

## 转抗菌肽 D 烟草对土壤微生物群落的影响

刘 丽<sup>1,2</sup>, 鲁国东<sup>2</sup>, 唐乐尘<sup>2</sup>, 周杰琰<sup>3</sup>, 王宗华<sup>2,\*</sup>

(1. 西南林学院国家林业局西南地区生物多样性保育重点实验室, 昆明 650224

2. 福建农林大学生物农药与化学生物学教育部重点实验室, 福州 350002; 3. 西南林学院保护生物学学院, 昆明 650224)

**摘要:** 采用 RAPD 分子标记技术研究了种植转抗菌肽 D 烟草的土壤环境中微生物群落遗传多样性的变化, 同时用传统平板培养法研究了土壤中可培养微生物在数量上的变化。RAPD 分析结果表明, 转抗菌肽 D 烟草与非转基因烟草根围微生物的遗传多样性相关指数并没有显著差异。培养计数结果表明, 转抗菌肽 D 烟草与非转基因烟草根围可培养细菌在数量上有极显著差异, 可培养真菌数量有显著减少, 可培养放线菌的数量没有显著差异。说明转抗菌肽 D 烟草可能抑制了病原细菌及其根围相关的微生物, 但是不影响微生物的遗传多样性。

**关键词:** 转基因烟草; 抗菌肽 D; 微生物群落; 生态安全

## Effects of transgenic tobacco with cecropin D on soil microbial communities

LIU Li<sup>1,2</sup>, LU Guodong<sup>2</sup>, TANG Lechen<sup>2</sup>, ZHOU Jielong<sup>3</sup>, WANG Zonghua<sup>2,\*</sup>

1 Key Laboratory of Biodiversity Conservation in Southwest China (Southwest Forestry College), State Forestry Administration, Kunming 650224, China

2 The Ministry of Education Key Laboratory of Bio-pesticide and Chemical Biology, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China

3 Faculty of Conservation Biology, Southwest Forestry College, Kunming 650224, China

**Abstract:** The study was carried out with both random amplified polymorphic DNA (RAPD) polymorphism with which to analyze the genetic diversity of soil microbial communities and cultured-based microbiological method with which to analyze the numerical change of soil microbial communities, in order to find the difference between the soil planted with transgenic tobacco with the cecropin D gene and the soil planted with non-transgenic tobacco. The results from RAPD showed that the difference of genetic diversity related index of microbial communities in two kinds of soils was not significant. But the result from culturing and numbering showed that transgenic tobacco with the cecropin D gene significantly reduced microbial colony number. The decrement is: bacterial > fungus. Actinomycetes population was not affected. The results suggested that transgenic tobacco with the cecropin D gene may inhibit the pathogenic bacterial and the related rhizospheric microbes, but does not affect the microbial genetic diversity.

**Key Words:** transgenic tobacco; cecropin D gene; microbial communities; ecological safety

烟草是中国的主要经济作物之一, 每年因病虫害造成的损失约 20%<sup>[1]</sup>。转抗病基因烟草是降低烟草病害损失的有效途径之一, 但推广任何转基因作物前须对其生态安全性进行探讨, 避免潜在风险。土壤微生物的多样性和活性的保持是农业生态系统健康稳定的基础, 是反映转基因作物生态安全性的重要内容之一。土壤微生物对环境的变化极为敏感, 同时它们又是恢复环境的先锋者, 使得生态系统的缓冲能力显著增强<sup>[2]</sup>。农作物植被类型的改变对土壤微生物的群落结构和活性具有显著的影响, 转基因作物作为生态系统的一种新植被类型被引入农田生态系统之后, 引发的土壤微生物群落的变化及其对农业生态系统的健康与稳定产生的影响, 已成为研究热点<sup>[3-4]</sup>。已有研究表明转基因作物对土壤微生物群落有一定影响<sup>[5-7]</sup>, 但对其是否会导致严重的生态环境问题有不同的观点。

