

大气 CO₂ 浓度升高对转基因玉米 Bt 毒素表达量的影响

刘凯强¹, 解海翠², 张天涛¹, 白树雄¹, 王振营¹, 何康来^{1*}

(1. 中国农业科学院植物保护研究所, 北京 100193; 2. 河北科技师范学院生命科技学院, 秦皇岛 066000)

摘要 大气 CO₂ 浓度升高不仅影响植物营养化学成分的变化, 还能够引起植物次生抗虫物质表达量的改变, 进而影响作物-害虫的互作关系。本试验利用开顶式气室(OTC)和室内动态气室模拟当前和未来大气 CO₂ 浓度(约 390、550、750 μL/L)环境, 测定了不同大气 CO₂ 浓度下普通玉米‘郑 58’和转 *cry1Ac-m* 基因玉米的营养物质成分、转 *cry1Ac-m* 基因玉米 Cry1Ac 杀虫蛋白的含量, 以及取食不同大气 CO₂ 浓度环境下生长的‘郑 58’或转 *cry1Ac-m* 基因玉米叶片的亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis* (Guenée) 初孵幼虫死亡率。结果表明, 与对照相比, 高大气 CO₂ 浓度(750 μL/L)环境下生长的转基因和对照玉米叶片中淀粉、可溶性糖、非结构性碳(TNC)含量及 TNC:N 都明显增加, 而 N 含量差异不显著。对照玉米叶片的 N 含量显著高于转基因玉米, 其他营养成分没有显著变化。随着大气 CO₂ 浓度的升高, 转基因玉米的 Cry1Ac 蛋白表达量有下降的趋势, 但各处理间差异不显著。亚洲玉米螟取食生长在不同大气 CO₂ 浓度环境下的‘郑 58’或转 *cry1Ac-m* 基因玉米叶片 48 h 后, 死亡率没有显著差异; 转 *cry1Ac-m* 基因玉米具有显著的杀虫效果。

关键词 大气 CO₂; 转基因玉米; 亚洲玉米螟; Bt 毒素

中图分类号: S 435.132 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3969/j.issn.0529-1542.2017.02.010

Effects of elevated atmospheric CO₂ concentration on the expression of Bt toxin in transgenic maize

Liu Kaiqiang¹, Xie Haicui², Zhang Tiantao¹, Bai Shuxiong¹, Wang Zhenying¹, He Kanglai¹

(1. Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China; 2. College of Life Science and Technology, Hebei Normal University of Science and Technology, Qinhuangdao 066000, China)

Abstract Elevated CO₂ (eCO₂) will generally lead to the change of chemical composition of plants. On the other hand, eCO₂ may also mediate the changes in plant secondary metabolism, which will affect the plant-herbivore interaction. This research simulated the growth and development of the corn line ‘Zheng 58’ and a line expressing Bt Cry1Ac toxin (GM-line), *Ostrinia furnacalis* and their interactions under ambient environment with two eCO₂ (about 390 μL/L, 550 μL/L, 750 μL/L) with open top chambers (OTCs) and closed dynamic chambers (CDC). Corn plant chemistry, especially the C and/or N contents as well as Cry1Ac toxin were assessed. The results showed that the starch and soluble sugar content, TNC and TNC:N were significantly increased in the plant tissues under eCO₂ (750 μL/L) OTC, but the N contents in leaves were not significantly different among CO₂ concentrations. However, the N content in leaves of ‘Zheng 58’ was significantly higher than that in GM-line. Although the amount of Cry1Ac toxin expressed in GM-line leaves declined along with the increase in atmospheric CO₂ level, there was no significant difference among atmospheric CO₂ treatments. eCO₂ did not significantly affect the mortality of *O. furnacalis* in 48 h. The survival rate was significantly lower in GM-line.

