

杂草环境下转 *EPSPS* 基因大豆 NZL06-698 的生态适应性研究

黄 鹄,郭汝清,刘 标

(环境保护部南京环境科学研究所,江苏 南京 210042)

摘 要:为研究转 *EPSPS* 基因大豆 NZL06-698 在杂草环境中的生态适应性,试验设置杂草处理模拟野外环境,研究转基因大豆 NZL06-698 (GT698) 的生存竞争能力以及外源 *EPSPS* 蛋白表达情况。结果表明:在相同处理下转基因大豆 GT698 的株高(R8 期)、百粒重显著高于亲本大豆蒙豆 12 (MD12),但单株产量、单株籽粒数、结实率显著低于亲本大豆,说明外源基因的存在并未增强转基因大豆的生存竞争力,且转基因大豆在野外的生存竞争能力与亲本大豆相比较弱。试验注意到,杂草环境对转 *EPSPS* 基因大豆的生长有明显的限制作用,杂草处理下转基因大豆的单株产量、单株籽粒数、百粒重、结实率等指标均显著低于对照处理。ELISA 检测结果表明,转基因大豆叶片及籽粒中外源 *EPSPS* 蛋白在杂草处理及对照中均正常表达,且两种处理下的 *EPSPS* 蛋白表达量无显著差异。以上结果表明杂草环境中转基因大豆的 *EPSPS* 蛋白正常表达,正常提供抗草甘膦性状,但是外源基因的存在并没有增加转基因大豆的生存竞争能力,且转基因大豆的生长受到杂草环境的显著抑制,由此得出结论:与亲本大豆相比,转 *EPSPS* 基因大豆 NZL06-698 在野外环境中生态适应能力较弱。

关键词:转 *EPSPS* 基因大豆;生存竞争能力;*EPSPS* 蛋白

中图分类号:S565. 1 **文献标识码:**A **DOI:**10. 11861/j. issn. 1000-9841. 2017. 06. 0866

Ecological Adaptability of Glyphosate-resistant Transgenic Soybean NZL06-698 in Weed Environment

HUANG Yao, GUO Ru-qing, LIU Biao

(Nanjing Institute of Environmental Sciences, Ministry of Environmental Protection, Nanjing 210042, China)

Abstract: To study the ecological adaptability of glyphosate-resistant transgenic soybean NZL06-698 (GT698) in the wild, we set weed treatment to simulate field environment to discuss the survival competitive ability of transgenic soybean and exogenous *EPSPS* protein expression. The results showed that the plant height (R8), 100-grain weight of GT698 were significantly higher than those of parent soybean Mengdou12 (MD12) under weed treatment and control, but the yield per plant, seed numbers per plant, and seed setting rate was significantly lower than that of MD12, which meant exogenous gene *epsps* did not enhance survival competitive ability of GT698. Compared to MD12, survival competitive ability of GT698 was weak. The study noted that weed condition limited the growth of GT698 significantly, yield per plant, seed numbers per plant, 100-grain weight and seed setting rate of GT698 in weed treatment were significantly lower than those of under control. ELISA showed that exogenous *EPSPS* protein in the leaves and grains of GT698 expressed normally in weed treatment and control, and there was no significant difference of *EPSPS* protein expression between two treatments. The above results showed that the transgenic soybean weeds expressed *EPSPS* protein normally, which provided GT698 with glyphosate-resistant trait. However, the exogenous gene did not increase the survival competitive ability of transgenic soybean, and the growth of GT698 was inhibited by weed significantly. In all, we speculated the ecological adaptation ability of GT698 is weaker comparing to the parent soybean MD12.

