

中国实生和无性系苹果砧木及其杂交后代矮化基因型分子鉴定

张恒涛¹, BUS Vincent G.M.², 张亚茹¹, 王欢¹, 王美丽¹, BOWATTE Deepa³,
GARDINER Susan E.³, CHAGNÉ David³, KIRK Chris³, KUMAR Satish²,
王大江⁴, 张瑞萍¹, 周喆¹, YAO Jia-Long^{1,5}, 阎振立¹

(¹中国农业科学院郑州果树研究所, 郑州 450009; ²新西兰皇家植物与食品研究院, Havelock North 4157, 新西兰;
³新西兰皇家植物与食品研究院, Palmerston North 4442, 新西兰; ⁴中国农业科学院果树研究所,
辽宁兴城 125100; ⁵新西兰皇家植物与食品研究院, Auckland 1142, 新西兰)

摘要:【目的】利用已开发的矮化性状分子标记(*Dw1/Dw2*)筛选中国实生和自育无性系苹果砧木, 探明各个砧木品种的矮化基因型, 为苹果砧木育种工作中亲本选择及矮化分子辅助育种提供帮助。【方法】以不同地区采集的24份中国实生和自育的无性系苹果砧木、147份新疆野苹果(李2-3)×‘M9’和345份山荆子(野1-2)×‘M9’杂交后代单株的叶片DNA为模板, 以矮化砧木‘M9’‘M116’和‘MM106’为对照, 利用已经开发的*Dw1*和*Dw2*矮化标记的SSR引物进行PCR扩增, 然后用毛细管电泳检测PCR产物, 分析确定各个样品的矮化基因型。【结果】在24份中国苹果砧木中鉴定出8份携带*Dw1*矮化基因, 5份携带*Dw2*矮化基因, 3个自育杂交品种同时携带*Dw1*和*Dw2*矮化基因; 新疆野苹果(李2-3)×‘M9’组合的147个杂种实生苗中有48株携带*Dw1*矮化基因, 14株同时携带*Dw1*和*Dw2*基因, 山荆子(野1-2)×‘M9’的345个杂交后代中仅有11个单株携带*Dw1*基因型, 其余单株均不携带任一矮化基因。【结论】试验中检测的八棱海棠(房2-3)、山荆子(野1-2)和平邑甜茶(野2-22)等中国常用实生砧木均不携带*Dw1*或*Dw2*基因, 仅新疆野苹果(李2-3)中含有*Dw2*矮化基因; 中国自育的杂交砧木品种中, 以‘M9’等矮化品种为亲本的后代大多携带*Dw1*或*Dw2*; 双亲都含有矮化基因的杂交组合后代能获得更多的携带矮化基因的单株。

关键词: 苹果砧木; 矮化性状; 基因型; 分子标记育种

中图分类号: S661.1

文献标志码: A

文章编号: 1009-9980(2020)12-1779-08

Genotyping of Chinese seedling and hybrid apple rootstocks and it's progenies for the dwarfing trait

ZHANG Hengtao¹, BUS Vincent G.M.², ZHANG Yaru¹, WANG Huan¹, WANG Meili¹, BOWATTE Deepa³, GARDINER Susan E.³, CHAGNÉ David³, KIRK Chris³, KUMAR Satish², WANG Dajiang⁴, ZHANG Ruiping¹, ZHOU Zhe¹, YAO Jia-Long^{1,5}, YAN Zhenli¹

(¹Zhengzhou Fruit Institute Research of CAAS, Zhengzhou 450009, Henan, China; ²The New Zealand Institute for Plant and Food Research Limited (PFR), Private Bag 1041, Havelock North 4157, New Zealand; ³The New Zealand Institute for Plant and Food Research Limited, Private Bag 11600, Palmerston North 4442, New Zealand; ⁴Research Institute of Pomology of CAAS, Xingcheng 125100, Liaoning, China; ⁵The New Zealand Institute for Plant and Food Research Limited, Private Bag 92169, Auckland 1142, New Zealand)

Abstract:【Objective】The Chinese apple industry is the largest in the world at present, both for fruit production and planted area. Most of the orchards are established with trees on seedling rootstocks, which leads to higher costs for the growers because more time and labour are required to grow good quality apples. Apple rootstocks play a vital role in apple cultivation as suitable rootstocks are important to achieve efficient production in high-yielding apple orchards. Growing dwarf trees in high density plant-

收稿日期: 2020-08-19 接受日期: 2020-10-27

基金项目: 中国农业科学院科技创新工程(CAAS-ASTIP-2016-RIP-02); 现代农业产业技术体系(CARS-28); 中国农业科学院国际合作项目

目

作者简介: 张恒涛, 男, 研究员, 博士, 主要从事苹果育种和分子生物学研究。Tel: 0371-55906980, E-mail: zhanghengtao@caas.cn

