

新疆主栽杏品种自交不亲和 *SFB* 基因的检测

刘月霞, 冯建荣*, 王大江, 樊新民, 姜 新

(石河子大学农学院, 新疆石河子 832003)

摘 要: 为系统鉴定新疆主栽杏品种自交不亲和 *SFB* 基因型, 以新疆 25 个主栽杏品种为试材, 利用蔷薇科保守序列设计引物对叶片基因组 DNA 进行 *SFB* 基因特异 PCR 扩增, 筛选出有效的扩增引物; 对成功扩增的杏品种的特异条带克隆测序, 在 GenBank 上进行 BLASTN 比对, 确定各品种的 *SFB* 基因型。结果显示: 引物组合 II-1、IV-2, 1-I、1-II 对新疆杏品种的扩增效果最好, 成功地在 18 个品种上扩增出了 5 种大小不同的条带, 14 种不同的基因型, 其中两个基因 (*SFB-36*, *SFB-42*) 与 GenBank 上已经登录的 *SFB-13* (the Accession No. EF062342) 为同一基因, 其余 12 个为新基因, 暂命名为: *SFB-30*、*SFB-31*、*SFB-32*、*SFB-33*、*SFB-34*、*SFB-35*、*SFB-37*、*SFB-38*、*SFB-39*、*SFB-40*、*SFB-41* 和 *SFB-43*。对扩增出的 *SFB* 氨基酸序列进行比较, 发现 3 个保守区和两个高变区; 将试验所得基因与李属果树 62 个 *SFB* 基因构建系统进化树, 显示李属果树 *SFB* 基因的种内相似性并不高于种间相似性。

关键词: 杏; 自交不亲和; *SFB* 基因

中图分类号: S 662.2

文献标识码: A

文章编号: 0513-353X (2011) 04-0666-09

Identification of Self-incompatibility *SFB* Genes for Apricot Cultivars in Xinjiang Area

LIU Yue-xia, FENG Jian-rong*, WANG Da-jiang, FAN Xin-min, and JIANG Xin

(College of Agriculture, Shihezi University, Shihezi, Xinjiang 832003, China)

Abstract: In order to identify *SFB* gene associated with self-incompatibility of apricot cultivars in Xinjiang area systematically, five pairs of primers designed according to the conserved sequences of Rosaceae *SFB* were used for specific PCR amplification of 25 mainly apricot cultivars in Xinjiang. The specific fragments amplified successfully were cloned and sequenced. The results showed: The primer combination II-1、IV-2, 1-I、1-II was the best optional; Five different size fragments and 14 different genes were cloned from 18 apricot cultivars. Searches for homology with our sequences publicly available DNA databases revealed 2 *SFB* gene fragments (*SFB-36*, *SFB-42*) had been deposited in the GenBank (Accession No: EF062342) as *SFB-13*, and the other 12 *SFB* gene fragments were novel *SFB* genes, temporarily named as: *SFB-30*, *SFB-31*, *SFB-32*, *SFB-33*, *SFB-34*, *SFB-35*, *SFB-37*, *SFB-38*, *SFB-39*, *SFB-40*, *SFB-41* and *SFB-43*. Comparison of amino acid sequences of this 14 *SFB* gene fragments in apricot revealed three conserved regions and two high variability regions. Sixty-two *SFB* genes in Rosaceae

收稿日期: 2010-09-17; 修回日期: 2011-03-14

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30760143); 科技部 ‘863’ 计划项目 (2008AA10Z109); 教育部 ‘新世纪优秀人才’ 支持计划项目 (NCET-08-0918)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: fengjr102@126.com; Tel: 13031329662)

Prunus genus were used to form their phylogenetic tree. The evolutionary relationships showed *SFB* genes did not form a distinct cluster within species. Intra-species similarity was not higher than inter-species one.

Key words: apricot; self-incompatibility; *SFB* gene

杏为中国原产的果树之一, 中国杏栽培历史悠久, 种质资源极为丰富。新疆是世界杏重要的起源中心之一, 现有杏属 (*Armeniaca* Mill.) 植物品种资源 200 多个类型 (陈学森 等, 2001)。但目前新疆原产杏品种多数为自交不亲和品种, 生产上造成产量低而不稳定, 从而制约了新疆杏产业的发展。

杏的自交不亲和性被普遍认为属于 *S-RNase* 体系的配子体自交不亲和系统, 受一个具有复等位基因的 *S*-位点控制, 包括花柱 *S*-决定子和花粉 *S*-决定子 (成建红 等, 2006), 花柱 *S*-决定子已确定为 *S-RNase* 基因, 并且在许多植物上已经被成功克隆 (Sassa et al., 1992)。花粉 *S*-决定子一般被认为应该是具有在花粉中特异表达, 与 *S-RNase* 基因紧密连锁, 在基因序列上存在与 *S-RNase* 基因高变区相对应的多态性和与 *S-RNase* 基因具有特异识别作用等特点, 现在基本判定在花粉中特异表达的 *F-box* 基因就是花粉 *S*-决定子, 并且已经在梅 (Entani et al., 2003)、樱桃 (Yamane et al., 2003a; Hiroyasu et al., 2008) 和扁桃 (Ushijima et al., 2003) 等物种中克隆到。朱墨等 (2005) 克隆出了樱桃上的 *SFB* 基因; 在扁桃上利用 RT-PCR 和 RACE 技术, 郭长奎等 (2009) 获得全长 *SFB* 基因 *AcSFB10*; 郭振宇等 (2006) 获得 *SLF* (*S* Locus *F*-box) 基因 (*PdSLF1*) 的 cDNA, 目前 GenBank 上已经登录了杏 *SFB* 的基因, 但是还没有相关的文献报道。