Keywords: Glyphosate-resistant transgenic soybean; Survival competitive ability; *EPSPS* protein

自 1996 年孟山都公司开发的转基因大豆商业化种植以来,全球转基因大豆种植面积迅猛增加。2015 年全球转基因大豆种植面积达到 11.1×10^8 hm^2 ,占转基因作物总面积的 61.7%^[1],其中,以转 *EPSPS* 基因大豆种植面积最大。转基因大豆的种植有诸多优势,如杂草管理变得简单易行,大大降低

了农业生产成本,且转基因大豆产量较传统大豆产量增加^[2-3],然而大面积的种植以及草甘膦的长期使用,使得抗草甘膦大豆的杂草化成为人们关注的重要环境风险之一^[4]。一些研究表明,外源基因提供的耐除草剂等优势性状可能使转基因作物的生存竞争能力变强,进而使得转基因作物生态适应性

收稿日期:2017-06-28
基金项目:转基因生物新品种培育重大专项(2016ZX08012-005);环保公益性行业科研专项(201509044)。
第一作者简介:黄鹄(1990-),男,硕士,主要从事转基因作物的环境安全评价研究。E-mail:huagnyaozhiyuan@163.com。
通讯作者:刘标(1969-),男,研究员,博导,主要从事转基因生物安全与多样性保护研究。E-mail:liubiao@nies.org。

变大,如 Wang 等^[5]研究发现转入 *EPSPS* 基因的杂草稻 (weedy rice) 的生长势以及产量均显著高于对照,但是环境因素如虫压、杂草环境、生长季节等对转基因作物生态适应性的影响十分显著, Li 等^[6]发现含有 *Bt* 或 *Bt/CpTI* 基因的转基因水稻-野生稻的杂交 F_1 、 F_2 代 (F_{1+} 、 F_{2+}) 仅在高虫压中表现出适合度利益 (穗数、单株结实量均比不含抗性基因的 F_{1-} 、 F_{2-} 高),而在低虫压中 F_{1+} 、 F_{2+} 表现与 F_{1-} 、 F_{2-} 无显著差异。宋小玲等^[7]研究发现适宜季节种植的抗农达转基因大豆 GTS40-3-2 的竞争能力弱于当地栽培豆,而在非适宜季节种植转基因大豆竞争能力与栽培豆相似。

转基因作物在野外的生存情况 and 自我繁衍是判断转基因作物生态适应能力强弱的重要方法。目前我国尚未批准转基因大豆种植,但是批准转基因大豆进口。大豆种子在运输、贮藏和销售过程中极有可能发生散落,而在野外环境中发生自生苗。多项对转基因油菜的研究表明,在日本、加拿大的港口、道路均发现了转基因油菜的幼苗及成株^[8-11],且这些自生苗在野外环境中可以自我繁衍 3 代以上^[12]。我国目前未见野外转基因大豆自生苗的研究报道。Ding 等^[3]指出普通栽培豆很少出现自生苗,但是野生大豆 (*Glycine max ssp. soja*) 却能在自然环境中自我繁衍。转基因大豆与野生大豆一旦发生基因漂移,将会给杂草管理带来很大的困难,并且污染我国特有的野生大豆资源。所以研究转基因大豆在野外的生长情况显得十分关键和必要。

转基因大豆表现的抗草甘膦性状取决于外源 *EPSPS* 蛋白能否持续的正常表达,因此,转基因大豆中外源蛋白的表达水平一直是其安全性评估的重要内容之一。目前,对草甘膦大豆外源基因的表达的研究主要集中于对外源 *EPSPS* 基因检测^[13-15],而对外源 *EPSPS* 蛋白表达量的研究相对较少。且已有研究主要集中于农田环境^[16-17],但是自然环境尤其是杂草胁迫对转基因大豆中外源 *EPSPS* 蛋白的影响鲜有报道。

本文以转 *EPSPS* 基因大豆 NZL06-698 为研究对象,模拟自然杂草环境的条件,研究转基因大豆在野外的生存竞争力,评价其生态适应能力,并研究在杂草环境中外源 *EPSPS* 蛋白的表达规律,以期为该转基因大豆的商业化种植提供试验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

