

大豆铝激活苹果酸转运家族基因 *GmALMT8* 的鉴定与功能验证

刘慧^{1,2}, 许文静^{1,2}, 张红梅¹, 刘晓庆¹, 张威¹, 王琼¹, 朱月林², 陈华涛¹

(¹江苏省农业科学院经济作物研究所, 南京 210014; ²南京农业大学园艺学院, 南京 210095)

摘要: 鲜食风味是菜用大豆食味品质的关键因素, 其形成与有机酸有着密切的关联, 研究有机酸合成机制对于菜用大豆的品质改良具有重要的实际意义。本研究利用大豆毛状根系统探究与苹果酸含量显著相关的候选基因 *GmALMT8*、*GmIF7GT5* 和 *GmAP* 在调控苹果酸含量方面的功能, 结果表明: 在 *GmALMT8*-OE 毛状根中, *GmALMT8* 基因表达量与苹果酸的含量均显著高于空载对照毛状根, 而 *GmIF7GT5* 和 *GmAP* 毛状根中苹果酸的含量无显著变化。鉴于已经报道的 *ALMT* 家族基因的苹果酸转运功能, 推测大豆中 *GmALMT8* 基因可能具有相似的功能, 在调控苹果酸含量方面发挥重要作用。通过拟南芥遗传转化进一步证明 *GmALMT8* 的稳定表达能够提高苹果酸含量, 明确 *GmALMT8* 基因在大豆中具有调控苹果酸含量的生物学功能, 丰富了大豆有机酸的理论研究, 对菜用大豆优质育种具有参考价值。

关键词: 菜用大豆; 苹果酸; 候选基因; 功能分析

Functional Analysis of Aluminum-Activated Malate Transporter Family Protein *GmALMT8* in Soybean

LIU Hui^{1,2}, XU Wenjing^{1,2}, ZHANG Hongmei¹, LIU Xiaoqing¹, ZHANG Wei¹, WANG Qiong¹, ZHU Yuelin²,
CHEN Huatao¹

(¹Institute of Industrial Crops, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014; ²College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095)

Abstract: Fresh flavor is the key factor of the taste quality of vegetable soybean, and its formation is closely related to the organic acids. It is of great practical significance to analyze the synthesis mechanism of organic acids in quality improvement of vegetable soybean. In this study, the soybean hairy root system was used to explore the functions of candidate genes *GmALMT8*, *GmIF7GT5* and *GmAP*, which are significantly related to malic acid content, in regulating malic acid content. The transcripts of *GmALMT8* gene and the content of malic acid in *GmALMT8*-OE hairy roots were significantly higher than those in control hairy roots without inserts, while the content of malic acid in *GmIF7GT5* and *GmAP* transformed hairy roots had no significant change. Considering the reported malic acid transport function of *ALMT* family genes, it is speculated that *GmALMT8* gene in soybean may have a similar function and play an important role in regulating malic acid content. *GmALMT8* over-expressing lines in *Arabidopsis thaliana* via genetic transformation resulted in an increase on malic acid content. These results approved that soybean *GmALMT8* gene had biological function in regulating malic acid content, which enriched the theoretical research of soybean organic acid and provided reference value for high-quality breeding of vegetable soybean. **Key words:** Vegetable soybean; Malic acid; Candidate gene; Functional analysis

收稿日期:

第一作者简介主要从事菜用大豆分子遗传研究, E-mail: 2020104078@stu.njau.edu.cn

通讯作者: 陈华涛, 主要从事大豆分子育种技术及种质创新, E-mail: cht@jaas.ac.cn

基金项目: 江苏省农业科技自主创新项目 (CX(22)5002)

Foundation project: Jiangsu Agriculture Science and Technology Innovation Fund (CX(22)5002)

菜用大豆[*Glycine max* (L.) Merr.]又称毛豆、鲜食大豆,是指在 R6(鼓粒盛期)至 R7(初熟期)生育期间采青食用的大豆专用型品种^[1]。鲜食风味是菜用大豆食味品质的关键因素,而有机酸作为多种氨基酸生物合成的底物,有利于籽粒中氨基酸的积累从而提高菜用大豆的鲜味^[2]。其中苹果酸作为主要有机酸之一,具有较好的抗氧化能力,能够加速消除机体自由基,并且具有清热、消炎、促进机体代谢的作用^[3]。

