

新疆野扁桃六个新 *S-RNase* 基因的克隆和序列分析

曾 斌^{1,2}, 刘梦雯¹, 王建友³, 王 波¹

(1. 新疆农业大学 林学与园艺学院, 新疆 乌鲁木齐 830000; 2. 新疆农业大学 果树学新疆特色果树研究中心, 新疆 乌鲁木齐 830000; 3. 中国林业科学院 新疆分院, 新疆 乌鲁木齐 830000)

摘 要:以我国闻名于世的珍稀野生果树新疆野扁桃为试材, 利用蔷薇科果树自交不亲和性通用引物组合, 采用 *S-RNase* 等位基因 PCR 扩增, RT-PCR 和 RACE 等技术方法, 克隆了新疆野扁桃不同株系的 *S-RNase* 基因, 以期新疆野扁桃自交不亲和分子机理的进一步研究提供基本的资料。结果表明:从新疆野扁桃不同株系中克隆鉴定出了 6 个新的 *S-RNase* 基因, 分别命名为 *PteS*₁₀ (GeneBank 登陆号: KJ755352), *PteS*₁₁ (GeneBank 登陆号: KJ755353), *PteS*₁₂ (GeneBank 登陆号: KJ755354), *PteS*₁₃ (GeneBank 登陆号: KJ755355), *PteS*₁₄ (GeneBank 登陆号: KJ755356) 和 *PteS*₁₅ (GeneBank 登陆号: KJ755357); 并对这 6 个新基因进行了序列生物信息学分析, 为基于新疆野扁桃自交不亲和特性的遗传改良以及分子调控模式奠定试验基础。

关键词:新疆野扁桃; 自然居群; 自交不亲和性; *S-RNase* 基因; 克隆鉴定

中图分类号:S 622.103.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2017)07-0105-11

显花植物的远亲繁殖方式主要有雌雄同株、雌雄异株, 还有极少的雌全异株以及以上这些类型以不等比例混合的方式, 其中, 90% 左右是雌雄同花类型, 在这一部分植物种中, 远亲繁殖方式有雄蕊或雌蕊先熟、花柱异常、选择性受精、自交不亲和性以及适应于虫媒和风媒传粉的其它特殊形态和生理特征等多种多样的异花授粉方式^[1]。

蔷薇科果树属于配子型自交不亲和类型(GSI, gametophytic self-incompatibility), 该类型是由花粉配子体核基因型决定花粉与雌蕊的不亲和反应, 即当花粉中的一个 S 等位基因与花柱中的一个等位基因相同时即表现不亲和性, 花粉和雌蕊的相互识别作用受控于一个高度多态的 S-位点复等位基因位点^[2]。多年的研究显示 S-位点编码的 S-核酸酶(*S-RNase*) 在生理上扮演着 S-locus 特异细胞毒素的角色, 如果当花粉与雌蕊中均含有相同的 S-locus

时, 花柱 *S-RNase* 进入花粉管, rRNA 产生降解, 就会抑制花粉在雌蕊中的伸长, 表现性状即显示自交不亲和性^[3]。

新疆野扁桃(*Prunus tenella* Batsch. syn *Amygdalus ledebouriana* Schlecht.) 属蔷薇科李亚科桃属扁桃亚属植物, 也称野巴旦杏, 地史新生代残遗物种。在我国的新疆塔城地区裕民县境内分布有世界最大连片面积的新疆野扁桃林自然保护区(2 000 hm²), 同时, 该物种还在塔城市郊、托里县、布尔津县和哈巴河县等境内有分布, 该物种分布林是重要的种质基因库, 具有非常重要的研究价值^[4], 授粉生物学表明新疆野扁桃具有自交不亲和性^[5]。

该研究以新疆境内分布的 5 个自然居群不同株系的野扁桃叶片以及花器官部分为试材, 采用 RT-PCR 和 RACE 等技术成功克隆鉴定到了 6 个新 *S-RNase* 基因, 并对这 6 个新基因进行了序列的生物信息学分析, 以期为基于新疆野扁桃自交不亲和特性的遗传改良以及分子调控模式奠定试验基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 植物材料 采集 5 个不同天然分布居群中的新疆野扁桃株系, 各居群内每样株均有间隔地选

第一作者简介:曾斌(1969-), 男, 博士, 副教授, 现主要从事果树种质资源及生物技术的教学与科研等工作。E-mail: zbxnd@163.com.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31660557, 31260465); 新疆维吾尔自治区果树学重点学科资助项目(201007)。

收稿日期:2016-12-05

取 30 个样株,春季嫩叶展露期采 150 份叶样,液氮保存, -80 ℃ 冰箱存贮备用,图 1 表示 5 个居群的自然地理分布情况。另外,取以上 150 个株系材料当中

