



⁶⁰Co-γ 和 EMS 诱变“天隆一号”突变体库变异特征的初步分析

张鑫¹, 苏彤², 顾玉阳², 张艺², 姚陆铭², 王彪², 朱骏¹, 顾大国³

(1. 上海师范大学 生命科学学院, 上海 200234; 2. 上海交通大学 农业与生物学院, 上海 200240; 3. 上海星辉蔬菜有限公司, 上海 201419)

摘要: 为培育新的适应长江流域气候类型的大豆品种, 利用⁶⁰Co-γ 射线和 EMS 分别对大豆天隆一号的种子进行诱变处理, 构建大豆突变体库。对 350 份有表型变异的株系进行连续两年田间鉴定, 运用 60 对 SSR 标记进行分子检测, 并对籽粒表型变化明显的突变株进行苯基丙酸类代谢主要酶 qPCR 分析。结果表明: 350 份材料中有 145 份在株高、叶形、花色、种皮色、结荚习性等方面有稳定可见的表型变异, 101 份材料中检测到与野生型天隆一号存在至少 1 个 SSR 位点差异, 其中 M₃-SD-1 与 M₃-SD-2 有超过 10 个标记的差异。SSR 分析表明, 表型发生变异的突变体主要是由 DNA 变化引起的, 且突变体发生了多位点变异, 突变位点也彼此不同。qPCR 检测结果显示, 种皮色、脐色等发生突变的 3 个材料苯基丙酸类代谢途径中关键基因的表达量发生显著变化。研究结果既可以为大豆品种改良提供新的种质资源, 也有助于大豆功能基因组的研究。

关键词: ⁶⁰Co-γ; EMS; 大豆; 突变体库; SSR 标记; qPCR

Preliminary Variability Analysis of Mutant Population for Soybean ‘Tianlong No. 1’ Induced by ⁶⁰Co-γ and EMS

ZHANG Xin¹, SU Tong², GU Yu-yang², ZHANG Yi², YAO Lu-ming², WANG Biao², ZHU Jun¹, GU Da-guo³

(1. College of Life Sciences, Shanghai Normal University, Shanghai 200234, China; 2. School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China; 3. Shanghai Xinhui Vegetable Co. Ltd., Shanghai 201419, China)

Abstract: In order to cultivate new soybean varieties adapted to the climate type of the Yangtze River Basin, the seeds of soybean ‘Tianlong No. 1’ were mutagenized by ⁶⁰Co-γ ray and EMS respectively to construct a soybean mutant library. The 350 mutant lines with phenotypic variation were planted in the field for two consecutive years, and we identified the molecular characteristics with 60 pairs of SSR markers. And then, we detected the expression of main phenylpropionic acid metabolic pathway in mutant plants with obvious phenotype variation on seed. The results showed that the 145 mutants displayed stable visible variation in plant height, leaf shape, flower color, seed coat color and pod habit, and the 101 lines were found to be with at least one SSR locus difference from the wild type ‘Tianlong No. 1’, and M₃-SD-1 and M₃-SD-2 have more than 10 polymorphic markers. The phenotypic variations were caused by DNA mutations that display multiple site mutations, and the mutation loci were different from each other by SSR markers. Three mutants with seed coat color and umbilical color were detected expression of key genes in the phenylpropionic acid metabolic pathway by qPCR, and those genes were significant different from their original patterns. This research can provide new germplasm resources for the improvement of soybean varieties and contribute to the further study on soybean functional genomics.

Keywords: ⁶⁰Co-γ; EMS; Soybean; Mutant library; SSR markers; qPCR

大豆[*Glycine max* (L.) Merr.]原产中国, 是一种具有极大经济价值的豆科作物, 是人类食物中植物蛋白质的主要来源, 大豆蛋白质的氨基酸组成和动物蛋白质成分近似, 其中氨基酸比较接近人体需要的比值; 同时, 大豆脂肪也具有很高的营养价值, 含有很多不饱和脂肪酸, 易被人体消化吸收。随着全世界人口的持续增长, 人们对大豆的需求也日益提高, 培育更优良性状的大豆迫在眉睫^[1-2]。在自然环境中, 因外界条件的变化和内部遗传结构的不

稳定, 植物可能会自发突变, 然而这类突变的几率非常低, 人工诱变可使这种突变提高千百倍。

目前, 诱变突变体的方式主要包括理化诱变和生物诱变。理化诱变又分为物理诱变和化学诱变。物理诱变主要有⁶⁰Co-γ 射线、离子束轰击^[3]、伦琴射线等, 目前最常用的是⁶⁰Co-γ 射线诱变。利用⁶⁰Co-γ 射线诱变大豆先后获得了抗病突变体、高蛋白高油脂突变体、高产型突变体等。温宏伟等^[4]使用⁶⁰Co-γ 诱变大豆滞绿突变体获得了蛋白含量高的突变系;

