



基于 TILLING 技术筛选大豆 *GmAGL15* 基因突变体

孙彦波^{1,2}, 李忠峰³, 王 俊¹, 邱丽娟^{1,2}

(1. 长江大学 农学院, 湖北 荆州 434025; 2. 中国农业科学院 作物科学研究所/国家农作物基因资源与遗传改良重大科学工程/农业部种质资源利用重点实验室, 北京 100081; 3. 河南农业大学 农学院, 河南 郑州 450002)

摘要: *AGL15* 是 MADS (MCM1-AGAMOUS-DEFICIENS-SRF) 基因家族中的一员, MADS 蛋白通过与下游基因启动子的顺式作用元件特异性结合调控植物种子中贮藏物质的积累。为验证大豆中 *AGL15* 基因的功能, 利用 TILLING 技术在 EMS 诱变的中品 661 的 M₅ 中筛选出 8 个 *GmAGL15* 突变体。共检测到 10 个突变位点, 其中 6 个突变位点发生在基因的编码区导致氨基酸发生改变, 4 个突变位点发生在基因的内含子。1 个 SNP 导致该基因第 2 个外显子的第 54 个碱基由 C 变为 T, 并使该基因编码的第 79 位氨基酸由丙氨酸突变为缬氨酸; 5 个 SNP 发生在该基因的第 6 个外显子的 112 位碱基上, 使得碱基由 T 变为 A, 导致该基因编码的第 568 位氨基酸由亮氨酸突变为甲硫氨酸。大豆 *GmAGL15* 的突变分布频率为 1/805 kb。考种发现 5 个非同义突变体和 1 个内含子突变体的蛋白质或脂肪含量与野生型 ZP661 相比差异显著。本研究发现的等位变异有助于阐明 *GmAGL15* 在大豆种子中的作用机制, 并为大豆的遗传改良提供宝贵的种质资源。

关键词: 大豆; 转录因子; *AGL15*; EMS; TILLING

Screening *AGL15* Mutant in Soybean by TILLING

SUN Yan-bo^{1,2}, LI Zhong-feng³, WANG Jun¹, QIU Li-juan^{1,2}

(1. College of Agriculture, Yangtze University, Jingzhou 434025, China; 2. Key Laboratory of Crop Germplasm Utilization, Ministry of Agriculture, Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Science/National Key Facility for Gene Resources and Genetic Improvement, Beijing 100081, China; 3. College of Agriculture, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: *AGL15* is a member of the MADS (MCM1-AGAMOUS-DEFICIENS-SRF) gene family. MADS proteins regulate the accumulation of storage substances in plant seeds by binding specifically to cis-acting elements of downstream gene promoters. To verify the function of *AGL15* gene in soybean, eight *GmAGL15* mutants were screened from M₅ of ZP661 mutant induced by EMS with TILLING. Ten mutation sites were detected, six of which occurred in the coding region of the gene, resulting in changes in amino acids, and four occurred in the intron of the gene. One SNP changed from C to T at the 54th base of the second exon, and mutated the 79th amino acid from alanine to valine. Five SNPs occurred on the 112 base of the sixth exon, which changed the base from T to A, resulting in the mutation of the 568th amino acid from leucine to methionine. The mutation frequency of soybean *GmAGL15* was 1/805 kb. The protein or fat contents of five non-synonymous mutants and one intron mutant were significantly different from those of wild type ZP661. Allelic variation found in this study is helpful to elucidate the mechanism of *GmAGL15* in soybean seeds and provide valuable germplasm resources for soybean genetic improvement.

Keywords: Soybean; Transcription factor; *AGL15*; EMS; TILLING

大豆是重要的粮油和经济作物^[1], 提高大豆产量和改善大豆品质是大豆遗传育种的两个研究热点。大豆种子的油脂含量是影响大豆品质的关键因素, 解析大豆种子发育的调控机制有利于大豆品质的改善。大豆种子发育的过程受到许多基因和酶的共同调控, 作用过程十分复杂^[2]。调控植物体种子成熟的基因 LAFL (*LEC1*、*ABI3*、*FUS3* 和 *LEC2*) 构成激活种子成熟程序的遗传途径^[3-6]。据报道,

这些转录因子都含有可以与油脂合成相关基因启动子区特异性结合的结构域。在植物种子生长发育的过程中这些转录因子既可影响种子油脂合成相关基因的转录也可调控油脂合成通路上其它转录因子的表达。*AGL15* 是 MADS (MCM1-AGAMOUS-DEFICIENS-SRF) 家族成员中的转录因子^[7-9], 位于 LAFL 基因的上游, 通过与 DNA 结合的方式与下游靶基因选择性的结合, 以此调控 LAFL

