

苏云金芽胞杆菌标记重组菌株的构建与杀虫基因水平转移*

周琴 孙明 李林 杨在清 喻子牛**

(华中农业大学农业微生物学国家重点实验室, 武汉 430070)

【摘要】 利用 SOE 法将构建的绿色荧光蛋白基因 *gfp* 和苏云金芽胞杆菌的杀虫晶体蛋白基因 *cry1Ac10* 的嵌合基因克隆到穿梭载体 pAD4412 上获得重组质粒 pBMBZGC10, 再通过电转化法导入苏云金芽胞杆菌无质粒突变株 CryB 中获得重组菌株 CryB(pBMBZGC10). 将重组菌株 CryB(pBMBZGC10) 的发酵液按 30、60 和 90 ml 共 3 个浓度梯度, 菌数约为 $10^7-10^8 \cdot \text{ml}^{-1}$, 分次喷洒供试植株小白菜、油菜和番茄, 结果表明, *cry1Ac10* 基因没有向供试土壤细菌、真菌和放线菌转移, 也未在供试植物根、茎和叶中检测到该基因.

关键词 苏云金芽胞杆菌 绿色荧光蛋白基因(*gfp*) 杀虫晶体蛋白基因 水平转移
文章编号 1001-9332(2005)01-0142-05 **中图分类号** Q784 **文献标识码** A

Construction of *Bacillus thuringiensis* labeled recombinant strain and horizontal transfer of its *cry1Ac10* gene. ZHOU Qin, SUN Ming, LI Lin, YANG Zaiqing, YU Ziniu (State Laboratory of Agricultural Microbiology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China). -Chin. J. Appl. Ecol., 2005, 16(1): 142~146.

A recombinant plasmid pBMBZGC10 was obtained by the ligation of *gfp-cry1Ac10* fusion gene and vector plasmid pAD4412, which was then introduced by gene pulser into acrySTALLIFEROUS strain CryB, and a recombinant strain CryB(pBMBZGC10) was obtained. Different fermentative solutions of recombinant strain were used for multi-spraying on *Brassica pekinensis*, *Ipomoea aquatica* and *Lycopersicon esculentum* leaves. The results of fluorescent detection and PCR amplification revealed that *cry1Ac10* gene did not transfer into indigenous bacteria, actinomyces and fungi in test soil, and could not be detected in roots, stems and leaves of test plants.

Key words *Bacillus thuringiensis*, Green fluorescent gene *gfp*, Insecticide crystal gene protein gene *cry*, Horizontal gene transfer.

1 引言

苏云金芽胞杆菌作为一种广泛应用的杀虫微生物,近 10 多年来,已成功用于防治农业、林业、贮藏物害虫和医学昆虫.随着微生物农药需求量的增大和人类环境保护意识的增强,生物安全性已越来越引起人们的重视,重组菌的使用面临着极大的挑战,例如重组菌携带的外源和抗性标记基因,是否能在环境中发生水平转移与基因扩散等问题,已普遍引发人们在环境释放时对重组菌安全性的担忧.尤其是转基因微生物的外源基因片段向土著微生物和动植物发生遗传物质转移的能力^[14].在转基因微生物存在的诸多潜在影响因素中,人们尤为关注的还是转基因微生物在环境中的生态效应、转基因微生物可能出现的新性状及其对人类健康和生态环境潜在的危险.此外,微生物具有分布广泛、生命力强、繁殖快和易变异等特性,一旦成为有害生物造成的影响往往是始料不及的;而且要从环境中彻底消除该

微生物也十分困难.所以,在进行转基因微生物大面积环境释放之前,对转基因重组微生物及其产品对人类健康和生态环境安全性的影响进行科学、合理的评价和管理是十分必要的^[3,6,10].

监测基因水平转移最常用的方法是分别用不同的标记基因标记重组菌和受体菌,然后根据标记基因转移来筛选发生了基因水平转移的转化子^[15].目前常用的标记基因有 *npt II*、*lacZ*、*gusA*、*luc*、*luxAB* 和 *gfp* 等^[5,9,11],其中能在异源细胞内表达产生绿色荧光的 *gfp*,由于具有独特的分子结构、简单的发光机理、稳定的化学性质和能在活体细胞内表达并检测等优点,已作为理想的报告基因广泛应用于微生物、动物和植物等领域的研究^[2],Tombloni 等^[16]利用表面荧光显微镜术监测出环境中用

* 国家自然科学基金项目(30170032)、国家高技术发展计划“863”项目(2004AA214092, 2003AA223081)和农业微生物学国家重点实验室基金资助项目.

