

三种大豆种子贮藏蛋白亚基缺失种质的筛选与鉴定

张国敏¹, 张亚琴¹, 舒英杰², 麻浩¹

(1. 南京农业大学 作物遗传与种质创新国家重点实验室/种业科学系, 江苏 南京 210095; 2. 安徽科技学院 农学院, 安徽 凤阳 233100)

摘要: 蛋白质组分改良是国内外大豆蛋白质品质育种的研究热点之一。大豆种子贮藏蛋白主要包括 11S 球蛋白和 7S β -伴大豆球蛋白, 它们也是大豆蛋白营养价值和功能特性的决定组分。利用我国自然突变产生的亚基缺失体材料通过聚合育种, 并经聚丙烯酰胺凝胶电泳法 (SDS - PAGE) 分析鉴定表明: 已获得 $A_3 + \alpha'$ 亚基缺失、只含有 β 亚基、只含有 $\alpha + \beta$ 亚基、只含有 $\alpha' + \beta$ 亚基、只含有 7S 亚基和 $A_5A_4B_3$ 亚基缺失、 $A_2A_{1a}A_{1b}$ 含量极低、 $B_{1a}B_{1b}B_2$ 含量极低等系列单缺、双缺、多缺的贮藏蛋白亚基组成类型新种质, 其中 $A_3 + \alpha'$ 亚基缺失、只含有 $\alpha + \beta$ 亚基、只含有 7S 亚基 3 种种质均能正常生长、结实, 并稳定遗传; 只含 7S 亚基类型大豆种子贮藏蛋白的 7S 组分总量含量最高; $A_3 + \alpha'$ 亚基缺失类型大豆种子贮藏蛋白 11S 组分总含量最高; 在 11S + 7S 组分总量上由高到低依次是 $A_3 + \alpha'$ 亚基缺失类型 > 只含 7S 亚基类型 > 只含 $\alpha + \beta$ 亚基类型; 11S/7S 比值的变异范围在 0.14 ~ 1.27。三种类型种质完熟期基本在 105 ~ 111 d; 百粒重基本一致; $A_3 + \alpha'$ 亚基缺失类型大豆单株产量最高平均为 55.12 g; 只含 $\alpha + \beta$ 亚基类型蛋白总含量最低为 57.6%, 蛋白质含量由高到低依次为只含 7S 亚基类型、 $A_3 + \alpha'$ 亚基缺失类型、只含 $\alpha + \beta$ 亚基类型, 脂肪含量由高到低依次为: 只含 $\alpha + \beta$ 亚基类型、只含 7S 亚基类型、 $A_3 + \alpha'$ 亚基缺失类型。

关键词: 大豆种质创新; 贮藏蛋白; 亚基缺失; 创制; 评价

中图分类号: S565.1 **文献标识码:** A **DOI:** 10.11861/j.issn.1000-9841.2015.01.0001

Screening and Identification of Three Types of Soybean Lines Lacking Different Seed Storage Protein Subunits

ZHANG Guo-min¹, ZHANG Ya-qin¹, SHU Ying-jie², MA Hao¹

(1. State Key Laboratory of Crop Genetics & Germplasm Enhancement/Department of Seed Industry Science, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. Agricultural College, Anhui Science and Technology University, Fengyang 233100, China)

Abstract: Improvement of protein components is one of the hotspots in the protein quality breeding of soybean. Soybean seed storage proteins mainly consist of 11S globulin and 7S β -conglycinin. They determine the nutritional value and functional properties of soy proteins. In the present study, natural mutants of subunit deficiency were used through pyramiding breeding to produce new deficiency types. After screening with polyacrylamide gel electrophoresis (SDS - PAGE), lines lacking $A_3 + \alpha'$ subunits, lines only containing β subunit, lines only containing $\alpha + \beta$ subunits, lines only containing $\alpha' + \beta$ subunits, lines only containing 7S subunits, lines lacking $A_5A_4B_3$ subunits, lines with the lower level of $A_2A_{1a}A_{1b}$ subunit and lines with the lower level of $B_{1a}B_{1b}B_2$ subunit, etc., were obtained. The lines lacking $A_3 + \alpha'$ subunits, containing only $\alpha' + \beta$ subunits, and containing 7S subunits could normally grow and develop as well as were stably inherited. The lines containing only 7S subunits had the highest amount of total 7S while the lines lacking $A_3 + \alpha'$ subunits possessed the highest level of 11S. The variation range for the 11S/7S ratio in the three new types was between 0.14 and 1.27, while their growth period was between 105 and 111 d. All the three new types had almost the same hundred-grain weight. The lines lack of $A_3 + \alpha'$ subunits had the highest yield per plant of 55.12 g. The lines containing only $\alpha + \beta$ subunits had the lowest amount of protein and oil (57.6%). The order of protein contents of the lines were as follows: lines containing 7S subunits > lines lacking $A_3 + \alpha'$ subunits > lines containing only $\alpha + \beta$ subunits. The order of fat content was as follows: lines containing only $\alpha + \beta$ subunits > lines containing only 7S subunits > lines lacking $A_3 + \alpha'$ subunits.

