园 艺 学 报 2006, 33 (3): 496～500
Acta Horticulturae Sinica

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

张妤艳 吴 俊 衡 伟 张绍铃 *
(南京农业大学园艺学院, 江苏南京 210095)

摘 要: 根据梨 *S*基因高度保守区 C1和 C3区, 设计 1对引物 P1和 P2, 对梨品种的基因组 DNA进行 *S*基因特异扩增、克隆、测序, 并在 GenBank中 BLAST比较, 确定 *S*基因特异性片段, 对京白梨等 6个供试自交不亲和品种的 *S*基因型比对结果为: 白梨中的'库尔勒香梨'为 $S_{21}S_{28}$, '苹果梨'为 $S_{17}S_{19}$; 砂梨中的'台湾蜜梨'为 $S_{11}S_{22}$; 西洋梨中的'葫芦梨'为 S_aS_b; 秋子梨中的'京白'为 $S_{16}S_{30}$, '早梨 18'为 S_4S_{28}。其中 S_{28}和 S_{30}为首次登录的新 *S*基因, 在 GenBank的登录号分别为 AY562394 (库尔勒香梨) 和 AY876945 (京白)。

关键词: 梨; 自交不亲和性; *S*基因; *S*基因型鉴定
中图分类号: S 662. 1; Q 78 **文献标识码**: A **文章编号**: 0513-353X (2006) 03-0496-05

Identification of S-Genotypes of Pear Cultivars and Analyses of Nucleotide Sequences of S_{28}-RNase and S_{30}-RNase

Zhang Yuyan, Wu Jun, Heng Wei, and Zhang Shaoling*
(College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu 210095, *China)*

Abstract: Partial *S*-RNase genes of pear were amplified and cloned by using a pair of primers (P1 and P2) based on the conserved regions C1 and C3 of pear *S*-RNase structure in six cultivars of unknown *S*-geontypes The PCR products were sequenced and compared in GenBank The S-genotypes of the six tested self-incompatible cultivars were identified as follows: 'Kuerle Xiangli' (*Pyrus bretschneideri* Rehd) was $S_{21}S_{28}$, 'Pingguoli' (*P. bretschneideri* Rehd) was $S_{17}S_{19}$, 'Taiwan Mili' (*P. pyrifolia* Nakai) was $S_{11}S_{22}$, 'Hululi' (*P. communis* L.) was S_aS_b, 'Jingbai' (*P. ussriensis* Max) was $S_{16}S_{30}$, 'Zaoli 18' (*P. ussriensis* Max) was S_4S_{28}. S_{28}-RNase and S_{30}-RNase were deposited in GenBank under the accession numbers of AY562394 and AY876945.

Key words: *Pyrus*; Self-incompatibility; *S*-RNase gene; *S*-genotyping

蔷薇科植物属于配子体型自交不亲和性类型, 受单一位点 (*S*-locus, *S*位点) 的复等位基因 (*S*-allele or *S*-gene, *S*基因) 控制, 当花粉的 *S*等位基因与花柱中两个 *S*等位基因之一相同时, 花粉管在花柱中的生长会受到抑制, 从而无法完成受精而表现出自交不亲和性。

植物自交不亲和 (self-incompatibility, SI) 对于植物自身适应自然、保持种质的遗传变异优势以及杂交种子的生产等方面具有有利的一面, 但是对于果树生产则必须合理配置授粉品种或花期人工辅助授粉, 才能获得稳定的产量和品质。目前多数梨园授粉品种的确定主要是以田间授粉坐果率的多少或经验来确定的, 田间人工授粉坐果率的确定需要多数品种的杂交组合和多年的实践, 耗物费时。而依据不同 *S*基因型品种间能够相互授粉的原理来鉴定梨品种的 *S*基因型, 确定授粉品种是省工高效的方法。因此, 鉴定自交不亲和性果树品种的 *S*基因型是一项十分重要的基础性工作。鉴定果树品种 *S*

