

桃花粉育性与花药颜色的关系及其 SSR分子标记

曹珂, 王思倩, 朱更瑞, 方伟超, 陈昌文, 王力荣

(中国农业科学院郑州果树研究所, 郑州 450009)

摘要:以李属桃亚属的 637份桃品种种质和栽培种瑞光 19 × Summergrand 杂交的 138株 F₁群体为试材,对桃花粉育性与花药颜色的关系及其 SSR分子标记进行研究。结果表明:在所有品种中,橘红花药最多,占总份数的 91.2%,其中绝大部分花粉可育;橘黄和黄色花药的种质数量次之;白色和浅褐花药的种质最少,且均表现为花粉不稔;整体表现为红色和黄色花药与花粉可育具有较强的正相关性。本试验从 122对 SSR引物中筛选出 2对与花粉育性性状连锁的标记 CPDCT013和 CP-SCT012,根据这 2个标记参考整合参考图谱的位置,将控制花粉育性的基因定位在桃第 6条染色体上端。对已经报道的 2个桃花粉育性标记 CPPCT004和 NNJ-I以及第 6条连锁群的其他 SSR位点在花粉育性不同的 24个品种上验证,结果表明只有 UDP96 - 001 (125bp)可以用于桃花粉育性的分子标记辅助育种。

关键词:桃;花粉育性;花药颜色;分子标记

Study on Relationship Between Pollen Fertility and Anther Color and Its SSR Marker Screening in Peach

CAO Ke, WANG Si-qian, ZHU Geng-ru, FANG Wei-chao, CHEN Chang-wen, WANG Li-rong

(Zhengzhou Fruit Research Institute, Chinese Academy of Agriculture Sciences, Zhengzhou 450009)

Abstract: 637 peach cultivars and 138 F₁ hybrid seedlings derived from the cross of Ruiguang 19 and Summergrand (*Prunus persica* (L.) Batsch) were used to investigate the relationship between anther color and pollen fertility, and screen the SSR markers linked to the pollen fertility. 91.2% of all cultivars were jacinth anther, and the most of them had fertile pollen; the number of cultivars with orange and yellow anther took the second place, cultivars with white and sandy beige anther with sterile pollen were the fewest. Positive correlation was found between red and yellow anther color and pollen fertility. 122 SSRs located at *Prunus* reference genetic map were screened using bulked segregant analysis (BSA), and two SSR markers, CPDCT013 and CP-SCT012, were found to be linked to fertile/sterile character. Pollen fertility gene was located on the group 6 (chromosome 6) according to the location of two marker in the reference map. CPPCT004 and NNJ-I, the pollen fertility markers in peach which reported in other papers together with whole SSRs in group 6, were also screened in 24 cultivars with different pollen fertility. The results showed that UDP96 - 001 had a higher accuracy when be used for selecting fertile pollen cultivar.

Key words: Peach; Pollen fertility; Anther color; Molecule marker

桃花粉育性由一对单基因 Ps/ps控制,可育 (Ps)对不育 (ps)为完全显性^[1]。花粉不稔,一般需配置授粉品种才能结实,因此选择花粉可育的品种是保证果实产量的一个重要指标。利用植物学性状的相关性可以对种质进行鉴定,马瑞娟等^[2]对南

京桃资源圃保存的 507份种质的花粉育性进行调查,87.4%的品种花粉可育,同时对花粉育性和果实类型、花型和雌蕊高度的性状的关系进行了分析。Dirlewanger等^[3]认为花粉育性与花药颜色具有一定的相关性,橙色的花药是可育的,

收稿日期: 2009-12-21 修回日期: 2010-06-11

基金项目: 国家“863”计划 (2006AA100108-4-12)

作者简介: 曹珂,助理研究员,主要从事桃种质资源与创新研究。E-mail: wyandck@126.com

通讯作者: 王力荣,研究员, E-mail: wlirong2009@sina.com

而无色的花药则是不稔的。随着分子生物学的发展,利用分子标记技术筛选与桃花粉育性紧密连锁的分子标记,从而对品种或实生单株的花粉育性进行早期判定是加快育种进程、保证果实产量的重要手段。

