



# 大豆籽粒蛋白代谢途径及相关调控机制研究进展

敖雁<sup>1</sup>, 王安<sup>2</sup>, 吴启<sup>3</sup>, 冯梦诗<sup>2</sup>, 蒋莹<sup>2</sup>, 吴薇<sup>2</sup>, 常庆涛<sup>2</sup>

(1. 苏州健雄职业技术学院, 江苏 苏州 215411; 2. 泰州市农业科学院, 江苏 泰州 225300; 3. 中国科学院南京土壤研究所, 江苏 南京 210008)

**摘要:** 氮是大豆生长发育不可缺少的一种元素, 主要通过大豆根部-根瘤体系等一系列途径转化为籽粒蛋白。大豆籽粒蛋白含量远高于其它作物, 因其独特的营养价值和保健功能被广泛应用。本文介绍了大豆籽粒蛋白的特性和分类、综述了其代谢途径和调控机制等方面的研究进展, 并提出以高蛋白大豆为主要育种目标的有效途径, 以期大豆的营养改良提供参考。

**关键词:** 大豆蛋白; 蛋白分类; 代谢途径; 调控机制

## Research Progress on Metabolic Pathways of Seed Protein and Related Regulation Mechanism in Soybean

AO Yan<sup>1</sup>, WANG An<sup>2</sup>, WU Qi<sup>3</sup>, FENG Meng-shi<sup>2</sup>, JIANG Ying<sup>2</sup>, WU Wei<sup>2</sup>, CHANG Qing-tao<sup>2</sup>

(1. Suzhou Chien-Shiung Institute of Technology, Suzhou 215411, China; 2. Taizhou Academy of Agricultural Sciences, Taizhou 225300, China; 3. Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China)

**Abstract:** Nitrogen is an indispensable nutrient for soybean. The nitrogen in the air can be transformed to protein in seed through Root-Rhizoma system and various pathway. Soybeans is an important food because of its nutritional qualities and functional properties, which contain considerably more protein content than other crops. This paper summarizes publications on the characteristics and classifications of soybean protein, discusses research progress of protein metabolism pathway and regulation mechanism in soybean. And we addressed effective way of breeding for high protein content soybean, which can provide the reference for soybean quality improvement.

**Keywords:** Soybean protein; Protein classification; Metabolic pathways; Regulation mechanism

大豆(*Glycine max* L.)是世界上种植面积较广的粮油兼用作物,也是人们摄入优良蛋白的重要来源之一<sup>[1]</sup>,大豆种植面积较大的国家主要有中国、美国、巴西、日本等<sup>[2-3]</sup>。大豆蛋白氨基酸组分齐全,尤其在营养价值方面,几乎与动物蛋白等同,在基因结构上也与人体氨基酸最为接近。同时,大豆蛋白作为植物性蛋白质,没有动物蛋白潜在的副作用,因此能够维持人体正常新陈代谢的过程<sup>[4-5]</sup>,大豆蛋白中所含有的必需氨基酸含量较为丰富,包括人体所需的8种必需氨基酸,特别是体内不能直接合成的色氨酸和赖氨酸,具有预防心血管疾病、抗肿瘤、增强免疫力等功能<sup>[6]</sup>。另外,大豆蛋白以其凝胶性、乳化性、持水性、发泡性等特点也被广泛应用于冰淇淋、奶油、面包、蛋糕等加工<sup>[7-9]</sup>。当前,随着人们物质生活水平的提高,对食物营养价值的需求也日益急迫,目前我国正经历从温饱型社会向营养型社会发展的关键时期,开发利用大豆蛋白是21世纪提高我国人民营养水平的重要途径之一。大豆籽粒蛋白含量一般在40%左右,中国农业科学院作物科学研究所大豆种质资源的蛋白含量变幅为30.8%~50.8%,远超过水稻、小麦、玉米等其它粮

食作物。研究表明野生栽培大豆籽粒蛋白含量比普通大豆要高,其蛋白含量高达50%以上<sup>[3]</sup>。大豆籽粒蛋白含量受到品种基因型、土壤氮含量、土壤含水量、温度、光照等多种因素的影响<sup>[10]</sup>。Rotundo等<sup>[11]</sup>研究温度、水分及氮肥胁迫对大豆蛋白含量影响时发现,水分胁迫会抑制大豆蛋白含量的积累,高温与氮肥环境则有利于籽粒蛋白的形成与积累。大豆籽粒蛋白含量除了受外在环境因素影响外,其自身遗传特性亦是影响蛋白含量高低的重要因素之一。本文就大豆籽粒蛋白特性和分类、主要代谢途径及其相关调控机制等方面的文献进行总结和评述,并对提高大豆籽粒蛋白含量的研究方向做了初步展望。

### 1 大豆籽粒蛋白分类和特性

大豆籽粒蛋白按照生物学功能可分为贮藏蛋白、结构蛋白和防御相关蛋白三大类<sup>[12]</sup>。其中以贮藏蛋白为主,它是人类食用最重要的植物性蛋白之一<sup>[13]</sup>,贮藏蛋白主要由大豆球蛋白和与大豆伴球蛋白构成<sup>[14]</sup>,分别占大豆籽粒蛋白总量的40%与25%<sup>[15]</sup>;结构蛋白主要有大豆外壳蛋白和抑制蛋白

两种<sup>[16]</sup>;防御相关蛋白主要包含病理相关蛋白、胰蛋白酶抑制剂与血凝集素多肽片段<sup>[17]</sup>。

根据蛋白质沉降系数又可将大豆籽粒蛋白分为 2S、7S、11S 和 15S。其中,7S 和 11S 含量较高,2S 和 15S 含量较少。7S  $\beta$ -伴球蛋白和 11S 球蛋白约占大豆籽粒总蛋白含量的 80%,2S 和 15S 分别占总蛋白含量的 15% 和 9.1%<sup>[13,18]</sup>。7S 主要由 7S  $\beta$ -伴球蛋白( $\beta$ -conglycinin)、甘氨酸和 7S 球蛋白组成。其中,7S  $\beta$ -伴球蛋白是由  $\alpha$ 、 $\alpha'$  和  $\beta$  共 3 个亚基通过疏水键相互连接形成的三聚体糖蛋白复合结构,亚基分子量分别为 76、72 和 52 kDa,研究表明  $\beta$  亚基是贮藏蛋白唯一不含丙氨酸、半胱氨酸和蛋氨酸的蛋白质亚基,是影响大豆籽粒蛋白含量、生化性质及加工品质的重要因素<sup>[12,19]</sup>,并受脱落酸(ABA)、湿度、肥料等多种外在环境因子的影响<sup>[20]</sup>。此外,Naito 等<sup>[21]</sup>研究还发现  $\beta$  亚基的表达量与  $\alpha$ 、 $\alpha'$  亚基不同,硫酸盐不足条件下会促进  $\beta$  亚基的急剧积累,外源蛋氨酸则会抑制其表达。7S 球蛋白是具有二硫键的稳定三维结构<sup>[22]</sup>。11S 主要由甘氨酸组成<sup>[23]</sup>,其组份主要是由 6 个酸性 A 亚基( $A_{1a}$ 、 $A_{1b}$ 、 $A_2$ 、 $A_3$ 、 $A_4$ 、 $A_5$ )和 6 个碱性 B 亚基( $B_{1a}$ 、 $B_{1b}$ 、 $B_2$ 、 $B_3$ 、 $B_4$ 、 $B_5$ )通过二硫键连接形成的比较稳定的环状六角形结构<sup>[15]</sup>,主要形式有 5 种类型,分别为  $A_{1a}B_{1b}$ 、 $A_2B_{1a}$ 、 $A_{1b}B_2$ 、 $A_3B_4$  和  $A_5A_4B_3$ <sup>[24]</sup>。Yang 等<sup>[25]</sup>研究发现大豆籽粒蛋白含量与  $A_5A_4B_3$  呈显著正相关,与  $A_{1a}B_{1b}$  呈显著负相关。

