

网络出版时间:2016-06-08 16:21

DOI:10.13207/j.cnki.jnwfufu.2016.07.015

网络出版地址:http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20160608.1621.030.html

芸薹属栽培种 *ALS*1-3 的克隆及序列分析

孙妍妍,曲高平,胡胜武

(西北农林科技大学 农学院,陕西 杨凌 712100)

【摘要】【目的】揭示6种芸薹属植物乙酰乳酸合成酶(ALS)基因的结构特征,为ALS酶的遗传操作和抗除草剂种质创制奠定基础。【方法】利用特异PCR方法,对甘蓝型油菜(*Brassica napus* L.)、甘蓝(*B. oleracea*)、芥菜型油菜(*B. juncea*)、白菜型油菜(*B. rapa*)、埃塞俄比亚芥(*B. carinata*)、黑芥(*B. nigra*)等6个芸薹属16份材料的ALS基因进行扩增、克隆测序及生物信息学分析。【结果】除1个*B. nigra*材料未扩增出任何产物外,其余参试材料中均有PCR扩增产物,共成功克隆了30个ALS基因(GenBank登录号为KM816807~KM816836),且克隆的基因ALS1、ALS2、ALS3均不含内含子,只有一个开放阅读框。ALS1基因开放阅读框长为1968 bp,编码655个氨基酸;ALS2基因开放阅读框长为1914 bp,编码637个氨基酸;ALS3基因开放阅读框长为1959 bp,编码652个氨基酸。参试材料中,在ALS1基因中检测到7个SNP,其中4个导致氨基酸突变;在ALS2基因中检测到3个SNP,其中2个导致氨基酸突变;在ALS3基因中检测到25个SNP,其中2个导致氨基酸突变。在3类ALS蛋白中,ALS1和ALS3遗传距离较近,与ALS2的遗传距离相对较远。ALS1基因定位于C01染色体上,ALS2和ALS3基因定位于A01染色体上。【结论】参试的6个芸薹属不同材料间ALS1、ALS2、ALS3基因序列及其编码的蛋白序列均存在差异。

【关键词】芸薹属植物;乙酰乳酸合成酶基因;基因克隆;生物信息学;基因序列分析

【中图分类号】 S503.53

【文献标志码】 A

【文章编号】 1671-9387(2016)07-0101-08

Cloning and sequence analysis of *ALS*1-3 genes from cultivated *Brassica* species

SUN Yanyan, QU Gaoping, HU Shengwu

(College of Agronomy, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: 【Objective】 This study revealed the acetolactate synthetase (ALS) genes from six *Brassica* species to lay foundation for genetic manipulation of ALS and creation of herbicide resistant materials. 【Method】 Specific PCR method was used to isolate ALS genes from 16 accessions of six *Brassica* species, including *Brassica napus* L., *B. oleracea*, *B. juncea*, *B. rapa*, *B. carinata*, and *B. nigra*. Bioinformatics and the isolated ALS genes and their encoding products were also analyzed. 【Result】 Except for one *B. nigra* accession, ALS genes from other 15 accessions were successfully amplified. In total, 30 ALS genes were cloned and their GenBank numbers (from KM816807 to KM816836) were obtained. ALS1, ALS2 and ALS3 had no introns and only one open reading frame (ORF). ORF of ALS1 was 1968 bp in length, encoding a peptide of 655 amino acids. ORF of ALS2 was 1914 bp in length, encoding a peptide of 637 amino acids. ORF of ALS3 was 1959 bp in length, encoding a peptide of 652 amino acids. Seven single nucleotide polymorphisms (SNP) were detected among ALS1, and four of them resulted in amino acid change. Three

【收稿日期】 2014-12-05

【基金项目】 现代农业产业技术体系建设专项(CARS-13);“十一五”国家科技支撑计划项目(2010BAD01B02)

【作者简介】 孙妍妍(1988—),女,吉林长春人,在读硕士,主要从事油菜遗传育种研究。E-mail:15929800833@163.com

【通信作者】 胡胜武(1966—),男,陕西柞水人,教授,博士生导师,主要从事油菜遗传育种研究。

E-mail:swhu83251@nwsuaf.edu.cn

SNPs were detected among *ALS2*, and two of them resulted in amino acid change. Twenty-five SNPs were detected among *ALS3*, and two of them resulted in amino acid change. Genetic distance between *ALS1* and *ALS3* was relatively closer than that with *ALS2*. *ALS1* was located in C01 chromosome, while *ALS2* and *ALS3* were located in A01 chromosome. 【Conclusion】 Nucleic acid differences in *ALS1*, *ALS2*, and *ALS3* were detected among six *Brassica* species, resulting in changes of several amino acids of the encoded proteins.

