

菠萝 SLF/SFB 基因家族全基因组鉴定与表达分析

井敏敏, 李小针, 李栋梁, 戴小红, 顾帅磊, 马朝明, 陈志辉, 陈晶晶*

中国热带农业科学院南亚热带作物研究所/国家热带果树种质资源圃(湛江)/农业农村部热带果树生物学重点实验室, 广东湛江 524091

摘要: 自交不亲和性是高等植物通过抑制自花授粉来阻止近亲繁殖的一种繁殖机制。在以茄科、蔷薇科、车前草科为代表的配子体自交不亲和机制中, 花粉和雌蕊之间的自我/非自我识别由多态性 S 位点决定, 其中 *SLF* (*S-locus F-box*)/*SFB* (*S-haplotype-specific F-box*) 基因是配子体自交不亲和和花粉 S 决定因子。本研究通过生物信息学方法从菠萝基因组中筛选鉴定出 21 个 *SLF/SFB* 家族基因 (*AcSLF1~AcSLF21*), 各 *AcSLF* 基因在 N 端具有 F-box 保守结构域, 其氨基酸长度、理论等电点、分子量存在较大差异, 编码氨基酸序列大小范围为 242~612 aa, 分子量为 27.778~69.070 kDa, 其中 18 个 *AcSLFs* 蛋白偏碱性, 总体蛋白稳定性较差, 预测 18 个 *AcSLFs* 蛋白亚细胞定位于细胞核中, 蛋白二级结构 60%以上由 α -螺旋和无规则卷曲组成。通过染色体定位分析发现其不均匀地分布在 14 条染色体上, 其中 *AcSLF21* 未定位到具体染色体位置, 并发现 *AcSLF4*、*AcSLF5*、*AcSLF6*、*AcSLF8*、*AcSLF14* 和 *AcSLF15* 与菠萝 RNase T2 家族基因发生连锁。从进化关系中发现, 菠萝 *SLF/SFB* 家族与蔷薇科、车前科、茄科植物 *SLF/SFB* 进化关系较远。利用 qRT-PCR 对 *AcSLFs* 基因在菠萝雌蕊、雄蕊、叶片、果肉、茎和根的表达量进行分析, 结果发现 *AcSLFs* 基因在菠萝不同组织中具有明显的表达差异性, 其中 *AcSLF1*、*AcSLF2*、*AcSLF4*、*AcSLF9*、*AcSLF10*、*AcSLF11*、*AcSLF15*、*AcSLF19*、*AcSLF20*、*AcSLF21* 基因在菠萝雄蕊中呈高表达量, *AcSLF3*、*AcSLF7* 在果肉中表达量最高, *AcSLF5*、*AcSLF12*、*AcSLF18* 在根中表达量显著高于其他组织, 总体来说, 大部分菠萝 *AcSLFs* 基因主要在菠萝雄蕊或叶片中高表达。同时分析了雌蕊自花、异花授粉前后的表达变化, 发现 *AcSLF1*、*AcSLF2*、*AcSLF15* 三个基因在授粉雌蕊中的表达量较未授粉显著上调, 尤其在授粉 6 h 表达量急剧上调, 随着花粉管的伸长其表达量降低, 但在授粉 24 h 仍具有较高的表达量, 推测这些基因可能在菠萝自交不亲和中起到重要作用。该研究为菠萝 *SLF/SFB* 家族基因的克隆提供参考, 并为菠萝自交不亲和机制研究奠定良好基础。

关键词: 菠萝; *SLF/SFB* 基因家族; 生物信息学; 表达量分析

中图分类号: S668.3 文献标识码: A

Genome-wide Identification and Expressions Analysis of *SLF/SFB* Gene Family in Pineapple

JING Minmin, LI Xiaozhen, LI Dongliang, DAI Xiaohong, GU Shuailei, MA Chaoming, CHEN Zhihui, CHEN Jingjing*

South Subtropical Crops Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences / National Field Genebank for Tropical Fruit (Zhanjiang) / Key Laboratory of Tropical Fruit Tree Biology, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Zhanjiang, Guangdong 524091, China

Abstract: Self-incompatibility is a genetic mechanism to prevent self-fertilization and the consequent inbreeding and fitness decay in plant populations. In the gametophyte self-incompatibility mechanism represented by Solanaceae, Rosaceae and Plantaginaceae, the self/non-self recognition between pollen and pistil is determined by the polymorphic S locus. *SLF* (*S-locus F-box*)/*SFB* (*S-haplotype-specific F-box*) gene is the pollen S determinant of gametophyte

收稿日期 2022-08-03; 修回日期 2022-09-22

基金项目 国家重点研发计划专项 (No. 2019YFD1001104); 海南省自然科学基金项目 (No. 322QN377); 农业农村部物种资源保护项目 (No. 125163006000160001)。

作者简介 井敏敏 (1990—), 女, 硕士, 研究实习员, 研究方向: 热带果树种质资源。*通信作者 (Corresponding author): 陈晶晶 (CHEN Jingjing), E-mail: chenjingjing0704@163.com。

self-incompatibility. In this study, 21 *SLF/SFB* family genes were screened and identified based on the genome-wide of the pineapple. Each *AcSLF* gene had an F-box conserved domain at the N-terminal. There were great differences in amino acid length, theoretical isoelectric point and molecular weight. The size range of the encoded amino acid sequence was 242–612 aa, and the molecular weight was 27.778–69.070 kDa. The isoelectric point ranged from 5.70 to 9.57. 18 *AcSLF* proteins were alkaline and most proteins were unstability, only *AcSLF19*, *AcSLF21* were stability. It was predicted that 18 *AcSLF* proteins were located in the nucleus, one *AcSLF* protein in chloroplast, two *AcSLF* protein in both chloroplast and nucleus, and more than 60% of the secondary structure of the protein was composed of alpha helix and random coil. Bioinformatics analysis showed that the pineapple *SLF/SFB* family genes, which were unevenly distributed on 14 chromosomes, and the chromosome location of *AcSLF21* was undetermined. Furthermore, *AcSLF4*, *AcSLF5*, *AcSLF6*, *AcSLF8*, *AcSLF14* and *AcSLF15* were linked with *RNase T2* family genes, this was one of the main characteristics of pollen *SLF* gene. *AcSLF* genes contained different numbers of introns, most of which contained 1–2 introns, and *AcSLF3* contained 4 introns. Based on the above analysis results, it showed that *AcSLF* proteins had different characteristics. Phylogenetic analysis indicated that the evolutionary relationship of *AcSLFs* in pineapple was far away from the *SLF/SFB* in Rosaceae, Plantaginaceae and Solanaceae, the degree of clustering was low on the branches of evolutionary tree. The expression levels of the *AcSLF* genes in pistil, stamen, leaf, sarcocarp, stem and root were analyzed by qRT-PCR. The results showed that *AcSLFs* had obvious expression differences in different tissues of pineapple. *AcSLF1*, *AcSLF2*, *AcSLF4*, *AcSLF9*, *AcSLF10*, *AcSLF11*, *AcSLF15*, *AcSLF19*, *AcSLF20* and *AcSLF21* genes were highly expressed in pineapple stamens. The expression of *AcSLF3* and *AcSLF7* in sarcocarp was higher than that of other tissue, and *AcSLF5*, *AcSLF12*, *AcSLF18* were higher expression in root than other tissues. In general, most pineapple *AcSLF* genes are mainly expressed in pineapple stamens or leaves. It was found that the expression of *AcSLF1*, *AcSLF2*, *AcSLF15* genes in pollinated pistil were significantly up-regulated than that in non-pollinated pistil. Especially at 6 h after cross-pollination, the expression level was significantly higher than that of non-pollinated pistils. With the extension of the pollen tube in the pistil, the expression level decreased, but it still had a high expression at 24 h after pollination. And the expression trend of *AcSLF1*, *AcSLF2* and *AcSLF15* in cross-pollination was consistent with the growth of pollen tube in the pistil. Therefore, it is speculated that *AcSLF1*, *AcSLF2* and *AcSLF15* play an important role in pineapple self-incompatibility. This is the first time to analyze the expression pattern of *SLF/SFB* family genes in pineapple. This study would provide a reference for the cloning of pineapple *SLF/SFB* family genes, and basis for the study of pineapple self-incompatibility mechanism.

