

种植转 Bt 基因抗虫棉对土壤生物学活性的影响

万小羽¹, 梁永超², 李忠佩³, 宋阿琳¹, 娄运生^{1,*}

(1. 南京农业大学资源与环境科学学院, 南京 210095; 2. 中国农业科学院农业资源与农业区划研究所农业部植物营养与养分循环重点实验室, 北京 100081; 3. 中国科学院南京土壤研究所, 南京 210008)

摘要: 采用温室盆栽实验, 研究了种植转 Bt 基因棉 (苏抗 103) 和同源常规棉 (苏棉 12) 对根际土壤生物学活性的影响。结果表明: 与对照常规棉相比, 种植转 Bt 基因棉对根际土壤脱氢酶、碱性磷酸酶、蔗糖酶和土壤呼吸的影响因生育期而异, 土壤脲酶、蛋白酶和微生物量 C 在各生育期均没有显著差异; 土壤蔗糖酶、土壤脱氢酶和土壤呼吸分别只在苗期 (苏抗 103 > 苏棉 12, 增幅为 25.5%)、花铃期 (苏抗 103 > 苏棉 12, 增幅为 21.6%)、花铃期 (苏抗 103 > 苏棉 12, 增幅为 36.1%) 存在显著差异; 土壤磷酸酶在花铃期和吐絮期活性显著下降 (降幅分别为 22.1% 和 32.9%)。

关键词: Bt 棉; 土壤酶活性; 土壤呼吸强度; 微生物量 C

文章编号: 1000-0933(2007)12-5414-07 中图分类号: Q968 文献标识码: A

Effect of planting transgenic Bt cotton on soil enzymatic and microbial activities

WAN Xiao-Yu¹, LIANG Yong-Chao², LI Zhong-Pei³, Song A-Lin¹, LOU Yun-Sheng^{1,*}

1 College of Resource and Environmental Science, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

2 Institute of Soil and Fertilizer, Key Lab of Plant Nutrition and Nutrient Cycling, MOA, CAAS, Beijing 100081, China

3 Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China

Acta Ecologica Sinica, 2007, 27(12): 5414 ~ 5420.

Abstract: Transgenic Bt cotton has been one of the most popular transgenic Bt crops in China. With increasing Bt cotton grown on arable soils, its impacts on soil environment have received more attentions due to the potential ecological risks by releasing Bt protein through root exudates, pollen or plant residue. A pot experiment was conducted under greenhouse conditions to investigate enzymatic and microbial activities in rhizosphere soils grown with Bt cotton (Sukang103) or with non-Bt cotton (Sumian12). The tested soil was a sandy loamy soil, collected from Yancheng, Jiangsu Province, China. A rhizobag made from nylon mesh was placed in the center of a plastic pot ($D \times H = 30 \times 30$ cm) and used to separate rhizosphere from non-rhizosphere. All pots were arranged in a randomized complete block design with 4 replicates, and rearranged daily to minimize positional effects on growth. The pots were weighed and irrigated with distilled water daily to keep soil moisture at 80% field capacity. Soil samples were collected at seedling, squaring, flowering-boll and boll-opening stages, respectively, to measure soil respiration, microbial biomass C and activities of soil enzymes including sucrase, dehydrogenase, alkaline phosphatase, urease, and protease. Compared with control (non-transgenic Bt cotton), the activities of dehydrogenase, alkaline phosphatase, sucrase and microbial respiration were obviously affected by planting Bt

基金项目: 江苏省自然科学基金会资助项目 (BK2004104); 国际科学基金会资助项目 (C/3593)

收稿日期: 2006-10-18; **修订日期:** 2007-04-29

作者简介: 万小羽, (1981 ~), 女, 江苏盐城人, 硕士生, 主要从事植物营养逆境生理生态研究. E-mail: fbcln@sohu.com

* 通讯作者 Corresponding authors. E-mail: yunshlou@yahoo.com

Foundation item: The project was financially supported by the Natural Science Foundation of Jiangsu Province (No. BK2004104) and the International Foundation for Science (No. C/3593)

