

魏琳琳, 杨殿林, 侯萌瑶, 等. 氮高效转基因水稻 OsNRT2.3b 对土壤氨氧化细菌群落多样性的影响[J]. 农业环境科学学报, 2017, 36(6): 1149–1159.
WEI Lin-lin, YANG Dian-lin, HOU Meng-yao, et al. Effect of N-efficient transgenic rice on diversity and community structure of soil ammonia-oxidizing bacteria[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2017, 36(6): 1149–1159.

氮高效转基因水稻 OsNRT2.3b 对土壤 氨氧化细菌群落多样性的影响

魏琳琳¹, 杨殿林¹, 侯萌瑶^{1,2}, 倪 土¹, 李 刚¹, 修伟明¹, 王 慧¹, 赵建宁^{1*}

(1. 农业部环境保护科研监测所, 农业部产地环境质量重点实验室/天津市农业环境与农产品安全重点开放实验室, 天津 300191;
2. 东北农业大学资源与环境学院, 哈尔滨 150030)

摘 要:以氮高效转基因水稻 OsNRT 2.3b 两个不同株系 N-04 和 N-08 为研究对象, 以非转基因亲本日本晴(Nipp)为对照, 在田间小区试验条件下, 设施氮和不施氮两种处理, 采用变性梯度凝胶电泳(PCR-DGGE)技术, 分析了氮高效转基因水稻在生长期对土壤氨氧化细菌群落多样性的影响。研究发现, 水稻土壤氨氧化细菌丰富度指数在各生长期内品种间均不存在显著差异。两种处理条件下 N-04 的土壤氨氧化细菌香农-威纳指数仅在拔节期与 Nipp 有显著差异, 其余生育期均无显著差异; 在施氮条件下 N-08 的土壤氨氧化细菌香农-威纳指数在拔节期和抽穗扬花期与 Nipp 存在显著差异, 不施氮条件下仅拔节期出现显著差异。两种处理条件下, N-04 的土壤氨氧化细菌均匀度指数与 Nipp 相比整个生长期均无显著差异, 而 N-08 在拔节期显著低于 Nipp。测序结果表明, 施氮和不施氮处理下氮高效转基因水稻(N-08 和 N-04)与 Nipp 相比土壤中拥有更多的亚硝化螺旋菌属(*Nitrosospira*)和亚硝化单胞菌属(*Nitrosomonas*)。研究表明, 氮高效转基因水稻在个别生育期对香农-威纳指数和均匀度指数有显著差异, 且其更有利于促进土壤铵态氮向硝态氮的转化。

关键词: 氮高效转基因水稻; 氨氧化细菌; 多样性; PCR-DGGE

中图分类号: S511 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-2043(2017)06-1149-11 **doi:** 10.11654/jaes.2017-0116

Effect of N-efficient transgenic rice on diversity and community structure of soil ammonia-oxidizing bacteria

WEI Lin-lin¹, YANG Dian-lin¹, HOU Meng-yao^{1,2}, NI Tu¹, LI Gang¹, XIU Wei-ming¹, WANG Hui¹, ZHAO Jian-ning^{1*}

(1. Key Laboratory of Original Agro-environment Quality, Ministry of Agriculture/Tianjin Key Laboratory of Agro-environment and Agro-product Safety, Agro-Environmental Protection Institute, Ministry of Agriculture, Tianjin 300191, China; 2. College of Resource and Environment, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: Our study investigated the effect of N-efficient transgenic rice of different strains (N-04 and N-08) and its parent on the diversity and community structure of soil ammonia-oxidizing bacteria. Regarding the field plot experiment, we analyzed the effect of the N-efficient transgenic rice on diversity and community structure of soil ammonia-oxidizing bacteria with nitrogenous and non-nitrogenous fertilizer application via a denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) technique. No significant difference in richness index (*S*) between the N-efficient transgenic rice and Nipp was found. Excluding the elongation stage, N-04 and Nipp had no significant difference in Shannon-Wiener index (*H*) between nitrogenous and non-nitrogenous fertilizer application. During the elongation, heading, and flowering stages with nitrogenous fertilizer application and the elongation stage without nitrogenous fertilizer application, N-08 had significant effects on the *H*. Under the conditions of nitrogenous and non-nitrogenous fertilizer application, N-04 had no significant difference on the evenness index

收稿日期: 2017-01-20

作者简介: 魏琳琳(1991—), 女, 天津北辰人, 硕士研究生, 从事转基因生物生态安全研究。E-mail: weilinlin0205@163.com

* 通信作者: 赵建宁 E-mail: zhaojn2008@163.com

基金项目: 国家自然科学基金项目(31301855); 转基因生物新品种培育重大专项(2016ZX08012005)

Project supported: The National Natural Science Foundation of China(31301855); Genetically Modified Organisms Breeding Major Projects(2016ZX08012005)

(*En*) during all growing stages, and N-08 only had significant difference with regard to Nipp during the elongation stage. The sequence and phylogenetic analysis indicated that N-04 and N-08 had more bands than Nipp, and these bands belonged to *Nitrosospira* and *Nitrosomonas*. Therefore, N-efficient transgenic rice had significant effects on the *H* and *En* of soil ammonia-oxidizing bacteria during certain rice growing stages, and it was more effective than its parent was for accelerating NH_4^+ transfer to NO_3^- .

Keywords: N-efficient transgenic rice; ammonia-oxidizing bacteria; diversity; PCR-DGGE

从1996年到2015年,全球转基因作物累计种植面积达到空前的20亿 hm^2 ,转基因作物已经成为现代农业史上推广最为迅速的农作物^[1],但转基因作物在给人们带来巨大经济效益的同时,其所带来的生态安全性问题也日益引起公众的广泛关注,尤其是对土壤微生物群落多样性的影响^[2]。有研究表明,转基因棉花的种植能使土壤细菌和真菌的数量明显增加,使其群落组成发生变化^[3-4],也有文献报道转基因作物的种植未对土壤微生物群落结构产生显著影响^[5-6]。然而,要更为深入评价转基因植物对土壤微生物的影响,在研究分析整体微生物群落的过程中,还应研究转基因植物对土壤指示性微生物的影响^[7]。

氨氧化细菌作为微生物生态研究的指示性微生物,同时也是执行硝化作用第一步(将氨氧化为亚硝酸盐即硝化速率限制性步骤)的关键微生物^[8-9],在土壤氮素循环中占有重要地位^[10],但其群落组成容易受气候条件、土壤利用方式和植被类型等的影响^[11-13],因此受到相关领域科学家的广泛关注^[14-15]。

