

刘瑞华, 陈静怡, 王丽丽, 等. 转基因棉花连续种植对土壤AM真菌群落结构的影响[J]. 农业环境科学学报, 2019, 38(2): 383–393.

LIU Rui-hua, CHEN Jing-yi, WANG Li-li, et al. Effects of continuous planting of transgenic cotton on the community structure of AM fungi in soil[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2019, 38(2): 383–393.

转基因棉花连续种植对土壤AM真菌群落结构的影响

刘瑞华^{1,2,4}, 陈静怡^{1,2,4}, 王丽丽^{2,4}, 李 静^{2,3,4}, 刘惠芬¹, 杨殿林^{2,4}, 赵建宁^{2,4*}

(1. 天津农学院农学与资源环境学院, 天津 300384; 2. 农业农村部环境保护科研监测所, 天津 300191; 3. 东北农业大学资源与环境学院, 哈尔滨 150030; 4. 农业部产地环境污染防控重点实验室/天津市农业环境与农产品安全重点实验室, 天津 300191)

摘要:为评价转基因棉花种植对土壤中AM真菌群落结构的影响,以转基因棉花013011(抗旱)、SGK321(抗虫)和非转基因棉花TH2(抗旱受体)、石远321(抗虫受体)为材料,研究不同生育期转基因棉花土壤中AM真菌的群落结构。采用PCR-DGGE技术对土壤中AM真菌的群落结构进行分析。结果发现:转基因棉花与非转基因棉花在花铃期和吐絮期土壤中AM真菌群落的最小相似度均大于0.6,这说明了转基因棉花的种植在花铃期和吐絮期均未对土壤中AM真菌的群落结构产生影响。另外转基因棉花和非转基因棉花的种植在花铃期和吐絮期均未对土壤AM真菌的丰富度(*S*)造成影响;土壤AM真菌香农-维纳指数(*H'*)仅在吐絮期石远321显著低于SGK321,其余品种和时期均未出现显著性差异;土壤AM真菌的均匀度(*E_u*)仅在吐絮期发现TH2显著高于013011,其余品种和时期均未出现显著性差异。DGGE指纹图谱结果表明转基因棉花与非转基因棉花同一生长期多为共有条带,且同一时期土壤AM真菌群落结构相似性较高,AM真菌的群落结构无明显变化。两个不同生育期优势属均为*Glomus*(球囊霉属)。研究表明:土壤AM真菌的群落结构变化只随着棉花生育期的不同会有短暂的变化,与是否为转基因棉花无显著性相关。

关键词:AM真菌;转基因棉花;PCR-DGGE

中图分类号:S154 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-2043(2019)02-0383-11 doi:10.11654/jaes.2018-0369

Effects of continuous planting of transgenic cotton on the community structure of AM fungi in soil

LIU Rui-hua^{1,2,4}, CHEN Jing-yi^{1,2,4}, WANG Li-li^{2,4}, LI Jing^{2,3,4}, LIU Hui-fen¹, YANG Dian-lin^{2,4}, ZHAO Jian-ning^{2,4*}

(1. College of Agronomy & Resources and Environment, Tianjin Agricultural University, Tianjin 300384, China; 2. Agro-Environmental Protection Institute, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Tianjin 300191, China; 3. College of Resources and Environment, Northeast Agricultural University, Harbin, 150030, China; 4. Key Laboratory of Original Agro-Environmental Pollution Prevention and Control, Ministry of Agriculture/Tianjin Key Laboratory of Agro-environment and Safe-product, Tianjin 300191, China)

Abstract: To detect the effects of cultivating transgenic crops on the community composition of soil arbuscular mycorrhizal (AM) fungi, we employed two transgenic cotton varieties, 013011 (drought-resistant) and SGK321 (insect-resistant), and their parental varieties TH2 (drought-resistant receptor) and Shiyuan321 (insect-resistant receptor). The Polymerase chain reaction-Denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE) technology was used to analyze the community structure of the AM fungi in the soil. The results showed that the minimum similarity of the AM fungi in the soil with planted transgenic cotton and non-transgenic cotton was 0.6, indicating that the transgenic cotton planting had no significant effect on the community structure of the AM fungi in the soil during the blooming and the wadding stages. No significant difference in the richness (*S*) of the AM fungi was found between the soils planted with the transgenic and non-transgenic cotton during the blooming and wadding stages. The Shannon-Wiener index (*H'*) of the AM fungi in the soil planted with Shiyuan 321 was signif-

收稿日期: 2018-03-20 录用日期: 2018-07-09

作者简介: 刘瑞华(1992—),男,湖北鄂州人,硕士研究生,主要从事转基因作物环境安全评价研究。E-mail: p450080886@163.com

*通信作者: 赵建宁 E-mail: zhaojn2008@163.com

基金项目: 国家转基因重大专项(2016ZX08012005-005); 中国农业科学院协同创新任务(CAAS-XTX2016015)

Project supported: The National Special Transgenic Project of China(2016ZX08012005-005); The Chinese Academy of Agricultural Sciences of Collaborative Innovation(CAAS-XTX2016015)

ificantly lower than that planted with SGK321 only at the wadding stage. However, no significant difference found among the other growing periods and other cotton types. The evenness (E_H) of the AM fungi in the soil planted with TH2 was significantly higher than that planted with 013011 only at the wadding stage, but no significant difference was observed among the other cotton types and growing periods. The DGGE fingerprinting of the AM fungi in soil planted with the transgenic cotton was very similar to that planted with the non-transgenic cotton at the same growing stage, indicating that the impacts of planting the transgenic cotton on the community structure of the AM fungi in soil was small. The predominant genera were *Glomus* during both the flowering and boll-setting periods. The community structure of the AM fungi in the soil only change temporarily with the growing periods, but is hardly affected by the planting of the transgenic cotton.

Keywords: arbuscular mycorrhizal fungi; transgenic cotton; Polymerase chain reaction-Denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE)

转基因作物在21年的全球商业化进程中,种植面积从1996年的170万 hm^2 上升至2016年的1.85亿 hm^2 。棉花作为我国种植面积最大的转基因作物,2016年种植面积约为280万 hm^2 ,占棉花总播种面积的96%以上^[1]。转基因作物的大规模商业化种植在给人们带来收益的同时,其对土壤微生物的影响及对土壤生态系统带来的风险越来越引发人们的关注^[2]。

土壤是植物与其生长环境之间物质循环和能量转化的重要场所。丛枝菌根真菌是其菌丝与植物根系形成的共生体^[3],也是土壤生态系统中一种同时具有植物根系和微生物特性的互惠共生体^[4]。其容易受到土壤环境变化的影响,是一种较好的指示微生物,因此近年来吸引了越来越多的研究者对其进行研究和探讨。卢鑫萍等^[5]研究发现,土壤盐分组成类型的不同会对AM真菌孢子的密度和侵染率有影响;Ndoye等^[6]研究发现,土壤pH值及各种无机速效养分含量均对AM真菌的种属分布有显著影响;张海波等^[7]研究发现,AM真菌物种丰富度、Shannon多样性指数和侵染率受土壤类型与植物种类交互作用的显著影响。

