



不同颜色大豆种皮成分及抗氧化性分析

吴采玉¹, 文春雨¹, 黄丽萍¹, 徐瑞新², 宋 健¹

(1. 长江大学 生命科学学院, 湖北 荆州 434023; 2. 长江大学 农学院, 湖北 荆州 434023)

摘要:为分析不同种皮颜色大豆种皮花色苷、总酚、总黄酮含量及抗氧化性差异,探讨类黄酮相关基因表达量与种皮颜色的关系,促进高抗氧化性的大豆种质的培育和筛选鉴定,以重组自交系(RIL)群体(♀中豆41×♂柘城小红豆)中4种纯合种皮颜色大豆及其亲本为试验材料,利用高效液相色谱法测定花色苷种类,利用分光光度计测定总酚和总黄酮含量,测定铁离子还原能力(FRAP)、DPPH·清除能力和ABTS⁺·清除能力,评价体外抗氧化能力差异,对比大豆种子着色前后转录组,分析类黄酮途径相关基因的表达量变化,并探讨不同颜色种皮黄酮类物质含量与抗氧化能力及基因表达的关系。结果表明:黑色大豆种皮中花色苷含量最多且种类最丰富,种皮颜色主要与天竺葵素-3-葡萄糖苷含量有关,矢车菊-3-葡萄糖苷和矢车菊-3-半乳糖苷含量与黑色和紫红色素沉积有关。黑色大豆的总酚、总黄酮、总花青素、铁离子还原能力(FRAP)、DPPH·清除能力和ABTS⁺·清除能力均最高,且均表现为黑色>紫红色>褐色>黄色,仅DPPH·清除能力在其他种皮颜色中差异不显著,说明黑色大豆种质在花色苷和抗氧化性方面更为优良,具有保健产品开发价值。总酚、总黄酮、总花青素含量与FRAP、DPPH·和ABTS⁺·清除能力呈极显著正相关。*CHS*基因的表达与酚类物质含量和抗氧化能力呈极显著正相关。黑色种皮着色前后主要*CHS*基因表达显著升高,褐色种皮着色前后MYB转录因子表达显著升高,*F3'5'H*基因和*F3'H*基因的表达显著下降。不同种皮颜色着色沉积时类黄酮途径*CHS*基因的表达可以用来衡量大豆种皮的抗氧化能力。

关键词:大豆;花色苷;酚类;黄酮;抗氧化性;类黄酮途径基因;转录组

Analysis of Seed Coat Composition and Antioxidant Activity of Soybean with Different Colors

WU Caiyu¹, WEN Chunyu¹, HUANG Liping¹, XU Ruixin², SONG Jian¹

(1. College of Life Sciences, Yangtze University, Jingzhou 434023, China; 2. College of Agriculture, Yangtze University, Jingzhou 434023, China)

Abstract: In order to analyze the differences in anthocyanins, total phenols, total flavonoids and antioxidant activity of soybean seed coat colors with different seed coat colors, explore the relationship between as the expression of flavonoid-related genes and seed coat color, and promote the cultivation, screening and identification of soybean germplasm with high antioxidant resistance to reorganize. With four kinds of homozygous seed coat color soybean and parents of the recombinant inbred lines (RIL) population (♀Zhongdou 41 × ♂Zhechengxiaohongdou) as test materials, and the species of anthocyanins were determined by high performance liquid chromatography, and the total phenol and total flavonoid content was determined by spectrophotometer. Iron reduction capacity (FRAP), DPPH· clearing ability and ABTS⁺·clearing ability were determined to evaluate the difference of antioxidant capacity *in vitro*. Compared the transcriptome before and after soybean seed coloration, analyzed the expression changes of flavonoid pathway-related genes, and to explore the relationship between flavonoid content and antioxidant capacity and gene expression in different color coats. The results showed that the content of anthocyanins in the seed coat of black soybean was the largest and the most abundant, and the color of the seed coat was mainly related to the content of geranium-3-glucoside and cornflower-3-glucoside and cornflower-3-galactoside content are associated with black and purplish pigment deposition. The contents of total phenols, total flavonoids, total anthocyanins, ferritin reducing ability (FRAP), DPPH· clearing ability and ABTS⁺· clearing ability of black soybeans were the highest, and all manifested as black > purplish red > brown > yellow. DPPH· clearing ability was not significant in other coat colors. These results indicated that black soybean germplasm had better anthocyanins and antioxidant properties, and was valuable for developing health products. The contents of total phenols, total flavonoids and total anthocyanins were positively correlated with scavenging ability of FRAP, DPPH· and clearing ability, and the expression of *CHS* gene was positively correlated with phenolic content and antioxidant ability. The expression of main *CHS* gene was significantly increased before and after staining of black coat, while the expression of MYB transcription factor was significantly increased before and after staining of brown coat, and the expression of *F3'5'H* and *F3'H* genes were significantly decreased. The expression of *CHS* gene of flavonoid pathway could be used to measure the antioxidant capacity of soybean seed coat.

Keywords: soybean; anthocyanins; phenols; flavonoids; antioxidant activity; flavonoid pathway-related genes; transcriptome

收稿日期: 2022-12-03

基金项目: 国家自然科学基金(32072016); 长江大学国家大学生创新创业项目(Yz2020262)。

第一作者: 吴采玉(2000—), 女, 硕士研究生, 主要从事生物学研究。E-mail: 1781964924@qq.com。

通讯作者: 宋健(1985—), 女, 硕导, 主要从事生物化学与分子生物学研究。E-mail: songjian@yangtzeu.edu.cn。

大豆[*Glycine max* (L.) Merr.]是起源于我国的重要粮油作物,蛋白和脂肪含量约占 60%,是食用蛋白与油脂的主要来源^[1]。同时,大豆中还含有异黄酮、皂苷、低聚糖和花青素等多种具有保健功能的营养物质^[2]。大豆种皮具有黄、褐、黑、绿和双等多种颜色,种皮颜色的形成与花色苷类黄酮物质的积累密切相关^[3]。花色苷是人类非必需营养物质,是广泛存在植物中的类黄酮化合物,是植物中花青素的存在形式,由苯基丙酸类合成途径和类黄酮合成途径生成。花色苷分子结构上有多个酚羟基,是迄今为止发现的最强效的自由基清除剂,可以通过自身氧化清除各种自由基,保持氧化还原系统与游离自由基之间的动态平衡,抗氧化衰老;酰基化的花色苷具有强烈的抗突变作用;花色苷可以通过减轻氧化应激,抑制炎症反应信号途径减少炎症因子的表达,从而发挥抗癌抗炎作用;还可以减少夜盲和近视,防止神经紊乱、防止老年痴呆症、预防心脑血管疾病^[4-5]。总之,花色苷是一种安全、无毒的天然食用色素,具有抗氧化、抗突变及清除自由基的生理活性功能,已经成为人类用于疾病预防和治疗的重要物质^[6-8]。此外,天然花色苷对提高植物耐逆境胁迫能力具有重要作用^[9]。

