

文章编号: 1000-5692(2007)06-0654-07

5个中国砂梨品种S基因型的确定

曾艳玲¹, 谭晓风¹, 张党权¹, 曾晓峰¹, 李秀根², 刘先雄³

(1. 中南林业科技大学 经济林育种与栽培国家林业局重点实验室, 湖南 长沙 410004; 2. 中国农业科学院 郑州果树研究所, 河南 郑州 450009; 3. 蓝山金地开发有限公司, 湖南 蓝山 425800)

摘要: 果树雌蕊自交不亲和基因(S基因)产物能降解具有相同S基因型的花粉管核糖核酸, 导致自然授粉结实率低, 果实品质差。确定不同梨品种S基因型, 为配置授粉树和杂交育种提供重要科学依据, 并为遗传改良梨品种奠定基础。实验以5个砂梨*Pyrus pyrifolia* 品种基因组脱氧核糖核酸为实验材料, 根据S基因一级结构特征, 设计合成特异引物, 采用PCR-RFLP系统检测和TA克隆测序等方法, 分离鉴定了这些品种扩增片段大小差异很小的2条S基因, 确定了它们的S基因型, 分别为晶玉*Pyrus pyrifolia* ‘Jingyu’ S₄S₂₄, 金水2号*P. pyrifolia* ‘Jinshui No. 2’ S₃S₂₁, 新雅*P. pyrifolia* ‘Xinya’ S₄S₂₄, 西子绿*P. pyrifolia* ‘Xizilv’ S₄S₁₃, 青魁*P. pyrifolia* ‘Qingkui’ S₁S₁₃, 并且对各品种测序结果进行了初步的生物信息学分析。图4 表1 参27

关键词: 园艺学; 砂梨; S基因型; 分离鉴定

中图分类号: S718.46; Q943.2 **文献标志码:** A

梨为蔷薇科Rosaceae 苹果亚科Maloideae 梨属*Pyrus* 植物, 受自交不亲和基因(S基因)的影响, 需要选育配置适宜的授粉树或采用亲和花粉进行人工授粉才能结果或提高产量^[1]。因此, 确定梨的S基因型不仅可以为梨栽培授粉品种提供科学依据, 也能为梨品种的遗传改良, 特别是杂交育种, 奠定基础。20世纪初, 日本学者开始研究日本砂梨*Pyrus serotina* 自交不亲和性, 通过大量的田间杂交试验, 发现了7个S等位基因^[2], 随后他们采用cDNA文库筛选、IEF-PAGE和PCR-RFLP等生物技术又分离鉴定了2个S等位基因, 并得到了S₁~S₉等位基因的全长cDNA序列^[3~7], 确定了近70个品种的S基因型^[8]。21世纪初, 中国和韩国也相继开展梨自交不亲和性研究。现已从韩国砂梨中分离鉴定了S₁₀等位基因^[9], 从中国的白梨*Pyrus bretschneideri*, 砂梨*P. pyrifolia* 和秋子梨*P. ussuriensis* 中分离鉴定了S₁₁~S₄₂共32个S等位基因^[8,10~16], 均已登录GenBank, 确定了近200个品种的S基因型^[8,10~18]。笔者采用PCR-RFLP分析及测序的方法确定了5个中国砂梨品种的S基因型。现将结果报道如下。

收稿日期: 2006-12-07; 修回日期: 2007-08-20

基金项目: 国家林业重点科学技术研究计划林业新技术开发与储备专项(2006-12); 湖南省科技三项基金资助项目(00JZYZ115)

作者简介: 曾艳玲, 助教, 从事植物分子生物学研究。E-mail: zyl225_2000@sina.com。通信作者: 谭晓风, 教授, 博士, 从事经济林栽培育种和林业生物技术研究。E-mail: tanxiaofen@ yahoo.com.cn

