

抗草甘膦转基因大豆(RRS)在黑土生态系统种植的安全性研究

吕晓波¹,王宏燕²,刘琦^{1,3},赵光²,李希臣^{1,3},徐广惠²,张俐俐^{1,3},刘佳²,刘昭军¹,李
宁²,李铁¹,雷勃钧¹

(¹ 黑龙江省农业科学院生物技术研究,黑龙江 哈尔滨 150086;² 东北农业大学资源环境学院,黑龙江 哈尔滨 150030;³ 黑龙江省作物与家畜
分子育种重点实验室,黑龙江 哈尔滨 150086)

摘要:为明确抗草甘膦转基因大豆(RRS)在黑土生态系统种植的安全性,经过连续3年田间和盆栽试验,分析了
抗草甘膦转基因漂移(漂流)可能性,及抗草甘膦转基因大豆(RRS)在黑土区对根际生态系统微生物数量,氮代谢
和两种土壤酶活性的影响。结果表明:在自然条件下花粉漂移几乎是不可能的,但如人为加大虫媒传播(大于10
头·m⁻²),抗草甘膦基因的漂移概率接近0.05%,漂移距离为0.7 m。RRS除对根际真菌数影响不显著外,对根际
土壤细菌、放线菌、氨化和硝化细菌均表现降低趋势。在大豆不同生育期,RRS除对根际土壤真菌数影响不显著
外,对根际土壤细菌、放线菌、氨化和硝化细菌均表现降低趋势;RRS根际土壤细菌多样性指数与均匀度指数均低
于亲本RRS-S;氨化强度与RRS-S相比差异不显著,RRS根际土壤硝化强度显著低于亲本RRS-S;RRS降低了过氧
化氢酶和脲酶活性。

关键词:抗草甘膦基因;转基因大豆;黑土生态系统;土壤细菌多样性

中图分类号:S565.1

文献标识码:A

文章编号:1000-9841(2009)02-0260-06

Biosafety of Roundup Ready Soybean(RRS) Planted in Black Soil Ecosystem

LÜ Xiao-bo¹, WANG Hong-yan², LIU Qi^{1,3}, ZHAO Guang¹, LI Xi-chen^{1,3}, XU Guang-hui², ZHANG Li-li^{1,3}, LIU
Jia², LIU Zhao-jun¹, LI Ning², LI Tie¹, LEI Bo-jun¹

(¹ Institute of Biotechnology, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086, Heilongjiang;² College of Resource and Environment, North-
east Agricultural University, Harbin 150030, Heilongjiang;³ Key Laboratory of Crop and Livestock Molecular Breeding of Heilongjiang, Harbin 150086,
Heilongjiang, China)

Abstract: In the three-year field and pot experiments, this study investigates possibility of the *CP4-EPSPS* gene flow of
Roundup Ready Soybean(RRS) in black soil ecosystem, and impacts of RRS on numbers of its rhizosphere microorganisms,
N-cycling and some enzymes in soil. According to the field experiments, the *CP4-EPSPS* gene flow did not happen in natu-
ral condition, but under insects(more than 10 insects per square meter) helping to pollen, the floating possibility of this
gene was 0.05%, and the floating distance was 0.7 meter. In different soybean growth stages, in rhizosphere soil of RRS, the
amount of bacteria, actinomycete, ammonifying bacteria, and nitrifying bacteria showed decreasing tendencies, except no
effect on total number of fungus. The bacterial diversity indexes and homogeneous degrees indexes in rhizospheric soil of
RRS were lower than that of its parent RRS-S. The difference of ammonification intensity was not significant in RRS and
RRS-S rhizosphere soil, and nitrification intensity in RRS was significantly lower than that in RRS-S rhizosphere soil in dif-
ferent growth stages and RRS inhibited activities of catalase and urease.