按照氨基酸序列的同源性可以将大豆籽粒蛋白分为两大类,第一类含有亚基  $A_{1a}B_{1b}$ 、 $A_2B_{1a}$  和  $A_{1b}B_2$ ,研究表明这类蛋白含量与豆腐的硬度有关<sup>[26]</sup>。第二类亚基包括  $A_3B_4$  和  $A_5A_4B_3$ <sup>[27]</sup>,各亚基含量因大豆基因型而异<sup>[28]</sup>。2S 球蛋白作为大豆籽粒贮藏蛋白的组分之一,与贮藏蛋白 7S 和 11S 截然不同,在分子量、一级结构、电荷性质、生物学特性等方面均有不同程度的差异<sup>[29]</sup>;15S 蛋白亚基主要由大豆球蛋白的二聚体构成,其含量大约占籽粒蛋白总量的 5%。通常情况下,11S 球蛋白含量显著高于 7S 蛋白,其含量比值(11S/7S)是衡量大豆籽粒蛋白营养价值、品质性状的重要指标,一直以来是大豆品质改良的重要目标之一<sup>[30]</sup>;此外,大豆蛋白根据蛋白质溶解特性可分为清蛋白、球蛋白、醇溶蛋白和谷蛋白。其中,球蛋白占总蛋白含量比例最高,为 90%;清蛋白属于糖蛋白,其凝固点较低,加热即可凝固,占总蛋白含量 5%,其主要成分由胰蛋白酶抑制剂、大豆血球凝集素、脂肪氧化酶、 $\beta$ -淀粉酶、细胞色素 C 等多种生理活性物组成<sup>[31]</sup>。醇溶蛋白是大豆贮藏蛋白的组分之一,其特点是不溶于水,可溶

于 50% ~ 90% 乙醇溶剂。

## 2 大豆籽粒蛋白代谢的主要途径

### 2.1 大豆籽粒蛋白代谢途径发生过程

大豆籽粒蛋白代谢开始于大豆植株对氮的固定转化,自 19 世纪末欧洲学者 Beijerinck 在豆科根瘤中获得固氮微生物根瘤菌以来,各地研究者在根瘤菌形态、生理生化特性、分子遗传学等方面取得了较大的研究进展。Arp<sup>[32]</sup>于 1985 年利用色谱法对根瘤菌对大豆根瘤的同质性纯化电泳时检测到根瘤菌是由两个分子量分别为 64 000 和 35 000 Da 的亚基,由半胱氨酸和 Ni、Fe 金属离子构成,Tanaka 等<sup>[33]</sup>研究发现 GS52 酶参与大豆根毛感染和根瘤节点形成,GS52 酶对对嘧啶核苷酸和二磷酸核苷酸底物的活性较高,与根瘤结节数目有显著相关性。

目前发现的固氮根瘤菌微生物种类较多,可分成根瘤菌属、慢生根瘤菌属、中慢生根瘤菌属和固氮根瘤菌属,在细菌、放线菌和蓝细菌等菌种中均有存在<sup>[34]</sup>。大豆通过根瘤与固氮微生物根瘤菌形成共生固氮体系,将大气中的氮还原成氨<sup>[35]</sup>,全球每年由其固定的氮总量已达  $2 \times 10^6$  t,相当于  $4 \times 10^8$  t 尿素,约占全球植物总需氮量的 75%<sup>[36]</sup>,大豆共生固氮体系运行主要依靠根瘤菌进行。根瘤菌属于革兰氏阴性细菌,在土壤中分布范围较广,主要通过大豆根毛、侧根杈口或其它部位侵入大豆后形成侵入线,进到根的皮层,识别、结合其分泌的类黄酮等分子信号,迅速增殖产生类菌体,刺激宿主皮层细胞分裂,形成根瘤,并在根瘤组织中形成大豆血红蛋白进行共生固氮。其主要过程为根瘤体系首先固定空气中的分子态氮转化为氨,该过程是在类菌体内完成,分子态氮被还原为氨后迅速转移至根瘤细胞浆中,固定的氨先合成嘌呤,嘌呤随之被降解为酰胺,随之通过大豆的茎运输到大豆荚皮并降解为乙醛酸和氨基酸,然后在关键酶的作用下使其转变成谷氨酰胺和谷氨酸,活化后再通过 tRNA 转运至 mRNA,进行蛋白多肽链合成、延长、终止、加工修饰等过程,最终完成大豆蛋白的合成代谢过程<sup>[37]</sup>。

### 2.2 大豆籽粒蛋白代谢过程中几个关键酶

大豆籽粒蛋白含量与大豆根瘤菌共生固氮能力有显著正相关,根瘤菌共生固氮能力除与其自身遗传机制有关,还与固氮代谢相关酶类活力强弱有直接关系。参与大豆植株进行生物固氮过程的酶有固氮酶、硝酸还原酶、谷氨酰胺合成酶(GS, glutamine synthetase)和谷氨酸合成酶(GOGAT, glutamate synthase)等,每种酶在氮素代谢中发挥各自的关键

作用。

根瘤固氮途径中最为重要的酶为固氮酶,固氮酶活性中心是由原子簇  $\text{FeMoco}$  与其周围蛋白分子形成的复杂三维结构<sup>[38]</sup>,关于根瘤菌固氮酶的活性研究已取得较深入的进展。大豆根瘤菌固氮酶活力对温度的敏感性最高,不同基因型大豆品种固氮酶活性对温度反应也不一样。Schweitz 等<sup>[39]</sup>分析发现温度对根瘤固氮酶的影响较大,大豆根部处在 18℃ 条件下显著低于 27℃ 条件下根瘤活性,表明一定范围内温度越高,根瘤固氮酶活力越高。万涛等<sup>[40]</sup>通过利用二次函数拟合光照与黑暗处理下根瘤固氮酶活性与温度的关系时发现两种条件下固氮酶活性最高的最佳温度分别为 20.1℃ 和 20.8℃,与低温相比,高温对根瘤固氮酶活性影响更明显,在同等温度条件下,光照处理的大豆根瘤固氮酶活力高于黑暗处理,该结果与 Schweitz 等研究结果较为一致。大豆根瘤菌固氮酶活力除了受温度、光照因素影响外,部分植物生长调节素亦参与其调控过程。Chen 等<sup>[41]</sup>在研究植物生长调节素参与大豆根瘤固氮酶活性调控过程中发现,赤霉素能显著抑制固氮酶活性而甲哌翁则促进固氮酶的活性,两种激素处理的大豆蛋白含量与对应的固氮酶活性变化趋势一致,而其它植物生长调节素如生长素、细胞分裂素等对根瘤固氮酶活性影响的研究较少。

