

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201311045

陈仲刚, 吕秀兰, 王进, 等. 24份甜樱桃材料自交不亲和S基因型鉴定[J]. 广西植物, 2015, 35(3):414-419

Chen ZG, Lü XLan, Wang J, et al. Identification of self-incompatibility genotypes of 24 sweet cherries[J]. *Guihaia*, 2015, 35(3):414-419

## 24份甜樱桃材料自交不亲和S基因型鉴定

陈仲刚, 吕秀兰\*, 王进, 阳姝婷, 涂勋良, 赖静

(四川农业大学园艺学院, 四川雅安625014)

**摘要:** 甜樱桃品种绝大部分自交不亲和, 限制了甜樱桃的正确评价和合理利用, 因此自交不亲和基因型的鉴定对于生产具有重要意义。以24个甜樱桃主栽品种为材料, 用5对蔷薇科李属引物组合对24个甜樱桃品种进行了S等位基因的PCR扩增, 克隆S基因的扩增片段, 用核酸序列在GenBank上搜索, 确定了5种S基因的核酸序列和大小。结果表明: PruC2+PruC4R引物组合扩增效果最好; 在琼脂糖凝胶上位置相同的扩增带其核酸序列相同, 是同一种S基因; 5种S基因扩增片段的大小分别是S1为800 bp, S3为762 bp, S4为962 bp, S5为300 bp, S6为456 bp, S9为650 bp; 24个甜樱桃S基因型是红手球、早红宝石为S1S3, 拉宾斯S1S4', 红宝石S1S6, 布鲁克斯S1S9, 那翁S3S4, 秦林、泰安大紫、先锋、早大果、丽珠、美早、5-106、左滕锦、桑提娜为S3S6, 黑珍珠、红灯、萨米脱、秦樱为S3S9, 胜利为S5S9, 明珠、红蜜、雷尼、滨库为S6S9。

**关键词:** 甜樱桃; 自交不亲和; S基因型

**中图分类号:** Q943; S662.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2015)03-0414-06

## Identification of self-incompatibility genotypes of 24 sweet cherries

CHEN Zhong-Gang, LÜ Xiu-Lan\*, WANG Jin, YANG Shu-Ting, TU Xun Liang, LAI Jing

(College of Horticulture, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China)

**Abstract:** Sweet cherry exhibits the monofactorial gametophytic self-incompatibility system, the correct evaluation and rational utilization on sweet cherry cultivars have been limited because of the self-incompatibility, therefore, determination of correct pollen incompatibility groups and assignment of cultivars to the groups are essential for good crop production. With 24 sweet cherry cultivars as materials, using 5 pairs of prunus primer combinations to amplify S-allele-specific PCR for 24 kinds of sweet cherries and S-genotypes of sweet cherry cultivars were identified, the S-gene amplified fragments were cloned and searched in GenBank, and combined with 5 primer combinations, S-genotype of 24 cultivars were identified. The conclusion was as follows: the same S genes displayed the same size fragments in electrophoresis; The sizes of S-gene amplification fragments were S1 800 bp, S3 762 bp, S4 962 bp, S5 300 bp, S6 456 bp, S9 650 bp. And the S genotypes of the tested self-incompatible cultivars were identified that Hongshouqiu and Early Ruby were S1S3; Lapins was S1S4; Ruby was S1S6; Brooks was S1S9; Napoleon was S3S4; Qinlin, Tartarian, Van, Zaodaguo, Lizhu, Meizao, 5-106 and Satonishiki the same as Santina were S3S6; Heizhenzhu, Hongdeng, Samituo and Qinying were S3S9; Victor was S5S9; Mingzhu, Hongmi and Rainier the same as Bing were S6S9.

**Key words:** sweet cherry; self-incompatibility; S-genotypes

收稿日期: 2014-03-28 修回日期: 2014-05-23

基金项目: 四川省科技支撑计划项目(2013NZ0008)

作者简介: 陈仲刚(1987-), 男, 四川雅安人, 硕士, 研究方向为果树种质资源与遗传育种, (E-mail)465114431@qq.com.

通讯作者: 吕秀兰, 博士, 教授, 研究方向为果树栽培学, (E-mail)xllvjj@163.com.

