

# 16S rDNA 克隆文库法探索转基因香石竹对土壤 细菌群落的影响

白蓝<sup>1</sup> 赵明文<sup>2</sup> 贾军伟<sup>1</sup> 李鹏<sup>1</sup> 王金斌<sup>1</sup> 潘爱虎<sup>1\*</sup>

(1. 上海市农业科学院生物技术研究所 上海市农业遗传育种重点实验室 农业部转基因植物  
环境安全监督检验检测中心(上海) 上海 201106)

(2. 南京农业大学 生命科学学院 农业部农业环境微生物工程重点开放实验室  
江苏 南京 210095)

**摘要:**【目的】通过研究转基因香石竹对土壤细菌群落的影响,为转基因香石竹的环境安全性评价提供依据。【方法】通过构建 16S rDNA 克隆文库,分析种植转基因和非转基因香石竹的土壤中细菌的群落结构组成。【结果】转基因和非转基因香石竹土壤中,共有的菌群有变形菌门(Proteobacteria)、浮霉菌门(Planctomycetes)、酸杆菌门(Acidobacteria),其中  $\alpha$ -变形菌门、 $\beta$ -变形菌门、浮霉菌门为优势菌群;而在放线菌门(Actinobacteria)、疣微菌门(Verrucomicrobia)及未培养菌(Uncultured bacterium clone)等菌群存在部分差异。【结论】通过 16S rDNA 克隆文库方法揭示了转基因香石竹的土壤中细菌多样性十分丰富,其栽培对土壤细菌群落结构影响有限。

**关键词:** 16S rDNA 克隆文库法, 转基因香石竹, 土壤细菌群落

## Analysis of soil bacterial community composition by 16S rDNA clone library sampling from transgenic carnation

BAI Lan<sup>1</sup> ZHAO Ming-Wen<sup>2</sup> JIA Jun-Wei<sup>1</sup> LI Peng<sup>1</sup>  
WANG Jin-Bin<sup>1</sup> PAN Ai-Hu<sup>1\*</sup>

基金项目: 上海市科技兴农重点攻关项目(No. 沪农科攻字 2008 第 8-9 号); 转基因生物新品种培育重大专项课题  
(No. 2008ZX08012-001)

\*通讯作者: Tel: 86-21-62208750; 邮箱: aihup@yahoo.com.cn

收稿日期: 2011-08-29; 接受日期: 2011-12-22

(1. Biotech Research Institute of Shanghai Academy of Agricultural Sciences,  
Shanghai Key Laboratory of Agricultural Genetics and Breeding, Supervision,  
Inspection and Test Center for Environment Safety of GM Crops of MOA (Shanghai),  
Shanghai 201106, China)

(2. Key Laboratory of Microbiological Engineering of Agricultural Environment, Ministry of  
Agriculture, College of Life Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing  
Jiangsu 210095, China)

**Abstract: [Objective]** We did this research to analyze the impact on the soil bacterial population of the transgenic carnation, which laid the foundation for the safety assessment of GM carnation. **[Methods]** Bacterial 16S rDNA gene clone libraries of GM and non-GM carnations were constructed, and the soil bacterial populations of these carnations were compared. **[Results]** The results showed Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, Planctomycetes and Acidobacteria were shared with GM and non-GM carnation. Some differences were found in Actinobacteria, Verrucomicrobia and uncultured bacterium clone. **[Conclusion]** The results indicated that high bacterial diversity was found in these GM carnation soil bacterial libraries, and the cultivation of genetically modified carnation did not have a significant impact on the soil bacterial community structure.

**Keywords:** 16S rDNA clone library, Transgenic carnation, Soil bacterial community

澳大利亚 Florigene 公司和日本 Suntory 公司通过从杂交矮牵牛中克隆到二氢黄酮醇-4-还原酶(Dihydroflavonol-4-reductase, DFR)基因和类黄酮-3',5'-羟化酶(Flavonoid-3',5'-hydroxylase, F3'5'H)基因, 转化白色的香石竹品种 FE123, 经过筛选获得花色呈蓝紫色的转基因香石竹<sup>[1]</sup>。月之霓裳“Moonshade”和月之伊人“Moonlite”是其中两个品系。

转基因植物的生物安全性一直是具有争议性的话题, 其重要原因是它们在非受控条件下使用, 对环境、生态和人类健康等方面带来的影响是未知的<sup>[2]</sup>。因此, 对转基因植物进行生物安全性评价成为转基因植物释放前必不可少的环节。转基因香石竹是在中国进行环境安全评价中间试验的第一例转基因花卉, 目前国内对转基因香石竹的田间农艺性状<sup>[3]</sup>等已进行了研究, 而转基因香石竹对土壤微生物影响方面的研究还十分有限。

细菌 16S rDNA 是微生物生态学研究中最广泛使用的生物标记(Biomarker), 长度在 1 475–1 544 核苷酸之间, 包括保守区和可变区, 已经成为细菌种属鉴定和分类的标准方法<sup>[4–6]</sup>。目前, 16S rDNA 克隆文库的构建是细菌菌群分析中应用最多的方法, 通过对 16S rDNA 全长序列的扩增和分析, 达到研究和检测样品与环境细菌多样性、种群结构和区系变化的目的<sup>[7–8]</sup>。本文运用 16S rDNA 克隆文库的方法初步探索了转基因香石竹对土壤细菌群落的影响, 为转基因香石竹的环境安全性评价提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 土壤样品:** Moonshade (转基因)、Moonlite (转基因)、受体 FE123 (非转基因)、兰贵人 (Rendiz-Vors) (本地品系, 非转基因)种植于上海市农业科学院白鹤基地(农业部转基因植物环境

安全评价试验基地) 双层塑料大棚内, 栽培土壤为砗磲灰:珍珠岩:复合肥:骨粉:泥炭土=4:4:1:1:4, 土壤经翻耕、甲醛消毒。土壤样品随机取自盛花期香石竹根部 15 cm 深度, 各品系分别取 3 个土壤样本, 装入无菌袋中运回实验室, 在实验室内将土壤过筛去除其中所附带的植物根系组织。

**1.1.2 主要试剂:** PCR 试剂、pMD18-T 购自 Takara; 限制性核酸内切酶购自上海生工生物工程技术服务有限公司; DH5 $\alpha$  感受态细胞购自天根生化科技(北京)有限公司; AxyPrep DNA 凝胶回收试剂盒购自爱思进生物技术(杭州)有限公司。

