



Bt 和 *Bar* 基因转化对水稻不同组织生态位微生物群落组成及潜在功能影响

葛蕾^{1,2}, 王璐瑶^{1,2}, 郭官清², 宋丽莉², 王翠², 汪小福³, 毛婵娟⁴, 李鹏^{1,2*}

1 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306

2 上海市农业科学院生物技术研究所 上海市农业遗传育种重点实验室, 上海 201106

3 浙江省农业科学院农产品质量安全与营养研究所, 浙江 杭州 310022

4 上海师范大学生命科学学院, 上海 200233

葛蕾, 王璐瑶, 郭官清, 宋丽莉, 王翠, 汪小福, 毛婵娟, 李鹏. *Bt* 和 *Bar* 基因转化对水稻不同组织生态位微生物群落组成及潜在功能影响[J]. 微生物学报, 2024, 64(5): 1607-1625.

GE Lei, WANG Luyao, GUO Guanqing, SONG Lili, WANG Cui, WANG Xiaofu, MAO Chanjuan, LI Peng. Effects of *Bt* and *Bar* transformation on microbial community composition and potential functions in different tissues of rice plants[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(5): 1607-1625.

摘要: 【目的】转 *Bt* 基因和 *Bar* 基因植物的微生态效应是环境安全评价的重要因素, 但关于 *Bt* 基因和 *Bar* 基因转化引起的水稻基因型改变对水稻不同组织生态位微生物群落组成和潜在功能的影响还无系统研究。【方法】以转 *Bt* 基因和 *Bar* 基因水稻 T1C-1 及其亲本对照 Minghui63 为研究对象, 基于细菌 16S rRNA 基因和真菌 ITS 高通量测序技术, 分析抽穗期 T1C-1 和 Minghui63 根际土壤微生物以及根、茎、叶内生菌的群落结构和潜在功能。【结果】细菌和真菌群落多样性在水稻不同组织生态位之间发生显著变化, 地下部分组织生态位(根际土壤和根系)微生物多样性显著高于地上部分(叶和茎)。T1C-1 显著影响叶片内生真菌的香农指数和辛普森指数, 而对茎和根的内生菌以及根际土壤微生物多样性无显著影响。叶片内生真菌曲霉菌属(*Aspergillus*)和篮状菌属(*Talaromyces*)相对丰度在 T1C-1 显著增加, 推测其参与碳素代谢、能量代谢和转录作用酶合成等过程。T1C-1 和 Minghui63 微生物群落关联网络分析表明, T1C-1 的平均聚类系数和平均度显著高于 Minghui63, 因而 T1C-1 提高了相关微生物群落网络复杂程度。通过重建未观测状态对群落进行系统发育研究(phylogenetic investigation of communities by reconstruction of unobserved states,

资助项目: 国家自然科学基金(32071657); 上海市农业科学院攀高计划(PG23211)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32071657) and the Talent Project of Shanghai Academy of Agricultural Sciences (PG23211).

*Corresponding author. E-mail: pengli13@fudan.edu.cn

Received: 2023-12-13; Accepted: 2024-02-22; Published online: 2024-02-26

PICRUSt2), 对叶片内生真菌功能酶基因进行功能预测, 相对于 Minghui63, T1C-1 显著改变了碳素代谢、脂类代谢和能量代谢等途径。【结论】相较于根际土壤, 叶片内生真菌的群落组成和潜在功能对 T1C-1 更敏感。尽管如此, T1C-1 并未导致叶片内生真菌的多样性指数降低。为了更准确地评估转基因植物的微生态效应, 我们需要加强对不同组织生态位内生菌多样性的关注。

关键词: 内生菌; 生态位; 根际微生物; *Bt* 基因; 微生物群落网络

Effects of *Bt* and *Bar* transformation on microbial community composition and potential functions in different tissues of rice plants

GE Lei^{1,2}, WANG Luyao^{1,2}, GUO Guanqing², SONG Lili², WANG Cui², WANG Xiaofu³, MAO Chanjuan⁴, LI Peng^{1,2*}

1 College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

2 Shanghai Key Laboratory of Agricultural Genetics and Breeding, Biotechnology Research Institute, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201106, China

3 Institute of Agro-product Safety and Nutrition, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310022, Zhejiang, China

4 College of Life Sciences, Shanghai Normal University, Shanghai 200233, China

Abstract: [Objective] The microecological effects of transgenic plants with *Bt* and *Bar* genes are an important aspect of environmental safety assessment. However, few studies concern the impacts of rice genotypic alterations induced by *Bt* and *Bar* transformation on the microbial community composition and potential functions in different tissues of rice plants. **[Methods]** High-throughput sequencing of bacterial 16S rRNA gene and fungal ITS was performed to analyze the microbial community structure and potential functions in the rhizosphere soil, roots, stems, and leaves of *Bt* and *Bar* transgenic rice T1C-1 and its parent Minghui63 (control) at the heading stage. **[Results]** The bacterial and fungal diversity varied among different tissues in rice plants, being significantly higher in the underground niches (rhizosphere soil and roots) than in the aboveground parts (leaves and stems). T1C-1 significantly affected the Shannon index and Simpson index of endophytic fungi in leaves but had no significant effect on the microbial diversity in the stems, roots, or rhizosphere soil. The endophytic fungi *Aspergillus* and *Talaromyces* showed increased relative abundance in the leaves of T1C-1, which suggested their involvement in processes such as carbon metabolism, energy metabolism, and transcription. The average clustering coefficient and average degree of the microbial communities in T1C-1 were significantly higher than those in Minghui63, indicating that T1C-1 increased the complexity of the microbial community network. Phylogenetic investigation of communities by reconstruction of unobserved states (PICRUSt2) was employed to predict the functional enzyme genes of endophytic fungi in the leaves, which

showed that T1C-1 significantly altered the pathways such as carbon metabolism, lipid metabolism, and energy metabolism compared with Minghui63. **[Conclusion]** The community composition and potential functions of endophytic fungi in leaves were more sensitive to T1C-1 than those in the rhizosphere soil, while T1C-1 did not decrease the diversity of endophytic fungi in leaves. More attention should be paid to the diversity changes of endophytic microorganisms in different ecological niches of plant tissues in the evaluation of the microecological effects of transgenic plants.

Keywords: endophytic microorganisms; ecological niche; rhizosphere microorganism; *Bt* gene; microbial community network

转基因作物自 1996 年在全球范围内大规模商业化种植以来, 其种植面积显著增加, 在 2021 年达到 1.955 亿 hm^2 , 与 1996 年相比增长了约 112 倍, 其中具有抗虫和抗除草剂(转 *Bt* 和 *Bar* 基因)复合性状的转基因作物在全球种植面积最大, 我国抗虫和抗除草剂转基因作物种植面积达 290 万 hm^2 ^[1]。2010 年, 在科学评估、依法管理的基础上, 我国积极稳妥有序推进转基因生物新品种产业化应用。*Bt* 基因和 *Bar* 基因是植物基因工程及转基因育种中应用最为广泛的抗虫和抗除草剂基因, 已被成功导入水稻、烟草、玉米和棉花等多种植物, 获得了一大批具有良好抗虫和抗除草剂性状的转基因植物品种或种质资源。随着转基因作物的大规模种植, 其对环境生态系统的影响及其潜在生态风险受到高度关注。微生物是生态环境中最活跃的群体, 植物与土壤微生物存在共生关系^[2], 微生物直接或间接参与植物生长发育过程, 如水分和养分获取^[3]、应激反应^[4]以及抑制病原菌^[5]等, 因而微生物多样性已成为评价转基因植物生态效应的重要指标^[6-8], 转基因植物对微生物群落结构和功能多样性的影响是目前国内外研究的前沿热点^[9-11]。为了加强转基因生物及其产品的安全监管, 我国对转基因植物实施安全性评价制度^[12], 只有经过安全性评价的转基因植物才能进行大田种植和大规模商业化生产。

2017 年修订的《农业转基因生物安全管理条例》^[13]和 2022 年修订的《农业转基因生物安全评价管理办法》^[12]对转基因植物环境安全评价主要集中在受体植物和靶标生物, 但是对非靶标生物, 特别是微生物生态效应评价尚无相关研究内容和技术标准。

微生物可以直接或间接与植物相互作用进而影响宿主植物的生长、抗病和胁迫耐受力(如干旱等非生物胁迫)等, 这些微生物统称为植物的第二基因组或扩展基因组^[2]。微生物几乎在植物的所有组织生态位中定殖, 包括土壤-根界面(根系表面)和植物组织内部(根、茎和叶内层)。目前单一植物生态位的微生物群落组成和构建研究取得了许多进展^[2,14-17], 但是以植物不同器官和组织为代表的不同生态位的微生物群落组成及相互关系研究较少。水稻是当今世界最重要的粮食作物之一, 全球一半以上的人口以稻米为主要食物来源^[18]。水稻是第一个完成全基因组测序的作物, 具有较短的生命周期、简单的组织培养和高效的遗传转化, 是功能基因组研究的模式植物, 因此研究水稻宿主基因组信息和微生物遗传多样性之间的关联作用, 有助于解析植物和微生物之间的互作机制。*Bar* 基因来源于土壤吸水链霉菌(*Streptomyces hygroscopicus*), 编码膦丝菌素乙酰转移酶(phosphinotricin acetyltransferase, PAT), 是广

泛应用于基因工程育种的除草剂抗性基因,也是遗传转化中重要的标记基因^[19]。*Bt* 基因表达 *Bt* 杀虫毒素,对害虫有很强的杀虫效果^[20]。我国已经培育出多个具有商业化前景的抗除草剂和抗虫复合性状转基因水稻,其微生态效应受到高度关注。陈晓雯等^[21]、关潇等^[22]、Lee 等^[23]、Li 等^[24]和宋亚娜等^[25]分析了转 *Bt* 基因水稻对根际土壤微生物及根系内生菌的影响;肖国樱等^[26]、段发平等^[27]和何美丹^[28]分析了转 *Bar* 基因水稻的遗传特性以及对土壤微生物的影响,但是由 *Bt* 基因和 *Bar* 基因转化引起的水稻基因型改变以及从地下到地上水稻不同组织生态位对微生物群落组成和潜在功能的影响还无系统研究。

