



甘蓝型油菜自交不亲和性基因遗传分析与初定位

谢立人¹, 星晓蓉¹, 李开祥^{1,2,*}, 杜德志^{1,2,*}

¹青海大学农林科学院, 西宁810016

²青海省春油菜遗传改良重点实验室, 西宁810016

*共同通信作者: 杜德志(qhurapa@126.com)、李开祥(18997174190@163.com)

摘要: 自交不亲和性是利用油菜(*Brassica* sp.)杂种优势的途径之一。自交不亲和系杂种有诸如没有不育胞质存在的负效应、恢复源广泛、可获得高质量F₁代种子等优点, 因此研究调控自交不亲和性的基因对利用油菜杂种优势具有重要意义。以甘白(甘蓝型油菜×白菜型油菜, *B. napus* × *B. rapa*)杂交选育的甘蓝型油菜自交不亲和系No. 234为研究对象, 通过遗传规律分析发现No. 234不同遗传背景的恢复系的自交不亲和性分别受1、2对隐性基因(*BnSI1*、*BnSI2*)控制; 利用AFLP(扩增片段长度多态性)标记和BSA-seq(极端性状混池重测序)将自交不亲和基因*BnSI1*初步定位在A07染色体2 Mb区间内。该研究为进一步定位、克隆*BnSI1*基因及后续的功能研究提供研究基础。

关键词: 甘蓝型油菜; 自交不亲和性; 遗传规律分析; 初步定位; 分子标记

Genetic analysis and initial location of self-incompatibility genes in *Brassica napus*

XIE Liren¹, XING Xiaorong¹, LI Kaixiang^{1,2,*}, DU Dezhi^{1,2,*}

¹Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Qinghai University, Xining 810016, China

²Key Laboratory of Spring Rapeseed Genetic Improvement of Qinghai Province, Xining 810016, China

*Co-corresponding authors: Du DZ (qhurapa@126.com), Li KX (18997174190@163.com)

Abstract: As one of the ways to exploit the heterosis in rape (*Brassica* sp.), the self-incompatibility line has no negative effect on the existence of sterile cytoplasm, has a wide range of recovery sources, can obtain high-quality F₁ generation seeds, etc. Therefore, it is important to study relative genes regulating self-incompatibility to exploit the heterosis in rape. In this study, the self-incompatibility line No. 234, a *B. napus* selected from a cross between *B. napus* and *B. rapa*, was used to study the genetic pattern. It shows that the self-incompatibility of No. 234 was controlled by one and two pairs of recessive genes (*BnSI1* and *BnSI2*), respectively, for recovery lines of different genetic backgrounds. AFLP (amplified fragment length polymorphism) markers and BSA-seq (bulk-segregant analysis sequencing) were used to initially locate the self-incompatibility gene *BnSI1* in the 2 Mb interval of chromosome A07. This study may lay the foundation for further localization and cloning of *BnSI1* gene, and subsequent functional studies.

Key words: *Brassica napus*; self-incompatibility; genetic pattern analysis; initial location; molecular marker

收稿 2023-11-20 修定 2023-12-28

资助 青海省帅才科学家负责制项目(2022-NK-170)。

油菜(*Brassica* sp.)是我国第一大油料作物(王汉中和殷艳2014)。高产是油菜重要的育种目标,利用杂种优势是提高产量的有效方法,而自交不亲和性(self-incompatibility, SI)作为十字花科作物的重要性状,是利用杂种优势的途径之一(贾永鹏等2016)。自交不亲和性是指雌雄蕊发育正常的有花植物,在识别本身的花粉或特定基因型的花粉后不能正常授粉或结实的一种现象,这种现象在植物长期进化过程中形成,是一种避免自交与近亲繁殖的保护机制,自交不亲和性有助于维持生物遗传多样性和适应环境的能力(Nishio和Hinata 1977)。由于自交不亲和性具有重要的生产应用价值,早在20世纪50年代国外已经有利用自交不亲和性对甘蓝(*B. oleracea* var. *capitata*)进行杂交种配制的研究报道,我国也在1983年左右初步利用自交不亲和性对甘蓝进行杂交制种(方智远等1983)。马朝芝等(1998)在傅廷栋培育的自交不亲和甘蓝型油菜的基础上,培育了“双低”自交不亲和品种‘S-1300’,实现了在生产上三系配套,其选育方式具有周期短、恢复系广、无不良细胞质效应、制种产量高等优点(沈金雄等2001),所以自交不亲和性在杂种优势利用的生产实践方面有较大的意义。

前人研究认为甘蓝型油菜(*B. napus*)自交不亲和性由S位点复等位基因控制, *SP11/SCR*和*SRK*等位基因的多样性共同进化,形成了一系列S单倍型,这些单倍型编码相应的配体-受体对。这些组合以整体的方式传递给子代,几乎没有发生重组。这些不同的组合被分为不同的S单倍型(Doucet等2016)。除此之外,还有一些影响自交不亲和发生的基因(*MLPK*、*ARCI*等)也参与在自交不亲和和信号通路中(Samuel等2008; Kakita等2007)。由于S单倍型之间的显隐性关系和通路中基因的存在,自交不亲和性性状遗传模式较为复杂,定位并克隆自交不亲和性相关基因具有比较重要的意义。极端性状混池重测序(bulked-segregant analysis sequencing, BSA-seq)是通过构建极端表型DNA混池与高通量测序技术相结合,快速定位与性状相关基因的方法。传统的定位耗时较长,利用传统分子标记与BSA重测序结合对基因定位的研究越来越多,在小麦(*Triticum aestivum*)、大豆(*Glycine max*)、油菜