ings has been the trend in new orchards globally for a considerable time now and the Chinese apple industry is following suit. Hence, the breeding and selection of dwarfing rootstocks with resistance to abiotic and biotic stresses will form the basis of the future Chinese apple industry. Because of the long cycle of apple rootstock breeding and its high resource requirements, breeding progress has been slow. Nevertheless, over the past decades in China, multiple initiatives in apple rootstock breeding have resulted in several cultivars. Compared with phenotypic identification methods, the application of molecular markers in trait characterization is more accurate and efficient, through identifying genomic differences. Molecular marker-assisted screening for the *Dw1* and *Dw2* dwarfing genes identified in 'M9' rootstock is being used in early pre-selection of hybrid seedlings as a means to predict the dwarfing performance of offspring. In future breeding, we can also purposefully design parental combinations with the selection objectives in mind. The objective of this study was the genetic characterization of Chinese seedling and hybrid apple rootstocks and its progenies for the dwarfing genes. **【Methods】** Leaf samples of 27 rootstocks were obtained from different regions around China including 'M9' 'M116' and 'MM106' as reference (semi-) dwarfing genotypes, and from 147 seedlings of a *M. sieversii* (Li 2-3) × 'M9' and 345 seedlings of a *M. baccata* (Wild 1-2) × 'M9' family. The first-generation hybrid seeds were obtained from the dwarf apple resource garden of the Zhengzhou Fruit Research Institute of the Chinese Academy of Agricultural Sciences in 2016 and 2017. DNA was extracted using DNA extraction kits (Luoyang Aisen Biological Technology Co. Ltd) for the genotyping of the entire *M. sieversii* (Li 2-3) × 'M9' and *M. baccata* (Wild 1-2) × 'M9' families and the 27 rootstock accessions. Polymerase chain reaction (PCR) products containing single nucleotide polymorphisms (SNPs) were performed on a LightCycler[®] 480 instrument. SSR markers Hi01c04 and MDP00024703 were amplified for the *Dw1* and *Dw2* genes, respectively, using PCR conditions as described by Foster et al. and the PCR products were separated by capillary electrophoresis (Tsingke Biological Technology Co. Ltd). **【Results】** The SSR marker indicated that 8 out of the 24 rootstocks had the allele for the *Dw1* dwarfing gene and 16 did not. SSR marker mdp0024703 for the *Dw2* gene was amplified in 5 accessions, showing the 167 bp band, and not in the remaining 19 Chinese varieties. Of these 24 Chinese apple rootstocks, three showed both the *Dw1* and *Dw2* markers: 'Liaoning No. 2', 'GM 256', and '77-34'. In the *M. sieversii* (Li 2-3) × 'M9' family, 14 progeny containing the markers for both *Dw1* and *Dw2* were identified, with a further 34 plants only carrying *Dw1*. In the *M. baccata* (Wild 1-2) × 'M9', 11 progeny contained the marker for *Dw1*, but no plants carrying both *Dw1* and *Dw2* were identified. The ratio of progeny carrying *Dw1* dwarfing genes was much higher in the *M. sieversii* (Li 2-3) × 'M9' family than in the *M. baccata* (Wild 1-2) × 'M9' family (38.8% and 3.3%, respectively). The majority of the dwarfing and semi-dwarfing rootstock accessions screened carried marker alleles linked to *Dw1* and *Dw2*. This suggests that most apple dwarfing rootstocks have been derived from the main genetic source carrying both *Dw* genes for this trait, 'M9'. **【Conclusion】** Genetic markers linked to *Dw1* and *Dw2* were screened over 24 Chinese rootstock accessions that confer a range of vigour effects on scion growth, with 3 of them carrying both *Dw* genes. Phenotypic records in the fields indicated that the combination of *Dw1* and *Dw2* has the strongest influence on rootstock-induced dwarfing, and that *Dw1* had a stronger effect than *Dw2*. Therefore, genetic characterization of rootstocks for dwarfing can assist breeders in rootstock parent selection as well as progeny selection in segregating families derived from dwarf rootstocks. The latter was applied to two 'M9' families, with the *M. sieversii* (Li 2-3) × 'M9' cross having more seedlings with one or two dwarfing genes than the *M. baccata* (Wild 1-2) × 'M9' cross. The selection of dwarf apple rootstocks will assist in managing tree vigour, which is associated with achiev-

ing higher fruit quality. Denser plantings in apple orchards enabled by dwarfing rootstocks will also improve yield per unit area, hence improve the production efficiency and economics of the apple industry in China.

Key words: Apple rootstock; Dwarfing; Genotype; Molecular marker

砧木在苹果栽培中起至关重要的作用,无论传统的乔化栽培还是现代的矮化密植栽培,均离不开适宜的优良苹果砧木^[1]。矮化砧木能使苹果树体矮小、易管理,且结果早、品质好、整体产量高,矮化密植也是当今世界苹果栽培强国的主流模式^[2]。随着劳动力短缺和成本增长,矮化密植栽培也将是我国苹果产业发展的主要方向,利用矮化砧木是实现苹果矮化栽培的主要方式^[3]。

推进苹果产业由乔化栽培向矮化栽培的有效措施,就是培育适应我国不同生长条件的优良矮化砧木,而苹果砧木育种周期长^[4]、优良砧木品种少,制约了中国苹果矮化栽培的快速发展。目前,中国的苹果砧木育种以杂交育种为主,早期矮化、抗病和抗寒等各种性状的高效鉴定方法缺乏,育种周期为15~20 a(年),比鲜食苹果品种更难选育。随着分子技术的进步,苹果砧木矮化性状的标记也被开发出来,Rusholme-Pilcher等^[5]第一次用‘M9’和‘Robusta 5’为群体,将*Dw1*矮化基因定位于‘M9’的第5条染色体上,开启了苹果砧木矮化标记研究的先河。接着,Fazio等^[6]以‘Ottawa 3’和‘Robusta 5’为群体,定位了*Dw1*和*Dw2*矮化基因,*Dw1*的位置与Rusholme-Pilcher等^[5]报道的*Dw1*的位置一致,*Dw2*位于第11条染色体上,其矮化能力弱于*Dw1*。后来,Harrison等^[7]以‘M27’和‘M116’为群体,以根皮率为矮化指标,再次定位了相同位置的*Dw1*和*Dw2*,同时发现了新的矮化基因*Dw3*。Foster等^[8]以早花性、树高和节间长度等为指标,研究了*Dw1*和*Dw2*在M系、CG系、B系及JM系砧木中的作用,发现大部分矮化砧木或者半矮化砧木中都含有*Dw1*基因,M9、M8和CG41等矮化砧木中同时含有*Dw1*和*Dw2*基因。利用分子标记在苗期对目标性状进行选择,可剔除大量非目标单株,提高育种效率^[9]。新西兰在苹果砧木育种中已经采用了分子标记辅助育种,杂交后代在苗期都要经过矮化(*Dw1/Dw2*)和抗病虫分子标记筛选(*Er1/Er2*^[10]和*Pl2*^[11-12]),然后再进入其他田间性状的评价。