收稿日期: 2005 - 06 - 26; **修回日期**: 2005 - 09 - 06
基金项目: 国家自然科学基金项目 (30270926); 高校博士学科点专项科研基金项目 (2001030701); 中国博士后科学基金项目 (2005037740); 江苏省博士后科研基金资助项目 (2005)
* **通讯作者** Author for correspondence (E-mail: nnzsl@njau. edu. cn)

基因型的方法很多，如田间授粉坐果率的高低，授粉花柱离体培养法[1]，花柱 S糖蛋白电泳分析法[2,3]等等，随着梨 S基因的 cDNA序列的克隆，根据 S基因保守区 C1和 C3区的核酸序列设计引物，对叶片基因组 DNA特异性地扩增，能够正确快速地反映品种的 S基因型，而且取样简便，用少量幼嫩叶片即可[4,5]。因此，该方法还被广泛用于鉴定其他果树品种的 S基因型，包括苹果，果梅，樱桃，李等〔6~9〕。

迄今鉴定并报道已知 S基因型的梨品种绝大多数为日本梨，对于我国主栽的中国梨品种的 S基因型报道极少[10]。本研究通过对叶片基因组 DNA特异性扩增、克隆、测序，鉴定不同品种 S基因型，并克隆新的 S基因，不仅为大量鉴定我国梨品种 S基因型提供技术平台，为合理配置授粉树提供科学依据，也为丰富 S基因的遗传信息，深入开展自交不亲和遗传机制研究奠定基础。

1　材料与方法

1.1　植物材料

试样采自中国农业科学院郑州果树研究所梨品种园，供试品种为‘库尔勒香梨’、‘苹果梨’、‘葫芦梨’、‘早梨 18’、‘台湾蜜梨’、‘京白’6个未知 S基因型的梨品种 (表 1)。春季采集新梢幼嫩叶片 2 g左右，用清水洗涤去除污物，液氮速冻后于 - 70℃冷冻保存。

1.2　基因组 DNA提取

基因组 DNA的提取主要采用改良的 CTAB法。经 1%琼脂糖凝胶电泳检测后，将 DNA于 - 20℃贮存备用。

1.3　引物设计

梨 S基因由 5个保守区、一段高变区 (hyper variable region, HV)以及一段内含子序列组成，其中 HV区被认为是与花粉识别的部位。本试验中根据已发表的梨 S基因的保守序列 C1区和 C3区设计合成引物 P1和 P2[5] (其中包括 HV区)。引物由上海博亚生物技术有限公司合成。引物序列分别为：P1:‘FTQQYQ’(5'-TTTACGCAGCAATATCAG-3'), P2:‘IWPNV’〔5'-AC (A/G) TTCGGCCAAATAATT-3'〕。

1.4　S基因特异性 PCR扩增

用提取的基因组 DNA为模板，PCR扩增体系为 dNTP 0.2 mmol·L^{-1}, P1 0.5 μmol·L^{-1}, P2 0.5 μmol·L^{-1}, $MgCl_2$ 1.5 mmol·L^{-1}, Taq酶 1～1.5 U。反应循环参照 Ishimizu的方法[5]。反应结束后，1.5%的琼脂糖凝胶电泳 1.5 h，检测 PCR扩增产物。

1.5　S基因扩增片段的回收、克隆、测序

通过 4%聚丙烯酰胺凝胶电泳回收目的条带，参照张峰等[11]的方法进行。用相同引物和反应条件进行再次扩增，扩增产物与克隆载体连接克隆，方法见文献〔12〕，取 1 μL菌液 PCR，用 1.5%的琼脂糖电泳检测 PCR产物，目的片段由上海博亚生物技术有限公司测序。