Key words atmospheric carbon dioxide; transgenic maize; *Ostrinia furnacalis*; Bt toxin

大气 CO₂ 浓度上升可提高植物的光合能力和生产产力, 影响植物组织内化学物质累积。一方面, 大气

收稿日期: 2016-05-03 修订日期: 2016-07-10

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项(201303026)

* 通信作者 E-mail: klhe@ippcaas.cn

CO₂ 浓度升高影响植物营养化学成分的变化,多数研究报道认为大气 CO₂ 浓度升高使植物组织内 C/N 增加,即组织内碳水化合物含量提高,含 N 化合物含量降低^[1-5];另一方面,大气 CO₂ 浓度升高也会引起植物次生抗虫物质的表达发生变化,如大气 CO₂ 浓度升高会促进针叶林总酚和单萜的积累^[6]。紫苜蓿 *Medicago sativa* (L.) 组织中皂苷含量随着大气 CO₂ 浓度升高而显著提高,但组织中黄酮类化合物含量变化不大^[7]。大气 CO₂ 浓度升高环境下生长的转基因棉花棉铃内 Bt 蛋白表达量显著降低^[8]。

玉米是重要的粮食、饲料及工业原料,亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis* (Guenée) 是严重为害玉米的重要害虫。转基因抗虫玉米的出现,为防治玉米害虫提供了新的途径,Bt 蛋白作为转基因玉米表达的最重要的外源性抗虫物质,在大气 CO₂ 浓度升高情况下的表达量变化是一个值得研究的问题。目前,关于大气 CO₂ 浓度升高下,转基因玉米 Bt 蛋白表达量变化的研究尚未见报道。

本试验测定了不同大气 CO₂ 浓度下普通玉米‘郑 58’和转 *cry1Ac-m* 基因玉米的营养物质含量、转 *cry1Ac-m* 基因玉米 Cry1Ac 杀虫蛋白表达量,并测定了取食两种玉米离体组织的亚洲玉米螟初孵幼虫的死亡率,为未来气候变化情境下转基因玉米抗虫性的变化趋势与利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 不同大气 CO₂ 环境

试验于 2015 年在 15 个正八边形开顶式气室 (open-top chamber, OTC) 内进行 (直径 4.2 m, 高 3.8 m), 气室位于吉林省公主岭市中国农业科学院植物保护研究所野外科学观测试验站。试验设置 3 个大气 CO₂ 浓度处理, 即约 390 μL/L (当前大气 CO₂ 浓度)、550 μL/L 和 750 μL/L (通过预测得到的未来大气 CO₂ 浓度)^[9-10]。OTC 由气室、控制室及控制系统组成, 具体结构和调控方式详见文献^[11]。OTC 内试验设计采用裂区设计, 大气 CO₂ 浓度为主区, 玉米品种为裂区, 即先按照大气 CO₂ 浓度设置 3 个处理的小区 (主处理); 然后在主处理的小区内引进玉米品种的 2 个处理 (副处理), 共有 6 个处理, 重复 5 次。

1.2 供试玉米

试验所用玉米品种包括转 *cry1Ac-m* 基因玉米 (启动子: 花椰菜花叶病毒启动子 CaMV35S, 终止子: 胭脂碱合成酶基因 (nos) 终止子), 对照‘郑 58’

(转基因玉米受体), 均由中国农业大学玉米中心提供。于 5 月 10 日播种, 行距 50 cm, 株距 30 cm, 每气室中间以 60 目纱网分开, 左右两侧分别种植 30 株转基因玉米和对照玉米。

1.3 供试亚洲玉米螟

亚洲玉米螟 *O. furnacalis* 来自吉林省公主岭市田间自然发生种群, 在室内用人工饲料^[12] 饲养数代后备用。

1.4 玉米组织内化学物质含量测定

玉米播种 45 d 后, 每小区随机取 5 株玉米, 取其叶片剪碎混匀后测定碳水化合物和 Cry1Ac 蛋白等化学物质含量。非结构性碳 (淀粉和糖类) 采用 Tissue 和 Wright^[13] 的方法测定。用凯氏定氮法 (Model KDY-9830 凯氏定氮仪, 北京) 测定氮含量。采用酶联免疫吸附法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 测定 Cry1Ac 蛋白含量, 试剂盒为 Agdia 公司生产 (试剂盒货号: PSP06200, 检测灵敏度: 0.01 ppb)。

