

# 转 Bt 基因棉花根际细菌与古菌群落结构分析

唐黎<sup>1</sup> 张永军<sup>2</sup> 吴晓磊<sup>1†</sup>

(1 清华大学环境科学与工程系, 环境模拟与污染控制国家重点实验室, 北京 100084)

(2 中国农业科学院植物保护研究所植物病虫害生物学国家重点实验室, 北京 100094)

**摘要** 在一年内棉花的四个生长时期(苗期, 蕾期, 花铃期, 吐絮期)分别采集转 Bt 基因抗虫棉 GK12 和非转基因亲本棉花泗棉 3 号根际土壤, 以及未种植棉花的背景土壤, 利用末端标记限制性片段长度多态性(T-RFLP)分析技术, 分析三种土壤中细菌和古菌的 16S rRNA 基因片段多态性, 结合克隆文库建立和测序, 研究了土壤中细菌和古菌群落结构的变化。结果表明: 在棉花生长的各个时期, 背景土壤中细菌群落结构发生了明显的变化, 生物多样性指数明显降低, 古菌群落结构也有一定的变化, 说明季节性变化对土壤中微生物群落产生了明显的影响。与背景土壤相比, 棉花种植后根际土壤中细菌和古菌群落发生显著的变化。转基因棉花与非转基因棉花相比, 根际土壤细菌和古菌的种类和种群大小的分布也发生了明显的改变。克隆文库和测序结果表明土壤中主体微生物为目前未培养的、功能特性未知的细菌和古菌, 转基因棉花种植对这些细菌和古菌影响的原因、环境危害和生态风险目前尚不清楚。与古菌群落相比, 棉花种植对细菌群落结构的影响较小。

**关键词** 转基因棉花; 微生物群落; 末端标记限制性片段长度多态性(T-RFLP); 生物安全

**中图分类号** X172 **文献标识码** A

自 1986 年第一例转基因植物进行田间试验以来, 转基因植物技术研究发展迅速。转基因植物在给农业生产带来极大效益的同时, 其潜在的生态环境风险以及生物安全也引起了人们的关注。其中与植物联系最密切的非靶标生物——土壤微生物因其结构群落的复杂性, 研究尚不深入, 所获得的数据还不能得出统一结论, 例如有研究表明, 产木质素过氧化酶和淀粉酶的转基因苜蓿根际微生物细菌种类和底物利用都存在差异<sup>[1]</sup>; 转抗除草剂草甘膦基因油菜的种植不会明显影响可培养的根际微生物数量, 但是会影响微生物种类组成<sup>[2]</sup>; 也有研究表明转 Bt 基因玉米对根际可培养细菌没有明显影响<sup>[3]</sup>。

目前我国有 6 种转基因植物经农业部批准进入商品化生产, 包括我国自己培育的耐储存番茄、抗虫棉、转花色的观赏植物矮牵牛、抗病毒甜椒、抗黄瓜花叶病毒的番茄, 以及美国孟三都公司培育的抗虫棉<sup>[4]</sup>。在上述转基因作物中, 转 Bt 杀虫蛋白基因的抗虫棉是国内商业化种植最广的转基因植

物。目前, 对于包括转基因棉花在内的转基因植物生物风险评价一般都集中在地面以上, 而地面以下一般也只研究了针对线虫等真核生物的影响或是采用培养手段研究可培养细菌, 而对于土壤中大量不可培养的微生物主体却少有研究。传统的利用培养方式对微生物进行检测的方法最大的缺陷是无法准确地揭示环境中微生物群落的真实情况。随着分子生物学的发展, 对微生物多样性的研究逐渐深入到 DNA 分子水平, 主要是利用了基于分子杂交和 PCR 技术的方法, 包括 FISH(荧光原位杂交)、DGGE(变性梯度凝胶电泳)、ARDRA(扩增 rDNA 限制性分析)等。

其中 1997 年由 Liu 等<sup>[5]</sup>研究开发的末端标记限制性片段长度多态性(Terminal restriction fragment length polymorphism, T-RFLP)分析技术由 ARDRA 结合荧光标记 PCR 发展起来, 利用一定的标记引物对样品中 DNA 进行特异性扩增, 然后进行限制性内切酶酶切, 用带荧光检测器的测序仪对荧光标记片断进行分离和识别, 并检测末端限制性片段

† 通讯作者: 吴晓磊(1968~), 男, 博士, 教授, 研究方向为分子微生物生态学、土壤微生物学等。Tel: 010-62772137; E-mail: xiaolei\_wu@tsinghua.edu.cn

作者简介: 唐黎(1981~), 女, 硕士研究生, 研究方向为环境土壤微生物学

收稿日期: 2006-05-09; 收到修改稿日期: 2007-04-02

(T-RF)的多样性。根据片段的种类、数量的不同并结合克隆测序等技术,评价微生物的群落结构及多样性。该技术可信度高,重复性强,非常适合进行微生物群落组成和结构、系统发育及多样性研究<sup>[6,7]</sup>。

古菌作为生命的第三种形式,由于最初的研究认为古菌主要生活在极端环境中,如热泉、盐湖等,因此多被归为极端微生物。由于在许多环境都发现了古菌的存在(包括海洋环境、陆地泥土和湖泊沉积物中),其在生态环境中所起的作用也日益受到人们的重视,尤其是产甲烷古菌对于农田甲烷释放机理的研究具有重要意义。但是在转基因植物对环境微生物的影响研究中,对于古菌这一大类的微生物,目前的研究尚少。

本研究在国内率先利用对土壤微生物 16S rRNA 基因的扩增、T-RFLP 分析,以及克隆文库的建立,研究棉花(包括转 *Bt* 基因棉花)根际土壤细菌和古菌群落结构随棉花品种和生长季节的变化。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试棉花品种及种植地土壤环境

转基因棉花:单价抗虫棉 GK12(将 *cryIA* 融合基因导入泗棉 3 号,系统选育而成)。非转基因亲本棉花:泗棉 3 号。种植于中国农业科学院廊坊科研基地,位于河北省廊坊市安次区炊庄,距廊坊市区约 7.5 km。年平均气温 13.1℃,年平均降雨量 490.5 mm,无霜期 183 d。土壤质地为粉砂壤土,含水率在 10%~15%之间(实测),Mg、Fe、F、N、B、Cr、Co、Cu、Pb、Zn、Mo、Cd、As、Hg、Se、Cl、I 等元素含量均衡,耕层速效钾 125.5 mg kg<sup>-1</sup>,速效磷 18.42 mg kg<sup>-1</sup>,全氮 0.274 g kg<sup>-1</sup>,pH 7.2。为咸水区,水化学类型为 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Cl 型,矿化度 0.5~3 g L<sup>-1</sup>。

