

大豆转座子的研究现状及应用前景

刘宇原, 付爱根, 徐敏

(西北大学 生命科学院, 陕西 西安 710069)

摘要: 大豆基因组中约有 5 万基因, 大部分基因的功能处于未知状态。转座子插入突变体库的应用可以为解码大豆基因组中未知基因的功能提供研究平台, 同时, 也可以为创建有育种应用价值的大豆突变体种质资源库提供基础。大豆基因组中 50% ~ 60% 的组分为转座子, 其中具有活性的且结构完整的转座子只有 *Tgm9*。大豆转座子突变体库目前主要还是利用外源转座子来建立, 但是开发并改进内源转座子, 增加其跳跃能力及稳定性, 可以成为构建突变体库的一个新方向。本文主要介绍了大豆基因组中发现的各种转座子及其特点, 并且重点讨论了外源转座子和大豆内源转座子在大豆突变体库创建中的应用现状及应用前景。

关键词: 大豆; 转座子; 突变体库; 功能基因组学

中图分类号: S565.1

文献标识码: A

DOI: 10.11861/j.issn.1000-9841.2016.03.0512

Research Status and Application Prospect of Soybean Transposon

LIU Yu-yuan, FU Ai-gen, XU Min

(College of Life Science, Northwest University, Xi'an 710069, China)

Abstract: There are about 50 000 genes in the soybean genome, and the function of majority genes remains to be determined. A comprehensive insertion mutant library could provide a platform for the functional characterization of unknown genes in soybean genome, and it could also contribute a collection of soybean germplasm resources with a variety of breeding values. Transposon works as a good tool for creating insertion mutants. In soybean, approximately 50%–60% of the genome are transposons, including retrotransposons and DNA transposons, while except DNA transposable elements *Tgm9*, all the elements are inactive. Many mutants were verified through transposon tagging experiment using T322, a soybean line containing active *Tgm9*. Although several mutant libraries were made using transposons from other species through gene transformation, developing native elements and improving their activity and consistence shall provide a new method in soybean mutagenesis. In this paper, we introduced transposons identified in soybean and the recent progress on applications of transposons in creating soybean insertion mutants for soybean functional genomics studies and germplasm renovation.

Keywords: Soybean; Transposon; Mutant library; Functional genomics

大豆 [*Glycine max* (L.) Merr.] 是世界上最重要的农作物之一, 为人类提供了食物、饲料、生物燃料等资源, 在国民经济中占有重要地位。大豆基因组是多重加倍后再二倍体化的结果, 组成非常复杂^[1]; 其全基因组序列初稿在 2010 年发布^[2], 其中转座子占有 60% 左右^[3]。大豆基因组拥有 50 000 左右编码蛋白质的基因^[2,4], 是模式植物拟南芥的两倍, 大部分基因的功能处于未知状态^[5]。

创建高通量的 T-DNA 插入突变体库是功能基因组学研究的最有力手段, 在拟南芥^[6] 和水稻^[7-9] 等高等植物中取得了成功, 推动了植物分子生物学

的发展。T-DNA 插入突变体库的建立需要高效的基因转化技术, 而大豆的遗传转化体系效率低, 时间长, 难以满足建立高通量的 T-DNA 插入突变体库的需要^[10-11]。转座子插入突变体库的建立可以作为一个有力的手段来解决这一问题, 这种方法只需要少量的起始基因转化植株, 然后通过繁殖带有转座子的转基因植株, 让转座子在基因组内部跳跃, 即可产生众多的插入突变体^[12]。利用转座子插入技术, 人们在各种植物^[12-13]、动物^[14] 及微生物^[15] 中创立了大量的突变体。目前, 也有人已经开始利用转座子在大豆中建立插入突变体库, 为大豆的功能

收稿日期: 2015-12-05

基金项目: 陕西省教育厅重点实验室科研计划项目(13JS108); 陕西省科技统筹创新工程项目(2014KTCL02-03)。

第一作者简介: 刘宇原(1990-), 女, 硕士, 主要从事大豆转座子的改造与利用。E-mail: 15929802100@163.com。

通讯作者: 徐敏(1973-), 女, 博士, 副教授, 主要从事大豆分子遗传研究。E-mail: xumin@nwnu.edu.cn。

基因组研究和种质资源创新提供了新的方向。为此,本文综述了大豆基因组中近年来报道过的转座子的类型及特性,并介绍了利用转座子构建大豆突变体库的最新进展,为大豆突变体库构建与种质资源创新提供新的思路。

