

程 丽, 胡茂龙, 浦惠明, 等. M342 抗除草剂基因 CAPS 标记的开发与应用[J]. 江苏农业学报, 2019, 35(2): 241-247.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2019.02.001

M342 抗除草剂基因 CAPS 标记的开发与应用

程 丽, 胡茂龙, 浦惠明, 龙卫华, 高建芹, 陈 锋, 周晓婴, 张 维, 陈 松, 张洁夫

(江苏省农业科学院经济作物研究所/农业部长江下游棉花与油菜重点实验室/国家油料作物改良中心南京分中心/江苏省现代作物生产协同创新中心, 江苏 南京 210014)

摘要: M342 是利用 EMS 诱变定向选育获得的甘蓝型油菜抗磺酰脲类除草剂新种质。通过 M342 抗性基因与敏感型油菜的 *ALS* 基因序列分析结果表明, M342 的 *BnALS3* 基因存在 1 处 SNP 突变, 导致编码的蛋白质第 556 位色氨酸突变为亮氨酸, 该突变导致基因序列对 *BsrD* I 内切酶消化的差异。为此设计了 8 条引物, 从中筛选到引物对 SU54F/SU58R 在不同油菜品种中可以特异性扩增出目的片段, 该片段经 *BsrD* I 酶切分型正确, 从而开发了检测 M342 中抗性基因 *BnALS3R* 的 CAPS 标记。运用该标记对除草剂敏感型油菜、纯合抗性油菜及杂合抗性油菜 *BnALS3* 的基因型进行验证, 并应用该标记对 F_2 、 BC_1 分离群体进行检测。结果表明, 该标记验证的基因型结果与测序结果一致。 F_2 分离群体有 Als3Als3、Als3als3、als3als3 3 种基因型, BC_1 分离群体有 Als3als3、als3als3 2 种基因型, 与表型鉴定结果一致, 遵循单基因遗传分离规律, 表明该标记可以应用于抗性基因的检测。CAPS 标记的获得为抗除草剂油菜的分子标记辅助选择育种奠定了基础。

关键词: 油菜; 磺酰脲类除草剂; 乙酰乳酸合酶; 酶切扩增多态性序列(CAPS)标记

中图分类号: Q789 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2019)02-0241-07

Development and application of the CAPS marker for herbicide-resistant gene in M342

CHENG Li, HU Mao-long, PU Hui-ming, LONG Wei-hua, GAO Jian-qin, CHEN Feng, ZHOU Xiao-ying, ZHANG Wei, CHEN Song, ZHANG Jie-fu

(Institute of Industrial Crops, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences/ Key Laboratory of Cotton and Rapeseed (Nanjing), Ministry of Agriculture/ Nanjing Sub-center, National Center of Oil Crops Improvement/Jiangsu Collaborative Innovation Centre for Modern Crop Production, Nanjing 210014, China)

Abstract: M342, a sulfonylurea-resistant germplasm in *Brassica napus* L., was developed and obtained by ethyl-methane sulfonate seed treatment. According to the analysis of the cloned *ALS* gene sequences between M342 and herbicide-sensitive rapeseed, one single nucleic acid polymorphism found in *BnALS3* of M342 led to substitution of tryptophan to leucine at site 556 of *ALS*, giving rise to the difference of digestion with *BsrD* I between *ALS* genes. Thus, eight primers were

收稿日期: 2018-06-26

基金项目: 国家重点研发计划项目(2016YFD0101300); 国家自然科学基金项目(31671731); 国家现代农业产业技术体系项目(CARS-12); 江苏省自然科学基金项目(BK20151369)

作者简介: 程 丽(1990-), 女, 湖北黄冈人, 硕士, 研究实习员, 主要从事植物分子生物学研究。

通讯作者: 胡茂龙, (Tel) 025-84390364; (E-mail) humolon@163.com。
浦惠明, (Tel) 025-84390370; (E-mail) puhuiming@126.com

designed, from which a pair of primers SU54F/SU58R amplifying the targeted fragments specifically in different rapeseed varieties was selected. The genotyping results of the PCR fragments digested with *BsrD* I were accurately got, and the CAPS marker detecting the resistant gene of *BnALS3R* in M342 was developed. Then the genotypes of *BnALS3* were validated in herbicide-sensitive, homozygous and heterozygous resistant rapeseed, and the F_2 and BC_1 populations were detected by CAPS marker. A perfect cor-

relation between the observed CAPS genotyping results, and the sequencing alignment results for the different lines was found. There were three genotypes of Als3Als3, Als3als3 and als3als3 in F_2 population, two genotypes of Als3als3 and als3als3 in BC_1 population, which was in accordance with the results of phenotype identification. The segregation followed the genetic law for a single gene model. The results confirmed that the CAPS marker could be applied to the detection of the resistant gene. The acquisition of CAPS marker lays a foundation for the marker-assisted selection breeding of herbicide-resistant rapeseed.

