

# 转Bt-*cry1Ac*基因棉花对意大利蜜蜂 肠道细菌群落的影响\*

姜玮瑜<sup>1,2</sup> 代平礼<sup>3</sup> 张永军<sup>1</sup> 周婷<sup>3</sup> 林毅<sup>2</sup> 束长龙<sup>1</sup> 张杰<sup>1\*\*</sup>

(<sup>1</sup>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 100193)

(<sup>2</sup>华侨大学化工学院 厦门 361021)

(<sup>3</sup>中国农业科学院蜜蜂研究所农业部授粉昆虫生物学重点开放实验室 北京 100093)

**摘要** 采用基于16S rDNA的变性梯度凝胶电泳(DGGE)的方法,研究了转Bt *cry1Ac*基因棉花SGK321对益虫——意大利蜜蜂(*Apis mellifera ligustica*)肠道细菌群落的影响。分别用转基因/非转基因棉花花粉和高浓度外源DNA饲喂蜜蜂7 d,通过DGGE分析经不同处理的蜜蜂肠道细菌群落组成的差异,同时用PCR检测是否发生外源基因的横向转移。结果显示,各个处理组DGGE图谱中的条带数目在11.3~15.0之间,Shannon's指数在0.87~1.05之间,相似性系数介于68.3%~84.7%,不同处理组肠道细菌组成差异不明显,用PCR的方法也没有检测到外源基因的横向转移。因此初步判定转基因棉花SGK321短期内对蜜蜂细菌群落尚无不利影响。图2 表3 参22

**关键词** 转基因棉花;蜜蜂;肠道细菌;基因水平转移;变性梯度凝胶电泳

CLC Q788 : S5035.3

## Effect of Transgenic Cotton with *cry1Ac* Gene on Intestinal Bacterial Community of *Apis mellifera ligustica*\*

JIANG Weiyu<sup>1,2</sup>, DAI Pingli<sup>3</sup>, ZHANG Yongjun<sup>1</sup>, ZHOU Ting<sup>3</sup>, LIN Yi<sup>2</sup>, SHU Changlong<sup>1</sup> & ZHANG Jie<sup>1\*\*</sup>

(<sup>1</sup>State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

(<sup>2</sup>College of Chemical Engineering, Huaqiao University, Xiamen 361021, Fujian, China)

(<sup>3</sup>Key Laboratory of Pollinating Insect Biology, Ministry of Agriculture, Institute of Apicultural Research, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100093, China)

**Abstract** The effect of transgenic cotton SGK321 with *cry1Ac* gene on bacterial community structures in honeybee (*Apis mellifera ligustica*) intestines was studied by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) based on sequencing of 16S rDNA. The honeybees were fed with the transgenic cotton pollens, non-transgenic cotton pollen and foreign DNA of high concentration for seven days, respectively. The intestinal bacterial diversity of each treatment was analyzed by DGGE and the possibility of a horizontal gene transfer was detected by polymerase chain reaction (PCR). The DGGE profile showed that the number of bands of all treatments ranged between 11.3~15.0 and Shannon's index between 0.87~1.05. The similarity (Dice) coefficient among the treatments ranged from 68.3% to 84.7%. These indices showed that different diets could not change the bacterial diversity in the honeybee intestines. At the same time, gene transfer was not detected. It was concluded that the transgenic cotton had no detrimental effects on the microbial diversity in honeybee intestines in short period of time. Fig 2, Tab 3, Ref 22

**Keywords** transgenic cotton; honeybee; intestinal microorganism; gene horizontal transfer; DGGE

CLC Q788 : S5035.3

转Bt基因作物能够编码杀虫晶体蛋白(ICPs),对鳞翅目、双翅目、鞘翅目等多种害虫有活性,且对人畜无害,不污染环境。抗虫棉自1996年在美国成功商业化以来,在全球取得了巨大的成功。迄今为止,转基因棉花是我国研究开发最为成功、目前唯一实现大规模产业化的转基因作物,我国是继美国之后第二个拥有抗虫棉自主知识产权的国家。2008年我国Bt转基因棉花的种植面积达 $3.8 \times 10^6$  hm<sup>2</sup>,占棉花种植总面积的69%,产生了巨大的经济生态和社会效益<sup>[1]</sup>。

