园 艺 学 报 2005, 32 (1): 97～100
Acta Horticulturae Sinica

甜樱桃 SFB4与 SFB4’基因的鉴别

朱 墨[1,2] 张开春[1*] 姜立杰[1] 张晓明[1]
([1]北京市农林科学院林业果树研究所, 北京 100093; [2]首都师范大学生命科学学院, 北京 100037)

摘 要: 本研究以最近发现的李属花粉决定子候选基因“*S*单元型特异 *F-box*蛋白基因 (*SFB*)”为基础, 根据甜樱桃 *SFB*4基因设计引物, 从自交不亲和‘雷尼’和‘佳红’以及自交亲和的‘斯坦拉’总DNA中分别扩增出 *SFB*4和 *SFB*4’基因的部分序列。经测序结果发现: *SFB*4’基因比 *SFB*4基因缺失了 4个碱基 TAAA。根据这个缺失差异, 设计了一对引物 BFP200和 BFP201, 这对引物只能扩增 *SFB*4’基因, 而不能扩增 *SFB*4基因, 从而利用 *SFB*基因区分开了甜樱桃自交不亲和的 *S*4和自交亲和的 *S*4’单元型。

关键词: 李属; *S*单元型特异 *F-box*蛋白基因 (*SFB*); 单元型
中图分类号: S 662.5 **文献标识码**: A **文章编号**: 0513-353X (2005) 01-0097-04

Distinguish SFB4’Gene from SFB4 Gene of Sweet Cherry (*Prunus avium*)

Zhu Mo[1,2], Zhang Kaichun[1*], Jiang Lijie[1], and Zhang Xiaoming[1]
([1]Institute of Forestry and Pomology, Beijing Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Beijing 100093, *China;* [2]*Institute of Life and Science, Capital Normal University, Beijing* 100037, *China)*

Abstract: Correct identification of self-compatibility genotype in sweet cherry is important to the breeding. By far, there have been no molecular methods to differentiate between self-incompatible *S*4 haplotype and self-compatible *S*4’haplotype. In this report, on the basis of the sequence of the *S*4 haplotype-specific *F-box* protein gene (*SFB*4) of sweet cherry in GenBank, a pair of primers were designed, by which PCR was performed to amplify the *SFB*4 gene from total DNA of self-incompatible varieties ‘Rainier’ and ‘Jiahong’ and the *SFB*4’gene from self-compatible variety ‘Stella’. The PCR products were sequenced and a difference between *SFB*4 and *SFB*4’genes was found. Compared with the *SFB*4 gene, there was a deletion of four nucleotides ‘TAAA’ in the *SFB*4’gene. The primers BFP 200 and BFP 201 were designed on the ground of the difference between the *SFB*4 and *SFB*4’genes, which only amplify the *SFB*4’gene. Therefore, using the primers BFP 200 and BFP 201, the difference between the *SFB*4 and *SFB*4’genes of sweet cherry was displayed, the self-incompatible *S*4 haplotype and the self-compatible *S*4’haplotype were distinguished successfully.

Key words: *Prunus avium*; *S* haplotype-specific *F-box* protein gene (*SFB*); Haplotype

1 目的、材料与方法

李属植物属于配子体自交不亲和, 其反应的特异性由 1个高度多态的基因座控制, 叫 *S*-基因座 (*S*-locus)。这是 1个多基因的复合体, 因此用“单元型”(haplotype) 指代基因座的变体[1]。人们推测 S-基因座应至少包括两个基因, 即雌蕊决定子基因和花粉决定子基因。李属植物雌蕊决定子基因是 *S-RNase*基因[2]。最近, 研究表明李属中的 4种植物即杏、甜樱桃、酸樱桃和梅中的“*S*单元型特异 *F-box*蛋白基因”(*S* haplotype-specific *F-box* protein gene, *SFB*) 可能就是花粉决定子基因[3～5]。

培育甜樱桃自交亲和品种是樱桃育种的重要目标, 目前鉴定甜樱桃基因型的手段主要有授粉试验、花柱离体培养、花柱 *S*糖蛋白电泳以及 *S*基因特异 PCR鉴定技术。其中前 3种方法必须在果树开花结实后才能进行, 并受到季节的限制。而 *S*基因特异 PCR鉴定技术一般使用 *S-RNase*基因进行鉴定[6]。

收稿日期: 2004-06-08; **修回日期**: 2004-07-16
基金项目: 北京市自然科学基金项目 (5032006)
* **通讯作者** Author for correspondence

