

大豆极早熟品种⁶⁰Co γ射线突变体库的建立及突变表型鉴定

吴春雷^{1,2}, 翟红², 吴红艳², 柏锡¹, 夏正俊²

(1. 东北农业大学 生命科学学院, 黑龙江 哈尔滨 150030; 2. 中国科学院 东北地理与农业生态研究所, 黑龙江 哈尔滨 150081)

摘要:应用⁶⁰Co γ射线对北方春大豆极早熟品种黑河13和北豆43种子进行诱变,并构建大豆突变体库。经M₂代选择获得420份在株型、成熟期和育性等性状变异明显的材料,其中168份材料的变异与株高相关。通过对供体材料进行生育期基因型鉴定,在大豆生育期E1至E4基因的基因型分别是e1-as/e2/e3-T/E4,在M₂代突变体库中获得了花期提前2~3 d的早花突变体38份,延迟开花6~8 d的晚花突变体50份。对选取的80份在M₂表型有变异的材料进一步在M₃代进行验证,获得25份与M₂代表型一致的株行。同时随机选取385份M₂代单株和株行的种子,通过近红外谷物分析仪对蛋白质和油分含量进行了测定,筛选比对照的供体材料蛋白质与油分含量明显偏高的变异材料15份。所获得的具有稳定遗传能力的材料可为研究相关性状的功能基因及分子育种提供较好的种质资源。

关键词:大豆突变体;⁶⁰Co γ射线;黑河13;北豆43

中图分类号:S565.1

文献标识码:A

DOI:10.11861/j.issn.1000-9841.2014.06.0820

Identify of Mutant Phynotype and Construction of ⁶⁰Co γ Mutant Population for Soybean Extremely Early Maturing Cultivar

WU Chun-lei^{1,2}, ZHAI Hong², WU Hong-yan², BAI Xi¹, XIA Zheng-jun²

(1. School of Life Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China; 2. Northeast Institute of Geography and Agroecology, Chinese Academy of Sciences, Harbin 150081, China)

Abstract: Soybean mutant population was constructed by treating the seeds of north spring soybean Heihe 13 and Beidou 43 with ⁶⁰Co γ rays. In M₂ generations, 420 mutants of plant type, flowering and maturing time and fertility were obtained, 168 plant height related mutants. By genotyping growth stage genes of two experimental varieties, the genotype of E1-E4 was respective e1-as/e2/e3-T/E4, 38 mutants with 2-3 d earlier flowering and 50 mutants with 6-8 d later flowering were obtained. In 80 mutants of M₂, 25 lines showed the same characters after validated in M₃. After detected the contents of protein and oil of seeds from 385 M₂ mutants (lines), there were 15 mutants with significant higher protein and oil content than control type were obtained. The mutants with stable genetic ability will be useful to study phenotype related functional genes and molecular soybean breeding.

Key words: Soybean mutant; ⁶⁰Co γ rays; Heihe 13; Beidou 43

大豆在我国已有5 000多年的栽培历史,是世界上重要的食用油和蛋白质的主要来源,突变体在大豆育种研究中具有重要的意义,理化诱变可导致高频率的基因突变,对许多重要性状的解析都是从获得突变体开始的。以突变体材料进行基因功能的研究是现代分子生物学快速而准确的研究手段。

诱变育种能在较短时间内能获得有利用价值的突变体,创造新的种质资源并育成新的品种。目前主要的诱变方法可以分为物理诱变、化学诱变和生物诱变,物理诱变主要包括:⁶⁰Co γ射线、航天诱变、激光诱变、热中子诱变和快中子轰击诱变等^[1];化学诱变主要包括:叠氮化钠和烷化类诱变剂诱变等;生物诱变主要包括:T-DNA插入诱变和转座子介导诱变等。⁶⁰Co γ射线诱变会产生较高频率的缺失或易位突变,1997年,夏璐等分析由⁶⁰Co γ射线诱导形成的质