## 1.2 方法

**1.2.1 土壤微生物总 DNA 的提取与纯化:** 使用上海申能博彩 3S DNA Isolation Kit V2.2 for Environmental Samples 试剂盒提取及纯化土壤样品总 DNA。

**1.2.2 PCR 扩增细菌 16S rDNA 的反应条件:** PCR 扩增所用引物: 27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', 1492R: 5'-TACGGCTACCTTGTACGACTT-3'。PCR 扩增总体积为 25  $\mu$ L: 10 $\times$ buffer 2.5  $\mu$ L, dNTPs (2.5 mmol/L) 2  $\mu$ L, 引物 P0、P6 (浓度为 10 mmol/L) 各 0.5  $\mu$ L, Mg<sup>2+</sup> (2.5 mmol/L) 1.5  $\mu$ L, Taq 酶 (2.5 U/ $\mu$ L) 0.2  $\mu$ L, 稀释 DNA 模板 1  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 补足至 25  $\mu$ L。采用 Reconditioning PCR 的方法, 其扩增反应参数见文献[9]。

**1.2.3 土壤细菌 16S rDNA 克隆文库的构建及阳性克隆的筛选:** PCR 产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 大小约 1 500 bp 的 DNA 条带经试剂盒切胶回收纯化后, 连接至 pMD18-T 载体上, 转化进入 DH5 $\alpha$  大肠杆菌感受态细胞, 涂布于含有 IPTG 和 X-Gal 氨苄青霉素的平板上, 37  $^{\circ}$ C 培养过夜。根据 pMD18-T 载体 BcaBEST 测序引物 M13-47 和 RV-M 进行阳性克隆的筛选, 选取片段 1 700 bp

左右(扩增片段包括 1 500 bp 左右的 16S rDNA 序列和 156 bp 载体上的序列)的克隆构建 16S rDNA 克隆文库。

**1.2.4 ARDRA 分型和测序:** 将鉴定为阳性的 PCR 产物进行扩增性 rDNA 限制性酶切片分析 (Amplified ribosomal DNA restriction analysis, ARDRA), 用 *Hinf* I 和 *Csp6* I 限制性内切酶消化 (37  $^{\circ}$ C)。2% 琼脂糖凝胶成像鉴别各阳性克隆的酶切图谱类型, 综合各个阳性克隆双酶切图谱类型, 将所有阳性克隆分成若干个操作分类单位 (Operational taxonomic unit, OTU), 统计操作分类单位的种类和各操作分类单位所含阳性克隆的数量<sup>[10]</sup>, 将每一个 OTU 类型送 1 个 PCR 产物进行测序(测序由英潍捷基 Invitrogen 上海贸易有限公司完成)。

**1.2.5 克隆文库分析:** 所构建文库的细菌多样性的体现程度以覆盖率  $C$  来评估, 计算公式为:  $C = (1 - n_1/N) \times 100\%$  其中,  $N$  代表 16S rDNA 克隆文库的库容,  $n_1$  代表在 16S rDNA 克隆文库中仅出现一次的 OTU 的数量<sup>[11]</sup>。所构建文库的细菌多样性以 Shannon-Wiener 指数来评估, 计算公式为:  $H' = -\sum_{i=1}^S P_i \ln P_i$ 。其中,  $P_i$  表示第  $i$  个 OTU 在克隆文库中所占的比例,  $S$  表示克隆文库中 OTU 的数目<sup>[12]</sup>。

用 DNAMAN 等软件对测序结果进行编辑、分析, 并把编辑好的序列在 GenBank 数据库中进行 BLAST 同源性检索后下载同源性序列。系统发育树的绘制使用 MEGA 4 软件完成, 算法为邻位相连法 (Neighbor-Joining analysis)。

## 2 结果与分析

**2.1 土壤微生物总 DNA 提取和 PCR 扩增结果**  
以 4 种香石竹的土壤样品总 DNA 作为模板, 采用 Reconditioning PCR 的方法扩增 16S rDNA

区,结果如图 1 所示。经 Reconditioning PCR 扩增获得了大小约 1 500 bp 的片段,条带专一,符合后续实验要求。Reconditioning PCR 是由 Thompson<sup>[9]</sup>提出的方法,由于所用模板是许多序列相近的 DNA 的混合物,所以在进行 PCR 扩增时容易出现错误,其中异源双链和嵌合体对克隆文库的构建影响较大,该方法可有效消除异源双链的产生。另外,减少 PCR 循环数和模板浓度,延长延伸时间以及选择适当的 DNA 聚合酶也有利于减少异源双链的产生<sup>[13]</sup>。

## 2.2 细菌 16S rDNA 的克隆文库分析

**2.2.1 16S rDNA 的克隆文库的建立:**将 12 份香石竹土壤的 16S rDNA PCR 扩增产物分别回收纯化,连接在 pMD18-T 载体上转化大肠杆菌,PCR 鉴定后经统计, Moonshade、Moonlite、受体 FE123、Rendiz-Vors 土壤中分别获得 43、44、41、31 个阳性克隆。

**2.2.2 土壤细菌 16S rDNA 的酶切分型分析:**以 159 个阳性克隆质粒为模板扩增 16S rDNA,应用限制性内切酶 *Hinf* I 和 *Csp6* I 进行酶切分型,每个 ARDRA 分型的结果作为一个 OTU,最后共获

得 42 个 OTU,编号为 OTU1 到 OTU42,如图 2 所示。42 个 OTU 在四种香石竹土壤中所含克隆数及在各克隆文库中所占百分比见表 1。经统计比较,从 Moonshade、Moonlite、受体 FE123、Rendiz-Vors 中得到的克隆,分别分为 21、24、19、15 种 OTU。42 个 OTU 的分布见表 1。

**2.2.3 土壤细菌 16S rDNA 的多样性分析:**只有当文库的库容大到足以检出群落中主要成员且多样性十分丰富时,文库之间进行比较才有意义。本文以覆盖率 *C* 值来评估所构建文库对细菌多样性的体现程度,计算结果如表 2。从各香石竹土壤细菌文库的覆盖率 *C* 值可以看出,虽然 Moonlite 的覆盖率要明显低于其它 3 种香石竹,但是克隆文库中所包含的细菌的种类占样品中全部细菌的种类比例较高,能够较全面地反映细菌群落多样性,因此其库容已足够。通过计算反映微生物多样性的 Shannon-Weiner 指数(见表 2),可见本试验中各香石竹的土壤细菌群落均具有丰富的多样性,但 Rendiz-Vors 的多样性要低于转基因品系以及受体,可能与从土壤中所获得的 OTU 偏少有关。

