

82 份苹果属资源 *SFB* 基因克隆及不同生态居群基因频率分析

刘 昭^{1,2}, 高 源¹, 王 昆¹, 冯建荣², 孙思邈¹, 路 翔^{1,2}, 李青山^{1,2}, 李连文¹, 王大江¹

(¹中国农业科学院果树研究所/农业农村部园艺作物种质资源利用重点实验室, 辽宁 兴城 125100; ²石河子大学农学院/特色果树栽培生理与种质资源利用兵团重点实验室, 新疆 石河子 832000)

摘要: 为了明确不同苹果属资源的 *SFB* 基因及在各居群中 *SFB* 基因的类型和分布频率, 本试验以‘奎花’等栽培苹果及新疆野苹果等野生资源共 82 份为试验材料, 利用 3 对苹果属 *SFB* 基因特异性引物, 以叶片 DNA 为模板进行 PCR 扩增。特异扩增结果显示: 鉴定的所有试材中均只鉴定出单一的 *SFB* 基因片段。经 GenBank 同源性比较分析, 共获得 5 种 *SFB* 基因, 分别为 *SFB*₁、*SFB*₂、*SFB*₃、*SFB*₇、*SFB*₉。同时对不同生态种群中 *SFB* 基因的分布频率进行了分析, 结果表明不同 *SFB* 基因出现的频率不同, *SFB*₃ 出现的频率最高为 45.12%, 其次为 *SFB*₁(42.60%), 而相同的 *SFB* 基因在不同苹果种间及种内出现的频率亦不同。此外, 系统进化树分析显示, 新疆野苹果与土库曼苹果及栽培苹果的驯化起源有关。

关键词: 苹果属; 资源; *SFB* 基因; 克隆; 频率

Isolation of *SFB* Genes of 82 *Malus* Germplasm Resources and Gene Frequency Analysis of Different Ecological Populations

LIU Zhao^{1,2}, GAO Yuan¹, WANG Kun¹, FENG Jian-rong², SUN Si-miao¹, LU Xiang^{1,2}, LI Qing-shan^{1,2},
Li Lian-wen¹, WANG Da-jiang¹

(¹Research Institute of Pomology, Chinese Academy of Agricultural Sciences / Key Laboratory of Horticultural Crops Germplasm Resources Utilization, Ministry of Agriculture and Rural Affairs of the People's Republic of China. Xingcheng, Liaoning 125100; ²College of Agriculture, Shihezi University, Xinjiang Production and Construction Corps Key Laboratory of Special Fruits and Vegetables Cultivation Physiology and Germplasm Resources Utilization, Shihezi, Xinjiang 832000)

Abstract: In order to clarify the *SFB* gene diversity in *Malus* and the distribution frequency of each sequence haplotype in ecological populations, 82 *Malus* germplasm resources including the cultivated apples (i.e. Kuihua) and wild resources (i.e. *Malus sieversii* (Led.) Roem.) were used. The genotyping was conducted using three gene-specific primer combinations. PCR amplification using leaf DNA produced a single *SFB* gene fragment in all materials. Sanger sequencing of PCR products revealed five haplotypes of the *SFB* gene, corresponding *SFB*₁, *SFB*₂, *SFB*₃, *SFB*₇ and *SFB*₉ based on GenBank homology comparison. At the same time, the distribution frequency of *SFB* gene in different ecological population was analyzed. The frequencies of different haplotypes in populations were different, and the highest frequency of *SFB*₃ was 45.12%, followed by *SFB*₁ (42.60%). The intraspecific and interspecific frequency of the same *SFB* gene was also different. In addition, the phylogenetic tree analysis showed that *Malus sieversii* (Led.) Roem was related to the domestication and origin of *Malus trukmenorum* (Juz, et Pop.) Likh. and apple cultivars.

Keywords: *Malus*; germplasm; *SFB* gene; clone; frequency

收稿日期: 2022-07-28

修回日期: 2022-08-17

网络出版日期:

URL:

第一作者研究方向为果树种质资源研究, E-mail: LZ_0427@163.com

通讯作者: 王大江, 研究方向为苹果种质资源, E-mail: dajiang0101@126.com

基金项目: 中国农业科学院创新工程项目 (ASTIP, CAAS)

Foundation project: The Agricultural Science and Technology Innovation (ASTIP, CAAS)

苹果(*Malus × domestica* Borkh.)属于蔷薇科苹果属植物^[1][1],我国是重要的起源演化中心之一,拥有的苹果种质资源极为丰富^[2]。世界公认的苹果属植物约有 35 个种,原产于我国有 27 个种,其中包括野生种 21 个,栽培种 6 个^[3]。苹果被普遍认为是典型的配子体自交不亲和性植物(Gametophytic self-incompatibility, GSI),由单一的 S-位点的复等位基因控制,该位点至少包括 2 个基因,即花柱 *S-RNase* 基因和花粉 *SFB* 基因^[4],二者共同决定苹果的自交不亲和性。

长期以来,人们对蔷薇科自交不亲和性研究主要集中在花柱 *S-RNase* 基因的克隆及鉴定上,关于 *SFB* 基因的探索与研究存在比较滞后的现象。在蔷薇科植物中,Ushijima 等^[5]首次在扁桃花粉中克隆出具有特异表达和等位多样性的 *SFB* 基因。随后,陆续在杏(*Prunus arminica*)^[6]、樱桃(*Prunus avium*)^[8]、梅(*Prunus mume*)^[9]等物种中均获得了专一序列多态性的花粉 S 候选基因。

据统计国内外学者运用 PCR 或 PCR 酶切技术成功鉴定了 1000 多种苹果 S 基因型并构建了苹果 *S-RNase* 基因型数据库^[12]。而关于苹果花粉 S 基因的研究,Cheng 等^[13]最先在苹果花粉中克隆出 *MdSLFB1* 和 *MdSLFB2* 基因;Sassa 等^[14]在苹果 *S₉* 单倍型上鉴定到 2 个 *F-box* 基因,此后国内外关于苹果自交不亲和花粉 *SFB* 基因的研究报道少之又少。我国拥有着丰富的苹果种质资源,而大多数苹果种质资源花粉 *SFB* 基因尚未得到鉴定。因此,本试验以 82 份苹果属资源(包括栽培品种,古老栽培品种和野生资源)为研究试材,利用 3 对苹果属特异引物,鉴定不同苹果资源花粉 *SFB* 等位基因,确定供试材料在各生态居群以及种间、种内的 *SFB* 基因分布类型及频率差异,了解 *SFB* 基因的进化历程,以期为丰富苹果自交不亲和性 *SFB* 等位基因信息及了解 *SFB* 基因进化研究提供科学的理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本试验供试材料均在中国农业科学院果树研究所采集,于春季采集 82 份苹果属资源的幼嫩叶片,分别标记后带回实验室,置于-80 °C 低温保存(表 1)。

表 1 82 份苹果属资源供试材料

Table1 Test materials of 82 *Malus* germplasm resources

代号 Code	资源名称 Names	学名 Scientific name	资源类型 Resource type	来源 Source
A1	南岔沙果 2	<i>Malus asiatica</i> Nakai.	古老栽培品种	中国黑龙江
A2	乌马河振华伟沙果	<i>Malus asiatica</i> Nakai.	古老栽培品种	中国黑龙江
A3	日新沙果 1	<i>Malus asiatica</i> Nakai.	古老栽培品种	中国黑龙江
A4	崂山柰子	<i>Malus asiatica</i> Nakai.	古老栽培品种	中国山东
A5	西府海棠	<i>Malus micromalus</i> Makino	古老栽培品种	中国山东
A6	花红	<i>Malus asiatica</i> Nakai.	古老栽培品种	中国山东
A7	双红	<i>Malus domestica</i> Borkh.	栽培品种(红玉×红魁)	中国辽宁
A8	奎花	<i>Malus domestica</i> Borkh.	栽培品种(金冠×红星)	中国河北
A9	枣强短枝	<i>Malus domestica</i> Borkh.	栽培品种(不详)	中国河北
A10	扁果海棠	<i>Malus coronaia</i> (L.) Mill.	野生资源	美国
A11	西蜀海棠	<i>Malus prattii</i> (Hemsl.) Schneid.	野生资源	中国
A12	南山 1 号	<i>Malus domestica</i> Borkh.	栽培品种(不详)	中国辽宁
A13	南山 4 号	<i>Malus domestica</i> Borkh.	栽培品种(不详)	中国辽宁
A14	华帅 1 号	<i>Malus domestica</i> Borkh.	栽培品种(元帅短枝芽变)	中国辽宁