Key words: rapeseed (*Brassica napus* L.); sulfonylurea herbicides; acetolactate synthase; cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS) marker

有效治理田间杂草是油菜实现机械化、轻简化生产的一个重要环节,化学除草是目前控制农田杂草最有效的手段。磺酰脲(Sulfonylurea, SU)类除草剂因其具有高效低量,对动物无害,高选择性,土壤残留期短等优点被应用于水稻(*Oryza sativa*)、小麦(*Triticum aestivum* L.)、玉米(*Zea mays*)等单子叶作物田间杂草的防除^[1]。油菜(*Brassica napus* L.)为双子叶植物,对商业化的磺酰脲类除草剂敏感,选育抗SU类除草剂的油菜新品种,拓宽现有SU类除草剂的应用范围,是油菜田间杂草治理经济有效的途径。

SU类除草剂属于乙酰羟乙酸合酶(AHAS)抑制剂类除草剂,作用靶标是AHAS。AHAS也叫乙酰乳酸合酶(ALS),是植物支链氨基酸(亮氨酸、异亮氨酸和缬氨酸)生物合成过程中的关键酶^[2]。除SU类外,ALS类除草剂还包括咪唑啉酮类(Imidazolinones, IMI)、三唑嘧啶磺酰胺(Triazopyrimidines, TZ)、嘧啶水杨酸类(Pyrimidyloxy-benzoates, PB)和磺酰氨基三唑嘧啶酮类(Sulfonylaminocarbonyl-triazolinones, SCT)等。这类除草剂的杀草机理是除草剂分子与ALS形成复合物阻断底物进入酶活性位点通路,抑制ALS活性,导致支链氨基酸合成受阻,生物体内蛋白质合成被破坏,使植物失绿、黄化,最后逐渐死亡^[3]。植物产生抗性是由于其ALS基因发生了若干碱基位点的突变,造成编码蛋白质氨基酸残基位点变异,从而改变除草剂与ALS的结合方式产生抗性^[4-8]。在已发现的抗性突变体中,主要涉及8个ALS氨基酸位点突变,这8个位点分别是Ala122、Pro197、Ala205、Asp376、Arg377、Trp574、Ser653、Gly654[以拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)的ALS氨基酸位置计算]^[9],其中对SU类除草剂产生抗性的氨基酸突变位点主要有Pro197、Ala205和Trp574^[5-6]。在油菜中,Swanson等^[10-11]通过诱变油菜小孢子获得了对IMI类除草剂具有抗性的油菜

P1和P2。P1的抗性突变位点是BnALS1的Ser653Asp, P2的抗性突变位点是BnALS3的Trp574Leu。Magha等^[12]在培养油菜原生质体后代时发现突变体RCS-5对SU类和IMI类除草剂具有抗性,但未揭示突变位点。有研究者在大豆(*Glycine max*)和油菜轮作的试验田中发现1株抗IMI类除草剂油菜M9,并揭示了M9的突变位点为BnALS1的Ser653Asp^[7,13-14]。浦惠明等^[15]利用EMS诱变和定向选育技术,获得了抗SU类除草剂的甘蓝型油菜突变体M342。M342在苯磺隆推荐使用质量浓度下无任何药害症状,仍能正常生长。胡茂龙等^[16]进一步通过分子生物学技术克隆得到M342抗性基因,突变位点为BnALS3的Trp574Leu。根据该突变体BnALS3的突变位点,开发检测油菜抗SU类除草剂性状的分子标记,通过标记快速区分油菜中抗性基因的基因型,指导油菜抗性育种,加快选育进程。

酶切扩增多态性序列(Cleaved amplified polymorphic sequence, CAPS)是通过设计特异性引物扩增出目的片段,然后通过限制性内切酶消化PCR产物,电泳检测不同大小的酶切片段来检测基因型的技术^[17]。CAPS标记是PCR和RFLP(Restriction fragment length polymorphism)的有机结合,该方法快速直观,避免了RFLP分析中膜转印这一繁琐步骤,又能保持RFLP分析的精确度,且是共显性标记,已广泛应用于靶基因突变导致的抗性植株的检测^[18-19]。然而,在油菜中利用CAPS标记检测抗除草剂的突变基因还鲜见报道。本研究以M342抗性突变体为材料,开发能快速准确检测抗性基因BnALS3R基因型的CAPS标记,为油菜抗除草剂分子辅助选择育种奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料与试剂

M342、M294-2等纯合抗性材料是由江苏省农

业科学院经济作物研究所油菜研究室在 EMS 诱变体库中通过非选择性除草剂大群体定向筛选或通过 M342 杂交回交转育获得, 宁油 20 号、N131、D1-2、D3-1 等敏感材料, MICMS 双低恢复系 N221、N340 和 N341 由本研究室保存。