收稿日期: 2019-02-18

基金项目: 转基因大豆新品种培育专项(2016ZX08004-003); 国家自然科学基金(31601321, 31871645)。

第一作者简介: 张鑫(1992-), 男, 学士, 主要从事大豆遗传育种与栽培研究。E-mail: junmogui@163.com。

通讯作者: 王彪(1973-), 男, 博士, 副教授, 主要从事大豆分子生物学研究。E-mail: wangbiao@sjtu.edu.cn。

鹿文成等^[5]利用⁶⁰Co- γ 射线诱变大豆黑河18成功选育早熟和高产的大豆新品种黑河52。

化学诱变是利用核酸碱基类似物、烷化类及羟胺等分子活性不稳定的化学物质作为诱变剂诱导植物基因组发生突变,其中主要产生G/C→A/T位点突变^[6]。通常用的是烷化类诱变剂甲基磺酸乙酯(ethyl methane sulfonate, EMS)^[7],EMS能使基因发生点突变而不易出现染色体的畸变。张力伟等^[8]利用EMS诱变大豆冀黄13,获得了雄性不育和黑色种皮突变体;陈远东等^[9]利用EMS处理大豆南农94-16,获得了高蛋白大豆突变体。

近年来,科研人员利用不同的诱变方式成功构建了不同的大豆突变体库^[10-15]。然而我国幅员辽阔,不同地区的气候差异明显,造成了在生产中对大豆品种的要求不同,高纬度地区的大豆品种无法适应低纬度的环境变化^[16-18]。因此,构建适应长江流域气候类型的特异大豆突变体库,并从分子水平上分析理化诱变的特征具有必要。本研究通过⁶⁰Co- γ 射线和EMS诱变适宜长江流域种植的大豆品种天隆一号,并且对突变体进行表型鉴定和SSR分析,以种皮色和脐色突变的材料为例,从分子水平上阐释⁶⁰Co- γ 射线和EMS诱变突变体库的变异特征。研究结果能为大豆基因功能分析及育种提供新的种质资源^[19-20]。

1 材料与方法

1.1 材料

天隆一号是由中国农业科学院油料作物研究所培育的产量高、抗病性好的大豆品种,该品种夏播的平均生育期为98 d,表现为灰毛、白花、株高60 cm左右,底荚高度13.8 cm,主茎节数13.9个,单株荚数29.3个,百粒重24~26 g。黄色种皮,种脐色接近种皮色。该品种适合南方地区夏播,材料由中国农业科学院油料作物研究所提供。

植物RNA提取试剂盒是由生工生物工程股份有限公司提供,植物DNA提取试剂盒、RNA反转录成cDNA试剂盒以及荧光定量PCR试剂盒由天根生化有限公司提供。

1.2 主要仪器

BIO RAD公司的CFX384™ Real-Time System qPCR仪,上海天能公司的Tanon 3500凝胶图像分析仪。

1.3 试验设计

2016年6月在上海交通大学农业与生物学院实验基地(E121°26'17",N31°2'1")播种经过⁶⁰Co- γ 和EMS诱变处理的大豆天隆一号籽粒各8 000粒,

按行播种,行距40 cm,株距15 cm,10月单株收种。2017年种植M₂诱变群体,收获农艺性状有明显变化单株,获得350份大豆资源。2018年将350份M₃单株扩繁成株系,6月播种,出苗后每7 d进行一次田间性状调查,选取两年鉴定表型与野生型差异较大且较稳定的M₃植株进行表型性状和分子生物学分析。

选取籽粒表型性状发生明显变化的突变株M₃-PU-4、M₃-PU-5和M₃-SD-2进行变异特性分析,其中M₃-PU-4和M₃-PU-5都发生种脐色突变,M₃-SD-2的籽粒的脐色和种皮色发生明显突变。用60对SSR引物检测3个突变材料的基因组突变位点。对苯基丙酸类代谢途径中的苯丙氨酸解氨酶(phenylalanine ammonia lyase, PAL)、黄烷酮-3-羟化酶(flavanone 3-hydroxylase, F3H)和异黄酮合成酶(isoflavone synthase, IFS)关键基因进行qPCR分析,检测其表达量^[21],用大豆CYP基因作为内参^[22]。

1.4 方法

1.4.1 表性调查 以天隆一号大豆为对照,记录叶形、株高、花期、成熟期、结荚习性、花色、开花习性,种皮色、种脐色、百粒重等性状,表型与天隆一号有明显差异的记录为突变体,如成熟时间比天隆一号早或晚7 d记录为早熟或晚熟,结荚从天隆一号的簇状结荚突变为辐射状记录为结荚习性突变。

1.4.2 SSR分子检测 从大豆基因组数据库(<https://www.soybase.org/>)选择大豆SSR分子标记,每条染色体各选择3个标记,近似均匀分布,共60对SSR引物。利用选取的SSR标记对田间筛选的145株M₃株系进行SSR分析。PCR反应在东胜龙EDC-810型PCR扩增仪上完成。PCR反应体系为10 μ L,包含:模板DNA 30 ng,正反向引物为0.6 μ L,2 \times Taq PCR Mixture,用ddH₂O补齐至10 μ L。PCR反应程序为:95℃预变性4 min;95℃变性30 s,45~56℃退火30 s,72℃延伸50 s,35个循环;72℃延伸10 min,4℃保温。扩增产物使用8%变性聚丙烯酰胺凝胶电泳,恒定电压180 V,电泳2 h,结束后银染法显色条带。

