

张校立,艾沙江·买买提,徐叶挺,等. 6 个新疆地方梨品种 S 基因型鉴定[J]. 江苏农业科学,2018,46(13):26–28.  
doi:10.15889/j.issn.1002–1302.2018.13.006

## 6 个新疆地方梨品种 S 基因型鉴定

张校立,艾沙江·买买提,徐叶挺,许娟,邓莉,王继勋

(新疆农业科学院园艺作物研究所/农业部新疆地区果树科学观测试验站,新疆乌鲁木齐 830091)

**摘要:**通过对新疆地方梨品种 S 基因型的鉴定,为库尔勒香梨授粉品种的筛选提供理论依据,并以期丰富我国梨品种 S 基因型信息。设计特异性引物对 6 个新疆地方梨品种的基因组 DNA 进行 PCR 扩增,片段回收、克隆、测序。使用生物信息学软件对各序列进行分析,确定 6 个新疆地方梨品种 S 基因型分别为:褐色句句梨 S28S4、霍城冬黄梨 S28S4、八月梨 S28S4、库尔勒黄酸梨 S22S35、奎克阿木特 2 号 S4S16、也历克阿木特 S18S12。6 个新疆地方梨品种 S 基因型鉴定,增加了我国 6 个新疆梨品种的 S 基因型信息;可为库尔勒香梨授粉筛选新疆地方梨品种提供理论依据。

**关键词:**新疆地方梨品种;S 基因型;自交不亲和性

**中图分类号:** S661.201 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002–1302(2018)13–0026–03

新疆地方梨品种属于新疆梨系统。新疆梨系统是梨五大栽培系统之一,代表品种是著名的库尔勒香梨(*Pyrus bretschneideri* Rehd)。库尔勒香梨维吾尔语名乃西米提或乃西普提,蒙古语名为开登木,原产新疆库尔勒地区,在新疆已有 1 400 多年的栽培历史,其果实香味浓郁、皮薄肉脆、清甜

爽口、细嫩多汁、耐贮藏性强,是新疆名特优果品之一。截至 2016 年,库尔勒香梨种植面积达 7.39 万  $\text{hm}^2$ ,产量达 128.04 万  $\text{t}^{[1]}$ ,香梨产业已成为库尔勒地区的主导产业。库尔勒香梨自交不亲和,S 基因型为 S22S28<sup>[2]</sup>,自交结实率低,需要配置授粉品种,但不同的授粉品种会对香梨果实产生显著的花粉直感效应,突出表现为不同花粉授粉后果实萼片脱落或宿存,萼片脱落后的幼果发育成为“母梨”,萼片宿存的幼果发育成为“公梨”,二者不但外在品质果形上差异很大,而且内在品质和口感上也差异明显,市场价格差异非常显著。徐胜利等研究表明,选择新疆梨作为授粉品种能够明显改善香梨果形和果实品质<sup>[3]</sup>。鉴定新疆地方梨品种 S–等位基因对库尔勒香梨合理授粉品种的选配具有重要的理论意义。梨自交不亲和性基因的研究始于 20 世纪 50 年代,国外最早研究的

收稿日期:2017–12–02

基金项目:新疆农业科学院青年科技基金(编号:xjnkq–2015024);  
新疆自治区公益性科研院所基本科研业务经费(编号:KYG2016118)。

作者简介:张校立(1981–),男,河南上蔡人,硕士,助理研究员,研究方向为梨遗传育种与栽培。E-mail:Zhangxiaoli2002@126.com  
通信作者:王继勋,研究员,研究方向为果树资源与育种。E-mail:924101849@qq.com。