### 1.2 土壤样品的采集和前处理

分别在棉花生长的五个时期采集土壤样品,即种植前、苗期、蕾期、花铃期和吐絮期。每个棉花品种三点随机选取 3 株取样,采取每个品种棉花地表以下 20 cm 处富含棉花根系的土壤,挖出带有完整根系的土块,分别装入无菌自封袋,带回实验室,轻轻抖动除去松散附在根上的土,剩下的附着于根部表层的 5 mm 以下的土壤即根际土,于 -20℃ 保存直至后续的 DNA 提取和分析。不种植棉花的对照土壤,过 2 mm 筛,去除杂质,部分装入无菌自封袋,存于 -20℃ 直至后续的 DNA 提取和分析,部分烘干用

于土壤水分及其他重要组分测定<sup>[8]</sup>。

### 1.3 土壤微生物总 DNA 的提取和 16S rDNA 的 PCR 扩增

按 Bügmann 等<sup>[9]</sup>的方法提取土壤微生物总 DNA,以 0.8% 琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测提取效果,所得 DNA 条带清晰,A<sub>260 nm</sub>/A<sub>280 nm</sub> 值在 1.6~1.8 之间,表明提取 DNA 质量较好。利用离心柱型 DNA 产物纯化试剂盒对所提取的 DNA 进行纯化,以排除其中可能存在的腐殖酸、蛋白质和多糖等杂质对后续 PCR 反应的抑制。本研究采用细菌引物为 8F:5'-AGAGTTGATCTTGCTCAG-3' 和 1492R:5'-GGT TACCTTGTTACG ACT T-3'<sup>[10]</sup>,并在 8F 的 5' 端标记荧光物质 6-FAM。古菌引物为 109F:5'-ACK-GCTCAGTAACAC GF-3' 和 915R:5'-GTGCTCCCCCGC-CAATTCCT-3',并在 915R 的 5' 端标记荧光物质 6-FAM。用于构建克隆文库的 PCR 则采用不带荧光标记的引物。普通引物由北京华美生物工程公司合成,荧光标记引物由上海基康生物技术有限公司合成。每 50 μl PCR 反应体系加入 10× 扩增缓冲液(10 mmol L<sup>-1</sup> Tris·HCl) 5 μl, MgCl<sub>2</sub> (1.5 mmol L<sup>-1</sup>) 3 μl,等摩尔浓度的 4 种 dNTP 的混合物(dATP、dTTP、dCTP 和 dGTP,各 200 μmol L<sup>-1</sup>) 4 μl,正向和反向引物(10 p mol L<sup>-1</sup>) 各 0.5 μl, Taq 酶 0.5 μl,其余体积由 ddH<sub>2</sub>O 补齐。PCR 反应条件:(1)对于扩增细菌,94℃ 预变性 5 min,每个循环中 94℃ 变性 1 min,48℃ 退火 45 s,72℃ 延伸 2 min,27 个循环,72℃ 加时延伸 5 min。(2)对于扩增古菌 16S rRNA 基因,退火温度改为 52℃,30 个循环。PCR 产物利用离心柱型 DNA 产物纯化试剂盒进行纯化。

### 1.4 T-RFLP 分析

对古菌和细菌 16S rDNA 的 PCR 产物分别用 *Taq*I/65℃ 酶切 3 h 和 *Msp*I/37℃ 酶切 3 h。每 20 μl 酶切体系中,加入 PCR 产物 9 μl,限制性内切酶 1 μl,酶切反应缓冲溶液(Tris·HCl, 100 mmol L<sup>-1</sup>, pH 7.5; MgCl<sub>2</sub>, 100 mmol L<sup>-1</sup>; NaCl, 500 mmol L<sup>-1</sup>; 二硫苏糖醇 Dithiothreitol, 10 mmol L<sup>-1</sup>) 2 μl,牛血清白蛋白 BSA (200 μg ml<sup>-1</sup>) 2 μl,其余体积由 ddH<sub>2</sub>O 补齐。对酶切产物进行脱盐,脱盐步骤为:加入 0.1 体积的 3 mol L<sup>-1</sup> 的 Na<sub>2</sub>AC 和 2 倍体积的冰乙醇(存于 -20℃),涡旋振荡混匀;4℃ 下 16 000 ×g 离心 15 min,弃废液;70% 乙醇 4℃ 下 16 000 ×g 离心 15 min,清洗两次,弃废液;真空干燥 5 min。对脱盐的酶切产物用 14 μl 甲酰胺和 0.3 μl 内标重悬,并加入 0.2 μl Liz500 内标(ABI,美国);将该混合物在

95 变性 5min,然后迅速转移至冰上,取 10 $\mu$ l 至 96 孔板中,在 ABI 遗传分析仪 (3130 Genetic Analyzer, ABI,美国)中进行毛细管电泳;取荧光强度 50 RFU 为基线,用 Genemapper 软件计算大于基线的峰高和出峰处的 T-RF (末端标记限制性片段)长度;将 T-RF 大于 50 bp 的峰面积进行标准化处理<sup>[11]</sup>,计算相对应的丰度。

### 1.5 克隆文库的构建、测序和系统发育分析

利用非荧光标记的引物对种植前背景土和泗棉 3 号苗期土样提取的总 DNA 进行细菌和古菌 16S rDNA 片段的 PCR 扩增,采用 pGEM-T Easy 载体系统 (Promega,美国)和 *E. coli* DH5 菌株建立细菌和古菌的 16S rDNA 文库。利用 PCR-T-RFLP 分析(方法同上)对古菌克隆文库中随机挑选的 220 个阳性克隆和细菌克隆文库中随机挑选的 111 个阳性克隆进行分型筛选,挑选代表克隆进行测序(诺赛基因组研究中心公司,北京),获得细菌和古菌的 16S rDNA 部分序列。对这些序列利用 BLAST 分析与 GenBank<sup>[12]</sup>中核酸数据进行序列比对。

## 2 结果与讨论

### 2.1 棉花种植对土壤古菌群落结构的影响

提取种植 GK12、种植泗棉 3 号和未种植棉花的三种土壤中微生物群落 DNA,扩增古菌的小亚基 (SSU) rRNA 基因 (16S rDNA),并通过 T-RFLP 分析,得到三种土壤不同种植期古菌群落的 T-RFLP 图谱(图 1 示例了泗棉 3 号 T-RFLP 图谱),对各特征末端片段 (T-RF) 所代表峰面积进行计算,分析各特征 T-RF 在整个土壤古菌群落中的相对丰度,以及各种古菌的变化如图 1 和图 2 所示。

