

# 转基因植物中外源基因及其表达产物转移的途径

王忠华, 叶庆富\*, 舒庆尧, 夏英武

(浙江大学农业与生物技术学院核农所, 农业部核农学重点开放实验室, 杭州 310029)

**摘要:**随着转基因植物商品化应用的增多, 全面了解转基因植物潜在的生态风险性尤为重要。国内外对“转基因植物中外源基因向野生亲缘物种漂移的可能性”、“昆虫对抗虫转基因植物的耐受性”以及“转基因植物对生物多样性的潜在影响”等问题已进行了广泛研究。对转基因植物中外源基因及其表达产物的几种可能转移途径作了概述。着重介绍了“经花粉散布或与野生亲缘物种杂交等途径引起的外源基因转移”以及“转基因植物对土壤生态系统的影响”等方面的研究情况。此外, 还对“鉴定外源基因及其表达产物存在的方法”进行了简要探讨。

**关键词:**转基因植物; 转移; 外源基因; 表达产物

## The Transfer of Foreign Genes and Its Expression Products in Genetically Modified Crops

WANG Zhong-Hua, YE Qing-Fu, SHU Qing-Yao, XIA Ying-Wu (*Institute of Nuclear Agricultural Sciences, College of Agriculture and Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou, 310029 China*). *Acta Ecologica Sinica*, 2002, 22(9): 1521~1526.

**Abstract:** It has been very important to understand thoroughly potential ecological risk of genetically modified crops (GMCs) with the recent increase of commercial use of GMCs. The likelihood of transgenes dispersal from GMCs to the related wild species, the tolerance of insect to insect-resistant GMCs and the potential impacts of GMCs on biodiversity had been extensively investigated. This article summarized several possible characteristics of the transfer of foreign genes and their expression products in GMCs: (i) Gene flow from GMCs via pollen dispersal. The distance of pollen flow is determined not only by the biological properties of pollen of different species, but also by natural surroundings; (ii) Spontaneous hybridizations between GMCs and other closely related wild species, which may result in creating super-weeds; (iii) The fate and consequences of foreign genes and proteins of GMCs in soil micro-ecosystem. It has been demonstrated that foreign genes or proteins of GMCs can survive for a long time in soils. It has also been shown that Bt plants can secrete Bt toxin from root throughout the entire growth stages, and these toxins can be released from residual materials of GMCs and can be deposited into soils after harvesting. It was suggested that Bt plants may impact the environment, for example, producing toxins to non-target microorganisms in soils and forcing the evolution of toxin-resistant target species; (iv) Gene flow via food chains that may influence the biodiversity of nature, such as the effect of GM Bt crops on predators or parasites. Finally, the identification methods of the existence of transgenes and their expressing products were also briefly discussed.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30070156)

收稿日期: 2000-12-25; 修订日期: 2001-10-10

\* 通讯作者 Author for correspondence, E-mail: QFY@zju.edu.cn

作者简介: 王忠华 (1970~), 男, 浙江开化人, 博士。主要从事水稻生物技术育种与安全性评价研究。E-mail: zhonghuawang@hotmail.com

**Key words:**genetically modified crops; transgenes flow; biodiversity

文章编号:1000-0933(2002)09-1521-06 中图分类号:Q344 文献标识码:A

自 1983 年人类首次获得转基因烟草、马铃薯以来,植物基因工程技术的发展日新月异,转基因植物的研究和开发取得了一系列令人瞩目的进展,已培育成功一批抗虫、抗病、耐除草剂和高产优质的农作物新品种。到 1999 年底,全球共有 12 个国家种植了转基因作物,种植面积已达 3990 万  $\text{hm}^2$ <sup>[1]</sup>。这些基因工程作物在农业生产中的应用引起了农业生产方式的巨大变革和经济效益的大幅度提高,并为人类解决目前所面临的人口膨胀、环境恶化、资源匮乏和效益衰减等问题提供了一条新的思路和途径。与此同时,它可能造成的负面影响已引起世界各国科学家的关注<sup>[2]</sup>,尤其是欧美发达国家。诸如转基因植物中的抗除草剂基因转移到其它亲缘野生种中可能会形成超级杂草、抗病毒基因逃逸到其它微生物中可能会产生超级病毒、目标生物体对药物产生抗性和转基因及其产物在环境中的残留等<sup>[3,4]</sup>。这些问题一旦发生,将会给人类带来不可预料的灾难。因此,在转基因作物进入大田试验和商品化生产阶段前进行生态风险性评价是极其必要的,也是非常重要的。综合近十年的研究来看,主要集中在转基因植物与野生亲缘种间的基因漂移及转基因植物对生物多样性的影响问题上。本文就转基因植物中外源基因及其表达产物的几种主要转移途径的研究进展作一综述。

