

羽衣甘蓝 SSR 指纹图谱构建及不同遗传类群的 SRK 单元型分布

冯一了^{1,2}, 陈文迪², 张斌², 任文静², 韩风庆², 陈立², 方智远², 杨丽梅²,
庄木², 吕红豪², 王勇², 季家磊², 张扬勇²

(¹青岛农业大学园艺学院, 山东青岛 266109; ²中国农业科学院蔬菜花卉研究所/蔬菜生物育种全国重点实验室, 北京 100081)

摘要: 十字花科作物主要由 S 位点的复等位基因控制自交不亲和性, 羽衣甘蓝 (*Brassica oleracea* var. *acephala*) 是十字花科芸薹属中典型的自交不亲和性植物。本研究利用 20 对 SSR 引物首次构建了 20 个羽衣甘蓝自交系的指纹图谱, 20 对 SSR 引物共鉴定到 65 个等位变异, 平均每对引物含有 3.25 个变异。等权重算术平均聚类法 (UPGMA) 将 20 个自交系聚类为 3 个遗传类群: OK1、OK2 和 OK3。其中遗传类群 OK1 的叶形为紧凑皱叶或披散皱叶, 波浪状叶缘, 叶色以红紫色为主; 遗传类群 OK2 的叶形为光滑叶, 波浪状或裂叶叶缘, 叶色为白色外叶; 遗传类群 OK3 的叶形为光滑叶, 波浪状或裂叶叶缘, 叶色以红紫色为主。利用 SRK 基因激酶区的特异性引物分析发现, 20 个羽衣甘蓝自交系中共有 9 个 SRK 单元型, 分别是 8 个 Class I 型 SRK 单元型 (SRK7、SRK13、SRK14、SRK16、SRK23、SRK36、SRK45 和 SRK51) 和 1 个 Class II 型 SRK 单元型 (SRK15)。遗传类群 OK1 主要为 SRK15 单元型 (50%), 其次为 SRK23 单元型 (20%); 遗传类群 OK2 主要为 SRK15、SRK16 单元型 (均为 40%); 遗传类群 OK3 主要为 SRK23 单元型 (40%)。亲和指数测定结果进一步验证了不同遗传类群内部或遗传类群间自交系杂交的亲缘关系, 杂交组合配制的过程中应兼顾遗传类群和 SRK 单元型。

关键词: 羽衣甘蓝; SSR 指纹图谱; 自交不亲和; SRK 单元型

Construction of SSR Fingerprint and SRK Haplotype Distribution of Different Genetic Groups in Ornamental Kale (*Brassica oleracea* var. *acephala*)

FENG Yiliao^{1,2}, CHEN Wendi², ZHANG Bin², REN Wenjing², HAN Fengqing², CHEN Li², FANG Zhiyuan²,
YANG Limei², ZHUANG Mu², LYU Honghao², WANG Yong², JI Jialei², ZHANG Yangyong²

(¹College of Horticulture, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, Shandong; ²Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences/State Key Laboratory of Vegetable Biobreeding, Beijing 100081)

Abstract: Self-incompatibility in Cruciferous crop such as ornamental kale (*Brassica oleracea* var. *acephala*), is a critical reproductive barrier governed primarily by the multiple alleles at the S loci. Ornamental kale is a typical self-incompatibility member of this family. In this study, we constructed the fingerprint map of 20 inbred lines of ornamental kale using 20 pairs of SSR primers, identified a total of 65 allelic variations, averaging 3.25 variations per primer pair. The unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) clustered these into three distinct genetic groups: OK1, OK2, and OK3. Group OK1 is characterized by wrinkled, wavy leaves, with red and purple as the dominant colors. In contrast, group OK2 features smooth leaves that are either wavy or lobed, with white outer leaves. Group OK3 also presents smooth leaves, which

收稿日期: 2024-02-26 网络出版日期: 2024-09-12

URL: <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20240226002>

第一作者研究方向为蔬菜遗传育种, E-mail: 8623533@stu.qau.edu.cn; 陈文迪为共同第一作者

通信作者: 张扬勇, 研究方向为蔬菜遗传育种, E-mail: Zhangyangyong@caas.cn

基金项目: 国家自然科学基金项目 (32172578)

Foundation project: National Natural Science Foundation of China (32172578)

may be wavy or lobed, with red and purple as the primary colors. Through the analysis of specific primers in the kinase region of *SRK* gene, nine *SRK* haplotypes were identified in these inbred lines including eight class I *SRK* haplotypes (*SRK7*, *SRK13*, *SRK14*, *SRK16*, *SRK23*, *SRK36*, *SRK45*, and *SRK51*) and one class II *SRK* haplotype (*SRK15*). The *SRK15* haplotype was predominant in the group OK1 (50%), followed by the *SRK23* haplotype (20%). In group OK2, the *SRK15* and *SRK16* haplotype were both major (at 40% each). In group OK3, the *SRK23* was predominant (40%). Further analysis of self-incompatible indices confirmed compatibility among inbred lines from the same or different genetic groups, emphasizing the importance of considering both genetic groups and *SRK* haplotypes in hybrid development.

Key words: ornamental kale; SSR marker fingerprint; self-incompatibility; *SRK* haplotype

羽衣甘蓝 (*Brassica oleracea* var. *acephala*) 原产于地中海沿岸, 是甘蓝的一个变种, 形态和颜色多样化; 其作为耐寒的观赏花卉和蔬菜作物, 在世界各地广泛种植。品种亲缘关系鉴定是羽衣甘蓝育种中重要的工作, 传统的亲缘关系鉴定方法基于表型差异, 但在品种表型差异小的情况下, 易导致品种鉴定失误, 从而影响羽衣甘蓝的育种进程。植物基因组中分布着大量的简单重复序列 (SSR, sample sequence repeat), 基于这些重复序列设计 DNA 分子标记, 进行 PCR 检测, 根据片段分离情况生成二维数字指纹图谱, 再通过聚类方法可对材料的亲缘关系进行快速鉴定及杂种优势群划分, 该方法不受环境和人为因素影响。王庆彪等^[1]基于甘蓝基因组设计了 20 对 SSR 核心引物, 构建了 50 个甘蓝代表品种的 SSR 遗传指纹图谱, 实现了甘蓝品种鉴定。李晓娟等^[2]开发了 29 对 SSR 标记并构建了 18 个球茎甘蓝的遗传指纹图谱, 实现了球茎甘蓝间的亲缘关系鉴定。

羽衣甘蓝是一种典型的孢子体自交不亲和植物, 花期表现出明显的自交不亲和特征。目前普遍认为, 这种自交不亲和性由多态性 S 位点控制^[3], S 位点上有编码雌、雄 S 识别因子的基因, 也称为 S 单元型^[4]。*SRK* 受体激酶基因是与 S 位点连锁的三类基因之一, S 位点还包括糖蛋白基因 (*SLG*) 以及 S 位点富半胱氨酸蛋白基因 (*SCR*) 或 S 位点蛋白 11 基因 (*SP11*)。*SRK* 基因^[5]在雌蕊柱头中表达, 作用于花粉和柱头的识别反应^[6]; *SLG* 基因^[7]在柱头表皮细胞中表达, 作用于自交不亲和反应^[8]; *SCR/SP11* 基因^[9]在花药中表达, 与柱头中的 *SRK* 受体相互作用, 触发导致花粉排斥的信号级联反应。基于 *SRK* 单元型差异, 十字花科的自交不亲和性分为两类: 强自交不亲和的 Class I 型和弱自交不亲和的 Class II 型^[10]。