而品质(如有机酸和苹果酸含量)、产量以及抗逆性等性状均属于数量性状,因此数量性状的研究对于农作物的遗传改良具有重要的实际意义,在不同的植物中已报道了许多与有机酸含量相关的 QTLs。Liebhard 等^[4]研究表明,苹果(*Malus pumila* Mill.)果实中可滴定酸含量的变化几乎完全可以由 8, 16 号连锁群上的 2 个主效 QTL 位点决定,分别能够解释后代中酸度表型变异的 46%, 42%, 其中位于第 16 连锁群上的主效基因位置与 Maliepaard 等^[5]报道的结果相一致。菜用大豆中的有机酸含量属于多个基因协同控制的数量性状,与传统的连锁定位方法相比,全基因组关联分析法(Genome wide association study, GWAS)节省了构建群体的时间,能够对不同种质进行遗传结构分析,提高 QTL 定位的精准性^[6-7],应用在大豆、小麦(*Triticum aestivum* L.)和水稻(*Oryza sativa* L.)等多种作物中^[8-10],已经成为快速有效的发掘植物数量性状基因的重要手段。

铝激活苹果酸转运蛋白(aluminum-activated malate transporters, ALMT)是植物特有的一类膜蛋白,在苹果酸的积累与运输中起着至关重要的作用。ALMT 家族基因在调控果实有机酸含量和果实酸化过程中发挥着重要作用,多项研究证实 ALMT 家族基因可作为果实品质的关键调节因子。葡萄(*Vitis vinifera* L.)中定位于液泡膜上的 VvALMT9 可以介导酒石酸和苹果酸的转运,在葡萄浆果有机酸的形成中起关键作用^[11],番茄(*Solanum lycopersicum* L.)中 SLALMT9 是影响苹果酸含量变异的重要基因,通过调控果实中苹果酸的积累从而影响果实品质^[12]。Xu 等^[13]发现白梨(*Pyrus bretschneideri* Rehder) ALMT 家族基因 *Pbr020270.1* 参与果实发育过程中的苹果酸积累。巫伟峰^[14]的研究表明在李(*Prunus salicina* Lindl.)的大多数品种果实中 ALMT4-like 基因具有促进苹果酸的积累的作用。在苹果中,多个研究团队均定位到位于 16 号染色体上的 ALMT 家族基因 *Mal1*,推测其可能主导苹果果实中酸度的形成^[15-16]。以上研究结果均表明多种果实中的 ALMT 家族基因与苹果酸的转运和积累密切相关,且影响果实酸度的形成和风味品质。

我们前期基于 GWAS 研究结果共挖掘到 3 个与苹果酸含量显著相关的候选基因,定位于 5 号染色体上的 *GmALMT8* 编码铝激活苹果酸转运家族蛋白(aluminum-activated malate transporter family protein);定位于 16 号染色体上的 *GmIF7GT5* 编码异黄酮 7-O-葡萄糖基转移酶 UGT5(isoflavone 7-O-glucosyltransferase UGT5);定位于 19 号染色体上的 *GmAP* 编码天冬氨酸蛋白酶家族蛋白(aspartic proteinase 36)。本研究利用菜用大豆毛状根系统探究上述候选基因在调控苹果酸含量方面的功能;并通过拟南芥(*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.)遗传转化获得 *GmALMT8* 基因过表达拟南芥株系 T₂ 代,进一步明确 *GmALMT8* 基因在调控菜用大豆苹果酸含量方面的生物学功能,旨在初步解析菜用大豆苹果酸含量的遗传学基础,为调控菜用大豆苹果酸含量的分子机制研究提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

以大豆栽培品种“Williams 82”作为大豆毛状根系统转化材料,拟南芥(*Arabidopsis thaliana*, Columbia-0 型)作为遗传转化材料。以上植物材料均由江苏省农业科学院豆类作物研究室提供。

1.2 方法

1.2.1 植物过表达载体的构建

通过同源重组方法构建重组表达载体 pCAMBIA1305-*GmALMT8*、pCAMBIA1305-*GmIF7GT5* 和 pCAMBIA1305-*GmAP*,转化大肠杆菌 DH5 α 并进行菌落 PCR 分子鉴定,试验中载体构建用到的引物见表 1。利用冻融法将构建好的载体和空载 pCAMBIA1305 分别转化到发根农杆菌(*Agrobacterium rhizogenes*) K599 和根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*) EHA105 感受态细胞中。

表 1 用于载体构建的引物

Table 1 Primers for vectors construction

引物名称	序列 (5'-3')
Primer	Sequence (5'-3')
GmALMT8-OE-F	CGGAGCTAGCTCTAGAATGGAAATGGCAATGGCTGAT
GmALMT8-OE-R	TGCTCACCATGGATCCTTCTGCTCCACGAGTAGGT
GmIF7GT5-OE-F	CGGAGCTAGCTCTAGAATGAAAGAAGCTGTAGTTTTC
GmIF7GT5-OE-R	TGCTCACCATGGATCCACTGACACACACTTTGTCTC
GmAP-OE-F	CGGAGCTAGCTCTAGAATGCGGGGTGGTGTTTCCCTG
GmAP -OE-R	TGCTCACCATGGATCCCAAAATTGGCACTCCATG

