

菜豆抗草甘膦基因 SSR 分子标记的研究

张俐俐^{1,2}, 陶波¹

(1. 东北农业大学, 黑龙江 哈尔滨 150030 2. 黑龙江省农业科学院 生物技术研究所, 黑龙江 哈尔滨 150086)

摘要: 利用抗草甘膦亲本 89-05-3 与敏感草甘膦亲本 89-13 杂交后获得 F₂ 代群体, 采用 BSA 法, 以上述 F₂ 代为定位群体, 利用抗、感亲本和抗、感池筛选 10 对 SSR 引物。结果表明: 3 对引物 BM143、BM156、BM164 均能在抗、感池间扩增出多态性条带, 用 Mapmaker 3.0 软件作图, 将该抗草甘膦基因初步定位在引物 BM156 和 BM164 之间, 遗传距离分别为 3.3 cM 和 4.4 cM, 并暂命名为 EPS2。该研究结果为菜豆抗性育种以及抗草甘膦基因的精细定位和图位克隆奠定了基础。

关键词: 菜豆; 抗草甘膦基因; SSR

中图分类号: S 481⁺.9; S 643 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2009)10-0062-03

国外的耐草甘膦基因是从菌中分离提纯出来的, 将其导入几种主要作物后获得转基因(GM)作物品种^[1]。从 1996 年种植 GM 作物以来, 每年的种植面积以两位数的百分比增长, 其被接受的速度非常惊人。根据农业生物技术应用国际服务组织 (ISAAA) 估计: 2008 年全球转基因作物的种植面积达到 1.25 亿 hm², 至此, 过去 13 a 来转基因作物的累计种植总面积达到了 7.016 亿 hm²。

美国 Monsanto 等公司在植物抗草甘膦基因工程方面已申请了数 10 份专利, 获得转基因抗草甘膦大豆、玉米、油菜、甜菜和棉花等作物系列品种, 而我国迄今尚未见具有自主知识产权且效果明显的抗草甘膦基因, 及抗草甘膦作物成功商业化的报道。考虑到环境及生物安全性的诸多因素^[2-3], 为此, 寻找、利用天然耐草甘膦的作物或植物都具有重要的现实意义和应用价值。该研究将对天然抗草甘膦的菜豆品系进行深入的分子水平研究, 针对菜豆自身存在的耐草甘膦基因进行筛选、分子标记及基因定位, 为下一步克隆出具有自主知识产权的基因打下基础, 并可以进行耐草甘膦基因分子标记的辅助育种。因此, 耐草甘膦种质资源的创新、耐草甘膦基

因的遗传规律及分子标记的研究, 对菜豆耐草甘膦育种、菜豆生产及耐草甘膦育种材料的丰富及培育出安全耐草甘膦作物品种等都具有重要的现实意义。

1 材料与方法

1.1 试验材料

母本(抗草甘膦菜豆品系): 89-05-3 和父本(敏感草甘膦菜豆品系): 89-13; 群体: 89-05-3/89-13 组合的 F₂ 群体 159 单株, 作为该试验的供试分离群体。

1.2 试验方法

1.2.1 田间试验 2007 年在东北农业大学试验农场(香坊农场)内种植抗草甘膦亲本 89-05-3 和感草甘膦亲本 89-13, 进行人工杂交试验; 当年冬季进行南繁, 种植亲本和杂交 F₁, 去杂提纯, 成熟后按单株收获。2008 年 5 月下旬播种所收的 F₂ 种子于香坊试验农场, 7 月初采取单株幼嫩叶片, 提取 DNA, 用作分子标记筛选。7 月中旬进行杂交群体植株抗草甘膦鉴定。

1.2.2 抗草甘膦鉴定试验 抗草甘膦鉴定试验采用田间喷洒草甘膦方法。当亲本及 F₂ 代植株幼苗生长至具有 7~8 展开叶(3 叶期)时, 进行田间喷洒草甘膦鉴定, 鉴定浓度为 1.1 ai ° kg/hm²; 喷洒草甘膦后进行田间调查, 当敏感亲本植株完全死亡时, 记载各植株表型鉴定的情况。

1.2.3 菜豆基因组 DNA 的提取 将 159 个 F₂ 单株作为定位群体, 利用优化的 CTAB 法提取各单株叶片总 DNA。同时采用 Michelmore 等提出的分离群体分组分析法(Bulked segregant analysis, 简称 BSA 法)^[4], 根据田间抗性鉴定结果, 分别从抗、感群体中随机选取 10 个单株 DNA 等量混合, 建立抗、感池。