然而,转基因抗虫植物的大面积应用是否会对环境特

别是非靶标生物和有益昆虫产生负面影响,这个问题一直是全球高度关注的焦点之一<sup>[2-3]</sup>。蜜蜂是很多农作物和野生植物的传粉者,在生态和经济中扮演着非常重要的角色,是一种关键的非靶标生物。蜜蜂一方面直接取食转基因抗虫植物的花粉、花蜜,另一方面花粉在自然界漂移扩散也增加了蜜蜂接触到转基因作物的风险。花粉是转基因作物和蜜蜂之间的重要媒介。目前,转基因作物对蜜蜂的影响已经作了大量的研究,但主要集中在:直接接触转基因作物或毒素对蜜蜂存活率的影响等方面<sup>[4]</sup>。昆虫肠道是众多微生物的良好生活环境,在长期的进化过程中,肠道微生物与其宿主形成了共生关系。肠道微生物对其宿主的生长发育起着非常重要的作用。共生菌有利于昆虫的繁殖、消化、营养物质的摄取和信息素的合成等<sup>[5-9]</sup>。已经有研究发现转基因作物被取食后,外源基

收稿日期: 2009-04-15 接受日期: 2009-05-18

\*国家重大基础研究计划项目("973"项目, No. 2007CB109203)资助  
Supported by the "973" Program of China (No. 2007CB109203)

\*\*通讯作者 Corresponding author (E-mail: jzhang@ippcaas.cn)

因能够在肠道或组织器官中残留<sup>[10-11]</sup>；而这些残留的DNA是否会与肠道微生物相互作用，继而对害虫、天敌以及非靶标昆虫产生不利影响？这些问题尚未有系统研究报道。因此，以肠道微生物为指标对转基因作物进行安全性评价具有重要的理论和实践意义。

为了研究外源基因是否会转移到其肠道微生物基因组DNA中，赋予微生物新的遗传信息，进而对肠道微生物群落产生影响，本研究设计了意大利蜜蜂工蜂分别取食转Bt基因棉花花粉（自然状态）和以本实验室分离克隆的、对玉米螟和棉铃虫等鳞翅目害虫高毒力的*cryIAh*基因为供试外源DNA（高浓度的外源DNA作为人为高选择压力）的试验，比较了超螺旋和线性这两种不同形状DNA发生转移的可能性，分析了肠道细菌组成差异。本研究结果将为转*cryIAh*基因水稻和玉米等新一代转基因作物的安全性研究奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂和仪器

所用的Ex Taq 聚合酶、各种限制型内切酶、pMD19-T Vector购自TaKaRa公司，2×Pfu PCR Mix 购自北京汇天东方科技有限公司，SYBR Green I购自AMRESCO公司，其它生化试剂均为分析纯。

PCR引物及序列测定由上海生工生物技术有限公司合成。PCR仪型号为Thermocycle，购自德国Biometra公司。DGGE仪器型号为DCode™ Universal Mutation Detection System (Bio-Rad Laboratories, USA)。DGGE凝胶成像系统为Universal Hood II (Bio-Rad Laboratories, USA)。

### 1.2 样品采集与制备

供试转Bt基因棉为SGK321，是通过将Bt基因(*cryIAc*)导入石远321常规棉而选育的转Bt基因棉品系。常规棉为石远321，为SGK321的受体，这些材料均种植于中国农科院植物保护研究所廊坊中试基地。人工采集这两种棉花的花粉，-20℃保存，鲜嫩叶片于-70℃保存。

超螺旋质粒HF366（含改造的*cryIAh*基因1.8 kb活性区片段，Amp<sup>r</sup>，4.8 kb）由本研究组保存，线性改造的*cryIAh*基因由HF366经*Bam*H I 酶切获得；质粒提取和酶切消化参见分子克隆手册<sup>[12]</sup>。