1.2.2 发根农杆菌介导转化大豆毛状根

根据 Kereszt 等人^[17]所提出的大豆毛状根转化方法，分别将携有 pCAMBIA1305-*GmALMT8*、pCAMBIA1305-*GmIF7GT5* 和 pCAMBIA1305-*GmAP* 质粒及相应空载质粒的发根农杆菌 K599 侵染 Williams 82 子叶节附近，侵染完成后置于恒温光照培养箱中培养，昼夜温度为 28 °C/25 °C，光周期为 16 h 光/8 h 暗，湿度为 70%以上。2-3wk 后从侵染部位长出的毛状根长度达到 5-10 cm 时，剪掉幼苗主根并置于霍格兰营养液中培养 7d 左右，最终得到的大豆幼苗嵌合体，包括非转基因的地上部以及转基因的毛状根，转化示意图如图 1。



A: 播种 5 天后侵染子叶节附近; B: 侵染 2-3 周后于侵染部位长出毛状根; C: 去除主根于营养液中培养 7 天后的植株

A: Stabbing of the hypocotyl close to the cotyledonary node of 5-day-old seedlings;B: vegetable soybean plant 2-3 weeks after inoculation with *A. rhizogenes* K599;C: vegetable soybean plant after the removal of the primary root cultured in nutrient solution for 7 days

图 1 大豆毛状根生成示意图

Fig. 1 Different stages of the soybean hairy root transformation

1.2.3 阳性毛状根鉴定

选取在共聚焦显微镜（Zeiss, LSM 780, Germany）下观察到绿色荧光的毛状根，取其中一部分毛状根用于阳性毛状根的 PCR 分子鉴定，另一部分快速冷冻于液氮中，保存至-80 °C冰箱备用，除用于检测候选基因的表达外，剩余毛状根全部用于苹果酸含量的检测。

1.2.4 大豆毛状根中候选基因表达量测定

采用 ABI 7500 系统(Applied Biosystems)进行实时荧光定量 PCR(quantitative real-time PCR, qRT-PCR)，设置 3 个技术学重复。候选基因检测所用的引物及内参基因 *Tubulin* 的引物序列见表 2。通过比较 CT（Cycle threshold）值对目标基因的表达水平进行分析，并使用相对定量 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法对数据进行处理和分析^[18]。

表 2 用于实时荧光定量 PCR 的特异引物
Table 2 Sequences of specific primers for qRT-PCR

引物名称	序列 (5'-3')
Primer	Sequence (5'-3')
GmALMT8-qRT-F	CCATCGGTTCGAGTCCTGTT
GmALMT8-qRT-R	GGCGACGGTTCCTTATGCTA
GmIF7GT5-qRT-F	GTGCTGGGGTGCCCATGATAGCATG
GmIF7GT5-qRT-R	CGATTCCATCAACTCCCTAA
GmAP-qRT-F	GAATTGGATGGGCCGATTAT
GmAP-qRT-R	GAAAGTGCCTATGTGGGAGC
Tubulin-F	CACCTCTGTTGGCATTGCAC
Tubulin-R	ACAGTGTAGTGTCCCTTGC

1.2.5 大豆毛状根中苹果酸含量测定

将用于苹果酸含量测定的毛状根按照单株分别放置，先 105 °C 杀青 30 min，再于 75 °C 烘干至恒重后用研钵研磨成粉末（过 0.45 mm 筛）。苹果酸的提取参考 Li 等^[19]的提取方法，并采用高效液相色谱法测定大豆毛状根中苹果酸含量，具体试验步骤参考文献^[20]。

1.2.6 拟南芥的遗传转化

为了进一步确认 *GmALMT8* 的功能，将构建的 pCAMBIA1305-*GmALMT8* 过表达载体转化到农杆菌 EHA105 中，并采用蘸花法侵染拟南芥^[21]。

1.2.7 转基因拟南芥阳性植株的鉴定

将 T₀ 代拟南芥种子置于 2 mL 离心管中，加入 75% 酒精对种子消毒 5 min，再用无菌水洗涤种子 2 次。加入 10% 次氯酸钠（活性氯≥5.5%）对种子消毒 5 min 后，用无菌水洗涤种子 5 次。将种子均匀播种在 1/2 MS 固体培养基上（含 15 mg/L Hyg 和 16 mg/L 特美汀），置于 4 °C 冰箱中 3 天后移至光照培养箱培养 14 天左右进行移苗。对具有 Hyg 和特美汀抗性的拟南芥，提取叶片 DNA 进行 PCR 检测。对 PCR 检测均呈阳性的株系收种，即得到 T₁ 代种子。将 T₁ 代种子按上述方法继续进行阳性筛选获得拟南芥 T₂ 代转基因植株，收获 T₂ 代种子用于苹果酸含量检测。