收稿日期: 2008-10-16; 修订日期: 2009-02-19

\* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: zonghuaw@163.com

本文采用了平板培养法和 RAPD 技术,利用培养方法初步分析转抗菌肽 D 烟草对可培养的土壤微生物群落数量的影响,同时利用的 RAPD 技术分析转抗菌肽 D 烟草对土壤微生物群落遗传多样性的影响,为评价转基因作物对土壤生态系统的影响提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

取前期种植拟南芥的土壤,搅拌均匀后分装于花盆中备用。非转基因烟苗(翠碧 1 号)和转抗菌肽 D 烟草同时经过组织培养 2 个月后,通过抑菌试验验证转基因烟苗(已有实验表明转抗菌肽 D 烟草对细菌 *Pseudomonas syringae* pv *tomato* DC3000 具有抑制作用)后移栽于花盆中央。以未种植烟草但同时进行相同操作的土壤(即与种植烟草的土壤同时同量补给水分)作为空白对照。

烟草移栽培养两个月后,选取生长势相近的非转基因烟草和转抗菌肽 D 烟草,在烟株的东西南北 4 个方向离花盆中心 1/2 半径处取 2—10cm 深处的土样,每盆所取 4 个土样充分混合均匀,每个处理设 3 个重复,以未种植烟草相同处理土壤为空白对照。对样品进行含水量测定、土壤微生物分离培养和遗传多样性分析。

### 1.2 土壤微生物计数

对土壤细菌、真菌、放线菌及好氧性固氮菌采用刮板接种法计数,另对土壤细菌功能群中的硝化细菌、反硝化细菌、硫化细菌、反硫化细菌用稀释培养法计数,根据不同菌群自身的特点采用不同的稀释梯度和培养条件(表 1)。刮板法接种的菌落数计算方法:每克土中菌落数 = 菌落平均数 × 稀释倍数 × 20/干土的百分数;稀释培养菌落数计算方法:根据数量指标查 Mccrady 表得近似值,每克土中菌落数 = 近似值 × 稀释倍数 × 干土的百分数<sup>[8]</sup>。所有数据用 Microsoft Excel 2003 进行处理,计算平均值和标准偏差。

表 1 土壤微生物培养  
Table 1 Culture of the soil microbes

| 微生物<br>Microbe                 | 稀释梯度<br>Gradient    | 培养条件 Condition of cultivation |                  |                     |
|--------------------------------|---------------------|-------------------------------|------------------|---------------------|
|                                |                     | pH                            | 温度 Temperature/℃ | 培养时间 Culture days/d |
| 一般细菌 Normal bacteria           | $10^{-4} - 10^{-6}$ | 7—7.2                         | 28—30            | 1.5—3               |
| 真菌 Fungi                       | $10^{-1} - 10^{-3}$ |                               | 28               | 5—7                 |
| 放线菌 Actinomycetes              | $10^{-3} - 10^{-5}$ | 7.6—7.8                       | 28—30            | 10—14               |
| 好氧性固氮菌 Aerobic azotobacter     | $10^{-1} - 10^{-3}$ | 7                             | 28—30            | 7                   |
| 反硝化细菌 Denitrifying bacteria    | $10^{-3} - 10^{-7}$ | 7.2—7.5                       | 28—30            | 10—14               |
| 硝酸细菌 Nitrobacteria             | $10^{-3} - 10^{-7}$ |                               | 25—28            | 10—14               |
| 硫化细菌 Sulphate reducer bacteria | $10^{-1} - 10^{-5}$ |                               | 28—30            | 15 及 30             |
| 反硫化细菌 Desulphurizing bacterium | $10^{-1} - 10^{-5}$ |                               | 28—30            | 14                  |

### 1.3 土壤微生物总 DNA 的提取

参考 Tatiana volossiuk 的方法提取土壤总 DNA。方法的要点为土壤样品用液氮研磨后与 DNA 提取液混合,加入蛋白酶 K 在 37℃ 下进行充分震荡。后按照一般步骤进行提取,还有一个关键步骤是吸取上清液后加入 DNA 提取液再重复提取 1 次,以此确保充分提取出土壤样品中的总 DNA<sup>[9]</sup>。