Key words: *CP4-EPSPS* gene; Transgenic soybean; Black soil ecosystem; Diversities of rhizosphere bacteria

转基因作物安全性的理论与试验研究是国内外
普遍关注的课题。目前有关转基因作物对生态系统
影响的试验研究,国外大多做的是转基因棉花和
马铃薯及转基因玉米和大豆对生物安全的影响及有
关检测方法^[1-4]。国内刚刚开始该类研究主要是转

基因水稻、转基因谷子的安全性及转基因大豆检测
和基因逃逸可能性等^[5-8],至于有关转基因大豆对
土壤生态系统的影响还鲜有报道^[9]。

某些作物及其近缘野生种之间的基因流动经常
发生^[10]。贾士荣先生指出:基因漂流是指转基因

收稿日期:2009-02-20

基金项目:黑龙江省自然科学基金(B类)资助项目(ZJN04-0402)。

作者简介:吕晓波(1964-),女,博士,主要从事大豆、小麦生物技术研究。E-mail: xb6032@163.com。

(如 *Bt* 基因等)通过花粉传至非转基因作物或相关杂草从而可能引起的生态问题。棉花为常异交作物,主要通过虫媒传粉。在较近距离内有相当高的异交率。鉴于我国不是棉花的起源地,在自然界不存在相关的野生种,在农业生态条件下也不存在可与棉花杂交的相关杂草,因此 *Bt* 基因的漂流并不是一个值得关注的安全性问题^[11]。对于大豆来说情况却不相同,尽管大豆是较严格的自花授粉作物,天然杂交率只有 0.5%,通过花粉传播使基因漂移(漂流)的可能性极小或不存在。但我国是大豆起源地,特别是自然界存在丰富的大豆野生资源,尤其在黑龙江省大豆主产区,抗除草剂(草甘膦)转基因大豆(Roundup Ready Soybean,简称 RRS)对野生大豆是否安全尚未见报道。另有研究表明转基因作物的外源基因和基因表达产物可通过根系分泌物或残茬进入土壤生态系统,进而对土壤生物功能类群及多样性造成影响^[12-13]。因此,通过对抗除草剂转基因大豆及其一定种植区域内的大豆及其近缘种等作物进行世代跟踪监测研究,研究花粉传播使基因漂流到大豆及其近缘种可能性及对土壤微生物多样性的影响。为转基因大豆生物安全性评价及大豆发源地种质资源保护提供重要的理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 植物材料 美国孟山都公司的抗草甘膦转基因大豆(RRS)、RRS 受体非转基因大豆(RRS-S);非转基因大豆品种黑生 101、黑农 38 和野生大豆。

1.1.2 引物合成 抗草甘膦基(CP4-EPSPS 基因)特异引物由上海生工生物工程技术公司合成。

引物序列为 CP4EPSP-1

5'GCA AAT CCT CTG GCC TTT CC3';

CP4EPSP-2

5'CTT GCC CGT ATT GAT GAC GTC3'

真细菌(*Eubacteria*)引物:U968fV6-V8,F984。

1.2 方法

1.2.1 风媒介传粉试验 RRS 风媒传粉试验于 2006、2007 年在黑龙江省农科院试验地进行,在生殖隔离状态下采取同心圆种植方式,种植在固定的地块上。2007 年对 2006 年种植在 RRS 周围收获的大豆喷洒 41% 农达(主要成分为草甘膦)进行抗草

甘膦植株筛选,浓度为 $2460 \text{ g} \cdot \text{ai} \cdot \text{hm}^{-2}$ 。喷药后如果出现成活株,说明可能是由于 RRS 通过风媒介传粉发生基因漂移而使非转基因大豆产生草甘膦抗性,需要进一步对成活株进行 PCR 检测,鉴定其真伪。

1.2.2 虫媒介传粉试验 RRS 虫媒传粉试验于 2006、2007 年在黑龙江省农科院固定的网棚内进行的,采取行间种植方式。在大豆开花初期,向网棚内放入一定数量的切叶蜂用于传播花粉(切叶蜂由吉林省农科院惠赠)。每平米可达 10 头以上,实际上传粉的虫媒数量已大大超过自然状态的虫媒数量。每年对上一年种植在 RRS 周围的栽培大豆喷施 41% 农达,进行抗草甘膦植株筛选,浓度为 $2460 \text{ g} \cdot \text{ai} \cdot \text{hm}^{-2}$ 。喷药后如果出现成活株,说明可能是由于 RRS 通过虫媒介传粉发生基因漂移而使栽培大豆产生草甘膦抗性,需要进一步对成活株进行 PCR 检测,鉴定其真伪。

