

新疆野扁桃五个自然分布居群 S 基因型的鉴定及发生频率分析

曾 斌^{1,2}, 刘梦雯^{1,2}, 王建友³, 王 波^{1,2}

(1. 新疆农业大学 林学与园艺学院, 新疆 乌鲁木齐 830052; 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 830052; 3. 中国林业科学院 新疆分院, 新疆 乌鲁木齐 830000)

摘 要:以新疆野扁桃 5 个自然分布居群的 150 个株系为试材, 采用生物统计学的方法, 研究了新疆野扁桃 5 个自然分布居群的 S 基因类型及其发生频率。旨在为新疆野扁桃资源的有效保护与合理利用及该物种自交不亲和性进化机理提供科学依据。结果表明: 在受试株系中共鉴定出 6 个 *S-RNase* 基因, S 基因型有 11 种类型, 各基因型组成在不同居群中的存在比率是不均等的, 有占主导地位的 S 基因型; 还有一些 S 基因型是某个居群特有的; 也有一些 S 基因型出现的比率很低, 变化差异较大; 表明 *S-RNase* 基因经历了一定的进化历程。

关键词:新疆野扁桃; 自交不亲和性; S 基因型; 频率

中图分类号:S 662.902.4 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2017)10-0087-06

蔷薇科果树植物表现为配子体自交不亲和性, 由单一 S 位点复等位基因控制, 该位点包括花柱 *S-RNase* 基因和花粉 *SFB* 基因, 表现为相同 S 基因型品种(系)间或者自花授粉时不能结实, 而不同 S 基因型的品种(系)间相互授粉可以正常结实^[1-3]。

近年来, 国内外利用蔷薇科植物自交不亲和性保守区序列的特性设计引物, 采用等位基因 PCR 扩增技术方法, 在苹果^[4]、梨^[5-6]、甜樱桃^[7-8]、扁桃^[9-10]、杏李^[11-12]等栽培果树品种鉴定 S 基因型方面的研究较多, 另外, 野生果树资源方面, 国内仅在新疆野生樱桃里有相关的研究报道^[13]。

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, 在我国主要位于新疆北疆塔城及阿勒泰地区的 5 个自然分布区域, 极具研究开发价值^[14], 研究表明新疆野扁桃是二倍体野

生果树树种, 并具有自交不亲和性^[15]。

该研究采用新疆野扁桃 5 个自然分布居群的 150 个株系, 前期已成功克隆出了 6 个新的 *S-RNase* 基因, 以此为基础, 进一步深入开展对这 6 个新的 *S-RNase* 基因的分析研究, 确定新疆野扁桃林 5 个自然居群的 S 基因类型及各基因型的比率差异, 确定 S 基因的进化历程, 以期新疆野扁桃资源的有效保护利用及该物种自交不亲和性进化机理研究提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料为新疆 5 个自然分布居群的新疆野扁桃株系, 各居群随机选取 30 个实生株系, 总计 150 个株系, 选取样方尽可能全覆盖野生扁桃林(图 1、表 1), 取每株系上的幼嫩叶片, 液氮保存带回实验室, 置 -80 °C 冰箱备用。

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 等试剂(盒)均购自大连宝生物工程公司, 所用生化试剂为进口分析纯。

