

转基因抗虫棉对棉田土壤细菌数量及群落结构的影响

陈俊辉, 王扬扬, 郑 婕, 李 荣, 闫 新, 李顺鹏, 蒋建东 *

(南京农业大学生命科学学院, 农业部农业环境微生物重点开放实验室, 南京 210095)

摘 要:以转基因抗虫棉(GK12、33B)及其亲本对照(SM、5415)为材料,利用稀释平板法和基于 rRNA 基因 PCR 扩增的变性梯度凝胶电泳(DGGE)技术研究了棉田土壤中细菌数量和群落结构在转基因棉种植第一年的动态变化。结果表明:棉田土壤细菌数量随棉花生育期逐渐增加,于花铃中期达到最大值,转基因棉与其亲本之间细菌数量差异不显著。放线菌数量随生育期变化较小,转基因棉与其亲本之间在花铃中期出现显著差异。DGGE 结果显示,转基因棉和亲本都存在丰富且相似的条带,聚类分析表明大多数转基因棉和亲本间条带相似性达 80%以上,根据不同的生理期分成 2 个簇;主成分分析表明转基因棉和亲本细菌群落结构没有显著差异,但在不同生育期存在一定差异,表明生育期是影响细菌群落结构的主要因素,与聚类分析结果相吻合。研究结果初步说明转基因棉对棉田土壤细菌数量和群落结构没有显著影响。

关键词:转基因抗虫棉;细菌群落;变性梯度凝胶电泳(DGGE);主成分分析

中图分类号:S154.36 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-2043(2012)04-0736-07

Impact of Transgenic Cottons on the Number and Community Structure of Bacteria in the Cotton Soils

CHEN Jun-hui, WANG Yang-yang, ZHENG Jie, LI Rong, YAN Xin, LI Shun-peng, JIANG Jian-dong*

(Key Laboratory of Microbiological Engineering of Agricultural Environment, Ministry of Agriculture, College of Life Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: Dynamic changes of the number and community structure of bacteria in the soils of transgenic cottons(GK12 and 33B) together with their parents(SM and 5415) were systematically investigated using traditional plate counting and rRNA gene based PCR-DGGE methods. The results showed that the total number of bacteria increased with the reproductive periods of cottons, and the largest number appeared at the middle blossoming stage of cottons. No significant differences in the numbers of bacteria between transgenic cottons and their parents were found. The number of actinomycete changed little during the reproductive periods. However, significant differences were observed between the transgenic cottons and their parents at the blossoming stage. The results from PCR-DGGE showed that there were abundant and similar bands among all transgenic cottons and their parents, and the similarities between most of these samples were above 80%. Samples were divided into two clusters according to different reproductive periods. Principal components analysis showed that there were no significant differences between the transgenic cottons and their parents, while little differences were observed among different reproductive periods, which was consistent with the cluster analysis. These results indicated that reproductive period was the most important factor affecting community structure of bacteria. In our studies, it was found that transgenic cottons did not have significant impact on the number and community structure of bacteria in cotton soils.

Keywords: transgenic cotton; bacterial community; DGGE; principal components analysis(PCA)

随着科学技术的进步,科研工作者们将外源重组 DNA 导入作物中并结合常规育种技术培育出了一大

批转基因作物。根据农业生物技术应用国际服务组织(ISAAA)的最新报告^[1],在 2010 年转基因作物商业化 15 年之际,全球累计种植面积首次超过了 10 亿 hm^2 。2010 年转基因作物的种植面积为 1.48 亿 hm^2 ,与 1996 年的 170 万 hm^2 相比,增长达 87 倍,使转基因作物成为现代农业史上应用最为迅速的作物技术。因苏云金芽孢杆菌(Bt)的杀虫基因可以产生杀虫晶体

收稿日期:2011-10-25

基金项目:国家转基因作物新品种培育重大专项(2009ZX08011-028B)

作者简介:陈俊辉(1985—),男,浙江兰溪人,硕士研究生,主要从事环境微生物学研究。E-mail:junhui5@126.com

* 通讯作者:蒋建东 E-mail:jiang_jjd@njau.edu.cn

蛋白 ICP(Insecticidal crystal protein),可高选择性地毒杀鳞翅目、双翅目和鞘翅目的昆虫而被广泛应用于转基因抗虫棉^[2],Perlak 等^[3]在 1990 年首次成功将苏云金杆菌的杀虫基因转入棉花获得抗虫植株。目前,转基因抗虫棉中报道的 Bt 杀虫蛋白有 Cry1Ab^[4]、Cry1A(C)^[5]、Cry11A 和 Cry1AV^[6]等几种。2010 年全球转基因棉种植面积达 2 100 万 hm², 占全球转基因作物种植面积的 14%, 为全球第三大转基因作物^[1]。2009 年我国转基因抗虫棉累计推广面积达 0.21 亿 hm²,产值超过 440 亿元,占全球面积的 2/3^[7],且种植面积有逐年扩大的趋势。