1 大豆转座子的分类与特性

转座子(transposon)又称跳跃因子(jump element),是基因组上不必借助于同源序列就可以直接从染色体上的一个位点移动到另一个位点的DNA片段^[16],由McClintock^[17]首先在玉米中发现,随后在各种生物的基因组中都有发现。转座子是植物基因组中的重要组成部分,在细胞重塑基因组的过程中扮演着重要的角色^[18-19]。根据转座时的中间介导分子类型及作用机制,转座子通常可以分为两大类:一类转座子(class I)与二类转座子(class II)^[20]。一类转座子(class I)又名反转录转座子(retrotransposon),或简称为反转座子(retroposon),它们利用RNA分子为介导,通过“复制-粘贴”(copy-paste)形式进行转座。二类转座子(class II)又为DNA转座子,它们直接以DNA分子为介导,通常以“剪切-粘贴”(cut-paste)的形式进行转座^[20]。

1.1 大豆中的反转录转座子

反转录转座子采用“复制-粘贴”(copy-paste)形式进行转座,通常在植物基因组中具有很高的拷贝数。根据结构,反转录转座子又可以分为LTR(Long terminal repeat,长末端重复序列)与non-LTR两大类。LTR转座子与反转录病毒结构相似,两末端具有序列极为相似的、互为正向重复的LTR。LTR区域长约几百到几千碱基对(base pair, bp),区域的起始端(常为5'-TG-3')与末端(常为5'-CA-3')互为反向重复^[21]。两个LTR区域间存在一些开放读码框(open reading frame, ORF),如:*gag*, *pol*, *env-like*等,编码与转座相关的蛋白。LTR反转座子一般都有*gag*与*pol*,有些LTR反转座子也具有*env-like*(类*env*)^[22]。*env*编码外壳蛋白,调节病毒的感染性,含有*env-like* ORF的反转座子有时也被称为内源性反转录病毒(endogenous retrovirus)^[22]。开放读码框*gag*与*pol*编码的都是多蛋白,即它们编码的多肽链最终会被切割、加工成多种具有不同生物学功能的成熟肽段。*gag*基因的最终蛋白产物都是构成反转录病毒的核心蛋白,参与新病

毒正确组装及成熟过程^[23]。*pol*基因编码的蛋白包括蛋白酶、反转录酶(RT)、整合酶(IN)及RNaseH(RH),可以将反转录病毒的遗传物质(RNA)或反转录转座子的RNA中间产物转变为双链DNA分子,再随机整合到寄主的基因组中^[24]。根据*pol*基因中4种蛋白编码序列的排列顺序,LTR反转座子又可以分为*Ty1/copia*和*Ty3/gypsy*两种亚类型^[24]。Non-LTR反转座子的结构中,顾名思义,没有LTR区域^[21],它们的结构与反转录病毒差别非常大。植物中non-LTR转座子主要有LINE(long interspersed nuclear element)与SINE(short interspersed nuclear element)两个亚类。

反转座子有一定的生物偏好性,non-LTR反转座子是哺乳动物的基因组中的常见元件^[21],如LINE-1元件在人类基因组中有大约500 000个拷贝,占了全基因组序列的17%~20%^[25];而LTR反转座子则为植物基因组中的主要类型^[21]。

大豆中反转座子的主要类型也为LTR。Du等^[3]通过生物信息学分析,从大豆基因组中鉴定出了32 552个反转座子,其中32 370个为LTR反转座子,为反转座子总量的99%以上,占大豆核基因组的42%。根据序列与结构的相似性,这些LTR反转座子可以归类为510个家族,分属于*Ty1/copia*(157个家族)与*Ty3/gypsy*(353个家族)两个亚型。这些反转座子中,经过遗传与生化实验分析并报道过的家族只有4个,包括:*Ty1/copia*亚型的*SIRE1*及*Ty3/gypsy*亚型的*Calypso*、*Diaspora*与*SNARE*^[22, 26-29]。不同的LTR反转座子家族的拷贝数不同,个别家族在基因组中占有相当大的比例。例如:*Diaspora*家族转座子的总量达到了大豆基因组的0.5%^[22, 28],更有甚者,*SNARE*家族有近6 000个拷贝数,总序列占了大豆基因组的12%,是大豆基因组中最大的一个家族^[29]。

*SNARE*家族的转座子长度约13~20 kb,其LTR的长度大约为1.6~2.2 kb,既有自主型元件(autonomous element),也有非自主型元件(non-autonomous element)。反转座子中,只要具备所有与转座有关的蛋白编码区,不论目前是否有转座活性,都为自主型元件;如果与转座有关的蛋白编码区出现缺失,则为非自主型元件^[24]。*SNARE*家族中有两种自主型反转座子*SARE^A*与*SARE^B*,但却只有一类非自主型元件*SNRE*,起源于*SARE^A*^[29]。不

