

大豆华夏 3 号突变体库构建及 SSR 分子标记

黄益安, 邓小娟, 万海波, 王 朋, 方小龙, 张 杰, 杨存义*

(广东省植物分子育种重点实验室, 国家大豆改良中心广东分中心, 华南农业大学农学院, 广东 广州, 510640)

摘要: 利用 $^{60}\text{Co}\gamma$ 射线和 EMS 分别对大豆华夏 3 号的种子进行诱变处理, 期望创制一批大豆突变体, 为大豆育种和分子机理研究提供材料。田间种植 670 份 M_4 株系, 调查其主要农艺性状, 并用均匀分布在 20 条染色体上的 82 个 SSR 标记分别对 270 个 M_4 株系进行鉴定。结果表明, 86 个株系叶、茎、花、荚、种子、花期等性状均发生了变异; 270 个株系中有 10 个株系与野生型华夏 3 号存在至少一个 SSR 位点的差异, 其中 M_3-91 、 $M_3-500-24$ 、 EMS_3-23 、 EMS_3-31 材料与野生型有超过 10 个标记的差异, 有 6 个突变体在 Satt513 位点上与野生型存在差异。获得的突变体既可为大豆品种改良提供新的种质资源材料, 也可为大豆功能基因组研究提供基础材料。

关键词: 大豆; 突变体库; SSR 分子标记**中图分类号:** S565.103 **文献标识码:** A **文章编号:** 1007-9084(2016)02-0159-08**Mutagenesis and SSR markers of soybean cultivar Huaxia 3**

HUANG Yi-an, DENG Xiao-juan, WAN Hai-bo,

WANG Peng, FANG Xiao-long, ZHANG Jie, YANG Cun-yi*

(Guangdong Provincial Key Laboratory of Plant Molecular Breeding/ Sub-center of National Soybean Improvement Center/ College of Agriculture, South China Agricultural University, Guangzhou 510640, China)

Abstract: To provide better materials for breeding and functional gene study, mutagenesis was carried out on soybean cultivar Huaxia 3 by ethyl methane sulphonate (EMS) and seed irradiation with ^{60}Co gamma-ray. Phenotypic traits including leaf, stem, flower, seed, pod and flowering-time variations were investigated in M_4 generation. 86 mutants were identified from the population including mutants on leaf (13), stem (30), flower color (4), seed (2), pod (15), and flowering-time (22). 82 pairs of SSR markers were used to screen the genomic difference between wild type and 270 mutants. Among them, 4 mutants (M_3-91 , $M_3-500-24$, EMS_3-23 and EMS_3-31) had more than 10 polymorphic markers. 6 mutants were different to wild type on locus Satt513.

Key words: Soybean; Mutant population; SSR marker

目前狭窄的大豆遗传资源基础已成为限制进一步提高大豆育种水平的因素之一^[1~6]。创制大豆突变体不仅有利于拓宽大豆育种材料的遗传基础, 也可为大豆基因功能研究提供材料^[7,8]。

目前突变体诱变方法主要包括物理诱变、化学诱变和生物诱变。物理诱变主要有 $^{60}\text{Co}\gamma$ 射线、空间诱变、激光诱变和离子束轰击, 最常用的是 $^{60}\text{Co}\gamma$ 射线诱变。利用 $^{60}\text{Co}\gamma$ 射线诱变大豆先后获得了农艺性状突变体^[9]、抗病突变体^[10]、脂肪氧合酶完全缺失的突变体^[11,12]、Kunitz trypsin 抑制酶的突变

体^[11]、蛋白和油份突变体^[13]和植酸突变体^[14]等。化学诱变是利用烷化类、核酸碱基类似物和叠氮化钠等分子结构不太稳定的化学物质做诱变剂, 导致大豆基因组产生点突变, 其中主要引起 G/C→A/T 的突变^[15]。最常用的是烷化类诱变剂 EMS(甲基磺酸乙酯)^[8], 容易形成点突变, 不容易造成染色体畸变、基因失活或部分失活^[16]。谢圣男等^[17]利用 EMS 对大豆绥农 14 的种子进行诱变, 经过 M_2 筛选和鉴定, 获得了叶、茎、花、种子等性状突变体。韩锁义等^[8]利用 EMS 诱变大豆南农 86-4 获得一系列

收稿日期: 2015-10-20

基金项目: 广东省农业科技项目(2013B020301); 国家 973 计划(2012AA101106); 国家自然科学基金(31271745)

作者简介: 黄益安(1987-), 男, 硕士, 研究方向为大豆分子育种, E-mail: 736229552@qq.com

* 通讯作者: 杨存义(1966-), 男, 博士, 副教授, 主要从事植物营养性状遗传学与改良研究, E-mail: ycy@scau.edu.cn

叶、茎、花器官、种子、子叶(3片子叶和子叶折叠)、蛋白含量和匍匐生长等表型变异材料。生物诱变主要是T-DNA插入突变和转座子介导诱变,已知插入元件/转座元件随机插入植物基因组中引起插入位点基因的变化,影响其正常功能造成突变,以此插入元件为标记来分离和克隆该基因^[18-28]。Mathieu等^[29]利用Ds转座子插入产生了一个大豆突变体库,包含雄性不育等性状。Cui等^[30]利用*Tnt1*转座子插入构建大豆转基因系突变体库。

突变体与野生型间的差异主要表现在表型性状、生理生化和DNA水平等方面。目前主要通过正向遗传学和反向遗传学两种策略进行突变体的筛选和利用。正向遗传学在鉴定突变体表型的基础上,建立遗传分析群体定位基因,最后通过图位克隆法确定突变基因^[31]。反向遗传学是先根据DNA序列信息筛选出DNA序列变异的突变体,再观察突变体的表型确定基因的功能,其中Deleteagene主要应用于物理诱变的突变体群体^[32],TILLING技术应用于化学诱变剂诱变的突变体群体^[33]。通过正向遗传学策略已鉴定了大豆成熟期相关的基因*E1*、*E2*、*E3*和*E4*^[34-38];利用反向遗传学策略也成功鉴定了大豆抗异皮线虫基因*LRR-RLK*^[39]。

近年来,已利用不同的诱变手段诱变建立了一些大豆突变体库^[17, 30, 40],然而我国不同地区的气候、土壤和耕作制度差异明显,生产上对大豆品种的要求不同,这些研究所用大豆品种无法适应南方地区特殊的条件,因此有必要根据我国华南地区大豆选育目标建立突变体库。本研究通过⁶⁰Co γ 射线和EMS诱变华南地区高产大豆品种华夏3号,并对获得的突变体进行表型鉴定和SSR分析,以期为大豆育种和基因功能分析创建新的种质资源。