从图 1 和图 2 可以看出,经过一个生长季三种土壤古菌群落结构随种植时间的不同存在显著的变化。其中,非转基因棉花泗棉 3 号根系古菌群落中,苗期各种古菌的相对种群大小比较均一:T-RF 为 75、80、91、175、185、190、225、255、282、306 和 329 bp 的各种古菌在整个古菌群落中所占比例为 4%~13%左右;而在蕾期,古菌群落结构发生了变化,其中苗期和蕾期优势菌群的代表 (T-RF 为 75、80、255、282 和 306 bp) 在整个古菌群落中相对比例明显下降,而 T-RF 为 175、190、255 和 329 bp 的各种古菌在整个古菌群落中所占比例上升,T-RF 为 91 bp 和 185 bp 的古菌在整个古菌群落中所占比例没有明显

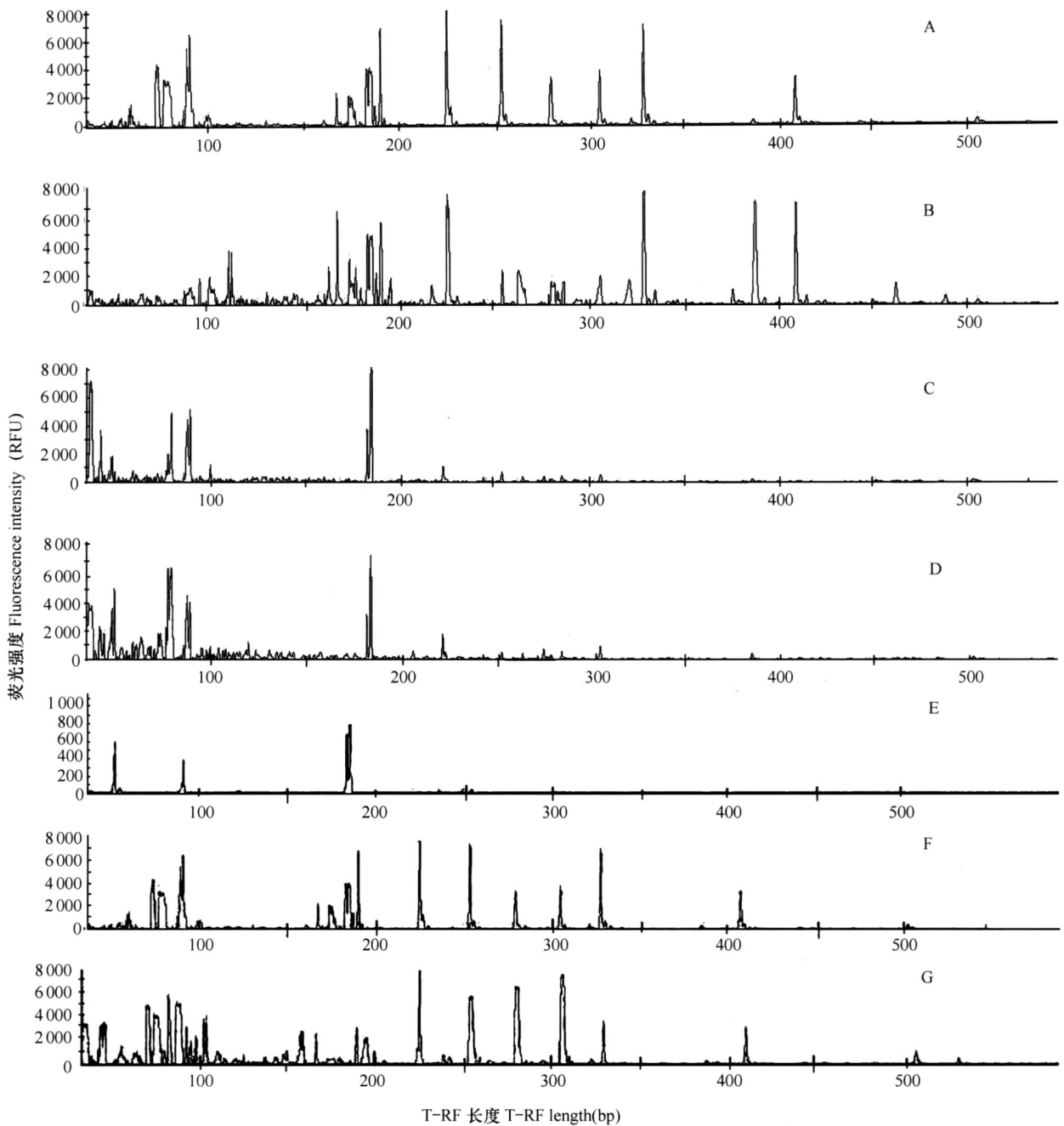
变化;在花铃期,苗期和蕾期的优势菌群持续下降,而 T-RF 为 75、80、81、185 和 282 bp 的古菌相对上升,在吐絮期,T-RF 为 75 bp 和 80 bp 古菌的相对丰度增加,其余古菌的变化较小。

对于转 *Bt* 基因的棉花 GK12,根系古菌群落结构在一个生长季也存在明显的变化,例如在苗期占优势古菌的 T-RF 为 80、91、282 和 306 bp;在蕾期占优势古菌的 T-RF 为 91、175、190、225 和 329 bp;在花铃期占优势古菌的 T-RF 为 80、91 和 185 bp;在吐絮期占优势古菌的 T-RF 为 80、91 和 185 bp。而且 GK12 根系古菌群落中各种古菌的相对大小存在明显的差异,例如,吐絮期 T-RF 为 185 bp 的古菌相对丰度最大,为 22%,而在花铃期和吐絮期,T-RF 为 329 bp 的古菌则在 T-RFLP 图谱中消失,变得不可检测。

在未种植棉花的背景土壤中古菌种类比较单一,主要为 T-RF 为 91 bp 和 185 bp 所代表的微生物,而且 T-RF 为 185 bp 的古菌为主要古菌,占总古菌群落的 60%~70%。随着时间的变化,T-RF 为 91 bp 的古菌逐渐增加,由 9% 增加到 23%,此外,T-RF 为 255、282 和 306 bp 的古菌在不同时期出现,但是在另外的时期不可检测。