1.4.3 qPCR分析 选取种皮色、脐色有明显变异的突变体进行变异特征分析,取同时期有突变表型株系的叶提取RNA,用紫外分光光度计测定260和280 nm的吸光值,调整RNA浓度到100 ng· μ L⁻¹,并反转录得到cDNA。参照天根公司的Talent qPCR PreMix(SYBR Green)试剂盒,进行Real Time PCR反应。反应体系为20 μ L,包含2 \times Talent qPCR PreMix 10 μ L, cDNA 1 μ L,正反向引物各0.6 μ L, RNase-Free ddH₂O补齐至20 μ L。三步法反应程

序:95℃ 预变性 3 min;95℃ ,5 s;55℃ ,10 s;72℃ ,15 s;共 40 个循环;溶解曲线从 65℃ 升高到 95℃。假设目标序列和内参序列的扩增效率相等,计算目的基因/内参的相对浓度,使用 2^{-ΔΔC_t}法分析相对基因表达差异^[23],每次反应 3 个重复,试验重复 3 次。

引物设计采用 Primer 5 软件。内参基因 *CYP*(NM_001354283.1), F: 5'-GTCGATTTATGGCGCCAAGT-3', R: 5'-GTCGAGCCACTCTGTCTTCT-3'。PAL2 (GQ358921.1), F: 5'-CATTGATGACCCCTGCAGTG-3', R: 5'-TCCTG-CACCTTCCACTTCCT-3'; *F3H* (AY669325.1), F: 5'-TGCCTACAACGAATTCAGCG-3', R: 5'-CACCGTGAT-CAACAACCTGG-3'。 *IFS2* (NM_001251586.2), F: 5'-ATAGCTCAGTGGCCATGGTT-3', R: 5'-AAG-CTCCT-CGGTCAAGTCAA-3'。qPCR 反应在 CFX384™ Real-Time System 仪器上进行。

1.5 数据分析

使用 Excel 2007 处理实验数据,并利用 Sigma Plot 10.0 作图。

2 结果与分析

2.1 诱变效应分析

天隆一号大豆种子经⁶⁰Co-γ 射线和 EMS 诱变后,M₁ 代出苗率仅为 31%,产生大量致死突变。M₂ 代出苗率为 37.4%,表现出生长期延长、育性降低、贪青晚熟、结荚多但结籽率低等影响育性的变异,因育性等问题在 M₃ 代的出苗率仅达到 41.7%。有些突变的性状可能受环境因素影响较大,在 M₂ 代出现了巨型株表型,最大株高 1.6 m,分枝辐射直径 1.1 m,但在 M₃ 代没有发现,说明诱变效应引起的表型变异在后代中并不都能稳定遗传,或许与表观修饰有关。

2.2 表型性状变异分析

⁶⁰Co-γ 射线和 EMS 诱变天隆一号构建的突变库连续两年鉴定结果中,有 145 个突变的株系在株高、叶形、花色、种皮色、结荚习性等方面有稳定的表型变异。农艺性状特征总结见表 1。

表 1 突变体库表型性状分类
Table 1 Category for phenotype characters of mutants

部位 Position	突变性状 Mutant characters	命名 Name	突变株数 No. of mutant plants	部位 Position	突变性状 Mutant characters	命名 Name	突变株数 No. of mutant plants
叶 Leaf	四叶 4-leaflet	F4	16	荚 Pod	多荚 Multi-pod	MP	11
	五叶 5-leaflet	F5	34		少荚 Less pod	PL	3
	窄叶 Narrow leaf	NL	7		宽荚 Wide pod	WP	2
	皱叶 Wrinkly leaf	WL	3		秕荚 Aborted pod	AP	1
	叶色深 Deep green	DG	3		落荚 Fall pod	FP	1
茎 Stem	细 Delicate stem	DS	14	籽粒 Seed	大粒 Bigger seed	BS	13
	粗 Thick stem	TS	15		紫脐 Purple umbilical	PU	41
	高 Tall	TA	30		开裂 Split	PS	3
	矮 Small	SM	42	其它 Others	早熟 Premature	PM	8
	蔓生 Sprawl	SP	3		晚熟 Late maturing	LM	16
花 Flower	紫花 Purple flower	PF	2		无限结荚习性 Infinite pod	IP	4
	早花 Flowering early	FE	2		半退化 Semi-degeneration	SD	2
	晚花 Flowering late	FL	3		锈病 Rust	RU	2
	无限花期 Infinite flowering	IF	4		易倒伏 Fall	FA	3
	花序 Inflorescence	IN	1		无表型 No phenotype	NP	9

(1) 叶突变:在⁶⁰Co-γ 射线和 EMS 诱变的群体中存在较大几率的叶突变。有的株系叶色比对照深,有的株系叶形变狭长,最多的变异为复叶数增加,达到了 34.4%。

(2) 茎秆突变:在诱变处理的后代群体中茎秆突变占有较高的比率。主要表现为株高、茎秆粗细

以及分枝数等变化。分枝数增加的株系,其茎秆普遍变粗,而无分枝的突变体表现出茎秆变细的性状,因而茎秆粗细和分枝数可能存在一定相关性。株高和茎秆粗细没有明显的关联性。茎秆的突变常伴随其它农艺性状的变异,如有的出现早熟,有的表现出发育不良(图 1)。



A: 贪青晚熟; B: 早熟; C: 发育不良; D: 矮小; E: 无分枝; F: 高杆。
A: Late maturing; B: Premature; C: Hypogenesis; D: Dwarf; E: Branch none; F: Tall plant.