1.2.8 过表达拟南芥植株中 *GmALMT8* 表达量及苹果酸含量测定

分别提取野生型拟南芥与转基因拟南芥 T₂ 叶片中的总 RNA 并反转录用于 qRT-PCR 试验，以 *AtTUB* 基因为内参基因，检测所用的引物列于表 3 中。测定过表达 *GmALMT8* 基因拟南芥 T₂ 代种子中苹果酸含量，测定方法同 1.2.5。

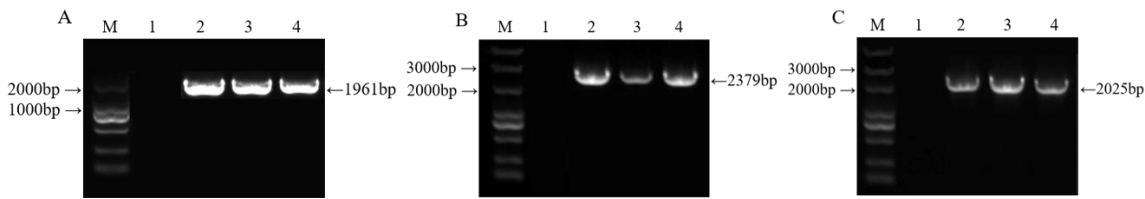
表 3 用于实时荧光定量 PCR 的特异引物
Table 3 Sequences of specific primers for qRT-PCR

引物名称	序列 (5'-3')
Primer	Sequence (5'-3')
GmALMT8-qRT-F	TATTTCCCTGAAC TTTCCCTCTG
GmALMT8-qRT-R	TAGGCTTCATAATCATGTCACCC
AtTUB-F	GTTCTCGATGTTGTTTCGTAAG
AtTUB-R	TGTAAGGCTCAACCACAGTAT

2 结果与分析

2.1 大豆阳性毛状根鉴定

分别提取转基因毛状根与空载对照毛状根的基因组 DNA，进行 PCR 检测，结果显示，转基因毛状根中分别有 *GmALMT8*、*GmIF7GT5* 和 *GmAP* 基因的存在（图 2 A, B, C）。



A: *GmALMT8*-OE 阳性毛状根 PCR 验证, M: DL2000 Marker, 1: 阴性对照, 2-4: 阳性毛状根; B: *GmIF7GT5*-OE 阳性毛状根 PCR 验证, M: DL5000 Marker, 1: 阴性对照, 2-4: 阳性毛状根; C: *GmAP*-OE 阳性毛状根 PCR 验证, M: DL5000 Marker, 1: 阴性对照, 2-4: 阳性毛状根; A: *GmALMT8*-OE positive hairy roots verified by PCR, M: DL2000 Marker, 1: negative control, 2-4: positive clones; B: *GmIF7GT5*-OE positive hairy roots verified by PCR, M: DL5000 Marker, 1: negative control, 2-4: positive clones; C: *GmAP*-OE positive hairy roots verified by PCR, M: DL5000 Marker, 1: negative control, 2-4: positive clones