笔者与新西兰皇家植物与食品研究院合作,利

用已开发的*Dw1*和*Dw2*矮化分子标记,对中国常用实生砧木和自育的无性系苹果砧木进行矮化基因型鉴定,以期弄清常用实生砧木和杂交培育砧木品种的矮化基因型,为今后中国矮化砧木育种的亲本选择提供指导,也用实际事例展示分子标记在辅助砧木育种中的应用。

1 材料和方法

1.1 试验材料

以中国常用的实生和自育苹果砧木为试验材料(‘M9’‘M116’和‘MM106’作为对照品种),为确保材料的准确性,特意从原育种单位收集叶片,提取各个样品的叶片DNA备用,品种名称和特征特性如表1所示。中国农业科学院郑州果树研究所于2016—2017年连续两年配置的新疆野苹果(李2-3)×‘M9’和山荆子(野1-2)×‘M9’两个杂交组合的后代也被逐一提取叶片DNA,并筛选其矮化基因型,用于分析比较不同矮化类型亲本杂交后代中获得的携带*Dw1*与*Dw2*基因的单株比例。

1.2 试验方法

采用磁珠法提取试验材料叶片DNA,提取试剂盒购自洛阳爱森生物科技有限公司。将0.2 g左右新鲜叶片放入2 mL离心管中,液氮冷冻研磨,然后加入500 μL Buffer AZ裂解液和10 μL Buffer B摇匀,适时水浴并离心,然后将装有上清液的深孔板放入核酸提取仪中(洛阳爱森生物科技有限公司,型号:AMY32),按照程序运行完成,然后转移收集得到的DNA。

*Dw1*和*Dw2*的基因型鉴定方法与Foster等^[8]的方法相同,略有改动。参考Foster等^[8]报道的引物序列合成*Dw1*与*Dw2*的SSR引物,在荧光定量PCR上运行(LightCycler480[®] II, Roche Diagnostics GmbH, Switzerland)相应的程序,在实验室获得PCR扩增产物之后,送公司用ABI 3500毛细管电泳检测,根据扩增出的目的片段的大小或者有无,鉴定样品的矮化基因型。*Dw1*引物为Hi01c04和Hi04a08,*Dw2*引物为MDP00024703和MDP 0000365711。

表 1 不同苹果砧木资源及品种的来源和特性

Table 1 Characteristics of different apple rootstock germplasm accessions and cultivars

