



# 大豆褐色种皮遗传分析及基因定位

董全中<sup>1,2</sup>, 蒋炳军<sup>3</sup>, 张 勇<sup>2</sup>, 薛 红<sup>2</sup>, 张明明<sup>2</sup>, 李微微<sup>2</sup>, 韩天富<sup>3</sup>, 宁海龙<sup>1</sup>

(1. 东北农业大学 农学院/大豆生物学教育部重点实验室/农业部东北大豆生物学与遗传育种重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150030; 2. 黑龙江省农业科学院 克山分院, 黑龙江 克山 161606; 3. 中国农业科学院 作物研究所, 北京 100081)

**摘 要:**为解析大豆籽粒种皮黄色向褐色突变的遗传规律及分子基础,本研究以田间发现的稳定繁殖的黄色种皮大豆中出现褐色种皮突变体及其原始品种为材料,进行田间表型性状鉴定。利用大豆 20 对染色体上的 176 个 SSR 标记对 4 对自然突变为褐色种皮的突变体及其原始品种进行基因型鉴定。利用种皮色突变体与其原始品种和非原始品种进行正向杂交和反向杂交试验,并对 F<sub>1</sub>、F<sub>2</sub> 种皮色的分离情况进行统计分析。利用 A2 连锁群上全部 72 对 SSR 标记对双亲遗传背景差异大的北豆 14 × 克 H09-95 的 F<sub>2</sub> 群体进行基因型鉴定。研究结果表明:褐色种皮的突变体是其对应的原始品种的近等基因系;褐色突变是可遗传的,受细胞核基因控制,与细胞质遗传无关;黄色种皮对自然突变的褐色种皮表现为显性,经卡方检验,杂种后代中种皮的黄色与褐色分离比例符合 3:1 的孟德尔的独立遗传规律,与经典遗传学的遗传方式是一致的。突变发生在 A2 连锁群的 sat<sub>162</sub> 和 SSR53 区间内。在大豆公共物理图谱(<http://www.soybase.org>)上 SSR53 和 sat<sub>162</sub> 区间包含 GmIRCHS 结构(曾被预测为 *I* 基因)区间,因此可证明参与控制种皮或种脐颜色性状的 A2 染色体上的经典位点 *I* 位点自然突变是黄色种皮变为褐色的原因。在研究的过程中,开发了 A2 染色体上的 1 个新的控制种皮颜色的标记 SSR53。

**关键词:**大豆;褐色种皮;*I* 基因;基因定位

## Inheritance Analysis and Gene Mapping of Brown Seed Coat in Soybean

DONG Quan-zhong<sup>1,2</sup>, JIANG Bing-jun<sup>3</sup>, ZHANG Yong<sup>2</sup>, XUE Hong<sup>2</sup>, ZHANG Ming-ming<sup>2</sup>, LI Wei-wei<sup>2</sup>, HAN Tian-fu<sup>3</sup>, NING Hai-long<sup>1</sup>

(1. Agronomy College, Northeast Agricultural University/Key Laboratory of Soybean Biology, Ministry of Education Key Laboratory of Soybean Biology and Breeding (Genetics), Ministry of Agriculture, Harbin 150030, China; 2. Keshan Branch of Academy of Heilongjiang Province, Keshan 161606, China; 3. Crop Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

**Abstract:** In order to analyze the genetic rule and molecular basis of soybean seed coat mutation from yellow to brown, the mutant lines of brown seed coat (MLBSC) and its original parents of yellow seed coat (OPYSC) were evaluated in the field. Four pairs of MLBSC and OPYSC were genotyped by 176 simple sequence repeat (SSR) on 20 chromosomes. The positive cross and reverse crosses were mated between MLBSC and the yellow seed coat including OPYSC and the non-OPYSC, the statistical analysis on the segregation of seed number with two kinds of coat color in F<sub>1</sub> and F<sub>2</sub> was conducted. Genotyping of F<sub>2</sub> individuals of cross Beidou 14 × KeH 09-95 was conducted by 72 SSR markers in A2 linkage group. The results showed that the mutants of the brown seed coat were the isogenic lines of the original parents. Mutation of brown seed coat was heritable and was controlled by nuclear genes without domination of cytoplasmic inheritance. The yellow seed coat was dominant to the naturally mutated brown seed coat. By Chi-square test, the yellow and brown separation ratio of seed coat in the hybrid offspring was in accordance with the Mendelian independent genetic law of 3:1 which was consistent with the genetic mode of classical genetics. The mutation occurred in the interval between sat<sub>162</sub> and SSR53 on A2 linkage group. The *GmIRCHS* structure (previously predicted to be *I* gene) has been found in the interval between SSR53 and sat<sub>162</sub> in the soybean common physical map (<http://www.soybase.org>). Summarizing above researches, the natural mutation of the classical *I* locus on A2 chromosome was the cause of the variation of seed coat color from yellow to brown. During the study, a new marker SSR53 related with seed color on the A2 chromosome was developed.

**Keywords:** Soybean; Brown seed coat; *I* gene; Gene location

栽培大豆蛋白质含量约为 40%, 脂肪含量约为 20%, 已成为人类食用蛋白、植物油、动物饲料蛋白的主要来源,在国民经济中起重要作用。野生大豆全部为黑色的种皮,从野生大豆到栽培大豆的演变过程中,大豆种皮色逐渐从黑色变成黄色、绿色、黑色、褐色、双色等多种颜色<sup>[1]</sup>。原始的野生大豆发

收稿日期:2020-03-02

基金项目:农业部北京大豆生物学重点实验室开放课题;黑龙江省“百千万”工程科技重大专项(SC2019ZX16B0039);哈尔滨市科技局科技研发项目(2017RAXXJ019)。

第一作者简介:董全中(1972-),男,硕士,副研究员,主要从事大豆遗传育种研究。E-mail: ksdqdzqz@163.com。

通讯作者:韩天富(1963-),男,博士,研究员,博导,主要从事大豆遗传育种研究。E-mail: hantianfu@caas.cn;

