

自交亲和苹果品种 S 基因型的鉴定

张雪梅¹, 李保国¹, 秦立者², 齐国辉¹, 郭素萍¹

(1. 河北农业大学 林学院, 河北 保定 071000; 2. 河北省农林科学院 石家庄果树研究所, 河北 石家庄 050061)

摘要: 为了探讨苹果自交亲和的发生机理, 根据保守氨基酸序列“FTQQYQ”和“anti-1/ WixPNV”设计了苹果花柱 S 基因的通用引物: P₁: 5'-TTTACGCAGCAATATCAG-3'; P₂: 5'-ACGTTTCGGCCAAATA/CATT-3'; 根据 GeneBank 登陆的花粉 SLF1 (DQ422810)、SLF9 (AB270792) 基因设计了花粉 S 基因的引物分别为: P SLF1(上游 5'-3': CTGGTGGTGTCTTTCTGTGTAT; 下游 5'-3': ACTTAACTCTTCCCTCAACTCA) 和 P SLF9(上游 5'-3': CAGGTGCGTGAAAGTGAAA; 下游 5'-3': TGAGCCAAGCATAAGAACCT), 以自交亲和的苹果品种早红香为试验材料, 利用 PCR-RFLP、克隆、测序等方法研究早红香苹果发生自交亲和的分子性状。结果表明: 自交亲和的早红香苹果 2 条花柱 S 基因没有发生变异。经 BLAST 比较, 由花粉 S 基因引物 P SLF1 和 P SLF9 扩增得到的花粉 S 基因的 DNA 序列, 与 *MdSLF2* 和 *MdSLF9* 基因 DNA 序列的相似性分别为 94% 和 96%, 推导氨基酸序列相似性分别为 94% 和 97%。由 P SLF1 扩增得到的花粉 S 基因 SLF1? 与 *MdSLF1* 的 DNA 序列相似性仅为 83%, 且二者不一致的碱基分布于整个 DNA 序列中, 自交亲和苹果品种早红香花粉 SLF1? 基因可能变异为了 *MdSLF2*。

关键词: 自交不亲和; 苹果; 花柱 S 基因; 花粉 S 基因

中图分类号: Q78; S66.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2009)05-0113-05

Identification of S-gene in Self-compatible Apple Cultivar

ZHANG Xue-mei¹, LI Bao-guo¹, QIN Li-zhe², QI Guo-hui¹, GUO Su-ping¹

(1. College of Forestry, Agricultural University of Hebei, Baoding 071000, China; 2. Shijiazhuang Pomology Institute, Hebei Academy of Agriculture and Forestry Science, Shijiazhuang 050061, China)

Abstract: In order to discuss the mechanism of apple self compatibility, the primer P₁: 5'-TTTACGCAGCAATATCAG-3' and P₂: 5'-ACGTTTCGGCCAAATA/CATT-3' of apple style S gene were designed according to the conservative amino acid sequence, the primer P SLF1 (upriver 5'-3': CTGGTGGTGTCTTTCTGTGTAT; backward position 5'-3': ACTTAACTCTTCCCTCAACTCA) and P SLF9 (upriver 5'-3': CAGGTGCGTGAAAGTGAAA; backward position 5'-3': TGAGCCAAGCATAAGAACCT) of apple pollen S gene were designed according to the SLF1 (DQ422810) and SLF9 (AB270792) in GeneBank, the molecular character of self-compatible apple Zaohongxiang was studied in the method of PCR-RFLP, clone and sequence. The result showed that: two style S gene of self-compatible apple Zaohongxiang did not variation. DNA sequence of pollen S gene which was amplified through pollen S gene primer P SLF1 and P SLF9 compared with the sequence of *MdSLF2* and *MdSLF9* had a high similarity, which arrived at 94% and 96%, amino acid similarity was 94% and 97%. The similarity of Pollen S gene SLF1? which was amplified through P SLF1 and DNA sequence of *MdSLF1* was 83%, and the differ bases were distributed in the whole DNA sequence, so that pollen S gene SLF1? could changed into *MdSLF2*.

