

苹果果实酸/低酸性状的 SSR 分析

姚玉新¹ 翟衡^{1*} 赵玲玲¹ 伊凯² 刘志² 宋烨¹

(¹ 山东农业大学园艺科学与工程学院, 泰安 271018; ² 辽宁省果树科学研究所, 熊岳 115214)

摘要: 以 91 株 ‘东光’ 和 ‘富士’ 的正反交 F_1 代群体为试材, 测定了成熟果实可滴定酸含量和果实不同发育阶段苹果酸含量的变化, 从表型上分析了苹果酸的遗传规律。利用 140 对共显性遗传的 SSR 引物对高酸和低酸个体群体分离分析, 筛选到一个与果实酸/低酸性状连锁的标记 SDY085, 遗传距离为 8.89 cM, 表型分析和标记分析都表明苹果果实酸/低酸性状由一对主效基因 Ma/ma 控制, 并且 Ma 对 ma 为完全显性, 而酸个体中苹果酸的连续分布则是加性多基因作用的结果。

关键词: 苹果; 酸/低酸性状; SSR 标记; 苹果酸

中图分类号: S 661.1 文献标识码: A 文章编号: 0513-353X (2006) 02-0244-05

Analysis of Apple Fruit Acid/Low-acid Trait by SSR Marker

Yao Yuxin¹, Zhai Heng^{1*}, Zhao Lingling¹, Yi Kai², Liu Zhi², and Song Ye¹

(¹ College of Horticultural Science and Engineering, Shandong Agricultural University, Taian 271018, China; ² Liaoning Fruit Research Institute, Xiongyue 115214, China)

Abstract: It is necessary for apple genomic research and breeding to find out malic acid genetic characteristics. In this research, SSR marker linked to acid/low-acid trait in apple fruit was identified from 140 SSR primer pairs, materialized by 91 F_1 population hybrid from the intra-specific cross between apple cultivar ‘Dongguang’ and ‘Fuji’. Of 140 SSR primer pairs, only primer SDY085 produced a polymorphic band linked to acid trait, and the linkage distance was 8.89 cM. Also, the titrated acid and malic acid in different developmental stages were determined. The SSR marker analysis, coupled with the change of the total acid and malic acid contents, revealed that acid/low-acid trait was governed by a major gene and acid trait was complete dominant.

Key words: Apple; *Malus xdomestica* Borkh.; Acid/low-acid trait; SSR marker; Malic acid

苹果果实的含酸量是其重要的风味性状之一, 酸与可溶性糖、香味物质等是果品感观品质的重要组成部分^[1]。研究苹果果实含酸量的遗传特性, 不仅为研究控制苹果果实含酸量的 Ma 基因奠定基础, 而且还为培育适于加工的高酸品种提供分子标记辅助手段。目前对苹果含酸量遗传的研究主要是通过果实含酸量的表型值来分析其遗传规律, Nybom^[2]、Visser 等^[3]、李宝江等^[4]、刘志等^[5]的研究一致认为苹果果实含酸量由一对主效基因 (Ma/ma) 和其他多基因控制, 主要受基因的加性效应控制, 隐性纯合表现为低酸, 但对 Ma/ma 之间的显性程度观点不一致。有人认为 Ma 对 ma 表现为完全显性, 显性纯合体和杂合体表现为高酸或中酸是受加性多基因作用的结果^[2,3,5]; 也有人认为 Ma 对 ma 是不完全显性, 显性纯合体 ($MaMa$) 表现为高酸, 杂合体 ($Ma ma$) 表现为中酸, 在同等酸型内株系间表现出连续性酸度差异, 则是多基因控制的结果^[4]。在基因水平上, Maliepaard 等检测到了 Ma 的 QTL^[6]。本研究主要是通过表型分析和利用筛选与酸基因连锁的 SSR 分子标记来分析苹果含酸量的遗传规律。

收稿日期: 2005 - 05 - 09; 修回日期: 2005 - 08 - 30

基金项目: 山东省 2003 良种产业化项目 (32271)

