

无籽沙糖橘 *CrSI-1* 基因的克隆与表达分析

吴秀兰*, 何思欣

广东肇庆学院生命科学学院, 广东肇庆 526061

摘要 为研究显花植物自交不亲和的分子机理, 以无籽沙糖橘为试材, 克隆无籽沙糖橘花粉 *SI* 基因的 cDNA 和 DNA 全长序列, 命名为 *CrSI-1*, 该基因 cDNA 和 DNA 全长均为 450 bp。半定量 PCR 分析结果表明, 该基因在花粉中特异表达。Real-time PCR 分析表明, 该基因在无籽沙糖橘自花授粉 72h 表达量达到最大, 而无籽沙糖橘×有籽沙糖橘异花授粉 72h 的表达量最低。

关键词 无籽沙糖橘; 自交不亲和性; *CrSI-1*; 表达分析

中图分类号 S666

文献标识码 A

Cloning and Function Analysis of *CrSI-1* Gene in *Citrus reticulata* Blanco cv. Wuzishatangju

WU Xiulan*, He Sixin

College of Life Science, Zhaoqing University, Zhaoqing, Guangdong 526061, China

Abstract In this study, the full-length sequences of cDNA and DNA of *CrSI-1* gene were obtained from a mandarin Wuzishatangju (*Citrus reticulata* Blanco). The length of cDNA or DNA is 450 bp. Tissue-specific expression of *CrSI-1* was detected using semi-quantitative RT-PCR and quantitative real-time PCR. *CrSI-1* expressed exclusively in anthers. When 'Wuzishatangju' was self-pollinated, the expression level of *CrSI-1* in pistils reached a maximum at 72 h, and decreased thereafter. While in cross-pollination of 'Wuzishatangju' × 'Shatangju', the expression was very weak at 72 h.

Key words Wuzishatangju; Self-incompatibility; *CrSI-1*; Expression analysis

doi 10.3969/j.issn.1000-2561.2014.08.020

植物自交不亲和性(Self-incompatibility, SI)是显花植物为防止近亲繁殖、促进异花授粉而形成的一种机制, 是分子生物学的研究热点之一。根据遗传背景可将 SI 分为配子体自交不亲和(Gametophytic self-incompatibility, GSI)和孢子体自交不亲和(Sporophytic self-incompatibility, SSI)。果树自交不亲和大多属于 GSI 自交不亲和, 主要由花柱 *S-RNase* 基因和花粉 *F-box* 基因关键因子决定^[1-6]。除了花粉和花柱关键因子外, 还有很多非关键因子, 如钙结合蛋白(CaBP)^[7-8]、泛素结合蛋白(actin-binding proteins)^[9]、锌指蛋白(Zinc-finger protein)^[10]、HT-B^[11-12]、 γ -硫堇(γ -thionin, MdD1)^[13]、S1 Protein 等^[14]可能也参与自交不亲和反应。这些非关键因子在花粉和花柱相互识别过程中, 可能起到识别和降解 S-RNase、细胞信号转导、调节花粉管生长等作用, 最终由关键因子与非关键因子共同作用而导致自交不亲和的发生^[6, 11, 15-16]。Foote 等^[14]通过虞美人(*Papaver rhoeas* L.)离体及活体花粉萌发试验, 发现 S1 蛋白可以抑制

SI 基因型的花粉萌发, 而不能抑制非 *SI* 基因型的花粉萌发, 认为 S1 蛋白参与了自交不亲和性反应。但在柑橘研究中, 关于 S1 蛋白在自交不亲和反应中的作用尚未见报道。本研究以无籽沙糖橘成熟花粉为试材, 克隆无籽沙糖橘 *SI* 基因 cDNA 和 DNA 的全长序列, 命名为 *CrSI-1*。并分析了该基因在不同组织器官、自交及异交授粉后不同时间段的表达特性, 为研究 S1 蛋白在自交不亲和反应中的作用及柑橘选育奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料由华南农业大学提供, 于 2012 年春季取无籽沙糖橘 7 个器官(芽、叶、花粉、花丝、柱头、花柱、子房), 以及无籽沙糖橘自交授粉、无籽沙糖橘×有籽沙糖橘异花授粉后不同时段(0、12、24、48、72、96、120、144 h)的雌蕊。所有材料液氮速冻后, 于-80℃保存。

