

苹果新品种自交不亲和基因型的分子生物学鉴定

张雪梅¹, 李保国^{1*}, 崔惠英², 齐国辉¹

(¹ 河北农业大学西校区林学院, 河北保定 071000; ² 河北省林业技术推广总站, 石家庄 050081)

摘要: 根据保守氨基酸序列 FTQQYQ 和 anti-¹/_M WPNV 设计苹果自交不亲和基因引物 P₁: 5'-TT-TACGCAGCAATATCAG-3'; P₂: 5'-ACGTTCGGCCAAATA/CATT-3', 利用 PCR-RFLP 分析方法, 以河北省新引进的苹果品种美国 8 号、昂林、松本锦、华冠、南方脆幼叶为试验材料, 鉴定其自交不亲和基因型分别为 S₉S₂₇、S₁S₉、S₉S₉、S₂S₉、S₂S₉。

关键词: 苹果; 自交不亲和基因型; 分离; 鉴定

中图分类号: S 661.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2007) 03-0747-04

Molecular Biology Identification of Self-incompatibility Genotypes of New Apple Cultivars

ZHANG Xue-mei¹, LI Bao-guo^{1*}, CUI Hui-ying², and QI Guo-hui¹

(¹ College of Forestry, Agricultural University of Hebei, Baoding, Hebei 071000, China; ² General Spreading Station of Forestry Technique of Hebei Province, Shijiazhuang 050081, China)

Abstract: Five new apple cultivars, USA No. 8, Korin, Matsumoto Nishiki, Huaguan and Nanfangcui, which were introduced into Hebei Province recently, were used as materials in the present study. The primers (P₁: 5'-TTTACGCAGCAATATCAG-3'; P₂: 5'-ACGTTCGGCCAAATA/CATT-3') were newly designed according to the conserved sequence of amino acid of S-RNase. The self-incompatibility alleles of the cultivars were isolated and identified using PCR-RFLP analysis. Based on the results, the self-incompatibility genotypes of the cultivars were identified as S₉S₂₇, S₁S₉, S₉S₉, S₂S₉ and S₂S₉, respectively.

Key words: Apple; Self-incompatibility genotype; Isolation; Identification

苹果 (*Malus domestica* Borkh.) 属于配子体自交不亲和类型, 由一个基因座上的复等位基因 - S 基因控制 (de Nettancourt, 1977), 如果不了解品种的 S 基因型, 在建国选配授粉品种时就具有一定的盲目性。河北省近几年引进了 '美国 8 号'、'昂林'、'松本锦'、'华冠'、'南方脆' 等苹果品种, 这些品种在原产地并没有进行 S 基因型鉴定, 虽然有经验性配置授粉品种的报道, 但河北本地并没有这些授粉品种。为此, 以这些新品种为试验材料, 利用 PCR-RFLP 分析方法鉴定它们的自交不亲和基因型。

1 材料与方法

供试材料昂林苹果栽植于河北省内丘县富岗山庄百花园中, 4 年生; 美国 8 号、松本锦、华冠、南方脆栽植于河北省满城县绿龙果品有限公司标本园中, 3 年生。春季采集嫩叶放入冰壶, 带回实验室后于 -70℃ 保存备用。

按 Doyle 等 (1990) 的方法提取基因组 DNA, 根据苹果 S 等位基因 C₁ 区的保守氨基酸序列 FTQQYQ (Shogo & Kentaro, 2000) 和 HV 区下游的 "anti-¹/_M WPNV", 分别设计正向引物 P₁ (5'-TT-

收稿日期: 2006-10-24; 修回日期: 2007-05-08

基金项目: 河北农业大学将帅基金资助项目

* 通讯作者 Author for correspondence (E-mail: lbg888@163.com)

TACGCA GCAATATCAG -3') 和反向引物 P_2 (5'-ACGTTCGGCCAAATA/CATT-3'), 由宝生物工程 (大连) 有限公司合成。20 μ L 的 PCR 反应体系为: 5 U/ μ L *Taq* DNA 聚合酶 1 U, 25 mmol/L dNTPs 2 μ L, 10 μ mol/L 引物 2 μ L, 25 mmol/L Mg^{2+} 2 μ L, 模板 DNA 40 ng, 10 \times PCR Buffer 2 μ L, 补充 ddH₂O 至 20 μ L。PCR 扩增程序参照谭晓风等 (2002) 的方法。反应结束后, 在 1.5% 的琼脂糖凝胶上电泳 1 h, 溴化乙锭 (EB) 染色法检测 PCR 产物及酶切情况。