另一方面,比较种植 GK12、泗棉 3 号和未种植棉花的背景土壤中古菌群落结构可以发现,三种土壤古菌群落也存在明显的差异。与没有种植棉花的背景土壤相比,非转基因棉花泗棉 3 号和转 *Bt* 基因的棉花 GK12 的种植明显增加了土壤中古菌的种类和各种古菌种群大小的均一性。种植了非转基因棉花泗棉 3 号和转 *Bt* 基因棉花 GK12 的根系土壤中,古菌群落也存在显著的不同。GK12 的种植在苗期显著地刺激了 T-RF 为 282 bp 和 306 bp 古菌,在吐絮期显著地刺激了 T-RF 为 90 bp 古菌的增长;而对大多数其他古菌则影响不大,或者具有一定的抑制作用,使它们的种群变小。这一结果表明,转基因棉花的种植对根系土壤中古菌群落结构产生了明显的影响。

根据 T-RFLP 图谱中 T-RF 的数量和相对丰度计算各土壤古菌群落香依指数 (Shannon-Wiener Index) 如表 1。背景土中古菌多样性指数基本稳定,香依指数在棉花种植的蕾期为 1.2,在其余时期基本在 0.8 左右。棉花的种植提高了土壤中古菌群落生物多样性,香依指数为 1.7~2.5。棉花种植土壤中古菌群落生物多样性随种植时间的推移而呈降低趋



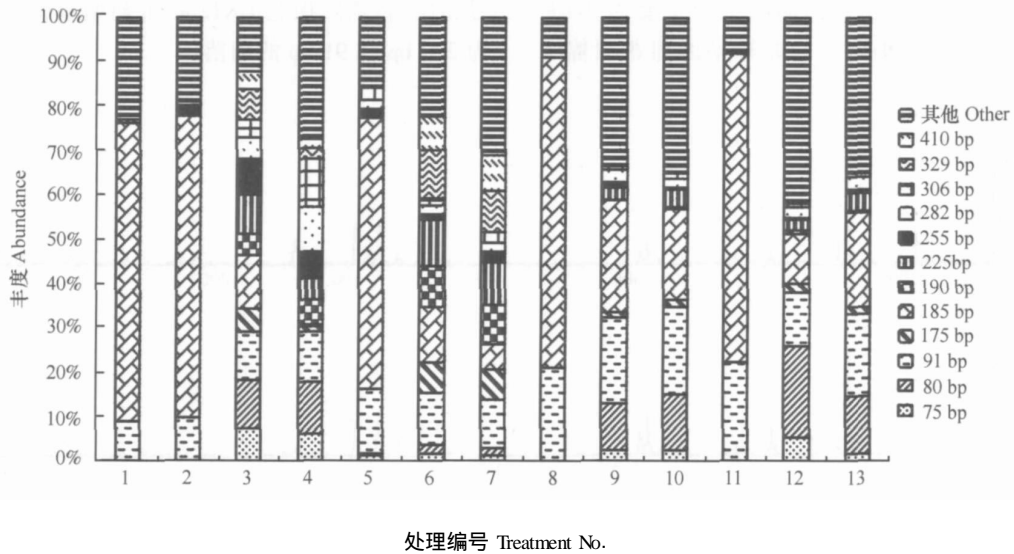
A. 泗棉3号,苗期;B. 泗棉3号,蕾期;C. 泗棉3号,花铃期;D. 泗棉3号,吐絮期;E. 背景土壤,苗期;F. 泗棉3号,苗期;G. GK12,苗期  
 A. Simian No. 3,Seedling ;B. Simian No. 3,Squaring ;C. Simian No. 3,Flowering and boll-forming ;D. Simian No. 3,Boll-opening ;E. Bulk soil,Seedling ;  
 F. Simian No. 3,Seedling ;G. GK12,Seedling

图1 古菌群落 T-RFLP 图谱

Fig. 1 T-RFLP pattern of archaeal community associated with cotton planting

势,其中苗期和蕾期的香依指数(2.19~2.49)明显高于花铃期和吐絮期(1.72~1.76)。在古菌多样性指数较高的苗期和蕾期转基因棉花根际古菌多样性

指数略低于非转基因棉花根际多样性指数,而在古菌多样性指数急剧下降的花铃期和吐絮期转基因棉花根际古菌多样性指数与非转基因棉花非常接近。



处理编号 Treatment No.  
 1. 背景土壤, 种植前; 2. 背景土壤, 苗期; 3. 泗棉 3 号, 苗期; 4. GK12, 苗期; 5. 背景土壤, 蕾期; 6. 泗棉 3 号, 蕾期; 7. GK12, 蕾期;  
 8. 背景土壤, 花铃期; 9. 泗棉 3 号, 花铃期; 10. GK12, 花铃期; 11. 背景土壤, 吐絮期; 12. 泗棉 3 号, 吐絮期; 13. GK12, 吐絮期  
 1. Bulk soil ,Before seedling; 2. Bulk soil ,Seedling; 3. Simian No. 3 ,Seedling; 4. GK12 ,Seedling; 5. Bulk soil ,Squaring; 6. Simian No. 3 ,Squaring; 7. GK12 ,Squaring; 8. Bulk soil ,Flowering and boll-forming; 9. Simian No. 3 ,Flowering and boll-forming; 10. GK12 ,Flowering and boll-forming; 11. Bulk soil ,Boll-opening; 12. Simian No. 3 ,Boll-opening; 13. GK12 ,Boll-opening

图 2 三种土壤中古菌群落典型 T-RF 的相对丰度  
 Fig. 2 Abundance of typical Archaeal T-RF in three soil types

表 1 三种土壤各个时期古菌群落香依指数

Table 1 Shannor-Wiener index of Archaeal community in three soil types throughout growth season

土壤类型 Soil type	种植前 Before seedling	苗期 Seedling	蕾期 Squaring	花铃期 Flowering and boll-forming	吐絮期 Boll-opening
背景土壤 Bulk soil	0.87	0.90	1.21	0.79	0.78
泗棉 3 号 Simian No. 3	N/A	2.49	2.27	1.72	1.74
GK12	N/A	2.22	2.19	1.73	1.76

注: Shannor-Wiener 多样性指数公式:  $H' = - \sum_{i=1}^S p_i \ln p_i$ , 其中  $H'$  为多样性指数,  $p_i$  为第  $i$  个 T-RF 的相对峰面积,  $S$  为该样品所有有效峰数量  
 Note: Shannor-Wiener Diversity index formula:  $H' = - \sum_{i=1}^S p_i \ln p_i$ ,  $H'$  is the diversity index,  $n_i$  is the peak area of T-RF,  $N$  is the total area of all the inviable peaks

