

释放后的转抗病虫基因作物对土壤生物群落的影响

王洪兴¹ 陈欣^{1*} 唐建军² 志水胜好³

1 (浙江大学华家池校区农业生态研究所, 杭州 310029)

2 (浙江大学玉泉校区植物科学研究所, 杭州 310027)

3 Laboratory of Comparative Environmental Agronomy, University of Tsukuba, Tsukuba, Ibaraki 305-8572, Japan

摘要: 土壤生物,尤其是土壤微生物多样性与活性的保持是农业生态系统健康稳定的基础。农业活动尤其是农作物植被类型的改变对土壤生物群落结构和活性具有显著的影响。释放后的转基因作物作为生态系统的一种新的生物组分,被引入农田生态系统之后所引发的农田生物群落(包括土壤微生物群落)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。本文对转抗虫 *Bt* 基因作物、转 T4-溶菌酶基因作物、转蛋白酶抑制剂 I 基因作物的基因产物、作物残体在土壤中的行为(如降解产物的存留形态与生物活性)及其对根际或残体周围土壤中各类生物,尤其是微生物群落结构与功能的影响进行了简要综合评述,指出基因表达产物的后效肯定是存在的且长远的,由其引发的土壤生物群落结构的变化是复杂的,因而有必要对不同类型的转基因作物释放后的生态效应做长期的跟踪研究。建议未来的研究工作应集中在以下 3 方面:(1)不同的转基因表达产物在环境中的迁移、结构变化、消长动态及其对生物保持毒杀性的时间;(2)不同类型转基因植物对土壤生物群落结构的影响趋势;(3)在实验室条件下,研究分离纯化的各种转基因表达产物对土壤各生物功能类群的影响。

关键词: 转基因作物,土壤生物群落,非靶标效应,转基因生物安全

中图分类号: Q754

文献标识码: A

文章编号: 1005-0094(2002)02-0232-06

Influence of released transgenic pest- and disease-resistant crops on plant-associated microorganisms in soil

WANG Hong-Xing¹, CHEN Xin^{1*}, TANG Jian-Jun², SHIMIZU Katsuyoshi³

1 Agroecology Institute, Life Science School, Zhejiang University, Hangzhou 310029

2 Institute of Plant Science, Life Science School, Zhejiang University, Hangzhou 310027

3 Laboratory of Comparative Environmental Agronomy, University of Tsukuba, Tsukuba, Ibaraki 305-8572, Japan

Abstract: The maintenance of biodiversity of organisms, especially microbes in the soil, plays a key role for a healthy and sustainable agroecosystem. Agricultural activities including farming systems affect significantly the structure and ecological functions of soil-borne plant-associated microorganisms. As a new biotic component of the ecosystem, released genetically engineered crops initiate a change in the biotic community, the health and the stability of an agricultural ecosystem. This paper focuses on the behavior of gene products released from the roots of transgenic pest- and disease-resistant crops (TPDRC) and the decomposition of TPDRC residue, and their effects on various organisms in the rhizosphere and surrounding crop residues in the soil. It is concluded that gene expression products have a long-term effect and lead to complex changes. It is suggested that a long-term study on ecological impacts of various released TPDRC is necessary. The emphasis should be focused on the following three aspects: (1) behavior of various products from different transgenic plants and their biotic activity in agroecosystems; (2) influence

of transgenic plants on community composition of soil-borne microorganisms and (3) influence of various isolated and purified gene expression products on microorganism functional groups in container culture conditions.

Key words : transgenic crops , plant-associated microorganisms in soil , non-target effect , GMO bio-safety

土壤微生物多样性与活性的保持是农业生态系统健康和稳定的基础(Kennedy & Smith ,1995 ;Finlay *et al.* ,1997 ;Groffman & Bohlen ,1999) ,农业活动尤其是农作物植被类型的改变对土壤微生物群落结构和活性具有显著的影响(Grünwald *et al.* ,1995)。随着优质、抗病虫、耐逆境的转基因作物不断育成和释放应用 ,农田植被类型与特征随之发生了变化。由此引发的农田生物群落(包括土壤微生物群落)的变化及其对农业生态系统的健康与稳定所产生的影响 ,已成为全球关注的研究热点(Burke ,1994 ;Falk ,1994 ;Morra ,1994 ;Trevors *et al.* ,1994 ;Kathen ,1996 ;钱迎倩 ,马克平 ,1998 ;Firbank & Forcella ,2000)。

