

# ‘沙糖橘’S 蛋白同源基因 *CrSPH* 的 克隆与表达分析

吴秀兰<sup>1</sup>, 唐文武<sup>2\*</sup>, 徐呈祥<sup>2</sup>, 李桂花<sup>3</sup>

(1 肇庆学院 食品与制药工程学院, 广东肇庆 526061; 2 肇庆学院 生命科学学院, 广东肇庆 526061; 3. 广东省农业科学院蔬菜研究所, 广州 510640)

**摘要:** 柑橘自交不亲和由 S 位点基因控制, 前期 SSH 文库中筛选出 1 个自交不亲和相关的 S 蛋白同源基因 (S-protein homologous gene, *SPH*), 但其功能尚不明确。研究以‘无籽沙糖橘’和‘沙糖橘’为材料, 利用反转录 PCR 技术克隆 *CrSPH* 基因, 通过 qPCR 技术分析该基因表达特性, 并进行原核表达和花粉萌发实验。结果表明, (1) *CrSPH* 的 CDS 长度为 417 bp, 编码 138 个氨基酸, 两材料间的 CDS 区存在 3 个碱基替换, 引起 2 个氨基酸突变。(2) Southern 杂交实验表明, *CrSPH* 基因在两材料基因组中均以单拷贝形式存在。(3) qPCR 实验表明, *CrSPH* 基因在‘沙糖橘’花器官不同部位表达差异显著, 子房中表达量最大, 花瓣、花丝等组织中表达量均较低; 在高表达的子房中, ‘沙糖橘’表达量是‘无籽沙糖橘’的 16 倍, 表明 *CrSPH* 基因在‘沙糖橘’中具有高度的组织表达特异性。(4) *CrSPH* 基因在异交授粉第 6, 7 天表达量最高, 与其他时段差异均达到显著水平, 第 6 天表达量是第 1 天表达量的 12.4 倍。(5) 原核表达实验成功诱导出 *CrSPH* 蛋白, 离体花粉萌发实验表明, 随着异源‘无籽沙糖橘’*CrSPH* 蛋白浓度的增加, ‘无籽沙糖橘’萌发率受到显著的抑制。研究表明, *CrSPH* 基因具有表达特异性, 可能与柑橘自交不亲和有关。

**关键词:** ‘沙糖橘’; *CrSPH*; 表达分析; 花粉萌发; 自交不亲和

中图分类号: Q943.2; S666 文献标志码: A

## Cloning and Expression Analysis of the S-protein Homologous Gene (*CrSPH*) from ‘Shatangju’

WU Xiulan<sup>1</sup>, TANG Wenwu<sup>2\*</sup>, XU Chengxiang<sup>2</sup>, LI Guihua<sup>3</sup>

(1 School of Food and Pharmaceutical Engineering, Zhaoqing University, Zhaoqing, Guangdong 526061, China; 2 School of Life Sciences, Zhaoqing University, Zhaoqing, Guangdong 526061, China; 3 Vegetable Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China)

**Abstract:** Self-incompatibility in *Citrus* was controlled by the S locus gene, one self-incompatibility related S-protein homologous gene (*SPH*) was screened from SSH library in the early stage, but its function is still unclear. In the study, the *SPH* gene was cloned from ‘Wuzishatangju’ and ‘Shatangju’ by reverse transcription PCR, named *CrSPH*. The expression level of the *CrSPH* gene was analyzed by qPCR. The prokaryotic expression and pollen germination experiments were also conducted. The results showed, (1) the CDS of *SPH* gene was successfully cloned from ‘Wuzishatangju’ and ‘Shatangju’, and the CDS was

收稿日期: 2023-03-30; 修改稿收到日期: 2023-05-26

基金项目: 国家外专局项目 (QN2022030025L); 肇庆学院博士科研启动基金项目 (611-612281)

作者简介: 吴秀兰 (1978-), 女, 博士, 副教授, 主要从事柑橘遗传育种与分子生物学研究。E-mail: 10844264@qq.com

\* 通信作者: 唐文武, 博士, 教授, 主要从事植物遗传育种与分子生物学研究。E-mail: wwtang@zqu.edu.cn

417 bp encoding a protein of 138 amino acids. There were three base pairs difference between ‘Wuzishatangju’ and ‘Shatangju’, which resulted in two amino acids mutation. (2) The southern hybridization experiment showed there was one copy of *CrSPH* in the genomic DNA both ‘Wuzishatangju’ and ‘Shatangju’. (3) The qPCR showed that the expression level of *CrSPH* gene was significantly different in flower organs of ‘Shatangju’, the highest expression level was found in ovary, and it was hardly expressed in petals, filaments, anthers, stigmas, styles. The relative expression level of *CrSPH* gene was 16 times higher in the ovaries of ‘Shatangju’ than that in ovaries of ‘Wuzishatangju’. (4) The highest expression of the *CrSPH* gene was detected at the 6<sup>th</sup> and 7<sup>th</sup> d after outcrossing (‘Wuzishatangju’ × ‘Shatangju’) pollination, and there were significant difference than the expression of the *CrSPH* gene at other periods, the relative expression level of *CrSPH* gene at 6 d was 16 times higher than that at 1 d. (5) The prokaryotic expression experiment successfully induced the *CrSPH* heterologous protein, and the pollen germination experiment in vitro showed that the pollen germination rate of ‘Wuzishatangju’ was significantly inhibited with increasing *CrSPH* protein concentrations from ‘Wuzishatangju’. The above results showed that the *CrSPH* gene had tissue expression specificity. We speculated that the *CrSPH* gene may be related to self-incompatibility of *Citrus*.

