

柚子(*Citrus grandis* Osbeck) S-like 核酸酶基因 *CgSL1* 的分离与特征分析*

王 平¹ 薛勇彪² 吕柳新¹

(1. 福建农林大学园艺学院, 福州 350002; 2. 中国科学院发育生物学研究所, 北京 100080)

摘要: 从柚子(*Citrus grandis* Osbeck) 2个自交不亲和品种——溪蜜柚和度尾蜜柚的花柱中克隆出一个类似 S 核酸酶基因 *CgSL1* (*C. grandis* S-like RNase), 它的 cDNA 序列全长 1 074 bp, 编码 297 个氨基酸。通过与其它植物 S-like 核酸酶和 S 核酸酶氨基酸序列进行比较, 发现 *CgSL1* 类似于 S-like 核酸酶, 与拟南芥中的 RNS2 一致性为 62.5%。对 *CgSL1* 的表达分析表明该基因在花柱、花药、叶片不同器官以及花柱的不同发育阶段均有表达, 且在花柱中的表达随衰老增强, 由此推测它可能与衰老有关。

关键词: 柚; 花柱; RT-PCR; S-like 核酸酶

中图分类号: S 666.3; Q 943.2

文献标识码: A

文章编号: 1000-470X(2002)02-0083-06

Cloning and Analysis of a S-like RNase Gene *CgSL1* from Self-incompatible Cultivars in *Citrus grandis* Osbeck

WANG Ping¹, XUE Yong-Biao², LU Liu-Xin¹

(1. Department of Horticulture, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China;

2. Institute of Developmental Biology, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

Abstract: A gene encoding a S-like RNase (*CgSL1*) was isolated from the styles of two self-incompatible pomelo cultivars *Citrus grandis* Osbeck vs. Guanxi and vs. Duwei. The cDNA of *CgSL1* was 1 074 bp in length with a capability of encoding a polypeptide consisting of 297 amino acids. Sequence comparison showed that *CgSL1* was more similar to S-like RNases than to S RNases and had a highest similarity with 62.5% identity to RNS2 from *Arabidopsis thaliana*. To reveal the tissue specificity and the temporal expression patterns of *CgSL1*, RT-PCR was conducted with RNAs from several tissues. Results showed that *CgSL1* expressed in styles, anthers and leaves, and its expression in styles increased in the proceeding of style senescence, suggesting that *CgSL1* may be related to senescence.

Key words: *Citrus grandis* Osbeck; Style; RT-PCR; S-like RNases

在柚子(*Citrus grandis* Osbeck) 中, 存在大量自交不亲和(SI)品种, 福建的溪蜜柚和度尾蜜柚被认为是自交不亲和的, 并推测属配子体 SI^[1,2]。目前的研究表明大多数的配子体 SI 植物的 S 位点编码一类核酸酶, 称为 S 核酸酶^[3]。为了探讨柚自交不亲和性与 S 核酸酶的关系, 我们开展了柚 S 核酸酶基

因的分离研究。研究发现, 柚的自交不亲和品种中, 除存在控制自交不亲和性 S 核酸酶外(王平等, 待发表数据), 和其它配子体 SI 植物如蔷薇科、茄科、玄参科的种一样^[3], 也存在 S-like 核酸酶。由于这类核酸酶不是 S 位点的产物, 因此它们与自交不亲和性无关, 仅参与其它植物生理过程。笔者报道了柚子的

收稿日期: 2001-06-04, 修回日期: 2001-07-03。

* 作者简介: 王平(1968-), 男, 讲师, 果树学专业, 从事园艺植物遗传与育种以及生物技术教学和科研。

本实验在中科院发育生物研究所植物遗传与发育实验室完成。

一个 S-like 核酸酶基因 *CgSL1*, 并对它的表达进行了分析。

1 材料与方法

1.1 材料

供试品种为 溪蜜柚(福建省平和县)和度尾蜜柚(福建省仙游县度尾镇) 2 个自交不亲和品种。在花蕾 0.5 cm、1 cm、开花当天和谢花后 4 个不同时期, 采集花柱、柱头、花药和幼嫩叶片等不同器官, 分别取 5 g 作为提取 RNA 的材料。