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

1 材料与方法

材料为‘东光’和‘富士’的正反交 F_1 代群体, 共 91 株, 12 年生大树, 由辽宁省果树研究所(熊岳)提供。取成熟果实采用碱滴定法连续 3 年测定可滴定酸含量, 选高酸 ($>0.7\%$)、中酸 ($0.36\% \sim 0.7\%$) 和低酸 ($<0.36\%$) 个体各 6 株, 从幼果开始每隔 1 个月 (迅速膨大期每隔两周) 取样, 利用毛细管电泳测定果实的苹果酸含量。根据苹果可滴定酸含量的分布, 本试验中规定果实可滴定酸高于 0.36% 为酸性状, 低于 0.36% 的为低酸性状。

毛细管电泳仪 (Backman) 检测有机酸的主要条件: 未涂层石英毛细管 ($50 \mu\text{m} \times 57 \text{ cm}$), 有效长度 50 cm (河北永年色谱公司), 缓冲液为 $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸氢二钾, $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ CTAB; pH 7; 电压 10 kV ; 压力进样 3 s , 200 nm 间接检测。

模板 DNA 的制备: 取秋梢幼嫩叶片, 采用 SDS 法提取基因组 DNA, 经 RNase A 消化处理。获得的 DNA 经紫外分光光度计测定纯度与含量, 将浓度调至 $10 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 。

酸/低酸基因池的构建: 根据 BSA 法的原理, 各取 8 份表现极端高酸和低酸果实的 DNA, 将其分别等量混合, 组成高酸性状基因池和低酸性状基因池。

SSR 分析: PCR 扩增为 $15 \mu\text{L}$ 反应体系 (基因组 DNA 10 ng , Tris-HCl $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 9.0, 每种 dNTP $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, MgCl_2 $1.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, KCl $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 每种正、反向引物 $0.2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, Taq E 1 U)。PCR 反应程序为: 94°C 2 min 30 s , 94°C 30 s , 65°C 1 min (每次循环降低 1°C), 72°C 1 min , 4 次循环; 94°C 30 s , 60°C 1 min , 72°C 1 min , 30 次循环; 72°C 5 min 。扩增产物用 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 银染显色。采用 Mapmaker/Exp 3.0 软件对标记与目标性状进行连锁分析, 利用 Kosambi 函数将重组率转化为遗传距离 (Centimorgan, cM)。

2 结果与分析

2.1 果实可滴定酸在后代群体中的分布

本试验 91 株个体果实的可滴定酸含量范围为 $0.10\% \sim 1.10\%$, 大体成双峰形 (图 1), 70 株表现为酸性状, 21 株表现为低酸性状, 卡方检验 $\chi^2 = 0.09$ ($\chi^2_{0.05} = 3.84$, $\chi^2 < \chi^2_{0.05}$), 符合 $3:1$ 的分离比例。说明果实的酸/低酸性状符合单基因遗传规律, 即由主效基因控制果实的酸、低酸性状, 且酸性状对低酸性状为显性, 推测两亲本的基因型都为杂合 ($Mama$)。

2.2 苹果果实不同发育阶段苹果酸含量的变化

苹果酸主要是在早期积累, 不同类型均以幼果期最高; 高酸和低酸类型初始酸度就有明显差异, 但中酸和高酸类型不能区分; 至幼果膨大期, 中酸类型的苹果酸有较大幅度的下降, 而高酸/低酸类型含酸量下降速度缓慢, 降幅小, 8 月 16 日以后大部分株系即可以明确区别开来 (图 2)。