硝酸还原酶 (NR, nitric acid reductase) 亦是根瘤固氮体系中重要酶类之一,它是大豆根瘤菌进行氮同化的第一个酶,也是作为催化分子态氮转化为氨态氮的诱导酶和限速酶,催化  $\text{NO}_3^-$  转化成  $\text{NO}_2^-$ ,可分为参与硝酸盐同化的同化型还原酶和催化以硝酸盐为活体氧化的最终电子受体的硝酸盐呼吸异化型还原酶,它的活性大小决定了硝酸盐同化成有机氮化合物的速度,其分子结构、生物学特性及调控机理方面的研究均已取得较大突破<sup>[42-44]</sup>,它的亚单位主要包括钼复合体 (Mo-Co)、黄素腺嘌呤二核苷酸 (FAD) 和正铁血黄素等。大豆根系 NR 活性高低与固氮酶类似,均受品种基因型、温度等因素的影响。Nicholas 等<sup>[45]</sup>研究发现黑暗处理大豆 NR 活性失活在 40℃ 时最快,27℃ 下, NR 活性持续下降,在 20℃ 达到最低,大田试验结果表明,16 ~ 27℃ 环境温度对植株体内 NR 活性没有影响。表明光照、温度是影响大豆体内 NR 活性的关键因素。

谷氨酰胺合成酶 (GS) 和谷氨酸合成酶 (GOGAT) 均是大豆氨同化所必需的酶。谷氨酰胺合成酶主要催化谷氨酸和铵离子合成谷氨酰胺,该过程消耗腺苷三磷酸 (ATP),分成两步进行,先是谷氨酰胺合成酶让 ATP 和谷氨酸反应,生成  $\gamma$ -谷

酰磷酸;接着铵离子替换掉磷酸。大豆谷氨酸合成酶是以铁氧还蛋白 (Fd) 为电子供体的 Fd-GOGAT 型,定位于叶片叶绿体中,在催化反应  $\alpha$ -酮戊二酸、谷氨酰胺形成谷氨酸过程中起作用。Huang 等<sup>[46]</sup>研究发现稀有金属镧 (III) 和 UV-B 辐射除了对根系硝酸还原酶、亚硝酸还原酶有影响外,对氨同化过程中的谷氨酰胺合成酶、谷氨酸合成酶也有抑制作用。Sun 等<sup>[47]</sup>对双酚胁迫处理可通过抑制氨同化过程中 GS/GOGAT 活性影响大豆氨基酸和蛋白含量。以上研究结果表明固氮酶、硝酸还原酶等关键酶在大豆籽粒蛋白合成代谢过程中起重要作用,其酶活性表达受到外界温度、光照、化学辐射等因子调控。

### 3 大豆籽粒蛋白的代谢调控机制

#### 3.1 关键基因及相关 QTL 位点的研究

随着分子遗传学和 RELP (Restriction Fragment Length Polymorphism)、RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)、SSR (Simple Sequence Repeats)、SNP (Single Nucleotide Polymorphism) 等分子标记技术的快速发展,大豆蛋白代谢途径中涉及的共生固氮途径、氨同化、蛋白质合成等过程中的相关基因定位、克隆都取得了较大的研究进展。

3.1.1 生物固氮相关 QTL 共生固氮体系是根瘤菌与大豆相互偶联的一系列分化发育过程,涉及到双方相关基因的激活表达。而其中根瘤菌的结瘤、固氮作用主要由结瘤基因和固氮基因分别控制。根瘤菌的结瘤基因 (*nod*) 根据其参与豆科植物根系的不同过程可大致分为 3 类。第一类共同结瘤基因 *nodABC* 是所有根瘤菌中最为保守,最具有代表性的基因,它广泛存在于所有的根瘤菌中,是诱导豆科植物根毛卷曲和根尖表皮细胞分裂所必须的一类基因。其中 *nodA* 主要是负责氨基葡萄糖骨架的 *N*-酯酰化;*nodB* 是几丁质寡糖脱乙酰酶;*nodC* 则是乙酰葡萄糖胺合成过程中的关键酶<sup>[48-49]</sup>。第二类是结构专一性结瘤基因,其具体包括宿主专一性 (host specific nodulation, *hsn*) 和基因型专一性 (genotype specific nodulation, *gsn*) 两种,它们大多能够协助根瘤菌特异性识别其特定的宿主。*nodE*、*nodF*、*nodG*、*nodH*、*nodL*、*nodM* 等主要是用来决定宿主范围,其具体机制仍值得进一步探究;而 *nodI* 序列与调控 ATP 合成蛋白相似,三叶草中 *nodI* 突变体易造成其体内 3-羟基丁酸含量的急剧减少;*nodJ* 与膜蛋白有关,推测可能与 *nodI* 相结合从而共同调控根毛的变形因子的生物合成等<sup>[50]</sup>。第三类正调控结瘤基因 *nodD* 一般是组成型表达的,可以用来启动其它 *nod* 基因

的转录,而其本身的表达又受到宿主植物分泌的黄酮类物质的调节。此外,其它结瘤基因如 *nol* 和 *noe* 等也能修饰结瘤因子的结构,最终影响寄主植物的特异性反应<sup>[51]</sup>。根瘤菌的固氮作用主要是依靠固氮基因(*nif* 和 *fix*)来进行的,*nifD* 和 *nifK* 分别编码固氮酶的  $\alpha$  和  $\beta$  亚基,而只有当根瘤菌进入宿主植物细胞中转变为类菌体后,固氮正调节基因 *nifA* 才能被诱导,进而启动对其它 *nif* 基因的正向调控过程,最终开始豆科植物的生物固氮过程。而目前为止,*fix* 基因也只是在根瘤菌中发现,可以参与根瘤菌与豆科植物共生固氮的过程,推测其中 *fixABC* 基因可能参与光合电子的传递,其具体机制仍有待进一步研究<sup>[52]</sup>。

谷氨酰胺合成酶(GS)和谷氨酸合成酶(GOGAT)可以将合成的氨基酸通过联合催化作用使其转变成谷氨酰胺和谷氨酸。目前在豆科植物中,GS 基因主要分为细胞质 *GS1* 和质体 *GS2* 两大类,而其中 *GS1* 基因又具体可以分为 *GS1 $\alpha$* 、*GS1 $\beta$*  和 *GS1 $\gamma$*  3 种。*GS1 $\alpha$*  主要存在于植物幼根中,*GS1 $\beta$*  是组成型表达,在成熟的根瘤中大量表达且表达模式的开始与固氮开始的时间相一致,说明固氮作用形成的氨是通过由 *GS1* 介导的氨同化的过程<sup>[53]</sup>。*GS2* 基因主要在叶绿体基质中表达,主要参与同化根瘤固氮所产生的  $\text{NH}_4^+$ 。同样,在氨同化的过程中,谷氨酸合酶(GOGAT)是限速酶,它能够帮助生成两分子谷氨酸,完成氨的初级同化过程。而在豆科植物根瘤中,GOGAT 主要以 NADH-GOGAT 的形式存在。最新的研究证明,编码 NADH-GOGAT 的基因似乎与 GS 基因是协同表达的,再加上这两种蛋白质都在豆科植物根系中的定位更加支持了两者可以在氨同化的过程中联合起作用的观点<sup>[54]</sup>。

