

## 转 *cry6Aa2m* 基因大豆遗传稳定性分析及农艺性状调查

杨秋姣<sup>1,2</sup>, 孙晓丽<sup>2</sup>, 孙明哲<sup>2</sup>, 陈超<sup>2</sup>, 赵超越<sup>2</sup>, 纪巍<sup>2</sup>, 朱延明<sup>1,2</sup>

(1. 塔里木大学 生命科学学院, 新疆 阿拉尔 843300; 2. 东北农业大学 农业生物功能基因重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150030)

**摘要:** 以前期获得的转抗虫基因 *cry6Aa2m* 大豆 T<sub>4</sub> 代植株 4 个株系为材料, 采用 PCR 及 RT-PCR 检测方法进行了外源基因遗传稳定性及表达情况分析。并以受体品种(东农 50)为对照, 进行了产量性状、形态性状、品质性状及环境适应能力等农艺性状的调查。结果表明: *cry6Aa2m* 基因能够在 T<sub>4</sub> 代转基因植株中遗传并表达; 在产量性状上, 除转基因株系 DpC6b7 单株结荚数显著低于对照外, 其余 3 个株系的百粒重和单株结荚数与对照相比无显著差异; 在形态性状上, 除转基因株系 DpC6b37 株高显著低于对照外, 其余株系的生育期、结荚习性、花色、叶形与对照也均无显著差异; 在品质性状上, 与对照相比, DpC6b37 粗蛋白含量高 2%, 粗脂肪含量高 5%。株系 DpC6b7 则粗蛋白含量高 4%, 粗脂肪含量低 1%; 在环境适应能力方面, 转基因株系种子萌发率、落粒率、种子休眠期、杂草竞争性与对照均无显著差异。综合结果表明 *cry6Aa2m* 基因能够稳定遗传并表达, 其中株系 DpC6b4 和 DpC6b8 所调查的农艺性状均不劣于受体品种。

**关键词:** 大豆; 抗虫基因 *cry6Aa2m*; 遗传稳定性; 农艺性状

中图分类号: S565.1

文献标识码: A

DOI: 10.11861/j.issn.1000-9841.2014.05.0629

## Genetic Stability Analysis and Agronomic Traits Investigation of *cry6Aa2m* Transgenic *Glycine max*

YANG Qiu-jiao<sup>1,2</sup>, SUN Xiao-li<sup>2</sup>, SUN Ming-zhe<sup>2</sup>, CHEN Chao<sup>2</sup>, ZHAO Chao-yue<sup>2</sup>, JI Wei<sup>2</sup>, ZHU Yan-ming<sup>1,2</sup>

(1. School of Life Sciences, Tarim University, Alar 843300, China; 2. Key Laboratory of Agricultural Biological Functional Genes, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

**Abstract:** In our previous studies, we had transformed the insect-resistant gene *cry6Aa2m* into *Glycine max* and obtained the T<sub>4</sub> generation of the *cry6Aa2m* transgenic lines. In order to screen the transgenic soybean lines not only with stable expression of the *cry6Aa2m* gene but also sharing good agronomic traits, in the current study, we analyzed the genetic stability and investigated the agronomic traits of the transgenic soybean lines with gene *cry6Aa2m*. By using PCR and RT-PCR analysis, we verified the heredity and expression of the *cry6Aa2m* gene in the T<sub>4</sub> generation transgenic plants, which were investigated in this study. As expected, we showed over 85% PCR-positive plants of all the T<sub>4</sub> transgenic lines, and demonstrated the constitutive expression of the *cry6Aa2m* gene in the transgenic lines by using the semi-quantitative RT-PCR assays. In this aspect, we investigated and analyzed the agronomic traits of four transgenic lines (DpC6b4, DpC6b7, DpC6b8 and DpC6b37), including yield traits, morphological traits, quality traits and adaptive capacity to environment. Results of plant yield traits showed that all transgenic lines displayed no significant differences in the 100-seed weight and pods per plant, except for the significantly less pods per plant for line DpC6b7. As to the morphological trails, no significant differences were observed in growth period, pod bearing habit, flower color and leaf shape, except that the plant height of line DpC6b37 was significantly shorter than the non-transgenic soybean. Furthermore, we also found that the transgenic line DpC6b7 exhibited 4% higher in the protein content and 1% lower in the oil content than non-transgenic soybean, while line DpC6b37 displayed 2% and 5% higher, respectively. In addition, we also observed no obvious differences in germination rates, period of dormancy, weed species and quantity between transgenic and non-transgenic plants. Taken together, our results presented in this study suggested that the *cry6Aa2m* gene could be stably inherited and expressed in the transgenic *Glycine max* lines, and its overexpression did not affect plant agronomic traits. Among the four transgenic lines, DpC6b4 and DpC6b8, with relatively higher expression levels of the *cry6Aa2m* gene, displayed better agronomic traits than the non-transgenic plants, which made them as optimal candidates for further application in fields.