转基因作物的残体及根系分泌物皆有可能对土壤中的AM真菌群落产生影响。王凤玲等^[8]研究表明转*Bt*棉叶片腐熟物抑制了AM真菌在植物根部的定植,降低了AM真菌的共生效应;Turrini等^[9-10]发现,转*Bt*基因的玉米会影响共生体菌丝生长和侵染,并危害到其附着胞的发育,最终导致转*Bt*基因品种的侵染率远低于其非转基因亲本;但是梁晋刚等^[11]对转基因高氨基酸大豆的研究并未发现AM真菌群落结构与非转基因大豆间存在显著性差异;Pasonen等^[12]研究发现转基因植物对AM真菌的定植可能会有一定的影响。目前关于转基因作物种植对AM真菌的影响还没有定论^[13],关于长期种植转基因作物是否会对AM真菌产生影响的研究还鲜见报道。因此,本研

究利用PCR-DGGE技术,以转基因棉花013011(抗旱)、SGK321(抗虫)和非转基因棉花TH2(抗旱受体)、石远321(抗虫受体)为研究材料,探究它们长期种植后对土壤AM真菌群落多样性的影响,旨在为转基因棉花种植的土壤环境安全评价提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 研究区概况

试验地位于天津市武清区梅厂镇周庄村(39°36'71.21"N, 117°22'69.65"E),海拔6.3 m。地处华北平原东北部,地势平缓。年平均气温为11.6℃,年平均降水量为606 mm,无霜期212 d。供试土壤为潮土,2016年棉花播种前试验地基本理化性质:全磷含量 $0.77 \pm 0.05 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,全氮含量 $0.65 \pm 0.04 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,有机质含量 $18 \pm 1.02 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,pH值 8.26 ± 0.06 。

1.2 供试材料

供试棉花品种为4个品种,分为2组对照试验。第1组:TH2(抗旱受体)和013011(抗旱);第2组:石远321(抗虫受体)和SGK321(抗虫)。供试的转基因材料013011抗旱棉尚属于研究阶段,因此其所转基因不便公布;SGK321为我国自主研发的双价抗虫棉,是将双价抗虫基因(Bt+CpTI)导入石远321后育成的新品种。供试品种均由中国农业科学研究院棉花研究所提供。

1.3 实验设计

本试验为大田试验,每个小区100 m^2 (20 $\text{m} \times 5\text{m}$),每种棉花种植3个小区即3次重复,宽窄行种植,行距分别为90 cm和40 cm。试验地自2011年开始种植供试品种至今,每个小区固定种植同一棉花品种,一直采用覆膜种植的方式,每个小区间种植宽度为5 m的玉米保护行。施肥量为:氮肥 $200 \text{ kg} \cdot \text{hm}^{-2}$,钾肥 $100 \text{ kg} \cdot \text{hm}^{-2}$,磷肥 $60 \text{ kg} \cdot \text{hm}^{-2}$ 。其中氮肥基施60%,追肥40%。磷钾肥全部作基肥施用,棉花其他田间管理

按照常规管理,不施农药。

1.4 土壤样品采集

本试验分别在棉花的花铃期(2016年8月16日)和吐絮期(2016年9月27日)采集土样。采用随机取样法每个小区选取3个点,每个点选5株相距最近的棉花,去除表面杂草和枯枝落叶,每株距离主根2 cm位置处用直径3.5 cm土钻取20 cm深土样,并将3个采样点的样品等比例混合,作为一个重复放入灭菌密封袋带回实验室放入低温冰箱(-20℃)保存。

1.5 土壤总DNA提出

称取0.35 g土壤样品后采用BBI公司(Canada)的EZ-10 Spin Soil DNA Extraction kit按操作说明提取总DNA,获得的总DNA使用Biophotometer(Eppendorf, Germany)进行定量分析,并在1.0%琼脂糖凝胶中进行电泳,检测总DNA质量。

1.6 PCR扩增

采用巢式PCR(Nested PCR)方法针对AM真菌的ITS片段进行扩增,引物序列及反应程序见表1。

第一轮PCR反应体系:1 μL每种引物,25 μL Premix Ex Taq(Load dye mix),2 μL的模板DNA,终体积为50 μL;第二轮PCR反应体系:1 μL每种引物,25 μL Premix Ex Taq(Load dye mix),以2 μL第一轮PCR产物为模板,补充无核酸酶水(Nuclease-Free water, Promega)至50 μL。

1.7 变性梯度凝胶电泳(DGGE)检测

采用Dcode™通用突变检测系统(Bio-Rad, USA)按照操作说明进行DGGE分析。丙烯酰胺凝胶(37.5:1)浓度为8%,变性剂梯度为25%~50%[100%变性剂含有7 mol·L⁻¹尿素和40%(V/V)去离子甲酰胺],电泳缓冲液为1×TAE。将25 μL PCR产物和5 μL 6×loading buffer混合后用微量进样器加入胶孔中,100 V、60℃条件下电泳16 h。电泳结束后,小心取出凝胶,放在SYBR™ Green I(1:10 000)(Invitrogen, USA)染

液中染色30 min,然后用Gel Dox XR凝胶成像系统(Bio-Rad, USA)观察与拍照。

1.8 条带回收及测序对比

选取主要条带割胶回收,用不带GC夹子的引物进行扩增,PCR产物经过电泳分析确定为单一条带后送出进行克隆测序。测序结果在NCBI上经过Blast对比分析。将其中同源性最高的序列确定为参照菌株。相似性≥97%的序列则视为同一序列型。

1.9 数据分析

采用Excel 2007和SPSS 17.0(Duncan's test)对试验数据进行分析,采用Quantity One 4.6.2软件进行数字化处理并进行聚类分析。各样品用香农-维纳指数(Shannon-Wiener index, H')、均匀度(Evenness index, E_H)和丰富度(Richness, S)评价AM真菌多样性的变化,其计算公式如下:

$$H' = -\sum P_i \ln P_i$$

$$E_H = H' / \ln S$$

式中: H' 代表香农-威纳指数; P_i 代表第*i*条带占总强度的比值; E_H 代表均匀度; S 代表条带数量或丰富度。

测序结果采用Chromas 2.0软件进行序列分析,登陆NCBI(National Center for Biotechnology Information)网站下载最相似的菌株序列作为系统发育树的参考序列。然后采用MEGA 6.0软件,Neighbor-Joining法构建系统发育树,自展数(Bootstrap)为1000。

2 结果与分析

2.1 土壤总DNA的提取及PCR扩增

各土壤样品的总DNA经过1.0%的琼脂糖凝胶电泳(图1),所有土壤样品总DNA均在9416~23 130 bp,表示所获得的土壤DNA质量很好。将获得的土壤DNA直接用于PCR扩增(图2)。扩增后所获得的片段集中在230 bp左右且条带清晰片段大小均一,可用于后续DGGE分析。

