

# 大豆 EMS 突变体库构建及其 M<sub>1</sub> 代重要农艺性状评价

孟永杰, 陈 锋, 帅海威, 刘卫国, 杜俊波, 刘 江, 舒 凯, 杨文钰

(四川农业大学 农学院/农业部西南作物生理生态与耕作重点实验室, 四川 成都 611130)

**摘 要:**构建突变体库是进行遗传学与分子生物学研究的重要前提条件之一。当前大豆突变体数量的不足,严重制约了大豆功能基因组学研究的深入开展。以南方大面积推广的大豆品种—南豆 12 为材料,通过 EMS 诱变构建了大豆 EMS 突变体库。统计发现,M<sub>1</sub>种子田间出苗率为 34.85%,表明 EMS 强烈抑制大豆种子的萌发和出苗。对随机选取的 913 株 M<sub>1</sub>植株进行了株高、单株荚数等重要农艺性状的调查。结果表明:经 EMS 处理后,M<sub>1</sub>植株在株高、单株荚数、节间数等方面与对照存在显著差异、表型变异丰富,其中 18.07% 发生矮化,11.06% 表现出多荚,另有 3 株不育株;群体间的节间个数极差达到 18。这些数据表明已成功构建了大豆 EMS 突变体库。在进一步的研究中,将对单个突变体进行分离、分类,并克隆相应的重要功能基因,为深入研究大豆功能基因组学以及筛选适合玉米—大豆带状复合种植模式的高光效、抗倒伏大豆品种奠定基础。

**关键词:**大豆;EMS;突变体库;农艺性状

**中图分类号:**S565.1      **文献标识码:**A      **DOI:**10.11861/j.issn.1000-9841.2016.01.0064

## Construction of EMS Mutant Library and the Evaluation of Important Agronomic Traits of M<sub>1</sub> in *Glycine max*

MENG Yong-jie, CHEN Feng, SHUAI Hai-wei, LIU Wei-guo, DU Jun-bo, LIU Jiang, SHU Kai, YANG Wen-yu  
(Agronomy College of Sichuan Agricultural University/Key Laboratory of Crop Ecophysiology and Farming System in Southwest China, Ministry of China, Chengdu 611130, China)

**Abstract:** Sufficient mutant pool is one of the most important preconditions for molecular biology and plant genetics studies. Lacking of enough mutants of soybean is a serious constraint to soybean functional genomics researching. In this study, soybean mutant pool was constructed by treating seeds of Nandou 12, which is prevailed in Southwestern China, by Ethyl Methyl Sulfone (EMS) treatment. The results showed that, emergence rate of M<sub>1</sub> seeds in field barely reached to 34.85%, which indicated that EMS significantly inhibit the emergence of soybean seeds. Analysis of the important agronomic traits, including plant height, pods per plant and so on, of 913 plants of M<sub>1</sub> generation showed that, plant height, pods per plant and internodes number were significantly different with Nandou 12. Compared to Nandou 12, 18.07% of the pool showed the dwarf phenotype; 11.06% revealed more pods per plant, and 3 sterile mutants were observed. Furthermore, the range (R) of internodes number of M<sub>1</sub> lines reached to 18. Taken together, these results demonstrated that soybean mutant pool had been constructed primarily. Classification of single mutant and cloning of the corresponded gene(s) would be focused on the following studies, which would has a profound effect on soybean functional genetics study and screening perfect soybean varieties for maize-soybean stripe intercropping system.

**Keywords:** Soybean; EMS; Mutant pool; Agronomic traits

功能基因组学是在结构基因组学的基础上,利用后者提供的基因信息和产物来研究生物体内各个基因的功能以及各基因之间相互作用的一门学科<sup>[1]</sup>。随着科技的进步,基因组研究进入以基因功能为主要研究对象的后基因组时代,而突变体库的构建是功能基因组学研究的重要基础<sup>[2-3]</sup>。在全基因组测序完成的基础上,拟南芥、番茄、水稻、金

