

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

吴元凤¹, 李刚^{1*}, 修伟明^{1,2*}, 冀国桢², 宋晓龙¹, 赵建宁¹, 杨殿林¹

(1.农业部产地环境质量重点实验室, 农业部环境保护科研监测所, 天津 300191; 2.沈阳农业大学植物保护学院 沈阳 110866)

摘要:采用末端片段多态性分析(T-RFLP)和实时定量 PCR(Quantitative real-time PCR, qPCR)方法,研究了不同生长时期双价转基因抗虫棉花和亲本非转基因棉花(对照)土壤氨氧化细菌(Ammonia-oxidizing bacteria, AOB)和氨氧化古菌(Ammonia-oxidizing archaea, AOA)群落结构和丰度的变化,以探讨双价转基因抗虫棉花种植对土壤氨氧化微生物的影响。结果表明,双价转基因抗虫棉花土壤中 AOB 和 AOA 优势种群与对照相同,且随生长时期无显著变化,但在各自样品中所占比例不同。不同生长时期双价转基因抗虫棉花土壤 AOB 的 Shannon 指数和 Evenness 指数均与对照无显著差异, AOA 的 Shannon 指数与对照也无显著差异,而苗期时 Evenness 指数显著低于对照($P<0.05$),其他 3 个生长时期差异均不显著。qPCR 分析表明,除花铃期双价转基因抗虫棉花土壤 AOB 丰度高于对照外,其他 3 个生长时期均低于对照,而 AOA 丰度在 4 个生长时期均低于对照。吐絮期时,双价转基因抗虫棉花与对照土壤 AOB 和 AOA 丰度均差异显著($P<0.05$)。双价转基因抗虫棉花对土壤 AOB 和 AOA 群落结构组成无显著影响,但降低了 AOB 和 AOA 的数量,双价转基因抗虫棉花对土壤微生物的某些类群可能存在潜在影响。

关键词:双价转基因抗虫棉花;氨氧化细菌;氨氧化古菌;T-RFLP;实时定量 PCR

中图分类号:S154.36 文献标志码:A 文章编号:1672-2043(2014)11-2155-09 doi:10.11654/jaes.2014.11.013

Community Structure and Abundance of Soil Ammonia-oxidizing Bacteria and Ammonia-oxidizing Archaea as Influenced by Insect-resistant Bivalent Transgenic Cotton

WU Yuan-feng¹, LI Gang^{1*}, XIU Wei-ming^{1,2*}, JI Guo-zhen², SONG Xiao-long¹, ZHAO Jian-ning¹, YANG Dian-lin¹

(1. Key Laboratory of Original Agro-environment Quality of Ministry of Agriculture, Agro-Environmental Protection Institute, Ministry of Agriculture, Tianjin 300191, China; 2. College of Plant Protection, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China)

Abstract: The cultivation area of genetically modified (GM) crops has expanded significantly in recent years. However, concerns have been raised over impacts of GM crops on soil ecosystem, especially soil microorganisms. Here, we examined the influence of insect-resistant bivalent transgenic cotton on soil ammonia-oxidizing bacteria (AOB) and ammonia-oxidizing archaea (AOA). Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) was used to evaluate community structure change and qPCR to detect abundance difference. Compared to the control, the population of dominant AOB and AOA did not show significant difference in insect-resistant bivalent transgenic cotton soil, with no changes over the growth season though the ratio of each dominant species population varied in different varieties and at different growth stages of cotton. The Shannon index and Evenness index of AOB had no significant difference between the transgenic cotton soil and its control during the whole growth period. The Shannon index of AOA had similar results, but Evenness index of AOA was significantly lower in the transgenic cotton soil than in the control at the seedling stage ($P<0.05$), with no difference found at the other growth stages. The abundance of AOB in the transgenic cotton soil was higher at the blooming stage, whereas lower at the other stages, as compared with the control soil. However, AOA had lower abundance in the GM cotton than in the control soil throughout the growing season. Therefore, the insect-resistant bivalent transgenic cotton had no significant impact on the community structure of soil AOB and AOA, but reduced the abundance of AOB and AOA, suggesting potential impacts of transgenic cotton on soil ammonia-oxidizing microorganisms.

Keywords: insect-resistant bivalent transgenic cotton; ammonia-oxidizing bacteria; ammonia-oxidizing archaea; T-RFLP; quantitative real-time PCR

收稿日期:2014-04-14

基金项目:国家自然科学基金(31200424);中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(农业部环境保护科研监测所)

作者简介:吴元凤(1989—),女,天津人,硕士研究生,从事转基因植物环境安全评价研究。E-mail:wyfgmo@sina.cn

*通信作者:李刚 E-mail:gangli1981@gmail.com;修伟明 E-mail:xiuweiming@caas.cn

2013年转基因作物种植进入第18年,种植面积增加至1.72亿 hm^2 ,成为现代农业史上采用最为迅速的作物技术^[1]。转基因作物的大面积种植给人们带来了可观的经济效益,但其种植对生态系统潜在的影响也受到了关注^[2]。土壤微生物是土壤生态系统中物质能量循环的主要驱动力,能够表征土壤质量变化,决定着土壤的健康和稳定^[3]。转基因作物种植是否会对土壤生态系统产生影响,尤其是对土壤生态系统的重要组成部分——土壤微生物产生影响,成为人们关注的热点^[4]。氨氧化微生物是土壤硝化作用的限速步骤氨氧化作用的主要执行者,对环境变化具有选择特异性,可以作为潜在的土壤质量生物学指标,常被用于研究土壤微生物对环境变化的响应^[5-7]。最初研究认为氨氧化细菌(Ammonia-oxidizing bacteria, AOB)是执行氨氧化作用的主要微生物^[8],而随着氨氧化古菌(Ammonia-oxidizing archaea, AOA)在海水和土壤中被发现^[9-10],AOA在硝化过程中所发挥的重要作用被人们所认识。因此,充分认识AOB和AOA共同对环境变化的响应将为研究环境变化对生态系统的影响提供重要依据。

中国作为棉花种植大国,转基因抗虫棉花成为主要种植品种,种植面积达到了420万 hm^2 ,成为种植面积最广的转基因作物^[1]。随着转基因抗虫棉花的大面积商品化生产,其环境风险日益受到人们的重视。目前对转基因抗虫棉花环境风险的研究已在多方面开展,如对农田非靶标害虫及天敌等昆虫的影响^[11],对土壤微生物结构和功能多样性的影响^[12-13],对土壤真菌多样性的影响^[14-15],基因水平转移(Horizontal gene transfer)^[16],外源蛋白残留情况及动态变化^[17-19],外源重组DNA土壤分布情况^[20]以及基因流(Gene flow)^[21]等。但转基因抗虫棉花长期种植对土壤功能微生物的影响,特别是氨氧化微生物的影响研究不足。本研究采用T-RFLP和实时荧光定量PCR方法分析双价转基因抗虫棉花种植后土壤AOB和AOA群落结构和丰度的变化,并结合统计学分析,探讨其对土壤AOB和AOA群落结构和丰度的影响,为综合评价转基因抗虫棉花的环境风险性提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 样地设置和土壤样品采集