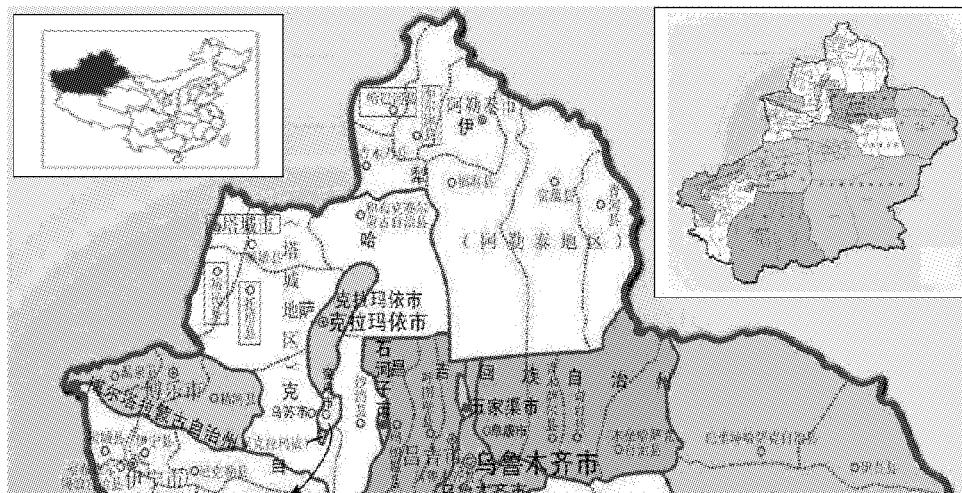
1.2 试验方法

1.2.1 基因组 DNA 提取 嫩叶 0.5 g 左右, CTAB 法提取 DNA^[16]。

第一作者简介:曾斌(1969-), 男, 湖北松滋人, 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:2017-01-16



注:图中方框均表示裕民居群、托里居群、塔城居群、布尔津居群、哈巴河居群。

Note: Black squares indicate Yumin population, Tuoli population, Tacheng population, Bu'erjin population, Habahe population.

图1 新疆野生扁桃5个不同天然居群的分布

Fig. 1 Natural distribution of the five populations of *Prunus tenella* in Xinjiang China

表 1

新疆野生扁桃不同天然居群研究材料

Table 1 Details on sample locations of populations of *Prunus tenella* in Xinjiang China used in this study

区域(县)	居群编号	采样数	经纬度	海拔
Region (county)	Population ID	Sample (strain)/株	Location	Altitude/m
裕民县 Yumin	Y	30	45°54' N, 82°30' E	1 000~1 200
托里县 Tuoli	L	30	46°09' N, 83°33' E	860~1 080
塔城县 Tacheng	T	30	47°03' N, 83°01' E	1 000~1 115
布尔津县 Bu'erjin	B	30	48°11' N, 87°06' E	1 100~1 300
哈巴河县 Habahe	H	30	48°18' N, 86°34' E	1 060~1 110

1.2.2 *S-RNase* 等位基因的扩增 PCR 扩增 *S-RNase* 等位基因引物组合为:Pruc2: 5'-CTATGGC-CAAGTAATTATTCAAACC-3', Pruc5: 5'-TAC-CACTTCATGTAAACAAGTGA-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^[17], 引物由北京金唯智公司合成。反应产物用 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 DH5α, 阳性克隆送北京百迈客公司测序。

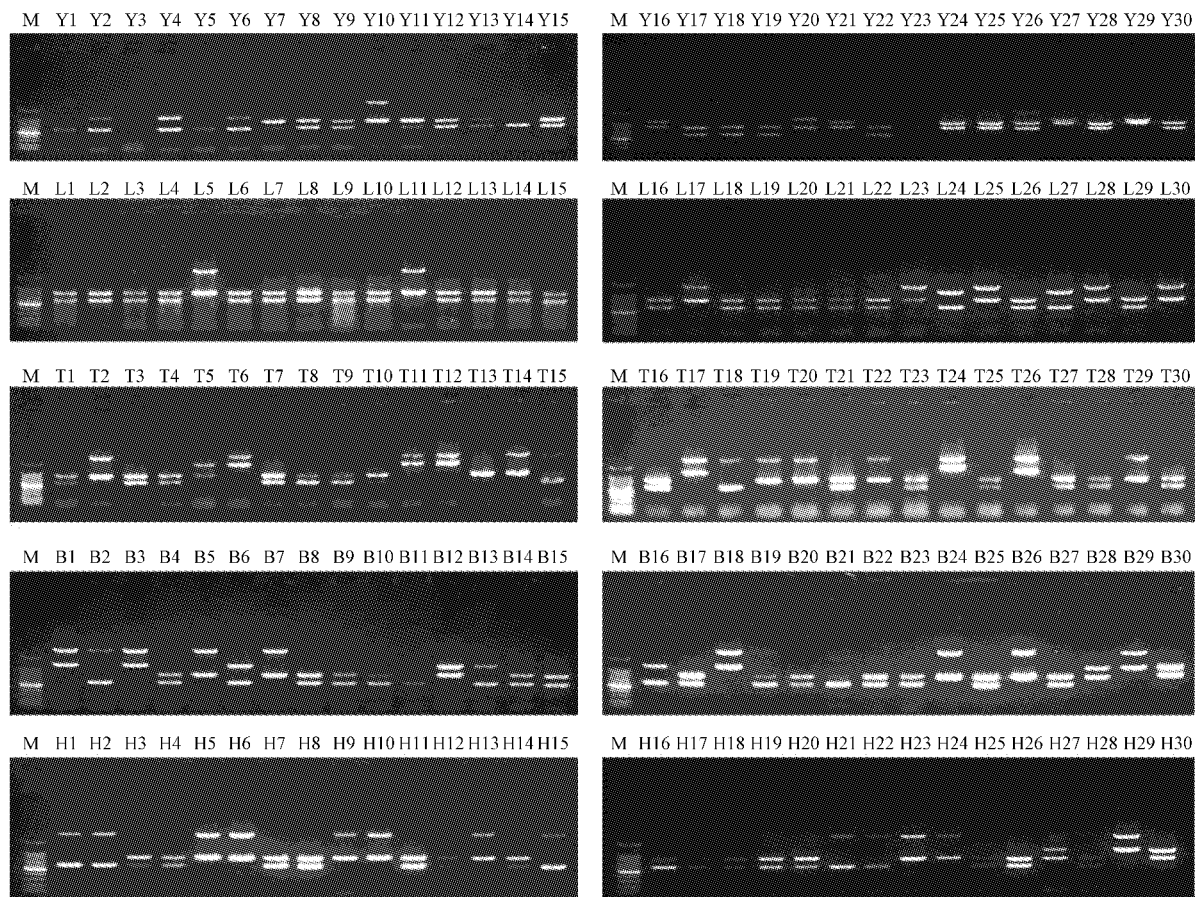
1.2.3 DNA 序列及 S 基因型确定分析 利用 NCBI 基因数据库在线软件 Blast 对测序结果进行序列比对分析, 确定受试新疆野扁桃株系的新 *S-RNase* 基因以及基因型, 研究分析受试 150 个株系 *S-RNase* 基因型的频率以及 *S-RNase* 基因型在 5 个居群中发生的频率。

