

Pre-Study on the Molecular Mechanism of Self-Compatibility in Longtanzhenzhuli

Yanping Ye^{1*}, Shaoxi Huang², Liping Meng¹

¹College of Agriculture, Guangxi University, Nanning

²College of Agricultural Sciences in Guangxi, Nanning

Email: *yeyanping0705@tom.com

Received: May 25th, 2012; revised: Jul. 18th, 2012; accepted: Aug. 6th, 2012

Abstract: Longtanzhenzhuli which is a new variety of plum with high quality were used as the experimental materials in this research. A specific primer was designed based on the conserved sequences of plum (*Prunus salicina* Lindl.) *S-Rnase(S)* genes, two specific fragments were isolated from Longtanzhenzhuli genome DNA with these specific primers. The sequencing results showed that these fragments were confirmed as the plum *S* genes. One was first cloned from *Prunus salicina* and named *PsS-RNase-28*, with length of 727 bp, containing 367 bp intron and 360 bp Exon. Comparing with *Prunus spinosa S-RNase S1* gene (EF636467.1), it showed high identity (98%), more than 79% with other plums *S-RNase* genes. The other fragment with 718 bp in length, containing 343 bp intron and 375 bp Exon, showed high identity (99%) with *Prunus salicina PsS-RNase-h* gene (AB084148.1), and more than 85% with other plums *S-RNase* genes. And sequences follow-up analysis of these fragments would be benefited to study on the mechanism of self-compatibility of Longtanzhenzhuli.

Keywords: Longtanzhenzhuli; Self-Incompatibility; Self-Compatibility; *S-Rnase Genes*

优良品种龙滩珍珠李自花结实分子机理初探

叶燕萍^{1*}, 黄绍西², 孟丽萍¹

¹广西大学农学院, 南宁

²广西农业科学院园艺研究所, 南宁

Email: *yeyanping0705@tom.com

收稿日期: 2012年5月25日; 修回日期: 2012年7月18日; 录用日期: 2012年8月6日

摘要: 本研究主要以广西本地生长的优质的具自花结实李品种龙滩珍珠李为材料, 根据李属雌蕊 *S-RNase* 基因的序列信息设计了一对特异性保守引物, 对龙滩珍珠李基因组 DNA 进行 PCR 扩增, 并对扩增产物进行克隆、测序以及序列分析, 成功克隆出两个 *S-RNase* 基因片段, 其中一个为在中国李中首次发现并命名为 *PsS-RNase-28*, 大小为 727 bp, 其中包含有 367 bp 的内含子, 仅有 360 bp 的外显子编码序列, 与黑刺李(*Prunus spinosa*)*S-RNase S1* 基因(EF636467.1)同源率达到 98%, 与其它李 *S-RNase* 基因的同源率都达到 79%以上。另一个扩增片段大小为 718 bp, 包含有 343 bp 的内含子, 其中仅有 375 bp 的外显子编码序列, 与中国李(*Prunus salicina*)*PsS-RNase-h* 基因(AB084148.1)相似性达到 99%, 与其它李 *S-RNase* 基因的相似性都达到 85%以上。这两个基因片段的获得及其后续分析有利于进一步探讨龙滩珍珠李自花结实的分子机理。

关键词: 龙滩珍珠李; 自交不亲和; 自花结实; *S-RNase(S)*基因

*通讯作者。

1. 引言

蔷薇科果树如苹果、梨、杏、甜樱桃、李、扁桃、梅等树种的大部分品种存在典型的配子体型自交不亲和性。因此,生产上必须配置授粉树、虫媒授粉或人工授粉以保证主栽品种获得较高的产量,这增加了生产成本和难度,还浪费有限的土地资源。因而弄清自交不亲和性的分子机理,鉴定果树品种的 *S* 基因型,寻找或创造果树自交亲和性材料,以达到简化栽培方式、降低果园生产成本、获得更高的经济效益的目的。也正因为如此,对于果树自交不亲和的克服及其分子机制的研究,成为当今研究的热点。陈迪新等^[1]在不同花龄,对“丰水”和“菊水”2个梨品种进行自花授粉,发现蕾期授粉和延迟授粉都能显著提高它们自花授粉的坐果率。李晓等^[2,3]研究表明,甜樱桃自交不亲和程度与其雌蕊的发育状态密切相关,蕾期授粉和延迟授粉都能够一定程度上克服甜樱桃的自交不亲和性,但蕾期授粉的作用更加明显。蕾期或延迟授粉克服自交不亲和的原因在于 *S-RNase* 在开花之前才大量形成,开花后 *S-RNase* 的含量下降,花蕾中未成熟的雌蕊不存在 *S-RNase* 或其含量极少,不具备开花当天花朵的那种有效抑制花粉管伸长的能力。另外,在各种自然或人为诱导条件下,自交不亲和性植物也会因 *S* 基因发生突变丧失花粉或者花柱特异性识别,进而表现自交亲和性。吴华清等^[4]研究表明,“奥嘎二十世纪”基因组中存在 *S-RNase-4* 基因,但不能遗传给后代。Tao 等^[5]发现果梅品种“Benissashi”和“Kensaki”也表现自交亲和性,Ushijima 等^[6]进一步研究发现这2个品种都含有发生突变的 *SFB* 基因 (*SFBf*),该基因的编码区插入了约 6.8 kbp 的核苷酸序列,导致 *SFBf* 的转录提前终止,从而使得携带该基因的花粉不能被 *Sf-RNase* 识别和抑制,最后表现自交亲和性,属于花粉突变体。Vilanova 等^[7]研究认为杏品种 Canino 自交亲和的原因是该品种的花粉 *S* 基因 *SFBc* 发生了突变,即编码区插入了 358 bp 的核苷酸残基。吴华清等^[8]以“黄花梨”及其芽变品种“大果黄花”为材料,研究表明,黄花和大果黄花是基于 *S-RNase* 基因的 *S* 基因型,发现两者均含有 *S-RNase-1* 和 *S-RNase-2* 基因;而且两品种的这1对雌蕊 *S-RNase* 基因均特异性地在花柱中表达,表达量没有明显差异,表明“大果黄花”和“黄花”的雌蕊 *S-RNase* 基