樱桃是蔷薇科李属(*Prunus*)樱桃亚属(subg. *Cerasus*)植物。甜樱桃(*P. avium*)果实大,颜色鲜丽,味美,营养价值和药用价值高,是果农增收、增效的果树产业之一。但由于甜樱桃自交不亲和,大大降低了座果率,限制其发展和正确评价。植物界自交不亲和主要有两种,一种是孢子体自交不亲和,另一种是配子体自交不亲和,而甜樱桃属于配子体自交不亲和。S 基因遗传上由染色体上具有复等位基因构成的单一位点或基因座控制(Bruce *et al.*, 2006)。在一个 S 基因座上,含有多个 S 等位基因。S 基因在雌蕊中特异表达,产物糖蛋白(McClure *et al.*, 1989; Sassa *et al.*, 1992; Xue *et al.*, 1996),具有核糖核酸酶(RNase)活性,这种糖蛋白也叫 S-RNase,它分布的位置(Anderson *et al.*, 1986; Cornish *et al.*, 1987)正是花粉生长抑制的区域,能降解同类品种花粉中的 RNA,抑制其授粉受精过程。

鉴定 S 基因的方法主要有 4 种,本研究所采用的是 PCR 法(Jie *et al.*, 2005; Haldsz *et al.*, 2005; Lopez *et al.*, 2004; Sanzol *et al.*, 2002)。所谓 PCR 法就是利用 PCR 扩增,对扩增片段进行克隆,再将克隆序列在 Genbank 上对比搜索,确定 S 基因。该方法简单、准确。通过深入了解甜樱桃自交不亲和性(SI)的遗传、分子机制和生殖现象,为品种间配置授粉树和亲本育种选配提供理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

2012 年 3 月 9 日于山东果树研究所苗圃地采集样品,24 个甜樱桃品种名称(编号)分别为明珠(1)、红蜜(2)、那翁(3)、秦林(4)、雷尼(5)、泰安大紫(6)、先锋(7)、布鲁克斯(8)、黑珍珠(9)、拉宾斯(10)、早大果(11)、早红宝石(12)、红灯(13)、滨库(14)、萨米脱(15)、红手球(16)、丽珠(17)、美早(18)、胜利(19)、5-106(20)、红宝石(21)、秦樱(22)、左滕锦(23)、桑提娜(24),取完整、无病虫害的甜樱桃幼嫩叶片为材料提取基因组 DNA。Taq DNA 聚合酶、Mg<sup>2+</sup>、dNTPs、PCR-buffer 及 5 对 S-PCR 引物组合购自上海生工生物工程股份有限公司。

### 1.2 方 法

1.2.1 基因组 DNA 提取及检测 采用改进的 CTAB 法提取甜樱桃叶片基因组 DNA(Verdoody *et al.*, 1998; Struss *et al.*, 2001)。

1.2.2 引物序列(表 1)及 PCR 扩增体系 根据已发表的甜樱桃 S 基因保守序列设计引物(Sonneveld *et al.*, 2001, 2003),引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

PCR 反应体系: 10 × PCR Buffer 2.5 μL, dNTPs (2.5 mmol · L<sup>-1</sup>) 1.6 μL, 引物 1 (10 μmol · L<sup>-1</sup>)、引物 2 (10 μmol · L<sup>-1</sup>) 均为 0.8 μL, DNA (50~100 ng) 0.5 μL, TaqDNA 聚合酶 (5 U · L<sup>-1</sup>) 0.2 μL, PCR 反应总体积 20 μL。PCR 反应程序: 预变性 94 °C 3 min, 94 °C 30 s, 32 个循环 (56 °C 30 s, 72 °C 2 min), 72 °C 延伸 5 min, 12 °C, PCR 产物在 1.5% 的琼脂糖凝胶上进行电泳分离电泳后用 EB 染色成像。

表 1 蔷薇科李属通用引物组合及其序列引物组合  
Table 1 Rosaceae *Prunus* universal primer combinations and sequences of primer combinations

引物组合 Primer combination	序列 (5'→3') Sequence (5'→3')
EM-PC2consFD	TCACMATYCATGGCCTATGG
EM-PC3consRD	AWCTRCCRTGYTTGTTCCATTC
PruC2	CTATGGCCAAGTAATTATCAAACC
PruC4R	GGATGTGGTACGATTGAAGCG
BFP93	GTTCTTGCTTTTGCTTTCTTC
BFP94	CATAGGCCATGGATGGTG
BFP208	GTAATTGCAACGGGTCAAATATGAG
BFP209	ACAACCTCAGTATTAGTTGCTGGATCA
BFP212	ACATGGTACATGTTCCCAACGGATC
BFP213	CTGCTGTTTCGATTACAGTCAATATGTAC

1.2.3 S-等位基因 PCR 扩增产物回收与纯化 用琼脂糖凝胶回收试剂盒(OMEGA)回收、纯化扩增得到目的 DNA 片段

1.2.4 目的片段连接克隆载体 *Escherichia coli* DH5α 来自中国科学院遗传与发育研究所 601 组, pMD19-T 载体购自 Takara 公司。将回收片段与 Takara pMD19-T 载体连接,连接体系如表 2, 16 °C 连接过夜。

