

桃自交亲和性的分子机制及遗传特性研究

许高歌, 吴华清, 吴俊, 王超, 齐开杰, 张绍铃*

(南京农业大学园艺学院, 南京 210095)

摘要: 以油桃 (*Prunus persica* var. *necturina*) ‘中油 5 号’及其自交后代为试材, 利用花柱 *S-RNase* 基因和花粉 *SFB* 基因的特异性引物进行 PCR 扩增, 对扩增片段进行回收、克隆、测序和 Blast 分析, 确定了‘中油 5 号’的自交不亲和基因型为 $S_1S_{2(m)}$ 。序列分析结果显示, ‘中油 5 号’桃 $S_1-RNase$ 和 $S_{2(m)}-RNase$ 与多个其他李属 *S-RNase* 基因氨基酸和核苷酸序列间都具有极高的相似性, SFB_1 和 SFB_2 基因与多个其他李属 *SFB* 基因氨基酸和核苷酸序列间也都具有极高的相似性。进一步对‘中油 5 号’自交后代个体的 *S* 基因型进行检测, 发现后代群体中存在 3 种 *S* 基因型, 分别为 S_1S_1 、 $S_1S_{2(m)}$ 和 $S_{2(m)}S_{2(m)}$, 且分离比为 8 : 13 : 7, 与预期的比例 1 : 2 : 1 差异不显著 ($\chi^2 = 0.214 < \chi^2_{0.05,2} = 5.991$), 说明 *S-RNase* 基因和 *SFB* 基因都遵循两因素的孟德尔遗传规律进行连锁分离。此外, 基因型为 S_1S_1 和 $S_{2(m)}S_{2(m)}$ 的纯合体的存在, 表明桃花花粉 SFB_1 和 SFB_2 基因均不能被自身花柱 *S-RNase* 所识别, 这是由于 SFB_1 和 SFB_2 基因翻译提前终止所造成的, 从而使‘中油 5 号’表现出自交亲和性。

关键词: 桃; 花柱 *S-RNase* 基因; 花粉 *SFB* 基因; 自交亲和

中图分类号: S 662.1

文献标识码: A

文章编号: 0513-353X (2012) 06-1035-10

Molecular Mechanism and Genetic Characterization of Self-compatibility in Peach

XU Gao-ge, WU Hua-qing, WU Jun, WANG Chao, QI Kai-jie, and ZHANG Shao-ling*

(College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: PCR were performed with specific primer sets of *Prunus S-RNase* and *SFB* alleles using ‘Zhongyou 5’ (*Prunus persica* var. *necturina*) as the template. The amplification products were extracted, cloned, sequenced and then Blast analysis, which were used to determine the *S*-genotype of this cultivar, $S_1S_{2(m)}$. Sequence analysis showed that *Prunus persica S_1-RNase* and $S_{2(m)}-RNase$ alleles have exceptionally high identities with other *Prunus S-RNase* alleles, and, SFB_1 and SFB_2 alleles have exceptionally high identities with other *Prunus SFB* alleles, too. The *S*-genotypes of self-pollinated progeny of ‘Zhongyou 5’ were detected, it is obviously that three classes were found in progeny, and the segregation ratio of S_1S_1 , $S_1S_{2(m)}$ and $S_{2(m)}S_{2(m)}$ was 8 : 13 : 7, which did fit to the expected ratio that was 1 : 2 : 1 ($\chi^2 = 0.214 < \chi^2_{0.05,2} = 5.991$). This result showed that *S-RNase* and *SFB* alleles are tightly co-segregation according to the Mendel genetic model. Moreover, the existence of S_1S_1 and $S_{2(m)}S_{2(m)}$ homozygotes suggested that SFB_1 and SFB_2 could not be cognized by self *S-RNase*, due to that the protein

收稿日期: 2012-01-04; 修回日期: 2012-05-25

基金项目: 江苏省自然科学基金项目 (BK2011067)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: nnzsl@njau.edu.cn)

of these two *SFB* alleles were premature, which resulted in the ‘Zhongyou 5’ is self-compatible.

Key words: peach; *S-RNase*; *SFB*; self-compatibility

自交不亲和性是被子植物防止近亲繁殖、促进远缘杂交的一种遗传机制 (Sijacic et al., 2004)。蔷薇科大部分果树表现 *S-RNase* 介导的配子体型自交不亲和, 该自交不亲和性是由具有复等位基因的单一位点即 *S* 基因座控制, 它至少包含一个在花柱中特异性表达的花柱 *S* 基因和一个在花粉中特异性表达的花粉 *S* 基因 (McCubbin et al., 2000)。控制花柱自交不亲和性的是一种具有 RNase 活性的 *S* 糖蛋白, 称为 *S-RNase*, 它能分解来自相同基因的花粉 rRNA 和 mRNA (Kao, 1994), 从而抑制离体花粉管生长 (Jahnen et al., 1989)。控制花粉自交亲和性的是一种 F-box 蛋白, 称为 *SFB* (*S*-haplotype-specific F-box protein) (Ushijima et al., 2003; Yamane et al., 2003a; Sonneveld et al., 2005) 或 *SLF* (Entani et al., 2003)。相同 *S* 基因的花柱和花粉 *S* 基因产物的相互识别会导致自交不亲和性反应 (McCubbin et al., 2000)。