1.2.3 土壤试验 2006、2007 年在东北农业大学试验地进行大田种植,小区采用随机设计法,每个小区设 3 次重复,8 垄区,垄长 7 m,垄宽 0.75 m。分别于大豆的花期、结荚期、鼓粒期和成熟期对大豆根际土壤进行取样分析。测定项目有:细菌、真菌、放线菌、氨化细菌和硝化细菌的计数;氨化强度、硝化强度;土壤过氧化氢酶、脲酶。测定方法按照许光辉等编著的《土壤微生物分析方法手册》的测定方法进行^[14]。

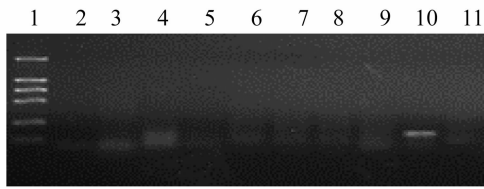
2 结果与分析

2.1 RRS 通过风媒介传粉发生基因漂移的可能性

对种植在 RRS 周围的非转基因大豆于三叶期喷洒 41% 农达进行草甘膦抗性筛选,结果施药 3 d 60% 出现轻度萎蔫;5d 90% 明显萎蔫;9d 绝大多数品种均已枯死,最后筛选出较耐草甘膦大豆 6 株,对 6 株成活株进一步进行 PCR 检测发现,6 株成活株没有阳性带,见图 1。说明并没有发生基因漂移,成活株喷洒草甘膦没有死亡,可能是着药不均造成的。

2.2 RRS 通过虫媒介传粉发生基因漂移的可能性

2006 年网棚内种植在 RRS 周围的栽培大豆收获后,2007 年对其进行鉴定,于三叶期喷施 41% 农达,浓度为 $2460 \text{ g} \cdot \text{ai} \cdot \text{hm}^{-2}$ 。结果在 1800 株栽培大豆中,发现黑农 38 中有一株对草甘膦有抗性,距离 RRS 70 cm,该植株在喷施草甘膦后生长完全



1. Marker 2. 水 3. 绥农 20 4-9. 为筛选后的成活株 10. 美国 2 号 11. 野生豆
1. Marker 2. ddH₂O 3. Suinong 20 4-9. Survival soybeans after screening 10. American No. 2 11. Wild soybean

