

梨自交不亲和基因克隆及其进化分析

梁文杰¹, 谭晓风², 乌云塔娜^{2,3}

(¹温州科技职业学院,浙江温州 325006; ²中南林业科技大学经济林育种与栽培国家林业和草原局重点实验室,长沙 410004; ³中国林业科学研究院经济林研究开发中心,郑州 450003)

摘要:【目的】获得梨S-RNase基因全长序列及其进化、遗传多态性情况。【方法】设计特异性引物扩增梨 S_{42} -RNase基因组DNA全长序列,利用RT-PCR结合cDNA末端快速扩增(rapid amplification of cDNA ends, RACE)技术获得其cDNA全长序列。构建梨属植物S-RNase基因编码区和高变区(hyper variable region, HV)内含子的系统发育树。【结果】梨 S_{42} -RNase基因编码226个氨基酸,包含由27个氨基酸组成的信号肽,由11、11、6、8、7个氨基酸组成的5个保守区以及HV区插入的335 bp内含子序列。系统进化树显示,梨S-RNase基因编码区和HV区内含子的拓扑结构既相似又有差异。编码区Normalized dN-dS结果显示,除了HV区外还有几个区域存在大量的非同义替换,表明对阳性选择具有很高的敏感性。【结论】梨S-RNase基因编码区和HV区内含子的进化存在一定的关联性,除HV区外还存在其他区域参与梨雌蕊与花粉间特异识别。梨S-RNase基因编码区进化动力源自其编码特异识别蛋白的功能,是平衡选择的结果。HV区的内含子序列表现出很高的长度多态性,进化受到负选择的压力。

关键词:梨; S-RNase; 基因克隆; 进化分析

中图分类号:S661.2

文献标志码:A

文章编号:1009-9980(2021)10-1621-17

Cloning and phylogenetic analysis of S-RNase genes in genus *Pyrus* plants

LIANG Wenjie¹, TAN Xiaofeng², WUYUN Tana^{2,3}

(¹Wenzhou Vocational College of Science and Technology, Wenzhou 325006, Zhejiang, China; ²The Key Lab of Non-Wood Forest Product of National Forestry and Grassland Administration, Central South University of Forestry and Technology, Changsha 410004, Hunan, China; ³Non-timber Research and Development Center, Chinese Academy of Forestry, Zhengzhou 450003, Henan, China)

Abstract:【Objective】Most pear cultivars in the world have self-incompatibility. The seed setting rate of self-pollination is far below the demand of commercial production. Studies have confirmed that pear self-incompatibility is a type of gametophyte self-incompatibility, and the pear S-RNase gene can specifically recognize pollen during the pollination process of stamens and pistils to prevent self-pollination. The objective of the study was to obtain the full-length sequence of the pear S-RNase gene and analyze the evolution of the pear S-RNase gene and its genetic polymorphism.【Methods】DNA was extracted from the leaves of pear cultivar Longxiang (*Pyrus ussuriensis* Maxim.), and specific primers were designed using the conservative characteristics of the apple subfamily S-RNase, and the full-length sequence of pear S_{42} -RNase genomic DNA was amplified by PCR. The RNA extracted from the pistil of pear cultivar Longxiang was used as the material, and the full-length cDNA sequence of the pear S_{42} -RNase gene was obtained by using RT-PCR and RACE technology. Its gene exon and HV region (Hyper variable region) intron sequences were obtained accurately by comparing the full-length cDNA and DNA sequence of the S_{42} -RNase. The full length sequences of other S-RNase genes cloned from *Pyrus* in GenBank were searched by BLAST. The phylogenetic trees of S-RNase gene coding region and HV region introns of *Pyrus* were constructed by multi-sequence alignment and manual adjustment with

收稿日期:2021-05-06 接受日期:2021-06-30

基金项目:国家自然科学基金(31000309)

作者简介:梁文杰,男,讲师,主要从事经济林育种与栽培研究以及园林植物应用研究。Tel:0577-88422665, E-mail:lwj60000@126.com

MEGA 6.06 software, and the differentiation and genetic polymorphism among the sequences were estimated.【Results】Bioinformatics analysis showed that the coding frame of pear *S₄₂*-RNase gene are composed of 678 bases and encoded 226 amino acids, including a signal peptide composed of 27 amino acids, five conserved regions (C1, C2, C3, RC4, C5) composed of 11, 11, 6, 8, and 7 amino acids and a HV region composed of 13 amino acids. In addition, there is a highly conserved hexapeptide region (IIWPNV) in the downstream region of HV. The full length of the genome DNA sequence is 1044 bp, and the HV region contained a 335 bp intron. The prediction of physical and chemical properties and secondary structure showed that the molecular weight of the protein encoded by the pear *S₄₂*-RNase gene is 25 844.6, the pI is 8.97, the chemical formula is $C_{1163}H_{1785}N_{307}O_{333}S_{14}$, and the half-life is 30h. The C1, RC4, and C5 hydrophobic regions composed of α -helices in the secondary structure were considered to be involved in the stability of the enzyme structure. The C2, C3 hydrophilic regions mainly composed of β -sheets contain conserved catalytic histidine residues. It would play an important role in RNase activity. The hydrophilic region of HV between C2 and C3 was located on the surface of the protein and was believed to support the selective interaction between *S*-RNase and pollen *S* gene determinants. Multiple sequence comparison analysis showed that the content of C+G in the coding region of pear *S*-RNase gene was lower than that of HV introns, the rate of conserved sites in the coding region was greater than that of introns in the HV region, and the conversion of the coding region was slightly more than that of transversion. The intron regions in the HV region were just the opposite. In addition, the intron sequence of the HV region showed a very high length polymorphism, ranging in size from 109 bp to 3130 bp. The constructed phylogenetic tree showed that the phylogenetic tree constructed by the coding region and HV introns was divided into 5 subgroups, the sequence divergence within the subgroups was smaller, the divergence between the subgroups was larger. The topological structure had both similarities and differences. The average Normalized *dN-dS* value corresponding to the pear *S*-RNase codon indicated that the difference in the coding sequence of the *S*-RNase gene was the result of adaptive amino acid substitutions, and its evolutionary power came from the function of the *S*-RNase gene to encode a specific recognition protein; The analysis also showed that in addition to the HV region, there were a large number of non-synonymous amino acid substitutions in several regions, indicating high sensitivity to positive selection.【Conclusion】The phylogenetic tree analysis of pear *S*-RNase sequences showed that the evolution of the coding region and introns in the HV region were correlated with each other under the condition of independence. In addition to the existing HV region, there were other regions in the coding region participating in the specific recognition between pear pistil and pollen. Therefore, the pear *S* gene could not stay in the same HV region to determine whether it was a new gene. The index of genetic diversity showed that the sequence of the coding region of the pear *S*-RNase gene and the intron sequence in the HV region had different evolutionary power sources. The sequence evolution of the coding region would be caused by balanced selection, and the evolution of introns in the HV region would be under the pressure of negative selection. Based on the genetic differentiation of the coding region of the pear *S*-RNase gene and the intron sequence in the HV region, we could conclude that Xinjiang pear is a hybrid of Asiatic pear and Western pear.

Key words: Pear; *S*-RNase; Gene clone; Evolutionary analysis

自交不亲和是植物防止自花授粉的机制之一。许多果树存在自交不亲和现象,具体表现为自花授粉不结实或结实率远低于异花授粉。梨(*Pyrus L.*)自交不亲和属于配子体自交不亲和类型,其自交不亲和受单个基因座的复S(全称S-RNase)等位基因的控制^[1-2]。配子体自交不亲和体系中,植物雄蕊与雌蕊在授粉过程中花粉S基因和雌蕊S基因发生相互作用以防止自花授粉^[3-4]。通过植物转入与敲除S基因的试验证实,雌蕊中的S-RNase具有RNase活性,是雌蕊S基因表达的能特异识别及隔绝不亲和花粉的物质^[5-6]。因此,梨S-RNase基因克隆是梨自交不亲和体系研究中的重要环节,其鉴定的通用方法为特异PCR扩增结合DNA测序^[7]。目前,在苹果(*Malus domestica* Borkh.)^[8]、甜樱桃(*Prunus avium* L.)^[9]、扁桃(*Prunus dulcis* Borkh. ex DC.)^[10]、砂梨(*Pyrus pyrifolia* Nakai)^[11-14]等果树中均已克隆出了S-RNase基因全长序列,这为研究其进化情况提供了可能。然而,关于蔷薇科植物S-RNase基因进化的研究较少,且主要集中于科或亚科S-RNase基因进化的整体研究^[15-16]。

我国被誉为梨原种的发源地^[17],梨属植物种及品种众多。截至目前,在我国梨品种中已分离鉴定的S基因有60个,且多为序列片段^[18-25]。要深入研究梨自交不亲和的规律,获取梨S基因编码区,检验基因组水平上推导的S基因的外显子和内含子序列的准确性均需要S基因DNA及cDNA全长序列。梨S₄₂-RNase基因先后从龙香梨(*P. ussuriensi* Maxim. ‘Longxiang’)、云南宝珠梨(*P. pyrifolia* ‘Yunnan Baozhu’)、早香水梨(*P. ussuriensis* Maxim. ‘Zaoxiang-shui’)等15个梨品种中分离出来。已知龙香梨S基因型为S₁₆S₄₂,为获得梨S₄₂基因全长序列,通过设计新的特异引物从龙香梨叶片DNA中扩增获得了S₄₂基因的全长DNA序列;从龙香梨雌蕊中提取RNA,采用逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)结合cDNA末端快速扩增(rapid amplification of cDNA ends, RACE)技术扩增获得了梨S₄₂基因的全长cDNA序列,二者比对获得了该基因高变区(hyper variable region, HV)内含子及编码序列。利用克隆的梨S₄₂基因序列搜索(Blast)基因序列数据库(GenBank)中梨属植物其他S-RNase基因序列构建系统发育树,估算遗传分化和多态性,研究其进化特性及相关指标。新的特异引物为扩增梨S-RNase基因全

长序列提供了方便快捷的途径,同时对梨S-RNase基因进化的研究有助于了解梨属植物S-RNase基因进化的历史。

1 材料和方法

1.1 试验材料

春天采摘龙香梨的叶片及雌蕊置于液氮罐中带回。试剂材料有TaKaRa公司的ExTaq、pMD18-T Vector及3'-Full RACE Core Set试剂盒、Invitrogen公司的RNA提取试剂盒以及回收试剂盒。

