

11 个苹果品种自交不亲和基因的分离与鉴定

张雪梅,李保国,齐国辉,郭素萍

(河北农业大学林学院,保定 071000)

摘要:以 11 个苹果品种为试验材料,根据保守氨基酸序列“FTQQYQ”和“anti-1/W I PNV”设计苹果自交不亲和基因引物,利用酶切分析和目的片段 DNA 测序方法鉴定了 9 个新的 S-等位基因,将该 9 个 S-等位基因分别标记为:S34-、S35-、S36-、S37-、S38-、S39-、S40-、S41-、S42-等位基因,在 GeneBank 中的接收号依次为:EU310474、EU391605、EU391606、EU391607、EU391609、EU391610、EU391611、EU391612、EU391613。11 个苹果品种的自交不亲和基因型分别为:桑萨(S40S40)、芳明(S1S9)、烟嘎 1(S38S27)、红金嘎拉(S39S27)、烟嘎 2(S38S27)、青 9 号(S41S42)、阿斯(S36S36)、皇家嘎拉(S37S27)、静香(S1S9S34)、高岭(S38S9)、红奥(S35S35)。

关键词:苹果;自交不亲和基因;分离;鉴定

Isolation and Identification of Self-incompatibility Allele in 11 Apple Cultivars

ZHANG Xue-mei, LI Bao-guo, QI Guo-hui, GUO Su-ping

(College of Forestry, Agricultural University of Hebei, Baoding 071000)

Abstract: The self-incompatibility allele of 11 apple cultivars were tested in this article. Self-incompatibility apple primers were designed according to the conserved sequence of amino acid“FTQQYQ”and“anti-1/W I PNV”. In this article, 9 new self-incompatibility genes named S34-, S35-, S36-, S37-, S38-, S39-, S40-, S41-, and S42-Allele respectively were isolated with enzyme digestion and DNA sequencing of aim fragment method. And they were deposited in GeneBank under the accession numbers of EU310474, EU391605, EU391606, EU391607, EU391609, EU391610, EU391611, EU391612, and EU391613. The self-incompatibility allele of 11 apple cultivars were Sansa (S40S40), Fangming (S1S9), Yanga1 (S38S27), Hongjingala (S39S27), Yanga2 (S38S27), Qing9 (S41S42), Asi (S36S36), Huangjiagala (S37S27), Jingxiang (S1S9S34), Gaoling (S38S9), and Hongao (S35S35).

Key-words: apple; self-incompatibility allele; isolation; identification

自交不亲和性 (self-incompatibility) 是植物防止近亲繁殖和保持物种连续性的一种重要机制,在植物界普遍存在。苹果 (*Malus domestica* Borkh.) 属于配子体自交不亲和类型,是由一个基因座上的复等位基因—S 基因控制^[1],如果不了解苹果品种的 S 基因型,在选配授粉品种时会具有较大的盲目性,生产中不能获得预期的产量和品质。因此,快速、早期鉴定苹果品种的 S 基因型是一项重要的工作。目

前,已从苹果中分离出 30 个 S-等位基因,包括 500 多个苹果品种^[2-12]。但由于世界上苹果品种较多,据统计有 8000 多个品种;再加上新品种的培育,使得苹果品种 S-等位基因更加丰富。因此,本研究对我国近几年引进及培育的苹果品种的自交不亲和基因用 PCR-RFLP 及测序的方法进行研究,以期为早期鉴定苹果自交不亲和基因、选择适合的授粉树以及新品种的选育提供依据,为丰富与发展苹果 S-等

收稿日期:2012-02-21 修回日期:2012-04-06 网络出版日期:2013-01-30

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20130130.1621.023.html>

基金项目:河北省科技支撑项目(11230605D)

作者简介:张雪梅,博士,副研究员,主要从事经济林栽培生理及分子生物学研究。E-mail: zhangxuemei888@163.com

通信作者:李保国,教授,主要从事经济林栽培生理研究。E-mail: lbg888@163.com

位基因体系奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试苹果品种分别为河北省内丘县富岗山庄百花园中的青9号、红奥,8年生;河北省农科院石家庄果树研究所标本园中的桑萨、芳明、烟嘎1、红金嘎拉、烟嘎2、阿斯、皇家嘎拉、静香、高岭,10年生。试验所用叶片于春季采集新梢顶端刚展开的嫩叶,采后放入冰壶立即带回实验室于-80℃冰箱保存备用。

