

转基因抗虫棉对茎部内生细菌多样性的影响^①

陈磊¹, 汪峰¹, 张祥志², 高国庆¹, 刘标³, 陈良燕⁴, 崔中利¹, 曹慧^{1*}

(1 南京农业大学农业部农业环境微生物工程重点开放实验室, 南京 210095; 2 江苏省环境监测中心站, 南京 210036; 3 国家环境保护部南京环境科学研究所, 南京 210042; 4 南京大学环境学院污染控制与资源化国家重点实验室, 南京 210093)

摘要: 比较转 *Bt* 基因抗虫棉与其母本茎部内生细菌多样性, 为评估转基因棉花生物安全性提供基础数据。采用平板培养方法对转基因棉花 (中棉 30, TC) 与其母本 (中棉 16, CC) 茎部内生细菌进行分离与计数, 用细菌的通用引物扩增细菌的 16S rDNA 片段, 进行 RFLP 分析。采用培养方法分离与计数所得的棉花茎部内生菌数量为 10^5 cfu/g; 随机挑取 100 个菌落, 分别用限制性内切酶 *Hha* I 和 *Ras* I 酶切, 转基因棉花中棉 30 (TC) 茎部内生细菌酶切后产生 10 种 OTUs, 常规棉中棉 16 (CC) 茎部内生细菌酶切后产生 9 种 OTUs; 测序结果表明, 中棉 30 (TC) 优势菌属于 *Microbacterium* 和 *Curtobacterium* 属, 中棉 16 (CC) 优势菌为 *Curtobacterium* 和 *Enterobacter* 属。转 *Bt* 基因抗虫棉中棉 30 (TC) 对茎部内生细菌数量和种类没有造成有害影响。

关键词: 转基因抗虫棉; 内生细菌; 生物安全性; RFLP 分析; 生物多样性

中图分类号: X172; S182

农作物性状转基因化是解决农业问题、发展优质高效农业的重要方向, 转基因抗虫棉育种与产业化的快速发展无疑是一个成功的典范。从 20 世纪 90 年代初中国农业科学院成功合成来自苏云金芽胞杆菌的杀虫晶体蛋白基因 (*Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein gene, *Bt cry IA*)^[1], 到花粉管通道法基因转移技术的创新^[2], 转基因抗虫棉的基础研究与产业化应用方面均取得了重要进展。然而转基因抗虫棉的大规模环境释放和产业化应用可能对生物多样性、生态环境和人体健康产生潜在的不利影响, 转基因抗虫棉的生物安全性成为制约转基因抗虫棉大规模产业化的最主要因素^[3]。在转基因棉花环境影响监测方面, 环境微生物一直是一个研究热点。由于微生物种类多、数量大、个体小、繁殖快, 且微生物对于环境因素的敏感性, 能够很好地指示生态环境的细微变化, 因而成为理想的监测转基因抗虫棉对生态环境影响的指标。植物内生菌是指那些在其生活史的一定阶段或全部阶段生活于健康植物的各种组织和器官内部的细菌或真菌, 并与寄主植物建立互惠关系的一类微生物^[4]。这类微生物与转基因棉存在紧密的空间关系, 某些具有“感受态”特征的内生细菌可能会优先发生转基因棉外源基因水平转移, 进而向其他微生物种群发生基

因漂移。国内外学者对转基因抗虫棉进行的大量生物安全性方面的研究中, 主要集中在转基因抗虫棉的基因漂移^[5-7]、对靶标昆虫抗性的影响^[8-9]、对非目标昆虫的影响^[10]及对土壤微生物影响^[11-14]等方面, 对转基因抗虫棉茎内微生物的多样性影响的研究鲜有报道。本研究选择转 *Bt* 基因抗虫棉 (中棉 30, TC) 与其母本 (中棉 16, CC) 为研究材料, 到目前为止, 未见上述两棉花品种内生细菌多样性报道。分离棉花茎部内生细菌, 用限制性内切酶对内生菌 16S rDNA 进行酶切, 进而对内生细菌进行酶切分型^[15-17], 比较转基因抗虫棉及其对照茎部内生细菌的多样性变化, 为转基因抗虫棉的生物安全评价提供理论数据和基础, 对于完善转基因抗虫棉的生物安全评价体系具有重要的意义。

