

基于 cDNA 芯片的梨品种 S 基因型鉴定及 新 *S-RNase* 基因进化分析

江南^{1,2}, 张琳², 谭晓凤², 谭慧², 张靖国³

¹ 湖南工业大学包装与材料工程学院, 株洲 412007;

² 中南林业科技大学经济林培育与保护教育部重点实验室/经济林育种与栽培国家林业局重点实验室, 长沙 410004;

³ 湖北省农业科学院果树茶叶研究所, 武汉 430064)

摘要: 梨品种 S 基因型鉴定对梨栽培中授粉品种选择和遗传育种都具有重要意义。本研究利用梨 *S-RNase* 基因荧光标记的特异引物 PCR 扩增获得梨品种荧光标记的 cDNA 特异产物; 进一步完善梨 *S-RNase* 基因 cDNA 芯片, 以被检测梨品种 cDNA 特异序列与梨 *S-RNase* 基因 cDNA 芯片杂交检测不同梨品种 S 基因型, 并发现新的 *S-RNase* 基因。结果表明: 利用梨 *S-RNase* 基因 cDNA 芯片鉴定了泸定王皮梨、兴山 24 号、弥渡百合等 35 个未知 S 基因型梨品种, 确定了各品种的 S 基因型。结合 PCR-RFLP 及 DNA 克隆和测序等技术, 发现了 7 个新的 *S-RNase* 基因资源, 获得了新 *S-RNase* 基因序列。序列分析表明各新 *S-RNase* 基因均具有 *S-RNase* 基因特异区域序列的典型特征; 进化分析显示 7 个新 *S-RNase* 基因主要属于蔷薇科苹果亚科 *S-RNase* 类群, 且存在种间和属间比种内和属内进化关系更近的现象。7 个新的 S 基因分别命名为: *PpS*₅₃ (*Pyrus pyrifolia* S₅₃)、*PpS*₅₄、*PpS*₅₅、*PpS*₅₆、*PpS*₅₇、*PpS*₅₈ 和 *PpS*₅₉, GenBank 登录号分别为: KX581753、KX581754、KX581755、KX581756、KX581757、KX581751 和 KX581752。

关键词: 梨; *S-RNase* 基因; cDNA 芯片; S 基因型; 进化分析

Detection of Pear S-genotypes and Evolutionary Analysis of Novel *S-RNase* Genes Identified by cDNA Microarray-based Method

JIANG Nan^{1,2}, ZHANG Lin², TAN Xiao-Feng², TAN Hui², ZHANG Jing-Guo³

¹ School of Packing and Material Engineering, Hunan University of Technology, Zhuzhou 412007;

² Key Laboratory of Cultivation and Protection for Non-wood Forest of Ministry of Education/Key Laboratory of Non-wood Forest Product of Forestry Ministry, Central-south University of Forestry and Technology, Changsha 410004;

³ Institute of Fruit and Tea, Hubei Academy of Agricultural Sciences, Wuhan 430064)

Abstract: Identification of S-genotypes of pear cultivars is useful for allocating suitable pollination trees and pear breeding program. The fluorescently-labeled specific cDNA sequences of *S-RNases* were obtained by PCR amplification using Cy3-labeled specific primers. The *S-RNase* cDNA microarray was further improved with which the pear S-genotype was detected and novel *S-RNase* genes were discovered. The S-genotypes of thirty-five pear cultivars, in total, including 'Luding Wangpili', 'Xingshan 24' and 'Midu Baihe' etc, were identified and seven new *Pyrus pyrifolia* (N. L. Burman) Nakai. *S-RNase* genes were discovered. Then the DNA sequences of the seven new *S-RNase* genes were identified by DNA cloning and sequencing combined with PCR-RFLP method. Sequence analysis demonstrated that the seven new genes showed typical structural features with specific domains of *S-RNase*. Evolution analysis indicated that the seven genes belonged to the *S-RNase* group of Maloideae, Rosaceae, and the evolutionary relationship among *S-RNases* was closer between species or genera than intra-species or intra-genus. The sev-

收稿日期: 2016-08-17 修回日期: 2016-10-11 网络出版日期: 2017-04-14

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20170414.1617.006.html>

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31272124); 国家林业局林业科技成果推广项目([2014]53)

第一作者研究方向为经济林栽培育种及农林生物技术。E-mail: namijiangan@126.com

en S-RNases were named *PpS₅₃* (*Pyruspyrifolia S₅₃*), *PpS₅₄*, *PpS₅₅*, *PpS₅₆*, *PpS₅₇*, *PpS₅₈* and *PpS₅₉*, and had been deposited under the GenBank database with accession numbers KX581753, KX581754, KX581755, KX581756, KX581757, KX581751 and KX581752, respectively.

Key words: pears; *S-RNase* gene; cDNA microarray; S-genotype; evolution analysis

自交不亲和性是普遍存在于绿色开花植物中预防近亲繁殖和保持物种遗传特性的一种重要机制^[1]。梨属于蔷薇科苹果亚科梨属植物,是典型的配子体自交不亲和性植物(GSI, gametophytic self-incompatibility)^[2],在梨栽培中必须配以不同的 S 基因型授粉品种才能保证授粉座果的顺利进行^[3]。我国梨品种资源丰富,在近 2000 多个品种中有三分之一以上为砂梨品种,地方品种或野生型个体中蕴含着丰富的 *S-RNase* 基因资源^[4],因此鉴定梨品种 S 基因型,挖掘梨 *S-RNase* 基因资源对梨的栽培育种具有重要的意义。

从 20 世纪 50 年代开始,国内外学者对梨自交不亲和性基因(*S-RNase*)进行了大量的研究工作。最早由日本学者 Terami 采用传统的田间杂交授粉方法鉴定了 10 个日本梨的 S 基因型^[5-6],该方法费时费力,易受外界环境影响。随着生物学技术的发展,蛋白质电泳分析^[7]、花粉管生长检测^[8]、PCR-RFLP 技术^[9]、DNA 测序及序列分析^[10],cDNA 克隆及序列分析方法和基因芯片杂交^[4,11-13]等技术均用于梨品种自交不亲和基因资源的研究,采用这些技术从东方梨中已获得 52 个 *S-RNase* 等位基因登录 GenBank,其中 47 个 *S-RNase* 等位基因序列完善^[11],并确定了部分梨品种 S 基因型,从西洋梨中已鉴定 53 个 *S-RNase* 等位基因均已登陆 GenBank^[11]。

在诸多鉴定梨品种 *S-RNase* 等位基因的方法中,芯片杂交技术是具有快速准确及并行检测特点的一种较为成熟的检测技术。作者前期研究中已根据东方梨中鉴定序列完善的 47 个 *S-RNase* 等位基因制备了梨 *S-RNase* 基因 cDNA 芯片和寡核苷酸芯片,并成功应用于梨品种所含 *S-RNase* 基因的鉴定^[4,11,13],结合 PCR-RFLP 技术和 DNA 克隆及序列分析等方法鉴定了部分梨品种的 S 基因型。本研究拟在前期研究的基础上进一步完善梨 *S-RNase* 基因 cDNA 芯片并用于梨品种 S 基因型鉴定,挖掘梨品种新的 *S-RNase* 基因资源,对本研究中新发现的 *S-RNase* 基因及前期研究中新发现的部分 *S-RNase* 基因^[11]进行序列和进化分析。

1 材料与方法

1.1 材料和主要试剂

植物材料均于 2016 年 3 月上旬和中旬从湖北省农业科学院果树茶叶研究所国家果树种质武汉砂梨圃采集,包括 35 个 S 基因型待测梨品种铃铛期的花枝和新鲜嫩枝(带 5~10 个嫩芽),均插水保养,将梨品种雌蕊-80℃冷冻保存,嫩枝水插室温培养待长出嫩叶时取嫩叶于-80℃冷冻保存。

