

# 梨花粉自交不亲和基因克隆及其评价分析

梁文杰<sup>1</sup>, 乌云塔娜<sup>2,3</sup>, 谭晓风<sup>3</sup>

(<sup>1</sup>温州科技职业学院, 浙江温州 325006; <sup>2</sup>中国林业科学研究院经济林研究所, 郑州 450003;

<sup>3</sup>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)

**摘要:**【目的】获得梨SFBB新基因全长序列, 研究不同SFBB基因参与梨自交不亲和的作用。【方法】设计特异性引物扩增梨SFBB22-gamma基因组DNA全长序列, 并对所有已鉴定、能够与梨S-RNase基因一一对应的SFBB基因全长序列进行比较分析。【结果】梨SFBB22-gamma基因编码区序列大小为1191 bp, 编码396个氨基酸, ProtParam预测分子质量为45.47 ku, 理论等电点4.67, 为酸性亲水不稳定蛋白。其中N端包含由50个氨基酸组成的F-box序列, 蛋白质二级结构有5个 $\alpha$ -螺旋和24个 $\beta$ -折叠。不同梨SFBB基因和对应S-RNase基因在序列变异、基因多态性以及进化特性等方面存在差异。【结论】现有序列数据显示, 梨SFBB基因的序列多态性和变异位点均小于S-RNase。梨SFBB基因4个群体中单个群体SFBB-beta基因和对应S-RNase基因在序列特征上最接近; 4个梨SFBB基因个体作为整体与对应S-RNase基因序列特征比SFBB-beta基因和对应S-RNase基因序列特征更接近。SFBB-beta基因存在独自参与自交不亲和的可能性, SFBB-alpha以及SFBB-gamma基因不存在独自参与自交不亲和的可能性。

**关键词:** 梨; 自交不亲和性; SFBB基因; 共同进化

中图分类号: S661.2

文献标志码: A

文章编号: 1009-9980(2022)06-0905-15

## Cloning and evaluation of *S* locus F-box brother genes in genus *Pyrus* plants

LIANG Wenjie<sup>1</sup>, WUYUN Tana<sup>2,3</sup>, TAN Xiaofeng<sup>3</sup>

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

**Abstract:** 【Objective】 In order to avoid self-pollination in the evolution process of Rosaceae, self-incompatibility is common. Studies have shown that the self-incompatibility of Rosaceae Maloideae *Pyrus* is achieved by the interaction of the pistil S-RNase gene and the pollen SFBB gene. In order to obtain the full-length sequence of the new pear SFBB gene, the situation of different pear SFBB genes involved in self-incompatibility was clarified, and the SFBB gene type that was more compatible with pear S-RNase gene was found. 【Methods】 DNA was extracted from the leaves of Yunnan Baozhu pear, Fu'an Jianba pear, and Pitai pear varieties, and specific primers were designed based on the conserved characteristics of the SFBB-gamma gene sequence of the Maloideae *Pyrus*, and the pear SFBB22-gamma genomic DNA Full-length sequence was amplified by PCR. The full-length sequences of all the isolated and identified SFBB-alpha, SFBB-beta, SFBB-gamma and SFBB-epsilon genes that can correspond one-to-one with the pear S-RNase gene were compared and analyzed. The two are respectively based on the physical and chemical properties of the gene, the proportion of variant sites, the proportion of different nucleotide compositions, the ratio of conversion and transversion, the pairwise genetic distance of the coding region sequence and the genetic diversity index, Tajima's Neutrality Test D value, positive position The proportion of points, the proportion of neutral loci and the number of consecutive positive loci were compared and analyzed. 【Results】 The size of the coding region of pear SFBB22-

收稿日期: 2022-02-28

接受日期: 2022-04-01

基金项目: 国家自然科学基金项目(31000309)

作者简介: 梁文杰, 男, 讲师, 硕士, 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

gamma gene was 1191 bp, encoding 396 amino acids; the predicted molecular weight of ProtParam was 45.47 ku; the theoretical isoelectric point was 4.67 and thus it might be an acid-hydrophilic unstable protein. The N-terminus contained an F-box sequence consisting of 50 amino acids. The protein secondary structure had 5  $\alpha$ -helices and 24  $\beta$ -sheets. The  $\alpha$ -helix was mainly distributed in the F-box region, and the  $\beta$ -sheet was scattered throughout the protein. At present, a total of 52 full-length CDS sequences of SFBB gene corresponding to pear *S*-RNase gene have been registered in the NCBI database, including 15 SFBB-alpha, 10 SFBB-beta, 24 SFBB-gamma, and 3 SFBB-epsilon, corresponding to 30 full-length CDS sequences of pear *S*-RNase genes. Different SFBB gene in NJ phylogenetic trees were clustered into 4 subgroups, and there was no clustering with species as the boundary; the corresponding pear *S*-RNase gene did not have obvious clustering with species as the unit either. The prediction of protein physicochemical properties showed that the proteins encoded by the pear SFBB-alpha, SFBB-beta, SFBB-gamma and SFBB-epsilon genes were all acidic proteins, and the basic proteins encoded by the pear *S*-RNase gene were theoretically attracted by positive and negative charges. At the same time, the proteins encoded by both were hydrophilic proteins with similar thermal stability. The molecular weight of the protein encoded by SFBB was about 1.75 times that of the protein encoded by the corresponding *S*-RNase gene. There was a theoretical possibility of interaction. The SFBB-alpha, SFBB-beta, SFBB-gamma and SFBB-epsilon genes of pear plants were highly conserved. Further research and analysis showed that the pear SFBB-alpha, SFBB-gamma and SFBB-epsilon genes had the same correlation with the corresponding *S*-RNase. There was less evidence of gene co-evolution, and these SFBB genes exhibited lower sequence variation, less positive selection, and lower gene polymorphisms. The SFBB-beta gene showed a higher level of sequence diversity, although it was still lower than that shown by the corresponding *S*-RNase gene. If the four subtypes of pear SFBB gene are considered as a whole, the above indicators and corresponding *S*-RNase conditions are better than those of SFBB-alpha, SFBB-gamma, SFBB-epsilon and SFBB-beta genes. **【Conclusion】** The design of specific primers can directly amplify the full-length sequence of pear SFBB gene. At present, this technology still has the defect of poor primer versatility and needs to be further improved. Finding a method comparable to amplifying the full-length sequence of the pear *S*-RNase gene is the key to the study of the pear SFBB gene. The existing SFBB gene full-length sequence family that can correspond one-to-one with the pear *S*-RNase gene has 4 members, and the sequences between each member are relatively conservative. All are smaller than *S*-RNase. Existing data show that pear SFBB-beta gene may participate in self-incompatibility alone, and pear SFBB-alpha and SFBB-gamma genes may not participate in self-incompatibility alone. From a theoretical point of view, whether all the four SFBB gene subtypes are involved in self-incompatibility or whether SFBB-beta alone is involved in self-incompatibility needs more research to verify.

**Key words:** Pear; Self-incompatibility; *S*-locus F-box brother genes; Co-evolution

蔷薇科植物在进化过程中为了避免自花授粉,普遍存在自交不亲和现象<sup>[1]</sup>。研究表明其自交不亲和和由雌蕊 *S*-RNase 基因和花粉 SFB (*S* haplotype specific F-box gene) 或 SFBB (*S* locus F-box brothers) 基因相互作用实现<sup>[2]</sup>。有研究显示苹果亚科 (Maloideae) 梨属 (*Pyrus*) 植物砂梨<sup>[3]</sup> (*Pyrus pyrifolia*)、新疆梨<sup>[3]</sup> (*P. sinkiangensis*)、西洋梨<sup>[3]</sup> (*P. communis*)、秋子梨<sup>[3]</sup> (*P. ussuriensis*)、白梨 (*P. bretschneideri*)<sup>[3]</sup>、野生

梨 (*P. pyrastrer*)<sup>[4]</sup>、苹果属 (*Malus*) 植物苹果 (*M. domestica*)<sup>[5]</sup>、野苹果 (*M. sylvestris*)<sup>[5]</sup>、新疆野苹果 (*M. sieversii*)<sup>[5]</sup>、窄叶海棠 (*M. angustifolia*)<sup>[5]</sup>、楸子 (*M. prunifolia*)<sup>[5]</sup>、陇东海棠 (*M. kansuensis*)<sup>[5]</sup>、锡金海棠 (*M. sikkimensis*)<sup>[5]</sup>、毛山荆子 (*M. mandshurica*)<sup>[5]</sup>、海棠 (*M. spectabilis*)<sup>[5]</sup>、变叶海棠 (*M. toringoides*)<sup>[5]</sup>、花叶海棠 (*M. transitoria*)<sup>[5]</sup>、山荆子 (*M. baccata*)<sup>[6]</sup>、丽江山荆子 (*M. rockii*)<sup>[6]</sup>、锡金海棠 (*M. sikkimensis*)<sup>[6]</sup>、八

棱海棠(*M. micromalus*)<sup>[6]</sup>、杂种海棠(*M. hybrid*)<sup>[7]</sup>、花楸属(*Sorbus*)植物欧亚花楸(*S. aucuparia*)<sup>[8]</sup>、山楂属(*Crataegus*)植物山楂(*C. pinnatifida*)<sup>[9]</sup>、单山楂(*C. monogyna*)<sup>[10]</sup>、枇杷属(*Eriobotrya*)植物枇杷(*E. japonica*)<sup>[11]</sup>已克隆出了 *S*-RNase 基因;李亚科(*Prunoideae*)李属(*Prunus*)植物李(*P. salicina*)<sup>[12]</sup>、扁桃(*P. dulcis*)<sup>[12]</sup>、杏(*P. armeniaca*)<sup>[12]</sup>、梅(*P. mume*)<sup>[12]</sup>、甜樱桃(*P. avium*)<sup>[12]</sup>、酸樱桃(*P. cerasus*)<sup>[12]</sup>、大岛樱(*P. speciosa*)<sup>[12]</sup>、樱桃(*P. pseudocerasus*)<sup>[13]</sup>以及桃(*P. persica*)<sup>[14]</sup>也克隆出了 *S*-RNase 基因。