1.2 试验方法

1.2.1 梨DNA的提取及S₄₂-RNase基因特异扩增用龙香梨的嫩叶,采用改良十六烷基三甲基溴化铵(cetyltriethyl ammonium bromide, CTAB)法^[26],抽提总DNA后置于TE(Tris EDTA buffer)溶液中。PCR反应体系20 μL:2.0 μL 10×PCR Buffer,0.3 μL dNTPs(10 mmol·L⁻¹),1.5 μL MgCl₂(25 mmol·L⁻¹),1.7 μL引物PF2(10 μmol·L⁻¹),1.7 μL引物PR2(10 μmol·L⁻¹),1 U ExTaqDNA聚合酶,10 ng模板DNA,其余为灭菌纯水;PCR循环运行条件:94 °C 1.5 min,50 °C 30 s,70 °C 2 min,循环10次;94 °C 30 s,50 °C 30 s,70 °C 2.5 min,循环25次;70 °C 7 min。5'端特异引物为:PF2:5'-TGCCTCGCTCTGAACAAA-3',3'端包含终止密码子的序列设计反向引物PR2:5'-ATACTGAATATTATCGGTGGG-3'。

1.2.2 雌蕊RNA的提取 用0.5%(ρ,后同)的焦碳酸二乙酯(diethyl pyrocarbonate, DEPC)处理用于配制试剂的无菌水。操作过程所用耐高温的器皿需高温杀毒4 h以上,不能高温消毒的器皿用0.5%DEPC溶液浸泡24 h后烘干备用,过程按照RNA抽提试剂盒说明书。

1.2.3 RT-PCR及3'RACE 5'端特异引物为:PF2:5'-TGCCTCGCTCTGAACAAA-3';PF1:5'-TT-TACGCAGCAATATCAG-3'。RT-PCR体系按照试剂盒说明书。循环运行条件:30 °C 10 min,50 °C 30 min,95 °C 5 min,5 °C 5 min,运行1次。运行结束后,按照以下体系:3 μL 25 mmol·L⁻¹ MgCl₂,4 μL 10×PCR Buffer(Mg²⁺ Free),1 μL 10 μmol·L⁻¹ PF1,0.25 μL 5 U·μL⁻¹ TaKaRa Taq,0.5 μL 20 μmol·L⁻¹ 3sites Adaptor Primer,10 μL上步反应液,33.75 μL无菌水。循环运行条件:95 °C 30 s,60 °C 30 s,70 °C 2 min,循环38次。

1.3 目的片段的回收克隆

PCR产物按照 invitrogen 公司试剂盒回收后与 pMD18-T Vector 载体连接, 转化到大肠杆菌 DH5α 感受态细胞。用蓝白斑筛选挑取白色单克隆测序。

1.4 S 基因序列分析

利用 Vector NTI11.5.3 软件进行 S-RNase 基因 DNA 及 cDNA 序列分析, 并借助 GenBank 数据库进行相似性搜索分析。

1.5 S 基因进化分析

从 GenBank 中搜索梨 S-RNase 基因全长序列, 找出编码序列和 HV 区内含子序列, 利用 MEGA 6.06 软件的 Clustal W 程序分别做多序列比对, 采用距离法中的邻接法(neighboor-joining, NJ)等分别构

建 S 基因编码区和 HV 区内含子序列的系统进化树, 用 Bootstrap 做 1000 次可靠性检验分析, 利用软件自带的 Models 下 Find Best DNA/Protein Models 分别找出 S 基因编码区和 HV 区内含子序列适用的最佳模型, 利用相应模型和算法计算序列间的分化, 再利用 Selection 下的 Tajima's Test of Neutrality 计算遗传多态性。

2 结果与分析

2.1 S₄₂-RNase 基因序列分析

S₄₂ 基因组 DNA 扩增序列大小为 1044 bp, cDNA 序列大小为 844 bp。DNA 与 cDNA 比对显示, DNA 序列 275~609 bp 处核苷酸序列为内含子序列(图 1)。

S ₄₂ cDNA	-----	20	*	40	*	60	*	80	
S ₄₂ gene	TGCGCTCGCTTGAACAAATATTATAAATGGGTTTACAGGAATGATATATGGTTACGGATGCTATTTCATTAAATTGTAT								: 83
	TGCCCTCGCTTGAACAAATATTATAAATGGGTTTACAGGAATGATATATGGTTACGGATGCTATTTCATTAAATTGTAT								: 83
S ₄₂ cDNA	-----	100	*	120	*	140	*	160	
S ₄₂ gene	TAATACTATCTCGGCCAGGTGGGATTCGATTATTTCATTACGGCAATATCAGCCGGCTGCTGCAATTAGTTAGTTCT								: 166
	TAATACTATCTCGGCCAGGTGGGATTCGATTATTTCATTACGGCAATATCAGCCGGCTGCTGCAATTAGTTAGTTCT								: 166
S ₄₂ cDNA	-----	180	*	200	*	220	*	240	
S ₄₂ gene	ACTCCTTGAAAGGATCCTCTGACAAGTTTACGGTTACGGTTGCTCAAACCGCAAGGGAAATGACCCAGAACG								: 249
	ACTCCTTGAAAGGATCCTCTGACAAGTTTACGGTTGCTCAAACCGCAAGGGAAATGACCCAGAACG								: 249
S ₄₂ cDNA	-----	260	*	280	*	300	*	320	*
S ₄₂ gene	TTGCAAGACACAGAAATATCAGAAGGTAAATATTAGTAATGAGATACTGAACTTAACTTAAAGTACTGTTG								: 331
	TTGCAAGACACAGAAATATCAGAAGGTAAATATTAGTAATGAGATACTGAACTTAACTTAAAGTACTGTTG								: 331
S ₄₂ cDNA	-----	340	*	360	*	380	*	400	*
S ₄₂ gene	GTCTATATATATTTTAATATATACATACTAACACAGAATTTCATGCACCGCTGTAACAAATTACAATTAA								: 414
	GTCTATATATATTTTAATATATACATACTAACACAGAATTTCATGCACCGCTGTAACAAATTACAATTAA								: 414
S ₄₂ cDNA	-----	420	*	440	*	460	*	480	*
S ₄₂ gene	AGTAAATTGCTAGATAGACTAAATTAAAACCAATTGTAAATTAAATATTGTGTATCACATTAACTAACACTTAA								: 497
	AGTAAATTGCTAGATAGACTAAATTAAAACCAATTGTAAATTAAATATTGTGTATCACATTAACTAACACTTAA								: 497
S ₄₂ cDNA	-----	500	*	520	*	540	*	560	*
S ₄₂ gene	AAGCCAATATCAAACTACATCATTTACTTAAACCGCTTAACATTAACGTTAACTAACCTAACTCATAAATT								: 580
	AAGCCAATATCAAACTACATCATTTACTTAAACCGCTTAACATTAACGTTAACTAACCTAACTCATAAATT								: 580
S ₄₂ cDNA	-----	600	*	620	*	640	*	660	*
S ₄₂ gene	ATGCAAACACTGGAAACCCAGTTGGAAATTATTGGCGGAACGTATACAAATCG								: 662
	ATGCAAACACTGGAAACCCAGTTGGAAATTATTGGCGGAACGTATACAAATCG								: 662
S ₄₂ cDNA	-----	680	*	700	*	720	*	740	*
S ₄₂ gene	AACCGCTAATGAAGCTCTGGCGTAACAGTGGTAAACACATGGCTCCTGTGCGCTCCCCATTACAGAACAGACGATT								: 745
	AACCGCTAATGAAGCTCTGGCGTAACAGTGGTAAACACATGGCTCCTGTGCGCTCCCCATTACAGAACAGACGATT								: 745
S ₄₂ cDNA	-----	760	*	780	*	800	*	820	*
S ₄₂ gene	ACTTTGATACAGTAATCAAATGTCAGAACCCAGAAACAAATGTCCTCATCAGAACGGCGAATATTGAGCCGAAG								: 828
	ACTTTGATACAGTAATCAAATGTCAGAACCCAGAAACAAATGTCCTCATCAGAACGGCGAATATTGAGCCGAAG								: 828
S ₄₂ cDNA	-----	840	*	860	*	880	*	900	*
S ₄₂ gene	GGGGAAAAAAGGGCACTAGTGGACATTGAAATGGCATACCGCATGGTACCAACAAATAGGCACCAAAACTCAAGTGCCAAAC								: 911
	GGGGAAAAAAGGGCACTAGTGGACATTGAAATGGCATACCGCATGGTACCAACAAATAGGCACCAAAACTCAAGTGCCAAAC								: 911
S ₄₂ cDNA	-----	920	*	940	*	960	*	980	*
S ₄₂ gene	GAATGCTAGGATGACTGCATTGGTTGAGGTACTCTTGGCAGCGATAGCAACTTAACGCAGTTCAATAATTGCCCCCGCCAT								: 659
	GAATGCTAGGATGACTGCATTGGTTGAGGTACTCTTGGCAGCGATAGCAACTTAACGCAGTTCAATAATTGCCCCCGCCAT								: 994
S ₄₂ cDNA	-----	1000	*	1020	*	1040	*	1060	*
S ₄₂ gene	TTCCACCGAGATCCCCATTATCTGCCAACCGATAATTATCAGTTAAAGAGCCGGCTAGCCAGTTATATATGTTAGTTGG								: 1041
	TTCCACCGAGATCCCCATTATCTGCCAACCGATAATTATCAGTTAAAGAGCCGGCTAGCCAGTTATATATGTTAGTTGG								: 1041
S ₄₂ cDNA	-----	0	*	1100	*	1120	*	1140	*
S ₄₂ gene	CCATACGGATGGCTATTCCATATAGGACAAGAGGAAGGCAATTGTGATTGTATTCTAAATTAAATGGCTTAA								: 825
	CCATACGGATGGCTATTCCATATAGGACAAGAGGAAGGCAATTGTGATTGTATTCTAAATTAAATGGCTTAA								: 825
S ₄₂ cDNA	-----	-----	*	844	-----	-----	*	-----	
S ₄₂ gene	TTAGTTAAAAAAAAAA		:	844			*		

图 1 S₄₂-RNase cDNA 序列与 DNA 序列比对

Fig. 1 Comparison of S₄₂-RNase cDNA and DNA sequence

推导梨 *S₄₂* 基因编码氨基酸序列(图2)符合梨 *S* 基因共有一级结构特征:梨 *S₄₂* 基因编码 226 个氨基酸,其中包含由 27 个氨基酸组成的信号肽,由 11、11、6、8、7 个氨基酸组成的 5 个保守区(C1、C2、C3、RC4、C5)以及由 13 个氨基酸组成的 HV 区。另外在 HV 下游区域存在 1 个高度保守的六肽区

(IIWPNV),编码这六肽的 DNA 序列经常被用于设计扩增梨 *S*-RNase 基因片段的反向引物。序列还包含 8 个非常保守的半胱氨酸残基(图2椭圆标示处),在 61 位的 C2 区和 117 位 C3 区各包含 1 个保守的催化组氨酸残基。另外,序列在 RC4 区包含保守的 Asn-Xaa-Ser/Thr 结构 NVS,而 Asn 是蔷薇科(Rosa-