砧木来源 Sample origin	砧木名称 Cultivar/Accession	亲本 Parents	品种特性 Characteristics
辽宁省果树研究所 Liaoning Institute of Pomology	辽砧 2 号 Liaozhen 2	助列涅特×M9 <i>M. prunifolia</i> × M9	矮化性相当于 M26, 抗寒性强于 M26, 嫁接亲和性好, 早果、丰产性能强 Dwarfing, precocity and productivity ability are similar to those of M26, the cold hardiness is stronger than that of M26, compatibility and yield are good
	辽砧 106 Liaozhen 106	平邑甜茶×M27 Pingyitiancha×M27	半矮化砧木, 树高与 M7 相当, 抗寒性强, 抗轮纹病 Semi-dwarfing rootstock, tree height is similar to that of M7, it could endure -32 °C low winter temperature, tolerance to apple Ring rot
	77-34	M9×小黄海棠 M9× <i>M. robusta</i>	矮化性介于 M7 与 M26 之间, 早果性及丰产性与 M26 相近, 亲和性好, 抗寒 Dwarfing ability is between M7 and M26, precocity and productivity ability are similar to those of M26, good graft compatibility, cold resistance
黑龙江农科院牡丹江分院 Mudanjiang Branch, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences	MD001	大秋果×M8 Daqiguoguo×M8	半矮化砧木, 嫁接树高为乔砧树的 69.8%, 抗寒力极强 Semi-dwarfing rootstock, tree height is 69.8% to that of seedling tree, very good cold resistance
吉林省农业科学院 果树研究所 Institute of Pomology, Jilin Academy of Agricultural Science	GM256	西伯利亚酸苹果、 美国酸苹果 × M9 <i>M. prunifolia</i> × M9	极抗寒矮化砧木, 能耐 -42 °C 低温, 早果、丰产, 与寒富搭配效果最佳 Dwarfing rootstock, it endures -42 °C winter temperature, precocity and productivity ability are good, it has best performance for grafting with Hanfu apple cultivar
	GM310	红太平×M9 Hongtaiping×M9	极抗寒矮化砧, 嫁接亲和性好, 枝干韧性强, 高抗苹果腐烂病 Good resistance and graft compatibility, resistance to <i>Valsa</i> apple canker
中国农业科学院果树所 Research Institute of Pomology, CAAS	78-43	M9 实生 M9 seedling	砧木性状稳定, 嫁接亲和性好, 嫁接树干性、产量、品质等均优于 M9 和 M26 Compatibility, quality and productivity are better than those of M9 and M26
	CX5	吉林 193×M9 Jilin 193×M9	矮化砧木, 亲和性好, 早果、丰产、抗寒性优于 M26 Dwarf rootstock, good graft compatibility, precocity and productivity, the cold hardiness is better than that of M26
青岛市农业科学院 Qingdao Academy of Agricultural Sciences	青砧 1 号 Qingzhen 1	平邑甜茶 × 柱形苹果株系 Co Pingyitiancha × Co	无融合生殖, 出苗率高, 整齐度好, 抗重茬性强 Apomictic apple rootstock, propagated through seeds and seedlings are uniform, tolerance to re-plant disease
	青砧 2 号 Qingzhen 2	平邑甜茶辐射诱变 Mutation of Pingyitiancha	半矮化砧木, 嫁接树体与 M7 做中间砧的嫁接树相当, 嫁接亲和性好, 适应性强 Apomictic and semi-dwarfing rootstock, dwarfing ability is similar to that of M7, good graft compatibility
中国农业大学 China Agricultural University	中砧 1 号 Zhongzhen 1	小金海棠实生 Seedling of <i>M. xiaojinensis</i>	矮化能力与 M7 相近, 四倍体, 具有无融合生殖能力, 抗缺铁 Dwarfing ability is similar to that of M7, tetraploid, resistance to chlorosis
山西农科院果树研究所 Research Institute of Pomology, Shanxi Academy of Agricultural Science	Y-1	山荆子实生 Seedling of <i>M. baccata</i>	矮化砧木, 固定性强, 易成花, 抗逆性强, 耐寒, 耐旱, 抗黄化 Dwarfing rootstock, strong root system, good cold hardiness, drought tolerance
	SH1	国光 × 河南海棠 Ralls × <i>M. honanensis</i>	矮化砧木, 抗寒、耐旱, 砧穗亲和性好, 早花早果 Dwarfing rootstock, cold resistance, drought tolerance, good precocity and compatibility, high yield
	SH3、SH17、SH18	国光 × 河南海棠 Ralls × <i>M. honanensis</i>	半矮化砧木, 3 个砧木矮化性相似, 早花早果, 早期丰产, 耐旱性能强 Semi-dwarfing rootstock, dwarfing ability of these three rootstocks is similar, drought tolerance, good precocity and graft compatibility, high yield
	SH6	国光 × 河南海棠 Ralls × <i>M. honanensis</i>	矮化砧木, 矮化性相当于 M26, 早花早果, 抗寒、耐旱, 抗抽条 Dwarfing ability is similar to that of M26, precocious and good graft compatibility, cold resistance, drought tolerance
	SH40	国光 × 河南海棠 Ralls × <i>M. honanensis</i>	嫁接树体大小相当于乔化树体的 60%, 早花早果 Semi-dwarfing rootstock, tree height is 60% that of seedling, good precocity
中国农业科学院 郑州果树研究所 Zhengzhou Fruit Research Institute, CAAS	M9	黄色梅兹乐园 <i>M. domestica</i> (Yellow Metz)	矮化性强, 早产、丰产、抗旱, 抗寒性和固定性差 Dwarfing rootstock, precocious and good productivity, susceptible to biotic and abiotic stresses
	M116	M27 × MM106	抗疫腐病和绵蚜, 矮化性与 MM106 相似或弱于 MM106 Dwarfing ability is similar to that of MM106, resistance to woolly apple aphid and <i>Phytophthora</i>
	MM106	Northern Spy × M1	半矮化砧木, 抗绵蚜, 易生根 Semi-dwarfing rootstock, resistance to woolly apple aphid and easy rooting

表1(续) Table 1(continued)

砧木来源 Sample origin	砧木名称 Cultivar/Accession	亲本 Parents	品种特性 Characteristics
	U8	M8 × 八棱海棠 M8 × <i>M. robusta</i>	矮化性介于M9与M26之间,丰产性能好,且对苹果枝干轮纹病抗性较强 Dwarfing ability is between M9 and M26, high yield, tolerance to apple ring rot
	楸子(李3-8) <i>M. prunifolia</i>	苹果实生砧木 Seedling apple rootstock	适应性广,抗寒,抗旱,耐涝,耐瘠薄,亲和性好 Wide adaptability, cold resistance, drought tolerance, flood tolerance, good graft compatibility
	新疆野苹果(李2-3) <i>M. sieversii</i>	苹果实生砧木 Seedling apple rootstock	适应性广,抗旱、耐盐碱 Wide adaptability, drought tolerance, saline-alkaline soil tolerance
	山荆子(野1-2) <i>M. baccata</i>	苹果实生砧木 Seedling apple rootstock	抗寒性强,较耐干旱,不耐盐碱,易黄化 Very strong cold resistance, drought tolerance, susceptible to chlorosis
	八棱海棠(房2-3) <i>M. robusta</i>	苹果实生砧木 Seedling apple rootstock	适应性强,耐盐碱,较耐干旱 Wide adaptability, saline-alkaline tolerance, drought tolerance
	平邑甜茶(野2-22) <i>M. hupehensis</i>	苹果实生砧木 Seedling apple rootstock	无融合生殖,耐涝,整齐度高 Apomictic, flood tolerance, high uniformity

