

# 苹果果实酸/低酸性状的 SSR 标记

王刚刚,王 飞,赵政阳,樊红科

(西北农林科技大学 园艺学院 农业部西北园艺植物种质资源及遗传改良重点开放实验室,陕西 杨凌 712100)

**[摘 要]** 【目的】通过表型分析筛选与苹果果实酸/低酸性状基因连锁的 SSR 分子标记,分析苹果果实可滴定酸的遗传规律,为苹果的早期选择和辅助育种提供依据。【方法】以“富士”×“粉红女士”杂交  $F_1$  代的 76 株群体为试材,测定了成熟苹果果实的可滴定酸含量,采用 BSA 法和 SSR 技术筛选与酸/低酸性状基因连锁的分子标记,并在杂种后代中进行验证。【结果】76 株杂交  $F_1$  代群体可滴定酸含量为 1.4~8.8 mg/g,从 80 对共显性遗传的 SSR 引物中筛选到与酸/低酸性状基因连锁的 SSR 标记 Hi01e10,其遗传距离为 10.014 cM,在杂交后代中的验证结果与可滴定酸含量在后代群体中的遗传规律基本吻合,进一步验证了该标记的可靠性。【结论】苹果果实酸/低酸性状是受主基因(Ma/ma)控制的,SSR 标记 Hi01e10 可用于苹果的早期选择和辅助育种。

**[关键词]** 苹果;酸/低酸性状;SSR 标记;可滴定酸含量

**[中图分类号]** S661.1

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-9387(2010)06-0133-05

## SSR makers of apple fruit acid/low-acid trait

WANG Gang-gang, WANG Fei, ZHAO Zheng-yang, FAN Hong-ke

(College of Horticulture, Northwest A&F University, Key Laboratory of Horticultural Plant Germplasm Resource Utilization in Northwest China, Ministry of Agriculture, the People's Republic of China, Yangling, Shaanxi 712100, China)

**Abstract:** 【Objective】In order to provide evidence for early selection and molecular marker assisted selection of apple, the titratable acid genetic characteristics were researched by SSR marker analysis and titratable acid analysis. 【Method】The apple hybrid combinations (“Fuji”×“Pinklady”) and 76  $F_1$  generation groups were used to determine the mature fruit titratable acid content, the linked marker was screened by BSA method and SSR technology. 【Result】A SSR marker Hi01e10 linked to acid/low-acid trait gene was screened from 80 SSR primer pairs by analyzing the genetic characteristics of 76  $F_1$  generation groups, the genetic distance was 10.014 cM. The validity of this SSR maker was verified by  $F_1$  population hybrid tests and its genetic characteristics of titratable acid. 【Conclusion】The acid/low-acid trait gene was governed by a major gene, and Hi01e10 can be used in early selection and molecular marker assisted selection.

**Key words:** apple fruit; acid/low-acid trait; SSR marker; content of titratable acid

苹果是我国加入世贸组织后具有国际市场竞争力的优势农产品,而当前以苹果浓缩汁为主的农产品深加工生产迫切需要发展适宜加工的高酸苹果品种<sup>[1]</sup>。研究苹果果实可滴定酸的遗传特性与规律,不仅可为研究控制苹果果实含酸量基因奠定基础,

而且能为培育适宜加工的高酸苹果品种提供生理、遗传与分子的理论依据<sup>[2]</sup>。

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,Visser 等<sup>[3]</sup>、李宝江等<sup>[4]</sup>、刘志等<sup>[5]</sup>、姚玉新等<sup>[6]</sup>研究认为,苹果

\* [收稿日期] 2009-11-19

[基金项目] 国家现代农业技术体系专项(nycytx-08-01-03)