**Key words:** Transgenic soybean; *Cry6Aa2m* gene; Genetic stability; Agronomic traits

大豆胞囊线虫病是大豆最主要的毁灭性病虫害之一, 对大豆产量和品质造成严重的威胁, 全球每年经济损失高达 16.2 亿美元以上<sup>[1]</sup>。大豆胞囊线虫寄生大豆根部后, 严重阻碍根系对水分和无机

盐的吸收和向上运输, 导致寄主植物畸形, 引发各种病害。利用苏云金芽胞杆菌基因进行抗胞囊线虫新品种培育, 在国际上已取得了巨大成功<sup>[2]</sup>。2007 年 Li 等<sup>[3]</sup>把经过密码子优化后的 *cry6A* 基因

收稿日期: 2014-01-09

基金项目: 转基因生物新品种培育重大专项(2011ZX08004-002); 国家自然科学基金(31171578); 黑龙江省高校科技创新团队建设计划(2011TD055); 国家高技术研究发展计划“863 计划”(2008AA-10Z153); 国家基础科学人才培养基金(J1210069)。

第一作者简介: 杨秋姣(1988-), 女, 硕士, 主要从事植物基因工程与分子生物学研究。E-mail: yangqiujaol@126.com。

通讯作者: 朱延明(1955-), 男, 教授, 博导, 主要从事植物基因工程与分子生物学研究。E-mail: ymzhu2001@aliyun.com。

转化番茄,发现转基因番茄根部胞囊数量少于非转基因植株,而且胞囊较小,卵块数量较少,胞囊孵化率明显降低。2008年Li等<sup>[4]</sup>研究表明转 *cry5B* 番茄植株根中线虫产卵数,与非转基因植株相比降低2/3。两个试验都表明杀线虫晶体蛋白在转基因植物中是可以正常表达并且依旧具有杀线虫的能力。而国内对杀线虫 *cry* 基因鲜有报道,华中农业大学微生物实验室克隆了 *cry1Ea6*、*cry5Ba2*、*cry6Aa2*、*cry55Aa1* 和其杀线虫晶体蛋白<sup>[5-6]</sup>。

本研究室在前期研究中,对抗胞囊线虫 *Bt* 基因进行密码子改造,人工合成了 *cry6Aa2m* 基因,并通过农杆菌介导大豆子叶节法转化大豆东农50,获得了4个抗胞囊线虫转基因大豆株系<sup>[7]</sup>。而如何在所获得的大量转抗虫基因材料中,筛选出产量性状、形态性状、品质性状及环境适应能力等方面均不劣于受体品种的新种质,并实现产业化,进行遗传稳定性分析及农艺性状调查是其重要的研究环节<sup>[8]</sup>。本研究以前期获得的4个转基因株系群体为材料,系统地进行了遗传稳定性分析及农艺性状调查,以期筛选鉴定出外源基因稳定遗传并表达且农艺性状优良的新种质,为抗虫大豆新品种的培育提供重要的种质资源。

## 1 材料与方法

### 1.1 植物材料

材料为转 *cry6Aa2m* 基因 T<sub>4</sub> 代大豆4个株系(DpC6b4、DpC6b7、DpC6b8及DpC6b37)群体。对照为未转基因的受体品种东农50(DN50,下同)。

### 1.2 栽培方法

试验在黑龙江省哈尔滨市东北农业大学香坊实验基地进行。田间试验采取人工点播,株距5cm,行长5m,行距0.5m,4行区。栽培管理按照《农业转基因生物安全评价管理办法》的要求进行。