1.5 玉米叶片室内生测

分别采集 3 个大气 CO₂ 浓度 OTC 中的玉米叶片, 放在直径 9 cm 的塑料培养皿中 (皿盖上有直径 3.5 cm 圆孔, 覆以 100 目尼龙纱网, 保证培养皿内的 CO₂ 浓度), 接入亚洲玉米螟初孵幼虫 50 头。每处理分两组, 分别放在 CO₂ 浓度与叶片生长环境相同的人工气候箱 (CDCC-1 型, 宁波赛福 PRX-450D-CO₂) 和当前大气 CO₂ 浓度人工气候箱 (CDCC-1 型, 宁波赛福 PRX-450D) 内饲养。人工气候培养箱内温度为白天 (28±1) °C, 夜间 (27±1) °C; 相对湿度 75%~85%; 光周期 L//D=16 h//8 h。

1.6 数据统计分析

对玉米品质的影响和对玉米螟死亡率的影响采用裂区设计的方差分析, 对 Bt 毒素表达量采用单因素方差分析, 平均数比较采用 LSD 检验, $P < 0.05$ 。统计分析计算用 SAS 软件实现。

2 结果与分析

2.1 玉米叶片化学成分含量

不同大气 CO₂ 浓度环境下生长的玉米, 其叶片的可溶性糖和淀粉含量差异显著, 而 N 含量差异不显著 (表 1), 因而非结构性碳比氮 (TNC:N) 差异显著。与当前大气 CO₂ 浓度相比, 在 750 μL/L CO₂ 浓度环境下生长的玉米叶片可溶性糖、淀粉、TNC 含量和 TNC:N 分别增加了 15.9%、10.3%、12.0% 和 17.3%, N 含量没有显著差异; 而在 550 μL/L

CO₂ 浓度环境下生长的玉米叶片除 TNC:N 显著升高了 7.0% 外, 其余参数无显著差异(图 1)。与 550 μL/L CO₂ 浓度相比, 750 μL/L CO₂ 浓度下生长的玉米叶片可溶性糖含量、TNC 含量和 TNC:N 显著升高了 16.4%、9.0%、9.5%, 淀粉含量没有显著差异。

‘郑 58’玉米叶片的 N 含量极显著地高于转基因玉米, 对照玉米和转基因玉米的可溶性糖、淀粉、TNC 含量和 TNC:N 没有显著差异(表 1, 图 1)。品种和 CO₂ 的交互作用对玉米叶片的可溶性糖、淀粉、TNC、氮含量、TNC:N 都没有显著影响(表 1)。

