

秋子梨品种‘龙香’*S* 基因型的鉴定及梨 *S*₄₂-RNase 新基因的序列分析

梁文杰^{1,2}, 谭晓风¹, 王立新², 夏丽芝², 曹玉芬³, 张琳¹

(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. 温州科技职业学院, 浙江 温州 325006; 3. 中国农业科学院 果树研究所 辽宁 兴城 125100)

摘要: 利用特异引物对秋子梨品种‘龙香’的基因组 DNA 进行 PCR 扩增。通过对扩增片段的回收、克隆和测序, 获得 2 条大小分别为 469 bp 和 653 bp 的 DNA 序列, 将其推导氨基酸序列与 GenBank 中已登录的梨 *S* 基因的序列进行比对。结果表明: 469 bp 序列与已登录梨的 *S*₁₆-RNase 基因完全一致, 确定‘龙香’的 1 个等位基因为梨 *S*₁₆ 基因; 653 bp 序列与梨 *S* 基因的相似性在 75%~90% 之间, 且在高变区存在 6 个以上氨基酸的差异, 进一步分析确定为 1 条新的梨 *S* 基因, 命名为 *S*₄₂-RNase 基因, 该基因在 GenBank 的登录号为: EF088497。确定秋子梨品种‘龙香’的 *S* 基因型为 *S*₁₆*S*₄₂。

关键词: 秋子梨; ‘龙香’; 自交不亲和性; *S* 因型; 鉴定
中图分类号: S 661.203.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2009)12-0021-05

植物自交不亲和性(Self-incompatibility)是植物生殖过程中的一种普遍现象, 约有一半的被子植物为自交不亲和植物^[1]。自交不亲和性对于植物本身预防近亲繁殖具有重要作用, 但却给生产上带来了很大的不便。梨为配子体自交不亲和类型, 由单个基因位点的多个 *S* 等位基因所控制^[2], 同一品种或 *S* 基因型相同的品种之间为杂交不亲和, 否则为杂交亲和。梨品种 *S* 基因型是梨生产中授粉树配置和杂交育种亲本选择的依据。日本最早对其国内梨品种的自交不亲和性进行了分子水平上的研究, 并于 1999 年建立了快速检验日本梨 (*P. pyrifolia* Nakai)品种 *S* 基因型的 PCR-RFLP 体系^[3], 还用此体系发现了 *S*₈ 和 *S*₉ 基因^[4-5]。2002 年韩国学者在砂梨中发现了 *S*₁₀^[6]。中国梨 *S* 基因的分离和梨品种 *S* 基因型的鉴定工作开展的较晚^[7-8], 并且国内已鉴定 *S*

基因型的梨品种多为白梨和砂梨品种, 秋子梨品种 *S* 基因型鉴定的报道很少。秋子梨 (*Pyrus ussuriensis* Maxm.) 是梨属植物中最抗寒的栽培种, 原产于我国的东北、华北和西北地区, 日本、朝鲜及俄罗斯亦有分布。在多数秋子梨品种的果实经后熟后柔软多汁, 具浓郁的香气, 有些品种还适宜加工成果汁等制品。在寒地果树生产中, 秋子梨占有很重要的地位。‘龙香’是黑龙江省农业科学院园艺研究所采用‘赖子梨’自然授粉实生选育而成的优良品种。1982 年 2 月通过技术鉴定, 并正式命名为‘龙香’。该品种抗寒、抗黑星病、抗虫能力都很强。该试验报道了秋子梨品种‘龙香’*S* 基因型的鉴定及新基因 *S*₄₂-RNase 的分离和序列分析情况。

1 材料与方法

1.1 试验材料

从中国农业科学院辽宁果树研究所采集秋子梨品种‘龙香’的嫩叶 200 mg 左右, 置于液氮中, 带回实验室后于 -80℃ 冷冻保存。

1.2 试验试剂

ExTaq、pMD18-T Vector 购自日本 TAKARA 公司, DNA 回收试剂盒购自安比奥生物技术公司 (Ambio-gen Life Tech Ltd), 其它药品购自上海生工生物工程技术服务有限公司 (上海生工)。