高保真性 DNA 聚合酶 *KOD-Plus* 及 PCR 试剂购自东洋纺(上海)生物科技有限公司, 克隆载体 pEASY-1 购自北京全式金生物技术有限公司。DNA 分子量标准、普通 *Taq* DNA 聚合酶、dNTP Mixture、 $10\times Ex Taq$ Buffer PCR、PCR 产物平末端加 A 试剂盒均购自 TaKaRa 生物工程有限公司(中国大连)。大肠杆菌 *E. coli* DH5 α 由本实验室保存。引物合成、DNA 测序均由南京金斯瑞生物科技有限公司完成。*BsrD* I 限制性内切酶(*NEB*)购于南京伟沃生物科技有限公司。苯磺隆除草剂为江苏省激素研究所股份有限公司生产的 10% 苯磺隆可湿性粉剂。

1.2 CAPS 标记开发

利用 EMS 诱变和定向选育技术, 我们获得了甘蓝型油菜抗 SU 类除草剂突变体 M342^[15], 该突变体是 *BnALS3* 基因起始密码子第一个核苷酸下游的 +1 667 位点单碱基 G 突变为 T, 导致第 574 位色氨酸突变为亮氨酸(以拟南芥的 *ALS* 氨基酸位置计算)。随后, 运用 Primer Premier5 分析了 M342 和野生型油菜 N131 之间酶切位点的差异, 发现野生型油菜 N131 的 *BnALS3* 基因 +1 667 位点的碱基 G 与其上游 +1 662 至 +1 666 的 5 个碱基构成的核苷酸序列“GCAATG”是限制性内切酶 *BsrD* I 的识别剪切位点。为明确该序列在多个敏感型油菜品种中的保守性, 设计了引物对 A1(表 1), 采用 CTAB 法对敏感型油菜宁油 20 号、N221、N340 和 N341 提取 DNA, PCR 克隆 4 个油菜品种的 *BnALS3* 基因。PCR 反应体系包含 1.0 μ l DNA 模板、2.0 μ l $10\times$ 酶反应缓冲液、1.2 μ l 25 mmol/L $MgSO_4$ 、2.0 μ l 2 mmol/L dNTPs、0.8 μ l 1 U/L *KOD-Plus Taq* 酶、13.0 μ l H_2O 。反应程序 94 $^{\circ}C$ 预变性 5 min; 94 $^{\circ}C$ 变性 30 s, 55 $^{\circ}C$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}C$ 延伸 2 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}C$ 延伸 5 min。按照试剂盒使用说明书对 PCR 产物进行平末端加 A 后, 用 1% (质量体积比) 的琼脂糖凝胶电泳回收纯化, 回收片段连接 pEASY-T1 载体, 转化大肠杆菌 DH5 α , 挑取阳性克隆测序。

甘蓝型油菜 A、C 基因组有 3 个 *ALS* 功能基因, 其中 C 基因组上的 *BnALS1* 和 A 基因组上的

BnALS3 在核酸和蛋白水平同源性达 98%, 为了避免不同油菜品种 *BnALS1* 对抗性基因检测的干扰, 设计引物对 A2, 同样对宁油 20 号、N221、N340 和 N341 的 *BnALS1* 基因进行克隆、测序。利用 DNA-MAN V6 软件分析 M342、N131、宁油 20 号、N221、N340 和 N341 的 *BnALS1*、*BnALS3* 基因序列差异, 在 *BnALS3* 基因 +1 662 ~ +1 667 序列的两端设计了 8 条引物(表 1), 正反引物分别锚定在 *BnALS1*、*BnALS3* 核苷酸差异序列上, 以期特异性扩增 *BnALS3* 基因片段。接着以 M342 的 5 个单株, 上述 5 种除草剂敏感型油菜(N131、宁油 20 号、N221、N340 和 N341)以及 M342 的 5 个单株为父本与上述 5 种除草剂敏感型油菜为母本杂交的 F_1 为材料, 提取油菜基因组 DNA, 使用上述 8 条引物组合成的 16 对引物进行扩增。反应体系如下: 20 ng DNA, 0.5 μ mol/L 引物, $1\times$ 酶反应缓冲液, 1.5 mmol $MgCl_2$, 0.2 mmol/L dNTP, 0.5 U *Taq* 酶。PCR 扩增程序为: 94 $^{\circ}C$ 预变性 5 min; 94 $^{\circ}C$ 变性 30 s, 55 $^{\circ}C$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}C$ 延伸 45 s, 共 35 个循环; 72 $^{\circ}C$ 延伸 5 min, 4 $^{\circ}C$ 保存。PCR 产物一部分纯化测序, 一部分用限制性内切酶进行酶切, 25.0 μ l 酶切反应体系包括: PCR 产物 5.0 μ l, $10\times$ 酶反应缓冲液 2.5 μ l, 内切酶 0.5 μ l, 水 17.0 μ l。65 $^{\circ}C$ 下反应 3~5 h。用 1.5% (质量体积比) 的琼脂糖凝胶检测酶切产物。