转基因棉的种植给我国带了显著的经济、社会和生态效益。据统计,每公顷抗虫棉化学农药用量减少约 47 kg,生产成本降低 20%~23%,平均每公顷增收节支 2 400 元^[8]。迄今为止,国产抗虫棉累计推广种植约 2 000 多万 hm², 每年减少农药用量 1~1.5 万 t,带来直接经济效益 590 多亿元,并且有效保护了农业生态环境和人民健康^[9-10]。然而转基因作物大面积种植带来的诸如外源基因的时空逃逸^[11]及导致的潜在环境和生态风险一直是备受争议的生物安全问题之一^[12]。研究发现,转 Bt 基因作物的根系可表达毒素蛋白,并通过根系分泌物不断地向土壤中释放外源基因及其表达产物^[13]。Zwahlen 等^[14]研究证明转基因作物通过植株残留和根际分泌释放到土壤中的蛋白数周后才能降解,在某些环境下其活性甚至可保持 200 d 以上。随着作物的生长,根际分泌的 Bt 毒素会逐渐增多,从而可能影响土壤中的微生物^[15]。尽管土壤本身也会产生少量的 Bt 晶体蛋白(约 0.25 g·hm⁻²),但是大多数转 Bt 作物会大量释放 Bt 毒素,其数量约 650 g·hm⁻²,是土壤本身释放量的 2 600 倍^[16]。因此,转基因作物通过根系分泌物或残体对土壤具有潜在的影响,并导致土壤生物多样性和活性的改变^[17],可能对土壤微生物产生有害或有益的影响^[18-19]。土壤微生物是有机质分解和养分转化循环等地球生物化学过程的重要参与者,其数量和群落结构是表征土壤微生物生态系统状况的重要信息,且土壤微生物对土壤环境因素变化极为敏感。因此,转基因棉花对土壤微生物数量及群落结构的影响是评价转基因棉生态安全性的重要组成部分^[20]。为了进一步加强转基因棉安全性认识,本研究在大田试验条件下,利用稀释平板法研究了土壤细菌数量的变化,同时为了避免可培养方法的缺陷,采用不依赖于培养的变性梯度凝胶电泳(DGGE)技术探讨了转基因抗虫棉对棉田土壤细菌

群落结构的影响,旨在为转基因棉花的安全性评价提供部分基础数据。

1 材料与方法

1.1 试验设计

本转基因棉试验基地位于湖北省武汉市武湖农场,试验用棉花品种为转基因单价抗虫棉 GK12(Cry1A),转基因双价抗虫棉 33B(Cry1A+CpT1)以及其亲本非转基因棉 SM 和 5415,均由中国农科院棉花研究所提供。试验采用随机区组设计,设转基因单价抗虫棉与其亲本,转基因双价抗虫棉与其亲本 4 个处理,每个处理 3 个重复,小区面积 6 m×6 m,各小区之间设 3 行保护行,前茬作物为普通棉花,收获后闲置。土壤类型为黄棕壤,有机碳 12.9 g·kg⁻¹,全氮 1.32 g·kg⁻¹,全磷 1.55 g·kg⁻¹,速效钾 86.72 mg·kg⁻¹,pH 6.7。播种时间为 2010 年 4 月上旬,水肥管理和生产条件下的大田管理一致。

1.2 样品采集

土壤样品采集按照棉花的生育期分别于苗期、盛花期、花铃前期、花铃中期、花铃后期和吐絮期采样,刮掉表层 1~2 cm 土壤,用灭菌采土器挖取距棉花主根 5 cm 的 2~15 cm 土壤,采用五点法取样,把每一点挖取的土样混合形成一个样品,装入无菌塑料袋,冰袋低温保存,带回实验室先进行土壤微生物平板计数,后转入-20℃冰箱保存以备提取土壤总 DNA。样品采集和处理设置见表 1。

表 1 样品采集和处理

Table 1 Sample collection and treatments

棉花生长期	转基因单价 抗虫棉 GK12	单价亲本 SM	转基因双价 抗虫棉 33B	双价亲本 5415
苗期	A1	B1	C1	D1
盛花期	A2	B2	C2	D2
花铃前期	A3	B3	C3	D3
花铃中期	A4	B4	C4	D4
花铃后期	A5	B5	C5	D5
吐絮期	A6	B6	C6	D6

注:字母代表处理,数字代表生长期。

1.3 稀释平板法计数可培养细菌和放线菌数量

准确称取 10 g 土样,加入盛有 90 mL 无菌水的三角瓶中,置于振荡器中室温振荡 20 min 制成土壤悬液。同时称取等量土壤于 105℃烘干 8 h,计算土壤干重百分率。吸取 1 mL 土壤悬液于 9 mL 无菌水中,依次按 10 倍稀释,稀释到 10⁻⁶ 备用。细菌采用 10⁻⁴~

10^{-6} 稀释度接种,放线菌采用 10^{-3} ~ 10^{-5} 稀释度接种,每一稀释度重复3次。取0.1 mL不同稀释倍数的土壤悬液加于培养基表面,立即用玻璃刮刀将悬液均匀地涂抹于琼脂表面。细菌于28~30℃恒温箱中培养3 d,放线菌培养7 d。选取菌落数在20~200的培养皿进行计数。培养基的制作按文献[21]进行,细菌用牛肉膏蛋白胨琼脂培养基,放线菌用改良高氏一号培养基。每克干土中菌数=菌落平均数×稀释倍数/干土所占百分比。

