

非抗虫转基因棉花对土壤细菌群落多样性的影响

赵云丽^{1,2}, 李刚¹, 修伟明¹, 多立安², 曹璇³, 雒珺瑜⁴, 崔金杰⁴, 杨殿林¹, 赵建宁^{1*}

(1. 农业部环境保护科研监测所, 农业部产地环境质量重点实验室/天津市农业环境与农产品安全重点开放实验室, 天津 300191; 2. 天津师范大学生命科学学院, 天津 300387; 3. 天津农学院农学与资源环境学院, 天津 300384; 4. 中国农业科学院棉花研究所, 河南 安阳 455000)

摘要:田间试验条件下,为了探究非抗虫转基因棉花对土壤细菌群落多样性的影响,应用 PCR-DGGE 技术对转 *RRM2* 基因高产棉、转 *GFP* 基因抗病棉、转 *ACO2* 基因优质棉及非转基因常规棉(中棉所 12)种植后在吐絮期的土壤细菌群落多样性进行分析。结果表明,与常规棉相比,3 种转基因棉的种植均未对土壤细菌香农-威纳指数(H')、均匀度(E_H)和丰富度(S)造成显著影响,且两类棉花土壤细菌群落结构相似性较高。可见,短期内,非抗虫转基因棉花的种植对土壤细菌群落多样性无显著影响。对 DGGE 的优势条带序列分析发现,同源性最高的微生物分别属于拟杆菌门(Bacteroidetes)的黄杆菌纲(Flavobacteria)、噬弧菌属(*Bacteriovorax*)、*Segetibacter*, 变形菌门(Proteobacteria)的 α -变形菌纲(alpha proteobacterium)、地杆菌属(*Geobacter*), 厚壁菌门(Firmicutes)的 *Paenisporosarcina*, 酸杆菌门(Acidobacterias)的酸杆菌属(*Acidobacterium*), 它们均为不可培养微生物。

关键词:转基因棉花; 土壤微生物; PCR-DGGE; 细菌多样性

中图分类号: S562 文献标志码: A 文章编号: 1672-2043(2015)04-0716-06 doi:10.11654/jaes.2015.04.016

Effects of Insect Non-resistant Transgenic Cottons on Bacterial Community Diversity in Soil

ZHAO Yun-li^{1,2}, LI Gang¹, XIU Wei-ming¹, DUO Li-an², CAO Xuan³, LUO Jun-yu⁴, CUI Jin-jie⁴, YANG Dian-lin¹, ZHAO Jian-ning^{1*}

(1. Agro-Environmental Protection Institute, Ministry of Agriculture; Key Laboratory of Original Agro-Environment Quality of Ministry of Agriculture and Tianjin Key Laboratory of Agro-Environment and Agro-product Safety, Tianjin 300191, China; 2. College of Life Sciences, Tianjin Normal University, Tianjin 300387, China; 3. Department of Agronomy, Tianjin Agricultural University, Tianjin 300384, China; 4. Institute of Cotton Research, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Anyang, 455000, China)

Abstract: There are increasing public concerns over the ecological risks of transgenic plants. Under field conditions, the diversity and composition of bacterial community in soils grown with three insect non-resistant transgenic cottons (high-yield transgenic cotton expressing the RNA recognition motif 2 gene, disease-resistant transgenic cotton expressing the gastrodia antifungal protein and high-quality transgenic cotton expressing the [1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) oxidase]) and one conventional cotton CCRI 12 (as control) were evaluated at the boll-opening stage by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). The results showed that planting three transgenic cottons did not show significant effects on Shannon-wiener index (H'), evenness (E_H) and richness (S) of soil bacteria. High degree of similarity in community structure was observed between transgenic and conventional cottons, indicating no influence of transgenic cottons on bacterial community diversity in the short term. High-yield *RRM2* transgenic cotton, disease-resistant *GFP* transgenic cotton, high-quality *ACO2* transgenic cotton and conventional cotton had 67% similarity in community levels and were thus regarded as one group. According to the sequence analysis of DGGE dominant bands, microorganisms which presented the highest homology belonged to families of Flavobacteria, *Bacteriovorax*, *Segetibacter*, alpha proteobacterium, *Geobacter*, *Paenisporosarcina*, and *Acidobacterium*, respectively, and all of them were not cultivatable.