的 25 个株系(每个居群各取 5 个)的气球期的花柱,再取 1 个株系的花药、叶片、花瓣和花萼等部分,液氮保存, -80 ℃ 冰箱存贮备用。

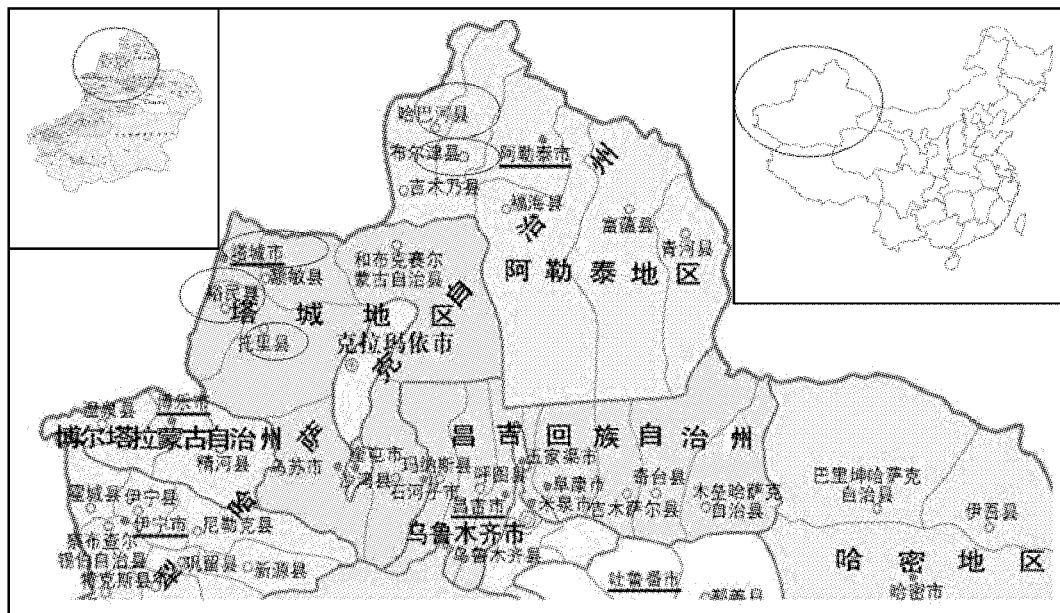


图 1 新疆野扁桃 5 个不同天然居群的分布

Fig. 1 The natural distribution of the five populations of *Prunus tenella* in Xinjiang

1.1.2 菌株、酶和生化试剂 大肠杆菌菌株 *E. coli* DH5 α , *Taq* DNA 聚合酶, pMD18-T vector, DNA Maker; DNA、RNA、RACE、cDNA 反转录及胶回收试剂(盒)均购自大连宝生物工程公司,所用生化试剂均为进口分析纯。

1.2 试验方法

1.2.1 基因组总 DNA 以及 RNA 的提取 叶片约 0.5 g,液氮研磨,DNA 提取采用 CTAB 法^[6],花药、花柱、花瓣、叶片和花萼等各约 0.1 g,液氮研磨,RNA 提取试剂盒提取总 RNA。

1.2.2 基因组 DNA *S-RNase* 等位基因的 PCR 特异性扩增 PCR 扩增 *S-RNase* 等位基因试验的引物组合为:Pruc2: 5'-CTATGGCCAAGTAATTATTCAAACC-3', Pruc5: 5'-TACCACTTCATGTAACAACCTGAG-3', PCR 扩增程序为:94 ℃ 预变性 4 min,94 ℃ 变性 30 s,50 ℃ 退火 2 min,68 ℃ 延伸 2 min,10 个循环后再 94 ℃ 变性 10 s,56 ℃ 退火 2 min,68 ℃ 延伸 130 s,25 个循环后再延伸 5 min^[7],引物由北京金唯智公司合成。扩增产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶检测,回收目的条带,连接 pMD18-T,转化感受态大肠杆菌菌株 DH5 α ,阳性克隆送北京百迈客公司测序。

1.2.3 合成 cDNA 链及 RACE 扩增试剂盒反转录

合成 cDNA 花柱 cDNA 为模板,PCR 扩增目标基因中间片段,扩增引物仍为 PruC2 和 PruC5,PCR 反应程序为 94 ℃ 预变性 4 min,94 ℃ 30 s,55 ℃ 30 s,72 ℃ 60 s,反应 40 个循环;72 ℃ 延伸 7 min^[8],产物用 1.0% 的琼脂糖凝胶检测,回收、连接及转化,阳性克隆送北京百迈客公司测序,按 RACE 试剂盒的要求设计 3',5'-RACE 特异性引物。巢式 PCR 扩增末端序列。

1.2.4 *S-RNase* 基因片段的拼接和验证 用 DNASTAR 软件把中间序列和 RACE 结果进行序列拼接并 BLAST 比对,设计特异引物,cDNA 为模板进行 PCR 扩增,测序验证。