表 1 油菜 *BnALS3*、*BnALS1* 基因的克隆及其 CAPS 标记的检测引物序列

Table 1 The primers used for the cloning of *BnALS3* and *BnALS1* and CAPS marker detection of herbicide-resistant gene in rapeseed

引物编号	序列(5'→3')	用途
A1	F: TCTCATTTCTCTCTCTCTCATC R: AGTCTGGGAACAAACCAAAAGC	克隆 <i>BnALS3</i> 基因
A2	F: AGAACAGTTAGATCCAC R: CAGCTTCATCTCTCAGTA	克隆 <i>BnALS1</i> 基因
SU52F	GTCCTAGACGAGCTAACCC	检测抗性基因的 CAPS 标记
SU53F	CTGTCGTCCTCAGGACTCG	
SU54F	GTTTGCGAGCAGGGCTAAGA	
SU55F	CGTTTGCGAGCAGGGCTAAGA	
SU56R	ACCACACAAAAGAACTGAAAAC	
SU57R	GCATTGAGTCCCAACATTATGT	
SU58R	GACATCCAACAGGTACGGTCCA	
SU59R	GATGACATCCAACAGGTACGGTCCA	

1.3 CAPS 标记的验证

对抗性油菜 M294-2、敏感型油菜 D1-2 和抗性油菜 M305、M306 与敏感型油菜 D42、D162 杂交的 F_1 及亲本种子进行萌发。7 d 后,取适量幼苗提取 DNA,并用 1% (体积质量比) 的琼脂糖凝胶电泳和分光光度计检测 DNA 浓度和纯度。引物对 SU54F/SU58R 扩增出目的片段,并用 *BsrD* I 进行酶切,验证 CAPS 标记。DNA 提取、PCR 反应、酶切分型方法同方法 1.2。

1.4 应用 CAPS 标记检测油菜分离群体中 *BnALS3R* 的基因型

用 MICMS 双低恢复系 N221 与 M342 配制 F_1 ,播种 F_1 套袋自交后得到 F_2 群体, F_1 单株分别与 N221 进行回交获得 BC_1 群体。当年秋季种植 F_2 、 BC_1 分离群体材料,待油菜生长至 3 到 5 叶期,喷施质量浓度为 45 g/hm² (a.i) 的苯磺隆鉴定分离群体中各单株除草剂抗性,喷药前取适量 F_2 、 BC_1 分离群体单株和亲本的叶片保存于 -20 ℃,用于 DNA 提取。利用引物对 SU54F/SU58R 扩增出目的片段,并用 *BsrD* I 酶切分型。DNA 提取、PCR 反应、酶切分型方法同方法 1.2。

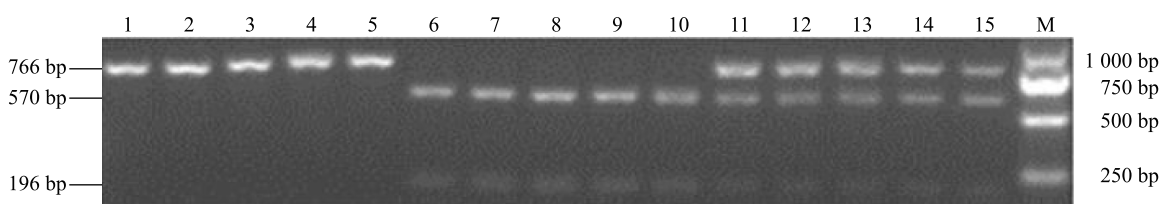
2 结果与分析

2.1 油菜抗磺酰脲类除草剂基因 *BnALS3R* 的 CAPS 标记

利用 A1 引物 PCR 克隆获得了敏感型油菜宁油

20 号、N221、N340 和 N341 的 *BnALS3* 基因序列。序列比对发现,在 +1 662~+1 667 位点的 6 个核苷酸序列均为“GCAATG”,与野生型油菜 N131 相同,表明该序列在敏感型油菜中具有高度保守性。16 对引物分别对多个油菜品种进行 PCR 扩增,多次 PCR 扩增结果表明,有些引物对无 PCR 产物,有些引物对 PCR 非特异扩增出多个条带,不利于进行酶切反应。其中引物对 SU54F/SU58R 能特异性扩增出目的条带,该条带经测序发现属于 *BnALS3* 基因片段,在敏感型和抗性油菜中存在 G/T 突变位点。