RNA 提取和特异片段扩增分别采用 TaKaRa 公司的 MiniBEST Plant RNA Extraction Kit 和 ExTaq DNA 聚合酶, Fermentas 公司的 RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit 反转录形成 cDNA,杂交液 IV 购自上海生工,二甲亚砜(DMSO)购自 Amresco 公司,TA 克隆试剂为 TransGen Biotech 公司的氨苄青霉素、Trans1-T1 和 pEASY-T1,PCR 产物回收采用 OMEGA 公司纯化试剂盒,各种内切酶分别购自 TaKaRa 公司和 TIANGEN 公司,3×CTAB 试剂为实验室配制,其他试剂为超纯或分析纯。由上海铂尚生物技术有限公司完成 DNA 测序。

1.2 方法

1.2.1 梨品种雌蕊总 RNA 的提取、cDNA 合成及 *S-RNase* 基因 cDNA 特异片段扩增 按 TaKaRa 公司的 RNA 提取试剂盒操作步骤分别提取各梨品种雌蕊总 RNA,琼脂糖电泳和浓度测定等进行质量检测后选取各品种理想的雌蕊 RNA 反转录形成 cDNA,分别在 *S-RNase* 保守区 C1 区和高频可变区(HV 区, hyper variable region)下游设计特异引物 PF:5'-TTTACGCAGCAATATCAG-3'和反向引物 PR:5'-ACRTTYGGCCAAATARTT-3'^[14],由北京六合华大基因科技股份有限公司合成,合成时 PF/R 的 5'端均用荧光物质 Cy3 修饰。用 PF/R 对各品种 *S-RNase* HV 区 cDNA 特异片段进行扩增,反应程序:94℃ 2 min;94℃ 30 s,50℃退火 30 s,70℃延伸 2 min,15 个循环;70℃延伸 2 min 30 s,25 个循环;70℃总延伸 7 min^[13]。得到荧光标记的 HV 区 cDNA 特异片段,为获得足够产量 cDNA,对 cDNA 扩增产物避光纯化回收后进行二次扩增,再次纯化

回收,1.5%琼脂糖凝胶电泳检测特异扩增条带和长度,Beckman DU-640 浓度测定后 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 储存备用。

1.2.2 梨 *S-RNase* 基因 cDNA 芯片与梨品种杂交 前期研究中已获得东方梨中已鉴定的 $S_1 \sim S_{52}$ 中序列完善的 47 个 *S-RNase* 高变区(HV 区)55 条特异的 cDNA 探针、阳性探针(173 bp 的梨内参基因 *Actin* 序列)和阴性探针(人类高血压 *HRG* 基因序列)^[11],对新发现的 *PpS*₁₈ (*Pyrus pyrifolia* S_{18} ^[13], GenBank 登录号: KX581750) 制备 cDNA 探针,按 *S-RNase* 编号顺序补充到梨 cDNA 芯片中,*PbS*₂₀ 和 *PsS*₂₈ 探针分别根据 *PbS*₂₀ 部分序列(AY250988) 和 *PsS*₂₈ 全长序列(EF566872) 设计,W. Heng 等^[15] 研究发现 *PpS*₈ 和 *PsS*₂₈ 编码区序列完全相同,但按 GenBank 中 *PpS*₈、*PsS*₂₈ (EF566872) 和 *PbS*₂₈ (AY562394) 设计的探针序列相互之间有 2 个碱基的差别,均保留于芯片中。调整 cDNA 阵列结构如图 1,按文献[11,13]的方法制备梨 cDNA 芯片。各品种荧光标记的 cDNA 特异 PCR 产物分别与制备好的梨 cDNA 芯片阵列避光杂交,一个品种对应一个阵列,过程如下:cDNA 芯片 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性,无水乙醇(预冷)处理后干燥玻片;各品种 Cy3 荧光标记的 cDNA 特异扩增产物(灭菌超纯水调整终浓度为

200 ng/ μL)、阳性对照基因(*Actin* 基因)PCR 产物(浓度 200 ng/ μL)、杂交液和灭菌超纯水按 1:1:2:2 比例混合均匀, $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴变性,冰上冷却,恢复室温后取适量混合液加至芯片阵列中,于杂交盒内 $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ (恒温水浴保温)避光杂交 8~10 h,然后避光洗涤,离心机干燥玻片^[11]。AXON-4100A 芯片扫描仪检测杂交信号,扫描仪自带分析软件(GenePix)分析阵列各探针位点荧光强度,各品种视杂交情况重复杂交 1~2 次。

1.2.3 未知 *S-RNase* 基因的鉴定 根据芯片阵列出现的杂交信号,对照图 1 芯片阵列中各位点对应的探针,可判断梨品种所含已知的 *S-RNase* 等位基因。对杂交阵列只出现 1 个 *S-RNase* 探针杂交信号的品种,采用实验室改良的 CTAB 法^[16] 提取梨品种嫩叶基因组 DNA,PF/R(不带荧光标记)特异扩增 DNA 片段,OMEGA 纯化试剂盒对 PCR 产物纯化回收后以纯化产物为模板 PF/R 进行二次扩增,用相应品种芯片鉴定的 *S-RNase* 内切酶进行酶切,若酶切未能鉴定,则进一步对二次扩增的 DNA 片段进行连接转化,TA 克隆、测序后,测序结果在 GenBank 数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) 中进行比对、分析,最终确定梨品种所含 *S-RNase*。

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P
1	<i>PpS</i> ₁	A1-D1			<i>PpS</i> ₂	E1-H1			<i>PpS</i> ₃	I1-L1			<i>PpS</i> ₄	M1-P1		
2	<i>PpS</i> ₅	A2-D2			<i>PpS</i> ₆	E2-H2			<i>PpS</i> ₇	I2-L2			<i>PpS</i> ₈	M2-P2		
3	<i>PpS</i> ₉	A3-D3			<i>PpS</i> ₁₀	E3-H3			<i>PbS</i> ₁₂	I3-L3			<i>PpS</i> ₁₂	M3-P3		
4	<i>PpS</i> ₁₃	A4-D4			<i>PbS</i> ₁₃	E4-H4			<i>PpS</i> ₁₅	I4-L4			<i>PpS</i> ₁₆	M4-P4		
5	<i>PpS</i> ₁₇	A5-D5			<i>PbS</i> ₁₈	E5-H5			<i>PpS</i> ₁₈	I5-L5			<i>PbS</i> ₁₉	M5-P5		
6	<i>PpS</i> ₂₀	A6-D6			<i>PbS</i> ₂₁	E6-H6			<i>PpS</i> ₂₂	I6-L6			<i>PcS</i> ₂₃	M6-P6		
7	<i>Actin</i>	A7-D7			<i>HRG</i>	E7-H7			<i>Actin</i>	I7-L7			<i>HRG</i>	M6-P6		
8	<i>PbS</i> ₂₆	A8-D8			<i>PbS</i> ₂₇	E8-H8			<i>PbS</i> ₂₈	I8-L8			<i>PsS</i> ₂₈	M8-P8		
9	<i>PbS</i> ₂₉	A9-D9			<i>PbS</i> ₃₀	E9-H9			<i>PbS</i> ₃₁	I9-L9			<i>PpS</i> ₃₂	M9-P9		
10	<i>PuS</i> ₃₂	A10-D10			<i>PpS</i> ₃₄	E10-H10			<i>PbS</i> ₃₅	I10-L10			<i>PsS</i> ₃₅	M10-P10		
11	<i>PpS</i> ₃₇	A11-D11			<i>PuS</i> ₃₇	E11-H11			<i>PbS</i> ₃₈	I11-L11			<i>PpS</i> ₃₉	M11-P11		
12	<i>PbS</i> ₃₉	A12-D12			<i>PuS</i> ₄₀	E12-H12			<i>PuS</i> ₄₁	I12-L12			<i>PuS</i> ₄₂	M12-P12		
13	<i>PpS</i> ₄₃	A13-D13			<i>PbS</i> ₄₃	E13-H13			<i>PpS</i> ₄₄	I13-L13			<i>PbS</i> ₄₅	M13-P13		
14	<i>PpS</i> ₄₆	A14-D14			<i>PpS</i> ₄₇	E14-H14			<i>PpS</i> ₄₈	I14-L14			<i>PpS</i> ₄₉	M14-P14		
15	<i>PpS</i> ₅₀	A15-D15			<i>PpS</i> ₅₁	E15-H15			<i>PpS</i> ₅₂	I15-L15			CK	M15-P15		