1.6　在 GenBank中特异片段序列分析及 S基因型确定

利用 Blast软件进行同源性序列检索，用 DNAman软件进行同源性比较。

将测序结果在 GenBank上搜索，把同源性最高 (98%以上)的基因确定为该基因的名称，从而确定被检测梨品种的 S基因型。

2　结果与分析

2.1　梨不同 S基因型品种 PCR产物电泳图的差异

从图 1可以看出，‘台湾蜜梨’的扩增产物表现为一条带，位于 300～400 bp之间，而其他 5个品种均有两条扩增条带，基本位于 300～500 bp之间。‘葫芦梨’和‘苹果梨’在琼脂糖凝胶上表现出相似的条带位置，仅从分子量大小判断，似乎应该为相同的基因型，在已报道的日本梨品种 S_1～S_7

的 7个 S基因中，除 S_2基因在 1 300 bp左右外，其他均在 360 bp左右，仅靠琼脂糖电泳无法明确其 S基因型，且易造成错误判断，需采用聚丙烯酰胺凝胶电泳进行进一步试验。

2.2 S基因型的鉴定

将 PCR扩增产物聚丙烯酰胺凝胶电泳后回收、克隆并测序，在 GenBank中与已登录的 S基因的核酸序列比较同源性，在确定特异扩增片段 S基因的核酸序列和大小的基础上，对比基因库各个已知 S基因序列，确定供试品种的 S基因型 (表 1)。

表 1 6个梨品种的 S基因型

Table 1 S genotypes of six pear cultivars

品种 Cutivars	系统 System	S等位基因扩增带型 PCR bands(bp)	根据序列确定的 S基因型 S geno-types by sequences
葫芦梨 Hululi	西洋梨 *P. communsis* L.	345, 441	S_aS_b
台湾蜜梨 Taiwan Mili	砂梨 *P. pyrifolia* Nakai	345, 367	$S_{11}S_{22}$
京白 Jingbai	秋子梨 *P. ussriensis* Max	345, 309	$S_{16}S_{30}$
早梨 18 Zaoli 18	秋子梨 *P. ussriensis* Max	370, 427	S_4S_{28}
库尔勒香梨 Kuerle Xiangli	白梨 *P. bretschneidieri* Rehd.	336, 427	$S_{21}S_{28}$
苹果梨 Pingguoli	白梨 *P. bretschneidieri* Rehd.	342, 446	$S_{17}S_{19}$

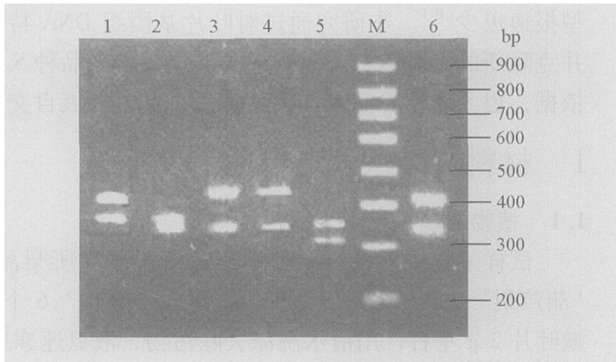

图 1 梨品种 S基因特异扩增的 2%琼脂糖凝胶电泳图

1. 早梨 18; 2. 台湾蜜梨; 3. 葫芦梨; 4. 苹果梨; 5. 京白; 6. 库尔勒香梨; M. Gene Ruler™ 100 bp DNA ladder plus。

Fig. 1 The 2% agarose gel electrophoresis of PCR amplification of genomic DNA with S gene specific primers on pear cultivars

1. Zaoli 18; 2. Taiwan Mili; 3. Hululi; 4. Pingguoli; 5. Jingbai; 6. Kuerle Xiangli; M. Gene Ruler™ 100 bp DNA ladder plus

