

秋子梨等九个品种 S 基因型的鉴定

张春芳, 李茂福, 韩振海, 龙慎山, 李天忠

(中国农业大学 园艺植物研究所, 北京 100094)

摘 要: 根据梨 S 基因高度保守区设计兼并引物, 对各秋子梨品种的基因组进行 S 基因特异性扩增、连接、转化并测序, GenBank 中比较后确定各品种的 S 基因型。9 个供试品种的 S 基因型分别为: 秋子梨中的‘寒香’为 $S_{36}S_x$, ‘苹香’为 S_1S_{31} , ‘南果梨’为 $S_{34}S_{34}$, ‘金香水’为 S_1S_1 , ‘延边大香水’为 $S_{31}S_{36}$, ‘寒红’为 $S_{27}S_{34}$, ‘小香水’为 $S_{29}S_{34}$, ‘花盖王’为 $S_{31}S_{31}S_{34}S_{34}$, 白梨中的‘锦丰’为 $S_{19}S_{34}$ 。

关键词: 秋子梨; 自交不亲和性; S 基因; S 基因型鉴定

中图分类号: S 661.203.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2008)11-0131-03

我国是梨的原产地之一, 拥有丰富的品种资源。大多数梨品种表现为配子体自交不亲和性, 极少数品种具有自交亲和性现象。因此, 鉴定不同梨品种的 S 基因型可为田间合理配置授粉树提供依据。迄今为止, 鉴定并报道已知 S 基因型的梨品种绝大多数属于白梨、砂梨和西洋梨系统^[1,2], 对于起源于我国北部的秋子梨品种的 S 基因型的报道极少^[3], 目前仅发现并鉴定了‘京白梨’和‘早梨 18’ S 基因型为 $S_{16}S_{30}$ 和 S_4S_{28} ^[2], 而秋子梨的代表品种如‘南果梨’、‘延边大香水’、‘小香水’、‘花盖王’等均缺乏关于 S 基因型的相关研究。研究通过对基因组 DNA 进行 S 基因特异性 PCR 扩增并测序, 来鉴定部分生产上栽培的秋子梨品种及具有秋子梨亲缘关系的品种的 S 基因型, 为生产上合理配置授粉树提供依据, 也为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

‘寒香’、‘寒红’、‘苹香’、‘金香水’、‘延边大香水’、‘小香水’等品种采自吉林省果树研究所梨资源圃, ‘南果梨’和‘花盖王’品种采自沈阳农业大学保存圃, ‘锦丰’品种采自中国农业科学院郑州果树研究所。其中, ‘南果梨’、‘延边大香水’、‘小香水’是我国古老的地方品种; ‘花盖王’是‘花盖梨’的四倍体大果芽变; ‘寒香’、‘苹香’、‘金香水’、‘寒红’均为传统的秋子梨品种杂交后代, 亲本如表 2 所示。

第一作者简介: 张春芳(1982-), 女, 硕士, 现主要从事果树分子生物学研究工作。
通讯作者: 李天忠。E-mail: litianzhong1535@163.com。
基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30671443); 北京市重点实验室资助项目。
收稿日期: 2008-07-29

1.2 总 DNA 提取和 PCR 扩增

取幼嫩叶片液氮速冻后于 -70°C 低温下保存待用。基因组 DNA 提取主要采用改良的 CTAB 法^[4], 经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 于 -20°C 储存备用。

S-RNase 基因特异性 PCR 及克隆测序: 根据梨 S 基因 DNA 序列中高度保守区 C1 和可变区下游的保守区 C3, 设计合成一对简并引物, ‘FTQQYQ’和‘IIWPNV’见表 1^[5], 引物由上海申能博彩生物技术有限责任公司合成。用提取的基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 反应条件参照谭晓风等的方法^[6]。PCR 扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分离, 切胶回收目的条带。回收产物连接到 pMD18-T 载体上, 转化大肠杆菌, 经菌落 PCR 鉴定, 挑取阳性克隆测序。测序由北京诺塞基因组研究中心有限公司完成。

1.3 限制酶酶切与鉴定

特异片段序列分析及 S 基因型确定: 用国家生物技术信息中心(NCBI)的 Blast 软件对所测得 S 基因序列进行检索, 根据相似程度, 确定测序结果的 S 基因名称, 从而确定供试梨品种的 S 基因型。

南果梨的 PCR 扩增产物用限制性内切酶 DraI 和 EcoRV 在 37°C 温度下进行酶切 3 h, 酶切产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳进行鉴定。