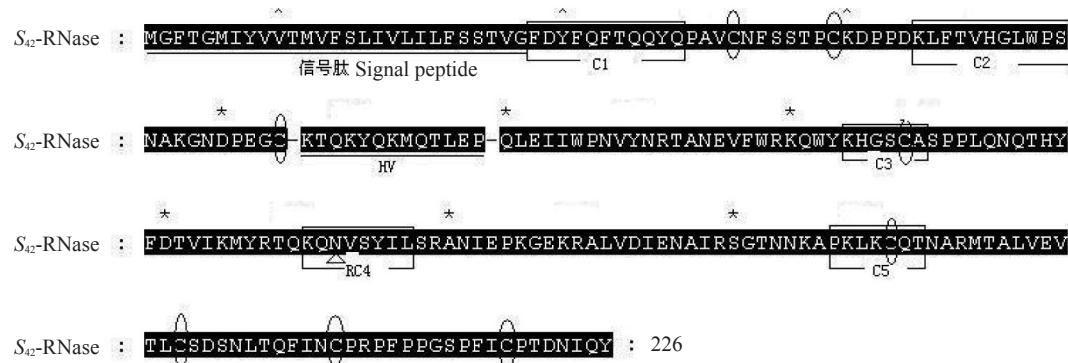


图 2 *S₄₂*-RNase 编码的氨基酸序列

Fig. 2 The amino acid sequence encoded by *S₄₂*-RNase

ceae) *S* 基因所特有的^[27]。

2.2 理化性质及二级结构预测

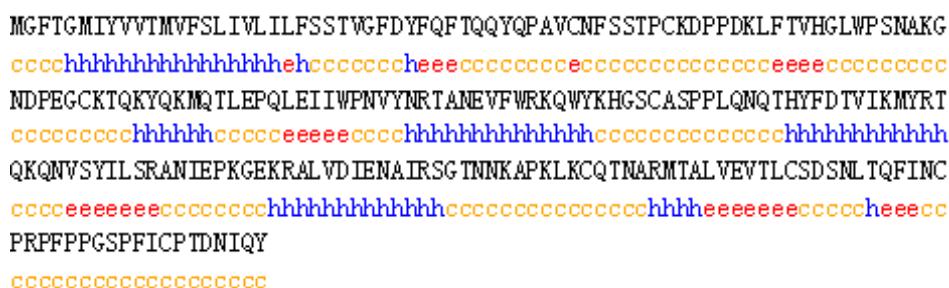
把 *S₄₂*-RNase cDNA 序列提交到 www.expasy.ch/tools/protparam.html, 预测结果显示 *S₄₂*-RNase 编码蛋白质的分子质量为 25 844.6 Da, 等电点(pI)为 8.97, 化学式为 C₁₁₆₃H₁₇₈₃N₃₀₇O₃₃₃S₁₄, 半衰期为 30 h。

用在线蛋白质数据库分析二级结构(图3),结果和已有梨 *S* 基因二级结构相似,均包含主要由 α -螺旋组成的信号肽,且 *S* 基因在授粉过程中进入花粉细胞,在 N 端信号肽引导下向细胞质基质分泌。另外,该二级结构还包含主要由 α -螺旋组成的 C1、RC4 和 C5 疏水区,被认为参与了酶结构的稳定。二

级结构还包含主要由 β -折叠组成的 C2、C3 及 HV 区亲水区。其中 C2 和 C3 区域包含保守的催化组氨酸残基在 RNase 活性中发挥重要作用;C2 和 C3 之间的 HV 区域位于蛋白质表面,被认为支撑了 *S*-RNase 和花粉 *S* 基因决定因素之间的选择性相互作用^[28]。

2.3 梨属植物 *S*-RNase 基因外显子和内含子序列收集及比对

蔷薇科植物自交不亲和的研究多集中于苹果亚科(Maloideae)及李亚科(Prunoideae)植物上。苹果亚科自交不亲和研究主要集中于梨属(*Pyrus*)和苹果属(*Malus*)植物,梨属植物目前已有白梨(*P. bretschneideri* Rehd.)、砂梨、秋子梨(*P. ussuriensis*



c 代表松散结构;e 代表 β -折叠;h 代表 α -螺旋。

c. Coil; e. β -sheet; h. α -helix.

图 3 *S₄₂*-RNase 编码蛋白质的二级结构

Fig. 3 Analysis of the protein encoded by *S₄₂*-RNase gene

Maxim.)、新疆梨(*P. sinkiangensis* Yu.)及西洋梨(*P. communis* L.)克隆出S-RNase基因。截至目前,已从梨属植物中克隆出全长S-RNase基因59条,其中亚洲梨37条,西洋梨22条(表1)。比对发现 S_7 和 S_{27} 、 S_8 和 S_{28} 、 S_{17} 和 S_{34} 、 S_{20} 和 S_{29} 、 S_{35} 和 S_d 以及 S_{21} (*Pyrus communis* L.)和 S_r 等编码区序列两两之间完全相同,去掉冗余序列,共有52条。用MEGA 6.06软件Alignment程序中Align by ClustalW(Condons)进行编码区多序列比对,人工调整多序列比对结果后点击Phylogenetic Analysis(系统发育分析)显示,S-RNase编码区序列长711 bp,有237个密码子,有483个变异位点,占比68%,保守位点222个,简约信息位点(变异至少包括2种类型的核苷酸)394个,单突变位点(变异至少包括2种类型的核苷酸,且在所有序列中只发生1次)位点89个。序列中核苷酸占比为A:32.67%、T:25.58%、C:21.71%、G:20.04%;A+T含量为58.25%,C+G含量为41.75%。转换和颠换的比值为1.01,转换略多于颠换。

梨S-RNase的HV区一直被认为是梨花粉与雌蕊特异性识别的主要区域,而对位于HV区的内含子研究较少。多序列比对结果显示,该区域的内含子序列呈现长度高度的多态性,比对发现其中 S_{35} 和 S_d 、 S_{13} 和 S_m 、 S_{17} 和 S_{34} 、 S_r 和 S_{27} 、 S_{21} (*Pyrus communis* L.)和 S_r 序列HV区插入的内含子序列两两之间完全相同;去掉冗余序列,共有54条HV区内含子序列,其长度由109 bp(S_{30})到3130 bp(S_{25}),符合“GT-AG”边界规则,即DNA序列外显子与内含子的分界线即5'剪辑位点为AG/GTAAGT的保守序列,3'剪辑位点的保守序列为TGCAG/G。所有内含子均为0相位内含子(内含子是处在2个完整的密码间)。通过多序列比对人工调整后,S-RNase基因HV区内含子长3239 bp,有2418个变异位点,占比74%,比编码区占比略高,保守位点502个,简约信息位点1051个,单突变位点405个。内含子序列中核苷酸占比为A:37.61%、T:37.61%、C:12.39%、G:12.39%;A+T含量为75.22%,C+G含量为24.78%。转换和颠换的比值为0.95,颠换略多于转换,与编码区情况相反。

有研究表明,序列的替代速率与其G+C含量成负相关^[29]。内含子的G+C含量低于外显子的G+C含量,说明内含子的替代速率大于相应的外显子的替代速率。

2.4 序列碱基替换的饱和性分析

系统进化树成立的前提是使用的氨基酸或核苷

酸序列包含了生物进化的全部信息。同源DNA的核苷酸碱基发生替换次数太多,其序列包含的系统发育信息大大降低,不能构建系统发育树。因此在构建进化树前,要对序列进行饱和度检测。

用目前常用的方法来检测碱基替换是否达到饱和。以MEGA 6.06遗传距离(P-distance)为横坐标,转换(transitions only, Ts)和颠换(transversions only, Tv)为纵坐标构建二维图。由图4可知,无论是编码序列还是HV区内含子序列,所呈现的均为直线,未出现平台现象,均未达到饱和,其序列构建的进化树能够反映进化历史。

2.5 梨属植物S-RNase基因进化分析

梨属植物S-RNase基因编码区的进化树NJ法、最小进化法(minimum evolution, ME)、最大简约法(maximum parsimony, MP)以及最大似然法(maximum Likelihood, ML)的聚类结果基本一致,这里用NJ进化树来做代表说明。根据构建的NJ进化树(图5)拓扑结构将梨属植物S-RNase基因编码区划分为5个亚类,亚类间基因的遗传分化通常大于亚类内基因的遗传分化。系统发育树显示S-RNase基因并没有以种为界限归类,梨属植物的S-RNase基因应由相同的S-RNase祖先基因分化,且在分歧早期产生了快速多样化。 S_{42} -RNase和 S_2 -RNase编码序列进化关系最近。

梨属植物S-RNase基因HV区内含子序列的NJ、ME、MP以及ML进化树的树形也基本一致。根据构建的NJ进化树(图6)拓扑结构将梨属植物S-RNase基因内含子也划分为5个亚类, S_{42} -RNase HV区内含子与 S_3 -RNase、 S_5 -RNase相应内含子进化关系最近。外显子和内含子进化树的拓扑结构既有不同又有相似的地方,显示二者不是完全各自独立的进化,二者进化可能存在一定的关联。

2.6 梨属植物S-RNase基因的序列分化分析

梨属植物S-RNase基因编码区序列成对的遗传距离(pairwise distances)计算结果见图7。编码区序列成对总平均遗传距离0.200,考虑所有碱基替换和仅考虑非同义替换二者之间的遗传距离分布情况比较相似,而同义替换的遗传距离分布比二者平滑。前二者的序列对的遗传分化在0.200~0.250的占比分别达到52.21%和45.70%,在0.150~0.200的占比分别达到34.54%和42.99%;较小(<0.15)和较大(>0.25)遗传分化的序列对占比均小于10%,由同