### 1.4 RAPD 分子遗传多样性分析

提取 PCR 扩增反应在 25μL 体积中进行,反应体系包括 10ng 土壤 DNA 样品、0.1μL rTaq 酶(Takara 公司生产)、40pm 寡核苷酸随机引物(博亚公司生产,共 16 个引物,它们的序列特征以及扩增产物的有无各不相同(表 2))、0.1mmol·L<sup>-1</sup> dNTP、配套缓冲液(Takara 公司生产)。PCR 反应在 MJ PTC-200 PCR 扩增仪上进行,扩增反应过程如下:95℃ 变性 3min;然后 94℃ 1min,35℃ 1min,72℃ 2min,循环 45 次;72℃ 延伸 7min。扩增产物用 1.5% 的琼脂糖胶电泳,紫外灯下观察照相。

### 1.5 土壤微生物群落多样性的分析方法

用 16 个随机引物(表 2)对不同土样微生物群落总 DNA 进行扩增,若群落不同,会扩增出不同的 DNA 位

点,依此分析 RAPD 条带,来初步反映整个群体 DNA 序列的信息。扩增的 RAPD 条带的数量可代表群落 DNA 序列的丰富度( $S$ ),群落 DNA 序列多样性指数采用 Shannon-Weaver 指数来表示。Shannon-Weaver 指数计算公式如下:

$$D_{sh} = - \sum_{i=1}^S P_i \ln P_i = - \sum_{i=1}^S (N_i/N) \ln (N_i/N)$$

式中, $D_{sh}$ 为 Shannon-Weaver 指数, $P_i$ 为第  $i$  个 RAPD 条带出现的频率。 $D_{sh}$ 值最小为 0,最大为  $\ln S$ , $S$  为丰富度<sup>[10]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 土壤中可培养微生物数量分析

测得土样含水量分别为:空白土样  $12.2 \pm 1.3$  (平均值  $\pm$  标准偏差);非转基因烟草土样  $11.9 \pm 0.8$ ;转抗菌肽 D 烟草土样  $12.2 \pm 1.3$ 。利用刮板接种法对不同土样的细菌、真菌、放线菌和好氧性固氮菌菌落数量进行计数;同时利用梯度稀释法对反硝化细菌、硝化细菌、硫化细菌、反硫化细菌等细菌的特殊类群进行了计数,结果见表 3。

从表 3 可以看出,转抗菌肽 D 烟土中这几种类群微生物的数量都有变化,其中细菌微生物群落数量受影响最大。但转抗菌肽 D 烟土中微生物的总体构成并没有受到什么影响,即仍以细菌为土壤中的主要微生物群,其次是放线菌和真菌。

进一步对不同处理下各微生物类群数量的差异进行方差分析,结果表明非转基因烟土与转抗菌肽 D

烟土的细菌数量具有极显著差异( $P=0.00245 < \alpha=0.01$ ),即转抗菌肽 D 烟草极显著地减少了其根围细菌的数量;转抗菌肽 D 烟土真菌数量也显著地少于非转基因烟土( $\alpha=0.01 < P=0.029582 < \alpha=0.05$ );但土壤放线菌数量的单因素方差分析表明转抗菌肽 D 烟草土样与非转基因烟草土样间无显著差异( $P=0.342348 > \alpha=0.05$ )。