1.2 总 RNA 的提取和 cDNA 链的合成

总 RNA 抽提采用异硫氰酸胍方法^[4]。采用 Smart Library Construction Kit (Clontech), 合成 cDNA (合成时引物: CDS 引物: 5'-ATTCTA-GAGGCCG AGGGGGCCGACATG-d(T)30N-1N-3, 其中 N = A, G, C 或 T, N-1 = A, G 或 C。SMART 引物: 5'-AAGCAGTGGTARCAACGC-AGAGTGGCATTATGGCCGGG-3')。

1.3 RT-PCR 扩增和 RACE 方法

分 2 次进行扩增: 首先对 3 端扩增。一端引物是根据已知的 S-like 核酸酶和 S 核酸酶氨基酸序列 C₂ 区高度保守的特征, 设计合成简并引物 G2243 (5'-TT (T/C) ACYAT YCA (T/C) GGYGTYT G-GCC-3'), 其中 Y 是 G、A、T 或 C。另一端引物为 CDS。然后根据测序的核苷酸序列结果设计 2 个特异引物和 SMART 引物组成 2 对引物进行套式 PCR, 对该核酸酶 5 端进行扩增。套式 PCR 引物: SMART 和 D102 (5'-GGAACCTGGCCTTCTT-GCTG-3') 一组, SMART 和 D101 (5'-CAGCAAGGCCAGGTTCC-3') 一组。RT-PCR 的条件参照 Xue *et al.*^[5]。

1.4 PCR 产物的纯化和 pBluescript 载体连接

PCR 产物采用 PCR Preps DNA Purification System Kit (Promega 公司) 纯化。纯化后的片段和 pBluescript (Promega 公司) 载体连接。

1.5 感受态细胞的制备和连接反应物的转化

用 CaCl₂ 法制备 DH5 α 感受态细胞^[4]。进行热激将质粒 DNA 导入感受态细胞中。转化: 取 30.0 mL DH5 α 感受态细胞, 3 mL 连接产物, 冰浴 30 min, 42 热激 55 s, 冰浴 2 min, 加 SOC 培养基 300 mL, 37 复苏 60 min, 吸 150 mL 菌液涂 LB 平板 (Amp+ X-gal+ IPTG), 37 培养 16 h, 进行蓝白斑筛选。

1.6 阳性克隆的筛选、鉴定、酶切分类和 DNA 序列测定

采用煮沸裂解法鉴定阳性克隆。挑选白斑, 经扩大培养, 提取质粒, PCR 检测以及酶切分类后, 挑选片段用 ABI377 自动测序仪进行测序。DNA 序列分析和比较分别利用 DNASTAR 软件包和 Blast 程序完成。

1.7 表达分析

根据 *CgSL1* 的核苷酸序列测定结果, 在其内部设计 2 个特异引物 D103 (5'-TATAATGATG-GACCTGGCC-3') 和 D102 (5'-GGAACCTGGC-CTTCTTGCTG-3') 以及 cDNA 合成引物 CDS, 从各时期和不同器官的组织中抽提总 RNA 进行 RT-PCR, 来检测该核酸酶在这些时期和器官的表达情况。RT-PCR 产物的 DNA 杂交分析按标准方法进行^[4]。探针为 *CgSL1* 的 cDNA, 其³²P 的标记按说明完成 (Primer-a-gene-labeling kit, Promega 公司)。

2 结果与分析

2.1 柚 S-like 核酸酶基因 *CgSL1* 的分离

从 溪蜜柚和度尾蜜柚 2 个品种开花当天的花柱中抽提总 RNA 逆转录合成 cDNA, 进行 RACE 和 RT-PCR 扩增。用 S 核酸酶 C₂ 区的简并引物 G2243 和逆转录引物 CDS 对 cDNA 3 扩增出 800 bp 的片段。然后根据测序的核苷酸序列结果设计特异引物 D102 和 SMART 进行 5 端扩增。由于出现非特异性扩增, 于是在第一次扩增的基础上用另一对引物 SMART 和 D101 进行套式 PCR, 得到 1 个 280 bp 的片段。实验从 溪蜜柚和度尾蜜柚花柱中成功地分离到 1 个与核酸酶相同的完整基因, 该基因的 cDNA 全长序列 1 074 bp (图 1)。它所编码的氨基酸序列含 279 个氨基酸。通过同源性比较发现该基因是一个 S-like 核酸酶基因 (图 2), 把它定名 *CgSL1* (*Citrus grandis* S-like RNase 1)。

