

扁桃自交不亲和基因的多态性分析

马艳^{1,2} 马荣才²

(¹河北科技师范学院园艺系, 昌黎 066600; ²北京市农林科学院生物技术研究中心, 北京 100089)

摘要: 根据蔷薇科树种 S 基因的保守序列设计引物, 利用 PCR 技术对 8 个新疆扁桃品种 S 基因进行扩增, 获得了 10 个大小不同的 S 基因片段。测序结果表明, 这些 DNA 片段的核苷酸序列中都具有编码蔷薇科 S-RNase 5 个高度保守区域: C1、C2、C3、RC4、C5 的序列、编码高变区 (RHV) 的序列以及变异度很大的内含子序列, 并且其高变区和内含子序列具有扁桃 S 基因特异性。同源性分析表明, 获得的 10 个氨基酸序列与蔷薇科中李亚科 S-RNase 的氨基酸序列同源性达 67% ~ 96%, 扁桃与樱桃、杏应同属于李亚科。

关键词: 扁桃; 自交不亲和; S 基因; PCR; 序列

中图分类号: S 662.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2006) 01-0137-03

Analysis on Polymorphism of S Gene in Almond

Ma Yan^{1,2} and Ma Rongcai²

(¹Hebei Normal College of Science and Technical, Changli 066600, China; ²Beijing Agro-biotechnology Research Center, Beijing 100089, China)

Abstract: To investigate the characteristics of the S gene in almond, we degenerative primers according to conservative sequence of S gene in rosaceous plant and got 10 S gene fragments by PCR application from 8 almond cultivars in China. All sequences were aligned with S genes in GeneBank by BLAST software. The result indicated that all 10 fragments contained domain encoding 5 high conservation regions (C1, C2, C3, RC4, C5) and hypervariable region (RHV) of rosaceous S-RNase. RHV and intron characterized S gene furthermore. Homology analysis showed that the amino acid sequence between putative peptides from above S gene fragments and that from S-RNase of rosaceous plant were 67% - 96% of homology. Almond should be assigned to plum subspecific groups with cherry and apricot.

Key words: Almond; Self-incompatibility; S gene; PCR; Sequence

1 目的、材料与方法

扁桃 (*Amgdalus communis* L.) 是典型的配子体自交不亲和树种, 生产中需要合理配置授粉树或人工授粉。我们克隆并测序了部分扁桃优良品种的自交不亲和基因片段, 希望通过对扁桃自交不亲和基因进行研究, 能够在分子水平上了解自交不亲和的机理, 鉴定 S 基因型, 为生产上合理配置授粉树、克服自交不亲和性带来的减产问题提供理论依据。

材料取自新疆喀什地区莎车县二林场品种资源圃 8 个扁桃品种: 矮丰, 大巴旦, 多果, 寒丰, 黄双, 双仁薄壳, 晚丰, 尖嘴黄。选取健壮、无病虫害的枝条 (带有新萌发的嫩叶) 插入吸水的海绵中放入保鲜袋, 扎紧袋口, 竖立放在自制的冰盒里, 24 h 内运回实验室。将枝条上的嫩叶去柄剪下、洗净, 用吸水纸吸干叶面水分后放入保鲜袋中 - 70 保存。

基因组 DNA 的提取采用经过改进的 CTAB 法。根据蔷薇科 S 基因的保守序列设计引物, 由上海生工生物工程公司合成。引物序列为: 5'-CARTTYGTBCARCARTGGCC-3'; 5'-CTATG-

收稿日期: 2005 - 06 - 03; 修回日期: 2005 - 11 - 28

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30170649)

GCAAA GTAA TTA TTCAACCC-3'; 5'-TACCACTTCA TGTAACAACTG-3'; 5'-TGTTTGTTCATTTCG-CYTCCCC-3'.

PCR反应体系为: 10 × PCR Buffer 5 μL, MgCl₂ (25 mmol · L⁻¹) 5 μL, dNTP (10 mmol · L⁻¹) 1 μL, Lower (25 μmol · L⁻¹) 1 μL, Upper (25 μmol · L⁻¹) 1 μL, DNA (100 ng · μL⁻¹) 5 μL, ddH₂O 31.2 μL, TaqDNA 酶 (3 U · μL⁻¹) 0.8 μL, 总体积 50 μL。循环条件: 94 2 min; 循环中: 94 1 min, 退火 58 1 min, 72 2 min, 共计 35个循环; 72 延伸 10 min。反应在 Perkin-Elmer thermocycler 2000 PCR 仪上进行。

将 PCR 扩增产物回收纯化后分别与 pUCmT 载体连接, 转化 DH5 菌株, 蓝白斑筛选阳性克隆, 提质粒, 酶切鉴定正确的克隆进行序列分析。将序列在 Genebank 进行 BLASTx 搜索, 对其编码的氨基酸序列进行同向排列, 用 DNASTar 4.05 进行序列的对比。