Keywords: pineapple; *SLF/SFB* gene family; bioinformatic; expression analysis

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2023.07.002

植物自交不亲和性 (self-incompatibility, SI) 是指绿色开花植物能产生正常的配子, 但自花不能正常授粉或授粉后不能正常结籽的一种生殖隔离现象^[1]。菠萝属于典型的自交不亲和植物, 除了部分野生种外, 多数菠萝品种自交不亲和, 无法产生种子, 而菠萝类群 *Ananas comosus* var. *Comosus* (主要是栽培菠萝) 自交不亲和表现尤为突出。目前普遍认为菠萝属于配子体自交不亲和类型^[2-3], 配子体自交不亲和是植物界分布最广泛的自交不亲和调控机制, 目前在蔷薇科、玄参科、茄科、罂粟科等配子体自交不亲和类型植物的研究中发现, 花柱自交不亲和的决定因子被确定为 *S-RNase* 基因, 花粉决定因子为编码 F-box 蛋白的 *SLF(S-locus F-box)/SFB(S-haplotype-specific F-box)* 基因^[4-5]。花柱分泌的 *S-RNase* 可进入花粉管, 通过自身的核糖核酸酶活性降解自花花

核糖核酸酶活性降解自花花粉管中的 rRNA, 造成花粉管细胞骨架解体^[6-7], 从而抑制花粉管生长, 造成自交不亲和, 与 *S-RNase* 互作的 *SLF/SFB* 可通过形成 SCF 复合体泛素化非自我 *S-RNase*, 泛素化的 *S-RNase* 最终被 26S 蛋白酶体降解^[8], 从而消除了 *S-RNase* 的细胞毒性作用, 花粉管可在花柱中继续生长。

迄今为止, 已经从茄科、蔷薇科和玄参科等多种配子体型自交不亲和植物中分离出近百个花柱关键基因 *S-RNase*^[9], 且其作用机制已研究较深入, 但花粉关键控制基因研究稍滞后。LAI 等^[10]通过对金鱼草 *S* 基因座进行长片段测序, 首次发现了 1 个与 *S₂-RNase* 紧密连锁的编码 F-box 蛋白的基因 *AhSLF-S₂*, 该基因在花粉中特异性表达。蔷薇科植物梅、扁桃中也鉴定出多个在花粉中特异性表达, 同时具有较高序列多态性的编码 F-box

蛋白的基因^[11-12]。在金鱼草及矮牵牛中利用转基因技术证实了 *S* 基因座中的 *F-box* 基因决定了花粉自交不亲和和特异性反应, 并命名为 *S-locus F-box (SLF)*^[13]。在蔷薇科植物中, 花粉 *S* 决定因子缺乏统一的命名, 苹果亚科花粉 *S* 候选基因被命名为 *S-locus F-box Brothers (SFBB)*^[14], 李属植物被命名为 *S-haplotype-specific F-box (SFB)*^[15]。

目前, 关于菠萝自交不亲和的研究主要集中在组织细胞学和田间杂交试验上, 菠萝自交不亲和的主要控制基因尚不明确。本研究利用生物信息学技术在菠萝基因组中分离出 21 个 SLF/SFB 家族成员, 并对其理化特性、基因结构、染色体分布、保守结构域以及系统进化关系进行详细分析, 并对各基因在菠萝不同组织中的表达模式进行分析, 同时对雌蕊授粉前后 *AcSLF* 基因的表达变化进行分析, 以期能为菠萝自交不亲和机制等方面研究提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料金菠萝 (MD2)、巴厘菠萝 (Comte De Paris) 种植于广东省湛江市亚热带作物研究所国家热带果树种质资源圃, 2 种材料均为自交不亲和材料, 且巴厘菠萝授粉金菠萝为亲和可育。收集金菠萝、巴厘菠萝成熟花粉至离心管, 用小毛刷蘸取花粉授于金菠萝柱头, 分别于授粉 2、6、24 h 后取花柱, 立即液氮冷冻, 同时采集金菠萝叶片、雄蕊、未授粉雌蕊、果肉、茎、根组织样品进行冷冻, 于 -80 °C 保存备用。

1.2 方法

1.2.1 菠萝 SLF/SFB 基因全基因组鉴定及理化特性分析 菠萝基因组数据从 Pineapple Genomics Database (<http://pineapple.zhangjisenlab.cn/pineapple/html/index.html>)^[16] 下载。从 NCBI 中下载已报道的 *SLF/SFB* 序列, 采用 MEGA 5 软件^[17] 进行 Clustal W 核苷酸序列比对, 然后利用 HMMER 软件的 Hmmbuild 生成 SLF/SFB 的 HMM 种子文件, 基于此种子文件, 筛选菠萝 *SLF/SFB* 基因。

利用 Expasy (<https://web.expasy.org/protparam/>) 在线软件进行理论等电点、蛋白分子量、不稳定指数、脂溶系数、疏水指数等分析。利用 Cell-PLoc 2.0 (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/Cell-PLoc-2/>) 在线软件预测亚细胞定位。利用 SOPMA (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=np

sa_sopma.html) 在线软件分析蛋白质二级结构。

1.2.2 菠萝 *AcSLF* 基因染色体定位 利用 TBtools^[18] 软件对菠萝 *AcSLF* 基因进行染色体定位作图。

1.2.3 菠萝 *AcSLF* 系统进化树构建 利用 MEGA5.0 软件构建菠萝 *AcSLF* 系统发育树, 进化树构建方法为邻接法 (Neighbor-joining method), bootstrap 值设置为 1000。

1.2.4 菠萝 *AcSLF* 基因结构及蛋白结构域分析 从菠萝基因组数据库获得 21 个 *AcSLFs* 的基因组和 CDS 序列, 使用 GSDS (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>)^[19] 在线软件绘制各基因的内含子-外显子结构图。蛋白结构域采用 SMART (<http://www.smart.embl-heidelberg.de/>) 在线软件进行分析, 并由 TBtools 软件进行可视化作图。

1.2.5 菠萝 *AcSLF* 基因表达分析 利用 OMGA RNA 提取试剂盒从菠萝不同组织 (叶片、雄蕊、雌蕊、果肉、茎、根以及授粉后雌蕊) 中提取总 RNA, 使用逆转录试剂盒合成 cDNA。利用 SYBR Green qPCR Master Mix 在 Quant Studio™ 6 Flex System 实时荧光定量 PCR 系统进行 qRT-PCR 分析, 内参基因为 *PP2A*^[20] (引物序列信息见表 1)。使用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 方法^[21] 计算各基因的相对表达水平。

