园艺学报，2015，42 (12)：2341 – 2352.
Acta Horticulturae Sinica
doi：10.16420/j.issn.0513-353x.2015-0399；http：//www. ahs. ac. cn

梨自交不亲和基因cDNA芯片制备及对部分砂梨品种*S*基因型的鉴定

江　南[1,2,*]，谭晓风[2]，张　琳[2]，张靖国[3]，胡红菊[3]

（[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；[3]湖北省农业科学院果树茶叶研究所，武汉 430064）

摘　要：利用东方梨中已鉴定的 52 个 *S* 等位基因 HV 区 cDNA 序列作为靶基因序列设计探针，制备梨 *S* 基因 cDNA 检测芯片，每张芯片上含有 240 个位点 55 个 cDNA 探针，包含所有序列完善的 *S* 基因 HV 区特异的 cDNA 序列。以被检测品种雌蕊 cDNA 为模板，采用 Cy3 荧光修饰引物经 *S* 基因特异 PCR 扩增标记被检测品种的 cDNA 序列，并与芯片杂交以检测不同品种的 *S* 基因型。结果表明：利用 cDNA 检测芯片与‘丽江黄酸梨’、‘秀玉’、‘弥渡玉梨’、‘白面梨’和‘德胜香’等已知 *S* 基因型品种杂交，杂交结果显示与 *S* 基因寡核苷酸芯片检测信号一致，与各品种已知 *S* 基因型相符合。利用 cDNA 芯片和进一步完善的 *S* 基因寡核苷酸芯片并行检测鉴定了‘文山红梨’等 24 个未知 *S* 基因型的砂梨品种，获得各品种的 *S* 基因型。梨 *S* 基因 cDNA 芯片的构建进一步完善了梨 *S* 基因检测平台。

关键词：梨；自交不亲和；*S* 基因型；cDNA 芯片；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（2015）12-2341-12

Preparation of *S-RNase* cDNA Microarray and Its Application in Identifying Pear Cultivars *S*-genotypes

JIANG Nan[1,2,*]，TAN Xiao-feng[2]，ZHANG Lin[2]，ZHANG Jing-guo[3]，and HU Hong-ju[3]

（[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*；[3]*Institute of Fruit and Tea*，*Hubei Academy of Agricultural Sciences*，*Wuhan* 430064，*China*）

Abstract：Using the cDNA sequences from Hyper variable（HV）regions of 52 *S*-alleles in Oriental pear cultivars，cDNA microarray for *S-RNase* detections was established. Totally 240 dots and 55 cDNA probes，which includes all the HV specific cDNA sequences of perfected *S-RNase* gene，were spotted on the chip. By Cy3-labeled primers and cDNA template of tested cultivars pistils，the Cy3-labeled specific cDNA PCR products of *S-RNase* were amplified and hybridized with the cDNA microarray in order to detect the *S* genotype of pear cultivars. Cultivars with known *S*-genotype such as Lijiang Huangsuanli，Xiuyu，Midu Yuli，Baimianli and Deshengxiang were *S*-genotyped using the cDNA microarray and the results showed that the microarray analyses were consistent with their oligonucleotide genechip analyses

收稿日期：2015 – 07 – 28；**修回日期**：2015 – 12 – 14

基金项目：国家自然科学基金项目（31272124）

* E-mail：namijiangnan@126.com

and their RFLP and DNA sequenced results. Then the *S-RNase* cDNA microarrays and the oligonucleotide genechips were used to parallel *S*-genotyping 24 sand pear cultivars with unknown *S*-genotype and their *S*-genotypes were determined. In conclusion，the construction of cDNA microarrays has further improved the pear *S-RNase* detection platform.

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

梨是典型的配子体自交不亲和植物，其自交不亲和反应由单一 *S* 位点复等位基因控制，现已知梨雌蕊花柱内的 *S* 基因产物为具有核酸酶（RNase）活性的糖蛋白 *S* 核酸酶（*S*-RNase），特异地控制花粉和雌蕊识别过程（Ishimizu et al.，1996；张绍铃　等，2001，2002），因此鉴定梨 *S* 基因型不仅可以为梨栽培授粉品种的选择提供科学依据，也为梨品种的遗传改良奠定基础。目前确定梨品种 *S* 基因型的方法有田间杂交试验、PCR-RFLP 技术、DNA 测序及序列分析、cDNA 克隆、花粉管生长检测、蛋白质电泳分析及基因芯片杂交等（江南　等，2014），采用这些技术已分别从东方梨中获得 52 个 *S* 等位基因并确定了少部分梨品种 *S* 基因型，从西洋梨中获得 53 个 *S* 等位基因，均已登录 GenBank。PCR-RFLP 技术和 *S* 基因 DNA 序列分析法在梨 *S* 基因鉴定中应用较为广泛，能准确快速鉴定品种和 *S* 等位基因资源较少的梨品种（如日本梨和韩国梨）的 *S* 基因型。中国梨品种丰富，砂梨品种占梨品种 1/3 以上（Zhang et al.，2007，2009a，2009b；邓建军　等，2010；王立新　等，2010），大量的地方品种或野生型个体中蕴含着种类丰富的 *S* 基因资源。

基因芯片技术具有快速并行检测的特点，作者在前期研究中根据已分离鉴定的 *S* 等位基因序列制备了 *S* 基因寡核苷酸芯片（Tan et al.，2007；江南　等，2008，2014），利用芯片成功检测了 27 个梨品种 *S* 基因型，并结合 PCR-RFLP 技术和 DNA 序列分析方法发现了砂梨 6 个新的 *S* 基因，分别命名为 S_{47}～S_{52}，GenBank 登录号依次为 KP867051、KP890691、KP890692、KP902676、KP902677 和 KP998819。但研究中发现 *S* 基因寡核苷酸芯片是用梨品种 DNA 序列进行杂交的，如果芯片探针设计位置在内含子部位，内含子的序列不同，杂交信号也会不同，根据杂交信号判断为不同的 *S* 基因，但其氨基酸序列一致，授粉仍会表现为自交不亲和。针对此种情况，本研究中拟进一步研究制作梨 *S* 基因的 cDNA 芯片，对同一梨品种用梨 *S* 基因的 cDNA 芯片和寡核苷酸检测芯片进行并行检测，比较分析杂交结果，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。

1　材料与方法

1.1　材料

24 个未知 *S* 基因型和 24 个已知 *S* 基因型的梨供试品种均种植在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。

2013 年 4 月采 24 个已知 *S* 基因型梨品种的新鲜嫩梢（带嫩叶 5 ～ 6 片），冰盒保鲜，带回实验室后取幼嫩叶片 –80 ℃保存备用。

2014 年 3 月中下旬采 24 个未知 *S* 基因型的梨供试品种和已知 *S* 基因型品种（用于芯片探针制备及芯片质量检测）的铃铛期花枝，水插保养，带回实验室取雌蕊于 –80 ℃超低温冰箱冷冻保存备用。

引物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　梨品种雌蕊总RNA的提取及cDNA合成

TaKaRa 公司的 MiniBEST Plant RNA Extraction Kit 分别提取各品种雌蕊总 RNA，取 2 μL RNA 1.5%琼脂糖电泳检测，Beckman DU-640 核酸蛋白分析仪测定浓度，取 OD_{260}/OD_{280} 值在 1.8 ～ 2.0 之间，且电泳检测 28S 和 18S 清晰，28S 亮度是 18S 2 倍的 RNA 于－80 ℃储存备用。

RevertAid^{TM} First Strand cDNA Synthesis Kit 逆转录获得各品种雌蕊 cDNA 用于 *S* 基因 cDNA 特异片段 PCR 和芯片探针制备。

1.3　基因组DNA提取及*S*基因特异片段PCR扩增

用 BIOER 公司 DNA 提取试剂盒从梨品种幼嫩叶片中提取 24 个供试品种的基因组 DNA，进行 DNA 检测、浓度测定及各品种 *S* 基因特异片段 PCR 和扩增产物荧光物质标记（江南 等，2014）。