试验样地位于中国农业科学院武清转基因生物农田生态环境影响野外科学观测试验站,土壤类型为潮土。试验始于2011年,选择双价转基因抗虫棉花

SGK321(转*CryIAc*和*CpTI*基因)及其亲本非转基因棉花石远321(对照)作为研究对象,每个棉花品种小区面积为25 m×30 m,各设置3次重复,随机区组设计,小区之间设置宽度为10 m的玉米保护行。氮肥总量为200 $\text{kg}\cdot\text{hm}^{-2}$,钾肥总量为100 $\text{kg}\cdot\text{hm}^{-2}$,磷肥总量为60 $\text{kg}\cdot\text{hm}^{-2}$,其中氮肥基施60%、追施40%,磷肥和钾肥全部做基肥施入。采用常规管理,不施用农药。试验前此样地种植作物为玉米和小麦。

于棉花种植第3年的苗期(2013年6月7日)、蕾期(2013年7月22日)、花铃期(2013年8月21日)和吐絮期(2013年9月22日)采集土壤样品,分别标记为SY-1、SGK-1、SY-2、SGK-2、SY-3、SGK-3、SY-4和SGK-4(SY为石远321,SGK为SGK321)。在每个处理小区采用W形采样方法,随机选取10个点位,去除表层土后,用直径为2.5 cm的衬片式土壤采样器紧贴棉花主茎采集0~20 cm土壤,每个处理小区的所有土壤采集后装入1个灭菌自封袋中,混匀后放入低温样品储藏箱中带回实验室。一份土壤样品放入-70℃冰箱中,用于分子生物学分析;另一份土壤样品过2 mm筛后用于土壤理化性质测定。

1.2 土壤理化性质和硝化势测定

全氮、全磷、速效磷、有机质、pH、土壤含水量测定方法见《土壤农化分析》^[22]。硝态氮和铵态氮采用连续流动注射分析仪(AA3-HR, SEAL, Germany)测定。土壤硝化势(Potential nitrification activity, PNA)的测定参见Ai等^[23]的方法。土壤理化性质和土壤硝化势的测定结果见表1和表2。

1.3 土壤总DNA提取

4个生长时期共24份土壤样品各称取0.5 g用于土壤DNA提取,提取方法和步骤按照土壤DNA提取试剂盒(UltraClean® DNA Isolation Kit, Mo Bio Laboratories, Solana Beach, CA, USA)的说明进行,最后用50 μL ddH₂O洗脱获得DNA样品。所获得的土壤DNA样品采用1.0%琼脂糖凝胶电泳检测DNA质量。

1.4 PCR扩增及T-RFLP分析

AOB和AOA分别采用引物amoA-1F/amoA-2R^[24]和Arch-amoAF/Arch-amoAR^[25]进行PCR扩增,其中上游引物amoA-1F和Arch-amoAF的5'端采用6-FAM进行标记,每个DNA样品3次重复。PCR反应体系(25 μL)包括:10×Buffer 2.5 μL , 0.8 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ dNTPs(TaKaRa), 0.4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 每种引物, 0.1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ BSA(TaKaRa), 0.025 $\text{U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ Taq Hot Start 聚合酶(TaKaRa), 1 μL DNA样品作为模板, 加灭菌水补至

表 1 不同生长时期双价转基因抗虫棉花和对照土壤理化性质

Table 1 Physico-chemical properties of soils grown with insect-resistant bivalent transgenic cotton and control cotton at different growth stages

处理 Treatment	pH	铵态氮 Ammonium-N 含量/mg·kg ⁻¹	硝态氮 Nitrate-N 含量/mg·kg ⁻¹	全氮 Total N 含量/g·kg ⁻¹	全磷 Total P 含量/g·kg ⁻¹	速效磷 Available P 含量/mg·kg ⁻¹	有机质 Organic matter 含量/g·kg ⁻¹	含水量 Soil moisture/%
SY-1	8.04±0.04a	3.57±0.39b	36.41±0.69c	0.10±0.00a	0.80±0.03abc	32.08±5.50d	23.12±1.52b	19.59±0.29abc
SGK-1	7.99±0.05a	3.51±0.45b	36.19±4.75c	0.10±0.00a	0.71±0.06ab	26.20±1.70bcd	22.09±0.70b	19.99±0.18bc
SY-2	8.32±0.02bc	2.89±0.37b	3.54±0.19a	0.18±0.01b	0.87±0.02c	28.20±1.45cd	26.61±0.14c	20.04±0.34bc
SGK-2	8.39±0.06c	2.92±0.13b	2.26±0.29a	0.26±0.03c	0.76±0.04abc	21.94±0.81abc	21.28±0.58ab	18.61±0.55ab
SY-3	8.33±0.01bc	1.63±0.22a	3.48±0.35a	0.18±0.01b	0.84±0.02c	18.80±0.97ab	22.84±0.86b	17.90±0.37a
SGK-3	8.31±0.06bc	1.57±0.30a	4.25±0.18a	0.14±0.01ab	0.81±0.04bc	16.02±1.27a	18.91±1.21a	17.93±1.17a
SY-4	8.22±0.01b	1.17±0.03a	12.35±1.31b	0.63±0.01d	0.82±0.01bc	26.84±2.49cd	27.81±0.09c	20.62±0.36c
SGK-4	8.43±0.07c	1.14±0.06a	5.41±1.02a	0.60±0.01d	0.69±0.02a	16.46±0.73a	21.81±0.51b	20.47±0.43c

注:同一列中不同小写字母表示差异达到显著水平($P<0.05$)。下同。

Note: Different lowercase letters in the same column indicate significant differences at $P<0.05$. The same below.

表 2 不同生长时期双价转基因抗虫棉花和对照土壤硝化势($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)Table 2 Potential nitrification activity(PNA) of soils grown with insect-resistant bivalent transgenic cotton and control cotton at different growth stages($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)

处理 Treatment	SY-1	SGK-1	SY-2	SGK-2	SY-3	SGK-3	SY-4	SGK-4
硝化势 PNA	0.99±0.06b	1.00±0.08b	2.08±0.07e	1.78±0.05d	1.66±0.04d	1.49±0.07c	0.42±0.02a	0.38±0.00a

注:同一行中不同小写字母表示差异达到显著水平($P<0.05$)。下同。

Note: Different lowercase letters in the same line indicate significant differences at $P<0.05$. The same below.