氮高效转基因水稻 OsNRT 2.3b 是利用转基因技术将水稻高亲和硝酸盐转运蛋白 OsNRT 2.3b 基因导入受体而获得的超表达材料。Fan 等^[16]和唐仲^[17]研究发现,与常规稻相比,OsNRT 2.3b 超表达株系中积累的氮素总量提高了21%,铵态氮吸收速率提高了12%,氮素利用效率提高了40%,单株产量提高了30%。由于土壤氮循环长期处于一个动态平衡的状态^[18],氮高效转基因水稻的种植势必会从土壤中吸收更多的氮素,改变土壤氮素动态特征^[11],进而可能影响土壤氨氧化细菌群落结构。

本研究采用 PCR-DGGE 技术,以氮高效转基因水稻 OsNRT2.3b 的两个不同株系 N-04 和 N-08 为对象,研究其土壤氨氧化细菌 16S rDNA 基因群落结构及多样性组成,为科学评价氮高效转基因水稻对土壤微生物的影响提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验地概况与试验设计

试验在农业部环境保护科研监测所网室内进行,

种植小区四周及底部为混凝土结构,内部长、宽、高均为1m,小区内土壤为天津市津南区未种植过作物的潮土,全磷含量 $1.19\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,全氮含量 $0.96\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,有机质含量 $24.55\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,pH 8.21。

试验采用完全随机区组设计,设施氮和不施氮两种处理,5次重复。氮源($20\text{ g}\cdot\text{m}^{-2}$)^[19-20]为尿素 $[\text{CO}(\text{NH}_2)_2]$,其中50%用作基肥,50%作追肥,追肥在水稻分蘖后期施用。分别以磷酸二氢钾($\text{P}_2\text{O}_5:15\text{ g}\cdot\text{m}^{-2}$)和硫酸钾($\text{K}_2\text{O}:18\text{ g}\cdot\text{m}^{-2}$)作为磷肥和钾肥,全部用作基肥。

1.2 供试材料

试验所用水稻为氮高效转基因水稻 OsNRT 2.3b 的两个不同株系 N-04 和 N-08 及非转基因亲本日本晴 Nipp,均由南京农业大学资源与环境科学学院植物营养分子生物学实验室提供。水稻种子于2015年5月8日播种于培养盘中,每穴5粒,于6月25日移苗,挑选长势一致的水稻苗,每个小区内移栽水稻20株。

1.3 土壤样品采集

分别于水稻分蘖期(7月27日)、拔节期(9月8日)、抽穗扬花期(10月10日)和成熟期(11月12日)采集土样。采集土样时,去除表面杂草和枯枝落叶,用直径3.5cm的土钻在距水稻主茎2cm处取20cm深的土样,每小区3个取样点。将各个小区的样品分别混合,置于 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱,用于土壤氨氧化细菌群落多样性分析。

1.4 测定方法

1.4.1 土壤微生物总 DNA 提取

本研究采用 Mo Bio 公司的 Powerlyzer powersoil DNA isolation kit(Mo Bio laboratories, Solana Beach, CA, USA)试剂盒,取0.5g鲜土置于 Glass Bead Tube 中,按操作说明逐步进行提取,将提取到土壤的 DNA 用1.5%的琼脂糖凝胶检测样品质量,并于 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 保存。

1.4.2 PCR 扩增

采用巢式 PCR(Nested PCR)方法扩增氨氧化细菌 16S rDNA 基因序列^[21],引物及反应条件见表1。第一轮 PCR 反应产物大小为465bp,PCR 反应体系为50 μL (两种引物各0.5 μL ,Premix Ex Taq 25 μL ,稀释2倍的土壤 DNA 模板5 μL ,用灭菌水补足至50

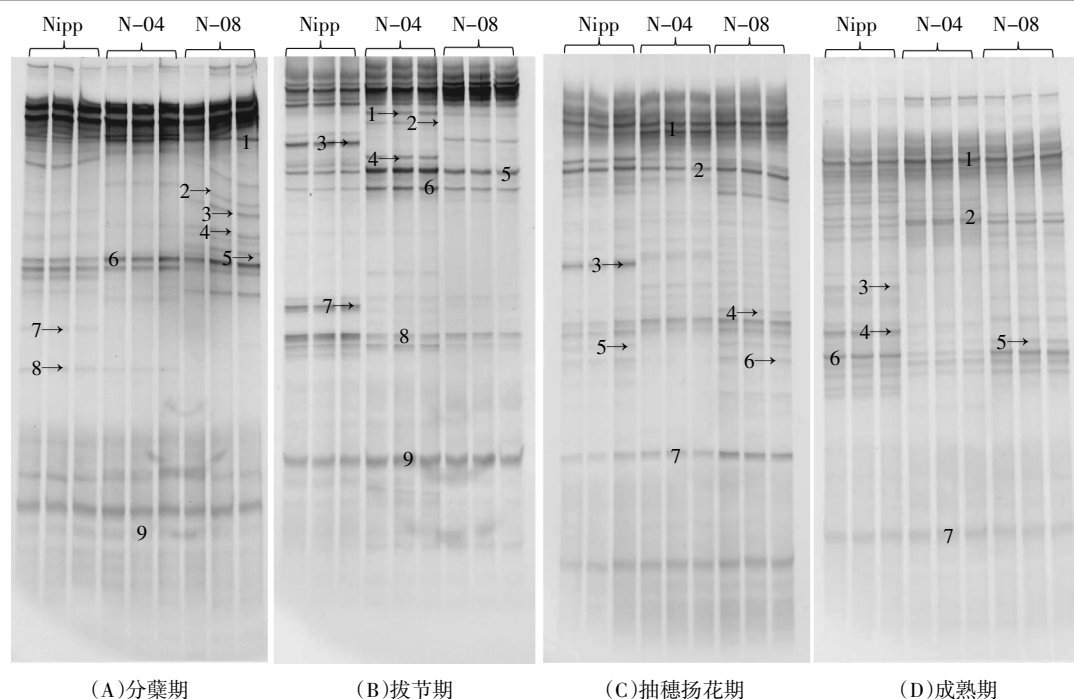


图1 施氮处理不同生长时期土壤样品 DGGE 指纹图谱

Figure 1 DGGE profile in soil grown with different rice varieties under nitrogenous fertilizer application

