

# Analysis of Endophytic Fungal Community from Roots of Two Transgenic Rice\*

Yuelian Liu<sup>1</sup>, Jianfu Guo<sup>1#</sup>, Hongxu Yuan<sup>2</sup>, Yueren Li<sup>3</sup>, Wei Li<sup>1</sup>, Yongxiang Huang<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Agricultural Institute of Guangdong Ocean University, Zhanjiang

<sup>2</sup>Life Science and Technology School, Zhanjiang Normal University, Zhanjiang

<sup>3</sup>Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou

Email: #gjf6292@126.com

Received: Jun. 18<sup>th</sup>, 2012; revised: Jul. 3<sup>rd</sup>, 2012; accepted: Jul. 12<sup>th</sup>, 2012

**Abstract:** Endophytic fungal community in roots of two transgenic rice (antifungal genes) was studied by isolation and staining observation. Compared with non-transgenic rice, the isolation frequency and diversity of the endophytic fungi from two transgenic rice in different growth stages exhibited no significant differences in contrast with the control. *Gaeumannomyces* was the dominant population of endophytic fungi in the roots of rice with the dominance of 23.23%, and could be isolated in either the two transgenic rice or the control, and any growth stages. By staining observation, the infection rates of endophytic fungi in seedlings of transgenic rice were significantly lower than the control by 21.25% and 26.56% respectively, but there were no significant differences in tillering and maturity. Therefore, it is inferred that the transgenic rice had no significant effect on fungal communities in rice roots.

**Keywords:** Transgenic Rice; Antifungal Genes; Endophytic Fungi

## 两个转抗真菌基因水稻根部内生真菌群落变化的分析\*

刘月廉<sup>1</sup>, 郭建夫<sup>1#</sup>, 袁红旭<sup>2</sup>, 李明仁<sup>3</sup>, 李伟<sup>1</sup>, 黄永相<sup>1</sup>

<sup>1</sup>广东海洋大学农学院, 湛江

<sup>2</sup>湛江师范学院生命科学与技术学院, 湛江

<sup>3</sup>福建省农业科学院, 福州

Email: #gjf6292@126.com

收稿日期: 2012年6月18日; 修回日期: 2012年7月3日; 录用日期: 2012年7月12日

**摘要:** 本文采用真菌分离培养法和直接染色观测法分析了两个转基因根内真菌群落变化。分离培养法表明, 与非转基因水稻相比, 不同生长期两个转基因水稻的内生真菌分离频率和多样性与对照无显著差异。*Gaeumannomyces* 为水稻根部内生真菌优势种群, 优势度达 23.23%, 在转基因的两个品种和对照均可分离到, 在不同的生长期也分离到。染色观测法表明, 转基因水稻的内生真菌侵染率在秧苗期与对照有显著性差异, 表现在它们的侵染率分别低于对照 21.25% 和 26.56%, 但在分蘖期和成熟期均无显著性差异。因此推论, 水稻转该基因后, 对水稻根内生真菌群落无显著影响。

**关键词:** 转基因水稻; 抗真菌基因; 内生真菌

### 1. 引言

水稻纹枯病遍及全球, 是水稻三大病害之一。该病害成为制约水稻生产的重要障碍。纹枯病菌及大多数真菌细胞壁的主要成分是几丁质, 采用基因枪法将抗真菌基因如水稻酸性几丁质酶基因(*RAC22*)、水稻

\*本研究得到中国农业部转基因生物新品种培育重大专项资助(2009zx08011029B)资助。

#通讯作者。

碱性几丁质酶基因(*RCH10*)导入水稻优良恢复系 E32 获得的 T6 代稳定遗传株系<sup>[1,2]</sup>进而培育出“转 1”、“转 8”等一些转基因抗病水稻品系, 这些品系具有良好的应用前景<sup>[3]</sup>。由于水稻体内也存在内生真菌及真菌, 并与水稻协同进化, 在演化过程中二者形成了互惠关系<sup>[4]</sup>。内生真菌可以通过增强植物吸收 N、P 等营养元素或产生促进植物生长的物质等作用促进植物生长<sup>[5]</sup>。内生真菌可以提高宿主植物的抗病性<sup>[6]</sup>。而转基因水稻在转入抗真菌基因而获得抗病性的同时, 也存在导致水稻内生微生物群落变化特别是内生真菌群落发生重大变化的可能, 这种变化有可能导致新的生态风险。转基因水稻体内微生物群落变化的研究是转基因水稻安全性评价的内容之一<sup>[3,7]</sup>, 可为转基因水稻的安全应用提供参。

