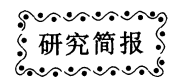


DOI: 10.3724/SP.J.1006.2012.02297



大豆 7S 球蛋白 α' 亚基缺失及 $(\alpha'+\alpha)$ 亚基双缺失品系的回交转育

宋 波^{1,**} 蓝 岚^{1,**} 田福东² 拓 云¹ 白 月¹ 姜自芹¹ 申丽威¹
李文滨¹ 刘珊珊^{1,*}

¹ 东北农业大学农学院大豆生物学教育部重点实验室, 黑龙江哈尔滨 150030; ² 内蒙古通辽市农业科学研究院, 内蒙古通辽 028015

摘 要: 7S 球蛋白 α' 与 α 亚基是大豆种子贮藏蛋白的重要组分, 是影响大豆营养价值与加工品质的重要因子, 同时还是主要的大豆致敏原, 降低它们的含量是大豆品质改良育种的最新研究热点之一。以日本育种材料 7S 球蛋白 $(\alpha'+\alpha)$ -亚基双缺失型日 B 为供体亲本, 黑龙江省主栽大豆品种东农 47 为受体亲本, 采用回交转育方法, 将 α' 与 $(\alpha'+\alpha)$ -亚基缺失特性导入东农 47。结果表明, α' -缺失型(Cc)和 $(\alpha'+\alpha)$ -双缺失型(Cd)品系均能正常生长、结实, 并能稳定遗传; Cc、Cd 产量组分性状的平均值均远高于轮回亲本, 蛋白质含量平均值均高于双亲, 部分 Cd 株系籽粒蛋白质总量高达 46.7%, 脂肪含量平均值介于双亲之间, 略高于日 B; 导入 α' -缺失和 $(\alpha'+\alpha)$ 双缺失性状后, 绝大多数氨基酸组分含量和氨基酸总量提高, 其中精氨酸和天门冬氨酸平均含量变幅最大。Cd 株系籽粒含硫氨基酸含量(蛋氨酸与胱氨酸之和)及氨基酸总量分别比东农 47 高出 0.11 和 5.56 个百分点。说明通过常规育种重组 α' -缺失或 $(\alpha'+\alpha)$ -双缺失性状即可提高大豆含硫氨基酸含量, 并提高其他氨基酸组分含量及氨基酸总量, 在 Cc、Cd 的 BC₂F₃ 后代群体中有望筛选到 α' -缺失或 α' 与 α 同时缺失的高产、高含硫氨基酸、优质大豆新品种。

关键词: 大豆; 致敏蛋白缺失; 高含硫氨基酸品系; 回交选育

Development of Soybean Lines with α' -Subunit or $(\alpha'+\alpha)$ -Subunits Deficiency in 7S Globulin by Backcrossing

SONG Bo^{1,**}, LAN Lan^{1,**}, TIAN Fu-Dong², TUO Yun¹, BAI Yue¹, JIANG Zi-Qin¹, SHEN Li-Wei¹, LI Wen-Bin¹, and LIU Shan-Shan^{1,*}

¹ Soybean Research Institute of Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China; ² Agriculture Science Institute of Tongliao City, Tongliao 028015, China

Abstract: The α' - and α -subunits of 7S globulin, the components of soybean storage protein as well as the main allergens, are important factors affecting the nutritional and processing quality of soybean. It is currently focused to improve the quality of soybean variety by reducing the contents of α' and α -subunits in soybean breeding. In the experiment, we successfully recombined the character of allergenic proteins deficiency into Chinese soybean, using a Japanese variety “Ri B” with $(\alpha'+\alpha)$ -subunits deficiency of 7S globulin (β -conglycinin) as the donor parent, and soybean variety Dongnong 47 with high oil content, widely planted in Heilongjiang Province of China, as the recurrent parent. The results showed that the plants of α' -subunit-deficient lines (Cc) and $(\alpha'+\alpha)$ -subunit-deficient lines (Cd) could normally grow, set seeds, and stably inherited. The average values of the yield traits in the two lines (Cc, Cd) increased compared with those in the recurrent parent Dongnong 47. The average protein contents in the two lines were higher than those in the parents. The protein content reached to 46.7% in the Cd lines. The average oil content in Cc and Cd lines was ranged between that of both parents and a bit more than that of “Ri B”. Fat content in part lines was 20% more than that in Cc and Cd lines, respectively. Total Amino acid contents were increased by introducing α' -subunit and $(\alpha'+\alpha)$ -subunit, amount of arginine (Arg) and asparagine (Asp) in two lines markedly increased. The sulfur-containing amino acid (Met and Cys) contents and the total amino acid content in Cd lines were 0.11% and 0.56% more than those in Dongnong 47, respectively. So the recombined lines have a great potential to enhance food safety and quality, and could be used in soybean breeding for quality.

本研究由国家自然科学基金项目(31071440, 30800625), 黑龙江省普通高等学校青年骨干支持计划项目(1155G12), 东北农业大学博士启动基金(2009RC47)和国家转基因生物新品种培育重大专项(2011ZX08004-004-006-002)资助。

* 通讯作者(Corresponding author): 刘珊珊, E-mail: ar336699@yahoo.com.cn, Tel: 0451-55190521

第一作者联系方式: E-mail: songbo_2010@yahoo.cn, Tel: 13936296646 ** 同等贡献(Contributed equally to this work)

Received(收稿日期): 2012-03-27; Accepted(接受日期): 2012-08-15; Published online(网络出版日期): 2012-10-08.