1.2 S-allele PCR 扩增

按 J. L. Doyle 等^[13] 的 CTAB 法提取基因组 DNA。根据苹果 S-等位基因 C1 区的“FTQYQ”和 HV 区下游的“anti-1/WIPNV”保守氨基酸序列^[14], 分别设计正向引物 P1 (5'-TTTACGCAGCAATATCAG-3') 和反向引物 P2 (5'-ACGTTTCGGCCAAATA/CATT-3')。引物由宝生物工程(大连)有限公司合成。

PCR 参照张雪梅等^[15] 的反应体系进行。反应结束后,用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳 1 h,溴化乙锭(EB)染色法检测 PCR 产物及酶切情况。

1.3 回收、酶切、测序

经 TaKaRa Agarase Gel DNA Purification Kit 试剂盒对扩增的目的片段进行切胶回收后,用 Afa I (Rsa I)、Ehe I、EcoR I、Kpn I、Acc I、EcoR V、Pst I、Taq I、ScrF I 9 种限制性内切酶进行酶切。前 2 种限制性内切酶 20 μL 酶切反应体系各成分用量分别为:1 ng/μL PCR 产物 6 μL,10 × T buffer 2 μL,10 × BSA 2 μL,5U/μL Enzyme 1 μL,ddH₂O 9 μL;后 7 种限制性内切酶 20 μL 酶切反应体系各成分用量为:1 ng/μL PCR 产物 6 μL,10 × Buffer 2 μL,5U/μL Enzyme 1 μL,ddH₂O 11 μL,在 37℃ 恒温水浴锅中进行酶切反应 16 h (Taq I 在 65℃ 恒温水浴锅中进行酶切反应 16 h)。

测序引物浓度为 4 pmol/μL,采用在 ddNTP 上做荧光标记的方法进行测序。

1.4 生物信息学分析

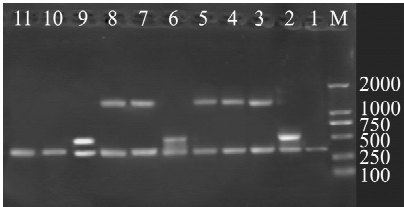
用 Chromas 3.25 软件校正测序结果,BLAST (Bsica Local Alignment Search Tool)软件进行同源性搜索。GeneDoc 软件进行 HV 区及周边外显子氨基酸比较。

2 结果与分析

2.1 不同苹果品种 S-等位基因的 PCR 扩增

用 S 基因通用引物 P1 和 P2 对桑萨、芳明、烟

嘎1、红金嘎拉、烟嘎2、青9号、阿斯、皇家嘎拉、静香、高岭、红奥 11 个苹果品种的基因组 DNA 进行 PCR 扩增,结果表明每个苹果品种分离到 1 或 2 个 S 基因特异性片段,大小在 300 ~ 1200 bp 之间(图 1)。各品种扩增所得 S 等位基因均含有 1 条 340 bp 左右的片段,芳明、青9号、静香各有 1 条 530 bp 左右的片段,烟嘎1、红金嘎拉、烟嘎2、阿斯、皇家嘎拉各含有 1 条 1200 bp 左右的片段(图 1)。



1 ~ 11:依次为桑萨、芳明、烟嘎1、红金嘎拉、烟嘎2、青9号、阿斯、皇家嘎拉、静香、高岭、红奥。M:Marker。下同
1-11: Sansa, Fangming, Yangal, Hongjingala, Yanga2, Qing9, Asi, Huangjiagala, Jingxiang, Gaoing, Hongao. M was marker. The same as below

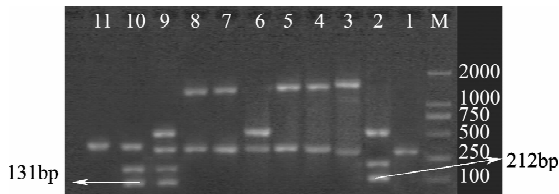
图 1 苹果 S-等位基因的 PCR 扩增结果
Fig. 1 PCR amplification result of S-allele in apple

11 个苹果品种中 3 个品种仅有 1 条 340 bp 左右的片段,说明它们含有相同的或条带大小相近的 S-等位基因;3 个品种有 340 bp、530 bp 左右的片段,5 个品种有 340 bp、1200 bp 左右的片段。