研究表明,黑色大豆具有最高的羟基清除能力,具有抗氧化、抵抗肿瘤、抗癌、降低血压以及降低血脂等作用^[10-11]。Takahata 等^[12]比较了不同颜色大豆种皮提取物的清除 DPPH·自由基活性,发现黑豆皮提取物活性最强,且其活性与酚类物质含量密切相关。Kumar 等^[13]研究发现,与黄豆和绿豆相比,黑豆有较高的 DPPH·清除能力和铁离子还原能力。黑豆种皮的主要成分是飞燕草-3-葡萄糖苷和矢车菊-3-葡萄糖苷,并且两种成分在酸性条件下稳定性比较好^[14]。不同种质资源黑豆的抗氧化性和花色苷含量也不相同,且抗氧化性和花色苷酚类含量显著正相关^[15-17]。不同产地的黑豆中花色苷的含量差异很大,经研究表明黑豆花色苷的含量是由黑豆品种的基因型和生长环境共同决定的^[18]。

随着人们生活水平的提高,对于营养类食物的需求日益增长,因此有越来越多的富含花色苷的食物和作物被人们关注,越来越多的技术手段也用于增强植物的花色苷及黄酮类物质的含量,比如创造紫色土豆、紫色玉米、紫米水稻等^[19-21]。大豆是食用蛋白和油类的来源,但是大豆中花色苷含量较少,即使黑豆中花色苷含量最多也仅有 $1 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,

对于其他种皮颜色如褐色、红色、紫色等大豆的花色苷种类和含量的研究也较少。为了充分了解大豆种皮颜色、总酚、总黄酮及花色苷含量、抗氧化性以及类黄酮相关基因表达的相互关系,本研究对 RIL 群体不同种皮颜色大豆的花色苷含量、总酚和总黄酮质量分数、FRAP 抗氧化能力、DPPH·清除能力和 ABTS⁺·清除能力和类黄酮途径主要基因表达进行了分析,这对提高酚类花色苷含量、增强抗氧化性具有重要意义,有利于进行高抗氧化性的大豆种质的培育和筛选鉴定,有利于提高大豆的经济价值和营养价值。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为从 RIL 群体(♀中豆 41 × ♂柘城小红豆) F₅ 世代中挑选的黑、紫、褐、黄种皮颜色各 3 个株系及其亲本中豆 41 和柘城小红豆。2019 年 5—10 月在湖北省荆州市长江大学农业科技园单行种植、混收,混收后在恒温干燥箱内 28 ℃干燥处理。挑取颗粒饱满、色泽均匀的大豆种子,用研磨机(Bear,FSJ-A03E1)研磨种皮,用 250 μm(60 目)滤筛过滤,−20 ℃保存备用。

试剂奎诺二甲基丙烯酸酯(Trolox)、没食子酸(Gallicacid)、芦丁(Rutin)、Folin 酚试剂均购自美国 Sigma 公司;色谱纯甲醇、甲酸均购自上海麦克林生化科技有限公司;其他试剂为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 花色苷提取及液相色谱分析 称量 0.1 g 大豆种皮样品于 10 mL 具塞离心管中,加入 4 mL $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 甲醇盐酸溶液(甲醇:浓盐酸体积比 100:16),振荡混匀 1 min,超声提取 30 min,90 ℃水浴 50 min,室温下冷却 10 min,然后用 $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 甲醇盐酸提取液再次定容,4 ℃低温下 $1500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min。所得上清液用 0.22 μm 水相滤膜(索莱宝,北京)滤去颗粒杂质,作为待测液,−20 ℃保存,备用,每个样品 3 个生物学重复。

采用 Agilent2000 高效液相色谱对花色苷提取液进行定性分析。色谱参考条件:(1)色谱柱为 C18 柱,250 nm × 4.6 nm × 5 μm;(2)流动相 A 为 10% 甲酸溶液,流动相 B 为乙腈;(3)检测波长为 530 nm;(4)柱温 35 ℃;(5)进样量 20 μL;(6)梯度洗脱程序(表 1)。测定完成后与文献报道的花青素种类标样进行比对,确定花色苷种类^[22-24]。

采用分光光度计测定提取液中花色苷含量,先利用全波谱扫描找到最大吸收波长 530 nm。以 1% HCl 的甲醇和去离子水等体积混合液(1% HCl 的甲醇:去离子水 = 1:1)为空白,测定 530 和 657 nm 处吸光值。 $Q_{\text{花色苷}} = (A_{530} - 0.25 \times A_{657}) \times M^{-1}$,式中, M 为样品质量(0.1 g DW),最终单位为 $(A_{530} - 0.25 \times A_{657})/\text{g DW}$ 。

表 1 梯度洗脱程序
Table 1 Gradient elution program

时间 Time/min	流速 Speed/ (mL·min ⁻¹)	流动相 A Mobile phase A/%	流动相 B Mobile phase B/%
0	0.8	96.0	4.0
8	0.8	85.0	15.0
23	0.8	85.0	15.0
24	0.8	20.0	80.0
27	0.8	20.0	80.0
28	0.8	96.0	4.0
35	0.8	96.0	4.0

1.2.2 总酚和总黄酮提取 参照 Min 等^[25-26]的方法,准确称取 100 mg 样品冻干粉于 10 mL 离心管中,加入 8 mL 正己烷,上下颠倒混匀后静置 10 min,4 ℃,4 000 r·min⁻¹离心 10 min,弃上清,重复 3 次(此步骤目的为除脂)。沉淀加入 8 mL 含 1% HCl 的甲醇提取液,每 10 min 上下颠倒 1 次,30 min 后 4 ℃,4 000 r·min⁻¹离心 10 min,收集上清液,重复 3 次,合并上清液,定容至 15 mL,−20 ℃保存备用,每个样品 3 个生物学重复。

1.2.3 总酚和总黄酮质量分数的测定 采用 Folin 酚法^[27]测定总酚含量,于提取液中 0.2 mL 加入 0.3 mL 蒸馏水、0.5 mL 50% 酚试剂和 2.5 mL 20% Na₂CO₃,于 25 ℃水浴 40 min,在 725 nm 处测定吸光值,以没食子酸作为标准品绘制标准曲线,得回归方程 $y = 0.1297x - 0.0086$ ($R^2 = 0.9952$),式中, y 为吸光度, x 为没食子酸质量浓度($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$),总酚质量分数以每 1 g 样品干质量中所含没食子酸量($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)表示;采用亚硝酸钠-硝酸铝-氢氧化钠法^[28]测定总黄酮质量分数,提取液取 0.5 mL 测定,以芦丁为标准品绘制标准曲线,得到回归方程

$y = 0.0123x - 0.0158$ ($R^2 = 0.9926$),式中, y 为吸光度, x 为没食子酸质量浓度($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)以每 1 g 样品中所含芦丁量($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)表示。