蔷薇科 *S*-RNase 基因的分离技术已经比较成熟,其作用机制和进化研究也已经比较深入<sup>[1-14]</sup>,但蔷薇科花粉自交不亲和控制基因的研究进展较慢。花粉自交不亲和基因研究最先在李亚科植物中取得实质性进展。Ushijima 等<sup>[15]</sup>从扁桃中分离出在花粉中特异表达且具有较高序列多态性的 *SFB* 基因,Entani 等<sup>[16]</sup>从梅中分离出了具有较高序列多态性在花粉中特异表达的 *SLF*(*S*-locus F-box)基因,比较发现二者是同一基因。研究者通过自交亲和的甜樱桃、扁桃品种与自交不亲和品种进行对比发现,自交亲和品种的 *SFB* 基因发生变异从而无法编码完整蛋白,从侧面印证了 *SFB* 是花粉自交不亲和决定基因<sup>[17-19]</sup>。

蔷薇科苹果亚科梨属花粉自交不亲和基因研究进展缓慢。1993年 Sassa 等<sup>[20]</sup>研究发现控制梨雌蕊和花粉的自交不亲和基因是不同的基因,2007年 Sassa 等<sup>[21]</sup>才从苹果和日本梨中分离出 *MdSFBB3-a*、*PpSFBB4-a* 等 10 个花粉自交不亲和相关 *SFBB* 基因。2010年 Franceschi 等<sup>[22]</sup>从 2 个西洋梨品种中分离出 *SFBB $\alpha$ -AF1*、*SFBB $\alpha$ -MRB1* 等 15 个 *SFBB* 基因,并对其在染色体上位置以及连锁情况进行了研究,二者在研究中均发现梨 *S* 基因座包含多个花粉相关基因。2009年国内学者张琳等<sup>[23]</sup>、2010年乌云塔娜等<sup>[24]</sup>先后从中国梨品种中分离出新的 *SFBB*- $\gamma$  基因,并分析发现该基因具有高度的同源性。2015年 Aguiar 等<sup>[14]</sup>以及 2019年 Claessen 等<sup>[25]</sup>对梨自交不亲和机制进行研究,发现其不同于李亚科自交不亲和单一花粉 *S* 基因的模式。截至目前,梨属植物砂梨、白梨、秋子梨、新疆梨以及西洋梨中均克隆出了 *SFBB* 基因<sup>[20-24]</sup>,但梨花粉 *SFBB* 基因的实际数量和所起的作用尚不明确。为了研究梨 *SFBB* 基因序列变异、基因多态性以及进化特性等特征,笔者从 3 个梨品种中分离鉴定出一个新的梨 *SFBB* 基因。同

时,对所有已分离鉴定的能够和梨 *S*-RNase 基因一一对应起来的 *SFBB* 基因全长序列进行比较分析。新的梨花粉自交不亲和基因的克隆丰富了梨花粉自交不亲和基因的资源,对现有梨花粉自交不亲和相关基因的分析评价有助于进一步找出梨自交不亲和基因现象中起主导作用的花粉 *S* 基因。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验材料

春季采摘云南宝珠梨(*P. pyrifolia* ‘Yunnan baozhu’)、福安尖把梨(*P. ussuriensis* Maxim. ‘Fu’an Jianba’)、皮胎梨(*P. ussuriensis* Maxim. ‘Pitai’)的嫩叶置于液氮灌中带回备用。

### 1.2 试验方法

1.2.1 基因特异扩增 试剂材料有 TaKaRa 公司的 *ExTaq*、*pMD18-T Vector*, 梨叶片基因组 DNA 采用 CTAB(Cetyltriethyl ammonium bromide)法提取备用。根据已有梨 *SFBB*- $\gamma$  基因的保守性设计 5’端特异引物 PF2:5’-tgtgtaattcatgtgcatgg-3’, 3’端包含终止密码子的反向引物 PR:5’-tggaacgtttccctcaactc-3’。PCR 条件:40 ng DNA, 0.4  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  引物, 200  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  dNTP, 1 $\times$ PCR Buffer, 1 U of *ExTaq* (TaKaRa), 灭菌纯水加至 20  $\mu\text{L}$ , 进行 PCR 扩增:94  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 个循环 15 s, 55  $^{\circ}\text{C}$  退火 15 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 1.5 min, 最后在 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 3 min。PCR 产物被克隆到质粒载体中测序。

1.2.2 基因序列分析 利用 DNASTar 软件进行基因 DNA 序列分析,并利用 NCBI 进行同源性搜索分析。

1.2.3 梨 *SFBB* 基因和对应 *S*-RNase 基因系统发育和序列分析 从 NCBI 中搜索已登录的能够相互对应的梨 *SFBB* 和 *S*-RNase 基因全长序列,找出其编码序列,利用 MEGA 6.06 软件自带程序分别进行多序列比对,并进行人工调整后采用邻接法(NJ)构建以 1000 次 Bootstrap 做可靠性验证的梨 *SFBB* 基因和对应 *S*-RNase 基因编码区的系统发育树,分别找出序列适用最优模型,借助模型和算法分别计算二者序列间的分化以及遗传多态性,对以上结果进行比较分析,用同样的方法对梨 *SFBB* 基因 4 个主要群体和对应的 *S*-RNase 基因进行分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 梨新 *SFBB*- $\gamma$ 基因序列分析

据前人的研究<sup>[26-28]</sup>,云南宝珠梨、福安尖把梨和

皮胎梨品种的S基因型分别为 $S_{22}S_{42}$ 、 $S_{16}S_{22}$ 和 $S_{22}S_{43}$ ，设计的特异引物从3个梨品种中均只能克隆出1个大小为1227 bp的基因，且3个基因序列完全一致，该基因编码区序列大小为1191 bp，DNASTAR MegAlign By Jotun Hein Method显示编码的氨基酸序列和已有的梨SFBB-gamma序列的同源率为96.0%~99.0%，最高为PpSFBB2-gamma (BAF79627.1)，仅有4处氨基酸的差异，最低的为SFBB21-gamma (ABZ81686.1)和SFBB28-gamma (ABZ81685.1)，也仅有16处氨基酸差异。3个梨品种具有共同的 $S_{22}$ -RNase基因，因此将克隆的基因命名为SFBB22-gamma (EU081887.1)。推导梨SFBB22-gamma基因编码氨基酸序列符合梨SFBB-gamma基因共有的一级结构特征：编码区序列大小为1191 bp，编码396个氨基酸，ProtParam预测分子质量为45.47 ku，理论等电点4.67，酸性氨基酸残基总数为60，碱性氨基酸残基总数为35，表明其为酸性蛋白质；分子式 $C_{2053}H_{3108}N_{500}O_{619}S_{24}$ ；不稳定性指数为40.62，属于不稳定蛋白，脂肪系数为85.86，总平均亲水性为-0.160，为亲水蛋白。其中N端包含由50个氨基酸组成的F-box。蛋白质二级结构分析表明，该基因编码蛋白的 $\beta$ -折叠和线圈的比例都高于 $\alpha$ -螺旋。蛋白质结构预测SFBB22-gamma基因有5个 $\alpha$ -螺旋和24个 $\beta$ -折叠， $\alpha$ -螺旋主要分布于F-box区域， $\beta$ -折叠则散布于整个蛋白质，和*P. dulcis*中SFBk蛋白预测的二级结构相似<sup>[29]</sup>。

## 2.2 梨SFBB基因和对应S-RNase基因数据分析

### 2.2.1 梨SFBB基因和对应S-RNase基因进化分析

目前，NCBI数据库中共登录能和梨S-RNase基因对应起来的SFBB基因全长CDS序列52个，其中SFBB-alpha 15个，SFBB-beta 10个，SFBB-gamma 24个，SFBB-epsilon 3个，对应的梨S-RNase基因全长CDS序列共30个。不同的梨SFBB基因NJ进化树分别聚成4个亚类(图1)，而亚类内部除了epsilon均为西洋梨数据无法看出，其余亚类没有出现明显的以种为界限的聚类现象；对应梨S-RNase基因也没有明显地以种为单位的聚类现象(图1)，SFBB 4个亚类间的同源率为73.8%~99.9%；对应S-RNase间的同源率为76.0%~99.7%。二者进化树没有出现明显相似的聚类。

若将梨SFBB基因4个亚类归为一个整体来看，则梨SFBB编码区序列长1227 bp，包含409个密码

子，544个变异位点，占比44.34%，683个保守位点，466个简约信息位点，78个单突变位点。序列中不同核苷酸占比，A:30.67%、T:30.67%、C:19.33%、G:19.33%，A+T:61.34%，C+G:38.66%。转换和颠换的比值(R)为1.85。

对应梨S-RNase编码区序列长711 bp，包含237个密码子，有421个变异位点，占比59.21%，287个保守位点，345个简约信息位点，76个单突变位点。序列中不同核苷酸占比，A:32.66%、T:25.40%、C:21.87%、G:20.07%，A+T占比58.06%，C+G为41.94%。R值为0.95。

二者变异位点占比梨S-RNase基因大于对应SFBB基因，前者是后者的1.34倍，R值后者是前者的1.95倍，二者C+G、A+T含量相差不大。

### 2.2.2 梨SFBB基因和对应S-RNase基因序列分化分析

梨SFBB基因和对应S-RNase基因编码区序列所有碱基成对遗传距离分布见图2，梨属植物SFBB基因编码区序列成对的平均遗传距离为0.147，而对应S-RNase基因编码区序列成对的平均遗传距离为0.211，后者是前者的1.44倍。由图2可知，梨SFBB基因遗传距离分布中0.000~0.030的占比远高于S-RNase在此范围的占比，这部分遗传距离是梨SFBB-alpha、SFBB-gamma以及SFBB-epsilon基因3个不同的亚类内部的遗传距离。此外，SFBB基因遗传距离占比最多的为>0.180~0.210，而S-RNase占比最多的为>0.201~0.240，遗传距离较大部分占比(>0.240~0.330)的S-RNase要比SFBB多。