### 2.2 棉花种植对土壤细菌群落结构的影响

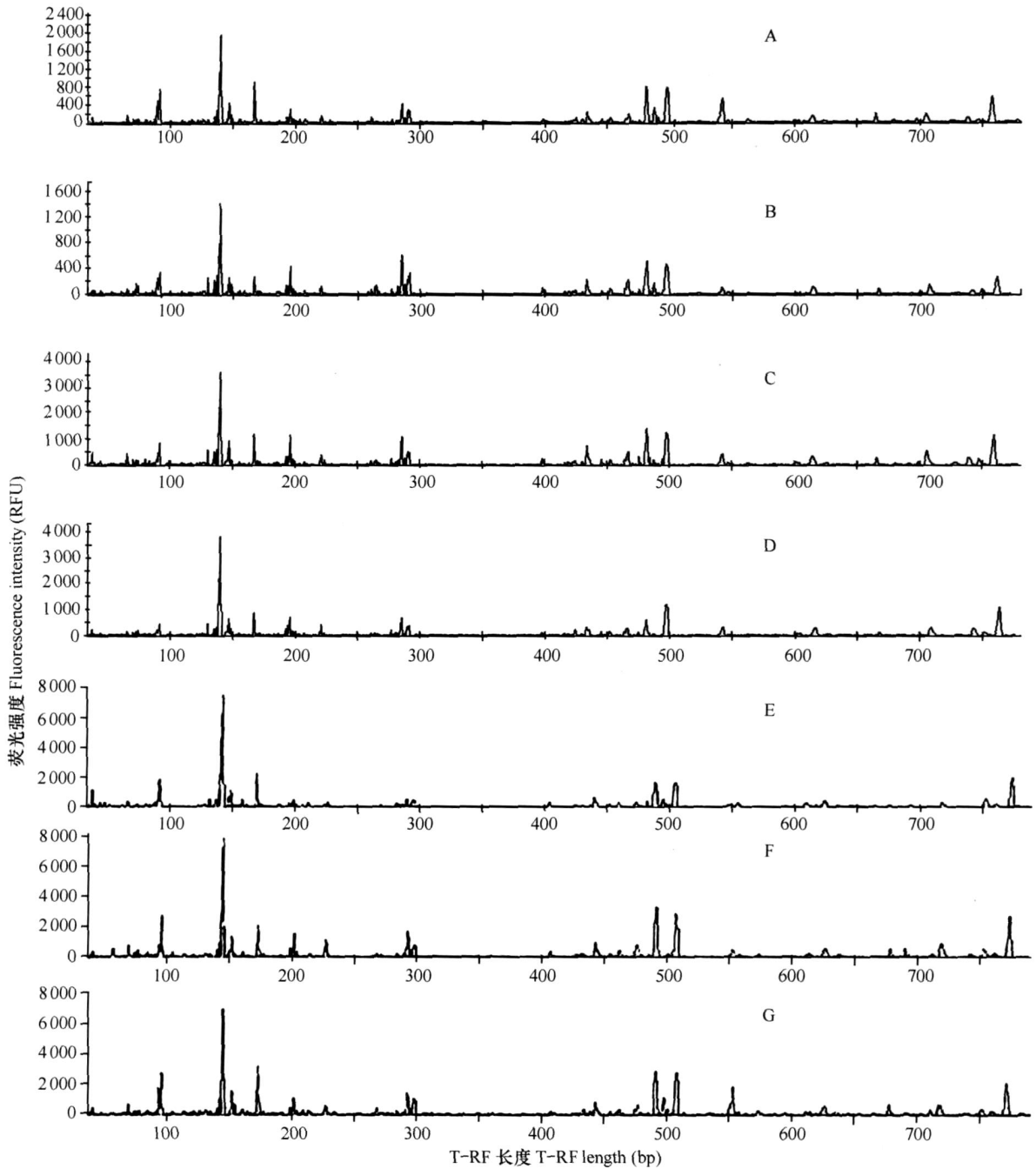
三种土壤细菌群落的 T-RFLP 图谱如图 3 (以 GK12 为例), 不同种植期各特征 T-RF 在整个土壤细菌群落中的相对丰度、以及随时间的变化如图 3 和图 4 所示。

与古菌群落结构变化相类似, 三种土壤中细菌群落结构随时间的变化也存在变化。对未种植棉花的背景土壤, 在种植前、苗期和蕾期, T-RF 为 67、72、

81、91、131、140、150、161、171、195、221、265、290、398、435、446、453 bp 的各种细菌在土壤中基本都存在; 而在花铃期, 被检测到的只有 T-RF 为 140、171、195、265 bp 的细菌; 在吐絮期, 能被检测到的只有 T-RF 为 72、140 和 171 bp 的细菌, T-RF 为 446 bp 的细菌只出现在种植前的土壤中。背景土壤细菌群落的香依指数表明(表 2), 随着时间的推移, 背景土壤细菌群落多样性明显下降, 从种植前的 2.78 下降到花铃期的 1.60 和吐絮期的 1.63。结合古菌群落结构的变化可明显看出, 在一个种植季中, 随着土壤温度、湿度的变化, 背景土壤细菌和古菌群落也相应发生改变。而对非转基因棉花泗棉 3 号和转基因棉花 (GK12), 各种细菌的相对丰度也有一定的变化, 但是这些变化没有这两种土壤古菌群落变化显著, 也较背景土壤细菌群落结构变化小。

同样地, 三种土壤中细菌群落结构也存在明显的差异。总体上, 棉花 (非转基因棉花和转基因棉花) 的种植, 在苗期抑制了 T-RF 为 67、131、171 bp 的细菌 (其相对丰度低于背景土壤中相应细菌的相对丰度), 而激活了其他细菌; 在蕾期, T-RF 为 67、81、131、150、171、195、221、265 bp 的细菌受到了抑制; 在花铃期, 除了 T-RF 为 140、171、265 bp 的细菌受到抑制以外, 其余细菌都得到了明显的激活; 而在吐絮

期,与背景土壤相比,受到抑制的细菌主要为 T-RF 为 72、140、171 bp 的细菌。与非转基因棉花泗棉 3 号相比,转基因棉花 GK12 在蕾期明显富集了 T-RF 为 290 bp 和 91 bp 的细菌。



A. GK12, 苗期; B. GK12, 蕾期; C. GK12, 花铃期; D. GK12, 吐絮期; E. 背景土壤, 苗期; F. 泗棉 3 号, 苗期; G. GK12, 苗期  
A. GK12, Seedling; B. GK12, Squaring; C. GK12, Flowering and boll-forming; D. GK12, Boll-opening; E. Bulk soil, Seedling; F. Simian No. 3, Seedling; G. GK12, Seedling