** 通讯联系人.

2003-11-18 收稿,2004-03-02 接受.

gfp 等发光基因标记的工程菌。周琴等首次报道了利用异源启动子驱动 *gfp* 在苏云金芽胞杆菌中的表达^[19]。本文在该研究基础上,进一步利用 *gfp* 标记苏云金芽胞杆菌杀虫晶体蛋白基因以构建一种新型、稳定的重组菌,通过 *gfp* 追踪杀虫基因在环境中的水平转移情况,从而完成安全性初步评价。

2 材料与方法

2.1 菌株和培养条件

供试重组菌株为克隆有 *gfpmut3a + cry1Ac10* 融合基因的 CryB(pBMBZGC10); 供试盆栽植株为白菜 (*Brassica pekinensis*) 品种四月慢购自湖北省种子分公司、蔬菜 (*Ipomoea aquatica*) 泰国品种购自东方正大集团、番茄 (*Lycopersicon esculentum*) 品种宝大 903 购自上海宝大种苗有限公司。供试选择性培养基: LB (Luria-Bertani) 培养基; 淀粉硝酸钾培养基; 马丁孟加拉红-链霉素培养基。

ICPM 杀虫晶体蛋白发酵培养基 (用纱布封口摇瓶发酵): 蛋白胨 0.6%, 葡萄糖 0.5%, CaCO₃ 0.1%, MgSO₄ 0.05%, KH₂PO₄ 0.05%, pH7.0. 10× Hoagland 植物营养液: Ca(NO₃)₂(4H₂O 11.8 g, KNO₃ 5.1 g, MgSO₄·7H₂O 4.9 g, KH₂PO 41.4 g, FeCl₃ 0.05 g, H₂O 1 000 ml。

2.2 重组质粒的构建

蜡状芽胞杆菌 (*Bacillus cereus*) 和苏云金芽胞杆菌 (*Bacillus thuringiensis*) 质粒提取均采用碱变性法, 菌体培养至对数期, 溶液 I 重悬菌体时加入溶菌酶 (终浓度 1 mg·ml⁻¹), 于冰上放置 1~2 h。重组质粒的构建参照 Sambrook^[13] 等进行的方法进行。

2.3 试剂、酶和引物

DNA 片段回收试剂盒购自 QIAGEN 公司。各种 DNA 限制性内切酶和 T4 连接酶等为 TaKaRa 和 Promega 公司产品, 其中 PCR 用 Tag 酶和 Pfu 酶分别购自 Bio-star 公司和 Sangon 公司。

本研究所用 PCR 扩增引物序列由 Sangon 公司合成。引物 *gfp-F* 和 *gfp-R* 用于扩增 *gfp* 活性片段, *cry-F* 和 *cry-R* 用于扩增含 *cry1Ac10* 基因的 N-末端。其序列如下:

gfp-F: ACCCGGGGATCCTCTAGATT

gfp-R: GTTCGGATTGTTATCCATTGTTACAAACT-CAAGAAGG

cry-F: CCTTCTTGAGTTTGTAAACAATGGATAACA-ATCCGAAC

cry-R: ATTTGTACAAGAAATGCGTC

2.4 重组质粒的转化

大肠杆菌的常规转化采用氯化钙法^[13], 苏云金芽胞杆菌采用电转化法^[7]。

2.5 质粒稳定性检测

将供试菌株在 LB 液体振荡培养 8 h, 按 1/1 000 接种量转至新鲜 LB 液体培养 8 h, 再转种一次使其培养 40 代以上。

梯度稀释后涂布 LB 平板, 于 30 ℃ 培养至长出单菌落。对携带抗性质粒的菌株分别点种于氯霉素抗性 (10 g·L⁻¹) 及无抗性 LB 平板观察其抗性是否丢失, 从而鉴定其复制子在无抗性选择压力下的遗传稳定性。