1 材料和方法

1.1 材料

晶玉 *Pyrus pyrifolia* ‘Jingyu’，金水2号 *P. pyrifolia* ‘Jinshui No. 2’ 采自中国农业科学院郑州果树研究所；新雅 *P. pyrifolia* ‘Xinya’，西子绿 *P. pyrifolia* ‘Xizilv’，青魁 *P. pyrifolia* ‘Qingkui’，采自湖南永州蓝山金地开发有限公司梨园。5月，采集新抽出的嫩叶1~3 g，储存于液氮中，带回实验室后于-75℃超低温冰箱中保存备用。

大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5α 为中南林业科技大学经济林育种与栽培国家林业局重点实验室保存菌种，*Taq* DNA 聚合酶购自TAKARA 公司，GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Hus 购自Fermentas 公司。PCR 产物回收试剂盒为安比奥生物技术有限公司的Puprep Gel Extraction Kit (Spin Column)，T载体为上海申能博彩生物科技有限公司的pUCmT Vector，引物由上海博亚生物技术有限公司合成。

1.2 基因组DNA 抽提及纯化

梨的基因组DNA 抽提主要参考较适合梨叶片基因组提取的改良CTAB 法^[19 20]。因特异引物序列设计相对较长，进行PCR 扩增时对模板基因组DNA 纯度要求较高，因此本实验在提取基因组DNA 后参考《精编分子生物学指南》^[21] 进行DNA 纯化。

1.3 引物设计

梨S 基因由5 个保守区(conserved region)，1 个高频可变区(hyper variable region)，1 个内含子(intron)组成^[22]。由于高频可变区(HV)是识别花粉配体的部位，且HV 区变异决定梨S 等位基因的多态性，因此通常根据HV 区的不同来确认不同的S 等位基因。根据已报道的梨S₁~S₉ 基因HV 区两端的序列，分别在信号肽上游-32 bp 处和HV 区下游设计了上游正向引物(PF：5'-TGCCTCGCT CTTGAACAA-3') 和下游反向引物(PR：5'-AC(A/G)TTCGGCCAAATAATT-3')。因S₇ 等位基因中下游引物序列C 被T 替换，因此在PR 引物中设计了一个简并碱基Y (A/G)。引物PF 和PR 分别与有关参考文献^[12] 中的引物P3 和P2 (‘anti-II WPNV’) 相同。

1.4 PCR 扩增

反应体系为总体积20 μL，包含1.5 μL 10×PCR Buffer，0.012 μmol dNTPs，0.05 μmol MgCl₂，17 pmol 正向引物和方向引物，16.67 nkat *Taq* DNA 聚合酶，10 ng 模板DNA。

扩增循环条件为：94℃ 预变性2 min；94℃ 变性30 s，48℃ 退火30 s，70℃ 延伸2 min，10 个循环；94℃ 变性30 s，48℃ 退火30 s，70℃ 延伸2.5 min，25 个循环；70℃ 延伸7 min；4℃ 保温。

1.5 PCR-RFLP 系统检测

采用日本学者建立的识别梨S₁~S₉ 等位基因的PCR-RFLP 系统^[23](表1) 对这5 个砂梨品种进行S 基因型的初步鉴定。原PCR-RFLP 系统中以引物P1 (C1 区‘FTQQYQ’ 5'-TTTACGCAGCAATATCAG-3')

表1 S₁~S₉ 等位基因PCR-RFLP 检测系统

Table 1 The identifying system of S₁~S₉ allele by PCR-RFLP

S 基因型	大小/bp	SceI/bp	AflII/bp	PpuM/bp	NdeI/bp	A/wN/bp	HaeIII/bp	AccI/bp	NuI/bp	BstBI/bp
S ₁	368	135+232	—	—	—	—	—	—	—	—
S ₂	1 348	—	564+783	—	—	—	—	—	—	—
S ₃	377	—	—	107+270	—	—	—	—	—	—
S ₄	369	—	—	—	140+228	—	—	—	—	—
S ₅	377	—	—	107+270	—	106+271	—	—	—	—
S ₆	348	—	—	—	—	—	133+214	231+117	—	—
S ₇	352	—	—	—	—	—	—	114+238	—	—
S ₈	435	—	—	—	—	—	—	—	249+186	—
S ₉	1 333	—	—	—	—	—	—	—	—	678+655