近年来, 随着分子生物学技术的不断发展, 许多花柱 *S-RNase* 基因已经从甜樱桃 *Prunus avium* (Tao et al., 1999; Sonneveld et al., 2003; Vaughan et al., 2008)、扁桃 *P. dulcis* (Ma & Oliveira, 2001; Ortega et al., 2006)、杏 *P. arminica* (Romero et al., 2004; Halász et al., 2005; Vilanova et al., 2006; Wu et al., 2009)、李 *P. salicina* (Beppu et al., 2002; Sapir et al., 2004; Halász et al., 2007; Zhang et al., 2008) 和梅 *P. mume* (Tao et al., 1999; Yaegaki et al., 2001; Heng et al., 2008) 等李属自交不亲和果树中分离出来。花粉 *SFB/SLF* 基因与花柱 *S-RNase* 基因紧密连锁 (Entani et al., 2003; Ushijima et al., 2003; Yamane et al., 2003b; Romero et al., 2004; Zhang et al., 2007)。花粉 *SFB* 基因也已经从甜樱桃 (Ikeda et al., 2004; Ushijima et al., 2004; Sonneveld et al., 2005; Vaughan et al., 2006)、扁桃 (Ushijima et al., 2003; 郭振宇 等, 2006; Šurbanovski et al., 2007)、杏 (Vilanova et al., 2006; Wu et al., 2009; 吴俊 等, 2010)、李 (Zhang et al., 2007) 和梅 (Entani et al., 2003; Yamane et al., 2003b) 中分离出来。

桃 (*Prunus persica* Lindl.) 也属于蔷薇科李属配子体果树, 但二倍体桃表现出自交亲和。不同于其他李属果树, 在桃物种中仅发现了两种不同的 *S* 基因, 分别为 S_1 和 S_2 (Hegedüs et al., 2006; Tao et al., 2007)。Tao 等 (2007) 对 S_1 和 S_2 这两个 *S* 单元型基因序列进行分析时, 发现 *SFB₁* 和 *SFB₂* 基因中都有碱基片段的插入, 并导致翻译的提前终止。此外, 一些桃品种的 S_2 -*RNase* 在 C5 区的第 6 个保守的半胱氨酸被酪氨酸替换, 从而失去 *S-RNase* 活性 (Tao et al., 2007)。然而, 前人对桃自交亲和性的研究焦点都集中在桃自身品种上, 至今还没有关注两个 *S* 基因的遗传模式。

本研究中以含有两个不同 *S* 单元型的油桃品种 ‘中油 5 号’ 为试材, 通过对自交后代种子 *S* 基因型的鉴定, 以期明确桃自交亲和性机制。

1 材料与方法

1.1 材料

材料采自南京农业大学江浦农场园艺站桃品种园, 品种为 ‘中油 5 号’ (*Prunus persica* var. *necturina*), 系中国农业科学院郑州果树研究所 ‘瑞光 3 号’ 油桃为母本、‘五月红’ 桃为父本杂交育成。于 2011 年春季采集幼嫩叶片, 经液氮速冻后保存于 -20 °C 冰箱中。

2011 年夏季采集到 28 粒 ‘中油 5 号’ 的自交后代种子, 去掉种皮, 经液氮速冻后保存于 -20 °C 冰箱中备用。

ExTaq、pMD19-T Vector 和 DNA 回收试剂盒购自 TaKaRa 公司, 其他药品购自上海生工生物技术服务有限公司。

1.2 基因组 DNA 提取

采用本实验室改良的 CTAB 法 (张好艳 等, 2006) 提取各试材基因组 DNA, 80 V 电压下取 3 μL 基因组 DNA 在 1% 琼脂糖凝胶上电泳, 紫外灯下检测 DNA 的纯度和完整性, 并于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.3 *S-RNase* 的 PCR 扩增

依据蔷薇科的 *S-RNase* 基因上的 5 个保守区 (C1、C2、C3、RC4 和 C5), 并结合 Tao 等 (1999) 的引物设计, 形成引物组合 PSF-C1/PSR-C5, 由上海英骏生物技术公司合成。引物序列分别为: PSF-C1: 5'-TATTTTCAATTTGTGCAACAATGG-3'; PSR-C5: 5'-TACCACTTCAT GTAACAACCTGAG-3'。

PCR 反应体系: 25 μL , 包括 2.5 μL 10 \times buffer, DNA 模板 100 ng; 0.2 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ dNTP, 0.1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 正、反向引物, 2.0 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MgCl_2 , 1 U 的 *Taq* 酶。反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 53 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。PCR 反应所用 *Taq* DNA 聚合酶购自宝生物工程 (大连) 有限公司。应用 PTC-200 扩增仪进行扩增。取 PCR 产物 5 μL , 1.2% 琼脂糖胶电泳检测 PCR 产物。

1.4 *SFB* 的 PCR 扩增

参照 Zhang 等 (2007) 的引物设计, 使用可获得 95% *SFB* 基因序列的引物组合: PsSFB-F 5'-GAAATCGTAATCGACATCCTCGTAAG-3'; PsSFB-R 5'-CACGAATTCGATTTTCGTCATATTTTC-3'。PCR 反应体系: DNA 模板 100 ng; 0.2 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ dNTP, 0.1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 正、反向引物, 1.5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MgCl_2 , 1 U 的 *Taq* 酶。反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 52 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min 45 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。使用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。

1.5 PCR 扩增产物的回收、测序与序列分析

利用 UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒回收经 2% 琼脂糖凝胶电泳后的 PCR 扩增片段。将 *S-RNase* 基因和 *SFB* 基因目的片段与 PMD19-T 载体 16 $^{\circ}\text{C}$ 条件下连接 2 h, 连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞。DNA 序列由北京六合华大基因科技股份有限公司测定, 测序结果在 NCBI 中利用 BLAST 与 GenBank + EMBL + DDBJ + PDB 等数据库已知序列比较, 再应用 DNAMAN 对 DNA 序列进行分析, 进而确定其 *S* 基因型。