宁海龙(1975-),男,博士,教授,博导,主要从事大豆遗传育种研究。E-mail: ninghailongneau@126.com。

生突变,产生黄色表型,在长期驯化和人工选择过程中,形成了现在栽培大豆的黄色种皮,目前已经没有野生大豆突变为黄色表型的自然种群存在<sup>[2]</sup>。但在收获的黄色栽培大豆种子中发现了频率非常低的整个种皮完全着色的籽粒<sup>[3]</sup>。国外有多份研究报道了黄色大豆种皮发生自然突变,获得了种皮沉积色素的大豆近等基因系<sup>[4-6]</sup>。在国内,续曲等<sup>[7]</sup>2013年发现黄色种皮品系 J1265-1 突变为褐色种皮 J1265-2。金梅等<sup>[8]</sup>2015年在合丰 25、合丰 39、绥农 10 等大豆品种中发现褐色籽粒。

种皮是由母体组织形成的,因此,种皮的表型由母体基因型决定,杂种后代种子颜色会在下一个世代发生分离。种脐组织是由受精后的合子组织形成<sup>[9]</sup>,种脐的表型由合子的基因型决定。除了绿色种皮与叶绿素代谢途径有关外<sup>[10]</sup>,黑色、褐色、不完全黑色等大豆的种皮或种脐颜色的形成主要与控制花青素或原花青素生物合成酶密切相关<sup>[1]</sup>。低温胁迫<sup>[11]</sup>、病毒侵染<sup>[12]</sup>也可以使黄色大豆种皮或种脐部分出现褐色,但这种着色方式并不遗传。突变体是遗传学研究的基础材料,利用自然突变体定位、克隆基因,进而研究基因的生物学功能和遗传变异机理,已经成为功能基因组学的重要研究内容。大豆种皮颜色的突变主要与控制或调节叶绿素、花青素和原花青素合成酶的基因的突变有关。绿色种皮受 1 对显性(*G*)基因、1 对隐性基因(*d1*, *d2*)和 1 个细胞质基因 *cytG* 控制<sup>[10]</sup>。除了控制绿色种皮的基因外,主要发现有 6 个经典的位点参与控制种皮或种脐颜色性状的形成,抑制位点 *I* 抑制整个种皮的色素沉积,成熟后种皮表现为均匀黄色,茸毛色位点 *T*、编码转录因子位点 *R*、花色位点 *W1* 和 *K1* 位点参与控制种皮或种脐颜色性状的形成,6 个独立的位点互作决定了种皮和种脐的颜色<sup>[1,4-5, 13-14]</sup>。茸毛色位点 *T*、编码转录因子位点 *R*、花色位点 *W1* 和 *K1* 位点在代谢通路上位于 *I* 位点的下游,受 *I* 位点的控制。查尔酮合成酶控制花青素和原花青素的合成,是 1 个多基因家族,有 9 个成员,其中 *CHS2*、*CHS6*、*CHS7* 和 *CHS8* 分别位于 5 号、9 号、1 号和 11 号染色体上, *CHS1*、*CHS3*、*CHS4*、*CHS5* 和 *CHS9* 位于 8 号染色体上<sup>[15]</sup>。Clough 等<sup>[16]</sup>、Senda 等<sup>[17]</sup>研究发现 A2 染色体上存在 *CHS1-CHS3-CHS4* + 5.87 kb + *CHS1-CHS3-CHS4* 反向串联重复结构,并推测这一结构的转录可能是查尔酮合成酶转录后沉默的原因<sup>[16]</sup>。Kasai 等<sup>[14]</sup>对反向串联重复结构区域进行研究,报道了 *I* 位点的候选基因为 *GmIRCHS* 结构, *GmIRCHS* 由 *CHS1-CHS3-CHS4* + 5.87 kb + *CHS1-CHS3-CHS4* 构成,其

中有 1 个 *CHS3* 部分被删除<sup>[18]</sup>,形成了 1 个假基因 *pseudoCHS3* ( $\Delta CHS3$ ) 且反向重复结构和它的互补序列呈尾对尾方向串联排列, *GmIRCHS* 结构转录形成 *CHS* 假基因的双链 RNA (dsRNA)<sup>[18-21]</sup>,通过基因沉默 (PTGS) 引起大豆种皮中的查尔酮合成酶的 mRNA 的减少<sup>[22]</sup>,释放了 1 号染色体上的 *CHS7* 和 11 号染色体上的 *CHS8* 基因,使 *CHS7/CHS8* 在种皮中表达<sup>[23]</sup>,花青素和原花青素得以沉积,这一研究支持了 *GmIRCHS* 结构就是 *I* 位点基因的观点<sup>[20]</sup>。Kasai 等<sup>[14]</sup>、Kurauchi 等<sup>[18]</sup>、Senda 等<sup>[19-20]</sup>通过 DNA 杂交技术等反向遗传学的方法证明了自然突变体是位于 A2 染色体上抑制色素沉积的 *I* 位点引起的,并指出 *GmIRCHS* 结构就是 *I* 位点基因,但到目前为止, *I* 位点并没有被克隆,明确的基因序列仍然未知。近几年本课题组在克交 09-95、克交 10-268、克交 10-1518、北豆 40 号等黄色种皮的稳定品种(系)中发现褐色籽粒。本研究针对发现的褐色的突变体与原始材料进行田间鉴定试验,室内 SSR 基因型鉴定突变体与原始材料是否为近等基因系;利用黄色种皮的原始品种或非原始品种与褐色突变材料进行正反交的杂交试验,确定褐色突变的遗传方式,并排除非遗传因素的影响;用正向遗传学的方法对北豆 14 与 × 克 H09-95 的 F<sub>2</sub> 代群体利用 SSR 标记进行定位研究,确定发生该突变的染色体及其位置,并与国外应用反向遗传学方法研究自然突变的结果进行比较。旨在明确不同地点发生自然突变的遗传方式及突变发生的染色体位置是否相同,从正向遗传学解析稳定的黄色种皮繁殖中出现频率非常低的褐色种皮籽粒的原因。