[作者简介] 王刚刚(1984—),男,甘肃庆阳人,在读硕士,主要从事果树育种与生物技术研究。

E-mail: wangganggangking@163.com

[通信作者] 王 飞(1954—),女,河南孟津人,教授,博士生导师,主要从事果树及花卉生理与生物技术育种研究。

E-mail: xnwangfei521@126.com

果实含酸量由 1 对主基因(Ma/ma)+多基因控制,以加性效应控制为主。在其他果树如葡萄<sup>[7]</sup>、柚子<sup>[8]</sup>上的研究表明,果实的低酸性状由 1 对主基因控制。吴俊等<sup>[9-10]</sup>对桃非酸/酸性状分子标记进行筛选,获得了与 D 基因紧密连锁的 AFLP 标记,并将其转化为简单的基于常规 PCR 扩增的 SCAR 标记。但类似研究主要集中在环境和栽培管理条件对酸度的影响,以及酸度遗传规律的表型分析方面,获得的可用于早期辅助育种选择的基因连锁标记较少,因而难以作为辅助选择育种提供有效依据。基于此,本研究以“富士”×“粉红女士”杂交 F<sub>1</sub> 代的 76 株群体为材料,通过表型分析筛选与酸/低酸基因连锁的 SSR 分子标记,并在杂交后代中进行验证,分析苹果含酸量的遗传规律,以期为苹果的早期选择和辅助育种提供依据。

1 材料与方法

1.1 植物材料

供试植物材料为“富士”×“粉红女士”的杂交 F<sub>1</sub> 代群体的 7 年生大树,共 76 株,栽植于地处陕西白水县的西北农林科技大学白水苹果试验站育种试验区。

1.2 苹果果实可滴定酸测定及酸/低酸性状的确定

参照 Dirlewanger 等<sup>[11]</sup>的碱滴定法测定果实可滴定酸含量:每株取 6 个成熟果实,去皮,等量混合榨汁,过滤,取 10 mL 滤液于三角瓶中,用去离子水稀释至 20 mL,加酚酞指示剂 2 滴,用标定好的 NaOH(0.1 mol/L)溶液滴定至滤液呈粉红色(pH 值 8.3),且持续 1 min 不褪色,记录 NaOH 用量,每个样品重复 3 次。

可滴定酸含量(mmol/L)= $\frac{V_1 \times N \times 10^3}{V_2}$ 。

式中:V<sub>1</sub> 为 NaOH 用量(mL),N 为 NaOH 浓度(mol/L),V<sub>2</sub> 为吸取果汁体积(mL)。根据苹果果实可滴定酸含量的分布,本试验将果实可滴定酸含量>4.0 mg/g 定为酸性状,≤4.0 mg/g 定为低酸性状。

1.3 苹果叶片 DNA 的提取

取苹果春梢或秋梢幼嫩叶片,采用改良 CTAB 法<sup>[12]</sup>提取苹果基因 DNA,经 RNaseA 消化后用紫外分光光度计检测 OD<sub>260 nm</sub>/OD<sub>280 nm</sub>,用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 纯度,用双蒸水稀释至 50 ng/μL,-20 ℃ 保存备用。

1.4 酸/低酸性状近等基因池的构建

根据 BSA 法<sup>[13-14]</sup>的原理,取“富士”×“粉红女士”的杂交 F<sub>1</sub> 代果实表现为酸与低酸的个体各 8 株,将其 DNA 分别等量混合,组成酸性状基因池与低酸性状基因池。

1.5 苹果酸/低酸性状的 SSR 标记筛选

以亲本“粉红女士”和“富士”DNA 为模板,通过 PCR 扩增,初步筛选出两者之间具有多态性 DNA 片段的引物;然后用“粉红女士”、“富士”的 DNA、F<sub>1</sub> 酸性状基因池、F<sub>1</sub> 低酸性状基因池为模板,对所选引物进行 PCR 扩增,以筛选与苹果果实酸/低酸性状基因连锁的 SSR 标记,重复 2~3 次。

PCR 反应体系:DNA 1.0 μL,10×Buffer(50 mmol/L Tris-HCl(pH 8.8),16 mmol/L(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,0.1% Tween 20)2.0 μL,25 mmol/L Mg<sup>2+</sup> 1.9 μL,2.5 mmol/L dNTP 1.6 μL,正、负链引物(50 ng/μL)各 1 μL,Taq 酶(5 U/μL)0.2 μL,加水至反应总体积为 20 μL。

PCR 反应程序:94 ℃ 4 min;94 ℃ 55 s,57.5 ℃ 1 min(退火温度依引物不同而不同),72 ℃ 90 s,72 ℃ 10 min,38 个循环。扩增产物用 6% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,银染显色。