2 结果与分析

2.1 菠萝 *SLF/SFB* 基因鉴定与理化特性分析

通过对菠萝基因组检索和鉴定, 共获得 21 个 *SLF/SFB* 基因, 按照其在染色体位置命名为 *AcSLF1~AcSLF21*。对 21 个菠萝 *AcSLFs* 进行理化特性分析, 结果显示, *AcSLFs* 在氨基酸长度、理论等电点、分子量有较大差异, *AcSLFs* 的氨基酸序列大小范围为 242~612 aa, 分子量介于 27.778~69.070 kDa 之间, 预测的 *AcSLFs* 的理论等电点 (pI) 为 5.70~9.57, 除 *AcSLF1*、*AcSLF5*、*AcSLF10*、*AcSLF15* 外, 其他蛋白偏碱性 (pI>7)。总体 *AcSLFs* 蛋白稳定性较差, 仅 *AcSLF19*、*AcSLF21* 较稳定 (表 2)。

利用 Cell-PLoc 2.0 软件预测蛋白质亚细胞定位, 预计有 18 种 *AcSLFs* 蛋白只定位于细胞核, *AcSLF4* 定位在叶绿体, *AcSLF7*、*AcSLF17* 在细胞核与叶绿体中均有分布。通过分析 *AcSLFs* 蛋白二级结构, 发现由 α -螺旋 (alpha helix)、延伸链 (extended strand)、 β -转角 (beta turn) 和无规则卷曲 (random coil) 4 种构型组成, 其中 α -螺旋和无规则卷曲占 60% 以上, 延伸链和 β -转角占

表 1 qRT-PCR 引物序列
Tab. 1 Sequence of qRT-PCR primers

引物名称 Primers name	正向引物序列 (5'-3') Forward primer sequence (5'-3')	反向引物序列 (5'-3') Reverse primer sequence (5'-3')
AcSLF1	TTCAAATGCGTGTCCAAGTC	GCAGTAGAACACCCAGAGG
AcSLF2	GCATCAAACCTCCAATCGCCAT	ATGAACTGCTTCCACGAGCC
AcSLF3	TAACACCACCACCTTCTA	TGACTGCTAACCATACCT
AcSLF4	CCTATTGCTACCGAATGGCTT	ATTGCCGCCATGAATTCGT
AcSLF5	GGCAGTCGTTAATAATGAG	CAGAGTGATCCAAGTGTT
AcSLF6	GGTGAAGTCCCTCCTCCGAT	ACGTAGGTTGCTTTGCCCTT
AcSLF7	ACCACCACTTCTCCAGATG	CTGCAGGGGAAGTATTCAG
AcSLF8	TGATGAACAACCTGCTTAT	TAGACCACTCTATGAAT
AcSLF9	CCTAATTCGGTGATCGTTGC	CGGTCAACACCTACAACGAGA
AcSLF10	GGCATTGGGAGCTTGATAA	CAAACCTCCCAAAACCTTGA
AcSLF11	ACCTGGTGCGAAAATCCCT	CCACTGAAGAAAATCGCCAGGA
AcSLF12	ATGGGCCCTGTCTTCTACGTT	ACCAACCAGAATGCCCACTCG
AcSLF13	CTTGCTATGATGGCTGCAAA	GCATAGATGCTCCCATTTGGT
AcSLF14	ATGAACGGAGAGTTGTAT	ATGATGGAATGGAGGATT
AcSLF15	ATTCTGAGTCGCCGACTTGC	ACTCTCCATAGCCGCGTCCA
AcSLF16	ATCCCTAGTGTTGCCCACTG	GCCTTCCATCTCCAAAATGA
AcSLF17	GCTGCCAACGAAATCTGTGCTT	ACCCAGCCCAAAATAGCTCT
AcSLF18	TGGATGCGAAGAAGACAGTG	CGAGTGCCATTGCTTACAAA
AcSLF19	AAGATCACGTTGCCGACGA	CCTATCCACCAGAGCCCACT
AcSLF20	GCAGACAAACTTGCCGCTA	ACACGCACAGCATAAAAGAGC
AcSLF21	GTTGAAGGATCGCGCTAAAG	CTTCTGGGTGCCATAAAAAA
PP2A	TTGTCATCGCTTCTCCAAG	GTGTTGTCCACCACAGTATGA

表 2 菠萝 SLF/SFB 基因家族成员特征
Tab. 2 Characteristics of SLF/SFB family genes in pineapple

基因名称 Gene name	基因 ID Gene ID	氨基酸 Amino acid	理论等电点 Theoretical pI	分子量 Molecular weight/kDa	不稳定指数 Instability index	脂肪系数 Aliphatic index	总平均亲水性 Grand average of hydropathicity
AcSLF1	Aco011265	346	5.95	38.794	45.41	79.51	-0.171
AcSLF2	Aco015095	447	8.46	50.346	47.20	88.79	0.013
AcSLF3	Aco012216	258	8.74	29.555	51.15	91.51	-0.067
AcSLF4	Aco001170	580	7.15	65.386	48.92	82.36	-0.333
AcSLF5	Aco001134	438	5.70	48.506	54.17	79.95	-0.277
AcSLF6	Aco000868	383	9.17	43.604	41.60	87.23	-0.317
AcSLF7	Aco013971	390	8.20	44.503	54.68	80.77	-0.181
AcSLF8	Aco014282	426	9.27	48.072	56.43	80.31	-0.307
AcSLF9	Aco007541	421	8.42	48.790	49.48	92.57	-0.092
AcSLF10	Aco010730	440	5.86	50.237	57.07	83.95	-0.193
AcSLF11	Aco005545	407	6.12	46.666	52.50	81.67	-0.131
AcSLF12	Aco018964	428	8.77	49.195	49.26	88.57	-0.083
AcSLF13	Aco024998	432	7.82	48.687	44.48	89.37	-0.073
AcSLF14	Aco004199	502	9.11	55.829	57.93	85.92	-0.166
AcSLF15	Aco004110	476	5.97	52.626	52.27	86.64	-0.214
AcSLF16	Aco003507	464	8.18	52.066	58.94	85.50	-0.172
AcSLF17	Aco003647	242	8.38	27.778	44.13	91.03	-0.258
AcSLF18	Aco021447	440	9.57	50.436	47.67	89.75	-0.281
AcSLF19	Aco007352	372	9.09	42.378	38.24	83.04	-0.065
AcSLF20	Aco013003	612	9.21	69.070	47.72	74.54	-0.459
AcSLF21	Aco031303	372	9.01	42.350	38.04	83.04	-0.062

30%左右，无规则卷曲占比最大约 50%（表 3）。

2.2 菠萝 *AcSLFs* 基因染色体定位

为明确菠萝 *AcSLFs* 基因在染色体上的分布，利用菠萝基因组数据库中的基因位置信息，使用 Ttools 软件对基因在染色体上位置进行可视化（图 1）。结果显示，*AcSLF21* 位于 scaffold_1507，尚未定位到具体染色体位置，其余染色体不均匀