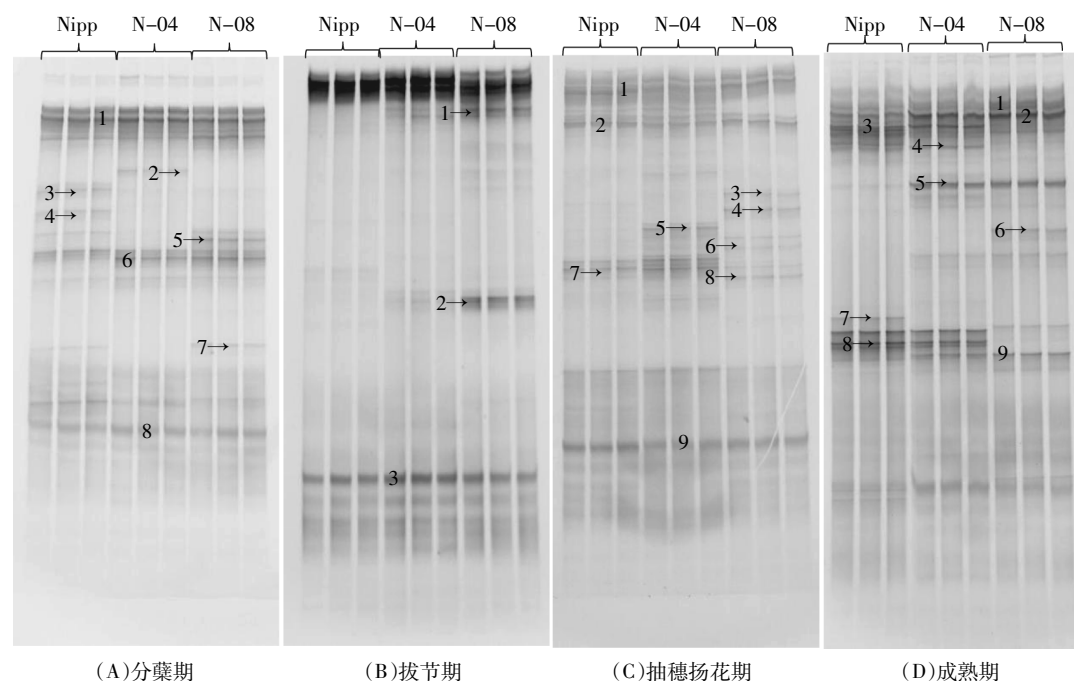


图2 不施氮处理不同生长时期土壤样品 DGGE 指纹图谱

Figure 2 DGGE profile in soil grown with different rice varieties without nitrogenous fertilizer application

Nipp 产生显著差异(表 3)。

2.3 土壤氨氧化细菌 16S rDNA 基因测序结果及系统发育分析

根据土壤氨氧化细菌 DGGE 指纹图谱(图 1 和图 2)及条带灰度比率值大小,在施氮条件下选取 32

条条带,不施氮条件下选取 29 条条带,进行克隆测序,并经 NCBI 序列比对分析。结果发现各选取条带与已知序列相似度均在 96%~100%之间(表 4 和表 5),将测序获得的基因序列与 Genbank 其他相似序列对比,绘制系统发育树并进行系统发育分析(图 3 和图 4)。

表 2 施氮处理不同生长期土壤氨氧化细菌 DGGE 图谱多样性指数分析

Table 2 Shannon-Wiener index, Richness and Evenness of soil ammonia oxidizing bacteria under nitrogenous fertilizer application

生长期 Growth stage	品种 Rice variety	丰富度(S) Richness	香农-威纳指数(H) Shannon-Wiener index	均匀度指数(En) Evenness
分蘖期 Tillering stage	Nipp	15±0.00a	2.51±0.02a	0.93±0.01a
	N-04	14±0.00a	2.49±0.02a	0.94±0.01a
	N-08	13±0.03a	2.48±0.01a	0.95±0.01a
拔节期 Elongation stage	Nipp	17±0.01a	2.76±0.00a	0.97±0.00a
	N-04	18±0.04a	2.77±0.01a	0.96±0.00a
	N-08	16±0.01a	2.61±0.02b	0.93±0.01b
抽穗扬花期 Heading and flowering stage	Nipp	15±0.00a	2.60±0.01b	0.96±0.00a
	N-04	15±0.03a	2.57±0.00c	0.95±0.00a
	N-08	16±0.01a	2.78±0.01a	0.96±0.00a
成熟期 Maturing stage	Nipp	16±0.02a	2.72±0.00a	0.98±0.00a
	N-04	15±0.02a	2.71±0.01a	0.97±0.00a
	N-08	16±0.02a	2.71±0.01a	0.97±0.00a

注: 同列不同小写字母表示同一生育期不同品种水稻多样性指数差异显著($P<0.05$)。下同。

Note: Different lower case letters within a line mean significant difference at 0.05 level between different varieties within the same stage. The same below.