过,在漫长的进化中,*SNRE*的LTR区域与*SARE^A*与*SARE^B*的LTR区域发生互换,致使*SNRE*的LTR序列产生分歧,一部分与*SARE^A*相似,另一部分与*SARE^B*相似。*SNARE*家族另一个特征是序列中除了含有*gag*、*pol*和*env-like* ORF外,还有一个功能未知、不为转座必需的ORF1,对于研究植物基因组中LTR-反转座子的进化具有重要意义^[30]。

1.2 大豆中的DNA转座子

根据转座的方式DNA转座子也可以分为两个亚类:第一亚类的元件以“剪切-粘帖”的方式进行转座,在基因组中拷贝数较低,目前发现的大部分DNA转座子都属于此亚类;但也有少部分的DNA转座子可以通过“复制-粘帖”的形式进行活动,这些转座子归为第二亚类,例如:*Helitron*元件,*Helitron*元件中有DNA聚合酶B的基因,使元件以DNA分子为中介进行转座^[31]。植物中第一亚类DNA转座子有6大超级家族:*Tc1/Mariner*、*hAT*、*Mutator*、*PIF/Harbinger*、*P*和*CACTA*家族^[24]。它们都具有特异的末端反向重复序列(Terminal inverted repeat, TIR) 转座子的两边有2~8 bp的目标位点重复序列(Target site duplication, TSD) 结构完整的转座子序列中还含有编码转座酶的基因。另外,植物基因组中还有大量有较难判定来源的微型反向序列(Miniature inverted transposable element, MITE)。它们是由各种DNA转座子退化形成的,长度只有几百个碱基对,两端含有末端重复序列。MITE序列中所包含的信息一般不足以判定它们从哪个家族退化而来,所以一般MITE的分类是根据它们的TIR序列的相似性与TSD的长度为依据,比如TSD长度为3 bp的*Tourist-like*元件和TSD长度为2 bp的*Stowaway*元件^[32]。

大豆基因组中DNA转座子约有6 000个,占大豆基因组的16%左右^[3],其中*helitron* 82个、*Tc1/mariner* 9个、*hAT* 65个、*Mutator* 2 400个、*PIF/Harbinger* 90个、*CACTA* 54个,另外还有MITE元件约3 000个(*Tourist* 1 575个、*Stowaway* 1 758个)。而栽培大豆(*Glycine max*)中克隆并分析过的转座子只有:*Soymar1*、*Tgm1*~*Tgm7*、*Tgm-Express*、*Tgmt^{*}*和*Tgm9*^[20, 33-36]。除*Soymar1*以外,这些DNA转座子都属于*CACTA*家族,而具有完整的转座子结构的转座子只有*Tgmt^{*}*和*Tgm9*。*Tgmt^{*}*插入在类黄酮3'羟化酶(*F3'H*)基因中,导致大豆植株产生灰白

色的表皮毛^[35]。*Tgm9*插入在一个编码二氢黄酮醇4-还原酶(DFR)的基因*DFR2*中,导致大豆花色呈白色,当它跳出后大豆花色回复紫色,因此含有*Tgm9*的大豆株系T322出现花色杂斑化现象^[36]。*Tgmt^{*}*和*Tgm9*应该从同一转座子进化而来,因为它们的序列相似度达99%以上,长度都为20 548 bp,包含以5'-CACTA-3'起始的5'-TIR和3'-TIR 2个编码转座酶的基因*GmTNP1*和*GmTNP2*。但有趣的是两者之中只有*Tgm9*有转座活性,*Tgmt^{*}*具有完整结构却失去转座活性,其中原因目前还不清楚^[35-36]。

野生大豆(*Glycine soja*)中也曾经克隆出一个可以跳跃的CACTA类转座子*Tgs1*,不过此转座子中没有转座酶基因,只有完整的TIR末端,可能需要植物中其他位点提供转座酶^[37]。

*Soymar1*是一个*Mariner*元件,此种元件广泛存在于人和一些无脊椎节肢动物(例如:涡虫、线虫)中,一般在植物基因组中很少见。*Mariner*家族的转座子片段大小相对较小,一般长度为1 300 bp左右,两侧有短的(30~40 bp)末端反向重复序列,转座子内部有一个开放阅读框,编码330个氨基酸长度的转座酶,此转座酶可以识别ITR序列以及切割转座子,并使其插入到靶序列中^[20]。