等作物中都有成功定位抗病基因、茎秆颜色、叶色、花色、株高等相关基因的成功案例(赵传纪2021; Shen等2003; 范立川2002)。在过去的30年里,对甘蓝型油菜自交不亲和反应的研究主要集中在SI识别基因的鉴定、SI信号转导、S单倍型的显隐性互作及自交不亲和分子机理的解析中,前人对自交不亲和性相关基因的研究大多采用同源克隆的方法,目前未见正向遗传学研究方法对甘蓝型油菜自交不亲和性基因的报道。本研究以甘蓝型油菜和白菜型油菜(*B. rapa*)杂交选育的甘蓝型油菜自交不亲和系No. 234为研究对象,通过遗传分析、基因定位,初步定位控制自交不亲和系No. 234自交不亲和性状的基因*BnSI1*,为鉴定该目标基因并且进一步研究其功能提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

用5个甘蓝型油菜(*Brassica napus* L.)自交亲和系No. 3071、No. 2036、No. 2053、No. 2063、No. 2073与自交不亲和系No. 234 [经甘蓝型油菜×白菜型油菜(*B. rapa* L.)杂交,简称“甘白杂交”选育]正反交,播种于青海大学农林科学院试验地,田间加强水肥管理与除杂工作。

1.2 自交不亲和性基因*BnSI1*的初定位

1.2.1 基因*BnSI1*定位群体构建

为了加快自交不亲和性状的定位速度,我们将组合No. 3071×No. 234中含有的单位点基因认定为*BnSI1*基因,以自交亲和系No. 3071为受体亲本、自交不亲和系No. 234为供体亲本进行回交,构建含有*BnSI1*基因的分离群体。在BC₁及BC₂、BC₃群体中,亲和与不亲和子代表型分离比均符合孟德尔1:1的分离比例,其中BC₁和BC₃分离群体用于*BnSI1*基因的定位。

1.2.2 F₂、BC₁田间亲和性调查

参考王金勋(1994)对十字花科自交不亲和性的研究方法对亲和性进行调查。在油菜植株顶端开有3~5朵花时,将已开放的花摘除掉并去除顶端花蕾,对群体中单株的主枝或较为强壮的一次分枝进行套袋,用曲别针别紧。自交袋连续拍打10 d (中午温度升高时最佳),起到辅助授粉的作用。每

隔1 d把纸袋向上抽提,抽提纸袋时若有侧芽上的花或花蕾露出纸袋外要及时把它打掉,以免外来花粉污染。选20个中下部角果统计亲和指数(self-compatibility index, SCI), $SCI = \text{籽粒数} / \text{花朵数}$ 。如果一个植株的 $SCI \geq 1$ 就判定其为自交亲和; 如果一个植株的 $SCI < 1$, 就判定其为自交不亲和(图1)。

1.2.3 DNA提取

在 BC_1F_1 群体苗期取约2 cm²的叶片于离心管中, 放入-20°C冰箱保存备用。提前制备质量分数为2%的十六烷基三甲基溴化铵(cetyltrimethylammonium bromide, CTAB)抽提缓冲液提取该群体的DNA。

1.2.4 利用BSA法构建基因池

参考Michelmore等(1991)的方法, 从 BC_1F_1 群体DNA中选择12株自交亲和单株和12株自交不亲和单株的DNA, 分别构建2个自交亲和基因池, 以及2个自交不亲和基因池。

1.2.5 扩增片段长度多态性标记筛选

在 BC_1F_1 群体筛选扩增片段长度多态性(amplified fragment length polymorphism, AFLP)标记, 用2种酶切组合(*EcoRI/MseI*、*PstI/MseI*)。在37°C对DNA模板进行酶切, 时间为5~6 h, 酶切结束后在65°C下进行酶失活1 h。然后进行连接, 在4°C连接过夜。连接体系中EAD (endonuclease adapter)接头由EF和ER等量混合, 经过“65°C、10 min→37°C、10 min→室温”处理后得到; PAD (pre-amplification primer adapter)和MAD (matched amplification primer, 或selective amplification primer)接头制备方法

同EAD接头。以酶切/连接产物为DNA模板, EA/MC、EA/MG以及P0/MC、P0/MG为预扩增引物, 使用这些引物组合进行预扩增。对预扩增后的产物稀释30倍, 作为选择性扩增的模板; EA/MC预扩引物组合的选扩引物EA01~EA16/MC01~MC16自由组合共有256对进行扩增, 4种预扩引物对应的共有1 024对选扩引物组合进行AFLP分析。以上预扩增、选择性扩增引物的序列、反应体系及反应程序参考赵会彦(2014)所述方法。选扩产物使用质量分数为6%的聚丙烯酰胺凝胶电泳检测, 银染和显影所用的试剂与方法参照陆光远(2003)所述(Xiao等2012)。