### 1.3 供试蜜蜂品系及饲养方法

供试蜜蜂为意大利蜜蜂(*Apis mellifera ligustica*)，由中国农业科学院蜜蜂研究所提供。选取刚羽化的意蜂工蜂分为5个处理组，每组50只，在33℃、相对湿度为70%的培养箱中培养。饲养方式如下：第一组：糖水+质粒HF366(800 ng/mL)；第二组：糖水+*cryIAh*(800 ng/mL)；第三组：糖水；第四组：糖水+石远321花粉(150 mg/mL)；第五组：糖水+SGK321花粉(150 mg/mL)，分别连续饲养7 d（鉴于蜜蜂这种社会型昆虫离开蜂王和群体正常生活的极限时间是10 d以内，本研究时间设为7 d）。

### 1.4 基因组DNA提取

将蜜蜂表面经75%酒精消毒后用无菌镊子解剖，取出肠道放入一个灭菌的1.5 mL离心管中，每管含10只经相同处理的蜜蜂肠道，提取肠道微生物基因组DNA，提取方法参照文献<sup>[13]</sup>。

SGK321和石远321叶片基因组DNA提取方法参照文献<sup>[14]</sup>。

### 1.5 16S rDNA V3区PCR扩增

16S rDNA V3区扩增所用引物为343f(5'-ACTCCTACGGG AGGCAGCAG-3')和534r(5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3')<sup>[15]</sup>在正向引物的5'端添加“GC-clamp”(5'-CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCC CGG GGG-3')，目的是为了防止PCR产物在变性梯度凝胶电泳中完全解链。50 μL的PCR反应体系为：DNA模板1 μL，引物(20 μmol/L)各为1 μL，2×Pfu PCR Mix，灭菌的去离子水补足50 μL，同时以ddH<sub>2</sub>O代替基因组DNA为空白对照。PCR扩增程序为：94℃预变性4 min；94℃变性1 min，64℃退火1 min，72℃延伸2 min，其后的19个循环，每个循环退火温度降低0.5℃，其他条件不变；最后15个循环退火温度为55℃，其它条件不变；72℃延伸10 min。为了去除PCR过程中产生的异源双链，将PCR产物作为模板进行Reconditioning PCR，反应程序为：94℃预变性1 min，94℃变性1 min，55℃退火1 min，72℃延伸2 min循环5次，72℃延伸10 min。PCR产物用试剂盒纯化。

### 1.6 DGGE分析

丙烯酰胺(37.5:1)浓度为8%，所用变性剂梯度为40%~65%（100%的变性剂溶液包含体积分数为40%的甲酰胺与7 mol/L的尿素），PCR产物上样量为200 ng，在60℃、200 V电压下持续电泳6 h，然后用SYBR Green I染色30 min，拍照。

### 1.7 DGGE图谱分析

DGGE图谱用Quantity One软件(Version 4.6.6, Bio-Rad)进行分析，人工去除组成<1%的条带。Shannon's指数反映了群落的多样性， $H' = -\sum P_i \log P_i$ ，其中 $P_i$ 指图谱中第*i*条带的相对丰度。Similarity (Dice) Coefficient,  $S_D$ 反映不同处理组间的肠道微生物群落相似性， $S_D = 2n_{AB}/(n_A + n_B)$ ，其中 $n_{AB}$ 是AB两个处理组中的共有条带数目， $n_A$ 是A处理组中的条带数目， $n_B$ 是B处理组中的条带数目。

### 1.8 特异条带克隆与序列分析

将图2中各个处理组公共的优势条带A、B、C、D切下，放在1.5 mL灭菌的离心管中，加入适量灭菌玻璃珠（直径1 mm）及200 μL超纯水，剧烈震荡，4℃过夜，离心，取10 μL上清PCR，体系同1.4，但所用的引物不含GC-clamp。纯化PCR产物加Poly-A后连接到pMD19-T载体(TaKaRa)，转化大肠杆菌JM110，得到克隆文库A、B、C、D。克隆经M13通用引物PCR鉴定和酶切鉴定后，每个条带随机挑4个进行测序。对从16S rDNA第343 bp处开始，V3区的约200 bp的有效序列信息，在NCBI数据库中进行比对，寻找同源性最高的序列，同源性以一致序列所占的百分比作为标准。

