

利用種子蛋白電泳及西方墨點分析進行大豆屬物種分群之研究

蔡元卿¹、謝宗涵²、陳映伶³、彭雅涓⁴、邢禹依⁵、謝兆樞^{1*}

¹ 國立臺灣大學農藝學系

² 國立臺灣大學生化科技系

³ 國立陽明大學醫學系

⁴ 國立臺灣大學化學工程系

⁵ 中央研究院植物暨微生物學研究所

摘要

野生大豆是栽培種大豆在實行抗病抗蟲耐旱等育種改良計畫時重要的基因庫，不同的野生種對於有益性狀有不同的貢獻，快速鑑別大豆屬物種有助於育種親本的選定，加速整個育種計畫流程。在許多試驗中證明種子蛋白電泳可以進行物種鑑定，搭配種子蛋白抗體進行西方墨點轉漬法分析，更是一項進行辨認大豆屬物種的有利工具。多種大豆屬物種的種子全蛋白以 SDS-PAGE 與西方墨點轉漬法進行分析，結果顯示每一個物種均有其獨特的電泳圖譜，可以做為物種鑑識之用。本研究用於免疫分析共有九個種子蛋白，其中變異少的蛋白有 MP130、glycinin、GmPM4、GmPM5、GmPM16、GmPM28 等六個種子儲存蛋白或成熟蛋白；而變異多的蛋白有 GmPM1、GmPM2、GmPM8 等三個種子成熟蛋白。依據這些種子蛋白的分析結果，針對 *G. tomentella* 物種複合群所做的分群與前人利用同功酶群的方法所推論出的結果一致。

關鍵詞：大豆屬物種、聚丙烯醯膠片電泳、大豆種子成熟蛋白、西方墨點轉漬法。

Using Seed Protein Electrophoresis Profile and Western Blotting to Analyse the Classification of *Glycine* Species

Yuan-Ching Tsai¹, Tzung-Harn Hsieh², Ying-Ling Chen³, Ya-Chuan Peng⁴, Yue-Ie C. Hsing² and Jaw-Shu Hsieh^{1*}

¹ Department of Agronomy, National Taiwan University, Taipei 10617, Taiwan ROC

² Department of Biochemical Science and Technology, National Taiwan University, Taipei 10617, Taiwan ROC

³ Faculty of Medicine, National Yang-Ming University, Taipei 11221, Taiwan ROC

⁴ Department of Chemical Engineering, National Taiwan University, Taipei 10617, Taiwan ROC

⁵ Institute of Plant and Microbial Biology, Academia Sinica, Taipei 11529, Taiwan ROC

ABSTRACT

The *Glycine* species are the important gene pools for improvement of soybean crop against insect, disease and drought stress, comparing to the narrower germplasm of the cultivar soybean. Identifying useful trait donors as parents for breeding effectively can facilitate the breeding program. Many experiments had confirmed that seed proteins electrophoresis can be used as a tool for plant taxonomy, and the efficiency will increase if collocate with Western blotting. In the present study, the seed proteins from several *Glycine* species were analyzed by sodium dodecyl sulfate-gel electrophoresis (SDS-PAGE) and Western blot against soybean seed maturation protein and seed storage protein antibodies. Each

* 通信作者, jawar@ntu.edu.tw

投稿日期：2005年7月1日

接受日期：2006年3月7日

作物、環境與生物資訊 3:159-176 (2006)

Crop, Environment & Bioinformatics 3:159-176 (2006)

189 Chung-Cheng Rd., Wufeng, Taichung Hsien 41301, Taiwan ROC

species yields a unique electrophoretic pattern that varied in the total number of bands and their relative mobilities. Thus, we may use these protein profiles as a tool to identify *Glycine* species. Six seed protein products, including MP130, Glycinin, GmPM4, GmPM5, GmPM16, and GmPM28, are less varied, and the other three proteins, GmPM1, GmPM2 and Gm PM8, are more varied among *Glycine* species. The results thus gave a similar conclusion as those provided by isozyme studies described previously by other group.

Key words: *Glycine* species, polyacrylamide gel electrophoresis, soybean seed maturation protein, Western blot.

前言

由於栽培種大豆種子含有高量的蛋白質與油分，所以長期以來是人類食品及食用油以及牲畜飼料的主要來源；在東亞，更是人類食用蛋白的主要來源。大豆種子內的蛋白質主要是可被稀鹽溶液所萃取出來的球蛋白 (globulin)，約佔種子蛋白質總量 90%，可分成 glycinin 及 conglycinin 兩大類，而這兩類蛋白約佔種子全蛋白總量的 70%，為大豆種子最重要的儲存性蛋白 (Gayler and Sykes 1985)。

經過多年研究，現今大豆屬 (*Glycine*) 分成兩個亞屬，即 *Soja* 亞屬與 *Glycine* 亞屬。*Soja* 亞屬包括栽培種 *Glycine max* 及野生種 *G. soja*，兩者皆為一年生二倍體 ($2n = 40$)，相互間可自由雜交。*Glycine* 亞屬包含全部的多年生野生種，原先的分類系統僅分為 7 種 (Hymowitz and Newell 1981)，現今依據形態或序列分析分類已歸類出 24 種物種 (Tsai *et al.* 2001, Doyle *et al.* 2003)，其中大多數為二倍體，而 *G. hirticaulis* 與 *G. tabacina* 除二倍體外還有四倍體細胞型 (cytotype, $2n = 80$)，此外 *G. tomentella* 則具有 $2n = 38$ 、 40 、 78 、 80 四種細胞型 (Grant *et al.* 1984)。這些多年生野生大豆物種主要分布在澳洲大陸，少數幾種在澳洲大陸以外地區亦被發現 (Grant *et al.* 1984)。以臺灣本島與鄰近附屬島

嶼為例，就有五種 *Glycine* 屬的植物：*G. max* (栽培種大豆)、*G. soja* (臺灣大豆)、*G. tabacina* (澎湖大豆，Doyle *et al.* 稱為 *G. pescadrensis*)、*G. tomentella* (絨毛大豆或闊葉大豆) 及 *G. dolichocarpa* (扁豆莢大豆) (Tateishi and Ohashi 1992, Doyle *et al.* 2003)。

栽培種大豆被認為是由一年生的野生種 *G. soja* 演化而來，且彼此是雜交可稔的，所以兩者基因組代號被定為 GG (Singh and Hymowitz 1985, Singh *et al.* 1988)。而多年生 *Glycine* 亞屬物種則具有抗病、抗蟲、耐冷、耐旱、對日長不敏感等特性 (Brown *et al.* 1984)，因此倍受從事大豆遺傳或育種改良之學者的注意。然而多年生野生種原的基因組組成至今仍未完全釐清，在 24 個多年生物種中仍有 7 個物種的基因組未被決定，尤其是 *G. tomentella* 物種複合群的成員。

目前大豆屬物種在分類上仍存在幾個物種複合群，如 *G. tabacina*、*G. tomentella*、*G. clandestina* 以及 *G. canescens*，但學者已開始從形態學與分子生物學研究著手，從事進一步的分群。其中 *G. tomentella* 物種複合群的複雜度最高，目前依據形態分出的新種有 *G. dolichocarpa* Tateishi et Ohashi (Ohashi *et al.* 1991)。

多年來，植物分類學家開始從外表型特徵進行分類轉變成基於演化關係去探討物種的親緣關係，一方面這樣的轉變所獲致的結論會更為真確，一方面也是由於分生技術的進步所致。這些分類學家長期以來便顯示出對蛋白研究有濃厚的興趣，Gibbs 於 1963 年的這段論述 “It seems probable that each kind of living organism has its own set of proteins: that the proteins of nearly related species are nearly alike; that those of more distantly related ones are unlike”，更吸引了眾多植物分類學家投入蛋白研究這個領域，特別是種子蛋白。成熟種子在生理上維持穩定，不會像其他營養器官或組織容易隨

環境變動而有所變異，同時也不像發育過程中的種子持續累積養分，使得種子成分一直變動。而 1975 年 Stegemann 發現 slab gel 可以改善蛋白圖譜的解析度之後，至少在 13 個科的 45 個屬的植物已經驗證過種子蛋白電泳這樣的技術 (Ladizinsky and Hymowitz 1979)，說明種子蛋白電泳可運用於物種分類及親緣分析。