1.2.6 遗传连锁图谱构建

筛选出的标记用于 BC_1F_1 群体(192株)单株扫描, 记录重组单株, 使用JoinMap 4.0 (美国Kyzma)软件进行遗传连锁分析, 用Kosambi函数计算遗传图距, 构建跨越*BnSII*基因染色体区域的部分连锁图。

1.2.7 AFLP特异片段回收、转化、克隆和测序

参考Yi等(2006)的方法, 对 BC_1F_1 群体中筛选出的与*BnSII*连锁的标记片段挖胶测序, 收集和纯化特异片段。将纯化的片段与pMD 19-T Vector Cloning Kit (大连Takara)载体连接, 使用大肠杆菌[*Escherichia coli* (Mig.) Cast. & Chalm.] DH5 α Competent Cells (大连Takara)进行热激转化, 再用M13引物检测转化的克隆。之后, 每个片段随机选择3个阳性克隆由陕西杨凌天润奥科生物科技有限公司进行测序, 在BnPIR (<http://cbi.hzau.edu.cn/cgi-bin/bnapus/search>)和BRAD (<http://brassicadb.org/brad/index.php>)数据库用ZS11参考基因组对测序结果进行blast比对。

1.3 BSA重测序

自交亲和(No. 3071)与不亲和(No. 234)亲本DNA各一份。从 BC_3F_1 分离群体中选自交亲和的20株单株DNA等量混合, 自交不亲和的20株单株DNA等量混合, 组成了自交亲和池(BnDQ)和自交不亲和池(BnDB)。DNA的纯度和完整性检测合格后, 送往北京诺禾公司进行建库测序与生信分析。测序后比对使用的参考基因组为ZS11.v0 (https://yanglab.hzau.edu.cn/BnIR/germplasm_info?id=ZS11.v0)。



图1 自交不亲和(A)与自交亲和(B)亲本套袋角果生长情况
Fig. 1 Silique growth of self-incompatibility (A) and self-compatibility (B) parents

1.4 简单重复序列标记开发

根据AFLP特异片段序列与ZS11基因组比对结果和重测序结果,在A07染色体26 000~28 000 kb (2 Mb)区段使用SSRHunter 1.3 (南京农大金陵研究院)软件获得该区域内的简单重复序列标记(simple sequence repeats, SSR)位点(李强和万建民2005),均匀挑选SSR位点并使用Primer 3软件设计SSR引物(Untergasser等2012)。在BC₃F₁群体中随机挑选12个自交亲和单株的DNA构成2个亲和混池,12个自交不亲和单株的DNA构成2个不亲和混池,用“亲和亲本+亲和混池1+亲和混池2+不亲和亲本+不亲和混池1+不亲和混池2”筛选具有多态性的引物,参考Lowe等(2002)的方法进行SSR扩增。随后在6%变性聚丙烯酰胺凝胶上进行电泳检测。

2 实验结果

2.1 遗传规律分析

用5个甘蓝型油菜自交亲和系与自交不亲和系No. 234 (经甘白杂交选育)正反交, F₁与RF₁代套袋自交能正常结籽,这表明该自交不亲和性状在这5个组合中是由隐性基因控制,并且这5个自交亲和系都是自交不亲和系No. 234的恢复系。在F₂分离群体中,经过卡方检验,4个组合的F₂群体都符

合孟德尔3:1的分离比,它们对应的BC₁群体分离比也符合1:1。根据以上结果,可以初步推断自交不亲和性状在这4个组合中由一对隐性基因控制(表1)。但是No. 2073×No. 234组合的F₂群体是15:1的分离比例,它所对应的BC₁F₁分离比为3:1,因此我们推断自交不亲和性状在该组合中由两对隐性基因控制(表1)。综合上述结果, No. 3071、No. 2036、No. 2053、No. 2063对于No. 234而言是单基因控制的亲和关系, No. 2073对于No. 234而言是两对基因控制的亲和关系,我们将这No. 3071恢复的不亲和基因命名为*BnSII*。

2.2 自交不亲和性基因*BnSII*的初定位

2.2.1 AFLP标记筛选结果

我们将组合No. 3071×No. 234中含有的单位点基因认定为*BnSII*基因,构建含有基因*BnSII*的回交群体,在BC₁群体对1 024对AFLP标记进行筛选,共获得5个与目标基因*BnSII*连锁的分子标记,这些标记都是从*Pst*I/*Mse*I酶切组合中筛选到的,而*Eco*RI/*Mse*I酶切组合中没有筛选到具有多态性的标记。这些标记可以将自交亲和与自交不亲和的单株区分开,表现是亲和有带,不亲和无带(图2),它们的引物组合分别是P01/MC12、P16/MC07、P12/MG06、P13/MG10、P03/MC01。