- [8] McFadden E S, Sears E R. The origin of *Triticum spelta* and its free – threshing hexaploid relatives[J]. The Journal of Heredity, 1946, 37 (3): 81–107.
- [9] Kimber G. A reassessment of the origin of the polyploid wheats[J]. Genetics, 1974, 78(1): 487–492.
- [10] Dvořák J, McGuire P E, Cassidy B. Apparent sources of the A genomes of wheats inferred from polymorphism in abundance and restriction fragment length of repeated nucleotide sequences[J]. Genome, 1988, 30(5): 680–689.
- [11] Lafiandra D, Masci S, D’ovidio R, et al. Relationship between the D genome of hexaploid wheats (AABBDD) and *Ae. squarrosa* as deduced by seed storage proteins and molecular marker analyses[J]. Hereditas, 1992, 116(3): 233–238.
- [12] Salse J, Chagué V, Bolot S, et al. New insights into the origin of the B genome of hexaploid wheat: evolutionary relationships at the SPA genomic region with the S genome of the diploid relative *Aegilops speltoides*[J]. BMC Genomics, 2008, 9(1): 555.
- [13] Cox T S. Deepening the wheat gene pool[J]. Journal of Crop Production, 1998, 1(1): 1–25.
- [14] Ravel C, Nagy I J, Martre P, et al. Single nucleotide polymorphism, genetic mapping, and expression of genes coding for the DOF wheat

prolamin – box binding factor[J]. Functional and Integrative Genomics, 2006, 6(4): 310–321.

- [15] 强琴琴,杨帆,陈其皎,等. 节节麦 *pb1f* 基因的克隆、序列分析及原核表达[J]. 麦类作物学报, 2014, 34(6): 727–734.
- [16] Yan Z H, Wan Y F, Liu K F, et al. Identification of a novel HMW glutenin subunit and comparison of its amino acid sequence with those of homologous subunits[J]. Chinese Science Bulletin, 2002, 47(3): 222–227.
- [17] Wray G A, Hahn M W, Abouheif E, et al. The evolution of transcriptional regulation in eukaryotes[J]. Molecular Biology and Evolution, 2003, 20(9): 1377–1419.
- [18] Yanagisawa S, Schmidt R J. Diversity and similarity among recognition sequences of *Dof* transcription factors[J]. The Plant Journal, 1999, 17(2): 209–214.
- [19] Dong G, Ni Z, Yao Y, et al. Wheat *Dof* transcription factor *WPBF* interacts with *TaQM* and activates transcription of an alpha – gliadin gene during wheat seed development[J]. Plant Molecular Biology, 2007, 63(1): 73–84.
- [20] 卫晓彬,王亚楠,张超,等. 小麦 *WPBF* 与高分子量谷蛋白基因上游 Prolamin – Like box 的特异结合[J]. 中国农业科学, 2012, 45(1): 7–15.

是 Kikuchi、Machida 等日本学者,采用广泛的田间授粉杂交试验,从日本梨中鉴定了 7 个 S 等位基因,命名为 S1、S2、S3、S4、S5、S6、S7<sup>[4-6]</sup>。国内最早研究的是乌云塔娜,2003 年,从中国白梨中分离鉴定了 7 个新的 S 基因,分别记为 S17、S19、S20、S21、S22、S26、S27 等位基因<sup>[7]</sup>。谭晓风等分别从白梨、沙梨及秋子梨等亚洲梨种群分离鉴定了 34 个 S 等位基因<sup>[8]</sup>。从 2003 年开始至今采用 PCR-RFLP、DNA 测序、杂交检测等方法开展了中国梨自交不亲和性的研究,发现了包括 S1~S10 基因在内的 42 个 S 基因,从中国梨中克隆了 S12、S13、S15、S17~S22、S25~S30、S32、S34、S35、S38~S40、S42、S46 等 S 基因全长 cDNA 序列,确定了近 500 个梨品种的 S 基因型。近 500 个品种中大部分都是白梨系统、秋子梨系统、沙梨系统的品种,新建梨系统的品种非常少,目前,只有陈慧等鉴定了黄句句(S22S34)、伊犁红句句(S22S28)、早熟句句(S17S19)、乃希木特阿木提(S19S28)、沙 01 号(S22S28)、斯尔克甫梨(S22S28)、墨梨(S26Sb)、贵德长把(S19Sb)等 8 个新疆梨系统品种 S-基因型<sup>[9]</sup>。新疆梨地方品种是我国特有的梨树资源,新疆地方梨品种 S 基因型的鉴定研究比较少,大部分新疆地方梨品种的 S 基因型还未鉴定,我们研究的 6 个新疆地方梨品种的基因型目前尚未有人报道。我们利用 DNA 测序技术鉴定了 6 个新疆地方梨品种的 S 基因型。6 个品种 S 基因型的鉴定,以期丰富我国梨品种 S 基因型信息;为库尔勒香梨筛选最佳的授粉梨品种提供理论基础,并可为库尔勒香梨的丰产栽培技术提供科学依据,也为香梨品种的遗传改良奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试品种为褐色句句梨、霍城冬黄梨、八月梨、库尔勒黄酸梨、奎克阿木特 2 号、也历克阿木特。品种均来自新疆农业科学院轮台国家果树资源圃。于 2017 年 4 月上旬采集各品种幼嫩叶片置于液氮中,带回实验室后于 -80 ℃ 冷冻保存。

