

利用 RAPD 标记和种间杂交组合构建葡萄的分子标记连锁图谱

罗素兰^{1,2} 贺普超² 周 鹏³ 郑学勤³

(¹ 海南大学农学院, 海口 570228; ² 西北农林科技大学园艺系, 杨凌 712100; ³ 热带作物生物技术国家重点实验室, 海口 571101)

摘 要: 利用随机扩增多态性 DNA (RAPD) 在一个葡萄的种间杂交组合 [毛葡萄 83-4-96 (*Vitis quinquangularis*) × 欧洲葡萄粉红玫瑰 (*V. vinifera*)] 的 F_1 群体中发展分子标记, 共产生了 89 个稳定的 RAPD 标记, 连同 4 个形态标记 (花型、霜霉病抗性、果皮颜色、果汁颜色) 构建了一个葡萄 RAPD 分子连锁图。该图覆盖基因组总长度为 1 033 cM, 标记间平均距离为 17.8 cM, 为毛葡萄连锁图谱的构建提供了一个连锁框架。

关键词: RAPD; 分子标记; 连锁图谱; 葡萄

中图分类号: S 663.1; Q 755 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2001) 01-0068-03

1 目的、材料与方法

根据“双假测交”(Pseudotest cross)理论, 高度杂合的果树品种亲本都相当于纯合亲本的杂种一代, 对亲本中所拥有的杂合位点而言, 杂交后代就相当于“ F_1 ”自交产生“ F_2 ”群体。所以利用 F_1 群体和 RAPD 标记进行果树遗传作图效率相当高^[1,2]。毛葡萄具有较好的经济生物学性状, 开展其图谱的构建对加速利用中国野葡萄资源有重要意义。

我们用 1988 年配制的远缘杂交组合 [毛葡萄 83-4-96 (*V. quinquangularis*) × 粉红玫瑰 (*V. vinifera*)] 的 60 个后代为作图群体构建亲本的分子连锁图。该群体保存在西北农林科技大学葡萄资源圃, 5~7 月采集嫩梢尖, 保存于 -70℃ 冰箱。分子生物技术部分在热带作物生物技术国家重点实验室完成。基因组 DNA 提取程序和 RAPD 反应体系参照王跃进等^[3]的方法稍加改进。RAPD 扩增引物购自美国 Operon 公司。480 型 PCR 扩增仪为美国 Perkin Elmer 公司生产。Taq DNA 聚合酶由华美公司生产。根据 RAPD 扩增电泳结果, 将每个杂种株系的电泳带型按亲本类型归类, 与 83-4-96 带型相同者赋值为 1, 与粉红玫瑰带型相同者赋值为 2, 带型不清或数据缺失者赋值为 0, 并对花型 (MFT)、霜霉病抗性 (MR)、果皮颜色 (MFC)、果汁颜色 (MJC) 4 个形态性状进行类似于标记的连锁分析。83-4-96 表现为雌能花, 抗霜霉病, 果皮紫色, 果汁红色; 粉红玫瑰表现为两性花, 感霜霉病, 果皮粉红色, 果汁无色。除果皮颜色在后代中分离比符合 3 (紫色) : 1 (白色) 外, 其余均符合 1 : 1 分离。经 χ^2 检验, 符合 1 : 1 和 3 : 1 分离的 RAPD 标记用于图谱构建, 计算机连锁分析采用 Mapmaker Version 3.0 软件, 具体分析方法参照 Lander 等的方法^[4]。标记名称前用“M”表示 83-4-96 特有标记, “F”表示粉红玫瑰特有标记, “MF”表示双亲共有标记 (呈 3 : 1 分离)。分别构建 83-4-96 和粉红玫瑰的遗传连锁图, 根据双亲共有标记进行整合。

