

利用基因芯片鉴定梨品种自交不亲和基因型

江南^{1,2,*}, 谭晓风², 张琳², 邓靖¹

(¹湖南工业大学包装与材料工程学院, 湖南株洲 412007; ²中南林业科技大学经济林培育与保护教育部重点实验室, 经济林育种与栽培国家林业局重点实验室, 长沙 410004)

摘要: 根据东方梨中已鉴定的 46 个 *S* 基因序列和 *S* 基因的结构特点, 设计了 86 条寡核苷酸探针并制备成 *S* 基因寡核苷酸检测芯片, 采用 Cy3 荧光修饰引物标记被检测品种的 PCR 产物并与芯片杂交, 以检测不同品种的 *S* 基因型。结果表明: 利用芯片与华梨 2 号、秀玉和德胜香等已知 *S* 基因型的品种杂交, 杂交信号显示与各品种已知基因型相符合。利用芯片鉴定了丽江黄酸梨等 27 个未知 *S* 基因型的梨品种, 获得了各品种的 *S* 基因型, 随机选取部分品种进行 DNA 测序和序列分析, 结果与芯片杂交结果完全一致, 证明利用 *S* 基因寡核苷酸芯片鉴定梨品种 *S* 基因型结果准确可靠。

关键词: 梨; 自交不亲和; *S* 基因型; 寡核苷酸; 芯片

中图分类号: S 661.2

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2014) 10-1983-10

Identifying Pear Cultivars *S*-genotypes Using Gene Chips

JIANG Nan^{1,2,*}, TAN Xiao-feng², ZHANG Lin², and DENG Jing¹

(¹*School of Packing and Material Engineering, Hunan University of Technology, Zhuzhou, Hunan 412007, China;* ²*Key Laboratory of Cultivation and Protection for Non-wood Forest of Ministry of Education, the Key Laboratory of Non-wood Forest Product of Forestry Ministry, Central-south University of Forestry and Technology, Changsha 410004, China*)

Abstract: Based on the structure characteristic of self-incompatibility gene and the gene group sequences of 46 *S* genes in Oriental pear cultivars, 86 probes for *S*-RNase detections were designed and oligonucleotide genechip was established. In order to detect the *S*-genotype of pear cultivars, the PCR products of *S*-RNase were amplified by Cy3-labeled primers and hybridized with the microarray. The cultivars with known *S*-genotype such as Huali 2 were hybridized with the genechip and 27 cultivars with unknown *S*-genotype were *S*-genotyped using the genechip. The DNA sequenced results of Huali 2, Xiuyu and Deshengxiang pears and randomly selected unknown *S*-genotype cultivars were consistent with the microarray analyses. In conclusion, the oligonucleotide genechip provided an accurate and reliable method for detecting *S*-genotype of pear cultivars.

Key words: pear; self-incompatibility; *S*-genotype; oligonucleotide; genechip

近 20 年, 在梨 *S* 自交不亲和基因的研究中, 利用 PCR-RFLP 技术、*S* 基因 DNA 序列分析、cDNA 克隆、杂交授粉试验、花粉管生长检测及蛋白质电泳分析等方法已分离鉴定了 53 个梨 *S* 等位基因 (GenBank 已登录), 鉴定了部分梨品种的 *S* 基因型。日本学者建立了鉴别梨 *S* 基因的 PCR-RFLP

收稿日期: 2014-06-26; 修回日期: 2014-08-11

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (31272124); 湖南省自然科学基金项目 (12JJ6017)

* E-mail: namijiangnan@126.com

方法 (Ishimizu et al., 1999; Takasaki et al., 2004), 并从日本梨中获得了 $S_1 \sim S_9$ 等位基因的 cDNA 序列和基因组序列 (Ishimizu et al., 1996; Castillo et al., 2002; Takasaki et al., 2004)。韩国学者利用 PCR-RFLP 方法和 DNA 测序从韩国砂梨中发现了 S_{10} (Kim et al., 2006)。中国学者从 2003 年开始采用 PCR-RFLP、DNA 测序、杂交检测等方法开展了中国梨自交不亲和性的研究, 发现了包括 $S_1 \sim S_{10}$ 基因在内的 42 个 S 基因, 并确定了 200 多个品种的 S 基因型; 同时采用 3'RACE 技术从中国梨中克隆了 S_{12} 、 S_{13} 、 S_{15} 、 $S_{17} \sim S_{22}$ 、 $S_{25} \sim S_{30}$ 、 S_{32} 、 S_{34} 、 S_{35} 、 $S_{38} \sim S_{40}$ 、 S_{42} 、 S_{46} 等 S 基因全长 cDNA 序列 (谭晓风 等, 2005a, 2005b, 2005c; 乌云塔娜 等, 2005, 2006; Zhang et al., 2007, 2009, 2014; 衡伟 等, 2008; 邓建军 等, 2010; 王立新 等, 2010)。GenBank 中 S 基因相关数据分析显示 $S_{47} \sim S_{53}$ 仅发现于西洋梨中。目前确定 S 基因型的方法以 PCR-RFLP 技术和 S 基因 DNA 序列分析法应用较为广泛, 这两种方法能较快速、准确地确定 S 等位基因数量比较少 (如日本梨, 10 个以下) 或品种资源数比较少的梨品种 S 基因型。然而中国梨品种资源丰富, 有近 2 000 多个梨品种, 其中超过三分之一为砂梨品种, 尤其在地方品种或野生型个体中蕴含着种类丰富的 S 基因资源, 现有的 PCR-RFLP、 S 基因 DNA 序列分析、人工控制授粉等技术方法难以在短时间内准确鉴定数目众多的梨品种的 S 基因型。基因芯片技术是一种较为成熟的具有快速准确和集成化特点的检测技术。作者前期研究 (江南和谭晓风, 2007, 2012; Tan et al., 2007; 江南 等, 2008) 中已根据梨自交不亲和基因的结构特点设计了部分 S 基因的检测探针, 制成寡核苷酸芯片, 并对芯片分子杂交条件进行优化, 获得了较好的反应条件并用制备的芯片检测了已知 S 基因型的梨品种, 证明了其是一种切实可行的检测方法。本研究在此基础上进一步针对已分离鉴定的 S 基因设计特异寡核苷酸探针, 利用 S 基因寡核苷酸芯片快速准确检测中国不同生态型种质资源梨品种的 S 基因型, 挖掘新的 S 基因资源, 为梨授粉品种优化配置及杂交育种亲本的选择提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料和主要试剂

27 个未知 S 基因型的梨供试品种和 3 个已知 S 基因型的品种华梨 2 号 (S_3S_4)、秀玉 (S_4S_5)、德胜香 (S_3S_{29}) (检测芯片质量) 的新鲜嫩梢 (带嫩叶 5 ~ 6 片) 于 2013 年 4 月采自湖北省农业科学院果树茶叶研究所国家果树种质武汉砂梨圃, 冰盒保鲜, 带回实验室后 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