Keywords: Soybean (*Glycine max* L. Merr.) ; Storage protein; Subunit deficiency; Germplasm enhancement; Evaluation

大豆(*Glycine max* L. Merrill)种子贮藏蛋白主要包括 11S 球蛋白 (glycinin) 和 7S β -伴大豆球蛋白 (β -conglycinin) 两种主要组分, 7S 组分主要由 α' 、 α 和 β 三种亚基 (β -伴大豆球蛋白) 构成^[1], 11S 组分主要由 $A_{1a}B_2$ 、 A_2B_{1a} 、 $A_{1b}B_{1b}$ 、 $A_5A_4B_3$ 和 A_3B_4 五个亚

基 (大豆球蛋白) 组成^[2]。它们也是大豆蛋白营养价值和功能特性的决定组分^[3-4], 蛋白质组分改良目前是国内外大豆蛋白质品质育种的研究热点之一^[5-8]。

到目前为止, 国外许多研究者对大豆籽粒 7S 和

收稿日期: 2014-03-12
基金项目: 上海市科委重点攻关项目 (12391900900); 国家自然科学基金 (30971840, 31171572, 31371711); 高等学校博士学科点专项科研基金 (20100097110030, 20120097110025); 江苏省高校优势学科建设工程资助项目。
第一作者简介: 张国敏 (1989-), 女, 硕士, 主要从事作物种质资源遗传改良研究。E-mail: vivyear@sian.cn。
通讯作者: 麻浩 (1965-), 男, 教授, 主要从事种子科学与大豆遗传育种研究。E-mail: Lq-ncsi@njau.edu.cn。

11S 组分做了大量筛选和创新^[9-10],并通过辐射和诱变方法获得了 7S 和 11S 组分不同亚基缺失的材料^[11-14],达到了改良大豆蛋白营养和功能特性的目的。我国大豆种质资源中蕴藏着丰富的蛋白亚基缺失体资源,如 α' 缺失、 α 缺失、 β 缺失、 $A_5A_4B_3$ 缺失、 A_3B_4 缺失等^[15-18]。但通过亚基特异材料进行大豆蛋白品质改良的研究国内尚少报道,尽管国内部分育种工作者已创制了 α 缺失、 $(\alpha + A_{1a}A_{1b}A_2)$ 缺失、 A_3 缺失、 $(\alpha' + A_4)$ 缺失和 $(\alpha' + \alpha)$ 缺失的种质^[19-21],但这些缺失亚基的基因主要引自日本,且常伴有萎黄病、不育或致死等性状^[22]。

本研究通过利用我国大豆自然缺失大豆种质配制杂交组合,并利用聚丙烯酰胺凝胶电泳法(SDS-PAGE)筛选聚合杂交后代贮藏蛋白亚基组成与含量情况,以期筛选获得各种亚基缺失大豆新种质,丰富我国蛋白品质改良的种质基础,从而为相应专用型大豆新品种的培育奠定种质基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试材料由南京农业大学作物遗传与种质创新国家重点实验室采用聚合育种方法获得的大豆主要贮藏蛋白亚基缺失体材料。

1.2 大豆亚基缺失特征分析(SDS-PAGE)

1.2.1 电泳样品的准备 称取 1.5 mg 大豆粉,加入 500 μ L 抽提缓冲液,室温提取 1 h,离心,利用 Bradford 法测定各蛋白质浓度使样品浓度一致。按 4:1 比例加入样品缓冲液(2% SDS,0.1 mol \cdot L⁻¹ Tris-HCl,0.01 mol \cdot L⁻¹ 2-巯基乙醇,1 g \cdot L⁻¹ 溴酚蓝,12.5 mL 甘油,pH8.0),点样前涡旋混匀并煮沸 3~5 min。

1.2.2 SDS-PAGE 过程 采用不连续垂直板凝胶电泳。凝胶厚度 1 mm,浓缩胶浓度为 5%,分离胶浓度为 12.5%。使用 Tris-Glycine 电极缓冲液系统(0.025 mol \cdot L⁻¹ Tris-HCl,0.192 mol \cdot L⁻¹ 甘氨酸,0.1% SDS,pH8.0)。电泳开始设置恒流 20 mA,待溴酚蓝带进入分离胶时,电流加倍。当溴酚蓝指示剂距离玻璃板 1 cm 处时结束电泳。用 0.1% 的考马斯亮蓝 R250 染色液(水:甲醇:乙酸=9:5:6)染色 30 min 后置于脱色液(水:甲醇:乙酸=17:2:1)中脱色 30~120 min(胶的背景脱色干净可见清晰条带结束脱色)。用天根凝胶成像系统拍照,大豆蛋白 7S 和 11S 组分和亚基的相对含量用天根凝胶成像分析仪分析。

1.3 农艺性状调查

田间考种和测定的主要农艺性状有生育时期、单株产量和百粒重。生育时期主要包括出苗期(VE)、子叶期(VC)、初花期(R1)、盛花期(R2)、初荚期(R3)、盛荚期(R4)、鼓粒始期(R5)、鼓粒盛期(R6)、初熟期(R7)、完熟期(R8);百粒重和单株产量取 3 次重复的平均值。