转基因大豆:转 *EPSPS* 基因大豆 NZL06-698 (表现抗草甘膦性状,以下简称 GT698),对照为蒙

豆 12 (以下简称 MD12)。NZL06-698 是以蒙豆 12 为母本,以孟山都公司抗草甘膦大豆 40-3-2 为父本通过常规杂交方法育成。

1.2 方法

1.2.1 GT698 生存竞争能力试验 本试验于 2015 年在环境保护部南京环境科学研究所温室内开展。将农田土装入塑料盆 (40 cm × 40 cm × 40 cm) 中,每盆栽 1 株大豆,按照常规大豆栽培方法培养大豆。杂草处理 (weed treatment, WT): 试验模拟自然的杂草环境,在大豆生长期不予除草。对照 (CK): 对照组模拟农田环境,将盆内出现的杂草全部人工除去。每个处理 15 盆,3 次重复。试验期间除正常浇水外不施用肥料,也不施用化学除草剂。

在大豆结荚期对盆内杂草种类以及密度进行调查,大豆收获后将盆中杂草齐根收割晾干称重。在转基因大豆花盆中出现的杂草密度为 8 株·cm⁻²,主要种类主要有马唐 [*Digitaria sanguinalis* (L.) Scop.], 狗尾草 [*Setaria viridis* (L.) Beauv.], 两种杂草分别占总草数量的 69.2% 和 23%,此外还有少量的牛筋草 [*Eleusine indica* (L.) Gaertn.]。亲本大豆 MD12 盆内的杂草密度为 5 株·cm⁻²,主要杂草为马唐 (占总草数量的 88.7%),此外还有少量的狗尾草 [*Setaria viridis* (L.) Beauv.]、刺儿菜 [*Cirsium setosum* (Willd.) MB.] 和铁苋菜 [*Acalypha australis* L.]。

转基因大豆与亲本大豆每重复随机选取 10 株进行生长指标的测量。测量指标与方法如下:

- (1)株高:从地面到植株顶端的高度。大豆播种后 V2、R4 及 R8 期分别调查一次。
- (2)地上部干生物量:大豆成熟时,整株自然晾晒至恒重后称重。
- (3)单株籽粒:统计大豆植株上健康籽粒 (没有发霉没有虫洞) 数量。
- (4)单株产量:大豆植株上全部籽粒 (包括发霉和虫洞) 的重量。
- (5)百粒重:收获的全部大豆的种子混匀后选取 100 粒健康种子进行称重。
- (6)结实率 (%) = 大豆植株上的全部籽粒数 / 大豆种室数量 × 100。

1.2.2 GT698 中外源 *EPSPS* 蛋白含量检测 采样策略:在大豆生长的 V2 (主茎上有 2 个节的叶片充分生长)、R4 (盛荚期)、R8 (成熟期) 采集大豆植株中部的叶片;并在 R8 期收集豆荚中成熟的籽粒。

使用 EnviroLogix 公司 CP4 *EPSPS* 的双抗夹心 ELISA 定量检测试剂盒进行 *EPSPS* 蛋白含量测定。所有样品的吸光度值均由酶标仪 (Tecan M 200) 读取,波长设定为 450 nm。每次检测均用进口 *EPSPS*

蛋白标样制作标准曲线,根据标准曲线求 EPSPS 蛋白含量。

1.3 数据分析

1.3.1 GT6987 生存竞争试验 采用 SPSS 18.0 软件进行单因素方差分析 ANOVA (LSD) 及多重比较,并以 $P < 0.05$ 作为统计学上检验的显著性水准。

1.3.2 相对适合度计算 相对适合度值 = $\{ \sum (X_i/Y_i) \} / j$ 。j 为考量指标的总数,这里 $j = 6$ 。X 为转基因大豆的指标数值,Y 为亲本大豆的指标数值,i 指代株高、单株干生物量、单株种子重、单株种子数、百粒重、结实率。

1.3.3 EPSPS 蛋白含量 将样品的 OD 值根据标准曲线换算得外源蛋白的含量,然后在 SPSS 18.0 中进行独立样本 T 检验。

2 结果与分析

2.1 转 EPSPS 基因大豆 GT698 在杂草环境下的生存竞争能力

2.1.1 株高 由表 1 可见,杂草处理下,GT698 的 V2、R4 和 R8 期株高分别为 23.6、31.71 和 41.31 cm,3 个时期的株高均显著高于亲本大豆 MD12。对照下,转基因大豆在 V2、R4 期的株高分别为 24.92 和 34.33 cm,这两时期的株高均与 MD12 无显著差异,但是 R8 期 GT698 株高显著高于 MD12 株高。

