

# 植物脂肪氧化酶同功酶快速检测技术在无豆腥味大豆育种上的应用研究<sup>\*</sup>

张 瑛<sup>1</sup> 张 磊<sup>2</sup> 吴敬德<sup>1</sup> 童继平<sup>1</sup> 郑乐娅<sup>1</sup> 吴跃进<sup>\* \* 1</sup>

(1. 安徽省农业科学院水稻研究所 安徽省水稻遗传育种重点实验室;

2. 安徽省农业科学院作物研究所 合肥 230031)

**摘要** 利用植物脂肪氧化酶同功酶快速检测技术对60个大豆种质资源和后代材料进行筛选,得到大豆脂肪氧化酶同功酶部分缺失和全缺失材料9个。用筛选的脂肪氧化酶同功酶缺失材料进行自交,在其自交后代中,得到无豆腥味且农艺性状优良的脂肪氧化酶同功酶部分缺失和全缺失的大豆品系10个。其中有大量的脂肪氧化酶同功酶全缺失和部分缺失的单株。

**关键词** 脂肪氧化酶同功酶; 检测技术; 无豆腥味; 缺失

中图分类号 S 565.103.5 文献标识码 A 文章编号 1000-9841(2003)01-0050-04

大豆起源于中国,近年来已成为世界上最经济的食物蛋白来源之一。Andre和Hou<sup>[1]</sup>于1932年首次发现大豆脂肪氧化酶使多元不饱和脂肪酸(PUFA)氧化产生豆腥味。脂肪氧化酶(lipoxygenase, EC1.13.11.12, Lox)能专一催化多元不饱和脂肪酸(PUFA)加氧反应,生成具有共轭双键的脂肪氢过氧化物,再经裂解酶分解生成短碳链的醇、酮和醛类等挥发性物质,导致大豆及其制品产生豆腥味,限制了其作为蛋白质来源的广泛利用,且直接影响中国加入WTO后的大豆生产和豆制品出口。消除豆腥味的历史是大豆产品开发利用的一大难题。现主要采用物理、化学和添加风味物质等方法来消除豆腥味,但这些皆为治标的方法,不仅增加加工成本,而且去豆腥味的效果也不理想。最经济和治本的方法应是选育种子脂肪氧化酶缺失的无豆腥味大豆品种<sup>[2-3]</sup>。因此,本文将自行开发研制的植物脂肪氧化酶同功酶检测技术(该技术已申请国家发明专利<sup>[4]</sup>)用于筛选大豆脂肪氧化酶同功酶缺失的新材料,对进一步研究克服大豆豆腥味有十分重要的意义。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

试验的大豆脂肪氧化酶缺失型种质资源和后代材料及不缺失型种质资源和后代材料均由安徽省农科院作物所提供。同时,安徽省农科院作物所还完成所检测的大豆脂肪氧化酶缺失型杂交材料的后代自交培育。

### 1.2 化学试剂

亚油酸为中国医药公司经销产品; $\beta$ -胡萝卜素为MERLK公司产品,其它化学试剂均为分析纯。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 植物脂肪氧化酶同功酶快速检测技术

该技术已申请国家发明专利<sup>[4]</sup>,其主要原理为:利用脂肪氧化酶的偶联氧化还原指示剂而产生显色反应,以下简称快速检测技术。

#### 1.3.2 大豆脂肪氧化酶同功酶缺失型材料的筛选

利用快速检测技术对60多个大豆种质资源和后代材料进行筛选大豆脂肪氧化酶同功酶缺失型材料。

#### 1.3.3 大豆脂肪氧化酶同功酶缺失型材料自交后代的筛选

利用快速检测技术对已筛选的大豆材料自交后代进行检测筛选大豆脂肪氧化酶同功酶缺失型品种

\* 收稿日期:2002-09-18

基金项目:该项研究得到国家科技部“863”项目(2001AA241018),农业部“948”(991018),安徽省科技厅重大科技专项(01603002)的资助。

作者简介:张瑛(1968-),男,硕士,主要从事植物生理生化研究。

\* \* 通讯作者:电话:5145827

(品系)。

利用快速检测技术对 60 个大豆种质资源和后代材料进行筛选大豆脂肪氧化酶同功酶缺失型材料, 结果如下:

2 结果与分析

2.1 大豆脂肪氧化酶同功酶缺失型材料的筛选

表 1 大豆种质资源和后代材料筛选结果

Table 1 Screening of soybean cultivars

品种	Lox-1	Lox-2	Lox-3	品种	Lox-1	Lox-2	Lox-3	品种	Lox-1	Lox-2	Lox-3	品种	Lox-1	Lox-2	Lox-3
Varieties				Varieties				Varieties				Varieties			
合豆 1 号	—	—	—	9609—6—1	+	+	—	六丰	—	—	—	0010	—	—	—
六青丰	—	—	—	9609—6—2	—	+	+	辽鲜	—	—	—	0005	—	—	—
十月青	—	—	—	9609—6—3	—	—	—	台湾 262	—	—	—	0277	—	—	—
9610 黄	—	—	—	9609—6—4	—	—	—	大粒早	—	—	—	0151	—	—	—
9610 青	—	—	—	9609—6—5	—	—	—	新六青	—	—	—	0258	—	—	—
郁南大黄豆	—	—	—	9609—6—6	+	+	+	早生白乌	—	—	—	0452	—	—	—
阜 75—71	—	—	—	9609—6—7	—	—	—	大豆诱处 4 号	—	—	—	0332	—	—	—
G7—1	+	+	+	9609—6—8	—	—	—	皖豆 14	—	—	—	92—35	—	—	—
B2—18	—	—	—	9609—6—9	—	+	+	9163	—	—	—	0100	—	—	—
F6—9	—	—	—	9609—6—10	—	+	+	北京豆	—	—	—	0334	—	—	—
504	—	—	—	9609—6—11	—	—	—	9767	—	+	—	0086	—	—	—
C3—6	—	—	—	9609—6—12	—	—	—	0448	—	—	—	0019	—	—	—
蒙 6 号	—	—	—	无豆腥味 141	—	—	+	0331	—	—	—	0020	—	—	—
M0304	—	—	—	大豆梦丰	—	—	—	诱处	—	—	—	91—413	—	—	—
9606—6—13	+	+	+	台湾 75	—	—	—	营 23	—	—	—	日本大粒青	—	—	—

注: 附: “+”为 lox 缺失; “—”为 lox 不缺失。

表 2 大豆 Lox 同功酶缺失型材料检测

Table 2 A summarization of soybean lipoxxygenase isozymes lacking mutants

Lox 同功酶缺失型材料的类型	Lox 同功酶缺失型材料
Types of soybean lipoxxygenase isozymes lacking mutants	Soybean lipoxxygenase isozymes lacking mutants
Lox 同功酶全缺失	G7—1、9606—6—13 和 9609—6—6
缺失 Lox—1 和 Lox—2	9609—6—1
缺失 Lox—2 和 Lox—3	9609—6—2、9609—6—9 和 9609—6—10
缺失 Lox—3	无豆腥味 141
缺失 Lox—2	9767

从表 1 可以看到 G7—1、9606—6—13 和 9609—6—6 的 Lox 同功酶全缺失, 9609—6—1 缺失 Lox—1 和 Lox—2, 9609—6—2、9609—6—9 和 9609—6—10 缺失 Lox—2 和 Lox—3, 无豆腥味 141 仅缺失 Lox—3, 9767 仅缺失 Lox—2。表 2 为 Lox 同功酶缺失型材料汇总。

2.2 大豆脂肪氧化酶同功酶缺失型材料自交后代的筛选

利用快速检测技术对已筛选的大豆脂肪氧化酶同功酶缺失型材料自交后代进行进一步检测大豆脂肪氧化酶同功酶缺失型材料, 结果如表 3。

从表 3 可以看到缺失种质材料自交后代均有 Lox 同功酶缺失, 其中有 Lox 同功酶全缺失的 G7—1、9606—6—13, 也有 Lox 同功酶部分缺失如其余 8 个品种, 具体情况现汇总如表 4。

表 4 的亲本中, G7—1 为材料, 其余 9 个品系又是以 G7—1 为亲本的杂交后代, 其自交后代的 Lox 同功酶缺失得到聚合或部分聚合, 达到消除豆腥味的目的, 并且 9609—6—1、9609—6—3、9606—6—13 的子代的 Lox 同功酶缺失类型检测与经农业部谷物品质监督检验测试中心用脂氧酶水平电泳法检测相一致。