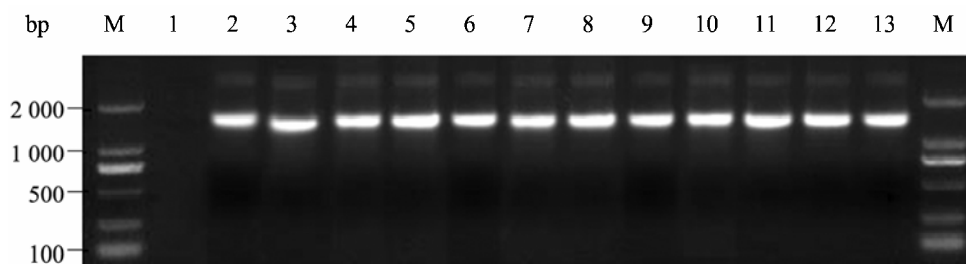


图 1 16S rDNA PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳图谱

Fig. 1 The agarose electrophoresis of 16S rDNA PCR products

注: M: DL2000 Marker; 1: 空白对照; 2-4: Moonshade 土壤微生物; 5-7: Moonlite 土壤微生物; 8-10: 受体 FE123 土壤微生物; 11-13: 兰贵人土壤微生物。

Note: M: DL2000 Marker; 1: No-DNA template control; 2-4: Moonshade soil microorganisms; 5-7: Moonlite soil microorganisms; 8-10: FE123 soil microorganisms; 11-13: Rendiz-Vors soil microorganisms.

表 1 不同香石竹土壤细菌 16S rDNA 克隆文库分析结果  
Table 1 Data of bacterial 16S rDNA clone library constructed with different carnation lines

OTU 编号 OTU No.	GenBank 中最大相似度细菌 (NCBI 登录号、相似度) Closest relative in GenBank (Accession number, similarity)	所属细菌类群 Phylogenetic group	Moonshade OTU 克隆数 (百分比) Number of OTU clone (Percentage)	Moonlite OTU 克隆数 (百分比) Number of OTU clone (Percentage)	FE123 OTU 克隆数 (百分比) Number of OTU clone (Percentage)	Rendiz-Vors OTU 克隆数 (百分比) Number of OTU clone (Percentage)
OTU2	<i>Ochrobactrum anthropi</i> (AB490238, 99%)	$\alpha$ -Proteobacteria	3(7.0%)	0	3(7.3%)	1(3.2%)
OTU10	Uncultured <i>Sphingomonas</i> sp. (EU794112, 97%)	$\alpha$ -Proteobacteria	1(2.3%)	0	0	0
OTU16	Uncultured alphaproteobacterium sp. (AM420114, 99%)	$\alpha$ -Proteobacteria	1(2.3%)	0	3(7.3%)	1(3.2%)
OTU17	Uncultured alphaproteobacterium sp. (FN298006, 95%)	$\alpha$ -Proteobacteria	2(4.7%)	1(2.3%)	2(4.9%)	2(6.5%)
OTU18	<i>Mesorhizobium</i> sp. MAP-14 (FJ560481, 98%)	$\alpha$ -Proteobacteria	1(2.3%)	0	1(2.4%)	0
OTU19	<i>Sphingomonas</i> sp. (AF385529, 99%)	$\alpha$ -Proteobacteria	4(9.3%)	2(4.6%)	0	0
OTU20	<i>Sphingomonas</i> sp. (AF385529, 96%)	$\alpha$ -Proteobacteria	0	1(2.3%)	2(4.9%)	2(6.5%)
OTU26	<i>Caulobacter</i> sp. (DQ337547, 95%)	$\alpha$ -Proteobacteria	0	0	0	3(9.7%)
OTU38	<i>Caulobacter</i> sp. BBCT11 (DQ337547, 98%)	$\alpha$ -Proteobacteria	0	0	2(4.9%)	0
OTU39	<i>Ochrobactrum anthropi</i> (AB490238, 99%)	$\alpha$ -Proteobacteria	0	0	3(7.3%)	0
OTU4	<i>Burkholderia cepacia</i> (GQ359110, 99%)	$\beta$ -Proteobacteria	0	0	3(7.3%)	2(6.5%)
OTU6	<i>Burkholderia cepacia</i> (GQ359110, 99%)	$\beta$ -Proteobacteria	0	0	0	2(6.5%)
OTU9	<i>Burkholderia</i> sp. (AB366329, 97%)	$\beta$ -Proteobacteria	3(7.0%)	0	3(7.3%)	2(6.5%)
OTU21	<i>Azoarcus anaerobius</i> (NR_026438, 98%)	$\beta$ -Proteobacteria	2(4.7%)	5(11.4%)	2(4.9%)	1(3.2%)
OTU27	<i>Azoarcus</i> sp. (AB241406, 91%)	$\beta$ -Proteobacteria	0	1(2.3%)	0	0
OTU28	<i>Ralstonia</i> sp. (AB503703, 95%)	$\beta$ -Proteobacteria	0	1(2.3%)	0	0
OTU30	<i>Burkholderiaceae</i> bacterium (DQ490294, 97%)	$\beta$ -Proteobacteria	0	1(2.3%)	0	0
OTU33	<i>Burkholderia xenovorans</i> (EF467847, 95%)	$\beta$ -Proteobacteria	0	1(2.3%)	1(2.4%)	0
OTU35	<i>Acidovorax</i> sp. (AM084035, 99%)	$\beta$ -Proteobacteria	0	1(2.3%)	0	0
OTU41	<i>Herbaspirillum frisingense</i> (AJ238359, 98%)	$\beta$ -Proteobacteria	3(7.0%)	2(4.6%)	0	0

(待续)