1.2.5 *S-RNase* 基因组织特异性表达分析 根据克隆到的新疆野扁桃 *S-RNase* 基因设计特异引物,以花药、花柱、花瓣、叶片和花萼的 cDNA 为模板,*Actin* 基因作为参照,PCR 扩增,1.5% 琼脂糖凝胶检测,确定基因组织特异性表达情况。

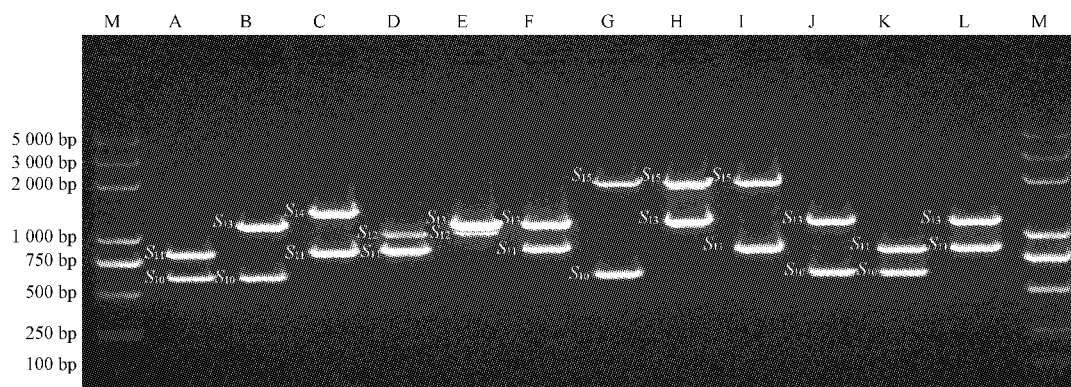
1.2.6 *S-RNase* 基因的序列比较和系统树构建 利用 NCBI 在线软件 Blast 序列比对,分析确定新基因,予以命名,用 DNASTAR 软件对蔷薇科属的植物序列进行比较,结果用 MEGA 4.1 软件中的邻接法(neighbor-joining,NJ)构建系统树。

2 结果与分析

2.1 *S-RNase* 等位基因的扩增及克隆鉴定

选用蔷薇科李属通用引物组合 PruC2 和 PruC5 对全部 150 株系基因组 DNA 进行特异性 PCR 扩增,全部 150 株系绝大多数扩增出了 2 条特异的条

带。对所有扩增出的图版归类分析,将相同的电泳带形归为一类,150 个株系扩增出的电泳图最终归类为 A~L 号等 12 个典型的株系电泳图谱,图 2 表示编号为 A~L 号株系的扩增结果。



注:M, DL 5 000 Marker; A~L 个野扁桃株系。

Note: M, DL 5 000 Marker; A~L indicate 12 *Prunus tenella* accessions used.

图 2 引物组合 PruC2 和 PruC5 对 12 个野扁桃株系基因组 DNA 的 *S-RNase* 等位基因扩增图

Fig. 2 PCR amplification of *S-RNase* alleles with primers PruC2 and PruC5 in 12 *Prunus tenella* accessions

测序结果比对发现,相同位置上的条带核苷酸序列相似性至少均在 99.5% 以上。在 GenBank 中进行 Blast 分析比对显示,与这些核苷酸序列同源性很高的前 50 个基因均为蔷薇科李属的 *S-RNase* 基因,核酸序列及其推测的氨基酸序列深入分析判断,这些株系中相同大小的扩增片段应是同一种 *S-RNase* 基因,分析总结,受试的新疆野扁桃全部 150 个株系中共包含了 6 种不同的核苷酸序列。

SURBANOVSKI 等^[5]研究了分布于欧洲巴尔干半岛的野扁桃(*Prunus tenella* Batsch.)的 *S-RNase* 基因,并克隆出了该种的 9 个 *S-RNase* 等位基因片段,已将其命名为 *PteS*_{1~9},为避免在野扁桃(*Prunus tenella* Batsch.)中基因型混乱,因此,该研究依上述作者命名顺序,对克隆到的新疆野扁桃 6 个新的核苷酸序列进行命名。分别为:*PteS*₁₀ (602 bp)、*PteS*₁₁ (870 bp)、*PteS*₁₂ (1 143 bp)、*PteS*₁₃ (1 330 bp)、*PteS*₁₄ (1 485 bp)和 *PteS*₁₅ (2 077 bp)。所得到的基因组 DNA 序列均已成功在 NCBI 网站完成注册,登陆号如下:*PteS*₁₀ (GeneBank 登陆号: KJ755352)、*PteS*₁₁ (GeneBank 登陆号: KJ755353)、*PteS*₁₂ (GeneBank 登陆号: KJ755354), *PteS*₁₃ (GeneBank 登陆号: KJ755355)、*PteS*₁₄ (GeneBank 登陆号: KJ755356)和 *PteS*₁₅ (GeneBank 登陆号: KJ755357)。