A15	新疆 327	<i>Malus domestica</i> Borkh.	栽培品种(不详)	中国新疆
A16	青岛 1 号	<i>Malus domestica</i> Borkh.	栽培品种(元帅芽变)	中国山东
A17	张家口短枝	<i>Malus domestica</i> Borkh.	栽培品种(不详)	中国河北
A18	3006	<i>Malus sieversii</i> (Led.) Roem.	野生资源	新疆新源
A19	3024	<i>Malus sieversii</i> (Led.) Roem.	野生资源	新疆新源
A20	3011	<i>Malus sieversii</i> (Led.) Roem.	野生资源	新疆新源
A21	3022	<i>Malus sieversii</i> (Led.) Roem.	野生资源	新疆新源
A22	3025	<i>Malus sieversii</i> (Led.) Roem.	野生资源	新疆新源
A23	2622	<i>Malus sieversii</i> (Led.) Roem.	野生资源	新疆新源
A24	27011	<i>Malus sieversii</i> (Led.) Roem.	野生资源	新疆霍城
A25	27015	<i>Malus sieversii</i> (Led.) Roem.	野生资源	新疆霍城
A26	27018	<i>Malus sieversii</i> (Led.) Roem.	野生资源	新疆霍城
A27	26008	<i>Malus sieversii</i> (Led.) Roem.	野生资源	新疆霍城
A28	27006	<i>Malus sieversii</i> (Led.) Roem.	野生资源	新疆霍城
A29	26026	<i>Malus sieversii</i> (Led.) Roem.	野生资源	新疆霍城
A30	26006	<i>Malus sieversii</i> (Led.) Roem.	野生资源	新疆霍城
A31	26007	<i>Malus sieversii</i> (Led.) Roem.	野生资源	新疆霍城
A32	26012	<i>Malus sieversii</i> (Led.) Roem.	野生资源	新疆霍城
A33	26014	<i>Malus sieversii</i> (Led.) Roem.	野生资源	新疆霍城
A34	26019	<i>Malus sieversii</i> (Led.) Roem.	野生资源	新疆霍城
A35	26020	<i>Malus sieversii</i> (Led.) Roem.	野生资源	新疆霍城
A36	26025	<i>Malus sieversii</i> (Led.) Roem.	野生资源	新疆霍城
A37	27003	<i>Malus sieversii</i> (Led.) Roem.	野生资源	新疆霍城
A38	27012	<i>Malus sieversii</i> (Led.) Roem.	野生资源	新疆霍城
A39	26021	<i>Malus sieversii</i> (Led.) Roem.	野生资源	新疆霍城
A40	28006	<i>Malus sieversii</i> (Led.) Roem.	野生资源	新疆特克斯
A41	28010	<i>Malus sieversii</i> (Led.) Roem.	野生资源	新疆特克斯
A42	28014	<i>Malus sieversii</i> (Led.) Roem.	野生资源	新疆特克斯
A43	29004	<i>Malus sieversii</i> (Led.) Roem.	野生资源	新疆特克斯
A44	28003	<i>Malus sieversii</i> (Led.) Roem.	野生资源	新疆特克斯
A45	28007	<i>Malus sieversii</i> (Led.) Roem.	野生资源	新疆特克斯
A46	29001	<i>Malus sieversii</i> (Led.) Roem.	野生资源	新疆特克斯
A47	29008	<i>Malus sieversii</i> (Led.) Roem.	野生资源	新疆特克斯
A48	29017	<i>Malus sieversii</i> (Led.) Roem.	野生资源	新疆特克斯
A49	29024	<i>Malus sieversii</i> (Led.) Roem.	野生资源	新疆特克斯
A50	29032	<i>Malus sieversii</i> (Led.) Roem.	野生资源	新疆特克斯
A51	28001	<i>Malus sieversii</i> (Led.) Roem.	野生资源	新疆特克斯
A52	28002	<i>Malus sieversii</i> (Led.) Roem.	野生资源	新疆特克斯
A53	28008	<i>Malus sieversii</i> (Led.) Roem.	野生资源	新疆特克斯
A54	28009	<i>Malus sieversii</i> (Led.) Roem.	野生资源	新疆特克斯
A55	28011	<i>Malus sieversii</i> (Led.) Roem.	野生资源	新疆特克斯
A56	28012	<i>Malus sieversii</i> (Led.) Roem.	野生资源	新疆特克斯
A57	29009	<i>Malus sieversii</i> (Led.) Roem.	野生资源	新疆特克斯
A58	29013	<i>Malus sieversii</i> (Led.) Roem.	野生资源	新疆特克斯
A59	29019	<i>Malus sieversii</i> (Led.) Roem.	野生资源	新疆特克斯
A60	29029	<i>Malus sieversii</i> (Led.) Roem.	野生资源	新疆特克斯
A61	29033	<i>Malus sieversii</i> (Led.) Roem.	野生资源	新疆特克斯
A62	长果	<i>Malus domestica</i> Borkh.	栽培品种(不详)	俄罗斯
A63	东方苹果	<i>Malus orientalis</i> Uglitz.	野生资源	欧洲
A64	土库曼苹果	<i>Malus turkmenorum</i> (Juz.) Langenf	野生资源	土库曼斯坦
A65	红冠	<i>Malus domestica</i> Borkh.	栽培品种(金冠×红冠)	美国
A66	奥勒岗矮生	<i>Malus domestica</i> Borkh.	栽培品种 (红王短枝芽变)	美国
A67	米勒矮生	<i>Malus domestica</i> Borkh.	栽培品种 (红星短枝芽变)	美国
A68	克鲁斯	<i>Malus domestica</i> Borkh.	栽培品种(不详)	美国

A69	秋金星	<i>Malus domestica</i> Borkh.	栽培品种(自然实生)	中国
A70	玉霰	<i>Malus domestica</i> Borkh.	栽培品种(自然实生)	美国
A71	小町	<i>Malus domestica</i> Borkh.	栽培品种(不详)	美国
A72	甜安东诺夫卡	<i>Malus domestica</i> Borkh.	栽培品种(不详)	原苏联
A73	米丘林纪念	<i>Malus domestica</i> Borkh.	栽培品种 (香槟海棠实生后代)	原苏联
A74	大陆 52 号	<i>Malus domestica</i> Borkh.	栽培品种 (不详)	不详
A75	黄色立哈尔德	<i>Malus domestica</i> Borkh.	栽培品种 (不详)	不详
A76	冬甜	<i>Malus domestica</i> Borkh.	栽培品种(不详)	原苏联
A77	乔雅尔	<i>Malus domestica</i> Borkh.	栽培品种(不详)	加拿大
A78	古德伯格	<i>Malus domestica</i> Borkh.	栽培品种(不详)	不详
A79	巴斯美	<i>Malus domestica</i> Borkh.	栽培品种(不详)	英国
A80	正定 2 号	<i>Malus domestica</i> Borkh.	栽培品种(不详)	比利时
A81	阿伊瓦尼亚	<i>Malus domestica</i> Borkh.	栽培品种(不详)	保加利亚
A82	青龙	<i>Malus domestica</i> Borkh.	栽培品种(不详)	法国