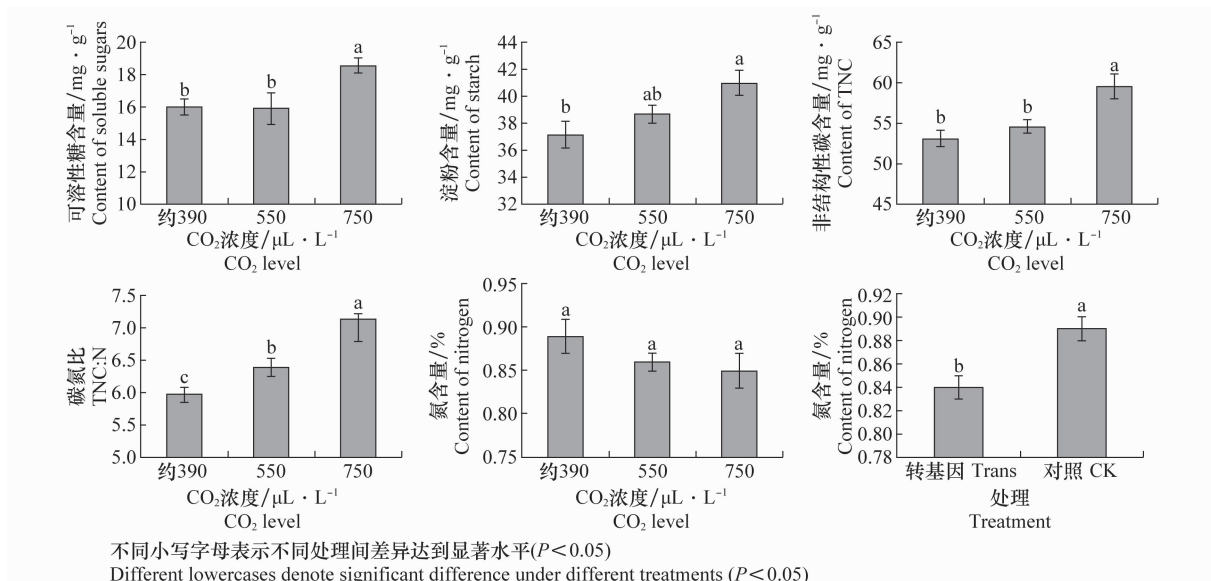


图 1 不同 CO₂ 浓度下玉米叶片中几种化学物质含量及不同玉米品种叶片的氮含量

Fig. 1 Contents of several compounds in the leaves of maize under different CO₂ levels and N content in the leaves of different varieties of maize

表 1 品种、二氧化碳及其交互作用对玉米叶片 C、N 含量影响的方差分析

Table 1 ANOVA analysis of the effects of CO₂ and variety on plant parameters

化合物 Compound	二氧化碳 CO ₂	品种 Variety	二氧化碳×品种 CO ₂ ×Variety
可溶性糖 Soluble sugar	F	5.25	4.52
	df	2,27	1,28
	P	0.035	0.055
淀粉 Starch	F	5.66	0.73
	df	2,27	1,28
	P	0.029	0.410
非结构性碳 TNC	F	8.87	4.19
	df	2,27	1,28
	P	0.009	0.063
氮 N	F	3.15	26.92
	df	2,27	1,28
	P	0.098	<0.001
非结构性碳:氮 TNC:N	F	19.35	0.34
	df	2,27	1,28
	P	<0.001	0.573

2.2 Cry1Ac 蛋白表达量

由表 2 可知, 随着大气 CO₂ 浓度的升高, 转基

因玉米组织中 Cry1Ac 蛋白表达量有下降的趋势, 但不同浓度间没有显著差异。

表 2 不同 CO₂ 浓度下生长的转 cry1Ac-m 基因玉米叶片的 Cry1Ac 蛋白表达量

Table 2 Cry1Ac protein contents in the leaves of GM maize under different CO₂ levels

CO ₂ 浓度/ μL·L ⁻¹ CO ₂ level	Cry1Ac 蛋白表达量/ mg·g ⁻¹ Quantity of Cry1Ac protein			
	Mean±SE	F	df	P
约 390	1.91±0.09	0.36	2,12	0.7062
550	1.88±0.06			
750	1.82±0.08			

2.3 不同处理下亚洲玉米螟 48 h 的死亡率

组织离体生测结果显示, 不同玉米品种的杀虫效果差异显著(表 3)。与‘郑 58’玉米相比, 转 cry1Ac-m 基因玉米有显著的杀虫效果, 亚洲玉米螟初孵幼虫取食 48 h 后, 死亡率都达到了 95.8% 以上, 而取食‘郑 58’玉米的死亡率小于 7.4%(表 4)。不同大气 CO₂ 浓度处理的亚洲玉米螟幼虫存活率间差异不显著, 且大气 CO₂ 浓度与品种间交互作用不显著(表 3)。

表 3 不同处理间差异显著性方差分析统计参数

Table 3 Statistic parameters of analysis of variance among the treatments

变异来源 Source of variance	统计参数 Statistic parameter		
	df	F	P
玉米品种 Corn variety	98	2 343.16	<0.000 1
大气 CO ₂ 浓度 Atmospheric CO ₂	97	1.01	0.417 2
玉米品种×大气 CO ₂ 浓度 Corn variety×atmospheric CO ₂	95	0.32	0.862 9

表 4 不同处理间亚洲玉米螟 48 h 的死亡率

Table 4 Mortality of *Ostrinia furnacalis* within 48 h among different treatments