为了探寻影响梨属植物SFBB基因和对应S-RNase基因的进化因素，利用MEGA软件Selection程序分别估算二者密码子对应的非同义替换率与同义替换率的差值(dN-dS)，结果见表1。dN-dS=0，序列之间分歧是中性选择的结果；dN-dS>0是正选择效应；dN-dS<0是纯化选择的结果。由表1可以看出，二者受正选择效应的位点占比接近，SFBB受中性选择的位点占比稍高于S-RNase，而受纯化选择的位点占比正好相反。SFBB连续阳性位点数(至少2个及以上的相邻位点dN-dS>0)是S-RNase的1.74倍，但若考虑序列的长度因素，二者的连续阳性位点占比基本一致。

2.2.3 梨SFBB基因和对应S-RNase基因位点的遗传多态性 梨SFBB基因和对应S-RNase基因编码

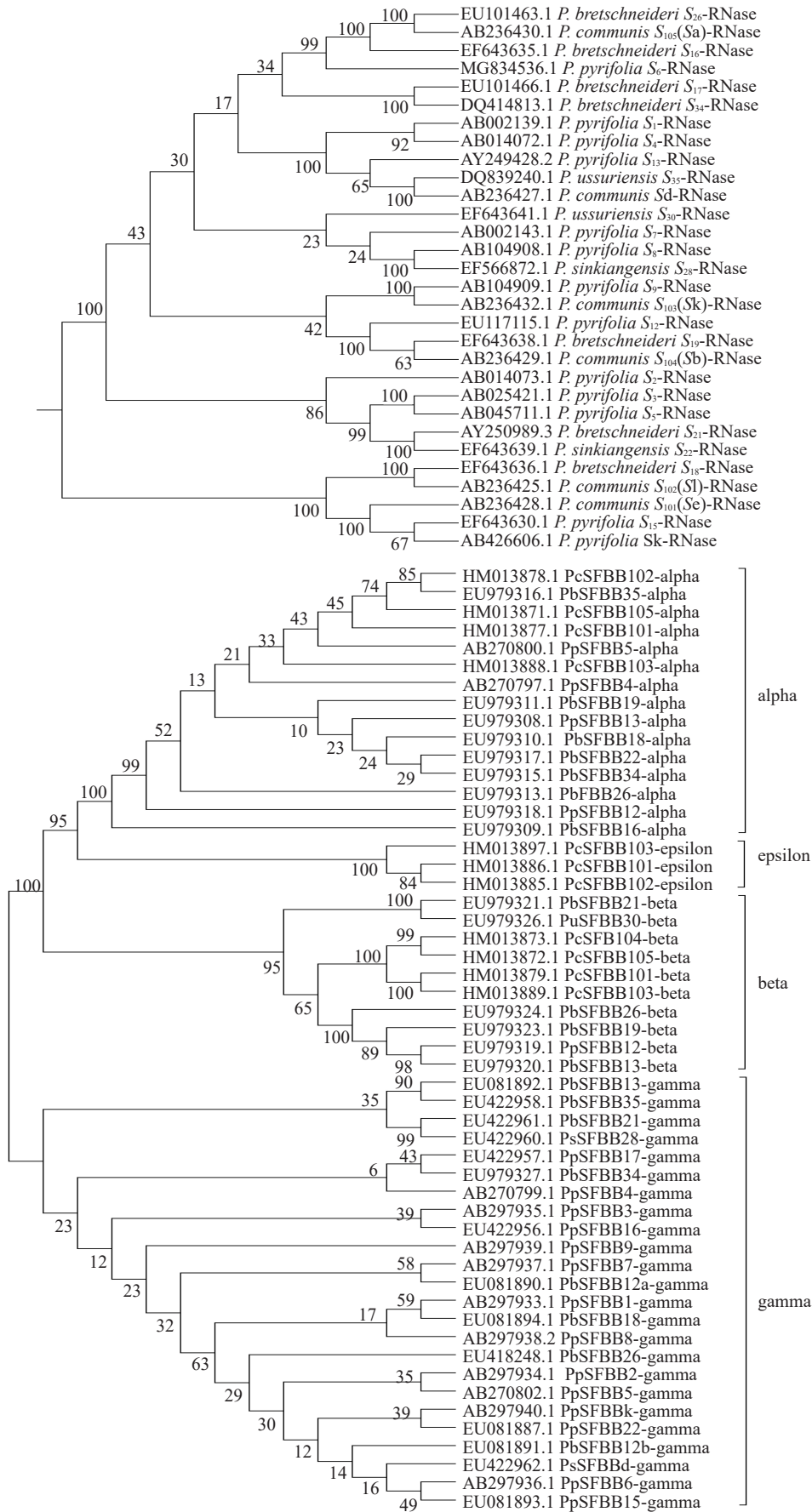


图1 梨 SFBB 基因和对应 S-RNase 基因的 NJ 系统发育树

Fig. 1 NJ phylogenetic tree of pear SFBB genes and corresponding S-RNase genes

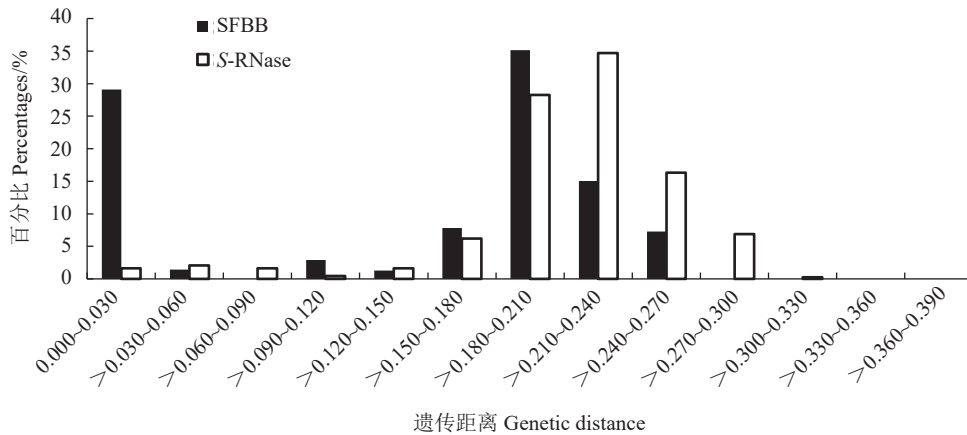


图 2 梨 SFBB 基因和对应 S-RNase 基因编码区序列所有碱基对遗传距离分布

Fig. 2 Pairwise genetic distance of whole nucleotide substitutions in coding regions of pear SFBB gene and S-RNase gene

表 1 梨 SFBB 基因与 S-RNase 基因核苷酸非同义突变率与同义突变率情况

Table 1 Nucleotide non-synonymous mutation rate and synonymous mutation rate of pear SFBB gene and S-RNase gene

基因名称 Gene name	dN-dS=0 位点占比 Proportion of dN-dS= 0/%	dN-dS>0 位点占比 Proportion of dN-dS> 0/%	dN-dS<0 位点占比 Proportion of dN-dS< 0/%	连续阳性 位点数 Number of consecutive positive sites
SFBB	20.05	42.28	37.67	40
S-RNase	16.19	42.86	40.95	23
SFBB-alpha	69.60	19.15	10.95	14
S-RNase	22.33	40.46	37.21	21
SFBB-beta	48.44	31.61	19.95	26
S-RNase	28.90	40.37	30.73	20
SFBB-gamma	80.81	9.85	9.34	6
S-RNase	18.40	40.56	41.04	21

区遗传多态性见表 2, 变异碱基位点由于受序列数的影响不能作为比较对象。从排除了序列数干扰能

表 2 梨 SFBB 基因和对应 S-RNase 基因编码区遗传多态性

Table 2 Genetic polymorphisms of pear SFBB gene and corresponding S-RNase gene coding region

基因名称 Gene name	序列 数 m	变异碱基 位点数 S	遗传参数 $\Theta$	核苷酸多样 性指标 $\pi$	Tajima 检验 统计量 D
SFBB	52	544	0.098 114	0.121 295	0.857 535
S-RNase	30	421	0.149 464	0.173 542	0.627 732
SFBB-alpha	15	137	0.034 850	0.024 207	-1.344 999
S-RNase	15	350	0.152 682	0.173 036	0.591 978
SFBB-beta	10	275	0.081 210	0.105 096	1.470 305
S-RNase	10	297	0.148 915	0.160 252	0.380 712
SFBB-gamma	24	84	0.018 887	0.011 557	-1.533 142
S-RNase	23	407	0.155 097	0.174 363	0.505 418

够反映遗传多态性的两个指标  $\Theta$  和  $\pi$  数值来看, S-RNase 基因的二者的数值均大于 SFBB 基因, 前者分别是后者的 1.52 和 1.43 倍, 这一点也可以通过表中的 S/m 反映出来, 因此梨 S-RNase 基因的遗传多态性高于 SFBB 基因。同时二者的 Tajima 检验统计量 D 均为正值, 表明二者均受平衡选择的影响。

### 2.3 梨 SFBB-alpha 基因及对应 S-RNase 基因特征分析

2.3.1 梨 SFBB-alpha 基因及对应 S-RNase 基因理化性质 用 Protparam 进行蛋白质理化性质预测, 梨 SFBB-alpha 基因编码蛋白平均由 393 个氨基酸组成, 平均分子量 45.53 ku, 平均理论等电点 5.01, 平均酸性蛋白质残基总数为 54, 平均碱性蛋白质残基总数为 38, 表明其为酸性蛋白质, 平均分子式  $C_{2069}H_{3047}N_{508}O_{608}S_{21}$ , 平均不稳定性指数为 43.33, 属于不稳定蛋白, 平均脂肪系数为 82.91, 总平均亲水性为 -0.219, 为亲水蛋白。

对应的 S-RNase 基因编码蛋白平均由 228 个氨基酸组成, 平均分子量 26.06 ku, 平均理论等电点 9.07, 平均酸性蛋白质残基总数为 17, 平均碱性蛋白质残基总数为 26, 表明其为碱性蛋白质, 平均分子式  $C_{1165}H_{1817}N_{315}O_{336}S_{15}$ , 平均不稳定性指数为 38.53, 属于稳定蛋白, 平均脂肪系数为 74.71, 总平均亲水性为 -0.451, 为亲水蛋白。

二者比较显示 SFBB-alpha 基因分子量是 S-RNase 基因的 1.75 倍, 二者蛋白分别为酸性和碱性, 理论上具有酸碱相互作用和异性电荷相吸引的化学反应和物理促进相互作用机制。蛋白质稳定性虽然相反, 但二者预测平均数值相差不大, 存在实际稳定性