收稿日期 2014-03-01

修回日期 2014-06-15

基金项目 广东高校优秀青年创新人才培养计划项目(育苗工程项目)(No. 2012LYM0135); 肇庆市科技创新项目(No. 2012G21)。

作者简介 吴秀兰(1978年—), 女, 讲师, 硕士研究生; 研究方向: 果树分子生物学。*通讯作者(Corresponding author): 吴秀兰(WU Xiulan), E-mail: xluwu@zq.edu.cn。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA、基因组 DNA 的提取及其 cDNA 第一链的合成 基因组 DNA 提取采用 CTAB 法^[17], 并略加改进。总 RNA 提取采用天恩泽公司的 Column Plant RNA_{OUT} 试剂盒进行, 并用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测。cDNA 第一链合成参照 Life Technology 公司生产的 M-MLV 反转录试剂盒进行。RNA 酶抑制剂(RNase Inhibitor)及 DNase I(RNase Free)购于 TaKaRa 公司。

1.2.2 *S1* 基因的克隆 *S1* 采用 3' 和 5' RACE 法克隆: 根据华中农业大学甜橙基因组 *S1*(Cs8g11080) 序列, 分别设计特异引物 S1-3' RACE 和 S1-5' RACE(表 1)。严格按照 Clontech 公司 SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit 操作说明进行。用 Agarose Gel DNA Extraction Kit(TaKaRa)回收 PCR 产物, 连接到 pMD19-T vector(TaKaRa)克隆载体, 转化至大肠杆菌 DH5 α 菌株, PCR 检测并酶切鉴定后送北京华大基因(BGI)公司测序。

S1 基因 cDNA 全长克隆: 利用生物软件 DNA Man 将 5' RACE、3' RACE 测序结果, 以及甜橙 Cs8g11080 序列进行拼接, 并用 ORF Finder(Open Reading Frame Finder)进行 ORF 预测。设计包含起始密码和终止密码的上、下游引物 S1-F 和 S1-R(表 1), 对预测 ORF 进行验证。以花粉 cDNA 为模

板, 进行 PCR 扩增, 反应体系为 10 $\times$ PCR buffer 5.0 L, dNTP 1.0 L, 上下游引物各 0.5 L, 模板 cDNA 1 L, ExTaq 0.5 L, 加 ddH₂O 至总体积 50 L。PCR 扩增程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 70 $^{\circ}$ C 延伸 90 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。回收、转化及测序同上。

S1 基因组 DNA 全长的克隆: 方法与扩增 cDNA 全长相同。

通过 NCBI 中 BLASTx 进行 *S1* 蛋白同源性搜索与比对, 利用 Clustal X 软件进行同源性分析, 使用 MEG 5 软件 UPGMA 法构建系统发育树。

1.2.3 实时荧光定量 PCR 分析 利用 TOYOBO 公司的 7300 Real-time PCR 扩增仪器进行实时定量 PCR 试验, 荧光染料试剂盒用 SYBR Premix Ex Taq。以反转录得到的 cDNA 用于 Real-time PCR 分析, 引物为 QS1-F 和 QS1-R(表 1)。以 ACTB 为内参引物(表 1)。扩增体系为 20 μ L: SYBR Green Real-Time PCR Master Mix 10 μ L, 上游引物 1 μ L, 下游引物 1 μ L, 模板 cDNA 20 ng, 加 ddH₂O 至 20 μ L。Real-time PCR 扩增程: 94 $^{\circ}$ C 2 min; 94 $^{\circ}$ C 10 s, 58 $^{\circ}$ C 15 s, 72 $^{\circ}$ C 35 s, 40 cycles, 每次循环在第 3 步采集荧光。内参基因和待测基因均设置 3 次重复。

表 1 试验所用引物及其序列

Table 1 The sequence of all primers used in this study

引物	序列(5'-3')	引物	序列(5'-3')
S1-3' RACE	GTGCAGGCATTGTGTATGGACTATT	QS-F1	GCAGGCATTGTGTATGGACTA
S1-5' RACE	GTGAGATCAACGCCTGGATCAATC	QS-R1	GGAATGGCGCTACGTACACGA
S1-F	ATGGGTTCTTTACCATACATAAT	ACTB-F	CCAATTCTCTCTTGAACCTGTCCTT
S1-R	TTAAGGAATGGCGCTACGTACAC	ACTB-R	TGACTGATGAGAACTGCCAGAAG