2.6 供试菌发光特性的检测

用 Leica MZFLIII Stereo 型荧光显微镜对供试菌株进行荧光检测, 同时用 SONY 3CCD 的 Color Video Camera 拍照, 滤光片选择 GFP-plus 型。

2.7 植物、真菌总 DNA 抽提

植物总 DNA 采用小量抽提 DNA 的 CTAB 方法。真菌总 DNA 制备步骤: 在放有约 0.05 g 菌丝体 (鲜重) 的 1.5 ml 离心管中加入 0.30 g 白石英砂 (Sigma) 和 60 ℃ 的 2× CTAB 缓冲液 1 ml, 用塑料槌充分研磨后置 60 ℃ 水浴中 1 h, 然后用酚: 氯仿 (1:1) 反复抽提, 直至获得澄清透亮的液体提取物; 采用 4 ℃ 95% 乙醇沉淀 DNA, 70% 的冷乙醇 (4 ℃) 洗涤 DNA 沉淀, 真空干燥 DNA 沉淀, 将 DNA 沉淀重新悬浮于 100 μl TE 缓冲液中; 取 5 μl DNA 溶液在 1.5% 琼脂糖凝胶上电泳检测基因组 DNA 的纯度和完整性; 最后, 将所得 DNA 样品置 -20 ℃ 保存。

2.8 重组菌株的喷洒及其样品的采集

将重组菌 CryB(pBMBZGC10) 的发酵液混匀后, 分别采用植物浇灌和小型喷雾器进行叶面喷洒。每次喷洒前都对发酵液进行菌数测定, 3 次菌数分别为 1.8×10⁷·ml⁻¹、1.93×10⁷·ml⁻¹ 和 1.09×10⁷·ml⁻¹。喷洒时间是待植物生长成熟后进行喷洒, 每隔 4~6 d 喷洒一次, 一共喷 3 次。每类蔬菜都分成 30、60 和 90 ml 共 3 个浓度梯度进行喷洒处理, 其中对照不喷洒。实验结束后, 在每种植物的不同处理盆中随机选取 3 株进行检测; 土样的采集是选取 0~5 cm 的表层土。

2.9 重组菌株与植物间基因水平转移的测定

经 3 次浓度梯度喷药 1 周后对供试植株进行基因水平转移检测。分别从每盆里随机选取 3 株植株, 首先分别测量其根长、叶长、叶宽、株高和干重, 取 3 株供试植株性状的平均值进行简单的生物学性状比较; 然后再用小量植物 DNA 提取法对供试 36 个样品进行根、茎、叶的总 DNA 提取, 共获得了 108 个总 DNA 样品, 再用融合基因 *gfp-F* 和 *cry-R* 引物分别对供试 DNA 样品进行 PCR 检测。

2.10 基因水平转移频率的计算

土壤-植物微生态系统中研究基因水平转移频率的基本方法: 建立微生态系统, 包括制备外源 DNA、受体菌等; 向土壤中接入外源 DNA、供体菌、受体菌等合适条件下培养; 样品收集及处理; 统计实验结果; 转移频率的计算^[17]。其中样品的收集及处理具体步骤: 喷药后将采集的土样研碎、混匀, 取 1 g 左右的土样浸入 100 ml 无菌水中 (混有玻璃珠), 置于摇床上振荡 15~20 min (200 rpm, 30 ℃)。取出三角瓶, 静置 5 min 左右, 取上层液体, 梯度稀释至合适的稀释度, 取适量土样悬液涂布相应的选择性培养基平板^[14]。首先用氯霉素作为筛选标记, 然后将抗性平板上生长出来的菌落分别用 PCR 和荧光检测, 以鉴定其是否为基因水平转移的产物。

3 结果与分析

3.1 重组质粒 pBMBZGC10 的构建

利用重叠引物剪切术(SOE法),分别设计 *gfp* 和 *cry1Ac10* 的 N-末端扩增引物,通过重叠引物的二次 PCR 扩增得到全长为 883bp 的融合基因,经 *Bam*HI 和 *Spe*I 双酶切消化后,克隆到经同样双酶切的中间载体 pBMBZ7169 上,获得 *gfp* 与全长 *cry1Ac10* 基因的融合片段,再将该融合片段克隆到蜡状芽胞杆菌-大肠杆菌穿梭载体 pAD44-12 上,获得 *gfp* 在苏云金芽胞杆菌中的表达载体 pBMBZGC10(图 1A),其酶切验证结果见图 1B。