1.3 总 DNA 提取和纯化

总 DNA 提取主要依据改良的 CTAB 方法^[9], 纯化按照《Current Protocols in Molecular Biology》的方法^[10]。

第一作者简介: 梁文杰(1981-), 男, 硕士, 助教, 现主要从事经济林栽培育种及林业生物技术方面的研究工作。E-mail: lwj6000@163.com。
通讯作者: 谭晓风(1956-), 男, 博士, 教授, 现主要从事经济林栽培育种及林业生物技术的研究工作。E-mail: tanxiaofeng@yahoo.com.cn。
基金项目: 国家林业局重点科学研究计划新技术开发与储备专项资金资助项目 (2006-12); 湖南省科技计划资助项目 (00JZY2115); 国家林业局重点(梨自交不亲和技术的开发与应用)资助项目 (2006-12)。
收稿日期: 2009-06-20

1.4 PCR 扩增

1.4.1 引物 梨 *S* 基因由 5 个保守区 (Conserved region)、1 个高频可变区 (Hyper variable region) 及 1 个内含子 (Intron) 和外显子 (Exons) 组成。该试验根据已报道的梨 $S_1 \sim S_9$ 的 HV 区两端的序列, 分别在信号肽上游 32bp 处、保守序列 C1 区设计了 5' 端延伸引物 P3 和正向引物 P1; 在 HV 区下游处设计了反向引物 P2。因 S_7 中下游引物序列 C 被 T 替换, 因此在 P2 引物中设计了 1 个简并碱基 Y (A/G)。引物由上海生工合成, 引物序列如下: P1: 正向引物, “FTQQYQ” (5'-TTTACGCAG-CAATATCAG-3')。P2: 反向引物, “anti-IIWPNV” (5'-AC(A/G)TTCGGCCAAATAATT-3')。P3: 5' 端延伸引物 (5'-TG CCTCGCTCTTGAACAAA-3')。

1.4.2 PCR 反应体系 PCR 扩增按照 Takeshi Takasaki 等^[5] 的 PCR 扩增反应体系和循环条件, 略有改动。反应体系和条件如下: 反应体系是总体积为 20 μ L, 包含 1.5 μ L PCR Buffer; 0.012 μ mol dNTPs, 0.05 μ mol MgCl₂, 17 pmol P1/P2 或 P3/P2, 1 U Taq DNA 聚合酶, 10 ng 模板 DNA。PCR 循环条件为: 94 $^{\circ}$ C 2 min; 94 $^{\circ}$ C 15 s, 48 $^{\circ}$ C 30 s, 70 $^{\circ}$ C 2 min, 10 个循环; 94 $^{\circ}$ C 15 s, 48 $^{\circ}$ C 30 s, 70 $^{\circ}$ C 2 min 30 s, 25 个循环; 70 $^{\circ}$ C 5 min。

1.5 PCR 产物回收、克隆、测序

PCR 产物回收按照 Ambigen Life Tech Ltd 的 Puprep Gel Extraction Kit 操作, 将回收产物按照 pMD 18-T Vector (TaKaRa) 说明书操作, 连接到 T 载体上, 转化至大肠杆菌 DH5 α , 挑选阳性克隆送至上海生工测序。

1.6 序列分析

测序结果用生物信息学软件拼接后, 经 BLASTn 同源性分析, 确认为梨 *S* 基因。梨 *S*-RNase 基因 HV 中含有一段内含子序列, 该研究根据双子叶植物内含子和外显子保守的边界序列 (5' GT-AG 3') 和已分离的梨 *S*-RNase 基因的一级结构特点^[5, 11-12], 查找 HV 区中的内含子序列, 并获得外显子序列, 推导出 HV 区+周边区的氨基酸序列, 进一步比较确认该 *S* 基因。

2 结果与分析

2.1 ‘龙香’ 自交不亲和基因特异性扩增及 DNA 片段的回收克隆

用特异引物 P1 和 P2 对秋子梨品种‘龙香’基因组 DNA 进行 PCR 扩增, PCR 产物出现 2 条带, 分别约为 530 bp 和 340 bp。500~600 bp 之间的带用此引物扩增在以前的梨品种中未出现过, 初步判断 530 bp 左右的 *S* 基因片断为 1 条新基因。为了得到较长的序列, 又用 5' 端延伸引物 P3 和反向引物 P2 对其进行扩增, PCR 产物同样出现 2 条带 (图 1, 2), 分别约为 650 bp 和 460 bp, 比