收稿日期: 2017-03-25

基金项目: 大豆种质资源保护与利用 (2019NWB036); 国家农作物资源共享平台 (NICGR2019)。

第一作者简介: 孙彦波 (1991-), 男, 硕士, 主要从事大豆突变体筛选和鉴定研究。E-mail: 1012080725@qq.com。

通讯作者: 邱丽娟 (1963-), 女, 博士, 研究员, 主要从事大豆基因资源发掘与利用研究。E-mail: qjulijuan@caas.cn。

基因在种子发育期间的表达,从而影响种子贮藏物质的积累^[10-11]。

利用 TILLING 技术(targeting induced local lesions in genomes)对突变群体进行广泛筛选从而验证基因功能已是科研人员常用的挖掘优异基因和拓展种质资源的方法。TILLING 技术是化学诱导突变与高通量筛选相结合的方法,拟南芥^[12-15]、玉米^[16-17]、小麦^[18-19]、水稻^[20-21]等作物的 TILLING 技术平台已建立,TILLING 已经成为一种成熟的反向遗传学研究方法。Cooper 等^[22]首次将 TILLING 技术引入到大豆的突变体筛选中,利用 EMS 和 NMU 诱导突变构建了大豆 Forrest 和 Williams 82 突变体库,并通过 TILLING 针对 *Clv1A*、*Clv1B*、*PpckK4* 和 *Rhg1* 基因筛选出 32,12,25 和 47 个突变位点;Bilyeu 等^[23]在大豆 Williams 82 突变群体中筛选到 4 个棉籽糖合酶基因 *RS2* 和 3 个脂肪酸不饱和酶基因 *FAD2-1A* 的突变体;Lakhssassi 等^[24]在大豆 Forrest 群体中鉴定出 4 个 *FAD2-1A* 突变体和 1 个 *FAD2-1B* 突变体。这些新发现的等位基因大大拓展了已有的基因变异基础,表明 TILLING 作为一种非转基因反向遗传学方法可以有效鉴定大豆中控制重要农艺性状的基因。

本研究利用 TILLING 技术,以模式植物拟南芥 *AGL15* 基因序列为参考查找大豆中的同源基因,从 EMS 诱变的中品 661 突变体库中筛选突变体,并检测这些突变体种子特性变化,旨在为鉴定 *GmAGL15* 在大豆种子发育中的功能奠定材料基础,并且为选育优质大豆提供种质资源。

1 材料与方法

1.1 试验设计

本试验于 2016 年夏季在中国农业科学院作物科学研究所北京顺义试验基地播种 1 600 个 0.62% EMS 处理的栽培大豆中品 661 M₅ 株系。于三出复叶时期提取 DNA,将拟南芥 *AGL15* 基因(*At5g13790*)所编码的氨基酸序列在大豆参考基因组数据库 Soybase 中进行 Blast 序列比对,搜索其在大豆中的同源基因,进行系统进化和结构分析。设计该基因的特异性引物,通过 TILLING 技术筛选突变位点和突变单株。TILLING 检测由 AdvanCE™ FS96 (Advanced Analytical Technologies, USA)完成。于成熟期调查突变体和野生型株系的主要农艺性状和品质性状,通过 SPSS 19.0 软件 T 检验分析野生型与突变体的表型差异。

1.2 方法

1.2.1 不同物种 *AGL15* 基因的系统进化分析 利用 MEGA 6.0 软件进行基因系统进化分析,进化树的构建通过 Neighbor-joining 方法,设定 bootstrap 值为 1 000,并隐藏可信度小于 70% 的值,筛选出大豆 *GmAGL15* 基因。

1.2.2 *GmAGL15* 结构域预测 在 Phytozome 数据库(<http://phytozome.jgi.doe.gov/>)下载 *GmAGL15* 的氨基酸序列,并将氨基酸序列添加至 NCBI 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/biosystems/>)的 Protein Blast 中,查找 *GmAGL15* 的结构域。

1.2.3 *GmAGL15* 特异性引物设计 NCBI 数据库下载 *GmAGL15* 的 DNA 序列,并以该序列为模板利用 Primer 3(<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>)设计分段引物,以覆盖整个基因。引物由生工生物工程(上海)合成。

1.2.4 DNA 提取、均一化和 8 倍池 DNA 的建立 突变单株 DNA 的提取采用 CTAB 法,通过分光光度计和琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的质量和浓度,并将 DNA 浓度稀释至 40 ng·μL⁻¹。每 8 个突变体 DNA 混合,共构建 200 个 8 倍 DNA 池。

1.2.5 PCR 扩增及异源双链核酸分子重组 利用 *GmAGL15* 基因的特异性引物与构建的 8 倍 DNA 池进行 PCR 扩增。PCR 体系包括 1 μL DNA(40 ng·μL⁻¹)、5 μL 2 × KOD Buffer、1 μL dNTPs、0.1 μL KOD Fx 酶、1 μL 引物和 1.9 μL 灭菌水;PCR 扩增程序为:95 ℃ 3 min;95 ℃ 30 s,62 ℃ 30 s,68 ℃ 1 min,4 个循环,每个循环退火温度降低 1 ℃;95 ℃ 3 min;98 ℃ 10 s,58 ℃ 30 s,68 ℃ 1 min,45 个循环;68 ℃ 5 min,99 ℃ 10 min;70 ℃ 20 s,70 个循环,每个循环降低 0.3 ℃。