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1809.S.20121008.1420.024.html>

Keywords: Soybean (*Glycine max* [L.] Merr.); Deficiency of allergenic proteins; High sulfur amino acids lines; Backcrossing

大豆(*Glycine max* [L.] Merr.)种子贮藏蛋白包含 7S 球蛋白(β -conglycinin)与 11S 球蛋白(glycinin) 2 种主要的组分,这两种蛋白共占大豆种子蛋白总量的 70%左右^[1-2],是大豆蛋白营养价值和功能特性的主要决定组分和研究热点。研究表明,7S 球蛋白的减少会导致 11S 球蛋白的补偿性增加^[2-4]。与 11S 球蛋白(glycinin)相比,7S 球蛋白的含硫氨基酸含量及氨基酸总量低,营养品质差^[5-8],其食品功能特性也不及 11S 球蛋白,以 11S 球蛋白为原料形成的凝胶硬度更强^[9-11]。另外,大豆致敏蛋白亚基主要集中在 7S 球蛋白中,3 个主要亚基 α' 、 α 和 β 都是大豆致敏原^[12-15]。鉴于以上原因,降低 7S 球蛋白的含量成为大豆蛋白质组分改良育种的重要目标及最新研究热点。

7S 球蛋白是由 α' -(76 kD)、 α -(72 kD)和 β -(52~54 kD)亚基组成的分子量为 150 kD 的三聚体化合物^[5,16-18]。到目前为止,人们已经得到了一系列经自然变异或人工诱变产生的具有 7S 与 11S 球蛋白不同亚基缺失表现的育种材料^[19-29]。借助这些育种材料,对大豆 7S 球蛋白 3 个主要亚基的研究日趋深入。氨基酸分析及溴化氰裂解分析表明, α' -亚基内含有 3~4 个蛋氨酸残基, α -亚基内含有 2 个蛋氨酸残基而 β -亚基不含有蛋氨酸残基^[30]。Krishnan 等^[4]研究证实,7S 球蛋白 α' 亚基含量的降低与 11S 球蛋白含量的增加相关, α' 亚基含量的减少可以提高大豆蛋白的营养品质。Salleh 等^[11]的研究表明,7S 球蛋白 3 个亚基对豆腐

凝胶硬度的影响各不相同,在 11S 球蛋白含量一致的前提下, α' 亚基缺失型原料豆腐凝胶的硬度比 α 亚基缺失型和正常型原料豆腐的硬度大, α 亚基对凝胶硬度的影响是 3 个亚基中最小的。以上结果表明,7S 球蛋白各亚基对大豆制品营养及加工品质指标的影响各不相同,通过调整大豆 7S 球蛋白的亚基组成可以在有效去除致敏蛋白的同时,提高大豆蛋白的营养品质,改善大豆蛋白的加工品质。

目前,已有通过选育 7S 球蛋白亚基缺失型大豆品种减少或除去致敏蛋白,同时改良大豆营养与加工品质的成功报道^[13,15,25,29,31]。本研究以回交转育方法,经过 2 代回交,将大豆 7S 球蛋白 α' -亚基缺失和($\alpha'+\alpha$)亚基双缺失性状导入东农 47。以期选育 α' -缺失或 α' 与 α 同时缺失的高产、高含硫氨基酸、优质大豆新品种,丰富我国致敏蛋白缺失型大豆的种质基础,为大豆在食品加工及动物饲料方面的广泛、安全应用提供物质保证。

1 材料与方法

1.1 亲本材料

以黑龙江省主栽大豆品种东农 47 为受体亲本,致敏蛋白缺失、7S 球蛋白亚基组成为($\alpha'+\alpha$)-双缺失型日本材料日 B 为供体亲本。2008 年夏季配制杂交组合,双亲主要农艺和品质性状见表 1。

表 1 杂交亲本特征
Table 1 Characteristics of soybean parents in backcrossing

项目 Item	东农 47 (受体亲本) Dongnong 47 (recurrent parent)	日 B (供体亲本) Ri B (donor parent)
亚基表现 Subunits phenotype (α' and α)	++	--
株高 Plant height (cm)	82.50	—
分枝数 Number of branches	3	—
花色 Color of flower	白花 White	紫花 Purple
主茎节数 Number of stem nodes	21	—
熟性 Maturity	中熟 Medium	晚熟 Late
单株荚数 Pod number per plant	86	—
单株粒数 Grain number per plant	189	—
百粒重 100-grain weight (g)	19.47	16.77
单株产量 Seed weight per plant (g)	36.64	—
蛋白质含量 Protein content (%)	40.30	43.40
脂肪含量 Fat content (%)	22.50	18.80

+: 亚基正常型; -: 亚基缺失型; —: 因生育期过长,日 B 在黑龙江省大田栽培无法正常收获,没能得到标准数据。

+ : subunit normal type; - : subunit deficiency type. —: Ri B could not be harvested in Heilongjiang Province, so that the traits data were not available.

1.2 田间回交选育

2008 年在东北农业大学试验站,分期播种两亲本(解决花期不遇问题),采用常规杂交方法,人工去雄、授粉,以东农 47 为母本,日 B 为父本配制杂交组合。将收获的

杂交种子送到海南南繁基地单粒点播,每个 F₂代(包括 F₂, BC₁F₂ 和 BC₂F₂), 仅以 α -亚基缺失为标准筛选单株,2010 年春季,收获 α 缺失(隐性纯合)、 α' 显性杂合型 BC₁F₂ 种子,同年 7 月中旬,用该类型植株 R1080 上的 6 朵花为母

本, 回交得到 BC_2F_1 种子, 南繁加代, 2011 年 3 月收获 BC_2F_2 种子: L13-1、L13-4 和 L13-7, 以上 3 株的 α' 亚基基因仍继续分离, 其自交 BC_2F_2 代种子的亚基表现型如表 2 所示, 分别收获正常型、 α -缺失型、 α' -缺失型、 $(\alpha'+\alpha)$ -双缺失型种子 67、18、15 和 7 粒(图 1)。上文提及的 F_1 、 F_2 、及后文提及的 BC_1F_1 、 BC_1F_2 、 BC_2F_1 、 BC_2F_2 、 BC_2F_3 、

BC_3F_2 均为种子世代。采用同样的冬季南繁加代, 春季 SDS-PAGE 法筛选缺失个体, 夏季回交加快世代进程。2009—2011 年在东北农业大学育种试验站同步进行田间小区试验, 试验地肥力中等, 行长 3 m, 行距 70 cm, 每年 5 月播种, 人工点播, 调查主要农艺性状, 成熟后收获种子进行品质分析。