本研究以转 *Bt* 基因和 *Bar* 基因水稻作为模式评价植物,采用细菌 16S rRNA 基因和真菌 ITS 高通量测序技术,分析根际土壤细菌以及根系、茎和叶内生细菌群落和功能多样性对转 *Bt* 和 *Bar* 基因水稻的响应规律;构建土壤细菌群落的物种关联网络图,解析细菌群落物种之间互作关系及核心物种,系统阐明转 *Bt* 基因和 *Bar* 基因水稻的微生态效应,为转基因植物的环境安全评价提供理论基础和参考策略。

1 材料与amp;方法

1.1 水稻种植

含 *Bt-Cry1C* 基因和 *Bar* 基因的转基因水稻 TIC-1 及其亲本明恢 63 (Minghui63)由上海市农业生物基因中心提供^[20,29]。TIC-1 和 Minghui63 于 2023 年 5 月 16 日种植于上海市农业科学院华漕院区实验大棚(31°13'18"N, 121°19'10"E)。水稻种植采用单因素随机区组法,每个处理 3 次重复,采用常规田间栽培管理措施。大棚土壤为水稻土。

1.2 样本采集

水稻抽穗期是水稻生长发育过程中一个关

键时期,是水稻从营养生长期到生殖生长期的转变过程^[30]。华桦^[31]和 Li 等^[11]研究表明转 *Bt* 基因水稻在抽穗期通过根系释放的 *Bt* 蛋白含量最高,推测抽穗期是转 *Bt* 基因水稻与亲本根系代谢水平差异最大的生长期。因此本研究在水稻抽穗期(2023 年 8 月 21 日)采集根际土壤微生物及根茎叶的内生菌。根际土壤采样时去除土壤表面杂草,按五点取样法将带土根系取出后,抖掉离根系较远的散土,用镊子轻轻刮取根系表面土壤,距离根系组织 2 mm 以内的土壤被视为根际土壤^[32]。过筛除去杂物,装入保鲜袋中带回实验室,土壤放于-20 °C 保存^[10,24]。TIC-1 和 Minghui63 各 3 个土壤根际土样本,用于后续根际土壤微生物 DNA 提取以及细菌和真菌核糖体 RNA 基因高通量测序分析。在提取水稻叶、茎、根组织样品内生菌之前,植物组织样本需要表面灭菌,其具体操作为:无菌水洗涤样本 30 s, 75%乙醇洗涤 1 min, 2% NaOCl 洗涤 3 min, 75%乙醇洗涤 1 min, 无菌水洗涤 30 s。TIC-1 和 Minghui63 各 5 个叶、茎、根组织样品,-80 °C 保存,用于后续内生菌 DNA 提取。

1.3 DNA 提取和高通量测序

根际土壤微生物和叶、茎、根等不同组织生态位的微生物 DNA 提取参照 Beckers 等^[2]和 Cregger 等^[33]的研究方法进行。委托上海美吉生物医药科技有限公司基于 Illumina MiSeq PE300/NovaSeq PE250 平台,分别对 36 个样本的细菌 16S rRNA 基因和真菌 ITS 基因扩增测序。细菌 16S rRNA 基因的 V5-V7 高变区采用引物 799F (5'-AACMGGATTAGATACCKG-3') 和 1193R (5'-ACGTCATCCCCACCTTCC-3') 扩增。真菌 ITS 区域采用引物 ITS1F (5'-CTTGGTCATTTA GAGGAAGTAA-3')和 ITS2R (5'-GCTGCGTTCT TCATCGATGC-3') 扩增。具体测序步骤参见李

玉洁等^[34]的方法。细菌和真菌原始序列已经提交至 NCBI SRA (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/>), 登录号分别为 SRP473814 和 SRP473825。Illumina 测序得到的 PE reads 进行样本拆分后, 根据测序质量对双端 reads 进行质控和过滤, 同时根据双端 reads 之间的 overlap 关系进行拼接, 获得质控拼接之后的优化数据。然后使用序列降噪方法(DADA2/Deblur 等)处理优化数据, 获得扩增子序列变体(amplicon sequence variant, ASV)代表序列和丰度信息。

1.4 数据处理及统计分析

基于 ASV 代表序列及丰度信息, 进行物种分类学分析、群落多样性分析, 以及物种差异分析、相关性分析、系统发育分析和功能预测分析等一系列的统计学或可视化分析。首先将得到数据按照 97% 相似度对非重复序列进行 ASV 聚类, 用于不同样本中微生物的多样性分析。通过 Mothur 软件进行 α 多样性分析, 评估微生物群落中物种的丰富度、多样性。分别运用 Student's *t* 检验和 Kruskal-Wallis 秩和检验的方法检测两组或多组之间的 α 多样性指数值是否具有显著性差异。基于 Bray-Curtis 距离算法和相似性分析(analysis of similarities, ANOSIM)进行主坐标分析(principal coordinates analysis, PCoA), 可视化呈现不同样本中群落分布的差异程度。

利用 Python (version 2.7) 软件绘制群落 Bar 图, 展示不同样本在属水平上的群落结构组成情况。分别采用 Kruskal-Wallis 秩和检验和 Student's *t* 检验评价多组或两组样本之间物种在属水平上的差异性。通过 R 语言, 采用 Pearson 方法计算各个物种之间的相关系数, 利用 Gephi 软件根据物种之间的相互关联性绘制相关性网络图, 仅显示相关性为极显著且相关系数大于 0.8 以上的相互作用($|R| \geq 0.8, P < 0.01$)。采用关联网

络分析寻找微生物在不同水稻基因型和组织生态位的共现或互斥的固有模式, 并据此寻找维持整个微生物群落稳定的核心物种。本研究在属分类水平将不同生态位微生物数据整合, 选取总丰度排名前 50 的物种, 通过计算物种之间的 Pearson 相关系数, 反映物种之间的相关性。选取相关系数 $|R| \geq 0.8, P < 0.01$ 的物种构建相关性网络。对水稻叶、茎、根内生菌和根际土壤微生物进行物种相关性网络分析。选取微生物属水平细菌物种丰度排名前 20 和真菌物种丰度排名前 50, 计算物种之间的相关系数。选取相关系数 $|R| \geq 0.8, P < 0.01$ 的物种构建相关性网络。图中节点的颜色代表不同的模块, 节点的大小取决于度的大小; 连线的颜色表示正负相关性, 红色表示正相关, 绿色表示负相关; 线越多表示该物种与其他物种之间的联系越密切。

利用通过重建未观测状态对群落进行系统发育研究(phylogenetic investigation of communities by reconstruction of unobserved states, PICRUSt2)软件对 ITS 扩增子测序结果进行酶功能预测。通过 PICRUSt2 对 Minghui63 和 T1C-1 叶片中真菌的功能进行预测分析。首先将 ASV 序列与其内部的参考序列比对, 把 ASV 置入相应的参考树中, 推断每个 ASV 基因家族(gene family)的拷贝数, 预测每个 ASV 的基因含量(gene content), 确定每个样本基因家族的丰度; 将基因家族信息与 KEGG 酶功能数据库进行比对, 获得每个样本中对应的酶功能信息。采取 Student's *t* 检验分析相对丰度前 50 的真菌酶的差异性。

2 结果与分析

2.1 水稻不同组织生态位微生物群落组成

通过 Illumina MiSeq 对总计 36 个样本进行微生物核糖体 RNA 基因测序, 抽穗期 T1C-1 和 Minghui63 的不同组织生态位的细菌群落组

成如图 1A–1D 所示。Minghui63 叶片内生细菌的优势物种为 unclassified_f_Alcaligenaceae 和微杆菌属(*Microbacterium*)，相对丰度分别为 75.6%和 5.6%。T1C-1 叶片内生细菌的优势物种为 unclassified_f_Alcaligenaceae 和罗氏菌属(*Romboutsia*)，相对丰度分别为 48.9%和 16.7%；Minghui63 和 T1C-1 的茎内生细菌的相对丰度最高的物种均为 unclassified_f_Alcaligenaceae，相对丰度分别为 88.9%和 70.0%；Minghui63 和 T1C-1 根系内生细菌优势物种为链霉菌属(*Streptomyces*)、unclassified_f_Alcaligenaceae、缓生根瘤菌属(*Bradyrhizobium*)等；T1C-1 根际土壤优势物种芽孢杆菌属(*Bacillus*)和鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*)相对丰度比 Minghui63 降低 66%和 48%。

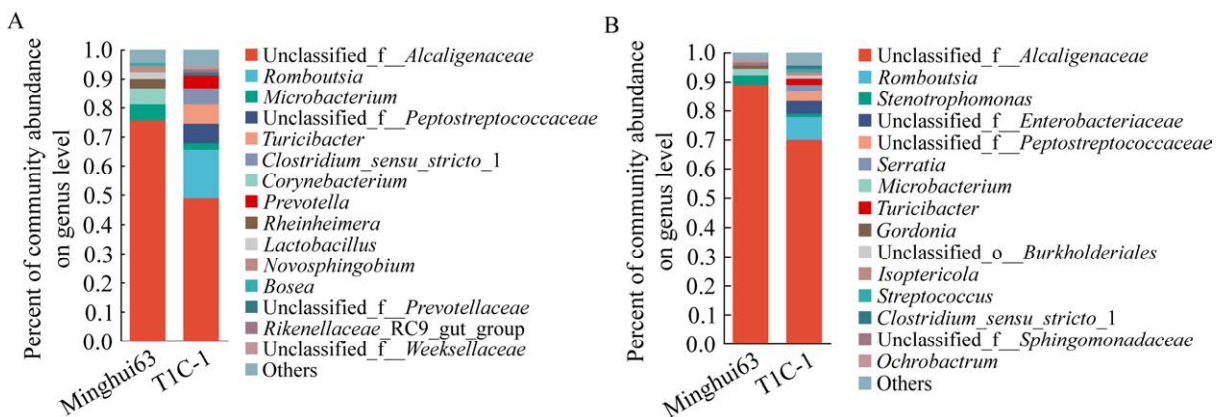
抽穗期 T1C-1 和 Minghui63 的不同组织生态位的真菌群落组成如图 1E–1H 所示。T1C-1 和 Minghui63 叶内生真菌的优势物种是帚枝霉属(*Sarocladium*)和 *Apiotrichum*；T1C-1 和 Minghui63 茎内生真菌的优势物种是 *Sarocladium* 和 *Meyerozyma*；相对于 Minghui63，T1C-1 根系内生真菌 unclassified_f_Lasiosphaeriaceae 的相对丰度增加 229%；T1C-1 和 Minghui63 根际土壤的优势真菌物种是被孢霉属(*Mortierella*)和螺旋聚孢霉属(*Clonostachys*)，并且这 2 种真菌