表1 梨属植物 *S*-RNase 基因信息
Table 1 Gene Information of *S*-RNase in *Pyrus*

类群 Taxa	<i>S</i> 基因名 <i>S</i> -RNase name	品种 Cultivar	编码区长度 Complete cds/bp	内含子长度 Intron length/bp	GenBank 登录号 GenBank accession
<i>P. pyrifolia</i>	<i>S</i> ₁	今村秋 Imamuraaki 黄花 Huanghua	687	167	AB002139.1 DQ515793.1
<i>P. pyrifolia</i>	<i>S</i> ₂	二十世纪 Nijisseiki	681	1153	AB014073.1
<i>P. pyrifolia</i>	<i>S</i> ₃	长十郎 Chojuro	684	179	AB025421.1
<i>P. pyrifolia</i>	<i>S</i> ₄	二十世纪 Nijisseiki	687	168	AB014072.1
<i>P. pyrifolia</i>	<i>S</i> ₅	长十郎 Chojuro	684	179	AB045711.1
<i>P. pyrifolia</i>	<i>S</i> ₆	今村秋 Imamuraaki 石酥梨 Shisuli	690	147	AB002142.1 MG834536.1
<i>P. pyrifolia</i>	<i>S</i> ₇	晚三吉 Okusankichi	681	152	AB002143.1
<i>P. pyrifolia</i>	<i>S</i> ₈	市原早生 Ichiharawase	687	234	AB104908.1
<i>P. pyrifolia</i>	<i>S</i> ₉	新兴 Shinkou	687	1115	AB104909.1
<i>P. pyrifolia</i>	<i>S</i> ₁₂	懋功 Maogong	681	342	EU117115.1
<i>P. pyrifolia</i>	<i>S</i> ₁₃	懋功 Maogong	684	150	AY249428.2
<i>P. pyrifolia</i>	<i>S</i> ₁₅	苍溪 Cangxi	699	777	EF643630.1
<i>P. bretschneideri</i>	<i>S</i> ₁₆	雪花 Xuehua	687	145	EF643635.1
<i>P. bretschneideri</i>	<i>S</i> ₁₇	大理鸡腿 Dalijitui	687	141	EU101466.1
<i>P. bretschneideri</i>	<i>S</i> ₁₈	金花 Jinhuia	690	1221	EF643636.1
<i>P. bretschneideri</i>	<i>S</i> ₁₉	冰糖 Bingtang	681	251	EF643638.1
<i>P. bretschneideri</i>	<i>S</i> ₂₀	冬黄 Donghuang	687	167	EU360894.1 AY250988.2
<i>P. bretschneideri</i>	<i>S</i> ₂₁	鸭梨 Yali	684	139	AY250989.3
<i>P. communis</i>	<i>S</i> ₂₁	帕斯卡桑 Passe Crassane	684	153	EU477839.1
<i>P. sinkiangensis</i>	<i>S</i> ₂₂	库尔勒香梨 Kuerlexiangli	684	148	KX214125.1
<i>P. pyrifolia</i>		黄长把 Huangchangba 云南宝珠 Yunnan Baozhu			EF643639.1 EF689008.1
<i>P. communis</i>	<i>S</i> ₂₂	居里 Cure	684	179	AB779646.1
<i>P. communis</i>	<i>S</i> ₂₃	约德尔·胜利 Triomphe de Jodoigne	687	145	AB779647.1
<i>P. communis</i>	<i>S</i> ₂₅	Durondeau	684	3130	AB731592.1
<i>P. bretschneideri</i>	<i>S</i> ₂₆	红皮酥 Hongpisu	687	144	EU101463.1
<i>P. bretschneideri</i>	<i>S</i> ₂₇	博山池 Boshanchi	681	152	EF643640.1
<i>P. sinkiangensis</i>	<i>S</i> ₂₈	无 Null	687	227	EF566872.1
<i>P. bretschneideri</i>		冬黄 Donghuang			EU375364.1
<i>P. sinkiangensis</i>		库尔勒香梨 Kuerlexiangli			KX214124.1
<i>P. bretschneideri</i>	<i>S</i> ₂₉	蜜梨 Mili	687	147	EU101462.1
<i>P. ussuriensis</i>	<i>S</i> ₃₀	京白 Jingbai	684	109	EF643641.1
<i>P. ussuriensis</i>	<i>S</i> ₃₂	黄山 Huangshan	687	149	EU336979.1
<i>P. bretschneideri</i>	<i>S</i> ₃₄	鹅梨 Eli	687	143	DQ414813.1
<i>P. pyrifolia</i>		博多青 Boduoqing			DQ269500.1
<i>P. ussuriensis</i>	<i>S</i> ₃₅	早酥梨 Zaosuli	684	169	DQ839240.1
<i>P. pyrifolia</i>	<i>S</i> ₃₇	威宁甘子梨 Weining Ganzili	681	169	KY608876.1
<i>P. bretschneideri</i>	<i>S</i> ₃₈	鹅酥 Esu	699	722	EF643631.2
<i>P. bretschneideri</i>	<i>S</i> ₃₉	雪花 Xuehua	687	328	EU336980.1
<i>P. ussuriensis</i>	<i>S</i> ₄₀	麦梨 Maili	684	176	EU101464.1
<i>P. ussuriensis</i>	<i>S</i> ₄₂	龙香 Longxiang	681	335	EF689006.1
<i>P. pyrifolia</i>		云南宝珠 Yunnan Baozhu			EF689007.1
<i>P. pyrifolia</i>	<i>S</i> ₄₄	火把 Huoba	684	148	KY608875.1 EF643642.1
<i>P. pyrifolia</i>	<i>S</i> ₄₆	惠阳红梨 Huiyang Hongli	687	150	FJ946628.1
<i>P. pyrifolia</i>	<i>S</i> ₄₇	兴山20 Xingshan20	681	243	KP867051.1
<i>P. pyrifolia</i>	<i>S</i> ₅₁	梨园麻子梨 Liyuan Mazili	684	162	KP902677.1
<i>P. communis</i>	<i>S</i> ₁₂₆	无 Null	684	175	KF588567.1
<i>P. communis</i>	<i>S</i> _a	考密斯 Doyenne du Comice	687	145	AB236430.1
<i>P. communis</i>	<i>S</i> _b	考密斯 Doyenne du Comice	681	246	AB236429.1

表1 (续)
Table 1 (Continued)

类群 Taxa	S基因名 S-RNase name	品种 Cultivar	编码区长度 Complete cds/bp	内含子长度 Intron length/bp	GenBank 登录号 GenBank accession
<i>P. communis</i>	Sc	哈蒂 Beurre Hardy	687	134	AB258359.1
<i>P. communis</i>	Sd	日面红 Flemish Beauty	684	169	AB236427.1
<i>P. communis</i>	Se	拉法兰西 La France	699	786	AB236428.1
<i>P. communis</i>	Sg	帕斯卡桑 Passe Crassane	687	1706	AB258360.1
<i>P. communis</i>	Sh	冬香梨 Winter Nelis	684	148	AB236431.1
<i>P. communis</i>	Si	无 Null	684	177	AB258361.1
<i>P. communis</i>	Sk	冬香梨 Winter Nelis	687	1074	AB236432.1
<i>P. pyrifolia</i>	Sk	芳玉 Hogyoku	699	804	AB426606.1
<i>P. communis</i>	Sl	General Leclerc	690	1211	AB236425.1
<i>P. communis</i>	Sm	Chapin	687	150	AB258362.1
<i>P. communis</i>	Sn	无 Null	681	162	AB258363.1
<i>P. communis</i>	Sp	无 Null	684	138	AB258364.1
<i>P. communis</i>	Sq	General Leclerc	687	1083	AB236424.2
<i>P. communis</i>	Sr	拉法兰西 La France	684	153	AB236426.2
<i>P. communis</i>	Ss	Danas Hovay	687	167	AB258365.1
<i>P. communis</i>	St	无 Null	690	1439	AB258366.1