因并无差异。由此他们推断:大果黄花的自交亲和性突变,是由于花粉自交不亲和性功能丧失,从而表现出自花授粉能够结实。配子体型自交不亲和性的二倍体物种多倍体化会导致自交亲和,如人工诱导染色体数目变异可以克服配子体型自交不亲和性。Entani 等^[9]将自交不亲和的矮牵牛(*Petunia hybrida*)PB 切段浸泡在 0.02% 的秋水仙素,过夜,然后生根,获得了自交亲和的四倍体 PF。转基因方法创制自交亲和性品种具有可行性,通过转入额外的 *S* 基因培育果树的自交亲和品种,也可通过基因沉默的方式调节 *S-RNase* 的表达量而产生自交亲和现象。Broothaerts 等^[10]对苹果品种“早捷”(Elstar)进行转基因操作,转入了 35S 启动子基因片段使花柱中的 *S-RNase* 基因发生基因沉默,花柱中没有 *S-RNase* 的产生,从而获得自交亲和性植株。

近年来,随着分子生物学技术的发展及各方面研究的深入,自交不亲和性的分子机理研究取得了许多突破性进展,极大地丰富了果树配子体型自交不亲和性机理的学术理论^[4-10]。目前国际上研究较多的和已鉴定出 *S* 基因型的果树树种有苹果、甜樱桃、杏和梨 4 种,对于李的自交不亲和性和 *S* 基因型的研究已有一些进展,黄绍西(2009)采用李属雌蕊 *S-RNase* 基因特异性保守引物进行 PCR 和 RT-PCR,并对扩增产物进行克隆、测序和序列比对,在中国的 10 个传统李品种中获得了 8 个符合雌蕊 *S* 特异性识别决定因子必要条件的新基因,同时鉴定了中国李 25 个品种的 *S-RNases* 基因型。在中国的传统李品种中鉴定出了更丰富的 *S-RNase* 基因多态性。并且认为中国李 *S-RNase-h* 在所研究样本中表现最高的基因频率,预示着该基因可能与某些优良农艺性状有连锁关系。龙滩珍珠李是广西科研单位与当地农民合作 10 年选育出来的优质李新品种,树势生长旺,可自花结实,不需要授粉树,适应性强,没有病虫害,产量高,对土壤条件要求不高,在较为贫瘠的地段生长结果良好,抗寒性也较好,是中国李中少有的能自花结实品质优良的李品种。而对于像广西龙滩珍珠李能够自花结实品质优良这样特殊的李品种 *S* 基因型的研究未见报道。研究和鉴定龙滩珍珠李的 *S* 基因型,研究其如何克服自交不亲和现象,从分子生物学的角度分析其自交亲和的机理。龙滩珍珠李 *S* 基因型的鉴定,对于李

品种的遗传改良和栽培利用具有一定的指导意义,也为丰富 *S* 基因的遗传信息,深入开展自交不亲和和遗传机制提供实验支持。

2. 材料与方法

2.1. 龙滩珍珠李 *S* 基因的克隆和 *S* 基因型的鉴定

2.1.1. 龙滩珍珠李总 DNA 的提取

本实验采用较适合于李叶片基因组 DNA 提取的改良 CTAB 法,具体步骤如下:

1) 取约 0.3~0.5 g 新鲜叶片,剪成 5 mm² 左右大小放入研钵中,再加入少量液氮迅速研磨。加入 3 或 4 次液氮反复研磨,直至磨碎成细粉末状为止。

2) 将样品粉末装入 1.5 ml 离心管中,加 800 μ l CTAB 缓冲液(含 2% PVP),24 μ l β -巯基乙醇。

3) 混匀后置 65 $^{\circ}$ C 水浴中 30 min,每隔 10 min 摇匀一次。

4) 水浴后将样品在 12,000 rpm 离心 5 min。

5) 吸取上清,加等体积的 CI(氯仿:异戊醇 = 24:1),混匀后于摇床上摇匀 15 min,10,000 rpm 离心 10 min。

6) 吸取上清,加等体积的 PCI(苯酚:氯仿:异戊醇 = 25:4:1),上下颠倒混匀,12,000 rpm 离心 10 min。

7) 吸取上清后再次加等体积的 CI 抽提,12,000 rpm 离心 10 min。

8) 吸取上清加 2 倍体积无水乙醇,1/10 体积的 NaAc,沉淀 DNA。

9) -20 $^{\circ}$ C 静置 30 min。12,000 rpm 离心 15 min,用 70%乙醇漂洗沉淀 2~3 次,室温下风干至无乙醇味时(30 min 左右)加 500 ml 无菌水溶解。

10) 加 10 mg/ml 的 *Rnase* A(天根公司)1 μ l,37 $^{\circ}$ C 水浴 1 h。

11) 等体积的 CI 抽提,吸取上清加入 1/10 体积的 NaAc 和 2 倍体积无水乙醇沉淀 DNA,于 -20 $^{\circ}$ C 静置 30 min。

12) 12,000 rpm 离心 15 min,沉淀用 70%乙醇洗 2~3 次,室温干燥,溶解于适量无菌水中(20~50 μ l)。

13) 取 2 μ l 样品在 0.8%的琼脂糖凝胶上电泳,电压 100 V,30 min 后结束电泳,将凝胶转移到溴化乙锭溶液中染色 5 min,紫外检测并拍照,观察主带是否清晰,有无降解,是否含有 RNA。