相对丰度在不同基因型水稻间无显著差异。

2.2 转基因水稻对不同组织生态位微生物 α 多样性影响

本研究采用香农(Shannon)指数、辛普森(Simpson)指数、观察丰富度(the observed richness, Sobs)指数和 Chao1 estimator (Chao)指数表征微生物 α 多样性。不同组织生态位的细菌 α 多样性指数在 2 个不同水稻基因型 Minghui63 和 T1C-1 之间无显著差异。土壤真菌群落多样性指数分析结果表明，相对于 Minghui63，T1C-1 对不同组织生态位的真菌多样性指数产生显著影响(图 2A–2D)。T1C-1 和 Minghui63 的根际土壤真菌和茎、根内生真菌的香农指数、辛普森指数、Sobs 指数和 Chao 指数无显著差异(图 2B–2D)，但是 T1C-1 和 Minghui63 叶内生真菌的香农指数和辛普森指数出现显著变化；相对于 Minghui63，T1C-1 叶内生真菌的香农指数显著增加(图 2A)。

水稻不同组织生态位细菌 α 多样性分析结果表明(图 3A)，根际土壤中的内生细菌 Chao 指数显著高于根、茎、叶内生细菌。根际土壤细菌和根系内生细菌的 Ace、Shannon 和 Simpson 指数无显著差异，表明根际土壤细菌和根系内生细菌群落组成更为相似；不同生态位的真菌 α 多样性结果说明(图 3B)，根际土壤



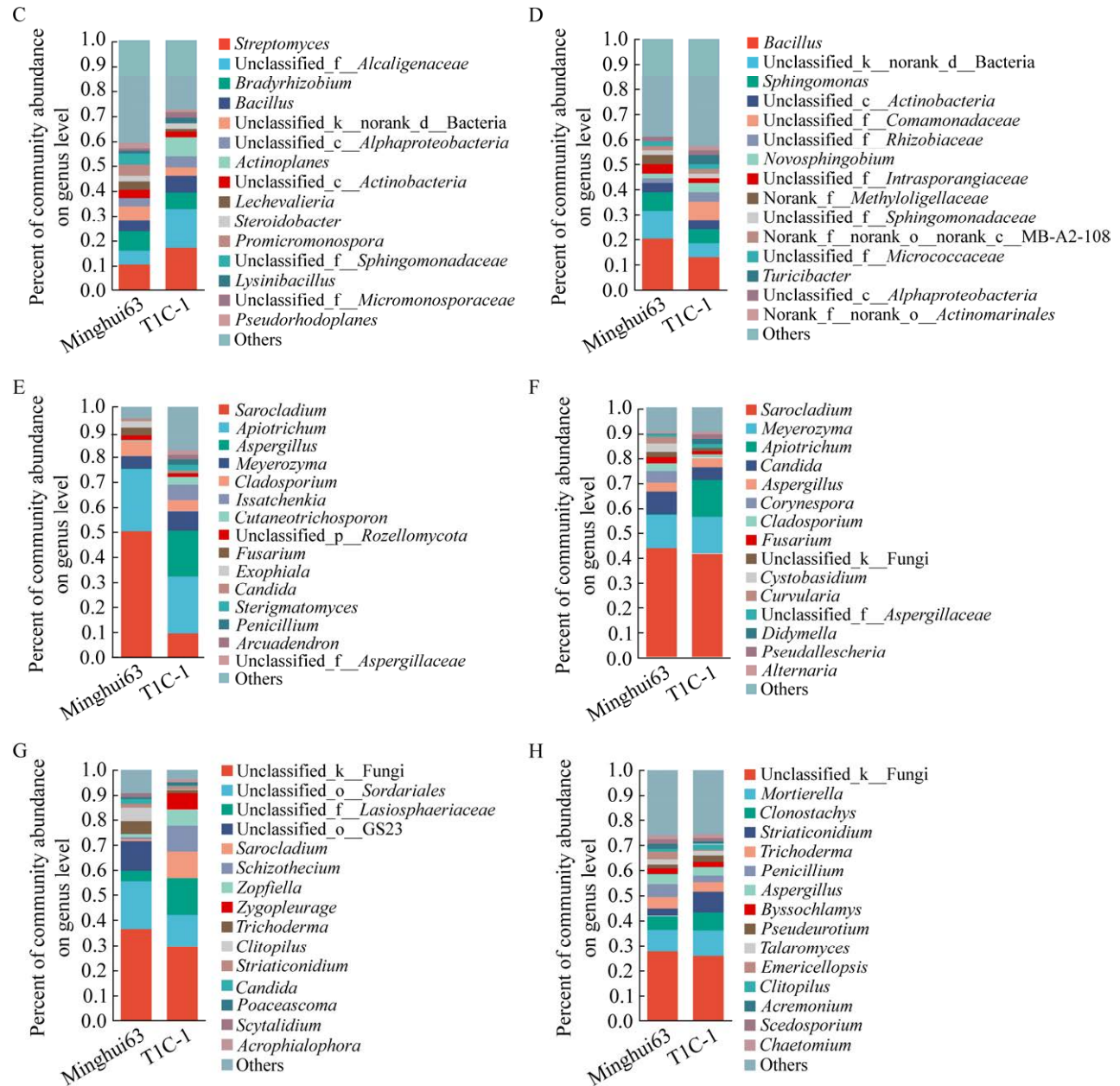


图 1 水稻不同组织生态位的微生物群落组成 A: 叶内生细菌的群落组成. B: 茎内生细菌的群落组成. C: 根内生细菌的群落组成. D: 根际土壤细菌的群落组成. E: 叶内生真菌的群落组成. F: 茎内生真菌的群落组成. G: 根内生真菌的群落组成. H: 根际土壤真菌的群落组成

Figure 1 Microbial communities composition in different ecological niches of rice tissues. A: The community composition of endophytic bacteria in leaves. B: The community composition of endophytic bacteria in stems. C: The community composition of endophytic bacteria in roots. D: The community composition of rhizosphere soil bacteria. E: The community composition of endophytic fungi in leaves. F: The community composition of endophytic fungi in stems. G: The community composition of endophytic fungi in roots. H: Community composition of rhizosphere soil fungi.

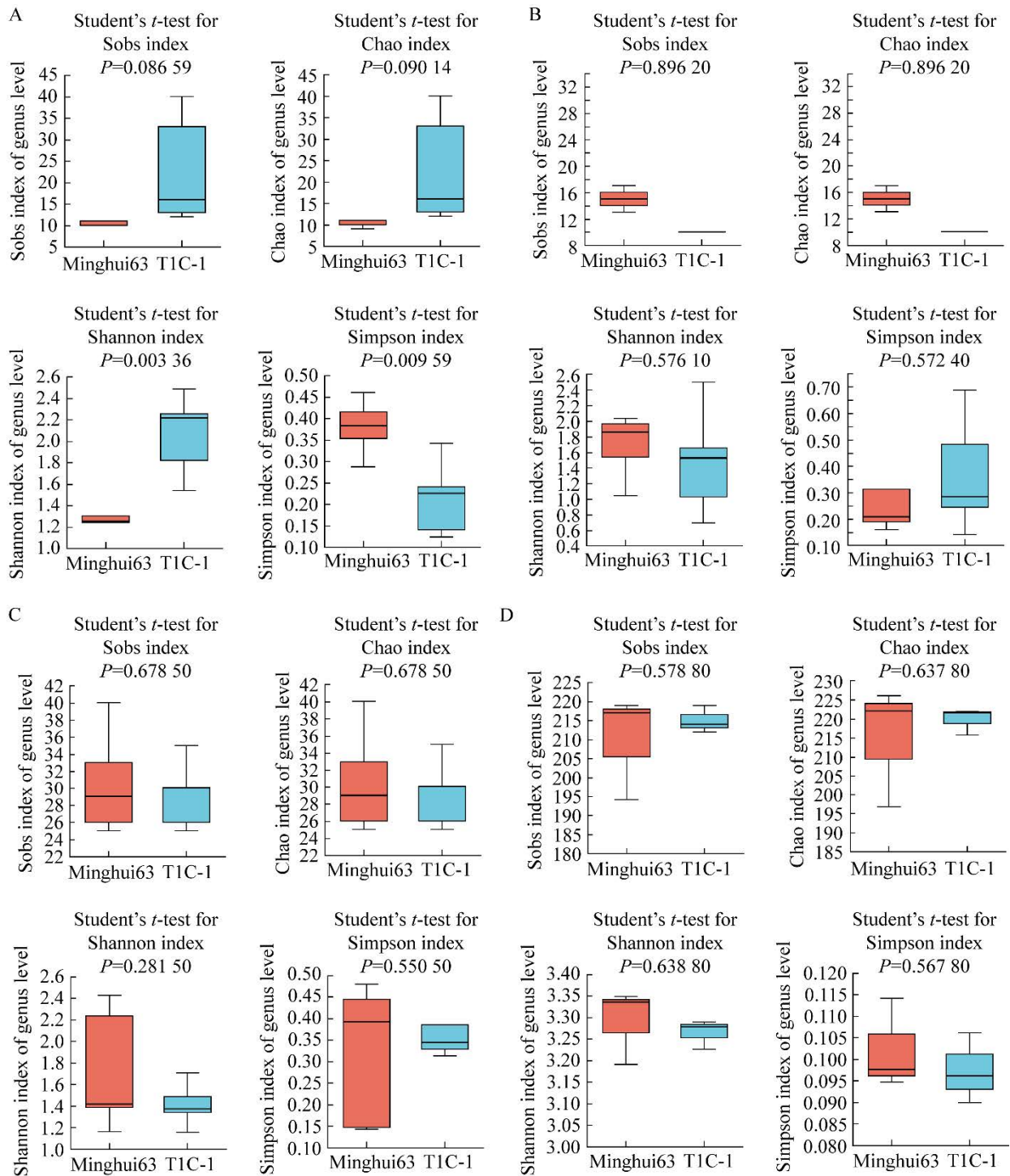


图2 TIC-1与Minghui63不同生态位内生真菌 α 多样性差异分析 A: 叶内生真菌的 α 多样性指数。

B: 茎内生真菌的 α 多样性指数。C: 根内生真菌的 α 多样性指数。D: 根际土壤真菌的 α 多样性指数

Figure 2 Alpha diversity analysis of endophytic fungi between TIC-1 and Minghui63. A: Alpha diversity index of endophytic fungi in leaves. B: Alpha diversity index of endophytic fungi in stems. C: Alpha diversity index of endophytic fungi in roots. D: Alpha diversity index of fungi in rhizosphere soil.

