

# 大豆科丰 14 持绿突变系的初步鉴定

白红丹,薛树鹏,张 娇,郭 远,王园清,倪资园,陈学珍,谢 皓

(北京农业应用新技术北京市重点实验室/北京农学院植物科学技术学院,北京 102206)

**摘要:**利用<sup>60</sup>Co-γ 射线辐照大豆科丰 14 种子,获得 1 株具有持绿特征的突变体,该突变体经多年选育,形成 20 个突变系。本文从生育期、生物学性状、生育后期叶片中叶绿素含量和叶片耐衰老性等方面鉴定突变系的持绿特点,为突变系的利用提供依据。结果表明,突变系具有叶片和果荚成熟前持绿时间较长、成熟子粒呈现绿种皮和绿子叶等特点;与亲本科丰 14 相比,20 个突变系开花期有早有晚,但是成熟期均晚于科丰 14;子粒灌浆期间,突变系叶片中叶绿素含量下降较慢,叶片干枯前含有较多的叶绿素,而科丰 14 成熟前叶绿素含量下降迅速,成熟时黄叶脱落;叶片诱导衰老试验也表明,突变系叶片的抗衰老性要大于亲本科丰 14。

**关键词:**大豆;持绿突变系;科丰 14

## Preliminary Identification of the Stay Green Line Derived from Kefeng 14 in Soybean

BAI Hong-dan, XUE Shu-peng, ZHANG Jiao, GUO Yuan, WANG Yuan-qing, NI Zi-yuan, CHEN Xue-zhen, XIE Hao

(Key Laboratory of New Technology in Agricultural Application, College of Plant Science and Technology, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206)

**Abstract:** A mutant with stay green features was created by <sup>60</sup>Co γ - ray radiation of the soybean Kefeng 14 seeds and 20 mutant lines were obtained from this mutant in years of selective breeding. The stay green features of these mutant lines were identified by comparing the growth period, biological characteristics, chlorophyll content of leaves in the late growth stage and the anti-aging test of leaves. The results showed that the mutant lines had longer duration of the stay green features in the leaves and seed pods, and the seeds had green seed coat and green cotyledon. The flowering times were different for the 20 mutant lines, however, the mature periods were all later than Kefeng 14. The chlorophyll content in the leaves of the mature stage were decreased slowly during seed filling stage even contained more chlorophyll before leaf dry in the mature period, while the chlorophyll content in Kefeng 14 were declined rapidly. The leaf-induced senescence test also showed that these mutant lines had stronger anti-aging than the original Kefeng 14.

**Key words:** soybean; stay green mutant line; Kefeng 14

在植物衰老过程中,叶绿素降解导致光合能力下降,生物产量减少。近年来,发现一些生育末期依然保持较长绿色时间、叶绿素降解缓慢、甚至种子或果实也表现持绿性状的突变体,如,菜豆<sup>[1-2]</sup>、豌豆<sup>[3]</sup>、玉米<sup>[4-5]</sup>、水稻<sup>[6]</sup>、高粱<sup>[7]</sup>、草地羊茅<sup>[8-9]</sup>、拟南芥<sup>[10]</sup>、番茄<sup>[11]</sup>和紫花苜蓿<sup>[12]</sup>等持绿突变体,其中部分突变体的持绿基因已被解析,分子序列也被克隆。例如,辣椒突变体的持绿基因 *cl* 是同源基因突变造成的,位于第 1 号染色体上<sup>[13]</sup>;草地羊茅持绿

突变体 b993 的持绿性由 1 个隐性核基因 *sid* 控制<sup>[8-9]</sup>。K. W. Cha 等<sup>[6]</sup>在水稻人工诱变时发现 1 株持绿突变株,通过杂交试验和分子标记技术,把控制持绿性的单隐性核基因 *SGR* 定位在 9 号染色体的长臂上,并克隆了该基因的全长 cDNA 序列(GenBank 登陆号为 AY850134)。I. Armstead 等<sup>[10]</sup>利用 RNAi 的技术,在拟南芥中发现 *SGR* 基因沉默的材料均表现出不同程度的持绿特点。在大豆持绿基因的研究上,J. J. Guamet 等<sup>[14-15]</sup>对大豆的持绿近等基

收稿日期:2012-10-09 修回日期:2012-11-27 网络出版日期:2013-06-07

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20130607.1740.016.html>

基金项目:北京市自然科学基金(5122009)

第一作者研究方向为大豆遗传育种。E-mail: bai2087@163.com

通信作者:谢皓,博士,教授,研究方向为大豆遗传育种。E-mail: xiehao126@126.com

因系鉴定表明,有 3 个核基因( $d_1$ 、 $d_2$  和  $G$ ) 和 1 个细胞质基因( $cytG$ )能够调控叶片、豆荚、种皮和子叶的绿色。其中, $G$  为显性表现种皮绿色, $d_1 d_2$ 、 $Gd_1 d_2$  和  $cytG$  均表现出叶片、豆荚、种皮和子叶为绿色。 $Gd_1 d_2$  基因型的近等基因系开花后的叶片光合效率增加 30%,每株增加 44% 的种子产量。