Key words: Self-compatible; Apple; Style S gene; Pollen S gene

自交不亲和性(Self-incompatibility)是植物防止近亲繁殖和保持物种连续性的一种重要机制, 在植物界普遍存在。苹果(*Malus domestica* Borkh.)属于配子体

自交不亲和类型, 是由一个基因座上的复等位基因 S 基因控制的, 包括至少一个花柱特异性表达的 S-决定子基因和一个花粉特异性表达的 S 决定子基因^[1],

收稿日期: 2009-02-19

基金项目: 河北农业大学将帅基金

作者简介: 张雪梅(1980-), 女, 河北丰润人, 博士, 主要从事经济林栽培生理及分子生物学研究。

通讯作者: 李保国(1958-), 男, 河北武邑人, 教授, 博士, 主要从事经济林栽培生理研究。

且大多数为自交不亲和品种。河北省廊坊市当地培育的苹果品种早红香与大多数品种不同,为自交亲和品种,笔者通过 2007 年和 2008 年连续 2 年的授粉试验表明,其自交授粉坐果率均达 80% 以上。为此,以该苹果品种为试验材料,利用 PCR-RFLP 分析、*S* 基因克隆、测序等方法对苹果自交亲和和发生机制进行了研究,以期培育自交亲和的苹果新品种、阐明苹果自交亲和的机理提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 试验材料

供试材料为自交亲和的苹果品种—早红香,栽植于廊坊永清县前店村,2008 年 4 月 20 日采集新梢顶端第一片尚未完全展开的幼叶放入冰壶,带回实验室后于 -70℃ 保存备用。

1.2 基因组 DNA 提取及 *S*-allele、SLF 的 PCR 扩增

参照 Doyle 等^[2] 的 CTAB(十六烷基三甲基溴化铵)法,略有改动:将 0.5 cm² 的材料放到 1.5 mL 的离心管中,加入 350 μL 65℃ 预热的 CTAB 提取液和 2% β 巯基乙醇,用与离心管底部吻合的研棒将材料研碎后再加入 350 μL 65℃ 预热的 CTAB 提取液,其他步骤同常规方法。

根据苹果花柱 *S* 等位基因 C1 区的保守氨基酸序列^[3] “FTQYQ” 和 HV 区下游的 “anti-¹/M IWPNV”, 分别设计正向引物 P₁ (5'-TTTACGCA GCAATATCAG 3') 和反向引物 P₂ (5'-ACGTTCCGG-CAAATA/CATF-3')。

根据 GeneBank 登陆的花粉 *SLF1* (DQ422810)、*SLF9* (AB270792) 基因用 DNASTar 软件设计两对引物分别为: P *SLF1* (上游 5'-3': CTGGTGGTGTCTTCTTCTGTGAT; 下游 5'-3': ACITAACTCTCCCTCAACTCA) 和 P *SLF9* (上游 5'-3': CAGGTGCGTGAAAGTGAAA; 下游 5'-3': TGAGCCAAGCATAAGAACCT)。

以上引物由上海生物工程有限公司合成。

PCR 反应体系为: 5 U/μL *Taq* DNA 聚合酶 1 U, 25 mmol/L dNTPs 2 μL, 10 μmol/L 引物 2 μL, 25 mmol/L Mg²⁺ 2 μL, 模板 DNA 40 ng, 10× PCR Buffer 2 μL, 补充 ddH₂O 至 20 μL。花柱 *S* 基因 PCR 扩增程序为: 94℃ 预变性 2 min 后进入扩增循环, 94℃ 变性 15 s, 48℃ 退火 30 s, 68℃ 延伸 1 min, 10 个循环; 94℃ 变性 15 s, 48℃ 退火 30 s, 68℃ 延伸 90 s, 25 个循环, 68℃ 延伸 5 min; 最后在 4℃ 下保温; 花粉 *S* 基因的扩增退火温度为 52℃, 其他与花柱 *S* 基因扩增程序相同。反应结束后,在 1.2% 的琼脂糖凝胶(含有 0.5% Goldview 染料)上电泳 1 h, 紫外分析仪检测

