

doi:10.11937/bfyy.20174364

苹果矮化基因的研究进展

邵 静, 李 粤 渤, 包 振 龙, 梁 英 海, 宋 宏 伟, 张 冰 冰

(吉林省农业科学研究院 果树研究所, 吉林 公主岭 136100)

摘 要:矮化苹果具有植株矮、冠幅小、早果性、丰产性好、生产管理方便等特点,国际上苹果生产均以矮化栽培的方式进行。因此矮化栽培是我国苹果生产的发展趋势,而矮化砧木品种选育是苹果矮化栽培的基础。近年来,国内外学者对苹果矮化的遗传特点、分子标记、基因克隆和转基因等方面进行了比较深入的研究。该研究从苹果矮化遗传特点、分子标记应用及矮化基因定位、矮化相关基因克隆和矮化转基因等方面的研究进行了概述,以期为进一步利用这些基因改良苹果农艺性状及矮化机理研究提供参考。

关键词:苹果;矮化基因;遗传特点

中图分类号:S 661.103.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2018)13-0157-05

我国苹果矮化育种工作始于 20 世纪 60 年代末,育种家开始利用英国东茂林实验站 M 系苹果矮化砧木进行杂交育种,选育出一批优良矮化砧木品种,有的品种已在生产中大面积应用于苹果矮化栽培,如 SH 系、GM-256^[1]。近年来,随着果树科研深入发展,已开展了苹果矮化相关基因的遗传学、分子标记、矮化基因分离与克隆和转基因研究,并取得了很大的进步。

1 苹果矮化基因遗传学研究

1.1 植物矮化基因的遗传学研究

植物矮化遗传主要有 2 种类型,即由单基因控制的质量性状遗传和由多基因控制的数量性状遗传^[2],大多数矮化突变体是由隐性基因控制。

植株矮化性状可能是控制矮化主基因表达作用的结果,也可能是受修饰基因或抑制基因影响,也有可能受光温反应特性影响,在水稻上表现明显。研究表明在低纬度地区种植矮秆稻种,株高趋于增加。

不同植物矮化遗传有所不同,黄瓜株高是由单基因和多基因体系共同作用决定^[3];南瓜的矮生性状是由显性矮生单基因控制^[4];梨的矮化性状是受显性单基因控制的质量性状^[5]。

1.2 苹果矮化遗传特点

苹果树体的矮化是一个较为复杂的性状,不同资源的矮化遗传表现也不同,矮化性遗传也因亲本组合不同而差别较大^[6]。COMMINS^[7]总结矮化砧木杂种分离情况发现矮化性属于数量遗传,遗传力较低,后代中矮性个体比例低,矮性平均值与亲本的中间值无明显相关性。有报道称在矮化与矮化的杂交后代中出现矮化植株和乔化植株。乔化性状对矮化性状为显性,矮化性状遗传为隐性单基因 *d* 控制,37 个组合 6 969 株杂交后代中分离矮化株系 422 株,矮化率为 6.1%,矮化×矮化 8 个组合 1 098 株后代中有 92 株是矮化型,矮化率 8.4%,乔化×乔化组合后代也能分离出 3.6%的矮化型株系,因此可能存在其它修饰基因起作用^[8]。

第一作者简介:邵静(1987-),女,硕士,研究实习员,现主要从事苹果育种及分子生物学等研究工作。E-mail:442635604@qq.com.

责任作者:张冰冰(1960-),女,博士,研究员,现主要从事寒地果树资源及苹果育种等研究工作。E-mail:zbb4005@163.com.