对持绿突变体生理特性的研究,主要集中在探索与叶绿素代谢相关的特定阻断过程上。研究发现,在高等植物中叶绿素的代谢主要是由脱镁叶绿酸  $a$  单加氧酶(PaO, pheophorbide  $a$  oxygenase)催化来完成,并因此将叶绿素降解途径称为 PaO 途径<sup>[16]</sup>,在 PaO 途径中还包括叶绿素酶(Chlase)、去螯合镁酶(MDCase)和红色叶绿素降解还原酶(RC-CR, red chlorophyll catabolite reductase)等一系列酶催化。上述任一酶活性异常都有可能影响叶绿素的代谢,导致其降解缓慢甚至不降解。例如,H. Thomas 等<sup>[9]</sup>认为,PaO 酶活性减弱是草地羊茅、豌豆和菜豆等植物持绿的主要原因,PaO 酶的活性对底物脱镁叶绿酸  $a$  具有高度的专一性,其活性与叶绿素降解的速率成正相关。NYC1 (non-yellow coloring 1) 和 NOL (nyc1-like) 是 2 个叶绿素  $b$  还原酶,也起到关键作用,催化叶绿素  $b$  转化为叶绿素  $a$ ,而叶绿素  $b$  的降解是捕光色素蛋白和叶绿体中蛋白膜/基粒的降解的前提<sup>[17]</sup>。目前发现的持绿基因在叶绿素降解上的作用可能有 3 种:一是调控叶绿素酶,进而控制叶绿素  $a$  的降解;二是通过调控叶绿素  $a$  内部蛋白的稳定性控制叶绿素  $a$  的降解;三是通过调控 PaO 酶的活性来控制叶绿素的降解<sup>[17-18]</sup>。

对持绿突变体的研究首先对全面揭示持绿的分子机制、改善农作物的光合效率、提高产量和品质具有重要的理论价值和实践意义。S. Gan 等<sup>[19]</sup>用转基因技术诱发了 1 个烟草持绿突变体,该突变体的生物量和种子产量分别增加了 40% 和 52%。其次,有助于阐明叶绿素含量与光合功能之间的关系和植物衰老过程中的变化特征,探索植物衰老现象的实质。再者,一些重要的持绿基因不仅可以作为作物抗逆性的重要基因资源,也可以作为保持绿色的自然资源,在绿叶植物的育种和栽培上有巨大的应用前景和经济价值。因此,持绿突变体的研究越来越受到各国植物生理学家和植物遗传育种学家的重视。

2006 年,本课题组从北京大豆品种科丰 14 种子的<sup>60</sup>Co- $\gamma$  射线辐照后代材料中,获得 1 株持绿突变株。经过几年的繁育,形成遗传稳定的突变系。野生型亲本科丰 14 成熟时,黄叶干枯脱落,种子为

黄种皮、黄子叶等性状,而突变系则表现为成熟时茎秆、果荚、叶片等器官持绿,成熟种子为绿种皮、绿子叶等特征<sup>[3]</sup>。为鉴定突变体的持绿性,本文对大豆 20 个科丰 14 突变系及其科丰 14 的生育期、生物学性状、成熟后期叶片中叶绿素的变化以及叶片耐绿性等鉴定突变系的持绿特点,为突变系的进一步研究和利用提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

大豆品种科丰 14 种子,由北京市种子管理站提供。20 个科丰 14 突变系,编号为 L1 ~ L20,由北京农学院大豆课题组选育。突变系选自科丰 14 种子的辐照后代,2005 年在原中国农业科学院原子能利用研究所辐照中心,用<sup>60</sup>Co- $\gamma$  射线辐照处理科丰 14 种子,剂量率为 1.2 Gy/min,总剂量 150 Gy,2006 年从辐照后代中发现 1 株叶片褪绿较晚、种子为绿种皮和绿子叶的变异单株。2007 年将变异种子种成株行,并从中选择出生物学性状有一定差异的 20 个单株,经几年的连续选育,形成 20 个遗传稳定的突变系,与辐照亲本科丰 14 成熟时叶片变黄、黄叶脱落、黄种皮和黄子叶相比,突变系均具有叶片、果荚失绿较晚,成熟后种子为绿种皮和绿子叶等特征(图 1)。



左:亲本科丰 14;右:科丰 14 突变系 L13

Left: Original Kefeng 14, Right: Kefeng 14 mutant line 13

图 1 科丰 14 及其突变系 L13 成熟时的叶片、果荚和种子  
Fig. 1 Leaves, seed coat, and seed of Kefeng 14 and mutant line 13 in the mature period