### 1.2 试剂

ExTaq、pMD18-T Vector、DNA 回收试剂盒,购自北京全式金生物技术(TransGen Biotech)有限公司;DNA 提取试剂盒,购于天根科技生化有限公司;其他药品均购自上海生工生物工程技术服务有限公司。

### 1.3 基因组 DNA 提取

参照植物基因组 DNA 提取试剂盒说明书(柱式植物 DNAout 2.0,天根科技生化有限公司)提取梨基因组 DNA,在 1% 琼脂糖凝胶、1×TAE 缓冲液、3~5 V/cm 下电泳,电泳结果用上海复日 FR-980 凝胶图成像系统照相,检测 DNA 样品。

### 1.4 PCR 扩增及检测

根据已报道的梨的 S 基因相关信息,获知梨 S 基因的一级结构由 5 个保守区、1 个高频可变区及 1 个内含子组成。高频可变区是花粉识别的部位。S 基因多态性主要源于高频可变区的差异,通常根据高频可变区的差别判断不同的 S 基因。因此,根据 S 基因一级结构特点,利用 S 基因高变区(hypervariable region, HV)的保守序列设计合成引物。

正向引物 PF:5'-TTTACGCAGCAATATCAG-3';

反向引物 PR:5'-AC(A/G)TTCGGCCAAATAATT-3'。

在江南等扩增反应体系及反应过程<sup>[10]</sup>的基础上略作调整,使用 ExTaq 酶保证扩增结果的可靠性,扩增产物在 1.4% 琼脂糖凝胶上于 100 V 电泳 30~45 min,上海复日 FR-980 凝胶图像系统分析拍照并记录分析。

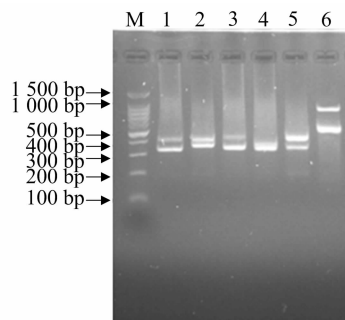
### 1.5 PCR 产物回收、克隆、测序

利用凝胶回收试剂盒回收目的 DNA 片段,与 PEASY-T5 载体 16 ℃ 条件下过夜连接,连接产物转化至感受态大肠杆菌 Trans1-T1,涂于 SOC/Amp50 固体培养基上 37 ℃ 过夜。挑选阳性克隆,菌液 PCR 筛选带有目的片段长度的克隆。每个 S 基因片段挑选 3 个阳性克隆,送上海生工生物工程技术服务有限公司测序。测序结果利用 Blast 与 GenBank 中已知的 S-RNase 基因序列比较,确定其 S 基因型。

## 2 结果与分析

### 2.1 S 基因特异性扩增

采用 S 等位基因特异性引物 PF 和 PR 对 6 个梨品种基因组 DNA 进行 PCR 扩增,琼脂糖电泳检测结果见图 1。



M—Markers; 1—褐色句句梨; 2—霍城冬黄梨; 3—八月梨; 4—库尔勒黄酸梨; 5—奎克阿木特 2 号; 6—也历克阿木特。图 2 同图 1 不同梨品种琼脂糖电泳检测结果