基金项目:国家科技支撑计划专项资助项目(2013BAD02B00)。

收稿日期:2018-02-24

研究报道发现苹果矮化是由显性矮生主基因控制或显性单基因控制,同时还受相关修饰基因的影响。研究发现柱型苹果与普通苹果杂交,后代近半数实生苗表现为柱型生长特性,将柱型苹果与‘新红星’‘富士’等进行杂交,后代中柱型与普通型单株比例符合1:1的分离比,而柱型苹果自交后代分离比为3:1,这些研究结果在一定程度上揭示了柱型性状应为显性单基因控制的质量性状。LAPINS^[9]在杂交试验中发现紧凑型的后代百分率低于期望值,OGNJANOV等^[10]通过不同苹果与柱型苹果杂交发现,后代具有柱型生长习性的植株仅占30%~50%,因此推断可能存在一个或多个修饰基因影响控制柱型性状的*Co*基因表达。

石丽雪^[11]以‘平邑甜茶’为母本,‘舞美’为父本进行杂交,获得了F₁后代的分离群体,在该群体的遗传分析中发现树体矮化性状是受单基因控制的质量性状。

此外,在植物上植株高度与赤霉素的合成途径密切相关,也有研究报道苹果矮化与激素代谢有关,国内外研究发现柱型苹果茎尖组织中赤霉素含量偏低^[12]。目前已经克隆出一些苹果赤霉素合成的关键酶基因,如*MdGA2ox*、*MdGA20ox*、*MdGA3ox*、*MdKO*、*MdKAO*以及*MdCPS*等,研究结果表面众多赤霉素合成途径关键酶基因中只有*MdKAO*的转录水平与柱型性状相关,有关这方面的研究还需要更多的研究数据去支持。

由于苹果树体大、童期较长、大部分自交不亲和以及基因杂合度高等原因,对苹果矮化的遗传学研究不够深入,还有待进一步的挖掘。

2 分子标记的应用及矮化基因定位

分子标记以生物大分子,尤其是核酸的多态性为基础的一种遗传标记,是继形态学标记、细胞学标记和生化标记之后发展起来的一种新的遗传标记,广泛应用于苹果品种鉴定、遗传多样性分析、遗传连锁图谱构建和基因定位克隆等方面^[13]。随着分子标记技术的不断完善,苹果矮化相关基因的分子标记工作也大量开展。目前分子标记应用于果树系谱分析和分类、种质资源保存和核心种质的构建、构建分子遗传图谱、重要性状基因的标记与定位、分子标记辅助育种、预测杂种

优势以及基因定位克隆等方面。基因标记是构建遗传图谱、基因定位、克隆和分子辅助育种的前提,目前在果树农艺性状的基因标记已经取得了一定的进展,包括果实品质相关基因、抗病性相关基因(如抗黑星病基因*Vf*)以及苹果矮化相关基因的定位。

目前关于苹果矮化性状相关基因的研究主要是3个方面,即控制树体柱型的*Co*基因、显性矮化主基因*Dw*和显性单基因*Md*。

苹果柱型性状是适合矮化密植的重要质量性状之一。大量研究结果表明柱型性状是受单显性*Co*(Columnar gene)基因控制,一个或多个修饰基因共同作用^[14]。2007年,KENIS等^[15]确认*Co*基因对树木形态具有重要影响。WEENDEN等^[16]研究发现了2个与*Co*基因紧密连锁的RAPD标记,其中含有一个高度多态的简单重复序列。随后HEMMAT等^[17]用BSA法在McIntosh wijk×NY75441-580的杂交后代找到2个与*Co*基因连锁的位点,遗传距离分别为8.9、24.0 cM。王彩虹等^[18]找到一个与*Co*基因连锁相关位点,遗传距离为3.3 cM,田义柯等^[19]通过分子标记将*Co*基因定位在苹果遗传连锁图谱第10连锁群上,找到一个遗传距离为2.86 cM的RAPD标记和一个遗传距离为3.9 cM的SSR标记。司鹏等^[20]利用SRAP技术在‘特拉蒙’×‘富士’杂交后代中找到一个与*Co*基因相关的特异性标记,遗传距离为5.8 cM。ZHU等^[21]用13个ISSR标记构建出*Co*基因的区域连锁图。KIM等^[22]利用RAPD技术找到了一个遗传距离为1.8 cM的标记,是距离*Co*基因最近的一个分子标记。BALDI等^[23]在*Co*基因附近区域开发了Co04R11、Co04R12和Co04R13等3个SSR标记。这些研究将为*Co*基因的最终定位与克隆奠定了良好的基础。