2 结果与分析

2.1 桃 *S-RNase* 的克隆与序列分析

以 '中油 5 号' 基因组 DNA 为模板, 用引物组合 PSF-C1/PSR-C5 进行 PCR 扩增, 得到大小约为 1 600 bp 和 800 bp 的两个不同的扩增产物 (图 1)。

将这两个扩增产物经琼脂糖凝胶电泳并回收后, 进行克隆和测序。测序结果在 GenBank 中进行 BLAST 比较, 发现大小约为 1 600 bp 的片段与桃 *S*₁-*RNase* (GenBank 登录号: AB252415) 序列完全一致, 大小约为 800 bp 的片段与桃 *S*₂-*RNase* (AB252417) 以及 *S*_{2m}-*RNase* (AB597186) 序列也完全一致, 从而确定 '中油 5 号' 的 *S* 基因型为 *S*₁*S*_{2(m)}。

基因与扁桃的 *SFB_k* (AB252408) 的核苷酸序列同源性高达 99.43%，氨基酸序列比较显示出两基因仅在 C 端存在很大的差异，而核苷酸序列比较发现桃 *SFB₁* 基因在 C 端存在一段大小为 155 bp 的插入片段，该片段的插入使得 *SFB₁* 基因翻译异常(图 5)。*‘中油 5 号’* 的 *SFB₂* 基因和李 *SFB_a* (AB252410) 基因的核苷酸序列同源性也高达 98.49%，氨基酸序列比较显示桃 *SFB₂* 基因缺失了 C 端的变区 V2、HVa 和 HVb (图 5)，核苷酸序列比较发现桃 *SFB₂* 基因序列中存在一段 5 bp 的插入片段，该片段的插入导致 C 端序列的不能正常翻译(图 5)。因此，桃 *SFB₁* 和 *SFB₂* 基因序列的异常翻译是导致 *‘中油 5 号’* 呈现出自交亲和的原因所在。

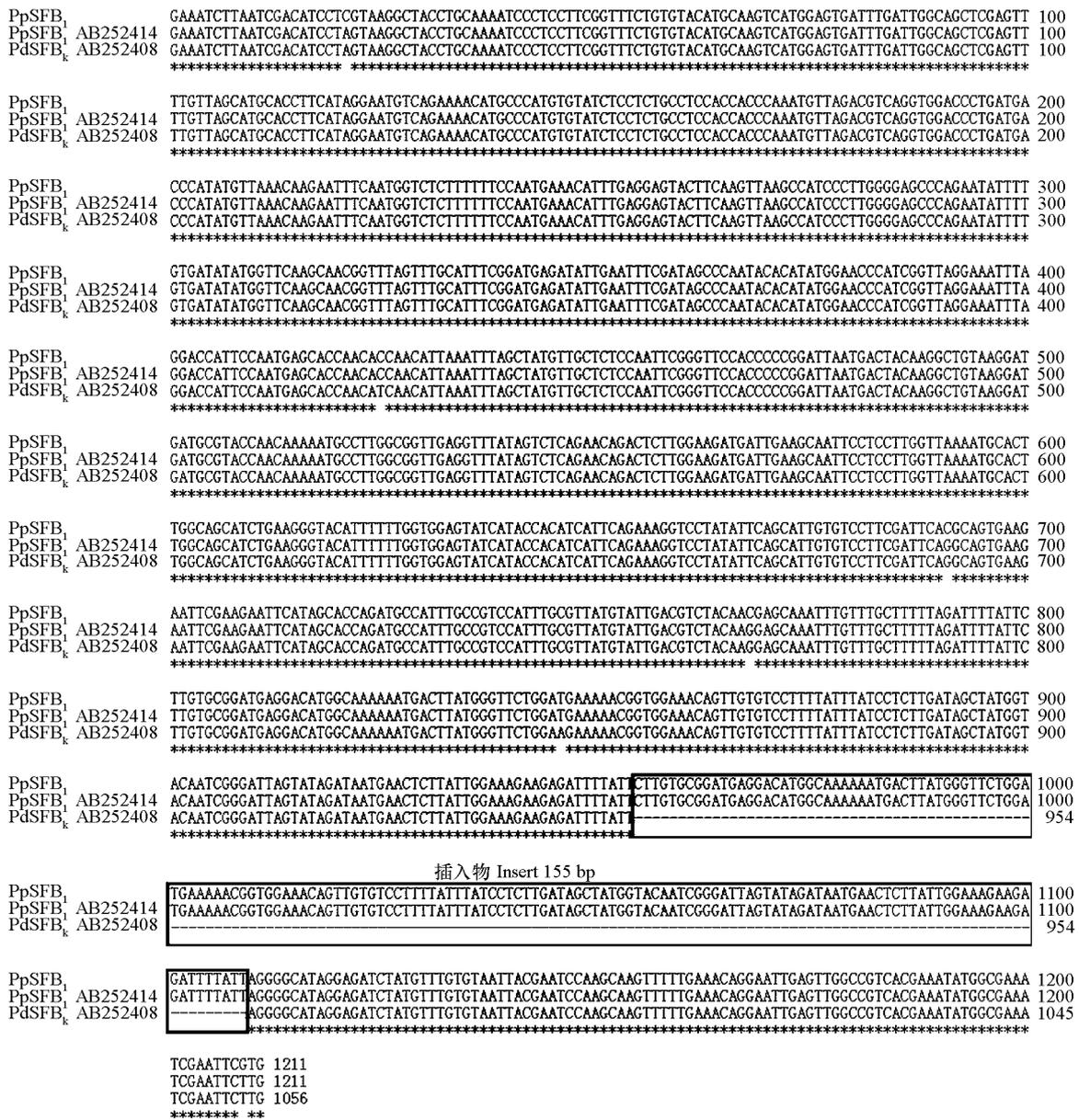


图 3 *‘中油 5 号’ SFB₁* 与桃 *SFB₁*、扁桃 *SFB_k* 基因核苷酸序列的比对结果

Pd: 扁桃; Pp: 桃; PpSFB₁: *‘中油 5 号’ SFB₁* 基因。

Fig. 3 Alignment of nucleotide sequences of *SFB₁* from *‘Zhongyou 5’* and other *Prunus* species

Pd: *P. dulcis*; Pp: *P. Persica*; PpSFB₁: *SFB₁* gene of *‘Zhongyou 5’* .