图1 部分突变体表型

Fig. 1 Phenotypes of some mutants

(3)花突变:在两种诱变处理得到的群体中都有花发育相关的突变出现。较为明显的是花色的变化,有两个突变株 PF-1 和 PF-2, M_2 和 M_3 代都由白花变为紫花。花期也出现明显变化,早花和晚花以及无限花期都有发现;有的株系发生花序的突变,在 M_2 代筛选到 3 株花序由总状花序变成了类穗状花序的突变株,其育性受到影响,仅收获 1 粒种子, M_3 代唯一单株仍保留该表型,也出现败育的现象,收到 20 粒种子,记录为 M_3 -IF-1。

(4)结荚突变:在两种诱变处理得到的后代群体中有多种结荚类型发生。表现为有限结荚习性

转变为无限结荚习性,细荚变宽荚以及荚出现不规则扭曲。如 M_2 -MP-1 株系具有结荚多 (multi-pod) 的性状,但多以秕荚为主且易落荚。

(5)籽粒突变:在两种诱变处理得到的群体中,籽粒的突变较为明显。如种脐色 (purple umbilical) 变化株系 M_3 -PU-4 种脐色由原来的浅褐色 (无色) 变为褐色以及子叶处开裂等性状。 M_3 -SD-2 株系籽粒变小且变扁,种皮色也从黄色突变成褐色 (图 2)。 M_3 -PU-5 株系的籽粒明显变大且种脐色突变为褐色。

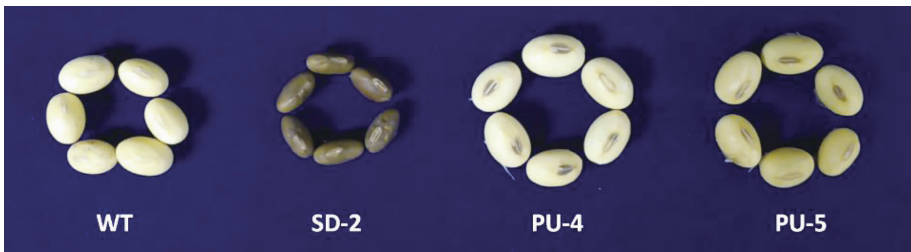


图2 籽粒颜色突变体与野生型的脐色和种皮色比较

Fig. 2 Umbilical color and seed coat color of seed color mutants and wild type

(6)其它突变:在两种诱变处理得到的群体中,还存在熟期的差异,早熟株系所占比例 5.7%,晚熟株系则占 11.4%,其中晚熟 (late maturing) 性状株系 M_3 -LM-2 比野生型晚熟 22 d。

有两株半退化 (semi-degeneration) 型突变株系分别为 M_3 -SD-1 和 M_3 -SD-2,其中 M_3 -SD-2 有较多的野生大豆性状,紫花,匍匐生长,荚小,种皮呈棕褐色;而 M_3 -SD-1 株型比较接近天隆一号,但叶形、叶色都和野生大豆接近,紫花,种皮也呈棕褐色 (图 2)。

后续研究选定 M_3 -SD-2、 M_3 -PU-4 和 M_3 -PU-5 进行表型性状和分子标记结果相关性研究。感病、易倒伏等突变只做记录,留待进一步研究。

2.3 分子检测

2.3.1 SSR 分子标记检测 60 对 SSR 引物的分子标记检测结果显示:在分子标记检测结果中存在差异的多数突变体的主要表型性状并没有显著变化,如 M_3 -NP-1;同时,表型存在显著差异的突变体在所筛选的 SSR 位点上也没有检测到多态性,如 M_3 -IF-1。

对突变体中出现较多变异的 SSR 位点归纳见表 2: Satt359、Satt346、Satt308 和 Satt181 在多个突变株系中都表现出差异,变异的频率较高,但不同的突变体中,有的检测到的 SSR 变异位点数量差别较大,有些突变体中没有检测出变异位点,共有 101 个株系检测到 SSR 变异位点。

