

转基因作物对土壤微生物多样性影响

王 振^{1,2}, 赵廷昌^{2*}, 刘学敏¹, 邓 欣²

(1. 东北农业大学农学院, 哈尔滨 150030;

2. 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 100094)

摘要 土壤微生物的多样性及其活性是保持农业生态系统稳定的基础,而作物的改变对土壤微生物的多样性结构和活性具有显著的影响。转基因作物被引入到农田后所带来的微生物群落的变化及对农业生态系统所带来的不确定因素,已成为研究热点。本文综述了近年来转基因作物对土壤微生物群落影响的研究进展,并且着重介绍了转基因抗虫棉对根际微生物多样性影响的研究进展。

关键词 转基因作物; 土壤微生物群落; 生物安全; 转基因抗虫棉

中图分类号 X 172

Advances in research on the impacts of transgenic crops on soil microbes

Wang Zhen^{1,2}, Zhao Tingchang², Liu Xuemin¹, Deng Xin²

(1. College of Agronomy, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China;

2. State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100094, China)

Abstract Microbes in the soil play a key role in keeping a healthy and sustainable agroecosystem. Introduction of transgenic crops significantly affects the structure and ecological functions of soil-borne plant-associated microorganisms. This paper focused on the effects of transgenic crops and their residues, particularly the insect-resistant transgenic cotton, on various organisms in the rhizosphere in the soil.

Key words genetically modified crops; soil microbes; biosafety; insect-resistant transgenic cotton

土壤是农业生产的基础,而土壤微生物在土壤物质能量转化过程中起着重要的作用。土壤微生物的多样性与活性的保持是农业生态系统健康和稳定

的基础^[1-2]。近年来的研究表明,转基因作物的外源基因和基因表达产物可通过根系分泌物或残茬进入土壤生态系统,进而对土壤生物功能类群及多样性

收稿日期: 2007-02-01

修订日期: 2007-03-06

* 通讯作者 E-mail: tingchangzhao@gmail.com

造成影响^[3-5]。因此,土壤微生物在转基因作物风险评价中占有重要地位^[3-6]。如美国环保局(署)(Environmental Protection Agency, EPA) 2000 年将转基因作物对土壤生态系统的影响列为风险评价的重要组成部分。本文简要综述了近几年转基因作物安全评价方面的发展状况,外源基因及基因表达产物在土壤中的行为以及转基因作物对土壤微生物影响的研究现状。

1 引言

近年来随着转基因作物的大面积种植,转基因作物的生态安全性逐渐受到政府、科学家及民间的关注,研究的主要内容是关于转基因作物与近缘物种之间的水平基因转移、靶标害虫抗性的产生、对非靶标生物和生态系统的影响以及作为食品的安全性等问题。许多专家对其利弊做了分析,但对其是否会导致严重的生态环境问题有不同的观点。目前对于转基因作物对土壤微生物群落影响的途径认识是比较明确的:首先,转基因作物的外源基因主要是通过转基因作物根系分泌物和转基因作物残体降解的途径进入土壤生态系统从而影响土壤微生物群落,使土壤生物功能类群以及土壤生物多样性都有可能因此改变,从而影响整个生态系统的功能与稳定性。其次,转基因作物的遗传改良可能会影响到植物本身的分解速度和碳、氮水平,进而影响土壤生物、生态过程,同样影响到整个生态系统的功能。

2 转基因作物外源基因表达产物及其分解的残体在土壤中的行为及其对土壤微生物的影响

转基因作物外源基因的产物释放到环境尤其是土壤环境后,对土壤生物可能产生的影响已经引起人们的关注。有关转基因作物外源基因的表达产物在土壤中的行为,目前主要以转 Bt 基因作物表达产物 Bt 蛋白在土壤中行为研究为主。Saxena 等通过沙培试验和田间试验证实,根系分泌物中的 Bt 蛋白在土壤中存在 180 d 以后,仍有杀虫活性^[7]。更有科学家研究发现转 Bt 基因玉米收获后,根茬中的 Bt 杀虫蛋白 1 447 d 后才消失^[8]。而 Tapp 等通过生物测定研究纯化的 Bt 蛋白与土壤颗粒结合后的活性表明,结合态 Bt 蛋白的毒性比非结合态的还强^[9]。有研究表明 Bt 毒素在土壤中也能够存留较

