

中国野生葡萄果实抗白腐病基因的分子标记

徐 炎¹ 王跃进^{1,*} 周 鹏² 张剑侠¹

(¹ 西北农林科技大学园艺学院, 杨凌 712100; ² 热带农业科学院热带作物生物技术国家重点实验室, 海口 571101)

摘 要: 以感病 × 抗病的葡萄种间杂交组合白玉霓 × 塘尾的 F₁ 代 17 个单株及塘尾自交一代 16 个单株为试材, 采用 BSA 法和 RAPD 技术, 通过对 155 个随机引物的筛选, 获得了一个与中国野生葡萄抗白腐病基因连锁的 RAPD 标记 OPP09-760, 并在中国野生葡萄 8 个种的 32 个株系及欧洲葡萄 16 个品种中得到验证。进一步将该 DNA 片段克隆并测序, 根据两端序列, 设计了一对长 26 bp 的特异引物分别扩增供试材料, 获得了与该 RAPD 标记相同大小的 DNA 片段, 成功地将 RAPD 标记转化为 SCAR 标记, 可以用作抗白腐病基因的分子辅助选择的依据。

关键词: 葡萄; 中国野生葡萄; 白腐病; RAPD; SCAR; 抗病基因

中图分类号: S 663.1; Q 943 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2003) 01-0006-05

葡萄白腐病 [*Coniothyrium diplodiella* (Speg) Sacc] 是世界性的葡萄重要真菌病害, 每年因该病造成产量损失 20% ~ 50%, 严重年份达到 80% 以上^[1,2]。目前生产上对该病的防治主要以化学药剂防治为主, 易引起果实农药残毒和环境污染, 而且真菌能产生耐药性。利用抗病基因选育抗病品种是防治白腐病根本有效的措施。中国野生葡萄是葡萄抗白腐病育种的重要种质资源^[3,4], 分子标记技术的应用^[5,6]为基因分析和鉴定提供了新手段。本研究利用 RAPD、SCAR 分子标记技术, 对中国野生葡萄及其杂种后代进行抗病基因的快速标记, 以达到分子标记辅助抗病育种早期鉴定选择杂种的目的。

1 材料与方法

试材为葡萄种间杂交组合欧洲葡萄品种白玉霓 × 刺葡萄塘尾的 F₁ 代 17 个单株, 塘尾自交一代 16 个单株, 中国野生葡萄 8 个种 32 个株系和欧洲葡萄 16 个品种 (表 1, 表 2), 均取自西北农林科技大学葡萄种质资源圃。葡萄白腐病的发病盛期 (6 ~ 9 月) 进行田间自然鉴定、田间和室内接种鉴定^[3,7]。

大肠杆菌为 *E. coli* DH5, 由中国热带农业科学院热带作物生物技术国家重点实验室提供; 质粒载体为 pGEM-T、pGEM^{R-T} Easy Vector Systems I, 购自 Promega 公司。Taq 酶、RNase, dNTPs、IPTG、X-Cal、溶菌酶、琼脂糖等购自上海生工公司, 各限制性内切酶, DNA/Hind + *E. coli* I、Tryptone、Yeast Extract、Amp^r、10 个碱基随机引物等购自 Promega 公司。

葡萄基因组 DNA 的提取采用改良 CTAB 法^[8], RAPD 反应体系参照王跃进等^[6,8]的方法。

PCR 产物回收参照姜泊等^[9]的方法; 连接反应参照 pGEM^{R-T} Easy Vector Systems I 说明书, 感受态细胞的制备、转化、阳性克隆的筛选鉴定参照 Sambrook 等^[10]的方法; 样品送上海生工公司进行测序。

根据 DNA 序列分析结果, 在上海生工公司分别合成 26 个碱基的两个引物。引物 1: 5' ACTAAG GACAGTGAATCCAAAG 3'; 引物 2: 5' GATCAGGTTACCTATTGAGAAAGTAT 3'。以上述所有抗感材料为模板进行 PCR 扩增。在无茵的 0.5 mL PCR 薄壁管中依次加入下列组分建立反应体系: 无茵水

收稿日期: 2002 - 03 - 26; 修回日期: 2002 - 07 - 22

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39970524); 国家高技术研究发展计划 (863 计划) 项目 (2001AA241172); 国家“十五”科技攻关项目 (2002BA515B11)