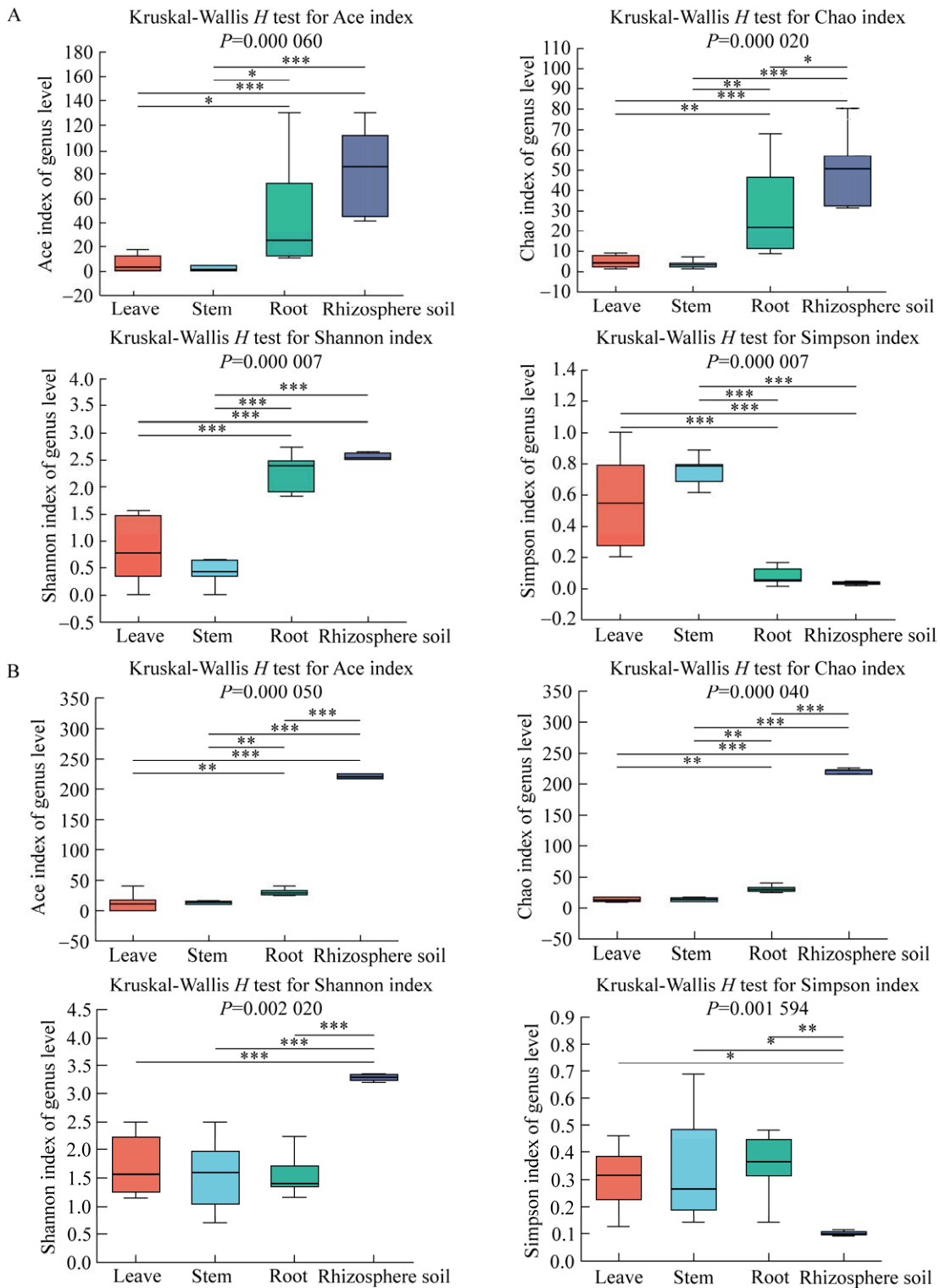


图 3 不同生态位 α 多样性指数 A: 水稻不同组织生态位细菌 α 多样性. B: 不同生态位的真菌 α 多样性

Figure 3 Alpha diversity index in different ecological niches of rice tissues. A: Alpha diversity analysis of endophytic bacteria in different ecological niches of rice tissues. B: Alpha diversity analysis of endophytic fungi in different ecological niches of rice tissues. *: $0.01 < P \leq 0.05$; **: $0.001 < P \leq 0.01$; ***: $P \leq 0.001$.

真菌 Ace、Chao、Shannon 和 Simpson 指数显著高于其他组织生态位的内生真菌。此外，内生细菌和真菌 α 多样性指数在水稻茎和叶 2 个组织生态位之间无显著差异。

2.3 转基因水稻对不同组织生态位微生物 β 多样性影响

本研究基于 Bray-Curtis 距离和 ANOSIM 组间差异检验进行主坐标分析(principal co-ordinates analysis, PCoA)以表征水稻不同生态位细菌和真菌群落的 β 多样性, 结果如图 4A、4B 所示。不同颜色点代表不同分组的样本, 样本点越接近, 表明样本物种组成越相似。在细菌群落 PCoA 分析中, T1C-1 和 Minghui63 根际土壤和叶、茎、根内生菌各样本聚集在一起, 样本间空间距离较小, 说明微生物群落结构相似(图 4A)。真菌群落的 PCoA 分析结果表明, 根际土壤真菌和茎、根内生真菌在 T1C-1 和 Minghui63 之间的群落无显著的差异性, 但是叶内生真菌在 T1C-1 和 Minghui63 之间的群落具有显著差异 ($P<0.05$) (图 4B), 表明转基因水稻 T1C-1 对叶片内生真菌群落结构产生显著影响。

2.4 水稻不同组织生态位和不同基因型物种差异

在微生物属分类水平, 本研究采用 Kruskal-Wallis 秩和检验的方法, 对水稻不同生态位细菌(图 5A)和真菌(图 5B)进行物种差异分析。根际土壤细菌 *Bacillus* 和 *Sphingomonas* 相对丰度显著高于根、茎、叶组织($P<0.001$); 根系内生细菌 *Streptomyces*、*Bradyrhizobium*、*Lechevalieria* 和 *Steroidobacter* 相对丰度显著高于其他组织生态位 ($P<0.05$)。叶内生细菌 *Microbacterium* 相对丰度显著高于茎($P<0.05$) (图 5A)。不同生态位真菌物种差异分析结果表明, *Apiotrichum* 和 *Cladosporium* 在叶片组织中相对丰度最高; *Sarocladium* 和 *Meyerozyma* 在

茎组织中相对丰度最高; *Mortierella*、*Trichoderma*、*Striaticonidium* 和 *Clonostachys* 在根际土中相对丰度极显著高于其他组织 ($P<0.001$) (图 5B)。

鉴于叶内生真菌在 T1C-1 和 Minghui63 之间的群落具有显著差异(图 6), 本研究在微生物的属分类水平, 采用 Student's *t* 检验的方法对 T1C-1 和 Minghui63 叶片内生真菌相对丰度进行差异分析。结果表明 T1C-1 叶片内生真菌 *Sarocladium* 相对丰度极显著低于 Minghui63 ($P<0.01$), *Aspergillus* 和 *Talaromyces* 的相对丰度则显著高于 Minghui63 ($P<0.05$) (图 6)。

2.5 水稻不同组织生态位和不同基因型的微生物群落网络

T1C-1 微生物关联网络有 91 个节点, 286 条边; Minghui63 微生物关联网络有 93 个节点, 243 条边。T1C-1 的平均度和平均聚类系数大于 Minghui63。基于网络度的大小筛选 T1C-1 和 Minghui63 的核心菌群。T1C-1 微生物群落核心物种为假散囊菌属(*Pseudeurotium*)、新赤壳属(*Neocosmospora*)、嗜热链球菌属(*Mycothermus*)、被孢霉属(*Mortierella*)和赛多孢子菌属(*Scedosporium*)。T1C-1 微生物群落核心物种为篮状菌属(*Talaromyces*)、被孢霉属(*Mortierella*)、假散囊菌属(*Pseudeurotium*)、赛多孢子菌属(*Scedosporium*)和芽孢杆菌属(*Bacillus*)。其中 *Bacillus* 在 Minghui63 相关网络中度的大小为 13, 而在 T1C-1 的网络中度的大小为 1, 发生显著变化(图 7A 和表 1)。不同生态位微生物关联网络分析结果表明(图 7B 和表 1), 茎内生菌的相关性网络平均度和平均聚类系数最高, 其次是叶片内生菌。相较于其他生态位, 根际土壤微生物网络中的负相关比例最高。叶片内生菌群落核心物种为青霉属(*Penicillium*)、假霉样真菌属(*Pseudallescheria*)、*Clostridium_sensu_*