长的一段时间,且不易被土壤微生物分解,其活性持续时间与黏粒含量成正比,而与土壤 pH 成反比^[10]。如 Rui 等发现 Bt 棉根系分泌的 Bt 毒素的高活性可持续 2 个月^[11]。Palm 测定转 Bt 蛋白和纯化的 Bt 蛋白降解速度在土壤的浓度均是在前 14 d 里迅速下降,然后缓慢下降,并在几个月内保持一定浓度,而这些较低含量的 Bt 蛋白可能会对非靶标的土壤微生物产生不利影响,并且随着转 Bt 植物的不断种植而积累^[12]。但 Graham 等报道,在连续种植了 3~6 年的转 Bt 棉花田中,用 ELISA 和生物检测法未检测到这种 Bt 毒蛋白^[13],认为种植了转 Bt 棉花后残留在田中的植株残体向土壤释放的 Bt 毒蛋白含量很低,生物活性也不足以达到能检测到的水平。芮玉奎通过对转 Bt 棉花的根际土壤中毒蛋白的周年变化的试验研究表明, Bt 毒蛋白在盛蕾期到棉铃发育期之间毒蛋白降解速度加快,最快时达到 4 ng/ g · h;到吐絮期以后毒蛋白的降解明显放慢,降低几十倍,降解速度不到 0.2 ng/ g · h。但到棉花收获后,毒蛋白在抗虫棉根际土壤中残留降低到常规棉根际土壤的水平,据此认为转基因抗虫棉毒蛋白残留不会对生态环境造成长时间的影响,但会对当季作物造成不利影响^[14]。

由于作物被收获的只有一小部分,大部分会残存或重新返回土壤中(秸秆还田等),增加了土壤微生物群落与作物残体内存在的转基因产物的接触时间。另外,作物残体在土壤中逐步分解的过程,其降解产物也会对土壤微生物群落产生一系列影响。James 报道,Bt 毒素可通过枯枝落叶和根系分泌物残留在土壤中,与土壤黏粒结合毒性难以降解^[15]。Donegan 等对转蛋白酶抑制剂 I 基因烟草中蛋白酶抑制剂在土壤中的残留进行了分析,发现含转基因烟草叶片的垃圾袋埋入土壤后 57 d 后仍能检测到 0.05% 的蛋白酶抑制剂^[16]。Widner 等利用枝叶埋入土壤法对转基因烟草中抗生素基因在土壤微生物生态系统中的残留进行了研究,发现 120 d 之后土壤中仍能检测到 0.14% 的外源抗生素序列^[17]。Hoffmann 等发现,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^[18]。钱迎倩等报道,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^[19]。

由上可知,转基因作物的外源基因产物在土壤环境中的作用还存在争议,但大多数科学家倾向于有影响,它的存在是引起土壤中微生物变化的一个原因。因此在转基因作物安全评价体系中转基因作物的外源基因产物在土壤的行为应该是评估的重要内容,而相应的土壤中微生物的变化也应是重要的评估内容。

3 转基因作物的遗传改良对土壤微生物的影响

Dunfield 研究了在加拿大的 4 个不同田块连续 2 年种植 4 种转抗除草剂基因的油菜和 4 种常规油菜品种对根际微生物多样性的影响^[20]。通过分析表明,转基因油菜品种 Quest 的根内和根际细菌群落与常规品种 Excel 和 Fairview 有差异。转基因油菜的根际微生物群落落在一些脂肪酸上显著偏高,表明其微生物群落组成发生了变化。2003 年 Dunfield 等又继续对这个问题进行了进一步的研究^[21]。他研究了连续 2 年种植转抗除草剂基因油菜(抗草甘膦)和常规油菜以及未种植油菜的田块的微生物群落,结果表明土壤微生物群落随着品种和生长季节而发生,在生长季节的某些时间观察到了转基因植物品种的差异。所有的分析表明,在越冬后转基因油菜和非转基因油菜的微生物群落没有差异。转基因植物对微生物群落的影响是暂时的,不会持续到下一个生长季节。