**Key words:** ‘Shatangju’; *CrSPH*; expression analysis; pollen germination; self-incompatibility

在显花植物中,自交不亲和性(self-incompatibility, SI)被认为是防止自花授粉、促进异花授粉及产生新基因型的重要遗传机制。SI是由1个单一的复等位基因S位点所控制,以实现接受还是排斥自我的花粉<sup>[1]</sup>。SI系统可分为孢子体SI(sporophytic SI, SSI)和配子体SI(gametophytic SI, GSI)。SSI和GSI由不同的S位点基因控制,以十字花科为代表的SSI主要由S位点的SRK(S-receptor kinase)和SCR(S-locus protein 11)基因控制<sup>[2]</sup>。这2个紧密连锁的S位点基因在柱头的乳突细胞中特异性表达,并在SI中控制柱头的功能<sup>[3]</sup>。以茄科为代表的GSI主要由雌蕊中的*S-RNase*和花粉中*SLF*(S-locus F-box)/*SFB*(S-haplotype-specific F-box)基因控制<sup>[4]</sup>。有关*S-RNase*研究较多,玄参科<sup>[5]</sup>、蔷薇科<sup>[6]</sup>、芸香科<sup>[7]</sup>、在茄科<sup>[8]</sup>等均有报道,不同*S-RNase*之间存在高度的多态性,其氨基酸序列的同源性介于38%~98%之间<sup>[9]</sup>。在花粉S位点基因研究方面,Lai等<sup>[10]</sup>从金鱼草的BAC文库中筛选到1个*AhSLF-S<sub>2</sub>*基因,该基因与*S<sub>2</sub>-RNase*紧密连锁。Sassa等<sup>[11]</sup>在梨中鉴定了5个*F-box*基因,均位于*S<sub>n</sub>-RNase*基因附近。Beecher等<sup>[12]</sup>报道除了关键S因子外,其他非关键因子也参与自交不亲和反应,如PCD<sup>[13]</sup>、SSK1<sup>[14]</sup>、CrSKP1-e<sup>[15]</sup>、BrCML49<sup>[16]</sup>等。

柑橘属于S-RNase介导的GSI,由花柱S-RNase和花粉SLF相互作用,通过抑制花粉管的生长实现自交不亲和性<sup>[17]</sup>。当花柱S-RNase进入花粉管后,非自我S-RNase会被SLF识别并被泛素化及降解,花粉管能正常延伸至子房受精。当自我S-

RNase释放到花粉管中,会降解花粉管中的RNA,使得花粉管无法在花柱中生长,表现出自交不亲和反应<sup>[18]</sup>。沙糖橘是中国重要的柑橘品种,属于自交亲和品种。‘无籽沙糖橘’是‘沙糖橘’的芽变体,属于GSI<sup>[19-20]</sup>,是研究自交不亲和的理想材料。课题组前期从无籽沙糖橘SSH文库中筛选到1个自交不亲和相关的EST序列,序列比对为S-蛋白同源基因(S-protein homologous gene, *SPH*),柑橘*SPH*基因的相关研究尚未见报道。本研究以甜橙(*Citrus sinensis*)的*SPH*基因序列(Cs5g34580.1)为参照,克隆了‘沙糖橘’*CrSPH*基因的CDS和DNA序列,并分析其在花器官不同部位、授粉后不同时间段的表达量,同时研究该蛋白对‘无籽沙糖橘’、‘沙糖橘’花粉萌发率的影响,以期研究*CrSPH*基因功能及在柑橘自交不亲和反应中的作用机制提供依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验材料

试验用‘无籽沙糖橘’及‘沙糖橘’果树由肇庆市德庆县马圩镇果园提供,为7年生果树。于2019年春季收集含苞待放花蕾,用镊子剥离出花瓣、花丝、柱头、花柱、子房、花丝和花药,液氮速冻后置于-80℃冰箱,用于不同组织表达分析。收集自交(‘无籽沙糖橘’×‘无籽沙糖橘’)、异交(‘无籽沙糖橘’×‘沙糖橘’)后0,1,2,3,4,5,6,7 d的雌蕊,液氮速冻后置于-80℃冰箱,用于授粉后不同时间段的表达分析。收集‘无籽沙糖橘’和‘沙糖橘’花粉,置于-20℃冰箱保存,用于体外花粉萌发实验。