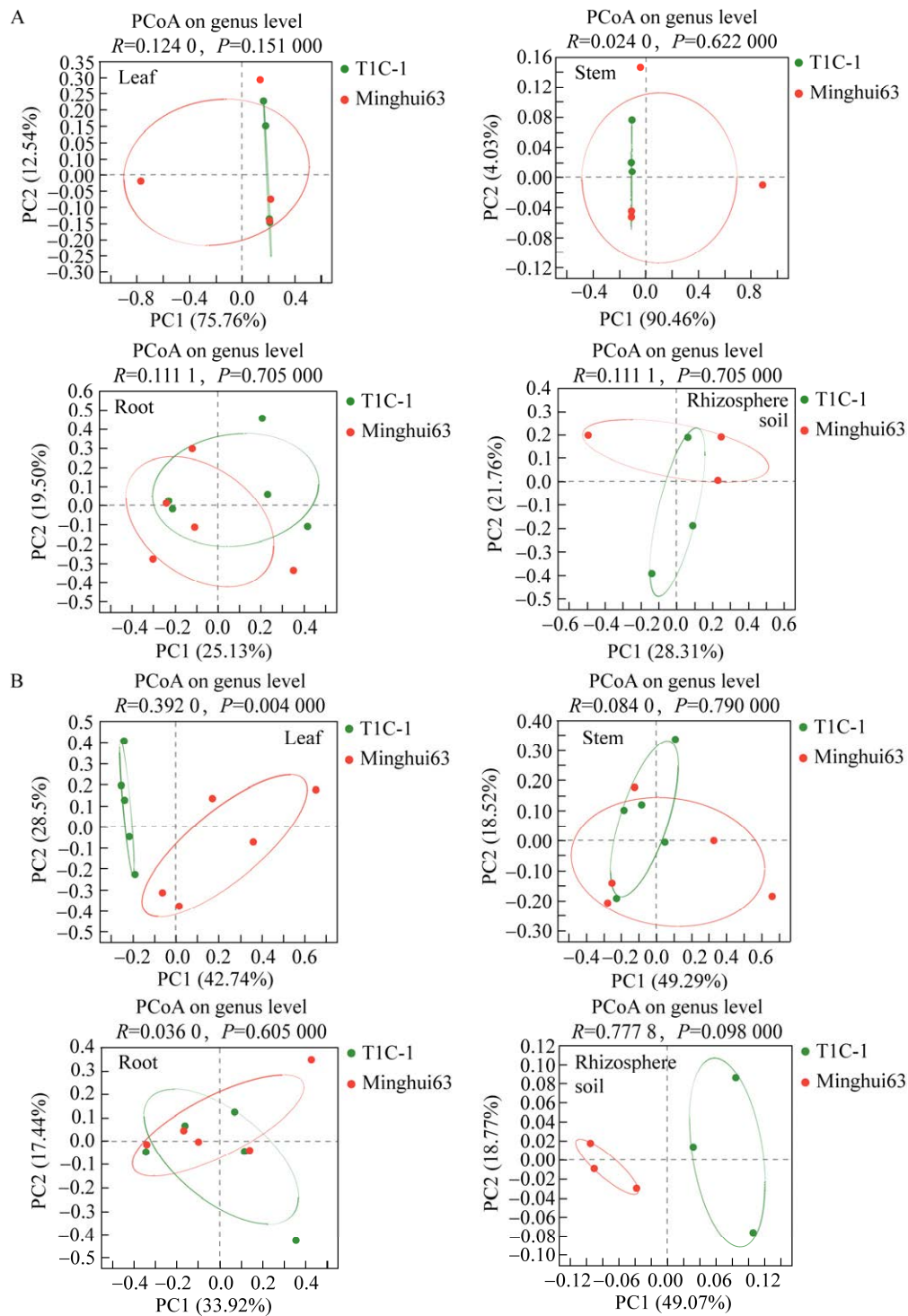


图4 水稻不同生态位细菌和真菌群落的 PCoA 分析 A: 水稻不同组织生态位细菌 PCoA 分析. B: 不同生态位的真菌 PCoA 分析

Figure 4 PCoA analysis of bacterial and fungal communities in different ecological niches of rice tissues. A: PCoA analysis of endophytic bacteria in different ecological niches of rice tissues. B: PCoA analysis of endophytic fungi in different ecological niches of rice tissues.

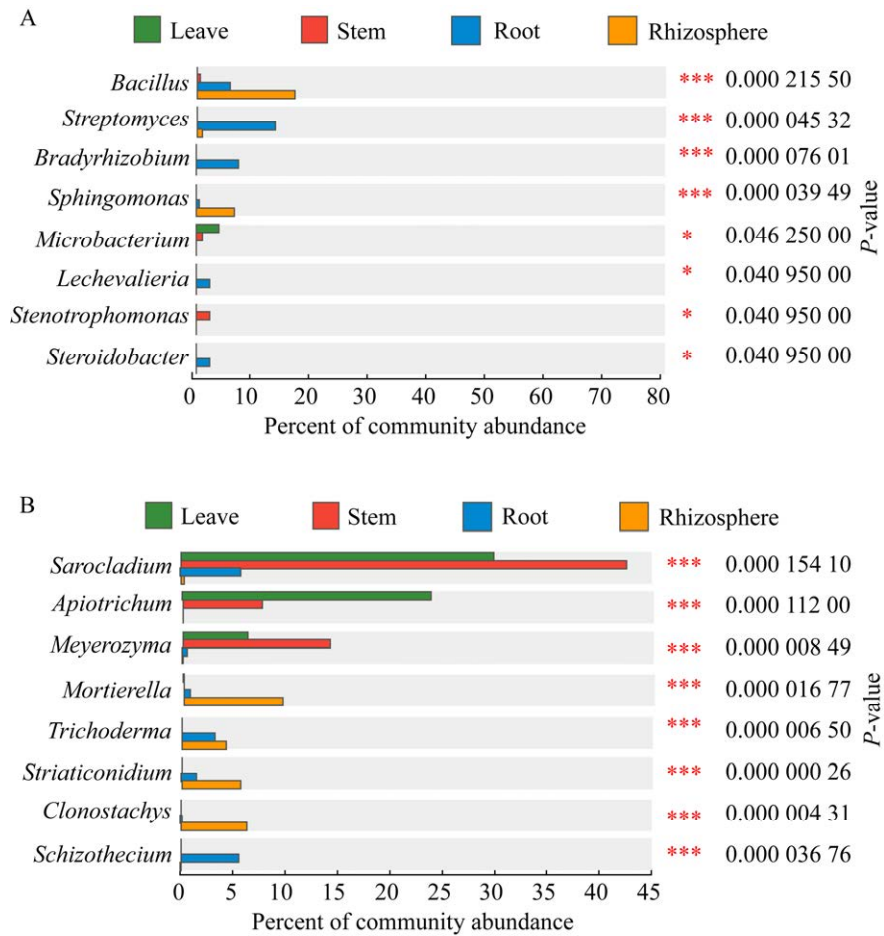


图 5 水稻不同生态位细菌(A)和真菌(B)组成差异

Figure 5 Differences of bacterial (A) and fungal (B) community composition in different ecological niches.

*: $0.01 < P \leq 0.05$; ***: $P \leq 0.001$.

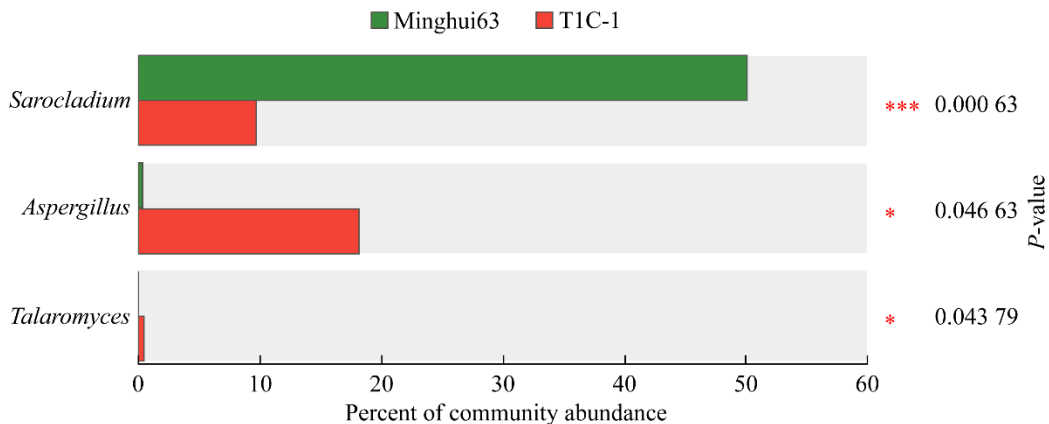


图 6 水稻叶片内生真菌组成差异

Figure 6 Differences in the endophytic fungal communities composition in rice leaves. *: $0.01 < P \leq 0.05$;

***: $P \leq 0.001$.

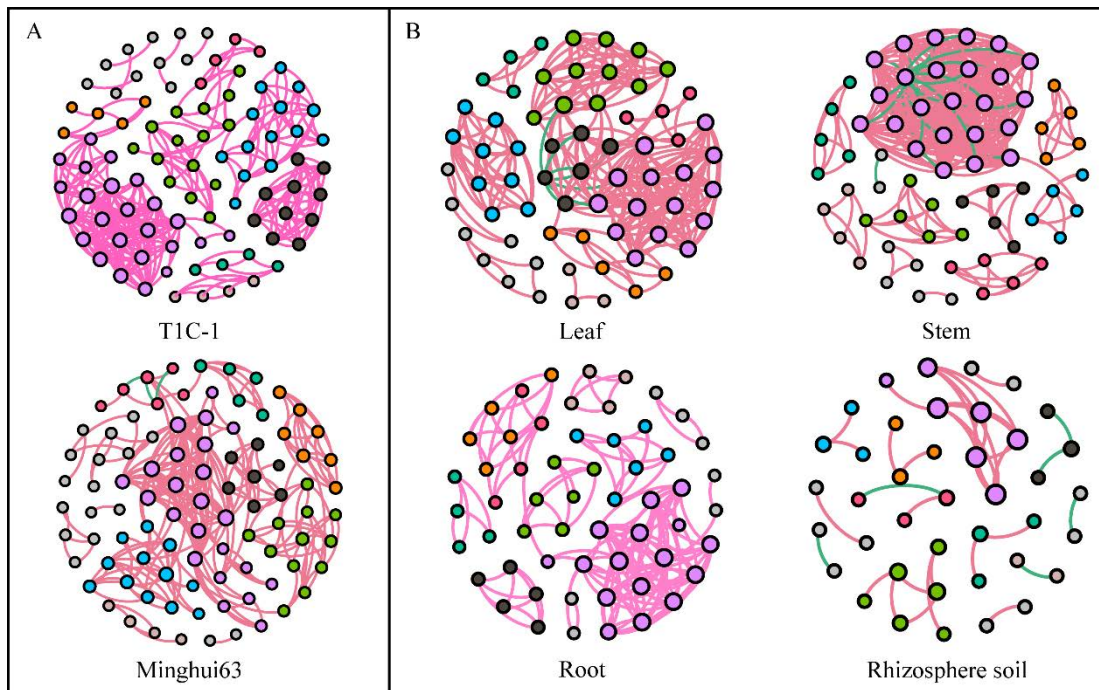


图 7 土壤微生物群落关联网络分析 A: TIC-1 和 Minghui63 的相关性网络分析. B: 水稻不同组织生态位的相关性网络分析

Figure 7 Correlation network analysis of soil microbial communities. A: Correlation network analysis of TIC-1 and Minghui63. B: Correlation network analysis in different ecological niches of rice tissues.