## 2. 材料与方法

### 2.1. 材料

#### 2.1.1. 供试水稻材料

供试转基因水稻转 1、转 8 及其对照非转基因亲本 E32 由中山大学提供。是由中山大学用基因枪法将广谱抗真菌基因: 水稻酸性几丁质酶基因(*RAC22*)、水稻碱性几丁质酶基因(*RCH10*)导入水稻优良恢复系 E32 获得的 T6 代稳定遗传株系。

试验分别于 2009 年晚季, 2010 年早季和 2010 年晚季在广东海洋大学试验田进行(农业转基因生物安全审批书为农基安办字 2009-T072)。

#### 2.1.2. 水稻根内生真菌分离及观察培养基

分离培养基: PDA 培养基 + 链霉素 80 μg/ml。

观察培养基: 马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)。

#### 2.1.3. 水稻真菌侵染率的检测试剂

甲醛、醋酸、95%酒精、KOH、NH<sub>4</sub>OH、30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、HCL、酸性复红、乳酸、甘油。

### 2.2. 方法

水稻的种植: 转基因水稻株系及亲本于 3 月中旬移植于中等肥力试验田(为隔离区), 每个株系(品种)为 1 小区, 种植 5 行, 每行 10 株, 行株距为 25 cm × 15 cm, 周围设 0.5 m 保护行, 小区随机排列。试验地为广东海洋大学试验农场。

#### 2.2.1. 采样

采样分别在水稻秧苗期、分蘖期和成熟期, 每个品种采用 5 点取样法, 每个点采集 5 株。当天取回新鲜的水稻根系, 冲洗干净, 除去表面附着的泥沙, 自然晾干。用 75%酒精漂洗后, 用 0.1%升汞处理 1.5 min, 然后用无菌水清洗 4 次。

#### 2.2.2. 内生真菌分离纯化与保存

材料表面消毒后, 用无菌解剖刀将根切成约 0.5 cm 长度的组织块, 然后将以上组织块分别贴放于分离培养基平板上(每个培养皿放 4 块, 每个品种各 20 块), 重复 4 次。置于 28℃~30℃恒温箱中培养 5~20 d, 待培养基上根组织周围长出菌丝后, 采用尖端菌丝挑取法进行纯化及编号并转接斜面保存<sup>[8]</sup>。

#### 2.2.3. 内生真菌的鉴定

将菌株接于马铃薯琼脂平板上, 28℃恒温培养 48 h 后, 开始观察菌落、产孢结构和分生孢子等形态与大小色泽等特征, 根据形态特征初步鉴定到属, 真菌分类鉴定参考文献有《Compendium of Soil Fungi》<sup>[9]</sup>, 《真菌鉴定手册》<sup>[10]</sup>等。真菌学名的使用参考《Dictionary of the Fungi》<sup>[11]</sup>。

对不能产孢的菌株进行 rDNA ITS 测序。

基因组 DNA 提取参考 White(1997)<sup>[12]</sup>等使用的方法, 用于 ITS 序列扩增的引物为通用引物 ITS1(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')和 ITS4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), PCR 反应体系(25 μL)包括: 10 × PCR Buffer(含 Mg<sup>2+</sup>)2.5 μL、dNTP(2.5 mmol/L)1 μL、模板 DNA(约 30 ng)1 μL、引物 ITS1(5 μmol/L)和 ITS4(5 μmol/L)各 1 μL、Taq DNA 聚合酶(5 U/μL)0.5 μL、ddH<sub>2</sub>O 18 μL。PCR 扩增程序为: 94℃预变性 2 min, 94℃ 30 s、55℃ 30 s、72℃ 1 min, 35 个循环, 72℃ 10 min, 4℃保存。PCR 产物测序。