草、苜蓿、玉米和矮牵牛等模式植物的饱和突变体库已构建完成<sup>[4-5]</sup>,显著促进了这些物种的遗传学及分子生物学的发展。前人通过 NaN<sub>3</sub>、<sup>60</sup>Co  $\gamma$  射线和甲基磺酸乙酯(EMS)等方法构建了大豆的突变体库,筛选出多个性状变异的突变体,并采用 SSR 标记对耐涝、叶色浅绿<sup>[6]</sup>以及高油、高蛋白<sup>[7-8]</sup>等突变体进行鉴定,但鲜有单基因突变体用于大豆功能

收稿日期:2015-03-13  
基金项目:国家重点基础研究发展计划“973 计划”(2011CB100402);国家现代农业产业技术体系(CARS-04-PS19)。  
第一作者简介:孟永杰(1990-),男,硕士,主要从事作物高产优质栽培理论与技术研究。  
通讯作者:舒凯(1982-),男,博士,副研究员,主要从事大豆遗传学和生理学研究。E-mail: kshu@sicau.edu.cn;  
杨文钰(1958-),男,教授,博导,主要从事作物栽培生理生态与区域农业研究。E-mail: mssiyangwy@sicau.edu.cn。

基因组学研究的报道。

间套作是我国农业生产中的一种搭配栽培模式,是多植物、多层次、多功能和多产业的复合种植模式。玉米-大豆带状复合种植模式下,玉米形成的荫蔽环境使大豆的光合产物积累不足,易倒伏。目前,耐荫品种的缺乏成为南方套作大豆高产、稳产和优质的重要限制因素之一<sup>[9]</sup>。因此,通过构建突变体库,筛选大豆耐荫突变体,并从功能基因组学角度,研究其耐荫的分子机理,是当前间套作大豆研究中亟需解决的问题。

甲基磺酸乙酯(ethyl methane sulfonate,EMS)被广泛用于植物突变体库的构建过程中。其诱变机理是 DNA 双链中鸟嘌呤的氧原子位置被 EMS 烷基化,在 DNA 复制过程中,烷基化的鸟嘌呤能与胸腺嘧啶配对,导致碱基替换,使 G:C 变为 T:A<sup>[10]</sup>。本研究以南方地区大面积推广的大豆品种南豆 12 为材料,采用 EMS 诱变的方法构建大豆突变体库,并通过调查 M<sub>1</sub>代的株高、单株荚数、节间数等重要农艺性状,旨在为大豆品种改良,创造新的遗传材料以及筛选适合带状复合种植模式的高光效、抗倒伏大豆品种提供参考指标,并为深入研究大豆功能基因组学奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

南豆 12 由四川省南充市农科院选育并提供。EMS 购自 SIGMA-ALORICH 公司(货号:M0880)。

1.2 试验设计

试验于 2014 年 6~11 月在四川省雅安市四川农业大学雅安校区教学农场进行。选取 7 500 粒颗粒饱满,无明显病虫害和机械损伤的南豆 12 种子,室温下水浸种 4 h,之后用 0.3% 的 EMS 溶液浸种 8 h,期间用摇床缓慢摇动,流水冲洗 1 h,以去除残留的 EMS。风干后播种。整个操作过程均在通风橱中进行。

以南豆 12 为对照,于 2014 年 6 月 17 日播种,行距 70 cm,株距 20 cm,播种深度为 3~4 cm。田间栽培管理措施同净作。播种 7 d 后调查田间出苗率。生长发育期间观察诱变植株的形态学变化,在 M<sub>1</sub>代群体中随机选取 913 株单株,调查叶片、株高、分枝数、单株荚数等农艺性状,对突变植株进行挂牌、拍照、统计农艺性状并计算突变频率。