1.2 试验方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 叶片 DNA 提取参照新型植物基因组 DNA 提取试剂盒 DP320 说明书(北京天根)。利用 1 % 的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 完整性, 利用核酸蛋白仪 Thermo NANODrop 2000 检测 DNA 浓度及纯度。DNA 样品于 -20 °C 保存备用。

1.2.2 *SFB* 基因的 PCR 扩增 本试验根据苹果属 *SFB* 基因的文献报道, 选用以下 3 对引物, 分别为 MdS-1F+MdS-1R、MdS-3F +MdS-3R、MdS-5F+ MdS-5R, 均由北京六合华大基因科技有限公司合成, 具体引物序列见表 2。

表 2 所选用的引物组合及其序列

Table 2 Sequences of consensus primer combinations

序号 No.	引物组合 Primer combination	序列 (5'-3') Sequence (5'-3')	退火温度 Anneal Temperature	参考文献 Reference
1	MdS-1F	GAA GGG ATT TTG TTA TTG GTT TAC	55 °C	[13]
	MdS-1R	TTT TGG ACA CAA GCA TAT TAC ATT T		
2	MdS-3F	TTC TAC CTT CCC CCC CGA A	57 °C	[15]
	MdS-3R	AAG AGC TTC AAA ACC CGT AAT C		
3	MdS-5F	TTA ATG AGA GAG TTG CAC ACA	57 °C	[15]
	MdS-5R	AAA TAT AAT AAA ACT CCA AAC CAA		

以叶片 DNA 为模板进行 *SFB* 基因克隆, PCR 反应采用 20 μ L 体系: 含 10 \times Buffer 2.5 μ L, 3.0 mmol L⁻¹ MgCl₂, 2 mmol L⁻¹ dNTP, 上下游引物各 0.5 μ mol·L⁻¹, 20~50 ng 模板 DNA, Taq 酶 1.25 U, ddH₂O 水补至 20 μ L。PCR 反应程序为 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 35 个循环后 72 °C 延伸 5 min, 引物 MdS-1F +MdS-1R 退火温度为 55 °C, MdS-3F +MdS-3R 和 MdS-5F+ MdS-5R 退火温度为 57 °C, 4 °C 保存。PCR 反应完成后, 取 5 μ L 扩增产物, 用 1 % 的琼脂糖凝胶电泳检测, 5 μ L DL2000 DNA Marker 作为参照, 以用来检测 PCR 扩增产物的有无及目的片段大小, 琼脂糖凝胶电泳结束后利用凝胶成像系统拍照。

1.2.3 *SFB* 的克隆测序 利用 DNA 回收纯化试剂盒(北京天根)进行目的条带的回收及纯化, 并将纯化的目的片段连接至 pEASY-Blunt-Simple 克隆载体上, 42 °C 热激法导入大肠杆菌 Trans5 α 感受态细胞, 进行单菌落阳性克隆选, 对同一 PCR 产物最少选取 10 个单菌落进行目标条带的检测并至少选取三个含有目标条带的

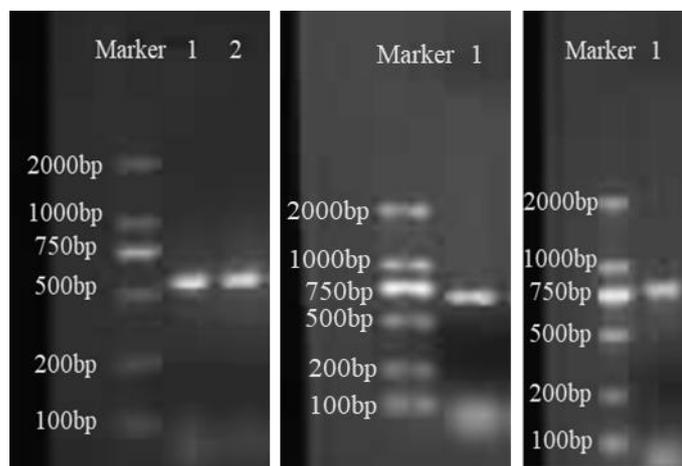
单菌落进行双向测序，所有的测序结果均由北京六合华大基因科技有限公司完成，所有结果均进行了3次重复测序。

1.2.4 数据分析 对本试验中所获得的核苷酸序列在NCBI的GenBank中用BLAST进行同源性比较分析，核苷酸序列的同源性在98%以上，可被认为是同一*S*基因型^[15]。同时在数据库中选取已经注册的蔷薇科李属、梨属和苹果属的*SFB*基因的全长序列，采用邻接法(neighbor-joining method)在MEGA11.0软件上分别进行比对，绘制并构建系统进化树。

2 结果分析

2.1 *SFB* 基因的特异扩增及鉴定

利用选出的3对*SFB*基因特异引物组合对82份苹果属资源的叶片DNA进行PCR扩增，如图1所示，所有供试材料中均扩增出1条特异性条带。经测序和序列比对发现克隆出的片段分属5种*SFB*基因，片段长度在556~783bp之间，大小分别为556bp(‘南岔沙果2’、‘西府海棠’等)、585bp(‘27006’)、698bp(‘双红’、‘奎花’、‘土库曼苹果’等)、783bp(‘26006’等)。其中片段为698bp克隆出2种*SFB*基因，分别为*SFB*₃、*SFB*₂。



注：左图中1、2分别表示片段长度556bp、585bp；中间图中1代表片段长度698bp；右图中1代表片段长度783bp

Note: Figure 1 and 2 on the left represent the fragment length of 556 bp and 585 bp; The Figure 1 on the middle represent the fragment length of 698 bp; Figure 1 on the right represent the fragment length of 783 bp

图1 供试苹果属资源*SFB*基因片段的PCR扩增结果

Fig. 1 PCR amplification results of *SFB* gene fragment of *Malus* germplasm resources

将上述获得的核苷酸序列在GenBank中进行同源性比较分析，BLAST对比结果表明，所克隆到的*SFB*基因与GenBank中已登录的苹果属*SFB*基因的同源性均在98%以上(表3)。根据各条带的比较结果，可以确定‘南岔沙果2’、‘乌马河振华伟沙果’、‘崂山柰子’等32份苹果资源的*SFB*基因为*SFB*₁；‘日新沙果1’、‘双红’、‘枣强短枝’等36份苹果资源的*SFB*基因为*SFB*₃；‘27006’的*SFB*基因为*SFB*₇；‘土库曼苹果’的*SFB*基因为*SFB*₂；‘2622’、‘26026’等12份新疆野苹果的*SFB*基因为*SFB*₉。

表3 82份苹果属资源*SFB*基因片段的比对结果

Table 3 Comparison results of *SFB* gene fragments from 82 *Malus* germplasm resources

品种代号	片段大小	基因名称	同源基因登录号	同源性(%)
Cultivar code	Length of fragment /bp	Gene name	Accession No. of homologous gene	Homology