基于公众出于对生物技术产品释放到环境中后可能引发的生态风险不确定性的担心而发起的全球性的行动 ,最早始于 20 世纪 70 年代。起先是科学家的行为 ,尔后是公众和政界的参与。在转基因植物的生态安全问题上 ,人们一直比较关注环境和生态风险方面 ,包括基因漂移导致的遗传污染、转基因逃逸、转基因的非靶标效应、抗病虫性衰退及生物多样性(尤其是昆虫群落多样性)下降、碳等元素循环发生变化等(Burke ,1994 ;Falk ,1994 ;Trevors *et al.* ,1994 ;Kathen ,1996 ;钱迎倩 ,马克平 ,1998 ;Firbank & Forcella ,2000)。在转 *Bt* 基因植物的生态安全问题中 ,人们一直比较关注的主要是害虫对转 *Bt* 基因植物重新产生抗性、转 *Bt* 基因植物对非靶标昆虫的伤害及对昆虫群落多样性的影响(Brewer ,1991 ;Gould *et al.* ,1997 ;Tabashnik ,1997 ;崔金杰 ,夏敬源 ,2000)。近年来 ,转基因植物的产物(如抗虫蛋白)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也逐渐引起了人们的注意。Jepson *et al.* (1994)提出 ,需要研究转 *Bt* 基因植物的产物(products)对地上和地下生物区系的影响 ,尤其是对土壤微生物群落的影响 ,需要作长期的田间试验监测 ;Morra (1994)认为 ,目前人们对转基因植物产物(包括基础代谢产物和次生代谢产物)对土壤微生物的影响认识和研究甚少 ,需要建立不同的研究方

法进行探讨。

转抗病虫基因作物是迄今种植面积较大的转基因作物 ,因而其安全性(对非靶标生物的影响)首先引起了人们的特别关注。据报道 ,到 1997 年为止 ,已有 21 种转 *Bt* 基因作物(以抗虫的玉米、马铃薯和棉花为主)进入了大规模的商品化生产 ;1999 年转 *Bt* 基因作物种植面积约占全球转基因作物总面积的 22%(James ,1999)。在中国 ,转基因植物中 ,只有转 *Bt* 基因的抗虫作物投入了商品化生产(吴刚等 ,1999)。基于此 ,本文主要对以转 *Bt* 抗虫基因作物为代表的转抗虫、抗病基因作物释放到农业生态系统中后对土壤生物群落产生的影响进行简要综述 ,并对未来研究重点提出建议。

1 转 *Bt* 基因作物表达产物经根系分泌后在土壤中的行为及其对土壤微生物的影响

有关转基因作物表达产物在土壤中的行为 ,目前研究较多的是转 *Bt* 基因作物表达产物 *Bt* 蛋白在土壤中的行为。*Bt* 基因是苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis* ,*Bt*)晶体蛋白基因的简称。由于这些蛋白具有杀虫活性 ,故被称为“杀虫晶体蛋白(insecticidal crystal proteins ,ICPs)”或“ δ -内毒素(δ -endotoxin)”。研究表明 ,由苏云金芽孢杆菌产生的 *Bt* 蛋白进入土壤后 ,与土壤粘粒(Tapp *et al.* ,1994)和腐殖酸(Crecchio & Stotzky ,1998)迅速结合 ;结合态的 *Bt* 蛋白仍保持杀虫活性(Tapp & Stotzky ,1995) ,而且不易被土壤微生物分解(Venkateswerlu & Stotzky ,1992 ;Koskella & Stotzky ,1997) ,保持杀虫活性的结合态 *Bt* 蛋白在土壤中存留时间至少可达 234 天(Tapp & Stotzky ,1998) 。Tapp & Stotzky(1995)通过生物测定(Bioassay)研究从苏云金芽孢杆菌的芽孢中纯化的 *Bt* 蛋白与土壤颗粒结合后的活性表明 ,与土壤颗粒结合的 *Bt* 蛋白对烟草甲虫类害虫(*Leptinotarsa decemlineata*)和天蛾类害虫(*Manduca sexta*)的幼虫仍有毒害作用 ,而且土壤结合态的 *Bt* 蛋白的毒性比非结合态的还强。Palm *et al.* (1996)测定比较了转 *Bt* 基因棉花叶片的 *Bt* 蛋白和纯化的 *Bt* 蛋