说明：图中横线表示没有该限制酶的酶切位点，数字表示酶切片段大小。限制酶识别位点分别为SceI: C *TPuPyAG；AflII : C *TTAAG；PpuM : PrG *GPwC CPy；NdeI : CA *TA TG；A/wN : CAGNNN *CTG；HaeIII : GTPy *PuAC；AccI : CG *CG；NuI : TCG *CGA；BstBI : TT *CGAA。

和P2(即本实验中的引物PR)扩增的产物为酶切底物,本实验以引物PE/PR扩增的产物为酶切底物。因引物PF位于原PCR-RFLP系统采用的引物P1上游约100 bp左右的位置,因此本研究酶切底物的大小也相应地比原PCR-RFLP系统酶切底物大100 bp左右。

1.6 PCR产物克隆及测序

PCR产物回收根据PCR产物回收试剂盒说明书进行,TA克隆主要参考pUCM-T Vector使用说明的推荐方法进行操作。委托上海博亚生物技术有限公司进行序列测定。

1.7 S基因型的确定及生物信息学分析

通过Blast初步确定所测基因片段是否为S等位基因,结合GeneDoc软件分析所测S基因一级结构特点,最终确定各品种S基因型。

2 结果与分析

2.1 S基因PCR-RFLP分析

采用S等位基因特异引物PF和PR对5个中国砂梨品种(晶玉、金水2号、新雅、西子绿和青魁)进行PCR扩增,电泳结果如图1所示。从图1可见,均呈现1条特异谱带。利用PCR-RFLP分析系统中的限制性内切酶对不同品种的特异PCR产物进行酶切分析,结果如图2所示。

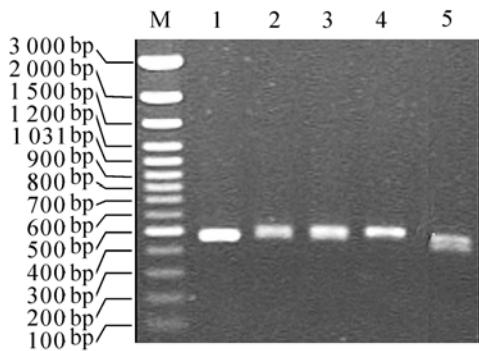


图1 5个梨品种S基因特异PCR扩增

M: 100 bp DNA Ladder Plus; 1. 新雅; 2. 晶玉; 3. 西子绿; 4. 青魁; 5. 金水2号

Figure 1 Specific PCR reaction of S-alleles of five pear cultivars

M: 100 bp DNA Ladder Plus; 1. Xinya; 2. Jingyu; 3. Xizilv; 4. Qingkui; 5. Jinshui No. 2

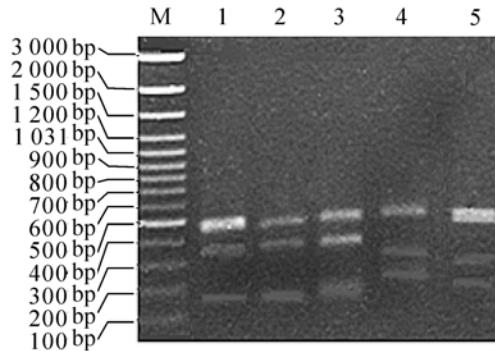


图2 特异扩增产物酶切电泳图

M: 100 bp DNA Ladder Plus; 1. 晶玉; 2. 新雅; 3. 西子绿; 4. 青魁; 5. 金水2号。采用的限制酶为: 1~3. Nde I; 4. Sce I; 5. Ppu M I

Figure 2 The enzymic reaction of specific PCR products

M: 100 bp DNA Ladder Plus; 1. Jingyu; 2. Xinya; 3. Xizilv; 4. Qingkui; 5. Jinshui No. 2. restriction enzyme 1~3. Nde I; 4. Sce I; 5. Ppu M I