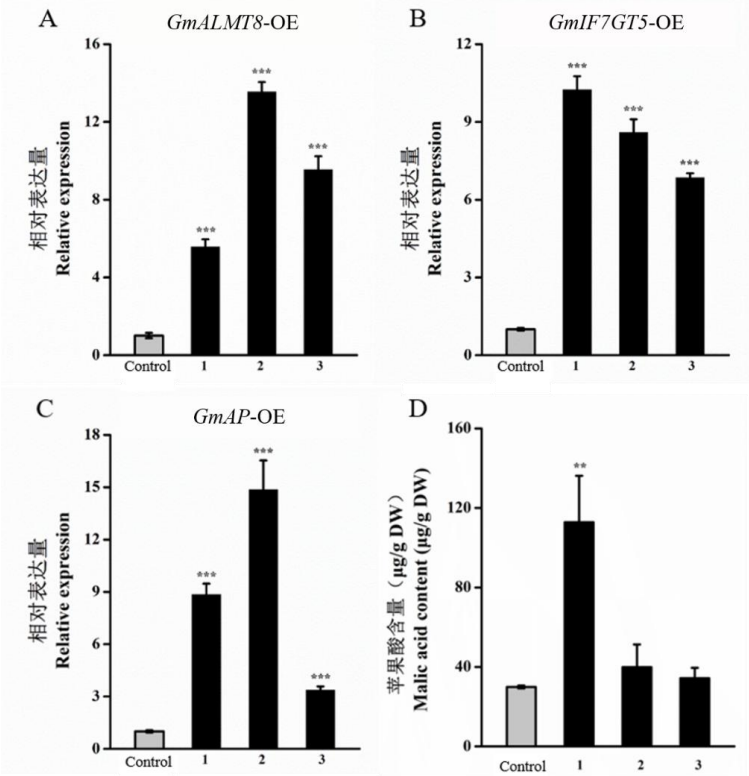
图 2 大豆转基因阳性毛状根鉴定

Fig. 2 Identification of transgenic positive hairy roots of soybean

2.2 候选基因在阳性毛状根中的功能分析

qRT-PCR 结果显示，与对照（Control）相比，在 *GmALMT8*-OE、*GmIF7GT5*-OE 和 *GmAP*-OE 毛状根中 *GmALMT8*、*GmIF7GT5* 和 *GmAP* 基因的表达量均显著增加（图 3 A, B, C）。

苹果酸含量检测结果表明，*GmALMT8*-OE 毛状根中苹果酸含量为 112.8 $\mu\text{g/g}$ ，显著高于空载对照毛状根，是空载毛状根的 3.77 倍。而 *GmIF7GT5*-OE 和 *GmAP*-OE 毛状根中苹果酸含量和空载对照毛状根相比均无显著性差异（图 3 D）。由上述结果推测 *GmALMT8* 可能参与菜用大豆苹果酸含量的调控过程。



A: 1-3: *GmALMT8* 基因在 *GmALMT8*-OE 中的表达量; B: 1-3: *GmIF7GT5* 基因在 *GmIF7GT5*-OE 中的表达量; C: 1-3: *GmAP* 基因在 *GmAP*-OE 中的表达量; D: 1: *GmALMT8*-OE 中苹果酸的含量, 2: *GmIF7GT5*-OE 中苹果酸的含量, 3: *GmAP*-OE 中苹果酸的含量; *, **, *** 分别表示在 $P < 0.05$ 、

$P < 0.01$ 、 $P < 0.001$ 水平上差异显著

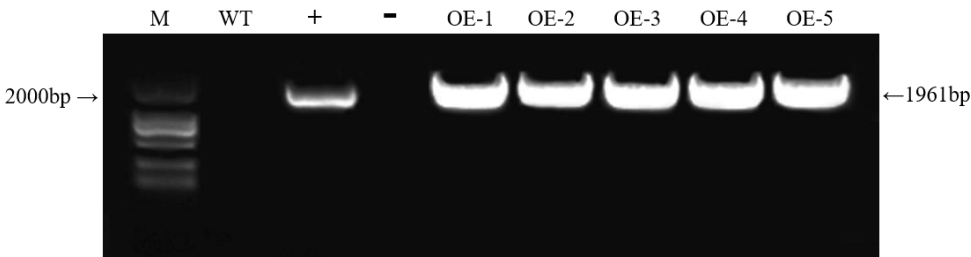
A: 1-3: expression of *GmALMT8* gene in *GmALMT8*-OE; B: 1-3: expression of *GmIF7GT5* gene in *GmIF7GT5*-OE; C: 1-3: expression of *GmAP* gene in *GmAP*-OE; D: 1: malic acid content in *GmALMT8*-OE; 2: malic acid content in *GmIF7GT5*-OE; 3: malic acid content in *GmAP*-OE; *, **, *** indicated significant difference at $P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$, respectively

图3 候选基因在阳性毛状根中的功能分析

Fig. 3 Functional analysis of candidate genes in positive trichome roots

2.3 转基因拟南芥的阳性鉴定

为了进一步验证 *GmALMT8* 的稳定表达是否能够正向调控苹果酸的积累, 将 pCAMBIA1305-*GmALMT8* 过表达载体转化至根癌农杆菌 EHA105, 通过蘸花法转化拟南芥, 反复筛选后获得 T₂ 代转基因拟南芥株系并进行 PCR 检测, 结果显示, 扩增条带大小与目的基因片段大小一致 (图 4)。



M: DL2000 Marker; +: 阳性对照, pCAMBIA1305-*GmALMT8* 质粒; -: 阴性对照, 空白对照; OE-1-OE-5: *GmALMT8* 基因成功插入的 5 株阳性拟南芥株系