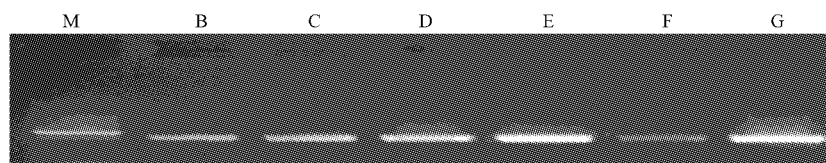
2.2 不同株系 *S-RNase* 基因克隆

采用 PruC2 和 PruC5 引物组合,在 B、C、D、E、

F、G 号等 6 个新疆野扁桃株系的花柱 cDNA 中 PCR 扩增均得到了约为 450 bp 的片段(图 3),产物回收、连接、转化、质粒酶切,每条带均至少挑 5 个单克隆,阳性克隆送北京百迈客公司测序,分析归类,共得到 6 个不同的序列,在 NCBI 数据库上 Blast 的结果表明,6 条序列都是 *S-RNase* 基因。

归类后初步确定可能克隆到了新疆野扁桃的 6 个不同 *S-RNase* 基因 CDS 的中间序列,以这些中间序列为模板,根据 SMART™ RACE cDNA Amplification Kit(BD)的说明书操作,分别扩增获得了各个 *S-RNase* 基因的 3'和 5'端,使用 DNASTAR 软件对各个 *S-RNase* 基因两端的序列进行拼接,连接后获得了 6 个新的拼接序列,下一步根据各个拼接的 *S-RNase* 基因序列设计特异引物,以 B、C、D、E、F、G 号等 6 个新疆野扁桃株系的花粉 cDNA 为模板扩增获得目的片段,回收,测序,结果显示与各自拼接片段一致。

3'-RACE 和 5'-RACE 采用巢式 PCR 方式进行,克隆得到的 6 个新的 CDS 片段情况如下:*PteS*₁₀-cds (510 bp)、*PteS*₁₁-cds (675 bp)、*PteS*₁₂-cds (654 bp)、*PteS*₁₃-cds (585 bp)、*PteS*₁₄-cds (711 bp)和 *PteS*₁₅-cds (537 bp)。其中 *PteS*₁₄-cds 为全长序列,这 6 个新的 CDS 片段与蔷薇科李属的 *S-RNase* 基因翻译的氨基酸序列有很高的同源性(85%~96%),同时,这 6 个新的 CDS 氨基酸序列互相之间也显示出较高的相似性(63.7%~81.2%)(图 4)。



注: M 100 bp DNA 标准分子量梯形标记。

Note: M 100 bp DNA Ladder Marker.

图 3 引物组合 PruC2 and PruC5 对 6 个野扁桃株系花柱 cDNA 的 PCR 扩增图

Fig. 3 PCR amplification with primer PruC2 and PruC5 in style cDNA of six *Prunus tenella* accessions

		平均相似度 Percent identity							
分歧 Divergence		1	2	3	4	5	6		
	1		72.4	70.6	27.9	81.2	66.5	1	<i>PteS10</i>
	2	31.3		69.7	70.8	69.3	65.9	2	<i>PteS11</i>
	3	30.2	27.9		75.9	74.8	63.7	3	<i>PteS12</i>
	4	31.3	35.7	23.0		72.3	70.9	4	<i>PteS13</i>
	5	19.4	30.3	29.4	40.4		68.7	5	<i>PteS14</i>
	6	38.8	37.1	36.8	33.2	38.5		6	<i>PteS15</i>
		1	2	3	4	5	6		

图 4 新疆野扁桃 6 个 *S-RNase* 基因氨基酸序列的相似性比较

Fig. 4 Comparison of six *S-RNase* amino acid sequences of *Prunus tenella*

2.3 *S-RNase* 基因 cDNA 与对应的基因组 DNA 的序列比较

进一步对新疆野扁桃中克隆到的 cDNA 与对应的基因组 DNA 的序列进行比较归类: *PteS10* 与 *PteS10*-cds 互为对应, 同样, 也确定了 *PteS11* 与

PteS11-cds; *PteS12* 与 *PteS12*-cds; *PteS13* 与 *PteS13*-cds; *PteS14* 与 *PteS14*-cds 以及 *PteS15* 与 *PteS15*-cds 的对应关系, 所克隆到的 *S-RNase* 基因 cDNA 与对应的基因组 DNA 的序列比较见图 5~10。

