

地理环境对大豆种子中异黄酮 积累的影响趋势^{*}

孙君明 丁安林

(中国农业科学院作物育种与栽培研究所,北京 100081)

摘 要

以 7 个异黄酮含量显著不同的大豆品种或品系分别在 7 个地区种植,利用 HPLC 技术分析所收种子中的异黄酮含量。以期获得种子中的异黄酮积累与地理环境之间的相互关系。结果显示,在 7 个地区中各品种异黄酮平均含量显著不同,山西最高(2492.3 μg/g),湖北最低(763.4 μg/g)。同一品种在不同地区其变异系数也不同,吉林 3 号变异系数最高(49.4%);张家口黑豆最低(33.3%)。7 个大豆品种异黄酮含量与纬度和海拔高度呈正相关,与经度呈负相关,且与纬度的相关程度最高,均达到显著或极显著水平,与经度和海拔高度的相关程度相对较低。另外,各品种与各地区的平均气温和降水量呈负相关,与日照时数呈正相关,且与平均气温的相关程度最高($r = -0.879^*$)。

关键词 大豆;异黄酮;地理环境;HPLC

大豆异黄酮是大豆体内特别是种子中积累的一类次生代谢产物。早期发现它是引起大豆食品苦涩味的主要因子之一^[6],但近几年证实它又具有特殊的生物效能,如:能有效的限制病原微生物的生长^[10],抑制人和动物肿瘤细胞的繁殖^[2],诱导大豆结瘤^[9]等重要的活性,其广泛的应用前景受到人们的普遍关注。大豆异黄酮在种子中的积累受多种内外因素的影响:包括光^[4]、温、水分、地理环境^[3-7]等。作者研究了光照对大豆幼苗组织中异黄酮含量和分布的影响,证实了光照对大豆异黄酮的积累有明显的促进作用(待发表)。Tsukamoto(1995)对 2 个不同纬度条件下的大豆品种的异黄酮含量变化进行了研究,指出温度影响了种子中异黄酮的积累^[11],但并没有研究地理环境(包括经度、纬度在内)对大豆异黄酮含量变化的综合影响关系。

本文选用经作者筛选^[1]的 7 个异黄酮含量显著不同的大豆品种或品系为试材,在 7 个地理环境显著不同的地区进行种植,观察各个品种的表现,并检测其种子中异黄酮含量,以期获得种子异黄酮与地理环境(经度、纬度)的变化关系,并进一步分析异黄酮积累与环境中的光、温、水等因素的相互关系,为有目的的控制种子中异黄酮含量提供依据。

^{*} 注:中国农业科学院院长基金资助,致谢冯国洲高级农艺师给予 HPLC 测定的支持。

材料和方法

1. 材料

实验选用异黄酮含量有显著差异的 7 个大豆 (*Glycine max* (L) Merri)品种或品系, 包括异黄酮水平较低的品种 2 个(楚秀和南汇早黑豆);异黄酮水平中等的 2 个(淮豆 1 号和吉林 3 号)和异黄酮水平较高的 3 个(901- 5024 张家口黑豆和鲁黑豆 2 号)。其中 901 - 5024 是中国农业科学院作物育种与栽培研究所培育,南泄早黑豆、淮豆 1 号、鲁黑豆 2 号、吉林 3 号和张家口黑豆由中国农业科学院作物品种资源研究所提供,楚秀引自江苏淮阴地区农科所。

2. 地理环境的选择、种植及取样

7 个大豆品种分别在 7 个省份和地区种植,包括湖北武昌、河南正阳、江苏淮阴、山东济南、山西汾阳、河北石家庄和北京昌平,其中这 7 个地区的纬度相差 10 度左右,经度相差 8 度左右,海拔相差 780m 左右(表 1)。天气情况包括平均气温、降水量、日照时数的数据来自中国气象局国家气象中心。各品种的播种期为 6 月 23 日左右,待种子成熟后全部收回,从每品种中随机抽取 20g 种子混合磨样,将粉样装入小瓶中待用。

