

## 20 个苹果品种的 *S* 基因型鉴定

丁体玉<sup>1,\*</sup>, 吴萌萌<sup>1,\*</sup>, 张瑞萍<sup>1,\*\*</sup>, 阎振立<sup>1,\*\*</sup>, 闫亚茹<sup>2</sup>, 陈迪新<sup>2</sup>, 张恒涛<sup>1</sup>, 高启明<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>中国农业科学院郑州果树研究所, 郑州 450009; <sup>2</sup>河南科技大学, 河南洛阳 471003)

**摘要:** 以‘富士’、‘华瑞’、‘华硕’和‘华星’等 20 个苹果品种为材料, 利用 *S* 等位基因高度保守氨基酸序列 FTQQYQ 和 anti-1/MIWPNV 设计的 *S* 基因通用引物, 以及 *S* 等位基因多态性序列设计的 19 对特异引物, PCR 扩增、测序以鉴定 20 个品种的 *S* 基因型; 并用‘华瑞’和‘华硕’分别与‘美八’、‘锦秀红’、‘华冠’和‘富士’进行授粉试验验证 *S* 基因型的准确性。PCR 结果表明: 通用引物扩增 *S* 等位基因时, 仅‘富士’、‘华瑞’、‘华硕’、‘华星’、‘美八’和‘红脆宝’6 个品种有效地扩增出 2 条特异的 *S* 等位基因条带, 其 *S* 基因型有  $S_1S_9$ 、 $S_9S_{24}$ 、 $S_5S_9$  和  $S_5S_{24}$  等 4 种; 19 对特异引物扩增 *S* 等位基因时, ‘华帅’等 14 个品种扩增得到 2 条特异性条带, *S* 基因型有  $S_{10}S_{19}$ 、 $S_2S_3$ 、 $S_2S_5$ 、 $S_3S_{10}$ 、 $S_2S_9$ 、 $S_5S_{24}$ 、 $S_9S_{10}$ 、 $S_3S_{10}$  和  $S_5S_9$  等 9 种。因此, 20 个苹果品种的 *S* 基因型分别为: ‘富士’  $S_1S_9$ , ‘华瑞’和‘华硕’  $S_9S_{24}$ , ‘华星’、‘美八’和‘红珍珠’  $S_5S_9$ , ‘红脆宝’、‘华玉’和‘99-1-29’  $S_5S_{24}$ , ‘华帅’  $S_{10}S_{19}$ , ‘金玉’  $S_2S_3$ , ‘早红’、‘华美’和‘嘎拉’  $S_2S_5$ , ‘Seokwang’  $S_3S_{10}$ , ‘锦秀红’、‘蜜玉’和‘华冠’  $S_2S_9$ , ‘绿佳’  $S_9S_{10}$ , ‘信浓红’  $S_3S_{10}$ 。2015 和 2016 年‘华瑞’与‘华硕’的正反交组合坐果率较低(低于 15.52%); 而‘华瑞’和‘华硕’分别与‘美八’、‘锦秀红’和‘华冠’、‘富士’品种的正反交组合坐果率较高(高于 46.30%)。因此, 本试验中相同 *S* 基因型的授粉组合其坐果率较低, 不同 *S* 基因型的授粉组合其坐果率较高, 授粉试验支持 *S* 基因型鉴定结果。

**关键词:** 苹果; 自交不亲和性; *S* 基因型

**中图分类号:** S 661.1

**文献标志码:** A

**文章编号:** 0513-353X (2018) 12-2277-14

## Identification of *S*-genotypes of 20 Apple Cultivars

DING Tiyu<sup>1,\*</sup>, WU Mengmeng<sup>1,\*</sup>, ZHANG Ruiping<sup>1,\*\*</sup>, YAN Zhenli<sup>1,\*\*</sup>, YAN Yaru<sup>2</sup>, CHEN Dixin<sup>2</sup>, ZHANG Hengtao<sup>1</sup>, and GAO Qiming<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Zhengzhou Fruit Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450009, China; <sup>2</sup>Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan 471003, China)

**Abstract:** To identify 20 apple germplasms' *S*-genotypes by PCR and sequencing, the universal primers and 19 pairs of specific primers of apple *S*-alleles were designed for ‘Fuji’, ‘Huarui’, ‘Huashuo’, ‘Huaxing’ and so on, based on the highly conserved amino acid sequences FTQQYQ and anti-1/MIWPNV and the polymorphic sequences of *S*-alleles. To verify the accuracy of identified

**收稿日期:** 2018-05-02; **修回日期:** 2018-12-17

**基金项目:** 国家自然科学基金青年基金项目(31401835); 国家现代农业产业技术体系建设专项资金项目(CARS-28); 中国农业科学院科技创新工程项目(CAAS-ASTIP-2016-RIP-02)

\* 并列第一作者

\*\* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: zhangruiping@caas.cn; yanzhenli@caas.cn)

*S*-genotypes, reciprocal crosses-pollination experiments were carried out using ‘Huarui’ and ‘Huashuo’ with ‘Meiba’, ‘Jinxiuhong’ and ‘Huaguan’, respectively. PCR results showed that when using the universal primers, two specific *S*-allele bands were amplified only from ‘Fuji’, ‘Huarui’, ‘Huashuo’, ‘Huaxing’, ‘Meiba’ and ‘Hongcuibao’, whose *S*-genotypes were  $S_1S_9$ ,  $S_9S_{24}$ ,  $S_5S_9$  and  $S_3S_{24}$ . When 19 pairs of specific primers were used for amplification, two specific bands were obtained from 14 cultivars, whose *S*-genotypes were  $S_{10}S_{19}$ ,  $S_2S_3$ ,  $S_2S_5$ ,  $S_3S_{10}$ ,  $S_2S_9$ ,  $S_5S_{24}$ ,  $S_9S_{10}$ ,  $S_3S_{10}$  and  $S_5S_9$ . Therefore, the *S*-genotypes for 20 apple cultivars were:  $S_1S_9$  for ‘Fuji’,  $S_9S_{24}$  for ‘Huarui’ and ‘Huashuo’,  $S_5S_9$  for ‘Huaxing’, ‘Meiba’ and ‘Hongzhenzhu’,  $S_3S_{24}$  for ‘Hongcuibao’, ‘Huayu’ and ‘99-1-29’,  $S_{10}S_{19}$  for ‘Huashuai’,  $S_2S_3$  for ‘Jinyu’,  $S_2S_5$  for ‘Zaohong’, ‘Huamei’ and ‘Gala’,  $S_3S_{10}$  for ‘Seokwang’,  $S_2S_9$  for ‘Jinxiuhong’, ‘Miyu’ and ‘Huaguan’,  $S_9S_{10}$  for ‘Lüjia’,  $S_3S_{10}$  for ‘Shinano Red’, respectively. The pollination experiment showed that the fruiting rate of reciprocal crosses-pollination between ‘Huarui’ and ‘Huashuo’ germplasm was lower than 15.52% in 2015 and 2016. The fruit ratio of reciprocal crosses-pollination between ‘Huarui’ and ‘Huashuo’ with ‘Meiba’, ‘Jinxiuhong’, ‘Huaguan’, ‘Fuji’ were higher than 46.30% in 2015 and 2016. Therefore, in this experiment, the same combination of *S*-genotypes had a low fruit setting percentage but a higher fruit setting percentage with different *S*-genotypes, indicating that the results of pollination supported the results of *S*-genotype identification.

**Keywords:** *Malus × domestica*; self-incompatibility; *S*-genotype

自交不亲和性 (self-incompatibility, SI) 是显花植物在长期进化过程中形成的有利于异花授粉、进化和环境适应的一种生殖机制 (McClure, 2006)。苹果 (*Malus × domestica* Borkh.) 属于蔷薇科苹果亚科, 是典型的配子体自交不亲和植物 (Gametophytic self-incompatibility, GSI) (薛勇和孟金陵, 1995)。GSI 受花粉本身的单基因 (即配子体基因) 支配, 因此当花粉与雌蕊中两个 *S* 等位基因的之一相同时, 花粉被排斥, 无法完成受精作用而表现自交不亲和 (Nettancourt, 2001; Shogo et al., 2018)。因此, 鉴定苹果品种的 *S* 基因型并预测其相互授粉的亲和性, 可以为苹果生产中授粉品种的选择及杂交育种亲本的选配提供理论依据。

到目前为止, 已有 500 多个苹果品种的 *S* 基因型被鉴定, 包含有 30 多个 *S* 等位基因 (Kitahara & Matsumoto, 2002; 李天忠 等, 2005, 2011; 张雪梅 等, 2007; 白松龄 等, 2008; Kim et al., 2008; Long et al., 2010; 龙慎山 等, 2010)。苹果 *S* 基因型的鉴定方法主要有 *S*-糖蛋白电泳分析 (Boskovic & Tobuut, 1999) 以及基因克隆和测序 (Broothaerts et al., 1995; Castillo et al., 2002; Sonneveld et al., 2003; Long et al., 2010; 龙慎山 等, 2010; 孙会玲 等, 2011) 等。其中基因克隆测序作为主要的鉴定方法, 主要分为两种: 一是利用 *S*-*Rnase* 的 N-端保守氨基酸序列 FTQQYQ 及内含子下游的保守氨基酸序列 anti-IIWPNV (Ishimizu et al., 1999) 或 (D/N) CP (H/R) (Ishimizu et al., 1998) 设计兼并引物, 鉴定未知种质的 *S* 基因型。如 Ishimizu 等 (1999) 利用 FTQQYQ 和 anti-IIWPNV 设计引物, 成功鉴别 7 个亚洲梨的 *S* 基因型; Matsumoto 和 Kitahara (2000) 利用 FTQQYQ 和 (I/M) IWPVN 成功鉴定种质 ‘Golden Delicious’、‘Sansa’、‘Fuji’ 和 ‘Meku 10’ 的 *S* 基因型。二是设计特异的 *S* 基因引物鉴定不同的苹果品种 (Janssens et al., 1995; Broothaerts et al., 1996, 2001; Broothaerts, 2003; Long et al., 2010; 龙慎山 等, 2010) 的 *S* 基因型。如龙慎山等 (2010) 基于 12 个常见的苹果 *S*-*Rnase* 基因一级结构, 在其特异区域设计 *S* 等位基因的特异引物并鉴定出 46 个苹果品种可能的 *S* 基因型; Long 等 (2010) 在上述 12 个 *S* 基因的基础上又开发了 9 个 *S* 基因的特

引物并鉴定了157个苹果品种的S基因型。

本研究中以作者所在单位自育的15个品种和5个引进苹果品种为试材(其中14个品种S基因型未被鉴定),以鉴定S等位基因所需通用引物(Ishimizu et al., 1999)和特异引物(Long et al., 2010)PCR扩增S等位基因,测序鉴定此20个苹果品种的S基因型,并结合田间授粉试验予以验证,以期在丰富我国苹果品种S基因型信息的同时,为丰产栽培和育种研究提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

2017年5月于中国农业科学院郑州果树研究所苹果资源圃采集20个苹果栽培品种(*Malus × domestica* Borkh.)幼嫩叶片(表1),分别标记后带回实验室, -80℃贮存备用。