1.4　*S*基因cDNA探针制备及*S*基因cDNA特异片段扩增

S 基因高变区（Hyper variable region，HV 区）是 *S* 基因富有多态性的识别部位，不同 *S* 基因 HV 区 cDNA 序列具有特异性。采用未进行 Cy3 荧光标记的正向引物 PF：5′-TTTACGCAGCAATATCAG-3′（Ishimizu et al.，1999）和反向引物 PR：5′-ACRTTYGGCCAAATARTT-3′（张琳，2008）分别以已知 *S* 基因型的梨品种雌蕊 cDNA 为模板，Ex *Taq* DNA 聚合酶进行 *S* 基因 HV 区 cDNA 特异片段扩增，反应程序：94 ℃ 2 min；94 ℃ 30 s，50 ℃退火 30 s，70 ℃延伸 2 min，15 个循环；70 ℃延伸 2 min 30 s，25 个循环；70 ℃总延伸 7 min。1.5%琼脂糖电泳检测，对理想 PCR 产物用 OMEGA 公司纯化试剂盒纯化回收，TA 克隆，挑选阳性克隆测定基因序列，保留各 *S* 基因序列准确测序稳定的克隆，提取质粒，以质粒为模板 PF/R 再次扩增即获得各 *S* 基因 HV 区特异 cDNA 探针，纯化回收 PCR 产物，浓度检测后－20 ℃储存备用，质粒－80 ℃保存。

采用合成时 Cy3 修饰的引物 PF/R 特异扩增 24 个未知 *S* 基因型的梨品种和对照品种[丽江黄酸梨（$S_{22}S_{42}$）、秀玉（S_4S_5）、弥渡玉梨（$S_{12}S_{19}$）、白面梨（$S_{15}S_{19}$）和德胜香（S_3S_{29}）]的 *S* 基因 HV 区 cDNA 特异片段，1.5%琼脂糖电泳检测，对扩增理想产物回收纯化，浓度检测，－20 ℃储存备用。

1.5　*S*基因cDNA芯片制备及芯片杂交

根据各 *S* 基因 cDNA 特异探针浓度加入适量 100% DMSO 作为点样液，调节终浓度为 300 ng · μL^{-1}，点样仪按设计阵列将探针点样至氨基硅烷化玻片（普通载玻片经 APTES 处理）上，点样后待玻片稍干（室温干燥玻片 30 min 左右），紫外交联仪中总能量为 350 mJ 的紫外光下照射，使探针交联到氨基硅烷包被的玻片上，然后烘箱内 80 ℃烘烤 1 h 后，暗盒保存备用。芯片阵列共包含 GenBank 和现有相关文献报道的东方梨已鉴定的 52 个 *S* 基因 55 条特异 cDNA 探针，阵列设计及各探针对应位置如图 1，图中 1 ~ 15 和 A ~ P 分别为阵列中的 15 行和 16 列编号。阵列矩形含 16 × 15 个位点，其中 PpS_n、PbS_n、PsS_n、PuS_n 和 PcS_n 分别对应已鉴定的登录 GenBank 中砂梨（*Pyrus pyrifolia* Nakai）、白梨（*P. bretschneideri* Rehd.）、新疆梨（*P. sinkiangensis* Yü）、秋子梨（*P. ussuriensis* Maxim.）和部分西洋梨（*P. communis* L.）各 *S* 基因，以 *Actin* 为内参基因。引物 F5′-TGGTGTCATG GTTGGTATGG-3′和 R5′-CAGGAGCAACACGAAGTTCA-3′（合成时 Cy3 修饰）扩增，扩增片段 173 bp（Zhang et al.，2014）作为阳性对照，人类高血压基因（*HRG*）作为阴性对照，50% DMSO 点样液作为空白对照。

	A B C D	E F G H	I J K L	M N O P
1	PpS_1 A1 ~ D1	PpS_2 E1 ~ H1	PpS_3 I1 ~ L1	PpS_4 M1 ~ P1
2	PpS_5 A2 ~ D2	PpS_6 E2 ~ H2	PpS_7 I2 ~ L2	PpS_8 M2 ~ P2
3	PpS_9 A3 ~ D3	PpS_{10} E3 ~ H3	PpS_{12} I3 ~ L3	PbS_{12} M3 ~ P3
4	PpS_{13} A4 ~ D4	PbS_{13} E4 ~ H4	PpS_{15} I4 ~ L4	PpS_{16} M4 ~ P4
5	PbS_{17} A5 ~ D5	PbS_{18} E5 ~ H5	PbS_{19} I5 ~ L5	PbS_{20} M5 ~ P5
6	PbS_{21} A6 ~ D6	PbS_{22} E6 ~ H6	PcS_{25} I6 ~ L6	PcS_{26} M6 ~ P6
7	*Actin* A7 ~ D7	*HRG* E7 ~ H7	*Actin* I7 ~ L7	*HRG* M7 ~ P7
8	PbS_{27} A8 ~ D8	PbS_{28} E8 ~ H8	PsS_{28} I8 ~ L8	PbS_{29} M8 ~ P8
9	PbS_{30} A9 ~ D9	PbS_{31} E9 ~ H9	PpS_{32} I9 ~ L9	PuS_{32} M9 ~ P9
10	PpS_{34} A10 ~ D10	PbS_{35} E10 ~ H10	PpS_{35} I10 ~ L10	PpS_{37} M10 ~ P10
11	PuS_{37} A11 ~ D11	CK E11 ~ H11	PbS_{38} I11 ~ L11	PpS_{39} M11 ~ P11
12	PbS_{39} A12 ~ D12	PuS_{40} E12 ~ H12	PuS_{41} I12 ~ L12	PbS_{42} M12 ~ P12
13	PpS_{43} A13 ~ D13	PbS_{43} E13 ~ H13	PpS_{44} I13 ~ L13	PpS_{45} M13 ~ P13
14	PpS_{46} A14 ~ D14	PpS_{47} E14 ~ H14	PpS_{48} I14 ~ L14	PpS_{49} M14 ~ P14
15	PpS_{50} A15 ~ D15	PpS_{51} E15 ~ H15	PpS_{52} I15 ~ L15	CK M15 ~ P15

图 1　*S* 基因 cDNA 探针在 cDNA 芯片阵列中的位置

Fig. 1　*S-RNase* gene cDNA probe location of cDNA microarray

制备好的芯片 95 ℃变性 3 min，迅速浸入预冷的无水乙醇中，离心机干燥玻片。调整各梨品种荧光标记的 *S* 基因 HV 区 cDNA 特异扩增产物和 *Actin* PCR 产物终浓度至 200 ng · μL^{-1}，等比例混合，混合 PCR 产物与杂交液和灭菌水等比例混合，95 ℃水浴变性 5 min 后迅速冰上冷却，室温 3 ~ 5 min 后取适量混合液加至芯片阵列中，于杂交盒内（加 30 μL 的 3× SSC 溶液）恒温水浴 42 ℃避光杂交 8 ~ 10 h 后，2× SSC + 0.1% SDS、0.1× SSC + 0.1% SDS、0.1× SSC 溶液依次避光洗涤 3 min，蒸馏水冲洗 2 ~ 3 次（每次不超过 10 s），离心机干燥玻片。AXON-4100A 芯片扫描仪使用 Cy3 光源（580 nm）进行信号检测，GenePix 分析软件分析杂交点阵 Cy3 的荧光强度，信号强度扣除背景值后以各探针重复点的平均值计算，各品种视杂交信号重复杂交 1 ~ 2 次。