田间出苗率(%) = 田间出苗数/播种种子数 × 100

突变频率(%) = 突变株数/成活总株数 × 100

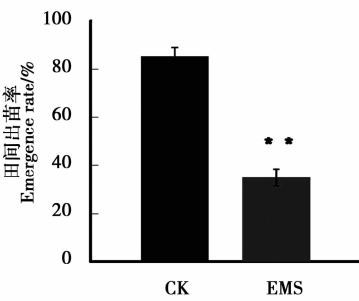
1.3 数据分析

试验数据采用 Excel 2010 进行均值、标准差计算以及制图,采用 IBM SPSS Statistics 20 进行单因素方差分析与多重比较。

2 结果与分析

2.1 EMS 对 M<sub>1</sub>代田间出苗率的影响

播种 7 d 后田间出苗率结果表明,EMS 对大豆萌发及出苗具有明显的抑制作用。M<sub>1</sub>代的田间出苗数为 2 614 株,出苗率仅为 34.85%,极显著低于南豆 12 的田间出苗率(图 1)。



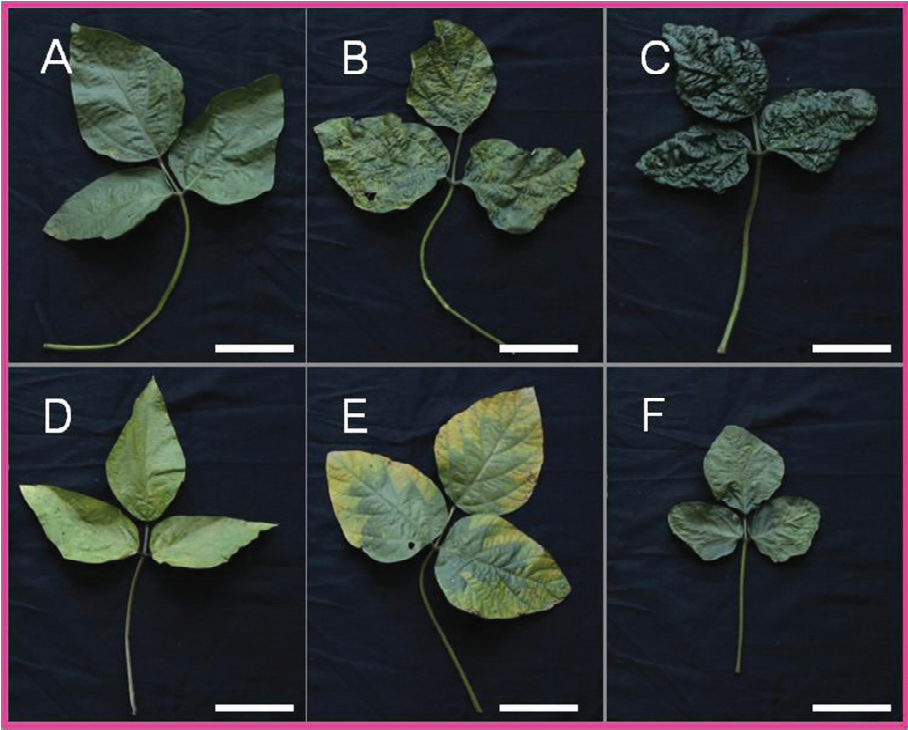
\*\* 代表差异极显著(P<0.01)。  
\*\* indicates difference is significant at the 0.01 level.

图 1 EMS 对南豆 12 田间出苗率的影响  
Fig. 1 Effect of EMS on the emergence rate of Nandou-12

2.2 M<sub>1</sub>代植株突变性状鉴定分析

M<sub>1</sub>代群体的农艺性状结果表明,M<sub>1</sub>代群体中出现多个农艺性状突变(表 1)。其中叶片和种子性状突变所占比例大致相当,分别为 1% 和 0.95%;株型突变所占比例最大,达到 30.15%,主要表现为无分枝和矮化(含生长受抑制),两者的突变频率分别为 15.4% 和 8.25%。此外,有 101 株植株的单株荚数超过 100 个,远超对照的平均单株荚数 65.17 个。

2.2.1 叶片性状突变 在 M<sub>1</sub>代植株中观察到叶色及叶型突变,包括 5 种类型(图 2):皱缩并带有黄白斑(图 2B)、深绿皱缩(图 2C)、叶片狭长(图 2D)、黄白斑(图 2E)、叶片小而圆(图 2F)。其中,深绿皱缩最多,黄白斑次之。随植株生长发育,叶色突变表型几乎贯穿整个生育时期,后期随叶片衰老,表型逐渐减弱。



A:对照;B:皱缩且带有黄白色斑块;C:皱缩深绿;D:叶片狭长;E:黄白色斑块;F:叶片小圆。  
标尺 = 1 cm。

A: CK; B: Curly, yellow spots; C: Curly, dark green; D: Leptophyllous; E: Yellow spots; F: Small, flat blade tip. Bar = 1 cm.