2.2 *CgSL1* 与其它核酸酶的氨基酸序列比较

图 2 为 *CgSL1* 与其他植物 S-like 核酸酶、S 核酸酶的氨基酸排列序列比较。*CgSL1* 与其它几个植物核酸酶氨基酸序列, 都具备 C₂ 和 C₃ 2 个保守区 16 个保守残基特征, 这些残基是 S-like 核酸酶和 S 核酸酶的活性部位。其中, C₂ 和 C₃ 2 个保守区中 2 个保守的组氨酸, 被认为在 S 核酸酶和 S-like 核酸酶中都是必要的^[3,5]。另外在 59、102、154、219 和 243 位置上共享有 5 个保守的半胱氨酸。笔者认为

GAAGCTATCGTAACGTTAACACCGATGGCATTTCTCGCTGATTCTGATTCGACTATCGCTCGTCCGGCTGCTA 80
 M A S F S L I L I R L S L V A V L
 CTTACGGCGTCGTTCTGCCAGCTCAAAGCGATCCAAATCAGACAGCCACTAGACCCATGCCCTACTGAGCACAGACACTTC 160
 L T A S F C Q L K A I G I R E A V D D A V V S R E S S
 CGATTACTTCAACTTTCTCTCCACTGGCCTGGCACTCAGTGTAAAAACACTCGCCATTGCTGTCCCTCCAAACGGTTGTC 240
 D Y F N F A L Q W P G T Q C K N T R H C C P S N G C
 TCGCCGACGGTCAATGCTCCAAACTGAATTACAATCCATGCACTGTGCCCCGACTATAATCATCGAACCTGGCCCTTC 320
 L A E G R M L Q T E F T I H G L W P D Y N D G T W P S
 TGCTGCAAGAAATCTAAAGTTGATGAGAAGGACATATCAACATGCTGTGCTGTGAGAACTACTGGCCATCATACAG 400
 C C K K S K F D E K E I S T L L D A L E K Y W P S Y R
 ATGTCGTTCAACATCCTAACTTGCTATAGTGGGAGGGTATTTGGCTCATGACTGGGAGAACCGAACGGAACTTGTTCTT 480
 C G S T S T C Y S G E G L F W A H E W E K H G T C S
 TTCCACTAGTTACACATGAATACACTACTTTCAACTACCCCTCAACTTGACTTTAAATATAATGTCACGAGACTACTG 560
 F P V V R D E Y S Y F S T T L N L Y F K Y N V T R V L
 AATGAACCTCCGATATCTTCCTCTTAATCTGAAAGCTATCCTCTAGGACCCATTGCTCTGCCATTCAAGATGCTTTCCA 640
 N E A G Y L P S N T E K Y P L G G I V S A I Q N A F H
 TCCAACTCCAAACATGGATTGCTCGAAAATGCTGTGAAATGACTTCATCTATGCTTTACAAGGATTCAACCCCTCGGG 720
 A T P K L D C S K D A V N E L H L C F Y K D F K P R
 ATTGTTATTATTGAAACAAGGCTGAAAATGACAATTATTTCTCAACCACTTCATGTCCTAACATTTCGTTAGCTTCCCTGTA 800
 D C I I E R S P E N D N Y F S S S S S C P K F V S L P V
 TATATGTCATCCGGAGTTGATGCCACCGCTCAATTCCCTGGATACTTGAAAATGAAACCTTTGATATCTCATCTC 880
 Y M S S G V D D A T A A I P W I L E N E P L .
 GGCACGGTTCATGTCATGTAATAGTTCAACAAATAACTGCTACCTATTATCATCTCAATTGAAACATCATATTAAAC 960
 TCTTGTGTAATTACCTGGATAACTACTGTCAGTTCTTCATGTTGGCTTGTGGTGAAGCATTCTTCAGTAAA 1040
 GCATCTGTTATTTGCAAAAAAAAAAAAAAA 1074

终止密码子用小黑点(·)表示。

The translation stop codon is shown by a black dot.