1.4 品种 S 基因型的特异性验证

根据测序结果以及 GeneBank 登录的基因序列设计 S 单元型特异性引物(见表 1), 对用兼并引物扩出的结果进行进一步的验证。

2 结果与分析

2.1 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳分离

由图 1 中可知, ‘锦丰’、‘苹香’、‘延边大香水’在 300~500 bp 之间有 2 条扩增条带。‘南果梨’、‘寒红’、‘小香水’、‘花盖王’和‘金香水’在 300~400 bp 之间处

有一条扩增条带,‘寒香’在510 bp 在有一条扩增条带。

表 1 研究所用的引物序列		
引物名称	引物序列 5'-3'	备注
PuS ₁ SpF	GATCATGTAGGCTTCTGGGAA	
PuS ₁ SpR	CAACCAATTCAGTCGTGTCCT	
PuS ₂₉ SpF	GC AAG AATACAACCAT TACTCCTC	
PuS ₂₉ SpR	CAGAAAAAT TGTGAT TGTGAGCC	
PuS ₂₇ SpF	CAGCTGTGGTATCCCGCAATAAT	
PuS ₂₇ SpR	AATCGGCCGGCAGAGATATG	
PuS ₁₉ SpF	ATACTCGAACCCAGT TGGT	
PuS ₁₉ SpR	AATATCGTGATCCT TGTGAAA	
PuS ₁ SpF	CAATCCGCCAATAATGAACGACAC	
PuS ₁ SpR	CAACCAATTCGTCA CCCACCATTA	
PuS ₃₄ SpF	TATTATTCATAGGGGATGACGG	
PuS ₃₄ SpR	TTCACGCAT TATTC AATCC TAT	
FTQQYQ	TTTACGCAGCAATATCAG	Ishimizu 等, 1999
anti-(L/M)WPNV	ACGTTCCGCCAAATA / CAT T	

表 2 9 个梨品种的 S 基因型				
品种	S 基因型	片断大小/bp	NCBI 登录号	亲本
寒香	S ₃₆ S _x	536' x	DQ417607. 1/	延边大香水× 苹香
苹香	S ₁ S ₃₁	367/ 345	DQ515793. 1/	苹果梨× 延边谢花甜
			DQ124366. 1	
南果梨	S ₃₄ S _x	341/ x	DQ269500. 1/	地方品种
金香水	S ₁ S _i	367/ 361	DQ515793. 1/	香水梨× 苹果梨
			AF518319. 1	
延边大香水	S ₃₁ S ₃₆	345' 536	DQ124366. 1/	地方品种
			DQ417607. 1	
寒红	S ₂₇ S ₃₄	352/ 341	EF643640. 1/	南果梨× 晋酥
			DQ269500. 1	
小香水	S ₂₉ S ₃₄	347/ 341	AY601098. 1/	地方品种
			DQ269500. 1	
花盖王	S ₃₁ S ₃₁ S ₃₄ S ₃₄	341/ 341/	DQ124366. 1/	花盖梨的四倍
		345' 345	DQ269500. 1	体大果芽变
			EF643638. 1	
锦丰	S ₁₉ S ₃₄	444/ 341	/ DQ269500. 1	苹果梨× 荏梨

2.3 品种 S 基因型的特异性验证

测序结果通过 Blast 软件分析后,在 Genebank 中找到该基因的全长序列后分别设计 S 单元型特异性引物(见表 1),来进一步的验证所得结果。如图 2 所示, PuS₁SpF 和 PuS₁SpR 只在‘苹香’和‘金香水’中有扩增,表明含有 S₁基因型; PuS₁₉SpF 和 PuS₁₉SpR 只在‘锦丰’中有扩增; PuS₂₇SpF 和 PuS₂₇SpR 只在‘寒红’中有扩增; PuS₂₉SpF 和 PuS₂₉SpR 只在‘小香水’中有扩增; PuS_iSpF 和 PuS_iSpR 只在‘金香水’中有扩增; PuS₃₄SpF 和 PuS₃₄SpR 能在‘南果梨’、‘寒红’、‘小香水’、‘花盖王’和‘锦丰’中都有扩增,表明含有 S₃₄基因型。这与用兼并引物扩增的结果一致。

图 1 梨品种 S 基因兼并引物扩增的琼脂糖凝胶电泳图

注. 1. 寒香; 2. 苹香; 3. 南果梨; 4. 金香水; 5. 延边大香水; 6. 寒红; 7. 小香水; 8. 花盖王; 9. 锦丰; M. Markers。