S10	0
<i>PteS10</i>	TTTGTACGTTATGAGCAGTGGATCTTATGACTATTTCAATTTGTGCAACAATGGCCACGCAACTGCAGAGTTGCGATCAAGCGACCTTGCTCCAATCCCGGCCATTACAATAT	120
Consensus	
S10CTATGGCCAGTAATTATTCAAACCAACGATGCTAGTAACGTCAATGGGACGCAATTTAAGATACAGAATTTGTAGAGTGTGTATTTTCTTCACTCACAT	105
<i>PteS10</i>	TTACCAATCCATGGCTATGGCCAGTAATTATTCAAACCAACGATGCTAGTAACGTCAATGGGACGCAATTTAAGATACAGAATTT.....	209
Consensus	ctatggccaagtaattattcaaacccaacgatgcttagtaactgcaatgggacgcaatttaagatacagaattt	
S10	TTGTTTTAGAAAATTAGATTGTCATCTGAAAATAAGATAATTTTTTCAATACACACTTTGGGTGTATATAATTTTTTTTCAATACACATGTAAGGGATAATCAAAATATAACTATC	225
<i>PteS10</i>	209
Consensus	
S10	CCTTACGTTTCTACGTTTCTCGTAATATGTATATATGCTTGGATGCCACAGTTTCCTTATTTACGATCCAGACTGAAGATGTCTTGGCCAGACGTGGAAAGTGGCAATGATACAAAG	345
<i>PteS10</i>GTTTCCTTATTTACGATCCAGACTGAAGATGTCTTGGCCAGACGTGGAAAGTGGCAATGATACAAAG	276
Consensus	gtttccttattttacgattccagactgaagatgtcttggccagacgtggaaagtgccaatgatacaaaag	
S10	TTTGGGAAGGCGAATGGAACAACATGGTACATGTTCCGAACGGATACTTAACATAATGCAATCTTCAGCGATCACAATCAATGTGGAAATCACAATATTACAGAGATCCTTAA	465
<i>PteS10</i>	TTTGGGAAGGCGAATGGAACAACATGGTACATGTTCCGAACGGATACTTAACATAATGCAATCTTCAGCGATCACAATCAATGTGGAAATCACAATATTACAGAGATCCTTAA	396
Consensus	ttttgggaaggcgaatggaacaacatggtacatgttccgaacggatacttaacataatgcaatacttccagcgatcacaatcaatgtggaatcacacaattattacagagatccttaaa	
S10	AACGCTTCAATCGTACCACATCCGACACAAACATGGAAGTACTCGACATAGCATACCCCATTAATCAGCAACTGGAAGAACACCCCTCTACGTTGCAACAGGATAAGAGTACTCAG	585
<i>PteS10</i>	AACGCTTCAATCGTACCACATCCGACACAAACATGGAAGTACTCGACATAGCATACCCCATTAATCAGCAACTGGAAGAACACCCCTCTACGTTGCAACAGGATAAGAGT.....	510
Consensus	aacgcttcaatcgtaaccatccgacacaaacatggaagtactcggacatagcatcaccatttaacagcaactggagaacacccctctactgttgcacacaggataagagt	
S10	TTGTTACATGAAGTGGT	602
<i>PteS10</i>	510
Consensus	

图 5 基因组 DNA 的序列 *PteS10* (图示为 S10) 与 *PteS10*-cds (图示为 *PteS10*) 的 cDNA 的序列比较

Fig. 5 Comparison of genomic DNA *PteS10* (Shown as S10) and cDNA sequences *PteS10*-cds (Shown as *PteS10*)

图 8 基因组 DNA 的序列 *PteS*₁₃ (图示为 S13) 与 *PteS*₁₃-cds (图示为 *PteS*₁₃) 的 cDNA 的序列比较

Fig. 8 Comparison of genomic DNA *PteS*₁₃ (Shown as S13) and cDNA sequences *PteS*₁₃-cds (Shown as *PteS*₁₃)

[illegible]

图 9 基因组 DNA 的序列 *PteS*₁₄ (图示为 S14) 与 *PteS*₁₄-cds (图示为 *PteS*₁₄) 的 cDNA 的序列比较

Fig. 9 Comparison of genomic DNA *PteS*₁₄ (Shown as S14) and cDNA sequences *PteS*₁₄-cds (Shown as *PteS*₁₄)

表 1 蔷薇科果树的 *S-RNase* 基因的氨基酸序列

Table 1 The amino acid sequence of *S-RNase* gene of Rosaceae

中文名称 Chinese name	拉丁名 Latin name	英文简称 English abbreviation	NCBI 登陆号 GeneBank accession number
矮牵牛	<i>Petunia hybrida</i>	PhS3	U07363
		PhS3L	AJ271065
金鱼草	<i>Antirrhinum hispanicum</i>	AhS3	AJ315593
		AhS4	X96466
苹果属	<i>Malus domestica</i>	MdS3	AB428425
		MdS9	AY187627
梨属	<i>Pyrus pyrifolia</i>	PyS3	AB025421
		PyS5	AB045711
李属扁桃	<i>Prunus dulcis</i>	PdSb	AF148466
		PdSf	AB467371
		PdSm	DQ099895
		PdSn	DQ093825
李属梅	<i>Prunus mume</i>	PmSl	AB364462
		PmS9	AB364470
李属野李	<i>Prunus salicina</i>	PsSf	DQ512911
李属野扁桃	<i>Prunus tenella</i>	PteS6	DQ983365
		PteSl0	KJ755352
		PteSl1	KJ755353
		PteSl2	KJ755354
		PteSl3	KJ755355
		PteSl4	KJ755356
		PteSl5	KJ755357