## 1.2 试验方法

### 1.2.1 *CrSPH* 基因克隆

采用 RNA 提取试剂盒提取总 RNA, 采用 CTAB 法<sup>[21]</sup>提取基因组 DNA, 采用 Life Technology 公司生产的 M-MLV 反转录试剂盒合成 cDNA。参考甜橙 *SPH* 基因序列(Cs5g34580.1)设计 1 对包含起始密码子和终止密码子的引物 *CrSPH*-F/R (表 1), 扩增 *CrSPH* 基因的 CDS 和 DNA 序列, 扩增产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳并回收, 获得目的基因片段。将目的基因与 pMD19-T 克隆载体连接并转化感受态细胞 DH5 $\alpha$ , 经 37 °C 过夜培养后, 挑取 3 个阳性菌落经 PCR 鉴定正确后, 送基因测序公司测序验证。

利用 NCBI 的 blastp 对 *CrSPH* 基因序列和蛋白序列进行分析, 采用 ProtParam 在线工具分析蛋白质的等电点及分子量。利用在线软件 SignalP 6.0 对 *CrSPH* 蛋白进行信号肽分析。

### 1.2.2 qPCR 表达分析

为分析 *CrSPH* 基因在花器官的不同部位及授粉后不同时段的表达量, 利用 qPCR 技术检测花瓣、子房、花柱、柱头、花丝和花药等花器官, 以及自交(‘无籽沙糖橘’ $\times$ ‘无籽沙糖橘’)、异交(‘无籽沙糖橘’ $\times$ ‘沙糖橘’)授粉后不同时段的基因表达量。根据 *CrSPH* 基因和柑橘 *Actin* 基因序列, 分别设计符合 qPCR 要求的特异引物(q*CrSPH*-F/R)和内参引物(*Actin*-F/R)(表 1), 按照 qPCR 试剂盒(SYBR Green)说明书进行 qPCR 反应, 反应体系为 20.0  $\mu$ L, 包括 10.0  $\mu$ L SYBR ExTaq, 10  $\mu$ mol/L 引物各 1.0  $\mu$ L, 6.0  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O 和 2.0  $\mu$ L(80 ng) cDNA, 扩增反应在 ABI 7500 实时定量 PCR 仪进行。设置 3 次重复, 每次用 ddH<sub>2</sub>O 做阴性对照, 数据分析采用  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  法计算<sup>[22]</sup>。

表 1 所用引物序列

Table 1 Primers for experiment

引物名称 Primer	引物序列(5'→3') Primer sequence (5'→3')
<i>CrSPH</i> -F	CCGCATGAAGTGGTTGATGGTGA
<i>CrSPH</i> -R	TCATCATCTCTGGCACTCCTGC
q <i>CrSPH</i> -F	GCTCAACATTGGAAGCTCATTGC
q <i>CrSPH</i> -R	CTGGTCATCAGGGCAGTAAACAT
<i>Actin</i> -F	CCAATTCTCTTGAACCTGTCCTT
<i>Actin</i> -R	TGACTGATGAGAACTGCCAGAAG
pET32a <i>CrSPH</i> -F	CGGAATTCATGAAGTGGTTGATGGTGA
pET32a <i>CrSPH</i> -R	TATATGTCGACTCTCTGGCACTCCTGC

### 1.2.3 Southern 杂交分析

以 10.0  $\mu$ g 基因组 DNA 为模板, 分别用限制性内切酶 *Eco*RI、*Sca*I、*Cla*I 于 37 °C 过夜消化, 全部酶切产物于 0.8% 琼脂糖凝胶电泳 3~5 h, 待全部产物分离后凝胶成像系统拍照, 将其转入 Hybond N+ 尼龙杂交膜。根据 PCR DIG 探针合成试剂盒说明书合成带有 DIG 标记的探针, 于 42 °C 预杂交 2 h 后, 加入制作好的探针过夜杂交; 然后用 2 $\times$ 柠檬酸钠(stand saline citrate, SSC)溶液(含 0.1% SDS), 再用 0.5 $\times$ SSC(含 0.1% SDS)于 65 °C 洗脱 2 次, 每次洗脱 10 min; 最后于暗室中将 X-ray 胶片平铺到杂交膜并置于暗匣中, 于 37 °C 曝光 5~30 min。

### 1.2.4 原核表达载体构建及 *CrSPH* 蛋白诱导

设计含有 *Bam*HI 和 *Sal*I 酶切位点的引物 pET32a-*CrSPH*-F/R(表 1), 以 pMD19-*CrSPH* 为模板扩增目的基因, 获得带有黏性末端的目的基因。用 *Bam*HI 和 *Sal*I 双酶切线性化原核表达载体 pET32a, 将带有黏性末端的目的基因与线性化的表达载体用 T<sub>4</sub> DNA 酶连接, 经转化、鉴定后获得 pET32a-*CrSPH* 重组原核表达载体。将上述重组质粒转化至大肠表达菌株 BL21(DE3), 以空质粒为对照。用 1 mmol/L IPTG 诱导菌株表达获得 pET32a-*CrSPH* 融合蛋白, 并经 12% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳。

### 1.2.5 花粉萌发实验

将原核诱导的 *CrSPH* 蛋白稀释成 0.4, 0.8, 1.6, 3.2, 6.4  $\mu$ g/ $\mu$ L 5 个浓度。花粉培养基配制按照 Miao 等<sup>[26]</sup>的方法, 分别取上述各浓度的‘无籽沙糖橘’和‘沙糖橘’*CrSPH* 蛋白 200  $\mu$ L, 加入到上述花粉培养基后分成 2 份: 一份用于‘无籽沙糖橘’花粉培养, 一份用于‘沙糖橘’花粉培养。相应花粉撒播至培养基后于恒温培养箱中 28 °C 培养 10 h, 以花粉管长度超过花粉粒直径作为萌发标准, 在光学显微镜下观察并统计各处理的花粉萌发率, 设置 3 次生物学重复, 以未添加 *CrSPH* 蛋白组作为对照。