芯片制备及杂交试剂参考文献 (江南 等, 2008), ExTaq DNA 聚合酶购自 TaKaRa 公司, Trans1-T1, pEASY-T1 购自 TransGen Biotech 公司, DNA 提取试剂盒及 PCR 产物纯化试剂盒均购自 BIOER 公司, 各种内切酶购自 TaKaRa 公司, 其他试剂为进口或国产分析纯。

引物和探针均由北京六合华大基因科技股份有限公司合成, DNA 测序由上海铂尚生物技术有限公司完成。

1.2 梨品种基因组 DNA 的提取及 S -RNase 特异片段 PCR 扩增

用 DNA 提取试剂盒从梨嫩叶中提取梨品种基因组 DNA, Beckman DU-640 核酸蛋白分析仪测定 DNA 浓度, 取 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 值在 1.6 ~ 2.0 之间的 DNA 于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 储存备用。S-RNase 特异片段扩增采用的正向引物 PF: 5'-TTTACGCAGCAATATCAG-3' (Ishimizu et al., 1999) 和反向引物 PR: 5'-ACRTTYGGCCAAATARTT-3' (张琳, 2008), 引物合成时均要求在 5'端进行荧光物质 Cy3 修饰, 根据 Zhang 等 (2009) 的反应体系及程序进行 PCR 扩增。取 5 μL PCR 产物 1.5% 的琼脂糖电泳检测, 对含有 S-RNase 基因目的片段的理想 PCR 产物用 PCR 产物纯化试剂盒进行回收纯化, 并对回收片段进行二次扩增, 用 1.5% 的琼脂糖电泳检测条带的有无。

1.3 S 基因寡核苷酸探针设计及合成

S-RNase 的高变区 (Hyper variable region, HV 区) 是 S-RNase 具有长度和序列多态性的部位, 不同的 S 等位基因之间差异较大, 根据 GenBank S 基因和相关文献, 获得已知存在于东方梨品种中的 $S_1 \sim S_{46}$ 的 HV 区特异系列, 其中 S_{14} 、 S_{23} 、 S_{24} 、 S_{33} 序列不确定, 暂不用于芯片。参考江南和谭晓风 (2012) 的方法在 S-RNase 的 HV 区设计各 S-RNase 长度为 32 bp 的寡核苷酸探针共 86 条, 其中包含各 S-RNase MM 探针 (错配 1 ~ 2 个碱基的探针) 各 1 条, 阳性和阴性对照探针各 1 条, 探针由北京六合华大基因公司合成, 各探针合成时均进行 5'氨基修饰。

1.4 S 基因寡核苷酸芯片制备及杂交

用 pH 9.0 碳酸盐缓冲液溶解合成的寡核苷酸探针并稀释成终浓度为 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 用点样仪 (DNA-Plotter) 按阵列设计点样, 依照文献 (江南 等, 2008) 的步骤制备并处理 S 基因寡核苷酸芯片。芯片阵列设计如图 1, 其中 S_n 为某 S 基因的寡核苷酸探针 (如 S_1), S_{n-1} 为 S_n 的 MM 探针, 同等浓度无关探针 (选自与 S 基因同源性很低的人类高血压相关基因 HRG 的一段 32 bp 的序列) 作为阴性对照, 5'氨基修饰的 PF1 序列作为阳性对照, pH 9.0 碳酸盐缓冲液作为空白对照。

S_1	S_1	S_2	S_2	S_3	S_3	S_4	S_4	S_5	S_5	S_6	S_6	S_7	S_7
S_1	S_1	S_2	S_2	S_3	S_3	S_4	S_4	S_5	S_5	S_6	S_6	S_7	S_7
S_{1-1}	S_{1-1}	S_{2-1}	S_{2-1}	S_{3-1}	S_{3-1}	S_{4-1}	S_{4-1}	S_{5-1}	S_{5-1}	S_{6-1}	S_{6-1}	S_{7-1}	S_{7-1}
S_8	S_8	S_9	S_9	S_{10}	S_{10}	S_{11}	S_{11}	S_{12}	S_{12}	S_{13}	S_{13}	S_{15}	S_{15}
S_8	S_8	S_9	S_9	S_{10}	S_{10}	S_{11}	S_{11}	S_{12}	S_{12}	S_{13}	S_{13}	S_{15}	S_{15}
S_{8-1}	S_{8-1}	S_{9-1}	S_{9-1}	S_{10-1}	S_{10-1}	S_{11-1}	S_{11-1}	S_{12-1}	S_{12-1}	S_{13-1}	S_{13-1}	S_{15-1}	S_{15-1}
S_{16}	S_{16}	S_{17}	S_{17}	S_{18}	S_{18}	S_{19}	S_{19}	S_{20}	S_{20}	S_{21}	S_{21}	S_{22}	S_{22}
S_{16}	S_{16}	S_{17}	S_{17}	S_{18}	S_{18}	S_{19}	S_{19}	S_{20}	S_{20}	S_{21}	S_{21}	S_{22}	S_{22}
S_{16-1}	S_{16-1}	S_{17-1}	S_{17-1}	S_{18-1}	S_{18-1}	S_{19-1}	S_{19-1}	S_{20-1}	S_{20-1}	S_{21-1}	S_{21-1}	S_{22-1}	S_{22-1}
S_{25}	S_{25}	S_{26}	S_{26}	S_{27}	S_{27}	S_{28}	S_{28}	S_{29}	S_{29}	S_{30}	S_{30}	S_{31}	S_{31}
S_{25}	S_{25}	S_{26}	S_{26}	S_{27}	S_{27}	S_{28}	S_{28}	S_{29}	S_{29}	S_{30}	S_{30}	S_{31}	S_{31}
S_{25-1}	S_{25-1}	S_{26-1}	S_{26-1}	S_{27-1}	S_{27-1}	S_{28-1}	S_{28-1}	S_{29-1}	S_{29-1}	S_{30-1}	S_{30-1}	S_{31-1}	S_{31-1}
S_{32}	S_{32}	S_{34}	S_{34}	S_{35}	S_{35}	S_{36}	S_{36}	S_{37}	S_{37}	S_{38}	S_{38}	S_{39}	S_{39}
S_{32}	S_{32}	S_{34}	S_{34}	S_{35}	S_{35}	S_{36}	S_{36}	S_{37}	S_{37}	S_{38}	S_{38}	S_{39}	S_{39}
S_{32-1}	S_{32-1}	S_{34-1}	S_{34-1}	S_{35-1}	S_{35-1}	S_{36-1}	S_{36-1}	S_{37-1}	S_{37-1}	S_{38-1}	S_{38-1}	S_{39-1}	S_{39-1}
S_{40}	S_{40}	S_{41}	S_{41}	S_{42}	S_{42}	S_{43}	S_{43}	S_{44}	S_{44}	S_{45}	S_{45}	S_{46}	S_{46}
S_{40}	S_{40}	S_{41}	S_{41}	S_{42}	S_{42}	S_{43}	S_{43}	S_{44}	S_{44}	S_{45}	S_{45}	S_{46}	S_{46}
S_{40-1}	S_{40-1}	S_{41-1}	S_{41-1}	S_{42-1}	S_{42-1}	S_{43-1}	S_{43-1}	S_{44-1}	S_{44-1}	S_{45-1}	S_{45-1}	S_{46-1}	S_{46-1}
5'PF1	5'PF1	5'PF1	HRG	HRG	HRG	CK	CK	CK					
5'PF1	5'PF1	5'PF1	HRG	HRG	HRG	CK	CK	CK					