表 1 网络拓扑指数

Table 1 Topology index of network

分组 Group	节点 Node	边 Link	平均聚类系数 Average clustering coefficient	平均度 Average degree	模块性 Modularity	正相关比例 Positive correlation proportion (%)	负相关比例 Negative correlation proportion (%)
TIC-1	91	286	0.856	6.286	0.704 6	100.00	0.00
Minghui63	93	243	0.766	5.226	0.722 1	98.77	1.23
叶 Leaf	65	270	0.902	8.308	0.619 2	97.41	2.59
茎 Stem	66	349	0.945	10.576	0.358 6	93.12	6.88
根 Root	57	155	0.875	5.439	0.614 4	100.00	0.00
根际土 Rhizosphere soil	40	37	0.458	1.850	0.790 4	83.78	16.22

stricto_1、嗜热真菌属(*Thermomyces*)。茎内生菌群落核心物种为耐热囊菌属(*Thermoascus*)、假霉样真菌属(*Pseudallescheria*)、嗜热真菌属(*Thermomyces*)和青霉属(*Penicillium*)。根内生菌群落核心物种为被孢霉属(*Mortierella*)、赛多孢子菌属(*Scedosporium*)、*Humicola*、*Scytalidium*

和镰孢菌属(*Fusarium*)。根际土壤微生物群落核心物种为芽殖球菌属(*Blastococcus*)、类诺卡氏菌属(*Nocardioides*)。值得注意的是,假霉样真菌属(*Pseudallescheria*)、嗜热真菌属(*Thermomyces*)、青霉属(*Penicillium*)均为叶和茎内生菌群落核心物种。

2.6 转基因水稻对叶片内生真菌潜在功能影响

T1C-1 和 Minghui63 叶片内生真菌的 PICRUSt2 功能预测分析结果表明,18 个真菌功能基因编码酶丰度具有差异;相对于 Minghui63,

T1C-1 真菌酶显著增加的有 11 个,显著降低的有 7 个(图 8)。其中参与碳素代谢[L-阿拉伯糖异构酶(EC: 5.3.1.4)、葡聚糖 1,4- α -葡糖苷酶(EC: 3.2.1.3)、 α -唾液酸酶(EC: 3.2.1.18)]、转录作用[聚(A)特异性核糖核酸酶(EC: 3.1.13.4)、DNA

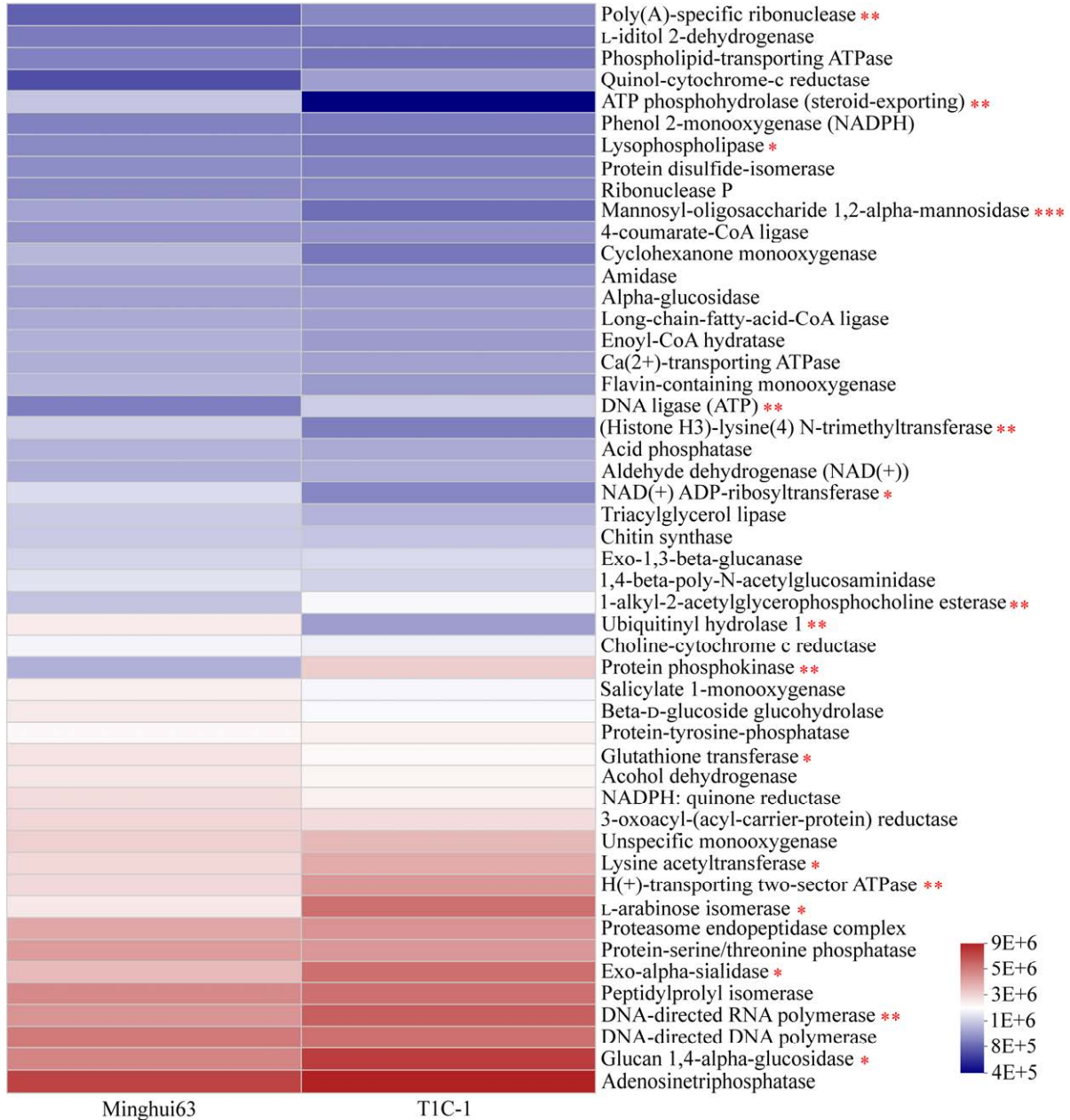


图 8 水稻叶片真菌功能酶相对丰度

Figure 8 Relative abundance of predicting fungal function enzyme in rice leaves. *: $0.01 < P \leq 0.05$; **: $0.001 < P \leq 0.01$; ***: $P \leq 0.001$.

指导性 RNA 聚合酶(EC:2.7.7.6)、组蛋白乙酰转移酶(EC: 2.3.1.48)]和能量代谢[H⁺-转运双区 ATP 酶(EC: 3.6.3.14)]、喹啉细胞色素 c 还原酶(EC: 1.10.2.2)的真菌功能基因编码酶相对丰度在 TIC-1 显著增加;参与碳素代谢[甘露寡糖 1,2- α 甘露糖苷酶(EC: 3.2.1.113)]、能量代谢[外源性转运 ATP 酶(EC: 3.6.3.44)]、脂质代谢[溶血磷脂酶(EC: 3.1.1.5)]的真菌功能基因编码酶的相对丰度在 TIC-1 显著降低。

3 讨论

3.1 不同生态位微生物群落组成对转 *Bt* 和 *Bar* 基因水稻种植响应

转 *Bt* 和 *Bar* 基因植物的微生态效应,是评价其生态环境风险的重要内容^[24,35-36]。目前转基因植物的微生态效应研究主要集中在转基因植物对根际土壤微生物多样性影响,*Bt* 和 *Bar* 基因转化对植物不同组织生态位微生物群落组成和潜在功能的影响还不清楚。植物相关微生物的群落组装过程是由生态位理论(特别是植物遗传因素^[37]、通过组织水平选择)和中性过程理论^[38]驱动的。本研究结果表明,细菌和真菌群落多样性在水稻不同基因型和不同组织生态位之间发生显著变化(图 2, 图 3);*Bt* 和 *Bar* 基因转化引起的水稻基因型改变,只是导致叶片内生真菌的香农指数和辛普森指数出现显著变化(图 2),而对茎和根的内生菌以及根际土壤微生物多样性无显著影响。因此,相对于基因型,细菌和真菌群落多样性变化受到组织生态位影响更大。导致上述结果的原因可能是微生物定殖生长的不同生态位环境条件选择(例如根系土壤受到根系分泌物影响、叶片和茎受到浇水和水分蒸发影响),以及不同微生物生活史差异而导致的生态位分化^[33]。华桦^[31]的研究表明转 *Bt* 基因水稻根、茎、叶均可以表达 *Bt* 蛋白,

Bt 蛋白在水稻孕穗期的叶片含量最高,根系和茎秆中 *Bt* 蛋白含量远低于叶片。李小宇等^[39]发现转 *Bar* 基因抗除草剂大豆叶片中 PAT 蛋白的含量显著高于茎和根。因而我们推测,相对于 Minghui63, TIC-1 叶片内生真菌暴露于更高含量的 *Bt* 蛋白和 PAT 蛋白中,这些真菌可能通过多糖水解、糖酵解和有机酸代谢等碳素利用途径参与到 *Bt* 蛋白和 PAT 蛋白的碳素转化过程中,进而引起真菌的群落组成显著变化。然而微生物的群落组成对外源基因在不同作物转化的响应是不同的。转 *Bar* 基因小麦的根际真菌多样性显著高于常规品种,可能是 *Bar* 基因改变了小麦根系分泌物,使根际环境发生变化,从而改变小麦根际真菌多样性^[40]。转 *Bar* 基因的甘蔗的土壤微生物数量和对照相比未表现出一定的规律性^[41]。Griffiths 等^[42-43]对大田的研究发现,转 *Bt* 基因玉米的土壤微生物数量与非转基因玉米无明显差异。Shen 等^[44]研究了转 *Bt* 棉花对根际微生物影响,发现 *Bt* 棉和非 *Bt* 棉根际土壤微生物群落的功能多样性无差异。Santos-Medellín 等^[45]的研究表明环境胁迫导致水稻相关微生物群落的重新组装,相对于根际土壤微生物,根系内生菌对环境胁迫更敏感。因此基于本研究结果,我们建议对转基因植物微生态效应的评估应该要关注对其不同生态位内生菌的影响。值得注意的是,虽然 TIC-1 与 Minghui63 的叶片内生真菌群落组成发生显著改变(图 4B),但是 TIC-1 未导致叶片内生真菌多样性指数降低。