1 材料与方法

1.1 材料

克交 09-95 与克交 H09-95 突变体(H 代表种皮褐色,下同)(2013 年发现)、克交 10-268 与克交 H10-268(2014 年发现)、克交 10-1518 与克交 H10-1518(2014 年发现)。褐色种皮的北豆 H40、黄色种皮的克交 07-584、克交 11-1669、克交 99-578。

1.2 试验设计

1.2.1 田间对比试验 2015 年进行克交 09-95 和克交 H09-95 田间对比试验,设 4 行区,3 次重复,行长 5 m,行距 65 cm,株距 5 cm。2016 年进行克交 09-95 和克交 H09-95、克交 10-268 和克交 H10-268、克交 10-1518 和克交 H10-1518 田间对比试验,设 4 行区,2 次重复,行长 5 m,行距 65 cm,株距 5 cm。田间调查苗期、开花期、成熟期等生长时期的株型、

植株长相。成熟后每次重复抽取连续 10 株测量株高、主茎节数、单株荚数、单株粒数;收获后按小区测定百粒重。

1.2.2 杂交试验 采用母本(黄色种皮)×父本(褐色种皮)设定为正交试验,母本(褐色种皮)×父

本(黄色种皮)为反交试验。同时设置双亲遗传背景差异大的北豆 14×克 H09-95 杂交组合,F<sub>2</sub>群体按单株编号挂牌,收获时按单株记录种皮颜色。各年份具体杂交方案如表 1 所示。

表 1 杂交试验设计  
Table 1 Design of hybrid test

编号 Code	年份 Year	母本 Female parent		父本 Male parent		杂交试验 Hybrid test
		品种 Variety	籽粒色 Seed color	品种 Variety	籽粒色 Seed color	
1	2014	克 09-95	黄色	克 H09-95	褐色	正交
2		克 H09-95	褐色	克 09-95	黄色	反交
3		北豆 14	黄色	克 H09-95	褐色	正交
4		克 H09-95	褐色	克 07-584	黄色	反交
5	2015	克交 10-268	黄色	克交 H10-268	褐色	正交
6		克交 H10-268	褐色	克交 10-268	黄色	反交
7		克交 10-1518	黄色	克交 H10-1518	褐色	正交
8		克交 H10-1518	褐色	克交 10-1518	黄色	反交
9	2016	克交 H10-1518	褐色	华疆 17	黄色	反交
10		北豆 H40	褐色	克交 99-578	黄色	反交
11		克交 H10-268	褐色	克交 11-1669	黄色	反交

1.2.3 分子标记 从大豆 20 个连锁群中选择 176 对 SSR 引物(<http://www.soybase.org>),鉴定 3 对原始品种与突变体的差异。选择 A2 染色体上全部 72 对 SSR 引物(<http://www.soybase.org>)在北豆 14 和克 H09-952 个亲本间进行筛选,标记在各染色体上的分布如图 1 所示,筛选出多态性明显的引物用于北豆 14×克 H09-95 组合的 F<sub>1</sub> 的 2 个株系衍生的 275 个 F<sub>2</sub>单株,按照黄色种皮和褐色种皮 2 个亚群,

对 2 个亚群的进行基因型鉴定。  
在参考基因组(*Glycine max* Wm82. a2. v1)查找连锁最为紧密位点的区间序列,利用 <http://redb.ncpgr.cn/modules/redbtools/primer3.php> 设计新的 SSR 引物,筛选差异标记,缩小标记区间。利用与褐色种皮存在紧密连锁的标记构建连锁图谱,确定控制黄色和褐色性状的基因在图谱上的位置和遗传距离。

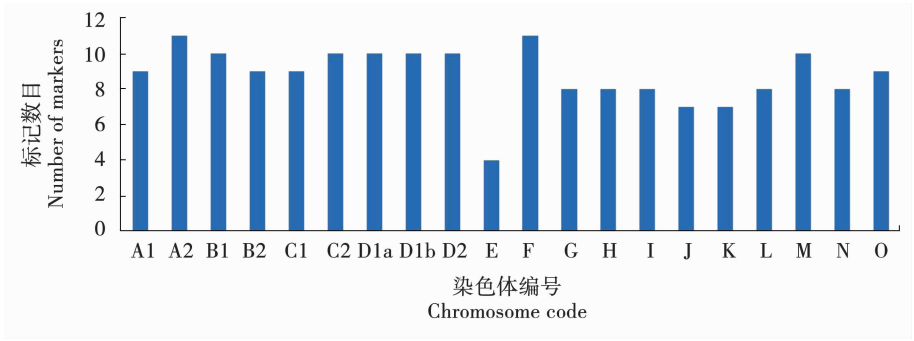


图 1 SSR 标记在各染色体的分布  
Fig. 1 The distribution of SSR markers in each chromosome

1.3 方法

1.3.1 总 DNA 提取 克交 09-95 与克交 H09-95、克交 10-268 与克交 H10-268、克交 10-1518 与克交 H10-1518、北豆 14×克交 H09-9 的 F<sub>2</sub> 群体在开花前于田间取幼嫩叶片。叶片采用打样机磨碎,用 DNA 提取试剂盒(G1689 植物基因组 DNA 提取试剂盒)提取 DNA,提取的大豆总 DNA 用紫外分光光

度计(TU-1810 紫外可见光光度计)测定浓度,用无菌水调节浓度为 50~100 ng·μL<sup>-1</sup>后,用于基因型鉴定。  
1.3.2 SSR 标记分析 原始品种与突变体差异鉴定和北豆 14×克交 H09-9 的 F<sub>2</sub>群体 SSR 遗传分析的 PCR 反应体系如下:Buffer 1.0 μL,引物 1.0 μL,引物 1.0 μL, dNTP 0.2 μL, *Taq* 酶 0.2 μL, DNA