图 1 S 基因检测芯片阵列设计

Fig. 1 Design of microarray detecting probes of S-genotype

将梨品种第 2 次扩增纯化后的 Cy3 标记的 PCR 产物稀释成终浓度为 $100 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, 与杂交液和灭菌超纯水 (SPW) 等比例混合, 95°C 水浴变性 5 min 后迅速冰上冷却, 取 $20 \mu\text{L}$ 混合液加入芯片阵列, 于杂交箱中 47°C 避光杂交 4 h (江南 等, 2008) 后, AXON-4100A 芯片扫描仪进行信号检测, GenePix 分析软件分析扫描结果, 信号强度扣除背景值后以各探针重复点的平均值计算, 各品种芯片杂交重复 1 次。

1.5 S 基因 DNA 测序对 S 基因寡核苷酸检测芯片杂交结果验证

对各品种进行芯片检测同时随机抽取部分品种并对品种第 2 次扩增的 PCR 产物进行 TA 克隆, DNA 测序, 测序结果在 NCBI 中通过 Blast 与数据库中已知序列进行 DNA 序列和推导的氨基酸序

列比对,应用 Vector NTI, DNAMAN 等软件对测序结果进行多序列分析,进而确定梨品种所包含的 *S* 基因和 *S* 基因型。

1.6 未知 *S* 基因的鉴定

对芯片鉴定梨品种 *S* 基因型过程中发现的未知 *S* 基因,先对相应品种第 2 次扩增的 PCR 产物进行酶切,若酶切未能鉴定,再对相应品种第 2 次扩增的 PCR 产物进行 TA 克隆, DNA 测序,测序结果按 1.5 中步骤处理,最终确定各品种的 *S* 基因型。

2 结果与分析

2.1 梨品种 *S* 基因型鉴定

S 基因型的对照品种和供试的 27 个梨品种 (表 1) PCR 扩增均有较好的特异扩增条带 (图 2),

表 1 梨种质名称、类型和 PCR 片段长度
Table 1 Name, type and length of fragment of pear cultivars

序号 Code	种质名称 Cultivar name	种质类型 Cultivar type	亲本或来源 Pedigree or source	片段/bp Fragment
1	丽江黄酸梨 Lijiang Huangsuanli	地方品种 Local cultivar	云南丽江 Lijiang, Yunnan	345/529
2	兴山 19 号 (老式香水梨) Xingshan 19 (Laoshi Xiangshuili)	地方品种 Local cultivar	湖北兴山 Xingshan, Hubei	347/361
3	兴山 26 号 (月半梨 2) Xingshan 26 (Yuebanli 2)	地方品种 Local cultivar	湖北兴山 Xingshan, Hubei	367/349
4	本地黄梨 Bendi Huangli	地方品种 Local cultivar	四川汉源 Hanyuan, Sichuan	350/529
5	九襄慈梨 Jiuxiang Cili	地方品种 Local cultivar	四川汉源 Hanyuan, Sichuan	989/529
6	白面梨 Baimianli	地方品种 Local cultivar	陕西镇巴 Zhenba, Shaanxi	989/445
7	原味小香梨 Yuanwei Xiaoxiangli	地方品种 Local cultivar	四川汉源 Hanyuan, Sichuan	367/350
8	新一 Xinyi	国外引进 Imported	山东省果树所 Shandong Fruit Research Institute	376/368
9	梨园杨称梨 Liyuan Yangchengli	地方品种 Local cultivar	四川汉源 Hanyuan, Sichuan	350/345
10	金星 Jinxing	品系 Strain	河北 Hebei	341/340
11	兴山 20 号 (兴山糖梨子) Xingshan 20 (Xingshan Tanglizi)	地方品种 Local cultivar	湖北兴山 Xingshan, Hubei	362/437
12	鹤峰雪花梨 Hefeng Xuehuali	地方品种 Local cultivar	湖北鹤峰 Hefeng, Hubei	367/434
13	安农 1 号 Annong 1	选育品种 Breeding cultivar	湖北武汉 Wuhan, Hubei	347/341
14	玉绿 Yulu	品系 Strain	莱阳茌梨 (白梨) × 太白 (砂梨) Laiyang Chili (<i>P. bretschneideri</i>) × Taibai (<i>P. pyrifolia</i>)	341/336 or 336/341
15	丽江马占梨 (3) Lijiang Mazhanli (3)	地方品种 Local cultivar	云南丽江 Lijiang, Yunnan	367/529
16	汉源招包梨 Hanyuan Zhaobaoli	地方品种 Local cultivar	四川汉源、金川 Hanyuan and Jinchuan, Sichuan	367/345
17	梨园自来梨 2 Liyuan Zilaili 2	地方品种 Local cultivar	四川汉源 Hanyuan, Sichuan	350/989
CK1	华梨 2 号 (对照 1, S_3S_4) Huali 2 (Control 1, S_3S_4)	地方品种 Local cultivar	湖北武汉 Wuhan, Hubei	376/368
CK2	秀玉 (对照 2, S_4S_5) Xiuyu (Control 2, S_4S_5)	国外引进 Imported	日本 Japan	368/375
CK3	德胜香 (对照 3, S_3S_{29}) Deshengxiang (Control 3, S_3S_{29})	地方品种 Local cultivar	四川 Sichuan	376/347
18	新秀 Xinxu	国外引进 Imported	山东烟台 Yantai, Shandong	368/375
19	罗田秤砣梨 Luotian Chengtuoli	地方品种 Local cultivar	湖北罗田 Luotian, Hubei	376/375
20	罗田冬梨 Luotian Dongli	地方品种 Local cultivar	湖北罗田 Luotian, Hubei	434/966
21	梨园麻子梨 Liyuan Mazili	地方品种 Local cultivar	四川汉源 Hanyuan, Sichuan	367/362
22	大酸梨 Dasuanli	地方品种 Local cultivar	四川汉源 Hanyuan, Sichuan	350/347
23	弥渡玉梨 Midu Yuli	地方品种 Local cultivar	云南弥渡 Midu, Yunnan	536/445 or 445/536
24	早酥蜜 Zaosumi	品系 Strain	河北 Hebei	367/376
25	丽江黄皮梨 Lijiang Huangpili	地方品种 Local cultivar	云南丽江 Lijiang, Yunnan	336/529
26	大理胭脂梨 Dali Yanzhili	地方品种 Local cultivar	云南大理 Dali, Yunnan	345/345
27	白大金梨 Baidajinli	地方品种 Local cultivar	四川汉源 Hanyuan, Sichuan	367/350