1.4 土壤细菌 16S rRNA 基因 V3 区的 PCR 扩增

土壤微生物总 DNA 提取与纯化参考文献[22]。

土壤细菌 16S rRNA 基因 V3 区的 PCR 扩增引物为 338FGC(5'-CGCCCGCCGCGCGCGGCGGGCGGGCGGGGCACGGGGGCTACGGGAGGCAGCAG-3') 和 518R(5'-GTATTACCGCGCTGCTGG-3')[23],该引物由上海英骏公司合成。PCR 扩增体系:无菌双蒸水 30.7 μ L,10×PCR 缓冲液(含 $MgCl_2$)5.0 μ L,4×dNTP 混合物($2.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)4.0 μ L,引物 338FGC($10\text{ pmol}\cdot\mu\text{L}^{-1}$)2.0 μ L,引物 518R($10\text{ pmol}\cdot\mu\text{L}^{-1}$)2.0 μ L,模板 DNA($1\times 10^{-3}\text{ pmol}\cdot\mu\text{L}^{-1}$)1.0 μ L,BSA(2%)5.0 μ L,Taq DNA 聚合酶 2 U。扩增的片段长度为 250 bp,采用 Bio-Rad 温度梯度变化 PCR 仪,其反应条件为:94℃变性 5 min,94℃变性 1 min,65℃退火 30 s,72℃1 min 延伸,以后每 2 个循环退火温度降低 1℃,20 个循环,94℃变性 30 s,55℃退火 30 s,72℃1 min 延伸,15 个循环,72℃最终延伸 8 min,4℃保存。

1.5 变性梯度凝胶电泳(DGGE)

用 BIO-RAD 基因突变仪分离 PCR 产物,使用 8%丙烯酰胺凝胶,电泳缓冲液为 1×TAE,变性梯度 35%~55%($7\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 尿素和 40% 去离子甲酰胺为

100%变性),PCR 产物上样量 15 μ L + 3 μ L 6×Loading buffer。电压 140 V,60℃,电泳 8 h,采用硝酸银染色法[24]。BIO-RAD 公司 Versa DOC 仪器系统下成像。

3 个重复样品均经 DGGE 检测,其结果具有高度重复性。

1.6 DGGE 图像处理与分析

用 Quantity one(4.6.2)软件对 DGGE 图像中条带的位置和亮度进行数字化处理。根据数字化处理结果,使用 Quantity one 软件进行聚类分析,用 Minitab 15.0 进行主成分分析。

1.7 数据处理

所得数据经 Excel 处理后,采用 SPSS 18.0 软件进行单因素方差(One-Way ANOVA)分析($P<0.05$)。

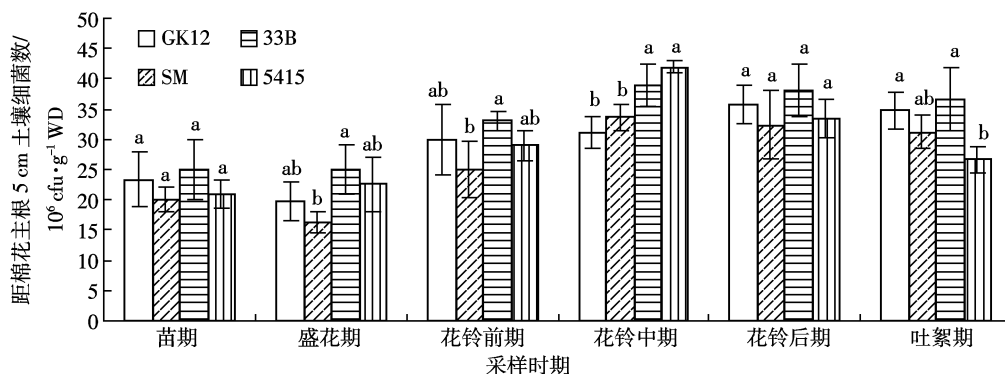
2 结果与分析

2.1 转基因抗虫棉对棉田土壤细菌数量的影响

由图 1 可知,转基因和非转基因棉田土壤细菌数量都随棉花生育期具有增加的趋势,表现在苗期和盛花期较少,花铃前期开始增加,花铃中期和后期达最大,但吐絮期有所下降。转基因抗虫棉与亲本棉田土壤细菌数量表现出少量差异,如盛花期转基因单价棉 GK12 的细菌数量高于亲本 SM,在吐絮期 33B 高于 5415,在花铃中期 33B 和 5415 高于 GK12 和 SM。然而,转基因棉与其亲本细菌数量在总体上无显著差异。

2.2 转基因抗虫棉对棉田土壤放线菌数量的影响

由图 2 可知,棉田土壤放线菌数量总体变化不大。双价转基因棉 33B 与 5415 放线菌数量在盛花期、花铃前期和中期有差异。单价转基因棉 GK12 在苗期、花铃中期和吐絮期有差异,都表现为 GK12 数量比其亲本 SM 多。



上图所示为同一时期不同品种的比较,直方柱上标相同字母表示处理间差异不显著,LSD: $P>0.05$,下同

The figure above shows comparison among different varieties at the same stage.