采用距离系数法中的邻接法 (neighbor joining method), DNASTar 4.05 中的 Clustal Method 进行系统树的构建。

2 结果分析与讨论

2.1 扁桃 S 基因的特异性扩增、测序及序列分析

为了研究扁桃的自交不亲和基因, 作者根据蔷薇科果树自交不亲和基因的保守序列设计引物, 以寒丰、黄双、双仁薄壳、尖嘴黄、晚丰、矮丰、多果、大巴旦 8 个扁桃品种基因组 DNA 为模板, 进行 PCR 扩增得到 10 个大小不同的片段 (图 1)。将这些片段进行克隆测序 (表 1)。

从所得序列推导其产物的氨基酸序列并进行分析发现, 分离的 10 个 S 基因片段编码的氨基酸序列含有 5 个高度保守的结构域: C1、C2、C3、RC4 和 C5, 许多不定的位点被划分为高变区 (RHV), 并且这 10 个 S 基因片段高变区和内含子序列具有 S 特异性。在 5 个不同区域中有 31 个完全保守位点。

用 BLAST 软件, 将所得的 S 基因片段编码的氨基酸序列与 NCBI 网站蛋白质数据库中的 S-RNase 氨基酸序列进行比较发现, 这 10 个 S 基因片段编码的氨基酸序列与其它蔷薇科果树 S-RNase 基因同源性在 67% ~ 96% 之间 (表 2)。我国扁桃品种大巴旦 S 基因编码的氨基酸序列与国外扁桃 *Prunus dulcis* S 基因同源性为 96%, 说明蔷薇科李属植物扁桃、杏、甜 (酸) 樱桃 S-RNase 基因有着相同的进化机制和共同的起源。

2.2 扁桃与其他蔷薇科树种的亲缘关系分析

将本研究中所得到的 10 个基因与目前蔷薇科中已知的 S-RNase 进行比较, 构建系统进化树如图 2 所示。这些物种通过 S-RNase 进行分类可分为两大类: 苹果亚科和李亚科, 与常用传统分类

表 1 我国扁桃 8 个品种的 10 个 S-RNase 基因

Table 1 10 new S-RNase genes of 8 almonds in China

品种 Cultivars	定名 Denomination	片段大小 The fragment of length (bp)	登录号 GenBank accession No.
矮丰 Aifeng	S51-RNase	997	AY613338
大巴旦 Dabadan	S52-RNase	1 713	AY613339
大巴旦 Dabadan	S53-RNase	2 021	AY613340
多果 Duoguo	S54-RNase	775	AY613341
多果 Duoguo	S55-RNase	1 685	AY613342
寒丰 Hanfeng	S56-RNase	775	AY613343
黄双 Huangshuang	S57-RNase	787	AY613344
双仁薄壳 Shuangren Baoke	S59-RNase	1 359	AY613346
晚丰 Wanfeng	S60-RNase	973	AY613347
尖嘴黄 Jianzuihuang	S64-RNase	992	AY613920

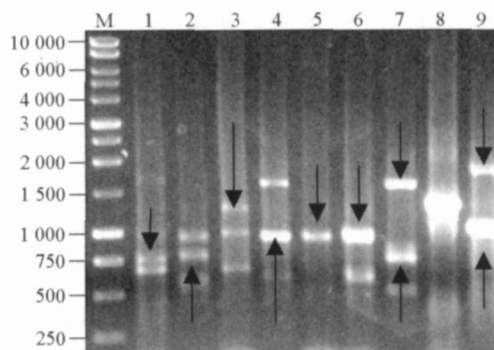


图 1 扁桃 S-RNase 基因扩增产物的 0.8% 琼脂糖凝胶电泳结果
M: 1 kb 分子量标准; 1. 寒丰; 2. 黄双; 3. 双仁薄壳; 4. 尖嘴黄; 5. 晚丰; 6. 矮丰; 7. 多果; 8. 未采用品种; 9. 大巴旦。

Fig. 1 0.8% agarose gel electrophoresis of S-RNase genes amplified product of almond

M: 1 kb molecular marker; 1. Hanfeng; 2. Huangshuang; 3. Shuangren Baoke; 4. Jianzuihuang; 5. Wanfeng; 6. Aifeng; 7. Duoguo; 8. A non-adopted cultivar; 9. Dabadan

结论相同。从此系统树中可以看出,扁桃和杏、樱桃亲缘关系比较近,同属于李亚科。亚科内 S-RNase 的相似性 (99.5%) 比亚科间的相似性 (10.4%) 高。在进化系统树中,蔷薇科 S-RNase 形成专一性亚科亚种,但没有形成专一性种,两个亚科的 S-RNase 可能是一个共同祖先,因为它们都有蔷薇科特有的保守区域 RC4。