地分布在 14 条染色体上，其中 *AcSLF3*、*AcSLF4*、*AcSLF5*、*AcSLF6* 位于 LG02 号染色体，大部分基因位于染色体两端。同时发现部分 *AcSLFs* 基因与菠萝 *RNase T2* 家族基因发生连锁，其中 *AcSLF4*、*AcSLF5*、*AcSLF6* 与 Aco001100 紧密连锁，*AcSLF8* 与 Aco004758 连锁，*AcSLF14*、*AcSLF15* 与 Aco00-4148 连锁。

表 3 菠萝 *AcSLFs* 蛋白亚细胞定位及二级结构分析

Tab. 3 Subcellular localization and protein secondary structure analysis of *AcSLFs* in pineapple

基因名称 Gene name	亚细胞定位 Subcellular location	α -螺旋 Alpha helix/%	延伸链 Extended strand/%	β -转角 Beta turn/%	无规则卷曲 Random coil/%
<i>AcSLF1</i>	Nucleus	18.50	28.61	3.18	49.71
<i>AcSLF2</i>	Nucleus	26.17	22.60	4.25	46.98
<i>AcSLF3</i>	Nucleus	45.35	12.02	2.33	40.31
<i>AcSLF4</i>	Chloroplast	29.83	16.38	7.07	46.72
<i>AcSLF5</i>	Nucleus	17.35	24.20	6.62	51.83
<i>AcSLF6</i>	Nucleus	17.75	26.63	3.92	51.70
<i>AcSLF7</i>	Chloroplast/Nucleus	16.41	29.74	5.38	48.46
<i>AcSLF8</i>	Nucleus	28.40	18.78	9.62	43.19
<i>AcSLF9</i>	Nucleus	16.86	26.60	4.04	52.49
<i>AcSLF10</i>	Nucleus	25.45	24.32	6.14	44.09
<i>AcSLF11</i>	Nucleus	22.60	24.57	6.14	46.68
<i>AcSLF12</i>	Nucleus	18.93	24.07	4.21	52.80
<i>AcSLF13</i>	Nucleus	22.69	24.77	4.17	48.38
<i>AcSLF14</i>	Nucleus	17.73	23.31	6.37	52.59
<i>AcSLF15</i>	Nucleus	25.63	16.81	6.09	51.47
<i>AcSLF16</i>	Nucleus	20.26	24.78	5.17	49.78
<i>AcSLF17</i>	Chloroplast/Nucleus	29.83	16.38	7.07	46.72
<i>AcSLF18</i>	Nucleus	20.45	25.91	5.45	48.18
<i>AcSLF19</i>	Nucleus	18.82	29.57	5.91	45.70
<i>AcSLF20</i>	Nucleus	28.27	18.14	4.74	48.86
<i>AcSLF21</i>	Nucleus	19.62	27.69	6.18	46.51

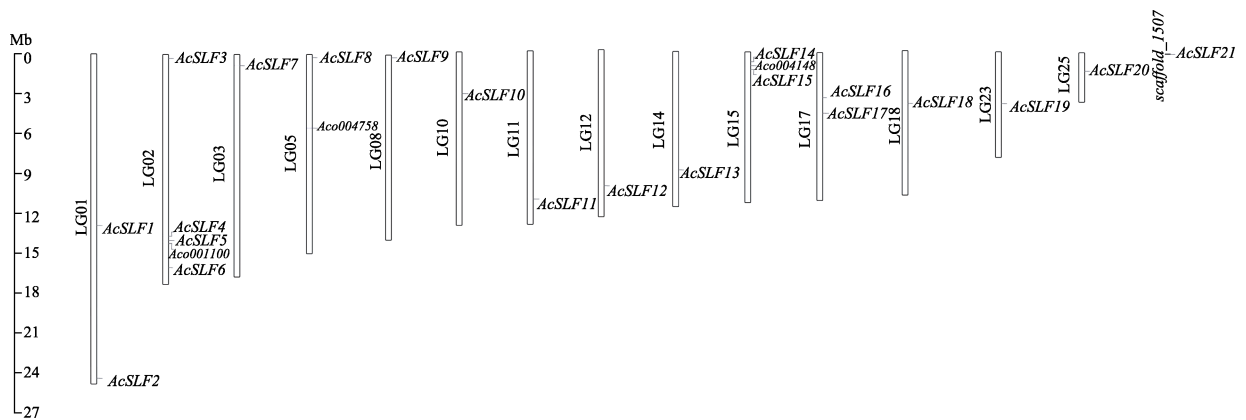


图 1 菠萝 *AcSLFs* 基因染色体定位

Fig. 1 Localization of *AcSLF* genes on pineapple chromosome

2.3 菠萝 *AcSLFs* 进化树构建

为了解菠萝 *AcSLFs* 蛋白之间进化关系, 将 21 个 *AcSLFs* 蛋白序列与苹果、梅、樱桃等蔷薇科植物、金鱼草车前科植物、番茄、矮牵牛等茄科植物的 *SLF/SFB* 蛋白序列进行多重序列比对, 通过 NJ 的方法使用 MEGA 6.0 软件构建系统进化树, 结果如图 2 所示 (蓝色表示茄科植物, 红色表示金鱼草车前科植物, 绿色表示蔷薇科植物, 黄色表示菠萝)。通过进化树分支聚类关系可以看出, 番茄、多毛番茄和矮牵牛的 *SLF*、*SLFL* 聚为一类, 苹果、梨、甜樱桃的 *SLFL*、*FBX* 和 *SFBB* 聚为一类, 甜樱桃、扁桃、梅的 *SFB* 聚为一类, 而菠萝 *AcSLFs* 与已报道的 *SLF/SFB* 蛋白均未聚类到一起, 说明菠萝 *AcSLFs* 与蔷薇科、车前科、茄科植物 *SLF/SFB* 进化关系较远, 在进化树分支

上聚类程度较低, 这也说明了单子叶植物菠萝与双子叶植物亲缘关系较远。

2.4 菠萝 *AcSLFs* 基因结构及蛋白结构域分析

在 21 个 *SLF/SFB* 家族成员中, 11 个 *AcSLFs* 基因均含有内含子, 其中 *AcSLF3* 含有 4 个内含子, 其他 10 个基因只包含 1~2 个内含子 (图 3A), 不同的 *AcSLFs* 基因含有内含子数量不同, 而内含子与基因分类无显著相关性。对 21 个菠萝 *AcSLFs* 基因进行蛋白结构域分析, 结果表明各 *AcSLFs* 基因在 N 端具有 F-box 保守结构域, 其中 *AcSLF17*、*AcSLF19*、*AcSLF21*、*AcSLF3* 只含有 F-box 结构域, 不含其他结构域, *AcSLF13*、*AcSLF16* 在 C 端具有 F-box 关联的 FBA 结构, 另外 *AcSLF20*、*AcSLF4*、*AcSLF15*、*AcSLF5*、*AcSLF8* 基因含有 Kelch 结构域 (图 3B)。