授粉验证试验分别于2015和2016年在中国农业科学院郑州果树研究所进行。

表1 20个苹果品种的亲本及其S基因型  
Table 1 Parentages and S-genotypes of 20 apple cultivars

品种 Cultivar	亲本及其S基因型 Parentages and its genotypes	参考文献 References
富士 Fuji	国光 ( $S_1S_2$ ) × 元帅 ( $S_9S_{28}$ ) Ralls Janet ( $S_1S_2$ ) × Delicious ( $S_9S_{28}$ )	Janssens et al., 1995;
华瑞 Huirui	美八 (?) × 华冠 ( $S_2S_9$ ) Meiba (?) × Huaguan ( $S_2S_9$ )	Sassa et al., 1995;
华硕 Hushuo	美八 (?) × 华冠 ( $S_2S_9$ ) Meiba (?) × Huaguan ( $S_2S_9$ )	Sakurai et al., 2000;
华星 Huaxing	藤木1号 ( $S_9S_{24}$ ) × 嘎拉 ( $S_2S_5$ ) MATO ( $S_9S_{24}$ ) × Gala ( $S_2S_5$ )	Broothaerts et al., 2003;
美八 Meiba	嘎拉 ( $S_2S_5$ ) 杂交后代中选育出来的优系 An excellent plant of breeding from the offspring of Gala ( $S_2S_5$ )	Heo et al., 2011;
红脆宝 Hongcuibao	藤木1号 ( $S_9S_{24}$ ) × 嘎拉 ( $S_2S_5$ ) MATO ( $S_9S_{24}$ ) × Gala ( $S_2S_5$ )	李天忠等, 2011;
华帅 Huashuai	富士 ( $S_1S_9$ ) × 新红星 ( $S_9S_{19}$ ) Fuji ( $S_1S_9$ ) × Starkrimson Delicious ( $S_9S_{19}$ )	丛佩华, 2015.
金玉 Jinyu	华美 (?) × 红露 ( $S_1S_9$ ) Huamei (?) × Honglu ( $S_1S_9$ )	
早红 Zaohong	意大利引进的材料培育而成 Selected from materials originated from Italian	
华美 Huamei	华帅 ( $S_2S_{19}$ ) × 嘎拉 ( $S_2S_5$ ) Huashuai ( $S_2S_{19}$ ) × Gala ( $S_2S_5$ )	
Seokwang	Mollie's Delicious ( $S_3S_7$ ) × 嘎拉 ( $S_2S_5$ ) Mollie's Delicious ( $S_3S_7$ ) × Gala ( $S_2S_5$ )	
锦秀红 Jinxiuhong	华冠 ( $S_2S_9$ ) 的早熟浓红芽变中选育 A mutation of Huaguan ( $S_2S_9$ )	
华玉 Huayu	藤木1号 ( $S_9S_{24}$ ) × 嘎拉 ( $S_2S_5$ ) MATO ( $S_9S_{24}$ ) × Gala ( $S_2S_5$ )	
嘎拉 Gala	Kidd's Orange Red ( $S_3S_9$ ) × 金冠 ( $S_2S_3$ ) Kidd's Orange Red ( $S_3S_9$ ) × Golden Delicious ( $S_2S_3$ )	
绿佳 Lujia	红玉 ( $S_7S_9$ ) × 华帅 ( $S_2S_{19}$ ) Jonathan ( $S_7S_9$ ) × Huashuai ( $S_2S_{19}$ )	
信浓红 Shinano Red	津轻 ( $S_3S_7$ ) × 贝拉 ( $S_{10}S_{24}$ ) Tsugaru ( $S_3S_7$ ) × Bella ( $S_{10}S_{24}$ )	
蜜玉 Miyu	华美 (?) × 红露 ( $S_1S_9$ ) Huamei (?) × Honglu ( $S_1S_9$ )	
99-1-29	美八 (?) × 早捷 ( $S_{23}S_{24}$ ) Meiba (?) × Geneva Early ( $S_{23}S_{24}$ )	
红珍珠 Hongzhenzhu	藤木1号 ( $S_9S_{24}$ ) × 嘎拉 ( $S_2S_5$ ) MATO ( $S_9S_{24}$ ) × Gala ( $S_2S_5$ )	
华冠 Huaguan	金冠 ( $S_2S_3$ ) × 富士 ( $S_1S_9$ ) Golden Delicious ( $S_2S_3$ ) × Fuji ( $S_1S_9$ )	

注: ? : 亲本S基因型未知。

Note: ? : S-genotypes of parentage were unknown.

### 1.2 苹果品种S基因型鉴定

#### 1.2.1 基因组DNA提取

以表1中的20个苹果品种为材料,用改良的CTAB法提取基因组DNA(Chang et al., 1993)。琼脂糖凝胶电泳检测DNA的质量和浓度并用ddH<sub>2</sub>O稀释至50 ng · μL<sup>-1</sup>, -20℃保存备用。

#### 1.2.2 苹果材料S基因型的克隆、测序和鉴定

采用两种方法检测苹果品种的S基因型。一是用保守氨基酸序列FTQQYQ和anti-1/MIWPNV

(Ishimizu et al., 1999) 设计的通用引物扩增 *S* 等位基因；二是对于通用引物难以鉴定成功的品种，查阅其亲本 *S* 基因型，发现其所包含的 *S* 等位基因都属于 Long 等 (2010) 所设计的 19 对 *S* 等位基因特异引物，因此结合这 19 对引物鉴定其余种质的 *S* 基因型。

### 1.2.3 通用引物扩增的 *S* 等位基因片段的回收、测序

根据苹果 *S*-RNase 的保守氨基酸序列 FTQQYQ 和 anti-1/MIWPNV (Ishimizu et al., 1999)，设计苹果 *S* 基因通用引物，上游引物：5'-TTTACGCAGCAATATCAG-3'；下游引物：5'-ACGTTTCGGCCAATAATT-3'，由生工生物工程（上海）股份有限公司（生工）合成，进行 PCR 扩增。反应体系：10 μL 的 2× *Taq* PCR MasterMix (TaKaRa)、1 μL 稀释的 DNA (50 ng · μL<sup>-1</sup>)、0.5 μL 上游引物 (10 μmol · L<sup>-1</sup>)、0.5 μL 下游引物 (10 μmol · L<sup>-1</sup>)，ddH<sub>2</sub>O 补至 20 μL。反应程序：94 °C 预变性 2 min 后进入扩增循环；94 °C 变性 15 s，48 °C 退火 30 s，68 °C 延伸 1 min，20 个循环；94 °C 变性 15 s，48 °C 退火 30 s，68 °C 延伸 90 s，25 个循环；68 °C 延伸 5 min，最后 4 °C 保温，1.2% 的琼脂糖凝胶检测 PCR 产物。PCR 产物回收采用 TaKaRa MiniBEST Agarose Gel DNA Extraction Kit Ver.4.0 试剂盒，回收片段由生工测序。

### 1.2.4 特异引物扩增的 *S* 等位基因片段的回收、测序

应用 Long 等 (2010) 设计的 19 对特异引物 (表 2) 和 PCR 反应体系鉴定待测苹果品种的 *S* 基因型，19 对引物由生工合成。反应体系同 1.2.3。反应程序：94 °C 预变性 2 min 后进入扩增循环，94 °C 变性 30 s，T<sub>m</sub> °C 退火 30 s，72 °C 90 s，30 个循环，72 °C 延伸 7 min，最后 4 °C 保温，1.2% 的琼脂糖凝胶检测 PCR 产物。

为了验证扩增条带的 *S* 等位基因是否准确，以某一苹果品种为例 (如以 ‘蜜玉’ 为例，验证 *S*<sub>2</sub> 特异引物扩增序列的准确性)，回收 PCR 产物并测序。

表 2 鉴定 20 个苹果品种的 *S* 等位基因特异性引物  
 Table 2 *S*-allele-specific primers for identifying the *S*-genotypes of 20 apple cultivars

<i>S</i> 等位基因 <i>S</i> -allele	引物名称 Primer	引物序列 (5' - 3') Sequence	<i>S</i> 等位基因 <i>S</i> -allele	引物名称 Primer	引物序列 (5' - 3') Sequence
<i>S</i> <sub>1</sub>	S <sub>1</sub> -F	TGTAAGGCACCGCCATATCATA	<i>S</i> <sub>20</sub>	S <sub>20</sub> -F	GTTGTGGCCTTCAGACTCG
	S <sub>1</sub> -R	CAACCTCAACCAATTCAGTCAATGA		S <sub>20</sub> -R	GGCCAACACTCTTTTATTTTCATC
<i>S</i> <sub>2</sub>	S <sub>2</sub> -F	AAATGAATCGAAGTGAATTATTTA	<i>S</i> <sub>21</sub>	S <sub>21</sub> -F	AAGTAATTGCCCGATAAGGAACATA
	S <sub>2</sub> -R	TTGAGGTTTGTTTCCTTACCATG		S <sub>21</sub> -R	AGTTTATGAAATGTTCTCCGCTGTA
<i>S</i> <sub>3</sub>	S <sub>3</sub> -F	GGCGAAAATTAACCAGGAGAAGAA	<i>S</i> <sub>23</sub>	S <sub>23</sub> -F	AAGAATACAACCATACGCCTCAGC
	S <sub>3</sub> -R	CCTCTCGTCTATATATGGAAATCAC		S <sub>23</sub> -R	ATTGTTGGTACTAATGCTTATGGCG
<i>S</i> <sub>4</sub>	S <sub>4</sub> -F	ATTGCAAGACAAGGAATCGTCGGAA	<i>S</i> <sub>24</sub>	S <sub>24</sub> -F	ATGGCTCTGTGCGTCTTCCC
	S <sub>4</sub> -R	AGAAATGTGCTCTGTTTTATCG		S <sub>24</sub> -R	CGTCATCCGTGTATAGGGCAACT
<i>S</i> <sub>5</sub>	S <sub>5</sub> -F	GGTCAAACCCACGGCGTCTCA	<i>S</i> <sub>26</sub>	S <sub>26</sub> -F	TCCATCAAACGTGACTTCTCAT
	S <sub>5</sub> -R	ATTCAGTTATCCCATTCCTCG		S <sub>26</sub> -R	ATCCTTCAGCATCCTGATTCG
<i>S</i> <sub>7</sub>	S <sub>7</sub> -F	AGTAAATCAACCGTGGATGCTCAG	<i>S</i> <sub>31</sub>	S <sub>31</sub> -F	TGACCCAAAATATTGCAAGGCGC
	S <sub>7</sub> -R	TTACAATACTACCTGTTTCCCTGGG		S <sub>31</sub> -R	TTTCAATATCTACCAGTCTCCGGC
<i>S</i> <sub>9</sub>	S <sub>9</sub> -F	CCACTTTAATCTACTCCTTGTAGA	<i>S</i> <sub>44</sub>	S <sub>44</sub> -F	GCATGGTAGGACCTGACCCAAGTA
	S <sub>9</sub> -R	TCAATTTCTTCTGTGTCCTGAATT		S <sub>44</sub> -R	TCTCAACCAATTGAGTCGTCGTACC
<i>S</i> <sub>10</sub>	FTC12	CCAAACGTACTCAATCGAAG	<i>S</i> <sub>45</sub>	S <sub>45</sub> -F	CCAGAAGGTTGCAAGACACAGAAAT
	S <sub>10</sub> -R	TCCCGTGTCTGAATCTCCC		S <sub>45</sub> -R	AGTTTTGGTGCCTTATTGTTGGTAC
<i>S</i> <sub>11</sub>	S <sub>11</sub> -F	AAATATTGCAAGGCGCCGC	<i>S</i> <sub>46</sub>	S <sub>46</sub> -F	CCCAACGTGCTCGATCGAACA
	S <sub>11</sub> -R	TTTCAATATCTACCAGTCTCCGGC		S <sub>46</sub> -R	TCAATTTCTTCTGTGTCCAGAATC
<i>S</i> <sub>19</sub>	S <sub>19</sub> -F	GCCTTCAAACAAGAATGGACC			
	S <sub>19</sub> -R	TCAATATCCCAATGACCTGTT			

注：参考 Long 等 (2010) 的文献。

Note: Reference Long et al., 2010.