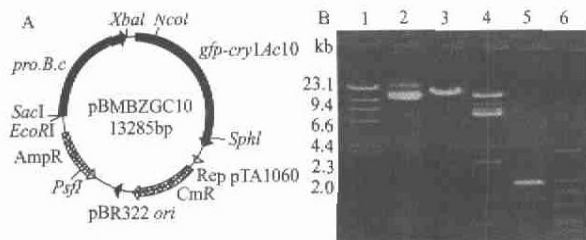


图 1 重组质粒 pBMBZGC10 的图谱及酶切检测

Fig. 1 Map and restriction analysis of recombinant plasmid pBMBZGC10.

A: The plasmid map of pBMBZGC10; B: The restriction analysis of plasmid pBMBZGC10. Lane 1: λ /HindIII marker; Lane 2: pBMBZGC10; Lane 3: pBMBZGC10/SphI; Lane 4: pBMBZGC10/NcoI; Lane 5: PCR product by primers GN & I3'; Lane 6: DL2000 marker.

3.2 pBMBZGC10 的电转化与转化菌株的筛选

用电转化的方法将重组质粒 pBMBZGC10 导入受体菌 CryB 后,从抗性平板中筛选出转化子 CryB (pBMBZGC10),经提取质粒进行酶切验证,结果表明,该重组质粒已成功地转入苏云金芽胞杆菌受体菌 CryB 中。

3.3 质粒遗传稳定性检测

重组菌 CryB(pBMBZGC10)在无抗性 LB 液体培养基中传 40 代后,稀释涂于 LB 平板培养至单菌落,分别随机挑取 100 个单菌落点种于氯霉素抗性平板,发现均带有氯霉素抗性,表明该重组质粒能在受体菌中稳定遗传。

3.4 重组菌株的荧光显微观察

将重组菌 CryB(pBMBZGC10)用 LC 液体培养基培养 20~24 h 后取样用荧光显微镜观察,结果发现 *gfp* 在重组菌 CryB 中能正常表达(图 2),同步生长菌体发光强度一致。由于在对数期随着菌体的不断生长,GFP 蛋白可以不断积累,所以荧光强度与菌体培养时间呈正比。

3.5 重组菌株与土壤微生物间基因转移频率

喷药前土著微生物数量测定结果见表 1。本研

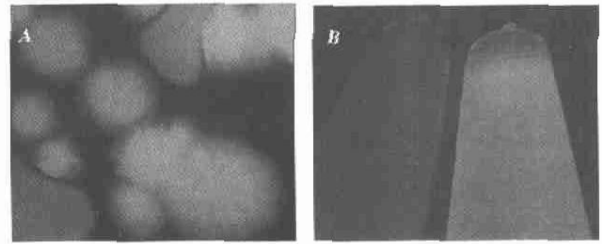


图 2 *gfp* 在苏云金芽胞杆菌重组菌株 CryB(pBMBZGC10)中的表达
Fig. 2 Expression of *gfp* in recombinant strain CryB(pBMBZGC10) of *Bacillus thuringiensis*.

A: GFP 基因在重组菌株 CryB(pBMBZGC10) 菌落中表达 Expression of *gfp* in colony of recombinant strain CryB(pBMBZGC10) under the UV light; B: GFP 基因在重组菌株 CryB(pBMBZGC10) 菌液中表达 [左:出发菌株 CryB; 右:重组菌株 CryB(pBMBZGC10)] Expression of *gfp* in suspension culture cells of recombinant strain CryB(pBMBZGC10) under UV light [Left: CryB stains; Right: CryB(pBMBZGC10) strain].

表 1 供试土著性微生物数量的测定

Table 1 Number of indigenous microorganisms from soil samples

土壤样品 Soil samples	细菌 Bacteria	放线菌 Actinomycete	真菌 Fungi
LA	2.9×10^7	2.61×10^6	2.9×10^7
LB	3.09×10^7	3.8×10^5	4×10^4
LC	8.4×10^6	8.9×10^5	3.4×10^5
CK	2.73×10^7	4.2×10^6	8.6×10^5

LA: 白菜 *Brassica pekinensis*; LB: 番茄 *Lycopersicon esculentum*; LC: 蕹菜 *Ipomoea aquatica*; CK: 不种植 No planting. 下同 The same below.

