遗传 HEREDITAS (Beijing) 2011 年 月, 33(5): 431－436
ISSN 0253-9772 www.chinagene.cn 综 述

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2011.00431

转基因技术与大豆品质改良

程浩, 金杭霞, 盖钧镒, 喻德跃

南京农业大学国家大豆改良中心, 作物遗传与种质创新国家重点实验室, 南京 210095

摘要: 大豆是重要的食用油、食用蛋白和饲用蛋白原料。应用转基因技术对调节大豆品质形成的关键基因进行定向操作, 可大大加速优质大豆品种的选育进程, 培育出适合不同消费需求的多样化优质大豆品种。文章主要综述了近年来转基因技术在大豆品质性状改良方面的应用进展, 同时也简要介绍了目前已经发展起来的安全转基因技术。

关键词: 大豆; 品质改良; 安全转基因技术

Transgenic technology and soybean quality improvement

CHENG Hao, JIN Hang-Xia, GAI Jun-Yi, YU De-Yue

National Center for Soybean Improvement, National Key Laboratory of Crop Genetics and Germplasm Enhancement, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, *China*

Abstract: Soybean is an important source of edible oil, protein and protein diet. The breeding process of high quality soybean can be accelerated via employment of transgenic technology, by which the key genes for soybean quality traits could be directly manipulated. Thus, various soybean varieties could be bred to fulfill different needs for specific consumers. Here, we reviewed the contribution of transgenic technology to improvement of soybean qualities in recent years. We also introduce some newly developed safe transgenic technologies and hope this information could relieve some concerns on the GM food.

Keywords: soybean; quality Improvement; safe transgenic technology

大豆[*Glycine max* (L.) Merr.]是重要的食用油、食用蛋白和饲用蛋白原料。目前全国食用大豆年消费量在 800 万吨以上[1], 大豆油消费量超过 900 万吨, 占植物油总消费量的 40%以上[2], 饲用豆粕消费量超过 3 000 万吨[3], 约占国内饲料工业蛋白原料的 60%[4], 是肉、蛋、奶中蛋白质的间接来源。大豆对保证城乡居民植物蛋白和油脂供应有着不可替代的作用。目前中国大豆年产量位列美国、巴西和阿根廷之后, 在世界大豆生产国中居第四, 但大豆加工和消费量居世界第二, 进口量居世界第一, 且每年的进口量呈上升趋势, 2009 年的进口量达 4 255 万吨, 连续第 5 年创下历史最高纪录[1]。

转基因技术可打破物种界限, 对基因进行定向改造、重组和转移, 在解决常规育种技术难以克服的产量、品质、多抗等性状协调改良方面发挥了重要作用。利用转基因技术对控制大豆品质形成关键

收稿日期: 2010−10−25; 修回日期: 2010−12−15
基金项目: 转基因生物新品种培育重大科技专项(编号: 2008ZX08004-003)资助
作者简介: 程浩, 博士, 研究方向: 大豆基因工程。Tel: 025-84396463; E-mail: jenny21star@njau.edu.cn
通讯作者: 喻德跃, 博士, 教授, 研究方向: 植物分子遗传与生物技术。E-mail: dyyu@njau.edu.cn

基因进行定向操作，可大大加速优质大豆品种的选育进程，培育出适合不同消费需求的多样化大豆品种，对提高大豆的营养价值、保证大豆食品的安全性、增进居民健康有重要意义。

目前，大豆品质改良的目标除了提高蛋白、油脂含量外，还包括改良某些特定营养成分的含量，如提高具有保健功能的脂肪酸(如油酸、γ- 亚麻酸等)含量，提高含硫氨基酸(如甲硫氨酸、半胱氨酸)含量等[5]，也包括对大豆中所含的生物活性物质(如异黄酮、维生素 E 等)进行定向改良，使具有这些优良品质性状的大豆产品既可以作为普通食品来源，也可以作为营养保健品满足特殊人群的需求。

