

抗草甘膦转基因大豆 (RRS) 对根际土壤 细菌数量和多样性的影响

徐广惠, 王宏燕*, 刘 佳

(东北农业大学资源与环境学院, 哈尔滨 150030)

摘要: 为深入研究种植抗草甘膦转基因大豆的黑土生态区根际土壤中细菌数量及多样性的变化, 试验采用 DGGE-cloning 测序技术与传统培养相结合的方法, 研究了抗草甘膦转基因大豆 (RRS) 对根际土壤细菌数量以及细菌群落多样性的影响。传统培养试验结果为 RRS 显著降低了土壤细菌的数量; DGGE 图谱分析表明, RRS 根际土壤细菌 16SrDNA 条带数、多样性指数及均匀度指数均要低于其他处理, 聚类分析显示 RRS 带谱与 RRS-S 和 Y-S 差异较大, 相似性分别为 64% 和 64.4%; DGGE-cloning 测序结果表明, 在 RRS 处理中缺失条带 1 和条带 12 分别属于 *Uncultured bacterium* 和 *Nitrospira* 门 *Nitrospira* 属, 其中条带 1 与其他切除条带最小遗传距离达 0.4, 与其他处理相比表现出弱势差异的条带 2、4、5 和条带 11 均属于 *Uncultured bacterium*。研究表明, RRS 不同程度上降低了根际土壤细菌的数量和细菌群落的多样性, 并对根际土壤中 *Nitrospira* 属细菌有一定的抑制作用。

关键词: 抗草甘膦转基因大豆; 根际土壤; 细菌多样性; DGGE-cloning

文章编号: 1000-0933(2009)08-4535-07 中图分类号: Q948 文献标识码: A

Effects of RRS on the amount and diversity of bacteria in rhizospheric soil

XU Guang-Hui, WANG Hong-Yan*, LIU Jia

Resources and Environment Sciences College, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China

Acta Ecologica Sinica, 2009, 29(8): 4535 ~ 4541.

Abstract: The development and use of genetically modified plants (GMPs) has been a topic of considerable public debate in recent years. The majority of studies addressing potential risks of GMP cultivation have addressed only aboveground effects. However, recent methodological advances in soil microbial ecology have allowed research focus to move underground to try to gain knowledge of GMP-driven effects on the microbial communities and processes in soil. In order to deeply understand the effect of Roundup Ready soybean (RRS) on diversity of rhizospheric bacteria in black soils, DGGE-cloning and traditional culture-depending methods were used. The results of traditional culture-depending methods showed that the bacterial density isolated from rhizospheric soil of RRS grown was significantly lower than those of its parent and other genotype soybeans ($P < 0.05$); DGGE fingerprint indicated that the number of bands of bacterial 16SrDNA, the bacterial diversity indexes and homogeneous degrees indexes in rhizospheric soil of RRS grown were all lower than other treatments. Cluster analysis demonstrated that fingerprint of RRS was different from those of RRS-S and Y-S with similarity being only 64% and 64.4%, which indicated that RRS may change the bacterial communities in the soil. The experimental results of DGGE-cloning showed the sequence of absent band 1 and band 12 respectively were belong to *Uncultured bacterium* and phylum *Nitrospira* genus *Nitrospira*, and particularly, minimum genetic distance of band 1 reached 0.4 compared with other excised bands. The band 2, 4, 5, 11 from all treated soil were all belong to uncultured *bacterium*, but the bands from RRS released soil were weaker. The study revealed that the release of RRS in Black soil decreased the amount and diversity of bacteria in rhizospheric soil in different degrees, and phylum *Nitrospira* genus *Nitrospira* was inhibited in rhizospheric soil.