通过PCR-RFLP分析(图2),晶玉、新雅和西子绿等品种的扩增片段均能被Nde I酶切消化,大小约为360 bp+135 bp;青魁的扩增片段能被Sce I酶切消化,大小约为268 bp+227 bp;金水2号的扩增片段能被Ppu M I酶切消化,大小约为239 bp+261 bp。因此,这5个品种基本可以各确定1条S等位基因:晶玉为S₄,新雅为S₄,西子绿为S₄,青魁为S₁,金水2号为S₃。为了完全确定这5个品种的S基因型,将它们的S基因特异PCR产物克隆。首先随机挑取1个阳性克隆进行测序分析,再根据分析,对其他阳性克隆的特异扩增产物进行相应酶切检测,选取另1个酶切结果不同的克隆进行测序。

2.2 S基因型确定

采用Genedoc软件将所测序列(图3)与已登录GenBank的梨S基因序列进行比对,最终确定这5个中国砂梨品种的S基因型分别为晶玉S₄S₂₄,金水2号S₃S₂₁,新雅S₄S₂₄,西子绿S₄S₁₃,青魁S₁S₁₃。这5个中国砂梨品种共包含6条不同的S基因,它们在引物P1和P2之间的片段大小分别为

S_1 367 bp, S_3 376 bp, S_4 370 bp, S_{13} 351 bp, S_{21} 338 bp, S_{24} 376 bp, 内含子大小分别为 S_1 168 bp, S_3 179 bp, S_4 168 bp, S_{13} 150 bp, S_{21} 139 bp, S_{24} 177 bp。