#### 2.2.4. 真菌多样性分析

参考唐启义等(2006)<sup>[13]</sup>对真菌多样性进行分析比较。主要分析指标有 Shannon-Wiener 多样性指数( $H'$ ), Pielou 均匀度指数( $J$ ), 丰度指数( $DMC$ )和优势度( $Y$ )。计算公式如下:

$$H' = -\sum_{i=1}^k p_i \times \ln p_i \quad (1)$$

其中  $pi = ni/N$  即第  $i$  种占总个体数  $N$  的比例;

$J = H'/H \max$ , 其中  $H \max = \ln(S)$  其中  $S$  为物种数;

$$DMC = \frac{N - \sqrt{\sum_{i=1}^S ni}}{N - \sqrt{N}} \quad (2)$$

其中  $ni$  为第  $i$  种的个体数,  $S$  是物种数,  $N$  是菌株数;

$$Y = \frac{ni}{N} \cdot fi \quad (3)$$

其中  $ni$  为第  $i$  种的个体数,  $N$  为该种在所有样品中的总个体数,  $fi$  为该种在各个水稻品种中出现的频率<sup>[14]</sup>。

利用 DPS v7.5 软件进行计算。

### 2.2.5. 水稻根内真菌侵染率的直接观测

采用酸性品红染色法<sup>[15]</sup>进行测定。将处理过的根样整齐、竖向摆放在于载玻片上, 每片载玻片约摆放 20 条粗细一致的根样, 共 80 条。加甘油为浮载剂, 置于 NICON 显微镜下观察(放大倍数为×100、×200、×400 和×1000)。重复 4 次。

### 2.2.6. 统计

侵染率(%)

$$= \text{有感染的根段数} / \text{检查根段总数} \times 100^{[16]} \quad (4)$$

侵染指数 =  $[\sum (\text{各级侵染数} \times \text{各级代表数值})]$

$$\div (\text{样本总数} \times \text{最高级代表数值}) \times 100\% \quad (5)$$

侵染级别: 每段根内 AM 菌数量 0 个为 0 级; 1~3 个为 1 级; 4~6 个为 2 级; 8~10 个为 3 级; 10 个以上为 4 级。

## 3. 结果与分析

### 3.1. 水稻根部内生真菌分离结果分析

2009 年及 2010 年两个转基因水稻及其对照的根部内生真菌分离结果表明, 各个样本均可分离到内生真菌, 共分离到 97 个真菌菌株。对得到的菌株进行编号及计数(见表 1)。

#### 3.1.1. 水稻根部内生真菌分离频率比较

分离结果表明, 2009 年两个转基因水稻品种与对照相比较, 不论是分蘖期还是成熟期, 它们根部内生真菌分离频率没有显著性差异(见表 2)。2010 年在水稻生长的三个不同时期所分离的根部内生真菌, 表现

Table 1. Endophytic fungi strains and number isolated form the roots of transgenic rice in 2009 and 2010

表 1. 2009 年及 2010 年两个转基因水稻根部内生真菌分离的菌株

年份	品种	生长期	菌株编号	
2009	转品 1	分蘖期 091T	091T1-091T8	
		成熟期 091M	091M1-091M7	
	转品 8	分蘖期 098T	098T1-098T3	
		成熟期 098M	098M1-098M9	
	CK	分蘖期 09CT	09CT1-09CT8	
		成熟期 09CM	09CM1-09CM4	
	2010	转品 1	秧苗期 101S	101S1-101S4
			分蘖期 101T	101T1-101T7
		成熟期 101M	101M1-101M5	
		转品 8	秧苗期 108S	108S1-108S3
分蘖期 108T			108T1-108T8	
成熟期 108M		108M1-108M7		
CK	秧苗期 10CS	10CS1-10CS6		
	分蘖期 10CT	10CT1-10CT10		
成熟期 10CM	10CM1-10CM8			

