

# 大白菜转修饰豇豆胰蛋白酶抑制剂基因获得抗虫植株

杨广东<sup>1,2</sup> 朱 祯<sup>3</sup> 李燕娥<sup>2</sup> 朱祝军<sup>1</sup> 肖桂芳<sup>3</sup> 魏晓丽<sup>3</sup>

(<sup>1</sup>浙江大学园艺系, 杭州 310029; <sup>2</sup>山西农业科学院棉花研究所, 运城 044000; <sup>3</sup>中国科学院遗传研究所, 北京 100101)

**摘要:** 以大白菜 3 d 苗龄带柄子叶为外植体, 经根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 介导, 将修饰的豇豆胰蛋白酶抑制剂基因 (*skt*) 导入大白菜自交系 ‘GP 11’ 和杂交种 ‘中白 4 号’, 并获得了卡那霉素抗性植株。PCR 检测和 Southern blot 杂交证实, *skt* 基因已整合进大白菜基因组中; 豇豆胰蛋白酶抑制剂活性检测表明, 大部分转基因植株都对牛胰蛋白酶有一定的抑制活性, 对照未转化植株抑制活性很低。室内离体叶片饲虫和田间自然抗虫性鉴定进一步证明, 转基因植株对菜青虫 (*Pieris rapae* L.) 具有一定抗性。

**关键词:** 大白菜; 修饰的豇豆胰蛋白酶抑制剂基因; 根癌农杆菌; 豇豆胰蛋白酶抑制剂活性; 抗虫

中图分类号: S 634. 1; Q 813 文献标识码: A 文章编号: 0513-353X (2002) 03 0224-05

豇豆胰蛋白酶抑制剂 (Cowpea trypsin inhibitor, CpTI) 为天然的抗虫物质, 对主要农作物害虫都有抑制作用, 在植物抗虫基因工程中已得到广泛的应用<sup>[1]</sup>。朱祯实验室采用细胞内定位技术对 *qpti* 基因进行了修饰, 修饰的 *qpti* 基因 (Signal-CpTI-KDEL, 即 *skt*) 在转基因植物细胞中的表达有了极大提高<sup>[2,3]</sup>。大白菜与同属的植物相比, 植株离体再生能力极低<sup>[4]</sup>, 这严重制约着转基因技术在其品种改良上的应用。本研究在前期工作基础上<sup>[5]</sup>, 应用农杆菌介导法将 *skt* 基因导入大白菜, 获得了抗虫效果较好的转基因植株, 并对抗性植株进行分子生物学鉴定和抗虫测试。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种和质粒

根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) LBA4404, 携带质粒 pBinΩSCK<sup>[6]</sup> (图 1)。该质粒含修饰的豇豆胰蛋白酶抑制剂基因 (*skt*), 5' 端添加增强子元件 Ω 序列和信号肽 *skti* 编码序列, 在 3' 端添加内质网滞留信号 KEDL 编码序列。

### 1.2 大白菜转化及其植株再生

1.2.1 农杆菌转化 采用大白菜优良自交系 ‘GP-11’ 和生产上常用的杂交种 ‘中白 4 号’ (购自中国农科院蔬菜花卉研究所)。取 3 d 苗龄的无菌苗带柄子叶 (柄长 1 mm) 作外植体, 先在预培养基 (PM, 即改良 MS+ BA 4 mg/L+ IAA 3 mg/L+ CPG 混合物 750 mg/L, pH 5.8) 上预培养 1 d 后, 于 OD<sub>600nm</sub> = 0.5 的工程菌液侵染

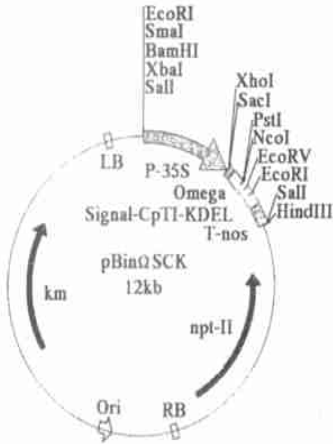


图 1 质粒 pBinΩSCK

Signal-CpTI-KDEL 为修饰的豇豆胰蛋白酶抑制剂基因 *skt*,  
P-35S 和 T-nos 为启动子和终止子。

Fig. 1 The Map of plasmid pBinΩSCK

Signal-CpTI-KDEL represent modified *qpti* gene (*skt*), P-35S  
and T-nos represent promoter and terminator respectively.