Keywords: transgenic cotton; soil microorganism; PCR-DGGE; bacterial diversity

收稿日期: 2014-12-11

基金项目: 转基因生物新品种培育重大专项(2014ZX08011-002); 国家自然科学基金(31200424); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(农业部环境保护科研监测所); 农业部产地环境质量重点实验室/天津市农业环境与农产品安全重点实验室开放基金项目

作者简介: 赵云丽(1989—), 女, 硕士研究生。E-mail: zyllily@126.com

* 通信作者: 赵建宁 E-mail: zhaojn2008@163.com

转基因技术在农业领域发挥了举足轻重的作用,转基因技术的兴起,改变了依靠农药和除草剂保证作物产量和品质的传统模式。据报道,2013年全球有27个国家种植转基因作物,种植面积超过1.75亿 hm^2 ,其中中国种植了420万 hm^2 的转Bt抗虫棉,占到棉花总种植面积的90%^[1]。随着转基因技术的飞速发展和人们对作物品种的多样性需求,我国已成功培育出具有各种优良性状和经济价值的转基因棉花品种。如将与棉花产量相关的RRM2(RNA recognition motif 2)基因导入我国主栽棉花品种*Gossypium hirsutum*中,获得的转RRM2基因高产棉新材料^[2],将天麻抗真菌蛋白(Gastrodia antifungal protein/GAFP)基因导入棉花植株获得的能够显著抑制棉花黄萎病菌和枯萎病菌的转GAFP基因抗病棉^[3],将与乙烯合成密切相关的1-氨基环丙烷-1-羧酸氧化酶(1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase/ACO)基因导入棉花植株获得的转ACO2基因优质棉^[4]。这些转基因材料的获得在棉花高产、抗病及优质品种培育方面具有极大的应用价值。近几年,国内外学者越来越关注转基因作物的环境安全,尤其是新型转基因棉花的环境安全性研究,这将有助于更好地保护人类的健康和生态环境的安全,保障转基因生物的健康发展。

土壤是物质循环和能量转化的重要场所,土壤微生物作为土壤中参与各种生化反应过程必不可少的一部分,在表征土壤健康和维持土壤生态系统平衡中扮演着重要的角色^[5]。土壤中微生物的种类繁多,数量巨大,土壤微小的变化都可能会引起微生物群落的改变。有研究表明,转基因抗虫作物的残体及根系中的毒素蛋白在土壤中不易被降解,对土壤中的生物尤其是以分解植物残体和降解毒素为主要活动的微生物可能产生不利的影响^[6-7]。土壤细菌是土壤微生物的主要组成部分,是土壤中最活跃的生物分子,参与了土壤物质循环、能量转化及有机物质分解和养分释放的过程,被公认为是土壤生态系统变化的提示信号,所以,土壤细菌是最适于研究转基因作物种植对土壤生态环境影响的微生物。目前,非抗虫转基因棉花作为有重要应用前景和效益的棉花品种,其对土壤细菌群落多样性影响的研究报道较少。因此,本研究利用PCR-DGGE技术,以转RRM2基因高产棉、转GAFP基因抗病棉、转ACO2基因优质棉和常规棉为研究材料,探究它们种植后对土壤细菌群落多样性的影响,旨在为非抗虫转基因棉花种植后的土壤环境安全评价提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验地概况

试验地位于天津市武清区梅厂镇周庄村(39°21'N, 117°12'E),海拔6.3 m。地处华北平原东北部,地势平缓,属暖温带湿润气候。供试土壤为潮土,部分基本理化性质如下:全磷含量 $0.79 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,全氮含量 $0.63 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,有机质含量 $18.00 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,pH8.24。