在早期大豆屬基因組關係的研究，Singh *et al.* (1992) 以蛋白質電泳圖譜鑑定雜交成功率過低的物種基因組，在其實驗中依照種子全蛋白電泳圖譜相似度為兩個物種訂出基因組代號，分別是 *G. latrobeana* (A₃A₃) 及 *G. curvata* (C₁C₁)。早期大豆屬物種分類研究也曾以同功酶圖譜來進行分群，其中 *G. tomentella* 複合群可分成多群 (D1-D5, T1-T7)，不同同功酶群間存在生殖隔離現象 (Doyle and Brown 1985, Doyle *et al.* 1986, Grant *et al.* 1984, Kollipara *et al.* 1993, 1994)。

在聚丙烯醯膠片電泳上觀察大豆種子發育充實過程蛋白圖譜的變化，可以發現一些蛋白質在成熟後期種子脫水乾燥開始大量累積，這些獨特的蛋白被稱為大豆種子成熟蛋白 (maturation protein; Rosenberg and Rinne 1988)，或是晚胚蛋白 (LEA, late embryogenesis abundant; Galau *et al.* 1986)，這些蛋白與種子發育及種子成熟時忍受乾燥脫水的能力相關。由大豆的發育中期種子及帶莢乾燥種子與成熟種子蛋白研究中，也發現這些成熟蛋白的累積與大豆種子能否發芽有直接的關係 (Hsing *et al.* 1995a)。我們選殖並定序了四十一個 cDNA clones，這些殖系被命名為 GmPM (*Glycine max* physiological mature) 系列 (Hsing *et al.* 1990, Hsing and Wu 1992)。此外，我們也利用其融合蛋白質製造了許多抗體。Hsieh *et al.* (2001) 曾利用 23 個搜集系共六個物種，闡述每一個大豆屬物種都有獨特的種子蛋白圖譜，並利用此種圖譜探討 *G. tomentella* 與 *G.*

dolichocarpa 的分類問題，試驗結果顯示，*G. dolichocarpa* 與 *G. tomentella* 有明顯差異。近年在 Doyle *et al.* (2002, 2003) 及 Rauscher *et al.* (2002, 2004) 發表的一系列文章中，則持續揭露了各種四倍體同功酶群可能的遺傳組成及演化關係。

本試驗將針對 39 個搜集系共六個物種的大豆屬物種搜集系，進行種子全蛋白及西方墨點轉漬法解析，並特別針對 *G. tomentella* 物種複合群成員進行分群，並與前人所做的同功酶分群結果進行比較。希望藉由所獲得的訊息，對於 *G. tomentella* 物種複合群能有更深入的認識。

材料與方法

以栽培種大豆十石 (Shi-shi)，臺灣原產野生種大豆及來自美國 Illinois 大學 Hymowitz 博士提供的外來種原，共計共六個物種 39 個搜集系為材料(每個搜集系詳細的基因組、生長習性及採集地點列於 Table 1)。其中 GG 基因組材料包括一年生的栽培種 *G. max* (十石)、三個臺灣的一年生野生種 *G. soja* (Soj001、010、022)、兩個國外一年生野生種 *G. soja* (Soj039、043)。另外還包括多個多年生的野生種，例如一個分佈在澳洲的 B₁B₁ 基因組 *G. latifolia* (Lat)、兩個澳洲的 AA 基因組 *G. canescens* (Can003、007)、八個分佈在臺灣離島的 AAB'B' 基因組 *G. tabacina* (Tab004、005、010、016、019、064、074 及 075) 和二十二個 *G. tomentella* 物種複合群的搜集系，這些搜集系除了兩個 2n=80，被命名為 *G. dolichocarpa* 的臺灣四倍體搜集系 Tom038、039 外，其餘搜集系依照染色體數目可分成四種細胞型 (cytotype)，分別為一個 EE 基因組 2n = 38 (Tom055)、四個 DD 基因組 2n = 40 (Tom049、52、62、63)、一個 DDEE 基因組 2n = 78 (Tom054) 及十四個 DDDD 基因組 2n = 80 (Tom019、029、034、037、045、046、047、048、053、056、058、059、060、061)。

Table 1. Accessions of the wild soybean and their relatives used in this study and their collection site.

Accession	Genome	Growth habitat	Collection site
Soja001	GG	Annual	Shimen, Taoyuan, Taiwan
Soja010	GG	Annual	Hsinchu, Taiwan
Soja022	GG	Annual	Chutung, Hsinchu, Taiwan
Soja039	GG	Annual	South Korea
Soja043	GG	Annual	Nanjing, China
Tab004	AAB'B'*	Perennial	Hoaliaw, Penghu, Taiwan
Tab005	AAB'B'*	Perennial	Sitaigubau, Penghu, Taiwan
Tab010	AAB'B'*	Perennial	Wangan, Penghu, Taiwan
Tab016	AAB'B'*	Perennial	Gibay, Penghu, Taiwan
Tab019	AAB'B'*	Perennial	Ouni, Penghu, Taiwan
Tab064	AAB'B'*	Perennial	Chimay, Penghu, Taiwan
Tab074	AAB'B'*	Perennial	Kingmen, Taiwan
Tab075	AAB'B'*	Perennial	Machu, Taiwan
Tom019	DDD ₃ D ₃ #	Perennial	Queensland, Australia
Tom029	DDD ₁ D ₁ #	Perennial	Maopitou, Pintung, Taiwan
Tom034	DDD ₁ D ₁ #	Perennial	Dakwung, Pintung, Taiwan
Tom037	DDD ₁ D ₁ #	Perennial	Haikou, Pintung, Taiwan
Tom038	DDD ₃ D ₃ #	Perennial	Chialuland, Taitung, Taiwan
Tom039	DDD ₃ D ₃ #	Perennial	Tungho, Taitung, Taiwan
Tom045	DDD ₁ D ₁ #	Perennial	Kingmen, Taiwan
Tom046	DDD ₁ D ₁ #	Perennial	Chenkunlin, Taichung, Taiwan
Tom047	DDD ₁ D ₁ #	Perennial	Longlueantan, Pintung, Taiwan
Tom048	DDD ₁ D ₁ #	Perennial	Kingmen, Taiwan
Tom049	DD	Perennial	North Queensland, Australia
Tom052	D ₃ D ₃	Perennial	North Queensland, Australia
Tom053	DDD ₁ D ₁ #	Perennial	Philippines
Tom054	DDEE#	Perennial	New S. Wales, Australia
Tom055	EE	Perennial	South Queensland, Australia
Tom056	DDD ₃ D ₃ #	Perennial	Queensland, Australia
Tom058	DDD ₃ D ₃ #	Perennial	Queensland, Australia
Tom059	DDD ₃ D ₃ #	Perennial	Queensland, Australia
Tom060	DDD ₃ D ₃ #	Perennial	North Queensland, Australia
Tom061	DDD ₂ D ₂ #	Perennial	Papua New Guinea
Tom062	DD	Perennial	Papua New Guinea
Tom063	DD	Perennial	Papua New Guinea
Lat	B ₁ B ₁	Perennial	New S. Wales, Australia
Can003	AA	Perennial	New S. Wales, Australia
Can007	AA	Perennial	South Australia
Max	GG	Annual	cultivar

*Genome of polyploidy reported from the paper of Doyle *et al.* 2003.

#Genome of polyploidy reported from the paper of Doyle *et al.* 2002.



種子全蛋白質的萃取，取每一種搜集系種子 0.1 g，於研鉢中磨成細粉，加入 1 mL 的種子蛋白萃取液 (63 mM Tris-HCl pH7.6, 20 mM MgCl₂, 4 mM PMSF)，混成均質態。加入 0.5 mL Laemmli protein solubilization buffer (186 mM Tris- HCl, pH 6.8; 6% SDS; 15% β - mercaptoethanol; 22.5% glycerol; Laemmli, 1970)，混合均勻。室溫下，以 15,133 g 離心 10 分鐘。取上清液，於 100°C 水浴 10 分鐘後，移至 4°C，10 分鐘。室溫下，以 15,133 g 離心 10 分鐘，收集上清液。再以 12.5% 的 SDS-PAGE 電泳進行蛋白的分離，並用 Coomassie Brilliant Blue R-250 進行染色。另進行由多個次單位 (subunit) 或多肽 (polypeptide) 組成之蛋白的分析，此一部分蛋白的萃取方法同上，