5 min。取出外植体用无菌滤纸吸干, 转入覆有一层无菌滤纸的共培养基 (CoM, 即 PM+ 乙酰丁香酮 200  $\mu\text{mol/L}$ , pH 5.2) 上, 25  $^{\circ}\text{C}$  条件下暗培养 2~3 d。

1.2.2 抗性植株的获得 共培养结束后将外植体移入诱导培养基 (IM, 即 PM+  $\text{AgNO}_3$  4 mg/L+ 头孢霉素 400 mg/L, pH 5.8) 上, 7~10 d 后再转接于筛选培养基 (SM, 即 PM+  $\text{AgNO}_3$  2 mg/L+ Km 5 mg/L+ 头孢霉素 300 mg/L, pH 5.8) 上进行 2 次筛选, 每次 2 周。将再生的转化芽丛从子叶柄上切下接入伸长培养基 (EM, 即改良 MS+ BA 2 mg/L+  $\text{GA}_3$  0.5 mg/L+ Km 7.5 mg/L+ 头孢霉素 300 mg/L, pH 5.8) 中诱导伸长, 20 d 后从芽丛中切取正常绿色的单芽转入 EM 中继续伸长 15 d, 之后转至生根培养基 (RM, 即 MS+ IBA 0.2 mg/L+ Km 5 mg/L+ 头孢霉素 200 mg/L, pH 5.8) 中诱导生根, 20 d 后将生根的卡那霉素抗性苗先移入装有蛭石的营养钵中在光照培养箱中培养 7~10 d, 再移到温室。

### 1.3 转化植株检测

1.3.1 PCR 检测 根据 *sch* 基因序列设计一对引物: 5' AAAATGAAGAGCACCATCITC3' 和 5' TCTAGAGTTCATCITTCTCATC3'。PCR 反应采用 25  $\mu\text{L}$  体系: 模板 DNA 20 ng, 两种引物各 0.5  $\mu\text{mol/L}$ , dNTP 各 0.25 mmol/L, 1 U Taq 酶。94  $^{\circ}\text{C}$  变性 5 min, 然后依次在 94  $^{\circ}\text{C}$  变性 1 min, 55  $^{\circ}\text{C}$  复性 1 min, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 1 min, 循环 35 次, 最后在 72  $^{\circ}\text{C}$  保温 10 min, 取样 10  $\mu\text{L}$  在 1.0% 的琼脂糖凝胶上进行电泳检查。

1.3.2 Southern blot 杂交分析 取 10  $\mu\text{g}$  转化植株基因组 DNA 及非转化大白菜基因组 DNA (阴性对照), *Sla*I 37  $^{\circ}\text{C}$  酶切 16 h, *Sla*I 酶切质粒 pBinQCK 为阳性对照, 通过纸吸印法将酶切的 DNA 转移到 Hybond N<sup>+</sup> (Amersham) 膜上, 低熔点胶回收 *sch* 基因片段作探针。预杂交、杂交均参照 Sambrook 等的方法<sup>[7]</sup>。