总的来看, 目前国内外杏 *SFB* 基因鉴定研究仍很落后, 尤其对国内培育及起源于中国新疆的杏品种更缺乏相关研究。本研究中通过筛选有效鉴定新疆地区主栽杏品种 *SFB* 基因的引物, 系统鉴定新疆地区主栽杏品种 *SFB* 基因型, 为从 *SFB* 基因序列上探讨杏自交不亲和机理, 研究栽培杏的起源演化提供重要的理论依据, 同时为科学合理地配置授粉品种, 提高杏产量提供有利的技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

试验材料均采自于新疆农业科学院轮台国家果树资源圃, 共 25 个杏品种: 馒头玉吕克、安江胡安娜、长胡安娜、依力克大杏、卡拉胡安娜、奎克皮曼、细黑叶杏、早大油杏、阿克玉吕克、卡尔胡安娜、脆佳娜丽、巴都玉吕克、赛来克玉吕克、冬杏、洛甫 2 号、托乎提、苏陆克、黄红待克、大五月、巴拉肖、晚熟杏、串枝杏、大树上干、大白油杏、赛买提。

本试验选用的 25 个杏品种 (类型) 理论上均为二倍体 (张加延, 2008), 2009 年 5 月底采集成熟的嫩叶洗净晾干后硅胶干燥保存, 2009 年 7 月开始试验。

1.2 方法

1.2.1 叶片 DNA 的提取

叶片基因组 DNA 的提取采用 CTAB 法 (张慧蓉 等, 2008), 取 3 μ L 基因组 DNA 在 1.2% 的琼脂糖凝胶上电泳, 核酸蛋白仪 (Thermo Nano DROP 2000) 检测 DNA 浓度, -20°C 保存备用。

1.2.2 引物的筛选

根据蔷薇科保守序列 (GenBank 登录号: DQ422946) 自行设计 4 对 *SFB* 基因特异性引物, 具体引物位置见图 1, 同时参考朱墨等 (2005) 设计的 BFP180/BFP184 引物对 25 个新疆杏叶片基因

组 DNA 进行 *SFB* 基因特异 PCR 扩增（详细引物序列见表 1，所用引物均由上海生工合成），以期筛选出能有效扩增新疆杏品种 *SFB* 基因的引物组合。

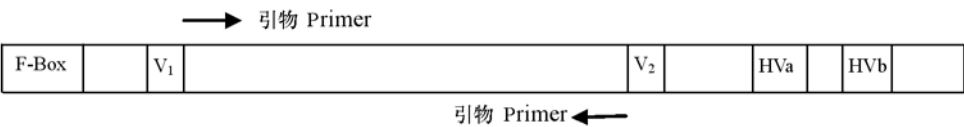


图 1 李属 *SFB* 基因的结构及引物的位置
V₁、V₂: 变异区; HVa、HVb: 高变区。

Fig. 1 The gene structure of *Prunus SFB* and its primer locations
V₁, V₂: Variable region; HVa, HVb: Hyper variable region.

表 1 所选用的引物组合及其序列
Table 1 Sequences of consensus primer combinations

序号 No.	引物组合 Primer combination	序列 5'-3' Sequence 5'-3'	文献 Reference
1	II-1	AATCCCTGGTTTCGGTTTCTG	参考 DQ422946 自行设计 Designed by us reference to DQ422946
	IV-2	CACTGCCTGAATCGAATG AC	
2	1- I	TGTTTATCTACTTTGCCTCC	
	1- II	TTGCTTCAATCATCTTCC	
3	3- I	GCAAAAATGAAAAGCACTAT	朱墨 等, 2005 Zhu et al., 2005
	3- II	GCCCTCCTCCTCCTCACACCCA	
4	Wang3- I	TATCTACTTTGCCTCCACCACC	
	Wang3- II	CTCCTCCTCACACCCATAACA	
5	BFP180	GACATCCTAGCAAGACTACCA	
	BFP184	CCATATTTGATGGTGGCCAAG	

1.2.3 *SFB*基因的特异性PCR扩增

5 对引物的 PCR 扩增体系均为 25 μL 体系: 含 10 × Buffer 2.5 μL, dNTP 0.5 μL, 各引物 0.5 μL, DNA 模版 2 μL, *Taq* 酶 0.25 μL。所用程序: 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 45 s, 退火 45 s, 退火温度分别为 52.2、50、50、57.5、56 和 72 °C, 延伸 2 min, 35 个循环后 72 °C 延伸 7 min。

1.2.4 *SFB*基因的克隆测序

回收 PCR 产物, 16 °C 连接到 PMD19-T (Takara) 载体 7 h, 然后转化大肠杆菌 DH5α 感受态细胞, 蓝白斑筛选, 挑单一菌落白斑于 LB 液体培养基中摇菌, PCR 检测, 测序。

1.2.5 数据分析

所有的样品测序均在华大基因和上海生工重复测序, 对测序结果用 DNAMAN 软件进行分析, 将分析后的序列在 GenBank 中 BLASTN, 与已登录的 *SFB* 基因氨基酸同源率 100% 的基因片段暂视为同一 *SFB* 基因 (陈晓流 等, 2004), 同源率低于 100% 的视为新基因, 进而确定各品种的 *SFB* 基因型。

将本试验所克隆得到的基因与已经登录的李属其它树种 *SFB* 基因一起进行氨基酸序列结构分析, 找出基因的变异区和保守区, 同时构建种系发生系统进化树, 分析新疆杏 *SFB* 基因与李属其它树种 *SFB* 基因的关系。

2 结果与分析

2.1 *SFB* 的克隆测序及 *SFB* 基因型的鉴定

把两对引物成功扩增出特异条带的 18 个品种的特异片段汇总（图 2），共扩增出 5 种长度不同的片段，片段长度为 434 ~ 673 bp 之间。其中引物组合 1 扩增出的片段较长。在引物组合 1 扩增出的片段上查找引物组合 2 的片段，结果显示有 1 ~ 3 个碱基的差别，说明可能是不同引物扩增出的相同基因位点的不同区段。