粒突变体的*laz Z*基因序列,研究⁶⁰Co γ射线引发突变的机制,发现碱基变异类型主要是颠换,且变异位点的分布不是随机的^[2]。⁶⁰Co γ射线诱变效果稳定,诱变当代效果直观,在M₂代即可出现大量突变性状,其后代突变性状明显,突变体易于筛选,被广泛的应用于突变体库的构建,现在许多试验中已经把⁶⁰Co γ射线诱变作为与其他诱变方法比较的标准。我国的大豆辐射诱变育种始于1958年,翁秀英等^[3]先后对辐射处理方法、处理剂量、后代变异规律与选择方法等进行了研究,获得了后代生育期、含油量、抗倒伏性、产量等性状较优的突变体材料。袁凤杰等^[4]于2005年首次利用⁶⁰Co γ射线辐射诱变创造出大豆籽粒高无机磷含量的突变材料。黑龙江省农业科学院采用⁶⁰Co γ射线等诱变处理方法选育出黑农41和903527突变系等高蛋白、高抗病性大豆品种和材

收稿日期:2014-03-25

基金项目:中国科学院百人计划及知识创新工程重要方向项目(KZCX2-EW-303);国家自然科学基金(31271742);黑龙江省重点项目(ZD201120)。

第一作者简介:吴春雷(1987-),男,硕士,主要从事植物学研究。E-mail:wuchunlei0620@126.com。

通讯作者:柏锡(1975-),男,博士,副教授,主要从事植物耐逆分子生物学和基因工程、应用生物信息学研究。E-mail:baixi@neau.edu.cn。

夏正俊(1962-),男,博士,研究员,主要从事大豆遗传学及分子生物学研究。E-mail:xiazhj@iga.ac.cn。

料^[5-6]。近年来,许多控制重要农艺性状的基因被成功克隆出来,如花期、育性、叶型和抗病性等。本研究通过⁶⁰Co γ 射线诱变旨在获得大量表型特别是花期的变异材料,不仅为育种研究提供了新种质资源,也为大豆基因功能分析提供了重要材料。

1 材料与方法

1.1 试验设计

供试大豆品种为北方春大豆极早熟品种黑河 13 和北豆 43,由中国科学院东北地理与农业生态研究所提供。2012 年于黑龙江省农业科学院玉米研究所辐射诱变实验室进行⁶⁰Co γ 射线诱变处理。用⁶⁰Co γ 射线辐射处理大豆种子 12 500 粒,两个品种每个处理剂量各 2 500 粒,吸收剂量为 A:350 Gy,B:300 Gy,C:250 Gy。北豆 43 未经过 C 剂量处理。

诱变处理后的种子作为 M₁代于 2012 年 5 月播种,对照种子各播种 100 粒,9 月将所有存活下来的诱变单株采荚收获;2013 年 5 月 16 日,播种 M₂代种子,M₂群体总株行数分别为北豆 43A(品种为北豆 43,吸收剂量为 350 Gy,下同。)1 200 株行,北豆 43B 1 130 株行,黑河 13A 800 株行,黑河 13B 855 株行,黑河 13C 630 株行,对照仍各播种 100 粒,为上代收获的种子。9 月将有变异性状的材料进行单株收获,有变异性状的株行按整株行收获,其余材料按单个株行里每株 8~10 个荚收获。选取重要变异性状的材料共 80 个 M₃代株行于人工气候室内种植,进行下一代表型验证。