*PpS*_n, *PbS*_n, *PsS*_n, *PuS*_n 和 *PcS*_n 分别代表登录到 GenBank 中的砂梨、白梨、新疆梨、秋子梨和部分西洋梨的各 *S* 基因
*PpS*_n, *PbS*_n, *PsS*_n, *PuS*_n, and *PcS*_n respectively direct the *S-RNases* in *Pyrus pyrifolia* (N. L. Burman) Nakai,
P. bretschneideri Rehd., *P. sinkiangensis* T. T. Yu, *P. ussuriensis* Maxim and part of *P. communis* L.

图 1 *S* 基因 cDNA 芯片阵列位点探针分布

Fig. 1 *S-RNase* cDNA probe location in cDNA microarray

1.2.4 新 *S-RNase* 基因序列结构特点及进化分析 经克隆、测序获得的新 *S-RNase* 基因序列用 Vector NTI 软件对照测序图进行序列校正后获得准确的序

列,在 GenBank 数据库中对各序列进行同源性搜索,将有最大相似性的基因序列信息下载后运用 Vector NTI、GENDOC 等软件对新 *S-RNase* 序列进行

比对分析,进一步对新 *S-RNase* 序列结构特点进行分析鉴定。选取 GenBank 数据库中与新 *S* 基因序列相似性高的蔷薇科 *S-RNase* 序列进行多序列比对,MEGA5.03 构建系统进化树,分析梨品种新 *S-RNase* 与蔷薇科植物其他 *S-RNase* 间的进化关系。

2 结果与分析

2.1 cDNA 芯片对梨品种 *S-RNase* 基因型的鉴定

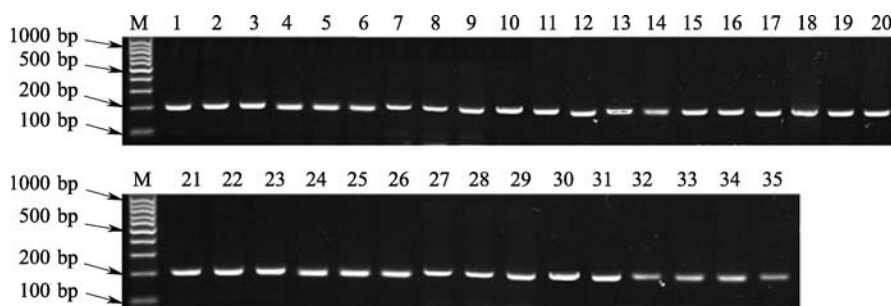
用 Cy3 修饰的引物 PF/R 分别从 35 个梨品

种(表 1)雌蕊 cDNA 中扩增获得荧光标记 cDNA 特异片段,对二次扩增的 cDNA 特异片段避光纯化回收后琼脂糖凝胶电泳检测如图 2。各品种特异扩增片段长度一致,均在 200 bp 左右,浓度检测显示各品种 cDNA 特异扩增产物浓度在 380 ~ 400 ng/ μ L。分别取 35 个品种荧光标记的 cDNA 特异片段与梨 *S-RNase* 基因 cDNA 芯片阵列避光杂交,一个品种杂交一个阵列,杂交信号检测结果如图 3。