1.6　*S*基因寡核苷酸芯片并行检测未知*S*基因型梨品种

根据新发现的 *S* 基因 S_{47} ~ S_{52} 的 HV 序列分别设计各 *S* 基因特异的寡核苷酸探针，设计芯片（江南 等，2008，2014），将探针按顺序补充到阵列中（按 S_{47} ~ S_{52} 的顺序点样于 S_{46} 和 5′PF1 之间的位点），此外对应 cDNA 阵列的探针内容按顺序补充原来 *S* 基因寡核苷酸检测芯片中不含有的 PbS_{12}、PsS_{28}、PpS_{32}、PpS_{34}、PsS_{35}、PpS_{37}、PpS_{38}、PpS_{39}、PbS_{43} 等寡核苷酸探针（包括错配探针）以完善芯片。芯片阵列重新设计含 20 × 18 个位点，按 cDNA 芯片探针位置编号方法寡核苷酸芯片各探针对应位置如图 2。

寡核苷酸芯片杂交鉴定梨品种未知 *S* 基因型按江南等（2014）的步骤进行。

1.7　砂梨品种中未知*S*基因的鉴定

对 *S* 基因 cDNA 芯片和寡核苷酸芯片并行检测发现的杂交信号不一致的梨品种，纯化回收 *S* 基因 PF/R DNA 特异片段并进行 TA 克隆、DNA 测序和序列分析（包含碱基序列和推导的氨基酸序列），最终鉴定砂梨品种 *S* 基因型。

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T
1	PpS_{1}	PpS_{1}	PpS_{2}	PpS_{2}	PpS_{3}	PpS_{3}	PpS_{4}	PpS_{4}	PpS_{5}	PpS_{5}	PpS_{6}	PpS_{6}	PbS_{7}	PbS_{7}	PpS_{8}	PpS_{8}	PbS_{9}	PbS_{9}	PpS_{10}	PpS_{10}
2	PpS_{1}	PpS_{1}	PpS_{2}	PpS_{2}	PpS_{3}	PpS_{3}	PpS_{4}	PpS_{4}	PpS_{5}	PpS_{5}	PpS_{6}	PpS_{6}	PbS_{7}	PbS_{7}	PpS_{8}	PpS_{8}	PbS_{9}	PbS_{9}	PpS_{10}	PpS_{10}
3	$PpS_{1\text{-}1}$	$PpS_{1\text{-}1}$	$PpS_{2\text{-}1}$	$PpS_{2\text{-}1}$	$PpS_{3\text{-}1}$	$PpS_{3\text{-}1}$	$PpS_{4\text{-}1}$	$PpS_{4\text{-}1}$	$PpS_{5\text{-}1}$	$PpS_{5\text{-}1}$	$PpS_{6\text{-}1}$	$PpS_{6\text{-}1}$	$PbS_{7\text{-}1}$	$PbS_{7\text{-}1}$	$PpS_{8\text{-}1}$	$PpS_{8\text{-}1}$	$PbS_{9\text{-}1}$	$PbS_{9\text{-}1}$	$PpS_{10\text{-}1}$	$PpS_{10\text{-}1}$
4	PpS_{12}	PpS_{12}	PbS_{12}	PbS_{12}	PpS_{13}	PpS_{13}	PbS_{13}	PbS_{13}	PpS_{15}	PpS_{15}	PpS_{16}	PpS_{16}	PbS_{17}	PbS_{17}	PbS_{18}	PbS_{18}	PbS_{19}	PbS_{19}	PbS_{20}	PbS_{20}
5	PpS_{12}	PpS_{12}	PbS_{12}	PbS_{12}	PpS_{13}	PpS_{13}	PbS_{13}	PbS_{13}	PpS_{15}	PpS_{15}	PpS_{16}	PpS_{16}	PbS_{17}	PbS_{17}	PbS_{18}	PbS_{18}	PbS_{19}	PbS_{19}	PbS_{20}	PbS_{20}
6	$PpS_{12\text{-}1}$	$PpS_{12\text{-}1}$	$PbS_{12\text{-}1}$	$PbS_{12\text{-}1}$	$PpS_{13\text{-}1}$	$PpS_{13\text{-}1}$	$PbS_{13\text{-}1}$	$PbS_{13\text{-}1}$	$PpS_{15\text{-}1}$	$PpS_{15\text{-}1}$	$PpS_{16\text{-}1}$	$PpS_{16\text{-}1}$	$PbS_{17\text{-}1}$	$PbS_{17\text{-}1}$	$PbS_{18\text{-}1}$	$PbS_{18\text{-}1}$	$PbS_{19\text{-}1}$	$PbS_{19\text{-}1}$	$PbS_{20\text{-}1}$	$PbS_{20\text{-}1}$
7	PbS_{21}	PbS_{21}	PbS_{22}	PbS_{22}	PcS_{25}	PcS_{25}	PbS_{26}	PbS_{26}	PbS_{27}	PbS_{27}	PbS_{28}	PbS_{28}	PsS_{28}	PsS_{28}	PbS_{29}	PbS_{29}	PbS_{30}	PbS_{30}	PbS_{31}	PbS_{31}
8	PbS_{21}	PbS_{21}	PbS_{22}	PbS_{22}	PcS_{25}	PcS_{25}	PbS_{26}	PbS_{26}	PbS_{27}	PbS_{27}	PbS_{28}	PbS_{28}	PsS_{28}	PsS_{28}	PbS_{29}	PbS_{29}	PbS_{30}	PbS_{30}	PbS_{31}	PbS_{31}
9	$PbS_{21\text{-}1}$	$PbS_{21\text{-}1}$	$PbS_{22\text{-}1}$	$PbS_{22\text{-}1}$	$PcS_{25\text{-}1}$	$PcS_{25\text{-}1}$	$PbS_{26\text{-}1}$	$PbS_{26\text{-}1}$	$PbS_{27\text{-}1}$	$PbS_{27\text{-}1}$	$PbS_{28\text{-}1}$	$PbS_{28\text{-}1}$	$PsS_{28\text{-}1}$	$PsS_{28\text{-}1}$	$PbS_{29\text{-}1}$	$PbS_{29\text{-}1}$	$PbS_{30\text{-}1}$	$PbS_{30\text{-}1}$	$PbS_{31\text{-}1}$	$PbS_{31\text{-}1}$
10	PpS_{32}	PpS_{32}	PuS_{32}	PuS_{32}	PpS_{34}	PpS_{34}	PpS_{35}	PpS_{35}	PsS_{35}	PsS_{35}	PpS_{37}	PpS_{37}	PuS_{37}	PuS_{37}	PpS_{38}	PpS_{38}	PbS_{38}	PbS_{38}	PpS_{39}	PpS_{39}
11	PpS_{32}	PpS_{32}	PuS_{32}	PuS_{32}	PpS_{34}	PpS_{34}	PpS_{35}	PpS_{35}	PsS_{35}	PsS_{35}	PpS_{37}	PpS_{37}	PuS_{37}	PuS_{37}	PpS_{38}	PpS_{38}	PbS_{38}	PbS_{38}	PpS_{39}	PpS_{39}
12	$PpS_{32\text{-}1}$	$PpS_{32\text{-}1}$	$PuS_{32\text{-}1}$	$PuS_{32\text{-}1}$	$PpS_{34\text{-}1}$	$PpS_{34\text{-}1}$	$PpS_{35\text{-}1}$	$PpS_{35\text{-}1}$	$PsS_{35\text{-}1}$	$PsS_{35\text{-}1}$	$PpS_{37\text{-}1}$	$PpS_{37\text{-}1}$	$PuS_{37\text{-}1}$	$PuS_{37\text{-}1}$	$PpS_{38\text{-}1}$	$PpS_{38\text{-}1}$	$PbS_{38\text{-}1}$	$PbS_{38\text{-}1}$	$PpS_{39\text{-}1}$	$PpS_{39\text{-}1}$
13	PbS_{39}	PbS_{39}	PuS_{40}	PuS_{40}	PuS_{41}	PuS_{41}	PbS_{42}	PbS_{42}	PpS_{43}	PpS_{43}	PbS_{43}	PbS_{43}	PpS_{44}	PpS_{44}	PbS_{45}	PbS_{45}	PpS_{46}	PpS_{46}	PpS_{47}	PpS_{47}
14	PbS_{39}	PbS_{39}	PuS_{40}	PuS_{40}	PuS_{41}	PuS_{41}	PbS_{42}	PbS_{42}	PpS_{43}	PpS_{43}	PbS_{43}	PbS_{43}	PpS_{44}	PpS_{44}	PbS_{45}	PbS_{45}	PpS_{46}	PpS_{46}	PpS_{47}	PpS_{47}
15	$PbS_{39\text{-}1}$	$PbS_{39\text{-}1}$	$PuS_{40\text{-}1}$	$PuS_{40\text{-}1}$	$PuS_{41\text{-}1}$	$PuS_{41\text{-}1}$	$PbS_{42\text{-}1}$	$PbS_{42\text{-}1}$	$PpS_{43\text{-}1}$	$PpS_{43\text{-}1}$	$PbS_{43\text{-}1}$	$PbS_{43\text{-}1}$	$PpS_{44\text{-}1}$	$PpS_{44\text{-}1}$	$PbS_{45\text{-}1}$	$PbS_{45\text{-}1}$	$PpS_{46\text{-}1}$	$PpS_{46\text{-}1}$	$PpS_{47\text{-}1}$	$PpS_{47\text{-}1}$
16	PpS_{48}	PpS_{48}	PpS_{49}	PpS_{49}	PpS_{50}	PpS_{50}	PpS_{51}	PpS_{51}	PpS_{52}	PpS_{52}	5’PF1	5’PF1	5’PF1	5’PF1	HRG	HRG	HRG	CK	CK	CK
17	PpS_{48}	PpS_{48}	PpS_{49}	PpS_{49}	PpS_{50}	PpS_{50}	PpS_{51}	PpS_{51}	PpS_{52}	PpS_{52}	5’PF1	5’PF1	5’PF1	5’PF1	HRG	HRG	HRG	CK	CK	CK
18	$PpS_{48\text{-}1}$	$PpS_{48\text{-}1}$	$PpS_{49\text{-}1}$	$PpS_{49\text{-}1}$	$PpS_{50\text{-}1}$	$PpS_{50\text{-}1}$	$PpS_{51\text{-}1}$	$PpS_{51\text{-}1}$	$PpS_{52\text{-}1}$	$PpS_{52\text{-}1}$	5’PF1	5’PF1	5’PF1	5’PF1	HRG	HRG	HRG	CK	CK	CK

