

甘蓝型油菜抗苯磺隆突变体 *ALS* 基因分析与 SNP 标记孙妍妍^{1,2}, 曲高平^{1,2,§}, 黄谦心^{1,2}, 吕金洋^{1,3}, 郭媛^{1,2}, 胡胜武^{1,2*}

(1. 旱区作物逆境生物学国家重点实验室, 陕西 杨凌, 712100; 2. 西北农林科技大学农学院, 陕西 杨凌, 712100; 3. 西北农林科技大学生命科学学院, 陕西 杨凌, 712100)

摘要: 为筛选新型甘蓝型油菜抗苯磺隆除草剂的等位基因特异分子标记, 以 EMS 诱变的甘蓝型油菜中双 9 号 M₂ 群体 (约 30 000 单株) 为材料, 通过苯磺隆喷药处理筛选到 3 株抗除草剂突变体 (分别记为 K1、K4、K5)。利用 PCR 技术克隆到抗性突变体相应的 *BnALS1*、*BnALS2*、*BnALS3* 基因, 序列分析结果表明, K1 和 K4 的 *BnALS3* 基因序列发生碱基突变, 其中第 +535 位 C 碱基突变为 T, 导致其编码的 BnALS3 蛋白第 197 位氨基酸由 Pro 突变为 Ser; 而 K5 的 *BnALS1* 基因序列第 +544 位 C 突变为 T, 导致其编码的 BnALS1 蛋白发生了 Pro197Ser 的改变 (均以拟南芥 *ALS* 氨基酸序列为准)。其中 K5 抗性位点 BnALS1: Pro197Ser 的改变属于首次报道。基于突变的基因序列设计了 8 对等位基因特异性 PCR 引物组合, 有 6 对能用于区分抗性突变体和野生型材料, 其中可检测 K5 的 *BnALS1* 基因 SNP 位点的引物有 2 对, 可检测 K1、K4 突变体 *BnALS3* 基因 SNP 位点的引物有 4 对。

关键词: 油菜; 抗除草剂突变体; 苯磺隆; 乙酰乳酸合成酶; 等位基因特异 PCR; 单核苷酸多态性

中图分类号: S565.403

文献标识码: A

文章编号: 1007-9084(2015)05-0589-07

SNP markers for acetolactate synthase genes from tribenuron – methyl resistant mutants in *Brassica napus* L.SUN Yan – yan^{1,2}, QU Gao – ping^{1,2,§}, HUANG Qian – xin^{1,2}, LV Jin – yang^{1,3}, GUO Yuan^{1,2}, HU Sheng – wu^{1,2*}

(1. State Key Laboratory of Crop Stress Biology in Arid Areas, Yangling 712100, China;

2. College of Agronomy, Northwest A&F University, Yangling 712100, China;

3. College of Life Sciences, Northwest A&F University, Yangling 712100, China)

Abstract: For molecular markers for tribenuron – methyl (TBM) resistant mutant in *Brassica napus* L., M₂ population of rapeseed (*B. napus*) cv Zhongshuang 9 mutagenized by ethylmethane sulfonate were treated by foliar spraying of TBM solution. 3 TBM – resistant mutants, K1, K4, and K5, were screened out from about 30 000 individuals of M₂ population. *BnALS1*, *BnALS2* and *BnALS3* genes of these TBM resistant mutants were cloned and detected for single nucleate polymorphisms (SNPs). Results showed that *BnALS3* gene from K1 and K4 had C to T transition at position +535 which led to substitution of proline with serine at position 197 in BnALS3 protein. K5 *BnALS1* also had C to T transition at position +544 which led to substitution of proline with serine at position 197 in BnALS1 protein. This *BnALS1*: Pro197Ser mutant in K5 was first reported in *B. napus*. According to allele – specific polymerase chain reaction (AS – PCR) results, 6 primers could identify these mutants from wild type. Among them, 2 primer pairs were used for SNP of K5 *BnALS1*, 4 for K1 and K4 mutant gene *BnALS3*.

Key words: *Brassica napus* L.; Herbicide – resistant mutant; Tribenuron – methyl; Acetolactate synthase; Allele – specific polymerase chain reaction (AS – PCR); Single nucleate polymorphism

杂草的综合有效治理是实现油菜轻简化、机械化的重要技术环节。选育抗除草剂油菜品种是防除

油菜田杂草最为经济有效的措施。抗除草剂油菜包括转基因和非转基因油菜两大类。目前, 加拿大已

收稿日期: 2015-03-27

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项资金 (CARS-13)

作者简介: 孙妍妍 (1988-), 女, 吉林长春人, 硕士研究生, 主要从事油菜遗传育种研究, E-mail: 15929800833@163.com;