1.4 品质分析

用 FOSS S0190711 近红外品质分析仪分析测定蛋白质和脂肪在所有成分中的百分比,数据为重复 3 次的平均值。

1.5 数据分析

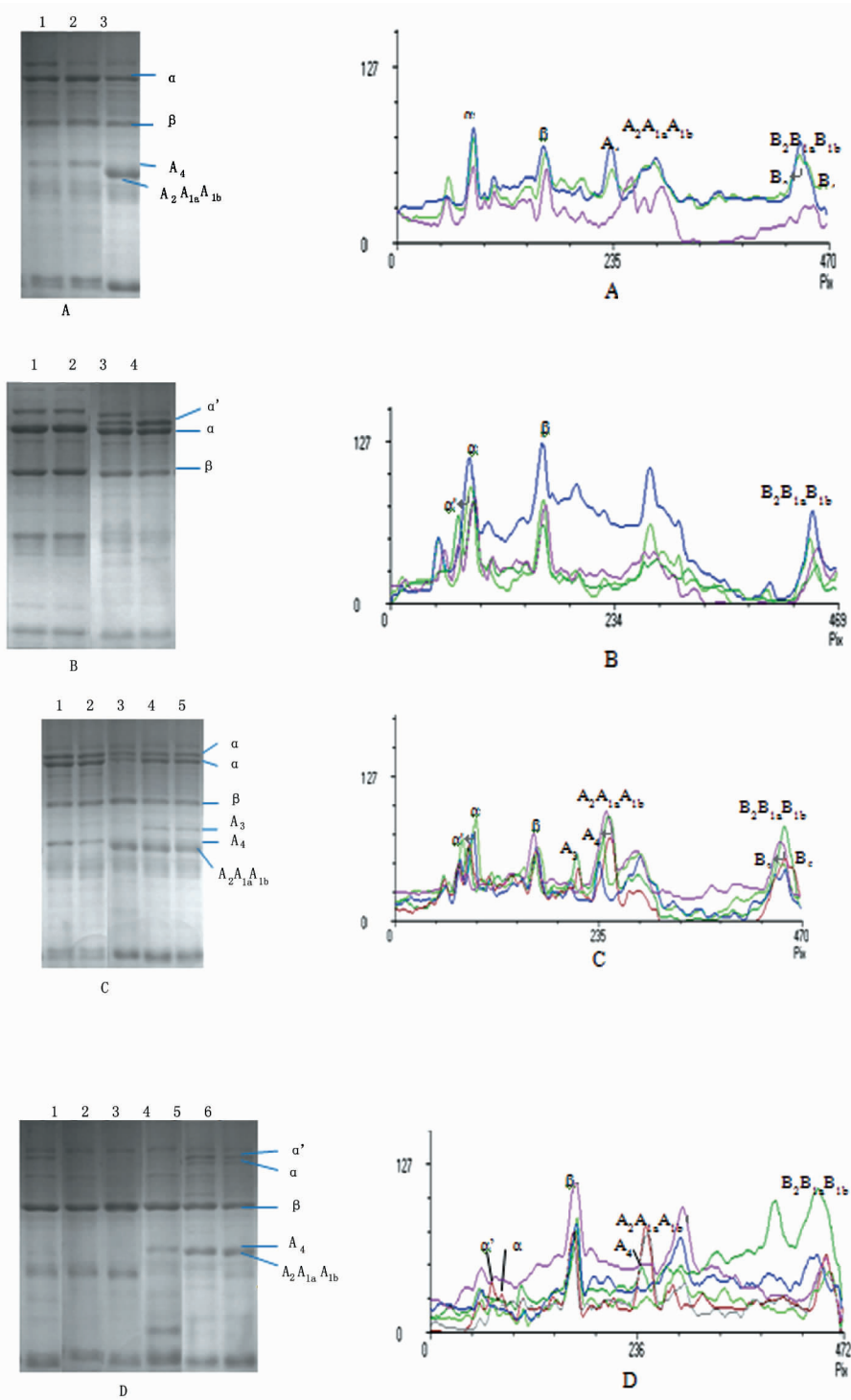
采用 Excel 2010 和 DPS 7.05 软件进行数据分析。

2 结果与分析

2.1 大豆种子贮藏蛋白亚基缺失种质的分析

通过多年聚合杂交,从收获的 2011 年海南繁种后代中筛选出具有一定遗传稳定性的大豆贮藏蛋白亚基变异品系。图 1 是大豆贮藏蛋白亚基变异种质的电泳图谱,可以看出 7S 组分和 11S 组分均有丰富的变异类型。将其类型简单分为 4 大类,11 小类。A 类为 α' 缺失 + 11S 部分缺失类(图 1A): $A_3 + A_2A_{1a}A_{1b}$ 亚基缺失(泳道 1、2)、 A_3 亚基缺失 + A_4 亚基含量低(泳道 3);B 类为 11S 全缺失类(图 1B):只含 $\alpha + \beta$ 类型(泳道 1、2)、只含 7S 类型(泳道 3、4);C 类为 11S 部分缺失类(图 1C): $A_3 + A_2A_{1a}A_{1b}$ 亚基缺失(泳道 1、2)、 A_3 亚基缺失 + A_4 亚基含量低(泳道 3)、 A_4 亚基含量低(泳道 4、5);D 类为 β 亚基含量高类(图 1D): $\alpha + 11S$ 亚基缺失(泳道 1)、 $\alpha' + \alpha + 11S$ 亚基缺失(泳道 2、3)、 $\alpha' + \alpha + A_3$ 亚基缺失 + $A_2A_{1a}A_{1b}$ 亚基含量低(泳道 4)、 A_3 亚基缺失及 $\alpha' + \alpha + A_4$ 亚基含量低(泳道 5、6)。

其中只含有 $\alpha' + \beta$ 亚基(A:泳道 1)、只含有 β 亚基(A:泳道 2、3)、只含有 $\alpha + \beta$ 亚基(C:泳道 1、2)3 种类型在大豆种子贮藏蛋白 7S、11S 组分亚基变异的研究中鲜有报道;只含有 7S 组分(11S 全缺失)亚基类型国内还尚未见报道。而这些材料中 α' 和 α 亚基缺失或含量极低的类型对提高大豆蛋白营养和功能特性具有重要意义,其他 11S 组分亚基部分缺失导致 7S 组分亚基含量相对提高,在提高大豆蛋白乳化和起泡能力等表面性质方面也很有应用价值。这些材料将为我国自主创制 7S 和 11S 组分各类型缺失品系提供重要的中间材料。