通过花粉辐射得到的甜樱桃 *S*4'单元型是 *S*4单元型的自交亲和型突变[7]。虽然二者的自交不亲和反应不同，但截止到目前尚无法用分子方法区分 *S*4-*RNase*与 *S*4'-*RNase*基因[7,8]。人们怀疑 *S*4'单元型这种花粉部分突变的突变型可能是花粉决定子基因发生了突变，但直到最近人们才发现配子体自交不亲和的花粉决定子候选基因 *SFB*。本研究目的就是鉴别 *SFB*4与 *SFB*4'基因，从而区分 *S*4单元型和 *S*4'单元型，为甜樱桃自交亲和育种提供分子标记辅助选择手段。

试材采自北京市农林科学院林业果树研究所，以斯坦拉 (*S*3*S*4')、斯坦拉自交后代 (*S*4'*S*4')、雷尼 (*S*1*S*4)、佳红 (*S*4*S*6)、先锋 (*S*1*S*3) 和 6-7 (*S*3*S*6) 幼嫩叶片为材料，采用 CTAB法[6]提取基因组 DNA。根据 GenBank中甜樱桃 *SFB*4 (AB111521) 基因的序列，设计引物 BFP 180 (5'GA-CATCCTAGCAAGACTACCA3') 和 BFP 184 (5'CCATATTTGATGGTGGCCAAG 3')。用引物 BFP 180/BFP 184扩增试材总 DNA，并将 PCR扩增产物进行测序，分别从 PCR产物的两端各测序 1次(北京鼎国生物技术公司进行)。根据 *SFB*4和 *SFB*4'的测序结果，设计 1对引物 BFP 200 (5'TA-ATGAGAAGGATAAAAG3') 和 BFP 201 (5'TTATATTGCTCTCCAG 3')。用以对斯坦拉、斯坦拉自交后代、雷尼、佳红、先锋和 6-7总 DNA进行扩增。

引物 BFP 180/BFP 184的 PCR反应体系为 15 μL体积：10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.3)，50 mmol/L KCl，0.2 mmol/L dNTPs，2 mmol/L $MgCl_2$，1.5 U Pfu DNA聚合酶，0.167 μmol/L引物，约 20 ng DNA。反应程序：94℃ 3 min；94℃ 45 s，64℃ 1 min，72℃ 1 min，35个循环；72℃延伸 10 min。

引物 BFP 200/201的 PCR反应体系为 15 μL体积：10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.3)，50 mmol/L KCl，0.2 mmol/L dNTPs，1.5 mmol/L $MgCl_2$，1.5 U Taq DNA聚合酶，0.167 μmol/L引物，约 20 ng DNA。反应程序为：94℃ 3 min；94℃ 45 s，52℃ 1 min，72℃ 1 min，35个循环；72℃延伸 10 min。

PCR产物在 2%的琼脂糖凝胶上进行电泳检测。

2 结果与分析

2.1 SFB4与 SFB4'基因的 PCR扩增与序列分析

引物 BFP 180/BFP 184对斯坦拉、雷尼、佳红、先锋和 6-7总 DNA的扩增结果表明：只在有 *S*4'或 *S*4单元型的斯坦拉、雷尼、佳红中有扩增，而在无 *S*4'或 *S*4单元型的先锋和 6-7中无扩增；在斯坦拉、雷尼、佳红中只扩增一条带，且带的大小相同，都介于 947 bp和 1375 bp之间，比较接近 947 bp的位置。根据引物 BFP 180/BFP 184与甜樱桃 *SFB*4 (AB111521) 的同源性，计算出扩增的片段大小应为 1028 bp。与实际扩增相符合 (图 1)。