根据 PCR 产物片段大小分别用 9 种限制性内切酶进行酶切。

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增结果

通用引物扩增结果如图 1, 5 个苹果品种都含有一条 340 bp 左右的片段, 昂林还含有一条 530 bp 左右的片段, 美国 8 号含有一条 1 200 bp 左右的片段。

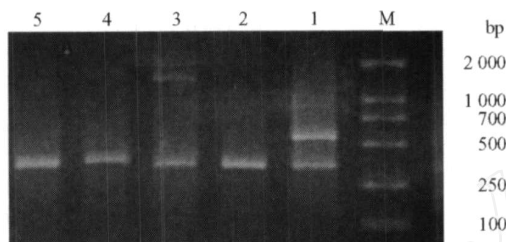


图 1 苹果 *S* 基因的 PCR 扩增结果

1. 昂林; 2. 南方脆; 3. 美国 8 号; 4. 华冠; 5. 松本锦。

Fig. 1 PCR amplification result of apple *S*-alleles

1. Korin; 2. Nanfangcui; 3. USA No. 8; 4. Huaguan; 5. Matsumoto Nishiki; M. DNA marker

2.2 酶切结果

2.2.1 S_9 -等位基因的酶切鉴定 根据前人对苹果自交不亲和基因的研究, PCR 扩增产物为 340 bp 左右的片段有 S_2 、 S_7 、 S_9 和 S_{30} (Janssens et al, 1995; Shogo & Kentaro, 2000)。因此, 分别用 S_2 、 S_7 、 S_9 和 S_{30} 等位基因的限制性内切酶 (*EcoR*、*Acc*、*Kpn*、*EcoR*) 对 340 bp 左右的片段进行了酶切。*EcoR* 限制性内切酶 5 个苹果品种酶切结果如图 2 (其它没有酶切产物的酶切图谱略)。可以看出, 5 个品种均有一条 340 bp 左右的片段被切开, 酶切产物大小分别为 212 bp 和 131 bp, 符合 S_9 -等位基因被 *EcoR* 切割的情况 (Shogo & Kentaro, 2000), 因此, 可以确定该 5 个品种均含有 S_9 -等位基因。

松本锦苹果两个 S 等位基因 PCR 扩增产物同时被切割, 并产生同样大小的片段, 片段大小为 212 bp 和 131 bp, 推测松本锦两个 S -等位基因均为 S_9 -等位基因, 因此该品种有可能是 S_9 -等位基因的纯合体 S_9S_9 。

华冠、南方脆两个品种除 S_9 -等位基因外, S -等位基因 PCR 扩增产物还有一条接近 340 bp 左右的片段没有被切开。这两个苹果品种的亲本分别为, 华冠: 金冠 (S_2S_3) \times 富士 (S_1S_9) (张顺妮和过国南, 2002); 南方脆: 嘎啦 (S_2S_5) \times 华丽 (未知) (邓丰产和安贵阳, 2000)。据此可知含 S_9 -等位基因的亲本分别为富士和华丽。苹果属于配子体自交不亲和类型 (de Nettancourt, 1977), 其杂交后代的两个 S -等位基因分别来自父本和母本。由此可知, 华冠和南方脆两个品种中没有被切开的 S -等位基因应分别来源于其亲本金冠 (S_2S_3) 和嘎啦 (S_2S_5), 而 S_2 、 S_3 和 S_5 等位基因的片段长度分别为 349、1 300 和 1 600 bp (Janssens et al, 1995; Shogo & Kentaro, 2000), 可以推测华冠、南方脆两个苹果品种没有被 *EcoR* 切开的 S 基因应为 S_2 -等位基因, 其基因型均为 S_2S_9 。

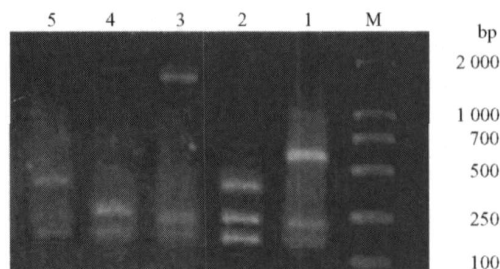


图 2 EcoR 酶切图谱

1. 昂林; 2. 南方脆; 3. 美国 8 号; 4. 松本锦; 5. 华冠。

Fig 2 Restriction pattern of the cultivars analyzed

1. Korin; 2. Nanfangcui; 3. USA No. 8; 4. Matsumoto Nishiki; 5. Huaguan; M. DNA marker

2.2.2 S_1 - 等位基因的酶切鉴定 ‘昂林’ 苹果的 S - 等位基因 PCR 扩增产物中含有一条 530 bp 左右的片段。苹果自交不亲和基因中 530 bp 左右的 S 基因片段有 S_1 、 S_{20} 和 S_7 。由与其对应的 3 种限制性内切酶酶切图谱 (图 3) 可知, S_1 - 等位基因的限制性内切酶 Afa (Rsa) 能将此片段切开, 酶切产物大小为 320 bp 和 210 bp 左右的片段, 符合 S_1 等位基因被切割的情况, 因此昂林苹果的基因型为 $S_1 S_9$ 。