王成等^[4]利用重阳红(花粉不育)×大久保(花粉可育)的52株F₁群体为试材,用RAPD(Random Amplified Polymorphic DNA)方法,获得了一个与桃花粉可育/不育连锁距离为5.8cM的RAPD标记,并将它转换为SCAR(Sequence Characterized Amplified Region)标记。俞明亮等^[5]根据拟南芥雄性不育序列标记设计引物,扩增出两个片段NNJ-I(600 bp)和NNJ-I(900 bp),其与桃的花粉不育性状之间的遗传距离为0cM。Dirlewanger等^[3]采用SSR(Simple Sequence Repeat)和AFLP(Amplified Fragment Length Polymorphism)标记将花粉育性标记定位在第6条染色体的顶端,连锁距离最近的SSR标记为CP-PCT004,连锁距离为9.7cM。

虽然目前国内外对花粉育性的鉴定方法和分子标记有了一定的研究,但对这些鉴定方法和分子标记

Table 1 The cultivars used to test exactitude of SSR marker

序号 No	品种名 Variety	花药颜色 Anther color	花粉育性 Pollen fertility	序号 No	品种名 Variety	花药颜色 Anther color	花粉育性 Pollen fertility
1	西野	白	不稔	13	仓方早生	橘红	不稔
2	霞晖 1号	白	不稔	14	安农水蜜	橘红	不稔
3	橙艳	白	不稔	15	GF677	黄	可育
4	深州水蜜	浅褐	不稔	16	洒红桃	黄	可育
5	五月鲜	浅褐	不稔	17	双丰	橘黄	可育
6	六月白	浅褐	不稔	18	礼泉 54	橘黄	可育
7	青毛子白花	黄	不稔	19	阳桃	橘黄	可育
8	金花露	黄	不稔	20	白凤	橘红	可育
9	郑黄 2号	黄	不稔	21	大久保	橘红	可育
10	川中岛白桃	橘黄	不稔	22	天津水蜜	橘红	可育
11	冈山白	橘黄	不稔	23	瑞光 19	橘红	可育
12	上海水蜜	橘黄	不稔	24	Summergrand	橘红	可育

1.2 花粉育性和花药颜色调查

2008、2009年春当资源圈内各品种和杂交群体单株处于盛花期时,采花药置于试验室内稳定光源下拍照,判定花药颜色,本试验中将花药颜色分为白、浅褐、黄、橘黄和橘红5类。花粉育性判定参照王力荣等^[6]的方法,采用手指捻并辅助花粉萌发试

记的应用报道较少。本研究首先利用国家桃资源圃(郑州)中保存的李属桃亚属内5个种(即光核桃(*Prunus mira*)、甘肃桃(*P. kansunensis*)、山桃(*P. davidiana*)、新疆桃(*P. ferganensis*)和普通桃(*P. persica*)等)637份种质的花粉育性和花药颜色的关系进行了分析;同时以瑞光19 [*Prunus persica* (L.) Batsch Ruiguang19] × Summergrand [*Prunus persica* (L.) Batsch Summergrand]杂交的138株F₁为试材,用SSR分析,筛选花粉育性标记并定位花粉育性基因,同时对其他文献中报道的花粉育性标记进行了验证。本研究可为花粉可育桃品种的早期辅助选择提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

637份桃种质取自中国农业科学院郑州果树研究所国家果树种质桃圃,用于分析花药颜色和花粉育性的关系。利用138株瑞光19(花粉可育)× Summergrand(花粉可育)的后代个体构建了F₁分离群体,供筛选分子标记。验证分子标记准确性的品种名和性状列表如下:

验进行。

1.3 SSR分子标记筛选

2009年春,采用CTAB方法从幼嫩叶片组织中提取总DNA。所用的122对SSR引物序列引自Genome database for rosaceae公布的李属遗传整合参考图谱(<http://www.rosaceae.org/cgi-bin/gdr/cmap/>)

map_set_info),由上海捷瑞生物工程有限公司合成。反应体系及产物电泳参照曹珂等^[7]的方法。采用BSA法,选取F₁群体中花粉可育和花粉不稔各5株的花粉构建花粉可育和不稔基因池。首先用122对引物对亲本及混合基因池进行筛选,得到亲本无差异、但混合池有差异的引物;然后再用该引物对所有138个单株和亲本扩增检测。

1.4 分子标记的连锁分析

根据SSR标记在后代群体中的分离规律,将有带的亲本及有带的后代在该位点为杂合,记为1;无带的亲本及无带的后代在该位点为隐性纯合,记为0。模糊不清或缺失的记为-。花粉可育的记为1,花粉不稔的记为0。进行标记连锁分析时,根据Mapmaker要求选用F₂自交分析模型构建连锁群,LOD值最小为3.0,最大遗传距离为30cM(Centorgan);根据Kosambi函数,将重组率转换成图距单位;最后,将各标记间的遗传距离输入Mapchart 2.0,绘制连锁图谱^[7]。

1.5 其他花粉育性分子标记的验证

利用本试验获得的花粉育性分子标记和其他报道标记对24个桃品种进行扩增,当用与目标性状紧密连锁的分子标记对品种进行电泳时,其谱带的有无应与性状表现一致,即在本试验中,受显性基因控制的花粉可育品种应该有扩增条带,而花粉不稔品种无扩增条带。

表2 637份桃种质的花粉育性和花药颜色统计

Table 2 Statistics of pollen fertility and anther color in 637 peach cultivars

花药颜色 Anther color	品种数量 No. of variety	该类型占总数量 的百分比(%) Rate	花粉育性 Pollen fertility	品种数量 No. of variety	品种 Variety
白	9	1.4	不稔	9	传十郎、西野、龙华水蜜、晚白蜜、丰白、银花露、黄肉6号、橙艳、霞晖1号
浅褐	8	1.3	不稔	8	接土白、酸桃、深州水蜜、五月鲜、六月白、鸡嘴白、云南观赏桃、肉蟠桃
黄	18	2.8	不稔	5	秋香、金花露、青毛子白花、郑黄2号、江村5号
			可育	13	白单瓣、寿白、鸳鸯垂枝、白离胡、白核桃、白重瓣垂枝、卡洛红、白花山桃、GF677、碧桃、洒红桃、西康扁桃、白单瓣垂枝
橘黄	21	3.3	不稔	16	大团蜜露、S9、川中岛白桃、新白花、砂子早生、北农2号、长岭早玉露、浅间白桃、冈山白、上海水蜜、白花、临城桃、晚蟠桃、49-32、玛拉米、8903
			可育	5	礼泉54号、寿粉、阳桃、双丰、D2R32T158
橘红	581	91.2	不稔	24	宣城甜桃、宝露、西尾Gold、阿布白桃、早凤王、沙红桃、东云水蜜、光义五月桃、冈山早生、实生3号、安农水蜜、源东白桃、未央2号、松森、朝晖、冈山3号、割谷、贵州水蜜、二接白、郑黄4号、新疆蟠桃(无花粉)、仓方早生、冈山11号、红玫2号
			可育	557	白凤、天津水蜜、大久保、丰黄、早露蟠桃、曙光、满天红、红花山桃、帚形山桃、陕甘山桃、红根甘肃桃等557份

2 结果与分析

2.1 桃花粉育性的遗传规律

亲本瑞光19和Summergrand均为花粉可育,138株F₁中花粉可育和花粉不稔呈现分离,其中花粉可育株105,花粉不稔33株,卡方测验 $X_{0.05,2} = 0.087 < X_{0.05,2}$,符合3:1,表明Ps基因为独立遗传,可育对不稔呈显性。