Table 2. Isolation frequency of endophytic fungi from roots of 2 transgenic rice in different stages

表 2. 2 个转基因水稻不同时期根部内生真菌的分离频率的比较

处理	平均分离频率(%)	处理	平均分离频率(%)
-	-	101S	5.00 ± 2.04 a
-	-	108S	3.75 ± 1.25 a
-	-	10CS	7.50 ± 1.44 a
091T	10.00 ± 3.54 a	101T	8.75 ± 2.39 a
098T	3.75 ± 2.39 a	108T	11.25 ± 4.73 a
09CT	10.00 ± 2.04 a	10CT	12.50 ± 1.44 a
091M	6.25 ± 2.39 a	101M	6.25 ± 2.39 a
098M	11.25 ± 2.39 a	108M	8.75 ± 1.25 a
09CM	5.00 ± 2.04 a	10CM	10.00 ± 2.04 a

注: Means in a column followed by the different small letters represent significant difference at 5% level(同一栏中数据后小写字母不相同者表示处理间差异在 5%水平显著)。

出不同品种和不同生长期它们的分离频率都差异不显著(见表 2)。说明转 *RAC22* 基因和转 *RCH10* 基因的两个水稻品种对水稻根内的真菌群落不产生显著性的影响。

### 3.1.2. 内生真菌种类多样性比较

97 个真菌菌株中, 有 95 个菌株鉴定到属, 共有 17 个属; 有 2 个菌株表现形态特征与 ITS 序列特征不一致, 为未确定菌株(见表 3)。经统计分析表明, *Gaeumannomyces* 的优势度最高, 达 23.23%; *Rhizopycnis* 和 *Fusarium* 为其次, 优势度分别为 8.04%和 7.56%; 其余的优势度较低。由此可见 *Gaeumannomyces* 为水稻根部内生真菌的优势种群。分析结果表明, 转基因的两个品种, 不同年份, 不同生长期, 都可分离到 *Gaeumannomyces*(见表 3); 同时 *Rhizopycnis* 和 *Fusarium* 也以较高的几率出现, 因此可以推测, 转 RAC22 基因对水稻根内的真菌优势种群不产生明显的影响。但是以优势度为 2.89%的 *Westerdykella* 种群, 对照组出现的频率较高, 而两个转基因组的频率较低(见表 4)。因此, 有可能转基因对个别种群有一定的抑制作用。

用。

进一步对内生真菌多样性分析, 结果表明, 与对照相比, 2009 年的转品 1 的 SHANNON 指数略低, 转品 8 的略高, 但它们的差异均不显著( $P > 0.05$ )。其物种的均匀度及丰度与对照也差异不显著。2010 年的转品 1 和转品 8 的 SHANNON 指数都低于对照, 但它们的差异均不显著( $P > 0.05$ )。其物种的均匀度及丰度也相似(见表 3)。

### 3.2. 根内生真菌侵染率的显微镜观测

根内真菌侵染率及侵染指数的分析。

通过观测结果表明, 2009 年两个转基因水稻秧苗期的内生真菌的侵染率分别低于对照 21.25%和 26.56%, 差异显著; 而到了分蘖期及成熟期, 两个转基因水稻的内生真菌的侵染率与对照无显著性差异,

Table 3. Dominance and identification of endophytic fungi from rice roots  
表 3. 水稻根部内生真菌的鉴定及其类群优势度