图 2 M<sub>1</sub>代植株代表性叶片表型

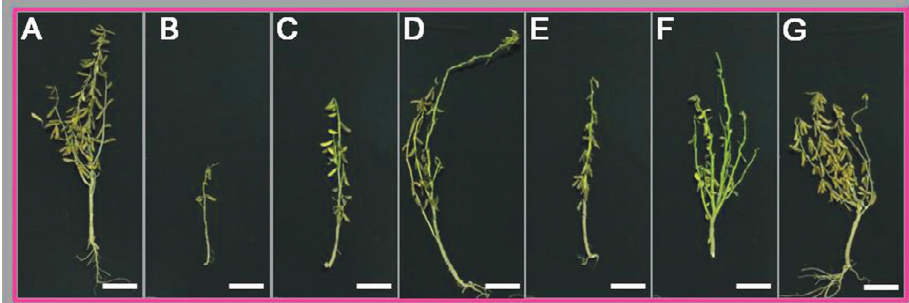
Fig. 2 Representative phenotypes of leaves of M<sub>1</sub> generation

表 1 M<sub>1</sub>代植株突变性状统计

Table 1 Summary of visible phenotypes observed in the M<sub>1</sub> generation

农艺性状 Agronomic traits	变异性状 Mutant phenotype	变异株数 Number of plants	突变频率 Frequency /%
叶片 Leaves	皱缩, 黄斑 Curly , yellow spots	1	0.05
	皱缩, 深绿 Dark green and curly	11	0.55
	狭长 Leptophyllous	2	0.10
	黄斑 Yellow spots	5	0.25
	小而圆 Small, flat blade tip	1	0.05
株型 Plant type	生长受抑制 Inhibition of growth	47	2.35
	矮化 Dwarfed	118	5.90
	高秆 High-stem plant	12	0.60
	无分枝 No branches	308	15.40
	多分枝 More branches	17	0.85
种子 Seeds	多荚 More pods	101	5.05
	淡青, 紫色斑 Nattierbue , purple spots	1	0.05
	粒小, 皱缩 Shrivelled and small	9	0.45
	粒小, 黑色斑 Small and shrivelled	3	0.15
	粒长, 皱缩 Small, dark spots	1	0.05
	种子大小不均 Inequality of seeds	1	0.05
	棕色斑 Longitudinal ditributed brown spots	1	0.05
	深棕色斑 Dark brown spots	3	0.15

2.2.2 株型性状突变 M<sub>1</sub>代群体中观察到 603 株植株在株高、分枝数以及荚数等方面发生变化,突变频率为 30.15% (表 1)。突变主要包括 5 种类型 (图 3):生长受抑制(图 3B)、矮秆(图 3C)、高秆(图 3D)、无分枝(图 3E)、多分枝(图 3F)、多荚(图 3G)。



A:对照;B:生长受抑制;C:矮秆;D:高秆;E:无分枝;F:多分枝;G:多荚。标尺 = 10 cm。  
A: CK; B: Inhibition of growth; C: Dwarfed; D: High-stem plant; E: No branches; F: More branches; G: More pods. Bar = 10 cm.