1.2.4 SSR 分析 SSR 分析在六一仪器厂的电泳仪上进行, 筛选来自菜豆 SSR 引物 94 对, PCR 反应使用

第一作者简介: 张俐俐(1980), 女, 黑龙江省海伦人, 在读硕士, 研究实习员, 现从事生物技术及分子育种研究工作。E-mail: zll20041001@163.com。

通讯作者: 陶波(1963-), 男, 黑龙江省望奎人, 博士, 教授, 现主要从事农药学和抗除草剂转基因植物安全性方面的研究工作, 现为黑龙江省农药学重点学科带头人, 黑龙江省植保学会副秘书长, 中国农业技术推广协会作物化学调控专业委员会委员, 中国植保学会杂草分会理事。E-mail: botao@163.com。

基金项目: 黑龙江省农业科学院 2006 年度重点研究资助项目。

收稿日期: 2009-05-02

PTC-200型扩增仪(美国 MJ 公司)。PCR 扩增体系为 25 μ L, 其中 buffer 2.5 μ L, dNTP 2 μ L, Taq 酶 0.15 μ L, DNA 2 μ L, primer 2.0 μ L, H₂O 16.35 μ L; 扩增程序为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 随后 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 50 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 共循环 30 次, 最后在 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。PCR 扩增产物用 6% 聚丙烯酰胺凝胶在 100W 恒功率下电泳 1~2 h。电泳后将平板放入 10% 冰醋酸溶液中固定 20~30 min, 水洗 3 次, 每次 2 min, 银染 20~30 min, 冲洗后的玻璃板迅速放入在 4 $^{\circ}$ C 条件下预冷的 3% 碳酸钠溶液中显影, 定影 3~5 min, 水洗 3 min, 待干燥后照相。

1.2.5 连锁分析及遗传距离估算 依据 F₂ 定位群体的分子标记及其所得种子的抗草甘膦鉴定结果的分离数据, 用 Mapmaker 3.0 计算各个标记与抗草甘膦基因之间的遗传距离(cM)。

2 结果与分析

2.1 与抗草甘膦基因连锁的分子标记

在亲本间筛选有多态性的 94 对 SSR 引物中, 有 3 对 SSR 引物 BM143、BM156、BM164, 在抗感池能够扩增出多态性条带, 经 Mapmaker 3.0 分析表明该特异带与抗草甘膦基因连锁。

图 1 为引物 BM143 在亲本和部分 F₂ 单株中的扩增产物, 1~8 泳道为抗性群体, 其中 4、6、7、8 泳道带型与敏感亲本带型相同, 9~16 泳道为敏感群体, 而 10 泳道则与抗性亲本带型一直。



图 1 引物 BM143 在亲本和部分 F₂ 单株中的扩增产物

注: Pr、Ps 为抗亲、感亲; 1~16 为部分 F₂ 单株

Fig.1 The amplified products of parent and part of F₂ plants by BM143 primer

Note: Pr、Ps represent resistant parent and susceptible parent, respectively; 1~16 for part of F₂ plants.

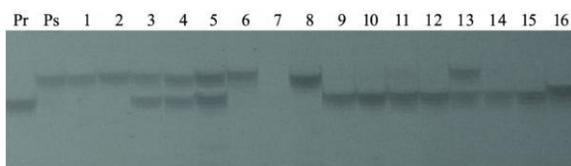


图 2 引物 BM156 在亲本和部分 F₂ 单株中的扩增产物

注: Pr、Ps 为抗亲、感亲; 1~16 为部分 F₂ 单株

Fig.2 The amplified products of parent and part of F₂ plants by BM156 primer

Note: Pr、Ps represent resistant parent and susceptible parent, respectively; 1~16 for part of F₂ plants.

图 2 为引物 BM156 在亲本和部分 F₂ 单株中的扩增结果 1、2、6、8 泳道带型与感亲相同, 9、10、11、12、14、15、16 泳道与抗亲带型一致 而 3、4、5、13 泳道则表现为杂合带型, 7 则表现为缺失。

图 3 为引物 BM164 在亲本和部分 F₂ 单株中的扩增结果, 12、14、15、16、19、20、21、22 泳道带型与抗亲相同, 3、4、5、6、7、8、9、10、11、13、17、18 泳道与感亲带型一致, 1、2 为杂合带型。

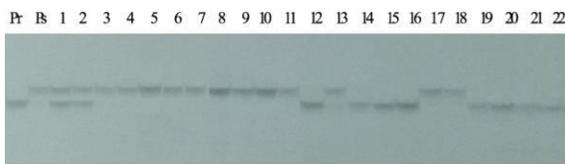


图 3 引物 BM164 在亲本和部分 F₂ 单株中的扩增产物

注: Pr、Ps 为抗亲、感亲; 1~22 为部分 F₂ 单株。

Fig.3 The amplified products of parent and part of F₂ plants by BM164 primer
Note: Pr、Ps represent resistant parent and susceptible parent, respectively; 1~22 for part of F₂ plants.