2 结果与分析

2.1 新疆野扁桃 *S-RNase* 等位基因的扩增和克隆鉴定

由图 2 可知, 该试验选用蔷薇科李属通用引物组合 PruC2 和 PruC5^[15], 全部受试的 150 个新疆野扁桃株系均扩增出了 2 条特异的条带。

依据图 2 扩增情况, 对全部受试 150 个株系扩增出的具有相同电泳带形的株系归为一类, 对产物进行测序, 结果显示, 受试的 150 个新疆野扁桃株系共包含 6 种核苷酸序列, 该研究依据 SURBANOVSKI 等^[15]克隆鉴定的欧洲野扁桃的 S 基因命名方法, 对克隆到的新疆野扁桃 6 个新的 S 基因的核苷酸序列依次命名为: PteS10 (602 bp)、PteS11 (870 bp)、PteS12 (1 143 bp)、PteS13 (1 330 bp)、PteS14 (1 485 bp)、PteS15 (2 077 bp), 6 个新的 S 基因均已成功在 GenBank 数据库注册登陆。



注:Y1~30.裕民居群1~30号样;L1~30.托里居群1~30号样;T1~30.塔城居群1~30号样;B1~30.布尔津居群1~30号样;H1~30.哈巴河居群1~30号样;M.DL 5 000 marker.

Notes: Y1—30. Yumin population samples; L. Tuoli population samples; T. Tacheng population samples; B. Bu' erjin population samples; H. Habahe population samples; M. DL 5 000 marker.

图2 新疆野扁桃5个居群150个株系基因组DNA的S-RNase等位基因扩增图(扩增引物组合 PruC2和 PruC5)

Fig.2 PCR amplification of S-RNase alleles with primers PruC2 and PruC5 in 150 *Prunus tenella* accessions in the five populations

2.2 150个株系S-RNase基因型频率统计分析

在该试验150个株系中共鉴定出6个S-RNase基因,新疆野扁桃为二倍体树种,依孟德尔遗传规律,6个S-RNase基因可以组合成15种杂合S基因型,从该试验结果分析得出受试株系的S基因型组成有11种,少于前述理论数值,造成这一结果的原因可能是研究取样有限;或者是其它几种基因型组成的株系已被破坏灭绝,另外的可能性是由于其它几种基因型的竞争力弱,已经被自然淘汰,各种基因型在各自然居群中存在比率的不均等性部分佐证了这些可能性。

