

谷子抗“拿捕净”基因的 SSR 标记

李志江,李延东,马金丰,李祥羽,赵丽娟,王绍滨

(黑龙江省农业科学院 作物育种研究所,黑龙江 哈尔滨 150086)

摘要:为探究谷子抗病育种的理论基础,采用 Blast 比对的方法,利用已知的谷子抗“拿捕净”除草剂的基因组序列,对谷子抗“拿捕净”基因进行 SSR 分子连锁标记筛选研究。利用抗“拿捕净”基因的已知序列找到了在谷子基因组中第 7 和第 9 条染色体上均存在同源序列,分别在这些同源序列上下游寻找 SSR 引物,在谷子 F₂ 群体中进行 SSR 标记的筛选,进行共分离分析。结果表明:位于第 7 染色体上的 2 个 SSR 标记 SIMS13569 和 SIMS13512 与谷子抗“拿捕净”基因性状共分离,即表现为连锁遗传,该标记可用于分子标记辅助选择,对谷子抗“拿捕净”基因育种具有重要的现实意义;而第 9 染色体上的序列不具有抗“拿捕净”的作用。

关键词:谷子;“拿捕净”基因;Blast;SSR 标记

中图分类号:S515.035

文献标识码:A

文章编号:1002-2767(2013)07-0005-03

谷子[*Setaria italica* (L.)Beauv.]是起源于我国的重要粮食作物之一,在我国北方广泛种植^[1]。谷子具有抗旱、耐贫瘠、适应性强以及粮饲兼用等特点,并且小米的营养价值极高,对孕妇具有保健作用。因此,谷子在我国历史上作为粮食作物曾经起着特别重要的作用。但是谷子粒小苗弱,其常规品种对目前除草剂缺乏抗性,田间除草要靠人工完成,工作量大,投入高,一直是妨碍谷子大面积生产的重要因素之一,导致谷子种植面积逐渐下降,影响和制约着谷子大规模集约化生产^[2]。谷子田间杂草不仅数量巨大、种类繁多,而且谷子大田中谷莠子形态同谷子极为相似,很难区分,降低了谷子的产量和品质,使谷子减产达到 20%~30%^[3]。若能解决谷子抗除草剂问题,则谷子必将重新受到农民的青睐。

20 世纪 80 年代,在美国和加拿大的农场均发现了抗“拿捕净”等除草剂的青狗尾草材料,法国科学家首先对这些材料进行了研究,并将有关对除草剂抗性的基因转育到谷子中,创制了抗除草剂的谷子材料。我国引进有关材料后,首先在夏谷品种中利用,并取得成功,实现了谷子生产的化学除草。近年引进这些材料到黑龙江,目的是创制适合黑龙江的抗除草剂材料,并开展相关研究。

该研究以杂交育种等手段,在引进河北省谷子所的抗“拿捕净”除草剂种质资源“K30-2”的基础上,利用抗“拿捕净”除草剂品种资源“K30-2”衍生后代的品系 09-K9003 作母本,俄罗斯早熟材料作父本,进行有性杂交,探索以杂交转育的方法将青狗尾草中蕴含的抗“拿捕净”显性除草剂基因转育到新的种质资源中,并在 F₂ 构建抗“拿捕净”基因抗感群体,用 SSR 标记进行筛选,寻找与抗“拿捕净”基因连锁的 SSR 标记,旨在为育种应用和理论研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料及抗性鉴定

抗“拿捕净”材料 K30-2 由河北省谷子研究所提供,群体 F₂ 是由该抗性材料的后代衍生品系 09-K9003(母本)同俄罗斯早熟(父本)杂交得到,种植在黑龙江省农业科学院民主试验基地,该地块前茬为小麦,秋整地,起垄,垄宽为 65 cm,4 月底播种,当植株长到 5 片叶时对各单株挂牌编号采集母本、父本以及杂交后代 F₂ 群体的叶片,利用硅胶进行干燥保存。待苗复壮后,对 F₂ 群体喷施 12.5% 的“拿捕净”1 500 mL·m⁻²,兑水 450 kg·hm⁻²,同时调查 F₂ 群体各单株抗性,并记录,根据不同单株抗性表现寻找与该基因连锁的标记。