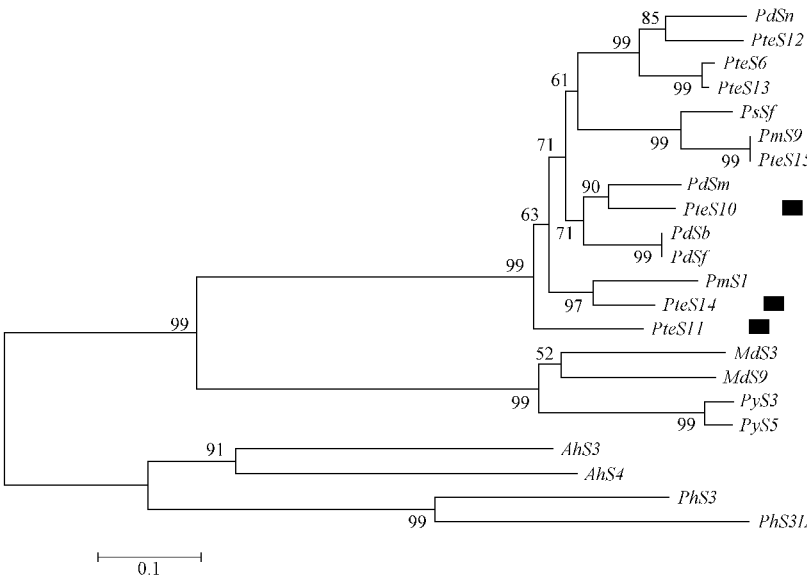
6 个新的野扁桃 *S* 基因氨基酸序列比对结果发现,这几类基因都共同具有 T₂/S 类型 *Rnase* 的蔷薇科植物 *S-RNase* 基因典型的 5 个保守区域(C1、C2、C3、RC4 和 C5)和一个高度变异区 RHV。

2.6 *S-Rnase* 基因组织特异性表达分析

分别以野扁桃花柱、花药、叶片、花瓣和花萼等材料的 cDNA 为模板,选择 S₁₁-*RNase* 基因为 PCR 扩增对象,图 13 结果表明,*Actin* 基因在 5 种器官组织中均能够扩增出目的条带,而 S₁₁-*RNase* 基因在花柱中专一性表达,在花药、叶片、花瓣和花萼等组织中都没有表达,为 *S-RNase* 基因作为花柱 *S* 基因提供了强有力的组织特异性试验证据。

3 讨论

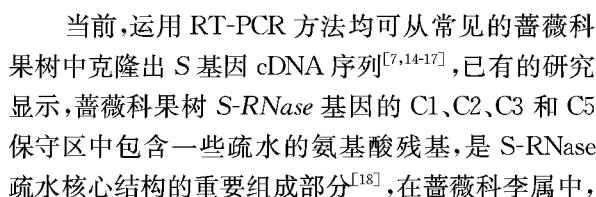
该试验使用蔷薇科植物自交不亲和性 *S* 基因通用引物组克隆新野扁桃 *S-RNase* 基因,得到的新核苷酸序列进行测序比对发现,这些新核苷酸序列之中有些序列的相似性都极高,因此推断试验扩增出的电泳图显示大小片段相同的条带(也是相似性极高的核苷酸)应是同一种 *S-RNase* 基因,根据这些核苷酸序列及大小确定了不同的 *S-RNase* 基因,TAO 等^[9]的试验也得出了与此类似的结论,蔷薇科李属(*Prunus*)果树的 *S-RNase* 基因除具有蔷薇科 *S-RNase* 蛋白质序列中的 5 个保守区域 C1、C2、C3、RC4 和 C5 外,还具有一个高变区的结构 RHV,同时



注:黑方形表示新疆野生扁桃 6 个 *S-RNase* 氨基酸。
Note: Black squares indicate six *S-RNase* of *Prunus tenella*.

图 11 蔷薇科中 *S-RNase* 系统发育树的构建

Fig. 11 Phylogenetic tree *S-RNase* of constructed with the neighbor-joining method



RC4 区也是相当保守的,但在 T_2/S 类型 *Rnase* 其它家族的情况却变异很大^[18-19]。

茄科与蔷薇科植物一样均属于 T_2/S 类型 *Rnase*,蔷薇科植物 *S-Rnase* 基因也存在与茄科类似的 C1、C2、C3 和 C5 保守区域,但并没有发现与茄科对应的 C4 区域,在蔷薇科植物中有一个特有的 RC4 区域与茄科 C4 区对应^[19],蔷薇科 *S-Rnase* 基因中发现的一个高变区 RHV 与茄科 HVa 区域相对应,特异识别花粉 S 基因的功能可能与该区域有关^[20]。