## 2 结果与分析

### 2.1 *CrSPH* 基因克隆

以‘无籽沙糖橘’和‘沙糖橘’的花蕾 cDNA 为模板, 利用引物 *CrSPH*-F/R 进行 PCR 扩增, 均得到约 400 bp 特异条带(图 1), 经回收、克隆后测序表明‘无籽沙糖橘’和‘沙糖橘’CDS 均为 417 bp, 编码 138 个氨基酸。两者间序列存在 3 个碱基差异, ‘沙

糖橘’第 93 位 C 突变为 T、第 190 位 G 突变为 A、第 324 位 C 突变 G,从而导致‘沙糖橘’第 64 位缬氨酸(V)突变为异亮氨酸(I),108 位天冬酰胺(N)突变为赖氨酸(K)(图 2)。利用 CrSPH-F/R 引物对 2 个材料的基因组 DNA 进行扩增及测序,其序列长度也是 417 bp,表明‘沙糖橘’和‘无籽沙糖橘’基因组 DNA 均不含内含子。利用 ProtParam 预测‘沙糖橘’CrSPH 蛋白显示其分子量为 16.05 kD,理论等电点为 8.48,SignalP 6.0 分析显示该蛋白不存在信号肽。

```

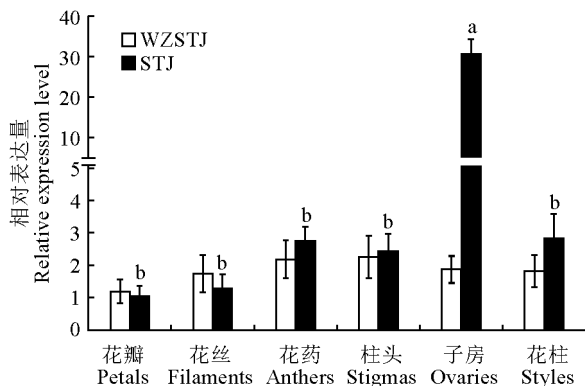
STJ : ATGAAGTGGTTGATGGTGAGTTGCTTGGTGTTTTAGTAGCTGCGTGTCCAGGCGCCCATCACAACTCACTTTTGAACCATTTCACAGAG 90
WZSTJ: M K W L M V S C L V F L V A A C Q A P I T N S L L N H F T E
STJ : CACCTAATCAATAATTGAACAATAGCTCAACATTGGAAGCTCATTGCAAAATCGATAGACGATGATTTGGGGCTTCGACGGCTGGCTGCT 180
WZSTJ: H L I N N L N N S S T L E A H C K S I D D D L G L R R L A A
STJ : GGCACAGAGGTTAATTGGACATTTCGCGTCAACTTCTGGTCAACCACGGCTTTTCTTTGCGACTTGAGGTGGGCAATGGCCATAAAGCG 270
WZSTJ: G T E I N W T F R V N F W S T T L F F C D L R W A N G H K A
STJ : TTCGATGTTTACTGCCCTGATGACCAGTTTCTAGCCAAGAAATGTGCCTATAACTTCTGCCGACGAGGTGCCAGAGATGATGGCATTAT 360
WZSTJ: F D V Y C P D D Q F L A K K C A Y K F C R R S A R D D G I Y
STJ : GCATTTAGCGAGAAGAAAACCAATTATGTTCTTGCTCATAAATGGGATCCTAAGTGA 417
WZSTJ: A F S E K K N H Y V L A H K W D P K *

```

STJ. Shatangju; WZSTJ. Wuzishatangju.

图 2 ‘沙糖橘’和‘无籽沙糖橘’CrSPH 基因比对

Fig. 2 Sequences of the CrSPH protein from ‘Wuzishatangju’ and ‘Shatangju’



柱状图上不同小写字母表示花器官不同部位  
表达量差异显著( $P < 0.05$ )。

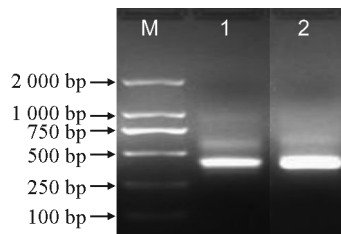
图 3 CrSPH 基因在‘无籽沙糖橘’和‘沙糖橘’  
花器官不同部位的表达分析

Different lowercase letters indicate significant expression  
differences in different parts of floral organ ( $P < 0.05$ ).