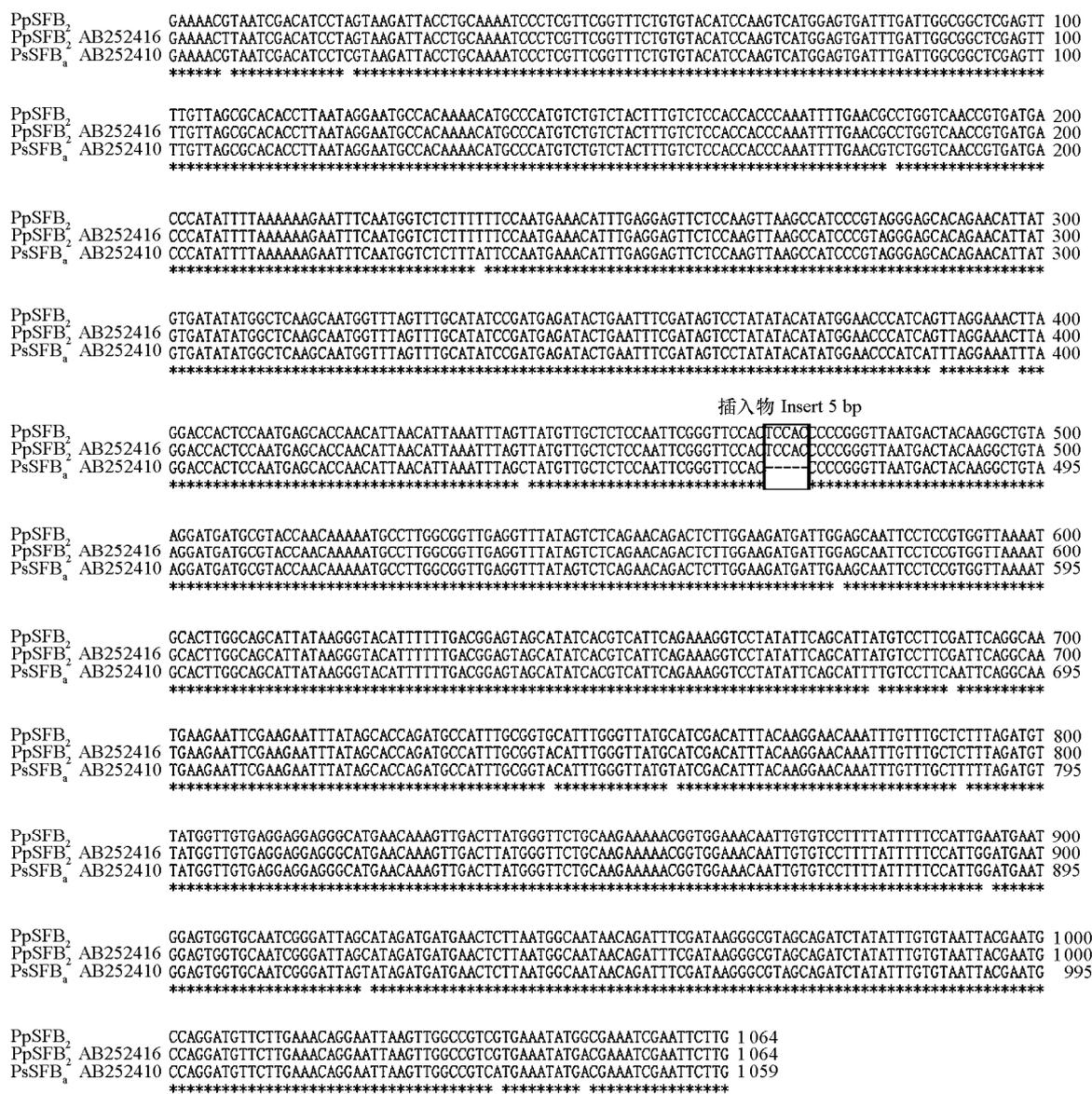


图 4 ‘中油 5 号’ *SFB*₂ 与桃 *SFB*₂、李 *SFB*_a 基因核苷酸序列的比对结果

Ps: 李; Pp: 桃; PpSFB₂: ‘中油 5 号’ *SFB*₂ 基因。

Fig. 4 Alignment of nucleotide sequences of *SFB* from ‘Zhongyou 5’ and other *Prunus* species

Ps: *P. salicina*; Pp: *P. Persica*; PpSFB₂: *SFB*₂ gene of ‘Zhongyou 5’.