### 1.9 PCR检测外源基因

为了检测食物中的外源基因是否整合到肠道微生物基因组中，以肠道总DNA为模板，用相应的特异性引物进行PCR扩增，跟踪各处理组中的外源基因*cryIAc*、*cryIAh*，预期产物分别为300 bp、2.1 kb左右。50 μL的PCR反应体系为：DNA模板0.5 μL，引物(20 μmol/L)各为1 μL dNTPs(各2.5 mmol/L)为4 μL，Mg<sup>2+</sup>(25 mmol/L)为4 μL，10×Taq Buffer为

5  $\mu$ L, 1 U Ex Taq, 灭菌的去离子水补足50  $\mu$ L. PCR扩增程序为: 94  $^{\circ}$ C预变性4 min; 94  $^{\circ}$ C变性1 min, 55  $^{\circ}$ C退火1 min, 72  $^{\circ}$ C延伸2 min, 30个循环; 72  $^{\circ}$ C延伸10 min. *cry1Ac*、*cry1Ah*引物序列分别为: *cry1Ac*-F: 5' GAAGGTTTGAGCAATCTCTAC 3', *cry1Ac*-R: 5' CGATCAGCCTAGTAAGGTCGT 3'; *cry1Ah*-F: 5' GGGGATCCATCCTATTTTTTAC 3', *cry1Ah*-R: 5' GTACCTTATCAAAGCTCGTC 3'.

## 2 结果与分析

### 2.1 PCR扩增16S rDNA V3区

将16S rDNA V3区PCR产物用1.5%的琼脂糖凝胶进行电泳, 从结果(图1)可以看出, 目的片段约大于200 bp, 与预期产物大小相符, 且特异性良好.

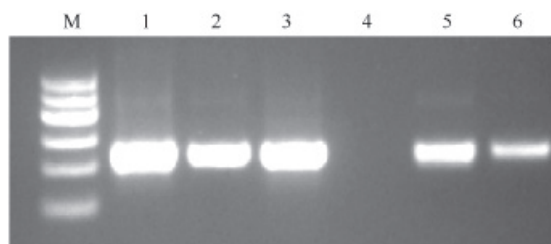


图1 16S rDNA V3区PCR产物检测结果

Fig. 1 Analysis of PCR products of 16S rDNA V3 fragment

M, DM2000 DNA marker (2 000, 1 000, 750, 500, 250, 100 bp); Lane 1, Diet containing plasmid HF366; Lane 2, Diet containing *cry1Ah* gene; Lane 3, Diet; Lane 4, Negative control; Lane 5, Diet containing non-transgenic pollen; Lane 6, Diet containing transgenic pollen

### 2.2 DGGE图谱分析

DGGE图谱显示了经过不同处理蜜蜂肠道菌群组成情况(图2). 每组条带分布情况相似, 大部分都集中在胶的上半部分. 用Quantity One软件(Version 4.6.6, Bio-Rad)对DGGE图谱进行进一步分析. 含质粒的糖水喂养的蜜蜂肠道菌群的DGGE条带数目最多(Lane 1~3), 为15.0, Shannon's指数为1.05, 但是有些条带的亮度相对其它处理组来说很浅. 含非转基因棉花花粉的处理组(Lane 4~6)与糖水处理组(Lane 7~9)条带数目最为接近, 分别为11.3和11.7, 但是Shannon's