不同 *SRK* 单元型材料之间花期授粉能正常结籽, 相同 *SRK* 单元型材料之间花期授粉不能结籽或结籽率极低, 因此, 在配置杂交组合时, 鉴定自交不亲和系的 *SRK* 单元型极为重要。亲和指数法^[11]常用来评价材料间的配合力和鉴定 *SRK* 单元型, 但是该方法田间工作量大、测定周期长、效率低; 此外, 还采用荧光显微法^[12]、免疫测定法^[13]和等电聚焦法^[14]等方法进行 *SRK* 单元型鉴定, 但是这些方法的应用难度较大。随着分子生物学的发展, 分子标记辅助育种技术^[15]得到了广泛应用, 该技术成本低, 鉴定时间短。基于已开发的 *SRK* 基因特异性分子标记, 克隆羽衣甘蓝不同材料的 *SRK* 基因, 然后在 NCBI 数据库中进行 BLAST 比对分析, 可以快速、准确地鉴定分析羽衣甘蓝不同遗传类群的 *SRK* 单元型。Nishio 等^[16]基于 *SRK* 基因设计了 2 对可用于 Class I 型 *SRK* 单元型扩增的分子标记 PK1/PK4 和 PK5/PK4。Park 等^[17]开发了用于鉴定 Class II 型 *SRK* 单元型的分子标记 KD4/KD7。蓝兴国等^[18]、田磊等^[10]和苗雯雯等^[19]利用 Class I 型分子标记 PK1/PK4 和 Class II 型分子标记 KD4/KD7, 实现了对甘蓝 *SRK* 单元型的快速鉴定。后来陈文迪^[20]发现分子标记 PK1/PK4 在不同的甘蓝群体中存在条带模糊、不稳定等缺点, 因此设计了特异性更强的 Class I 型引物 PKC6F/PKC6R。

本研究利用已开发的 20 对 SSR 标记对 20 个羽衣甘蓝自交系进行 PCR 扩增及电泳, 通过遗传指纹图谱及聚类对自交系间的杂种优势关系进行划分, 并利用已开发的 2 对 *SRK* 激酶区特异引物快速准确的鉴定羽衣甘蓝不同遗传类群的 *SRK* 单元型, 并对不同遗传类群中 *SRK* 单元型的分布及花期自交和杂交亲和指数进行分析。通过指纹图谱构建、遗传类群划分及 *SRK* 单元型鉴定, 为羽衣甘蓝的杂种优势育种提供参考依据。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

本研究所使用的 20 份羽衣甘蓝自交系材料(表 1),均由中国农业科学院蔬菜花卉研究所甘蓝类蔬菜遗传育种创新团队选育。2021 年种植在昌平南口中试基地,进行统一的栽培管理。在温室大棚使用 64 孔穴盘播种育苗,20~30 d 后定植于露地,每畦宽 100 cm,畦间距 30 cm,行距×株距为 50 cm×30 cm,每份自交系种植 2 畦,每畦 30 棵。定植后采用滴灌浇水,注意缺苗的及时补苗和除草。

1.2 基因组 DNA 的提取与 PCR 扩增

取成熟期的新鲜甘蓝幼嫩叶片 2 g 装入 2 mL 收集管中,利用改良的 CTAB 法提取叶片基因组 DNA,利用微量分光光度计(BioDrop)检测 DNA 浓度和纯度后备用。

利用王庆彪等^[1]开发的 20 对 SSR 引物对 20 份羽衣甘蓝材料进行扩增(表 2),PCR 反应体系为 10 μL,包含:200 μg/μL 的模板 DNA 1.0 μL,2×3G Taq Master Mix for PAGE 5.0 μL(南京诺唯赞生物科技有限公司),正反向引物(5 mmol/L)各 0.5 μL(苏州金唯智生物科技有限公司合成),ddH₂O 3.0 μL。PCR 反应程序:95℃ 预变性 3 min;95℃ 变性 15 s,60℃ 退火 15 s,72℃ 延伸 30 s,72℃ 彻底延伸 5 min,35 个循环。配置 8% 聚丙烯酰胺凝胶进行电泳,恒压 150 V,时间 1 h 10 min。最后对 page 胶进行银染成像保存。

表 1 20 份羽衣甘蓝自交系的特征

Table 1 Characterization of 20 kale inbred lines

编号 Number	名称 Name	叶色 Leaf color	叶形 Leaf shape
2510	浅紫东林	红紫色	紧凑皱叶、波浪状叶缘
2511	东林紫红	红紫色	紧凑皱叶、波浪状叶缘
2512	名古屋红	红紫色	紧凑皱叶、波浪状叶缘
2515	白鸽	外叶白色、内叶紫色	光滑叶、波浪状叶缘
2519	白鸽	黄白色	光滑叶、波浪状叶缘
2522	东京红	红紫色	光滑叶、波浪状叶缘
2523	名混紫	红紫色	紧凑皱叶、波浪状叶缘
2524	三雄红	红紫色	紧凑皱叶、波浪状叶缘
2526	邹叶白	白色	紧凑皱叶、波浪状叶缘
2528	紫鸽	红紫色	光滑叶、波浪状叶缘
2533	维多利亚鸽	外叶白色、内叶紫色	光滑叶、波浪状叶缘
2535	白孔雀	白色	光滑叶、裂叶叶缘
2536	红孔雀	紫色	光滑叶、裂叶叶缘
2538	白珊瑚	黄白色	光滑叶、波浪状叶缘
2542	红斑鸠	红紫色	光滑叶、波浪状叶缘
2546	双色鸽	外叶白色、内叶紫色	光滑叶、波浪状叶缘
2549	红宝	红色	披散皱叶、波浪状叶缘
2550	苏格兰甘蓝	绿色	披散皱叶、波浪状叶缘
2551	Red bor	红色	披散皱叶、波浪状叶缘
2552	布比甘蓝	绿色	披散皱叶、波浪状叶缘