另外大豆中还有很多种不稳定系,如花色不稳定系*W4-m*与*wp-m*^[38-39],种皮颜色不稳定系*r-m*^[40],及叶片颜色不稳定系*Y18-m*^[41]。目前已经从*w4-m*位点中克隆出了具有自主跳跃活性的转座子*Tgm9*^[36],从*wp*位点中克隆了无自主跳跃活性的转座子*Tgm-Express1*^[34],所以很可能*r-m*与*Y18-m*位点也存在有活性的或TIR完整的转座子。

2 大豆转座子的应用

目前大豆基因组序列测序与拼接已经基本完成^[2],大豆基因组中大约有45 000~50 000个基因,其中大部分的基因功能未知,因此创建较完善的基因突变体库进行功能基因组研究对于大豆的基础研究及育种都非常重要。创建大豆突变体库可以使用化学试剂(如EMS)对基因组DNA进行点突变,再结合TILLING的方法筛选突变基因^[42];也可以利用物理射线,如快中子,对DNA进行缺失突变,快中子辐射形成的缺失片段大小不一,1 bp到30 kb以上的缺失都有可能发生^[43]。利用EMS与

快中子等突变方式的优点是突变位点随机性强,但它们的缺点也很明显,很难控制与检测一个突变植株上的突变位点数、难以定位与克隆突变位点,这些都为突变基因的鉴定及基因功能鉴定增加了难度。诱导突变的另一种方式是利用转座子和 T-DNA 等 DNA 元件在基因组中形成插入突变。由于这些元件带有特异性的序列,所以在检测插入突变位点与突变基因克隆方面更加简便。早在十几年前,就有人利用 T-DNA 在拟南芥和水稻中突变创造了大量的突变体,为两者的功能基因组学奠定了良好的基础^[44-45]。不过,大豆单株结实率低,转化技术较难且效率较低,单纯的使用 T-DNA 突变来创建大量突变体,以目前的技术很难做到^[5]。转座子标签技术利用转座子跳跃产生新的单拷贝插入突变,也是一种常用的突变诱导技术,容易操作,新的突变基因可以使用 TAIL-PCR 等技术进行快速鉴定,是创立大豆突变体库的一个好途径^[46]。

迄今,大豆中使用的转座子标签技术有两类:一类是通过转基因技术将外源转座子转化到大豆基因组中,利用它们的跳跃产生突变体^[5,11,47];另一类利用含活性内源性转座子的株系,通过自我繁殖,产生突变体^[48]。

2.1 外源转座子在大豆中的应用

利用外源转座子来创建大豆突变体的常用手段是通过转基因技术建立一个二元体系,此体系由一个带非自主性转座子的转基因株系与一个带相应转座酶基因的转基因株系组成。二者杂交后可以产生既含有转座子又含有转座酶的株系,而此株系中的非自主性转座子就能在转座酶的作用下进行跳跃,形成新的插入突变^[16,46]。目前开发的大豆外源转座子突变体系有 3 个,它们分别利用了玉米的 *Ac/Ds* 系统^[11]、水稻的 *mPing* 系统^[5]以及烟草反转子 *Tnt1* 系统^[47]作为突变原。

Mathieu 等^[11]在 2009 年将玉米的 *Ac* 转座酶 (*AcTPase*) 基因与 *Ds* 转座子分别转化到大豆中,得到了 900 个左右 *Ds* 转化株系,与 25 个带有 *AcTPase* 的转基因植株。但令人遗憾的是,两者杂交后所得到的杂交植株发生转座现象的几率极低。水稻的微型反向重复转座元件 *mPing* 长度只有 430 bp,在水稻中具有高频率的转座活性及较高的拷贝数^[49]。*mPing* 跳跃后一般在原位点上不留下足迹,不对原位点序列造成任何影响。并且 *mPing* 的跳跃在外

源寄主拟南芥与酵母中(*Saccharomyces cerevisiae*)也有同样的特点^[50]。Hancock 等^[5]于 2011 年将 *mPing* 插入到 35S 启动子与报告基因 *gfp* 之间通过基因枪技术转入到大豆基因组中,*mPing* 跳跃后,上游的 35S 启动子启动 *gfp* 基因的表达,植株在紫外光下出现绿色荧光。*mPing* 转基因株系与含编码转座酶基因的转基因植株杂交形成的后代中确实可以监测到活跃的 *mPing* 跳跃活动。但是 *mPing* 在大豆中倾向于跳跃到原插入位点 2.5 kb 以内的染色体区域,这对建立全基因组的饱和突变体库是不利的。