1.2 供试材料

本试验所使用的三种转基因棉花材料及非转基因材料均由中国农业科学院棉花研究所提供。非转基因常规棉品种为“中棉所12”;转RRM2基因高产棉是将甘蓝型油菜(*Brassica napus*)中的可提高双子叶植物产量并改善品质的RRM2基因转入“中棉所12”而获得的新型转RRM2基因棉花^[2];转GAFP基因抗病棉是将GAFP基因转入新疆陆地棉栽培品种(系)中获得的新材料,GAFP基因是从我国传统中药天麻(*Gastrodia elata* Bl.)中分离得到的一种编码具有广谱抗真菌活性的蛋白质的基因,它所编码的蛋白质对许多植物真菌病的致病菌具有很强的抑制作用^[3];转ACO2基因优质棉中的ACO2基因是ACC氧化酶基因家族(ACO1、ACO2和ACO3)中的一个,ACO是乙烯合成途径中的最后一个酶,也称为乙烯形成酶(EFE),在棉花纤维发育过程中,ACO基因在纤维快速伸长期大量表达,具有显著的纤维表达特异性^[4]。

1.3 试验设计

4种棉花种植面积均为 300 m^2 (20 m×15 m),覆膜种植,每个品种间种植宽度为5 m的玉米保护行。氮肥 $200 \text{ kg} \cdot \text{hm}^{-2}$,钾肥 $100 \text{ kg} \cdot \text{hm}^{-2}$,磷肥 $60 \text{ kg} \cdot \text{hm}^{-2}$ 。其中氮肥基施60%,追施40%。磷钾肥全部作基肥施用,其他田间管理按常规进行,不施农药。

1.4 土壤样品采集

2013年5月4日播种,在棉花吐絮期(2013年9月22日)采集土壤样品。采集时,去除表面杂草和枯枝落叶,分别在随机划分的3个区域内各选取3株棉花,用直径3 cm的土钻在距离主根2 cm位置取20 cm深土样,并将每个采样区的样品分别混合置于冰盒中带回实验室,采集土样一部分置于-20℃冰箱用于土壤细菌群落多样性分析,一部分经过风干、研磨、过筛用于土壤理化性质的测定。

1.5 测定方法

1.5.1 土壤细菌多样性分析

(1)土壤总DNA提取

采用 MoBio 公司的 Ultraclean soil DNA isolation kit(MoBio laboratories, Solana Beach, CA, USA)试剂盒,按照操作说明提取,用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳进行 DNA 质量检测。

(2) PCR 扩增

提取的土壤总 DNA 使用细菌 16S rDNA V3 可变区通用引物 341f-GC 和 534r。每个样品 3 个重复,按照使用说明书,反应体系为 50 μ L, PCR 反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 45 s, 57 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 35 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。扩增后产物用于 DGGE 分析。

(3) DGGE 检测

PCR 产物采用 Bio-Rad 公司的 Dcode™ 通用突变检测系统(Bio-Rad, USA)按照操作说明进行检测。浓度为 8% 聚丙烯酰胺, 变性梯度为 40%~60%, 60 $^{\circ}$ C 预热, 将 20 μ L PCR 产物与 10 μ L 6 $\times$ loading buffer 混合后用微量进样器加入胶孔中, 在 60 $^{\circ}$ C 100 V 恒定电压下电泳 14 h。电泳完毕后用 SYBR® Green1 (1:10 000) 染色 30 min, 然后用 Gel Dox XR 凝胶成像系统(Bio-Rad)进行观察与拍照。

1.5.2 DGGE 条带回收和测序

采用 Quantity One 图像处理软件对 DGGE 图谱中条带进行数字化处理, 然后在紫外灯下对图谱的特异条带和优势条带进行割胶, 用 341f 和 534r 引物进行扩增。PCR 产物用 Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up system 试剂盒(Progenia, USA)纯化后与载体 pGEM-T Easy Vector(Progenia, USA)连接, T7、SP6 为引物测序, 由上海生工生物工程技术有限公司完成。将阳性的克隆子在 NCBI 数据库中进行比对分析。