图 3 M<sub>1</sub>植株代表性株型表型

Fig. 3 Representative phenotypes of plant architecture of M<sub>1</sub> generation

2.2.3 M<sub>1</sub>代植株株高、节间数、节间长和单株荚数比较 生长受抑制、矮秆和高秆植株的平均株高分别为正常植株株高的 36.88%、57.0% 和 127.93% (表 2)。节间数随着生长受抑、矮化,正常植株和高秆植株的顺序依次增加;第二节间长不受株高变化的影响,差异不显著;单株荚数的变化趋势与节间数一致。

表 2 突变植株与正常植株株高、节间数、节间长和单株荚数的比较

Table 2 Comparison on plant height, internodes number, length of internodes and pods number per plant					
测定项目 Measurements	株型 Plant type	均值 Average	标准差 Standard error	最大值 Maximum	最小值 Minimum
株高 Plant height /cm	正常植株 Normal plant	62.21	±6.94	79.2	49.8
	生长受抑制 Inhibition of growth	22.94 **	±5.54	30.0	5.5
	矮化 Dwarfed	35.46 **	±2.77	40.0	30.2
	高秆 High-stem plant	79.59 **	±7.83	93.4	70.9
节间数 Internodes number	正常植株 Normal plant	15.43	±1.98	19.0	11.0
	生长受抑制 Inhibition of growth	9.26 **	±2.53	16.0	5.0
	矮化 Dwarfed	11.82 **	±2.29	18.0	6.0
节间长 Internodes length	正常植株 Normal plant	2.32	±0.17	2.7	2.0
	生长受抑制 Inhibition of growth	2.14	±0.43	2.9	1.4
	矮化 Dwarfed	2.19	±0.61	3.4	1.1
单株荚数 Pods per plant	正常植株 Normal plant	68.00	±12.48	86.0	41.0
	生长受抑制 Inhibition of growth	11.92 **	±8.09	41.0	0
	矮化 Dwarfed	22.88 **	±9.52	44.0	10.0
	高秆 High-stem plant	107.00 *	±18.10	123.0	86.0

\*\* 代表差异极显著 ( $P < 0.01$ ); \* 代表差异显著 ( $P < 0.05$ )。  
\*\* Difference is significant at the 0.01 level; \* difference is significant at the 0.05 level.

2.2.4  $M_2$ 代种子性状突变 在 $M_1$ 代群体中观察到19株植株的种子发生突变,突变频率为0.95%。主要包括:种皮淡青,带紫色斑(图4B);粒小,皱缩

(图4C);粒小,黑色斑(图4D);粒长,皱缩(图4E);种子大小不均(图4F);棕色斑,纵向分布(图4G);深棕色斑(图4H)。



A: 对照; B: 紫色斑, 种皮开裂, 淡青色; C: 种子小且皱缩; D: 种子小, 带黑色斑; E: 粒长, 皱缩; F: 种子大小不均; G: 棕色斑块, 纵向分布; H: 深棕色斑。标尺 = 1 cm。

A: CK; B: Cracked natterblue seed coat with purple spots; C: Small shrivelled seeds; D: Small seeds with dark spots; E: Shrivelled long seeds; F: Inequality of seeds size; G: Longitudinal ditributed brown spots; H: Dark brown spots. Bar = 1 cm.

图4  $M_2$ 种子代表性种子表型

Fig. 4 Representative phenotypes of  $M_2$  germination

3 讨论

化学诱变是丰富作物种质资源、选育作物新品种的重要手段<sup>[11]</sup>,具有操作简单、突变频率高、容易产生单基因突变体等优点<sup>[10]</sup>。其中,EMS不论从突变谱的广度还是突变频率来讲,都是创建突变体库的优良诱变剂<sup>[12]</sup>。拟南芥<sup>[13-14]</sup>、油菜<sup>[15]</sup>、小麦<sup>[16-17]</sup>、水稻<sup>[18]</sup>等植物的EMS突变体库均已成功构建,并在育种和功能基因组研究中发挥了重要作用。EMS诱变在大豆突变体库的构建及功能基因组的研究方面尚处于起步阶段。

本研究以南豆12大豆种子为试验材料,研究了EMS对种子田间出苗率的影响以及突变植株的形态学表现。 $M_1$ 种子田间出苗率为34.85%,最终成活株数为2 000株,得到了在叶型、叶色、分枝数、株高、以及生育期等性状方面发生明显突变的 $M_1$ 群体,成功构建了南豆12 EMS突变体库。对突变群体 $M_2$ 、 $M_3$ 代的田间性状调查和重复鉴定、对相关关键基因的图位克隆以及功能验证等工作将是下一步研究的主要内容。