1.2 表型性状调查

对⁶⁰Co γ 射线诱变获得的 M₂代材料,全生育期每 2~3 d 田间调查 1 次,观察记载开花期、成熟期、株高、株型、叶形、叶色等性状。

突变频率(%) = M₂所有发生突变的株行数/M₂种植的总株行数 × 100^[7]。

1.3 DNA 提取

大豆叶片 DNA 提取方法采用改进后的 CTAB

提取法^[8]。

1.4 生育期基因的基因型鉴定

对两个大豆供试品种的生育期基因 E1,E2,E3,E4 的基因型进行鉴定,PCR 产物直接或经酶切后聚丙烯酰胺凝胶或琼脂糖凝胶电泳检测^[9]。

1.5 品质性状测定

对 M₂代种子量足够的 385 份表型变异材料的种子和对照材料种子利用近红外分析仪 MATRIX-I 进行蛋白质、油含量测定。对照种子各测定 10 组。

2 结果与分析

2.1 诱变效应

诱变处理对两个品种的田间出苗率均产生了不同程度的影响,M₁代表现出苗迟,生长受到严重抑制,个别黄化苗存活。出现大量不育株,贪青晚熟植株,结荚少或只结单粒荚。诱变群体的表型变异植株在 M₂代比 M₁代大量减少,分析其原因可能是不育株、白化苗等的死亡;诱变处理带来的生理损伤导致表型异常个体在后代变异性状消失;受环境因素影响导致一些不利突变植株不能存活;有些突变性状可能受多基因控制,在 M₂和 M₃代不能稳定遗传等。

⁶⁰Co γ 射线的不同处理剂量在 M₂代群体的性状表现上也存在差异,两个品种的 A 剂量处理的后代群体会出现较多的不利突变,如黄化苗、矮小、叶片皱缩和不育株等,C 剂量处理的后代突变频率相对较低,黑河 13 的 3 个剂量处理突变频率分别为 A:8.50%;B:6.90%;C:8.00%,北豆 43 的 2 个处理剂量的突变频率分别为 A:8.92%;B:12.21%。从表 1 中可以看出,B 剂量处理北豆 43 品种的突变频率较高,且不利突变率比 A 剂量低将近 2 个百分点;B 剂量处理黑河 13 的不利突变率最低。因此,可初步判定处理剂量 B(300 Gy)为最佳处理剂量。

表 1 两个品种在⁶⁰Coγ 射线不同处理剂量下突变频率和不利突变率

Table 1 Mutation frequency and harmful mutation ratio of Heihe 13 and Beidou 43 under different dose of ⁶⁰Co γ rays

品种/剂量 Variety/ Dose	M ₂ 代株行数 M ₂ lines	突变株(行)数 Mutation plants(lines)	突变频率 Mutation Frequencies/%	不利突变株数 Harmful mutation plants	不利突变率 Harmful mutation Ratio/%
黑河 13A Heihe13A	800	68	8.50	21	30.88
黑河 13B Heihe13B	855	59	6.90	11	18.64
黑河 13C Heihe13C	630	48	8.00	10	20.83
北豆 43A Beidou43A	1200	107	8.92	12	11.21
北豆 43B Beidou43B	1130	138	12.10	13	9.40

2.2 表型性状分析

⁶⁰Co γ 射线辐射诱变处理黑河 13 在 M₂代中发现表型变异株 175 株,占辐射诱变 M₂代群体植株总数的 7.66%;北豆 43 在 M₂代中发现表型变异株

245 株,占辐射诱变 M₂代群体植株总数的 10.52%。株高性状突变株占表型变异株总数的 40%;花期突变株占表型变异株总数的 20.95%;熟期突变株占 15%;叶型、叶色突变株占 8.1%(表 2)。

表 2 ^{60}Co γ 射线处理黑河 13 和北豆 43 产生突变体初步分类
Table 2 Primary category of mutants of Heihe 43 and Beidou 43 treated with ^{60}Co γ rays