Received date: 2006-10-18; **Accepted date:** 2007-04-29

Biography: WAN Xiao-Yu, Master, mainly engaged in physiology and ecology of plant nutrition under stresses. E-mail: fbcln@sohu.com

cotton but varied with growth stages. No significant differences in soil urease, protease and microbial biomass C were observed between Bt cotton and non-Bt cotton during the growth period. Sucrase activity at seedling stage was significantly higher in rhizosphere soil grown with Bt cotton than in rhizosphere grown with non-Bt cotton (i. e. Bt cotton > non-Bt cotton, increased by 25.5%). Higher dehydrogenase activity and microbial respiration were detected in the soil with Bt cotton than with non-Bt cotton at flowering-boll stage (i. e. Bt cotton > non-Bt cotton, enhanced by 21.6% and 36.1%, respectively). Moreover, the activity of alkaline phosphatase was significantly lower in the soil with Bt cotton than with non-Bt cotton at both flowering and boll-opening stages (Bt cotton < non-Bt cotton, decreased by 22.1% and 32.9%, respectively). Further research, however, is needed to better evaluate the impacts of transgenic Bt cotton on soil eco-environment under field conditions.

Key Words: Bt cotton; enzymatic activity; soil respiration; microbial biomass C

转 Bt 基因作物是迄今种植面积最大的转基因作物, Bt 基因是苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*, Bt) 晶体蛋白基因的简称, 由于其具有杀虫活性, 故被称为“杀虫晶体蛋白”或“ δ -内毒素”。自从 1987 年比利时科学家首次报道转 Bt 基因抗虫烟草以来, 迄今为止已获得了 50 多种转基因抗虫作物。转 Bt 基因作物是全球商业化程度最快的也是种植面积较大的转基因作物, 据估计目前全球转 Bt 基因作物的种植面积约占总体的 15%。转 Bt 基因棉花是我国大量投入商品化生产的转 Bt 基因作物之一。

随着转 Bt 基因作物的应用和推广, 转 Bt 基因作物对生态环境的影响越来越受到重视。土壤是生态系统中物质循环和能量转化过程的重要场所, 转基因作物的表达产物(如 Bt 毒素)可通过根系分泌物^[1,2]、植物残体分解或秸秆还田^[3]以及花粉飘落^[4]等途径进入土壤生态系统, 尤其是进入土壤的 Bt 毒素可被土壤粘粒吸附而不易被微生物降解^[5], 将引起 Bt 毒素在土壤中的累积, 从而有可能导致土壤的特异生物功能类群以及生物多样性的改变。遗传改良可能影响到植物分解速率和 C、N 水平, 进而影响土壤生物、生态过程和肥力^[6]。因此, 有关转 Bt 基因作物与土壤生态环境的关系已成为当前国内外土壤学、农学及生态学界共同关注的热点课题之一。目前, 对于转 Bt 基因棉花的释放对土壤生物学特性如酶活性、土壤微生物量 C、土壤呼吸等方面的研究还比较少。本文以转 Bt 基因棉花及其亲本棉花为试材, 研究了转 Bt 基因棉花的种植对土壤生物学活性的影响, 从土壤学的角度进一步完善转基因作物生态风险评价的内容、指标和体系。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试棉花为江苏省农业科学院培育的转 Bt 基因抗虫棉苏抗 103(简称 Bt cotton)及其亲本受体品种苏棉 12(non-Bt cotton)。苏抗 103 是将 Bt 基因导入苏棉 12 后得到的一种转基因抗虫棉的新品系。

供试土壤为滨海盐土, 采自江苏省盐城市棉花主产区常规棉田耕层土壤(0~20 cm), 质地为砂壤土, pH 7.69, 有机质 12.99 g kg⁻¹, 全氮 1.00 g kg⁻¹, 速效磷 9.89 mg kg⁻¹, 速效钾 179.65 mg kg⁻¹, 风干后过 1 mm 筛, 充分混匀备用。

1.2 试验设计

采用土培试验, 在南京农业大学温室进行。试验用盆采用塑料桶(高 30 cm、直径 30 cm), 用 300 目孔径的尼龙纱网制成网袋置于盆的中央, 使棉花根系只在尼龙袋内生长, 以此区分根际土(根袋内)和非根际土(根袋外)^[7]。试验开始前, 将肥料与土壤充分混匀, 分别装入网袋和试验盆中, 每盆土重 4.0 kg, 用称重法调节土壤含水量为田间持水量的 80%。