*通讯作者。

13.7 μL , 10 \times buffer 2.5 μL , dNTPs 2.5 μL , Taq 酶 0.3 μL (5 U/ μL), 25 mmol/L MgCl_2 2 μL , 模板 DNA 2 μL (25 ng/ μL), 引物 1 (25 $\mu\text{mol}/\mu\text{L}$) 和引物 2 (25 $\mu\text{mol}/\mu\text{L}$) 各 1 μL 。混匀后总体积为 25 μL 。在其上加 25 μL 石蜡油后, 按下面的循环程序进行 PCR 扩增反应: 94 预变性 5 min; 94 变性 1 min, 65 退火 1 min, 72 延伸 2 min, 40 个循环; 最后 72 延伸 10 min。用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增结果。

表 1 中国野生葡萄和欧洲葡萄对白腐病的抗性

Table 1 The resistance of the Chinese wild *Vitis* and *V. vinifera* L. to white rot

种 Species	株系或品种 Clones or varieties	R or S	OPP09-760	种 Species	株系或品种 Clones or varieties	R or S	OPP09-760
刺葡萄 <i>V. davidii</i>	塘尾 Tangwei	R	+	华东葡萄	白河 - 35 - 1 Baihe-35-1	R	+
	雪峰 Xuefeng	R	+	<i>V. pseudoreticulata</i>	白河 - 13 - 1 Baihe-13-1	R	-
	福建 - 4 Fujian-4	R	+	毛葡萄	83-4-96()	S	-
	济南 - 1 Jinan-1	R	+	<i>V. quinquangularis</i>	83-4-94	S	-
	略阳 - 4 Luyang-4	R	+		83-4-49	S	-
裂叶刺葡萄 var. <i>ningqiangensis</i>	宁强 - 6 Ningqiang-6	R	+		83-4-85	S	-
复叶葡萄 <i>V. piasezkii</i>	留坝 - 9 Liuba-9	R	+		泰山 - 12 Taishan-12	S	-
	留坝 - 8 Liuba-8	R	-	欧洲葡萄	渭南 - 3 Weinan-3	S	-
	留坝 - 7 Liuba-7	R	-	<i>V. vinifera</i>	商南 - 24 Shangnan-24	S	-
	眉县 - 6 Meixian-6	R	+		法国兰 Blue French	S	-
	甘肃 - 91 Gansu-91	S	-		黑比诺 Pinot Noir	S	-
秋葡萄 <i>V. rotundifolia</i>	江西 - 1 Jiangxi-1	R	+		霞多丽 Chardonnay	S	-
	平利 - 2 Pingli-2	R	-		赤霞珠 Cabernet Sauvignon	S	-
	平利 - 7 Pingli-7	R	+		小白玫瑰 Muscat Blanc	S	-
	留坝 - 1 Liuba-1	R	+		白诗南 Chenin Blanc	S	-
	江西 - 2 Jiangxi-2	S	-		品丽珠 Cabernet Franc	S	-
	留坝 - 11 Liuba-11	S	-		白玉霓 Ugni Blanc	S	-
山葡萄 <i>V. amurensis</i>	左山 - 1 号 Zuoshan-1	R	+		梅鹿特 Merlot	S	-
	左山 - 75097 Zuoshan-75097	R	+		佳利酿 Carignane	S	-
	通化三号 Tonghua-3	R	+		粉红玫瑰 Muscat Rose	S	-
	双优 Shuangyou	R	+		五月紫 Mariky Noin	S	-
欧洲葡萄 <i>V. thunbergii</i>	安林 - 3 Anlin-3	R	+		雷司令 Riesling	S	-
	泰山 - 1 Taishan-1	S	-		巴库斯 Bacchus	S	-
					詹娜生玫瑰 Muscat Zana	S	-
					红地球 Red Globe	S	-

注: R, 抗病; S, 感病; +, 有; -, 无。

Note: R, Resistant; S, Susceptible; +, Present; -, Absent.