但種子蛋白萃取液中不含 β -mercaptoethanol。每個蛋白樣本分析量為 40 μ g。

SDS-PAGE 電泳完畢後，依照 Towbin *et al.* (1979) 的方法進行西方墨點轉漬法。我們使用了 9 種大豆種子儲存性蛋白或成熟蛋白的初級抗體，其次使用結合鹼性磷酸酶的山羊抗兔子抗體作為次級抗體，並使用 nitroblue-tetrazolium 作為呈色基質以進行呈色反應。初級抗體稀釋倍數分別為：GmPM1，50,000 倍；GmPM2，80,000 倍；GmPM4，10,000 倍；GmPM5，20,000 倍；GmPM8，160,000 倍；GmPM16，10,000 倍；GmPM28，5,000 倍；MP130，20,000 倍；glycinin，10,000 倍。

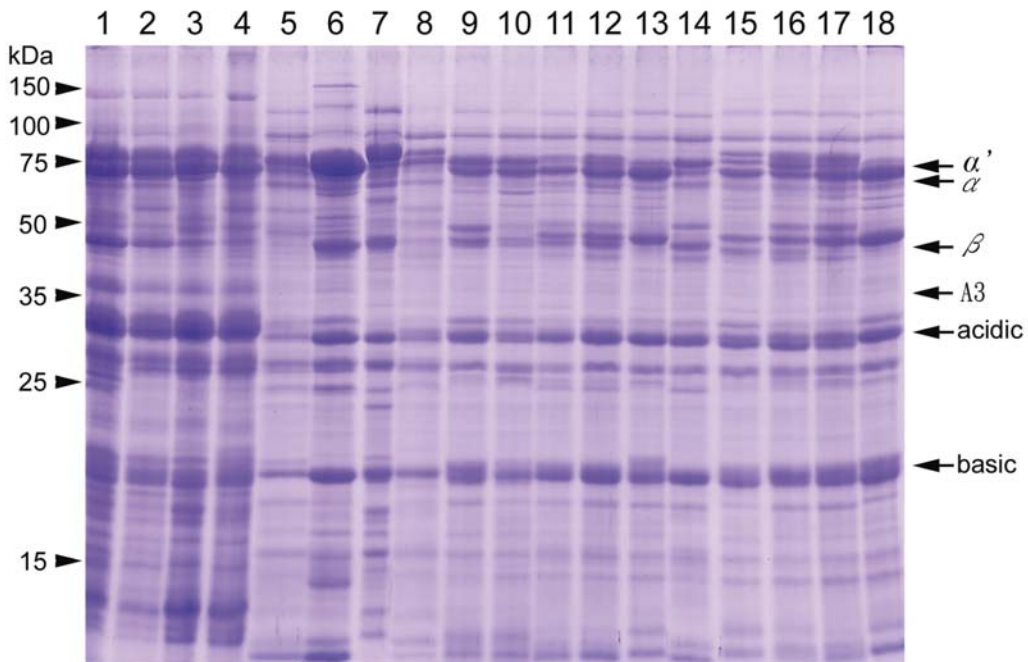


Fig. 1. SDS-PAGE of total soluble seed proteins of various *Glycine* species. Proteins were prepared from 1. *G. max* Shi-shi; 2. *G. max* ssp. *formosana* Soj001; 3. *G. soja* Soj039; 4. Soj043; 5. *G. canescens* Can003; 6. Can007; 7. *G. latifolia* Lat; 8. *G. tabacina* Tab004; 9. *G. tomentella* Tom029; 10. Tom037; 11. Tom039; 12. Tom056; 13. Tom049; 14. Tom052; 15. Tom054; 16 Tom055; 17. Tom061; and 18. Tom062. Arrow-heads indicate molecular markers in kDa. The positions of α' , α and β -conglycinin, and the acidic and basic polypeptides of glycinin, are indicated on the right.

結果

以 SDS-PAGE 分析種子全蛋白

本試驗利用 SDS-PAGE 分析 38 個野生大豆搜集系成熟種子的種子蛋白，並與栽培種十石做比較。在總共 39 個搜集系材料中，包括多種基因組，二倍體的有兩個 AA 基因組、一個 BB 基因組、四個 DD 基因組、一個 EE 基因組及六個 GG 基因組，而四倍體則有八個 AABB 基因組、十六個 DDDD 基因組及一個 DDEE 基因組。在 Fig. 1 中，選取其中 18 個具有代表性的搜集系，分別是 AA 基因組的 Can003 與 Can007、B₁B₁ 基因組的 Lat、DD 基因組的 Tom049 與 Tom062、D₃D₃ 基因組的 Tom052、EE 基因組的 Tom055、GG 基因組的 Max, Soj001, Soj039, Soj043、AAB'B' 基因組的 Tab004、DDD₁D₁ 基因組的 Tom029 與 Tom037、DDD₂D₂ 基因組的 Tom061、DDD₃D₃ 基因組的 Tom039 與 Tom056 和 DDEE 基因組的 Tom054。

以 Coomassie Brilliant Blue 染色所得的結果中，同為 *Soja* 亞屬的栽培種 *G. max* 與一年生的野生物種 *G. soja* 有相近的條帶型式 (Fig. 1, lane 1-4)；而 *Glycine* 亞屬的物種包括 *G. canescens*、*G. latifolia*、*G. tabacina* 與 *G. tomentella* 則各有獨特的條帶，其中同屬於 *G. tomentella* 物種複合群的搜集系條帶型式較為一致 (Fig. 1, 5-8 及 9-18)。兩個 *G. canescens* 搜集系 (Can003 與 Can007) 的條帶型式差異甚大 (Fig. 1, lane 5 與 6)。另外由於進行蛋白電泳時注入相同的蛋白量，由儲存性蛋白所在位置的蛋白條帶的粗細，可以判斷 *Soja* 亞屬相較於 *Glycine* 亞屬物種有較多的儲存性蛋白。但是綜觀整體，相似的條帶反映出整個大豆屬在分化的過程中重要的基因仍被保留，例如五條重要的種子儲存性蛋白條帶 (β -conglycinin 的 a'、a、 β subunit 以及 glycinin 的 acidic 與 basic polypeptide) 均被保留，儘管在分子量與條

帶數目上有少許變動 (Fig. 1)。

以西方墨點轉漬法分析種子全蛋白

由於大豆種子蛋白種類及含量眾多，尤其儲存性蛋白佔了 70% (Gayler and Sykes 1985)，且利用 Coomassie Brilliant Blue 染色，許多細微的差異無法真正顯現，因此進一步利用本實驗室製備的大豆種子儲存性蛋白及多種成熟蛋白抗體進行西方墨點轉漬法，分別對 9 種種子蛋白進行分析，結果顯示於 Fig. 2 與 Fig. 3。由結果得知，依照蛋白條帶數目及分子量的變異程度可約略分成兩組，變異程度少的蛋白有 MP130、glycinin、GmPM4、GmPM5、GmPM16、GmPM28 六個種子儲存蛋白或成熟蛋白 (Fig. 2)。而變異程度多的蛋白有 GmPM1、GmPM2、GmPM8 三個種子成熟蛋白 (Fig. 3)。所有的 39 個搜集系的條帶分子量大小及條帶數目詳細調查資料則分別整理成 Table 2 及 Table 3。

由 Table 2、Table 3 得知，當以不同物種區隔來探討種子蛋白圖譜的變化，*Soja* 亞屬物種與 *Glycine* 亞屬物種顯著不同。*Soja* 亞屬內物種，*G. max* 與 *G. soja* 則非常相似，而 *Glycine* 亞屬物種中，所有的 *G. tabacina* 搜集系非常一致，不管條帶數目與分子量大小都一樣；此外 *G. canescens* 與 *G. latifolia* 的條帶型式自成一系，而整個 *G. tomentella* 物種複合群成員，雖有差異，但是種內差異比種間差異來的小。

同樣的，由 Table 2 及 Table 3 的結果依照 9 種不同蛋白種類分別進行探討。首先在 GmPM1 這個蛋白方面，*Soja* 亞屬物種均有兩條條帶，但是 *G. max* (Max) 與 *G. soja* (Soj001、010 與 022) 有相同的分子量，21 kDa 與 17.2 kDa，*G. soja* (Soj039 與 Soj043) 其中較高分子量的條帶與 Max 不同，分子量為 21.5 kDa。*G. tabacina* 有四條條帶，分子量為 21.7 kDa、20.7 kDa、20.2 kDa 與 19.3 kDa。*G. latifolia* 也有四條條帶，分子量分別為 22 kDa、21.7 kDa、19.9 kDa 與 19.5 kDa。