## 1 转基因植物中外源基因转移的途径

### 1.1 转基因作物花粉的散布

由于目前大多数转基因植物的培育采用组成型启动子,使得外源目的基因在所有组织和器官中均有表达,因此,转基因植物中花粉的散布成为外源基因逃逸的主要渠道之一。这方面国内外已有不少综述和报道<sup>[5~8]</sup>。其实,花粉的散布在非转基因植物中也相当普遍,包括水稻、玉米、小麦、马铃薯、棉花、油菜和甜菜等主要粮食和经济作物<sup>[8]</sup>。植物育种学家对如何保护作物不受外来花粉污染的研究已进行了半个多世纪,主要根据外来花粉与保护作物杂交的频率来确定传粉隔离距离。这种方法为转基因植物花粉散布距离的研究提供了宝贵的思路。

近十年来人们对不同转基因作物的花粉散布距离进行了研究,包括棉花、高粱、粟、马铃薯、油菜、甜菜、向日葵、西瓜、芥菜和拟南芥等粮食和经济作物。不同转基因作物的花粉散布距离是有差别的,如转基因油菜、马铃薯、芥菜、棉花和向日葵花粉的逃逸距离分别为 12、20、35、100 和 1000m<sup>[9~12]</sup>,这与特定作物的生物学传粉特性有关。

同一种作物不同试验所估测的隔离距离也存在很大的变异性。例如,原来对转基因马铃薯隔离距离的估计达到 600m,而现在则不到 50m<sup>[9]</sup>,这可能与周围植被的类型和密度、其他植物的开花期和气象条件等因素有关<sup>[13]</sup>。

转基因作物的释放面积大小也影响到转基因的传粉距离。Scheffler 等<sup>[14]</sup>研究了释放面积为 75m<sup>2</sup> 转基因油菜花粉的传布距离,发现离转基因方块(plot)1m 和 3m 处的转基因花粉的杂交频率分别为 1.5% 和 0.4%,在 47m 处则下降到 0.00033%。而在释放面积为 400m<sup>2</sup> 的研究中,其结果与前者有较大的差异,200m 处的杂交频率为 0.0156%,在 400m 处仍可检测到<sup>[15]</sup>。Timmons 等<sup>[16]</sup>研究发现,离转基因油菜(释放面积为 10  $\text{hm}^2$ )方块 360m 处花粉密度只降到释放边缘的 10%,在 1500m 处仍计数到 22 粒/ $\text{m}^3$  的花粉。

当然,花粉散布距离与传粉的途径(主要包括风媒和虫媒途径)密切相关,上述转基因作物花粉传布距离差异很大,有可能是不同传粉途径造成的。

### 1.2 转基因植物作为野生亲缘种花粉的受体形成杂种

转基因植物除了花粉散布造成外源基因的空间逃逸外,若作为野生亲缘种花粉的受体,形成的杂种子在土壤中残留,在条件适宜的情形下,转基因作物与其野生亲缘种的杂交种可以与野生亲本不断回交。转基因进入野生亲本的遗传背景就会造成外源基因在时间上的逃逸。Jorgensen 等<sup>[17]</sup>分析了甘蓝型油菜栽培种 *Brassica napus*( $n=38$ )与杂草型亲缘种 *B. campestris*( $2n=20$ ,作父本)杂交后代植株的育性和染色体数目,发现杂种的育性为 16%~65%,染色体数目介于两亲本之间( $2n=29$ )。Mikkelsen 等<sup>[18]</sup>研究了转