Tnt1 是烟草中的一个反转录转座子,在正常的植物组织中是不活跃的,但是植物经过组织培养,其基因组内的 *Tnt1* 可以被活化。*Tnt1* 转化到大豆基因组后也能通过“copy-paste”方式进行转座活动,每一代植株中,*Tnt1* 转座可以产生 4~20 个新的插入位点^[47],并且 *Tnt1* 一般转座到大豆基因富集区,有利于高效诱导基因的突变。但此种方法的缺陷是,*Tnt1* 元件的活性必须通过组织培养活化,而组织培养再生容易导致植物基因组出现各种染色体变异,这增加了后期突变鉴定的复杂性。

2.2 大豆内源性转座子的应用

有些栽培大豆中含有活跃的内源性转座子,如 T322 中所含的 *Tgm9*^[36]。T322 中 *Tgm9* 插在基因 *DFR2* 的内含子中(第 17 号染色体),它的活动导致 T322 出现不稳定花色性状。*Tgm9* 从原位点跳出后,植株花色可以回复野生性状,这些回复株也会因为 *Tgm9* 的重新插入而产生新的突变性状,已经分离到的突变性状有新的花色、叶绿素减少、育性改变、腐根等^[48,51-56]。除了 T322 以外,栽培大豆中还发现了另一些不稳定系,如种皮颜色、叶片颜色不稳定系等^[40-41],但是尚未有人从中克隆到转座子。

利用内源性转座子构建突变体库有很多优点:第一,方法简单。只要大量栽培繁殖,从后代的回复株系中筛选突变体。第二,*Tgm9* 的活性高。通过多次独立实验的结果统计,T322 的生殖回复频率为 4%~6%,体细胞的回复率可高达 25%^[36,57]。第三,*Tgm9* 在染色体上重新插入的位点随机性强,在由 *Tgm9* 转座后导致的众多新突变体中,只有 2 个插入到 *Tgm9* 原位点的临近位置^[51],其它的新突变位点则随机分布在各条染色体上^[52-56]。转座的

随机性对于建立一个覆盖全基因组的插入突变文库很重要。第四, *Tgm9* 是一个低拷贝数元件^[36,56], 以 *Tgm9* 的 3' 末端区域为探针对酶解后代大豆基因组进行 Southern 分析, 只能检测到 3~4 个条带, 简化了后期克隆突变基因的工作。

然而转座子 *Tgm9* 长度达到 20 kb 左右, 在繁殖过程中, 容易通过重组产生缺失等突变从而失去跳跃能力。如在 Williams 82 中的 *Tgm10* 在序列上与 *Tgm9* 非常相似, 但是失去了 3' 末端区域。 *Tgm9* 在跳到新的位点时末端也容易丢失, 这样加大克隆新突变基因的难度^[36]。另外, 内源性的转座子还有可能通过表观遗传机制失去跳跃活性。如 *Tgmt** 的序列与 *Tgm9* 基本相同, 结构非常完整, 可是它不再跳跃, 其失活机制不是很清楚^[35]。最后, *Tgm9* 所在的 T322 并没有经过全基因组测序, 遗传背景不十分清楚, 也限制了突变的性状的鉴定与基因的克隆。

上述这些缺陷, 也许通过改造 *Tgm9* 可以得到完善。例如将 *Tgm9* 进行一定的改造, 再通过农杆菌^[58]或基因枪^[59]等手段转化到目前遗传背景已经比较清楚的 Williams 82 中。转化时也可以构建一个二元体系, 一个含有短的非自主性转座子, 另一个表达转座酶。野生大豆(*Glycine soja*)中分离到的 *Tgs1* 就是一个可以跳跃的 4.5 kb 长的转座子, 只含完整的末端序列而没有转座酶的编码区, 它的跳跃应该就是利用了基因组中其他位点表达的转座酶^[37]。缩短的转座子可以减少转座子内部同源重组而导致末端缺失的机率, 有助于后期突变基因的克隆。

3 结 语

大豆原产于中国, 20 世纪 50 年代我国大豆总产量位居世界第一位, 但多年来我国大豆生产一直停滞不前, 大豆种植呈现递减形式, 目前是世界上最大的大豆进口国, 对外依存度达到 85% 以上。对大豆的需求日益增长, 而大豆生产能力不断萎缩, 这种现象威胁国家的粮食安全, 引起了我国社会的广泛担忧^[60-61]。大豆是我国主要作物中单产低于世界平均水平的唯一作物, 而且品质也不太理想, 难以与进口大豆竞争。要想解决我国大豆的基本需求, 只能依靠科技的力量提高我国大豆的品质与产量, 其中潜力非常大。