Key words: *Brassica* species; acetolactate synthetase (ALS) gene; gene cloning; bioinformatics; sequence analysis

油菜是我国乃至全世界的主要油料作物,随着我国国民经济的快速发展,农村青壮年劳动力向城市大量转移,轻简化、机械化已成为油菜产业发展的主要方向。杂草的综合有效治理是实现油菜机械化、轻简化的重要技术环节^[1],选育和推广抗除草剂油菜品种是克服油菜田间草害最为经济有效的措施。目前,抗除草剂油菜主要分为两大类:转基因抗除草剂油菜(主要抗性基因有抗草胺磷的 *bar* 和抗草甘膦的 *aroA*)和非转基因抗除草剂油菜。Swanson 等^[2]和 Hattori 等^[3]采用小孢子化学诱变的方法获得 2 个抗咪唑啉酮类除草剂的油菜突变体 PM1 和 PM2。PM1 和 PM2 均由 *ALS* 基因点突变所致,其中 PM1 是 *BnALS1* 基因上的第 653 位丝氨酸(Ser)突变为天冬酰胺(Asn),PM2 是基因 *BnALS3* 的第 574 位色氨酸(Trp)突变为亮氨酸(Leu)(对应拟南芥序列)。2004 年江苏省农业科学院在油菜和大豆轮作喷施咪唑啉酮类除草剂的试验田中,发现了自然突变的除草剂抗性油菜新种质 M9,该突变体抗性稳定、抗性效应明显^[4-5]。胡茂龙等^[6]研究表明,M9 抗性由 1 个显性核基因控制,其 *BnALS1* 的抗性突变位点是 Ser-653-Asn(对应拟南芥序列)。目前,国外生产上大面积使用转基因抗除草剂油菜品种,而非转基因油菜主要是由 PM1 和 PM2 选育得到的抗咪唑啉酮类油菜。

乙酰乳酸合成酶(Acetolactate synthase, ALS)抑制剂类除草剂是发展最快、品种最多、市场最大的一类选择性除草剂,该类除草剂由于生物活性高、杀草谱广、对人和动物十分安全而应用于多种作物^[7-9]。乙酰乳酸合成酶(ALS)是控制植物体内合成支链氨基酸(包括亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸)公共途径的关键酶,该酶由催化亚基和调控亚基组成^[10-16],它同时催化 2 个平行反应,催化 2 分子丙酮酸缩合形成 2-乙酰乳酸并释放出 CO_2 ,最终生成缬氨酸和亮氨酸;催化 1 分子丙酮酸和 1 分子 2-氧丁酸缩合形成乙酰羟基丁酸,最终生成异亮氨酸^[17]。

细菌、真菌、藻类和植物中均含有 ALS,植物 ALS 由核基因编码,定位于叶绿体^[18]。ALS 是磺酰脲类、咪唑啉酮类等 5 类高选择性、低毒化学除草剂的作用靶标^[19-21],因此 ALS 基因是抗除草剂遗传操作的一个重要候选基因,具有重要的研究价值。

甘蓝型油菜(*Brassica napus* L.)基因组内存在 5 个 *ALS* 基因拷贝(*ALS1*—*ALS5*),芸薹属植物中 *ALS* 基因以多基因家族的形式存在,其多样性超过烟草和拟南芥中的 *ALS* 基因^[22]。*ALS1* 和 *ALS3* 享有广泛的同源性,它们可能是编码植物生长和发育所必需的 ALS 酶。*ALS2* 与 *ALS1* 和 *ALS3* 在 DNA 序列上差异较大,在成熟蛋白编码区、N 端叶绿体转运肽的编码区及基因上游非编码区具有独特的特征,并且只在成熟的胚珠和不成熟的种子胚胎中表达,表明 *ALS2* 酶可能在种子的发育中起特殊作用。*ALS4* 和 *ALS5* 的编码区被打断,可能是缺失功能 *ALS* 基因。分析 *B. napus* 的二倍体祖先 *B. rapa* 和 *B. oleracea* 表明,*ALS2*、*ALS3* 和 *ALS4* 起源于 *B. rapa*,而 *ALS1* 和 *ALS5* 起源于 *B. oleracea*^[22]。

本研究拟对 6 个不同芸薹属植物的 *ALS* 基因进行克隆测序及生物信息学分析,以明确这 6 个主要芸薹属植物 *ALS* 基因的特征特性,为 ALS 酶的遗传操作和抗除草剂种质创制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料包括 4 个 *Brassica napus* 材料:中双 9 号、SH11、秦油 3 号、新型甘蓝型油菜;2 个 *B. oleracea* 材料:特选中甘 11、晚丰;3 个 *B. juncea* 材料:渭源大黄芥、关中芥菜、黔西牛尾油菜;4 个 *B. rapa* 材料:金秋 66、彬县义门油菜、Opava、Rapi-do;2 个 *B. carinata* 材料:Dodalla、09H2901003;1 个 *B. nigra* 材料:Sizaja。上述材料均由西北农林科技大学油菜研究中心提供,2013 年 9 月播种于陕

西杨凌西北农林科技大学农学院标本区,10 月 28 日取嫩叶,用于基因组 DNA 的提取。

Ex *Taq* 酶、dNTP Mixture、10×Ex *Taq* Buffer 及 pMD 19-T Vector 由大连宝生物 TaKaRa 公司生产;6×DNA Loading Buffer 和琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒及 DH5α 大肠杆菌感受态细胞均由天根生化科技(北京)有限公司生产;引物合成和测序均由上海立菲生物技术有限公司完成。