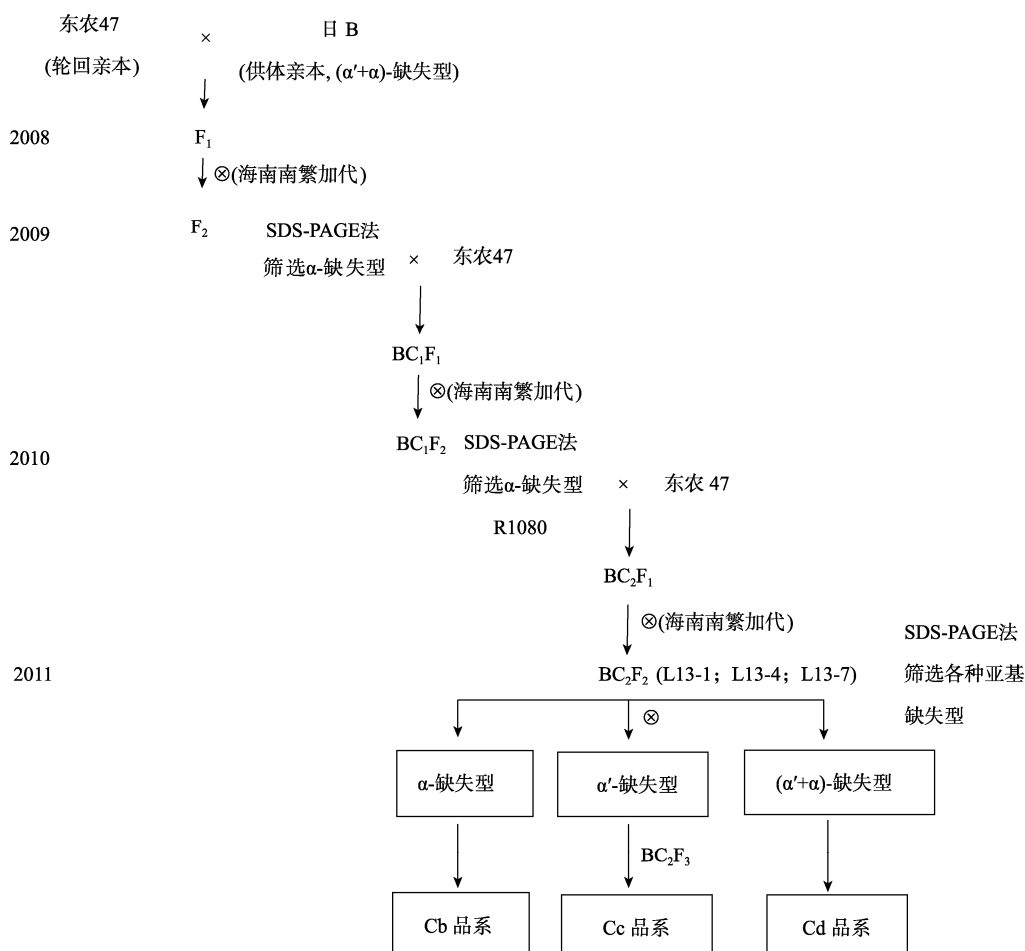


图 1 7S 球蛋白 α' -缺失和 $(\alpha'+\alpha)$ -双缺失型大豆品系的回交选育过程
Fig. 1 Schematic map of introgressing α' -null and $(\alpha'+\alpha)$ -null traits into variety Dongnong 47

1.3 α' 与 α -亚基缺失特性检测(SDS-PAGE 梯度电泳法)

称取 5 mg 大豆粉, 加 0.5 mL 抽提缓冲液 (0.05 mol L^{-1} Tris-HCl, pH 8.0, 0.2% SDS, 5 mol L^{-1} 尿素)充分混匀, 静置过夜(室温), 再加 10 μL 巯基乙醇, 充分混匀, 4℃, 18 000 $\times g$ 离心 15 min, 取 20 μL 上清液进行 SDS-PAGE 电泳及考马斯亮蓝染色^[32]。

1.4 田间调查与考种

田间调查性状有生育期、株高、分枝数和主茎节数。考种性状有单株荚数、单株粒数、百粒重和单株产量。

1.5 品质分析

用 Perten 8620 近红外谷物分析仪测定蛋白质、脂肪含量, 按照国际标准 GB/T 18246-2000 法, 利用日立 L-8800 氨基酸分析仪测定氨基酸含量。

2 结果与分析

2.1 α' -亚基缺失型和 $(\alpha'+\alpha)$ -亚基双缺失型品系的回交选育

回交转育的每个 F_1 代(包括 F_1 , BC_1F_1 和 BC_2F_1)杂交种子经自交后, 其 F_2 代分离群体中正常型与 α' -缺失型、 α -缺失型和 $(\alpha'+\alpha)$ -双缺失型性状的分离比率符合 9 : 3 : 3 : 1 的理论值。以上 BC_2F_2 种子的代表性 SDS-PAGE 图谱如图 2 所示, 种子的亚基表现型包括正常型(图 2, 第 3~5、7~9、11、12 和 14 泳道); α 缺失型(图 2, 第 6 和第 13 泳道); α' 缺失型(图 2, 第 10 泳道)和 $(\alpha'+\alpha)$ -双缺失型(图 2, 第 2 泳道)。表 2 中所示 L13-1 用作留种, L13-4 和 L13-7 中的 α' 缺失和 $(\alpha'+\alpha)$ -双缺失型种子在 2011 年 5 月播种于东北农业大学试验站, 用于培育 α' -缺失和 $(\alpha'+\alpha)$ -双缺失型

BC₂F_{2.3} 群体。BC₂F₃ 代 α' -缺失和($\alpha'+\alpha$)-双缺失型纯合株系种子的代表性 SDS-PAGE 图谱如图 3-A 和 B 所示, 致