图 2　*S* 基因寡核苷酸探针在寡核苷酸芯片阵列中的位置

Fig. 2　*S*-RNase gene oligonucleotide probe location of oligonucleotide gene chip

2　结果与分析

2.1　梨品种*S*基因特异cDNA探针制备和特异片段PCR

梨品种 PF/R cDNA 特异片段为 *S* 基因 HV 区不含内含子的 cDNA 序列，虽然不同 *S* 基因 PF/R DNA 特异片段长度不一，但去除内含子后 PF/R 序列长度均为 200 bp 左右。24 个供试砂梨品种和 24 个已知 S 基因型梨品种（表 1）PF/R cDNA 特异扩增产物均条带清晰，长度均一（图 3）。对经测序检测的已知 S_1 ~ S_{52} 基因以提取阳性克隆质粒为模板，PF/R 特异扩增后获得各 *S* 基因 HV 区特异 cDNA 探针，纯化回收后浓度检测均在 380 ng · μL^{-1} 以上。其中 S_{12} ~ S_{13}、S_{38} ~ S_{39} 和 S_{43} 分别在砂梨和白梨品种中、S_{28} 和 S_{35} 分别在白梨和新疆梨品种中、S_{32} 和 S_{37} 分别在砂梨和秋子梨品种中 HV 区存在明显的碱基和氨基酸序列差别，分别对相应基因不同序列制备 cDNA 探针；GenBank *S* 基因数据分析发现 PpS_{16}、PbS_{16} 与 PpS_{31} 基因序列完全相同，为同一 *S* 基因，保留 PpS_{16}；PpS_{15} 和 PpS_{38} 内含子有两个碱基差别，编码区碱基序列和氨基酸序列完全相同，保留 PpS_{15}；结合他人研究（衡伟 等，2007，2008）还发现 PpS_{12} 与 PpS_{36} 基因序列完全相同，为同一 *S* 基因，探针设计保留 PpS_{12}；同时探针设计中删除不确定或不完善 *S* 基因序列（如 S_{11}、S_{14}、S_{23}、S_{24}、S_{33}）；PpS_{10}、PbS_{20}、PcS_{25}、PbS_{28}、PsS_{28}、PbS_{30}、PbS_{31}、PpS_{32}、PuS_{32}、PpS_{34}、PsS_{35}、PuS_{37}、PpS_{39}、PbS_{38}、PbS_{39}、PuS_{40}、PuS_{41}、PbS_{43}、PpS_{44}、PbS_{45} 由于未采集到含相应基因的梨品种，GenBank 获得 HV 区 cDNA 序列后由华大基因合成，实验室克隆测序检测后用于芯片探针。通过分析比较，最后得到用于 cDNA 芯片制备点样的特异 cDNA 探针 55 条。

荧光修饰的 PF/R 引物扩增 24 个未知 *S* 基因型的供试砂梨品种的 *S* 基因 HV 区 DNA 特异片段，获得了较好的荧光标记的特异 PCR 产物。24 个砂梨品种 PF/R 特异扩增片段大小 340 ~ 1 500 bp，其中只有 26 号（长金二十世纪）、27 号（会理小黄梨）、32 号（兴山 23 号）、34 号（兴山 28）、35 号（兴山 32）、36 号（兴山 40）和 44 号（十里香）品种扩增条带为双带，其他品种均为单带，为方便杂交，双带品种 PCR 产物 1 管回收，各品种 DNA 特异扩增产物纯化回收后电泳检测如图 4。