玉米品种 Corn variety	生长环境大气 CO ₂ 浓度/ μL·L ⁻¹ Atmospheric CO ₂ level of ambient environment	生测环境大气 CO ₂ 浓度/ μL·L ⁻¹ Atmospheric CO ₂ level of bioassay environment	死亡率/% Mortality rate
	郑 58 Zheng 58	约 390	约 390
郑 58 Zheng 58	550	约 390	7.4±2.11
郑 58 Zheng 58	750	约 390	5.6±2.17
郑 58 Zheng 58	550	550	5.6±1.71
郑 58 Zheng 58	750	750	5.0±2.20
转 <i>cry1Ac-m</i> 基因玉米 Transgenic corn expressing <i>cry1Ac-m</i> gene	约 390	约 390	95.8±1.41
转 <i>cry1Ac-m</i> 基因玉米 Transgenic corn expressing <i>cry1Ac-m</i> gene	550	约 390	99.4±0.31
转 <i>cry1Ac-m</i> 基因玉米 Transgenic corn expressing <i>cry1Ac-m</i> gene	750	约 390	97.2±0.80
转 <i>cry1Ac-m</i> 基因玉米 Transgenic corn expressing <i>cry1Ac-m</i> gene	550	550	97.4±0.67
转 <i>cry1Ac-m</i> 基因玉米 Transgenic corn expressing <i>cry1Ac-m</i> gene	750	750	96.8±1.04

3 讨论

大气 CO₂ 浓度升高,使植物光合作用底物浓度增加,光合作用效率增加,提高植物生产力,相当于“施肥效应”^[14-15],同时引起植物组织内不同化合物成分与含量发生变化^[16-18]。然而,不同作物对“施肥

效应”的反应水平或效果差异较大。关于大气 CO₂ 浓度升高对植物营养成分含量影响的研究很多,但大多数集中在对 C₃ 植物的研究上,对 C₄ 植物的研究相对较少。本试验研究显示,大气 CO₂ 浓度升高,玉米叶片中淀粉和可溶性糖含量、TNC:N 都明显增加,这与前人的研究结果相同^[5,8,19]。一般来讲,大多数植物(尤其是 C₃ 植物)的光合作用速率和生长会随着 CO₂ 浓度的升高而提高^[20-21],进而会提高叶片对 C/N 和水利用效率,叶片 N 含量降低^[22-23]。另一些研究则认为,大气 CO₂ 浓度升高对不同作物的影响不同。如生长在高 CO₂ 浓度环境下的红车轴草 *Trifolium pratense* (L.) 和草木樨 *Melilotus alba* (Desr.) (C₃ 植物,豆科)的 C、N 含量以及 C/N 没有差异^[24]。即使是同一作物,不同研究者所用品种与栽培方式不同、测定的组织不同,其结果也存在差异。如,大气高 CO₂ 浓度环境下,盆栽的‘Kedan 8’玉米籽粒中蛋白、TNC/蛋白显著增加,但 TNC 的含量差异不显著^[25],而在直播的‘XY335’玉米叶和茎中 TNC 含量比对照均显著增加^[11]。土壤的施 N 量也会影响植物组织的 C/N^[26-27]。在本试验中,不同大气 CO₂ 环境下生长的玉米叶片的 N 含量差异不显著。这可能与品种有关,本研究所用玉米品种为自交系‘郑 58’及其转 *cry1Ac-m* 基因品系。但本研究中 TNC/N 的结果与已报道的玉米相关研究结果一致。

与对照玉米相比,转基因玉米叶片 N 含量显著降低,其他营养成分差异不显著,这可能与外源基因的插入有关。Chen 等^[8]的研究也发现生长在 CO₂ 浓度为 750 μL/L 的开顶式气室环境中的转基因棉花的 N 含量显著低于非转基因棉花。

Bt 蛋白属于转基因玉米植株内的氮源抗虫物质,转 *cry1Ac-m* 基因玉米叶片中 Cry1Ac 杀虫蛋白表达量没有随着大气 CO₂ 浓度的升高而改变,这与本试验中玉米叶片 N 元素含量没有显著变化保持一致。有报道表明,转 Bt 基因抗虫棉铃内 Bt 杀虫蛋白表达量受大气 CO₂ 浓度升高影响而显著降低,降低幅度与棉花中 N 含量有关^[8,25,28],而 Coviella 等^[29]报道,大气 CO₂ 浓度升高的情况下,改变土壤施 N 量,叶片的含 N 量和 Bt 蛋白的表达量变化是一致的,即随着施 N 量的增加,使得叶片 N 含量和 Bt 蛋白表达量下降的趋势变得不显著。白树雄^[30]研究认为外源基因的导入并没有对转基因玉米抗虫次生物质产生影响,这与本试验结果一致。外源基因的导入是否会引起转基因作物体内次生代谢物质表