深入分析结果表明,各基因型在150个株系中的分布比率存在较大的差异,其中S₁₀S₁₁基因型的比率最高,达54.00%,而S₁₂S₁₃基因型比率最低,占1.33%(表2)。

表2 新疆野扁桃150个株系S-RNase基因型及其比率

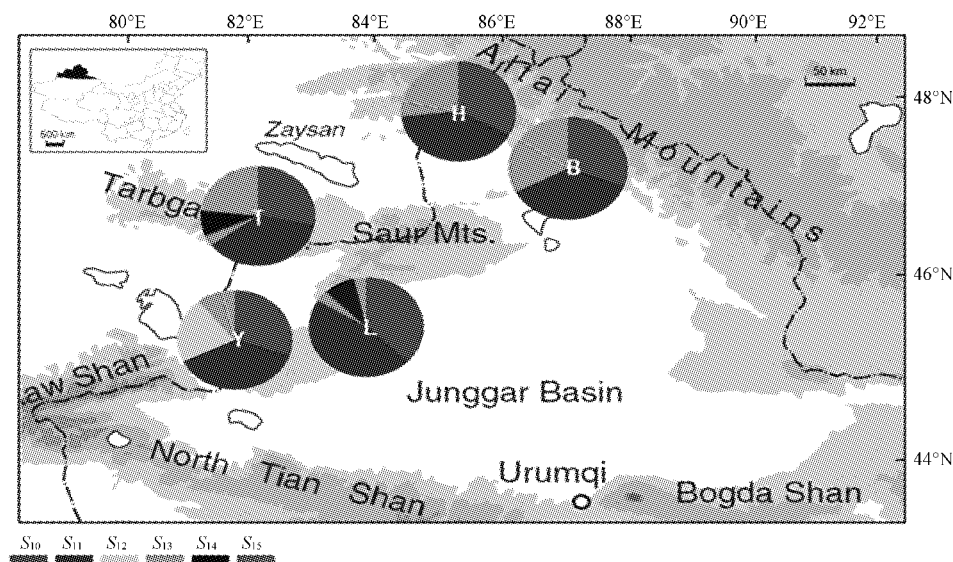
Table 2 S-RNase genotypes and their rates of 150 accessions in *Prunus tenella* from five different natural populations in Xinjiang China

序号 No.	S 基因型 S genotypes	株系数量 Number of accession	比率 Rate/%
1	S ₁₀ S ₁₁	81	54.00
2	S ₁₀ S ₁₂	3	2.00
3	S ₁₀ S ₁₃	6	4.00
4	S ₁₀ S ₁₅	9	6.00
5	S ₁₁ S ₁₂	7	4.67
6	S ₁₁ S ₁₃	5	3.33
7	S ₁₁ S ₁₄	6	4.00
8	S ₁₁ S ₁₅	20	13.33
9	S ₁₂ S ₁₃	2	1.33
10	S ₁₃ S ₁₅	7	4.67
11	S ₁₄ S ₁₅	4	2.67

2.3 *S-RNase* 基因型在 5 个居群中频率分布统计分析

该研究结果显示,5 个居群中 *S-RNase* 各等位基因的分布是不均等的。在裕民居群中有 5 个 *S-*

RNase 等位基因 S_{10} 、 S_{11} 、 S_{12} 、 S_{13} 、 S_{15} ,托里和塔城居群中均有 5 个 *S-RNase* 等位基因 S_{10} 、 S_{11} 、 S_{13} 、 S_{14} 、 S_{15} ,而在哈巴河和布尔津 2 个居群中均只有 4 个 *S-RNase* 等位基因 S_{10} 、 S_{11} 、 S_{13} 、 S_{15} (图 3)。



注:Y. 裕民;T. 塔城;H. 哈巴河;L. 托里;B. 布尔津。

Note: Y. Yumin; T. Tuoli; H. Habahe; L. Tacheng; B. Bu'erjin.