**3.1.2 大豆籽粒蛋白品质相关 QTL** 众所周知,大豆籽粒蛋白质的合成不仅易受环境因素的影响,而且受到多对基因共同控制。一直以来,大豆籽粒蛋白品质优劣的机制研究都是大豆遗传改良的重点内容之一。目前,已定位到与蛋白品质相关的 QTLs 报道有很多。如 Lu 等<sup>[55]</sup>通过 301 份 SSR 标记对不同年份及环境下 212 份来自亲本 ZDD09454 与 Yudou12 的重组自交系进行了水溶性蛋白含量(WSPC, Water Soluble Protein Content)的 QTLs 鉴定分析,发掘了在多年不同环境下重现性较高的 WSPC 相关 QTLs,分别为 *qsp8-4* 和 *qsp8-5*。Zhang 等<sup>[56]</sup>同样利用高密度标记对 219 份大豆品种与 152 份重组自交系进行基因分型,筛选鉴定出 6 种不同环境下最大效应的 WSPC 特异性基因座 *GqWSPC8*,以上发掘的重现性较好的 WSPC 含量相关 QTLs,表

明它们所处染色体位置可能存在影响水溶蛋白含量的重要基因。然而,QTL 群体的弊端在于两对亲本间每对基因组最多只能涉及 2 个等位基因,解析精度不够,只能对相关基因进行初步定位,精确度不够,且构建作图群体费时费力。近年来,在 QTL 分析植物数量性状和分子育种的基础上,新兴起的关联分析(Association Analysis)在鉴定群体目标性状与遗传标记或候选基因间的联系取得了较大的突破与发展。Zhang 等<sup>[57]</sup>人利用 1 536 个 SNP 标记对 192 份来源广泛的大豆品种的蛋白含量(PC, Protein Content)、水溶蛋白含量(WSPC, Water-Soluble Protein Content)进行了基于混合线性模型(MLM, Mixed Linear Model)的关联分析,在两种以上的环境下筛选到 PC、SPC 共有标记分别有 4 个和 8 个。其中,BARC-021267-04016 标记与 PC 极显著关联,它与已定位的大豆球蛋白基因 *G7* 的遗传距离仅为 0.28 cm。Li 等<sup>[58]</sup>于 2015 和 2016 年通过分子标记辅助选择(MAS, Marker-Assisted Selection)对 185 份大豆种质资源的蛋白含量进行了关联鉴定,发现分别位于 1、13、20 号染色体上的 SNP 标记 rs19485676、rs19485676、rs24787338 在 2015 和 2016 年度均被重复检查到与籽粒蛋白高度相关,具有较高的重现性。以上等研究表明,通过分子标记与大豆籽粒蛋白含量的关联分析,可以从全基因组水平找到与大豆蛋白含量基因紧密关联的分子标记,这些标记将对大豆蛋白品质的遗传机制及高蛋白大豆筛选、鉴定发挥重要作用。

### 3.2 大豆籽粒蛋白代谢基因表达调控研究

**3.2.1 参与根瘤形成的表达调控模式** 近年来随着对豆科植物根瘤菌研究的不断深入,越来越多参与大豆根瘤形成的相关基因被报道。Okazaki 等<sup>[59]</sup>在研究大豆与埃氏慢生根瘤菌共生体系的过程中,通过转录组数据分析了 *ENOD40* 和 *NIN* 两个根瘤固氮基因在大豆受体植入突变体 *En1282* 后表达量会增加,而植入突变体 *T3SS*(Type III Secretion System, III 型分泌系统)后表达量却没有增加,表明 *T3SS* 可能是绕过了根瘤诱导的识别而激活根瘤形成相关信号的表达;Lim 等<sup>[60]</sup>通过定量 PCR 技术克隆出位于第 13 条染色体上的 *GmNIC1* 同源基因 *GmNIC2*,该基因能一定程度抑制野生大豆根瘤体系的形成,作为大豆结瘤抑制因子,其表达量高低受硝酸盐浓度影响。同样,近年来的一些研究表明,大豆根瘤的形成也与其本身离子的吸收、天然色素的合成密切相关。Chiasson 等<sup>[61]</sup>在研究大豆 SAT1(Symbiotic Ammonium Transporters1,共生铵转运体 1)编码 bHLH 转录因子参与根瘤生长和  $\text{NH}_4^+$  运输

时发现 *GmbHLHm1* 基因在大豆-根瘤体系形成中主要起参与植株体内铵态盐离子通道代谢物的活性调控。Sugawara 等<sup>[62]</sup>在共生条件下菌株 *B. elkanii* 和大豆根瘤菌对硫酸盐吸收的影响,发现 *BLL6451*、*BLL7010* 基因在根瘤体系建立时起一定的调控作用。而在  $\beta$ -胡萝卜素的研究中, Kim 等<sup>[63]</sup>克隆了一个在大豆根瘤形成过程中起重要作用的基因并命名为 *GmBCH1*, 该基因编码  $\beta$ -胡萝卜素羟化酶, 其表达量在大豆根瘤共生体系形成时有明显的提升。Lee 等<sup>[64]</sup>最新研究表明, 编码甘露糖转移酶的 *lpcC* 基因失活及钝化不仅会对豆类植物抗原菌体有抑制作用, 还会造成共生固氮体系细胞疏水性、细胞膜形成及扩展等细胞相关性质的改变; 这些基因的发现及克隆有助于对大豆根瘤体系调控机制的进一步认识, 对大豆根系的高效固氮具有重要意义。

3.2.2 氨同化过程的调控 谷氨酰胺合成酶(GS)是氨同化途径最为重要的催化酶之一, 是豆科植物将无机态 N 转化成有机态 N 的关键因子, 如上文所述, GS 同工酶可以分为两类, 即胞质型(GS1)和质体型(GS2)。一般认为, GS2 类同工酶可以直接参与氨同化的过程, 而 GS1 类催化酶则与氮素的分配与再利用相关联, 因此深入探究氨同化过程中氮素的吸收、转移以及再利用机制对于日后提高豆科植物体内氮素利用率具有重要指导意义。在转录水平, 2010 年 Masalkar 等<sup>[65]</sup>首次在大豆中发现 GS1 基因可以与水孔通道蛋白 NOD26 的 C 端相互作用(该蛋白定位于根瘤生物膜上), 形成的蛋白复合物结构可以将  $\text{NH}_4^+$  催化成谷氨酰胺和谷氨酸, 这种蛋白之间的相互调节作用既可以避免氨过多造成的毒害作用, 又可以提高氮循环过程中氨同化效率, 为 GS1 同工酶表达的调控模式提供了最有力的分子依据。在翻译水平上, Ortega 等<sup>[66]</sup>通过分别构建 GS1 基因含有和不含 5'-UTR(5'非翻译区)和 3'-UTR(3'非翻译区)的对比试验, 研究发现, 当 3'-UTR 在翻译过程中功能缺失时, 5'-UTR 可以作为翻译的增强子来增加 GS1 的表达。同时当在 5'-UTR 前端连接报告基因时, GUS 报告基因的活性与不接 5'-UTR 相比增强了 20 倍, 因此 GS1 基因的 5'-UTR 在激活翻译起始信号以及增强氨同化过程中 GS1 蛋白表达等方面起着重要的调控作用。除了在不同分子水平对 GS 的调控作用, GS 本身的结构特性可能也是引起不同豆科植物氨同化效率高低的的重要因素。超速离心实验表明, GS1 $\gamma$  是十二聚体而 GS1 $\beta$  是十聚体, GS1 $\gamma$  异构体与 GS1 $\beta$  异构体的最大的不同之处在于: 它们在亚基界面活性位点 C159