表1 五个组合F₂与BC₁表型调查
Table 1 Phenotype of F₂ and BC₁ in 5 combinations

组合	F ₁ /RF ₁ 群体	群体	数量		分离比	卡方值(χ ²)
			SCI≥1	SCI=0~1		
No. 3071×No. 234	F ₁ /RF ₁ (SC)	F ₂	165	53	3:1	0.055
		BC ₁	107	94	1:1	0.841
No. 2036×No. 234	F ₁ /RF ₁ (SC)	F ₂	169	44	3:1	2.142
		BC ₁	83	87	1:1	0.094
No. 2053×No. 234	F ₁ /RF ₁ (SC)	F ₂	126	56	3:1	3.230
		BC ₁	103	85	1:1	1.723
No. 2063×No. 234	F ₁ /RF ₁ (SC)	F ₂	163	57	3:1	0.097
		BC ₁	68	58	1:1	0.794
No. 2073×No. 234	F ₁ /RF ₁ (SC)	F ₂	242	19	15:1	0.472
		BC ₁	173	48	3:1	1.268

$P<0.05$, $\chi^2_{0.05,1}=3.84$; χ^2 越小,偏差越小,理论值与观测值越趋于符合。SCI: self-compatibility index, 亲和指数。F₁/RF₁群体: reciprocal crosses, 正、反交得到的后代,可以检验细胞质遗传等现象。SC: self-compatibility, 自交亲和; 在表中表示F₁群体中单株的表型全部是自交亲和的。

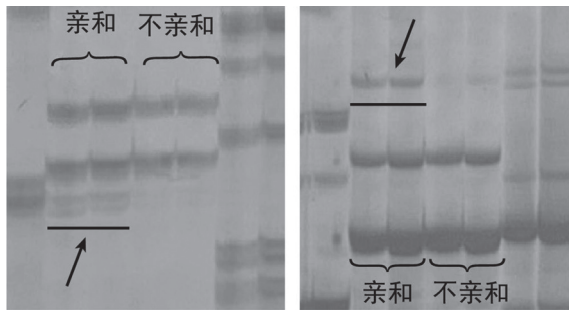


图2 AFLP标记扩增

Fig. 2 Amplification results of AFLP markers

AFLP引物筛选2对2混池图片, 前2孔为亲和, 后2孔为不亲和, 箭头所指为特异性条带。左图为P01/MC12的扩增条带, 右图为P13/MG10的扩增条带。

2.2.2 遗传连锁图谱绘制

用5对AFLP标记对No. 3071与No. 234杂交后回交得到的BC₁F₁群体192株单株进行基因型分析, 根据扩增结果, 使用JoinMap 4软件绘制遗传连锁图。结果表明P12/MG06与P01/MC12位于*BnSII*基因的一侧, 遗传距离分别为5.7、6.5 cM; P13/MG10、P03/MC01与P16/MC07位于*BnSII*基因的另一侧, 遗传距离分别为24.6、14.2、6.1 cM; 其中标记P16/MC07和P12/MG06离*BnSII*基因最近(图3)。

2.2.3 AFLP特异片段同源性分析

我们将与*BnSII*基因连锁的5个AFLP标记的特异片段进行胶回收并纯化, 再进行TA克隆, 将含有目标片段的菌液送到陕西杨凌天润奥科生物科技有限公司进行测序, 然后将测序结果在BRAD数据库比对。比对的结果显示3个标记P01/MC12、P16/MC07、P12/MG06与甘蓝型油菜ZS11染色体A07上的序列同源, P13/MG10、P03/MC01分别在A06和A09上, 在A07上的3个标记的物理位置分别在21 517、25 197、30 169 kb。根据这些标记比对信息, 我们初步推测*BnSII*基因可能位于甘蓝型油菜染色体A07上(表2)。

2.2.4 BSA重测序

对双亲No. 3071 (BnPQ)、No. 234 (BnPB)和BC₃F₁群体的子代极端混池BnDQ、BnDB的测序结果进行分析。所有样品数据、测序质量、GC分布等均符合建库测序的要求。之后与参考基因组

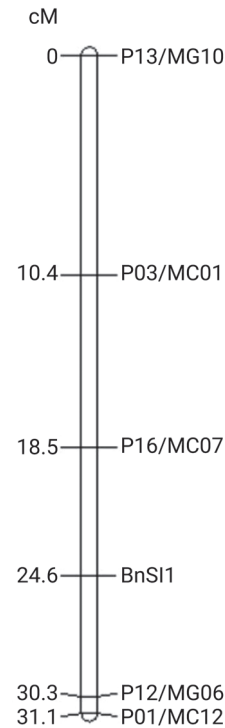

 图3 *BnSII*基因初步定位的遗传连锁图

 Fig. 3 Genetic linkage map for initial location of *BnSII* gene

P13/MG10、P03/MC01、P16/MC07、P12/MG06和P01/MC12为连锁标记名称, *BnSII*为自交不亲和性基因。

进行比对, 参考基因组(排除N区)的平均覆盖深度在15.68×~30.28×之间, 测序结果可靠。基于单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)变异, 筛选亲本中纯合的SNP位点后得到过滤后的1 586 922个多态性标记位点。在进行性状定位时, 通过计算在该位点含有突变型亲本基因型的读段占总读段的比例(即单核苷酸多态性指数, SNP-index), 选取自交亲和亲本BnPQ作为参考亲本, 然后分别计算2个子代的SNP-index。为了更清晰地展现2个子代池之间的差异区域, 我们计算2个子代SNP-index的差值: $\Delta(\text{SNP-index}) = \text{SNP-index}_{S_2} - \text{SNP-index}_{S_1}$, 并对基因组区域作图(图4)。在95%置信水平候选区间中, 共有23个候选区间, 其中18个候选区间在A07染色体上, 3个候选区间在A06染色体上, 2个候选区间分别在C03和C04染色体上。根据上述结果我们可以推测基因可能位于A06、A07、