收稿日期: 2000 - 03 - 10; 修回日期: 2000 - 07 - 20

基金项目: 热带作物生物技术国家重点实验室开放基金资助

福建农业大学吴为人教授在本文的数据处理过程中给予了帮助, 特此致谢。

2 结果与分析

2.1 亲本的 RAPD 多态性分析 使用 280 个 GC 含量为 60 % ~ 70 % 的 RAPD 引物分别在两亲本 83-4-96 和粉红玫瑰间进行多态性引物筛选, 其中有 39 个引物产生的 89 个位点在两亲本间存在多态性。随后用这 39 个具有多态性的引物分别在 60 株杂交后代群体中进行 RAPD 扩增, 共产生了 89 个稳定的符合孟德尔分离比例 (1 1 或 3 1) 的 RAPD 标记, 其片段大小在 300 ~ 2 200 bp 之间, 引物扩增片段数为 1 ~ 10 条, 平均为 5 条, 平均每个引物产生 2.28 条多态性带。本研究中 RAPD 引物在 83-4-96 和粉红玫瑰间扩增多态性的比例为 14 % (280 个引物中有 39 个引物可扩增出多态性片段), 略低于已报道的栽培番茄间的 16 %, 桃树间的 16 %, 苹果间的 17.5 %^[2]。

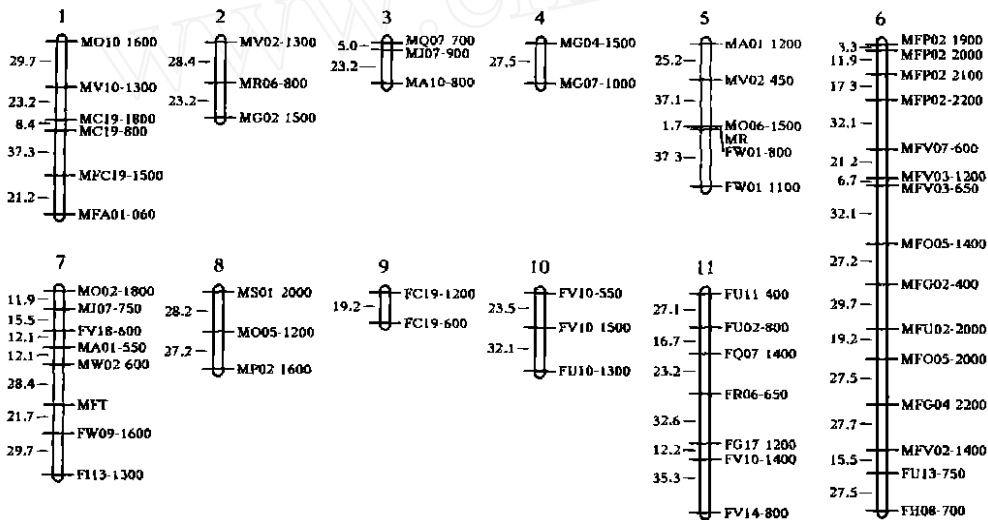


图1 葡萄的 RAPD 图谱
M. 母本毛葡萄 83-4-96 特有标记; F. 父本粉红玫瑰特有标记; MF. 双亲共有标记
Fig. 1 Grape RAPD map
M. Markers only present in female parent 83-4-96; F. Markers only in male parent Muscat Rose
MF. Markers present in both parents

2.2 RAPD 分子连锁图的构建 利用 Mapmaker Version 3.0 软件, 设置最大重组率为 0.37 和最小 LOD 值为 3.0, 将 89 个 RAPD 标记中的 56 个标记及 2 个形态标记 (MFT 和 MR) 分成 11 个连锁群 (图 1)。其中母本特有标记 23 个, 父本特有标记 19 个, 双亲共有标记 16 个。标记覆盖的基因组总长度为 1 033 cM, 标记间平均距离为 17.8 cM。来自感病父本的标记 FO10-800 与霜霉病抗性基因 MR (感病表型) 处于同一点位, 二者共分离, 完全连锁;

表1 不连锁的 RAPD 标记
Table 1 Unlinked RAPD markers

MV07-1300	MQ04-700	MW09-1800	MR06-600	MW11-500	FG17-1100	MFV07-400
MCG6-1800	MCG6-900	MA01-1400	MV14-750	MQ07-850	MFV04-1200	MR06-750
MGI7-1800	MGI7-400	MO10-600	MV03-800	FU13-380	MFV02-1200	FU02-900
FV07-900	FC15-1200	FC15-900	FC15-700	FH08-800	FG13-1400	MS01-1400
FW02-700	FW09-2000	FW02-1800	FW08-1800	FS12-500		