图 3 新疆野扁桃株系 5 个自然分布居群 *S-RNase* 等位基因生态区域的地理分布

Fig. 3 Geographical distribution of *Prunus tenella* *S-RNase* alleles growing eco-regions or subregions from five different natural populations in Xinjiang China

表 3 表明,各等位基因在不同居群中的存在比率也是不均等的, S_{10} 和 S_{11} 2 个等位基因在各居群中均高频率的出现,可能这 2 个等位基因从进化起源上来看更为古老,占主导地位,另外,如 S_{12} 等位基因只在裕民居群中独有,而在其它居群中均没有检测到,该等位基因分别和 S_{10} 、 S_{11} 、 S_{13} 有基因型组合产生, $S_{10}S_{12}$ 、 $S_{11}S_{12}$ 、 $S_{12}S_{13}$ 等 3 个基因型也是裕民居群所特有,分析认为这个 S_{12} 等位基因很有可能是新进

化产生的,而非在其它居群中消失,因为它在该居群中占有很高的比率,约 20%;如 $S_{14}S_{15}$ 只有在托里居群中检测到。其它有些基因型比率较低,如 $S_{10}S_{13}$ 、 $S_{11}S_{13}$ 、 $S_{13}S_{15}$ 等,并且在有些居群中未检测到该组合的存在,塔城和哈巴河居群中就未检测到 $S_{10}S_{13}$ 基因型,托里和塔城居群中未检测到 $S_{11}S_{13}$,裕民和托里居群中未检测到 $S_{13}S_{15}$ 基因型。

表 3 新疆野扁桃 5 个自然居群的 *S-RNase* 基因型及其比率

Table 3 The *S-RNase* haplotypes and their rates of the accessions of five populations in *Prunus tenella* in Xinjiang China

居群	S 基因型比率 Rate of S-genotypes/%										
Population	$S_{10}S_{11}$	$S_{10}S_{12}$	$S_{10}S_{13}$	$S_{10}S_{15}$	$S_{11}S_{12}$	$S_{11}S_{13}$	$S_{11}S_{14}$	$S_{11}S_{15}$	$S_{12}S_{13}$	$S_{13}S_{15}$	$S_{14}S_{15}$
裕民 Yumin	46.67	10.00	3.33	3.33	23.34	3.33	0.00	3.33	6.67	0.00	0.00
托里 Tuoli	69.99	0.00	6.67	0.00	0.00	0.00	16.67	6.67	0.00	0.00	0.00
塔城 Tacheng	50.00	0.00	0.00	6.67	0.00	0.00	3.33	20.00	0.00	6.67	13.33
布尔津 Bu'erjin	53.33	0.00	10.00	3.33	0.00	6.67	0.00	13.33	0.00	13.33	0.00
哈巴河 Habahe	50.00	0.00	0.00	16.67	0.00	6.67	0.00	23.33	0.00	3.33	0.00
平均 Average	54.00	2.00	4.00	6.00	4.67	3.33	4.00	13.33	1.33	4.67	2.67

3 讨论

自交不亲和是一古老的繁殖机制,早在属/种分化前就已经存在,具有很高的保守性,但是 *S-RNase*

基因在进化中经历强正选择的现象普遍存在,这是为了适应新的环境,一些有利的突变被保留^[18-20]。

RICHMAN 等^[21]通过对茄科植物 *S-RNase* 基

因序列的分析比较研究,明确了自交不亲和性 S 位点含有较多的等位基因,认为可通过等位基因进化关系的分析了解物种的进化历史^[22]。

从新疆野扁桃 5 个天然分布居群 *S-RNase* 等位基因及其基因型分析可以看出,*S-RNase* 基因经历了一定的进化历程,并且这种进化有可能还正在进行着,可以看出, S_{10} 、 S_{11} 在每个居群中都存在,说明它们是古老的等位基因,可能是在不同居群分离前的主导等位基因,随着居群的分离,在不同居群中同样还占据着主导地位。

分析认为裕民居群中的 S_{12} 等位基因可能是在进化中新近产生的,它和其它等位基因组成了不同的基因型,说明为了适应当地的环境,*S-RNase* 基因在该地区经历了强烈的正选择,也许正逐步形成为主导的等位基因,而其它的一些基因型也可能是在居群分化后形成的,比如 S_{14} S_{15} 只有在塔城居群中被发现,说明这种基因型很有可能是最近产生的。