表 3 大豆种质自交后代检测

Table 3 The offspring of soybean lipoxygenase isozymes lacking mutants

亲代 Parent	子代 Offspring	Lox-1	Lox-2	Lox-3	亲代 Parent	子代 Offspring	Lox-1	Lox-2	Lox-3
9609-6-1	9609-6-1-1	+	+	+	9609-6-11	9609-6-11-1	-	-	-
	9609-6-1-2	+	+	-	9609-6-11	9609-6-11-2	-	-	-
	9609-6-1-3	+	+	+		9609-6-11-3	-	-	-
9609-6-2	9609-6-2-1	-	+	-		9609-6-11-4	-	-	-
	9609-6-2-2	-	-	+	9609-6-12	9609-6-12-1	-	-	-
9609-6-3	9609-6-3-1	-	-	-		9609-6-12-2	-	+	-
	9609-6-3-2	-	-	-		9609-6-12-3	-	-	-
	9609-6-3-3	-	-	-	9606-6-13	9606-6-13-1	+	+	+
9609-6-4	9609-6-4	-	-	-		9606-6-13-2	+	+	+
9609-6-5	9609-6-5-1	-	+	-		9606-6-13-3	+	+	+
	9609-6-5-2	-	-	-	9767-43	9767-43-1	-	+	-
9609-6-6	9609-6-6-1	+	+	-		9767-43-2	-	-	-
	9609-6-6-2	+	+	-		9767-43-3	-	-	-
	9609-6-6-3	+	+	+		9767-43-4	-	-	-
9609-6-7	9609-6-7-1	-	-	-		9767-43-5	-	-	-
	9609-6-7-2	+	+	-		9767-43-6	-	+	-
	9609-6-7-3	-	-	-		9767-43-7	-	-	-
9609-6-8	9609-6-8-1	-	-	-		9767-43-8	-	-	-
	9609-6-8-2	-	-	-		9767-43-9	-	+	-
	9609-6-8-3	-	-	-		9767-43-10	-	-	-
	9609-6-8-4	-	-	-		9767-43-11	-	-	-
	9609-6-8-5	-	-	-		M1184	-	-	-
9609-6-9	9609-6-9-1	+	+	+		M1185	-	-	-
	9609-6-9-2	-	-	-	M304	M304	-	-	-
	9609-6-9-3	-	-	-	G7-1	G7-1	+	+	+
9609-6-10	9609-6-10-1	-	+	+	C3-6	C3-6	-	-	-
	9609-6-10-2	+	+	+		M1143	-	-	-
	9609-6-10-3	-	+	+					

注: 附: “+”为 lox 缺失; “-”为 lox 不缺失。

表 4 植物脂肪氧化酶同工酶快速检测技术结果

Table 4 Results by using the rapid detective technique of lipoxygenase isozymes of plant

大豆材料(品系)名称 Soybean Cultivars	同一材料不同株系 Lox 同工酶缺失类型 Lipoxygenase isozymes lacking mutants in different soybean individual plant of the same cultivar	大豆材料(品系)名称 Soybean cultivars	同一材料不同株系 Lox 同工酶缺失类型 Lipoxygenase isozymes lacking mutants in different soybean individual plant of the same cultivar
9609-6-1	缺失 Lox-1, 2, 3	9609-6-9	缺失 Lox-1, 2, 3
	缺失 Lox-1, 2		Lox 非缺失
9609-6-2	Lox 非缺失	9609-6-10	缺失 Lox-1, 2, 3
	缺失 Lox-2, 3		缺失 Lox-2, 3
9609-6-5	Lox 非缺失	9606-6-13	缺失 Lox-1, 2, 3
	缺失 Lox-2		
9609-6-6	缺失 Lox-1, 2, 3	9767-43	Lox 非缺失
	缺失 Lox-1, 2		缺失 Lox-2
9609-6-7	Lox 非缺失	G7-1	缺失 Lox-1, 2, 3
	缺失 Lox-1, 2		

3 讨论

在大豆中, 大豆脂肪氧化酶能专一催化多元不饱和脂肪酸(PUFA)加氧反应, 生成具有共轭双键的脂肪氢过氧化物, 再经裂解酶分解生成短碳链的挥发性物质, 导致大豆及其制品产生豆腥味, 其挥发性物质主要成分为己醛、己酮。图 1 为大豆脂肪氧化酶途径, 整个酶系统包括脂酶(Lp)、脂肪氧化酶(Lox)、脂肪酸氢过氧化物裂解酶(HPO Lyase)、醇脱氢酶(Adh)和异构因子(IF)。