1991年,科研工作者从矮化资源‘扎矮76’中获得苹果属第一个显性矮化主基因并定名为*Dw*基因^[24]。随后,张开春等^[25]以具兼性无融合生殖特性的优良苹果砧木‘平邑甜茶’与‘扎矮76’杂交后代为试材,采用集群分析法获得2个与*Dw*基因连锁的RAPD标记,即F04-800和F03-1150,其与*Dw*基因的遗传距离分别为14.0 cM和25.5 cM。毕晓颖等^[26]发现了与*Dw*基因连

锁的 RAPD 标记,其遗传距离仅为 0.69 cM。PILCHER 等^[27]利用 BSA 技术对‘M9’×‘R5’后代群体研究,发现 *Dw1* 基因与‘M9’第五连锁群顶端的遗传距离为 2.5 cM。FAZIO 等^[28]对 0.3×R 5 杂交后代进行研究,利用 QTL 标记,*Dw1* 位于 LD5,遗传距离为 7.2 cM,一个新的 QTL,与 *Dw1* 作用相同,命名为 *Dw2* 位于 LG11,遗传距离为 6.4 cM。HARRISON 等^[29]研究发现在 LG13 有一个新 QTL 标记与 *Dw1* 和 *Dw2* 作用相同,命名为 *Dw3*。

石丽雪^[11]发现新的控制树体矮化的基因被定位在苹果 L12 染色体上,命名为 *Md* 基因。通过 SSR 分子标记分析,发现 CH01f02、CH01g12 距离 *Md* 基因遗传距离分别为 1.59、3.17 cM。通过 AFLP 标记发现 MCAA/E-AGC₂₀₃、M-CAC/E-ACA₁₈₀ 和 M-CCG/E-AAC₂₂₅ 与 *Md* 基因紧密连锁,其遗传距离分别为 1.56、4.76、7.94 cM。

3 矮化相关基因的克隆

分离和克隆控制果树性状基因,是深入了解这些性状发育分子机理的重要突破口,也是为果树新品种选育提供一种新方法。目前,人类已经完成了苹果、葡萄、草莓、桃、番木瓜等果树的基因组测序工作,预示着果树学研究进入了后基因组学和系统生物学时代。

郑立伟等^[30]以 T337 为材料克隆了 *Md-CBBL 1* 和 *MdCBBL 2* 基因,ORF 长度为 1 707 bp,短于基因组中 *MdCBBL 1* 和 *Md-CBBL 2*,但克隆得到基因与 NCBI 中基因序列信息基本一致,相似度达 99%。

研究发现乔化和矮化砧木中生长素运输基因表达存在差异,推测 *ABC19* 可能参与 M9 生长素向基部运输减少而导致矮化^[31]。宋春晖等^[32]以矮化砧 M9 和乔化砧 MM106 为材料,克隆 *MdABC19* 基因,并对其功能进行研究,研究结果表明 *MdABC19* 通过调控生长素转运参与砧木苗矮化性状的调控。

GA20-氧化酶是植物 GA 合成的关键酶之一,也是赤霉素合成关键酶中研究最多的一种酶,其缺失植株表现矮小。研究发现 GA20-氧化酶等过量表达促进 GA 分解代谢 GA20-氧化酶,造

成植株节间缩短和矮化^[33]。宣利利等^[34]研究认为 GA20-氧化酶的表达强弱与植株高矮相关,并从梨矮化砧木中克隆到全长 1 179 bp 的 GA20-氧化酶,编码 392 个氨基酸,与苹果 GA20-氧化酶氨基酸序列相似度达 91% 以上。宋扬^[35]利用同源克隆技术分离得到 GA20-氧化酶和贝壳杉烯氧化酶 cDNA 序列,并发现二者基因表达差异与赤霉素含量变化有关。

4 矮化转基因研究

20 世纪 80 年代末,人们开始探索转基因研究,通过基因工程手段,将理想基因转移到优良的栽培品种中去,以达到定向改良的目的,这一技术为果树新品种选育提供了新方法。随着生物学和基因工程技术的发展,转基因研究的深入,许多苹果优良性状得到了非常深入的研究并取得了较好的成果。