2.3 ‘中油 5 号’ 自交后代中 *S* 基因的遗传特性

分别用引物对 PSF-C1/PSF-C5 和 PsSFB-F/PsSFB-R 对 ‘中油 5 号’ 和其 28 粒自交后代种子进行 PCR 扩增, 扩增结果显示后代群体具有 3 种不同的 *S* 基因型, 分别为 *S*₁*S*₁、*S*₁*S*_{2(m)}和 *S*_{2(m)}*S*_{2(m)} (图 6, 图 7), 且分离比为 8 : 13 : 7, 与预期的比例 1 : 2 : 1 没有显著的差异 ($\chi^2 = 0.214 < \chi^2_{0.05, 2} = 5.991$), 符合孟德尔遗传规律, 进一步说明桃 *S*₁ 单元型和 *S*_{2(m)} 单元型均表现出自交亲和性。此外, 扩增结果显示出花粉 *SFB*₁ 和 *SFB*₂ 基因始终分别与它们自身的花柱 *S-RNase* 基因共同分布在后代的任一个体中, 表明桃 *SFB*₁ 与 *S*₁-*RNase* 以及 *SFB*₂ 与 *S*_{2(m)}-*RNase* 都是连锁遗传至后代个体。

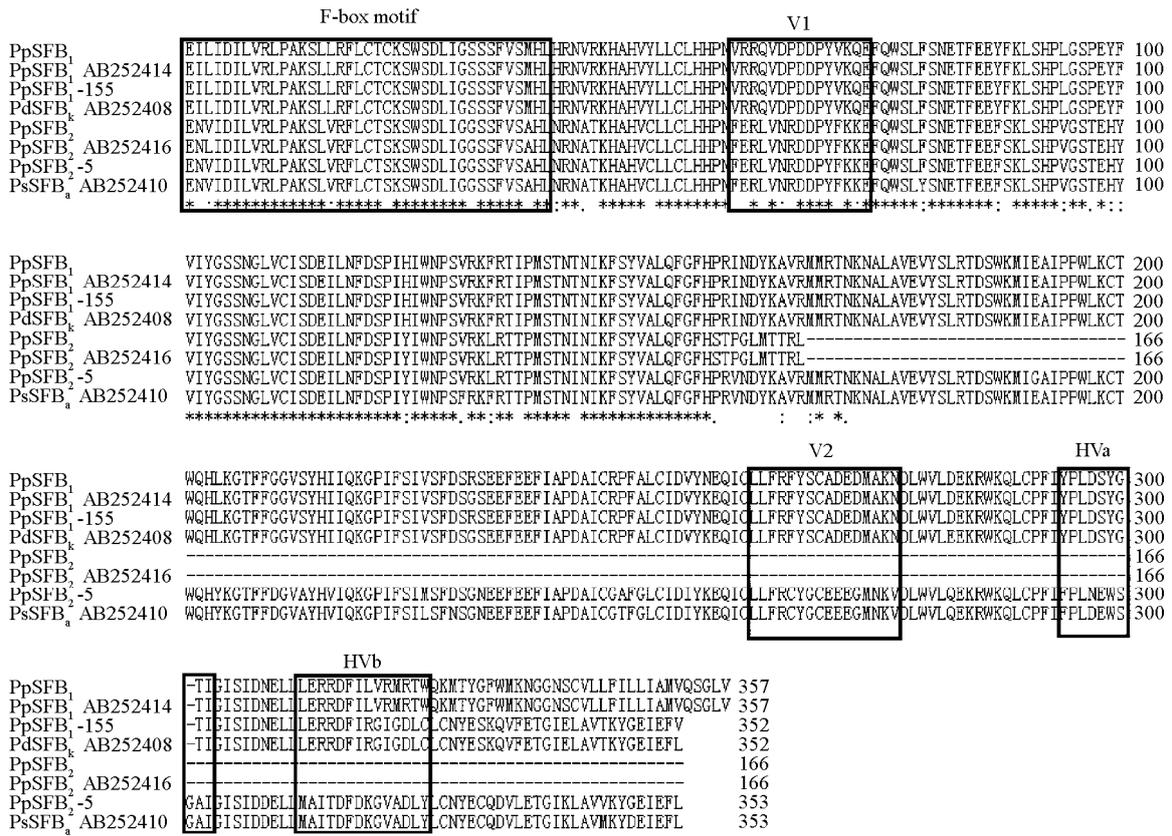


图 5 ‘中油 5 号’与李属其它物种 *SFB* 的氨基酸序列比对结果

黑框中为蔷薇科李属 *SFB* 基因结构的 F-box motif、两个变区 (V1、V2) 和两个高变区 (HVa、HVb)。

Pd: 扁桃; Ps: 李; Pp: 桃; PpSFB₁: ‘中油 5 号’ *SFB*₁ 基因; PpSFB₂: ‘中油 5 号’ *SFB*₂ 基因。

Fig. 5 Alignment of the deduced amino-acid sequences of *SFB* from peach and other *Prunus* species

F-box motif, two variable (V1 and V2), and two hypervariable (HVa and HVb) regions are boxed.

Pd: *P. dulcis*; Ps: *P. salicina*; Pp: *P. Persica*;

PpSFB₁: *SFB*₁ gene of ‘Zhongyou 5’; PpSFB₂: *SFB*₂ gene of ‘Zhongyou 5’.

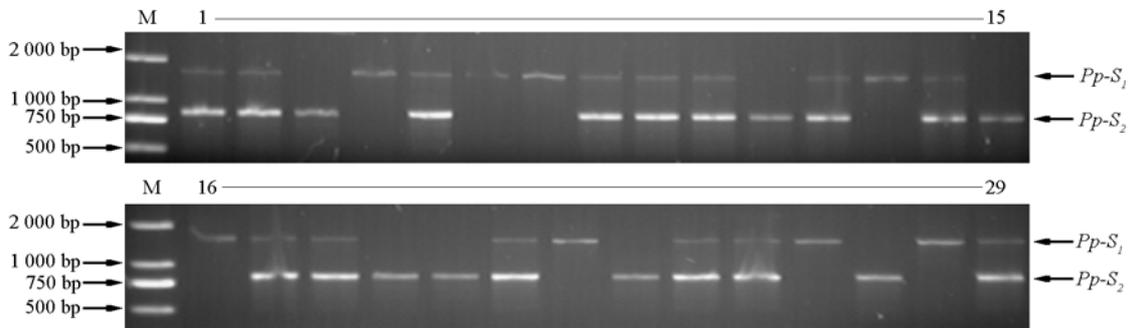


图 6 ‘中油 5 号’及其自交后代 *S-RNase* 基因等位特异 PCR 扩增产物的电泳图

M: Marker; 1: ‘中油 5 号’; 2~29: ‘中油 5 号’的自交后代。

Fig. 6 Electrophoresis pattern of PCR amplification of genomic DNA with *S-RNase* gene allelic-specific primers on peach cultivars

M: Marker; 1: ‘Zhongyou 5’; 2 - 29: The selfprogeny of ‘Zhongyou 5’.