一致的可能性,亲水性方面均为亲水蛋白,二者的蛋白质脂肪系数均比较高,脂肪系数是一个蛋白质中脂肪侧链所占的相对值,包括异亮氨酸、亮氨酸、丙氨酸、缬氨酸所占的比重,常作为蛋白质热稳定性增加的阳性因素,说明二者蛋白热稳定性近似。

2.3.2 梨SFBB-alpha基因及对应S-RNase基因进化分析 梨SFBB-alpha基因及对应S-RNase基因NJ进化树见图3,二者对应的基因在自己的进化树中拓扑结构不一致。

梨SFBB-alpha基因编码区序列长1209 bp,有

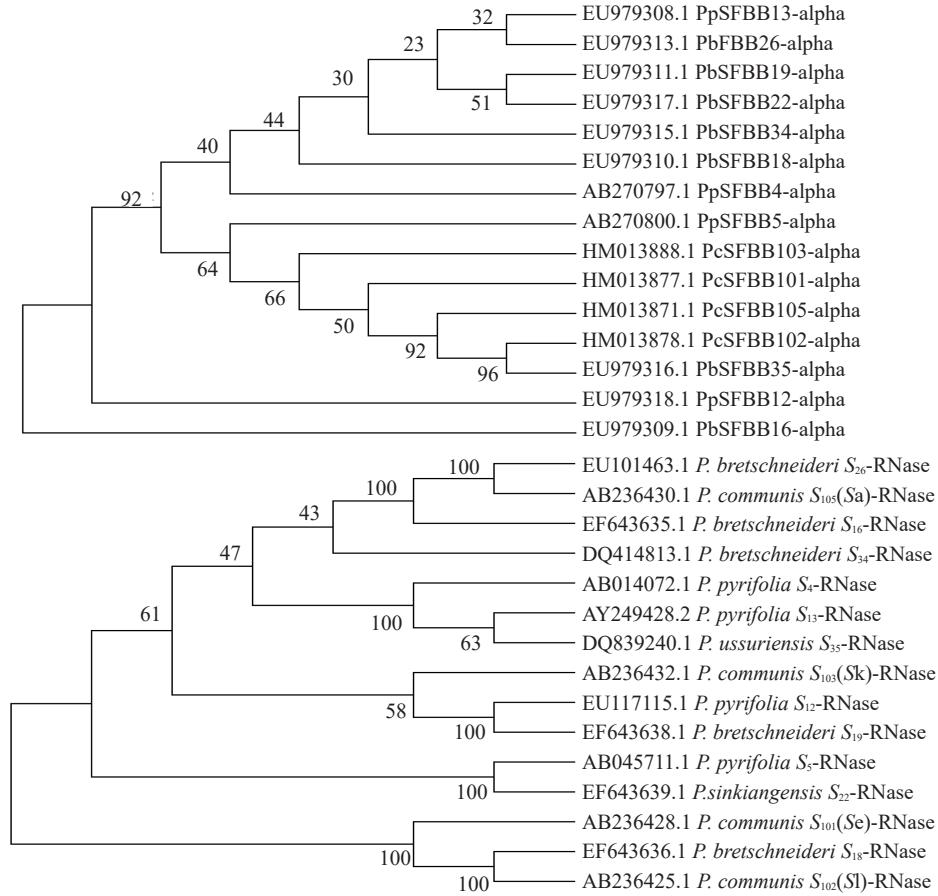


图3 梨SFBB-alpha基因和对应S-RNase基因的NJ系统发育树

Fig. 3 NJ phylogenetic tree of pear SFBB-alpha genes and corresponding S-RNase gene

403个密码子,137个变异位点,占比11.33%,1057个保守位点,45个简约信息位点,87个单突变位点。序列中不同核苷酸占比,A:30.53%、T:30.53%、C:19.47%、G:19.47%,A+T占比61.06%,C+G为38.94%。R为1.81。

对应的梨S-RNase编码区序列长705 bp,235个密码子,350个变异位点,占比49.65%,346个保守位点,256个简约信息位点,94个单突变位点。序列中核苷酸占比,A:29.16%、T:29.16%、C:20.84%、G:20.84%,A+T占比58.32%,C+G为41.68%。R为0.86。

二者变异位点占比梨S-RNase基因大于SFBB-alpha基因,前者是后者的4.38倍,R值后者是前者

的2.11倍,C+G、A+T含量相差不大。

2.3.3 梨SFBB-alpha基因和对应S-RNase基因序列分化分析 梨属植物SFBB-alpha和对应的梨S-RNase基因编码区序列成对的遗传距离计算结果如图4所示。SFBB-alpha总平均遗传距离0.025,考虑所有碱基替换分布情况:>0.015~0.020、>0.020~0.025、>0.025~0.030分别占比29.52%、25.71%和20.95%、其他>0.010~0.015占比8.57%、>0.050~0.055占比9.52%,其余占比不足5%。对应的梨S-RNase总平均遗传距离0.208,是对应SFBB-alpha基因平均遗传距离的8.32倍,>0.150~0.200、>0.200~0.250、>0.250~0.300分别占比25.74%、43.81%、20.95%,其余占比不足10%,图形分布和SFBB-al-

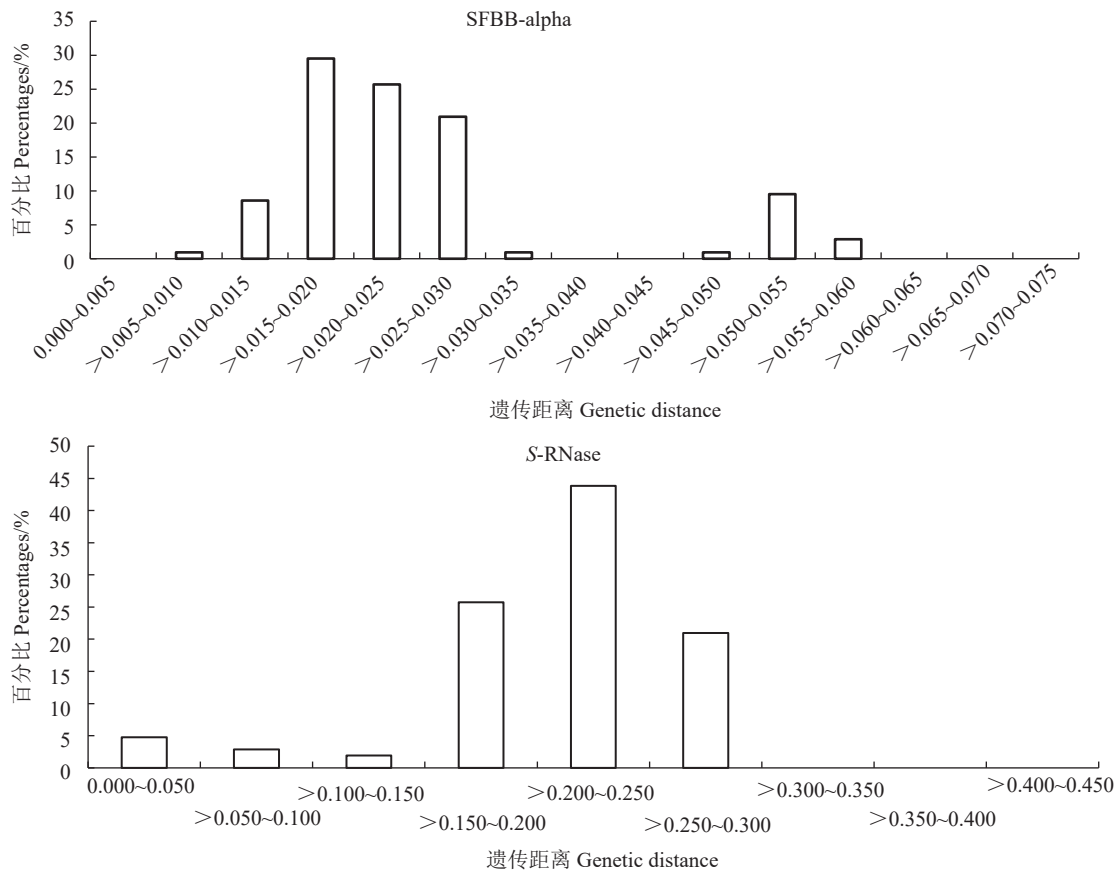


图 4 梨 SFBB-alpha 基因和对应 *S-RNase* 基因编码区序列所有碱基成对遗传距离分布  
Fig. 4 Pairwise genetic distance of whole nucleotide substitutions in coding regions of pear SFBB-alpha genes and *S-RNase* genes

pha 相差较大。

梨 SFBB-alpha 基因和对应 *S-RNase* 基因所有密码子对应 dN-dS 结果见表 1。由表 1 可以看出二者受正选择效应的位点 SFBB-alpha 是 *S-RNase* 的 1/2, 受中性选择的位点 SFBB-alpha 则是 *S-RNase* 的 3 倍, 而受纯化选择的位点 SFBB-alpha 则是 *S-RNase* 的 1/3。连续阳性位点数 SFBB-alpha 是 *S-RNase* 的 2/3。

**2.3.4 梨 SFBB-alpha 基因和对应 *S-RNase* 基因位点的遗传多态性** 梨属不同植物 SFBB-alpha 和对应 *S-RNase* 基因位点的遗传分化情况结果如表 2 所示。从反映遗传多态性的两个指标  $\Theta$  和  $\pi$  数值来看, 梨 *S-RNase* 基因二者的数值均远远大于对应的 SFBB-alpha 基因, 前者分别是后者的 4.38 和 7.16 倍, 因此 *S-RNase* 基因的遗传多态性高于 SFBB 基因。同时二者的 Tajima 检验统计量  $D$  一正一负, 表明二者受不同选择的影响。