2 结果与分析

2.1 中国野生葡萄抗白腐病基因 RAPD 标记的筛选

从白玉霓 \times 塘尾组合 F_1 代和塘尾自交一代中分别取 10 株抗病单株 (14-6-1、14-6-5、14-6-9、14-7-11、15-7-1、15-7-2、15-7-3、15-7-4、15-7-5、15-7-6) 的 DNA 和 10 株感病单株 (14-6-2、14-6-3、14-6-4、14-6-7、14-6-8、14-7-2、14-7-3、14-7-4、14-7-5、14-7-9) 的 DNA 构成抗病与感病的两组 DNA 基因池, 采用 BSA 法^[11], 使用 Operon 公司生产的 A、B、C、D、G、H、J、O、P、Q、R、S、U、V、W 共 15 个引物系列的 155 个引物进行扩增, 从中筛选出大小一致、重复性好、扩增条带清晰可辨具多态性的特异引物 OPP09- (5' GTGGTCCGCA 3')。特异引物 OPP09 在种间杂交组合白玉霓 \times 塘尾 F_1 代及塘尾自交一代的 33 个单株中, 抗病的 20 个单株均拥有 760 bp 的多态性片段, 而感病的 13 个单株则没有约 760 bp 的多态性片段 (图 1, 表 2)。

同时, 我们用中国野生葡萄 8 个种 32 个株系的基因组 DNA 及 16 个欧洲葡萄品种的基因组 DNA

为模板, 用特异引物 OPP09 进行 PCR 扩增。研究表明, 在田间表现为抗病的 22 个中国野生葡萄株系中, 除平利 - 2, 白河 - 13 - 1, 留坝 - 8 和留坝 - 7 没有 760 bp 的特异条带外, 其余的 18 个株系均拥有约 760 bp 的特异 DNA 片段; 而在 10 个感病的中国野生葡萄株系及 16 个感病的欧洲品种中均没有 760 bp 的特异条带 (图 1, b, 表 1)。这进一步表明了 OPP09-760 来自刺葡萄塘尾, 是中国野生葡萄特有的抗白腐病基因的分子遗传标记之一, 并遗传。

表 2 OPP09 对种间杂交组合白玉霓 × 塘尾 F₁ 代和塘尾自交一代单株的分析结果

Table 2 RAPD analysis of interspecific cross F₁ hybrids of Ugni Blanc × Tangwei and of self-pollination F₁ Plants of Tangwei by primer OPP09

亲本及 F ₁ 代 Parents and F ₁	R or S	OPP09-760	亲本及 F ₁ 代 Parents and F ₁	R or S	OPP09-760	F ₁ 代 F ₁ plants	R or S	OPP09-760	F ₁ 代 F ₁ plants	R or S	OPP09-760
塘尾 Tangwei	R	+	14-6-9	R	+	14-7-13	S	-	15-7-3	R	+
白玉霓 Ugni Blanc	S	-	14-7-2	S	-	15-8-1	R	+	15-7-4	R	+
14-6-1	R	+	14-7-3	S	-	15-8-2	R	+	15-7-5	R	+
14-6-2	S	-	14-7-4	S	-	15-8-4	R	+	15-7-6	R	+
14-6-3	S	-	14-7-5	S	-	15-8-5	R	+	15-7-7	R	+
14-6-4	S	-	14-7-7	S	-	15-8-6	R	+	15-7-8	R	+
14-6-5	R	+	14-7-9	S	-	15-8-7	R	+	15-7-9	R	+
14-6-7	S	-	14-7-11	R	+	15-7-1	R	+	15-9-1	R	+
14-6-8	S	-	14-7-12	S	-	15-7-2	R	+			

注: R. 抗病; S. 感病; +. 有; -. 无。

Note: R. Resistant; S. Susceptible; +. Present; -. Absent.