PCR 产物及酶切情况。

1.3 酶切、克隆及测序

花柱 *S* 基因根据 PCR 产物片段大小分别用 *Afa* iv(*Rsa* iv)、*EcoR* iv 限制性内切酶进行酶切。酶切反应体系各成分用量分别为: 1 ng/μL PCR 产物 6 μL, 10× Buffer 2 μL, 5 U/μL Enzyme 1 μL, ddH₂O 11 μL, 在 37℃ 恒温条件下进行酶切反应 16 h。

TIANGel Midi Purification Kit 试剂盒回收目的片段, pGM-T 载体连接后转化大肠杆菌 TOP10, 蓝白斑筛选后, 挑取一个单克隆的一部分用 pGM-T 重组菌落 PCR 鉴定试剂盒鉴定重组子, 并将剩余部分的单克隆摇菌后送天根生化科技(北京)有限公司测序。

花粉 *S* 基因经 PCR 扩增后直接回收、测序(双向)。

2 结果与分析

2.1 花柱 *S* 基因 PCR 扩增

用花柱 *S* 基因引物对早红香苹果基因组 DNA 进行 PCR 扩增, 上样量为 4 μL 的电泳结果如图 1。由图 1 可见, 该苹果品种花柱 *S* 基因各有一条 340 bp 左右和 530 bp 左右的片段。

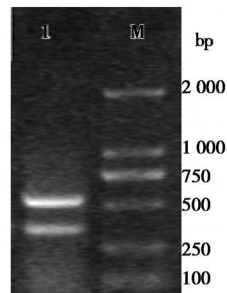
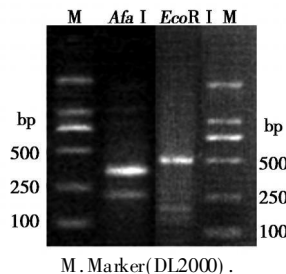


图 1 早红香雌蕊 *S* 基因的 PCR 扩增结果

Fig. 1 PCR amplification result of apple *S*-allele in Zaohongxiang



M. Marker(DL2000).

图 2 *Afa* iv 和 *EcoR* iv 酶切图谱

Fig. 2 Restriction pattern of *EcoR* iv

2.2 花柱 *S* 等位基因的酶切鉴定

用限制性内切酶 *EcoR* v 和 *Afa* iv(*Rsa* iv) 分别对早红香苹果 PCR 扩增的 2 条片段进行酶切, 酶切结果如图 2 所示。由图 2 可以看出, 早红香花柱 *S* 基因 340 bp 的片段分别能被限制性内切酶 *EcoR* v 切割成 210 bp 和 130 bp 左右的片段, 530 bp 左右的

片段分别能被限制性内切酶 *Afa* iv(*Rsa* iv) 切割成 320 bp 和 210 bp 左右的片段,符合花柱 *S*₁ 和 *S*₉ 等位基因被切割的情况,初步确定早红香苹果的花柱 *S* 基因型为 *S*₁*S*₉。

2.3 花柱 S 等位基因序列分析

对 PCR 产物回收、克隆后测序,结果经 BLAST 比较表明,该品种花柱 *S* 基因 530 bp 左右的片段与富士苹果(GeneBank 中登号为 EU427454) *S*₁ 基因 DNA 序列完全一致,没有发现变异基因位点。花柱 *S* 基因 340 bp 左右片断的 DNA 序列经 BLAST 同源比较,与其他花柱 *S* 基因相似性均在 80% 以上,和 *S*₉ 基因(GeneBank 中登号为 AB270297) DNA 序列一致性达到 99%,并且这一区域包括了自交不亲和基因变异最高的高变区和内含子区,和 *MdSFB9* 基因序列同源性达 100%,说明该基因与花粉 *S* 基因是紧密连锁的。为此可以确定自交亲和苹果早红香花柱 *S* 基因没有发生变异。

2.4 花粉 S 基因 PCR 扩增

用花粉特异性引物 P SLF₁、P SLF₉ 对早红香苹果花粉 *S* 基因进行 PCR 扩增,上样量为 4 μL 的电泳结果如图 3 所示。由图 3 可知,早红香苹果的两条花粉 *S* 基因经扩增后得到 1 100 bp 左右的片断,与根据花