基金项目: 黑龙江省自然科学基金资助项目 (04-0402: ZJN)

收稿日期: 2008-09-11; 修订日期: 2009-03-04

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: why220@126.com

Key Words: Roundup Ready Soybean(RRS); rhizospheric soil; bacterial diversity; DGGE-cloning

抗草甘膦转基因大豆由美国孟山都公司于 1994 年推出,商品名为 Roundup Ready Soybean(简称 RRS)。RRS 是通过农杆菌介导方法,将矮牵牛 Ti 质粒(CaMy)中 35S 启动子控制 EPSPS 基因导入到大豆植株,进而培育成抗草甘膦转基因大豆的新品种^[1]。RRS 商业种植始于 1996 年,种植面积由最初的 50 万 hm^2 猛增到 2006 年的 5860 万 hm^2 ,占全球转基因作物的 57%。据统计,2005 年我国进口转基因大豆达到 2083.5 万 t,已经成为转基因大豆进口大国。随着转基因作物商品化进程的加快,转基因作物的风险评价倍受人们的关注^[2]。目前,国内外针对转基因作物对土壤微生物和环境的影响研究,大多集中在转基因玉米^[3,4]、油菜^[5]、棉花^[6]、马铃薯^[7]、小麦^[8]等作物上,而研究转基因大豆对根际土壤微生物影响的报道较少。

转基因作物在农业土壤中大面积种植后,与土壤中微生物区系相互作用,有可能对土壤微生物的种类、数量、多样性以及特定功能表达施加影响。一些研究结果表明,转基因作物对土壤微生物区系没有显著影响;而有些研究则显示,转基因作物对土壤中特定微生物具有明显影响^[9,10]。本研究采用传统培养与 DGGE-cloning 相结合的方法,对种植抗草甘膦转基因大豆(RRS)的土壤进行研究,重点研究 RRS 对根际土壤细菌数量以及细菌群落多样性的影响,目的在于深入探讨 RRS 对黑土生态区土壤细菌群落多样性的影响,为转基因大豆生物安全性评价提供基础研究资料。

1 研究区域概况

研究地点位于黑龙江省哈尔滨市东北农业大学试验基地($\text{N}45^{\circ}34'$, $\text{E}126^{\circ}22'$),气候属于寒温带大陆性气候,年降水量 400~600mm,无霜期平均气温 3.78°C ,平均有效积温 2800°C 。供试土壤为黑土,部分理化性状如下:有机质 44.1 g/kg,速效氮 169 mg/kg,速效磷 21 mg/kg,速效钾 218 mg/kg, pH 7.01,种植作物大豆。

2 研究方法

2.1 试验设计及样品采集

试验始于 2007 年,设 5 个处理,试验材料为 5 种大豆(*Glycine max*),分别为抗草甘膦转基因大豆(RRS)、亲本非转基因大豆(RRS-S)、东农 42(D-42)、东农 46(D-46)和野生大豆(*Glycine soja*)(Y-S)。各品种按株距 10cm 均匀撒播,各处理在种植及管理过程中均不施用化肥和农药。试验处理为随机区组设计,3 次重复,小区面积 30m^2 。2007 年 7 月 3 日于大豆盛花期采集根际土壤样品,每个试验区随机取 10 株植株,采用抖落法收集根际土壤并混匀,作为 1 个土壤样品。

2.2 土壤细菌数量

采用稀释平板测数法,培养基为牛肉膏蛋白胨培养基。

2.3 土壤细菌群落多样性分析

2.3.1 DNA 提取与纯化

采用改进的化学裂解法^[11]直接从土壤样品中提取 DNA。称取 5g 土壤于 13.5ml 缓冲液和 50 μl 蛋白酶 K(10mg/L)中, 37°C 下,225r/min 振荡 30min,加入 1.5ml 20% 的 SDS, 65°C 水浴加热 2h,2000~3000r/min 离心 5min 后收集上清液,加入 1:1 的氯仿,充分振荡,9000r/min 离心 5min,收集上清液,并在上清液中加入 1:1 的预冷的无水乙醇过夜沉淀 DNA,9000r/min 离心 5min,用双蒸水溶解沉淀即为 DNA 粗提液。