2.2 不同苹果品种 S-等位基因的酶切鉴定

不同苹果品种 S-等位基因扩增产物中,340 bp 左右的片段占总扩增条带的 57.89%,难以根据 PCR 产物的片段大小区别不同苹果品种的 S 基因型。因此,用 PCR-RFLP 方法对 11 个苹果品种 S-等位基因进行酶切鉴定。

2.2.1 S9-等位基因的酶切鉴定 根据前人对苹果自交不亲和基因研究^[4-6,16],PCR 扩增产物为 340 bp 左右的片段有 S2、S7、S9 和 S30,因此,分别用 S2、S7、S9 和 S30 等位基因的限制性内切酶 EcoR V、Acc I、EcoR I 和 Kpn I 对 340 bp 左右片段进行酶切。EcoR I 对 11 个苹果品种 S 等位基因 340 bp 片段的酶切结果如图 2 所示(其他没有酶切产物,图略)。由图 2 可以看出,芳明、静香、高岭 3 个苹果品种 340 bp 左右的片段被限制性内切酶 EcoR I 切开,酶切产物大小分别为 212 bp 和 131 bp,符合 S9-等位基因被 EcoR I 切割的情况,因此可以确定该 3 个苹果品种均含有 S9-等位基因。



箭头指示为限制性内切酶 EcoR I 酶切产物

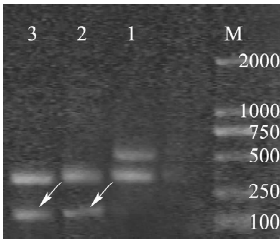
Arrow shows the product of restriction endonuclease EcoR I

图 2 EcoR I 对苹果 S 基因的酶切结果

Fig. 2 PCR amplification result of style S gene in apple

2.2.2 S30-等位基因的酶切鉴定 对于没有被 EcoR I 切割的 8 条 340 bp 左右的 S-等位基因用 EcoR V、Acc I、Kpn I 3 种限制性内切酶进行酶切, 结果均未被限制性内切酶 Kpn I 切开, 因此, 可以确定该 8 个苹果品种均不含有 S30-等位基因。

2.2.3 S1-等位基因的酶切鉴定 供试样品中芳明、青 9 号、静香 3 个苹果品种的 S-等位基因 PCR 扩增产物中含有 1 条 530 bp 左右的片段, S1-等位基因的限制性内切酶 Afa I (Rsa I)^[6] 能将芳明、静香 2 个苹果品种 530 bp 左右的片段切开 (图 3), 酶切产物大小为 320 bp 和 210 bp 左右的片段, 符合 S1 等位基因被 Afa I (Rsa I) 切割的情况, 因此芳明、静香 2 个苹果品种含有 S1-等位基因。青 9 号苹果 530 bp 左右的 S 基因片段未被限制性内切酶 Afa I (Rsa I) 切割, 因此, 需要进一步对未知 S-等位基因片段进行回收、测序鉴定。



1: 青 9 号; 2: 静香; 3: 芳明

箭头指示为限制性内切酶 Afa I (Rsa I) 酶切产物

1: Qing 9, 2: Jingxiang, 3: Fangming

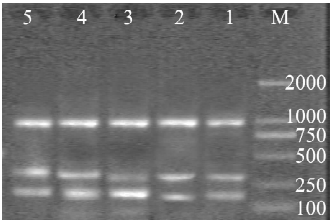
Arrow shows the product of restriction endonuclease Afa I (Rsa I)

图 3 Afa I (Rsa I) 酶切图谱

Fig. 3 Restriction pattern of Afa I (Rsa I)

2.2.4 S27-等位基因的酶切鉴定 供试样品中烟嘎 1、红金嘎拉、烟嘎 2、阿斯、皇家嘎拉 5 个苹果品种的 S-等位基因中均有 1 条 1200 bp 左右的片段, 苹果自交不亲和基因中, 1200 bp 左右的 S 基因片段有 S3-、S5-和 S27-等位基因, 与其对应的 3 种限制性内切酶依次为 Pst I^[16]、EcoR V^[17] 和 Taq I^[7], S27-

等位基因的限制性内切酶 Taq I 对 5 个苹果品种 1200 bp 片段酶切图谱如图 4 所示 (未被切开的图略)。由图 4 可知, S27-等位基因的限制性内切酶 Taq I 能将此片段切开, 酶切产物大小为 1000 bp 和 200 bp 左右的片段, 符合 S27-等位基因被切割的情况, 因此可以确定烟嘎 1、红金嘎拉、烟嘎 2、阿斯和皇家嘎拉 5 个苹果品种含有 S27-等位基因。