其中 1 号丽江黄酸梨、4 号本地黄梨、5 号九襄慈梨、6 号白面梨、13 号安农 1 号、15 号丽江马占梨 (3)、17 号梨园自来梨 2、20 号罗田冬梨、23 号弥渡玉梨、25 号丽江黄皮梨等 10 个品种有两个 PF~PR 特异片段条带, 其中 13 号安农 1 号两条带很靠近, 作为一条带回收。另外 17 个品种 PF~PR 片段呈现单带, 目的片段大小为 340~1 000 bp (表 1)。

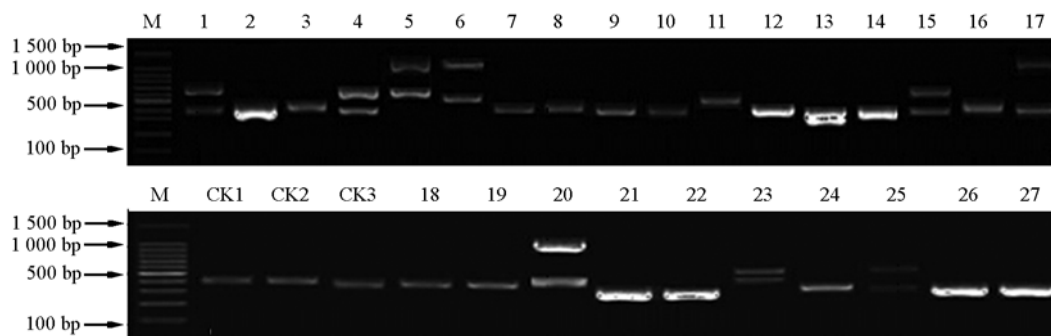


图 2 梨品种 S 基因 PCR 产物于 1.5% 琼脂糖凝胶电泳图

1~27 及 CK1~CK3 分别对应表 1 中的 30 个品种。

Fig. 2 PCR products of S gene on pear cultivars in 1.5% agarose gel electrophoresis

The accession codes 1~27 and CK1~CK3 are the same as those shown in Table 1.

用已知 S 基因型的对照品种华梨 2 号、秀玉、德胜香纯化后的 Cy3 标记的 PCR 产物分别与芯片阵列避光杂交, 一个品种对应一个阵列, 杂交结果如图 3, 根据阵列中各探针的位置和杂交信号, 可判断华梨 2 号、秀玉和德胜香所含有的 S-RNase 基因和 S 基因型分别是华梨 2 号 S_3S_4 、秀玉 S_4S_5 、德胜香 S_3S_{29} , 与各品种已知的 S 基因型相符, 重复杂交试验, 结果一致, 可用芯片进一步检测未知 S 基因型的梨品种。

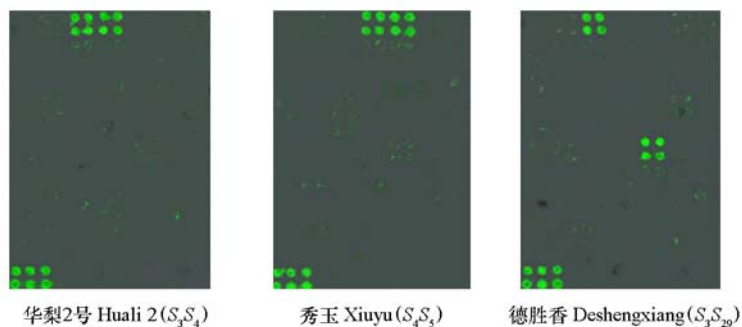


图 3 已知 S 基因型梨品种与芯片杂交信号扫描结果

Fig. 3 The scanning results of known S-genotypes pear cultivars hybridized with the microarray

将丽江黄酸梨等 27 个未知 S 基因型的梨品种第二次扩增纯化后的 Cy3 标记的 PCR 产物分别与芯片阵列避光杂交, 一个品种对应一个阵列, 重复杂交 1 次, 杂交结果如图 4。根据芯片杂交信号扫描结果, 可以判断其中 26 个品种所包含的 S-RNase 基因有: S_1 、 S_3 、 S_4 、 S_5 、 S_7 、 S_8 、 S_{12} 、 S_{13} 、 S_{15} 、 S_{17} 、 S_{19} 、 S_{21} 、 S_{22} 、 S_{29} 、 S_{42} , 兴山 19 号、兴山 26 号、罗田冬梨、梨园麻子梨和大理胭脂梨阵列中均只有一个 S-RNase 基因探针的杂交信号, 分别为: S_{29} 、 S_1 、 S_8 、 S_1 和 S_{22} , 兴山 20 阵列中无探针杂交信号, 假设这 6 个品种含有另一个 S-RNase 基因为 S_X 。从杂交结果可鉴定 21 个品种的 S 基因型如表 2。