表 2 SSR 多态性引物和 SRK 激酶区特异引物

Table 2 SSR polymorphism primers and SRK gene kinase region specific primers

编号 No.	引物名称 Primer name	正向引物(5'-3') Forward sequence(5'-3')	反向引物(5'-3') Reverse sequence(5'-3')
#1	BoE188	CGACGATGGCGAGGAAACA	CACATAACCCAAATACCCAAATCA
#2	BoE607	TCTATTCACAACGATTCAACTAAC	CGGTACGGCTGGCTCTT
#3	BoE162	AGCAGCTTCGTTCAATCTCC	CGGCAGCGTATACCTTCACA
#4	BoE966	TCGAATAAAGAAGAAAAAGAAGA	TAATCCCTGGTAAGAGTAGT
#5	BoE222	ACTACCCTCTCCGTTTACTCCACA	GCCCCATAGCTTTCTCAA
#6	BoE718	CAAGAAACGGACGTGGTGAAAG	TCTCGCGTATGGGGCTGTCT
#7	BoE002	CGTACGGTGGCGCTTTATTTT	ACGACGTCGCCGACTGAAC
#8	BoE450	TCTCGCCATGGCTGATAAG	TCGGGGCGTTGATTCTCGTCTCT
#9	BoE882	CCGCTTCTCTTGCCTTCTCT	TTCGCCAGTAGATCCCCGTAATG
#10	BoE699	TCCCCACCCCAAAAAGAGA	AACGAGCCATCCGAAGAAGAGG
#11	BoE379	GCGGGGACTCTACCTCTA	AGCAGCTCAGCATACAAG
#12	BoE761	CATTCAGCGACTTCTTCAAACCTT	GGCGCACTTCTTCCCTGTGA
#13	BoE723	CGTTGAGGCCGAGAGTGAGAG	ATGGACGCCGAAATGAGAA

表 2 (续)

编号 No.	引物名称 Primer name	正向引物(5'-3') Forward sequence(5'-3')	反向引物(5'-3') Reverse sequence(5'-3')
#14	BoE209	ATCTATCCCATCCGCTCGTCA	AACCCCTATTCGCTTACTCC
#15	BoE875	CCGACAATGGCTGGAGTAGG	GATAAGCCGGTAGAGCATAAGGAG
#16	BoE237	AATCCCGAAAAGAGCGAAACC	CTGGGGAGCCGAGAAGGAG
#17	BoE134	CTCTTATTTCTGTAGGGCTTTTA	CCGTTGGAGATGACTGACTG
#18	BoE734	TCATCCAAAAGAAATCAGAGG	ACAGGGAGAAAAGAAAAGAGA
#19	BoE051	GAGTCTTCGTCTTCTTCTTCC	AGTCGCCATTATTAACACCTCTA
#20	BoE917	AACAACCCTTTCCTGACAC	AAAAACCAAAGAACTACAAAATA
#21	Class I SRK-K	CAATTTACAGAGAATAGTGA	ACCATTCCGGATATCCGCATTT
#22	Class II SRK-K	GAGGGCGAGAAGATCTTAATT	AAGACKATCATATTACCGAGC

利用陈文迪^[20]开发的 Class I 型特异性标记 PKC6F/PKC6R 和 Park 等^[17]开发的 Class II 型特异性引物 KD4/KD7 对 SRK 基因激酶区的 DNA 片段进行扩增(表 2 的 #21 和 #22)。为提高效率,两对引物加入同一 PCR 反应体系(11 μ L), 200 μ g/ μ L 的模板 DNA 1.0 μ L, 2 \times Accurate Taq Master Mix 5.0 μ L(湖南艾科瑞生物工程有限公司), 正反向引物(5 mmol/L)各 1 μ L, ddH₂O 3.0 μ L。PCR 反应程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 30 s; 98 $^{\circ}$ C 变性 10 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 (PKC6F/PKC6R 为 45 s, KD4/KD7 为 1 min 15 s), 72 $^{\circ}$ C 彻底延伸 2 min, 35 个循环。PCR 扩增产物利用配制的 1% 的琼脂糖凝胶进行电泳, 恒压 150 V 20 min。利用紫外凝胶成像仪系统进行拍照记录保存。

1.3 SSR 指纹图谱构建及遗传类群划分

根据 20 个羽衣甘蓝自交系的 SSR 扩增结果, 统计变异位点和基因型, 0 表示无扩增, 1 表示有扩增, 人工读带构建二元 0、1 数字指纹图谱。指纹编码方式为“引物序号_0/1”, 如 #6_010 表示编号为 #6 标记的 3 个变异位点编码分别为 0、1、0。计算引物的多态信息含量 (PIC, polymorphism information content) 值, 并利用 NTSYSY 软件中的等权重算术平均聚类 (UPGMA, unweighted pair group method with arithmetic mean) 方法对数字指纹进行聚类分析, 对材料进行遗传类群划分。多态信息含量计算公式如下。

$$H_j = \sum P_i^2 \quad j=1, 2, 3, \dots, n; i=1, 2, 3, \dots, n$$

其中, H_j 表示第 j 对引物的 PIC 值, P_i 表示第 i 个等位基因的基因频率。

1.4 SRK 基因测序分析

将 PCR 反应液用 FastPure Gel DNA Extraction Mini Kit 试剂盒(南京诺唯赞生物科技股份有限公司)进行纯化回收、连接 pEASY-T1 Cloning Vector

载体(北京全式金生物技术股份有限公司)、涂 LB 培养基、挑单克隆菌和摇菌后送苏州金唯智生物科技有限公司测序, 测序完成后, 在 NCBI 数据库中 BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.gov/Blast.cgi>) 比对, 根据 SRK 基因序列覆盖度和相似性确定 20 份羽衣甘蓝材料的 SRK 单元型。

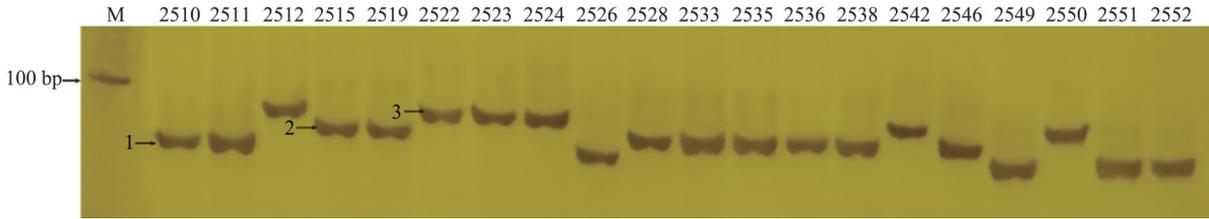
1.5 亲和指数测定

在不同遗传类群各选择 2 份自交系进行自交, 包括 Class I 型 SRK 单元型和 Class II 型 SRK 单元型, 在遗传类群中和遗传类群间选取 1~2 份自交系进行杂交, 包括 Class I 型不同 SRK 单元型间的杂交、Class I 型和 Class II 型 SRK 单元型间的杂交。通过花期人工授粉后, 统计授粉花朵数, 待种荚成熟后逐一考种, 计算花期自交和杂交亲和指数。亲和指数表示为花期自交结籽数、杂交结籽数分别占授粉总朵数的百分率。3 次生物学重复, 采用 SPSS 26 软件和 Excel 软件进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 SSR 引物多态性分析

利用王庆彪等^[1]开发的 20 对用于甘蓝遗传背景鉴定的 SSR 引物对 20 份羽衣甘蓝自交系进行了 PCR 检测, 结果发现, 20 对 SSR 引物在 20 份材料中, 共鉴定到 65 个等位变异, 平均每个位点含有 3.25 个等位变异, 其中高多态性引物有 11 对(等位变异数大于或等于 3), 包括 BoE607、BoE162、BoE966、BoE718(图 1)、BoE882、BoE699、BoE209、BoE875、BoE734、BoE051 和 BoE917, 分别有 5 个、7 个、3 个、3 个、6 个、6 个、4 个、4 个、3 个、3 个和 3 个变异位点, 多态信息含量在 0.4~0.83 之间。以上结果说明这套 SSR 引物对 20 份羽衣甘蓝自交系的鉴别能力较强。