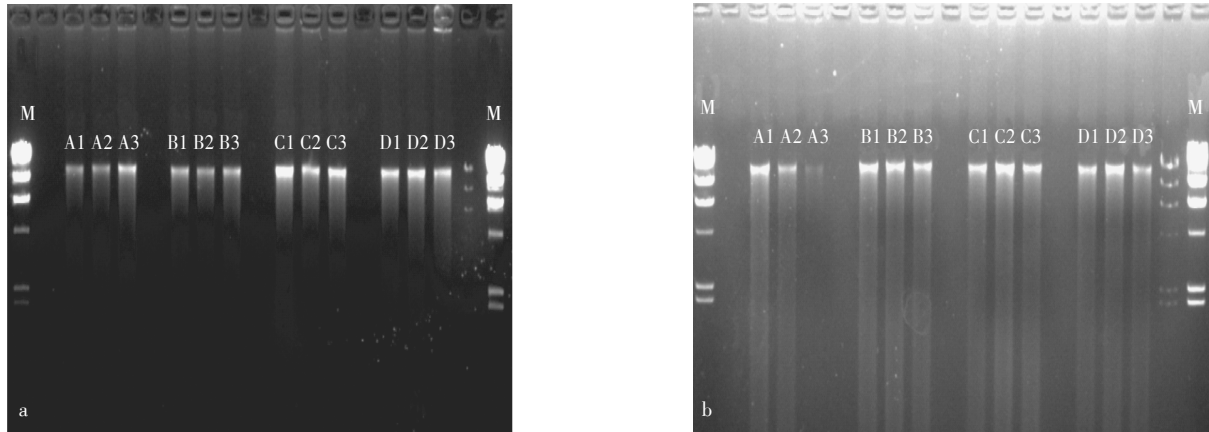
表1 PCR反应的引物及反应条件

Table 1 Primers and conditions used for PCR

巢式PCR Nested PCR	引物 Primer	引物序列(5'至3') Primer sequences(5' to 3')	反应条件 Reaction conditions
第一步 Step1	AML1 AML2	ATCAACTTTCGATGGTAGGATAGA GAACCCAAACACTTTGTTTCC	94℃ 3 min; 94℃ 30 s, 50℃ 30 s, 72℃ 45 s, 35个循环; 72℃ 7 min
第二步 Step2	NS31 G101	GC-CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGCA CGGGGGTTGGA GGGCAA GTCTGCTGCC GCC TGC TTT AAA CAC TCT A	94℃ 3 min; 94℃ 30 s, 54℃ 20 s, 72℃ 45 s, 35个循环; 72℃ 7 min

注:*GC夹序列为5'-CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGCA CGGGGGTTGGA GGGCAA GTCTGCTGCC-3'。

Note: *The sequence of GC-clamp: 5'-CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGCA CGGGGGTTGGA GGGCAA GTCTGCTGCC-3'.

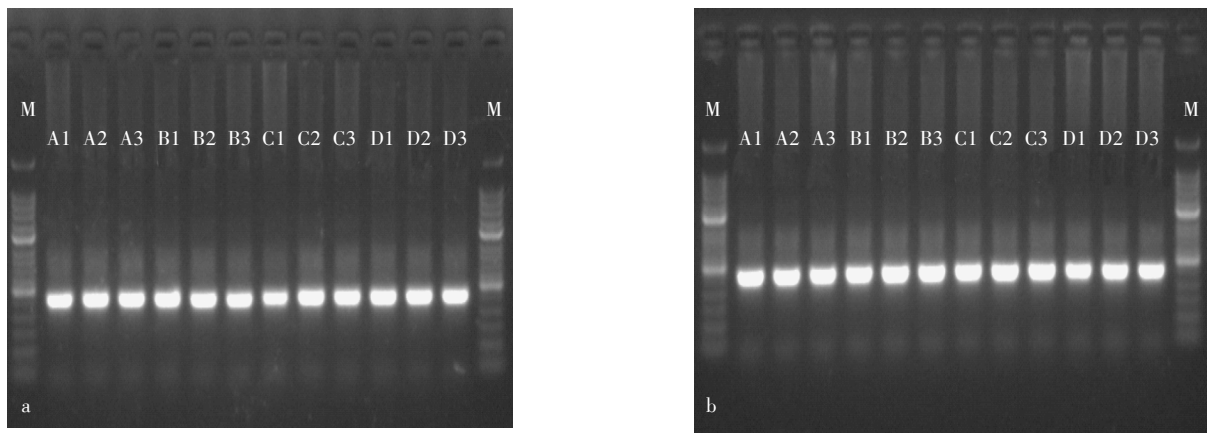


M 为 λ DNA / HindⅢ, A1、A2、A3 为 TH2 的三次重复, B1、B2、B3 为 013011 的三次重复, C1、C2、C3 为石远 321 的三次重复, D1、D2、D3 为 SGK321 的三次重复。下同

M is λ DNA/HindⅢ. A1, A2, A3 repeat three times for TH2. B1, B2, B3, repeat three times for 013011. C1, C2, C3, repeat three times for Shiyuan321. D1, D2, D3 repeated three times for SGK321. The same below

图1 棉花土壤样品花铃期(a)和吐絮期(b)DNA提取

Figure 1 DNA samples extracted from the cotton soil at flowering and boll-setting stage(a) and boll opening stage(b)



M 为 50 bp ladder.
M is 50 bp ladder.

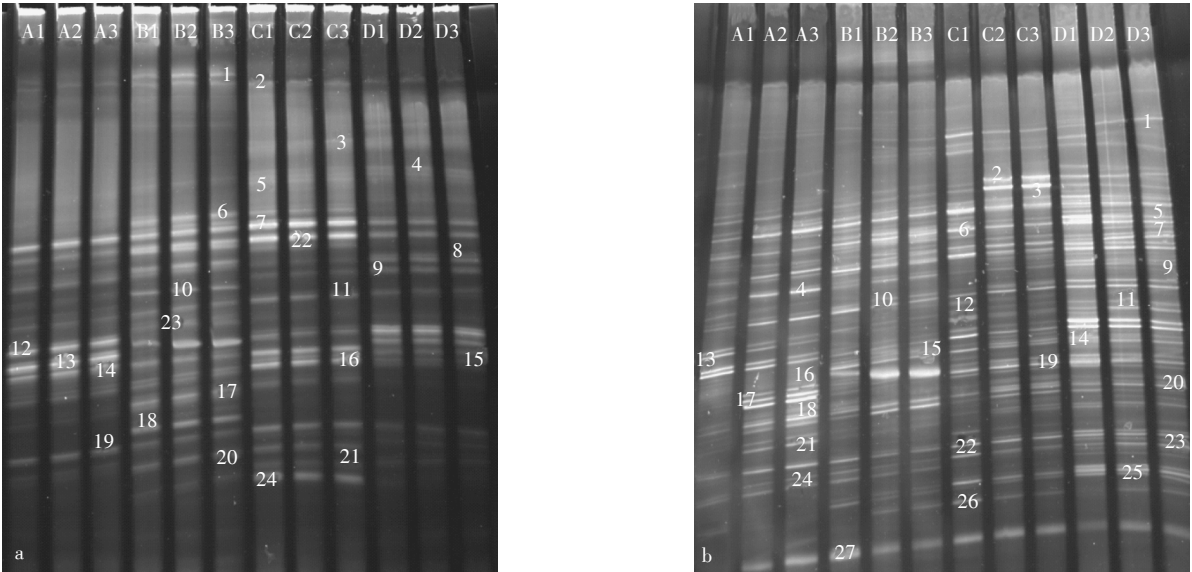
图2 棉花土壤样品花铃期(a)和吐絮期(b)AM真菌的ITS片段PCR结果

Figure 2 AM fungi ITS fragment PCR results of the cotton samples at flowering and boll-setting stage(a) and boll opening stage(b)