1.0 μL, ddH<sub>2</sub>O 6.6 μL。PCR 反应在 PCR 扩增仪 (Bio-RadT100, 美国伯乐) 上进行。SSR 反应程序: 94 ℃ 5 min 预变性; 94 ℃ 30 s, 46 ℃ 30 s, 72 ℃ 60 s, 42 个循环; 72 ℃ 5 min; 4 ℃ 10 min。扩增产物用 6% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 银染显色, 记录带型差异。

1.4 数据分析

采用 SAS 9.2 对数据进行分析, 田间表型鉴定分析采用 *t* 检验的方法, 分离比例采用卡方检验, 利用卡方检验和 IciMapping 软件 (<http://www.isbreeding.net/software/>) 2 种方法构建大豆遗传图谱。

2 结果与分析

2.1 原始品种与突变体表型变异分析和基因型鉴定

2.1.1 田间表型变异分析 如表 2 所示, 2015 年, 克 09-95 与克 H09-95 的株高、主茎节数、百粒重、小

区产量 *t* 检验  $P > 0.05$ , 表明 2015 年克 09-95 与克 H09-95 两个品系各性状差异不显著; 2016 年, 除克 09-95 与克 H09-95 单株粒数性状  $P < 0.05$  外, 克 09-95 与克 H09-95 株高、主茎节数、百粒重、小区产量均表现为  $P > 0.05$ ; 2015 年, 克交 10-268 和克交 H10-268、克交 10-1518 和克交 H10-1518 的株高、主茎节数、单株粒数、百粒重、小区产量均为  $P > 0.05$ 。结果表明原始品种和突变体各表型性状差异不显著。同时, 原始品种和突变体的出苗期、开花期、成熟期和各生长阶段的田间长相一致 (图 2)。

2.1.2 基因型 SSR 鉴定 使用分布在 20 个染色体的 176 个 SSR 标记的结果表明: 克 09-95 与克 H09-95、克交 10-268 和克交 H10-268、克交 10-1518 和克交 H10-1518、北豆 40 和北豆 H40 每对原始品种和突变体材料扩增产物的带型一致, 初步判定每对原始品种和对应的褐色突变体材料除了种皮颜色外具有相同的遗传背景。

表 2 2015 和 2016 年原始品种与突变体各性状田间对比

Table 2 Comparative test on traits of original parent and mutation in field in 2015 and 2016

年份 Year	品种 Variety	株高 Plant height /cm	主茎节数 Node number	单株荚数 Pod number per plant	单株粒数 Seed number per plant	百粒重 100-seed weight/g	小区产量 Yield per plot /kg	出苗期(月-日) Seedling (Month-Day)	开花期(月-日) Flowering (Month-Day)	成熟期(月-日) Mature (Month-Day)
2015	09-95	60.2	12.8	39.8	87.2	19.06	4.10	05-21	07-06	09-10
2015	09-95	57.2	11.4	57.2	78.2	19.44	4.12	05-21	07-06	09-10
2015	09-95	52.0	12.2	54.6	96.0	19.53	3.86	05-21	07-06	09-10
2015	H09-95	58.6	12.6	38.2	93.8	18.99	4.06	05-21	07-06	09-10
2015	H09-95	58.8	11.8	59.4	89.8	19.57	4.16	05-21	07-06	09-10
2015	H09-95	52.8	11.2	49.8	90.0	19.94	3.90	05-21	07-06	09-10
	<i>P</i>	0.808	0.578	0.56	0.519	0.372	0.667			
2016	09-95	62.8	11.8	18.8	47.8	16.85	1.95	05-23	07-02	09-13
2016	09-95	57.4	12.0	19.0	55.0	19.25	1.89	05-23	07-02	09-13
2016	h09-95	63.0	12.6	17.8	42.2	17.145	2.00	05-23	07-02	09-15
2016	h09-95	57.0	11.8	20.4	50.0	18.85	1.90	05-23	07-02	09-15
	<i>P</i>	0.795	0.656	0.895	0.036	0.905	0.374			
2016	10-268	70.2	12.0	19.2	46.2	16.87	2.06	05-23	07-02	09-15
2016	10-268	63.4	11.4	21.2	41.4	18.03	2.36	05-23	07-02	09-15
2016	h10-268	65.0	11.4	20.0	44.6	17.12	2.08	05-23	07-02	09-20
2016	h10-268	65.2	11.8	20.4	40.4	17.94	2.42	05-23	07-02	09-20
	<i>P</i>	0.712	0.874	1.000	0.144	0.709	0.295			
2016	10-1518	69.4	12.4	20.2	47.6	19.12	2.10	05-23	07-02	09-10
2016	10-1518	63.6	11.4	15.8	44.0	18.67	1.98	05-23	07-04	09-10
2016	h10-1518	63.8	11.4	17.8	51.8	19.68	2.08	05-23	07-02	09-13
2016	h10-1518	64.6	10.8	18.8	42.4	18.67	2.02	05-23	07-04	09-13
	<i>P</i>	0.612	0.156	0.93	0.732	0.506	0.795			

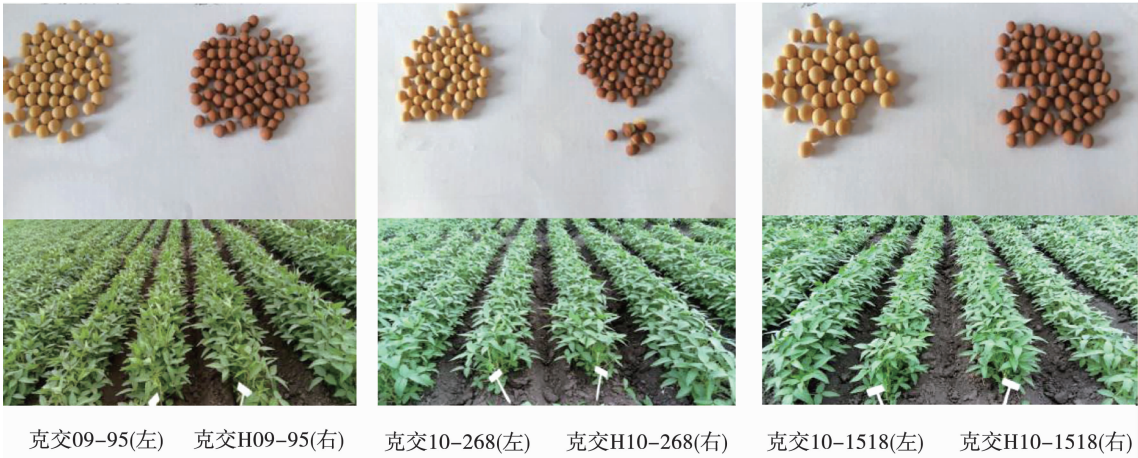


图2 克交 09-95、克交 10-268、克交 10-1518 及其突变体籽粒和田间照片

Fig. 2 Photos of seed and plant in field of Kejiao 09-95, Kejiao 10-268, Kejiao 10-1518 and their mutants