GT698 在杂草处理下 V2、R4 期以及成熟期的株高与对照下的无显著差异。MD12 在杂草处理下 V2、R4 时的株高显著低于对照;但是成熟期时,与对照的株高无显著差异。

表 1 GT698 和 MD12 在不同处理下的株高
Table 1 Plant height of GT698 and MD12 under different treatments (cm)

处理 Treatments	大豆品种 Soybean varieties	大豆生育期 Soybean growth period		
		V2	R4	R8
杂草处理 WT	GT698	23.60 ± 0.40 a	31.71 ± 0.77 a	41.31 ± 2.12 a
	MD12	20.00 ± 0.51 b	25.86 ± 1.83 b	35.91 ± 1.57 b
对照 CK	GT698	24.92 ± 0.37 a	34.33 ± 0.73 a	44.28 ± 1.34 a
	MD12	24.91 ± 0.23 a	35.56 ± 1.37 a	39.68 ± 1.49 b

GT698 表示转 EPSPS 基因大豆 NZL06-698;MD12 表示亲本大豆蒙豆 12。不同小写字母表示数据之间无显著差异 ($P < 0.05$),下同。
GT698 means transgenic glyphosate-tolerant soybean, MD12 means Mengdou12. Mean values within a column followed by different letter are significantly different ($P < 0.05$), the same below.

2.1.2 地上部干生物量 杂草处理下,GT698 的成熟期地上部干生物量平均值为 3 g,低于 MD12 的 5.29 g,但是两者之间无显著差异。对照处理,GT698 成熟期地上部干生物量平均值为 12.04 g,略

高于 MD12 的 10.93 g,但是二者之间也无显著差异。

GT698 与 MD12 在杂草处理下的地上部干生物量均要显著低于对照。

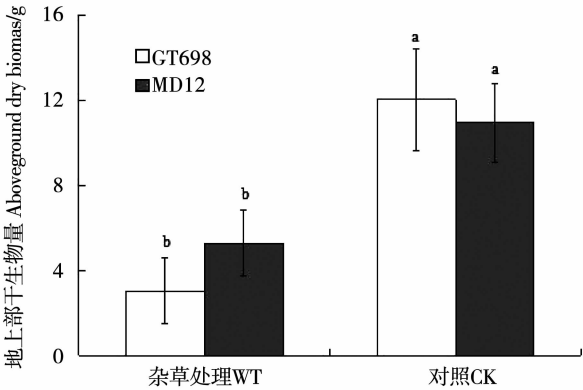


图 1 GT698 与 MD12 在不同处理下的地上部干生物量

Fig. 1 Aboveground dry biomass of GT698 and MD12 under different treatments

2.1.3 繁育指标 杂草处理下,GT698 的单株产量、单株籽粒数、结实率显著低于 MD12,而百粒重指标显著高于 MD12;对照下,GT698 的单株产量、单株籽粒数、结实率也显著低于 MD12,百粒重显著

高于 MD12。

GT698 在杂草处理下单株产量、单株籽粒数、百粒重、结实率均显著低于对照组。MD12 在杂草处理下的单株产量、单株籽粒数显著低于对照组,而

百粒重、结实率与对照的无显著差异。此外,在杂草处理或对照下 GT698 种子腐坏率比较高,在 33% 左右,腐坏率显著高于亲本大豆 MD12。

表 2 GT698 和 MD12 在不同处理下的繁育指标

Table 2 The reproductive indexes of GT698 and MD12 under different treatments

处理 Treatments	大豆品种 Soybean varieties	单株产量 Yield per plant/g	单株籽粒 Seed numbers per plant	百粒重 100-seed weight/g	结实率 Seed rate/%	腐坏率 Rotted rate/%
杂草处理	GT698	0.75 ± 0.58 c	4.17 ± 4.42 d	20.3.3 ± 5.88 b	26.39 ± 19.43 c	33.33 ± 4.61 a
WT	MD12	1.97 ± 0.41 d	13.67 ± 3.47 c	14.54 ± 1.71 c	50.41 ± 9.72 a	1.97 ± 0.21 b
对照	GT698	4.40 ± 0.92 b	20.25 ± 4.47 b	21.78 ± 1.69 a	35.74 ± 6.20 b	33.97 ± 2.27 a
CK	MD12	5.44 ± 0.9 a	31.00 ± 5.13 a	17.61 ± 1.64 c	57.73 ± 6.90 a	2.43 ± 0.62 b