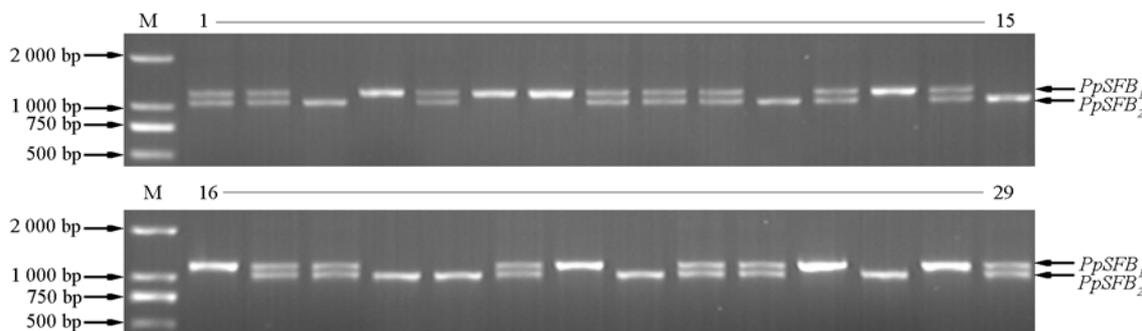


图 7 ‘中油 5 号’及其自交后代 *SFB* 基因等位特异 PCR 扩增产物的电泳图

M: Marker; 1: ‘中油 5 号’; 2~29: ‘中油 5 号’的自交后代。

Fig. 7 Electrophoresis pattern of PCR amplification of genomic DNA with *SFB* gene allelic-specific primers on peach cultivars

M: Marker; 1: ‘Zhongyou 5’; 2 - 29: The selfprogeny of ‘Zhongyou 5’.

3 讨论

本研究中利用等位基因 PCR 技术从桃品种‘中油 5 号’及其自交后代个体中分别克隆出了 S_1 -*RNase*、 $S_{2(m)}$ -*RNase*、*SFB*₁ 和 *SFB*₂ 基因片段，发现 *SFB*₁ 与 S_1 -*RNase* 以及 *SFB*₂ 与 $S_{2(m)}$ -*RNase* 都能稳定的连锁遗传至后代个体中，且都符合双因素遗传的孟德尔规律，从而确定了该自交亲和品种的 *S* 基因型为 $S_1S_{2(m)}$ 。序列分析显示出桃的两个 *S-RNase* 基因具有典型的李属 *S-RNase* 基因结构特征，含有全部的 5 个保守区 (C1、C2、C3、RC4 和 C5) 和 1 个相对高变区 (RHV) 结构 (图 2)。同时，桃 *SFB*₁ 和 *SFB*₂ 基因也都具有典型的李属 *SFB* 基因结构特征。然而，155 bp 的碱基插入使得 *SFB*₁ 基因 C 端氨基酸序列翻译异常并提前终止翻译，而 5 bp 碱基的插入也同样致使 *SFB*₂ 基因翻译的提前终止 (Tao et al., 2007)。由于这两个 *SFB* 基因都只能形成短截蛋白，导致它们都不能被自身的花柱 *S-RNase* 所识别，从而致使含有这两个基因的桃品种均表现出自交亲和。同样的变异类型也存在于其它李属物种中，如含有 *SFB*_c 基因的杏品种 (Vilanova et al., 2006)、含有 *SFB*_{3'}、*SFB*_{4'} 或 *SFB*_{5'} 的甜樱桃品种 (Ushijima et al., 2004; Sonneveld et al., 2005; Marchese et al., 2007) 和含有 *SFB*_f 的扁桃品种 (Ushijima et al., 2004) 等都因 *SFB* 基因翻译的提前终止而表现出自交亲和性。

序列间比较发现，桃 S_1 -*RNase* 基因与扁桃 S_k -*RNase* 基因以及桃 $S_{2(m)}$ -*RNase* 基因与李 S_a -*RNase* 基因的氨基酸和核苷酸序列间的同源性极高，即使是位于相对高变区 (RHV) 中的内含子序列间的同源性也同样很高。RHV 是一个正向选择区域，该区域中核苷酸序列的插入、缺失以及碱基替换的频率很高 (Ishimizu et al., 1998)，是花柱 *S-RNase* 识别自身花粉 *SFB* 基因的关键位点之一 (Wünsh & Hormaza, 2004)。该区域序列间的高保守性充分说明李属植物 *S-RNase* 基因的进化在物种分化之前 (Ushijima et al., 1998; Igic & Kohn, 2001)。因核苷酸片段的插入，桃 *SFB*₁ 和 *SFB*₂ 基因 C 端序列均翻译异常，对这两个基因氨基酸和核苷酸序列进行比较，发现它们分别与扁桃 *SFB*_k 和李 *SFB*_a 存在极高的同源性。充分说明李属植物 *SFB* 基因的进化同样是在物种分化之前 (Ikeda et al., 2004)。