A (α' 缺失 + 11S 部分缺失类) : 泳道 1、2: $A_3 + A_2A_{1a}A_{1b}$ 亚基缺失; 泳道 3: A_3 亚基缺失 + A_4 亚基含量低; B (11S 全缺失类) : 泳道 1、2: 只含 $\alpha + \beta$ 亚基类型; 泳道 3、4: 只含 7S 亚基类型; C (11S 部分缺失类) : 泳道 1、2: A_3 亚基和 $A_2A_{1a}A_{1b}$ 亚基缺失; 泳道 3: A_3 亚基缺失、 A_4 亚基含量低; 泳道 4、5: A_4 亚基含量低; D (β 亚基含量高类) : 泳道 1: $\alpha + 11S$ 亚基缺失; 泳道 2、3: $\alpha' + \alpha + 11S$ 亚基缺失; 泳道 4: $\alpha' + \alpha + A_3$ 亚基缺失、 $A_2A_{1a}A_{1b}$ 亚基含量低; 泳道 5、6: A_3 亚基缺失、 $\alpha' + \alpha + A_4$ 亚基含量低。

A (Type of lacking α' + some of 11S components) : lanes 1, 2: $A_3 + A_2A_{1a}A_{1b}$ subunit deficiency; lane 3: A_3 subunit deficiency + low level of A_4 subunit; B (Type of lacking total 11S components) : lanes 1, 2: line only containing $\alpha + \beta$ subunits ($\alpha + \beta$ type); lanes 3, 4: line only containing 7S subunits (7S type); C (Type of lacking some 11S components) : lanes 1, 2: $A_3 + A_2A_{1a}A_{1b}$ subunits deficiency; lane 3: A_3 subunit deficiency + low level of A_4 subunit; lanes 4, 5: low level of A_4 subunit; D (High level of β subunit) : lane 1: $\alpha +$ total 11S subunit deficiency; lanes 2, 3: $\alpha' + \alpha +$ total 11S subunit deficiency; lane 4: $\alpha' + \alpha + A_3$ subunit deficiency and low level of $A_2A_{1a}A_{1b}$ subunits; lanes 5, 6: A_3 subunit deficiency and low level of $\alpha' + \alpha + A_4$ subunits.

图 1 大豆种质种子贮藏蛋白亚基变异种质的 SDS - PAGE 图谱和光密度扫描图

Fig. 1 SDS - PAGE patterns and scanning profiles of soybean lines with different subunit contents

2012 年,将按单株收获的各品系种子夏播于安徽科技学院实验教学基地,收获单株种子,利用 SDS -PAGE 方法,分别按单株检测种子贮藏蛋白亚基表现类型。若检测后代中种子贮藏蛋白亚基表现类型全部与亲本一致,则认为此类种子具有遗传稳定性。结果发现(表 1)A 类(α' + 11S 部分缺失类)大部分植株种子具有该性状的遗传稳定性,其后代种子贮藏蛋白亚基类型与亲本一致;但存在一些单株 11S 亚基部分缺失类型与亲本不一致的现象。B

类(11S 全缺失类)种子具有遗传稳定性,其后代植株种子贮藏蛋白亚基类型与亲本一致。

D 类(β 亚基含量高)植株后代亚基类型分离现象较严重,后代中未检测出遗传稳定的只含有 β 亚基类型的单株(图 1D:泳道 2、3);同时 D 类后代种子贮藏蛋白 7S 组分亚基表型基本为只含 $\alpha + \beta$ 类型或只含 7S 类型,而有关只含有 β 亚基的种子遗传机制有待进一步研究。

表 1 大豆种质种子贮藏蛋白亚基变异类型

Table 1 The polymorphism of seed storage protein subunits of soybean lines		
类型 Type	遗传稳定情况 Inheritance stability	泳道位置 Lane position
$\alpha' + \beta$ 类型(D 类型) $\alpha' + \beta$ type	不稳定 Instable	图 1D:泳道 1 Fig. 1D: lane 1
β 类型(D 类型) β type	不稳定 Instable	图 1D: 泳道 2,3 Fig. 1D: lanes 2, 3
$A_2A_{1a}A_{1b}$ 亚基含量低(D 类型)		
Low level of $A_2A_{1a}A_{1b}$	不稳定 Instable	图 1D: 泳道 4 Fig. 1D: lane 4
α' 、 α 含量低(D 类型)		
Low level of α' and α	不稳定 Instable	图 1D: 泳道 5,6 Fig. 1D: lanes 5, 6
A_3 、 $A_2A_{1a}A_{1b}$ 亚基缺失的 α' 缺失类型(A 类型)		
Lacking $A_3 + A_2A_{1a}A_{1b}$ of α' deficiency type	稳定 Stable	图 1A: 泳道 1,2 Fig. 1A: lanes 1, 2
A_3 亚基缺失、 α' 缺失类型(A 类型)		
$A_3 + \alpha'$ deficiency	稳定 Stable	图 1A: 泳道 3 Fig. 1A: lane 3
$\alpha + \beta$ 类型(B 类型) $\alpha + \beta$ type	稳定 Stable	图 1B: 泳道 1,2 Fig. 1B: lanes 1, 2
7S 类型(B 类型)7S type	稳定 Stable	图 1B,泳道 3,4 Fig. 1B: lanes 3, 4

2.2 大豆缺失种质种子贮藏蛋白 11S 和 7S 亚基组成及含量分析

种子贮藏蛋白组分的变异主要包括亚基组成及亚基含量的变异,利用 SDS - PAGE 凝胶电泳法分析收获

的所有亚基缺失大豆种子贮藏蛋白的 11S 和 7S 组分及其亚基相对含量,结果表明各亚基相对含量的变异幅度和变异系数都比较大(表 2),11S 和 7S 组分及其亚基相对含量基本呈正态分布(图 2 ~ 图 4)。