25 μL 。AOB PCR 反应条件为:95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,40 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 7 min。AOA PCR 反应条件为:95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,53 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 45 s,30 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 7 min。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测后,采用 Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System(Promega,USA)纯化,将 3 次重复的 PCR 纯化产物混合均匀。

纯化得到的 AOB PCR 产物采用限制性内切酶 *Msp*I(TaKaRa)进行酶切,纯化得到的 AOA PCR 产物采用限制性内切酶 *Hha*I(TaKaRa)进行酶切(条件为 37 $^{\circ}\text{C}$ 3 h)。酶切产物送生工生物工程(上海)股份有限公司进行 T-RFLP 分析。T-RFLP 数据分析时将大小相差为 ± 1 bp 的 T-RFs 合并为一个 T-RF^[26],T-RF 的相对丰度(Relative abundance,Ra)按照 Lukow 等^[27]的方法计算,其 3 次重复值均大于 1%的 T-RFs 用于 T-RFLP 分析,而大于 10%的 T-RFs 为优势 T-RF^[28]。

1.5 qPCR 分析

细菌、古菌、AOB 和 AOA 的丰度采用 qPCR 方法进行测定,每个 DNA 样品 3 次重复。qPCR 反应体系(25 μL)包括:1 $\times$ SYBR Premix Ex TaqTM Buffer (Takara),200 nmol $\cdot\text{L}^{-1}$ 每种引物,1 $\times$ ROX reference dye II (Takara),10 ng $\cdot\mu\text{L}^{-1}$ T4 gene 32 protein(Roche, Laval, Quebec, Canada),1 μL 20 倍稀释的土壤 DNA

(经验证此稀释倍比条件下 PCR 抑制效应可以忽略不计),ddH₂O 补充至 25 μL 。qPCR 引物信息见表 3。qPCR 反应条件为:95 $^{\circ}\text{C}$ 1 min;35 个循环包括 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,退火 30 s(退火温度见表 3),72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s。所有 qPCR 反应均于 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸时收集荧光信号,并绘制熔解曲线(60~95 $^{\circ}\text{C}$,每扫描一次温度增加 0.5 $^{\circ}\text{C}$),同时采用 1.5%琼脂糖凝胶电泳以确定 PCR 产物的特异性。所有 qPCR 反应均设置空白对照。

以提取的土壤 DNA 为模板进行 PCR 扩增获得上述目的基因片段。PCR 产物纯化后,与 pGEMT-easy Vector(Promega,USA)连接,并转化 *E. coli* JM109 感受态细胞,挑取白色阳性单菌落。将鉴定正确的阳性克隆于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养后提取质粒 DNA。以 10 倍梯度稀释质粒溶液制备成标准溶液进行 qPCR,每个浓度重复 3 次,获得标准曲线。本研究,4 种目的基因标准曲线均具有良好的线性度, R^2 均大于 0.99,扩增效率在 87.1%~103.3%之间。

1.6 数据分析

qPCR 反应数据采用 MxPro-Mx 3005P v 4.00 (Stratagene,USA)软件收集,并计算获得 qPCR 反应标准曲线。采用 SPSS 16.0 软件进行方差分析(One-Way ANOVA)以及相关性分析,处理间的差异性采用 Duncan 法,显著水平设定为 $P<0.05$ 。AOB 和 AOA 群

表 3 qPCR 引物和反应条件
Table 3 Primers and reaction conditions for qPCR

目标基因 Target gene	引物 Primer	序列 5'-3' Sequences 5'-3'	退火温度 Annealing temperature	产物大小 Product size	参考文献 Reference
细菌 16S rRNA Bacterial 16S rRNA	515F	TGCCAGCAGCGCGGTAA	55 ℃	425 bp	[29]
	927R	CTTGTGCGGGCCCCGCTCAATTC			
古菌 16S rRNA Archaeal 16S rRNA	ARC344F	ACGGGGYGCAGCAGGCGCGA	55 ℃	552 bp	[30]
	ARC915R	GTGCTCCCCGCGCAATTCCT			
AOB <i>amoA</i>	amoA-1F	GGGGTTTCTACTGGTGTT	60 ℃	491 bp	[31]
	amoA-2R	CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC			
AOA <i>amoA</i>	19F	ATGGTCTGGCTWAGACG	55 ℃	628 bp	[32]
	CrenamoA616r48x	GCCATCCANCKRTANGTCCA			
					[33]

落多样性用 Shannon 指数(H)和 Evenness 指数(EH)评价,计算公式如下:

$$H=-\sum P_i \ln P_i$$
$$EH=H/\ln S$$

式中: H 为 Shannon 指数; EH 为 Evenness 指数; S 为样品中 T-RFs 数目; P_i 为第 i 条带峰面积占该样品总峰面积的比率。

采用 Canoco 4.5 软件包对 T-RFLP 结果与土壤理化性质间进行典范对应分析(Canonical Correspondence Analysis, CCA)。

2 结果与分析

2.1 土壤 AOB 和 AOA 群落结构和多样性变化

AOB PCR 产物经酶切后主要得到 57、89、155、226、235、247、249、256、489 bp 这 9 种 T-RFs ($R_a > 1\%$), 其中 57、235、256、489 bp 片段所代表的 T-RFs 在土壤中占优势(图 1)。苗期时, 双价转基因抗虫棉花土壤中 235、489 bp 片段百分含量显著低于对照 ($P < 0.05$), 而 247 bp 片段百分含量高于对照, 差异达到极显著 ($P < 0.01$); 蕾期时, 双价转基因抗虫棉花土壤中 256 bp 片段百分含量显著高于对照 ($P < 0.05$); 花铃期时, 双价转基因抗虫棉花土壤中 57 bp 片段百分含量显著低于对照 ($P < 0.05$), 而 256、489 bp 片段百分含量显著高于对照 ($P < 0.05$); 吐絮期时, 仅 489 bp 片段百分含量显著低于对照 ($P < 0.05$)。这说明, 不同生长时期双价转基因抗虫棉花和对照间不同 T-RFs 所代表的 AOB 在各自的土壤中所占比例发生改变, 但 AOB 的群落结构未发生明显改变。AOA PCR 产物经酶切后主要得到 8 种 T-RFs, 大小分别为 56、168、259、356、550、566、605、608 bp (图 1), 其中 168、259、550 bp 片段所代表的 T-RFs 在土壤中占优势, 且为双价转基因抗虫棉花和对照土壤中所共有。仅在