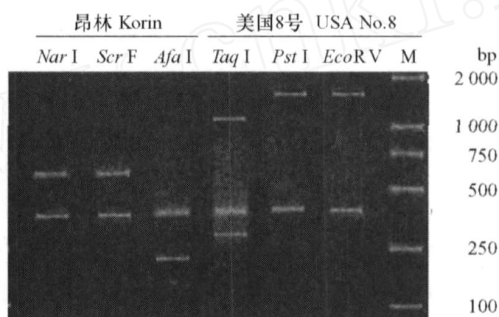


图 3 美国 8 号和昂林苹果的酶切鉴定

Fig 3 Restriction patterns of USA No. 8 and Korin

2.2.3 S_{27} 等位基因的酶切鉴定 美国 8 号苹果的 S - 等位基因中含有一条 1 200 bp 左右的片段, 而 1 200 bp 左右的 S 基因片段有 S_3 、 S_5 和 S_{27} (Janssens et al, 1995; Shogo & Kentaro, 2000)。与其对应的 3 种限制性内切酶依次为: $EcoR$ 、 Pst 、 Taq 。由此 (图 3) 可知, S_{27} 等位基因的限制性内切酶 Taq 能将此片段切开, 酶切产物大小为 1 000 bp 和 200 bp 左右的片段, 符合 S_{27} 等位基因被切割的情况, 因此可以确定美国 8 号苹果的基因型为 $S_9 S_{27}$ 。

References

- de Nettancourt D. 1977. Incompatibility in angiosperms. New York: Springer-Verlag: 1 - 29.
- Deng Feng-chan, An Gui-yang. 2000. New apple cultivar Nanfangcui. Northwest Horticulture, (3): 31. (in Chinese)
- 邓丰产, 安贵阳. 2000. 苹果新品种南方脆. 西北园艺, (3): 31.
- Doyle J L, Doyle J J. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus, 12: 13 - 15.
- Janssens G A, Goderis I J, Broekaert W F, Brothaerts W. 1995. A molecular method for S -allele identification in apple based on allele-specific PCR. Theor Appl Genet, 91: 691 - 698.
- Shogo Kitahara, Kentaro Kitahara. 2000. Discovery of a new self-incompatibility allele in apple. HortScience, 35 (7): 1329 - 1332.
- Tan Xiao-feng, Hu Fang-ming, Zhang Dang-quan, Zhou Xu-hui, Yang Wei. 2002. Molecular identification of main cultivars of *Torreya grandis*.

by RAPD markers Acta Horticulturae Sinica, 29 (1): 69 - 71. (in Chinese)

谭晓风, 胡芳名, 张党权, 周熙惠, 杨 伟. 2002 香榧主要栽培品种的 RAPD 分析. 园艺学报, 29 (1): 69 - 71.

Zhang Shun-ni, Guo Guo-nan 2002, Cultivating present situation, economic performance and the development foreground of Huaguan and short Huaguan The Yantai Fruit Tree, (2): 3 - 4. (in Chinese)

张顺妮, 过国南. 2002 华冠及短枝华冠的栽培现状、经济效益和发展前景. 烟台果树, (2): 3 - 4.

1-MCP对苹果果皮酚类物质及其抗氧化活性的影响

李玲玲¹, 陈 新¹, 穆清泉², 张元湖^{1*}, 张立华¹, 李杨昕¹ (¹ 山东农业大学生命科学学院, 山东泰安 271018; ² 临沂市农业科学院, 山东临沂 276000)

Effects of 1-MCP on Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Apple

LI Ling-ling¹, CHEN Xin¹, MU Qing-quan², ZHANG Yuan-hu^{1*}, ZHANG Li-hua¹, and LI Yang-xin¹ (¹ College of Life Science, Shandong Agricultural University, Tai'an, Shandong 271018, China; ² Linyi Academy of Agricultural Sciences, Linyi, Shandong 276000, China)

关键词: 苹果; 1-MCP; 酚类物质; 抗氧化活性

中图分类号: S 661.1 文献标识码: A 文章编号: 0513-353X (2007) 03-0750-01

1-MCP (1-甲基环丙烯) 作为乙烯作用抑制剂, 已经在果品保鲜中广泛应用。大量研究表明, 多酚类化合物是果实中重要的抗氧化剂成分, 是反映果实品质的重要指标之一。1-MCP使用后是否影响苹果果实中多酚类物质的含量及抗氧化活性尚未见报道。