2.2 桃花粉育性与花药颜色的关系

对资源圃中保存的637份种质的花药颜色和花粉育性进行分类描述和统计,其中,花药橘红的最多,共581份,占总份数的91.2%,其次为橘黄花药21份,黄色花药18份,白色花药9份,最少为浅褐花药,占总份数的1.3%(表2)。

在581份橘红色花药的种质中,557份种质表现为花粉可育,24份不稔,即花粉不稔率为4.1%;橘黄花药种质中,可育5份,不稔16份,即76.2%的花粉不稔;黄色花药中72.2%的花粉可育,27.8%的花粉不稔;而17份浅褐花药和白色花药的种质花粉全部不稔(表2)。因此在598份橘红色、浅褐和白色花药种质中,符合红色花药的花粉可育而无色(或浅褐)花药的花粉不稔的种质有574份,即根据花药颜色判断花粉育性的正确率可达96.0%,而对于花药颜色为黄色和橘黄的品种需要通过花粉发芽试验来判定其花粉育性。

将 5 种花药颜色中的白、浅褐和橘红看做红色逐渐加深, 而将橘红、橘黄和黄看做红色逐渐减弱、黄色逐渐加深, 进而分析花药颜色与花粉育性的关系, 推论如下: 当花药中的颜色由白、浅褐加深至橘红时, 可育花粉种质的比例迅速增加; 而当

花药中红色减弱时, 即由橘红到橘黄时, 可育花粉种质的比例又呈下降趋势, 即花药的红色与花粉育性呈正相关。而当花药中黄色增加时, 即花药颜色由橘黄到黄色, 虽然红色仍在减弱, 但可育花粉种质的比例又重新增加 (图 1)。

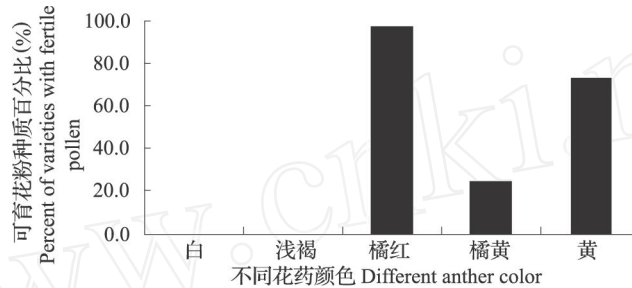


图 1 花粉育性和花药颜色的关系

Fig. 1 Relationship between percent of varieties with fertile pollen and anther color

2.3 桃花粉可育/不育性状的 SSR 标记筛选

通过植物学特性的相关进行花粉育性的判定虽然准确度较高, 但对树龄仍有一定的要求。随着分子标记的出现, 使在幼苗期开展花粉育性的早期筛选成为可能。

研究选用 122 对 SSR 引物, 首先对亲本和混合池进行筛选, 有 2 对引物 (CPDCT013 和 CPST012) 在父、母本间扩增无差异, 而在混合池间扩增有差异, 即花粉可育池有带, 花粉不稔池无

带。继而利用 CPDCT013 和 CPST012 对 138 株后代进行扩增, 如图 2, CPDCT013 表现为显性标记, 在群体中扩增 94 个单株有带, 44 个单株无带, 卡方测验 $X_{0.02} = 3.487 < X_{0.052} = 3.84$, 即分离比例符合 3:1; 而 CPST012 表现为共显性标记, 在群体中扩增, 29 个单株扩增出 1 条长片段带, 82 个单株扩增出双带, 27 个单株扩增出 1 条短片段带, 卡方测验 $X_{0.02} = 4.956 < X_{0.052} = 5.99$, 即 3 种带型分离符合 1:2:1。