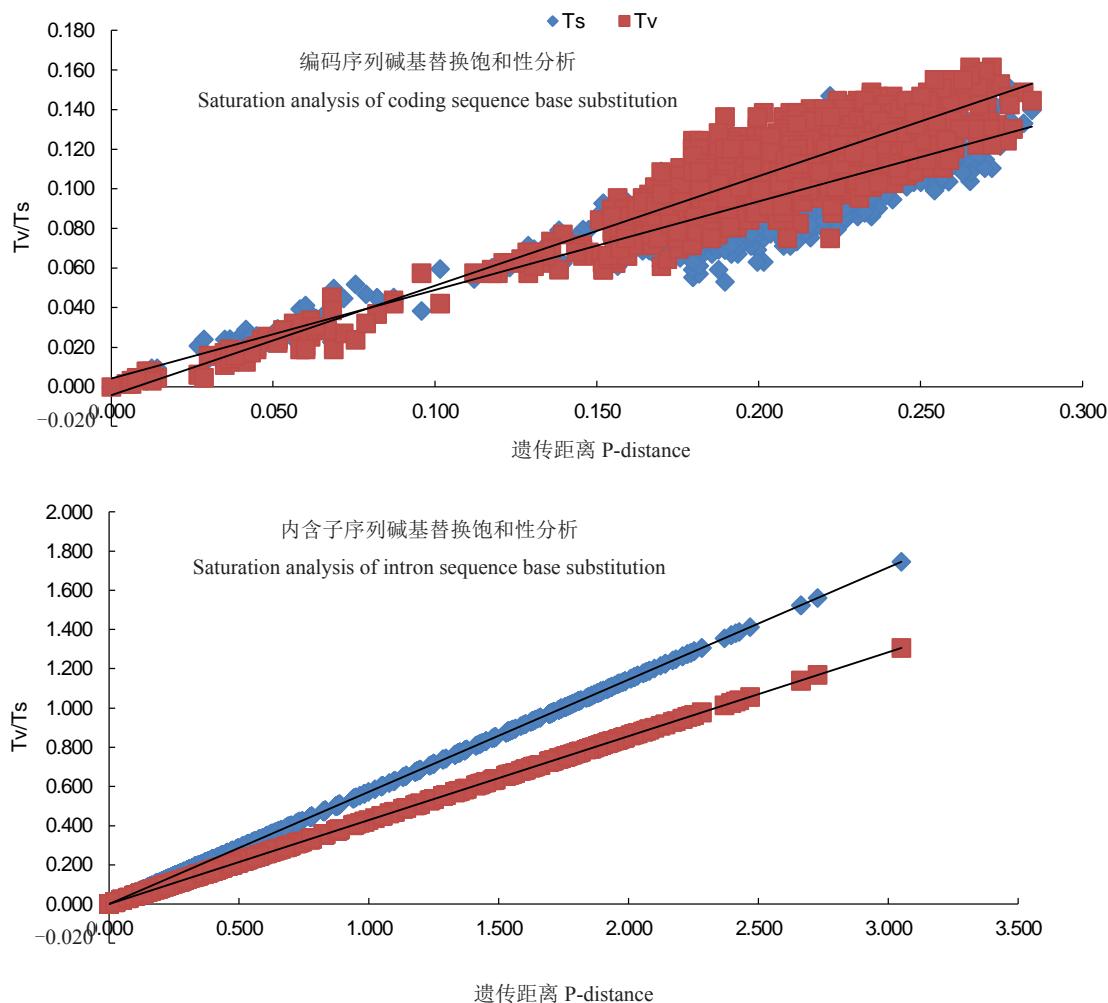


图4 碱基替换饱和性分析
Fig. 4 Saturation analysis of base substitution

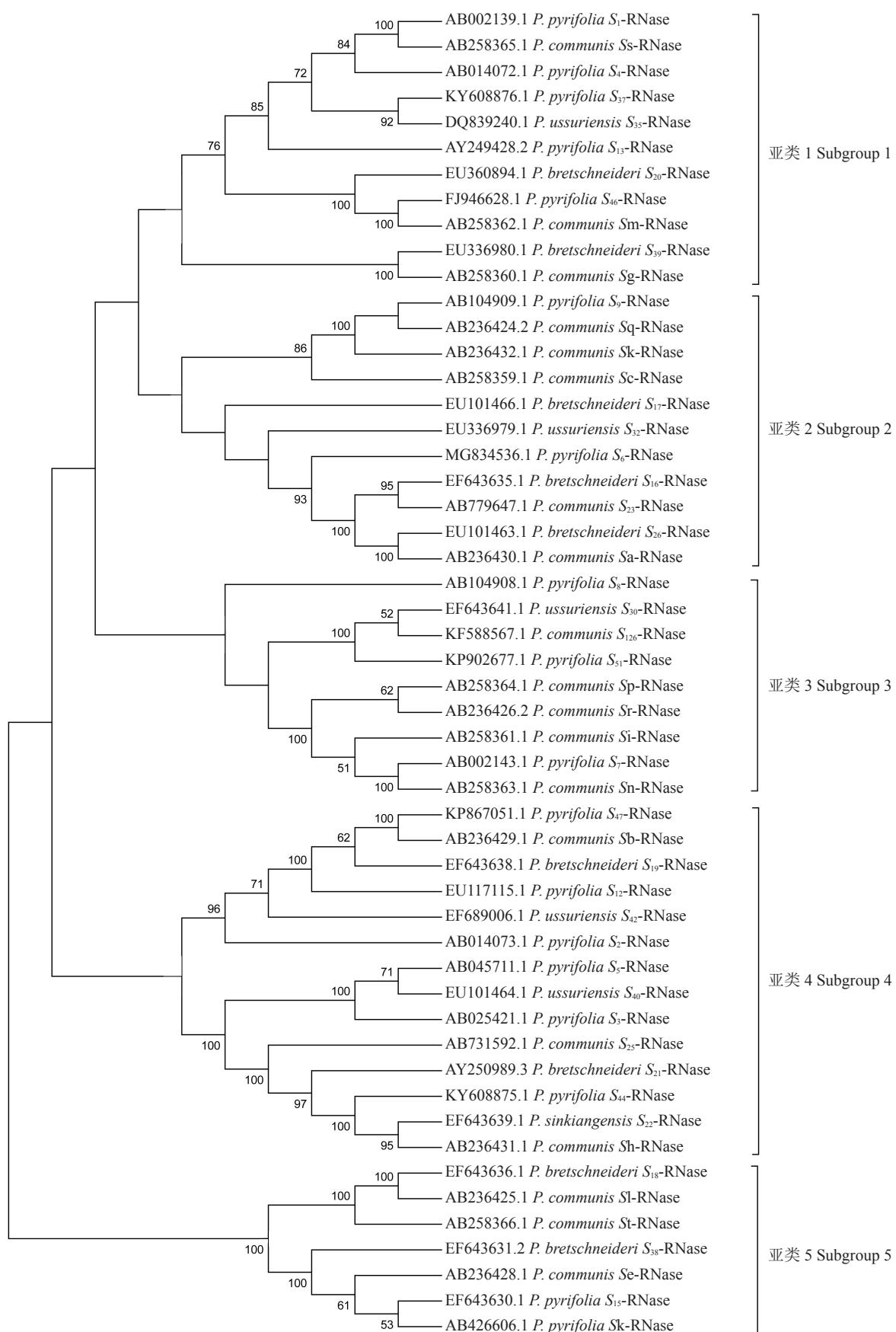


图 5 基于梨 S-RNase 基因编码区的 NJ 系统发育树

Fig. 5 NJ phylogenetic tree based on the coding region of S-RNase gene in pear

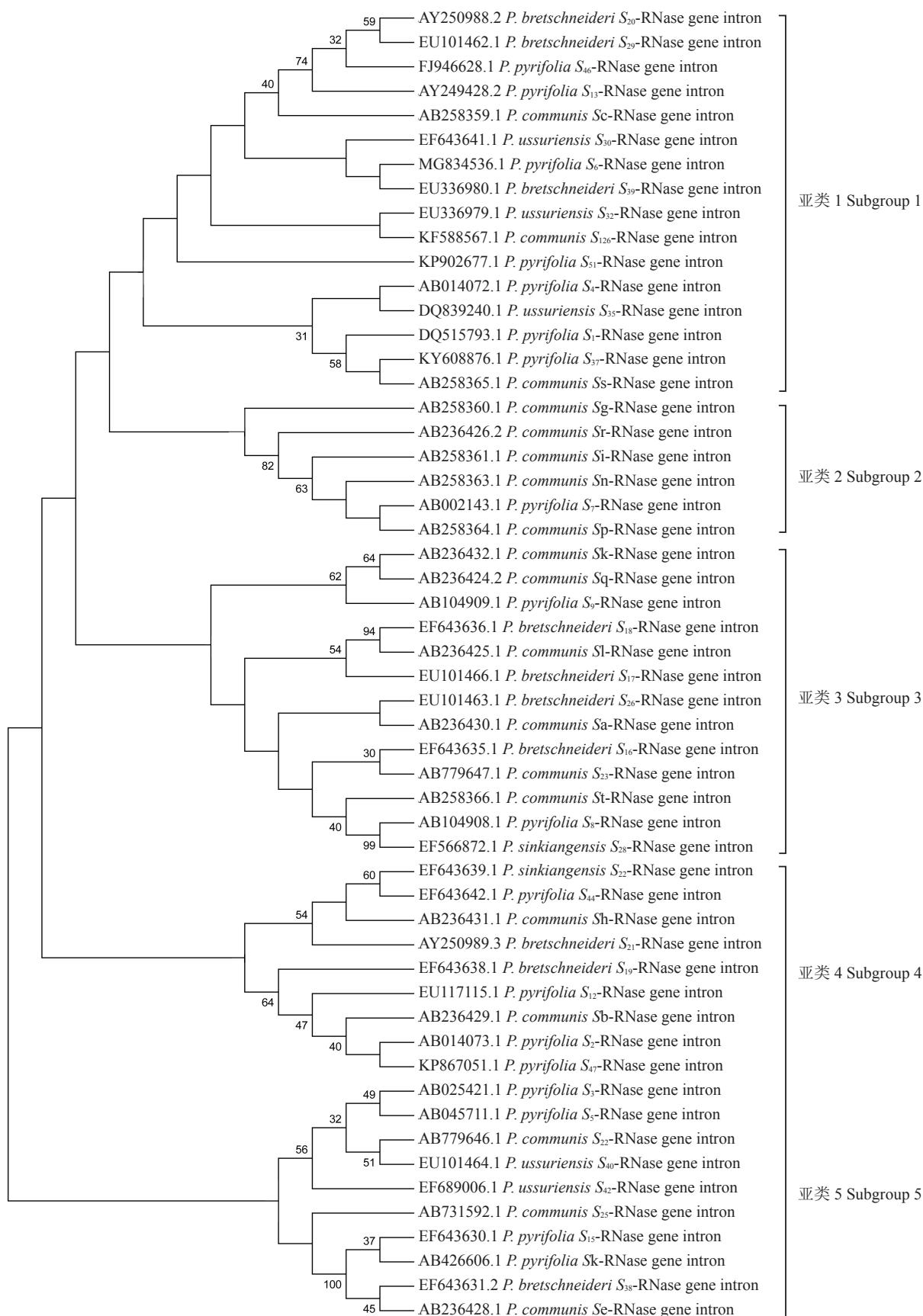


图 6 基于梨 S-RNase 基因 HV 区内含子的 NJ 系统发育树

Fig. 6 NJ phylogenetic tree based on the introns in the HV region of S-RNase gene in pear

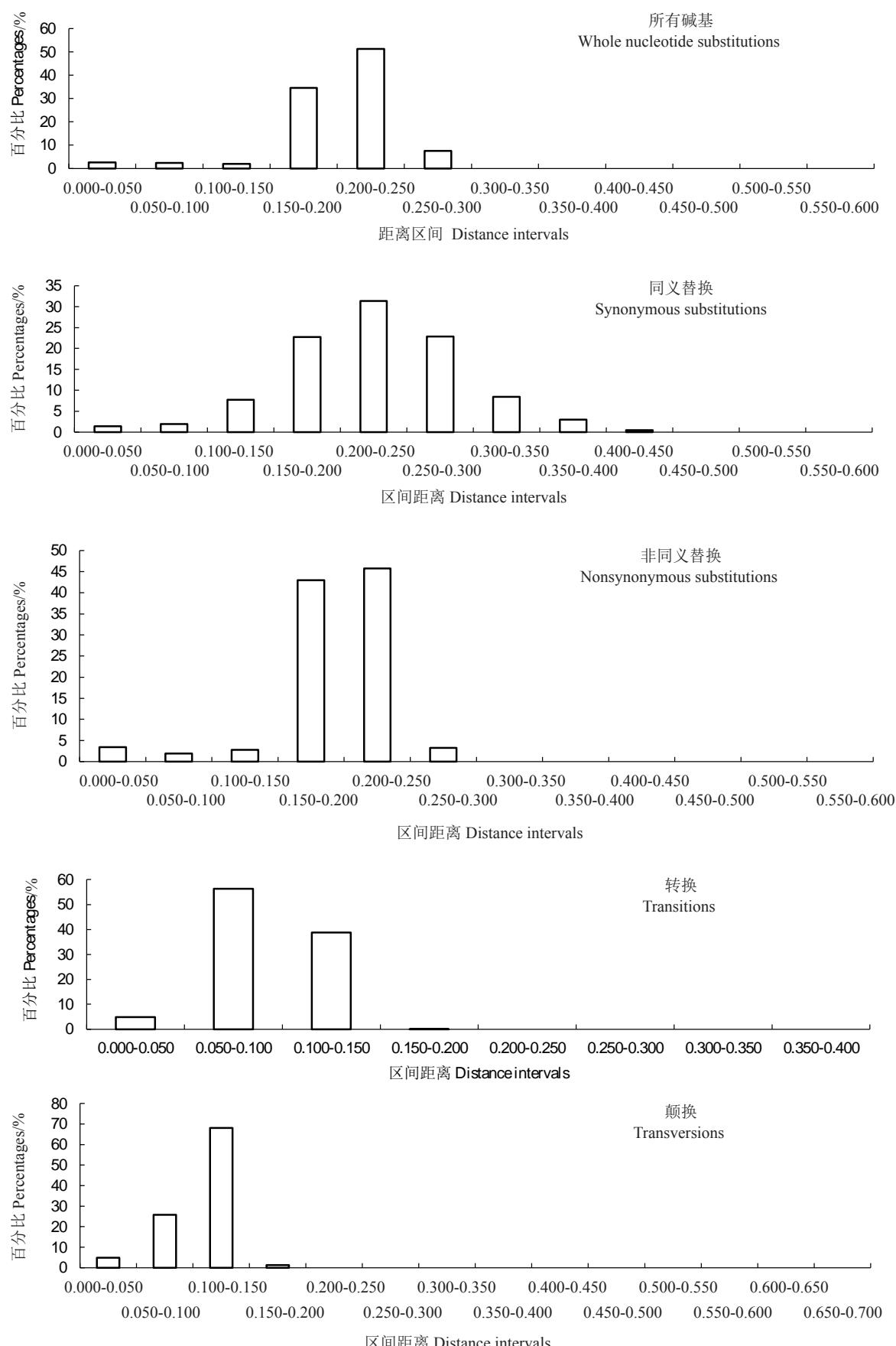


图 7 梨 S-RNase 基因编码区成对遗传距离分布

Fig. 7 The paired genetic distance distribution of pear S-RNase gene coding region