Holger Heuer 等研究了转 T4 溶菌酶马铃薯,指出 T4 溶菌酶表达的马铃薯与对照相比没有发现根际群落有偏差,是季节、田块的位置或年份相关的环境因子而不是转基因植物表达的 T4 溶菌酶影响了根际群落^[22]。Jana Lottmann 等研究了转 T4 溶菌酶马铃薯根际产生植物激素吲哚乙酸的有益细菌和对病原菌 *Erwinia carotovora* 和 *Verticillium dahliae* 有抗性的抗生素的变化,也得出相似的结论,认为转 T4 溶菌酶基因对这些微生物的影响与环境中的自然变异相比是很小的^[23]。Jana Lottmann 等还将利福平抗性突变的两个植物结合细菌用于接种 T4 溶菌酶表达的转基因马铃薯、转基因对照马铃薯和非转基因的亲本马铃薯块茎上,评估转基因马铃薯产生的 T4 溶菌酶对这些接种菌生存的影响^[24]。结果发现,在所有取样时间,根际和块茎表面群落的 DGGE 模式在接种和非接种的马铃薯之间没有差异。

Griffiths 等研究了转两种凝集素伴刀豆蛋白 A (ConA)和雪花凝集素(GNA)的马铃薯以及纯化的凝

集素对土壤微生物群落的影响^[25]。实验室研究发现土壤细菌群落没有检测到直接影响。田间试验表明转 GNA 的马铃薯在收获时改变了根际微生物群落,但是这种效应不能从一个季节持续到下一个季节,转 GNA 马铃薯对后来种植的大麦生长没有显著影响。

Stephen Gyamfi 等研究了转 Basta 抗性的油菜的种植以及相应的除草剂的使用对根际 *Pseudomonas* 和 *Eubacterial* 群落结构的影响^[26]。试验结果表明,转基因植物的根际微生物群落发生了轻微的变化,但是这个变化与植物生长带来的变化相比是很微弱的。在生长后期都检测到了两种除草剂对 *Pseudomonas* 和 *Eubacterial* 群落结构的暂时的改变。Saxena 等把转 Bt 基因玉米和非 Bt 转基因玉米以及空白土壤对照相比,细菌、放线菌和真菌在数量和类群上没有显著差异^[27]。

而 Thomas Lukow 用末端限制性片段长度多态性(T-RFLP)分析了转 *GUS* 基因和 *Barnase/Barstar* 基因马铃薯和非转基因马铃薯的土壤细菌群落,发现它们有显著的差异^[28]。S. D. Siciliano 的研究也表明抗除草剂草甘膦的转基因油菜与对照相比根内有更多的 *Flavobacterium* 和 *Pseudomonas* 分离菌,而 *Bacillus*、*Micrococcus* 和 *Variovorax* 分离较少^[29]。根际与对照相比 *Arthrobacter* 和 *Bacillus* 分离菌较少。与对照相比转基因油菜的微生物多样性减少。G. D. Di Giovanni 对转木质素过氧化酶基因的苜蓿进行了研究,转基因和非转基因亲本之间的 Biolog GN 的细菌群落的 ERIC-PCR 指纹聚类分析表明在根际富集的细菌类型有区别^[30]。陈敏、应文荷通过研究转 Bt 水稻与常规水稻根际土壤,初步判断转 Bt 水稻根际土壤的细菌生理类群无论在数量或是结构组成上均明显不同于常规水稻^[31]。

4 转基因棉对根际微生物多样性的影响

目前转基因抗虫棉所用的基因主要是 Bt 杀虫蛋白基因(*Bacillus thuringiensis*, Bt)、豇豆胰蛋白酶抑制剂基因(cowpea trypsin inhibitor, CpTI)、植物凝集素基因等。中国、美国、印度等几个国家种植了转基因抗虫棉,其中我国是世界上抗虫棉种植面积最大的国家。我国于 1988 年启动了转基因抗虫棉的研究,十多年的研究取得了丰硕的成果,目前我国已审定了 16 个抗虫棉品种,其中单价抗虫棉 13 个,双价棉 3 个。累计推广面积达 600 万 hm^2 ,累计产生的社会经