敏蛋白 α' 缺失和($\alpha'+\alpha$)双缺失特性均可以稳定遗传, 以上 2 株系分别定名为 Cc 和 Cd (图 1)。

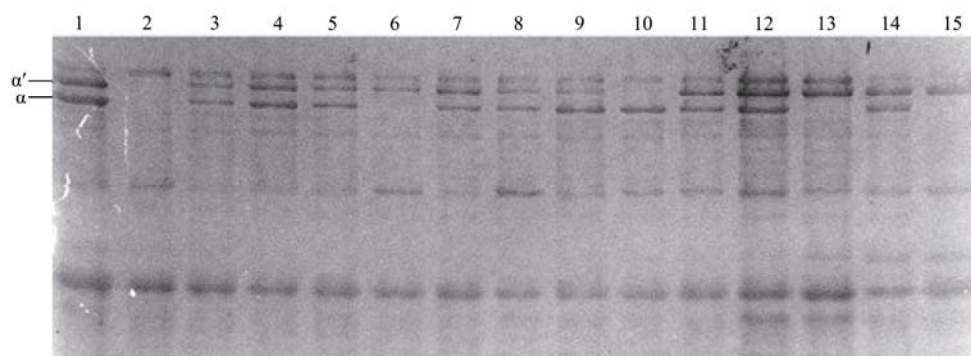


图 2 BC₂F₂ 代(2011 春)种子 7S 球蛋白亚基组成的代表性 SDS-PAGE 图谱
Fig. 2 Banding patterns of proteins from BC₂F₂ seeds (2011 spring) by SDS-PAGE

1: 轮回亲本东农 47; 2: ($\alpha'+\alpha$)-缺失型种子; 3~5、7~9、11、12 和 14: 正常型种子; 6 和 13: α -缺失型种子; 10: α' -缺失型种子; 15: 回交母本 R1080 (α -缺失型, 2010)。
1: recurrent parent Dongnong 47; 2: ($\alpha'+\alpha$)-null type; 3~5, 7~9, 11, 12, and 14: normal type; 6 and 13: α -null type; 10: α' -null type; 15: R1080 (α -null type, female parent in 2010 for backcrossing).

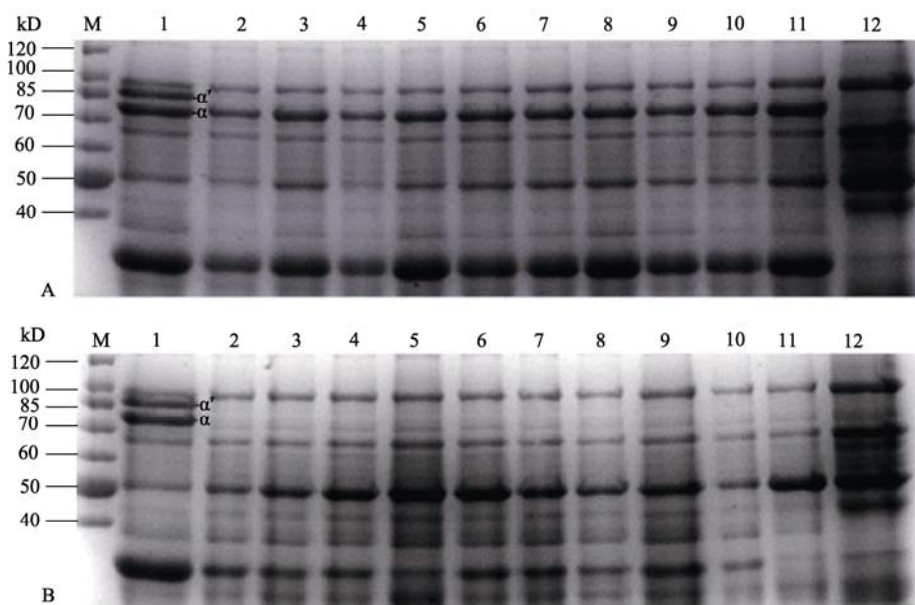


图 3 BC₂F₃ 代种子(2011 秋)7S 球蛋白亚基组成的代表性 SDS-PAGE 图谱
Fig. 3 Banding patterns of proteins from BC₂F₃ seeds (2011 autumn) by SDS-PAGE

A: α' -亚基缺失型株系; M: 蛋白 marker; 1: 轮回亲本东农 47; 2~11: Cc 5-1~10 α' -缺失型种子; 12: 非轮回亲本日 B。
B: ($\alpha'+\alpha$)-亚基双缺失型株系; M: 蛋白 marker; 1: 轮回亲本东农 47; 2~11: Cd 6-1~10: ($\alpha'+\alpha$)-双缺失型种子; 12: 非轮回亲本日 B。
A: α' -subunit null line; M: protein marker; 1: recurrent parent Dongnong 47; 2~11: Cc5-1~10: α' -null type seeds; 12: donor parent Ri B.
B: ($\alpha'+\alpha$)-subunit null line; M: protein marker; 1: recurrent parent Dongnong 47; 2~11: Cd6-1~10: ($\alpha'+\alpha$)-null type seeds; 12: donor parent Ri B.

2.2 α' -亚基缺失型和($\alpha'+\alpha$)-亚基双缺失型品系的主要农艺性状表现

将轮回亲本东农 47 和 Cc、Cd 两品系于 2011 年春季一起在东北农业大学育种试验站种植成株系, 二者均能正常生长、结实(图 4-A); BC₂F_{2.3} 植株的花色均为白色, 与东农 47 相同(图 4-B); BC₂F₃ 代种子籽粒饱满、种皮黄色、有光泽(图 4-C)。

从表 3 和表 4 看出, Cc、Cd 主要农艺性状与双亲(表 1)比较, BC₂F₂ 植株的生育期为 125 d, 与我省中熟品种

(121~130 d)的生育期接近。二者的株高、分支数和主茎节数的平均值均大于轮回亲本。其中 Cd 株高的标准差较大, 其 BC₂F_{2.3} 群体内包含无限型, 亚有限型和有限型植株, 进一步筛选株高适宜(85~95 cm)、抗倒伏、产量高的亚有限型植株是该品系下一步选育工作的重点。

由表 4 可知, 两品系的单株荚数、单株粒数和单株产量的平均值都远高于轮回亲本, 而且各组数据的标准差较大, 针对以上 3 个产量性状进一步筛选最佳株系是下一步育种工作的重点。两品系百粒重的平均值均低于双亲,

表 2 南繁收获 BC₂F₂ 种子的亚基组成表现(2011 年春)
Table 2 Subunit phenotypes of BC₂F₂ seeds harvested in 2011 spring