表 3 可培养土壤微生物群落计数

Table 3 The number of the soil microbes from culture

| 微生物类群<br>Microbe group                            | 空白土壤<br>CK<br>/(个·g <sup>-1</sup> ) | 非转基因烟草土壤<br>Non-transgenic sample<br>/(个·g <sup>-1</sup> ) | 转抗菌肽 D 烟草土壤<br>Transgenic sample<br>/(个·g <sup>-1</sup> ) |
|---------------------------------------------------|-------------------------------------|------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|
| 一般细菌 Normal bacteria(×10 <sup>6</sup> )           | 1.2520±0.2546                       | 3.4002±0.5604                                              | 0.5586±0.3242                                             |
| 真菌 Fungi(×10 <sup>4</sup> )                       | 1.6185±0.2394                       | 2.4887±0.1685                                              | 1.6185±0.1180                                             |
| 放线菌 Actinomycetes(×10 <sup>4</sup> )              | 2.6983±0.1932                       | 5.1020±0.7284                                              | 4.5587±0.3585                                             |
| 好氧性固氮菌 Aerobic azotobacter(×10 <sup>5</sup> )     | 1.9746±0.7750                       | 3.8235±0.1312                                              | 2.3158±0.7207                                             |
| 反硝化细菌 Denitrifying bacteria(×10 <sup>7</sup> )    | 1.5873±0.3928                       | 1.5873±0.3833                                              | 1.5642±0.2771                                             |
| 硝化细菌 Nitrobacteria(×10 <sup>4</sup> )             | 1.2471±0.5708                       | 3.4014±0.3159                                              | 2.7933±0.2842                                             |
| 硫化细菌 Sulphate reducer bacteria(×10 <sup>3</sup> ) | 0.4554±0.4876                       | 3.4014±0.2478                                              | 3.3520±0.2404                                             |
| 反硫化细菌 Desulphurizing bacterium(×10 <sup>3</sup> ) | 1.7078±0.2530                       | 3.4011±0.4839                                              | 2.7933±0.3905                                             |

表中数值均为三个重复平均值±标准偏差

### 2.2 土壤微生物群落 DNA 序列多样性分析

本实验共采用了 16 条随机引物对非转基因烟土、转抗菌肽 D 烟土及空白对照土进行了检测。其中引物 BA1007,BA1366,BA1367 无扩增产物,其余均得到了能在 1.5% 的琼脂糖胶上可分辨出的 RAPD 条带。若将

表 2 RAPD 引物序列

Table 2 RAPD random primer sequences

| 编号<br>Code | 序列<br>Sequence(5'-3') | GC 含量/%<br>Content of GC | 扩增产物<br>Amplification |
|------------|-----------------------|--------------------------|-----------------------|
| BA1007     | CCCTACGGAG            | 70                       | 无                     |
| BA1008     | TTCCCGTGCC            | 70                       | 有                     |
| BA1020     | GGAAGGTGAG            | 60                       | 有                     |
| BA1021     | GGCATCGGCT            | 70                       | 有                     |
| BA1351     | ACGCGCCTCC            | 80                       | 有                     |
| BA1352     | CTGTGCGCGT            | 70                       | 有                     |
| BA1357     | GGTGATTCGG            | 60                       | 有                     |
| BA1363     | GGCTGTGTGG            | 70                       | 有                     |
| BA1364     | CCAGCCTCAG            | 70                       | 有                     |
| BA1365     | TCCGCATACC            | 60                       | 有                     |
| BA1366     | CCTTCGGAGG            | 70                       | 无                     |
| BA1367     | CACGACTCTC            | 60                       | 无                     |
| BA1371     | TCCAGCGCGT            | 70                       | 有                     |
| BA1375     | TCCGCTAGTC            | 60                       | 有                     |
| BA1376     | AGCGGAACTG            | 60                       | 有                     |
| BA1377     | CACGCAGATG            | 60                       | 有                     |

3 种处理均能扩增出的条带定义为非多态条带,反之将不是 3 种处理都能扩增出来的条带定义为多态性条带(图 1),则可得到如下结果:3 种处理的土壤 DNA 共计扩增出 RAPD 条带 86 条,其中多态性条带有 51 条,占总条带的 59.3%;非多态条带有 35 条,占总条带数的 40.7%。

### 2.3 土壤微生物群落 DNA 序列丰富度分析

从土壤样品的角度来看,空白对照土壤共扩增出 RAPD 条带 58 条,非转基因烟草扩增出 59 条,转抗菌肽 D 烟草扩增出 43 条。由于 RAPD 所采用的引物是随机的,所以不同土壤样品所扩增的条带数可以间接的反映土壤微生物群落的丰富度。即扩增出的条带越多则 DNA 序列种类相对也就越丰富。结果可知转抗菌肽 D 烟草的微生物群落的丰富度相对低,非转基因烟草和空白对照土的微生物群落的丰富度相似。就平均值而言,如果以空白土样为 1,则非转基因烟草土样也为 1,转抗菌肽 D 烟草土样为 0.7(表 5)。