和 C92 之间存在二硫键, GS1 $\gamma$  异构体可逆地受到分子间形成二硫键的抑制, 而 GS1 $\beta$  异构体对于二硫键的抑制作用表现出相对不敏感, 正是由于其敏感性的差异, 因此推测 GS1 $\gamma$  可能在根瘤菌固氮过程中起着更为重要的作用<sup>[67]</sup>。当然, GS 除了在豆科植物中的表达受到调控外, 在其它作物如小麦、玉米、水稻中也能受到特异性调节。张同勋等<sup>[68]</sup>揭示了小麦 GS 同工酶的时空表达关系, 在茎中 GS1 酶活性在各个不同发育时期均处于主导地位, 而仅在绿色茎中能检测到 GS2 的表达; 在叶片中, GS2 酶活性在光合作用过程中起主要作用, 推测可以为氮素同化提供更多的能量与原料, 而 GS1 则主要是参与氮素在不同器官之间的转运作用, 可能是与氨的再利用机制有关; 在籽粒中只能检测到 GS1 酶活性且会随着时间推移活性逐渐减弱, 其具体功能仍有待后续进一步探究。同样在烟草中, 共转入 GS 基因和蔗糖磷酸合成酶基因(*SPS*)后在低氮条件下烟草的 GS 酶活较高, 植株生长发育也明显受到促进作用, 推测 GS 基因可以通过与 *SPS* 的互作来增强自身的表达量, 从而提高氨同化效率维持植物的正常生长, 但其深层的分子调控机制目前尚不明确<sup>[69]</sup>。

谷氨酸合成酶(GOGAT)是氨同化过程中的另一个限速酶, 可以将一分子的谷氨酰胺催化形成两分子的谷氨酸, 完成氨同化的初级过程。根据其电子供体类型的不同, GOGAT 在植物体内主要有两种存在方式: NADH-GOGAT 和 Fd-GOGAT<sup>[70]</sup>。Fd-GOGAT 一般在植物叶片中有较高的活力, 其中 Fd-GOGAT 约占总 GOGAT 活性的 95% 左右<sup>[71]</sup>。1992 年, Lea 等<sup>[72]</sup>首次在拟南芥中发现 *gls* 突变体中发现了编码 Fd-GOGAT 的 2 个基因(*Glu1* 和 *Glu2*), *Glu1* 主要是在地上部表达而在根部检测到 *Glu2* 的表达量较高。随后 Ishizaki 等<sup>[73]</sup>在拟南芥中过表达 *Glu1* 基因后并同时控制  $\text{CO}_2$  浓度、光照强度等外界环境的条件, 发现谷氨酸的合成明显增加, 这进一步说明 *Glu1* 基因可以参与氨同化的过程。对于 *Fd-GOGAT* 基因功能缺失的研究工作报道较少, 2017 年 Zeng 等<sup>[74]</sup>从水稻中分离出一株叶片早衰的突变体, 命名为 *gagat1*, 其成熟叶片中 GOGAT 酶活明显降低, 进一步理化数据分析, 其籽粒蛋白含量(GPC)显著低于野生型, 这说明 *Fd-GOGAT* 基因可能在衰老叶片中氮素的再利用中起着重要的作用。除了过表达或构建 *Fd-GOGAT* 突变体之外, *Fd-GOGAT* 基因本身的结构差异也能影响植物氨同化的效率。Nigro 等<sup>[75]</sup>对六倍体小麦中 3 个同源的 *Fd-GOGAT* 基因(*Fd-GOGAT-A*、*Fd-GOGAT-B* 和 *Fd-*

*GOGAT-D*)进行了全基因组序列比较,结果显示,3个同源基因均有33个外显子和32个内含子,并且这些区域具有相同的结构。唯一不同的是,*Fd-GOGAT-A*基因内含子区域含有一系列的插入现象(Indels),从而造成小麦籽粒蛋白含量(GPC)明显增加。而有关*Fd-GOGAT*基因在豆科植物中对于氮同化过程的影响,目前相关的研究报道还很少,仍值得进一步的探讨。*NADH-GOGAT*主要是在叶片韧皮部分布较广,在叶中酶活性较低,目前对其了解还不是很深入,尤其是有关豆科植物氮素循环方面的研究,因此我们在这里不予赘述。

**3.2.3 大豆油脂与蛋白合成的表达调控互作** 在大豆中,油脂和蛋白质含量是决定其经济价值的主要因素,因此研究大豆油脂脂肪酸含量和蛋白质代谢合成的表达调控模式也成了近年来研究者工作的热点之一。大豆油脂的合成和积累主要是受其体内脂肪酸合成途径中关键酶的影响,这些基因的表达可以在转录前、转录、翻译、翻译后修饰等各个不同的水平上受到调控,而其中针对豆科植物油脂代谢的转录调控又是近年来研究工作的重点。通过微阵列分析及启动子结合试验发现,*GmDof4*和*GmDof11*类转录因子可以分别上调长链乙酰辅酶A合成酶基因和乙酰辅酶A羧化酶,同时也能通过与*CRA1*基因启动子区直接结合来抑制储存蛋白基因*CRA1*的表达。此结果表明,*GmDof4*和*GmDof11*通过上调脂肪酸合成、下调储存蛋白合成相关基因增加籽粒中的脂肪酸含量,最终提高大豆籽粒中的油脂含量<sup>[76]</sup>。同样,在将该转录因子*GmDof4*过表达在椭圆小球藻后发现,在不影响小球藻生长速率的情况下*GmDof4*可以显著增加其油脂含量<sup>[77]</sup>。通过酵母杂交验证后,*Song*等<sup>[78]</sup>发现,转录因子*GmbZIP123*可以直接与作用于下游靶基因(*SUC1*、*SUC5*)的启动子区域相结合来调控自身体内蔗糖的合成,同时,*GmbZIP123*还能够正向调节细胞壁转化酶相关基因(*cuINV1*、*cuINV3*和*cuINV6*)的表达,促进植物中蔗糖含量的累积,进而提高豆科植物中油脂的含量。*Lu*等<sup>[79]</sup>通过测定和分析栽培大豆和野生大豆发育种子的40个转录组数据并通过基因共表达网络分析发现,编码转录因子*GmNFYA*基因的启动子区域1500 bp的插入变异导致了它的基因表达量变化,最终造成豆科作物种子油脂含量的变化。

一般来说,豆科植物中的油脂含量和蛋白质含量往往是成反比的。*LEA*蛋白(Late Embryo Genesis Abundant Proteins)作为大豆晚期胚胎发生蛋白,在调控大豆储存蛋白的表达方面起着重要的作用。*Zhang*等<sup>[80]</sup>研究表明,大豆转录因子*GmDREBL*可

以通过结合在晚期胚胎发生蛋白*LEA*的启动子来增强其转录活性,从而提高种子脂肪酸含量,提高大豆蛋白质的品质,同时*GmDREBL*的表达还能受到其它转录因子如*GmABI3*和*GmABI5*的诱导,推测可能与其自身的启动子结构有关。豆科植物半胱氨酸含量也是衡量大豆蛋白营养品质的重要指标,2008年*Zhang*等<sup>[81]</sup>首次在野生大豆品种中克隆得到半胱氨酸合成酶相关基因*OAS-TL*。随后,研究者便将大豆*GmOASTL4*基因转入烟草中过表达,结果显示烟草中半胱氨酸含量显著增加,同时发现烟草体内镉含量也明显减少,因此推测*GmOASTL4*基因的过量表达可能还能提高植物抵御镉胁迫的能力<sup>[82]</sup>。而有关*GmOASTL*家族其它基因功能和进化方面的相关研究,仍值得后续进一步的探究。