表 2 连接反应体系 I  
Table 2 Components of ligation I

试剂 Reagent	用量 Amount (μL)
Solution 1	5.0
pMD19-T	0.5
回收 DNA Recorer	4.5

1.2.5 质粒 DNA 热激转化 将欲转化的连接体系加入到装有 100 μL DH 5α 感受态细胞的管中,冰浴 30 min;取出放入 42 °C 水浴中连接 90 s;将转化

混合物冰上放置 2~5 min,加 900  $\mu\text{L}$  无添加抗生素的 LB 培养液,37  $^{\circ}\text{C}$ ,150  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  保温 45~60 min;取 50  $\mu\text{L}$  菌液涂布于含 0.1  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  Amp 的 LB 琼脂平板上,倒置于 37  $^{\circ}\text{C}$  温箱培养 12~16 h。

1.2.6 重组菌落 PCR 鉴定 挑取白色单菌落接种 1 mL LB 含氨苄(0.1  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ )的液体培养基中,37  $^{\circ}\text{C}$ ,200  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  振荡培养 5 h;取 1  $\mu\text{L}$  的菌液作为模板,用相应的引物进行 PCR 扩增,20  $\mu\text{L}$  反应体系见表 3。

表 3 PCR 反应体系 II

Table 3 Components of PCR reaction 2

试剂 Reagent	用量 Amount ( $\mu\text{L}$ )
10 $\times$ PCR Buffer ( $\text{Mg}^{2+}$ plus)	2.5
dNTP Mixture (Each 2.5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )	1.6
Sense Primer (10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )	0.8
Anti-Sense Primer (10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )	0.8
菌液 Bacilli	0.5
TaKaRa Taq (5 U $\cdot \mu\text{L}^{-1}$ )	0.2
ddH <sub>2</sub> O	Up to 20

电泳检测 PCR,若出现了很亮的条带并与目的片段的大小相一致,说明目的片段已经连接到克隆载体中,取该菌液 1.5 mL,送上海生工公司测序。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同引物组对甜樱桃 S 基因的扩增效果及特异性引物

2.1.1 引物组合 EM-PC2consFD+EM-PC3consRD 对甜樱桃 S 基因的扩增效果 从图 1 可以看出,引物组合 EM-PC2consFD+EM-PC3consRD 对一些实验品种可以扩增出带,大多数都是两条带;对另一些实验品种不能扩增出带。

2.1.2 引物组合 PruC2+PruC4R 对甜樱桃 S 基因的扩增效果 由图 2 看出,引物组合 PruC2+PruC4R 对实验品种大都可以扩增出带,都有两条,且比较清晰,扩增效果较好。

2.1.3 引物组合 BFP93+BFP94 对甜樱桃 S 基因的扩增效果 由图 3 看出,引物组合 BFP93+BFP94 对实验品种只有少部分品种扩增出条带,扩增仅有一条带,扩增效果较差,不能达到实验目的。

2.1.4 S1、S5 特异性引物组合 BFP208+BFP209 和 BFP212+BFP213 对甜樱桃 S 基因的扩增效果 由图 4 看出,24 个甜樱桃品种,布鲁克斯、拉宾斯、红

手球、红宝石、早红宝石有一条带;胜利有一条带。

### 2.2 甜樱桃 S 基因的克隆测序及鉴定结果

对这些 DNA 片段克隆测序显示,24 个甜樱桃品种共包含 6 个核苷酸序列,分别是 300、456、650、762、800 和 962 bp。通过测序,发现相同位置上的带,核酸序列相似性在 90% 以上。进一步与 GenBank 中的序列比较,按照核酸序列及其推测的氨基酸序列分析,不同品种,相同大小和位置一致的扩增片段是同一种 S 基因;克隆的各基因部分片段分别为 S1:800 bp;S3:762 bp;S4:962 bp;S5:300 bp;S6:456 bp;S9:650 bp。由此,把 24 个甜樱桃品种的 S 基因型确定,如表 4。