种属	鉴定依据	鉴定菌株	优势度%
<i>Acremonium</i>	产孢, 形态典型	108S1、108M3、10CS3、10CT5	1.10
<i>Aspergillus</i>	产孢, 形态典型	09CT2、10CT2、10IS1	0.62
<i>Chaetomium</i>	产孢, 形态典型	091T1、091M2、098T3、098M1、101M2、108T7、108T8、108M1	3.85
<i>Cladosporium</i>	产孢, 形态典型	10CM2	0.06
<i>Curvularia</i>	产孢, 形态典型	098T1、108T1	0.27
<i>Dokmaia</i>	无孢, 最高同源序列为 DQ780454.1	09CT5	0.06
<i>Fusarium</i>	产孢, 形态典型	091M1、098M7、09CT1、09CM2、101T1、108T6、108M4、10CS5、10CS6、10CT6、10CM3	7.56
<i>Gaeumannomyces</i>	无孢, 最高同源序列为 FJ430719.1	091T5、091T6、091M4、091M6、091M7、098M2、09CT3、09CT4、09CT8、10IS2、10IS3、101T2、101T3、101M3、101M4、108S2、108T3、108T5、108M2、10CS1、10CS2、10CT8、10CT9、10CT10、10CM4、10CM8	23.23
<i>Rhizopycnis</i>	无孢, 最高同源序列为 HQ610505.1	091T2、091T3、091T4、091M3、091M5、098M5、098M8、09CT7、101T7、101M1、108T4、10CT7、10CM7	8.04
<i>Paraphaeosphaeria</i>	无孢, 最高同源序列为	09CM4	0.06
<i>Penicillium</i>	产孢, 形态典型	098M6、101T4、101T5、108S3、108M5、10CM1	2.06
<i>Pleosporales</i>	无孢, 最高同源序列为 EU041792.1	108T2	0.06
<i>Ramichloridium</i>	产孢, 形态典型	09CT6、10CT1	0.27
<i>Sarocladium</i>	产孢, 形态典型	098M3、09CM1、10CM5	0.62
<i>Trichocladium</i>	产孢, 形态典型	091T7、101T6	0.27
<i>Verticillium</i>	产孢, 形态典型	098M4	0.06
<i>Westerdykella</i>	无孢, 最高同源序列为 FJ624258.1	09CM3、10IS4、101M5、10CS4、10CT3、10CT4、10CM6	2.89
未确定属	形态属的特征与 ITS 序列属的特征不一致	098T2、098M9	

Table 4. Diversity of endophytic fungi form rice roots  
表 4. 水稻根部内生真菌种类多样性

品种	属数*	菌株数	SHANNON(H')	均匀度(J)	丰度(DMC)
091	9	15	3.0062	0.9238	0.8477
098	11	12	3.4183	0.9849	0.9675
09C	10	12	3.1887	0.9546	0.9088
101	12	18	3.4613	0.9543	0.8972
108	14	16	3.7500	0.9833	0.9607
10C	18	24	4.0535	0.9746	0.9338

\*: 有 2 个未确定菌株未参加统计。

它们的侵染率达到 90.31%~100%(见图 1)。说明转基因对水稻内生真菌的侵染不产生明显的影响。进一步对其侵染指数统计分析表明, 秧苗期和分蘖期两个转基因品种的内生真菌侵染指数与对照无显著性差异, 而成熟期转品 1 也与对照无显著差异; 但 8 显著性地低于对照(见图 2), 这种现象有待于进一步分析及研究。总体来说, 通过侵染指数进一步证明了转基因对水稻基本上不产生显著性影响。

2010 年的重复试验表明, 秧苗期, 转品 8 的内生真菌侵染率显著地高于对照, 而加转品 1 与对无显著性差异。分蘖期及成熟期两个转基因品种与对照无显著差异(见图 3)。进一步的侵染指数分析表明, 秧苗期的两个转基因品种显著性地高于对照, 分蘖期及成熟期转品 1 与对照无显著差异, 而转品 8 显著性地高于对照(见图 4)。因此说明水稻转基因作用对水稻根内正常菌群不产生明显的抑制作用。普遍表现秧苗期不稳定, 但到分蘖期及成熟期趋于平稳。本试验中, 转品 8 表现个别不正常现象, 有待于进行的研究。

#### 4. 结论与讨论

通过对转基因水稻根部内生真菌的研究分析, 结果表明, 2009 年和 2010 年的研究结果表现基本一致。转基因水稻根部内生真菌的分离频率和种类多样性与对照无显著性差异; 根内真菌的侵染率及侵染指数与对照也无显著性差异。据此可以推论, 转 *RAC22* 基因和转 *RCH10* 基因的水稻, 对水稻根部内生真菌不产生显著性作用。