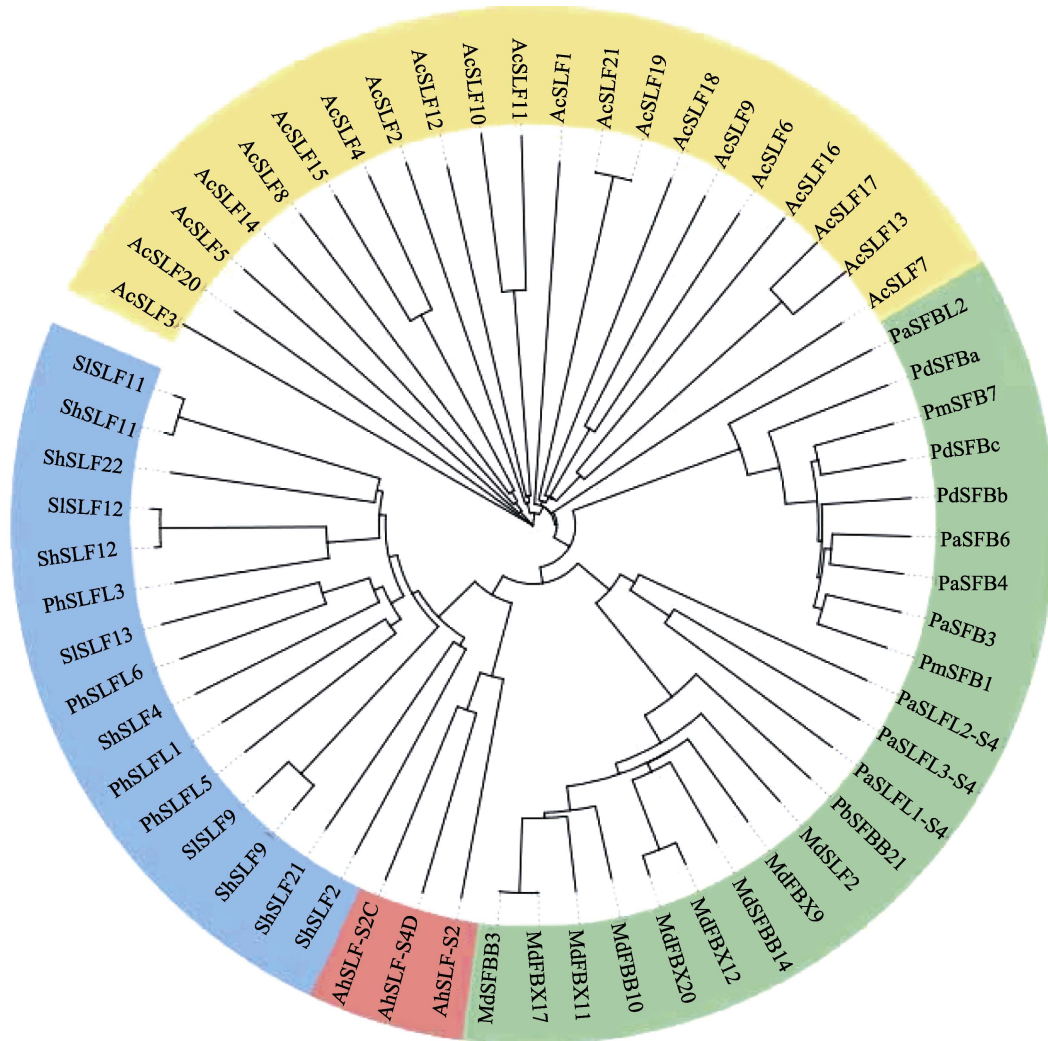
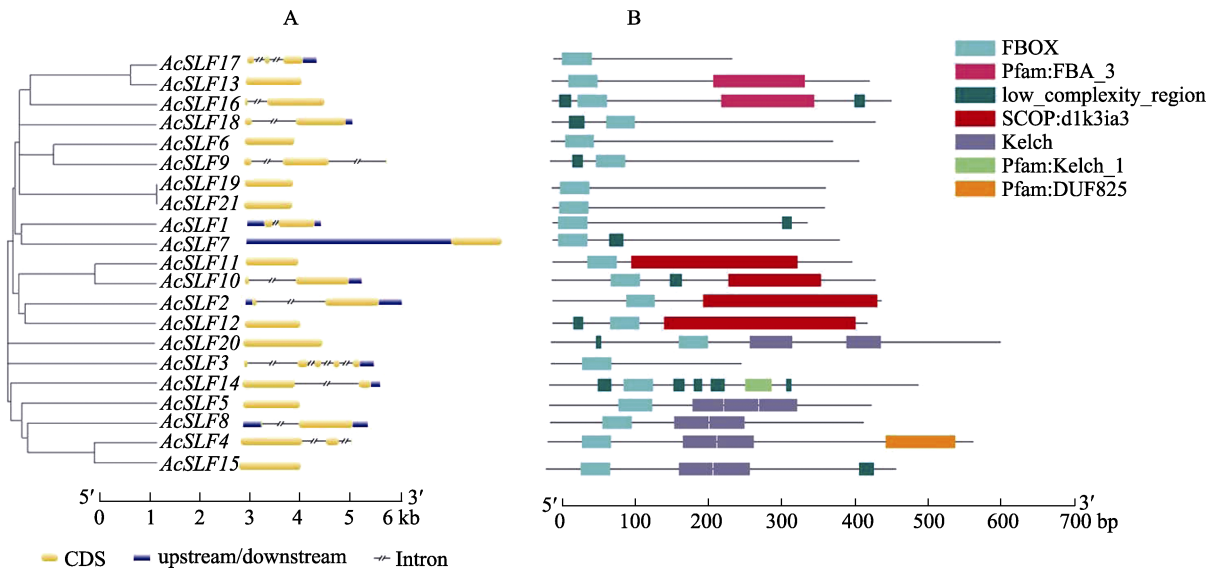


图 2 *AcSLFs* 系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree of *AcSLFs*

图 3 菠萝 *AcSLFs* 基因结构及保守结构域分析Fig. 3 Gene structure and protein conserved domain analysis of *AcSLF* genes in pineapple

2.5 菠萝 *AcSLFs* 基因组织表达分析

为了研究菠萝 *AcSLFs* 基因组织表达模式,通过 qRT-PCR 技术对 21 个 *AcSLFs* 基因在菠萝雄蕊、雌蕊、叶片、果肉、茎和根不同组织的表达量进行分析。结果显示(图 4),不同的 *AcSLFs* 基因在菠萝不同组织中表现出明显的表达差异,其中, *AcSLF1*、*AcSLF4*、*AcSLF13*、*AcSLF14*、*AcSLF15*、*AcSLF16* 和 *AcSLF17* 在叶片中呈最高表达量, *AcSLF3*、*AcSLF7* 在果肉中表达量最高, *AcSLF5*、*AcSLF12*、*AcSLF18* 在根中表达量高于其他组织, *AcSLF6* 在 6 个组织部位表达量均较低, *AcSLF1*、*AcSLF2*、*AcSLF4*、*AcSLF9*、*AcSLF10*、*AcSLF11*、*AcSLF15*、*AcSLF19*、*AcSLF20*、*AcSLF21* 在雄蕊中呈高表达量。总体来说,大部分菠萝 *AcSLFs* 基因主要在菠萝雄蕊或叶片中表达量高。