### 1.3 转基因大豆株系分子生物学检测

1.3.1 转基因大豆株系 PCR 检测 1) DNA 提取:采用 EasyPure Plant Genomic DNA Kit(Transgen, Beijing, Cat No. EE111-02)试剂盒提取转基因及对照植株基因组幼叶的 DNA;2) 引物设计:根据 *cry6Aa2m* 基因序列采用 Primer Premier 5 软件设计 PCR 引物 (Sense-primer 5'-TACGAGGAGGCTGCTAAG-3'; Anti-sense primer 5'-TGTTGGTGGTAGGGTTAG-3');3) PCR 扩增:采用 TRAN Easy TaqDNA Polymerase,以转基因及对照植株基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增。4) PCR 反应条件如下:94℃ 预变性 5 min,94℃ 变性 30 s,52℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 30 s,35 个循环,最后 72℃ 延伸 10 min,4℃ 终止反应。

1.3.2 转基因大豆植株 RT-PCR 检测 1) RNA 提取:采用 Trizol 法提取大豆植株总 RNA;2) 反转录:采用 GoldScript cDNA Synthesis Kit (Invitrogen, Cat No. C81401190) 试剂盒对 RNA 进行反转录获得 cDNA;3) 引物设计:采用 Primer Premier 5 软件设计基因特异 RT-PCR 引物 (Sense primer 5'-TTATTTCAAAGCAGGAGTGGGC-3'; Anti-sense primer 5'-TGAAGTCTT GTCAGAGCAGTAAACG-3');4) PCR 扩增:采用 TRAN Easy TaqDNA Polymerase,以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,检测 *cry6Aa2m* 基因表达情况。5) RT-PCR 反应条件如下:94℃ 预变性 5 min,94℃ 变性 30 s,60℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 15 s,35 个循环,最后 72℃ 延伸 10 min,4℃ 终止反应。

### 1.4 性状调查及测定

调查标准严格按照农业部《农业转基因生物安全评价管理办法》执行。

1.4.1 产量性状 单株结荚数为单株全部正常结实的荚数,每个株系考种 30 株,计算均值;百粒重为从单株正常结实粒中随机选取 100 粒称重,重复 3 次,计算平均值(g)。

1.4.2 形态性状 株高为大豆植株从地面到主茎顶端生长点的长度(cm)。生育期为自大豆播种出苗至正常成熟时的天数(d)。结荚习性为植株开花结荚状况,分无限型(I)、亚有限型(S)、有限型(D)3类。花瓣颜色分紫色(P)和白色(W)两类。叶形于开花盛期观察植株中上部第8~10节的复叶中间小叶的形状,分长叶(L)和圆叶(R)两类。

1.4.3 品质性状 株系混合脱粒后,取 20 g 样品测定转基因和非转基因大豆种子蛋白质含量和油分含量,由农业部谷物及制品质量监督检测中心(哈尔滨)完成。

1.4.4 环境适应能力 1) 种子萌发率:待种子幼苗出土后,每天检查和记载出苗的种子数,10 d 后,扒开土壤检查已发芽而未出土的种子数,计算种子发芽率。发芽率(%) = 10 d 内正常发芽的种子粒数/供试种数 × 100。2) 落粒率:随机选择不同品种的 10 株植株,在大豆生理成熟后开始,观察供试材料在自然条件下的落粒数。每 7 d 观察 1 次,共观察 3 次。计算落粒率。记录植株总粒数和已落粒数。3) 休眠期:取刚收获的大豆种子(约 400 粒),播种于钵中,每天统计发芽种子数。当发芽率达到 85% 时,则认为种子通过休眠。4) 杂草竞争性:按当地常规栽培方式播种后,不加任何其他管理措施。调查每平方米杂草的种类及数量。

### 1.5 数据分析

采用 Excel 2007 进行方差分析和统计显著性分析

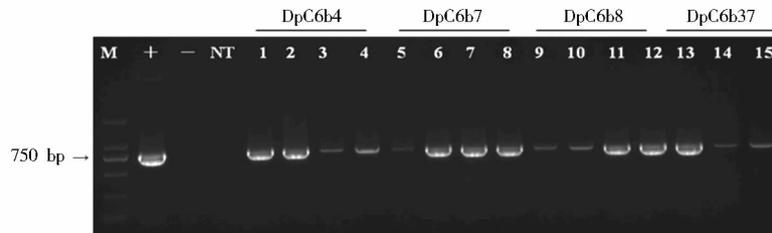
(Student T-test), 比较转基因株系与受体品种差异。

## 2 结果与分析

### 2.1 转 *cry6Aa2m* 基因大豆株系 $T_4$ 代植株遗传稳定性分析

2.1.1 转基因株系 PCR 鉴定 随机选取 4 个转基因大豆株系各 150 株, 采用 *cry6Aa2m* 基因特异引物进行 PCR 检测(图 1)。结果显示, 以转基因大豆植