M:2000 bp DNA Marker, 1, 2 和 3 表示 3 个不同的等位变异;材料编号同表 1, 下同

Different allelic variants are represented by 1, 2 and 3; Material numbers are the same as in Table 1, the same as below

图 1 SSR 引物 BoE718 对 20 份羽衣甘蓝自交系的扩增结果

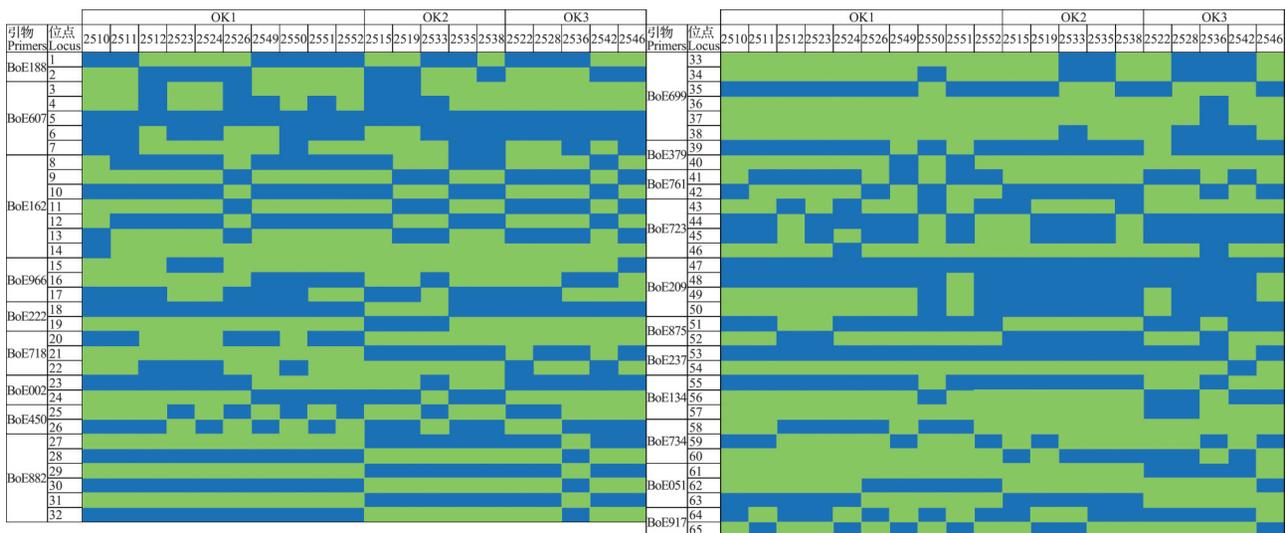
Fig. 1 Amplification results of SSR primer BoE718 on 20 kale inbred lines

2.2 羽衣甘蓝遗传指纹图谱构建与遗传类群划分

将 20 对 SSR 引物扩增结果转换为 0 和 1 的二元矩阵,其中 1 代表扩增条带存在,0 代表条带的缺失。基于这些标记位点,首次构建了羽衣甘蓝自交系的 SSR 遗传指纹图谱(图 2),显示了各个自交系间的多态性。为进一步分析自交系之间的遗传关系,基于二元矩阵数据进行系统聚类分析,使用 UPGMA 聚类算法对羽衣甘蓝自交系进行聚类。结果显示,在遗传相似系数为 0.558 处将羽衣甘蓝自交系聚类为 3 个遗传类群:类群 OK1、类群 OK2 和类群 OK3 (图 3)。遗传类群中所有自交系在同一 SSR 分子标记的指纹相同,即表示该指纹与遗传类群高度相关。通过指纹图谱分析,与遗传类群 OK1 高度相关的指纹有 #5_10、#9_010101 和 #16_10;与遗传类群 OK2 高度相关的指纹有 #6_010、#9_101010、#11_10、#12_01、#14_1111、#15_01、#16_10、#17_100 和 #19_001;与遗传类群 OK3 高度相关的指纹有 #5_10

和 #7_10;此外,特异指纹分析显示,遗传类群 OK1 中,指纹 #2_01100、#10_010000 和 #14_1000 分别在材料 2549、2550 和 2551 中特异;遗传类群 OK2 中,指纹 #10_110000 在材料 2535 中特异;遗传类群 OK3 中,指纹 10_110111 和 13_0111 在材料 2536 中特异,指纹 #14_1001 在材料 2546 中特异(表 3 和图 4)。

遗传类群 OK1 包括 10 个自交系,叶色以红紫色为主,叶形为紧凑皱叶或者披散皱叶,波浪状叶缘,包括自交系 2510、2511、2512、2523、2524、2526、2549、2550、2551 和 2552,其中前 5 个自交系的表型高度相似。遗传类群 OK2 和 OK3 均为光滑叶,叶缘包括波状和裂叶,遗传类群 OK2 包括自交系 2515、2519、2533、2535 和 2538,其中自交系 2515 和 2533 的表型相似,自交系 2519 和 2538 的表型相似;遗传类群 OK3 包括 2522、2528、2536、2542 和 2546,其中自交系 2522、2528 和 2542 表型高度相似。另外遗传类群 OK2 基本为白色外叶,遗传类群 OK3 基本为红紫色叶。



蓝色和绿色方块分别代表 1 和 0, 数字 1 ~ 65 代表不同的变异位点

The blue and green square represent the value 1 and 0, respectively, numbers 1-65 represent different mutation sites