2.2 DGGE 指纹图谱和 AM 真菌基因测序结果分析

DGGE 图谱能够直观地反映出不同棉花品种土壤中 AM 真菌群落结构的多样性。在 DGGE 图谱中,不同位置的条带代表不同的 AM 真菌类群,不同泳道同一横向位置的不同条带一般被认为是同一 AM 真菌类群。花铃期共有 24 条不同条带,显示出 AM 真菌的种类,其中非转基因棉 TH2 有 18 个条带,转基因棉 013011 有 20 个;非转基因棉石远 321 有 21 个,转基因棉 SGK321 有 21 个。吐絮期共有 27 条不同条带,显示出 AM 真菌的种类,其中非转基因棉 TH2 有 26 个条带,转基因棉 013011 有 25 个;非转基因棉石远 321 有 27 个,转基因棉 SGK321 有 26 个。

根据 AM 真菌 DGGE 指纹图谱(图 3)选择 DGGE 胶上易于区分的条带进行克隆测序。在花铃期样品中选取 24 条条带,在吐絮期样品中选取 27 条条带,分别进行测序。测序结果登陆美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI),得到条带所代表的 AM 真菌类型。分析所得序列的归属(表 2、表 3)以及样品的指纹图谱(图 3)发现,花铃期测序的样品条带中两组对照 TH2 和 013011(抗旱)、石远 321 和 SGK321(抗虫)多为共有条带,均包含有 Uncultured *Glomus*(球囊霉属)、Uncultured *Glomeraceae*(球囊霉科)、Uncultured *Glomeromycota*(球囊菌门)、Uncultured *Rhizophagus*(根孢囊霉



图中的数字代表花铃期(a)和吐絮期(b)进行克隆测序的条带
The figure represents the bands of clone sequencing during flowering and boll-setting stage(a) and boll opening stage(b)

图3 转基因棉和非转基因棉在花铃期(a)和吐絮期(b)土壤中AM真菌群落结构DGGE图谱分析
Figure 3 DGGE fingerprint analyses of AM fungi communities planted with GM versus Non-Gm cotton at flowering and boll-setting stage(a) and boll opening stage(b)

属)和 *Glomus* sp.,且亮度较高的条带大多为 *Uncultured Glomus* (球囊霉属),因此 *Uncultured Glomus* (球囊霉属)为共同优势属。对比TH2和013011(抗旱)样品指纹图谱(图3)发现条带18和条带24为转基因棉013011(抗旱)特有条带,分别属于 *Uncultured Glomus* (球囊霉属)和 *Uncultured Glomeromycota* clone (球囊霉科);条带13为非转基因棉TH2特有条带,属于 *Uncultured Rhizophagus* (根孢囊霉属)。对比石远321和SGK321(抗虫)样品指纹图谱(图3)发现条带13为转基因棉SGK321特有条带,属于 *Uncultured Rhizophagus* (根孢囊霉属);条带24为非转基因棉石远321特有条带,属于 *Uncultured Glomeromycota* (球囊菌门)。未能在GenBank收录相似的AM真菌分类中找到与条带17相似的分类。吐絮期测序的样品条带中两组对照TH2和013011(抗旱)、石远321和SGK321(抗虫)多为共有条带,均包含有 *Uncultured Rhizophagus* (根孢囊霉属)、*Uncultured Glomeraceae* (球囊霉科)、*Uncultured Glomus* (球囊霉属)、*Rhizophagus* sp.、*Uncultured Diversispora* (多孢囊霉属)、*Uncultured Glomeromycotina* 和 *Uncultured Claroideoglomus* (幼套近明囊属),且亮度较高的条带大多为 *Uncultured Clomus* (球囊霉属),因此 *Uncultured Clomus* (球囊霉属)为共同优势属。对比TH2和013011(抗旱)样品指纹

表2 花铃期序列鉴定和同源性分析结果
Table 2 Sequence identification and homology analysis of flowering and boll-setting period

条带编号	登陆号	同源性最高的菌株	相似度/%
1	KY232445.1	Uncultured <i>Glomus</i> clone	100
2	KU246928.1	Uncultured <i>Glomeraceae</i> clone	99
3	KT291389.1	Uncultured <i>Glomus</i> clone	100
4	KY232464.1	Uncultured <i>Glomus</i> clone	99
5	AB630084.1	Uncultured <i>Glomus</i>	99
6	KU247079.1	Uncultured <i>Glomeraceae</i> clone	100
7	KY232440.1	Uncultured <i>Glomus</i> clone	99
8	KY232519.1	Uncultured <i>Glomus</i> clone	100
9	KP201526.1	Uncultured <i>Glomeraceae</i> clone	100
10	KY232417.1	Uncultured <i>Glomus</i> clone	100
11	KY232457.1	Uncultured <i>Glomus</i> clone	100
12	KJ740956.1	Uncultured <i>Glomeromycota</i> clone	100
13	LN715091.1	Uncultured <i>Rhizophagus</i>	100
14	KM658439.1	Uncultured <i>Glomeromycota</i> clone	99
15	AB695021.1	Uncultured <i>Glomus</i>	99
16	KX349107.1	Uncultured <i>Glomus</i> clone	99
18	KY232521.1	Uncultured <i>Glomus</i> clone	99
19	KC558550.1	<i>Glomus</i> sp.	100
20	KJ740950.1	Uncultured <i>Glomeromycota</i> clone	100
21	KX099708.1	<i>Glomus</i> sp.	100
22	KY232455.1	Uncultured <i>Glomus</i> clone	100
23	KJ740950.1	Uncultured <i>Glomeromycota</i> clone	99
24	KJ740848.1	Uncultured <i>Glomeromycota</i> clone	99

图谱(图3)发现条带18为非转基因棉TH2特有条带,属于Uncultured *Glomus*(球囊霉属),条带15为转基因棉013011特有条带,属于*Rhizophagus* sp.(根孢囊霉属)。对比石远321和SGK321(抗虫)样品指纹图谱(图3)发现全为共有条带。未能在GenBank收录相似的AM真菌分类中找到与条带16、20、21、23、24相似的分类。

表3 吐絮期序列鉴定和同源性分析结果

Table 3 Sequence identification and homology analysis of boll opening stage

条带编号	登陆号	同源性最高的菌株	相似度/%
1	KX809136.1	Uncultured <i>Rhizophagus</i> clone	100
2	KX809135.1	Uncultured <i>Rhizophagus</i> clone	100
3	KU247079.1	Uncultured <i>Glomeraceae</i> clone	100
4	KY232445.1	Uncultured <i>Glomus</i> clone	99
5	KY232455.1	Uncultured <i>Glomus</i> clone	100
6	KY232438.1	Uncultured <i>Glomus</i> clone	99
7	KX099707.1	<i>Rhizophagus</i> sp.	100
8	LT158571.1	Uncultured <i>Glomus</i>	100
9	KX349119.1	Uncultured <i>Diversispora</i> clone	100
10	KY232457.1	Uncultured <i>Glomus</i> clone	100
11	MF567531.1	Uncultured <i>Glomeromycotina</i> clone	100
12	KC558541.1	<i>Rhizophagus</i>	100
13	LT672508.1	Uncultured <i>Claroideoglomus</i>	99
14	KX349107.1	Uncultured <i>Glomus</i> clone	99
15	KP757870.1	<i>Rhizophagus</i> sp.	99
17	FR832460.1	Uncultured <i>Glomus</i>	99
18	KY232454.1	Uncultured <i>Glomus</i> clone	100
19	KT291397.1	Uncultured <i>Glomus</i> clone	100
22	KX349107.1	Uncultured <i>Glomus</i> clone	100
25	KY232519.1	Uncultured <i>Glomus</i> clone	100
26	KT291331.1	Uncultured <i>Glomus</i> clone	98
27	KY232529.1	Uncultured <i>Glomus</i> clone	100