耐除草剂 BASTA 基因油菜 *B. napus* ( $2n=38$ ) 与杂草型亲缘种 *B. campestris* ( $2n=20$ , 作父本) 杂交、回交后代植株的育性和染色体数目, 结果发现杂种花粉的育性超过 90%, 其农艺性状和染色体数目接近野生种, 并且有 42% 左右的植株抗除草剂 BASTA。Chevre 等<sup>[19~21]</sup>则研究了转抗除草剂 BASTA 基因甘蓝型油菜 *B. napus* ( $2n=38$ ) 与野生型萝卜 *Raphanus raphanistrum* L. ( $2n=18$ )、野生芥菜 (*Sinapis arvensis*) (作为父本) 杂交后代植株花粉的育性和染色体数目。结果发现, 随着世代的增加, 染色体的数目逐渐减少, 由杂种的 28 条逐步接近野生小萝卜的染色体数目 ( $2n=18$ ), 在这个过程中, 每一世代植株的可育性不断增加。Snow 等<sup>[22]</sup>也报道了类似的结果。Mallory-Smith 等<sup>[23]</sup>对转抗除草剂基因小麦 (*Triticum aestivum*) 与野生山羊草 (*Aegilops cylindrica*) 杂交种进行研究, 结果发现杂种可在田间自发地与野生山羊草回交。由此表明, 经过不断的回交, 转基因作物中的外源基因可进入野生亲缘种的遗传背景, 从而造成转基因的转移。

2 外源基因表达产物转移的途径

2.1 根系分泌物和残枝落叶在土壤中的残留

Mayenc 等<sup>[24]</sup>报道, 作物产生的毒素 (toxins) 往往被束缚在土壤颗粒中很难降解, 并持续产生毒性。转基因作物也不例外。据 James<sup>[25]</sup>报道, Bt 毒素可通过枯枝落叶残留在土壤中, 并与土壤粘粒相结合, 结合态的毒性可持留 2~3 个月。Bt 毒素从转基因作物的残枝落叶进入土壤和水中, 可能会对土壤和水中的无脊椎动物以及养分循环过程产生负面影响。美国纽约大学 Saxena 等<sup>[26]</sup>在《Nature》上发表了 Bt 玉米根系分泌物室内喂虫 (欧洲玉米螟幼虫) 试验结果, 发现 Bt 玉米组的幼虫停止进食, 5 d 后死亡率高达 95%~100%, 而对照组无一死亡, 这是人们对转基因作物根系分泌物毒性的首次报道。随后, 他们又研究了由 Bt 玉米根系分泌的毒素在土壤中的行为, 结果发现 Bt 毒素可与土壤中的表面活性颗粒结合, 进而延缓了毒素的生物降解<sup>[27]</sup>。尽管 Bt 毒素渗入土壤后对自然环境将产生何种影响仍需做进一步的田间研究才能得出结论, 但这次试验证实了外源基因表达产物可通过根系分泌物造成空间上的转移。

Smalla 等<sup>[28]</sup>和 Paget 等<sup>[29]</sup>利用 PCR 技术分析了转基因甜菜、马铃薯和烟草外源 DNA 在土壤中的残留情况, 发现此种 DNA 可在土壤中持续存在。Palm 等<sup>[30]</sup>将转 Bt 棉花叶枝埋入 5 种不同微生态系统土壤中, 发现 140 d 后在 3 种土壤中仍能检测到 Bt 毒素, 含量分别为起始浓度的 3%、16% 和 35%。Oger 等<sup>[31]</sup>研究了转基因植物对根际细菌的影响, 发现转基因植物根际的冠瘿碱浓度高于对照, 由此表明转基因植物可改变根际细菌的生物学环境。Donegan 等<sup>[32]</sup>就转蛋白酶抑制剂基因烟草对土壤生态系统的潜在影响进行了评估和分析, 发现含转基因植物叶片的垃圾袋埋入土壤中 57 d 后仍能检测到 0.05% 的蛋白酶抑制剂, 并发现转基因植物根际土壤中存在更多的线虫, 具体原因尚不清楚。Glandorf 等<sup>[33]</sup>研究了抗真菌和细菌转基因烟草对腐生型土壤细菌 (如菌根和根瘤菌等) 的影响, 发现抗真菌和细菌蛋白会残留在根际土壤中, 从而影响腐生型土壤细菌的数量。