Fig. 3 Expression analyses of CrSPH gene in different  
parts of floral organ from ‘Wuzishatangju (WZSTJ)’  
and ‘Shatangju (STJ)’

## 2.2 不同部位花器官的基因表达分析

采用 qPCR 技术对花瓣、花丝、花药、柱头、花柱和子房等花器官部位的 CrSPH 基因表达量进行检测,结果如图 3 所示,CrSPH 基因在‘沙糖橘’花器



M. Marker; 1. Wuzishatangju; 2. Shatangju.

图 1 ‘沙糖橘’和‘无籽沙糖橘’CrSPH 基因的  
PCR 扩增结果

Fig. 1 PCR product of CrSPH gene from  
‘Wuzishatangju’ and ‘Shatangju’

官不同部位的表达量差异较大,其中子房组织的表达量最高,且与其他部位表达量差异均达到显著水平;‘无籽沙糖橘’不同部位的表达量差异均未达到显著水平。在高表达的子房中,‘沙糖橘’表达量是‘无籽沙糖橘’的 16 倍,表明 CrSPH 基因在‘沙糖橘’中具有高度的组织表达特异性。

## 2.3 自交和异交授粉后不同时间段的基因表达分析

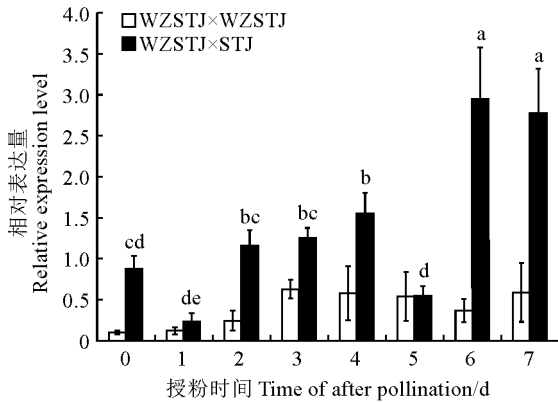
利用 qPCR 检测了 CrSPH 基因在自交(‘无籽沙糖橘’×‘无籽沙糖橘’)和异交(‘无籽沙糖橘’×‘沙糖橘’)授粉后 0,1,2,3,4,5,6,7 d 的雌蕊组织表达量,相关结果见图 4。由图 4 可知,异交授粉后第 6,7 天的表达量最高,与其他时段的差异均达到显著水平;异交授粉后第 2~4 天的表达量较高,与表达量较低的第 1 和第 5 天的差异达到显著水平,异交授粉第 6 天表达量是第 1 天表达量的 12.4 倍,表明 CrSPH 基因在异交授粉后不同时间段的表达量差异显著。

由图 4 可知,自交授粉后各时段的基因表达水平较低,其表达量呈现出先上升后下降的表达规律,以第 3 天的表达量最高,但不同时间段的基因表达量差异未达到显著水平。

## 2.4 Southern 杂交分析

利用 CrSPH 基因内部不存在酶切位点的

*EcoR* I 和 *Sac* I 酶以及存在 1 个酶切位点的 *Cla* I 酶对基因组 DNA 消化后,与 DIG 标记 *CrSPH* 基因的探针进行杂交实验,结果见图 5。由图 5 可知,经 *EcoR* I 和 *Sac* I 消化的 DNA 杂交出 1 条杂交带,而经 *Cla* I 酶消化的 DNA 出现 2 条杂交带,表明 *CrSPH* 基因在‘无籽沙糖橘’和‘沙糖橘’基因组中均以单拷贝形式存在。

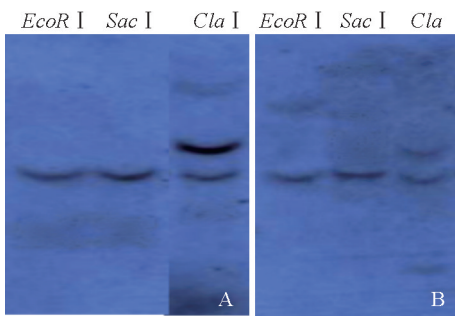


柱状图上不同小写字母表示授粉后不同时间的表达量差异显著 ( $P < 0.05$ )。

图 4 *CrSPH* 基因在自交、异交授粉后不同时段表达分析

Different lowercase letters indicate significant expression differences in different stage after pollination ( $P < 0.05$ ).

Fig. 4 Expression analyses of *CrSPH* gene in different stages in ovaries after self-pollination and cross-pollination



A. ‘Wuzishatangju’, B. ‘Shatangju’.

图 5 *CrSPH* 基因在‘无籽沙糖橘’和‘沙糖橘’基因组中 Southern 杂交分析

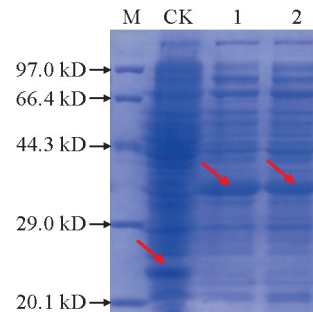
Fig. 5 Southern hybridization analysis of the *CrSPH* gene in ‘Wuzishatangju’ and ‘Shatangju’