采用 Promega 公司的 Wizard DNA Clean-up System 试剂盒(型号为 A7280),按操作说明对 DNA 粗提液进行纯化。

2.3.2 PCR 扩增

纯化后的 DNA 使用细菌通用引物 F338 和 R518 进行扩增,序列分别为:F338GC,(5'CGC CCG CCG CGC CCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GCC TAC GGG AGG CAG CAG 3');R518,(5'ATT ACC GCG GCT GCT GG 3')。反应体系:20pmol 每种引物,1U 的 Taq DNA polymerase,5 μl 的 $10\times$ buffer(free MgCl_2),1.5mmol/L 的 MgCl_2 ,200 $\mu\text{mol/L}$ dNTP(每种 10 mmol/L),100ng 的模板 DNA,终体积 50 μl 。反应条件: 94°C ,

4min; 94℃, 1min, 60℃, 1min; 72℃, 1min; 72℃, 7min; 30 个循环。

2.3.3 DGGE 分析

丙烯酰胺凝胶强度为 8%, 变性剂梯度为 20% ~ 60%, 凝胶板制作好后, 组装放入含有 1 × TAE 的电泳槽中, 预热到 60℃, 将混合好的 20μl PCR 产物和 5μl 6 × loading buffer 用微量进样器加入胶孔, 100V、60℃ 条件下电泳 12h (Bio-Rad laboratories, Hercules, CA, USA)。电泳结束后, 小心取出凝胶, 放在稀释 1:10000 倍的 EB 核酸染料中避光染色 20min, 然后在凝胶成像仪下进行观察与拍照。

2.3.4 DGGE 条带的回收与测序

由 Tanon Gis 凝胶成像图像处理系统对 DGGE 图谱中条带的迁移位置进行数字化处理, 根据其迁移率, 在紫外灯下从胶上不同位置切取 12 条条带, 其中 7 条为差异性条带, 其他 5 条为共有条带。按照 Saman BOWATTE 等的方法^[12]回收 DGGE 带, 由博仕生物技术有限责任公司测定其序列, 并且登录 GenBank 获取测定序列的具体信息。

2.4 数据分析

采用 Excel (2003) 对试验数据进行处理及方差分析; 采用 Tanon Gis 凝胶成像图像处理系统对 DGGE 图谱中条带的位置和亮度进行数字化处理; 细菌群落多样性和均匀度采用 *Dsh* 和 *Jsh* 表示, 其公式为:

$$Dsh = \sum P_i \ln P_i = \sum (N_i / N) \ln (N_i / N)$$

$$Jsh = Dsh / \ln S$$

式中, *Dsh* 的计算是基于 DGGE 胶条带的位置和条带的强度, 而条带的强度则通过条带的峰面积来表示, 其中 *ni* 为峰面积, *N* 为所有峰的总面积; 采用 NTYSY 聚类分析软件对不同样品进行聚类分析; 应用 MEGA 4.0 软件建立进化树。

3 结果

3.1 土壤细菌数量

RRS-S 根际土壤细菌菌落数最多, 达到 11.41×10^5 cfu/g, 而 D-42、D-46、RRS 和 Y-S 分别为 5.17×10^5 cfu/g, 7.95×10^5 cfu/g, 4.60×10^5 cfu/g, 8.10×10^5 cfu/g。RRS 分别比 D-42、D-46、RRS-S 和 Y-S 降低 11.03%、42.14%、59.68% 和 43.21%。方差分析结果表明, RRS 与 D-46、RRS-S、Y-S 根际土壤细菌菌落数在 $P < 0.05$ 水平差异显著, 与 D-42 根际土壤细菌菌落数未达到显著水平。由此可见, RRS 降低了根际土壤中细菌的数量。