表 2 大豆种质种子贮藏蛋白 11S 和 7S 组分及其亚基相对含量分析

Table 2 The content variation of 11S and 7S and their subunits of soybean lines									
	α' 亚基 α' subunit	α 亚基 α subunit	β 亚基 β subunit	A_3 亚基 A_3 subunit	酸性亚基 Acidic subunit	碱性亚基 Basic subunit	7S 组分 7S component	11S 组分 11S component	11S/7S
变幅 AV/%	6.97 ~ 36.91	7.67 ~ 44.11	7.5 ~ 71.89	2.02 ~ 9.16	2.61 ~ 57.79	0.82 ~ 74.41	23.4 ~ 96.29	0.82 ~ 76.11	0.14 ~ 3.19
极差 R/%	29.94	36.44	64.39	7.14	55.18	73.59	72.89	75.29	3.17
平均值 \pm 标准差 Mean \pm SD	16.88 \pm 0.68	21.19 \pm 0.58	27.64 \pm 1.08	5.46 \pm 1.58	22.24 \pm 0.86	17.25 \pm 1.44	54.44 \pm 1.84	32.01 \pm 1.63	0.65 \pm 0.70
变异系数 CV/%	37.37	29.76	38.27	33.16	39.04	57.75	27.76	57.57	76.56

AV: Amplitude variable; R: Range; CV: Coefficient of variation.

续表 3

统计指标 Statistical index	类型 Type	α' 亚基 α' subunit	α 亚基 α subunit	β 亚基 β subunit	酸性亚基 Acidic subunit	碱性亚基 Basic subunit	7S 组分 7S component	11S 组分 11S component	7S + 11S 组分 7S + 11S component	11S/7S
最小值 Min.	只含 7S 亚基 Only containing 7S type	9.84	8.26	10.22	0.00	6.14	36.12	7.53	50.78	0.14
	只含 $\alpha + \beta$ 亚基 Only containing $\alpha + \beta$ type	0.00	18.70	14.87	0.00	9.62	35.85	9.62	46.02	0.22
	$A_3 + \alpha'$ 亚基缺失 $A_3 + \alpha'$ deficiency	0.00	14.57	12.66	10.54	8.45	28.35	20.57	52.66	0.62
极差 Range	只含 7S 亚基 Only containing 7S type	11.37	13.67	12.86	0.00	10.31	26.83	17.27	22.74	0.43
	只含 $\alpha + \beta$ 亚基 Only containing $\alpha + \beta$ type	0.00	7.88	13.59	0.00	8.81	16.79	8.81	22.84	0.18
	$A_3 + \alpha'$ 亚基缺失 $A_3 + \alpha'$ deficiency	0.00	7.68	14.45	8.98	11.87	21.01	15.49	30.46	0.65
变异系数 Coefficient of variation	只含 7S 亚基 Only containing 7S type	18.00	19.89	18.21	0.00	22.91	14.30	26.95	10.15	35.51
	只含 $\alpha + \beta$ 亚基 Only containing $\alpha + \beta$ type	0.00	10.84	16.42	0.00	23.27	10.83	22.42	11.97	19.02
	$A_3 + \alpha'$ 亚基缺失 $A_3 + \alpha'$ deficiency	0.00	10.98	18.46	13.42	24.91	12.82	12.64	10.13	16.69

2.4 三种蛋白亚基缺失新型大豆种质的主要农艺性状差异

三种缺失类型大豆均出苗基本正常、整齐,能正常生长、结实。收获的种子籽粒饱满、近球形;种皮黄色、有光泽;种脐色浅,近黄色(图 5A)。这三种类型大豆植株农艺性状基本相近,均属于矮秆类型,阔型叶,紫花。生育时期表现为(表 4):播种后第 7 天为出苗期,初花期均在第 38 天,初荚期在第 55 天,只含 $\alpha + \beta$ 亚基类型的盛荚期、鼓粒盛期、初熟期比其他两种类型晚 2 d,只含 7S 亚基类型和 $A_3 + \alpha'$ 亚基缺失类型大豆完熟期在 105 ~ 107 d,只含 $\alpha + \beta$ 亚基类型完熟期在 105 ~ 111 d,晚 4 d。可以

判断这 3 种新型大豆种质生育时期基本一致,且在同一生产区域内属于中熟或早熟类型。

由表 5 可知,3 种类型大豆种子百粒重基本一致,只含 7S 亚基类型大豆种子百粒重稍高,为 3.57 g,其次是 $A_3 + \alpha'$ 亚基缺失类型为 22.92 g,只含 $\alpha + \beta$ 亚基类型百粒重稍低,为 22.61 g; $A_3 + \alpha'$ 亚基缺失类型大豆单株产量最高,只含 7S 亚基类型大豆种子单株产量次之,只含 $\alpha + \beta$ 亚基类型大豆种子单株产量最低;相应的, $A_3 + \alpha'$ 亚基缺失类型大豆种子单株粒数最高,只含 7S 亚基类型次之,只含 $\alpha + \beta$ 亚基类型最低。

表 4 三种蛋白亚基缺失新型大豆种质的生育时期
Fig. 4 The growth period of the three new types of soybean lines (d)

名称 Name	VE	VC	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8
只含 7S 亚基 Only containing 7S type	7 ~ 9	12 ~ 15	38 ~ 40	50 ~ 54	55 ~ 57	59 ~ 61	67 ~ 69	80 ~ 82	93 ~ 97	105 ~ 107
只含 $\alpha + \beta$ 亚基 Only containing $\alpha + \beta$ type	7	13	38	50	55 ~ 56	61 ~ 63	67 ~ 70	82 ~ 84	95 ~ 97	105 ~ 111
$A_3 + \alpha'$ 亚基缺失 $A_3 + \alpha'$ deficiency	7 ~ 9	12 ~ 16	38	50 ~ 53	55 ~ 56	59 ~ 61	67 ~ 69	80 ~ 84	93 ~ 95	105 ~ 107