1.6 数据分析

采用 Excel 2007 和 SPSS 17.0(Duncan's test)对试验数据进行分析, 采用 Quantity One 4.6.2 软件进行数字化处理并进行聚类分析。各样品用香农-维纳指数(Shannon-Wiener index, H)、均匀度(Evenness index, E_H)和丰富度(Richness, S)^[8]评价细菌多样性的变化, 其计算公式如下:

$$H = -\sum P_i \ln P_i$$

$$E_H = H / \ln S$$

公式中: H 代表香农-威纳指数; P_i 代表第 i 条带占总强度的比值; E_H 代表均匀度指数; S 代表条带数量或丰富度。

2 结果与分析

2.1 DGGE 指纹图谱分析和聚类分析

由图 1 和图 2 可以看出, Ultraclean soil DNA isolation kit(MoBio laboratories, Solana Beach, CA, USA)试剂盒提取的 4 种棉花土壤基因组总 DNA 较好, 通过 16S rDNA V3 区通用引物进行 PCR 扩增反应, 得到产物长度约为 230bp 的片段, PCR 产物用于 PCR-DGGE 分析。

DGGE 图谱能够直观地反映不同土壤细菌 16S rDNA 的多样性, 也可在分子水平上反映出不同土壤细菌种群结构的多样性。在 DGGE 图谱中, 不同位置的条带代表不同的细菌类群, 一般认为, 条带的亮度反映出不同细菌类群的相对量的多少, 亮度高的被认为是优势菌群。不同泳道同一横向位置的不同条带一般被认为是同一细菌类群。由图 3 可见, 4 种棉花土壤样品 DGGE 图谱的电泳条带数目、强度和迁移率均无显著差异。另外, 对 4 种不同土壤样品细菌群落结构相似性进行聚类分析, 结果如图 4 所示。3 种转



1~3: 常规棉; 4~6: 转基因高产棉; 7~9: 转基因抗病棉;

10~12: 转基因优质棉。下同

1~3: Conventional cotton; 4~6: High-yield transgenic cotton;

7~9: Disease-resistant transgenic cotton;

10~12: High-quality transgenic cotton. The same below

图 1 部分样品基因组 DNA 提取图

Figure 1 Picture of genomic DNA extraction of some samples

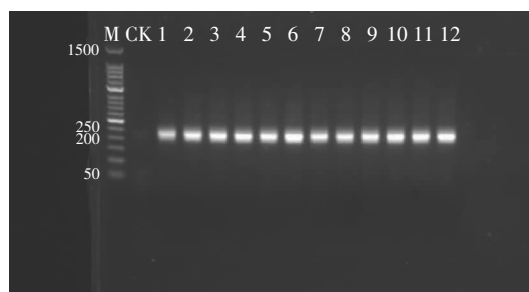


图 2 部分样品 16S rDNA 基因 PCR 扩增图

Figure 2 Picture of 16S rDNA gene PCR amplification of some samples

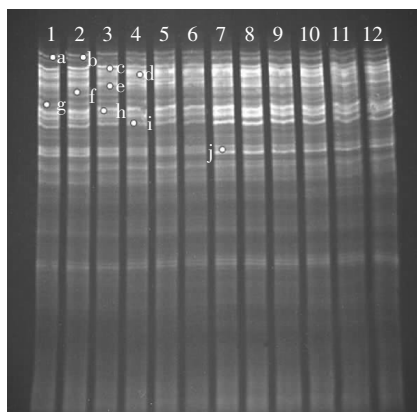


图 3 不同土壤样品 DGGE 图谱

Figure 3 DGGE profile of different soil samples

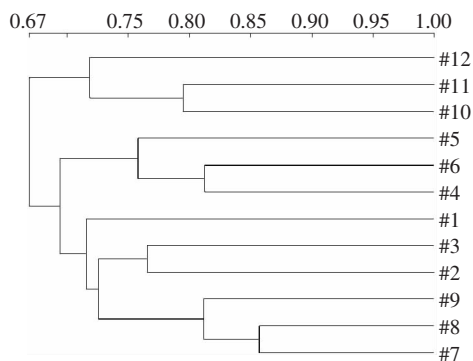


图 4 UPGMA 群落结构相似性聚类分析

Figure 4 Cluster analysis of bacterial community structure similarity by UPGMA

基因棉与常规棉在 67% 的相似性水平上聚为一类。一般不同条带相似度高于 60% 的两个群体就具有较好的相似性。由此看出, 3 种转基因棉与常规棉土壤细菌群落结构差异不显著。