项目 Item	变异性状 Variation of performance	变异株数(M_2) Mutant numbers(M_2)		突变份数(M_3) Mutant number(M_3)	
		黑河 13 Heihe 13	北豆 43 Beidou 43	黑河 13 Heihe 13	北豆 43 Beidou 43
茎 Stem	矮秆 Dwarf	41	69	3	5
	高秆 Tall	18	40	2	3
	多分枝 Polytomous branching	23	41	0	0
	无限结荚习 Indeterminate growth habit	1	0	0	0
	株型 Plant type	5	2	0	1
叶 Leaf	白花苗 Albino plantlets	5	8	0	0
	黄化苗 Etioated seedlings	1	1	0	0
	叶色深绿 Deep green	2	2	0	0
	叶色浅绿 Light green	1	1	1	0
	圆叶 Round	4	5	1	0
	窄叶 Narrow	1	0	0	0
	皱缩叶 Wrinkly	3	0	0	0
	3 片龙骨瓣 Three tropis	1	0	0	0
花 Flower	种皮皱缩 Wrinked seed	0	1	0	0
	种皮色 Seed coat color	2	2	0	0
	小粒 Small seed	0	1	0	1
	早花 Early flowering	14	24	1	3
Time to flowering or maturity	晚花 Late flowering	17	33	0	1
	早熟 Premature	5	6	2	0
	晚熟 Late mature	16	36	0	0
	不(低)育 Sterile	33	22	0	1
品质 Quality	高油含量 High oil content	2	4	0	0
	高蛋白含量 High protein content	3	6	0	0

由于性状重合,表中 M_2 代各性状变异突变材料数目总和不等于获得的所有突变材料数量。

The sum of mutant materials of M_2 was not equal to the total mutant materials because of traits coincidence.

2.2.1 叶突变 在一般的诱变群体中,一般能观察到叶性状的突变体。在所观察的突变体库中共发现 34 株叶色或叶形上发生变化的突变体植株。一般白化苗在苗期即全部死亡,黄化苗极大部分死亡,本试验中仅存活 2 株。同时,亦观察到 2 个叶色明显变淡突变类型^[10](图 2G),在叶形上,有明显变圆(图 2F)、变窄或皱缩的突变体,同时还观察到第一片复叶为 4 叶的突变体^[11]。

2.2.2 株型突变 在所得到的诱变群体中,均能观察到株高上有明显变化的变异株。其中出现频率最高的为矮秆植株(图 2B),占突变群体的 26.19%,其表现为节间数目少,顶端停止生长较早或极早,结荚密集集中于顶部呈伞状,最矮植株株高仅有 10 cm。矮秆突变体的获得为培育大豆抗倒伏,高产品种提供重要材料^[12]。高秆突变株株高达到 100 cm 以上(图 2C),顶端生长在开花后还持续相当一段时间。但这类变异在 M_3 代验证时仅部分突变体得到了验证。同时获得了 1 株茎部粗壮且具 5 个分枝

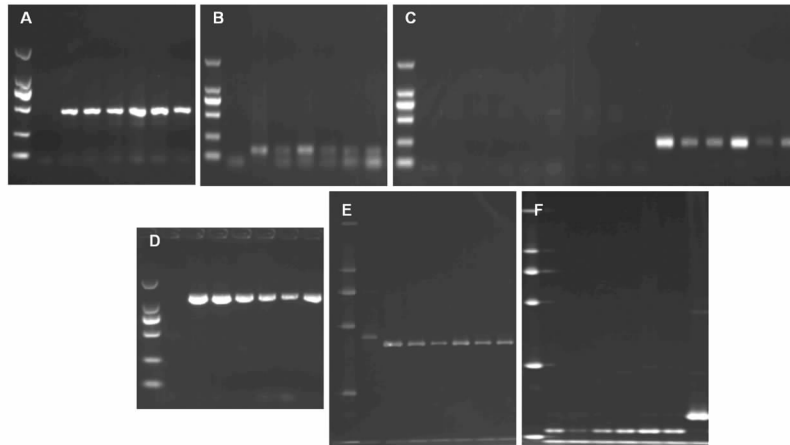
的高产突变株(图 2D),其高秆性状在 M_3 代中得以验证。在 M_2 代群体中还发现 7 株在株型上与对照有明显差异的植株,株高均在 40~60 cm 范围内,叶柄短或叶柄张开角度小,株型收敛, M_3 代仅验证一个株行,表型与上代一致。此外, ^{60}Co γ 射线处理获得的 M_2 代出现双茎植株,多分枝植株(图 2D),也有匍匐生长植株和无限结荚习性植株出现,这些突变体还有待进一步验证的基础上加以解析。

