

转基因技术在大豆性状改良上的应用

杜艳丽, 谢甫绋

(沈阳农业大学 大豆研究所, 辽宁 沈阳 110866)

**摘要:**随着我国大豆需求量的逐年增加, 培育超高产、优质、高抗性品种的需求变得越来越迫切。基因工程方法的应用作为作物遗传育种开辟了一条新的道路, 通过转基因技术, 将控制优良性状的基因整合到作物基因组中, 培育转基因植株, 可以准确的、有目的对作物的农艺性状进行定向改良。近年来, 功能基因组学的发展为转基因技术提供了新的指导。本文着重讲述了大豆遗传转化方法的新方向, 同时介绍了国内外转基因技术在大豆性状(抗除草剂、抗虫、抗病、抗逆、品质性状等)改良中的研究进展, 并对未来大豆转基因方向进行了展望。

**关键词:**转基因技术; 大豆; 功能基因组学; 性状; 遗传改良

**中图分类号:** S565.1      **文献标识码:** A      **DOI:** 10.11861/j.issn.1000-9841.2015.02.0320

Review on Application of Transgenic Technology in Soybean Traits Improvement

DU Yan-li, XIE Fu-ti

(Soybean Research Institute of Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China)

**Abstract:** With the increased soybean demand in China year by year, the development of super-high-yield, high quality and resistance of soybean became increasingly urgent. The application of genetic engineering for crop genetic breeding have been offered a new way, by the biotechnology, the genes which controlled the good traits could be integrated into the crops' genome, by the development of transgenic plants, the improvement of agronomic traits of crops would be more accurate, purposeful directionally. In recent years, the development of functional genomics provided a new guidance to transgenic technology. This paper was a review on the new direction of genetic transformation method in soybean and the progress of transgenic technology in the improvement of soybean traits which included herbicide tolerance, insect resistance, disease resistance, stress tolerance, quality traits and so on.

**Keywords:** Transgenic technology; Soybean; Functional genomics; Trait; Genetic improvement

大豆[*Glycine max* (L.) Merr.]属于豆科、蝶形花亚科、大豆属的二倍体( $2n=40$ )植物, 起源于中国, 后传入日本、欧洲、美国等地<sup>[1]</sup>。大豆营养丰富, 既是蛋白质作物, 又是油料作物, 可用作食品工业原料和饲用, 在作物轮作制中占有重要地位。随着人们对自身生活品质和养生保健等方面的意识的增加, 大豆逐渐发展成为备受人们欢迎的保健食品。大豆在国内外农产品市场上占有重要的地位, 因此提高大豆产量和优化大豆品质成为人们关注的热点。

作物新品种的培育, 一是通过常规育种手段, 二是采用常规育种手段与现代生物技术相结合的方法。常规育种方法很难使作物在产量、品质和抗性等方面产生大幅度改进, 因为控制产量的性状多数属于数量性状或多基因控制的质量性状, 很难从表型上进行判断, 这就需要育种人员具有较丰富的育种经验, 而且常规育种的工作量大、周期长; 且受作物遗传资源的限制, 寻找作物优良性状的难度

大。基因工程等生物技术手段在 20 世纪 80 年代迅速崛起, 基因工程的出现为作物遗传育种开辟了一条新的道路。通过转基因技术, 可将具有优良农艺性状的基因整合到作物基因组中, 从而获得具有优良性状的转基因作物。通过这条途径克服了植物远缘杂交的不亲和性, 可以准确的、有目的的对作物的品质等农艺性状进行定向的改良, 大大缩短作物的育种周期。分子生物学和功能基因组学的快速发展将给育种工作者带来更广阔的发展空间。

### 1 大豆遗传转化方法的新方向

随着人们对大豆油脂和蛋白质的需求增加, 全世界范围内通过转基因技术和功能基因组学来提高大豆的品质和产量变得越来越重要, 现有的大豆遗传分析和改良技术主要依靠重组再生和转化体系。目前, 大豆转化中比较成功的方法有农杆菌介导的遗传转化体系和基因枪遗传转化方法, 还有一

收稿日期: 2014-07-18  
基金项目: 国家转基因重大专项(2014ZX08004-004); 辽宁省科技厅项目(2014201007)。  
第一作者简介: 杜艳丽(1991-), 女, 硕士, 主要从事大豆遗传转化研究。E-mail: dyl0305@sina.cn。  
通讯作者: 谢甫绋(1966-), 男, 教授, 博导, 主要从事大豆株型育种和栽培研究。E-mail: snssoybean@sohu.com。

些其他的转化技术也比较常见,例如电击法<sup>[2]</sup>、PEG 法<sup>[3]</sup>、碳化硅介导法<sup>[4]</sup>、显微镜注射法<sup>[5]</sup>、叶绿体介导法<sup>[6]</sup>等。然而,这几种大豆遗传转化的方法都仅限于几个基因型中并且转化和筛选效率不高。因此,研究一种有效的、一致的遗传转化方法将会有助于促进大豆功能基因组学的发展和遗传转化技术的进步。

现最广泛使用的遗传转化方法多是农杆菌介导法,20 世纪 80 年代,Hinchee 等<sup>[7]</sup>首次以大豆品种 Peking 的子叶作为外植体,经农杆菌侵染,以抗生素作为筛选剂,获得了 6% 的含有报告基因 *gus* 基因和筛选基因 *npt II* 基因的转基因植株。此后,许多科学家对农杆菌介导法做了进一步的改良,以提高其转化效率<sup>[8-11]</sup>,此法具有拷贝数少、整合基因完整、遗传稳定、重复性好、能转化大片段的目的基因等特点。但其在转化中会无意识插入一些无用的抗生素标记和激活子等,这一问题可引发潜在的生物安全问题,如环境问题和人类健康问题等。为了克服这些潜在的危險,科学家们致力于发展无标记转基因植株方法,共转化<sup>[12]</sup>、专一位点的共转化<sup>[13]</sup>和转座子介导的转化<sup>[14]</sup>等方法由此诞生。这些方法中共转化系统是最常用于无标记转化植株的方法,其原理是将标记基因和目的基因放在两个独立的质粒上再转入植株基因组中,经转化植株后代的遗传重组,目的基因在后代中与标记基因分离,得到无选择标记基因的转化植株。大部分农杆菌可以包含多个 T-DNA,并且冠瘿瘤常与多个 T-DNA 共转化<sup>[15]</sup>。Kamori 等<sup>[12]</sup>通过试验找到一种合适的超级二元载体系统的共转化方法,已在水稻和烟草中生产出携带两个无标记 T-DNA 片段的特殊质粒。在 Komari 的基础上,Lu 等<sup>[17]</sup>进一步改进了质粒的构建方法,将两个独立的 T-DNA 序列改建成含双右边界 T-DNA 和一个左边界 T-DNA 的序列,转化的水稻植株有 36% ~ 64% 的转基因后代目标基因与目的基因发生分离。近年来,Jonathan 等<sup>[18]</sup>构建的双右边界载体 pMarkfree5.0 是将 *bar* 基因放在双右边界 T-DNA 序列中,克隆的  $\beta$ -葡萄糖醛酸酶和 *npt II* 基因(标记基因)在左边界 T-DNA 上,得到的转化烟草植株后代中有 55.6% 的植株抗卡那霉素,利用双右边界载体 pMarkfree5.0 共转化 *npt II* 基因和 *bar* 基因的频率是 66.7%,并且两种基因在转化植株后代中共表达且各自分离。随着共转化系统的优化及新的理论的提出,育种家们即可创造出一种包含重要农艺性状及其它优良基因的全新植株。