1 材料与方法

1.1 试验小区设置与样品采集

试验小区位于南京市六合区, 该地区属亚热带湿润气候, 年平均气温 15.3℃, 年降水量 1 106.5 mm。转基因棉为中棉 30 (TC), 携带杀虫晶体蛋白 (*Bt*) 基因和卡那霉素 (*npt II*) 标记基因; 常规棉为 *Bt* 对照品系中棉 16 (CC)。小区面积为 48 m² (6 m×8 m), 3 次重复。样品采集时间为 2008 年 8 月 5 日, 选择 5 株

①基金项目: 国家环境保护总局公益性行业科研专项项目 (2007HGBY47) 资助。

* 通讯作者 (hcao@njau.edu.cn)

作者简介: 陈磊 (1987—), 男, 安徽宣城人, 硕士研究生, 主要研究方向为环境微生物学。E-mail: 2009116033@njau.edu.cn

棉花植株,采集棉花茎秆鲜重约 100 g。两种棉的茎,分别放入无菌的样品袋,带回实验室放 4℃ 冰箱保存,内生细菌的计数和分离实验在一周之内完成。

1.2 实验试剂

四碱基限制性内切酶 *Hha* I 和 *Rsa* I 购自 Takara 公司 (*Hha* I 酶切位点为 GCG' C; *Rsa* I 酶切位点为 GT' AC); dNTP、Taq DNA 聚合酶购自上海 Genbase 公司,引物由上海 Sangon 公司合成。

1.3 内生细菌的分离及计数

棉花茎部用去离子水清洗表面晾干后,称取 2 g,将经过表面消毒(75% 乙醇浸 1 min, 2% 次氯酸钠溶液中 3 min, 75% 乙醇 30 s, 无菌水漂洗 3 次)^[18-19]的材料剪碎放于无菌研钵中,加 18 ml 无菌水,加石英砂充分研磨,所得到的汁液为母液,梯度稀释到 10^{-5} ,取 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 4 个浓度的菌悬液,以 0.2 ml (200 μ l) 加入 LB 固体分离培养基进行涂布,在恒温 30℃ 条件下培养 3 天。选取合适的浓度(每皿 20~300 个菌落)进行菌落计数。

1.4 16S rDNA 的扩增

采用菌体 PCR 扩增其 16S rDNA,用细菌通用引物分别扩增其 16S rDNA。引物序列为:5' 端引物:5'-CAGGCCTAACACATGCAAGTC-3' (63F), 3' 端引物:5'-GGGCGGWGTGTACAAGGC-3' (1387R)。建立 25 μ l 反应体系的扩增反应体系:dNTP (20 mmol/L) 2.5 μ l, Mg^{2+} (25 mmol/L) 2.5 μ l, 吐温 20 (10%) 2 μ l, 5'端引物 (25 pmol/ μ l) 0.5 μ l, 3' 端引物 (25 pmol/ μ l) 0.5 μ l, Taq DNA 聚合酶 (5 U/ μ l) 0.3 μ l, 补 ddH₂O 至 25 μ l。PCR 扩增反应条件:94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 30 s, 52℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 30 个循环; 72℃ 终末延伸 10 min。PCR 产物经 0.75% 的琼脂糖电泳, EB 染色后用紫外分析仪检测,检查产物有无及扩增特异性情况。每个样品扩增 3 个重复,扩增产物均匀混合以消除单次扩增的偏向性。