大豆转基因的方法主要有农杆菌介导法、基因枪法和花粉管通道法等[6]，其中，农杆菌介导法和基因枪法最为常用。目前已经有较多的文献对大豆转基因技术进行了综述[6~10]，本文主要综述近年来转基因技术在大豆品质相关性状改良方面的国内外进展，同时也简要介绍目前已经发展起来的安全转基因技术，以期从转基因技术方面尽可能减少消费者对转基因食品安全问题的顾虑。

1 大豆品质改良研究进展

1.1 大豆油脂改良

大豆是重要的油料作物，含脂肪 16%~22%，大豆油约占食用、饲用和工业用植物油的 30%。大豆油脂的主要成分是棕榈酸(16∶0)，油酸(18∶1)，亚油酸(18∶2) 和亚麻酸(18∶3)，其中以多不饱和脂肪酸为主，如亚油酸、亚麻酸等，占总脂肪酸量的 60%左右；大豆的单不饱和脂肪酸，主要是油酸，占总脂肪酸量的 20%左右；大豆油脂中的饱和脂肪酸则仅占 20%左右，主要为棕榈酸和硬脂酸[11]。除脂肪酸甘油酯外，大豆油脂中还含有 1.1%~3.2%的磷脂，主要为卵磷脂、脑磷脂及磷脂酰肌醇[12]。

1.1.1 提高大豆油脂总含量

油脂含量的提高可以通过增加油脂合成途径的酶或者抑制油脂合成竞争途径的酶来实现。Rao 等[13]将酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)的 *SCL1* 基因与种子特异性启动子 phaseolin 一起导入大豆体细胞胚胎中，在 T2 和 T3 代大豆种子中油脂含量都得到提高，在一个 T3 代的大豆材料中油脂含量更是提高了 3.2%，但是这些种子油份的提高伴随着蛋白含量的降低。大豆脂肪氧化酶(Lipoxygenase)是大豆主要营养抑制因子之一，大豆中存在约占总蛋白含量 1%~2%的脂肪氧化酶，作为蛋白质的大豆脂肪氧化酶含量的减少，将有可能使大豆脂肪含量增加。马建等[14]通过花粉管通道法将具有 hpRNA 和 ihpRNA 结构的大豆脂肪氧化酶基因 RNAi 表达载体导入大豆，抑制了大豆脂肪氧化酶基因的表达，大豆的脂肪氧化酶含量比对照平均降低 55%~77%，而转基因植株脂肪含量得到提升，脂肪平均含量比非转基因对照提高 0.74~1.18 个百分点，最大提高了 1.16 个百分点，达到 24.76%，但是该研究中转基因材料的蛋白总含量也有降低。

大豆种子中的油脂总含量与蛋白总含量一般呈负相关[15]，为了打破这种关联性，可以通过转基因技术导入专一调控油脂或者蛋白合成代谢途径的特异基因，在不影响其他代谢途径的前提下，仅对一条代谢途径进行特异调控。Lardizabal 等[16]将来源于土壤拉曼毛霉(*Umbelopsis ramanniana*)的二酰基甘油酰基转移酶 2A (Diacylglycerol acyltransferase 2A, DGAT2A)基因转入大豆中，使得成熟种子中的油脂净重含量提高了 1.5%。该研究是通过转基因的方法提高大豆种子的油脂总含量而对蛋白含量和产量没有明显影响的首次报道，对于提高大豆油脂总含量育种具有重要意义。