达量的变化是有争议的, 如有研究表明转基因棉植株体内的单宁酸、棉酚表达量与对照亲本表达量不同^[31]。因此, 转 Bt 基因抗虫作物外源杀虫 Bt 蛋白的表达量是否受大气 CO₂ 浓度升高的影响因作物品种、土壤中氮肥含量、外源基因导入方式等而异。

对玉米组织的离体生测结果显示, 转 *cry1Ac-m* 基因玉米品种相比‘郑 58’的杀虫效果显著, 这与试验中大气 CO₂ 浓度升高对转基因抗虫玉米 Bt 蛋白表达量没有显著影响一致。本试验只进行了离体玉米组织的抗虫性研究, 而在大气 CO₂ 浓度升高情况下, 田间不同品种玉米的抗虫性鉴定需要进一步的研究。

参考文献

- [1] Bezemer T M, Jones T H. Plant-insect herbivore interactions in elevated atmospheric CO₂: quantitative analyses and guild effects [J]. *Oikos*, 1998, 82(2): 212 - 222.
- [2] Veteli T O, Kuokkanen K, Julkunen-Tiitto R, et al. Effects of elevated CO₂ and temperature on plant growth and herbivore defensive of chemistry [J]. *Global Change Biology*, 2002, 8 (12): 1240 - 1252.
- [3] Stacey D A, Fellowes M D E. Influence of elevated CO₂ on interspecific interactions at higher trophic levels [J]. *Global Change Biology*, 2002, 8(7): 668 - 678.
- [4] Hamilton J G, Dermody O, Aldea M, et al. Anthropogenic changes in tropospheric composition increase susceptibility of soybean to insect herbivory [J]. *Environmental Entomology*, 2005, 34(2): 479 - 485.
- [5] Xie Haicui, Liu Kaiqiang, Sun Dandan, et al. A field experiment with elevated atmospheric CO₂ - mediated changes to C₄ crop-herbivore interactions [J]. *Scientific Reports*, 2015: 13923.
- [6] Idso C D, Idso K E. Forecasting world food supplies: The impact of rising atmospheric CO₂ concentration [J]. *Technology*, 2000, 7: 33 - 55.
- [7] Agrell J, Anderson P, Oleszek W, et al. Combined effects of elevated CO₂ and herbivore damage on alfalfa and cotton [J]. *Journal of Chemical Ecology*, 2004, 30(11): 2309 - 2324.
- [8] Chen Fajun, Wu Gang, Ge Feng, et al. Effects of elevated CO₂ and transgenic Bt cotton on plant chemistry, performance, and feeding of an insect herbivore, the cotton bollworm [J]. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 2005, 115(2): 341 - 350.
- [9] Watson R T, Zinyowera M C, Moss R H. Climate change 1995: impacts, adaptations and mitigation of climate change: scientific-technical analysis [M]. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 1996.
- [10] Houghton J T, Ding Y, Griggs D J, et al. Climate change 2001: the scientific basis [M]. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 2001.
- [11] 解海翠. 大气 CO₂ 浓度升高对“玉米一害虫一天敌”系统的影响 [D]. 北京: 中国农业大学, 2014.
- [12] 周大荣, 何康来. 玉米螟综合防治技术 [M]. 北京: 金盾出版社, 1995.
- [13] Tissue D T, Wright S J. Effects of seasonal water availability on phenology and the annual shoot carbohydrate cycle of tropical forest shrubs [J]. *Functional Ecology*, 1995, 9: 518 - 527.
- [14] Gunderson C A, Norby R J, Wullschlegel S D. Foliar gas exchange of two deciduous hardwoods during 3 years of growth in elevated CO₂: no less of photosynthetic enhancement [J]. *Plant, Cell & Environment*, 1993, 16: 979 - 807.
- [15] Rogers H H, Runion G B, Krupa S V. Plant responses to atmospheric CO₂ enrichment with emphasis on roots and the rhizosphere [J]. *Environment Pollution*, 1994, 83: 155 - 189.
- [16] Slansky F, Feeny P. Stabilization of the rate of nitrogen accumulation by larvae of the cabbage butterfly on wild and cultivated food plants [J]. *Ecological Monographs*, 1997, 47(2): 209 - 228.
- [17] Mattson W J. Herbivory in relation to plant nitrogen contents [J]. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 1980, 11: 119 - 161.
- [18] White T C R. The abundance of invertebrate herbivores in relation to the availability of nitrogen in stressed food plants [J]. *Oecologia*, 1984, 63(1): 90 - 105.
- [19] Williams R S, Lincoln D E, Norby R J. Leaf age effects of elevated CO₂ - grown white oak leaves on spring-feeding lepidopterans [J]. *Global Change Biology*, 1998, 4(3): 235 - 246.
- [20] Wong S C. Elevated atmospheric partial pressure of CO₂ and plant growth I. Interactions of nitrogen nutrition and photosynthetic capacity of C₃ and C₄ plants [J]. *Oecologia*, 1979, 44(1): 68 - 74.
- [21] Rodgers H H, Thomas J F, Bingham G E. Responses of agronomic and forest species to elevated atmospheric carbon dioxide [J]. *Science*, 1983, 220: 428 - 429.
- [22] Kimball B A, Lamorte R L, Seay R S, et al. Effects of free-air CO₂ - enrichment on energy balance and evapotranspiration of cotton [J]. *Agricultural and Forest Meteorology*, 1994, 70: 259 - 278.
- [23] Lindroth R L, Arteel G E, Kinney K K. Responses of three saturniid species to paper birch grown under enriched CO₂ atmospheres [J]. *Functional Ecology*, 1995, 9(2): 306 - 311.
- [24] Karowe D N. Are legume-feeding herbivores buffered against direct effects of elevated carbon dioxide on host plants? A test with the sulfur butterfly, *Colias philodice* [J]. *Global Change Biology*, 2007, 13(10): 2045 - 2051.
- [25] Yin Jin, Sun Yucheng, Wu Gang, et al. Effects of elevated CO₂ associated with maize on multiple generations of the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* [J]. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 2010, 136(1): 12 - 20.
- [26] Ainsworth E A, Long S P. What have we learned from 15 years of free - air CO₂ enrichment (FACE)? A meta - analytic review of the responses of photosynthesis, canopy properties and plant production to rising CO₂ [J]. *New Phytologist*, 2005, 165(2): 351 - 372.
- [27] 马红亮, 朱建国, 谢祖彬, 等. 开放式空气 CO₂ 浓度升高对冬小麦生长和 N 吸收的影响 [J]. *作物学报*, 2005, 31(12): 1634 - 1639.