2.2 突变体与原始品种及非原始品种的正反交表型分析

2.2.1 褐色种皮遗传方式和显隐性关系分析 克 09-95 与克 H09-95 正反交、克交 10-268 与克交 H10-268 正反交、克交 10-1518 与克交 H10-1518 杂交、北

豆 14 与克 H09-05 杂交、克 H09-05 与克交 07-584 杂交,  $F_1$  均表现为黄色种皮, 表明黄色种皮对褐色种皮为显性、且为细胞核遗传, 与细胞质遗传无关 (表 3)。

表3 不同种皮色杂交  $F_1$  表型鉴定

Table 3 Phenotype identification of hybrid  $F_1$  of different seed colors

编号 Code	母本 Female parent		父本 Male parent		$F_1$ 种皮色
	品种 Variety	籽粒色 Seed color	品种 Variety	籽粒色 Seed color	Seed color of $F_1$
1	克 09-95	黄色	克 H09-95	褐色	黄色
2	克 H09-95	褐色	克 09-95	黄色	黄色
3	北豆 14	黄色	克 H09-95	褐色	黄色
4	克 H09-95	褐色	克 07-584	黄色	黄色
5	克交 10-268	黄色	克交 H10-268	褐色	黄色
6	克交 H10-268	褐色	克交 10-268	黄色	黄色
7	克交 10-1518	黄色	克交 H10-1518	褐色	黄色
8	克交 H10-1518	褐色	克交 10-1518	黄色	黄色
9	克交 H10-1518	褐色	华疆 17	黄色	黄色
10	北豆 H40	褐色	克交 99-578	黄色	黄色
11	克交 H10-268	褐色	克交 11-1669	黄色	黄色

2.2.2  $F_2$  分离比例测定 克 09-95 与克 H09-95 正反交、克交 10-268 与克交 H10-268 正反交、克交 10-1518 与克交 H10-1518 正反交  $F_2$  群体黄色与褐色的分离比例非常接近 3:1; 田间观察  $F_2$  代除种皮色存在分离外, 株型、株高、开花等性状田间表现整齐一致。北豆 14 与克 H09-05 杂交、克 H09-05 与克交 07-584、克交 H10-1518 × 华疆 17、北豆 H40 × 克交 99-578、克交 H10-268 × 克交 11-1669 黄色种皮对褐色种皮为显性,  $F_2$  代群体黄色与褐色的分离比符合 3:1, 田间观察种皮色、株型、株高、开花等性状田间均表现分离。黄色种皮色自然突变褐色种皮与经

典遗传显隐性关系、分离比例一致。卡方检验结果均不显著 ( $P > 0.05$ ), 说明以上分离比例符合单基因突变的 3:1 分离比例 (表 4)。

2.3 种皮色突变定位

在北豆 14 × 克 H09-95 群体的 2 个亲本之间进行多态性筛选, 筛选出 12 对有多态性的 SSR 标记。在褐色种皮亚群中, 假设褐色种皮与以上标记不存在连锁, 以上标记  $F_2$  符合 A (母本基因型): H (杂合型): B (父本基因型) 为 1:2:1 分布, 从卡方检验可以看出, sat\_406、satt589、satt177、sat\_162、satt187、satt424、AW132402、sat\_250、satt208、sat\_294、satt409

标记卡方检验均为  $P < 0.01$  (表 5),表明这些标记与褐色种皮存在连锁,从  $P$  值大小可以看出 sat\_162 和 satt187 连锁最为紧密。为了缩小标记区间,在参考基因组上根据 sat\_162、satt187 的位置,获得 sat\_162 至 satt187 标记区间的参考基因组 (*Glycine max* Wm82. a2. v1) 的序列,利用 <http://redb.ncpgr.cn/modules/redbtools/primer3.php> 设计 94 对 SSR 引物,进行多态性筛选,筛选出 1 个有差异的 SSR 标记,位于 Gm08:8990163 ~ 8990224 bp 位置,包含 31 个 TA 重复,附近的序列为:AATGGACCCCAATGTT-GGAGATTCATACTTCCTGTCTCGTGGGTTTCATATAT-

ATCCAAGAAAATTAAATACTGAAATAATTAAGCTT-AATATATATGTGta TGTATGTATGTATTTAATTAAGCT-AATATTTTTTCCTTTTCTTTTTAAACATGTTATAAGCT-TGAGTTAGGTTTAGTTATCTTTTATACTTTGCTAAACT。其顺序号为 53,因此命名为 SSR53。利用 SSR53 分别对褐色和黄色亚群体 F<sub>2</sub> 个体基因型鉴定,并进行卡方检验,在褐色种皮亚群中 SSR53 卡方检验值小于 satt187(表 5),因此种皮色突变基因位于 sat\_162 和 SSR53 之间。

表 4 突变体与原始品种或非原始品种杂交 F<sub>2</sub> 代分离比例

Table 4 Hybrid F<sub>2</sub> separative ratio between mutant and original breed or non-original breed