14) 取 2 μ l DNA 溶液加纯水稀释至 400 μ l,紫外分光光度计测定,波长 200~300 nm。根据 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 估计其纯度,根据以下公式计算 DNA 的浓度。并用无菌水调节 DNA 浓度为 50~100 ng/ μ l。

DNA 的质量浓度 = 50 \times OD₂₆₀ \times 稀释倍数(单位: mg/ml)。

2.1.2. 引物设计

蔷薇科李属 *S-RNase* 具有以下结构特点(图 1),与其他蔷薇科 *S-RNase* 一样,具有 5 个保守区(C1-C5)和一个高变区 RHV(或 HV),第一个内含子位于信号肽和 C1 区之间,第二个内含子位于高变区,而高变区(RHV)则位于 C2 和 C3 之间。

根据蔷薇科李属 *S-RNase* 结构特点,分别在 C2 上游区设计引物

Pru-C2(TGGCCAAGTAATTATTCAAACCC),在 C5 下游区设计引物

Pru-C5(CAAAATACCACTTCATGTAACAAC),用这对引物对龙滩珍珠李基因组 DNA 进行 PCR 扩增。

2.1.3. *S*-等位基因 PCR 扩增反应体系和反应条件

用引物 Pru-C2 与 Pru-C5 对龙滩珍珠李的基因组 DNA 进行扩增,其反应体系如下:

Template DNA	1.0 μ l
10 \times PCR Buffer	2.5 μ l
MgCl ₂ (25 mmol/L)	2.5 μ l
dNTP Mixture(2.5 mmol/L)	2.5 μ l
Primer 1: Pru-C2 (2.5 mmol/L)	0.625 μ l
Primer 2: Pru-C5 (2.5 mmol/L)	0.625 μ l
Taq DNA polymerase (5 U/ μ l)	0.2 μ l
ddH ₂ O	15 μ l
Total volume	25 μ l

反应程序如下:

Step 1	94 $^{\circ}$ C	3 min	} 35 cycles
Step 2	94 $^{\circ}$ C	30 s	
Step 3	56 $^{\circ}$ C	45 s	
Step 4	72 $^{\circ}$ C	1 min 30 s	
Step 5	72 $^{\circ}$ C	10 min	
Step 6	4 $^{\circ}$ C	END	

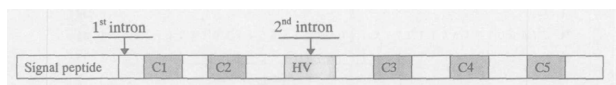


Figure 1. The structure of *Prunus S-RNase*
图 1. 李属 *S-RNase* 结构示意图

2.1.4. 凝胶上回收特异性 DNA 目的片段

对 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳检测, 获得 1 条特异性条带。采用 UNIQ-10 柱离心式 DNA 胶回收试剂盒(上海生工)来回收此条带。操作步骤如下:

1) 用琼脂糖凝胶电泳将目的 DNA 片段与其他 DNA 尽可能分开, 然后用干净的手术刀割下所要的 DNA 琼脂块, 放入 1.5 ml 离心管中。

2) 按每 100 mg 琼脂糖凝胶加入 400 μ l Binding Buffer, 置于 50 $^{\circ}$ C~60 $^{\circ}$ C 水浴中 10 min, 使胶彻底融化。加热融胶时, 每 2 min 混匀一次。

3) 将 UNIQ-5 柱放入 2 ml 收集管中, 将融化的胶溶液转移到 UNIQ-5 柱中, 室温放置 2 min 后, 8000 rpm 室温离心 1 min。

4) 取下 UNIQ-5 柱, 倒掉收集管中的废液, 将 UNIQ-5 柱放入原收集管中, 放入 450 μ l Wash Solution, 8000 rpm 室温离心 1 min。

5) 重复步骤 4。

6) 取下 UNIQ-5 柱, 倒掉收集管中的废液, 将 UNIQ-5 柱放入原收集管中, 让离心管盖敞开着, 12,000 rpm 室温下离心 1 min。

7) 将 UNIQ-5 柱放入一根新的 1.5 ml 离心管中, 柱膜中央加入 30 μ l Elution Buffer 或水(pH 7.0), 室温或 37 $^{\circ}$ C 放置 2 min, 提高 DNA 的洗脱效率。

8) 12,000 rpm 高速离心 1 min, 离心管中的收集液即含有回收的 DNA 片段, 可立即使用或保存于-20 $^{\circ}$ C 备用。

2.1.5. 目的 DNA 片段与 T 载体的连接

采用 PUCm-T 载体(上海生工), 连接体系如下:

回收的 DNA	1 μ l
PUCm-T Vector (50 ng/ μ l)	1 μ l
10 \times Buffer	1 μ l
T4 DNA ligase	1 μ l
ddH ₂ O	6 μ l
Total volume	10 μ l

混匀后, 20 $^{\circ}$ C 连接过夜。

2.1.6. 大肠杆菌感受态细胞的转化及阳性克隆的筛选

参照《分子克隆实验指南》(萨姆布鲁克等, 1996) 并加以改进。

1) 在 1.5 ml 离心管中将连接产物加入到 200 μ l 感受态细胞(新鲜制备或-70 $^{\circ}$ C 保存均可), 轻轻摇匀。

2) 将离心管在冰上放置 20 min 后, 放在 42 $^{\circ}$ C 水浴中热激 90 s, 立即把离心管放置在冰上冷却 2 min。

3) 加入 800 μ l LB 液体培养基(不含 AMP), 混匀。37 $^{\circ}$ C, 200 rpm 培养 45~60 min。

4) 离心, 去上清, 将剩余的 150 μ l 菌液重悬后均匀涂布于 LB 平板上(用蓝白斑筛选法, 平板表面涂有 40 μ l X-Gal, 4 μ l IPTG), 室温放置 2 h 左右, 37 $^{\circ}$ C 倒置培养 16 h 以上, 直至出现单菌落。