1.2.4 抗氧化性指标测定 参考 Benzie 等^[29]的方法测定 FRAP 抗氧化能力,提取液稀释 5 倍后取 0.1 mL 测定,加入 3 mL FRAP 反应液,25 ℃水浴 5 min 后,593 nm 处测定吸光度,以奎诺二甲基丙烯酸酯(Trolox)作为标准品绘制标准曲线,得到回归方程 $y = 0.0091x - 0.0936$ ($R^2 = 0.9949$),其中 y 为吸光度, x 为 Trolox 质量浓度(单位为 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)。结果以干基每 1 g 样品中的质量分数($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)表示。

参考 Chen 等^[30]的方法测定 DPPH·清除能力,提取液稀释 5 倍后取 0.1 mL 测定,加入 3 mL DPPH 溶液,室温静置 30 min 后,测定 517 nm 处吸光值,以 Trolox 当量为标准品绘制标准曲线,得到回归方程 $y = -0.003x - 0.0549$ ($R^2 = 0.9976$),其中 y 为吸光度, x 为 Trolox 质量浓度(单位为 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)。结果以干基每 1 g 样品中的质量分数($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)表示。

参考 Re 等^[31]的方法测定 ABTS⁺·清除能力,提取液稀释 5 倍后取 0.1 mL 测定,加入 3.9 mL ABTS 反应液,混匀后室温放置 6 min,测定 734 nm 处吸光值,以 Trolox 当量为标准品绘制标准曲线,得到回归方程 $y = -0.003x - 0.0549$ ($R^2 = 0.9976$),式中, y 为吸光度, x 为 Trolox 质量浓度($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)。结果以干基每 1 g 样品中的质量分数($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)表示。

1.2.5 基因表达分析 RIL 群体 F₃世代不同种皮颜色各 3 个株系,在豆荚鼓粒后,根据对鲜种子的称量确定籽粒发育时期,最终以豆荚鼓粒最大之前的籽粒大小在 200~300 mg 时作为无色素积累时期的取样标准,以豆荚鼓粒最大且豆荚变色后的籽粒大小在 400~500 mg 时作为有色素积累时期的取样标准。着色前后种皮由元萃生物公司进行 RNA-seq 转录组分析,参考基因组 Glycine_max_v2.1,在 RNA-seq 分析中,通过比对到参考基因组区域的序列(clean reads)的数量来计算基因的表达水平。根据 Hisat2 软件计算每个基因/转录本在样本中的 FPKM 值,以该值作为基因/转录本在样本中的表达量。分析种皮色相关基因(表 2)的表达情况,3 个重复。

表 2 大豆种皮色位点基因及功能

Table 2 Gene and function of soybean seed coat color locus

经典位点 Classic loci	基因 ID Gene ID	基因功能 Gene function	参考文献 Reference
I	<i>Glyma. 08G109200</i>	编码查尔酮合成酶 CHS	[32]
	<i>Glyma. 08G109300</i>	编码查尔酮合成酶 CHS	
	<i>Glyma. 08G109400</i>	编码查尔酮合成酶 CHS	
	<i>Glyma. 08G109500</i>	编码查尔酮合成酶 CHS	
	<i>Glyma. 08G110300</i>	编码查尔酮合成酶 CHS	
	<i>Glyma. 08G110400</i>	编码查尔酮合成酶 CHS	
	<i>Glyma. 08G110500</i>	编码查尔酮合成酶 CHS	
	<i>Glyma. 08G110700</i>	编码查尔酮合成酶 CHS	
	<i>Glyma. 08G110900</i>	编码查尔酮合成酶 CHS	
T	<i>Glyma. 06G202300</i>	编码黄烷酮-3'-羟化酶 F3'H	[33]
R	<i>Glyma. 09G235100</i>	编码 MYB 转录因子	[34]
W1	<i>Glyma. 13G072100</i>	编码黄烷酮-5'3'羟化酶 F3'5'H	[35]
K1	<i>Glyma. 11G190900</i>	编码 AGO5 蛋白	[36]
G	<i>Glyma. 01G198500</i>	编码 CAAX 氨基酸末端蛋白酶	[37]

1.3 数据分析

利用 Excel 2013 和 R 软件进行数据统计和分析,数据以平均值 ± 标准差 (Means ± SD) 表示,采用单因素方差分析,不同种皮颜色材料间比较采用 Duncan's 法,显著水平为 0.05,利用 Excel 2013 进行绘图。

2 结果与分析

2.1 不同颜色种皮花色苷成分分析

如表 2 所示,在柘城小红豆 (ZCXHD) 的种皮中主要存在 3 种花色苷类型:一类是矢车菊素花色苷,主要为矢车菊素-3-半乳糖苷 (Cy-3-gal) 和矢车菊素-3-葡萄糖苷 (Cy-3-glu);第二类为天竺葵花色苷,主要是天竺葵素-3-葡萄糖苷 (Pg-3-glu);第三类为芍药色素花色苷,主要是芍药素-3-葡萄糖苷 (Pn-3-glu)。在中豆 41 (ZD41) 的种皮中仅在 Pg-3-glu 处