## 4 展 望

随着人民饮食结构的多样性调整,对大豆籽粒蛋白的需求量及其营养品质提出了更高的要求。因此,提高大豆蛋白含量是大豆研究方向的重要目标之一。

生物固氮体系作为大豆蛋白形成发育的源头之一,在大豆根系对氮的固定同化方面发挥重要作用。虽然对大豆根瘤体系的形成及代谢机制已有初步认识,但对该途径中的多种调控机制还缺乏深入研究,大豆根瘤固氮体系中涉及的酶类的活性如固氮酶、硝酸还原酶等对温度、水分、pH等非生物因子的敏感性非常强,因此,对固氮体系中这些酶最佳活性的有效调控还缺乏一定的综合性认识,这成为植株对氮高效吸收利用的阻碍之一。近年来,国际上虽然对这些酶类的功能、活性条件等方面做了很多研究<sup>[83-85]</sup>,但由于固氮体系中多种酶类的代谢机制较为复杂及其影响因子较多,大豆植株对氮高效吸收、同化的潜力需进一步发掘利用。

除了大豆共生固氮体系外,植株吸收外源氮的另一个途径是通过吸收土壤中氮素,研究表明施用一定量氮素有益于大豆根瘤体系的形成和固氮,但施氮量过大会导致籽粒细胞中碳源不足及抑制根瘤形成而限制蛋白质的集聚合成。

另外,不同基因型大豆品种在氮素固定积累方面存在明显差异。野生大豆籽粒蛋白质含量远比栽培品种要高,这表明野生大豆品种在氮固定、转运及蛋白形成等方面具有一定的优越性,利用野生大豆与栽培大豆进行基因重组,探索其遗传规律和蛋白基因位点,是提高大豆蛋白含量的有效途径之一<sup>[86]</sup>。因此,通过对不同基因型大豆品种氮代谢相关生理机制的研究,可以分析大豆蛋白形成的遗传

规律,对提高大豆籽粒蛋白质含量、改善大豆营养品质具有重要意义。另一方面,氮固定同化等途径中相关基因调控作用机制已得到深入研究。伴随着大豆基因组测序的完成及高通量分子标记技术的发展,未来可以尝试通过转基因手段将其他作物高蛋白基因转到大豆中去。同时,亦可将大豆籽粒高蛋白基因转到其它作物中,进一步提高其蛋白质含量。

参考文献

[1] 牛宁,李占军,金素娟,等. 大豆应答逆境胁迫的蛋白质组学研究进展[J]. 大豆科学, 2016, 35(2): 337-343. (Niu N, Li Z J, Jin S J, et al. Advances on proteomics of soybean under stress[J]. Soybean Science, 2016, 35(2): 337-343. )

[2] Grieshop C M, Fahey G C. Comparison of quality characteristics of soybeans from Brazil, China, and the United States[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2001, 49: 2669-2673.

[3] Espina M J, Ahmed C M S, Bernardini A, et al. Development and phenotypic screening of an ethyl methane sulfonate mutant population in soybean[J]. Frontiers in Plant Science, 2018, 9: 394-405.

[4] Geng X T, Tang J J, Cheng K P, et al. Synthesis and cytotoxicity evaluation of 3-amino-2-hydroxypropoxygenistein derivatives [J]. Chinese Journal of Natural Medicines, 2017, 15(11): 871-880.

[5] Eder K, Siebers M, Most E, et al. An excess dietary vitamin E concentration does not influence Nrf2 signaling in the liver of rats fed either soybean oil or salmon oil[J]. Nutrition & Metabolism, 2017, 14: 71-85.

[6] Lund M N, Lametsch R, Hviid M S, et al. High-oxygen packaging atmosphere influences protein oxidation and tenderness of porcine longissimus dorsi during chill storage [J]. Meat Science, 2007, 77(3): 295-303.

[7] Cucu T, Devreese B, Kerkaert B, et al. A comparative study of lipid and hypochlorous acid induced oxidation of soybean proteins [J]. LWT-Food Science and Technology, 2013, 50(2): 451-458.

[8] Xu Y T, Liu L L. Structural and functional properties of soy protein isolates modified by soy soluble polysaccharides[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2016, 64(38): 7275-7284.

[9] Piornos J A, Burgosdiaz C, Ogura T, et al. Functional and physicochemical properties of a protein isolate from AluProt-CGNA: A novel protein-rich lupin variety (*Lupinus luteus*) [J]. Food Research International, 2015, 76: 719-724.

[10] Ziegler V, Ferreira C D, Hoffmann J F, et al. Effects of moisture and temperature during grain storage on the functional properties and isoflavone profile of soy protein concentrate[J]. Food Chemistry, 2018, 242: 37-44.

[11] Rotundo J L, Westgate M E. Meta-analysis of environmental effects on soybean seed composition[J]. Field Crops Research, 2009, 110(2): 147-156.

[12] Wang J, Liu L, Guo Y, et al. A dominant locus, qBSC-1, controls  $\beta$  subunit content of seed storage protein in soybean (*Glycine*

*max* (L.) Merr.) [J]. Journal of Integrative Agriculture, 2014, 13(9): 1854-1864.

[13] Boehm J D, Nguyen V, Tashiro R M, et al. Genetic mapping and validation of the loci controlling 7S alpha' and 11S A-type storage protein subunits in soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2018, 131: 659-671.

[14] Maruyama N, Matsuoka Y, Yokoyama K, et al. A vacuolar sorting receptor-independent sorting mechanism for storage vacuoles in soybean seeds[J]. Scientific Reports, 2018, 8(1): 1108-1116.

[15] Nielsen N C, Bassstiner R, Beaman T. Cellular and molecular biology of plant seed development [M]. Berlin Springer Netherlands, 1997: 151-220.

[16] Kinsella J E. Functional properties of soy proteins[J]. Journal of the American Oil Chemists' Society, 1979, 56: 242-258.

[17] Utsumi S, Kinsella J E. Forces involved in soy protein regulation: Effects of various reagents on the formation, hardness and solubility of heat-induced gels made from 7S, 11S, and soy isolate[J]. Journal of Food science, 1985, 50:1278-1282.

[18] Naito S, Hirai M Y, Chino M, et al. Expression of a soybean (*Glycine max* [L.] Merr.) seed storage protein gene in transgenic *Arabidopsis thaliana* and its response to nutritional stress and to abscisic acid mutations[J]. Plant Physiology, 1994, 104(2): 497-503.

[19] Nagano T, Hirotsuka M, Mori H, et al. Dynamic viscoelastic study on the gelation of 7S globulin from soybeans[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 1992, 40(6): 941-944.

[20] Maruyama N, Mohamed Salleh M R, Takahashi K, et al. Structure-physicochemical function relationships of soybean beta-conglycinin heterotrimers[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2002, 50(15): 4323-4326.