1.3.3 转化植株 CpTI 相对表达量的测定 参照 Erlanger 等<sup>[8]</sup>的方法。

### 1.4 抗虫生物活性测试

在直径 9 cm 的培养皿中放置两层滤纸, 无菌水浸湿后置适量新鲜大白菜叶片, 以非转化的大白菜叶片为对照, 每皿内放置 5 只 2~3 龄的菜青虫 (*Pieris rapae* L.), 重复 3 次。7 d 后统计死活虫数, 并计算死亡率和生物总量, 同时记录叶片受损程度。菜青虫死亡率= 死亡数/接虫总数  $\times$  100%; 生物总量= 存活昆虫的总质量 (mg)。叶片受损级别分 5 级: 0 级, 叶片仅有极微小的孔; 1 级, 叶片有小孔, 但小孔并不相连; 2 级, 叶片小孔相连, 但叶片完整; 3 级, 叶片有大洞, 叶片基本完整, 还有大量叶片残余; 4 级, 叶片仅剩叶脉及不完整叶片。在菜青虫盛发期调查转基因植株 T<sub>0</sub> 代的抗虫情况, 对转基因大白菜田间自然抗虫性进行初步鉴定。

## 2 结果与分析

### 2.1 大白菜高效遗传转化体系的建立

本研究在对影响大白菜转化效果的诸多因素进行优化研究后, 初步建立了一套大白菜的高效遗传转化体系: 以预培养 1 d 的 3 d 苗龄的大白菜带柄子叶为外植体, 在 OD<sub>600</sub> 值为 0.5 的农杆菌工程菌液中侵染 5 min, 再在 pH 值为 5.2 的共培养基中暗培养 2~3 d 后, 经过诱导、筛选、伸长以及生根等过程, 获得抗性植株, 其最高转化频率可达到 5.74%。我们在研究 6-BA、CPPU、TDZ 以及 BR 等多种激素对大白菜再生的影响中发现, 在改良 MS 培养基中添加 6-BA 4 mg/L+ IAA 3 mg/L 的激素组合并附加适当浓度的  $\text{AgNO}_3$  可以明显提高再生频率, 而其他激素作用甚微。在 MS 培养基中降低  $\text{NH}_4^+$  浓度, 同时再添加适当比例组合的 CPG 混合物 (水解酪蛋白、脯氨酸和甘氨酸等) 一定程度上可提高再生频率。

### 2.2 转化植株的获得

由于转化用的质粒带有显性标记基因 (*nptII*), 它能使转化细胞在含有卡那霉素的选择培养基上存活生长。在模式转化植物烟草上, 叶圆片可以在含有卡那霉素的再生培养基上直接再生不定芽, 但

对大部分植物来说, 在具有选择压的培养基上直接再生不定芽是十分困难的。经过侵染的大白菜子叶若直接放在含有卡那霉素的诱导培养基上, 几乎很难再生出芽, 大多数叶片逐渐变黄、死亡, 少数产生绿色致密抗性愈伤团, 但不能分化出芽。这可能因为外源基因从转入到表达所需时间不同, 选择剂的加入时间及浓度也不同, 应有一段过渡期使转化细胞得到恢复生长并充分表达外源基因 (包括选择压力抗性基因)。本研究把经过侵染的大白菜外植体在共培养后先放在不含卡那霉素的诱导培养基上恢复生长一段时间, 再转到含 5 mg/L 卡那霉素的筛选培养基上进行选择。结果发现 (表 1), 在推迟选择 4 d 的情况下, 外植体诱导出的芽丛率只有 1.6%, 这些芽丛转到含卡那霉素的筛选培养基上经过 1~2 次继代选择, 最后获得正常伸长和生根的单个抗性芽率只占总外植体的 0.67%; 在推迟选择 7~10 d 的情况下, 获得的抗性芽丛率在 6.3%~6.4%, 而抗性芽率在 2.14%~2.19%; 但在推迟选择 13 d 的时候, 虽然诱导出的芽丛率在 10.0% 以上, 可最终无法得到抗性芽, 所有芽丛在经过 80 d 的卡那霉素筛选后全部白化死亡。分析原因可能是大白菜外植体对卡那霉素非常敏感, 极低的卡那霉素就能抑制植株再生, 在推迟选择 7~10 d 后, 刚好有利于转化细胞有一个恢复生长过程; 若超过 10 d 以上, 则会导致非转化细胞进入分化阶段, 而且大量非转化芽的形成还可能抑制真正转化芽的再生。