1.1.2 提高大豆油酸含量

油酸是一种相对稳定、不易氧化的单不饱和脂肪酸，在高油温时更稳定、保质期更长，并且有降低胆固醇和血脂等营养价值。而亚油酸等则遇热不稳定，易氧化。

在油脂合成途径中，油酸经$\triangle^{12}$-脂肪酸脱氢酶和$\triangle^{15}$-脂肪酸脱氢酶作用分别生成亚油酸和亚麻酸。因此抑制$\triangle^{12}$-脂肪酸脱氢酶基因(*FAD2*)的表达，能降低亚油酸生成，提高油酸含量。Kinney 等[17]运用基因枪技术抑制$\triangle^{12}$-脂肪酸脱氢酶基因的表达，得到油酸含量达 88%的转基因大豆。Buhr 等[18]通过抑制大豆$\triangle^{12}$-脂肪酸脱氢酶基因(*FAD2*)和 ACP-棕榈酸硫激酶基因(*FatB*)的表达，使大豆油酸含量提高到 91%，同时棕榈酸含量下降到 2.2%，该转基因大豆被命名为 335-13，已经应用于生产。Wang 等[19]

通过含有大豆 *FAD2* 基因片段的 RNAi 载体转化大豆, 获得油酸含量为 81.9%的转基因大豆。

特别值得注意的是, 近期美国农业部(USDA)批准了杜邦 (Dupont Co.)旗下种子事业先锋良种公司(Pioneer Hi-Bred)开发的一种转基因高油酸大豆的环境释放试验。该转基因大豆被称为“充满油酸(高油酸)的大豆”(Plenish high-oleic soybeans), 其产出的豆油油酸含量＞75%, 且饱和脂肪酸比目前商品豆油减少了 20%, 具有更好的耐高温特性和更长的保质期。该公司已于 2010 年 6 月获得该转基因大豆的上市许可, 并计划于 2012 年实现商业化[20]。这种新的转基因大豆的特性或许能帮助生物技术工业实现已有 20 年之久的承诺: 改良农作物的营养价值。迄今为止, 大多数商业化的生物技术农作物被设计成具有抗虫害、抗除草剂的特性, 多数情况下, 这样的特性的受益者仅是农民, 而不是食品工业或消费者[20]。

1.1.3　提高大豆多不饱和脂肪酸含量

多不饱和脂肪酸的代谢从油酸开始, 油酸在$\triangle^{12}$-脂肪酸脱氢酶的催化下形成亚油酸, 亚油酸可以在$\triangle^{15}$-脂肪酸脱氢酶催化下形成 α-亚麻酸(α-linolenic acid, ALA), 从而进入多不饱和脂肪酸代谢径。亚油酸和 α-亚麻酸经$\triangle^{6}$-脂肪酸脱氢酶的催化分别转化成 γ-亚麻酸(γ-linolenic acid, GLA)和十八碳四烯酸(Octadecatetraenoic acid, OTA)。

γ-亚麻酸和十八碳四烯酸具有保健作用。$\triangle^{6}$-脂肪酸脱氢酶是 γ-亚麻酸和十八碳四烯酸生物合成的关键酶。Sato 等[21]将琉璃苣(Borago officinalis)的$\triangle^{6}$-脂肪酸脱氢酶基因整合到大豆染色体中, 获得了无筛选标记的转基因大豆, 使 T_1 代转基因大豆的 γ-亚麻酸含量从 3.4%提高到 28.7%, 同时十八碳四烯酸含量从 0.6%提高到 4.2%。Eckert 等[22]将两种分别带有外源基因(琉璃苣的$\triangle^{6}$-脂肪酸脱氢酶基因和拟南芥的$\triangle^{15}$-脂肪酸脱氢酶基因)的转基因大豆进行杂交, 将琉璃苣的$\triangle^{6}$-脂肪酸脱氢酶基因和拟南芥的$\triangle^{15}$-脂肪酸脱氢酶基因聚合到一个株系中, 使十八碳四烯酸含量超过 29%, ω-3 脂肪酸在总脂肪酸中的比例达到 60%以上。

1.2　大豆蛋白质及组分改良

大豆富含优质蛋白质(一般可达 40%以上), 是粮食作物中蛋白质含量最丰富的作物, 约为玉米蛋白质含量的 3 倍、小麦的 5 倍、水稻的 10 倍。组成大豆蛋白质的氨基酸有 18 种之多, 富含 8 种人体所必需的氨基酸。