PCR体系和程序——15 μL反应体系: ddH₂O 9.1 μL、10×Buffer (Mg²⁺ Puls) 2 μL、dNTP 1.2 μL、正反引物各 0.3 μL、*Taq* 酶 0.1 μL、DNA 2 μL。PCR扩增程序: 94 °C 预变性 2.45 min、94 °C 变性 55 s、60 °C 退火 55 s、72 °C 延伸 1.39 min、共 40 个循环,前 5 个循环,每个循环降 1 °C; 72 °C 最后延伸 10 min。

2 结果与分析

2.1 不同 *Dw1* 和 *Dw2* 分子标记引物在试验材料中的可用性

文献报道的 *Dw1* 和 *Dw2* 分子标记引物较多,但每对引物并非对所有材料都适用,本试验采用新西

兰植物与食品研究院(PFR)常用SSR方法中的 *Dw1* (Hi01c04 和 Hi04a08) 和 *Dw2* 引物(MDP00024703 和 MDP 0000365711),选择已经报道测试过的M系砧木为对照,以中国常用实生砧木、自育无性系苹果砧木及其后代为材料,检验所选引物的准确性及所用材料的适用性。结果如表2所示,所选的几个SSR引物在每个材料中都能获得理想的PCR产物,且PCR产物在毛细管电泳中都能成功地区分出各个材料是否携带矮化基因。M系的矮化基因型分析结果与以前报道的一致,不同杂交组合的亲本基因型又可以清晰区分,说明选择的试验方法和分子标记引物可以成功地在本试验中应用。

表2 不同 *Dw1* 和 *Dw2* 引物扩增的PCR产物片段Table 2 The PCR results for *Dw1* and *Dw2* markers for six apple rootstocks

砧木品种 Rootstock cultivar	<i>Dw1</i> (Hi01c04) <i>Dw1</i> =234 bp	<i>Dw1</i> (Hi04a08) <i>Dw1</i> =230 bp	<i>Dw2</i> (MDP0000365711) <i>Dw2</i> =151 bp	<i>Dw2</i> (MDP00024703) <i>Dw2</i> =167 bp
M9	234/241	228/230	146/151	167/171
M116	234/235	232/240	137/155	178/180
MM106	222/230	233/245	146/148	177/179
新疆野苹果(李2-3) <i>M. sieversii</i>	222/241	232/240	138/151	167/173
山荆子(野1-2) <i>M. baccata</i>	210/222	210/240	129/155	137/151
八棱海棠(房2-3) <i>M. robusta</i>	231/250	233/235	129/131	165/171

2.2 不同砧木资源和品种的 *Dw1* 基因型鉴定

利用上述验证过的 *Dw1* 分子标记对收集到的不同来源地的 24 份中国常用实生和自育无性系苹果砧木进行矮化基因型鉴定,结果如表3所示,24 份资源中有 8 份资源携带 *Dw1* 矮化基因,另外 16 份资源无 *Dw1* 矮化基因,‘M9’‘MM106’的矮化基因型与以前报道的相同。中国常用的实生苹果砧木资源均不携带 *Dw1* 矮化基因,如八棱海棠(房2-3)、山荆

子(野1-2)、新疆野苹果(李2-3)、平邑甜茶(野2-22)及楸子(李3-8)等。以‘M8’及‘M9’作为亲本的杂种或实生后代品种均携带 *Dw1* 矮化基因,如‘U8’‘辽砧2号’‘GM256’‘GM310’‘MD001’‘CX5’‘77-34’和‘78-43’等,这些砧木品种也都表现出与‘M9’或者‘M26’相似或稍弱的田间矮化表型。以‘M27’作父本品种‘辽砧106’不携带 *Dw1* 矮化基因,以其做母本的‘M116’携带 *Dw1* 基因,其他非矮化亲本

的后代品种均无 *Dw1* 矮化基因,如‘青砧1号’和‘青砧2号’、SH系、‘中砧1号’及‘Y-1’等。

2.3 不同砧木资源和品种的 *Dw2* 基因型鉴定

Dw2 矮化标记的测试结果如表3所示,24份中国常用实生及自育无性系苹果砧木中有5份砧木携

表3 不同来源苹果砧木资源和品种的矮化基因型鉴定

Table 3 Genotypes of Chinese apple rootstocks for the dwarfing trait

样品来源 Sample origin	砧木品种 Rootstock cultivar	<i>Dw1</i>	<i>Dw2</i>
中国农业科学院 郑州果树研究所 Zhengzhou Fruit Research Institute, CAAS	M9	+	+
	U8	+	-
	M116	+	-
	楸子(李3-8) <i>M. prunifolia</i>	-	-
	新疆野苹果(李2-3) <i>M. sieversii</i>	-	+
	山荆子(野1-2) <i>M. baccata</i>	-	-
	八棱海棠(房2-3) <i>M. robusta</i>	-	-
中国农业科学院 果树研究所 Research Institute of Pomology, CAAS	78-43	+	-
	CX5	+	-
	辽宁省果树研究所 Liaoning Institute of Pomology	辽砧2号 Liaozhen 2	+
山西农科院果树研究所 Research Institute of Pomology, Shanxi Academy of Agricultural Science	辽砧106 Liaozhen 106	-	+
	77-34	+	+
	SH40	-	-
	SH18	-	-
	SH17	-	-
	SH6	-	-
	SH3	-	-
青岛市农业科学院 Qingdao Academy of Agricultural Sciences	SH1	-	-
	Y-1	-	+
	青砧1号 Qingzhen 1	-	-
中国农业大学 China Agricultural University	青砧2号 Qingzhen 2	-	-
	中砧1号 Zhongzhen 1	-	-
吉林省农业科学院 果树研究所 Institute of Pomology, Jilin Academy of Agricultural Science	GM256	+	+
	GM310	+	-
黑龙江省农业科学院 牡丹江分院 Mudanjiang Branch, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences	MD001	+	-

注: +. 有; -. 无。Note: +. Yes; -. No.