从图 1 可以看出,每个梨品种扩增都得到 2 条 S 基因特异片段,大约在 300~1 500 bp。褐色句句梨、霍城冬黄梨、八月梨、奎克阿木特 2 号、也历克阿木特等 5 个品种都扩增出明显的 2 条带;库尔勒黄酸梨扩增出来的 2 条带不是太明显,说明这个品种的 S 等位基因片段大小相差很小。

### 2.2 梨品种 PCR 扩增产物的聚丙烯酰胺凝胶电泳分离

将 PCR 扩增产物进一步进行聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,PCR 产物在聚丙烯酰胺凝胶上电泳随迁移率的不同,表现为不同位置的条带。从图 2 可以看出,6 个品种在聚丙烯酰胺凝胶上均呈现 2 条明显的条带,褐色句句梨、霍城冬黄梨、八月梨、奎克阿木特 2 号 4 个品种的 2 条带都在 300~500 bp 之间;褐色句句梨、霍城冬黄梨的 1 条约 450~500 bp 之间的扩增条带在聚丙烯酰胺凝胶上的位置相同,它们的 S 基因的碱基序列是否相同有待进一步分析;也历克阿木特的 1 条带在 1000~1 500 bp 内,另 1 条带在 600~1 000 bp 内。

### 2.3 梨品种 S 基因型的鉴定

聚丙烯酰胺凝胶电泳后回收目的条带,将克隆后的阳性克隆送上海生工生物工程技术服务有限公司测序,将 12 条测定的结果序列使用生物信息学软件进行 Blast 搜索、同源性比较,根据分析 GenBank 内 S 基因的碱基序列及同源性,确定 6 个新疆地方梨品种的 S 基因型。从表 1 可以看出,6 个品种

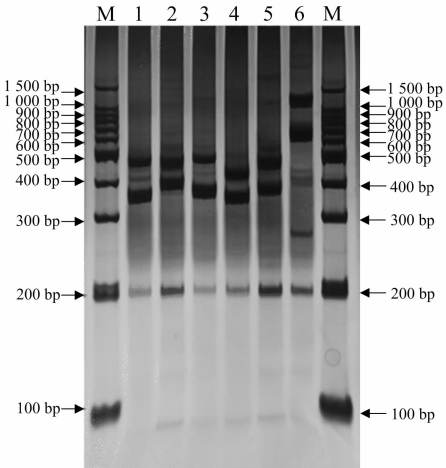


图2 不同梨品种 S 基因特异扩增的 6% 聚丙烯酰胺凝胶电泳

中 S 基因的核苷酸序列与 GenBank 中已登录的梨 S 基因有极高的同源相似性,褐色句句梨的 S 基因与 S28、S4 基因的相似性达 98%、99%;霍城冬黄梨的 S 基因与 S28、S4 基因的相似性达 100%、99%;八月梨 S 基因与 S28、S4 基因的相似性达 99%、100%;库尔勒黄酸梨的 S 基因与 S22、S35 基因的相似性达 100%、100%;奎克阿木特 2 号的 S 基因与 S4、S16 基因的相似性达 100%、100%;也历克阿木特 S 基因与 S18、S12 基因的相似性达 94%、100%。

表 1 6 个新疆地方梨品种的 S 基因型

序号	品种	PCR 片段长度 (bp)	S 基因型
1	褐色句句梨	428/374	S28S4
2	霍城冬黄梨	428/371	S28S4
3	八月梨	428/347	S28S4
4	库尔勒黄酸梨	346/378	S22S35
5	奎克阿木特 2 号	440/345	S4S16
6	也历克阿木特	1 452/536	S18S12