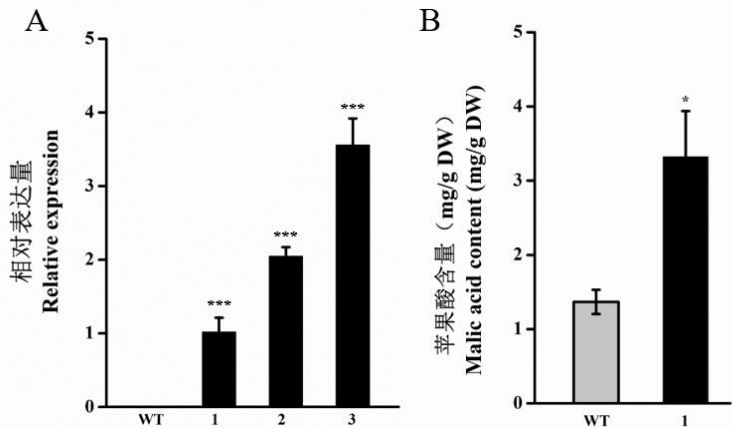
M: DL2000 Marker; +: positive control, pCAMBIA1305-*GmALMT8* plasmid; -: negative control, blank control; OE-1-OE-5: different *GmALMT8* transgenic *Arabidopsis thaliana*

图4 T₂代转基因拟南芥 *GmALMT8* 基因的 PCR 检测

Fig. 4 PCR analyses of *GmALMT8* transgenic *Arabidopsis thaliana* from T₂ transgenic lines

2.4 过表达 *GmALMT8* 促进苹果酸的积累

qRT-PCR 结果显示, 与野生型 (WT) 相比, T₂ 代转基因拟南芥株系中 *GmALMT8* 基因的表达量显著提高 (图 5 A)。此外, 与阳性毛状根中苹果酸测定的结果相类似, 异源过表达 *GmALMT8* 显著提高了苹果酸含量, T₂ 代转基因拟南芥株系种子中苹果酸的含量是 WT 的 2.43 倍 (图 5 B)。



A: *GmALMT8* 过表达拟南芥与野生型拟南芥相对表达水平, 1-3: *GmALMT8* 基因在 T₂ 代转基因拟南芥株系中的表达量; B: 1: T₂ 代转基因拟南芥株系种子中苹果酸含量;

A: Relative expression levels of *GmALMT8* overexpressed *Arabidopsis Thaliana* and wild type *Arabidopsis Thaliana*, 1-3: Expression levels of *GmALMT8* in T₂ transgenic *Arabidopsis Thaliana*; B: 1: malic acid content in seeds of T₂ transgenic *Arabidopsis thaliana*.

图 5 过表达 *GmALMT8* 对苹果酸含量的影响

Fig. 5 Effect of overexpression of *GmALMT8* on malic acid content

3 讨 论

果实中有机酸的积累程度在很大程度上取决于有机酸代谢过程中的合成、降解和转化,因此,有机酸转运体的研究对于果实中有机酸积累的机制研究具有重要的意义。不同物种中均证实了 *ALMT* 家族基因能介导植物中苹果酸的转运,且参与果实中的苹果酸含量的调控,在果实酸化过程中发挥着重要作用^[22-23]。

本研究通过大豆毛状根转化系统对 3 个与菜用大豆苹果酸含量相关的候选基因 *GmALMT8*、*GmIF7GT5* 和 *GmAP* 进行功能验证。Peng 等人研究表明,苹果中的转录因子 *MdMYB21* 可以下调编码铝激活苹果酸转运蛋白 *ALMT* 的基因 *MdMal1* 的表达从而显著降低了苹果酸含量^[24],此外玉米 (*Zea mays* L.) 中编码 *ALMT* 的基因 *EAD1* 功能障碍导致顶端部分未成熟穗的苹果酸含量降低,且严重退化。而外源苹果酸注射液挽救了 *ead1* 的表型缺陷^[25],Ye 等人同样鉴定了番茄中的 *SLALMT9*,它是番茄果实成熟过程中苹果酸积累所必需的,并提高番茄的果实风味和抗铝胁迫能力^[12]。本研究同样发现在 *GmALMT8*-OE 毛状根中, *GmALMT8* 基因表达量与苹果酸的含量均显著高于空载对照毛状根。由此推测菜用大豆中的 *GmALMT8* 基因可能具有参与调控菜用大豆中苹果酸的含量的功能。因此选择该基因作为探索菜用大豆苹果酸含量调控机理的主要研究对象,进一步深入研究。

为验证 *GmALMT8*-OE 毛状根中苹果酸含量的变化是否由 *GmALMT8* 基因表达的改变引起的,本研究采用蘸花法在拟南芥中过表达 *GmALMT8* 基因。与阳性毛状根中苹果酸测定的结果相类似,过表达 *GmALMT8* 显著提高了 *T₂* 代转基因拟南芥株系种子中的苹果酸含量,