表 4 24 份甜樱桃材料的 S 基因型

Table 4 S-genotypes of 24 sweet cherry cultivars

品种 Cultivar	PCR 条带 PCR band (bp)	S 基因型序列 S-genotype by sequence
明珠 Mingzhu	456,650	S6S9
红蜜 Hongmi	456,650	S6S9
那翁 Napoleon	762,945	S3S4
秦林 Qinlin	762,456	S3S6
雷尼 Rainier	456,650	S6S9
泰安大紫 Tartarian	762,456	S3S6
先锋 Van	762,456	S3S6
布鲁克斯 Brooks	800,650	S1S9
黑珍珠 Heizhenzhu	762,650	S3S9
拉宾斯 Lapins	800,962	S1S4'
早大果 Zaodaguo	762,456	S3S6
早红宝石 Early Ruby	800,762	S1S3
红灯 Hongdeng	762,650	S3S9
滨库 Bing	456,650	S6S9
萨米脱 Samituo	762,650	S3S9
红手球 Hongshouqiu	800,456	S1S6
丽珠 Lizhu	762,456	S3S6
美早 Meizao	762,456	S3S6
胜利 Victor	300,650	S5S9
5-106	762,456	S3S6
红宝石 Ruby	800,456	S1S6
秦樱 Qinying	762,650	S3S9
左滕锦 Satonishiki	762,456	S3S6
桑提娜 Santina	762,456	S3S6

## 3 讨论与结论

### 3.1 不同引物组合对甜樱桃 S 基因扩增效果

通过 5 对引物组合对甜樱桃品种的扩增效果比较,引物 PruC2+PruC4R 组合最好,EM-PC2consFD+EM-PC3consRD 次之,BFP93+BFP94 最差。与周杰(2008)得出的结论不一致,分析其原因可能是

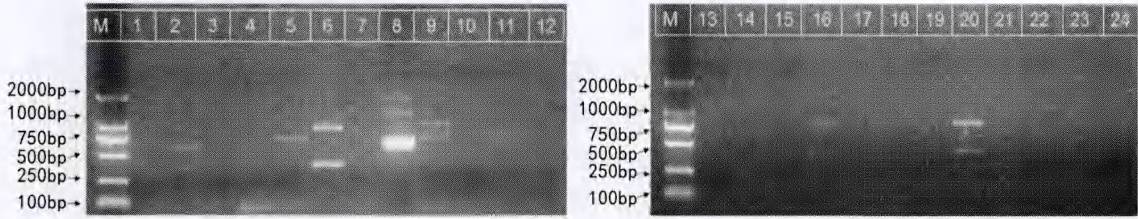


图 1 引物组合 EM-PC2consFD+EM-PC3consRD 对甜樱桃品种基因组 DNA 的 S 等位基因扩增图

Fig. 1 S-allele amplification with primer EM-PC2consFD + EM-PC3consRD in sweet cherry cultivars

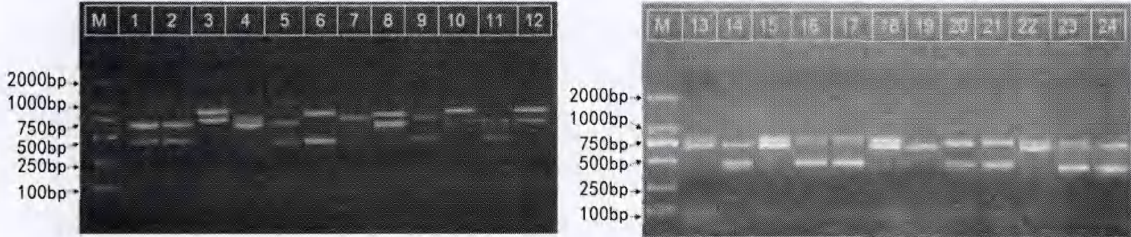


图 2 引物组合 PruC2+PruC4R 对甜樱桃品种基因组 DNA 的 S 等位基因扩增图

Fig. 2 S-allele amplification with primer PruC2 + PruC4R in sweet cherry cultivars

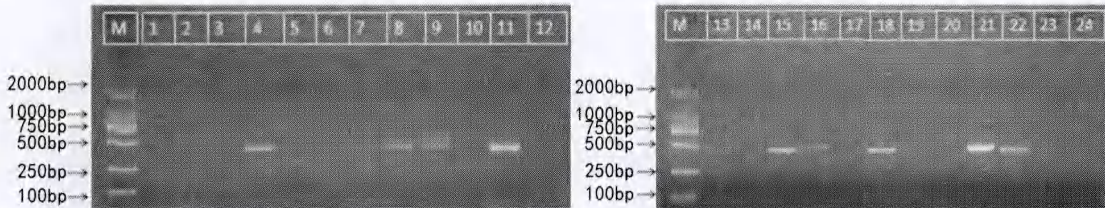


图 3 引物组合 BFP93 + BFP94 对甜樱桃品种基因组 DNA 的 S 等位基因扩增图

Fig. 3 S-allele amplification with primer BFP93 + BFP94 in sweet cherry cultivars