2.2.3 种子突变 得到的诱变群体中,都有种子突变出现。表现为种子皱缩,种皮和种脐颜色变为褐色。经 M_3 代验证性状未得到传承。得到 1 株种子明显变小的变异株,百粒重明显降低,该突变体在株型等性状上基本与对照一致,经 M_3 代验证表型与上代一致。种子的变异直接影响产量性状,所以对 M_2 代突变群体的种子进行了蛋白质和油分含量的检测。

2.2.4 花期突变 由于两个品种皆为北方早熟品种,通过花期基因型鉴定,初步确定为 $e1-as/e2/e3-$

T/E4 基因型(图 1),所以开花期的变异不是很明显,北豆 43 对照植株的开花期为 6 月 23 日,早花突变体表现为提前 2~3 d 开花。黑河 13 对照植株的开花日期为 6 月 22 日,诱变材料极少表现出早花性状。共获得 38 份早花突变株, M_3 代选取 5 份早花

突变株行进行验证,其中就有 4 个 M_3 代株行比对照早开花 3 d,说明 M_2 代的早花早熟突变具有较高的稳定遗传给 M_3 代的能力。晚花突变的发生频率相对较高,共获得 50 份突变株,占突变株总数的 11.91%,变异性状较明显,一般比对照晚开花 6~8 d。



A,B,C,D:PCR 鉴定琼脂糖凝胶电泳结果;E,F:为酶切鉴定聚丙烯酰胺凝胶电泳结果;A,E:*E1* 基因的基因型鉴定;B,F:*E2* 基因的基因型鉴定;C:*E3* 基因的基因型鉴定;D:*E4* 基因的基因型鉴定。

A,B,C,D:PCR identify;E,F:Restriction enzyme digestion;A,E:Genotyping of *E1* gene;B,F:Genotyping of *E2* gene;C:Genotyping of *E3* gene;D:Genotyping of *E4* gene.

图 1 突变体亲本品种的生育期基因的基因型鉴定

Fig. 1 Genotyping of maturity genes for parental cultivars of mutant libraries

2.2.5 生育期性状突变 处理得到的诱变群体中,都有育性和熟期改变的突变,主要表现不育、低育、早熟和晚熟,发现不育或低育株共 55 株,在突变体库中占比例较大,达到 13%。不育或低育株多表现为贪青、晚熟,系常见复合性状突变。叶色很深或出现其他色素的积累,结荚只为单粒荚,与前人研究结果相似^[13]。育性突变与花期突变也紧密相关,多数不育或低育株都表现出晚花性状,花期过后不结荚或结荚率极低。早熟和晚熟性状多伴随早花和晚花性状出现,也发现有早花晚熟和晚花早熟性状的变异株各 1 株。

2.3 品质性状分析

经测定已明确对照北豆 43 的蛋白质含量平均 41.47%,标准差值 0.83,油分含量平均 20.66%,标准差值 0.45。对照黑河 13 的蛋白质含量平均为 40.57%,标准差值 0.56。油含量平均为 21.69%,标准差值 0.35。⁶⁰Co γ 射线诱变群体 M_2 代 392 份材料的蛋白质含量,油分含量测定结果见图 2。北豆 43 高蛋白材料比对照高 5.167 个百分点,低蛋白材料比对照低 5.72 个百分点;高油材料比对照高 4.08 个百分点,低油材料比对照低 2.87 个百分点;黑河 13 高蛋白材料比对照高 4.48 个百分点,低蛋白材料比对照低 5.29 个百分点;高油材料比对照高 2.55 个百分点,低油材料比对照低 4.8 个百分点。共获得 15 份高油、高蛋白材料,对比对照材料经差异显著性分析均表现出极显著差异,准备进行下一代验证。

3 讨论

理化诱变能在短时间内构建大量诱变群体^[7],目前通过物理诱变构建突变体库的方法已经成为开发新型种质资源的首选方法。⁶⁰Co γ 射线能量高、穿透能力强,可造成共价键断裂,导致易位、倒位和缺失等染色体突变^[14]。