图 3 土壤细菌群落 T-RFLP 图谱

Fig. 3 T-RFLP pattern of bacterial community associated with cotton planting

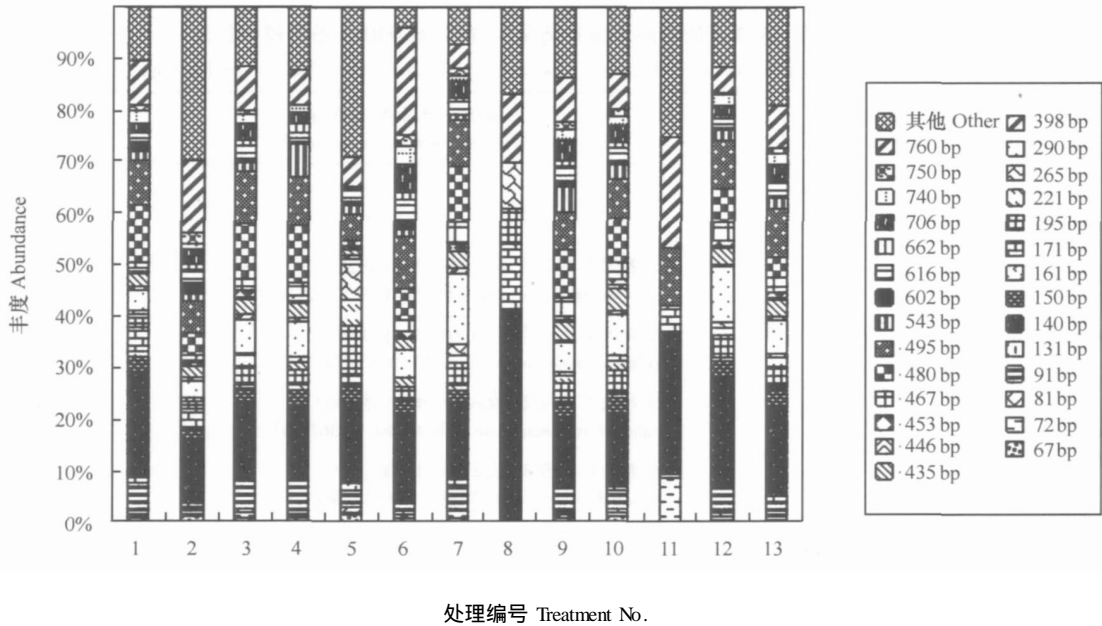


图 4 三种土壤中细菌群落典型 T-RF 的相对丰度  
 1. 背景土壤,种植前;2. 背景土壤,苗期;3. 泗棉 3 号,苗期;4. GK12,苗期;5. 背景土壤,蕾期;6. 泗棉 3 号,蕾期;7. GK12,蕾期;  
 8. 背景土壤,花铃期;9. 泗棉 3 号,花铃期;10. GK12,花铃期;11. 背景土壤,吐絮期;12. 泗棉 3 号,吐絮期;13. GK12,吐絮期  
 1. Bulk soil ,Before seedling;2. Bulk soil ,Seedling;3. Simian No. 3 ,Seedling;4. GK12 ,Seedling;5. Bulk soil ,Squaring;6. Simian No. 3 ,Squaring;  
 7. GK12 ,Squaring;8. Bulk soil ,Flowering and boll-forming;9. Simian No. 3 ,Flowering and boll-forming;10. GK12 ,Flowering and boll-forming;  
 11. Bulk soil ,Boll-opening;12. Simian No. 3 ,Boll-opening;13. GK12 ,Boll-opening

图 4 三种土壤中细菌群落典型 T-RF 的相对丰度

Fig. 4 Abundance of typical Bacterial T-RF in three soil types

表 2 三种土壤各个时期细菌群落香依指数

Table 2 Shannon-Wiener index of bacterial community in three soil types throughout growth season

土壤类型 Soil type	种植前 Before seedling	苗期 Seedling	蕾期 Squaring	花铃期 Flowering and boll-forming	吐絮期 Boll-opening
背景土壤 Bulk soil	2.78	2.53	2.47	1.60	1.68
泗棉 3 号 Simian No. 3	N/A	2.85	2.67	2.84	2.72
GK12	N/A	2.81	2.82	2.93	2.87

2.3 三种土壤中主要微生物种类分析

根据细菌和古菌克隆文库中特征 T-RF 所对应克隆的序列,分析其与 Genbank 中已知微生物 16S rDNA 序列的相似性(表 3)。

从表 3 中可以看出,在三种土壤中古菌主要属于 *crenarchaeote* 中的微生物,而属于 *eurysarchaeote* 的古菌很少,在所有的克隆中没有发现属于产甲烷古菌的克隆。在稻田土壤中 *eurysarchaeote* 中的古菌是主要的微生物<sup>[9]</sup>,其中各种产甲烷微生物占古菌的主要部分。细菌主要属于 *Acidobacteriales*、*Proteobac-*

*teria*、*Methylobacteriaceae*、*Planctomycete*。表 3 中土壤中无论是细菌还是古菌,所得到的克隆都与未培养微生物比较接近,其中 T-RF 为 284 bp 的古菌和 T-RF 为 108、137、149、662 bp 的细菌与已知未培养微生物的相似性仅为 94 % 左右,说明这些微生物都属于新的未培养的物种,属于利用培养方法无法解析和认知的物种。这些结果证明了未培养微生物在环境中占主要部分,也表明了利用 T-RFLP 分析环境微生物群落结构的优势,以及用以分析转基因作物种植对土壤微生物群落结构影响的必要性。

3 讨论

综上所述,棉花种植过程中,气候、土壤温度、湿度等的改变以及棉花生长期根际分泌物的变化显著影响了土壤中细菌和古菌群落结构:对有些微生物物种起到了激活、富集的作用,而抑制了另外的微生物,表现在 T-RFLP 图谱上特征 T-RF 的变化。同时,与背景土壤细菌和古菌群落相比,转基因棉花和非转基因棉花的种植分别对土壤微生物群落结构产生了明显的作用,改变了土壤细菌和古菌的种类和种群大小的分布。

表 3 转基因棉花 GK12 苗期根际土壤中细菌和古菌 16S rRNA 基因相似性分析  
 Table 3 16S rDNA analysis of archaea and bacteria associated with transgenic cotton GK12 in seedling stage