表 3 不施氮处理不同生长期土壤氨氧化细菌 DGGE 图谱多样性指数分析

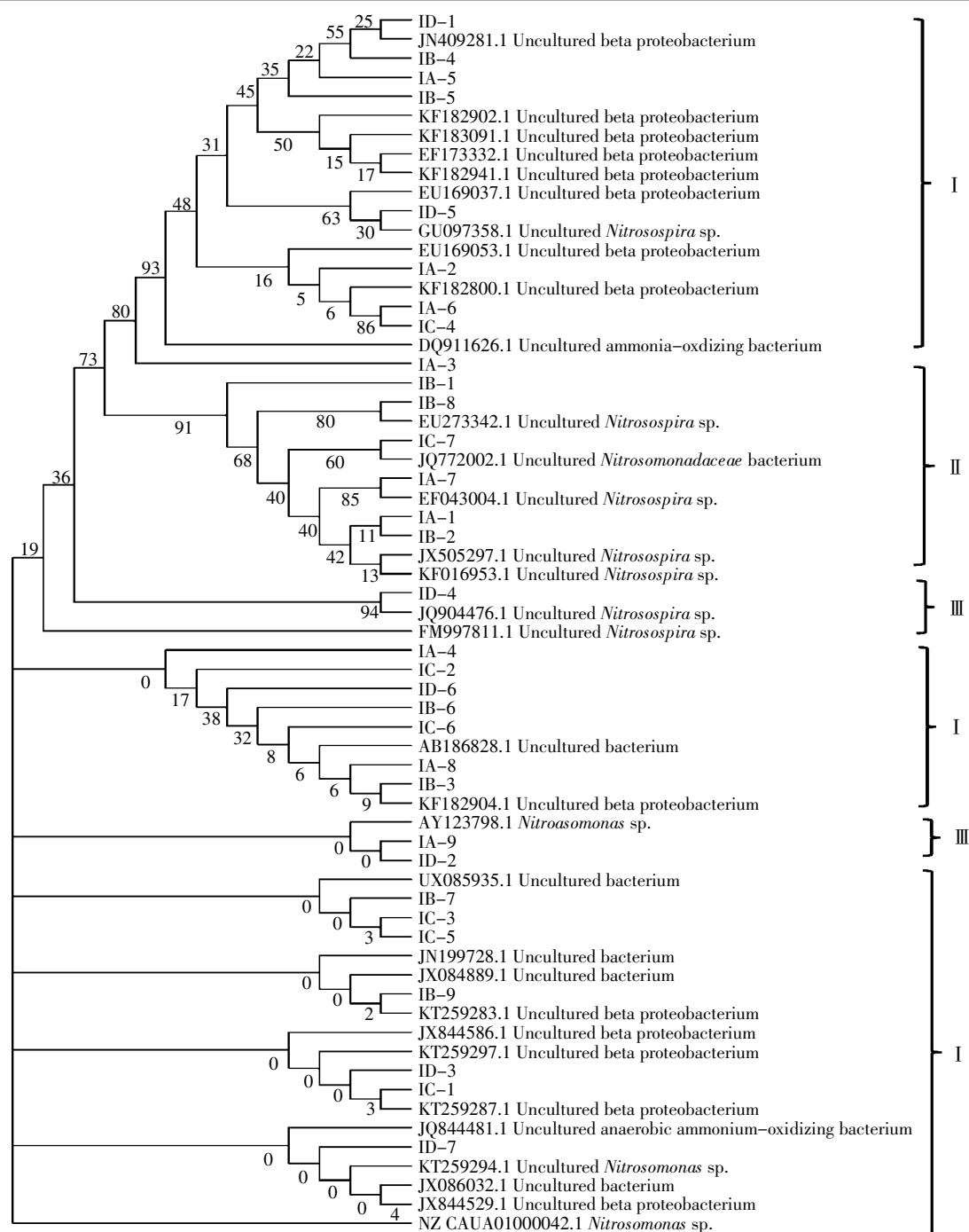
Table 3 Shannon-Wiener index, Richness and Evenness of soil ammonia oxidizing bacteria without nitrogenous fertilizer application

生长期 Growth stage	品种 Rice variety	丰富度(S) Richness	香农-威纳指数(H) Shannon-Wiener index	均匀度指数(En) Evenness
分蘖期 Tillering stage	Nipp	11±0.01a	2.33±0.01a	0.97±0.01a
	N-04	11±0.01a	2.31±0.00a	0.97±0.00a
	N-08	11±0.00a	2.33±0.00a	0.97±0.00a
拔节期 Elongation stage	Nipp	10±0.02a	2.23±0.02b	0.95±0.01a
	N-04	10±0.00a	2.24±0.01b	0.96±0.00a
	N-08	12±0.04a	2.36±0.00a	0.93±0.00b
抽穗扬花期 Heading and flowering stage	Nipp	16±0.00a	2.75±0.00a	0.99±0.00a
	N-04	15±0.00a	2.66±0.00b	0.99±0.00a
	N-08	16±0.01a	2.75±0.00a	0.99±0.00a
成熟期 Maturing stage	Nipp	14±0.03a	2.53±0.00a	0.98±0.00a
	N-04	14±0.01a	2.59±0.00a	0.98±0.00a
	N-08	15±0.01a	2.55±0.00a	0.98±0.00a

从系统发育树可以看出, 施氮处理条件下 32 个阳性克隆和不施氮处理条件下 29 个阳性克隆主要属于不可培养 β -变形菌纲(Uncultured beta proteobacterium)、亚硝化螺旋菌属(*Nitrosospira* sp.)和亚硝化单胞菌属(*Nitrosomonas* sp.), 其中 N-08 的优势属为亚硝化螺旋菌属(*Nitrosospira* sp.), N-04 和 Nipp 的优势属均为不可培养 β -变形菌纲(Uncultured beta proteobacterium)。

根据土壤氨氧化细菌 DGGE 指纹图谱及条带比对结果发现, 在施氮处理条件下, 各生长期 N-08 属于 β -变形菌门的亚硝化单胞菌属(*Nitrosomonas*

sp.)的条带共有 6 条, 属于 β -变形菌门的亚硝化螺旋菌属(*Nitrosospira* sp.)的有 3 条, N-04 属于上述菌属的条带共有 6 条, 而 Nipp 有 5 条(表 4)。不施氮条件下, N-08 属于 β -变形菌门的亚硝化单胞菌属(*Nitrosomonas* sp.)和亚硝化螺旋菌属(*Nitrosospira* sp.)的条带共有 6 条, N-04 则有 5 条, Nipp 仅有 1 条属于亚硝化螺旋菌属(*Nitrosospira* sp.)的条带, 未发现属于亚硝化螺旋菌属(*Nitrosospira* sp.)的条带, 且该条带属于三种水稻品种共有条带(表 5)。由此可以看出, N-08 和 N-04 属于亚硝化螺旋菌属(*Nitrosospira* sp.)和亚硝化单胞菌属(*Nitrosomonas* sp.)的条带数量显



I : 不可培养 β -变形菌纲(Uncultured beta proteobacterium); II : 亚硝化螺旋菌属(*Nitrosospira* sp.); III : 亚硝化单胞菌属(*Nitrosomonas* sp.)