义替换计算的遗传距离在此二者的序列对占比要高于前二者,这符合同义替换中性进化的理论模式。仅考虑转换遗传分化在0.050~0.100占比56.33%、在0.100~0.150占比38.76%,仅考虑颠换遗传分化在0.100~0.150占比68.10%、在0.050~0.100占比25.79%,同义替换和非同义替换的遗传距离分布均比转换和颠换的遗传距离分布平滑。这是由于转换和颠换发生在密码子第3个碱基上时才会发生同义替换,发生在其余2个碱基上会发生非同义替换,转换和颠换发生的概率均大于同义替换和非同义替换所致。

编码区系统发育树将梨属植物S-RNase基因分为5个亚群,计算显示亚群内部的上述3种的遗传分

化分别为0.095~0.163、0.076~0.161和0.149~0.194,亚群之间的遗传分化为0.188~0.238、0.188~0.228和0.196~0.307之间,大于亚群内的分化。

梨属植物S-RNase基因HV区内含子成对的遗传距离计算结果见图8。内含子平均遗传分化距离为0.632,是编码区序列的3倍。考虑所有碱基替换遗传分化在0.200~0.400占比31.79%、在0.000~0.200占比24.04%、其余在0.400~3.500之间;仅考虑转换遗传分化在0.100~0.200占比27.81%、在0.200~0.400占比26.69%;仅考虑颠换遗传分化在0.100~0.200占比32.92%、在0.000~0.100占比28.76%。此数据比编码区对应的距离分布更平滑,且遗传距离的跨度范围更大,说明HV区内含子遗传多样性相

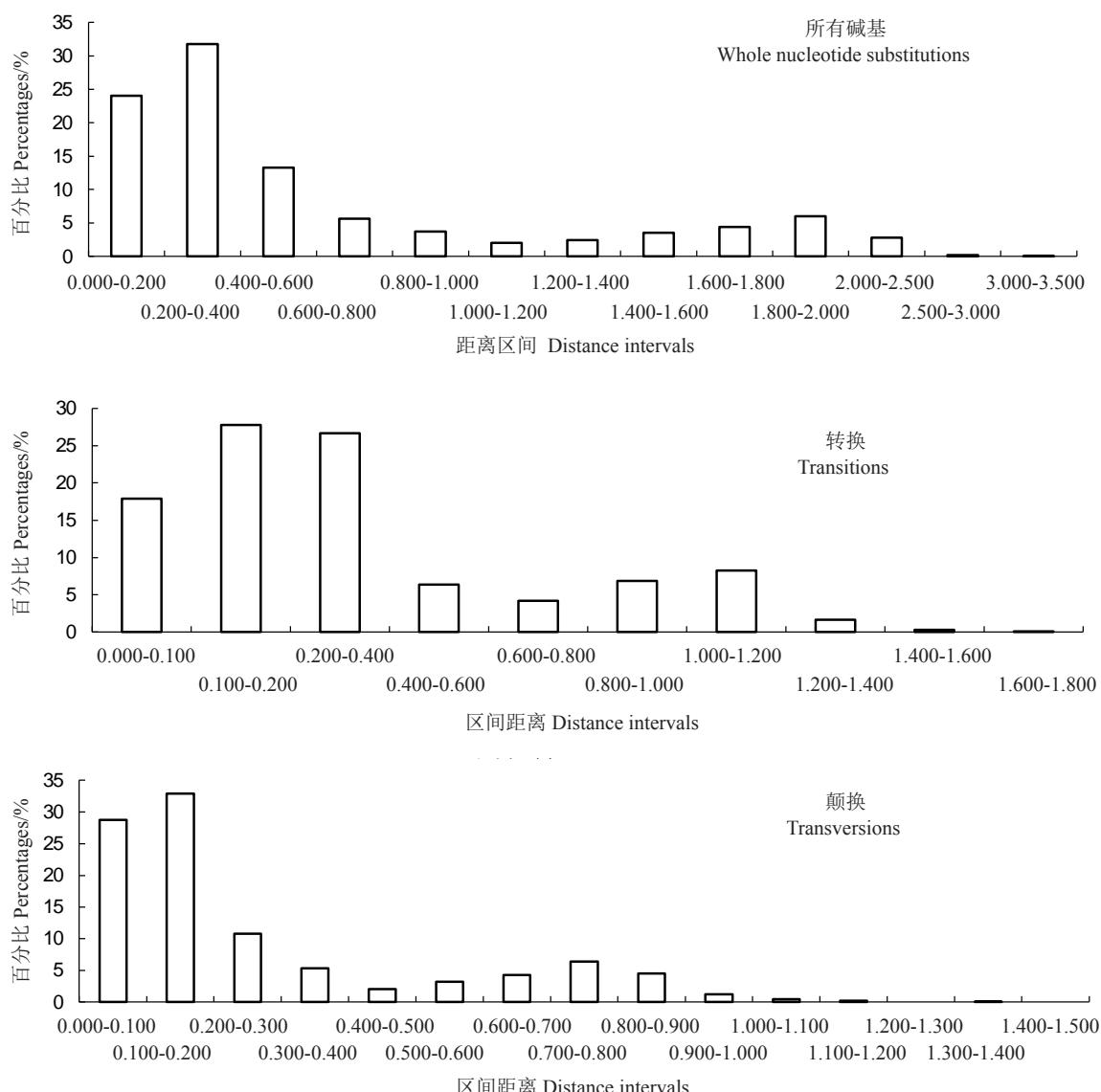


图8 梨S-RNase基因HV区内含子成对遗传距离分布

Fig. 8 The Paired genetic distance distribution of the HV region of S-RNase gene in pear

对编码区较高,在进化的过程中其遗传变异性较大,进化速度较快。另外,HV区内含子序列存在ATAT-TA、AAAACA、AATT、AAAAAA以及其他多个大小不一的保守位点,显示HV区内含子可能存在一定的功能。

系统发育树将梨属植物S-RNase基因HV区内含子分为5个亚群,计算显示亚群内部的上述3种的平均遗传分化分别为0.497、0.215和0.248,亚群之间的遗传分化为0.778、0.390和0.388,大于亚群内的分化。

2.7 梨属不同植物S-RNase基因位点的遗传多态

性和遗传分化

为了获得梨属不同植物S-RNase基因位点的遗传分化情况,对已获得的所有梨属植物的砂梨、白梨、秋子梨以及西洋梨的S-RNase基因位点的遗传多样性进行计算,结果如表2所示。遗传参数(θ)和核苷酸多样性指标(π)这2种多态性指标显示,西洋梨S-RNase基因的遗传多态性高于砂梨,白梨略高于秋子梨。新疆梨基因序列少于3条,不在计算范围。亚洲梨与西洋梨在S-RNase基因位点上的遗传分化见表3。基于3种替换水平估算的遗传分化显

表2 不同梨种S-RNase基因编码区遗传多态性

Table 2 Genetic polymorphism of S-RNase gene coding region in different pear species

多样性指标 Diversity index	类群 Taxa				
	所有梨属物种 All <i>Pyrus</i> species	砂梨 <i>P. pyrifolia</i>	白梨 <i>P. bretschneideri</i>	秋子梨 <i>P. ussuriensis</i>	西洋梨 <i>P. communis</i>
遗传参数 θ	0.174 254	0.174 388	0.188 560	0.185 312	0.176 621
核苷酸多样性指标 π	0.149 933	0.155 735	0.176 610	0.178 042	0.159 672
Tajima检验统计量 D	0.598 938	0.422 896	0.322 430	0.219 038	0.438 296

表3 基于S-RNase基因编码区的东方梨种群与西洋梨之间的遗传分化

Table 3 Genetic differentiation between Asian pear population and western pear population based on S-RNase gene coding region

遗传分化测度 Measures of genetic divergence	类群 Taxa			
	新疆梨 <i>P. sinkiangensis</i>	砂梨 <i>P. pyrifolia</i>	白梨 <i>P. bretschneideri</i>	秋子梨 <i>P. ussuriensis</i>
所有位点遗传分化 All sites distance	0.187	0.202	0.205	0.206
同义位点遗传分化 Synonymous distance	0.194	0.214	0.228	0.222
非同义位点遗传分化 Nonsynonymous distance	0.176	0.192	0.192	0.194

示,新疆梨与西洋梨的遗传分化距离最小,这一数据和新疆梨是西洋梨和亚洲梨的杂交种的新观点相一致^[30]。其他亚洲梨种群和西洋梨的遗传分化距离较大,也很好地印证了亚洲梨和西洋梨独立驯化的路径。

为了寻找影响梨属植物S-RNase基因序列的进化因子,利用MEGA 6.06软件Estimate Selection at Codons(HyPhy)程序估算S-RNase所有密码子对应的平均非同义替换率与同义替换率差值(Normalized $dN-dS$),结果见图9。Normalized $dN-dS=0$,序列之间分歧是中性选择的结果,Normalized $dN-dS>0$ 是正选择效应;Normalized $dN-dS<0$ 是纯化选择的结果。统计显示,51.4%的位点受纯化选择的影响,9.3%的位点受中性选择的结果,剩余39.3%位点是正选择效应。其中,HV区的位点80%为正选择位点,其变化的动力主要来源于适应性氨基酸的改变,

这也验证了HV区是梨雌蕊与花粉间特异识别关键区域的观点。信号肽主要功能是引导合成的蛋白质向分泌通路转移,信号肽区域的位点主要受中性选择和纯化选择的影响,仅有18.52%的位点受主动选择的影响。C1区和C2区的位点主要受中性选择的影响;C3区50%位点受中性选择的影响,33.33%位点受主动选择的影响,16.67%位点受纯化选择的影响;C4区37.5%位点受中性选择的影响,37.5%位点受纯化选择的影响,25%位点受正选择的影响;C5区57.14%位点受中性选择的影响,42.86%位点受主动选择的影响。

对所有梨属植物的砂梨、白梨、秋子梨以及西洋梨的S-RNase基因位点HV区内含子的遗传多样性进行计算,结果如表4所示。 θ 和 π 这2种多态性指标显示,西洋梨S-RNase基因内含子的遗传多态性最小,最高的为秋子梨,其次为白梨和砂梨,这一结