1.2.6 *CEL I* 酶提取及酶切条件 *CEL I* 酶的详细提取方法参考 Jiang 等^[25]。酶切体系:2 μL PCR 产物、0.6 μL 10 × *CEL I* Buffer、0.2 μL *CEL I* 和 3.2 μL H₂O。酶切条件:酶切温度 45 ℃,酶切时间 15 min。酶切反应结束后立即用 3 μL 0.25 mol·L⁻¹ EDTA 终止反应。

1.2.7 突变单株测序验证及突变频率分析 PCR 产物经过高温变性和缓慢复性后形成异源双链核酸分子,若 DNA 池中存在 SNP,则异源双链核酸分子中将含有错配碱基,利用可以特异性识别并切割错配碱基的 *CEL I* 酶对 PCR 产物进行酶切反应,最后采用灵敏度较高的毛细管凝胶电泳仪(Advan-CE™ FS96)检测被切割的 DNA 片段。TILLING 筛

选出的突变个体,进行 PCR 产物测序,测序结果通过在线软件 Multalin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>) 比对分析以验证突变位点的真实性。计算群体中 *GmAGL15* 的突变分布频率,突变频率 = 1/(基因长度突变群体大小/筛选出突变位点个数)。

1.2.8 突变体的生物信息学分析 利用 ProtParam 在线软件(<http://expasy.org/tools/protparam.html>) 分析 *GmAGL15* 基因所编码蛋白质的理化性质,利用 TargetP(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>) 预测氨基酸的酸碱性质,利用 TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 预测氨基酸的跨膜结构域,利用 ChloroP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/>) 预测氨基酸的亚细胞定位,利用 ProtScale (<http://www.expasy.org/cgi-bin/protscale.pl>) 分析氨基酸序列亲水性和疏水性,利用

NetNGlyc (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) 预测氨基酸潜在的磷酸化位点。

1.2.9 表型性状调查 于成熟期在每个株行取连续的长势一致的 5 个单株,调查突变体及野生型株系的株高、单株荚数、单株分枝数、单株粒重和百粒重。利用傅里叶近红外谷物分析仪检测种子蛋白质含量和脂肪含量。

2 结果与分析

2.1 大豆 *AGL15* 基因预测及结构分析

2.1.1 *AGL15* 基因的系统进化分析 如图 1 所示,在大豆中发现 9 个与拟南芥 *AGL15* 同源性较高的基因,其中与 *AGL15* 氨基酸序列同源性最高的基因为 Glyma.04G142500。因此,初步判断 Glyma.04G142500 是拟南芥 *AGL15* 在大豆中的同源基因,并将其命名为 *GmAGL15*。

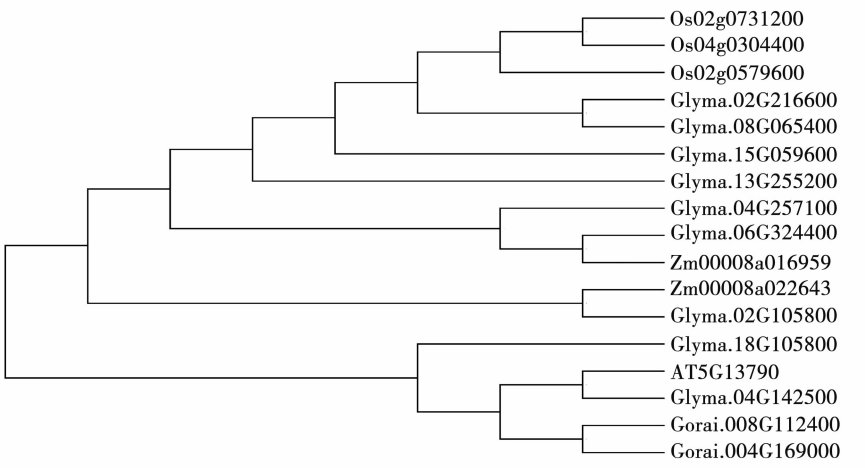


图 1 拟南芥 *AGL15* 的系统进化分析

Fig.1 Phylogenetic analysis of *AGL15* gene

2.1.2 *GmAGL15* 结构域预测 *GmAGL15* 基因全长 5 032 bp,包含 6 个外显子和 5 个内含子。该基因编码的蛋白共有 8 个结构域,分别为拟南芥同源框蛋白 GLABRA2 的 C 端脂质结合起始域 START_*ArGLABRA2*_like、START 结构域、同源框结构域 Homeobox、参与真核生物生长发育过程起转录调控作

用的 DNA 结合域 Homeodomain、调控转录的 DNA 结合因子 Hox 结构域、转录因子同源结构域 COG5576、参与重组 DNA 修复的 RecF 结构域和在细胞生长过程中发挥调节作用的 RsfA 结构域(图 2)。