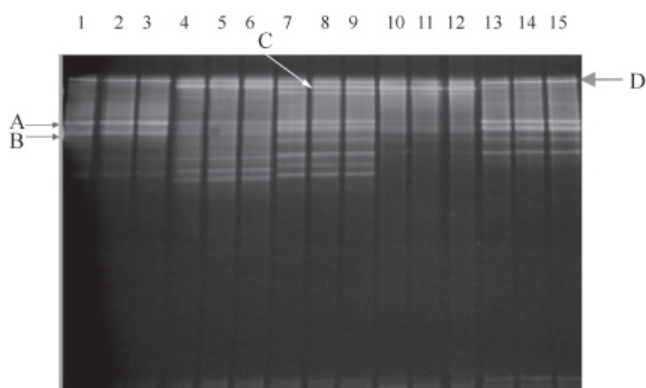


图2 16S rDNA V3片段PCR产物DGGE分析

Fig. 2 DGGE analysis of PCR products of 16S rDNA V3 fragments amplified from gut bacteria

Lanes 1~3: Diet containing transgenic pollens; Lanes 4~6: Diet containing non-transgenic pollens; Lanes 7~9: Diet; Lanes 10~12: Diet containing *cry1Ah*; Lanes 13~15: Diet containing plasmid HF366

指数有一定的差异. 含*cry1Ah*基因的处理组(Lane 10~12)及含质粒HF366的处理组(Lane 13~15)之间差异很小. 总体来说, 各个处理组DGGE图谱中的条带数目在11.3~15.0之间, Shannon's指数在0.87~1.05之间(表1), 数值较接近, 没有显著差异, 这点也在处理组之间的相似性系数中有所反映(表2), 相似性系数介于68.3%~84.7%, 大部分集中在75.0%以上, 相似性很高. 由此可以初步判定, 转基因棉花SGK321对意大利蜜蜂肠道菌群的影响并不显著.

### 2.3 DGGE图谱中的特异条带克隆及序列分析

表1 各处理组中的条带数目和Shannon's指数

Table 1 Band number and Shannon's index  $H'$  of different treatments

处理 Treatment	1	2	3	4	5
$N$	13.7	13.3	11.3	11.7	15.0
$H'$	1.02 $\pm$ 0.14 <sup>a</sup>	0.98 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	0.87 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	0.99 $\pm$ 0.14 <sup>a</sup>	1.05 $\pm$ 0.16 <sup>a</sup>

a: Standard deviation

表2 各处理组之间的相似性系数 ( $S_D/\%$ )

Table 2 Similarity indexes among different treatments ( $S_D/\%$ )

处理 Treatment	2	3	4	5
1	84.7	80.0	68.3	83.7
2		81.8	83.7	77.3
3			79.4	81.0
4				75.9

优势菌群在宿主中普遍存在, 在维持宿主的健康中发挥着主要的作用, 如若优势群落发生了变化, 将会对宿主健康产生威胁, 因此有必要对各个处理组的优势条带进行分析. 对各处理组的公共优势条带A、B、C、D进行回收和克隆, 经过PCR、*Sal* I和*Eco*R I双酶切鉴定, 每个条带随机挑取4个阳性克隆进行测序, 结果如表3. 对序列分析发现: A条带的4个克隆中包含3个不同的序列, 其中A2和A4序列完全相同. 在NCBI中进行序列对比发现, 3个序列分别与乳杆菌(*Lactobacillus* sp.)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)及一种不可培养的细菌相似性为100%. B条带的4个克隆的测序结果中, B4为杂合体, 在后续分析中去除, B1、B2、B3与NCBI中的序列相似性不是很高, 依次为96%、97%和98%. C条带也包含3个不同的序列, 最高相似性除C1为99%以外, C2、C3都为100%. D条带的4个克隆测序结果中有一个为杂合体, D1、D3序列完全相同, 与不可培养的肠杆菌相似性为98%, D2与*Saccharibacter* sp.相似性为100%.

从表3可以看出, 这些序列大多属于未可培养或不可培养的细菌, 而且在分类学上主要属于厚壁菌门(Firmicutes)、变形菌门(Proteobacteria), 还有一部分序列分类地位还未确定. Firmicutes主要由*Lactobacillus* sp.组成, Proteobacteria包含有 $\alpha$ -、 $\gamma$ -proteobacteria.