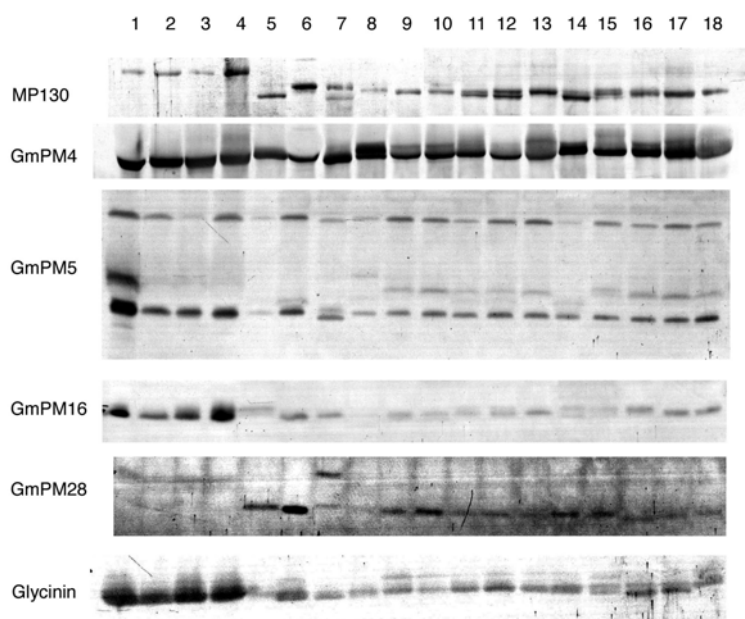


Fig. 2. Immunostaining after SDS-PAGE of soybean seed proteins recognized by specific seed protein antibodies. The cross-reactive polypeptides recognized by antibodies against MP130, GmPM4, GmPM5, GmPM16, GmPM28 and glycinin are illustrated. The accessions and their labelings are the same as those in Fig. 1. Numbers on the left indicate the apparent molecular weights of specific polypeptides.

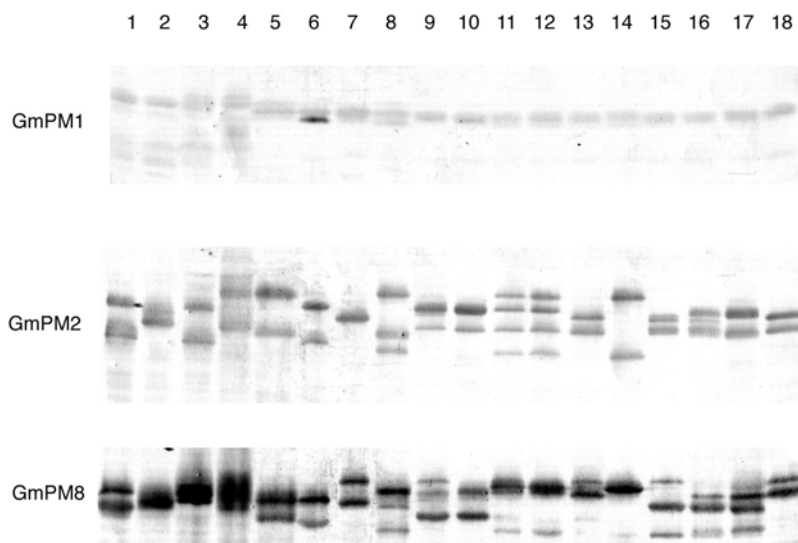


Fig. 3. Immunostaining after SDS-PAGE of soybean seed proteins recognized by specific seed protein antibodies. The cross-reactive polypeptides recognized by antibodies against GmPM1, GmPM2 and GmPM8 are illustrated. The accessions and their labelings are the same as those in Fig. 1. Numbers on the left indicate the apparent molecular weights of specific polypeptides.

G. canescens 的兩個搜集系則出現差異，Can003 只有一條 19.7 kDa 的條帶，而 Can007 另外多出一條 22 kDa 的條帶。在 *G. tomentella* 的搜集系這個部分，為了要與前人研究的同功酶群做比較，因此將所使用的搜集系再細分為不同同功酶群進行結果描述，其中 D1 同功酶群 Tom055 只有一條 20 kDa 的條帶。D3、D4、T1、T2、T3 同功酶群搜集系均只有兩條條帶，D3 同功酶群 Tom049、062、063，分子量為 20 與 19.5 kDa。D4 同功酶群 Tom052，分子量為 20 與 19.8 kDa。而 T1 同功酶群 Tom054，分子量為 20 與 19.5 kDa。臺灣東部的 Tom038、039 與澳洲昆士蘭的 Tom019、056、058、059 及 060 共七個搜集系屬於 T2 同功酶群，分子量為 20 與 19.6 kDa。T3 同功酶群 Tom061，分子量為 20 與 19.5 kDa。至於 T4 同功酶群包括七個臺灣的 *G. tomentella* 搜集系如 Tom029、034、037、045、046、047 與 048，分佈於屏東、臺中與金門，以及一個菲律賓搜集系 Tom053，具有四條條帶，分子量為 22、21.7、20 與 19.5 kDa。

在 GmPM2 方面，*Soja* 亞屬物種雖然同為 GG 基因組，且都有兩條條帶，但是條帶分子量已顯示明顯差異。*G. max* 為 63.5 與 56 kDa，三個臺灣的 *G. soja* 為 63 與 59 kDa，兩個國外的 *G. soja* 也不同，南韓的 Soj039 為 63 與 55 kDa，大陸的 Soj043 為 66.5 與 57 kDa。本實驗室利用這樣的條帶差異作為鑑定 Max X Soj001 雜交 F1 子代的分子標誌。*G. tabacina* 有三條條帶，分子量為 66.5、57 與 54 kDa。*G. latifolia* 只有一條條帶，分子量為 61 kDa。*G. canescens* 的兩個搜集系都有兩條，但是分子量出現差異，Can003 為 66.5 與 59 kDa 的條帶，而 Can007 為 65 與 57 kDa。*G. tomentella* 方面，D1 同功酶群 Tom055 有三條條帶，分別為 63.5、61.8 與 59.5 kDa。而 D3、D4 同功酶群搜集系均只有兩條條帶，然而 D3 又細分 D3A 與 D3B，Tom049 屬於 D3A，Tom062 與 Tom063 屬

於 D3B，在此處其分子量的差異也反映出這個分群，Tom049 的分子量為 62 與 59.5 kDa，Tom062 與 063 的分子量為 61.8 與 59.5 kDa。而 D4 的 Tom052 為 66.5 與 54 kDa。至於 T1 與 T2 均有四條，T1 的大小分別是 62、61.8、59.5 與 59.3 kDa。T2 的大小則為 66.5、63.5、59.5 與 54 kDa。而 T3 與 T4 條帶數目與大小都相同，均有三條，分子量為 63.5、62 與 59.5 kDa。

在 GmPM4 方面，只有 *G. tabacina* 具有兩條條帶，大小分別為 65.5 與 63.5 kDa，其他搜集系均只有一條，分子量也相當，約為 65 kDa。GmPM4 是一種與 biotin 結合的蛋白，功能可能是提供 biotin 以供種子發芽後幼苗生長之用(Hsing *et al.* 1998)。

在 GmPM5 方面，在種子蛋白萃取液含有 β -mercaptoethanol 時，栽培種子在 SDS-PAGE 膠片中可以看到兩條大小不同的 GmPM5 條帶，分別為 41 與 26 kDa，41 kDa 是 GmPM5 實際的大小，26 kDa 是其部分多肽。本實驗室製備此一抗體時，切取 26 kDa 條帶作為抗原，故在西方轉漬墨點的結果，所有的野生種搜集系大小兩條條帶均能檢測出來，且分子量均為 41 與 26 kDa，除了 *G. latifolia* 為 40 與 25.7 kDa。在 Fig. 2 中，GmPM5 西方式轉漬墨點的結果只顯示分子量 41 kDa 的條帶。

在 GmPM8 方面，*Soja* 亞屬物種也同 GmPM2 蛋白一般呈現顯著差異，Max 與 Soj043 有相同的條帶數與大小，兩條條帶大小為 50 與 47 kDa。Soj001、010、022 與 Soj039 則各為一條，分子量分別為 47.5 kDa 及 51 kDa。*G. tabacina* 有三條條帶，分子量為 50.5、47.5 與 43 kDa。*G. latifolia* 有兩條條帶，分子量分別為 52.5 與 48 kDa。*G. canescens* 的兩個搜集系都有兩條，但是其中一條分子量出現差異，Can003 為 49 與 45 kDa 的條帶，而 Can007 為 49 與 44 kDa。*G. tomentella* 方面，D1 同功酶群(Tom055)有三條條帶，分別為 49.5、47.5 與 43.5 kDa。