图3 施氮条件下土壤氨氧化细菌 16S rRNA 基因系统发育树

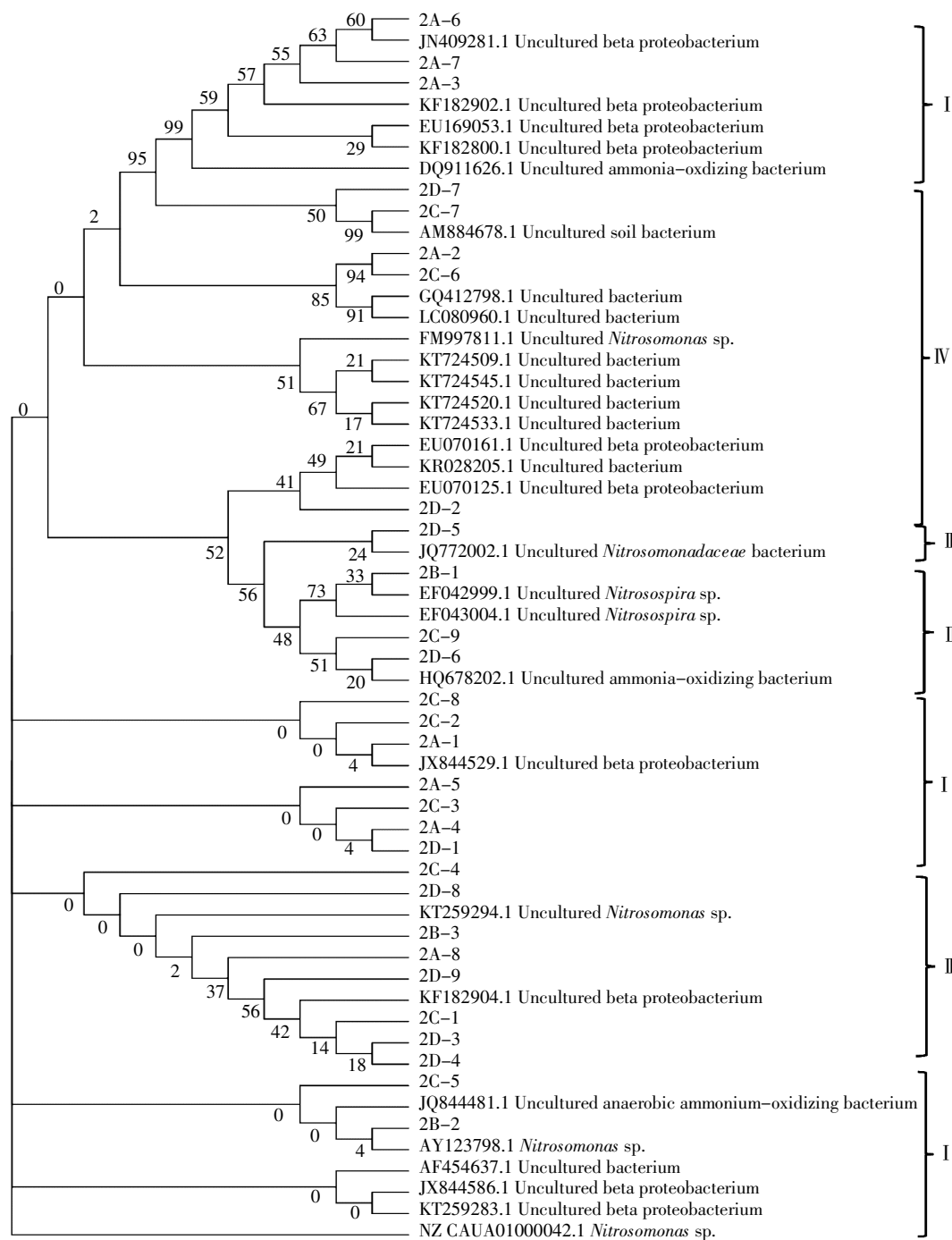
Figure 3 Neighbour-joining tree depicting the phylogenetic relationships among the 16S rRNA sequences under nitrogenous fertilizer application

著高于 Nipp。

3 讨论

目前关于转基因水稻生态环境安全性评价的研究主要集中在基因漂移、靶标及非靶标生物的影响以

及农业生态环境等方面^[22]。转基因生物释放后是否对土壤微生物产生影响,近年已成为研究热点^[23-25]。陈丽华等^[26]研究发现抗真菌转基因水稻秸秆降解对土壤细菌数量的影响不显著,且转基因土壤样品与非转基因土壤样品中土壤细菌的丰富度、多样性指数、均匀



I : 不可培养 β -变形菌纲 (Uncultured beta proteobacterium); II : 亚硝化螺旋菌属 (*Nitrosospira* sp.); III : 亚硝化单胞菌属 (*Nitrosomonas* sp.); IV : 不可培养细菌 (*Uncultured bacterium*)

图 4 不施氮条件下土壤氨氧化细菌 16S rDNA 基因系统发育树

Figure 4 Neighbour-joining tree depicting the phylogenetic relationships among the 16S rDNA sequences without nitrogenous fertilizer application

度指数均不存在显著差异。但陈晓雯等^[27]却发现转 *CryIAc* 基因和转 *CryIAb* 基因水稻在生长旺盛时期, 土壤中细菌数量显著高于非转基因亲本水稻, 不过这种影响的持续时间较短。陈丽华等^[28]也证实了广谱抗真菌蛋白转基因水稻秸秆降解对土壤可培养真菌数

和真菌群落结构有影响, 但所产生的影响是短暂的、不持续的。

本研究发现, N-08 的土壤氨氧化细菌香农-威纳指数在施氮条件下的抽穗扬花期和不施氮条件下的拔节期均显著高于 Nipp, 其余时期无显著差异。这与

表4 施氮条件下 DGGE 条带比对结果

Table 4 BLAST analysis on the sequences of the 16S rDNA/DGGE excised under nitrogenous fertilizer application