3.2 土壤细菌群落多样性分析

3.2.1 DGGE 图谱分析

对 16SrDNA 扩增产物 DGGE 指纹图谱分析表明, 不同处理间有很强的相似性, 许多条带为共有条带, 这说明这些条带所代表的土壤细菌很稳定, 不受品种的影响。但在 RRS 泳道的某些部位出现条带缺失, 如条带 1 和条带 12, 这可能与 RRS 对根际土壤细菌多样性的影响有关(图 1)。

表 1 结果显示, RRS 根际土壤细菌 DGGE 条带数、多样性指数和均匀度指数明显低于 D-42、D-46、RRS-S 和 Y-S, 表明 RRS 降低了原有根际土壤细菌的多样性和多度。

聚类分析结果表明(图 2), RRS 与 D-46 根际土壤细菌 DGGE 图谱相似性达 79%, 并聚成一簇, 这说明 RRS 根际土壤细菌种类与 D-46 相似性最高, 但 RRS 根

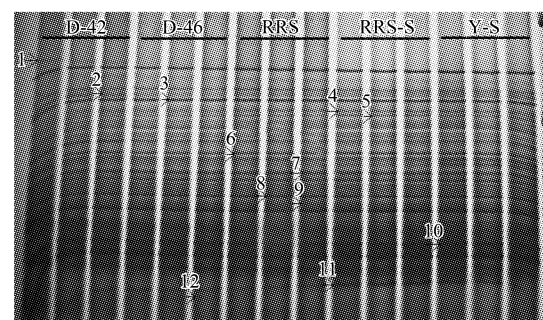


图 1 不同处理根际土壤中细菌的 PCR-DGGE 指纹图谱

Fig. 1 DGGE fingerprinting of bacteria in rhizospheric soil by different treatment

标记条带被切取测序 Labeled DGGE bands were chosen for sequencing

际土壤细菌指纹图谱条带数、多样性指数与均匀度指数均要低于 D-46;RRS 与 D-42 和 Y-S 相似性达 64.4%,与 RRS-S 相似性只有 64%。这可能由 RRS 改变了根际土壤细菌生长的微生态环境所致。

表 1 不同处理土壤细菌 DGGE 图谱条带数、多样性指数和均匀度指数

Table 1 The number of DGGE bands,diversity index (D_{sh}) and homogeneous degrees index (J_{sh}) of bacteria influenced by different treatments

处理 Treatment	条带数 Band number	多样性指数 D_{sh}	均匀度指数 J_{sh}
D-42	42ab	$3.73 \pm 0.02ab$	$0.96 \pm 0.02a$
D-46	39abc	$3.63 \pm 0.06b$	$0.94 \pm 0.01a$
RRS	33c	$3.59 \pm 0.01b$	$0.93 \pm 0.01a$
RRS-S	37bc	$3.81 \pm 0.02a$	$0.97 \pm 0.02a$
Y-S	45a	$3.75 \pm 0.07ab$	$0.95 \pm 0.01a$

表中数据为平均数 $\pm$ 标准误差 Data in the table are Mean $\pm$ SE;表中不同字母表示 5% 差异显著水平 Different letters represent the significant difference at $p < 0.05$

3.2.2 DGGE-cloning 测序分析

依据根际土壤细菌 DGGE 图谱条带位置和亮度的数字化结果,从图谱上选择性切取 12 条带,其中条带 1 和条带 12 为 RRS 根际土壤细菌缺失带;条带 9 为 RRS 特有带,条带 2、4、5 和 11 为其他大豆根际土壤细菌优势带并为 RRS 弱势带,其他带为 5 种大豆共有优势带。具体每条带的近源菌见表 2。条带 9 在 GenBank 中没有找到相似菌株,条带 11 是一株未经鉴定的细菌克隆,其他 10 条带均为未经培养的细菌且条带 2、3 和 12 序列与 GenBank 中最匹配菌株或克隆同一性高达 100%。

表 2 DGGE 带的确认及根据测序结果推测的 DGGE 带代表的细菌

Table 2 Identification of DGGE bands and deduced bacteria that DGGE band represented based on DNA sequencing