表 2 ⁶⁰Co-γ 和 EMS 诱变突变体的多态 SSR 位点的数量

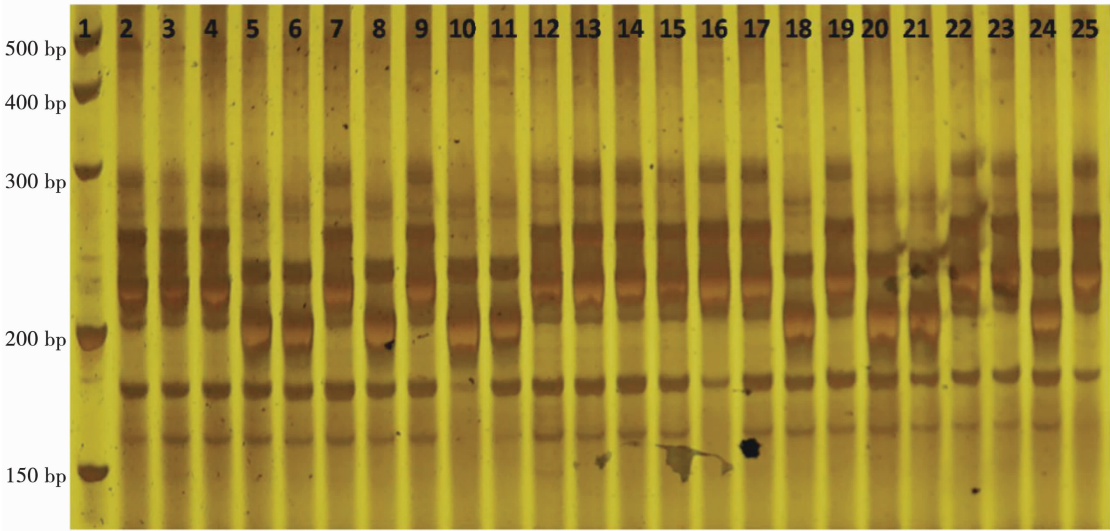
Table 2 Number of polymorphic SSR among some soybean mutants induced by ⁶⁰Co-γ and EMS

SSR 标记 SSR marker	突变植株数量 Number of mutant plant	突变表型(数量) Mutant characters(No.)
Satt359	51	株高(27)、复叶数(19)、熟期(7)
Satt346	49	株高(29)、复叶数(12)、分枝数(5)
Satt308	48	复叶数(16)、熟期(10)、茎秆直径(8)
Satt181	47	株高(22)、茎秆直径(13)、复叶数(15)、花期(2)
Satt185	4	半退化(2)
Satt237	4	半退化(2)、分枝数(2)
Satt194	4	半退化(2)
Satt309	4	半退化(2)、结荚习性(1)
Satt292	4	半退化(2)、复叶数(2)
Satt590	3	半退化(2)、株高(1)
Satt002	3	半退化(2)、结荚习性(2)

PAGE 结果显示突变体的 SSR 条带有多种变化,涵盖了株高、复叶数、熟期、茎秆直径、花期等表型(表 2)。以 Satt346 扩增条带为例,突变体 M₃-TS-6(thick stalk)以及 M₃-SD-2 的条带片段长度比野生型小,表明突变体对应的位点发生 DNA 序列的删减(图 3);突变体 M₃-SM-1(small)和 M₃-NP-1(no phenotype)等在 Satt181 的条带片段长度比野生型大,表明突变体在该处位点发生 DNA 序列的插入。两

株半退化突变株系与天隆一号在多个 SSR 标记位点上存在差异,其中 M₃-PF-1 和 M₃-PF-2 在 Satt181、Satt346、Satt309 等位点出现插入或删减,而 M₃-IF-1 仅在 Satt181 位点检测出差异。

Satt185、Satt181、Satt216、Satt346、Satt194 和 Satt309 共 6 对 SSR 引物的扩增结果在 SD-2、PU-4、PU-5 间存在差异(表 3)。



1: 分子量标准物;25:野生型;2-24:诱导的突变体,其中 10 泳道为 M₃-SD-2,24 泳道为 M₃-TS-6。
1: Ladder marker; 25: WT; 2-24: Mutants; 10: M₃-SD-2; 24: M₃-TS-6.

图 3 Satt346 引物在部分突变体中的扩增

Fig. 3 Amplification of Satt346 primers among some soybean mutants

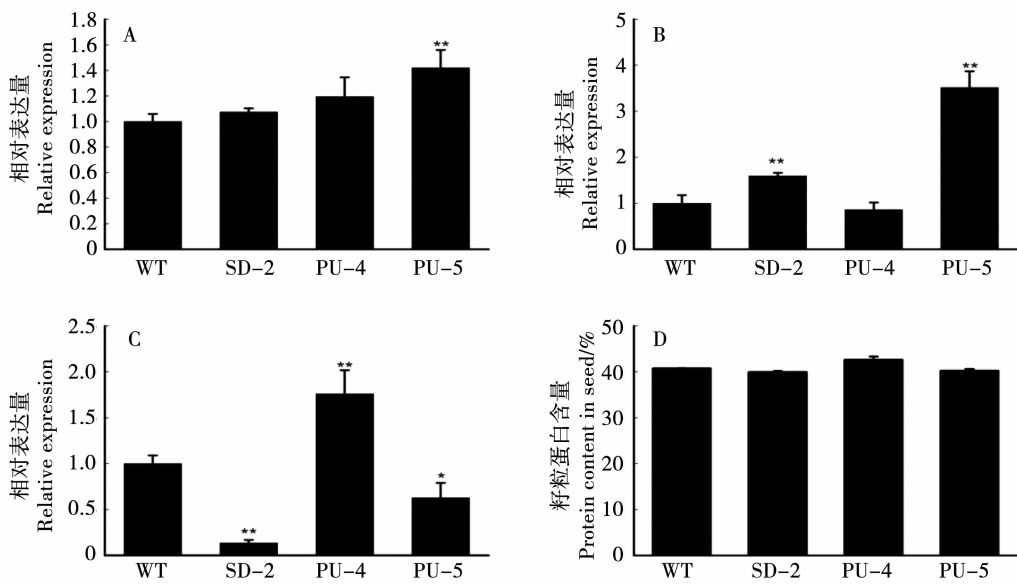
表3 SD-2、PU-4 和 PU-5 株系差异 SSR 标记
Table 3 Number of polymorphic SSR loci among SD-2、PU-4 和 PU-5 mutants

SSR 标记 SSR marker	SD-2	PU-5	PU-4
Satt185	✓	—	—
Satt181	✓	—	✓
Satt216	✓	—	—
Satt346	✓	—	—
Satt194	✓	✓	—
Satt309	—	—	✓

✓:有 PCR 条带;—:没有 PCR 条带。
✓:With PCR bands; —:Without PCR bands.