1 材料与方法

1.1 材料

诱变处理的大豆品种华夏3号是华南农业大学和广西农业科学院合作育成的品种。该品种用桂早1号与巴西13号杂交后,采用改良系谱法选育而成。有限结荚习性,平均株高100.7cm,株型收敛,有效分枝4.5个,单株有效荚数平均78.9个。叶卵圆形,白花,棕毛,荚黄色。籽粒椭圆形,种皮黄色,脐浅褐色,百粒重17.5g。属华南夏大豆,晚熟品种,华南地区夏播平均生育期113d。田间综合抗性好,落叶性好,籽粒整齐,不裂荚,但易倒伏。

1.2 诱变处理方式

物理诱变是用辐射剂量为250Gy的⁶⁰Co辐射处

理5kg华夏3号种子。化学诱变是先用纯水浸种3.5kg华夏3号种子约4h,然后用40mmol·L⁻¹EMS浸泡8h,之后用流水冲洗多次,风干后马上播种。

1.3 播种与收获

2005年7月在华南农业大学增城科研基地播种⁶⁰Co处理的种子和EMS处理的种子。种子按行播种,行长1.5m,行距50cm,株距10cm,每隔20行种华夏3号作对照。当年11月根据田间性状收获单株1150株,其余混收。随后在2006年7月和2007年7月分别将上年入选的单株种成株系,而混收种子按区播种,收获季节分别在株系和混播区继续根据田间性状选单株。2007年秋季收获的M₄种子按单株保存在冷库中。

2013年7月根据多年的调查数据,从M₄中选取了670个株系(其中562株系来自⁶⁰Co处理、108株系来自EMS处理),每个株系种2行区(1.2m株行、株距5cm),重复3次。从出苗后每7d就进行一次田间性状调查,对比华夏3号发现表型差异较大的突变体,收获时根据株系的表现单株或混收突变株种子。

1.4 表型性状调查

以华夏3号为参照,记录叶形、叶色、株高、花色、种子颜色、荚型、花期和成熟期等性状,表型与华夏3号差异明显的做为突变体,其中在成熟期株高只有华夏3号一半的系为矮化突变体;开花时间比华夏3号早或晚7d以上的系确定为早花或晚花突变体。

1.5 部分突变系农艺性状的调查

根据田间调查的数据,从670个株系中选取29个性状明显变异和综合性状优良突变系的花期、株高、节数、分枝数、荚粒数(三粒荚、二粒荚、一粒荚和秕荚)、百粒重和单株产量,比较主要农艺性状的变异。

1.6 SSR分子检测

依据大豆分子标记遗传(<http://soybase.negr.org/>)选取大豆SSR分子标记,除第11染色体和第13染色体有5个SSR标记外,其他染色体各选择4个标记,共计82对SSR引物。利用这些SSR标记对根据田间观察选取得270份M₄株系(其中⁶⁰Co诱变202份,EMS诱变68份)进行SSR分析。

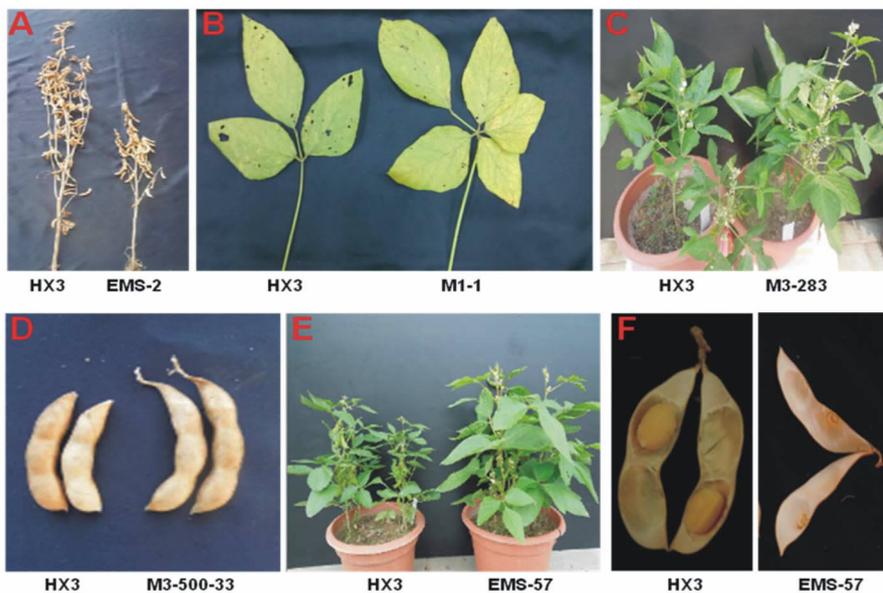
2 结果与分析

2.1 主要形态性状的变异

在不同生育期对670个株系的主要农艺性状进

行了调查,发现其中86个株系在株型、叶片、花色、种子大小、荚大小和花期等方面明显不同于野生型

华夏3号,占M₄株系的12.84%,其中由⁶⁰Co诱变获得的占9.56%,由EMS诱变获得的占3.28%。



注:A:株高突变体;B:五小叶突变体;C:早花突变体;D:大荚突变体;E:晚花突变体;F:秕荚

Note:A:plant height mutant; B:5-leaflet mutant; C:early flowering mutant; D:larger pods mutant; E:lately flowering mutant; F:aborted pods mutant

图1 部分⁶⁰Co和EMS诱变获得突变体与野生型华夏3号的表型比较

Fig. 1 Phenotype of wild-type (HX3) and mutants induced by ⁶⁰Co and EMS

M₄突变系中共有30个株系茎秆表现不同于华夏3号,包括9株高秆植株、20株矮秆植株(图1A)、1株匍匐株,其中⁶⁰Co诱变后代22株系,EMS诱变后代8株系;有13个株系叶片形态不同于野生型,其中4个株系为五出复叶,不同于野生型华夏3号三出复叶(图1B),7个株系呈不同于野生型华夏3号卵圆形的狭长叶,3个株系呈不同于野生型华夏3号的叶背多毛,其中⁶⁰Co诱变后代12株系,EMS诱变后代1株系;22份呈现花期突变,比华夏3号早开花的突变体有7份(图1C),比华夏3号晚开花的突变体15份(图1E),其中⁶⁰Co诱变后代11株系,EMS诱变后代11株系;4个株系表现花色突变,其中两个株系由华夏3号的白花突变为紫花,另2个株系表现紫花和白花分离,其中⁶⁰Co诱变后代3株系,EMS诱变后代1株系。⁶⁰Co诱变后代14个株系的荚长显著比华夏3号长(图1D)。EMS诱变处理的EMS-57株系的秕荚率为50.62%,远高于对照华夏3号13.38%(图1F)。