序号 Sequence designation	GenBank 中最匹配菌株或克隆 Closest match Strain or clone from GenBank	同一性 IdentityGenbank	登录号 Genbank accession no.
1	Uncultured <i>bacterium</i> clone T003E07. x0	96%	EF430256 GI:129564515
2	Uncultured <i>bacterium</i> clone F_S_03_30	100%	FJ471033 GI:217417580
3	Uncultured <i>bacterium</i> clone B_M_04_27	100%	FJ470636 GI:217417183
4	Uncultured soil <i>bacterium</i> clone Tc120 - E04	99%	AY242617 GI:29134538
5	Uncultured <i>bacterium</i> clone 2A - 9	98%	DQ906780.1 GI:117580701
6	Uncultured soil <i>bacterium</i> clone RFS - C70	99%	DQ154397.1 GI:73672187
7	Uncultured <i>actinobacterium</i> clone CF2	998%	AJ535736.1 GI:27525481
8	Uncultured <i>bacterium</i> clone KD4 - 106	97%	AY218623.1 GI:29027969
9	?	?	?
10	Uncultured <i>bacterium</i> clone cl102	99%	EF615021.1 GI:148992169
11	Unidentified <i>bacterium</i> clone Neu4P1-92	96%	AJ518399 GI:25265527
12	Uncultured <i>bacterium</i> clone Hellad03	100%	FJ229130.1 GI:209365343

除条带 9 外,将其他 11 条带序列与 GenBank 中匹配的细菌 16SrDNA 序列一起使用 MEGA 4.0 软件进行系统树分析(图 3)。条带 2 和 3 相似性达 99%,条带 8 和条带 6、7、12 的相似性也达到 99%,其他条带相似性都在 93% 以下,特别是条带 4、5、10、11 与其他带相似性低于 60% (遗传距离大于 0.4)。

通过 Ribosomal Database Project 搜索(<http://rdp.cme.msu.edu/classifier/hierarchy.jsp>),证明在 GenBank 中有匹配的 11 个序列里,10 个已鉴定为细菌,其中条带 7 属于 *Actinobacteria* 门、条带 10 属于 *Proteobacteria* 门 *Sphingomonadaceae* 属、条带 12 属于 *Nitrospira* 门 *Nitrospira* 属,其他 7 种细菌尚未分类。而条带 3 属于 *Archaea*

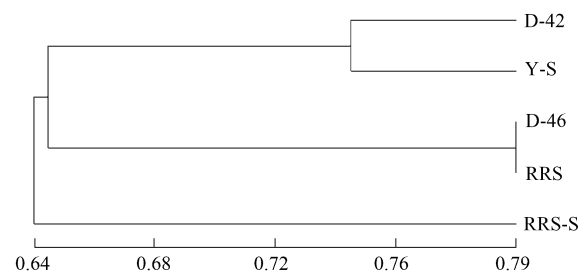


图 2 不同基因型大豆根际土壤细菌 DGGE 图谱聚类分析

Fig.2 Cluster analysis of different genotype soybeans of bacteria in rhizosphere soil