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 生育期和主要生物学性状鉴定 20 个突变

系和辐照亲本科丰 14 于 2011 年 6 月 18 日在北京农学院大豆试验田播种,随机区组设计,3 次重复,2 行区,行长 5 m,行距 45 cm,株距 10 cm,每行种植 50 粒种子。生长期间和成熟后调查突变系的生育期和主要生物学性状。

**1.2.2 叶绿素含量测定** 利用 SPAD-502 叶绿素含量测定仪,测定叶片的叶绿素相对含量。从 8 月 12 日开始,10 月 14 日结束测定,每周测定 1 次,共 10 次,每次 3 次重复。测定时,每个突变系随机选取 3 株,测定每株第 3 和 4 叶复叶中间小叶的叶绿素,每叶片随机取 3 个测量点,取其平均值。

**1.2.3 叶片诱导衰老试验** 参考 M. Ryouhei 等<sup>[20]</sup>的方法,9 月 15 日分别取突变系第 3 和 4 复叶中间小叶各 1 片,叶片用灭菌水清洗 15 s,75% 的酒精浸泡 10 s,灭菌水清洗;培养皿底部铺 1 层湿润滤纸,将叶片平铺在滤纸上,培养皿置于 25 ℃ 培养箱中暗培养,15 d 后观察叶片变化情况。参照 A. C. Leopold<sup>[21]</sup>的方法略有改动,评价叶片老化和变黄程度。叶片持绿性分为 6 个等级:0 级,全叶青绿;1 级,叶尖缺绿坏死;2 级,叶尖叶缘缺绿坏死;3 级,叶片内部坏死;4 级,半叶失绿坏死;5 级,全叶坏死。

## 2 结果与分析

**2.1 科丰 14 突变系生育期和主要生物学性状比较** 与科丰 14 相比,20 个突变系的全生育期均有

一定的延长(表 1)。科丰 14 全生育期为 111 d,而突变系最少为 112 d,如 L2 等;最多的为 124 d,如 L17,增加了 13 d。比较开花期,有 11 个突变系的开花期早于亲本科丰 14,最早的突变系 L14 开花期为 7 月 27 日,比科丰 14 的开花期 8 月 2 日早 6 d,但成熟期却比科丰 14 晚 2 d,其他开花期早于科丰 14 的突变系,成熟期也有不同程度的延长。

表 2 为突变系与亲本科丰 14 主要生物学性状的表现。20 个突变系与科丰 14 相比,或多或少都有一定的变化,有些突变系在某些性状上变异程度相对大一些,有些突变系变异程度小一些,但是总体变异幅度以科丰 14 为 midpoint,呈正态分布或偏正态分布。例如,株高,科丰 14 为 75.65 cm,突变系中植株最高的为 113.2 cm,最低的为 57.63 cm;单株荚数,科丰 14 为 75.53 个,突变系中单株荚数最多的为 127.73 个,最少的为 61.78 个;百粒重科丰 14 为 22.20 g,突变系中百粒重最高的为 25.27 g,最低的为 16.27 g。在以形状和颜色描述的性状上,20 个突变系在叶形和粒形上与亲本科丰 14 相似,分别为长椭圆和卵圆,部分突变系的花色和脐色与科丰 14 的白花和浅褐色种脐相同,变异最大的性状为种皮和子叶颜色,科丰 14 的种子为黄种皮和黄子叶,而突变系的种皮和子叶颜色全部为绿色。

表 1 科丰 14 突变系和科丰 14 的生育期

Table 1 The growth period of Kefeng 14 mutant lines and Kefeng 14

突变系	播种期(月/日)	出苗期(月/日)	开花期(月/日)	成熟期(月/日)	播种-成熟天数(d)
Mutant line	Sowing date	Seeding date	Flowering date	Maturity date	Days of sowing to maturity
L1	6/18	6/25	8/9	10/13	117
L2	6/18	6/25	7/29	10/8	112
L3	6/18	6/25	7/29	10/8	112
L4	6/18	6/25	7/28	10/8	112
L5	6/18	6/25	8/6	10/13	117
L6	6/18	6/25	7/28	10/9	113
L7	6/18	6/25	7/28	10/12	116
L8	6/18	6/25	7/28	10/9	113
L9	6/18	6/25	7/28	10/10	114
L10	6/18	6/25	7/30	10/15	119
L11	6/18	6/25	8/6	10/13	117
L12	6/18	6/25	8/8	10/15	119
L13	6/18	6/25	8/8	10/16	120
L14	6/18	6/25	7/27	10/9	113
L15	6/18	6/25	7/31	10/14	118
L16	6/18	6/25	8/10	10/16	120
L17	6/18	6/25	8/12	10/20	124
L18	6/18	6/25	7/30	10/16	120
L19	6/18	6/25	8/8	10/17	121
L20	6/18	6/25	8/7	10/17	121
Kefeng 14(CK)	6/18	6/25	8/2	10/7	111