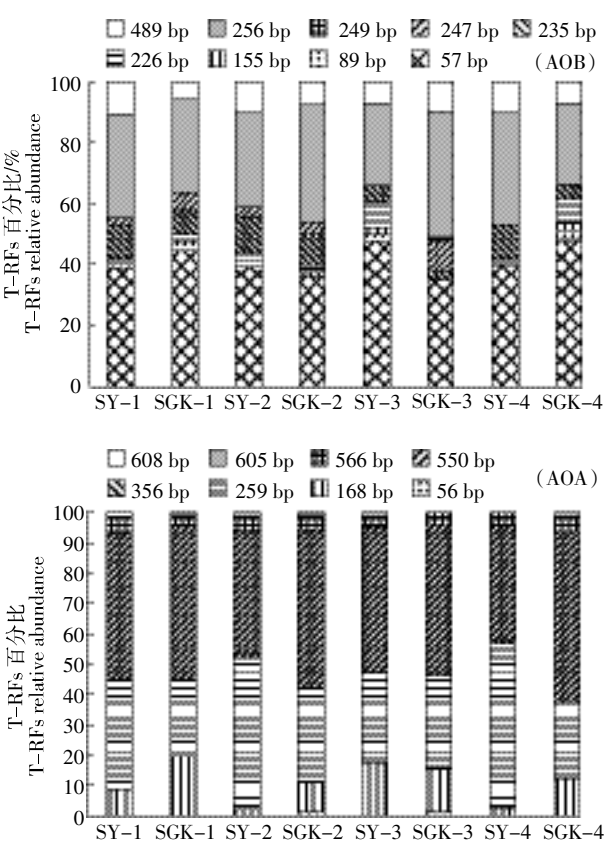


图 1 土壤 AOB 和 AOA *amoA* 基因的 T-RFs 百分比
Figure 1 T-RFs relative abundance of AOB and AOA *amoA* gene

双价转基因抗虫棉花土壤中发现 56 bp 片段所代表的 AOA, 说明此 T-RFs 为双价转基因抗虫棉花土壤所特有, 但其所占比例很低, 最高仅为 1.33%。苗期和花铃期时, 双价转基因抗虫棉花和亲本土壤中各 T-RFs 均无显著差异; 蕾期时, 双价转基因抗虫棉花土壤中 356 bp 片段百分含量显著低于对照 ($P < 0.05$); 吐絮期时, 双价转基因抗虫棉花土壤中 550 bp 片段百分含量显著高于对照 ($P < 0.05$), 而 259、356 bp 片段百分含量显著低于对照 ($P < 0.05$)。与 AOB 相同, 双价转

基因抗虫棉花和对照间代表不同 AOA 的 T-RFs 所占比例发生变化,但其群落结构未发生明显变化。

生物多样性指数是描述生物类型数和均匀度的一个度量指标,在一定程度上可反映生物群落中物种的丰富程度及其各类型间的分布比例^[34]。由表 4 可以看出,不同生长时期对照土壤 AOB 的 Shannon 和 Evenness 多样性指数表现为先增高后降低的趋势,而双价转基因抗虫棉花土壤 AOB 的 Shannon 指数表现为先增高后降低再增高的趋势,而 Evenness 多样性表现为先降低后增高的趋势,与对照的变化趋势有所不同。显著性分析发现,双价转基因抗虫棉花和对照之间土壤 AOB 的 Shannon 和 Evenness 多样性指数无显著差异,而且不同生长时期 Shannon 和 Evenness 多样性指数均未发生显著变化,说明土壤 AOB 的多样性并没有因为双价转基因抗虫棉花的种植而发生显著改变,而且未受到生长时期的影响。不同生长时期对照土壤 AOA 的 Shannon 和 Evenness 多样性指数表现为先降低后升高再降低的变化趋势,双价转基因抗虫棉花土壤 AOA 的 Shannon 指数表现为先升高后降低的趋势,而 Evenness 多样性表

现为逐渐下降的趋势,与对照的变化趋势不同。显著性分析发现,双价转基因抗虫棉花和对照之间土壤 AOA 的 Shannon 多样性指数差异不显著,与 AOB 相同,而 Evenness 多样性指数有所不同,对照表现出较大的波动性,最大值(0.559)出现在苗期,最低值(0.482)出现在蕾期,而双价转基因抗虫棉花不同生长时期之间差异不显著,除苗期双价转基因抗虫棉花显著低于对照外($P<0.05$),其他生长时期与对照均无显著差异。

2.2 土壤 AOB 和 AOA 群落结构与土壤理化性质的典范对应分析

将土壤 pH、硝态氮(NO_3^--N)、铵态氮(NH_4^+-N)、全氮(TN)、全磷(TP)、速效磷(AP)、有机质(OM)和含水量(SM)对土壤 AOB 和 AOA 群落结构的影响采用 CANOCO 软件进行 CCA 分析。结果(图 2)发现,双价转基因抗虫棉花和对照 AOB 群落结构均表现为与生长时期的相关性,从整体上可分为两种不同的聚类形式,即苗期和蕾期以及花铃期和吐絮期 AOB 群落可分别聚为一类。双价转基因抗虫棉花和对照土壤 AOA 群落则无明显的聚类形式,与 AOB 群落结构分

表 4 土壤 AOB 和 AOA 的 Shannon 指数和 Evenness 指数

Table 4 Shannon index and Evenness index of soil AOB and AOA

处理 Treatment	AOB		AOA	
	Shannon 指数 Shannon index	Evenness 指数 Evenness index	Shannon 指数 Shannon index	Evenness 指数 Evenness index
SY-1	1.521±0.042a	0.613±0.008a	1.256±0.026a	0.559±0.035c
SGK-1	1.566±0.072a	0.588±0.014a	1.402±0.142a	0.533±0.002ab
SY-2	1.627±0.011a	0.622±0.006a	1.236±0.075a	0.482±0.014a
SGK-2	1.592±0.042a	0.580±0.025a	1.446±0.039a	0.514±0.010ab
SY-3	1.560±0.069a	0.610±0.009a	1.416±0.065a	0.524±0.015ab
SGK-3	1.528±0.014a	0.575±0.011a	1.398±0.091a	0.515±0.025ab
SY-4	1.566±0.040a	0.579±0.011a	1.220±0.041a	0.489±0.017a
SGK-4	1.638±0.051a	0.596±0.023a	1.288±0.081a	0.512±0.027ab