2.2 土壤细菌 DGGE 图谱的多样性分析

H 、 E_H 和 S 是细菌丰富度和均匀度的综合性指标。根据每个样品条带的信息, 对 4 种棉花种植土壤样品的细菌多样性指数进行了分析, 结果发现, 与常规棉相比,

转基因高产棉以及其他两种转基因棉种植并未对土壤细菌 H 、 E_H 和 S 造成显著影响(表 1)。

2.3 土壤样品部分细菌优势条带序列比对分析

根据土壤细菌 DGGE 图谱数字化结果, 对部分优势条带进行割胶回收, 共得到 10 个共有条带(图 4)。这些条带经过割胶回收、连接、转化后测序, 将所得的序列通过 Blast 进行相似性分析, 选择匹配度高的序列作为比对结果, 采用 Mega(邻接法)构建系统发育树, 结果显示, 大多同源序列为不可培养微生物(图 5), 这些同源序列分别属于拟杆菌门(Bacteroidetes)的黄杆菌纲(Flavobacteria)、噬弧菌属(*Bacteriovorax*)、*Segetibacter*; 变形菌门(Proteobacteria)的 α -变形菌纲(alpha proteobacterium)、地杆菌属(*Geobacter*); 厚壁菌门(Firmicutes)的 *Paenisporosarcina*; 酸杆菌门(Acidobacterias)的酸杆菌属(*Acidobacterium*), 其中拟杆菌门和变形菌门为优势菌群。

3 讨论

转基因作物外源蛋白可通过根系分泌物、花粉传播和秸秆还田等方式进入土壤, 给土壤环境及人类健康带来潜在影响, 土壤微生物由于其特殊的角色, 对土壤健康的指示作用不可替代^[9]。俞明正等^[10]利用 PCR-DGGE 技术研究不同生育期的转 *TaDREB4* 基因抗旱小麦种植对土壤微生物群落多样性的影响发现, 在同一生育期, 转 *TaDREB4* 基因抗旱小麦与其受体的香农多样性指数、均匀度指数差异不显著。最近利用稀释平板法对转 *AmGS* 抗寒基因红叶石楠的研究发现, 转 *AmGS* 基因红叶石楠根际土壤与对照组相比, 细菌的种类和数量没有发生明显变化^[11]。之前的研究也未发现转基因大豆种植对土壤线虫群落造成显著影响^[12], 对于以微生物为主要食物来源的土壤线虫来说, 这表明转基因作物的种植可能未通过食物链对土壤线虫产生间接的影响, 即转基因作物的种植未对土壤微生物群落产生影响。但也有研究报道, 转

表 1 不同棉花品种土壤细菌多样性指数

Table 1 Shannon-Wiener index, richness and evenness of soil microbial diversity under different cotton varieties

棉花品种 Cotton varieties	常规棉 Conventional cotton	转基因高产棉 High-yield transgenic cotton	转基因抗病棉 Disease- resistant transgenic cotton	转基因优质棉 High-quality transgenic cotton
香农-威纳指数 Shannon-Wiener index(H)	1.62±0.16a	1.59±0.19a	1.80±0.11a	1.87±0.16a
均匀度 Evenness(E_H)	0.99±0.00a	0.99±0.00a	0.99±0.00a	0.99±0.00a
丰富度 Richness(S)	27.00±5.29a	22.67±1.53a	25.00±3.61a	24.33±1.15a

注: 同一行不同字母表示品种间差异显著($P<0.05$)。

Note: Different letters in the same row indicate significant difference at $P<0.05$.