济效益超过 120 亿元,显示了巨大的经济效益^[32]。

伴随着转基因棉花的大面积种植,转基因棉花对土壤微生物群落的影响逐渐成为研究热点。Donegan 等研究发现,2 个转 Bt 基因的棉花品系的处理小区,细菌和真菌的数量显著高于其他处理,而另一个转 Bt 基因的棉花品系及纯化的 Bt 蛋白则不显著^[33]。通过微生物群落物质利用和 DNA 指纹分析也发现上述变化。他认为转 Bt 基因棉可能由于遗传修饰后的植株的生理生化特性发生变化而对土壤微生物产生影响,并非表达产物的直接影响。Oger 等研究转产冠瘿碱基因植物根际分泌物对细菌群落的影响,结果发现,虽然转基因植物和非转基因植物根际的总细菌数无明显差异,但在转基因植物根际中利用冠瘿碱的细菌种群的个体数量是非转基因植物的 80 倍,表明转基因植物根系分泌物改变了根际微环境,导致细菌群落结构发生变化^[34]。徐征研究指出抗虫棉土壤的微生物种类、组成与常规棉差异显著^[35]。土壤中好氧细菌和真菌数量显著增加,芽孢杆菌和链球菌是优势种。Yudina 等发现 4 种不同转 Bt 基因棉花促使了土壤中细菌和真菌数量发生短暂性的显著增加^[36]。Watrud 和 Seidier 也报道,转 Bt 基因棉花可以提高土壤中细菌和真菌的数量^[37]。Trevors 等认为转基因 Bt 抗虫作物的遗传体在土壤中被降解后,对土壤微生物活动过程(硝化作用、固氮作用等)的影响,可导致土壤生物地球化学循环的严重变化^[38]。

但是,也有转基因作物对微生物群落没有影响的报道。Tapp^[39]与 Stotzky^[10]发现与土壤结合的 Bt 毒素不能作为碳源被微生物利用。沈法富等在大田栽培条件下,以转 Bt 基因抗虫棉 GK212 和常规棉花泗棉 3 号作为材料,研究根际土壤微生物的变化,表明不同年份和生育期棉花根际微生物数量存在差异,但年度间和相同的发育时期棉花根际微生物的数量变化趋势一致^[40]。裴克全采用对原核生物核糖体小亚基 16S rDNA 全序列分析的方法,研究转基因抗虫棉根际土壤微生物的多样性,也没有发现抗虫棉田与非抗虫棉田间有显著的差异^[41]。

5 结束语

土壤中的微生物在农业生态系统中不仅可以调节植物生长发育、抑制病原微生物的生长,而且在生态系统中的营养元素矿化、土壤肥力的保持和提高以及能量转化和物质循环等方面具有其他生物无法代替的作用。随着各种抗虫、抗病等转基因作物不

断选育种植,这种变化对土壤微生物存在潜在危险而可能造成对农业生态系统的影响成为研究热点。但正如上面所述,有的学者认为转基因作物对生态环境没有影响,但也有学者认为转基因作物对生态环境是有影响的,本人倾向于后者。因为耕作作物作为农业生态系统中重要的组成部分,它的改变必然会影响到农业生态系统中其他的组成部分。

转基因作物对土壤生物的影响是复杂的,多方面的,例如它所产生的特有蛋白是否会对其他生物产生毒害作用,发生毒害作用所需要的积累时间有多长;为了适应转基因作物而改变的生产劳动方式对原有的生物产生的负面影响有多大等等。还有它与现有的策略是否相冲突。如 Tabashnik 认为,转基因作物使害虫数量降低,对保持天敌的有效数量会有负面影响^[42]。这些结果意味着转基因作物与依赖健康天敌数量的 IPM 防治策略及生物保育存在潜在的冲突。另一方面,在美国威斯康星(Wisconsin)进行的田间试验发现,在转 Bt 马铃薯田里捕食性昆虫和寄生性昆虫的数量要比传统的采用化学杀虫剂防治非转基因马铃薯害虫的田间大。但是这个试验没有检测未施或少施化学杀虫剂的传统马铃薯田间的情况^[43]。这些结果说明,在评价转基因抗虫作物的作用时,必须与现在的各种防治措施进行比较,包括频繁使用化学药剂、少用或根本不用化学药剂的情况。

因此对于转基因作物的评价必须建立生态学意义的评估方法和理论体系并加以科学验证,尤其是需要加强分子生物学方法的应用,以获得更精确的评价。同时应当认识到转基因生物安全性的研究是一件长期而艰苦的任务,也许需要 10 年、20 年或者更多的积累。