传统育种技术、分子育种技术和转基因技术是

提高大豆生产的有力手段, 但目前进度都非常缓慢。这 3 种技术都依赖于可供利用的大豆优质品质资源和对优良性状相关基因的了解。创建可供育种利用的大豆品种资源和开发大豆优良性状相关基因是目前大豆研究中最紧迫的任务。为了解决这两个关键问题, 必须加强大豆的功能基因组学的研究, 才能为大豆的育种与生产提供坚实的基础。

在转化效率较低、基因组复杂的大豆中, 转座子标签技术是一个非常有效的分析大豆优良性状相关基因的方法, 同时也是一项优良的创建高通量的大豆品种资源库的方法。目前利用外源转座子所建立的几个突变体库虽然不是十分理想, 但也表现了一定的应用潜力。大豆内源性转座子特性优良, 可以克服外源转座子的不足, 不过该系统的应用还需要更进一步的深入优化。

参考文献

- [1] Shoemaker R C, Schlueter J, Doyle J J. Paleopolyploidy and gene duplication in soybean and other legumes[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2006, 9: 104-109.
- [2] Schmutz J, Cannon S, Schlueter J, et al. Genome sequence of the palaeopolyploid soybean[J]. Nature, 2010, 463: 178-183.
- [3] Du J, Grant D, Tian Z, et al. SoyTEdb: A comprehensive database of transposable elements in the soybean genome[J]. BioMed Central Genomics, 2010, 11: 113.
- [4] Libault M, Farmer A, Joshi T, et al. An integrated transcriptome atlas of the crop model *Glycine max*, and its use in comparative analyses in plants[J]. Plant Journal, 2010, 63: 86-99.
- [5] Hancock C N, Zhang F, Floyd K, et al. The rice miniature inverted repeat transposable element *mPing* is an effective insertional mutagen in soybean[J]. Plant Physiology, 2011, 157: 552-562.
- [6] Alonso J M, Stepanova A N, Leisse T J, et al. Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*[J]. Science, 2003, 301: 653-657.
- [7] An S, Park S, Jeong D H, et al. Generation and analysis of end sequence database for T-DNA tagging lines in rice[J]. Plant Physiology, 2003, 133: 2040-2047.
- [8] Jung K H, An G, Ronald P C. Towards a better bowl of rice: Assigning function to tens of thousands of rice genes[J]. Nature Reviews Genetics, 2009, 9: 91-101.
- [9] Fu F F, Ye R, Xu S P, et al. Studies on rice seed quality through analysis of a large-scale T-DNA insertion population[J]. Cell Research, 2009, 19: 380-391.
- [10] Parrott W A, Clemente T E. Transgenic soybean[M]//Specht J E, Boerma H R. Soybeans: Improvement, production, and uses. Madison, WI: ASA-CSASSA, 2004: 265-302.