图 1 *CgSL1* 的核苷酸和氨基酸序列

Fig. 1 Nucleotide and amino acid sequences of *CgSL1*

这 5 个保守的半胱氨酸与核酸酶的构象有关, 形成核酸酶的骨架折叠^[3,5]。除 C₂ 和 C₃ 2 个保守区和 5 个保守的半胱氨酸以外, 它们在 125、126、143、144、165、166、184、205 和 206 位置上也有保守的氨基酸残基。这些保守区和氨基酸残基说明 *CgSL1* 具备 S 类核酸酶的共同特征。当进一步比较时, 发现 *CgSL1*

更相似于 S-like 核酸酶。它和 S-like 核酸酶氨基酸序列, 有 32 个氨基酸残基为这类核酸酶所严格保守, 这比 S 核酸酶特有严格保守的氨基酸残基(8 个)要多 24 个(图 2)。这些氨基酸残基在 S 核酸酶中是不严格保守的, 如 14 位置的亮氨酸有一些为苯丙氨酸或亮氨酸或丝氨酸所代替。

表 1 *CgSL1* 与其它植物 S-like 核酸酶和 S 核酸酶的氨基酸一致性的比较

Table 1 Pairwise amino acid sequence identities of S-like RNases and S RNases of *CgSL1* and other plants

| 柚 (<i>C. gran-</i> <i>dis</i>) <i>CgSL1</i> | S 核酸酶 S RNases | | | | | | S-like 核酸酶 | | | | S-like RNases | |
|--|------------------------------|------|------|-----------------------|------|---------------------------|---------------------------|------|------|--------------------------|----------------------------|--------------|
| | 金鱼草 <i>A. nitorrhinum</i> | | | 烟草 <i>N. alata</i> | | 番茄 <i>L. peruviana</i> | 拟南芥 <i>A. thaliana</i> | | | 萬打碗花 <i>C. sepium</i> | 番茄 <i>L. esculentum</i> | |
| | AHS2 | AHS4 | AHS5 | LA1 | LA2 | | RNS1 | RNS2 | RNS3 | CSS-L | RNLE | |
| *** | 18.5 | 22.2 | 19.4 | 22.4 | 21.3 | 22.2 | 32.0 | 62.5 | 25.4 | 48.4 | 28.2 | <i>CgSL1</i> |
| *** | 34.5 | 44.7 | 24.7 | 34.3 | 29.3 | 23.7 | 18.5 | 24.9 | 18.5 | 23.5 | AHS2 | |
| *** | 26.5 | 23.5 | 29.0 | 24.6 | 24.3 | 24.3 | 22.8 | 21.9 | 19.9 | 25.3 | AHS4 | |
| *** | 30.0 | 32.5 | 26.3 | 20.7 | 22.9 | 20.7 | 22.9 | 22.5 | 17.6 | 20.0 | AHS5 | |
| | *** | 48.5 | 47.3 | 26.0 | 20.0 | 26.0 | 20.0 | 26.6 | 20.6 | 22.9 | LA1 | |
| | *** | 44.9 | 24.9 | 18.9 | 27.2 | 44.9 | 18.9 | 27.2 | 20.7 | 23.7 | LA2 | |
| | | *** | 27.5 | 21.0 | 25.7 | 27.5 | 21.0 | 25.7 | 21.6 | 24.6 | LPS3 | |
| | | *** | 30.2 | 58.6 | 27.8 | 30.2 | 58.6 | 27.8 | 66.3 | RNS1 | | |
| | | *** | 26.0 | 44.1 | 26.5 | 26.0 | 44.1 | 26.5 | RNS2 | | | |
| | | *** | 20.7 | 52.1 | RNS3 | 20.7 | 52.1 | RNS3 | | | | |
| | | *** | 27.1 | CSS-L | 27.1 | 27.1 | CSS-L | 27.1 | | | | |
| | | *** | RNLE | | | | | | | | | |

注: 表中的数字为氨基酸一致性百分比。除萬打碗花外, 其余序列的来源与图 2 一样。

Notes: Values show the percentage of amino acid identity. The sources of the sequences are the same as in Figure 2 except CSS-L from *Catalystia sepium* (Van Damme et al., 2000)^[12].