2.6 菠萝 *AcSLFs* 基因授粉前后的表达差异分析

通过对 21 个 *AcSLFs* 基因在未授粉金菠萝雌蕊、自花授粉 2、6、24 h 以及巴厘菠萝授金菠萝雌蕊 2、6、24 h 的表达分析发现, *AcSLF1*、*AcSLF2*、*AcSLF15* 三个基因在授粉后表达显著上调,尤其是异花授粉后 6 h,表达量显著高于未授粉雌蕊,在授粉后 24 h 同样具有较高表达量,同时异花授粉表达量高于自花授粉(图 5)。 *AcSLF5* 在自花授粉后表达上调,而异花授粉后几乎无表达, *AcSLF10*、*AcSLF11*、*AcSLF17*、*AcSLF19*、*AcSLF20* 和 *AcSLF21* 在异花授粉 6 h 稍上调表达。在配子体自交不亲和植物中,亲和与不亲和花粉均可在柱头上萌发生长,并伸入花柱, S-RNase 主要聚

集在花柱上端,当花粉管受到雌蕊分泌的 S-RNase 胁迫时,会启动相应保护机制,花粉管编码多个识别非自我 S-RNase 的 SLF 蛋白, SLF 蛋白可识别并泛素化非自我 S-RNase,使 S-RNase 丧失毒性,从而花粉管可继续生长,而“自身”花粉管在 S-RNase 的毒性下丧失活性停止生长^[22-23]。在菠萝授粉后, *AcSLF1*、*AcSLF2*、*AcSLF15* 基因异花授粉显著高于自花授粉,这说明“非自我”花粉 *SLF* 基因的高表达,有助于其更好地发挥解毒作用,暗示这 3 个基因在菠萝自交不亲和中发挥重要作用。

3 讨论

本研究通过全基因组检索鉴定了 21 个菠萝 *AcSLFs*,与矮牵牛 16~20 个 *SLF* 基因数目相当^[24],与柑橘中报道 113 个 *SLF/SLFL* 基因相差较多^[25]。 *AcSLFs* 在氨基酸长度、理论等电点、分子量有较大差异,且绝大多数 *AcSLFs* 蛋白为碱性蛋白,总体 *AcSLFs* 蛋白稳定性较差,仅 *AcSLF19*、*AcSLF21* 较稳定。基于 S-RNase 介导的自交不亲和反应,雌蕊 *S* 基因 *S-RNase* 周围存在多个 *SLF/SFB* 共同行使花粉 *S* 基因功能,通过形成 SCF 复合体泛素化非自我 S-RNase,从而 S-RNase 被 26S 蛋白酶体降解,而 SLF/SFB 无法识别降解自我 S-RNase,导致自交不亲和性^[26-27]。通过染色体定位分析,发现 20 个 *AcSLFs* 基因定位在 14 条染色体上, *AcSLF21* 未定位到具体染色体位置,同时发现 *AcSLF4*、*AcSLF5*、*AcSLF6*、*AcSLF8*、

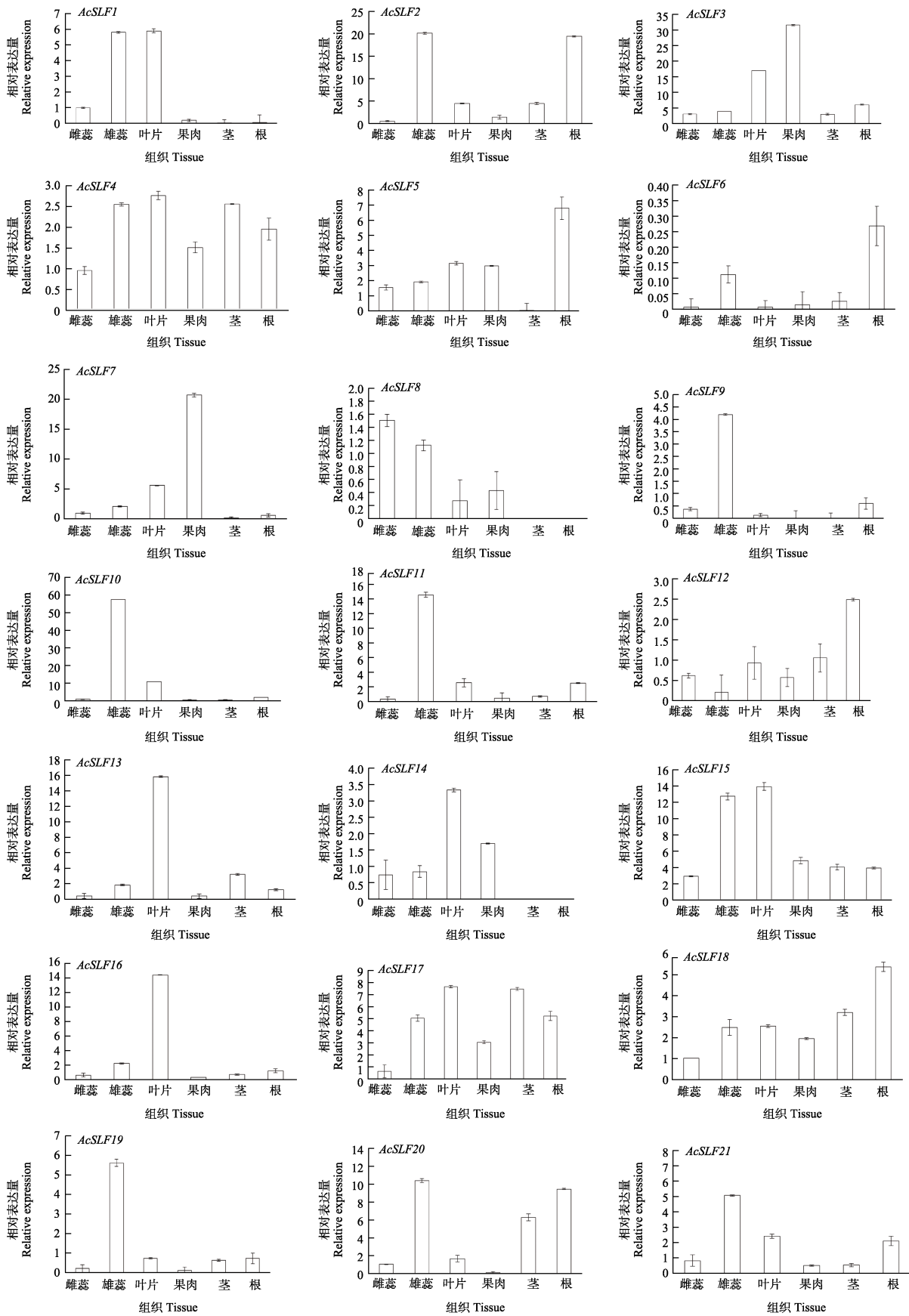
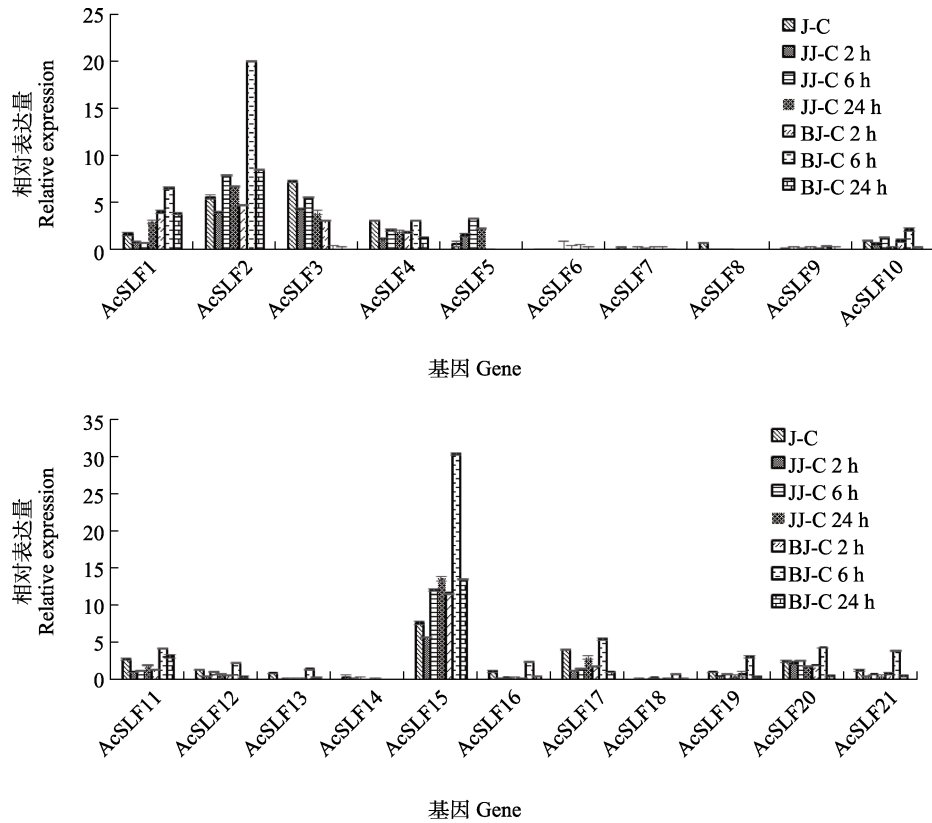