表 1 推迟选择时间对产生卡那霉素抗性芽的影响  
Table 1 Influences of delayed selection on kanr shoot regeneration

推迟选择 天数 Delayed days	外植体总数 No. of explants	再生芽丛数 No. of regeneration shoots ( % * )	卡那霉素抗性 芽 数 No. of kanr shoots ( % ** )
0	264	1 ( 0.38 )	0 ( 0 )
4	300	5 ( 1.6 )	2 ( 0.67 )
7	280	18 ( 6.4 )	6 ( 2.14 )
10	320	20 ( 6.3 )	7 ( 2.19 )
13	250	26 ( 10.4 )	0 ( 0 )

\* 表示再生芽丛数占总外植体的比例;  
\*\* 表示卡那霉素抗性芽数占总外植体的比例。  
\* No. of regeneration shoot explants/ No. of infected explants;  
\*\* No. of kanr shoots/No. of infected explants.

采用分级分布筛选, 即共培养后先在不含卡那霉素的诱导培养基上恢复生长 7~10 d, 再转到含 5 mg/L 卡那霉素的筛选培养基上选择, 当抗性芽丛分化后转到含 7.5 mg/L 卡那霉素的伸长培养基上诱导伸长, 将伸长的单芽切下再转到含 5 mg/L 卡那霉素的生根培养基上生根。在伸长培养基中提高卡那霉素浓度, 主要是加大选择抗性芽丛, 淘汰芽丛中的假转化体, 更有利于转化芽的生长 (见插页 1 图版, A、B)。将在伸长培养基上正常伸长的单芽从芽丛中切下, 转入生根培养基, 20 d 后几乎所有小芽都长出根, 进而发育成完整的植株 (见插页 1 图版, C、D)。期间总共得到 ‘GP-11’ 转化苗 9 株, ‘中白 4 号’ 转化苗 6 株。

2.3 转化植株的 PCR 检测和 Southern blot 杂交分析

以质粒 pBinΩSCK 作阳性对照, 未转基因植株作为阴性对照, 对 15 株转 *sch* 基因苗进行 PCR 分析 (见插页 1 图版, G), 其中有 13 个再生植株含有 *sch* 目的基因, 未转化植株和基因型 ‘GP-11’ 的两个抗性植株基因组未出现 PCR 扩增片段, 转基因植株得到一条和预期长度一样大小的 415 bp 的片段。

从 PCR 检测为阳性的转基因植株中随机选择 6 个植株进行 Southern blot 杂交分析, 结果表明 6 个植株均获得了明显的杂交信号, 而非转化对照基因组中未出现任何杂交信号 (见插页 1 图版, H), 进而证实了 *sch* 基因已整合进大白菜的基因组中。从转基因植株 Southern blot 的杂交图谱上看, 除 ‘GP-11-07’ 出现 2 条杂交带外, 其它都是一条带。

2.4 转基因植株 CpTI 的相对表达量

CpTI 能够有效地抑制胰蛋白酶的活性。植物体内 CpTI 含量越高, 胰蛋白酶消化食物的能力就越低。当害虫摄食有 CpTI 的转基因植物后, 其胰蛋白酶的活力受到抑制, 肠道中的食物不能消化, 使害虫产生厌食症, 最后导致饥饿而死亡。对共计 13 株转 *sch* 基因苗进行 CpTI 抑制活性分析, 同时根据标准曲线及转化植株胰蛋白酶抑制活性大小, 计算 CpTI 的相对表达量, 结果如图 2 所示。其中有 15% 的转化植株 CpTI 相对表达量大于 0.8%, 约 60% 处于 0.5%~0.8% 之间, 这表明这些转基因植株体内 CpTI 积累量达到较高水平, 具有一定的抑制活性, 使胰蛋白酶剩余活力很低。而有近 30% 的