注:系统为新疆梨;引物为 PF/FR。

3 讨论与结论

本研究应用 PCR 技术和对 S 基因特异性扩增条带的测序,通过 DNA 序列分析确定了 6 个新疆地方梨品种的 S 基因型。鉴定结果为:褐色句句梨 S28S4、霍城冬黄梨 S28S4、八月梨 S28S4、库尔勒黄酸梨 S22S35、奎克阿木特 2 号 S4S16、也历克阿木特 S18S12。同为新疆地方梨品种,它们之间既有相同之处,也有不同之处,如褐色句句梨、霍城冬黄梨、八月梨等 3 个品种具有相同的基因型 S28S4,这 3 个品种间不能相互作授粉品种,因为它们具有相同的基因型,如果相互间作授粉品种,就会出现不结果或结果率极低;库尔勒黄酸梨、奎克阿木特 2 号、也历克阿木特 3 个品种的基因型不相同,这 3 个品种间可以相互作授粉品种。褐色句句梨、霍城冬黄梨、八月梨 3 个品种具有相同的基因型,并且都具有库尔勒香梨的 S28,库尔勒黄酸梨具有库尔勒香梨的 S22 基因,表明褐色句句梨、霍城冬黄梨、八月梨、库尔勒黄酸梨与库尔勒香梨在起源上相关

性比较大,奎克阿木特 2 号、也历克阿木特与库尔勒香梨在起源上相关性比较小。鉴定出的 6 个新疆地方梨品种分别含有 S4、S12、S16、S18、S22、S28、S35 等 S 基因,这些基因分别属于白梨系统、沙梨系统和西洋梨系统的 S 基因,初步推论新疆地方梨品种可能是白梨系统、沙梨系统和西洋梨系统的杂种,杂种后代又经过长期的自然杂交,互相演化而来成现在的品种。在果树育种学上,沈德绪等认为,新疆梨可能是西洋梨与白梨的杂交种<sup>[11]</sup>。新疆地方梨品种具体的起源与分类还需对其更多品种的 S - 基因进行鉴定,并需要进一步的分析与研究。

6 个新疆地方梨品种基因型的鉴定,增加了我国 6 个新疆梨品种的 S 基因型信息,可为库尔勒香梨授粉品种的筛选新疆地方梨品种提供理论依据。褐色句句梨、霍城冬黄梨、八月梨 3 个品种具有库尔勒香梨的 S28 基因,库尔勒黄酸梨具有库尔勒香梨的 S22 基因,表明褐色句句梨、霍城冬黄梨、八月梨和库尔勒黄酸梨不太适宜作库尔勒香梨的授粉品种;奎克阿木特 2 号与也历克阿木特可以作为库尔勒香梨的授粉品种,但其授粉后对库尔勒香梨品质的影响,还需开展进一步研究。

参考文献:

[1]新疆维吾尔自治区统计局.新疆统计年鉴[M].北京:中国统计出版社,2017:383.

[2]吕文娟,冯建荣,刘小芳,等.‘库尔勒香梨’自交不亲和 S - RNase 等位基因全长的克隆与分析[J].分子植物育种,2017,15(5):1639 - 1647.

[3]徐胜利,陈小青,徐崇志,等.新疆梨系统品种花粉直感对香梨果萼发育及品质的影响[J].山西果树,2014(5):3 - 6.

[4]Kikuchi A. Investigations in 1927 and 1928, Pater clinical incompatibility in the Japanese pear[J]. Okistse Hort Soc,1929,24:1 - 6.

[5]Machida Y. S genotype of several cultivars of Japanese pear and doubts about the parents of ‘Housui’[C]. Abstr Japan Soc Hort Sci Autumn Meet,1982:58 - 59.

[6]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.

[7]乌云塔娜.中国白梨自交不亲和基因的分离鉴定[D].长沙:中南林学院,2003.

[8]Tan X F, Zhang L, Wuyun T N, et al. Molecular identification of two new self - incompatible alleles (S - alleles) in Chinese pear (*Pyrus bretschneideri*) [J]. Journal of Plant Physiology and Molecular Biology,2007,33(1):61 - 70.

[9]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.

[10]江南,张琳,谭晓风,等.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[J].植物遗传资源学报,2017,18(3):520 - 529.

[11]沈德绪.果树育种学[M].北京:中国农业出版社,1995:175.