| | | | |
|--|--|----------|--------|
| I | | * | 70 |
| MAS_FSLILRLSLVAVLLTASFQLKAIGIREAVDDAVSRESSDYFNFALQWPQGTQCK_NTRHCCPSN | | 柚 CgSL1 | |
| MRYSN_TLI_LIKLIIQYLSVL_CVS | QDFDFFYFVQQWPGAYC_DTKHTC | 沙梨 Pys_L | |
| M_ASNSAFSLF_LILLIQTCLSVL_NAA | KDFDFFYFVQQWPGSYC_DTKQSC | 番茄 RN_le | |
| MAS_RLCL_LLLVACI | AGAFAGDVIELNRSQREFDYFALSLQWPQGTYCR_GTRHCCSKN | 拟南芥 Rns2 | |
| MATVQKSQHSH_FFLLVGCIVHLSNFCSTTTA | Q_FDYFKLVLQWPNSYCSLKTTH_CPR | 金鱼草 Ahs2 | |
| M_VTGMIVVMMVFSLILLI | LSSSTVGFDDYQQFTQQYQPAVCNSNPT | 苹果 Aps | |
| MI_KPQLMSVLFLFLFVFPVCGD | FDYLQLVLQWPQRSFC_KTRY_CPN | 番茄 Lps3 | |
| MAM_LKSSLFLVLFAGAFFL_CFI | ISAGDGSYVYFQFVQQWPPTCRVQKK_CSK | 杏 Prs3 | |
| 71 | * ***** | * | 140 |
| GCLAEGRMLQTEFTIHGLWP_DYNDGTWPSCCKSK_FDEKEIS_TLLDALEKYWPSYRCGSTSTCYSGE | 柚 CgSL1 | | |
| _CYPKSG_KPTADFGIHGLWP_NYKDGGYPSNCDPDSVFDKSQIS_ELLTSLNKNWPSLSCPS | SNG | 沙梨 Pys_L | |
| _CYPTTG_KPAADFGIHGLWP_NNNDGTYPSNCDPNSPYDQSQIS_DLISMM_QQNWPWTACPS | GSG | 番茄 RN_le | |
| AC_CRGs_DAPTQFTIHGLWP_DYNDGSWPSCCYRSD_FKEKEIS_TLMGDKYWPSLSCGSPSSCNGG | 拟南芥 Rns2 | | |
| R_L_PSQFTIHGLWPDKNSWPL_SN_CRTDSADVLCITDKGLIQDLAVHWPDLT_RRQR_KVP | 金鱼草 Ahs2 | | |
| PCK_DPPDKL_FTVHGLWPSN_SNGND_PEYCKAPPYHTI_KMLEPQL_VIIWPVN | 苹果 Aps | | |
| P_VP_RNFTIHGLWPDK_QRIM_PINCPA_KESYKSITD_SKKIKLLEQHWPDLT_SNQGSA | 番茄 Lps3 | | |
| _P_RP_L_QNFTIHGLWPSNYSNPTMPSNCNGSR_FKKEELL_SPRMQSKLKISWPNVVS | SND | 杏 Prs3 | |
| C2 | | | |
| 141** *** * | ** | * | ** 210 |
| GLFWAHEWEKHGTCSFPVVRDEYSYFSTTLNLY_FKYNVTRVLNEAGYLPNSTEKYPLGGIVSAIQNA | 柚 CgSL1 | | |
| YRFWSHEWEKHGTCSSEL_DQKEYFEAALKR_EKVNLQILKNAG_IVPNDELYNLESIVEAIKVGV | 梨 Pys_L | | |
| STFWHSHEWEKHGTCAESVLTNQHAYFKKALDLK_NQIDLLSILQGAD_IHPDGESYDLVNIRNAIKSAI | 番茄 RN_le | | |
| GSFWGHEWEKHGTCSPPVFHDEYYNFTTLNLY_LKHNVTDVLYQAGYVASNSEKYPLGGIVTAIQNAF | 拟南芥 Rns2 | | |
| QKFWVTQWKHHGACALPMYSFN_DYFVKALELK_KRNNVLDMLSRSKSLTPGD_QRVDVSDVNGAITKVT | 金鱼草 Ahs2 | | |
| EGFWRKQWDKHHGSCASSPIQNQKHYFDVTIKMYTTQKQNVSEILSKANIKPGRKNR_PLVDIENAIRV | 苹果 Aps | | |
| _EFWRYQYKKHGTCSVDLYNQE_QYFDLAI_ELK_EKF DLLKTLKNHGHTPS_TNTVIDVEAIKAVT | 番茄 Lps3 | | |
| TKFWESEWNKHGTCSQTL_NQVQYFEISHEMW_NSFN_ITDILKNASIVPHPTQTKYSDIVSAIQSKT | 杏 Prs3 | | |
| C3 | | | |
| 211 * | * | | 280 |
| HAT_PKLDCSKDAV_NELHLCFYKDFKPRDCIIER_SPENDN_YFSSSSCPKFVSLPV_YMSSGV | 柚 CgSL1 | | |
| GHT_PGIENKDSA_GNSQL_YQIYLCVDTs_GQDIIECPLPKGRCAKIQFPK | 沙梨 Pys_L | | |
| GYT_PWIQCNDQS_GNSQL_YQVYICVDGS_GSSSLIECPIFPGKCGTSIEFP | 番茄 RN_le | | |
| HIT_PEVVCKRDAI_DEIRICFY_KDFKPRDCV_GSQD_LTSRKSCPKYVSLPE_YTPLDG | 拟南芥 Rns2 | | |
| GGI_AILKCPGY_L_TEVIICFDPS_GFPVIDCPGPFPC | 金鱼草 Ahs2 | | |
| NNMTPFKCQKNRTSLTE_LVEVGLCSDSN_LTQFINCPRPFQGSRNFC | 苹果 Aps | | |
| KEV_PNLNCIGDSSQTME_L LEIGICFNRE_GTTVIACRRRWINH_PNGNQ_K | 番茄 Lps3 | | |
| QRT_PLLRCKTDPAPHNANTQL_LHEVVFCYGYNAIKQIDCNRTAGCKNQVNILFPRS | 杏 Prs3 | | |