属古生细菌。

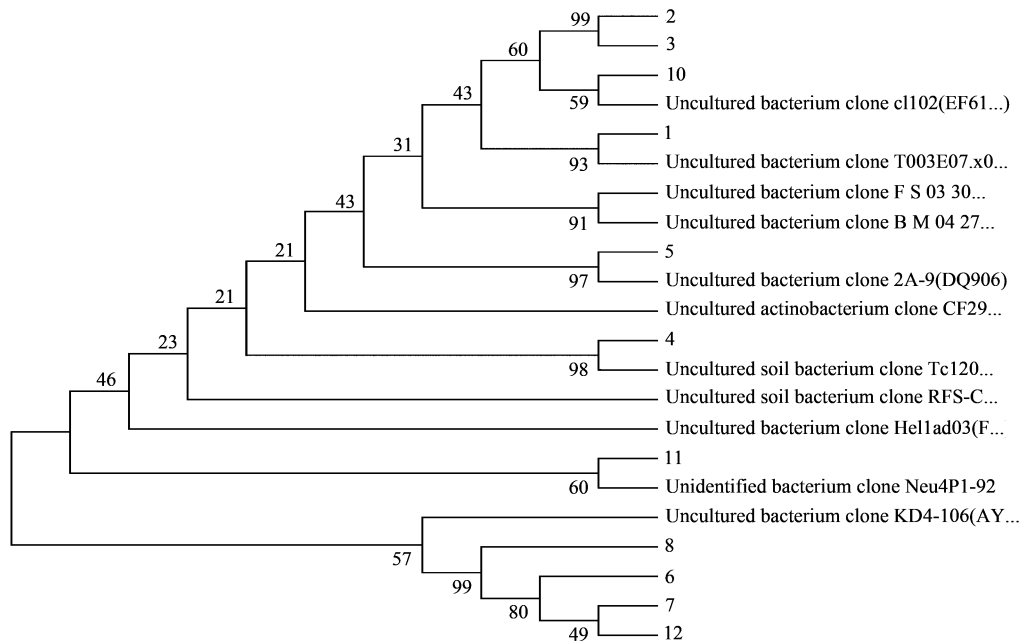


图3 基于部分 16SrDNA 序列构建的系统树

Fig. 3 Phylogenetic tree based on partial 16SrDNA sequences

4 讨论

近年来,转基因作物的种植对根际土壤微生物群落结构和功能的影响倍受国内外学者的普遍关注。一些研究表明,转基因作物种植到农田后,其插入的抗虫、抗病或抗除草剂目的 DNA 片段会随着作物的残体、根系脱落细胞及其根系分泌物进入土壤生态系统^[6,7,13],并且这些目的片段会通过基因水平转移^[14]进入近源土壤微生物体内并与其发生重组^[15,16],通过重组微生物的增殖,进而改变土壤微生物群落结构及其多样性。Nielsen、Kay 和 de Vries 等人已经先后在土壤中检测到转基因作物插入的目的片段通过基因水平转移与土壤中细菌发生重组^[16~18]。此外,转基因作物的释放使得其表达的抗虫、抗病和相关抗性蛋白随根系分泌物和植物残体进入土壤中,并且很难降解^[19,20],这些蛋白抑制物会抑制土壤中酶的活性^[21],也会抑制许多微生物的生长^[13,22]。Cowgill 证实了转基因马铃薯的种植抑制了根际土壤细菌与真菌的生长,并使其丰富度减少 23%^[23];Li 和 Wang 利用传统培养方法证明抗草甘膦转基因大豆抑制了根际土壤细菌数量^[24]。这与本研究传统培养试验结果相一致。

由于 DGGE 图谱条带复杂,有很多条带肉眼难以识别,并且不同条带分别代表何种菌类,缺失或发生改变的条带是哪种微生物,这些问题常常使得不同处理间的差异难以深入比较,所以 DGGE 与克隆测序相结合的方法常被用来明确不同处理对根际土壤中何种微生物产生影响。一些研究者已经用此方法研究土壤中细菌^[25]、真菌^[26]和丛枝菌根真菌群落^[27]。在本试验中,利用 DGGE-cloning 测序结合的方法对从 DGGE 图谱切取的条带进行克隆测序,结果表明,RRS 的缺失条带为条带 1 (Uncultured *bacterium*) 和条带 12 (*Nitrospira* 门 *Nitrospira* 属),可以明确 RRS 对根际土壤中 *Nitrospira* 属细菌有抑制作用,至于条带 1 属于未培养细菌,还需继续发展新方法去鉴定其为何种菌属。此外,RRS 特有带(条带 9)测序后并未在 GenBank 中查到相关匹配菌株或克隆,在 Liang 的研究中也曾出现类似情况^[27],推测条带 9 可能来源于人工突变或是一种经 RRS 种植而在土壤中发生突变的变异菌类。