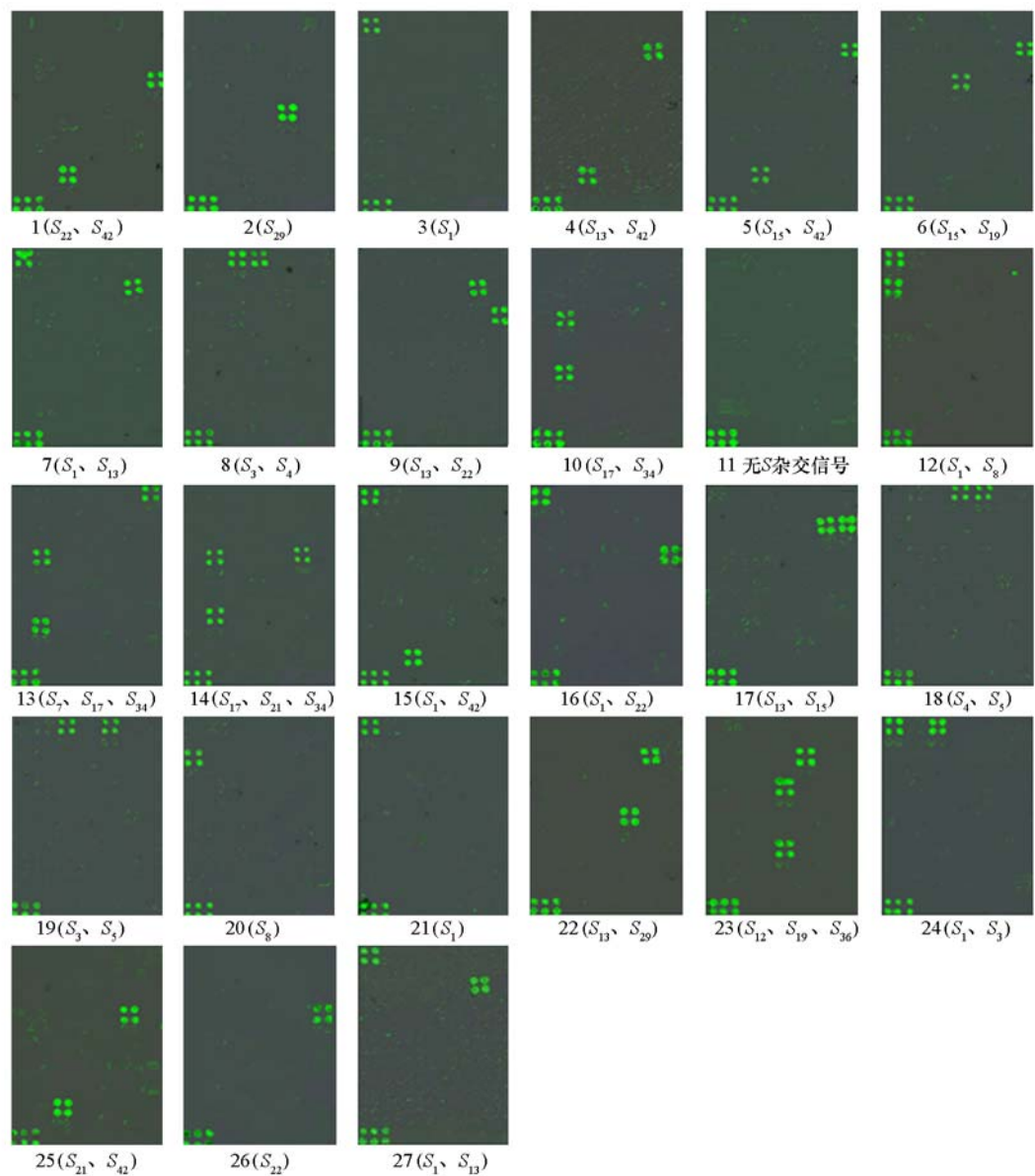


图 4 未知 S 基因型梨品种与芯片杂交信号扫描结果
1~27 分别对应表 1 中的 27 个品种。

Fig. 4 The scanning results of unknown S-genotypes pear cultivars hybridized with the microarray
The accession codes 1 to 27 are the same as those shown in Table 1.

表 2 梨种质的 S 基因型
Table 2 S-genotypes of pear cultivars

序号 Code	S 基因型 S-genotype	序号 Code	S 基因型 S-genotype	序号 Code	S 基因型 S-genotype
1	$S_{22}S_{42}$	11	S_xS_x	21	S_1S_x
2	$S_{29}S_x$	12	S_1S_8	22	$S_{13}S_{29}$
3	S_1S_x	13	S_7S_{17}/S_7S_{34}	23	$S_{12}S_{19}/S_{19}S_{36}$
4	$S_{13}S_{42}$	14	$S_{17}S_{21}/S_{21}S_{34}$	24	S_1S_3
5	$S_{15}S_{42}$	15	S_1S_{42}	25	$S_{21}S_{42}$
6	$S_{15}S_{19}$	16	S_1S_{22}	26	$S_{22}S_x$
7	S_1S_{13}	17	$S_{13}S_{15}$	27	S_1S_{13}
8	S_3S_4	18	S_4S_5	CK1	S_3S_4
9	$S_{13}S_{22}$	19	S_3S_5	CK2	S_4S_5
10	$S_{17}S_x/S_{34}S_x$	20	S_8S_x	CK3	S_3S_{29}

2.2 DNA 测序验证芯片鉴定梨品种 *S* 基因型结果

基因检测芯片检测未知品种 *S* 基因型同时, 随机选取兴山 20 号、丽江黄酸梨、弥渡玉梨、汉源招包梨、早酥蜜、玉绿和安农 1 号等 7 个品种进行 DNA 测序, 对芯片鉴定品种 *S* 基因型结果进行验证。丽江黄酸梨、弥渡玉梨、安农 1 号等 PCR 特异扩增为双带, 兴山 20 号、汉源招包梨、早酥蜜和玉绿等 PCR 特异扩增为单带, 第二次扩增的 PCR 特异片段经 TA 克隆和测序, 得到相应 *S*-RNase 基因特异片段核苷酸序列。

序列分析及与 GenBank 中已知 *S*-RNase 基因比对结果表明: 丽江黄酸梨、弥渡玉梨的两条 PCR 特异扩增条带分别与梨属中的 S_{22} 和 S_{42} 、 S_{12} (S_{36}) 和 S_{19} 的相似性为 100%, 因此可确定丽江黄酸梨、弥渡玉梨 *S* 基因型分别为 $S_{22}S_{42}$ 、 $S_{12}S_{19}$ 或 $S_{36}S_{19}$; 兴山 20 号 PCR 特异扩增产物含有长度分别为 362 bp 和 437 bp 的序列, 序列分析 437 bp 片段 HV 区与西洋梨 $S_{51.01}$ 等位基因 (GenBank 登录号 KC473796.1) 内含子相差 8 个碱基, 氨基酸序列同源性 100%, 可确定 437 bp 序列为中国梨一新 *S* 基因序列, 按 GenBank 中中国梨 *S* 基因命名序号, 初步命名为 S_{47} , 362 bp 片段与 S_{27} 相似性最大 (92%), HV 区与西洋梨 *S*-RNase- $S_{34.01}$ (GenBank 登录号 KC473637.1) HV 区完全相同, 保守区 “IIWPNV” 序列有两个碱基差别, 可确定为一新 *S* 基因, 初步命名为 S_{48} , 由此可鉴定兴山 20 号 *S* 基因型为 $S_{47}S_{48}$ 。汉源招包梨、早酥蜜、玉绿和安农 1 号等 *S*-RNase 基因 PCR 特异扩增序列分别与中国梨的 S_1 和 S_{22} 、 S_1 和 S_3 、 S_{17} 和 S_{21} 、 S_7 和 S_{17} 完全相似 (100%)。随机对部分供试品种 *S*-RNase 基因进行 DNA 克隆、测序, 检测结果与芯片杂交结果完全一致。