表 1 *S* 基因型待测梨品种

Table 1 The pear cultivars with *S*-genotype to be detected

序号 Code	种质名称 Cultivar name	种质类型 Cultivar type	亲本或来源 Pedgree or source	学名 Scientific name	<i>S</i> 基因型鉴定 Identified <i>S</i> -genotype
1	泸定王皮梨	地方品种	四川泸定	<i>P. pyrifolia</i> (N. L. Burman) Nakai	<i>PpS</i> ₅₉ <i>PpS</i> ₅₉
2	兴山 24 号(兴山青皮梨)	地方品种	湖北兴山	<i>P. pyrifolia</i> (N. L. Burman) Nakai	<i>PbS</i> ₁₇ <i>PbS</i> ₂₇
3	兴山 33 号(兴山秤砣梨 3)	地方品种	湖北兴山	<i>P. pyrifolia</i> (N. L. Burman) Nakai	<i>PbS</i> ₂₉ <i>PbS</i> ₂₉
4	麻壳	地方品种	湖北武汉	<i>P. pyrifolia</i> (N. L. Burman) Nakai	<i>PpS</i> ₅ <i>PbS</i> ₂₁
5	中翠	选育品种	跃进 × 二官白	<i>P. pyrifolia</i> (N. L. Burman) Nakai	<i>PpS</i> ₃ <i>PpS</i> ₃
6	金吊子	地方品种	四川铜梁	<i>P. pyrifolia</i> (N. L. Burman) Nakai	<i>PpS</i> ₁₆ <i>PbS</i> ₂₇
7	大宝梨	地方品种	云南呈贡	<i>P. pyrifolia</i> (N. L. Burman) Nakai	<i>PbS</i> ₂₂ <i>PuS</i> ₄₂
8	早魁	选育品种	雪花梨 × 黄花	<i>P. bretschneideri</i> Rehd.	<i>PpS</i> ₂ <i>PpS</i> ₁₆
9	大理水扁梨	地方品种	云南大理	<i>P. pyrifolia</i> (N. L. Burman) Nakai	<i>PbS</i> ₂₂ <i>PbS</i> ₂₂
10	大堰六月早	地方品种	四川汉源	<i>P. pyrifolia</i> (N. L. Burman) Nakai	<i>PpS</i> ₈ <i>PbS</i> ₂₇
11	初夏绿	选育品种	西子绿 × 翠冠	<i>P. pyrifolia</i> (N. L. Burman) Nakai	<i>PpS</i> ₃ <i>PpS</i> ₄
12	弥渡百合	地方品种	云南弥渡	<i>P. pyrifolia</i> (N. L. Burman) Nakai	<i>PpS</i> ₁ <i>PuS</i> ₄₂
13	大理冬梨	地方品种	云南大理	<i>P. pyrifolia</i> (N. L. Burman) Nakai	<i>PbS</i> ₂₂ <i>PuS</i> ₄₂
14	大堰罐罐梨	地方品种	四川汉源	<i>P. pyrifolia</i> (N. L. Burman) Nakai	<i>PuS</i> ₄₂ <i>PpS</i> ₄₇
15	雄古火把(1)	地方品种	云南丽江	<i>P. pyrifolia</i> (N. L. Burman) Nakai	<i>PpS</i> ₁₂ <i>PpS</i> ₃₇
16	丽江小黄梨	地方品种	云南丽江	<i>P. pyrifolia</i> (N. L. Burman) Nakai	<i>PuS</i> ₄₂ <i>PuS</i> ₄₂
17	华丰	选育品种	新高 × 丰水		<i>PpS</i> ₃ <i>PpS</i> ₃
18	猴嘴梨	地方品种	湖北武汉	<i>P. pyrifolia</i> (N. L. Burman) Nakai	<i>PpS</i> ₁ <i>PbS</i> ₁₉
19	梨园假白梨 1	地方品种	四川汉源	<i>P. pyrifolia</i> (N. L. Burman) Nakai	<i>PpS</i> ₁₅ <i>PbS</i> ₂₂
20	华金	选育品种	早酥 × 早白		<i>PpS</i> ₁ <i>PpS</i> ₄
21	黄糖梨	地方品种	广西龙胜	<i>P. pyrifolia</i> (N. L. Burman) Nakai	<i>PpS</i> ₁ <i>PpS</i> ₈
22	奥冠	选育品种	‘满天红’芽变品系	<i>P. pyrifolia</i> (N. L. Burman) Nakai	<i>PpS</i> ₁ <i>PpS</i> ₁₂
23	青皮大香梨	地方品种	四川汉源		<i>PpS</i> ₁₅ <i>PuS</i> ₄₂
24	梨园红皮梨	地方品种	四川汉源	<i>P. pyrifolia</i> (N. L. Burman) Nakai	<i>PpS</i> ₁ <i>PbS</i> ₁₇
25	大理奶头梨	地方品种	云南大理	<i>P. pyrifolia</i> (N. L. Burman) Nakai	<i>PbS</i> ₂₂ <i>PuS</i> ₄₂
26	王冠	国外引进	日本		<i>PpS</i> ₅ <i>PpS</i> ₈
27	黄皮长把糖梨	地方品种	广西恭城	<i>P. pyrifolia</i> (N. L. Burman) Nakai	<i>PpS</i> ₂ <i>PbS</i> ₁₇
28	威宁乌梨	地方品种	贵州威宁	<i>P. pyrifolia</i> (N. L. Burman) Nakai	<i>PpS</i> ₁ <i>PpS</i> ₃₇
29	新黄	国外引进	日本	<i>P. pyrifolia</i> (N. L. Burman) Nakai	<i>PpS</i> ₃ <i>PpS</i> ₄
30	威宁葫芦梨	地方品种	贵州威宁	<i>P. pyrifolia</i> (N. L. Burman) Nakai	<i>PbS</i> ₂₁ <i>PpS</i> ₃₇
31	高要淡水梨	地方品种	广东高要	<i>P. pyrifolia</i> (N. L. Burman) Nakai	<i>PpS</i> ₅₃ <i>PpS</i> ₅₃
32	丽江大中古	地方品种	云南丽江	<i>P. pyrifolia</i> (N. L. Burman) Nakai	<i>PbS</i> ₂₁ <i>PbS</i> ₂₂
33	梧洋梨	地方品种	福建屏南	<i>P. pyrifolia</i> (N. L. Burman) Nakai	<i>PpS</i> ₁₅ <i>PuS</i> ₄₂
34	白花梨	地方品种	四川铜梁	<i>P. pyrifolia</i> (N. L. Burman) Nakai	<i>PpS</i> ₁₅ <i>PbS</i> ₂₂
35	小花红梨	地方品种	四川汉源	<i>P. pyrifolia</i> (N. L. Burman) Nakai	<i>PpS</i> ₁₃ <i>PpS</i> ₅₇



编号 1~35 对应表 1 中的品种,下同

The accession codes 1 to 35 are the same as those shown in Table 1, the same as below

图 2 35 个梨品种 cDNA 特异扩增产物凝胶电泳检测

Fig. 2 cDNA specific PCR products of 35 pear cultivars in agarose gel electrophoresis

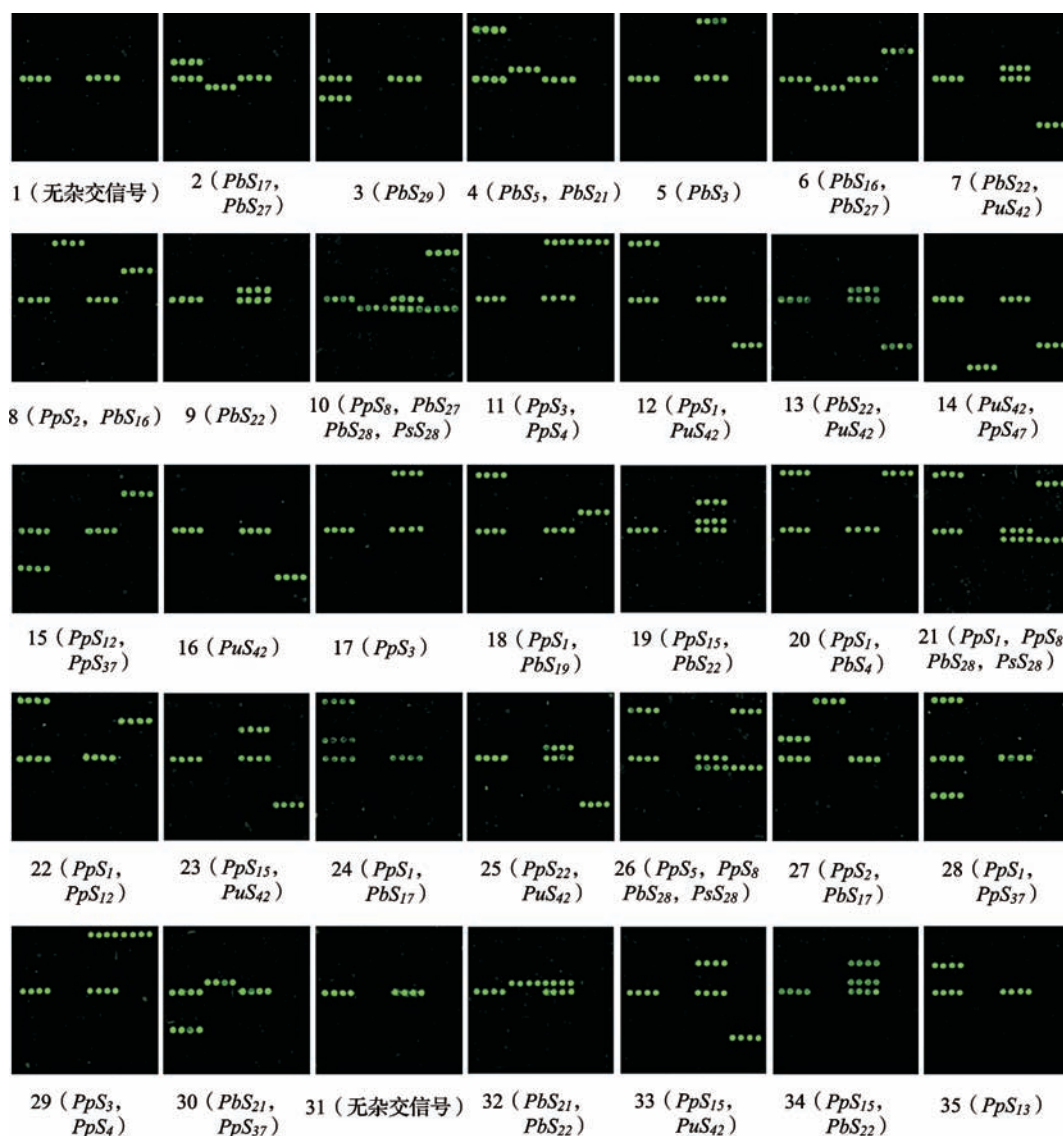


图 3 35 个梨品种与 cDNA 芯片阵列杂交信号扫描

Fig. 3 The scanning results of 35 pear cultivars hybridized with the cDNA microarray