究在对所有得到的细菌、放线菌和真菌用 *gfp*-F 和 *cry*-R 引物对进行了 PCR 扩增,并进一步对在细菌一类中得到阳性结果的菌落进行了荧光检测和 DNA 抽提验证,发现这些阳性结果的菌落均来自于喷洒的重组菌,而非基因水平转移的结果。

3.6 重组菌株与植物间基因水平转移

实验结束后抽提供试植物根、茎、叶样品,共获得 108 个总 DNA 样品(图 3A),再用融合基因 *gfp*-F 和 *cry*-R 引物分对供试 DNA 样品进行 PCR 检测。结果表明,供试 108 个样品总 DNA 的 PCR 扩增结果全部为阴性,即在植物的根、茎、叶中没有检测到

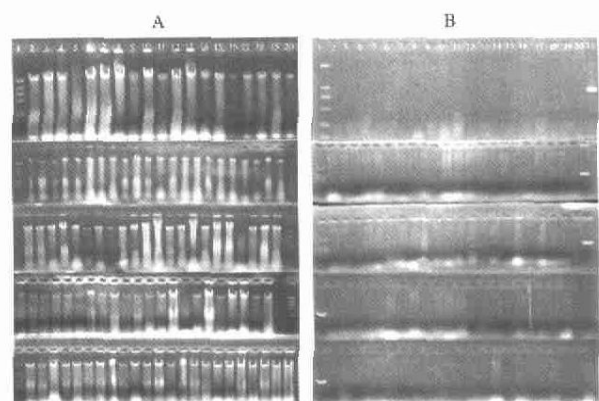


图 3 108 个植物样品的总 DNA 的凝胶图谱及其 PCR 检测

Fig. 3 Total DNA of 108 plant samples and PCR detection.

A: 108 个植物样品的总 DNA 的凝胶图谱(两边为 λ /HindIII marker) Total DNA of 108 plant samples; B: 108 个植物样品的总 DNA 的 PCR 检测(两边分别是 DL 2000 marker 或阳性对照) PCR detection of the total DNA of 108 plant samples.

融合基因的转移(图 3B)。

3.7 供试植株生物学性状的比较

在对供试植株抽提总 DNA 以前,分别选取根长、叶长、叶宽、株高和干重作为参考指标进行了生物学性状的比较测定。由表 2 可见,供试处理植株的根长、叶长、叶宽、株高和干重与对照均在相同变异范围内;表明喷洒了重组菌株 CryB(pBMBZGC10)后,3 种供试植物都没有发生明显的表型变化,即此重组菌对植物未产生负作用。

表 2 供试植株生物学性状的测定

Table 2 Biologic character detection of plants tested

植株编号 Plant No.	根长 Root length (cm)	叶长 Leaf length (cm)	叶宽 Leaf width (cm)	株高 Plant height (cm)	干重 Dry weight (g)
LA 1	6.70	6.67	2.90	14.30	8.44
LA 2	5.27	6.10	3.27	13.20	6.85
LA 3	10.23	7.13	4.13	15.37	13.18
LA CK	6.23	6.90	2.97	15.33	7.48
LB 1	5.33	5.33	2.93	21.67	6.32
LB 2	7.50	4.87	2.70	19.50	5.65
LB 3	7.20	4.20	2.43	21.87	6.92
LB CK	3.93	4.77	3.27	21.83	4.50
LC 1	4.57	5.70	0.87	14.50	1.61
LC 2	5.20	3.63	0.77	9.40	1.02
LC 3	6.17	3.53	0.73	8.00	0.80
LC CK	4.57	5.00	0.63	7.37	0.40

1)90 ml;2)60 ml;3)30 ml;CK:不施药 No spraying.