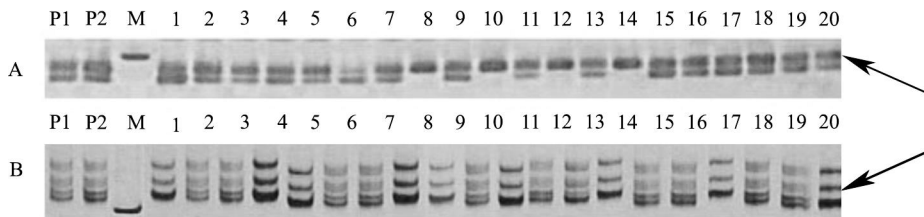


图 2 CPDCT013(A)和 CPST012(B)对亲本及 20 株后代的扩增电泳图

Fig. 2 Electrophoresis results of amplification products from primer CPDCT013(A) and CPST012(B) on parents and seedlings

P1: Summergrand; P2: Ruiguang19; arrow showed the different band

2.4 桃花粉育性连锁 SSR 标记的遗传距离及定位

将调查所得的花粉育性数据与 CPST012、CPDCT013 扩增结果一起输入 Mapmaker3.0 分析软件, 进行花粉育性基因与该 SSR 标记的连锁分析, 结果表明: 控制花粉育性的基因位点与标记 CPDCT013 的连锁距离为 18.9 cM, CPST012 与花粉育性位点的连锁距离为 39.8 cM (图 3)。根据 CPDCT013 和 CPST012 位于李属整合参考图谱的第 6

条连锁群上, 且由于目前分子图谱和染色体已经对应, 因此本试验将花粉育性的基因定位在第 6 条染色体上端。

2.5 桃花粉育性分子标记的验证

如图 3 所示, 在整合参考图谱第 6 条连锁群上, 与花粉育性标记较近的 SSR 引物为 PS7a2 (7.0)、CPPCT008 (8.7) 和 UDP96-001 (17.5), 虽然它们在瑞光 19 × summergrand 群体中无扩增条带或扩增

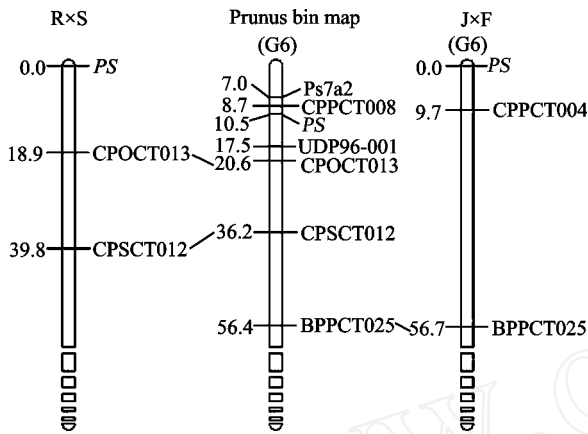


图 3 SSR标记在瑞光 19 x summergrand (R x S)第 6 连锁群顶端上的位置与李属整合参考图谱及 Ferjalou Jalousa x Fantasia (J x F) 图谱的同线性分析

Fig. 3 Alignment of the homologous fragments at the top of linkage group 6 from the Ruiguang 19 x summergrand and the Prunus bin maps

条带无差异,但其是否可用来判定其他品种花粉育性,尚不可知。因此,利用这些 SSR 引物和本试验获得的标记 CPDCT013 以及其他文献报道的连锁标记如 CPPCT004^[3]对花粉育性不同的 24 个桃品种进行扩增,以验证其判定花粉育性效率的准确性,扩增结果见表 3。

扩增结果表明,PS7a2 在 24 个桃品种间均无扩增条带,可能与其来源于樱桃基因组有关 (http://www.bioinf.wsu.edu/cgi-bin/gdr/gdr_marker.cgi?MName_Result=PS7a2)。NNJ-I 和 CPPCT008 虽然

表 3 不同 SSR 引物对桃花粉育性不同品种的验证

Table 3 The test of exactitude used SSR marker

所用引物来源 Primer origin	引物名称 Primer name	扩增结果 Amplification result	参考文献 Reference
其他研究中报道的花粉育性标记	CPPCT004	有差异	[3]
本试验获得的标记	NNJ-I	无差异	[5]
	CPDCT013	有差异	—
	PS7a2	无扩增条带	[7]
整合参考图谱上第 6 条连锁群花粉育性基因近旁的位点	CPPCT008	无差异	[7]
	UDP96-001	有差异	[7]