很多研究人员认为,转基因作物对土壤特定微生物产生的显著影响可能是由转基因植株的生理生化特性的改变及其表达产物化学和生物学特性引起的^[28~30]。Kremer 研究了抗草甘膦转基因大豆与传统大豆根系分泌物成分的区别,表明前者根系分泌物中有更高量的氨基酸和碳水化合物,进而对根际微生物有一定影

响^[30]。本文利用传统培养与 DGGE-cloning 测序结合的研究方法得出,RRS 不仅降低了根际土壤细菌的数量,而且降低了土壤细菌多样性,这可能与抗草甘膦转基因大豆和传统大豆根系分泌物成分的不同有关。具体的影响机制还有待于进一步研究。

References:

- [1] Su S Q. Transgenic herbicide-resistant crops and development and application of herbicides. *Pesticides*, 2002,10(3):12—16.
- [2] Wolfenbarger L L, Phifer P R. The ecological risks and benefits of genetically engineered plants. *Science*, 2000, 290:2088—2093.
- [3] Nie C R, Luo S M, Wang J W. Change of photosynthesis and growth of Bt corn. *Acta Ecologica Sinica*,2006,26(6):1957—1962.
- [4] Sun C X, Wu Z J, Chen L J. Advances in the eco-safety researches of transgenic Bt maize. *Acta Ecologica Sinica*,2004,24(4):798—805.
- [5] Gyamfi S, Pfeifer U, Stierschneider M, *et al.* Effects of transgenic glufosinate-tolerant oilseed rape (*Brassica napus*) and the associated herbicide application on eubacterial and *Pseudomonas* communities in the rhizosphere. *FEMS Microbiology Ecology*,2002,41:181—190.
- [6] 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. *Journal of Applied Ecology*, 1997,34 (3):767—777.
- [7] 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*,1995,2:111—124.
- [8] Li Y H, Zhu C Q, Qin J B. The environmental risks of transgenic wheat. *Journal of Xinjiang Normal University(Natural Sciences Edition)*,2007, 26(3):140—142.
- [9] Li X G, Liu B, Han Z M, Zheng Y P. Impact of Transgenic Plants on Soil Ecosystems. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2008, 5:1957—1960.
- [10] Rasche F, Velvis H, Zachow C, *et al.* Impact of transgenic potatoes expressing anti-bacterial agents on bacterial endophytes is comparable with the effects of plant genotype, soil type and pathogen infection. *Journal of Applied Ecology*,2006,(43):555—566.
- [11] Zhou J, Mary B, James M T. DNA recovery from soils of diverse composition. *Applied and Environmental Microbiology*,1996,62:316—322.
- [12] Saman Bowatte, Rie Ishihara, Susumu Asakawa, Makoto Kimura. Characterization of ammonia oxidizing bacteria associated with weeds in a Japanese paddy field using *amoA* gene fragments. *Soil Science and Plant Nutrition*, 2006, 52:593—600.
- [13] Dunfield and Germida K E. Dunfield J, Germida J. Impact of genetically modified crops on soil- and plant-associated microbial communities. *Journal of Environmental Quality*,2004, 33:806—815.
- [14] Douville M, *et al.* Occurrence and persistence of *Bacillus thuringiensis* (Bt) and transgenic Bt corn *cry1Ab* gene from an aquatic environment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*,2007,66:195—203.
- [15] de Vries J, Herzfeld T, Wackernagel W. Transfer of plastid DNA from tobacco to the soil bacterium *Acinetobacter* sp. by natural transformation. *Molecular Microbiology*,2004,53:323—334.
- [16] de Vries J, Wackernagel W. Microbial horizontal gene transfer and the DNA release from transgenic crop plants. *Plant and Soil*, 2004,266:91—104.
- [17] Nielsen K M, Bones A M, Smalla K, van Elsland J D. Horizontal gene transfer from transgenic plants to terrestrial bacteria — a rare event? *FEMS Microbiology Reviews*, 1998,22:79—103.
- [18] Kay E, Vogel T M, Bertolla F, Nalin R, Simonet P. In situ transfer of antibiotic resistance genes from transgenic (Transplastomic) tobacco plants to bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002,68:3345—3351.
- [19] Gebhard K. Smalla. Monitoring field releases of genetically modified sugar beets for persistence of transgenic plant DNA and horizontal gene transfer. *FEMS Microbiology Ecology*, 1999,28:261—271.
- [20] Crecchio C, Ruggiero P, Curci M, Colombo C, Palombo G, Stotzky G. Binding of DNA from *Bacillus subtilis* on montmorillonite humic acids aluminum or iron hydroxypolymers: effects on transformation and protection against Dnase. *Soil Science Society of America Journal*, 2005,69:834—841.
- [21] Kumar K, Rosen C J, Ruselle M P. Enhanced protease inhibitor expression in plant residues slows nitrogen mineralization. *Agronomy Journal*, 2006,98:514—521.
- [22] Watve M G, Tickoo R, Jog M M, Bhole B D. How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*. *Archives of Microbiology*, 2001,176: 386—390.
- [23] Cowgill S E, Bardgett R D, Kiezebrink D T, Atkinson H J. The effect of transgenic nematode resistance on non-target organisms in the potato rhizosphere. *Journal of Applied Ecology*, 2002,39:915—923.