梨是典型的配子体自交不亲和植物,一般为自交不亲和二配体,理论上应含有两个 *S-RNase* 等位

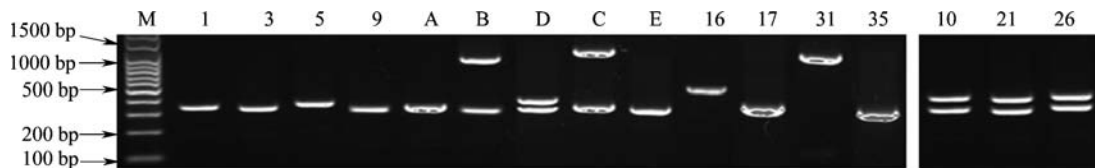
基因^[17]。因此各品种阵列杂交结果一般应出现两个 *S-RNase* 探针的杂交信号。根据图 3 芯片杂交信

号扫描结果,结合阵列中各探针的位置(图 1),可判断梧洋梨等 27 个品种含有 2 个及 2 个以上不同的已鉴定的 *S-RNase* 等位基因;兴山 33 号(表 1 中 3 号)、中翠(5 号)、大理水扁梨(9 号)、丽江小黄梨(16 号)、华丰(17 号)、小花红梨(35 号)6 个品种含有 1 个已鉴定的 *S-RNase*,这些品种可能是纯合子或含有另外 1 个新的 *S-RNase*;泸定王皮梨(1 号)和高要淡水梨(31 号)品种无杂交信号,可认为这两个品种不含有现已鉴定的 *S-RNase*。大堰六月早(10 号)、黄糖梨(21 号)和王冠(26 号)分别含有已鉴定的 *PbS*₂₇、*PpS*₁和 *PpS*₅,此外 3 个品种杂交阵列均出现了 *PpS*₈、*PbS*₂₈和 *PsS*₂₈ 探针信号。这 3 条探针序列相互之间只有 2 个碱基的差别,杂交时 3 条探针相互之间识别率不高,而芯片其他位点的探针均有较好的特异性,芯片杂交探针识别率可达 94.6%。芯片同时出现这 3 条探针杂交信号可提示 3 个品种所含另一 *S-RNase* 基因为 *PpS*₈、*PbS*₂₈和 *PsS*₂₈ 其中之一。

2.2 新 *S-RNase* 基因的鉴定及序列分析

前期研究中利用 cDNA 芯片鉴定的砂梨品种中兴山 17 号(*PbS*₁₇*S*_x)、兴山 32 号(*PpS*₅₂*S*_x)和罗田短柄梨(*PbS*₂₉*S*_x)对应的阵列分别出现 1 个 *S-RNase* 探针信号,兴山 40 号(*S*_x*S*_x)、兴山 28 号(*S*_x*S*_x)无杂交信号^[11],本研究利用芯片鉴定了 35 个梨品种 S 基

因型,其中泸定王皮梨和高要淡水梨对应阵列无杂交信号,兴山 33 号等 6 个品种只出现 1 个 *S-RNase* 探针信号,大堰六月早、黄糖梨和王冠对应的杂交阵列出现了 4 个 *S-RNase* 杂交信号。对这些品种用 PF/R 二次扩增获得 DNA 特异片段,1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测如图 4,各品种 DNA 特异片段长度为 350 ~ 1500 bp 不等,表现梨品种 *S-RNase* 的片段长度多态性的特点。其中对 cDNA 芯片阵列杂交出现 1 个 *S-RNase* 探针信号且 DNA 特异扩增条带为单带的品种:兴山 33 号(含 *PbS*₂₉)、中翠(含 *PbS*₃)、大理水扁梨(含 *PbS*₂₂)、罗田短柄梨(含 *PbS*₂₉)、丽江小黄梨(含 *PuS*₄₂)、华丰(含 *PpS*₃)、小花红梨(含 *PpS*₁₃),分别用内切酶 *Acc* II、*Ppu*M I、*Bss*H II、*Acc* II、*Sca* I、*Bss*H II 和 *Acc* II 对其 PF/R 二次扩增产物进行酶切,电泳检测酶切结果如图 5。分析图 5 电泳条带可以认为兴山 33 号、中翠、大理水扁梨、丽江小黄梨和华丰 5 个品种分别为 *PbS*₂₉、*PbS*₂₉、*PpS*₃、*PpS*₃、*PbS*₂₂、*PuS*₄₂、*PuS*₄₂ 和 *PpS*₃、*PpS*₃ 的纯合子,罗田短柄梨和小花红梨还含有另一未知 *S-RNase*。兴山 17 号所含 *PbS*₁₇ 未找到内切酶,兴山 32 号为双带必含有另一未知 *S-RNase*。大堰六月早、黄糖梨和王冠 DNA 特异扩增条带均为双带,片段长度 300 ~ 400 bp/400 ~ 500 bp, *PpS*₈、*PbS*₂₈和 *PpS*₂₈ PF/R 长度均在 400 ~ 500 bp 之间。

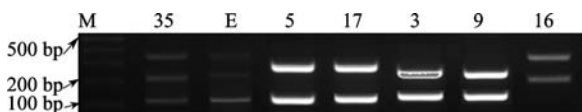


A、B、C、D、E 分别为兴山 17 号、兴山 40 号、兴山 28 号、兴山 32 号和罗田短柄梨

A, B, C, D, E respectively direct the cultivars of Xingshan 17, Xingshan 40, Xingshan 28, Xingshan 32 and Luotian duanbingli

图 4 梨品种 DNA 特异扩增产物凝胶电泳检测

Fig. 4 The DNA specific PCR products of pear cultivars in agarose gel electrophoresis



E 为罗田短柄梨

E directs the cultivar of Luotian duanbingli

图 5 梨品种 DNA 特异扩增序列酶切结果电泳检测

Fig. 5 The digestion results of *S-RNase* gene DNA PF/R specific PCR sequences of pear cultivars in agarose gel electrophoresis

进一步将兴山 17 号(含 *PbS*₁₇)、无杂交信号及杂交出现了 4 个 *S-RNase* 探针信号的品种二次

扩增产物回收,大堰六月早、黄糖梨和王冠只回收长度为 400 ~ 500 bp 条带,PF/R 引物测序,发现泸定王皮梨、高要淡水梨 PF/R 特异扩增产物中分别只含 369 bp 和 997 bp 的 *S-RNase* 序列,为纯合子;大堰六月早、黄糖梨和王冠均含 434 bp 的 *S-RNase* 序列;兴山 17 号、兴山 40 号、兴山 28 号测序双峰,可确定此 3 个品种 PF/R 特异扩增产物中含不同的 *S-RNase* 序列。将兴山 17 号、兴山 40 号、兴山 28 号、兴山 32 号(含 *PbS*₅₂)及罗田短柄梨和小花红梨的 PF/R 二次 DNA 特异扩增产物纯化回收后进行 TA 克隆、测序获得各品种 *S-RNase* 基因 PF/R