针对植物性状改良的研究,功能基因组的发展

同样受到科学家们的重视,比如,大段细菌人工染色体(bacterial artificial chromosome, BAC)和增强植物转化竞争力的双元质粒克隆<sup>[15]</sup>等已逐步深入到各种植株的研究中。在功能基因组研究中,BAC 是一个基于大肠杆菌致育质粒(F 因子)上的单拷贝的人工染色体载体。它在宿主细胞中稳定存在,可用于大规模的基因克隆<sup>[19]</sup>。由于基因功能组中一些 BAC 库存在大量的亚克隆而不能直接转入植物中,人们又发展了双元细菌人工染色体(binary bacterial artificial chromosome, BIBAC)库。BIBAC 库基于 BAC 载体,同时含有大肠杆菌(*E. coli*)F 因子质粒的复制起始点和发根土壤杆菌(*Agrobacterium rhizogenes*)Ri 质粒的复制子。这种载体也含有一个 *sacB* 基因作为大肠杆菌的阳性选择基因和植物的选择标记基因。它是一种既能用于克隆并构建基因组文库,又能进行转化,可将克隆的 DNA 片段导入植物基因组内的新型载体。自报道了 BIBAC 载体以来,这些载体已经应用于像烟草、油菜、番茄和水稻等模式植物的转化中<sup>[20-23]</sup>。尽管转化效率很低,但是通过农杆菌介导的转化体系 BIBAC 载体作为单基因位点已经成功的作为大片段插入到这些作物中,被转入的 T-DNA 在几个世代中可稳定保持和遗传,也无基因沉默现象<sup>[22]</sup>。Wang 等<sup>[24]</sup>利用盐芥的 BIBAC 文库获得特异的抗盐 BAC 克隆,利用 BIBAC 文库可快速、高效筛选出特异性相关的 DNA 大片段,这将有利于加快高产、优质特异性品种的选育进程。然而,目前还没有使用 BIBAC 载体的大豆遗传转化体系,育种工作者正致力于此方向的研究。

## 2 转基因技术在大豆性状改良上的应用

### 2.1 抗除草剂转基因大豆

现代农业中除草剂的广泛使用显著地节约了劳动力、提高劳动效率,但除草剂在消除杂草的同时也不同程度地伤害农作物、污染环境,这将不利于农业生态的长远发展。结合转基因技术将抗除草剂基因转入大豆等农作物中,可高效地解决除草剂的安全问题。目前国际上转基因大豆主要有抗除草剂 Glyphosate(草甘膦)和 Glufosinate(草丁膦)的两种。草甘膦是一种高效广谱的除草剂,它对植物中的 EPSPS(5-烯醇丙酮莽草酸-3-磷酸合成酶)有专一抑制作用,阻断芳香族氨基酸的生物合成,从而扰乱植物体的正常氮代谢而致其死亡<sup>[25]</sup>。目前理论上通过转基因手段造成作物对草甘膦产生抗性的策略有:(1)植物内源编码 EPSPS 蛋白基因

的超表达;(2)导入能够降解草甘膦的基因;(3)导入与草甘膦亲和性下降的 EPSPS 蛋白的编码基因。Widholm 等<sup>[26]</sup>通过悬浮培养体细胞胚,获得了超表达内源 EPSPS 基因的转基因大豆。美国 Monsanto (孟山都)公司研发的 Roundup Ready Soybean(抗草甘膦转基因大豆)是世界上最早获得推广的抗除草剂转基因大豆,并于 1996 年获准商业化生产,成为世界上最早获准推广的转基因作物。Roundup Ready Soybean 的发展更便于实施免耕以及更利于窄行密植,这种优势使得其大面积的种植和大范围的推广。Bayer Crop Science(拜耳作物科学公司)研发了另一转基因作物 Liberty Link<sup>®</sup> soybean(抗草丁磷转基因大豆)<sup>[27]</sup>。Liberty Link<sup>®</sup> soybeans 表达的是一种从链霉菌(*Streptomyces viridochromogenes*)中分离出的 PAT(草丁磷-N-乙酰转移酶)基因。PAT 是一种谷氨酰胺合成酶抑制剂,可以使植物抵抗广谱型的草丁磷除草剂。有些学者将抗两种不同除草剂的基因(抗草甘膦和抑制乙酰乳酸合成酶除草剂基因)转入大豆中,这种转基因大豆表达草甘膦乙酰转移酶(GAT4601)并且修饰乙酰乳酸合成酶(GM-HRA)蛋白<sup>[28]</sup>。GAT4601 蛋白对草甘膦有抗性,GM-HRA 蛋白表现出对抑制乙酰乳酸合成酶除草剂的抗性。与之前的单基因控制的单一性状转基因大豆相比,这种多基因导致的抗两种除草剂特性的转基因大豆采用了不同的处理方法,其作用机制也存在差异。Syngenta(先正达)公司和 Bayer Crop Science 公司共同研制了一种新性状的抗 HPD 抑制剂的转基因大豆。Hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (HPPD)抑制剂使植物中的质体醌生物合成受阻,从而影响光合作用、类胡萝卜素合成以及维生素 E 合成,导致叶绿素被破坏和杂草白化<sup>[29]</sup>。Giani 等<sup>[30]</sup>研究了草甘膦对抗草甘膦转基因大豆产量、固氮作用和籽粒品质的影响,结果发现转化型大豆并没有影响土壤微生物群、生物固氮作用、产量以及籽粒中的异黄酮含量,但即使在推荐应用剂量下,种子中的草甘膦含量仍偏高,并且能在土壤和籽粒中检测出磷酸残留。我国抗除草剂基因工程研究起始于 20 世纪 80 年代,岳绍先等<sup>[31]</sup>将从龙葵中得到的抗 Atrazine(阿特拉津)psbA 基因导入大豆叶绿体基因组中得到表达并能遗传到后代,这是我国最早的转基因抗除草剂作物。Liu 等<sup>[32]</sup>成功的利用农杆菌介导的子叶节转化法获得了 4 株抗除草剂的转化植株,并且所有的植株都有较好的产量、gus 和 bar 基因表型以 3:1 比率传递给后代植株。当然,未来新的分子技术发展将使得转