4 讨 论

进行转基因重组菌的安全性评价,需要选择恰当的标记基因、灵敏的检测手段和合适的实验方法。基因水平转移频率一般在 $10^{-6} \sim 10^{-7}$ 之间,但染色体携带的外源基因发生基因水平转移的频率同质粒载体携带的外源基因相比要低得多(尤其是不同种的菌株间,受 *mutSL* 错配修复系统的作用,基因水平转移的频率更低)^[12]。Baily 等^[1]报道定殖于甜菜的标记工程菌——荧光假单胞菌 SBW25 在实验室和田间试验中均未发现标记基因丢失和转移的现象,实验室条件和缺乏可移动遗传因子的情况下,染色体基因发生转移的频率接近为零,基本上可以忽略不计。有趣的是,在不少基因水平转移试验中,重组菌非但没有丢失或转移其携带的标记基因,相反,土著微生物中一些质粒及其携带的基因却转移到了重组菌内^[8]。

环境样品微生物总基因组 DNA 提取技术的建立和发展,为分子生物学技术在微生物生态学中的应用提供了物质基础。关于环境中微生物总 DNA/RNA 提取方法研究内容较多,主要包括:DNA/RNA 提取方法的建立和比较研究;提取 DNA/RNA 粗样品的进一步纯化方法研究等^[18]。丁志勇等^[4]采

用该法检测接种到土壤中苏云金芽胞杆菌的检测极限为 $2.2 \times 10^2 \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ ^[5]。该方法已广泛应用于监测释放的重组菌和以自由状态吸附在土壤颗粒表面的重组 DNA。在本研究中,考虑到 *cry1Ac* 基因也是土著苏云金芽胞杆菌的常见基因,进一步以绿色荧光蛋白基因作为标记基因,将二者构建成融合基因,检测时既可以通过荧光方法检测,又能利用融合基因的引物进行 PCR 扩增,从而达到快速准确地检测基因的来源和追踪目的基因 *cry1Ac* 在环境中的动态分布的研究目的。

本研究构建的携带 *gfp* 标记质粒的苏云金芽胞杆菌重组菌,除能用于测定自然条件下重组菌与土著微生物之间的基因水平转移和环境安全性等研究外,还可用于研究施用苏云金芽胞杆菌后,环境因素以及土著微生物对苏云金芽胞杆菌杀虫活性的影响,标记苏云金芽胞杆菌在自然条件下的存活期及其在植物与土壤中的动态变化,也可用于研究标记重组菌对土著微生物菌群的影响以及在生态环境中的动态变化,从而为菌剂的进一步开发与利用提供可靠的实验依据。

致谢 本科生范俊强参与部分工作。

参考文献

- Baily MJ, Lilley AK, Thompson IP, et al. 1995. Site directed chromosomal marking of a fluorescent *Pseudomonad* isolated from the phytosphere of sugar beet: Stability and potential for marker gene transfer. *Mol Ecol*, 4: 755 ~ 764
- Chalfie M, Kain S. 1998. Green Fluorescent Protein: Properties, Applications, and Protocols. A Wiley-Liss Publication. New York: John Wiley & Sons.
- Chen Z-Y(陈中义), Lu W(陆伟), Lin M(林敏), et al. 2001. Safety of agricultural biological genetic engineered microorganisms. In: Huang D-F(黄大方), eds. Genetic Engineering of Agricultural Microorganisms. Beijing: Science Press. 457 ~ 492 (in Chinese)
- Ding Z-Y(丁志勇), Xu C-R(许崇任). 1999. Analysis of soil microorganisms by using PCR and molecular hybridization method. *Acta Microbiol Sin* (微生物学报), 39(4): 381 ~ 383 (in Chinese)
- Janson JK. 2002. Antibiotic, chromogenic, and luminescent marker for bacteria. In: Christon JH, Ronald LC, Guy RK, eds. Manual of Environmental Microbiology. Washington: ASM Press. 604 ~ 614
- Jin S-Y(靳素英), Zhang J-Z(张嘉治), Di J-Y(狄军艳). 2003. Ecological studies on genetically engineered microorganism in environment. *Chin J Appl Ecol* (应用生态学报), 14(9): 1578 ~ 1580 (in Chinese)
- Li L(李林), Yang C(杨超), Liu Z-D(刘子铎), et al. 2000. Screening of acrySTALLIFEROUS mutant from *Bacillus thuringiensis* and their transformation properties. *Acta Microbiol Sin* (微生物学报), 40(1): 85 ~ 90 (in Chinese)
- Lieey AK, Fry JC, Day MJ, et al. 1994. In-situ transfer of an exogenously isolated plasmid between *Pseudomonas* spp. in sugar-beet rhizosphere. *Microbiology*, 140: 27 ~ 33
- Loper JE, Lindow SE. 2002. Reporter genes systems usefull in evaluating *in situ* gene expression by soil- and plant-associated bacteria. In: Christon JH, Ronald LC, Guy RK, eds. Manual of Environ