将 18 个杏品种的特异 PCR 扩增产物进行克隆测序，测序结果利用 DNAMAN 软件进行同源性比较，结果显示，同一引物扩增的长度相近的片段之间的相似性最高的达 100%，最低的达 74.39%。其中卡拉胡安娜、细黑叶杏、早大油杏序列相似性为 100%，卡尔胡安娜、黄红待克的序列相似性为 100%，赛来克玉吕克、洛甫 2 号序列相似性为 100%，将相似性为 100% 的基因视为同一基因，则共有 14 种不同基因序列。

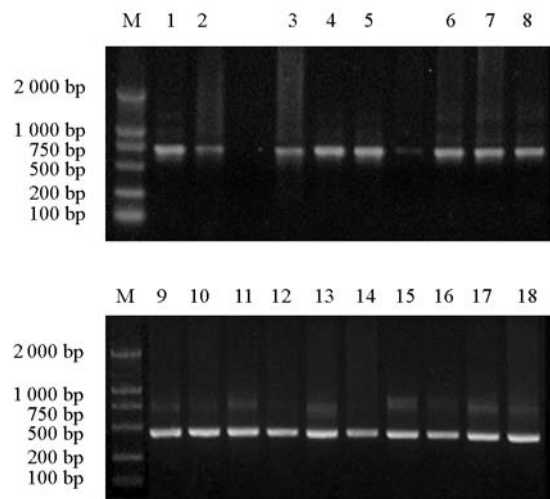


图 2 18 个杏品种的 *SFB* 基因 PCR 扩增图

1~8 为引物组合 1 扩增；9~18 为引物组合 2 扩增。M: Marker DL 2000；1: 馒头玉吕克；2: 安江湖安娜；3: 长胡安娜；4: 依力克大杏；5: 卡拉胡安娜；6: 奎克皮曼；7: 细黑叶杏；8: 早大油杏；9: 阿克玉吕克；10: 卡尔胡安娜；11: 脆佳娜丽；12: 巴都玉吕克；13: 赛来克玉吕克；14: 冬杏；15: 洛甫 2 号；16: 托乎提；17: 苏陆克；18: 黄红待克。

Fig. 2 *SFB* gene PCR amplification for 18 apricot cultivars in Xinjiang area

1~8 were amplified by primer combination 1; 9~18 were amplified by primer combination 2. M: Marker DL 2000; 1: Mantouyulvke; 2: Anjianghu'anna; 3: Changhu'anna; 4: Yilikedaxing; 5: Kalahu'anna; 6: Kuikepiman; 7: Xiheyexing; 8: Zaodayouxing; 9: Akeyulvke; 10: Kaerhu'anna; 11: Cuijianali; 12: Baduyulvke; 13: Sailaikeyulvke; 14: Dongxing; 15: Luofu 2; 16: Tuohuti; 17: Suluke; 18: Huanghongdaike.

在 GenBank 数据库中搜索与 14 个基因同源的核苷酸序列证实与这些片段同源性高的前 10 个基因都是蔷薇科李属植物 (*Rosaceae Prunus*) *SFB* 基因，BLASTN 结果见表 2。暂时对这些基因进行编号，依次为：卡拉胡安娜、细黑叶杏、早大油杏 *SFB-30*，卡尔胡安娜、黄红待克 *SFB-31*，赛来克玉吕克、洛甫 2 号 *SFB-32*，馒头玉吕克 *SFB-33*，安江湖安娜 *SFB-34*，长胡安娜 *SFB-35*，依力克

大杏 *SFB-36*, 奎克皮曼 *SFB-37*, 阿克玉吕克 *SFB-38*, 脆佳娜丽 *SFB-39*, 巴都玉吕克 *SFB-40*, 冬杏 *SFB-41*, 托乎提 *SFB-42*, 苏陆克 *SFB-43*。

将相似性 98%以上的 *SFB* 基因的 DNA 序列, 利用 DNAMAN 软件去除内含子后推导的氨基酸序列与 GenBank 上同源率最高的 *SFB* 基因的氨基酸序列进行同源性比较, 结果显示 *SFB-30* 与扁桃 *SFB-5* 基因 (FJ514937) 同源率为 96.80%, *SFB-34* 与杏 *SFB-23* 基因 (EU652886) 同源率为 99.54%, *SFB-35* 与杏 *F-box 2* (DQ422944) 同源率为 98.65%, *SFB-36* 与杏 *SFB-13* 基因 (EF062342) 同源率为 100%, *SFB-37* 与杏 *F-box 3* 基因 (DQ422945) 同源率为 99.33%, *SFB-39* 与杏 *F-box 3* 基因 (DQ422945) 同源率为 98.25%, *SFB-42* 与杏 *SFB-13* 基因 (EF062342) 同源率为 100%, *SFB-43* 与扁桃 *SFB-c* 基因 (FJ362527) 同源率为 67.36。

由此判定 *SFB-36*、*SFB-42* 与杏 *SFB-13* 基因 (EF062342) 为同一基因, 即依力克大杏、托乎提的 *SFB* 基因为 *SFB-13*。其余 12 个 *SFB* 基因均为新 *SFB* 基因, 新基因目前正在 GenBank 登录中, 将 12 个新基因进行同源性比对, 结果见表 2。