图 1 成活株 *CP4-EPSPS* 基因的 PCR 检测

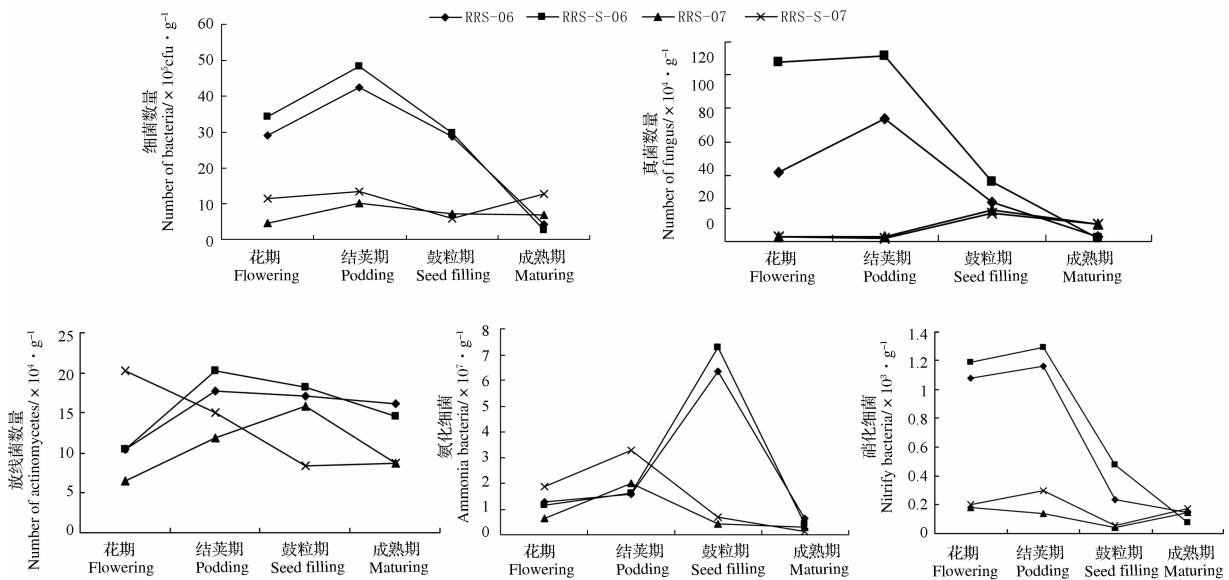
Fig. 1 PCR analysis of *CP4-EPSPS* in survival soybeans

正常。

在实验室提取虫媒试验中成活单株的 DNA 及 F₂代成活植株 DNA 进行 PCR 检测 *CP4-EPSPS* 基因,喷药后的成活单株及成活单株 F₂代均有阳性带,见图 2。说明该植株可能是由切叶蜂将转基因大豆的花粉传给了非转基因大豆,使非转基因大豆的后代表现了抗草甘膦特性,抗草甘膦大豆中的抗草甘膦基因经高密度可传粉的虫媒介漂移至栽培大豆。

2.3 RRS 对土壤生态系统相关指标的影响

2.3.1 土壤微生物数量动态变化 2006 年和 2007

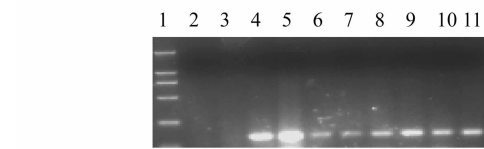


RRS-06:2006 年转基因大豆;RRS-S-06:2006 年亲本非转基因大豆;RRS-07:2007 年转基因大豆;RRS-S-07:2007 年亲本非转基因大豆
RRS-06:Roundup ready soybean in 2006;RRS-S-06:Parents of roundup ready soybean in 2006;RRS-07:Roundup ready Soybean in 2007;RRS-S-07:Parents of roundup ready soybean in 2007

图 3 大豆不同生育期根际土壤微生物数量的动态变化

Fig. 3 Dynamic change on the number of soil microorganism in RRS and RRS-S rhizosphere soil in different growth stages

而 2007 年则在鼓粒期达到最大,比 2006 年滞后。除 2006 年花期和结荚期 RRS 根际真菌数显著



1. Marker 2. 水 3. 黑农 38 4. 喷药后的成活单株 5-10. 喷药后的成活单株 F₂ 代 11. RRS

1. Marker 2. ddH₂O 3. Heinong38 4. Survival soybean 5-10. the F₂ of survival soybean 11. RRS

图 2 黑农 38 成活株 *CP4-EPSPS* 基因的 PCR 检测

Fig. 2 PCR analysis of *CP4-EPSPS* in survival soybeans of Heinong 38

年 RRS 和 RRS-S 对根际土壤细菌数量影响的变化趋势大体一致,表现为花期至结荚期土壤细菌数量呈增长趋势,此后逐渐降低,土壤细菌数量均在结荚期达到最大值,见图 3。方差分析结果表明对土壤细菌数量影响显著 ($P < 0.05$),2006 年 RRS 根际土壤的细菌数量低于其亲本 RRS-S,2007 年尤为显著。从 2006、2007 年数据分析,除成熟期外,2007 年各时期根际土壤细菌数量均低于 2006 年。2006 年,在整个生长期土壤中真菌数量均在结荚期达到最大。