试验开始于 2005 年 6 月 15 日, 棉花种子经硫酸脱绒, 洗净晾干, 选取外观一致的种子, 在 25℃ 培养箱中催芽。将催芽的种子播于石英砂中, 在人工气候室中培养, 最低温度控制在 18℃, 最高温度 25℃, 光强 10000 lx, 光照时间 14 h/d。2 周后移栽。往网袋中移入大小一致的棉花幼苗 3 株, 成活后定苗 1 株, 移栽后分别于苗期(7 月 27 日)、蕾期(8 月 22 日)、花铃期(9 月 23 日)及吐絮期(11 月 19 日)4 个生育期采集根际土样。

取样时,将根袋、根袋内土壤及植株同时取出,剪开尼龙袋,去除 2cm 表层土壤,然后将根部土壤轻轻抖落,仔细弃根后即根际土壤^[8]。随机排列,重复 4 次。一部分土壤鲜样置于 4℃ 冰箱保存,剩余土壤经风干、磨碎、过筛,保存。鲜样用于测定土壤脱氢酶、微生物量 C 和土壤呼吸;其它土壤酶活性(包括脲酶、蔗糖酶、蛋白酶、磷酸酶)用风干样测定。

1.3 水肥管理

利用测水笔调节水分,保持水分的一致性。氮、磷、钾肥料用量按常规施肥水平(N300;P150;K150mg/kg 风干土),其中氮肥 60% 作基肥,40% (分别于 7 月 29 日、8 月 25 日及 9 月 28 日)作追肥;磷钾肥全部作基肥施用。在 8 月 25 日及 9 月 10 日分别对两种棉花进行蚜虫的防治。

1.4 研究方法

土壤脱氢酶活性($\mu\text{g TPF g}^{-1}\text{dry soil (24h)}^{-1}$)采用氯代三苯基四氮唑(TTC)法、蔗糖酶活性($\mu\text{g Glucose g}^{-1}\text{dry soil (24h)}^{-1}$)采用 3-5 二硝基水杨酸比色法、蛋白酶活性($\mu\text{g Try g}^{-1}\text{dry soil (24h)}^{-1}$)采用茚三酮比色法、脲酶活性($\mu\text{g NH}_4\text{-N g}^{-1}\text{dry soil (3h)}^{-1}$)采用苯酚钠比色法、磷酸酶活性($\mu\text{g P-Nitrophenol g}^{-1}\text{dry soil (2h)}^{-1}$)采用磷酸苯二钠比色法,具体的测定参照 Alef^[9]的方法。土壤呼吸采用密闭培养碱液吸收法测定。土壤微生物量 C 的测定用氯仿熏蒸提取法^[10]。土壤有机质、全氮、速效磷、速效钾等基本理化性质的测定参照鲍士旦《土壤农化分析》的方法^[11]。

1.5 数据分析

采用 SPSS 统计软件进行方差分析,多重比较使用邓肯氏新复极差检验法(简称 DMRT 法)。

2 结果与分析

2.1 种植转 Bt 基因抗虫棉对根际土壤酶活性的影响

2.1.1 土壤蔗糖酶活性

土壤蔗糖酶能水解蔗糖生成葡萄糖和果糖,直接参与土壤 C 素循环,反映了土壤有机质分解代谢的强弱^[12,13]。由图 1 可见,两种棉花的根际土壤蔗糖酶活性变化特点基本一致,随着生长发育呈降低趋势,且降低幅度逐渐变小。Bt cotton 根际土壤蔗糖酶活性在各个生育期内均不同程度地高于对照 non-Bt cotton,但只在苗期差异达显著水平。说明种植 Bt cotton 提高了土壤蔗糖酶的活性,促进了碳水化合物的转化,为植物和微生物提供了更多的营养源。