白在土壤中的降解速度,发现无论是叶片 *Bt* 蛋白还是纯化的 *Bt* 蛋白,在土壤中的浓度均是在前 14 天里迅速下降,然后缓慢下降,并在较长时期(几个月)内保持一定浓度。他们还指出,保留在土壤中的这些较低含量的 *Bt* 蛋白可能会对非靶标生物产生不利的影响,并且这种影响有可能随着转 *Bt* 基因植物的不断种植而积累。Saxena *et al.* (1999)在《Nature》上报道了他们的研究结果,发现 *Bt* 玉米根系分泌 *Bt* 蛋白到根际土壤中,与土壤颗粒迅速结合。生物测定表明,结合态的 *Bt* 蛋白仍保持杀虫活性。但转 *Bt* 基因植物根系分泌或死亡后的根系将 *Bt* 蛋白释放到根际土壤后,对根际生物(包括土壤动物、微生物等)群落多样性和主要功能类群活性的影响在该研究中未论及。

Donegan *et al.* (1995)研究了纯化的 *Bt* 蛋白、3 个转 *Bt* 基因棉品系、转基因棉母本、转 *Bt* 基因棉的母本 + 纯化 *Bt* 蛋白、纯土壤(作对照)对土壤微生物群落组成、真菌和细菌数量的影响,结果表明,其中 2 个转 *Bt* 基因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* 基因棉花品系及纯化的 *Bt* 蛋白对土壤细菌和真菌数量的影响不显著。通过微生物群落物质利用和 DNA 指纹的分析也发现,与其他处理相比,那 2 个转 *Bt* 棉花的细菌群落物种组成也发生了明显的变化。由于纯化的 *Bt* 蛋白对土壤微生物无显著影响,Donegan *et al.* (1995)认为转 *Bt* 基因棉可能是由于遗传修饰后的植株的生理生化特性发生了变化,从而对土壤微生物产生影响,而不是表达产物的直接影响。

2 转抗病基因作物对土壤微生物的影响

溶菌酶(lysozyme)是一种抗菌成分。转入 T4-溶菌酶基因的作物可以大大提高对致病微生物的抗性(Düring *et al.*, 1993; Stahl *et al.*, 1998)^①。Lottmann *et al.* (1999)等对转 T4-溶菌酶基因的马铃薯作了较为系统的研究,比较测定了转基因马铃薯、转基因马铃薯对照品种(除了 T4-溶菌酶基因外其余遗传组成完全与转基因马铃薯相同)和非转基因马铃薯在生长过程中根际分泌物对根际土壤以及块茎表面的微生物种群的影响。结果表明,在马铃薯的不同发育阶段(幼苗期、开花期、结实期),转基因马铃薯与非转基因马铃薯两者根际土壤细菌的数量没有显著的差异。

在土壤微生物中,有一些特殊种类能产生类似植物激素的物质或者能够直接产生植物激素如 IAA(吲哚乙酸),其中产 3-IAA 的微生物种群能抵抗病原物。Lottmann *et al.* (1999)同时研究了转 T4-溶菌酶基因的马铃薯对产 3-IAA 的微生物种群的影响,发现能够分泌 3-IAA 的微生物种群数量占微生物总量的百分比在马铃薯不同生育时期存在差异,其变化趋势是:第 1 年幼苗期较高,开花期下降,结实期又趋于上升;第 2 年,开花期和结实期的百分比均比幼苗期的要大。但这些变化趋势在转基因和非转基因的马铃薯中没有明显差异。