PCR 产物经 *BsrD* I 酶切后显示,抗磺酰脲类除草剂油菜 M342 的 5 个单株均为只有 1 条 766 bp 的条带,敏感型油菜 N131、宁油 20 号、N221、N340 和 N341 均为含有 570 bp、196 bp 2 条条带, F_1 均为含有 766 bp、570 bp 和 196 bp 3 条条带(图 1)。田间苗期油菜喷施苯磺隆后,未发现 M342 及杂交 F_1 单株死亡,但 5 种敏感型油菜喷药 20 d 后全部死亡。上述结果表明,从 16 对引物筛选出的引物对 SU54F/SU58R 可以作为抗磺酰脲类除草剂基因 *BnALS3R* 的 CAPS 标记引物,该 CAPS 标记可以准确检测出油菜种质资源中是否含有抗磺酰脲类除草剂基因 *BnALS3R*。



M: DNA 分子量标准;1~5: M342 的 5 个单株;6~10: N131、宁油 20 号、N221、N340 和 N341;11~15: M342 分别与 N131、宁油 20 号、N221、N340 和 N341 杂交的 F_1 代单株。

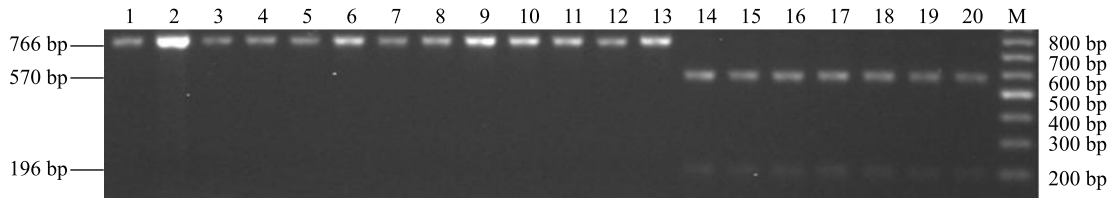
图 1 引物对 SU54F/SU58R 在不同油菜品种中的 PCR 扩增产物的酶切结果

Fig.1 The result of the amplicons of SU54F/SU58R digested by *BsrD* I in different rapeseed varieties

2.2 CAPS 标记在油菜抗磺酰脲类除草剂基因 *BnALS3R* 中的验证

利用 CAPS 标记对不同油菜的抗性基因 *BnALS3R* 进行检测,结果表明 M294-2、M295-1、M296-1、M297-1、M298-1、M299-1、M300-1、M301-1、M303-1、

M304-1、M305-1、M306-2、M307-1 是纯合抗性油菜,酶切产物只有 1 条分子量为 766 bp 的条带;D1-2、D3-1、D4-1、D7-1、D8-2、D9-1、D10-2 是敏感型油菜,酶切产物分别有 570 bp、196 bp 的 2 条条带(图 2),该 CAPS 标记的检测方法与测序结果一致。

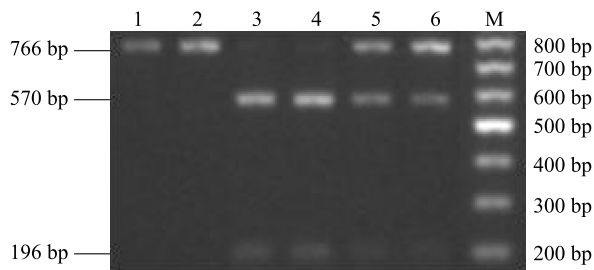


M: DNA 分子量标准; 1~13: M294-2、M295-1、M296-1、M297-1、M298-1、M299-1、M300-1、M301-1、M303-1、M304-1、M305-1、M306-2、M307-1; 14~20: D1-2、D3-1、D4-1、D7-1、D8-2、D9-1、D10-2。

图 2 纯合抗性油菜和敏感型油菜的 CAPS 标记分析

Fig.2 CAPS marker analysis of homozygous resistant rapeseed and sensitive rapeseed

纯合抗性油菜 M305、M306 的 CAPS 标记检测结果表明只有 1 条 766 bp 的条带,敏感型油菜 D42、D162 的酶切结果显示 570 bp 和 196 bp 2 条条带(图 3),均与其基因型结果一致。分别将 M305、M306 与 D42、D162 进行杂交,杂交后代 F_1 基因型是杂合型,以 F_1 幼苗的 DNA 为模板,扩增片段酶切后分别有 766 bp、570 bp 和 196 bp 3 条条带,与预期结果一致(图 3)。



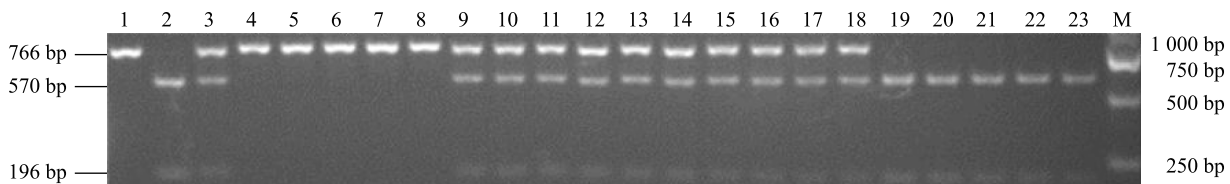
M: DNA 分子量标准; 1~6: M305、M306、D42、D162、D42×M305、D162×M306。