BC ₁ F ₂ 组合(2010) BC ₁ F ₂ cross (2010)			BC ₂ F ₂ 种子的亚基组成表现(2011 春南繁收获种子) Subunit phenotypes of BC ₂ F ₂ seeds (harvested in 2011 spring)							
轮回亲本 Recurrent parent	母本基因型(2010) Genotype of female parent (2010)	母本单株代码(2010) Plant number of female parent (2010)	BC ₂ F _{1,2} 株系代码 Plant number of BC ₂ F _{1,2}	正常型 Normal type	α -缺失 α -null		α' -缺失 α' -null		$(\alpha'+\alpha)$ -缺失 $(\alpha'+\alpha)$ -null	
				粒数	粒数	种子代码 ¹⁾	粒数	种子代码 ¹⁾	粒数	种子代码 ¹⁾
				Grain number	Grain number	Seed code ¹⁾	Grain number	Seed code ¹⁾	Grain number	Seed code ¹⁾
东农 47 Dongnong 47	α 缺失(隐性纯合), α' 显性	R1080	L13-1	41	8	4, 17, 27, 28, 30, 42, 47	4	5, 10, 19, 51	1	43
	杂合型母本		L13-4	17	8	2, 5, 7, 11, 23, 26, 35, 47	8	1, 15, 16, 27, 28, 38, 43, 46	4	17, 34, 36, 41
	α -null is recessive homozygous and α' -null is dominant heterozygous		L13-7	9	2	1, 8	3	5, 12, 15	2	3, 13
各种亚基表现型种子总数 Total number of seeds harvested in 2011 spring				67	18		15		7	

¹⁾ SDS-PAGE 单粒分析对应的种子编码。 ¹⁾ Seed codes marked in SDS-PAGE analysis for each seed.

表 3 2 种致敏蛋白缺失型大豆田间农艺性状比较
Table 3 Comparison of agronomic traits between two recombinant lines

品系 Line	亚基组成 Subunit composition	生育期 Growth period (d)	株高 Plant height (cm)				分枝数 Number of branches				主茎节数 Number of stem nodes			
			平均值 Mean	标准差 SD	最小值 Min	最大值 Max	平均值 Mean	标准差 SD	最小值 Min	最大值 Max	平均值 Mean	标准差 SD	最小值 Min	最大值 Max
轮回亲本 ¹⁾ Recurrent parent ¹⁾	正常型 Normal type	123	82.5				3				21			
Cc	α' -缺失型 α' -null type	125	89.0	3.61	85	92	7	2.65	5	10	24	1.15	23	25
Cd	$(\alpha'+\alpha)$ -缺失型 $(\alpha'+\alpha)$ -null type	125	91.2	12.99	74	109	7.40	1.34	6	9	25	1.87	23	28

¹⁾ 轮回亲本为东农 47。 ¹⁾ Recurrent parent is Dongnong 47.

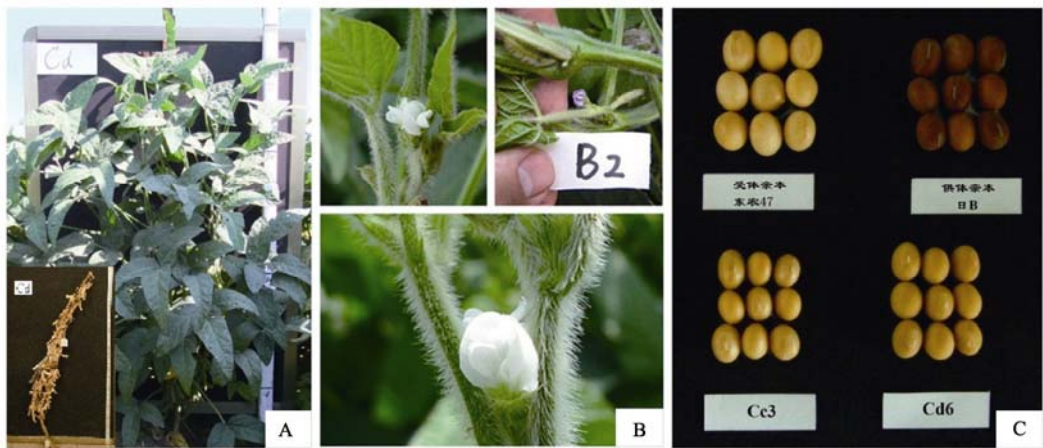


图 4 2 种致敏蛋白缺失型大豆品系的代表性农艺性状表现
Fig. 4 Representative agronomic traits of two recombinant lines

A: 植株 Cd 6[(α' + α)-亚基缺失型]; B: 花(BC₂F_{2,3}); C: 种子(BC₂F₃)。
A: plant Cd 6 [(α' + α)-subunit null type]; B: flower (BC₂F_{2,3}); C: seeds (BC₂F₃).

表 4 2 种致敏蛋白缺失型大豆收获后产量性状比较
Table 4 Comparison of yield traits between two recombinant lines

品系 Line	亚基组成 Subunit composition	单株荚数 Pod number per plant				单株粒数 Grain number			
		平均值 Mean	标准差 SD	最小值 Min.	最大值 Max.	平均值 Mean	标准差 SD	最小值 Min.	最大值 Max.
轮回亲本 RP ¹⁾	正常型 Normal type	86				189			
Cc	α' -缺失型 α' -null type	203	51.19	159	259	331	76.96	271	418
Cd	(α' + α)-缺失型 (α' + α)-null type	236	46.40	184	292	398	65.74	294	421

品系 Line	亚基组成 Subunit composition	百粒重 100-grain weight (g)				单株产量 Seed weight per plant (g)			
		平均值 Mean	标准差 SD	最小值 Min.	最大值 Max.	平均值 Mean	标准差 SD	最小值 Min.	最大值 Max.
轮回亲本 RP ¹⁾	正常型 Normal type	19.47				36.64			
Cc	α' -缺失型 α' -null type	13.45	1.57	12.06	15.16	45.36	16.01	32.67	63.35
Cd	(α' + α)-缺失型 (α' + α)-null type	13.81	1.50	12.26	16.20	54.54	7.73	48.18	66.77

¹⁾ 轮回亲本为东农 47。¹⁾ Recurrent parent is Dongnong 47. RP: recurrent parent.