		(续表 1)				
OTU8	<i>Aquicella siphonis</i> (NR_025764, 94%)	$\gamma$ -Proteobacteria	1(2.3%)	0	0	0
OTU40	<i>Pseudomonas</i> sp. (GQ241352, 98%)	$\gamma$ -Proteobacteria	2(4.7%)	0	1(2.4%)	0
OTU23	Uncultured <i>Polyangiaceae</i> sp. (EU665110, 96%)	$\delta$ -Proteobacteria	0	1(2.3%)	0	1(3.2%)
OTU1	Uncultured <i>Planctomycetales</i> sp. (AM935325, 100%)	Planctomycetes	0	0	1(2.4%)	1(3.2%)
OTU5	Uncultured <i>Planctomyces</i> sp. (FJ543006, 97%)	Planctomycetes	3(7.0%)	4(9.1%)	5(12.2%)	3(9.7%)
OTU14	Uncultured <i>Planctomyces</i> sp. (FJ543082, 98%)	Planctomycetes	1(2.3%)	0	0	0
OTU29	Uncultured sludge bacterium (AF234736, 95%)	Planctomycetes	0	2(4.6%)	1(2.4%)	0
OTU31	Uncultured <i>Planctomycetaceae</i> sp. (FJ543038, 97%)	Planctomycetes	0	2(4.6%)	0	0
OTU36	Planctomycetes GMD21C08 (AY162119, 89%)	Planctomycetes	0	1(2.3%)	0	0
OTU42	Planctomycetales bacterium (AY673410, 94%)	Planctomycetes	2(4.7%)	0	2(4.9%)	0
OTU12	Uncultured <i>Actinobacteria</i> sp. (CU918748, 95%)	Actinobacteria	1(2.3%)	0	2(4.9%)	0
OTU15	<i>Arthrobacter monumeti</i> (AJ315070, 96%)	Actinobacteria	2(4.7%)	1(2.3%)	2(4.9%)	0
OTU24	Uncultured <i>Acidobacteria</i> sp. (EF663281, 95%)	Acidobacteria	0	2(4.6%)	0	2(6.5%)
OTU32	Uncultured <i>Acidobacteria</i> sp. (AM934963, 95%)	Acidobacteria	3(7.0%)	2(4.6%)	0	0
OTU37	Uncultured <i>Acidobacteria</i> bacterium (EU449684, 96%)	Acidobacteria	0	1(2.3%)	2(4.9%)	0
OTU7	Uncultured <i>Verrucomicrobiales</i> sp. (FJ516822, 89%)	Verrucomicrobia	2(4.7%)	1(2.3%)	0	0
OTU22	<i>Alterococcus agarolyticus</i> (AF075271, 96%)	Verrucomicrobia	0	1(2.3%)	0	0
OTU34	Uncultured <i>Verrucomicrobia</i> sp. (EF018226, 94%)	Verrucomicrobia	0	2(4.6%)	0	0
OTU3	Uncultured bacterium clone (DQ532258, 95%)	Uncultured bacterium	3(7.0%)	5(11.4%)	0	6(19.4%)
OTU11	Uncultured bacterium clone (EU881147, 95%)	Uncultured bacterium	1(2.3%)	0	0	0
OTU13	Uncultured bacterium clone (EF157249, 93%)	Uncultured bacterium	2(4.7%)	3(6.8%)	0	0
OTU25	Uncultured bacterium clone (EU134679, 93%)	Uncultured bacterium	0	0	0	2(6.5%)

