

大豆种子发育过程中脂肪酸积累模式研究

李晓丹, 吴 刚, 武玉花, 肖 玲, 卢长明

(中国农业科学院油料作物研究所, 基因工程与转基因安全研究室, 武汉 430062)

摘要 对夏大豆种子发育过程中脂肪酸的累积过程进行了研究。研究表明, 大豆种子发育早期有 6 种脂肪酸, 成熟期减少为 5 种。成熟期的种子亚油酸和油酸占全部脂肪酸的 80% 以上, 棕榈油酸发育中途消失。大豆种子脂肪酸总量呈升—降—升的 Z 字型变化模式。此外, 本文通过对脂肪酸组分的相关性及主成份分析, 对大豆种子发育过程中脂肪酸的积累模式进行了探讨, 发现大豆种子发育过程中油酸与亚油酸呈同步积累, 高度正相关, 在脂肪酸组成中具支配地位, 推测 SAD 和 FAD2 两种酶在决定大豆含油量方面可能具有决定性作用。

关键词 大豆; 种子发育; 脂肪酸; 主成分分析; 酶

中图分类号 S565.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-9841(2007)04-0506-05

THE ACCUMULATION PATTERN OF FATTY ACIDS DURING THE DEVELOPMENT OF SOYBEAN SEEDS

LI Xiao-dan, WU Gang, WU Yu-hua, XIAO Ling, LU Chang-ming

(Department of Genetic Engineering and GMO Biosafety/Oil Crops Research Institute, CAAS, Wuhan 430062)

Abstract In this study, cumulative process of fatty acids in soybean cultivar Zhongdou 8 was analyzed during seed development. The results indicated that there were six fatty acid components at the early stage of soybean seeds developing while five at the mature stage. Linoleic acid and oleic acid accounted for 80% of the total fatty acids in mature seeds. C16 : 1 disappeared in the halfway of seed growth. Z-shape was observed when studying the change pattern of the total fatty acids amounts during seed development. During soybean seed development, oleic acid and linoleic acid were accumulated simultaneously and highly positive correlation was found. It is considered that oleic acid and linoleic acid play a dominant role in fatty acid compositions in soybean seeds, so it presumed SAD and FAD2 maybe play a decisive role in the oil content of soybean.

Key words Soybean; Seed developing; Fatty Acids; Principal component analysis; Enzyme

大豆(*Glycine max* (L.) Merr.)是我国以及世界上重要的经济作物, 动物营养及食品加工工业植物

食用油主要来自大豆种子。目前, 商用大豆种子含油量一般为 18%~22%, 我国种质资源大豆含油量

收稿日期: 2007-04-09

基金项目: 国家自然科学基金 (30471099)

作者简介: 李晓丹(1977-), 女, 博士研究生, 从事基因工程与转基因安全研究。E-mail: lxiaodan@163.com

通讯作者: 卢长明, E-mail: cmlu@oilcrops.cn

为 23%^[1]。大豆脂肪酸组分及配比直接关系到大豆油脂的营养价值、贮运加工等环节,是决定大豆油脂品质的最重要因素。因此,在开展大豆品质育种以提高脂肪含量为主要育种目标的同时,亦应重视大豆脂肪酸组分的合理配比^[2~4]。大豆种子含油量和脂肪酸组成是决定大豆油脂品质的最重要的因素,许多学者进行了相关的研究^[5~8],但对我国大豆种子发育过程中脂肪酸真正物质质量的累积过程及其组成变化还未见详细研究报道。为了探索在我国夏大豆生态条件下种子品质形成的规律和调控策略,文章分析了夏大豆种子发育过程中不同脂肪酸的累积过程、组成变化以及不同脂肪酸之间的相关关系,旨在为大豆的品质育种与调控提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