C_2 至 C_3 相对应的区域是已经证实在茄科 S-核酸酶中保守的结构域。加粗表示保守的残基, * 号为所有的序列都保守。短线为空的残基。各个序列的来源如下: 沙梨(Norika *et al.*, 1999)、秘鲁番茄(Royo *et al.*, 1994; Jost *et al.*, 1991)、拟南芥(Taylor *et al.*, 1993)、金鱼草(Xue *et al.*, 1996)、苹果(Sassa *et al.*, 1996)和巴旦杏(Ushijima *et al.*, 1998)。
 C_2 and C_3 correspond to previously identified conservative domains among S RNases of Solanaceae species. Conserved residues are indicated by bolding; * indicates conserved residues among all sequences. Short lines are gaps introduced to maximize the alignment. Sequences are from Japanese pear (Norika *et al.*, 1999)^[6], wild tomato (Royo *et al.*, 1994; Jost *et al.*, 1991)^[7,8], *Arabidopsis* (Taylor *et al.*, 1993)^[9], *Antirrhinum* (Xue *et al.*, 1996)^[5], apple (Broothaerts *et al.*, 1995)^[10] and almond (Ushijima *et al.*, 1998)^[11].

图 2 *CgSL1* 与其它植物 S-like 核酸酶和 S 核酸酶的氨基酸序列排列

Fig. 2 Amino acid sequence alignment of S-like RNases and S RNases of *CgSL1* and other plants

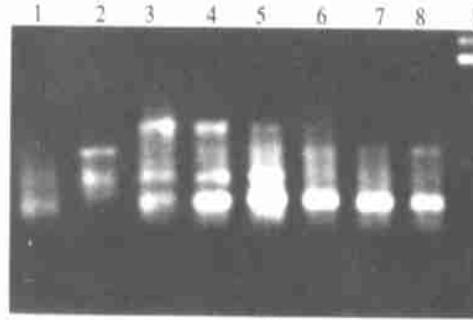
2.3 *CgSL1* 与其它核酸酶的序列相似性分析

为了进一步研究 *CgSL1* 和其他植物 S 核酸酶和 S-like 核酸酶的关系, 对它们之间的序列一致性作了比较(表 1)。*CgSL1* 与 S 核酸酶的相似性在 18.5% ~ 22.4% 之间, 而它与 S-like 核酸酶的一致性在 25.4% 以上, 其中它与拟南芥中 RNS2 的一致性达到 62.5%。而 RNS2 与 S 核酸酶的相似性仅在 25% 之下。因此, *CgSL1* 的结构非常类似于 RNS2。

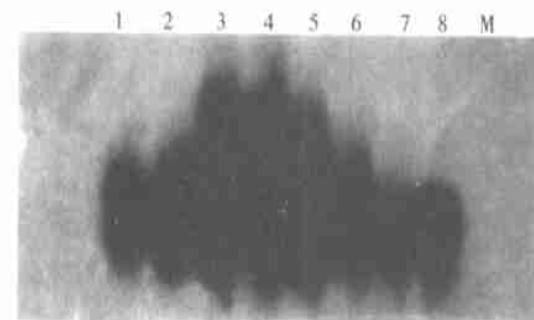
2.4 *CgSL1* 的表达分析

为了确定 *CgSL1* 的时空表达情况, 从 2 个柚品种、4 个不同时期的花柱以及柱头、花药和叶片不同器官组织中提取 RNA 作基因表达分析(图 3)。根据 *CgSL1* 的核苷酸序列设计特异引物 D103 和 D102