编号 Code	杂交组合 Cross combination	黄色种皮株数 Plant number of yellow seeds	褐色种皮株数 Plant number of brown seeds	黄色: 褐色 Ratio of yellow / brown	$\chi^2$	$P$
1	克 09-95 × 克 H09-95	1044	342	3:1	0.062	0.804
2	克 H09-95 × 克 09-95	744	242	3:1	0.087	0.769
3	北豆 14 × 克 H09-95	1271	434	3:1	0.164	0.685
4	克 H09-95 × 克 07-584	1078	348	3:1	0.239	0.625
5	克交 10-268 × 克交 H10-268	1321	442	3:1	0.002	0.967
6	克交 H10-268 × 克交 10-268	1315	415	3:1	0.015	0.345
7	克交 10-1518 × 克交 H10-1518	986	329	3:1	0.000	0.987
8	克交 H10-1518 × 克交 10-1518	923	310	3:1	0.007	0.934
9	克交 H10-1518 × 华疆 17	1425	471	3:1	0.018	0.895
10	北豆 H40 × 克交 99-578	1236	407	3:1	0.034	0.853
11	克交 H10-268 × 克交 11-1669	927	315	3:1	0.069	0.793

表 5 褐色种皮亚群卡方检验结果

Table 5 Chi-square test results of brown seed subgroup

标记 Marker	实际分布 Actual distribution				理论分布 Theoretical distribution			$P$
	A 实际值 Actual value of A	H 实际值 Actual value of H	B 实际值 Actual value of B	总计 Total	A 理论值 Theoretical value of A	H 理论值 Theoretical value of H	B 理论值 Theoretical value of B	
sat_406	5	34	40	79	19.75	39.5	19.75	8.21E-14
satt589	3	30	54	87	21.75	43.5	21.75	1.57E-15
satt177	4	28	55	87	21.75	43.5	21.75	4.14E-16
sat_162	1	8	77	86	21.25	43.0	21.25	2.88E-42
SSR53	1	7	75	83	20.75	41.5	20.75	7.78E-42
satt187	1	9	76	86	21.25	43.0	21.25	8.29E-41
satt424	1	19	66	86	21.50	43.0	21.50	4.60E-30
AW132402	3	25	59	87	21.75	43.5	21.75	5.02E-24
sat_250	15	41	23	79	19.75	39.5	19.75	2.03E-09
satt208	33	28	19	80	20.00	40.0	20.00	2.01E-09
sat_294	17	31	32	80	20.00	40.0	20.00	5.63E-11
satt409	19	43	17	79	19.75	39.5	19.75	2.19E-09

A:母本基因型; H:杂合型; B:父本基因型。下同。  
A:Maternal genotyp; H:Heterozygous genotype; B:paternal genotype. The same below.

利用与褐色种皮存在紧密连锁的标记,对黄色种皮亚群 F<sub>2</sub> 单株进行基因型鉴定,依据连锁的紧密程度,选择 satt589、satt177、sat\_162、satt187、satt424、AW132402,即在连锁最紧密的两个标记向上和向下各延伸了 2 个标记。同样,假设控制种皮色基因与以上标记不存在连锁,以上标记 F<sub>2</sub> 符合 A:H:B 符合 1:2:1 分布。从表 6 卡方检验结果可以看出,这些标记卡方检验的 *P* 值均 <0.01,表明这些标记与

黄色种皮存在连锁,从 *P* 值的大小可以看出,也是 sat\_162、satt187 连锁最为紧密。对新开发的标记 SSR53 的卡方检验,在黄色种皮亚群中 SSR53 卡方检验的 *P* 值 < satt187 的 *P* 值(表 6),因此种皮色突变基因位于 sat\_162 和 SSR53 之间。以上结果表明褐色亚群和黄色亚群结果一致、相互印证,黄色种皮突变为褐色控制基因与 *I* 基因位于同一染色体上或者说就是经典遗传学的 *I* 位点的自然突变。

表 6 黄色种皮亚群卡方检验结果

Table 6 Chi-square test results of yellow seed subgroup

标记 Marker	实际分布 Actual distribution				理论分布 Theoretical distribution			<i>P</i>
	A 实际值	H 实际值	B 实际值	总数 Total	A 理论值	H 理论值	B 理论值	
	Actual value	Actual value	Actual value		Theoretical	Theoretical	Theoretical	
	of A	of H	of B		value of A	value of H	value of B	
att589	66	98	16	180	45.00	90.0	45.00	4.56E-07
satt177	61	106	18	185	46.25	92.5	46.25	6.36E-06
Sat_162	60	122	5	187	46.75	93.5	46.75	1.59E-11
SSR53	58	123	5	186	46.50	93.0	46.50	1.73E-11
Satt187	69	111	7	187	46.75	93.5	46.75	4.47E-11
Satt424	65	102	19	186	46.50	93.0	46.50	4.80E-06
AW132402	63	98	23	184	46.00	92.0	46.00	0.000113

为证明以上结果不是由单个标记的偏分离引起,对整个群体内的每个标记正态性分布进行卡方检验,每一个标记的卡方检验均为 *P* > 0.05(表 7),

表明以上标记没有偏分离,说明以上分析结果是可靠的,可以用于作图和定位研究。

表 7 标记分布的正态性检验

Table 7 Normality test of distribution of SSR markers

	带型	标记 Marker						
	Marker type	Satt589	Satt177	Sat_162	Satt187	SSR53	Satt424	AW132402
实际分布 Actual distribution	A	69	65	61	70	59	66	66
	H	128	134	130	120	130	121	123
	B	70	73	82	83	84	85	82
理论分布 Theoretical distribution	A	66.75	68.0	67.25	68.25	68.25	68.0	67.8
	H	133.50	136.0	136.50	136.50	136.50	136.0	135.5
	B	66.75	68.0	68.25	68.25	68.25	68.0	67.8
卡方检验 <i>P</i> 值 <i>P</i> value of chi-square test		0.794	0.767	0.146	0.073	0.074	0.074	0.123