来自抗病父本的标记 MO06-1500 与 MR (抗病表型) 相距仅 1.7 cM, 二者紧密连锁 (见第 5 连锁群)。花型标记 MFT 位于第 7 连锁群, 由于标记数较少, 与 MFT 连锁的标记距离均较远 (大于 21.7 cM), MFC 和 MIC 未进入连锁群。还有 33 个不连锁的 RAPD 标记 (表 1)。该研究为葡萄连锁图谱的构建提供了一个连锁框架。

3 讨论

本研究中毛葡萄 83-4-96 和粉红玫瑰种间杂交 F_1 群体有 55.1 % 的检出位点发生了分离, 在发生分离的位点中 69.9 % (占检出位点总数的 38.5 %) 的位点发生了孟德尔分离, 分别可用于 83-4-96 和粉红玫瑰的遗传作图以及双亲连锁群间的同源性分析。本研究中 39 个经过筛选的 Operon 引物共产生了 89 个可用于遗传作图的 RAPD 标记, 平均每个引物可产生 2.28 个作图标记。可见, 利用 F_1 分离群体和 RAPD 标记进行葡萄遗传作图效率相当高, 是遗传作图的有力手段。

构建一个葡萄的高密度遗传图谱, 就可以明确染色体上基因间的距离及它们之间的相互关系, 可以对新基因进行定位, 并有助于葡萄育种家们选择有利基因进行品种间的转移及从野生种中转移一些新基因 (如抗病基因), 在遗传分析中把复杂的多基因控制的性状看作许多简单的孟德尔因子进行分析, 进行数量性状基因的定位 (quantitative trait locus, QTL) 及标记辅助选择育种。由于葡萄童期较长 (3~5 年), 单株占地面积大, 许多重要经济生物学性状要等到开花结果以后才能进行选择, 且需要多年时间及大量的劳力和资金投入, 因而标记辅助选择育种对葡萄的遗传改良具有更为重要的意义, 可通过与目标性状紧密连锁的标记对杂种进行早期选择, 缩小杂种群, 提高育种效率。本研究所采用的作图材料具备永久性质, 利用分群法 (bulk segregant analysis), 通过与目标性状连锁的标记在子代群体中的分离, 在图谱上进行更多形态性状的基因定位或找出与目标性状相连锁的其它标记, 进一步填充更多的 RAPD 标记。

参考文献:

- 1 史永忠, 邓秀新. RAPD 技术与果树种质资源及育种研究. 中国果树, 1997 (2): 46~48, 56
- 2 Patrick J Susank k. Randomly amplified polymorphic DNA-based genetic linkage maps of three apple cultivars. J. Amer. Soc. Hort. Sci., 1997, 122 (3): 350~359
- 3 王跃进, Lamikanra O. 用 RAPD 分析鉴定葡萄属远缘杂种. 西北农业大学学报, 1997, 25 (1): 16~20
- 4 Lander E S, Green P. Mapmaker: An interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural population. Genomics, 1987, (1): 174~181

Construction of Molecular Linkage Map in Grape Using RAPD Markers and F_1 Population of Interspecific Cross

Luo Sulan^{1,2}, He Puchao², Zhou Peng³, and Zheng Xueqin³

(¹ Department of Agronomy, Hainan University, Haikou 570228; ² Department of Horticulture, Northwestern Agricultural University, Yangling 712100; ³ The National Key Biotechnology Laboratory for Tropical Crops, Haikou 571101)

Abstract: A set of 280 random oligonucleotide primers was screened for random amplified polymorphic DNAs (RAPD) fragments within a sample of 60 F_1 hybrids to generate RAPD markers and construct the molecular linkage map from two parents 83-4-96 (*V. quinquangularis*) and Muscat Rose (*V. vinifera*). 89 repeatable RAPD markers as well as four morphological markers (flower type, grape downy mildew-resistance, berry color and juice color) were obtained. The map consisted of 11 linkage groups, it covered a total genetic distance of over 1 033 cM (centimorgan), the average distance between markers was 17.8 cM. It supplied a linkage framework for a more saturated linkage map of grape.

Key words: RAPD; Molecular marker; Linkage map; Grape