进行表达检测, 其中 3, 4, 5 泳道的产物是用 D103 和 D102 以及 D103 和 CDS 两对引物进行检测的。杂交结果表明, 从花柱中得到的 *CgSL1* 在 溪蜜柚和度尾蜜柚的花柱以及柱头、叶片和花药不同器官都有不同程度的表达, 花柱和柱头中有较强的表达, 而叶片和花药中表达要弱一些。由此说明 *CgSL1* 是不具备花柱器官表达的特异性。结果还发现, 在 3 个不同时期的花柱组织中 *CgSL1* 表达也不完全一致, 在 800 bp 大小的片段上, 表现出衰老的花柱器官杂交信号增强(见图 3: A、B 中 3, 4, 5 泳道), 谢花后的花柱比开花前有更强的趋势。从表达结果推测, *CgSL1* 与自交不亲和性的表达无关, 而可能是与衰老有关的 S-like 核酸酶基因。



(A)



(B)

A 和 B 分别为 *CgSL1* 的表达产物的电泳和杂交结果。1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 和 M 分别代表叶片, 花药, 谢花后花柱, 花蕾 1 cm 时的花柱, 花蕾 0.5 cm 时的花柱, 度尾蜜柚开花时花柱, 溪蜜柚开花时花柱, 柱头和 1 kb DNA Ladder Marker。A and B represent the RACE products of *CgSL1* analyzed by agarose gel electrophoresis and hybridization, respectively. Lane 1, leaves; 2, anthers, 3~7 styles from flower buds of post-anthesis, 1 cm, 0.5 cm, anthesis (Duwe) and anthesis of Guanxi, respectively, and 8, stigma; M, 1 kb DNA Ladder Marker.

图 3 *CgSL1* 的组织特异性和时空表达

Fig. 3 Tissue specificity and temporal expression of *CgSL1*

3 讨论

S-核酸酶和 S-like 核酸酶在初级结构上具有一些共同的特征, 具有广泛的相似性。表现在这两类植物核酸酶都保守的这些残基在 RNase T2 和 RNase Rh 两个真菌核酸酶中也保守。显示出它们属核酸酶 T2 型。虽然两者共有一些结构特征, 但是它们还拥有各自不同的一些高度保守的残基^[9]。更重要的是, 它们执行的是 2 个完全不同的生理功能。因此, 有必要弄清楚这两者有一个什么样的进化关系和它们调控的机理有哪些不同。

柚子 *CgSL1* 氨基酸序列与大多数 S-like 核酸酶相似, 除了 C₂ 和 C₃ 两个保守区外, 有 32 个严格保守的氨基酸残基, 它与 S 核酸酶的相似性仅在 18.5% ~ 22.4% 之间, 而与 S-like 核酸酶的相似性

在 25.4% 以上, 最高的与拟南芥的 S-like 核酸酶 RNS2 的相似性达 62.5%。RNS2 在所有的器官组织中都有表达, 但在花柱中表达量最高。*CgSL1* 与 RNS2 一样, 表现出相同的结果, 从而证明它不是花柱器官的特异性表达。在 3 个不同时期的花柱组织作基因表达分析时, *CgSL1* 表达也不完全一致, 800 bp 大小的片段上表现出衰老的花柱器官表达量有更强的趋势, 但仍还需要进一步做基因功能实验来证实。RNS2 已证明是与衰老相关的 S-like 核酸酶。衰老对植物核酸酶活性的效果前人已经进行了较深入的研究。一般来讲, 在植物衰老过程中, 核酸酶活性逐渐增强, 但在不同的系统中, 增强的时期和程度并不相同。现在已弄清楚衰老很明显地调控单个核酸酶活性和基因的表达。如拟南芥的 3 个核酸酶 RNS1、RNS2、RNS3 在叶片中伴随衰老过程受

