趋势相对缓慢的现象一致。在蕾期,两种棉花土壤中铵浓度迅速降低可解释为随着温度的升高,氮的矿化作用增强,从而刺激了氨氧化细菌的增加,所以在蕾期,SY321 和 SGK321 根际土壤中均观测到了氨氧化细菌数量的显著增加。我们研究发现转基因棉花根际土壤的硝化作用强度均低于非转基因棉花根际土壤,这与之前报道转基因棉花在花铃期和吐絮期抑制硝化作用强度的结论一致^[24]。由于植物根系分泌物可以改变根际土壤环境的物理化学条件,从而对根际微生物的活性和群落结构产生影响^[25-27]。因此,我们推测转基因棉花和非转基因棉花不完全相同的根际分泌物导致了根际土壤中的微环境不同,进而导致其根际氨氧化细菌数量和活性的差异。

致谢:本研究在取样过程中得到了中国农科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] Finlay B, Maberly S, Cooper J. Microbial diversity and ecological function. *Oikos*, 1997, 80: 209-213.
- [2] Groffman P, Bohlen P. Soil and sediment biodiversity—cross-system comparisons and large-scale effects. *Bioscience*, 1999, 49: 139-148.
- [3] Angle J. Release of transgenic plants: biodiversity and population-level considerations. *Molecular Ecology*, 1994, 3: 45-50.
- [4] Wang HX, Chen X, Tang JJ. Influence of the straw decomposition of Bt transgenic rice on soil culturable microbial flora. *Acta Ecologica Sinica*, 2004, 24 (1): 89-94. (in Chinese)
- [5] Wang HX, Chen X, Tang JJ. Influence of released transgenic pest and disease-resistant crops on plant associated microorganisms in soil. *Biodiversity Science*, 2002, 10 (2): 232-237. (in Chinese)
- [6] Jepson P, Croft B, Pratt G. Test systems to determine the ecological risks posed by toxin release from *Bacillus thuringiensis* genes in crop plants. *Molecular Ecology*, 1994, 3: 81-89.
- [7] Donegan KK, Palm CJ, Fieland VJ, Porteous LA, Ganio LM, Schaller DL, Bucao 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.
- [8] Yudina T, Burtseva L. Activity of delta endotoxins of the four *Bacillus thuringiensis* subspecies against rokaryotes. *Microbiology*, 1997, 66: 25-31.
- [9] 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.
- [10] Dong L, Zang C, Wang J, Li L, Gao Y, Wu L, Li P. Lambda genomic DNA quantification using ultrasonic treatment followed by liquid chromatography-isotope dilution mass spectrometry. *Analytical Bioanalytical Chemistry*, 2012, 402 (6): 2079-2088.
- [11] Kalinina O, Lebedeva I, Brown J, Silver J. Nanoliter scale PCR with TaqMan detection. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25 (10): 1999-2004.
- [12] Sykes PJ, Neoh SH, Brisco MJ, Hughes E, Condon J, Morley AA. Quantitation of targets for PCR by use of limiting dilution. *Biotechnology*, 1992, 13: 444-449.
- [13] Vogelstein B, Kinzler K. Digital PCR. *Proceeding National Academic Science USA*, 1999, 96 (16): 9236-9241.
- [14] Pinheiro LB, Coleman VA, Hindson CM, Herrmann J, Hindson BJ, Bhat S, Emslie KR. Evaluation of a