- [24] Li N, Wang H Y. Effect of RRS on nitrogen transition and related bacteria in rhizosphere soil. *Journal of Northeast Agricultural University*(English Edition), 2007,14(4): 333 — 336.
- [25] Kozdroj J, Van Elsas J D. Response of the bacterial community to root exudates in soil polluted with heavy metals assessed by molecular and cultural approaches. *Soil Biology & Biochemistry*,2000,32:1405 — 1417.
- [26] Kowalchuk G A, Hol W H G, Van Veen J A. Rhizosphere fungal communities are influenced by *Senecio jacobaea* pyrrolizidine alkaloid content and composition. *Soil Biology & Biochemistry*, 2006,38:2852 — 2859.
- [27] Zhanbei Liang, Rhae A. Drijber. A DGGE-cloning method to characterize arbuscular mycorrhizal community structure in soil. *Soil Biology & Biochemistry*,2008,40:956 — 966.
- [28] Alexei Melnitchouc, Peter Leinweber, Inge Broer, *et al.* Pyrolysis-field ionization mass spectrometry of genetically modified plants on soil-organisms. *Environ Biosafety Res*,2006,5:37 — 46.
- [29] Macgregor A N, Turner M A. Soil effects of transgenic agriculture;biological processes and ecological consequences. *N Z Soil News*,2000,48(6): 166 — 169.
- [30] Kremer R J, Means N E. Glyphosate affects soybean root exudation and rhizosphere micro-organisms. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*,2005,85 (15):1165 — 1174.

参考文献:

- [1] 苏少泉. 转基因抗除草剂作物与除草剂开发及使用. *农药*,2002,10(3):12 ~ 16.
- [3] 聂呈荣, 骆世明, 王建武. Bt 玉米光合作用和生长性状的变化. *生态学报*,2006,26(6):1957 ~ 1962.
- [4] 孙彩霞, 武志杰, 陈利军. 转 Bt 基因玉米的生态安全性研究进展. *生态学报*,2004,24(4):798 ~ 805.
- [8] 李艳红, 祝长青, 覃建兵. 转基因小麦的环境风险. *新疆师范大学学报(自然科学版)*,2007,26(3):140 ~ 142.
- [9] 李孝刚, 刘标, 韩正敏, 郑央萍. 转基因植物对土壤生态系统的影响. *安徽农业科学*, 2008,5:1957 ~ 1960.