在此研究基础上，对‘中油 5 号’自交后代个体的 *S* 基因型进行了检测，发现后代群体中存在 3 种不同的 *S* 基因型，分别为 S_1S_1 、 $S_1S_{2(m)}$ 和 $S_{2(m)}S_{2(m)}$ (图 6, 图 7)，且分离比为 8:13:7，与预期的比例 1:2:1 差异不显著 ($\chi^2 = 0.214 < \chi^2_{0.05,2} = 5.991$)。基因型为 S_1S_1 和 $S_{2(m)}S_{2(m)}$ 的纯合体的存在，说明了桃 S_1 单元型和 S_2 单元型中的花柱 *S-RNase* 都不能够正常识别自身的花粉 *SFB* 基因。Deshaies (1999) 认为 F-box 蛋白的 C 端部分为一受体，能够合并目标蛋白成为 SCF 复合体，而李属 *SFB* 基因含有的两个高变区参与决定等位基因的特异性 (Ushijima et al., 2003; Ikeda et al., 2004)。因

此, C 端序列(包括 HVb)(图 5)结构异常的桃 *SFB*₁ 基因以及缺失 V2、HVa 和 HVb 结构的桃 *SFB*₂ 基因均丧失原有的基因特异性, 导致其不能被自身花柱 *S-RNase* 所识别, 最终使‘中油 5 号’以及含有这两个基因的桃品种都表现出自交亲和性。

References

- Beppu K, Yamane H, Yaegaki H, Yamaguchi M, Kataoka I, Tao R. 2002. Diversity of *S-RNase* genes and *S* haplotypes in Japanese plum (*Prunus salicina* Lindl.). *J Hort Sci Biotech*, 77: 658 - 664.
- Deshaies R J. 1999. SCF and Cullin/Ring H2-based ubiquitin ligases. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 15: 435 - 467.
- Entani T, Iwano M, Shiba H, Che FS, 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.
- 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.
- Halász J, Hegedüs A, Hermán R, Stefanovits-Bányai E, Pedryc A. 2005. New self-incompatibility alleles in apricot (*Prunus armeniaca* L.) revealed by stilar ribonuclease assay and S-PCR analysis. *Euphytica*, 145: 57 - 66.
- Halász J, Pedryc A, Hegedus A. 2007. Origin and dissemination of the pollen-part mutated SC haplotype which confers self-compatibility in apricot (*Prunus armeniaca* L.). *New Phytol*, 176: 792 - 803.
- Hegedüs A, Szabó Z, Nyéki J, Júlia Halás, Pedryc A. 2006. Molecular analysis of *S*-haplotypes in peach, a self-compatible *Prunus* species. *JASHS*. 131: 738 - 743.
- Heng W, Wu H Q, Chen Q X, Wu J, Zhang S J, Zhang S L. 2008. Identification of *S*-genotypes and novel *S-RNase* alleles in *Prunus mume*. *J Hort Sci Biotech*, 83: 689 - 694.
- Igic B, Kohn J R. 2001. Evolutionary relationships among self-incompatibility RNases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98: 13167 - 13171.
- Ikeda K, Igic B, Ushijima K, Yamane H, Hauck N R, Nakano 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.
- Ishimizu T, Endo T, Yamaguchi-Kabata Y, Nakamura K T, Sakiyama F, Norioka S. 1998. Identification of regions in which positive selection may operate in *S-RNase* of Rosaceae: Implication for *S*-allele-specific recognition sites in *S-RNase*. *FEBS Letters*, 440: 337 - 342.
- Jahnen W, Lush W M, Clarke A E. 1989. Inhibition of in vitro pollen tube growth by isolated *S*-glycoprotein of *Nicotiana glauca*. *Plant Cell Reprod*, 1: 501 - 510.
- Kao T H. 1994. Gametophytic self-incompatibility: A mechanism for self/ non-self discrimination during sexual reproduction. *Plant Physiology*, 105: 461 - 466.
- Ma R C, Oliveira M M. 2001. Molecular cloning of the self-incompatibility genes *S*₁ and *S*₃ from almond (*Prunus dulcis* cv. Ferragnès). *Sex Plant Reprod*, 14: 163 - 167.
- Marchese A, Boskovic R I, Caruso T, Raimondo A, Cutuli M, Tobutt K R. 2007. A new self-compatibility haplotype in the sweet cherry ‘Kronio’, *S*₅’, attributable to a pollen-part mutation in the *SFB* gene. *J Exp Bot*, 58: 4347 - 4356.
- McClure B A, Cruz-Garcia F, Beecher B S, Sulaman W. 2000. Factors effecting inter-and intra-specific pollen rejection in *Nicotiana*. *Ann Bot Suppl A*, 85: 113 - 123.
- Ortega E, Bo Kovi R I, Sargent D J, Tobutt K R. 2006. Analysis of *S-RNase* alleles of almond (*Prunus dulcis*): Characterization of new sequences, resolution of synonyms and evidence of intragenic recombination. *Mol Genet Genomics*, 276: 413 - 426.
- Romero C, Vilanova S, Burgos L, Martínez-Calvo J, Vicente M, Llacer G, Badenes M L. 2004. Analysis of the *S*-locus structure in *Prunus armeniaca* L. identification of *S*-haplotype specific *S-RNase* and *F-box* genes. *Plant Mol Biol*, 56: 145 - 157.
- Sapir G, Stern R A, Eisikowitch D, Goldway M. 2004. Cloning of four new Japanese plum *S*-alleles and determination of the compatibility between cultivars by PCR analysis. *J Hort Sci Biotech*, 79: 223 - 227.
- Sijacic P, Wang X, Skirpan A L, Wang Y, Dowd P E, McCubbin A G, Huang S, Kao T H. 2004. Identification of the pollen determinant of *S-RNase*-mediated self-incompatibility. *Nature*, 429: 302 - 325.