1.2 ALS 基因的克隆

叶片全基因组 DNA 采用 CTAB 法提取。利用胡茂龙等^[6]设计的 3 对引物:*BnALS1-F1/BnALS1-R1*、*BnALS2-F1/BnALS2-R1*、*BnALS3-F1/BnALS3-R1* 分别扩增 *ALS1*、*ALS2* 和 *ALS3* 基因序列。PCR 反应体系:模板 DNA 2 μL,Ex *Taq* 酶(5 U/μL)0.15 μL,10×Ex *Taq* Buffer 2 μL,上下游引物(10 μmol/L)各 0.75 μL,ddH₂O 补足 20 μL。PCR 循环参数:94℃预变性 5 min;94℃变性 40 s,55℃退火 40 s,72℃延伸 2.5 min,34 个循环;72℃延伸 10 min。PCR 扩增产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳分离,然后切下目的条带,用离心柱型琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒回收纯化(具体步骤参照

试剂盒说明书)。回收产物经 pMD 19-T Vector 连接、DH5α 大肠杆菌感受态转化、蓝白斑筛选、菌落 PCR 鉴定后,每个材料每个基因分别随机选取 3~5 个阳性克隆送至上海立菲生物技术有限公司测序。将克隆成功的 30 条核酸序列提交至 GenBank 数据库中,并获得登录号。

1.3 生物信息学分析

利用 NCBI 网站(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)进行核酸和蛋白质的 Blast 分析,利用 Clustal X 2.0.12 软件进行核酸和蛋白质的序列比对,利用 MEGA 5.1 软件,采用极大似然法(Maximum-likelihood,ML)构建 *ALS* 蛋白系统发育进化树。利用在线软件 <http://brassicadb.org/brad/>对 *ALS* 基因进行定位。

2 结果与分析

2.1 ALS 基因的克隆

试验结果显示,除在 1 个 *B. nigra* 材料中未扩增出任何产物外,其他参试材料中均有 PCR 扩增产物(图 1~3)。

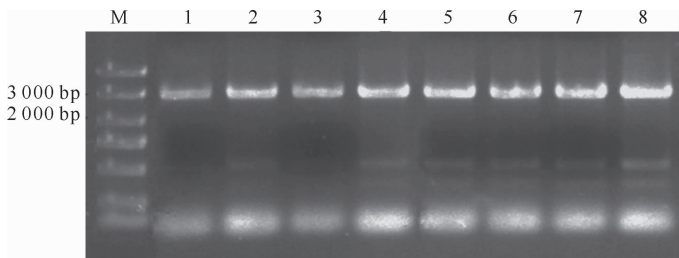


图 1 *ALS1* 基因扩增结果

M. Marker III;1. 中双 9 号;2. SH11;3. 秦油 3 号;4. 新型甘蓝型油菜;5. 特选中甘 11;6. 晚丰;7. Dodalla;8. 09H2901003

Fig. 1 PCR amplification of *ALS1*

M. Marker III;1. Zhongshuang No. 9;2. SH11;3. Qinyou No. 3;4. New type *Brassica napus*;
5. Texuanzhonggan No. 11;6. Wanfeng;7. Dodalla;8. 09H2901003

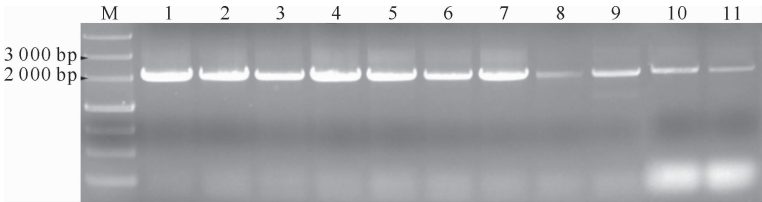


图 2 *ALS2* 基因扩增结果

M. Marker III;1. 中双 9 号;2. SH11;3. 秦油 3 号;4. 新型甘蓝型油菜;5. 渭源大黄芥;
6. 关中芥菜;7. 黔西牛尾油菜;8. 金秋 66;9. 彬县义门油菜;10. Opava;11. Rapido

Fig. 2 PCR amplification of *ALS2*

M. Marker III;1. Zhongshuang No. 9;2. SH11;3. Qinyou No. 3;4. New type *Brassica napus*;5. Weiyuandahuangjie;
6. Guanzhongjiecai;7. Qianxiniuweiyoucai;8. Jinqiu 66;9. Binxianyimenyoucai;10. Opava;11. Rapido