- Droplet Digital Polymerase Chain Reaction Format for DNA Copy Number Quantification. *Analytical Chemistry*, 2012, 84: 1003-1011.
- [15] Morisset D, Štebih D, Milavec M, Gruden K, Želj. Quantitative Analysis of Food and Feed Samples with Droplet Digital PCR. *PLoS One*, 2013, 5 (8): e62583. doi:10.1371/journal.pone.0062583
- [16] NY/T 53-1987, 《土壤全氮测定法》, 农业行业标准.
- [17] NY/T 1121.6-2006 土壤检测 第六部分: 《土壤有机质的测定》, 农业行业标准.
- [18] NY/T 149-1990 《石灰性土壤有效磷测定方法》, 农业行业标准.
- [19] Suzuki MT, Beja TLT, Delong EF. Phylogenetic analysis of ribosomal RNA operons from uncultivated coastal marine bacterioplankton. *Environmental Microbiology*, 2001, 3: 323-331.
- [20] Okano Y, Hristova KR, Leutenegger CM, Jackson LE, Denison RF, Gebreyesus B, Lebauer D, Scow KM. Application of real-time PCR to study effects of ammonium on population size of ammonia-oxidizing bacteria in soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70: 1008-1016.
- [21] Wang XJ, Zhang RS. Study on intensity of microorganism nitrification and denitrification in constructed wetlands. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2006, 2: 225-229. (in Chinese)
王小娟, 张荣社. 人工湿地微生物硝化与反硝化强度对比研究. *环境科学学报*, 2006, 2: 225-229.
- [22] Li C, Zhang X, Wu J, Liu H. Effect of transgenic cotton on microbial community diversity in rhizospheresoil. *Journal of Agro-Environment Science*, 2008, 1857-1859. (in Chinese)
李长林, 张欣, 吴建波, 刘惠芬. 转基因棉花对根际土壤微生物多样性影响. *农业环境科学学报*, 2008, 1857-1859.
- [23] 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 Biochemistry*, 2009, 41: 1612-1621.
- [24] Liu LX. Effects of transgenic cotton planting on rhizosphere soil N transformation related soil enzyme activities. *Crops*, 2010, 3: 69-71. (in Chinese)
刘立雄. 转基因棉花种植对根际土壤氮转化相关酶的影响. *作物杂志*, 2010, 3: 69-71
- [25] Badalucco L, Kuikman PJ. Mineralization and immobilization in the rhizosphere. // Pinton R, Varanini Z, Nannipieri P (eds) *The rhizosphere. Biochemistry and organic substances at the soil-plant interface*. New York: Marcel Dekker, 2001, 141-196.
- [26] Nannipieri P, Ascher J, Ceccherini MT, Landi L, Pietramellara G, Renella G, Valori F. Effects of Root Exudates in Microbial Diversity and Activity in Rhizosphere Soils. *Soil Biology*, 2008, 15: 339-365.
- [27] Weinert N, Meincke R, Gottwald C, Radl V, Dong X, Schloter M, Berg G, Smalla K. Effects of genetically modified potatoes with increased zeaxanthin content on the abundance and diversity of rhizobacteria with in vitro antagonistic activity do not exceed natural variability among cultivars. *Plant and Soil*, 2010, 326 (1-2): 437-452.

Effects of transgenic Bt + CpTI cotton on rhizosphere bacteria and ammonia oxidizing bacteria population

Lianhua Dong^{1*}, Ying Meng², Jing Wang¹

¹National Institute of Metrology, Beijing 100013 China

²Hubei Institute of Measurement and Testing Technology, Wuhan 430223, Hubei Province, China

Abstract: The effect of transgenic cotton on the rhizosphere bacteria can be important to the risk assessment for the genetically modified crops. **[Objective]** We studied the rhizosphere microbial community with cultivating genetically modified cotton. **[Methods]** The effects of transgenic Bt + CpTI Cotton (SGK321) and its receptor cotton (SY321) on rhizosphere total bacteria and ammonia oxidizing bacteria population size were studied by using droplet digital PCR. We collected rhizosphere soil before cotton planting and along with the cotton growth stage (squaring stage, flowering stage, belling stage and boll opening stage). **[Results]** There was no significant change on the total bacterial population between the transgenic cotton and the receptor cotton along with the growth stage. However, the abundance of ammonia oxidizing bacteria (AOB) in both type of cottons showed significant difference between different growth stages, and the variation tendency was different. In squaring stage, the numbers of AOB in rhizosphere of SY321 and SGK321 increased 4 and 2 times, respectively. In flowering stage, AOB number in rhizosphere of SY321 significantly decreased to be 5.96×10^5 copies/g dry soil, however, that of SGK321 increased to be 1.25×10^6 copies/g dry soil. In belling stage, AOB number of SY321 greatly increased to be 1.49×10^6 copies/g dry soil, but no significant change was observed for AOB number of SGK321. In boll opening stage, both AOB number of SY321 and SGK321 clearly decreased and they were significantly different from each other. Compared to the non-genetically modified cotton, the change in abundance of ammonia oxidizing bacteria was slightly smooth in the transgenic cotton. **[Conclusions]** Not only the cotton growth stage but also the cotton type caused this difference. The transgenic cotton can slow down the speed of ammonia transformation through impacting the number of AOB, which is advantageous for plant growth.

Keywords: Droplet digital PCR, ammonia oxidizing bacteria, transgenic Bt + CpTI cotton, Shiyuan321, *amoA*, 16S rRNA

(本文责编: 张晓丽)