### 2.4 PCR检测外源基因水平转移

SGK321、质粒HF366为阳性对照, 石远321为阴性对照, 通过特异性的引物对外源基因进行PCR扩增发现, 除了阳性对照有扩增产物之外, 供试样品均无条带. 这表明无论在自然条件下或是人为高选择压力下, 杀虫基因等外源基因没有发生水平转移(PCR产物检测分析图略).

表3 DGGE切胶回收条带的序列与NCBI数据库比对结果  
Table 3 Results of DGGE band sequence of alignment against the sequences from NCBI database

测序的克隆 Sequenced clone	类群 Group	登录号 Accession number	相似性 Similarity	序列来源 Sequence source
A1	Firmicutes	EF187242	100%	<i>Lactobacillus</i> sp. Bma5
	Firmicutes	AY667701	100%	<i>Lactobacillus apis</i> strain 1F1
A2	$\gamma$ -proteobacteria	EU097342	100%	Uncultured <i>Pseudomonas</i> sp.
	$\gamma$ -proteobacteria	EF584110	100%	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	$\gamma$ -proteobacteria	AF448038	100%	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
A3	Unknow	FJ229345	100%	Uncultured bacterium
	Unknow	EU528229	100%	Uncultured bacterium
A4			The same as A2	
B1	$\alpha$ -proteobacteria	AJ971906	96%	<i>Saccharibacter</i> sp. Am 22
	$\alpha$ -phaproteobacteria	AJ971902	96%	<i>Saccharibacter</i> sp. Am 06
	$\alpha$ -proteobacteria	AJ971857	96%	Uncultured $\alpha$ proteobacterium
	$\alpha$ -proteobacteria	AJ971850	96%	Uncultured $\alpha$ proteobacterium
B2	Unknown	EF511704	98%	Uncultured bacterium
	Unknown	EF509090	98%	Uncultured bacterium
	$\gamma$ -proteobacteria	FJ194518	98%	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	Unknown	EF509505	98%	Uncultured bacterium
	$\gamma$ -proteobacteria	EF016296	98%	<i>Pseudomonas</i> sp. 2,4BNP
B3	Unknown	FJ229345	97%	Uncultured bacterium
	Unknown	FJ228974	97%	Uncultured bacterium
	Unknown	DQ816552	97%	Uncultured bacterium
C1	Firmicutes	DQ837634	99%	Uncultured <i>Firmicutes bacterium</i>
C2	$\gamma$ -proteobacteria	FJ360760	100%	<i>Enterobacter aerogenes</i>
C3	Unknown	FJ229345	100%	Uncultured bacterium
	Unknown	EU198063	100%	Uncultured bacterium
C4			The same as C3	
D1	$\gamma$ -proteobacteria	FJ268980	98%	Uncultured <i>Enterobacter</i> sp.
	$\gamma$ -proteobacteria	EU554428	98%	<i>Enterobacter cloacae</i>
	$\gamma$ -proteobacteria	FJ179170	98%	<i>Enterobacter</i> sp. Sw 39
D2	$\alpha$ -proteobacteria	AJ971906	100%	<i>Saccharibacter</i> sp. Am 22
	$\alpha$ -proteobacteria	AJ971902	100%	<i>Saccharibacter</i> sp. Am 06
D3			The same as D1	

### 3 讨论

迄今为止,还没有发现转Bt基因作物花粉或是Bt毒素会对蜜蜂产生显著的负面影响. Babendreier等通过T-RFLP技术研究了转Bt基因玉米花粉或其表达产物对蜜蜂肠道微生物的影响,发现无论是转Bt玉米花粉或是高浓度的Cry1Ab蛋白(0.001 4%)都不会对蜜蜂肠道微生物群落产生显著的影响<sup>[16]</sup>. Mohr等对转*pat*基因的抗除草剂油菜环境释放进行了安全行评价,发现长期生活在转*pat*基因油菜田间的卡尼鄂拉蜂(*Apis mellifera* ssp. *carnica*)、熊蜂(*Bombus terrestris*)以及独栖蜜蜂(*Osmia bicornis*)3种蜜蜂肠道细菌群落组成与对照相差不大,用PCR方法也没有检测到外源基因的横向转移<sup>[17]</sup>.