碱基序列。各品种测序所得序列分别在 GenBank 数据库中进行同源性搜索与其他序列最大相似性如表 2。依据 *S-RNase* 相同时其 DNA 序列同源性应为 100% 的原理^[18], 可确定大堰六月早、黄糖梨和王冠均含 *PpS₈*; 兴山 17 号、兴山 32 号、罗田短柄梨和小花红梨分别含 *PbS₁₇*、*PpS₅₂*、*PbS₂₉* 和 *PpS₁₃*, 而另一 *S* 基因序列为未知 *S* 基因, 这与梨 cDNA 芯片鉴定结果是一致的。各品种所含另一未知 *S-RNase* 基因与最大相似基因核苷酸序列比对如图 6。序列分析可发现各未知 *S-RNase* 序列均具有 *S-RNase* 基因 PF/R 特异区域序列典型特征, 即均含有 *S-RNase* 基因的保守区 1 (conserved 1, C1)、保守区 2 (conserved 2, C2) 和 HV 区, HV 区包含 1 个内含子^[19]。各基因间内含子长度相差较大, 7 个未知 *S-RNase* 基因内含子长度为 146 ~ 1070 bp, 编码区 (外显子) 长度基本一致, 各基因内含子和外显子边界序列均遵循双子叶植物 5'GT—AG 3'特征^[17]。因此可判断各未知序列均为

梨品种中新发现的 *S-RNase* 基因序列, 按 GenBank 数据库中 *S-RNase* 编号顺序可将兴山 40 号所含 997 bp 序列、兴山 28 号所含 347 bp/1270 bp 序列、兴山 32 号所含 437 bp 序列分别命名为 *PpS₅₃* (*Pyrus pyrifolia S₅₃*)、*PpS₅₄/PpS₅₅* 和 *PpS₅₆*, GenBank 登录号分别为: KX581753、KX581754、KX581755、KX581756; 高要淡水梨所含 997 bp 和兴山 40 号相同, 为 *PpS₅₃*, 罗田短柄梨和小花红梨所含 346 bp 序列为同一 *S-RNase* 序列, 命名为 *PpS₅₇*, GenBank 登录号为 KX581757。兴山 17 号与兴山 40 号所含 352 bp 序列为同一 *S-RNase* 序列, 与 *PbS₂₇* 有最大相似性 (98%), 泸定王皮梨 369 bp 序列与西洋梨 *PcS₈* 有最大相似性 (99%), 序列比对与 *PuS₃₅* 和 *PbS₃₅* 有 4 个碱基的差别, 兴山 17 号与兴山 40 号均属于砂梨品种^[11], 因此可将以上含 PF/R 352 bp 特异序列和 369 bp 特异序列的 *S-RNase* 分别命名为 *PpS₅₈* (*Pyrus pyrifolia S₅₈*, GenBank 登录号为 KX581751) 和 *PpS₅₉* (*Pyrus pyrifolia S₅₉*, GenBank 登录号为 KX581752)。

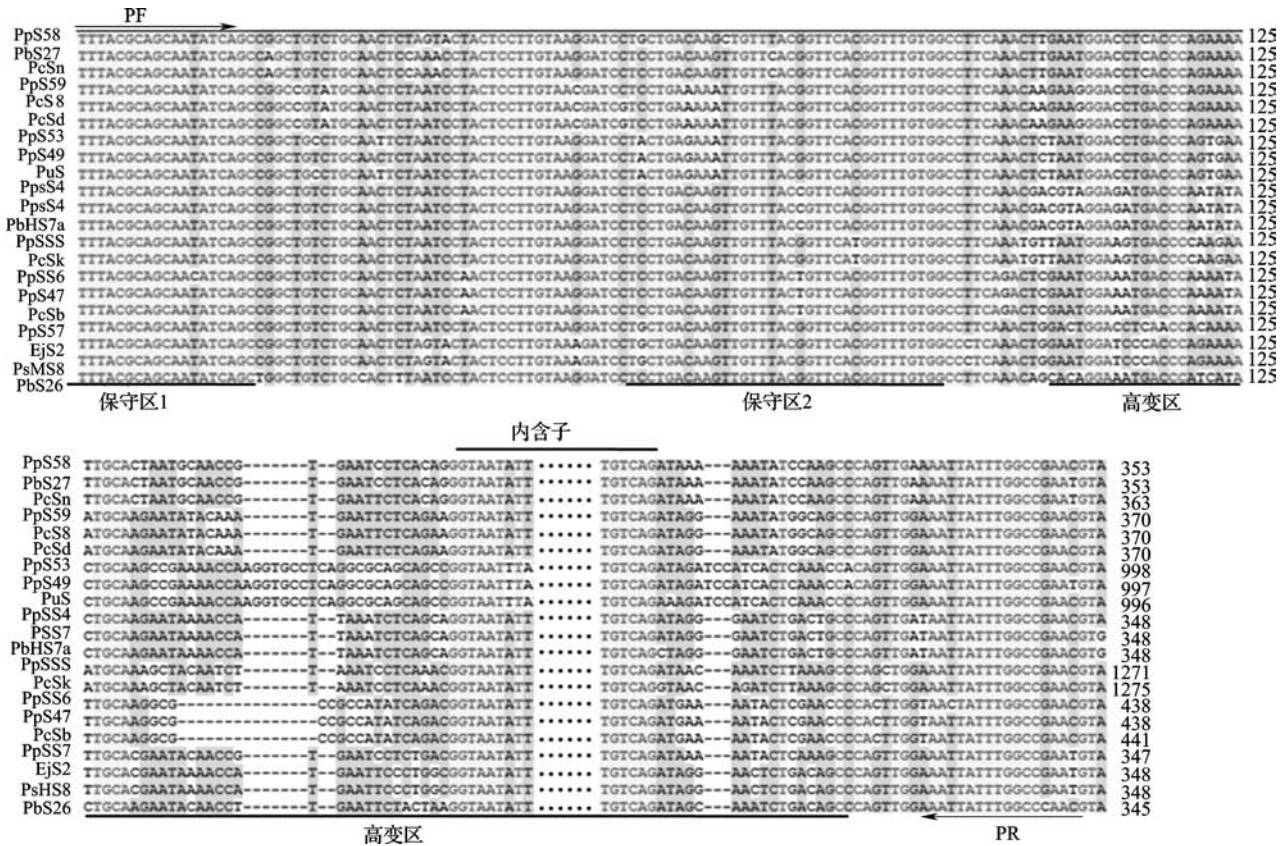
表 2 新 *S-RNase* 基因序列 GenBank 同源性搜索

Table 2 New *S-RNase* sequences homology search in GenBank

品种 Cultivars	PF/R 片段大小(bp) Length of PF/R	Blastn 同源性搜索最大相似基因 Maxium homology search by Blastn	GenBank 登录号 Accession number in GenBank	序列相似性(%) Sequence similarity
大堰六月早	434	<i>PpS₈</i>	AB104908	100
兴山 17 号(秣砣梨)	341	<i>PbS₁₇</i>	EU101466	100
	352	<i>PbS₂₇</i>	EF643640	98
泸定王皮梨	369	<i>PcS₈</i>	KC529666	99
兴山 40 号(兴山秣砣梨 1)	352	<i>PbS₂₇</i>	EF643640	98
	997	<i>PpS₄₉</i>	KP890692	98.9
兴山 28 号(小青皮梨)	347	<i>PcS₇</i>	FJ493175	100
	1270	<i>PcS_k</i>	DQ871241	97
兴山 32 号(蜂糖梨)	361	<i>PpS₅₂</i>	KP998819	100
	437	<i>PpS₄₇</i>	KP867051	98.9
高要淡水梨	997	<i>PpS₄₉</i>	KP890692	98.9
黄糖梨	434	<i>PpS₈</i>	AB104908	100
王冠	434	<i>PpS₈</i>	AB104908	100
罗田短柄梨	346	<i>PbS₂₆</i>	EU101463	89
	347	<i>PbS₂₉</i>	AY601098	100
小花红梨	350	<i>PpS₁₃</i>	AY249428	100
	346	<i>EjS₂</i>	GU384665	89