参考文献

- [1] FINLAY B J, MABERLY S C, COOPER J I. Microbial diversity and ecological function[J]. *Oikos*, 1997, 80: 209 - 213.
- [2] GROFFMAN P M, BOHLEN P J. Soil and sediment biodiversity-cross-system comparisons and large-scale effects[J]. *BioScience*, 1999, 49: 139 - 148.
- [3] ANGLE J S. Release of transgenic plants: biodiversity and population-level considerations[J]. *Mol Ecol*, 1994, 3: 45 - 50.
- [4] 王洪兴,陈欣,唐建军,等. 释放后的转抗病虫基因作物对土壤生物群落的影响[J]. *生物多样性*, 2002, 10(2): 232 - 237.
- [5] 王洪兴,陈欣,唐建军,等. 转 Bt 基因水稻秸秆降解对土壤微生物可培养类群的影响[J]. *生态学报*, 2004, 24(1): 89 - 94.
- [6] JEPSON P C, CROFT B A, PRATT G E. Test systems to deter-

- mine the ecological risks posed by toxin release from *Bacillus thuringiensis* genes in crop plants[J]. *Mol Ecol*, 1994, 3: 81 - 89.
- [7] SAXENA D, FLORES S, STOTZKY G. Bt toxin is released in root exudates from 12 transgenic corn hybrids representing three transformation events[J]. *Soil Biol Biochem*, 2002, 34: 133 - 137.
- [8] SIMS S R, REAM J E. Soil inactivation of the insecticidal protein within transgenic cotton tissue: laboratory microcosms and field studies[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1997, 45 (6): 1502 - 1505.
- [9] TAPP H, STOTZKY G. Insecticidal activity of the toxins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* and *tenebrionis* adsorbed and bound on pure and soil clays[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, 61(5): 1786 - 1790.
- [10] STOTZKY G. Persistence and biological activity in soil of insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis* and of bacterial DNA bound on clays and humic acids[J]. *J Environ Qual*, 2000, 29: 691 - 705.
- [11] RUI Y K, YI G X, Zhao J, et al. Changes of Bt toxin in the rhizosphere of transgenic Bt cotton and its influence on soil functional bacteria[J]. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2005, 21: 1279 - 1284.
- [12] PALM C J, SCHALLER D L, DONEGAN K K, et al. Persistence in soil of transgenic plant produced *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* delta - endotoxin[J]. *Can J Microbiol*, 1996, 42(12): 1258 - 1262.
- [13] GRAHAM H, JAMES B S, JON A M, et al. No detection of Cry1Ac protein in soil after multiple years of transgenic Bt cotton (Bollgard) use[J]. *Environ Entomol*, 2002, 31 (1): 30 - 36.
- [14] 芮玉奎. 转基因抗虫棉生产安全性的研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2003.
- [15] JAMES R R. Utilizing a social ethic toward the environment in assessing genetically engineered insect-resistance in trees[J]. *Agric Human Values*, 1997, 14: 237 - 249.
- [16] DONEGAN K K, SEIDLER R, 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 population[J]. *Journal of Applied Ecology*, 1997, 34 (3): 767 - 777.
- [17] WIDMER F, SEIDLER R J, WATRUD L S. Sensitive detection of transgenic plant marker gene persistence in soil microcosms[J]. *Molecular Ecology*, 1996, 5 (5): 603 - 613.
- [18] HOFFMANN T, GOLZ C, SCHIEDER O. Foreign DNA sequences are received by a wild-type strain of *A. niger* after coculture with transgenic higher plants[J]. *Curr Genet*, 1994, 27: 70 - 76.
- [19] 钱迎倩, 马克平. 经遗传修饰生物体的研究进展及其释放后对环境的影响[J]. *生态学报*, 1998, 18 (1): 1 - 9.
- [20] DUNFIELD K E, GERMIDA J J. Diversity of bacterial communities in the rhizosphere and root interior of field-grown genetically modified *Brassica napus* [J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2001, 38: 1 - 9.
- [21] DUNFIELD K E, GERMIDA J J. Seasonal changes in the rhizosphere microbial communities associated with field-grown genetically modified canola (*Brassica napus*) [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(12): 3710 - 3718.
- [22] HOLGER HEUER, KROPPESTEDT R M, JANA LOTTMANN, et al. Effects of T4 lysozyme release from transgenic potato roots on bacterial rhizosphere communities are negligible relative to natural factors[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2002, 68(3): 1325 - 1335.
- [23] JANA LOTTMANN, HOLGER HEUER, KORNELIA SMALLA, et al. Influence of transgenic T4-lysozyme-producing potato plants on potentially beneficial plant-associated bacteria[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 1999, 29: 365 - 377.
- [24] JANA LOTTMANN, HOLGER HEUER, JOHANN DE VRIES, et al. Establishment of introduced antagonistic bacteria in the rhizosphere of transgenic potatoes and their effect on the bacterial community [J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2000, 33: 41 - 49.
- [25] GRIFFITHS B S, GEOGHEGAN I E, ROBERTSON W M. Testing genetically engineered potato, producing the lectins GNA and Con A, on non-target soil organisms and processes [J]. *Journal of Applied Ecology*, 2000, 37(1): 159 - 170.
- [26] STEPHEN GYAMFI, ULRICH PFEIFER, MICHAEL STIER-SCHNEIDER, et al. Effects of transgenic glufosinate-tolerant oilseed rape (*Brassica napus*) and the associated herbicide application on eubacterial and *Pseudomonas* communities in the rhizosphere [J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2002, 41: 181 - 190.
- [27] SAXENA D, STOTZKY G. Insecticidal toxin from *Bacillus thuringiensis* is released from roots of transgenic Bt corn *in vitro* and *in situ* [J]. *FEMS Microbiol Ecol*, 2000, 33: 35 - 39.
- [28] 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 [J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2000, 32: 241 - 247.
- [29] SICILIANO S D, GERMIDA J J. Taxonomic diversity of bacteria associated with the roots of field-grown transgenic *Brassica napus* cv. Quest, compared to the non-transgenic *B. napus* cv. Excel and *B. rapa* cv. Parkland [J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 1999, 29: 263 - 272.
- [30] DI GIOVANNI G D, WATRUD L S, SEIDLER R J, et al. Comparison of parental and transgenic alfalfa rhizosphere bacterial communities using bioglog GN metabolic fingerprinting and enterobacterial repetitive intergenic consensus sequence-PCR (ERIC-PCR) [J]. *Microb Ecol*, 1999, 37: 129 - 139.
- [31] 陈敏, 应文荷. 转 Bt 水稻与常规水稻根际土壤细菌类群的比较研究[J]. *杭州师范学院学报(自然科学版)*, 2005, 4(4): 290 - 292.
- [32] 郭三堆, 崔洪志. 我国抗虫棉的研究现状及展望[C]// 中国-欧盟农业生物技术研讨会资料汇编. 2003: 97 - 102.