- tative PCR assays [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(7): 4117 - 4120.
- [27] Vilgalys R, Hester M. Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species [J]. Journal of Bacteriology, 1990, 172(8): 4238 - 4246.
- [28] Zoetendal E G, Akkermans A D L, De Vos W M. Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1998, 64(10): 3854 - 3859.
- [29] Nübel U, Engelen B, Felske A, et al. Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis [J]. Journal of Bacteriology, 1996, 178(19): 5636 - 5643.
- [30] Heal O W, Anderson J M, Swift M J. Plant litter quality and decomposition: an historical overview [C] // Cadisch G, Giller K E. Driven by nature: plant litter quality and decomposition, 1997; 3 - 30.
- [31] Puget P, Drinkwater L. Short-term dynamics of root-and shoot-derived carbon from a Leguminous green manure [J]. Soil Science Society of America Journal, 2001, 65(3): 771 - 779.
- [32] Huang Xinqi, Liu Liangliang, Wen Teng, et al. Illumina MiSeq investigations on the changes of microbial community in the *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* infected soil during and after reductive soil disinfection [J]. Microbiological Research, 2015, 181: 33 - 42.
- [33] Rui Junpeng, Peng Jingjing, Lu Yahai. Succession of bacterial populations during plant residue decomposition in rice field soil [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(14): 4879 - 4886.
- [34] Rodriguez-Kabana R, Morgan-Jones G, Chet I. Biological control of nematodes: Soil amendments and microbial antagonists [J]. Plant and Soil, 1987, 100(1/3): 237 - 247.
- [35] Oka Y, Shapira N, Fine P. Control of root-knot nematodes in organic farming systems by organic amendments and soil solarization [J]. Crop Protection, 2007, 26(10): 1556 - 1565.
- [36] Tenuta M, Lazarovits G. Ammonia and nitrous acid from nitrogenous amendments kill the microsclerotia of *Verticillium dahliae* [J]. Phytopathology, 2002, 92: 255 - 264.
- [37] Shrestha U, Ownley B H, Roskopf E N, et al. Optimization of amendment C:N ratio in anaerobic soil disinfection for control of *Sclerotium rolfsii* [C] // Proceedings of the international research conference on methyl bromide alternatives and emissions reductions. San Diego, California, 2013: 4 - 6.
- [38] Rousk J, Bååth E. Fungal and bacterial growth in soil with plant materials of different C/N ratios [J]. FEMS Microbiology Ecology, 2007, 62(3): 258 - 267.
- [39] 朱同彬, 孟天竹, 张金波, 等. 强还原方法对退化设施蔬菜地土壤的修复 [J]. 应用生态学报, 2013, 24(9): 2619 - 2624.
- [40] Zhu Tongbin, Zhang Jinbo, Yang Wenyan, et al. Effects of organic material amendment and water content on NO, N₂O, and N₂ emissions in a nitrate-rich vegetable soil [J]. Biology and Fertility of Soils, 2013, 49(2): 153 - 163.
- [41] Meng Tianzhu, Zhu Tongbin, Zhang Jinbo, et al. Effect of liming on sulfate transformation and sulfur gas emissions in degraded vegetable soil treated by reductive soil disinfection [J]. Journal of Environmental Sciences, 2015, 36: 112 - 120.