表 2 科丰 14 突变系与科丰 14 的主要生物学性状

Table 2 The main biological characteristics of Kefeng 14 mutant lines and Kefeng 14

突变系 Mutant line	株高 (cm) Plant height	主茎节数 Nods number of main stem	主茎分枝数 Branch number of main stem	单株荚数 Pods per plant	单荚粒数 Grains per pod	百粒重 (g) 100-seed weight	单株粒重 (g) Grain weight per pod	花色 Flower color	叶形 Leaf shape	脐色 Hilum color	荚色 Pod color	粒形 Grain shape	种皮色 Seed coat color	子叶色 Cotyledon color
L1	71.55 ± 8.89	21.22 ± 1.64	3.70 ± 1.26	61.99 ± 23.42	2.71 ± 0.11	18.67 ± 3.18	28.33 ± 6.03	白色	长椭圆	浅褐色	黄褐色	卵圆	绿色	绿色
L2	60.12 ± 8.85	15.20 ± 1.93	2.90 ± 0.93	62.98 ± 29.27	2.47 ± 0.46	18.40 ± 0.60	25.19 ± 8.03	紫色	长椭圆	浅褐色	黄褐色	卵圆	绿色	绿色
L3	57.91 ± 6.50	15.09 ± 1.16	2.84 ± 0.99	61.78 ± 24.07	2.20 ± 0.22	17.87 ± 1.47	21.20 ± 2.93	紫色	长椭圆	褐色	黄褐色	卵圆	绿色	绿色
L4	57.63 ± 6.13	14.93 ± 1.28	3.40 ± 1.80	73.27 ± 26.28	2.28 ± 0.14	19.93 ± 1.72	30.36 ± 1.50	紫色	长椭圆	褐色	浅褐色	卵圆	绿色	绿色
L5	85.1 ± 10.91	19.12 ± 1.81	3.56 ± 1.66	74.51 ± 36.01	2.55 ± 0.31	19.40 ± 1.64	34.67 ± 14.61	白色	长椭圆	无色	黄褐色	卵圆	绿色	绿色
L6	70.07 ± 16.21	19.73 ± 4.57	2.73 ± 1.67	68.80 ± 22.46	2.20 ± 0.07	20.33 ± 1.70	28.35 ± 7.29	紫色	长椭圆	褐色	褐色	卵圆	绿色	绿色
L7	69.29 ± 12.68	18.56 ± 2.85	3.88 ± 1.67	105.68 ± 42.44	2.26 ± 0.41	18.53 ± 1.89	45.09 ± 17.36	白色	长椭圆	褐色	浅褐色	卵圆	绿色	绿色
L8	86.46 ± 19.98	23.49 ± 5.26	2.08 ± 1.61	78.31 ± 32.17	2.44 ± 0.34	21.40 ± 2.65	43.45 ± 9.45	紫色	长椭圆	浅褐色	黄褐色	卵圆	绿色	绿色
L9	89.9 ± 5.52	23.80 ± 2.75	2.77 ± 1.53	64.30 ± 27.04	2.50 ± 0.35	21.33 ± 1.72	30.53 ± 8.76	紫/白色	长椭圆	褐色	黄褐色	卵圆	绿色	绿色
L10	113.2 ± 11.62	30.38 ± 4.56	4.36 ± 1.92	100.11 ± 42.54	2.34 ± 0.24	18.33 ± 3.29	42.64 ± 15.89	白色	长椭圆	褐色	褐色	卵圆	绿色	绿色
L11	66.99 ± 8.70	19.27 ± 2.74	4.07 ± 1.53	72.20 ± 39.19	2.25 ± 0.10	25.27 ± 1.15	39.75 ± 19.34	紫色	长椭圆	浅褐色	黄褐色	卵圆	绿色	绿色
L12	68.93 ± 8.34	19.93 ± 2.39	5.12 ± 1.75	89.20 ± 41.96	2.22 ± 0.27	23.53 ± 0.76	44.33 ± 4.71	紫色	长椭圆	浅褐色	黄褐色	卵圆	绿色	绿色
L13	69.49 ± 4.31	20.10 ± 1.76	5.50 ± 1.62	72.83 ± 23.62	2.44 ± 0.48	25.00 ± 0.53	43.62 ± 13.38	紫色	长椭圆	浅褐色	褐色	卵圆	绿色	绿色
L14	85.81 ± 11.8	25.60 ± 2.72	4.07 ± 1.53	81.33 ± 18.79	2.57 ± 0.12	17.60 ± 1.56	34.24 ± 8.17	白色	长椭圆	浅褐色	黄褐色	卵圆	绿色	绿色
L15	89.5 ± 9.13	26.17 ± 2.31	3.93 ± 1.57	94.17 ± 31.27	2.46 ± 0.27	16.27 ± 1.67	35.95 ± 8.24	白色	长椭圆	褐色	黄褐色	卵圆	绿色	绿色
L16	67.22 ± 8.95	19.84 ± 1.80	4.79 ± 1.57	83.34 ± 31.63	2.16 ± 0.08	22.53 ± 0.64	39.32 ± 4.77	紫色	长椭圆	浅褐色	浅褐色	卵圆	绿色	绿色
L17	99.92 ± 7.11	31.67 ± 2.99	6.87 ± 1.77	127.73 ± 30.46	2.25 ± 0.09	16.53 ± 1.03	46.85 ± 5.01	紫/白色	长椭圆	浅褐色	黄褐色	卵圆	绿色	绿色
L18	79.73 ± 17.15	23.53 ± 4.11	5.07 ± 2.32	80.10 ± 38.25	2.25 ± 0.12	20.27 ± 0.95	33.25 ± 11.87	紫色	长椭圆	褐色	浅褐色	卵圆	绿色	绿色
L19	85.11 ± 10.63	24.31 ± 3.09	6.12 ± 2.72	98.94 ± 37.18	1.86 ± 0.73	20.43 ± 2.19	40.49 ± 9.45	紫色	长椭圆	浅褐色	褐色	卵圆	绿色	绿色
L20	99.69 ± 18.67	25.83 ± 5.92	5.77 ± 2.26	87.33 ± 34.20	2.56 ± 0.20	19.93 ± 1.55	37.12 ± 14.45	紫色	长椭圆	浅褐色	黄褐色	卵圆	绿色	绿色
Kefeng 14	75.65 ± 8.72	19.67 ± 1.18	3.80 ± 1.37	75.53 ± 37.79	2.47 ± 0.24	22.20 ± 2.80	40.88 ± 27.38	白色	长椭圆	浅褐色	黄褐色	卵圆	黄色	黄色