粉 *SLF1* 和 *SLF9* 基因设计的花粉 *S* 基因引物之间 DNA 片段长度一致。

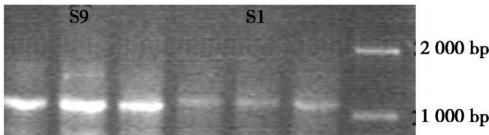


图 3 早红香花粉 S 基因的 PCR 扩增结果

Fig. 3 PCR amplification result of pollen SLF in Zaohongxiang apple

2.5 花粉 SLF 基因序列分析

早红香苹果两条花粉 *S* 基因经双向测序后拼接测序结果,经 BLAST 比较表明,由 P SLF₁ 和 P SLF₉ 扩增得到的花粉 *S* 基因(以下称: *SLF1*? 和 *SLF9*?)与 *MdSLF2* 和 *MdSLF9* DNA 序列相似性最高,分别为 94% 和 96%。推导氨基酸序列相似性分别为 94% 和 97%,表现出高的等位基因多态性。并且两个花粉等位基因氨基酸序列 N-端均有 F-box 蛋白保守的 F-box motif 结构域, G-端分别有可变区 A 和可变区 B(图 4),因此,这两个基因应为花粉等位基因。在两个花粉 *S* 等位基因中, *SLF1*? 推导的氨基酸序列与 *SLF2* 相比除两个高变区外还有 19 个点发生变异,而 *SLF9*? 只有 8 处发生变异,而由