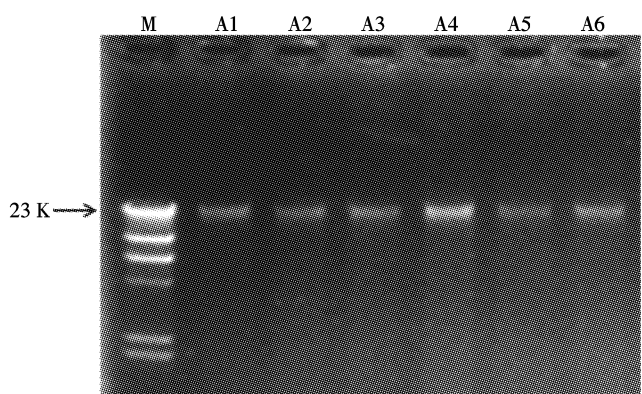
The same letters over the bars mean no significant difference at $P>0.05$ (LSD), the same below.

图 1 转基因抗虫棉对棉田土壤细菌数量的影响

Figure 1 Effect of transgenic cotton on total number of bacteria in cotton soils

2.3 棉田土壤样品的 PCR-DGGE 分析

将试剂盒纯化后的土壤总 DNA 抽提物用 1% 的琼脂糖凝胶进行电泳, 所提取的土壤微生物总 DNA 质量较好、无杂带, 提取的 DNA 在量上有些差异(图 3)。用紫外分光光度计测定 OD_{260} 、 OD_{230} 和 OD_{280} 值, 通过之间的比值来检测纯度, $OD_{260/280}$ 均在 1.65~1.80 之间, 符合 PCR 扩增所需的浓度和纯度。



(M: λ DNA/Hind III Marker; A1: seedling stage; A2: budding stage; A3~A5: three periods of blossoming and boll-forming phase; A6: wadding stage)

图 3 土壤微生物总 DNA 电泳图(GK12)

Figure 3 Agarose gel electrophoresis of genomic DNA of soil microorganisms of sample GK12

3 个重复样品的 16S rRNA 基因 V3 区片段的 DGGE 图谱具有较高重复性, 这里只选取了其中 1 个重复(图 4)。土壤样品电泳图谱中共有的条带数目可以反映不同样品之间微生物群落结构的相似性, 而亮度可以大概反映数量差异。据此比较各个时期土壤细菌条带, 发现转基因棉与其亲本棉土壤细菌具有很多共同条带, 如图 4 中标注的数字 1~10, 这些共有条带在整个 DGGE 图谱中占有很大的比例, 而且在整个生育期内条带亮度基本相近, 说明这些类群的细菌不受转基因棉花和生育期的影响, 可能对构成农田微生

态环境结构和稳定性起着重要作用。从图 4 中也看到, 随着棉花的生长, 出现了一些特异性条带, 如字母 a~f 所示, 这些条带在转基因棉和亲本中也共同存在, 且在花铃中期、后期和吐絮期表现显著, 如单价转基因棉图谱中(左)字母 a 标注的条带, 其代表的细菌数量在花铃后期数量最多, 吐絮期略有减少。同样, 在双价转基因棉图谱中(右)字母 d 标注的条带, 其代表的细菌数量随生育期逐渐变多。花铃期是整个棉花生育期中代谢活性最旺盛的时期, 这个时期棉花吸收大量养分, 同时也会分泌大量的根系分泌物, 并且由于气温的升高, 可能促进了这一部分特异类群微生物的生长。对比转基因棉和亲本的相似性条带和特异性条带, 发现两者基本相似, 推断转基因棉对距棉花主根 5 cm 处的土壤细菌群落结构没有显著影响, 细菌多样性主要受生育期及温度的影响。

用 Quantity one(4.6.2)软件对图谱上的条带数量、迁移率和亮度进行数字化处理, 应用非聚类平均加权法(UPGMA)进行聚类分析。从图 5 可看出, 转基因棉和亲本(除 B3 外)在各个时期的相似性都比较高, 其中转基因单价棉在苗期、盛花期和花铃中期的相似性都超过了 80%, 转基因棉和亲本相同生育期的样品基本聚在一起, 单、双价转基因棉均可分成两个独立的簇。苗期、盛花期和花铃前期与其他 3 个时期没有聚在一起, 这与后 3 个时期出现的特异性条带及数量有较大关系。

2.4 棉田土壤样品 PCR-DGGE 的主成分分析

由 DGGE 指纹图谱可见, 不同样品的 DGGE 条带的位置和亮度存在一定差异, 即使是相似度很高的转基因棉和亲本同时期样品也存在少量差异, 因此将 Quantity one 软件分析的 DGGE 条带位置和亮度的数字化结果进行主成分分析, 以进一步显示转基因棉和非转基因棉样品土壤细菌群落结构组成的共同点和差异。在主成分分析中横坐标的百分数表示能够用第