2.3.2 种皮变异植株苯基丙酸类代谢相关酶分析

SD-2、PU-4、PU-5 和 WT 的 qPCR 检测结果表明, *PAL2* 的表达在 SD-2、PU-4 和 PU-5 株系中均高于 WT,但只有 PU-5 与对照存在极显著差异(图 4A), *IFS2* 的表达量在 SD-2 和 PU-4 中与 WT 差异极显著,PU-5 中低于 WT 且差异显著(图 4C),而 *F3H* 的表达结果却与 *IFS2* 相反(图 4B),*F3H* 的表达量在 PU-5 和 SD-2 中高于 WT 并且差异极显著,PU-4 中略低于 WT 但无显著差异。SD-2、PU-4、PU-5 与 WT 材料相比,籽粒的蛋白含量没有明显差异(图 4D)。种皮色与脐色与花青素合成途径密切相关,种皮色、脐色发生突变,苯基丙酸类代谢途径中关键基因表达发生显著的变化,特别是苯丙氨酸解氨酶基因的表达量呈高于 WT 的趋势。



A: *PAL2*; B: *F3H*; C: *IFS2*; D: 籽粒蛋白含量; *: 显著差异; **: 极显著差异。
A: *PAL2*; B: *F3H*; C: *IFS2*; D: Content of protein; *: Significant difference; **: Extremely significant difference.

图4 SD-2、PU-4、PU-5 和 WT 苯基丙酸类代谢途径中关键基因的表达和籽粒蛋白质含量
Fig. 4 Key genes expression of phenylpropanoid pathway and protein content in SD-2, PU-4, PU-5 and WT

3 讨论

物理和化学等人工诱变方法能够在短时间内获取大量无序的突变后代,是一种获得育种资源的有效途径。⁶⁰Co-γ 射线能量高、穿透力强,是原子内层电子能级跃迁,导致原子离子化而与其它分子结合,使共价键发生断裂,从而造成基因组易位或缺失等染色体结构的异变^[24]。EMS 主要能诱发点突变,可能导致无义突变、沉默突变和错义突变。使用 EMS 和⁶⁰Co-γ 等方法都能获得农艺性状或特异表型符合育种目标或遗传研究的大豆突变体。随着功能基因组学的发展以及对基因研究的深入,构

建理化诱变突变体库已经越来越重要。⁶⁰Co-γ 辐射大豆种子得到了复叶数,种皮色,茎、生长习性、株高、育性、蛋白质含量等性状的突变体^[4-5]。利用 EMS 化学诱变剂诱变大豆种子,获得了油脂含量,花期,叶型,株高等性状的突变体^[8-9]。本研究利用 EMS 和⁶⁰Co-γ 两种方式处理大豆天隆一号,在诱变的后代中都获得了在株高、叶色、叶形、花期、熟期,种皮色等性状明显变异的突变体,为育种提供了丰富的种质资源。

突变体库的构建不仅可以丰富种质资源,创造各种优良农艺性状的个体,而且可以为基因功能的深入提供素材。本研究获得了一些株高、叶形、花

期、育性等性状发生变化的突变体,与前人的研究结果有很多相似,表明这些性状是比较容易发生突变的^[25]。本研究发现的稀有突变性状,如退化成半野生突变、无限结荚习性突变、花序的突变,这些突变都能够稳定遗传且在 SSR 检测中都存在差异性。半野生退化突变体的发现有助于对大豆进化的机理进行研究;而花序突变以及无限结荚习性的突变有助于大豆花发育相关的研究,若能够深入进行,可能对完善大豆花发育模型提供理论基础。这些突变对大豆基因组研究尤为重要。