2.3 土壤AM真菌多样性分析

AM真菌的多样性指数是研究其群落物种数、个体数以及均匀度的综合指标。一般可用香农-威纳指数(H),均匀度(E_H)和丰富度(S)表现。根据DGGE指纹图谱中每条条带的灰度比率对香农-威纳指数(H)、均匀度(E_H)和丰富度(S)进行分析。

结果表明土壤中AM真菌的香农-威纳指数仅在吐絮期石远321显著低于SGK321,其余均未发现显著性差异;TH2、013011和石远321、SGK321的土壤AM真菌丰富度在各生长期均未发现显著性差异;土壤中AM真菌的均匀度仅在吐絮期TH2显著高于013011,其余均未发现显著性差异(表4)。

2.4 条带相似性分析及系统发育树分析

利用相似性矩阵数据,通过未加权算术平均对群法(The unweighted pair-group method with arithmetic averages, UPGMA)进行聚类分析。一般认为相似度大于0.60就说明两个群体具有较好的相似性。本研究中花铃期4种不同土壤样品的最小相似度为0.65(图4),在吐絮期4种不同土壤样品的最小相似度为0.61(图4)。说明转基因棉与常规棉土壤中AM真菌群落结构在花铃期和吐絮期差异不显著。

结果表明,花铃期测序序列与数据库中的已知序列相似度在99%~100%;吐絮期测序序列与数据库中的已知序列相似度在98%~100%。将测序获得的基因序列与相似序列对比,采用MEGA6软件Neighbor-Joining法构建系统发育树并进行系统发育分析(图5和图6)。花铃期样品根据进化上亲缘关系的相似度,条带1、3、4、6、7、9、10、11、12、14、21、22形成了第1类群;条带2、5、15形成了第2类群;条带8、16、18、19、20、23、24形成了第3类群;条带13为第4类群。

表4 DGGE图谱多样性指数分析

Table 4 DGGE profiles diversity index analysis

生长期 Growth stage	品种 Variety	香农-威纳指数(H) Shannon-Wiener index	丰富度(S) Richness	均匀度(E_H) Evenness
花铃期 Flowering and boll-setting period	石远321	3.19±0.01a	26.67±0.58a	0.97±0.00a
	SGK321	3.10±0.07a	26.00±1.00a	0.95±0.01a
吐絮期 Boll opening stage	石远321	3.37±0.00b	32.00±0.00a	0.97±0.00a
	SGK321	3.41±0.00a	32.67±0.58a	0.98±0.00a
花铃期 Flowering and boll-setting period	TH2	3.06±0.06a	25.33±0.58a	0.95±0.02a
	013011	3.14±0.04a	25.00±1.00a	0.98±0.00a
吐絮期 Boll opening stage	TH2	3.25±0.05a	28.33±1.15a	0.97±0.00a
	013011	3.20±0.04a	28.00±1.00a	0.96±0.00b

注:同列不同小写字母表示同一生育期转基因棉花和非转基因棉花多样性指数差异($P<0.05$)。

Note: Different small letters within the same column mean the same growth period of transgenic cotton and non-transgenic cotton diversity index difference ($P<0.05$).

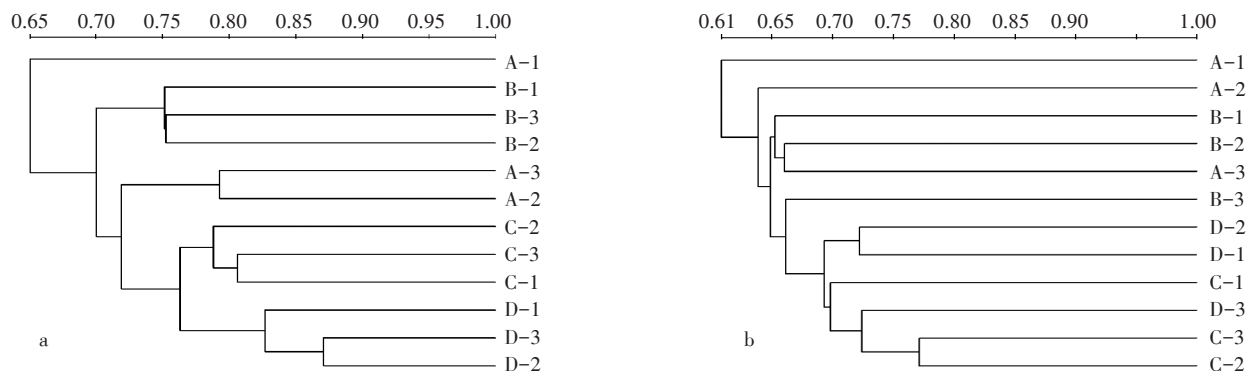


图4 转基因棉与非转基因棉在花铃期(a)和吐絮期(b)土壤样品AM真菌群落结构聚类分析

Figure 4 Dendrogram of AM fungi communities at flowering and boll-setting(a) and boll opening stage(b) based on DGGE fingerprint

由图6可知,吐絮期样品根据进化上亲缘关系的相似度,条带4、5、6、7、9、10、18、19形成第1类群;条带1、2、3、12、15、17形成第2类群;条带8、11、13、14、22、25、26、27形成了第3类群。

3 讨论

本研究采用了PCR-DGGE技术分析转基因棉与非转基因棉土壤中AM真菌群落结构,直观地反映出花铃期和吐絮期两组对照样品中AM真菌群落结构的动态变化。结果发现同一时期转基因样品与非转基因样品之间DGGE指纹图谱有很强的相似性,且各条带的亮度差异较小。一般认为条带的多少代表群落的多样性,条带的亮度代表微生物的量^[14]。这说明同一生育时期AM真菌的群落多样性和群落构成比较稳定,没有因为转基因棉花的种植而发生变化。而Castaldini等^[15]和Turrini等^[10]的研究表明转基因作物的种植会对AM真菌造成负面的影响,Blackwood等^[16]采用Biolog方法发现转Bt玉米种植的土壤中真菌的含量要高于常规玉米,这些结果与本研究结果存在一定的差异,可能是由于所选生境及植物的种类不同而造成的。本研究中,花铃期和吐絮期土壤样品中AM真菌群落结构的最小相似度均大于0.6,优势属均为*Glomus*(球囊霉属),进一步证明了转基因棉的种植未对AM真菌群落产生显著影响,这一结果与Knox等^[17]的研究结果相似,其结果也表明了转基因植物的种植对AM真菌无影响或影响甚微,Daniell等^[18]的研究结果表明*Glomus*(球囊霉属)是根际丛枝菌根真菌群落的重要组分,这也与本研究结果相一致。同时还可以发现两组棉花对照土壤样品并不是以转基因与非转基因分布在聚类图的上下两侧,而是根据品种的不同分在了聚类图的上下两侧,这说明品种间的差异