株基因组 DNA 为模板, 均扩增出 750 bp 的目的条带, 而阴性对照和非转基因受体植株则未扩增出条带。表 1 PCR 检测阳性率统计结果表明: 4 个转基因株系 PCR 阳性率均超过 85%, 说明转基因大豆  $T_4$  代群体中转基因阳性个体占有很高比例, *cry6Aa2m* 基因在大部分转基因大豆中能够稳定遗传; 对其进行农艺性状调查能够反映 *cry6Aa2m* 基因对转基因大豆农艺性状的影响。



M: 核酸分子量标准 DL2000; +: 阳性对照; -: 阴性对照; NT: 受体大豆东农 50; 1~15: 转基因株系。

M: DNA molecular weight standards DL2000; +: Positive control; -: Negative control; NT: Non-transgenic soybean DN50; 1-15: *cry6Aa2m* transgenic lines.

图 1 转 *cry6Aa2m* 基因大豆株系  $T_4$  代植株 PCR 检测

Fig. 1 PCR identification of the *cry6Aa2m* transgenic soybean ( $T_4$  generation)

表 1 转 *cry6Aa2m* 基因大豆株系  $T_4$  代植株 PCR 阳性率

Table 1 PCR positive rates of  $T_4$  plants with *cry6Aa2m* gene

| 株系<br>Lines | $T_4$ 代植株数<br>No. of $T_4$ plants | PCR 阳性植株数<br>No. of PCR positive plants | PCR 阳性率<br>PCR-positive rate/% |
|-------------|-----------------------------------|---|--------------------------------|
| DpC6b4      | 150                               | 132                                     | 88                             |
| DpC6b7      | 150                               | 129                                     | 86                             |
| DpC6b8      | 150                               | 140                                     | 93                             |
| DpC6b37     | 150                               | 139                                     | 93                             |

2.1.2 转基因株系 RT-PCR 鉴定 随机选取 4 个转基因株系  $T_4$  代 PCR 阳性植株各 10 株, 采用 *cry6Aa2m* 基因特异引物进行半定量 RT-PCR 检测。如图 2 所示, *cry6Aa2m* 基因在 4 个转基因大豆株系中均能稳定表达, DpC6b4 和 DpC6b8 株系中表达量高于 DpC6b7 和 DpC6b37。



图 2  $T_4$  代转 *cry6Aa2m* 基因大豆 RT-PCR 检测

Fig. 2 RT-PCR analysis of the *cry6Aa2m* transgenic soybean ( $T_4$  generation)

### 2.2 转 *cry6Aa2m* 基因大豆株系 $T_4$ 代植株的农艺性状

2.2.1 产量性状 4 个转基因株系百粒重与对照相比无显著差异; 株系 DpC6b7 单株结荚数显著低于对照, 其他 3 个株系与对照无显著差异(表 2)。

表 2 转 *cry6Aa2m* 基因大豆株系  $T_4$  代产量性状调查分析

Table 2 Comparison on the yield traits between the non-transgenic and the *cry6Aa2m* transgenic soybean ( $T_4$  generation)

| 株系<br>Lines | 百粒重<br>100-seed weight/g | 单株荚数<br>Pods per plant |
|-------------|--------------------------|------------------------|
| DN50(CK)    | 8.59 ± 0.21              | 117.00 ± 7.00          |
| DpC6b4      | 8.30 ± 0.57              | 113.67 ± 2.52          |
| DpC6b7      | 8.16 ± 0.35              | 102.00 ± 6.24 *        |
| DpC6b8      | 8.02 ± 0.21              | 105.33 ± 9.45          |
| DpC6b37     | 8.17 ± 0.46              | 119.67 ± 7.23          |

\*: 0.05 水平下显著, 下同。

\*: Significant difference at 0.05 level. The same below.