表 1 已知 *S* 基因型品种和未知供试品种

Table 1 The pear cultivars with known *S*-genotype and unknown *S*-genotype

序号 Code	来源 Source	*S* 基因型 *S* genotype	种质名称 Cultivar name	制备探针 Probe preparation
1	云南丽江 Lijiang，Yunnan	$S_{22}S_{42}$	丽江黄酸梨（对照 1）Lijiang Huangsuanli（Control 1）	PbS_{22}，PbS_{42}
2	日本 Japan	S_1S_6	黄蜜（今村夏）Huangmili（Imamuranatsu）	PpS_1，PpS_6，
3		S_2S_4	早生二十世纪 Wasenijisseiki	PpS_2，PpS_4
4		S_3S_9	新高 Niitaka	PpS_3，PpS_9
5		S_4S_5	秀玉（对照 2）Xiuyu（Control 2）	PpS_5
6	湖北武汉 Wuhan，Hubei	S_7S_{17}	安农 1 号 Annong 1	PpS_7，PbS_{17}
7	湖北罗田 Luotian，Hubei	S_8S_{49}	罗田冬梨 Luotian Dongli	PpS_8，PpS_{49}
8	云南弥渡 Midu，Yunnan	$S_{12}S_{19}$	弥渡玉梨（对照 3）Midu Yuli（Control 3）	PpS_{12}
9	四川会理 Huili，Sichuan	$S_{12}S_{26}$	红皮酥 Hongpisu	PbS_{12}
10	福建政和 Zhenghe，Fujian	$S_{13}S_{43}$	政和大雪梨 Zhenghe Daxueli	PpS_{13}，PpS_{43}
11	福建晋江 Jinjiang，Fujjian	$S_{13}S_{34}$	鹅梨 Eli	PbS_{13}
12	陕西镇巴 Zhenba，Shaanxi	$S_{15}S_{19}$	白面梨（对照 4）Baimianli（Control 4）	PpS_{15}，PbS_{19}
13	辽宁兴城 Xingcheng，Liaoning	$S_{16}S_{19}$	桔蜜 Jumi	PpS_{16}
14	浙江杭州 Hangzhou，Zhejiang	$S_{18}S_{34}$	杭红 Hanghong	PbS_{18}
15	河南郑州 Zhengzhou，Henan	$S_{21}S_{26}$	红香酥 Hongxiangsu	PbS_{21}，PbS_{26}
16	浙江义乌 Yiwu，Zhejiang	$S_{15}S_{27}$	早三花 Zaosanhua	PbS_{27}
17	湖北兴山 Xingshan，Hubei	$S_{29}S_{52}$	兴山 19 号 Xingshan 19	PbS_{29}，PpS_{52}
18	河南郑州 Zhengzhou，Henan	S_4S_{35}	中梨 1 号 zhongli 1	PbS_{35}
19	云南丽江 Lijiang，Yunnan	$S_{36}S_{37}$	索美梨 Suomeili	PpS_{37}
20	广东惠阳 Huiyang，Guangzhou	$S_{46}S_{47}$	惠阳红梨 Huiyang Hongli	PpS_{46}
21	湖北兴山 Xingshan，Hubei	$S_{47}S_{48}$	兴山 20 号 Xingshan 20	PpS_{47}，PpS_{48}
22		S_1S_{50}	兴山 26 号 Xingshan 26	PpS_{50}
23	四川汉源 Hanyuan，Sichuan	S_1S_{51}	梨园麻子梨 Liyuan Mazili	PpS_{51}
24	四川 Sichuan	S_3S_{29}	德胜香（对照 5）Deshengxiang（Control 5）	
25	四川汉源 Hanyuan，Sichuan	未知 Unknown	汉源雪花梨 Hanyuan Xuehuali	
26	日本 Japan		金二十世纪 Gold Nijisseiki	
27	四川会理 Huili，Sichuan		会理小黄梨 Huili Xiaohuangli	
28	湖北兴山 Xingshan，Hubei		兴山 17 号 Xingshan 17	
29			兴山 18 号 Xingshan 18	
30			兴山 21 号 Xingshan 21	
31			兴山 22 号 Xingshan 22	
32			兴山 23 号 Xingshan 23	
33			兴山 25 号 Xingshan 25	
34			兴山 28 号 Xingshan 28	
35			兴山 32 号 Xingshan 32	
36			兴山 40 号 Xingshan 40	
37	湖北罗田 Luotian，Hubei		罗田短柄梨 Luotian Duanbingli	
38	云南丽江 Lijiang，Yunnan		雄古冬梨 Xionggu Dongli	
39	中国台湾 Taiwan，China		台湾赤花 Taiwan Chihua	
40	湖北武汉 Wuhan，Hubei		白雪 Baixue	
41			黄皮香 Huangpixiang	
42	湖北远安 Yuan'an，Hubei		朵朵花 Duoduohua	
43			龙团梨 Longtuanli	
44			十里香 Shilixiang	
45	广东惠阳 Huiyang，Guangdong		细花红梨 Xihua Hongli	
46	广东封开 Fengkai，Guangdong		杏花大银梨 Xinghua Dayinli	
47	云南晋宁 Jinning，Yunnan		细把清水梨 Xiba Qingshuili	
48	云南昆明 Kunming，Yunnan		文山红梨 Wenshan Hongli	

注：代号 1～24 号为已知 *S* 基因型品种，1、5、8、14 和 24 号为对照品种，其余均为未知供试品种。

Note：Codes 1–24 for known *S* genotype cultivars. Codes 1，5，8，14 and 24 for control and the others are tested cultivars.

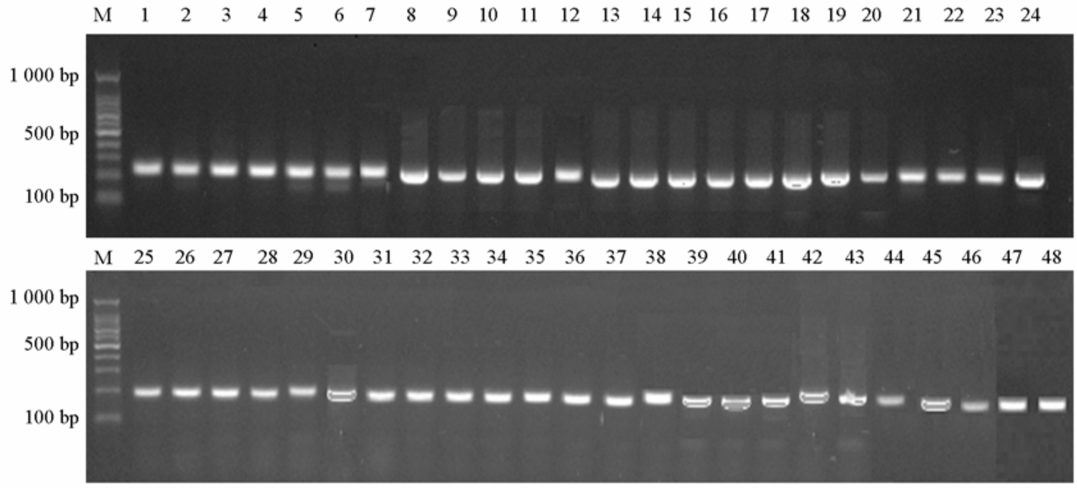

图 3　已知（1 ~ 24）和未知 *S* 基因型梨品种 cDNA PCR 产物凝胶电泳图

1 ~ 48 分别对应表 1 中的 48 个品种。

Fig. 3　cDNA PCR products of known *S*-genotype（1–24）and unknown *S*-genotype pear cultivars in agarose gel electrophoresis

The accession codes 1–48 are the same as those shown in Table 1.

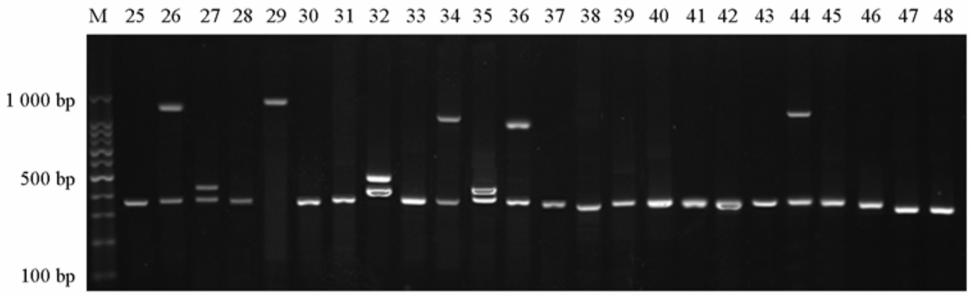

图 4　未知 *S* 基因型供试品种 DNA PCR 产物纯化后凝胶电泳图

25 ~ 48 分别与表 1 中的对应。

Fig. 4　Purified DNA PCR products of unknown *S*-genotype pear cultivars in agarose gel electrophoresis

The accession codes 25–48 are the same as those shown in Table 1.

2.2　梨*S*基因寡核苷酸芯片和cDNA芯片对梨品种*S*基因型并行鉴定结果

将对照品种丽江黄酸梨、秀玉、弥渡玉梨、白面梨和德胜香的 Cy3 荧光标记的 cDNA 特异扩增产物分别与 cDNA 芯片阵列避光杂交，1 个品种对应 1 个阵列，杂交结果如图 5。对照图 1 各位点探针和杂交信号可判断各对照品种所含 *S* 基因分别为丽江黄酸梨 $S_{22}S_{42}$、秀玉 S_4S_5、弥渡玉梨 $S_{12}S_{19}$、白面梨 $S_{15}S_{19}$ 和德胜香 S_3S_{29}，杂交信号所示 *S* 基因与寡核苷酸芯片检测各品种出现杂交信号的 *S* 基因（江南 等，2014）一致，杂交结果与各品种已知 *S* 基因型相符。说明 cDNA 芯片检测梨品种 *S* 基因型可行。

将文山红梨等 24 个未知 *S* 基因型的梨品种 Cy3 荧光标记的 cDNA 特异扩增产物和 DNA 特异扩增产物分别对应 *S* 基因 cDNA 芯片阵列和寡核苷酸芯片阵列避光杂交，1 个品种对应 1 个阵列，重复杂交 1 次，杂交结果如图 6 和图 7。