图 4 菠萝 *AcSLFs* 基因组织表达模式分析
 Fig. 4 Expression profile of *AcSLF* genes in pineapple



J-C: 金菠萝雌蕊; JJ-C: 金菠萝自交雌蕊; BJ-C: 巴厘菠萝授金菠萝雌蕊。

J-C: The pistil of 'MD2'; JJ-C: The self-pollination pistil of 'MD2'; BJ-C: The pistil of 'MD2' pollinated by 'Comte de Paris'.

图 5 *AcSLFs* 基因在自交/异交雌蕊中的表达分析

Fig. 5 Expression analysis of *AcSLF* genes in self-pollination/cross-pollination pistil

AcSLF14、*AcSLF15* 与菠萝 *RNase T2* 家族基因连锁, ZHAO 等^[28]在菠萝 LG15 染色体上发现存在 *RNase T2* 家族基因与 *F-box* 基因紧密连锁。WILLIAMS 等发现矮牵牛 *SLF* 基因均位于 *S-RNase* 基因序列的下游, 且与 *S-RNase* 具有相反的转录方向^[29-31], 目前尚不清楚是否所有配子体自交不亲和植物的 *S* 基因均具有此特性, 在菠萝中与 *S-RNase* 连锁的 *SLF* 基因 *AcSLF6*、*AcSLF15* 位于 *S-RNase* 基因下游, 其余几个基因位于上游, 且在菠萝中发现与 *S-RNase* 连锁的 *F-Box* 基因较少, 远远少于矮牵牛、柑橘等其他配子体自交不亲和物种。

菠萝 *AcSLFs* 基因组织表达分析发现 *AcSLF1*、*AcSLF2*、*AcSLF4*、*AcSLF8*、*AcSLF9*、*AcSLF10*、*AcSLF11*、*AcSLF15*、*AcSLF19*、*AcSLF20*、*AcSLF21* 在雄蕊中具有较高表达量, 其中 *AcSLF1*、*AcSLF2*、*AcSLF15* 基因在授粉后的花柱中表达显著上调, 且异花授粉显著高于自花授粉, 尤其在异花授粉 6 h 表达量急剧升高, 这说明异花授粉诱导了其表达, 随着花粉管在雌蕊中的伸长其表达量降低,

但在授粉 24 h 后仍然具有较高的表达量。张伟等^[32]研究发现神湾与亲和性不同的父本进行授粉 7 h 后, 亲和性强的花粉管已伸长至花柱中部。本研究前期利用苯胺蓝染色发现亲和花粉管在授粉 24 h 已达到花柱底端, 异花授粉后 *AcSLF1*、*AcSLF2*、*AcSLF15* 的表达趋势与花粉管的生长相吻合, 其表达模式表明 *AcSLF1*、*AcSLF2*、*AcSLF15* 可能是调控菠萝自交不亲和反应的重要因子。本研究只分析了 *AcSLFs* 在授粉后花柱包含花粉管一起的表达模式, 还需进一步建立体外花粉管培养及诱导不亲和反应, 分析其在花粉管中的表达模式及作用机制。本研究对菠萝 *SLF/SFB* 家族成员进行鉴定和表达分析, 有助于进一步寻找菠萝自交不亲和花粉 *S* 决定因子, 为研究菠萝自交不亲和机制研究提供良好的理论基础。

参考文献

- [1] MCCLURE B A, CRUZ-GARCIA F, ROMERO C. Compatibility and incompatibility in *S-RNase*-based systems[J]. *Annals of Botany*, 2011, 108(4): 647-658.