2.1.2 土壤脱氢酶活性

土壤脱氢酶主要促进碳水化合物、有机酸等有机物质的脱氢作用,其高低标志着土壤微生物分解代谢的强弱,反映了微生物总活性,其活性是土壤微生物种群及其活性的重要敏感性指标^[9,12,13]。不同生长时期种植 Bt cotton 对根际土壤脱氢酶活性的影响见图 2。与对照 non-Bt cotton 相比,Bt cotton 根际土壤脱氢酶的活性均高于对照,且在花铃期达到显著水平,提高幅度为 4.9%~27.6%。在整个生育期内,两种棉花对根际土壤脱氢酶活性的影响趋势是一致的。在蕾期,脱氢酶活性有所降低;花铃期,脱氢酶活性显著提高并达到最大值;在棉花的生长后期,脱氢酶的活性又逐渐降低。可见,在棉花生长最旺盛的花期,土壤微生物的活性有显著的提高。

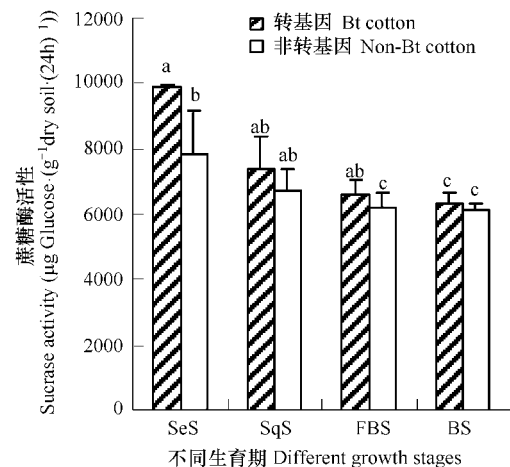


图 1 不同生育期根际土壤蔗糖酶活性

Fig. 1 Sucrase activity in rhizospheric soil at different growth stages
SeS: 苗期 Seedling stage; SqS: 蕾期 Squaring stage; FBS: 花铃期 Flowering-boll stage; BS: 吐絮期 Boll-opening stage; 下同 the same below

2.1.3 土壤磷酸酶活性

磷酸酶是土壤中广泛存在的一种水解酶,能够催化磷酸脂的水解反应,碱性磷酸酶可以促进有机磷的矿化,提高土壤磷素的有效性,是评价土壤磷素生物转化方向的重要指标^[12,13]。在整个生育期内,种植 Bt cotton 的根际土壤碱性磷酸酶活性较对照相比均有不同程度的降低。苗期和蕾期两者无显著差异,在花铃期和吐絮期, Bt cotton 根际土壤碱性磷酸酶活性显著低于对照(图 3)。在生长前期,两种棉花的根际土壤碱性磷酸酶活性呈增加趋势;花铃期,酶活性显著提高并达到最大值;吐絮期,活性都有所降低。

2.1.4 土壤脲酶活性

脲酶活性的高低在一定程度上反映了土壤的供氮水平的状况^[12,13]。由图 4 可见,与对照 non-Bt cotton 相比,种植 Bt cotton 降低了根际土壤脲酶的活性,但差异不显著。两种棉花对根际土壤脲酶活性的影响没有明显的规律。

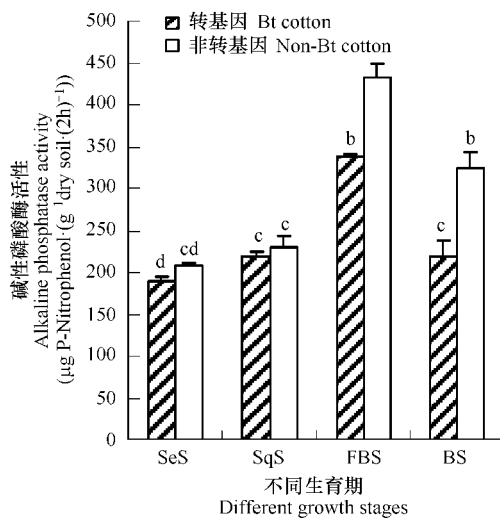


图 3 不同生育期根际土壤碱性磷酸酶活性

Fig. 3 Alkaline phosphatase activity in rhizospheric soil at different growth stages