2.2 科丰 14 突变系与科丰 14 叶片中叶绿素含量比较

利用 SPAD-502 叶绿素测定仪在子粒灌浆期间测定叶片中叶绿素的含量,比较突变系和科丰 14 叶片叶绿素在子粒成熟过程中的变化情况,结果表明(图 2),突变系和科丰 14 的第 3 叶复叶中间小叶叶绿素变化趋势为在 9 月 1-16 日期间含量分别达到最高。参照表 1 生育期表现可以看出,开花早、生育期短的突变系,叶绿素含量达到峰值的时间早;反

之,开花晚、生育期较长的品系,叶绿素含量达到峰值的时间较晚,峰值之后含量下降。与亲本科丰 14 相比较,突变系的叶绿素含量下降较慢,无论生育期短的和生育期长的突变系,在叶片成熟干枯前均有较多的叶绿素;科丰 14 叶绿素含量 9 月 1 日达到峰值后,至 9 月 16 日之前缓慢下降,之后迅速下降,表明叶绿素在植株成熟前解体迅速,成熟时叶片黄化。图 3 为第 4 叶复叶中间小叶叶绿素含量变化,与第 3 叶复叶中间小叶叶绿素变化趋势相同。

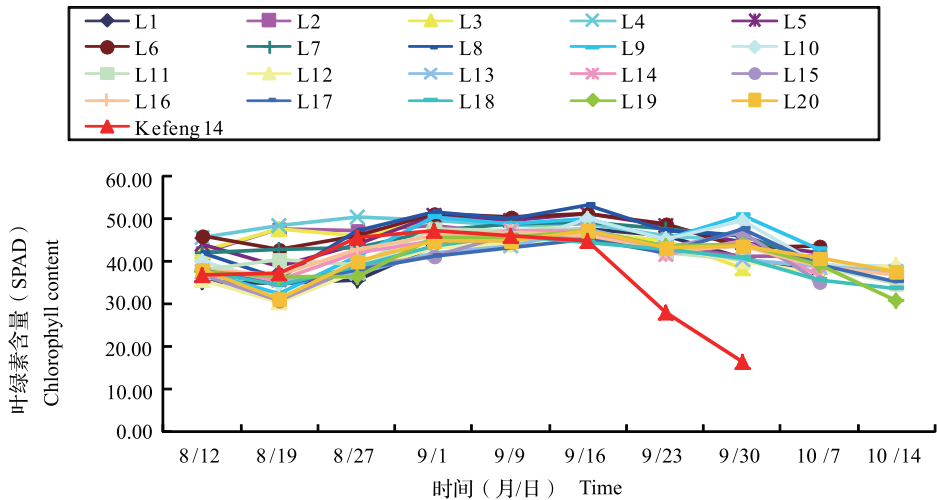


图 2 植株衰老期间第 3 叶复叶中间小叶叶绿素含量变化  
Fig. 2 Changes of chlorophyll content in the third leaf during senescence