而 D3、同功酶群有兩條條帶，在此處 D3A 與 D3B 也出現差別，D3A 的分子量為 53 與 50 kDa，D3B 的分子量為 53.5 與 50.5 kDa。D4 的 Tom052 只有一條 51 kDa 大小的條帶。至於 T1、T2 與 T4 均有三條，T1 的大小分別是 53、47.5 與 42.5 kDa。T2 的大小則為 52、50.5 與 43 kDa。而 T4 的大小為 52.5、50 與 45.5 kDa。T3 則有四條，大小分別為 52、49.5、47.5 與 43 kDa。

在 GmPM16 方面, *Soja* 亞屬物種條帶一致，僅呈現一條分子量 14.4 kDa 的條帶，然而根據本實驗室所獲得的 GmPM 殖系資料中，得知 GmPM29 與 GmPM16 序列相近，因此在栽培種理論上會有兩條條帶，可能是因為兩者只差幾個胺基酸，導致分子量差異不顯著而無法以電泳方式分辨。*G. tabacina* 有三條條帶，分子量為 14.6、14.4 與 13.7 kDa。*G. latifolia* 只有一條條帶，分子量為 14.5 kDa。*G. canescens* 的兩個搜集系則出現差異，Can007 只有一條 14.5 kDa 的條帶，而 Can003 另外多出一條 15 kDa 的條帶。*G. tomentella* 方面，D1 與 D3 同功酶群均只有一條條帶，D1 與 D3B 相同，大小為 14.5 kDa，D3A 則略小，為 14.4 kDa。D4 有兩條，大小為 14.6 與 14.3 kDa。至於 T1、T2 與 T4 均有兩條，T1 的大小分別是 14.6 與 14.3 kDa。T2 的大小則為 14.6 與 14.4 kDa。而 T4 的大小為 14.4 與 14.2 kDa。T3 則只有一條，大小為 14.5 kDa。

在 GmPM28 方面, *Soja* 亞屬物種一致，均僅一條，其分子量為 14.8 kDa。*G. tabacina* 也只有一條條帶，大小為 13.2 kDa。*G. latifolia* 和 *G. canescens* 三個搜集系 (Lat、Can003 與 Can007) 均只有一條條帶，但是分子量分別為 13.4、13.2 與 12.8 kDa。*G. tomentella* 方面，除了 T4 同功酶群有兩條條帶外，其他同功酶群都是一條，分子量為 13.2 kDa，除了 D1 的 Tom055 為 12.8 kDa，而 T4 多出的那一條，分子量為 13.8 kDa。

在 MP130 方面，四倍體 T1 與 T2 同功酶

群的 *G. tomentella* 搜集系以及 *G. latifolia* (Lat) 有兩條條帶，即 T1 為 118 與 115 kDa。Lat 為 117 與 110 kDa。其餘搜集系均為一條條帶。其中 *Soja* 亞屬物種約為 130 kDa，剩餘的搜集系則約為 120 kDa。然而即使同為 T2 同功酶群，分佈在臺灣東部與澳洲昆士蘭的搜集系也存在細微差異，其分子量分別是 114 kDa、112 kDa 與 115 kDa、112 kDa，其中一條條帶分子量相差 1 kDa。

在 glycinin 方面, *Soja* 亞屬物種具一條分子量為 31.5 kDa 的條帶，*G. tabacina* 及 *G. latifolia* 的單一條帶分子量為 31 kDa，而 *G. canescens* 中的 Can003 與 Can007 條帶數不同，前者為一條 31.5 kDa 條帶，後者兩條條帶分子量則為 32.5 kDa 與 30.5 kDa。整個 *G. tomentella* 物種複合群，除了 Tom054 有三條條帶外，不論染色體倍數性，均為兩條條帶，且其中除了 Tom062、063 之外，所有的分子量均為 32.5 kDa 與 31 kDa。

在 *G. tomentella* 物種複合群中，以九個種子蛋白進行分群，可將所使用的 22 個 *G. tomentella* 搜集系分成七群 (Table 4，只列其中三種種子成熟蛋白 GmPM1、2、8 的結果)，每一群具有各自獨特的條帶，在變異大的三個種子成熟蛋白 GmPM1、2 及 8 的條帶型式中，尤其明顯。分群的效果也與先前利用同功酶所做的分群 (D1-D5，T1-T7) 效果一致，例如第一群相當於 T4 同功酶群，第二群相當於 T2 同功酶群，第三與第四分別是 T3 與 T1 同功酶群，而第五到第七群則分別是 D3、D4 與 D1 同功酶群 (Table 4, Kollipara et al. 1993, 1994)。其中臺灣的兩群 *G. tomentella*，蔓生纏繞長莢種 (Tom038、039) 及匍匐短莢種 (Tom029、034、037、045 等) 分別屬於 T2 及 T4 同功酶群，亦即 *G. dolichocarpa* 是屬於 *G. tomentella* 物種複合群中的 T2 同功酶群。屬於物種複合群中的相同同功酶群的搜集系，在意義上等同於同一物種，但是仍然可以觀察到不同的搜集系有差異產生，例如 T4 的 Tom037 在 GmPM8 有一

條條帶分子量由 52.5 kDa 變成 51 kDa，T2 的 Tom058 在 GmPM2 有一條條帶分子量由 63.5 kDa 變成 62 kDa，這樣的差異顯示在 T4 與 T2 內出現不同的生態種 (ecotype)。

影響蛋白條帶泳動的因素有很多，本試驗中所觀察的種子蛋白基因，有些基因產物是由兩個或兩個以上多生肽以雙硫鍵連接所構成，因此當種子蛋白萃取液中含有 β -mercaptoethanol 時，可觀察到的是分離的多生肽，由於同一亞屬的搜集系有近似的多生肽，以致於電泳分離出的條帶型式相當。為了觀察未被打斷雙硫鍵前蛋白結構的關係，我們亦利用不含 β -mercaptoethanol 的種子蛋白萃取液進行蛋白抽取，所得到的電泳圖譜顯示如 Fig. 4。當進一步利用西方墨點轉漬法分析，可發現 GmPM5 與 glycinin 的條帶泳動會受到 β -mercaptoethanol 添加的影響

(Fig. 5 及 Fig. 6)，而 GmPM1、GmPM2、GmPM8、GmPM16 與 MP130 則不受影響 (資料略)。

討論

種子蛋白對於植物的繁衍極為重要，儲存性蛋白包括 glycinin 提供種子萌芽發育所需氮源，而成熟蛋白 GmPM4 提供 biotin 以供種子發芽後幼苗生長之用 (Hsing *et al.* 1998)。屬於 LEA group 3 的 GmPM2、GmPM8，以及屬於 LEA group 4 的 GmPM1、16 及 28 分別在胺基酸序列上有特殊的結構，被認為可以在胚發育後期時扮演重要功能 (Hsing *et al.* 1995 b, Shih *et al.* 2004)。因此這些種子蛋白基因在大豆屬物種的演化中一直保留著。

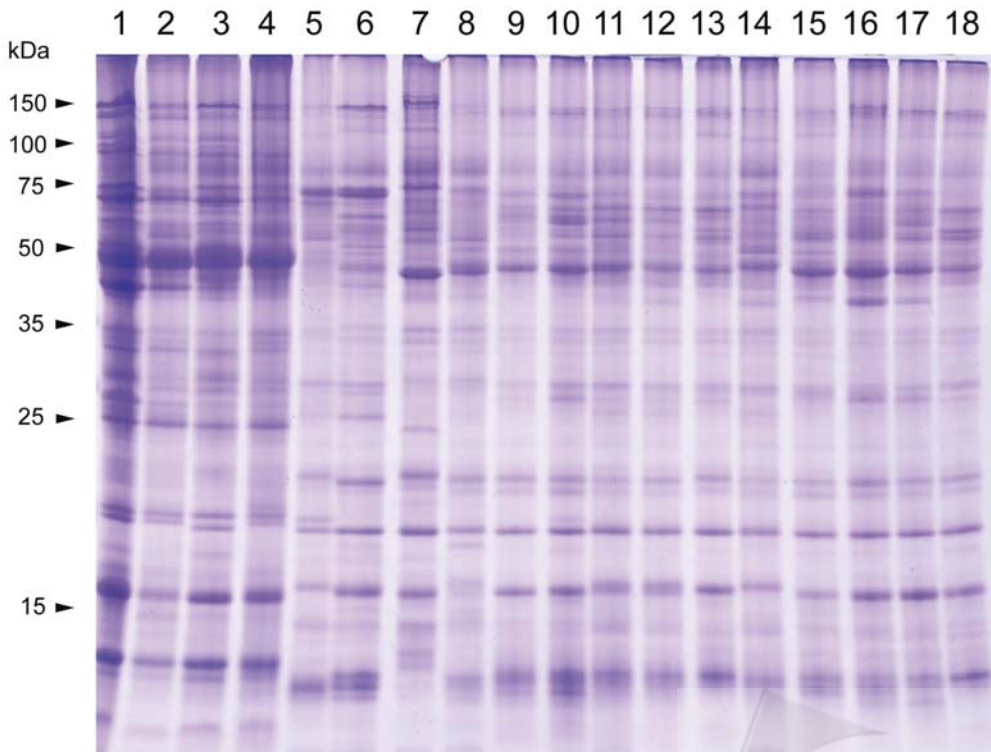


Fig. 4. SDS-PAGE of total soluble seed proteins of various *Glycine* species (not contained mercaptoethanol). The accessions and their labelings are the same as those in Fig. 1.