基因大豆获得更新更强的抗杂草特性,沿着减少对环境的污染,提高生物安全性以及降低大豆消费者和生产者成本的方向发展。

## 2.2 转基因抗虫大豆

采用农药防治害虫已经取得了显著的效果,但同时广泛大量使用农药又会导致环境恶化、危害人类和其他物种的健康,同时减少环境中的有益昆虫数量,增强害虫的抗药性等等一系列危害,这将不利于生态环境的可持续发展。我国北方是主要的大豆生产区,而大豆食心虫(*Leguminivora glycinivorella* Mats.)对大豆危害极其严重,虫食率高达 10%~20%<sup>[33]</sup>。大豆食心虫属于鳞翅目(*Lepidoptera*)、小卷蛾科(*Tortricidae*),其幼虫以大豆的豆荚和籽粒为食,导致碎粒和生成虫口,因而降低大豆产量,影响籽粒品质。所以抗虫转基因大豆是虫害育种中新的突破。大豆抗病虫基因主要有两类,一类是苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*,简称 Bt)分离出的 Bt 基因。苏云金芽孢杆菌在形成芽孢过程中产生一种杀虫晶体蛋白(insecticidal control proteins, ICPs)或  $\delta$ -内毒素( $\delta$ -endotoxin)的杀虫伴胞晶体蛋白,这类蛋白对鳞翅目、鞘翅目(*Coleoptera*)、双翅目(*Diptera*)等多科昆虫具有杀伤力,使其不能进食而死亡。另一类是来源于高等植物蛋白酶抑制因子的基因,具有抗虫谱广的特性,这些基因对人体无副作用并且害虫不易产生耐受性,其中抗虫效果最理想的基因是豇豆胰蛋白酶抑制剂(*CpTi*)。豇豆胰蛋白酶抑制剂是由约 80 个氨基酸组成的多肽,产物抑制昆虫消化道中的消化酶,使昆虫因不能消化吸收营养物质而死。Parrott 等<sup>[34]</sup>用携带有 Bt 内毒素蛋白基因和 *CpTi* 基因微弹轰击各种基因型大豆品种的胚型悬浮系,获得三个转 Bt 内毒素蛋白基因的大豆细胞系并已得到再生植株。Stewart<sup>[35]</sup>将合成的 Bt 晶体蛋白基因(*cry IAc*)构建进入 pSG3525 质粒中获得 pSG/BT 载体,通过基因枪轰击感虫品种 Jack 的悬浮培养球形细胞胚,经过潮霉素筛选得到 3 个转基因株系。Walker 等<sup>[36]</sup>三年内在大田中使用铁笼和人工侵染鳞翅目幼虫的方法比较转 Bt 基因大豆与对照大豆的抗虫性,结果是对照大豆的落叶率比转 Bt 基因大豆的落叶率高 9 倍。Mepherson 和 MacRae 等<sup>[37]</sup>也做了相似的实验,通过控制鳞翅目种类评估转 Bt 基因大豆抗虫性,两年比较实验得出,表达 *CryI Ac* 基因的大豆与对照相比鳞翅目的昆虫数量大大减少,而对照中幼虫数目最多达到每行 20~30 只。转 Bt 基因大豆落叶率 <1.5%,对照中落叶率达到 53%,转 Bt 基因大

豆的百粒重和产量也未受到影响。国内很多学者深入研究了抗虫转基因大豆,徐香玲等<sup>[38]</sup>以 Ti 质粒为介导,把 *Bt* 内毒素蛋白基因导入大豆获得抗大豆食心虫的新类型。南相日等<sup>[39]</sup>利用 PEG 法将 *Bt* 毒蛋白基因导入大豆原生质体中,经筛选检测获得再生植株。据报道,利用花粉管通道技术可将抗虫基因导入到大豆中,获得再生植株,经检测后证明,外源基因被整合到大豆基因组中<sup>[40-42]</sup>。虽然抗虫转基因大豆的研究取得了较好的效果,部分转化植株的抗虫能力可以稳定遗传<sup>[43-45]</sup>,但由于受基因型限制,以及易产生嵌合体等原因,高代转化植株中的外源基因易丢失,稳定遗传效果差,有关转化后高代植株的基因稳定性遗传的报道还比较少。目前,商业化生产的抗虫转基因大豆几乎都是转 *Bt* 基因,抗虫转基因大豆也存在一定缺陷,主要是每种抗虫蛋白的抗虫谱仅局限于几种特定的昆虫,同时昆虫对抗虫蛋白也会产生耐受性,将 *Bt* 基因与其他抗性基因结合转化到大豆中可减少化学农药的消耗,多基因共转化策略在将来大豆抗虫性研究中越来越重要。

### 2.3 抗病性增强的转基因大豆

大豆花叶病毒(soybean mosaic virus, SMV)、大豆疫霉菌(*Phytophthora sojae* Kaufmann & Gerdemann)、大豆灰斑病(*Cercospora sojina* Hara)、大豆孢囊线虫(soybean cyst nematode, SCN)等是危害大豆生产的重要病害<sup>[46-48]</sup>,这些病害可以从籽粒、根部、茎叶、豆荚及特定的组织侵染植株,从而严重影响大豆的产量和品质。为有效控制病害,在传统育种中多采取改良耕作的方式,例如,筛选耐荫品种、宽行种植及与无病害植株循环种植等手段,其效果并未尽如人意。当然也可采取一下化学防治方法,但考虑其低渗透、喷洒不均匀、高投入及对环境不利等因素也并不是理想的方法。因此,研究抗病毒的转基因大豆对于提高大豆抗性,增加产量具有重要意义。Abel 等<sup>[49]</sup>利用烟草花叶病毒(Tobacco mosaic virus, TMV)外壳蛋白基因(*CP*),首次获得抗 TMV 的转基因烟草植株。自此以来,研究抗病毒转基因植物的策略不断被提出,包括外壳蛋白基因介导的抗性、复制酶介导的抗性、病毒运动蛋白介导的抗性、利用缺陷干扰性分子介导病毒抗性等。大豆抗病虫主要是利用转入外壳蛋白基因获得对病毒的抗性<sup>[50]</sup>。随后,Di 等<sup>[51]</sup>利用农杆菌介导法把豆荚斑点病毒外壳蛋白前导基因(*BPMV-cp-p*)转化到大豆子叶节中,获得 5 个转化植株,经检测后部分转基因植株后代表现对 *BPMV* 抗性,同时获得纯合