**2.4 梨 SFBB-beta 基因及对应 *S-RNase* 基因特征分析**

**2.4.1 梨 SFBB-beta 基因及对应 *S-RNase* 基因理化性质** 梨 SFBB-beta 基因编码蛋白质理化性质预测显示其由 395 个氨基酸组成, 平均分子量 45.62 ku, 平均理论等电点 5.32, 平均酸性氨基酸残基总数为 52, 平均碱性氨基酸残基总数为 37, 表明其为酸性蛋白质, 平均分子式  $C_{2059}H_{3135}N_{521}O_{605}S_{22}$ , 平均不稳定系数为 46.26, 属不稳定蛋白, 平均脂肪系数为 87.84, 总平均亲水性为 -0.200, 为亲水蛋白。对应 *S-RNase* 基因编码蛋白质理化性质预测结果显示其由 228 个氨基酸组成, 平均分子量 26.07 ku, 平均理论等电点 9.08, 平均酸性氨基酸残基总数 17, 平均碱性氨基酸残基总数 25, 表明其为碱性蛋白质, 平均分子式  $C_{1169}H_{1820}N_{316}O_{334}S_{14}$ , 平均不稳定系数为 41.32, 属于不稳定蛋白, 平均脂肪系数为 76.00, 总平均亲水性为 -0.436, 为亲水蛋白。

梨 SFBB-beta 基因编码蛋白平均分子量是 *S-RNase* 基因编码蛋白的 1.75 倍, 二者蛋白分别为酸性和碱性, 理论上二者具有酸碱相互作用和异性电荷相吸引的化学和物理促进相互作用机制。蛋白不



稳定系数相近,且均属于不稳定蛋白,亲水性方面均为亲水蛋白,蛋白热稳定性近似。

2.4.2 梨 SFBB-beta 基因及对应 S-RNase 基因进化

分析 梨 SFBB-beta 基因及对应 S-RNase 基因 NJ 进化树见图 5,二者对应的基因在自己的进化树中拓扑结构不一致。

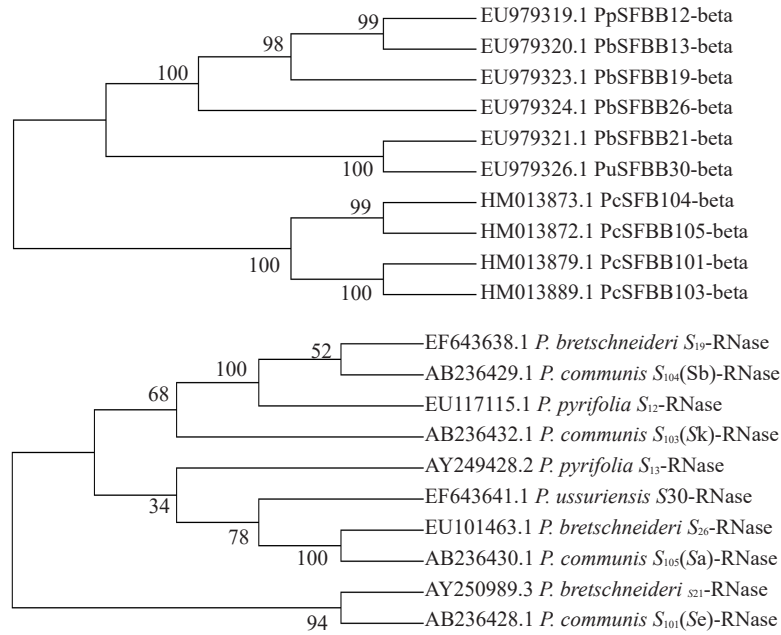


图 5 梨 SFBB-beta 基因和对应 S-RNase 基因的 NJ 系统发育树  
Fig. 5 NJ phylogenetic tree of pear SFBB-beta genes and S-RNase genes

梨 SFBB-beta 编码区序列长 1197 bp, 399 个密码子,有 275 个变异位点,占比 22.97%,922 个保守位点,235 个简约信息位点,39 个单突变位点。序列中不同核苷酸占比,A: 30.72%、T: 30.72%、C: 19.28%、G: 19.28%, A+T 占比 61.44%, C+G 为 38.56%。R 为 1.99。

对应的 S-RNase 编码区序列长 705 bp,235 个密码子,有 297 个变异位点,占比 42.13%,396 个保守位点,162 个简约信息位点,135 个单突变位点。序列中核苷酸占比,A:32.28%、T:25.76%、C:22.09%、G:19.87%,A+T 占比 58.04%,C+G 为 41.96%。R 为 0.88。

二者变异位点占比 S-RNase 基因大于 SFBB-alpha 基因,前者是后者的 1.83 倍,后者 R 值是前者的 2.26 倍,C+G、A+T 含量相差不大。

2.4.3 梨 SFBB-beta 基因和对应 S-RNase 基因序列分化分析 梨 SFBB-beta 序列成对的总平均遗传距离 0.119。其中 >0.160~0.180 占比 35.56%, 0.000~0.020 占比 13.33%, >0.100~0.120 占比 11.11%、>0.020~0.040、>0.140~0.160、>0.180~

0.200 占比 8.89%, >0.040~0.060、>0.120~0.140 占比 6.67%,其余占 0.00%。对应的梨 S-RNase 序列成对的总平均遗传距离 0.191,是梨 SFBB-beta 的 1.61 倍。其中 >0.200~0.220 占比 42.22%, >0.180~0.200 占比 17.78%, >0.220~0.240 占比 15.56%, >0.160~0.180 占比 8.89%, >0.240~0.260 占比 6.67%,其余占比不足 10%。图形分布和 SFBB-beta 非常相似(图 6)。

梨 SFBB-beta 和对应 S-RNase 所有密码子对应 dN-dS 见表 1,二者受正选择效应的位点 SFBB-beta 是 S-RNase 的 4/5,受中性选择的位点 SFBB-beta 则是 S-RNase 的 1.68 倍,而受纯化选择的位点 SFBB-beta 则是 S-RNase 的 3/5。SFBB-alpha 与 S-RNase 连续阳性位点数比为 26:20。

2.4.4 梨 SFBB-beta 基因和对应 S-RNase 基因位点的遗传多态性 从反映梨属不同植物 SFBB-beta 和对应 S-RNase 基因位点遗传多态性的两个指标  $\Theta$  和  $\pi$  数值来看(表 2),S-RNase 基因的二者的数值均大于对应的 SFBB-beta 基因,分别是其的 1.83 倍和 1.52 倍。因此,S-RNase 基因的遗传多态性高于

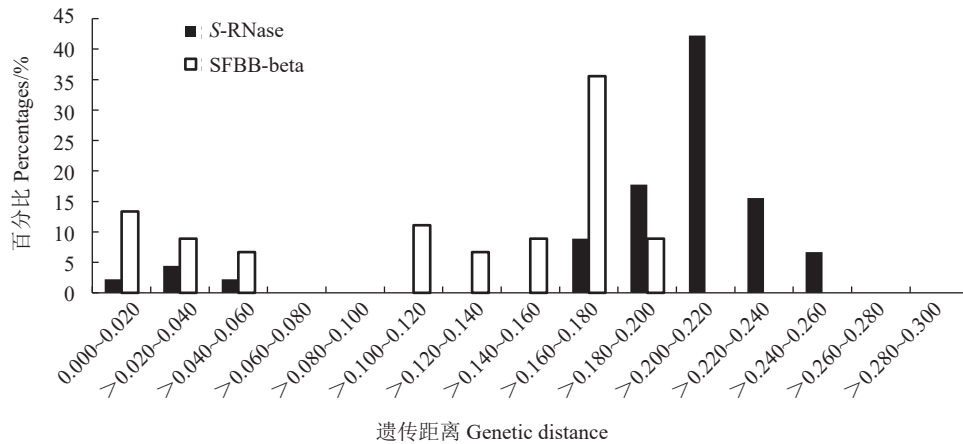


图 6 梨 SFBB-beta 基因和对应 S-RNase 基因编码区序列所有碱基成对遗传距离分布

Fig. 6 Pairwise genetic distance of whole nucleotide substitutions in coding regions of pear SFBB-beta genes and S-RNase genes

SFBB 基因。同时二者的 Tajima 检验统计量 D 为正值,表明二者受相同选择的影响。

## 2.5 梨 SFBB-gamma 基因及对应 S-RNase 基因特征分析

### 2.5.1 梨 SFBB-gamma 基因及对应 S-RNase 基因理化性质

梨 SFBB-gamma 基因编码蛋白平均由 396 个氨基酸组成,分子质量 45.45 ku,平均理论等电点 4.66,平均酸性氨基酸残基总数 60,平均碱性氨基酸残基总数 35,为酸性蛋白,平均分子式  $C_{2054}C_{3108}N_{498}O_{618}S_{24}$ ,平均不稳定系数为 43.76,为不稳定蛋白,平均脂肪系数为 86.05,总平均亲水性 -0.147,为亲水蛋白。

对应 S-RNase 基因编码蛋白平均由 228 个氨基酸组成,平均分子质量 26.02 ku,平均理论等电点 9.12,平均酸性氨基酸残基总数 17,平均碱性氨基酸残基总数 26,为碱性蛋白,平均分子式  $C_{1161}C_{1812}N_{316}O_{335}S_{15}$ ,不稳定系数为 37.98,属于稳定蛋白,平均脂肪系数为 73.94,总平均亲水性 -0.446,为亲水蛋白。

SFBB-gamma 基因分子质量是 S-RNase 基因的 1.75 倍,二者蛋白分别为酸性和碱性,理论上具有酸碱相互作用和异性电荷相吸引的化学和物理促进相互作用机制。蛋白质稳定性虽然相反,但二者预测平均数值相差不大,存在实际稳定性一致的可能性,亲水性方面均为亲水蛋白,热稳定性也相似。

### 2.5.2 梨 SFBB-gamma 基因及对应 S-RNase 基因进化分析

梨 SFBB-gamma 基因及对应 S-RNase 基因 NJ 进化树见图 7,二者对应的基因在自己的进化树

中拓扑结构不一致。由于 SFBB-gamma 基因的同源性太高,导致其进化树绝大多数分枝自展值不高。

梨 SFBB-gamma 编码区序列长 1191 bp,397 个密码子,有 84 个变异位点,占比 7.05%,1107 个保守位点,34 个简约信息位点,50 个单突变位点。序列中不同核苷酸占比,A:30.71%、T:30.71%、C:19.29%、G:19.29%,A+T 占比 61.42%,C+G 为 38.58%。R 为 3.68。