本文研究了在自然条件和人为高选择压力下,转基因棉花SGK321对蜜蜂肠道细菌群落的影响,人为设计了高浓度的外源DNA,包括质粒DNA及线性的DNA片段,旨在提供一个有可能发生基因转移的条件.通过变性梯度凝胶电泳(DGGE)图谱直观地比较了不同处理组的群落组成,从各个处理组的条带数目、Shannon's指数和相似性系数三方面进一步分析DGGE图谱,发现不同处理组细菌群落没有很明显的差别;而且用PCR方法也没有检测到外源DNA整合到肠道微生物的基因组中.从这3个表征群落多样性的参数和PCR检测结果来看,不同处理对蜜蜂肠道细菌群落并无显著影响.

出现这样的情况可能有以下三方面的原因:首先,外源基因在消化道中被一些酶或是微生物代谢产物降解;其次,蜜蜂肠道环境不适合外源基因通过接合或转化等方式转移到微生物基因组中;第三,外源基因有可能在消化道存活并发生了基因转移,但含转基因的细菌只占极小部分,无法被检测出.

优势菌群在宿主中普遍存在,在维持宿主的健康中发挥着主要的作用,如若优势群落发生了变化,将会对宿主健康产生威胁.因此,对各个处理组的优势条带进行了分析,本研究对DGGE图谱中的公共优势条带进行回收、克隆、测序.通过序列分析发现优势菌群分类学上主要属于厚壁菌门(Firmicutes)和变形菌门(Proteobacteria).Firmicutes主要由乳杆菌(*Lactobacillus* sp.)组成,Proteobacteria包含有 $\alpha$ - $\gamma$ -proteobacteria,未具体分类的proteobacteria,与前人研究结果一致<sup>[18-19]</sup>.

本研究16S rDNA V3区片段只有200 bp左右,其信息量尚不足以用来确定细菌的分类地位,判断微生物所属的系统类群要求分析的16S rDNA片段长度至少达到500 bp<sup>[20]</sup>,但是用DGGE分析超过500 bp片段的DNA会降低其分辨率. DGGE在有些情况下能够区分同一个种的不同基因型<sup>[21]</sup>,但在本实验中,对DGGE图谱的特异条带A、B、C、D进行回收、克隆、测序分析,发现DGGE并不能检测到种的水平,因此要准确可信

地分析微生物群落多样性, 还需要更多的技术互相补充。

综合上述分析可以推断, 转基因棉花SGK321短期内不会对蜜蜂产生显著的不良影响。当然今后需要设计新的试验, 增加田间放蜂与大型网室的调查, 进行整个生长季节的追踪和研究, 以获取更加丰富的研究结果。

*cry1Ah*基因是本实验室分离得到的具有自主知识产权的新基因<sup>[22]</sup>, 并对其进行了密码子优化使其适合在植物中表达, 目前, 该基因已经被导入到水稻和玉米中, 在转基因植株中表现出良好的抗虫性状。本研究以转基因棉花SGK321为主要试材, 通过建立DGGE监测肠道微生物群落变化与PCR检测外源基因漂移相结合的监测方法, 对转基因植物进行了安全性评价, 这种监测方法的建立为我国新一代转基因玉米、水稻等即将商业化的GMO作物的环境安全性评价创造了条件。