1~5: 依次为烟嘎 1、红金嘎拉、烟嘎 2、阿斯、皇家嘎拉

1-5: Yanga1, Hongjingala, Yanga2, Asi, Huangjiagala

Arrow shows the product of restriction endonuclease Taq I

图 4 TaqI 酶切图谱

Fig. 4 Restriction pattern of Taq I

2.3 苹果新 S-等位基因序列的鉴定

2.3.1 目的片段的回收 桑萨、烟嘎 1、红金嘎拉、烟嘎 2、青 9 号、阿斯、皇家嘎拉、静香、高岭、红奥 10 个苹果品种经 PCR-RFLP 方法未能确定其 S 基因型, 其中静香和高岭 2 个品种 340 bp 左右的片段经 S9-等位基因限制性内切酶 EcoRI 切割后, 切胶回收测序; 其他的 340 bp 的片段还无法确认, 经 PCR 扩增后直接回收测序。

2.3.2 S-等位基因测序后的确认 将桑萨、烟嘎 1、红金嘎拉、烟嘎 2、青 9 号、阿斯、皇家嘎拉、静香、高岭、红奥 10 个苹果品种分离得到的 S 基因序列测序, 得到的 9 个 DNA 序列经 BLAST 同源性搜索比较, 结果表明, 每个片段与 BLAST 同源性搜索相似性达 75% 以上, 说明所分离到的 DNA 序列是 S-等位基因。

S34-等位基因的鉴定 静香苹果叶片 DNA 产物经 PCR 扩增和测序分析, 得到 291 bp 片段, 经 BLAST 同源性比较表明, 该片段内含子大小为 117 bp, 与同源性最高的 S7-RNase 基因内含子相比少 21 个碱基, 二者 DNA 序列中 28 个碱基有差异, 差异发生在内含子区和 HV 区。推导氨基酸序列有 9 处差异。因此将该基因命名为 S34-RNase, GeneBank 接收号为 EU310474。

S35 等位基因的鉴定 红奥苹果叶片 DNA 产物经 PCR 扩增和测序分析, 得到 312 bp 片段, 经

BLAST 同源性比较表明,该片段内含子大小为 118 bp,与同源性最高的 S7-*RNase* 的内含子相比少 21 个碱基,二者 DNA 序列中 26 个碱基有差异,差异发生在 HV 区。推导氨基酸序列有 9 处差异。因此将该基因命名为 S35-*RNase*, GeneBank 接收号为 EU391605。

S36-等位基因的鉴定 阿斯苹果叶片 DNA 产物经 PCR 扩增和测序分析,得到 363 bp 片段,经 BLAST 同源性比较表明,该片段内含子大小为 168 bp,与同源性最高的 Se-*RNase* 的内含子相比少 1 个碱基,二者 DNA 序列中 25 处碱基有差异,差异发生在内含子区和高变区。推导氨基酸序列有 6 处差异。因此,将该基因命名为 S36-*RNase*, GeneBank 接收号为 EU391606。

S37-等位基因的鉴定 皇家嘎拉苹果叶片 DNA 产物经 PCR 扩增和测序分析,得到 339 bp 的片段,经 BLAST 同源性比较表明,该片段的内含子大小为 146 bp,与同源性最高的 S46-*RNase* 的内含子相比多 3 个碱基,二者外显子及内含子碱基 57 处有差异,其中 29.82% 的差异发生在内含子区,其他在高变区。推导氨基酸序列有 36 处差异。因此将该基因命名为 S37-*RNase*, GeneBank 接收号为 EU391607。

S38-等位基因的鉴定 烟嘎 1、烟嘎 2 和高岭苹果叶片 DNA 产物经 PCR 扩增和测序分析,得到 343 bp 的片段,用 GeneDOC 软件将烟嘎 1、烟嘎 2 和高岭的测序结果进行同源性比较,三者同源性为 100%,因此烟嘎 1、烟嘎 2 和高岭 340 bp 左右的片段为同一个 S-等位基因。经 BLAST 同源性比较表明,该片段内含子大小为 146 bp,与同源性最高的 S46-*RNase* 内含子相比多 2 个碱基,二者外显子及内含子有 55 处差异,其中 31.48% 的差异发生在内含子区,其他在高变区。推导氨基酸序列有 24 处差异。因此将该基因命名为 S38-*RNase*, GeneBank 接收号为 EU391609。