另外, 抗抗生素和抗除草剂基因表达产物也可通过转基因植物的残枝落叶转移到其他土壤微生物中从而导致外源基因的逃逸。Hoffmann 等<sup>[34]</sup>发现, 转基因油菜、黑芥菜、蒺藜和甜豌豆中抗抗生素基因 (*npt II*) 可通过转基因植株的残枝落叶转移到一种能与植物共生的黑曲霉微生物中。Widmer 等<sup>[35]</sup>利用叶枝埋入土壤法对转基因烟草中抗生素基因 *npt II* 在土壤微生态系统中的残留进行了研究, 结果发现 120 d 后仍能检测到 0.14% 的外源抗生素含量。Nordlee<sup>[36]</sup>则报道了一种抗除草剂 2,4-D 细菌 (*Pseudomonas putida*) 能把除草剂 2,4-D 降解成一种严重危害真菌类的物质。钱迎倩等<sup>[37]</sup>报道, 带有几丁质酶的抗真菌的转基因作物可通过残枝落叶的降解和根系分泌物减少土壤中菌根的种群。菌根是一种真菌与植物的共生联合体, 对作物的生长发育和保持土壤的肥力是极其重要的<sup>[38]</sup>。

目前, 人们只是对外源基因表达产物在土壤中的残留量进行了研究, 其对自然环境究竟能造成多大的影响, 还有待于在田间试验进一步确证。

2.2 食物链的传递

转基因植物作为食物链的基本组成部分, 很可能会使转基因植物中的外源基因表达产物转移到其它非靶标动物, 成为转基因的转移。Schuler 等<sup>[39]</sup>综述了抗虫转基因植物对节肢动物天敌的潜在边际效应, 其中有许多例子就涉及到外源基因表达产物在食物链中的传递。这种转移在大多数情形下不会给非

靶标动物带来显著的影响,但也有一些带来负面影响。Birch<sup>[40]</sup>利用喂饲转 Bt 基因马铃薯的蚜虫作为瓢虫的取食饲料,发现喂转基因马铃薯雌蚜虫的卵比对照组的减少 1/3,饲喂转基因马铃薯蚜虫的受精卵在未孵化前比对照组死亡率高近 3 倍,以转基因马铃薯蚜虫为食物的雌瓢虫的存活时间比对照组少一半。Hilbeck<sup>[41]</sup>用喂养转 Bt 玉米的欧洲玉米螟作为草蛉的饲料,实验结果发现,转 Bt 玉米组草蛉死亡率要高于对照组 20% 左右,该作者推测此结果与转基因玉米中 Bt 毒素转移到草蛉体内有关。最近美国康奈尔大学 Losey<sup>[42]</sup>发现,在一种植物马利筋叶片上撒上转 Bt 玉米花粉后,一种称之为黑脉金斑蝶的幼虫对叶片就吃得少,长得慢,死得快。4d 后幼虫死亡率达 44%,而对照无一死亡。尽管以上试验均在实验室完成,有许多人为的因素,其结果并不能代表田间的实际情况,但在一定程度上也反映了转基因作物中的外源基因表达产物可通过食物链转移到其他非靶标动物中。

### 3 讨论

#### 3.1 研究外源基因转移的手段与方法

在研究转基因花粉传播距离时,各国学者和科学家均采用不同方向不同距离上转基因花粉与非转基因作物杂交的频率来确定不同转基因作物的传粉距离。当然,转基因花粉散布的测定方法是多种多样的,包括亲本分析、花粉计数、花粉收集和花粉活力测定等<sup>[42]</sup>。目前主要运用的是亲本分析法。操作方法一般是先在实验中心设置一个转基因作物方块,然后在其四周种植非转基因作物或其亲缘种,最后于作物成熟期在不同方向的不同距离上取一定面积的样本或一定数量的植株或种子(果实),分析成熟种子或果实中转基因存在的频率,作为转基因传粉的频率。

在外源基因表达产物通过根系分泌物和食物链转移的研究中,只有对现有的生态系统进行长期的追踪研究,才能得出有意义的结论。如在进行转基因植物根系分泌物对土壤微生物种类和数量的研究时,必须模拟当地的土壤微生态系统(包括微生物的种类和菌落大小等)进行可控试验,得出一个较理想的模型。另外,目前对转基因表达产物在土壤中的残留大多停留在包埋法,即将转基因作物的残枝枯叶埋在不同的土壤中,研究外源基因表达产物在不同时期的残留量。其实,这种方法并不能准确地阐明转基因表达产物在土壤中的行为和归趋。土壤的成分非常复杂,这些表达产物能否与土壤中的腐殖质、粘粒、蒙脱石和高岭土等基质结合,怎样结合以及结合残留物的释放规律等应该成为今后研究的重点。在这方面,可借鉴小分子(如同位素标记农药分子等)的相关研究。