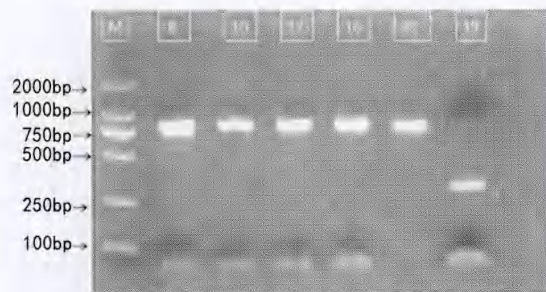


图 4 S1, S5 特异引物组合 BFP208+BFP209 和 BFP212 + BFP213 对甜樱桃品种基因组 DNA 的 S 基因扩增

Fig. 4 S-allele S1 and S5-specific amplification with primer BFP 208+BFP209 and BFP212+BFP213 in sweet cherry cultivars

因为 S-等位基因 PCR 扩增体系和程序不一致引起的。

### 3.2 关于甜樱桃 S 基因确定

经过对甜樱桃基因组 DNA 的 S-等位基因扩增

后均得到两条大小不同的扩增带,说明 S 基因型由 2 种不同的 S 基因组成。基因型为 S1 为 800 bp; S3 为 762 bp; S4 为 962 bp; S5 为 300 bp; S6 为 456 bp; S9 为 650 bp, 与 Tao *et al.* (1999)、陈晓流等 (2004) 的实验结果基本一致,认为 S1、S3 序列大小相同,在琼脂糖凝胶电泳上不能分离。但本研究引用 S1 的特异性引物对材料进行扩增,只有含 S1 基因的甜樱桃才能扩增出条带,可明显把 S1 和 S3 区分开来,说明 S1、S3 序列可以分开;实验得出的 S5 为 300 bp 与 Sonneveld *et al.* (2001)、张晓明等 (2007) 研究结果一致,与 Tao *et al.* (1999) 研究结果不一致,实验用引物组合 PruC2 + PruC4R 对实验材料扩增,但甜樱桃胜利只扩增出一条带,在结合 S5 特异性引物对其扩增,结果扩增出一条 300 bp 的条带,说明 S5 为 300 bp。

本研究结果表明,使用 1 组引物组合很难将所

GGGACATGACATGATTACGCCAGCTTGCATGCCCTGCAGGTCGACGATTGTAATTGCAACGGGTCAAAAATATGAGCAG  
 GAAAAGTGGTAGGCCATTAATTTTTTACTTTCTCCTTAGTTTTTGTAGAAAATTAAATTTGTCATGTGATGTGAAGATAAATATA  
 CTTTCAATGAATCTTAGGGTGTCTAAAATTTTCGATGTCGGTCTTGTAGACACATTATTTTGAATAAAACAACCTACCAC  
 GTAGATATTTATAATAAGAAAAATGCTAGAGAGACCAATTTGGGATACCAACTTGTGTACCAACTCTCTAATAGAGTGTG  
 GGACCCATTGTATTGGTGGGCTCCACCTCTATTAGAGAGTTGGTACACAAATTTGGTCTCCCTAACATGACCCCTTATAATA  
 ATGGATATCCTCCAAATTAAGGACCTACTATTATTCTGTATGTATATATTCAAAAACTGTACCAAAATTAATAATTAAT  
 TTAATAATCAGGGTTAACGAAGAGAAAAACAATTTATCCAAATAATGTCTACATTGTTTGCATGTCTCAGTACCCTAAAT  
 TCGCATCCAAACTGAAGAGATCTTGGCCCGACGTGGAAGTGGCAATGATACAAAGATTTTGGGAAGGCGAATGGAACAAA  
 CATGGCAGATGTTCCGAACAGACACTTAACCAAAATGCAATACTTCGAGATATCTCACGACATGTGGGTGTCGTACAATAT  
 TACAGAGATCCTTAAAAACGCTTCAATCGTACCACATCCGACACAAAAATGGAGCTACTCCGACATAGTATCACCCATTA

图 5 S1 基因序列

Fig. 5 S1 gene sequences (800 bp)

CTATGGCCAAAGTAATTATTCAAACCCAAACGATGCCAGTAATTGCAATGGGTCGCGATTTAAGAAAAGAGCTATTGGTAGG  
 TATTGTTTCTTTTGTGTTTTGTTTTTTTTTTTTTCTCCATTTACCCTTAAGCATTTAGTTTTTAGGAAAATTAGTTGT  
 CACCTGAAGATAATATGCTTTTTTTCAATAAACCTTCGAGTTGGATAAAAATTTAATGTTAGTTATGTGATTAGGCACA  
 TTATTTTGTATTGTATACATAAGGACAGAATACAAATGAGCAATGCTAGGCATATCACATTTACAAATGTAGTATGACTAG  
 CATTTTTTATTACAAATATATGTATATTAGTAGATATATTAATGTACATAATTTCAACCATCATATAAGATGCTATAAAA  
 TTGTGGTAAAAATAGCAGTGGTACCTAATAAAAATGGTAAAAATTAATAATTCAAATTTAATAATCAGGTTATAAATGAGAAA  
 AGATGAAAAATCTTCGCTAACGTTTTGACTTTTTTTTTTCTCTCAAAAATATGGCTATATTGGCTGGATGTCCAGTCCCCTC  
 GAATGCAATCCAAACTGAAGATATCTTGGCCGAACGTGTAAAGTAGCAACGATACAAAATTTGGGAAAGTGAATGGAACA  
 AACATGGTACTTGTTCGGAACAGACACTTAACCAAGTGCATACTTCGAGATATCCCACAAATGTGGAACCTGTTCAATA  
 TTACAGATATCCTTAAAAACGCTTCAATCGTACCACATCCAT