## 2.5 *CrSPH* 蛋白诱导表达及对离体花粉萌发影响

将线性化的 pET32a 表达载体与带有 *Bam* H I 和 *Sal* I 酶切位点的目的基因连接后,经转化、培养、测序鉴定后,成功构建含有 *CrSPH* 基因的原核表达载体 pET32a-*CrSPH*。将该重组质粒转化大肠杆菌 BL21(DE3),经 IPTG 诱导表达及 SDS-PAGE 电泳结果见图 6。由图 6 可知,原核诱导表达的融合蛋白条带约 37 kD,其中 CK 中的标签蛋白为 21

kD,诱导获得的 *CrSPH* 蛋白约为 16 kD,这与生物信息学预测的 16.05 kD 结果相吻合,表明该原核表达系统成功诱导表达出 *CrSPH* 蛋白。

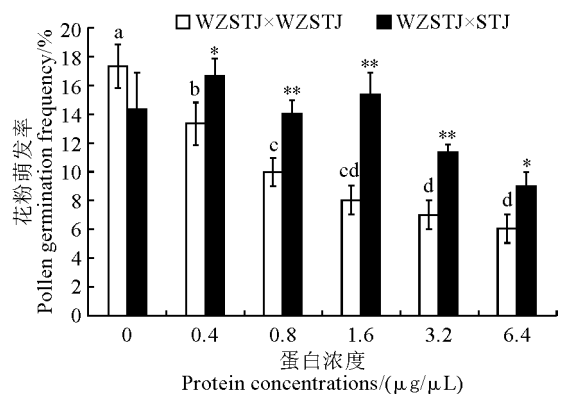
将上述异源表达的 *CrSPH* 蛋白稀释成 0.4, 0.8, 1.6, 3.2, 6.4  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  浓度后添加到花粉培养基,观察其对花粉萌发率的影响,并以不添加外源 *CrSPH* 蛋白组为对照,结果见图 7。由图 7 可知,‘无籽沙糖橘’*CrSPH* 蛋白对 2 种花粉萌发率有一定影响,随着异源‘无籽沙糖橘’*CrSPH* 蛋白浓度增加,‘无籽沙糖橘’花粉萌发率显著性降低;但‘沙糖橘’花粉在 0.4, 1.6  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  的低浓度处理时萌发率较高,而在 3.2, 6.4  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  的高浓度处理下萌发率反而下降。‘沙糖橘’*CrSPH* 蛋白对‘无籽沙糖橘’和‘沙糖橘’的花粉萌发均无明显影响。



M. Marker; CK. His tags protein; 1. ‘Wuzishatangju’; 2. ‘Shatangju’.

图 6 原核系统异源表达 *CrSPH* 蛋白

Fig. 6 Heterologous expression of *CrSPH* protein from ‘Wuzishatangju’ and ‘Shatangju’ using prokaryotic expression



图柱上不同字母表示不同浓度处理下的差异显著性 ( $P < 0.05$ ),

\* 表示两材料间差异达到显著水平 ( $P < 0.05$ ),

\*\* 表示两材料间差异达到极显著水平 ( $P < 0.01$ )。

图 7 原核表达的 *CrSPH* 蛋白对花粉萌率的影响

Different lowercase letters on the bars indicate significant difference between treatments with WZSTJ ( $P < 0.05$ ), \* on the bars indicate significant difference between WZSTJ and STJ ( $P < 0.05$ ).

Fig. 7 Effect of *CrSPH* protein on pollen germination frequency of ‘Wuzishatangju’ and ‘Shatangju’

### 3 讨论

多数果树属于配子体自交不亲和,其自交不亲和性是雌蕊关键因子 *S-RNase* 基因和花粉关键因子 *SLF/SFB* 基因相互作用结果<sup>[7,17,23-25]</sup>。Lai 等<sup>[10]</sup>在研究金鱼草花粉自交不亲和反应中,将金鱼草花粉特异表达 *AhSLF-S2* 基因和雌蕊特异表达的 *AhS<sub>2</sub>-RNase* 基因转入矮牵牛 (*Petunia hybrida*),结果分别在转基因矮牵牛的花粉和雌蕊中检测这两个基因的表达量,Qiao 等<sup>[26]</sup>进一步通过花粉实验证明转了 *AhSLF-S2* 和 *AhS<sub>2</sub>-RNase* 基因的矮牵牛由 SI 转变成 SC。然而蔷薇科花粉自交不亲和反应并非由于基因表达量差异导致,而是花粉 S 基因编码区发生了碱基的替换、缺失,导致 S 蛋白发生改变,从而导致由 SI 向 SC 转变<sup>[27]</sup>。Sassa 等<sup>[4]</sup>发现 SC 突变体‘Osa-Nijisseiki’是由于 SI 日本梨‘Nijisseiki’的 *S<sub>4</sub>-RNase* 基因发生了突变,使得 *S<sub>4</sub>-RNase* 基因不能在花柱表达,导致 SI 向 SC 突变。Ushijima 等<sup>[28]</sup>在梅 (*Prunus mume*) 中获得花粉突变造成的自交亲和单体型 *S<sub>f</sub>*, *S<sub>f</sub>* 基因结构中有 6.8 kbp 碱基插入,造成编码的 F-box 蛋白缺少了 C-端序列,从而造成亲和突变。本研究中, *CrSPH* 基因在‘沙糖橘’和‘无籽沙糖橘’CDS 序列存 3 个碱基的差异(C→T, G→A, C→G),导致 2 个氨基酸残基发生改变(V→I, N→K)。在 *CrSPH* 基因在特异性表达的子房部位,‘沙糖橘’表达量是‘无籽沙糖橘’的 16 倍,推测‘无籽沙糖橘’的 *CrSPH* 基因突变和子房中低水平表达可能与其自交不亲和和表型相关。