P1 和 P2 扩增出的对应条带分别大 120 bp 左右, 这和引物设计位置相符合。因此选择 P3 和 P2 扩增的较长片段进行下一步试验, 以便获得较长的序列。

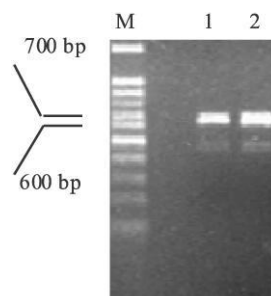


图 1 龙香 *S* 基因特异引物扩增

注: 1. ‘龙香’; 2. ‘龙香’。

Fig. 1 Amplification of *S*-RNase fragments from *Pyrus ussuriensis* Longxiang

Note: M. DNA marker 1. ‘Longxiang’, 2. ‘Longxiang’.

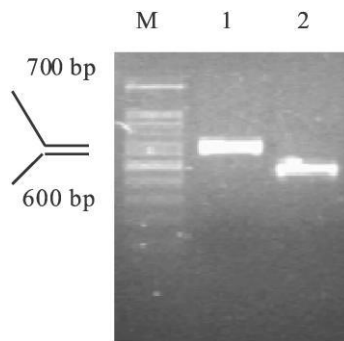


图 2 PCR 回收产物电泳图

注: 1. 目的条带 1; 2. 目的条带 2。

Fig. 2 The figure of PCR products extraction

Note: 1. *S*-RNase fragment one; 2. *S*-RNase fragment two.

2.2 ‘龙香’ 品种 469 bp 基因片段的分离鉴定

以 BLASTn 的默认参数对克隆到的核酸序列进行相似性搜索, 发现 469 bp 的序列 (图 3) 与 GenBank 中梨的 S_{16} (登录号: AY249431) 完全一致, 确定为梨 S_{16} -RNase。

2.3 ‘龙香’ 品种 653 bp 基因片段的分离鉴定

653 bp 的序列至少能搜索到 90 个植物种的 *S*-RNase 序列, 且相似性达 70%~90%, 充分说明该片段是 *S*-RNase 基因, 需对此序列进行进一步分析。‘龙香’ *S* 基因型初步确定为 $S_{16}S_x$ 。