S39-等位基因的鉴定 红金嘎拉苹果叶片 DNA 产物经 PCR 扩增和测序分析,得到 342 bp 的片段,经 BLAST 同源性比较表明,该片段与内含子大小为 146 bp,与同源性最高的 S9-*RNase* 的内含子相比多 2 个碱基,二者外显子及内含子有 56 处差异,其中 29.82% 的差异发生在内含子区,其他在高变区。推导氨基酸序列 35 处有差异。因此将该基因命名为 S39-*RNase*, GeneBank 接收号为 EU391610。

S40 等位基因的鉴定 桑萨苹果叶片 DNA 产

物经 PCR 扩增和测序分析,得到 340 bp 的片段。经 BLAST 同源性比较表明,该片段内含子大小为 189 bp,与同源性最高的 S46-*RNase* 的内含子相比多 3 个碱基,二者外显子及内含子有 58 处差异,其中 31.03% 的差异发生在内含子区,其他在高变区。二者推导氨基酸序列有 33 处差异。因此将该基因命名为 S40-*RNase*, GeneBank 接收号为 EU391611。

S41、S42-等位基因的鉴定 青 9 号苹果叶片 DNA 产物经 PCR 扩增和测序分析,得到 417 bp 和 539 bp 两条片段,经 BLAST 同源性比较表明,其中 417 bp 片段内含子大小为 145 bp,与同源性最高的 S46-*RNase* 的内含子相比多 2 个碱基,二者外显子及内含子有 56 处差异,其中 30.35% 的差异发生在内含子区,其他在高变区。推导氨基酸序列有 34 处差异。因此将该基因命名为 S41-*RNase*, GeneBank 接收号为 EU391612。

青 9 号苹果 539 bp 片段内含子大小为 338 bp,与同源性最高的 Sh-*RNase* 的内含子相比少 1 个碱基,二者外显子及内含子有 14 处差异,其中 14.28% 的差异发生在内含子区,其他在高变区。推导氨基酸序列有 8 处差异。因此将该基因命名为 S42-*RNase*, GeneBank 接收号为 EU391613。

2.3.3 苹果新 S-等位基因 DNA 序列分析 10 个苹果品种中分离到的 9 个新 S-等位基因 DNA 序列比较如图 5 所示。由图 5 可知,所分离的 DNA 片段包括 C1 区、C2 区、HV 区、内含子区以及其他外显子区。其中 C1 区的 DNA 序列 ‘TTTACGCAG-CAATATCAG’ 在 9 个新 S-等位基因中均没有出现碱基的替换或缺失。保守的半胱氨酸残基与 S-*RNase* 的结构有关,编码半胱氨酸残基的密码子 “TGC” 和 “TGT” 在新 S-等位基因中没有碱基被替换,表现为完全保守。编码组氨酸的密码子 “CAC” 与 S-*RNase* 的功能有关,该密码子在新 S-等位基因中均没有碱基替换现象;C2 区大小为 27 bp,新 S-等位基因 C2 区 ‘TTTACGGTTCACGGTTTGTGCGCCT-TCA’ 比较保守,仅在 S42-*RNase* 中有一处碱基 ‘G’ 被 ‘T’ 替换;新 S-等位基因中内含子长度变化较大,从 147 ~ 338 bp 不等,不同 S-等位基因的内含子序列替换、缺失和插入碱基的现象较多,差异较大,相似性低。HV 区是苹果 S-*RNase* 与花粉 S 基因特异识别的部位,该区变异丰富。由 S-等位基因 DNA 序列分析可知,内含子区和 HV 区是苹果 S-等位基因变异最大的 2 个区域,也是不同 S-等位基因的差别区域。