系。Tougou 等<sup>[52-53]</sup>通过插入大豆矮病毒的外壳蛋白基因(soybean dwarf virus, *SbDV*)获得了抗 *SbDV* 大豆植株。之后他们又将 *SbDV* 反向重复序列的 *CP* 基因用  $\beta$ -葡萄糖醛酸酶序列隔开,利用 RNA 沉默来得到 *SbDV* 抗性,感染病毒试验后转基因植株未感病,表明利用 RNA 沉默介导方法可得到 *SbDV* 抗性植株。在抗真菌病转基因大豆研究上,Cunha 等<sup>[54]</sup>获得过表达草酸脱氢酶(OXDC)的抗茎腐病(*Sclerotinia stem rot*, SSR)转基因大豆株系。几丁质酶(chitinase)主要水解几丁质多聚体中的  $\beta$ -1,4 糖苷键,当植物受到真菌、细菌和病毒感染时,几丁质酶的活性就会迅速提高,与植物对病原微生物的抗性密切相关<sup>[55]</sup>。Li 等<sup>[56]</sup>将多种抗真菌的基因转入大豆中来获得多基因抗性,并且成功获得过表达几丁质酶(CHI)和大麦核糖体灭活蛋白(RIP)两种抗性的转基因大豆。利用生物技术手段,植株可以产生双链小 RNAs(dsRNAs)使线虫基因沉默。Steeves 等<sup>[57]</sup>首次应用 RNAi 防治大豆孢囊线虫病,他将包含大豆孢囊线虫的主要精子蛋白域(major sperm protein, MSP)的 cDNA 克隆反向重复序列的 RNAi 表达载体转移到大豆中,导致大豆孢囊线虫的生殖率降低 75%。随后 Li 等<sup>[58]</sup>利用 RNAi 原理检测有关大豆孢囊线虫繁殖力和适应力的潜在基因(*Cpn-1*、*Y25*、*Prp-17* 基因)。近年来 Ibrahim 等<sup>[59]</sup>用 RNAi 原理断裂大豆根结线虫形成基因减少大豆根部危害。Andrea 等<sup>[60]</sup>利用基因过表达和 RNAi 原理检测植物抗病性主要蛋白 NPR1 的抑制因子(*SCN1*、*SN1*)对大豆和拟南芥的抗孢囊线虫病性,结果表明 *SCN1* 基因过表达和 *SN1* 基因沉默可有效降低雌性线虫数量。在国内,刘德璞等<sup>[61-62]</sup>利用花粉管通道技术将大豆导入抗 SMV 的基因,结合常规育种程序,获得遗传稳定的抗病丰产品系。郭玉双等<sup>[63]</sup>以东北地区主栽大豆品种为材料,利用农杆菌介导法,将几丁质酶基因和核糖体失活蛋白基因转入受体材料,Southern 检测到同时整合双价基因的  $T_0$ 代转基因植株,转化频率为 0.5%,扩繁至  $T_2$ 代后,经抗性检测以及分子生物学检测表明,外源基因已在大豆株系中表达。张云月等<sup>[64]</sup>把具有广谱抗病性的 *hrpZpsta* 基因利用农杆菌介导的方法导入大豆植株,获得 *hrpZpsta* 基因遗传表达的  $T_3$ 代抗灰斑病的转基因大豆株系。在防治大豆病害上,RNAi 技术在降低线虫的繁殖率和传染率,以及在根源上提高大豆的抗性将发挥越来越大的作用。

### 2.4 抗逆性改良的转基因大豆

在转基因大豆抗逆性的研究中,目前研究较多

的主要在耐旱、耐盐、耐热和抗氧化等方面。各种基因的分离和转化的成功更有利于转基因大豆抗逆性的提高。de Ronde 等<sup>[65]</sup>在干旱胁迫条件下,利用生理技术评估转正、反义方向的 L- $\Delta^1$ -吡咯啉-5-羧酸盐还原酶(*P5CR*)基因的大豆与非转基因大豆。结果表明,与非转基因和反义基因的大豆相比,正义大豆植株表现出对于干旱胁迫更强的耐性和更高的相对含水量(RWC)、游离脯氨酸含量和*P5CR*含量,但脯氨酸脱氢酶(PDH)活性下降。说明,正义转基因植株有更强的耐旱性。Liu 等<sup>[66]</sup>把从小盐芥分离出的一种多磷酸肌醇激酶 *ThIPK2*,通过根瘤农杆菌介导转化到大豆中,与未转化的大豆植株相比,转化植株更具有耐缺水性、耐盐性和抗氧化性。然而,*ThIPK2* 的表达改变了大豆籽粒中脂肪酸比例的组成,导致油酸含量的增加(C18:1)。同时,转基因的植株籽粒变大,有利于提高大豆籽粒品质和大豆产量。虽然近年来挖掘出很多耐盐基因,如水稻的 *DST*<sup>[67]</sup>,小麦的 *HKT1*<sup>[68]</sup>,拟南芥上的 *NHX*<sup>[69]</sup>和 *SOS1*<sup>[70]</sup>,野生大豆的 *GmCHX1*<sup>[71]</sup>等,但有关大豆耐盐性的机理研究还不透彻。Cao 等<sup>[72]</sup>利用发根农杆菌介导的转化体系,把 *TaNHX2* 基因导入大豆根系,获得大豆“复合体”植株,耐盐实验表明,过表达 *TaNHX2* 基因的大豆复合体显现出更高的耐盐性,其根系也较非转基因植株在耐盐实验中受到的抑制更少。利用根瘤农杆菌介导法,在  $150 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaCl 溶液中,与野生型相比,获得的过量表达的 *TaNHX2* 转基因大豆有更高的耐盐性。刘志华等<sup>[73]</sup>研究了抗盐胁迫的转 *BADH* 基因大豆对盐碱土壤氮素转化的影响,结果表明转 *BADH* 基因大豆通过调节苗期、花期根际土壤氮素转化功能菌数量和生化过程强度进而影响氮素转化。陈晓军等<sup>[74]</sup>利用农杆菌介导的方法转化 *Gm-HsfAl* 基因,发现 *GmHsfAl* 的过量表达激活或促进其下游 3 个热激蛋白基因的转录或表达,显著提高了转基因大豆植株的耐热能力。

## 2.5 品质性状改良的转基因大豆

大豆籽粒蛋白质含量约为 40%,油分含量约为 20%,是人类植物蛋白和脂肪的主要来源<sup>[75]</sup>,提高其蛋白和脂肪含量具有重要的意义。随着分子生物学的快速发展,大豆通过基因修饰和遗传转化的改良更能满足人们的需求。一般说来,大豆种子中油脂含量与蛋白质含量呈负相关<sup>[76]</sup>,可利用转基因的方法通过调控油脂或蛋白合成的特异基因来调控其中一种代谢途径,打破其关联性。Lardizabal 等<sup>[77]</sup>把土壤拉曼毛霉(*Umbelopsis ramanniana*)的二