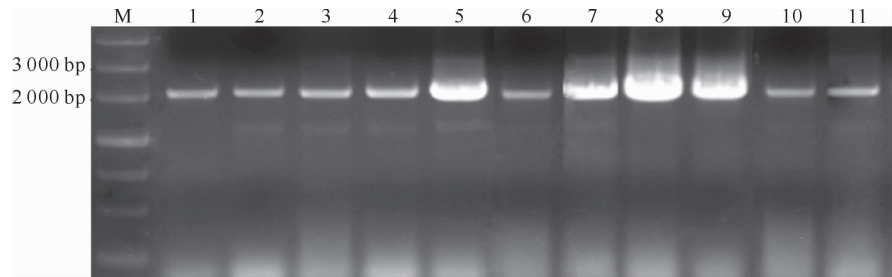


图 3 ALS3 基因扩增结果

M. Marker Ⅲ;1. 中双 9 号;2. SH11;3. 秦油 3 号;4. 新型甘蓝型油菜;5. 渭源大黄花芥;6. 关中芥菜;
7. 黔西牛尾油菜;8. 金秋 66;9. 彬县义门油菜;10. Opava;11. Rapido

Fig. 3 PCR amplification of ALS3

M. Marker Ⅲ;1. Zhongshuang No. 9;2. SH11;3. Qinyou No. 3;4. New type *Brassica napus*;5. Weiyuandahuangjie;
6. Guanzhongjiecai;7. Qianxiniuweiyoucai;8. Jinqiu 66;9. Binxianyimenyoucai;10. Opava;11. Rapido

在参试的 *B. napus*、*B. oleracea*、*B. carinata* 中扩
增得到 *ALS1* 基因(图 1),在 *B. napus*、*B. rapa*、*B.*
*junce*a 中扩增得到 *ALS2*(图 2)和 *ALS3* 基因(图 3)。
对扩增目的片段进行回收、克隆、测序,共成功克隆了
30 个 *ALS* 基因,并在 GenBank 数据库中登录,获得

登录号 KM816807—KM816836(表 1)。经过 NCBI 的
Blast 分析,结果显示所克隆基因分别与 NCBI 上已公
开的 *B. napus ALS1*(Z11524)、*ALS2*(Z11525)、*ALS3*
(Z11526)基因的一致率达到 99%,证明克隆所得基因
与预期结果相符。

表 1 参试材料及成功克隆的 ALS 基因

Table 1 Plant materials and cloned ALS genes

材料名称 Materials name	芸薹属名 Species	克隆基因 Cloned gene	GenBank 登录号 GenBank No.
中双 9 号 Zhongshuang No. 9	<i>Brassica napus</i>	<i>ALS1</i>	KM816810
		<i>ALS2</i>	KM816811
		<i>ALS3</i>	KM816812
SH11	<i>Brassica napus</i>	<i>ALS1</i>	KM816807
		<i>ALS2</i>	KM816808
		<i>ALS3</i>	KM816809
秦油 3 号 Qinyou No. 3	<i>Brassica napus</i>	<i>ALS1</i>	KM816813
		<i>ALS2</i>	KM816814
		<i>ALS3</i>	KM816815
新型甘蓝型油菜 New type <i>Brassica napus</i>	<i>Brassica napus</i>	<i>ALS1</i>	KM816816
		<i>ALS2</i>	KM816817
		<i>ALS3</i>	KM816818
特选中甘 11 Texuanzhonggan No. 11	<i>Brassica oleracea</i>	<i>ALS1</i>	KM816819
晚丰 Wanfeng	<i>Brassica oleracea</i>	<i>ALS1</i>	KM816820
渭源大黄花芥 Weiyuandahuangjie	<i>Brassica juncea</i>	<i>ALS2</i>	KM816821
		<i>ALS3</i>	KM816822
关中芥菜 Guanzhongjiecai	<i>Brassica juncea</i>	<i>ALS2</i>	KM816823
		<i>ALS3</i>	KM816824
黔西牛尾油菜 Qianxiniuweiyoucai	<i>Brassica juncea</i>	<i>ALS2</i>	KM816825
		<i>ALS3</i>	KM816826
金秋 66 Jinqiu 66	<i>Brassica rapa</i>	<i>ALS2</i>	KM816827
		<i>ALS3</i>	KM816828
彬县义门油菜 Binxianyimenyoucai	<i>Brassica rapa</i>	<i>ALS2</i>	KM816829
		<i>ALS3</i>	KM816830
Opava	<i>Brassica rapa</i>	<i>ALS2</i>	KM816831
		<i>ALS3</i>	KM816832
Rapido	<i>Brassica rapa</i>	<i>ALS2</i>	KM816833
		<i>ALS3</i>	KM816834
Dodalla	<i>Brassica carinata</i>	<i>ALS1</i>	KM816835
09H2901003	<i>Brassica carinata</i>	<i>ALS1</i>	KM816836

2.2 *ALS* 基因的序列分析

利用 NCBI 网站的 ORF Finder 软件对 2.1 节克隆得到的基因序列进行分析,结果表明:5 种芸薹属植物中所克隆的 *ALS* 基因均不含内含子,只有 1 个开放阅读框。*ALS1* 基因开放阅读框长为 1 968 bp,编码 655 个氨基酸;*ALS2* 基因开放阅读框长为 1 914 bp,编码 637 个氨基酸;*ALS3* 基因开放阅读框长为 1 959 bp,编码 652 个氨基酸。利用 Clustal X 2.0.12 软件分析表明,5 个芸薹属不同种材料的 *ALS* 基因核酸序列存在差异(表 2~4),导致由其编码的氨基酸也存在差异。对 8 个材料 *ALS1* 基因的