### References

- James C. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2008. *ISAAA Brief*, 2008, **39**: 87~95
- Hails RS. Genetically modified plants-the debate continues. *Trends Ecol Evol*, 2000, **15**: 14~18
- Conner AJ, Glare TR, Nap JP. The release of genetically modified crops into the environment-part II. Overview of ecological risk assessment. *Plant J*, 2003, **33**: 19~46
- Malone LA, Pham-Delegue MH. Effects of transgenic products on honeybees (*Apis mellifera*) and bumble bees (*Bombus* sp.). *Apidologie*, 2001, **32**: 287~304
- Fu Q (傅强), Zhang ZT (张志涛), Hu C (胡萃), Lai FX (赖凤香). The effects of high temperature on both yeast-like symbiotes and amino acid requirements of *Nilaparvata lugens*. *Acta Entomol Sin* (昆虫学报), 2001, **44**: 534~540
- Lü ZX (吕仲贤), Yu XP (俞晓平), Chen JM (陈建明), Zheng XS (郑许松), Xu HX (徐红星). The effect of endosymbiote on the development and reproduction of brown plant hopper *Nilaparvata lugens* Stal. *J Plant Prot* (植物保护学报), 2001, **28**: 193~197
- Dillon RJ, Vennard CT, Charnley AK. Exploitation of gut bacteria in the locust. *Nature*, 2000, **403**: 851
- Dillon RJ, Vennard CT, Charnley AK. A note: Gut bacteria produce components of a locust cohesion pheromone. *J Appl Microbiol*, 2002, **92**: 759~763
- Genta FA, Dillon RJ, Terra WR, Ferreira C. Potential role for gut microbiota in cell wall digestion and glucoside detoxification in *Tenebrio molitor* larvae. *J Insect Physiol*, 2006, **52**: 593~601
- Tony MA, Butschke A, Broll H, Grohmann L, Zagon J, Halle I, Danicke. Safety assessment of BT176 maize in broiler nutrition: Degradation of maize-DNA and its metabolic fate. *Arch Anim Nutr*, 2003, **57**: 235~252
- Douville M, Gagne F, Blaise C, Andre C. Occurrence and persistence of *Bacillus thuringiensis* and transgenic Bt corn *cry1Ab* gene from an aquatic environment. *Ecotoxicol & Environl Saf*, 2007, **2**: 195~203
- Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Beijing, China: Science Press, 2002. 36~38
- Lau WWW, Jumars PA, Armbrust EV. Genetic diversity of attached bacteria in the hindgut of the deposit-feeding shrimp *Neotrypaea californiensis* (Decapoda: Thalassinidae). *Microbial Ecol*, 2002, **43**: 455~466
- Ma X (马轩), Du XM (杜雄明). Preliminary study on the methods of extracting cotton genomic DNA. *Cotton Sci* (棉花学报), 2004, **16**: 40~43
- Nakatsu CH, Torsvik V, Ovreas L. Soil community analysis using DGGE of 16S rDNA polymerase chain reaction products. *Soil Sci Soc Am J*, 2000, **64**: 1382~1388
- Babendreier D, Joller D, Romeis J, Bigler F, Widmer F. Bacterial community structures in honeybee intestines and their response to two insecticidal proteins. *FEMS Microbiol Ecol*, 2007, **59**: 600~610
- Mohr KI, Tebbe CC. Field study results on the probability and risk of a horizontal gene transfer from transgenic herbicide-resistant oilseed rape pollen to gut bacteria of bees. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, **75**: 573~582
- Jeyaprakash A, Hoy MA, Allsopp MH. Bacterial diversity in worker adults of *Apis mellifera capensis* and *Apis mellifera scutellata* (Insecta: Hymenoptera) assessed using 16S rRNA sequences. *J Invertebr Pathol*, 2003, **84**: 96~103
- Mohr KI, Tebbe CC. Diversity and phylotype consistency of bacteria in the guts of three bee species (Apoidea) at an oilseed rape field. *Environ Microbiol*, 2006, **8**: 258~272
- Hugenholtz P, Goebel B M, Pace NR. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *J Bacteriol*, 1998, **180**: 4765~4774
- Reeson AF, Jankovic T, Kasper ML, Rogers S, Austin AD. Application of 16S rDNA-DGGE to examine the microbial ecology associated with a social wasp *Vespula germanica*. *Insect Mol Biol*, 2003, **12**: 85~91
- Xue J, Liang G, Crickmore N, Li H, He K, Song F, Feng X, Huang D, Zhang J. Cloning and characterization of a novel Cry1A toxin from *Bacillus thuringiensis* with high toxicity to the Asian corn borer and other lepidopteran insects. *FEMS Microbiol Lett*, 2008, **280**: 95~101