通过该试验得到的 6 个新的 cDNA 氨基酸序列与多数蔷薇科果树的序列比对发现,这 6 个新的新疆野扁桃 cDNA 的氨基酸序列与多数蔷薇科果树具有相同的典型特征—C1、C2、C3、RC4、C5 等 5 个保守区和一个高度变异区 RHV,也具有真菌 *S-RNase* 的 Rh 和 T_2 两个活性区,属于 T_2/S 类型 *Rnase*。

参考文献

- [1] HISCOCK S J, KUES U, DICHINSON H G. Molecular mechanisms of self-incompatibility in flowering plants and fungi-different means to the same end[J]. Trends Cell Biol, 1996, 6: 421-428.
- [2] de NETTANCOURT D. Incompatibility and incongruity in wild and cultivated plants[J]. Berlin: Springer-Verlag, 2001: 163.
- [3] ZHANG Y J, ZHAO Z H, XUE Y B. Roles of proteolysis in plant self-incompatibility[J]. Annual Review of Plant Biology, 2009, 60: 21-42.
- [4] 朱京琳. 新疆巴旦杏[M]. 乌鲁木齐: 新疆人民出版社, 1983.
- [5] SURBANOVSKI N, TOBUTT K R, KONSTANTINOVIC M, et al. Self-incompatibility of *Prunus tenella* and evidence that reproductively isolated species of *Prunus* have different *SFB* alleles coupled with an identical *S-RNase* allele[J]. Plant J, 2007, 50: 723-734.
- [6] HARRISON B D, LIU Y L, KHALID S, et al. Detection and relationship of cotton leaf curl virus and allied whitefly-transmitted geminiviruses occurring in Pakistan[J]. Annals of Applied Biology, 1997, 130 (1): 61-75.
- [7] TAO R, YAMANE H, SUGIURA A. Molecular typing of *S*-alleles through identification, characterization and cDNA cloning for *S-RNases* in sweet cherry[J]. J Amer Soc Hort Sci, 1999(24): 224-233.
- [8] HIROTA T, NATSUAKI T, MURAI T, et al. Yellowing disease of tomato caused by tomato chlorosis virus newly recognized in Japan[J]. Journal of General Plant Pathology, 2010, 76(2): 168-171.
- [9] TAO R, YAMANE H, SASSA H, et al. Identification of stylar *Rnase* associated with gametophytic self-incompatibility in almond (*Prunus dulcis*) [J]. Plant Cell Physiol, 1997, 38: 304-311.
- [10] TAO R, HBAU T, YAMNAE H, et al. Molecular markers for self-compatibility in Japanese apricot (*Prunus mume*) [J]. Hort Sci, 2000, 35: 1121-1123.
- [11] TAO R, HABU T, NAMBA A, et al. Inheritance of *S^f-RNase* in Japanese apricot (*Prunus mume*) and its relation to self-compatibility[J]. Theor Appl Genet, 2002, 105: 222-228.
- [12] 齐洁. 杏自交不亲和相关基因的克隆及表达分析[D]. 泰安: 山东农业大学, 2002.
- [13] 陈晓流. 樱桃 S 基因型及自交不亲和和机制研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2003.
- [14] BROOHTHAERTS W, JANSSENS G A, PROOST P, et al. cDNA cloning and molecular analysis of two self-incompatibility alleles from apple[J]. Plant Mol Biol, 1995, 27: 499-511.
- [15] NORIOKA N, NORIOKA S, YOSHIMI S, et al. Molecular cloning and nucleotide sequences of cDNA encoding *S*-allele specific stylar *RNases* in a self-incompatible cultivar and its self-compatible mutant of Japanese pear, *Pyrus pyrifolia* Nakai [J]. Journal of Biochemistry, 1996, 120: 335-345.
- [16] USHIJIMA K, SASSA H, TAO R, et al. Cloning and characterization of cDNAs encoding *S-RNases* in almond (*Prunus dulcis*): primary structural features and sequence diversity of the *S-RNases* in Rosaceae [J]. Mol Gen Genet, 1998, 260: 261-268.
- [17] MA R C, OLIVEIRA M M. Evolutionary analysis of *S-RNase* genes from Rosaceae species [J]. Mol Genet Genomics, 2002, 267: 71-78.
- [18] ISHIMIZU 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]. Journal of Biochemistry, 1996, 120: 326-334.
- [19] SASSA H, NISHIO T, KOWYAMA Y, et al. Self-incompatibility (*S*) alleles of the Rosaceae encode members of a distinct class of the T_2/S ribonuclease superfamily [J]. Mol Gen Genet, 1996, 250: 547-557.
- [20] MATTON D P, MAES O, LAUBLIN G, et al. Hypervariable domains of self-incompatibility *RNase* mediate allele-specific pollen recognition [J]. Plant Cell, 1997(9): 1757-1766.