Lottmann & Heuer (2000)在转基因马铃薯和非转基因马铃薯的块茎表面接种 2 种拮抗性的微生物 *Pseudomonas* QC14-3-8 和 *Sirratia grimesii* L16-3-3,两者都是具有利福平抗性的突变株,前者具有溶菌酶抗性,后者则是敏感的。把接种后的马铃薯块茎种下以观察转基因马铃薯对这 2 种微生物增殖情况的影响。结果发现(1)在马铃薯幼苗期和开花期,这 2 种微生物在转基因马铃薯、非转基因马铃薯、转基因马铃薯对照品种的 3 种根际中,种群数量的变化趋势无明显差异。但不同生育期存在差异,微生物生物量在开花期比幼苗期稍低,而在结实期,转基因马铃薯块茎表面微生物群落的总量反而要比非转基因以及转基因对照品种高;(2)对于抗性菌株来讲,在幼苗期和结实期,增殖情况在 3 种马铃薯类型中没有明显的差异;但在开花期,转基因植株根际中的抗性菌株数量比非转基因的要高一些。

植物根际分泌物对土壤微生物起一种选择性刺激作用(Graysron *et al.*, 1998),在 Lottmann & Heuer (2000)的研究中,在外源基因表达量最高的开花期,对溶菌酶(基因表达产物)具有抗性的菌株数量大大增加,这说明,正是由于该微生物具有对溶菌酶的抗性而使其能在作物外源基因表达量最大的时候大量增殖,基因表达产物溶菌酶对抗性菌株起到选择性刺激作用,其机理可能是,敏感的微生物种群在宿主根际分泌物分泌达到高峰期时的急剧减少,为抗性微生物种群的发展提供了更丰富的物质基础和更广阔的生存空间。

^①Stahl D J, A Maser, J Dettendoerfer, B Hornschulte, J E Thomzik, R Hain and R Nehl, 1998. Increased fungal resistance of transgenic plants by heterologous expression of bacteriophage T4-lysozyme gene. 7th International Congress on Plant Pathology. Edinburgh

推测起来,对溶菌酶敏感的菌株应该只能是非转基因植株中分离得到,因为转基因品种能产生大量的对微生物有害的溶菌酶。但在 Lottmann & Heuer(2000)的研究中,敏感性菌株 L16-3-3 在转基因马铃薯和非转基因马铃薯中的增殖情况相差无几,特别是在作物衰老时期,L16-3-3 在转基因马铃薯根际土壤中的数量明显上升,估计这种情况可能与转基因马铃薯生长后期转基因的表达量急剧下降有关。虽然 2 种接种微生物在马铃薯的根际和块茎表面都能正常增殖,但是在块茎表面的细菌数量却比根际数量低一个数量级,说明作物根际分泌物能够为微生物的增殖生长提供营养物质,越靠近作物根部,根际分泌物量越大,基因表达产物的浓度也就越高,对微生物的生长发育及增殖的影响也就越大。

Oger *et al.* (1997)研究了转产冠瘿碱基因植物(Opine-producing transgenic plant)根系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量无明显差异,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,表明转基因植物的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。Glandorf *et al.* (1997)报道,转抗真菌和抗细菌基因植物根系分泌物中含有抗真菌蛋白和抗细菌蛋白,对许多根际有益微生物(beneficial microorganisms)功能类群如菌根真菌、根瘤菌等的活性产生影响(如转基因烟草根系分泌的 β -1,3-葡聚糖酶降低菌根真菌的侵染和菌根的形成等)。

为了获得植物对病原物的持久广谱抗性,人们以动物、植物和微生物为基因供体进行了转基因研究。结果表明,植物所释放的抗细菌和抗真菌蛋白对腐生性的土壤微生物区系可能存在影响。这些环境中大量增加的抗微生物的化合物不仅作用于靶标病原物,而且对有益微生物如菌根真菌、根瘤菌及其他与植物健康、植物残体分解及养分循环有关的微生物也有影响,从而引起人们的极大关注。基因表达释放出来的蛋白具有潜在的抗真菌和/或抗细菌活性,可能抑制植物根际某些特定类型的土传植物病原物的活性。当然,对腐生性微生物的非靶标效应的报道是不多的也是不完全的,而且主要集中在菌根真菌的共生上。烟草中与抗真菌病原物蛋白有关的基因表达多数情况下不影响菌根真菌的根系感染,但表达水平较高的第 2 组烟草 β -1,3-葡聚糖酶