#### 3.2 鉴定转基因及其表达产物存在的方法

鉴定转基因存在的方法也是多种多样的,包括形态学特征分析、细胞学方法(如减数分裂和染色体配对分析)、蛋白质及同工酶电泳分析、DNA 分析技术(如 PCR、Southern blotting 和 DNA 测序等)以及统计分析方法(如 F-统计)等<sup>[43]</sup>。一般这些研究方法并不是孤立的,而是相互渗透、相互结合的。Doebley<sup>[44]</sup>将形态学、同工酶和叶绿体 DNA 分析相结合来研究转基因玉米与其野生亲缘种间的花粉逃逸。Kerlan 等<sup>[45]</sup>则结合 PCR 技术,利用染色体计数的方法来分析转基因甘蓝型油菜与其亲缘种间的杂交频率。Desplanque 等<sup>[46]</sup>利用 Southern blotting 和微卫星标记相结合的方法来鉴定转基因甜菜外源基因的转移。

外源基因表达产物即蛋白质的检测一般按常规方法(如 Dot blotting、Western blotting 和 ELISA 等),这些方法只能定量检测游离态的目标蛋白质。一旦这些目标蛋白质与土壤或非靶标动物中的某些成分结合,就很难用上述方法进行检测与跟踪研究。因此,有必要开展一些蛋白质同位素标记方面的研究。目前最常用的是<sup>125</sup>I、<sup>14</sup>C 和<sup>32</sup>P。用同位素标记来跟踪研究外源基因表达产物在土壤或非靶标动物中的行为与归趋值得进一步探讨。

### 4 展望

由于上述种种原因,转基因植物进入商业化生产阶段,其外源基因及其表达产物的转移是无法避免的。唯一能做的是着手研究转基因及其表达产物转移后的命运及其对生态系统的影响,使转基因作物的负面影响尽量减少到最低限度,从而更好地为我们人类服务。我国虽然在转基因水稻、棉花和番茄等方面的研究已取得<sup>125</sup>I、<sup>14</sup>C 和<sup>32</sup>P 同位素标记转基因作物的生态环境效应的研究却很少,希望能引起有关政府和科研部门的高度重视,使我国的转基因作物向有利于可持续性农业的健康方向发展。