条带编号 Band No.	相似度 Similarity/%	GenBank 登录号 GenBank accession number	比对菌 Relative bacterium	菌类 Fungus
1A-1	100	KF016953.1	Uncultured <i>Nitrosomonas</i> sp.	亚硝化单胞菌属
1A-2	98	FM997811.1	Uncultured <i>Nitrosomonas</i> sp.	亚硝化单胞菌属
1A-3	99	EF043004.1	Uncultured <i>Nitrospira</i> sp.	亚硝化螺旋菌属
1A-4	100	JQ844481.1	Uncultured anaerobic ammonium-oxidizing bacterium	厌氧氨氧化细菌
1A-5	99	AY123798.1	<i>Nitrosomonas</i> sp.	亚硝化单胞菌属
1A-6	98	EU169037.1	Uncultured beta proteobacterium	β -变形菌纲
1A-7	98	NZ_CAU01000042.1	<i>Nitrospira</i> sp.	亚硝化螺旋菌属
1A-8	99	KT259294.1	Uncultured <i>Nitrosomonas</i> sp.	亚硝化单胞菌属
1A-9	100	JN199728.1	Uncultured bacterium	细菌
1B-1	100	JX505297.1	Uncultured <i>Nitrosomonas</i> sp.	亚硝化单胞菌属
1B-2	99	JN409281.1	Uncultured beta proteobacterium	β -变形菌纲
1B-3	99	KF182904.1	Uncultured beta proteobacterium	β -变形菌纲
1B-4	100	KF182800.1	Uncultured beta proteobacterium	β -变形菌纲
1B-5	99	EF173332.1	Uncultured beta proteobacterium	β -变形菌纲
1B-6	99	JX844586.1	Uncultured beta proteobacterium	β -变形菌纲
1B-7	98	DQ911626.1	Uncultured ammonia-oxidizing bacterium	氨氧化细菌
1B-8	100	EU273342.1	Uncultured <i>Nitrospira</i> sp.	亚硝化螺旋菌属
1B-9	99	KT259287.1	Uncultured beta proteobacterium	β -变形菌纲
1C-1	100	KT259297.1	Uncultured beta proteobacterium	β -变形菌纲
1C-2	99	JX844529.1	Uncultured beta proteobacterium	β -变形菌纲
1C-3	100	EU169053.1	Uncultured beta proteobacterium	β -变形菌纲
1C-4	99	JQ904476.1	Uncultured <i>Nitrosomonas</i> sp.	亚硝化单胞菌属
1C-5	99	KT259283.1	Uncultured beta proteobacterium	β -变形菌纲
1C-6	98	JX085935.1	Uncultured bacterium	细菌
1C-7	99	JQ772002.1	Uncultured Nitrosomonadaceae bacterium	亚硝化单胞菌科
1D-1	98	KF182941.1	Uncultured beta proteobacterium	β -变形菌纲
1D-2	100	JX086032.1	Uncultured bacterium	细菌
1D-3	98	KF183091.1	Uncultured beta proteobacterium	β -变形菌纲
1D-4	98	KF182902.1	Uncultured beta proteobacterium	β -变形菌纲
1D-5	99	GU097358.1	Uncultured <i>Nitrospira</i> sp.	亚硝化螺旋菌属
1D-6	98	AB186828.1	Uncultured bacterium	细菌
1D-7	99	JX084889.1	Uncultured bacterium	细菌

Jin 等^[29]的研究结果一致,其也发现转基因大豆的土壤氨氧化细菌香农-威纳指数仅在收获期显著增高。本研究还发现 N-04 与 Nipp 的土壤氨氧化细菌香农-威纳指数在施氮和不施氮处理条件下均无显著差异(除抽穗扬花期外),说明氮高效转基因水稻本身对土壤氨氧化细菌的影响也是短暂的,但不同施肥处理、不同生长期之间土壤氨氧化细菌香农-威纳指数差异较大。这与金凌波等^[30]对转基因大豆土壤微生物群落水平的研究结果相似。Heuer 等^[31]对转 T4 溶菌酶基因土豆根际微生物群落结构的研究,也发现其主要与季节、种植地点和年份有关。

本文对土壤氨氧化细菌均匀度指数的研究发现,在两种供氮处理条件下,N-08 与 Nipp 的土壤氨氧化细菌均匀度指数在分蘖期、抽穗扬花期和成熟期均无显著差异,仅在拔节期显著低于 Nipp。邵婧鑫^[32]、徐广惠^[33]也证明了这一现象,其发现转基因大豆的土壤氨氧化细菌均匀度指数仅在生长旺盛时期显著低于非转基因品种。董莲华等^[7]的研究也发现,转 *Bt+CpTI* 基因抗虫棉的土壤氨氧化细菌均匀度指数在花铃期显著低于非转基因材料,且其余时期均未发现明显差异,与本研究结果也一致,说明氮高效转基因水稻对土壤氨氧化细菌均匀度指数的影响是

表 5 不施氮条件下 DGGE 条带比对结果

Table 5 BLAST analysis on the sequences of the 16S rDNA/DGGE excised without nitrogenous fertilizer application

条带编号 Band No.	相似度 Similarity/%	GenBank 登录号 GenBank accession number	比对菌 Relative bacterium	菌类 Fungus
2A-1	99	AF454637.1	Uncultured bacterium	细菌
2A-2	97	GQ412798.1	Uncultured bacterium	细菌
2A-3	99	KF182902.1	Uncultured beta proteobacterium	β -变形菌纲
2A-4	99	KT259283.1	Uncultured beta proteobacterium	β -变形菌纲
2A-5	99	FM997811.1	Uncultured <i>Nitrosomonas</i> sp.	亚硝化单胞菌属
2A-6	99	EU169053.1	Uncultured beta proteobacterium	β -变形菌纲
2A-7	98	KF182800.1	Uncultured beta proteobacterium	β -变形菌纲
2A-8	99	JX844529.1	Uncultured beta proteobacterium	β -变形菌纲
2B-1	99	EF042999.1	Uncultured <i>Nitrospira</i> sp.	亚硝化螺旋菌属
2B-2	98	AY123798.1	<i>Nitrosomonas</i> sp.	亚硝化单胞菌属
2B-3	98	KT724509.1	Uncultured bacterium	细菌
2C-1	98	KT724545.1	Uncultured bacterium	细菌
2C-2	99	NZ_CAU01000042.1	<i>Nitrospira</i> sp.	亚硝化螺旋菌属
2C-3	99	JX844586.1	Uncultured beta proteobacterium	β -变形菌纲
2C-4	100	KT259294.1	Uncultured <i>Nitrosomonas</i> sp.	亚硝化单胞菌属
2C-5	100	JQ844481.1	Uncultured anaerobic ammonium-oxidizing bacterium	厌氧氨氧化细菌
2C-6	96	LC080960.1	Uncultured bacterium	细菌
2C-7	98	AM884678.1	Uncultured soil bacterium	土壤细菌
2C-8	99	DQ911626.1	Uncultured ammonia-oxidizing bacterium	氨氧化细菌
2C-9	100	HQ678202.1	Uncultured ammonia-oxidizing bacterium	氨氧化细菌
2D-1	98	KT724533.1	Uncultured bacterium	细菌
2D-2	99	KR028205.1	Uncultured bacterium	细菌
2D-3	98	EU070161.1	Uncultured beta proteobacterium	β -变形菌纲
2D-4	96	EF043004.1	Uncultured <i>Nitrospira</i> sp.	亚硝化螺旋菌属
2D-5	99	JQ772002.1	Uncultured Nitrosomonadaceae bacterium	亚硝化单胞菌科
2D-6	99	JN409281.1	Uncultured beta proteobacterium	β -变形菌纲
2D-7	97	KF182904.1	Uncultured beta proteobacterium	β -变形菌纲
2D-8	98	KT724520.1	Uncultured bacterium	细菌
2D-9	98	EU070125.1	Uncultured beta proteobacterium	β -变形菌纲