A1	562	<i>SFB₁</i>	DQ422810.1	98 %
A2	556	<i>SFB₁</i>	DQ422810.1	99 %
A3	698	<i>SFB₃</i>	GU345811.1	100 %
A4	556	<i>SFB₁</i>	DQ422810.1	99 %
A5	556	<i>SFB₁</i>	DQ422810.1	99 %
A6	556	<i>SFB₁</i>	DQ422810.1	99 %
A7	698	<i>SFB₃</i>	GU345811.1	99 %
A8	698	<i>SFB₃</i>	GU345811.1	99 %
A9	698	<i>SFB₃</i>	GU345811.1	99 %
A10	556	<i>SFB₁</i>	DQ422810.1	98 %
A11	556	<i>SFB₁</i>	DQ422810.1	98 %
A12	698	<i>SFB₃</i>	GU345811.1	99 %
A13	698	<i>SFB₃</i>	GU345811.1	99 %
A14	698	<i>SFB₃</i>	GU345811.1	100 %
A15	698	<i>SFB₃</i>	GU345811.1	99 %
A16	698	<i>SFB₃</i>	GU345811.1	99 %
A17	698	<i>SFB₃</i>	GU345811.1	99 %
A18	556	<i>SFB₁</i>	DQ422810.1	98 %
A19	556	<i>SFB₁</i>	DQ422810.1	98 %
A20	556	<i>SFB₁</i>	DQ422810.1	99 %
A21	556	<i>SFB₁</i>	DQ422810.1	99 %
A22	782	<i>SFB₃</i>	GU345811.1	100 %
A23	782	<i>SFB₉</i>	FJ610153.1	99 %
A24	556	<i>SFB₁</i>	DQ422810.1	98 %
A25	556	<i>SFB₁</i>	DQ422810.1	98 %
A26	556	<i>SFB₁</i>	DQ422810.1	98 %
A27	698	<i>SFB₃</i>	GU345811.1	99 %
A28	585	<i>SFB₇</i>	GU345816.1	99 %
A29	585	<i>SFB₉</i>	FJ610153.1	100 %
A30	782	<i>SFB₉</i>	FJ610153.1	99 %
A31	782	<i>SFB₉</i>	FJ610153.1	99 %
A32	782	<i>SFB₉</i>	FJ610153.1	99 %
A33	782	<i>SFB₉</i>	FJ610153.1	99 %
A34	782	<i>SFB₉</i>	FJ610153.1	99 %
A35	783	<i>SFB₉</i>	FJ610153.1	99 %
A36	782	<i>SFB₉</i>	FJ610153.1	99 %
A37	783	<i>SFB₉</i>	FJ610153.1	99 %
A38	782	<i>SFB₉</i>	FJ610153.1	99 %
A39	782	<i>SFB₉</i>	FJ610153.1	99 %
A40	556	<i>SFB₁</i>	DQ422810.1	98 %
A41	556	<i>SFB₁</i>	DQ422810.1	98 %
A42	556	<i>SFB₁</i>	DQ422810.1	98 %
A43	556	<i>SFB₁</i>	DQ422810.1	98 %
A44	556	<i>SFB₁</i>	DQ422810.1	99 %
A45	556	<i>SFB₁</i>	DQ422810.1	99 %
A46	556	<i>SFB₁</i>	DQ422810.1	99 %
A47	556	<i>SFB₁</i>	DQ422810.1	99 %
A48	556	<i>SFB₁</i>	DQ422810.1	99 %
A49	556	<i>SFB₁</i>	DQ422810.1	99 %
A50	556	<i>SFB₁</i>	DQ422810.1	99 %
A51	718	<i>SFB₃</i>	GU345811.1	99 %
A52	782	<i>SFB₃</i>	GU345811.1	99 %
A53	698	<i>SFB₃</i>	GU345811.1	99 %
A54	698	<i>SFB₃</i>	GU345811.1	99 %

A55	698	<i>SFB</i> ₃	GU345811.1	99 %
A56	698	<i>SFB</i> ₃	GU345811.1	99 %
A57	698	<i>SFB</i> ₃	GU345811.1	99 %
A58	698	<i>SFB</i> ₃	GU345811.1	99 %
A59	698	<i>SFB</i> ₃	GU345811.1	99 %
A60	698	<i>SFB</i> ₃	GU345811.1	99 %
A61	698	<i>SFB</i> ₃	GU345811.1	99 %
A62	555	<i>SFB</i> ₁	DQ422810.1	98 %
A63	556	<i>SFB</i> ₁	DQ422810.1	99 %
A64	698	<i>SFB</i> ₂	MG458455.1	99 %
A65	698	<i>SFB</i> ₃	GU345811.1	99 %
A66	716	<i>SFB</i> ₃	GU345811.1	99 %
A67	698	<i>SFB</i> ₃	GU345811.1	99 %
A68	698	<i>SFB</i> ₃	GU345811.1	100 %
A69	698	<i>SFB</i> ₃	GU345811.1	99 %
A70	698	<i>SFB</i> ₃	GU345811.1	99 %
A71	698	<i>SFB</i> ₃	GU345811.1	99 %
A72	698	<i>SFB</i> ₃	GU345811.1	99 %
A73	698	<i>SFB</i> ₃	GU345811.1	99 %
A74	698	<i>SFB</i> ₃	GU345811.1	99 %
A75	698	<i>SFB</i> ₃	GU345811.1	99 %
A76	698	<i>SFB</i> ₃	GU345811.1	100 %
A77	698	<i>SFB</i> ₃	GU345811.1	99 %
A78	556	<i>SFB</i> ₁	DQ422810.1	99 %
A79	556	<i>SFB</i> ₁	DQ422810.1	99 %
A80	556	<i>SFB</i> ₁	DQ422810.1	99 %
A81	556	<i>SFB</i> ₁	DQ422810.1	99 %
A82	556	<i>SFB</i> ₁	DQ422810.1	99 %

2.2 *SFB* 基因的频率统计分析

本研究鉴定的 82 份苹果属资源中共包括：6 份古老栽培品种、29 份栽培品种、47 份野生资源，共涉及到 5 种不同的 *SFB* 基因。分析结果显示这 5 种 *SFB* 基因在 82 份苹果属资源中分布频率明显不同，分布频率最高的为 *SFB*₃，为 45.12 %，其次是 *SFB*₁(42.60 %)，*SFB*₉(17.10 %)，*SFB*₂ 和 *SFB*₇ 均仅出现 1 次，频率为 1.20 %。

此外在苹果属不同资源类型中 *SFB* 基因分布频率也有所差异：对 6 份古老栽培品种的 *SFB* 基因分析发现，共涉及到 2 个基因为 *SFB*₁(6.09 %)和 *SFB*₃(1.20 %)；29 份苹果栽培品种中同样涉及到 *SFB*₁(12.19 %)和 *SFB*₃(26.82 %)，但与 6 份古老栽培品种相比，栽培品种中 *SFB*₁、*SFB*₃ 基因分布频率较高；而 *SFB*₂、*SFB*₇、*SFB*₉ 这 3 个基因型均只分布在苹果野生资源中，未在其他资源类型中分布（图 2）。

研究发现供试材料中，种间甚至种内的 *SFB* 基因分布频率亦大不相同。本试验共涉及 8 个种，新疆野苹果(*Malus sieversii* (Led.) Roem.)、栽培种(*Malus domestica* Borkh.)及花红(*Malus asiatica* Nakai.)为 82 份供试苹果资源中主要的 3 个种，西府海棠(*Malus micromalus* Makino)、扁果海棠(*Malus coronaia* (L.) Mill.)、西蜀海棠(*Malus prattii* (Hemsl.) Schneid.)、东方苹果(*Malus orientalis* Uglitz.)及土库曼苹果(*Malus turkmenorum* (Juz.) Langenf)在供试材料中均只有 1 份资源。对不同苹果种间 *SFB* 基因分布频率分析，可以看出 *SFB* 基因的分布是不均等的。除土库曼苹果以外，*SFB*₁ 基因在其他 7 个种内均有分布，且 *SFB*₁ 在新疆野苹果中分布频率最高，为 21.95 %；*SFB*₃ 基因主要分布在新疆野苹果、栽培种及花红中，且 *SFB*₃ 在栽培种中分布频率

最高,为 26.80 %; *SFB*₇ 和 *SFB*₉ 基因仅分布在新疆野苹果中; *SFB*₂ 基因仅分布在土库曼苹果中,频率为 1.20 %。对同一种内 *SFB* 基因分布频率分析,可以看出在新疆野苹果中 *SFB*₁ 基因分布频率最高, *SFB*₃ 和 *SFB*₉ 基因的分布差异不明显,而 *SFB*₇ 基因分布频率最低;在栽培种中 *SFB*₃ 基因分布频率最高;在花红中 *SFB*₁ 基因分布频率最高;在西府海棠、扁果海棠、西蜀海棠、东方苹果这 4 个种内均只分布 *SFB*₁ 基因,且频率相同为 1.20 % (图 3)。