图 3 M305、M306、D42、D162 及其 F_1 杂交后代的 CAPS 分析

Fig.3 The CAPS analysis of M305, M306, D42, D162 and F_1 hybrid plants

2.3 应用 CAPS 标记检测油菜分离群体 *BnALS3R* 的基因型

利用 CAPS 标记技术对 F_2 、 BC_1 群体进行检测,结果表明 F_2 群体 CAPS 标记呈现 3 种基因型条带(图 4),即酶切产物为 766 bp 1 条条带,为抗磺酰脲类除草剂 *Als3Als3* 纯合抗性植株,如单株 4~8;酶切产物为 766 bp、570 bp 和 196 bp 3 条条带,为 *Als3als3* 杂合抗性植株,如单株 9~18;酶切产物为 570 bp 和 196 bp 2 条条带,为 *als3als3* 纯合敏感植株,如单株 19~23, CAPS 标记分析结果与抗磺酰脲类除草剂基因 *BnALS3R* 基因型测序结果一致。 BC_1 群体 CAPS 标记分析呈现 2 种基因型条带(图 5),即酶切产物为 766 bp、570 bp 和 196 bp 3 条条带,为杂合抗性 *Als3als3* 植株,如单株 4~13;酶切产物为 570 bp 和 196 bp 2 条条带,为敏感 *als3als3* 植株,如单株 14~23。以上 2 个群体 CAPS 标记结果与苗期喷施苯磺隆表型鉴定结果一致,并且 F_2 和 BC_1 群体的 CAPS 标记结果遵循孟德尔单基因遗传分离规律,因此该 CAPS 标记可以有效地检测分离群体 *BnALS3R* 的基因型。



M: DNA 分子量标准; 1: M342; 2: N221; 3: F_1 (N221×M342); 4~23: 部分 F_2 单株。

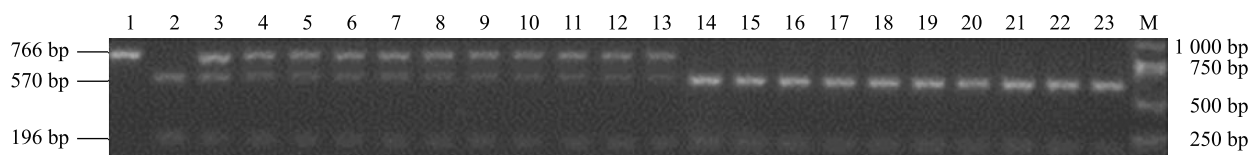
图 4 F_2 群体的 CAPS 标记分析

Fig.4 CAPS marker analysis among F_2 population in rapeseed

3 讨论

传统的育种方式主要是根据表型进行选择,而

环境条件、基因间互作、基因型等多种因素会影响对植株的选择,育种周期较长。分子标记辅助育种技术可以提高育种的准确性和效率,在农业育种中发



M: DNA 分子量标准; 1: M342; 2: N221; 3: F₁ (N221×M342); 4~23: 部分 BC₁ 单株。

图 5 BC₁ 群体的 CAPS 标记分析

Fig.5 CAPS marker analysis among BC₁ population in rapeseed

挥重要的作用^[20-22]。理想的分子标记能在广泛的遗传背景下有效追踪目标基因,重复性高^[23-24]。CAPS 标记技术将 PCR 扩增和酶切反应相结合,具有操作简便、结果稳定可靠等优点,已广泛用于植物抗除草剂基因的检测。运用 CAPS 标记技术,Massa 等^[19]检测了阿披拉草 (*Apera spica-venti*) ALS 基因 Pro197 突变体。Yu 等^[25-26]对野麦草 (*Hordeum leporinum* Link.) ALS 基因 Pro197 突变体基因检测,随后对硬直黑麦草 (*Lolium rigidum* Gaud.) ALS 基因 Pro197、Trp574 突变体进行基因分型。邓维^[27]运用 CAPS 标记快速检测播娘蒿 (*Descurainia sophia* L.) ALS1 或 ALS2 的 Pro197、Asp376 和 Trp574 突变体。然而,由于在播娘蒿中 ALS1、ALS2 基因同源性达到了 96.4%,设计的引物可同时扩增出 ALS1、ALS2,但酶切无法明确区分 Pro197 突变体究竟是 ALS1 还是 ALS2 基因位点的突变。甘蓝型油菜是由白菜型油菜和甘蓝天然杂交形成的异源四倍体,包括 A、C 基因组,基因组内 3 个具有催化功能的 ALS 基因核酸序列高度同源,尤其是 ALS1 和 ALS3,同源性达到 98%,这为开发检测抗 SU 类除草剂油菜抗性基因 BnALS3R 的分子标记增加了难度。本研究通过克隆比对 BnALS1 和 BnALS3 序列差异设计出 8 条引物,从组合的 16 对引物中筛选出 1 对引物 (SU54F/SU58R) 能特异扩增出不同油菜品种中与 BnALS1 高度同源的 BnALS3R 基因片段,且酶切分型正确,为利用抗性基因进行油菜抗除草剂分子标记辅助选择育种奠定了基础。