本试验利用⁶⁰Co γ 射线诱变处理大豆品种黑河 13 和北豆 43,2012 年田间调查发现大量致死突变和物理损伤造成的生长抑制,存活下来的则是经过射线处理发生非致死突变的部分材料,为我们提供重要的各种表型变异的遗传材料。对于 M_2 代所有突变株, M_3 代未进行全部验证,并且某些重要的产量性状由于室内空间和土壤营养成分的限制不容易表现出来。 M_2 代所有突变株连同随机选取的 M_2 代中未观察到表型变化的植株,于下一年进行大田种植加以验证。同时由于突变基因多为隐性基因,其性状观察只能在纯合的后代遗传群体中才能进行,应该通过观察性状分离比进行多代筛选,或者有的突变位点发生在非功能基因区域,不表现出性状变异。

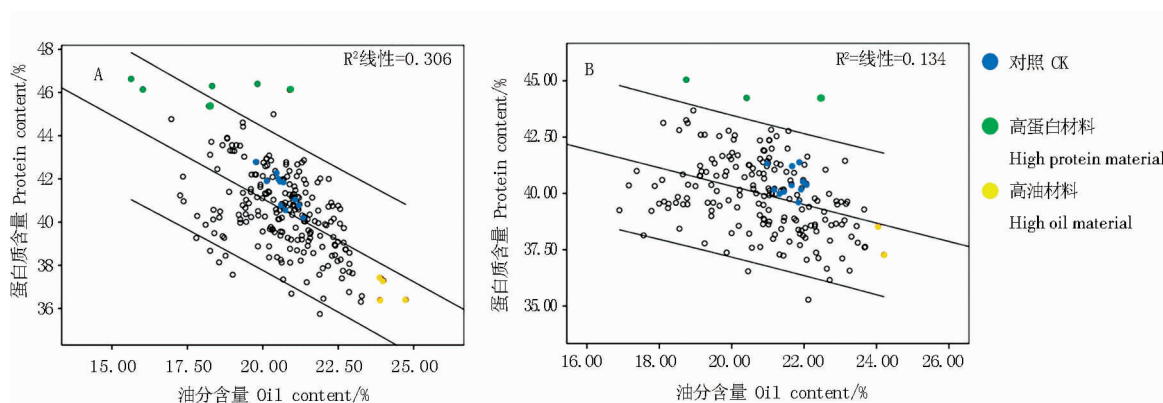
本研究获得了花期、株高、熟期、叶型、叶色、育性、分枝数和蛋白质、油分含量等性状发生变化的突变体,说明这些性状在射线诱变处理后是容易发生变化的,与前人研究结果相似。在 M_2 代诱变群体中,两个品种共得到 38 株比对照早开花 2 d 左右的植株,且多数表现为提早成熟, M_3 代选取 5 份突变



A:对照;B:矮化突变表型;C:高突变表型;D:高秆多分枝突变表型;E:对照;F:圆叶;G:叶色黄化。
A: CK; B: Dwarf; C: Tall; D: Tall and polytomous branching; F: Round leaf; G: Etiolated leaf.

图2 部分突变体表型

Fig. 2 Phenotypes of partial mutants



A:北豆 43; B:黑河 13。

A: Beidou 43; B: Heihe 13.

图3 ^{60}Co γ 射线诱变处理两个品种突变群体 M_2 代种子蛋白质及油分含量分布

Fig. 3 Distribution of protein and oil contents in seeds of M_2 treated with ^{60}Co γ

株行进行验证,其中就有4个 M_3 代株行比对照早开花3 d,说明 M_2 代的早花早熟突变具有较高的稳定遗传给 M_3 代的能力。 $E1$ 基因对大豆开花期和成熟期影响最大^[15]。经过花期基因型鉴定,确定两个品种皆为 $e1$ 基因型,反映了两个品种极早熟的特性^[15-16]。 $E2$ 基因经研究发现会减弱植物体对光周期的敏感性,降低日照时长对植物体自身的影响,虽然大豆 $E2$ 基因已被证实是 *GIGANTEA* 的同源序列 *GmGla*,但相关的功能有待深入研究解析。 $E3$,