比对分析发现了 7 个 SNP,其中 4 个 SNP 可导致氨基酸突变,*B. napus* 材料 SH11 的 *ALS1* 基因与其他 *B. napus* 材料间存在 3 个 SNP,但只有 1 个 SNP 导致氨基酸突变。对 11 个材料 *ALS2* 基因的比对分析发现了 3 个 SNP,其中 2 个 SNP 导致氨基酸突变。对 11 个材料 *ALS3* 基因的比对分析发现了 25 个 SNP,但仅有 2 个 SNP 导致氨基酸突变。从 SNP 数量来看,在自然条件下 *ALS3* 发生同义突变的概率最大,而发生错义突变的概率最小;*ALS2* 序列相对保守,发生同义突变的概率最小,但最易发生错义突变。

表 2 *ALS1* 核酸和蛋白质序列变异

Table 2 Mutations of *ALS1* DNA and protein sequences

材料名称 Materials name	芸薹属名 Species	目标基因位置 Location in the target gene						
		232 *	241	387	1 287 *	1 347 *	1 873 *	1 920
Z11524	<i>Brassica napus</i>	G(E)	C	C	G(T)	G(E)	A(I)	A
中双 9 号 Zhongshuang No. 9	<i>Brassica napus</i>	G(E)	C	C	G(T)	G(E)	A(I)	A
SH11	<i>Brassica napus</i>	G(E)	T	C	A(I)	G(E)	A(I)	C
秦油 3 号 Qinyou No. 3	<i>Brassica napus</i>	G(E)	C	C	G(T)	G(E)	A(I)	A
新型甘蓝型油菜 New type <i>Brassica napus</i>	<i>Brassica napus</i>	G(E)	C	C	G(T)	G(E)	A(I)	A
特选中甘 11 TexuanzhongganNo. 11	<i>Brassica oleracea</i>	G(E)	T	C	G(T)	A(G)	A(I)	A
晚丰 Wanfeng	<i>Brassica oleracea</i>	G(E)	T	C	A(I)	G(E)	A(I)	C
Dodalla	<i>Brassica carinata</i>	A(K)	T	T	A(I)	G(E)	G(V)	C
09H2901003	<i>Brassica carinata</i>	A(K)	T	T	A(I)	G(E)	G(V)	C

注:Z11524 是 NCBI 上已公开的 *ALS1* 序列;黑体表示突变位点;目标基因位置中括弧外为编码核苷酸,括弧内为引起突变的氨基酸;* 表示此位点发生错义突变。下表同。

Note:Z11524 is the sequence of *ALS1* published in NCBI;Mutations are showed in bold;outside brackets are the coding nucleotides,in brackets are the mutation amino acid. * means missense mutation at this site. The same below tables.

表 3 *ALS2* 核酸和蛋白质序列变异

Table 3 Mutations of *ALS2* DNA and protein sequences

材料名称 Materials name	芸薹属名 Species	目标基因位置 Location in the target gene		
		263 *	1 179	1 367 *
Z11525	<i>Brassica napus</i>	G(S)	C	A(Y)
中双 9 号 Zhongshuang No. 9	<i>Brassica napus</i>	G(S)	G	A(Y)
SH11	<i>Brassica napus</i>	G(S)	G	A(Y)
秦油 3 号 Qinyou No. 3	<i>Brassica napus</i>	G(S)	G	A(Y)
新型甘蓝型油菜 New type <i>Brassica napus</i>	<i>Brassica napus</i>	G(S)	G	A(Y)
渭源大黄芥 Weiyuandahuangjie	<i>Brassica juncea</i>	G(S)	G	A(Y)
关中芥菜 Guanzhongjiecai	<i>Brassica juncea</i>	G(S)	G	A(Y)
黔西牛尾油菜 Qianxiniuweiyoucai	<i>Brassica juncea</i>	G(S)	G	A(Y)
金秋 66 Jinqiu 66	<i>Brassica rapa</i>	G(S)	G	A(Y)
彬县义门油菜 Binxianyimenyoucai	<i>Brassica rapa</i>	G(S)	G	A(Y)
Opava	<i>Brassica rapa</i>	A(N)	G	T(F)
Rapido	<i>Brassica rapa</i>	G(S)	C	A(Y)

注:Z11525 是 NCBI 上已公开的 *ALS2* 序列。

Note:Z11525 is the sequence of *ALS2* published in NCBI.