以上结果表明, *GmALMT8* 与大豆有机酸有显著关联,可能通过提高苹果酸积累而影响大豆品质。此外,拟南芥中的 *AtALMT12* 可以调控苹果酸的运输,并且参与调节气孔运动^[26-27],同样,在大豆中,前人研究表明低磷条件诱导根部 *GmALMT5* 的上调可以增加根系中苹果酸的外排,从而提高磷的利用效率^[28],以上结果均表明 *ALMT* 与苹果酸密切相关,包括转运、积累等过程。

参考文献

- [1] Zhang G W, Xu S C, Mao W H, Hu Q Z, Gong Y M. Determination of the genetic diversity of vegetable soybean [*Glycine max*(L.)Merr.] using EST-SSR markers. *Journal of Zhejiang University Science B*, 2013, 14(4): 279-288.
- [2] Hu R, Zhang Y, Chen Y, Lin G Q. Dynamic metabolic profiling in vegetable soybean seed development. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 2018, 30(2): 90-98.
- [3] 南龙伟, 闫小玉, 门靖, 邓洪丽, 李娟, 宋洋. 苹果酸的生理功能及在食品中的应用研究进展. *精细化工中间体*, 2022, 52(5):26-29, 62.
- [4] Nan L W, Yan X Y, Men J, Deng H L, Li J, Song Y. Research progress on physiological function of malic acid and its application in food industry. *Fine Chemical Intermediates*, 2022, 52(5):26-29, 62.
- [5] Liebhart R, Koller B, Gianfranceschi L, Gessler C. Creating a saturated reference map for the apple (*Malus × domestica* Borkh.) genome. *Theoretical and Applied Genetics*, 2003, 106(8): 1497-1508.
- [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, den 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. *Theoretical and Applied Genetics*, 1998, 97(1/2): 60-73.
- [7] Zhang X, Guan Z, Wang L, Fu J, Zhang Y, Li Z, Ma L, Liu P, Zhang Y, Liu M, Li P, Zou C, He Y, Lin H, Yuan G, Gao S, Pan G, Shen Y. Combined GWAS and QTL analysis for dissecting the genetic architecture of kernel test weight in maize. *Molecular Genetics and Genomics: MGG*, 2020, 295(2): 409-420.

- [7] Zhang Y, Liu Z, Wang X, Li Y, Li Y, Gou Z, Zhao X, Hong H, Ren H, Qi X, Qiu L. Identification of genes for drought resistance and prediction of gene candidates in soybean seedlings based on linkage and association mapping. *The Crop Journal*, 2022, 10(3): 830-839.
- [8] 丁杰荣, 孙炳蕊, 于航, 江立群, 张静, 吕树伟, 陈文丰, 范芝兰, 潘大建, 李晨, 刘清. 广东水稻核心种质耐冷萌发全基因组关联分析. *植物遗传资源学报*, 2022, 23(5):1425-1437.
- Ding J R, Sun B R, Yu H, Jiang L Q, Zhang J, Lyu S W, Chen W F, Fan Z L, Pan D J, Li C, Liu Q. Genome-wide Association Analysis of Cold Tolerance Germination in Rice Core Germplasm of Guangdong Province in China. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2022, 23(5):1425-1437.
- [9] 梁腾月, 谷勇哲, 马英杰, 王辉, 杨光, 敖雪, 邱丽娟. 大豆耐低磷性全基因组关联分析. *植物遗传资源学报*, 2023, 24(01):237-251.
- Liang T Y, Gu Y Z, Ma Y J, Wang H, Yang G, Ao X, Qiu L J. Genome Wide Association Study of Low Phosphorus Tolerance in Soybean (*Glycine max* L.). *Journal of Plant Genetic Resources*, 2023, 24(01):237-251.
- [10] 程宇坤, 董一帆, 耿洪伟, 任毅, 王睿, 张志辉. 小麦籽粒相关性状全基因组关联分析. *植物遗传资源学报*, 2023, 24(4), 993-1006.
- Cheng Y K, Dong Y F, Geng H W, Ren Yi, WANG Rui, Zhang Z H. Genome-wide Association Analysis of Wheat Grain Related Traits. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2023, 24(4), 993-1006.
- [11] De Angeli A, Baetz U, Francisco R, Zhang J, Chaves M M, Regalado A. The vacuolar channel VvALMT9 mediates malate and tartrate accumulation in berries of *Vitis vinifera*. *Planta*, 2013, 238(2): 283-291.
- [12] Ye J, Wang X, Hu T, Zhang F, Wang B, Li C, Yang T, Li H, Lu Y, Giovannoni J J, Zhang Y, Ye Z. An inDel in the promoter of *Al-ACTIVATED MALATE TRANSPORTER9* selected during tomato domestication determines fruit malate contents and aluminum tolerance. *The Plant Cell*, 2017, 29(9): 2249-2268.
- [13] Xu L L, Qiao X, Zhang M Y, Zhang S L. Genome-Wide analysis of aluminum-activated malate transporter family genes in six rosaceae species, and expression analysis and functional characterization on malate accumulation in Chinese white pear. *Plant Science*, 2018, 274: 451-465.
- [14] 巫伟峰. 李果实苹果酸转运体的克隆表达及其有机酸的关联性分析. 福州: 福建农林大学, 2017: 65-67.
- WU W F. Cloning and expression analysis of malate transporter in plum fruit and analysis of the correlation of organic acids. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2017: 65-67.
- [15] Bai Y, Dougherty L, Li M, Fazio G, Cheng L, Xu K. A natural mutation-led truncation in one of the two aluminum-activated malate transporter-like genes at the Ma locus is associated with low fruit acidity in apple. *Molecular Genetics and Genomics*, 2012, 287(8): 663-678.
- [16] Li C, Dougherty L, Coluccio A E, Meng D, El-Sharkawy I, Borejsza-Wysocka E, Liang D, Piñeros M A, Xu K, Cheng L. Apple ALMT9 requires a conserved c-terminal domain for malate transport underlying fruit acidity. *Plant Physiology*, 2020, 182(2): 992-1006.
- [17] Kereszt A, Li D, Indrasumunar A, Nguyen C D, Nontachaiyapoom S, Kinkema M, Gresshoff P M. Agrobacterium rhizogenes-mediated transformation of soybean to study root biology. *Nature Protocols*, 2007, 2(4): 948-952.
- [18] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} Method. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [19] Li Q, Zhang H H, Claver I P, Zhu K X, Peng W, Zhou H M. Effect of different cooking methods on the flavour constituents of mushroom (*Agaricus bisporus*(Lange)Sing) soup[J]. *International Journal of Food Science and Technology*, 2011, 46(5): 1100-1108.
- [20] 张艳艳, 孙晓康, 张晓元, 袁丹丹, 刘英梅, 赵国敏, 刘飞. 高效液相色谱一步法快速测定 10 种有机酸. *食品与药品*, 2022, 24(1): 44-47.
- Zhang Y Y, Sun X K, Zhang X Y, Yuan D D, Liu Y M, Zhao G M, Liu F. Fast and Effective Determination of Ten Kinds of Organic Acids by HPLC. *Food and Drug*, 2022, 24(1): 44-47.
- [21] Clough S J, Bent A F. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 1998, 16(6): 735-743.