表 5 三种蛋白亚基缺失新型大豆种质的产量性状

Fig. 5 The yield characters of the three new types of soybean lines

名称 Name	亚基类型				百粒重	单株产量				单株粒数	
	Subunit type				100 - seed weight/g	Single plant yield/g				Seeds per plant	
	α'	α	β	11S	Mean \pm SD	Mean \pm SD	Max.	Min.	Mean \pm SD	Max.	Min.
只含 7S 亚基 Only containing 7S type	+	+	+	-	23.57 \pm 0.46	43.55 \pm 4.77	51.55	34.39	193.21 \pm 1.36	217	176
只含 $\alpha + \beta$ 亚基 Only containing $\alpha + \beta$ type	-	+	+	-	22.61 \pm 0.14	30.90 \pm 4.19	38.04	24.28	142 \pm 0.74	196	117
$A_3 + \alpha'$ 亚基缺失 $A_3 + \alpha'$ deficiency	-	+	+	+	22.92 \pm 0.37	55.12 \pm 7.49	122.38	26.58	245.53 \pm 0.93	298	207



只含 $\alpha + \beta$ 亚基类型
Only containing $\alpha + \beta$
type



只含 7S 亚基类型
Only containing
7S type



$A_3 + \alpha'$ 亚基缺失类型
 $A_3 + \alpha'$ deficiency



图 5 三种新型大豆种质种子、植株及花表现

Fig. 5 The performance of three new types of soybean lines

2.5 三种蛋白亚基缺失新型种质的品质性状差异

由表 6 可知,3 种缺失型大豆的蛋白质含量均低于 40%,由高到低依次为只含 7S 亚基类型、 $A_3 + \alpha'$ 亚基缺失类型、只含 $\alpha + \beta$ 亚基类型;脂肪含量均在 21% 以上,由高到低依次为:只含 $\alpha + \beta$ 亚基类型、只含 7S 亚基类型、 $A_3 + \alpha'$ 亚基缺失类型。同时还可以发现 3 种类型大豆蛋白质和脂肪总量基本一致,接近 60%,只含 $\alpha + \beta$ 亚基类型较低(57.6%)。一般品种要求蛋白质含量在 42% 以上,油脂含量在 20% 以上;高蛋白品种要求在 44% ~ 46% 或以上;

高油脂品种要求在 23% 以上;蛋白质和油脂双高型品种要求蛋白质含量 42% 以上,油脂含量 21% 以上。因此,提高大豆蛋白质含量是下一步育种工作的重点。有研究表明 11S/7S 比值的变异对大豆蛋白、脂肪含量无显著相关^[23],三种类型亚基缺失体蛋白质含量较低,而大豆蛋白质含量和脂肪含量的遗传存在母体效应。因此,这三种缺失体可通过杂交育种的方法增加 11S 球蛋白含量或减少 7S 球蛋白含量,从而选育出高 11S 相对含量的优质大豆品种。

表 6 三种蛋白亚基缺失新型大豆种质的品质性状比较(平均值 \pm 标准差, $n = 2$)

Table 6 Comparison of quality characters of three soybean lines(Mean \pm SD, $n = 2$)

名称 Name	亚基类型				脂肪含量	蛋白含量	蛋脂总量
	Subunit type				Oil content	Protein content	Protein + oil content
	α'	α	β	11S	/%	/%	/%
只含 7S 亚基 Only containing 7S type	+	+	+	-	22.3 \pm 0.08	37.57 \pm 0.17	59.87 \pm 0.21
只含 $\alpha + \beta$ 亚基 Only containing $\alpha + \beta$ type	-	+	+	-	23.27 \pm 0.05	34.33 \pm 0.34	57.6 \pm 0.37
$A_3 + \alpha'$ 亚基缺失 $A_3 + \alpha'$ deficiency	-	+	+	+	22.17 \pm 0.40	37.47 \pm 0.46	59.63 \pm 0.23

“+”和“-”分别表示“含有”和“缺失”。
‘+’ or ‘-’ indicate ‘present’ or ‘deficient’.

3 结论与讨论

本研究通过筛选、自主创制的只含 7S 组分材料和只含 $\alpha + \beta$ 材料,具有遗传稳定性,增加了我国大

豆优异种质类型。利用这些材料作为育种基础材料,继续配制杂交组合,可加快我国优质蛋白加工专业型大豆新品种的培育步伐。

由于 7S 和 11S 组分在大豆籽粒贮藏蛋白总量中所居的主体地位,通过聚合缺失不同亚基基因创制各

种亚基组合类型的大豆材料(极端至仅含 11S、仅含 7S、11S 和 7S 全缺等),会彻底改变其亚基构成和 11S/7S 比值,导致其功能性和营养性发生显著变化^[24]。如 11S 组分含硫氨基酸含量比 7S 组分高,并含有丰富的二硫键及-SH,它所形成的凝胶硬度强;7S 组分二硫键和-SH 少,所以凝胶的硬度低,但因赖氨酸含量比 11S 组分,疏水性氨基酸多,表面活性性强,因而乳化性好^[17];蛋白 11S/7S 比值愈低乳化性愈好,愈高则凝胶性愈好^[25]。因此,对这类新型蛋白亚基组合材料进行生态适应性、遗传效应和遗传影响以及蛋白营养性和功能性等方面进行评价很有必要。

本研究发现只有 β 亚基类型后代出现性状分离;只含有 α' + β 亚基的类型,其后代单株分析中未发现此种类型的存在,表现为只含 α + β 亚基类型或只含 7S 亚基类型。这两种类型遗传机制有待进一步研究。

本研究检测到的 α' 缺失、 α' 亚基缺失和 α 亚基缺失、 α' 亚基含量低和 α 亚基含量低等类型材料对提高大豆蛋白营养品质与功能特性有重要意义,而其他 11S 组分亚基变异导致 7S 组分相对提高的种质在提高大豆蛋白乳化性等功能特性方面也很有利用价值。这些亚基变异的种质为培育优质大豆新品种以及国内大豆种质基因变异机制的研究提供了重要基础材料。