### 1.2.5 生物信息分析

用 Chromas3.25 软件打开测序图, 去掉两端难以确定的序列和未测出的序列 N, 同时打开上游引物测序图和下游引物测序图, 将双向测序图按碱基顺序逐一比较, 并按照碱基互补原则相互校正, 使正反向测序结果完全一致。利用 Blast 和 DNAMAN 软件与 GenBank 中已知的苹果 S 等位基因序列进行序列同源性检索和比较, 确定苹果品种的 S 基因型。

### 1.3 授粉并调查坐果率

依照表 4 的授粉组合, 分别于 2015 和 2016 年 4—5 月花期时采集铃当花或初开花, 用镊子剥去花瓣, 花粉均匀摊在纸上, 置于 20~30 °C 的灯光下烤 12 h, 待花粉完全散出后装入干燥的西林瓶内, 放入干燥器内备用。

每个品种选择 100 个无损的大蕾期花进行授粉, 点授中心花, 除去其余花朵, 套袋, 挂牌, 授粉 1 周后去袋, 于授粉 17 d 后统计花朵坐果率。

## 2 结果与分析

### 2.1 通用引物扩增的 S 等位基因片段回收、测序、比对

利用 S 等位基因保守氨基酸序列 FTQQYQ 和 anti-1/MIWPNV (Ishimizu et al., 1999) 设计引物, 对 20 个苹果品种进行 PCR 扩增, 琼脂糖凝胶图显示仅有‘富士’、‘华瑞’、‘华硕’、‘华星’、‘美八’和‘红脆宝’有效地扩增出 2 条特异的 S 等位基因条带 (图 1), 其余品种仅扩增出 1 条特异条带。

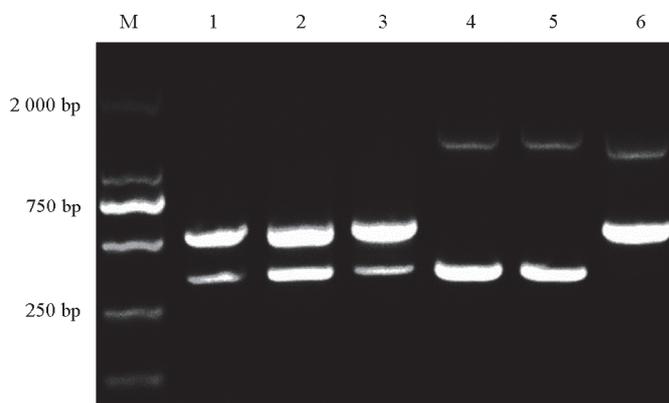


图 1 通用引物对 6 个苹果品种 S 等位基因 PCR 扩增的 1.2% 凝胶电泳

M: 2 000 bp marker; 1. ‘富士’; 2. ‘华瑞’; 3. ‘华硕’; 4. ‘华星’; 5. ‘美八’; 6. ‘红脆宝’。

Fig. 1 The 1.2% agarose electrophoresis of PCR amplification of genomic DNA with universal primer on 6 apple cultivars

M: 2 000 bp DNA ladder. 1 to 6 represented the cultivars of ‘Fuji’, ‘Huarui’, ‘Huashuo’, ‘Huaxing’, ‘Meiba’ and ‘Hong Cuibao’, respectively.

测序结果表明, 上述 6 个品种共获得 4 种 S ( $S_1$ 、 $S_5$ 、 $S_9$  和  $S_{24}$ ) 等位基因, 与 GenBank 中登录的 S 基因的同源性均在 99% 以上, 具有 FTQQYQ 保守序列 (图 2)。其中, ‘富士’ 获得两条大小分别为 538 和 344 bp 的条带, 与 GenBank 中的  $S_1$  (HQ689389) 和  $S_9$  (AB270792) 等位基因的同源性均达到 99%; ‘华瑞’ 和 ‘华硕’ 的扩增条带大小为 344 和 533 bp, 与 GenBank 中的  $S_9$  (AB270792)

S <sub>1</sub>	HQ689389	TTTACCGCAGCAATATCAGCCGGCTGCTGCAACCTAAATCCAACTCCTTGTAGGATCCCTCGACAAGTTGTTACCGT TTTACCGCAGCAATATCAGCCGGCTGCTGCAACCTAAATCCAACTCCTTGTAGGATCCCTCGACAAGTTGTTACCGT	80
	S <sub>1</sub>	FTQQYQ	80
S <sub>1</sub>	HQ689389	TCACGGTTGTGGCCCTCAAACTCGAAATGGAATGACCCAGAAATATGTAAGGCACCCGATATCATACGGTAAATATTA TCACGGTTGTGGCCCTCAAACTCGAAATGGAATGACCCAGAAATATGTAAGGCACCCGATATCATACGGTAAATATTA	160
	S <sub>1</sub>	C2	160
S <sub>1</sub>	HQ689389	TAGCATAATCAGATAGTCAATATATTTCTCTCAATTTATGTACTTGTGTGTGTATATATATATTTTGGATAATGCTA TAGCATAATCAGATAGTCAATATATTTCTCTCAATTTATGTACTTGTGTGTGTATATATATATTTTGGATAATGCTA	240
	S <sub>1</sub>	HVa	240
S <sub>1</sub>	HQ689389	AAGTCACCAAGTTTAAACCAAAATATGTGTACAGATATAAAATAAACACGTTAATCAACACTTAAATAATAATTCAA AAGTCACCAAGTTTAAACCAAAATATGTGTACAGATATAAAATAAACACGTTAATCAACACTTAAATAATAATTCAA	320
	S <sub>1</sub>		320
S <sub>1</sub>	HQ689389	CATCAACATCTACATCATTTGATTCAAAAAAGTTTCTCTCCAGGATFACCTATATTTTTTTTATATATACATATAC ATCAACATCTACATCATTTGATTCAAAAAAGTTTCTCTCCAGGATFACCTATATTTTTTTTATATATACATATAC	400
	S <sub>1</sub>		400
S <sub>1</sub>	HQ689389	TCAACACAGGTTTCAATGACGGCGTGAATAATACAAATAATTTAAATTTAAATCATATAATTTCTATATATAAT TCAACACAGGTTTCAATGACGGCGTGAATAATACAAATAATTTAAATTTAAATCATATAATTTCTATATATAAT	480
	S <sub>1</sub>		480
S <sub>1</sub>	HQ689389	TATATATATGTCAGATAAAAATGCTCGAACCCAGTTGGTAAATCATTGGCCGAACG TATATATATGTCAGATAAAAATGCTCGAACCCAGTTGGTAAATCATTGGCCGAACG	537
	S <sub>1</sub>	HVb	537
S <sub>5</sub>	EU427460	TTTACCGCAGCAATATCAGCCGGCTGCTGCAACCTAAATCCAACTCCTTGTAGGATCCCTCGACAAGTTGTTACCGT TTTACCGCAGCAATATCAGCCGGCTGCTGCAACCTAAATCCAACTCCTTGTAGGATCCCTCGACAAGTTGTTACCGT	80
	S <sub>5</sub>	FTQQYQ	80
S <sub>5</sub>	EU427460	TCACGGTTGTGGCCCTCAAACTCGAAATGGAATGACCCAGAAATATGTAAGGCACCCGATATCATACGGTAAATATTA TCACGGTTGTGGCCCTCAAACTCGAAATGGAATGACCCAGAAATATGTAAGGCACCCGATATCATACGGTAAATATTA	160
	S <sub>5</sub>	C2	108
S <sub>5</sub>	EU427460	TATATATGATAAATAAGATAGTCAATACAGTTCATGTTCTTATTTATTAATATTCATGACGAGGGCCTTATAGTTTTTA TATATATGATAAATAAGATAGTCAATACAGTTCATGTTCTTATTTATTAATATTCATGACGAGGGCCTTATAGTTTTTA	240
	S <sub>5</sub>	HVa	188
S <sub>5</sub>	EU427460	GATTTTAAATCGAAGTTCCTATTTTAGTATATTAAGTACAGTTCGATAATTTCTTAAATAAAAATTAATAATTCAT GATTTTAAATCGAAGTTCCTATTTTAGTATATTAAGTACAGTTCGATAATTTCTTAAATAAAAATTAATAATTCAT	320
	S <sub>5</sub>		268
S <sub>5</sub>	EU427460	TTAGGTTTAAATCTCACACTTACAAACTCTTAATTAATTTTCGATTCAAAACAATTCAAAATAAAAATAGTTTTC TTAGGTTTAAATCTCACACTTACAAACTCTTAATTAATTTTCGATTCAAAACAATTCAAAATAAAAATAGTTTTC	400
	S <sub>5</sub>		348
S <sub>5</sub>	EU427460	TACTTACAAATTTTATAAAAAGATTTGTCCTAATCTTAACTTAAATGACCCATTCATATGTTTTTTTGTCAAAA TACTTACAAATTTTATAAAAAGATTTGTCCTAATCTTAACTTAAATGACCCATTCATATGTTTTTTTGTCAAAA	480
	S <sub>5</sub>		428
S <sub>5</sub>	EU427460	ATTGATTTTGTAGATAGATGTTGATGAGCCACGAGCTCGAACCCACCCGTCATGCAAGAGTTCACACCTT ATTGATTTTGTAGATAGATGTTGATGAGCCACGAGCTCGAACCCACCCGTCATGCAAGAGTTCACACCTT	560
	S <sub>5</sub>		508
S <sub>5</sub>	EU427460	TTCCACCATATGATAAAGGGCCACTTGTAAATGTACCAATTCATATAGTATTTCAAAATTTAATACTTAAATACATTC TTCCACCATATGATAAAGGGCCACTTGTAAATGTACCAATTCATATAGTATTTCAAAATTTAATACTTAAATACATTC	640
	S <sub>5</sub>		588
S <sub>5</sub>	EU427460	TAAATGTACCAATTTGTTATATGTAATAATCCATATTTTTTAAATAAAAATACACCATTTTTTTGTCAAAAATTCAT TAAATGTACCAATTTGTTATATGTAATAATCCATATTTTTTAAATAAAAATACACCATTTTTTTGTCAAAAATTCAT	720
	S <sub>5</sub>		668
S <sub>5</sub>	EU427460	TCAATTTTTTAAATCCATTTTAAACTTATATGGGTACATCTTTTTCGTTGATTTGAAAATGATCCATGCAAGTTTA TCAATTTTTTAAATCCATTTTAAACTTATATGGGTACATCTTTTTCGTTGATTTGAAAATGATCCATGCAAGTTTA	800
	S <sub>5</sub>		748
S <sub>5</sub>	EU427460	ATCGAAGAATTTACTAATGCTATTAAGACTAGTATCTTATTTTGGTTTGAAGAATGTACCCCATGTTGATATAAC ATCGAAGAATTTACTAATGCTATTAAGACTAGTATCTTATTTTGGTTTGAAGAATGTACCCCATGTTGATATAAC	880
	S <sub>5</sub>		828
S <sub>5</sub>	EU427460	AACTTTTCCGTTAAATTTGATGAAATGAGCCCAATGTTCTGATATGTTGATATACATATATATAGATATATATGGAGAA AACTTTTCCGTTAAATTTGATGAAATGAGCCCAATGTTCTGATATGTTGATATACATATATATAGATATATATGGAGAA	960
	S <sub>5</sub>		908
S <sub>5</sub>	EU427460	ATAATCTTTTCATATTTTCATTCGCAAAAATATGGGTATTTTAAATTTGATTAATATAAACCCACCAAAATTTTA ATAATCTTTTCATATTTTCATTCGCAAAAATATGGGTATTTTAAATTTGATTAATATAAACCCACCAAAATTTTA	1 040
	S <sub>5</sub>		988
S <sub>5</sub>	EU427460	ATTTCTGATTTAAATTTCTAATAATTCATATAGAAATACATTTGTTACATTAATTCAGAGATTCGAAAAAAAACAAA ATTTCTGATTTAAATTTCTAATAATTCATATAGAAATACATTTGTTACATTAATTCAGAGATTCGAAAAAAAACAAA	1 120
	S <sub>5</sub>		1 068
S <sub>5</sub>	EU427460	AAACCAACAAGTTCAATTAATAAACAATTTATAAATAGGACCGGATCCAAAGTCTATTTATTTTCAATTTATTTACT AAACCAACAAGTTCAATTAATAAACAATTTATAAATAGGACCGGATCCAAAGTCTATTTATTTTCAATTTATTTACT	1 200
	S <sub>5</sub>		1 148
S <sub>5</sub>	EU427460	TGTGATGTATACATATACACAACATAGATTTTCAGGTACGTTGTGCAAAATATACAAATCAATTTAAATTTAATCATA TGTGATGTATACATATACACAACATAGATTTTCAGGTACGTTGTGCAAAATATACAAATCAATTTAAATTTAATCATA	1 280
	S <sub>5</sub>		1 228
S <sub>5</sub>	EU427460	AAATTTTTCTATTTGATATATATATTTTTCAGATAGATACATCAAAACCCAGTTGGAAATTTTGGCCGAACG AAATTTTTCTATTTGATATATATATTTTTCAGATAGATACATCAAAACCCAGTTGGAAATTTTGGCCGAACG	1 358
	S <sub>5</sub>		1 257
S <sub>9</sub>	AB270792	TTTACCGCAGCAATATCAGCCGGCTGCTGCAACCTAAATCCAACTCCTTGTAGGATCCCTCGACAAGTTGTTACCGT TTTACCGCAGCAATATCAGCCGGCTGCTGCAACCTAAATCCAACTCCTTGTAGGATCCCTCGACAAGTTGTTACCGT	80
	S <sub>9</sub>	FTQQYQ	80
S <sub>9</sub>	AB270792	TCACGGTTGTGGCCCTCAAACTCGAAATGGAATGACCCAGAAATATGTAAGGCACCCGATATCATACGGTAAATATTA TCACGGTTGTGGCCCTCAAACTCGAAATGGAATGACCCAGAAATATGTAAGGCACCCGATATCATACGGTAAATATTA	160
	S <sub>9</sub>	C2	160
S <sub>9</sub>	AB270792	TATATATAAATCAGATGTTCAATATGTTTATTTCAATATACATATACATCAACATAGATTTTCAATGCAATGCTAGTGA TATATATAAATCAGATGTTCAATATGTTTATTTCAATATACATATACATCAACATAGATTTTCAATGCAATGCTAGTGA	240
	S <sub>9</sub>	HVa	240
S <sub>9</sub>	AB270792	AAATATACAAATTTAAATTTAAATTTAAATTTAAATTTAAATTTAAATTTAAATTTAAATTTAAATTTAAATTTAAAT AAATATACAAATTTAAATTTAAATTTAAATTTAAATTTAAATTTAAATTTAAATTTAAATTTAAATTTAAATTTAAAT	320
	S <sub>9</sub>		320
S <sub>9</sub>	AB270792	CTTGGAAATATTTGGCCCAACG CTTGGAAATATTTGGCCCAACG	343
	S <sub>9</sub>	anti-1/MWPNV	343
S <sub>24</sub>	HQ693067.1	TTTACCGCAGCAATATCAGCCGGCTGCTGCAACCTAAATCCAACTCCTTGTAGGATCCCTACTGACAAGTTGTTACTGT TTTACCGCAGCAATATCAGCCGGCTGCTGCAACCTAAATCCAACTCCTTGTAGGATCCCTACTGACAAGTTGTTACTGT	80
	S <sub>24</sub>	FTQQY	80
S <sub>24</sub>	HQ693067.1	TCACGGTTGTGGCCCTCAAACTCGAAATGGAATGACCCAGAAATATGTAAGGCACCCGATATCATACGGTAAATATTA TCACGGTTGTGGCCCTCAAACTCGAAATGGAATGACCCAGAAATATGTAAGGCACCCGATATCATACGGTAAATATTA	160
	S <sub>24</sub>	C2	160
S <sub>24</sub>	HQ693067.1	TAGCATAATCAGATAGTCAATATGTTTATCTCAATTTATTTACTTGTGTGTGTGTGTATTTGGATAATGCTAAGGT TAGCATAATCAGATAGTCAATATGTTTATCTCAATTTATTTACTTGTGTGTGTGTGTATTTGGATAATGCTAAGGT	240
	S <sub>24</sub>	HVa	240
S <sub>24</sub>	HQ693067.1	CATCAAAATTTTAAACCAAAATGATGTGTCAATAATAAAAATAAGCAGTTAATCAACATTTAACTAAATAATTCATCATC CATCAAAATTTTAAACCAAAATGATGTGTCAATAATAAAAATAAGCAGTTAATCAACATTTAACTAAATAATTCATCATC	320
	S <sub>24</sub>		320
S <sub>24</sub>	HQ693067.1	AAATTCATATCATTTGGTTACAAGAAAATTTAGTCTTCTTGCATTTATATTTTTTATATATACATATACATATCAAC AAATTCATATCATTTGGTTACAAGAAAATTTAGTCTTCTTGCATTTATATTTTTTATATATACATATACATATCAAC	400
	S <sub>24</sub>		400
S <sub>24</sub>	HQ693067.1	ACAGGTTTTCATGACGGCGTACAAAATATACAAATTAATTTAAATTTAAATTTAAATTTAAATTTAAATTTAAATTTAAAT ACAGGTTTTCATGACGGCGTACAAAATATACAAATTAATTTAAATTTAAATTTAAATTTAAATTTAAATTTAAATTTAAAT	480
	S <sub>24</sub>		480
S <sub>24</sub>	HQ693067.1	TATTTGTCAGATGAAAATACCGAACCCAGTTGGTAAATCATTGGCCGAACG TATTTGTCAGATGAAAATACCGAACCCAGTTGGTAAATCATTGGCCGAACG	533
	S <sub>24</sub>	anti-1/MWPNV	533