以夏大豆中豆 8 号为试验材料。5 月底至 6 月初播种,9 月底成熟。试验材料种植在中国农业科学院油料作物研究所试验田内,于盛花期标记始开花朵,从标花第 12 d 开始,每 4 d 取发育中的蒴果一次,于-70℃冷冻保存,取材直到蒴果成熟,共取材 9 次。每次取材随机分成 3 份,作为 3 次重复,备作脂肪酸分析。

1.2 方法

1.2.1 脂肪酸甲脂的制备 将冷冻保存的大豆蒴果剥取发育的种子,冷冻干燥至衡重,精确称重后研磨成粉状,加入石油醚和乙醚(v/v=1:1)的混合溶剂 1 mL,振荡溶解,再加入 0.4 N KOH-甲醇溶液 1 mL,充分混匀,于 60℃温浴 1 h 进行甲脂化反应,冷却至室温后加入内标十九碳饱和脂肪酸甲脂(methy nonadecanoate),然后加入 2 mL 蒸馏水,剧烈震荡后离心,取上层清液,备做色谱分析。

1.2.2 气相色谱分析 所用仪器为 Agilent Technologies 6890N。采用程序升温法,柱温 210℃~230℃,升温速率 10℃/min,进样口温度 260℃,入口压强 25 pa,高纯氮气 25 mL/min,氢气 40 mL/min,空气 400 mL/min。

1.2.3 数据分析 气相色谱分析结果以 6 种主要脂肪酸的绝对量(mg/g)和相对量(%)表示。根

据各种脂肪酸的量计算脂肪酸总量(mg/g)。绝对量计算公式为 $\omega_i = A_i \cdot m_s / (A_s \cdot m)^{[9]}$,其中 A_i 为第 i 种脂肪酸组分的峰面积, A_s 为内标的峰面积, m_s 为内标的物质质量, m 为样品干重。相对量(%) = $A_i / \sum A_i \cdot 100$ 。每个取样时间点计算 3 次重复的平均数,不同脂肪酸累积过程的相关性和主成分分析在脂肪酸绝对含量的基础上采用 SAS 软件进行分析。

2 结果与分析

2.1 种子发育过程中各种脂肪酸相对含量的变化

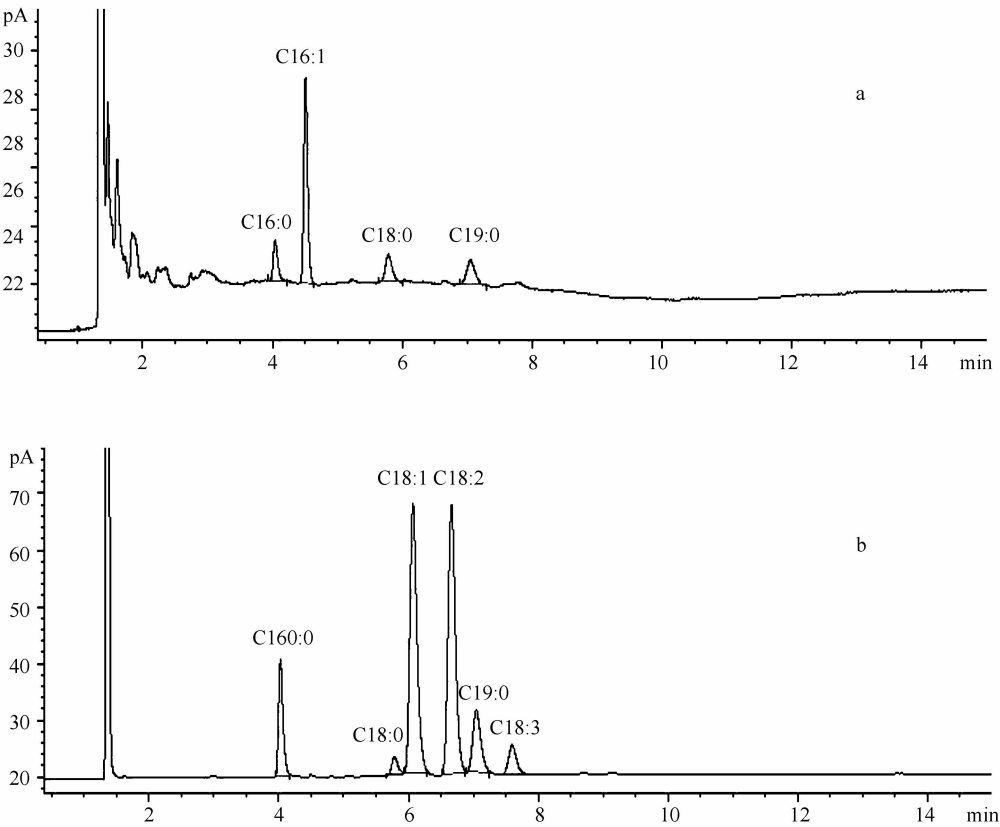
大豆种子发育过程中,共出现 6 种主要脂肪酸(图 1),它们分别是棕榈酸(C16:0),棕榈油酸(C16:1)、硬脂酸(C18:0)、油酸(C18:1),亚油酸(C18:2)和亚麻酸(C18:3)。由图 2 可以看出,种子形成初期(开花后第 12 d),种子中包含了 73.70% 的 C16:1 和几乎等量的 C16:0, C18:0。伴随着 C18:2、C18:1 和 C18:3 的出现及上升, C16:1 呈现明显下降的趋势。开花后 24 d, C16:1 基本消失, C18:1 仍在快速积累, C16:0、C18:0、C18:2 基本稳定, C18:3 开始下降。至 32 d 各组分变化趋向平稳,与成熟种子(44 d)的脂肪酸组成相近。种子成熟后(44 d),单不饱和脂肪酸 C18:1(42%)和多不饱和脂肪酸 C18:2(38%)占了种子内全部脂肪酸的 80% 以上。