## 参考文献

- [1] Sun L X (孙雷心). Global review of commercialized transgenic crops: 1999. *Biotechnology Information* (in Chinese) (生物技术通报), 2000, **3**:39~41.
- [2] Bergelson J, Purrington C B, Wichmann G. Promiscuity in transgenic plants. *Nature*, 1998, **395**:25.
- [3] Qian Y Q (钱迎倩). Analysis of advantages and disadvantages on transgenic crops. *Biotechnology Information* (in Chinese) (生物技术通报), 1999, **5**:7~11.
- [4] Zhu Z (朱祯), Liu X (刘翔). Genetically modified crops-frankenstein or savior. *J. of Agricultural Biotechnology* (in Chinese) (农业生物技术学报), 2000, **8**(1):1~6.
- [5] Rogers H J and Parkes H C. Transgenic plants and the environment. *J. of Exp. Botany*, 1995, **46**:467~488.
- [6] Paoletti M G and Pimentel D. Genetic engineering in agriculture and the environment. *Bioscience*, 1996, **46**(9):665~673.
- [7] Snow A A and Palma P M. Commercialization of transgenic plants: potential ecological risks. *Bioscience*, 1997, **47**(2):86~96.
- [8] Wei W (魏伟), Qian Y Q (钱迎倩), Ma K P (马克平). Gene flow between transgenic crops and their wild related species. *Acta Botanica Sinica* (in Chinese) (植物学报), 1999, **41**(4):343~348.
- [9] Dale P J, McPartlan H C, Parkinson R, *et al.* Gene dispersal from transgenic plants. In: *Annual-report-1992,-AFRC-Institute-of-Plant-Science-Research,-Cambridge-Laboratory,-John-Innes-Institute,-Nitrogen-Fixation-Laboratory-and-Sainsbury-Laboratory*. 1993. 9~11.
- [10] Arias D M and Rieseberg L H. Gene flow between cultivated and wild sunflowers. *Theor. Appl. Genet.*, 1994, **89**:655~660.
- [11] Zhang C Q (张长青), Lu Q Y (吕群燕), Wang Z X (王志兴), *et al.* Frequency of 2,4-D resistant gene flow of transgenic cotton. *Scientia Agricultura Sinica* (in Chinese) (中国农业科学), 1997, **30**(1):92~93.
- [12] Dastidar N G and Varma N S. A study on extent of cross pollination in field trials of transgenic Indian mustard. *Cruciferae-Newsletter*, 1998, **20**:49~50.
- [13] Gliddon C, Boudry P, Walker S. Gene flow-a review of experimental evidence. In: *The workshop on transgenic organisms in the New Millenium: Risks and Benefits*, Italy, Dec 1997. 1~5.
- [14] Scheffler J A, Parkinson R, Dale P J. Frequency and distance of pollen dispersal from transgenic oilseed rape (*B. napus*). *Trans. Res.*, 1993, **2**(6):356~364.
- [15] Scheffler J A, Parkinson R, Dale P J. Evaluating the effectiveness of isolation distances for field plots of oilseed rape (*B. napus*) using a herbicide-resistance transgene as a selectable marker. *Plant Breeding*, 1995, **114**(4):317~321.
- [16] Timmons A M, Brien E T, Charters Y M, *et al.* Assessing the risks of wind pollination from field of genetically modified *B. napus*. *Euphytica*, 1995, **85**:417~423.
- [17] Jorgensen R B and Andersen B. Spontaneous hybridization between oilseed rape (*Brassica napus*) and weedy *B. campestris* (*Brassicaceae*): a risk of growing genetically modified oilseed rape. *American J. of Botany*, 1994, **81**(12):1620~1626.
- [18] Mikkelsen T R, Andersen B, Jorgensen J H. The risk of crop transgene spread. *Nature*, 1996, **380**:31.
- [19] Chevre A M, Eber F, Baranger A, *et al.* Gene flow from transgenic crops. *Nature*, 1997, **389**:924.
- [20] Chevre A M, Eber F, Baranger A, *et al.* Characterization of backcross generations obtained under field conditions from oilseed rape-wild radish F1 interspecific hybrids: an assessment of transgene dispersal. *Theor. Appl. Genet.*, 1998, **97**:90~98.
- [21] Chevre A M, Eber F, Renard M, *et al.* Gene flow from oilseed rape to weeds. In: *Gene flow and agriculture: relevance for transgenic crops*. Proceedings of a symposium held at Keele, UK on 12-14 April, 1999. 125~130.
- [22] Snow A A and Jorgensen R B. Fitness costs associated with transgenic glufosinate tolerance introgressed from *B. napus ssp. oleifera* (oilseed rape) into weedy *B. rapa*. In: *Gene flow and agriculture: relevance for transgenic crops*. Proceedings of a symposium held at Keele, UK on 12~14 April, 1999. 137~142.
- [23] Mallory-Smith C A, Snyder J, Hansen J L, *et al.* Potential for gene flow between wheat (*T. aestivum*) and jointed goatgrass (*A. holstii*) in the field. In: *Gene flow and agriculture: relevance for transgenic crops*. Proceedings of a symposium held at Keele, UK on 12~14 April 1999. 165~169.