图 2 20 份羽衣甘蓝自交系的 SSR 指纹图谱数据库

Fig. 2 SSR finger-printing database of 20 kale inbred lines

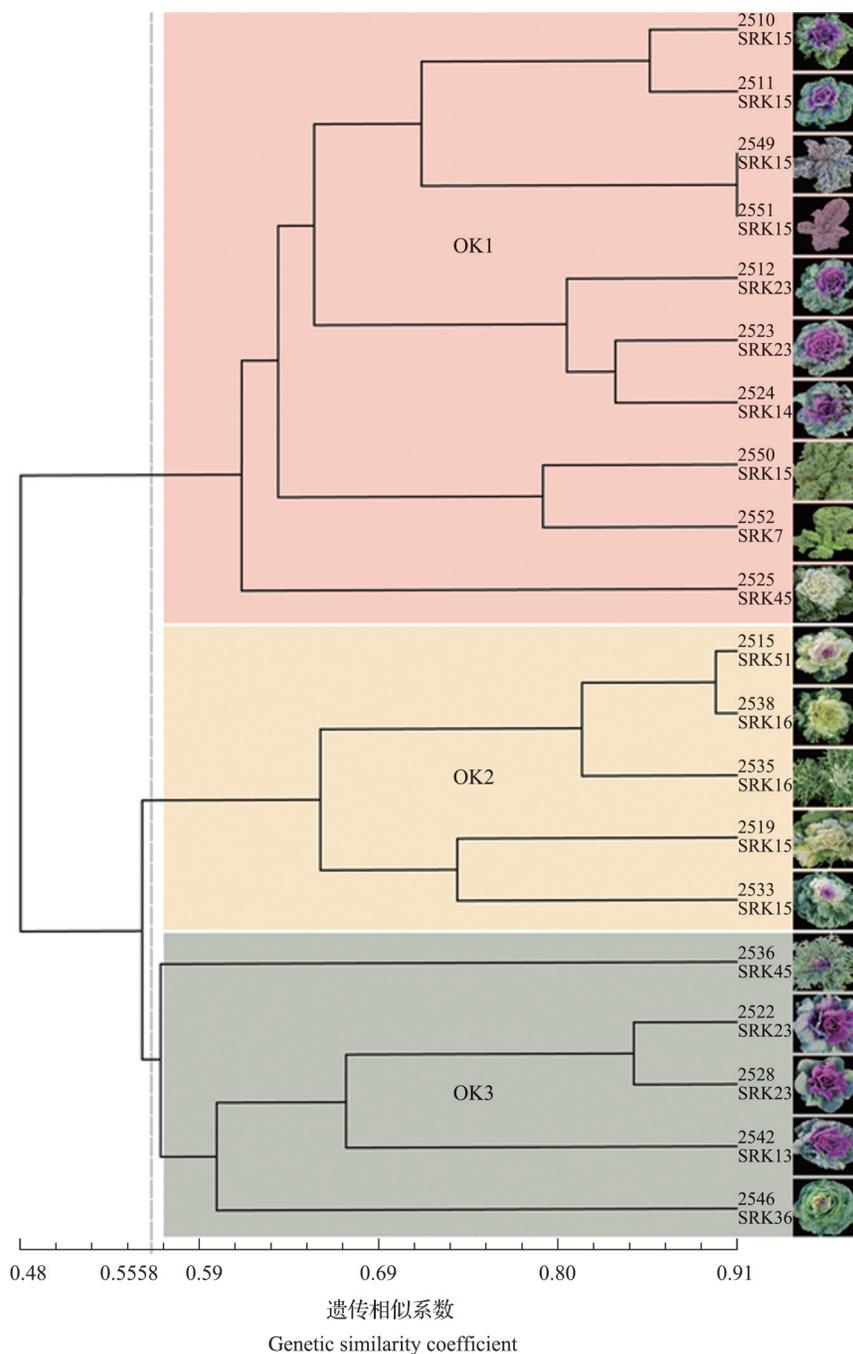


图 3 羽衣甘蓝自交系二元矩阵聚类
Fig. 3 Binary matrix cluster of kale inbred lines

表 3 20 份羽衣甘蓝自交系的数字 0,1 矩阵
Table 3 Digital 0, 1 matrix of 20 kale inbred lines

遗传类群 Genetic group	编号 Number	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9	#10	#11	#12	#13	#14	#15	#16	#17	#18	#19	#20
OK1	2510	10	00111	0010011	001	10	100	10	01	010101	001000	10	01	0110	1100	10	10	100	010	001	10
	2511	10	00111	1010100	001	10	100	10	01	010101	001000	10	10	0110	1100	10	10	100	010	001	01
	2512	01	11100	1010100	001	10	001	10	01	010101	001000	10	10	1000	1100	01	10	100	100	001	10
	2523	01	00110	1010100	100	10	001	10	10	010101	001000	10	10	0110	1100	01	10	100	100	001	10
	2524	01	00110	1010100	100	10	001	10	01	010101	001000	10	10	1101	1100	10	10	100	100	001	01

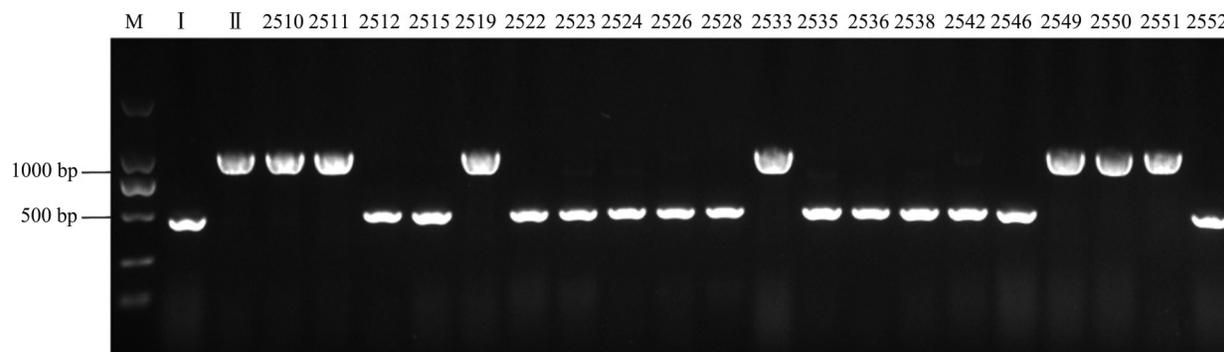


图5 特异引物PKC6F/PKC6R和KD4/KD7的PCR扩增结果

Fig. 5 PCR amplification results of specific primers PKC6F/PKC6R and KD4/KD7

将PKC6F/PKC6R和KD4/KD7的扩增产物进行测序,在NCBI数据库中进行BLAST分析,确定不同材料的SRK单元型。结果发现,羽衣甘蓝3个遗传类群共包括9个不同的SRK单元型,遗传类群OK1包括SRK7、SRK14、SRK15、SRK23和SRK45,

遗传类群OK2包括SRK15、SRK16和SRK51,遗传类群OK3包括SRK13、SRK23、SRK36和SRK45;除SRK15、SRK23和SRK45外,其余6个SRK单元型特异分布在不同的遗传类群中(表4)。

表4 基于UPGMA聚类分析对20个羽衣甘蓝自交系分组

Table 4 Grouping of 20 kale inbred lines based on UPGMA cluster analysis

类群Cluster	材料Materials	SRK单元型SRK haplotype	类群Cluster	材料Materials	SRK单元型SRK haplotype
OK1	2510	SRK15	OK2	2515	SRK51
	2511	SRK15		2519	SRK15
	2512	SRK23		2533	SRK15
	2523	SRK23		2535	SRK16
	2524	SRK14		2538	SRK16
	2526	SRK45	OK3	2522	SRK23
	2549	SRK15		2528	SRK23
	2550	SRK15		2536	SRK45
	2551	SRK15		2542	SRK13
2552	SRK7	2546		SRK36	