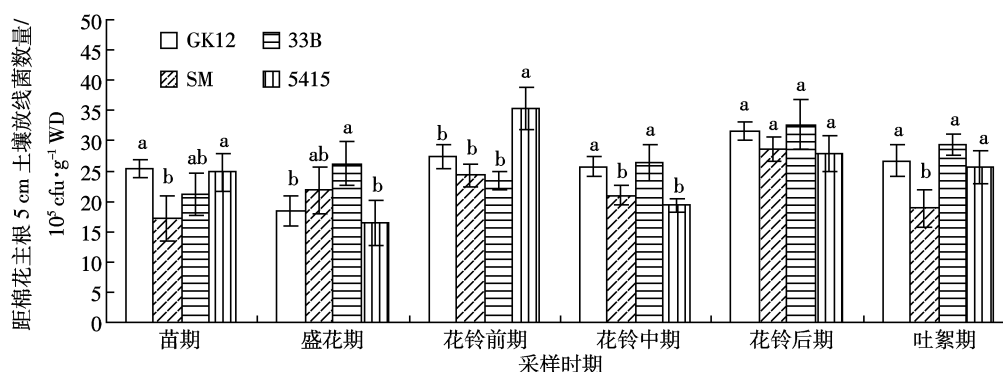
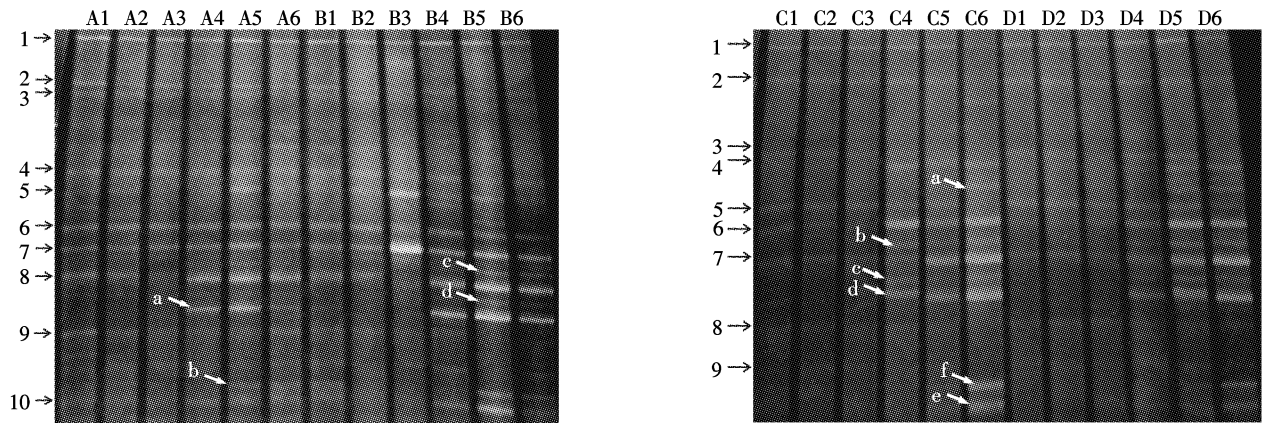


图 2 转基因抗虫棉对根部放线菌数量的影响

Figure 2 Effect of transgenic cotton on total number of actinomycetes in cotton soils



(A, B, C, D: GK12, SM, 33B, 5415; 1~6: from seedling phase to wadding phase, respectively)

图 4 转基因棉和亲本样品根际土壤细菌扩增产物 DGGE 指纹图谱

Figure 4 DGGE fingerprints of transgenic cotton and non-transgenic cotton soil samples in rhizosphere soil

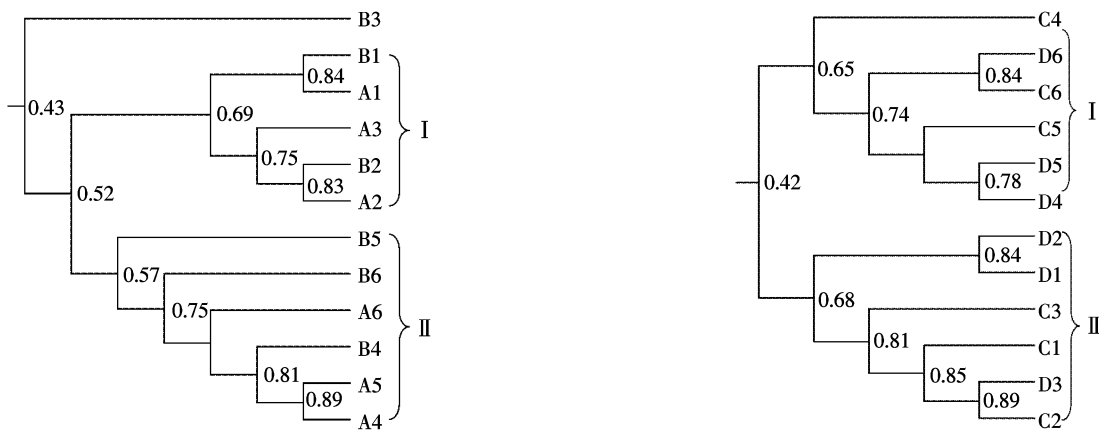


图 5 转基因棉和亲本根际土壤细菌 DGGE 指纹图谱的聚类分析

Figure 5 Dendrogram constructed with UPGMA method based on DGGE fingerprints of soil samples from transgenic cottons and their parents