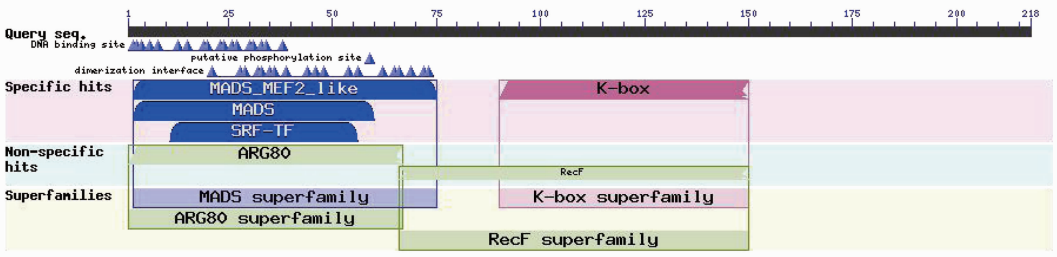


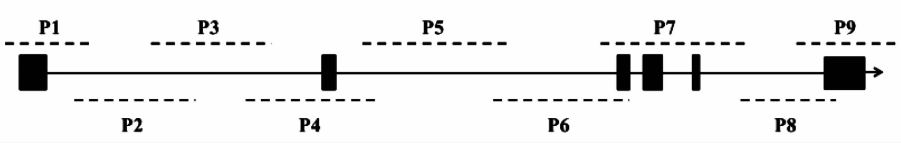
图 2 *GmAGL15* 的结构域预测

Fig.2 Structure domain prediction of *GmAGL15*

2.2 突变体库构建

2.2.1 *GmAGL15* 引物设计 利用 NCBI 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/biosystems/>) 下载 *GmAGL15* 的 DNA 序列。以其为模板利用 Primer 3

([http://bioinfo. ut. ee/primer3-0. 4. 0/](http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/)) 设计 9 对片段长度为 600 ~ 1 200 bp 的特异性引物,以覆盖整个基因(图 3)。

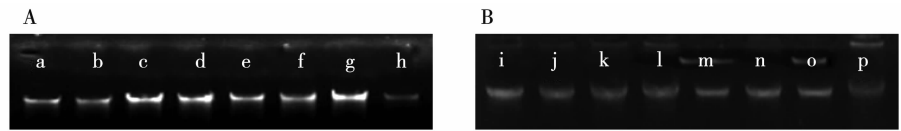


箭头表示基因的方向;黑框、黑线和虚线分别表示基因的外显子、内含子和引物的扩增片段; P1 ~ P9 表示不同的引物。
The arrow indicates the direction of gene; Black frames, black lines and dotted lines represent exons, introns and the amplified fragments of primers, respectively; P1-P9 represents different primers.

图 3 *GmAGL15* 引物扩增片段在基因结构中的位置

2.2.2 DNA 提取及 DNA 池的构建 突变体 DNA 的提取采用 CTAB 法,利用紫外分光光度计检测 1 600 份 DNA 原液的浓度,经检测 DNA 原液的浓度为 500 ~ 2 000 ng·μL⁻¹,使用双蒸水将 DNA 原液浓度稀释至 40 ng·μL⁻¹。每 8 份稀释后的 DNA 混匀

建池,共构建 200 个 8 倍 DNA 池。琼脂糖凝胶电泳结果显示,DNA 及混池后的 DNA 带条清晰无降解(图 4),表明 DNA 质量较好,可以用于 TILLING 筛选突变体。



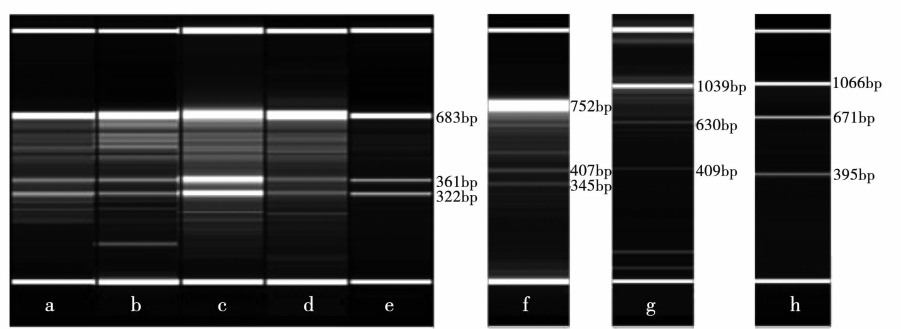
A:DNA 母液;a ~ h 分别代表不同突变体单株的 DNA;B: DNA 池;i ~ p 分别代表不同的 DNA 池。
A: DNA solution; a-h represent the DNA of different mutants; B: DNA pool; i-p represent different DNA pools.

图 4 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量

2.3 TILLING 技术筛选 *GmAGL15* 突变体及测序分析

2.3.1 *GmAGL15* 突变体的筛选 采用 *GmAGL15* 的 9 对引物对 DNA 池进行 PCR 扩增。TILLING 技

术共鉴别出 8 对筛选 *GmAGL15* 突变体的酶切条带。其中 5 个样品的酶切条带大小一致,推测 5 个突变体的突变位点在基因的同一个碱基处(图 5)。



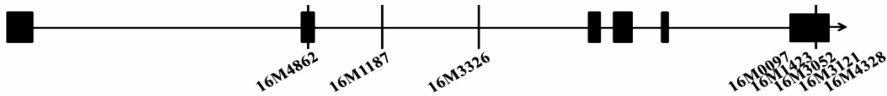
a、b、c、d、e、f、g、h 分别表示突变体 16M0097、16M1423、16M3052、16M3121、16M4328、16M3326、16M1187 和 16M4862。
a, b, c, d, e, f, g and h represent mutant of 16M0097, 16M1423, 16M3052, 16M3121, 16M4328, 16M3326, 16M1187 and 16M4862, repectively.