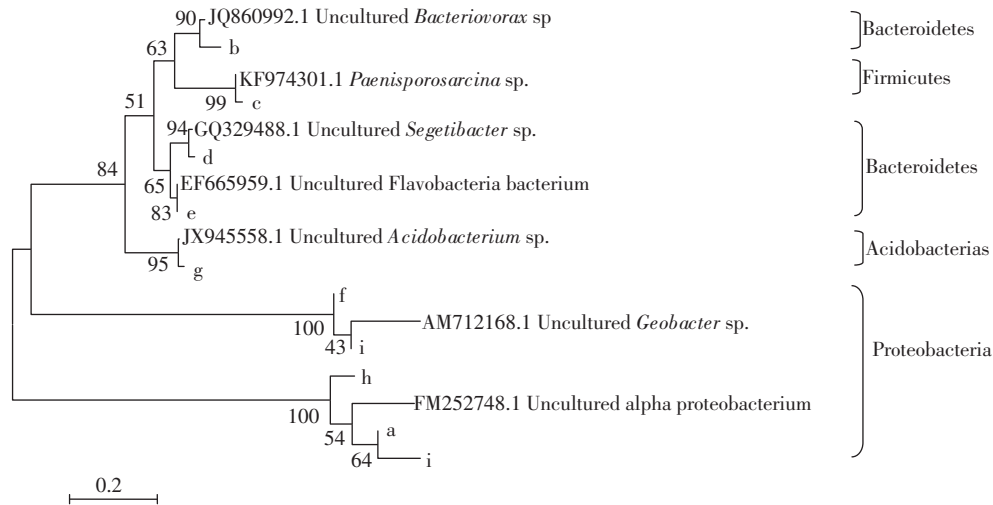


图5 以16S rDNA 同源性为基础的系统发育树

Figure 5 Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequences

基因作物的种植对土壤微生物多样性有影响。Castaldini 等^[13]在温室条件下利用 DGGE 技术对转 *Bt* 基因玉米(Bt11 和 Bt176)的研究发现,转基因玉米和非转基因玉米根际土壤微生物群落存在显著差异。Baumgarte 等^[14]的研究发现,土壤微生物群落结构的变化主要受到各种环境因素的影响,转基因作物自身的影响较小。本研究表明,与常规棉相比,3 种转基因棉种植均未对土壤细菌 *H*、*E_H* 和 *S* 造成显著影响,且 4 种棉花土壤细菌群落相似性较高,这一结果与 Li 等^[15]、Hu 等^[16]和 Saxena 等^[17]的研究结果一致。可见,土壤细菌群落结构多样性并没有因为转基因棉花的种植产生明显的变化^[18]。

通过对 DGGE 指纹图谱的优势条带进行割胶回收测序,结果显示,这些同源序列分别属于拟杆菌门(Bacteroidetes)的黄杆菌纲(Flavobacteria)、噬弧菌属(*Bacteriovorax*)、*Segetibacter*,变形菌门(Proteobacteria)的 α -变形菌纲(alpha proteobacterium)、地杆菌属(*Geobacter*),厚壁菌门(Firmicutes)的 *Paenisporosarcina*,酸杆菌门(Acidobacterias)的酸杆菌属(*Acidobacterium*),其中拟杆菌门和变形菌门为优势菌群。而大部分属于拟杆菌门和 α -变形菌纲的类群广泛分布于农田土壤中^[19],有很强的适应性,且具有解磷作用^[20-21],从 DGGE 指纹图谱上可以看出,拟杆菌门的黄杆菌纲和变形菌门的 α -变形菌纲在 4 种棉花所代表的条带上亮度较高,说明这些菌株在 4 种棉花种植土壤中比较丰富,可能对棉花的土壤磷素吸收有着重要作用。系统发育树显示,所有比对微生物均为不可培养微生物类群,这些不可培养的微生物无法直接判断其

准确的生理特性和其存在于生态环境中的意义^[22],也就无法具体分析转基因棉花种植对土壤细菌遗传多样性的影响。因此,要全面地研究转基因棉花种植对土壤细菌群落多样性的影响,关键是要了解微生物各个菌群在土壤中的生态意义。