各个品种 S基因的核苷酸序列间有较高的同源性，'早梨 18'中核苷酸数目为 370 bp的 S基因与 S_4同源性为 99%，'台湾蜜梨'中核苷酸数目为 345 bp的 S基因与 S_{11}同源性为 99%，'京白'中核苷酸数目为 345 bp的 S基因与 S_{16}同源性为 100%，'苹果梨'中核苷酸数目为 342 bp的 S基因与 S_{17}同源性为 99.42%，'苹果梨'中核苷酸数目为 446 bp的 S基因与 S_{19}同源性为 100%，'库尔勒香梨'中核苷酸数目为 336 bp的 S基因与 S_{21}同源性为 99.41%，'台湾蜜梨'中核苷酸数目为 367 bp的 S基因与 S_{22}同源性为 100%，'葫芦梨'中核苷酸数目为 345 bp的 S基因与 S_a同源性为 100%，'葫芦梨'中核苷酸数目为 441 bp的 S基因与 S_b同源性为 98%，其中'早梨 18'中的一条核苷酸数目为 427 bp的 S基因与作者登录的 S_{28}同源性为 99.53%，则为同一个基因。

2.3 两个新 S基因 (S_{28}、S_{30}) 的核苷酸序列

本研究发现了两个新的基因 S_{28}和 S_{30}，在 GenBank上的登录号分别为：AY562394 (库尔勒香梨) 和 AY876945 (京白) (图 2)。

2.4 梨 S基因的核苷酸序列的种间比较

目前我国主栽的梨品种主要来自于白梨、秋子梨、西洋梨、砂梨、新疆梨等种，其中除属于欧洲种群的西洋梨原产地不在中国外，其他 4个种均属于东亚种群，原产于中国。根据分类学研究认为，新疆梨、白梨、砂梨、秋子梨种亲缘关系较近，其中白梨与砂梨关系更近，西洋梨与这 4个种亲缘关系较远。从不同栽培梨种的 S-RNase的核苷酸序列同源性比较发现，'早梨 18'(秋子梨) 和'库尔勒香梨'(白梨) 中碱基数目同为 427 bp的扩增条带的同源性极高，达 99.53%，而'葫芦梨'(西洋梨)、'台湾蜜梨'(砂梨) 和'京白'(秋子梨) 中碱基数目为 345 bp的扩增条带的同源性仅为 88.22%。因此，认为白梨与秋子梨的亲缘关系很近。