2.2.2 形态性状 如表 3 所示, 4 个转基因株系生育期、结荚习性、花色和叶形与对照相比均无显著差异。株高只有株系 DpC6b37 株高显著低于非转基因植株, 其他株系与对照差异均不显著。

表3 转 *cry6Aa2m* 基因大豆株系 T<sub>4</sub>代形态性状调查分析Table 3 Comparison on the morphological traits between the non-transgenic and *cry6Aa2m* transgenic soybean(T<sub>4</sub> generation)

| 株系<br>Lines | 株高<br>Plant height/cm | 生育期<br>Growth period/d | 结荚习性<br>Pod bearing habit | 花色<br>Flower color | 叶形<br>Leaf shape |
|-------------|-----------------------|------------------------|---------------------------|--------------------|------------------|
| DN50(CK)    | 46.83 ± 2.57          | 102.10 ± 0.74          | S                         | W                  | L                |
| DpC6b4      | 43.33 ± 1.53          | 101.40 ± 0.97          | S                         | W                  | L                |
| DpC6b7      | 45.50 ± 2.29          | 102.50 ± 1.18          | S                         | W                  | L                |
| DpC6b8      | 42.00 ± 3.91          | 101.90 ± 1.10          | S                         | W                  | L                |
| DpC6b37     | 42.00 ± 2.50*         | 103.00 ± 1.63          | S                         | W                  | L                |

S:亚有限型;W:白花;L:长叶。

S;Semi-determinate;W;White flower;L;Long leaf.

2.2.3 品质性状 如表4所示,株系 DpC6b7 粗蛋白含量、粗脂肪及油脂总含量分别比对照高4%、1%和3%;株系 DpC6b37 粗蛋白含量比对照高2%,粗脂肪含量比对照高5%,油脂总含量比对照高3%。因在植物体内蛋白质及油分的积累与环境

条件、栽培条件及播种前种子活力等多种因素有关,往往不同品种甚至相同品种的不同植株间蛋白质及油分含量不严格相同。因此认为转基因株系 DpC6b7 和 DpC6b37 与对照之间微小差异不会影响其品质。

表4 转 *cry6Aa2m* 基因大豆株系 T<sub>4</sub>代品质性状调查分析Table 4 Comparison on the quality traits between the non-transgenic and *cry6Aa2m* transgenic soybean(T<sub>4</sub> generation)

| 株系<br>Lines | 粗蛋白(干基)<br>Protein content/% | 粗脂肪(干基)<br>Oil content/% | 油脂总含量<br>Protein and oil content/% |
|-------------|------------------------------|--------------------------|------------------------------------|
| DN50(CK)    | 42.67                        | 17.41                    | 60.08                              |
| DpC6b7      | 44.53                        | 17.31                    | 61.84                              |
| DpC6b37     | 43.61                        | 18.20                    | 61.81                              |

2.2.4 环境适应能力 如表5所示,转基因大豆种子萌发率、落粒率及休眠期与对照相比均无显著差异,表明 *cry6Aa2m* 基因的导入未对种子活力及植株落粒性造成影响。与转基因植株竞争的杂草种类

和数量与对照相比无显著差异,表明转基因植株与杂草竞争能力没有发生改变。上述结果表明 *cry6Aa2m* 基因的导入没有显著改变转基因植株的环境适应能力。

表5 转 *cry6Aa2m* 基因大豆株系 T<sub>4</sub>代环境适应能力调查分析Table 5 Comparison of the environmental adaptive ability between the non-transgenic and *cry6Aa2m* transgenic soybean(T<sub>4</sub> generation)

| 株系<br>Lines | 萌发率<br>Germination rate/% | 落粒率<br>Seed shattering rate/% | 休眠期<br>Period of dormancy/d | 杂草种类及数量 Weed species and quantity  |                                      |
|-------------|---------------------------|-------------------------------|-----------------------------|------------------------------------|--------------------------------------|
|             |                           |                               |                             | 狗尾草<br>Green<br>Bristlegrass/Plant | 小藜<br>Chenopodium<br>Serotinum/Plant |
| DN50(CK)    | 75                        | 1.19 ± 0.03                   | 6.00 ± 0.82                 | 82.67 ± 3.86                       | 4.33 ± 2.62                          |
| DpC6b4      | 70                        | 1.03 ± 0.03                   | 6.67 ± 0.47                 | 83.67 ± 5.44                       | 3.33 ± 1.25                          |
| DpC6b7      | 90                        | 2.07 ± 0.07                   | 6.00 ± 0.82                 | 81.33 ± 7.04                       | 5.00 ± 0.82                          |
| DpC6b8      | 75                        | 1.72 ± 0.04                   | 6.67 ± 0.47                 | 79.33 ± 2.05                       | 3.33 ± 1.25                          |
| DpC6b37     | 77                        | 0.19 ± 0.01                   | 6.33 ± 0.47                 | 87.00 ± 4.9                        | 5.67 ± 1.25                          |