- [2] BREWBAKER J L, GORREZ D D. Genetics of self-incompatibility in the monocot genera, *Ananas* (pineapple) and *Gasteria*[J]. American Journal of Botany, 1967, 54: 611-616.
- [3] MAJUMDAR S K, KERNS K R, BREWBAKER J L. Assessing self-incompatibility in pineapple by a pollen fluorescence technique[J]. Proceedings of the American Society for Horticultural Science, 1964, 84: 217-223.
- [4] LEE H S, HUANG S, KAO T H. S proteins control rejection of incompatible pollen in *Petunia inflata*[J]. Nature, 1994, 367: 560-563.
- [5] SIJACIC P, WANG X, SKIPAN A L, WANG Y, DOWD P E, MCCUBBIN A G, HUANG S, KAO T. Identification of the pollen determinant of S-RNase-mediated self-incompatibility[J]. Nature, 2004, 429: 2-5.
- [6] JUAN A R, HERNAN J R, GOLDRAIJ A. Disorganization of F-actin cytoskeleton precedes vacuolar disruption in pollen tubes during the in vivo self-incompatibility response in *Nicotiana glauca*[J]. Annals of Botany, 2012, 110(4): 787-795.
- [7] YANG Q, MENG D, GU Z, LI W, CHEN Q J, LI Y, YUAN H, YU J, LIU C S, LI T Z. Apple S-RNase interacts with an actin-binding protein, MdMVG, to reduce pollen tube growth by inhibiting its actin-severing activity at the early stage of self-pollination induction[J]. The Plant Journal, 2018, 95(1): 41-56.
- [8] SUN P, KAO T H. Self-incompatibility in *Petunia inflata*: the relationship between a self-incompatibility locus F-box protein and its non-self S-RNase[J]. Plant Cell, 2013, 25(2): 470-485.
- [9] 何敏, 谷超, 吴巨友, 张绍铃. 果树自交不亲和和机制研究进展[J]. 园艺学报, 2021, 48(4): 759-777.
HE M, GU C, WU J Y, ZHANG S L. Recent advances on self-incompatibility mechanism in fruit trees[J]. Acta Horticulture Sinica, 2021, 48(4): 759-777. (in Chinese)
- [10] LAI Z, MA W, HAN B, LIANG L Z, ZHANG Y S, HONG G F, XUE Y B. An F-box gene linked to the self-incompatibility (S) locus of *Antirrhinum* expressed specifically in pollen and tapetum[J]. Plant Molecular Biology, 2002, 50(1): 29-41.
- [11] ENTANI T, IWANO M, SHIBA H, CHE F S, ISOGAI A, TAKAYAMA S. Comparative analysis of the self-incompatibility (S-) locus region of *Prunus mume*: identification of a pollen-expressed F-box gene with allelic diversity[J]. Genes Cells, 2003, 8(3): 203-213.
- [12] USHIJIMA K, YAMANE H, WATARI A, KAKEHI E, IKEDA K, HAUCK N R, IEZZONI A F, TAO R. The S haplotype-specific F-box protein gene, *SFB*, is defective in self-compatible haplotypes of *Prunus avium* and *P. mume*[J]. The Plant Journal, 2004, 39(4): 573-586.
- [13] QIAO H, WANG F, ZHAO L, ZHOU J L, LAI Z, ZHANG Y S, ROBBINS T P, XUE Y B. The F-box protein AhSLF-S2 controls the pollen function of S-RNase-based self-incompatibility[J]. Plant Cell, 2004, 16(9): 2307-2322.
- [14] KAKUI H, KATO M, USHIJIMA K, KITAGUCHI M, KATO S, SASSA H. Sequence divergence and loss-of-function phenotypes of S locus F-box brothers genes are consistent with non-self recognition by multiple pollen determinants in self-incompatibility of Japanese pear (*Pyrus pyrifolia*)[J]. Plant Journal, 2011, 68(6): 1028-1038.
- [15] YAMANE H, IKEDA K, USHIJIMA K, SASSA H, TAO R. A pollen-expressed gene for a novel protein with an F-box motif that is very tightly linked to a gene for S-RNase in two species of cherry, *Prunus cerasus* and *P. avium*[J]. Plant Cell Physiology, 2003, 44(7): 764-769.
- [16] XU H, YU Q, SHI Y, HUA X T, TANG H B, YANG L, MING R, ZHANG J S. PGD: pineapple genomics database[J]. Horticulture Research, 2018, 17(5): 66.
- [17] TAMURA K, PETERSON D, PETERSON N, STECHER G, NEI M, KUMAR S. MEGA5: molecular evolution analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods[J]. Molecular Biology Evolution, 2011, 28(10): 2731-2739.
- [18] CHEN C J, CHEN H, ZHANG Y, THOMAS H R, FRANK M H, HE Y H, XIA R. TBtools: an integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data[J]. Molecular Plant, 2020, 13(8): 1194-1202.
- [19] HU B, JIN J P, GUO A Y, ZHANG H, LUO J C, GAO G. GSDB 2.0: an upgraded gene feature visualization server[J]. Bioinformatics, 2015, 31(8): 1296-1297.
- [20] CHEN H H, HU B Y, ZHAO L H, SHI D D, SHE Z Y, HUANG X Y, PRIYADARSHANI S V G N, NIU X P, QIN Y. Differential expression analysis of reference genes in pineapple (*Ananas comosus* L.) during reproductive development and response to abiotic stress, hormonal stimuli[J]. Tropical Plant Biology, 2019, 12(2): 67-77.
- [21] LIVAK K J, SCHMITTGEN 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.
- [22] KAO T H, TSUKAMOTO T. The molecular and genetic bases of S-RNase-based self-incompatibility[J]. Plant Cell, 2004, 16 (Suppl): S72-S83.
- [23] AHMAD M H, RAO M J, HU J B, XU Q, LIU C C, CAO Z H, LARKIN R M, DENG X X, BOSCH M, CHAI L J. Systems and breakdown of self-incompatibility[J]. Critical Reviews in Plant Sciences, 2022, 41(3): 209-239.
- [24] WU L H, WILLIAMS J S, SUN L H, KAO T. Sequence

- analysis of the *Petunia inflata* S-locus region containing 17 S-Locus F-Box genes and the *S-RNase* gene involved in self-incompatibility[J]. *The Plant Journal*, 2020, 104: 1348-1368.
- [25] 梁梅. 柑橘自交不亲和相关基因鉴定及其演化[D]. 武汉: 华中农业大学, 2019.
- LIANG M. Gene identification and evolution of self-incompatibility of citrus[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2019. (in Chinese)
- [26] HUA Z, KAO T H. Identification and characterization of components of a putative petunia S-locus F-box-containing E3 ligase complex involved in S-RNase-based self-incompatibility[J]. *Plant Cell*, 2006, 18(10): 2531-2553.
- [27] LIANG M, CAO Z, ZHU A, LIU Y L, TAO M Q, YANG H Y, XU Q, WANG S H, LIU J J, LI Y P, CHEN C W, XIE Z Z, DENG C L, YE J L, GUO W W, XU Q, XIA R, LARKIN R M, DENG X X, BOSCH M, FRANKLINTONG V E, CHAI L J. Evolution of self-compatibility by a mutant *Sm-RNase* in citrus[J]. *Nature Plants*, 2020, 6: 131-142.
- [28] ZHAO H, ZHANG Y, ZHANG H, SONG Y Z, ZHAO F, ZHANG Y E, ZHU S H, ZHANG H K, ZHOU Z D, GUO H, LI M M, LI J H, HAN Q Q, COPSEY L, LI Q, CHEN H, COEN E, ZAHNG Y J, XUE Y B. Origin, loss and regain of self-incompatibility in angiosperms[J]. *Plant Cell*, 2022, 43(1): 579-596.
- [29] WILLIAMS J S, DER J P, DEPAMPHILIS C W, KAO T. Transcriptome analysis reveals the same 17 S-locus F-box genes in two haplotypes of the self-incompatibility locus of *Petunia inflata*[J]. *Plant Cell*, 2014, 26(7): 2873-2888.
- [30] WILLIAMS J S, NATALE C A, WANG N, LI S, BRUBAKER T, SUN P L, KAO T. Four previously identified *Petunia inflata* S-locus F-box genes are involved in pollen specificity in self-incompatibility[J]. *Molecular Plant*, 2014, 7(3): 567-569.
- [31] IKEDA K, IGIC B, USHIJIMA K, YAMANE H, HAUCK N R, NAKANO R, SASSA H, IEZZONI A F, KOHN J R, TAO R. Primary structural features of the S haplotype-specific F-box protein, SFB, in *Prunus*[J]. *Sexual Plant Reproduction*, 2004, 16(5): 235-243.
- [32] 张伟, 何业华, 栾爱萍, 李晶晶, 吴竞, 谢桃, 丁雅琦, 薛彪, 刘朝阳. ‘神湾’菠萝与亲缘关系不同的父本的交配亲和性研究[C]. 郑州: 中国园艺学会, 2019: 90.
- ZAHNG W, HE Y H, LUAN A P, LI J J, WU J, XIE T, DING Y Q, XUE B, LIU C Y. Study on pollination compatibility of ‘Shenwan’ pineapple with different paternal relationship[C]. Zhengzhou: Chinese Society for Horticultural Science, 2019: 90. (in Chinese)