由于试验材料以及处理方法的差异,EMS处理后的诱变频率也不尽相同。徐艳花等<sup>[17]</sup>利用EMS溶液处理小麦豫农201的种子,突变频率仅为11.44%。甘蓝型油菜<sup>[15]</sup>的突变频率可达27.19%,而水稻<sup>[19]</sup>的突变频率不足10%。本试验获得突变

株共642株,突变频率为32.1%,远高于小麦、水稻等作物。表明EMS诱变技术有可能在大豆中创造更多的点突变。其中,株型变化最为显著,包括6种类型,占总突变率的93.93%;叶片及种子性状的突变率较低,分别为1%和0.93%;不育植株仅有3株,突变率为0.15%。不同性状的突变频率差异很大,可能与控制各性状基因数目的差异以及EMS的作用位点有关<sup>[20]</sup>。其次是叶色和叶型突变。本试验共发现皱缩黄白斑、皱缩深绿、狭长、黄白斑、小而圆5种叶色及叶型突变。这些叶片突变性状可以作为形态标记,应用于杂交育种和突变体的筛选,简化良种繁育过程,提高育种效率<sup>[21]</sup>。

适宜的株高是衡量大豆品种优劣的重要指标。矮化是一种优良的农艺性状,可以提高种植密度,提高光能利用率<sup>[22]</sup>。因此,矮秆大豆是优良的种质资源。突变群体中出现的矮秆植株和高秆植株,有助于研究控制大豆株高的功能基因,为减少玉米-大豆带状复合种植模式中大豆的倒伏现象,以及筛选高光效大豆材料提供了可能。因此,该突变体库对于深入研究大豆功能基因组学以及提高我国大豆产量具有一定意义。

参考文献

[1] Lino M. Toward understanding the ecological functions of tropisms: Interactions among and effects of light on tropisms [J].