图 5 突变体的毛细管凝胶电泳图

Fig. 5 Capillary gel electropherogram of mutants

2.3.2 突变单株突变频率分析 利用上述 PCR 体系及程序扩增筛选出的突变单株 DNA 后,对 PCR 产物进行测序。鉴定出 10 个突变位点,这些突变位点来自于 8 个突变体,包括 6 个非同义突变体和 2 个内含子突变体,共分为 6 种单倍型。其中 6 个 SNP 位于基因的外显子,这 6 个 SNP 分为 2 种单倍型,分别为外显子的第 236 位碱基由 C 变为 T (16M4862)和第 568 位碱基由 T 变为 A(16M0097、

16M1423、16M3121、16M4328 和 16M3052);4 个 SNP 位于基因的内含子,这 4 个 SNP 分为 4 种单倍型,分别为内含子的第2 171 位碱基由 A 变为 G (16M1187),第2 929位碱基由 C 变为 A,第3 028位碱基由 T 变为 A(16M0097)和第3 216位碱基由 G 变为 A(16M3326)。其中突变体 16M0097 在 *GmAGL15* 上有 3 个突变位点,分别为 1 个非同义突变、2 个非编码区碱基替换(图 6)。



黑箭头表示基因的方向;黑框和横线分别表示外显子和内含子;数字表示突变体编号;竖线表示突变位点在基因结构中的物理位置。

The black arrow represents the direction of the gene; Boxes and lines indicate exons and introns; The numbers indicate the mutants; Hevertical lines represents the physical position of the mutation sites in the gene structure.

图 6 突变单株突变位点在基因结构中的物理位置

Fig. 6 Physical position of the mutation sites in the gene structure

根据 SNP 的数量计算,*GmAGL15* 在突变群体中的突变频率为 $1/(1\ 600 \times 5.032\ \text{kb}/10) = 1/805\ \text{kb}$ 。其中 T > A 变化类型占碱基变化总数的 60%,C > T、A > G、C > A 和 G > A 变化类型各占碱基变化总数的 10%。突变体 16M0097、16M1423、16M3052、16M3121 和 16M4328 的突变位点和突变类型相同,

造成 *GmAGL15* 编码的 190 位氨基酸由亮氨酸变为蛋氨酸。突变体 16M4862 的 79 位氨基酸由丙氨酸变为缬氨酸,该 SNP 处于基因 RecF 结构域中(表 1)。推测该位点的碱基变化可能对基因功能的改变造成较大的影响。

表 1 *GmAGL15* 突变位点的碱基变化
Table 1 Base change in the mutation sites

突变体编号 Number of mutants	区域 Region	位置 Position	碱基变化 Change of base	氨基酸位置 Position of amino acids	氨基酸变化 Change of amino acids
16M0097	外显子	568	T > A	190	L > M
16M1423	外显子	568	T > A	190	L > M
16M3121	外显子	568	T > A	190	L > M
16M4328	外显子	568	T > A	190	L > M
16M3052	外显子	568	T > A	190	L > M
16M4862	外显子	236	C > T	79	A > V
16M0097	内含子	2929	C > A	—	—
16M0097	内含子	3028	T > A	—	—
16M1187	内含子	2171	A > G	—	—
16M3326	内含子	3216	G > A	—	—

“T > A”表示碱基由 T 突变为 A;“L > M”表示亮氨酸变为蛋氨酸。下同。
‘T > A’ represents the base mutated from T to A; ‘L > M’ represents that the Leucine changed to Methionine. The same below.

2.3.3 突变位点的生物信息学分析 表 2 预测结果显示:*GmAGL15* 编码的蛋白不含跨膜区,且是个弱碱性疏水蛋白,该蛋白共有 12 个丝氨酸、7 个苏氨酸、1 个酪氨酸磷酸化潜在位点。当氨基酸发生

突变后,该蛋白的亚细胞定位、等电点、跨膜结构和潜在的磷酸化位点都没有发生改变;突变体的亲水系数虽然发生变化但该蛋白质仍然是疏水蛋白。

表 2 突变位点的生物信息学分析
Table 2 Bioinformatics prediction of mutation sites

材料 Material	氨基酸位置 Position of amino acids	氨基酸变化 Change of amino acids	亚细胞定位 Subcellular localization	等电点 Isoelectric point	亲水系数 Hydrophilic coefficient	扩膜结构域 Transmembrane structure	磷酸化位点 Phosphorylation site
ZP661	–	–	Other	7.64	–0.426	0	12S/7T/1Y
16M0097	190	L > M	Other	7.64	–0.435	0	12S/7T/1Y
16M1423	190	L > M	Other	7.64	–0.435	0	12S/7T/1Y
16M3121	190	L > M	Other	7.64	–0.435	0	12S/7T/1Y
16M4328	190	L > M	Other	7.64	–0.435	0	12S/7T/1Y
16M3052	190	L > M	Other	7.64	–0.435	0	12S/7T/1Y
16M4862	79	A > V	Other	7.64	–0.442	0	12S/7T/1Y