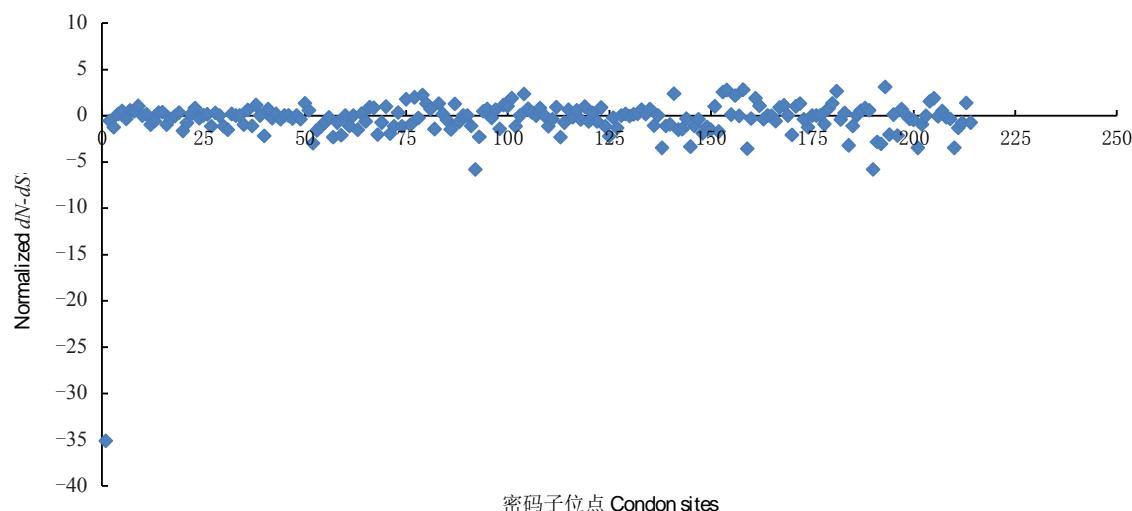


图9 基于密码子位点的S-RNase基因的Normalized $dN-dS$ 分析
Fig. 9 Normalized $dN-dS$ analysis of S-RNase gene based on codon sites

表4 不同梨种S-RNase基因HV区内含子遗传多态性

Table 4 Genetic polymorphism of the introns in the HV region of the S-RNase gene in different pear species

多样性指标 Diversity index	类群 Taxa (内含子 Intron)				
	所有梨属物种 All Pyrus species	砂梨 <i>P. pyrifolia</i>	白梨 <i>P. bretschneideri</i>	秋子梨 <i>P. ussuriensis</i>	西洋梨 <i>P. communis</i>
遗传参数 θ	0.021 635	0.054 954	0.060 473	0.098 220	0.033 361
核苷酸多样性指标 π	0.163 823	0.220 375	0.157 873	0.136 736	0.118 094
Tajima 检验统计量 D	-3.151 170	-3.211 167	-3.092 017	-2.140 089	-3.037 689

果和编码区序列结果相反。新疆梨基因序列少于3条,不在计算范围。亚洲梨与西洋梨在S-RNase基因位点HV区内含子的遗传分化见表5。基于3种替换水平估算的遗传分化显示,新疆梨与西洋梨的遗传分化距离最小,这一数据和编码区结果相

一致,同样支持新疆梨是西洋梨和亚洲梨的杂交种的观点。其他亚洲梨种群和西洋梨的遗传分化距离较大,也很好地印证了亚洲梨和西洋梨独立驯化的路径,这一结果和编码区基本吻合。内含子 $\pi=0.300\ 569$, $\theta=0.204\ 485$, 均高于编码区序列这

表5 基于S-RNase基因HV区内含子的东方梨种群与西洋梨之间的遗传分化

Table 5 Genetic differentiation between Asian pear population and western pear population based on the introns in the HV region of the S-RNase gene

遗传分化测度 Measures of genetic divergence	类群 Taxa (内含子 Intron)			
	新疆梨 <i>P. sinkiangensis</i>	砂梨 <i>P. pyrifolia</i>	白梨 <i>P. bretschneideri</i>	秋子梨 <i>P. ussuriensis</i>
所有位点遗传分化 All sites distance	0.583	0.746	0.637	0.632
转换位点遗传分化 Transitions only distance	0.292	0.374	0.319	0.317
颠换位点遗传分化 Transversions only distance	0.291	0.373	0.318	0.316

2项数值。

3 讨 论

梨属植物自交不亲和的研究人员主要为日本及我国学者。中国学者多数集中于亚洲梨的自交不亲和研究;日本的亚洲梨资源有限,其学者除对日本亚

洲梨研究外,还专注于西洋梨自交不亲和的研究。两国学者研究的热点主要为梨品种S基因型的鉴定、S基因的克隆、鉴定体系的完善,以及花粉S基因的寻找、克隆鉴定。关于梨S基因的进化相关研究还未见系统报道。笔者在本研究中利用苹果亚科S-RNase基因的保守序列特征设计新的特异引物,从

秋子梨品种龙香的基因组 DNA 扩增出了 S_{42} 全长 DNA 序列,该引物也可用于其他梨 S 基因全长 DNA 序列的扩增。新引物的应用改变了原来引物扩增长度的局限性,提高了 S -RNase 基因鉴定的准确性。

梨属植物具有较大经济价值的梨种类有白梨、砂梨、秋子梨、新疆梨及西洋梨等。其中,白梨、砂梨、秋子梨和新疆梨品种分离的 S 基因以阿拉伯数字命名,如 S_1 、 S_2 、 S_3 等。西洋梨品种分离的 S 基因一般以小写英文字母表示,如 S_a 、 S_b 、 S_c 等。后期 2 个体系的命名出现了一定的混淆。GenBank 中登录了 2 个 S_k 、2 个 S_{21} 和 2 个 S_{22} ,分别来自亚洲梨和西洋梨且均为不同的序列,容易让人混淆,因此建议以后的学者沿用最早命名方法。

多数学者认为 HV 区是梨雌蕊与花粉间特异识别的唯一关键区域。最近有学者根据西洋梨自交不亲和的研究成果提出除了 HV 区外,还可能有其他区域在特异识别过程中发挥重要作用的新观点^[31-32]。针对现有的梨属植物 S -RNase 全长编码序列的 Normalized $dN-dS$ 分析显示,除了 HV 区外还有几个区域存在大量的非同义氨基酸替代,表明对阳性选择具有很高的敏感性。这些区域可能也参与梨雌蕊与花粉间的特异识别,这与新观点相吻合。位于 HV 区的内含子序列表现出很高的长度多态性,大小在 109~3130 bp,至今还未有对其用途的研究报道。位于 HV 区内含子的变化是否一定程度上引起了 HV 区编码序列的变化,还需要深入研究。有研究表明,内含子在调控基因表达方面起一定作用,某些梨芽变品种产生自交亲和现象,其 S 基因型并未发生变化,这种现象可能与内含子发生变化有关^[33]。

构建的 S -RNase 序列的编码区序列和 HV 区内含子序列的系统发育树在拓扑结构上有相似的地方,证明内含子可能不是完全独自进化的,与编码区序列进化可能存在一定的关联。梨 S -RNase 基因序列比对发现,梨 S 基因编码区相同的 2 个基因,其 HV 区内含子不完全相同甚至差异很大,编码区不同的 2 个基因却存在其内含子序列完全相同的现象。此现象证明编码区序列和 HV 区内含子序列进化有一定的独立性。编码区序列和 HV 区内含子序列均显示,新疆梨与西洋梨的遗传分化距离最小,这一结果和新疆梨是西洋梨和亚洲梨的杂交种的观点相一致。其他亚洲梨和西洋梨的编码区以及 HV 区

内含子序列遗传分化距离较大,也很好地印证了亚洲梨和西洋梨独立驯化的路径。有学者关于蔷薇科 S 基因进化研究表明,蔷薇科 S 基因的进化早于梨属与苹果属的分化时间,晚于苹果亚科及李亚科的分化时间^[15-16,34]。目前能搜索到的梨属植物 S 基因全长序列构建的系统进化树也进一步验证了此观点。由于梨属植物间不存在生殖隔离,种间杂交普遍,作为和生殖相关的梨 S -RNase 的多态性也与此现象相吻合。最新研究表明,梨 S -RNase 基因的进化速率比梨其他平衡选择基因的进化速率快。研究结论支持快速进化的梨 S -RNase 基因可能导致其高变性,这符合繁殖相关基因显示更高的进化率的理论,这可能有助于加强梨的配子体自交不亲和,促进异交,从而促进不同遗传背景基因型之间的遗传重组^[30]。

梨 S -RNase 编码区对应的平均 Normalized $dN-dS$ 数值表明, S -RNase 基因的编码序列差异是适应氨基酸发生替换的结果,其进化的动力源自 S -RNase 基因具有的编码特异识别蛋白的功能。雌蕊中的 S -RNase 是 S 基因表达的能特异识别及隔绝不亲和花粉的具有 RNase 活性的物质。一种新的 S -RNase 基因的出现必然会因为可以识别更多的花粉 S 基因而得到自然选择的青睐,直至该基因频率达到与原有 S -RNase 的适合度一致为止,然后会再出现新的基因。 S -RNase 基因在花粉受精过程中的识别功能决定了其序列是适应性氨基酸替换的重要区域。编码区的进化可能是梨属植物为将突变保持在一定频率而平衡选择的结果,也可能是由群体收缩所致。已有研究表明,在进化过程中梨属植物 S -RNase 基因几乎没有因为人为干预驯化而产生群体瓶颈效应,因此,编码区进化较为可能是由平衡选择引起的。HV 区内含子进化是由净化选择或群体中存在轻微的不利突变导致,也可能由于群体扩张所引起。内含子长度序列高度的多态性显示出内含子可能受到负选择的压力。

我国梨主要栽培品种的 S 基因型基本鉴定完成,国内学者对于我国众多的其他梨品种特别是野生梨品种 S 基因型的鉴定热度逐渐衰退,目前已鉴定梨品种 500 多个,还有 2500 个品种没有鉴定,新的梨 S 基因的发掘已长期未见报道。我国被誉为梨的发源地,有着众多的梨品种,或为栽培品种,或野生半野生,因此搞清家底才能真正搞清梨 S -RNase 基

因的遗传进化历史。

4 结 论

梨 S_{42} -RNase 自交不亲和基因 DNA 全长序列可以利用特异引物直接扩增,该引物还可用于扩增其他梨 S 基因 DNA 全长序列。结合 DNA 序列和 cDNA 序列分析了梨 S_{42} 基因的序列特点并预测了其二级结构特征。梨属植物 S -RNase 基因进化树分析显示,编码区和 HV 区内含子的进化在相互独立的前提下有一定的关联性。编码区的 Normalized $dN-dS$ 结果分析显示,除了现有的 HV 区外还可能存在别的区域参与梨雌蕊与花粉间的特异识别,因此梨 S 基因不能停留在以 HV 区是否相同来确定是否为新的基因。基于 S -RNase 基因编码区和 HV 区内含子序列遗传分化均支持新疆梨是亚洲梨和西洋梨的杂交种这一结论。