1.2.1　提高大豆蛋白质含量

根据蛋白质溶解特性, 大豆蛋白可分为清蛋白和球蛋白两类, 清蛋白一般占大豆蛋白质的 5%左右, 球蛋白约占 90%左右。因此提高大豆球蛋白含量能够提高大豆总蛋白含量。El-Shemy 等[23]将由大豆球蛋白基因 *Gy1* 改造的 *V3-1* 基因通过基因枪技术转入大豆中, 转基因大豆球蛋白含量增加, 改良了大豆的营养品质。

1.2.2　提高大豆含硫氨基酸

大豆蛋白质同其他农作物一样也存在氨基酸不均衡的现象, 大豆蛋白中仅有少量甲硫氨酸和半胱氨酸等含硫氨基酸。Dinkins 等[24] 利用基因枪技术将 15 kDa δ-玉米醇溶蛋白基因转入大豆中, 对转基因后代进行氨基酸组分分析, 发现甲硫氨酸提高了 12 %~20 %、半胱氨酸提高了 15 %~35 %, 而其他的氨基酸组分没有发生明显的变化。Li 等[25]通过基因枪技术获得转 27 kDa γ-玉米醇溶蛋白基因的大豆, 转基因大豆种子的甲硫氨酸含量比对照提高了 15.49%到 18.57%, 半胱氨酸含量比对照提高 26.97%到 29.33%。

1.2.3　增加特殊蛋白

大豆蛋白中没有一些动物蛋白所特有的营养成份, 但通过基因工程技术, 可以获得含有特殊动物蛋白的转基因大豆。Maughan 等[26]就曾将牛奶蛋白β-酪蛋白基因导入大豆基因组, 获得了含有 β-酪蛋白的转基因大豆种子。

1.2.4　消除大豆过敏蛋白原

大豆又是人类主要的蛋白来源之一, 但大豆蛋白也属于 8 类主要致过敏食物之一。Ogawa 等[27]用免疫印迹技术, 识别了大约 15 种大豆过敏原, 其中 3 种是主要的过敏原被分别命名为 Gly m Bd 28K、Gly m Bd 30K 和 Gly m Bd 60K, 都存在于 7S 球蛋白组分中。通过对主要过敏蛋白原进行改良, 能够降低过敏发生的机率。Herman 等[28]通过基因沉默技术, 抑制了大豆种子中一种主要过敏原 P34/Gly m Bd

30K 蛋白的合成。

1.2.5 减低大豆胰蛋白酶抑制剂

大豆胰蛋白酶抑制剂(Trypsin inhibitor, TI)是大豆主要营养抑制因子之一，主要抑制动物体内分泌的胰蛋白酶活性，降低蛋白质消化吸收和造成胰腺肿大，是影响大豆品质的主要原因之一。因此，培育低含量或不含胰蛋白酶抑制剂大豆品种具有重要的意义。吕品等[29]构建了大豆胰蛋白酶抑制剂基因 *KSTI3* 的 RNAi 载体，通过花粉管通道法将其导入大豆，获得 T_0 代转基因大豆，张洪伟等[30]对其 T_1 代转基因大豆经 SDS-PAGE 方法测定胰蛋白酶抑制剂蛋白的表达，发现转基因大豆的胰蛋白酶抑制剂蛋白与对照相比表达量明显下降。

1.3 生物活性物质

大豆还含有维生素 E、卵磷脂、大豆异黄酮等营养物质和生理活性成分，具有营养和保健作用，适于各类“富贵病”患者食用。

大豆异黄酮是一类具有特殊功效的多酚类化合物，具有极高的保健作用。Yu 等[31]在大豆中表达了玉米 C1 和 R 转录因子，在激活大豆苯丙氨酸生物合成途径的基础上，通过抑制黄烷酮-3-羟化酶基因表达阻断异黄酮合成竞争途径，使转基因大豆种子中异黄酮含量提高了 4 倍以上。