却可抑制感染,这意味着转基因表达产物存在着非靶标效应。推测其他的效应可能与基因产物有关。许多转基因植物的转入基因表达产物可以通过伤口等被释放到根际中。这些从伤口逸释的物质可以为黏土或腐殖质所吸附,从而在较长时间内保持着生物活性(Glandorf *et al.*, 1997)。

3 遗留在土壤中的转基因作物残体及其降解中间产物在分解过程中对土壤生物的影响

由于作物本身只有一部分被生产经营者收获,大部分会残存于或重新返回土壤中(如秸秆还田)。作物残体较长时间残存于土壤中,延长了土壤生物群落与植物残体内存在的转基因产物(如杀虫因子)的接触时间,从而对生物群落产生影响。此外,作物残体在土壤中逐步分解的过程中,其降解产物也会对土壤生物群落产生一系列影响,因而研究转基因作物残体在分解过程中对土壤生物群落的影响也是一个重要方面。

Donegan *et al.* (1997)研究了在转蛋白酶抑制剂 I 基因烟草和非转基因烟草的凋落叶片分解过程中,基因表达产物在土壤中的行为及其对土壤生物群落的影响。实验分 3 个处理,即把转蛋白酶抑制剂 I 基因的烟草和非转基因烟草的叶子装在袋子里面埋在地下,并设空白对照,取样测定烟草叶片的分解情况及微生物的呼吸、种群数量动态,同时测定掩埋叶片样品附近土壤中线虫、原生动物的种群数量动态。结果发现,转基因烟草叶子中的蛋白酶抑制剂 I 在至少 2 个月内仍能保持相对生物学免疫活性。57 天后由于转基因蛋白产物可能与土壤颗粒、矿物质颗粒结合在一起,因而利用 ELISA 检测不到其存在,但这种微量的以结合状态存在的转基因蛋白仍有可能继续保持生物活性并对附近微生物产生影响。从残体降解速度看,转基因和非转基因烟草基本上是一致的,其分解最高速度和微生物呼吸率最大值的出现时间表现一致。

Donegan *et al.* (1997)的研究还发现,在掩埋转基因烟草叶片的周围土壤中,线虫数量比非转基因烟草和对照品种的要高。而且,在转基因烟草叶片残体周围取食真菌的线虫数量要远远高于非转基因烟草和对照品种的处理,取食真菌的线虫和取食细菌的线虫数量之比在转基因烟草中也显著高于非转基因烟草。线虫的这种变化反映了真菌和细菌营养

类群上的变化,间接地反映了土壤中细菌和真菌数量的变化。这种变化所具有的可能的生态学意义值得进一步探讨。

在 Donegan *et al.* (1997) 的整个实验过程中,土壤生物的数量随着时间呈现出一定的规律性变化:在早期的取样中螨虫数量达到高峰并且占了微节肢动物总数的 90%;而在后期弹尾目昆虫的数量增加并占了主导地位;原生动物的数量在转基因作物和非转基因作物根际中没有明显的差别。在降解试验过程中,土壤微生物的呼吸率在降解初期最高,而后逐渐下降,其变化规律在转基因作物和非转基因作物中差异不明显。

从物质的变化看,在降解初期,转基因烟草和非转基因烟草叶片碳素的含量是相近的,但是 35 天以后一直到实验结束的整个过程中,转基因作物叶片碳素的含量明显低于非转基因作物叶片的碳素含量 (Donegan *et al.*, 1997)。这说明转基因烟草叶片在物质组成和结构上与对照品种存在差异。在转基因品种和非转基因品种的叶片降解过程中,尽管土壤昆虫的数量都很少,但在转基因作物的叶片残体及其周围土壤中昆虫数量更少一些,可能是由于该蛋白酶抑制剂对昆虫有一定杀伤力,表明转基因产物对土壤昆虫也产生了直接影响。还有一点需要说明的是,把叶片埋入地下进行试验本身就为微生物提供了一个丰富的食物仓库,这种外来因素的介入往往会给原来存在的微生物群落带来一定影响。