表2 与*BnSI1*连锁的特异性AFLP标记
Table 2 Specific AFLP markers linked to *BnSI1*

AFLP标记	染色体	物理位置/bp	片段长度/bp	得分
P01/MC12	A07	21 517 353~21 517 537	209	1.00×10^{-92}
P12/MG06	A07	25 197 868~25 198 127	285	4.00×10^{-79}
P16/MC07	A07	30 169 105~30 169 334	284	1.00×10^{-117}
P03/MC01	A09	7 655 808~7 655 988	180	6.20×10^{-95}
P13/MG10	A06	38 008 917~38 009 054	137	4.22×10^{-58}

得分: 根据随机情况考虑其他序列与目标序列的相似度大于这个显示的序列的可能性, 因此较低的分值表示较好的结果。

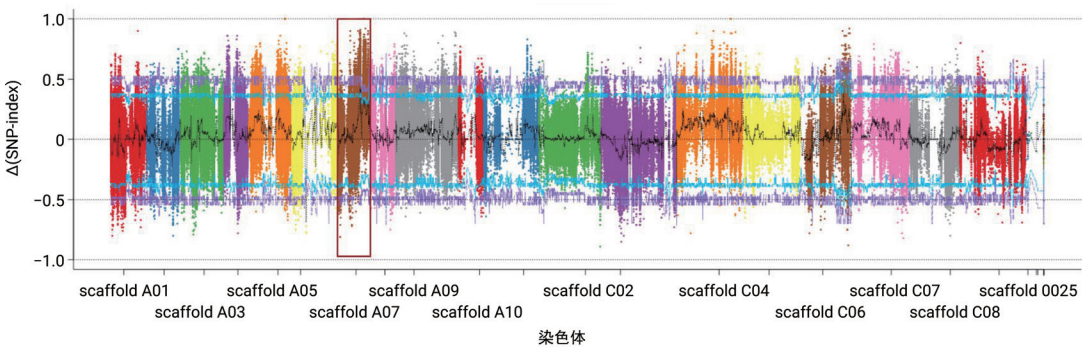


图4 两个子代Δ(SNP-index)在染色体上的分布

Fig. 4 Distribution of Δ(SNP-index) on chromosome of two progenies

表示SNP-index均值的线是黑色的, 标记为SNP-index均值线。蓝色的线是95%的阈值线, 用于表示SNP-index的阈值。紫色的线是99%的阈值线, 用于表示更严格的SNP-index阈值。scaffold: 基因组组装时的概念, 比染色体小一点的组装单位。

C03和C04上(表3)。

2.2.5 遗传连锁图与重测序组合分析候选区间

在前期我们使用AFLP标记将*BnSI1*基因定位到A07染色体5 Mb (25 197~30 169 kb)区间内。重测序结果给出的18个候选区间位于A07染色体上, 其中14个候选区间与分子标记定位的区间有重合(表3)。基于以上结果, 我们结合AFLP标记与BSA重测序结果, 确定该基因位于A07染色体上, 之后将AFLP标记确定的候选区间(25 197~30 169 kb)与重测序得到的候选区间比对, 将初定位区间缩小到约2 Mb (26 000~28 000 kb)范围内。

2.3 SSR标记

我们参照ZS11参考基因组, 在A07染色体26 000~28 000 kb (2 Mb)区段均匀设计40对SSR标记, 并使用亲本+混池筛选引物, 最终得到4对具有多态性的SSR标记, 分别为BnaA07-1、BnaA07-2、

BnaA07-3和BnaA07-4。将筛选出来的共显性标记BnaA07-1和BnaA07-4对No. 3071与No. 234组合构建的群体中BC₃F₁群体的47株自交亲和单株与47株自交不亲和单株进行验证, 发现这两对标记能较好地地区分亲和与不亲和单株以及杂合单株(图5)。之后对这4个标记的特异性片段进行挖胶测序, 将测序结果在BnPIR (<http://cbi.hzau.edu.cn/cgi-bin/bnapus/search>)网站进行blast分析, 结果表明这4个标记在ZS11的A07染色体上(表4)

3 讨论

甘蓝型油菜是由白菜与甘蓝天然杂交形成的异源四倍体, 与白菜和甘蓝只有1种S单倍型不同, 甘蓝型油菜在A基因组和C基因组上有2种不同的S单倍型(高长斌等2013), 探明其遗传规律、定位自交不亲和性基因对自交不亲和性在甘蓝型油菜中