2.1.4 相对适合度 不论是杂草处理还是对照处理,转基因大豆 GT698 的相对适合度都小于 1,表明转基因大豆的生长弱于亲本大豆,而且在杂草处理下,转基因大豆的生长要比亲本大豆更弱(图 2)。

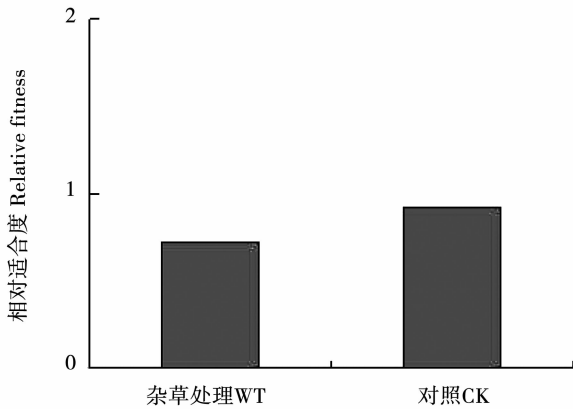


图2 不同处理下转基因大豆的相对适合度

2.2 转 *EPSPS* 基因大豆 GT698 的 EPSPS 蛋白含量

由表 3 可得, 杂草处理下叶片在 V2 期 GT698 中 EPSPS 蛋白含量为 $226.31 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$, 进入生殖期后, 叶片中 EPSPS 蛋白含量逐渐上升, R4 期 EPSPS 蛋白达到了 $320.58 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$, 随后叶片中 EPSPS 蛋白开始下降, R8 期达到最低值, 仅为 $53.19 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ 。对

表 3 GT698 叶片及种子中 EPSPS 蛋白含量
Table 3 EPSPS protein in GT698 leaves and seeds (ng·g⁻¹)

处理 Treatments	叶片 Leaves			种子 Seed
	V2	R4	R8	R8
杂草处理 WT	226.31 ± 25.36	320.58 ± 20.96	53.19 ± 21.65	587.79 ± 24.2
对照 CK	248.57 ± 15.63	312.28 ± 41.00	62.52 ± 18.96	544.26 ± 12.16

3 结论与讨论

本研究模拟杂草环境,研究了转 *EPSPS* 大豆 NZL06-698 (GT698) 的生存竞争能力。生存竞争能力强,则说明该转基因大豆入侵新环境、占据生存空间的能力较强,存在杂草化风险。本研究表明在

照处理下的 GT698 中 EPSPS 蛋白表达规律与杂草处理下的一致,且两处理下的转基因大豆的 EPSPS 表达量无显著差异。

杂草处理下 GT698 种子的 EPSPS 蛋白含量为 $587.79 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$, 对照 GT698 种子的 EPSPS 蛋白的含量为 $544.26 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$, 两者之间无显著差异。两者的对照亲本大豆中均没有检测到外源蛋白。

杂草环境中的转基因大豆 GT698 整个生长期的株高要显著高于亲本大豆 MD12, 良好的株高优势可以满足大豆对光照资源的争夺, 但是这种株高优势并没有对转基因大豆的产量性状作出贡献。杂草处理及对照下, 转基因大豆 GT698 的单株产量、单株籽粒数、结实率均显著低于亲本大豆 MD12。Liu