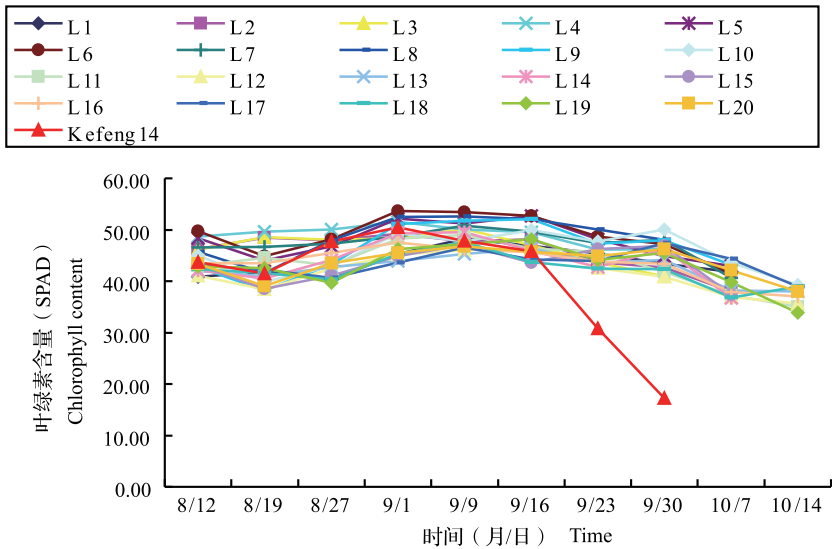


图 3 植株衰老期间第 4 叶复叶中间小叶叶绿素含量变化  
Fig. 3 Changes of chlorophyll content in the fourth leaf during senescence

2.3 叶片诱导衰老分析

叶色由绿变黄是叶片衰老最明显的形态标志,叶片暗处理诱导衰老的目的是评价叶片的抗衰老性,进而表明叶片的持绿程度。从试验结果来看,突

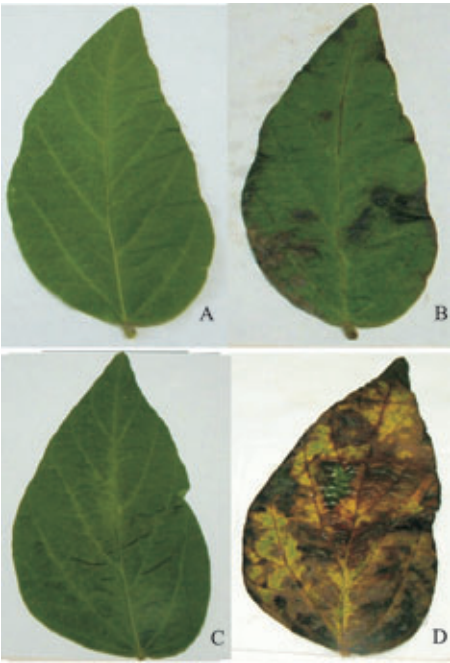
变系和科丰 14 暗处理前叶片持绿性均为 0 级,15 d 处理后,20 个突变系第 3 叶复叶中间小叶持绿等级在 1~4 级之间(表 3),其中 1 级有 2 个系、2 级有 2 个系、3 级有 11 个系、4 级有 5 个系。第 4 叶复叶中

间小叶持绿等级在 2~4 级之间(表 3),其中 2 级有 2 个系,3 级有 6 个系,4 级有 12 个系。第 4 叶复叶中间小叶与第 3 叶复叶中间小叶相比叶片持绿性总体较低一些,但是依然有 8 个系持绿等级在 3 级或 3 级以下,表明持绿性较强。然而,亲本科丰 14 第 4 叶和第 3 叶复叶中间小叶暗处理后,持绿等级均为 5 级,叶片已基本褪绿变黄。比较而言,有些突变系持绿性强一些(如 L6),有些弱一些(如 L2),但是全部突变系均表现一定的抗衰老持绿性。以突变系 L13 和科丰 14 第 3 叶复叶中间小叶暗处理叶片前后变化为例(图 4),可以看出,突变系 L13 叶片处理前(图 4A)和暗处理 15 d 后(图 4B)叶片颜色变化不大,仍然保持较大面积的绿色,而科丰 14 叶片处理前(图 4C)和暗处理后(图 4D)颜色差异明显,处理 15 d 后叶片呈现黄色或褐黄色,叶绿素已经完全褪色。试验表明,突变系叶片的抗衰老性要大于亲本科丰 14。