分别为 13.45 g 和 13.81 g, 通过进一步回交转育, 筛选百粒重与东农 47 更接近的株系, 有望克服百粒重低的不足。

2.3 α' -亚基缺失型和(α' + α)-亚基双缺失型品系的营养品质表现

2.3.1 蛋白质与脂肪含量 由表 5 看出, 两品系蛋白质含量的平均值均高于其双亲(表 1), 分别比轮回亲本高出 3.33 和 4.83 个百分点, 其中 Cd 的蛋白质含量最高, 该群体内最优株系的蛋白质总量高达 46.70%。两品系脂肪含量的平均值介于双亲中间, 略高于日 B, 分别为 19.67% 和 19.20%。一般认为蛋白质含量高于 45% 的为高蛋白品种, 脂肪含量高于 21% 的为高油品种, 脂肪含量大于 20%, 同时蛋脂总量超过 63% 的品种被认为是“双高(高油、高蛋白)”品种。根据以上标准, 从 2 种致敏蛋白缺失型 BC₂F₃ 后代群体中筛选出“双高”、优质大豆新品种是完全可能的。

2.3.2 17 种氨基酸组分含量 从表 6 看出, 两品系 17

种氨基酸总量的平均值均高于双亲, 与东农 47 相比, 分别高出 2.67 和 2.68 个百分点, 其中, Cd 氨基酸总量的平均值最大, 为 40.87, 该家系内最优株系氨基酸总量的最大值为 43.75。两品系脯氨酸含量的平均值均低于东农 47, 此外, Cc 的酪氨酸、Cd 的谷氨酸和蛋氨酸含量的平均值略低于东农 47, 其他各氨基酸组分含量的平均值均高于东农 47。2 种类型缺失体氨基酸含量变幅最大的是精氨酸, 其次为天门冬氨酸, 前者的平均值分别比东农 47 高出 0.84(Cc)和 0.68(Cd)个百分点, 其中 Cc 品系内精氨酸含量的最高值为 4.03, 比东农 47 高出 1.20 个百分点; 后者的平均值分别比东农 47 高出 0.52(Cc)和 0.53(Cd)个百分点, 其中, Cd 天门冬氨酸含量的最高值为 5.45, 比东农 47 高出 0.95 个百分点。Cc 和 Cd 中必需氨基酸含量增加最多的是亮氨酸, 比东农 47 增加 0.24 个百分点, 其次是 Cd 中的苏氨酸, 增长 0.22 个百分点。Cc 和 Cd 胱氨酸含量的平均值均比东农 47 高, Cd 中筛选到胱氨酸含量最高

表 5 2 种致敏蛋白缺失型大豆蛋白质和脂肪含量的差异
Table 5 Variation of protein and fat content between two recombined lines

品系 Line	亚基组成 Subunit composition	蛋白含量 Protein content (%)				脂肪含量 Fat content (%)			
		平均值	标准差	最小值	最大值	平均值	标准差	最小值	最大值
		Mean	SD	Min.	Max.	Mean	SD	Min.	Max.
轮回亲本 RP ¹⁾	正常型 Normal type	40.30				22.50			
Cc	α' -缺失型 α' -null type	43.63	1.01	43.00	44.80	19.67	0.90	18.80	20.60
Cd	$(\alpha'+\alpha)$ -缺失型 $(\alpha'+\alpha)$ -null type	45.13	1.51	43.10	46.70	19.20	0.78	18.60	20.30

¹⁾ 轮回亲本为东农 47。¹⁾ Recurrent parent is Dongnong 47. RP: recurrent parent.

表 6 2 种致敏蛋白缺失型大豆 BC₂F₃ 种子的氨基酸组成
Table 6 Amino acid composition in soybean seeds of two recombined BC₂F₃ seeds

氨基酸 Amino acid (%)	亲本 Parents		Cc, α' -缺失型 α' -null type				Cd, $(\alpha'+\alpha)$ -缺失型 $(\alpha'+\alpha)$ -null type			
	日 B	东农 47	平均值	标准差	最小值	最大值	平均值	标准差	最小值	最大值
	RiB	Dongnong 47	Mean	SD	Min.	Max.	Mean	SD	Min.	Max.
天门冬氨酸 Asp	4.57	4.5	5.02	0.10	4.94	5.13	5.03	0.27	4.70	5.45
苏氨酸 Thr	1.76	1.62	1.74	0.03	1.71	1.76	1.84	0.08	1.74	1.92
丝氨酸 Ser	2.04	2.11	2.37	0.05	2.31	2.41	2.36	0.12	2.22	2.53
谷氨酸 Glu.	5.34	7.21	7.41	0.20	7.25	7.63	7.11	0.58	6.71	8.03
甘氨酸 Gly	1.68	1.66	1.83	0.04	1.78	1.86	1.93	0.08	1.86	2.06
丙氨酸 Ala	1.81	1.69	1.84	0.00	1.84	1.84	1.86	0.09	1.77	1.99
胱氨酸 Cys ¹⁾	0.69	0.67	0.68	0.03	0.66	0.71	0.72	0.04	0.67	0.78
缬氨酸 Val.	1.76	1.72	1.82	0.03	1.80	1.85	1.83	0.09	1.71	1.93
蛋氨酸 Met ¹⁾	0.62	0.55	0.55	0.01	0.54	0.56	0.52	0.03	0.47	0.55
异亮氨酸 Ile	1.48	1.67	1.68	0.04	1.64	1.71	1.69	0.08	1.59	1.81
亮氨酸 Leu	2.91	2.99	3.23	0.08	3.15	3.31	3.23	0.16	3.05	3.46
酪氨酸 Tyr	1.18	1.42	1.33	0.05	1.29	1.38	1.44	0.07	1.35	1.54
苯丙氨酸 Phe	1.85	2.02	2.07	0.05	2.03	2.13	2.03	0.13	1.90	2.23
赖氨酸 Lys	2.54	2.55	2.68	0.08	2.61	2.76	2.65	0.11	2.50	2.79
组氨酸 His	1.13	1.04	1.20	0.04	1.16	1.24	1.23	0.07	1.15	1.34
精氨酸 Arg	4.68	2.83	3.67	0.32	3.43	4.03	3.51	0.18	3.29	3.68
脯氨酸 Pro	1.43	1.94	1.75	0.02	1.74	1.77	1.90	0.04	1.85	1.94
氨基酸总量 Tall	37.47	38.19	40.86	0.73	40.05	41.46	40.87	1.90	38.77	43.75

¹⁾ 为含硫氨基酸。¹⁾ Sulfur-containing amino acids.