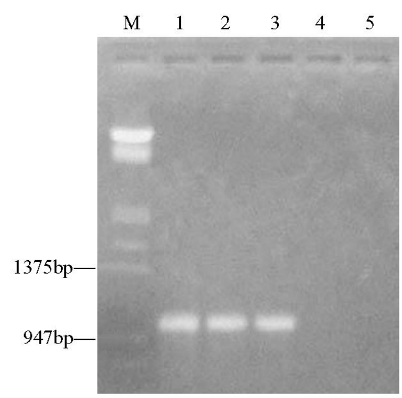


图 1 引物 BFP 180/BFP 184对甜樱桃总 DNA的扩增结果

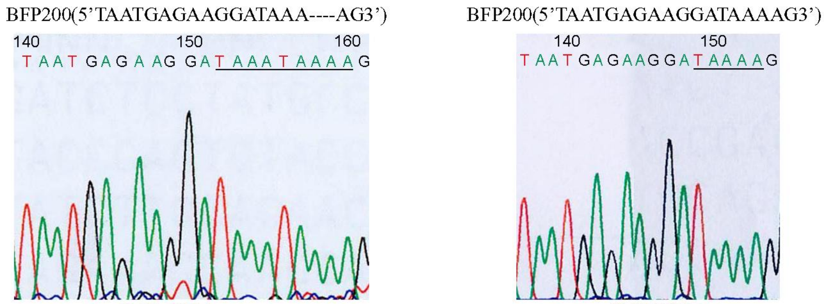
M. Marker；1. 斯坦拉；2. 雷尼；3. 佳红；4. 先锋；5. 6-7。

Fig. 1 PCR was performed with the primers BFP 180 and BFP 184 to amplify the SFB4' gene and the SFB4 gene from total DNA of sweet cherry

M. Marker; 1. Stella; 2. Rainier; 3. Jiahong; 4. Van; 5. 6-7.

将上述斯坦拉、雷尼、佳红的 PCR产物直接测序。斯坦拉共测序 3次，雷尼和佳红各测序 2次。使用 Blast程序分别将斯坦拉、雷尼、佳红的测序结果与 GenBank中的基因进行比较，结果发现斯坦拉、雷尼和佳红中的扩增片断与甜樱桃 *SFB*基因的同源性最高。与甜樱桃的 *SFB*基因相比较，斯坦拉与 *SFB*4 (AB111521) 的平均同源性为 98%，与 *SFB*3 (AB096857) 的平均同源性为 85%；雷尼与 *SFB*4 (AB111521) 和 *SFB*1 (AB111518) 的平均同源性分别为 97.5%和 88%；佳红与 *SFB*4 (AB111521) 和 *SFB*6 (AB096858) 的平均同源性则分别为 96.67%和 86.33%。这证明引物 BFP 180/BFP 184在斯坦拉总 DNA中扩增的片断是 *SFB*4'，而不是 *SFB*3；在雷尼总 DNA中所扩增的片断为 *SFB*4，而不是 *SFB*1；在佳红总 DNA中所扩增的片断为 *SFB*4，而不是 *SFB*6。

比较测序结果发现，斯坦拉中的 *SFB*4’基因比雷尼、佳红的 *SFB*4和 GenBank中的 *SFB*4 (AB111521) 缺少了 4个碱基“TAAA”(图 2)。



*SFB*4 基因　　*SFB*4’基因

图 2　比较引物 BFP 180/BFP 184扩增产物测序后的结果

Fig. 2　The sequences amplified by the primers BFP 180/BFP 184

2.2　*SFB*4’基因的特异 PCR扩增

根据测序结果，设计了引物对 BFP 200/BFP 201，引物 BFP 200是 *SFB*4’基因的特异引物，也不包括 TAAA这四个碱基 (图 2)，而引物 BFP 201为 *SFB*4和 *SFB*4’基因的共有序列。因此从理论上讲，BFP 200/BFP 201应只扩增 *SFB*4’，不扩增 *SFB*4及其它 *SFB* 基因。根据引物 BFP 200/BFP 201与本次研究所测斯坦拉 *SFB*4’序列的同源性，计算出应扩增片段的大小为 453 bp。从图 3中可看出 BFP 200/BFP 201只扩增斯坦拉和斯坦拉自交后代总 DNA中的 *SFB*4’基因，而不扩增雷尼和佳红总 DNA中的 *SFB*4基因，也不扩增先锋和 6-7总 DNA中的其它 *SFB* 基因。而且 BFP 200/BFP 201在斯坦拉及斯坦拉自交后代中只扩增 1条带，大小介于 501 bp与 404 bp之间，这与预期的 453 bp相符合。

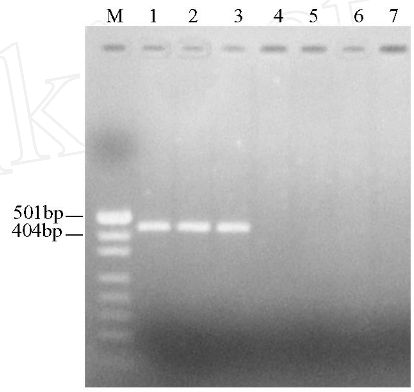


图 3　引物 BFP 200/BFP 201对甜樱桃总 DNA的扩增结果

M. Marker; 1, 2. 斯坦拉; 3. 斯坦拉自交后代; 4. 雷尼; 5. 佳红; 6. 先锋, 7. 6-7。

Fig. 3　PCR was performed with primers BFP 200 and BFP 201 to amplify the *SFB*4’gene from the total DNA of sweet cherry