X-Gal 储液(20 ng/ml)的配制为 0.02 g X-Gal 溶于 1 ml 的二甲基甲酰胺, 外包铝或黑纸, 以防光破坏, 储于-20 $^{\circ}$ C; IPTG 储液(200 ng/ml)配制为 1 ml 蒸馏水中溶解 200 mg IPTG 后, 用 0.22 μ m 滤膜过滤除菌, 装于 eppendorf 管中。

2.1.7. 重组质粒的 PCR 鉴定

1) 配制 200 ml LB 液体培养基, 121 $^{\circ}$ C 高压灭菌 20 min 后, 冷却至 55 $^{\circ}$ C 左右时加入 200 μ l 100 μ g/ml 的氨苄青霉素, 混匀后分装于已灭菌的 eppendorf 管中。

2) 待蓝白斑显色后挑取平板上的白色单菌落, 放入已冷却的 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C, 200 rpm 过夜(16 h 以上)震荡培养, 至饱和状态(OD₆₀₀ = 4 左右)。

3) 取 5 μ l PCR 产物用相同引物和反应条件进行再次 PCR 鉴定, 反应体系如下:

菌液	1.0 μ l
10 \times PCR Buffer	2.5 μ l
MgCl ₂ (25 mmol/L)	2.5 μ l
dNTP (2.5 mmol/L)	2.5 μ l
Primer 1 (2.5 mmol/L)	0.625 μ l
Primer 2 (2.5 mmol/L)	0.625 μ l
Taq DNA polymerase (5 U/ μ l)	0.2 μ l
ddH ₂ O	15 μ l
Total volume	25 μ l

4) 用 1.5%的琼脂糖电泳检测是否获得目的条带, 将获得目的条带的菌液直接由上海生工测序。

2.1.8. 特异片段序列分析

序列分析采用DNAMAN软件与 <http://www.bio-soft.net/sms/index.html>在线分析软件, 然后在NCBI的GenBank、DDBJ数据库与 <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw>在线分析软件, 进行核苷酸序列比对。用DNAMAN和Clustalx 1.83、Clustalw软件进行*S-RNase*序列的同源分析比对。

3. 结果与分析

3.1. 龙滩珍珠李 *S* 基因的克隆

3.1.1 龙滩珍珠李总 DNA 的提取

提取的龙滩珍珠李基因组 DNA OD_{260}/OD_{230} 比值大于 2.0, OD_{260}/OD_{280} 比值约为 1.8, 质量好, 产量高, 在 0.8%琼脂糖凝胶电泳检测中, 主带清晰, 无降解现象(图 2), 完全可以满足后续 PCR 扩增要求。

3.1.2. *S*-等位基因 PCR 扩增

本实验分别对 Taq 酶、模板 DNA、 Mg^{2+} 、dNTP 和引物的使用量进行调整, 以使 PCR 反应体系达到最优化, 效果最佳。最终确定的最适合用量分别为: Taq 酶 1 U、模板 DNA 1 μ l、 Mg^{2+} 、2.5 μ l、dNTP 2.5 μ l、Primer 1 0.625 μ l、Primer 2 0.625 μ l, 共 25 μ l 的反应体系。

经过反复试验对 PCR 反应程序进行调整, 特别是对不同退火温度和时间以及循环数进行调整, 以使 PCR 扩增效果最好。最终确定的最佳反应程序是: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 56 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min 30 s, 35 个循环, 72 $^{\circ}$ C 后延伸 10 min。

建立了最佳 PCR 反应体系和反应程序, 进行 PCR 扩增, 结果如图 3 所示, 得到 1 条清晰的特异扩增

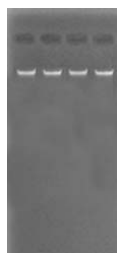
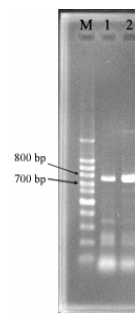


Figure 2. Genome DNA of Longtanzhenzhuli by the CTAB method
图 2. 龙滩珍珠李基因组 DNA



1 and 2, PCR products; Lane M, DL-1500 marker

Figure 3. Allele-specific PCR amplification of *S-RNase* genes from Longtanzhenzhuli Lane

图 3. 龙滩珍珠李 *S* 基因的 PCR 扩增

条带, 片段大小在 700 bp~800 bp 之间, 接近 800 bp。

3.1.3. 凝胶上回收特异性 DNA 片段

本实验使用上海生工生产的 UNIQ-10 柱式 DNA 凝胶回收试剂盒, 对目的片段进行回收纯化, 如图 4 所示, 对电泳分离出的条带进行切割回收纯化, 结果条带较清晰, 可以进行下一步实验。

3.1.4. 重组质粒的 PCR 鉴定

如图 5 电泳检测结果显示, 在位置 700 bp~800 bp 对应的出现了更为清晰的条带, 说明目的片段已被转入大肠杆菌中。将出现条带的菌液送至上海生工进行测序, 测序结果为 727 bp 和 718 bp, 分别用 *S-RNase*₁、*S-RNase*₂ 来表示。

3.2. 龙滩珍珠李 *S* 基因型的鉴定

龙滩珍珠李 *S-RNase* 基因的序列分析

1) 通过 NCBI 的 GenBank、DDBJ 数据库以及生物软件分析显示, 珍珠 *S-RNase*-1 片段在中国李中首次发现并命名为 *PsS-RNase*-28, 其中包含有 367 bp 的内含子(见图 6), 仅有 360 bp 的外显子编码序列, 编码 119 个氨基酸, 通过 GeneBank 数据库的 BLAST 同源性分析结果表明(表 1), 与黑刺李(*Prunus spinosa*) *S-RNase* *SI* 基因(EF636467.1)相似性达到 98%, 与其它李 *S-RNase* 基因的相似性都达到 79%以上。