2.3 未知 *S* 基因鉴定结果

从图 4 芯片杂交信号分析可知, 兴山 19 号、兴山 26 号、罗田冬梨、梨园麻子梨和大理胭脂梨的 *S* 基因型分别为: $S_{29}S_x$ 、 S_1S_x 、 S_8S_x 、 S_1S_x 和 $S_{22}S_x$, 其中除罗田冬梨 PF ~ PR 片段为双带 (1 000 bp 左右/434 bp), 其他均为单带。直接回收罗田冬梨第二次扩增的 1 000 bp 左右 PF ~ PR 特异片段, TA 克隆、测序后获得 966 bp 的特异片段核苷酸序列, 经序列分析和同源性比对发现 966 bp 序列与 S_{37} 的相似性最大 (98%), 确定为中国梨一新的 *S* 基因, 初步命名为 S_{49} 。

用内切酶 *Bfm* I (*Sfc* I)、*Pau* I (*Bss*H II)、*Acc* II 分别对品种兴山 26 号和梨园麻子梨、大理胭脂梨、兴山 19 号第 2 次扩增特异片段回收产物进行酶切, 结果如图 5。各品种酶切产物电泳条带表明大理胭脂梨特异片段回收产物全部被 *Bss*H II 酶切成两个目的片段, 说明大理胭脂梨只含有 S_{22} , 为 $S_{22}S_{22}$ 纯合体, 兴山 26 号、梨园麻子梨和兴山 19 号还均含有 1 条未知的 *S* 基因。

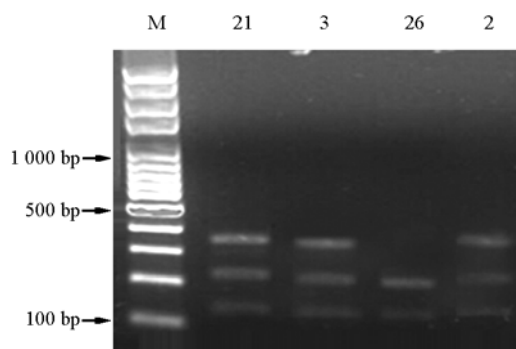


图 5 梨品种 *S* 基因酶切产物

M: Marker; 21: 梨园麻子梨; 3: 兴山 26 号; 26: 大理胭脂梨; 2: 兴山 19 号。

Fig. 5 Digestion products of *S* gene on pear cultivars

M: Marker; 21: Liyuan Mazili; 3: Xingshan 26; 26: Dali Yanzhili; 2: Xingshan 19.

将兴山 26 号、梨园麻子梨和兴山 19 号第 2 次扩增特异片段回收产物 TA 克隆、测序。序列分析及 GenBank 同源性比对,发现 3 个品种 *S* 基因 PF~PR 特异扩增产物中均含有两条长度不同的特异扩增片段,兴山 26 号含长度为 349 bp 和 367 bp 的两个片段,梨园麻子梨的为 362 bp 和 367 bp,兴山 19 号的为 347 bp 和 361 bp。序列分析表明兴山 26 号与梨园麻子梨的 367 bp 片段序列一致,均与砂梨 *S*₁ 的相似性为 100%,349 bp 序列 HV 区与中国梨 *S*₃₂ 同源性最大,为 97%,有 9 个碱基差别,362 bp 序列与苹果属 *S*₂₆ 相似性 96%,与新疆梨 *S*₃₅ 相似性 95%,可确定兴山 26 号 349 bp 序列及梨园麻子梨 362 bp 序列分别为一新的 *S* 基因序列,初步命名为 *S*₅₀ 和 *S*₅₁;兴山 19 号的 347 bp 序列与白梨的 *S*₂₉ 相似性为 100%,361 bp 序列 HV 区与 *Pyrus pyrastrer* (西洋梨) *S*_{34.04} 等位基因 (KC473640.1) 相似性最大 (95%),HV 区有 7 个 aa 不同,与枇杷 (*Eriobotrya japonica*) *S*₉ 相似性最大 (95%),HV 区有 12 个 aa 不同,与梨园麻子梨 (362 bp) HV 区有 17 个 aa 不同,可确定兴山 19 号中的 361 bp 序列为一个新的 *S* 基因序列,初步命名为 *S*₅₂。

3 讨论

本研究制备了 *S*-RNase 基因检测芯片,芯片阵列由 GenBank 中登录和文献报道的已知序列完善的东方梨中 42 个 *S*-RNase 基因的特异探针和 MM 探针组成。中国是东方梨系统的主要起源地,用此芯片阵列可直接快速地鉴定梨品种的 *S* 基因,发掘新的 *S*-RNase 基因资源。用已知 *S* 基因型品种与芯片杂交,各阵列杂交检测信号显示与对应品种 *S* 基因型相符,品种与 *S*-RNase 探针杂交信号与阳性对照杂交信号接近,MM 探针杂交信号较弱,表明探针特异性好,前期研究探索的杂交条件适合本研究中芯片杂交;同时芯片信号扫描结果还显示芯片背景清晰,阵列中探针样点均匀,阵列点样效果好,制备的芯片可用于梨 *S*-RNase 基因的检测。

不管是东方梨还是西洋梨的 *S* 基因有着相同的保守区域 (Conserved region) 和高变区域 (Hypervariable region, HV),包括 *S* 基因氨基酸序列的基本结构也是一致的 (衡伟 等, 2008)。HV 区是识别花粉的功能部位 (Royo et al., 1994),在 HV 区中有几个甚至一个氨基酸被取代,就有可能改变自交不亲和反应的方向。一个氨基酸的差异就可能产生新 *S* 基因型的产生,所以 HV 区是 *S* 基因富有多态性的识别部位,在 *S* 基因的 HV 区设计组成芯片阵列的探针,能确保探针的特异性。为确保检测过程中对芯片杂交信号的准确判断,用 MM 探针识别杂交假阳性信号,5'氨基酸修饰的 PF1 序列作为阳性对照,以检验 Cy3 对各品种 PCR 扩增 *S* 基因特异片段标记的标记效率。各品种 PCR 扩增特异片段都包含有梨 *S*-RNase 基因的典型特征,即保守区 1、保守区 2 和高变区,以及没有被鉴定为保守区但却非常保守的一段 “II WPNV” 氨基酸序列,PF1 序列位于保守区 1 中,所以各品种纯化后适宜浓度 (100 ng · μL⁻¹) PCR 产物与阳性对照杂交的信号强度应接近一致。以人类高血压基因 HRG-1 (hypertension related gene 1) 的一段编码序列 (32 bp) 作为阴性对照,不含 DNA 序列的碳酸后缓冲液作为空白对照,HRG 序列与梨 *S* 基因 PCR 特异片段几乎没有同源性,可以用来估计非特异性杂交的程度,阵列中其它任何杂交点的信号强度如果不显著高于阴性对照和空白对照,则可视作该杂交点没有结合荧光 PCR 特异片段。以上对照可以在芯片检测过程中很好地监控芯片杂交质量,以消除芯片检测过程中的试验偏差。