图 2 通用引物扩增的 *S* 基因序列与 GenBank 中序列的同源性和结构对比

仅取引物序列及引物中间的扩增序列对比。箭头表示在该位置插入内含子。

Fig. 2 Sequence homology and structure comparison between *S* gene amplified by universal primers and sequences in GenBank. Only the sequence of primers and amplification sequences in the primers are taken. The location of the single intron is indicated by an arrow.

和  $S_{24}$  (HQ693067) 等位基因的同源性均达到 99%,  $S$  基因型一致; ‘华星’和‘美八’的扩增条带分别为 1 257 和 344 bp, 与 GenBank 中的  $S_5$  (EU424760) 和  $S_9$  (AB270792) 等位基因的同源性均达到 99%,  $S$  基因型相同; ‘红脆宝’的扩增条带大小分别为 1 257 和 533 bp, 与 GenBank 中的  $S_5$  (EU424760) 和  $S_{24}$  (HQ693067) 等位基因的同源性均达到 99%。

由上述对各品种序列的分析可以确定‘富士’的  $S$  基因型为  $S_7S_9$ , ‘华瑞’和‘华硕’为  $S_9S_{24}$ , ‘华星’和‘美八’为  $S_5S_9$ , ‘红脆宝’为  $S_5S_{24}$ 。

## 2.2 特异性引物扩增的 $S$ 等位基因回收、测序、比对

用通用引物 (Ishimizu et al., 1999) 对 20 个苹果品种的  $S$  基因型鉴定, 仅有 6 个品种扩增出 2 条特异性条带 (图 1), 并且测序成功; 另外 14 个品种仅扩增出 1 条条带, 并不能确定其  $S$  基因型为纯合或是未扩增出另外 1 条条带, 因此基于 Long 等 (2010) 设计的 19 对  $S$  等位基因特异引物对 14 个品种进行 PCR 扩增, 成功鉴定出  $S$  基因型。

在 19 对特异引物中, 仅有  $S_2$ 、 $S_3$ 、 $S_5$ 、 $S_9$ 、 $S_{10}$ 、 $S_{19}$  和  $S_{24}$  等位基因特异性引物有扩增条带, 且与 GenBank 中登录的  $S$  基因同源性均在 99% 以上 (片段大小见表 3)。结果 (图 3) 显示 14 个品种均对 2 对特异引物有扩增。以‘蜜玉’、‘金玉’、‘红珍珠’、‘华冠’、‘绿佳’、‘华帅’和‘华玉’为例, 分别分析  $S_2$ 、 $S_3$ 、 $S_5$ 、 $S_9$ 、 $S_{10}$ 、 $S_{19}$  和  $S_{24}$  等位基因的序列, 其产物片段大小分别为 147、293、1 235、520、203、481 和 421 bp, 与 GenBank 中  $S$  基因序列相似性分别达到 100% (图 4,  $S_2$ )、100% (图 4,  $S_3$ )、99% (图 4,  $S_5$ )、100% (图 4,  $S_9$ )、100% (图 4,  $S_{10}$ )、100% (图 4,  $S_{19}$ ) 和 100% (图 4,  $S_{24}$ ); 外显子区域和内含子区域大小见表 3。

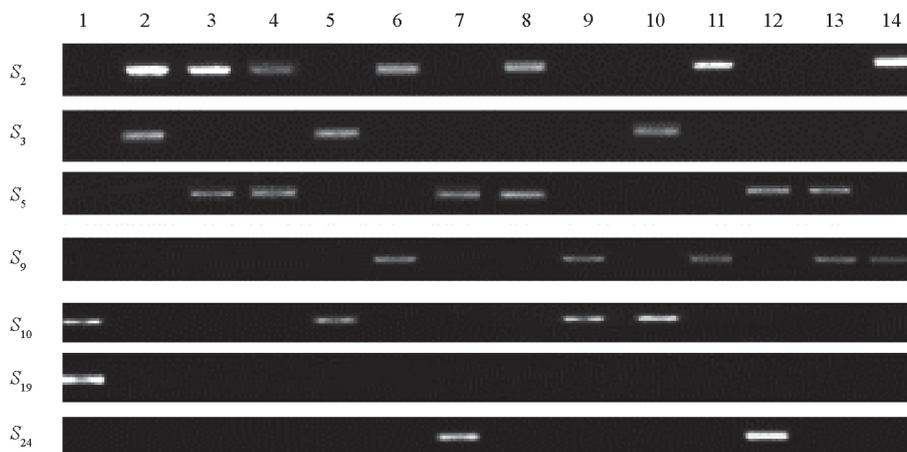


图 3 14 个苹果品种  $S$  等位基因特异性 PCR 扩增结果

每一行表示利用一对  $S$  等位基因特异性引物对不同品种的扩增结果, 扩增片段在 1.2% 琼脂糖凝胶上分离。

1: ‘华帅’; 2: ‘金玉’; 3: ‘早红’; 4: ‘华美’; 5: ‘Seokwang’; 6: ‘锦秀红’; 7: ‘华玉’; 8: ‘嘎拉’;  
9: ‘绿佳’; 10: ‘信浓红’; 11: ‘蜜玉’; 12: ‘99-1-29’; 13: ‘红珍珠’; 14: ‘华冠’。

Fig. 3 PCR amplification results of  $S$ -alleles for 14 apple cultivars using the specific primers

Each row shows the outcome of a single allele-specific PCR reaction using the different cultivar and amplified fragments were separated on 1.2% agarose gel. 1 to 14 was represented the varieties of ‘Huashuai’, ‘Jinyu’, ‘Zaohong’, ‘Huamei’, ‘Seokwang’, ‘Jinxihong’, ‘Huayu’, ‘Gala’, ‘Lujia’, ‘Shinano Red’, ‘Miyu’, ‘99-1-29’, ‘Hongzhenzhu’, ‘Huaguan’, respectively.