2.2 S 基因型的鉴定与分析

将 PCR 扩增产物经凝胶分离后回收,克隆并测序。在 GenBank 中与其它已登录的 S 基因核酸酶序列进行比对,以确定各个品种的 S 基因型。其中‘寒红’、‘小香水’、‘花盖王’的第一条带扩增较弱,经过切胶回收进行二次扩增后测序,‘金香水’经过多个克隆测序,分别获得 2 个 S 基因序列。根据相似程度确定这些品种的 S 基因型为:‘锦丰’为 S₁₉S₃₄,‘苹香’为 S₁S₃₁,‘金香水’为 S₁S_i,‘延边大香水’为 S₃₁S₃₆,‘寒红’为 S₂₇S₃₄,‘小香水’为 S₂₉S₃₄。

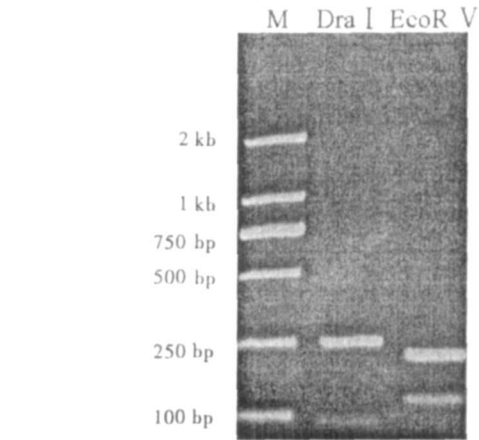
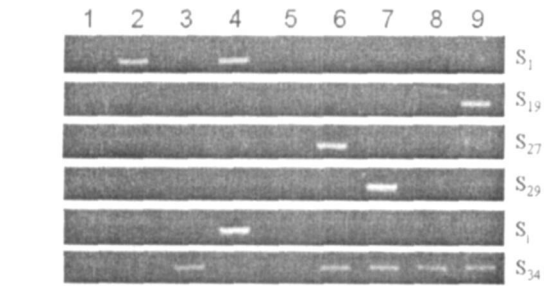


图 3 南果梨的 DraI、EcoRV酶切图谱



‘寒香’(S₃₆S_x)是‘延边大香水’(S₃₁S₃₆)和‘苹香’(S₁S₃₁)的杂交后代^[7],通过特异性引物扩增的方法只扩增出一条带,即 S₃₆,但通过亲本可以推断它的另外一个 S 基因可能是 S₁。同时,由于杂交过程中可能存在自交亲和,因而另外一个 S 基因还可能是 S₃₆ 或 S₃₁,而同样

图 2 梨品种 S 基因特异性扩增的琼脂糖凝胶电泳图

注. 1. 寒香; 2. 苹香; 3. 南果梨; 4. 金香水; 5. 延边大香水; 6. 寒红; 7. 小香水; 8. 花盖王; 9. 锦丰; M. Markers。

的引物在‘苹香’和‘金香水’中扩出 S_1 , 在‘苹香’、‘延边大香水’和‘花盖王’中可扩出 S_{31} , 却未能在寒香中扩增出来, 因此, 寒香的 S 基因型有可能是 $S_{31}S_{36}$ 。

‘寒红’($S_{27}S_{34}$)是‘南果梨’($S_{34}S_x$)的杂交后代, 与 S 基因型鉴定相符合, 其中‘寒红’的 S_{34} 基因应该是来自‘南果梨’。但是, 特异性引物扩增得不到‘南果梨’的另一个 S 基因。通过 S_{34} 等位基因的限制性内切酶 $DraI$ 和 $EcoRV$ 均能将此片段切开, 酶切产物大小分别为 250、91 bp 和 215、126 bp 的片段, 符合 S_{34} 等位基因被切割的情况(图 3)。另外, 张茂君等杂交试验证明:‘南果梨’($S_{34}S_x$)和‘寒红’($S_{27}S_{34}$)之间授粉表现为单向亲和^[8], 即‘南果梨’($S_{34}S_x$) \times ‘寒红’($S_{27}S_{34}$)的坐果正常, 花序坐果率为 93.3%; 反交则表现不亲和, 坐果率为 0。以上结果可以初步推断‘南果梨’的 S 基因型可能为 $S_{34}S_{34}$, 即纯合体。‘花盖王’是从‘花盖梨’中选出四倍体芽变品种^[9], 因此, 应为同源四倍体, 而测序结果为 $S_{34}S_{31}$, 则它的 S 基因型可能为 $S_{34}S_{34}S_{31}S_{31}$ 。