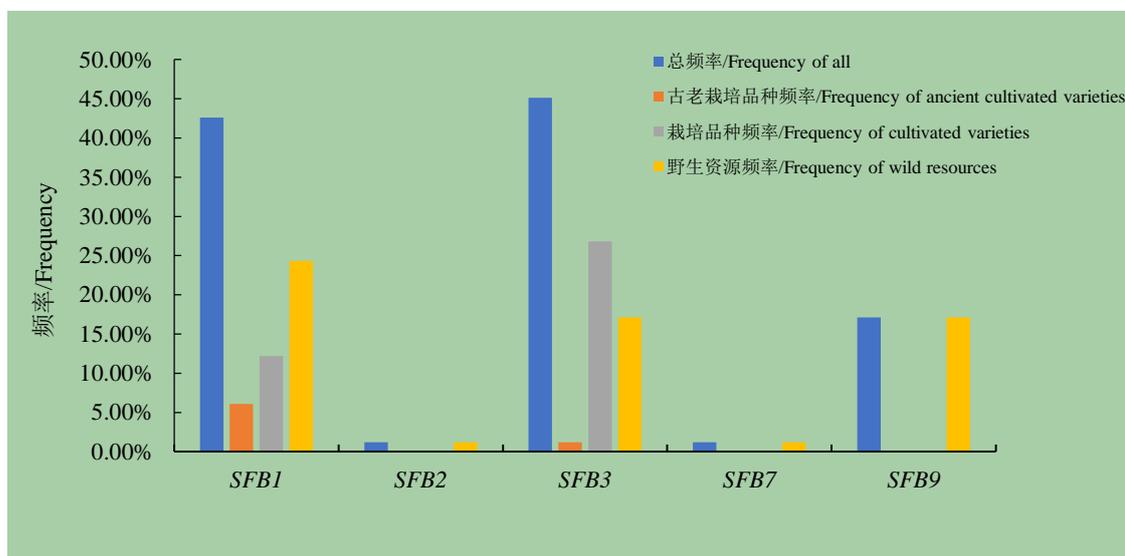


图 2 82 份材料的 *SFB* 基因频率

Fig. 2 *SFB* gene frequencies of 82 materials

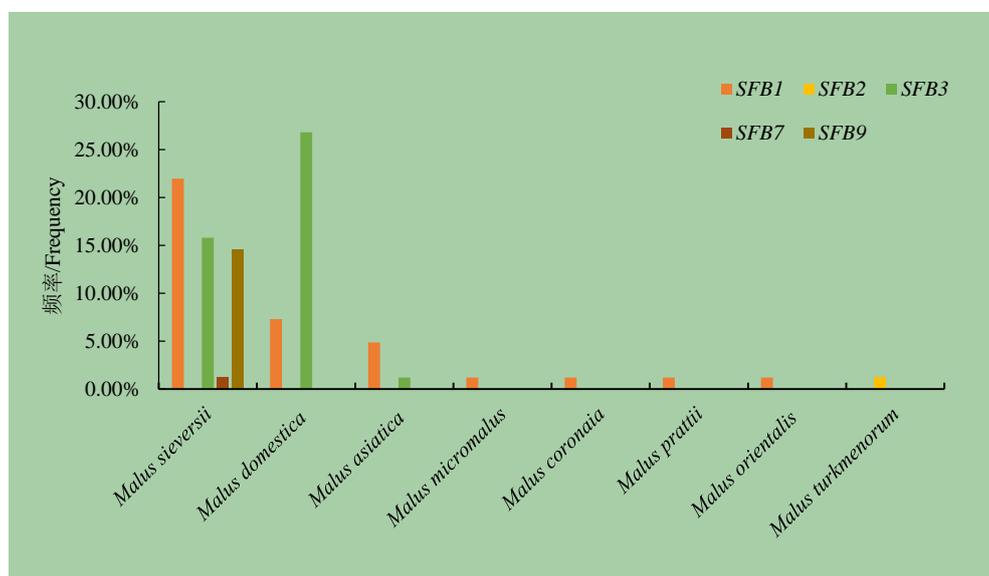


图 3 不同种的 *SFB* 基因频率

Fig.3 *SFB* gene frequencies among different species

2.3 *SFB* 基因在不同居群中分布分析

供试苹果 *SFB* 基因的频率和分布与所依赖的不同生态居群有着密切的关系,研究结果显示,82 份苹果属资源共涉及 9 个不同的生态居群,其中,国内包含 5 个分布居群,分别为黑龙江居群、辽宁居群、山东

居群、河北居群以及新疆居群，国外包含 4 个不同的分布居群，分别为加拿大居群、美国居群、欧洲居群以及俄罗斯居群。在 9 个不同的生态居群中 *SFB* 基因的分布是不同的：黑龙江、河北、山东、新疆特克斯县以及俄罗斯居群均分布有 *SFB*₁ 和 *SFB*₃；新疆新源县及美国居群中均有 3 个 *SFB* 等位基因，为 *SFB*₁、*SFB*₃、*SFB*₉；欧洲居群中有 3 个 *SFB* 等位基因，为 *SFB*₁、*SFB*₂、*SFB*₃；新疆霍城县居群中有 4 个 *SFB* 等位基因，为 *SFB*₁、*SFB*₃、*SFB*₇、*SFB*₉；而在辽宁、加拿大居群中均只有 1 个 *SFB* 等位基因，为 *SFB*₃（图 4、图 5）。

此外，*SFB* 等位基因在不同居群中的比率是不均等的，*SFB*₁ 和 *SFB*₃ 等位基因在 9 个不同的生态居群中均占有一定的频率，分析认为这 2 个等位基因可能在苹果 *SFB* 基因中占有主导地位，*SFB*₉ 等位基因虽出现在新疆霍城、新源及美国这 3 个不同的生态居群中，却在新疆霍城居群中占较高比率，约 70%，分析认为苹果 *SFB*₉ 等位基因可能是新疆霍城居群的主要等位基因。*SFB*₇ 和 *SFB*₂ 这 2 个基因分布比率较低，*SFB*₇ 仅在新疆霍城居群分布，*SFB*₂ 仅在欧洲居群分布，未在其他居群分布，分析认为这 2 个等位基因可能为这 2 个居群新进化而来。