影响微生物群落多样性的因素很多,作物和土壤类型、土壤养分因子、作物根系分泌物和农业管理等都会影响微生物的活力^[23],且往往一种因素的变化,会使其他因素产生变化,最终影响到与此相关的微生物。因此,要了解转基因棉花种植对土壤细菌群落多样性的影响,需综合各种影响因素进行分析,并对转基因棉花进行长期监测。本试验是在短期内对非抗虫转基因棉的影响进行分析,长期种植后,非抗虫转基因棉花是否会对土壤细菌群落多样性产生影响还有待进一步研究。

4 结论

与常规棉“中棉所 12”相比,3 种转基因棉的种植并未对土壤细菌 *H*、*E_H* 和 *S* 造成显著影响。两类棉花土壤细菌的群落结构相似性较高,且土壤细菌主要类群属于拟杆菌门、变形菌门、厚壁菌门和酸杆菌门,其中拟杆菌门和变形菌门为优势菌群。总之,非抗虫转基因棉的种植对土壤细菌群落多样性没有产生显著影响。

参考文献:

- [1] James C. 2013 年全球生物技术/转基因作物商业化发展态势[J]. 中国生物工程志, 2014, 34(1): 1-8.
James C. Global status of commercialized Biotech/GM Crops; 2013 [J].