带 *Dw2* 矮化基因,其余砧木资源均不携带 *Dw2* 基因。乔化实生苹果砧木中仅新疆野苹果(李2-3)携带 *Dw2* 矮化基因,八棱海棠(房2-3)、山荆子(野1-2)、平邑甜茶(野2-22)及楸子(李3-8)等均无 *Dw2* 矮化基因。以‘M8’及‘M9’作为亲本的杂交砧木品种中只有‘辽砧2号’‘GM256’和‘77-34’携带 *Dw2* 矮化基因。以‘M27’作父本的品种‘辽砧106’也含有 *Dw2* 矮化基因,而以其作母本的‘M116’无 *Dw2* 矮化基因,其他非矮化亲本的后代品种中只有‘Y-1’携带 *Dw2* 矮化基因。

综合不同砧木品种的 *Dw1* 和 *Dw2* 鉴定结果,除‘M9’外,中国自育的无性系苹果砧木中有‘辽砧2号’‘GM256’和‘77-34’等3个品种属于同时携带 *Dw1* 和 *Dw2* 两个矮化基因的砧木类型,这也与它们的田间矮化能力相吻合,它们的亲本均有M系的身影,说明他们的矮化能力均从M系中遗传得来,但是 *Dw2* 在新疆野苹果和Y-1中也被检测出,山荆子作为苹果的起源原始种,新疆野苹果作为栽培苹果的祖先,可以推测 *Dw2* 的变异可能早于 *Dw1*。

2.4 不同亲本杂交组合后代的 *Dw1* 和 *Dw2* 矮化基因型鉴定

不同亲本杂交组合后代的 *Dw1* 基因型鉴定结果如表4所示,连续两年试验中新疆野苹果(李2-3)×‘M9’组合的杂种后代中携带 *Dw1* 主效矮化基因的比例均高于山荆子(野1-2)×‘M9’的杂交组合,两年分别得到25株和23株携带 *Dw1* 矮化基因的单株, *Dw1* 矮化基因型的比例分别为24.04%和53.48%,山荆子(野1-2)×‘M9’组合杂交后代大部分表现为山荆子的非矮化性状,树体高大,且携带 *Dw1* 基因的单株较少,两年分别得到6株和5株,比率均不超过5%。将山荆子(野1-2)×‘M9’和新疆野苹果(李2-3)×‘M9’组合杂交后代中携带 *Dw1* 基因的单株再进行 *Dw2* 矮化基因型鉴定,结果如表4所示,2016和2017两年获得的11株携带 *Dw1* 基因的山荆子(野1-2)×‘M9’后代单株中均无 *Dw2* 基因;而2016年携带 *Dw1* 基因的25株新疆野苹果(李2-3)×‘M9’组合中有5株携带 *Dw2* 基因,比例达到20%,2017年的23株 *Dw1* 植株中有14株同时携带 *Dw2* 基因,比例达60.9%,这是因为新疆野苹果(李2-3)本身携带 *Dw2* 基因,所以相对于与山荆子(野1-2)组合来说,同时携带 *Dw1* 和 *Dw2* 的比率明显较高;但是两个组合获得的后代中 *Dw1* 和 *Dw2* 的携带率均

表4 不同亲本杂交组合后代的 *Dw1* 基因型鉴定结果Table 4 Identification results of *Dw1* gene in different cross combinations

年份 Year	杂交亲本 Parents	检测数量 Number	含有 <i>Dw1</i> 单株数量 Number with <i>Dw1</i>	<i>Dw1</i> 比例 Ratio of <i>Dw1</i> /%	含 <i>Dw1</i> 和 <i>Dw2</i> 单株数 Number with <i>Dw1</i> and <i>Dw2</i> genes	<i>Dw1</i> 和 <i>Dw2</i> 比例 Ratio of <i>Dw1</i> and <i>Dw2</i> /%
2016	山荆子(野1-2)×M9 <i>M. baccata</i> ×M9	154	6	3.90	0	0.0
	新疆野苹果(李2-3)×M9 <i>M. sieversii</i> ×M9	104	25	24.04	5	20.0
2017	山荆子(野1-2)×M9 <i>M. baccata</i> ×M9	191	5	2.62	0	0.0
	新疆野苹果(李2-3)×M9 <i>M. sieversii</i> ×M9	43	23	53.48	14	60.9

低于孟德尔遗传规律,推测可能是采集了部分没有杂交成功的种子或者山荆子与‘M9’的亲合性较低所致。

3 讨论

世界及中国苹果砧木新品种选育目前仍然以杂交育种为主,矮化是砧木选育中关注的首要性状,但杂交后代矮化性状早期基因型鉴定技术缺乏、田间表型鉴定周期长、整体筛选鉴定效率低等因素,严重制约了苹果砧木的育种进程。因此,急需利用已有分子标记,鉴定现有砧木资源的矮化基因型,并结合田间表型,建立一套高效的砧木分子育种体系,以提高砧木的育种效率、加快优良砧木育种步伐。