2 结果与分析

2.1 RNA 的提取和 cDNA 第一条链的合成

采用柱式植物 RNAout(TIANDZ)提取无籽沙糖橘花器官总 RNA 后, 取 5 μ L 点样于 1.2% 的琼脂糖凝胶中进行电泳检测。结果见图 1。从图 1 可以看出, 28S RNA 与点样孔之间无明显亮带, 说明无 DNA 污染; 28S RNA 和 18S RNA 条带清晰明亮, 并且 5S RNA 可见, 说明提取的总 RNA 完整, 无降解, 适宜进行后续的 cDNA 第一条链的合成。

2.2 *S1* 基因的克隆与序列分析

根据 *S1* 基因(Cs8g11080)序列设计的特异引物 S1-3' RACE 和 S1-5' RACE, 进行 PCR 扩增(图 2-A、B), 克隆测序后分别得到 486 bp 的 3' 端

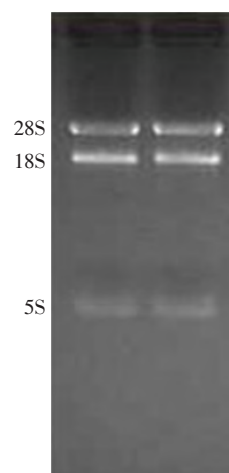


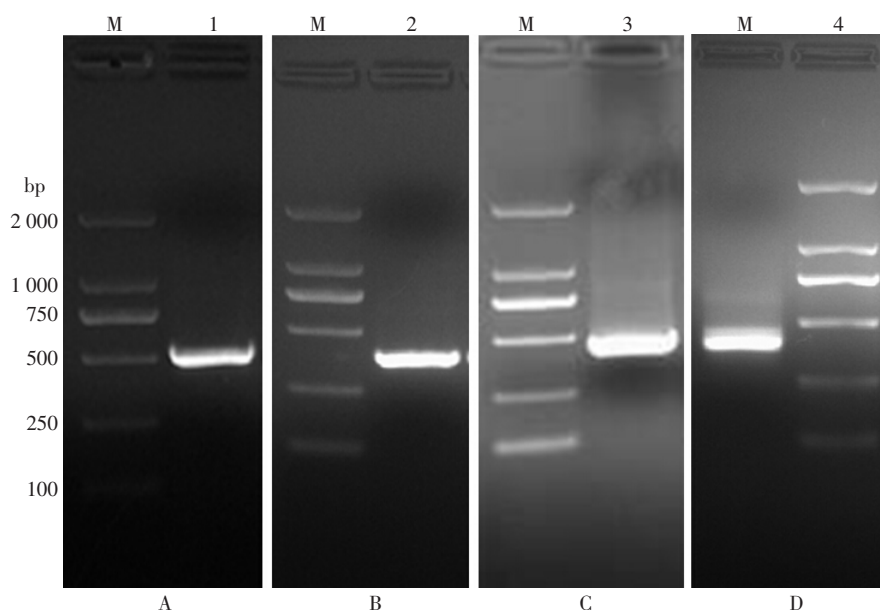
图 1 RNA 提取电泳图

Fig. 1 Electrophoresis figure of total RNA from citrus

(图 2-A)，以及 366 bp 的 5' 端(图 2-B)序列。将克隆得到 RACE 序列与 Cs8g11080 中间序列进行拼接，得到 450 bp(图 2-C)，该序列含起始和终止密码子的 *SI* ORF。根据拼接所得序列，设计特异引物 *SI-F* 和 *SI-R* 进行 PCR 扩增(图 2-D)，克隆测序后获得长度为 450 bp 序列(表 2)，经比对后，发现该序列与拼接序列相一致。通过 NCBI 在线比

对，发现该序列与其他植物的 *SI* 基因序列具有较高的同源性，可以确定所获得的基因为柑橘花粉 *SI* 基因家族中的一员，命名为 *CrSI-1*。

ORF Finder 分析表明，*CrSI-1* 基因包含一个 450 bp 的完整开放阅读框，编码一个含 149 个氨基酸的蛋白质(表 2)，推定的分子量为 18.13 ku，理论等电点为 6.19。



M: DL 2 000 Marker; 1: 3' RACE电泳图; 2: 5' RACE 电泳图; 3: cDNA全长扩增图; 4: 基因组DNA全长扩增图。

M: DL 2 000 Marker; 1: Electrophoresis figure of 3' RACE; 2: Electrophoresis figure of 5' RACE; 3: Electrophoresis figure of the length cDNA; 4: Electrophoresis figure of DNA.