[21] Naito S, Hirai M K, Nambara E, et al. Expression of soybean seed storage protein genes in transgenic plants and their response to sulfur nutritional conditions[J]. Journal of Plant Physiology, 1995, 145(6): 614-619.

[22] Magni C, Sessa F, Capraro J, et al. Structural and functional insights into the basic globulin 7S of soybean seeds by using trypsin as a molecular probe[J]. Biochemical & Biophysical Research Communications, 2018, 496: 89-94.

[23] Singh A, Meena M, Kumar D, et al. Structural and functional analysis of various globulin proteins from soy seed[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2015, 55(11): 1491-1502.

[24] Utsumi S, Matsumura Y, Mori T. Food proteins & their applications [M]. UK:Taylor Francis Inc, 1997: 257-291.

[25] Yang A, Yu X, Zheng A, et al. Rebalance between 7S and 11S globulins in soybean seeds of differing protein content and 11SA4 [J]. Food Chemistry, 2016, 210: 148-155.

[26] Tezuka M, Taira H, Igarashi Y, et al. Properties of tofus and soy milks prepared from soybeans having different subunits of glycinin [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000, 48: 1111-1117.

[27] Nielsen N C. Soybean genetics molecular biology & biotechnology [M]. UK: CAB International, 1996: 127-163.

[28] Utsumi S, Kinsella J E. Structure-function relationships in food proteins: Sub-unit interactions in heat-induced gelation of 7S,11S and soy isolate proteins [J]. Journal of Agricultural and food



- chemistry, 1985, 33: 297-303.
- [29] Murzin A G, Brenner S E, Hubbard T. SCOP: A structural classification of proteins database for the investigation of sequences and structures [J]. Journal of Molecular Biology, 1995, 247 (4): 536-540.
- [30] Xu J, Mukherjee D, Chang S. Physicochemical properties and storage stability of soybean protein nanoemulsions prepared by ultra-high pressure homogenization [J]. Food Chemistry, 2017, 240: 1005-1013.
- [31] Burks A W, Cockrell G, Connaughton C, et al. Identification of peanut agglutinin and soybean trypsin inhibitor as minor legume allergens [J]. International Archives of Allergy & Immunology, 1994, 105(2): 143-149.
- [32] Arp D J. Rhizobium japonicum hydrogenase: Purification to homogeneity from soybean nodules, and molecular characterization [J]. Arch Biochem Biophys, 1985, 237: 504-512.
- [33] Tanaka K, Nguyen CT, Libault M, et al. Enzymatic activity of the soybean ecto-apyrase GS52 is essential for stimulation of nodulation [J]. Plant Physiol, 2011, 155: 1988-1998.
- [34] Ferguson B J. Rhizobia and legume nodulation genes [J]. Brenners Encyclopedia of Genetics, 2013: 236-239.
- [35] Silva L R, Pereira M J, Azevedo J, et al. Inoculation with Bradyrhizobium japonicum enhances the organic and fatty acids content of soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) seeds [J]. Food Chemistry, 2013, 141(4): 3636-3648.
- [36] Zahran H H. Rhizobium legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in arid climate [J]. Microbiology & Molecular Biology Reviews, 1999, 63(4): 968-989.
- [37] Delves A C, Mathews A, Day D A, et al. Regulation of the soybean-Rhizobium nodule symbiosis by shoot and root factors [J]. Plant Physiology, 1986, 82(2): 588-590.
- [38] Kim J, Rees D C. Structural models for the metal centers in the nitrogenase molybdenum-iron protein [J]. Science, 1992, 257: 1677-1682.
- [39] Schweitzer L E, Harper J E. Effect of light, dark and temperature on root nodule activity (acetylene reduction) of soybeans [J]. Plant Physiology, 1980, 65(1): 51-56.
- [40] 万涛, 邸伟, 马春梅, 等. 大豆根瘤固氮酶活性与温度关系的研究 [J]. 作物杂志, 2012, 6: 56-60. (Wan T, Di W, Ma C M, et al. Study on the relationship between soybean nodule nitrogenase activity [J]. Crops, 2012, 6: 56-60.)
- [41] Chen W, Zheng D, Feng N, et al. The effects of gibberellins and mepiquat chloride on nitrogenase activity in Bradyrhizobium japonicum [J]. Acta Physiologiae Plantarum, 2015, 37(1): 1723-1733.
- [42] Xia B, Sun Z, Wang L, et al. Analysis of the combined effects of lanthanum and acid rain, and their mechanisms, on nitrate reductase transcription in plants [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2017, 138: 170-178.
- [43] Baghel L, Kataria S, Guruprasad K N. Static magnetic field treatment of seeds improves carbon and nitrogen metabolism under salinity stress in soybean [J]. Bioelectromagnetics, 2016, 37(7): 455-470.
- [44] Sánchez C, Itakura M, Okubo T, et al. The nitrate-sensing NasST system regulates nitrous oxide reductase and periplasmic nitrate reductase in Bradyrhizobium japonicum [J]. Environmental Microbiology, 2014, 16(10): 3263-3274.
- [45] Nicholas J C, Harper J E, Hageman R H. Nitrate reductase activity in soybeans (*Glycine max* [L.] Merr.): I. Effects of light and temperature [J]. Plant Physiology, 1976, 58: 731-735.
- [46] Huang G, Wang L, Sun Z, et al. Combined effects of Lanthanum (III) and elevated Ultraviolet-B radiation on root nitrogen nutrient in soybean seedlings [J]. Biological Trace Element Research, 2015, 163: 224-234.
- [47] Sun H, Wang L, Zhou Q. Effects of bisphenol A on growth and nitrogen nutrition of roots of soybean seedlings [J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 2013, 32: 174-180.
- [48] Verma D P S, Fortin M G, Stanley J, et al. Nodulins and nodulin genes of *Glycine max* [J]. Plant Molecular, 1986, 7(1): 51-61.
- [49] Fuller F, Künstner P W, Nguyen T, et al. Soybean nodulin genes: Analysis of cDNA clones reveals several major tissue-specific sequences in nitrogen-fixing root nodules [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1983, 80(9): 2594-2598.
- [50] Gresshoff P M. Nitrogen fixation: Achievements and objectives [M]. Germany: Springer Science and Business Media, 2012.
- [51] Perret X, Staehelin C, Broughton W J. Molecular basis of symbiotic promiscuity [J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2000, 64(1): 180-201.
- [52] Catherine M B, Eric G, Xavier P, et al. Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: How many rhizobium recipes? [J]. Trends in Microbiology, 2009, 17(10): 458-466.
- [53] Morey K J, Ortega J L, Sengupta-Gopalan C. Cytosolic glutamine synthetase in soybean is encoded by a multigene family, and the members are regulated in an organ-specific and developmental manner [J]. Plant Physiology, 2002, 128(1): 182-193.
- [54] Ishiyama K, Hayakawa T, Yamaya T. Expression of NADH-dependent glutamate synthase protein in the epidermis and exodermis of rice roots in response to the supply of ammonium ions [J]. Planta, 1998, 204(3): 288-294.
- [55] Lu W, Li H, Yuan D, et al. Identification of the quantitative trait loci (QTL) underlying water soluble protein content in soybean [J]. Theoretical & Applied Genetics, 2013, 126(2): 425-433.
- [56] Zhang D, Lyu H, Chu S, et al. The genetic architecture of water-soluble protein content and its genetic relationship to total protein content in soybean [J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 5053-5065.
- [57] Zhang D, Kan G, Hu Z, et al. Use of single nucleotide polymorphisms and haplotypes to identify genomic regions associated with protein content and water-soluble protein content in soybean [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2014, 127(9): 1905-1915.
- [58] Li D, Zhao X, Han Y, et al. Genome-wide association mapping for seed protein and oil contents using a large panel of soybean accessions [J/OL]. Genomics, 2018, <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2018.01.004>.
- [59] Okazaki S, Kaneko T, Sato S, et al. Hijacking of leguminous nodulation signaling by the rhizobial type III secretion system [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2013, 110(42): 17131-17136.
- [60] Lim C W, Lee Y W, Lee S C, et al. Nitrate inhibits soybean nodulation by regulating expression of CLE genes [J]. Plant Science,