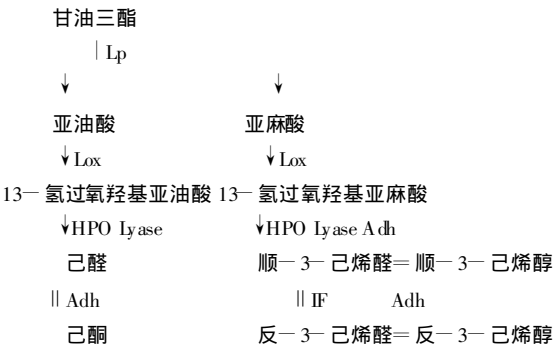


图 1 大豆脂肪氧化酶途径

Fig 1 A pathway of soybean lipoxygenase isozymes

从上图可以看出, 选育种子脂肪氧化酶全缺失型且农艺性状优良的无豆腥味大豆品种可完全克服大豆豆腥味<sup>[3]</sup>。

本实验利用自行开发研制的植物脂肪氧化酶同功酶检测技术(该技术已申请国家发明专利<sup>[4]</sup>)对 60 多个大豆种质资源和后代材料进行筛选到 G7-1 等的大豆脂肪氧化酶同功酶缺失型材料 9 个。再将已

筛选的大豆脂肪氧化酶同功酶缺失型材料进行自交, 并利用快速检测技术对其自交后代进行进一步检测大豆脂肪氧化酶同功酶缺失型材料的大豆品系 10 个, 其中有大量的脂肪氧化酶同功酶全缺失和部分缺失的单株, 大大地丰富了大豆脂肪氧化酶同功酶缺失型种质资源和后代材料, 对建立大豆脂肪氧化酶同功酶的近等位基因系, 更好研究大豆脂肪氧化酶同功酶的遗传特性、生化特性、分子生物学特性和从根本上消除大豆豆腥味具有重要意义。

另外, 本实验中的植物脂肪氧化酶同功酶快速检测技术是利用脂肪氧化酶偶联氧化还原指示剂产生显色反应的原理, 建立测定 Lox 同功酶活性的方法。该技术具有操作简便、快速, 结果直观、准确, 能进行定性和定量分析的特点。将该技术应用于无豆腥味大豆品种进行辅助育种具有极其重要的意义, 为无豆腥味且农艺性状优良的脂肪氧化酶同功酶缺失大豆品种的大面积扩繁, 为彻底消除大豆的豆腥味, 改善大豆风味提供了可能。

参 考 文 献

1 Andre E., Hou KW. The presence of a lipid oxidase in soybean, *Glycine soya* [ J ]. *Compte Rendu Acad Sci(Paris)* 1932 194: 645.  
2 麻浩, 官春云, 何小玲, 等. 大豆脂肪氧化酶同功酶的缺失对其农艺性状的影响[ J ]. *湖南农业大学学报(自然科学版)*, 2000, 26(6): 445—448  
3 王海滨. 植物的脂肪氧化酶[ J ]. *植物生理通讯* 1990(2): 63—67.  
4 中华人民共和国知识产权局. 发明专利公报[ J ]. 2001 年, 第 17 卷第 21 号(总 793): P53.

STUDY ON THE TECHNIQUE OF ANALYSING LIPOXYQENASE ISOZYMES FOR  
ABSCENCE OF BEANY FLAVOR MUTANTS IN SOYBEAN BREEDING

Zhang Ying<sup>1</sup> Zhang Lei<sup>2</sup> Wu Jingde<sup>1</sup> Tong Jiping<sup>1</sup> Zheng Leya<sup>1</sup> Wu Yuejin<sup>\*1</sup>

(1. Rice Research Institute Anhui Academy of Agricultural Sciences Key Lab of Rice Genetics and Breeding of MOA; 2. Crop Research Institute Anhui Academy of Agricultural Sciences, Hefei 230031)

**Abstract** Nine mutants lacking soybean lipoxygenase isozymes were screened by using the rapid detective technique of lipoxygenase isozymes from sixty soybean cultivars, and the offspring of the mutants was developed, and ten soybean mutants without beany flavor and with fine agronomic characteristics were obtained from the offspring.

**Key words** Lipoxygenase isozymes; Detective techniques; Without beany flavor; Lacking mutants