T-RF 长度 Actual T-RF size (bp)	对应克隆 Clone NCBI	上最接近的结果(检索号) Closest NCBI match(accession number)	相似度 Homology (%)
古菌 Archaea			
泉古菌 <i>Crenarchaeote</i>			
92 bp	A11-4	未培养的古菌克隆 DRV-SSA016(A Y923103) Uncultured archaeon clone DRV-SSA016(A Y923103)	99
187 bp, 184 bp	A11-1, A5-1, A5-3, A5-7	未培养的泉古菌克隆 54D9(A Y278106) Uncultured <i>crenarchaeote</i> clone 54D9(A Y278106)	99
187 bp	A11-5	未培养的古菌克隆 660mArC10(A Y367315) Uncultured archaeon clone 660mArC10(A Y367315)	98
187 bp	A11-6	未培养的泉古菌 MRR31(A Y125706) Uncultured <i>crenarchaeote</i> MRR31(A Y125706)	99
284 bp	A11-35	未培养的古菌克隆 MRR31(A Y125706) Uncultured archaeon clone HSWK56(AJ631247)	94
184 bp	A5-2	未培养的古菌克隆 HTA-B6(AF418928) Uncultured archaeon clone HTA-B6(AF418928)	99
广古菌 <i>Euryarchaeote</i>			
184 bp	A5-6	未培养的广古菌(A Y217535) Uncultured <i>euryarchaeote</i> (A Y217535)	95
细菌 Bacteria			
108 bp	B8-49	未培养的浮霉状菌克隆 AKYGI711(A Y921874) Uncultured <i>Planctomycete</i> clone AKYGI711(A Y921874)	92
137 bp	B7-5	未培养的细菌克隆 LR-102(DQ302435) Uncultured bacterium clone LR-102(DQ302435)	93
137 bp	B8-30	未培养的细菌克隆 25BSU19(AJ863223) Uncultured bacterium clone 25BSU19(AJ863223)	96
		未培养的变形菌克隆 EB1080(A Y395399) Uncultured beta <i>Proteobacterium</i> clone EB1080(A Y395399)	93
149 bp	B7-27	未培养的细菌克隆 AKIW1111(DQ129636) Uncultured bacterium clone AKIW1111(DQ129636)	97
	B7-27	未培养的酸杆菌门细菌克隆 AKYG742(A Y922059) Uncultured <i>Acidobacteria</i> bacterium clone AKYG742(A Y922059)	95
149 bp	B8-45	未培养的甲基杆菌科细菌克隆 MI0Ba32(A Y360622) Uncultured <i>Methylobacteriaceae</i> bacterium clone MI0Ba32(A Y360622)	98
195 bp	B8-37	未培养的酸杆菌门细菌克隆 18(A Y942992) Uncultured <i>Acidobacteria</i> bacterium clone 18(A Y942992)	97
		<i>Chelatococcus asaccharovorans</i> 纯培养 CP141b(AJ871433) <i>Chelatococcus asaccharovorans</i> isolate CP141b(AJ871433)	98
197 bp	B7-32	未培养的酸杆菌目细菌克隆 GR20(A Y150900) Uncultured Acidobacteriales bacterium clone GR20(A Y150900)	98
221 bp	B9-15	未培养的 -变形菌纲细菌克隆 AKYH490(A Y921821) Uncultured beta <i>Proteobacterium</i> clone AKYH490(A Y921821)	96
201 bp	B8-33	未培养的细菌 AL T23(A Y703462) Uncultured bacterium isolate AL T23(A Y703462)	97
446 bp	B9-18	未培养的 -变形菌纲细菌克隆 AKYH119(A Y921758) Uncultured alpha <i>Proteobacterium</i> clone AKYH119(A Y921758)	97
662 bp	B7-2	未培养的细菌克隆 E15(AJ966590) Uncultured bacterium clone E15(AJ966590)	94



转基因作物种植对根际微生物群落结构变化可能是因为转基因作物代谢产物渗透到土壤中改变了微生物的生存环境中,也可能是外源基因引入导致的基因流动等造成的。Donegan 等<sup>[13]</sup>利用纯培养、底物利用和基因指纹、以及纯杀虫蛋白和转 *Bt* 基因棉花叶片等,研究了 *Bt* 杀虫蛋白对于根际微生物的短期影响。结果发现在土壤中增加转基因成分后,细菌和真菌数量都有增加,但是作者认为这可能不是由于产生的 *Bt* 杀虫蛋白本身造成的,而是因为基因修饰后引起植物生理生化特性发生改变,从而使之相关联的微生物群落产生变化。张永军等<sup>[14]</sup>采用酶联接免疫吸附剂测定法(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA)和室内初孵棉铃虫生测法对国内已经商业化的几个 *Bt* 棉花品种的研究表明,棉花苗期和蕾期杀虫蛋白表达量较高,花期呈下降趋势,花铃期下降最为明显,到铃期和吐絮期含量略有回升。孙彩霞等<sup>[15]</sup>的研究亦表明,在整个生育期内,*Bt* 棉花根际土壤中杀虫晶体蛋白含量明显高于非 *Bt* 棉而磷酸酶活性则呈现出较非 *Bt* 棉低的趋势,反映了 *Bt* 棉花对根际土壤生物化学过程可能存在一定影响。

本研究克隆文库和测序结果表明,T-RFLP 所检测的微生物主要是目前尚未培养的细菌和古菌,目前无从了解它们的功能,所以无从推测导致这些变化的原因,以及对环境和人类的危害。例如本研究中转基因棉花的种植刺激了 T-RF 为 290 bp 和 91 bp 的细菌、以及 T-RF 为 282 bp 和 506 bp 的古菌的增加,是否是由于 Donegan 等报道的原因;转基因棉花的种植抑制了 T-RF 为 185、190 和 329 bp 的古菌,是否是由于转基因棉花外源 *Bt* 基因时空表达变化所致;目前尚不得而知。因而转基因棉花种植对土壤微生物群落结构的改变存在怎样的生态风险还需要更深入的研究来进行评价和解析。

与古菌群落相比,棉花的种植对细菌群落影响较小,一个很重要的原因可能是土壤中细菌群落比较复杂,种植转基因棉花对土壤细菌的影响作用分散在细菌的多个种群;而古菌群落组成比较单一,外界的影响会集中积累在少数的物种上。

## 4 结 论

本研究利用 T-RFLP 分析技术,通过对转基因棉花(GK12)和非转基因棉花(泗棉 3 号)种植后根际土壤、以及未种植棉花的背景土壤中细菌和古菌的

16S rRNA 基因片段多态性分析,结合克隆文库建立和测序,研究了土壤中细菌和古菌群落结构的变化,结果表明:

1) 在棉花生长的各个时期,背景土壤中细菌群落结构发生了明显的变化,生物多样性指数明显降低,古菌群落结构也有一定的变化,说明棉花生长及季节变化对土壤中微生物群落产生了明显的影响。