Vitamin E 是一种脂溶性维生素，又称生育酚，是最主要的抗氧化剂之一。大豆中生育酚的含量不高，但利用基因工程手段可以提高大豆生育酚含量。Van Eenennaam 等[32]克隆了拟南芥维生素 E 合成途径中的 *At-VTE3* 基因，并将 *At-VTE3* 基因导入大豆中，转基因大豆后代的种子中 α-生育酚的含量比对照提高了 8 倍，而 δ-生育酚的含量降低到 2%。

1.4 降低大豆植酸含量

植酸是大豆营养抑制因子，是大豆食品不易消化的原因之一。植酸与钙、镁、钾、钠、锌、铁、铜、锰等易形成不能被消化吸收的植酸盐复合物，从而影响动物体内各种营养物质的代谢。Chiera 等[33]通过在大豆中过量表达大豆植酸酶基因(*GmPhy*)降低了转基因大豆种子中的植酸含量。Nunes 等[34]利用 RNAi 技术沉默大豆中与植酸合成有关的 *GmMIPS1* 基因，从而大幅度降低了转基因大豆植酸含量，最大下降比例超过 94.5%。

2 转基因安全技术

获准商业化种植的优质转基因大豆品种包括高油酸大豆、低亚麻酸大豆、高油大豆、高必需氨基酸大豆等[35]。在此类转基因大豆中，外源基因的导入使目标品质成分生物合成途径中关键酶的活性增强，或使竞争性代谢支路中关键酶的活性被抑制，从而使目标性状得以改良。由于品质相关外源基因的插入不会产生大豆中原先不存在的新物质，因而，此类转基因大豆的食用安全性主要取决于标记基因。虽然目前商品化转基因大豆所用的标记基因均未发现产生有害物质，但是提高转基因大豆标记基因安全性还是转基因大豆的发展趋势。

目前，提高转基因植物中选择标记基因安全性的策略主要包括：(1) 使用生物安全标记基因；(2) 剔除转基因植株中的标记基因[36, 37]。

2.1 安全标记基因的应用

使用安全标记基因作选择标记的转化系统与传统的转化系统不同，它不是将非转化细胞杀死，而是使转化细胞处于某个有利的代谢条件下，从而筛选出转化细胞[38]。传统的选择系统称为负选择系统，相应地这种选择系统称之为正选择系统[36, 38]。正选择系统的主要优点在于选择剂无毒副作用，而且在多数情况下有利于转化植株的再生，从而提高转化率。

目前，已经报道的安全标记基因主要包括：(1) 与糖代谢相关的基因; (2) 与氨基酸代谢相关的基因; (3) 与激素相关的基因; (4) 化合物解毒酶基因; (5) 抗逆基因; (6) 叶绿体合成中的关键酶基因等[37]。采用生物安全标记基因是目前提高转基因植物安全性最有效且应用最广泛的方法。部分安全选择标记基因还可以兼为目的基因，特别是一些抗逆基因不仅能作为转化选择标记，而且可以提高转基因植物抗逆性。因此生物安全标记基因的研究是未来提高转基因植物安全性研究的主要方向，该技术的发展有利于转基因植物的产业化。

2.2 剔除抗性标记基因

在获得转基因植物后，标记基因的存在是多余的，甚至是有潜在的危害，是公众关注转基因植物安全的

焦点。利用转基因植株后代遗传重组使抗性选择标记与目的基因分离, 或利用位点特异性酶将抗性标记基因切除可以获得无抗性选择标记的转基因植物。目前已经报道的剔除转基因植物选择标记基因的方法主要包括 4 种: (1) 位点特异性重组酶系统; (2) 共转化法; (3) 转座子系统; (4) 染色体内重组系统[37]。