S <sub>2</sub>	U12199.1	TTTACGCAGCAATATCAGCCGGCTGCCTGCAACTCTAATCCTACTCCTTGTAAAGATCCTCCTGACAAGTTGTTACGGT	80
	S <sub>2</sub>	C1 C2	0
	U12199.1	TCACGGTTTGTGGCCTTCAAACATGAATCGAAGTGAATTTAATTCAGTAGTTCAAACGTGACTTATGCCA... AACATGAATCGAAGTGAATTTAATTCAGTAGTTCAAACGTGACTTATGCCAAGGTTAA	154 61
	U12199.1	TATTATTAACAATCAGATATTCAATATTGTTATTTCATATTATACATATACTCAACATAGATTTTTATGCCAGCGTGTG	154 141
	S <sub>2</sub>	HVa	
	U12199.1	CAAAACATTACATTTAAATTTAAAAATTAATCATAAACTTTTCTATTATTATTATGTTGTCAGATACAAAATTCGGAAC AGATACAAAATTCGGAAC	173 221
	U12199.1	CCAGTTGGAAATGATTGGCCAAACGATTCAAATCGAAAAATCAATTTAGGCTTCGGAAATAGAGAGTGGAAACAAACCG CCAGTTGGAAATGATTGGCCAAACGATTCAAATCGAAAAATCAATTTAGGCTTCGGAAATAGAGAGTGGAAACAAACCG	253 301
	S <sub>2</sub>	HVb C3	
	U12199.1	CGCCCTGTGGGTATCCACAAATACGGAACGACTTGCATTACTTTCAACAGTAATCAAAAATGACATAACCCAGAAACAA CGCCCTGTGGGTATCCACAAATACGGAACGACTTGCATTACTTTCAACAGTAATCAAAAATGACATAACCCAGAAACAA	333 381
	S <sub>2</sub>	C4	
U12199.1	AACGTCCTGATATCCTCTCAAAGGCCAAGATTGAACCGGATGGAAATTCAGGACACAGAAGAAATTTAGATGCCAT AACGTCCTGATATCCTCTCAAAGGCCAAGATTGAACCGGATGGAAATTCAGGACACAGAAGAAATTTAGATGCCAT	413 461	
U12199.1	AAGAAAAGGTATCCATGGTAAGGAACCAAACTCAAAGTCCAAAAGAAATACTCAGATGACTGAATTTGGTTGAGGTCACATC AAGAAAAGGTATCCATGGTAAGGAACCAAACTCAA	493 497	
S <sub>2</sub>	C5		
U12199.1	TTTGCAGCGATGGCAACTTAAAGCAGTTCATAGATTGCCCCACCATTTTCCAAATGGATCAGCAGATAACTGCCCCACG	573	
S <sub>2</sub>			
U12199.1	AATCATATTCTGTATTAAGAGCCCGGGCTAGATAGTATATATACGGGTGACAATTTTCGATATATAGGACGAGAGGAATG	653	
S <sub>2</sub>			
U12199.1	AAGTTATGTGGTTGTATTCTTAATGAATAAGTCTCTTAATTAATAAACTTATGTG	711	
S <sub>2</sub>			
S <sub>3</sub>	U12200.1	TTTACGCAGCAATATCAGCCGGCTGTCTGCACTCTAATCCTACTCCTTGTAAAGATCCTCCTGACAAGTTGTTACGGT	80
	S <sub>3</sub>	C1 C2	0
	U12200.1	TCATGGTTTGTGGCCTTCAAATGTTAATGGAAGTGACCCCAAGAAATGCAAACTACAATCTTGAACCCCTCAACCGATAA	160
	S <sub>3</sub>	HVa	0
	U12200.1	CAAACTTACAGCCAGCTGGAAATTTTGGCCAAACGACTCAATCGAAAGGCTCATGCACGGTCTTGGCGTAAACAG	240
	S <sub>3</sub>	HVb	0
	U12200.1	TGGCGTAAACATGGCACCTGTGGTACCCACAATAGCGGACGACATGCATTACTTTAGCACAGTAATCGAAATGTACAT	320
	S <sub>3</sub>	C3	0
	U12200.1	AACCAAGAAAACAAAATGTCTCTGAAATCCTCTCAAAGCGAAAATTAACCGGAGAAGAAATTCAGGACACGGGACGACA GGCGAAAATTAACCGGAGAAGAAATTCAGGACACGGGACGACA	400 44
	S <sub>3</sub>	C4	
U12200.1	TTGTGAATGCCATAAGCCAAAGTATCGACTATAAGAAACCAAACTCAAGTGAAGAAACAATATCAGATAACTGAATTTG TTGTGAATGCCATAAGCCAAAGTATCGACTATAAGAAACCAAACTCAAGTGAAGAAACAATATCAGATAACTGAATTTG	480 124	
U12200.1	GTTGAGTCCGCTCTTGCAGCGATAACAACCTAACCGAGTTCATAGATTGCCCCCGCCATTCCACAAGGATCACCATT GTTGAGTCCGCTCTTGCAGCGATAACAACCTAACCGAGTTCATAGATTGCCCCCGCCATTCCACAAGGATCACCATT	560 204	
S <sub>3</sub>	C5		
U12200.1	TTTTGCCCCACCAATAATATTCAGTATTAAGAGCCAGCTAGAGTATTCGATAACGAAATGGTGAATTTCCATATAAGG TTTTGCCCCACCAATAATATTCAGTATTAAGAGCCAGCTAGAGTATTCGATAACGAAATGGTGAATTTCCATATAAGG	640 284	
U12200.1	ACGAGAGCAATGCAGTTATGTGATTATTCTAATGAATAAATCTTAATTAG ACGAGAGG	694 292	
S <sub>3</sub>			
S <sub>5</sub>	AB428427.1	TTTACGCAGCAATATCAGCCGGCTGCCTGCAAGTTTACCATACTCCTTGTAAAGATCCTCCTGACAAGTTGTTACGGT	80
	S <sub>5</sub>	C1 C2	0
	AB428427.1	TCACGGATTGTGGCCTTCAAACCTTAAATGGACCTGACCCAGAAAACGCAAGGTCAAACCCAGGGCTCTCAAACGGTTAA	160
	S <sub>5</sub>		0
	AB428427.1	TATTATTGATAATAAGATAGTCAATACAGTTCATGTTCTTATTATTAAATATTGACTGAGGCCTTATTAGTTTTTA	240
	S <sub>5</sub>	HVa	0
	AB428427.1	GATTTTAAATCGAAGTTCCTATTTTAGTATATTAATGAGTCAATCCATAATTTCTTAAAAATAAATAAATTCAT AAAAATAAATAAATAAATTCAT	320 23
	AB428427.1	TTAGGGTTTTAATCTCACACTTTACTAACTCTAAATTAATTTTCGATTCAAAACATTTCCAAAATAAATAAAGTTTG TTAGGGTTTTAATCTCACACTTTACTAACTCTAAATTAATTTTCGATTCAAAACATTTCCAAAATAAATAAAGTTTG	400 103
	S <sub>5</sub>		
	AB428427.1	TACTTACTAATTTTTATAAAAAGATTTGTCCAATCTTAACTTAAATGTACCCATTCATATGTTTTTTTGTCAAAT TACTTACTAATTTTTATAAAAAGATTTGTCCAATCTTAACTTAAATGTACCCATTCATATGTTTTTTTGTCAAAT	480 183
AB428427.1	ATTGATTTTGTAGATTAGATGTTTGTATAGCCACCGAGGAGCTGAAACCCACCGTCAATGCAAGAGTTCAACACCTTT ATTGATTTTGTAGATTAGATGTTTGTATAGCCACCGAGGAGCTGAAACCCACCGTCAATGCAAGAGTTCAACACCTTT	560 263	
AB428427.1	TTCCACCATATGATAAAGGGCCACTTGTAAATGTACCCATTCATATAGTATTCAAATTTATAATCTTAAATACATTTCT TTCCACCATATGATAAAGGGCCACTTGTAAATGTACCCATTCATATAGTATTCAAATTTATAATCTTAAATACATTTCT	640 343	
AB428427.1	TAAATGTACCAATTTGTATAATGAAAATCCATATTTTTTAAATAAATAACACCCATTTTTTTTGTACAAAATCCAT TAAATGTACCAATTTGTATAATGAAAATCCATATTTTTTAAATAAATAACACCCATTTTTTTTGTACAAAATCCAT	719 423	
AB428427.1	TCAAATTTTTTAATCCATTTTTAAACTTATATGGGTACATTTCTTTTCGTTGATTTGAAAATGTATCCGTTGTCAAGTTTA TCAAATTTTTTAATCCATTTTTAAACTTATATGGGTACATTTCTTTTCGTTGATTTGAAAATGTATCCGTTGTCAAGTTTA	799 503	
AB428427.1	ATCGAAGAAATTTACTAATGCTATTAAGACTAGTATCTATTTTGGTTTTGAAGAAATGACCCCATGTTGATATAAC ATCGAAGAAATTTACTAATGCTATTAAGACTAGTATCTATTTTGGTTTTGAAGAAATGACCCCATGTTGATATAAC	879 583	