目前,国内外至今还未有培育出商业化的抗 SU 类除草剂油菜品种的公开报道,主要原因是缺少抗性种质。因此,筛选鉴定具有生产应用价值的抗 SU 类除草剂油菜新种质成为迫切需要。Magha 等^[12]发现突变体 RCS-5 对 SU 类和 IMI 类除草剂具有抗性,但未揭示抗性位点。Li 等通过筛选 EMS 突变后代群体鉴定出几株抗苯磺隆突变体,其突变位点为

BnALS3 第 197 位 Pro 突变为 Ser/Leu^[28]。曲高平等^[29-30]报道在 3×10^4 株的 EMS 诱变 M₂ 群体中筛选到 K1、K4、K5 共 3 株苯磺隆抗性突变体,随后揭示了突变体 K1、K4 均为 BnALS3 第 535 位碱基 C 突变为碱基 T 导致 BnALS3 第 197 位 Pro 突变为 Ser, K5 为 BnALS1 第 544 位碱基 C 突变为碱基 T 导致 BnALS1 第 197 位 Pro 突变为 Ser,并开发了 SNP 标记用于检测 3 株突变体基因。通过定向选育方法^[15],我们筛选到抗 SU 类除草剂油菜 M342,该突变体是 BnALS3 第 1 667 位碱基 G 突变为碱基 T 导致第 574 位 Trp 突变为 Leu,这为抗除草剂油菜种质创新和品种选育奠定了基础。本研究根据 BnALS3 基因 Trp574 突变位点的 SNP,开发了油菜抗 SU 类除草剂性状的 CAPS 标记,该标记在分离群体中可以准确地鉴定纯合抗性油菜、纯合敏感油菜及杂合抗性油菜 BnALS3R 的基因型。同时,该标记是根据基因的核苷酸突变特性设计的功能性基因标记,能直接反映植株的抗性,不存在由于遗传交换而造成的错误鉴定,极大地提高了抗性基因的选择效率。利用该标记可以在油菜任何时期鉴定抗性基因纯合型单株以及优良性状的敏感单株,淘汰其他单株,这样不仅可以节约田间育种成本,而且可以大大提高抗除草剂油菜品种的选择进程。

参考文献:

- [1] 张敏恒. 磺酰脲类除草剂的发展现状、市场与未来趋势[J]. 农药, 2010, 49(4): 235-245.
- [2] MCCOURT J A, DUGGLEBY R G. Acetohydroxyacid synthase and its role in the biosynthetic pathway for branched-chain amino acids[J]. Amino Acids, 2006, 31(2): 173-210.
- [3] MCCOURT J A, PANG S S, KING-SCOTT J, et al. Herbicide-binding sites revealed in the structure of plant acetohydroxyacid synthase[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006, 103(3): 569-573.
- [4] SADA Y, UCHINO A. Biology and mechanisms of sulfonylurea resistance in *Schoenoplectiella juncoides*, a noxious sedge in the rice