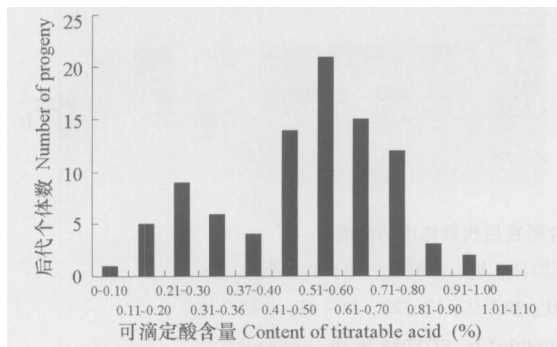


图 1 果实可滴定酸在后代群体中的分布

Fig 1 The distribution of fruit titratable acid in the progeny

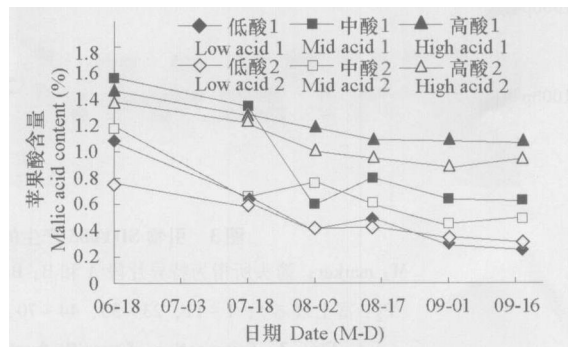


图 2 果实不同发育阶段苹果酸含量变化

Fig 2 Change of malic acid during fruit development

研究还发现苹果酸占有机酸总量的比率也发生变化, 由早期的 89%左右降到后期 80%左右, 可以看出苹果酸含量除受主效基因控制外, 还受其他多基因的影响。

2.3 酸/低酸性状近等基因池 SSR 标记的筛选

用 140 对苹果上的 SSR 引物对近等基因池进行扩增筛选, 132 对引物能扩增出清晰的条带, 117 对引物只能扩增 1 个位点, 最多扩增两个等位基因, 15 对引物能扩增 2 个不同的位点, 涉及 3~4 个不同的等位基因。140 对 SSR 引物共有 5 对引物在基因池间产生多态性片段, 其中只有 1 对引物 SDY085 (正向序列: 5'-gcc cag aag caa taa gta aac c-3', 反向序列: 5'-att gct cca tgc ata aag gg-3') 表现为与酸性状共分离。

2.4 多态性片段的群体共分离分析

产生共分离的引物 SDY085 在表现为酸性状的基因池及后代中同时扩增出两条 120~130 bp 的特异片段 A 和 B, 在低酸基因池及后代中无此片段的扩增, 可以得出特异片段 A 和 B 共同与显性基因位点 *Ma* 相连锁。在两个亲本 '东光' 和 '富士' 中都有特异带的扩增, 表明亲本都含有 *Ma*, 基因型为杂合 *Ma ma*。91 株后代中 (酸 70 株, 低酸 21 株), 酸个体中有 8 株表现为交换型, 重组率为 8.79%, $\chi^2 = 1.94$ ($\chi^2_{0.05} = 3.84$, $\chi^2 < \chi^2_{0.05}$)。利用 Koambi 公式计算得该标记与 *Ma* 基因位点的遗传连锁距离为 8.89 cM。

2.5 SSR 标记的共显性分析

从电泳图上看, 显性纯合体有 70~130 bp 的 6 条清晰的带, 而 120 bp 以下的 4 条带在一部分酸个体中没有, 并且在一部分低酸个体中存在, 说明这些带不与 *Ma* 连锁。隐性纯合体对应位置上有 140~170 bp 的 4 条带。本试验两个亲本基因型都为杂合 (*Ma ma*), 91 个个体中 25 个基因型为显性纯合 (*Ma Ma*), 45 个基因型为杂合 (*Ma ma*), 21 个为隐性纯合 (*ma ma*), $\chi^2 = 0.84$ ($\chi^2_{0.05} = 5.99$, $\chi^2 < \chi^2_{0.05}$), 符合 1:2:1 的分离比例。在本试验中如果根据分离比例把含酸量大于 0.7% 的定为高酸, 0.36%~0.7% 为中酸, 那么 22 株高酸个体仅有 50% 的基因型为显性纯合 (图 3, 上), 48 株中酸个体有 58% 的基因型为杂合 (图 3, 下), 可见基因型与含酸量并不对应, 说明 *Ma* 对 *ma* 为完全显性。