表 1 7 个地区的经纬度和海拔高度的差异

Table 1 Difference of longitude latitude and sea level elevation in 7 locations

地区	湖北武昌	河南正阳	江苏淮阴	山东济南	山西汾阳	河北石家庄	北京昌平
纬度 (N)	30° 32′	32° 32′	33° 39′	36° 40′	37° 16′	38° 0′	40° 0′
经度 (E)	114° 16′	114° 24′	119° 7′	117° 2′	111° 47′	114° 30′	116° 22′
海拔 (m)	27. 5	69. 0	19. 1	53. 9	805. 0	54. 0	84. 5

3. 大豆异黄酮提取及测定

称取粉样 100mg,加入 80% 的乙醇提取液 4ml,室温静置 1- 2h,转入 1. 5ml 离心管中,4℃ 下 12000r /min 离心 15min,将上清液移入液谱专用小瓶中封口,4℃ 下保存待测。

用岛津高效液相色谱仪 (LC- 6A)系统定性定量测定样品中的异黄酮。分析条件包括:色谱柱: 150mm× 4. 9mm C₁₈ HICROM316A- LOK (UK);流动相: 含 5% 乙酸的 25% 的甲醇水溶液; 流速: 1ml /min; 检测波长: 254nm; 柱温: 50℃; 进样量: 10μl; 分析时间: 20min。样品。

异黄酮标准样品大豆甙 (daidzin)和染料木甙 (genistin)由日本筑波农研中心喜多村 (Kitamura)博士提供,其他标样购自 Sigma 公司。样品根据标样的保留时间定性,根据标准峰面积定量。

结果与分析

1. 在不同地理环境中的大豆异黄酮总含量的变化关系

7 个大豆品种分别种植在不同的地理环境条件下,种子中的异黄酮含量总的变化趋势是各地区种植的高水平异黄酮的大豆品种总含量的平均值与低水平的品种相比基本上

保持较高水平(表 1),其中鲁黑豆 2号的异黄酮平均总含量最高,达 $2181.2\mu\text{g/g}$;南汇早黑豆的异黄酮平均总含量最低($989.5\mu\text{g/g}$),表现了种子中的异黄酮积累受一定的基因型的控制。然而,由表 1同样可以看出,同一大豆品种在不同地区其异黄酮含量变异很大,吉林 3号的变异系数最高(49.4%);张家口黑豆的变异系数最低(33.5%)。这些品种的异黄酮平均总含量在各地区之间的差异见图 1,在 8个地区中,山西汾阳的异黄酮平均含量最高($2492.3\mu\text{g/g}$);湖北武昌的异黄酮平均含量最低($763.4\mu\text{g/g}$)。表明了种子中的异黄酮积累受地理环境的影响十分显著,由于不同品种对环境的适应性不同,因而形成了异黄酮含量上的很大差异。

表 2 不同大豆品种在 7个不同地区的异黄酮平均总含量的变化

Table 2 Variation of means of the total isoflavone content among different soybean varieties in 7 various locations

品种或品系 Variety or line	平均含量 ($\mu\text{g/g}$) Average content ($\mu\text{g/g}$)	标准差 (Sx) Standard deviation	变异系数 (cv%) Coefficient of variability
南汇早黑豆 ¹	989.5	465.4	47.0
楚秀 ¹	1109.1	460.7	41.5
淮豆 1号 ²	1396.4	671.0	48.1
吉林 3号 ²	1457.6	719.7	49.4
901-5024 ³	1846.6	715.3	38.7
鲁黑豆 2号 ³	2181.2	879.5	40.3
张家口黑豆 ³	2118.3	708.7	33.5

注: 1.低水平异黄酮(<1000 $\mu\text{g/g}$ 左右); 2.中水平异黄酮(1000-15000 $\mu\text{g/g}$); 3.高水平异黄酮(>1500 $\mu\text{g/g}$)