3.1 中国野生及自育砧木品种的矮化基因型

Foster等^[8]的研究结果显示,*Dw1*和*Dw2*这两个QTLs一起或者单独出现影响了大部分苹果砧木品种的矮化能力,且*Dw1*的影响力大于*Dw2*。‘M9’‘M8’和‘CG41’矮化砧木都同时携带*Dw1*和*Dw2*基因;‘CG202’和‘CG935’等半矮化砧木中携带有*Dw1*基因;而‘Robusta 5’和‘Northern Spy’等乔化砧木既不携带*Dw1*基因,也不携带*Dw2*基因。本研究中,国内常用的乔化实生苹果砧木如八棱海棠(房2-3)、山荆子(野1-2)、新疆野苹果(李2-3)、平邑甜茶(野2-22)及楸子(李3-8)等均未检测到*Dw1*矮化基因,与其田间的乔化表型相吻合。而在*Dw2*基因型鉴定中,新疆野苹果(李2-3)携带*Dw2*矮化基因,说明*Dw2*矮化基因在新疆野苹果的自然实生苗中存在一定的变异,结合*Dw1*基因鉴定情况及新疆野苹果为栽培苹果的祖先,推测*Dw2*的变异起源较*Dw1*早,但是仍需要结合森林苹果和东方苹果的鉴定结果进行确定。另外,在杂交后代的基因型鉴定中,新疆野苹果与‘M9’的后代也比山荆子与‘M9’的后代

表现出更多同时含有*Dw1*和*Dw2*基因的单株,说明相对于与山荆子×‘M9’组合而言,新疆野苹果和M9的亲合力更高,更容易进行杂交,且新疆野苹果的*Dw2*基因也可遗传给后代,是苹果砧木矮化性状杂交选育的一个优良亲本。

中国自育的无性系矮化砧木品种中‘辽砧2号’‘GM256’和‘77-34’同时含有*Dw1*和*Dw2*矮化基因,‘U8’携带*Dw1*基因,基本与它们的田间矮化表型吻合。而‘青砧1/2号’‘中砧1号’和SH系均未检测出*Dw1*或*Dw2*矮化基因标记,与这些品种在实践中都表现出一定矮化能力的表型不太一致。另外,文献报道树体大小和早花性状都优于或与‘M9’相似的砧木‘Y-1’^[13],仅含有*Dw2*标记,按照Foster等^[8]的研究结果,其矮化能力应该较弱。出现这些基因型与矮化表型不太一致的结果,可能是亲本的不同导致矮化标记的准确性或适应性的差异,*Dw1*和*Dw2*矮化标记开发的样本数据都是基于‘M9’的杂交后代,而‘Y-1’是实生选种而来,无‘M9’系的基因;也有可能是‘Y-1’‘青砧1/2’和SH系与‘Mac9’一样,属于不携带*Dw1*和*Dw2*矮化基因的矮化性砧木,有其他方面的矮化机制。

3.2 矮化基因在不同基因型亲本杂交后代中的产生比例

以矮化性状不同的新疆野苹果、山荆子和M9为亲本配置杂交组合,两年的试验结果显示,新疆野苹果(李2-3)×‘M9’组合后代中含有*Dw1*基因的单株比例明显高于山荆子(野1-2)×‘M9’的组合,且新疆野苹果(李2-3)×‘M9’组合中同时携带*Dw1*和*Dw2*基因的单株比例也明显高于山荆子(野1-2)×‘M9’组合,但两个组合后代的矮化基因型比例均未达到理论数值。不同组合矮化比例的差异,一方面可能是由于亲本的自身基因型及其与‘M9’的亲合

性有差异,含有 *Dw2* 标记的新疆野苹果与‘M9’组合自然获得了更多的同时携带 *Dw1* 和 *Dw2* 基因的单株,也说明新疆野苹果与‘M9’的杂交亲和力要高于山荆子;另一方面可能是标记在不同组合间的适用性不同,在有些组合间的准确率更高,有些组合的适应性差一些。本研究筛选出的携带矮化基因单株的矮化能力还有待进一步验证,但是在现有研究水平下,在配置杂交组合时应首先弄清楚亲本的矮化基因型,并选择双亲同时含有矮化标记的亲本,比单亲含有矮化标记的组合能获得更多的矮化后代。但是值得注意的是,本文采用的 *Dw1* 和 *Dw2* 矮化标记均由‘M9’杂交群体定位而得,因此在进行砧木杂交后代筛选时,对‘M9’或者亲本有‘M9’亲缘的杂交后代适用性可能更强。

4 结 论

中国常用的八棱海棠(房2-3)、山荆子(野1-2)和平邑甜茶(野2-22)等实生砧木均不含 *Dw1* 或 *Dw2* 矮化基因,仅新疆野苹果中含有矮化能力稍弱的 *Dw2* 矮化基因;中国自育的无性系砧木中,以‘M9’等矮化品种为亲本的砧木大多都携带 *Dw1* 或 *Dw2* 基因,其中‘辽砧2号’‘GM256’和‘77-34’同时携带 *Dw1* 和 *Dw2* 基因。试验结果为以后苹果矮化砧木选育的亲本选配提供参考,也帮助育种者利用分子标记在早期选择更多的具有矮化性状的单株。