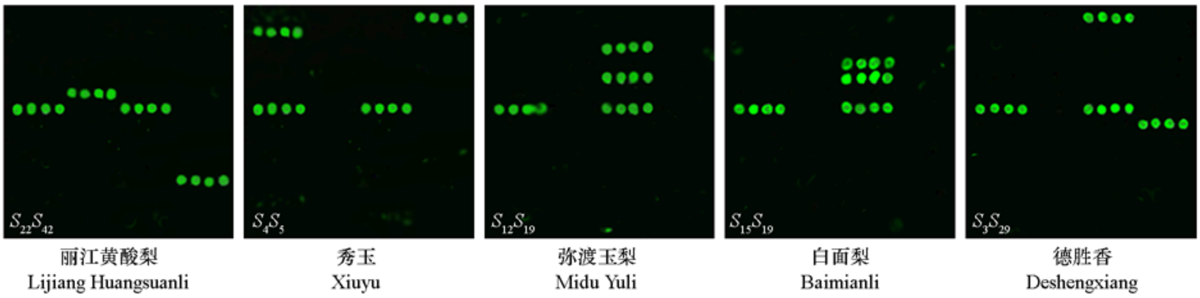

图 5　已知 *S* 基因型梨品种与 cDNA 芯片杂交信号扫描

Fig. 5　The scanning results of known *S*-genotypes pear cultivars hybridized with the cDNA microarray

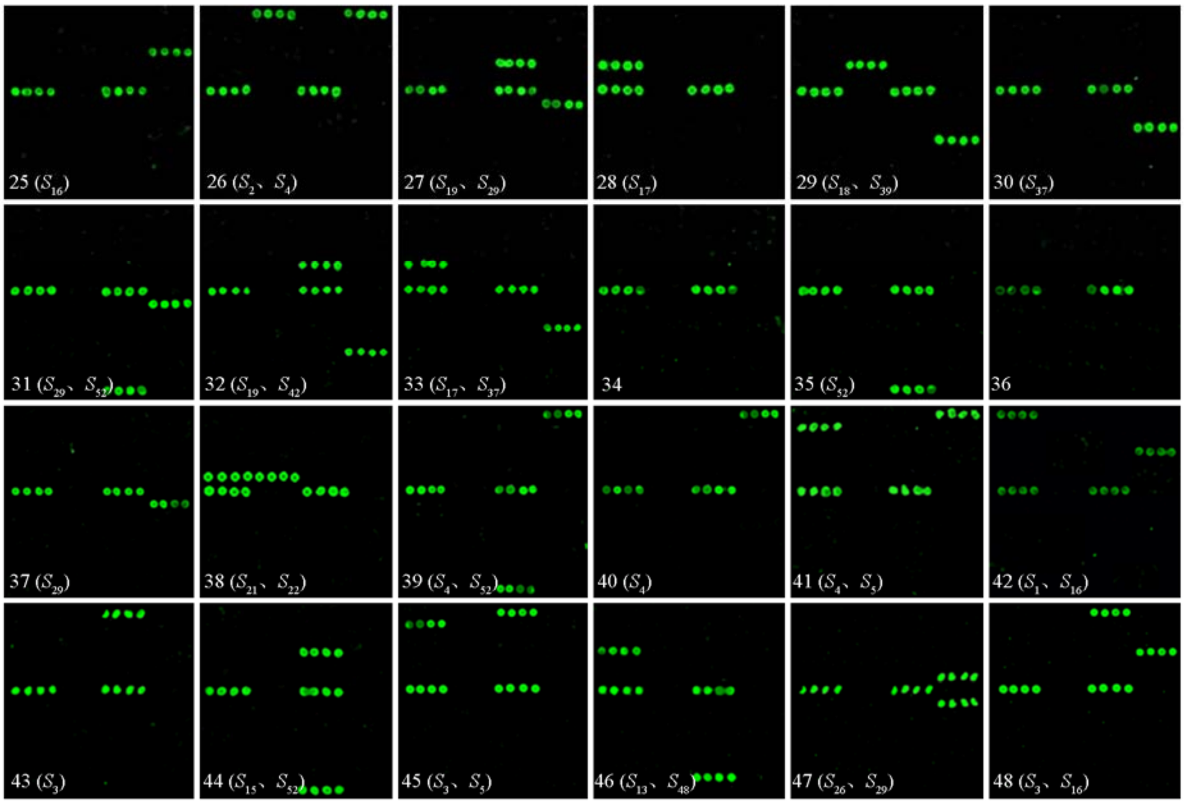

图 6　未知 *S* 基因型供试品种与 cDNA 芯片杂交信号扫描

25～48 分别与表 1 中的对应。34 和 36 *S* 无杂交信号。

Fig. 6　The scanning results of unknown *S*-genotype pear cultivars hybridized with the cDNA microarray

The accession codes 25 to 48 are the same as those shown in Table 1. No *S*-RNase probe signal showed in microarray 34 and 36.

对应芯片阵列中探针位点和杂交信号扫描结果，cDNA 芯片检测 24 个品种中‘会理小黄梨’（27 号）等 15 个品种有两个 *S*-RNase 基因探针的杂交信号，包含 PpS_1、PpS_2、PpS_3、PpS_4、PpS_5、PpS_{13}、PpS_{15}、PpS_{16}、PbS_{17}、PbS_{18}、PbS_{19}、PbS_{21}、PbS_{22}、PbS_{26}、PbS_{29}、PpS_{37}、PpS_{39}、PbS_{42}、PpS_{48}、PpS_{52} 等已知 *S*-RNase 基因，兴山 17 号（28）、兴山 21 号（30）、汉源雪花梨（25）、兴山 32 号（35）、罗田短柄梨（37）、白雪（40）、龙团梨（43）等 7 个品种只有 1 个 *S*-RNase 基因探针的杂交信号，分别为：PbS_{17}、PpS_{37}、PpS_{16}、PpS_{52}、PbS_{29}、PpS_4、PpS_3，兴山 28 号（34）和兴山 40 号（36）无

杂交信号。寡核苷酸芯片检测杂交信号扫描结果中，除兴山 18 号（29）和杏花大银梨（46），其他 22 个品种杂交信号与 cDNA 芯片杂交信号一致。兴山 18 号 cDNA 芯片杂交信号显示含 PbS_{18} 和 PpS_{39} 基因，杏花大银梨含 PpS_{13} 和 PpS_{48}，但寡核苷酸芯片均无杂交信号（图 7）。