图2 RACE扩增电泳图

Fig. 2 Electrophoresis figure of RACE

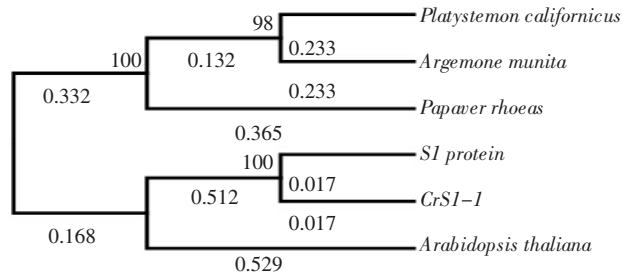
表2 *CrSI-1* 核苷酸序列及推测氨基酸序列

Table 2 nucleotide and amino acid sequence of the *CrSI-1*

ATGGGTTCTTTCACCATACATAATTTGTTGGTCATCCTTTTTGTTTTTCCACTCTTGCATATGTGATAGGCGAG
M G S F T I H N L L V I L F V F P L F A Y V I G E
GACTCGGAGGGCTTAAAGAAGATGTGAGGCATATTCGGATAACAAATAAGATTGATCCAGGCGTTGATCTCCCT
D S E G L K E D V R H I R I T N K I D P G V D L P
TTTGAATGCAAGTCCAGAGATGATGATTTTGGGAAAAAGGTGCTTCATTATAATACTTATTGGGAGTTTCAGTTT
F E C K S R D D D F G K K V L H Y N T Y W E F Q F
CGGCCTAATTTTGGGGAACCAAGATATTACTGCTGGTTTGCATGGCGAAATGAATTCAAATGGTTTGATCTC
R P N F W G T T R Y Y C W F A W R N E F K W F D L
TACGATCATAACAGAGATGCTCGTGAGTGCAGGCATTGTGTATGGACTATTCAACCTGATGGGCCCTGCATGATA
I D H N R D A R E C R H C V W T I Q P D G P C M I
AATAAAGCTGAAAATAATTATGACATTGTATTCTGGAACAGGCCTGATCGTGACGTAGCGCCATTCCTTAA
N K A E N N Y D I C Y F W N R P D R V R S A I P -

2.3 CrSI-1 系统进化树分析

利用 NCBI 对 CrSI-1 氨基酸序列进行同源性比对, 结果见图 3。由图 3 可知, *CrSI-1* 基因编码的蛋白与甜橙 S1 蛋白(Cs8g11080)同源性最高, 达到 99%。其次是拟南芥 S1 蛋白(NM00112557), 同源性为 78%。



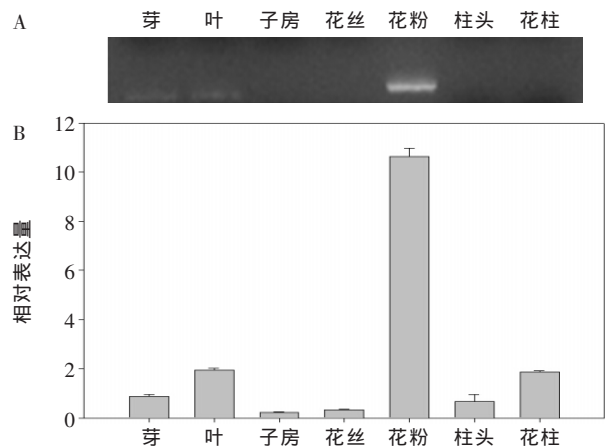
Arabidopsis thaliana (NM_001125578), *Argemone munita* (ACU31828), *Papaver rhoeas* (CAA52380), *Platystemon californicus* (ACU31813), *S1 Protein* (Cs8g11080).