1.6 SSR 标记的验证

以所有 F<sub>1</sub> 代群体植株的 DNA 为模板,用获得的具有差异片段的引物进行 PCR 扩增,验证所获得 SSR 标记的可靠性。

1.7 SSR 标记在群体中的验证及遗传距离的计算

将获得的 SSR 标记在群体中进行验证,并做标记和对应性状的连锁分析,用 JoinMap 3.0<sup>[15]</sup> 计算酸/低酸性状标记与性状间的遗传距离。

2 结果与分析

2.1 苹果果实可滴定酸含量在杂交 F<sub>1</sub> 代群体中的分布

经测定,试验中 76 株杂交 F<sub>1</sub> 代群体苹果果实可滴定酸含量为 1.4~8.8 mg/g,总体呈双峰形(图 1)。其中 59 株表现为酸性状,17 株表现为低酸性状,χ<sup>2</sup> 适合度检验结果为:χ<sup>2</sup> = 1.28(χ<sup>2</sup><sub>0.05</sub> = 3.15,χ<sup>2</sup> < χ<sup>2</sup><sub>0.05</sub>),符合 3:1 的分离比例。说明苹果果实的酸/低酸性状符合单基因遗传规律,即苹果果实的酸/低酸性状由主基因控制,且酸性状对低酸性状为显性,推测两亲本(“富士”与“粉红女士”)的基因型均为杂合型(Mama)。

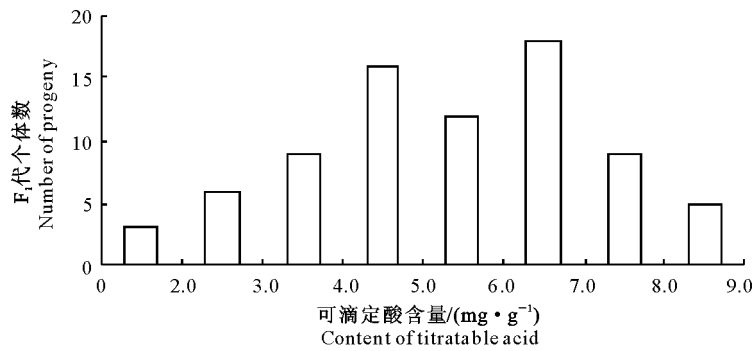


图 1 苹果果实可滴定酸含量在杂交 F<sub>1</sub> 代群体中的分布  
Fig.1 The distribution of fruit titratable acid in the progeny

2.2 苹果叶片 DNA 质量的检测

电泳检测结果表明,苹果叶片 DNA 条带清楚,无明显拖尾现象及弥散带,无 RNA 条带(图 2),说明提取的苹果叶片 DNA 比较完整,RNA 清除完

全;紫外分光光度计检测结果表明,DNA 的  $OD_{260\text{ nm}}/OD_{280\text{ nm}}$  在 1.8~2.0,说明 DNA 质量较好,可以满足 SSR 标记的需要。

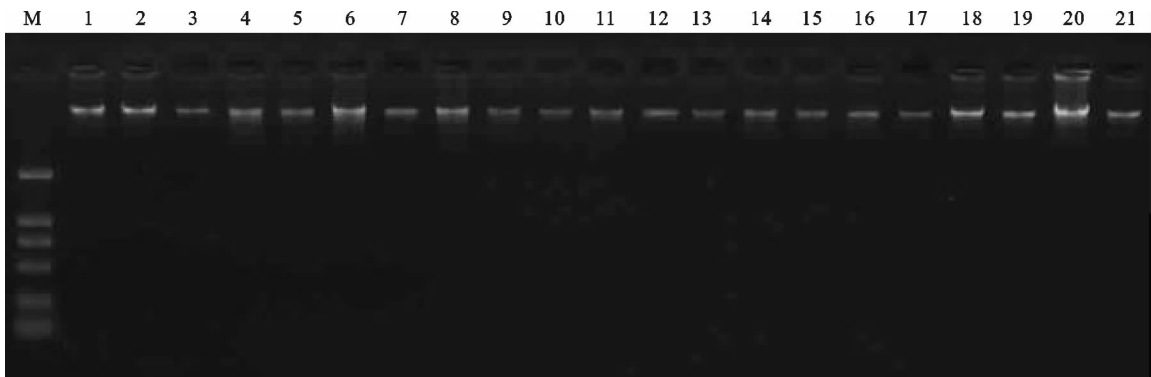


图 2 部分苹果叶片基因组 DNA 电泳结果  
1~21.“富士”×“粉红女士”的杂交 F<sub>1</sub> 代;M. DNA Marker  
Fig.2 Electrophoresis results of partial extracted DNA samples  
1—21. The material codes;M. DNA Marker