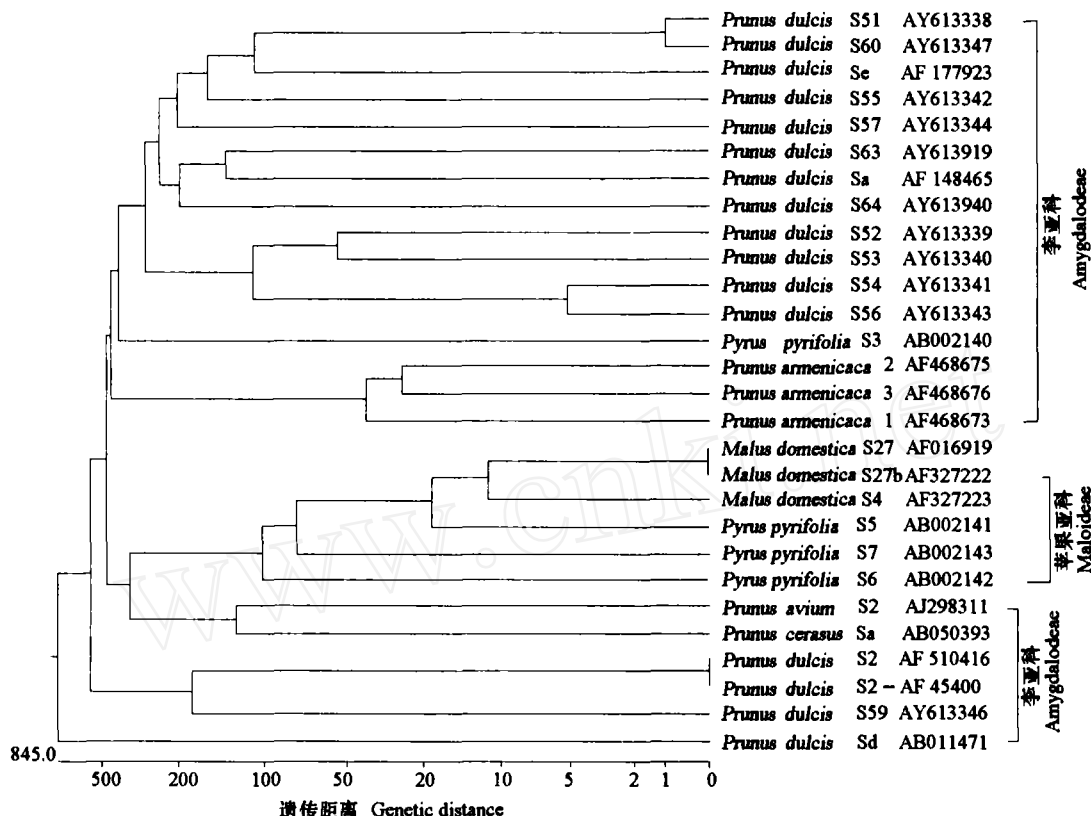


图 2 蔷薇科中系统树的构建

Fig 2 Neighbour-joining genetic tree of Rosaceae S-RNase

2.3 讨论

扁桃生产中受粉树配置不当是造成产量低的一个重要原因,为了合理配置受粉树就必须正确鉴定 S 基因型。目前鉴定 S 基因型所用方法主要是利用 S 等位基因专一的 PCR 与限制性内切酶分析结合,从 DNA 水平上鉴定 S 基因型^[2,3]。这一方法利用已经具有的 S-RNase 基因序列,设计专一的 PCR 引物,并且对 PCR 产物进行序列专一的内切酶分析,其前提是要克隆有关的基因,然后才能研究这些基因的组合。目前我国扁桃 S 基因的等位基因的数量和组成还不清楚,还没有分子水平的鉴定 S 基因的方法。为了有效确定鉴定我国扁桃等位基因的方法还需要做大量细致的工作。

参考文献:

- 张绍铃, 房经贵, 杨记琛. 果树自交不亲和性的遗传与生理机制及其研究. 果树学报, 2001, 18 (1): 49 ~ 52
Zhang S L, Fang J G, Yang J G. Study on the genetics of the fruit self-incompatibility and its physiological mechanism. Journal of Fruit Science, 2001, 18 (1): 49 ~ 52 (in Chinese)
- Ma R C, Oliveira M M. Molecular cloning of the self-incompatibility genes S1 and S3 from almond (*Prunus dulcis* cv. Ferragnes). Sex Plant Reprod, 2001, 14: 163 ~ 167
- Ma R C, Oliveira M M. Molecular identification of S-genotypes of almond (*Prunus dulcis*). Acta Horticulturae, 2001, 546: 575 ~ 580