GmAGL15 基因编码蛋白质的二级结构中, α 螺旋占 46.54%,延伸链占 23.5%, β 转角占 8.29%,无规则卷曲占 21.66%;16M0097 等 5 份突变体的第 190 位氨基酸由亮氨酸变为蛋氨酸后,导致 α 螺旋增加 0.46%,延伸链较少 0.46%, β 转角和无规则卷曲没有变化;16M4862 的第 79 位氨基酸由丙氨酸变为缬氨酸后,导致 β 转角增加 0.46%,无规则卷曲减少 0.46%, α 螺旋和延伸链没有变化。

2.4 突变体的表型分析

成熟突变体的表型观察和考种数据分析表明:突变体 16M0097、16M1423、16M3121、16M4328、

16M3052 和 16M1187 的株高都显著低于野生型;突变体 16M0097、16M1423、16M3121、16M3052、16M4862 和 16M1187 的蛋白质含量与野生型相比存在显著性差异;突变体 16M4862、16M3052 和 16M1187 的脂肪含量与野生型相比差异显著;突变体 16M4862 的单株荚数与野生型相比显著降低;突变体 16M0097、16M3121 和 16M4328 的分枝数显著低于野生型;突变体 16M0097、16M3121 和 16M3052 的单株粒重显著低于野生型;突变体 16M0097 和 16M1423 的百粒重显著低于野生型(表 3)。

表 3 突变体考种分析
Table 3 Field phenotype of mutant

材料 Material	株高 Plant height /cm	单株荚数 Pod number	分枝数 Branching number	单株粒重 Seed weight per plant/g	百粒重 100-seed weight/g	蛋白质含量 Protein content /%	脂肪含量 Fat content /%
ZP661	146.7±2.9	105.7±2.6	7.0±1.0	37.1±1.4	19.1±0.5	40.6±0.4	20.6±0.2
16M0097	108.7±1.2*	104.7±6.6	2.3±0.6*	25.1±4.0*	15.1±0.6*	35.6±0.1*	21.6±0.1
16M1423	110.7±1.2*	112.3±6.1	6.0±0.0	32.3±5.8	15.7±0.3*	38.6±0.5*	21.4±0.1
16M3121	127.3±4.6*	97.0±2.2	3.3±0.2*	31.5±2.0*	17.4±0.4	38.1±0.1*	21.4±0.2
16M4328	123.7±1.2*	103.7±4.1	4.0±0.1*	34.4±6.1	19.1±0.5	38.9±0.2	20.2±0.1
16M3052	121.7±2.1*	100.7±3.0	5.3±2.1	30.6±1.1*	16.7±1.2	36.2±0.3*	22.3±0.3*
16M4862	148.0±1.7	93.3±4.1*	7.0±1.0	34.9±3.4	17.0±1.5	43.9±0.3*	18.3±0.3*
16M3326	141.7±2.9	118.7±4.1	9.6±1.5	41.2±4.4	20.0±0.2	39.5±0.3	20.4±0.3
16M1187	93.3±2.9*	99.0±5.5	6.6±2.1	32.7±3.5	20.2±1.0	43.7±0.6*	17.4±0.4*

* 表示在 $P=0.05$ 水平上差异显著。
* indicates significant difference at 5%.

3 讨论

反向遗传学高效筛选的首要条件就是拥有一个高密度变异的诱变群体。然而,随着突变频率的增加,突变群体中不育突变或致死突变将会越来越多。为了高效筛选重要农艺性状相关基因突变体,

本课题组将突变体 M_2 不断自交加代并进行表型筛选至 M_5 ,但突变群体世代的增加和表型的筛选很可能会降低群体的突变频率。因此,本试验中 TILLING 筛选 M_5 群体得到 1/805 kb 的突变频率低于 Cooper 等^[22] 和 Anai^[26] 通过 TILLING 筛选 M_2 突变群体得到的 1/140 kb 和 1/330 kb 的突变频率。

目前,关于 *AGLI5* 对花的调控机理研究较为深入^[27-29],但是 *AGLI5* 控制植物种子生长发育和贮藏物质积累的研究较少。Chen 等^[30] 研究发现下调 *AGLI5* 的表达可以抑制种子成熟,表明 *AGLI5* 可以调控植物种子的发育进程;Wang 等^[31] 发现在拟南芥中上调 *AGLI5* 会促进 *DTA1* 的表达、抑制 *DTA2* 的表达,并影响种子贮藏物质的积累。说明 *AGLI5* 可以通过与下游靶基因特异性结合的方式,调控种子的蛋白质和脂肪含量,并在植株种子的生长发育过程中发挥重要作用。

本研究利用 TILLING 筛选出 8 个 *GmAGLI5* 突变体,拓展了 *GmAGLI5* 功能研究的遗传资源。突变体的考种分析表明:*GmAGLI5* 与 *AGLI5* 的基因功能相似^[32-33],可能参与调控大豆的形态建设和种子贮藏物质的积累,但 *GmAGLI5* 的作用机制尚需进一步试验证明。另外,研究表明大豆的蛋白质含量与产量呈显著负相关^[34-36],而突变体 16M4862、16M1187 的蛋白质含量较野生型显著提高,但单株粒重和百粒重没有显著性变化。说明这两个突变体在产量不变的前提下,拥有较高含量的蛋白质,是优秀的高蛋白大豆,为培育优质大豆提供了宝贵的育种材料。