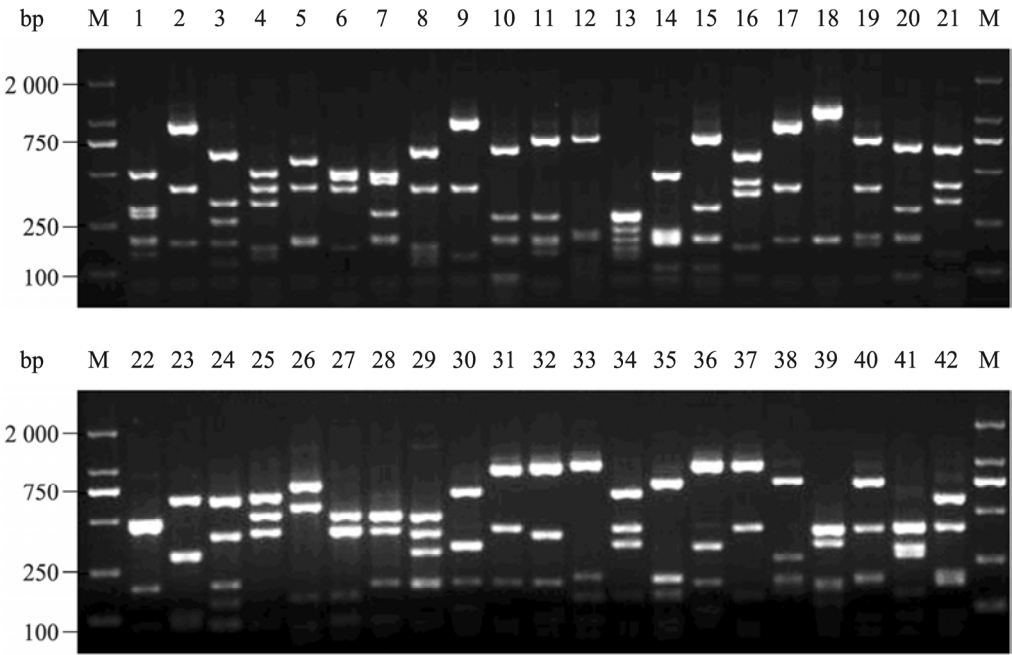


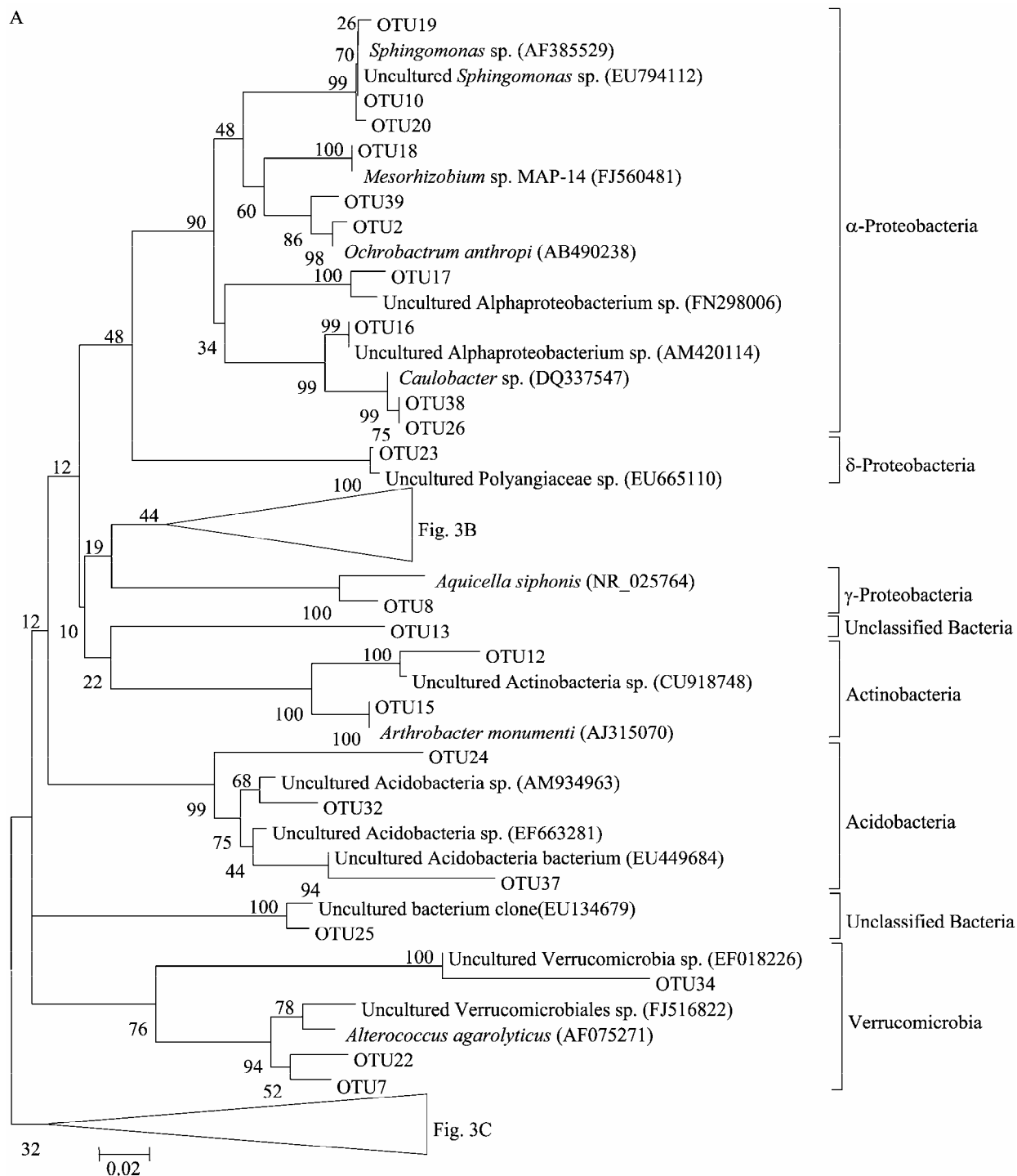
图 2 42 种 ARDRA 类型图谱  
Fig. 2 Forty-two patterns of ARDRA

表 2 不同香石竹土壤细菌的覆盖率 C 值和香农-维纳指数		
Table 2 Coverage C and Shannon-Wiener index of soil bacteria in different carnation lines		
品系 Line	覆盖率 C 值 Coverage C (%)	香农-维纳指数 Shannon-Wiener index
Moonshade	82.9	4.257
Moonlite	70.5	4.329
FE123	87.8	4.100
Rendiz-Vors	83.9	3.701

**2.2.4 系统发育分析:** 每个 OTU 挑取 1 个克隆子进行测序, 测序结果在 GenBank 数据库中进行 BLAST 比对, 查找其相似性菌株, 结果见表 1。对获得的序列构建系统发育树如图 3 所示。

42 个 OTU 分别属于细菌域的 9 个主要类群, 并且所得序列与数据库中的序列具有极高的相似性, 均在 89%–100% 之间, 其中绝大部分相似性达到 95% 以上。其中, 与香石竹土壤中细菌相似性较高的  $\alpha$ -变形菌门菌属主要是苍白杆菌属 (*Ochrobactrum*)、鞘脂单胞菌属 (*Sphingomonas*)、根瘤菌属 (*Mesorhizobium*)、

柄杆菌属 (*Caulobacter*); 与香石竹土壤中细菌相似性较高的  $\beta$ -变形菌门菌属主要是伯克氏菌属 (*Burkholderia*)、固氮弧菌属 (*Azoarcus*)、草螺菌属 (*Herbaspirillum*)、青枯菌属 (*Ralstonia*)、食酸菌属 (*Acidovorax*); 与香石竹土壤中细菌相似性较高的  $\gamma$ -变形菌门菌属主要是假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、*Aquicella*。样品中属于浮霉菌门 (Planctomycetes)、酸杆菌门 (Acidobacteria)、放线菌门 (Actinobacteria)、疣微菌门 (Verrucomicrobia)、 $\delta$ -变形菌门 ( $\delta$ -Proteobacteria) 的大多是未培养菌。