试材 ‘红星’ 苹果于商业采摘期 (2005 - 09 - 04) 采自泰安市郊区果园。分别使用 0.2 和 0.5 $\mu\text{L} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 1-MCP 处理果实, 无 1-MCP 处理的为对照。每周取样 1 次, 随机取 15 个果实, 测定果皮中类黄酮 (碱性硝酸铝法)、多酚 (Folin-Ciocalteu 法) 的含量及对 DPPH \cdot (2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical)、ABTS $^{\cdot+}$ [2, 2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium radical] 的清除能力。以 TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) 表示果皮对 ABTS $^{\cdot+}$ 的清除能力。

结果 (表 1) 表明, 在常温贮存的前 4 周, 0.5 $\mu\text{L} \cdot \text{L}^{-1}$ 1-MCP 处理的果实果皮中类黄酮、游离酚、总酚的含量及对自由基的清除能力明显高于对照果实。0.2 $\mu\text{L} \cdot \text{L}^{-1}$ 1-MCP 处理的效果不明显。

表 1 红星苹果常温 (25℃) 贮藏条件下果皮中酚类物质的含量及抗氧化能力的变化

Table 1 Changes of phenolics and antioxidant activity of peel of Starking apple at ambient temperature (25℃)

贮藏时间 Storage time (d)	1-MCP ($\mu\text{L} \cdot \text{L}^{-1}$)	类黄酮 Flavonoids ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	游离酚 Free phenolics ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	总酚 Total phenolics ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	DPPH \cdot 清除率 Scavenging (%)	TEAC ($\text{mmol} \cdot \text{g}^{-1}$)
0	0	23.98 \pm 0.13a	6.82 \pm 0.007a	9.72 \pm 0.213a	54.6 \pm 0.012a	0.652 \pm 0.003a
	0.2	23.98 \pm 0.13a	6.82 \pm 0.007a	9.72 \pm 0.213a	54.6 \pm 0.005a	0.652 \pm 0.003a
	0.5	23.98 \pm 0.13a	6.82 \pm 0.007a	9.72 \pm 0.213a	54.6 \pm 0.012a	0.652 \pm 0.007a
7	0	22.62 \pm 0.19b	6.67 \pm 0.026b	9.75 \pm 0.116b	47.5 \pm 0.007b	0.611 \pm 0.005b
	0.2	22.30 \pm 0.22b	6.44 \pm 0.048b	9.16 \pm 0.090b	48.8 \pm 0.003b	0.606 \pm 0.003b
	0.5	24.73 \pm 0.26a	7.18 \pm 0.034a	10.86 \pm 0.134a	53.4 \pm 0.012a	0.638 \pm 0.005a
14	0	23.03 \pm 0.13b	6.60 \pm 0.052b	9.99 \pm 0.169b	49.7 \pm 0.016c	0.622 \pm 0.005c
	0.2	23.94 \pm 0.23b	6.84 \pm 0.014b	10.33 \pm 0.106b	55.1 \pm 0.006b	0.663 \pm 0.004b
	0.5	24.98 \pm 0.14a	7.16 \pm 0.079a	11.95 \pm 0.319b	57.6 \pm 0.012a	0.680 \pm 0.002a
21	0	23.11 \pm 0.24b	6.60 \pm 0.028b	11.11 \pm 0.135b	53.7 \pm 0.009b	0.669 \pm 0.003ab
	0.2	22.19 \pm 0.25b	6.65 \pm 0.054b	10.77 \pm 0.311b	52.7 \pm 0.012b	0.661 \pm 0.001b
	0.5	26.18 \pm 0.50a	7.20 \pm 0.036a	11.73 \pm 0.197a	60.1 \pm 0.007a	0.690 \pm 0.003a
28	0	20.43 \pm 0.28b	6.71 \pm 0.09a	10.38 \pm 0.100b	47.6 \pm 0.014c	0.652 \pm 0.004c
	0.2	20.17 \pm 0.15b	6.29 \pm 0.017b	10.63 \pm 0.059a	48.7 \pm 0.020b	0.665 \pm 0.003b
	0.5	20.88 \pm 0.19a	6.40 \pm 0.002a	10.63 \pm 0.156a	49.9 \pm 0.023a	0.678 \pm 0.002a

注: 表中数据为平均值 \pm 标准误 (n=3)。字母不同表示差异显著。

Note: Values in the table are means \pm SE (n=3). Value followed by different letters denote significant difference

收稿日期: 2006 - 12 - 13; 修回日期: 2007 - 04 - 06

*通讯作者 Author for correspondence (E-mail: yyhzhang@sdau.edu.cn)