其中特别值得注意的是一种称为"外源基因清除"的标记剔除技术(GM-gene-deletor)[39]。为了获得高效的基因删除系统, 彻底删除转基因植物中所有的外源基因, 解决转基因植物可能带来的生物安全性问题, Luo 等[39]针对现有重组酶系统存在的不足, 对影响删除效率的两个关键因素: 重组酶的特异性识别位点和重组酶基因的表达进行了研究, 构建了具有融合识别位点的高效基因自动删除系统。在转基因烟草的花粉和种子中, 所有外源基因都被 100%地删除, 首次实现了在转基因植物中获得非转基因的花粉和种子, 为解决由于转基因植物花粉或种子扩散引起基因逃逸的问题, 提供了一个可行的技术手段。这项技术对于以种子为主要收获目标的大豆来说, 具有重要的应用价值。

2.3 ZFNs 技术

Townsend 等[40]报道, 利用一种独特的酶, 称为锌指核酸酶(Zinc-finger nucleases, ZFNs), 用于改变烟草植物细胞中的单基因, 发生改变的细胞在植株发育成熟后便具有了抗除草剂性状。 ZFNs 属于工程酶, 其作用是与特定 DNA 序列结合并将基因修饰信息导入结合区域或引至区域周围。

ZFNs 技术的使用, 基于对基因功能及其在不同材料中的等位基因信息的了解, 如果在某个材料中, 发现了优异等位基因, 则可以在高产、优质的推广品种中修饰该基因位点, 使其在不导入外源基因的条件下, 获得所需优异性状。这是学习大自然自己的创造方式来改造生物, 其变异方式与自然变异相似, 或许可以使人们对转基因作物的担心降至最低。该技术值得在大豆上研究和利用。

3 展 望

大豆转基因技术目前依然受到基因型、再生体系等多种因素的限制, 转化效率尚有待提高。通过创新转化受体、新型载体、时空表达调控元件、叶绿体遗传转化、定点整合、多基因转化等新型转化方法, 以及无选择标记基因的安全转基因技术, 提高大豆遗传转化的效率和安全性, 是大豆转基因技术发展的主要方向。

虽然转基因技术已经应用在大豆品质改良的各个方面, 而且也取得了一些进展, 但是大部分报道还是局限于单个基因单个性状的改良。然而, 多性状聚合大豆品种已经成为新一代转基因大豆育种的重点, 目前主要是在抗草甘膦性状的基础上, 添加品质和抗性性状。2005 年, 孟山都公司推出了抗除草剂和低亚油酸大豆(VISTIVE 大豆), 聚合抗除草剂、低亚麻酸、高饲用营养、高聚球蛋白(β-conglycinin)4 个优良性状的转基因大豆品种, 这已经成为转基因大豆研发的重要内容。

进而, 在满足基本的食用需求后, 向消费者提供更加健康和安全的大豆是转基因大豆研发的又一个重要方向。孟山都公司在 2010 年初宣布其研制的新型大豆"SDA omega-3"进入研发的第四阶段(即已经历了 5~10 年的研究, 预计 1~3 年内进入商业化生产), 已通过美国食品和药物管理局(FDA)安全认证。孟山都表示"SDA omega-3"是一种类似于鱼油的脂肪酸, 这种脂肪酸以前只见于鱼类和鱼油中, 食用含有这种脂肪酸的大豆油能够有效改善人类心血管的健康状况。应用转基因技术在改良传统大豆品质性状的基础上, 根据不同市场需要, 培育出具有特殊利用价值的高附加值大豆新品种, 从而向医疗保健、化工能源等领域拓展。

参考文献(References):