- [24] Mayenc A N and Gleich G L. Eosinophilia-myalgia syndrome and tryptophan production; a cautionary tale. *Trends in Biotechnology*, 1994, **12**:346~352.
- [25] James R R. Utilizing a social ethic toward the environment in assessing genetically engineered insect-resistance in trees. *Agriculture and Human Values*, 1997, **14**:237~249.
- [26] Saxena D, Florest S, Stotzky G. Insecticidal toxin in root exudates from Bt corn. *Nature*, 1999, **402**:480.
- [27] Saxena D and Stotzky G. Insecticidal toxin from *Bacillus thuringiensis* is released from roots of transgenic Bt corn in vitro and in situ. *FEMS Microbiol Ecology*, 2000, **33**:35~39.
- [28] Smalla K, Gebhard F, Elsas J D, *et al.* Bacterial communities influenced by transgenic plants. In: *The biosafety results of field tests of genetically modified plants and microorganisms*. Proceedings of the 3rd International Symposium, Monterey, California, USA, 13~16 November, 1994. 157~167.
- [29] Paget E, Lebrun M, Freyssinet G, *et al.* The fate of recombinant plant DNA in soil. *Eur. J. Soil Biol.*, 1998, **34**(2):81~88.
- [30] Palm C J, Schaller D L, Donegan K K, *et al.* Persistence in soil of transgenic plant produced *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* delta-endotoxin. *Canadian J. of Microbiology*, 1996, **42**(12):1258~1262.
- [31] Oger P, Petit A, Dessaux Y. Genetically engineered plants producing opines alter their biological environment. *Nature Biotech.*, 1997, **15**(4): 369~372.
- [32] Donegan K K, Seidler R J, Fieland V J, *et al.* Decomposition of genetically engineered tobacco under field conditions: persistence of the proteinase inhibitor I product and effects on soil microbial respiration and protozoa, nematode and microarthropod populations. *J. of Applied Ecology*, 1997, **34**(3): 767~777.
- [33] Glandorf D C M, Bakker P A H M, Van Loon L C, *et al.* Influence of the production of antibacterial and antifungal proteins by transgenic plants on the saprophytic soil microflora. *Acta-Botanica-Neerlandica*, 1997, **46**(1): 85~104.
- [34] Hoffmann T, Golz C, Schieder O. Foreign DNA sequences are received by a wild-type strain of *A. niger* after co-culture with transgenic higher plants. *Curr. Genet.*, 1994, **27**:70~76.
- [35] Widmer F, Seidler R J, Watrud L S. Sensitive detection of transgenic plant marker gene persistence in soil microcosms. *Molecular Ecology*, 1996, **5**(5): 603~613.
- [36] Nordlee J A. Identification of brazil-nut allergen in transgenic soybeans. *The New England J. of Medicine*, 1996, **334**:688~692.
- [37] Qian Y Q(钱迎倩), Ma K P(马克平). Progress in the studies on genetically mooified organisms, and the impact of its release on environment. *Acta Ecologica Sinica* (in Chinese) (生态学报), 1998, **18**(1):1~9.
- [38] Chen W X(陈文新). *Soil and Environment Microbiology* (in Chinese) (土壤和环境微生物). Beijing: Beijing Agricultural University Press, 1989. 210~226.
- [39] Schuler T H, Poppy G M, Kerry B R, *et al.* Potential side effects of insect-resistant transgenic plants on arthropod natural enemies. *Trend in Biotech.*, 1999, **17**(5):210~216.
- [40] Birch A N E. Interaction between plants resistance genes, pest aphid populations and beneficial aphid predators. *Scottish Crops Research Institute Annual Report*, 1997:70~72.
- [41] Hilbeck A. Effect of transgenic *Bacillus thuringiensis* corn fed prey on mortality and development time of immature *Chrysoperla carnea*. *Environ. Entomol.*, 1998, **27**:480~487.
- [42] Losey J E, Rayor L S, Carter M E. Transgenic pollen harms monarch larvae. *Nature*, 1999, **399**:214.
- [43] Kjellson G. Principles and procedures for ecological risk assessment of transgenic plants. In: Kjellsson G, Simonsen V, Ammann K eds. *Methods for risk assessment of transgenic plants:II. Pollination, gene transfer and population impacts*. Basel:Birkhauser Verlag, 1997. 221~237.
- [44] Doebley J. Molecular evidence for gene flow among *Zea* species. *Bioscience*, 1990, **40**:443~448.
- [45] Kerlan M C, Chevre A M, Eber F. Interspecific hybrids between a transgenic rapeseed and related species: cytogenetical characterization and detection of transgene. *Genome.*, 1993, **36**:1099~1106.
- [46] Desplanque B, Boudry P, Broomberg K, *et al.* Genetic diversity and gene flow between wild, cultivated and weedy forms of *Beta vulgaris* L., assessed by RFLP and micro-satellite markers. *Theor. Appl. Genet.*, 1999, **98**:1194~1201.