Molecular Identification Analysis of Six New *S-RNase* Genes Controlling Self-incompatibility From Xinjiang Wild Almond (*Prunus tenella* Batsch.)

ZENG Bin^{1,2}, LIU Mengwen¹, WANG Jianyou³, WANG Bo¹

(1. College of Forestry and Horticulture, Xinjiang Agricultural University, Urumqi, Xinjiang 830000; 2. Research Center for Xinjiang Characteristic Fruit Tree, Xinjiang Agricultural University, Urumqi, Xinjiang 830000; 3. Branch of Xinjiang, China Academy of Forestry Sciences, Urumqi, Xinjiang 830000)

Abstract: Taking *Prunus tenella* Batsch. (wild almond) as materials, which is a very primitive tree species, precious, ancient and very scarce in the world today. The use of Rosaceae self-incompatibility primer combinations,

盐碱胁迫下羊草转录因子的转录组分析

董园园¹, 李晓薇¹, 姚娜¹, 刘秀明¹, 陈欢², 李海燕^{1,2}

(1. 吉林农业大学 生物反应器与药物开发教育部工程研究中心, 吉林 长春 130118;

2. 吉林农业大学 生命科学学院, 吉林 长春 130118)

摘要:以羊草为试材,采用罗氏454二代测序方法,研究了羊草转录因子家族在逆境胁迫条件下来自38个家族的243个转录因子表达差异模式,以期揭示WRKY、C3HL、NAC等转录因子家族差异基因数量,探讨羊草的抗逆分子机制。结果表明:羊草转录组测序片段经de novo拼接共获得104 105条Unigene序列,对照含有97个转录因子基因,盐碱处理组含有213个转录因子,其中67个转录因子为2组共表达。差异基因表达分析揭示羊草主要通过WRKY、C3HL、NAC转录因子家族的差异表达调控盐碱适应性。该研究为耐盐碱型作物培育奠定了基础。

关键词:转录组分析;羊草;转录因子;盐碱胁迫;高通量测序

中图分类号:Q 789;S 543⁺.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2017)07-0115-06

羊草(*Leymus chinensis*)具有产量高、氨基酸含量高、脂肪含量高、逆境耐受能力强等特点,是多年生经济型牧草^[1]。由于羊草在盐碱、干旱、低温等逆境下的生存适应性,近年来在土地保护、生态环境保护、环境适应性等方面受到了广泛关注^[2]。针对羊

草盐碱适应性强的特点,探讨羊草盐碱适应性调控机制,对培育抗盐碱型作物及稳定生态环境具有指导意义。

转录因子在植物生长发育过程、组织分化、营养运输、代谢合成及环境应答等生命过程中起着至关重要的转录调控作用^[3-4],转录因子在细胞内通过调控基因的表达水平参与介导植物产生环境适应的多样性^[5-6]。已有大量研究数据显示,植物在盐碱、干旱、冷冻等非生物胁迫过程中,转录因子与基因上游DNA启动区的6~12个碱基的顺式作用元件结合,激发并传递细胞内信号,进而激活或抑制逆境响应基因表达^[7-8],增强植物的逆境适应性,降低植物在逆境胁迫中可能受到的威胁^[9]。因此,对转录因子种类、表达及功能的研究有助于理解植物逆境调控的分子机制。但是,植物中转录因子种类较多、数量

第一作者简介:董园园(1985-),女,博士,讲师,现主要从事植物分子生物学等研究工作。E-mail:yydong@aliyun.com.

责任作者:李海燕(1971-),女,博士,教授,博士生导师,现主要从事抗逆分子生物学等研究工作。E-mail:hyli99@163.com.

基金项目:农业部转基因生物新品种培育重大专项资助项目(2016ZX08010002);国家自然科学基金资助项目(31271746, 31101091, 31501366);吉林省科技厅资助项目(20140520164JH, 20150623024TC-11);吉林农业大学科研启动基金资助项目(2015018)。

收稿日期:2016-12-15

using *S-RNase* allele PCR amplification, RT-PCR and RACE technology, the *S-RNase* gene of Xinjiang wild almond was studied, in order to further study for the Xinjiang wild almond molecular mechanism of self-incompatibility. The results showed that six new self-incompatibility *S-RNase* genes were successfully cloned from the pistils of the wild almond from five natural populations different individuals sample, which were named *PtS*₁₀ (GeneBank accession number: KJ755352), *PtS*₁₁ (GeneBank accession number: KJ755353), *PtS*₁₂ (GeneBank accession number: KJ755354), *PtS*₁₃ (GeneBank accession number: KJ755355), *PtS*₁₄ (GeneBank accession number: KJ755356) and *PtS*₁₅ (GeneBank accession number: KJ755357); and the six new genes were analyzed by bioinformatics study. These studies provided basic information for the further study of molecular mechanism of self-incompatibility in Xinjiang wild almond.

Keywords: *Prunus tenella*; natural population; self-incompatibility; *S-RNase* gene; clone and identification