1.5 扩增片段的限制性酶切分析

分别用 *Hha* I 和 *Rsa* I 两种四碱基酶对 16S rDNA PCR 扩增产物进行酶切分析。酶切体系为:5 \times 酶切缓冲液 1 μ l, PCR 产物 1 μ l, *Hha* I 酶(或 *Rsa* I 酶) (10 U/ μ l) 0.2 μ l, 补水至 5 μ l。37℃ 水浴 4 h 以上以充分酶切。酶切产物经聚丙烯酰胺凝胶电泳,银染显色后,得到 16S rDNA 指纹图谱。以基因片段多态图谱为基础进行聚类,聚合到一起的具有相同图谱的克隆需要用第二种限制性内切酶进行酶切与电泳分离。当第二

次所得的基因图谱仍然相同时,则认为它们是相同的基因型(OTU)。

1.6 核酸序列注册登录号与系统发育树的构建

选择 12 种 OTUs,由上海英骏生物公司完成测序工作,测出的 16S rDNA 基因序列在 NCBI 网站中比对其同源性并提交 GenBank 数据库,获得登录号(Accession number)为:FJ941080~FJ941091。根据 NCBI 同源性比对的结果,从核酸数据库中下载同源性高的 16S rDNA 序列以及不同分类来源的代表性 16S rDNA 序列,用 BioEdit 将序列转换为 FASTA 格式。以上 FASTA 格式文件用 ClustalX 进行多序列比对后,用 MEGA 进行分析比对,最后通过邻接法(neighbor-joining)生成系统进化树。

2 结果与分析

2.1 棉花茎部内生细菌分离与计数

采集中棉 30 (TC) 和中棉 16 (CC) 的茎部进行适当的表面消毒后计数结果显示,茎部内生细菌相当丰富。中棉 30 (TC) 茎部内生细菌数量每克鲜组织中约有 1.70×10^5 cfu, 而中棉 16 (CC) 每克鲜组织中约 1.17×10^5 cfu, 中棉 30 (TC) 茎部内生细菌数量上略高于中棉 16 (CC)。

2.2 16S rDNA 的扩增及 RFLP 分析结果

以 63F 和 1387R 为引物,特异性地对 100 株内生细菌 16S rDNA 区段进行扩增,扩增片段大小约为 1.5 kb 左右(图 1)。利用限制性内切酶 *Hha* I 和 *Rsa* I 分别酶切,经聚丙烯酰胺凝胶电泳(图 2),统计发现中棉 30 (TC) 酶切后产生 10 种不同的 OTUs,中棉 16 (CC) 经酶切后产生 9 种不同的 OTUs(图 3)。在中棉 30 (TC) 样品酶切的 10 种 OTUs 中,TC-1 和 TC-4 的 OTUs 占据主要优势,约占总文库的 62%。而在中棉 16 (CC) 的酶切的 OTUs 中,占文库绝大部分为 CC-2 和 CC-4 的 OTUs,约占总文库的 82%。

2.3 多样性指数分析

一般从两个方面考虑群落物种的多样性,一方面是环境中物种数量的丰富度(Species richness),另一方面是各物种的相对比例,即均匀度(Species evenness)^[20]。克隆文库的库容体现样品各类微生物的覆盖程度,由表 1 可以看出两种 16S rDNA 克隆文库酶切文库的库容值都达 90% 以上,表明所研究的克隆文库库容较高,可以反映两种棉花茎内生细菌的多样性。对两种棉的茎内细菌的多样性指数分析(表 1)发

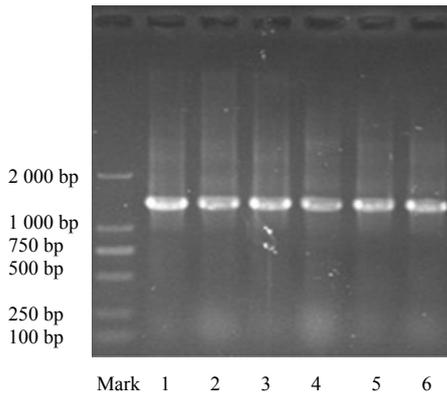


图 1 部分 16S rDNA 扩增结果 (Maker: DL2000)