苹果矮化转基因研究主要是通过转基因手段使树形缩小,改变叶幕结构,培育紧密型、短枝型、矮化、半矮化的新品种。目前,人们已经从农杆菌中鉴定和克隆出与植物激素合成和代谢相关的基因,主要有 *ipt* (isopentenyl transferase gene)、*rolA*、*rolB*、*rolC*、*rolD* 基因等^[36]。TRIFONOVA 等^[37]利用农杆菌介导法将 *ipt* 基因转入澳洲青苹,获得 2 个表现“灌木状”的株系。杨莉等^[38]研究发现 *rolA* 在植株体内表达,表现为叶小而浓绿、节间缩短;转 *rolC* 基因植株顶端优势明显减弱,节间缩短明显,树体极其矮小。HOLEFORS 等^[39]通过农杆菌介导法将 *rolA*、*rolB* 或 *rolC* 基因导入苹果,研究发现转 *rolA* 基因,植株树体矮小,有的植株表现节间明显缩短,有的植株叶面积和根、叶干质量均降低。ZHU 等^[40]利用农杆菌介导法转入筛选基因 *rolB* 获得矮化苹果砧木 M 9/29。WELANDER 等^[41]将 *rolB*、*rolC* 等基因转入矮化苹果和梨,结果表明转入 *rolB*、*rolC* 基因植株节间明显缩短,株高明显降低。KIM 等^[42]利用农杆菌介导法将 *rolC* 基因导入 M 26 中,节间减少,同时可以促进生根。

BULLEY 等^[43]将反义 *MpGA20ox1* 基因导入砧木获得转基因株系植株高度比对照减少了 50%,随后用转基因系植株作为砧木嫁接发现,接

穗也有明显的矮化特性。赵凯^[44]利用农杆菌介导将 pRNAi-GA 20ox 导入苹果,获得转基因系 8 株,转基因植株的茎间和节间长度均短于非转基因对照,植株高度低于对照。

5 结语

加强矮化遗传特点以及分子机制与矮化转基因研究,深入开展矮化遗传规律研究,培育具有稳定矮化性状的亲本资源材料,缩短育种周期,获得优良的苹果矮化新品种,是当前矮化基因研究的主攻方向。目前在苹果矮化转基因方面已经取得一定进展,但苹果在遗传上高度杂合,遗传背景复杂,因此在积极寻找矮化资源的同时,更要进一步利用现代分子生物学和基因工程等技术分离、克隆矮化基因,揭示苹果矮化的分子机制,为苹果矮化分子育种奠定基础。