总之,转基因烟草和非转基因烟草在分解过程中的确存在着差异(如残存叶片碳素含量的变化),土壤中微生物类群也发生了一定变化,蛋白酶抑制剂在 57 天后仍然保持一定活性,这是观测到的事实。随着大面积种植转基因作物,其影响也许会变得更加复杂,值得进一步探讨。

4 结语和展望

转基因作物对土壤生物群落尤其是微生物群落的影响情况比较复杂,目前的研究还未能很好地阐明转基因作物对土壤微生物群落产生的各种影响,特别对于好气性易培养的微生物更是如此。在转基因作物和非转基因作物根际土壤中,微生物群落结构和种群数量都未发现显著的差异,在转基因作物和非转基因作物的生长发育及衰老的过程中,微生物种群有着相似的变化,但尚未找出其变化规律,甚

至有些微生物种类在转基因作物根际土壤中的数量还要高于非转基因作物。有的研究还表明,转基因和非转基因作物在分解过程中存在一定的差异,但造成这种差异的原因还不是很清楚。作物体内的转基因表达产物在土壤中的一段时间内尚能保持活性,因此,研究转基因表达产物在土壤中的分解及去向问题仍具有十分重要的意义。

我们认为,从土壤生态学的角度,有关转基因植物释放后的生态安全问题,未来应着重以下几个方面的研究:

(1) 不同的转基因表达产物在环境中的迁移、结构变化、消长动态及其对生物保持的毒杀性的时间;

(2) 不同类型转基因植物对土壤生物群落结构的影响趋势以及对土壤中一些特有微生物功能类群活性的影响;

(3) 在实验室条件下,研究分离纯化的各种转基因表达产物对土壤各类生物功能类群的影响。

参考文献

- 崔金杰,夏敬源,2000. 转 *Bt* 基因棉田昆虫群落多样性及其影响因素研究. 生态学报, **20**(5): 824 ~ 829
- 钱迎倩,马克平,1998. 经遗传修饰生物体的研究进展及其释放后对环境的影响. 生态学报, **18**(1): 1 ~ 9
- 吴刚,崔海瑞,舒庆尧,1999. *Bt* 转基因植物的研究进展及其持续利用. 生物技术, **9**(5): 34 ~ 38
- Brewer G J, 1991. Resistance to *Bacillus thuringiensis* subsp. *Kurstaki* in sunflower moth (Lepidoptera: Pyralidae). *Environmental Entomology*, **20**(1): 316 ~ 322
- Burke T, 1994. Ecological implication of transgenic plant release. *Molecular Ecology*, **3**: 53 ~ 55
- Crecchio C and G Stotzky, 1998. Insecticidal activity and biodegradation of the toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* bound to humic acids from soil. *Soil Biology and Biochemistry*, **30**: 463 ~ 470
- Donegan K K, C J Palm, V J Fieland, L A Porteous, L M Ganio, D L Schallr, L Q Bucaco and R J Seidler, 1995. Changes in levels, species and DNA fingerprints of soil microorganisms associated with cotton expressing the *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* endotoxin. *Applied Soil Ecology*, **2**(2): 111 ~ 124
- Donegan K K, R J Seidler, V J Fieland, D L Schaller, C J Palm, L M Ganio, D M Cardwell and Y Steinberger, 1997. Decomposition of genetically engineered tobacco under field condition: persistence of the proteinase inhibitor I. product and effects on soil microarthropod populations. *Journal of Applied Ecology*, **34**: 767 ~ 777
- Düring K, P Porsch, M Fladung and H Lörz, 1993. Transgenic