(责任编辑: 田 喆)

(上接 58 页)

- [8] 向本春, 谢浩, 崔星明, 等. 新疆辣椒轻斑驳病毒的分离鉴定 [J]. 病毒学报, 1994, 10(3): 240 - 245.
- [9] Li Xiaodong, An Mengnan, Wu Yuanhua. First report of pepper mild mottle virus in Northeast China [J]. Plant Disease, 2016, 100(2): 541.
- [10] 李晓冬, 安梦楠, 王冠中, 等. 辣椒轻斑驳病毒辽宁分离物的鉴定及序列分析 [J]. 沈阳农业大学学报, 2016, 47(1): 29 - 34.
- [11] 谭根堂, 史联联, 尚慧兰, 等. 陕西线辣椒病毒病原检测简报 [J]. 辣椒杂志, 2003(3): 32 - 33.
- [12] 黄粤, 马荣群, 岳文辉. 应用 RT-PCR 方法检测辣椒轻斑驳病毒 [J]. 山东农业科学, 2004(5): 56 - 57.
- [13] 李兴红, 严红, 郭京泽, 等. 种传辣椒轻斑驳病毒病 DAS-ELISA 的检测 [J]. 植物保护, 2005, 31(3): 66 - 68.
- [14] Peng Jiejun, Shi Bingbin, Zheng Hongying, et al. Detection of pepper mild mottle virus in pepper sauce in China [J]. Archives of Virology, 2015, 160: 2079 - 2082.
- [15] Colson P, Richet H, Desnues C, et al. Pepper mild mottle virus, a plant virus associated with specific immune responses, fever, abdominal pains, and pruritus in humans [J]. PLoS ONE, 2010, 5(4): 1 - 12.

(责任编辑: 田 喆)

(上接 63 页)

- [28] Coviella C E, Morgan D J W, Trumble J T. Interactions of elevated CO₂ and nitrogen fertilization: Effects on production of *Bacillus thuringiensis* toxins in transgenic plants [J]. Environmental Entomology, 2000, 29(4): 781 - 787.
- [29] Coviella C E, Stipanovic R D, Trumble J T. Plant allocation to defensive compounds: interactions between elevated CO₂ and nitrogen in transgenic cotton plants [J]. Journal of Experimental Botany, 2002, 53(367): 323 - 331.
- [30] 白树雄. 转基因抗虫玉米次生代谢物质的变化及对亚洲玉米螟寄生性天敌腰带长体茧蜂的影响 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2011.
- [31] 陆宴辉, 刘芳, 杨益众, 等. 转基因棉棉株体内主要营养物质和次生物质含量分析 [J]. 江苏农业学报, 2005, 21(2): 92 - 97.

(责任编辑: 田 喆)