$E4$ 作为光敏色素基因,同 $E1$ 共同调控植物体对光周期的响应^[15]。大豆花期突变体的获得会为揭示大豆生育期基因调控网络及光周期反应本质提供有价值的研究材料。

获得的高秆和矮秆突变体经过 M_2 和 M_3 代的持续验证基本可以确定为可稳定遗传的株高突变体。本试验获得的 M_2 代种皮颜色候选突变体在 M_3 代表型恢复,说明不能够稳定遗传。叶色叶型突变体在 M_3 代也都有稳定遗传的植株出现。 ^{60}Co γ 射线诱变

后代低产现象比较普遍^[17],育性突变在 M₂代突变群体中占有较大比例,在 M₃代株行中仍有不育或低育株出现。研究发现育性突变与花期和成熟期突变密切相关,M₂代中不育或低育株的花期和成熟期明显推迟,表现出显著地晚花和贪青晚熟表型^[18]。此外,还发现一些株型较对照植株收敛的突变植株,即表现为叶柄与主茎夹角较小,多不产生分枝,并且具有较高的稳定遗传的能力。

大豆的蛋白质和油分含量不仅是评价大豆营养价值的重要指标,同时也影响着大豆的经济效益。本研究获得的 9 株高蛋白突变株和 6 株高油突变株测定指标均明显高于对照材料,均达到极显著差异水平。两个品种中两个指标的相关性均呈明显负相关,本研究中未发现双高材料。韩锁义等^[19]通过⁶⁰Co γ 射线和 EMS 处理大豆南农 86-4,发现两种处理方式均能得到在品质性状方面的超亲突变体,但 EMS 处理具有更明显的效果。高品质性状材料的获得还需要经过多代的筛选。

本研究发现的新的突变性状如双茎植株,4 出复叶植株在 M₃代没有出现,说明控制这些性状的基因关键位点较难诱变,因此可以尝试采用其他诱变方法进行研究可能会有所收获^[7,19]。研究获得的矮秆、密荚和多 4 粒荚等农艺性状突变体会为大豆高品质、高产育种研究提供有价值的切入点^[20]。