- Sonneveld T, Tobutt K R, Robbins T P. 2003. Allele-specific PCR detection of sweet cherry self-incompatibility (*S*) alleles S_1 to S_{16} using consensus and allele-specific primers. *Theor Appl Genet*, 107: 1059 - 1070.
- Sonneveld T, Tobutt K R, Vaughan S P, Robbins T P. 2005. Loss of pollen *S* function in two self-compatible selections of *Prunus avium* is associated with deletion/mutation of an *S* haplotype-specific *F-box* gene. *Plant Cell Reprod*, 17: 37 - 51.
- Šurbanovski N, Tobutt K R, Konstantinović M, Maksimović V, Sargent D J, Stevanović V, Bösković R I. 2007. Self-incompatibility of *Prunus tenella* and evidence that reproductively isolated species of *Prunus* have different *SFB* alleles coupled with an identical *S-RNase* allele. *Plant J*, 50: 723 - 734.
- Tao R, Watari A, Hanada T, Habu T, Yaegaki H, Yamaguchi M, Yamane H. 2007. Self-compatible peach (*Prunus persica*) has mutant versions of the *S* haplotypes found in self-incompatible *Prunus* species. *Plant Mol Biol*, 63: 109 - 123.
- Tao R, Yamane H, Sugiura A. 1999. Molecular typing of *S*-alleles through identification characterization and cDNA cloning for *S-RNases* in sweet cherry. *J Amer Soc Hort Sci*, 24: 224 - 233.
- 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 Reprod*, 15: 771 - 781.
- Ushijima K, Sassa H, Tao R, Yamane H, Dandekar A M, Gradziel T M, Hirano H. 1998. Cloning and characterization of cDNAs encoding *S-RNases* from almond (*Prunus dulcis*): Primary structural features and sequence diversity of the *S-RNases* in Rosaceae. *Mol Gen Genet*, 260: 261 - 268.
- Ushijima K, Yamane H, Watari A, Kakehi E, Ikeda K, Hauck N R, Iezzoni A F, Tao R. 2004. The *S* haplotype-specific *F-box* protein gene, *SFB*, is defective in self-compatible haplotypes of *Prunus avium* and *P. mume*. *Plant Journal*, 39: 573 - 586.
- Vaughan S P, Bo Kovi R I, Gisbert-Climent A, Russell K, Tobutt K R. 2008. Characterisation of novel *S*-alleles from cherry (*Prunus avium* L.). *Tree Genet Genomes*, 4: 531 - 541.
- Vaughan S P, Russell K, Sargent D J, Tobutt K R. 2006. Isolation of *S*-locus *F-box* alleles in *Prunus avium* and their application in a novel method to determine self-incompatibility genotype. *Theor Appl Genet*, 112: 856 - 866.
- Vilanova S, Badenes M L, Burgos L, Martinez-Calvo J, Llacer G, Romero C. 2006. Self-compatibility of two apricot selections is associated with two pollen-part mutations of different nature. *Plant Physiol*, 142: 629 - 641.
- Wu J, Gu C, Zhang S L, Zhang S J, Wu H Q, Heng W. 2009. Identification of *S*-haplotype-specific *S-RNase* and *SFB* alleles in native Chinese apricot (*Prunus armeniaca* L.). *J Hort Sci Biotech*, 84: 645 - 652.
- Wu Jun, Gu Chao, Zhang Shao-ling, Zhang Shu-jun, Song Hong-feng, Zhao Xi-ping. 2010. Identification and sequence analysis of pollen-sepecific *SFB* genes in self-incompatible Chinese apricot (*Prunus armeniaca*). *Acta Horticulturae Sinica*, 37 (8): 1329 - 1338. (in Chinese)
- 吴俊, 谷超, 张绍铃, 张树军, 宋宏峰, 赵习平. 2010. 中国杏自交不亲和和花粉特异*SFB*基因的鉴定与序列分析. *园艺学报*, 37 (8): 1329 - 1338.
- Wünsch A, Hormaza J I. 2004. Cloning and characterization of genomic DNA sequences of four self-incompatibility alleles in sweet cherry (*Prunus avium* Lindl.). *Theor Appl Genet*, 108: 299 - 305.
- Yaegaki H, Shimada T, Moriguchi T, Hayama H, Haji T, Yamaguchi M. 2001. Molecular characterization of *S-RNase* genes and *S*-haplotypes in the Japanese apricot (*Prunus mume* Sieb. et Zucc.). *Sex Plant Reprod*, 13: 251 - 257.
- Yamane H, Ikeda 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.
- Zhang S L, Huang S X, Kitashiba H, Nishio T. 2007. Identification of *S*-haplotype-specific *F-box* gene in Japanese plum (*Prunus salicina* Lindl.). *Sex Plant Reprod*, 27: 1075 - 1085.
- Zhang S J, Huang S X, Heng W, Wu H Q, Wu J, Zhang S L. 2008. Identification of *S*-genotypes in 17 Chinese cultivars of Japanese plum (*Prunus salicina* Lindl.) and molecular characterisation of 13 novel *S*-alleles. *J Hort Sci Biotech*, 83: 635 - 640.
- Zhang Yu-yan, Wu Jun, Heng Wei, Zhang Shao-ling. 2006. Identification of *S*-genotypes of pear cultivars and analyses of nucleotide sequences of S_{28} -RNase and S_{30} -RNase. *Acta Horticulturae Sinica*, 33 (3): 496 - 500. (in Chinese)
- 张好艳, 吴俊, 衡伟, 张绍铃. 2006. 京白梨等品种 *S* 基因型鉴定及新基因 S_{28} 和 S_{30} 的核苷酸序列分析. *园艺学报*, 33 (3): 496 - 500.