S <sub>5</sub>	AB428427.1	AACTTTCGGTTAATATTCATGAATAGGACCCATGTTTGTGTATGTGTAATACATATATATAGATATATATTGGAGA AACTTTCGGTTAATATTCATGAATAGGACCCATGTTTGTGTATGTGTAATACATATATATAGATATATATTGGAGA	957 663
	AB428427.1	ATATAATTCCTTTCATATTTTCATTCACCACAATTAATGGGTATTATTTAAAAATCATTAAATAAAACCACCACAATTT ATATAATTCCTTTCATATTTTCATTCACCACAATTAATGGGTATTATTTAAAAATCATTAAATAAAACCACCACAATTT	1 037 743
	AB428427.1	TAATTTCTGATTTAAAAATCTAATAATCTACATAGAAATACATTGTTACATTAATTTTCAGAGATTCGAAAAAATAAACA TAATTTCTGATTTAAAAATCTAATAATCTACATAGAAATACATTGTTACATTAATTTTCAGAGATTCGAAAAAATAAACA	1 117 823
	AB428427.1	AAAAACCAACAAGTTTCAATTAATAAAACATTTATAAAATAGGACCCGATCCAAAGTCATTTATTTTCATTTATTTA AAAAACCAACAAGTTTCAATTAATAAAACATTTATAAAATAGGACCCGATCCAAAGTCATTTATTTTCATTTATTTA	1 197 903
	AB428427.1	CTTGTGTATGTATACATATACACAACATAGATTTTCAGGTACGCTTGTGCAAAATTTACAATCAATTTAAAAATTTAATCA CTTGTGTATGTATACATATACACAACATAGATTTTCAGGTACGCTTGTGCAAAATTTACAATCAATTTAAAAATTTAATCA	1 277 983
	AB428427.1	TAAATATTTTTCATTTGTATATATATATTTTCAGATAGATACATCACTCAAACCCAGTTGGAATATTTTGGCCGAAC TAAATATTTTTCATTTGTATATATATATTTTCAGATAGATACATCACTCAAACCCAGTTGGAATATTTTGGCCGAAC	1 357 1 063
	AB428427.1	GTATTCATTCGAGCCGATCATGAAAGCTTCTGGCAAAAACAGTGGGACAAAACATGGCCACTTGGGCTCCCAACAATAA GTATTCATTCGAGCCGATCATGAAAGCTTCTGGCAAAAACAGTGGGACAAAACATGGCCACTTGGGCTCCCAACAATAA	1 437 1 143
	AB428427.1	HVb C3 AGACAAGAACCATTACTTTGAAACAGTAATCAGAAATGTACATAACCGAGAAGCAAAACGTCCTTTATATCCTATCCAAAG AGACAAGAACCATTACTTTGAAACAGTAATCAGAAATGTACATAACCGAGAAGCAAAACGTCCTTTATATCCTATCCAAAG	1 517 1 223
	AB428427.1	C4 CCAATATCAATCCGGATGTTAAAGCAGGACACGGAAGGATTTCAAATTTGCCATACGCAATAGTACCAACGATAAGGAA CCAATATCAATCCGGATGTTAAAGCAGGACACGGAAGGATTTCAAATTTGCCATACGCAATAGTACCAACGATAAGGAA	1 597 1 235
	AB428427.1	CCAAAACCTCAAGTGCCAAACGAAGAATGGGATACTGAATTTGGTTGAGGTCTCTCTT CCAAAACCTCAAGTGCCAAACGAAGAATGGGATACTGAATTTGGTTGAGGTCTCTCTT	1 654
S <sub>9</sub>	D50836.1	TTTACGCAGCAATATCAGCCGGCTGTCTCCACITTTAAITCCITACCTTGTAGAGATCCCTCCGACAGTTTGTITACGGT TTTACGCAGCAATATCAGCCGGCTGTCTCCACITTTAAITCCITACCTTGTAGAGATCCCTCCGACAGTTTGTITACGGT	80 51
	D50836.1	TCACGGTTTGTGGCTTCAAAACAGCTCAGGAAATGACCAATAATACGCAAGAAATACAACTGAATTTCTACTA TCACGGTTTGTGGCTTCAAAACAGCTCAGGAAATGACCAATAATACGCAAGAAATACAACTGAATTTCTACTA	154 131
	D50836.1	..... TATTATTAATAAICAGATGTTCAATATTTGTTTATTTCATATATACATATACCAACATAGATTTTCATGCAATGCTAGTGA TATTATTAATAAICAGATGTTCAATATTTGTTTATTTCATATATACATATACCAACATAGATTTTCATGCAATGCTAGTGA	154 211
	D50836.1	HVa AAATATTAAGAAATTAATTAATAATTAATCATAAATTTTCTATTATATATATTTGTCAGATAGCAAAATCTGACAGCCCG AAATATTAAGAAATTAATTAATAATTAATCATAAATTTTCTATTATATATATTTGTCAGATAGCAAAATCTGACAGCCCG	176 291
	D50836.1	GTGGAAATTTTGGCCCAAGCTACCGATCGAAGCAATATACCTTCTGGAAATAAACAGTGGAAACAACATGGCA GTGGAAATTTTGGCCCAAGCTACCGATCGAAGCAATATACCTTCTGGAAATAAACAGTGGAAACAACATGGCA	256 371
	D50836.1	HVb C3 GCTGTGGGATCCCGCAATACAGAAGCAGATGCAATTTTGCAAACAGTAAATCAAAAATGTACATAACCCAGAAACAAC GCTGTGGGATCCCGCAATACAGAAGCAGATGCAATTTTGCAAACAGTAAATCAAAAATGTACATAACCCAGAAACAAC	336 451
	D50836.1	C4 GCTCTGAAATCTCTCAAAGGCCAAGATTTGAACCGTGGGAAATTCAGGACACAGAAGAAATTTGAAAGGCCATAGG GCTCTGAAATCTCTCAAAGGCCAAGATTTGAACCGTGGGAAATTCAGGACACAGAAGAAATTTGAAAGGCCATAGG	416 520
	D50836.1	CAAGGTACCAATAATAAGGAACCCAAACTCAAGTGCCAAAAGAATAGTCAGAGGACTGAATTTGGTTGAGGTCACTATTT CAAGGTACCAATAATAAGGAACCCAAACTCAAGTGCCAAAAGAATAGTCAGAGGACTGAATTTGGTTGAGGTCACTATTT	496
	D50836.1	C5 GTAGCGATCGCAACTTAAACAGTTCATAGATTTGCCCGCCCTATTTTAAATGGATCAGGATACACTGCCCCCAAAAT GTAGCGATCGCAACTTAAACAGTTCATAGATTTGCCCGCCCTATTTTAAATGGATCAGGATACACTGCCCCCAAAAT	576
	D50836.1	AATATCTGTATTAAAGAGCGCGGTAGCTAGTATATAT AATATCTGTATTAAAGAGCGCGGTAGCTAGTATATAT	656
D50836.1	ATATATATATATATATATAAGTAGTTGGCCTATATACGGGTGAGCATTTCATATAGAGGACGAGAGGAATGAAGTTATG ATATATATATATATATATAAGTAGTTGGCCTATATACGGGTGAGCATTTCATATAGAGGACGAGAGGAATGAAGTTATG	736	
D50836.1	TGATTGTATTTCTAATGAATAAGTTGGCTTAATTCATTAATACTCATGTGAATATGTGAATTTTCTT TGATTGTATTTCTAATGAATAAGTTGGCTTAATTCATTAATACTCATGTGAATATGTGAATTTTCTT	803	
S <sub>10</sub>	AB052683.1	TTTACGCAGCAATATCAGCCGGCTGTCTGCAACTTAACTCTACCTTGTAAAGGATCCTCCGGACAAGTTGTTTACGGT TTTACGCAGCAATATCAGCCGGCTGTCTGCAACTTAACTCTACCTTGTAAAGGATCCTCCGGACAAGTTGTTTACGGT	80 0
	AB052683.1	TCATGGTTTGTGGCTTCAAATGTTAATGGAAGTGACCCCAAGAAATGCAAAAGTACAATCTTAAATCTCAAACGATAA TCATGGTTTGTGGCTTCAAATGTTAATGGAAGTGACCCCAAGAAATGCAAAAGTACAATCTTAAATCTCAAACGATAA	160 0
	AB052683.1	CAAACTCTTAAAGCCAGCTGGAAATTTATTTGGCCAAAACGTCATCAATCGAAGGGCTCATGTACGCTTCTGGCGTAAACAG CAAACTCTTAAAGCCAGCTGGAAATTTATTTGGCCAAAACGTCATCAATCGAAGGGCTCATGTACGCTTCTGGCGTAAACAG	240 48
	AB052683.1	HVa HVb TGGCGTAAACATGGCGCTGTGGTACCCCAATAGCGGACGACATGCAATTTACATTTAGCACAGTAAATCGAAATGTACAT TGGCGTAAACATGGCGCTGTGGTACCCCAATAGCGGACGACATGCAATTTACATTTAGCACAGTAAATCGAAATGTACAT	320 128
	AB052683.1	C3 AAACAAGAAACAACAAAGCTCTTGAATTCCTTCAAAAGGCCAAGATTTAAACCGGAGGGAGATTCAGGACAGGGGACGACA AAACAAGAAACAACAAAGCTCTTGAATTCCTTCAAAAGGCCAAGATTTAAACCGGAGGGAGATTCAGGACAGGGGACGACA	400 203
	AB052683.1	C4 TTGTAATGCCATAAGCCAAAGTATCGACTATAAGAAACCAAACTCAAGTGCAAGATCAATAATCAGACAACGTAATTTG TTGTAATGCCATAAGCCAAAGTATCGACTATAAGAAACCAAACTCAAGTGCAAGATCAATAATCAGACAACGTAATTTG	480
	AB052683.1	S <sub>10</sub> GTTGAGGTGGGCTTTGACGCGATAACAACCTTAACCGCAGTTCATAAATTTGCCCAACCCATTTTCTCAAGGATCACCATA GTTGAGGTGGGCTTTGACGCGATAACAACCTTAACCGCAGTTCATAAATTTGCCCAACCCATTTTCTCAAGGATCACCATA	560
	AB052683.1	C5 TTTCTGCCCCACCAATAATATTCAGTATTAAGAGCGCAGCTAGATAGTATTGCATATACGGATGATGATTTCCATATATA TTTCTGCCCCACCAATAATATTCAGTATTAAGAGCGCAGCTAGATAGTATTGCATATACGGATGATGATTTCCATATATA	640
	AB052683.1	GGACGAGGAAATGACAGTTATGTGATTTCTAATGAATAAATTTGTCITTAATTAATTAATAAAAAAAAAAAAAA GGACGAGGAAATGACAGTTATGTGATTTCTAATGAATAAATTTGTCITTAATTAATTAATAAAAAAAAAAAAAA	714

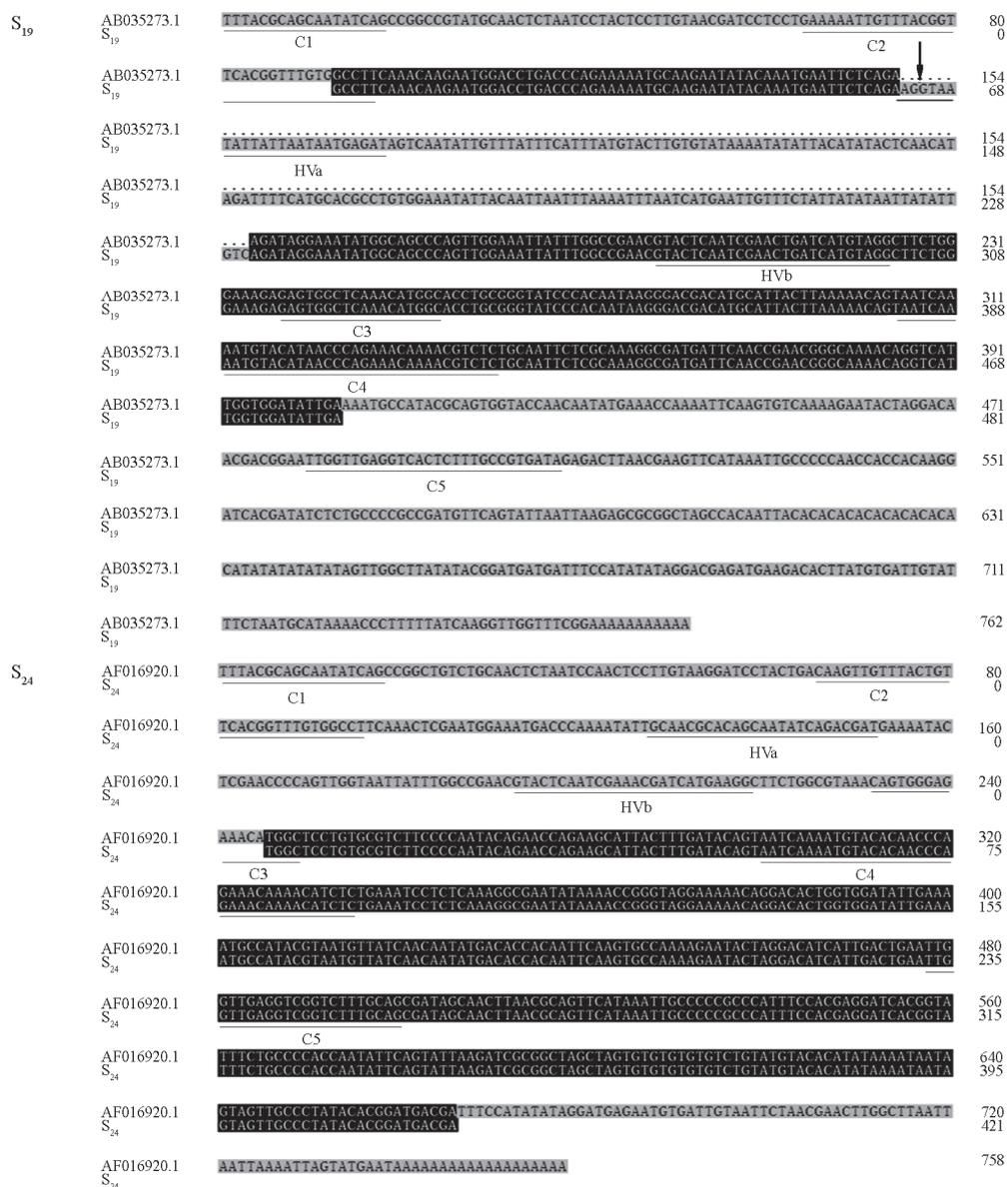


图 4 特异引物扩增的 *S* 基因序列 ( $S_2$ 、 $S_3$ 、 $S_5$ 、 $S_9$ 、 $S_{10}$ 、 $S_{19}$  和  $S_{24}$ ) 与 GenBank 中同源序列的同源性和结构对比  
 保守区 (C1 ~ C5) 和高变区 (HVa 和 HVb) 用下划线表示; 序列上方的箭头表示在该位置插入内含子。

Fig. 4 Sequence homology and structure comparison of homologous sequences in GenBank were compared with the *S*-gene ( $S_2$ ,  $S_3$ ,  $S_5$ ,  $S_9$ ,  $S_{10}$ ,  $S_{19}$  and  $S_{24}$ ) sequence amplified by specific primers

The position conserved region (C1 - C5) and hypervariable regions (HVa and HVb) are underlined.