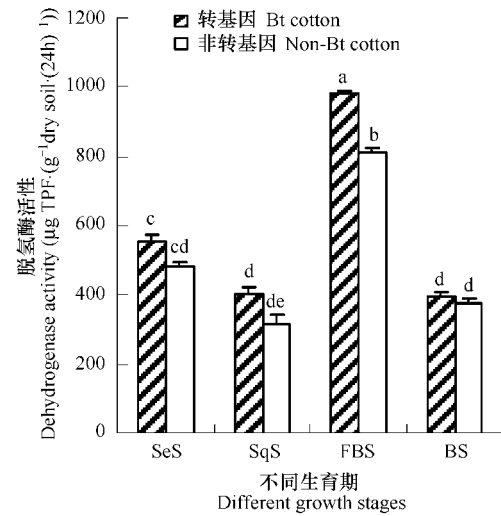


图 2 不同生育期根际土壤脱氢酶活性

Fig. 2 Dehydrogenase activity in rhizospheric soil at different growth stages

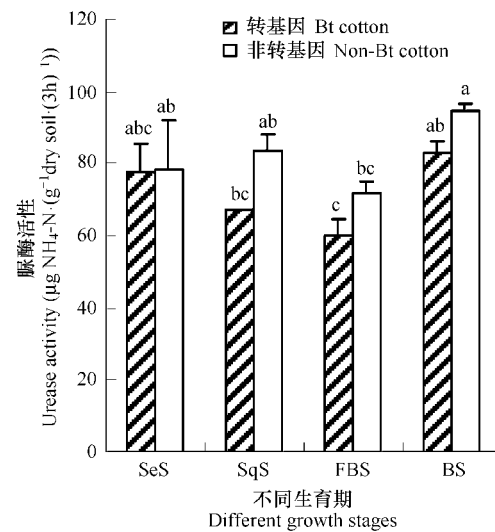


图 4 不同生育期根际土壤脲酶的活性

Fig. 4 Urease activity in rhizospheric soil at different growth stages

2.1.5 土壤蛋白酶活性

土壤蛋白酶活性的高低直接关系到植物所利用的有效氮源的多少^[12,13]。图 5 表明,在整个生育期内两种棉花处理对根际土壤蛋白酶活性影响的趋势一致,与对照 non-Bt cotton 相比,种植 Bt cotton 的根际土壤蛋白酶活性较高,但差异不显著。

2.2 种植转 Bt 基因抗虫棉对根际土壤呼吸的影响

土壤呼吸是由土壤中的生物能量代谢所产生的。土壤生物的主要组成部分是土壤微生物,所以土壤呼吸可以反映土壤微生物总的活性^[14]。由图 6 可以看出,在 4 个生育期内, Bt cotton 处理的根际土壤呼吸强度均高于对照,在花铃期差异达到显著水平,在其它 3 个生育期差异不显著。