2.2 种子发育过程中脂肪酸物质质量的变化

种子发育过程中的脂肪酸总量变化如图 3 所示:总体呈升—降—升的模式。种子脂肪酸总量在 12~28 d 变化不明显,28~32 d 迅速累积。而后大幅下降,至 36 d 后持续累积,至 44 d 达到了累积最高峰值 163.72 mg/g。

同时,监测了随着种子的发育,种子中各个脂肪酸组分的物质质量的真正变化情况(表 1)。表中的数据均为 3 次重复的平均值,由这些数据可知,中豆 8 号种子脂肪酸累积的变化趋势大体上可分为四种情况:第一种是随着时间的变化,整体呈增加趋势的 C18:1 和 C18:2;第二种是在发育过程早期略有增加而后呈平稳走势的 C18:3;第三种是发育早期出现,而后迅速消失的 C16:1;第四种是发育过程中变化不大的 C16:0 和 C18:0。可以看出 C18:1 和 C18:2 是主导成分,而且两

者是完全同步变化的。在开花 12~40 d C18 : 2 量与 C18:2 相当。
绝对量均高于 C18 : 1,开花第 44 d 左右 C18:1 的



a 为开花后 12 d,b 为开花后 44 d,图中 C19 : 0 为内标

a is 12 days after flowering and b is that in 44 days after flowering,C19 : 0 is internal standard