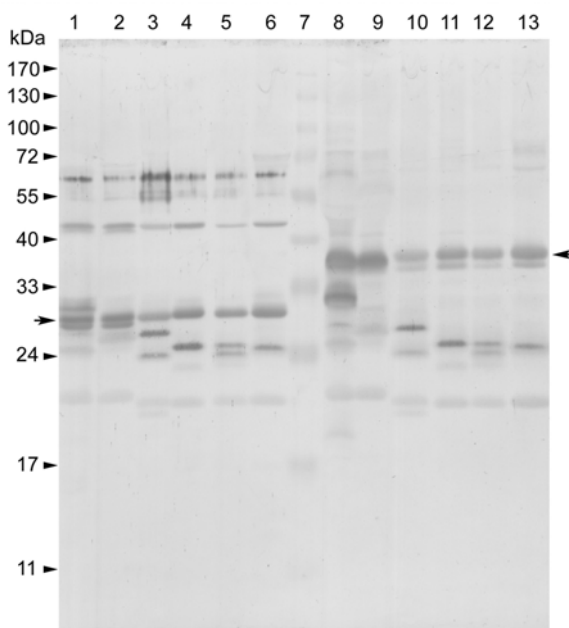


Fig. 5. Immunostaining after SDS-PAGE of soybean seed proteins recognized by GmPM5 antibody. Proteins were prepared from 1 and 8 *G. max* Shi-shi; 2 and 9 Soj001; 3 and 10 Tab004; 4 and 11 Tom029; 5 and 12 Tom039 ; 6 and 13 Can007; 7. Protein markers . Lane 1~6 are extracted with β -mercaptoethanol in Laemmli protein solubilization buffer. Lane 8~13 are without β -mercaptoethanol. Arrow-heads indicate molecular markers in kDa. Arrows indicate the difference between these two treatments.

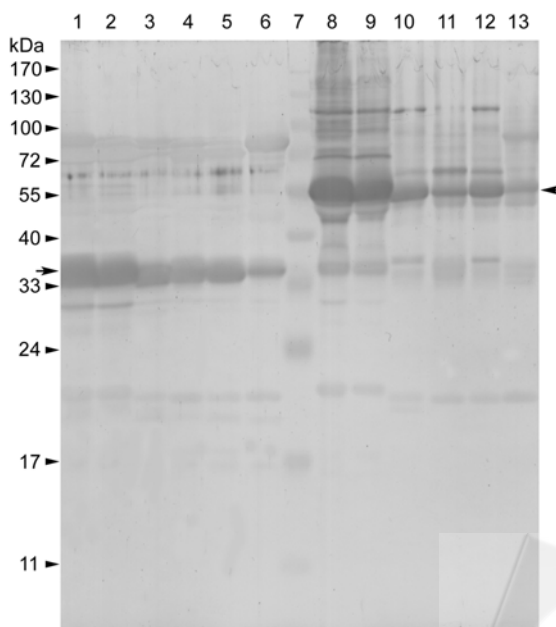


Fig. 6. Immunostaining after SDS-PAGE of soybean seed proteins recognized by glycinin antibody. The accessions and their labelings are the same as those in Figure 5.

大豆屬物種一如其他被子植物，在演化的過程中會朝向多倍體發展，因此在幾乎都是二倍體物種所組成的 *Glycine* 亞屬中，就有二倍體與四倍體遺傳組成並行的物種的存在，如 *G. tabacina* 及 *G. tomentella* 的例子就是 (Hymowitz *et al.* 1990)。而多倍體化替 *G. tabacina* 及 *G. tomentella* 所帶來的好處明顯可見，也就是它們能夠從澳洲這塊起源地散播出去，散播範圍廣及西太平洋上小島及東亞島弧包括臺灣及琉球。這可能是因為由二倍體經雜交形成四倍體時基因組成倍增，而四倍體較二倍體多出的基因組成經過演化發展出新的功能，或是用於另一份基因功能受損時予以遞補或修復，所以比原先的二倍體具有更強的適應力，當其被候鳥攜帶到新環境後有更多的機會存活下來 (Hymowitz *et al.* 1990)。

異源多倍體由雜交並經染色體加倍而形成，理論上其遺傳組成由兩貢獻親加成，因此基因個數或倍數會隨之增加或變動，在本試驗中，的確在 *G. tomentella* 這個物種複合群中的看到這樣的現象。在 GmPM1、GmPM2 與 GmPM8 這三個種子成熟蛋白基因的表現，可以看到四倍體的條帶數目的確比二倍體的條帶數目多 (Table 2 與 Table 3)。

在 DDEE (Tom054) 中，GmPM1、2、8 蛋白的條帶數目都多於或等於兩個可能的二倍體親本 DD (Tom049) 與 EE (Tom055) (Table 3)，若是依照種子蛋白具有累加性的說法 (Ladizinsky and Hymowitz 1979)，在 GmPM1 蛋白，Tom049 的兩條條帶為 20 kDa、19.5 kDa，Tom055 為 20 kDa，理論上 Tom054 會出現為 20 kDa 與 19.5 kDa 的兩條條帶，而 Tom054 也的確如此 (Table 2)。在 GmPM2 蛋白，Tom054 呈現的是 62 kDa、61.8 kDa、59.5 kDa、59.3 kDa 四條條帶，少掉 63.5 kDa 以及多了 59.3 kDa (Table 2)。在 GmPM8 蛋白，Tom054 只有 53 kDa、47.5 kDa、42.5 kDa 三條，少了 50 kDa、49.5 kDa、43.5 kDa，而多了 42.5 kDa (Table 2)。

在 GmPM2 及 GmPM8 蛋白的表現可以觀察到，某些蛋白在單一或兩個二倍體親本有，卻在四倍體子代中缺乏；同時有些二倍體親本沒有的蛋白會在四倍體子代中表現，亦即存在基因產物的缺失以及額外多出的現象。基因產物的缺失可能是由基因丟失 (gene loss) 或是基因表現抑制 (gene silencing) 所造成，其中甲基化可能參與基因表現抑制的調控；而基因產物額外多出可能與反轉錄跳躍子相關，這樣的例子在研究新合成的四倍體小麥的 transcriptome 的例子中也可以窺見 (Kashkush *et al.* 2002)，在其研究結果中有 60 個轉錄產物 (transcripts) 只在單一或兩個二倍體親本中表現，而在新合成的四倍體中缺失，也觀察到數個全新的基因轉錄產物在新合成的四倍體表達。當然也可能是由於兩個二倍體貢獻親經過雜交，形成異元多倍體 (allopolyploid) 後經歷長期的演化，發展出不同的對偶基因 (allele)，真正參與的機制難以斷定，但是可以推測這些改變與新種的形成有密切關係。