The location of the single intron is indicated by an arrow.

由上述对各品种序列的分析可以确定‘华帅’的 *S* 基因型为  $S_{10}S_{19}$ ，‘金玉’  $S_2S_3$ ，‘早红’、‘华美’和‘嘎拉’  $S_2S_5$ ，‘Seokwang’  $S_3S_{10}$ ，‘锦秀红’、‘蜜玉’和‘华冠’  $S_2S_9$ ，‘华玉’和‘99-1-29’  $S_5S_{24}$ ，‘绿佳’  $S_9S_{10}$ ，‘信农红’  $S_3S_{10}$ ，‘红珍珠’  $S_5S_9$ 。

表3 20个栽培苹果品种的S基因型  
Table 3 S-genotypes of 20 apple cultivars

品种 Cultivar	试验结果 Result		前人结果 Previous result				
	S基因型 S-genotype	PCR片段/bp The PCR fragment	内含子/bp Intron	采样地点 Source	S基因型 S-Genotype	采样地点 Source	参考文献 References
富士 Fuji	S <sub>7</sub> S <sub>9</sub>	538/344	344/144	中国郑州	S <sub>7</sub> S <sub>9</sub>	日本 Japan	Matsumoto & Kitahara, 2000
华瑞 Huirui	S <sub>9</sub> S <sub>24</sub>	344/533	144/339	Zhengzhou,	—	—	
华硕 Huashuo	S <sub>9</sub> S <sub>24</sub>	344/533	144/339	China	—	—	
华星 Huaxing	S <sub>5</sub> S <sub>9</sub>	1 257/344	1 153/144	—	—	—	Long et al., 2010
美八 Meiba	S <sub>5</sub> S <sub>9</sub>	1 257/344	1 153/144	—	—	—	
红脆宝 Hongcuibao	S <sub>5</sub> S <sub>24</sub>	1 257/533	1 153/339	—	—	—	Long et al., 2010
华帅 Huashuai	S <sub>70</sub> S <sub>19</sub>	203/481	No/169	—	S <sub>7</sub> S <sub>19</sub>	中国兴城 Xingcheng, China	
金玉 Jinyu	S <sub>2</sub> S <sub>3</sub>	497/293	147/No	—	—	—	李天忠 等, 2010
早红 Zaohong	S <sub>2</sub> S <sub>5</sub>	497/1 235	147/1 017	—	S <sub>7</sub> S	—	
华美 Huamei	S <sub>2</sub> S <sub>5</sub>	497/1 235	147/1 017	—	—	—	Hoy et al., 2006
Seokwang	S <sub>3</sub> S <sub>10</sub>	293/203	No/No	—	S <sub>3</sub> S <sub>5</sub>	韩国 Korea	
锦秀红 Jinxiuhong	S <sub>2</sub> S <sub>9</sub>	497/520	147/144	—	—	—	Janssens et al., 1995
华玉 Huayu	S <sub>5</sub> S <sub>24</sub>	1 235/421	1 017/No	—	—	—	
嘎拉 Gala	S <sub>2</sub> S <sub>5</sub>	497/1 235	147/1 017	—	S <sub>2</sub> S <sub>5</sub>	英国 U.K.	Janssens et al., 1995
绿佳 Lujia	S <sub>9</sub> S <sub>10</sub>	520/203	144/No	—	—	—	
信浓红 Shinano Red	S <sub>3</sub> S <sub>10</sub>	292/203	No/No	—	—	—	Long et al., 2010
蜜玉 Miyu	S <sub>2</sub> S <sub>9</sub>	497/520	147/144	—	—	—	
99-1-29	S <sub>5</sub> S <sub>24</sub>	1 235/421	1 017/No	—	—	—	Long et al., 2010
红珍珠 Hongzhenzhu	S <sub>5</sub> S <sub>9</sub>	1 235/520	1 017/144	—	—	—	
华冠 Huaguan	S <sub>2</sub> S <sub>9</sub>	497/520	147/144	—	S <sub>2</sub> S <sub>9</sub>	中国兴城 Xingcheng, China	

注：—：未报道S基因型和采样地的品种；No：S等位基因序列中不含内含子。

Note: —: Unreported S-genotype and source cultivars. No: No introns in the sequences of the S-alleles.

### 2.3 不同S基因型品种的杂交亲和力分析

2015年的10组异花授粉组合中,坐果率(表4)在6.00%~85.00%之间,最低组合为‘华硕’×‘华瑞’的正反交组合(6.00%和8.00%),最高组合为‘华硕’×‘富士’的正反交组合(78.00%和83.00%);2016年10组异花授粉组合中,坐果率在2.88%~91.24%之间,最低组合为‘华硕’×‘华瑞’的正反交组合(2.88%和15.52%),最高组合为‘华瑞’×‘美八’的正反交组合(80.00%和91.24%)。可以看出不论正交和反交,仅有‘华瑞’与‘华硕’这对组合在2015和2016年的坐果率较低;而‘华冠’、‘富士’分别与‘华瑞’和‘华硕’在2015年的正反交组合坐果率较高,高于56.00%,‘美八’、‘锦秀红’分别与‘华瑞’和‘华硕’在2016年的正反交组合坐果率也较高,高于46.30%,两年的坐果率均能够满足生产上对产量的要求。这些结果说明‘华

表4 2年不同S基因型品种间异花授粉的坐果率  
Table 4 The fruiting rate of cross-pollination among different S genotypes for two years

2015		2016	
组合(♀×♂) Group	坐果率/% Fruit-setting rate	组合(♀×♂) Group	坐果率/% Fruit-setting rate
华硕 Huashuo × 华瑞 Huarui	6.00	华硕 Huashuo × 华瑞 Huarui	2.88
华瑞 Huarui × 华硕 Huashuo	8.00	华瑞 Huarui × 华硕 Huashuo	15.52
华瑞 Huarui × 华冠 Huaguan	83.00	华瑞 Huarui × 美八 Meiba	80.00
华冠 Huaguan × 华瑞 Huarui	75.00	美八 Meiba × 华瑞 Huarui	91.24
华硕 Huashuo × 华冠 Huaguan	73.00	华硕 Huashuo × 美八 Meiba	46.30
华冠 Huaguan × 华硕 Huashuo	56.00	美八 Meiba × 华硕 Huashuo	85.29
华瑞 Huarui × 富士 Fuji	73.00	华瑞 Huarui × 锦秀红 Jinxiuhong	68.23
富士 Fuji × 华瑞 Huarui	85.00	锦秀红 Jinxiuhong × 华瑞 Huarui	82.29
华硕 Huashuo × 富士 Fuji	78.00	华硕 Huashuo × 锦秀红 Jinxiuhong	53.65
富士 Fuji × 华硕 Huashuo	83.00	锦秀红 Jinxiuhong × 华硕 Huashuo	91.03

硕’与‘华瑞’互相授粉时亲和力差，而与‘华冠’、‘富士’、‘美八’、‘锦秀红’品种的亲合力较好。因此，在本试验中相同 *S* 基因型的组合授粉后其坐果率较低（2.88%~15.52%），不同 *S* 基因型的组合坐果率较高（46.30%~91.24%），授粉试验支持 *S* 基因型鉴定结果。

### 3 讨论

关于苹果品种 *S* 基因型的鉴定方法，目前主要是根据 *S* 等位基因的保守氨基酸序列 (Ishimizu et al., 1998, 1999) 和特异序列 (Long et al., 2010; 龙慎山 等, 2010) 两种方法设计引物, PCR 扩增、测序比对得知其 *S* 基因型 (Matsumoto & Kitahara, 2000; 张雪梅 等, 2009)。因此, 本研究中把两种方法相结合成功鉴定了 20 个苹果品种的 *S* 基因型。在本试验中, 发现仅一种方法并不能完全鉴定此 20 个品种, 如通用引物扩增时仅有 6 份种质得到 2 条带, 其余种质仅扩增出 1 条带, 这可能是某些品种的 *S* 等位基因所含有的内含子较长影响了 PCR 扩增效率 (Broothaerts et al., 1995), 而特异引物扩增时同样存在某些种质仅扩增出 1 条带, 因此还需要结合通用引物进行 PCR 扩增、测序和克隆得到其 *S* 基因型。两种方法相互结合相互验证, 可以更准确地鉴定待测种质的 *S* 基因型。

本研究中所检测的 20 个苹果品种, 有 6 个前人已鉴定其 *S* 基因型 (Janssens et al., 1995; Sassa et al., 1995; Matsumoto & Kitahara, 2000; Hoy et al., 2006; Long et al., 2010), 另 14 个没有文献报道。在 6 个已鉴定的品种中, ‘富士’、‘嘎拉’和‘华冠’的 *S* 基因型和前人的研究 (Janssens et al., 1995; Sassa et al., 1995; Matsumoto & Kitahara, 2000) 一致; ‘Seokwang’、‘早红’和‘华帅’的 *S* 基因型与前人报道 (Hoy et al., 2006; 李天忠 等, 2011) 的不同。其中, ‘Seokwang’是韩国引进品种, 本试验鉴定结果  $S_3S_{10}$  与 Hoy 等 (2006) 的结果 ( $S_3S_5$ ) 不同。‘早红’是从意大利引进的‘嘎拉’自然杂交种中的早熟单株, 父本不详 (阎振立 等, 2007), 因此不能通过孟德尔基因遗传规律确定鉴定的 *S* 基因型是否准确。本试验鉴定‘华帅’*S* 基因型为  $S_{10}S_{19}$ , 而 Long 等 (2010) 鉴定 *S* 基因型为  $S_2S_{19}$ , 二者结果不同; 本单位利用‘华帅’( $S_{10}S_{19}$ ) × ‘红玉’( $S_7S_9$ ) 育成的品种‘绿佳’( $S_9S_{10}$ ), 其 *S* 基因型支持母本‘华帅’的 *S* 基因型, 为进一步验证该结果将更原始的‘华帅’材料进行鉴定。同一品种的 *S* 基因型鉴定结果出现差异, 往往与品种材料引种有误有关, 因此有必要正源清本鉴定品种的准确 *S* 基因型、以避免错误的 *S* 基因型结果误导生产中授粉树搭配而造成经济损失, 这也是本研究对自育品种进行鉴定或再次鉴定的意义所在。

Heo 等 (2011) 的研究中也发现苹果品种‘Gamhong’和‘Hongan’的 *S* 基因型与亲本 *S* 基因型不一致, 作者推测可能是其他花粉如‘富士’( $S_7S_9$ ) 或 1981 年韩国的育种计划中授粉时其他具有  $S_9$  等位基因的品种, 或者是花粉亲本未知的公开授粉导致的。在本研究中, 也出现‘华硕’、‘华瑞’、‘金玉’、‘Seokwang’和‘华帅’等 5 份材料与其亲本的 *S* 基因型发生冲突的现象。通过对 *S* 基因型分析, 初步推测‘金玉’的母本‘华美’可能存在疑问, 其余 4 个品种的原因正在分析中。下一步除了排除采样有误的可能外, 还需要分析育种过程中是否存在亲本混淆问题, 必要时通过分子标记的方法进行亲本验证。