表 2 克隆得到的 14 个新序列同源性比对结果
Table 2 The alignment results of 14 new sequence

/%

基因 Gene	<i>SFB-30</i>	<i>SFB-31</i>	<i>SFB-32</i>	<i>SFB-33</i>	<i>SFB-34</i>	<i>SFB-35</i>	<i>SFB-36</i>	<i>SFB-37</i>	<i>SFB-38</i>	<i>SFB-39</i>	<i>SFB-40</i>	<i>SFB-41</i>	<i>SFB-42</i>
<i>SFB-31</i>	57.12												
<i>SFB-32</i>	53.03	77.88											
<i>SFB-33</i>	99.70	56.97	52.88										
<i>SFB-34</i>	88.03	58.33	50.45	87.88									
<i>SFB-35</i>	78.91	50.15	49.12	78.61	79.06								
<i>SFB-36</i>	88.64	59.85	51.67	88.33	89.55	79.94							
<i>SFB-37</i>	78.79	49.93	49.04	78.50	78.94	98.96	80.12						
<i>SFB-38</i>	57.73	91.01	78.34	57.73	58.33	50.44	60.61	50.22					
<i>SFB-39</i>	50.96	75.72	74.39	50.81	50.07	64.78	52.28	65.53	75.94				
<i>SFB-40</i>	52.88	77.42	98.39	52.73	50.30	49.26	51.52	49.19	78.11	74.61			
<i>SFB-41</i>	57.73	91.01	78.57	57.73	58.33	50.74	60.61	50.52	99.54	77.04	78.34		
<i>SFB-42</i>	58.18	91.47	79.03	58.03	58.64	51.92	65.45	51.69	92.63	78.37	78.80	92.63	
<i>SFB-43</i>	65.15	87.33	81.11	65.00	57.33	50.88	58.18	50.66	88.25	78.62	80.88	88.25	88.94

2.2 *SFB* 基因氨基酸序列比较

18 个新疆杏品种上扩增出来的 14 个 *SFB* 基因的核苷酸序列去除内含子后, 经 DNAMAN 软件推导出氨基酸序列, 与李属其他植物已经扩增出的 *SFB* 基因氨基酸序列进行比较, 结果如图 3 所示。本试验克隆出的 *SFB* 基因与已经登录的 *SFB* 基因都有两个高度变异的区域 HVa、HVb 和 3 个保守区 C1、C2、C3, 但本试验中由于扩增的序列太短, 尚没有获得 F-box 保守区域。

2.3 蔷薇科 *SFB* 基因遗传距离分析

将本试验得到的 14 个杏 *SFB* 基因与在 GenBank 上登录的李属 *SFB* 基因构建蔷薇科李亚科 *SFB* 基因种系发生系统进化树, 结果如图 4 所示。本试验扩增出的基因较为均匀地分散在进化树中, 而且杏、扁桃、李、樱桃的种间并没有明显地表现出种内相似性高于种间的相似性。由此可见: *SFB* 基因的进化应该在种形成之前。