植株 CpTI 相对表达量低于 0.5%，有个别的几乎等同于对照。

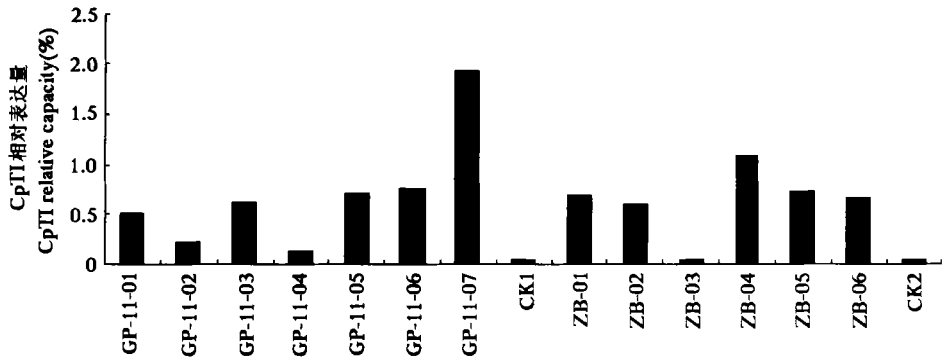


图2 转 *sck* 基因大白菜植株 CpTI 的相对表达量  
Fig. 2 CpTI relative capacity of transgenic Chinese cabbage plants transferred by *sck* gene

### 2.5 转基因植株的饲虫试验

检测结果表明: 菜青虫被饲养 7 d 后, 转基因植株的叶片比非转基因植株的叶片被危害的程度轻, 后者只剩下叶脉和部分残缺的叶片 (表 2, 插页 1 图版, E); 昆虫的生物总量也远远低于对照, 其中 GP 11-07 的昆虫生物总量只有对照的 52.5%, ‘GP 11-03’、‘GP 11-05’、‘ZB-01’、‘ZB-04’ 等植株上的昆虫生物总量也只有对照的 53.3%~65.8%。可见 CpTI 在转基因大白菜中的表达使菜青虫发育受到了很大抑制。从我们观察来看, 转基因大白菜使菜青虫发育减缓, 即延长了菜青虫世代周期, 在一定时间内可以减少害虫世代, 降低繁殖密度。从昆虫致死率上看, 各植株之间以及与对照相比, 差异并不明显, 这表明 CpTI 的表达量还不足以致虫于死地, 尚可以维持菜青虫完成生育期。对于后期成虫的产卵能力是否有影响还在持续调查中。结合 CpTI 相对表达量测定结果, 转基因植株 CpTI 抑制活性与抗虫能力基本吻合, 如 ‘GP 11-07’ 和 ‘ZB-04’ 的抗虫能力与其体内 CpTI 相对表达量有着明显的相关关系。此外, 转基因植株在田间自然抗虫鉴定也显示了一定的抗虫能力, 而非转化植株对照的抗虫能力较低 (见插页 1 图版, F)。

表2 转 *sck* 基因大白菜植株室内抗虫性鉴定  
Table 2 Evaluation on insect resistance of transgenic Chinese cabbage plants transferred by *sck* gene

株 系	致 死 率	生物总量***	叶片受损级别
Line	Mortality (%)	Biomass (mg)	Leaf damage level
GP 11-01	6.67	342.5+ 21.8	2
GP 11-02	13.34	388.4+ 17.5	3
GP 11-03	20.00	276.4+ 21.8	1
GP 11-04	0	400.7+ 15.7	3
GP 11-05	13.34	270.7+ 20.1	1
GP 11-06	6.67	356.2+ 11.7	2
GP 11-07	40	221.4+ 31.2	1
GP 11-CK*	0	420.3+ 25.6	4
ZB-01	13.34	265.8+ 26.3	1
ZB-02	20	332.3+ 18.7	2
ZB-03	0	460.8+ 15.9	4
ZB-04	33.34	238.6+ 16.3	1
ZB-05	13.34	307.1+ 21.3	2
ZB-06	20	317.9+ 31.6	2
ZB-CK**	0	447.5+ 27.5	4

\* 表示基因型 ‘GP 11’ 未转化植株作为对照; \*\* 表示基因型 ‘中白 4 号’ 未转化植株作为对照; \*\*\* 数值为平均值 ± 标准差。

\* The control of transgenic ‘GP 11’ plants; \*\* The control of transgenic ‘Zhongbai 4’ plants; \*\*\* All values are means ± S. D.