与大多数植物在内含子/外显子剪接位点一样 (Fincham, 1994; Beuppu 等, 2002), 中国李 *S-RNase* 基因内含子的剪切位点也具有 GT/AG 保守序列, 此外, 第一个剪切位点的左侧有两个相对保守的碱基 TG, 第二个剪切位点的右侧第一个碱基通常为 T, 附近 4 个碱基富含 C。



Figure 4. Electrophoresis detection of PCR product

M: DL-1500 marker

图 4. 回收 PCR 产物的电泳检测

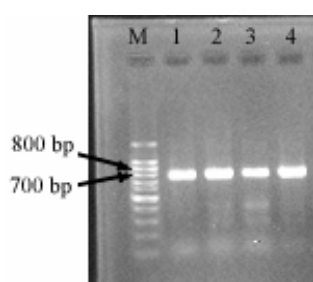


Figure 5. The PCR detection of plasmids M: DL-1500 marker

图 5. 转化菌落的 PCR 鉴定

根据图 7, 对中国李的 *S-RNase-28* 和黑刺李 *S-RNase-1* 的 DNA 序列进行比较, 结果表明, 前者的内含子省略了 117 bp, 在编码区两者只有 4 个碱基的差异。

在氨基酸序列上(图 8), 中国李的 *S-RNase-28* 和黑刺李的 *S-RNase-1* 两者没有区别。氨基酸序列相同, 其功能是否相同还需要进行进一步研究。

2) 龙滩珍珠李 *S-RNase-2* 片段包含有 343 bp 的内含子(见图 9), 其中仅有 375 bp 的外显子编码序列, 编码 124 个氨基酸, 通过 GeneBank 数据库的 BLAST 同源性分析结果表明(表 2), 与中国李(*Prunus salicina*) *PsS-RNase-h* 基因(AB084148.1)同源率达到 99%, 与其它李 *S-RNase* 基因的同源率都达到 85% 以上。

4 讨论与结论

本研究采用 PCR、克隆和测序的方法, 在广西龙滩珍珠李基因组 DNA 中获得了 2 个基因片段, 通过 NCBI 进行序列比对和同源性序列搜索, 分析了这 2 个基因片段, 其中一个为在中国李中首次发现并命名为 *PsS-RNase-28*, 与黑刺李(*Prunus spinosa*)*S-RNase*

Table 1. Homology analysis of sequence of Zhenzhu plum *S-RNase*₁(*PsS-RNase-28*)

表 1. 龙滩珍珠李 *S-RNase*₁(*PsS-RNase-28*) 序列同源性分析

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
EF636467.1	<i>Prunus spinosa</i> <i>S</i> -locus <i>S-RNase</i> S1 gene, partial cds	846	1285	99%	0.0	98%
DQ677587.1	<i>Prunus spinosa</i> <i>S-RNase</i> (<i>S-RNase</i>) gene, <i>S-RNase-8</i> allele and <i>S</i> -locus F-box protein (SFB) gene, SFB-8 allele, partial cds	344	344	42%	4e-91	86%
AB093135.1	<i>Prunus salicina</i> gene for <i>Sm-RNase</i> , partial cds	335	335	43%	2e-88	85%
AB093134.1	<i>Prunus salicina</i> gene for <i>SI-RNase</i> , partial cds	324	324	42%	5e-85	85%
DQ677588.1	<i>Prunus spinosa</i> <i>S-RNase</i> (<i>S-RNase</i>) gene, <i>S-RNase-9</i> allele and <i>S</i> -locus F-box protein (SFB) gene, SFB-9 allele, partial cds	322	322	40%	2e-84	86%
EU833958.1	<i>Prunus spinosa</i> <i>S7-2 RNase</i> (<i>S-RNase</i>) gene, <i>S-RNase-S7-2</i> allele and SFB (SFB) gene, SFB7-2 allele, partial cds	318	318	41%	2e-83	85%
DQ677586.1	<i>Prunus spinosa</i> <i>S-RNase</i> (<i>S-RNase</i>) gene, <i>S-RNase-7-1</i> allele and <i>S</i> -locus F-box protein (SFB) gene, SFB-7-1 allele, partial cds	318	318	41%	2e-83	85%
DQ646488.1	<i>Prunus salicina</i> haplotype Sb <i>S</i> -locus-F-box (SFB) gene and <i>S-RNase</i> (<i>S</i>) gene, Sb allele, partial cds	311	311	40%	4e-81	85%
AB252413.1	<i>Prunus salicina</i> gene for <i>Sb-RNase</i> , complete cds	311	311	40%	4e-81	85%
DQ512912.1	<i>Prunus salicina</i> <i>S7-RNase</i> mRNA, partial cds	311	311	37%	4e-81	87%
DQ677584.1	<i>Prunus spinosa</i> <i>S-RNase</i> (<i>S-RNase</i>) gene, <i>S-RNase-3-1</i> allele and <i>S</i> -locus F-box protein (SFB) gene, SFB-3-1 allele, partial cds	309	309	62%	1e-80	79%
EU113311.1	<i>Prunus salicina</i> cultivar wickson <i>Sk-RNase</i> gene, partial cds	305	305	42%	2e-79	84%
AB093133.1	<i>Prunus salicina</i> gene for <i>Sk-RNase</i> , partial cds	305	305	42%	2e-79	84%
AB084143.1	<i>Prunus salicina</i> <i>PS-Sb</i> gene for <i>Sb-RNase</i> , partial cds	305	305	40%	2e-79	85%
DQ677585.1	<i>Prunus spinosa</i> <i>S-RNase</i> (<i>S-RNase</i>) gene, <i>S-RNase-3-2</i> allele and <i>S</i> -locus F-box protein (SFB) gene, SFB-3-2 allele, partial cds	303	303	62%	7e-79	79%