2.4 羽衣甘蓝不同遗传类群SRK单元型分布及叶形叶色分析

分析不同遗传类群羽衣甘蓝自交系的SRK单元型分布,结果发现,Class I型SRK单元型和Class II型S单元型在不同遗传类群中存在明显差异(表5)。遗传类群OK1的5种SRK单元型中,有4种为Class I型(SRK7、SRK14、SRK23和SRK45),共5份自交系;1种为Class II型(SRK15),包含5个自交系,占OK1类群的50%。遗传类群OK2的3种SRK单元型中,包括SRK16和SRK51两种Class I型SRK单元型,分别有2份和1份自交系,该类群中Class I型SRK单元型材料占主导地位,OK2中也存在1种Class II型SRK单元型(SRK15)。遗传类群OK3的4种SRK单元型均为Class I型,包括SRK13、

SRK23、SRK36和SRK45,共5份材料。综上,高代自交不亲和系育种可能会使Class II型SRK单元型逐渐丧失,不利于维持Class I型和Class II型SRK单元型间平衡和SRK单元型的多样性。

表5 20个羽衣甘蓝自交系SRK单元型的分布

Table 5 Distribution of SRK haplotypes in 20 kale inbred lines

类群Cluster	S单元型S haplotype	类型Type	数量Quantity
OK1	SRK7	Class I型	1
	SRK14	Class I型	1
	SRK15	Class II型	5
	SRK23	Class I型	2

表 5 (续)

类群 Cluster	S 单元型 S haplotype	类型 Type	数量 Quantity
OK2	SRK45	Class I 型	1
	SRK15	Class II 型	2
	SRK16	Class I 型	2
OK3	SRK51	Class I 型	1
	SRK13	Class I 型	1
	SRK23	Class I 型	2
	SRK36	Class I 型	1
	SRK45	Class I 型	1

叶形叶色分析发现,遗传类群 OK1 的 5 种 SRK 单元型叶缘均为波浪状,SRK15 单元型包括 5 份自交系(2510、2511、2549、2550 和 2551),占 50%,其中 2510 和 2511 的叶色叶形为红紫色紧凑皱叶,2549 和 2551 为红色披散皱叶,2550 为绿色披散皱叶;SRK23 单元型包括 2 份自交系(2512 和 2523),占 20%,均为红紫色紧凑皱叶;SRK14、SRK7、SRK45 单元型均只包括 1 份自交系(分别为 2524、2552、2526),均占 10%,分别为红紫色紧凑皱叶,绿色披散皱叶和白色紧凑皱叶。遗传类群 OK2 的 3 种 SRK 单元型均为光滑叶,SRK15 单元型包括 2 份自交系(2519 和 2533)均为波浪状叶缘,分别为黄白色叶和外白内紫色叶,占 40%;SRK16 单元型包括两份自交系(2535 和 2538),分别为白色叶、裂叶叶缘和黄白色叶、波浪状叶缘,占 40%;SRK51 单元型只包括 1 份自交系(2515),占 20%,为外白内紫色叶、

波浪状叶缘。遗传类群 OK3 的 4 种 SRK 单元型均为光滑叶,SRK23 单元型包括两份自交系(2522 和 2528),占 40%,均为红紫色叶、波浪状叶缘;SRK13、SRK36、SRK45 单元型均只包括 1 份自交系(分别为 2542、2546、2536),均占 20%,分别为红紫色叶、波浪状叶缘,外白内紫色叶、波浪状叶缘和紫色叶、裂叶叶缘(表 1)。

2.5 羽衣甘蓝自交系花期自交/杂交亲和性验证

通常认为花期亲和指数在 0.5 或 1 以下为强自交不亲和系,在 1~3 之间为弱自交不亲和系,3~10 之间为弱自交亲和系,10 以上为强自交亲和系^[11]。挑选羽衣甘蓝不同遗传类群材料进行自交和杂交,分别有 6 个杂交和 6 个花期自交(表 6)。6 份自交系的花期自交测定结果发现,属于 Class I 型 SRK 单元型的 5 份自交系均表现强自交不亲和,属于 Class II 型 SRK 单元型的 1 份自交系表现弱自交亲和,亲和指数达到 5.74。Class I 型相同 SRK 单元型材料间杂交表现为强不亲和,不同 SRK 单元型材料杂交表现为强亲和,且所有 Class I 型 SRK 单元型材料与 Class II 型 SRK15 单元型材料杂交均表现为强亲和。因此,在配制羽衣甘蓝杂交组合时,在优先考虑不同遗传类群的前提下,兼顾考虑 SRK 单元型,不配制相同 Class I 型 SRK 单元型材料间的杂交组合。以 SRK23 为例,有 4 份材料属于 SRK23 单元型,分别是遗传类群 OK1 的 2512、2523 和 OK3 的 2522、2528,实际杂交育种过程中应避免这 4 份材料的任意两两杂交。其余含有相同 Class I 型 SRK 单元型的两组材料(2526 和 2536、2535 和 2538)也应避免配制杂交组合。

表 6 不同羽衣甘蓝自交系的自交、杂交亲和指数

Table 6 Compatible index of self-pollination or cross-pollination with different kale inbred lines

类型 Type	自交系或杂交组合 Inbred line or hybrid combination	遗传类群 Genetic cluster	花朵数 Number of flowers	种子数 Seed number	亲和指数 Compatible index
花自交 Flowering self-pollination	2546(SRK36)	OK3	18	0	0i
	2524(SRK14)	OK1	14	1	0.07i
	2535(SRK16)	OK2	19	2	0.11i
	2542(SRK13)	OK3	18	13	0.72g
	2538(SRK16)	OK2	16	12	0.75g
	2510(SRK15)	OK1	23	132	5.74f
杂交 Flowering cross-pollination	2522×2528(SRK23×SRK23)	OK3×OK3	19	6	0.36h
	2546×2515(SRK36×SRK51)	OK3×OK2	17	414	24.35e
	2542×2551(SRK13×SRK15)	OK3×OK1	20	524	26.2d

表 6 (续)

类型 Type	自交系或杂交组合 Inbred line or hybrid combination	遗传类群 Genetic cluster	花朵数 Number of flowers	种子数 Seed number	亲和指数 Compatible index
杂交 Flowering cross-pollination	2523×2519(SRK23×SRK15)	OK1×OK2	15	491	32.73c
	2552×2549(SRK7×SRK15)	OK1×OK1	19	764	40.21b
	2550×2549(SRK15×SRK15)	OK1×OK1	20	885	43.25a

不同字母表示差异显著($P<0.05$)

Different letters indicate a significant difference ($P<0.05$)

3 讨论

在植物的自交不亲和性中,S单元型和遗传背景之间存在密切的关系,S单元型是植物自交不亲和性的关键因素,它们位于植物基因组中的特定位点,并影响花粉和雌蕊之间的亲和性^[21],而遗传背景则反应了个体的遗传构成,包括基因型、遗传多样性以及遗传结构等。研究表明,S单元型在不同遗传背景的甘蓝品种中呈不均匀分布,而不同S单元型的基因频率也不尽相同,导致了S单元型在遗传过程中有了优势和弱势之分,不同的遗传背景可能导致甘蓝群体具有特异的优势S单元型分布,从而影响自交不亲和性的表现,同时育种方式的不同会使甘蓝群体丢失弱势S单元型而积累优势S单元型^[20]。因此,理解S单元型与遗传背景之间的关系对于揭示甘蓝自交不亲和性的遗传机制具有重要意义。未来的研究可以进一步探讨不同遗传背景对S单元型分布的影响,及其在甘蓝育种中维持S单元型多样性的重要价值。