参考文献

- [1] GAO H, DANG Z, LI D, et al. The history of apple breeding in People's Republic of China[J]. Acta Horticulturae, 2011, 903: 199-205.
- [2] 廖娇, 黄春辉, 辜青青, 等. 植物矮化相关基因研究进展[J]. 生物技术通讯, 2011(4): 593-597.
- [3] 嵇怡. 黄瓜矮生性状的遗传分析及相关 QTLs 初步定位[M]. 扬州: 扬州大学, 2008.
- [4] 孟令君, 李柱刚, 韩俊岩, 等. 南瓜无蔓性状的研究进展[C]. 中国园艺学会南瓜分会. 中国园艺学会南瓜分会籽用南瓜新品种展示及产业发展研讨会论文集, 2012: 4.
- [5] RIVALTA L, DRADI M, ROSATI C. Thirty years of pears breeding activity at ISF FORL, Italy[J]. Acta Horticulturae, 2002, 596: 233-238.
- [6] 韩振海. 苹果矮化密植栽培理论与实践[M]. 北京: 科技出版社, 2011.
- [7] CUMMINS J N. Register of new fruit and nut varieties brooks and olmo list 36[J]. HortScience, 1994(9): 944-945.
- [8] 胡春根. 果树遗传育种学[M]. 北京: 科学普及出版社, 2001.
- [9] LAPINS K O. Inheritance of compact growth type in apple[J]. Journal of American Society for Horticultural Science, 1976, 101: 133-135.
- [10] OGNJANOV V, VUJANIC V D, GAIC K. Breeding columnar apples in Novi Sad[J]. Acta Horticulturae, 1999, 484: 207-209.
- [11] 石丽雪. 苹果矮化基因 *Ma* 连锁标记的筛选及染色体定位[M]. 泰安: 山东农业大学, 2006.
- [12] 王丽琴, 唐芳, 赵飞, 等. 苹果紧凑型品种和矮化砧木内源激素的变化[J]. 园艺学报, 2002(1): 5-8.
- [13] 季晓钊, 魏宏亮, 唐颂豪, 等. SSR 分子标记在苹果研究中的应用[J]. 安徽农业科学, 2014(21): 6942-6945, 7228.
- [14] 朱元娣, 李光晨, 李春雨, 等. 苹果柱型基因的 ISSR 分子标记研究[J]. 园艺学报, 2003, 30(5): 505-510.
- [15] KENIS K, KEULEMANS J. Study of tree architecture of apple (*Malus × domestica* Borkh.) by QTL analysis of growth traits[J]. Molecular Breeding, 2007(3): 193-208.
- [16] WEEDEN N F, HEMMAT M, LAWSON D M, et al. Development and application of molecular marker linkage maps in woody fruit crops[J]. Euphytica, 1994, 77: 71-75.
- [17] HEMMAT M, WEEDEN N F, CONNER P J, et al. A DNA marker for columnar growth habit in apple contains a simple sequence repeat[J]. Journal of the American Society for Horticultural Science, 1997, 122: 347-349.
- [18] 王彩虹, 王倩, 戴洪义, 等. 与苹果柱型基因 (*Co*) 相关的 AFLP 标记片段的克隆[J]. 果树学报, 2001(4): 193-195.
- [19] 田义柯, 王彩虹, 张继澍, 等. 一个与苹果柱型基因 (*Co*) 连锁的 RAPD 标记[J]. 西北植物学报, 2003(12): 2176-2179.
- [20] 司鹏, 戴洪义, 薛华柏, 等. 苹果柱型性状的 SRAP 分析[J]. 经济林研究, 2010(3): 31-33, 89.
- [21] ZHU Y D, ZHANG W, LI G C, et al. Evaluation of inter-simple sequence repeat analysis for mapping the *Co* gene in apple (*Malus pumila* Mill.) [J]. The Journal of Horticultural Science and Biotechnology, 2007(3): 371-376.
- [22] KIM M Y, SONG K J, HWANG J H, et al. Development of RAPD and SCAR markers linked to the *Co* gene conferring columnar growth habit in apple (*Malus pumila* Mill.) [J]. The Journal of Horticultural Science and Biotechnology, 2003, 78: 512-517.
- [23] BALDI P, WOLTERS P J, KOMJANC M, et al. Genetic and physical characterisation of the locus controlling columnar habit in apple (*Malus × domestica* Borkh.) [J]. Molecular Breeding, 2013 (31): 429-440.
- [24] 孟庆炎. 苹果属中发现极抗寒矮化种质资源[J]. 中国果树, 1991(3): 42.
- [25] 张开春, 毕晓颖, 李荣旗, 等. 苹果属 (*Malus*) 显性矮化主基因 *Dw* 的 RAPD 分子标记[J]. 农业生物技术学报, 1999(2): 183-185.
- [26] 毕晓颖, 吴禄平, 安利佳. 一个与苹果属显性矮生主基因 *Dw* 连锁的 RAPD 标记[J]. 园艺学报, 2002(1): 1-4.
- [27] PILCHER R L R, CELTON J M, GARDINER S E, et al. Genetic markers linked to the dwarfing trait of apple rootstock 'Malling 9' [J]. Journal of the American Society for Horticultural Science, 2008(1): 100-106.
- [28] FAZIO G, WAN Y Z, KVIKLYS D, et al. *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(2): 87-98.
- [29] HARRISON N, HARRISON R J, NURIA B P, et al. 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(6):1871-1881.
- [30] 郑立伟, 马娟娟, 张东, 等. 苹果矮化砧木 T337 *MdCBB1* 基因的克隆与表达分析[J]. *西北农业学报*, 2016(9):1365-1370.