另外,还有一些基因型可能在居群分离中或者分离后在个别居群中消失,比如 S_{10} S_{13} , S_{10} S_{15} , S_{10} S_{13} 在塔城和哈巴河居群中未能都被鉴定,而在其它居群中都被发现,这说明这种基因型很有可能是种群分离中/后由于不适应当地的环境逐步在塔城和哈巴河居群中消失,可见 *S-RNase* 基因受到了正选择稳定了一些新等位基因/基因型的同时还受到自然选择,将一些不适应当地环境的等位基因/基因型淘汰。也有可能是在哈巴河居群中不能被鉴定是因为在从起源中心分离中已经被淘汰。同样, S_{11} S_{14} 有可能在分离中/后在托里居群中被淘汰。总之,对蔷薇科植物种群自交不亲和性 S 基因型发生频率的分析研究,有助于更好的理解自交不亲和和 S 基因进化的历程。

参考文献

- [1] de NETTANCOURT D. Incompatibility in angiosperms[J]. Sex Plant Reprod, 1977(10):185-199.
- [2] CHEN G, ZHANG B, LIU L, et al. Identification of a ubiquitin-binding structure in the S-locus F-box protein controlling *S-RNase*-based self-incompatibility[J]. Journal of Genetics and Genomics, 2012, 39: 93-102.
- [3] LIU W, FAN J B, LIU J H, et al. SCF^{SLF}-mediated cytosolic degradation of *S-RNase* is required for cross-pollen compatibility in *S-RNase*-based self-incompatibility in *Petunia* hybrid[J]. Plant Genetics and Genomics, 2014(5):1-15.
- [4] PESSINA S, PALMIERI L, BIANCO L, et al. Frequency of a natural truncated allele of *MdMLO19* in the germplasm of *Malus domestica*[J]. Mol Breeding, 2017, 37(1):7. doi:10. 1007/s11032-016-0610-8.
- [5] 陈慧, 张树军, 张好艳, 等. 40 个梨品种 S 基因型的鉴定及 S 基因频率分析[J]. 南京农业大学学报, 2013, 36(5):21-26.
- [6] QIAO X, LI M, LI L T, et al. Genome-wide identification and comparative analysis of the heat shock transcription factor family in Chinese white pear (*Pyrus bretschneideri*) and five other Rosaceae species[J]. BMC Plant Biology, 2015(15):12-25.
- [7] VAUGHAN S P, BOKOVI R I, GISBERT-CLIMENT A, et al. Characterisation of novel alleles from cherry (*Prunus avium* L.)[J]. Tree Genet Genomes, 2008(4):531-541.
- [8] CARRASCO B, MEISEL L, GEBAUER M, et al. Breeding in peach, cherry and plum: from a tissue culture, genetic, transcriptomic and genomic perspective[J]. Biol Res, 2013, 46:219-230.
- [9] ORTEGA E, BOKOVI R I, SARGENI D J, et al. Analysis of *S-RNase* alleles of almond (*Prunus dulcis*): Characterization of new sequences, resolution of synonyms and evidence of intragenic recombination[J]. Mol Genet Genomics, 2006, 276:413-426.
- [10] QUAGLINO F, KUBE M, JAWHARI M, et al. 'Candidatus Phytoplasma phoenicium' associated with almond witches-broom disease: From draft genome to genetic diversity among strain populations[J]. BMC Microbiology, 2015(15):148-169.
- [11] 张树军, 黄绍西, 张绍铃, 等. 桃李等 15 个李品种 S 基因型鉴定及其多态性分析[J]. 果树学报, 2008, 25(3):338-342.
- [12] WANG P P, GAO Z H, NI Z J, et al. Isolation and identification of new pollen-specific *SFB* genes in Japanese apricot (*Prunus mume*) [J]. Genet Mol Res, 2013, 12(3):3286-3295.
- [13] 刘崇琪, 陈晓流, 张艳敏, 等. 新疆野生櫻桃李 *S-RNase* 基因分离与鉴定的初步研究[J]. 园艺学报, 2009, 36(3):333-340.
- [14] 关鹏, 曾斌, 李疆, 等. 2 个野扁桃自交不亲和和 *S-RNase* 基因全长的克隆与序列分析[J]. 果树学报, 2016, 33(8):905-916.
- [15] 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.
- [16] 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.
- [17] 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.
- [18] BATEMAN A J. Self-incompatibility in angiosperms. I. Theory[J]. Heredity, 1952(6):285-310.
- [19] BATEMAN A J. Self-incompatibility systems in angiosperms. III. Cruciferae[J]. Heredity, 1955(9):51-68.
- [20] MATTON D P, NASS N, CLARKE A E, et al. Self-incompatibility: How plants avoid illegitimate offspring[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91:1992-1997.
- [21] RICHMAN A D, UYENOYAMA M K, KOHN J R. Allelic diversity and gene genealogy at the self-incompatibility locus in the Solanaceae[J]. Science, 1996, 273:1212-1216.
- [22] UYENOYAMA M K. Genealogical structure among alleles regulating self-incompatibility in natural populations of flowering plants[J]. Genetics, 1997, 147:1389-1400.