	C1	C2	
<i>SFB-30</i> (细黑叶杏)	SLVRFLCTCKSWSDFIGSPSFVSTHLHRNVTGHAHAYLLCLHHPNFECQRD	DDDPYVKEELQWSLFSNETFEQCFKLNHPLENT	1-84
<i>SFB-31</i> (卡尔胡安娜)	-----VYLLCLHYSNFELQAD-----	PDDPYVKEQFQWSLFSNETFEQCFKLNHPLENT	1-49
<i>SFB-32</i> (赛来克玉吕克)	-----VYLLCLHEDFERKFD-----	VDDPFVKQDLQWSLFSNETFEQCFKLNHPLENT	1-49
<i>SFB-33</i> (馒头玉吕克)	SLVRFLCTCKSWSDFIGSPSFVSTHLHRNVTGHAHAYLLCLHHPNFECRRD	DDDPYVKEELQWSLFSNETFEQCFKLNHPLENT	1-84
<i>SFB-34</i> (安江胡安娜)	SLVRFLCTCKSWSDLISSSFVSTHLNRNVAKHEHVYLLCLHHPNVRQVD	RDDPYVKEQFQWSLFSNETFEQCFKLNHPLENT	1-84
<i>SFB-35</i> (长胡安娜)	SLVRFLCACKSWSDLINSSSFITTLQNRNVTKHLHVSLLCLHHPNFERND	DDDPYVKEELQWSLFSNETFEQCFKLNHPLENT	1-84
<i>SFB-36</i> (依力克大杏)	SLVRFLCTCKSWSDLISSSFVSTHLHRNVTKHTHVYLLCLHHPNFERND	PDDPYVKEQFQWSLFSNETFEQCFKLNHPLENT	1-84
<i>SFB-37</i> (奎克皮曼)	SLVRFLCACKSWSDLINSSSFITTLQNRNVTKHLHVSLLCLHHPNFERND	DDDPYVKEELQWSLFSNETFEQCFKLNHPLENT	1-84
<i>SFB-38</i> (阿克玉吕克)	-----VYLLCLHHPNFERLDD-----	PDDPYVKEQFQWSLFSNETFEQCFKLNHPLENT	1-49
<i>SFB-39</i> (脆佳娜丽)	-----VYLLCLHHPNFERLDD-----	PDDPYVKEQFQWSLFSNETFEQCFKLNHPLENT	1-49
<i>SFB-40</i> (巴都玉吕克)	-----VYLLCLHHPNFERLDD-----	PDDPYVKEQFQWSLFSNETFEQCFKLNHPLENT	1-49
<i>SFB-41</i> (冬杏)	-----VYLLCLHHPNFERLDD-----	PDDPYVKEQFQWSLFSNETFEQCFKLNHPLENT	1-49
<i>SFB-42</i> (托乎提)	-----VYLLCLHHPNFERLDD-----	PDDPYVKEQFQWSLFSNETFEQCFKLNHPLENT	1-49
<i>SFB-43</i> (苏陆克)	-----VYLLCLHHPNFERLDD-----	PDDPYVKEQFQWSLFSNETFEQCFKLNHPLENT	1-49
<i>SFB-10</i> (<i>P. spinosa</i>)	-----HHNPFEC-----	HVDPPDFVKKEQFQWSLFSNETFEQCFKLNHPLENT	1-43
<i>SFB-1</i> (<i>P. dulcis</i>)	SLVRFLCTCKSWSDLISSSFVSTHLHRNVTGHAHAYLLCLHHPNFER	QRDDDPYVKEELQWSLFSNETFEQCFKLNHPLENT	1-84
<i>SFB-26</i> (<i>P. cerasus</i>)	SLRFLCTCKSWSDLISSSFVSTHLHRNVTGHTHVYLLCLHHPNFER	NEDPDDPYVKEQFQWSLFSNETFEQCFKLNHPLENT	1-84
<i>SFB-f</i> (<i>P. dulcis</i>)	SLVRFLCTCKSWSDLISSSFVSTHLHRNVTGHAHAYLLCLHHPNFER	KDDPDDPYVKEQFQWSLFSNETFEQCFKLNHPLENT	1-84
<i>SFB-Sc</i> (<i>P. salicina</i>)	SLVRFLCTCKSWSDLISSSFVSTHLHRNVTGHTHVYLLCLHHPNFER	AVDPPDDPYVKEQFQWSLFSNETFEQCFKLNHPLENT	1-84
	C3	HVa	HVb
<i>SFB-30</i> (细黑叶杏)	EHYRIYGSSNGLVCISDEILNFDSPHIIWNPSISKFRTPPMSTNINLKFAVVALQFGFHPG	-----	85-145
<i>SFB-31</i> (卡尔胡安娜)	EHYVIYGSSNGLVCISDEILNFDSPHIIWNPSVKKRTPPMSTNINIKFSHVALQFGFHPG	-----	50-110
<i>SFB-32</i> (赛来克玉吕克)	EHFPIYGSSNGLVCISDEILNFDSPHIIWNPSISKFRTPPMSTNINLKFAVVALQFGFHPG	-----	50-110
<i>SFB-33</i> (馒头玉吕克)	EHYRIYGSSNGLVCISDEILNFDSPHIIWNPSISKFRTPPMSTNINLKFAVVALQFGFHPG	-----	85-145
<i>SFB-34</i> (安江胡安娜)	EHYGIYGSSNGLVCISDEILNFDSPHIIWNPSVKKRTPPMSTNINLKFAVVALQFGFHPG	-----	85-145
<i>SFB-35</i> (长胡安娜)	KDYRVYGSSNGLVCISDDKLDTSPIHIIWNPSVKKRTPPMSTNINLKFAVVALQFGFHPG	NVKFRYIALQFGFHPGVNDYKVRMLRVHKDDAFVEVYSLSTD	90-176
<i>SFB-36</i> (依力克大杏)	EHYMIYGSSNGLVCISDEILNFDSPHIIWNPSVKKRTPPMSTNINIKFSHVALQFGFHPG	-----	85-145
<i>SFB-37</i> (奎克皮曼)	KNYRVYGSSNGLVCISDDKLDTSPIHIIWNPSVKKRTPPMSTNINLKFAVVALQFGFHPG	NVKFRYIALQFGFHPGVNDYKVRMLRVHKDDAFVEVYSLSTD	90-147
<i>SFB-38</i> (阿克玉吕克)	EHYVIYGSSNGLVCISDEILNFDSPHIIWNPSVKKRTPPMSTNINIKFSHVALQFGFHPG	-----	50-110
<i>SFB-39</i> (脆佳娜丽)	KNYRVYGSSNGLVCISDDKLDTSPIHIIWNPSVKKRTPPMSTNINLKFAVVALQFGFHPG	NVKFRYIALQFGFHPGVNDYKVRMLRVHKDDAFVEVYSLSTD	55-112
<i>SFB-40</i> (巴都玉吕克)	EHFPIYGSSNGLVCISDEILNFDSPHIIWNPSISKFRTPPMSTNINLKFAVVALQFGFHPG	-----	50-110
<i>SFB-41</i> (冬杏)	EHYVIYGSSNGLVCISDEILNFDSPHIIWNPSVKKRTPPMSTNINIKFSHVALQFGFHPG	-----	50-110
<i>SFB-42</i> (托乎提)	EHYMIYGSSNGLVCISDEILNFDSPHIIWNPSVKKRTPPMSTNINIKFSHVALQFGFHPG	-----	50-110
<i>SFB-43</i> (苏陆克)	EHYRIYGSSNGLVCISDEILNFDSPHIIWNPSISKFRTPPMSTNINLKFAVVALQFGFHPG	-----	50-110
<i>SFB-10</i> (<i>P. spinosa</i>)	EHYGIYGSSNGLVCISDEILNFDSPHIIWNPSVKKRTPPMSTNINLKFAVVALQFGFHPG	-----	85-171
<i>SFB-1</i> (<i>P. dulcis</i>)	EHYVIYGSSNGLVCISDEILNFDSPHIIWNPSVKKRTPPMSTNINIKFSHVALQFGFHPG	-----	85-171
<i>SFB-26</i> (<i>P. cerasus</i>)	EHYVIYGSSNGLVCISDEILNFDSPHIIWNPSVKKRTPPMSTNINIKFSHVALQFGFHPG	-----	85-171
<i>SFB-f</i> (<i>P. dulcis</i>)	EHYVIYGSSNGLVCISDEILNFDSPHIIWNPSVKKRTPPMSTNINIKFSHVALQFGFHPG	-----	85-171
<i>SFB-Sc</i> (<i>P. salicina</i>)	EHYGIYGSSNGLVCISDEILNFDSPHIIWNPSVKKRTPPMSTNINIKFSHVALQFGFHPG	-----	85-171