3.2 特定功能微生物对转 *Bt* 和 *Bar* 基因水稻种植响应

植物内生菌来自外界,通过不同方式进入到植物体内发挥作用,因此其遗传与代谢功能都是与宿主在长期共同进化过程中形成的^[46]。本研究发现叶片内生真菌 *Sarocladium*、*Aspergillus* 和

Talaromyces 相对丰度在 T1C-1 和 Minghui63 之间有显著差异(图 6)。*Sarocladium* 是造成水稻叶鞘腐败病的植物病原菌, 该病原菌不仅在水稻各生育期发生危害, 还能侵害叶鞘、谷粒、叶片中脉等^[47]。相对于 Minghui63, T1C-1 叶片组织中的 *Sarocladium* 相对丰度显著降低。*Talaromyces* 参与碳素循环, 能产生高活性的木质纤维素酶类, 是自然界中重要的分解者, 部分物种能够促进植物对矿物质吸收, 增强抗病、抗逆和促进生长的作用^[48-49]。*Aspergillus* 广泛分布于植物性产品和土壤中, 可生产淀粉酶、酸性蛋白酶、纤维素酶、果胶酶等和参与多糖降解途径^[50]。*Talaromyces* 和 *Aspergillus* 不仅可以表达天冬氨酸蛋白酶^[51], 也可以降解角蛋白^[52]。因此, 我们推测 *Talaromyces* 和 *Aspergillus* 参与了 Bt 蛋白和 PAT 蛋白的碳素转化过程, 进而引起真菌群落组成的显著变化。本研究中 T1C-1 叶片组织中的 *Talaromyces* 和 *Aspergillus* 相对丰度显著高于 Minghui63, *Sarocladium* 相对丰度显著低于 Minghui63。探索微生物潜在功能对转 *Bt* 基因和 *Bar* 基因作物种植的反应规律, 成为评价转基因作物微生态效应的新切入点^[34]。本研究的 PICRUST2 功能预测结果表明, 相对于 Minghui63, T1C-1 显著改变了碳素代谢、脂类代谢和能量代谢等途径(图 8), 表明叶片内生真菌群落的物种多样性和潜在多功能性对转 *Bt* 和 *Bar* 基因作物种植的反应是一致的。

4 结论

本研究解析了水稻不同组织生态位微生物群落组成及潜在功能对外源 *Bt* 基因和 *Bar* 转化的反应规律, 转 *Bt* 和 *Bar* 基因水稻 T1C-1 对叶片内生真菌群落组成产生显著影响, 但是 T1C-1 未导致叶片内生真菌多样性指数降低。基于本研究结果, 对转基因植物微生态效应的评估需要关

注对其不同生态位内生菌的影响。

致谢

感谢中国科学院南京土壤研究所蒋禹霁研究员和柳旭博士对关联网络分析方法进行指导。

参考文献

- [1] ISAAA. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: ISAAA Brief No. 55[EB]. <https://www.isaaa.org>. Accessed year: 2024.
- [2] BECKERS B, de BEECK MO, WEYENS N, BOERJAN W, VANGRONSVELD J. Structural variability and niche differentiation in the rhizosphere and endosphere bacterial microbiome of field-grown poplar trees[J]. *Microbiome*, 2017, 5(1): 25.
- [3] PII Y, MIMMO T, TOMASI N, TERZANO R, CESCO S, CRECCHIO C. Microbial interactions in the rhizosphere: beneficial influences of plant growth-promoting rhizobacteria on nutrient acquisition process: a review[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2015, 51(4): 403-415.
- [4] de ZELICOURT A, AL-YOUSIF M, HIRT H. Rhizosphere microbes as essential partners for plant stress tolerance[J]. *Molecular Plant*, 2013, 6(2): 242-245.
- [5] BERENDSEN RL, PIETERSE CMJ, BAKKER PAHM. The rhizosphere microbiome and plant health[J]. *Trends in Plant Science*, 2012, 17(8): 478-486.
- [6] 王建武, 冯远娇, 聂呈荣. 转基因作物的生态风险评估: 以转 *Bt* 基因玉米为例[M]. 北京: 化学工业出版社, 2010: 116.
WANG JW, FENG YJ, NIE CR. Ecological Risk Assessment of Transgenic Crops: a Case Study of Transgenic *bt* Maize[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2010: 116 (in Chinese).
- [7] 杨永华. 转基因作物对土壤微生物群落的影响及主要研究策略[J]. *农业生物技术学报*, 2011, 19(1): 1-8.
YANG YH. Advances on the effects of genetically modified crops on soil microbial community and main countermeasures of their approaches[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2011, 19(1): 1-8 (in Chinese).
- [8] MOVAHEDI A, WEI H, ALHASSAN AR, DZINYELA R, WANG P, SUN WB, ZHUGE Q, XU C. Evaluation of the ecological environment affected by *Cry1Ah1* in poplar[J]. *Life*, 2022, 12(11): 1830.

- [9] 周学永, 刘宁, 赵曼, 李河, 周浪, 唐宗文, 曹斐, 李巍. 转 *Bt* 基因作物释放杀虫晶体蛋白对土壤生态安全的影响[J]. 遗传, 2011, 33(5): 443-448.
ZHOU XY, LIU N, ZHAO M, LI H, ZHOU L, TANG ZW, CAO F, LI W. Advances in effects of insecticidal crystal proteins released from transgenic *Bt* crops on soil ecology[J]. Hereditas, 2011, 33(5): 443-448 (in Chinese).
- [10] LI P, DONG JY, YANG SF, BAI L, WANG JB, WU GG, WU X, YAO QH, TANG XM. Impact of β -carotene transgenic rice with four synthetic genes on rhizosphere enzyme activities and bacterial communities at different growth stages[J]. European Journal of Soil Biology, 2014, 65: 40-46.
- [11] LI P, YE SF, CHEN J, WANG LY, LI YJ, GE L, WU GG, SONG LL, WANG C, SUN Y, WANG JB, PAN AH, QUAN ZX, WU YF. Combined metagenomic and metabolomic analyses reveal that *Bt* rice planting alters soil C-N metabolism[J]. ISME Communications, 2023, 3: 4.
- [12] 农业农村部. 中华人民共和国农业部令(2022年第2号, 农业农村部关于修改〈农业转基因生物安全评价管理办法〉等规章的决定[Z]. 2022-01-21.
- [13] 农业农村部, 农业部科技教育司. 农业转基因生物安全管理条例[Z]. 2017-10-7.
- [14] LEFF JW, del TREDICI P, FRIEDMAN WE, FIERER N. Spatial structuring of bacterial communities within individual *Ginkgo biloba* trees[J]. Environmental Microbiology, 2015, 17(7): 2352-2361.
- [15] COLEMAN-DERR D, DESGARENNES D, FONSECA-GARCIA C, GROSS S, CLINGENPEEL S, WOYKE T, NORTH G, VISEL A, PARTIDA-MARTINEZ LP, TRINGE SG. Plant compartment and biogeography affect microbiome composition in cultivated and native *Agave* species[J]. The New Phytologist, 2016, 209(2): 798-811.
- [16] MATSUMOTO H, FAN XY, WANG Y, KUSSTATSCHER P, DUAN J, WU SL, CHEN SL, QIAO K, WANG YL, MA B, ZHU GN, HASHIDOKO Y, BERG G, CERNAVA T, WANG MC. Bacterial seed endophyte shapes disease resistance in rice[J]. Nature Plants, 2021, 7: 60-72.
- [17] AHMAD GANIE S, BHAT JA, DEVOTO A. The influence of endophytes on rice fitness under environmental stresses[J]. Plant Molecular Biology, 2022, 109(4): 447-467.
- [18] LI YH, HALLERMAN EM, LIU QS, WU KM, PENG YF. The development and status of *Bt* rice in China[J]. Plant Biotechnology Journal, 2016, 14(3): 839-848.
- [19] 段发平, 梁承邳, 黎垣庆. *Bar* 基因和转 *Bar* 基因作物的研究进展[J]. 广西植物, 2001, 21(2): 166-172.
DUAN FP, LIANG CY, LI YQ. Research advances of *Bar* gene and its transgenic crops[J]. Guihaia, 2001, 21(2): 166-172 (in Chinese).
- [20] ZHAO K, REN FF, HAN FT, LIU QW, WU GG, XU Y, ZHANG J, WU X, WANG JB, LI P, SHI W, ZHU H, LV JJ, ZHAO X, TANG XM. Edible safety assessment of genetically modified rice TIC-1 for Sprague Dawley rats through horizontal gene transfer, allergenicity and intestinal microbiota[J]. PLoS One, 2016, 11(10): e0163352.
- [21] 陈晓雯, 林胜, 尤民生, 杨广, 王锋. 转基因水稻对土壤微生物群落结构及功能的影响[J]. 生物安全学报, 2011, 20(2): 151-159.
CHEN XW, LIN S, YOU MS, YANG G, WANG F. Effects of transgenic rice on the structure and function of soil microbial communities[J]. Journal of Biosafety, 2011, 20(2): 151-159 (in Chinese).
- [22] 关潇, 吴刚, 王敏. 转 *Bt* 基因水稻对土壤微生物群落结构的影响[J]. 湖北农业科学, 2015, 54(5): 1046-1052, 1058.
GUAN X, WU G, WANG M. Effects of transgenic *Bt* rice on the structure of soil microbial community[J]. Hubei Agricultural Sciences, 2015, 54(5): 1046-1052, 1058 (in Chinese).
- [23] LEE ZL, BU NS, CUI J, CHEN XP, XIAO MQ, WANG F, SONG ZP, FANG CM. Effects of long-term cultivation of transgenic *Bt* rice (Kefeng-6) on soil microbial functioning and C cycling[J]. Scientific Reports, 2017, 7: 4647.
- [24] LI P, XUE Y, SHI JL, PAN AH, TANG XM, MING F. The response of dominant and rare taxa for fungal diversity within different root environments to the cultivation of *Bt* and conventional cotton varieties[J]. Microbiome, 2018, 6(1): 184.
- [25] 宋亚娜, 陈在杰, 林艳, 胡太蛟, 吴明基, 王锋. 抗虫转基因水稻及其杂交水稻对土壤微生物群落多样性与组成的影响[J]. 中国生态农业学报(中英文), 2024, 32(1): 15-29.
SONG YN, CHEN ZJ, LIN Y, HU TJ, WU MJ, WANG F. Effect of insect-resistant transgenic rice and its hybrid combination rice on diversity and composition of soil microbial community[J]. Chinese Journal of Eco-Agriculture, 2024, 32(1): 15-29 (in Chinese).
- [26] 肖国樱, 袁隆平, 辛世文. 转 *Bar* 基因抗除草剂水稻 Bar68-1 的研究与应用[C]//中国作物学会. 中国作物学会 50 周年庆祝会暨 2011 年学术年会论文集, 2011: 8.