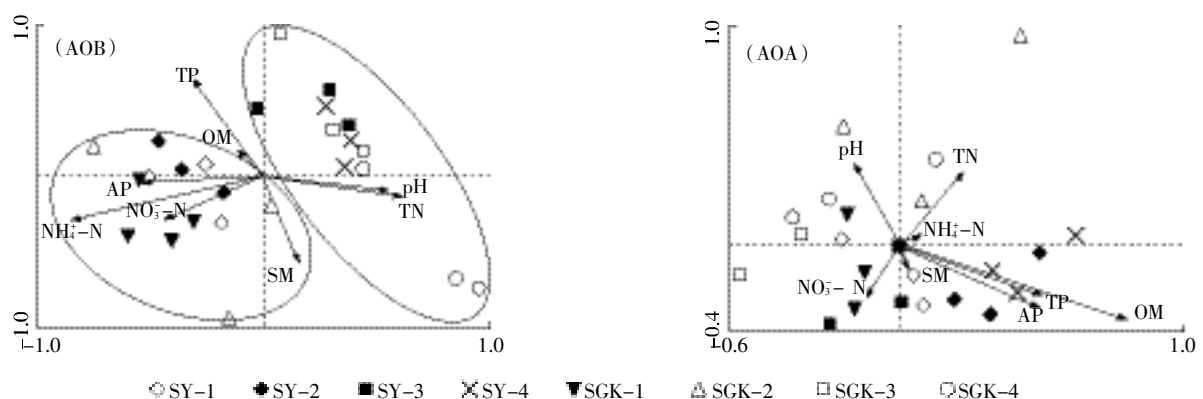


图 2 CCA 分析土壤理化性质对 AOB 和 AOA 群落结构的影响

Figure 2 Canonical correspondence analysis(CCA) of effects of soil physico-chemical properties on AOB and AOA structure

析结果不同。双价转基因抗虫棉花和对照之间 AOB 群落结构均未发生分离,AOB 群落结构变化与棉花生长期具有相关性,而不受双价转基因抗虫棉花种植的影响,与 AOB 相同,AOA 群落结构也均未发生分离。经蒙特卡洛检验(Monte Carlo permutation test)发现,各理化因子中铵态氮和总磷含量的变化是 AOB 群落结构变化的主要影响因素 ($\text{NH}_4^+-\text{N}=0.002\ 0$; $\text{TP}=0.008\ 0$, $P<0.05$),而土壤有机质含量($\text{OM}=0.002\ 0$, $P<0.05$)对 AOA 群结构变化有显著影响。

2.3 土壤 AOB 和 AOA 丰度变化

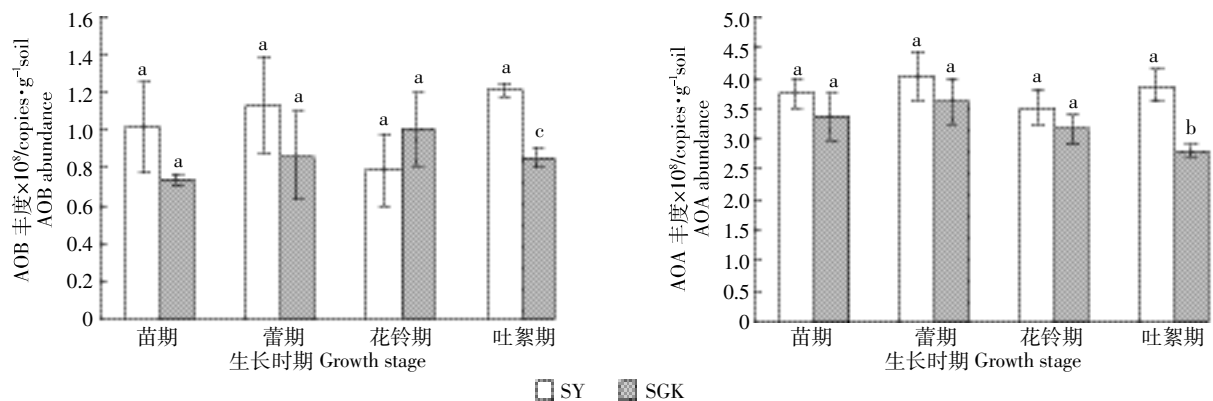
土壤 AOB 和 AOA 丰度的定量 PCR 结果见图3。对照土壤 AOB 丰度随生长期呈现出先增加后减少再增加的趋势,而双价转基因抗虫棉花土壤 AOB 丰度表现为先增加后降低的趋势。对照土壤 AOB 丰度的最高值出现在吐絮期,为每克土壤 1.21×10^8 个拷贝数,最低值出现在铃期,为每克土壤 7.88×10^7 个拷贝数,而双价转基因抗虫棉花土壤 AOB 丰度最高值出现在花铃期,为每克土壤 1.01×10^8 个拷贝数,最低值出现在苗期,为每克土壤 7.36×10^7 个拷贝数。在苗期、蕾期和吐絮期,双价转基因抗虫棉花土壤 AOB 丰度均低于对照,而在花铃期高于对照,除吐絮期双价转基因抗虫棉花土壤 AOB 丰度极显著低于对照外($P<0.01$),在其他三个生长时期均无显著差异。对照土壤 AOA 丰度与 AOB 变化趋势相同,为先增加后减少再增加,而双价转基因抗虫棉花土壤 AOA 丰度既与对照不同,也与 AOB 不同,表现为先增加后逐渐降低。对照土壤 AOA 丰度的最高值出现在蕾期,为每克土壤 4.03×10^8 个拷贝数,最低值出现在铃期,为每克土壤 3.52×10^8 个拷贝数,而双价转基因抗虫棉花土壤 AOA 丰度的最高值出现在蕾期,为每克土壤 $3.62\times$

10^8 个拷贝数,最低值出现在吐絮期,为每克土壤 2.80×10^8 个拷贝数。在整个生长期中,双价转基因抗虫棉花土壤 AOA 丰度均低于对照,其中在吐絮时期差异达到显著水平($P<0.05$)。

对不同生长时期双价转基因抗虫棉花和对照土壤 AOB 丰度占细菌丰度的比例、AOA 丰度占古菌丰度的比例以及 AOB 与 AOA 丰度比值的分析(表5)发现,在整个生长期中,除 AOA 丰度占古菌丰度的比例随不同生长时期的变化表现出显著差异外,AOB 丰度占细菌丰度的比例和 AOB 与 AOA 丰度比值均无显著差异。同时发现,无论土壤 AOB 丰度占细菌丰度的比例,还是 AOA 丰度占古菌丰度的比例以及 AOB 与 AOA 丰度比值,在同一生长时期双价转基因抗虫棉花和对照之间均无显著差异。对土壤硝化势与土壤 AOB、AOA 以及 AOB 与 AOA 比例进行相关分析(表6)发现,土壤硝化势与土壤 AOB 以及 AOA 呈正相关,而与 AOB/AOA 比例呈负相关,均未达到显著水平。