§ 曲高平, 共同第一作者

* 通讯作者: 胡胜武, 男, 陕西柞水人, 教授, 博士生导师, 从事油菜遗传育种研究, E-mail: swhu83251@nwsuaf.edu.cn

登记的抗除草剂甘蓝型油菜品种有 76 个,其中转基因油菜品种 71 个(93.42%) (<http://www.canola-council.org/>)。通过转基因技术获得的抗除草剂油菜,抗性彻底,但公众对转基因油菜的安全性尚存在争议。目前,欧洲^[1]及中国尚不允许转基因油菜品种的推广种植。Swanson 等^[2,3]通过诱变剂乙基亚硝基脲诱变油菜小孢子,选择获得了对咪唑啉酮类除草剂具有抗性的油菜 *P1* (或记为 *PM1*) 和 *P2* (或记为 *PM2*)。 *P1* 的抗性突变位点为 *BnALS1* 的 Ser653Asp, *P2* 的抗性突变位点是 *BnALS3* 的 Trp574Leu, *P2* 的抗性水平比 *P1* 高。目前国外已商业化的抗咪唑啉酮 Clearfield 油菜都是由这 2 个突变体转育而成^[4,5]。Magha 等^[6]在油菜原生质体培养后代中也发现了自然突变的磺酰脲类 (SU) 和咪唑啉酮类 (IMI) 除草剂抗性突变体 RCS-5,但未揭示其突变位点。我国江苏省农业科学院在油菜和大豆多年轮作的试验田中发现了 1 株抗咪唑啉酮油菜,培育出抗性稳定的株系 *M9*,该抗性株系的突变位点是 *BnALS1* 基因的 Ser653Asp 突变^[7~9]。华中农业大学报道从油菜 EMS 突变后代群体中鉴定出几株苯磺隆抗性突变体,测序表明它们的突变位点均为 *BnALS3* 的 Pro197Ser/Leu 突变^[10]。

苯磺隆是我国麦田广泛使用的阔叶除草剂之一,属乙酰乳酸合成酶 (acetolactate synthase, ALS, EC 4.1.3.18) 抑制剂类除草剂家族,内吸传导型,能被植物叶片和根系吸收,可阻断底物进入 ALS 酶活性位点通路而抑制酶活性。该类除草剂具有杀草谱广、活性高、选择性强,对哺乳动物毒性低等优点^[11],是世界上使用最多的一类除草剂^[12]。研究表明,乙酰乳酸合成酶 (ALS),也叫乙酰羟基酸合酶 (acetoxyacid synthase, AHAS, EC 2.2.1.6) 是磺酰脲类除草剂的靶标酶,它同时催化 2 个平行反应,催化两分子丙酮酸缩合形成 2-乙酰乳酸并释放出 CO₂,最终生成缬氨酸和亮氨酸;催化一分子丙酮酸和一分子 2-氧丁酸缩合形成乙酰羟基丁酸,最终生成异亮氨酸^[13]。由于 ALS 抑制剂类除草剂对植物 ALS 酶的抑制,使支链氨基酸—亮氨酸、异亮氨酸与缬氨酸的生物合成受阻,导致蛋白质合成停止,最终植株死亡^[14]。植物典型的中毒症状为:叶片失绿或变紫,节间缩短,顶芽死亡,最终全株死亡。此外,α-丁酮酸的累积及光合产物转运系统的崩溃等也是引起植物死亡的重要原因^[15]。

目前,我国油菜田杂草防除采取的主要措施是播后苗前利用乙草胺等进行封闭除草。适于苗期防除油菜田阔叶杂草的除草剂种类较少^[1,16],只有草

除灵和二氯吡啶酸。苯磺隆是我国麦田广泛使用的阔叶除草剂,如能选育出抗苯磺隆的油菜品种,将苯磺隆和现有油菜田单子叶除草剂混合使用,可为油菜田杂草的有效防除提供一条新的途径。本课题组从油菜中双 9 号的 EMS 突变的 M₂ 群体 2 558 个株系中筛选得到 3 株苯磺隆抗性突变体^[17]。本研究将以该 3 株苯磺隆抗性突变体为材料,对其 *ALS* 基因进行克隆测序,以期揭示其 *ALS* 基因的序列变化情况;并开发检测抗性位点的 SNP 标记,为我国油菜苯磺隆抗性育种提供理论和技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

3 株苯磺隆抗性油菜 (*Brassica napus* L.) 突变体,分别记为 K1、K4、K5,它们是中双 9 号油菜经 EMS 处理得到的 2 558 个 M₂ 株系用苯磺隆溶液筛选得到的^[17],以及中双 9 号、中双 7 号、中双 11 号、SH11、秦油三号、新型甘蓝型油菜和 Dalibor。上述材料均由西北农林科技大学油菜研究中心提供。

Ex Tap 酶、dNTP Mixture、10 × Ex Tap Buffer 由大连宝生物 TaKaRa 公司生产;6 × DNA Loading buffer、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、DH5α 大肠杆菌感受态细胞购自天根生化科技有限公司(北京);PMD 19-T Vector 购自 TaKaRa 公司。引物 BnALS1-F1/R1、BnALS2-F1/R1 和 BnALS3-F1/R1 序列参见文献^[7]。引物和测序均由上海立菲生物技术有限公司完成。75% 苯磺隆水分散粒剂由陕西上格之路生物科学有限公司生产。