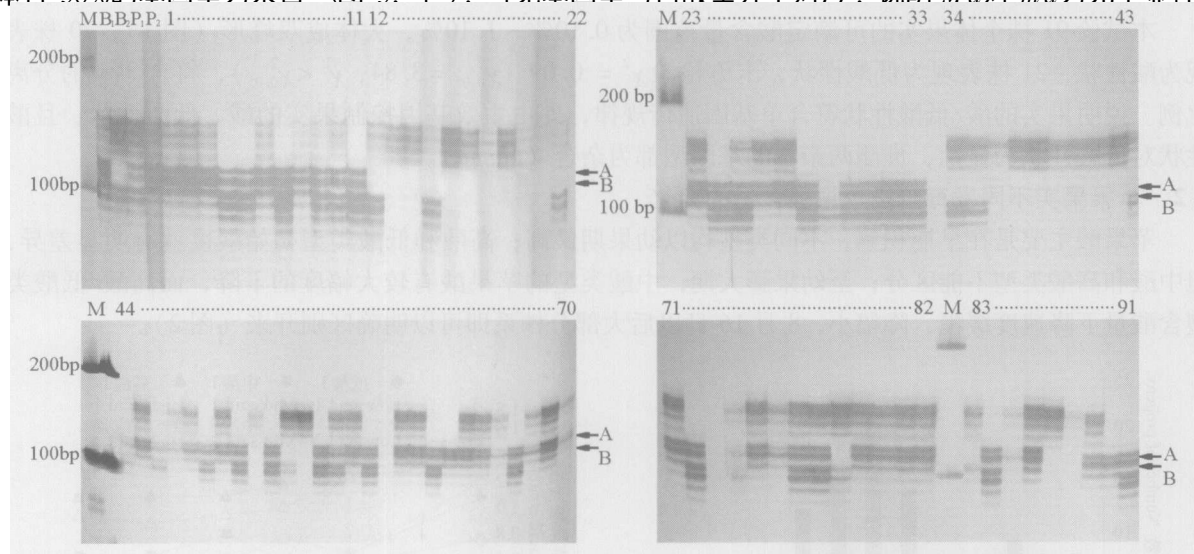


图 3 引物 SDY085 产生的特异片段在后代群体中的分离

M: marker, 箭头所指为特异片段 A 和 B; B₁: 酸基因池; B₂: 非酸基因池; P₁: 东光 ();

P₂: 富士 (); 1~11, 23~33, 44~70, 71~91: 酸个体; 12~22, 34~43: 非酸个体。

Fig 3 Segregation of specific fragment amplified by SDY085 in the progeny

M: marker, B₁: DNA pool of acid trait, B₂: DNA pool of non-acid trait, P₁: Dongguang (); P₂: Fuji ();

1-11, 23-33, 44-70, 71-91: Acid individuals; 12-22, 34-43: Non-acid individuals; The specific fragment is arrowed

2.6 SDY085在标记连锁图上的定位

有人利用‘菲耶思塔’和‘发现’的杂交后代群体,将部分 SSR 引物定位在连锁图上^[7]。本试验筛选的与苹果果实酸性状连锁的 SSR 标记被定位在两亲本的第 6 连锁群上。这为控制苹果果实酸/低酸性状的基因在染色体上的初步定位提供了一定依据,并且 SSR 标记可在不同物种间转移,也为其他物种遗传图谱的构建提供了参考。

3 讨论

3.1 控制果实酸/低酸性状的 SSR 标记筛选

SSR 标记的优点主要表现在共显性遗传,能扩增多个等位基因,标记可以在不同品种间转移,操作简单,重复性好。但 SSR 绝大部分为不编码序列,不能用于 cDNA 的标记筛选。到目前为止苹果上只开发出 140 多对 SSR 引物,还远不能满足标记筛选及构建遗传图谱的需要。