表 5 土壤 AOB 与细菌、AOA 与古菌以及 AOB 与 AOA 丰度比值变化

处理 Treatment	AOB/细菌 AOB/bacteria $\times 10^{-4}$	AOA/古菌 AOA/archaea	AOB/AOA AOB/AOA
SY-1	1.16 $\pm$ 0.14a	0.52 $\pm$ 0.01abc	0.27 $\pm$ 0.05a
SGK-1	0.92 $\pm$ 0.11a	0.52 $\pm$ 0.01abc	0.22 $\pm$ 0.02a
SY-2	0.89 $\pm$ 0.13a	0.55 $\pm$ 0.05bc	0.27 $\pm$ 0.04a
SGK-2	0.73 $\pm$ 0.16a	0.60 $\pm$ 0.05c	0.24 $\pm$ 0.06a
SY-3	0.79 $\pm$ 0.10a	0.54 $\pm$ 0.05abc	0.22 $\pm$ 0.04a
SGK-3	1.03 $\pm$ 0.17a	0.51 $\pm$ 0.01abc	0.31 $\pm$ 0.04a
SY-4	0.97 $\pm$ 0.13a	0.49 $\pm$ 0.02ab	0.31 $\pm$ 0.01a
SGK-4	0.86 $\pm$ 0.08a	0.44 $\pm$ 0.01a	0.30 $\pm$ 0.02a



图中不同小写字母表示各处理间差异显著($P<0.05$)
Different lowercase letters indicate significant differences ($P<0.05$) between different treatments

图 3 土壤 AOB 和 AOA 丰度变化
Figure 3 Changes of soil AOB and AOA abundance

表 6 土壤硝化势(PNA)与 AOB 丰度、AOA 丰度和 AOB/AOA 丰度比的相关系数

Table 6 Correlation coefficients between PNA and abundance of AOB and AOA genes and AOB/AOA ratio

<i>R</i>	AOB 丰度	AOA 丰度	AOB/AOA 丰度比
硝化势 PNA	0.287	0.021	-0.214

3 讨论

转基因作物的种植对土壤生态系统,尤其是对土壤微生物是否造成影响,一直受到科学界的关注^[4]。N 素循环是陆地生态系统中物质能量循环的重要组成部分,氨氧化微生物(AOB 和 AOA)作为在 N 素生物地球化学循环中发挥重要作用的微生物类群,其群落结构变化能够反映陆地生态系统对环境变化的响应,已广泛用于微生物生态学研究^[35]。本研究将 T-RFLP 和 qPCR 方法相结合,分析了双价转基因抗虫棉花种植对土壤 AOB 和 AOA 群落结构和丰度的影响。

T-RFLP 数据分析发现,AOB 酶切片段中 57、235、256、489 bp 片段所代表的 AOB 为优势菌,这些片段比例的变化反映了不同生长时期双价转基因抗虫棉花和对照土壤中 AOB 群落结构的整体变化趋势。不同生长时期双价转基因抗虫棉花和对照土壤中不同 T-RFs 所占比例变化虽然各不相同,但优势 AOB 组成结构未发生明显改变,说明双价转基因抗虫棉花种植未对土壤 AOB 的群落结构产生显著影响,AOB 群落结构的变化不仅与棉花品种有关,也受到生长期等其他环境因素的影响。AOA 的 T-RFLP 分析结果与 AOB 相似,168、259、550 bp 片段所代表的 AOA 为优势菌,存在于每个样品中,这些片段在不同生长时期和不同棉花品种土壤中所占比例变化也各不相同,AOA 的群落结构则未发生明显改变,同样受到棉花品种和其他环境因素的影响。

对土壤 AOB 多样性指数分析发现,不同生长时期双价转基因抗虫棉花和对照之间 Shannon 和 Evenness 指数差异均不显著,而且不同生长时期之间也未表现出显著差异,说明双价转基因棉花种植对 AOB 多样性无显著影响,同时其多样性未受到生长时期的显著影响。与 AOB 相同,在不同生长时期土壤 AOA 的 Shannon 指数未发生显著变化,且在整个生长时期内均无显著差异,而 Evenness 指数表现有所不同,苗期 Evenness 指数双价转基因抗虫棉花显著低于对照,其他时期则无显著差异,同时苗期 Evenness 指数

高于其他生长时期,其中与对照差异更是达到显著水平($P<0.05$),分析认为这与苗期施肥有关。对土壤理化性质分析发现,苗期硝态氮的含量极显著高于其他时期,有研究认为 AOA 适宜在低能供应环境中生存^[36],而在这种高能条件下,土壤中硝态氮含量的增加导致土壤 pH 值发生改变,AOA 对此变化产生瞬时的响应,同时双价转基因抗虫棉花与对照可能产生不同的响应,导致其根系分泌物不同,这些变化虽然没有对 Shannon 指数产生显著影响,但 Evenness 指数所反映的均一性受到明显的影响,最终导致苗期 Evenness 指数显著低于对照。AOB 由于较适应这种偏碱性的环境^[34],其多样性指数均无显著变化。将 AOB 和 AOA 与环境因子进行典范对应分析(CCA),发现铵态氮和总磷含量的变化是 AOB 群落结构变化的主要影响因素,而 AOA 与有机质变化显著相关,说明在相同环境条件下 AOB 和 AOA 对不同环境因子的依赖性不同。

对 AOB 丰度分析发现,除花铃期双价转基因抗虫棉花土壤 AOB 丰度高于对照外,其余生长时期均低于对照,与董莲华等^[37]的研究结果一致。双价转基因抗虫棉花土壤 AOB 丰度除在吐絮期时极显著低于对照外($P<0.01$),在其他三个生长时期均无显著差异。而对 AOA 进行 qPCR 分析发现,4 个生长时期双价转基因抗虫棉花均低于对照,其中在吐絮期时差异达到显著水平($P<0.05$),与 AOB 相同。AOB 与细菌丰度的比值、AOB 与 AOA 丰度的比值在整个生长时期均无显著差异,而 AOA 与古菌丰度的比值表现出差异性,而对比双价转基因抗虫棉花和对照,这 3 项指标均无显著差异。本研究中虽然 AOA 的数量要显著高于 AOB,但 AOB 与 AOA 丰度的比值明显高于其他研究的结果^[8, 38-39],也说明偏碱性土壤更适宜 AOB 的生长。双价转基因抗虫棉花和对照土壤硝化势均呈现先升高后降低的趋势,除苗期双价转基因抗虫棉花高于对照外,其他时期均低于对照,且在蕾期和铃期差异达到显著水平,说明双价转基因棉花可能对土壤硝化势具有一定的抑制作用。这种抑制作用的产生可能是由双价转基因抗虫棉花根系分泌物与对照不同造成的^[37, 40],这种抑制作用同时也反映在 AOB 和 AOA 的数量上。对硝化势进行相关分析发现,硝化势与 AOB、AOA 丰度均呈正相关变化趋势,而与 AOB 和 AOA 的比值呈负相关变化趋势,虽然均未达到显著水平,但仍可表明硝化势的变化可能与 AOB 和 AOA 数量变化具有协同效应,需要进一步研究说明棉花种植条件下土壤环境中 AOB 和 AOA 对氨氧