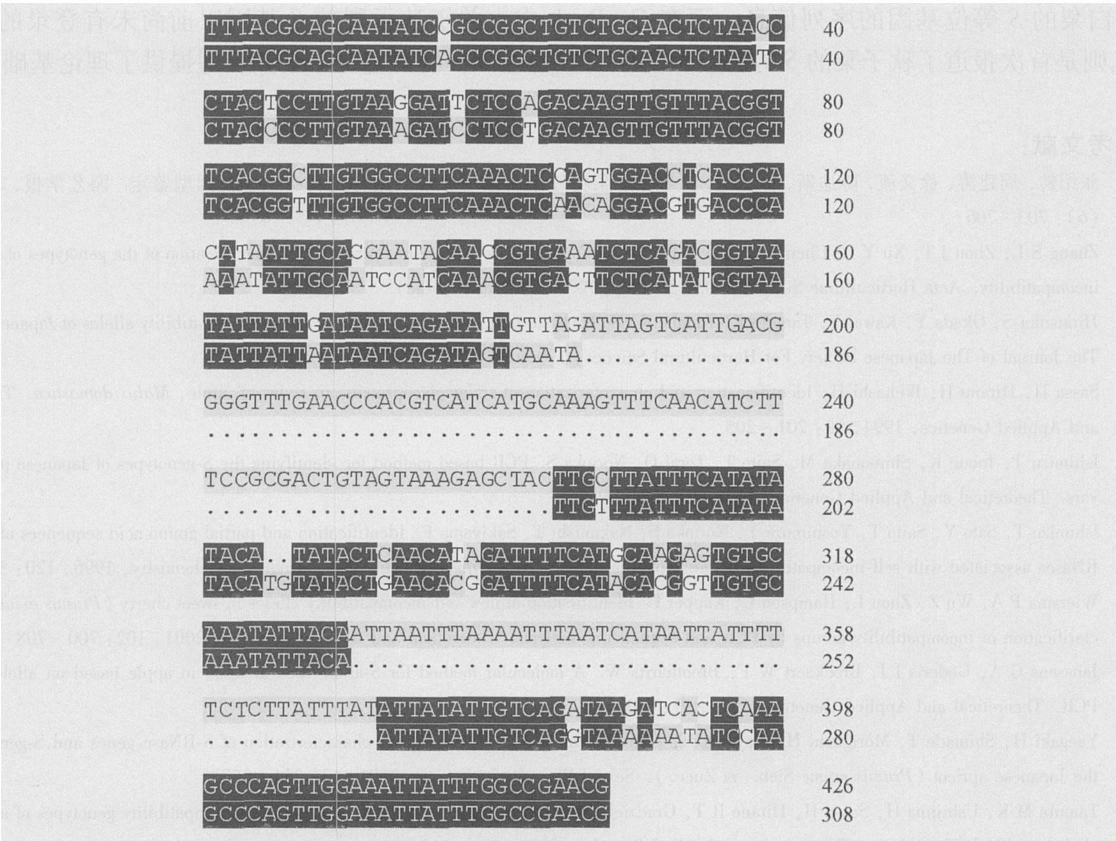

图 2　'库尔勒香梨'(上) 和'京白'(下) S_{28}和 S_{30}基因的核苷酸序列 (部分序列)

黑色阴影表示相同的核苷酸，灰色阴影表示有差异的核苷酸。

Fig. 2　The nucleotide acid sequences of S_{28} (Kuerle Xiangli, up) and S_{30} (Jingbai, down)

The black shadowed alphabets stand for the same nucleotide.

3　讨论

我国是梨的主要起源地，品种众多，含有丰富的基因资源，但目前对于中国梨品种 *S*基因型的报道极少[12]。本研究应用特异引物扩增的方法鉴定了几个梨品种的 *S*基因型，发现了两个新的 *S*基因，并总结出了一系列梨品种 *S*基因型鉴定的技术方法，不再采用传统的田间授粉方法或复杂的蛋白电泳法，就可以迅速的鉴定梨的基因型，为生产实践提供方便。

供试的梨品种除新疆梨尚未涉及外，几个主要种至少有一个梨品种的 *S*基因型被鉴定出来，其中，西洋梨和秋子梨均是首次报道 *S*基因型。并且各个种间的 *S*基因并非独立存在，各个种间的 *S*基因相似性较高，如秋子梨的扩增条带也见于白梨系统，而砂梨的扩增条带与白梨 (如库尔勒香梨) 鉴定出来的 S_{28}的同源性为 99%以上，结果与作者预想的各个种间的 *S*基因是独立的观点相矛盾，实际上秋子梨、砂梨与白梨存在共同的 *S*基因，这可能与它们的亲缘关系远近有关，但也不排除其他种存在同样的基因。从系统进化的角度看，*S*-RNase的进化与梨的系统发育不同步，可能在梨系统分化后期形成。目前，关于 *S*-RNase基因的进化存在两种学说，一种学说认为自交不亲和 (SI) 是在物种进化后期形成的，由于亲缘关系近的科并不都具有共同的 SI系统，以及同样的 SI系统可以在不同的科中出现，因此 SI是经过多次独立进化产生的[13]；另一种学说认为各种 SI是由一个共同的祖先即具有 *S*-RNase功能的双子叶植物进化而来[14]。本研究结果发现 *S*-RNase的多态性并不与梨的分类学相一致，而是梨自身系统的发育可能早于 *S*-RNase系统的分类，所以比较倾向于前一种的学说。

在对中国梨品种 *S*基因型鉴定过程中，发现了两个新的 *S*基因，分别为 S_{28}和 S_{30}，S_{28}的发现丰富

了白梨的 S等位基因的序列信息，而在 GenBank中，关于秋子梨的 S基因以前尚未有登录的基因，S_{30}则是首次报道了秋子梨的 S等位基因的序列，为进一步研究自交不亲和机理提供了理论基础。