近年来, 人们对转基因水稻的安全性评价可归纳为受体植物安全, 外源基因, 转基因产品, 环境安全 4 个方面<sup>[17]</sup>。而受体植物安全性评价主要在表型、农

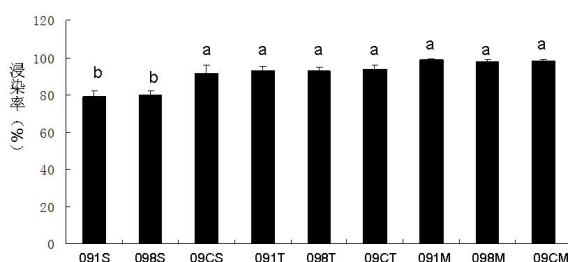


Figure 1. Colonization rate of endophytic fungi from the roots in different stages of the transgenic rice in 2009

图 1. 2009 年转基因水稻不同时期根部内生真菌的侵染率

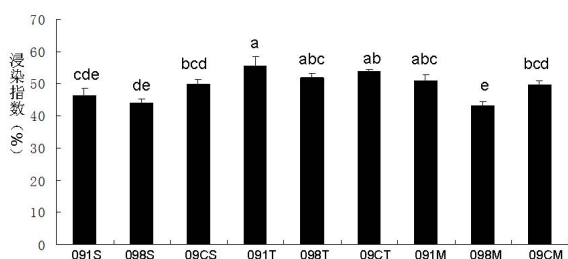


Figure 2. Infection index of endophytic fungi from the roots in different stages of the transgenic rice in 2009

图 2. 2009 年转基因水稻不同时期根部内生真菌的侵染指数

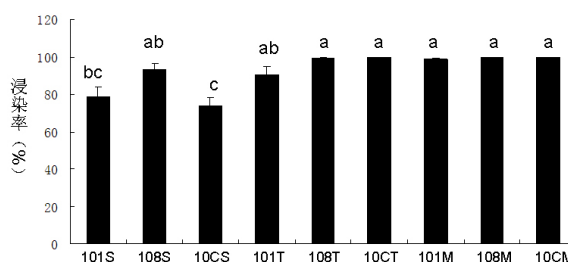


Figure 3. Colonization rate of endophytic fungi from the roots in different stages of the transgenic rice in 2010

图 3. 2010 年转基因水稻不同时期根部内生真菌的侵染率

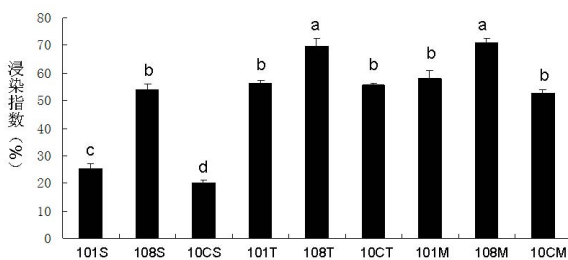


Figure 4. Infection index of endophytic fungi from the roots in different stages of the transgenic rice in 2010

图 4. 2010 年转基因水稻不同时期根部内生真菌的侵染指数

艺性状、组成成分实质等同性分析、动物营养学评价、体内及体外毒理学评价、致敏性评价等方面进行<sup>[18]</sup>。转基因水稻对微生物群落的影响主要在环境安全性

评价方面来进行<sup>[19,20]</sup>。而本研究的目标是受体水稻体内的真菌群落, 这些体内真菌与病原菌一样是直接接受转几丁质酶基因影响的。因此通过对水稻体内的真菌群落的调查研究, 能够从更为直接的角度来反映其安全性。本研究表明, 转 *RAC22* 基因和转 *RCH10* 基因水稻, 对其根部内生真菌不产生显著性影响, 但与对照有差异, 这些差异是否会积累或者会减少, 有待于进一步的研究。本文只报道了转基因对水稻根内真菌群落的影响, 对水稻地上部位的影响将展开研究。

## 5. 致谢

本研究得到中国农业部转基因生物新品种培育重大专项资助(2009zx08011029B), 同时得到广东海洋大学农学院陈俊呈, 叶成峰, 黄敏浩和黄陆浩等同学的帮助, 谨此致谢!