1.2 方法

1.2.1 CTAB 法提取植物 DNA CTAB 提前 65℃ 预热,将之前硅胶保存的叶片材料取适量加入 2 mL EP 管中,放入液氮研磨,每管加入 800 μL 的 CTAB,充分震荡,65℃ 水浴 45 min,每管加入 800 μL 的氯仿/异戊醇(24:1),上下颠倒数次,4℃ 离心,

收稿日期:2013-03-13

基金项目:国家现代农业产业技术体系专项资金资助项目(CARS-07);黑龙江省农业科技创新工程资助项目

第一作者简介:李志江(1982-),男,河北省邯郸市人,硕士,助理研究员,从事谷子遗传育种研究。E-mail:lizhijiang12@163.com。

12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$, 10 min, 取上清, 加入到 1.5 mL 的 EP 管中, 加 2/3 体积的异丙醇, -20°C 沉淀 30 min 以上, 4°C 离心, 12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$, 10 min, 弃上清, 用 75% 的酒精洗涤沉淀 2 次, 4°C 离心, 12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$, 10 min, 在超净工作台干燥 1 h, 每管加入 100 μL ddH₂O, 充分溶解后检测 DNA 浓度, 稀释至 100 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, 编号备用。

1.2.2 聚合酶链式 (PCR) 反应体系 建立 20 μL 的 PCR 反应体系, 分别加入 2 μL 的 10 \times Loading buffer、1.6 μL 的 dNTP、0.4 μL Taq 酶、2 μL 的模板 DNA、上下游引物各 1 μL 、超纯水 12 μL 。混匀后放置在 PCR 仪上, 设定程序: 94°C 预变性 5 min, 94°C 变性 30 s, 退火 30 s, 72°C 延伸 2 min, 15 个循环, 最后 72°C 延伸 10 min, 4°C 保存, 退火温度为 T_m 值。

1.2.3 聚丙烯酰胺凝胶电泳及染色 每个样品加入 2 μL 的 6 \times Loading buffer, 混匀后取 5 μL

样品加入点样孔, 1 200 V 恒压电泳 1 h。电泳结束后, 取下凝胶板, 将长短玻璃板分开, 用清水轻轻冲洗, 染色 10 min, 再用清水冲洗 1 次, 放入到显影液中进行显影 10 min。

2 结果与分析

2.1 谷子基因组中抗“拿捕净”基因的同源序列

利用已知的抗“拿捕净”基因序列 (cDNA 的 GenBank 登陆号是 AY219175), 在谷子基因组中进行 Blast 比对, 结果见图 1, 在第 7 条、第 8 条和第 9 条染色体上均有同该基因高度同源的序列。在第 8 条染色体上的同源序列太短, 只有 100 bp 与之相匹配, 不可能是执行功能的基因。第 7 和第 9 条染色体上的同源序列, 其 DNA 长度、Score 值、同源性和匹配性都很高 (见图 2, 图 3), 因此这两条染色体上的同源序列很有可能就是执行功能的抗“拿捕净”基因。

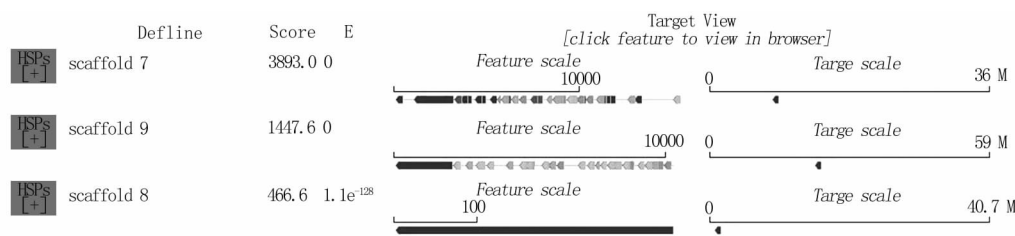


图 1 抗“拿捕净”基因在谷子基因组中的比对结果

Fig. 1 The Blast result of herbicide-resistant to Sethoxydim gene in Foxtail millet genome