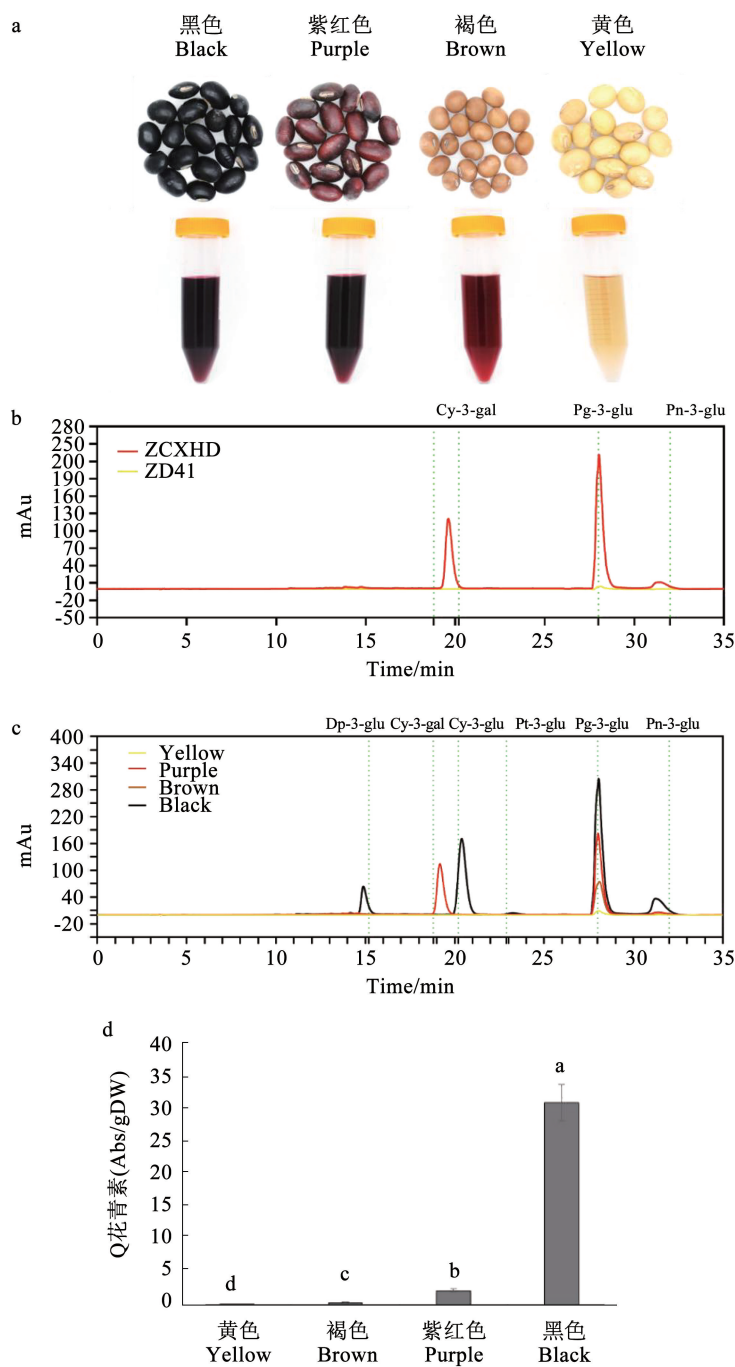
检测到微弱峰值 (图 1b)。

在 F₅ (RIL) 世代黄色、褐色、紫红色、黑色 4 种颜色种皮中,黑色种皮中的花青素种类最为复杂,主要含有天竺葵色素、矢车菊素、飞燕草色素、矮牵牛色素、芍药花色苷,具体花色苷类型为天竺葵素葡萄糖苷 (Pg-3-glu)、矢车菊素葡萄糖苷 (Cy-3-glu)、飞燕草色素葡萄糖苷 (Dp-3-glu)、以及微量的矮牵牛色素葡萄糖苷 (Pt-3-glu) 和芍药花色苷葡萄糖苷 (Pn-3-glu)。紫红色大豆种皮中特异含有 Cy-3-gal;褐色大豆种皮与黄色大豆种皮中都仅含有 Pg-3-glu,并且黄色大豆种皮中的天竺葵色素花色苷含量极少 (图 1c)。4 种颜色种皮中花色苷含量分别为 0.000 35 ± 0.000 19、0.003 36 ± 0.000 73、0.021 66 ± 0.002 81、0.310 08 ± 0.027 65 mg·g⁻¹,含量差异极显著 (P < 0.001) (图 1d)。

表 3 不同颜色种皮中的花色苷类型

Table 3 Anthocyanin types in different color seed coat

	矢车菊素-3- 半乳糖苷 Cy-3-gal	矢车菊素-3- 葡萄糖苷 Cy-3-glu	天竺葵素-3- 葡萄糖苷 Pg-3-glu	芍药素-3- 葡萄糖苷 Pn-3-glu	飞燕草素-3- 葡萄糖苷 Dp-3-glu	矮牵牛素-3- 葡萄糖苷 Pt-3-glu
中豆 41 Zhongdou 41			√			
柘城小红豆 Tuochengxiaohongdou	√	√	√	√		
黄色 Yellow			√			
褐色 Brown			√			
紫红 Purple	√	√	√			
黑色 Black		√	√	√	√	√



注：a. 不同颜色种皮中提取花青素；b. 亲本之间的花色苷差异 ZD41 表示中豆 41，ZCXHD 表示柘城小红豆；c. 黄色、褐色、紫色、黑色种皮颜色大豆中花色苷的差异；d. 在黄色、褐色、紫色、黑色种皮颜色大豆中花色苷含量。不同字母表示显著差异 ($P < 0.05$)。

Note: a. Extraction of anthocyanins from different seed coat color; b. Anthocyanin differences between parents, ZD41 means Zhongdou 41, ZCXHD means Zhechengxiaohongdou; c. Anthocyanin differences in yellow, brown, purple, black seed coat colors; d. Anthocyanin content in yellow, brown, purple, black seed coat colors. Different letters mean significantly differences ($P < 0.05$).

图 1 不同颜色种皮中花青素的提取与测定

Fig.1 Extraction and determination of anthocyanin in different color seed coat

2.2 不同颜色种皮总酚和总黄酮含量

由表 3 可知,大豆不同种皮颜色中总黄酮含量存在显著差异($P < 0.05$),表现为黑色种皮 > 紫红种皮 > 褐色种皮 > 黄色种皮,黑色种皮含量最高,为 $10.313 \pm 0.008 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,黄色种皮最低含量为

$2.996 \pm 0.001 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$;总酚含量在不同颜色大豆种皮中含量差异显著($P < 0.05$),表现为黑色种皮 > 紫红种皮 > 褐色种皮 > 黄色种皮,黑色种皮中含量最高,为 $29.973 \pm 0.050 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,黄色种皮中含量最低,为 $2.463 \pm 0.021 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

表 4 RIL 群体不同颜色种皮中的总酚和总黄酮

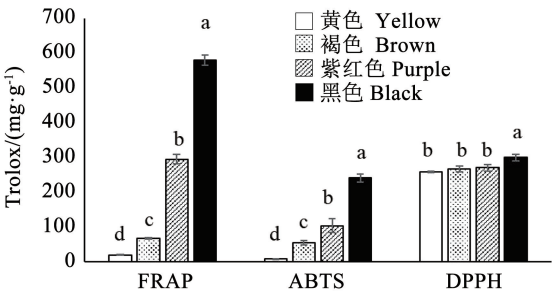
Table 4 Total phenols and total flavonoids in different colors of seed coat in RIL population

种皮颜色 Seed coat color	总酚 Total phenolic/($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	总黄酮 Total flavonoid/($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)
黄色 Yellow	$2.463 \pm 0.021 \text{ d}$	$2.996 \pm 0.001 \text{ d}$
褐色 Brown	$6.756 \pm 0.059 \text{ c}$	$3.717 \pm 0.002 \text{ c}$
紫红 Purple	$13.583 \pm 0.167 \text{ b}$	$5.984 \pm 0.003 \text{ b}$
黑色 Black	$29.973 \pm 0.050 \text{ a}$	$10.313 \pm 0.008 \text{ a}$

注:不同字母表示差异显著($P < 0.05$)。
Note: Different letters mean significantly differences($P < 0.05$).