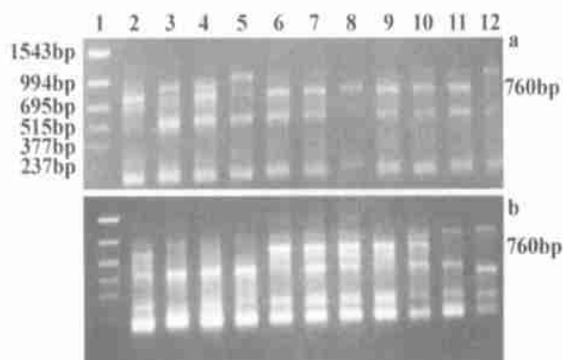


图 1 中国野生葡萄抗白腐病基因相连锁的 RAPD 标记

- a: 1. PCR markers; 2. 塘尾; 3. 14-6-1; 4. 14-6-5;
5. 14-6-9; 6. 14-7-11; 7. 15-8-1; 8. 15-8-2; 9. 15-8-6;
10. 15-7-2; 11. 15-7-8; 12. 15-7-9。
b: 1. PCR markers; 2. 塘尾; 3. 白玉霓; 4. 抗病基因池;
5. 感病基因池; 6. 略阳 - 4; 7. 雪峰; 8. 宁强 - 6;
9. 济南 - 1; 10. 福建 - 4; 11. 留坝 - 8; 12. 留坝 - 7。

Fig. 1 The RAPD Marker OPP09-760 linked to the disease resistance white-rot genes in grape samples using primer OPP09

- a: 1. PCR markers; 2. Tangwei; 3. 14-6-1; 4. 14-6-5;
5. 14-6-9; 6. 14-7-11; 7. 15-8-1; 8. 15-8-2; 9. 15-8-6;
10. 15-7-2; 11. 15-7-8; 12. 15-7-9。
b: 1. PCR markers; 2. Tangwei; 3. Ugni Blanc;
4. The resistant gene pool; 5. The susceptible gene pool;
6. Luyang-4; 7. Xuefeng; 8. Ningqiang-6; 9. Jinan-1;
10. Fujian-4; 11. Liuba-8; 12. Liuba-7。

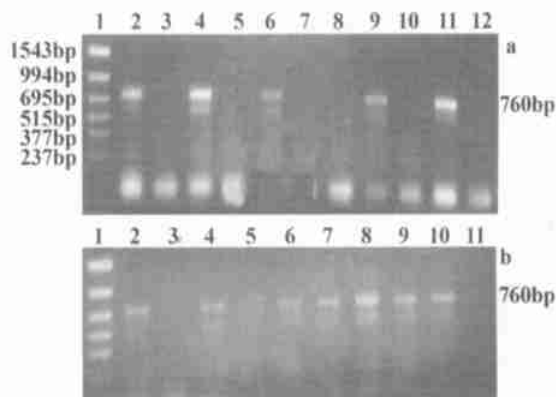


图 2 中国野生葡萄抗白腐病基因连锁的 SCAR 标记

- a: 1. PCR Markers; 2. 塘尾; 3. 白玉霓; 4, 6, 9, 11. 抗病
单株; 5, 7, 8, 10, 12. 感病单株。
b: 1. PCR Markers; 2. 塘尾; 3. 白玉霓; 4. 留坝 - 9;
5. 安林 - 3; 6. 左山 75097; 7. 左山 1 号; 8. 通化三号;
9. 双优; 10. 白河 - 35 - 1; 11. 留坝 - 7。

Fig. 2 The SCAR marker link to the disease resistance white-rot genes of the Chinese wild grapes using primer 1 and primer 2

- a: 1. PCR Markers; 2. Tangwei; 3. Ugni Blanc;
4, 6, 9, 11. The resistant progenies;
5, 7, 8, 10, 12. The Susceptible progenies。
b: 1. PCR Markers; 2. Tangwei; 3. Ugni Blanc; 4. Liuba-9;
5. Anlin-3; 6. Zuoshan 75097; 7. Zuoshan 1; 8. Tonghuar-3;
9. Shuangyou; 10. Baihe-35-1; 11. Liuba-7。

2.2 中国野生葡萄果实抗白腐病基因 SCAR 分子标记

为了获得中国野生葡萄抗白腐病基因的特异片段 RAPD 标记的遗传信息, 并将该 RAPD 分子标记转化为特异性高、重复性好的 SCAR 分子标记, 以酶切及 PCR 鉴定为阳性克隆的外源插入片段测序后, 用 PC-gene 软件进行了序列分析。约 760 bp 的特异片段的序列含有多个终止子, 属非编码序列, 按照其特定的序列, 实际全长为 769 bp。为将中国野生葡萄抗白腐病基因的 RAPD 分子标记转化为 SCAR 分子标记, 根据用 10 个碱基的随机引物 OPP09 扩增得到的抗病特异性片段的序列分析结果, 分别合成具有 26 个碱基的两个引物, 用这两个引物进行 PCR 扩增, 结果在抗病的中国野生葡萄种内的多数株系及其杂种单株中能够扩增出一条相应于约 760 bp 的特异性 DNA 片段的抗病特异带 (图 2), 这说明用引物 OPP09 扩增得到的 RAPD 分子标记可以转化为重复性和特异性更好的 SCAR 分子标记。