酰基甘油酰基转移酶 2A (Diacylglycerol acyltransferase 2A, *DGAT2A*) 基因导入大豆,获得的成熟种子中其油脂净重含量提高了 1.5%。这是利用转基因方法提高大豆种子油脂含量而对蛋白质含量没有显著影响的首次报道,在提高大豆油脂含量育种方面有重要意义。最近又报道了许多通过转基因技术促进了大豆油脂含量的积累<sup>[78-80]</sup>。然而,大豆品质性状的改良不仅包括提高油脂、蛋白质<sup>[81]</sup>的含量,也包括提高像油酸、 $\gamma$ -亚麻酸等具有保健功能的脂肪酸和一些含硫氨基酸的含量以及降低植酸等营养抑制因子的含量等。Kim 等<sup>[82]</sup>将在水稻中表达的尿黑酸香叶基香叶基转移酶(homogentisate geranylgeranyl transferase, HGGT)转化到大豆中表达,表达 HGGT 基因的转基因大豆有显著高的抗氧化活性水平,并且提高了维生素 E 水平,这些维生素 E 包括大豆中没有的生育三烯酚类(除了  $\beta$ -形式的)的各种形式的天然维生素 E。Kinney 等<sup>[83]</sup>利用基因枪技术,得到了油酸含量 88% 的转基因大豆。Li 等<sup>[84]</sup>利用基因枪技术获得转  $\gamma$ -玉米醇溶蛋白基因的大豆,氨基酸分析转基因植株 T1 和 T2 代种子表明,甲硫氨酸含量比对照提高 15.49% 到 18.75%,半胱氨酸含量提高 26.97% 到 19.33%。Zhang 等<sup>[85]</sup>在转基因大豆中表达一个从头合成蛋白(MB-16)来提高大豆蛋白质品质,结果表明甲硫氨酸和半胱氨酸的含量从 16.2% 显著提高到 65.9%,增加了大豆的营养品质。 $\gamma$ -亚麻酸和十八碳四烯酸具有保健作用,而  $\Delta 6$ -脂肪酸脱氢酶是  $\gamma$ -亚麻酸和十八碳四烯酸生物合成的关键酶。Sato 等<sup>[86]</sup>将琉璃苣(*Borago officinalis*)的  $\Delta 6$ -脂肪酸脱氢酶基因整合到大豆染色体中,获得的无筛选标记的 T1 代转基因大豆  $\gamma$ -亚麻酸含量从 3.4% 提高到 28.7%,十八碳四烯酸含量从 0.6% 提高到 4.2%。随后, Eckert 等<sup>[87]</sup>将两种分别带有外源基因(琉璃苣的  $\Delta 6$ -脂肪酸脱氢酶基因和拟南芥的  $\Delta 15$ -脂肪酸脱氢酶基因)的转基因大豆杂交,将琉璃苣的  $\Delta 6$ -脂肪酸脱氢酶基因和拟南芥的  $\Delta 15$ -脂肪酸脱氢酶基因整合到一个株系中,检测转化后代植株中十八碳四烯酸含量超过 29%, $\omega$ -3 脂肪酸在总脂肪酸中的比例达到 60% 以上。植酸作为一种很强的螯合剂,在消化道中结合二价和三价金属离子,形成不能被消化的不溶性螯合物,是大豆营养的抑制因子。Chiera 等<sup>[88]</sup>通过在大豆中过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。雷勃钧等<sup>[89]</sup>采用花粉通道法直接将外源高蛋白野生大豆总 DNA 导入栽培大豆中,获得了蛋白质含量提高

12.5%的变异后代。Wang 等<sup>[90]</sup>把从芝麻中分离出的全链 cDNA 编码的二酰基甘油酰基转移酶 (*DGAT1*) 基因转入大豆中,*DGAT1* 基因在转基因植株中过量表达,结果表明,与对照相比 T2 和 T3 代转基因株系的含油量分别增加了 1.75% 和 1.39%。

3 展 望

大豆是植物遗传转化难度最高的作物之一,与水稻、烟草等作物相比,大豆的遗传转化效率一直很低,但是,随着组织培养技术和转基因技术等的发展,对大豆的转基因研究进入了快速发展的时期。在遗传转化方法中,较常用并且研究较深的是农杆菌介导的子叶节转化方法,但此方法易产生嵌合体,后期筛选工作量大,仍需要进一步优化大豆组织培养条件和遗传转化体系。随着遗传转化技术的不断优化、大豆基因功能组的深入研究和新的转化理念的发展,在分子水平上对大豆进行性状改良将变得越来越简便轻松。通过转基因技术已经获得抗除草剂、抗虫、抗病、耐逆性好、高产、高蛋白的转基因大豆品种,但是大部分报道仅局限于单个性状的改良,并且遗传稳定性差。新一代转基因大豆育种的重点应集中在多元载体共转化和多性状综合改良,克服外源基因的导入能否在植物体中稳定表达和遗传,以及标记基因剔除的难点。随着分子生物学的快速发展,科学家们正致力于开发研究大豆更潜在的使用价值和商业价值。比如,生产出表达碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)的转基因大豆种子<sup>[91]</sup>,或是把大豆作为药物生物反应器,大豆种子内部环境可贮存疫苗抗原多年,而且不会减少和消失,这种天然的特性可以降低对低温运输系统的需求,从而减少运输成本<sup>[92-95]</sup>。把大豆作为医疗平台这一理念代表着未来医疗保健领域的重大革新,高水平的转基因技术手段、优秀的制药领域合作伙伴以及未来更大的商业价值将挖掘大豆更大的利用潜力。

参考文献

[1] 刘海坤,卫志明. 大豆遗传转化研究进展[J]. 植物生理与生物学报,2005,31(2):126-134. (Liu H K, Wei Z M. Recent advance in soybean genetic transformation[J]. Journal of Plant Physiology and Molecular Biology,2005,31(2):126-134. )

[2] Salmenkallio-Marttila M, Aspegren K, Akerman S, et al. Transgenic barley (*Hordeum vulgare* L.) by electroporation of protoplasts[J]. Plant Cell Reports, 1995, 15(3):301-304.

[3] Davey M R, Anthony P, Power J B, et al. Plant protoplasts: status and biotechnological perspectives [J]. Biotechnology Ad-

vances, 2005,23(2): 131-171.

[4] Kaeppeler H F, Somers D A, Rines H W, et al. Silicon carbide fiber-mediated stable transformation of plant cells[J]. TAG Theoretical and Applied Genetics, 1992, 84(5):560-566.

[5] Crossway A, Oakes J V, Irvine J M, et al. Integration of foreign DNA following microinjection of tobacco mesophyll protoplasts [J]. Molecular and General Genetics MGG, 1986, 202 ( 2 ): 179-185.

[6] Boynton J E, Gillham N W, Harris E H, et al. Chloroplast transformation in *Chlamydomonas* with high velocity microprojectiles [J]. Science,1988,240(4858):1534-1538.

[7] Hinchee M A W, Conner-Ward D V, Newell C A, et al. Production of transgenic soybean plants using *Agrobacterium*-mediated DNA transfer[J]. Bio Technology,1993,6:915-922.

[8] Okpuzor J, Omidiji D. Peroxidase-polyphenol oxidase association in *Dioscorea esculent* [J]. Z Naturforsch C., 1998,53(11-12): 957-960.

[9] Olhoft P M, Somers D A. L Cysteine increases *Agrobacterium*-mediated T-DNA delivery into soybean cotyledonary-node cells[J]. Plant Cell Report, 2001,20:706-711.

[10] Olhoft P M, Flagel L E, Donovan C M, et al. Efficient soybean transformation using hygromycin B selection in the cotyledonary-node method[J]. Planta, 2003,5:723-735.

[11] 陆玲鸿,韩强,李林,等. 以草甘膦为筛选标记的大豆转基因体系的建立及抗除草剂转基因大豆的培育[J]. 中国科学:生命科学,2014(4):406-415. ( Lu L H, Han Q, Li L, et al. Establishment of an efficient transformation protocol for soybean using Glyphosate as selective agent and the development of glyphosate-tolerant transgenic soybean lines[J]. Science China, 2014(4): 406-415. )

[12] Komari T, Hiei Y, Saito Y, et al. Vectors carrying two separate T-DNAs for co-transformation of higher plants mediated by *Agrobacterium tumefaciens* and segregation of transformants free from selection markers [J]. The Plant Journal, 1996, 10(1): 165-174.

[13] BaiX Q, Wang Q Y, Chu C C. Excision of a selective marker in transgenic rice using a novel Cre/loxP system controlled by a floral specific promoter [J]. Transgenic Research, 2008, 17(6): 1035-1043.