表 1 为 3 对引物在 F₂ 代的回检结果。其中引物 BM143 在 159 株 F₂ 作图群体中扩增时, 121 株抗草甘膦单株中有 43 株表现抗性亲本带型 73 株为杂合带型, 5 株表现敏感亲本带型; 而在 38 株敏感单株中有 28 株表现敏感亲本带型, 9 株表现杂合带型, 1 株表现抗草甘膦亲本带型。

引物 BM156 引物在 F₂ 作图群体扩增时, 121 株抗草甘膦单株中有 37 株表现抗性亲本带型, 77 株为杂合带型, 4 株为敏感亲本带型; 而在 38 株敏感单株中有 30 株表现敏感亲本带型, 7 株表现杂合带型。

引物 BM164 引物在 F₂ 作图群体扩增时, 121 株抗草甘膦单株中有 39 株表现抗性亲本带型, 78 株为杂合带型, 3 株为敏感亲本带型; 而在 38 株敏感单株中有 34 株表现敏感亲本带型, 4 株表现杂合带型。

表 1 89-05-3/89-13F₂ 群体草甘膦抗性与 SSR 标记的分离

Table 1 Segregation of 89-05-3/89-13 F₂ population for the stem rust resistance gene and the SSR markers

SSR 标记	表现型	标记带型 Marker genotype			单株总数
SSR maker	Resistance genotype	A	H	B	Sum
BM143	R	43	73	5	159
	S	1	9	28	
BM156	R	37	77	4	159
	S	0	7	30	
BM164	R	39	78	3	159
	S	0	4	34	

注: R 为抗性, S 为敏感, A 为抗性亲本带型 B 为敏感亲本带型 H 为杂合带型

Note: R: resistance; S: sensitive; A: resistant parental genotype; B: Sensitive parental genotype; H: heterozygous genotype.

2.2 局部遗传连锁图的构建

结合标记 BM143、BM156 和 BM164 在 159 个 89-05-3/89-13 F₂ 作图群体中扩增带型与作图群体在田间抗性鉴定的结果, 构建局部遗传连锁图(图 2), 经 Mapmaker 3.0 软件计算、分析, 可将抗草甘膦基因定位于 BM164 和 BM156 之间, 距 BM164 引物 4.4 cM, 距 BM156 引物 3.3 cM。暂将抗草甘膦基因命名为 EPSPS2。

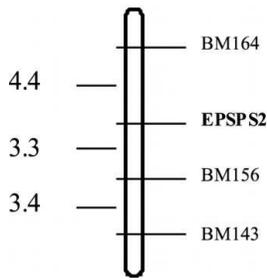


图4 抗草甘膦基因与 SSR 分子标记的遗传连锁图
Fig.4 Genetic linkage map of glyphosate resistance gene and SSR molecular markers

3 讨论

抗草甘膦基因的发现, 该研究高抗材料 89-05-3、89-09 和敏感材料 89-13、89-21 均来自对 60 份菜豆品种和品系通过田间多次喷洒草甘膦筛选而获得。此种方法与传统诱变育种相比, 目的性、定向性强, 大田突变, 性状不易改变, 仅仅是个别碱基发生错误, 是寡基因控制的抗性品系, 育种上应用起来更方便、更广泛。但随机性大、工作量大、周期长、效率低。而诱变育种方法则容易使性状发生改变, 不利于下一步分子生物学研究。如 2 种方法相结合进行筛选, 既能大大提高筛选效率、减少周期和工作量, 还能为除草剂抗性育种奠定理论和实践基础, 更有利于抗草甘膦作物品种的选育。

抗草甘膦基因的定位, 该研究利用分离群体分析 (BSA) 法, 运用 BSA 法定位的基因有棉花黄萎病抗性基因^[5]、小麦雄性不育基因^[6]、大豆灰斑病基因^[7]和小麦 T 型 GMS 的恢复基因^[8]等。