要大于转基因与非转基因之间的差异。另外同一组对照之间转基因棉与非转基因棉聚类结果大多没有完全分开,可能是由于转基因的导入使棉花根系分泌物发生了一定变化,从而导致土壤中AM真菌的生长发育过程受到了一定的影响^[29]。

对土壤样品AM真菌的香农-威纳指数、丰富度、均匀度研究发现吐絮期的数值均要高于花铃期,这种微生物数量与植株生长发育呈正相关的现象在其他文献中也有相似报道^[20-21]。香农-威纳指数仅在吐絮期石远321显著低于SGK321,均匀度仅在吐絮期TH2显著高于013011,这种显著性差异从整体结果来看相差甚微,且其余结果均未发现显著性差异。由于在自然环境中影响微生物群落多样性的因素很多,作物的生长期的不同、作物和土壤类型的差异、土壤养分因子、作物根系分泌物和农业管理等都会影响微生物的群落结构^[22]。因此对于这种短暂的、不持续的差异性,本研究认为是由于生育期的不同和种植地点的差异引起的。这也与Meyer等^[23]发现影响真菌群落结构的主要因素是作物生育期、种植地点及季节的观点相符合。本研究还发现,同一生育期同一特有条带在两组对照实验中出现在一组的转基因棉中同时也出现在另一组非转基因棉中,因此认为这种特异性并不是由于转基因棉的种植而引起的,可能是由于品种的不同而造成,Bouffaud等^[24]对玉米土壤微生物的研究也表明不同玉米品种的种植会对其根际微生物群落组成产生一定的影响。在不同的生育期两组对照实验的特异性条带差异较大。因此可以认为生育期的不同对土壤AM真菌的群落结构有一定的影响^[25],类似地,Liu等^[26]和Guadarrama等^[27]的研究也认为季节变化以及生育期的不同对AM真菌群落结构有较大的影响。从系统发育树结果分析可知吐絮期AM真

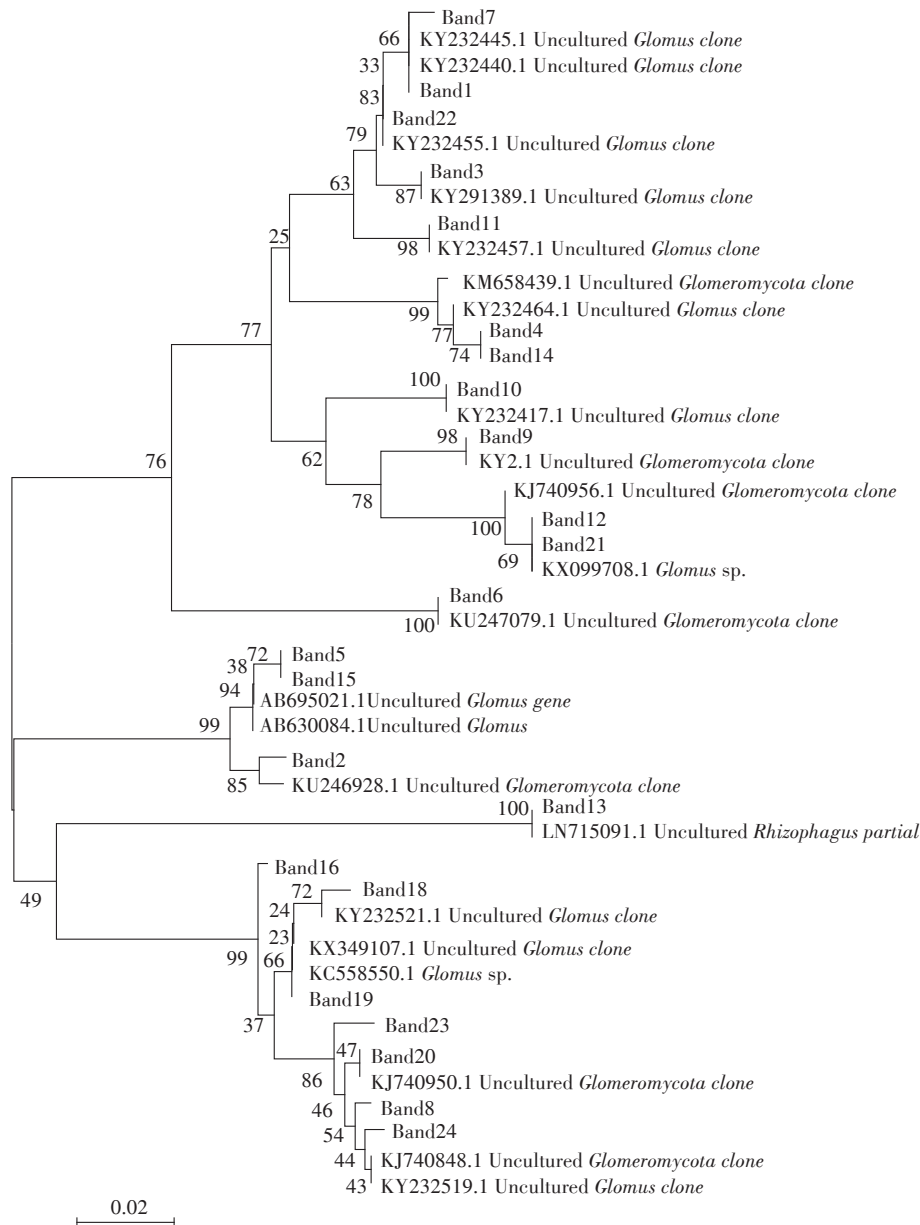


图5 花铃期系统发育树

Figure 5 Phylogenetic tree of flowering and boll-setting period

菌的类群与花铃期相比发生了变化,这与本研究认为AM真菌的类群差异是由于生育期的不同而造成的相一致。

任馨^[28]对转Bt基因水稻种植的土壤研究发现,转Bt基因水稻的种植没有对土壤中的AM真菌造成影响,刘华等^[29]对多年种植转基因棉的研究也未发现转基因的种植对土壤微生物群落结构造成影响。本实验室其他研究者用不同方法对与本研究相同试验地种植的转基因棉与非转基因棉土壤中酶活性、养分含量、微生物群落、细菌群落以及古菌群落结构进行研究,其研究结果均未发现转基因棉的种植会对以上

指标造成显著性的影响^[30-34]。这也与本研究结果认为转基因棉的种植并未对土壤AM真菌群落结构造成显著性影响相一致。另外,本研究检测出的大多数AM真菌属于不可培养微生物,且大部分分类地位仍未知,要确定其具体种属和功能特性还需要进一步研究。