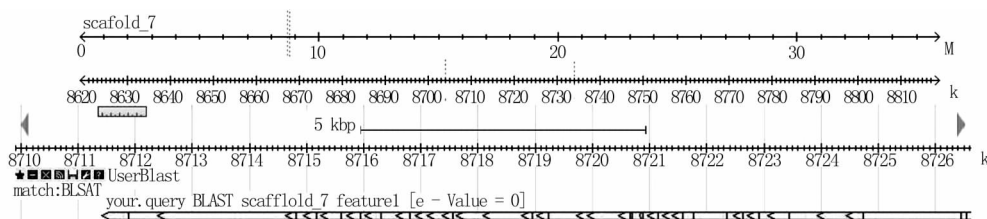


图 2 第 7 条染色体上 Blast 比对结果

Fig. 2 The Blast result in the seventh chromosome

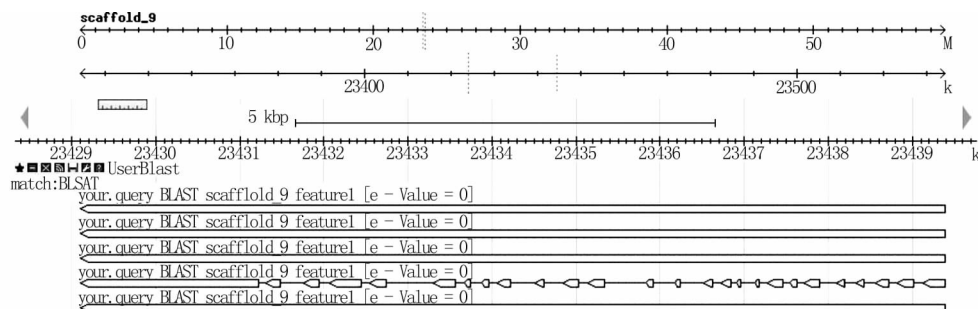


图 3 第 9 条染色体上 Blast 比对结果

Fig. 3 The Blast result in the ninth chromosome

2.2 与谷子抗“拿捕净”基因连锁的 SSR 引物筛选

通过在谷子基因组中第 9 条和第 7 条染色体上抗“拿捕净”基因的同源序列上下游寻找引物,只找到了 6 对引物(见表 1),利用这 6 对引物对父

表 1 所使用的 SSR 引物

Table 1 Used SSR primers

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence	染色体 Chromosome
SIMS13459_fwd	ATGGTGCGATACCTCAAAGG	7
CAAS7002_Fwd	TAGCACCCCAAACATACATAC	7
SIMS13569_fwd	CCTCCTCCTCCAGCTCTTCT	7
SIMS13512_fwd	ACTTCGAGTGCGCCTCTAT	7
CAAS9054_Fwd	GGGATTGCGGTGGGGACGGC	9
SIMS1455_fwd	GGATGAGGATTCTGAGCTGC	9

母本进行多态性筛选,引物 CAAS7002 没有扩增出来,位于第 9 条染色体上的引物 SIMS1455 和位于第 7 条染色体上的引物 SIMS13459 在父母本之间没有多态性,引物 CAAS9054、SIMS13512、SIMS13569 在父母本之间扩增出多态性。用这 3 对引物对父母本以及 F_2 群体的 DNA 进行 PCR 扩增(见图 4),从图谱的结果和 F_2 群体各单株抗性