1.2 M₂ 处理方法

2012 年 10 月 17 日,油菜 5 叶期,喷施 2mg ai/L × 300L/hm² (active ingredient, ai) 苯磺隆溶液筛选油菜抗苯磺隆突变体^[18]。2012 年 11 月 1 日,对初次筛选得到的抗性突变株再次喷施苯磺隆溶液 (2mg ai/L × 20mL/株),进行抗性重复鉴定。

1.3 M₃ 处理方法

2013 年 10 月 29 日,油菜 4~5 叶期,对上年获得的油菜苯磺隆抗性突变株系(来自 K4、K5 单株自交后代)喷 6mg ai/L × 300L/hm² 苯磺隆溶液。

1.4 ALS 基因克隆

油菜叶片全基因组 DNA 采用 CTAB 法提取^[19]。利用胡茂龙等^[7]设计的 3 对引物 BnALS1-F1/R1、BnALS2-F1/R1 和 BnALS3-F1/R1 分别扩增中双 9 号、K1、K4、K5 材料的 *ALS1*、*ALS2* 和 *ALS3* 基因。PCR 反应体系:模板 DNA 2.0μL, Ex Taq (5U/μL) 0.15μL, 10 × Ex Taq Buffer 2.0μL, 上下游

引物 (10 μ mol/L) 各 0.75 μ L, ddH₂O 补足 20 μ L。PCR 循环参数:94 $^{\circ}$ C 预变性 5min;94 $^{\circ}$ C 变性 40s, 57 $^{\circ}$ C 退火 40s,72 $^{\circ}$ C 延伸 2.5min,34 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。PCR 扩增产物经 1.0% (m/V) 琼脂糖凝胶电泳分离,然后将目的条带切下,用离心柱型琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒(天根)回收纯化(具体步骤参照试剂盒内说明书)。回收产物经 PMD 19-T Vector 连接、DH5 α 大肠杆菌感受态转化、蓝白斑筛选、菌落 PCR 鉴定克隆后,每个样品每个基因分别随机选取 3~5 个阳性克隆送至公司测序。

1.5 基因突变位点特异分子标记的开发

1.5.1 特异性引物设计 特异性引物的 3'末端与

SNP 位点对应的等位碱基完全匹配,需要人为地在 3 末端的倒数第 3 位或第 4 位引入 1 个错配碱基。理论上每个位置应该引入 3 种错配碱基以获得多态性标记,但 Zhang^[20,21]、Hayashi^[24] 和胡茂龙等^[8] 研究表明,在特异性引物 3'末端的倒数第 3 位引入 C/A 类型错配的引物特异性较高,所以本试验只设计了此种类型错配的引物(表 1)。另外,由于 ALS1 和 ALS3 基因的序列相似度高达 98%,所以公用引物锚定在 ALS1 和 ALS3 基因核苷酸序列的 4 个 SNP 位点上。理论上,若样品中的 SNP 位点与特异性引物的 3'末端相匹配,便能进行有效 PCR 扩增,反之则不能进行有效的 PCR 扩增。

表 1 检测抗性基因 SNP 位点的 AS-PCR 引物
Table 1 AS-PCR primers for assaying single nucleotide polymorphism of herbicide-resistant genes

引物名称 Primer name	引物序列(5'→3') Sequence	位置 Location	GenBank	目的片段/bp Expected size	适宜退火温度/ $^{\circ}$ C Annealing
M-ALS1-F1	TGTCGCCATTACAGGACAGG <u>ACT</u>	3 030 ~ 3 052	Z11524	604	67.4
M-ALS1-F2	TGTCGCCATTACAGGACAGG <u>CCT</u>	3 030 ~ 3 052	Z11524	604	-
NM-ALS1-F3	TGTCGCCATTACAGGACAGG <u>ACC</u>	3 030 ~ 3 052	Z11524	604	67.0
NM-ALS1-F4	TGTCGCCATTACAGGACAGG <u>CCC</u>	3 030 ~ 3 052	Z11524	604	-
M-ALS1-R1	TTTAGCCCTGCTAGCGAAAG	3 614 ~ 3 633	Z11524	604	-
M-ALS3-F5	CGTCGCCATCACAGGACAGG <u>ACT</u>	770 ~ 792	Z11526	604	66.2
M-ALS3-F6	CGTCGCCATCACAGGACAGG <u>CVCT</u>	770 ~ 792	Z11526	604	68.0
NM-ALS3-F7	CGTCGCCATCACAGGACAGG <u>ACC</u>	770 ~ 792	Z11526	604	68.4
NM-ALS3-F8	CGTCGCCATCACAGGACAGG <u>CCC</u>	770 ~ 792	Z11526	604	67.0
M-ALS3-R2	CTTAGCCCTGCTCGCAAACG	1 354 ~ 1 373	Z11526	604	-