该研究所获得的与抗草甘膦基因最紧密的 SSR 标记距离分别为 6.7、4.4、3.3 cM, 而作为分子标记辅助选择的一般距离为 2~3 cM, 显然与抗草甘膦基因连锁的 SSR 标记用于分子标记辅助选择还不够理想, 仍需要进一步寻找新的更为紧密的连锁标记。另外, 菜豆基因组相对而言是十分庞大的, 并且菜豆的全基因组序列还没有测序完成。在菜豆中要想利用染色体步移克隆一个目的基因是非常困难的, 必须要找到与该基因共分离的

或连锁非常紧密的分子标记, 才有可能用于图位克隆。该研究所获得的 SSR 标记若作为染色体步移来分离抗草甘膦基因, 遗传距离太远, 还存在一定的问题。

4 结论

该研究利用亲本间有多态性的 94 对 SSR 引物, 经过三轮的筛选, 结果 3 对引物在小群体有稳定的多态性扩增, 符合要求, 分别是 BM143、BM156、BM164。经过 89-05-3/89-13 F₂ 作图群体中扩增带型与作图群体在田间抗性鉴定的结果, 利用 Mapmaker 3.0 软件进行连锁性分析, BM143、BM164 和 BM156 均与抗草甘膦基因连锁, 遗传距离分别为 6.7、4.4、3.3 cM。遗传群体中, 抗草甘膦基因位于标记 BM164 和 BM156 之间。

该研究结果为菜豆抗性育种以及抗草甘膦基因的精细定位奠定了基础, 同时有利于抗除草剂作物育种的更好开展。

参考文献

- [1] Comai L, Faciotti D, Hiatt W R, et al. Expression in plants of a mutant *aroA* gene from *Salmonella typhimurium* confers tolerance to glyphosate [J]. *Nature*, 1985(317): 741-744.
- [2] 杨崇良, 路兴波, 张君亭. 世界农业转基因生物. 产品研发及其安全性监管. 农业转基因生物及产品发展进展 [J]. *山东农业科学*, 2005(1): 68-71.
- [3] 杨崇良, 路兴波, 张君亭. 世界农业转基因生物. 产品研发及其安全性监管 III. 农业转基因生物及其产品安全评价与管理 [J]. *山东农业科学*, 2005(3): 67-70.
- [4] Mithelmore R W, Paran I, Kesseli R V. Identification of markers linked to disease resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations of the DSA [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 1991, 88: 9828-9832.
- [5] 杜威世, 杜雄明, 马峙英. 棉花黄萎病抗性基因 SSR 标记研究 [J]. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 2004, 32(3): 20-24.
- [6] 李生强, 窦秉德, 杜金昆, 等. 小麦雌性不育基因的微卫星标记定位 [J]. *淮阴师范学院学报(自然科学版)*, 2005, 4(3): 231-235.
- [7] 张文慧, 陈庆山, 杨庆凯, 等. 大豆灰斑病 1 号生理小种抗性基因的 SSR 标记分析 [J]. *大豆科学*, 2004(8): 169-173.
- [8] 张萃, 王宏英, 沈银柱, 等. 用微卫星标记定位小麦 T 型 GMS 的恢复基因 [J]. *遗传学报*, 2003, 30(5): 459-464.

Study on SSR Molecular Markers of Kidney Bean Glyphosate Resistance Gene

ZHANG Li-li^{1,2}, TAO Bo¹

(1. Northeast Agricultural University, Harbin, Heilongjiang 150030, China; 2. Biotechnology Institute Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences Harbin, Heilongjiang 150086, China)

Abstract: In this paper, F₂ generation groups were obtained by hybridization of anti-glyphosate parent 89-05-3 and sensitive glyphosate parent 89-13 hybrid, 10 pairs of SSR primers were filtered by using resistant and susceptible parents and resistant and susceptible pool on behalf of the above-mentioned F₂ as target groups with BSA law. The results showed that 3 pairs of primers BM143, BM156, BM164 can all amplified polymorphic bands between resistant and susceptible pool, using the software Mapmaker 3.0 mapping, the glyphosate resistance gene was initially located between primer BM156 and BM164, the genetic distance of 3.3 cM and 4.4 cM, and temporarily named EPSPS2. The results of this study have laid a foundation for kidney bean resistance breeding as well as fine mapping and map-based cloning of glyphosate resistance gene.

Key words: Kidney bean; Glyphosate resistance gene; SSR