而 2007 年则在鼓粒期达到最大,比 2006 年滞后。除 2006 年花期和结荚期 RRS 根际真菌数显著低于其受体亲本外,其他时期和 2007 年均无明显差异。方差分析结果得出转基因大豆对土壤放线菌数

量的影响达到显著水平($P < 0.05$)。在整个测定期内,RRS-S 土壤放线菌数量比 RRS 分别高 14.38% (2006 年)和 14.7% (2007 年),RRS 对根际土壤放线菌数量有一定的抑制作用。整体上看,2006、2007 年 RRS 处理根际土壤氨化细菌数量低于转基因大豆亲本($P < 0.05$)。2006 年 RRS 和 RRS-S 不同生育期根际土壤硝化细菌数量同 2007 年相比,都存在一定趋势的变化,即 2007 年 2 个品种大豆不同时期根际土壤硝化细菌数量均高于 2006 年的数值。2006 年 2 种大豆根际土壤硝化细菌数量在结荚期达到最大值。

综上所述,转基因大豆品种(RRS)对土壤细菌生长存在一定的抑制作用,降低了土壤中细菌的数量,对土壤的真菌数量的影响差异不显著,RRS 对根际土壤放线菌有一定的抑制作用。在整个生育期,RRS 土壤硝化细菌数量小于其受体 RRS-S;转基因大豆的种植将对土壤中的硝化细菌产生抑制作用。

2.3.2 根际土壤细菌多样性的分析 大豆花期、结荚期和鼓粒期是土壤微生物代谢旺盛的时期,因此选择对这三个生育期土壤细菌 DNA 的 V3 区进行 PCR-DGGE 分析,以比较根际土壤细菌生物多样性,见图 4。根据 DGGE 图谱的数字化结果分析得出:花期,RRS 根际土壤细菌多样性指数及均匀度指数均低于 RRS-S,RRS-S 细菌多样性指数比 RRS 增加了 32.14%,均匀度指数比 RRS 高 4.1%。结荚期,RRS 根际土壤细菌多样性指数及均匀度指数与亲本 RRS-S 差异不显著。鼓粒期,RRS 根际土壤细菌多样性指数及均匀度指数低于其 RRS-S。

2.3.3 土壤微生物各种作用强度的动态变化

2007 年 2 个大豆品种根际土壤氨化强度均高于

HR、
HS;
JR、
JS;
GR、
GS
分
别
代
表
花
期
RRS、
花
期
RRS-
S;
结
荚
期
RRS、
结
荚
期
RRS-
S;
鼓
粒
期
RRS、
鼓
粒
期
RRS-
S
HR、
HS;
JR、
JS;
GR、
GS
sep-
arately
represents
RRS
and
RRS-
S
in
Flowering
,
Pod-
setting
and

2006 年。2006 年 2 种大豆根际土壤氨化强度在结荚期达到最大值,2007 年在花期达到最大值,后逐渐降低。2006 年和 2007 年的田间 RRS 对土壤氨化强度的抑制作用不明显。RRS 土壤硝化作用强度在不同程度上低于非转基因栽培大豆,但与其亲本比较,不同时期有不同变化,并在一定程度上降低了土壤硝化作用强度,见图 5。2006 年土壤硝化强度

差异均不显著。2007 年 RRS 在结荚期对土壤硝化强度的影响达到极显著水平($P < 0.01$),RRS-S 平均值较 RRS 高 18.7%。2006 年和 2007 年呈现出不同的增长变化趋势,这可能与土壤根系分泌物对土壤氨化和硝化细菌的影响受不同生长时期土壤氨化硝化细菌自身生长代谢状况的影响有关。