对应 S-RNase 编码区序列长 711 bp,237 个密码子,有 407 个变异位点,占比 57.24%,298 个保守位点,297 个简约信息位点,109 个单突变位点。序列中核苷酸占比,A:28.99%、T:28.99%、C:21.01%、G:21.01%,A+T 占比 57.98%,C+G 为 42.02%。R 为 0.93。

二者变异位点占比 S-RNase 基因大于对应 SFBB-beta 基因,前者是后者的 8.12 倍,R 值后者是前者的 3.96 倍,C+G、A+T 含量相差不大。

### 2.5.3 梨 SFBB-gamma 基因和对应 S-RNase 基因序列分化分析

梨 SFBB-gamma 序列成对总平均遗传距离 0.012。>0.009~0.012 占比 25.36%、>0.006~0.009 占比 23.19%、>0.012~0.015 占比 14.86%、>0.015~0.018 占比 13.77%、>0.003~0.006 占比 11.23%、>0.018~0.021 占比 7.61%、>0.021~0.024 占比 3.99%,其余为 0。对应 S-RNase 序列成对的遗传距离总平均遗传距离 0.212,是 SFBB-gamma 的 17.67 倍,其中 >0.200~0.240 占比 42.69%、>0.160~0.200 占比 24.51%、>0.240~0.280 占比 21.34%、其余占比 11.46%(图 8)。

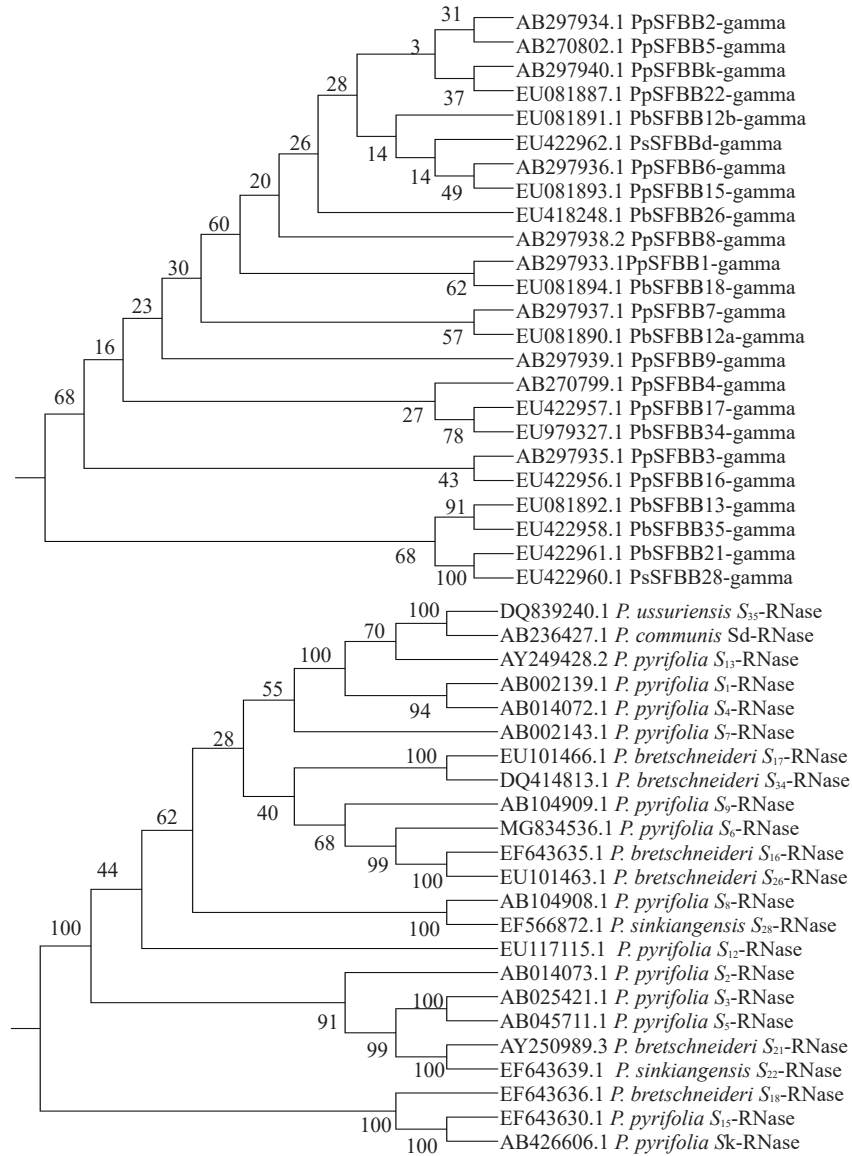


图7 梨 SFBB-gamma 基因和对应 S-RNase 基因的 NJ 系统发育树  
 Fig. 7 NJ phylogenetic tree of pear SFBB-gamma genes and S-RNase genes

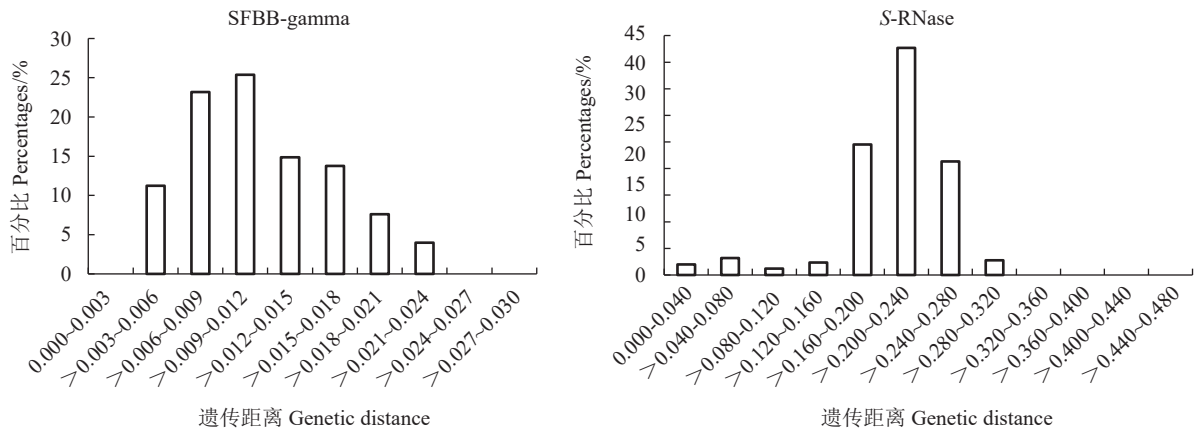


图8 梨 SFBB-gamma 基因和对应 S-RNase 编码区序列所有碱基对遗传距离分布  
 Fig. 8 Pairwise genetic distance of whole nucleotide substitutions in coding regions of pear SFBB-gamma genes and S-RNase genes

梨 SFBB- $\gamma$  和对应 *S*-RNase 所有密码子对应的 dN-dS 结果见表 1, 二者受正选择效应的位点 SFBB- $\gamma$  是 *S*-RNase 的 1/4, 受中性选择的位点 SFBB- $\gamma$  则是 *S*-RNase 的 4.4 倍, 而受纯化选择的位点 SFBB- $\gamma$  则是 *S*-RNase 的 1/5。梨 SFBB- $\gamma$  与对应 *S*-RNase 的连续阳性位点数比为 6:21。

2.5.4 梨 SFBB- $\gamma$  基因和对应 *S*-RNase 基因位点的遗传多态性 梨属不同植物 SFBB- $\gamma$  和对应 *S*-RNase 基因位点的遗传分化情况结果如表 2 所示。从反映遗传多态性的两个指标  $\Theta$  和  $\pi$  数值来看, *S*-RNase 基因的二者的数值均远远大于对应的 SFBB- $\gamma$  基因, 分别是其 8.21 倍和 15.09 倍, 因此 *S*-RNase 基因的遗传多态性高于 SFBB- $\gamma$  基因。同时二者的 Tajima 检验统计量  $D$  一正一负, 表明二者受不相同选择的影响。

## 2.6 梨 SFBB- $\epsilon$ 基因及对应 *S*-RNase 基因特征分析

由于梨 SFBB- $\epsilon$  基因及对应 *S*-RNase 基因目前只有 3 个, 因此仅能比较理化性质和基因进化情况, 其余由于数据较少, 无法比较。

2.6.1 梨 SFBB- $\epsilon$  基因及对应 *S*-RNase 基因理化性质 梨 SFBB- $\epsilon$  基因编码蛋白平均由 390 个氨基酸组成, 平均分子量 45.25 ku, 理论等电点 5.30, 平均酸性氨基酸残基总数 51, 平均碱性氨基酸残基总数 28, 为酸性蛋白, 平均分子式  $C_{2054}H_{3111}N_{506}O_{591}S_{28}$ , 不稳定系数 42.71, 属于不稳定蛋白, 脂肪系数 86.08, 总平均亲水系数 -0.149, 属于亲水蛋白。

对应 *S*-RNase 基因编码蛋白平均由 230 个氨基酸组成, 平均分子量 26.09 ku, 平均理论等电点 9.12, 平均酸性氨基酸残基总数 18, 平均碱性氨基酸残基总数 27, 为碱性蛋白, 平均分子式  $C_{1174}H_{1830}N_{315}O_{338}S_{14}$ , 不稳定系数为 34.84, 属于稳定蛋白, 脂肪系数 74.41, 总平均亲水性 -0.478, 属于亲水蛋白。

梨 SFBB- $\epsilon$  基因编码蛋白分子量是 *S*-RNase 基因编码蛋白的 1.73 倍, 二者蛋白分别为酸性和碱性, 理论上具有酸碱相互作用和异性电荷相吸引的化学和物理促进相互作用机制。蛋白质稳定性虽然相反, 但二者预测平均数值相差不大, 存在实际稳定性一致的可能性, 亲水性方面均为亲水蛋白,

蛋白热稳定性相似。

2.6.2 梨 SFBB- $\epsilon$  基因及对应 *S*-RNase 基因进化分析 梨 SFBB- $\epsilon$  编码区序列长 1173 bp, 391 个密码子, 有 19 个变异位点, 占比 1.62%, 1154 个保守位点, 1 个简约信息位点, 1 个单突变位点。序列中不同核苷酸占比, A+T 占比 30.66%, C+G 为 19.34%。R 值为 2.18。阳性位点占比 3.85%、连续阳性位点 1 处, 等于 0 占比 95.13%、小于 0 占比 1.02%。平均成对遗传距离 0.011。