一主成分解释的变异度,纵坐标百分数表示第二主成分可以解释的变异度,横坐标变异大于纵坐标即表明不同处理分布在横坐标方向上的差异程度较大,而分布在纵坐标方向上的差异程度较小。

由图 6 可知,若以 2 个单位做标准,单价转基因棉及其亲本在第二主成分上的变异较小(除 B3 外),变异度主要分布在第一主成分上,并以纵轴为分界线,可以分为 2 个较独立的区。双价转基因棉及其亲本在前 3 个时期分布较集中,后 3 个时期相对较分散。转基因棉及其亲本按不同生育期在坐标轴上可以划分为相对独立的 4 个区(如图中椭圆标注),区中转基因棉及其亲本基本分布在相近位置,说明转基因棉和亲本差异不大,但是区与区之间有差异,差异来源主要是随生育期出现的特异性条带及其亮度,暗含生育期是影响细菌区系的重要因素,结果与聚类分析相吻合。

3 讨论

转基因植物可通过植物残体或根系分泌物进入土壤的方式,或者依靠外源基因在植物体中的导入和表达影响植物性状的间接方式,影响土壤生态系统的物质循环和能量流动^[25]。含有外源基因的植物残体或者分泌物因存在特殊的外源蛋白,当其进入一个复杂的生态系统后对土壤生物,尤其是土壤微生物的影响评价是至关重要的。土壤微生物对环境因子的响应极为敏感,土壤微生物多样性对表征土壤生态系统结构和功能有重要作用。

孙彩霞等^[26]通过检测 Bt 杀虫晶体蛋白的土壤残留表明转 Bt 棉的杀虫晶体蛋白可通过根系分泌物或作物残体进入土壤。芮玉奎^[27]对常规棉和转基因抗虫棉根际土壤 Bt 毒蛋白含量进行了比较分析,发现转基因棉根际土壤 Bt 毒蛋白含量显著高于常规棉,尤

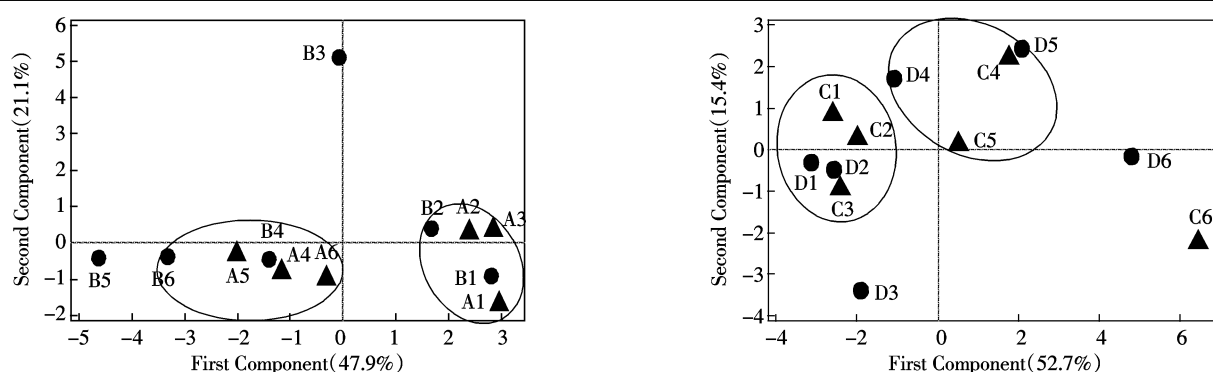


图 6 转基因棉和亲本棉田土壤细菌 DGGE 指纹图谱的主成分分析

Figure 6 Principal components analysis of transgenic cottons and their parents based on DGGE fingerprints of soil samples

其从苗期到盛花期表现突出。Donegan 等^[28]应用 DNA 指纹分析技术发现转 Bt 抗虫棉根际土壤中的微生物组成、种类和数量与常规棉存在显著差异。然而,也有众多研究表明转基因棉对土壤微生物的影响不显著。裴克全^[29]通过比较抗虫棉田与非抗虫棉田根际土壤微生物 16S rDNA 全序列分析表明转基因棉和非转基因棉微生物多样性没有显著差异。Yu 等^[30]通过研究转 Bt 棉对根际功能微生物影响,发现转基因棉与亲本的根际 Bt 含量与功能菌数量在生育后期差异不显著。李长林等^[31]应用 PCR、RFLP 研究了转基因抗虫棉 (SGK321 和中棉所 41) 苗期、花铃期、衰老期根际土壤微生物特异性 DNA 序列变化,发现转基因棉花对根际土壤微生物的影响不明显,棉花根际土壤微生物区系差异主要受生育期影响。张美俊^[32]通过盆栽种植研究了转基因棉和非转基因棉对细菌、真菌和放线菌的影响,结果显示 Bt 蛋白可在种植了转基因作物的土壤中检测到,但不同转基因品种的分秘量和降解速率存在差异,毒蛋白反而对细菌和真菌的繁殖有促进作用,转基因“Bt 新彩 1”的根际土壤碱性磷酸酶活性受到抑制、脱氢酶活性受到激活。