借鉴 GenBank 已登录梨的 *S* 基因的特点, 找出保守区边界, 推导出 HV 区+周边区的氨基酸序列。 S_x 推导氨基酸序见图 4。

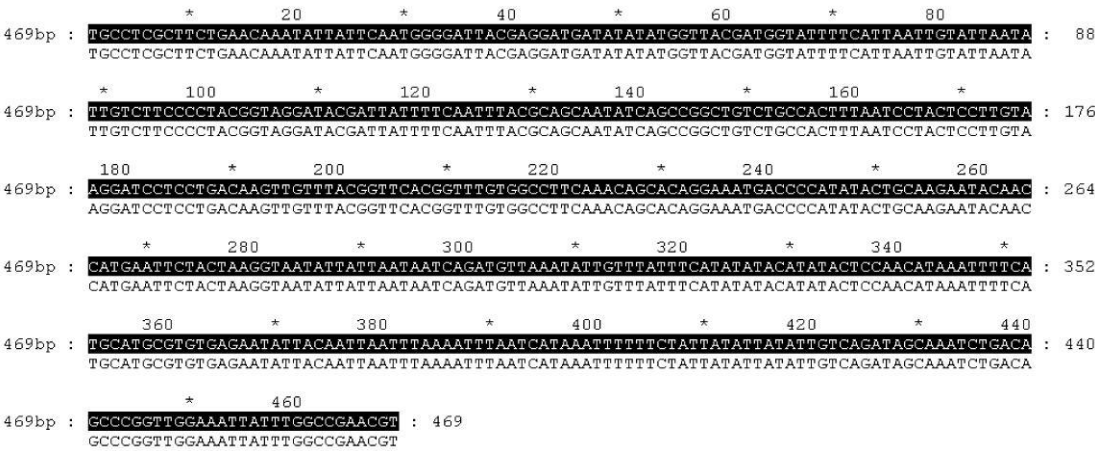


图 3 469 bp 基因片段的核苷酸序列
Fig.3 Nucleic acid sequence of the 469 bp gene fragment

将 S_x 推导的氨基酸序列和 GenBank 中已有的梨的氨基酸序列进行比对(图 5)。从图中可以看出 S_x 推导的氨基酸完全符合梨 S 基因氨基酸序列所具有的特点: 具有 S 基因的信号肽、C1、C2 保守区和 HV 高变区。除去 HV 区, S_x 与其它的 S 基因相似性高达 75%~90%。
HV 区是 S -RNase 的识别区, S_x 的 HV 区和以上 S 基因 HV 区的相似性仅为 10%~63%(S_2 为 74%), 因此可以初步确定 S_x 是 1 条新基因。通过有信号肽的 S 基

因比对可以看出, 除 S_2 外, 信号肽由 27~28 个氨基酸组成, 除 S_2 和 S_8 外, 其余的相似性都很高。 S_x 的信号肽由 27 个氨基酸组成, 第一个“ I ”被“ F ”取代。保守区 C1 由 11 个氨基酸组成。 S_x 的 C1 区的第 1 个“ Y ”由“ F ”取代, 保守区 C2 也由 11 个氨基酸组成, HV 区除 S_{15} 和 S_{37} 都由 13~15 个氨基酸组成, 且为辨别 S 基因型的主要区域。 S_x 的 HV 区由 13 个氨基酸组成, 与 S 基因的 HV 区最接近, 将 S_x 和 S_2 的 HV 区单独比对(见图 6)。



图 4 S_x 核酸序列(上列)及推导的氨基酸序列(下列), 核酸序列中阴影部分为内含子

Fig.4 Nucleic acid sequence of the gene (upper) and the deduced amino acid sequence (listed below), The intron in the shaded nucleic acid sequence