对应 *S*-RNase 编码区序列长 699 bp, 233 个密码子, 有 175 个变异位点, 占比 25.04%, 515 个保守位点, 0 个简约信息位点, 175 个单突变位点, 序列中不同核苷酸占比, A+T 占比 29.38%, C+G 为 20.62%。R 为 0.97。阳性位点占比 29.74%、连续阳性位点 15 处, 等于 0 占比 50%、小于 0 占比 20.26%。平均成对遗传距离 0.204。

二者变异位点占比 *S*-RNase 基因大于 SFBB- $\beta$  基因, 前者是后者的 18.36 倍, R 值后者是前者的 2.25 倍, C+G、A+T 含量相差不大。

## 3 讨 论

笔者在本研究中利用苹果亚科梨属 SFBB- $\gamma$  基因的保守序列特征设计特异引物, 从 3 个梨品种中扩增出了 SFBB22- $\gamma$  全长序列, 针对 SFBB- $\gamma$  设计的特异引物未能在 3 个梨品种中扩增出其他 SFBB- $\gamma$  基因, 这种现象在以前研究中<sup>[23-25]</sup>也常有出现, 这制约了更多的梨 SFBB 基因被分离鉴定, 一定程度上影响了后续对 SFBB 基因特征的研究。

目前, NCBI 上登录的能与梨 *S*-RNase 和对应 SFBB 全长基因有  $\alpha$  ( $\alpha$ )、 $\beta$  ( $\beta$ )、 $\gamma$  ( $\gamma$ ) 以及  $\epsilon$  ( $\epsilon$ ) 4 个类群。本研究的结果发现  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  以及  $\epsilon$  现有序列均自己聚成一类, 显示各序列内有一定的保守性, 这一结论还需要更多新的同类基因序列分离出来加以验证。理化性质预测 SFBB- $\alpha$ 、SFBB- $\beta$ 、SFBB- $\gamma$  以及 SFBB- $\epsilon$  基因编码的蛋白均为酸性蛋白和 *S*-RNase 编码的碱性蛋白均具有正负电荷相吸引的物理机制促进和酸碱反应的化学促进机制, 这和 Li 等<sup>[30]</sup>在研究矮牵牛 (*Petunia hybrida*) 自交不亲和位点 *S*-RNase 和 SLF 情况一致, 同时二者编码蛋白均为亲水蛋白, 热稳定性也相似, SFBB 编码的蛋白分

子质量约是 *S*-RNase 基因编码蛋白的 1.75 倍,均存在理论上相互作用的可能性。

在已分离鉴定的蔷薇科植物花粉 *S* 基因中,李亚科的李属、茄科矮牵牛属以及车前科金鱼草属的花粉 *SFB* 基因是位于 *S* 位点区域 *S*-RNase 基因下游的第一个 *F*-box 基因<sup>[15,31-32]</sup>。苹果亚科梨属、苹果属、花楸属中花粉 *S* 基因的研究表明,这些物种 *S* 位点区域 *S*-RNase 基因单倍型内含有两个以上 *F*-box 基因(被称为 *SFBB* 基因)<sup>[20-23,33]</sup>。具体实际数量尚不清楚,目前也很难假设有多少未被发现。现有和梨 *S*-RNase 基因一一对应的 *SFBB* 基因全长序列统计结果也支持上述观点。

已有的花粉和雌蕊 *S* 基因进化研究的情况显示,蔷薇科李亚科李属植物花粉 *SFB* 基因与雌蕊 *S*-RNase 基因在序列多样性、阳性选择证据和共享的祖先多态性方面表现出共同进化的特征,茄科矮牵牛属和车前科金鱼草属的雌蕊 *S*-RNase 基因和花粉 *S* (*SLF/SFB*) 基因之间没有太多共同进化的特征<sup>[34]</sup>。最近的研究表明,蔷薇科的自交不亲和包括两个不同的系统:蔷薇科李亚科李属表现出的一种自我识别系统,即其他的 *SFB* 识别自我 *S*-RNase;而苹果亚科苹果属、梨属以及花楸属显示了一种非自我识别系统<sup>[14,33]</sup>。在对花楸属欧亚花楸的自交不亲和模式研究中发现许多 *SFBB* 蛋白可能参与自交不亲和,每个识别非自身 *S*-RNases 的子集,即一个 *SFBB* 基因可以识别不止一个 *S*-RNase 基因。为何梨亚科花粉 *S* 基因的模式更接近亲缘关系较远的茄科、车前科等植物而非亲缘关系近的李亚科,有研究表明毛茛科、茄科、车前科和蔷薇科多个物种 *S* 位点极其古老,可能与被子植物的起源和扩张有关。因此,推测 *SFB* 或 *SFBB* 基因的分化至少早于毛茛科、茄科、车前科和蔷薇科植物<sup>[35]</sup>。

根据多数学者认为的自交不亲和位点进化理论,花粉 *S* 基因预计与雌蕊 *S* 基因存在共同进化<sup>[33,35]</sup>。因此这两个基因应该表现出长期共同进化的共同特征。通过对比梨属雌蕊 *S*-RNase 和其对应的在 *S* 位点区域内花粉 *SFBB* 基因的 4 个类群 52 个成员在序列变异、基因多态性以及进化方面的特性找出更符合的花粉 *S* 基因。研究表明梨属植物 *SFBB*-alpha、*SFBB*-beta、*SFBB*-gamma 以及 *SFBB*-epsilon 的结构具有较高的保守性,进一步研究分析表明梨 *SFBB*-alpha、*SFBB*-gamma 以及 *SFBB*-epsi-

lon 表现出与对应 *S*-RNase 基因共进化的证据较少,这些 *SFBB* 基因表现出较低的序列变异,较少的阳性选择以及较低的基因多态性。*SFBB*-beta 基因显示出较高的序列多样性水平,尽管其仍低于 *S*-RNase 显示的序列多样性水平。这与矮牵牛花 *SLF* 表现出的特征相一致<sup>[36-37]</sup>,Chen 等<sup>[38]</sup>和 Vieira 等<sup>[39]</sup>认为有害突变的强烈选择作用于 *SLF* 基因,从而限制矮牵牛 *SLF* 的变异性,但这并不影响其作为花粉 *S* 基因的作用。若把 *SFBB* 基因 4 个类群作为整体来看,其和对应 *S*-RNase 的情况反而好于 *SFBB*-alpha、*SFBB*-gamma 和 *SFBB*-epsilon,甚至比 *SFBB*-beta 基因更接近 *S*-RNase 序列特征,这种分析方式在以往学者的类似研究中还未出现。是否 4 种亚类均参与自交不亲和还是 *SFBB*-beta 独自参与自交不亲和还需要更多的研究加以验证。

## 4 结 论

设计特异引物可以直接扩增出梨 *SFBB* 基因全长,目前这一技术在通用性方面还有待于改进。找出一种可以媲美扩增梨 *S*-RNase 全长序列的方法是研究梨 *SFBB* 基因的关键所在。现有能和梨 *S*-RNase 基因一一对应的全长序列 *SFBB* 基因有 4 个成员,其每组成员间序列相对比较保守,现有序列数据显示其在序列多态性和变异位点方面均小于对应 *S*-RNase,从理论角度讲是否某一 *SFBB* 基因参与自交不亲和,其余 *SFBB* 基因不直接参与还是所有 *SFBB* 基因均参与其中都有一定的证据,但还需要更多的试验数据进一步加以验证。

## 参考文献 References:

- [1] SASSA H. Molecular mechanism of the *S*-RNase-based gametophytic self-incompatibility in fruit trees of Rosaceae[J]. *Breeding Science*, 2016, 66(1): 116-121.
- [2] 何敏,谷超,吴巨友,张绍铃. 果树自交不亲和机制研究进展[J]. *园艺学报*, 2021, 48(4): 759-777.  
HE Min, GU Chao, WU Juyou, ZHANG Shaoling. Recent advances on self-incompatibility mechanism in fruit trees[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2021, 48(4): 759-777.
- [3] 梁文杰,谭晓风,乌云塔娜. 梨自交不亲和基因克隆及其进化分析[J]. *果树学报*, 2021, 38(10): 1621-1637.  
LIANG Wenjie, TAN Xiaofeng, WUYUN Tana. Cloning and phylogenetic analysis of *S*-RNase genes in genus *Pyrus* plants[J]. *Journal of Fruit Science*, 2021, 38(10): 1621-1637.
- [4] WOLKO Ł, ANTKOWIAK W, SIPS M, SŁOMSKI R. Self-in-