植物自交不亲和主要由 1 个单一的复等位基因 S 位点控制,该基因座上存在 2 个紧密连锁且分别在花柱和花粉中特异表达的基因,分别是雌蕊决定因子 *S-RNase* 和花粉决定因子 *SLF/SFB*。柑橘

属于 *S-RNase* 介导的 GSI,主要通过抑制花粉管的生长实现自交不亲和性,因此 S 位点蛋白在花粉萌发和抑制花粉管生长中起着重要的作用<sup>[17]</sup>。Zhang 等<sup>[18]</sup>提出泛素蛋白降解和液泡分选途径假说,认为 *S-RNase* 通过细胞内吞作用从细胞外基质进入到花粉管后被运输到花粉的液泡中,在异花授粉的花粉管中,液泡膜未被破坏,*S-RNase* 会被 SCF<sup>CLF</sup> 泛素化而降解,花粉管正常延伸;而自花授粉后,液泡膜由于某种机制会被破坏,*S-RNase* 便释放到细胞质中,产生细胞毒素效应从而抑制自花花粉管的生长。SI 除了雌蕊决定因子 *S-RNase* 和花粉决定因子 *SLF* 外,其他非 S 因子也参与自交不亲和反应。Beecher 等<sup>[12]</sup>等发现通过转化单一的 *S-RNase* 基因不一定能够使自交亲和的烟草品种恢复拒斥自花花粉的能力,说明 SI 除了花粉和花柱 S 决定因子外,其他非关键因子也参与自交不亲和反应。Goldraij 等<sup>[29]</sup>报道了 HT-B 作为非 S 因子可使不亲和花粉管中的液泡破裂,使得 *S-RNase* 酶从液泡中释放出来,从而抑制了花粉管生长。Thomas 等<sup>[13]</sup>报道了 PCD 等非 S 因子不参与花粉管生长尖端的生长抑制,可能参与 SI 下游事件来保证花粉管生长抑制的不可逆性。Ren 等<sup>[15]</sup>从无籽沙糖橘中克隆到 1 个 *CrSKP1-e* 基因,在花粉中特异表达,是 *SSK1* 基因的同源基因并参与 SI 反应。本研究中, *CrSPH* 作为 S 位点蛋白的同源基因, *CrSPH* 蛋白对花粉萌发表型效应也有显著影响,随着‘无籽沙糖橘’*CrSPH* 蛋白浓度增加,‘无籽沙糖橘’花粉萌发率显著性降低;而‘沙糖橘’花粉在低浓度 *CrSPH* 蛋白处理时萌发率较高,在高浓度处理时萌发率下降,因此,笔者推测 *CrSPH* 蛋白作为非关键因子,可能通过参与花粉管液泡破裂或其他下游代谢过程参与柑橘 SI 反应过程,但具体如何作用,需要进一步遗传研究和功能验证。

#### 参考文献:

- [1] DE NETTANCOURT D. Incompatibility in angiosperms[J]. *Sexual Plant Reproduction*, 1997, **10**(4): 185-199.
- [2] EDH K, WIDEN B, CEPLITIS A. The evolution and diversification of S-locus haplotypes in the Brassicaceae family[J]. *Genetics*, 2009, **181**(3): 977-984.
- [3] TAKASAKI T, HATAKEYAMA K, SUZUKI G, et al. The S receptor kinase determines self-incompatibility in *Brassica stigma*[J]. *Nature*, 2000, **403**(6772): 913-916.
- [4] SASSA H, HIRANO H, NISHIO T, et al. Style-specific self-compatible mutation caused by deletion of the *S-RNase* gene in Japanese pear (*Pyrus serotina*)[J]. *The Plant Journal*, 1997, **12**(1): 223-227.
- [5] LIANG L, HUANG J, XUE Y. Identification and evolutionary analysis of a relic *S-RNase* in *Antirrhinum* [J]. *Sexual Plant Reproduction*, 2003, **16**(1): 17-22.
- [6] 李天忠, 龙慎山, 李茂福, 等. 苹果自交不亲和基因型(S 基因)研究进展[J]. 中国农业科学, 2011, **44**(6): 1 173-1 183.
- LI T Z, LONG S S, LI M F, et al. Advances in research of