- paddy fields of Japan[J]. Weed Biology and Management, 2017, 17(3): 125-135.
- [5] DENG W, YANG Q, ZHANG Y Z, et al. Cross-resistance patterns to acetolactate synthase (ALS)-inhibiting herbicides of flaxweed (*Descurainia sophia* L.) conferred by different combinations of ALS isozymes with a Pro-197-Thr mutation or a novel Trp-574-Leu mutation [J]. Pesticide Biochemistry & Physiology, 2017, 136: 41-45.
- [6] LEE H, RUSTGI S, KUMAR N, et al. Single nucleotide mutation in the barley *acetohydroxy acid synthase* (AHAS) gene confers resistance to imidazolinone herbicides[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2011, 108(21): 8909-8913.
- [7] HU M L, PU H M, KONG L N, et al. Molecular characterization and detection of a spontaneous mutation conferring imidazolinone resistance in rapeseed and its application in hybrid rapeseed production[J]. Molecular Breeding, 2015, 35(1): 46.
- [8] LI J, LI M, GAO X X, et al. A novel amino acid substitution Trp574Arg in acetolactate synthase (ALS) confers broad resistance to ALS-inhibiting herbicides in crabgrass (*Digitaria sanguinalis*) [J]. Pest Management Science, 2017, 73(12): 2538-2543.
- [9] TRANEL P J, WRIGHT T R, HEAP I M. Mutations in herbicide-resistant weeds to ALS inhibitors [DB/OL]. [2018-09-15]. <http://www.weedscience.com/Mutations/MutationDisplayAll.aspx>.
- [10] SWANSON E B, COUMANS M P, BROWN G L, et al. The characterization of herbicide tolerant plants in *Brassica napus* L. after in vitro selection of microspores and protoplasts[J]. Plant Cell Reports, 1988, 7(2): 83-87.
- [11] SWANSON E B, HERRGESELL M J, Arnoldo M, et al. Microspore mutagenesis and selection: Canola plants with field tolerance to the imidazolinones [J]. Theoretical and Applied Genetics, 1989, 78(4): 525-530.
- [12] MAGHA M I, GUERCHE P, BREGEON M, et al. Characterization of a spontaneous rapeseed mutant tolerant to sulfonylurea and imidazolinone herbicides [J]. Plant Breeding, 2010, 111(2): 132-141.
- [13] 高建芹,浦惠明,戚存扣,等. 抗咪唑啉酮油菜种质的发现与鉴定[J]. 植物遗传资源学报, 2010, 11(3): 369-373.
- [14] 胡茂龙,浦惠明,高建芹,等. 油菜乙酰乳酸合成酶抑制剂类除草剂抗性突变体 M9 的遗传和基因克隆[J]. 中国农业科学, 2012, 45(20): 4326-4334.
- [15] 浦惠明,胡茂龙,高建芹,等. 一种基于 ALS 靶酶的抗除草剂油菜定向选育方法;CN103070068A [P]. 2013-05-01.
- [16] 胡茂龙,浦惠明,龙卫华,等. 一种甘蓝型油菜抗磺酰脲类除草剂基因及其应用;CN103266118A [P]. 2013-08-28.
- [17] WEILAND J J, YU M H. A cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS) marker associated with root-knot nematode resistance in sugarbeet[J]. Crop Science, 2003, 43(5): 1814-1818.
- [18] LIU W T, YUAN G H, DU L, et al. A novel Pro197Glu substitution in acetolactate synthase (ALS) confers broad-spectrum resistance across ALS inhibitors[J]. Pesticide Biochemistry & Physiology, 2015, 117: 31-38.
- [19] MASSA D, KRENZ B, GERHARDS R. Target-site resistance to ALS-inhibiting herbicides in *Apera spica-venti* populations is conferred by documented and previously unknown mutations [J]. Weed Research, 2011, 51(3): 294-303.
- [20] 任海,吕小红,杜萌. 多抗水稻分子标记辅助育种方法[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(19): 154-158.
- [21] 周丽霞,吴翼,肖勇. 基于 SSR 分子标记的油棕遗传多样性分析[J]. 南方农业学报, 2017, 48(2): 216-221.
- [22] 孙大元,周丹华,张景欣,等. 广谱抗源 H4 中 2 个主效抗病基因的单基因系构建及评价[J]. 江苏农业学报, 2017, 33(1): 1-5.
- [23] 邓琳,余小刚,姜朵,等. 棉花分子育种研究进展[J]. 山东农业科学, 2017, 49(5): 144-150.
- [24] 王亚琦,孙子淇,郑峥,等. 作物分子标记辅助选择育种的现状与展望[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(5): 6-12.
- [25] YU Q, NELSON J K, ZHENG M Q, et al. Molecular characterization of resistance to ALS-inhibiting herbicides in *Hordeum leporinum* biotypes[J]. Pest Management Science, 2007, 63(9): 918-927.
- [26] YU Q, HAN H P, POWLES S B. Mutations of the ALS gene endowing resistance to ALS-inhibiting herbicides in *Lolium rigidum* populations [J]. Pest Management Science, 2008, 64(12): 1229-1236.
- [27] 邓维. 抗苯磺隆播娘蒿抗性机理及抗性突变对乙酰乳酸合成酶功能影响[D]. 北京: 中国农业大学, 2017.
- [28] LI H T, LI J J, ZHAO B, et al. Generation and characterization of tribenuron-methyl herbicide-resistant rapeseed (*Brassica napus*) for hybrid seed production using chemically induced male sterility [J]. Tag, theoretical & Applied Genetics, theoretische Und Angewandte Genetik, 2015, 128(1): 107-118.
- [29] 曲高平,孙妍妍,庞红喜,等. 甘蓝型油菜 EMS 突变体库构建及抗除草剂突变体筛选[J]. 中国油料作物学报, 2014, 36(1): 25-31.
- [30] 孙妍妍,曲高平,黄谦心,等. 甘蓝型油菜抗苯磺隆突变体 ALS 基因分析与 SNP 标记[J]. 中国油料作物学报, 2015, 37(5): 589-595.

(责任编辑:陈海霞)