利用制备的 *S*-RNase 基因检测芯片鉴定了 27 个梨地方品种或育成品种的 *S* 基因型,其中兴山 19 号、兴山 26 号、罗田冬梨、梨园麻子梨、大理胭脂梨阵列中均只有一个 *S*-RNase 基因探针的杂交信号,兴山 20 号无杂交信号,其他 21 个砂梨品种或野生个体均包含两个不同的 *S* 基因。罗田冬梨 PF/PR 扩增均有两条明显的 *S* 基因特异条带,长度为 966 bp/434 bp 左右,可断定未知的 *S* 基因是新的 *S* 基因或为没集中于芯片阵列中的西洋梨 *S* 等位基因。兴山 19 号、兴山 20 号、兴山 26 号、大

理胭脂梨、梨园麻子梨 PF/PR 扩增均为单带, 这些品种的 S 基因型存在以下情况, 其一为纯合体, 含有两个相同的 S 基因; 其二包含尚未发现的新的 S 基因; 其三含有的另一个 S 基因为西洋梨中的 S 等位基因。对品种中芯片杂交未能鉴定的 S 基因, 辅助以 PF/PR 扩增的特异片段进行酶切或测序的方法最终将各品种 S 基因型成功鉴定。

弥渡玉梨 PF/PR 扩增 S 基因特异条带为双带, 图 4 中 23 号杂交信号显示其包含 S_{12} 、 S_{36} 、 S_{19} 等 S 等位基因, 衡伟等 (2008) 序列分析表明 S_{12} 与 S_{36} 为同一基因, 弥渡玉梨杂交结果证明了此结论是准确的, 所以弥渡玉梨的 S 基因型是 $S_{12}S_{19}$ 或 $S_{19}S_{36}$, 安农 1 号、玉绿 PF/PR 扩增 S 基因特异条带为单带, 图 4 中 13 号 (安农 1 号) 和 14 号 (玉绿) 分别在 S_7 、 S_{17} 和 S_{34} , S_{17} 、 S_{21} 和 S_{34} 有较好的杂交信号, 张琳 (2008) 序列分析显示 S_{17} 和 S_{34} 为同一基因, 安农 1 号和玉绿的杂交信号与其分析结论一致, 安农 1 号和玉绿的 S 基因型分别为 S_7S_{17} 或 S_7S_{34} , $S_{17}S_{21}$ 或 $S_{21}S_{34}$, 同理, 图 4 中 10 号杂交信号显示金星含有 S_{17} 和 S_{34} , 据此可断定金星可能还含有另一个 S 等位基因 S_x 或为 S_{17} (S_{34}) 纯合体 (因本品种第 2 次扩增特异片段回收产物被污染, 暂未进一步鉴定)。

通过制备 S -RNase 基因检测芯片成功地鉴定了部分梨品种 S 基因型, 显示了利用芯片鉴定梨品种 S 基因和 S 基因型的快速、准确的检测优势。但从结果分析可以看出, 基因芯片只能检测出在梨品种中已发现的 S 基因, 不能鉴定出未发现的 S 基因型, 对未发现的 S 基因只能根据杂交信号推测其在梨品种中存在的可能性, 说明利用基因芯片鉴定梨品种 S 基因存在一定的局限性。对梨品种中存在的新的 S 基因, 还需辅以酶切, DNA 测序等技术方法进行鉴定, 如大理胭脂梨 ($S_{22}S_{22}$)、梨园麻子梨等 (S_1S_{51}) 等品种中新 S 基因的鉴定; 同时基因芯片是用 DNA 序列进行杂交的, 如果内含子的序列不同, 杂交信号也会不同, 针对此种情况, 接下来的研究可补充制作梨 S 基因的 cDNA 芯片, 和梨 S 基因寡核苷酸检测芯片对梨品种进行并行检测, 比较分析杂交结果, 可以保证利用基因芯片鉴定梨品种 S 基因型的准确性和可靠性。

后续研究中需对检测过程中不断发现的新的 S 基因设计探针, 加入到 S 基因寡核苷酸检测芯片阵列中, 同时制作 S 基因的 cDNA 芯片, 可使梨品种 S 基因芯片检测系统日趋完善, 更大效率地发挥芯片快速、准确的检测优势, 本研究可望建立一个较完善、高效、快速、准确的梨 S 基因型检测平台。

References

- Castillo C, Takasaki T, Saito T, Norioka S, Nakanishi T. 2002. Cloning of the S_8 -RNase (S_8 -allele) of Japanese pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai) . Plant Biotechnology, 19 (1): 1 - 6.
- Deng Jian-jun, Tan Xiao-feng, Bao Mei-rong, Wuyun Ta-na, Zhang Lin, Cao Yu-fen. 2010. S -genotypes of 11 Chinese pear cultivars. Journal of Central South University of Forestry & Technology, 30 (3): 63 - 66. (in Chinese)
- 邓建军, 谭晓风, 包梅荣, 乌云塔娜, 张琳, 曹玉芬. 2010. 11 个中国梨品种 S 基因型的鉴定. 中南林业科技大学学报, 30 (3): 63 - 66.
- Heng Wei, Zhang Shao-ling, Fang Cheng-quan, Wu Hua-qing, Wu Jun. 2008. Identification of 20 S -genotypes and cloning novel S -RNases in *Pyrus*. Acta Horticulturae Sinica, 35 (3): 313 - 318. (in Chinese)
- 衡伟, 张绍铃, 方成泉, 吴华清, 吴俊. 2008. 梨 20 个品种 S 基因型的鉴定及新 S -RNases 基因的克隆. 园艺学报, 35 (3): 313 - 318.
- Ishimizu T, Inoue K, Shimonaka M, Saito T, Terai O, Norilka S. 1999. PCR-based method for identifying the S -genotypes of Japanese pear cultivars. Theor Appl Genet, 98 (6 - 7): 961 - 967.
- Ishimizu T, Sato Y, Saito T, Yoshimura Y, Norioka S, Nakanishi T, Sakiyama F. 1996. Identification and partial amino acid sequences of seven S -RNase associated with self-incompatibility of Japanese pear, *Pyrus pyrifolia* Nakai. Journal of Biochemistry, 120 (2): 326 - 334.
- Jiang Nan, Tan Xiao-feng. 2007. Identification technology for pear cultivar S -genotype based on genechip. Journal of Central South University of Forestry & Technology: Natural Science, 27 (1): 104 - 108. (in Chinese)