3 讨论

通过 S -RNase 基因特异性 PCR 扩增及克隆测序, 直接确定了‘苹香’、‘金香水’、‘延边大香水’、‘寒红’、‘小香水’、‘锦丰’等 7 个品种的 S 基因型。并推测出‘寒香’、‘南果梨’和‘花盖王’的 S 基因型。‘南果梨’、‘延边大香水’、‘小香水’是我国古老的地方品种, 菊池秋雄等人认为, 我国华北和东北地区栽培的梨品种, 均源出于秋子梨, 他把属于白梨系统的部分品种归于秋子梨的另一个变种^[10]。根据汪先甫等人对果树进化的推断, 秋子

梨和白梨在是平行演化的^[11]。通过对部分秋子梨代表品种的 S 基因鉴定发现, 原始的秋子梨品种存在的 S 基因型是白梨系统中常见的 S 基因型, 同时并未在秋子梨品种发现新的 S 基因型。因此, 秋子梨和白梨可能在自交不亲和基因分化完成后才发生的演化过程。

参考文献

[1] 谭晓风, 乌云塔娜, 杨谷良, 等. 白梨新 S 基因的克隆[J]. 中南林学院学报, 2005, 25(1): 1-3.
[2] 张舒艳, 吴俊, 张绍铃, 等. 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[J]. 园艺学报, 2006, 33(3): 496-500.
[3] Tomimoto Y, Nakazaki T, Hayashi R, et al. Analysis of self-incompatibility-related ribonucleases(S -RNase) in two species of pears, *Pyrus communis* and *Pyrus ussuriensis*[J]. Scientia Horticulturae, 1996, 66: 159-167.
[4] 马兵钢, 赵宗胜, 牛建新, 等. 梨叶片 DNA 提取的方法比较[J]. 石河子大学学报(自然科学版), 2000, 4(4): 26-32.
[5] Ishimizu T, Inoue K, Shimonaka M, et al. PCR-based method for identifying the S -genotypes of Japanese pear cultivars[J]. Theoretical and Applied Genetics, 1999(6): 961-967.
[6] 谭晓风, 乌云塔娜, 杨谷良, 等. 中国梨品种自交不亲和基因的分离与鉴定[J]. 中南林学院学报, 2005, 25(1): 1-3.
[7] 丁丽华, 张茂君, 冯美琦, 等. 抗寒、优质、软肉梨新品种寒香梨的选育报告[J]. 吉林农业科学, 2003, 28(1): 40-43.
[8] 张茂君, 李宝江, 邢国杰, 等. 秋子梨野生种和部分栽培品种交配亲和性研究[J]. 果树学报, 2007, 24(4): 427-432.
[9] 刘凤君, 张凯斌, 张志宏. 梨新品种‘花盖王’[J]. 园艺学报, 2003, 30(3): 370.
[10] 张鹏. 我国梨属植物种和品种分类的进展[J]. 山西果树, 1991(2): 2-5.
[11] 汪先甫, 初庆刚, 张长胜. 中国梨属植物的分类和演化[J]. 莱阳农学院报, 1992, 9(1): 18-21.

Identification of S -genotypes of Ussurian Pear Cultivars

ZHANG Chun-fang, LI Mao-fu, HAN Zhen-hai, LONG Shen-shan, LI Tian-zhong
(Institute of Horticultural Plants, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract: Partial S -RNase genes of Ussurian pear were amplified and cloned by using two pairs of primers based on the conserved regions of pear S -RNase structure in nine cultivars of unknown S -genotypes. The PCR products were sequenced and compared in GenBank. The S -genotypes of the nine tested cultivars were identified as follows: ‘Hanxiang’ was $S_{36}S_x$, ‘Pingxiang’ was S_1S_{31} , ‘Nanguoli’ was $S_{34}S_{34}$, ‘Jinxiangshui’ was S_1S_1 , ‘Yanbian Daxiangshui’ was $S_{31}S_{36}$, ‘Hanhong’ was $S_{27}S_{34}$, ‘Xiaoxiangshui’ was $S_{29}S_{34}$, ‘Huagaiwang’ was $S_{31}S_{31}S_{34}S_{34}$, ‘Jinfeng’ was $S_{19}S_{34}$.

Key words: Ussurian pear (*P. ussuriensis* Maxim); Self-incompatibility; S -RNase genes; S -genotyping