图 3 14 个杏 *SFB* 基因氨基酸序列结构分析

C1、C2 和 C3 为保守区, HVa 和 HVb 为高变区。

Fig. 3 The analysis about structure of amino acid sequences of 14 *SFB* gene fragments in apricot

C1, C2 and C3: Conservative regions; HVa and HVb: Hypervariable regions. *SFB-30*: Xiheyixing; *SFB-31*: Kaerhu'anna; *SFB-32*: Sailaikeyulvke; *SFB-33*: Mantouyulvke; *SFB-34*: Anjianghu'anna; *SFB-35*: Changhu'anna; *SFB-36*: Yilikedaxing; *SFB-37*: Kuiekpiman; *SFB-38*: Akeyulvke; *SFB-39*: Cuijianali; *SFB-40*: Baduyulvke; *SFB-41*: Dongxing; *SFB-42*: Tuohuti; *SFB-43*: Sulukey.

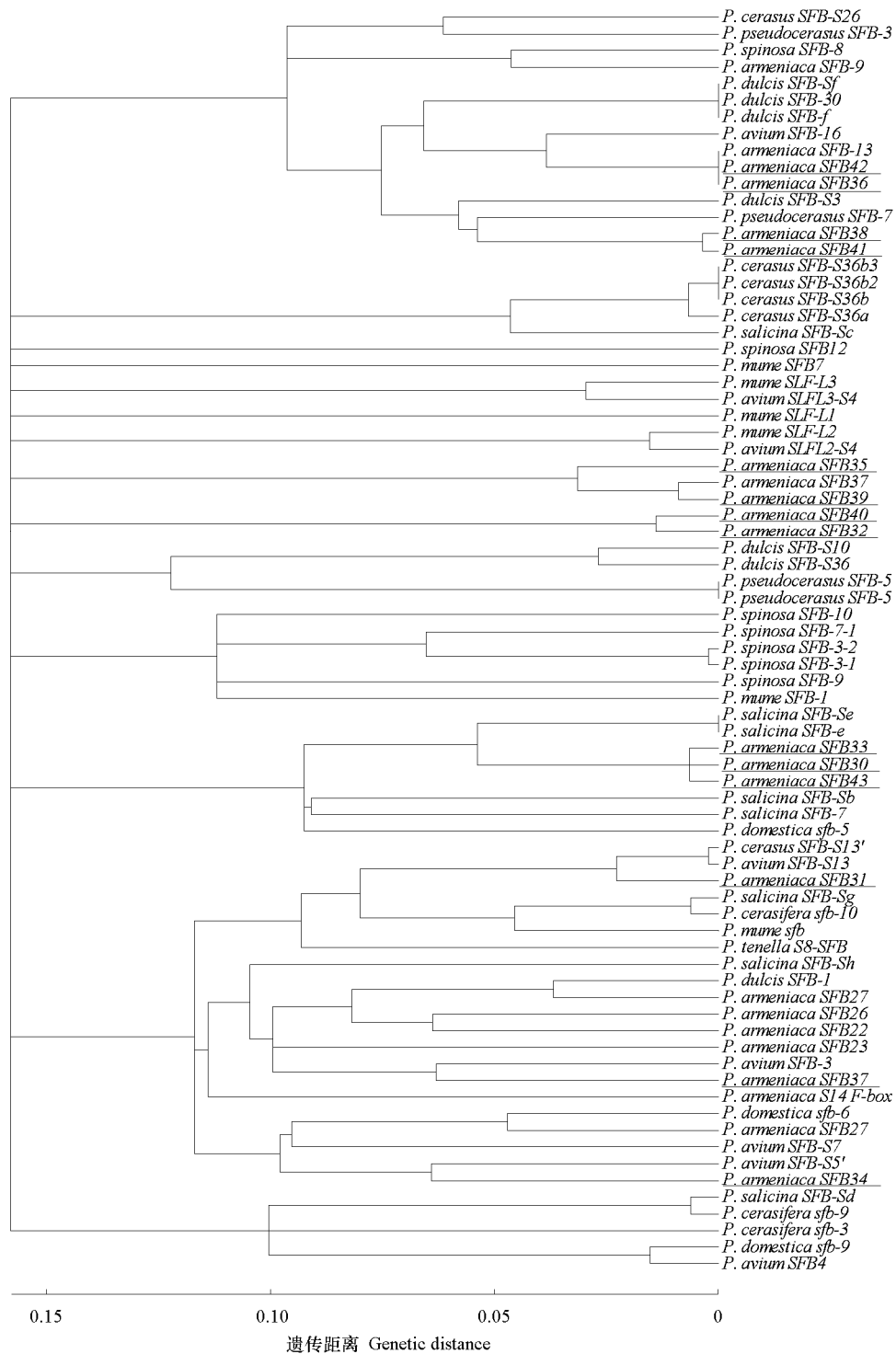


图 4 蔷薇科李亚科 *SFB* 基因的系统进化分析

下划线代表本试验得到的新基因。

Fig. 4 Phylogenetic tree of *SFB* gene of Rosaceae Prunoideae

New genes from this experiment are underlined.