>S Rnase-1

AACGATGCCAGTAAATGCCTTGGGTCGCAATTTAAGGAGGAGAATTTGgtatgtattgtttgatttttatatttttatatt
 tttgcaattattctttacgcatttagttttaaaaaaaaaatagattgtcatctgaagcgaatattcttctttcaataaacctt
 gggtagtagataaaatgtgaacttggctctctcggtacattatitttgactatgtaccetaagtacaaaatgtataatccttttaa
 ttaaagggcctaccattttgtacttacgtatatgaaatattgtacctaataaaggatcaaaataaaattcaatttaatat
 tcatgtttaatttaaaaacaatctttatcaagaatgcaataataactatccttttagttttcacttttttcccaaaatgtgtca
 gTCCCTAAGTTGCTATTGAAACTGAAGAGATCCTGGCCGAACTGGAAGGTGGAACGATACAAGATTTTGGGAAGGGGAAT
 GGAAGAAACATGGTACATGTTCCGAACAGACACTTACCCAATGCAATACTTCCAGCGATCCCACGAAATGTGGAAGTTCGTTT
 AATATTACAGAGATCCTTAAAAACGCATCAATCGTACCAAGTGGACACAAAAATGGAAGTATTCCGGACATAGCAGACCAAT
 TAAGACAGCAACTAAAAGAACCCTCCTTCGTTGCAAACGTGATCCAGCAACTAATACTGA

Figure 6. Sequence of Zhenzhu plum *S-RNase₁* (*PsS-RNase-28*) (lineated italic small letters indicated the nucleotides of predicted intron)
 图 6. 龙滩珍珠李 *S-RNase₁* (*PsS-RNase-28*) 序列(内含子序列用划线小写字母表示)

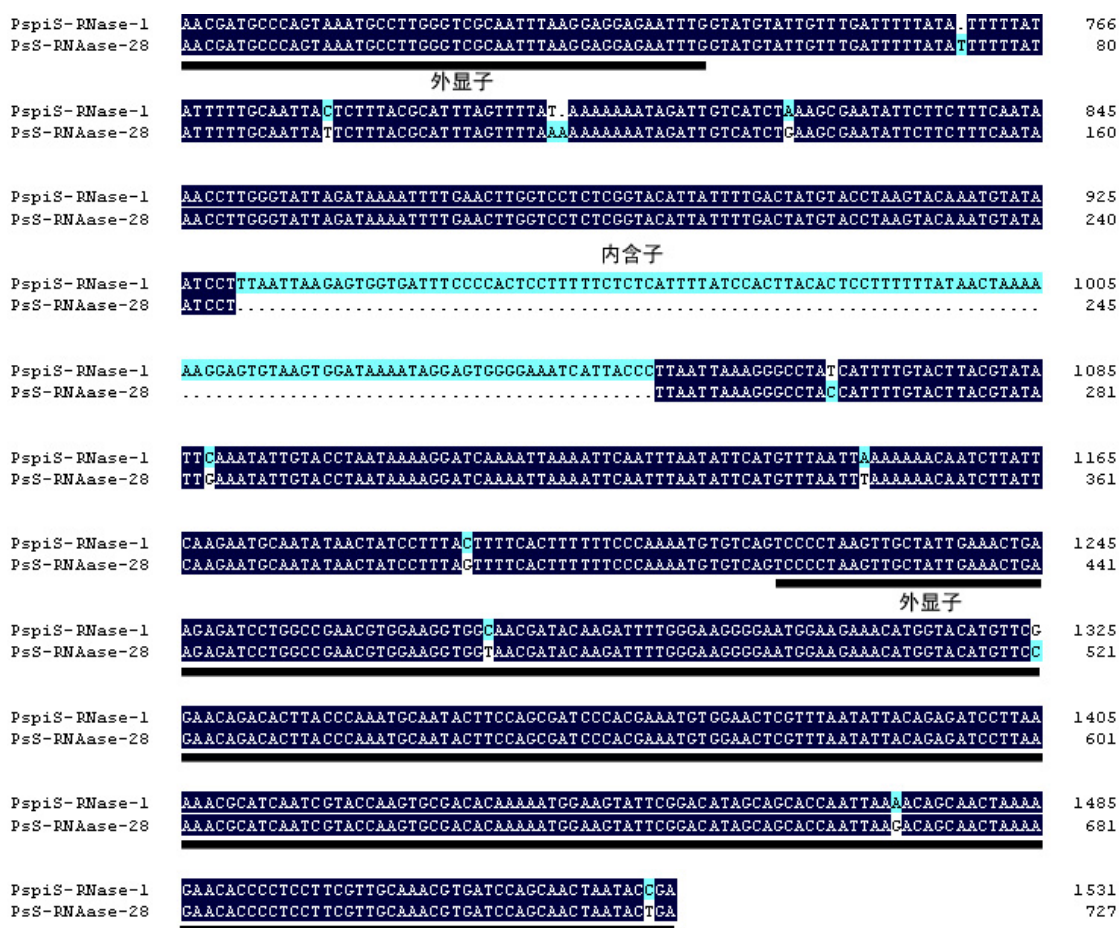


Figure 7. Alignment between Zhenzhu plum *S-RNase₁* (*PsS-RNase-28*) and *Prunus spinosa S-RNase-1*
 图 7. 龙滩珍珠李 *S-RNase₁* (*PsS-RNase-28*) 和黑刺李 *S-RNase-1* 的 DNA 序列比较