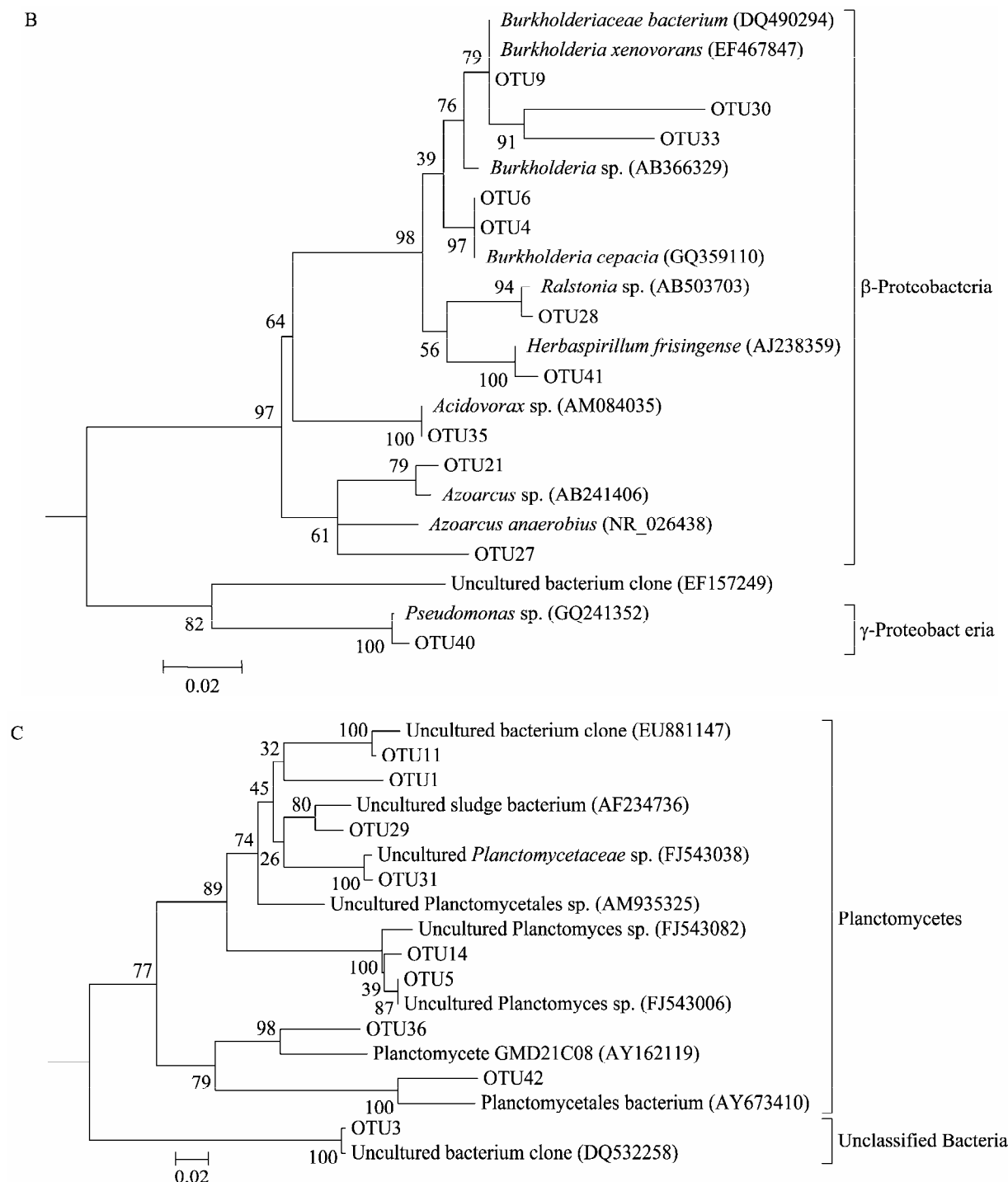


图 3 16S rDNA 基因克隆文库的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree of 16S rDNA gene sequences of the obtained clones

注: A:  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$ -变形菌门, 放线菌门, 酸杆菌门, 未确定的细菌, 疣微菌门; B:  $\beta$ ,  $\gamma$ -变形菌门; C: 浮霉菌门, 未确定的细菌; 括号内为序列登录号; 标尺代表 0.02 进化距离单位; Bootstrap 值(百分值)标注在分支处。

Note: A:  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$ -Proteobacteria, Actinobacteria, Acidobacteria, Unclassified bacteria, Verrucomicrobia; B:  $\beta$ ,  $\gamma$ -Proteobacteria; C: Planctomycetes, Unclassified bacteria. GenBank accession numbers are given in parentheses. The scale bar indicates the 0.02 evolutionary distance unit. Bootstrap values (percent) are shown at branch nodes.

**2.2.5 不同香石竹土壤细菌 16S rDNA 克隆文库的比较:** 比较不同香石竹土壤细菌 16S rDNA 克隆文库的结果见图 4, 转基因和非转基因香石竹土壤细菌群落组成大致相同, 转基因香石竹具有更为丰富的多样性。

4 种香石竹土壤 16S rDNA 克隆文库均得到大量来源于变形菌门(Proteobacteria)的克隆, 包括  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ -变形菌门。变形菌门的克隆在 4 种克隆文库中所占比例分别为: Moonshade 53.5%, Moonlite 38.6%, FE123 63.4%, Rendiz-Vors 54.8%。其中  $\alpha$ ,  $\beta$ -变形菌门在 4 种土壤文库中所占比例较大, 而  $\gamma$ ,  $\delta$ -变形菌门所占比例相对较小。另外, 浮霉菌门(Planctomycetes)、酸杆菌门(Acidobacteria)也是转基因和非转基因香石竹土壤克隆文库中所共有的菌群。

4 种香石竹的土壤细菌克隆文库之间也存在部分差异。Moonlite 中  $\alpha$ -变形菌门比例较小,  $\beta$ -变形菌门比例较大, 这与其他 3 种香石竹呈现相反的趋势。部分 OTU 在文库之间呈现不均衡分布, 如  $\alpha$ -变形菌门中的柄杆菌属(OTU26、

OTU38)、苍白杆菌(OTU39)和  $\beta$ -变形菌门中的洋葱伯克氏菌(OTU4、OTU6)仅存在于非转基因香石竹土壤克隆文库中, 而在转基因香石竹土壤克隆文库中未被发现。此外, 放线菌门(Actinobacteria)存在于 Moonshade、Moonlite、FE123 土壤克隆文库中, 在 Rendiz-Vors 中则未发现; 一些未培养菌(Uncultured bacterium clone)在转基因香石竹和 Rendiz-Vors 土壤克隆文库中有少量分布, 而 FE123 土壤克隆文库中未发现; 疣微菌门(Verrucomicrobia)仅存在于转基因香石竹土壤克隆文库中, 而在非转基因香石竹土壤克隆文库中未发现。

### 3 讨论

转基因香石竹的种植对土壤微生物群落的影响是评价其环境安全性的重要指标之一。本文采用构建 16S rDNA 克隆文库的方法, 分析了转基因和非转基因香石竹土壤细菌群落结构组成, 结果表明种植转基因香石竹的土壤中细菌多样性十分丰富。