短暂的。

亚硝化单胞菌属(*Nitrosomonas* sp.)在硝化作用第一阶段亚硝化作用中起主导作用,可以促进 NH_4^+ 氧化成 NO_2^- ,具有限制二氧化碳固定的能力^[34-35],亚硝化螺旋菌属(*Nitrospira* sp.)可作为硝化细菌,将亚硝酸盐氧化为硝酸盐^[36-37]。本研究中施氮和不施氮处理下,氮高效转基因水稻(N-04 和 N-08)土壤中属于亚硝化螺旋菌属(*Nitrospira* sp.)和亚硝化单胞菌属(*Nitrosomonas* sp.)的氨氧化细菌显著多于 Nipp。因此,N-04 和 N-08 的种植存在促进土壤中铵态氮氧化为硝态氮的可能。本研究对各生长期土壤硝态氮和铵态氮含量也进行了分析(研究结果未在文中列出),结果发现 N-08 和 N-04 在生长旺盛时期土壤硝态氮含量

确实显著高于 Nipp,而铵态氮含量显著低于 Nipp,也进一步证明了氮高效转基因水稻的种植有利于土壤铵态氮向硝态氮的转化。

4 结论

(1)各生长期内氮高效转基因水稻(N-04 和 N-08)和非转基因水稻(Nipp)在施氮和不施氮处理条件下 DGGE 指纹图谱多为共有条带。

(2)N-04 和 N-08 的土壤氨氧化细菌香农-威纳指数和均匀度指数仅在个别时期与 Nipp 产生显著差异,说明氮高效转基因水稻本身对土壤氨氧化细菌群落多样性的影响是短暂的。

(3)氮高效转基因水稻(N-04 和 N-08)土壤中属

于亚硝化螺旋菌属(*Nitrosospira* sp.)和亚硝化单胞菌属(*Nitrosomonas* sp.)的氨氧化细菌显著多于 Nipp,说明氮高效转基因水稻的种植有利于土壤铵态氮向硝态氮的转化。

参考文献:

- [1] James C. 2015 年全球生物技术/转基因作物商业化发展态势[J]. 中国生物工程杂志, 2016, 36(4): 1-11.
James C. Global biotech/GM crops commercialization development situation in 2015[J]. *China Biotechnology*, 2016, 36(4): 1-11.
- [2] 赖 欣, 张永生, 赵 帅, 等. 转基因大豆对土壤氨氧化细菌的影响[J]. 华北农学报, 2011, 26(1): 210-214.
LAI Xin, ZHANG Yong-sheng, ZHAO Shuai, et al. Effect of transgenic soybean on amount and diversity of ammonia-oxidizing bacteria in rhizospheric soil[J]. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 2011, 26(1): 210-214.
- [3] Han C, Zhong W H, Shen W S, et al. Transgenic *Bt* rice has adverse impacts on CH₄ flux and rhizospheric methanogenic archaeal and methanotrophic bacterial communities[J]. *Plant and Soil*, 2013, 369(112): 297-316.
- [4] Wang H X, Chen X, Tang J J. Influence of the straw decomposition of *Bt* transgenic rice on soil culturable microbial flora[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2004, 24(1): 89-94.
- [5] Song Y N, Su J, Chen R, et al. Diversity of microbial community in a paddy soil with *cry1Ac/cpti* transgenic rice[J]. *Soil Science Society of China*, 2014, 24(3): 349-358.
- [6] Zhu W J, Lu H H, Hill J, et al. ¹³C pulse-chase labeling comparative assessment of the active methanogenic archaeal community composition in the transgenic and nontransgenic parental rice rhizospheres[J]. *Fems Microbiology Ecology*, 2014, 87(3): 746-756.
- [7] 董莲华, 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[J]. 微生物学报, 2014, 54(3): 309-318.
DONG Lian-hua, MENG Ying, WANG Jing. Effects of transgenic *Bt+CpTI* cotton on rhizosphere bacteria and ammonia oxidizing bacteria population[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2014, 54(3): 309-318.
- [8] Oved T, Shaviv A, Goldrath T, et al. Influence of effluent irrigation on community composition and function of ammonia-oxidizing bacteria in soil[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(8): 3426-3433.
- [9] 董莲华, 杨金水, 袁红莉. 氨氧化细菌的分子生态学研究进展[J]. 应用生态学报, 2008, 19(6): 1381-1388.
DONG Lian-hua, YANG Jin-shui, YUAN Hong-li. Research advances in molecular ecology of ammonia oxidizing bacteria[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2008, 19(6): 1381-1388.
- [10] Kowalchuk G A, Stephen J R. Ammonia-oxidizing bacteria: A model for molecular microbial ecology[J]. *Annual Review Microbiol*, 2001, 55(1): 485-529.
- [11] 张 慧, 袁红朝, 朱亦君, 等. 不同利用方式对红壤坡地微生物多样性和硝化势的影响[J]. 生态学杂志, 2011, 30(6): 1169-1176.
ZHANG Hui, YUAN Hong-chao, ZHU Yi-jun, et al. Microbial diversity and nitrification potential of sloping land red soil under different land use patterns[J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2011, 30(6): 1169-1176.
- [12] Zhang L M, Wang M, Prosser J I, et al. Altitude ammonia oxidizing bacteria and archaea in soils of Mount Everest[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2009, 70(4): 208-217.
- [13] 文都日乐, 李 刚, 杨殿林, 等. 内蒙古呼伦贝尔草原土壤氨氧化细菌多样性及群落结构[J]. 应用生态学报, 2011, 22(4): 929-935.
WENDU Ri-le, LI Gang, YANG Dian-lin, et al. Diversity and community structure of soil ammonia-oxidizing bacteria in Hulunbeier Grassland, Inner Mongolia[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2011, 22(4): 929-935.
- [14] Mccraig A E, Philips C J, Stephen J R, et al. Nitrogen cycling and community structure of proteobacterial β -subgroup ammonia-oxidizing bacteria within polluted marine fish farm sediments[J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 1999, 65(1): 213-220.
- [15] Nicolaisen M H, Ramsing N B. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) approaches to study the diversity of ammonia-oxidizing bacteria[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2002, 50(2): 189-203.
- [16] Fan X R, Tang Z, Tan Y W, et al. Over expression of a pH-sensitive nitrate transporter in rice increases crop yield[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2016, 113(26): 7118-7123.
- [17] 唐 仲. 水稻高亲和硝酸盐转运蛋白基因 OsNRT 2.3a/b 生物学功能分析[D]. 南京: 南京农业大学, 2012.
TANG Zhong. Function analyses of high-affinity nitrate transporter gene OsNRT 2.3a/b in rice[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2012.
- [18] 张春娜. 中国陆地土壤氮库研究[D]. 重庆: 西南农业大学, 2004.
ZHANG Chun-na. Study on terrestrial soil nitrogen pool in China[D]. Chongqing: Southwest Agricultural University, 2004.
- [19] 晏 娟, 尹 斌, 张绍林, 等. 不同施氮量对水稻氮素吸收与分配的影响[J]. 植物营养与肥料学报, 2008, 14(5): 835-839.
YAN Juan, YIN Bin, ZHANG Shao-lin, et al. Effect of nitrogen application rate on nitrogen uptake and distribution in rice[J]. *Plant Nutrition and Fertilizer Science*, 2008, 14(5): 835-839.
- [20] 叶永印, 张时龙. 氮肥施用技术对水稻产量及构成因素的影响[J]. 安徽农业科学, 2002, 30(3): 366-368.
YE Yong-yin, ZHANG Shi-long. Effect of nitrogen application skill on the yield and yield components of rice[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2002, 30(3): 366-368.
- [21] Zhang B, Sun B, Ji M, et al. Quantification and comparison of ammonia-oxidizing bacterial communities in MBRs treating various types of waste water[J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101(9): 3054-3059.
- [22] Lu B R, Xia H. Environmental biosafety of transgenic plants: Research and assessment of transgene escape and its potential ecological impacts[J]. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2011, 23(2): 186-194.
- [23] 王 敏, 关 潇. 不同转基因作物对土壤微生物的影响[J]. 山西农业科学, 2015, 43(2): 229-232, 243.
WANG Min, GUAN Xiao. The effects of different genetically modified crops on soil microorganisms[J]. *Journal of Shanxi Agricultural Sciences*, 2015, 43(2): 229-232, 243.