2) 与背景土壤相比,棉花种植后根际土壤中细菌和古菌群落发生显著的变化。转基因棉花与非转基因棉花相比,土壤细菌和古菌的种类和种群大小的分布也发生了明显的改变。克隆文库和测序结果表明,土壤中主体微生物为未培养的细菌和古菌,其功能特性目前还不十分清楚。所以需要深入的研究来了解转基因棉花种植对这些细菌和古菌影响的原因、环境危害和生态风险。

## 参 考 文 献

- [ 1 ] Di Giovanni G D, Watrud L S, Seidler R J, *et al.* Comparison of parental and transgenic alfalfa rhizosphere bacterial communities using BIOLOG CN metabolic fingerprinting and enterobacterial repetitive intergenic consensus sequence-PCR (ERIC-PCR). *FEMS Microb. Ecol.*, 1999, 37: 129 ~ 139
- [ 2 ] Dunfield K E, Germida J J. Diversity of bacterial communities in the rhizosphere and root interior of field-grown genetically modified *Brassica napus*. *FEMS Microb. Ecol.*, 2001, 38(1) : 1 ~ 9
- [ 3 ] Saxena D, Stotsky G. *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) toxin released from root exudates and biomass of *Bt* corn has no apparent effect on earthworms, nematodes, protozoa, bacteria, and fungi in soil. *Soil Biol. Biochem.*, 2001, 33: 1 225 ~ 1 230
- [ 4 ] 王琴芳,薛爱红,黄大. 转基因植物产业化现状与发展趋势. *中国农业科技导报*, 2000, 2: 33 ~ 36. Wang Q F, Xue A H, Huang D F. The development and commercialization of transgenic plants (In Chinese). *Review of China Agricultural Science and Technology*, 2000, 2: 33 ~ 36
- [ 5 ] Liu W T, Marsh T L, Cheng H, *et al.* Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Applied Environmental Microbiology*, 1997, 63(11) : 4 516 ~ 4 522
- [ 6 ] Liu B R, Jia G M, Chen J, *et al.* A review of methods for studying microbial diversity in soils. *Pedosphere*, 2006, 16(1) : 18 ~ 24
- [ 7 ] 张瑞福,崔中利,李顺鹏. 土壤微生物群落结构研究方法进展. *土壤*, 2004, 36(5) : 476 ~ 480. Zhang R F, Cui Z L, Li S P. Advance in methods for research on soil microbial community structure (In Chinese). *Soils*, 2004, 36(5) : 476 ~ 480
- [ 8 ] Siciliano S D, Germida J J. Taxonomic diversity of bacteria associated with the roots of field grown transgenic *Brassica napus* cv. Quest, compared to the non-transgenic *B. napus* cv. Excel and *B. rapa* cv. Parkland. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 1999, 29: 263 ~ 272
- [ 9 ] B ü gmann H, Pesaro M, Widmer F, *et al.* A strategy for optimizing

- quality and quantity of DNA extracted from soil. *Journal of Microbiological Methods*, 2001, 45(1): 7 ~ 20
- [10] Weisburg W G, Barns S M, Pelletier D A, *et al.* 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.*, 1991, 43: 1 691 ~ 1 705
- [11] Wu X L, Friedrich M W, Conrad R. Diversity and ubiquity of thermophilic methanogenic archaea in temperate anoxic soils. *Environmental Microbiology*, 2006, 8(3): 394 ~ 404
- [12] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>
- [13] Donegan K K, Palm C J, Fieland V J, *et al.* Changes in levels, species, and DNA fingerprints of soil microorganisms associated with cotton expressing the *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* endotoxin. *Appl. Soil Ecol.*, 1995, 2: 111 ~ 124
- [14] 张永军, 吴孔明, 郭予元. 转 *Bt* 基因棉花杀虫蛋白含量的时空表达及对棉铃虫的毒杀效果. *植物保护学报*, 2001, 28(1): 1 ~ 6. Zhang Y J, Wu K M, Guo Y Y. On the spatio-temporal expression of the contents of *Bt* insecticidal protein and the resistance of *Bt* transgenic cotton to cotton bollworm (In Chinese). *Acta Phytophylacica Sinica*, 2001, 28(1): 1 ~ 6
- [15] 孙彩霞, 陈利军, 武志杰. *Bt* 杀虫晶体蛋白的土壤残留及其对土壤磷酸酶活性的影响. *土壤学报*, 2004, 41(5): 761 ~ 766. Sun C X, Chen L J, Wu Z J. Persistence of *Bt* toxin in soil and its effects on soil phosphatase activity (In Chinese). *Acta Pedologica Sinica*, 2004, 41(5): 761 ~ 766

## BACTERIAL AND ARCHAEOAL COMMUNITY STRUCTURE IN RHIZOSPHERE SOIL PLANTING *Bt* TRANSGENETIC COTTON

Tang Li<sup>1</sup> Zhang Yongjun<sup>2</sup> Wu Xiaolei<sup>1†</sup>

(1 Department of Environmental Science and Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

(2 State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, CAAS, Beijing 100094, China)

**Abstract** Impact of genetically modified or transgenic plants on the eco-environment has aroused great concerns. But little is known of their possible impacts on non-target organisms, such as microbial communities associated with their parent plants in the soil environment because of the complex structure-function relationships of microorganisms. A one-year field study was carried out by analyzing soil samples collected from the cotton field and the rhizospheres of cotton plants of transgenic cotton variety GK12 (expressing *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins) and its non-transgenic parent variety Simian No. 3 at four different growth phrases (seedling, squaring, flowering and boll-forming, and boll-opening). Based on amplification of 16S rDNA retrieved from the soil microbial communities associated with both transgenic and non-transgenic cottons, terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis, clone library construction and sequencing were carried out to see changes in bacterial and archaeal community structures in the soils. Shannon-Wiener index analysis showed that bacterial diversity declined and a certain change occurred in archaeal diversity as well in bulk soil, indicating microbial communities were affected by season succession. According to the clone library and sequencing analysis, the dominant microorganisms in the soil were bacteria and archaea that have never been cultivated or known for their functions in the soil ecosystem. It remains unclear what causes these differences and whether these differences have any ecological threats and bio-risk to the soil ecosystem. Compared to bulk soil samples, the rhizosphere soil samples showed cultivation of cotton varieties remarkably affected bacterial and archaeal communities therein. Variation of bacterial and archaeal communities, especially the archaeal community, was significantly associated with both cotton variety and growth season in T-RFLP analysis. Since archaeal community is less diversified than bacterial community, the study illustrates that the impacts of transgenic cotton on soil microorganisms varied with the microbial background and transgenic cotton affected the less diversified microbial community more.

**Key words** Genetically modified cotton; Microbial community; Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP); Bio-safety