4 结论

(1)转基因棉与非转基因棉土壤AM真菌DGGE指纹图谱在同一生长时期多为共有条带,同一生长时期土壤AM真菌群落结构相似性较高,花铃期和吐絮

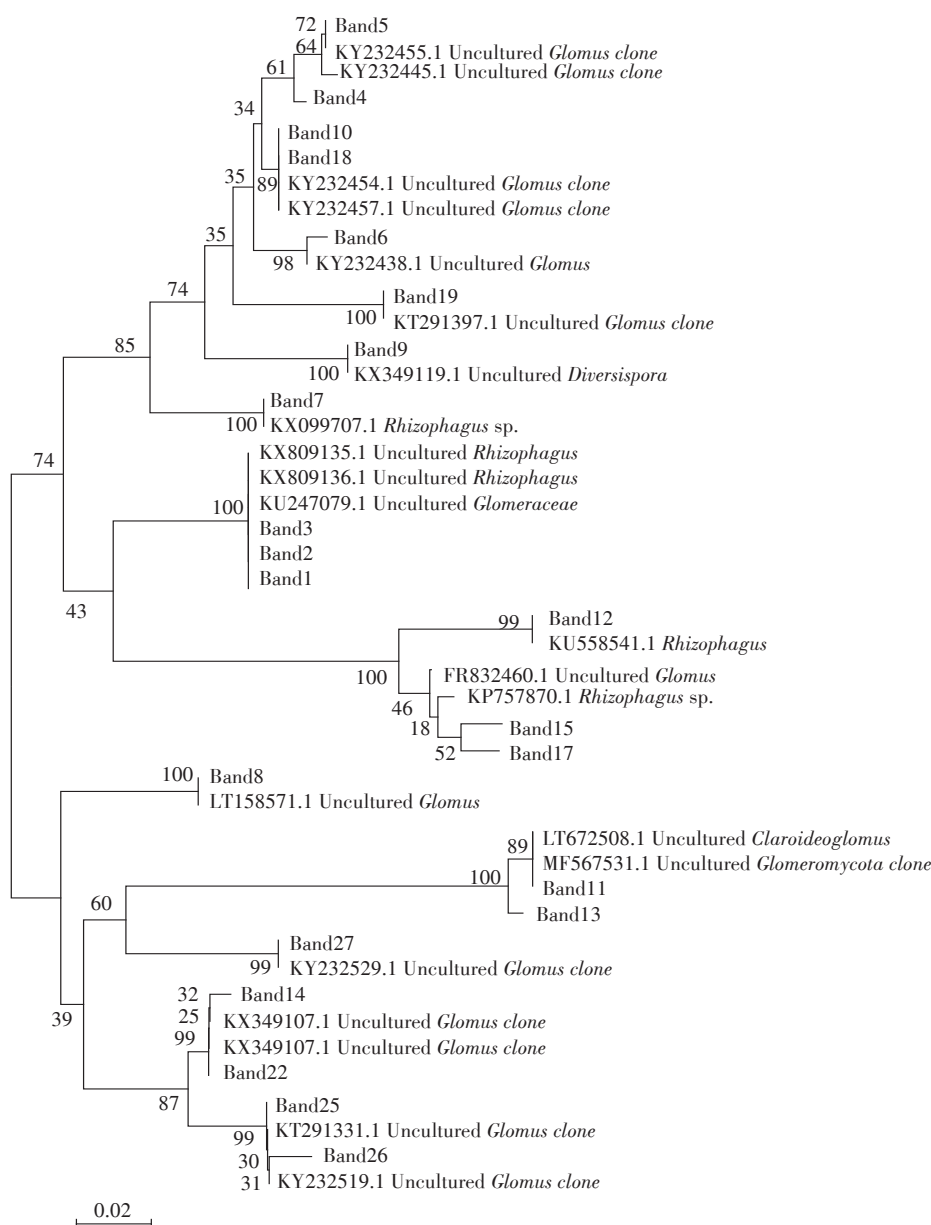


图6 吐絮期系统发育树

Figure 6 Phylogenetic tree of boll opening stage

期优势属均为 *Glomus* (球囊霉属)。

(2) 转基因棉与非转基因棉的种植对土壤AM真菌香农-威纳指数(H)、均匀度(E_H)和丰富度(S)几乎没有产生显著性影响。

因此,本研究认为转基因棉的种植对土壤AM真菌群落多样性没有产生显著影响。

参考文献:

- [1] James C. Global status of commercialized biotech/GM crops: 2016[R]. International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications (ISAAA) brief No. 52. ISAAA: Ithaca, NY. 2016.

- [2] 梁晋刚, 张正光. 转基因作物种植对土壤生态系统影响的研究进展[J]. 作物杂志, 2017(4): 1-6.
LIANG Jin-gang, ZHANG Zheng-guang. Advance on effects of genetically modified crops on soil ecosystems[J]. *Crops*, 2017(4): 1-6.
- [3] Yang H, Jiang L, Li L, et al. Diversity-dependent stability under mowing and nutrient addition: Evidence from a 7-year grassland experiment[J]. *Ecology Letters*, 2012, 15(6): 619-626.
- [4] 程春泉, 贺学礼, 赵金莉, 等. 蒙古沙冬青根围土壤AM真菌PCR-DGGE分析[J]. 西北农业学报, 2014, 23(12): 175-183.
CHENG Chun-quan, HE Xue-li, ZHAO Jin-li, et al. PCR-DGGE analysis of AM fungi in the rhizosphere soil of ammopiptanthus mongolicus[J]. *Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica*, 2014, 23(12):