由于果树为多年生,杂合度高,童期长,近等基因系的构建十分困难,BSA 法的提出成为快速鉴别与特定基因相连锁标记的有效方法。一般组建 DNA 基因池的个体数目为 6~10 个。不同植物材料最适组池的个体数需要根据材料本身基因组的复杂程度、亲本间亲缘关系远近以及不同的分子标记方法来确定。本试验中最初采用 6 株个体组成基因池,发现 40% 左右的引物在近等基因池间产生多态性片段,无法正常进行筛选,同时考虑到组成基因池个体数增加,包含交换型的几率也增加,并且会影响基因池混合样品中部分条带的有效扩增,从而影响多态性片段的筛选,最终选择了使用 8 株个体组成近等基因池,两近等基因池间的多态性检出率适合。

由于目前已开发的苹果上的 SSR 标记数量太少,本试验未能找到与 *Ma* 基因紧密连锁的 SSR 标记 (<5 cM),获得的与 *Ma* 基因连锁的标记遗传距离为 8.89 cM,可以用于分析苹果果实中 *Ma* 基因的遗传规律和构建苹果遗传图谱,但不适合标记辅助育种和图位克隆。本实验室目前正利用 cDNA-AFLP 技术进行筛选,以期得到 *Ma* 基因的一段序列,最终克隆该基因。

3.2 苹果果实酸/低酸性状的遗传规律分析

苹果果实高酸(酸性状)与低酸(非酸性状)的划分目前没有统一的标准,本文根据可滴定酸的分布以 0.36% 为标准划分,与 SSR 标记结果一致。Visser 等规定 pH 3.8 以下为高酸,以上则为低酸^[3]。李宝江等则以 pH 4.2 为酸和低酸的划分标准^[4]。该标准因不同栽培地区、不同的测试群体、不同的测定时期、测定方法(本试验中通过口尝的方法有 10% 与滴定结果不一致)等因素的影响,很难有一个统一的标准。

含酸量与酸性状是两个不同的概念,含酸量反映的是果实中各种有机酸的总含量;酸性状是与低酸(非酸)性状(含酸量低于某个临界值)相对应,与有机酸的种类没有关系。如在番茄上含有多种有机酸,含酸量是受多基因作用的结果^[8,9],而番茄的低酸性状由一对主效基因控制^[10]。研究还表明,桃^[11]、葡萄^[12]、柚子^[13]的低酸性状都由一个主效基因控制。桃的低酸性状由一个显性主效基因控制^[14],而柑橘的低酸性状由隐性主效基因控制^[15],可见不同的物种有机酸遗传机理并不相同。苹果酸和柠檬酸在同时积累两种有机酸的番茄中和在积累柠檬酸的柚子中都分别由一个主效基因控制^[6,9]。

苹果中主要积累苹果酸,控制苹果果实酸/低酸性状的基因必然是调控苹果酸的代谢,本试验所筛选的标记与该基因的显性位点 *Ma* 相连锁,在表现为酸性状的个体中,连锁标记表现为完全显性,表明相应基因只决定了果实的酸/低酸性状,而不能决定酸个体中苹果酸含量的连续变化,苹果酸含量的连续分布应该由其他的加性多基因控制。与主效基因相比,这些加性多基因对果实的含酸量都有一定的贡献,在基因调控网络中每一个基因都受其他基因的影响,因此综合起来这些基因的表达就受到相当多因素的影响,从而使果实含酸量表现为连续变异。

参考文献:

- 1 Sweeney J P, Chapman V J, Hepner P A. Sugar, acid and flavor in fresh fruits J. Am. Diet Assoc, 1970, 57: 432 ~ 435
- 2 Nybom T. On the inheritance of acidity in cultivated apples Hereditas, 1959, 45: 332 ~ 350
- 3 Visser T, Verhaegh J J. Inheritance and selection of some fruit characters of apple Euphytica, 1978, 27: 753 ~ 760
- 4 李宝江, 景士西, 丁玉英, 张景娥. 苹果糖酸遗传和选择研究. 遗传学报, 1994, 21 (2): 147 ~ 154
Li B J, Jing S X, Ding Y Y, Zhang J E. Studies of the inheritance and selection of sweetness and acidity in apples Acta Genetica Sinica, 1994, 21 (2): 147 ~ 154 (in Chinese)
- 5 刘 志, 伊 凯, 王冬梅, 杨 巍, 杨 锋, 张景娥. 富士杂交后代果实内在品质性状的遗传. 果树学报, 2004, 21 (2): 95 ~ 102
Liu Z, Yi K, Wang D M, Yang W, Yang F, Zhang J E. Studies on the fruit internal characteristics inheritance trends of Fuji apple variety crossed progenies Journal of Fruit Science, 2004, 21 (2): 95 ~ 102 (in Chinese)
- 6 Maliepaard C, Alston F H, Arkel G V, Brown L M, Chevreau E, Dunemann F, Evans K M, Gardiner S, Guilford P, Heusden A W V, Janse J, Laurens F, Lynn J R, Manganaris A G, Nijs A P M, Periam N, Rikkerink E, Roche P, Ryder C, Sansavini S, Schmidt H, Tartarini S, Verhaegh J J, Vrielink-van Ginkel M, King G J. Aligning male and female linkage maps of apple (*Malus pumila* Mill.) using multi-allelic markers Theor Appl Genet, 1998, 97: 60 ~ 73
- 7 Liebhard R, Gianfranceschi L, Koller B, Ryder C D, Tarchin R, Van De Weg E, Gessler C. Development and characterization of 140 new microsatellites in apple Molecular Breeding, 2002, 10: 217 ~ 241
- 8 Fulton T M, Grandillo S, Beck Bunn T, Fridman E, Frampton A, Lopez J, Petiard V, Uhlig J, Zamir D, Tanksley S D. Advanced backcross QTL analysis of a *Lycopersicon esculentum* × *Lycopersicon parviflorum* cross Theor Appl Genet, 2000, 100: 1025 ~ 1042
- 9 Saliba-Colombani V, Causse M, Langlois D, Philouze J, Buret M. Genetic analysis of organoleptic quality in fresh market tomato 1. Mapping QTLs for physical and chemical traits Theor Appl Genet, 2001, 102: 259 ~ 272
- 10 Stevens M A. Citrate and malate concentration in tomato fruits: Genetic control and maturational effects J. Am. Soc. Hort. Sci., 1972, 97: 655 ~ 658
- 11 Yoshida M. Genetical studies on the fruit quality of peach varieties 1. Acidity. Bull. Hort. Res. Stn. Jpn. Series A, 1970, 9: 1 ~ 15
- 12 Boubals D, Bourzeix M, Guitraud J. Le Gora Chirine, variété de vigne iranienne à faible teneur en acides organiques Ann. Am. Hort. Plantes, 1971, 21: 281 ~ 285
- 13 Cameron J W, Soost R K. Acidity and total soluble solids in *Citrus* hybrids and advanced crosses involving acidless orange and acidless pummelo J. Am. Soc. Hort. Sci., 1977, 120: 510 ~ 514
- 14 Monet R. Genetic transmission of the 'fruit sweetness' character. Incidence on selection for quality. In: NRA ed. Eucarpia Symposium Tree Fruit Breeding Angers: NRA, 1979. 273 ~ 276
- 15 Fang D Q, Federici C T, Roose M L. Development of molecular markers linked to a gene controlling fruit acidity in citrus Genome, 1997, 40: 841 ~ 849

新书推荐

《汉英生物学词汇》

本书是一部汉英对照的大型工具书。收有动物学、植物学、人体解剖学、组织胚胎学、微生物学、遗传学、细胞学、生物化学、生物物理学、时间生物学、生物工程、分子生物学、生态学等学科以及医学、农学的名词，共约 14 万条。定价：106 元（含邮费）。

购书者请通过邮局汇款至北京中关村南大街 12 号中国农科院蔬菜花卉所《园艺学报》编辑部，邮编 100081。