等^[18]的研究发现抗逆 *ThIPK2* 基因可以提高大豆籽粒的重量。本试验有类似的发现,转 *EPSPS* 基因大豆 GT698 的百粒重要显著高于亲本大豆。但是由于转基因大豆 GT698 的结实能力较差,且 GT698 籽粒的腐坏率较高,导致其在产量上不能表现出优势。沈晓峰等^[19]指出转基因作物表现出低产量可能是普遍存在的问题。现在多数研究认为抗性基因在宿主植物中表达时需要消耗额外的能量从而影响了植物的正常生长^[20-22]。由此可见,外源基因 *EPSPS* 导入亲本大豆后并没有增强其生存竞争的能力,反而使其在关键的繁育指标上表现劣势。

杂草环境对 GT698 的株高影响并不是很显著,环境因素对转基因大豆的影响主要表现在繁育指标上,杂草处理下 GT698 的单株产量、单株籽粒数、结实率等均显著低于对照处理。

为更好评估转基因大豆的生存竞争能力,我们引入相对适合度这一概念。适合度 (fitness) 是指生物体在其所处的环境中生存和繁殖的能力^[23]。相对适合度即是与对照相比,生物体的生存与繁殖能力的大小。大多数研究结果表明,在靶标选择压下,转基因作物与受体相比表现出一定的适合度利益,而在靶标选择压较低或缺失的情况下,转基因作物表现出适合度成本^[24-26]。本研究结果显示,在无靶标草甘膦选择压的情况下(对照处理),转基因大豆的相对适合度值小于 1,这说明转基因大豆 GT698 整体的生存竞争能力要比亲本大豆 MD12 弱。在无草甘膦选择压而有着很高的杂草竞争压下(杂草处理),转基因大豆的相对适合度更小,一方面说明转基因大豆的生长严重受到杂草的抑制,转基因大豆在与杂草竞争生长中处于劣势,另一方面说明转基因大豆在草压环境中表现比亲本大豆差。由此可见,转 *EPSPS* 基因大豆的在野外环境中的生存竞争能力不强,杂草化风险低。

转 *EPSPS* 基因大豆表现抗性性状取决于外源基因正常表达出并转录翻译为蛋白,转基因作物中外源基因的表达受到很多因素的影响,如湿度、温度、非生物胁迫^[27-29]。于惠林等^[17]指出靶标草甘膦选择压的有无对转基因大豆叶根、茎、叶中 *EPSPS* 蛋白的表达无显著影响。本研究发现杂草环境下转基因大豆 GT698 叶片及籽粒中外源基因均正常表达,杂草环境下的 GT698 叶片及籽粒中 *EPSPS* 蛋白含量与对照环境中的无显著差异。在不同的生育期,转基因大豆叶片中的 *EPSPS* 蛋白含量存在一定的差异,繁殖生长阶段的 *EPSPS* 蛋白含量比营养生长阶段的要高,但在大豆成熟期 (R8),叶片中 *EPSPS* 蛋白含量急速下降。本研究发现转基因大豆

籽粒中 *EPSPS* 蛋白含量显著高于叶片中的含量,该结果与前人的研究结果一致^[16]。

综上所述,杂草环境中转基因大豆外源 *EPSPS* 蛋白正常表达,且表达量与对照下的无显著差异。杂草环境中转基因大豆的株高虽然高于亲本大豆,但是单株产量、单株籽粒数、结实率都要显著低于亲本大豆,表明外源基因的存在并没有增强转基因大豆的生存竞争能力,外源基因的存在反而降低了转基因大豆的生存竞争能力。而且杂草环境对转基因大豆的生长造成了显著的抑制作用。由此可以得出结论,在杂草环境中,转基因大豆 NZL06-698 与亲本大豆蒙豆 12 相比,其生态适应能力不强。

虽然转基因大豆 NZL06-698 在野外环境中的生态适应能力不强,但是其尚能产生有效的后代,如果散落在野外环境中,对当地的栽培豆或野生大豆仍可能造成污染,所以需要对于二代甚至更多世代进行观测,以明确该转基因大豆在野外环境下的持续生存能力。

参考文献

[1] James 2016. <http://www.isaaa.org/resources/publications/pocketk/16/default.asp>.

[2] Bonny S. Herbicide-tolerant transgenic soybean over 15 years of cultivation: Pesticide use, weed resistance, and some economic issues; The case of the USA [J]. Sustainability, 2011, 3 (9): 1302-1322.