Fig. 1 16S rDNA PCR amplification

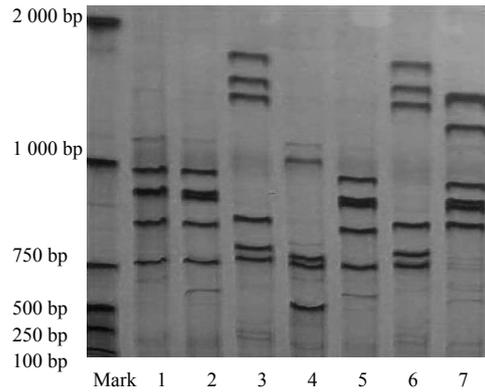


图 2 部分 16S rDNA 酶切 PAGE 电泳图谱

Fig. 2 Restriction patterns of PAGE

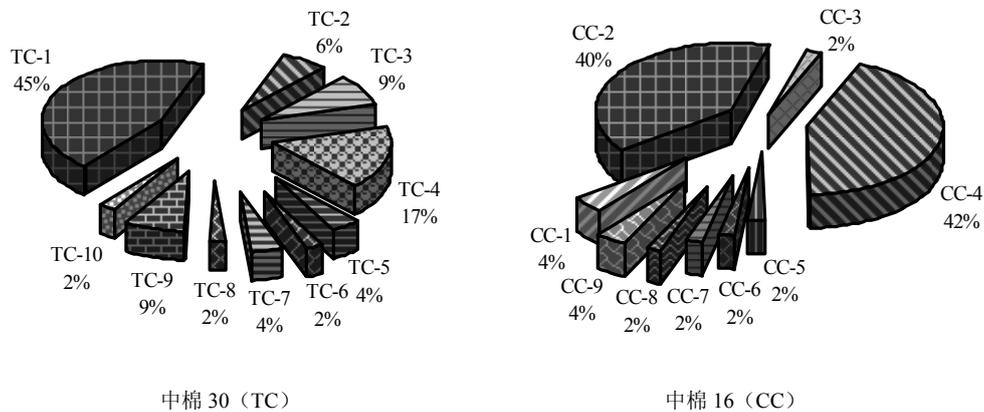


图 3 两种棉花茎内细菌的 RFLP 种类与比例

Fig. 3 Patterns and proportion of 16S rDNA digested by *Hha* I and *Rsa* I

表 1 16S rDNA 克隆文库酶切类型的多样性

Table1 Diversity of restriction endonuclease types in 16S rDNA clone library

棉花品种	库容 (C)	Shannon-wiener 指数 (H')	Simpson 指数 (D)	丰富度 (d _{Ma})	均匀度 (E)
中棉 30 (TC)	93.62%	1.608 1	0.718 8	2.077 9	0.418
中棉 16 (CC)	92.45%	1.314 9	0.648 5	1.763 1	0.331

现, 中棉 30 (TC) 的均匀度高, 表明其内生细菌的数量更多, 这与计数体现的结果是一致的。中棉 30 (TC) 的 Shannon-wiener 指数、Simpson 指数、丰富度、均匀度均高于母本中棉 16 (CC), 表明转 *Bt* 基因棉花中棉 30 (TC) 棉花茎内细菌的多样性高于中棉 16 (CC)。

2.4 序列测定及系统进化树的构建

根据限制性酶切后的片段多态性图谱, 挑选酶切

类型不同菌株的 16S rDNA 进行测序。测序结果根据 BLAST 同源性比对的结果, 构建系统发育树 (图 4)。从图 4 中可以看出, 茎部内生细菌主要有 6 个属, 分别是 *Curtobacterium*、*Microbacterium*、*Enterobacter*、*Bacillus*、*Pseudomonas*、*Sphingobacterium*, 分别属于 *Actinobacteria*、*Firmicutes*、*Bacteroidetes*、*γ-Proteobacteria* 纲。中棉 30 (TC) 茎和中棉 16 (CC) 茎中的内生细菌的优势菌群有所不同, *Microbacterium*