表 4 16 种随机引物对三种土壤微生物群落总 DNA 的扩增结果  
Table 4 Amplified outputs from total DNA of three soil microbial communities with 16 random primers

| 编号<br>Code | 扩增条带数<br>/条<br>Total bands | 非多态性条带<br>/条<br>Polymorphic<br>bands | 多态性条带<br>/条<br>Monomorphic<br>bands |
|------------|----------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|
| BA1008     | 10                         | 1                                    | 9                                   |
| BA1020     | 3                          | 0                                    | 3                                   |
| BA1021     | 3                          | 0                                    | 3                                   |
| BA1351     | 6                          | 1                                    | 5                                   |
| BA1352     | 8                          | 1                                    | 7                                   |
| BA1357     | 3                          | 2                                    | 1                                   |
| BA1363     | 5                          | 5                                    | 0                                   |
| BA1364     | 6                          | 2                                    | 4                                   |
| BA1365     | 4                          | 4                                    | 0                                   |
| BA1371     | 10                         | 10                                   | 0                                   |
| BA1375     | 4                          | 0                                    | 4                                   |
| BA1376     | 6                          | 5                                    | 1                                   |
| BA1377     | 6                          | 5                                    | 1                                   |
| BA1007     | 0                          | 0                                    | 0                                   |
| BA1366     | 0                          | 0                                    | 0                                   |
| BA1367     | 0                          | 0                                    | 0                                   |

表 5 每个引物对每个土壤样品总 DNA 的 RAPD 条带扩增数  
Table 5 Amplified outputs from total DNA of different soil with different primer

| 引物<br>Primer       | 空白土壤<br>CK sample | 非转基因<br>烟草土壤<br>Non-transgenic<br>sample | 转抗菌肽 D<br>烟草土壤<br>Transgenic<br>sample |
|--------------------|-------------------|------------------------------------------|----------------------------------------|
| BA1008             | 7                 | 7                                        | 2                                      |
| BA1020             | 3                 | 1                                        | 0                                      |
| BA1021             | 1                 | 1                                        | 1                                      |
| BA1351             | 3                 | 4                                        | 1                                      |
| BA1352             | 5                 | 6                                        | 1                                      |
| BA1357             | 2                 | 3                                        | 2                                      |
| BA1363             | 5                 | 5                                        | 5                                      |
| BA1364             | 3                 | 4                                        | 4                                      |
| BA1365             | 4                 | 4                                        | 4                                      |
| BA1371             | 10                | 10                                       | 10                                     |
| BA1375             | 3                 | 1                                        | 1                                      |
| BA1376             | 5                 | 6                                        | 6                                      |
| BA1377             | 7                 | 7                                        | 6                                      |
| 总数 Total number    | 58                | 59                                       | 43                                     |
| 平均值 Mean value     | 4.5               | 4.5                                      | 3.3                                    |
| 相对值 Relative value | 1                 | 1                                        | 0.7                                    |

### 2.4 土壤微生物群落 DNA 序列的 Shannon-Weaver 指数

本试验的空白土样、非转基因烟草土样和转抗菌肽 D 烟草土样的多样性指数分别是 3.99174、3.91772 和 3.67616。由此可以看出转抗菌肽 D 烟草的土样多样性指数最小,空白土样与非转基因烟草土样的多样性指数相近。就平均值而言,各群落 DNA 序列的 Shannon-Weaver 指数表达的结果与丰富度相似(图 1)。

## 3 讨论

### 3.1 转抗菌肽 D 烟草对土壤微生物数量的影响

王忠华对转 Bt 水稻“克螟稻”根际土中微生物数量研究表明,“克螟稻”根际土中的细菌数量显著低于其非转基因亲本根际土<sup>[11]</sup>。沈法富等研究发现转基因抗虫棉根际细菌生理群的数量也发生了变化<sup>[12]</sup>。本研究表明转抗菌肽 D 烟草明显减少了土壤可培养细菌和真菌的数量,但细菌受到的影响更大。原因可能在于抗菌肽 D 的作用机理主要是使原核生物细胞膜穿孔,细胞质外渗导致死亡<sup>[13]</sup>,而真菌的细胞膜具有膜蛋白和胆固醇,这相对阻碍了抗菌肽的作用。