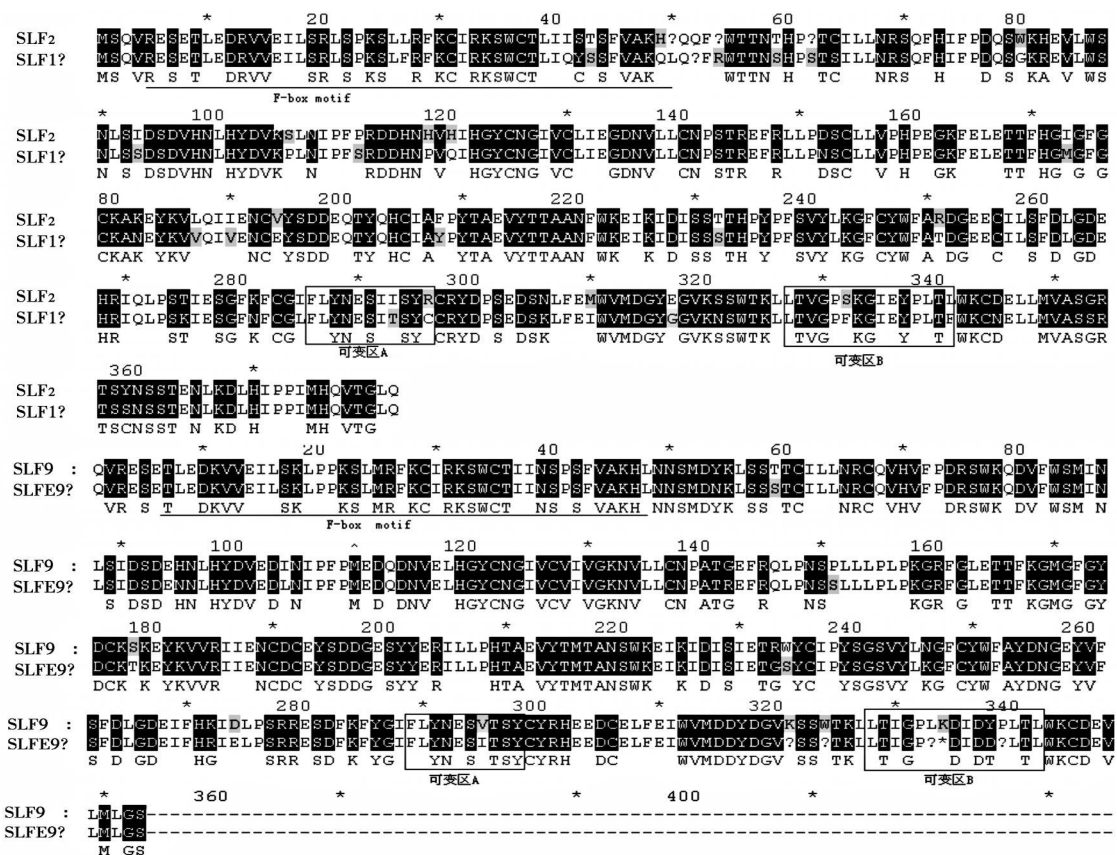


图 4 苹果花粉 S 基因氨基酸序列比较

Fig. 4 Amino acid compare in S gene of apple pollen

Query	22	AACTCCTGTAGACAGGACGGTCGAGAACTCTTGTC--GGTTGTCGCCCAAGTCTCT-ATTG	79
Sbjct	104	AACTCCTGAAGATAGGGTGGTCG-CCATCATGTCCAAGTTGCCGCCCAAGTCTCTGA-TG	161
Query	80	CGATTCAAATGCATACGCAAGTCTTTGGTGCACCTCTCATCAATAGTCCAAGTTTTGTGGCC	139
Sbjct	162	CGATTCAAATGCATACGCAAGTCTTTGGTGCACCTCTCATCAATAATCCAAGTTTTGTGGCC	221
Query	140	AAACACCTCAGCAATTTCCT-TGGACAACAACTCTCATCCTCCACTTGTATCCTTCTCAA	198
Sbjct	222	AAACACCTCAGCAATT-CTGTGGACAACAATTTCTCATCCTATACCTGTATCCTCCTCAA	280
Query	199	CCGTTCTCAGTTTTCACATTTTCCCGGATC-AGAGTTGGAACGTAAGTTTTATGGTCCA	257
Sbjct	281	CCGTTCTCAGTTTTCACGTTTTCCTCGGA-CAAGAGTTGGAACATGAAGTTTTATGGTCCA	339
Query	258	TGATTAATCTTTCCAGTGATAGTGATGTGCA--CAACCTTCATTATGATGTT-AAGCCCT	314
Sbjct	340	TGATTAATTTTTTTAATGATAGAG-T-TTCACGCACCCTTTATTATAATGTTGAGGACC-	396
Query	315	TAAATATACCGTTTTCTAGGGATGACCAT-AATCCTGTACAGATTACGGGTATTGCAAT	373
Sbjct	397	TAAATATACCGTTTTCCAAGGGATGACCATGAA-CATATACTGATTCATGGTTATTGCAAT	455
Query	374	GGGATTGTATGCTAATAAAGGGGATAATGTTCTTCTATGCAATCCTTCAACGAGGGAA	433
Sbjct	456	GGAATTGTTTGTGTAATATCAGGGAATAATATTCTTTATGCAATCCTGCAACGAGGGAA	515
Query	434	TTCAGGCTACTTCCCAATTCATGCCTTCTTGTA-C--CCCATCCCGAG-GGAAAAATTCGA	489
Sbjct	516	TTCAGGCAACTTCCTGATTCATTCTTCTCTACCTTCCCTCTCTCG-GCGGAAAAATTCGA	574
Query	490	ATTGGA-AACAACCTTT-CACGGAATGGGTTTTGGCTACGATTGCAAAAGCTAATGAATAC	547
Sbjct	575	ATTGAGAGCCGA-CTTTGGA-GGATTGGGATTGGCTATGATTGCAGAGCTAAAGATTAC	632
Query	548	AAGGTTGTGCAAAATTGTAGAAAATTGTGAGTATTCGGATGATGAGCAACATATCAACAT	607
Sbjct	633	AAGGTTGTGCGAATTATAGAAAATTGTGAGTATTCAGATGATGAGCGAACATATTATCAT	692
Query	548	AAGGTTGTGCAAAATTGTAGAAAATTGTGAGTATTCGGATGATGAGCAACATATCAACAT	607
Sbjct	633	AAGGTTGTGCGAATTATAGAAAATTGTGAGTATTCAGATGATGAGCGAACATATTATCAT	692
Query	608	TGTATTGCTTAT-CCTTACACGGCTGAGGTATACACCACGGCTGCTAACTTTTGAAAGA	666
Sbjct	693	CGTATT-CCTCTGCCTCACACGGCTGAGGTATACACCATGGCTACTAACTCTTGAAAGA	751
Query	667	GATCAAGATTGATATATCAAGTTCAACCCATCCCTATCCCTT-TTCTGTGTACTTTGAAGG	725
Sbjct	752	GATCAAGATTGATATATCAAGTAAACTTATCCCTGTTC-TTGTTCAGGTACTTTGAAGG	810
Query	726	GATTTTGTATTGGTTTGCACGGATGGCGAAGAATGCATACTTTCATTTGATTTAGGTG	785
Sbjct	811	GATTTTGTATTGGTTTACAAAGGATGGTGAGGAATTCATACTTTCATTTAATTTAGGGCG	870
Query	786	ATGAGATATTTTCATAGAATACAATTCCTTCTAAGATAGAATCCGGTTTTAACTTTTGTG	845
Sbjct	871	ATGAGAGATTTTCATAGAATACAATTTGCCTTCTAGGAGAGAATCCGGTTTTGAGTTTTATT	930
Query	846	GTCTTTTCTTTTATAATGAATCTATCCTTCTTATTGTTGTGCTTATGATCCAAGTGAGG	905
Sbjct	931	ATATTTTGTGTGTAATGAATCCATTGCTTCTTTTGTCTCTTTATGATCGAAGTCAAG	990
Query	906	ATTCTAAATTATTTGAAATATGGGTAATGGATGGGTATGGCGGAGTTAAGAAATTCATGGA	965
Sbjct	991	ATTCTAAATCATGTGAAATATGGGTAATGGACG---ATGATGGAGTCAAGAGTTTCATGGA	104
Query	966	CAAACTCCTAACCGTTGGTCCCTTTAAAGGCATTGAGTATCCATTGACATTTTGAAAT	102
Sbjct	1048	CAAACTCCTAGTCGCTGGACCTTTAAAGGCATTGAGAAGCCATTGACACTTTGAAAT	110
Query	1026	GTAACGAGCTTCTTATGTTTG-CTTCC-AGTAGAAGAGTCACCTCTTCTAATTCTAGTAC	108
Sbjct	1108	GTGATGAGCTTCTTATGATTGACA-CCGA-TGGAAAGAGTCATCTCTTATAATTCTGGTAT	116
Query	1084	CGGAAATCTCA 1094	
Sbjct	1166	TGGATATCTCA 1176	