2.3 不同颜色种皮抗氧化能力

如图 2 所示:不同种皮颜色 FRAP 抗氧化能力的变幅为 $19.88 \sim 581.09 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,不同颜色的 FRAP 抗氧化能力差异较大,排序为黑色种皮 > 紫红种皮 > 褐色种皮 > 黄色种皮。不同颜色种皮 ABTS \cdot 清除能力与 FRAP 抗氧化能力存在相似规律,黑色种皮最高,为 $241.72 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,紫红次之,为 $103.75 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,褐色为 $54.53 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,黄色最低,为 $7.73 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。在 DPPH \cdot 清除能力方面,黑色的抗氧化能力显著高于其他颜色($P < 0.05$),为 $200.46 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,紫红、褐色、黄色种皮无显著差异,变幅为 $173.12 \sim 180.46 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

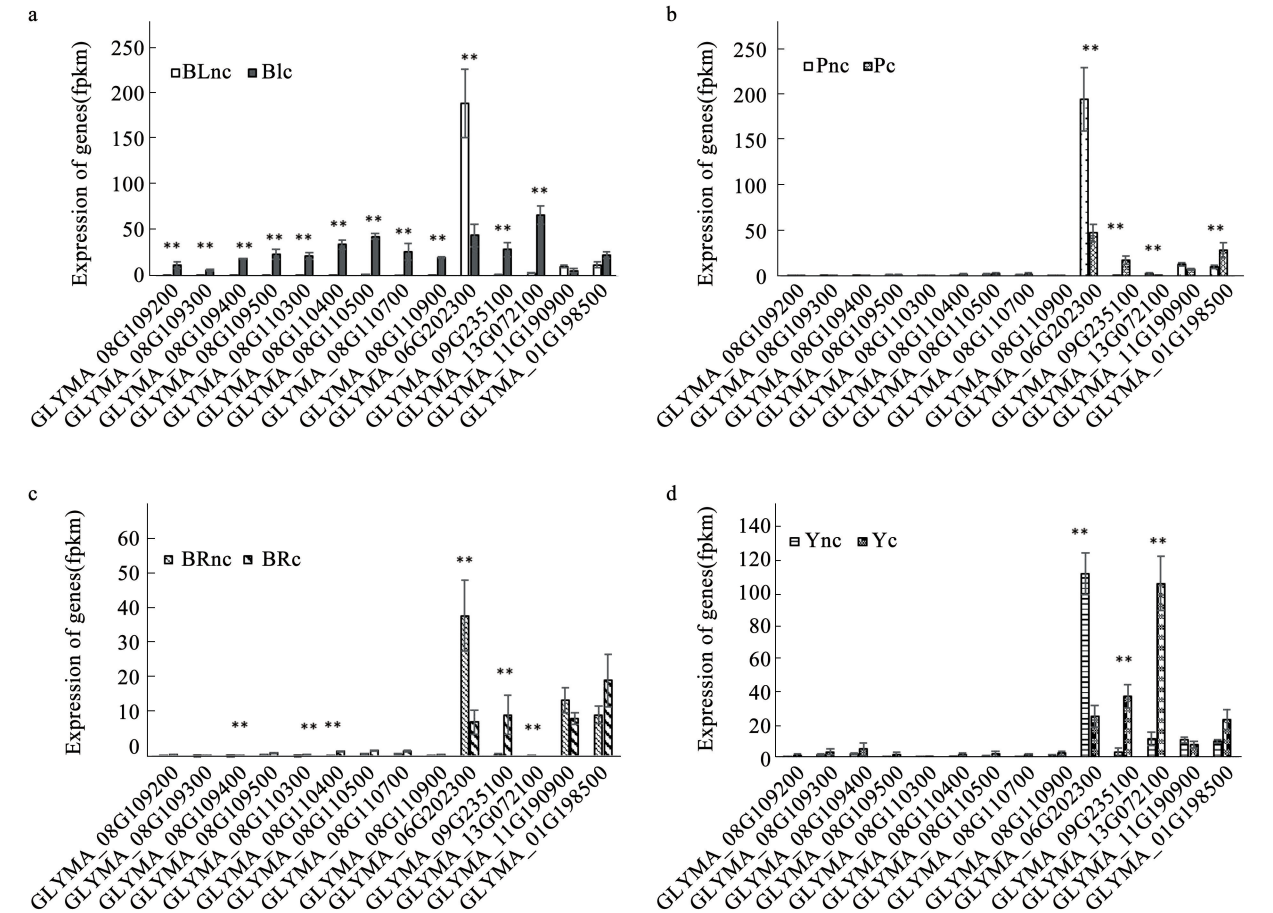


注:不同的字母表示着显著差异($P < 0.05$)。
Note: Different letters mean significantly differences($P < 0.05$).

图 2 大豆不同颜色种皮的抗氧化能力
Fig.2 Antioxidant abilities of different color seed coat of soybean

2.4 不同颜色种皮相关基因表达分析

大豆种皮颜色相关基因在不同颜色着色前后的表达差异如图 3 所示:在黑色种皮着色前后编码 *I* 位点的 *CHS* 基因、编码 *W1* 位点的 *F3'5'H* 基因、编码 *R* 位点的 *MYB* 转录因子表达显著升高($P < 0.05$),编码 *T* 位点的 *F3'H* 基因的表达显著下降($P < 0.05$),*K1* 和 *G* 位点基因表达无明显变化,说明黑色着色主要与 *CHS* 基因表达量有关(图 3a);紫红色大豆种皮着色前后 *CHS* 基因无明显变化,*MYB* 转录因子表达显著升高($P < 0.05$),而 *F3'H* 基因和 *F3'5'H* 基因的表达显著下降($P < 0.05$),*K1* 位点基因 *Glyma. 11G190900* 表达无明显变化,*G* 位点候选基因表达有差异,但是仅升高了 2.8 倍,说明紫色调控主要与 *R* 位点 *MYB* 转录因子调控有关(图 3b);褐色种皮大豆着色前后部分 *CHS* 基因(*Glyma. 08G109400*、*Glyma. 08G110300*、*Glyma. 08G110400*)表达显著升高($P < 0.05$),但是没有黑色的表达量高,*MYB* 转录因子表达显著升高($P < 0.05$),*F3'5'H* 基因和 *F3'H* 基因的表达显著下降($P < 0.05$),*K1* 和 *G* 位点基因表达无明显变化,说明褐色的调控受多个位点影响(图 3c);黄色种皮大豆着色前后 *CHS* 基因无明显差异,*F3'5'H* 基因和 *MYB* 转录因子表达显著升高($P < 0.05$),*F3'H* 基因的表达显著下降($P < 0.05$),*K1* 和 *G* 位点基因表达无明显变化(图 3d)。



注:a. 黑色大豆种皮色素着色前后相关基因的表达模式;b. 紫色大豆种皮色素着色前后相关基因的表达模式;c. 褐色大豆种皮色素着色前后相关基因表达模式;d. 黄色大豆种皮色素着色前后相关基因的表达模式。* * 表示存在显著差异 ($P < 0.05$)。

Note: a. Expression patterns of related genes before and after pigmentation in black soybean seed coat; b. Expression patterns of related genes before and after pigmentation in purple soybean seed coat; c. Expression patterns of related genes before and after pigmentation in brown soybean seed coat; d. Expression patterns of related genes before and after pigmentation in yellow soybean seed coat. * * mean there were significantly differences ($P < 0.05$).