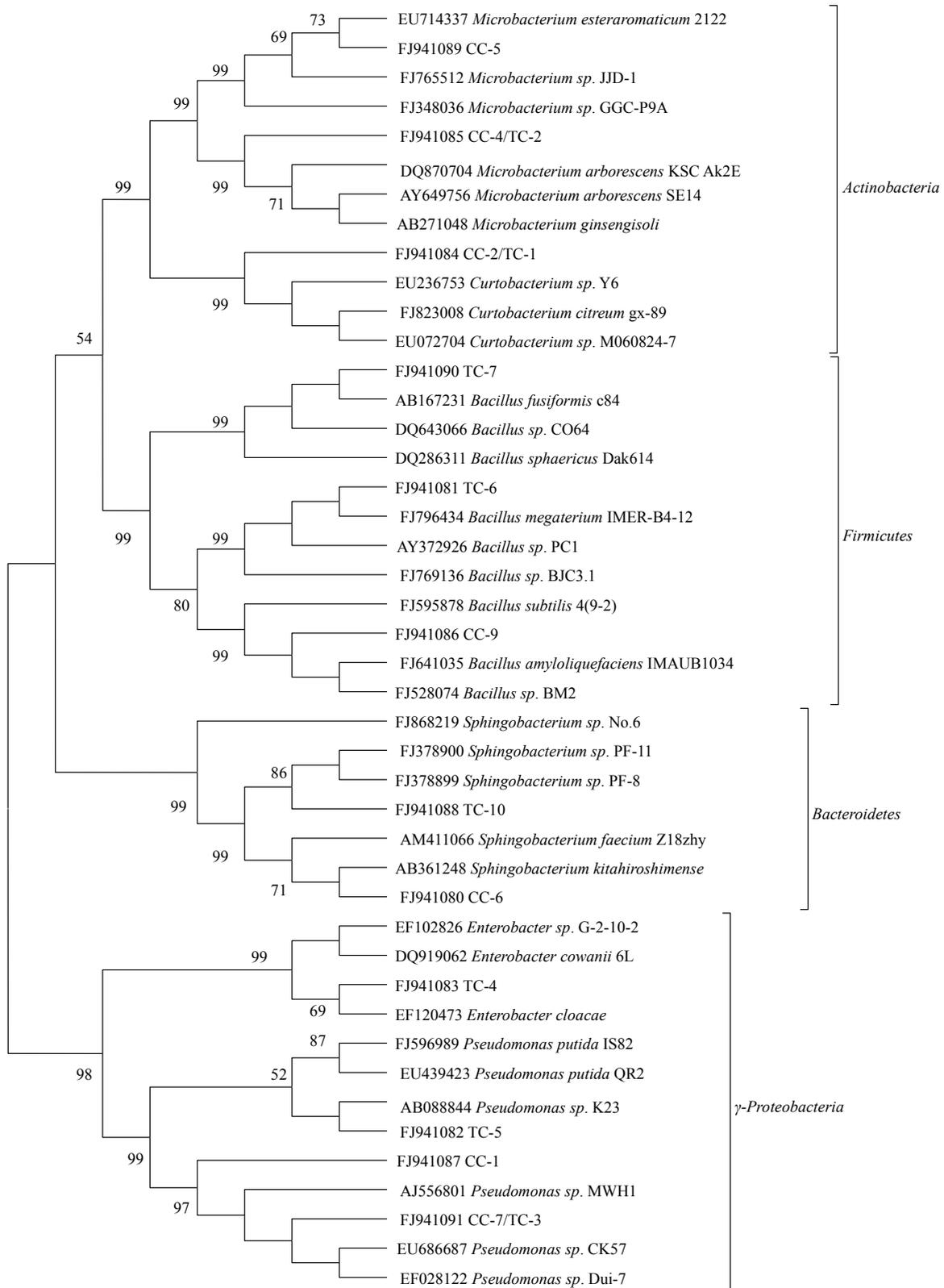


图 4 基于 16S rDNA 序列的系统发育树

Fig.4 Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequencing

和 *Curtobacterium* 为中棉 16 (CC) 茎部内生细菌的优势菌群; 而 *Curtobacterium* 和 *Enterobacter* 为中棉 30 (TC) 茎部内生细菌的优势菌群。*Curtobacterium* 为两种棉茎部内生细菌共同的优势菌群。