图 6 S3 基因序列

Fig. 6 S3 gene sequences (762 bp)

有 S 位基因分开和扩增出来,所以一般要设计 2 组以上的引物组合,对于特殊的 S 基因型还需要采用 S-等位基因专用引物才能进行准确的判断。本实验得出的 S 基因中,S2、S5、S4、S4' 包括极少,可能因为栽植过程中偏重对经济性状的选择,使得这些 S 基因出现的频率低,在本实验中 S3 频率出现较高,猜测 S3 基因(Williams *et al.*, 1956)在育种中选择优势强。

目前,我国正从国外引进更多的甜樱桃试栽品种,所以正在收集更多的甜樱桃品种,检测其 S 基因的多态性,对评价、利用品种资源及进行遗传关系提供理论依据。

#### 参考文献:

Anderson MA, Cornish EC, Mau SL, *et al.* 1986. Cloning of cDNA for a stylar glycoprotein associated with expression of self-in-

- compatibility in *Nicotiana glauca* [J]. *Nature*, **321**:38-44  
 Bruce A, Mc Clure, Frankli-Tog V. 2006. Gametophytic self-incompatibility: understanding the cellular mechanisms involved in self pollen tube inhibition [J]. *Planta*, **224**:233-245  
 Chen XL. 2004. Identifying the S genotypes of sweet cherry; (*Prunus avium* L.) cultivars [J]. *Acta Genet Sin*, **31**(10): 1142-1148  
 Cornish EC, Pettitt JM, Bonig I, *et al.* 1987. Developmentally controlled expression of a gene associated with self-incompatibility in *Nicotiana glauca* [J]. *Nature*, **326**:99-102  
 Haldsz J, Hegedus A, Herdmn R, *et al.* 2005. New self-incompatibility alleles in apricot (*Prunus armeniaca* L.) revealed by stylar ribonuclease assay and S-PCR analysis [J]. *Euphytica*, **145**:57-66  
 Jie Q, Shupeng Q, Jixiang Z, *et al.* 2005. Identification of self-incompatibility genotypes of apricot (*Prunus armeniaca* L.) by S-allele-specific PCR analysis [J]. *Biotechnol Lett*, **27**:1205-1209  
 Lopez M, Mnejja M, Rovira M, *et al.* 2004. Self-incompatibility genotypes in almond re-evaluated by PCR stylar ribonucleases sequencing analysis and controlled pollinations [J]. *Theor Appl Genet*, **109**:954-964

AATGCCCTATGGCCAAGTAATTATTCAAAACCAAGGATGCCAGTAAGTGCACCTGGTCGCTGTTAACTTTAGGAAAGT  
 GGTATGTACTGTTTCTCTTTTTCTACTTACTGCATTTAGTTCATGTACTGGTTCATGCTCTTGAGTCGCAACACCTTGTA  
 AAGGATTGGTTACTAAAATTAATAAATACTCATTTTTAGCTCAACATTTTCTTCATCATTTGCTGTGTATTCTCGTTATCT  
 ATATGTCACTAAATTAAGCTGTTGACTTGAAAATCTTTTCTTTTATGATGGGAAGTGACATATAAAATAAAGCAATACGGA  
 TTGGAGGTAAACTTATCTATATGTATTCTCGTTATCTTTTCTTTTCTTTTCAAAGGTTTTTTTTCTTTTGGTCTTTTAT  
 AAACTTATCTTTATTTTGAACATAATTATCTAATTTAATCAACTATATATTTTTAATTGGTTTTAATATTATTTTCAA  
 TTTTTTTAACTGCAATTATACGAAAAGGACTTAAATTTGGTTAACAAAATTAGATAATTGAAAATTACAAATAACTTAAAAAT  
 TAATAAATTTGATAATACATAACCGAGAATGAGAATATGTTTTTACTTTTTATCCATTACGATAAAAATAATCCAGTTTA  
 TACTTATATGTATAGGAAGGTTCTGTTGAGAGTACTATCCCTTACGTTTTTAATTTTTCTCAAAGTGTGTAATTTATTGC  
 TTGGTTGCTTGGATGTCTCAGTACCCTCAATTGCGTTCGGATCTGAAAGATATCTTGGCCAGACGTGGAAGTGGCAATGA  
 TACAAGGTTTTGGAAAAGCGAATGGAACAAACATGGTAGATGTTCTGAAGCCTCACTTAATCAAATGATACTTCGAGCGG  
 TOGCACGCAATGTGGATATCGTACAATATCACAGAGATCCTTAAAAACGCTTCAATCGTACCACATCCAUUUCCTTTTGG  
 CC