图 3 大豆种皮颜色相关基因的表达

Fig. 3 Expression of genes related to seed coat color in soybean

2.5 黄酮类物质含量与抗氧化能力及基因表达关系分析

如表 5 所示:总酚、总黄酮和总花青素质量分数与 FRAP 抗氧化能力、DPPH · 清除能力以及 ABTS⁺ · 清除能力的相关性较大,相关系数在 0.91 以上。结果表明花青素作为一类黄酮类酚类化合物,在植物抗氧化能力上具有一定的作用。

CHS 基因的表达量和总酚、总黄酮和总花青素质量分数以及 FRAP 抗氧化能力、DPPH · 清除能力

以及 ABTS⁺ · 清除能力的相关性较大,其中 *Glyma. 08G109200*、*Glyma. 08G109500*、*Glyma. 08G110300*、*Glyma. 08G110400*、*Glyma. 08G110500*、*Glyma. 08G110700* 的表达量与 DPPH · 清除能力、ABTS⁺ · 清除能力、总花青素、总黄酮质量分数相关系数均大于 0.91,说明 *CHS* 基因调控引起色素沉积从而使大豆种皮表现为黑色,而黑色种皮大豆中的花青素含量、总酚含量和总黄酮含量以及抗氧化及清除能力都高于其他颜色大豆。

表 5 总酚类、总黄酮类和总花青素与抗氧化能力和基因表达的相关系数

Table 5 Correlation coefficients of total phenols, total flavonoids and total anthocyanins with the antioxidant capacities and expression of genes

	FRAP	ABTS ⁺ ·	DPPH·	总花青素	总酚	总黄酮	<i>Glyma.08G</i>	<i>Glyma.08G</i>	<i>Glyma.08G</i>	<i>Glyma.08G</i>	<i>Glyma.08G</i>	<i>Glyma.08G</i>	<i>Glyma.08G</i>	<i>Glyma.06G</i>	<i>Glyma.09G</i>	<i>Glyma.13G</i>	<i>Glyma.11G</i>	<i>Glyma.01G</i>
	109200	109300	109400	109500	110300	110400	110500	110700	110900	202300	235100	072100	190900	198500				
FRAP	1.00																	
ABTS ⁺ ·	0.98	1.00																
DPPH·	0.95	0.99	1.00															
总花青素	0.91	0.94	0.98	1.00														
总酚	0.98	0.97	0.92	0.83	1.00													
总黄酮	0.99	0.99	0.98	0.94	0.97	1.00												
<i>Glyma.08G</i> 109200	0.88	0.91	0.96	1.00	0.79	0.92	1.00											
<i>Glyma.08G</i> 109300	0.64	0.65	0.73	0.86	0.48	0.69	0.89	1.00										
<i>Glyma.08G</i> 109400	0.79	0.82	0.88	0.96	0.67	0.83	0.98	0.97	1.00									
<i>Glyma.08G</i> 109500	0.88	0.91	0.96	1.00	0.79	0.92	1.00	0.89	0.98	1.00								
<i>Glyma.08G</i> 110300	0.89	0.93	0.97	1.00	0.81	0.93	1.00	0.87	0.97	1.00	1.00							
<i>Glyma.08G</i> 110400	0.88	0.92	0.96	1.00	0.80	0.92	1.00	0.88	0.97	1.00	1.00	1.00						
<i>Glyma.08G</i> 110500	0.89	0.92	0.97	1.00	0.81	0.93	1.00	0.88	0.97	1.00	1.00	1.00	1.00					
<i>Glyma.08G</i> 110700	0.89	0.93	0.97	1.00	0.81	0.93	1.00	0.87	0.97	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00				
<i>Glyma.08G</i> 110900	0.85	0.88	0.94	0.99	0.75	0.89	1.00	0.92	0.99	1.00	0.99	0.99	1.00	1.00	1.00			
<i>Glyma.06G</i> 202300	0.79	0.67	0.57	0.55	0.76	0.73	0.51	0.40	0.47	0.51	0.36	0.34	0.51	0.52	0.49	1.00		
<i>Glyma.09G</i> 235100	0.10	0.05	0.11	0.31	-0.08	0.13	0.37	0.74	0.55	0.36	0.34	0.31	0.34	0.43	0.25	0.25	1.00	
<i>Glyma.13G</i> 072100	0.00	-0.02	0.07	0.28	-0.19	0.04	0.35	0.73	0.54	0.34	0.31	0.33	0.32	0.31	0.41	0.06	0.98	1.00
<i>Glyma.11G</i> 190900	-0.67	-0.55	-0.49	-0.56	-0.57	-0.63	-0.56	-0.63	-0.60	-0.55	-0.54	-0.55	-0.55	-0.55	-0.57	-0.91	-0.63	-0.47
<i>Glyma.01G</i> 198500	0.37	0.23	0.07	-0.03	0.44	0.27	-0.09	-0.24	-0.17	-0.09	-0.08	-0.09	-0.08	-0.07	-0.12	0.79	-0.18	-0.38

3 讨论

3.1 大豆中花色苷的积累

本研究通过对亲本 ZD41、ZCXHD 和 RIL(F₅) 群体中的黄色、褐色、紫红色和黑色 4 种种皮颜色株系的花色苷测定分析,发现花色苷含量在不同种皮颜色中差异显著,其中黑色最多黄色最少,与前人研究相符^[38]。不同颜色种皮的花色苷种类存在明显差异,黑色种皮含有更多的花色苷类型,这与前人研究结果相符^[39]。但在具体种类上与前人研究有所区别,本研究材料中的黑色种皮含量最多的花色苷类型为 Pg-3-glu,并不是 Cy-3-glu^[39],此外,黑色种皮中还含有 Dp-3-glu、Pt-3-glu、Pn-3-glu,因此黑色种皮的形成是多种花色苷共同作用的结果。紫红色种皮主要含有 Pg-3-glu 花色苷,同时 Cy-3-gal 为紫色种皮特异含有,说明紫红色主要与矢车菊素花色苷 Cy-3-gal 有关。褐色大豆种皮与黄色大豆种皮中都仅含有 Pg-3-glu,并且黄色大豆种皮中的天竺葵素花色苷含量极少。鉴定结果发现 4 种颜色的种皮中都含有天竺葵素花色苷,但在含量上存在明显差异,黑色 > 紫红色 > 褐色 > 黄色,因此推测天竺葵素花色苷可能是影响种皮颜色的重要物质。

在花色苷合成代谢通路中,不同花青素类型是由 CHS、F3H、F3'H、F3'5'H 羟基化柚皮素然后经过 DFR、ANS 一系列的酶促反应,最后由 UF3GT 糖基转移酶将不稳定的花青素糖基化形成^[40-41]。本研究发现,I 位点的 CHS 基因,以及位于 8 号染色体串联的 9 个 CHS 基因全部在黑色种皮的有色素积累时期表达量上调;编码 F3'H 的 T 位点基因 *Glyma.06G202300*,它在各颜色有色素积累时期的表达被下调;*R* 位点候选基因 *Glyma.09G235100* 在褐色和紫色种皮有色素积累时期表达量上调;*W1* 位点编码基因 *F3'5'H* 在紫色和褐色种皮色素积累时期表达下调。另外,本研究发现 *F3'5'H* 基因与 *MYB* 基因的表达极显著正相关,说明 *F3'5'H* 基因的表达可能受到 *MYB* 转录因子的调控;*F3'H* 基因与 *K1* 基因表达极显著负相关,说明 *K1* 基因影响种脐或者鞍挂部分色素沉积时主要影响 *F3'H* 基因表达进而影响色素沉积。综上,这些基因可能控制种皮颜色的形成,与前人研究相符^[39-41]。