表3 95%置信水平候选区间
Table 3 Candidate intervals for the 95% confidence level

染色体	位置1/bp	位置2/bp
Scaffold A06	12 829 001	13 331 000
Scaffold A06	14 355 001	15 004 000
Scaffold A06	33 645 001	33 646 000
Scaffold A07	22 255 001	23 111 000
Scaffold A07	23 113 001	23 175 000
Scaffold A07	23 231 001	23 716 000
Scaffold A07	26 178 001	26 436 000
Scaffold A07	26 437 001	26 442 000
Scaffold A07	26 447 001	26 464 000
Scaffold A07	26 479 001	26 531 000
Scaffold A07	26 541 001	26 554 000
Scaffold A07	26 556 001	26 582 000
Scaffold A07	26 596 001	26 599 000
Scaffold A07	26 601 001	26 612 000
Scaffold A07	26 688 001	26 692 000
Scaffold A07	27 467 001	27 471 000
Scaffold A07	27 472 001	27 481 000
Scaffold A07	27 517 001	27 519 000
Scaffold A07	27 846 001	27 850 000
Scaffold A07	28 379 001	28 431 000
Scaffold A07	31 103 001	31 260 000
Scaffold C03	29 918 001	30 226 000
Scaffold C04	68 841 001	68 909 000

位置1是指候选区间中位于上游的位置, 位置2是指候选区间中位于下游的位置。

的运用具有重要的实际意义。对芸薹属自交不亲和性遗传机制的研究中, Murased等(2004)对自交亲和的印度白菜型油菜‘Yellow Sarson’的遗传分析表明它的亲和性受到两个独立的位点控制, 并通过AFLP标记进行图位克隆定位到 $MLPK$ (M locus protein kinase)基因, 它不与S位点连锁, 其翻译的蛋白能与S位点受体激酶SRK (S-locus receptor kinase)直接互作(Kitashiba和Nasrallah 2014)。葛婷婷(2013)对不结球白菜自交不亲和性的研究认为, 一对隐性等位基因控制其自交不亲和性, 并将基因初定位在白菜A03基因组上。比起白菜与甘蓝, 甘蓝型油菜自交不亲和性的遗传机制更加复杂。‘S-1300’是马朝芝等(1998)培育的双低甘蓝型油菜自交不亲和品种, 在对自交不亲和系‘S-1300’与其恢复系的研究中, 张幸果(2008)初步认为‘S-1300’的自交不亲和性受隐性单位点控制, 之后高长斌(2013)的研究再次证明‘S-1300’自交不亲和性符合隐性单位点控制的孟德尔遗传规律, 并且认为A基因组上的S单倍型决定‘S-1300’的自交不亲和性, 但他的研究仍不能排除C基因组上的S位点也可能对其自交不亲和性起作用。‘S-1300’的自交不亲和性来自于自交不亲和系271, 前人对甘蓝型油菜自交不亲和系271的研究中提出两对基因控制其自交不亲和性的假说; Yang等(2001)认为除了S位点等位基因, 还有自交不亲和性的抑制基因(Sp基

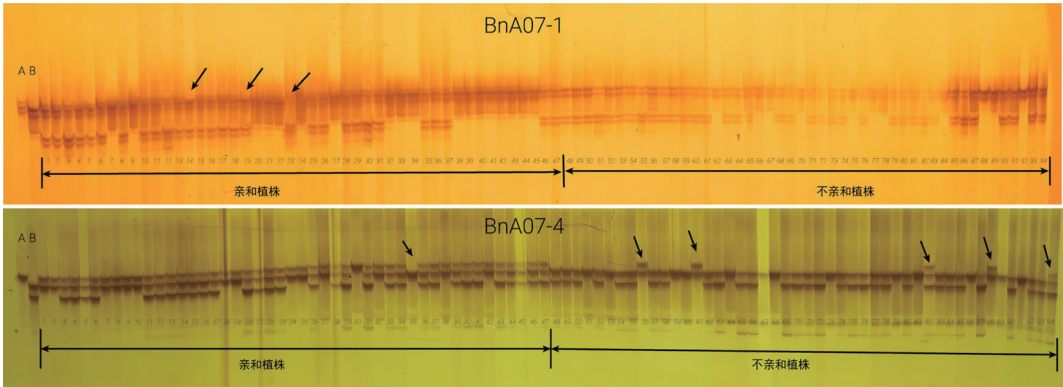


图5 引物BnaA07-1和BnaA07-4对BC₃F₁单株验证

Fig. 5 Validation of BC₃F₁ single plant by primers BnaA07-1 and BnaA07-4

A为自交亲和亲本, B为自交不亲和亲本, 箭头是指交换单株, 1~94孔是BC₃F₁群体中的94个单株DNA。

表4 特异性SSR标记信息
Table 4 Specific SSR markers information

SSR标记名称	片段大小/bp	染色体	物理位置/kb	引物序列(5'→3')
BnaA07-1	201	A07	26 205	左: GAAGGACATGCAAGAGAGTG 右: TTGGGAAATGAAGAAATGTG
BnaA07-2	151	A07	26 262	左: AGACGATTGATTGCGACTTA 右: GCAGAAACACGTTGAATCAT
BnaA07-3	208	A07	26 870	左: CTGAAACGAGAATCAAATGAG 右: AAGCTGAGTTCTCCGAGTGT
BnaA07-4	216	A07	26 986	左: CTCACAAGCAAAAATCCAAG 右: CAGTATCACACCCAGGAAGA