2.2 部分突变体主要农艺性状的变异

选取29个突变系对其主要农艺性状进一步调查,发现花期、株高、节数、分枝数、荚粒数(三粒荚、二粒荚、一粒荚和秕荚)、百粒重和单株产量等均有不同于华夏3号的变异。

2.2.1 花期 野生型华夏3号花期平均是52.4d,诱变后代花期变化范围为41.40~65.60d,其中早

花突变体EMS-23花期只有41.40d,比野生型早11d;晚花突变体EMS-57花期达65.60d,比野生型晚13.2d(表3)。早花突变体M₃-283综合性状优良,可用于育种。

2.2.2 株高和节数 华夏3号株高104.34cm,诱变后代株高变化范围为60.50~160.84cm,其中矮秆突变体EMS-2株高只有60.50cm,比野生型矮54.15%;高秆突变体M₃-500-24株高达160.84cm,比野生型高42.02%(表1)。华夏3号平均节数为20.80个,诱变后代变化范围为16.60~22.00个,其中突变体M₃-500-①只有16.60个,比野生型少4.20个;突变体M₃-500-24达22.00个,比野生型多1.2个(表1)。

同时比较株高和节数发现,一些矮秆突变体(例如M₃-71、M₃-71-2、M₃-148、M₃-399和EMS-29)节数多于野生型,主要是节间缩短导致株高矮于野生型;另一些矮秆突变体(例如M₃-500-32、EMS-2、EMS-7、EMS-21和EMS₃-31)节数少于野生型,节数少和节间缩短均对株高有贡献。矮秆突变体M₃-7和EMS-21克服了华夏3号易倒伏的弱点,同时兼具丰产性,可直接用于育种。在⁶⁰Co诱变处理中发现1株系表现匍匐生长,这一突变系可用于大豆生长习性的遗传分析。

2.2.3 分枝数 野生型华夏3号平均分枝为9.0个,诱变后代中分枝变异范围4.8~10.4个,其中

EMS-52 的分枝最少,只有 4.8 个,是野生型华夏 3 号的 53.3%,而 $M_3-500-24$ 分枝最多 10.4 个,达野生型华夏 3 号的 115.56% (表 1)。

2.2.4 荚数 野生型华夏 3 号的单株总荚平均为 142.6 个,诱变后代中变异范围 64.2~267.0 个,其中 EMS-52 的单株荚最少,平均只有 63.6 个,只有野生型华夏 3 号的 44.6%,而 M_3-7 单株荚最多,平均达 267.0 个,是野生型华夏 3 号的 187.2% (表 3)。15 个突变系的单株荚数比华夏 3 号有显著的降低,只有 4 个突变系 (M_3-7 、 $M_3-500-24$ 、EMS-21 和 EMS-57) 的单株荚数比华夏 3 号有显著增加 (表 1)。

野生型华夏 3 号单株的三粒荚、二粒荚、一粒荚和秕荚分别是 16.0、81.2、26.4 和 19.0 个,占总荚的比例分别为 11.22%、56.94%、18.51% 和 13.32%;单株荚最多的突变系 M_3-7 的三粒荚、二粒荚、一粒荚和秕荚分别是 22.4、131.4、60.0 和 53.2 个,占总荚的比例分别为 8.39%、49.21%、22.47% 和 19.93%;单株荚最少的 EMS-52 的三粒

荚、二粒荚、一粒荚和秕荚分别是 5.0、23.6、24.0 和 14.0 个,占总荚的比例分别为 7.86%、37.11%、33.03% 和 22.01%。4 个比华夏 3 号有显著增加的突变系中, M_3-7 和 EMS-21 的三粒荚、二粒荚、一粒荚和秕荚占总荚的比例类似于野生型,而 $M_3-500-24$ 三粒荚的比例显著高于野生型,EMS-57 秕荚的比例显著高于野生型 (表 1)。

2.2.5 百粒重 野生型华夏 3 号的百粒重为 15.07 g,诱变后代中百粒重变异范围 6.84~18.68g,其中 $M_3-500-24$ 材料百粒重最小,只有 6.84g,是野生型华夏 3 号的 45.39%,而 EMS-57 材料百粒重最大为 18.68g,是野生型华夏 3 号的 123.95% (表 1)。

2.2.6 单株产量 野生型华夏 3 号的单株产量平均为 35.7g,诱变后代中单株产量变异范围 14.38~64.31g,其中 EMS-52 的单株产量最低,只有 14.38g,只有野生型华夏 3 号的 38.9%,而 M_3-7 单株产量最高,平均达 64.31g,是野生型华夏 3 号的 180.1% (表 1)。