### 3 结论与讨论

在转基因植物早期世代中,其后代会出现一定比例的非转基因植株<sup>[9]</sup>。本研究对转 *cry6Aa2m* 基因大豆4个株系 T<sub>4</sub>代植株进行了PCR检测,发现4个转基因株系 T<sub>4</sub>代植株 PCR 阳性率都超过85%,表明外源 *cry6Aa2m* 基因能够在大部分植株中稳定遗传。而出现的少数非阳性植株,可能是由于基因分离、丢失和遗传不稳定等原因<sup>[9]</sup>所致。对随机选取的PCR阳性植株进行的RT-PCR检测发现, *cry6Aa2m* 基因在4个转基因株系 T<sub>4</sub>代植株中均能

稳定表达,且株系 DpC6b4 和 DpC6b8 中 *cry6Aa2m* 基因表达量高于株系 DpC6b7 和 DpC6b37。这种同一外源基因在不同转化事件中表达量有差异的情况普遍存在<sup>[10]</sup>,推测其原因为:不同转化事件其外源基因拷贝数不同;后代植株纯合与否会影响外源基因表达量;外源基因插入位点对其所连启动子的影响导致其表达量的差异。

基因工程育种的目的是在不降低植物原有优良性状标准的前提下,获得相应的目的性状。植物原有优良性状不改变,外源基因能够稳定遗传并表达,是转基因植物应用价值实现产业化的保障。本

研究对转 *cry6Aa2m* 基因大豆 4 个株系 T<sub>4</sub> 代植株进行了农艺性状调查,结果显示 4 个转基因株系在品质性状的粗蛋白含量、粗脂肪含量 2 个指标上与对照无显著差异,表明 *cry6Aa2m* 基因的导入未引起大豆品质性状明显改变;在环境适应能力上,种子萌发率、落粒率、种子休眠期及杂草竞争性 4 个方面与对照无显著差异,表明 *cry6Aa2m* 基因导入未影响转基因植株的环境适应能力;在产量性状上,百粒重、单株结荚数 2 个指标上只有株系 DpC6b7 的单株结荚数与对照相比产生显著差异,表明 *cry6Aa2m* 基因导入未影响其他 3 个株系转基因植株的产量性状;在形态性状的株高、生育期、结荚习性、花色和叶形 5 个指标上只有株系 DpC6b37 株高与对照相比,存在显著差异,表明 *cry6Aa2m* 基因导入未影响其他 3 个株系转基因植株的形态性状。产生这种差异的原因,有以下 5 个方面:第一,在组织培养过程中植物体内转座子的活化,染色体加倍,基因点突变,甲基化方式改变等引起植物体细胞无性系变异。这种变异可遗传,而且可能导致转基因后代表现型的改变<sup>[11]</sup>;第二,外源基因随机插入引起的变异,即转基因的位置效应,外源基因的插入可能破坏或改变了某个或某些植物原有基因的功能导致转基因植株性状的改变<sup>[12]</sup>;第三,外源基因拷贝数不同引起的变异<sup>[13]</sup>;第四,转基因及筛选和组织培养过程都影响转基因株系的活力,随着繁殖世代的增加大豆植株不断进行自身修复趋于正常<sup>[14]</sup>;第五,因植株在大田受环境影响较大,故也不排除这种差异由环境导致。