因), S位点和Sp位点上的等位基因存在显隐性关系。因此自交不亲和性的遗传模式复杂, 不同的材料杂交组合的后代分离情况并不完全一致。在本试验遗传规律分析中, 自交不亲和系No. 234与其恢复系No. 2073组合后代的分离情况表明, 试验材料No. 234自交不亲和性由两对隐性基因控制。这与前人单位点控制甘蓝型油菜自交不亲和性的结论不同, 可能由以下方面原因造成: (1)不同材料突变类型不同, 导致决定其自交不亲和性的基因不同。(2)遗传规律分析所选自交亲和亲本材料之间遗传背景相似, 导致重要的遗传位点丢失; 目前已报道的甘蓝型油菜自交不亲和系中, 隐性自交不亲和系只有‘S-1300’和‘S-70’ (Chen等2019; 马朝芝等1998)。而材料No. 234也是隐性自交不亲和系, 因此其在育种工作中是具有应用潜力的。随着分子生物学的快速发展, 分子标记技术与全基因组重测序技术为作物重要基因的图位克隆提供了极其重要的支持。洪美艳(2017)通过AFLP、SSR标记的开发与全基因组重测序分析相结合, 将甘蓝型油菜种皮颜色的基因定位在A09染色体105 kb范围。赵传纪(2019)在甘蓝型油菜突变体库中挑选3个株型差异显著的材料, 对叶色、花色、株高进行研究, 利用BSA重测序技术和竞争性等位基因特异性PCR (kompetitive allele specific PCR, KASP)、SNP标记对3个基因分别进行了精细定位并预测候选基因。因此通过重测序技术与分子标记结合的方式能够帮助我们快速确定目标基因的候选区间, 为后续目标基因的克隆与功能验证提供基础。本研究中

我们使用甘蓝型油菜自交不亲和系No. 234和甘蓝型油菜自交亲和系No. 3071杂交并构建回交群体, 利用AFLP标记在BC₁F₁群体进行初定位, 在BC₃F₁群体通过BSA重测序与分子标记结果结合分析, 最终将目标基因*BnSII*初定位在甘蓝型油菜A07染色体大约2 Mb的区间。在此基础上我们可以进一步扩大回交群体, 设计新的分子标记, 从而进行该基因的精细定位。目标基因是否与A07染色体上已报道的S位点基因有关, 亦或是一个新的基因, 需要在后续工作中进一步研究。

参考文献(References)

Chen F, Yang Y, Li B, et al (2019). Functional analysis of M-locus protein kinase revealed a novel regulatory mechanism of self-incompatibility in *Brassica napus* L. *Int J Mol Sci*, 20 (13): 3303

Doucet J, Lee HK, Goring DR (2016). Pollen acceptance or rejection: a tale of two pathways. *Trends Plant Sci*, 21 (12): 1058–1067

Fan LC (2022). QTL mapping of important agronomic traits of soybean stem color and multi-leaflet (dissertation). Taian, Shandong: Shandong Agricultural University (in Chinese with English abstract) [范立川(2022). 大豆茎秆颜色和多少小叶等重要农艺性状的QTL定位(学位论文). 山东泰安: 山东农业大学]

Fang ZY, Sun PT, Liu YM (1983). Some problems on the utilization of heterosis in cabbage and the selection of self-incompatibility. *Sci Agric Sin*, (3): 51–62 (in Chinese with English abstract) [方智远, 孙培田, 刘玉梅(1983). 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*, (3): 51–62]