化过程的贡献。

本研究从群落结构和丰度变化的角度,探讨了双价转基因抗虫棉花种植对土壤 AOB 和 AOA 的影响,但是由于 T-RFLP 方法的局限性,未能获得不同生长时期 AOB 和 AOA 的归属信息,不能从分类学角度系统分析双价转基因抗虫棉花种植对土壤 AOB 和 AOA 的影响。因此,今后在进行长期监测的同时,要结合多种先进的分子生物学方法,如高通量测序、SIP 等^[41-42],在 DNA 和 RNA 水平上不仅针对细菌、古菌等微生物整体开展研究,更要针对具有生态学意义的功能微生物开展研究,更加全面地评价转基因抗虫棉花种植对土壤微生物的影响。

4 结论

双价转基因抗虫棉花对土壤 AOB 和 AOA 群落结构无显著影响。土壤铵态氮和总磷含量变化是土壤 AOB 群落结构变化的主要影响因素,而 AOA 群落结构变化与土壤有机质变化显著相关。除花铃期双价转基因抗虫棉花土壤 AOB 丰度高于对照外,其他 3 个生长时期均低于对照;而在 4 个生长时期,土壤 AOA 丰度均低于对照。在吐絮期时,双价转基因抗虫棉花与对照土壤 AOB 和 AOA 丰度差异显著。双价转基因抗虫棉花降低了土壤 AOB 和 AOA 的数量,并反映为对土壤硝化势的抑制,双价转基因抗虫棉花对土壤微生物的某些类群可能存在潜在影响。

参考文献:

- [1] James C. Global status of commercialized Biotech/GM crops;2013[R]. New York: ISAAA, 2013.
- [2] Wolt J D, Peterson R K D. Prospective formulation of environmental risk assessment: Probabilistic screening for *CryIA(b)* maize risk to aquatic insects[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2010, 73(6): 1182-1188.
- [3] Groffman P and Bohlen P. Soil and sediment biodiversity-cross-system comparisons and large-scale effects[J]. *Bioscience*, 1999, 49(2): 139-148.
- [4] Hannula S E, de Boer W, van Veen J A. Do genetic modifications in crops affect soil fungi? A review[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2014, 50(3): 433-446.
- [5] 贺纪正, 张丽梅. 氨氧化微生物生态学与氮循环研究进展[J]. 生态学报, 2009, 29(1): 406-415.
HE Ji-zheng, ZHANG Li-mei. Advances in ammonia-oxidizing microorganisms and global nitrogen cycle[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2009, 29(1): 406-415.
- [6] Li M, Gu J D. Community structure and transcript responses of anammox bacteria, AOA, and AOB in mangrove sediment microcosms amended with ammonium and nitrite[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97(22): 9859-9874.
- [7] 李永春, 刘卜榕, 郭 帅, 等. 亚热带不同林分土壤氨氧化菌群落特征[J]. 应用生态学报, 2014, 25(1): 125-131.
LI Yong-chun, LIU Piao-rong, GUO Shuai, et al. Characteristics of soil ammonia-oxidation microbial communities in different subtropical forests, China[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2014, 25(1): 125-131.
- [8] 周磊榴, 祝贵兵, 王衫允, 等. 洞庭湖岸边带沉积物氨氧化古菌的丰度、多样性及对氨氧化的贡献[J]. 环境科学学报, 2013, 33(6): 1741-1747.
ZHOU Lei-liu, ZHU Gui-bing, WANG Shan-yun, et al. Abundance, biodiversity and contribution to ammonia oxidation of ammonia oxidizing archaea in littoral sediments of Dongting Lake[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2013, 33(6): 1741-1747.
- [9] Venter J C, Remington K, Heidelberg J F, et al. Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso sea[J]. *Science*, 2004, 304: 66-74.
- [10] Treusch A H, Leininger S, Kletzin A, et al. Novel genes for nitrite reductase and Amo-related proteins indicate a role of uncultivated mesophilic crenarchaeota in nitrogen cycling[J]. *Environmental Microbiology*, 2005, 7(12): 1985-1995.
- [11] Han P, Niu C Y, Lei C L, et al. Quantification of toxins in a *CryIAC+ CpTI* cotton cultivar and its potential effects on the honey bee *Apis mellifera* L[J]. *Ecotoxicology*, 2010, 19(8): 1452-1459.
- [12] 李永山, 范巧兰, 陈 耕, 等. 利用 PLFA 方法研究转 *Bt* 基因棉花对土壤微生物群落结构变化的影响[J]. 棉花学报, 2009, 21(6): 503-507.
LI Yong-shan, FAN Qiao-lan, CHEN Geng, et al. Soil microbial community structure change analysis of transgenic *Bt* Cotton based on phospholipid fatty acid method[J]. *Cotton Science*, 2009, 21(6): 503-507.
- [13] 叶 飞, 宋存江, 陶 剑, 等. 转基因棉花种植对根际土壤微生物群落功能多样性的影响[J]. 应用生态学报, 2010, 21(2): 386-390.
YE Fei, SONG Cun-jiang, TAO Jian, et al. Effects of planting transgenic cotton on functional diversity of rhizosphere soil microbial community[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2010, 21(2): 386-390.
- [14] Knox O G G, Nehl D B, Mor T, et al. Genetically modified cotton has no effect on arbuscular mycorrhizal colonization of roots[J]. *Fields Crops Research*, 2008, 109(1-3): 57-60.
- [15] Li X G, Liu B, Cui J J, et al. No evidence of persistent effects of continuously planted transgenic insect-resistant cotton on soil microorganisms[J]. *Plant and Soil*, 2011, 339(1): 247-257.
- [16] 邓 欣, 赵廷昌, 高必达. 转基因抗虫棉叶围卡那霉素抗性细菌种群动态及 *npt II* 基因漂移研究[J]. 中国农业科学, 2007, 40(11): 2488-2494.
DENG Xin, ZHAO Ting-chang, GAO Bi-da. Dynamics in kanamycin-resistant bacterial population and shift of *npt II* gene in the phyllosphere of insect-resistant transgenic cotton[J]. *Agricultural Science in China*, 2007, 40(11): 2488-2494.
- [17] Helassa N, Quiquampoix H, Noinville S, et al. Adsorption and desorption of monomeric Bt (*Bacillus thuringiensis*) CryIAa toxin on montmorillonite and kaolinite[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2009, 41(3): 498-504.
- [18] Chen Z H, Chen L J, Zhang Y L, et al. Microbial properties, enzyme ac-