3 讨论

葡萄果实抗白腐病的田间鉴定代表了不同种和株系及品种对白腐病的田间抗病性表现; 室内离体鉴定结果也可说明葡萄材料的抗病表现, 但这两种鉴定结果均受环境条件和栽培管理水平的影响, 特别是果实对葡萄白腐病的抗性在早期鉴定十分困难, 甚至在结果前不可能鉴定。此外葡萄为多年生果树, 育种周期长, 常规的抗白腐病鉴定又需要更长的时期。因此对葡萄这种基因组高度杂合的果树, 如何获得与目的基因连锁的分子标记, 在幼苗期进行结果前抗病基因标记辅助育种选择显得尤为重要。

关于葡萄特别是中国野生葡萄抗白腐病基因标记的研究尚未见到报道。Michelmore 等^[11]建立的 BSA 法, 用 RAPD 技术对果树杂交分离群体快速获得 DNA 分子标记是可行的。前人用此方法在研究其他性状标记方面取得了成功的结果。Wang 等^[8]用 BSA 法对葡萄 B₇₂₋₂₁₆ × B₄₅₋₁₈₇ 进行 RAPD 分析, 获得的 UBC269-500 片段与葡萄无核基因有一定的连锁关系, 并认为葡萄无核性状是多基因控制的, 该片段与主效基因之一有连锁关系。Lahogue 等^[12]用 140 个随机引物对葡萄无核性状进行 RAPD 分析得到了 RAPD 标记与主效的显性基因紧密连锁, 遗传距离分别为 0.7 cM 和 3.5 cM。这些成功的方法与结果为本研究提供了借鉴和应用的依据。因此, 我们在多年抗白腐病鉴定的基础上, 对中国野生种的株系与欧洲葡萄品种的杂交后代采用 BSA 法和 RAPD 分析, 获得了与中国野生葡萄抗白腐病基因连锁的 RAPD 标记 OPP09-760, 进一步将其转化为更快速、且容易检测的 SCAR 标记, 可以用于葡萄杂种幼苗期抗白腐病基因的 DNA 分子标记鉴定。

关于葡萄对白腐病的抗性遗传, 国内外尚未见有报道。本研究根据刺葡萄塘尾果实对白腐病表现出高度抗性及其自交一代也表现出全部抗病, 而塘尾与欧洲葡萄品种白玉霓种间杂交 F₁ 代的抗性表现分离的事实, 又根据获得的抗白腐病基因的 RAPD 标记 OPP09-760 在这些材料中的分离情况, 从遗传上推测刺葡萄塘尾是一个抗白腐病的隐性纯合体, 而欧洲葡萄品种白玉霓为一个杂合体。另外, 本研究所获得的抗白腐病基因的 RAPD 标记 OPP09-760 在供试的 8 个中国野生葡萄种的 22 个抗病株系中的分析结果, 除秋葡萄平利 - 2、复叶葡萄留坝 - 7、留坝 - 8 和华东葡萄白河 - 13 - 1 共 4 个抗病株系外, 其余 18 个不同种的抗病株系均携带这一 RAPD 标记, 即该标记与抗白腐病基因存在着连锁关系, 但并非完全连锁。这也表明中国野生葡萄抗白腐病不是单基因控制的, 很可能属于多基因控制的抗白腐病。关于中国野生葡萄种的抗白腐病基因的更多的 RAPD 标记及 SCAR 分子标记, 我们正在研究中。

现在获得的抗白腐病基因的 DNA 分子标记来自抗白腐病的中国野生葡萄刺葡萄塘尾且能向后代遗传, 并且存在于中国野生葡萄的其它种及株系中, 这为葡萄抗白腐病育种的杂种早期抗病性鉴定提供了 DNA 依据。我们获得的刺葡萄塘尾抗白腐病基因 RAPD 标记 OPP09-760, 仅为研究抗白腐病基因提供了一个突破点, 更多的 RAPD 标记及其与抗白腐病基因位点的距离及定位作图是我们正在研究的内容。