- potato plants resistant to the phytopathogenic bacterium *E. carotovora*. *Plant Journal*, **3**: 587 ~ 598
- Falk B W, 1994. Will transgenic crops generate new viruses and new diseases? *Science*, **263**: 1395 ~ 1396
- Finlay B J, S C Maberly and J I Cooper, 1997. Microbial diversity and ecological function. *Oikos*, **80**: 209 ~ 213
- Firbank L G and F Forcella, 2000. Genetically modified crops and farmland biodiversity. *Science*, **289**: 1481 ~ 1482
- Glandorf D C M, P A H M Bakker and L C Loon, 1997. Influence of the production of antibacterial and antifungal proteins by transgenic plants on the saprophytic soil microflora. *Acta Botanica Neerlandica*, **46**(1): 85 ~ 104
- Gould F, A Anderson and A Jones, 1997. Initial frequency of alleles for resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in field populations of *Heliothis virescens*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, **94**: 3519 ~ 3523
- Graysron S J, S Q Wang and C D Campbell, 1998. Selective influence of plant species on microbial diversity in the rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry*, **30**(3): 369 ~ 378
- Groffman P M and P J Bohlen, 1999. Soil and sediment biodiversity—Cross-system comparisons and large-scale effects. *BioScience*, **49**: 139 ~ 148
- Grünwald N J, S J Hu and A H C van Bruggen, 1995. Effects of cover crop decomposition on microbial communities, nutrient cycling and receptivity to damping-off pathogens of tomato in organic versus conventionally managed soil. *Bulletin of the Ecological Society of America*, **76**(2): 104
- James C. Global view of commercialized transgenic crops. International Service for the Acquisition of Agri-biotech Application, Briefs No. 12, 1999, <http://www.isaaa.org>
- Jeppson P C, B A Croft and G E Pratt, 1994. Test systems to determine the ecological risks posed by toxin from *Bacillus thuringiensis* genes in crop plants. *Molecular Ecology*, **3**(1): 81 ~ 89
- Kathen A, 1996. The impact of transgenic crop releases on biodiversity in developing countries. *Biotechnology Development and Monitor*, **28**: 10 ~ 15
- Kennedy A C and K L Smith, 1995. Soil microbial diversity and the sustainability of agricultural soils. *Plant and Soil*, **170**: 75 ~ 86
- Koskella J and G Stotzky, 1997. Microbial utilization of free and clay-bound insecticidal toxins from *Bacillus thuringiensis* and their retention of insecticidal activity after incubation with microbes. *Applied and Environmental Microbiology*, **63**: 3561 ~ 3568
- Lottmann J and H Heuer, 2000. Establishment of introduced antagonistic bacteria in the rhizosphere of transgenic potatoes and their effect on the bacterial community. *Microbiology Ecology*, **33**: 41 ~ 49
- Lottmann J, H Heuer, K Smalla and G Berg, 1999. Influence of transgenic T₄-lysozyme-producing potato plants on potentially beneficial plant-associated bacteria. *Microbiology Ecology*, **29**: 365 ~ 377
- Morra M J, 1994. Assessing the impact of transgenic plant products on soil microorganisms. *Molecular Ecology*, **3**(1): 53 ~ 55
- Oger P, A Petit and X Dessaux, 1997. Genetically engineered plants producing opines alter their biological environment. *Nature Biotechnology*, **15**(4): 369 ~ 372
- Palm C J, D L Schaller, K K Donegan and R J Seidler, 1996. Persistence in soil of transgenic plant produced *Ballicus thuringiensis* var. *kurstaki* δ -endotoxin. *Canadian Journal Microbiology*, **42**: 1258 ~ 1262
- Saxena D, S Flores and G Stotzky, 1999. Transgenic plants: Insecticidal toxin exudates from *Bt* corn. *Nature*, **402**: 408
- Tabashnik B E, 1997. Seeking the root of insect resistance to transgenic plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, **94**: 3488 ~ 3490
- Tapp H, L Calamai and G Stotzky, 1994. Adsorption and binding of the insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* and subsp. *tenebrionis* on clay minerals. *Soil Biology and Biochemistry*, **26**: 663 ~ 679
- Tapp H and G Stotzky, 1995. Insecticidal activity of the toxins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* and *tenebrionis* adsorbed and bound on pure and soil clays. *Applied and Environmental Microbiology*, **61**(5): 1786 ~ 1790
- Tapp H and G Stotzky, 1998. Persistence of the insecticidal toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, **30**: 471 ~ 476
- Trevors J T, P Kuikman and B Watson, 1994. Transgenic plants and biogeochemical cycles. *Molecular Ecology*, **3**(1): 57 ~ 64
- Venkateswerlu G and G Stotzky, 1992. Binding of the protoxin and toxin proteins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* on clay minerals. *Current Microbiology*, **25**: 225 ~ 233