有扩增条带,但条带间无差异。CPPCT004、CPDCT013 和 UDP96-001 的电泳谱带如图 4,其中 CPPCT004 为显性带型,在品种 1~14 (花粉不稔) 中有 8 个扩增出条带,而品种 15~24 (花粉可育) 中有 7 个无扩增条带,扩增带的有无与性状的误差率为 62.5%。CPDCT013 为共显性扩增带型,在花粉不稔品种中有 12 个有扩增条带,而在花粉可育品种中有 4 个无扩增条带,扩增带的有无与性状的误差率为 66.7%。UDP96-001 在不同品种间扩增存在着多个等位位点,范围在 105~140bp 之间。其中瑞光 19 有 2 条扩增条带,135bp 条带在所有品种均有扩增,125bp 条带虽然在本试验中所用的杂交 F₁ 群体的亲本间无差异,且在后代中也无差异,但在 14 个花粉不稔品种中的 4 个上有扩增,而在 10 个花粉可育品种中只有 2 个无扩增,即用该扩增带鉴定品种花粉育性的准确率高达 75%。

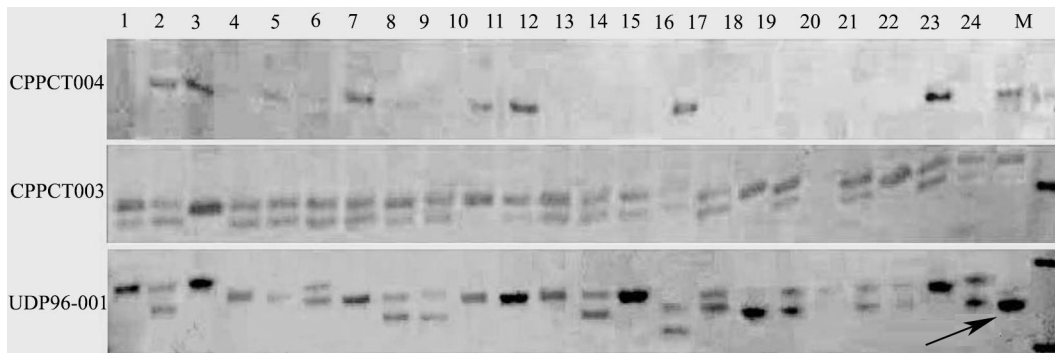


图 4 CPPCT004、CPDCT013 和 UDP96-001 对 24 个桃品种的扩增电泳图

Fig. 4 Electrophoresis results of 24 peach cultivars amplified by primer CPPCT004, CPDCT013 and UDP96-001

3 讨论

3.1 花粉育性与花药颜色的关系

本试验研究表明花药颜色与花粉育性具有一定

的相关性,因此在判定白色、浅褐和橘红花药的花粉育性正确率为 96.0%,这高于利用一个与花粉育性连锁距离大于 2cM 的分子标记进行品种花粉育性鉴定的准确率;但在根据花药颜色判定橘黄和黄色

花药种质的花粉育性时,准确率较低。

花药颜色不仅可以作为花粉育性的一个判定指标,同时对于揭示花粉发育生理具有一定意义。对于花粉不稔的原因,一些研究认为花粉育性与 Ca^{2+} ^[8]和脯氨酸含量^[9-11]关系密切,由于脯氨酸是一种重要的渗透调节物质,而使花药显色的花色素苷、类胡萝卜素等类黄酮物质是否也做为一种渗透调节物影响花粉育性或受其影响,有待研究。