我国在大豆蛋白育种和蛋白加工领域的落后不仅体现在大豆蛋白加工专用型品种选育和原料加工特性掌握上的落后,也体现在蛋白加工技术上的落后。从而导致各种亚基组合类型的蛋白加工专用型大豆品种的缺乏;我国大豆蛋白企业产品品种单一、功能性差,许多产品类型还不能生产,难以满足国内食品工业的需求,需大量进口;传统蛋白制品在进一步提高营养性和功能性等方面开发上落后于国外等^[26]。因此,要想尽快突破此困境,必须借鉴发达国家在此领域的成功经验,充分利用我国大豆种质资源中蕴藏的丰富蛋白亚基缺失体材料,从大豆品种(原料)培育上入手来实现突破,创制和培育各种亚基组合类型的蛋白加工专用型大豆品种,从而推动我国大豆蛋白加工业发展。因此,利用我国大豆蛋白亚基缺失体材料,开展大豆蛋白加工专用型新品种的选育很有必要。

参考文献

[1] Nik A M, Alexander M, Poysa V, et al. Effect of soy protein subunit composition on the rheological properties of soymilk during acidification[J]. Food Biophysics, 2011, 6: 26-36.

[2] Adachi M, Takenaka Y, Gidamis A B, et al. Crystal structure of soybean β -glycinin A_{1a}B_{1b} homotrimer[J]. Journal of Molecular Biology, 2001, 305(2): 291-305.

[3] Fukushima D. Structures of plant storage proteins and their functions[J]. Food Reviews International, 1991, 7(3): 353-81.

[4] 刘珊珊, 王志坤, 葛玉君, 等. 大豆 7S 球蛋白亚基相对含量与品质性状间的相关分析[J]. 中国油料作物学报, 2008, 30(3): 284-289. (Liu S S, Wang Z K, Ge Y J, et al. Correlations between relative content of individual subunit of 7S globulin and quality characteristics in soybean germplasm[J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2008, 30(3): 284-289.)

[5] Ladin B F, Doyle J J, Beachy R N. Molecular characterization of a deletion mutation affecting the α' subunit of β -conglycinin of soybean[J]. Journal of Molecular and Applied Genetics, 1984, 2: 372-380.

[6] Kaizuma N, Kowata H, Odanaka H. Genetic variation on soybean seed proteins induced by irradiation[J]. Genetic Resources and Crop Evolution, 1989, 32: 97-99.

[7] Takahashi K, Mizuno Y, Yumoto S, et al. Inheritance of the α' -subunit deficiency of β -conglycinin in soybean (*Glycine max* L. Merrill) line induced by γ -ray irradiation[J]. Breed Science, 1996, 46: 251-255.

[8] Takahashi K, Banba H, Kikuchi A, et al. An induced mutant line lacking the α' -subunit of β -conglycinin in soybean (*Glycine max* L. Merrill) [J]. Breed Science, 1994;44:65-66.

[9] Kitamura K, Norihiko K. Mutant strains with low level of subunits of 7S globulin in soybean seeds[J]. Japanese Journal of Breeding, 1981, 31(4): 353-359.

[10] Thanh V C, Trang D T X, Liu S S, et al. Evaluation of 7S β -subunit deficiency and its inheritance among soybeans *Glycine max* L. in the Mekong Delta, Viet Nam[J]. Biosphere Conservation, 2004, 6(1): 1-5.

[11] Teraishi M, Takahashi M, Hajika M, et al. Suppression of soybean β -conglycinin genes by a dominant gene, Seg-1[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2001, 103: 1266-1272.

[12] Liu S S, Ohta K, Dong C, et al. Genetic diversity of soybean (*Glycine Max* L. Merrill) 7S globulin protein subunits[J]. Genetic Resources and Crop Evolution, 2006, 53(6): 1209-1219.

[13] Hajika M, Takahashi M, Sakai S, et al. A new genotype of 7S globulin (β -conglycinin) detected in wild soybean (*Glycine soja* Sieb. Et Zucc.) [J]. Breeding Science, 1996, 46: 485-386.

[14] Hajika M, Takahashi M, Sakai S, et al. Dominant inheritance of a trait lacking β -conglycinin detected in a wild soybean line[J]. Breed Science, 1998, 48: 383-386.

[15] 关荣霞, 常汝镇, 邱丽娟, 等. 栽培大豆蛋白亚基 11S/7S 组成及过敏蛋白缺失分析[J]. 作物学报, 2004, 30(11): 1076-1079. (Guan R X, Chang R Z, Qiu L J, et al. Analysis of protein subunit 7S/11S constitution and allergen lacking of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] cultivars[J]. Acta Agronomica Sinica, 2004, 30(11): 1076-1079.)

[16] 刘珊珊, 刁桂珠, 王志坤, 等. 中国和越南大豆种质资源贮藏蛋白亚基组成的鉴定[J]. 中国油料作物学报, 2008, 30(4): 511-513. (Liu S S, Diao G Z, Wang Z K, et al. Characterization and evaluation for subunit composition of storage protein in soybean germplasm[J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2008, 30(4): 511-513.)

(1):6-9. (Liao L. Soybean resistant research work and prospects [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 1992,8(1):6-9.)

[3] 任友科,于保全. 大豆灰斑病研究进展 [J]. 现代农业科技, 2010(3):164-169. (Ren Y K, Yu B Q. Soybean resistant research progress [J]. Modern Agricultural Sciences and Technology, 2010(3):164-169.)