图 1 大豆种子脂肪酸含量气相色谱测定峰图

Fig. 1 Peak graphs by gas—chromatography

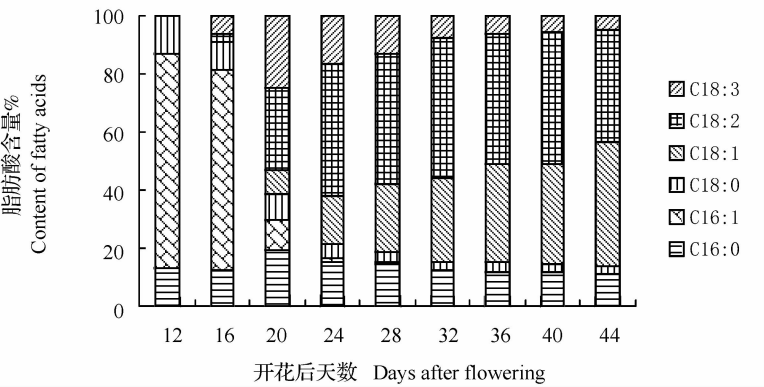


图 2 大豆种子发育过程中脂肪酸组分的变化

Fig. 2 Changes in fatty acid composition during seed development of soybean

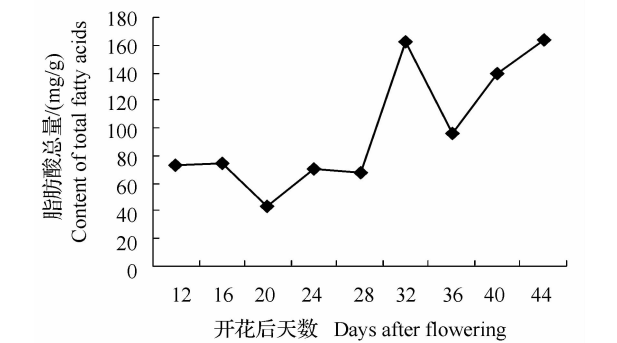


图3 大豆种子发育过程中脂肪酸总量的变化
Fig.3 Changes in the total fatty acids amounts during seed development

表1 大豆种子发育过程中每种脂肪酸的物质质量(mg/g)

Table 1 Fatty acids content during seed development of soybean

开花后天数 Days after flowering	C16 : 0	C16 : 1	C18 : 0	C18 : 1	C18 : 2	C18 : 3
12	9.57	53.90	9.66	—	—	—
16	9.17	51.05	7.08	—	2.45	4.45
20	8.26	4.45	3.96	3.64	12.21	10.77
24	10.64	1.04	3.17	12.06	32.13	11.57
28	9.97	0.57	2.25	15.81	30.61	8.80
32	20.35	—	4.61	46.85	78.94	12.04
36	11.59	—	2.82	32.82	42.87	5.96
40	16.57	—	3.84	48.26	63.86	7.42
44	18.50	—	4.057	0.19	63.61	7.38

注:—痕量,未检测出 Notes:—trace amount,not detected

2.3 种子发育全过程脂肪酸的相关分析和主成份分析

为了解大豆种子发育过程中脂肪酸组成的变化规律,对种子发育全过程的脂肪酸组成进行了相关分析和主成份分析。结果显示,C16 : 0、C18 : 1、C18 : 2 和 C18 : 3 相互之间呈正相关,属于第一类;C16 : 1 和 C18 : 0 之间也呈正相关,属于第二类。第一和第二类脂肪酸之间呈负相关(表 2)。

表2 种子发育过程中脂肪酸相关系数表
Table 2 Correlation coefficient of fatty acids during seed development

	C16 : 0	C16 : 1	C18 : 0	C18 : 1	C18 : 2	C18 : 3
C16 : 0	1					
C16 : 1	-0.4582	1				
C18 : 0	-0.1953	0.9207	1			
C18 : 1	0.9079	-0.6077	-0.4049	1		
C18 : 2	0.9267	-0.7325	-0.5264	0.9136	1	
C18 : 3	0.3131	-0.7884	-0.7467	0.2701	0.5170	1

为了消除不同脂肪酸之间复杂的相关干扰,进

一步了解不同脂肪酸之间的消长关系,在相关分析的基础上进行了主成份分析。结果表明,主成份分析的第一特征根为 1700.99,它的贡献率达到总变异的 84.92%。由此可见,第一主成份即可以代表大豆种子发育过程脂肪酸的累积变化情况。从各种脂肪酸的特征向量(表 3)可以看出,C16 : 0、C18 : 2、C18 : 1 和 C18 : 3 是第一主成份的正向决定性因素,是正向同步关系,其中 C18 : 2 和 C18 : 1 更为重要;C16 : 1 和 C18 : 0 是第一主成份的负向决定因素,是负向同步关系;这也与相关性分析所得到的结果相同。第二主成解释释总变异的 12%。