SSR标记因具有基因组分布广泛、数量丰富、重复性好、多态性高、共显性和成本低等优点而被广泛应用于亲缘关系分析、遗传图谱构建和基因定位等研究^[1-2, 22-25]。传统的遗传背景鉴定方法是基于材料的表型差异,存在费时费力和材料表型差异小时鉴定困难等缺点,而利用SSR分子标记可快速可靠的实现材料遗传背景的鉴定。谭晨等^[26]和郭宁等^[27]分别利用20对和46对SSR引物对羽衣甘蓝品种进行了亲缘关系和遗传多样性分析,但没进行自交不亲和S单元型的鉴定。本研究首先利用20对SSR引物对20份羽衣甘蓝自交系进行扩增,首次构建了20份羽衣甘蓝自交系的数字指纹遗传图谱,并通过UPGMA聚类方法将其聚类为3个遗传类群(OK1、OK2和OK3),遗传类群OK1的材料均为皱叶,遗传类群OK2和OK3的材料均为光滑叶,且叶形叶色相似的材料有聚在一起的趋势,后续又利用

PKC6F/PKC6R和KD4/KD7引物鉴定出20份羽衣甘蓝材料有9种SRK单元型,为羽衣甘蓝的杂种优势育种中的杂交组合配置提供了参考。

植物的自交不亲和性按花的形态分为同型花蕊型自交不亲和(Homomorphic self-incompatibility)和异型花蕊型自交不亲和(Heteromorphic self-incompatibility)^[28]。同型花蕊型自交不亲和又可分为配子体型自交不亲和(GSI, gametophytic self-incompatibility)和孢子体型自交不亲和(SSI, saprophytic self-incompatibility)^[29]。羽衣甘蓝属孢子体型自交不亲和植物,当孢子体型自交不亲和发生时,花粉与柱头乳突细胞之间会形成大量的胼胝质抑制受精^[20]。SRK是与自交不亲和位点连锁的3个基因之一,其单独表达就能使植株表现为自交不亲和^[30]。迄今为止,甘蓝中基于SRK基因鉴定到的SRK单元型有50多个。通过SRK基因特异标记可将芸薹属自交不亲和性分为Class I型和Class II型,前者自交不亲和,后者自交亲和^[31]。郑敏等^[32]用SRK特异标记PK1/PK4、KD4/KD7对23份甘蓝自交不亲和系进行了SRK单元型鉴定,发现7份Class I、Class II型杂合材料,16份Class I型纯合材料,同一自交不亲和系作为母本与不同单倍型材料杂交后出现结籽数量差异大的现象。Chen等^[33]发现PK1/PK4引物存在不稳定情况,开发了新的SRK基因特异Class I型引物PKC6F/PKC6R,并结合前人开发的Class II型引物KD4/KD7对58份越冬甘蓝材料进行了SRK单元型鉴定,发现了15份Class II型SRK单元型材料和43份Class I型SRK单元型材料,而羽衣甘蓝中SRK单元型鉴定的报道较少。本研究利用2对SRK基因激酶区特异引物对羽衣甘蓝不同遗传类群的SRK单元型进行了鉴定,发现SRK15单元型主要分布在遗传类群OK1中。通过亲和指数分析,发现I型SRK单元型材料自交表现为不亲和,II型SRK15单元型材料自交表现为亲和,不同SRK单元型材料杂交表现为亲和,且所有Class I型SRK单

倍型材料与 Class II 型 SRK15 单元型材料杂交均表现为亲和。Class II 型 SRK15 单元型材料可利用蜜蜂授粉,避免人工蕾期授粉繁殖亲本,大大节省制种成本。对于杂交种的组配,可选用不同 SRK 单元型材料间的杂交组合,以避免材料间发生杂交不亲和。

参考文献

- [1] 王庆彪, 张扬勇, 庄木. 中国 50 个甘蓝代表品种 EST-SSR 指纹图谱的构建. 中国园艺文摘, 2016, 32(1): 227-228
Wang Q B, Zhang Y Y, Zhuang M. Construction of EST-SSR fingerprints of 50 representative cabbage varieties in China. Chinese Horticultural Abstracts, 2016, 32(1): 227-228
- [2] 李晓娟, 赵文菊, 赵孟良, 邵登魁, 马一栋. 球茎甘蓝 SSR 分子标记开发及指纹图谱构建. 南方农业学报, 2023, 54(1): 22-33
Li X J, Zhao W J, Zhao M L, Shao D K, Ma Y D. Development of SSR molecular markers and fingerprinting of bulbous kale. Southern Journal of Agriculture, 2023, 54(1): 22-33
- [3] Kusaba M, Nishio T, Satta Y, Hinata K, Ockendon D. Striking sequence similarity in inter- and intra-specific comparisons of class I *SLG* alleles from *Brassica oleracea* and *Brassica campestris*: Implications for the evolution and recognition mechanism. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1997, 94(14): 7673-7678
- [4] Iwano M, Takayama S. Self/non-self discrimination in angiosperm self-incompatibility. Current Opinion in Plant Biology, 2012, 15(1): 78-83
- [5] Stein J C, Howlett B, Boyes D C, Nasrallah M E, Nasrallah J B. Molecular cloning of a putative receptor protein kinase gene encoded at the self-incompatibility locus of *Brassica oleracea*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1991, 88(19): 8816-8820
- [6] Suzuki G, Kakizaki T, Takada Y, Shiba H, Takayama S, Isogai A, Watanabe M. The S haplotypes lacking *SLG* in the genome of *Brassica rapa*. Plant Cell Reports, 2003, 21(9): 911-915
- [7] Lalonde B A, Nasrallah M E, Dwyer K G, Chen C H, Barlow B, Nasrallah J B. A highly conserved *Brassica* gene with homology to the S-locus-specific glycoprotein structural gene. The Plant Cell, 1989, 1(2): 249-258
- [8] Hatakeyama K, Takasaki T, Suzuki G, Nishio T, Watanabe M, Isogai A, Hinata K. The S receptor kinase gene determines dominance relationships in stigma expression of self-incompatibility in *Brassica*. The Plant Journal, 2001, 26(1): 69-76
- [9] Okamoto S, Sato Y, Sakamoto K, Nishio T. Distribution of similar self-incompatibility (S) haplotypes in different genera, *Raphanus* and *Brassica*. Sexual Plant Reproduction, 2004, 17(1): 33-39
- [10] 田磊, 庄木, 苗雯雯, 方智远, 刘玉梅, 杨丽梅, 张扬勇. 甘蓝自交系 S 单元型的快速分类鉴定//中国园艺学会, 中国农业科学院蔬菜花卉研究所. 中国园艺学会 2011 年学术年会论文摘要集. 北京: 园艺学会, 2011: 106
Tian L, Zhuang M, Miao W W, Fang Z Y, Liu Y M, Yang L M, Zhang Y Y. Rapid classification and identification of S-haplotype of cabbage inbred lines//Chinese Society for Horticultural Science, Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences. Abstracts of 2011 annual academic conference of Chinese Horticultural Society. Beijing: Horticultural Society, 2011: 106
- [11] 方智远, 孙培田, 刘玉梅. 甘蓝杂种优势利用和自交不亲和系选育的几个问题. 中国农业科学, 1983, 16(3): 51-62
Fang Z Y, Sun P T, Liu Y M. Several problems on utilization of cabbage heterosis and breeding of self-incompatible lines. Scientia Agricultura Sinica, 1983, 16(3): 51-62
- [12] 张恩慧. 用荧光显微法测定甘蓝的自交不亲和性. 陕西农业科学, 1989(1): 6-7
Zhang E H. Determination of self-incompatibility of cabbage by fluorescence microscopy. Shaanxi Agricultural Sciences, 1989(1): 6-7
- [13] Kandasamy M K, Paolillo D J, Faraday C D, Nasrallah J B, Nasrallah M E. The S-locus specific glycoproteins of *Brassica* accumulate in the cell wall of developing stigma papillae. Developmental Biology, 1989, 134(2): 462-472
- [14] Nishio T, Hinata K. Analysis of S-specific proteins in stigma of *Brassica oleracea* L. by isoelectric focusing. Heredity, 1977, 38(3): 391-396
- [15] Tang J, Zhang J, Ma C, Tang W, Gao C, Li F, Wang X, Liu Y, Fu T. CAPS and SCAR markers linked to maintenance of self-incompatibility developed from SP11 in *Brassica napus* L.. Molecular Breeding, 2009, 24(3): 245-254
- [16] Nishio T, Sakamoto K, Yamaguchi J. PCR-RFLP of S locus for identification of breeding lines in cruciferous vegetables. Plant Cell Reports, 1994, 13(10): 546-550
- [17] Park J I, Lee S S, Watanabe M, Takahata Y, Nou I S. Identification of S-alleles using polymerase chain reaction-cleaved amplified polymorphic sequence of the S-locus receptor kinase in inbreeding lines of *Brassica oleracea*. Plant Breeding, 2002, 121(3): 192-197
- [18] 蓝兴国, 解莉楠, 于晓敏, 李玉花. 羽衣甘蓝自交不亲和系的选育及 S13b 单倍型的鉴定. 北京林业大学学报, 2006(52): 31-39
Lan X G, Xie L N, Yu X M, Li Y H. Self-incompatible line breeding of kale and identification of S13b haplotype. Journal of Beijing Forestry University, 2006(52): 31-39
- [19] 苗雯雯, 田磊, 庄木, 刘玉梅, 杨丽梅, 张扬勇, 方智远. 甘蓝一代杂种 S 单元型的分布. 中国蔬菜, 2013(10): 23-28
Miao W W, Tian L, Zhuang M, Liu Y M, Yang L M, Zhang Y Y, Fang Z Y. Distribution of S-type of cabbage F₁ hybrids.