3 讨论

棉花茎部内生细菌的数量与棉花品种的基因型, 棉花的栽培条件、栽培措施、自然环境、微生态环境有关^[21]。本研究采用平板培养方法, 分离获得的棉花茎部内生菌的数量为 10^5 cfu/g, 这一分离结果介于李春红等^[22]测定的几种棉花品种中茎部内生细菌的数量 ($10^3 \sim 10^5$ cfu/g)。

对分离的两种棉花茎内细菌 16S rDNA 进行了 PCR-RFLP 分析。从酶切分型结果可以看出, 转 *Bt* 棉花中棉 30 (TC) 与其对照亲本中棉 16 (CC) 内生菌群落组成发生了较大变化。例如 TC-2 和 CC-4 是相同的 OTU, 但它们数量在其文库中所占比例分别为 6% 和 42%; TC-3 和 CC-7 也是相同的 OTU, 比例分别为 9% 和 2%。在转 *Bt* 棉花中棉 30 (TC) 与其对照亲本中棉 16 (CC) 茎内, 均存在不同的 OTUs, 如 TC-4 数量在其文库中所占比例高达 17%, CC-1 和 CC-9 比例均为 4%。

分离得到的茎部内生细菌主要有 6 个属, 其中 *Bacillus*、*Pseudomonas*、*Curtobacterium* 是比较常见的土壤微生物, 同时 *Bacillus* 和 *Pseudomonas* 也是最常见的内生菌。已经证实 *Bacillus* 和 *Pseudomonas* 是分布较广泛、数量较多的内生细菌, 它们通过产生多种的生长调节物质、抗生素来调节植物生长和发育^[23-24]。不同植物、不同基因型和不同的组织中内生细菌的种类不相同。鲁素芸^[25]等从棉花中分离得到的优势菌为 *Bacillus* 属; 邓欣等^[26]分离得到的 6 种棉花叶围细菌主要涉及 9 个细菌属, 占优势的为 *Bacillus* 及 *Pseudomonas*; 植物如甘草分离得到的优势菌为 *Bacillus* 属^[27]。

棉花茎内生细菌比较丰富, 以纯培养技术为基础的分离方法, 会有一部分未培养内生细菌的存在。转基因棉花通过基因工程方法获得, 与自然条件下普通棉花突变与选择不同, 可能直接或间接地对生态系统造成不利影响, 需要一定的时间才会显露出来。转基因抗虫棉潜在的生态风险性是一个重要而且特殊的问题, 因此, 必须对大面积种植的转基因抗虫棉的生物安全性进行长期跟踪监测。目前对转基因抗虫棉评估

方面安全性的研究有限, 对其生物安全性全面、系统的研究有待进一步深入。

我国是个农业大国, 棉花作为主要的经济作物, 在农业生产中具有重要的地位。转基因棉的种植产生了显著的经济和社会效益^[28]。转基因棉花的大规模种植使得农药的使用量大大减少, 因农药过度使用造成的环境污染降低^[29]。采用培养和分子生物学的方法对茎内生细菌进行了研究, 清楚地呈现了中棉 30 (TC) 和中棉 16 (CC) 茎内生细菌的变化, 为转基因抗虫棉的生物安全评价提供理论依据。

4 结论

转基因抗虫棉中棉 30 (TC) 相对于母本中棉 16 (CC) 茎部内生细菌数量增加, 通过多样性指数分析发现转基因抗虫棉中棉 30 (TC) 相对于母本中棉 16 (CC) 茎部内生细菌种类增多, 表明转 *Bt* 基因抗虫棉中棉 30 (TC) 对茎部内生细菌数量和多样性没有造成有害影响。