用表型来鉴定变异存在局限,因为⁶⁰Co-γ 和 EMS 等物理化学手段诱发的突变很多是隐性的,大量突变也很难出现肉眼可见的表型,因此,有必要从分子水平上,如利用 SSR、TILLING 等技术手段来鉴定突变体^[26-27]。EMS 诱变并非是单纯的点突变,也存在小片段 DNA 的缺失、简单重复序列的缺失或重复等。在烟草、棉花等研究中发现 EMS 诱变使得突变体产生了丰富的多态性和广泛的遗传变异,导致 SSR 多态性的产生^[28-29]。本研究用 60 对 SSR 引物对⁶⁰Co-γ 和 EMS 诱导的突变体库进行检测,所发现的 SSR 变异都是随机发生的。大多数分子标记检测出有差异的突变体的主要性状与野生型相比并没有显著的农艺性状变化,如 M₃-NP-1;同时,农艺性状发生显著变异的突变体在所筛选的 SSR 位点上也没有检测到多态性,如 M₃-IF-1。在 Zuo 等^[30]的研究中发现,Satt308 与光周期和温度响应值(VRPT)相关,而本研究在中在 Satt308 存在差异的株系表现出在复叶数、茎秆直径和熟期等表型上的突变,在后期筛选中也可以尝试探究这些突变株系是否与光周期和温度响应值存在关联。⁶⁰Co-γ 和 EMS 诱发的突变在基因组中是随机分布的,在突变育种中,即使只是某一表型性状发生突变,但在 DNA 水平上仍然可能存在多个突变位点^[31-32]。无论是⁶⁰Co-γ 还是 EMS 诱导产生的突变,都有可能产生缺失、插入、倒转、碱基替代等染色体变化,从而在分子水平上产生丰富的多态性,继而出现农艺性状突变^[32-33]。

大豆类黄酮及异黄酮是大豆重要的次生代谢产物之一,而大豆类黄酮和花青素合成途径都处于苯基丙酸类代谢途径的下游,本研究选取 3 个种皮色、脐色发生突变的材料,检测其苯基丙酸类代谢途径中关键酶基因的表达,发现突变体苯基丙酸类代谢途径中关键酶基因表达量发生显著变化,导致表型发生变异,这些材料可用于对相关途径作用机理的研究。

4 结 论

利用⁶⁰Co-γ 射线和 EMS 诱变处理适宜长江流域种植的大豆品种天隆一号,构建了包含 350 个株系的突变体库,并对其表型特征进行连续两年的统计分析,获得有肉眼可见表型稳定变异的 145 个突变体株系,用均匀分布在 20 条染色体上的 60 对 SSR 标记进行分子鉴定,其中 101 个突变体株系在 DNA 水平检测到了突变位点。选取种皮色、脐色发生突变的 3 个材料,qPCR 检测发现苯基丙酸类代谢途径中关键酶基因的表达发生显著变化,导致表型变异的发生。