注:M-ALS1-R1 为公用引物,它分别与 M-ALS1-F1、M-ALS1-F2、NM-ALS1-F3、NM-ALS1-F4 组成四对引物进行鉴定;M-ALS3-R2 为公用引物,分别与 M-ALS3-F5、M-ALS3-F6、NM-ALS3-F7、NM-ALS3-F8 组成 4 对引物进行鉴定。3'末端引入了 C/A 错配(下划线)
Note:M-ALS1-R1;common primer, combined with M-ALS1-F1, M-ALS1-F2, NM-ALS1-F3, NM-ALS1-F4 resulting in 4-pair primers. M-ALS3-R2;common primer, combined with M-ALS3-F5, M-ALS3-F6, NM-ALS3-F7, NM-ALS3-F8 resulting in 4-pair primers. C/A mismatches were underlined at the 3'-terminals

1.5.2 AS-PCR 反应体系 PCR 反应体系为模板 DNA 2 μ L, Ex Taq (5U/ μ L) 0.15 μ L, 10 $\times$ Ex Taq Buffer 2 μ L, 上下游引物 (10 μ mol/L) 各 0.75 μ L, ddH₂O 补足 20 μ L。PCR 循环参数:94 $^{\circ}$ C 预变性 5min;94 $^{\circ}$ C 变性 30s,退火 30s(不同引物的退火温度见表 3),72 $^{\circ}$ C 延伸 1min,35 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 5min。PCR 扩增采用 C1000TM Thermal Cycler。

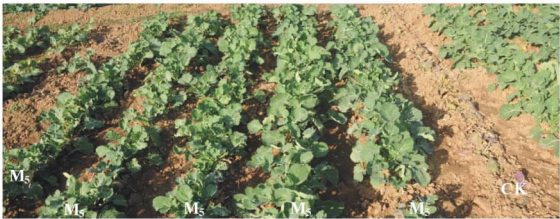
1.5.3 AS-PCR 产物分析及验证 扩增产物经 1.2% (m/V) 的琼脂糖凝胶上电泳,溴化乙锭染色,凝胶成像系统下观察、照相。用筛选获得的多态性标记引物在抗性油菜和野生型品种中进行 AS-PCR 扩增、切胶回收、克隆、产物测序。

2 结果与分析

2.1 油菜苯磺隆抗性突变体的筛选

前期利用 1.0% 的 EMS(甲基磺酸乙酯)溶液处理中双 9 号油菜干种子,创建了包括子叶、叶片、花

器、株型、角果等多器官变异类型的突变体库^[18]。2012 年 10 月 17 日,油菜 5 叶期,继续对 2 558 个 M₂ 株系(大约 3 万株个体)叶面喷施 2.0mg ai/L $\times$ 300L/hm² 的苯磺隆溶液,筛选抗苯磺隆的突变体。2012 年 11 月 1 日,对初次筛选得到的抗性突变株 M₅ 后代再次喷施苯磺隆(2.0mg ai/L $\times$ 20mL/株),重复鉴定(图 1)。最终筛选到 3 株苯磺隆抗性突变体,分别记为 K1、K4 和 K5,突变率约为 10⁻⁴。



注:图中 CK 为中双 9 号油菜,其它为 M₅ 后代材料
Note:CK;Zhongshuang 9. The other lines are M₅ progeny of the mutant
图 1 喷施除草剂苯磺隆溶液后突变体的 M₅ 后代的抗性表现
Fig. 1 Performance of progeny of M₅ mutants treated with tribenuron-methyl solution

2.2 ALS 基因分析

利用 *BnALS1* - F1/*BnALS1* - R1、*BnALS2* - F1/*BnALS2* - R1、*BnALS3* - F1/*BnALS3* - R1 三对引物(表1),分别扩增3株苯磺隆抗性突变体(K1、K4、K5)和中双9号油菜中*BnALS1*、*BnALS2*、*BnALS3*基因。PCR扩增结果(图2)显示,扩增条带清晰、条带大小与预期目标条带大小一致。对扩增目标条带进行回收、克隆和测序。结果表明,中双9号、K1、K4的*BnALS1*编码区序列(GenBank: KM816810; KP985782; KP985784)与已报道的*BnALS1*(GenBank: Z11524.1)编码区序列完全相同。K5的*BnALS1*(GenBank: KP985786)第+544位C→T(*C*₅₄₄CT→TCT),导致所编码的*BnALS1*蛋白+182位Pro→Ser,对应于拟南芥ALS蛋白Pro197→Ser。