- the self-incompatibility genotypes (S-genotypes) in apple[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2011, **44**(6): 1 173-1 183.
- [7] 梁 梅. 柑橘自交不亲和相关基因的鉴定及其演化[D]. 武汉:华中农业大学, 2019.
- [8] ZHAO H, SONG Y Z, LI J H, *et al.* Primary restriction of S-RNase cytotoxicity by a step wise ubiquitination and degradation pathway in *Petunia hybrida* [J]. *New Phytologist*, 2021, **231**: 1 249-1 264.
- [9] 张一婧, 薛勇彪. 基于S-核酸酶的自交不亲和性的分子机制. 植物学通报, 2007, **24**(3): 372-388.  
ZHANG Y J, XUE Y B. Molecular control of S-RNase-based self-incompatibility[J]. *Chinese Bulletin of Botany*, 2007, **24**(3): 372-388.
- [10] LAI Z, MA W S, HAN B, *et al.* An F-box gene linked to the self-incompatibility (S) locus of *Antirrhinum* is expressed specifically in pollen and tapetum[J]. *Plant Molecular Biology*, 2002, **50**(1): 29-42.
- [11] 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): 1 869-1 881.
- [12] BEECHER B, ZUREK D, MCCLURE B. Effects of RNases on rejection of pollen from *Nicotiana tabacum* and *N. plumbaginifolia* [J]. *Sexual Plant Reproduction*, 2001, **14**: 69-76.
- [13] THOMAS S G, FRANKLIN-TONG V E. Self-incompatibility triggers programmed cell death in *Papaver* pollen [J]. *Nature*, 2004, **429**(6989): 305-309.
- [14] ZHAO L, HUANG J, ZHAO Z, *et al.* The Skp1-like protein SSK1 is required for cross-pollen compatibility in S-RNase-based self-incompatibility [J]. *Plant Journal*, 2010, **62**(1): 52-63.
- [15] REN Y, HUA Q, PAN J, *et al.* SKP1-like protein, Cr-SKP1-e, interacts with pollen-specific F-box proteins and assembles into SCF-type E3 complex in ‘Wuzhishatangju’ (*Citrus reticulata* Blanco) pollen [J]. *Peer Journal*, 2020, **8**: e10578.
- [16] 张倩雯, 吕春澍, 王若凡, 等. 大白菜 *BrCML49* 基因的分离鉴定及表达特性分析 [J]. 西北植物学报, 2020, **40**(9): 1 447-1 453.  
ZHANG Q W, LU C S, WANG R F, *et al.* Identification and expression analysis of *BrCML49* gene in Chinese cabbage [J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2020, **40**(9): 1 447-1 453.
- [17] HU J, XU Q, LIU C, *et al.* Down regulated expression of S2-RNase attenuates self-incompatibility in “Guiyou No. 1” pummelo [J]. *Horticulture Research*, 2021, **8**: 199.
- [18] ZHANG S L, HUANG S X, KITASHIBA H, *et al.* Identification of S-haplotype-specific F-box gene in Japanese plum (*Prunus salicina* Lindl.) [J]. *Sexual Plant Reproduction*, 2007, **20**(1): 1-8.
- [19] 叶自行, 曾 泰, 许建楷, 等. 无籽沙糖橘(十月橘)的选育 [J]. 果树学报, 2006, **23**(1): 149-150.  
YE Z X, ZENG T, XU J K, *et al.* Wuzhishatangju, a new mandarin cultivar [J]. *Journal of Fruit Science*, 2006, **23**(1): 149-150.
- [20] YE W J, QIN Y H, YE Z X, *et al.* Seedless mechanism of a new mandarin cultivar ‘Wuzhishatangju’ (*Citrus reticulata* Blanco) [J]. *Plant Science*, 2009, **177**(1): 19-27.
- [21] 胡桂兵. 园艺植物生物技术实验指导 [M]. 北京:中国农业出版社, 2010: 56-59.
- [22] LIVAK K J S T D. Analysis of relative gene expression data using Real Time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  method [J]. *Methods*, 2001, **25**(4): 402-408.
- [23] MIAO H X, YE Z X, TEIXEIRA DA SILVA JAIME A, *et al.* Identifying differentially expressed genes in pollen from self-incompatible ‘Wuzhishatangju’ and self-compatible ‘Shatangju’ Mandarins [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2013, **14**(4): 8 538-8 555.
- [24] 李秋磊. 无籽沙糖桔自交不亲和和相关基因的筛选与克隆 [D]. 广州:华南农业大学, 2017.
- [25] 张 红, 张艳敏, 陈晓流, 等. 欧李自交不亲和 S 基因的克隆及序列分析 [J]. 西北植物学报, 2008, **28**(5): 876-881.  
ZHANG H, ZHANG Y M, CHEN X L, *et al.* Cloning and evolutionary analysis of self-incompatibility S-gene in *Prunus humilis* Bunge [J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2008, **28**(5): 876-881.
- [26] QIAO H, WANG H Y, ZHAO L *et al.* The F-box protein AhSLF-S2 physically interacts with S-RNases that may be inhibited by the ubiquitin/26S proteasome pathway of protein degradation during compatible pollination in *Antirrhinum* [J]. *Plant Cell*, 2004, **16**(3): 582-595.
- [27] TSUKAMOTO T, HAUCK N R, TAO R, *et al.* Molecular characterization of three non-functional S-haplotypes in sour cherry (*Prunus cerasus*) [J]. *Plant Molecular Biology*, 2006, **62**(3): 371-383.
- [28] USHIJIMA K, YAMANE H, WATARI A, *et al.* the S haplotype-specific F-box protein gene, SFB, is defective in self-compatible haplotypes in self-compatible haplotypes of *Prunus avium* and *P. mume* [J]. *Plant Journal*, 2004, **39**(4): 573-586.
- [29] 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.

(编辑:韦青侠)