表 3 叶片诱导衰老后分级

Table 3 Grade afterdark-induced leaf senescence

突变系 Mutant line	第 3 叶 Third leaf		第 4 叶 Fourth leaf	
	诱导前	诱导后	诱导前	诱导后
	Before dark-induced	After dark-induced	Before dark-induced	After dark-induced
L1	0	3	0	3
L2	0	4	0	4
L3	0	3	0	2
L4	0	4	0	4
L5	0	2	0	4
L6	0	1	0	2
L7	0	3	0	4
L8	0	4	0	4
L9	0	3	0	3
L10	0	3	0	4
L11	0	3	0	4
L12	0	3	0	4
L13	0	3	0	3
L14	0	3	0	4
L15	0	3	0	4
L16	0	3	0	3
L17	0	4	0	4
L18	0	4	0	4
L19	0	1	0	3
L20	0	2	0	3
Kefeng 14	0	5	0	5



A:科丰 14 突变系 L13 叶片暗处理前;B:科丰 14 突变系 L13 叶片暗处理后;C:科丰 14 叶片暗处理前;D:科丰 14 叶片暗处理后  
A;Kefeng 14 mutant line L13 leaf before dark-induced, B;Kefeng 14 mutant line L13 leaf after dark-induced, C;Kefeng 14 leaf before dark-induced, D;Kefeng 14 leaf after dark-induced

图 4 科丰 14 突变系 L13 叶片和科丰 14 叶片暗处理诱导叶片衰老前后变化

Fig. 4 Changes of the leaves in Kefeng 14 mutant line L13 and Kefeng 14 before and after dark-induced leaf senescence

3 讨论

本试验对科丰 14 突变株选育的 20 个突变系的生育期、生物性状、成熟后期叶片叶绿素和叶片持绿耐性进行研究,初步鉴定了突变系的持绿性。与科丰 14 相比,20 个突变系成熟后期茎叶和果实表现出较长的持绿期、子粒的种皮和子叶呈现绿色;突变系叶片叶绿素在成熟末期依然表现较高;叶片的持绿性较长,叶绿素褪色较慢。参照已报道<sup>[1-11]</sup>的植物持绿突变体的特征,上述 20 个突变系均具有持绿特性,作为突变系的父代科丰 14 突变株可以认定为持绿突变体。因此,本课题组获得的大豆持绿突变系和对突变系部分持绿特点的鉴定分析,可为进一步研究植物持绿的生物学特性和功能提供帮助。

通过对突变体后代品系的生育期调查发现,与科丰 14 相比,20 个突变系开花期有早有晚,但全生育期都有一定程度的延长,可能与突变系在成熟后

期叶片、茎秆及果荚中叶绿素降解较慢、延长衰老有关,只要温度和光照条件适宜,突变系仍能保持一定的生长量,甚至在子粒产量潜力上较辐照亲本科丰 14 有所提高。例如,科丰 14 的百粒重为 22.2 g 左右,而突变系 L11 和 L13 的百粒重分别达到 25.27 g 和 25.00 g;科丰 14 的单株粒重为 40.88 g,而 L17、L7 和 L12 分别为 46.85 g、45.09 g 和 44.33 g,明显高于辐照亲本。虽然,持绿突变系的全生育期有所延长,但从产量潜力上分析,有可能从衍生后代中选出高产的优良品种,并通过选择适宜的种植地区和种植方式,避免由于生育期较长而造成的影响。2012 年突变系 L2 和 L13 作为双青豆(绿种皮和绿子叶)特色品系,分别参加了北京市大豆品种区试的夏播试验和春播试验。从田间表现看,突变系 L2 与对照品种冀豆 12 的生育期相近,能够在 10 月初正常成熟;L13 后期持绿时间长,在 10 月中旬左右成熟,但是其子粒较大,可作为菜用大豆在生产上应用。目前,北京地区大豆品种中鲜有双青豆类型,科丰 14 持绿突变体及后代品系均为双青豆,将丰富北京市农业中大豆品种和类型的多样性。

利用辐射技术,育种家们已经选育出数以百计的优良品种<sup>[22]</sup>。如今辐射技术在突变体的创造上也发挥着重要的作用,例如水稻半矮秆<sup>[23]</sup>和脆性突变体<sup>[24]</sup>。突变体是研究植物基因功能和培育优质高产作物新品种的重要材料<sup>[25]</sup>,在理论研究和生产应用上都具有重要的价值。本课题组发现的科丰 14 突变体在表型上具备持绿突变体的特征,其遗传规律和突变机理的进一步研究,将为挖掘与叶绿素代谢相关的持绿基因和解析植物衰老生理的机制提供更多的科学依据。

参考文献

[1] Ronning C M, Bouwkamp J C, Solomos T. Observations on the senescence of a mutant non-yellowing genotype of *Phaseolus vulgaris* L. [J]. J Exp Bot, 1991, 42: 235-241

[2] Fang Z, Bouwkamp J C, Solomos T. Chlorophyllase activities and chlorophyll degradation during leaf senescence in the non-yellowing mutant and wild-type of *Phaseolus vulgaris* L. [J]. J Exp Bot, 1998, 49: 503-510