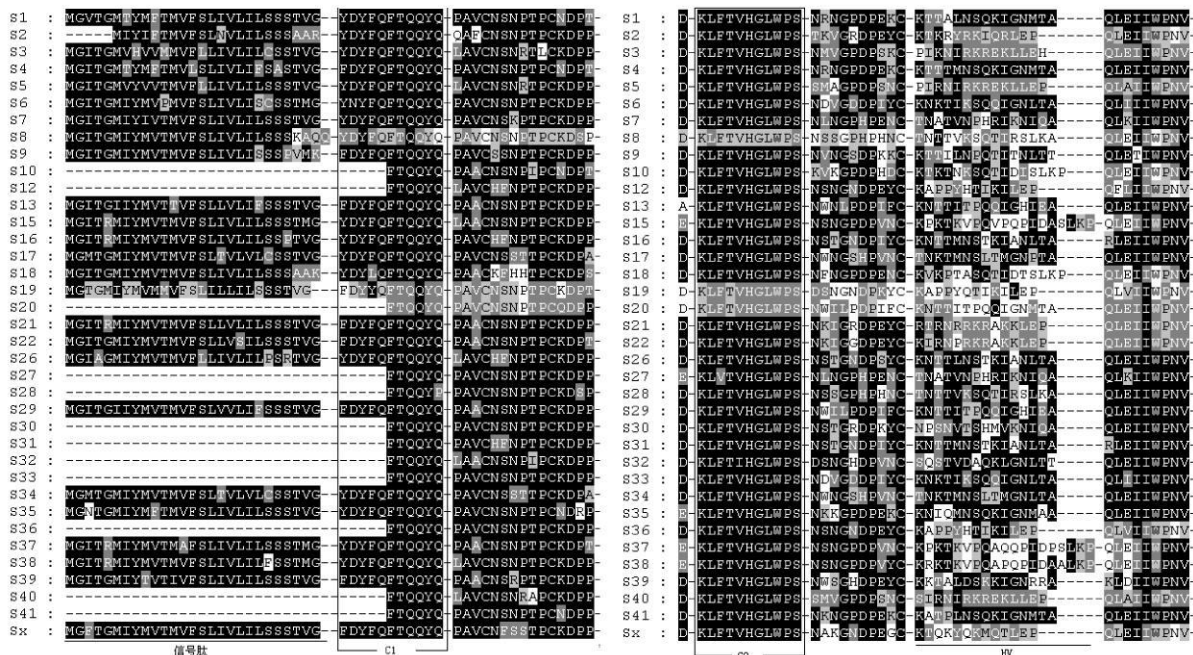


图5 推导氨基酸序列与已知其它梨S基因氨基酸序列比对

Fig. 5 Putative amino acid sequences alignment among *Sx* and pear *S*-RNases on Genbank

由图6可知, *Sx*的HV区的第3、4、6、8、10个氨基酸“K”, “R”, “R”, “I”, “R”分别被 *Sx*的HV区的“Q”, “K”, “Q”, “M”, “T”所取代, 据此可以判断 *Sx*是新基因。把此基因命名为 *S42*-RNase, 提交至 GenBank, 登录号为: EF088497。

(1) 1 13
S2H (1) KTKRYRKIQRIEP
SxH (1) KTQKYQKMOTIEP
 Consensus (1) KT KY KIQ IEP

图6 *Sx* HV区与 *S2* HV区比对图Fig. 6 Putative amino acid sequences alignment of Hyper variable regions of *Sx* and *S2*

3 结论与讨论

该研究从秋子梨品种‘龙香’中分离鉴定出1个新的 *S*-RNase基因, 所分离的基因序列为653 bp, 到目前为止, 是从梨基因组用“FTQYYQ”和扩增中唯一600~700 bp之间的序列。并采用PCR技术结合DNA测序技术确定了秋子梨品种‘龙香’的 *S*基因型为 *S16S42*。目前为止 GenBank 中登录的东方梨 *S*基因已达到42条。除了 *S1*~*S9*是从日本梨, *S10*从韩国梨中分离出来的外, 其余均为中国梨中分离出来的。从此也可以证明我国梨资源丰富, 研究我国的梨品种的自交不亲和很可能是亚洲梨自交不亲和研究的突破口。

日本学者为了快速检测分离出来的 *S*-RNase基因

创立了适合日本梨的PCR-RFLP体系, 但对于中国梨来说, 能够被此系统的酶切也无法证明是 *S1*~*S9*之间的基因, 在 *S30*-RNase具有NdeI的酶切位点, *S33*-RNase具有AccII和HincII的酶切位点, *S42*-RNase具有AccII的酶切位点等。所以对于中国梨品种来说日本学者所建立的PCR-RFLP系统有一定的局限性, 尤其对于一个新的基因来说, 测序是较快捷和准确的办法, 因此该试验采取了直接测序的方法。但测序也限制了中国梨 *S*基因分离鉴定的快捷性。随着越来越多的 *S*基因型的鉴定, 应该建立一种类似日本学者所创立的快速检测 *S*基因型的方法来快速经济地鉴定中国梨品种的 *S*基因型。

参考文献

- [1] Hiscock S J, Kues U, Dickinson H G. Molecular mechanisms of self-incompatibility in flowering plant and fungi-different means to the same end [J]. Trends Cell Biol, 1996(6): 421-428.
- [2] Kim H T, 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(3): 444-451.
- [3] Ishimizu 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.
- [4] Castillo C, Takeshi, Toshihiro S, et al. Cloning of the *Sg*-RNase (*Sg*-allele) of Japanese Pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai) [J]. Plant Biotechnology, 2002, 19(1): 1-6.
- [5] Takasaki T, Okada K, Castillo C, et al. Tetsu Nakanishi. Sequence of the *Sg*-RNase cDNA and PCR-RFLP system for discriminating *S1* to *S9*-allele in Japanese pear [J]. Euphytica, 2004, 135: 157-167.
- [6] Kim H T, Hirata Y, Kim H T, et al. The presence of a new *S*-RNase

allele (S₁₀) in Asian pear (*Pyrus pyrifolia*(BURM; Nakai)) [J]. Genetic Resources Crop Evolution, 2006, 53: 1375-1383.