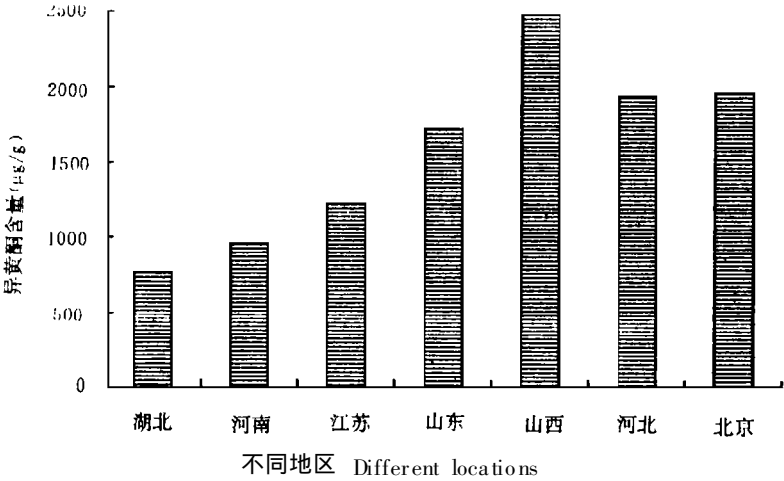


图 1 不同地区各品种异黄酮的平均总含量的比较

Fig. 1 Comparison on the average of total isoflavone contents in different locations

2 不同大豆品种的异黄酮含量与经纬度以及海拔高度的相互关系

以湖北、河南、江苏、山东、河北、北京 6个地点(纬度相差 10°N ,经度相差不大)为基础计算纬度与品种中的异黄酮含量的相关;以山西、河北、山东、江苏 4个地点(经度相差 8° ,纬度相差不大)为基础计算经度与品种中的异黄酮含量的相关。由表 3可以看出, 7个大豆品种的异黄酮含量与纬度和海拔高度呈正相关, 与经度呈负相关。不同品种所达到的

显著程度不同,淮豆 1 号和鲁黑豆 2 号与经纬度和海拔高度的相关系数均达到了显著水平或极显著水平,而张家口黑豆和吉林 3 号与经纬度和海拔高的相关系数相对较低。就相关程度而言,纬度与各品种的相关程度最高,且均达到显著或极显著水平;与经度相关程度次之;与海拔高度的相关最低。

表 3 7 个大豆品种的异黄酮含量与经纬度以及海拔高度之间的相关系数
Table 3 Correlating coefficient between isoflavone contents of 7 soybean varieties and longitude, latitude, or sea level elevation

品种	南汇早黑豆	楚秀	淮豆 1 号	吉林 3 号	901- 5024	鲁黑豆 2 号	张家口黑豆
纬度	0.810 [*]	0.926 [*]	0.923 [*]	0.840 [*]	0.983 [*]	0.943 [*]	0.922 [*]
经度	- 0.912 [*]	- 0.986 [*]	- 0.897 [*]	- 0.794 [*]	- 0.999 [*]	- 0.945 [*]	- 0.745 [*]
海拔	0.658	0.536	0.839 [*]	0.515	0.667	0.801 [*]	0.377

注: * 和* * 分别表示 P_{0.05}和 P_{0.01}的显著水平。
Note: * and* * represented P_{0.05} and P_{0.01} significant levels respectively.

3.不同品种的异黄酮含量与各地区的平均气温、降水量和日照时数的相关关系
7 个大豆品种在 7 个地区的异黄酮含量与平均温度和降水量呈负相关,与日照时数呈正相关,但各品种与 3 个参数之间的相关程度各不相同(表 4)。总体看来,其平均含量与平均气温的相关程度最高,达显著水平($r = - 0.879$);与日照时数相关次之($r = 0.600$);与降水量之间的相关最低($r = - 0.566$)。在 7 个大豆品种中,以鲁黑豆 2 号与平均气温的相关程度最高($r = - 0.935$),且达到了极显著水平;与降水量的相关系数也较高($r = - 0.690$);而与日照时数的相关较低($r = 0.616$)。另外,在与降水量的相关中以淮豆 1 号的相关程度最高($r = 0.727$),并达到了显著水平。其他品种除与平均气温的相关系数较高外,与其他二因子之间的相关系数均较低。