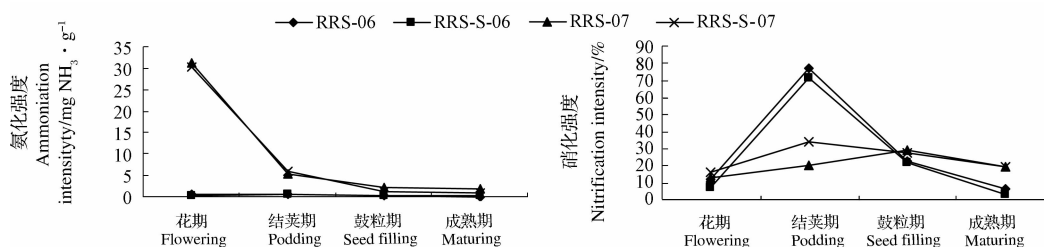


图 5 大豆不同生育期根际土壤氨化作用强度与硝化作用强度的动态变化

Fig. 5 Dynamic change on ammonification and nitrification intensity in RRS and RRS-S rhizosphere soil in different growth stages

2.3.4 各种土壤酶活性的动态变化 在大豆生长期过氧化氢酶活性变化量不显著,2006 年根际土壤过氧化氢酶活性平均高于 2007 年。除结荚期外,2006 年 RRS 根际土壤过氧化氢酶活性均低于 RRS-S。

2006 年根际土壤脲酶活性均在花期、结荚期、鼓粒期高于 2007 年,而在成熟期均低于 2007 年,见

图 6。RRS 根际土壤脲酶活性各时期平均值 2007 年比 2006 年降低 60.2%;RRS-S 降低 36.45%。表明某些时期 RRS 可能在一定程度上降低了土壤过氧化氢酶活性。2007 年各时期不同品种大豆根际土壤脲酶均低于 2006 年,这可能是由于大豆连作造成的。具体影响机制,还有待进一步研究。

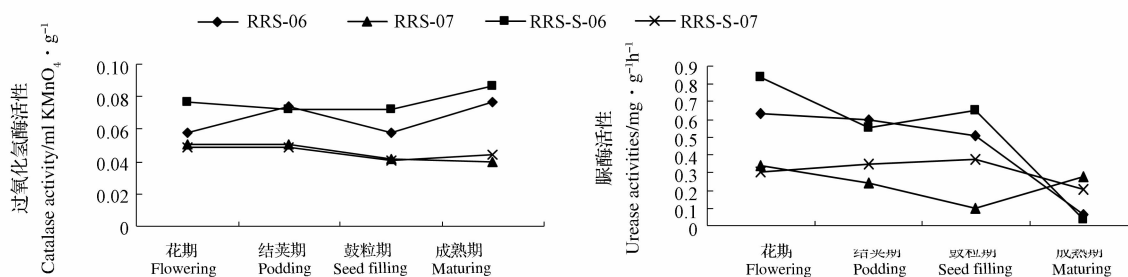


图 6 大豆不同生育期根际土壤过氧化氢酶与脲酶活性的动态变化

Fig. 6 Dynamic change on activity of catalase and urease in RRS and RRS-S rhizosphere soil in different growth stages

3 讨论

在众多转基因检测方法中,当蛋白质不表达或对转基因原料进行加工时,用 ELISA 法、Western 法、酶法可能无法检测出外源基因的表达产物^[7]。而 Southern、Northern 等方法成本大,耗时耗力,不适合进行大量材料的检测。相对而言,对植株进行田间抗药性筛查和表型鉴定及 PCR 检测相结合的检测方法则简便易行,成本相对较低,便于进行大规模

检测。

田间药剂筛查中的少量成活株被疑似抗草甘膦植株,但进一步筛查不能成活,并且 PCR 鉴定为阴性。其原因是由于试验地有限,材料较多致使田间种植密度过大,造成了植株着药不均,而出现了能继续生长发育的植株。