- China Biotechnology*, 2014, 34(1):1-8.
- [2] 雒珺瑜, 刘传亮, 张 帅, 等. 转 *RRM2* 基因棉生长势和产量及对棉田节肢动物群落的影响[J]. 植物生态学报, 2014, 38(7):785-794.
- LUO Jun-yu, LIU Chuan-liang, ZHANG Shuai, et al. Growth vigour and yield of transgenic *RRM2* (RNA recognition motif 2) cotton and their effects on arthropod community in cotton field[J]. *Chinese Journal of Plant Ecology*, 2014, 38(7):785-794.
- [3] 陈 英, 王义琴, 诸葛强, 等. 转天麻抗真菌蛋白基因 *GAFP* 烟草的获得及离体抑菌活性检测[J]. 植物资源与环境学报, 2002, 11(2):1-5.
- CHEN Ying, WANG Yi-qin, ZHUGE Qiang, et al. Acquisition of tobacco with transformation genes of *GAFP* (*Gastrodia Antifungal Protein*) and evaluation of antifungal activity in vitro[J]. *Journal of Plant Resources and Environment*, 2002, 11(2):1-5.
- [4] 张 萍. 棉花乙烯合成关键基因参与细胞伸长发育的功能分析[D]. 石河子:石河子大学, 2010.
- ZHANG Ping. Function analysis of cotton key genes in ethylene synthesis of cell elongation[D]. Shihezi: Shihezi University, 2010.
- [5] Bhatia C R. Role of Microbial diversity for soil, health and plant nutrition[M]//Nautiyal C S, Dion P. Molecular mechanisms of plant and microbe coexistence: Soil biology. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2008, 15:53-74.
- [6] Chun Y J, Kim H J, Park K W, et al. Two-year field study shows little evidence that PPO-transgenic rice affects the structure of soil microbial communities[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2012, 48(4):453-461.
- [7] Hart M M, Powell J R, Gulden R H, et al. Detection of transgenic *cp4* epsps genes in the soil food web[J]. *Agronomy for Sustainable Development*, 2009, 29(4):497-501.
- [8] Bell T, Ager D, Song J I, et al. Larger islands house more bacterial taxa [J]. *Science*, 2005, 308(5730):1884.
- [9] Rosenzweig N. The importance and application of bacterial diversity in sustainable agricultural crop production ecosystems[M]//Maheshwari D K. Bacterial diversity in sustainable agriculture: Sustainable development and biodiversity. Switzerland: Springer-Verlag, 2014, 1:341-367.
- [10] 俞明正, 戴濡伊, 吴季荣, 等. 转 *TaDREB4* 基因抗旱小麦对其根际土壤速效养分、酶活性及微生物群落多样性的影响[J]. 江苏农业学报, 2013, 29(5):938-945.
- YU Ming-zheng, DAI Ru-yi, WU Ji-rong, et al. Analysis of available nutrient, enzyme activities and microorganism community diversity in rhizospheric soil of *TaDREB4* transgenic wheat with drought resistance [J]. *Jiangsu Journal of Agriculture Science*, 2013, 29(5):938-945.
- [11] 白 朋, 张 虹, 罗 磊, 等. 转 *AmGS* 抗寒基因红叶石楠对土壤微生物的影响[J]. 安徽农学通报, 2014, 20(8):28-30.
- BAI Peng, ZHANG Hong, LUO Lei, et al. Impacts of transgenic *Phoxinaxfraseri* with cold-tolerant gene *AmGS* on soil microbes[J]. *Anhui Agriculture Science Bull*, 2014, 20(8):28-30.
- [12] 杨志国, 赵建宁, 李 刚, 等. 耐草甘膦转基因大豆对土壤线虫多样性的影响[J]. 农业环境科学学报, 2013, 329(11):2199-2205.
- YANG Zhi-guo, ZHAO Jian-ning, LI Gang, et al. Effect of glyphosate-tolerant soybean on diversity of soil nematodes[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2013, 329(11):2199-2205.
- [13] Castaldini M, Turrini A, Sbrana C, et al. Impact of Bt corn on rhizospheric and soil eubacterial communities and on beneficial mycorrhizal symbiosis in experimental microcosms[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(11):6719-6729.
- [14] Baumgarte S, Tebbe C C. Field studies on the environmental fate of the Cry1Ab Bt-toxin produced by transgenic maize (MON810) and its effect on bacterial communities in the maize rhizosphere[J]. *Molecular Ecology*, 2005, 14(8):2539-2551.
- [15] Li P, Dong J Y, Yang S F, et al. Impact of β -carotene transgenic rice with four synthetic genes on rhizosphere enzyme activities and bacterial communities at different growth stages[J]. *European Journal of Soil Biology*, 2014, 65:40-46.
- [16] Hu H Y, Liu X X, Zhao Z W, et al. Effects of repeated cultivation of transgenic Bt cotton on functional bacterial populations in rhizosphere soil[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2009, 25(3):357-366.
- [17] Saxena D, Stotzky G. *Bacillus thuringiensis* (Bt) toxin released from root exudates and biomass of Bt corn has no apparent effect on earthworms, nematodes, protozoa, bacteria, and fungi in soil[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2001, 33(9):1225-1230.
- [18] Cotta S R, Dias A C F, Marriel I E, et al. Temporal dynamics of microbial communities in the rhizosphere of two genetically modified (GM) maize hybrids in tropical agrosystems[J]. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2013, 103(3):589-601.
- [19] Roesch L F W, Fulthorpe R, Riva A, et al. Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity[J]. *The ISME Journal*, 2007, 1(4):283-290.
- [20] 李海峰, 李志建, 屈建航. 解磷微生物及其应用的研究进展[J]. 贵州农业科学, 2012, 40(10):108-110.
- LI Hai-feng, LI Zhi-jian, QU Jian-hang. Research progress of phosphate-solubilizing microorganisms and their application[J]. *Guizhou Agricultural Sciences*, 2012, 40(10):108-110.
- [21] 何玉龙, 周青平. 解磷微生物研究进展[J]. 青海畜牧兽医杂志, 2012, 42(2):36-38.
- HE Yu-long, ZHOU Qing-ping. Advance in phosphorus-dissolving microbes[J]. *Chinese Qinghai Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 2012, 42(2):36-38.
- [22] Iverson V, Morris R M, Frazar C D, et al. Untangling genomes from metagenomes: Revealing an uncultured class of marine euryarchaeota [J]. *Science*, 2012, 335:587-590.
- [23] Dey R, Pal K K, Tilak K V B R. Influence of soil and plant types on diversity of rhizobacteria[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2012, 82(3):341-352.