### 3 讨论

Hilder 等研究认为转基因烟草中外源 CpTI 蛋白占可溶性总蛋白的 0.8% 时, 抗虫效果才比较明显; 在 0.5%~0.8% 之间为中等表达水平。本试验中 *cpTi* 基因经细胞内定位修饰后, 多数转基因大白菜植株 CpTI 蛋白含量占可溶性总蛋白的 0.5% 以上, 最高可达 1.9%。抗虫性分析也证实, 转基因植株的抗菜青虫能力与其体内 CpTI 含量存在着明显的相关关系。同样的结果在棉花<sup>[2]</sup>和杨树<sup>[3]</sup>中也得到了证明。这表明内质网定位修饰提高了转基因植株中外源 CpTI 蛋白的积累水平, 从而有助于得

到高抗菜青虫等害虫的转基因植株。但在实验中发现有近 30% 的转基因植株抗虫性与对照相差不大, 有个别的还低于对照, 这可能与转基因沉默或失活有关。外源基因整合到基因组中后, 其在植物体内的表达调控是一个相当复杂的过程, 可能由于某种原因不表达或表达后不能正常翻译, 无法表现出理想的抗虫效应。这些猜测还需进一步结合 northern blot 和 western blot 等分析手段来加以验证。另外, 转基因植株已正常开花并自交结籽, 收获的种子将用于分析后代 *scK* 基因的分离情况和选育抗虫转基因大白菜纯合系。

## 参考文献:

- 1 Hilder V A, Barker R F, Samour R A, et al. Protein and cDNA sequences of Bowman's Birk protease inhibitor from the cowpea (*Vigna unguiculata* L. var. *wolpe*). *Plant Mol. Biol.*, 1989, 13: 701~710
- 2 王 伟, 朱 祯, 邓朝阳, 等. 陆地棉栽培品种新陆早 1 号转基因抗虫棉植株的获得. *高技术通讯*, 1998, 8: 1~5
- 3 郝桂霞, 朱 祯, 朱之悌, 等. 豇豆胰蛋白酶抑制剂基因转化毛白杨的研究. *植物学报*, 1999, 41 (12): 1276~1282
- 4 Zhang F L, Takahata Y, Watanabe M, et al. *Agrobacterium* mediated transformation of cotyledonary explants of Chinese cabbage (*Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis*). *Plant Cell Rep.*, 2000, 19: 569~575
- 5 杨广东, 李燕娥, 上官小霞. 大白菜遗传转化体系优化的研究. *园艺学进展*, 2000, 4: 300~304
- 6 刘春明, 朱 祯, 周兆澜, 等. 豇豆胰蛋白酶抑制剂 cDNA 在大肠杆菌中的克隆和表达. *生物工程学报*, 1993, 9: 152~157
- 7 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular cloning: A laboratory manual*, 2nd ed. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1989. 565~572
- 8 Erlanger B F, Kokowsky N, Cohen W. The preparation and properties of two new chromogenic substrate of trypsin. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1961, 95: 271~278

## Obtaining Transgenic Plants of Chinese Cabbage Resistant to *Pieris rapae* L. with Modified CpTI Gene (*scK*)

Yang Guangdong<sup>1,2</sup>, Zhu Zhen<sup>3</sup>, Li Yan'e<sup>2</sup>, Zhu Zhujun<sup>1</sup>, Xiao Guifang<sup>3</sup>, and Wei Xiaoli<sup>3</sup>  
(<sup>1</sup>Department of Horticulture, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China; <sup>2</sup>Cotton Research Institute, Shanxi Academy of Agricultural Sciences, Yuncheng 044000, China; <sup>3</sup>Institute of Genetics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