表 1 29 个入选突变系农艺性状的变异

Table 1 Variation of agronomy characteristics among 29 M_3 mutants

突变系 Mutant	开花期 Flowering period/d	株高 Plant height/cm	节数 Nodes	分枝数 Branches	总荚数 Seed pods	三粒荚 3-seed pods	二粒荚 2-seed pods	一粒荚 1-seed pods	秕荚 Aborted pods	百粒重 100-seed weight/g	单株产量 Yield per plant/g
华夏 3 号	52.40 ± 0.24	104.34 ± 1.29	20.80 ± 0.20	9.00 ± 0.32	142.6 ± 6.35	16.00 ± 3.42	81.20 ± 13.56	26.40 ± 5.16	19.00 ± 3.30	15.07 ± 0.12	35.70 ± 4.99
M_3-7	53.00 ± 0.32	69.60 ± 3.38	19.00 ± 0.45	9.00 ± 0.45	267 ± 11.20	22.40 ± 6.92	131.40 ± 17.25	60.00 ± 12.58	53.20 ± 6.56	16.50 ± 0.10	64.31 ± 11.05
M_3-45	54.00 ± 0.32	82.00 ± 1.64	17.20 ± 0.66	7.60 ± 0.40	121.4 ± 2.51	9.40 ± 1.08	83.60 ± 3.44	22.20 ± 3.65	6.20 ± 1.11	15.21 ± 0.10	33.09 ± 0.48
M_3-71	52.60 ± 0.24	78.60 ± 1.57	20.40 ± 0.51	8.20 ± 0.37	185 ± 8.11	16.00 ± 3.82	66.00 ± 11.13	66.80 ± 15.46	36.20 ± 4.61	15.77 ± 0.11	38.88 ± 6.20
M_3-71-2	53.60 ± 0.24	78.34 ± 1.35	21.20 ± 1.24	9.60 ± 0.24	196.2 ± 4.93	12.80 ± 3.15	85.00 ± 2.61	42.40 ± 2.50	56.00 ± 9.03	13.74 ± 0.19	34.45 ± 1.42
M_3-78	53.20 ± 0.20	96.60 ± 5.43	20.60 ± 1.03	8.20 ± 0.58	144 ± 7.87	17.80 ± 4.91	66.80 ± 13.02	39.80 ± 8.00	19.60 ± 5.22	17.32 ± 0.11	39.29 ± 7.62
M_3-105	52.00 ± 0.32	94.04 ± 1.57	20.20 ± 0.86	8.00 ± 0.32	115 ± 4.17	20.00 ± 1.30	63.60 ± 7.20	23.80 ± 5.38	7.60 ± 2.01	17.48 ± 0.13	36.92 ± 4.08
M_3-119	53.40 ± 0.24	81.36 ± 0.90	19.40 ± 0.24	8.20 ± 0.37	86.6 ± 2.06	10.60 ± 1.36	37.00 ± 1.82	24.20 ± 3.40	14.80 ± 1.07	13.92 ± 0.15	18.08 ± 0.53
M_3-148	57.40 ± 0.24	77.56 ± 1.13	22.80 ± 0.49	8.40 ± 0.51	147 ± 9.26	8.80 ± 2.27	69.00 ± 19.32	38.60 ± 9.04	30.60 ± 6.55	11.70 ± 0.11	23.77 ± 5.98
M_3-283	43.60 ± 0.24	98.50 ± 2.18	20.40 ± 0.68	9.60 ± 0.40	150.4 ± 5.52	14.80 ± 0.66	80.00 ± 14.76	38.40 ± 5.01	17.20 ± 1.93	15.18 ± 0.36	36.68 ± 4.83
M_3-399	52.20 ± 0.20	65.92 ± 2.48	21.80 ± 0.37	8.20 ± 0.37	88.6 ± 4.03	13.80 ± 0.80	38.20 ± 6.89	4.80 ± 1.39	31.80 ± 7.07	13.03 ± 0.18	15.91 ± 2.08
$M_3-500-①$	48.60 ± 0.24	91.84 ± 4.07	16.60 ± 0.60	6.80 ± 0.80	66.2 ± 6.23	16.20 ± 3.97	30.60 ± 12.37	14.20 ± 6.78	5.20 ± 2.44	17.19 ± 0.09	21.32 ± 7.05
$M_3-500-24$	52.60 ± 0.24	160.84 ± 2.43	22.00 ± 0.55	10.40 ± 0.24	212 ± 9.01	83.20 ± 15.48	79.20 ± 9.68	25.00 ± 4.94	24.60 ± 6.91	6.84 ± 0.03	29.59 ± 4.70
$M_3-500-32$	52.20 ± 0.20	80.92 ± 2.49	18.60 ± 0.81	6.00 ± 0.55	101.2 ± 4.5.2	23.40 ± 3.88	58.40 ± 9.51	12.00 ± 3.03	7.40 ± 2.11	16.94 ± 0.12	33.65 ± 5.09
$M_3-500-33$	53.40 ± 0.24	77.80 ± 3.98	19.80 ± 0.37	7.20 ± 0.20	143.2 ± 6.97	23.00 ± 4.35	61.40 ± 11.47	41.40 ± 9.72	16.40 ± 2.56	16.03 ± 0.40	37.42 ± 3.68
M_1-1	47.60 ± 0.24	94.42 ± 2.62	20.00 ± 0.55	7.60 ± 0.51	106.8 ± 2.31	25.80 ± 3.25	61.20 ± 2.89	4.60 ± 1.21	15.20 ± 1.66	15.04 ± 0.28	30.76 ± 2.26
$Mm-4-3-2$	52.40 ± 0.40	82.98 ± 2.82	18.80 ± 0.49	6.40 ± 0.24	81.2 ± 2.64	9.40 ± 1.33	32.00 ± 4.01	24.80 ± 2.52	15.00 ± 2.53	14.16 ± 0.27	16.61 ± 1.99
E_2-18	52.60 ± 0.24	85.86 ± 2.24	21.00 ± 0.32	7.20 ± 0.20	53.4 ± 1.26	14.40 ± 2.34	31.40 ± 0.75	5.00 ± 2.30	2.60 ± 0.75	13.92 ± 0.11	15.45 ± 0.78
EMS-2	53.00 ± 0.32	60.50 ± 1.50	17.40 ± 0.24	6.80 ± 0.37	64.6 ± 1.57	7.20 ± 1.16	19.60 ± 1.81	17.40 ± 1.03	20.40 ± 2.58	11.51 ± 0.12	8.99 ± 0.55
EMS-18	64.00 ± 0.32	99.34 ± 5.49	21.00 ± 0.45	6.00 ± 0.32	151.8 ± 5.65	9.60 ± 1.86	44.80 ± 8.03	40.80 ± 8.16	56.60 ± 3.76	15.78 ± 0.14	25.22 ± 3.89
EMS-21	52.60 ± 0.24	80.14 ± 1.52	20.60 ± 0.75	10.20 ± 0.37	259.8 ± 4.15	28.60 ± 2.58	113.20 ± 4.87	69.00 ± 3.89	49.00 ± 5.76	15.13 ± 0.09	57.67 ± 2.96
EMS-23	41.40 ± 0.24	76.20 ± 5.72	18.80 ± 1.07	6.60 ± 0.51	101.6 ± 7.93	11.60 ± 6.76	35.80 ± 8.39	25.60 ± 9.07	28.60 ± 8.27	15.88 ± 0.08	21.02 ± 6.30
EMS-26	52.20 ± 0.20	102.58 ± 2.52	20.60 ± 0.40	6.00 ± 0.71	105.6 ± 3.25	17.60 ± 2.25	46.00 ± 7.15	4.40 ± 5.01	37.60 ± 5.53	15.79 ± 0.40	23.46 ± 3.27
EMS-27	53.60 ± 0.24	92.24 ± 3.53	21.20 ± 0.80	6.60 ± 1.21	90.4 ± 7.98	12.80 ± 6.19	43.80 ± 15.54	3.60 ± 1.81	30.20 ± 8.22	16.00 ± 0.16	20.66 ± 8.11
EMS-29	53.40 ± 0.40	85.34 ± 0.96	21.60 ± 0.68	7.00 ± 0.63	99.8 ± 4.75	11.20 ± 2.48	45.60 ± 9.85	5.80 ± 1.32	37.20 ± 5.99	14.13 ± 0.12	18.38 ± 3.67
EMS-49	53.20 ± 0.37	117.40 ± 3.67	21.00 ± 0.32	7.00 ± 0.32	86 ± 2.07	2.20 ± 0.58	27.80 ± 4.07	30.20 ± 1.98	25.80 ± 2.18	17.54 ± 0.10	16.22 ± 1.96
EMS-52	51.80 ± 0.37	96.00 ± 6.79	18.40 ± 1.29	6.40 ± 0.58	63.6 ± 2.14	5.00 ± 1.18	23.60 ± 3.85	21.00 ± 1.64	14.00 ± 1.82	17.25 ± 0.21	14.38 ± 1.78
EMS-57	65.60 ± 0.40	130.80 ± 8.99	20.40 ± 0.98	8.60 ± 0.93	241.2 ± 8.27	9.00 ± 3.00	42.20 ± 7.68	67.60 ± 11.57	122.40 ± 11.10	18.68 ± 0.21	33.41 ± 6.12
EMS ₃ -13	52.40 ± 0.24	86.94 ± 2.58	19.60 ± 0.40	7.20 ± 0.73	128.4 ± 5.65	10.00 ± 2.93	43.20 ± 7.64	40.40 ± 8.10	34.80 ± 5.74	17.51 ± 0.09	27.46 ± 5.17
EMS ₃ -31	48.00 ± 0.32	64.88 ± 1.73	17.60 ± 0.24	6.80 ± 0.86	64.2 ± 2.33	23.00 ± 3.26	27.00 ± 2.98	11.20 ± 3.75	3.00 ± 1.34	11.62 ± 0.26	15.63 ± 2.15