M. Marker; 1, 2. Stella; 3. the progeny of Stella; 4. Rainier; 5. Jiahong; 6. Van; 7. 6-7.

以先锋和 6-7作为对照是由于存在雷尼、佳红和斯坦拉中的 *S*1, *S*6和 *S*3单元型，当 *BFP* 200/*BFP* 201不扩增先锋和 6-7中的 3种单元型时，就排除了 *BFP* 200/*BFP* 201在斯坦拉、雷尼和佳红总 DNA中扩增这 3种单元型的可能性。当 *BFP* 200/*BFP* 201只在斯坦拉及斯坦拉自交后代总 DNA中有扩增时，则扩增出的这条带应该是 *SFB*4’基因，而不是 *SFB*3基因。而且引物 *BFP* 180/*BFP* 184和 *BFP* 200/*BFP* 201扩增所使用的 DNA模板相同，雷尼、佳红的总 DNA可被引物 *BFP* 180/*BFP* 184扩增，但不能被引物 *BFP* 200/*BFP* 201扩增；而引物 *BFP* 180/*BFP* 184和 *BFP* 200/*BFP* 201在斯坦拉总 DNA中都能扩增，这说明是由于 *SFB*4’基因缺失了 TAAA这 4个碱基的缘故，使得引物 *BFP* 200/*BFP* 201不能扩增 *SFB*4基因。以上结果证明 *BFP* 200/*BFP* 201在斯坦拉及斯坦拉后代中所扩增的带是预期的条带。因此，利用引物 *BFP* 200/*BFP* 201区别开自交不亲和的 *S*4单元型和自交亲和的 *S*4’单元型。

本研究以花粉决定子基因 *SFB* 为基础鉴别开了 *S*4和 *S*4’单元型，这样可以在育种中进行早期分子标记辅助选择，鉴定出具 *S*4’单元型的自交亲和后代，从而大大减少育种的工作量和时间。

参考文献：

1　McCubbin A G, Kao T H. Molecular recognition and response in pollen and pistil interactions. Annual Review of Cell and Developmental Biology, 2000, 16: 333～364

2 Sassa H, Hirano H, Ikehashi H. Self-incompatibility-related RNase in style of Japanese pear (*Pyrus serotina* Rehd.). Plant Cell Physiol, 1992, 33: 811～814
3 Yamane H, Ikeda K, Ushijima K, Sassa H, Tao R. A Pollen-Expressed gene for a novel protein with an F-box motif that is very tightly linked to a gene for S-RNase in two species of cherry, *Prunus cerasus* and *P. avium*. Plant and Cell Physiology, 2003, 44 (7): 764～769
4 Yamane H, Ushijima K, Sassa H, Tao R. The use of the S haplotype-specific F-box protein gene, *SFB*, as a molecular marker for S-haplotypes and self-compatibility in Japanese apricot (*Prunus mume*). Theoretical and Applied Genetics, 2003, 107 (8): 1357～1361
5 VUshijima K, Sassa H, Dandekar A M, Gradziel T M, Tao R, Hirano H. Structural and transcriptional analysis of the Self-Incompatibility locus of Almond: Identification of a pollen-expressed *F-Box* gene with haplotype-specific polymorphism. The Plant Cell, 2003, 15: 771～781
6 张绍铃，曹生民，吴华清. 果树自交不亲和性基因型及其鉴定方法. 果树学报，2003, 20 (5): 358～363
Zhang S L, Cao S M, Wu H Q. Self-incompatibility genotypes of fruit trees and their identification methods. Journal of Fruit Science, 2003, 20 (5): 358～363 (in Chinese)
7 Boskovic R, Tobutt K R, Schmidt H, Sonneveld T. Re-examination of (in) compatibility genotypes of two John Innes self-compatible sweet cherry selections. Theoretical and Applied Genetics, 2000, 101: 234～240
8 Sonneveld T, Tobutt L R, Robbins T P. Allele-specific PCR detection of sweet cherry self-incompatibility (*S*) alleles *S*1 to *S*16 using consensus and allele-specific primers. Theoretical and Applied Genetics, 2003, 107 (6): 1059～1070
9 印莉萍，刘祥林. 分子细胞生物学实验技术. 北京：首都师范大学出版社，1999. 16
Yin L P, Liu X L. Molecular and cellular biological Experimental technologies. Beijing: Captain Normal University Press, 1999. 16 (in Chinese)