[3] Ding W, Li X H, Wang Z H. Benefits, potential risks and environmental safety assessments of herbicide-resistant transgenic soybean [J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2011, 18 (3): 65-70.

[4] 赵波, 张鹏飞. 抗除草剂转基因大豆的生态安全评价进展 [J]. 山地农业生物学报, 2012, 31 (1): 70-76. (Zhao B, Zhang P F. Ecological assessment of transgenic soybean tolerant to herbicide [J]. Journal of Mountain Agriculture and Biology, 2012, 31 (1): 70-76.)

[6] Li L, Yang X, Wang L, et al. Limited ecological risk of insect-resistance transgene flow from cultivated rice to its wild ancestor based on life-cycle fitness assessment [J]. Science Bulletin, 2016, 61 (18): 1440-1450.

[7] 宋小玲, 强胜, 彭于发. 转 *EPSPS* 基因大豆 (*Glycine max* (L) Merri) 杂草性评价的试验实例 [J]. 中国农业科学, 2009, 42 (1): 145-153. (Song X L, Qiang S, Peng Y F. An experimental case of safety assessment of weediness of transgenic glyphosate-resistant soybean [*Glycine max* (L.) Merri] [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2009, 42 (1): 145-153.)

[8] Nishizawa T, Nakajima N, Aono M, et al. Monitoring the occurrence of genetically modified oilseed rape growing along a Japanese roadside: 3-year observations [J]. Environmental Biosafety Research, 2009, 8 (8): 33-44.

[9] Saji H, Nakajima N, Aono M, et al. Monitoring the escape of

transgenic oilseed rape around Japanese ports and roadsides[J]. Environmental Biosafety Research, 2005, 4(4):217-222.

[10] Kawata M, Murakami K, Ishikawa T. Dispersal and persistence of genetically modified oilseed rape around Japanese harbors[J]. Environmental Science & Pollution Research, 2009, 16(2):120-126.

[11] Yoshimura Y, Beckie H J, Matsuo K. Transgenic oilseed rape a-long transportation routes and port of Vancouver in western Canada [J]. Environmental Biosafety Research, 2006(5):67 - 75.

[12] Busi R, Powles S B. Transgenic glyphosate-resistant canola (*Bras-sica napus*) can persist outside agricultural fields in Australia[J]. Agriculture Ecosystems & Environment, 2016, 220:28-34.

[13] 朱元招, 尹靖东, 李德发, 等. 转抗草甘膦基因大豆 PCR 定量检测研究[J]. 中国农业大学学报, 2005, 10(3):25-29. (Zhu Y Z, Yin J D, Li D F, et al. Quantitative PCR method for detec-ting glyphosate-tolerant gene transfer in soybeans[J]. Journal of China Agricultural University, 2005, 10(3):25 -29.)

[14] 田芳, 王秀敏, 滕达, 等. 转抗草甘膦基因大豆及其加工产品的环介导等温扩增检测技术[J]. 中国畜牧兽医文摘, 2011, 23(3):480-485. (Wang F, Wang X M, Teng D, et al. A loop-mediated isothermal amplification to detect genetically modified soybean resistant to glyphosate and its processed products[J]. Chi-nese Abstracts of Animal Husbandy and Veterinary Medicine, 2011, 23(3):480-485.

[15] Yoke K C, Yee T C, Siew P K, et al. Development of multiplex-PCR for genetically modified organism (GMO) detection targeting EPSPS and *Cry1Ab* genes in soy and maize samples[J]. Interna-tional Food Research Journal, 2011, 18:517-522.

[16] 邢珍娟, 李飞武, 刘娜, 等. 转 *EPSPS* 基因大豆植株中蛋白的表达[J]. 大豆科学, 2009, 28(6):981-984, 989. (Xing Z J, Li F W, Liu N, et al. Expression of CP4 EPSPS protein of genetical-ly modified roundup ready soybean[J], Soybean Science, 2009, 28(06):981-984, 989.)