Gao CB (2013). Molecular Mechanism of dominant self-com-

- patibility and its application in *Brassica napus* L. (dissertation). Wuhan: Huazhong Agricultural University (in Chinese with English abstract) [高长斌(2013). 甘蓝型油菜自交不亲和分子恢复机理研究及应用(学位论文). 武汉: 华中农业大学]
- Ge TT (2013). SSR molecular marker of self-incompatibility gene in 'Aijiaohuang', a cultivar of non-heading chinese cabbage (dissertation). Nanjing: Nanjing Agricultural University (in Chinese with English abstract) [葛婷婷(2013). 不结球白菜'矮脚黄'自交不亲和性的SSR分子标记(学位论文). 南京: 南京农业大学]
- Hong MY (2017). Fine mapping of the seed coat color gene and transcriptomic analysis of the seed coat in *Brassica napus* (dissertation). Wuhan: Huazhong Agricultural University (in Chinese with English abstract) [洪美艳(2017). 甘蓝型油菜种皮颜色基因的精细定位与种皮转录组分析(学位论文). 武汉: 华中农业大学]
- Jia YP, Li X, Zhou GL, et al (2016). Molecular marker development of self-incompatibility related genes in Chinese cabbage. *J Changjiang Veget*, 8: 38–41 (in Chinese with English abstract) [贾永鹏, 李霞, 周国林等(2016). 小白菜自交不亲和性相关基因的分子标记开发. 长江蔬菜, 8: 38–41]
- Kakita M, Murase K, Iwano M, et al (2007). Two distinct forms of *M*-locus protein kinase localize to the plasma membrane and interact directly with *S*-locus receptor kinase to transduce self-incompatibility signaling in *Brassica rapa*. *Plant Cell*, 19 (12): 3961–3973
- Kitashiba H, Nasrallah JB (2014). Self-incompatibility in Brassicaceae crops: lessons for interspecific incompatibility. *Breed Sci*, 64 (1): 23–37
- Li Q, Wan JM (2005). SSRHunter: development of a local searching software for SSR sites. *Hereditas Beijing*, 27 (5): 808–810 (in Chinese with English abstract) [李强, 万建民 (2005). SSRHunter, 一个本地化的SSR位点搜索软件的开发. 遗传, 27 (5): 808–810]
- Lowe AJ, Jones AE, Raybould AF, et al (2002). Transferability and genome specificity of a new set of microsatellite primers among *Brassica* species of the U triangle. *Mol Ecol Resour*, 2 (1): 7–11
- Lu GY (2003). Molecular markers for the dominant genic male sterility gene and the suppressor gene in *Brassica napus* and their applications (dissertation). Wuhan: Huazhong Agricultural University (in Chinese with English abstract) [陆光远(2003). 甘蓝型油菜显性细胞核雄性不育基因和抑制基因的分子标记及其应用(学位论文). 武汉: 华中农业大学]
- Ma CZ, Fu TD, Yang GS, et al (1998). Breeding for self-incompatibility lines with double zero on *Brassica napus* L. *J Huazhong Agric Univ*, (3): 211–213 (in Chinese with English abstract) [马朝芝, 傅廷栋, 杨光圣等(1998). 甘蓝型油菜双低自交不亲和系的选育. 华中农业大学学报, (3): 211–213]
- Michelmore RW, Paran I, Kesseli RV (1991). 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. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88 (21): 9828–9832
- Murase K, Shiba H, Iwano M, et al (2004). A membrane-anchored protein kinase involved in *Brassica* self-incompatibility signaling. *Science*, 303 (5663): 1516–1519
- Nishio T, Hinata K (1977). Analysis of S-specific proteins in stigmas of *Brassica oleracea* L. by isoelectric focusing. *Heredity*, 38: 391–396
- Samuel MA, Mudgil Y, Salt JN, et al (2008). Interactions between the S-domain receptor kinases and AtPUB-ARM E3 ubiquitin ligases suggest a conserved signaling pathway in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 147 (4): 2084–2095
- Shen X, Zhou M, Lu W, et al (2003). Detection of Fusarium head blight resistance QTL in a wheat population using bulked segregant analysis. *Theor Appl Genet*, 106 (6): 1041–1047
- Sheng JX, Fu TD, Yang GS (2001). Primary study on heterosis of self-incompatibility on *Brassica napus*. *J Huazhong Agric Univ*, 20: 528–530 (in Chinese with English abstract) [沈金雄, 傅廷栋, 杨光圣(2001). 甘蓝型油菜自交不亲和系杂种优势的初步研究. 华中农业大学学报, 20: 528–530]
- Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, et al (2012). Primer3—new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res*, 40 (15): e115
- Wang HZ, Yin Y (2014). Analysis and strategy for oil crop industry in China. *Chin J Oil Crop Sci*, 36 (3): 414–421 (in Chinese with English abstract) [王汉中, 殷艳(2014). 我国油料产业形势分析与发展对策建议. 中国油料作物学报, 36 (3): 414–421]
- Wang JX (1994). Some elements affecting on compatible index in self-incompatible line of mustard family. *J Fujian Acad Agric Sci*, 9 (2): 46–50 (in Chinese with English abstract) [王金勋(1994). 影响十字花科自交不亲和系指数的几个因素. 福建省农科院学报, 9 (2): 46–50]
- Xiao L, Zhao Z, Du DZ, et al (2012). Genetic characterization and fine mapping of a yellow-seeded gene in Dahuang (a *Brassica rapa* landrace). *Theor Appl Genet*, 124 (5): 903–909
- Yang GS, Chen CB, Zhou GL, et al (2001). Genetic analysis of four self-incompatible lines in *Brassica napus*. *Plant Breeding*, 120: 57–61
- Yi B, Chen Y, Lei S, et al (2006). Fine mapping of the recessive genic male-sterile gene (*Bnms1*) in *Brassica napus* L.

- Theor Appl Genet, 113 (4): 643–650
- Zhang XG (2008). Preliminary study on self-incompatibility of rapeseed (*Brassica napus* L.) (dissertation). Wuhan: Huazhong Agricultural University (in Chinese with English abstract) [张幸果(2008). 甘蓝型油菜自交不亲和性的初步研究(学位论文). 武汉: 华中农业大学]
- Zhao CJ (2019). Genetic analysis and positional cloning of leaf color, flower color and plant height mutants in *Brassica napus* L. (dissertation). Wuhan: Huazhong Agricultural University (in Chinese with English abstract) [赵传纪(2019). 甘蓝型油菜叶色、花色和株高突变体的遗传分析与定位克隆(学位论文). 武汉: 华中农业大学]
- Zhao HY (2014). Fine mapping of multilocus gene *Bjln1* in *Brassica juncea* L. (dissertation). Xining: Qinghai University (in Chinese with English abstract) [赵会彦(2014). 芥菜型油菜多室基因*Bjln1*定位的研究(学位论文). 西宁: 青海大学]