结合梨 cDNA 芯片鉴定结果分析, 可确定本研究中 35 个梨品种 *S* 基因型如表 1, 前期研究中^[11] 未最终鉴定的 5 个品种 *S* 基因型为: 兴山 17 号

PbS₁₇ *PpS₅₈*, 兴山 32 号 *PpS₅₂* *PpS₅₆*, 兴山 40 号 *PpS₅₃* *PpS₅₈*, 兴山 28 号 *PpS₅₄* *PpS₅₅*, 罗田短柄梨 *PbS₂₉* *PpS₅₇*。



Pp: *Pyrus pyrifolia*, Pc: *Pyrus communis*, Pb: *Pyrus bretschneideri*, Pu: *Pyrus ussuriensis*, Ps: *Pyrus syriaca*,
 PbH: *Pyrus betulifolia* (havat matahim1), Ej: *Eriobotrya japonica*, PsM: *Pyrus syriaca* (manara12)

图 6 梨品种 7 个未知 S-RNase 基因的 PF/R 区域 DNA 序列比对

Fig. 6 DNA sequence (PF/R) alignment of seven new S-RNase in pear cultivars

2.3 新 S-RNase 基因进化分析

将 PpS₃₃ ~ PpS₅₉ 等 7 个新 S-RNase 基因 DNA 序列与蔷薇科其他 24 个 S-RNase 基因序列利用 MEGA5.03 软件进行多序列比对后构建系统进化树如图 7。蔷薇科其他 24 个 S-RNase 基因序列主要包括李亚科的杏 (*Armeniaca Vulgaris Lam.*) ParS_c-RNase 和 ParS₂-RNase 基因,甜樱桃 (*Cerasus avium (L.) Moench*) 的 Pav₁-RNase、Pav₃-RNase 和 Pav₄-RNase 基因,梅 (*Armeniaca mume Sieb.*) 的 PmS₇-RNase 和 PmS₇-RNase 基因,扁桃 (*Amygdalus Communis L.*) 的 PdS₆-RNase 基因,苹果亚科的苹果 (*Malus Pumila Miller*) MdS₄-RNase 和 MdS₉-RNase 基因及分别与梨 7 个新 S 基因有最大相似性的 14 个 S 基因序列。系统进化图显示 7 个新的 S 基因同属于苹果亚科 S-RNase, PpS₃₃、PpS₅₄、PpS₅₅、PpS₅₆、PpS₅₇、PpS₅₈ 和 PpS₅₉ 分别与已知 S-RNase 基因 PpS₄₉、PsS₇、PcS_k、PpS₄₇、EjS₂、PbS₂₇ 和 PcS₈ 等在一个进化分枝上,进一步说明新发现的 7 个基因序列为梨品种新的 S-RNase 基因序列,同时发现蔷薇科各亚科的 S-RNase 在系统中是分开独立

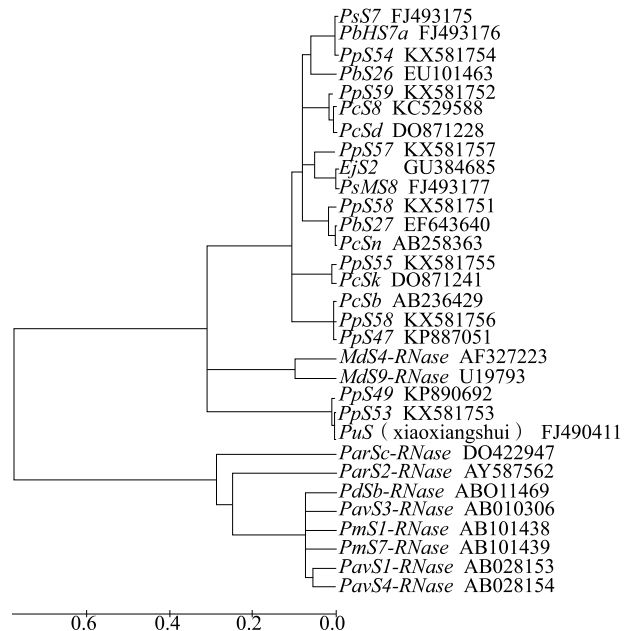


图 7 新 S-RNase 基因的系统进化分析

Fig. 7 Phylogenetic analysis of new S-RNases

进化的, *S-RNase* 基因在种间比种内有更近的进化关系, 如图 7 所示的梨属的砂梨 *PpS₅₉-RNase* 基因与西洋梨 *PcS₈* 和 *PcS_d-RNase* 基因在同一进化分枝上, 而并没有和其他砂梨 *S-RNase* 基因在同一进化分枝上。

3 讨论

东方梨种群和西方梨种群的 *S-RNase* 基因序列具有相同的结构, 都包含 C1、C2、C3 等 3 个保守区域和 1 个高度变化区域 (HV) 等典型的 *S-RNase* 一级结构特征^[19]。HV 区是表现 *S-RNase* 基因片段长度多态性和决定 *S-RNase* 特异性的区域, T. Ishimizu 等^[20]认为 HV 区 1~2 个氨基酸的差别就可导致 1 个新的 *S-RNase* 的产生。HV 区含有 1 个内含子, 不同 *S-RNase* 内含子长度不同, 约在 155 bp ~ 1221 bp 之间, 但编码区长度基本一致, 约 200 bp 左右^[17], 因此针对已鉴定的 *S-RNase* 保守区 1 和 HV 区下游序列设计 cDNA 探针制成梨 cDNA 芯片能准确鉴定梨品种所含已知 *S-RNase*。本研究中利用梨 cDNA 芯片快速鉴定了 35 个梨品种所含已知 *S-RNase*, 包括泸定王皮梨等 27 个地方品种、早魁等 6 个选育品质和新黄、王冠国外引入品种。其中选育品种早魁是白梨品种雪花梨 (母本, *PpS₄PpS₁₆*) 和砂梨品种黄花 (父本, *S₁S₂*) 杂交培育而成^[21-22]。芯片鉴定早魁 *S* 基因型为 *PpS₂PpS₁₆*, 显然其 *PpS₁₆* 来自母本雪花梨, 而 *PpS₂* 是来自父本黄花的, 早魁与父母本间各有 1 个相同的 *S* 基因, 符合 *S* 基因遗传规律; 初夏绿是西子绿 (*PpS₃PpS₅*) × 翠冠 (*PpS₁PpS₄*) 的杂交后代, 芯片鉴定初夏绿所含 *S-RNase* 基因为 *PpS₃PpS₄*, 与戴美松等^[23]用 PCR-RFLP 技术和测序及技术鉴定结果一致。华金的亲本是早酥 (*PpS₁PbS₃₅*) × 早白 (*S_xS_x*)^[24], 芯片鉴定华金 *S* 基因型为 *PpS₁PpS₄*, 符合 *S* 基因遗传规律, 同时可推测早白含有 *PpS₄-RNase*。以上分析说明芯片鉴定结果的可靠性。梨 cDNA 芯片应用于梨 *S-RNase* 的鉴定, 进一步完善了梨品种 *S-RNase* 鉴定和检测平台。

根据杂交信号推测梨品种可能含有未知 *S-RNase* (如图 3 中 1 号泸定王皮梨、35 号小花红梨等), 结合克隆、测序等分子生物学方法发现了 7 个梨品种新的 *S-RNase*, 获得 7 个新的 *S-RNase* 的 PF/R 特异序列并提交 GenBank 数据库。蔷薇科 *S-RNase* 基因进化过程中形成了两个亚科 (苹果亚科和李亚科) 特异的 *S-RNase* 类群^[25]。进化研究发现 7 个新 *S-RNase* 基因主要属于苹果亚科 *S-RNase*