[14] YanH, Rommens C M. Transposition-based plant transformation [J]. Plant Physiology, 2007,143(2):570-578.

[15] Hooykaas P J, Schilperoort R A. *Agrobacterium* and plant genetic engineering [J]. Plant Molecular Biology, 1992,19(1):15-38.

[16] Wu C, Sun S, Nimmakayala P, et al. A BAC- and BIBAC-based physical map of the soybean genome [J]. Genome Research, 2004,14(2):319-326.

[17] Lu H J, Zhou X R., Gong,Z X, et al. Generation of selectable marker-free transgenic rice using double right-border (DRB) binary vectors[J]. Functional Plant Biology,2001,28(3):241-248.

[18] Matheka J M, Anami S, Gethi J, et al. A new double right border binary vector for producing marker-free transgenic plants [J]. BMC Research Notes,2013, 6:448 .

[19] ZhangH B, Wu C C. BAC as tools for genome sequencing [J].

- Plant Physiology and Biochemistry, 2001, 39(3-4): 195-209.
- [20] Hamilton C M, Frary A, Lewis C, et al. Stable transfer of intact high molecular weight DNA into plant chromosomes[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 1996, 93(18): 9975-9979.
  - [21] Cui Y H, Bi Y M, Brugière N, et al. The S locus glycoprotein and the S receptor kinase are sufficient for self-pollen rejection in Brassica[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 2000, 97(7): 3713-3717.
  - [22] Frary A, Hamilton C M. Efficiency and stability of high molecular weight DNA transformation: an analysis in tomato[J]. Transgenic Research, 2001, 10(2): 121-132.
  - [23] He RF, Wang YY, Du B, et al. Development of transformation system of rice based on binary bacterial artificial chromosome (BI-BAC) vector [J]. Acta Genetica Sinica, 2006, 33(3): 269-276.
  - [24] Wang W Q, Wu Y R, Li Y, et al. A large insert *Thell-ungliella* halophila BIBAC library for genomics and identification of stress tolerance genes [J]. Plant Molecular Biology, 2010, 72(1-2): 91-99.
  - [25] Steinrucken H C, Amrhein N. The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase [J]. Biochemistry & Biophysics, 1980, 94: 1207-1212.
  - [26] Widholm J M, Chinnala A R, Ryu J H, et al. Glyphosate selection of gene amplification in suspension cultures of 3 plant species [J]. Physiology Plant, 2001, 112: 540-545.
  - [27] Bayer Crop Science. <http://www.bayercropscience.com>.
  - [28] Mathesius C A, Barnett J F J, Cressman R F, et al. Safety assessment of a modified acetolactate synthase protein (GM-HRA) used as a selectable marker in genetically modified soybeans [J]. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 2009, 55(3): 309-320.
  - [29] van Andreas A. HPPD-Inhibitors-A proven mode of action as a new hope to solve current weed problems [J]. Outlooks on Pest Management, 2009, 20(1): 27-30.
  - [30] Bohm G M B, Rombaldi C V, Genovese M I, et al. Glyphosate effects on yield, nitrogen fixation, and seed quality in glyphosate-resistant soybean [J]. Crop Science, 2014, 54: 4: 1737-1743.
  - [31] 岳绍先, 刘博林, 毛大璋, 等. 抗阿特拉津转基因大豆植株后代的遗传分析[J]. 植物学报, 1990, 32(5): 343-349. (Yue S X, Liu B L, Mao D Z, et al. A genetic analysis to the progenies of atrazine-resistance transgenic soybean plant [J]. Acta Botanica Sinica, 1990, 32(5): 343-349.)
  - [32] Liu S C, Zhang G C, Yang L F, et al. Bialaphos-resistant transgenic soybeans produced by the *Agrobacterium*-mediated cotyledonary-node method [J]. Journal of Agricultural Science and Technology, 2014, 16: 175-190.
  - [33] 胡代花, 杨晓伟, 冯俊涛, 等. 大豆食心虫性信息素的研究及应用进展[J]. 农药学报, 2014(3): 235-244. (Hu D H, Yang X W, Feng J T, et al. Advances in the research and application of sex pheromone *Leguminivora glycinivorella* Mastunure [J]. Chinese Journal of Pesticide Science, 2014(3): 235-244.)
  - [34] Parrot W A, All J N, Adang M J, et al. Recovery and evaluation of soybean plants transgenic for a *Bacillus thuringiensis* var. kurst-aki insecticidal gene [J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 1994, 30: 144-149.
  - [35] Stewart C N Jr, Adang M J, All J N, et al. Genetic transformation, recovery, and characterization of fertile soybean transgenic for a synthetic *Bacillus thuringiensis* cry1Ac gene [J]. Plant Physiology, 1996, 112: 121-129.
  - [36] Walker D R, All J N, Mcpherson R M, et al. Field evaluation of soybean engineered with a synthetic cry1Ac transgene for resistance to corn earworm, soybean looper, velvetbean caterpillar (*Lepidoptera: Noctuidae*), and lesser cornstalk borer (*Lepidoptera: Pyralidae*) [J]. Journal of Economic Entomology, 2000, 93(3): 613-622.
  - [37] Mcpherson R M, MacRae T C. Evaluation of transgenic soybean exhibiting high expression of a synthetic *Bacillus thuringiensis* cry1Ac transgene for suppressing lepidopteran population densities and crop injury [J]. Journal of Economic Entomology, 2009, 102(4): 1640-1648.
  - [38] 徐香玲, 高晶, 刘伟华, 等. Ti 质粒介导的 *Bt* *k-δ* 内毒素蛋白基因转化大豆的初步研究 [J]. 大豆科学, 1997, 16(1): 7-12. (Xu X L, Gao J, Liu W H, et al. Studies on transferring *Bt. k-Delta* endotoxin gene into soybean with Ti-plasmid primaril [J]. Soybean Science, 1997, 16(1): 7-12.)
  - [39] 南相日, 刘文萍, 刘丽艳, 等. PEG 介导 *BT* 基因转化大豆原生质体获转基因植株 [J]. 大豆科学, 1998, 17(4): 41-45. (Nan X R, Liu W P, Liu L Y, et al. PEG-mediated transformation and regeneration of soybean protoplast with *Bacillus Thuringiensis* CrgIAc gene [J]. Soybean Science, 1998, 17(4): 41-45.)
  - [40] 任海红, 任小俊, 王英, 等. 外源 DNA 直接导入技术及在大豆育种中的应用 [J]. 山西农业科学, 2013(5): 503-505, 514. (Ren H H, Ren X J, Wang Y, et al. Direct introduction exogenous DNA technique and application in soybean breeding [J]. Journal of Shanxi Agricultural Sciences, 2013(5): 503-505, 514.)
  - [41] 杨庆凯, 曹越平, 崔岩, 等. 利用花粉管通道技术将抗虫基因导入大豆的研究 [J]. 中国油料作物学报, 2002, 24(3): 17-20. (Yang Q K, Cao Y P, Cui Y, et al. Study on introducing Bt gene into soybean by pollen tube path method [J]. Chinese journal of oil crop sciences, 2002, 24(3): 17-20.)
  - [42] 武小霞, 刘伟婷, 刘琦, 等. 利用花粉管通道法将抗虫基因 (*cryV*) 转入大豆的研究 [J]. 大豆科学, 2010, 29(4): 565-568, 574. (Wu X X, Liu W T, Liu Q, et al. Introduction of anti pest gene (*cry V*) to soybean via pollen-tube pathway [J]. Soybean Science, 2010, 29(4): 565-568, 574.)
  - [43] 杨向东, 郭东全, 包绍君, 等. 双价抗虫转基因大豆抗苜蓿夜蛾分析 [J]. 农业科学与技术 (英文版), 2008, 9(3): 67-69. (Yang X D, Guo D Q, Bao S J, et al. Resistance analysis of the binary insect-resistant transgenic soybean to *Heliothis virescens* [J]. Agricultural Science & Technology, 2008, 9(3): 67-69.)
  - [44] Ma X H, Wu T L. Rapid and efficient regeneration in soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] from whole cotyledonary node explants [J]. Acta Physiologiae Plantarum, 2008, 30(2): 209-216.
  - [45] 陈秀华, 柏锡, 潘欣, 等. 转 *cryIIem* 基因大豆的培育及抗虫性