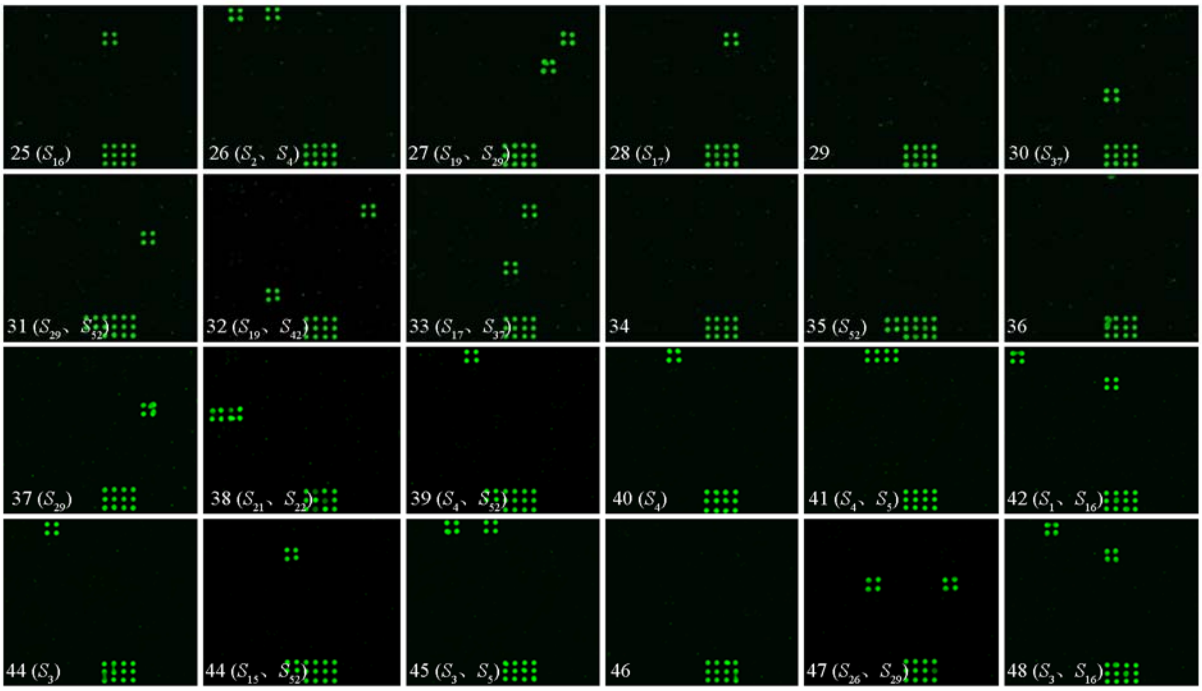

图 7　未知 S 基因型供试品种与寡核苷酸芯片杂交信号扫描

25～48 分别对应表 1 中的 24 个品种。29、34、36 和 46 *S* 无杂交信号。

Fig. 7　The scanning results of unknown *S*-genotype pear cultivars hybridized with the oligonucleotides microarray

The accession codes 25 to 48 are the same as those shown in Table 1. No *S*-RNase probe signal showed in microarray 29，34，36 and 46.

2.3　芯片检测信号不一致品种*S*基因的鉴定

S 基因 cDNA 芯片和寡核苷酸芯片并行检测的 24 个品种中，兴山 18 号（29）和杏花大银梨（46）扫描信号不一致。图 4 电泳检测显示两个品种 *S* 基因 PF / PR 特异扩增 DNA 片段均为单带。分别对其 PF/PR 特异 DNA 片段纯化回收，TA 克隆、测序后，发现兴山 18 号含 1 422 bp/1 426 bp 序列，杏花大银梨含 349 bp/362 bp 序列。GenBank 序列比对 1 422 bp 与 PbS_{18} 有最大同源性（99%），内含子 1 219 bp，比 PbS_{18} 内含子少 2 个碱基同时还有 3 个碱基差异，且有 2 个突变碱基部位包含于 S_{18} 寡核苷酸探针中，编码区碱基序列及 AA 序列相同，砂梨品种中未发现 S_{18}，可将兴山 18 号含 PF/R 特异序列 1 422 bp 的 *S* 基因命名为砂梨 S_{18}（*P. pyrifolia* S_{18}）；1 426 bp 序列与 PpS_{39} 基因同源性 99%，内含子 1 223 bp，比 PpS_{39} 内含子多 1 个碱基同时还有 13 个碱基的差别，编码区碱基序列及 AA 序列相同；杏花大银梨 349 bp/362 bp 分别与 PpS_{13} HV 区/PpS_{48}HV 区内含子有 3 个/2 个碱基不同，但编码区碱基序列完全一致，根据砂梨 S_{5a} 的命名方法（张琳，2008），兴山 18 号 1 426 bp 序列所属 *S* 基因可命名为 S_{39a}（*P. pyrifolia* S_{39a}），杏花大银梨 349 bp 序列命名为 S_{13a}（*P. pyrifolia* S_{13a}），362 bp 命名为 S_{48a}（*P. pyrifolia* S_{48a}）。最后确定兴山 18 号和杏花大银梨 *S* 基因型分别为 $S_{18(Pp)}S_{39a}$ 和 $S_{13a}S_{48a}$。综合芯片杂交结果，可确定 24 个未知 *S* 基因型品种（25～48 号）的 *S* 基因型芯片并行检测结果（表 2）。

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
25	$S_{16}S_X$	33	$S_{17}S_{37\,(Pp)}$	41	S_4S_5
26	S_2S_4	34	S_XS_X	42	S_1S_{16}
27	$S_{19}S_{29}$	35	$S_{52}S_X$	43	S_3S_X
28	$S_{17}S_X$	36	S_XS_X	44	$S_{15}S_{52}$
29	$S_{18\,(Pp)}S_{39a}$	37	$S_{29}S_X$	45	S_3S_5
30	$S_{37\,(Pp)}S_X$	38	$S_{21}S_{22}$	46	$S_{13a}S_{48a}$
31	$S_{29}S_{52}$	39	S_4S_{52}	47	$S_{26}S_{29}$
32	$S_{19}S_{42}$	40	S_4S_X	48	S_3S_{16}

3　讨论

本研究中以东方梨中已鉴定的 47 个序列完善的 *S* 基因为基础制备了梨 *S* 基因的 cDNA 检测芯片，用已知 *S* 基因型的梨品种与制备的 cDNA 芯片杂交检测芯片质量，芯片扫描结果显示阵列背景清晰，阵列 *S* 基因位点杂交信号与对应品种 *S* 基因型一致，同时阳性对照（*Actin*）出现杂交信号，阴性对照无杂交信号，说明探针与片基固定效果好并能与靶基因片段有效结合，制备的 cDNA 芯片可用于梨 *S* 基因的检测；补充了 *S* 基因寡核苷酸芯片探针内容，进一步完善了 *S* 基因寡核苷酸芯片结构并利用 *S* 基因 cDNA 芯片与寡核苷酸芯片成功并行检测了 24 个供试品种的 *S* 基因型，其中含已知 *S* 基因的品种杂交信号一致。前期研究（江南　等，2014）表明 *S* 基因寡核苷酸芯片能准确检测梨品种所含的已知 *S* 基因，*S* 基因 cDNA 芯片和寡核苷酸芯片对同一品种并行检测显示已知 *S* 基因探针杂交信号一致，说明 cDNA 芯片的准确性。利用两种 *S* 基因芯片并行检测可直接、快速、准确地鉴定梨品种的 *S* 基因型。

无论何种芯片，探针的制备及芯片杂交动力学分析是芯片制备和检测中的两个关键问题（Lipshutz et al.，1999）。cDNA 探针的制备通常采用 PCR 结合克隆的方法完成，全长基因 cDNA 探针因不同基因长度不一致导致杂交的条件不易控制（Kenichi & Akira，1999）。本研究中选择 *S* 基因 HV 区作为制备 cDNA 探针的备选区域，因为从已知梨 *S* 基因序列比对和现有绿色开花植物 *S* 基因研究文献表明 *S* 基因有着相同的结构，包含保守区（Conserved region）和高变区（HV 区），内含子包含于 HV 区中（Castillo et al.，2001），HV 区是 *S*-RNase 特异识别花粉配体的功能区，是 *S* 基因富有多态性的识别部位，不同 *S* 基因有 1 个至多个氨基酸序列的碱基差别（Ishimizu et al.，1996；张绍铃　等，2001，2002）。虽然各 *S* 基因全长长度不一，但 HV 区 cDNA 长度均在 194 ~ 200 bp 左右，所以 HV 区部位制备 cDNA 探针不仅确保各 *S* 基因 cDNA 探针的特异性，还可保证 cDNA 探针长度均一性，方便杂交条件控制，特别是杂交温度和杂交时间的控制。经过多次试验对杂交条件探索（另文报道）后选择用含 50%甲酰胺的杂交液（生工杂交液Ⅳ）与梨品种 cDNA 特异 PCR 产物和灭菌水等比例混合，杂交体系 42 ℃杂交 8 ~ 10 h，杂交结果表明用以上 cDNA 特异探针制备的 *S* 基因 cDNA 芯片检测梨品种 *S* 基因型，芯片信噪比较高，假阳性率低，各阵列探针杂交信号与 *S* 基因寡核苷酸芯片检测相应品种出现 *S* 基因探针杂交信号一致，同时具备较宽的杂交动力学范围（李亚莉　等，2002）。但由于 cDNA 探针较寡核苷酸探针（长度 32 bp）长，相对于 *S* 基因的寡核苷酸芯片检测 cDNA 芯片杂交时间相对较长，如何通过进一步优化杂交体系，适当缩短时间，提高杂交检测的效率，是 *S* 基因 cDNA 芯片下一步要完善的内容。