4 结 论

利用 TILLING 技术从大豆 EMS 突变体 M₅ 中筛选出 8 个 *GmAGLI5* 基因突变体。其中 6 个为非同义突变体,2 个为内含子突变体。*GmAGLI5* 的突变频率为1/805 kb。非同义突变体 16M4862 和内含子突变体 16M1187 的产量与野生型相比无显著性差异,但蛋白质含量显著提高。本研究为 *GmAGLI5* 的功能研究提供了等位变异,并为培育高产高蛋白大豆提供了优异的种质资源。

参考文献

[1] 朱浩哲,黄初女,王光达,等. 浅谈大豆蛋白质品质改良[J]. 吉林农业科学, 2006, 31(1): 4-8. (Zhu H Z, Huang C N, Wang G D, et al. Talking about the improvement of soybean protein quality[J]. Journal of Jilin Agricultural Sciences, 2006, 31(1): 4-8.)

[2] Wobus U, Weber H. Seed maturation: Genetic programmes and control signals[J]. Current Opinion in Plant Biology, 1999, 2(1): 33-38.

[3] Lotan T, Ohto M, Yee K M, et al. *Arabidopsis* *LEAFY COTYLEDON1* is sufficient to induce embryo development in vegetative cells[J]. Cell, 1998, 93(7): 1195-1205.

[4] Luerssen H, Kirik V, Herrmann P, et al. *FUSCA3*, encodes a protein with a conserved VPI/ABI3-like B3 domain which is of functional importance for the regulation of seed maturation in *Ara-*

bidopsis thaliana[J]. The Plant Journal, 1998, 15(6): 10.

[5] Stone S L, Kwong L W, Yee K M, et al. *LEAFY COTYLEDON2* encodes a B3 domain transcription factor that induces embryo development[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2001, 98(20): 11806-11811.

[6] Finkelstein R, Reeves W, Ariizumi T. Molecular aspects of seed dormancy[J]. Annual Review of Plant Biology, 2008, 59(59): 387-415.

[7] Heck G R, Perry S E, Nichols K W, et al. *AGLI5*, a MADS domain protein expressed in developing embryos [J]. The Plant Cell, 1995, 7(8): 1271-1282.

[8] Messenguy F, Dubois E. Role of MADS box proteins and their co-factors in combinatorial control of gene expression and cell development[J]. Gene, 2003, 316(1): 1-21.

[9] Nardeli S M, Artico S, Aoyagi G M, et al. Genome-wide analysis of the MADS-box gene family in polyploid cotton (*Gossypium hirsutum*) and in its diploid parental species (*Gossypium arboreum*, and *Gossypium raimondii*) [J]. Plant Physiology & Biochemistry, 2018, 127: 169-184.

[10] Holdsworth M J, Le  nie B, Soppe W J J. Molecular networks regulating *Arabidopsis* seed maturation, after-ripening, dormancy and germination[J]. The New Phytologist, 2008, 179(1): 33-54.

[11] Harding E W, Tang W, Nichols K W, et al. Expression and maintenance of embryogenic potential is enhanced through constitutive expression of *AGAMOUS-Like 15* [J]. Plant Physiology, 2003, 133(2): 653-663.

[12] McCallum C M, Comai L, Greene E A, et al. Targeting induced local lesions in genomes (TILLING) for plant functional genomics [J]. Plant Physiology, 2000, 123(2): 439-442.

[13] H  drich N, Gibon Y, Schudoma C, et al. Use of TILLING and robotised enzyme assays to generate an allelic series of *Arabidopsis thaliana* mutants with altered ADP-glucose pyrophosphorylase activity [J]. Journal of Plant Physiology, 2011, 168(12): 1395-1405.

[14] Lai K S, Kaothien-Nakayama P, Iwano M, et al. A TILLING resource for functional genomics in *Arabidopsis thaliana* accession C24[J]. Genes & Genetic Systems, 2012, 87(5): 291-297.

[15] Mart  n B, Ramiro M, Mart  nezzapater J M, et al. A high-density collection of EMS-induced mutations for TILLING in Landsberg erecta genetic background of *Arabidopsis*[J]. BMC Plant Biology, 2009, 9(1):147.

[16] Till B J, Reynolds S H, Weil C, et al. Discovery of induced point mutations in maize genes by TILLING[J]. BMC Plant Biology, 2004, 4:12-19.

[17] Peter C, Tai T H, Jennifer C, et al. Discovery of chemically induced mutations in rice by TILLING[J]. BMC Plant Biology, 2007, 7:19-30.

[18] Uauy C, Paraiso F, Colasuonno P, et al. A modified TILLING approach to detect induced mutations in tetraploid and hexaploid wheat[J]. BMC Plant Biology, 2009, 9:115-128.

[19] Dong C M, Daltonmorgan J, Vincent K, et al. A modified TILLING method for wheat breeding[J]. Plant Genome, 2009, 2(1): 39-47.