- [31] MA J, HAN M. Genome wide analysis of ABCBs with a focus on ABCB1, and ABCB19, in *Malus domestica* [J]. *Journal of Genetics*, 2016(1):1-9.
- [32] 宋春晖, 张东, 马娟娟, 等. 苹果生长素运输基因 *MdABC19* 的克隆及其在矮化砧木中的表达分析[J]. *园艺学报*, 2017(3):409-421.
- [33] LEE D J, ZEEVAART J A D. Regulation of gibberellin 20-oxidase1 expression in spinach by photoperiod[J]. *Planta*, 2007(10):425-436.
- [34] 宣利利, 欧青春, 王斐, 等. 梨矮化砧木中矮 1 号 GA20-氧化酶基因克隆与表达分析[J]. *果树学报*, 2011(5):883-887.
- [35] 宋扬. 富士苹果短枝型性状相关基因的分离及表达[M]. 泰安: 山东农业大学, 2012.
- [36] XUE Z T, HOLEFORS A, WELANDER M. Intron splicing in 5' untranslated region of the *rolA* transcript in transgenic apple [J]. *Journal of Plant Physiology*, 2008, 165:544-552.
- [37] TRIFONOVA A, SAVOVA D, IVANOVA K, et al. *Agrobacterium*-mediated transformation of the apple cultivars Granny Smith [J]. *Progress in Temperate Fruit Breeding*, 1994(1):343-347.
- [38] 杨莉, 徐昌杰, 陈昆松. 果树转基因研究进展与产业化展望 [J]. *果树学报*, 2003(5):331-337.
- [39] HOLEFORS A, XUE Z T, WELANDER M. Transformation of the apple rootstock M26 with the *rolA* gene and its influence on growth [J]. *Plant Science*, 1998, 136:69-78.
- [40] ZHU L H, HOLEFORS A, AHLMAN A, et al. Transformation of the apple rootstock M 9/29 with the *rolB* gene and its influence on rooting and growth [J]. *Plant Science*, 2001(3):433-439.
- [41] WELANDER M, ZHU L H, LI X Y. Transformation of dwarfing apple and pear rootstocks with the *rolb* gene and its influence on rooting and growth [J]. *Acta Horticulturae*, 2004, 663:437-442.
- [42] KIM J H, KWON S, SHIN I I S, et al. The apple rootstock transgenic M 26 (*Malus pumila*) with enhanced rooting ability [J]. *Korean Journal of Breeding Science*, 2009(4):482-487.
- [43] BULLEY S M, WILSON F M, HEDDEN P, et al. Modification of gibberellin in the grafted apple scion allows control of tree height independent of the rootstock [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2005(1):215-223.
- [44] 赵恺. 通过沉默 *GA20-ox* 基因获矮化苹果植株的研究[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2016.

Research Advance on Dwarfing Genes in Apples

SHAO Jing, LI Yuebo, BAO Zhenlong, LIANG Yinghai, SONG Hongwei, ZHANG Bingbing
(Fruit Research Institute, Jilin Academy of Agricultural Sciences, Gongzhuling, Jilin 136100)

Abstract: The dwarfing apples have many advantages such as short-lived, small crown, early fruiting, high productivity, convenient in management and so on. Most countries in the world had adopted the system of high density planting with dwarfish variety. In order to catch up the competition situation and continuous changes in the international apple market, dwarf culture was the development trend of apple production in China, and dwarf rootstock breeding was the basis of apple dwarf cultivation in recent years. Many in-depth studies on the genetic characteristics of dwarfing apples, the applications of molecular markers, the locating, isolating and cloning of dwarfing genes and the dwarfing genes transformation had been done. This study summarized the progresses of studies on the dwarfing genes in apples including the genetic characteristics of dwarfing apples, the applications of molecular markers, the locating, isolating and cloning of dwarfing genes and the dwarfing genes transformation, in order to provide a reference for future use of these genes on agronomic traits improvement of apple and dwarfing mechanism research.

Keywords: apples; dwarfing genes; genetic characteristic