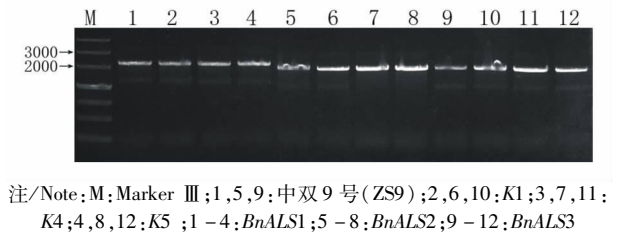


图2 *BnALS1* - 3 基因扩增结果

Fig. 2 PCR amplification of *BnALS1* - 3 genes

中双9号、K1、K4和K5的*BnALS2*编码区序列与已报道的*ALS2*(GenBank: Z11525.1)编码区序列完全相同,没有突变位点。

与已报道的*BnALS3*(GenBank: Z11526.1)编码区序列相比(表2):中双9号和K5的*BnALS3*(GenBank: KM816812; KP985787)存在5个SNP位点,其中4个为同义突变,另1个为错义突变(+975位G→C,即GAG₉₇₅→GAC),使编码的谷氨酸E(GAG)突变为天冬氨酸D(GAC);K1和K4*BnALS3*(GenBank: KP985783; KP985785)存在5个SNP位点,第+535位C→T(*C*₅₃₅CT→TCT),导致所编码的*BnALS3*蛋白+182位Pro→Ser,对应于拟南芥ALS蛋白Pro197→Ser。

2.3 *BnALS1* 和 *BnALS3* 基因特异分子标记的开发及验证

根据K1、K4和K5三个突变体*BnALS1*和*BnALS3*基因中检测到的SNP位点,我们设计了8对AS-PCR引物组合(表1)。利用这8对引物对中双9号、K1、K4、K5进行PCR分析,结果除M-ALS1-F2/M-ALS1-R1和M-ALS1-F4/M-ALS1-R1两对引物外,其它6对引物均获得了预期扩增结果。

表2 *BnALS3* SNP 位点及编码氨基酸

Table 2 Single nucleotide polymorphisms in *BnALS3* genes and their encoding proteins

SNP 位置	SNP location	Z11526.1	中双9号 Zhongshuang 9	K5	K1	K4
135		A	<i>T</i>	<i>T</i>	<i>T</i>	<i>T</i>
312		C	<i>T</i>	<i>T</i>	<i>T</i>	<i>T</i>
535		C(P)	C(P)	C(P)	<i>T</i> (S)	<i>T</i> (S)
660		A	<i>T</i>	<i>T</i>	<i>T</i>	<i>T</i>
816		C	<i>T</i>	<i>T</i>	<i>T</i>	<i>T</i>
975		G(E)	<i>C</i> (D)	<i>C</i> (D)	<i>C</i> (D)	<i>C</i> (D)

注:SNP用斜体表示,括弧内字母表示错义突变
Note:Single nucleotide polymorphisms showed by italic letters, and missense mutations by letters in parentheses

K5突变体的AS-PCR检测结果如下:当退火温度介于60~66.5℃时,引物对M-ALS1-F1/M-ALS1-R1在K5和中双9号均有目的条带扩增;当退火温度上升至67℃时可以区分出两个材料中的SNP类型,但结果不甚稳定;退火温度上升至67.4℃时,K5有明显扩增条带,而中双9号无扩增条带。可见,M-ALS1-F1/M-ALS1-R1为区分突变体K5和野生型中双9号*BnALS1*第+544位C→T(*C*₅₄₄CT→TCT)的阳性标记,其退火温度为67.4℃。引物对NM-ALS1-F3/M-ALS1-R1,为检测K5*BnALS1*第+544位C→T的阴性标记,其退火温度为67.0℃,在此条件下,中双9号有目标条带,K5无扩增产物。

利用M-ALS1-F1/M-ALS1-R1、NM-

ALS1-F3/M-ALS1-R1对K5和中双9号等9个油菜品种(系)进行PCR扩增,结果M-ALS1-F1/M-ALS1-R1仅在K5中有目的条带扩增,其他材料均没有条带;NM-ALS1-F3/M-ALS1-R1除K5外,其余7个油菜材料中均扩增出目标条带(图3)。说明M-ALS1-F1/M-ALS1-R1、NM-ALS1-F3/M-ALS1-R1能有效检测*BnALS1*+544位上C→T突变。

K1和K4突变体的AS-PCR检测结果如下:引物对M-ALS3-F5/M-ALS3-R2和M-ALS3-F6/M-ALS3-R2为检测K1、K4*BnALS3*第+535位C→T(*C*₅₃₅CT→TCT)的阳性标记,M-ALS3-F5/M-ALS3-R2的退火温度为66.2℃,M-ALS3-F6/M-ALS3-R2的退火温度为68.0℃。引物

对 NM - ALS3 - F7/M - ALS3 - R2 和 NM - ALS3 - F8/M - ALS3 - R2 为检测 K1、K4 *BnALS3* 第 + 535 位 C→T 的阴性标记, NM - ALS3 - F7/M - ALS3 - R2 的退火温度为 68. 4℃, NM - ALS3 - F8/M - ALS3 - R2 的退火温度为 67. 0℃。