2.4 A2 染色体作图的遗传距离和物理距离

在整个群体内把黄色和褐色看做 1 对显性标记,命名称为 color,将卡方检验结果极显著的 SSR53 和 Satt589、Satt177、Sat\_162、Satt187、Satt424、AW132402 标记一起利用 ICIMmapping 软件构建连锁图谱,确定控制黄色和褐色性状的基因在图谱上的位置和遗传距离。所构建的连锁图谱与上述褐色和黄色亚群的卡方分析判断顺序一致,控制黄色

和褐色的相对性状位于 sat\_162 和 SSR53 之间,color 与 SSR53 之间的遗传距离为 4.78 cM,与 sat\_162 之间的遗传距离为 5.11 cM(图 3)。在 <http://www.soybase.org> 大豆公共图谱上利用 blast 查找连锁最为紧密的 SSR53 和 Sat\_162 在参考基因组上的位置,找到两个标记物理图谱的位置,2 个标记间物理距离为 7 10 752 bp,较 Satt187 与 Sat\_162 之间的 920 452 bp 缩短了 209 700 bp(表 8)。

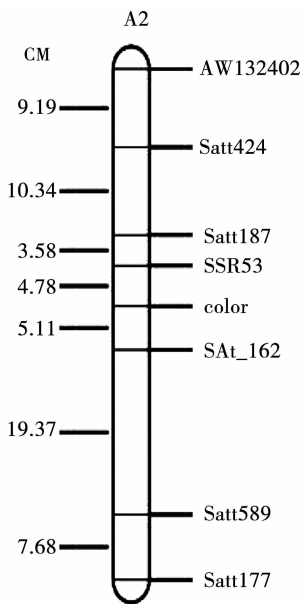


图3 各个标记在 A2 染色体上的位置  
Fig.3 Location of each marker on A2 chromosome

表8 附近标记在 *Glycine max* Wm82. a2. v1 上的物理位置  
Table 8 Physical location of nearby makers in *Glycine max* Wm82. a2. v1

标记 Marker	开始 Start/bp	结束 End/bp
satt589	5175991	5176047
sat_162	8279411	8279478
SSR53	8990163	8990224
satt187	9199863	9199919
satt424	10751723	10721881

3 讨论

除了绿色种皮与叶绿素代谢途径有关外<sup>[10]</sup>,黑色、褐色、不完全黑色等大豆种皮颜色的形成主要与花青素和原花青素生物合成途径的酶密切相关<sup>[1]</sup>。控制代谢途径的查尔酮合成酶(CHS)位于花青素和原花青素生物合成途径起始位点。本研究通过对褐色种皮材料和原始品种进行田间性状鉴定和室内 SSR 分析,证实了褐色种皮材料和原始品种极有可能为近等基因系。通过突变材料与原始品种和非原始品种杂交、表型的世代跟踪证实了黄色种皮突变为褐色种皮是基因突变引起的,这种突变是可遗传的,受细胞核基因控制,与细胞质遗传无关,黄色种皮对褐色种皮显性,杂种后代分离比例为黄色:褐色=3:1,与经典遗传学的遗传方式相同。与不可遗传的低温胁迫<sup>[11]</sup>、病毒侵染<sup>[12]</sup>引起的黄色大豆种皮或种脐部分出现褐色明显不同。

为了避免突变体与原始品种杂交找不到遗传多态性标记,采用突变体与非原始品种杂交,获得遗传多态性,可用基因定位的方法进行研究。

根据已有的研究 I 位点位于 A2 染色体上的报道,首先利用 A2 染色体上全部 72 对 SSR 标记对北豆 14 × 克 H09-95 的 F<sub>2</sub> 进行定位,种皮色突变位点位于 sat\_162 和 satt187 之间,在 sat\_162 和 satt187 区间内利用 <http://redb.ncpgr.cn/modules/redbtools/primer3.php> 设计 SSR 引物 94 对,通过多态性筛选获得了 1 个多态性引物 SSR53。利用 SSR 在 Sat\_162 和 Satt187 进行重新扫描,种皮色突变位点位于 SSR53 和 Sat\_162 之间,在 <http://www.soybase.org> 大豆公共图谱上利用 blast 查找连锁最为紧密的 SSR53 和 Sat\_162 在参考基因组上的位置,2 个标记间物理距离为 710 752 bp,较 Satt187 与 Sat\_162 之间的 920 452 bp 缩短了 209 700 bp,但区间仍然较大。在定位方法上,对北豆 14 × 克 H09-95 的 F<sub>2</sub> 采用种皮色分群,利用卡方分析的方法,2 个亚群得到一致并相互印证的结果。同时,把黄色和褐色做为 1 对显性标记,将多态性标记利用 ICIMapping 软件构建连锁图谱,所构建的连锁图谱与卡方分析判断顺序一致,2 种统计方法都证实了控制黄色和褐色的相对性状位于 sat\_162 和 SSR53 之间。在 <http://www.soybase.org> 大豆公共图谱上利用 blast 查找连锁最为紧密的 SSR53 和 Sat\_162 在参考基因组上的位置和 *GmIRCHS* 结构的位置,SSR53 和 Sat\_162 区间包含 *GmIRCHS* 结构所在的区间,从正向遗传学方法佐证了前人反向遗传学方法的研究结果,但 SSR53 和 Sat\_162 2 个标记区间仍然较大,除了包含 *GmIRCHS* 结构指出的多个查尔酮合成酶(CHS)基因,还包括 90 多个其它基因,因此,还需要进一步深入研究来缩小区间,为基因的精准克隆做好准备。

4 结论

黄色种皮稳定的大豆品种繁殖中出现频率非常低的褐色种皮籽粒是自然基因突变引起的,褐色种皮突变体与对应繁殖黄色种皮原始品种为近等基因系。这种自然突变是可遗传的,受细胞核基因控制,与细胞质遗传无关。种皮黄色对自然突变后种皮褐色显性,杂种后代中黄色种皮与自然突变的褐色种皮符合 3:1 分离比例,与经典遗传学 I 位点的遗传方式相同。该自然突变发生在 A2 连锁群的 sat\_162 和 SSR53 区间内,该区间包含前人反向遗传学所研究推测 *GmIRCHS* 结构(曾被预测为 I 基因)。在研究的过程中开发了 A2 染色体上的 1 个新的标记 SSR53。