- [24] 张艳军, 谢明, 彭德良. 转基因作物对土壤微生物的影响[J]. 应用生态学报, 2013, 24(9):2685–2690.
ZHANG Yan-jun, XIE Ming, PENG De-liang. Effects of transgenic crops on soil microorganisms: A review[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2013, 24(9):2685–2690.
- [25] Sohn S I, Oh Y J, Kim B Y, et al. Effect of genetically modified rice producing resveratrol on the soil microbial communities[J]. *J Korean Soc Appl Biol Chem*, 2015, 58(6):795–805.
- [26] 陈丽华, 吕新, 林碧娇, 等. 抗真菌转基因水稻秸秆降解对土壤细菌数量及多样性的影响[J]. 生态安全学报, 2012, 21(2):125–129.
CHEN Li-hua, LÜ Xin, LIN Bi-jiao, et al. Effects of straw decomposition of antifungal transgenic rice on the amount and diversity of soil bacteria[J]. *Journal of Biosafety*, 2012, 21(2):125–129.
- [27] 陈晓雯, 林胜, 尤民生, 等. 转基因水稻对土壤微生物群落结构及功能的影响[J]. 生物安全学报, 2011, 20(2):151–159.
CHEN Xiao-wen, LIN Sheng, YOU Min-sheng, et al. Effects of transgenic rice on the structure and function of soil microbial communities[J]. *Journal of Biosafety*, 2011, 20(2):151–159.
- [28] 陈丽华, 吕新, 林碧娇, 等. 广谱抗真菌蛋白转基因水稻秸秆模拟还田对土壤真菌群落结构的影响[J]. 中国生态农业学报, 2015, 23(1):87–94.
CHEN Li-hua, LÜ Xin, LIN Bi-jiao, et al. Effects of simulated straw return of transgenic rice expressing broad-spectrum antifungal proteins on soil fungal community structure[J]. *Chinese Journal of Eco-Agriculture*, 2015, 23(1):87–94.
- [29] Jin Y, Qu J J, Ren G M, et al. Effects of transgenic DREB soybean Dongnong 50 on the diversity of soil ammonia-oxidizing bacteria[J]. *Plant Protection*, 2013, 14(7):988–992.
- [30] 金凌波, 周峰, 姚涓, 等. 磷高效转基因大豆对根际微生物群落的影响[J]. 生态学报, 2012, 32(7):2082–2090.
JIN Ling-bo, ZHOU Feng, YAO Juan, et al. Effects of P-efficient transgenic soybean on rhizosphere microbial community[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2012, 32(7):2082–2090.
- [31] Heuer H, Kroppenstedt R M, Lottmann J, et al. Effects of T4 Lysozyme release from transgenic potato roots on bacterial rhizosphere communities are negligible relative to natural factors[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(3):1325–1335.
- [32] 邵婧鑫. SRTS 对盐碱土氮素转化及 AOB 多样性的影响[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2012.
SHAO Jing-xin. Effects of SRTS on the nitrogen transition and the diversity of AOB in saline-alkaline soil[D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2012.
- [33] 徐广惠. RRS 对根际土壤 AOB 与 AOA 群落多样性的影响[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2010.
XU Guang-hui. Effects of RRS on the diversity of AOB and AOA in rhizospheric soils[D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2010.
- [34] Marsh K L, Sims G K, Mulvaney R L, et al. Availability of urea to autotrophic ammonia-oxidizing bacteria as related to the fate of ^{14}C - and ^{15}N -labeled urea added to soil[J]. *Biol Fert Soil*, 2005, 42(8):137–145.
- [35] Purkhold U, Wagner M, Timmermann G, et al. 16S rRNA and amoA-based phylogeny of 12 novel betaproteobacterial ammonia-oxidizing isolates: Extension of the dataset and proposal of a new lineage within the nitrosomonads[J]. *Microbiol*, 2003, 53(5):1485–1494.
- [36] Angel R, Asaf L, Ronen Z, et al. Nitrogen transformations and diversity of ammonia-oxidizing bacteria in a desert ephemeral stream receiving untreated wastewater[J]. *Microb Ecol*, 2010, 59(1):46–58.
- [37] Meincke M, Bock E, Kastrau D, et al. Nitrite oxidoreductase from *Nitrobacter hamburgensis*: Redox centers and their catalytic role[J]. *Arch Microbiol*, 2004, 158(2):127–31.