致谢:辽宁省果树研究所的杨峰老师、黑龙江省农业科学院牡丹江分院的刘畅老师、吉林省农业科学院果树研究所的李粤渤老师、青岛市农业科学院的沙广利老师、中国农业大学的王忆老师以及山西省农业科学院果树研究所的杨廷桢老师提供了各自单位所培育砧木品种的叶片,确保试验所用各个品种的材料准确无误,在此一并表示感谢。

参考文献 References:

- [1] 王大江, BUS V G M, 王昆, 高源, 赵继荣, 刘立军, 李连文, 朴继成. 美国苹果砧木育种历史、现状及其商业化砧木特性[J]. 中国果树, 2018(6): 107-110.
WANG Dajiang, BUS V G M, WANG Kun, GAO Yuan, ZHAO Jirong, LIU Lijun, LI Lianwen, PIAO Jicheng. The history and present situation of apple rootstock breeding in America and its commercial rootstock characteristics[J]. China Fruits, 2018(6): 107-110.
- [2] 赵玲玲, 宋来庆, 刘美英, 唐岩, 孙艳霞, 姜中武. 特异资源在苹果矮化砧木育种中的利用研究[J]. 中国果菜, 2016, 35(2): 76-80.
ZHAO Lingling, SONG Laiqing, LIU Meiyong, TANG Yan, SUN Yanxia, JIANG Zhongwu. Study progress of the specific germplasm resources in apple dwarf rootstock breeding[J]. China Fruit & Vegetable, 2016, 35(2): 76-80.
- [3] 沙广利. 关于苹果矮化砧与矮化栽培几个问题的探讨[J]. 中国果树, 2020(3): 6-10.
SHA Guangli. Discussion on apple dwarfing rootstock and dwarfing cultivation[J]. China Fruits, 2020(3): 6-10.
- [4] 杜学梅, 杨廷桢, 高敬东, 王骞, 蔡华成, 李春燕, 弓桂花. 苹果矮砧育种国内研究进展[J]. 中国农学通报, 2017, 33(19): 57-64.
DU Xuemei, YANG Tingzhen, GAO Jingdong, WANG Qian, CAI Huacheng, LI Chunyan, GONG Guihua. Advances in breeding apple dwarf rootstock in China[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2017, 33(19): 57-64.
- [5] RUSHOLME-PILCHER R, CELTON J M, GARDINER S, TUSTIN D S. Genetic markers linked to the dwarfing trait of apple rootstock ‘Malling 9’ [J]. Journal of the American Society for Horticultural Science, 2008, 133(1): 100-106.
- [6] FAZIO G, WAN Y, KVIKLYS D, ROMERO L, ADAMS R R, STRICKLAND D, ROBINSON T L. *Dw2*, a new dwarfing locus in apple rootstocks and its relationship to induction of early bearing in apple scions[J]. Journal of the American Society for Horticultural Science, 2014, 139(2): 87-98.
- [7] HARRISON N, HARRISON R J, BARBER-PEREZ N, CAS-CANT-LOPEZ E, COBO-MEDINA M, LIPSKA M, CONDE-RUIZ R, BRAIN P, GREGORY P J, FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ F. A new three-locus model for rootstock-induced dwarfing in apple revealed by genetic mapping of root bark percentage[J]. Journal of Experimental Botany, 2016, 67(6): 1871-1881.
- [8] FOSTER T M, CELTON J M, CHAGNÉ D, TUSTIN D S, GARDINER S E. Two quantitative trait loci, *Dw1* and *Dw2*, are primarily responsible for rootstock-induced dwarfing in apple[J]. Horticulture Research, 2015, 2, 15001.
- [9] 常源升, 程来亮, 王海波, 何平, 李慧峰, 李林光. 苹果分子标记及辅助育种研究进展[J]. 园艺学报, 2017, 44(9): 1658-1680.
CHANG Yuansheng, CHENG Lailiang, WANG Haibo, HE Ping, LI Huifeng, LI Linguang. Review of molecular marker and marker assisted breeding of apple [J]. Acta Horticulturae Sinica, 2017, 44(9): 1658-1680.
- [10] BUS V G M, CHAGNÉ D, BASSETT H C M, HE P, LI H F, LI L G. Genome mapping of three major resistance genes to woolly apple aphid (*Eriosoma lanigerum* Hausm.) [J]. Tree Genetics & Genomes, 2008, 4: 223-236.
- [11] BUS V G M, BASSETT H C M, BOWATTE D, CHAGNÉ D, RANATUNGA C A, ULLUWISHEWA D, WIEDOW C, GARDINER S E. Genome mapping of an apple scab, a powdery mildew and a woolly apple aphid resistance gene from open-pollinated mildew immune selection[J]. Tree Genetics & Genomes, 2010, 6: 477-487.
- [12] BUS V G M, RANATUNGA C, GARDINER S, BASSETT H, RIKKERINK E. Marker assisted selection for pest and disease resistance in the New Zealand apple breeding programme[J]. Acta Horticulturae, 2000, 538: 541-547.
- [13] 弓桂花, 杨廷桢, 王骞, 蔡华成, 李春燕, 王新平, 高京东. 苹果矮化砧木 Y-1 选育及栽培要点[J]. 山西农业科学, 2015, 43(6): 664-667.
GONG Guihua, YANG Tingzhen, WANG Qian, CAI Huacheng, LI Chunyan, WANG Xinping, GAO Jingdong. Breeding and cultivation techniques of apple dwarf rootstock Y-1 [J]. Journal of Shanxi Agricultural Sciences, 2015, 43(6): 664-667.