在科学家预测的某些风险中,其中一条是对抗草甘膦转基因大豆(RRS)在田间有可能通过花粉传播,发生抗除草剂基因漂流到非转基因大豆、特别是

近缘野生大豆和豆科杂草的可能^[8,15]。尽管已知大豆天然杂交率只有 0.5% ~ 1%, 通过花粉传播使基因漂移的可能性极小或不存在。但一旦发生这 0.5% ~ 1% 的可能, 将对大豆资源和生态平衡将产生不可估量的严重后果。在试验中, 未发现风媒引起基因漂移, 但这只是初步的结果, 还需要进行较长时期的跟踪监测, 不能得出最终的结论; 在特定的环境和试验条件下, 在有大量虫媒传粉的情况下, 抗草甘膦大豆的抗草甘膦基因还是有可能漂移至栽培大豆的, 但漂移概率很低, 只有 0.05%, 漂移距离只有 70 cm。这就要求在种植抗草甘膦大豆时要慎之又慎。

黑土生态系统是大豆种植区的主要土壤类型, 是世界宝贵的三大黑土区之一, 近年来的研究表明, 转基因作物的外源基因和基因表达产物可通过根系分泌物或残茬进入土壤生态系统, 进而对土壤生物功能类群及多样性造成影响。初步探讨 RRS 对根际土壤微生物数量和多样性有影响。但由于土壤生态系统的复杂性, 需要将转基因大豆对土壤的生物多样性和土壤中的相关功能的影响进行深入的研究。

参考文献

- [1] Pia Malnoe. A progress report: Biosafety considerations on transgenic potato plants expressing antifungal genes [C]//Sino- Italian Workshop on Biosafety Symposium, Beijing; 2001: 77-81.
- [2] Lipp M, Brodmann P, Pietsch K, et al. IUPAC collaborative trial study of a method to detect genetically modified soybeans and maize in dried powder [J]. Journal of AOAC International, 1999, 84(4): 923-928.
- [3] York A C, Stewart A M, Vidrine P R, et al. Control of volunteer glyphosate-resistant cotton in glyphosateresistant soybean [J]. Weed Technology, 2004, 18: 532-539.
- [4] Carol Mallory Smith, Maria Zapiola. Gene flow from glyphosate-resistant crops [J]. Pest Management Science, 2008, 64: 428-440
- [5] Wang T, Li Y, Shi Y, et al. Gene flow from cultivated herbicide-resistant foxtail millet to its wild relatives: a basis for risk assessment of the release of transgenic millet [C]//Sino- Italian Workshop on Biosafety Symposium, 2001, 82-87.
- [6] Zhu Z. Development of highly insect-resistance transgenic rice and its risk assessment [C]// Sino-Italian Workshop on Biosafety Symposium, Beijing; 2001, 49-62.
- [7] 雷勃钧, 吕晓波, 单红, 等. PCR-ELISA 法对大豆品种的转基因定性检测研究 [J]. 大豆科学, 2004, 1, 55-58. (Lei B J, Lu X B, Shan H, et al. Study on qualitative test of transgenes by PCR-ELISA in soybean cultivars [J]. Soybean Science, 2004, 1, 55-58.)
- [8] 刘琦, 李希臣, 刘昭军, 等. 抗草甘膦转基因大豆基因漂移的研究 I 大豆风媒介传粉的基因漂移实验研究 [J], 黑龙江农业科学, 2008(1): 14-16. (Liu Q, Li X C, Liu Z J, et al. Study on gene flow of roundup ready soybean with CP4 EPSPS. I Study on roundup ready gene move to soybean by anemophily [J]. Heilongjiang Agricultural Sciences, 2008(1): 14-16.)
- [9] Li N, Wang H Y. Effect of RRS on nitrogen transition and related bacteria in rhizosphere soil [J]. Journal of Northeast Agricultural University (English Edition), 2007, 14(4): 333-336.
- [10] Mark Tepfer. Biosafety questions concerning virus-resistant transgenic plants [M]// Sino- Italian Workshop on Biosafety Symposium, Beijing, 2001: 67-71.
- [11] Shirong Jia. Commercialization of Bt Cotton and Its Environmental Risk Assessment in China [C]//Sino- Italian Workshop on Biosafety Symposium, Beijing, 2001: 34-38.
- [12] Di Giovanni et al. Comparison of parental and transgenic alfalfa rhizosphere bacterial communities using biology GN metabolic fingerprinting and antrobacterial repetitive intergenic consensus sequence-PCR (ERIC-PCR) [J]. Microbial Ecology, 1999, 37: 129-139.
- [13] Donegan et al. A field study with genetically engineered alfalfa inoculated with recombinant sinorhizobium meliloti; effects on the soil ecosystem [J]. Journal of Applied Ecology 1999, 36: 920-936
- [14] 许光辉, 郑洪元. 土壤微生物分析方法手册 [M], 北京: 农业出版社. 1986. (Xu G H, Zheng H Y. The analytical method handbook of edaphon [M]. Beijing: Agricultural Publishing Company, 1986)
- [15] 刘琦, 李希臣, 刘昭军, 等. 抗草甘膦转基因大豆基因漂移的研究 [J]. 江苏农业学报, 2008, 24(增刊): 84-87. (Liu Q, Li X C, Liu Z J, et al. Study on gene flow of roundup ready soybean with CP4 EPSPS [J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2008, 24(Supplement) 84-87.)