到不同程度的诱导: RNS1 mRNA 水平仅仅轻微地增强, 而 RNS2 和 RNS3 的 mRNA 增强很显著^[9, 13]。在衰老过程中, 细胞结构被分解, 一些植物组织中大分子也相继降解, 游离出来的营养转到其它组织中。这个过程被认为是为了保留矿物质和物质的再利用而出现的。这种降解和重新分布既可出现在营养生长过程中(如从衰老的子叶中营救矿物质), 又可出现在生殖过程中(如受精后花柱迅速凋萎)。核酸酶可能还包括衰老过程中各种不同的水解酶, 它们加速细胞成分的降解。在磷饥饿的状态下, 也可诱导它们的产生, 被认为可能参与磷的转移和再利用过程^[9, 13]。当衰老、机械损伤或凋亡的细胞出现溶菌现象时, 胞外核酸酶就从这些细胞的 RNA 中把磷营救出来, 使它参与植物代谢的其它过程^[14, 15]。根据本研究所得结果看, *CgSL1* 是一个与 RNS2 极为相似的 S-like 核酸酶。它与柚的自交不亲和性没有关系, 而可能是与衰老相关的 S-like 核酸酶。植物受精后花柱会迅速凋萎, 可能与这类核酸酶的大量表达有关。

自交不亲和性在柚类果树中普遍存在, 是柚类无核或少核的重要原因之一。芸香科中的官溪蜜柚和度尾蜜柚是具有很高经济价值的果树, 但在果实成熟和储藏过程中, 存在一些品质问题, 如汁胞粒化、裂果、裂瓣严重, 影响其商品价值。这类衰老相关基因是否参与了果实的衰老过程, 是一个值得进一步研究的课题。

参考文献:

- [1] 陈振光, 吕柳新, 赖钟雄, 等. 福建柑桔若干特殊种质资源的遗传背景研究. 中国南方果树, 1996, 25(1): 10—12.
- [2] 陈振光, 赖钟雄. 中国柚的种质资源及其研究. 福建农学院学报(自然科学版), 1993, 22(3): 290—295.
- [3] Bariola P A, Green P J. Plant ribonucleases. In: G D'Alessio, Riordan J F, eds. Ribonucleases: Structures and Functions. New York: Academic Press, 1997. 163—190.
- [4] Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [5] Xue Y, Carpenter R, Dickinson H G, et al. Origin of allelic diversity in *Antirrhinum* S-Hocus RNases, *Plant Cell*, 1996, 8: 805—814.
- [6] Norika N, Noroka S, Ohnish Y, et al. Molecular cloning and nucleotide sequence of cDNA encoding S-allele specific stylar RNases in a self-incompatible cultivar and its self-compatible mutant of Japanese pear, *Pyrus pyrifolia* Nakai. *J Biochem (Tokyo)*, 1996, 120: 335—345.
- [7] Royo J, Kow yama Y, Clarke A E. Cloning and nucleotide sequence of two S-RNases from *Lycopersicon peruvianum* L. Mill. *Plant Physiol*, 1994, 105: 751—752.
- [8] Jost W, Glund K, Terpstra P, et al. Amino acid sequence of an intracellular, phosphate-starvation-induced ribonucleases from cultured tomato (*Lycopersicon peruvianum*) cells. *Eur J Biochem*, 1991, 198: 1—6.
- [9] Taylor C B, Bariola P A, del Cardayré S B, et al. RNS2: a senescence-associated RNase of *Arabidopsis* that diverged from the S-RNases before speciation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90: 5118—5122.
- [10] Broothaerts W, Janssens G A, Proost P, et al. cDNA cloning and molecular analysis of two self-incompatibility alleles from apple. *Plant Mol Biol*, 1995, 27: 499—511.
- [11] Ushijima K, Sassa H, Tao R, et al. Cloning and characterization of cDNAs encoding S-RNases from almond (*Prunus dulcis*): primary structural features and sequence diversity of the S-RNases in Rosaceae. *Mol Gen Genet*, 1998, 260: 261—268.
- [12] Van Damme E J, Hao Q, Barre A, et al. Major protein of resting rhizomes of *Claystegia sepium* (hedge ben-weed) closely resembles plant RNases but has no enzymatic activity. *Plant Physiol*, 2000, 122: 433—446.
- [13] Bariola P A, Howard C J, Taylor C B, et al. The *Arabidopsis* ribonuclease gene RNS1 is tightly controlled in response to phosphate limitation. *Plant J*, 1994, 6: 673—685.
- [14] Kock M, Löffler A, Abel S, et al. cDNA structure and regulatory properties of a family of starvation-induced ribonucleases from tomato. *Plant Mol Biol*, 1995, 27: 477—485.
- [15] Lers A, Khalditski A, Lomaniec E, et al. Senescence-induced RNases in tomato. *Plant Mol Biol*, 1998, 36: 439—449.