3 讨论

Arumuganathan 和 Early (1991) 及张加延 (2008) 研究报道显示: 普通杏、辽杏、西伯利亚杏、藏杏、紫杏、李梅杏和梅 7 个杏属植物种及其各变种和类型染色体均为二倍体, 本试验中采用品种 (类型) 均是普通杏, 在理论上都应被扩增出两条带, 但本试验 25 个杏品种中有 18 个品种被扩增出了 1 条带, 对此冯建荣等 (2006) 认为很有可能是所选引物不合适或引物与目的片段的结合不是很好造成的; 袁德义等 (2007) 解释为品种的 *S* 等位基因片段大小可能相差不大, 较难确定其 *S* 基因型; 唐忠建 (2007) 认为只有一条 *S* 等位基因, 可能它们的基因型是一个纯合体。但是本试验中采用 5 对引物, 在 18 个杏品种上 *SFB* 基因均被扩增出 1 条带; 国内外在扁桃 (Ikeda et al., 2004)、杏 (Yamane et al., 2003b)、樱桃 (Ikeda et al., 2005) 等树种 *SFB* 基因相关报道中没有明确说明检测到两条 *SFB* 基因, 也没有进一步对二倍体植物扩增出一条 *SFB* 基因的解释, 在 *SFB* 基因中是否存在与 *S-RNase* 基因类似情况, 或者可能有其它原因造成新疆杏 *SFB* 基因只存在或只检测出 1 条带, 目前尚无法得出明确结论。

本试验扩增出的 14 种 *SFB* 基因的出现频率 (5.6%~16.7%) 不尽相同。新疆杏属于中亚生态品种群, 根据地理分布和品种的生物学特性, 目前被划分为胡安娜亚群、佳娜丽亚群、库车小白杏亚群和黑叶杏亚群 (廖明康, 2008)。但本试验结果显示, 被同一引物扩增的馒头玉吕克、细黑叶杏、早大油杏属于不同的亚群, 但它们却有一个相同的 *SFB* 基因; 属于同一亚群的馒头玉吕克、阿克玉吕克和赛来克玉吕克却有着不相同的 *SFB* 基因; 被另一引物扩增的卡尔胡安娜和黄红待克属于不同亚群却又有着相同的 *SFB* 基因; 被不同引物扩增并且不同亚群的依力克大杏与托乎提也有着相同的基因, 由此可见, *SFB* 基因在新疆主栽杏品种的分布与品种亚群并无明显相关关系。

由图 3 可以看出, 杏的 *SFB* 基因具有所有 *SFB* 基因的基本结构, 有 3 个保守区和两个高变区 HVa、HVb。张晓明等 (2005) 认为 HVa、HVb 两个高变区决定了樱桃 *SFB* 基因的多态性, 影响两个高变区编码的因素可能影响花粉 *S* 基因的专一性, 从而导致自交不亲和。在杏上, 是否也是两个高变区影响不亲和的特异性还需要进一步的研究证实。

本试验筛选了两对能有效扩增新疆杏品种 *SFB* 基因的引物: II-1、IV-2, 1-I、1-II, 并成功地在 18 个新疆杏品种上扩增出了 5 种大小不同的条带, 14 种不同的基因型。将本试验得到的 14 个杏 *SFB* 基因与李属部分 *SFB* 基因进行氨基酸序列比对, 发现 3 个保守区和两个高变区, 同时构建蔷薇科李亚科 *SFB* 基因种系发生系统进化树, 结果表明: *SFB* 基因序列均匀分布在李属植物 *SFB* 基因中, 说明 *SFB* 基因的进化应该在种形成之前。

References

- Argumuganathan K, Early E D. 1991. Nuclear DNA contents of some important plants species. *Plant Mol Biol Rep*, 9: 208 - 218.
- Chen Xiao-liu, Chen Xue-sen, Shu Huai-rui. 2004. Identifying the *S* genotypes of sweet cherry (*Prunus avium*). *Acta Genetica Sinica*, 31 (10): 1142 - 1148. (in Chinese)
- 陈晓流, 陈学森, 束怀瑞. 2004. 甜樱桃 (*Prunus avium* L.) 品种 *S* 基因型鉴定. *遗传学报*, 31 (10): 1142 - 1148.
- Chen Xue-sen, Li Xian-li, Zhang Yan-min, Wu Shu-jing, Shen Hong-bo, Shu Huai-rui. 2001. Advances in apricot germplasm resources evaluation and genetic breeding. *Journal of Fruit Science*, 18 (3): 178 - 181. (in Chinese)
- 陈学森, 李宪利, 张艳敏, 吴树敬, 沈洪波, 束怀瑞. 2001. 杏种质资源评价及遗传育种研究进展. *果树学报*, 18 (3): 178 - 181.
- Cheng Jian-hong, Bai Song-ling, Han Zhen-hai, Xu Xue-feng, Li Tian-zhong. 2006. Cloning and expression analysis of the self-incompatibility 9-Haplotype specific F-box genes in cherry (*Prunus avium*). *Scientia Agricultura Sinica*, 39 (5): 976 - 983. (in Chinese)
- 成建红, 白松龄, 韩振海, 许雪峰, 李天忠. 2006. 樱桃自交不亲和S9-单元型特异的F-box基因克隆及其表达分析. *中国农业科学*, 39 (5): 976 - 983.