[20] Suzuki T, Eiguchi M, Kumamaru T, et al. MNU-induced mutant pools and high performance TILLING enable finding of any gene

- mutation in rice[J]. *Molecular Genetics & Genomics*, 2008, 279 (3): 213-223.
- [21] Stephenson P, Baker D, Girin T, et al. A rich TILLING resource for studying gene function in *Brassica rapa*[J]. *BMC Plant Biology*, 2010, 10(1): 62.
- [22] Cooper J L, Till B J, Laport R G, et al. TILLING to detect induced mutations in soybean[J]. *BMC Plant Biology*, 2008, 8 (1): 9.
- [23] Bilyeu K D, Dierking E C. New sources of soybean seed meal and oil composition traits identified through TILLING[J]. *BMC Plant Biology*, 2009, 9(1): 1-11.
- [24] Lakhssassi N, Zhou Z, Liu S, et al. Characterization of the *FAD2* gene family in soybean reveals the limitations of gel-based TILLING in genes with high copy number[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 324.
- [25] Jiang G Q, Yao X F, Liu C M. A simple *CEL I* endonuclease-based protocol for genotyping both SNPs and InDels[J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2013, 31(6): 1325-1335.
- [26] Anai T. Potential of a mutant-based reverse genetic approach for functional genomics and molecular breeding in soybean[J]. *Breeding Science*, 2012, 61(5): 462-467.
- [27] Dreni L, Zhang D. Flower development; The evolutionary history and functions of the *AGL6* subfamily MADS-box genes[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2016, 67(6): 1625-1638.
- [28] Zeng X, Liu H, Du H, et al. Soybean MADS-box gene *GmAGL1* promotes flowering via the photoperiod pathway[J]. *BMC Genomics*, 2018, 19(1): 51.
- [29] Perry S E, Zheng Q, Zheng Y. Transcriptome analysis indicates that *GmAGAMOUS-Like 15* may enhance somatic embryogenesis by promoting a dedifferentiated state[J]. *Plant Signaling & Behavior*, 2016, 11(7): e1197463.
- [30] Chen N, Veerappan V, Abdelmageed H, et al. HSI2/VAL1 silences *AGL15* to regulate the developmental transition from seed maturation to vegetative growth in *Arabidopsis*[J]. *The Plant Cell*, 2018, 30(3): 600-619.
- [31] Wang H, Tang W, Zhu C, et al. A chromatin immunoprecipitation (ChIP) approach to isolate genes regulated by *AGL15*, a MADS domain protein that preferentially accumulates in embryos[J]. *The Plant Journal*, 2002, 32(5): 13.
- [32] 汪潇琳, 陈艳萍, 喻德跃. MADS-box 基因 *GmAGL15* 在大豆种子发育过程中的表达[J]. *作物学报*, 2008, 34(2): 330-332. (Wang X L, Chen Y P, Yu D Y. Expression of the MADS-Box gene *GmAGL15* in seed development of soybean[J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2008, 34(2): 330-332.)
- [33] Fernandez D E, Heck G R, Perry S E, et al. The embryo MADS domain factor *AGL15* acts postembryonically: Inhibition of perianth senescence and abscission via constitutive expression[J]. *The Plant Cell*, 2000, 12(2): 183-197.
- [34] 王有伟, 苗燕妮, 江鹏, 等. 水稻产量、蛋白质及食味特性的关联研究[J]. *中国农学通报*, 2017, 33(5): 1-5. (Wang Y W, Miao Y N, Jiang P, et al. Correlation studies on yield, protein and palatability of rice[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2017, 33(5): 1-5.)
- [35] Wilcox J R, Cavins J F. Backcrossing high seed protein to a soybean cultivar[J]. *Crop Science*, 1995, 35(4): 1036-1041.
- [36] 郭小红. 不同年代育成大豆品种农艺性状和产量的比较[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2017. (Guo X H. Comparison on agronomic traits and yield of soybean cultivars developed in different years[D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2017.)

欢迎订阅 2020 年《大豆科学》

《大豆科学》是由黑龙江省农业科学院主管主办的大豆专业性学术期刊,被国内外多家重要数据库和文摘收录源收录的重点核心期刊。主要刊登有关大豆遗传育种、品种资源、生理生态、耕作栽培、植物保护、营养肥料、生物技术、食品加工、药用功能及工业用途等方面的学术论文、科研报告、研究简报、国内外研究述评、学术活动简讯和新品种介绍等。

《大豆科学》主要面向从事大豆科学研究的科技工作者,大专院校师生、各级农业技术推广部门的技术人员及科技种田的农民。

《大豆科学》为双月刊,16 开本,国内外公开发行。国内每期定价:40.00 元,全年 240.00 元,邮发代号:14-95。国外每期定价:40.00 美元(含邮资),全年 240.00 美元,国外代号:Q5587。全国各地邮局均可订阅,也可向编辑部直接订购。

地址:哈尔滨市南岗区学府路 368 号《大豆科学》编辑部

邮编:150086

电话:0451-86668735

网址: <http://ddkx.haasep.cn>

E-mail: soybeanscience@vip.163.com