3.2 大豆中的总酚和总黄酮质量分数与抗氧化能力

多酚黄酮类物质是大豆中一类具有生物活性

的次级带型产物,因具有抗癌和抗氧化等多种功能被广泛应用到医学药物^[11,26]。本研究发现,在不同种皮颜色大豆中总黄酮和总酚的含量均表现为黑色 > 紫红色 > 褐色 > 黄色,黄酮含量变幅为 10.313 ~ 2.996 mg·g⁻¹,总酚含量变幅为 29.973 ~ 2.463 mg·g⁻¹,黑色大豆的总酚和总黄酮含量在徐金瑞等^[17]的黑色大豆含量变幅内,其他颜色的总黄酮量也基本相符^[38]。大豆的抗氧化能力与总酚、总黄酮和花色苷的含量之间存在显著的正相关性,相关系数达到极显著水平,表明大豆的抗氧化作用与其种皮中的总酚、总黄酮和花色苷类物质相关。分析基因表达与大豆抗氧化作用,发现 *CHS* 基因与抗氧化性极显著正相关,且 *CHS* 基因之间的表达也极显著正相关,这与 *CHS* 基因为串联富集区域,且表达相互影响一致,也与 *CHS* 基因是黑色种皮大豆色素沉积的主要调控基因一致,说明正是 *CHS* 基因表达升高导致黑色种皮大豆中的花色苷和总酚总黄酮物质的积累进而导致其抗氧化作用最高,这也与前人的研究相符^[32,36]。除 *CHS* 基因以外其他基因与抗氧化性相关系数较低,只有 *F3'H* 基因相关系数在 0.57 ~ 0.79,仅次于 *CHS* 基因。

4 结论

不同颜色大豆种皮中总酚、总黄酮、花色苷的含量存在明显差异,黑色种皮大豆含量最多,且花色苷种类最丰富,以天竺葵素葡萄糖苷(Pg-3-glu)和矢车菊素葡萄糖苷(Cy-3-glu)为主,紫红色大豆种皮中特异含有矢车菊素-3-半乳糖苷(Cy-3-gal),褐色大豆种皮与黄色大豆种皮中都仅含有 Pg-3-glu,并且黄色大豆种皮中的天竺葵素花色苷含量极少,因此天竺葵素花色苷可能是影响种皮着色的重要物质,且矢车菊素两种花色苷的含量也影响着色的深浅。不同种皮色的总酚、总黄酮、总花青素含量、FRAP 和 ABTS⁺·清除能力关系为黑色 > 紫红 > 褐色 > 黄色,仅 DPPH·清除能力在其他种皮颜色中差异不显著。黑色大豆中总酚、总黄酮和花色苷质量分数显著高于其他颜色,同时抗氧化能力最强,且酚类物质含量与抗氧化性显著正相关,*CHS* 基因的表达量也与酚类物质含量和抗氧化性能力显著正相关,因此提高 *CHS* 基因的表达有利于多酚类物质的积累和提高抗氧化活性,可以将其作为检测或培养高抗氧化活性和多花色苷类大豆的辅助指标。

参考文献

[1] LIU S L, ZHANG M, FENG F, et al. Toward a “Green Revolution” for soybean[J]. *Molecular Plant*, 2020, 13(5): 688-697.

[2] 陈波, 邓源喜, 高树叶, 等. 大豆的营养保健功能及其开发应用进展[J]. *广州化工*, 2016, 44(2): 14-16. (CHEN B, DENG Y X, GAO S Y, et al. Advancement of health function of soybean and its utilization[J]. *Guangzhou Chemical Industry*, 2016, 44(2): 14-16.)

[3] LEE J, HWANG Y S, KIM S T, et al. Seed coat color and seed weight contribute differential responses of targeted metabolites in soybean seeds [J]. *Food Chemistry*, 2017, 214: 248-258.

[4] ROSS J A, KASUM C M. Dietary flavonoids: Bioavailability, metabolic effects and safety [J]. *Annual Review of Nutrition*, 2002, 22(1): 19-34.

[5] SCALBERT A, JOHNSON T, SALMARSH M. Polyphenols: Antioxidants and beyond [J]. *American Journal of Clinical Nutrition*, 2005, 81: 215S-217S.

[6] BUTELLI E, TITTA L, GIORGIO M, et al. Enrichment of tomato fruit with health-promoting anthocyanins by expression of select transcription factors[J]. *Nature Biotechnology*, 2008, 26(11): 1301-1308.

[7] WALLACE T C, GIUSTI M M. Anthocyanins[J]. *Advances in Nutrition*, 2015, 6(5): 620-622.

[8] SANTOS-BUELGA C, MATEUS N, DE FREITAS V. Anthocyanins. Plant pigments and beyond [J]. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2014, 62(29): 6879-6884.

[9] BALLARE C L. Stress under the sun: Spotlight on ultraviolet-B responses[J]. *Plant Physiology*, 2003, 132(4): 1725-1727.

[10] 王跃强, 孙国娟, 崔洁, 等. 不同大豆品种的抗氧化性研究[J]. *现代农业科技*, 2011, 20: 358-359. (WANG Y Q, SUN G J, CUI J, et al. Study on antioxidant capacity of different soybean varieties [J]. *Modern Agricultural Science and Technology*, 2011, 20: 358-359.)

[11] 徐飞, 葛阳阳, 刘新春, 等. 黑豆营养成分及生物活性的研究进展[J]. *中国食物与营养*, 2019, 25(9): 55-61. (XU F, GE Y Y, LIU X C, et al. Research advancement of nutritional composition and biological activity of black soybean[J]. *Food and Nutrition in China*, 2019, 25(9): 55-61.)

[12] TAKAHATA Y, OHNISHI-KAMEYAMA M, FURUTA S. Highly polymerized procyanidins in brown soybean seed coat with a high radical-scavenging activity [J]. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2001, 49(12): 5843-5847.

[13] KUMAR V, RANI A, DIXIT A K. A comparative assessment of total phenolic content, ferric reducing-anti-oxidative power, free radical-scavenging activity, vitamin C and isoflavones content in soybean with varying seed coat colour [J]. *Food Research International*, 2010, 43: 323-328.

[14] KIM S Y, WI H R, CHOI S, et al. Inhibitory effect of anthocyanin-rich black soybean testa (*Glycine max* L. Merr.) on the inflammation-induced adipogenesis in a DIO mouse model[J]. *Journal of Functional Foods*, 2015, 14: 623-633.

[15] 肖湘, 卢刚, 张捷. 黑色食品色素清除活性氧功能及抗氧化活性[J]. *药物生物技术*, 2000, 7(2): 112-115. (XIAO X, LU G, ZHANG J. Studies on the black pigments for its ability to scavenge active oxygen radical and antioxidant actions [J]. *Pharmaceutical Biotechnology*, 2000, 7(2): 112-115.)