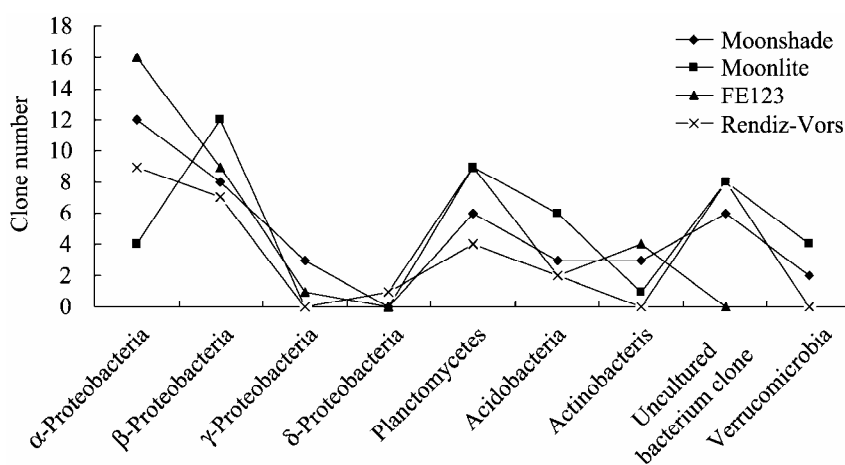


图 4 不同香石竹土壤细菌群落组成比较

Fig. 4 Comparison of bacteria community in different carnation soil

转基因和非转基因香石竹所共有的优势菌群为变形菌门(Proteobacteria)中的  $\alpha$ -变形菌门、 $\beta$ -变形菌门、浮霉菌门(Planctomycetes)、酸杆菌门(Acidobacteria), 其中  $\alpha$ -变形菌门、 $\beta$ -变形菌门、浮霉菌门为优势菌群。这与近几年来利用 16S rDNA 克隆文库的方法对土壤样品进行分析研究所得的结果基本一致。Handelsman 等<sup>[14]</sup>利用 16S rDNA 基因序列来研究农田土壤样品细菌的生态学分类, 结果得到土壤样品细菌包括 7 个主要类群 Proteobacteria (48.6%), Acidobacteria (15.3%)等。国内部分研究结果亦表明<sup>[15-17]</sup> $\alpha$ -变形菌门、 $\beta$ -变形菌门、浮霉菌门、酸杆菌门等是土壤中常见的微生物类群。

本试验中所分离到的较多菌株如苍白杆菌属(*Ochrobactrum*)<sup>[18]</sup>、伯克氏菌属(*Burkholderia*)<sup>[19-20]</sup>和鞘脂单胞菌属(*Sphingomonas* sp.)<sup>[21]</sup>等, 都与生物降解有关, 出现该现象的可能原因是: 在田间试验的过程中, 为了防治香石竹病虫害, 在植株上喷洒了农药百菌清, 对土壤微生物产生了筛选作用<sup>[22]</sup>。

此外, 与其他 3 种香石竹相比, Moonlite 土壤中  $\beta$ -变形菌门的比例较大(27.3%), 其中固氮菌较多, 如固氮弧菌属(*Azoarcus*)、草螺菌属(*Herbaspirillum*)等都是常见的固氮菌属。目前, 在自然条件下固氮菌很少能成为根际土壤细菌的优势菌群, 数量一般占总数的 1%-10%, 当土壤中氮素很贫乏时固氮菌才会表现出竞争的优势。李鹏等<sup>[3]</sup>的统计结果表明, Moonlite 的植物茎粗、叶片长度、花瓣数目、花柱长度均小于受体 FE123 和 Moonshade, 需要较多的氮素来促进生长, 这可能是 Moonlite 土壤中的固氮菌数量多于其他 3 种香石竹的原因。

本次试验结果显示转基因与非转基因香石竹土壤微生物群落存在某些差异。 $\alpha$ -变形菌门中的柄杆菌属(OTU26、OTU38)、苍白杆菌(OTU39)

和  $\beta$ -变形菌门中的洋葱伯克氏菌(OTU4、OTU6)仅存在于非转基因香石竹土壤克隆文库中, 而在转基因香石竹土壤克隆文库中未发现, 但由于本次试验所得的文库克隆数有限, OTU26、OTU38、OTU39、OTU4 和 OTU6 的数量在非转基因香石竹土壤克隆文库中所占比例相对较高, 造成了这种差异。

另外, 未确定种属的未培养菌(Uncultured bacterium clone)在转基因香石竹、Rendiz-Vors 与 FE123 中差异较为显著, 而经综合统计后发现: 已分类的和未分类的未培养菌之总数在 4 种香石竹土壤细菌克隆文库中所占比例分别为 46.5% (Moonshade)、59.1% (Moonlite)、39.0% (FE123)、58.1% (Rendiz-Vors), 可见未培养菌在各克隆文库中都占有较大的比例。

疣微菌门(Verrucomicrobia)在转基因和非转基因香石竹土壤细菌中也存在差异。疣微菌门是新划分出来的一类菌群, 目前相关的报道普遍说明该类菌群主要存在于一些极端环境中, 如国外一些研究发现在一些极端的酸度、温度、盐碱度环境下, 例如火山口周围、热泉、碱湖等, 分离到属于疣微菌门的嗜极端环境的甲烷营养型微生物<sup>[23-26]</sup>; 陈彬等<sup>[27]</sup>在研究羊八井热田两废弃地热热井沉积物及热水中的细菌多样性时, 分离到未确定的疣微菌(Unidentified *Verrucomicrobium*); 李涛等<sup>[16]</sup>从南海南部陆坡表层沉积物中也分离到少量的疣微菌。本试验在转基因香石竹土壤中分离到 *Alterococcus agarolyticus* 以及未培养的疣微菌(Uncultured *Verrucomicrobia* sp.)相似菌株, 据报道 *Alterococcus agarolyticus* 是一种嗜盐嗜热菌<sup>[28]</sup>。由于本次试验分离到的疣微菌的数量在香石竹土壤细菌总数中所占比例很小(3.8%), 不足以确定该菌群的存在是否由于种植转基因香石竹而引起的, 可能与土壤取样的随机性有关, 或者由于外界因素如施用农药等引起, 还需要今后

的试验中作进一步的检测和分析。

本文通过 16S rDNA 克隆文库方法揭示了转基因香石竹的土壤中细菌多样性十分丰富,其栽培对土壤细菌群落结构影响有限,该研究将为转基因香石竹的环境安全性评价提供依据。