利用 M - ALS3 - F5/M - ALS3 - R2、M - ALS3 - F6/M - ALS3 - R2、NM - ALS3 - F7/M - ALS3 - R2、NM - ALS3 - F8/M - ALS3 - R2 四对引物对 K1、K4, 和中双 9 号等 9 个油菜品种(系)进行 PCR

扩增, 结果 M - ALS3 - F5/M - ALS3 - R2、M - ALS3 - F6/M - ALS3 - R2 仅 K1、K4 有目的条带扩增, 其它 7 个材料均没有条带。引物 M - ALS3 - F7/M - ALS3 - R2、NM - ALS3 - F8/M - ALS3 - R2 除 K1、K4 外, 其余 7 个材料均有目的条带扩增(图 4)。说明引物 M - ALS3 - F5/M - ALS3 - R2、M - ALS3 - F6/M - ALS3 - R2、NM - ALS3 - F7/M - ALS3 - R2、NM - ALS3 - F8/M - ALS3 - R2 能有效检测 *BnALS3* 上 C₅₃₅→T 突变。

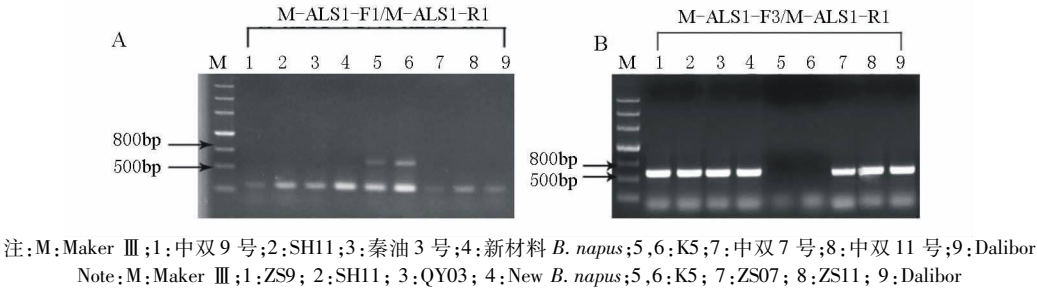


图 3 *BnALS1* 基因 AS - PCR 引物的扩增

Fig. 3 Development of allele specific PCR - polymerase chain reaction primers for *BnALS1*

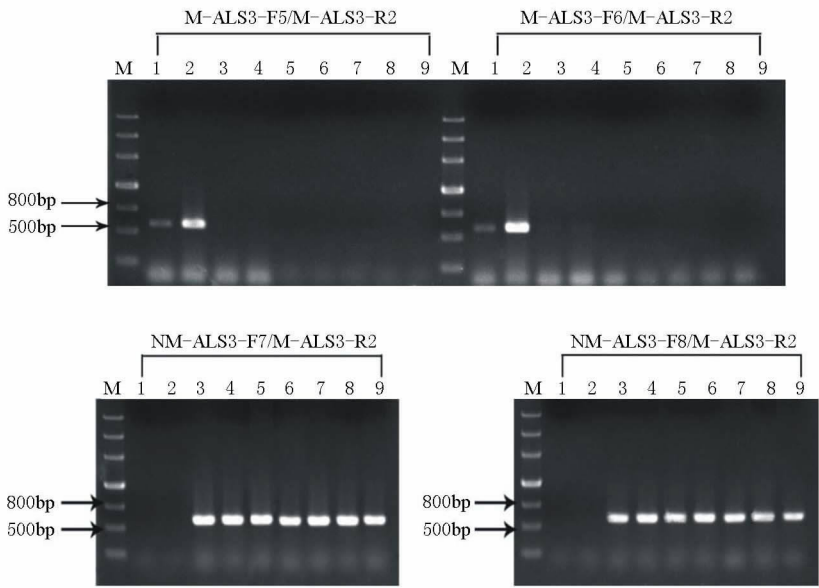


图 4 *BnALS3* 基因 AS - PCR 引物的扩增

Fig. 4 Development of allele specific PCR - polymerase chain reaction primers for *BnALS3*

3 讨论

以往报道的对 ALS 抑制剂类除草剂有贡献的抗性位点主要为 Ala122, Pro197, Ala205, Asp376, Trp574 和 Ser653 (以拟南芥 ALS 氨基酸序列为参照)^[5, 23]。油菜中, Swanson 等^[3]采用小孢子诱变获得抗咪唑啉酮类除草剂的油菜突变体 PM1 和 PM2, 其中 PM1 是 *BnALS1* 基因突变导致 *BnALS1* 蛋白的

Ser653Asp 改变, PM2 是 *BnALS3* 基因突变导致 *BnALS3* 蛋白的 Trp574Leu 改变^[4, 5]。我国江苏省农业科学院报道的抗咪唑啉酮油菜株系 M9 的突变位点也是 *BnALS1* 的 Ser653Asp 改变^[7~9]。华中农业大学报道从华双 5 号油菜 EMS 突变后代群体中鉴定出几株苯磺隆抗性突变体, 其突变位点均为 *BnALS3* 基因突变导致 *BnALS3* 的 Pro197Ser/Leu 改变^[10]。本研究中, 通过对中双 9 号油菜 EMS 突变