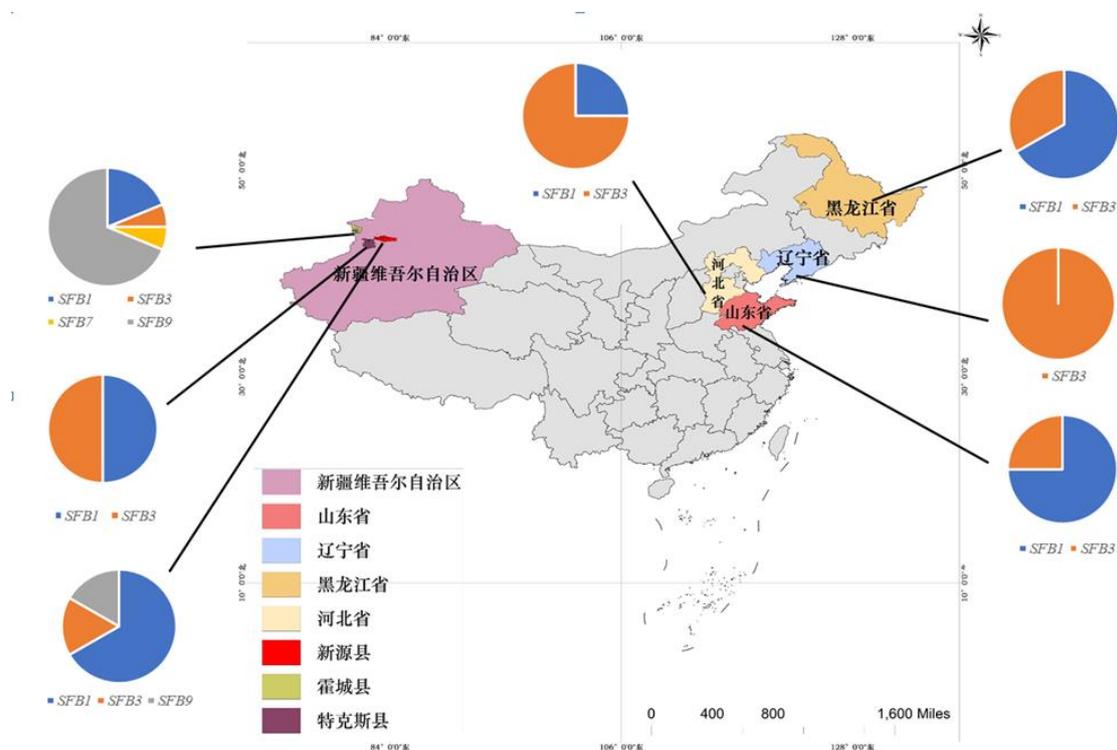


图 4 供试苹果属资源 *SFB* 基因在国内不同生态区域的地理分布

Fig. 4 Geographical distribution of *SFB* gene of *Malus* germplasm resources in different ecological regions in China

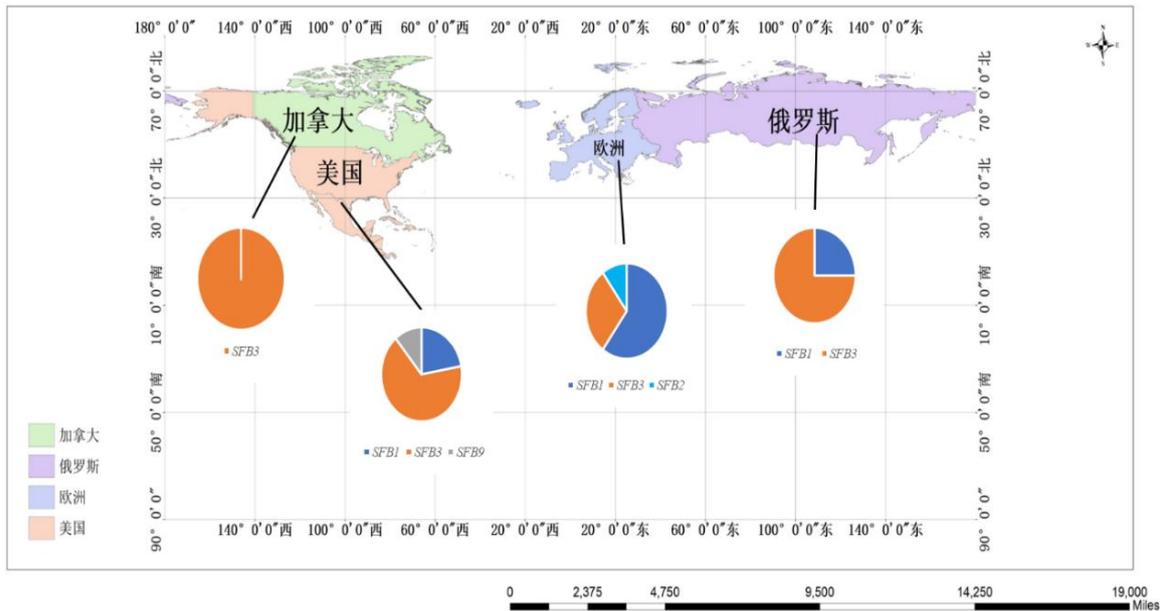


图 5 供试苹果属资源 *SFB* 基因在国外不同生态区域的地理分布

Fig. 5 Geographical distribution of *SFB* gene of tested *Malus* germplasm resources in different ecological regions abroad

2.4 *SFB* 基因的系统进化分析

为进一步分析蔷薇科苹果属、李属、梨属 *SFB* 基因在系统进化上的关系，利用 NCBI 数据库检索选取了已登录的蔷薇科 *SFB* 基因，包括李属扁桃(*Prunus dulcis*)、樱桃(*Prunus pseudocerasus*)、大岛樱(*Prunus speciosa*)、中国李(*Prunus Salicina*)、杏(*Prunus armeniaca*)、梨属白梨(*Pyrus bretschneideri*)、新疆梨(*Pyrus Sinkiangensis*)的 15 条 *SFB* 基因，与本试验得到的 5 种苹果 *SFB* 基因序列利用 MEGA11.0 软件构建系统进化树。结果如图 6 所示，该系统进化树主要分为 2 个大类，第一大类主要为李属 *SFB* 基因的聚类；第二类主要为试验所得苹果属 *SFB* 基因与梨属 *SFB* 基因的聚类。可以看出，本试验从新疆野苹果、古老栽培品种及栽培品种中鉴定的 *SFB*₃ 基因与从土库曼苹果中鉴定的 *SFB*₂ 基因亲缘关系为 100%，表现为极相近的亲缘关系。另外，从新疆野苹果、古老栽培品种和栽培品种中鉴定的 *SFB*₁ 基因与从新疆野苹果中鉴定的 *SFB*₇ 和 *SFB*₉ 基因亲缘关系亦相近。