图5 苹果花粉 *SLFI*? (Query) 与 *SLFI* (Subject) 基因 DNA 序列 BLAST 比较

Fig. 5 DNA sequence compare between *SLFI*? (Query) and *SLFI* (Subject) gene of apple pollen

PSLFI 扩增得到的花粉 *S* 基因 *SLFI*? 经 BLAST 比较与 *MdSLFI* 的 DNA 序列相似性仅为 83%, 且二者不一致的碱基分布于整个 DNA 序列中(图 5), 因此自交亲和苹果品种早红香花粉 *SLFI*? 基因向 *Md-SLF2* 变异的可能性较大。

3 讨论

蔷薇科果树发现自交亲和性突变的在梨中较多, 自交亲和的日本梨品种奥嘎二十世纪发生变异的原因是花柱 *S* 等位基因之一突变或缺失使之在花柱中不表达, 但并不影响在花粉中的表达^[4]。李晓芳等^[5]研究闫庄梨后代 *S*-RNase 基因时发现 *S*₂₁ 等位基因及其编码产物突变可能是导致其自交亲和性的原因, 吴华清等^[6]证实自交亲和的金坠梨在花

柱方面和鸭梨并无差异, 可能是花粉 *S* 基因发生突变表现出自花授粉能够结实。朱墨等^[7]在研究甜樱桃 *SFB4* 基因时发现, 自交亲和的斯坦拉 *SFB4* 基因比自交不亲和雷尼和佳红 *SFB4* 基因缺失了 4 个碱基 TAAA。本研究对自交亲和苹果早红香总 DNA 扩增了花柱和花粉 *S* 基因并测序, 发现花柱的两个 *S* 基因 *S*₁ 和 *S*₉ 基因(富士苹果—自交不亲和) DNA 序列一致, 推导氨基酸没有改变, 而两个花粉 *S* 基因与 *S*₂、*S*₉ DNA 序列相似性分别为 94% 和 96%, 但未发现类似于甜樱桃花粉 *S* 基因 DNA 序列中发生连续碱基缺失的情况。因此, 可以证明早红香苹果花柱 *S* 基因没有发生改变, 导致其亲和的原因有可能是花粉 *S* 基因的变异。关于导致早红香苹果自交亲和的花粉 *S* 基因是如何发挥作用以及是否存