体库 2 558 个 M₂ 株系约 30 000 个单株进行苯磺隆抗性鉴定,筛选到 3 株抗性突变体(分别记为 K1、K4、K5)。通过对这 3 株抗性油菜的 *BnALS1* - 3 的克隆测序表明,K1 和 K4 的 *BnALS3* 第 +535 位 C→T,导致所编码的 *BnALS3* 的 Pro197Ser 改变;K5 的 *BnALS1* 第 +544 位 C→T,导致所编码 *BnALS1* 的 Pro197Ser 改变(*BnALS1*, *BnALS3* 均以拟南芥 *ALS* 氨基酸序列为准)。K1、K4 的抗性位点与 Li 等^[10]报道的一致;K5 的抗性位点 *BnALS1*: Pro197Ser 改变属于首次报道。这些除草剂抗性材料的发现及创制,将会极大地促进我国具有自主知识产权的抗除草剂油菜品种的选育。

乙酰乳酸合成酶(*ALS*)是磺酰脲类除草剂的靶标酶,目前已报道的该酶对磺酰脲类除草剂产生抗性的位点主要有 3 个,分别是 Pro197、Ala205 和 Trp574。截止目前,根据美国除草剂抗性委员会(Herbicide Resistance Action Committee, HRAC; <http://www.weedscience.org>)报道的 8 大类(Ala122, Pro197, Ala205, Asp376, Arg377, Trp574, Ser653, Gly654)共 128 例 *ALS* 氨基酸变化产生的抗性杂草中,Pro197 突变的有 72 例,占 56.25%。这 72 例中,除 1 例未鉴定外,有 71 例均是对 SU 类除草剂产生抗性;其中对 IMI 和 SU 均具有抗性的有 19 例^[24]。*ALS* 第 197 位氨基酸位于该酶的第五个 α 螺旋(197 - 201 氨基酸)末端,构成该酶 α - domain 活性位点通道的入口,与磺酰脲类除草剂的芳香环接触^[25,26]。该位置 Pro 在植物中高度保守^[10],该位置氨基酸种类的变化将导致除草剂抗性^[27~30]。本研究获得的 3 株苯磺隆抗性突变体也全是 Pro197Ser 改变,K1 和 K4 的 *BnALS3* 的 Pro197Ser 改变,K5 的 *BnALS1* 的 Pro197Ser 改变。*BnALS1* 和 *BnALS3* 的 Pro197Ser 改变其抗性是否存在差异,二者是否具有叠加效应;以及该突变材料是否对其他 *ALS* 抑制剂类除草剂具有抗性值得进一步深入研究。

等位基因特异 PCR(allele - specific PCR, AS - PCR)是基于等位基因的 SNP 设计特异引物,通过 PCR 扩增来检测样本基因型的一种鉴定方法。该方法不受季节和时间限制,具有快速、高效的优点。Kadaru 等^[31]在水稻、Lee 等^[32]在大麦中获得了检测抗咪唑啉酮基因的 AS - PCR 标记。胡茂龙等^[8]开发了检测抗咪唑啉酮类除草剂油菜 M9 中 *BnALS1R* 基因突变的 AS - PCR 标记。本研究中,我们成功开发出了 6 对检测 *BnALS* 基因的 AS - PCR 标记,其中检测 *BnALS1* + 544 位上 C→T 突变的引物 2 对;检

测 *BnALS3* + 535 位上 C→T 突变的引物 4 对。本研究结果进一步丰富了除草剂抗性油菜种质资源,为我国油菜抗除草剂育种奠定了物质基础与技术储备。

苯磺隆是我国麦田广泛使用的阔叶除草剂之一,基于本研究及前人报道的苯磺隆抗性资源^[10]选育出抗性油菜品种,将苯磺隆和现有油菜田单子叶除草剂混合使用,可为油菜田杂草的有效防除提供一条新的途径。

参考文献:

- [1] Krato C, Petersen J. Gene flow between imidazolinone - tolerant and susceptible winter oilseed rape varieties[J]. *Weed Res*, 2012, 52(2): 187 - 196.
- [2] 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 Rep*, 1988, 7(2): 83 - 87.
- [3] Swanson E B, Hergesell M J, Arnoldo M, et al. Microspore mutagenesis and selection: canola plants with field tolerance to the imidazolinones[J]. *Theor Appl Genet*, 1989, 78(4): 525 - 530.
- [4] Hattori J, Brown D, Mourad G, et al. An acetohydroxy acid synthase mutant reveals a single - site involved in multiple herbicide resistance[J]. *Mol Gen Genet*, 1995, 24(6): 419 - 425.
- [5] Tan S, Evans R R, Dahmer M L, et al. Imidazolinone - tolerant crops: history, current status and future[J]. *Pest Manag Sci*, 2005, 61: 246 - 257.
- [6] Magha M I, Guerche P, Bregeon M, et al. Characterization of a spontaneous rapeseed mutant tolerant to sulfonlurea and imidazolinone herbicides[J]. *Plant Breeding*, 1993, 111(2): 132 - 141.
- [7] 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): 4 326 - 4 334.
- [8] 胡茂龙, 龙卫华, 高建芹, 等. 油菜抗咪唑啉酮类除草剂基因 *BnALS1R* 等位基因特异 PCR 标记的开发与应用[J]. *作物学报*, 2013, 39(10): 1 711 - 1 719.
- [9] 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]. *Mol Breeding*, 2015, 35: 1 - 13.
- [10] 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]. *Theor Appl*