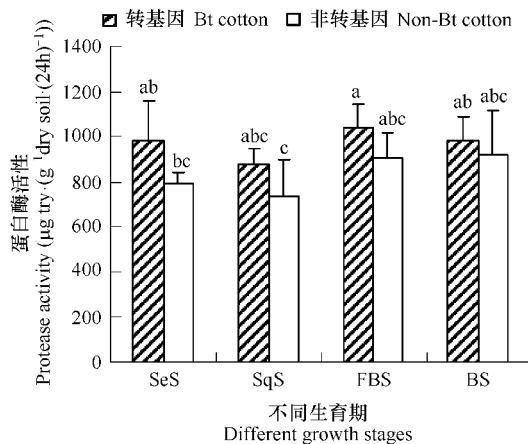


图5 不同生育期根际土壤蛋白酶活性

Fig. 5 Protease activity in rhizospheric soil at different growth stages

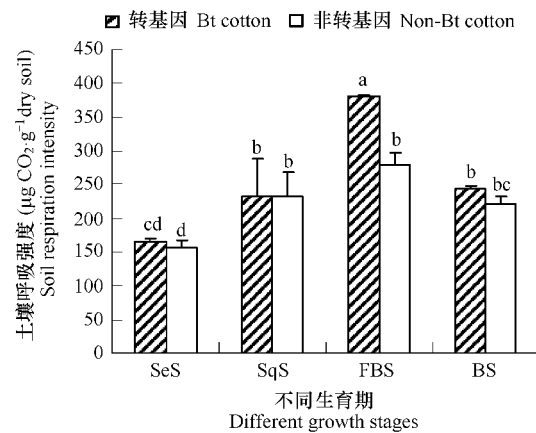


图6 不同生育期根际土壤呼吸

Fig. 6 Soil respiration in rhizospheric soil at different growth stages

2.3 种植转 Bt 基因抗虫棉对根际土壤微生物量 C 的影响

土壤微生物是土壤营养物质循环的重要参与者,土壤微生物量 C 是活性的营养库,是土壤有机碳的灵敏指标^[15]。从图 7 可知,在各个生育期,Bt cotton 处理的根际土壤微生物量 C 均高于对照,但差异不显著。总体来看,无论是 Bt cotton 还是对照处理的根际土壤微生物量 C 都随着棉花的生长发育逐渐降低。

3 讨论

土壤酶、呼吸强度和微生物量 C 可以反映土壤生态系统中微生物的活性和养分循环状况。土壤酶在常温、常压和适宜的 pH 值条件下,能大大加快土壤中的许多重要的生物化学过程,包括腐殖物质的合成和分解,各类有机物质的水解和转化,以及有机物质和某些无机物质的氧化和还原等^[16,17]。这些过程与土壤中各营养元素的释放与贮存、土壤中腐殖质的形成与发育,以及土壤结构和物理状况都密切相关^[18]。本研究结果表明,两种棉花根际土壤酶、呼吸强度和微生物量 C 随棉花生育期变化的趋势一致,转 Bt 基因棉对根际土壤脱氢酶、碱性磷酸酶、蔗糖酶及土壤呼吸有显著影响,其影响幅度因不同生育期而异,表现为苗期蔗糖酶活性显著提高;花铃期土壤脱氢酶活性和土壤呼吸显著提高;花铃期和吐絮期土壤磷酸酶活性显著下降;对土壤脲酶、蛋白酶活性及土壤微生物量 C 没有明显影响。在花铃期土壤脱氢酶、磷酸酶等生物活性有显著性差异,这可能与棉花在花铃期生长旺盛,棉花根系分泌物和脱离物比较多,刺激棉花根际微生物的生长有关。

导致根际土壤酶活性、土壤呼吸和微生物量 C 发生变化的原因可能是:(1)目前研究表明,土壤酶主要以酶-无机矿质胶体复合体、酶-腐殖质复合体和酶-无机矿质胶体复合体等形式存在于土壤中,土壤酶活性与土壤粘粒和腐殖质含量密切相关^[16,17,19]。纯化杀虫晶体蛋白与土壤性质关系的研究也表明,导入土壤中的杀虫晶体蛋白能于土壤矿物质、土壤腐殖质、土壤有机矿质复合体吸附和结合,因而导入土壤中的杀虫晶体蛋白可能通过与土壤酶竞争土壤颗粒活跃表面的结合位点而对土壤酶活性产生影响^[2]。(2)外源 Bt 基因导入后可能引起受体作物秸秆以及根系分泌物化学组成的改变。转 Bt 基因作物根系分泌物及其残体进入土壤后,通过与土壤微生物相互作用,可能会改变土壤微生物对外来底物的利用,影响微生物的活动过程,从而改变土