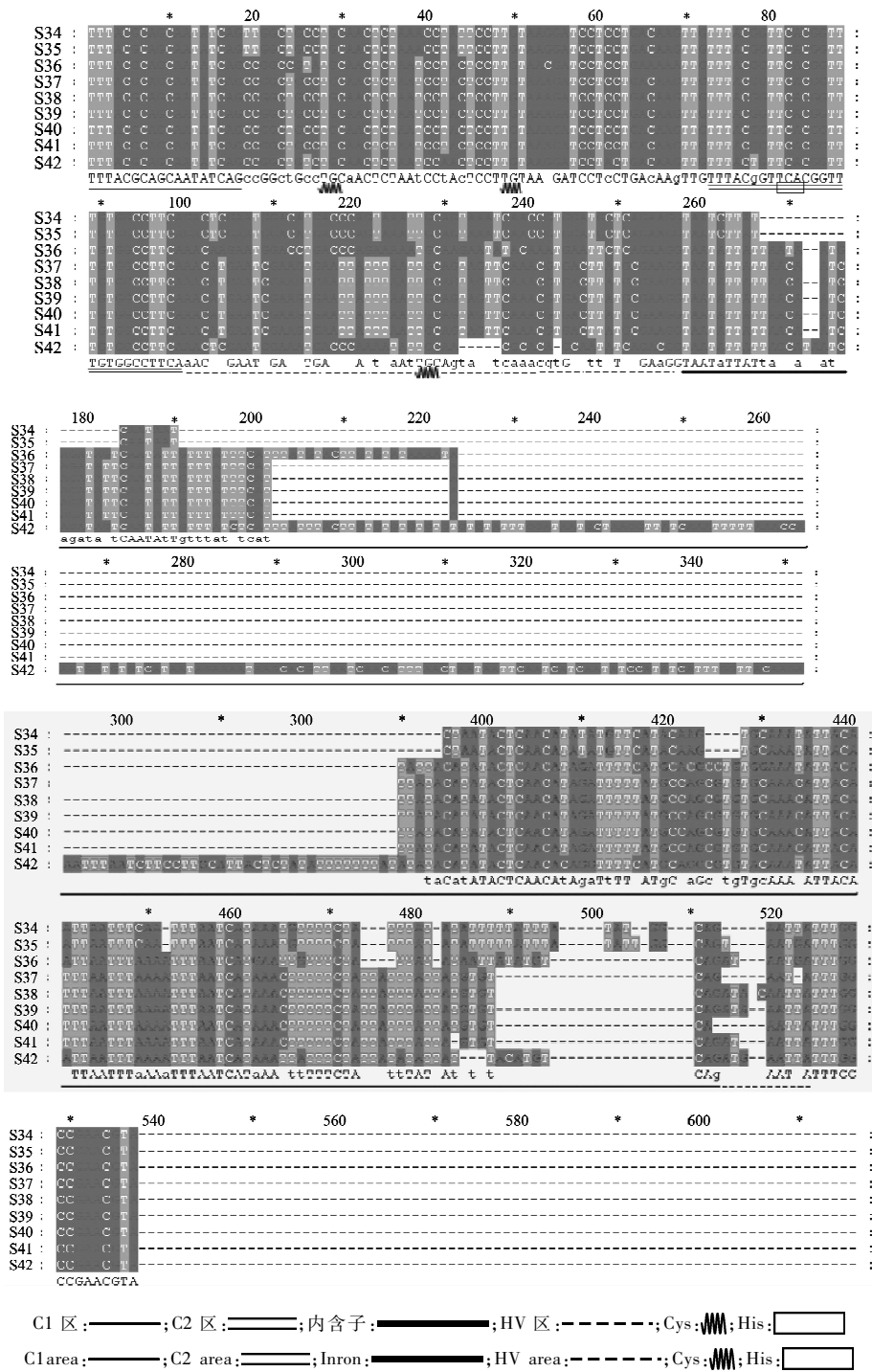


图 5 苹果新 S-等位基因的 DNA 序列比较

Fig. 5 DNA sequence alignment of new S-genes in apple

2.3.4 苹果新 S-等位基因推导氨基酸序列比较分析 10 个苹果品种新 S-等位基因推导的氨基酸序列比较分析如图 6 所示,新 S-等位基因推导氨基酸序列包括 C1、C2、HV、与 S-RNase 结构有关的 3 个半胱氨酸残基、与功能有关的 1 个组氨酸残基。C1 和 C2 区的氨基酸序列“FTOYQ”和“LFTVHGLWP”在新 S 等位基因中是非常保守的,没有出现氨基酸的替换或缺

失。保守的半胱氨酸残基(C)中 2 个半胱氨酸残基位于 C1 区和 C2 区之间的外显子区域,第 3 个半胱氨酸残基位于 C2 区和 HV 区之间的外显子区域,保守的组氨酸残基(H)位于 C2 区,这 4 个氨基酸残基均没有被替换或缺失。HV 区的大小为 18~20 个氨基酸,该区插入、缺失、替换的氨基酸最多,同源性低,被替换的氨基酸有 3~10 个。