表 4 ALS3 核酸和蛋白质序列变异

Table 4 Mutations of ALS3 DNA and protein sequences

材料名称 Materials name	芸薹属名 Species	目标基因位置 Location in the target gene												
		46 *	177	366	495	576	615	714	759	870	993	1 029 *	1 117	1 287
Z11526	<i>Brassica napus</i>	T(L)	A	C	A	C	G	A	T	C	G	G(E)	A	G
中双 9 号 Zhongshuang No. 9	<i>Brassica napus</i>	T(L)	T	T	A	C	G	T	T	T	G	C(D)	A	G
SH11	<i>Brassica napus</i>	T(L)	T	T	A	C	G	T	T	T	G	C(D)	A	G
秦油 3 号 Qinyou No. 3	<i>Brassica napus</i>	T(L)	T	T	A	C	G	T	T	T	G	C(D)	A	G
新型甘蓝型油菜 New type <i>Brassica napus</i>	<i>Brassica napus</i>	T(L)	T	T	A	C	G	T	T	T	G	C(D)	A	G
渭源大黄芥 Weiyuandahuangjie	<i>Brassica juncea</i>	T(L)	T	C	T	T	C	T	C	T	G	G(E)	A	G
关中芥菜 Guanzhongjiecai	<i>Brassica juncea</i>	T(L)	T	C	T	T	C	T	C	T	G	G(E)	A	G
黔西牛尾油菜 Qianxiniuweiyoucai	<i>Brassica juncea</i>	G(V)	T	T	T	C	G	A	C	T	T	C(D)	A	A
金秋 66 Jinqiu 66	<i>Brassica rapa</i>	T(L)	T	C	T	T	C	T	C	T	G	G(E)	A	G
彬县义门油菜 Binxianyimenyoucai	<i>Brassica rapa</i>	T(L)	T	C	T	T	C	T	C	T	G	C(D)	A	G
Opava	<i>Brassica rapa</i>	T(L)	T	T	T	C	G	A	C	T	T	C(D)	A	A
Rapido	<i>Brassica rapa</i>	T(L)	T	T	A	C	G	A	C	T	T	C(D)	C	A

材料名称 Materials name	芸薹属名 Species	目标基因位置 Location in the target gene											
		1 413	1 500	1 506	1 521	1 527	1 545	1 593	1 602	1 896	1 902	1 917	1 986
Z11526	<i>Brassica napus</i>	A	G	G	C	A	C	T	C	T	G	C	C
中双 9 号 Zhongshuang No. 9	<i>Brassica napus</i>	A	G	G	C	A	C	T	C	T	G	C	C
SH11	<i>Brassica napus</i>	A	G	A	A	C	T	T	T	A	A	G	A
秦油 3 号 Qinyou No. 3	<i>Brassica napus</i>	A	G	G	C	A	C	T	C	T	G	C	C
新型甘蓝型油菜 New type <i>Brassica napus</i>	<i>Brassica napus</i>	A	G	G	C	A	C	T	C	T	G	C	C
渭源大黄芥 Weiyuandahuangjie	<i>Brassica juncea</i>	A	G	G	C	A	C	T	C	T	G	C	C
关中芥菜 Guanzhongjiecai	<i>Brassica juncea</i>	A	G	G	C	A	C	T	C	T	G	C	C
黔西牛尾油菜 Qianxiniuweiyoucai	<i>Brassica juncea</i>	C	G	G	A	A	C	C	C	A	G	C	A
金秋 66 Jinqiu 66	<i>Brassica rapa</i>	A	G	G	C	A	C	T	C	T	G	C	C
彬县义门油菜 Binxianyimenyoucai	<i>Brassica rapa</i>	A	G	G	C	A	C	T	C	T	G	C	C
Opava	<i>Brassica rapa</i>	C	A	G	A	A	C	T	C	A	G	C	A
Rapido	<i>Brassica rapa</i>	C	A	G	A	A	C	T	C	A	G	C	A

注:Z11526 是 NCBI 上已公开的 ALS3 序列。

Note:Z11526 is the sequence of ALS3 published in NCBI.

2.3 ALS 蛋白系统发育进化树的构建

利用 MEGA 5.1 软件,采用极大似然法(Maximum-likelihood,ML)对 2.1 节成功克隆的 30 个 ALS 基因编码的蛋白质序列构建系统发育进化树,结果见图 4。图 4 表明,ALS1、ALS2、ALS3 独自聚为一类,然后 ALS1 和 ALS3 聚在一起,最后与 ALS2 聚在一起,说明 ALS1 和 ALS3 遗传距离较近,与 ALS2 的遗传距离相对较远。8 个材料共编码了 4 种不同 ALS1 蛋白(SH11、晚丰、Dodalla 和 09H2901003、其他 4 个材料)。11 个材料编码了 2 种 ALS3 蛋白,其中渭源大黄芥、关中芥菜、金秋 66 编码的 ALS3 与基因库中 Z11526 编码的相同;其他

8 个材料编码的 ALS3 相同。11 个材料共编码了 2 种 ALS2 蛋白,Opava 编码了 1 种 ALS2,其他 10 个材料编码的 ALS2 相同。

2.4 ALS 基因的定位预测

利用网站 <http://brassicadb.org/brad/>对 *B. oleracea* 和 *B. rapa* 材料的 ALS 基因进行染色体定位,结果表明(1)*B. oleracea* 材料 ALS1 基因编码区序列(第 1—1 968 碱基)定位于 C01 染色体上(第 17 124 680—17 122 713 碱基);(2)*B. rapa* 材料 ALS2 基因编码区(第 199—1 217 碱基)定位于 A01 染色体上(第 14 732 437—14 731 422 碱基);(3)*B. rapa* 材料 ALS3 基因编码区(第 1—1 959 碱