同樣的在 DDD_3D_3 (Tom056) 中，GmPM1、2、8 蛋白的條帶數目也都多於或等於兩個可能的二倍體親本 DD (Tom049) 與 D_3D_3 (Tom052) (Table 3)。觀察分子量的變化，在 GmPM1 蛋白，Tom049 的兩條條帶為 20 kDa、19.5 kDa，Tom052 的兩條條帶為 20 kDa 與 19.8 kDa，略有不同，而 Tom056 為 20 kDa 與 19.6 kDa，在兩個貢獻親條帶分子量相近的情形下，後代也呈現近似的條帶 (Table 2)。在 GmPM2 蛋白，Tom056 呈現 66.5 kDa、63.5 kDa、59.5 kDa、54 kDa 四條，只差在 62 kDa 變成 63.5 kDa (Table 2)，這個現象高度符合 Doyle *et al.* (2002) 由 Histone H3-D 序列所推斷的結果---T2 同功酶群物種 (基因組 DDD_3D_3) 由 D_3 與 D_4 同功酶群物種 (基因組分別是 DD 與 D_3D_3) 雜交演化得到。在 GmPM8 蛋白，Tom049 有 53 kDa 與 50 kDa 兩條，Tom052 只有 51 kDa 一條，而 Tom056 則為 52 kDa、50.5 kDa 與

43 kDa 三條 (Table 2), 這樣的非一致性原因可能與 DDEE 基因組不一致的原因相同。

在 DDD_1D_1 與 DD 基因組的比較中, 亦即 T4 與 D3 同功酶群的比較, 可以發現在 GmPM1、2、4、5、16、28 及 glycinin 蛋白, D3 所具有的蛋白條帶在 T4 都完全可以找到, 而在 GmPM8, D3 的 53 kDa 條帶可能在 T4 的演化中變成 52.5 kDa, 同樣的, 在 MP130, D3 的 115 kDa 轉變成 T4 的 114 kDa。

在 DDD_2D_2 與 DD 基因組的比較中, 亦即 T3 與 D3 同功酶群的比較, 可以發現在 GmPM1、2、4、5、16、28、MP130 及 glycinin 蛋白, D3 所具有的蛋白條帶在 T3 都完全可以找到, 而在 GmPM8, D3 的 53 與 50 kDa 條帶可能在 T4 的演化中變成 52 與 49 kDa。

當我們從一、條帶數目改變、二、條帶分子量改變及三、條帶粗細改變三方面對種子蛋白圖譜的差異加以探討, 可以發現:

在條帶數目改變方面: 一年生 *Soja* 亞屬物種比多年生 *Glycine* 亞屬物種多了 glycinin A3 此單位 (Fig. 1, 約 42 kDa 處), 這與 Staswick *et al.* (1983) 的結果相同。Staswick *et al.* 以 SDS-PAGE 來分析數種大豆野生種的種子鹽溶性蛋白, 7S 與 11S 的儲存性蛋白的條帶圖譜在數量與相對泳動率, 每個物種均大不相同。其中 42 kDa 的 A3 subunit 只有在 *Soja* 亞屬物種可觀察到, *Glycine* 亞屬缺少此一蛋白。同時在 GmPM1 蛋白, *Soja* 亞屬也比 *Glycine* 亞屬多出 18 kDa 左右的條帶 (Fig. 3)。而 Can007 比其他搜集系在 150 kDa 處多出一條條帶 (Fig. 1)。Lat 在 GmPM28 蛋白也較其他 *Glycine* 亞屬物種多出一條條帶 (圖 2, lane 7)。除此之外, 一如先前討論的除了 *G. canescens* 與 *G. latifolia* 不計, 大致上多倍體物種的條帶數目比二倍體物種多, 而條帶數目不是二倍體的整倍數, 可能是基因靜默化 (gene silencing) 或是由於重複的基因發生基因座間的重組、gene conversion 或趨同演化所造成 (Wendel 2000)。

在條帶分子量改變方面: 又可分成對偶

基因 (allele) 所產生的改變, 以及蛋白結構所造成的改變。關於前者, 在我們所獲得的四十一個栽培種大豆 GmPM 蛋白殖系, 以 GCG 分析軟體分析比較後得知, 有幾組殖系是其他殖系在演化過程發生改變所造成的, 例如 GmPM9 比 GmPM1 少掉 23 個胺基酸, 且另有 6 個胺基酸發生改變; GmPM10 則比 GmPM8 多了 15 個胺基酸, 但是另外有 38 個胺基酸發生改變; GmPM29 只比 GmPM16 少了兩個胺基酸, 另外有 11 個胺基酸發生改變。而這些缺失改變直接反映在 SDS-PAGE 圖譜上 (十石) (Fig. 3)。另外, 一年生物種 *G. soja* 變化大致與 *G. max* 相同, 但是這些 GmPM 基因在野生種變化更大, 產生多種對偶基因 (Chung 2000, Chen 2005)。關於 GmPM1 基因的改變本實驗室已經完成深入的研究 (Chung 2000), 目前正持續進行 GmPM16 及 GmPM28 基因改變的相關研究; 關於蛋白結構所引起的條帶分子變化, glycinin 就是其例, 它的分子量為 350kDa, 由六個不同的次單位組成, 而每一個次單位又是由一個酸性及一個鹼性多肽以一個雙硫鍵連結起來所構成 (Badley *et al.* 1975)。酸性與鹼性多肽的分子量分別大約為 36~40 kDa 與 18~20 kDa (Riblett *et al.* 2001)。因此我們在 Fig. 1 SDS-PAGE 看到的 glycinin 是其酸性與鹼性多肽, 而在 Fig. 4 看到的是完整的次單位或是次單位間結合的情形。

在條帶粗細改變方面, 可能是蛋白表現量增減, 實驗結果明顯顯示 *Soja* 亞屬儲存性蛋白的含量遠高於 *Glycine* 亞屬。在 GmPM16 蛋白, *Soja* 亞屬的含量也比 *Glycine* 亞屬物種多且其分子量也較大, 然而在 GmPM28 蛋白, 則有相反的現象, 反而是 *Glycine* 亞屬表現較多 (Fig. 2), 這個現象的原因可能是因為這兩個基因均是屬於 *Lea 4* 基因群, 存在重複 (redundance) 的效果, 一個基因表現量多, 另一個基因的表現量就少。此外 GmPM5 蛋白的表現, 四倍體的搜集系如 Tom056 表現量跟二倍體 Tom049 相當, 這可能是劑量補

償 (dosage compensation) 效應所致，即使基因拷貝數多，比現出來的蛋白量還是維持一致 (Fig. 2, lane 12 與 13)。

將本試驗中所獲致的蛋白條帶型式予以歸類，發現特別是在物種複合群 (*G. tomentella*) 的結果中，以九個種子蛋白抗體免疫分析進行分群的結果與前人利用同功酶所做的分群一致 (Table 4)，顯示本次實驗所使用的種子蛋白抗體，特別是種子成熟蛋白抗體是一項進行辨認大豆屬物種的有利工具。因此它的利用性在於：我們在野外採集到一個新的搜集系，因有限外表型條件下不易分辨其是否為大豆屬物種，但以一粒種子就能利用此粒種子萃取出蛋白進行蛋白電泳，再由電泳得到的圖譜與已知的大豆屬物種電泳圖譜比較，便能清楚分辨這個物種是否屬

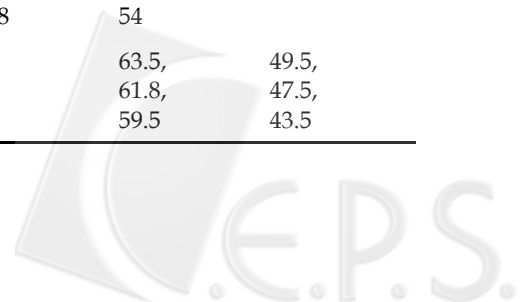
於大豆屬，或者其是大豆屬中的哪一個特定物種。

引用文獻

- Badley RA, D Atkinson, H Hanser, C Odani, JP Green, JM Stubbs (1975) The structure, physical and chemical properties of the soybean protein glycinin. **Biochim. Biophys. Acta.** 412: 214-228.
- Brown AHD, JE Grant, JJ Brudon, JP Grace (1984) Wild perennial *Glycine* species as genetic resources for soybean improvement. **Soybean Genet. Newsl.** 11: 17-19.
- Chen JJ (2005) Study on phylogenetic and molecular relationship in the genus *Glycine*, using group 4 *Lea* gene family. Master thesis. National Taiwan University. Graduate institute of Agronomy. Taipei, Taiwan.

Table 4. Member of the *G. tomentella* species as grouped by seed protein patterns.