- Entani T, Iwano M, Shiba H, Che F S, Isogai A, Takayama S. 2003. Comparative analysis of the self-incompatibility (*S*-) locus region of *Prunus mume*: Identification of a pollen-expressed F-box gene with allelic diversity. *Genes Cells*, 8: 203 – 213.
- Feng Jian-rong, Chen Xue-sen, Wu Yan. 2006. Molecular detection and sequences characterization of Self-incompatibility *S*-RNase gene in apricot (*Armeniaca vulgaris*). *Scientia Slivae Sinica*, 42 (10): 129 – 132. (in Chinese)
- 冯建荣, 陈学森, 吴 燕. 2006. ‘凯特’与‘新世纪’杏自交不亲和 *S*-RNase 基因的检测及克隆. *林业科学*, 42 (10): 129 – 132.
- Guo Chang-kui, Luo Shu-ping, He Tian-ming, Li Jiang, Gao Qi-ming. 2009. Cloning and bioinformatic analysis of *SFB* gene in almond. *Journal of Fruit Science*, 26 (2): 170 – 175. (in Chinese)
- 郭长奎, 罗淑萍, 何天明, 李 疆, 高启明. 2009. 扁桃 *SFB* 基因的克隆及其生物信息学分析. *果树学报*, 26 (2): 170 – 175.
- Guo Zhen-yu, Chang Feng-qi, Xie Hua, Xu Yong, Ma Rong-cai. 2006. Cloning and expression analysis of the *SLF* and *S*-RNase genes in almond. *Acta Horticulturae Sinica*, 33 (6): 1185 – 1192. (in Chinese)
- 郭振宇, 常凤启, 谢 华, 徐 勇, 马荣才. 2006. 扁桃 *SLF* 基因和 *S*-RNase 基因的克隆及表达分析. *园艺学报*, 33 (6): 1185 – 1192.
- Hiroyasu K, Shao-ling Zhang, Jun Wu Kenta S, Takeshi N. 2008. *S* genotyping and *S* screening utilizing *SFB* gene polymorphism in Japanese plum and sweet cherry by dot-blot analysis. *Mol Breeding*, 21: 339 – 349.
- Ikeda K, Igic B, Ushijima K, Yamane H, Nathanael R, Hauck N R Sassa H, Iezzoni A F, Kohn J R, Tao R. 2004. Primary structural features of the *S* haplotype-specific F-box protein, *SFB*, in *Prunus*. *Sex Plant Reprod*, 16: 235 – 243.
- Ikeda K, Ushijima K, Yamane H, Tao R, Hauck N R, Sebolt A M, Iezzoni A F. 2005. Linkage and physical distance between the *S*-haplotype *S*-RNase and *SFB* genes in sweet cherry. *Sex Plant Reprod*, 17: 289 – 296.
- Liao Ming-kang. 2008. Xinjiang apricot and diversification among the specie groups of middle Asia // Zhang Jia-yan. Study and use advance about plum and apricot resource (Fifth). Beijing: China Forestry Publishing House: 137 – 139. (in Chinese)
- 廖明康. 2008. 新疆的杏及中亚生态品种群内的变化 // 张加延. 李杏资源的研究与利用进展 (五). 北京: 中国林业出版社: 137 – 139.
- Sassa H, Hirano H, Ikehashi H. 1992. Self-incompatibility-related RNase in styles of Japanese pear (*Pyrus serotina* Rehd.). *Plant Cell Physiol*, 33: 811 – 814.
- Tang Zhong-jian. 2007. Study on *S* genotype of dangshansu pear [M. D. Dissertation]. Hefei: Anhui Agriculture University. (in Chinese)
- 唐忠建. 2007. 砀山酥梨 *S* 基因型研究 [硕士论文]. 合肥: 安徽农业大学.
- Ushijima K, Sassa H, Dandekar A M, Gradziel T M, Tao R, Hirano H. 2003. Structural and transcriptional analysis of the self-incompatibility locus of almond: Identification of a pollen-expressed F-box gene with haplotype-specific polymorphism. *Plant Cell*, 15: 771 – 781.
- Yamane H, Keda K, Ushijima K, Sassa H, Tao R. 2003a. 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 Cell Physiol*, 44: 764 – 769.
- Yamane H, Ushijima K, Sassa H, Tao R. 2003b. 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*). *Theor Appl Genet*, 107: 1357 – 1361.
- Yuan De-yi, Tan Xiao-feng, Zhang Lin, Zhao Si-dong, Wuyun Ta-na, Duan Jing-hua, Cao Yu-fen. 2007. Identification of *S*-genotype of ten cultivars from Niitaka line pear. *Acta Horticulturae Sinica*, 34 (6): 1353 – 1360. (in Chinese)
- 袁德义, 谭晓风, 张 琳, 赵思东, 乌云塔娜, 段经华, 曹玉芬. 2007. 新高系梨10个品种 *S* 基因型的鉴定. *园艺学报*, 34 (6): 1353 – 1360.
- Zhang Hui-rong, Qiao Yu-shan, Cao Shang, Zhang Chuan-lai, Hu Hui-ling, Xue Hua-bai. 2008. Extraction of genomic DNA from mature leaves of some varieties of *Prunus simonii*. *Acta Agriculture Jiangxi*, 20 (10): 4 – 6. (in Chinese)
- 张慧蓉, 乔玉山, 曹 尚, 张传来, 扈惠灵, 薛华柏. 2008. 几个杏李品种成熟叶片基因组DNA的提取. *江西农业学报*, 20 (10): 4 – 6.
- Zhang Jia-yan. 2008. Study and use advance about plum and apricot resource (Fifth). Beijing: China Forestry Publishing House: 102 – 110. (in Chinese)
- 张加延. 2008. 李杏资源的研究与利用进展 (五). 北京: 中国林业出版社: 102 – 110.
- Zhang Xiao-ming, Zhu Mo, Jiang Li-jie, Zhang Kai-chun, Yan Guo-hua. 2005. A review on the research on the pollen *S* genes of fruit trees. *Journal of Fruit Science*, 22 (3): 261 – 264. (in Chinese)
- 张晓明, 朱 墨, 姜立杰, 张开春, 闫国华. 2005. 果树自交不亲和花粉 *S* 基因研究进展. *果树学报*, 22 (3): 261 – 264.
- Zhu Mo, Zhang Kai-chun, Jiang Li-jie, Zhang Xiao-ming. 2005. Distinguish *SFB4'* gene from *SFB4* gene of sweet cherry (*Prunus avium*). *Acta Horticulturae Sinica*, 32 (1): 97 – 100. (in Chinese)
- 朱 墨, 张开春, 姜立杰, 张晓明. 2005. 甜樱桃 *SFB4* 与 *SFB4'* 基因的鉴别. *园艺学报*, 32 (1): 97 – 100.