- compatibility alleles in Polish wild pear [*Pyrus pyraeaster* (L.) Burgsd.]: A preliminary analysis[J]. *Journal of Applied Genetics*, 2010, 51(1):33-35.
- [5] 唐亮, 马香, 李明霞, 周志钦. 苹果属 *S*-RNase 基因的进化研究[J]. *中国农业科学*, 2013, 46(13):2717-2729.  
TANG Liang, MA Xiang, LI Mingxia, ZHOU Zhiqin. Evolutionary studies of *S*-RNase genes in genus *Malus*[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2013, 46(13):2717-2729.
- [6] GU C, WANG L, KORBAN S S, HAN Y P. Identification and characterization of *S*-RNase genes and *S*-genotypes in *Prunus* and *Malus* species[J]. *Canadian Journal of Plant Science*, 2015, 95(2):213-225.
- [7] RYAN S, SARA S, PAOLO D F, LUCA D, STEFANO M. Characterization of a novel self-incompatibility allele in *Malus* and *S*-genotyping of select crabapple cultivars[J]. *Scientia Horticulturae*, 2018, 240: 186-195.
- [8] OLIVIER R, JOSHUA R K. Population structure at the *S*-locus of *Sorbus aucuparia* L. (Rosaceae: Maloideae) [J]. *Molecular Ecology*, 2007, 16(6): 1315-1325.
- [9] MA J Z, WANG H J, WANG D S, LI X Y, LIU J Z, XIAO X, ZHANG L B, WU J K. Self-compatibility of *Crataegus pinnatifida* Bge. 'Zizhenzhu' is associated with the mutation of a pistil-part non-*S* factor[J]. *Scientia Horticulturae*, 2020, 268: 109362.
- [10] RASPE' O, KOHN J R. *S*-allele diversity in *Sorbus aucuparia* and *Crataegus monogyna* (Rosaceae: Maloideae)[J]. *Heredity*, 2002, 88:458-465.
- [11] ZHANG Y, QIN L H, WANG H K, CHEN X P, WANG S H. Identification of *S* genotypes in loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.) based on allele specific PCR[J]. *Scientia Horticulturae*, 2017, 225: 736-742.
- [12] ASHKANI J, REES D J G. A comprehensive study of molecular evolution at the self-Incompatibility locus of Rosaceae[J]. *Journal of Molecular Evolution*, 2016, 82(2/3): 128-145.
- [13] GU C, ZHANG S L, HUANG S X, HENG W, LIU Q Z, WU H Q, WU J. Identification of *S*-genotypes in Chinese cherry cultivars (*Prunus pseudocerasus* Lindl.) [J]. *Tree Genetics & Genomes*, 2010, 6(4):579-590.
- [14] AGUIAR B, VIEIRA J, CUNHA A E, FONSECA N A, IEZZONI A, VAN NOCKER S, VIEIRA C P. Convergent evolution at the gametophytic self-Incompatibility system in *Malus* and *Prunus*[J]. *PLoS One*, 2015, 10(5):e0126138.
- [15] USHIJIMA K, SASSA H, DANDEKAR A M, GRADZIEL T M, TAO R, HIRANO H. Structural and transcriptional analysis of the self-incompatibility locus of almond: Identification of a pollen-expressed F-box gene with haplotype-specific polymorphism[J]. *The Plant Cell*, 2003, 15(3): 771-781.
- [16] ENTANI T, IWANO M, SHIBA H, CHE F S, ISOGAI A, TAKAYAMA S. Comparative analysis of the self-incompatibility (*S*-) locus region of *Prunus mume*: Identification of a pollen-expressed F-box gene with allelic diversity[J]. *Genes to Cells*, 2003, 8(3):203-213.
- [17] SONNEVELD T, TOBUTT K R, VAUGHAN S P, ROBBINS T P. Loss of pollen-*S* function in two self-compatible selections of *Prunus avium* is associated with deletion/mutation of an *S* haplotype-specific F-box gene[J]. *The Plant Cell*, 2005, 17(1):37-51.
- [18] MARCHESE A, BOSKOVIC R I, CARUSO T, RAIMONDO A, CUTULI M, TOBUTT K R. A new self-compatibility haplotype in the sweet cherry 'Kronio', *S*'<sub>5</sub>, attributable to a pollen-part mutation in the *SFB* gene[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2007, 58(15/16):4347-4356.
- [19] USHIJIMA K, YAMANE H, WATARI A, KAKEHI E, IKEDA K, HAUCK N R, IEZZONI A F, TAO R. The *S* haplotype-specific F-box protein gene, *SFB*, is defective in self-compatible haplotypes of *Prunus avium* and *P. mume*[J]. *The Plant Journal*, 2004, 39(4):573-586.
- [20] SASSA H, HIRANO H, IKEHASHI H. Identification and characterization of stylar glycoproteins associated with self-incompatibility genes of Japanese pear, *Pyrus serotina* Rehd. [J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 1993, 241(1/2): 17-25.
- [21] SASSA H, KAKUI H, MIYAMOTO M, SUZUKI Y, HANADA T, USHIJIMA K, KUSABA M, HIRANO H, KOBATA T. *S* locus F-box brothers: Multiple and pollen-specific F-box genes with *S* haplotype-specific polymorphisms in apple and Japanese pear[J]. *Genetics*, 2007, 175(4):1869-1881.
- [22] FRANCESCHI P D, PIERANTONI L, DONDINI L, GRANDI M, SANZOL J, SANSAVINI S. Cloning and mapping multiple *S*-locus F-box genes in European pear (*Pyrus communis* L.)[J]. *Tree Genetics & Genomes*, 2011, 7(2):231-240.
- [23] 张琳, 谭晓风, 胡姣, 乌云塔娜, 袁德义, 何小勇, 龙洪旭, 李秀根. 中国白梨 *PbSFBB13-gamma* 基因的分子克隆与序列特征[J]. *林业科学*, 2009, 45(11):36-43.  
ZHANG Lin, TAN Xiaofeng, HU Jiao, WUYUN Tana, YUAN Deyi, HE Xiaoyong, LONG Hongxu, LI Xiugen. Molecular cloning and characterization of *PbSFBB13-gamma* from Chinese white pear (*Pyrus bretschneideri*) [J]. *Scientia Silvae Sinicae*, 2009, 45(11):36-43.
- [24] 乌云塔娜, 李洪果, 李振国, 包梅荣, 谭晓风. 梨 4 个 SFBB<sup>r</sup> 基因的分离及遗传多态性分析[J]. *林业科学*, 2010, 46(1): 147-151.  
WUYUN Tana, LI Hongguo, LI Zhenguo, BAO Meirong, TAN Xiaofeng. Isolation and genetic polymorphism analysis of pear SFBB<sup>r</sup>-r genes[J]. *Scientia Silvae Sinicae*, 2010, 46(1): 147-151.
- [25] CLAESSEN H, KEULEMANS W, POEL B V D, 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.
- [26] 王立新, 梁文杰, 谭晓风, 李秀根, 张琳. 6 个梨品种 *S* 基因型鉴定及新基因 *S*<sub>5</sub>-RNase 序列分析[J]. *果树学报*, 2010, 27(5): 689-693.

- WANG Lixin, LIANG Wenjie, TAN Xiaofeng, LI Xiugen, ZHANG Lin. Identification of *S*-genotypes of six pear cultivars and sequence analyses of *S*<sub>45</sub>-RNase[J]. Journal of Fruit Science, 2010, 27(5):689-693.
- [27] 邓建军,谭晓风,包梅荣,乌云塔娜,张琳,曹玉芬. 11个中国梨品种 *S* 基因型的鉴定[J]. 中南林业科技大学学报, 2010, 30(3):63-66.
- DENG Jianjun, TAN Xiaofeng, BAO Meirong, WUYUN Tana, ZHANG Lin, CAO Yufen. *S*-genotypes of 11 Chinese pear cultivars[J]. Journal of Central South University of Forestry & Technology, 2010, 30(3):63-66.
- [28] 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, Aishajiang · Maimaiti, XU Yeting, DENG Li, WANG Jixun. Present advance of *S*-gene genotype and *S*-genotypes in pear[J]. Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica, 2018, 27(8):1077-1087.
- [29] ABDALLAH D, BARAKET G, PEREZ V, HANNACHI A S, HORMAZA J I. Self-compatibility in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch]: Patterns of diversity surrounding the *S*-locus and analysis of SFB alleles[J]. Horticulture Research, 2020, 7(1):170.
- [30] LI J H, ZHANG Y, SONG Y Z, ZHANG H, FAN J B, LI Q, ZHANG D F, XUE Y B. Electrostatic potentials of the *S*-locus F-box proteins contribute to the pollen *S* specificity in self-incompatibility in *Petunia hybrida*[J]. The Plant Journal, 2017, 89(1):45-57.
- [31] LAI Z, MA W S, HAN B, LIANG L Z, ZHANG Y S, HONG G F, XUE Y B. An F-box gene linked to the self-incompatibility (*S*) locus of *Antirrhinum* is expressed specifically in pollen and tapetum[J]. Plant Molecular Biology, 2022, 50(1):29-42.
- [32] WANG Y, TSUKAMOTO T, YI K W, WANG X, HUANG S, MCCUBBIN A G, KAO T H. Chromosome walking in the *Petunia inflata* self-incompatibility (*S*-) locus and gene identification in an 881-kb contig containing *S*<sub>2</sub>-RNase[J]. Plant Molecular Biology, 2004, 54(5):727-742.
- [33] AGUIAR B, VIEIRA J, CUNHA A E, FONSECA N A, REBOIRO-JATO D, REBOIRO-JATO M, FDEZ-RIVEROLA F, RASPÉ O, VIEIRA C P. Patterns of evolution at the gametophytic self-incompatibility *Sorbus aucuparia* (Pyrinae) *S* pollen genes support the non-self recognition by multiple factors model[J]. Journal of Experimental Botany, 2013, 64(8):2423-2434.
- [34] NEWBIGIN E, PAAPE T, KOHN J R. RNase-based self-incompatibility: Puzzled by pollen *S*[J]. Plant Cell, 2008, 20(9):2286-2292.
- [35] ZHAO H, ZHANG Y, ZHANG H, SONG Y Z, ZHAO F, ZHANG Y, ZHU S H, ZHANG H K, ZHOU Z D, GUO H, LI M M, LI J H, GAO Q, HAN Q Q, HUANG H Q, COPSEY L, LI Q, CHEN H, COEN E, ZHANG Y J, XUE Y B. Origin, loss and regain of self-incompatibility in angiosperms[J]. The Plant Cell, 2022, 34(1):579-596.
- [36] SIJACIC P, WANG X, SKIRPAN A L, WANG Y, DOWD P E, MCCUBBIN A G, HUANG S, KAO T H. Identification of the pollen determinant of *S*-RNase-mediated self-incompatibility[J]. Nature, 2004, 429(6989):302-305.
- [37] QIAO H, WANG F, ZHAO L, ZHOU J L, LAI Z, ZHANG Y S, ROBBINS T P, XUE Y B. The F-box protein AhSLF-*S*<sub>2</sub> controls the pollen function of *S*-RNase-based self-incompatibility[J]. Plant Cell, 2004, 16(9):2307-2322.
- [38] CHEN G, ZHANG B, ZHAO Z H, SUI Z H, ZHANG H, XUE Y B. 'A life or death decision' for pollen tubes in *S*-RNase-based self-incompatibility[J]. Journal of Experimental Botany, 2010, 61(7):2027-2037.
- [39] VIEIRA J, FONSECA N A, VIEIRA C P. RNase-based gametophytic self-incompatibility evolution: Questioning the hypothesis of multiple independent recruitments of the *S*-pollen gene[J]. Journal of Molecular Evolution, 2009, 69(1):32-41.