有很多研究表明转 Bt 基因作物对土壤微生物没有显著影响<sup>[14-16]</sup>,这可能是因为 Bt 基因是一种抗虫基因,对土壤微生物群落没有影响。所以当分析一个转基因品种对生态环境的影响时,应该重点考虑转基因所针对的对象<sup>[17-18]</sup>。但 Watrud 和 Seidier 研究报道,转 Bt 基因棉花提高了土壤中细菌和真菌的数量<sup>[19]</sup>。综上

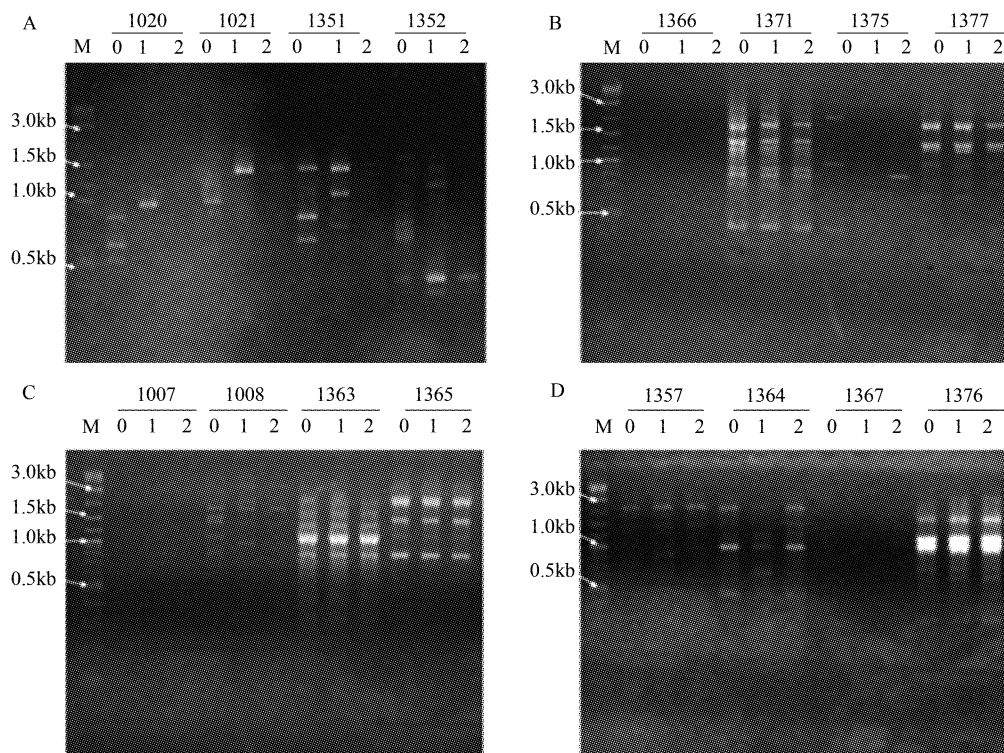


图1 16种随机引物对3种土样的RAPD扩增图谱

Fig.1 Amplified outputs from total DNA of different soil with 16 random primer

A,B,C,D 为 PAPD 扩增产物,其中 M 代表 2-log marker(NEB);0 代表空白土样总 DNA;1 代表非转基因烟草土样总 DNA;2 代表转抗菌肽 D 烟草土样总 DNA

所述,不同的转基因,以及同一个基因转入不同的植物其对土壤微生物的群落结构的影响情况是不同的,因此我们对转基因作物进行生态安全分析时得到的结论只能针对具体情况。

本实验还对土壤中的放线菌、固氮菌、硝化细菌等与土壤的肥力和植物病害防治有密切关系的特殊微生物类群进行了分析,结果表明转抗菌肽 D 烟草根围和非转基因烟草根围这些类群的微生物数量没有显著的差异。即转抗菌肽 D 烟草的种植可能会对土壤生态系统中细菌和真菌的群落数量有显著影响,但其对土壤中利于植物生长的可培养微生物的数量没有显著影响。因此,转抗菌肽 D 烟草有潜在的应用前景,但对其安全性有待进一步评估。