DOI:10.11937/bfyy.201710021

金叶锦带组培技术

马金贵, 郭淑英

(唐山职业技术学院 农林工程系, 河北 唐山 063004)

摘要:以金叶锦带的腋芽为外植体,采用组织培养法,通过在培养基中添加不同浓度激素,筛选最佳培养基,为金叶锦带的大面积推广提供技术支撑。结果表明:最佳诱导培养基为 MS+0.6 mg·L⁻¹ 6-BA+0.1 mg·L⁻¹ NAA+蔗糖 30 g·L⁻¹+琼脂 7 g·L⁻¹,诱导率达 86.3%;最佳增殖培养基为 MS+1.0 mg·L⁻¹ 6-BA+1.0 mg·L⁻¹ GA₃+蔗糖 30 g·L⁻¹+琼脂 7 g·L⁻¹,增殖系数 7.250 6;最佳生根培养基为 1/2MS+1.0 mg·L⁻¹ IBA+蔗糖 30 g·L⁻¹+琼脂 7 g·L⁻¹,生根率 100.0%。

关键词:金叶锦带;组织培养;激素配比

中图分类号:S 687.903.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2017)10-0092-03

金叶锦带(*Weigela* 'Red Prince'+vat)属忍冬科锦带花属,是红王子锦带(*Weigela florida* cv. Red

第一作者简介:马金贵(1964-),男,河北丰润人,硕士,副教授,现主要从事园林植物栽培教学与研究等工作。E-mail:tsguoshuying@163.com。

责任作者:郭淑英(1964-),女,本科,教授,现主要从事园林植物栽培与应用教学与研究等工作。

基金项目:河北省科技厅科学研究计划资助项目(15236830)。

收稿日期:2016-12-12

Prince)的金叶变种。落叶灌木,高 1.5~1.8 m,冠幅 1.4 m。叶长椭圆形,金黄色,聚伞花序生于叶腋或枝顶,花冠漏斗状钟形,花鲜红色,花期 4 月下旬至 10 月中旬,金叶红花,既可孤植于庭院的草坪之中,也可丛植于路旁,还可用来做色块,是一种优良的绿化树种。现采用金叶锦带腋芽为外植体,对影响金叶锦带萌芽、增殖和生根等因素进行了试验研究,筛选出不同发育阶段的最适培养基,以期加速金叶锦带的培育,并为金叶锦带的大面积推广提供技术支撑。

Identification of S-genotypes in the Five Natural Populations and Analysis of S-RNase Genes Frequency From Xinjiang Wild Almond(*Prunus tenella* Batsch.)

ZENG Bin^{1,2}, LIU Mengwen^{1,2}, WANG Jianyou³, WANG Bo^{1,2}

(1. College of Forestry and Horticulture, Xinjiang Agricultural University, Urumqi, Xinjiang 830052; 2. Research Center for Xinjiang Characteristic Fruit Tree, Xinjiang Agricultural University, Urumqi, Xinjiang 830052; 3. Xinjiang Branch, China Academy of Forestry Sciences, Urumqi, Xinjiang 830000)

Abstract: Taking 150 accessions of *Prunus tenella* Batsch. (wild Almond) as materials, using the statistics method, the S genotype group and its occurrence frequency were studied in the five populations of *Prunus tenella* Batsch. in Xinjiang China. The results showed that six S-RNase genes were identified in the tested accessions, eleven S-genotypes were determined, the S-genotypes were heterogeneous and some were dominant S-genotypes, and some were unique. There were some S-genotypes in the ratio was very low, the change was quite different, the aim of the study was to provide the scientific basis for the effective protection and reasonable utilization of the wild almond resources in Xinjiang and lay the foundation for the further study of the mechanism of self-incompatibility of *Prunus tenella*.

Keywords: *Prunus tenella* Batsch.; self-incompatibility(SI); S-genotype; frequency