S 基因 cDNA 芯片和寡核苷酸芯片并行检测梨品种 *S* 基因型过程中，兴山 18 号和杏花大银梨两个品种出现了两种芯片杂交信号不一致现象，表现为 cDNA 芯片有较好的杂交信号而寡核苷酸芯片

无杂交信号。从芯片杂交原理分析存在以下情况：一是梨品种所含 *S* 基因 HV 区变异位点发生在内含子区域，包含于寡核苷酸探针设计部位，如兴山 18 号和杏花大银梨所包含的 *P. pyrifolia* S_{18}、S_{39a} 和 S_{13a}、S_{48a}；二是寡核苷酸探针设计部位跨 *S* 基因 HV 区外显子和内含子区域，内含子部分存在变异位点，芯片和品种 DNA 特异 PCR 产物杂交后，在同等洗脱条件下探针由于只有外显子部分序列完整结合而容易被洗脱，出现杂交信号弱或无杂交信号。而以上情况 HV 区 cDNA 序列（不包含内含子）稳定，因而 cDNA 芯片杂交信号好。这是寡核苷酸芯片检测梨品种 *S* 基因型的不足之处（江南 等，2014）。同时在这种变异位点发生在内含子区域情况下，若无寡核苷酸芯片杂交信号作为对照，单独根据 cDNA 芯片的杂交信号很容易出现错误判断，如兴山 18 号和杏花大银梨很容易误判 *S* 基因型分别为 $S_{18}S_{39}$ 和 $S_{13}S_{48}$，这也是 cDNA 芯片检测梨品种 *S* 基因的局限性。以上分析表明利用 cDNA 芯片和寡核苷酸芯片并行检测鉴定梨品种 *S* 基因型正好弥补了单独利用 cDNA 芯片或寡核苷酸芯片检测梨品种 *S* 基因的不足，利用两种芯片并行检测梨品种 *S* 基因，比较分析杂交信号，能保证利用 *S* 基因芯片快速检测的准确性和可靠性。

但不管是 *S* 基因 cDNA 芯片还是寡核苷酸芯片，都只能检测梨品种中所含已知的 *S* 基因，新的 *S* 基因只能根据芯片杂交信号推测其存在的可能性，这是两种 *S* 基因芯片并行检测梨 *S* 基因的不足之处。如本研究中的兴山 17 号 $S_{17}S_X$、兴山 21 号 $S_{37}S_X$、汉源雪花梨 $S_{16}S_X$、兴山 32 号 $S_{52}S_X$、罗田短柄梨 $S_{29}S_X$、白雪 S_4S_X、龙团梨 S_3S_X，这些品种可能为纯合子，也可能含有新 *S* 基因，需辅以酶切和 DNA 测序进行鉴定；对芯片检测无杂交信号或杂交信号不一致的品种，如兴山 28 号（S_XS_X）、兴山 40 号（S_XS_X）、兴山 18 号和杏花大银梨，对其 PF/R 特异片段回收纯化，直接进行 TA 克隆、DNA 测序和序列分析，可最终鉴定梨品种的 *S* 基因型。后续研究中将一方面根据芯片检测梨品种 *S* 基因型过程中出现的问题继续优化芯片内容和杂交条件，另一方面对检测过程中不断发现的新的 *S* 基因序列鉴定后设计和制备探针，不断完善芯片结构和芯片内容。

References

Castillo C，Takasaki T，Saito T，Yoshimura Y，Norioka S，Nakanishi T. 2001. Reconsideration of *S*-genotype assignments and discovery of a new allele based on *S*-RNase PCR-RFLPs in Japanese pear cultivars. Breeding Science，51 (1)：5 – 11.

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，Zhang Yu-yan，Wu Jun，Li Xiu-gen. 2007. Identifiction of *S*-genotypes of twelve pear cultivars by analysis of DNA sequence. Acta Horticulturae Sinica，34 (4)：853 – 858. (in Chinese)

衡　伟，张绍铃，张妤艳，吴　俊，李秀根. 2007. 12 个梨品种 *S* 基因型的鉴定. 园艺学报，34 (4)：853 – 858.

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，Sato Y，Saito T，Yoshimura Y，Norioka S，Nakanishi T，Sakiyama F. 1996. Identification and partial amino acid sequences of seven S-RNases associated with self-incompatibility of Japanese pear，*Pyrus pyrifolia* Nakai. Journal of Biochemistry，120 (2)：326 – 334.

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 Genel，98 (6 – 7)：961 – 967.

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，Zhang Lin，Deng Jing. 2014. Identifying pear cultivars *S*-genotypes using gene chips. Acta Horticulturae Sinica，41 (10)：1983－1992. (in Chinese)

江　南，谭晓风，张　琳，邓　靖. 2014. 利用基因芯片鉴定梨品种自交不亲和基因型. 园艺学报，41 (10)：1983－1992.

Kenichi K，Akira S. 1999. Probe design for DNA chips. Genome Informatices，10 (2)：225－226.

Li Ya-li，Chen Qin，Huang Jian-feng，Xu Hong，Li Yao. 2002. Study on the dynamics range and result reproducibility of DNA microarray experiment. Journal of Fudan University：Natural Science，41 (6)：698－703. (in Chinese)

李亚莉，陈　沁，黄建锋，许　宏，李　瑶. 2002. 对于基因芯片实验的动力学范围和结果可重复性的研究. 复旦学报：自然科学版，41 (6)：698－703.

Lipshutz R J，Fodor S P，Gingeras T R，Lockhart D J. 1999. High density synthetic oligonucleotide arrays. Nature Genetics，21 (Supl)：20－24.

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 5'th International Forum on Post-Genome Technologies（5'IFPT），9 (10－11)：62－65.

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，Tan Xiaofeng，Wuyun Tana. 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. 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，Tan Xiaofeng，Zhang Donglin，Yuan Deyi. 2009a. Pollen tube growth in compatible and incompatible pear genotypes. HortScience，44 (4)：1174.

Zhang Lin，Tan Xiaofeng，Zhang Donglin，Yuan Deyi. 2009b. Full length cDNA sequence of pear（*Pyrus bretschneideri* Rehd.）S_{29}-RNase and S_{29}-allele identification. HortScience，44 (4)：1088.

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 *PbS*$_{26}$*-RNase* gene in Chinese white pear（*Pyrus bretschneideri*）. The Scientific World Journal，http：//dx. doi. org/10. 1155/2014/147061：1－9.

Zhang Shao-ling，Hiratsuka S，Xu Guo-hua，Fang Jing-gui，Liu You-liang. 2001. Expression and possible role of S_4（S_4^{SM}）gene in the styles of self-incompatibile pear cultivars and its self-compatibile mutant. Acta Botanica Sinica，43 (11)：1172－1178. (in Chinese)

张绍铃，平塚伸，徐国华，房经贵，刘友良. 2001. 梨自交不亲和及其亲和突变品种花柱内 S_4（S_4^{SM}）基因的表达与作用的比较. 植物学报，43 (11)：1172－1178.

Zhang Shao-ling，Yang Ji-gun，Li Xiu-gen，Hiratsuka S，Wolukau J N. 2002. Differences of *S*-glycoprotein content in the styles among pear cultivars differing in self-incompatibile strength. Acta Horticulturae Sinica，29 (2)：165－167. (in Chinese)

张绍铃，杨记磙，李秀根，平塚伸，Wolukau J N. 2002. 梨自交不亲和强度不同品种花柱 *S* 糖蛋白含量的差异. 园艺学报，29 (2)：165－167.