[7] 谭晓风, 乌云塔娜, 中西テツ, 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

[8] 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[J]. 园艺学报, 2006, 33(3): 496-500.

[9] 乌云塔娜, 张党权, 谭晓风. 梨不同 DNA 提取方法效果的研究[J]. 中国生物工程杂志, 2003, 23(7): 98-101.

[10] Ausubel F, Brent R, Robert E, et al. Current Protocols in Molecular Bi-

ology[M]. John Wiley & Sons Inc. 1995.

[11] Sassa H, Ninano T, Kowiyama Y, et al. Self-incompatibility (S) alleles of the rosaceae encode members of a distinct class of T2/S ribonuclease superfamily [J]. Molecular and General Genetics MSS, 1996, 5(250): 547-557.

[12] 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]. Journal of Plant Physiology and Molecular Biology, 2007, 33(1): 1-10.

Identification of S-genotypes and Sequence Analyses of S₄₂-R Nase from ‘ LongXiang’ (*Pyrus ussuriensis*)

LIANG Wen-jie^{1,2}, TAN Xiao-feng², WANG Li-xin², XIA Li-zhi², CAO Yu-fen³, ZHANG Lin¹

(1. The Key Lab of Non-wood Forest Product of State Forestry Administration, Central South University of Forestry and Technology, Changsha, Hunan 410004, China 2. Wenzhou Vocational College of Science and Technology, Wenzhou, Zhejiang 325006, China 3. Fruit Tree Research Institute of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Xingcheng, Liaoning 121600, China)

Abstract: Using two pairs of primers specific to pear S-PCR amplification from genomic DNA of Chinese pear cultivar Longxiang’ was carried out. Then the PCR products were extracted, cloned and sequenced. Consequently, 469 bp and 653 bp DNA sequences of S-RNase were determined. Comparison of the two S-RNase alleles and those deposited under GenBank revealed that the 469 bp S-allele was identical to S₁₆-allele, and that the 653 bp S-allele represents a new allele and was 75%~90% homologous to other pear S-alleles. The new S-allele was thus named S₄₂-RNase allele that was submitted to GenBank (Accession number EF088497). The S-genotype of ‘ Long Xiang’ (*P. ussuriensis*) was identified as S₁₆S₄₂.

Key words: *Pyrus ussuriensis*; ‘ Longxiang’ ;Self-incompatibility; S-genotype; Identification

农药冬季安全高效施用技巧

冬季气温低,病虫害的活动大都处于隐蔽状态。为了提高农药的防治效果,除对症施药外,还应注意掌握以下技巧。

1 选择晴天高温时段用药

因为害虫在气温较高时的取食量与呼吸强度均较大,药液喷洒到虫体上后被带到体内的药物也多些,有利于发挥毒杀作用。

2 适当增加用药量

在冬季如果按常规用量施药,害虫往往食药后不死亡,所以要适当增加用药量。具体用量应根据气温高低

而定,但一般不超过常规用药量的50%。冬季施用农药时要严格按稀释倍数加水,不能随意加大或减少水的用量。

3 合理选用适宜冬季施用的农药

一般情况下,胃毒剂和触杀剂受温度的影响小些,内吸剂和熏蒸剂受温度的影响大些。如敌杀死、敌敌畏、乐果等农药,低温会明显影响其杀虫效果;而溴氰菊酯、辛苦硫磷、石硫合剂等农药,在较低温度下施用仍能发挥较好的杀虫效果。此外,冬季施用除草剂,其显示出效果的时间比夏季施

用后要长得多,用药后要耐心等待,一般不需重新喷药。

4 优先使用土农药

土农药的优点是价格低廉,缺点是容易产生药害。但果树冬季休眠期对农药抗性强,用波尔多液、石硫合剂等土农药防治害虫,既经济又有效。

5 注意延长农药的安全间隔期

冬季施用农药,农药的降解速度变慢,农药在作物体内的残存期也相对延长,冬季防治蔬菜作物的病虫害时,应特别注意延长农药的安全间隔期,以确保安全。