- Chinese Vegetables, 2013 (10): 23-28
- [20] 陈文迪. 越冬甘蓝自交不亲和S单元型的鉴定及中甘2418双亲杂交不亲和的克服. 北京: 中国农业科学院, 2022
- Chen W D. Identification of self-incompatible S-haplotypes and breakdown of cross-incompatibility between two parents of elite hybrid zhong-gan 2418 in overwinter cabbage. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2022
- [21] Sun P, Kao T H. Self-incompatibility in *Petunia inflata*: The relationship between a self-incompatibility locus F-box protein and its non-self S-RNases. *Plant Cell*, 2013, 25 (2): 470-485
- [22] Wang Z, Weber J L, Zhong G, Tanksley S D. Survey of plant short tandem DNA repeats. *Theoretical and Applied Genetics*, 1994, 88(1): 1-6
- [23] Weber J L. The informativeness of human (dC-dA)_n(dG-dT)_n polymorphism. *Genomics*, 1990, 7: 524-530
- [24] Pavani M, Sundaram R M, Ramesha M S, KaviKishor P B, Kemparaju K B. Prediction of heterosis in rice based on divergence of morphological and molecular markers. *Journal of Genetics*, 2018, 97(5): 1263-1279
- [25] Liu Y L, Geng Y P, Song M L, Zhang P F, Hou J L, Wang W Q. Genetic structure and diversity of *Glycyrrhiza* populations based on transcriptome SSR markers. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2019, 37(5): 401-412
- [26] 谭晨, 刘慧春, 张加强, 周江华, 朱开元. 观赏羽衣甘蓝主要品种间的SSR遗传多样性分析. *分子植物育种*, 2020, 18 (16): 5395-5402
- Tan C, Liu H C, Zhang J Q, Zhou J H, Zhu K Y. Analysis of SSR genetic diversity among main varieties of ornamental kale (*Brassica oleracea* L.). *Molecular Plant Breeding*, 2020, 18 (16): 5395-5402
- [27] 郭宁, 高怀杰, 韩硕, 宗梅, 王桂香, 张月云, 刘凡. 观赏羽衣甘蓝SSR标记分型与亲缘关系研究. *植物遗传资源学报*, 2017, 18 (2): 349-357, 366
- Guo N, Gao H J, Han S, Zong M, Wang G X, Zhang Y Y, Liu F. Genotypic and genetic relationship analysis of ornamental kale (*Brassica oleracea* var. *acephala*) by SSR markers. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2017, 18 (2): 349-357, 366
- [28] Watanabe M, Hatakeyama K, Takada Y, Hinata K. Molecular aspects of self-Incompatibility in *Brassica* species. *Plant and Cell Physiology*, 2001, 42(6): 560-565
- [29] de Nettancourt D. Incompatibility in angiosperms. *Sexual Plant Reproduction*, 1997, 10(4): 185-199
- [30] Takasaki T, Hatakeyama K, Suzuki G, Watanabe M, Isogai A, Hinata K. The S receptor kinase determines self-incompatibility in *Brassica* stigma. *Nature*, 2000, 403(6772): 913-916
- [31] Nasrallah J, Nasrallah M. Pollen [mdash] stigma signaling in the sporophytic self-incompatibility response. *The Plant Cell*, 1993, 5(10): 1325-1335
- [32] 郑敏, 朱陈曾, 刘梦慈, 徐冰冰, 马存发, 李勤菲, 任雪松, 司军, 宋洪元. 基于SRK基因序列分析的甘蓝自交不亲和系单倍型鉴定及验证. *中国蔬菜*, 2018, (3): 32-39
- Zheng M, Zhu C Z, Liu M C, Xu B B, Ma C F, Li Q F, Ren X S, Si J, Song H Y. Haplotype identification and verification of cabbage self-incompatibility lines based on *SRK* gene sequence analysis. *Chinese Vegetables*, 2018, (3): 32-39
- [33] Chen W, Zhang B, Ren W, Chen L, Fang Z, Yang L, Zhuang M, Lv H, Wang Y, Zhang Y. An identification system targeting the *SRK* gene for selecting S-haplotypes and self-compatible lines in cabbage. *Plants*, 2022, 11 (10): 1372