为了验证本研究鉴定品种 *S* 基因型的准确性, 对授粉组合进行正反交试验, 统计坐果率。由于‘华瑞’与‘华硕’的 *S* 基因型相同, 连续两年的正反交坐果率较低, 为 2.88%~15.52%, 表现为完全不亲和; 而‘华瑞’、‘华硕’分别与‘美八’、‘锦秀红’和‘华冠’、‘富士’, 其 *S* 基因型不同, 分别在 2015 年和 2016 年的正反交组合坐果率均较高, 在 46.30%~91.24%之间, 表现为较高的杂交亲和性。本研究中的授粉坐果率数据符合齐国辉 (2005) 提出的标准 (自交坐果率 > 30%)

为SI弱的品种, 10%~30%为SI中等的品种, <10%为SI强的品种)。生产中通常认为杂交坐果率达到30%以上才能够满足丰产栽培的要求(Komori et al., 1998)。通过对本研究中部分品种坐果率的分析, 这些不同S基因型品种之间的亲和性可以满足实际生产中的丰产需求。

在苹果的育种和生产过程中, 搭配品种之间的亲和性至关重要。本研究中鉴定的20个苹果品种, 在中国已经有较大面积推广、具有一定的影响力, 其中14个品种的S基因型本研究首次鉴定, 对苹果的生产和育种研究有较为重要的意义。

## References

- Bai Song-ling, Yi Kai, Liu Guo-cheng, Han Zhen-hai, Xu Xue-feng, Wang Dong-mei, Li Tian-zhong. 2008. The self-fruitfulness of 'Hanfu' apple and identification of the S-genotype. *Acta Horticulturae Sinica*, 35(4): 475-480. (in Chinese)
- 白松龄, 伊凯, 刘国成, 韩振海, 许雪峰, 王冬梅, 李天忠. 2008. '寒富'苹果的白花结实性及其S基因型. *园艺学报*, 35(4): 475-480.
- Boskovic R, Tobuut K R. 1999. Correlation of stylar ribonuclease isoenzymes with incompatibility alleles in apple. *Euphytica*, 107(1): 29-43.
- Broothaerts W. 2003. New findings in apple S-genotype analysis resolve previous confusion and request the re-numbering of some S-alleles. *Theoretical and Applied Genetics*, 106(4): 703-714.
- Broothaerts W, Janssens G A, Proost P, Broekaert W F. 1995. cDNA cloning and molecular analysis of two self-incompatibility alleles from apple. *Plant Molecular Biology*, 27(3): 499-511.
- Broothaerts W, Verdoodt L, Keulemans J, Janssens G A, Broekaert W F. 1996. The self-incompatibility gene in apple and determination of the S-genotype of apple cultivars by PCR. *Acta Horticulturae*, 423: 103-109.
- Broothaerts W, Wiersma P A, Lane W D. 2001. Lane multiplex PCR combining transgene and S-allele control primers to simultaneously confirm cultivar identity and transformation in apple. *Plant Cell Reports*, 20: 349-353.
- Castillo C, Nakanishi T, Ishimizu T, Takasaki T, Norioka S, Saito T. 2002. S-RNase based PCR-RFLP system for S-genotype assignment in Japanese pear. *Acta Horticulturae*, 587: 449-458.
- Chang S, Puryear J, Cairney J. 1993. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Molecular Biology Reporter*, 11(2): 113-116.
- Cong Pei-hua. 2015. *Apple varieties in China*. Beijing: China Agriculture Press. (in Chinese)
- 从佩华. 2015. *中国果树品种*. 北京: 中国农业出版社.
- Heo S, Han S E, Kwon S I, Jun J H, Kim M J, Lee H J. 2011. Identification of S-allele genotypes of Korean apple cultivars by using allele-specific polymerase chain reaction. *Horticulture Environment Biotechnology*, 52(2): 158-162.
- Hoy T K, Gen H, Yutaka H, Dae I K, Jeong H H, Yong U S, Ill S N. 2006. Determination of self-incompatibility genotypes of Korean apple cultivars based on S-RNase PCR. *Journal of Plant Biology*, 49(6): 448-454.
- Ishimizu T, Inoue K, Shimonaka M, Saito T, Terai O, Norioka S. 1999. PCR-based method for identifying the S-genotypes of Japanese pear cultivars. *Theoretical and Applied Genetics*, 98(6-7): 961-967.
- Ishimizu T, Shinkawa T, Sakiyama F, Norioka S. 1998. Primary structural features of rosaceous S-RNases associated with gametophytic self-incompatibility. *Plant Molecular Biology*, 37(6): 931-941.
- Janssens G A, Goderis I J, Broekaert W F. 1995. A molecular method for S-allele identification in apple based on allele-specific PCR. *Theoretical and Applied Genetics*, 91(4): 691-698.
- Kim H, Park J, Hirata Y, Nou I. 2008. Molecular characterization of new S-RNases ('S<sub>31</sub>' and 'S<sub>32</sub>') in apple (*Malus × domestica* Borkh.). *Journal of Plant Biology*, 3(31): 202-208.
- Kitahara K, Matsumoto S. 2002. Sequence of the S<sub>10</sub> cDNA from 'McIntosh' apple and a PCR-digestion identification method. *HortScience*, 37(1): 187-190.
- Komori S, Soejima J, Ito Y, Bessho H, Abe K, Kotoda N. 1998. Analyses of the self-incompatibility genotypes in some apple cultivars. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 67(6): 917-926.

- Li Tian-zhong, Katoh N, Toshikatsu O. 2005. *S*-RNase cDNA cloning in style of self-fruitful apple cultivars. *Acta Horticulturae Sinica*, 32 (5): 869 - 871. (in Chinese)  
李天忠, 加藤直幹, 奥野智旦. 2005. 苹果自花结实性品种花柱 *S* - 核酸酶基因的克隆. 园艺学报, 32 (5): 869 - 871.
- Li Tian-zhong, Long Shen-shan, Li Mao-fu, Bai Song-ling, Meng Dong. 2011. Advances in research of the self-incompatibility genotypes (*S*-genotypes) in apple. *Chinese Agricultural Science*, 44 (6): 1173 - 1183. (in Chinese)  
李天忠, 龙慎山, 李茂福, 白松龄, 孟冬. 2011. 苹果自交不亲和基因型 (*S* 基因) 研究进展. 中国农业科学, 44 (6): 1173 - 1183.
- Long S S, Li M F, Han Z H, Wang K, Li T Z. 2010. Characterization of three new *S*-alleles and development of an *S*-allele-specific PCR system for rapidly identifying the *S*-genotype in apple cultivars. *Tree Genetics and Genomes*, 6 (2): 161 - 168.
- Long Shenshan, Li Maofu, Han Zhenhai, Zhang Bingbing, Wang Kun, Li Tianzhong. 2010. Characterization of two novel *S*-RNase genes and PCR analyzing of *S*-genotypes of 46 cultivars in *Malus domestica* Borkh. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 18 (2): 1 - 7. (in Chinese)  
龙慎山, 李茂福, 韩振海, 张冰冰, 王昆, 李天忠. 2010. 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, 18 (2): 1 - 7.
- Matsumoto S, Kitahara K. 2000. Discovery of a new self-incompatibility allele in apple. *HortScience*, 35 (7): 1329 - 1332.
- McClure B. 2006. New views of *S*-RNase-based self-incompatibility. *Current Opinion Plant Biology*, 9 (6): 639 - 646.
- Nettancourt D D. 2001. Incompatibility and incongruity in wild and cultivated plants. New York: Springer-Verlag: 1 - 25.
- Qi Guo-hui. 2005. Physiological and biochemical characteristics, molecular mechanism of self incompatible Yali pear and its self-compatible mutations [Ph. D. Dissertation]. Baoding: Hebei Agriculture University. (in Chinese)  
齐国辉. 2005. 鸭梨自交不亲和与亲和变异的生理生化特性及分子机理研究[博士论文]. 保定: 河北农业大学.
- Sakurai K, Brown S K, Weeden N F. 2000. Self-incompatibility alleles of apple cultivars and advanced selections. *HortScience*, 35 (1): 116 - 119.
- Sassa H, Hirano H, Ikehashi H. 1992. Self-incompatibility-related RNases in styles of Japanese pear (*Pyrus serotina* Rehd.) . *Plant and Cell Physiology*, 33 (6): 811 - 814.
- Sassa H, Nishio T, Koyama Y, Hirano H, Koba T, Ikehashi H. 1995. Self-incompatibility (*S*) alleles of the Rosaceae encodes members of a distinct class of T2/*S*-ribonuclease superfamily. *Molecular General Genetics*, 250 (5): 547 - 557.
- Shogo Matsumoto, Li Tianzhong, Shungo Otagaki, Li Yang, Bai Songling. 2018. Efficient breeding and cultivation of type 2 red-fleshed apple cultivars using a search system for suitable apple cultivar combination. *Horticultural Plant Journal*, 4 (6): 219 - 225.
- Sonneveld T, Tobutt K R, Robbins T P. 2003. Allele-specific PCR detection of sweet cherry self-incompatibility (*S*) alleles *S<sub>1</sub>* to *S<sub>16</sub>* using consensus and allele-specific primers. *Theoretical and Applied Genetics*, 107 (6): 1059 - 1070.
- Sun Hui-ling, Meng Dong, Bai Song-ling, Hu Jian-fang, Li Tian-zhong. 2011. Screen and identification of pollen  $\gamma$ -thionin interacting with style *S*-RNase in apple. *Acta Horticulturae Sinica*, 38 (8): 1437 - 1446. (in Chinese)  
孙会玲, 孟冬, 白松龄, 胡建芳, 李天忠. 2011. 苹果花粉中与花柱 *S*-RNase 互作的  $\gamma$  - 硫堇筛选及鉴定. 园艺学报, 38 (8): 1437 - 1446.
- Xue Meng-hu, Meng Jin-ling. 1995. Higher plants self-incompatibility of molecular health. *Biological Engineering Progress*, 15 (1): 32 - 42. (in Chinese)  
薛勇彪, 孟金陵. 1995. 高等植物自交不亲和性的分子生物学. 生物工程进展, 15 (1): 32 - 42.
- Yan Zhen-li, Zhang Shun-ni, Guo Guo-nan, Ma Qing-zhou, Li Yu-ping, Zhao Suo-yin. 2007. Breeding report on new apple cultivar, Zaohong. *Journal of Fruit Science*, (2): 248 - 249. (in Chinese)  
阎振立, 张顺妮, 过国南, 马庆州, 李玉萍, 赵锁印. 2007. 苹果新品种——早红的选育. 果树学报, (2): 248 - 249.
- Zhang Xue-mei, Li Bao-guo, Cui Hui-ying, Qi Guo-hui. 2007. Molecular biology identification of self-incompatibility genotypes of new apple cultivars. *Acta Horticulturae Sinica*, 34 (3): 747 - 750. (in Chinese)  
张雪梅, 李保国, 崔惠英, 齐国辉. 2007. 苹果新品种自交不亲和基因型的分子生物学鉴定. 园艺学报, 34 (3): 747 - 750.
- Zhang Xue-mei, Li Bao-guo, Qin Li-zhe, Qi Guo-hui, Guo Su-ping. 2009. Identification of *S*-genotypes of self-compatible apple cultivars. *Journal of North China Agricultural University*, 24 (5): 113 - 117. (in Chinese)  
张雪梅, 李保国, 秦立者, 齐国辉, 郭素萍. 2009. 自交亲和苹果品种 *S* 基因型的鉴定. 华北农学报, 24 (5): 113 - 117.