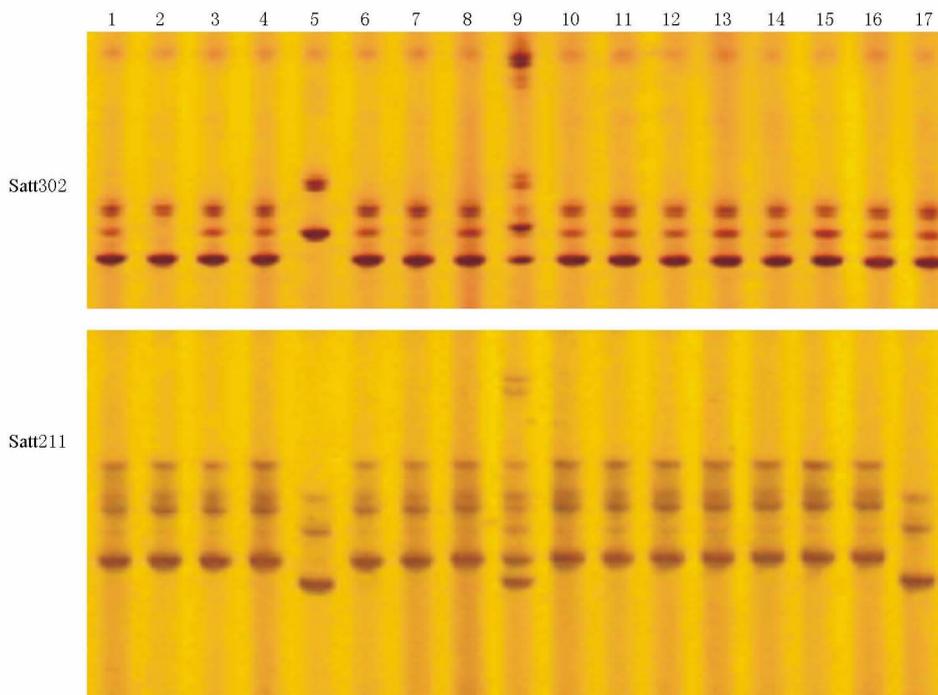
分析单株产量构成因素发现,单株产量构成因素中一个变化都可影响产量。荚数、荚粒数和百粒重都高的系有高的单株产量,例如 M_3-7 荚数是野生型的 187.2%,荚粒数和百粒重与野生型相似,单

株产量是野生型的 180.1%;单株产量构成因素中任何一个因素较低都导致单株产量降低,例如 $M_3-500-24$ 的百粒重和 EMS-52 的荚数影响了单株产量。

2.3 突变体的 SSR 分子标记检测

用 82 对 SSR 引物对 270 个 M_4 株系进行 SSR 分子标记检测,发现突变体的 SSR 带型有多种变化(图 2)。其中突变体 M_3-91 在 Satt302 位点的带型比野生型大,表明突变体对应位点发生 DNA 序列的

增加;突变体 M_3-91 在 Satt211 的带型比野生型小,表明突变体在该位点发生 DNA 的删除;突变体 $M_3-500-24$ 带型增加,表明突变体发生 DNA 插入;突变体 M_3-18 比野生型有带型缺失,表明突变体发生了 DNA 删除。



注/Note:1:野生型/wild type;2: M_3-18 ;3: M_3-39 ;4: M_3-82 ;5: M_3-91 ;6: M_2-107 ;7: $Mm-4-3-2$;8: $M_3-500-6$;9: $M_3-500-24$;10: $M_3-500-33$;11:EMS-21;12:EMS-26;13:EMS-27;14:EMS-49;15:EMS₃-13;16:EMS₃-23;17:EMS₃-31

图 2 部分突变体 SSR 带型的变异

Fig.2 Variation of SSR patterns among some soybean mutants induced by ⁶⁰Co and EMS

表 2 部分⁶⁰Co 和 EMS 诱变获得突变体的多态 SSR 位点的数量

Table 2 Number of polymorphic SSR among some soybean mutants induced by ⁶⁰Co and EMS