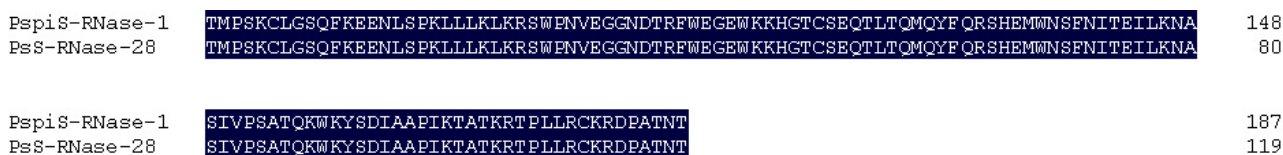


Figure 8. Alignment of the amino acid between Zhenzhu plum *S-RNase₁* (*PsS-RNase-28*) and *Prunus spinosa S-RNase-1*
 图 8. 龙滩珍珠李 *S-RNase₁* (*PsS-RNase-28*) 和黑刺李 *S-RNase-1* 的氨基酸序列比较

>S Rnase-2
 AACGACGCCAGTAATTGCAATGGGGCGCAATTTGATGACAGGAAAGTGgtatgtcattatTTTTTTTcacttgctcttagca
 ttttagTTTTTTTatTTTTTgtatggagatattagcatttagctcttagaaaaatgttgaatTTTTTctgaaaagtactcggaagt
 gcttcttgaaaaaacacaaatgtgtttctccagaaagcgcttttaaaactcataaacacttttaaatgTTTTTgtcaaatgt
 agacataagcacttttatttagtcatttttagaagcactcctaaacatacccttagtattgTTgattgtatctttctcaaatctt
 atatccatttgagtttatactTTTTTctcaaaatatactatattgcttggatgtctcagTACCCCCGATTGCGATCCAAACT
 GAAGATATCTTGGCCGGACGTGGAAAATGGCAATGATACAAAATTTGGGAAGGCGAATGGAACAAACATGGTAGATGTTCCG
 AACGACACTTAACCAATGCAGTACTTCGAGCGATCCTACGAAATATGGAACCTGTTCATATTACCAATATCCTTAAAAAT
 GCTTCAATCGTACCAAGTGGACACAAACATGGACCTACTCCGACATAGTATCAAATATTAAGCAGTAACCTCAAAGAACC
 CCTCCTCGTTGCAGACGCAATCCAGCATATAATAAGAGCGGGCGAACTCTCA

Figure 9. Sequence of Zhenzhu plum *S-RNase*₂ (lined italic small letters indicated the nucleotides of predicted intron)
 图 9. 龙滩珍珠李 *S-RNase*₂ 序列(含子序列用划线小写字母表示)

Table 2. Homology analysis of sequence of *Prunus spinosa S-RNase-2*
 表 2. 李 *S-RNase-2* 序列同源性分析

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
AB084148.1	<i>Prunus salicina PS-Sh</i> gene for <i>Sh-RNase</i> , partial cds	1312	1312	99%	0.0	99%
DQ790374.1	<i>Prunus salicina</i> cultivar Friar <i>Sh-RNase</i> gene, partial cds	893	893	68%	0.0	99%
DQ790373.1	<i>Prunus salicina</i> cultivar Green Sun <i>Sh-RNase</i> gene, partial cds	883	883	67%	0.0	99%
DQ512914.1	<i>Prunus salicina Sh-RNase</i> mRNA, partial cds	604	696	52%	2e-169	100%
DQ677587.1	<i>Prunus spinosa S-RNase (S-RNase)</i> gene, <i>S-RNase-8</i> allele and <i>S-locus F-box</i> protein (SFB) gene, SFB-8 allele, partial cds	424	424	48%	5e-115	88%
AB280793.1	<i>Prunus salicina</i> gene for <i>Se-RNase</i> , complete cds, haplotype: Se	381	381	41%	3e-102	89%

SI 基因(EF636467.1)同源率达到98%,与其它李 *S-RNase* 基因的同源率都达到79%以上。另一个扩增片段与中国李(*Prunus salicina*)*PsS-RNase-h* 基因(AB084148.1)同源率达到99%,与其它李 *S-RNase* 基因的同源率都达到85%以上。

1988年,研究者在米曲霉(*Aspergillus oryzae*)中发现和鉴定了 *T2-RNase* 的序列^[11]。*T2-RNase* 与 *S*-糖蛋白具有相似的序列特征^[12]。进一步研究表明, *S*-糖蛋白具有体外 *RNase* 酶活性^[12]。所有已知的 *S*-糖蛋白与 *T2-RNase* 一样包含两个具有催化活性的组氨酸^[13]。因此, *S*-糖蛋白被重新命名为 *S-RNase*, 编码该蛋白的基因也被命名为 *S-RNase* 基因。*T2-RNase* 和 *S-RNase* 被归类并命名为 *T2/S-RNase* 家族, 该家族还包括了 *S-like RNase* 和 *relic S-RNase*。*relic S-RNase* 和 *S-like RNase* 一样, 广泛存在于蔷薇科、茄科和玄参科植物中, 与 *S-RNase* 具有序列相似性。但是它们不表现 *S* 单元型特异多态性, 此外, *relic S-RNase* 与 *S-RNase*

具有更多的相似性, 比如在花柱中特异性地表达。

比较茄科不同 *S-RNases* 氨基酸序列, 发现 *S-RNases* 具有5个保守区(C1、C2、C3、C4和C5), 2个高变区(HVa和HVb)^[13]。*S-RNase* 属于碱性胞外糖蛋白, 主要分布于花柱的中上部引导组织的基质中, 通常自花花粉管生长也是在该部位受到抑制。*S-RNase* 分子量大约为24-32KD, N-端有22~27个氨基酸残基组成的信号肽, C1、C4、C5是疏水区与 *S-RNase* 的高级结构有关; C2和C3为亲水区, 各存在1个组氨酸残基, 是 *S-RNase* 的活性部位; 高变区HVa和HVb分布于C2与C3之间, 氨基酸残基具有亲水性和多变性, 与 *S-RNase* 的等位基因特异性识别有关。