表 4 7 个大豆品种的异黄酮含量与平均气温、降水量和日照时数的相关系数
Table 4 Correlation coefficient between isoflavone contents in 7 soybean varieties and mean temperature, amount of precipitation or hours of sunshine

项目	平均含量 ⁴	南汇早黑豆	楚秀	淮豆 1 号	吉林 3 号	901- 5024	鲁黑豆 2 号	张家口黑豆
平均气温 ¹	- 0.879 [*]	- 0.786 [*]	- 0.839 [*]	- 0.844 [*]	- 0.682 [*]	- 0.932 [*]	- 0.935 [*]	- 0.728 [*]
降水量 ²	- 0.566	- 0.451	- 0.618	- 0.671	- 0.428	- 0.532	- 0.690	- 0.301
日照时数 ³	0.600	0.674	0.418	0.727 [*]	0.589	0.508	0.616	0.394

注: * 和* * 分别表示 P_{0.05}和 P_{0.01}的显著水平。
1. 指各个地区 6 月~ 10 月的平均气温; 2. 3. 分别指各个地区 6 月 - 10 月的总降水量和总日照时数; 4. 指在每个地区中 7 个品种异黄酮总含量的平均值。
Note: * and* * represented P_{0.05} and P_{0.01} significant levels respectively
1. The mean temperature from June to October in different locations; 2. 3. the total amount of precipitation and the total hours of sunshine from June to October in different locations respectively; 4. the average of total isoflavone content in locations on 7 soybean varieties

讨 论

1. 大豆种子中的异黄酮的积累除受到不同基因型的影响外(表 2),很大程度上受到综合的环境因素影响,主要包括光^[4]、温、水、地理条件^[3]等。一个地区特定的经纬度具有特定日照、气温、雨量等环境条件,因而表现了异黄酮含量的差异。

2. 大豆异黄酮属类黄酮的一种,研究证明它是一种受光信号诱导的物质^[8]。其合成来自前体苯丙氨酸(phenylalanine),经苯丙氨酸裂解酶(PAL)、香豆酸 CoA 连接酶(4CL)、苯基苯乙烯酮合成酶(CHS)等酶催化合成的。这些酶的含量和活性受到光照的调节^[5,8],作者也证实了光照促进异黄酮的积累(未发表)。另外,环境中光的数量、质量等特性影响和决定了其他一些相关的地理环境因子(如温度、水分、土壤结构等)的性质,从而使异黄酮积累也随地理环境的变化而变化。本文的实验结果证明了地理纬度与异黄酮积累具有很大的相关性,且呈正相关(表 3)。纬度自北向南逐渐降低,光照变短,温度升高,水分增加,引起异黄酮的含量显著降低(表 4),这与作者初步研究大豆异黄酮含量南低北高^[1]的结果相符合,同时也与 Tsukamoto 的研究结果温度升高降低异黄酮含量相符合^[11]。至于,经度与异黄酮的积累呈负相关(表 3),这可能与水分对异黄酮的影响有关,因降水量与种子中的异黄酮的积累呈负相关(表 4),自西向东,降水量增加,引起异黄酮含量的逐渐降低。如图 1 所示,山西地区属于旱作区,其异黄酮含量较高,而江浙地区属海洋性气候,异黄酮便较低。另外,海拔高度与地理环境一样,同样影响着大豆的个体发育,海拔高度不同,气候条件也不同,从而形成大豆种子中异黄酮积累的差异。如:山西地区海拔较高,大豆中的异黄酮含量也较高;而湖北、江苏等地区海拔均较低,异黄酮含量也较低(表 1,图 1),说明了海拔高度增加使种子中异黄酮的积累增加。