- Genet,2015,128(1):107–118.
- [11] Mazur B J, Falco S C. The development of herbicide resistant crops[J]. Annu Rev Plant Biol,1989,40(1):441–470.
- [12] Tranel P J, Wright T R. Resistance of weeds to ALS – inhibiting herbicides: what have we learned [J]. Weed Sci,2002,50(6):700–712.
- [13] Chen H, Saksa K, Zhao F Y, et al. Genetic analysis of pathway regulation for enhancing branched – chain amino acid biosynthesis in plants[J]. Plant J,2010,63:573–583.
- [14] 苏少泉. 乙酰乳酸合成酶抑制型除草剂抗性作物的创制与发展[J]. 世界农药,2011,33(3):1–5.
- [15] Shaner D L. Physiological effects of the imidazolinone herbicides [J]. The Imidazolinone Herbicides, 1991, 129–138.
- [16] 张宏军,刘 学,张 佳,等. 我国油菜田除草剂登记和使用情况[J]. 科技创新导报,2008,15:252–253.
- [17] 曲高平. 甘蓝型油菜 EMS 突变体库的构建及抗除草剂新种质的创制 [D]. 杨凌:西北农林科技大学,2014.
- [18] 信晓阳,曲高平,张 荣,等. 不同品种油菜对苯磺隆耐药性差异鉴定[J]. 西北农业学报,2014,23(7):68–74.
- [19] Edwards K, Johnstone C, Thompson C. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis[J]. Nucleic Acids Res,1991,19(6):1349.
- [20] Zhang N Y, Linscombe S, Oard J. Out – crossing frequency and genetic analysis of hybrids between transgenic glufosinate herbicide – resistant rice and the weed, red rice[J]. Euphytica,2003,130(1):35–45.
- [21] Zhang W, Gianibelli M C, Ma W, et al. Identification of SNPs and development of allele – specific PCR markers for gliadin alleles in *Triticum aestivum* [J]. Theor Appl Genet,2003,107(1):130–138.
- [22] Hayashi K, Hashimoto N, Daigen M, et al. Development of PCR – based SNP markers for rice blast resistance genes at the Piz locus [J]. Theor Appl Genet, 2004,108:1212–1220.
- [23] Heap I. The international survey of herbicide resistant weeds [OL]. [http://www. weedscience. org](http://www.weedscience.org). (2013. 02).
- [24] Tranel P J, Wright T R, Heap I M. Mutations in herbicide – resistant weeds to ALS inhibitors [OL]. [http://www. weedscience. com](http://www.weedscience.com). (2015. 09. 03).
- [25] Duggleby R G, McCourt J A, Guddat L W. Structure and mechanism of inhibition of plant acetohydroxy acid synthase [J]. Plant Physiol Bioch,2008,46(3):309–324.
- [26] 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.
- [27] Haughn G W, Smith J, Mazur B, et al. Transformation with a mutant Arabidopsis acetolactate synthase gene renders tobacco resistant to sulfonylurea herbicides [J]. Mol Gen Genet,1988,211:266–271.
- [28] Ghio C, Ramos M L, Altieri E, et al. Molecular characterization of ALS1, an acetohydroxyacid synthase mutation conferring resistance to sulfonylurea herbicides in soybean [J]. Theor Appl Genet,2013,126:2957–2968.
- [29] Cui H L, Zhang C X, Wei S H, et al. Acetolactate synthase gene proline (197) mutations confer tribenuron – methyl resistance in flaxweed (*Descurainia sophia*) populations from China [J]. Weed Sci,2011,59:376–379.
- [30] Sibony M, Michel A, Haas H U, et al. Sulfometuron – resistant *Amaranthus retroflexus*; cross – resistance and molecular basis for resistance to acetolactate synthase – inhibiting herbicides [J]. Weed Res, 2001, 41: 509–522.
- [31] Kadaru S, Zhang W Q, Yadav A, et al. Development and application of allele – specific PCR assays for imazethapyr resistance in rice (*Oryza sativa*) [J]. Euphytica,2008,160:431–438.
- [32] Lee H, Sachin R, Neeraj K, et al. Single nucleotide mutation in the barley acetohydroxy acid synthase (AHAS) gene confers resistance to imidazoline herbicides [J]. Proc Natl Acad Sci USA,2011,108:8909–8913.

(责任编辑:郭学兰)