为 0.78 的个体, 比东农 47 的胱氨酸含量高 0.11 个百分点。两品系含硫氨基酸 (蛋氨酸与胱氨酸的和) 含量的平均值均高于轮回亲本, 其中 Cd 含硫氨基酸总量的最大值为 1.33, 比轮回亲本高出 0.11 个百分点。Cd 最优株系的各种氨基酸组分含量均比东农 47 高或相同, 含硫氨基酸含量及氨基酸总量分别比东农 47 高出 0.11 和 5.56 个百分点, 该株系将在后续育种工作中重点选育。

3 讨论

近年来, 众多育种实践表明, 7S 球蛋白亚基缺失, 可以改善大豆种子蛋白的氨基酸配比, 提高大豆蛋白质含量^[4,31], 在含硫氨基酸含量增加的同时保持或提高大豆种子的蛋白质总量^[4,13,15,29,33-34]。低 7S 球蛋白株系的选育因此成为大豆蛋白质组分改良育种的新思路。Takahashi 等^[33]通过杂交育种方法, 获得 7S 与 11S 球蛋白全部缺失型突

变体, 尽管缺失 2 种主要的贮藏蛋白使该缺失体萌发、生长、开花和结实均无明显异常表现, 但该品系的自由氨基酸(free amino acids)含量由常规大豆的 0.3%~0.8%增长为 4.5%~8.2%, 比对照高出 5~8 倍, 其中精氨酸(Asp)、天门冬氨酸(Asp)、谷氨酸(Glu)和组氨酸(His)的含量均大幅提高。2010 年, 该课题组利用以上亚基缺失型种质, 通过转基因手段调整大豆氨基酸组成, 进一步证实, 大豆种子贮藏蛋白含量的减少会补偿性地促进氮同化代谢途径的活化, 从而导致自由氨基酸大量增加, 贮藏蛋白亚基的缺失的确可以改善大豆种子的氨基酸配比^[34]。本研究表明, α' -缺失和 $(\alpha'+\alpha)$ 双缺失特性的导入伴随着绝大多数氨基酸组分含量和氨基酸总量的提高, 其中精氨酸和天门冬氨酸平均含量的变幅最大(表 6), 组氨酸含量的平均值也都比轮回亲本东农 47 高, 这与 Takahashi 等^[33-34]报道的结果相同, 但谷氨酸含量略有不同, α' -缺失型谷氨酸含量

的平均值仅比东农 47 高 0.20 个百分点,而($\alpha'+\alpha$)-双缺失型品系谷氨酸含量的平均值比东农 47 低,这可能是本研究材料的亚基缺失组合与报道的亚基缺失类型不同所致。对 7S 球蛋白各个亚基的遗传效应及遗传机理的明晰,还有待进一步深入研究。

本研究在同一杂交-回交组合(东农 47/日 B)内,在转育 α -亚基缺失特性的同时,经过 2 代回交,将大豆 7S 球蛋白 α' -亚基缺失和($\alpha'+\alpha$)亚基双缺失特性成功导入中国大豆遗传背景,打破了一组回交组合,只能培育一种新品种的局限性,大大节约了人力和物力。目前,通过 SSR 标记辅助背景选择回交转育 α -亚基缺失型新品种的研究,已经筛选到双亲东农 47 和日 B 间多态性良好,分辨率较高,带型质量好、平均分布在大豆全基因组 20 条连锁群上的引物 98 对(结果待发表),利用以上引物对 α' 缺失和($\alpha'+\alpha$)双缺失品系的分子标记辅助背景选择工作已经开始,要得到与受体亲本东农 47 相同遗传背景的 α' 缺失和($\alpha'+\alpha$)双缺失型新品种,还需要借助分子标记筛选试验的顺利进行(预计 2012 年底完成相关分析)或再进行 2~3 轮回交转育。另外,BC₂F₃ 群体中筛选到的 α' 缺失型种子仍包含 α 显性杂合体,筛选 α' 缺失且 α 为显性纯合的个体用于下一步回交育种是 α' 缺失型品种选育中需注意的。各个类型新品系的自由氨基酸组成情况如何,将在今后的研究中加以确认。