- 175-183.
- [5] 卢鑫萍, 杜 茜, 闫永利, 等. 盐渍化土壤根际微生物群落及土壤因子对 AM 真菌的影响[J]. 生态学报, 2012, 32(13):4071-4078.
- LU Xin-ping, DU Qian, YAN Yong-li, et al. Effects of soil rhizosphere microbial community and soil factors on arbuscular mycorrhizal fungi in different salinized soils[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2012, 32(13):4071-4078.
- [6] Ndoye F, Kane A, Bakhoun N. Response of *Acacia senegal* (L.) willd. to inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi isolates in sterilized and unsterilized soils in senegal[J]. *Agroforestry Systems*, 2013, 87(4):941-952.
- [7] 张海波, 梁月明, 冯书珍, 等. 土壤类型和树种对根际土丛枝菌根真菌群落及其根系侵染率的影响[J]. 农业现代化研究, 2016, 37(1):187-194.
- ZHANG Hai-bo, LIANG Yue-ming, FENG Shu-zhen, et al. The effects of soil types and plant species on arbuscular mycorrhizal fungi community and colonization in the rhizosphere[J]. *Research of Agricultural Modernization*, 2016, 37(1):187-194.
- [8] 王凤玲, 张 锐, 陈秀华. 转 Bt 基因棉叶片腐熟物抑制 AM 真菌定殖及菌根对磷的吸收[J]. 菌物学报, 2017, 36(7):963-971.
- WANG Feng-ling, ZHANG Rui, CHEN Xiu-hua. The composted leaves of Bt cotton inhibit AM symbiosis and phosphate uptake[J]. *Mycosystema*, 2017, 36(7):963-971.
- [9] Turrini A, Sbrana C, Giovannetti M, et al. Experimental systems to monitor the impact of transgenic corn on keystone soil microorganisms [C]. 16 IFOAM Organic World Congress, Modena, Italy. 2008.
- [10] Turrini A, Sbrana C, Nuti M P, et al. Development of a model system to assess the impact of genetically modified corn and aubergine plants on arbuscular mycorrhizal fungi[J]. *Plant and Soil*, 2004, 266:69-75.
- [11] 梁晋刚. 转基因高蛋氨酸大豆种植对根际微生物群落结构与功能影响的研究[D]. 南京:南京农业大学, 2015.
- LIANG Jin-gang. Effect of transgenic high-methionine soybean on the structure and function of rhizospheric microbial communities[D]. Nanjing:Nanjing Agricultural University, 2015.
- [12] Pasonen H L, Lu J R, Niskanen A M, et al. Effects of sugarbeet chitinase IV on root-associated fungal community of transgenic silver birch in a field trial[J]. *Planta*, 2009, 230(5):973-983.
- [13] Guan Z, Lu S, Huo Y, et al. Do genetically modified plants affect adversely on soil microbial communities? [J]. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 2016, 235:289-305.
- [14] 解开治, 徐培智, 李康活, 等. 三种不同种植模式对土壤细菌群落多样性的影响[J]. 植物营养与肥料学报, 2009, 15(5):1107-1113.
- XIE Kai-zhi, XU Pei-zhi, LI Kang-huo, et al. Effects of three different cropping system on diversity of soil bacterial community[J]. *Plant Nutrition and Fertilizer Science*, 2009, 15(5):1107-1113.
- [15] Castaldini M, Turrini A, Sbrana C, et al. Impact of Bt corn on rhizospheric and soil eubacterial communities and on beneficial mycorrhizal symbiosis in experimental microcosms[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(11):6719-6729.
- [16] Blackwood C B, Buyer J S. Soil microbial communities associated with Bt and non-Bt corn in three soils[J]. *Journal of Environmental Quality*, 2004(33):832-836.
- [17] Knox O G G, Nehl D B, Mor T, et al. Genetically modified cotton has no effect on arbuscular mycorrhizal colonisation of roots[J]. *Field Crops Research*, 2008, 109(1/2/3):57-60.
- [18] Daniell T J, Husband R, Fitter A H, et al. Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi colonising arable crops[J]. *FEMS Microbiol Ecol*, 2001, 36:203-209.
- [19] 刘文科, 杜连凤. 转 Bt 基因作物对丛枝菌根真菌的影响研究进展[J]. 中国土壤与肥料, 2007(6):10-13, 18.
- LIU Wen-ke, DU Lian-feng. Advances in effects of Bt transgenic crops on arbuscular mycorrhizal fungi[J]. *Soil and Fertilizer Sciences in China*, 2007(6):10-13, 18.
- [20] 沈法富, 韩秀兰, 范术丽. 转 Bt 基因抗虫棉根际微生物区系和细菌生理群多样性的变化[J]. 生态学报, 2004, 24(3):432-437.
- SHEN Fa-fu, HAN Xiu-lan, FAN Shu-li. Changes in microbial flora and bacterial physiological group diversity in rhizosphere soil of transgenic Bt cotton[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2004, 24(3):432-437.
- [21] 段 杉, 谢响明, 李世东, 等. 转基因抗虫棉对根区土壤真菌影响的初步研究[J]. 微生物学杂志, 2008(4):7-12.
- DUAN Shan, XIE Xiang-ming, LI Shi-dong, et al. Impacts of transgenic insect-resistance cotton on rhizospheric fungi[J]. *Journal of Microbiology*, 2008(4):7-12.
- [22] Dey R, Pal K K, Tilak K V B R. Influence of soil and plant types on diversity of rhizobacteria[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2012, 82(3):341-352.
- [23] Meyer M, Montel S, Colnat-Coulbois S, et al. Neurosurgery in parkinson's disease: Social adjustment, quality of life and coping strategies [J]. *Neural Regeneration Research*, 2013, 8(30):2856-2867.
- [24] Bouffaud M L, Kyselkova M, Gouesnard B, et al. Is diversification history of maize influencing selection of soil bacteria by roots? [J]. *Mol Ecol*, 2012, 21:195-206.
- [25] 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.
- [26] Liu Y, He L, An L, Helgason T, et al. Arbuscular macorrhizal dynamics in a chronosequence of *Caragana korshinskii* plantations[J]. *FEMS Microbiol Ecol*, 2009, 67:81-92.
- [27] Guadarrama P, Castillo S, Ramos-Zapata J, et al. Arbuscular mycorrhizal fungal communities in changing environments: The effects of seasonality and anthropogenic disturbance in a seasonal dry forest[J]. *Pedobiologia*, 2014, 57:87-95.
- [28] 任 馨. 转 Bt 基因克螟稻对土壤细菌和根际 AM 真菌的影响研究[D]. 杭州:浙江大学, 2006.
- REN Xin. Effect of Bt transgenic rice(KMD) on soil bacterial community and rhizosphere AM fungi[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2006.
- [29] 刘 华, 常晓蕾, 蒋 玮, 等. 转基因棉花中选择性标记基因 *npt II*

- 对土壤微生物的影响[J]. 上海农业学报, 2017, 33(2):2-12.
- LIU Hua, CHANG Xiao-lei, JIANG Wei, et al. Effect of selective marker gene *npt II* on soil microorganism in transgenic cotton[J]. *Acta Agriculturae Shanghai*, 2017, 33(2):2-12.
- [30] 刘红梅, 赵建宁, 黄永春, 等. 种植转双价基因(*Bt+CpTI*)棉对主要土壤养分和酶活性的影响[J]. 棉花学报, 2012, 24(2):133-139.
- LIU Hong-mei, ZHAO Jian-ning, HUANG Yong-chun, et al. Effects of transgenic *Bt+CpTI* cotton planting on the soil main nutrients and enzyme activities[J]. *Cotton Science*, 2012, 24(2):133-139.
- [31] 赵孝丹, 赵建宁, 红雨, 等. 转抗旱基因棉对土壤酶活性及速效养分含量的影响[J]. 中国农学通报, 2016, 32(12):77-83.
- ZHAO Xiao-dan, ZHAO Jian-ning, HONG Yu, et al. Effects of transgenic drought-resistant cotton on enzyme activities and available nutrients content in soil[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2016, 32(12):77-83.
- [32] 乌兰图雅, 赵建宁, 李刚, 等. 转双价基因抗虫棉对土壤微生物群落多样性的影响[J]. 生态学杂志, 2012, 31(10):2486-2492.
- WULAN Tu-ya, ZHAO Jian-ning, LI Gang, et al. Effects of transgenic *Bt+CpTI* insect-resistant cotton on microbial community diversity in rhizosphere soil[J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2012, 31(10):2486-2492.
- [33] 赵云丽, 李刚, 修伟明, 等. 非抗虫转基因棉花对土壤细菌群落多样性的影响[J]. 农业环境科学学报, 2015, 34(4):716-721.
- ZHAO Yun-li, LI Gang, XIU Wei-ming, et al. Effects of insect non-resistant transgenic cottons on bacterial community diversity in soil[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2015, 34(4):716-721.
- [34] 吴元凤, 李刚, 修伟明, 等. 双价转基因抗虫棉花对土壤氨氧化细菌和氨氧化古菌群落结构及丰度的影响[J]. 农业环境科学学报, 2014, 33(11):2155-2163.
- WU Yuan-feng, LI Gang, XIU Wei-ming, et al. Community structure and abundance of soil ammonia-oxidizing bacteria and ammonia-oxidizing archaea as influenced by insect-resistant bivalent transgenic cotton[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2014, 33(11):2155-2163.