- 检测大豆科学[J]. 2009,28(6):959-963. (Chen X H, Bai X, Pan X, et al. Cultivation of *cryIlem* gene transformed soybean and insect resistant assay[J]. Soybean Science, 2009, 28(6):959-963.)
- [46] 郑翠明,常汝镇,邱丽娟. 大豆花叶病毒病研究进展[J]. 植物病理学报,2000,30(2):97-105. (Zheng C M, Chang R Zh, Qiu L J. Progress on the disease of soybean mosaic virus[J]. Acta Phytopathologica sinica, 2000, 30(2):97-105.)
- [47] Schmitthenner A F. Problems and progress in control of Phytophthora root rot of soybean[J]. Plant Disease, 1985, 69(4):362-368.
- [48] 徐兆飞,刘亚光. 灰斑病菌对大豆叶片总多酚和总黄酮的诱导研究[J]. 大豆科学,2006,25(3):234-238. (Xu Z F, Liu Y G. Study on Induction of total polyphenol and flavonoid in soybean leaves by *Cercospora sojina* hara[J]. Soybean Science, 2006, 25(3):234-238.)
- [49] Abel P P, Nelson R S, De B, et al. Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat proteingene[J]. Science, 1986, 232(4751):738-743.
- [50] 韩阳,王昌凌,赖冰冰. 转基因技术在大豆抗病毒育种中的应用研究进展[J]. 江苏农业科学,2010(1):118-120. (Han Y, Wang C L, Lai B B. Advances in transgenic technology of antiviral soybean breeding[J]. 2010(1):118-120.)
- [51] Di R, Puecell V, Collons G B, et al. Production of transgenic soybean lines expressing the bean pod mottle virus coat protein precursor gene[J]. Plant Cell Reports, 1996, 15:746-750.
- [52] Tougou M, Furutani N, Yamagishi N, et al. Development of resistant transgenic soybeans with inverted repeat-coat protein genes of soybean dwarf virus [J]. Plant Cell Report, 2006;25(11):1213-1218.
- [53] Tougou M, Yamagishi N, Furutani N, et al. Soybean dwarf virus-resistant transgenic soybeans with the sense coat protein gene [J]. Plant Cell Report, 2007, 26(11):1967-1975.
- [54] Cunha W G, Tinoco M L P, Pancoti H L, et al. High resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in transgenic soybean plants transformed to express an oxalatedecarboxylase gene [J]. Plant Pathology, 2010, 59(4):654-660.
- [55] 张志忠,吴菁华,吕柳新,等. 植物几丁质酶及其应用研究进展[J]. 福建农业大学学报,2005(4):494-499. (Zhang Z Z, Wu J H, Lyu L X, et al. Progress of plant chitinase and its application [J]. Journal of Fujian Agricultural University, 2005, 04:494-499.)
- [56] Li H Y, Zhu Y M, Chen Q, et al. Production of transgenic soybean plants with two anti-fungal protein genes via *Agrobacterium* and particle Bombardment [J]. Biologia Plantarum, 2004, 48(3):367-374.
- [57] Steeves R M, Todd T C, Essig J S, et al. Transgenic soybeans expressing siRNAs specific to a major sperm protein gene suppress *Heterodera glycines* reproduction [J]. Functional Plant Biology, 2006, 33:991-999.
- [58] Li J, Todd T C, Oakley T R, et al. Host-derived suppression of nematode reproductive and fitness genes decreases fecundity of *Heterodera glycines* Ichinohe[J]. Planta, 2010, 232(3):775-785.
- [59] Ibrahim H M, Alkharouf N W, Meyer S L, et al. Post-transcriptional gene silencing of root-knot nematode in transformed soybean roots[J]. Exp Parasitol, 2011, 127(1):90-99.
- [60] Andrea Maldonado, Reham Youssef, Margaret McDonald, et al. Modification of the expression of two NPR1 suppressors, *SNC1* and *SN1I*, in soybean confers partial resistance to the soybean cyst nematode, *Heterodera glycine*[J]. Functional Plant Biology, 2014, 41(7):714-726.
- [61] 刘德璞,李长有. 导入外源 DNA 获得抗 SMV 大豆品系[J]. 松辽学刊(自然科学版), 1995(3):40-43. (Liu D P, Li C Y. Obtaining anti-SMV soybean lines by introducing foreign DNA[J]. Songliao Journal( Natural Science Edition) 1995(3):40-43.)
- [62] 刘德璞,廖林,袁鹰,等. 导入外源 DNA 获得抗 SMV 大豆品系[J]. 大豆科学,1997,16(4):2-7. (Liu D P, Liao L, Yuan Y, et al. Gaining of soybean lines resistant to SMV by introducing exogenous DNA[J]. Soybean Science, 1997, 16(4):2-7.)
- [63] 郭玉双,张艳菊,朱延明,等. 转几丁质酶和核糖体失活蛋白双价基因大豆的获得与抗病性鉴定[J]. 作物学报,2006,32(12):1841-1847. (Guo Y S, Zhang Y J, Zhu Y M, et al. Obtainment of transgenic soybean plants with chitinase and ribosome inactivating protein genes and their resistance identification [J]. Acta Agronomica Sinica, 2006, 32(12):1841-1847.)
- [64] 张云月,付永平,王丕武,等. 转 *hrpZpsta* 抗病基因大豆的研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2011, 39(9):86-92. (Zhang Y Y, Fu Y P, Wang P W, et al. Study on transforming *hrpZpsta* gene into soybean[J]. Journal of Northwest A&F University( Nat. Sci. Ed. ), 2011, 39(9):86-92.)
- [65] de Ronde J A, Laurie R N, Caetano T, et al. Comparative study between transgenic and non-transgenic soybean lines proved transgenic lines to be more drought tolerant[J]. Euphytica, 2004, 138(2):123-132.
- [66] Liu M, Li D M, Wang Z K. Transgenic expression of *ThIPK2* gene in soybean improves stress tolerance, oleic acid content and seed size[J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 2012, 111:277-289.
- [67] Huang X Y, Chao D Y, Gao J P, et al. A previously unknown zinc finger protein, DST, regulates drought and salt tolerance in rice via stomatal aperture control [J]. Genes Development, 2009, 23(15):1805-1817.
- [68] Schachtman D P, Schroeder J I. Structure and transport mechanism of a high-affinity potassium uptake transporter from higher plants[J]. Nature, 1994, 370:655-658.
- [69] Yokoi S, Quintero F J, Cubero B, et al. Differential expression and function of Arabidopsis thaliana  $\text{NHX Na}^+/\text{H}^+$  antiporters in the salt stress response[J]. Plant Journal, 2002, 30(5):529-39.
- [70] Shi H, Ishitani M, Kim C, et al. The Arabidopsis thaliana salt tolerance gene *SOS1* encodes a putative  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 2000, 97:6896-6901.
- [71] Qi X P, Li M W, Xie M, et al. Identification of a novel salt tolerance gene in wild soybean by whole-genome sequencing [J]. Nature Communications, 2014, 4340.
- [72] Cao D, Hou W S, Liu W, et al. Overexpression of *TaNHX2* enhances salt tolerance of 'composite' and whole transgenic soybean