突变体 Mutant	多态性引物数 Number of polymorphic SSR	差异的 SSR 标记 Polymorphic SSR
M_3-18	5	Satt193(Chr13), Sat_112(Chr15), Sat_333(Chr17), Satt513(Chr19), Satt239(Chr20)
M_3-39	1	Sat_333(Chr17)
M_3-82	1	satt193(Chr13)
M_3-91	29	Satt160(Chr1), Sat_351(Chr2), Satt009(Chr3), Satt530(Chr3), Satt338(Chr4), Satt607(Chr4), Satt042(Chr5), Satt211(Chr5), Satt681(Chr6), Satt463(Chr7), Satt150(Chr7), Satt043(Chr9), Satt349(Chr9), Satt552(Chr9), Satt478(Chr10), Satt444(Chr11), Satt279(Chr12), Satt253(Chr12), Satt302(Chr12), Satt304(Chr14), Satt534(Chr14), Sat_107(Chr15), Satt311(Chr17), Satt389(Chr17), Satt688(Chr18), Satt130(Chr18), Satt513(Chr19), Sat_105(Chr20), Satt270(Chr20)
$M_3-500-6$	1	Satt279(Chr12)
$M_3-500-24$	12	Satt160(Chr1), Satt338(Chr4), Satt607(Chr4), Sat_077(Chr4), Satt211(Chr5), Satt463(Chr7), Satt150(Chr7), Satt478(Chr10), Satt481(Chr19), Satt239(Chr20), Sat_105(Chr20) Satt270(Chr20)
EMS-49	4	Sat_077(Chr4), Satt193(Chr13), Satt513(Chr19), Satt239(Chr20)
EMS ₃ -13	3	Satt279(Chr12), Satt513(Chr19), Satt239(Chr20)
EMS ₃ -23	11	Satt266(Chr2), Satt009(Chr3), Sat_077(Chr4), Satt540(Chr7), Satt253(Chr12), Satt302(Chr12), Sat_107(Chr15), Satt311(Chr17), Satt688(Chr18), Satt513(Chr19), Satt239(Chr20)
EMS ₃ -31	22	Satt160(Chr1), Satt530(Chr3), Satt338(Chr4), Satt607(Chr4), Sat_077(Chr4), Satt591(Chr5), Satt211(Chr5), Satt246(Chr6), Satt463(Chr7), Satt150(Chr7), Satt279(Chr12), Satt253(Chr12), Satt302(Chr12), Satt534(Chr14), Sat_107(Chr15), Satt333(Chr17), Satt389(Chr17), Satt668(Chr18), Satt076(Chr19), Satt513(Chr19), Sat_105(Chr20), Satt270(Chr20)

10 个突变株系与华夏 3 号在多个 SSR 标记位点上存在差异,其中株 $M_3 - 91$ 、 $M_3 - 500 - 24$ 、 $EMS_3 - 23$ 和 $EMS_3 - 31$ 分别有 29、12、11 和 22 个 SSR 位点的差异(表 2)。仅有 3 个分子标记检测有差异的突变系在主要性状上和华夏 3 号存在显著差异(例如 $M_3 - 500 - 24$ 表现匍匐茎),大多分子标记检测有差异的突变体在主要性状上与野生型并不存在显著表型和农艺性状的差异,同时表型和农艺性状存在显著差异的大部分突变系在检测的 SSR 位点上未观察到多态。

3 讨论

物理和化学等人工诱变能在短时间内得到大量诱变后代,是创制育种资源的一种途径,应用 ^{60}Co 和 EMS 等方法都能获得农艺性状及品质性状符合育种目标的大豆突变体。 ^{60}Co 照射大豆种子得到了叶色、种皮色、真叶、子叶融合、生长习性、株高、熟期、蛋白质含量等性状的突变体^[41-43]。利用 EMS 诱变剂诱变大豆获得了低亚麻酸突变体^[44]。利用 NaN_3 诱变黑豆种子,获得了 5 个异黄酮含量比野生型高 5%~25% 的突变体和 4 个产量比野生型高 17%~25% 的突变体^[45]。本研究利用 ^{60}Co 和 EMS 两种手段处理华夏 3 号,在诱变后代中都获得一些在茎、叶形、花色、花期、荚等性状表现特殊的突变体,表明这两种手段都可创造大豆新的突变体。

突变体不但可以丰富种质资源、创造各种优良性状个体,而且可为基因功能的分析提供材料^[7,46]。目前既有通过物理和化学诱变手段构建的大豆随机突变体库^[8,17,40,47-49],也有利用转座子和反转座子构建的插入突变体库^[29,30]。利用这些突变体库提供的材料结合高通量测序技术等分子生物学方法对大豆重要性状的遗传特征有了全新的认识^[7,40,48,49]。然而,华南地区为热带、亚热带气候条件,土壤存在酸铝、低磷和重金属等问题^[50],本研究利用丰产、抗逆、重金属低积累品种华夏 3 号所构建的突变体库可满足这些研究。

除利用表型性状的变异筛选突变体,也可在分子水平上通过检测 DNA 的变异筛选突变体。SSR 是基于简单重复序列重复次数不同而产生的一类分子标记,可以用于分析基因组的变异^[51]。大豆的 SSR 标记因其染色体随机分布、高多态性、检测手段简单成为大豆遗传多样性研究的重要手段^[52,53]。利用 120 个 SSR 标记对 EMS 诱变大豆绥农 14 获得的 120 份突变体进行了全基因组扫描,发现 2 株与野生型有超过 7 个标记的差异,其余植株分别有

1~7 个标记的差异^[53]。本试验利用分布在大豆 20 条染色体上 82 对 SSR 标记对 270 份突变材料进行全基因组扫描,发现有 10 份材料与野生型至少有 1 个标记存在差异,其中有 4 株与野生型有超过 10 个标记的差异,表明这些突变体发生多位点突变。同时发现 6 个突变体与野生型在 Satt513 有多态性,表明 Satt513 位点是一个易突变的位点。

目前的研究结果认为 ^{60}Co 和 EMS 两者的诱变机理不同, ^{60}Co 由于能量高、穿透力强,可以使原子内层电子激活释放,造成共价键断裂,导致易位、倒位和缺失等染色体结构畸变^[54,55]。EMS 主要诱发点突变,可能导致无义突变、错义突变和沉默突变^[56]。本研究对突变体 SSR 分子标记检测结果表明 EMS 诱变不仅可导致点突变,也可以引起插入/缺失突变。这一结果和前人认为 EMS 主要引起点突变和 ^{60}Co 主要引起缺失突变这一观点^[56-58]不一致。但要了解两种诱变机制差异需要进一步对突变后代从全基因组水平上深入分析 DNA 结构变异。