基)也定位于 A01 染色体上(第 14 183 751 — 14 181 793 碱基)。ALS 基因编码区序列与定位在

该染色体区间内的碱基序列一致率高达 99%,说明定位结果真实可靠。

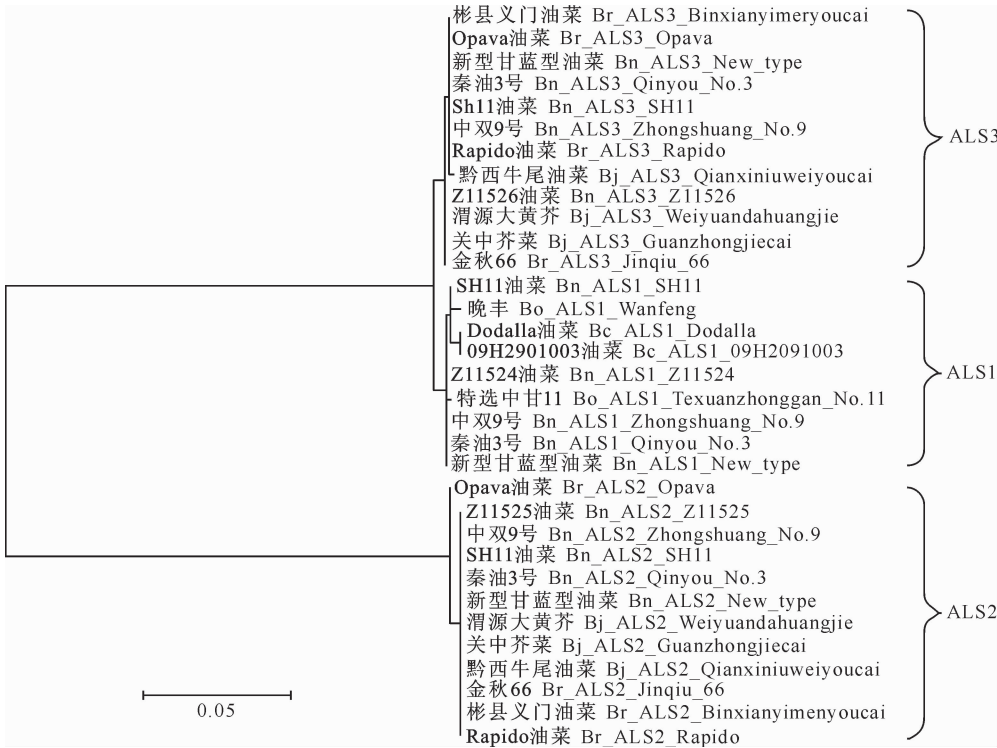


图 4 5 种芸薹属植物 ALS1、ALS2、ALS3 蛋白的系统发育进化树
每个分支上的数值为自展检验值(1 000 次重复)

Fig. 4 Phylogenic analysis of ALS1, ALS2, and ALS3 proteins from five *Brassica* species
The number for each interior branch is the bootstraps value (1 000 replicates)

3 结论与讨论

在以轻简化、机械化为油菜产业发展主要方向的大环境下,抗除草剂油菜品种的选育和推广工作势在必行,而乙酰乳酸合成酶(ALS)基因作为抗除草剂遗传操作的一个重要候选基因得到了人们的日益重视。本研究对 6 个不同芸薹属 16 个植物材料 ALS 基因进行 PCR 扩增,其中 15 个材料的 ALS 基因克隆成功,仅 1 个 *B. nigra* 材料未扩增成功,其原因可能是 ALS1 基因定位于 C 基因组中,ALS2 和 ALS3 基因定位于 A 基因组中,而 *B. nigra* 材料只包含 B 基因组。本研究所用的 ALS1、ALS2、ALS3 基因特异引物在 *B. nigra* 中均无 PCR 扩增产物,因此 *B. nigra* 的 ALS 基因有待进一步研究。

对 15 个不同材料 ALS1、ALS2、ALS3 基因的分析发现,ALS1 和 ALS3 同源性较高(达到 95% 以上),这 2 个基因中的突变位点较多,其中一部分形成错义突变;而 ALS2 与 ALS1 和 ALS3 同源性较低,在 DNA 序列上差异较大,相对保守,极少出现核苷酸的突变。Rutledge 等^[22]认为,ALS1 和

ALS3 可能是编码植物生长和发育所必需的 ALS 酶,而 ALS2 在成熟蛋白编码区、N 端叶绿体转运肽的编码区及基因上游非编码区具有独特的特征,可能具有不同于 ALS1 和 ALS3 的功能。本研究结果与 Rutledge 等^[22]的上述观点相符合。经过对 15 种材料 ALS 蛋白的比对分析,未发现以往报道的对抗除草剂有贡献的 SNP 位点。以往报道的对除草剂抗性有贡献的位点主要为 Ala122、Pro197、Ala205、Asp376、Trp574 和 Ser653^[23-24](以拟南芥序列为参照)。本研究所发现的 ALS 突变位点是否对除草剂有贡献,尚有待于进一步研究。

[参考文献]

[1] 张宏军,张 佳,刘 学,等.我国油菜田农药的登记及应用概况 [J].湖北农业科学,2008,47(7):846-851.
Zhang H J,Zhang J,Liu X,et al. The review of the registration and application of pesticide of canola in China [J]. Hubei Agricultural Sciences,2008,47(7):846-851.