(上接第 255 页)

- [13] 刘岳燕, 姚槐应, 黄昌勇. 水分条件对水稻土微生物群落多样性及活性的影响 [J]. 土壤学报, 2006, 43(5): 818-834. (Liu Y Y, Yao K Y, Huang C Y. Influence of Soil moisture regime on microbial community diversity and activity in a paddy soil [J]. Acta Pedologica Sinica, 2006, 43(5): 818-834.)

- [14] Ebhin Mastro R, Chhonkar P K, Dhyana Singh, et al. Changes in soil biological and biochemical characteristics in a long-term field trial on a subtropical incept soil [J]. Soil Biology & Biochemistry. 2006, 38(7): 1577-1582.
- [15] Wang Y, Zhang Y P. NH_4^+ adsorption in a Eum-orthic anthrosol at different solution/soil ratios and temperatures [J]. Pedosphere,

- 2004, 14(2):253-257.
- [16] 蒲一涛, 钟毅沪. 固氮菌和纤维素分解菌对固氮的影响[J]. 深圳大学学报, 1999, 16(4):61-65. (Pu Y T, Zhong Y H. A study on the mixed culturing of Nitrogen-fixation bacteria and cellulose decomposing organism[J]. Journal of Shenzhen University, 1999, 16(4):61-65.)
- [17] Rosch C, Mergel A, Bothe H. Biodiversity of denitrifying and dinitrogen-fixing bacteria in an acid forest soil[J]. Applied Environment Microbiology, 2002, 68(8):3818-3829.
- [18] 张华勇, 林先贵, 李忠佩, 等. 单季不施氮肥对太仓水稻土的微生物功能多样性的影响[J]. 土壤, 2005, 37(6):12-14. (Zhang H Y, Lin X G, Li Z P, et al. Effects of seasonal withdrawal of nitrogenous fertilizer on microbial function diversity in paddy soil in Taicang[J]. Soils, 2005, 37(6):12-14.)
- [19] 王淑彬, 黄国勤. 稻田水旱轮作(第三年度)的土壤微生物效应[J]. 江苏农业大学学报, 2002, 24(3):320-323. (Wang S B, Huang G Q. The effects of paddy-upland rotation on microorganisms of soil(the third year)[J]. Journal of Jiangsu University, 2002, 24(3):320-323.)
- [20] 王春风, 朱洪德, 冯丽娟. 水分和施肥量对高蛋白大豆农艺性状及品质的效应[J]. 大豆科学, 2008, 27(2):233-237. (Wang C F, Zhu H D, Feng L J. Effect of water and fertilizer level on agronomic characteristics and quality of high protein soybean[J]. Soybean Science, 2008, 27(2):233-237.)
- [21] 倪君蒂, 李振国. 淹水对大豆生长的影响[J]. 大豆科学, 2000, 19(1):42-48. (Ni J D, Li Z G. Effect of flooding on growth of soybean seedlings[J]. Soybean Science, 2000, 19(1):42-48.)