2.3 S 基因片段推导氨基酸一级结构分析

由于引物PF 位于信号肽上游-32 bp 处, 引物PR 位于HV 区下游, 因此经过PCR 扩增能获得S

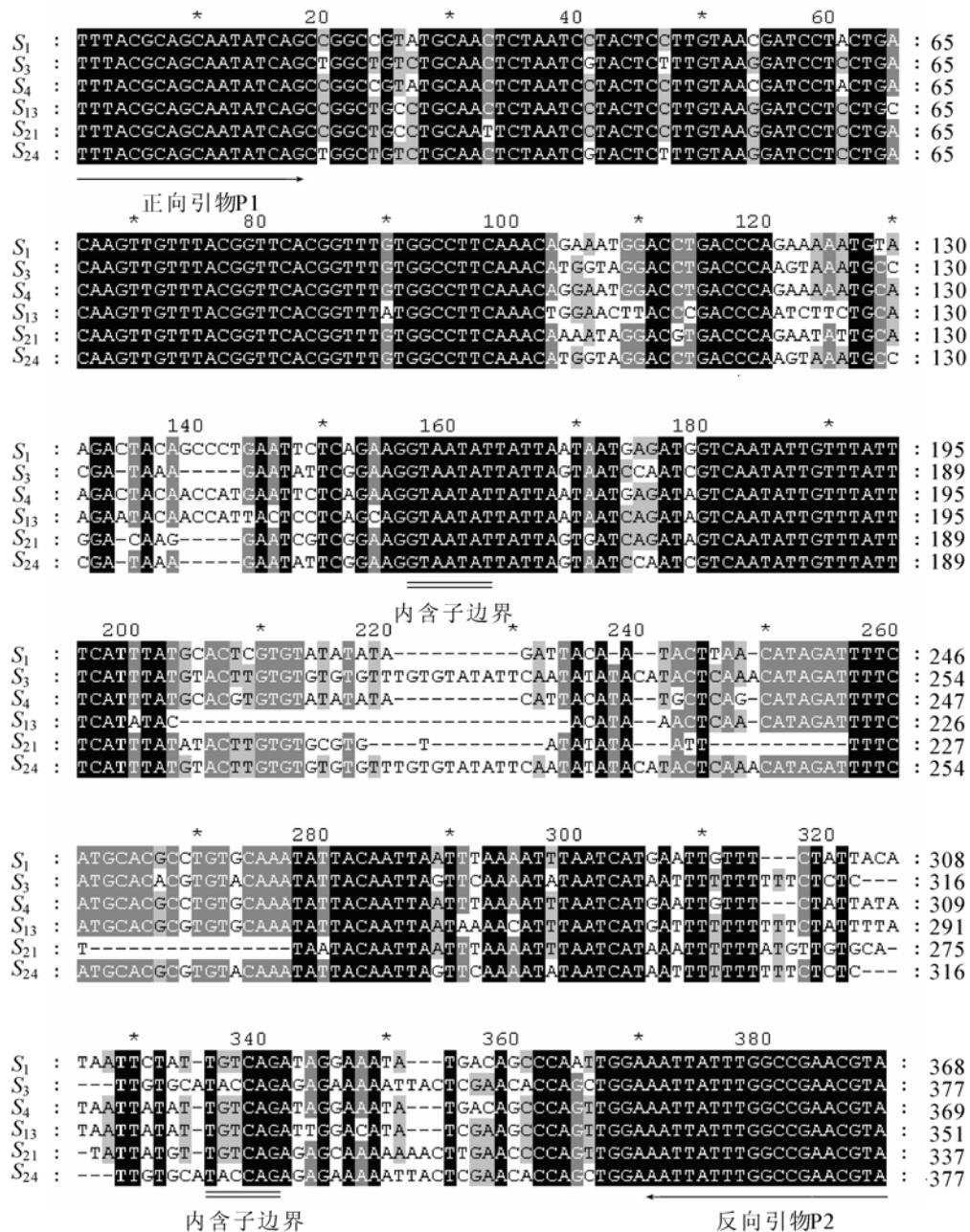


图3 5个梨品种所含S基因片段序列

Figure 3 The sequences of *S*-alleles fragments of five pear cultivars

基因起始密码子序列+ 信号肽序列+ 保守区C1 + 保守区C2 + 高变区HV , 如图4 所示。根据相关文献分析^[24-26], S_1 , S_3 , S_4 , S_{13} 和 S_{21} 的信号肽均由27 个氨基酸组成, 保守区C1 编码11 个氨基酸, 保守区C2 编码9 个氨基酸。 S_{24} 测序时未测得引物P1 上游序列, 因此仅由此知 S_{24} 的C2 区也编码9 个

非常保守的氨基酸。 S_1 、 S_4 和 S_{13} 的高变区HV编码15个氨基酸，在HV区第9个和第10个氨基酸之间为内含子插入点， S_3 、 S_{21} 和 S_{24} 的高变区HV编码14个氨基酸，在HV区第8个和第9个氨基酸之间为内含子插入点。