[3] Thomas H, Schellenberg M, Vicentini F, et al. Gregor mendel's green and yellow pea seed [J]. Bot Acta, 1996, 109: 3-4

[4] Bekavac G. Path analysis of stay-green trait in maize [J]. Cereal Res Commun, 1998, 26(2): 161-167

[5] Yukari A, Toshiya H, Shingo K, et al. Maizemutants lacking chloroplast FtsY exhibit pleiotropic defects in the biogenesis of thylakoid membranes [J]. Plant Cell, 2004, 16: 201-214

[6] Cha K W, Lee Y J, Koh H J, et al. Isolation characterization, and

mapping of the stay green mutant in rice [J]. Theor Appl Genet, 2002, 104(4): 526-532

[7] Xu W, Subudhi P K, Crasta O R, et al. Molecular mapping of QTLs conferring stay greening rain sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) [J]. Genome, 2000, 43: 461-469

[8] Thomas H. A mendelian locus controlling thylakoid membrane disassembly in senescing leaves of *Festuca pratensis* [J]. Theor Appl Genet, 1987, 73: 551-555

[9] Thomas H, Matile P. Photobleaching and chloroplast pigments in leaves of non-yellowing mutant genotype of *Festuca pratensis* [J]. Phytochemistry, 1988, 27: 345-348

[10] Armstead I, Donnison I, Aubry S, et al. Cross-species identification of mendel's /locus [J]. Science, 2007, 315: 73

[11] Huz L, Deng L, Anb Y, et al. Silencing of the Le *SGRI* gene in tomato inhibits chlorophyll degradation and exhibits a stay-green phenotype [J]. Biologia Plantarum, 2011, 55(1): 27-34

[12] Zhou C, Han L, Catalina P, et al. From model to crop: functional analysis of a stay-green gene in the model legume *Medicago truncatula* and effective use of the gene for alfalfa improvement [J]. Plant Physiol, 2011, 157: 1483-1496

[13] Efrati A, Eyal Y, Paran I. Molecular mapping of the chlorophyll retainer (cl) mutation in pepper (*Capsicum spp.*) and screening for candidate genes using tomato ESTs homologous to structural genes of the chlorophyll catabolism pathway [J]. Genome, 2005, 48: 347-351

[14] Guaiamet J J, Schwartz E, Pichersky E, et al. Characterization of cytoplasmic and nuclear mutations affecting chlorophyll and the chlorophyll-binding protein during senescence in soybean [J]. Plant Physiol, 1991, 96: 227-231

[15] Guaiamet J J, Giannibelli M C. Nuclear and cytoplasmic "stay green" mutations of soybean alter the loss of leaf soluble proteins during senescence [J]. Plant Physiol, 1996, 96: 655-661

[16] Adriana P, Gaby T, Sylvain A, et al. Chlorophyll breakdown in senescent *Arabidopsis* leaves characterization of chlorophyll catabolites and chlorophyll catabolic enzymes involved in the degreening reaction [J]. Plant Physiol, 2005, 139(9): 52-63

[17] Yutaka S, Ryouhei M, Susumu K, et al. Two short-chain dehydrogenase/reductases, non-yellow coloring 1 and NYC1-like, are required for chlorophyll band light-harvesting complex II degradation during senescence in rice [J]. Plant J, 2009, 57: 120-131

[18] Yutaka S, Ryouhei M, Minoru N, et al. Mendel's green cotyledon gene encodes a positive regulator of the chlorophyll-degrading pathway [J]. PNAS, 2007, 104(35): 14166-14173

[19] Gan S, Amasino R M. Inhibition of leaf senescence by autoregulated production of cytokinin [J]. Science, 1995, 270: 1986-1988

[20] Ryouhei M, Yutaka S, Yu M, et al. Defect in non-yellow coloring 3, an a/b hydrolase-fold family protein, causes a stay-green phenotype during leaf senescence in rice [J]. Plant J, 2009, 59: 940-952

[21] Leopold A C. Senescence in plant development [J]. Science, 1961, 34: 1727-1741

[22] Wang L Z. Soybean improvement using nucleier techniques [C]// Plant mutation breeding in Asia. Beijing: Agricultural Scien Tech Press, 1996: 89-103

[23] 谷福林, 黄胜东, 翟虎渠, 等. 水稻新矮源的诱变、鉴定和遗传研究 [J]. 植物遗传资源学报, 2004, 5(3): 205-209

[24] 刘斌美, 叶亚峰, 章忠贵, 等. 一个籼稻脆性突变体的生物学特性及基因定位研究 [J]. 植物遗传资源学报, 2011, 12(5): 259-264

[25] 陈仁霄, 张所兵, 赵凌, 等. 来源于 02428ha 的水稻双矮品系的获得与鉴定 [J]. 植物遗传资源学报, 2010, 11(1): 65-71