2.3 苹果酸/低酸性状基因连锁的 SSR 标记

以亲本“富士”和“粉红女士”DNA 为模板,通过 PCR 扩增,对上海生工生物工程技术有限公司(Sangon)合成的 80 对苹果 SSR 引物进行初步筛选,结果表明,能扩增出多态性片段的引物有 56 对(占 68.8%),其中有 22 对引物能够在亲本间扩增出差异常带,占总引物数的 27.5%。

用已筛选出的 56 对能扩增出多态性片段的引物,在两亲本及 F<sub>1</sub> 酸/低酸性状基因池间进行再次筛选,结果表明,56 对引物在混合池间均能扩增出条带,其中引物 Hi01e10(正向序列:5'-TGGGCTT-GTTTAGTGTGTCAG-3',反向序列:5'-GTTTG-GCTAGTGATGGTGGAGGTG-3')能够在 F<sub>1</sub> 代酸性状基因池中扩增出 201 bp 的条带,在 F<sub>1</sub> 代低酸

性状基因池中并没有扩增出此条带,表现为与酸性状共分离,初步判断 Hi01e10 与苹果酸/低酸性状 Ma/ma 基因连锁;而在两亲本(“富士”与“粉红女士”)中均有此条带的扩增,说明两亲本的基因型均为杂合型(Mama)。

2.4 SSR 标记 Hi01e10 在杂交后代中的验证

用引物 Hi01e10 对“富士”×“粉红女士”的 F<sub>1</sub> 代群体进行 PCR 扩增,结果表明,在 59 株酸性状杂交后代中,有 50 株(占 84.7%)出现了 201 bp 的片段,而在 17 株低酸性状杂种后代中有 16 株(占 91.7%)没有出现此片段(图 3,4),重组率为 11.8%。 $\chi^2$  检验仍符合 3:1 的分离比例,其结果与苹果果实可滴定酸含量在后代群体中的遗传规律基本吻合,验证了 Hi01e10 作为 SSR 标记的可靠

性。

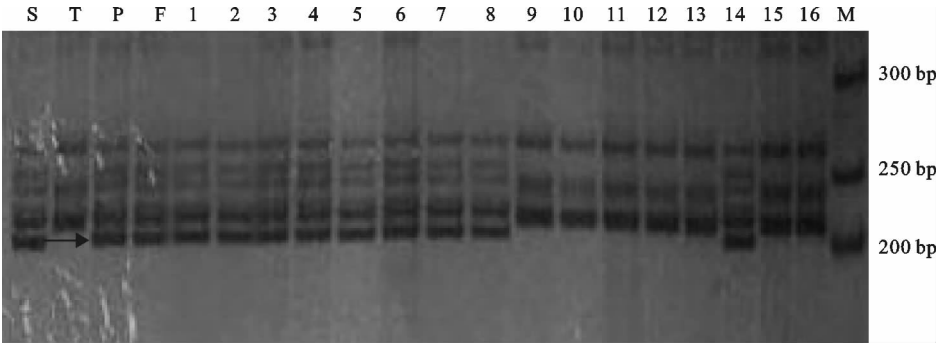


图 3 引物 Hi01e10 在“粉红女士”、“富士”、酸/低酸性状基因池间的 SSR 标记  
M. Marker;P. “粉红女士”(♂);F. “富士”(♀);S. 酸性状基因池;T. 低酸性状基因池;  
1~8. 酸性状个体;9~16. 低酸性状个体;箭头所指为特异片段  
Fig. 3 Primer Hi01e10 in “Pinklady”, “Fuji”, DNA pool of acid trait and DNA pool of non-acid trait  
M. Marker;P. “Pinklady”(♂);F. “Fuji”(♀);S. DNA pool of acid trait;T. DNA pool of non-acid trait;  
1—8. Acid individuals;9—16. Non-acid individuals;The specific fragment is arrowed