表3 种子发育过程中脂肪酸主成份分析
Table 3 Principal component analysis of fatty acids during seed development

参 数 Parameter	脂肪酸 Fatty acids	主成份 1 PRIN1	主成份 2 PRIN2
特征向量 Eigenvectors	C16 : 0	0.0955	0.1186
	C16 : 1	-0.4495	0.8393
	C18 : 0	-0.0353	0.1046
	C18 : 1	0.5730	0.4683
	C18 : 2	0.6757	0.1616
	C18 : 3	0.0502	-0.1578
特征根值 Eigenvalue		1700.99	246.44
累计贡献 Cumulative		0.8492	0.9722

根据主成份的大小,6 种脂肪酸可以分成三大类:C16 : 1 为一类、C16 : 0、C18 : 0 和 C18 : 3 为第二类,C18 : 1 和 C18 : 2 归为第三类(图 4)。

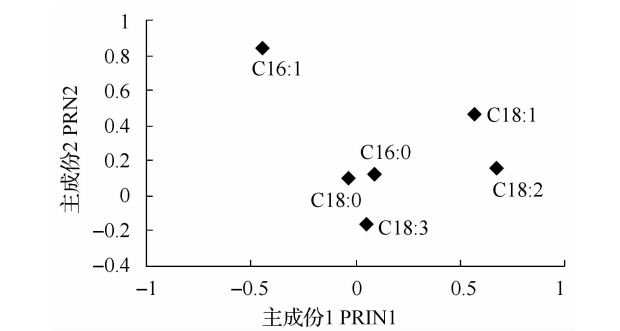


图4 种子发育过程中脂肪酸主成份分析图
Fig.4 Plot chart of principal component analysis of fatty acids during seed development

3 讨论

大豆种子脂肪酸总量呈 Z 字型,升一降一升的模式变化,至 32 d 达到第一个累积高峰 162.79 mg/g,而后在近 40%的回落后逐渐回升至峰值

163.72 mg/g。油脂的回落可能是与被用来参与细胞中其他生命物质如蛋白质和一些单糖的合成有关^[10]。

大豆种子在发育过程中先后有6种不同脂肪酸出现,成熟期只剩5种。C16:1出现后迅速消失,C18:1和C18:2在种子发育早期未出现,至开花后16 d才检测到微量,而后快速增长,迅速成为脂肪酸的主要成分,表明控制C18:1和C18:2合成的酶从16 d后进入了高度活跃期。

研究发现,在大豆种子形成早期有C16:1的出现,并且达到脂肪酸总量的73.70%之多,但其随着种子的生长发育迅速下降,至24 d时已基本消失。这一现象在其它学者对大豆脂肪酸组分的研究中未有报道。由于C16:1是以C16:0为底物,在FAD4和FAD5去饱和酶的催化下产生的^[11],因此,大豆种子发育早期是否有FAD4和FAD5去饱和酶的活动导致C16:1的生成与消失,值得进一步研究。

李永忠^[12]通过对五种脂肪酸成分对含油量的通径分析表明,五种脂肪酸对含油量的相对重要性依次为油酸(0.8148) > 亚油酸(0.7987) > 亚麻酸(-0.3283) > 硬脂酸(0.3207) > 棕榈酸(0.1399)。通过对脂肪酸绝对含量的主成份分析表明,大豆种子发育过程中6种脂肪酸对含油量的相对重要性为亚油酸(0.6757) > 油酸(0.5730) > 棕榈油酸(-0.4495) > 棕榈酸(0.0955) > 亚麻酸(0.0502) > 硬脂酸(-0.0353)。此结果与李永忠的结论是有差异的,但影响大豆含油量的最主要的因子均为油酸和亚油酸。