图3 CrSI-1氨基酸序列进化树

Fig. 3 The evolutionary tree of the CrSI-1

2.4 半定量与 Real-time PCR 表达分析

利用半定量和定量 PCR 对 *CrSI-1* 在无籽沙糖橘不同组织器官, 以及自交和异交后不同时间段雌蕊的表达特性进行了分析。结果表明, 该基因在芽、叶、花粉中均有表达, 其中花粉的表达量最高, 为特异性表达。在花柱、花丝、柱头、子房中基本不表达(图 4-A)。Real-Time PCR 分析结果见图 4-B, 由图 4 可知, 该基因在花粉中表达量最高, 达到 10.62, 而在子房中的表达量最低, 仅为 0.21, 不同器官的表达水平排序分别为花粉>叶>花



A: 半定量RT-PCR电泳图; B: Real-time PCR分析图。

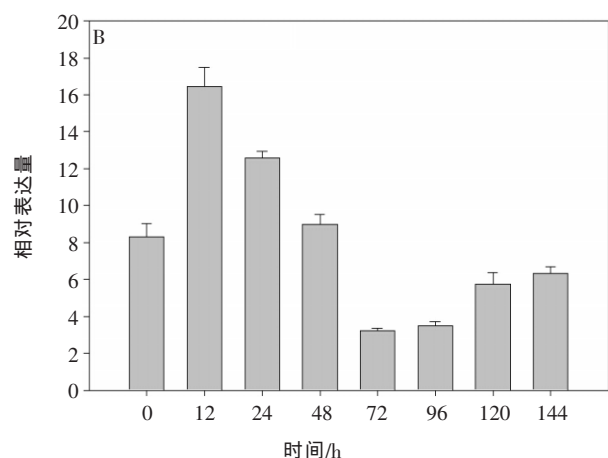
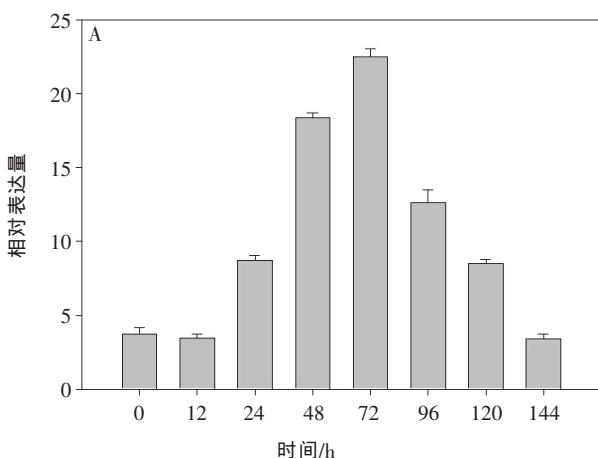
A: Electrophoresis figure of semi-quantitative PCR; B: Expression analysis of the *CrSI-1* in different tissues and organs.

图4 *CrSI-1*在无籽沙糖橘不同组织器官表达分析

Fig. 4 Expression analysis of the *CrSI-1* in different tissues and organs

柱>柱头>芽>花丝>子房。其结果与半定量结果基本一致。

由于 *CrSI-1* 在花粉中特异性表达, 为研究该基因授粉后的表达情况, 检测了无籽沙糖橘自花授粉、无籽沙糖橘×有籽沙糖橘异交授粉后 8 个不同时间段的基因表达水平, Real-time PCR 结果见图 5。雌蕊中无籽沙糖橘自交授粉后 0 h 基本不表达, 12 h 到 24 h 表达量上升, 48 h 到 72 h 迅速上升, 3 d 之后有迅速下降, 6 d 后表达量降到很低。而在无籽沙糖橘×有籽沙糖橘异交授粉后 0 h 到 48 h 呈下降表达, 72 h 表达量迅速下降, 之后缓慢上升。



A: *CrSI-1*在无籽沙糖橘自交后的表达量; B: *CrSI-1*在无籽沙糖橘×有籽沙糖橘异交后的表达量。

A: Expression analysis of *CrSI-1* in different stages after self-pollination of 'Wuzishatangju' × 'Wuzishatangju';

B: Expression analysis of *CrSI-1* in different stages after self-pollination of 'Wuzishatangju' × 'Youzishatangju'.