类群, 未形成梨属或梨种特异的 *S-RNase* 类群, 其进化模式与蔷薇科植物其他 *S-RNase* 基因基本一致。7 个新的 *S-RNase* 之间在进化系统上表现出近或远的进化关系, 主要是因为不同 *S-RNase* 间序列 (PF/R 区域) 相似性大小不同, 包含内含子序列和长度的不同及编码区序列的差异, 如 *S-RNase* 基因 *PpS₅₉* 分别与 *PpS₅₈*、*PpS₅₄*、*PpS₅₇* 相似性高 (82.2% ~ 82.7%), 而 *PpS₅₃* 与 *PpS₅₄* 之间及分别与其他 5 个新 *S-RNase* 之间同源性很低。进化分析 (图 7) 还发现 *PpS₅₇* (*Pyrus pyrifolia S₅₇-RNase*) 与 *EjS₂* (*Eriobotrya japonica S₂-RNase*)、*PsMS₈* (*Pyrus syriaca manara12 S₈-RNase*) 等 *S-RNase* 在同一个进化分枝上, 表现出苹果亚科 *S-RNase* 在不同属间或不同种间有比属内或物种内更近的遗传距离的现象。东方梨 *S-RNase* 基因 (如 *PpS₅₇*) 与西洋梨 *S-RNase* 基因 (如 *PsMS₈-RNase*) 的遗传距离与同一种群内的 *S-RNase* 基因相比 (如各 *Pyrus pyrifolia S-RNase* 之间) 遗传距离更近, 梨属与枇杷属植物一般杂交授粉难以成功, 但 *S-RNase* 基因存在很近的亲缘关系。以上分析说明蔷薇科 *S-RNase* 基因的出现于蔷薇科植物亚科的形成之后、种群分化形成之前。

梨 cDNA 芯片能快速鉴定梨品种所含已鉴定的 *S-RNase* 基因, 结合 DNA 克隆和测序等方法, 可在一定程度上加快中国梨品种 *S-RNase* 基因的鉴定及 *S-RNase* 基因资源的挖掘研究, 为梨合理配置授粉树种及梨新品种的选育提供科学依据。但梨 cDNA 芯片探针不含内含子, 无法鉴定编码区相同而内含子序列不同的 *S-RNase*, 如砂梨品种中的 *PpS₅-RNase* 和 *PpS_{5a}-RNase* 基因, 虽不会影响梨杂交授粉过程, 但无法正确判断编码区相同而内含子不同的已知 *S* 等位基因。前期研究中已成功制备梨寡核苷酸芯片并用于梨品种 *S-RNase* 基因鉴定, 寡核苷酸芯片特异探针针对 *S-RNase* 基因 HV 区的编码区和内含子序列设计, 因此对 cDNA 芯片鉴定的已知 *S-RNase*, 若存在编码区相同而内含子不同的等位基因, 可辅以梨寡核苷酸芯片的杂交检测, 不但使梨品种 *S-RNase* 检测平台更加完善, 更利于促进梨品种 *S-RNase* 资源的挖掘和梨种质资源的发现和利用。

参考文献

- [1] McClure B. New views of *S-RNase*-based self-incompatibility [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2006, 9(6): 639-646
- [2] 张绍铃, 曹生民, 吴华清. 果树自交不亲和性基因型及其鉴定方法 [J]. *果树学报*, 2003, 20(5): 358-363

- [3] 张好艳,吴俊,衡伟,等.京白梨等品种 S 基因型鉴定及新基因 S_{28} 和 S_{30} 的核苷酸序列分析[J].园艺学报,2006,33(3):496-500
- [4] 江南,谭晓风,张琳,等.利用基因芯片鉴定梨品种自交不亲和基因型[J].园艺学报,2014,41(10):1983-1992
- [5] Terami H. Analysis of the sterility factors existing in varieties of the Japanese pear (*Pyrus serotina* Rehd. var. *culta* Rehd.) [J]. Studies Hort Inst Kyoto Imp Univ, 1946, 3: 267-271
- [6] 张好艳,张绍铃,吴俊,等.14个梨品种自交不亲和基因(S基因)型的鉴定[J].果树学报,2007,24(2):135-139
- [7] Hiratsuka S, Okada Y, Kamai Y. Stylar basic proteins corresponding to 5 self-incompatibility alleles of Japanese pears [J]. J Jpn Soc Hort Sci, 1995, 64(3): 471-478
- [8] 张绍玲,周建涛,徐义流,等.梨花柱半离体培养法及品种自交不亲和基因型鉴定[J].园艺学报,2003,30(6):703-706
- [9] 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
- [10] 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(6-7): 961-967
- [11] 江南,谭晓风,张琳,等.梨自交不亲和基因 cDNA 芯片制备及对部分砂梨品种 S 基因型的鉴定[J].园艺学报,2015,42(12):2341-2352
- [12] Tan X F, Jiang N, Zhang L, et al. Application of genechip in S-genotyping of pear cultivars [C]// Suzhou: The 5'th International Forum on Post-Genome Technologies (5'IFPT), 2007: 62-65
- [13] Jiang N, Tan X F, Zhang L, et al. Establishment of self-incompatibility gene cDNA microarray to identify S-genotypes of *Pyrus pyrifolia* [J]. Horticult Plant J, 2015, 1(3): 121-130
- [14] Takasaki T, Okada K, Castillo C, et al. Sequence of the S_9 -RNase cDNA and PCR-RFLP system for discriminating S_I to S_9 -allele in Japanese pear [J]. Euphytica, 2004, 135(2): 157-167
- [15] Heng W, Wu J, Wu H, et al. Recognition specificity of self-incompatibility in *Pyrus* and *Malus* [J]. Mol Breed, 2011, 28(4): 549-557
- [16] Tan X F, Zhang L, Wu Yu T, et al. Molecular identification of two new self-incompatible alleles (S-alleles) in Chinese pear (*Pyrus bretschneideri*) [J]. J Plant Physiol Mol Biol, 2007, 33(1): 61-70
- [17] 张琳.梨品种 S 基因型鉴定及自交不亲和 S 基因的克隆[D].长沙:中南林业科技大学,2008
- [18] 衡伟,张绍铃,张好艳,等.12个梨品种 S 基因型的鉴定[J].园艺学报,2007,34(4):853-858
- [19] Matsuura T, Sakai H, Unno M, et al. Crystal structure at 1.5-Å resolution of *Pyrus pyrifolia* pistil ribonuclease responsible for gametophytic self-incompatibility [J]. J Biol Chem, 2001, 276(48): 45261-45269
- [20] Ishimizu T, Shinkawa T, Sakiyama F, et al. Primary structural features of rosaceous S-RNases associated with gametophytic self-incompatibility [J]. Plant Mol Biol, 1998, 37(6): 931-941
- [21] 李勇,李晓,韩彦肖,等.早熟梨新品种早魁的选育[J].华北农学报,2003,18(S1):88-90
- [22] 姜淑苓,王斐,欧春青,等.梨优异种质早酥及利用[J].植物遗传资源学报,2014,15(1):182-185
- [23] 戴美松,王月志,孙田林,等.‘翠冠’梨2个后代品种 S 基因型鉴定及杂交亲和性强度观察[J].浙江大学学报:农业与生命科学版,2012,38(2):132-138
- [24] 王斐,林盛华,方成泉,等.梨新品种及其亲本的 AFLP 分析[J].园艺学报,2007,34(4):847-852
- [25] Yaegaki H, Shimada T, Moriguchi T, et al. Molecular characterization of S-RNase genes and S-genotypes in the Japanese apricot (*Prunus mume* Sieb. et Zucc.) [J]. Sex Plant Reprod, 2001, 13(5): 251-257