参考文献

- [1] Muller H J. The effects of X-radiation on genes and chromosomes [J]. Science, 1928; 67-82.
- [2] 夏璐,丘冠英,杜海彪. γ 射线诱导质粒 pGEM-3 ZF (-) DNA lacZ 基因突变的序列分析[J]. 生物物理学报, 1997, 13 (3): 482-488. (Xia L, Qiu G Y, Du H B. Mutational DNA sequence changes induced by γ-rays in the lacZ gene of pGEM-3Zf(-) DNA [J]. Acta Biophysica Sinica, 1997, 13 (3): 482-488.)
- [3] 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, 1 (2): 157-169. (Weng X Y, Wang B R, Wu H L, et al. Research on soybean mutation breeding[J]. Acta Genetica Sinica, 1974, 1 (2): 157-169.)
- [4] 袁凤杰,刘学良,任庆龙,等. 大豆籽粒高无机磷突变体的选育和特性研究[J]. 中国农业科学, 2005, 38 (11): 2356-2359. (Yuan F J, Liu X L, Ren Q L, et al. Isolation and characterization of mutants with high inorganic phosphorus seeds of soybean[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2005, 38 (11): 2356-2359.)
- [5] 郭泰,刘忠堂,胡喜平,等. 辐射诱变培育高油大豆新品种及其应用[J]. 核农学报, 2005, 19 (3): 163-167. (Guo T, Liu Z T, Hu X P, et al. Breeding and application of high oil soybean varieties through radiation[J]. Acta Agriculturae Nucleatae Sinica, 2005, 19 (3): 163-167.)
- [6] 王培英,许德春,郭玉虹,等. 人工诱变改良大豆品质的研究[J]. 核农学报, 2000, 14 (1): 21-23. (Wang P Y, Xu D C, Guo Y H, et al. Induced mutation for soybean quality[J]. Acta Agriculturae Nucleatae Sinica, 2000, 14 (1): 21-23.)
- [7] 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. (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): 33-37.)
- [8] Doyle J J, Domle J L. A rapid DNA isolation method for small quantities of fresh tissues [J]. Phytochemistry Bull, 1987, 19: 11-15.
- [9] Xu M, Xu Z, Liu B, et al. Genetic variation in four maturity genes affects photoperiod insensitivity and PHYA-regulated post-flowering responses of soybean [J]. BMC Plant Biology, 2013, 13 (91): 1471-2229.
- [10] 何冰,刘玲珑,张文伟,等. 植物叶色突变体[J]. 植物生理学通讯, 2006 (1): 1-9. (He B, Liu L L, Zhang W W, et al. Plant leaf color mutants [J]. Plant Physiology Communications, 2006 (1): 1-9.)
- [11] Wang K J, Li F S, Zhou T, et al. Inheritance of a five leaflet character arising from wild soybean (*Glycine soja* Sieb. Et Zucc.) in soybeans (*G. max* (L.) Merr.) [J]. Soybean Science, 2001, 20 (1): 22-25.
- [12] 郝再彬,吴东岚. 矮秆大豆突变体的获得[J]. 核农学报, 2004, 18 (3): 204-206. (Hao Z B, Wu D L. Obtaining of soybean dwarf mutant [J]. Acta Agriculturae Nucleatae Sinica, 2004, 18 (3): 204-206.)
- [13] 赵团结,盖钧镒. 大豆不育性自然变异的发现与鉴定[J]. 中国农业科学, 2006, 39 (9): 1756-1764. (Zhao T J, Gai J Y. Detection and identification of soybean natural variation of sterility [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2006, 39 (9): 1756-1764.)
- [14] 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 (12): 131-135. (Han S Y, Yang M L, Chen Y D, et al. Construction of mutant library for soybean ‘Nannong 96-16’ and analysis of some characters [J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2008, 22 (2): 131-135.)
- [15] 夏正俊. 大豆光周期反应与生育期基因的研究进展[J]. 作物学报, 2013, 39 (4): 571-579. (Xia Z J. Research progresses on photoperiodic flowering and maturity genes in soybean (*Glycine max* Merr.) [J]. Acta Agronomica Sinica, 2013, 39 (4): 571-579.)
- [16] 宁慧霞,常汝镇,关荣霞,等. 大豆生育期研究进展[J]. 西南农业学报, 2005, 18 (S): 92-97. (Ning H X, Chang R Z, Guan R X, et al. A review of the growing stages of soybean [J]. Southwest China Journal of Agricultural Science, 2005, 18 (S): 92-97.)
- [17] 余章清,张富厚,范占标,等. 钴 60 γ 射线对大豆辐射后代性状变异的研究及应用[J]. 河南农业学报, 1997 (1): 6-8. (Yu Z Q, Zhang F H, Fan Z B, et al. Studies on the radiation effect of ⁶⁰Co γ rays on the progeny soybean plant [J]. Henan Agricultural Science, 1997 (1): 6-8.)
- [18] 赵团结,盖钧镒. 大豆 2 个雌雄不育突变体的发现与鉴定[J]. 大豆科学, 2006, 25 (2): 109-112. (Zhao T J, Gai J Y. Discovery and inheritance of two soybean mutants with completely female and male sterility [J]. Soybean Science, 2006, 25 (2): 109-112.)
- [19] 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 ‘Nannong86-4’ [J]. Acta Agronomica Sinica, 2007, 33 (12): 2059-2062.)
- [20] 李雪华. 大豆突变体库的初步构建及突变类型的鉴定[D]. 南京:南京农业大学, 2003. (Li X H. Construction of soybean mutant pools and characterization of different mutant types [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2003.)