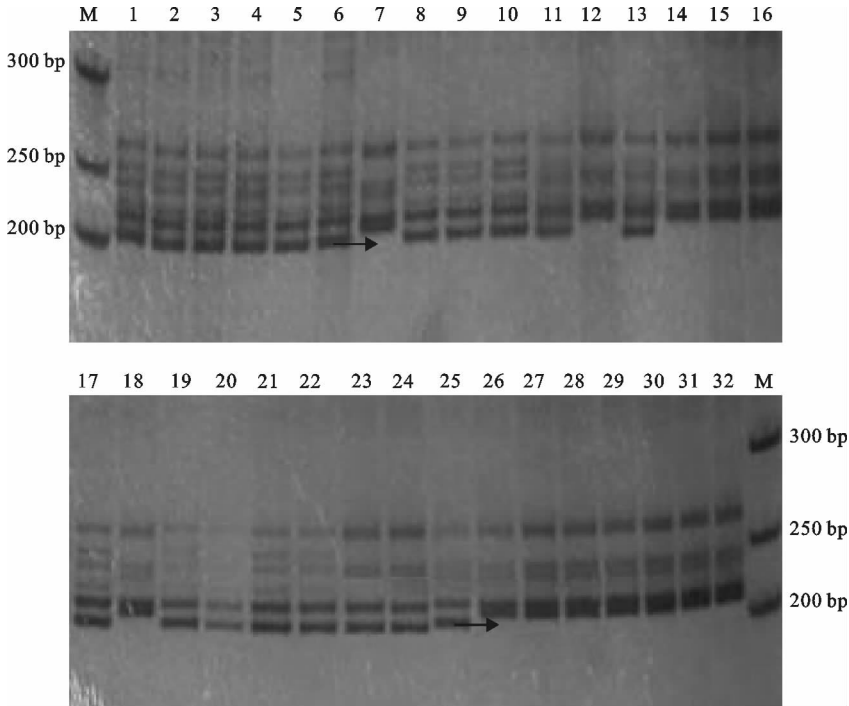


图 4 引物 Hi01e10 产生的特异片段在部分后代群体中的分离  
M. Marker;1~13,17~26. 酸性状个体;14~16,27~32. 低酸性状个体;箭头所指为特异片段  
Fig. 4 Segregation of specific fragment amplified by Hi01e10 in the partial progeny  
M. Marker;1—13,17—26. Acid individuals;14—16,27—32. Non-acid individuals;The specific fragment is arrowed

2.5 SSR 标记与苹果果实酸/低酸性状基因的连锁  
根据 Hi01e10 在“富士”×“粉红女士”76 株 F<sub>1</sub> 代群体上的条带表现以及各单株果实的可滴定酸含量,采用 JoinMap 3.0 软件,对所得 SSR 标记 Hi01e10 和苹果果实酸/低酸性状基因进行连锁分析,结果表明,该标记与苹果果实酸/低酸性状基因

存在连锁关系,其遗传距离为 10.014 cM。

### 3 讨 论

目前,与目标性状基因相连锁的分子标记研究多采用近等基因系和集群分离分析(Bulked Segregant Analysis,BSA)方法<sup>[16-17]</sup>。本研究采用 BSA

法获得了 1 个与苹果果实酸/低酸性状基因连锁的分子标记 Hi01e10,遗传距离为 10.014 cM,为苹果的分子标记辅助育种提供了重要参考。关于标记与目标性状的连锁程度,一般以小于 5 cM 为最佳距离<sup>[18]</sup>,而本试验中遗传距离较远的原因可能与引物数量和 F<sub>1</sub> 代杂交群体数量较少有关。因此,应在增加研究群体规模的基础上加大引物密度,进一步筛选引物,以提高标记结果的可靠性。不同植物材料最适组池数由供试材料基因组的复杂程度、亲本间亲源关系远近以及不同的分子标记方法来决定,一般组建 DNA 基因池的个体数目为 6~10 个。本试验中,曾分别采用 6 株和 10 株个体组成基因池,但发现用 6 株组池时,有 20%左右的引物在近等基因池间产生差异片段,筛选难度大;用 10 株组池时,引物在近等基因池间产生的差异片段模糊,随着基因组池数增加,包含交换型的几率也增大,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。因此,本研究最终选择使用 8 株个体组成近等基因池,2 组近等基因池间的多态性检出率适合。