辣椒对莴苣的化感作用及其成分分析

程智慧 耿广东 张素勤 孟焕文 (西北农林科技大学园艺学院，杨凌 712100)

Allelopathy to Lettuce and Related Chemicals of Hot Pepper

Cheng Zhihui, Geng Guangdong, Zhang Suqin, and Meng Huanwen (*College of Horticulture, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling* 712100, *China*)

关键词：辣椒；化感作用；化学物质；莴苣
中图分类号：S 636.2; S 641.3 **文献标识码**：A **文章编号**：0513-353X (2005) 01-0100-01

将粉碎好的线辣椒 (8819) 植株 20 g加 500 mL蒸馏水在常温下浸提 48 h，此液为 0.04 g/mL水浸液，过滤后配成 0.01、0.02、0.03、0.04 g/mL的浓度，用于莴苣发芽和生长试验，4次重复，测定发芽率、发芽指数、地上部长和根长，分析水浸液对莴苣的化感作用。

将 40 g粉碎的线辣椒植株加 1000 mL蒸馏水浸提 48 h，过滤并经 3000 r/min离心，上清液转移到长 40 cm、直径 2 cm的 XAD-4吸附树脂柱上，分别用乙醚、50%乙醚 +50%乙酸乙酯、乙酸乙酯、50%乙酸乙酯 +50%甲醇、甲醇、蒸馏水各 200 mL洗脱 (各洗脱液依次简称为 L1, L2, L3, L4, L5, L6)，收集洗脱液并减压浓缩至干，再用 8 mL甲醇溶解，检测各部分的生物活性，利用综合隶属函数值推断水浸液各组分的化感作用。综合隶属函数值越大，表明化感作用越小。

取化感作用强的组分 (L1)，转移到 XAD-4吸附树脂柱上，使甲醇自然挥发，然后分别用 60%乙醚 +40%乙酸乙酯、40%乙醚 +60%乙酸乙酯和 20%乙醚 +80%乙酸乙酯各 200 mL洗脱 (各洗脱液依次简称为 L1-1, L1-2, L1-3)，再按上述方法浓缩至干，并再溶解，检测其生物活性和化感作用。对活性较强的组分用 GC-MS测定化感物质。

结果表明，辣椒植株水浸液对莴苣的化感作用表现为高抑低促的浓度双重效应，并且对根部生长的抑制作用大于地上部。辣椒植株水浸液浓度为 0、0.01、0.02、0.03和 0.04 g/mL，莴苣地上部长依次为 15.8、17.7、16.6、15.2和 13.1 cm，根长依次为 34.4、28.9、16.2、11.8和 7.0 cm；莴苣发芽率和发芽势也表现相同的趋势。

用辣椒植株水浸液各有机溶剂的洗脱组分进行莴苣发芽试验，根据莴苣发芽率、发芽指数、地上部长和根长进行分析，计算各指标的隶属函数值和综合隶属函数值，从而确定化感作用的大小。各组分的综合隶属函数值大小顺序为 L6 > CK > L5 > L2 > L3 > L4 > L1，其综合隶属函数值依次为 0.867、0.860、0.721、0.655、0.542、0.461和 0.041，因此认为化感作用最强的组分为 L1，最弱的为 L6。

用辣椒植株水浸液的 L1组分分离的 L1-1、L1-2和 L1-3组分进行莴苣发芽试验，根据 3个组分的发芽率、发芽指数、地上部长和根长的统计结果，计算其综合隶属函数值依次为 0、0.506和 0.755，以 L1-1的最小。由此认为辣椒植株水浸液的 L1组分各分离成分对莴苣化感作用最强的为 L1-1组分。

对 L1-1组分进行气相色谱 -质谱联仪 (GC-MS) 分析，根据标准样品图谱认定辣椒化感作用中起主要作用的化学物质有：邻苯二甲酸、邻苯二甲酸二丁酯、苯萘胺、4，4-二叔丁基苯酚、叶绿醇、二苯胺、2，3-丁二醇、丁酸、2-叔丁基苯酚、戊二酸二丁酯、2，4-二叔丁基苯酚。

本试验是通过辣椒植株水浸液获得的化学物质，如要鉴定这些物质中哪种是化感物质，必须把这些物质与根系分泌的化学物质综合起来分析、比较，最后可确定辣椒的主要化感物质。

收稿日期：2004-05-04; **修回日期**：2004-11-04
基金项目：国家“十五”科技攻关重大专项课题 (2004BA516A09)