Group	Accessions	Isozyme group	genome	GmPM1	GmPM2	GmPM8
1	Tom029, Tom034, Tom037, Tom045, Tom046, Tom047, Tom048, Tom053	T4	DDD ₁ D ₁	22, 21.7, 20, 19.5	63.5, 62, 59.5	52.5, 50, 45.5
2	Tom019, Tom038, Tom039, Tom056, Tom058, Tom059, Tom060	T2	DDD ₃ D ₃	20, 19.6	66.5, 63.5, 59.5, 54	52, 50.5, 43
3	Tom061	T3	DDD ₂ D ₂	20, 19.5	63.5, 62, 59.5	52, 49.5, 47.5, 43
4	Tom054	T1	DDEE	20, 19.5	62, 61.8, 59.5, 59.3	53, 47.5, 42.5
5	Tom049, Tom062, Tom063	D3	DD	20, 19.5	62, 59.5	53, 50
6	Tom052	D4	D ₃ D ₃	20, 19.8	66.5, 54	51
7	Tom055	D1	EE	20	63.5, 61.8, 59.5	49.5, 47.5, 43.5



- Chung CI (2000) Study on phylogenetic and molecular relationships between *Glycine dolichocarpa* and other species in the genus *Glycine*, using LEA *GmPM1/9* as a marker. Master thesis. National Taiwan University. Graduate institute of Agronomy. Taipei, Taiwan.
- Doyle JJ, JL Doyle, AHD Brown, RG Palmer (2002) Genomes, multiple origins, and lineage recombination in the *Glycine tomentella* (Leguminosae) polyploidy complex: Histone H3-D gene sequences. **Evolution** 56: 1388-1402.
- Doyle JJ, JL Doyle, JT Rauscher, AHD Brown (2003) Diploid and polyploidy reticulate evolution throughout the history of the perennial soybeans (*Glycine* subgenus *Glycine*). **New Phytologist** 161: 121-132.
- Doyle MJ, AHD Brown (1985) Numerical analysis of isozyme variation in *Glycine tomentella*. **Biochem. Syst. Ecol.** 13: 413-419.
- Doyle MJ, JE Grant, AHD Brown (1986) Reproductive isolation between isozyme group of *Glycine tomentella* (Leguminosae), and spontaneous doubling in their hybrids. **Aust. J. Bot.** 34: 523-535.
- Galau GA, DW Hughes, L Dure III (1986) Abscisic acid induction of cloned cotton late embryogenesis-abundant (*Lea*) mRNA. **Plant Mol. Biol.** 7: 155-170.
- Gayler KR, GE Sykes (1985) Effects of nutritional stress on the storage proteins of soybeans. **Plant Physiol.** 78: 582-585.
- Gibbs RD (1963) In: Chemical Plant Taxonomy. T Swain (ed.) p. 41-88. Academic Press, London and New York.
- Grant JE, AHD Brown, JP Grace (1984) Cytological and isozyme diversity in *Glycine tomentella* Hayata (Leguminosae). **Aust. J. Bot.** 32: 665-677.
- Hill JE, RW Breidenbach (1974) Proteins of soybean seed. II. Accumulation of the major protein components during seed development and maturation. **Plant Physiol.** 53: 747-751.
- Hsieh JS, KL Hsieh, YC Tsai, YI Hsing (2001) Each species of *Glycine* collected in Taiwan has a unique seed protein pattern. **Euphytica** 118: 67-73.
- Hsing YI, RW Rinne, AG Hepburn, RE Zielinski (1990) Expression of maturation-specific genes in soybean seeds. **Crop Sci.** 30: 1343-1350.
- Hsing YIC, SJ Wu (1992) Cloning and characterization of cDNA clones encoding soybean seed maturation polypeptides. **Bot. Bull. Acad. Sin.** 33:191-199.
- Hsing YIC, KL Hsieh, YC Huang, JS Hsieh (1995a) The relationships of cultivated soybeans and their wild relatives collected from Taiwan: revealed by seed proteins. **Bot. Bull. Acad. Sin.** 36:65-72.
- Hsing YIC, ZY Chen, MD Shih, JS Hsieh, TY Chow (1995b) Unusual sequence of group 3 LEA mRNA inducible by maturation or drying in soybean seeds. **Plant Mol. Biol.** 29: 863-868.
- Hsing YIC, CH Tsou, TF Hsu, ZY Chen, KL Hsieh, JS Hsieh, TY Chow (1998) Tissue- and stage-specific expression of a soybean (*Glycine max* L.) seed- maturation, biotinylated protein. **Plant Mol. Biol.** 29: 1-10.
- Hymowitz T, CA Newell (1981) Taxonomy of the genus *Glycine*, domestication and uses of soybeans. **Econ. Bot.** 35:272-288.
- Hymowitz T, RJ Singh, RP Larkin (1990) Long-distance dispersal: The case for the allopolyploids *Glycine tabacina* (Labill.) Benth. and *G. tomentella* Hayata in the westcentral pacific. **Micronesica** 23: 5-13.
- Kashkush K, M Feldman, AA Levy (2002) Gene loss, silencing and activation in a newly synthesized wheat allotetraploid. **Genetics** 160: 1651-1659.
- Kollipara KP, RJ Singh, T Hymowitz (1993) Genomic diversity in aneuploid ($2n = 38$) and diploid ($2n = 40$) *Glycine tomentella* revealed by cytogenetic and biochemical methods. **Genome** 36: 391-396.
- Kollipara KP, RJ Singh, T Hymowitz (1994) Genomic diversity and multiple origins of tetraploid ($2n = 78, 80$) *Glycine tomentella*. **Genome** 37: 448-459.
- Ladizinsky G, T Hymowitz (1979) Seed protein electrophoresis in taxonomic and evolutionary studies. **Theor. Appl. Genet.** 54: 145-151.

- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature** 227:680-685.
- Ohashi H, Y Tateishi, T Nemoto, H Hoshi (1991) Taxonomic studies on the Leguminosae of Taiwan IV. **Sci. Rep. Tohoku. Univ. 4th ser. (Biol.)** 40: 1-37.
- Rauscher JT, JJ Doyle, AHD Brown (2002) Internal transcribed spacer repeat-specific primers and the analysis of hybridization in the *Glycine tomentella* (Leguminosae) polyploidy complex. **Mol. Ecol.** 11: 2691-2702.
- Rauscher JT, JJ Doyle, AHD Brown (2004) Multiple origins and nrDNA internal transcribed spacer homeologue evolution in the *Glycine tomentella* (Leguminosae) allopolyploid complex. **Genetics** 166: 987-998.
- Riblett AL, TJ Herald, KA Schmidt, KA Tilley (2001) Characterization of β -conglycinin and glycinin soy protein fractions from four selected soybean genotypes. **J. Agric. Food Chem.** 49: 4983-4989.
- Rosenberg LA, RW Rinne (1988) Protein synthesis during natural and precocious soybean seed (*Glycine max* (L.) Merr.) maturation. **Plant Physiol.** 87: 474-478.
- Shih MD, SC Lin, JS Hsieh, CH Tsou, TY Chow, TP Lin, YIC Hsing (2004) Gene cloning and characterization of a soybean (*Glycine max* L.) LEA protein, GmPM16. **Plant Mol. Biol.** 56:689-703.
- Singh RJ, T Hymowitz (1985) The genomic relationships among six wild perennial species of the genus *Glycine* subgenus *Glycine* Willd. **Theor. Appl. Genet.** 71: 221-230.
- Singh RJ, KP Kollipara, T Hymowitz (1988) Further data on the genomic relationships among wild perennial species ($2n = 40$) of the genus *Glycine* Willd. **Genome** 30: 166-176.
- Singh RJ, KP Kollipara, T Hymowitz (1992) Genomic relationships among diploid wild perennial species of the genus *Glycine* Willd. subgenus *Glycine* revealed by crossability, meiotic chromosome pairing and seed protein electrophoresis. **Theor. Appl. Genet.** 85: 276-282.
- Staswick PE, P Brove, NC Nielsen (1983) Glycinin composition of several wild soybean species. **Plant Physiol.** 72: 1114-1118.
- Stegemann H (1975) *In: The Chemistry and Biochemistry of Plant Proteins.* JB Harborne, CR Van Sumere (eds.) p.71-88. Academic Press, London and New York.
- Tateishi Y, H Ohashi (1992) Taxonomic studies on *Glycine* of Taiwan. **J. Jpn. Bot.** 67:127-147.
- Towbin H, T Staehlin, J Gordon (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 76:4350-4354.
- Tsai YC, YIC Hsing, CI Chung, JS Hsieh (2001) Wild soybean and its relatives collected in Taiwan. **Chinese Agron. J.** 11:217-230.
- Wendel JF (2000) Genome evolution in polyploids. **Plant Mol. Biol.** 42: 225-249.