图 7 S4 基因序列  
 Fig. 7 S4 gene sequences (962 bp)

TCCGAAGAAGCCCGTAATTGCACTGGACCGCAATTTAAGCGAATATTGGTATGTATTGTTTCATTTTGTGTTTTCCACCTA  
 CCCTTTAGCTTTTAGTTTTTACAAAATTAGATTGTTAGTATGAACATATATAATATACTTTTTTTTTATAACATTCGTCA  
 TCTGGTTAGGCACACACATTATTTTGAATATATATCTAAGTACAAAATTGCTTGGATGTCTCAGTCCCTCAACTGGGAT  
 CCAAACCTGCAGACATCTTGGCCGACGTGAAAAGTGCCAAATGATACAAAAGTTTTGGGAAAAGCGAATGGAACAAACATGGT  
 ACATGTTCCAAAAGAGACACTTAACCAAATGCAGTACTTCGAGCGATCCTACGCAATGTGGATGTCTGTAATATTACAGA  
 GATCCTTAAAAACGCTTCAATCGTACCACATCCACATAGCGTGGGATCGCTCGATG

图 8 S6 基因序列  
 Fig. 8 S6 gene sequences (456 bp)

ACCCAGGCCCGGTAATTGCATTGGGTGCGCAATTTAACGATAGCAAAGTGGTATGTATTGTTTCATTATTTTTTCACTT  
 ACTCTTTAGCATTTAGTTTTTTAGGAAAGAAAATTTGAAAATTTGTTTTTTTCAATAAATGTTGGGTGCTACATAAAAATTTT  
 ATTTGGTCTCTGTGTTGGCATAATTATTTTGATTATATACCGAAAAGTATAAAATTTGTTAATACATTTACATTTGTATCAAT  
 GTAATAATGGATCTGCTCATCTAATTGAAGGACCTGCGTATATTCAAAATATTGTACATAATGAAAAGGTTTAAAACCCAAA  
 ACGCAGTTTAATACTCAGGTTTAGTGAAGAAAAAACAATCTTGTTCAAAAATGAAAATTTGAAGTACCCTAAAATTTGT  
 TTCGTTTTTATCAAAAATATGTATATATTTGTTGGATGTCTCAGTACCCTAAAATTTGGATCCAAAACCTGAAGAGATCTTGGC  
 CGGACGTGAAAAGTGGCAATGATACAAGGTTTTTGGGAAGCGAATGGAACAAACATGGTAAAATGTTCCGAAACGGACACTT  
 AAACCAATCCAAATACTTCGAGCGATCCCACGAAAATGTGGAATTTTCACAATATTACAGAGATCCTTAAAAACGCTTCAAT  
 CGTACCACA

图 9 S9 基因序列  
 Fig. 9 S9 gene sequences(650 bp)

Me Clure BA, Haring V, Ebert PR, et al. 1989. Style self-incompatibility gene products of *Nicotiana glauca* are ribonucleases [J]. *Nature*, **342**:955-957  
 Sassa H, Hiraho H, Ikehashi H, et al. 1992. Self-incompatibility-related RNases in styles of Japanese pear (*Pyrus serotina* Rehd.) [J]. *Plant Cell Physiol*, **33**:811-814  
 Sanzol J, Herrero M. 2002. Identification of self-incompatibility al-

leles in pear cultivars (*Pyrus communis* L.) [J]. *Euphytica*, **128**:325-331  
 Struss D, Boritzki M, Glozer K, et al. 2001. Detection of genetic diversity among populations of sweet cherry (*Prunus avium* L.) by AFLPs [J]. *J Hort Sci & Biol*, **76**(3):362-367  
 (下转第 407 页 Continue on page 407)