图5 *CrSI-1*基因在授粉后不同时间段的Real-time PCR 表达水平

Fig. 5 Expression analysis of the *CrSI-1* in different stages after self-pollination of 'Wuzishatangju' × 'Wuzishatangju' and 'Wuzishatangju' × 'Youzishatangju'

3 讨论与结论

自交不亲和性是显花植物为防止近亲繁殖、促进异化授粉而形成的一种机制。研究表明, 自交不亲和性反应是一个多基因协同作用的复杂过程, 在模式植物中, 除花柱 S-RNase 和花粉 F-box 基因(SLF/SFB)2 个自交不亲和反应关键决定因子外, 还有非关键因子如: 钙结合蛋白、泛素、S1 蛋白自交不亲和蛋白等也参与其中^[4,9,12]。Ye 等^[18]发现无籽沙糖橘的阻抑部位在子房, 其表现是无籽沙糖橘自交 72 h 时花粉管在子房内部开始自身盘绕生长, 无法接近胚珠, 并且向着远离胚珠的子房底部盘绕生长。随后 Miao 等^[19]对 S-RNase 进行了研究, 发现 S-RNase 在无籽沙糖橘自交后 72 h 表达量达到最高, 120 h 以后迅速递减, 168 h 几乎不表达, 而该基因在无籽沙糖橘异交后 72 h 几乎不表达, 这与细胞学上观察到无籽沙糖橘自交后 72 h 出现花粉管卷曲, 异交后 72 h 花粉管正常生长的时间相吻合。

本研究无籽沙糖橘花粉中克隆到一个自交不亲和 *CrSI-1* 基因, 半定量 PCR 结果表明, *CrSI-1* 基因在无籽沙糖橘上具有明显的组织器官表达特异性, 与成建红等^[20]在樱桃上报道花粉关键基因 *PaSFB9* 基因具有组织器官特异性表达结果一致, 也与蔷薇科果树扁桃(*Prunus dulcis*)^[21]、甜樱桃(*P. avium*)^[22]和苹果(*Malus domestica*)^[23]等植物花粉 SFB/SLF 基因的表达特异性一致。Real-time PCR 进一步发现该基因在花粉中表达量明显高于其它部位, 约为叶片的 5 倍、芽的 9 倍。无籽沙糖橘自交不同时段 Real-time PCR 分析表明, 无籽沙糖橘自交后 72 h 表达量达到最高, 96 h 后迅速递减, 144 h 表达量很低; 无籽沙糖橘×沙糖橘异交后不同时段 Real-Time 表明异交后 72 h 表达很低。这与无籽沙糖橘 S-RNase 自交及异交不同时段不同组织表达结果相一致, 也与细胞学上观察到无籽沙糖橘自交后 72 h 出现花粉管卷曲而异交后 72 h 花粉管正常生长的时间相吻合^[18-19]。推测 *CrSI-1* 基因参与了关键因子自交不亲和反应, 从而抑制了花粉管的正常生长导致花粉管出现卷曲, 不能到达胚珠完成正常的授粉受精过程, 形成无籽果实。但 *CrSI-1* 如何参与关键因子进行自交不亲和反应仍需进一步研究。

参考文献

- [1] Janssens G A, Goderis I J, Broekaert W F Broothaerts. Molecular method for S-allele identification in apple based on allele-specific PCR[J]. Theor Appl Genet, 1995, 91: 691-698.