- 江 南, 谭晓风. 2007. 基于基因芯片的梨品种 *S* 基因型鉴定的技术方法. 中南林业科技大学学报: 自然科学版, 27 (1): 104 - 108.
- Jiang Nan, Tan Xiao-feng, Chen Hong, Wang Xiu-li, Zhang Lin, Zeng Yan-ling. 2008. Preparation of prototype *S*-RNase microarray and molecule hybridization condition. *Acta Horticulturae Sinica*, 35 (4): 481 - 486. (in Chinese)
- 江 南, 谭晓风, 陈 洪, 王秀利, 张 琳, 曾艳玲. 2008. 梨 *S* 基因芯片的试制及分子杂交条件的优化. 园艺学报, 35 (4): 481 - 486.
- Jiang Nan, Tan Xiao-feng. 2012. Design of oligo nucleotide probes on detection genechip of pear *S*-RNase. *Nonwood Forest Research*, 30 (3): 1 - 5. (in Chinese)
- 江 南, 谭晓风. 2012. 梨 *S* 基因检测芯片的 OLIGO 探针设计. 经济林研究, 30 (3): 1 - 5.
- Kim H T, Hirata Y, Kim H J, Nou I S. 2006. The presence of a new *S*-RNase allele (*S*₁₀) in Asian pear [*Pyrus pyrifolia* (Burm; Nakai)]. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 53 (7): 1375 - 1383.
- Royo J, Kunz C, Kowyma Y, Anderson M, Clarke A E, Newbigin E. 1994. Loss of a histidine residue at the active site of *S*-locus ribonuclease is associated with self-compatibility in *Lycopersicon peruvianum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91 (14): 6511 - 6514.
- Takasaki T, Okada K, Castillo C, Moriya Y, Saito T, Sawamura Y, Nakanishi T. 2004. Sequence of the *S*₉-RNase cDNA and PCR-RFLP system for discriminating *S*₁ to *S*₉-allele in Japanese pear. *Euphytica*, 135 (2): 157 - 167.
- Tan Xiao-feng, Wuyun Ta-na, Nakanishi T, Li Xiu-gen, Cao Yu-fen, Yang Gu-liang. 2005a. Isolation and identification of *S*₁₉-RNase gene of the *Pyrus bretschneideri* (Chinese pear). *Journal of Central South Forestry University*, 25 (1): 1 - 4. (in Chinese)
- 谭晓风, 乌云塔娜, 中西テツ, 李秀根, 曹玉芬, 杨谷良. 2005a. 中国梨品种自交不亲和新基因的分离鉴定. 中南林学院学报, 25 (1): 1 - 4.
- Tan Xiao-feng, Wuyun Ta-na, Nakanishi T, Li Xiu-gen. 2005b. Identification and sequencing of seven new *S*-RNase genes from *Pyrus pyrifolia*. *Journal of Central South Forestry University*, 25 (4): 1 - 7. (in Chinese)
- 谭晓风, 乌云塔娜, 中西テツ, 李秀根. 2005b. 中国砂梨 7 个自交不亲和新基因的分离与测序. 中南林学院学报, 25 (4): 1 - 7.
- Tan Xiao-feng, Bi Fang-cheng, Wuyun Ta-na. 2005c. Determination of 9 cultivars' genotypes and isolation of *S*₂₉-RNase gene in *Pyrus bretschneideri*. *Journal of Central South Forestry University*, 25 (4): 13 - 16. (in Chinese)
- 谭晓风, 毕方城, 乌云塔娜. 2005c. 中国白梨 9 个主栽品种 *S* 基因型的确定及 *S*₂₉-RNase 基因的分离鉴定. 中南林学院学报, 25 (4): 13 - 16.
- Tan Xiao-feng, Jiang Nan, Zhang Lin, Zeng Yan-ling, Zhang Dang-quan, Chen Hong. 2007. Application of genechip in *S*-genotyping of pear cultivars. The 5th International Forum on Post-Genome Technologies (5TFPT), 9 (10 - 11): 62 - 65.
- Wuyun Ta-na, Tan Xiao-feng, Bi Fang-cheng, Li Xiu-gen, Cao Yu-fen. 2005. Determination of 7 cultivars of the *S*-genotype and identification of two new allele of self-incompatibility of *Pyrus bretschneideri* (Chinese pear). *Journal of Central South Forestry University*, 25 (4): 7 - 12. (in Chinese)
- 乌云塔娜, 谭晓风, 毕方城, 李秀根, 曹玉芬. 2005. 中国白梨 7 个品种 *S* 基因型的确定和 2 个新 *S* 基因的鉴定. 中南林学院学报, 25 (4): 7 - 12.
- Wuyun Ta-na, Tan Xiao-feng, Li Xiu-gen, Cao Yu-fen, Zhang Lin. 2006. Isolation and identification of *S*₁₂-RNase gene of *Pyrus bretschneideri*. *Scientia Silvae*, 42 (4): 117 - 121. (in Chinese)
- 乌云塔娜, 谭晓风, 李秀根, 曹玉芬, 张 琳. 2006. 梨自交不亲和新基因 *S*₁₂-RNase 的分离鉴定及序列分析. 林业科学, 42 (4): 117 - 121.
- Wang Li-xin, Liang Wen-jie, Tan Xiao-feng, Li Xiu-gen, Zhang Lin. 2010. Identification of *S*-genotypes of six pear cultivars and sequence analyses of *S*₄₅-RNase. *Journal of Fruit Science*, 27 (5): 689 - 693. (in Chinese)
- 王立新, 梁文杰, 谭晓风, 李秀根, 张 琳. 2010. 6 个梨品种 *S* 基因型鉴定及新基因 *S*₄₅-RNase 序列分析. 果树学报, 27 (5): 689 - 693.
- Zhang Lin. 2008. Identification of *S*-genotypes of cultivars and cloning of self-incompatibility-associated genes in pear [Ph. D. Dissertation]. Changsha: Central South University of Forestry and Technology. (in Chinese)
- 张 琳. 2008. 梨品种 *S* 基因型鉴定及自交不亲和 *S* 基因的克隆 [博士论文]. 长沙: 中南林业科技大学.
- Zhang Lin, Jia Bao-guang, Zou Feng, Tan Xiao-feng, Liu Min, Song Zhi-bo, Zeng Yan-ling, Jiang Nan, Yuan De-yi. 2014. Sequence characterization and spatiotemporal expression patterns of *PbS₂₆-RNase* gene in Chinese white pear (*Pyrus bretschneideri*). *The Scientific World Journal*, [http: //dx.doi.org/10.1155/2014/147061](http://dx.doi.org/10.1155/2014/147061): 1 - 9.
- Zhang Lin, Tan Xiao-feng, Wuyun Ta-na. 2007. Identification of new *S*-RNase genes and *S*-genotype in two pear species (*Pyrus pyrifolia* and *P. bretschneideri*) grown in China by genomic PCR and pollination tests. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 35 (4): 403 - 413.
- Zhang Lin, Tan Xiao-feng, Zhang Dong-lin, Shen Yan, Yuan De-yi. 2009. Full length cDNA sequence of pear (*Pyrus bretschneideri* Rehd.) *S*₂₉-RNase and *S*₂₉-allele identification. *HortScience*, 44 (4): 1088.