挑选酶切类型不同的菌株的 16S rDNA 测序结果发现棉花中棉 30 (TC) 与其对照亲本中棉 16 (CC) 内生菌群落优势菌群发生了一定变化, 中棉 30 (TC) 茎部内生细菌的优势菌群为 *Curtobacterium* 和 *Enterobacter*; 中棉 16 (CC) 茎部内生细菌的优势菌群为 *Microbacterium* 和 *Curtobacterium*。

参考文献:

- [1] 谢道昕, 范云六, 倪万潮, 黄骏麒. 苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*) 杀虫晶体蛋白基因导入棉花获得转基因植株. 中国科学 (B 辑), 1991(4): 367-373
- [2] 郭三堆, 崔洪志. 中国转基因抗虫棉研究又取得新进展. 中国农业科学, 1998, 31(6): 1-5
- [3] 环境保护部. 中国转基因生物安全性研究与风险管理. 北京: 中国环境科学出版社, 2008: 208-211
- [4] Kleopfer JW, Schippers B, Bakker PAHM. Proposed elimination of the term *Endorhizosphere*. Phytopathology, 1992, 82: 726-727
- [5] Messeguer J. Gene flow assessment in transgenic plants. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2003, 73: 201-212
- [6] Zhang BH, Pan XP, Guo TL, Wang QL, Andson TA. Measuring gene flow in the cultivation of transgenic cotton. Molecular Biotechnology, 2005, 31: 11-20
- [7] Deynze AEV, Sundstrom FJ, Bradford KJ. Pollen-mediated gene flow in California cotton depends on pollinator activity. Crop Science Society of America, 2005, 45: 1 565-1 570

- [8] Wu KM, Lu YH, Feng HQ, Jiang YY, Zhao JZ. Suppression of cotton bollworm in multiple crops in China in areas with *Bt* toxin-containing cotton. *Science*, 2008, 321: 1 676-1 678
- [9] 何丹君, 沈晋良, 周威君, 高聪芬. 应用单雌系 F2 代法检测棉铃虫对转 *Bt* 基因棉抗性等位基因的频率. *棉花学报*, 2001, 13(2): 105-108
- [10] Xia JY, Cui JJ, Ma LH, Dong SX, Cui XF. The role of transgenic *Bt* cotton in integrated insect pest management. *Acta Gossypii Sinica*, 1999, 11(2): 57-64
- [11] Ganesan S, Keerti SR. Transgenic cotton: Factors influencing *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration. *Molecular Breeding*, 2001, 8: 37-52
- [12] Rui YK, Yi GX, Zhao J, Wang BM, Li ZH, Zhai ZX, He ZP, Li QX. Changes of *Bt* toxin in the rhizosphere of transgenic *Bt* cotton and its influence on soil functional bacteria. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2005, 21: 1 279-1 284
- [13] 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的影响. *农业环境科学学报*, 2008, 27(5): 1 857-1 859
- [14] Liu B, Zeng Q, Yan FM, Xu HG, Xu CG. Effects of transgenic plants on soil microorganisms. *Plant and soil*, 2005, 271: 1-13
- [15] Brunel B, Givaudan A, Lanois A, Akhurst RJ, Boemare N. Fast and accurate identification of *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* species by restriction analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 2: 574-580
- [16] Stubbs SLJ, Brazier JS, Talbot PR, Duerden BI. PCR-restriction fragment length polymorphism analysis for identification of *Bacteroides* spp. and characterization of nitroimidazole resistance genes. *Journal of Clinical Microbiology*, 2000, 9: 3 209-3 213
- [17] Bulgari D, Casati P, Brusetti L, Quaglino F, Brasca M, Daffonchio D, Bianco PA. Endophytic bacterial diversity in grapevine (*Vitis vinifera* L.) leaves described by 16S rRNA gene sequence analysis and length heterogeneity-PCR. *The Journal of Microbiology*, 2009, 47(4): 393-401
- [18] Halmschlager E, Butin H, Donaubaue E. Endophytische pilze in blättern und zweigen von *Quercus petraea*. *European Journal of Forest Pathology*, 1993, 23: 51-63
- [19] 王利娟, 贺新生. 植物内生真菌分离培养的研究方法. *微生物学杂志*, 2006, 26(4): 55-60
- [20] Wintzingerode FV, Göbel UB, Stackebrandt E. Determination of microbial diversity in environmental samples: Pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiology Reviews*, 1997, 21: 213-229
- [21] Adams PD, Kloepper JW. Effect of host genotype on indigenous bacterial endophytes of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Plant and Soil*, 2002, 240: 181-189
- [22] 李春宏, 邓渊钰, 赵明文, 唐灿明, 李顺鹏, 吕海伟. 棉花内生细菌数量动态及其对棉花黄枯萎病菌的拮抗作用. *微生物学报*, 2009, 49(9): 1 196-1 202
- [23] Hardoim PR, Overbeek LSV, Elsas JDV. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends in Microbiology*, 2008, 16(10): 463-471
- [24] Angela S, Birgit R, Gabriele B. Endophytic bacterial communities of field-grown potato plants and their plant-growth-promoting and antagonistic abilities. *Canadian Journal of Microbiology*, 2004, 50(4): 239-249
- [25] 鲁素芸, 陈延熙. 棉花维管束中主要微生物类群初步分析. *北京农业大学学报*, 1989, 15(3): 387-392
- [26] 邓欣, 赵廷昌, 高必达, 王振, 孙福在. 转基因抗虫棉叶围细菌种群动态变化及其分子鉴定. *中国农业科学*, 2008, 41(8): 2 310-2 317
- [27] 张敏, 沈德龙, 饶小莉, 曹凤明, 姜昕, 李俊. 甘草内生细菌多样性研究. *微生物学通报*, 2008, 35(4): 524-528
- [28] Huang JK, Rozelle S, Pray C, Wang QF. Plant biotechnology in China. *Science*, 2002, 295: 674-677
- [29] Elbehri A, Macdonald S. Estimating the impact of transgenic *Bt* cotton on west and central Africa: A general equilibrium approach. *World Development*, 2004, 32(12): 2 049-2 064