### 3.2 转抗菌肽 D 烟草对土壤微生物遗传多样性的影响

多样性指数反映的是整个群落种类多样性,一般认为在正常环境下,Shannon-Weaver 多样性指数值高;环境受到污染,Shannon-Weaver 多样性指数值低。本实验遗传多样性的研究表明,转抗菌肽 D 烟草对土壤微生物群落的遗传多样性的影响并不显著。沈法富等研究认为转基因抗虫棉根际细菌生理群的 Shannon-Weaver 指数和细菌生理群分布的均匀度均有所下降<sup>[12]</sup>。

分析认为生态系统结构的一个重要特征是具有自我调控和自我修复的功能。微生物与其它生物以及不同种类的微生物出现在一个限定的时空内,它们之间互为环境,相互影响,既相互排斥又相互依赖,表现出复杂的关系。在这些复杂关系的相互作用下,微生物的生态群落结构的改变应该是一个相当漫长的过程。本试验的结果只能说是转抗菌肽 D 烟草与土壤微生物相互作用过程中的一个阶段性的结果,长期种植转抗菌肽 D 烟草的影响还需进行长期的跟踪实验。Lukow 等分析比较了转基因马铃薯和非转基因马铃薯对细菌群落的影响,结果表明转基因马铃薯土壤的细菌多样性随着取样时间的不同而有所变化,而非转基因马铃薯土壤则没有变化<sup>[18]</sup>。这用数据说明了植物与土壤微生物之间有个动态的调整过程,调整之后是造成群落的彻底改

变还是恢复,还需要大量、长期的数据来进一步说明。

在评估转基因作物的环境安全性时,也应该注意到某些常规农业措施已给环境带来巨大的负面影响。现有的转基因作物大部分是转抗菌或抗虫基因,所以转基因作物可显著地减轻农业对化学农药的依赖,一定程度上有利于可持续农业系统的建立<sup>[18]</sup>。因此在考虑转基因作物潜在的生态威胁的同时,也要考虑与化学农药的大量使用相比,究竟哪一个威胁更大。