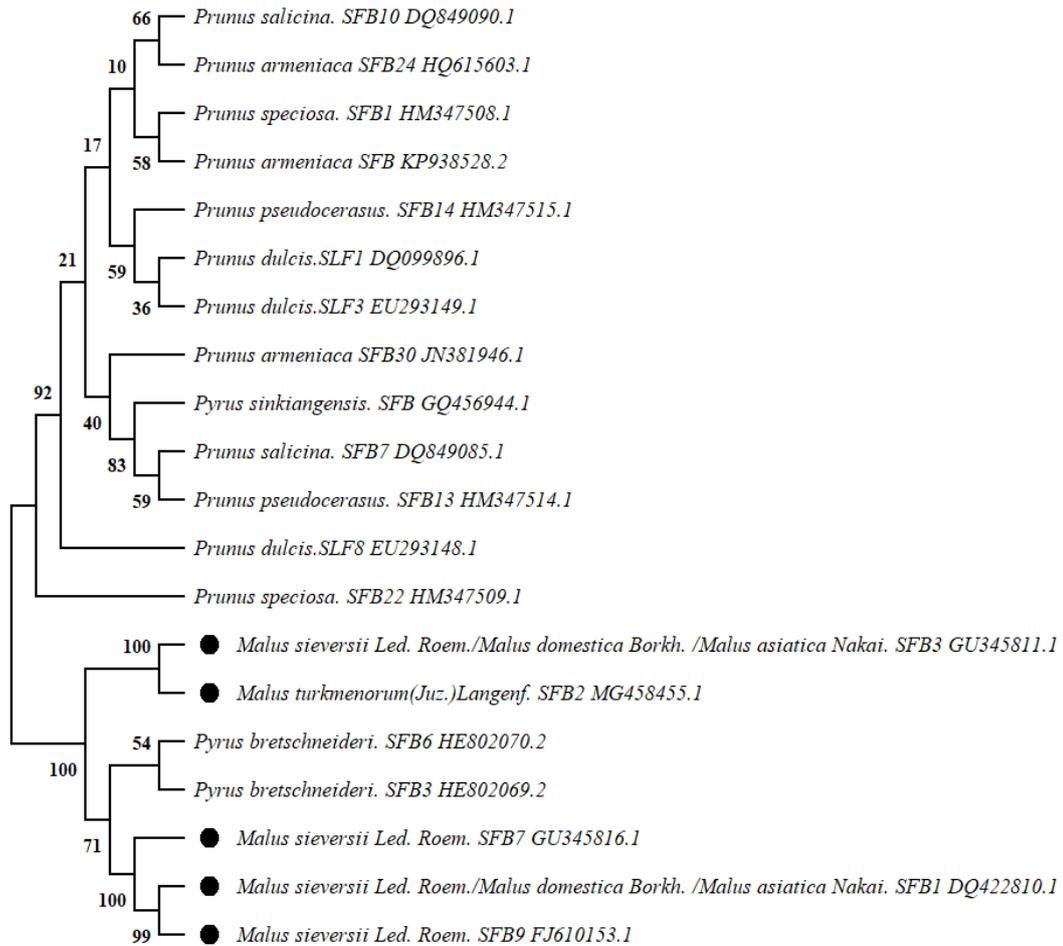


图 6 蔷薇科 *SFB* 基因系统进化分析

Fig.6 Phylogenetic analysis of *SFB* gene in *Rosaceae*

3 讨论

生产中广泛栽培的苹果品种大多数是二倍体，仅有少数品种为多倍体。参试的 82 份苹果属资源在理论上都应扩增出 2 条带，但本试验均只扩增出 1 条特异性条带，并不能确定所有供试材料的 *SFB* 基因型。对此袁德义等^{[17][17]}认为可能由于 *S* 等位基因片段大小相差较小，难以确定其 *S* 基因型；唐忠建^[18]认为可能是其 *SFB* 基因型是纯合体，从而出现只有一条 *S* 等位基因的现象；吴俊等^[6]认为 *SFB* 基因的内含子长度较短且差异小，基于其序列长度的多态性很难分辨出不同的 *S* 等位基因。虽然国内外在蔷薇科果树如桃^[19]、杏^[20]、甜樱桃^[21]等树种中对 *SFB* 基因的相关报道均未明确鉴定出两条 *SFB* 等位基因片段，但 Ikeda 等⁰利用不同引物组合确定了 11 种樱桃的 2 倍体 *SFB* 基因型；胡国峰等^[9]利用等位基因特异性 PCR 明确了 11 个梅品种的 *SFB* 基因型。因此，对于本试验中只扩增出一条 *SFB* 基因是什么原因造成，目前尚未得出明确结论，需要尝试挑选更多的引物组合和改进的试验方法进行进一步的研究。

自交不亲和是一种古老的遗传机制，早在属/种分化前就已经存在^[23]。从供试材料的 *SFB* 基因可以看出，*SFB* 基因经历了一定的进化过程，*SFB*₁ 和 *SFB*₃ 在苹果古老栽培品种、栽培品种及野生资源类型中均存在，说明它们是苹果中古老的 *S* 等位基因，可能是苹果不同种分化前的主导等位基因。此外，不同的 *SFB* 基因在苹果供试品种中分布频率不同，且在苹果属种间及种内分布频率亦存在差异。新疆野苹果被认为是现代

栽培苹果的祖先种, 在供试材料中亦是 *SFB* 基因最丰富的 1 个种, 而在栽培种、西府海棠等种中 *SFB* 基因种类的丰富度呈下降趋势, 分析认为可能是在苹果属遗传演化及选育过程中, *SFB* 基因多样性逐渐减少、遗传基础越来越狭窄。也可能是本试验在西府海棠、扁果海棠等 5 个种中选取的资源份数较少, 导致 *SFB* 基因种类鉴定不全面。

随着居群的分离, *SFB* 基因的出现频率亦大不相同。如 *SFB₁* 和 *SFB₃* 在 9 个不同的生态居群中均占据着一定的比例, 分析认为这 2 个基因在不同居群中存在的比率不同很有可能是为了适应当地环境, 受到一些自然选择, 使得 *SFB* 基因在遗传中发生偏好性, 更加倾向于一方。本试验中鉴定的 *SFB₇* 基因只出现在新疆霍城居群的新疆野苹果中, *SFB₂* 基因只出现在欧洲居群, 而在其他居群中均未鉴定到该基因, 分析认为 *SFB₇* 和 *SFB₂* 基因可能是这 2 个居群中新进化产生的, 也可能是由于该研究在其他生态居群所选取的资源份数相对较少, 致使 *SFB₇* 和 *SFB₂* 基因出现的频率较低, 在其他居群中未鉴定出。因此, 还需加大对不同生态居群苹果资源 *SFB* 基因的鉴定数量。总之, 对苹果自交不亲和性 *SFB* 基因发生频率及在不同居群分布的分析研究, 有助于更好了解自交不亲和 *SFB* 基因进化的历程。

目前普遍研究认为蔷薇科李属、梨属、苹果属 *S-RNase* 基因的序列聚类模式主要为梨属和苹果属 *S-RNase* 基因聚类在一起, 而李属 *S-RNase* 基因单独聚类在一起, 出现这种聚类模式主要与蔷薇科自交不亲和的识别方式有关^[24]。本研究发现蔷薇科 *SFB* 基因与 *S-RNase* 基因具有相似的聚类模式。梨属和苹果属 *SFB* 基因的自交不亲和识别是由多重因子共同参与的非自我识别模式^[26], 花粉决定因子被认为由多个 SLF 蛋白协同作用, 每个 *S* 单倍型能编码识别非自我 *S-RNase* 的多个 SLF, 但不能够编码识别自我 *S-RNase* 的 SLF^[27], 从而使花粉管得以正常生长。此外, 栽培苹果的 *SFB* 基因与新疆野苹果的聚在一起, 并且序列同源性较高, 表明栽培苹果的这些 *SFB* 基因很可能源自新疆野苹果, 这与现有文献中报道的栽培苹果的原始祖先是新疆野苹果的观点一致^{[28][28]}。而土库曼苹果的 *SFB₂* 基因也与新疆野苹果聚在一起, 表明新疆野苹果也可能参与了土库曼苹果的驯化起源。

参考文献

- [1] Sassa H. Molecular mechanism of the *S-RNase* based gametophytic self-incompatibility in fruit trees of *Rosaceae*. *Breeding Science*, 2016, 66 (1):116-121
- [2] 王昆,刘凤之,高源,龚欣,刘立军,王大江.我国苹果种质资源基础研究进展.中国果树, 2013, (2):61-64
Wang K, Liu F Z, Gao Y, Gong X, Liu L J, Wang D J. Advances in basic research on apple germplasm resources in China. *China Fruits*, 2013, (2):61-64
- [3] 段乃彬, 栽培苹果起源、演化及驯化机理的基因组学研究. 山东农业大学, 2017
Duan N B. Genomic analyses provide new insights into apple evolution, domestication and genetic diversity. Shandong Agricultural University, 2017
- [4] Mccubbin A G, Kao T H. Molecular recognition and response in pollen and pistil interactions. *Annual Review of Cell Develop Biology*, 2000, 16(1):333-364
- [5] 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. *Plant Cell*, 2003, 15:771-781.
- [6] 吴俊,谷超,张绍铃,张树军,宋宏峰,赵习平.中国杏自交不亲和和花粉特异 *SFB* 基因的鉴定与序列分析.园艺学报, 2010, 37(8):1329-1338.
Wu J, Gu C, Zhang S L, Zhang S J, Song H F, Zhao X P. Identification and sequence analysis of pollen-specific *SFB* genes in self-incompatible Chinese apricot (*Prunus armeniaca*). *Acta Horticulture Sinica*, 2010, 37(8):1329-1338
- [7] 刘月霞,冯建荣,王大江,樊新民,姜新.新疆主栽杏品种自交不亲和 *SFB* 基因的检测.园艺学报, 2011, 38(04):666-674
Liu Y X, Feng J R, Wang D J, Fan X M, Jiang X. Identification of self-incompatibility *SFB* genes for apricot cultivars in Xinjiang area. *Acta Horticulture Sinica*, 2011, 38(04):666-674
- [8] 于鹏,中国樱桃 *SFB* 基因的克隆与表达研究. 山东农业大学, 2010