References

- [1] Derbyshire E, Wright D B, Boulter D. Legumin and vicilin, storage proteins of legume seeds. *Phytochem*, 1976, 15: 3–24
- [2] Hill J E, Breidenbach R W. Proteins of soybean seeds: I. Isolation and characterization of the major components. *Plant Physiol*, 1974, 53: 742–746
- [3] Ogawa T, Tayama E, Kitamura K, Kaizuma N. Genetic improvement of seed storage proteins using three variant alleles of 7S globulin subunits in soybean (*Glycine max* L.). *Jpn J Breed*, 1989, 39: 137–147
- [4] Krishnan H B. Engineering soybean for enhanced sulfur amino acid content. *Crop Sci*, 2005, 45: 454–461
- [5] Thanh V H, Shibasaki K. Beta-conglycinin from soybean proteins. Isolation and immunological and physicochemical properties of the monomeric forms. *Biochem Biophys Acta*, 1977, 490: 370–384
- [6] Staswick P E, Hermodson M A, Nielsen N C. Identification of the acidic and basic subunit complexes of glycinin. *J Biol Chem*, 1981, 256: 8752–8755
- [7] Kaviani B, Kharabian A. Improvement of the nutritional value of soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] seed with alteration in protein subunit of glycinin (11S globulin) and beta-conglycinin (7S globulin). *Turk J Biol*, 2008, 32: 91–97
- [8] Tsukada Y, Kitamura K, Harada K, Kaizuma N. Genetic analysis of subunits of two major storage protein (β -conglycinin and glycinin) in soybean seeds. *Jpn J Breed*, 1986, 36: 390–400
- [9] Koshiyama I. Chemical and physical properties of a 7S protein in soybean globulins. *Cereal Chem*, 1968, 45: 394–404
- [10] Utsumi S, Kinsella J E. Forces involved in soy protein gelation: effects of various reagents on the formation, hardness and solubility of heat-induced gels made from 7S, 11S and soy isolate. *J Food Sci*, 1985, 50: 1278–1282
- [11] Salleh M R B, Maruyama N, Takahashi K, Yagasaki K, Higasa T, Matsumura Y, Utsumi S. Gelling properties of soybean beta-conglycinin having different subunits compositions. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2004, 68: 1091–1096
- [12] Ogawa T, Bando N, Tsuji H, Nishikawa K, Kitamura K. Alpha-subunit of beta-conglycinin, an allergenic protein recognized by IgE antibodies of soybean-sensitive patients with atopic dermatitis. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1995, 59: 831–833
- [13] Ogawa T, Samoto M, Takahashi K. Soybean allergens and hypoallergenic soybean products. *J Nutr Sci Vitaminol*, 2000, 46: 271–279
- [14] Krishnan H B, Kim W S, Jang S, Kerley M S. All three subunit of soybean beta-conglycinin are potential food allergens. *J Agric Food Chem*, 2009, 57: 938–943
- [15] Samoto M, Fukuda Y, Takahashi K, Tabuchi K, Hiemori M, Tsuji H, Ogawa T, Kawamura Y. Substantially complete removal of three major allergenic soybean proteins (Glym Bd 30K, Glym Bd 28, and the alpha-subunit of β -conglycinin) from soy protein by using a mutant soybean, Tohoku 124. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1997, 61: 2148–2150
- [16] Thanh V H, Shibasaki K. Heterogeneity of beta-conglycinin from soybean seeds. *Biochem Biophys Acta*, 1976, 439: 326–338
- [17] Thanh V H, Shibasaki K. Major proteins of soybean seeds: subunit structure of beta-conglycinin. *J Agric Food Chem*, 1978, 26: 692–695
- [18] Higgins T J V. Synthesis and regulation of major proteins in seeds. *Annu Rev Plant Physiol*, 1984, 35: 191–221
- [19] Kitamura K, Kaizuma N. Mutant strains with low level of subunit of 7S globulin in soybean (*Glycine max* Merr.) seed. *Jpn J Breed*, 1981, 31: 353–359
- [20] Harada K, Toyokawa Y, Kitamura K. Genetic analysis of the most acidic 11S globulin subunit and related characters in soybean seeds. *Jpn J Breed*, 1983, 33: 23–30
- [21] Kaizuma N, Kowata H, Odanaka H. Genetic variation on soybean seed proteins induced by irradiation. *Rep Tohoku Br Crop Sci Jpn*, 1989, 32: 97–99

- [22] Odanaka H, Kaizuma N. Mutants on soybean storage proteins induced by γ -ray irradiation. *Jpn J Breed*, 1989, 39 (suppl-1): 430–431 (in Japanese)
- [23] Kitagawa S, Ishimoto M, Kikuchi F, Kitamura K. A characteristic lacking or decreasing remarkably 7S globulin subunits induced with γ -ray irradiation in soybean seeds. *Jpn J Breed*, 1991, 41(suppl-2): 460–461 (in Japanese)
- [24] Takahashi K, Banda H, Kikuchi A, Ito M, Nakamura S. An induced mutant line lacking the α -subunit of β -conglycinin in soybean (*Glycine max* [L.] Merr). *Breed Sci*, 1994, 44: 65–66
- [25] Yagasaki K, Kaizuma N, Kitamura K. Inheritance of glycinin subunits and characterization of glycinin molecules lacking the subunits in soybean (*Glycine max* [L.] Merr.). *Breed Sci*, 1996, 46: 11–15
- [26] Takahashi K, Mizuno Y, Yumoto S, Kitamura K, Nakamura S. Inheritance of the α -subunit deficiency of β -conglycinin in soybean (*Glycine max* [L.] Merrill) line induced by γ -ray irradiation. *Breed Sci*, 1996, 46: 251–255
- [27] Hajika M, Takahashi M, Sakai S, Igita M. A new genotype of 7S globulin (β -conglycinin) detected in wild soybean (*Glycine soja* Sieb. et Zucc.). *Breed Sci*, 1996, 46: 385–386
- [28] Hayashi M, Harada K, Fujiwara T, Kitamura K. Characterization of a 7S globulin-deficient mutant of soybean (*Glycine max* L. Merrill). *Mol Gen Genet*, 1998, 258: 208–214
- [29] Liu S-S(刘珊珊), Teng W-L(滕卫丽), Zhang B-B(张彬彬), Ge Y-J(葛玉君), Diao G-Z(刁桂珠), Zheng T-H(郑天慧), Jiang Z-Q(姜自琴), Zeng R(曾蕊), Wu S(吴帅), Li W-B(李文滨). Development of soybean germplasm lacking of 7S globulin α -subunit. *Acta Agron Sin* (作物学报), 2010, 36 (8): 1–5 (in Chinese with English abstract)
- [30] Coates J B, Medeiros J S, Thanh V H, Nielsen N C. Characterization of the subunits of β -conglycinin. *Arch Biochem Biophys*, 1985, 243: 184–194
- [31] Herman E M, Helm R M, Jung R, Kinney A J. Genetic modification remove an immunodominant allergen from soybean. *Plant Physiol*, 2003, 132: 36–43
- [32] Yagasaki K, Takagi T, Sakai M, Kitamura K. Biochemical characterization of soybean protein consisting of different subunits of glycinin. *J Agric Food Chem*, 1997, 45: 656–660
- [33] Takahashi M, Uematsu Y, Kashiwaba K, Yagasaki K, Hajika M, Matsunaga R, Komatsu K, Ishimoto M. Accumulations of high levels of free amino acids in soybean seeds through integration of mutations conferring seed protein deficiency. *Planta*, 2003, 217: 577–586
- [34] Kita Y, Nakamoto Y, Takahashi M, Kitamura K, Wakasa K, Ishimoto M. Manipulation of amino acid composition in soybean seeds by the combination of deregulated tryptophan biosynthesis and storage protein deficiency. *Plant Cell Rep*, 2010, 29: 87–95