- [22] Sauvage C, Segura V, Bauchet G, Stevens R, Do P T, Nikoloski Z, Fernie A R, Causse M. Genome-wide association in tomato reveals 44 candidate loci for fruit metabolic traits. *Plant Physiology*, 2014, 165(3): 1120-1132.
- [23] Liu J, Zhou M. The *ALMT* gene family performs multiple functions in plants. *Agronomy*, 2018, 8(2): 20.
- [24] Peng Y J, Yuan Y Y, Chang W J, Zheng L T, Ma W F, Ren H, Liu P P, Zhu L C, Su J, Ma F W, Li M J, Ma B Q. Transcriptional repression of MdMa1 by MdMYB21 in Ma locus decreases malic acid content in apple fruit. *The Plant Journal*, 2023, 115,(5):1231-1242.
- [25] Pei Y R, Deng Y N, Zhang H R, Zhang Z G, Liu J, Chen Z B, Cai D R, Li K, Du Y M, Zang J, Xin P Y, Chu J F, Chen Y H, Zhao L, Liu J, Chen H B. EAR APICAL DEGENERATION1 regulates maize ear development by maintaining malate supply for apical inflorescence. *The Plant Cell*, 2022, 34(6): 2222–2241
- [26] Meyer S, Mumm P, Imes D, Endler A, Weder B, Al-Rasheid K A, Geiger D, Marten I, Martinoia E, Hedrich R. AtALMT12 represents an R-type anion channel required for stomatal movement in *Arabidopsis* guard cells. *The Plant Journal*, 2010, 63(6): 1054-1062.
- [27] Sasaki T, Mori I C, Furuichi T, Munemasa S, Toyooka K, Matsuoka K, Murata Y, Yamamoto Y. Closing plant stomata requires a homolog of an aluminum-activated malate transporter. *Plant and Cell Physiology*, 2010, 51(3): 354-365.
- [28] Peng W T, Wu W W, Peng J C, Li J J, Lin Y, Wang Y N, Tian J, Sun L L, Liang C Y, Liao H. Characterization of the soybean *GmALMT* family genes and the function of *GmALMT5* in response to phosphate starvation. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2018, 60(3): 216-31.