4 结论

本研究利用 ^{60}Co 射线和 EMS 分别对华南地区主栽大豆品种华夏 3 号的种子进行诱变处理建立突变体库,该突变体库包括丰富的形态变异类型,发现叶、茎、花、荚、种子、花期等性状发生了变异的突变体。突变体库中发现的一批综合性状好、产量高的大豆突变体,为大豆育种提供了材料,而发现的生育期、荚形态、叶形态和抗逆性等性状的突变体也为大豆分子机理研究提供材料。通过大豆全基因组标记筛选,选出有 10 株系与野生型华夏 3 号存在至少一个 SSR 位点的差异,同时发现 ^{60}Co 射线和 EMS 均能引起 DNA 序列的重复和缺失,因此有必要利用测序技术比较该突变体库中不同来源材料的差异,为诱变机理提供数据。

参考文献:

- [1] Priolli R H G, Mendes - Junior C T, Arantes N E A Q, et al. Characterization of Brazilian soybean cultivars using microsatellite markers[J]. *Genetics and Molecular Biology*, 2002, 25(2): 185 - 193.
- [2] Brown - Guedira G L, Thompson J A, Nelson R L, et al. Evaluation of genetic diversity of soybean introductions and North American ancestors using RAPD and SSR markers[J]. *Crop Science*, 2000, 40(3): 815 - 823.
- [3] Gizlice Z, Carter T E, Burton J W. Genetic base for North American public soybean cultivars released between 1947 and 1988[J]. *Crop Science*, 1994, 34(5):

- 1 143 – 1 151.
- [4] Li Z, Nelson R L. Genetic diversity among soybean accessions from three countries measured by RAPDs [J]. *Crop Science*, 2001, 41(4): 1 337 – 1 347.
- [5] Wysiński P T, Vello N A. The genetic base of Brazilian soybean cultivars: evolution over time and breeding implications [J]. *Genetics and Molecular Biology*, 2013, 36(4): 540 – 546.
- [6] Mulato B M, Möller M, Zucchi M I, et al. Genetic diversity in soybean germplasm identified by SSR and EST – SSR markers [J]. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 2010, 45(3): 276 – 283.
- [7] Anai T. Potential of a mutant – based reverse genetic approach for functional genomics and molecular breeding in soybean [J]. *Breed Sci*, 2012, 61(5): 462 – 467.
- [8] 韩锁义, 张恒友, 杨玛丽, 等. 大豆“南农 86 – 4”突变体筛选及突变体库的构建 [J]. *作物学报*, 2007(12): 2 059 – 2 062.
- [9] Mudibu J, Nkongolo K K, Kalonji – Mbuyi A, et al. Effect of gamma irradiation on morpho – agronomic characteristics of soybeans (*Glycine max* L.) [J]. *American Journal of Plant Sciences*, 2012, 3: 331 – 337.
- [10] 翁秀英, 王彬如, 吴和礼, 等. 大豆辐射育种的研究 [J]. *遗传学报*, 1974(2): 157 – 169.
- [11] Lee K J, Kim J, Ha B, et al. Proteomic characterization of Kunitz trypsin inhibitor variants, Tia and Tib, in soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] [J]. *Amino Acids*, 2012, 43(1): 379 – 388.
- [12] 陆兆新. 日本辐射诱变育种的最新进展 [J]. *核农学通报*, 1997(6): 49 – 50.
- [13] Manjaya J G, Suseelan K N, Gopalakrishna T, et al. Radiation induced variability of seed storage proteins in soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] [J]. *Food Chemistry*, 2007, 100(4): 1 324 – 1 327.
- [14] Yuan F, Zhao H, Ren X, et al. Generation and characterization of two novel low phytate mutations in soybean (*Glycine max* L. Merr.) [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2007, 115(7): 945 – 957.
- [15] 孙 洁, 崔海瑞. TILLING 技术及其应用 [J]. *细胞生物学杂志*, 2007(1): 41 – 46.
- [16] 陈 洋, 高兰英, 邵艳军, 等. EMS 诱导小麦易位系 YW642 突变体的鉴定与分子标记分析 [J]. *核农学报*, 2011(4): 617 – 621.
- [17] 谢圣男, 王宏光, 杨 振, 等. 大豆绥农 14 突变体库构建及株高性状分析 [J]. *核农学报*, 2013(3): 307 – 313.
- [18] Sessions A, Burke E, Presting G, et al. A high – throughput Arabidopsis reverse genetics system [J]. *The Plant Cell Online*, 2002, 14(12): 2 985 – 2 994.
- [19] Krysan P J, Young J C, Jester P J, et al. Characterization of T – DNA insertion sites in *Arabidopsis thaliana* and the implications for saturation mutagenesis [J]. *Omics: a journal of integrative biology*, 2002, 6(2): 163 – 174.
- [20] Wesley S V, Helliwell C A, Smith N A, et al. Construct design for efficient, effective and high – throughput gene silencing in plants [J]. *The Plant Journal*, 2001, 27(6): 581 – 590.
- [21] Parinov S, Sundaresan V. Functional genomics in *Arabidopsis*: large – scale insertional mutagenesis complements the genome sequencing project [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2000, 11(2): 157 – 161.
- [22] Li Y, Rosso M G, Strizhov N, et al. GABI – Kat SimpleSearch: a flanking sequence tag (FST) database for the identification of T – DNA insertion mutants in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Bioinformatics*, 2003, 19(11): 1 441 – 1 442.
- [23] Sallaud C, Meynard D, Van Boxtel J, et al. Highly efficient production and characterization of T – DNA plants for rice (*Oryza sativa* L.) functional genomics [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2003, 106(8): 1 396 – 1 408.
- [24] Krysan P J, Young J C, Tax F, et al. Identification of transferred DNA insertions within Arabidopsis genes involved in signal transduction and ion transport [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1996, 93(15): 8 145 – 8 150.
- [25] Ríos G, Lossow A, Hertel B, et al. Rapid identification of Arabidopsis insertion mutants by non – radioactive detection of T – DNA tagged genes [J]. *The Plant Journal*, 2002, 32(2): 243 – 253.
- [26] Krysan P J, Young J C, Sussman M R. T – DNA as an insertional mutagen in Arabidopsis [J]. *The Plant Cell Online*, 1999, 11(12): 2 283 – 2 290.
- [27] Jeong D, An S, Kang H, et al. T – DNA insertional mutagenesis for activation tagging in rice [J]. *Plant Physiology*, 2002, 130(4): 1 636 – 1 644.
- [28] Koncz C, Németh K, Rédei G P, et al. T – DNA insertional mutagenesis in Arabidopsis [J]. *Plant Molecular Biology*, 1992, 20(5): 963 – 976.
- [29] Mathieu M, Winters E K, Kong F, et al. Establishment of a soybean (*Glycine max* L. Merr) transposon – based mutagenesis repository [J]. *Planta*, 2009, 229(2): 279 – 289.
- [30] Cui Y, Barampura S, Stacey M G, et al. *Tnt1* retrotransposon mutagenesis: a tool for soybean functional genomics [J]. *Plant Physiology*, 2013, 161(1): 36 – 47.
- [31] Feng C, Mundy J. Gene discovery and functional analy-