[16] 徐金瑞, 张名位, 刘兴华, 等. 黑大豆种皮花色苷的提取及其抗氧化作用研究[J]. *农业工程学报*, 2005, 21(8): 161-164. (XU J R, ZHANG M W, LIU X H. Extraction and antioxidation of anthocyanin of black soybean seed coat[J]. *Transactions of the Chinese Society of Agriculture Engineering*, 2005, 21(8): 161-164.)

[17] 徐金瑞, 张名位, 刘兴华, 等. 黑大豆种质抗氧化能力及其与总酚和花色苷含量的关系[J]. *中国农业科学*, 2006, 39(8): 1545-1552. (XU J R, ZHANG M W, LIU X H, et al. Correlation between antioxidation, and content of total phenolics and anthocyanin in black soybean accessions [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2006, 39(8): 1545-1552.)

[18] 吴海军. 西南黑豆种质资源的品质分析及其耐荫性评价[D]. 成都: 四川农业大学, 2017. (WU H J. Quality analysis and shading tolerance evaluation of black soybean germplasms in southwest China [D]. Chengdu: Sichuan Agricultural University, 2017.)

[19] SCHIJLEN E G, DE VOS C H, TUNEN A J, et al. Modification of flavonoid biosynthesis in crop plants [J]. *Phytochemistry*, 2004, 65: 2631-2648.

[20] REDDY N P, REDDY B A, GUNASEKAR D, et al. Flavonoids from *Limnophila indica* [J]. *Phytochemistry*, 2007, 68: 636-639.

[21] GONZALI S, MAZZUCATO A, PERATA P. Purple as a tomato: towards high anthocyanin tomatoes [J]. *Trends in Plant Science*, 2009, 14(5): 237-241.

[22] LEE J H, KANG N S, SHIN S O, et al. Characterisation of anthocyanins in the black soybean (*Glycine max* L.) by HPLC-DAD-ESI/MS analysis [J]. *Food Chemistry*, 2009, 112(1): 226-231.

[23] ASTADI I R, ASTUTI M, SANTOSO U, et al. *In vitro* antioxidant activity of anthocyanins of black soybean seed coat in human low density lipoprotein (LDL) [J]. *Food Chemistry*, 2009, 112(3): 659-663.

[24] KOH K, YOUN J E, KIM H S. Identification of anthocyanins in black soybean (*Glycine max* L. Merr.) varieties [J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2014, 51(2): 377-381.

[25] MIN B, GU L, MCCLUNG A M, et al. Free and bound total phenolic concentrations, antioxidant capacities, and profiles of proanthocyanidins and anthocyanins in whole grain rice (*Oryza sativa* L.) of different bran colours [J]. *Food Chemistry*, 2012, 133(3): 715-722.

[26] 侯泽豪, 孙坤坤, 魏淑东, 等. 一份特有红花甜养活性物质的抗氧化特性研究[J]. *西北农业学报*, 2019, 28(8): 1259-1266. (HOU Z H, SUN K K, WEI S D, et al. Antioxidant activities of different plant parts of a special cultivar of red-flower

buckwheat [J]. Acta AgriculturaeBoreali-occidentalis Sinica, 2019, 28(8): 1259-1266.)

[27] SINGLETON V L, ORTHOFER R, LAMUELA-RAVENTÓS R M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-cio-calteu reagent[J]. Methods in Enzymology,1999, 299:152-178.

[28] JIA Z S, TANG M C, WU J M, et al. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals [J]. Food Chemistry, 1999, 64 (4): 555-559.

[29] BENZIE I F, STRAIN J J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “Antioxidant Power”; The FRAP assay [J]. Analytical Biochemistry, 1996, 239(1): 70-76.

[30] CHEN C W, HO C T. Antioxidant properties of polyphenols extracted from green and black teas[J]. Journal of Food Lipid, 1995, 2(1): 35-46.

[31] RE R, PELLEGRINI N, PROTEGENTE N, et al. Antioxidant activity applying an improvement ABTS radical cation decolourization assay [J]. Free Radical Biology and Medicine, 1999, 26(9): 1231-1237.

[32] SENDA M, KURAUCHI T, KASAI A, et al. Suppressive mechanism of seed coat pigmentation in yellow soybean [J]. Breeding science, 2012, 61(5): 523-530.

[33] ZABALA G, VODKIN L. Cloning of the pleiotropic T locus in soybean and two recessive alleles that differentially affect structure and expression of the encoded flavonoid 3’ hydroxylase [J]. Genetics, 2003, 163(1): 295.

[34] ZABALA G, VODKIN L O. Methylation affects transposition and splicing of a large CACTA transposon from a MYB transcription factor regulating anthocyanin synthase genes in soybean seed coats [J]. PloS One, 2014, 9(11): e111959.

[35] ZABALA G, VODKIN L O. A rearrangement resulting in small tandem repeats in the *F3’5’H* gene of white flower genotypes is associated with the soybean *W1* locus[J]. Crop Science, 2007, 47(S2): S113-S124.

[36] CHO Y B, JONES S I, VODKIN L O. Mutations in argonaute5 illuminate epistatic interactions of the *K1* and *I* loci leading to saddle seed color patterns in *Glycine max*[J]. Plant Cell, 2017, 29(4): 708-725.

[37] WANG M, LI W, FANG C, et al. Parallel selection on a dormancy gene during domestication of crops from multiple families [J]. Nature Genetics, 2018, 50(10): 1435-1441.

[38] 张豪,武国瑞,杨万明,等.不同颜色大豆种皮色素含量的分析[J]. 山西农业科学, 2020, 48(4): 492-496. (ZHANG H, WU G R, YANG W M, et al. Analysis of pigment content in different color soybean seed coats [J]. Journal of Shanxi Agricultural Sciences, 2020, 48(4): 492-496.)

[39] ITO C, OKI T, YOSHIDA T, et al. Characterisation of proanthocyanidins from black soybeans: Isolation and characterisation of proanthocyanidin oligomers from black soybean seed coats[J]. Food Chemistry, 2013, 141(3): 2507-2512.

[40] 邱红梅,陈亮,侯云龙,等.大豆种子颜色遗传调控机制研究进展[J]. 作物学报, 2021, 47(12): 2299-2313. (QIU H M, CHEN L, HOU Y L, et al. Research progress on genetic regulatory mechanism of seed color in soybean (*Glycine max*) [J]. Acta AgronomicaSinica, 2021, 47(12): 2299-2313.)

[41] LIM Y J, KWON S J, QU S, et al. Antioxidant contributors in seed, seed coat, and cotyledon of γ -ray-induced soybean mutant lines with different seed coat colors [J]. Antioxidants, 2021, 10: 353.

协 办 单 位

中国作物学会大豆专业委员会
东北农业大学大豆研究所
吉林省农业科学院大豆研究所
南京农业大学大豆研究所
辽宁省农业科学院作物研究所
河北省农林科学院粮油作物研究所