- [33] DONEGAN K K, PALM C J, FIELAND V J. Changes in levels, species and DNA fingerprints of soil microorganisms associated with cotton expressing the *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* endotoxin[J]. Applied Soil Ecology, 1995, 2(2): 111 - 777.
- [34] OGER P, PETIT A, DESSAUX Y. Genetically engineered plants producing opines alter their biological environment [J]. Nature Biotechnol, 1997, 15: 369 - 372.
- [35] 徐 征. 农业转基因生物对土壤生态系统功能影响的研究进展[J]. 中国农学通报, 2004, 20(4): 47 - 50.
- [36] YUDINA T G, BURTSEVA L I. Activity of deltaendotoxins of four *Bacillus thuringiensis* subspecies against rokaryotes [J]. Microbiol, 1997, 66: 25 - 31.
- [37] WATRUD L S, SEIDLER R J. Nontarget ecological effects of plant, microbial, and chemical introductions to terrestrial systems, soil chemistry and ecosystem health[C]. Wisconsin: Special Publication 52. Soil Science Society of America, 1998: 313 - 340.
- [38] TREVORS J T, KUIKMAN P, WATSON B. Transgenic plants and bio-geochemical cycles [J]. Molecular Ecology, 1994, 3: 57 - 64.
- [39] TAPP H, STOTZKY G. Insecticidal activity of the toxin from *Bacillus thuringiensis* subspecies *kurstaki* and *tenebrionis* adsorbed and bound on pure and soil clays[J]. Appl Environ Microbiol, 1995, 61: 1786 - 1790.
- [40] 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[J]. 生态学报, 2004, 24(3): 432 - 437.
- [41] PEI K Q. Biosafety information construction and preliminary study of molecular ecology of transgenic cotton rhizo spherical microbes[D]. Beijing: Institute of Botany, CAS. 2001.
- [42] TABASHNIK B E. Evolution of resistance of *Bacillus thuringiensis*[J]. Ann Rev Ent, 1994, 39: 47 - 49.
- [43] HOY C W, FELDMAN J, GOULD F, et al. Naturally occurring biological controls in genetically engineered crops[M] // BARBOSA PED. Conservation Biological Control. San Diego: Academic Press, 1998: 185 - 205.