参考文献

- [1] Ram K S, Virendra S B, Bhat K V, et al. SSR and AFLP based genetic diversity of soybean germplasm differing in photoperiod sensitivity[J]. *Genetics and Molecular Biology*, 2010, 33(2): 319-324.
- [2] Mulato B M, Möller M, Zucchi M I, et al. Genetic diversity in soybean germplasm identified by SSR and EST-SSR markers[J]. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, 2010, 45(3): 276-283.
- [3] 陈恒雷,吕杰,曾宪贤,等. 离子束诱变育种研究及应用进展[J]. *种子*, 2005, 6: 505-506. (Chen H L, Lyu J, Zeng X X, et al. Advances in induced mutation breeding with ion beam implantation[J]. *Seed*, 2005, 6: 505-506.)
- [4] 温宏伟,王鹏,李贵全,等. ⁶⁰Co 诱变大豆滞绿突变体 M₆ 变异分析[J]. *山西农业科学*, 2018, 46(4): 522-525, 533. (Wen H W, Wang P, Li G Q, et al. Mutation analysis of ⁶⁰Co mutagenic soybean stay-green mutants in M₆ generation[J]. *Journal of Shanxi Agricultural Sciences*, 2018, 46(4): 522-525, 533.)
- [5] 鹿文成,闫洪睿,张雷,等. ⁶⁰Co-γ 射线诱变选育早熟和高产及优质大豆新品种“黑河 52”[J]. *黑龙江农业科学*, 2011, 9: 4-6. (Lu W C, Yan H R, Zhang L, et al. Breeding of soybean cultivar ‘Heihe 52’ with early maturity, high yield and good quality by hybridization and ⁶⁰Co-γ ray irradiation [J]. *Heilongjiang Agricultural Science*, 2011, 9: 4-6.)
- [6] 孙洁,崔海瑞. TILLING 技术及其应用[J]. *细胞生物学杂志*, 2007, 29(1): 41-46. (Sun J, Cui H R. TILLING technology and its application [J]. *Chinese Journal of Cell Biology*, 2007, 29(1): 41-46.)
- [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] 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): 34-37, 42. (Zhang L W, Fan Y L, Niu T F, et al. Screening of mutants and construction of mutant population for soybean cultivar ‘Jihuang 13’ [J]. *Soybean Science*, 2013, 32(1): 34-37, 42.)
- [9] 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): 574-577,582. (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): 574-577,582.)
- [10] Michelmores R W, Paran I, Kesseli R V. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1991, 88: 9828-9832.
- [11] 张磊,戴欧和,黄志平,等. 杂交大豆“杂优豆1号”选育[J]. 大豆通报, 2007, 2:14-16. (Zhang L,Dai O H,Huang Z P, et al. Breeding of hybrid soybean ‘Zayoudou No. 1’ [J]. Soybean Bulletin, 2007, 2:14-16.)
- [12] 张磊,戴欧和. 大豆质核互作不育系 W931A 的选育研究[J]. 中国农业科学, 1997, 30(6):90-91. (Zhang L, Dai O H. Selection and breeding of nueleo-cytoplasmic male sterile line W931A in soybean [J]. Scientia Agricultura Sinica, 1997, 30(6):90-91.)
- [13] Stam P. Construction of integrated genetic linkage maps by means of a new computer package: Join Map [J]. The Plant Journal, 1993(5):739-744.
- [14] 汤复跃,周立人,张磊,等. 大豆 M 型细胞质雄性不育恢复基因 SSR 标记初步定位[J]. 大豆科学, 2008, 27(3): 383-386. (Tang F Y, Zhou L R, Zhang L, et al. SSR marker location for fertility restorer gene of M cytoplasmic male sterility in soybean [J]. Soybean Science, 2008, 27(3):383-386.)
- [15] Song Q J, Marek L F, Shoemaker R C, et al. A new integrated genetic linkage map of the soybean [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2004, 109:122-128.
- [16] Assefa Y, Bajjalieh N, Archontoulis S, et al. Spatial characterization of soybean yield and quality (amino acids, oil, and protein) for United States[J]. Scientific Reports, 2018, 8:14653.
- [17] Carrera C S, Reynoso C M, Funes G J, et al. Amino acid composition of soybean seeds as affected by climatic variables [J]. Pesquisa Agropecuária Brasileira, 2011, 46: 1579-1587.
- [18] Rotundo J L, Miller-Garvin J E, Naeve S L, et al. Regional and temporal variation in soybean seed protein and oil across the United States [J]. Crop Science, 2016, 56: 797-808.
- [19] Shi A N, Chen P Y, Li D X, et al. Genetic confirmation of 2 independent genes for resistance to soybean mosaic virus in J05 soybean using SSR markers[J]. Journal of Heredity, 2008, 99(6): 598-603.
- [20] Xu D H, Abe J, Gai J Y, et al. Diversity of chloroplast DNA SSRs in wild and cultivated soybeans: Evidence for multiple origins of cultivated soybean[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2002, 105:645-653.
- [21] Yu O, Jung W, Shi J, et al. Production of the isoflavones genistein and daidzein in non-legume dicot and monocot tissues [J]. Plant Physiology, 2000, 124(2): 781-794.
- [22] Jian B, Liu B, Bi Y R, et al. Validation of internal control for gene expression study in soybean by quantitative real-time PCR [J]. BMC Molecular and Cell Biology, 2008, 23:59.
- [23] Schmittgen T D, Livak K J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method[J]. Nature Protocols, 2008, 3(6):1101-1108.
- [24] Liu Z Q, Gu W B, Li W J. Effects of heavy-ion beams irradiation on survival rate and antioxidant enzymes of sweet sorghum seedlings [J]. Agricultural Science & Technology, 2012, 13(11): 2257-2260,2268.
- [25] 黄益安,邓小娟,万海波,等. 大豆“华夏3号”突变体库构建及 SSR 分子标记[J]. 中国油料作物学报, 2016, 38(2):159-166. (Huang Y A, Deng X J, Wan H B, et al. Mutagenesis and SSR markers of soybean cultivar ‘Huaxia 3’ [J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2016, 38(2):159-166.)
- [26] Mary J E, Sabbir A C M, Bernardini A, et al. Development and phenotypic screening of an ethyl methane sulfonate mutant population in soybean [J]. Front Plant Science, 2018, 9:394.
- [27] Khalil F, Xiao N Y, Muhammad T, et al. Screening of EMS-induced drought-tolerant sugarcane mutants employing physiological, molecular and enzymatic approaches[J]. Agronomy, 2018, 8:226.
- [28] 薄韶云,刘文涛,张渐隆,等. 甲基磺酸乙酯诱变烟草的 SSR 多态性分析[J/OL]. 分子植物育种, 2018;1-13. [2019-06-10]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20181105.1700.019.html>. (Bo S Y, Liu W T, Zhang J L, et al. Analysis of SSR polymorphism induced by ethyl methyl sulfate in tobacco [J]. Molecular Plant Breeding, 2018;1-13. [2019-06-10]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20181105.1700.019.html>.)
- [29] 叶春秀,庄振刚,谢宗铭. 新疆早熟陆地棉 EMS 诱变后代鉴定及分子标记检测[J]. 分子植物育种, 2015,13(8): 1730-1734. (Ye C X, Zhuang Z G, Xie Z M, et al. EMS-induced cotton generations identified and validated by molecular markers[J]. Molecular Plant Breeding, 2015, 13(8): 1730-1734.)
- [30] Zuo Q, Wen Z, Zhang S, et al. QTL Identification of the insensitive response to photoperiod and temperature in soybean by association mapping[J]. Journal of Integrative Agriculture, 2013, 12(8): 1423-1430.
- [31] Cheng X J, Chai L, Chen Z Y, et al. Identification and characterization of a high kernel weight mutant induced by gamma radiation in wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. BMC Genetics, 2015, 16:127.
- [32] Till B J, Cooper J, Tai T H, et al. Discovery of chemically induced mutations in rice by TILLING [J]. BMC Plant Biology, 2007, 7:19.
- [33] Ryouhei M, Makoto K, Shuichi I, et al. Molecular characterization of mutations induced by gamma irradiation in rice [J]. Genes & Genetic System, 2009, 84(5):361-370.