**Abstract:** Modified CpTI (Cowpea Trypsin Inhibitor) gene (*scK*) was successfully transferred into Chinese cabbage (*Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis*) varieties 'GP-11' and 'Zhongbai 4' mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. Kanamycin resistant plants were obtained from cotyledons with petiole. PCR and Southern blot assays confirmed that *scK* gene was integrated into Chinese cabbage genome DNA. The test about expression of CpTI inhibitory activity indicated that almost every transgenic plant had ability to inhibit bovine trypsin, and non-transformed plants had lower activity. Insect-tolerance of the transgenic plants to *Pieris rapae* L. were observed in the laboratory and field which showed some transgenic plants had strong resistance to this pest.

**Key words:** Chinese cabbage; *scK*; *Agrobacterium tumefaciens*; CpTI relative capacity; Insect-tolerance

### 新书推荐

### 基因工程原理 (第二版) 上、下册 吴乃虎著译

本书由科学出版社出版。全书共十二章, 分上下两册, 书末附有基因工程名词术语解释及索引。

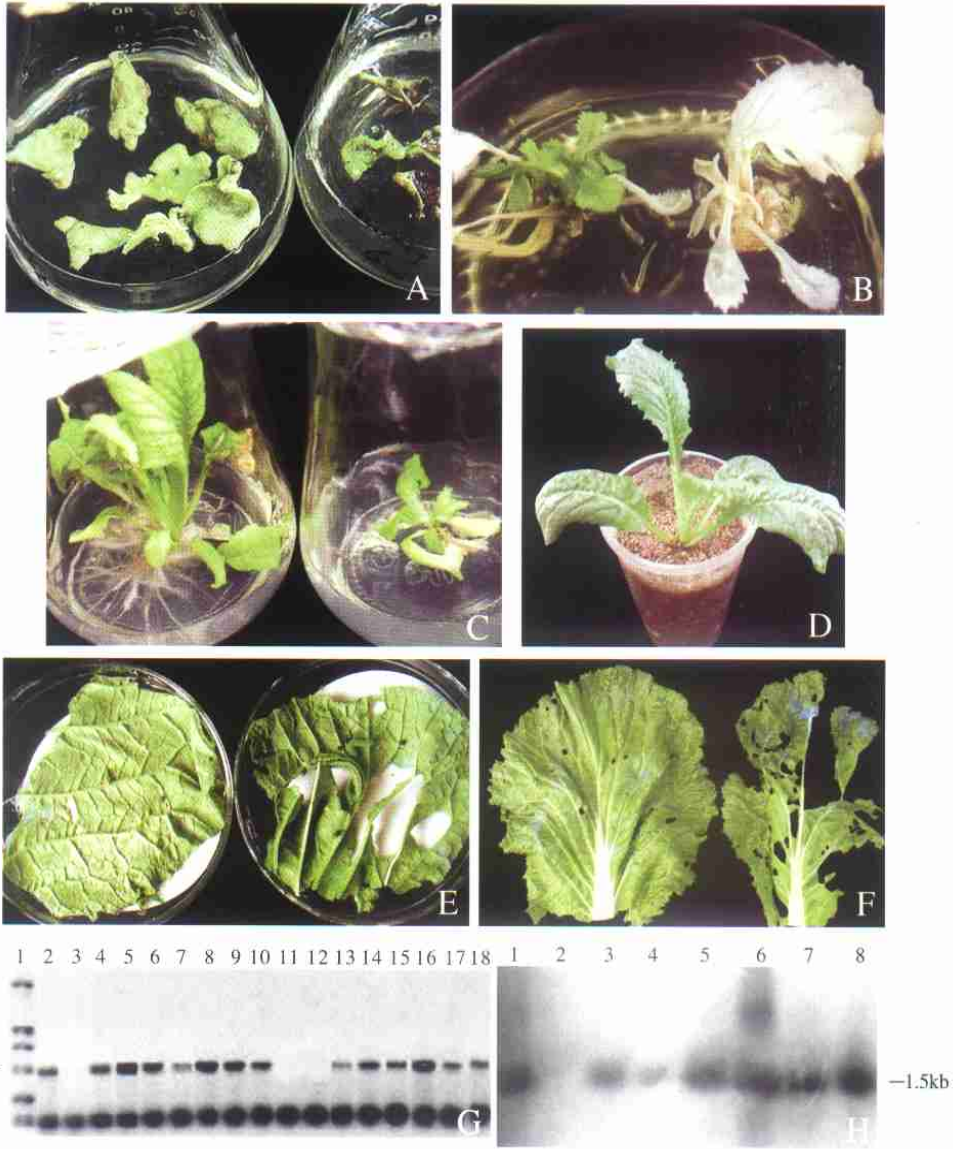
上册: 一至六章 (基因与基因工程、基因操作的主要技术原理、基因克隆的酶学基础、基因克隆的质粒载体、噬菌体载体和柯斯载体、基因的分离与鉴定)。定价 58 元 (含邮费)。