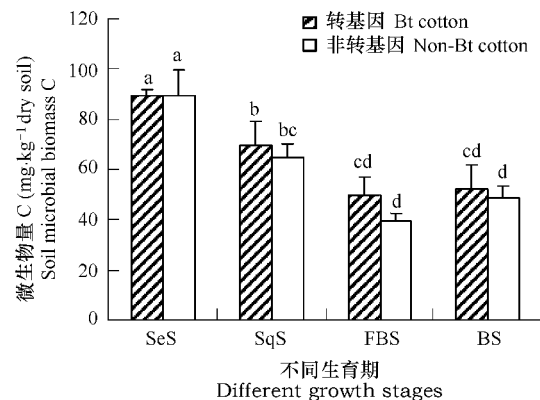


图7 不同生育期根际土壤微生物量 C

Fig. 7 Microbial biomass C in rhizospheric soil at different growth stages

壤生物活性。转基因抗虫棉由于外源基因的插入,引起受体棉花同工酶谱^[20]和挥发性气味的化学成分改变^[21]。Grayston 等^[22]研究发现转基因植物改变了其根系分泌物和化学成分。有研究发现转基因抗虫棉根际土壤中 Bt 毒蛋白含量明显高于常规棉根际土壤,尤其是在生长旺盛期,抗虫棉根际土壤毒蛋白含量最高比常规棉高 1 倍以上^[23]。Donegan^[24]发现美国 247 和 249 系 Bt 抗虫棉土壤中微生物数量、种类和组成与常规棉差异显著,土壤中好氧细菌和真菌的数量显著增加。Watrud 和 Seidler^[25]报道转 Bt 棉提高了土壤中细菌和真菌的数量。此外,由于杀虫晶体蛋白的表达受作物内部发育的调控、外部环境及管理措施等因素的影响,从而使杀虫晶体蛋白在不同作物组织、不同发育时期的表达呈现一定的时空特性。

作物根系的生长与土壤中有机和无机物质的组成有关,根际是根系生长发育、营养成分吸收和新陈代谢的场所,根际土壤酶及微生物对土壤养分的有效化产生影响,从而影响作物的吸收利用。土壤生态系统复杂而异质,土壤微生物丰富多样且存在大量的功能冗余,土壤微生物及主要的生化过程对生态环境因子的变化和人为扰动的反应也很敏感^[26]。深入了解除转基因作物之外其它生态环境或农业管理措施对土壤酶及土壤微生物群落的影响可能是解释和评价转 Bt 基因作物对土壤生态系统结构与功能潜在影响的关键^[27]。

References:

- [1] Saxena D, Florest S, Stotzy G. Insecticidal toxin in root exudates from Bt corn. *Nature*, 1999, 402: 480.
- [2] Saxena D, Florest S, Stotzy G. Bt toxin is released in root exudates from 12 transgenic corn hybrids representing three transformation events. *Soil Biology and Biochemistry*, 2002, 34:133—137.
- [3] Wang J W, Luo S M, Fen Y J, *et al.* Environmental fate and ecological effects of Bt toxin from transgenic Bt crops in soil. *Acta Ecologica Sinica*, 2003, 23(4): 797—804.
- [4] Losey J E, Rayor L S, Cartet M E. Transgenic pollen harms monarch larvae. *Nature*, 1999, 399: 214.
- [5] Tapp H, Stotzy G. Adsorption and binding of the insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *Kurstaki* and subsp. *tenebrionis* on clay. *Soil Biology and Biochemistry*, 1994, 26: 663—679.
- [6] Wang J W, Fen Y J, Luo S M. Effects of transgenic crops on soil ecosystem. *Chin. J. Applied Soil Ecology*, 2002, 13(4): 491—494.
- [7] Steen E. Usefulness of the mesh bag method in quantitative root studies. In: Atkinson D, ed. *Plant root growth: an ecological perspective*. Blackwell, Oxford, 1991. 75—86.
- [8] Shen Y X, Zhou W J, Liu W Y, *et al.* Soil phosphatase and P availability in rhizosphere and non-rhizosphere of *Pinus yunnanensis*. *Ecology and Environment*, 2005, 14(1): 91—94.
- [9] Alef K. *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*. New York: Academic Press, 1995. 229—355.
- [10] Vance E D. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. *Soil Biol Biochem*, 1987, 19(6): 703—707.
- [11] Bao S D. *Agricultural Chemical Analysis of Soil*. Third edition, Beijing: China Agriculture Press, 2000.
- [12] Guan S Y. *Study Way of Soil Enzymes*. Beijing: China Agriculture Press, 1986.
- [13] Zhou L K. *Soil Enzymes*. Beijing: Science Press, 1987.
- [14] Li F D. *Experimental Techniques in Agricultural Microbiology*. Beijing: China Agriculture Press, 1996.
- [15] Bradley L, Fyles J W. A kinetic parameter describing soil available carbon and its relationship to rate increase in C mineralization. *Soil Biology and Biochemistry*, 1994, 22(2): 167—172.
- [16] Busto M D, Perez- Mateos M. Extraction of humic- β -glucosidase fractions from soil. *Biology and Fertility of Soils*, 1995, 20: 77—82.
- [17] Rao M A, Violante A, Gianfreda L. Interaction of acid phosphatase with clays, organic molecules and organic-mineral complexes: kinetics and stability. *Soil Biology and Biochemistry*, 2000, 32: 1007—1014.
- [18] Tabatabai M A, Garda Manzanedo A M, Acosta Martinez V. Substrate specificity of arylamidase in soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 2002, 34: 103—110.
- [19] Tapp H and Stotzy G. Insecticidal activity of the toxin from *Bacillus thuringiensis* subspecies. *Kurstaki* and *tenebrionis* adsorbed and bound on pure and soil clays. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, 61(5): 1786—1790.
- [20] Ding Z Y, Xu C R, Wang R J. Comparison of several important isoenzymes between Bt cotton and regular cotton. *Acta Ecologica Sinica*, 2001, 21(2): 332—336.
- [21] Yan F M, Xu C R, Marie B, *et al.* Volatile comparison of transgenic Bt cotton and their electrophysiological effect on cotton bollworm. *Acta Entomologica Sinica*, 2002, 45(4): 425—429.