- mental Microbiology. Washington: ASM Press. 627~637
- 10 Liu Q(刘谦), Zhu X-Q(朱鑫泉), Cao M-Q(曹鸣庆), eds. 2001. Biosafety. Beijing: Science Press. (in Chinese)
- 11 Li Y-G(李友国), Zhou J-C(周俊初). 2003. Root colonization and nodulation of *Sinorhizobium fredii* HN01DL in *Glycine max* rhizosphere. *Chin J Appl Ecol* (应用生态学报), 14(8): 1283~1286 (in Chinese)
- 12 Matic I, Taddei F, Radman M. 1996. Genetic barriers among bacteria. *Trends Microbiol*, 4: 69~72
- 13 Sambrook J, Russell DW. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 96~99
- 14 Tiedje JM, Colwell RK, Grossman YL, et al. 1989. The planned introduction of genetically engineered organisms: Ecological considerations and recommendation. *Ecology*, 70: 298~315
- 15 Thomas I, Morgan W, Whipps M, et al. 2001. Plasmid transfer between *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* strains in laboratory culture, river water, and dipteran larvae. *Appl Environ Microbiol*, 67(1): 330~338
- 16 Tombolini R, Jansson JK. 1998. Monitoring of GFP tagged bacterial cells. *Meth Mol Biol*, 102: 285~298
- 17 Timms-Wilson TM, Van Overbeek LS, Trevors JT, et al. 2002. Quantification of gene transfer in soil and the phytosphere. In: Christon JH, Ronald LC, Guy RK, eds. Manual of Environmental Microbiology. Washington: ASM Press. 648~659
- 18 Zhang H-W(张惠文), Zhang Q-R(张倩茹), Zhou Q-X(周启星), et al. 2003. Introduction and progress of molecular microbial ecology. *Chin J Appl Ecol* (应用生态学报), 14(2): 286~292 (in Chinese)
- 19 Zhou Q(周琴), Sun M(孙明), Zhou J-C(周俊初), et al. 2003. A preliminary study on the expression of *gfp* gene in *Bacillus thuringiensis*. *Sci Agric Sin* (中国农业科学), 8: 981~984 (in Chinese)

作者简介 周琴,女,1975年生,博士,主要从事微生物分子生物学及基因安全方面的研究,发表论文10多篇. Tel: 027-87283455; E-mail: zhouqin@mail.hzau.edu.cn

第五届全国化学生态学学术研讨会第一轮通知

第五届全国化学生态学学术研讨会将于2005年5月中旬在广东省珠海市召开.此次会议由中国生态学会化学生态学专业委员会主办,农业部昆虫生态、毒理重点开放实验室和中国科学院会同森林生态实验站联合承办.会议就下列内容进行学术研讨:1. 昆虫信息素及其应用;2. 植物与其它有机体的化学作用;3. 植物化感作用;4. 天然活性有机物及其生态功能.

组委会会前将编辑论文摘要集,会议期间交流的优秀论文将由专业委员会推荐在国内外相关学术期刊发表.请参会代表在2005年3月31日前将论文摘要(A4纸一页)通过E-mail传至组委会.

联系人:张茂新 510642 广州天河五山 华南农业大学昆虫学系

Tel:020-85280301;E-mail:mxzhang@scau.edu.cn

胡飞 510642 广州天河五山 华南农业大学农学院

Tel:020-85280204;E-mail:hufei@mail.edu.cn

会议期间,组委会将安排珠海和澳门生态农场考察.欲访问香港的代表,组委会将给予安排,费用自理.欢迎国内同行及感兴趣的专家学者参会.会议第二轮通知将于2005年4月初发出.

中国生态学会化学生态学专业委员会

2004年11月10日