## 参 考 文 献

- [1] Tanaka Y, Tsuda S, Kusumi T. Metabolic engineering to modify flower color[J]. *Plant and Cell Physiology*, 1998, 39(11): 1119-1126.
- [2] 董志峰, 马荣才, 彭于发, 等. 转基因植物中外源非目的基因片段的生物安全研究进展[J]. *植物学报*, 2001, 43(7): 661-672.
- [3] 李鹏, 吴云飞, 杨仁国, 等. 转基因香石竹中间试验的农艺性状评价[J]. *中国农学通报*, 2009, 25(9): 196-198.
- [4] Amann R, Ludwig W. Ribosomal RNA-targeted nucleic acid probes for studies in microbial ecology[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2000, 24(5): 555-565.
- [5] Head IM, Saunders JR, Pickup RW. Microbial evolution, diversity, and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms[J]. *Microbial Ecology*, 1998, 35(1): 1-21.
- [6] Olsen GJ, Lane DJ, Giovannoni SJ, et al. Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach[J]. *Annual Review of Microbiology*, 1986, 40(1): 337-365.
- [7] Brambilla E, Hippe H, Hagelstein A, et al. 16S rDNA diversity of cultured and uncultured prokaryotes of a mat sample from Lake Fryxell, McMurdo Dry Valleys, Antarctica[J]. *Extremophiles*, 2001, 5(1): 23-33.
- [8] Baker GC, Gaffar S, Cowan DA, et al. Bacterial community analysis of Indonesian hot springs[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2001, 200(1): 103-109.
- [9] Thompson JR, Marcelino LA, Polz MF. Heteroduplexes in mixed-template amplifications: formation, consequence and elimination by 'reconditioning PCR'[J]. *Nucleic Acids Research*, 2002, 30(9): 2083-2088.
- [10] Vanechoutte M, Rossau R, Vos PD, et al. Rapid identification of bacteria of the Comamonadaceae with amplified ribosomal DNA-restriction analysis (ARDRA)[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1992, 93(3): 227-233.
- [11] Good IJ. The population frequencies of species and the estimation of population parameters[J]. *Biometrika*, 1953, 40(3/4): 237-264.
- [12] Elshahed MS, Senko JM, Najar FZ, et al. Bacterial diversity and sulfur cycling in a mesophilic sulfide-rich spring[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(9): 5609-5621.
- [13] Qiu XY, Wu LY, Huang HS, et al. Evaluation of PCR-generated chimeras, mutations, and heteroduplexes with 16S rRNA gene-based cloning[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(2): 880-887.
- [14] Schloss PD, Handelsman J. Status of the microbial census[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2004, 68(4): 686-691.
- [15] 刘玮琦, 茆振川, 杨宇红, 等. 应用 16S rRNA 基因文库技术分析土壤细菌群落的多样性[J]. *微生物学报*, 2008, 48(10): 1344-1350.
- [16] 李涛, 王鹏, 汪品先. 南海南部陆坡表层沉积物细菌和古菌多样性[J]. *微生物学报*, 2008, 48(3): 323-329.
- [17] 李潞滨, 刘振静, 杨凯, 等. 青藏铁路沿线唐古拉山口土壤微生物的 ARDRA 分析[J]. *生态学报*, 2008, 28(11): 5482-5487.
- [18] 史秀珍. 百菌清降解菌的筛选及其降解特性研究[D]. 中国农业科学院硕士学位论文, 2007.
- [19] Coenye T, Vandamme P. Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches[J]. *Environmental Microbiology*, 2003, 5(9): 719-729.
- [20] Mahenthiralingam E, Urban TA, Goldberg JB. The multifarious, multireplicon *Burkholderia cepacia* complex[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2005, 3(2): 144-156.
- [21] Takeuchi M, Kawai F, Shimada Y, et al. Taxonomic study of polyethylene glycol-utilizing bacteria:

- emended description of the genus *Sphingomonas* and new descriptions of *Sphingomonas macrogoltabidus* sp. nov., *Sphingomonas sanguis* sp. nov. and *Sphingomonas terrae* sp. nov.[J]. Systematic and Applied Microbiology, 1993, 16(2): 227–238.
- [22] 李向丽, 谭贵良, 陈坚, 等. 五氯酚厌氧生物降解体系中细菌的多样性分析[J]. 基因组学与应用生物学, 2009, 28(3): 481–485.
- [23] Dunfield PF, Yuryev A, Senin P, et al. Methane oxidation by an extremely acidophilic bacterium of the phylum *Verrucomicrobia*[J]. Nature, 2007, 450(7171): 879–882.
- [24] Islam T, Jensen S, Reigstad LJ, et al. Methane oxidation at 55°C and pH 2 by a thermoacidophilic bacterium belonging to the *Verrucomicrobia* phylum[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008, 105(1): 300–304.
- [25] Pol A, Heijmans K, Harhangi HR, et al. Methanotrophy below pH 1 by a new *Verrucomicrobia* species[J]. Nature, 2007, 450(7171): 874–878.
- [26] Semrau JD, Dispirito AA, Murrell JC. Life in the extreme: thermoacidophilic methanotrophy[J]. Trends in Microbiology, 2008, 16(5): 190–193.
- [27] 陈彬, 马超, 周世宁, 等. 西藏羊八井废弃地热热井的细菌多样性[J]. 微生物学报, 2009, 49(2): 217–226.
- [28] Shieh WY, Jean WD. *Alterococcus agarolyticus*, gen. nov., sp. nov., a halophilic thermophilic bacterium capable of agar degradation[J]. Canadian Journal of Microbiology, 1998, 44(7): 637–645.

## 征订启事

### 欢迎订阅《微生物学通报》

《微生物学通报》创刊于 1974 年, 是中国科学院微生物研究所和中国微生物学会主办, 国内外公开发行, 以微生物学应用基础研究及技术创新与应用为主的综合性学术期刊。刊登内容包括: 基础微生物学研究, 农业微生物学研究, 工业微生物学研究, 医学微生物学研究, 食品微生物学研究, 环境微生物学研究, 微生物功能基因组研究, 微生物蛋白组学研究, 微生物模式菌株研究, 微生物工程与药物研究, 微生物技术成果产业化及微生物教学研究改革等。

本刊为中国生物科学类核心期刊。曾获国家级优秀科技期刊三等奖, 中国科学院优秀科技期刊三等奖, 北京优秀科技期刊奖, 被选入新闻出版总署设立的“中国期刊方阵”并被列为“双效”期刊。

自 2008 年本刊已经全新改版, 由双月刊改为月刊, 发表周期缩短, 内容更加丰富详实。欢迎广大读者到邮局订阅或直接与本刊编辑部联系购买, 2012 年每册定价 58 元, 全年 696 元, 我们将免邮费寄刊。

另, 本编辑部现存有少量过刊, 如有需要者可直接与编辑部联系(请事先与编辑部联系, 获悉每册售价。敬请在汇款单上注明所购刊物的年代、卷、期和数量)。

邮购地址: (100101) 北京朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中国科学院微生物研究所 《微生物学通报》编辑部

Tel: 010-64807511; E-mail: bjb@im.ac.cn, tongbao@im.ac.cn

网址: <http://journals.im.ac.cn/WSWXTBCN>

国内邮发代号: 2-817; 国外发行代号: BM413