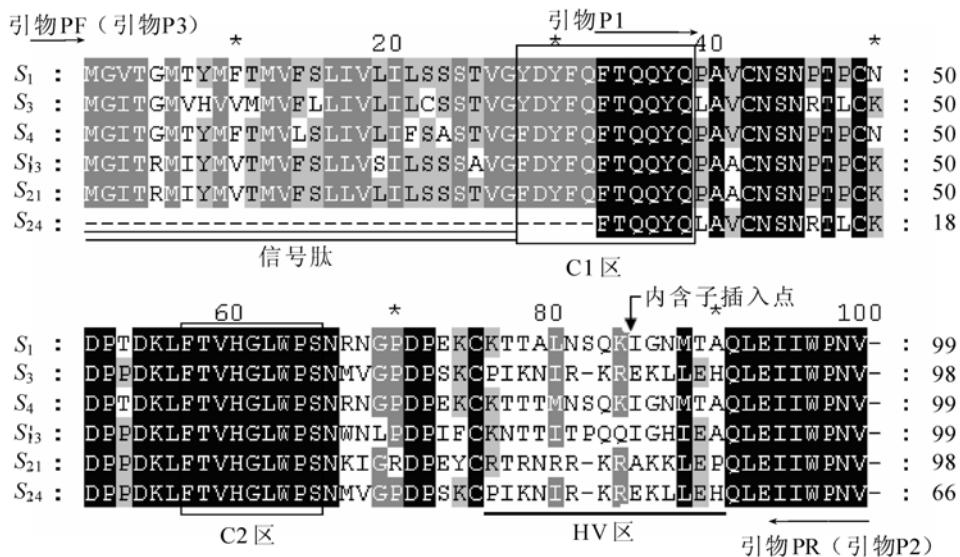


图4 部分S基因引物PF/PR间推导氨基酸序列

Figure 4 Putative amino acid sequence of parts of *S*-alleles between PF and PR

3 小结与讨论

植物的自交不亲和性(self-incompatibility, 简称SI)指能产生具有正常功能且同期成熟的雌雄配子体的雌雄同株植物，在自花授粉或相同基因型异花授粉时不能受精的现象^[27]。梨是典型的配子体型自交不亲和性植物，该特性受单一位点的复等位基因(*S*基因)控制。通常情况下，每个梨品种含有2条*S*基因，但是多倍体梨品种可能含有3~4条*S*基因^[8]。如果*S*基因型相同的2个梨品种相互授粉则会发生不亲和现象，坐果率一般低于30%，故弄清各品种的*S*基因型是开展自交不亲和研究的基础，也是梨品种遗传改良的科学依据。

通过PCR-RFLP分析检测及特异扩增片段的测序，确定了5个中国砂梨品种的*S*基因型：晶玉为 S_4S_{24} ，金水2号为 S_3S_{21} ，新雅为 S_4S_{24} ，西子绿为 S_4S_{13} ，青魁为 S_1S_{13} 。根据所确定的这5个中国砂梨品种含有 S_1 ~ S_9 等位基因以外的*S*基因的现象，可以推知，中国梨品种繁多，*S*等位基因的多样性也较大，当某个梨品种所含*S*基因均为 S_1 ~ S_9 等位基因以外的*S*基因，且片段大小相近的时候，日本学者建立的仅适用于梨 S_1 ~ S_9 等位基因的PCR-RFLP系统将不再适用，有可能出现采用PCR-RFLP系统无法分离*S*基因片段的现象，也可能出现酶切消化了但是并不是 S_1 ~ S_9 等位基因的现象。因此，鉴定我国不同梨品种的*S*基因型需要在PCR-RFLP系统分析的基础上辅以克隆测序或其他的实验技术验证。

此外，通过生物信息学分析，推导出了 S_1 、 S_3 、 S_4 、 S_{13} 、 S_{21} 和 S_{24} 基因编码的部分氨基酸序列，并确定 S_1 、 S_4 和 S_{13} 在引物PF/PR区间都编码99个氨基酸， S_3 和 S_{21} 在引物PF/PR区间都编码98个氨基酸，其中信号肽为27个氨基酸，C1区为11个氨基酸，C2区为9个氨基酸； S_1 、 S_4 和 S_{13} 的HV区编码15个氨基酸， S_3 和 S_{21} 的HV区编码14个氨基酸。 S_{24} 在引物P1/P2区间编码66个氨基酸，其中C2区为9个氨基酸，HV区为14个氨基酸。

参考文献:

- [1] 中西ラツ. 日本梨の自家不和合性について[J]. 今月の癡瘻, 1989, 33(9): 1-7.
- [2] TERAM H, TORIKATA H, SHIMAZU Y. Analysis of the sterility-factors existing in varieties of the Japanese pear (*Pyrus serotina* Rehd. var. *culta* Rehd.) (In Japanese, English abstract) [J]. *Sud Hort Inst Kyoto Inv Univ*, 1946, 3: 267-271.
- [3] ISHIMZU T, SHINKAWA T, SAKIYAMA F, et al. Primary structural features of rosaceous S-RNases associated with gametophytic self-incompatibility [J]. *Hort Md Bd*, 1998, 37: 931-941.
- [4] HIRATSUKA S, OKADA Y, KAWAI Y, et al. Expression and inheritances of S-proteins in self-compatible and incompatible Japanese pears [J]. *J Jpn Soc Hort Sci*, 1995, 64: 479-484.
- [5] ISHIMZU T, SATO Y, SAITO T, et al. Identification and partial amino-acid sequences of seven S-RNases associated with self-incompatibility of the Japanese pear, *Pyrus pyrifolia* Nakai [J]. *J Biochem*, 1996, 120: 326-334.
- [6] TAKASAKI T, OKADA K, CASTILLO C, et al. Sequence of the *Sg*-RNase cDNA and PCR-RFLP system for discriminating *Sg* to *Sg*-allele in Japanese pear [J]. *Euphytica*, 2004, 135: 157-167.
- [7] CASTILLO C, TAKASAKI T, SATO T, et al. Cloning of the *Sg*-RNase (*Sg*-allele) of Japanese pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai) [J]. *Hort Biotechnol J*, 2002, 19: 1-6.
- [8] 谭晓风, 乌云塔娜, 中西ラツ, 等. 中国砂梨7个自交不亲和新基因的分离与测序[J]. 中南林学院学报, 2005, 25(4): 1-6.
- [9] KIM H, HIRATA Y, NOU I S. Determination of S-Genotypes of pear (*Pyrus pyrifolia*) cultivars by S-RNase sequencing and PCR-RFLP analyses [J]. *Mol Cell*, 2002, 13: 444-451.
- [10] 谭晓风, 乌云塔娜, 中西ラツ, 等. 中国梨品种自交不亲和新基因的分离鉴定[J]. 中南林学院学报, 2005, 25(1): 1-3.
- [11] 乌云塔娜, 谭晓风. 中国白梨7个主栽品种S基因型的确定及2个新S-RNase基因的鉴定[J]. 中南林学院学报, 2005, 25(4): 7-12.
- [12] 谭晓风, 毕方铖, 乌云塔娜. 中国白梨9个主栽品种S基因型的确定及*S2g*-RNase新基因的分离鉴定[J]. 中南林学院学报, 2005, 25(4): 13-16.
- [13] 乌云塔娜, 谭晓风, 李秀根, 等. 梨自交不亲和新基因*S12*-RNase的分离鉴定及序列分析[J]. 林业科学, 2006, 42(4): 117-121.
- [14] 乌云塔娜, 谭晓风, 曹玉芬, 等. 白梨新S基因的克隆[J]. 园艺学报, 2006, 33(2): 385-388.
- [15] 张好艳, 吴俊, 衡伟, 等. 京白梨等品种S基因型鉴定及新基因*S28*和*S30*的核苷酸序列分析[J]. 园艺学报, 2006, 33(3): 496-500.
- [16] TAN X F, ZHANG L, WUYUN T N, et al. Molecular identification of two new self-incompatible alleles (S-alleles) in Chinese pear (*Pyrus bretschneideri*) [J]. *J Hort Physiol Md Bd*, 2007, 33(1): 61-70.
- [17] 谭晓风, 曾艳玲, 乌云塔娜, 等. 雪花梨及其亲缘品种S基因型的确定[J]. 果树学报, 2006, 23(3): 355-358.
- [18] 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[J]. 西北植物学报, 2004, 24(10): 1861-1865.
- [19] 乌云塔娜, 张党权, 谭晓风. 梨不同DNA提取方法的效果研究[J]. 中国生物工程杂志, 2003, 23(7): 98-101.
- [20] 谭晓风, 漆龙霖, 黄晓光, 等. 山茶属植物叶片DNA抽提[J]. 中南林学院学报, 1999, 19(4): 16-21.
- [21] 奥斯伯F, 布伦特R, 金斯顿R E. 精编分子生物学实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 1998.
- [22] MATSUURA T, SAKAI H, UNNO M, et al. Crystal structure at 1.5 Å resolution of *Pyrus pyrifolia* pistil ribonuclease responsible for gametophytic self-incompatibility [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(48): 45261-45269.
- [23] ISHIMZU T, INOUE K, SHIMONAKA M, et al. PCR-based method for identifying the S-genotypes of Japanese pear cultivars [J]. *Theor Appl Genet*, 1999, 98: 961-967.
- [24] USHIJIMA K, SASSA H, TAO R, et al. cloning and characterization of cDNAs encoding S-RNases from almond (*Prunus dulcis*): primary structural features and sequence diversity of the S-RNases in Rosaceae [J]. *Mol Gen Genet*, 1998, 260: 261-268.
- [25] USHIJIMA K, SASSA H, HIRANO H. Characterization of the flanking regions of the S-RNase genes of Japanese pear (*Pyrus serotina*) and apple (*Malus × domestica*) [J]. *Gene*, 1998, 211: 159-167.
- [26] TAMURA M, USHIJIMA K, SASSA H, et al. Identification of self-incompatibility genotypes of almond by allele-specific PCR