在其他原因还有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] De Nettancourt D. Incompatibility in angiosperms [M]. New York: Springer-Verlag, 1977: 1- 29.
- [2] Doyle J L, Doyle J J. Isolation of plant DNA from fresh tissue [J]. Focus, 1990, 12: 13- 15.
- [3] Shogo Kitahara, Kentaro, Kitahara. Discovery of a new self-incompatibility allele in apple [J]. Hort Science, 2000, 35(7): 1329- 1332.
- [4] 张绍铃, 房经贵, 杨记礅. 果树自交不亲和性的遗传与生理机制及其研究 [J]. 果树学报, 2001, 18(1): 49- 52.
- [5] 李晓芳, 李茂福, 韩振海, 等. 鸭梨芽变闰庄梨自交亲和性分子机制初步研究 [J]. 园艺学报, 2008, 35(1): 13- 18.
- [6] 吴华清, 张绍铃, 吴巨友, 等. 金坠梨自交亲和性突变机制的初步研究 [J]. 园艺学报, 2007, 34(2): 295- 300.
- [7] 朱 墨, 张开春, 姜立杰, 等. 甜樱桃 *SFB4* 与 *SFB4'* 基因的鉴别 [J]. 园艺学报, 2005, 32(1): 97- 100.

西北农林科技大学学报(自然科学版)》2010 年 征 订 启 事

《西北农林科技大学学报(自然科学版)》是西北地区创办最早的综合性农业科学学术期刊,创刊于 1936 年,其前身是《西北农业大学学报》。本刊立足国际科学发展前沿,兼顾理论探索与应用开发研究,面向社会,主要刊登农业科学、林业科学、植物保护、资源环境科学、园艺科学、动物科学、动物医学、食品科学、农田水利与建筑工程、机械与电子工程、生物技术与基础学科等方面具有创新性或实用性的学术论文、研究简报、文献综述,以及反映最新科研成果的快报。读者对象为国内外农林科技工作者、高等院校教师、研究生和农林管理干部。

本刊主办单位西北农林科技大学为国家“985 工程”和“211 工程”重点建设高校,是教育部直属全国重点大学。本刊为中国自然科学核心期刊、全国综合性农业科学核心期刊、中国科学引文数据库核心期刊和中国科技核心期刊,论文被国内外多家权威性数据库和文摘期刊固定转载和收录。1994 年以来,本刊连续进入“被引频次最高的中国科技期刊 300 名排行表”,在全国和陕西省科技期刊综合质量评比中,先后 20 余次获奖,其中 1997 年获第二届全国优秀科技期刊二等奖,1999 年获全国优秀自然科学学报及教育部优秀科技期刊一等奖、陕西省高校“十佳学报”及陕西省科技期刊“十佳期刊”,2001 年入选“中国期刊方阵双效期刊”,2004 年获第四届全国优秀农业期刊一等奖,2006 年获“2005 年百种中国杰出学术期刊”和“首届中国高校优秀科技期刊”,2007 年再度入选“2006 年百种中国杰出学术期刊”,2008 年获“2008 年度中国精品科技期刊”和“第二届中国高校精品科技期刊”。在促进学术交流、发展学科理论、推动科技进步等方面做出了较大贡献。

《西北农林科技大学学报(自然科学版)》为月刊,每月 10 日出版,国内外公开发行。每期定价 10 元,全年 120 元。邮发代号为 52- 82,全国各地邮局均可订阅,亦可直接向本刊编辑部订阅。国外总发行为中国国际图书贸易总公司(北京 399 信箱)。

编辑部地址:陕西杨凌 西北农林科技大学北校区 40 号信箱

邮 编: 712100 电 话: 029- 87092511 E-mail: xb2511@yahoo. com. cn

网址: <http://XBNY. chinajournal. net. cn>; <http://xbnydx. periodicals. net. cn>