参考文献 References:

- [1] ZUCCHERELLI S, TASSINARI P, BROOTHAERTS W, TAR-TARINI S, DONDINI L, SANSAVINI S. S -allele characterization in self-incompatible pear (*Pyrus communis* L.)[J]. Sexual Plant Reproduction, 2002, 15(3): 153-158.
- [2] SANZOL J, HERRERO M. Identification of self-incompatibility alleles in pear cultivars (*Pyrus communis* L.) [J]. Euphytica, 2002, 128(3): 325-331.
- [3] 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]. Molecules and Cells, 2002, 13(3): 444-451.
- [4] WANG Y, WANG X, SKIRPAN A L, KAO T H. S -RNase-mediated self-incompatibility[J]. Journal of Experimental Botany, 2003, 54(380): 115-122.
- [5] LEE H S, HUANG S, KAO T H. S proteins control rejection of incompatible pollen in *Petunia inflate*[J]. Nature, 1994, 367 (6463): 560-563.
- [6] MURFETT J, ATHERTON T L, MOU B Q, GASSER C S, MC-CLURE B A. S -RNase expressed in transgenic *Nicotiana* causes S -allele-specific pollen rejection[J]. Nature, 1994, 367(6463): 563-566.
- [7] 张校立,艾沙江·买买提,徐叶挺,邓莉,王继勋.梨 S 基因与 S 基因型鉴定的研究进展[J].西北农业学报,2018,27(8): 1077-1087.
ZHANG Xiaoli, Aishajianu Maimaiti, XU Yeting, DENG Li, WAND Jixun. Present advance of S -gene genotype and S -genotypes in pear[J]. Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica, 2018, 27(8): 1077-1087.
- [8] CERTAL A C, SANCHEZ A M, KOKKO H, BROOTHAERTS W, OLIVERA M M, FEIJO J A. S -RNase in apple are expressed in the pistil along the pollen tube growth path[J]. Sexual Plant Reproduction, 1999, 12(2): 94-98.
- [9] WIERSMA P A, WU Z, ZHOU L, HAMPSON C, KAPPEL F. Identification of new self-incompatibility alleles in sweet cherry (*Prunus avium* L.) and clarification of incompatibility groups by PCR and sequencing analysis[J]. Theoretical & Applied Genetics, 2001, 102(5): 700-708.
- [10] CERTAL A C, ALMEIDA R B, OLIVEIRA M M, FEIJÓ J A. Structural and molecular analysis of self-incompatibility almond (*Prunus dulcis*)[J]. Sexual Plant Reproduction, 2002, 15(1): 13-20.
- [11] ISHIMIZU T, INOUE K, SHIMONAKA M, SAITO T, TERAI O, NORIOKA S. PCR-based method for identifying the S -genotypes of Japanese pear cultivars[J]. Theoretical & Applied Genetics, 1999, 98(6/7): 961-967.
- [12] CASTILLO C, TAKASAKI T, SAITO T, NORIOKA S, NAKANISHI T. Cloning of the S_s -RNase (S_s -allele) of Japanese Pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai)[J]. Plant Biotechnology, 2002, 19 (1): 1-6.
- [13] TAKASAKI T, OKADA K, CASTILLO C, MORIYA Y, SAITO T, SAWAMURA Y, NORIOKA N, NORIOKA S, NAKANISHI T. Sequence of the S_s -RNase cDNA and PCR-RFLP system for discriminating S_i to S_s -allele in Japanese pear[J]. Euphytica, 2004, 135(2): 157-167.
- [14] KIM H T, HIRATA Y, KIM H J, NOU I S. The presence of a new S -RNase allele (S_{10}) in Asian pear [*Pyrus pyrifolia* (Burm; Nakai)] [J]. Genetic Resources Crop Evolution, 2006, 53(7): 1375-1383.
- [15] VIEIRA J, FERREIRA P G, AGUIAR N, FONSECA N A, VIEIRA C P. Evolutionary patterns at the RNase based gametophytic self-incompatibility system in two divergent Rosaceae Groups (*Maloideae* and *Prunus*)[J]. BMC Evolutionary Biology, 2010, 10(1): 200.
- [16] MA R C, OLIVEIRA M M. Evolutionary analysis of S -RNase genes from Rosaceae species[J]. Molecular Genetics & Genomics, 2002, 267(1): 71-78.
- [17] 滕元文.梨属植物系统发育及东方梨品种起源研究进展[J].果树学报,2017,34(3):370-378.
TENG Yuanwen. Advances in the research on phylogeny of the genus *Pyrus* and the origin of pear cultivars native to East Asia[J]. Journal of Fruit Science, 2017, 34(3): 370-378.
- [18] 乌云塔娜,谭晓风,毕方铖,曹玉芬,李秀根.中国白梨 S 基因研究 I 7 个品种 S 基因型的确定和 2 个新 S 基因的鉴定[J].中南林学院学报,2005,25(4):7-12.
WUYUN Tana, TAN Xiaofeng, BI Fangcheng, CAO Yufen, LI Xiugen. Studies of Chinese pear S -Gene: determination of 7 cultivars of the s-genotype and identification of two new allele of self-incompatibility of *Pyrus bretschneideri* (Chinese pear)[J]. Journal of Central South Forestry University, 2005, 25(4): 7-12.

- [19] 谭晓风,曾艳玲,乌云塔娜,李秀根,张党权.雪花梨及其亲缘品种S基因型的确定[J].果树学报,2006,23(3):355-358.
TAN Xiaofeng, ZENG Yanling, WUYUN Tana, LI Xiugen, ZHANG Dangquan. Identification of S-genotypes in Xuehuali pear and its relative cultivars[J]. Journal of Fruit Science, 2006, 23(3):355-358.
- [20] TAN X F, ZHANG L, WUYUN T N, YUAN D Y, CAO Y F, JIANG A F, LIANG W J, ZENG Y L. 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.
- [21] TAN X F, ZHANG L, YUAN D Y, ZENG Y L, JIANG A F. Cloning and sequence analysis of full length cDNA encoding S_{16} -RNase from 'Xuehua' pear (*Pyrus bretschneideri* Rehd.) [J]. Journal of Zhejiang University (Agriculture & Life Sciences), 2008, 34(2):149-157.
- [22] 张好艳,吴俊,衡伟,张绍铃.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.
ZHANG Yuyan, WU Jun, HENG Wei, ZHANG Shaoling. Identification of S-genotypes of pear cultivars and analyses of nucleotide sequences of S_{28} -RNase and S_{30} -RNase[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2006, 33(3):496-500.
- [23] 张好艳,张绍铃,吴俊,张瑞萍,李秀根.八月酥等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.
ZHANG Yuyan, ZHANG Shaoling, WU Jun, ZHANG Ruiping, LI Xiugen. Identification of S-genotypes in 14 pear cultivars[J]. Journal of Fruit Science, 2007, 24(2):135-139.
- [24] GU Q Q, ZHANG Q L, HU H J, CHEN Q L, LUO Z R. Identification of self-incompatibility genotypes in some sand pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai) by PCR-RFLP analysis[J]. Agricultural Sciences in China, 2009, 8(2):154-160.
- [25] 谭慧,谭晓风,江南,邓靖,王楚正.梨自交不亲和基因cDNA芯片杂交条件优化及应用[J].生物技术,2017,27(1):58-64.
TAN Hui, TAN Xiaofeng, JIANG Nan, DENG Jing, WANG Chuzheng. Optimization and application of pear self-incompatibility gene cDNA microarray hybridization assay[J]. Biotechnology, 2017, 27(1):58-64.
- [26] 乌云塔娜,张党权,谭晓风.梨不同DNA提取方法的效果研究[J].中国生物工程杂志,2003,23(7):98-101.
WUYUN Tana, ZHANG Dangquan, TAN Xiaofeng. Studies on methods of isolating pear DNA[J]. China Biotechnology, 2003,
- 23(7):98-101.
- [27] SASSA H, NISHIO T, KOWYAMA Y, HIRANO H, KOBA T, IKEHASHI H. Self-incompatibility (S) alleles of the rosaceae encode members of a distinct class of T/S ribonuclease superfamily[J]. Molecular & General Genetics, 1996, 250(5): 547-557.
- [28] MATTON D P, MAES O, LAUBLIN G L, QIN X K, BERTRAND C, MORSE D, CAPPADOCIA M. Hypervariable domains of self-incompatibility RNases mediate allele specific pollen recognition[J]. The Plant Cell, 1997, 9(10):1757-1766.
- [29] 王宁,陈润生.基于内含子和外显子的系统发育分析的比较[J].科学通报,1999,44(19):2095-2102.
WANG Ning, CHEN Runsheng. Comparison of phylogenetic analysis based on introns and exons[J]. Chinese Science Bulletin, 1999, 44(19): 2095-2102.
- [30] WU J, WANG Y T, XU J B, KORBAN S S, FEI Z J, TAO, S T, MING R, TAI S S, KHAN A M, POSTMAN J D, GU C, YIN H, ZHENG D M, QI K J, LI Y, WANG R Z, DENG C H, KUMAR S, CHAGNÉ D, LI X L, WU J Y, HUANG X S, ZHANG H P, XIE Z H, LI X, ZHANG M Y, LI Y H, YUE Z, FANG X, LI J M, LI L T, JIN C, QIN M F, ZHANG J Y, WU X, KE Y Q, WANG J, YANG H, ZHANG S L. Diversification and independent domestication of Asian and European pears[J]. Genome Biology, 2018, 19(1):77.
- [31] ZISOVICH A H, STERN R A, SAPIR G, SHAFIR S, GOLDWAY M. The RHV region of S-RNase in the European pear (*Pyrus communis*) is not required for the determination of specific pollen rejection[J]. Sexual Plant Reproduction, 2004, 17(30): 151-156.
- [32] CLAESSEN H, KEULEMANS W, POEL B V, STORME N D. Finding a compatible partner: Self-incompatibility in European pear (*Pyrus communis*); molecular control, genetic determination and impact on fertilization and fruit set[J]. Frontiers in Plant Science, 2019, 10:407.
- [33] 聂玉敏,刘宏德,孙啸.调控真核基因表达的非编码序列[J].生物物理学报,2013,29(4):249-265.
NIE Yumin, LIU Hongde, SUN Xiao. Non-Coding sequences regulating eukaryotic gene expression[J]. Acta Biophysica Sinica, 2013, 29(4): 249-265.
- [34] IGIC B, KOHN J R. Evolutionary relationships among self-incompatibility RNases[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2001, 98(23): 13167-13171.