[4] 谢树章,刘亚娟,秦平伟,等. 植物几丁质酶及应用研究进展 [J]. 安徽农学通报,2009,15(8):58-61. (Xie S Z, Liu Y J, Qin P W, et al. Progress on research of plant chitinase and its application[J]. Anhui Agricultural Sciences Bulltin,2009,15(8):58-61.)

[5] 于平. 几丁质酶基因及其应用新进展[J]. 生物学杂志,2004,21(3):5-7. (Yu P. Advances on chitinase gene and its application[J]. Journalof Biology, 2004,21(3):5-7.)

[6] Dong H P, Peng J L, Bao Z L, et al. Downstream divergence of the ethylene signaling pathway for harpin - stimulated *arabidopsis* growth and insect defense[J]. Plant Physiology, 2004,136:3628 - 3638.

[7] Wei Z M, Beer S V. Harpin from *Erwinia amylovora* induces plant resistance[J]. Acta Horticulture, 1996,411:223-225.

[8] 姜兆远,邹晓威,高洁. 烟草野火病菌 *hrpZpsta* 基因的克隆及蛋白的原核表达[J]. 吉林农业大学学报,2009,31(6):700-704. (Jiang Z Y, Zou X W, Gao J. Cloning and expression of *hrpZpsta* gene from *Pseudomonas syringae*pv. *tabaci*[J]. Journal of Jilin Agricultural University,2009,31(6):700-704.

[9] 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(Natural Science Edition),2011,39(9):86-92.

[10] 刘立鸿,许璐,汪凯,等. 地高辛标记探针 Southern 印迹杂交技术要点及改进[J]. 生物技术通报,2008(3):57-59. (Liu L H, Xu L, Wang K, et al. The key technological points of Southern blot using dig -labeled DNA probes and improvement[J]. Biotechnology Bulletin,2008(3):57-59.)

[11] 陈旭,齐凤坤,康立功,等. 实时荧光定量 PCR 技术研究进展及其应用[J]. 东北农业大学学报,2010(8):148-155. (Chen X, Qi F K, Kang L G, et al. Advance and application of real - time fluorescent quantitative PCR[J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2010,41(8):148-155.)

[12] 朱捷,杨成君,王军. 荧光定量 PCR 技术及其在科研中的应用 [J]. 生物技术通报,2009(2):73-76. (Zhu J, Yang C J, Wang J. Real - time fluorescent quantitative PCR and application in scientific research[J]. Biotechnology Bulletin,2009(2):73-76.)

(上接第 8 页)

[17] 刘春,王显生,张占琴,等. 大豆种子贮藏蛋白亚基含量变异种质的筛选与创制[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2008, 34(3):249-255. (Liu C, Wang X S, Zhang Z Q, et al. Screening and creation of content variations of soybean seed storage protein subunits [J]. Journal of Hunan Agricultural University (Natural Sciences), 2008, 34(3):249-255.)

[18] 姜振峰,赫卫,汪洋,等. 大豆种子 7S、11S 球蛋白及 7S 球蛋白亚基的研究[J]. 中国油料作物学报, 2007, 29:32-35. (Jiang Z F, Hao W, Wang Y, et al. Study on 7S,11S globulin and subunits of 7S globulin of soybean seed[J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2007, 29:32-35.)

[19] 宋波,蓝岚,田福东,等. 大豆 7S 球蛋白 α 亚基缺失及 (α' + α) 亚基双缺失品系的回交转育[J]. 作物学报, 2012, 38: 2297-2305. (Song B, Lan L, Tian F D, et al. Development of soybean lines with α' -subunit or (α' + α) - subunits deficiency in 7S globulin by backcrossing [J]. Acta Agronomica Sinica, 2012, 38: 2297-2305.)

[20] 刘珊珊,滕卫丽,姜自芹,等. 大豆 7S 球蛋白 α 亚基缺失型种质创新[J]. 作物学报 2010, 36(8):1409-1413. (Liu S S, Teng W L, Jiang Z Q, et al. Development of soybean germplasm lacking of 7S globulin α - subunit [J]. Acta Agronomica Sinica, 2010, 36(8):1409-1413.)

[21] 刘珊珊,葛玉君,武小霞,等. 大豆 7S 球蛋白 (α + β) 亚基双缺失体遗传特征分析[J]. 作物杂志, 2008(4):61-63. (Liu S S, Ge Y J, Wu X X, et al. Subunit composition diversity in progenies segregated from 7S globulin (α + β) - null soybean mutant [J]. Crops, 2008(4):61-63.)

[22] Hayashi M, Nishioka M, Kitamura K, et al. Identification of AFLP markers tightly linked to the gene for deficiency of the 7S globulin in soybean seed and characterization of abnormal phenotypes involved in the mutation[J]. Breeding Science, 2000, 50: 123-129.

[23] 黄丽华,麻浩,王显生,等. 大豆种子贮藏蛋白 11S 和 7S 组分的研究[J]. 中国油料作物学报, 2003, 25(3):20-23. (Huang L H, Ma H, Wang X S, et al. Study on 11S and 7S fractions of seed storage protein in soybean seeds [J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2003, 25(3):20-23.)

[24] Badley R A, Atkinson D, Hauser H, et al. The structure, physical and chemical properties of the soy bean protein glycinin [J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure, 1975, 412(2):214-228.

[25] 陈海敏,华欲飞. 品种差异对大豆功能性的影响[J]. 中国油脂, 2000, 25(6):178-180. (Chen H M, Hua Y F. Effects of various cultivars on functionalities of soy protein [J]. China Oils and Fats, 2000, 25(6):178-180.)

[26] 盖钧镒. 大豆加工业的发展及其对大豆品质的要求[J]. 农产品加工, 2008(7):4-7. (Gai J Y. Development of soybean processing industry and its requirements on quality of soybean [J]. Agriculture Products Processing,2008(7):4-7.)