3. 本文采用多个品种在同一年份不同地点种植,初步对大豆异黄酮含量与地理环境的相互关系进行了观察与分析,发现随纬度自北向南降低,气温升高,雨量增加,湿度增大,日照较少异黄酮含量具有逐渐降低的趋势。要想获得年份与环境的互作的多年结果,还需进一步试验。另外,为进一步明确异黄酮的积累与环境温度、水分以及海拔高度之间的确切关系,还需详细的研究与证实。

参 考 文 献

- [1] 孙君明,丁安林,常汝镇,东惠茹,1995,中国大豆异黄酮含量的初步分析,中国粮油学报,10(4): 51- 54
- [2] Coward L, Barnes N, C, Setchell K D R, et al. 1993, Genistein, daidzein and their β - glycoside conjugates: antitumor isoflavones in soybean foods from American and Asian diets. J Agric Food Chem, 41, 1961- 1967
- [3] Eldridge A C, et al. 1983, Soybean isoflavones: Effect of environment and variety on composition. J. Agric, Food Chem. 31, 394- 396
- [4] Graham T L, et al, 1991, Flavonoid and isoflavonoid distribution in developing soybean seedling tissues and in seed and root exudates, Plant Physiol 95, 594- 603
- [5] Hahlbrick K and Scheel D. Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. Annu Rev

- Plant Physiol Plant Mol. Biol, 1989, (40): 347– 369
- [6] Huang A, Hsieh O A L and Chang S S. 1981, Characterization of the nonvolatile minor constituents responsible for the objectionable taste of defatted soybean flour. J Food Science 47, 19– 23
- [7] Kitamura K, Igita K, Kikuchi A. et al. 1991, Low isoflavone content in some early maturing cultivars, so-called "Summer-type soybeans" (*Glycine max* (L) Merr) Japan. J. Breed. 41, 651– 654
- [8] Koes R. E, Spelt C. E, Mol J. N. M. The chalcone synthase multigene family of *Petunia hybrida* (V30): differential light-regulated expression during flower development and UV light induction. Plant Mol. Biol. 1989, (12): 213– 225
- [9] Kosslak R. M. Bookland R, Barkei J. et al. 1987, Induction of *Bradyrhizobium japonicum* common nod genes by isoflavones isolated from *Glycine max*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 84, 7428– 7432
- [10] Morris P F, Savard M E and Ward E W B. 1991, Identification and accumulation of isoflavinoids and isoflavone glucosides in soybean leaves and hypocotyls in resistance responses to *Phytophthora megaspera* f.sp. *Glycinea*. Physiol. Mol. Plant Pathol. 39(3): 229– 244
- [11] Tsukamoto C, Shimada S, Igita K et al. 1996, Factors affecting isoflavone content in soybean seeds changes in isoflavones, saponins, and composition of fatty acids at different temperatures during seed development. J. Agric. Chem. 43 1184– 1192

EFFECTS OF GEOGRAPHICAL CONDITIONS ON THE ACCUMULATION OF ISOFLAVONES IN SOYBEAN SEEDS

Sun Junming Ding Anlin

(Institute of Crop Breeding and Cultivation, CAAS, Beijing, China, 100081)

Abstract

To understand the relationship between the accumulation of isoflavone content and geographical conditions, 7 soybean varieties with different isoflavone level were planted in 7 locations and the soybean isoflavone contents in the seed were determined by HPLC. The results showed that the average total isoflavone contents were significant different in 7 locations, the highest content (2492.3 μ g/g) was showed in Shanxi, the lowest (763.4 μ g/g) was showed in Hubei. Coefficient of variability of the same variety varied markedly in different locations. Coefficient of variability of Jilin No. 3 was the highest (49.4%), that of Zhangjiakou Heidou was the lowest (33.5%). We draw a conclusion of that there existed highly significant positive correlation of isoflavone content with latitude, and positive correlation with sea level elevation, but negative correlation with longitude. Moreover, there were negative correlation of isoflavone content with mean temperature and amount of precipitation; positive correlation of isoflavone content with hours of sunshine. And the coefficient of correlation with mean temperature was the highest ($r = -0.879^{**}$).

Key words Soybean; Isoflavone; Geographical condition; HPLC