- ses in the model plant *Arabidopsis* [J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2006, 48(1): 5–14.
- [32] Li X, Song Y, Century K, et al. A fast neutron deletion mutagenesis – based reverse genetics system for plants [J]. *Plant J*, 2001, 27(3): 235–242.
- [33] Alonso J M, Stepanova A N, Leisse T J, et al. Genome – wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana* [J]. *Science*, 2003, 301(5 633): 653–657.
- [34] Watanabe S, Hideshima R, Xia Z, et al. Map – based cloning of the gene associated with the soybean maturity locus *E3* [J]. *Genetics*, 2009, 182(4): 1 251–1 262.
- [35] Komatsu K, Hwang T Y, Takahashi M, et al. Identification of QTL controlling post – flowering period in soybean [J]. *Breed Sci*, 2012, 61(5): 646–652.
- [36] Page D R, Grossniklaus U. The art and design of genetic screens: *Arabidopsis thaliana* [J]. *Nature Reviews Genetics*, 2002, 3(2): 124–136.
- [37] Xia Z, Watanabe S, Yamada T, et al. Positional cloning and characterization reveal the molecular basis for soybean maturity locus *E1* that regulates photoperiodic flowering [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2012, 109(32): 2 155–2 164.
- [38] Matsumura H, Liu B, Abe J, et al. AFLP mapping of soybean maturity gene *E4* [J]. *Journal of Heredity*, 2008, 99(2): 193–197.
- [39] Liu X, Liu S, Jamai A, et al. Soybean cyst nematode resistance in soybean is independent of the *Rhg4* locus *LRR – RLK* gene [J]. *Functional and Integrative Genomics*, 2011, 11(4): 539–549.
- [40] Bolon Y, Haun W J, Xu W W, et al. Phenotypic and genomic analyses of a fast neutron mutant population resource in soybean [J]. *Plant Physiology*, 2011, 156(1): 240–253.
- [41] Lee K J, Kim J B, Kim S H, et al. Alteration of seed storage protein composition in soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] mutant lines induced by gamma – irradiation mutagenesis [J]. *J Agric Food Chem*, 2011, 59(23): 12 405–12 410.
- [42] 余章清, 张富厚, 范占标, 等. 钴 60γ 射线对大豆辐射后代性状变异的研究及应用 [J]. *河南农业科学*, 1997(1): 6–8.
- [43] Dixit A K, Bhatnagar D, Kumar V, et al. Gamma irradiation induced enhancement in isoflavones, total phenol, anthocyanin and antioxidant properties of varying seed coat colored soybean [J]. *J Agric Food Chem*, 2010, 58(7): 4 298–4 302.
- [44] Reinprecht Y, Luk – Labey S, Larsen J, et al. Molecular basis of the low linolenic acid trait in soybean EMS mutant line RG10 [J]. *Plant Breeding*, 2009, 128(3): 253–258.
- [45] Jeng T L, Shih Y J, Wu M T, et al. Evaluations and selections for high isoflavone black soybean mutants induced by NaN_3 treatment [J]. *American Journal of Plant Sciences*, 2013, 4: 35.
- [46] Tadege M, Wang T L, Wen J, et al. Mutagenesis and beyond! Tools for understanding legume biology [J]. *Plant Physiology*, 2009, 151(3): 978–984.
- [47] 张力伟, 樊颖伦, 牛腾飞, 等. 大豆“冀黄13”突变体筛选及突变体库的建立 [J]. *大豆科学*, 2013, 32(1): 33–37.
- [48] Bolon Y, Stec A O, Michno J, et al. Genome resilience and prevalence of segmental duplications following fast neutron irradiation of soybean [J]. *Genetics*, 2014, 198(3): 967–981.
- [49] Tsuda M, Kaga A, Anai T, et al. Construction of a high – density mutant library in soybean and development of a mutant retrieval method using amplicon sequencing [J]. *BMC Genomics*, 2015, 16(1): 1.
- [50] 赵云云, 钟彩霞, 方小龙, 等. 华南地区夏播大豆品种镉耐性及籽粒镉积累的差异 [J]. *大豆科学*, 2013(3): 336–340.
- [51] Kalia R K, Rai M K, Kalia S, et al. Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants [J]. *Euphytica*, 2011, 177(3): 309–334.
- [52] Wang L, Guan R, Liu Z X, et al. Genetic diversity of Chinese cultivated soybean revealed by SSR markers [J]. *Crop Science*, 2006, 46(3): 1 032–1 038.
- [53] Singh R K, Bhat K V, Bhatia V S, et al. Association mapping for photoperiod insensitivity trait in soybean [J]. *National Academy Science Letters*, 2008, 31(9–10): 281–283.
- [54] 邹伟民, 伍育源, 黎学军, 等. 激光与 γ – 射线辐照蚕豆诱变效应研究 [J]. *光电子·激光*, 1993, 2: 16.
- [55] 吕东辉. 浅谈诱变技术在大豆育种中的应用 [J]. *大豆通报*, 1999(4): 17.
- [56] Greene E A, Codomo C A, Taylor N E, et al. Spectrum of chemically induced mutations from a large – scale reverse – genetic screen in *Arabidopsis* [J]. *Genetics*, 2003, 164(2): 731–740.
- [57] Fladung M, Deutsch F, Honicka H, et al. T – DNA and transposon tagging in aspen [J]. *Plant Biol (Stuttg)*, 2004, 6(1): 5–11.
- [58] Cooper J L, Till B J, Laport R G, et al. TILLING to detect induced mutations in soybean [J]. *BMC Plant Biol*, 2008, 8: 9.