目前,苹果果实高酸(性状)与低酸(非酸性状)的划分尚无统一标准<sup>[6]</sup>,可受到栽培地区、测试群体、测定时期、测定方法以及糖酸比(本试验中通过品尝的方法有 8%与滴定结果不一致)等因素的影响<sup>[10]</sup>。本研究在关中地区通过“富士”与“粉红女士”及其组合杂交后代 2 年可滴定酸含量的测定结果认为,以 4.0 mg/g 为标准划分酸/低酸性状是符合果实口感的。

苹果果实中苹果酸含量由多基因控制,但酸/低酸性状由 1 个主基因控制<sup>[3-6]</sup>。本研究筛选得到了与苹果果实酸/低酸性状基因连锁的分子标记 Hi01e10,且该标记在杂种后代群体的扩增结果与可滴定酸含量在后代群体中的遗传规律基本吻合,进一步验证了该标记的可靠性。说明苹果果实的酸/低酸性状是受主基因(Ma/ma)控制的,这与前人研究结果一致。为今后推测目标基因的基因型,预测其杂种后代性状的表现型,实现果实甜酸性状的早期筛选及苹果品种的辅助选育、基因工程改良提供了理论参考。

## [参考文献]

- [1] 王 昆,朱佳满,龚 欣.我国高酸苹果生产现状及建议[J].落叶果树,2007(6):20-21.

Wang K,Zhu J M,Gong X. Production status and suggestions

of China's high-acid apple [J]. Deciduous Fruit,2007(6):20-21. (in Chinese)

- [2] Sweeney J P,Chapman V J,Hepner P A. Sugar,acid and flavor in fresh fruits [J]. Am Diet Assoc,1970,57:432-435.
- [3] Visser T,Verhaegh J J. Inheritance and selection of some fruit characters of apple [J]. Euphytica,1978,27:753-760.
- [4] 李宝江,景士西,丁玉英,等.苹果糖酸遗传和选择研究[J].遗传学报,1994,21(2):147-154.
- Li B J,Jing S X,Ding Y Y,et al. Studies of the inheritance and selection of sweetness and acidity in apples [J]. Acta Genetica Sinica,1994,21(2):147-154. (in Chinese)
- [5] 刘 志,伊 凯,王冬梅,等.富士杂交后代果实内在品质性状的遗传[J].果树学报,2004,21(2):95-102.
- Liu Z,Yi K,Wang D M,et al. Studies on the fruit internal characteristics inheritance trends of Fuji apple variet crossed progenies [J]. Journal of Fruit Science,2004,21(2):95-102. (in Chinese)
- [6] 姚玉新,翟 衡,赵玲玲,等.苹果果实酸/低酸性状的 SSR 分析[J].园艺学报,2006,33(2):244-248.
- Yao Y X,Zhai H,Zhao L L,et al. Analysis of apple fruit acid/low-acid trait by SSR marker [J]. Acta Horticulturae Sinica,2006,33(2):244-248. (in Chinese)
- [7] Boubals D,Bourzeix M,Guitraud J. Le Gora Chirine,variété de vigne iranienne à faible teneur en acides organiques [J]. Ann Amélior Plantes,1971,21:281-285.
- [8] 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.
- [9] 吴 俊,束怀瑞,张开春,等.桃果实非酸/酸性状分子标记的初步筛选[J].中国农业科学,2004,37(12):1892-1898.
- Wu J,Shu H R,Zhang K C,et al. Preliminary screening molecular markers linked to non-acid/acid fruit traits in peach [J]. Scientia Agricultura Sinica,2004,37(12):1892-1898. (in Chinese)
- [10] 吴 俊,束怀瑞,张开春,等.桃果实非酸/酸性状 AFLP 标记的筛选[J].果树学报,2004,21(4):298-301.
- Wu J,Shu H R,Zhang K C,et al. Identification of AFLP markers linked to non-acid/acid fruit traits in peach [J]. Journal of Fruit Science,2004,21(4):298-301. (in Chinese)
- [11] Dirlewanger E,Moing A,Rothan C,et al. Mapping QTLs controlling fruit quality in peach(*Prunus persica* (L.) Batsh) [J]. Theoretical and Applied Genetics,1999(98):18-31.
- [12] Maria T D,Roberta Q,Ignazio V. A peach linkage map integrating RFLPs,SSRs,RAPDs,and morphological markers [J]. Genome,2001,44:783-790.
- [13] Michemor R W,Paran I,Kesseli R V. Identification of markers linked to disease resistance gene by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions using segregating populations [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA,1991,88:9828-9832.