3.2 花粉育性的分子标记

本试验利用 122 对 SSR 引物对不同花粉育性混合池进行筛选,获得与花粉育性最近的分子标记为 CPDCT013,连锁距离 18.9cM,大于质量性状分子标记辅助育种要求的低于 5cM 的标准。其原因可能如下:(1)一些已经报道的标记在本群体中没有获得结果。如 Dirlwanger 等^[3]将花粉育性的基因定位在 J xF 图谱的第 6 连锁群上,与之最近的标记为 CPPCT004 (9.7cM),然而在本试验中 CPPCT004 在混合池间扩增却没有差异。通过检索李属整合参考图谱发现, CPPCT004 位于第 1 和 5 连锁群上,可能在 Dirlwanger 等^[3]的研究中该位点发生了交换才导致其位于第 6 连锁群。因此,在本试验中, CPPCT004 与位于第 6 连锁群上的花粉育性位点不连锁,这与参考图谱的结论是一致的。(2)第 6 连锁群 SSR 位点少。分析李属整合参考图谱的所有 8 条连锁群上的 SSR 位点可以看出,第 2 条连锁群上定位的 SSR 位点最密,位点间距 3.6cM;而第 6 条连锁群上定位的 SSR 位点最少,位点间距 7.0cM,这可能是本试验难以获得与花粉育性基因连锁距离最近的 SSR 标记的原因。

因此,在今后的研究中,可以采用其他多态性高的标记方法如 AFLP、SRAP (Sequence Related Amplified Polymorphism) 等以降低标记的连锁距离,提高应用价值。

3.3 花粉育性分子标记在品种上的验证

由于试验获得的花粉育性分子标记与控制花粉育性的基因位点距离较远,试验对其他的花粉育性标记 CPPCT004 和 NNJ-1 进行了验证。然而,这两个标记均不能准确的对试验中采用的桃品种进行花粉育性的判定。试验同时对位于参考图谱上花粉育性位点附近的 SSR 位点进行了反复筛选,虽然 UDP96-001 (125bp) 在群体中进行扩增时没有差异,但在判定不同品种的花粉育性时准确性较高,其他标记准确性差。因此,要筛选一个实用的分子标记,并不能仅仅利用杂交群体来筛选,在不同品种上对标记进行验证也是至关重要的。

参考文献

- [1] Connors Sterility in peaches [J]. Mem Hort Soc NY, 1927, 3: 215-222
- [2] 马瑞娟,宋宏峰,沈志军,等. 桃花器和开花特性研究 [J]. 植物遗传资源学报, 2004, 5 (4): 382-385
- [3] Dirlwanger E, Cosson P, Boudehri K, et al Development of a second-generation genetic linkage map for peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] and characterization of morphological traits affecting flower and fruit [J]. Tree Genetics & Genomes, 2006, 3: 1-13
- [4] 王成,曹后男,宗成文,等. 桃花粉可育基因连锁的 RAPD 标记与 SCAR 标记的转化 [J]. 园艺学报, 2007, 34 (4): 865-870
- [5] 俞明亮,马瑞娟,沈志军,等. 桃果肉颜色、果皮茸毛和花粉育性性状的分子标记 [J]. 园艺学报, 2006, 33 (3): 511-517
- [6] 王力荣,朱更瑞. 桃种质资源描述规范和数据标准 [S]. 北京: 中国农业出版社, 2005
- [7] 曹珂,王力荣,朱更瑞,等. 桃遗传图谱的构建及两个花性状的分子标记 [J]. 园艺学报, 2009, 36 (2): 179-186
- [8] 孟祥红,王建波,利容干. 光周期对光敏胞质不育小麦花药发育过程中 Ca^{2+} 分布的影响 [J]. 植物学报, 2000, 42 (1): 15-22
- [9] Stanley R G, Linstens H F. Pollen [M]. New York: Springer-Verlag, 1974: 154-158
- [10] 陈桂信,吕柳新. 柑桔花药游离脯氨酸含量的动态变化与花粉育性的关系 [J]. 福建农业大学学报, 1996, 25 (1): 21-23
- [11] 罗来水,霍光华,刘勇,等. 桃雄性育性与花器官内游离氨基酸含量的关系 [J]. 果树科学, 2000, 17 (4): 255-260