plants[J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 2011, 107: 541-552.

[73] 刘志华,姜振峰,张少良,等. 转 *BADH* 基因大豆对盐碱土壤氮素转化的影响[J]. 中国生态农业学报, 2014, 22(10): 1200-1206. (Liu Z H, Jiang Z F, Zhang S L, et al. Effects of transgenic *BADH* soybean on nitrogen transformation in saline-alkaline soil [J]. Chinese Journal of Eco-Agriculture, 2014, 22(10): 1200-1206. )

[74] 陈晓军,叶春江,吕慧颖,等. *GmHSA1* 基因克隆及其过量表达提高转基因大豆的耐热性[J]. 遗传, 2006, 11: 1411-1420. (Chen X J, Ye C J, Lyu H Y, et al. Cloning of *GmHSA1* gene and its overexpression leading to enhancement of heat tolerance in transgenic soybean[J]. Hereditas, 2006, 11: 1411-1420. )

[75] 曹永强,宋书宏,董丽杰. 大豆蛋白质和油分含量遗传研究进展[J]. 大豆科学, 2012, 31(2): 316-319. (Cao Y Q, Song S H, Dong L J. Research progress on heredity of protein and oil content in soybean [J]. Soybean Science, 2012, 31(2): 316-319. )

[76] Hurburgh C R, Brumm T J, Guinn J M, et al. Protein and oil patterns in US and world soybean markets[J]. Journal of the American Oil Chemists Society, 1990, 67(12): 966-973.

[77] Lardizabal K, Effertz R, Levering C, et al. Expression of *Umbe-lopsis ramanniana DGAT2A* in seed increases oil in soybean[J]. Plant Physiology, 2008, 148(1): 89-96.

[78] Kent Brink, Chok-Fun Chui, Robert F. Molecular characterization, compositional analysis, and germination evaluation of a high-oleic soybean generated by the suppression of *FAD2-1* expression [J]. Crop Science, 2012, 54(5): 2160-2174.

[79] Zhang L, Yang X D, Zhang Y Y, et al. Changes in oleic acid content of transgenic soybeans by antisense RNA mediated posttranscriptional gene silencing[J]. International Journal of Genomics, 2014(2014): 8.

[80] Liu Y F, Li Q T, Lu X, et al. Soybean *GmMYB73* promotes lipid accumulation in transgenic plants [J]. BMC Plant Biology, 2014, 14: 73.

[81] El-Shemy H A, Khalafalla M M, Fujita K, et al. Improvement of protein quality in transgenic soybean plants[J]. Biologia Plantarum, 2007, 51(2): 277-284.

[82] Kim Y H, Lee Y Y, Kim Y H, et al. Antioxidant activity and inhibition of lipid peroxidation in germinating seeds of transgenic soybean expressing *OsHGGT* [J]. Journal of Agricultural Food Chemistry, 2011, 59(2): 584-591.

[83] Kinney A J, Knowlton S. Designer oils: the high oleic acid soybean[M]// Roller S, Harlander S. Genetic modification in the food industry. London: Blackie Academic, 1998: 193-213.

[84] Li Z W, Meyer S, Essig J S, et al. High-level expression of maize  $\gamma$ -zein protein in transgenic soybean (*Glycine max*) [J]. Mol Breed, 2005, 16(1): 11-20.

[85] Zhang Y, Scherthanau J, Labbé N, et al. Improved protein quality in transgenic soybean expression a de novo synthetic protein, MB-16[J]. Transgenic Research, 2014, 23(3): 455-467.

[86] Sato S, Xing A Q, Ye X G, et al. Production of  $\gamma$ -linolenic acid and stearidonic acid in seeds of marker-free transgenic soybean [J]. Crop Science, 2004, 44(2): 646-652.

[87] Eckert H, LaVallee B, Schweiger B J, et al. Co-expression of the borage  $\Delta 6$  desaturase and the Arabidopsis  $\Delta 15$  desaturase results in high accumulation of stearidonic acid in the seeds of transgenic soybean[J]. Planta, 2006, 224(5): 1050-1057.

[88] Chiera J M, Finer J J, Grabau E A. Ectopic expression of a soybean phytase in developing seeds of *Glycine max* to improve phosphorus availability[J]. Plant Molecular Biology, 2004, 56(6): 895-904.

[89] 雷勃钧,李希臣,卢翠华,等. 外源野生大豆 DNA 导入栽培大豆及 RAPD 分子验证[J]. 中国科学(B辑 化学 生命科学 地学), 1994(6): 596-601. (Lei B J, Li X C, Lu C H, et al. Wild soybean exogenous DNA transferring into planting soybeans and RAPD molecular validation[J]. Science in China(Series B), 1994(6): 596-601. )

[90] Wang Z K, Huang W J, Chang J M, et al. Overexpression of *SidGAT1*, a gene encoding acyl-CoA: diacylglycerol acyltransferase from *Sesamum indicum* L. increases oil content in transgenic Arabidopsis and soybean[J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 2014, DOI 10. 1007/s 11240-014-0543-z.

[91] Ding S H, Huang L Y, Wang Y D, et al. High-level expression of basic fibroblast growth factor in transgenic soybean seeds and characterization of its biological activity [J]. Biotechnol Lett, 2006, 28(12): 869-875.

[92] Judy L O, Kenneth L B, Kenneth J P. Stability of a soybean seed-derived vaccine antigen following long-term storage, processing and transport in the absence of a cold chain [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2009, 89(13): 2191-2199.

[93] Cunha N B, Araujo A C, Leite A, et al. Correct targeting of proinsulin in protein storage vacuoles of transgenic soybean seeds [J]. Genetic Molecular Research, 2010, 9(2): 1163-1170.

[94] Cunha N B, Murad A M, Cipriano T M, et al. Expression of functional recombinant human growth hormone in transgenic soybean seeds [J]. Transgenic Research, 2011, 20: 811-826.

[95] Nobuyuki Maruyama, Keigo Fujiwara, Kazunori Yokoyama, et al. Stable accumulation of seed storage proteins containing vaccine peptides in transgenic soybean seeds [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2014, 118(4): 441-447.