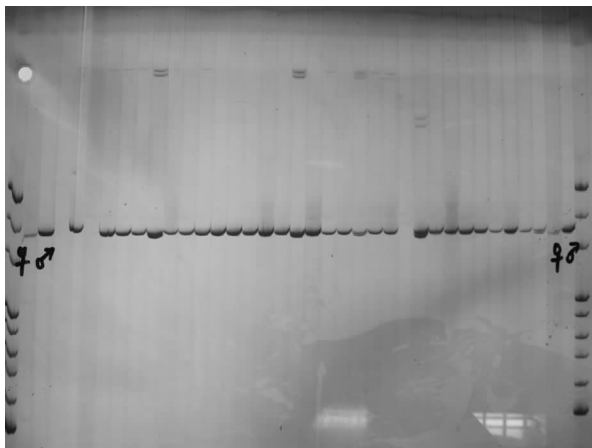


图 4 引物 SIMS13569 在隐性群体的 PCR 扩增

Fig. 4 SIMS13569 primer PCR amplification in recessive groups

抗感分离调查结果综合分析来看,位于第 9 条染色体上的引物 CAAS9054 与抗“拿捕净”基因之间没有发生共分离,没有表现抗性性状与抗“拿捕净”基因的连锁关系;位于第 7 条染色体上的引物 SIMS13512 和 SIMS13569 与抗“拿捕净”基因发生了共分离,表现为抗性性状与抗“拿捕净”基因的连锁关系,其中 SSR 标记 SIMS13569 与该基因的物理距离是 3.69 Mb;SSR 标记 SIMS13512 与该基因的物理距离是 1.86 Mb,它们可直接用于分子标记辅助选择。

3 结论与讨论

谷子中抗“拿捕净”基因 *Sr.f* 来源于谷子的一个近缘物种青狗尾草的突变株,并且已证实其抗性由一显性单核基因控制^[5-6]。牛玉红等利用 AFLP 标记的方法定位了抗“拿捕净”基因,筛选到了两个与该基因连锁的标记 AP1₂₈₄ 和 AP2₃₅₀,它们与该基因的遗传距离分别是 6.3 和 2.9 cM^[6]。“拿捕净”除草剂的作用靶蛋白是乙酰辅酶 A 羧化酶(ACCCase),赵虎基等利用禾本科作物 ACCase cDNA 序列的保守性,通过 RACE 技术克隆出了 ACCase 基因,并利用 Southern 杂交技术来确定谷子基因组中抗“拿捕净”基因的拷贝数,结果表明抗“拿捕净”基因在谷子基因组中只有一个拷贝^[7]。而该研究通过 Blast 比对,在谷子基因组第 7 和第 9 条染色体上发现了抗“拿捕净”基因的同源序列,通过筛选这 2 条染色体上与抗“拿捕净”基因连锁的 SSR 引物,证实在谷子基因组中,只有第 7 条染色体上的抗“拿捕净”基因执行功能,即该基因在谷子基因组中只有一个执行功能的拷贝,而第 9 条染色体上的同源序列只是在进化过程中产生的冗余序列。

抗“拿捕净”除草剂在黑龙江省引入研究,为谷子抗除草剂新品种的育成,解决谷子田间除草的难题提供理论依据和技术保障,与抗“拿捕净”基因连锁的 SSR 标记的筛选与应用,加快了谷子抗“拿捕净”基因在谷子遗传育种应用的进程,推动了黑龙江省谷子产业的发展,对取得更高的经济效益和社会效益具有重要意义。

参考文献:

- [1] 李志江,刁现民. 谷子分子标记与功能基因组研究进展[J]. 中国农业科技导报,2009,11(4):16-22.
- [2] 李志江. 谷子抗除草剂基因的发现及其应用[J]. 基因组学与应用生物学,2010,29(4):1-7.
- [3] 王天宇,辛志勇,石云素,等. 抗除草剂谷子新种质的创制、鉴定与利用[J]. 中国农业科技导报,2002,2(5):62-66.
- [4] Tautz D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers[J]. Nucleic Acids Research,1989,17:6463-6471.
- [5] Wang T Y, Chen H B, Reboud X, et al. Pollen-mediated gene flow in an autogamous crop: foxtail millet (*Setaria italica*) [J]. Plant Breeding,1997,116:579-583.
- [6] 牛玉红,黎裕,石云素,等. 谷子抗除草剂“拿捕净”基因 AFLP 标记[J]. 作物学报,2002,28(3):359-362.
- [7] 赵虎基. 谷子抗拿捕净基因的克隆和转基因玉米的研究以及玉米抗拿捕净体细胞无性系突变体的筛选[D]. 北京:中国农业大学,2004:1-110.

(下转 59 页)