Effects of Insect-resistant Transgenic Cotton on Diversity of Endophytic Bacteria in Stems

CHEN Lei¹, WANG Feng¹, ZHANG Xiang-zhi², GAO Guo-qing¹, LIU Biao³, CHEN Liang-yan⁴, CUI Zhong-li¹, CAO Hui¹

(1 Key Laboratory of Microbiological Engineering of Agricultural and Environment, MOA, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China;

2 Jiangsu Provincial Environmental Monitoring Center, Nanjing 210036, China;

3 Nanjing Institute of Environmental Sciences, State Environmental Protection Administration, Nanjing 210042, China;

4 State Key Laboratory of Pollution Control and Resource Reuse, College of Environment, Nanjing University, Nanjing 210093, China)

Abstract: This paper tries to compare the diversities of endophytic bacteria from *Bt* transgenic cotton and its parent cotton, and provides basic data for the biosafety evaluation of *Bt* transgenic cotton. Endophytic bacteria were isolated separately from the stems of two cottons (Zhongmian 30, *Bt* transgenic cotton, TC; Zhongmian 16, contrast non-transgenic parent, CC) by culture-dependent method. 16S rDNAs were amplified with universal primers of bacteria, and PCR products were digested with restriction endoenzyme *Hha* I and *Rsa* I respectively, than analyzed by RFLP analysis. The results showed that endophytic bacteria content was 10^5 cfu/g. There were 10 OTUs (operational taxonomic units) in the stems of *Bt* transgenic cotton and 9 OTUs in contrast parent cotton. The 16S rDNA sequences of 12 respective strains were identified and submitted to GenBank. 16S rDNA sequencing indicated that the dominant genera of *Bt* transgenic cotton are *Microbacterium* and *Curtobacterium*. The predominance families of corresponding receptor cotton are *Curtobacterium* and *Enterobacter*. *Bt* transgenic cotton did not bring harmful effects upon the number and diversity of endophytic bacteria in stems.

Key words: Insect-resistant transgenic cotton, Endophytic bacteria, Biosafety, RFLP analysis, Biodiversity