# 参考文献

- [1] Song J, Liu Z, Hong H, et al. Identification and validation of loci governing seed color by combining association mapping and bulk segregation analysis in soybean [J]. *PLoS One*, 2016, 11 (7): e0159064.
- [2] Wang C S, Todd J J, Vodkin L O. Chalcone synthase mRNA and activity are reduced in yellow soybean seed coats with dominant *I* alleles[J]. *Plant Physiol*, 1994, 105: 739-748.
- [3] Bernard R L, Weiss M G. In Soybeans: Improvement, production, and uses[A]. Roger B H. Qualitative genetics[C]. Madison: American Society of Agronomy, 1973: 117-154.
- [4] Wilcox J R. Performance and use of seed coat mutants in soybean [J]. *Cropence*, 1988, 28(1): 30-32.
- [5] Senda M, Jumonji A, Yumoto S, et al. Analysis of the duplicated *CHSI* gene related to the suppression of the seed coat pigmentation in yellow soybeans[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2002, 104(6): 1086-1091.
- [6] Kasai A, Kasai K, Yumoto S, et al. Structural features of *GmIRCHS*, candidate of the *I* gene inhibiting seed coat pigmentation in soybean: Implications for inducing endogenous RNA silencing of chalcone synthase genes [J]. *Plant Molecular Biology*, 2007, 64(4): 467-479.
- [7] 续曲, 郭 勇, 邱丽娟. 褐色种皮大豆与其黄色种皮衍生亲本的表型及基因型比较[J]. *植物遗传资源学报*, 2013, 14(2): 284-288. (Xu Q, Guo Y, Qiu L J. Comparison of phenotype and genotype between brown seed coat line and its parental line with yellow seed coat in soybean (*Glycine max*) [J]. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2013, 14(2): 284-288. )
- [8] 金梅, 胡喜平, 姜延青, 等. 大豆褐色种皮衍生系农艺性状变化[J]. *现代化农业*, 2015(1): 14-15. (Jin M, Hu X P, Jang Y Q, et al. Change of agronomic traits of soybean brown seed coat derived lines[J]. *Modern Agriculture*, 2015(1): 14-15. )
- [9] Thorne J H. Morphology and ultrastructure of maternal seed tissues of soybean in relation to the import of photosynthate [J]. *Plant Physiology*, 1981, 67(5): 1016-1025.
- [10] Guiamet J J, Schwartz E, Pichersky E, et al. Characterization of cytoplasmic and nuclear mutations affecting chlorophyll and chlorophyll-binding proteins during senescence in soybean [J]. *Plant Physiology*, 1991, 96(1): 227-231.
- [11] Ohnishi S, Funatsuki H, Kasai A, et al. Variation of *GmIRCHS* (*Glycine max* inverted-repeat CHS pseudogene) is related to tolerance of low temperature-induced seed coat discoloration in yellow soybean[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2011, 122(3): 633-642.
- [12] Senda M, Masuta C, Ohnishi S, et al. Patterning of virus-infected *Glycine max* seed coat is associated with suppression of endogenous silencing of chalcone synthase genes [J]. *The Plant Cell*, 2004, 16(4): 807-818.
- [13] Gillman J D, Tetlow A, Lee J D, et al. Loss-of-function mutations affecting a specific *Glycine max* R2R3 MYB transcription factor result in brown hilum and brown seed coats [J]. *BMC Plant Biology*, 2011, 11(1): 155.
- [14] Kasai A, Kasai K, Yumoto S, et al. Structural features of *GmIRCHS*, candidate of the *I* gene inhibiting seed coat pigmentation in soybean: Implications for inducing endogenous RNA silencing of chalcone synthase genes [J]. *Plant Molecular Biology*, 2007, 64(4): 467-479.
- [15] Kurauchi T, Matsumoto T, Taneda A, et al. Endogenous short interfering RNAs of chalcone synthase genes associated with inhibition of seed coat pigmentation in soybean [J]. *Breeding Science*, 2009, 59(4): 419-426.
- [16] Clough S J, Tuteja J H, Li M, et al. Features of a 103-kb gene-rich region in soybean include an inverted perfect repeat cluster of *CHS* genes comprising the *I* locus [J]. *Genome*, 2004, 47(5): 819-831.
- [17] Senda M, Kasai A, Yumoto S, et al. Sequence divergence at chalcone synthase gene in pigmented seed coat soybean mutants of the *Inhibitor* locus [J]. *Genes and Genetic Systems*, 2002, 77 (5): 341-350.
- [18] Kurauchi T, Kasai A, Tougo M, et al. Endogenous RNA interference of chalcone synthase genes in soybean: Formation of double-stranded RNA of GmIRCHS transcripts and structure of the 5' and 3' ends of short interfering RNAs [J]. *Journal of Plant Physiology*, 2011, 168(11): 1264-1270.
- [19] Senda M, Kurauchi T, Kasai A, et al. Suppressive mechanism of seed coat pigmentation in yellow soybean [J]. *Breeding Science*, 2012, 61(5): 523-530.
- [20] Senda M, Nishimura S, Kasai A, et al. Comparative analysis of the inverted repeat of a chalcone synthase pseudogene between yellow soybean and seed coat pigmented mutants [J]. *Breeding Science*, 2013, 63(4): 384-392.
- [21] Baulcombe D. RNA silencing in plants [J]. *Nature*, 2004, 431 (7006): 356-363.
- [22] Senda M, Jumonji A, Yumoto S, et al. Analysis of the duplicated *CHSI* gene related to the suppression of the seed coat pigmentation in yellow soybeans [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2002, 104(6): 1086-1091.
- [23] Tuteja J H, Clough S J, Chan W C, et al. Tissue-specific gene silencing mediated by a naturally occurring chalcone synthase gene cluster in *Glycine max* [J]. *The Plant Cell*, 2004, 16(4): 819-835.