综上所述,转基因株系 DpC6b4 和 DpC6b8 中 *cry6Aa2m* 基因均能表达,且没有因外源基因的导入产生不良农艺性状,具有良好的应用前景。

## 参考文献

- [1] 刁琢,许艳丽. 中国大豆胞囊线虫抗源筛选及抗病育种研究进展[J]. 大豆科技,2008(5):14-16. (Diao Z, Xu Y L. Research progress of the screening and utilization of resistant soybean sources and resistance breeding against soybean cyst nematode in China [J]. Soybean Science & Technology, 2008(5):14-16.)
- [2] Hartwig E E. Breeding productive soybean cultivars resistant to soybean cyst nematode for the southern United State[J]. Plant Disease, 1981, 65:303-307.
- [3] Li X Q, Wei J Z, Tan A, et al. Resistance to root-knot nematode in tolnato roots expressing a nematocidal *Bacillus thuringiensis* crystal protein[J]. Plant Biotechnology, 2007, 5(4):455-464.
- [4] Li X Q, Tan A, Michael V. Expression of Cry5B protein from *Bacillus thuringiensis* in plant roots confers resistance to root-knot nematode[J]. Biological Control, 2008, 47(1):97-102.
- [5] Guo S, Liu M, Peng D, et al. New strategy for isolating novel nematocidal crystal protein genes from *Bacillus thuringiensis* strain YBT-1518 [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 11:6997-7001.
- [6] Yu Z, Bai P, Ye W, et al. A novel negative regulatory factor for nematocidal cry protein gene expression in *Bacillus Thuringiensis* [J]. Microbiology Biotechnology, 2008, 18(6):1033-1039.
- [7] 纪巍,杨丽坤,柏锡,等. *Cry6Aa2m* 基因植物表达载体构建及大豆的遗传转化[J]. 东北农业大学学报,2014,45(1):59-64. (Ji W, Yang L K, Bai X, et al. Construction of plant expression vector of *cry6Aa2m* gene and transformation into *Glycine max* [J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2014, 45(1):59-64.)
- [8] 朱延明,张凤,柏锡,等. 转 *SCMRP* 基因大豆“中间试验”农艺性状调查[J]. 东北农业大学学报,2013,44(10):11-13. (Zhu Y M, Zhang F, Bai X, et al. Agronomic performance investigation of field trial of transgenic *SCMRP* soybean [J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2013, 44(10):11-13.)
- [9] 赵彦平,赵春海. 植物转基因育种的分析与研究[J]. 生物技术通报,2011(3):72-77. (Zhao Y P, Zhao C H. Research and analysis of transgenic breeding in plants [J]. Biotechnology Bulletin, 2011(3):72-77.)
- [10] 岳同卿,郎志宏,王延峰,等. 转 *BtCryAh* 基因抗虫玉米的获得及其遗传稳定性分析[J]. 农业生物技术学报,2010,18(4):638-644. (Yue T Q, Lang Z H, Wang Y F, et al. Acquisition of the transgenic maize harboring *BtCry1Ah* gene and analysis of its inheritable stability [J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2010, 18(4):638-644.)
- [11] 林凡敏,柏锡,樊超,等. 转 *GsGST14* 耐盐碱基因大豆的农艺性状调查[J]. 大豆科学,2013,32(1):56-58. (Li F M, Bai X, Fan C, et al. Investigation and analysis of the main agronomic traits of different transgenic soybean line with *GsGST14* gene [J]. Soybean Science, 2013, 32(1):56-58.)
- [12] 赵超越,柏锡,樊超,等. 转 *GsCa<sup>2+</sup>-ATPase* 基因大豆主要农艺性状调查与分析[J]. 大豆科学,2013,31(6):903-906. (Zhao C Y, Bai X, Fan C, et al. Investigation and analysis of the main agronomic traits of different transgenic soybean line with *GsCa<sup>2+</sup>-ATPase* gene [J]. Soybean Science, 2013, 31(6):903-906.)
- [13] 樊超,柏锡,赵超越,等. 转 *GsSAMS* 基因大豆主要农艺性状调查与分析[J]. 大豆科学,2013,31(2):252-254. (Fan C, Bai X, Zhao C Y, et al. Investigation and analysis of the main agronomic traits of different transgenic soybean line with *GsSAMS* gene [J]. Soybean Science, 2013, 31(2):252-254.)
- [14] 马炳田,李平,朱桢,等. 转抗虫基因优良粳型恢系的获得及外源基因的遗传稳定性研究[J]. 中国水稻科学,2002,16(3):211-215. (Ma B T, Li P, Zhu Z, et al. Turn insect-resistant gene fine indica restorer for exogenous gene and its genetic stability study [J]. Chinese Journal of Rice Science, 2002, 16(3):211-215.)