#### References:

- [1] Su X K, Wang Z Q, Zhang X H, Sun D G. Progress of Research on Tobacco Insect Resistant Genetic Engineering. *Journal of Jilin Agricultural University*, 2005, 27 (2): 167-171.
- [2] Xia B C. Effect of vegetation on structure of soil microbial community. *Chinese Journal of Applied Ecology* Jun., 1998, 9(3): 296-300.
- [3] Wolfenbager L L, Phifer P R. The ecological risks and benefits of genetically engineered plants. *Science*, 2000, 290(5499): 2088-2093.
- [4] Qian Y Q, Wei Sang W G, Ma K p. Effect of transgenic crops on biodiversity. *Acta Ecology Science*, 2001, 21(3): 337-343.
- [5] Ruan M H, Xu Y, Zheng Y, Yang C Y, Zhang J S, Que Y X, Chen R K, Zhang M J. Effects of Transgenic Sugar cane of ScMV-CP Gene on the Soil Microbe. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2008, 29(2): 187-191.
- [6] Zhang J M, Yang W D, Li Y E. Effects of Bt transgenic cottons planting on rhizosphere soil microorganisms at different growth stages. *Journal of Plant Ecology*, 2008, 32 (1): 197-203.
- [7] Wang Z, Zhao T C, Liu X M, Deng X. Advances in research on the impacts of transgenic crops on soil microbe. *Plant Protection*, 2007, 33(4): 15-20.
- [8] Xu G H, Zheng H Y. Analysis manual of microbial in soil. Beijing: Agricultural publishing company, 1986.
- [9] Tatiana V, Jane robb E, Ross Nazar. Direct DNA extraction for PCR-Mediated assays of soil organisms, *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, 61(11): 3972-3976.
- [10] Yang Y H, Yao J, Wang M C. RAPD marker and substrate utilization pattern applied to study microbial community diversity in the soil affected by agriculture chemicals. *Journal of Environmental Science and Health*, 2004, 39 (1): 125-138.
- [11] Wang ZH. Potential effects of Bt transgenic rice on soil micro-ecosystem. *Chinese Journal of Applied Ecology*, Dec. 2005, 16 (12): 2469-2472.
- [12] Shen F F, Han X L, Fan S L. Changes in microbial flora and bacterial physiological group diversity in rhizosphere soil of transgenic Bt cotton. *Acta Ecologica Sinica*, 2004, 24(3): 432-437.
- [13] Park Y, Lee D G, Jang S H, Woo E R, Jeong H G, Choi C H, Hahm K S. A Leu-Lys-rich antimicrobial peptide: activity and mechanism. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2003, 1645(2): 172-182.
- [14] Saxena D, Stoozky G. Insecticidal toxin from *Bacillus thuringiensis* is released from roots of transgenic Bt corn in vitro and in situ. *Federation of European Microbiological Societies microbial ecology*, 2000, 33(1): 35-39.
- [15] Brusetti L, Francia P, Bertolini C, Pagliuca A, Borin S, Sorlini C, Abruzzese A, Sacchi G, Viti C, Giovannetti L, Giuntini E, Bazzicalupo M, Daffonchio D. Bacterial communities associated with the rhizosphere of transgenic Bt 176 maize (*Zea mays*) and its non transgenic counterpart. *Plant and Soil*, 2004, 266(1/2): 11-21.
- [16] Shen R F, Cai H, Gong W H. Transgenic Bt cotton has no apparent effect on enzymatic activities or functional diversity of microbial communities in rhizosphere soil. *Plant and Soil*, 2006, 285(1/2): 149-159.
- [17] Sacena D, Stoozky G. *Bacillus thuringiensis* toxin released from root exudates and biomass of Bt corn has no apparent effect on earthworms, nematodes, protozoa, bacteria and fungi in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 2001, 33(9): 1225-1230.
- [18] Lukow T, Dunfield P F, Liesack W. Use of the T-RFLP technique to assess spatial and temporal changes in the bacterial community structure within an agricultural soil planted with transgenic and non-transgenic potato plants. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Ecology*, 2000, 32(3): 241-247.
- [19] Watrud L S, Seidier R J. Nontarget ecological effects of plant microbial and chemical introductions to terrestrial systems. *Soil chemistry and ecosystem Health. Special Publication 52*. Soil science society of America, Madison, Wisconsin, 1998(52): 313-340.
- [20] Lei B Q. Development and Safety Management of Agriculture Transgenic Creature. *Reclaiming and Rice cultivation*, 2003(2): 3-6.

#### 参考文献:

- [1] 苏贤坤, 汪自强, 张晓海, 孙德国. 烟草抗虫基因工程研究进展. *吉林农业大学学报*, 2005, 27 (2): 167-171.
- [2] 夏北成. 植被对土壤微生物群落的影响. *应用生态学报*, 1998, 9(3): 296-300.
- [5] 阮妙鸿, 许燕, 郑瑶, 杨引毓, 张积森, 阙友雄, 陈如凯, 张木清. 转 ScMV-CP 基因甘蔗对土壤微生物的影响. *热带作物学报*, 2008, 29(2): 187-191.
- [6] 张美俊, 杨武德, 李燕娥. 不同生育期转 Bt 基因棉种植对根际土壤微生物的影响. *植物生态学报*, 2008, 32 (1): 197-203.
- [7] 王振, 赵廷昌, 刘学敏, 邓欣. 转基因作物对土壤微生物多样性影响. *植物保护*, 2007, 33(4): 15-20.
- [8] 许光辉, 郑红元. 土壤微生物分析方法手册. 北京: 农业出版社, 1986.
- [11] 王忠华. 转 Bt 基因水稻对土壤微生物生态系统的潜在影响. *应用生态学报*, 2005, 16(12): 2469-2472.
- [12] 沈法富, 韩秀兰, 范术丽. 转 Bt 基因抗虫棉根际微生物区系和细菌生理群多样性的变化. *生态学报*, 2004, 24(3): 432-437.
- [20] 雷秉乾. 农业转基因生物的发展及安全管理. *垦殖与稻作*, 2003(2): 3-6.