- tivities and the persistence of exogenous proteins in soil under consecutive cultivation of transgenic cottons (*Gossypium hirsutum* L.)[J]. *Plant Soil and Environment*, 2011, 57(2):67-74.
- [19] Chen Z H, Chen L J, Wu Z J. Relationships among persistence of *Bacillus thuringiensis* and Cowpea trypsin inhibitor proteins, microbial properties and enzymatic activities in rhizosphere soil after repeated cultivation with transgenic cotton[J]. *Applied Soil Ecology*, 2012, 53(1):23-30.
- [20] 李 刚, 修伟明, 赵建宁, 等. 转基因抗虫棉花重组 DNA 在土壤中分布的实时定量 PCR 分析[J]. 农业环境科学学报, 2012, 31(10):1933-1940.
- LI Gang, XIU Wei-ming, ZHAO Jian-ning, et al. Real time PCR assays for the distribution of recombinant DNA of a transgenic insect-resistant cotton in soil[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2012, 31(10):1933-1940.
- [21] Heuberger S, Ellers-Kirk C, Tabashnik B E, et al. Pollen- and seed-mediated transgene flow in commercial cotton seed production fields[J]. *PLoS ONE*, 2010, 5(11):e14128.
- [22] 鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 三版. 北京:中国农业出版社, 2008:39-89.
- BAO Shi-dan. Soil and agriculture chemistry analysis[M]. 3rd Edition. Beijing:China Agriculture Press. 2008:39-89.
- [23] Ai C, Liang G Q, Sun J W, et al. Different roles of rhizosphere effect and long-term fertilization in the activity and community structure of ammonia oxidizers in a calcareous fluvo-aquic soil[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2013, 57:30-42.
- [24] Wang Y, Ke X, Wu L, et al. Community composition of ammonia-oxidizing bacteria and archaea in rice field soil as affected by nitrogen fertilization[J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 2009, 32(1):27-36.
- [25] Francis C A, Roberts K J, Beman J M, et al. Ubiquity and diversity of ammonia-oxidizing archaea in water columns and sediments of the ocean[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102(41):14683-14688.
- [26] Yuan H Z, Ge T D, Zou S Y, et al. Effect of land use on the abundance and diversity of autotrophic bacteria as measured by ribulose-1, 5-biphosphate carboxylase/oxygenase (RubisCO) large subunit gene abundance in soils[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2013, 49:609-616.
- [27] Lukow T, Dunfield P F, Liesack W. Use of the T-RFLP technique to assess spatial and temporal changes in the bacterial community structure with in an agricultural soil planted with transgenic and no transgenic potato plants[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2000, 32(3):241-247.
- [28] Yuan H Z, Ge T D, Wu X H, et al. Long-term field fertilization alters the diversity of autotrophic bacteria based on the ribulose-1, 5-biphosphate carboxylase/oxygenase(RubisCO) large-subunit genes in paddy soil[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2012, 95:1061-1071.
- [29] Ducey T F, Shriner A D, Hunt P G. Nitrification and denitrification gene abundances in swine wastewater anaerobic lagoons[J]. *Journal of Environmental Quality*, 2011, 40(2):610-619.
- [30] Nakaya A, Onodera Y, Nakagawa T, et al. Analysis of ammonia monooxygenase and archaeal 16S rRNA gene fragments in nitrifying acid-sulfate soil microcosms[J]. *Microbes and Environments*, 2009, 24(2):168-174.
- [31] Hayden H L, Drake J, Imhof M, et al. The abundance of nitrogen cycle genes *amoA* and *nifH* depends on land-uses and soil types in South-Eastern Australia[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2010, 42(10):1774-1783.
- [32] Leininger S, Urlich T, Schlöter M, et al. Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils[J]. *Nature*, 2006, 442:806-809.
- [33] Schauss K, Focks A, Leininger S, et al. Dynamics and functional relevance of ammonia-oxidizing archaea in two agricultural soils[J]. *Environmental Microbiology*, 2009, 11(2):446-456.
- [34] 王亚男, 曾希柏, 王玉忠, 等. 设施蔬菜种植年限对氮素循环微生物群落结构和丰度的影响[J]. 应用生态学报, 2014, 25(4):1115-1124.
- WANG Ya-nan, ZENG Xi-bai, WANG Yu-zhong, et al. Effects of vegetable cultivation years on microbial biodiversity and abundance of nitrogen cycling in greenhouse soils[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2014, 25(4):1115-1124.
- [35] Shen J P, Zhang L M, Di H J, et al. A review of ammonia-oxidizing bacteria and archaea in Chinese soils[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2012(3):296.
- [36] Valentine D L. Adaptation to energy stress dictate the ecology and evolution of the archaea[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2007, 5(4):316-323.
- [37] 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.
- [38] Gao J F, Luo X, Wu G X, et al. Quantitative analyses of the composition and abundance of ammonia-oxidizing archaea and ammonia-oxidizing bacteria in eight full-scale biological wastewater treatment plants[J]. *Bioresource Technology*, 2013, 138:285-296.
- [39] Xiao R, Chen B, Liu Y J, et al. Higher abundance of ammonia oxidizing archaea than ammonia oxidizing bacteria and their communities in Tibetan Alpine Meadow soils under long-term nitrogen fertilization[J]. *Geomicrobiology Journal*, 2014, 31:597-604.
- [40] 刘立雄. 转基因棉花种植对根际土壤氮转化相关酶的影响[J]. 作物杂志, 2010(3):69-71.
- LIU Li-xiong. Effects of transgenic cotton planting on rhizosphere soil N transformation related soil enzyme activities[J]. *Crops*, 2010(3):69-71.
- [41] Lauber C L, Ramirez K S, Aanderud Z, et al. Temporal variability in soil microbial communities across land-use types[J]. *The ISME Journal*, 2013, 7(8):1641-1650.
- [42] Dumont M G, Pommerenke B, Casper P. Using stable isotope probing to obtain a targeted metatranscriptome of aerobic methanotrophs in lake sediment[J]. *Environmental Microbiology Reports*, 2013, 5(5):757-764.