- [27] 段发平, 郑枫, 段俊. 转 *BAR* 基因水稻的抗性遗传、生理特性和农艺性状研究[J]. 浙江大学学报, 2006, 1: 355-359.
DUAN FP, ZHENG F, DUAN J. Research on resistance inheritance, physiological characteristics, and agronomic traits of transgenic rice with *BAR* gene[J]. Journal of Zhejiang University, 2006, 1: 355-359 (in Chinese).
- [28] 何美丹. 转 *bar* 基因水稻及其还田秸秆对土壤微生物的影响[D]. 海口: 海南大学博士学位论文, 2019.
HE MD. Effects of *bar*-transgenic rice and its straw return on soil microorganisms[D]. Haikou: Doctoral Dissertation of Hainan University, 2019 (in Chinese).
- [29] 赵笑, 任方方, 王玉炯, 韩芳婷, 刘启文, 吴洋洋, 胡瑞丽, 吴潇, 赵凯, 唐雪明. 转基因水稻 T1C-1 Bt *CryIC* 基因的克隆、表达、纯化和实质等同性研究[J]. 上海农业学报, 2014, 30(5): 21-27.
ZHAO X, REN FF, WANG YJ, HAN FT, LIU QW, WU YY, HU RL, WU X, ZHAO K, TANG XM. Cloning, expression, purification and substantial equivalence of Bt *CryIC* gene in transgenic rice T1C-1[J]. Acta Agriculturae Shanghai, 2014, 30(5): 21-27 (in Chinese).
- [30] 梁力文. 水稻 CCT 家族基因 *OsPRR73* 和 *OsCO₃* 调控抽穗期的分子机制研究[D]. 武汉: 华中农业大学博士学位论文, 2020.
LIANG LW. Study on molecular mechanism of CCT family genes *OsPRR73* and *OsCO₃* regulating heading date in rice[D]. Wuhan: Doctoral Dissertation of Huazhong Agricultural University, 2020 (in Chinese).
- [31] 华桦. 转基因水稻中 Bt 蛋白的表达规律及生态适应性研究[D]. 武汉: 华中农业大学硕士学位论文, 2012.
HUA H. Study on expression regularity and ecological adaptability of Bt protein in transgenic rice[D]. Wuhan: Master's Thesis of Huazhong Agricultural University, 2012 (in Chinese).
- [32] DEANGELIS KM, BRODIE EL, DESANTIS TZ, ANDERSEN GL, LINDOW SE, FIRESTONE MK. Selective progressive response of soil microbial community to wild oat roots[J]. The ISME Journal, 2009, 3(2): 168-178.
- [33] CREGGER MA, VEACH AM, YANG ZK, CROUCH MJ, VILGALYS R, TUSKAN GA, SCHADT CW. The *Populus holoibont*: dissecting the effects of plant niches and genotype on the microbiome[J]. Microbiome, 2018, 6(1): 31.
- [34] 李玉洁, 葛蕾, 胡聪. 土壤真菌群落和潜在功能对施加外源 Bt 毒素的响应[J]. 土壤学报, 2024, 61(3): 1-15.
LI YJ, GE L, HU C. Response of soil fungal communities and potential functions to the application of exogenous Bt toxins[J]. Journal of Soil Science, 2024, 61(3): 1-15.
- [35] 梁晋刚, 张秀杰. 转基因作物对土壤微生物多样性影响的研究方法[J]. 生物技术通报, 2017, 33(10): 111-116.
LIANG JG, ZHANG XJ. Strategies for evaluating the effects of transgenic crops on soil microbial diversity[J]. Biotechnology Bulletin, 2017, 33(10): 111-116 (in Chinese).
- [36] 张旭冬, 肖冰, 张秀杰, 栾颖, 周晓莉, 张正光, 宋新元, 陈红, 梁晋刚. 转基因抗虫玉米 CM8101 对根际微生物群落功能的影响[J]. 东北农业科学, 2023, 48(3): 48-51.
ZHANG XD, XIAO B, ZHANG XJ, LUAN Y, ZHOU XL, ZHANG ZG, SONG XY, CHEN H, LIANG JG. Effect of GM maize CM8101 on functional diversity of rhizosphere microorganisms[J]. Journal of Northeast Agricultural Sciences, 2023, 48(3): 48-51 (in Chinese).
- [37] EDWARDS J, JOHNSON C, SANTOS-MEDELLÍN C, LURIE E, PODISHETTY NK, BHATNAGAR S, EISEN JA, SUNDARESAN V. Structure, variation, and assembly of the root-associated microbiomes of rice[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2015, 112(8): E911-E920.
- [38] EMERSON BC, GILLESPIE RG. Phylogenetic analysis of community assembly and structure over space and time[J]. Trends in Ecology & Evolution, 2008, 23(11): 619-630.
- [39] 李小宇, 张春雨, 郭东全, 张淋淋, 尤晴, 董英山, 王永志, 李启云. 双抗夹心 ELISA 检测转 *Bar* 基因抗除草剂大豆[J]. 食品科学, 2016, 37(4): 222-225.
LI XY, ZHANG CY, GUO DQ, ZHANG LL, YOU Q, DONG YS, WANG YZ, LI QY. Double-antibody sandwich ELISA for the detection of transgenic *Bar* gene herbicide-tolerant soybeans[J]. Food Science, 2016, 37(4): 222-225 (in Chinese).
- [40] 赵海泉, 曹珂珂, 王凤娟, 胡子全. *bar* 基因对盆栽小麦根际微生物的影响[J]. 安徽农业大学学报, 2007, 34(1): 1-7.
ZHAO HQ, CAO KK, WANG FJ, HU ZQ. Effects of *bar*-gene on microbial flora in wheat rhizosphere soil[J]. Journal of Anhui Agricultural University, 2007, 34(1): 1-7 (in Chinese).

- [41] 王继华, 曹干, 张木清, 张剑亮, 吕冰, 安康. 转 *Bar* 基因甘蔗根际土壤微生物分析[J]. 广东农业科学, 2011, 38(S1): 108-109.
WANG JH, CAO G, ZHANG MQ, ZHANG JL, LÜ B, AN K. Microbial analysis of rhizosphere soil of transgenic sugarcane with *Bar* gene[J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2011, 38(S1): 108-109 (in Chinese).
- [42] GRIFFITHS BS, CAUL S, THOMPSON J, BIRCH ANE, SCRIMGEOUR C, ANDERSEN MN, CORTET J, MESSÉAN A, SAUSSE C, LACROIX B, KROGH PH. A comparison of soil microbial community structure, protozoa and nematodes in field plots of conventional and genetically modified maize expressing the *Bacillus thuringiensis* *Cr_yIAb* toxin[J]. Plant and Soil, 2005, 275(1): 135-146.
- [43] GRIFFITHS BS, CAUL S, THOMPSON J, BIRCH AN, SCRIMGEOUR C, CORTET J, FOGGO A, HACKETT CA, KROGH PH. Soil microbial and faunal community responses to *bt* maize and insecticide in two soils[J]. Journal of Environmental Quality, 2006, 35(3): 734-741.
- [44] SHEN RF, CAI H, GONG WH. Transgenic Bt cotton has no apparent effect on enzymatic activities or functional diversity of microbial communities in rhizosphere soil[J]. Plant and Soil, 2006, 285(1): 149-159.
- [45] SANTOS-MEDELLÍN C, EDWARDS J, LIECHTY Z, NGUYEN B, SUNDARESAN V. Drought stress results in a compartment-specific restructuring of the rice root-associated microbiomes[J]. mBio, 2017, 8(4): e00764-17.
- [46] 张祺玲, 杨宇红, 谭周进, 谢丙炎. 植物内生菌的功能研究进展[J]. 生物技术通报, 2010(7): 28-34.
ZHANG QL, YANG YH, TAN ZJ, XIE BY. The progress of researches on endophytic functions in vegetations[J]. Biotechnology Bulletin, 2010(7): 28-34 (in Chinese).
- [47] ABBAS A. 结合土壤微生物组和菌核诱捕策略筛选水稻纹枯病生防因子[D]. 武汉: 华中农业大学硕士学位论文, 2020.
ABBAS A. Screening of biocontrol factors for rice sheath blight by combining soil microbiome and bacterial nucleus trapping strategy[D]. Wuhan: Master's Thesis of Huazhong Agricultural University, 2020 (in Chinese).
- [48] EAKJAMNONG W, KEAWSALONG N, DETHOUP T. Novel ready-to-use dry powder formulation of *Talaromyces tratensis* KUFA0091 to control dirty panicle disease in rice[J]. Biological Control, 2021, 152: 104454.
- [49] GUPTA S, SRIVASTAVA PK, SINGH RP. Growth promotion and zinc biofortification in lettuce (*Lactuca sativa* L.) by the application of *Talaromyces* strain as a biostimulant[J]. Scientia Horticulturae, 2024, 323: 112534.
- [50] 魏娜, 张飞龙. 青藏高原粮油作物曲霉菌污染及菌株产毒力研究[J]. 中国粮油学报, 2024, 39(2): 31-37.
WEI N, ZHANG FL. Study on *Aspergillus* contamination and virulence production of crops in Xizang Plateau[J]. Chinese Journal of Cereals and Oils 2024, 39(2): 31-37.
- [51] 郭玉杰. 丝状真菌天冬氨酸蛋白酶的自激活机制与热稳定性改良研究[D]. 北京: 中国农业科学院博士学位论文, 2019.
GUO YJ. Study on self-activation mechanism and thermal stability improvement of filamentous fungus aspartic protease[D]. Beijing: Doctoral Dissertation of Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2019 (in Chinese).
- [52] 张芝元. 特定生境中角蛋白降解真菌物种多样性[D]. 贵阳: 贵州大学硕士学位论文, 2018.
ZHANG ZY. Species diversity of keratin-degrading fungi in specific habitats[D]. Guiyang: Master's Thesis of Guizhou University, 2018 (in Chinese).