analysis [J]. *Theor Appl Genet*, 2000, **101**: 344–349.

[27] 方瑾. 植物的生殖讲座(五): 被子植物的自交不亲和性[J]. 生物学通报, 1996, **30**(1): 28–30.

Identification of *S*-genotypes from five cultivars of *Pyrus pyrifolia*

ZENG Yan-ling¹, TAN Xiao-feng¹, ZHANG Dang-quan¹, ZENG Xiao-feng¹, HU Xu-gen², HU Xian-xiong³

(1. The Key Laboratory of Non-wood Forest Product of State Forestry Administration, Central South University of Forestry and Technology, Changsha 410004, Hunan, China; 2. Zhengzhou Fruit Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450009, Henan, China; 3. Lanshan Gold Field Exploitation Limited Company, Lanshan 425800, Hunan, China)

Abstract: With natural pollination, fruit from trees having pistil self-incompatible *S*-alleles will degrade pollen tube RNA resulting in low yield and poor fruit quality. This research identified *S*-allele genotypes of pear (*Pyrus*) that served as an important scientific foundation for determining cultivars for pollination and crossbreeding, as well as for establishing a basis on inheriting desired characteristics and improving pear cultivars. Five kinds of pear genomic DNA material were tested based on primary structural characteristics of *S*-alleles. After designing and synthesizing specific primers and using the polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) system along with TA clone technique, results of sequences were analyzed with bioinformatics software (GeneDoc). Two *S*-alleles of amplified segments, which had similar sizes, were isolated and identified with their *S*-genotypes identified as cultivars of *Pyrus pyrifolia*, namely 'Jingyu', S_4S_{24} ; 'Jinshui' No. 2, S_3S_{21} ; 'Xinya', S_4S_{24} ; 'Xizilv', S_4S_{13} ; and 'Qingkui', S_1S_{13} . [Ch, 4 fig. 1 tab. 27 ref.]

Key words: horticulture; *Pyrus pyrifolia* (pear); *S*-genotype; isolate and identify

王旭烽《让我们敲希望的钟啊》获全国“五个一工程”奖

2007年9月7日,第十届精神文明建设“五个一工程”表彰座谈会和颁奖晚会在北京举行。在这项代表我国国家级文艺奖项最高荣誉的评奖中,浙江林学院茶文化学院教授、学科带头人王旭烽的新作《让我们敲希望的钟啊》榜上有名。此次浙江省共有9部优秀作品获此奖项。此前,王教授的长篇小说《南方有嘉木》获中宣部1995年度“五个一工程”奖。她也是浙江省唯一2次荣获全国“五个一工程”奖图书类优秀作品的著名学者。

“五个一工程”是党中央倡导,由中共中央宣传部组织实施的精神产品生产重点工程,评奖范畴包括戏曲、电影、诗歌、电视剧、广播剧、歌曲、文艺图书等七大类。该次评奖共在全国各省、市、自治区选送的优秀作品中评选出特等奖7个,优秀作品奖122个,入选作品奖138个。

(李文杰)