[1] 王恩慧. 中国大豆消费现状与展望. 农业展望, 2010, 6(5): 33–36.
[2] 王永刚. 中国油脂油料供求、贸易、政策的现状与前景. 粮食科技与经济, 2009, 34(6): 11–13.
[3] 王恩慧. 2010 年上半年大豆豆粕市场回顾及下半年行情展望. 饲料广角, 2010, (14): 14–18.
[4] 石彦国. 调整产业结构 确保大豆产业健康持续发展. 中国食品学报, 2010, 10(4): 1–7.
[5] 蔡一荣, 李望丰, 刘立侠, 许守民. 大豆品质改良的基因工程育种概况. 大豆科学, 2006, 25(1): 62–66.
[6] 李涛, 蒋春志, 赵青松, 张孟臣. 大豆转基因方法的研究进展. 安徽农业科学, 2009, 37(22): 10391–10394.
[7] 邓向阳, 卫志明. 大豆转化技术. 植物生理学通讯, 1998, 34(5): 381–387.
[8] 王萍, 王罡, 季静, 吴颖. 大豆转基因体系的研究进展. 遗传, 2004, 26(6): 969–976.
[9] 刘海坤, 卫志明. 大豆遗传转化研究进展. 植物生理与分子生物学学报, 2005, 31(2): 126–134.