- Current Opinion in Plant Biology, 2006, 9(1): 89-93.
- [2] Veleulescu V E, Zhang L, Vogelstein B, et al. Serial analysis of gene expression[J]. Science, 1995, 270(5235): 484-486.
- [3] 代君丽,李振岐. 小麦的比较基因组学和功能基因组学[J]. 西北植物学报, 2004, 24(5): 949-953. (Dai J L, Li Z Q. Comparative and functional genomics of wheat[J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2004, 24(5): 949-953. )
- [4] Somerville C, Somerville S. Plant functional genomics [J]. Science, 1999, 285(5426): 380-383.
- [5] Bouchez D, Hofte H. Functional genomics in plants [J]. Plant Physiology, 1998, 118(3): 725-732.
- [6] 韩锁义,杨玛丽,陈远东,等. 大豆“南农 94-16”突变体库的构建及部分性状分析[J]. 核农学报,2008, 22(2): 131-135. (Han S Y, Yang M L, Chen Y D, et al. Construction of mutant library for soybean ‘Nannong 94-16’ and analysis of some characters[J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2008, 22(2): 131-135. )
- [7] 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, 33(12): 2059- 2062. (Han S Y, Zhang H Y, Yang M L, et al. Screening of mutants and construction of mutant population in soybean ‘Nannong 86-4’ [J]. Acta Agronomica Sinica, 2007, 33(12): 2059- 2062. )
- [8] 陈远东,喻德跃. EMS 诱发大豆“南农 94-16”突变体库的扩建及部分突变体的 SSR 分析[J]. 大豆科学,2009, 28(4): 574-577. (Chen Y D, Yu D Y. Construction of mutant pools for soybean ‘Nannong 94-16’ induced by EMS and analysis of SSR marker on several mutants[J]. Soybean Science, 2009, 28(4): 574-577. )
- [9] 周蓉,王贤智,陈海峰,等. 大豆倒伏性及其相关性状的 QTL 分析[J]. 作物学报, 2009, 35(1): 57-65. (Zhou R, Wang X Z, Chen H F, et al. QTL analysis of lodging and related traits in soybean[J]. Acta Agronomica Sinica, 2009, 35(1): 57-65. )
- [10] Pedziwilk F. Ethyl methanesulfonate (EMS)-induced mutants of *Propionibacterium shermanii* 2 [J]. Acta microbiologica Polonica. Series B: Microbiologia Applicata, 1971, 3(2): 79.
- [11] 张俐俐,雷勃钧,吕晓波,等. 应用化学诱变法筛选抗草甘膦大豆突变株系 [J]. 大豆科学, 2009, 28(5): 938-940. (Zhang L L, Lei B J, Lyu X B, et al. Glyphosate resistant mutant strain of soybean filtered be chemomorphsis[J]. Soybean Science, 2009, 28(5): 938-940. )
- [12] 张力伟,牛腾飞,张文会,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. (Zhang L W, Niu T F, Zhang W H, et al. Screening of mutants and construction of mutant population for soybean cultivar “Jihuang13” [J]. Soybean Science, 2013, 32(1): 33-37. )
- [13] Chiu W H, Chandler J, Cnops G, et al. Mutations in the TOR-NAD02 gene affect cellular decision in the peripheral zone of the shoot apical meristem of *Arobidopsis thaliana*[J]. Plant Molecular Biology, 2007, 63(6): 731-744.
- [14] Koornneeff M, Dellaert L, van der Veen J H, et al. EMS and relation-induced mutation frequencies at individual loci in *Arabidopsis thaliana*(L. ) Heynh [J]. Mutation Research, 1982, 93(1): 109-123.
- [15] 曲高平,孙妍妍,庞红喜,等. 甘蓝型油菜 EMS 突变体库构建及抗除草剂突变体筛选[J]. 中国油料作物学报, 2014, 36(1): 25-31. (Qu G P, Sun Y Y, Pang H X, et al. EMS mutagenesis and ALS-inhibitor herbicide-resistant mutants of *Brassica napus* L. [J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2014, 36(1): 35-31. )
- [16] Kuraparth V, Sood S, Dhaliwal H S, et al. Identification and mapping of a tiller inhibition gene(*tin-3*)in wheat[J]. Theoretical and Applied of Genetics, 2007, 114(2): 285-294.
- [17] 徐艳花,陈锋,董中东,等. EMS 诱变的普通小麦豫农 201 突变体库的构建与初步分析[J]. 麦类作物学报, 2010, 30(4): 625-629. (Xu Y H, Chen F, Dong Z D, et al. Construction and analysis of EMS induced mutant library of hexaploid wheat cultivar Yunong 201[J]. Journal of Triticeae Crops, 2010, 30(4): 625-629. )
- [18] Krishnan A, Guiderdoni E, An G, et al. Mutant resources in rice for the functional genomics of the grasses [J]. Plant Physiology, 2009, 149: 165-170.
- [19] 叶俊,吴建国,郑希,等. 水稻“9311”突变体筛选和突变体库构建[J]. 作物学报, 2006, 32(10): 1525-1529. (Ye J, Wu J G, Zheng X, et al. The screening of mutants and construction of mutant population for cultivar “9311” in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Acta Agronomica Sinica, 2006, 32(10): 1525-1529. )
- [20] Zhao Y, Wang M L, Zhang Y Z, et al. Achlorophyll-reduced seedling mutant in oilseed rape, *Brassica napus* for utilization in F<sub>1</sub> hybrid production [J]. Plant Breeding, 2000, 119(2): 131-135.
- [21] Tadege M, Wang T L, Wen J Q, et al. Mutagenesis and beyond! Tools for understanding legume biology [J]. Plant Physiology, 2009, 151(3): 978-984.
- [22] 张达,王军虹,王豫颖,等. 矮化大豆突变体 GA<sub>3</sub> 的调控[J]. 大豆科学, 2008, 27(3): 456-460. (Zhang D, Wang H J, Wang Y Y, et al. GA<sub>3</sub> regulation in the dwarfing mutant soybean [J]. Soybean Science, 2008, 27(3): 456-460. )