油酸和亚油酸的合成分别由硬脂酰-ACP去饱和酶SAD和脂肪酸去饱和酶FAD2催化^[11],本实验大豆种子发育过程中C18:1与C18:2高度正相关,说明两种酶活性是同步变化的。由于C18:1和C18:2是影响大豆脂肪酸含量的最主要因子,因此表明SAD和FAD2两种酶在决定大豆含油量上具有决定性作用。

4 结论

4.1 大豆种子发育早期发现有6种脂肪酸,成熟期减少为5种。早期发现的脂肪酸有C16:0、C16:1、C18:0、C18:1、C18:2和C18:3,其中C16:1占73.7%。开花22 d后C16:1消失,也就是说成熟的大豆种子中含有C16:0、C18:0、C18:1、C18

:2和C18:3这5种脂肪酸,其中单不饱和脂肪酸C18:1(42%)和多不饱和脂肪酸C18:2(38%)占了种子内全部脂肪酸的80%以上。

4.2 大豆种子脂肪酸总量呈升一降一升的模式变化,脂肪酸累积峰值为163.72mg/g。

4.3 相关性分析及主成份分析结果表明,C16:0、C18:1、C18:2和C18:3相互之间呈正相关,为主成份的正向决定性因素,是正向同步关系,为第一类;C16:1和C18:0之间也呈正相关,但为主成份的负向决定因素,是负向同步关系,为第二类。第一和第二类脂肪酸之间呈负相关,也可以说第一类代表了大豆种子中脂肪酸合成的方向,第二类为脂肪酸转化的方向。

4.4 油酸和亚油酸是影响大豆脂肪酸含量的最主要因子,SAD和FAD2两种酶可能在决定大豆含油量上具有决定性作用。

参 考 文 献

- [1] 盖钧镒. 发展我国大豆遗传改良事业解决国内大豆供给问题[J]. 中国工程科学, 2003, 5(5): 1-6.
- [2] 陈震南, 陈震东, 魏正惠. 浅析多不饱和脂肪酸植物油的负面作用与品种改良[J]. 福建农业学报, 1998, 13(3): 14-20.
- [3] 伊冰摘译. 有关人类膳食脂肪和油脂的专家建议[J]. 国外医学卫生学分册, 1995, 22(3): 192-193.
- [4] 尹田夫. 大豆油脂脂肪酸改良与生化育种策略[J]. 大豆科学, 1988, (1), 75-79.
- [5] 袁玉春, 刘铜. 大豆种子不同部位的脂肪酸组成[J]. 大豆科学, 1998, 17(4): 374-378.
- [6] 马淑英, 梁歧, 尹田夫, 等. 大豆籽粒发育过程中脂肪酸的组分分析[J]. 大豆科学, 1999, 18(2): 125-128.
- [7] 任波, 李毅. 大豆种子脂肪酸合成代谢的研究进展[J]. 分子植物育种, 2005年, 3(3): 301-306.
- [8] 徐杰, 胡国华, 张大勇. 大豆种子脂肪酸组分的研究进展[J]. 大豆科学, 2005, 24(1): 61-66.
- [9] Beatrice A Were, Augustino O Onkware, Samuel Gudu, et al. Seed oil content and fatty acid composition in East African sesame (*Sesamum indicum* L.) accessions evaluated over 3 years[J]. Field Crops Research, 2006, 97: 254-260.
- [10] Sébastien Baud, Jean-Pierre Boutin, Martine Miquel, et al. Christine Rochat. An integrated overview of seed development in *Arabidopsis thaliana* ecotype WS[J]. Plant Physiol Biochem, 2002, 40: 151-160.
- [11] Ohlrogge JB, Browse JA. Lipid biosynthesis[J]. Plant Cell, 1995, 7: 957-970.
- [12] 李永忠. 大豆脂肪酸及其组成成分的相关和通径分析[J]. 大豆科学, 1987, 6(3): 203-208.