参考文献:

- 1 刘长远, 赵奎华, 王 克, 等. 我国葡萄白腐病菌分类地位的重新确定研究. 植物病理学报, 1999, 29 (2): 174~176
- 2 王海燕. 黄河故道地区葡萄果穗白腐病发生流行的时间动态. 果树科学, 1999, 16 (2): 123~125
- 3 贺普超, 王跃进. 中国葡萄属野生种抗白腐病的鉴定研究. 中国果树, 1988, (1): 5~8
- 4 王跃进, 贺普超. 中国葡萄野生种抗白腐病机制的研究. 北方园艺, 1988, (1): 5~8
- 5 王跃进, 王西平, 周 鹏, 等. 中国野生葡萄抗黑痘病基因的 RAPD 标记. 园艺学报, 2000, 27 (5): 321~325
- 6 王跃进, 徐 炎, 张剑侠, 等. 中国野生葡萄果实抗炭疽病基因的 RAPD 标记. 中国农业科学, 2002, 35 (5): 536~540
- 7 王跃进, 贺普超. 葡萄白腐病和黑痘病抗性鉴定方法. 西北农业大学学报, 1988, 16 (3): 17~21
- 8 Wang YJ, Lamikanra O. Identification of genetic marker linked to seedless genes in grape using RAPD. 西北农业大学学报, 1996, 25 (4): 1~10
- 9 姜 泊, 张亚历, 周殿元. 分子生物学实验方法. 北京: 人民军医出版社, 1996. 53~55
- 10 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning, A Laboratory Manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. 16~34
- 11 Michelmore R W, Paran I, Kesseli R V. Identification of markers linked to disease resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genetic regions by using segregating population. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1991, 88: 9828~9832
- 12 Lahogue F, This P, Bouquet A. Identification of a codominant scar marker linked to the seedlessness character in grapevine. Theoretical and Applied Genetics, 1998, 97 (5~6): 950~959

Identification of Molecular Genetic Markers Tightly Linked to White Rot Resistant Genes in Chinese Wild Grape

Xu Yan¹, Wang Yuejin¹, Zhou Peng², and Zhang Jianxia¹

(¹ College of Horticulture, Northwest Sci-Tech university of Agriculture and Forestry, Yangling 712100, China; ² National Key biotechnology laboratory for tropical crops, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 571101, China)

Abstract: Bulk segregant analysis (BSA), randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) and sequence characterized amplified region (SCAR) methods were used to tag the white rot-resistant genes of grape with 17 individuals of F₁ progeny between Tangwei (*Vitis davidii*), white rot-resistant and Ugni Blanc (*V. vinifera*), White rot-sensitive and 16 individuals self-pollinated of Tangwei. Among 155 random primers gave distinct band Patterns, One RAPD marker OPP09-760 was tightly linked to a major gene resistant to *Coniothyrium diplodiella*. Marker OPP09-760 was cloned and sequenced. According to the Sequence, two specific primers were designed to amplify all plant materials. RAPD marker was converted into SCAR marker. One distinct single band only in resistant plants was amplified and its size was the same as that of the RAPD marker. The SCAR marker's popularity was confirmed. And it could be used for the identification of hybrid resistant to *Coniothyrium diplodiella*.

Key words: Grape; Chinese wild grape; White rot; RAPD; SCAR; Resistant genes

新书推荐

《中国果树病虫原色图谱》(第二版)

全书介绍果树病虫害近千种, 较原图谱(第一版)增加图片和病虫数量均超过 50%, 含彩版 114 页, 彩色生态照片 1152 幅, 文字 120 万字, 包括落叶果树病虫害 305 种, 害虫 338 种; 常绿果树和亚热带、热带果树病害 195 种, 害虫 160 种, 成为中国果树病虫识别与防治大全。定价: 101.00 元(含邮费)

购书者请通过邮局汇款至北京中关村南大街 12 号中国农科院蔬菜花卉所《园艺学报》编辑部, 邮编 100081。