## 参考文献 (References)

- [1] 李宝健, 朱华晨. 论应用多基因转化策略综合改良生物体遗传性研究方向的前景II. 多基因转化策略中的规律、前景和问题[J]. 中山大学学报(自然科学版), 2005, 44: 79-83.
- [2] Z. Jiao, X. Si, G. Li, Z. Zhang and X. Xu. Unintended compositional changes in transgenic rice seeds (*Oryza sativa* L.) studied by spectral and chromatographic analysis coupled with chemometrics methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010, 58: 1746-1754.
- [3] 袁红旭, 张建中, 郭建夫等. 种植转双价抗真菌基因水稻对根际微生物群落及酶活性的影响[J]. 土壤学报, 2005, 42(1): 122-126.
- [4] C. Gimenez, R. Cabrera, M. Reina, et al. Fungal endophytes and their role in plant protection. *Current Organic Chemistry*, 2007, 11: 707-720.
- [5] V. M. Reis, J. I. Baldani and V. L. D. Baldani. Biological nitrogen fixation in *Gramineae* and palm trees. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 2000, 19: 227-247.
- [6] M. Stinson, D. Ezra and W. M. Hess. An endophytic *Gliocladium* sp. of *Eucryphia cordifolia* producing selective volatile antimicrobial compounds. *Plant Science*, 2003, 165(4): 913-922.
- [7] 杨毓峰, 袁红旭, 刘月廉, 许新萍, 李宝健. 转几丁质酶基因水稻根系微生物群落分析[J]. 中国生态农业学报, 2002, 10(2): 29-31.
- [8] 田新莉, 蔡爱群, 曹理想等. 水稻内生真菌类群分析及其拮抗病原菌活性研究[J]. 中山大学学报(自然科学版), 2005, 44(2): 70-73.
- [9] K. H. Domsch, W. Gams and T. H. Anderson. *Compendium of soil fungi*. 2nd Edition, Eching: IHW-Verlag, 2007: 1-672.
- [10] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1982.
- [11] P. M. Kirk, P. F. Cannon, D. W. Minter and J. A. Stalpers. *Ainsworth & Bisby's dictionary of the fungi*. 10th Edition, Wallingford: CAB International, 2008: 1-771.
- [12] T. White, T. Bruns, S. Lee and J. Taylor. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky and T. J. White, Eds., *PCR Protocols, a Guide to Methods and Applications*. San Diego: Academic Press, 1990: 315-322.
- [13] 唐启义. DPS 数据处理系统——实验设计、统计分析及模型优化[M]. 北京: 科学出版社, 2006: 442-444.
- [14] 柯志新, 黄良民, 谭焯辉, 尹健强. 2007 年夏季南海北部浮游植物的物种组成及丰度分布[J]. 热带海洋学报, 2011, 30(1): 131-143.
- [15] 中国科学院南京土壤研究所微生物室. 土壤微生物研究法[M]. 北京: 科学出版社, 1985: 4.
- [16] 郭绍霞, 孟祥霞, 张玉刚, 王莲英. 牡丹 AM 菌根菌自然感染率的调查[J]. 中国农学通报, 2003, 19(3): 77-78.
- [17] 马丽莲, 郭龙彪, 钱前. 转基因水稻安全性评价的内容[J]. 中国稻米, 2004, 5: 48-49.
- [18] 贺晓云, 黄昆仑, 秦伟等. 转基因水稻食用安全性评价国内外概况[J]. 食品科学, 2008, 12: 760-765.
- [19] 李本金, 李仁, 胡奇勇等. 抗真菌转基因水稻对根际土壤微生物群落的影响[J]. 福建农林大学学报(自然科学版), 2006, 35(3): 319-323.
- [20] H. F. Qian, B. L. Hu, D. Cao and W. Chen. Bio-safety assessment of validamycin formulation on bacterial and fungal biomass in soil monitored by real-time PCR. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 2007, 78: 239-244.