- [11] Mathieu M , Winters E K , Kong F M , et al. Establishment of a soybean (*Glycine max* Merr. (L)) transposon-based mutagenesis repository [J]. *Planta* , 2009 , 229: 279-289.
- [12] Walbot V. Saturation mutagenesis using maize transposons [J]. *Current Opinion in Plant Biology* , 2000 , 3: 103-107.
- [13] Wang N , Long T , Yao W , et al. Mutant resources for the functional analysis of the rice genome [J]. *Molecular Plant* , 2013 , 6: 596-604.
- [14] DeNicola G M , Karreth F A , Adams D J , et al. The utility of transposon mutagenesis for cancer studies in the era of genome editing [J]. *Genome Biology* , 2015 , 16: 229.
- [15] Horton B N , Kumar A. Genome-wide synthetic genetic screening by transposon mutagenesis in *Candida albicans* [J]. *Methods in Molecular Biology* , 2015 , 1279: 125-135.
- [16] 王文静, 马浩然, 李加纳, 等. *Ac/Ds* 转座子激活标签技术研究进展 [J]. *中国农业科学* , 2013 , 46 (14) : 2845-2855. (Wang W J , Ma H R , Li J N , et al. Research progresses in *Ac/Ds* transposon activation tagging system [J]. *Scientia Agricultura Sinica* , 2013 , 46 (14) : 2845-2855.)
- [17] Fedoroff N V. The discovery of transposable elements [M] // Kung S D , Yang S F. Discoveries in plant biology Vol. 1. Singapore: World Scientific , 1998: 89-104.
- [18] Slotkin R K , Martienssen R. Transposable elements and the epigenetic regulation of the genome [J]. *Nature Reviews Genetics* , 2007 , 8: 272-285.
- [19] Fedoroff N V. Transposable elements , epigenetics , and genome evolution [J]. *Science* , 2012 , 338: 758-767.
- [20] Jarvik T , Lark K G. Characterization of *Soymar1* , a mariner element in soybean [J]. *Genetics* , 1998 , 149: 1569-1574.
- [21] Kumar A , Bennetzen J L. Plant retrotransposons [J]. *Annual Review of Genetics* , 1999 , 33: 479-532.
- [22] Wright D A , Voytas D F. *Athila4* of *Arabidopsis* and *Calypso* of soybean define a lineage of endogenous plant retroviruses [J]. *Genome Research* , 2002 , 12: 122-131.
- [23] Bell N M , Lever A M. HIV Gag polypeptide: Processing and early viral particle assembly [J]. *Trends Microbiology* , 2013 , 21 (3) : 136-144.
- [24] Wicker T , Sabot F , Hua V A , et al. A unified classification system for eukaryotic transposable elements [J]. *Nature Reviews Genetics* , 2007 , 8 (12) : 973-982.
- [25] Brouha B , Schustak J , Badge R M , et al. Hot L1s account for the bulk of retrotransposition in the human population [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences , USA* , 2003 , 100: 5280-5285.
- [26] Laten H M , Majumdar A , Gaucher E A. *SIRE-1* , a *copia/Ty1*-like retroelement from soybean , encodes a retroviral *envelope*-like protein [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences , USA* , 1998 , 95: 6897-6902.
- [27] Havecker E R , Voytas D F. The soybean retroelement *SIRE1* uses stop codon suppression to express its *envelope*-like protein [J]. *European Molecular Biology Organization Reports* , 2003 , 4: 274-277.
- [28] Yano S T , Panbehi B , Das A , et al. *Diaspora* , a large family of *Ty3-gypsy* retrotransposons in *Glycine max* , is an envelope-less member of an endogenous plant retrovirus lineage [J]. *Bio Med Central Evolutionary Biology* , 2005 , 5: 30.
- [29] Du J C , Tian Z X , Bowen N J , et al. Bifurcation and enhancement of autonomous-nonautonomous retrotransposon partnership through LTR swapping in soybean [J]. *Plant Cell* , 2010 , 22 (1) : 48-61.
- [30] 刘静, 杜建厂. 植物 LTR-反转座子中 *Orf1* 基因的分子进化 [J]. *遗传* , 2013 , 35 (9) : 1117-1124. (Liu J , Du J C. Molecular evolution of *Orf1* gene in plant LTR-retrotransposons [J]. *Heredity* , 2013 , 35 (9) : 1117-1124.)
- [31] Kapitonov V , Jurka J. Rolling-circle transposons in eukaryotes [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences , USA* , 2001 , 98: 8714-8719.
- [32] Feschotte C , Zhang X , Wessler S. Miniature inverted-repeat transposable elements (MITEs) and their relationship with established DNA transposons in Mobile DNA II [J]. *American Society for Microbiology* , 2002 , 1147-1158.
- [33] Rhodes P R , Vodkin L O. Organization of the *Tgm* family of transposable elements [J]. *Genetics* , 1988 , 120: 597-604.
- [34] Zabala G , Vodkin L O. The wp mutation of *Glycine max* carries a gene-fragment-rich transposon of the CACTA superfamily [J]. *The Plant Cell* , 2005 , 17: 2619-2632.
- [35] Zabala G , Vodkin L. A putative autonomous 20.5 kb-CACTA transposon insertion in an *F3'H* allele identifies a new CACTA transposon subfamily in *Glycine max* [J]. *Bio Med Central Plant Biology* , 2008 , 8: 124.
- [36] Xu M , Brar H K , Grosic S , et al. Excision of an active CACTA-Like transposable element from *DFR2* causes variegated flowers in soybean [*Glycine max* (L) Merr.] [J]. *Genetics* , 2010 , 184: 53-63.
- [37] Takahashi R , Morita Y , Nakayama M , et al. An active CACTA-family transposable element is responsible for flower variegation in wild soybean *Glycine soja* [J]. *Plant Genome* , 2012 , 5: 62-70.
- [38] Palmer R G , Groose R W , Weigelt H D , et al. Registration of a genetic stock (*w4-m w4-m*) for unstable anthocyanin pigmentation in soybean [J]. *Crop Science* , 1990 , 30: 1376-1379.
- [39] Johnson E O C , Stephens P A , Fasoula D A , et al. Instability of a novel multicolored flower trait in inbred and outcrossed soybean line [J]. *The Journal of Heredity* , 1998 , 89: 508-515.
- [40] Chandless J M , Vodkin L O. Unstable expression of a soybean gene during seed coat development [J]. *Theoretical and Applied Genetics* , 1989 , 77: 587-594.
- [41] Chandless J M , Vodkin L O. Unstable genes affecting chloroplast development in soybean [J]. *Developmental Genetics* , 1989 , 10:

- 532-541.
- [42] Cooper J L , Till B J , Laport R G , et al. TILLING to detect induced mutations in soybean [J]. Bio Med Central Plant Biology , 2008 , 8: 9.
- [43] Bolon Y T , 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: 240-253.
- [44] Galbiati M , Moreno M A , Nadzan G , et al. Large-scale T-DNA mutagenesis in *Arabidopsis* for functional genomic analysis [J]. Functional and Integrative Genomics , 2000 , 1: 25-34.
- [45] Jeon J S , Lee S , Jung K H , et al. T-DNA insertional mutagenesis for functional genomics in rice [J]. Plant Journal , 2000 , 22: 561-570.
- [46] 吴迪,刘斌,侯文胜,等. 转座子标签法及其在大豆功能基因组研究中的应用[J]. 大豆科学, 2007 , 26(2) : 254-258. (Wu D , Liu B , Hou W S , et al. Transposon tagging and ITS potential use in functional genomics study of soybean [J]. Soybean Science , 2007 , 26(2) : 254-258.)
- [47] Cui Y Y , Barampura S , Stacey M G , et al. *Tnt1* retrotransposon mutagenesis: A tool for soybean functional genomics [J]. Plant Physiology , 2013 , 161: 36-47.
- [48] Palmer R G , Hedges B R , Benavente R S , et al. *w4*-mutable line in soybean [J]. Developmental Genetics , 1989 , 10: 542-551.
- [49] Naito K , Cho E , Yang G J , et al. Dramatic amplification of a rice transposable element during recent domestication [J]. Proceedings of the National Academy of Science , USA , 2006 , 103: 17620-17625.
- [50] Hancock C N , Zhang F , Wessler S R. Transposition of the *Tourist*-MITE *mPing* in yeast: An assay that retains key features of catalysis by the class 2 *PIF/Harbinger* superfamily [J]. Mobile DNA , 2010 , 1: 5.
- [51] Xu M , Palmer R G. Genetic analysis and molecular mapping of a pale flower allele at the *W4* locus in soybean [J]. Genome , 2005 , 48: 334-340.
- [52] Xu M , Palmer R G. Molecular mapping of *k2 mdh1-ny20* , an unstable chromosomal region in soybean [*Glycine max*(L.) Merr.] [J]. Theoretical and Applied Genetics , 2005 , 111: 1457-1465.
- [53] Kato K K , Palmer R G. Molecular mapping of the male-sterile , female-sterile mutant gene (*st8*) in soybean [J]. Journal of Heredity , 2003 , 94: 425-428.
- [54] Kato K K , Palmer R G. Molecular mapping of four ovule lethal mutants in soybean [J]. Theoretical and Applied Genetics , 2004 , 108: 577-585.
- [55] Palmer R G , Zhang L , Huang Z , et al. Allelism and molecular mapping of soybean necrotic root mutants [J]. Genome , 2008 , 51: 243-250.
- [56] Raval J , Baumbach J , Ollhoff A R , et al. A candidate male-fertility female-fertility gene tagged by the soybean endogenous transposon *Tgm9* [J]. Functional and Integrative Genomics , 2013 , 13: 67-73.
- [57] Groose R W , Schulte S M , Palmer R G. Germinal reversion of an unstable mutation for anthocyanin pigmentation in soybean [J]. Theoretical and Applied Genetics , 1990 , 79: 161-167.
- [58] Song Z Y , Tian J L , Fu W Z , et al. Screening Chinese soybean genotypes for *Agrobacterium*-mediated genetic transformation suitability [J]. Journal of Zhejiang University Science B , 2013 , 14: 289-198.
- [59] Olhoft P M , Flagel L E , Donovan C M , et al. Efficient soybean transformation using hygromycin B selection in the cotyledonary-node method [J]. Planta , 2003 , 216: 723-735.
- [60] 侯升文,胡继海,李明妹,等. 世界大豆生产发展现状与趋势 [J]. 农业与技术, 2013 , 30(2) : 1-3. (Hou S W , Hu J H , Li M S , et al. The present situation and the trend of development of the world soybean production [J]. Agriculture and Technology , 2013 , 30(2) : 1-3.)
- [61] 杨红旗. 我国大豆产业现状分析及问题探讨 [J]. 中国种业 , 2010(4) : 18-20. (Yang H Q. Current situation and problems of soybean industry in China [J]. China Seed Industry , 2010(4) : 18-20.)