- transcription factor may be involved in osmotic stress response (拟南芥 WRKY2 转录调控因子可能参与调控渗透胁迫反应)[J]. *Acta Bot Yunnan* (云南植物研究), **31**(5):427-432
- Jonson CS, Kolevski B, Smyth DR. 2002. TRANSPARENT TESTA GLA-BRA 2, a trichome and seed coat development gene of *Arabidopsis*, encode a WRKY transcription factor [J]. *Plant Cell*, **14**(6):1 359-1 375
- Li J, Besseau S, Toronen P, et al. 2013. Defense-related transcription factors WRKY70 and WRKY54 modulate osmotic stress tolerance by regulating stomatal aperture in *Arabidopsis* [J]. *New Phytol*, **7**(1):1-16
- Li J, Brader G, Kariola T, et al. 2006. WRKY70 modulates the selection of signaling pathways in plant defence[J]. *Plant J*, **46**(3):477-491
- Li LQ (李立芹), Huang YB (黄玉碧), Wang XY (王西瑶). 2011. Cloning, sequence analysis and prokaryotic expression of the WRKY6 of potato (马铃薯 WRKY6 基因的克隆、序列分析与原核表达研究)[J]. *Acta Pratac Sin* (草业学报), **20**(2): 177-183
- Robatzek, Somssich IE. 2002. Targets of *At*WRKY6 regulation during plant senescence and pathogen defense[J]. *Genes Dev*, **16**(9):1 139-1 149
- Sun CX, Palmqvist S, Olsson H, et al. 2003. A novel WRKY transcription factor, SUSIBA2, participates in sugar signaling in barley by binding to the sugar-responsive elements of the iso 1 promoter[J]. *Plant Cell*, **15**(9):2 076-2 092
- Takemoto D, Yoshioka H, Doke N, et al. 2003. Disease stress-inducible genes of tobacco expression profile of elicitor-responsive genes isolated by subtractive hybridization[J]. *Physiol Plant*, **118**(4):545-553
- Mare C, Mazzucotelli E, Crosatti C, et al. 2004. Hv-WRKY38; a new transcription factor involved in cold and drought response in barley[J]. *Plant Mol Biol*, **55**(3):399-416
- Verk MC, Bol JF, Linthost HJ. 2011. WRKY transcription factors involved in activation of SA biosynthesis genes[J]. *BMC Plant Biol*, **19**(11):89-111
- Xu YH, Wang JW, Wang S, et al. 2004. Characterization of GaWRKY1, a cotton transcription factor that regulates the sesquiterpene synthase gene(+)- $\delta$ -cadinene synthase-A[J]. *Plant Physiol*, **135**(1):507-515
- Wang C, Deng P, Chen L, et al. 2013. A Wheat WRKY transcription factor TaWRKY10 confers tolerance to multiple abiotic stresses in transgenic tobacco[J]. *PLoS One*, **8**(6):1-13
- Wang J, Zhang S, Stacey G. 2004. Activation of a mitogen-activated protein kinase pathway in *Arabidopsis* by chitin[J]. *Mol Plant Pathol*, **5**(2):125-135

( 上接第 419 页 Continue from page 419 )

- Sonneveld T, Tobutt KR, Robins TP. 2003. Allele-specific PCR detection of sweet cherry self-incompatibility alleles S1 to S16 using consensus and allele-specific primers[J]. *Theor Appl Genet*, **107**: 1 059-1 070
- Sonneveld T, Robbins TP, Boskovic R, et al. 2001. Cloning of six cherry self-incompatibility alleles and development of allele-specific PCR detection[J]. *Theor Appl Genet*, **102**:1 046-1 055
- Tao R, Yamane H, Sugiura A. 1999. Molecular Typing of S-alleles through identification characterization and cDNA cloning for S-RNases in sweet cherry[J]. *Am Soc Hortic Sci*, **24**(3):224-233
- Verdoodt L, Van Haute A, Goderis IJ, et al. 1998. Use of multi-allelic self-incompatibility gene in apple to assess homozygosity in shoots obtained through haploid induction[J]. *Theor Appl Genet*, **96**:294-300
- Williams W, Brown AG. 1956. Genetic response to selection in cultivated plants: gene frequencies in *Prunus avium*[J]. *Heredity*, **10**:237-245
- Xue Y, Carpenter R, Dickinson HG, et al. 1996. Origin of allelic diversity in *Antirrhinum* S-locus RNases[J]. *Plant Cell*, **8**:805-814
- Zhang XM (张晓明), Wang HX (王鸿霞), et al. 2007. Sweet cherry S genotype PCR identification technology (甜樱桃 S 基因型 PCR 鉴定技术研究)[J]. *J Fruit Sci* (果树学报), **24**(4):466-471
- Zhou J (周杰). 2008. Analysis of sweet cherry varieties S genotype identification and genetic diversity (甜樱桃品种 S 基因型鉴定及遗传多样性分析)[D]. Tai'an (泰安): Shandong Agricultural University (山东农业大学)