- [22] Grayston S J, Wang S, Campbell C D, *et al.* Selective influence of plant species on microbial diversity in the rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry*, 1998, 30:369—378.
- [23] Rui Y K. Dynamics of Bt toxin and plant hormones in rhizosphere system of transgenic insecticidal cotton. *Letters in Biotechnology*. 2005, 16: 515—517.
- [24] 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. *Applied Soil Ecology*, 1995, 2(2): 111—124.
- [25] Watrud L S, Seidler R J. Nontarget ecological effects of plants, microbial, and chemical introductions to terrestrial system. *Soil chemistry and Ecosystem Health*, Special Publication 52. Madison, Wisconsin: Soil Science Society of America, 1998, 313—340.
- [26] Johansson J F, Paul L R, Finlay R D. Microbial interactions in the mycorrhizosphere and their significance for sustainable agriculture FEMS. *Microbiology Ecology*, 2004, 48: 1—13.
- [27] Bruinsma M, Kowalchuk G A, van Veen J A. Effects of genetically modified plants on microbial communities and processes in soil. *Biology and Fertility of Soils*, 2003, 37: 329—337.

参考文献:

- [3] 王建武, 骆世明, 冯远娇, 等. 转 Bt 基因作物 Bt 毒素在土壤中的环境去向及其生态效应. *生态学报*, 2003, 23(4): 797~804.
- [6] 王建武, 冯远娇, 骆世明. 转基因作物对土壤生态系统的影响. *应用生态学报*, 2002, 13(4): 491~494.
- [8] 沈有信, 周文君, 刘文耀, 等. 云南松根际与非根际磷酸酶活性与磷的有效性. *生态环境*, 2005, 14(1): 91~94.
- [11] 鲍士旦主编. 土壤农化分析(第三版). 北京: 中国农业出版社, 2000.
- [12] 关松荫主编. 土壤酶及其研究法. 北京: 中国农业出版社, 1986.
- [13] 周礼恺主编. 土壤酶学. 北京: 科学出版社, 1987.
- [14] 李卓棣主编, 农业微生物学实验技术. 北京: 中国农业出版社, 1996.
- [20] 丁志勇, 许崇任, 王戎疆. 转基因抗虫棉与常规棉几种同工酶的比较. *生态学报*, 2001, 2(2): 332~336.
- [21] 阎凤鸣, 许崇任, Maric B, 等. 转 Bt 基因棉挥发性气味的化学成分及其对棉铃虫的电生理活性. *昆虫学报*, 2002, 45(4): 425~429.
- [23] 芮玉奎. Bt 棉与常规棉根际土壤 Bt 毒蛋白和植物激素变化动态. *生物技术通讯*, 2005, 16: 515~517.