[10] 武小霞, 李文滨, 张淑珍. 我国大豆转基因研究进展. 大豆科学, 2005, 24(2): 144–149.
[11] 吴加根. 谷物与大豆食品工艺学. 北京: 中国轻工业出版社, 1997.
[12] 谈黎明. 大豆磷脂生理功能及其应用. 粮食与油脂, 1999(2): 36–38.
[13] Rao SS, Hildebrand D. Changes in oil content of transgenic soybeans expressing the yeast *SLC1* gene. *Lipids*, 2009, 44(10): 945–951.
[14] 马建. 大豆脂肪氧化酶基因 RNAi 表达载体的构建及表达调控的研究[学位论文].吉林农业大学, 2008.
[15] Hurburgh CR, Brumm TJ, Guinn JM, Hartwig RA. Protein and oil patterns in US and world soybean markets. *J Am Oil Chem Soc*, 1990, 67(12): 966–973.
[16] Lardizabal K, Effertz R, Levering C, Mai J, Pedroso MC, Jury T, Aasen E, Gruys K, Bennett K. Expression of *Umbelopsis ramanniana* DGAT2A in seed increases oil in soybean. *Plant Physiol*, 2008, 148(1): 89–96.
[17] Kinney AJ, Knowlton S. Designer oils: the high oleic acid soybean. In: Genetic Modification in the Food Industry. London: Chapman and Hall, 1998, 193–213.
[18] Buhr T, Sato S, Ebrahim F, Xing AQ, Zhou Y, Mathiesen M, Schweiger B, Kinney A, Staswick P, Clemente T. Ribozyme termination of RNA transcripts down - regulate seed fatty acid genes in transgenic soybean. *Plant J*, 2002, 30(2): 155–163.
[19] Wang GL, Xu YN. Hypocotyl-based *Agrobacte*rium-mediated transformation of soybean (Glycine max) and application for RNA interference. *Plant Cell Rep*, 2008, 27(7): 1177–1184.
[20] Waltz E. Food firms test fry Pioneer's trans fat-free soybean oil. *Nat Biotechnol*, 2010, 28(8): 769–770.
[21] Sato S, Xing AQ, Ye XG, Schweiger B, Kinney A, Graef G, Clemente T. Production of γ-linolenic acid and stearidonic acid in seeds of marker-free transgenic soybean. *Crop Sci*, 2004, 44(2): 646–652.
[22] Eckert H, LaVallee B, Schweiger BJ, Kinney AJ, Cahoon EB, Clemente T. Co-expression of the borage Δ^6 desaturase and the *Arabidopsis* Δ^{15} desaturase results in high accumulation of stearidonic acid in the seeds of transgenic soybean. *Planta*, 2006, 224(5): 1050–1057.
[23] El-Shemy HA, Khalafalla MM, Fujita K, Ishimoto M. Improvement of protein quality in transgenic soybean plants. *Biologia Plantarum*, 2007, 51(2): 277–284.
[24] Dinkins RD, Srinivasa Reddy MS, Meurer CA, Yan B, Trick H, Thibaud-Nissen F, Finer JJ, Parrott WA, Collins GB. Increased sulfur amino acids in soybean plants overexpressing the maize 15 kDa zein protein. *In Vitro Cell Dev Biol*, 2001, 37(6): 742–747.
[25] Li ZW, Meyer S, Essig JS, Liu Y, Schapaugh MA, Muthukrishnan S, Hainline BE, Trick HN. High-level expression of maize γ-zein protein in transgenic soybean (*Glycine max*). *Mol Breed*, 2005, 16(1): 11–20.
[26] Maughan PJ, Philip R, Cho MJ, Widholm JM, Vodkin LO. Biolistic transformation, expression, and inheritance of bovine β-casein in soybean (*Glycine max*). *In Vitro Cell Dev Biol*, 1999, 35(4): 344–349.
[27] Ogawa T, Bando N, Tsuji H, Okajima H, Nishikawa K, Sasaoka K. Investigation of the IgE-binding proteins in soybeans by immunoblotting with the sera of the soybean-sensitive patients with atopic dermatitis. *J Nutr Sci Vitaminol* 1991, 37(6): 555–565.
[28] Herman EM, Helm RM, Jung R, Kinney AJ. Genetic modification removes an immunodominant allergen from soybean. *Plant Physiol*, 2003, 132(1): 36–43.
[29] 吕品. 大豆胰蛋白酶抑制剂 KSTI3 基因的克隆及植物表达载体构建[学位论文].吉林农业大学, 2007.
[30] 张洪伟. 转移蛋白酶抑制剂基因 RNAi 表达载体转化大豆的遗传变异研究[学位论文]. 吉林农业大学, 2008.
[31] Yu O, Shi J, Hession AO, Maxwell CA, McGonigle B, Odell JT. Metabolic engineering to increase isoflavone biosynthesis in soybean seed. *Phytochemistry*, 2003, 63(7): 753–763.
[32] van Eenennaam AL, Lincoln K, Durrett TP, Valentin HE, Shewmaker CK, Thorne GM, Jiang J, Baszis SR, Levering CK, Aasen ED. Engineering vitamin E content: from Arabidopsis mutant to soy oil. *Plant Cell*, 2003, 15(12): 3007–3019.
[33] Chiera JM, Finer JJ, Grabau EA. Ectopic expression of a soybean phytase in developing seeds of *Glycine max* to improve phosphorus availability. *Plant Mol Biol*, 2004, 56(6): 895–904.
[34] Nunes ACS, Vianna GR, Cuneo F, Amaya-Farfán J, de Capdeville G, Rech EL, Aragão FJL. RNAi-mediated silencing of the *myo*-inositol-1-phosphate synthase gene (*GmMIPS1*) in transgenic soybean inhibited seed development and reduced phytate content. *Planta*, 2006, 224(1): 125–132.
[35] 孙东升. 转基因大豆与我国大豆产业发展. 安徽农业科学, 2006, 34(19): 5046–5047.
[36] 毛健民, 李俐俐. 无选择标记及安全选择标记转基因植物研究进展. 自然杂志, 2004, 26(1): 13–16.
[37] 李文凤, 季静, 王罡, 王海勇, 牛宝龙. 提高转基因植物标记基因安全性策略的研究进展. 中国农业科学, 2010, 43(9): 1761–1770.
[38] Joersbo M, Okkels FT. A novel principle for selection of transgenic plant cells: positive selection. *Plant Cell Rep*, 1996, 16(3–4): 219–221.
[39] Luo KM, Duan H, Zhao DG, Zheng XL, Deng W, Chen YQ, Stewart CN, McAvoy R, Jiang XN, Wu YH, He AG, Pei Y, Li Y. 'GM-gene-deletor': fused *loxP-FRT* recognition sequences dramatically improve the efficiency of FLP or CRE recombinase on transgene excision from pollen and seed of tobacco plants. *Plant Biotechnol J*, 2007, 5(2): 263–374.
[40] Townsend JA, Wright DA, Winfrey RJ, Fu FL, Maeder ML, Joung JK, Voytas DF. High-frequency modification of plant genes using engineered zinc-finger nucleases. *Nature*, 2009, 459(7245): 442–445.