参考文献：

1 张绍铃，周建涛，徐义流，陈迪新，徐国华，吴桂法. 梨花柱半离体培养法及品种自交布亲和基因型鉴定. 园艺学报，2003，30（6）：703～706

Zhang S L，Zhou J T，Xu Y L，Chen D X，Xu G H，Wu G F. Semi vitro culture of pear style and identification of the genotypes of pear self-incompatibility. Acta Horticulturae Sinica，2003，30（6）：703～706（in Chinese）

2 Hiratsuka S，Okada Y，Kawai Y，Tamura F，Tanabe K. Stylar basic proteins corresponding to 5 self-incompatibility alleles of Japanese pears. The Journal of The Japanese Society For Horticultural Science，1995a，64：471～478

3 Sassa H，Hirano H，Ikehashi H. Identifiacation and characterization of stylar glycoproteins in styles of apple, *Malus domastica*. Theoretical and Applied Genetics，1994，89：201～205

4 Ishimizu T，Inoue K，Shimonaka M，Saito T，Terai O，Norioka S. PCR based method for identifying the *S*-genotypes of Japanese pear cultivars. Theoretical and Applied Genetics，1999，98：961～967

5 Ishimizu T，Sato Y，Saito T，Yoshimura Y，Norioka S，Nakanishi T，Sakiyama F. Identification and partial amino acid sequences of seven *S*-RNases associated with self-incompatibility of the Japanese pear *Pryrus pyriforia* Nakai. The Journal of Biochemistry，1996，120：326～334

6 Wiersma P A，Wu Z，Zhou L，Hampson C，Kappel F. Identification of new self-incompatibiltiy alleles in sweet cherry（*Prunus avium* L）and clarification of incompatibility groups by PCR and sequencing analysis. Theoretical and Applied Genetics，2001，102：700～708

7 Janssens G A，Goderis I J，Brockaert W F，Broothartts W. A molecular method for *S*-allele identification in apple based on allele-specific PCR. Theoretical and Applied Genetics，1995，91：691～689

8 Yaegaki H，Shimade T，Moriguehi H，Hayama H，Haji T，Yamaguchi M. Molecular characterization of *S*-RNase genes and S-genotypes in the Japanese apricot（*Prunus mume* Sieb. et Zucc.）. Sexual Plant Reproduction，2001，13：251～257

9 Tamura M K，Ushijima H，Sassa H，Hirano R T，Gradziel T M，Dandekar A M. Identification of self-incompatibility genotypes of almond by allele-specific PCR analysis. Theoretical and Applied Genetics，2000，101：344～349

10 徐国华，吴华清，张绍铃. 中国梨品种 S基因型鉴定的初步研究. 西北植物学报，2004，24（10）：1861～1865

Xu G H，Wu H Q，Zhang S L. Study on identification of *S*-genotypes of Chinese pear cultivars. Acta Bot. Boreali-Occident. Sin.，2004，24（10）：1861～1865（in Chinese）

11 张 峰，宋文芹，李 凌，李秀兰，陈瑞阳. 利用 AFLP-银染法筛选与抗甘蓝黑腐病性状连锁的分子标记. 南开大学学报（自然科学），1999，32（3）：177～181

Zhang F，Song W Q，Li L，Li X L，Chen R Y. Isolation of the DNA markers linked to the cabbage black rot（*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*）resistanceusng AFLP-silver staining method. Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Nankaiensis，1999，32（3）：177～181（in Chinese）

12 Joseph Sambrook，David W. Russell. Molecular cloning: A laboratory manual. 3rd ed. New York：Cold Spring Harobor Labortary Press，2002. 1217～1265

13 Bateman A J. Self-incompatiibility in angiosperms：I Theory. Heredity，1952，6：285～310

14 Igic B，Kohn J R. Evolutionary relationships among self-incompatiibility RNases. Pvoceedings of the National Academy of Sciences，2001，23：13167～13171