[17] 于惠林, 杨鑫浩, 肖娅风, 等. EPSPS 蛋白在转基因耐草甘膦大豆植株中的表达量测定[C]. 长沙:第十一届全国杂草科学大会论文摘要集, 2013. (Yu H L, Yang X H, Xiao Y F, et al. Expression of EPSPS protein in transgenic glyphosate tolerant soy-bean plants[C]. Changsha: Abstracts of proceedings of the Elev-enth National Weed Science Conference, 2013.)

[18] Liu M, Li D, Wang Z, et al. Transgenic expression of *ThIPK2* gene in soybean improves stress tolerance, oleic acid content and seed size[J]. Plant Cell Tissue & Organ Culture, 2012, 111(3):277-289.

[19] 沈晓峰, 栾凤侠, 陶波. 转抗草甘膦基因大豆生物与环境安-全性[J]. 东北农业大学学报, 2007, 38(3):401-404. (Shen X F, Luan F X, Tao B. Biosafety and environmental safety of genetic modified soybean resistant to glyphosate[J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2007, 38(3):401-404.)

[20] Damgaard C, Kjaer C. Competitive interactions and the effect of herbivory on Bt-*Brassica napus*, *Brassica rapa* and *Lolium perenne* [J]. Journal of Applied Ecology, 2009, 46(5):1073-1079.

[21] Laughlin K D, Power A G, Snow A A, et al. Risk assessment of ge-netically engineered crops: Fitness effects of virus-resistance trans-genes in wild *Cucurbita pepo* [J]. Ecological Applications, 2009, 19(5):1091-1101.

[22] Zeller S L, Kalinina O, Brunner S, et al. Transgene × environ-ment interactions in genetically modified wheat [J]. Plos One, 2010, 5(7):e11405.

[23] Orr H A. Fitness and its role in evolutionary genetics[J]. Nature Reviews Genetics, 2009, 10(8):531-539.

[24] 浦海清, 王健, 陈良燕, 等. 转基因植物的生态适合度研究现状与展望[J]. 江苏农业科学, 2012, 40(10):41-44. (Pu H Q, Wang J, Chen L Y, et al. Current situation and prospect of eco-logical fitness of transgenic plants[J]. Jiangsu Agricultural Sci-ences, 2012, 40(10):41-44.)

[25] 苏军, 宋亚娜, 姚玉仙, 等. 转 *CryIAb* 水稻在不同生长条件下-的适合度[D]. 分子植物育种, 2013, 11(4):469-476. (Su J, Song Y N, Yao Y X, et al. Fitness of transgenic insecticidal rice under different growing condition[J]. Molecular Plant Breeding, 2013, 11(4):469-476.)

[26] Yang X, Wang F, Su J, et al. Limited fitness advantages of crop-weed hybrid progeny containing insect-resistant transgenes (Bt/CpTI) in transgenic rice field [J]. Plos One, 2012, 7(7):e41220.

[27] 王永慧. 温湿度逆境、棉铃大小和生长物质对 Bt 棉 Bt 蛋白表-达量的影响及其生理机制[D]. 扬州:扬州大学, 2010. (Wang Y H. Effects of combination of temperature and humidity, boll size, growth substances on Bt protein expression and metabolism for Bt cotton[D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2010.)

[28] 张桂玲, 温四民. 盐胁迫对转 *Bt* 基因棉苗期 *Bt* 蛋白表达量-和氮代谢的影响[J]. 西北农业学报, 2011, 20(6):106-109. (Zhang G L, Wen S M. Effects of salt stress on bt protein content and nitrogen metabolism of transgenic *Bt* cotton[J]. Acta Agricul-turae Boreali-occidentalis Sinica, 2011, 20(6):106-109.)

[29] 陈源, 韩勇, 花明明, 等. 低温和湿度胁迫对盛铃期 Bt 棉叶片-*Bt* 蛋白表达量的影响[J]. 棉花学报, 2014, 26(4):29. (Chen Y, Han Y, Hua M M, et al. Effect of stresses of low temperature and different relative humidity on the bt protein content in leaves at the bolling stage in Bt cotton[J]. Cotton Science, 2014, 26(4):29.)