下册: 七至十二章 (基因的表达与调节、真核基因在大肠杆菌中的表达、植物基因工程、哺乳动物基因工程、重组 DNA 与现代生物技术、重组 DNA 与医学研究)。定价 78 元 (含邮费)。

购书者请通过邮局汇款至北京中关村南大街 12 号中国农科院蔬菜花卉所《园艺学报》编辑部, 邮编 100081。

杨广东等：大白菜转修饰豇豆胰蛋白酶抑制剂基因获得抗虫植株

Yang Guangdong, et al. Obtaining Transgenic Plants of Chinese Cabbage Resistant to *Pieris rapae* L. with Modified CPTI Gene(sck)



图版说明：A. 外植体诱导抗性芽（左），对照逐渐褐化（右）；B. 转化芽在筛选培养基上正常伸长并保持绿色（左），非转化芽则白化死亡（右）；C. 抗性小苗在生根培养基上生根（左），非转化小苗逐渐萎缩死亡（右）；D. 正常生根的抗性小苗移入土体中；E. 抗性植株室内抗虫性分析，左为抗性植株，右为对照；F. 抗性植株田间自然抗虫性观察，左为抗性植株，右为对照；G. 转化植株的PCR分析（1. DL2000分子量标志；2. 阳性对照，模板为 pBinΩSCK；3. 阴性对照，模板为非转化植株DNA；4-18. 抗性植株，其中4-12为基因型“GP-11”，13-18为基因型“中白4号”）；H. 转化植株的 Southern blot 分析（1. 阳性对照，*SalI*酶切 pBinΩSCK；2. 阴性对照，*SalI*酶切非转化植株基因 DNA；3-8. *SalI*酶切转基因植株 GP-11-03、GP-11-05、GP-11-06、GP-11-07、ZB-04 和 ZB-05 基因组 DNA）。

**Explanation of plates:** A. Regenerated shoots induced from explants (left), CK was slowly black(right); B. Regenerated shoots elongating in filter medium and keeping green(left), non-transformed shoot was slowly white and dead(right); C. Kan<sup>r</sup> shoot rooted in root medium(left), non-transformed shoot was withered(right); D. Kan<sup>r</sup> plantlet transplanted into pot; E. Evaluation on insect resistant in room, kan<sup>r</sup> plant(left) and non-transformed(right); F. Survey on insect resistant in the field, kan<sup>r</sup> plant (left) and non-transformed plant (right); G. PCR analysis on transformed plants (1. DL2000marker; 2. pBinΩSCK plasmid as positive control; 3. nontransformed plants as negative control; 4-18, transformed plants); H. Southern blot analysis on transformed plants (1. pBinΩSCK digested with *SalI* as positive control; 2. nontransformed plants as negative control; 3-8, transformed plants).