本研究采集了不同生长期离棉花主根 5 cm 处的土壤进行了稀释平板法和 DGGE 分析,发现转基因棉和亲本土壤细菌的种类和数量在整个生育期内均随温度的升高和棉花的生长而呈现同一趋势的变化,只在个别生长期出现显著差异,在生长旺盛期出现某些特异类群的微生物;聚类分析结果显示在同一生育期内,转基因棉及其亲本的 DGGE 图谱相似性较高,单、双价转基因棉和其亲本的细菌群落结构除个别时期外基本相似,生育期是影响细菌群落结构的重要因素,这与李长林等的研究结论一致。然而,结果中也存在少量较明显的差异,如稀释平板法显示个别时期转

基因抗虫棉的细菌总体数量显著高于亲本,DGGE 图谱中个别特异条带在转基因和亲本棉之间并不一致,聚类分析得到的相似性也并不高,产生的原因还需要进一步的研究和验证。此外,本文仅从土壤 DNA 水平对细菌群落结构加以研究,还需要对微生物的活性和数量进行定量,结合相关酶的活性作全面分析和安全性评价。

4 结论

(1)转基因抗虫棉与亲本对根部土壤细菌的数量影响不显著,细菌数量随棉花生育期逐渐增加,于花铃中期达到最大值。放线菌数量随生育期变化较小,只在花铃中期出现显著差异。

(2)DGGE 图谱显示转基因棉和亲本都存在丰富且相似的条带,聚类分析表明大多数转基因棉和亲本间相似性达 80%以上,根据不同的生育期分成 2 个簇;在花铃中期、后期吐絮期出现了一些特异条带。主成分分析表明转基因棉和亲本细菌群落结构图谱基本分布在相近位置,但不同生育期之间存在一定差异,图谱根据生育期划分为 4 个区,表明生育期是影响细菌群落结构的重要因素,结果与聚类分析相吻合。

本研究结果初步说明,在种植一年的转基因棉田中,转基因棉对根部土壤细菌群落结构和数量未见产生显著影响。

参考文献:

- [1] Clive James. 2010 年全球生物技术/转基因作物商业化发展态势[J]. 中国生物工程杂志, 2011, 31(3): 1-12.
Clive James. Global status of commercialized biotech/GM crops: 2010 [J]. *China Biotechnology*, 2011, 31(3): 1-12.
- [2] 王继磊, 刘迪秋, 丁元明, 等. Bt 转基因抗虫植物研究进展 [J]. 生态学杂志, 2010, 27(4): 75-78.
WANG Ji-lei, LIU Di-qiu, DING Yuan-ming, et al. Research advances