Yu P. Cloning and expression of *SFB* Genes in Chinese cherry. Shandong Agricultural University, 2010

- [9] 胡国峰,倪照君, Daouda Coulibaly, 高志红. 梅品种 *S* 基因型分析及新 *S* 基因鉴定. 植物遗传资源学报, 2021, 22(03):860-872
Hu G F, Ni Z J, Daouda Coulibaly, Gao Z H. Identification of *S* genotype and novel *S-RNase* genes in Japanese apricot (*Prunus mume* Sieb. et Zucc.). Journal of Plant Genetic Resources, 2021, 22(03):860-872
- [10] 龙慎山,李茂福,韩振海,张冰冰,王昆,李天忠. 苹果两个新 *S-RNase* 基因克隆与 46 个品种 *S* 基因型鉴定. 农业生物技术学报, 2010, 18 (2): 1-7
Long S S, Li M F, Han Z H, Zhang B B, Wang K, Li T Z. Characterization of two novel *S-RNase* genes and PCR analyzing of *S*-genotypes of 46 cultivars in *Malus domestica* Borkh. Journal of Agricultural Biotechnology, 2010, 18 (2): 1-7
- [11] Heo S, Han S E, Kwon S I, Jun J H, Kim M J, Lee H J. Identification of *S*-allele genotypes of Korean apple cultivars by using allele-specific polymerase chain reaction. Horticulture Environment and Biotechnology, 2011, 52(2):158-162
- [12] 李洋,刘春生,于杰,松本省吾,王昆,刘志,李天忠. 苹果 *S* 基因型数据库的建立与使用. 中国果树, 2017, (05):58
Li Y, Liu C S, Yu J, Song B X W, Wang K, Liu Z, Li T Z. The establishment of apple *S* genotype database and instruction. China Fruits, 2017, (05):58
- [13] Cheng J H, Han Z H, Xu X F, Li T Z. Isolation and identification of the pollen-expressed polymorphic *F-box* genes linked to the *S*-locus in apple (*Malus domestica*). Sexual Plant Reproduction, 2006, 19 (4):175-183
- [14] Sassa H, Kakui H, Miyamoto M. *S*-Locus *F-Box* Brothers: Multiple and pollen-specific *F-box* genes with *S* haplotype-specific polymorphisms in apple and Japanese pear. Genetics, 2007, 175:1869-1881
- [15] Li M F, Zhu K K, Bai S L, Liu Z, Li T Z. Isolation and *S*-genotyping application of *S*-allelic polymorphic *MdSLFBs* in apple (*Malus domestica* Borkh.). Molecular Breeding, 2011, 28:171-180
- [16] 曾斌,高启明,田嘉,李疆. 新疆扁桃品种自交不亲和 *S-RNase* 基因型的分析鉴定. 新疆农业科学, 2014, 51(08):1400-1408
Zeng B, Gao Q M, Tian J, Li J. Analysis and identification of self-incompatibility *S-RNase* genotype of almond varieties in Xinjiang. Xinjiang Agricultural Sciences, 2014, 51(08):1400-1408.
- [17] 袁德义,谭晓风,张琳,赵思东,乌云塔娜,段经华,曹玉芬. 新高系梨 10 个品种 *S* 基因型的鉴定. 园艺学报, 2007, 34(6):1353-1360
Yuan D Y, Tan X F, Zhang L, Zhao S D, Wu Y T N, Duan J H, Cao Y F. Identification of *S*-genotype of ten cultivars from Niitaka Line Pear. Acta Horticulturae Sinica, 2007, 34(6):1353-1360
- [18] 唐忠建, 砀山酥梨自然保护区梨 *S* 基因型研究. 安徽农业大学, 2007
Tang Z J, Studay on *S*-gene of pear cultivated in the protection district of Dangshansu pear germplasm resources. Anhui Agricultural University, 2007
- [19] 陈秋菊,孟冬,李威,顾钊宇,段续伟,袁晖,张懿,李天忠. 新疆桃花柱 *S-RNase* 和花粉 *SFB* 基因的克隆与分析. 中国农业大学学报, 2015, 20(06):76-83
Chen Q J, Meng D, Li W, Gu Z Y, Duan X W, Yuan H, Zhang Y, Li T Z. Cloning and analysis of *S-RNase* and *SFB* genes in Xinjiang peach (*Prunus ferganensis* Kost. et Riab). Journal of China Agricultural University, 2015, 20(06):76-83
- [20] 李亚兰,李淑玲,曹晓艳,刘月霞,冯建荣. 赛买提杏自交不亲和 *SFB* 基因全长的克隆与序列分析. 新疆农业科学, 2014, 51(10):1787-1791
Li Y L, Li S L, Cao X Y, Liu Y X, Feng J R. Cloning and sequence analysis of the *SFB* gene from Saimaiti apricot. Xinjiang Agricultural Sciences, 2014, 51(10):1787-1791
- [21] 李洋,李长龙,王晶,闫国华,张晓明,李威,张开春,李天忠. 甜樱桃‘拉宾斯’自交亲和性与 *SFB4* 基因的关系研究. 园艺学报, 2015, 42(07):1251-1259
Li Y, Li C L, Wang J, Yan G H, Zhang X M, Li W, Zhang K C, Li T Z. Research of relationship between sweet cherry *Lapins* Self-compatibility and *SFB4* gene. Acta Horticulture Sinica, 2015, 42(07):1251-1259
- [22] Ikeda K, Ushijima K, Yamane H, Tao R, Hauck N R, Sebolt A M, Iezzoni A F. Linkage and physical distance between the *S*-haplotype *S-RNase* and *SFB* genes in sweet cherry. Sex Plant Report, 2005, 17: 289-296
- [23] 曾斌,刘楠楠,夏江宏,刘梦雯,王建友,王波,新疆野扁桃自交不亲和花粉 *SFB* 基因的克隆及生物信息学分析. 中国农学通报, 2017, 33(25):22-30
Zeng B, Liu N N, Xia J H, Liu M W, Wang J Y, Wang B. Molecular cloning and bioinformatics analysis of *SFB* genes controlling self-incompatibility in Xinjiang wild almond (*Prunus tenella* Batsch.). Chinese Agricultural Science Bulletin, 2017, 33(25):22-30
- [24] Aguiar B, Vieira J, Cunha A E, Fonseca N A, Reboiro-Jato D, Reboiro-Jato M, Fdez-Riverola F, Raspe 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. Journal of experimental botany, 2013, 64:2423-2434
- [25] Kakui H, Kato M, Ushijima K, Kitaguchi M, Kato S, Sassa H. Sequence divergence and loss-of-function phenotypes of *S* locus *F-box* brothers genes are consistent with non-self-recognition by multiple pollen determinants in self-incompatibility of Japanese pear (*Pyrus pyrifolia*). Plant Journal, 2011, 68:1028-1038
- [26] Okada K, Takasaki T, Saito T, Moriya Y, Castillo C, Norioka S, Nakanishi T. Reconsideration of *S*-genotype for a Japanese pear 'Kumoi'. Japanese Society Horticultural Science, 2004, 73:524-528
- [27] 梁梅. 柑橘自交不亲和和相关基因鉴定及其演化. 华中农业大学, 2019
Liang M. Gene Identification and evolution of Self-incompatibility of citrus. Huazhong Agricultural University, 2019
- [28] 唐亮,马香,李明霞,周志钦. 苹果属 *S-RNase* 基因的进化研究. 中国农业科学, 2013, 46(13):2717-2729
Tang L, Ma X, Li M X, Zhou Z Q. Evolutionary studies of *S-RNase* genes in genus *Malus*. Scientia Agricultura Sinica, 2013, 46(13):2717-2729