根据 *S-RNase* 的序列特征, 在5个保守区设计引物, 利用PCR技术, 可以克隆 *S-RNase* 的cDNA及其基因组片段。这种方法对自交不亲和的种群及其进化的研究^[14], 对植物 *S*-基因型的鉴定尤为有用^[15]。通过PCR的方法在别的物种中寻找 *S-RNase* 的同源基因,

可以初步认为该物种也具有 *S-RNase* 介导的配子体自交不亲和性现象。比如, 通过这种方法其他学者在金鱼草植物(*Antirrhinum hispanicum*)克隆了 *S-RNase* 同源基因的 cDNA, 并发现这个物种也表现配子体自交不亲和性。*S-RNase* 的系统发育分析提示不同科植物间的配子体自交不亲和起源于共同的祖先。

虽然中国李 *S-RNase-28* 和黑刺李 *S-RNase-1* 的氨基酸序列相似性高达 100%, 但前者的内含子省略了 117 bp, 在编码区两者也有 4 个碱基的差异。张树军等^[6]对中国李 *S-RNase-26* 与杏 *S-RNase-2* 进行了序列比对分析, 结果在编码区仅有 2 个碱基差异, 而在内含子区域, 无论长度还是碱基组成, 二者差异都比较大, 两者推导的氨基酸序列相似性达到 99%, 具有相同的高变区(RHV)。在甜樱桃中也报道了相似的结果。Zisovich 等^[16]在西洋梨(*Pyrus communis*)上更进一步的证明了具有相同高变区(RHV)的 *S-RNase-i* 和 *S-RNase-n* 基因具有不同的等位基因特异性识别。因此, 即使是氨基酸序列相似性高达 100%, 其功能是否一样还需要进一步的研究。

龙滩珍珠李具有自花结实而且品质优良, 本研究成功克隆得到的两个基因片段中, 一个为曾被报道过的中国李 *S-RNase-h*, 另一个新基因与曾被报道过的李属其它 *S-RNases* 基因有高度的同源性, 这说明 *S-RNases* 氨基酸序列中从 C2 到 C5 的区域是正常的, 导致其自花结实的原因很可能在于 C1 之前或 C5 之后的区域出现了不同于其他李品种的变化, 产生了变异, 具体原因有待于进一步研究。

6. 致谢

感谢广西农科院作物遗传改良生物技术重点实验室及魏源文博士、黄诚梅博士、邓智年博士。

参考文献 (References)

- [1] 陈迪新, 张绍铃, 陶书田. 沙梨花粉原位萌发与花粉管生长特性[J]. 南京农业大学学报, 2004, 27(3): 34-37.
- [2] 李晓, 吴华清, 吴俊, 陶书田, 张绍铃. 不同发育阶段甜樱桃花授粉后花粉萌发和花粉管生长的差异[J]. 果树学报, 2008, 25(4): 501-505.
- [3] 李晓芳, 李茂福, 韩振海, 许雪峰, 李天忠. “鸭梨”芽变“闫庄梨”自交亲和性分子机制初步研究[J]. 园艺学报, 2007, 35(1): 13-18.
- [4] 吴华清, 齐永杰, 张绍铃. “奥嘎二十世纪”梨自交亲和性分子机制及其遗传特性研究[J]. 园艺学报, 2008, 35(8): 1009-1116.
- [5] 吴华清, 衡伟, 李晓, 黄绍西, 张绍铃. “大果黄花”梨自交亲和性变异机制研究[J]. 南京农业大学学报, 2007, 30(2): 29-33.
- [6] R. Tao, T. Habu, A. Namba, H. Yamane, F. Fuyuhiko, K. Iwamoto and A. Sugiura. Inheritance of *S-RNase* in Japanese apricot (*Prunus mume*) and its relation to self-compatibility. *Theoretical and Applied Genetics*, 2002, 105: 222-228.
- [7] K. Ushijima, H. Yamane, A. Watari, E. Kakehi, K. Ikeda, N. R. Hauck, A. F. Iezzoni and R. Tao. The S haplotype-specific F-box protein gene, SFB, is defective in self-compatible haplotypes of *Prunus avium* and *P. mume*. *Plant Journal*, 2004, 39: 573-586.
- [8] S. Vilanova, M. L. Badenes, L. Burgos, J. Martinez-Calvo, G. Llacer, and C. Romero. Self-compatibility of two apricot selections is associated with two pollen-part mutations of different nature. *Plant Physiology*, 2006, 142: 629-641.
- [9] W. Broothaerts, J. Keumans and I. V. Nerum. Self-fertile apple resulting from *S-RNase* gene silencing. *Plant Cell Reports*, 2004, 22: 497-501.
- [10] 黄绍西. 中国李(*Prunus salicina*)自交不亲和性与中国樱桃(*P. pseudocerasus*)自交亲和性机制的初步研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2009.
- [11] Y. Kawata, et al. Amino-acid sequence of ribonuclease T2 from *Aspergillus oryzae*. *European Journal of Biochem*, 1988, 103: 408-418.
- [12] B. A. McClure, V. Haring, P. R. Ebert, et al. Style self-incompatibility gene products of *Nicotiana glauca* are ribonucleases. *Nature*, 1989, 342: 955-957.
- [13] T. R. Ioerger, A. G. Clark, T.-H. Kao. Polymorphism at the self-incompatibility locus in *Solanaceae* predates speciation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87: 732-735.
- [14] A. D. Richman, W. Broothaerts, J. R. Kohn. Self-incompatibility *Rnase* from the three plant families: Homology or convergence. *Am J Bot*, 1997, 84: 912-917.
- [15] R. Tao, H. Yamane, H. Sassa, et al. Identification of stylar *RNase* associated with gametophytic self-incompatibility in almond (*Pyrus dulcis*). *Plant Cell Physiology*, 1997, 38: 304-311.
- [16] 张树军, 黄绍西, 张绍铃等. 携李等 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.