- 2014, 229: 1-9.
- [61] Chiasson D M, Loughlin P C, Mazurkiewicz D, et al. Soybean SAT1 (Symbiotic Ammonium Transporter 1) encodes a bHLH transcription factor involved in nodule growth and  $\text{NH}_4^+$  transport [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2014, 111(13): 4814-4819.
- [62] Sugawara M, Shah G R, Sadowsky M J, et al. Expression and functional roles of Bradyrhizobium japonicum genes involved in the utilization of inorganic and organic sulfur compounds in free-living and symbiotic conditions [J]. Molecular Plant-Microbe Interaction, 2011, 24(4): 451-457.
- [63] Kim Y K, Kim S, Um J H, et al. Functional implication of  $\beta$ -carotene hydroxylases in soybean nodulation [J]. Plant Physiology, 2013, 162(3): 1420-1433.
- [64] Lee H I, In Y H, Jeong S Y, et al. Inactivation of the lpcC, gene alters surface-related properties and symbiotic capability of Bradyrhizobium japonicum [J]. Letters in Applied Microbiology, 2014, 59(1): 9-16.
- [65] Masalkar P, Wallace I S, Hwang J H, et al. Interaction of cytosolic glutamine synthetase of soybean root nodules with the C-terminal domain of the symbiosome membrane nodulin 26 aquaglyceroporin [J]. Journal of Biological Chemistry, 2010, 285(31): 23880-23888.
- [66] Ortega J L, Wilson O L, Sengupta-Gopalan C. The 5' untranslated region of the soybean cytosolic glutamine synthetase  $\beta_1$  gene contains prokaryotic translation initiation signals and acts as a translational enhancer in plants [J]. Molecular Genetics and Genomics, 2012, 287(11-12): 881-893.
- [67] Masalkar P D, Roberts D M. Glutamine synthetase isoforms in nitrogen-fixing soybean nodules: Distinct oligomeric structures and thiol-based regulation [J]. FEBS Letters, 2015, 589(2): 215-221.
- [68] 张同勋. 小麦谷氨酰胺合成酶在氮素代谢中的功能分析 [D]. 郑州: 河南农业大学, 2012. (Zhang T X. The functional analysis of glutamine synthetase innitrogen metabolism in wheat [D]. Zhouzhou: Henan Agricultural University, 2012. )
- [69] Seger M, Gebril S, Tabilona J, et al. Impact of concurrent overexpression of cytosolic glutamine synthetase (GS1) and sucrose phosphate synthase (SPS) on growth and development in transgenic tobacco [J]. Planta, 2015, 241(1): 69-81.
- [70] Djennane S, Chauvin J E, Quilleré I, et al. Introduction and expression of a deregulated tobacco nitrate reductase gene in potato lead to highly reduced nitrate levels in transgenic tubers [J]. Transgenic Research, 2002, 11(2): 175-184.
- [71] Sun F, Hou X, Li Y, et al. Molecular cloning and characterization of nitrate reductase gene cDNA from non-heading Chinese cabbage [J]. Frontiers of Agriculture in China, 2007, 1(2): 188-192.
- [72] Lea P J, Blackwell R D, Joy K W. Ammonia assimilation in higher plants [M]. United Nations: Food and Agriculture Organization, 1992.
- [73] Ishizaki T, Ohsumi C, Totsuka K, et al. Analysis of glutamate homeostasis by overexpression of *Fd-GOGAT* gene in *Arabidopsis thaliana* [J]. Amino Acids, 2010, 38(3): 943-950.
- [74] Zeng D D, Qin R, Li M, et al. The ferredoxin-dependent glutamate synthase (OsFd-GOGAT) participates in leaf senescence and the nitrogen remobilization in rice [J]. Molecular Genetics and Genomics, 2017, 292(2): 385-395.
- [75] Nigro D, Blanco A, Anderson O D, et al. Characterization of ferredoxin-dependent glutamine-oxoglutarate amidotransferase (Fd-GOGAT) genes and their relationship with grain protein content QTL in wheat [J]. PloS One, 2014, 9(8): e103869.
- [76] Wang H W, Zhang B, Hao Y J, et al. The soybean Dof-type transcription factor genes, *GmDof4* and *GmDof11*, enhance lipid content in the seeds of transgenic *Arabidopsis* plants [J]. The Plant Journal, 2007, 52(4): 716-729.
- [77] Zhang J, Hao Q, Bai L, et al. Overexpression of the soybean transcription factor GmDof4 significantly enhances the lipid content of *Chlorella ellipsoidea* [J]. Biotechnology for Biofuels, 2014, 7(1): 128.
- [78] Song Q X, Li Q T, Liu Y F, et al. Soybean *GmbZIP123* gene enhances lipid content in the seeds of transgenic *Arabidopsis* plants [J]. Journal of experimental botany, 2013, 64(14): 4329-4341.
- [79] Lu X, Li Q T, Xiong Q, et al. The transcriptomic signature of developing soybean seeds reveals the genetic basis of seed trait adaptation during domestication [J]. The Plant Journal, 2016, 86(6): 530-544.
- [80] Zhang Y Q, Lu X, Zhao F Y, et al. Soybean *GmDREBL* increases lipid content in seeds of transgenic *Arabidopsis* [R]. Scientific Reports, 2016, 6: 34307.
- [81] Zhang C, Meng Q, Gai J, et al. Cloning and functional characterization of an O-acetylserine (thiol) lyase-encoding gene in wild soybean (*Glycine soja*) [J]. Molecular Biology Reports, 2008, 35(4): 527-534.
- [82] Ning H, Zhang C, Yao Y, et al. Overexpression of a soybean O-acetylserine (thiol) lyase-encoding gene *GmOAST14* in tobacco increases cysteine levels and enhances tolerance to cadmium stress [J]. Biotechnology Letters, 2010, 32(4): 557-564.
- [83] Kyrichenko O, Mahfouze H A, El-Sayed O, et al. The affect of specific plant exogenous lectin on the symbiotic potential of soybean-rhizobium system and lectin activity of soybean seeds [J]. Scientia Agriculturae, 2014, 6(1): 1-7.
- [84] Cooper B, Campbell K B, Beard H S, et al. A proteomic network for symbiotic nitrogen fixation efficiency in *Bradyrhizobium elkanii* [J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2018, 31: 334-343.
- [85] Gao T G, Xu Y Y, Jiang F, et al. Nodulation characterization and proteomic profiling of *Bradyrhizobium liaoningense* CCBAU05525 in response to water-soluble humic materials [R]. Scientific Reports, 2015, 5: 10836.
- [86] 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. )