- in Bt transgenic anti-insect Plants[J]. *Journal of Biology*, 2010, 27(4): 75–78.
- [3] Perlak Frederick J, Deaton R W, Armstrong T A, et al. Insect resistant cotton plants[J]. *Biotechnology*, 1990, 8:939–942.
- [4] Benedict J H, Sachs E S, Altman D W, et al. Field performance of cottons expressing transgenic Cry1A insecticidal proteins for resistance to *Heliothis virescens* and *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae)[J]. *Ecology Entomology*, 1996, 89(1):230–238.
- [5] Perlak F J, Deaton R W, Armstrong T A. Insect resistant cotton plants[J]. *Nature*, 1990, 8:93–94.
- [6] Jenkins J N, McCarty J C, Buehler R E, et al. Resistance of cotton with δ -endotoxin genes from *Bacillus thuringiensis* var. kurstaki on selected lepidopteran insects[J]. *Agronomy*, 1997, 89:768–780.
- [7] Clive James. 2009 年全球生物技术/转基因作物商业化发展态势[J]. 中国生物工程杂志, 2010, 30(2):1–22.
Clive James. Global status of commercialized biotech/GM crops:2009 [J]. *China Biotechnology*, 2010, 30(2):1–22.
- [8] 万建民. 我国转基因植物研发形势及发展战略 [J]. 生命科学, 2011, 23(2):157–167.
WAN Jian-min. Research and development status and future strategy of transgenic plants in China[J]. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2011, 23(2):157–167.
- [9] 国家发展和改革委员会高技术产业司, 中国生物工程学会. 中国生物技术产业发展报告 2009[M]. 北京: 化学工业出版社, 2010.
Department of National Development and Reform Commission (NDRC) High-Tech Industry, Chinese society of biotechnology. Annual report on bioindustry in China: 2009 [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2010.
- [10] 黎 欲, 王健康, 邱丽娟, 等. 中国作物分子育种现状与发展前景 [J]. 作物学报, 2010, 36:1425–1430.
LI Yu, WANG Jian-kang, QIU Li-juan, et al. Crop molecular breeding in China: Current status and perspectives [J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2010, 36:1425–1430.
- [11] Quist D, Chapela H. Transgenic DNA introgressed into traditional maize landraces in Oaxaca, Mexico[J]. *Nature*, 2001, 414:541–543.
- [12] 卢宝荣, 夏 辉. 转基因植物的环境生物安全: 转基因逃逸及其潜在生态风险的研究和评价[J]. 生命科学, 2011, 23(2):186–194.
LU Bao-rong, XIA Hui. Environmental biosafety of transgenic plants: Research and assessment of transgene escape and its potential ecological impacts[J]. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2011, 23(2):186–194.
- [13] Saxena D, Stotzky G. Insecticidal toxin from *Bacillus thuringiensis* is released from roots of transgenic Bt corn in vitro and in situ [J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2000:33–35.
- [14] Zwahlen C, Hilbeck A, Gugerli P, et al. Degradation of the Cry1Ab protein within transgenic *Bacillus thuringiensis* corn tissue in the field [J]. *Molecular Ecology*, 2003, 12:765–775.
- [15] Sarkar B, Patra A K, et al. Assessment of biological and biochemical indicators in soil under transgenic Bt and non-Bt cotton crop in a sub-tropical environment[J]. *Environ Monit Assess*, 2009, 156(1–4):595–604.
- [16] Blackwood C B, Buyer J S. Soil microbial communities associated with Bt and non-Bt corn in three soils[J]. *Journal of Environmental Quality*, 2004, 33:832–836.
- [17] Stotzky G. Persistence and biological activity in soil of the insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis*, especially from transgenic plants [J]. *Plant and Soil*, 2004, 266:77–89.
- [18] Wei X D, Zou H L, Chu L M, et al. Field released transgenic papaya affects microbial communities and enzyme activities in soil [J]. *Plant and Soil*, 2006, 285:347–358.
- [19] Griffiths B S, Caul S, Thompson J, et al. Soil microbial and faunal community responses to Bt maize and insecticide in two soils [J]. *Journal of Environmental Quality*, 2006, 35:734–741.
- [20] 宋新元, 张欣芳, 于 壮, 等. 转基因植物环境安全评价策略 [J]. 生物安全学报, 2011, 20(1):37–42.
SONG Xin-yuan, ZHANG Xin-fang, YU Zhuang, et al. Strategy of environmental bio-safety assessment for transgenic plants[J]. *Journal of Biosafety*, 2011, 20(1):37–42.
- [21] 李振高, 骆永明, 滕 应. 土壤与环境微生物研究法[M]. 北京: 科学出版社, 2008:90–91.
LI Zhen-gao, LUO Yong-ming, TENG Ying. Methods of soil and environmental microorganisms[M]. Beijing: Science Press, 2008:90–91.
- [22] Zhou J, Bruns M, et al. DNA recovery from soils of diverse composition [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62(2):316–322.
- [23] Muyzer G, E De Waal, et al. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 59(3):695.
- [24] Heuer H, Krsek M, et al. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63(8):3233.
- [25] Liu Biao, Zeng Qing, Yan Fengming, et al. Effects of transgenic microorganisms[J]. *Plant and Soil*, 2005, 271:1–13.
- [26] 孙彩霞, 陈利军, 武志杰, 等. Bt 杀虫晶体蛋白的土壤残留及其对土壤磷酸酶活性的影响[J]. 土壤学报, 2004, 41(5):761–765.
SUN Cai-xia, CHEN Li-jun, WU Zhi-jie. Persistence of Bt toxin in soil and its effects on soil phosphatase activity[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2004, 41(5):761–765.
- [27] 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 [J]. 生物技术通讯, 2005, 16(5):515–517.
RUI Yu-kui. Dynamics of Bt toxin and plant hormones in rhizosphere system of transgenic insecticidal cotton (*Gossypium L.*) [J]. *Letters in Biotechnology*, 2005, 16(5):515–517.
- [28] Donegan K K, Palm C J, Fieland V J, et al. Changes in levels, species and DNA fingerprinting of soil microorganisms associated with cotton expressing the *Bacillus thuringiensis* var. kurstaki endotoxin[J]. *Applied Soil Ecology*, 1995, 2:111–124.
- [29] 裴克全. 转基因棉根际微生物的生物安全信息及其分子生态学的初步研究[R]. 博士后工作报告. 北京: 中国科学院植物研究所, 2001.
PEI Ke-quan. Biosafety information construction and preliminary study of molecular ecology of transgenic cotton rhizospheric microbes[R]. Postdoctoral report. Beijing: Institute of Botany, CAS, 2001.
- [30] Yu K R, Guo X Y. Changes 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.
- [31] 李长林, 张 欣, 吴建波, 等. 转基因棉花对根际土壤微生物多样性的影响[J]. 农业环境科学学报, 2008, 27(5):1857–1859.
LI Chang-lin, ZHANG Xin, WU Jian-bo, et al. Effect of transgenic cotton on microbial community diversity in rhizosphere soil[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2008, 27(5):1857–1859.
- [32] 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[J]. 植物生态学报, 2008, 32(1):197–203.
ZHANG Mei-jun, YANG Wu-de, LI Yan-e. Effects of Bt transgenic cottons planting on rhizosphere soil microorganisms at different growth stages[J]. *Journal of Plant Ecology*, 2008, 32(1):197–203.