- [2] Hiratsuka S, Okada Y, Kawai Y, et al. Styler basic protein corresponding to self-incompatibility alleles of Japanese pears[J]. Jpn Soc Hortic Sci, 1995, 64(3): 471-478.
- [3] Boskovic C R, Tobutt K R. Inheritance of styler ribonucleases in cherry progenies and reassignment of incompatibility alleles in apple[J]. Euphytica, 1999, 107: 29-43.
- [4] Li S, Samaj J, Franklin-Tong V E. A mitogen-activated protein kinase signals to programmed cell death induced by self-incompatibility in Papaver pollen[J]. Plant Physiol, 2007, 145(1): 236-245.
- [5] Sassa H, Kakui H, Miyamoto M, et al. 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.
- [6] Zhang S J, Huang S X, Zhang X L, et al. Identification of S-genotypes of Japanese plum cultivars by PCR and analysis on polymorphism of S-RNase genes[J]. Fruit Sci, 2008, 25(3): 338-342.
- [7] Franklin-Tong V E. Signaling and the modulation of pollen tube growth[J]. Plant Cell, 1999, 11: 727-738.
- [8] Furuyama T, Dzelzkalns V A. A novel calcium-binding protein is expressed in Brassica pistils and anthers late in flower development[J]. Plant Mol Biol, 1999, 39(4): 729-737.
- [9] Poulter N S, Bosch M, Franklin-Tong V E. Proteins implicated in mediating self-incompatibility induced alterations to the actin cytoskeleton of Papaver pollen[J]. Ann Bot, 2011, 108(4): 659-675.
- [10] Kong Z S, Li M, Yang W Q, et al. A novel nuclear-localized CCH-type zinc finger protein, OsDOS, is involved in delaying leaf senescence in rice[J]. Plant Physiol, 2006, 141(4): 1376-1388.
- [11] Goldraij A, Kondo K, Lee C B, et al. Compartmentalization of S-RNase and HT-B degradation in self-incompatible Nicotiana[J]. Nature, 2006, 439(7078): 805-810.
- [12] Puerta A R, Ushijima K, Koba T, et al. Identification and functional analysis of pistil self-incompatibility factor HT-B of Petunia[J]. Exp Bot, 2009, 60(4): 1309-1318.
- [13] 孙会玲, 孟冬, 白松岭, 等. 苹果花粉中与花柱 S-RNase 互作的 γ -硫基筛选及鉴定[J]. 园艺学报, 2011, 38(8): 1437-1446.
- [14] Foote H C, Ride J P, Franklin-Tong V E, et al. Cloning and expression of a distinctive class of self-incompatibility(S) from Papaver rhoeas L[J]. Plant Biology, 1994, 91: 2265-2269.
- [15] Franklin-Tong V E, Holdaway-Clarke T L, Straatman K R, et al. Involvement of extracellular calcium influx in the self-incompatibility response of Papaver rhoeas[J]. Plant, 2002, 29: 333-345.
- [16] Miao H X, Qin Y H, Teixeira da Silva J A, et al. Identification of differentially expressed genes in pistils from self-incompatible Citrus reticulata by suppression subtractive hybridization[J]. Mol Biol Rep, 2013, 40: 159-169.
- [17] 胡桂兵. 生物技术实验指导[M]. 北京: 中国农业出版社, 2010: 53-55.
- [18] Ye W J, Qin Y H, Ye Z X, et al. Seedless mechanism of a new mandarin cultivar 'Wuzishatangu'(Citrus reticulata Blanco)[J]. Plant Sci, 2009, 177(1): 19-27.

- [29] Miao H X, Qin Y H, Teixeira da Silva J A, *et al.* Cloning and expression analysis of S-RNase homologous gene in citrus reticulate Blanco cv. Wuzhishatangju[J]. Plant Science, 2011, 180: 358-367.
- [20] 成建红, 白松龄, 韩振海, 等. 樱桃自交不亲和 S9-单元型特异的 F-box 基因克隆及其表达分析[J]. 中国农业科学, 2006, 39(5): 976-983.
- [21] Ushijima K, Sassa H, Dandekar A M, *et al.* Structural and transcriptional analysis of the self-incompatibility locus of almond: identification of a pollen-expressed F-box gene with haplotype-specific polymorphism[J]. Plant Cell, 2003, 15(3): 771-781.
- [22] Yamane H, Ikeda K, Hauck N R, *et al.* Self-incompatibility (S) locus region of the mutated S6-haplotype of sour cherry (*Prunus cerasus*) contains a functional pollen S allele and a non-functional pistil S allele[J]. Exp Bot, 2003, 54(392): 2 431-2 437.
- [23] Cheng J H, Bai S L, Han Z H, *et al.* Cloning and expression analysis of the self-incompatibility S9-Haplotype specific F-box genes in cherry (*Prunus avium*) [J]. Sci Agric Sin, 2006, 39 (5): 976-983.

责任编辑: 赵军明