[2] 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.

[3] 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,1995,246(4):419-425.

[4] 高建芹,浦惠明,龙卫华,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.

Gao J Q,Pu H M,Long W H,et al. Identification of imidazolidone resistant oilseed rape mutant [J]. Journal of Plant Genetic Resoures,2010,11(3):369-373.

[5] 浦惠明,高建芹,龙卫华,等. 油菜抗咪唑啉酮性状的遗传及其应用 [J]. 中国油料作物学报,2011,33(1):15-19.

Pu H M,Gao J Q,Long W H,et al. Studies on inheritance of imidazolinones resistance in *Brassica napus* and its utilization [J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences,2011,33(1):15-19.

[6] 胡茂龙,浦惠明,高建芹,等. 油菜抗乙酰乳酸合成酶抑制剂类除草剂突变体 M9 抗性基因的分离与鉴定 [J]. 中国农业科学,2012,45(20):4326-4334.

Hu M L,Pu H M,Gao J Q,et al. Inheritance and gene cloning of an ALS inhabiting herbicide resistant mutant line M9 in *Brassica napus* [J]. Scientia Agricultura Sinica,2012,45(20):4326-4334.

[7] 张一宾. 抑制乙酰乳酸合成酶(ALS)除草剂世界市场及品种发展概述 [J]. 现代农药,2005,6(4):28-31.

Zhang Y B. Summary of global market and development of ALS inhibitors [J]. Modern Agrochemicals,2005,6(4):28-31.

[8] 苏少泉. 抗除草剂作物的发展 [J]. 农药研究与应用,2008,12(5):1-6.

Su S Q. The development of crops [J]. Agrochemicals Research & Application,2008,12(5):1-6.

[9] 薛思佳,邹金山. 新型乙酰乳酸合成酶(ALS)抑制剂的研究进展 [J]. 化学世界,2000,41(8):399-403.

Xue S J,Zou J S. Progress on new acetolactate synthase (ALS) inhibitor [J]. Chemical World,2000,41(8):399-403.

[10] Umbarger H E. Amino acid biosynthesis and its regulation [J]. Annu Rev Biochem,1978,47:533-606.

[11] McCourt J A,Duggleby R G. Acetohydroxyacid synthase and its role in the biosynthetic pathway for branched-chain amino acids [J]. Amino Acids,2006,31:173-210.

[12] Ray T B. Site of action of chlorsulfuron;inhibition of valine and isoleucine biosynthesis in plants [J]. Plant Physiol,1984,75:827-831.

[13] Schloss J V. Acetolactate synthase,mechanism of action and its herbicide binding site [J]. Pestic Sci,1990,29(3):283-292.

[14] Shaner D L,Anderson P C,Stidham M A. Imidazolinones: potent inhibitors of acetohydroxyacid synthase [J]. Plant Physiol,1984,76:545-546.

[15] Stidham M A,Shaner D L. Imidazolinone inhibition of acetohydroxyacid synthase in vitroand *in vivo* [J]. Pestic Sci,1990,29:335-340.

[16] Duggleby R G,McCourt J A,Guddat L W. Structure and mechanism of inhibition of plant acetohydroxyacid synthase [J]. Plant Physiol Biochem,2008,46:309-324.

[17] Chen H,Saksa K,Zhao F Y,et al. Genetic analysis of pathway regulation for enhancing branched-chain amino acid biosynthesis in plants [J]. The Plant Journal,2010,63:573-583.

[18] 赵跃芳. 乙酰羧酸合成酶亚基间相互作用的研究 [D]. 天津:南开大学,2013.

Zhao Y F. Study on subunits interaction of acetohydroxyacid synthase [D]. Tianjin:Nankai University,2013.

[19] Binder S,Knill T,Schuster J. Branched-chain amino acid metabolism in higher plants [J]. Physiologia Plantarum,2007,129(1):68-78.

[20] Zhou Q Y,Liu W P,Zhang Y S,et al. Action mechanisms of acetolactate synthase-inhibiting herbicides [J]. Pest Biochem Physiol,2007,89:89-96.

[21] McCourt J A,Pang S S,King-Scott J,et al. Herbicide-binding sites revealed in the structure of plant acetohydroxyacid synthase [J]. Proc Natl Acad Sci USA,2006,103(3):569-573.

[22] Rutledge R G,Quellet T,Hattori J,et al. Molecular characterization and genetic origin of the *Brassica napus* acetohydroxyacid synthase multigene family [J]. Mol Gen Genet,1991,229:31-40.

[23] Tan S,Evants R R,Dahmer M L,et al. Imidazolinone-tolerant crops;history, current status and future [J]. Pest Management Science,2005,61:246-257.

[24] Heap I. The international survey of herbicide resistant weeds [J/OL] Integrated Pest Management, 2014, 3: 281-301, [2014-10-18]. <http://www.weedscience.org>.