

16-20

第25卷 第3期
1997年6月西北农业大学学报
Acta Univ. Agric. Boreali-occidentalisVol. 25 No. 3
Jun. 1997

用 RAPD 分析鉴定葡萄属远缘杂种

Lamikanra O

王跃进¹ Lamikanra O² Schell L² 卢江² S663.103.5

(1 西北农业大学园艺系, 陕西杨陵 712100) (2 美国佛罗里达农工大学葡萄科研中心, FL 32307)

摘要 用随机扩增多态型 DNA (RAPD) 技术, 在幼苗期鉴定了圆叶葡萄和真葡萄亚属杂交的杂种。结果表明, 以两个杂交组合后代及其亲本 DNA 作模板, 用随机引物 UBC-250, UBC-266 和 UBC-272 可以分别扩增出 1400, 1440, 350 和 500 bp 的多态性片段, 作为来自无核亲本的分子标记。

关键词 RAPD, 圆叶葡萄, 葡萄杂种, 分子标记

中图分类号 S663.103.2

欧洲葡萄 ($2n=38$) 主栽品种拥有高产、优质或无核等优良的经济性状而被广泛地用作制酒、鲜食和制干等, 但其不抗病虫。原产美国东南部的圆叶葡萄 ($2n=40$) 不仅适应温暖、湿热的气候环境, 而且具有高度抗病虫的特点^[1~3]。所以, 葡萄育种家利用这两种资源的各自特点, 围绕高产优质兼抗性的育种总目标, 进行杂交育种。但是, 由于这两个亚属间染色体的差异, 在精卵细胞受精时出现染色体配对上的混乱, 致使众多的杂交不能获得杂种, 即使获得极少数的杂种, 利用常规技术进行形态性状鉴定, 至少经历 3~5 年。本研究采用 RAPD 技术, 对葡萄属的远缘杂种后代进行多态性 DNA 鉴定, 寻找远缘杂种的遗传标记及其特征, 为远缘杂交育种提供 DNA 分子标记和鉴定区分真假杂种的方法。

1 材料和方法

1.1 材料

本研究在美国佛罗里达农工大学葡萄科研中心完成。试材(表1)有: ①圆叶葡萄栽培品种 Welder 作母本, 佛罗里达大学育成的奥兰多无核 (Orlando Seedless) 作父本, 1992 年杂交。本研究采用获得的 9 株杂种, 其中一株从叶型、卷须上与父本相似, 其他 8 株表现为母本性状。②圆叶葡萄 Jumbo 作母本, 无核白 (Thompson Seedless) 作父本, 仅获一株杂种单株, 其叶型、卷须以及感染黑痘病均与父本相似。

1.2 方法

1.2.1 DNA 的提取 参照 Doyle 的方法^[4]略加修改, 即将幼叶 0.5 g 置于研钵中, 加入 5 mL 液氮, 研磨成细粉状, 待解冻后加入 5 mL DNA 浸提液 (1.4 mol/L NaCl, 20 mmol/L EDTA, 100 mmol/L Tris-HCl pH 8.0 和 0.4% β -mercaptoethanol)。研磨成均匀的混合液后, 转入 15 mL 离心管中, 置于 65℃ 恒温水浴锅中; 30 min 后, 取出离心管, 置于室温下冷却; 加入 50 mg PVPP (Polyvinylpoly-Pyrrolidone) 和等体积的氯仿-辛醇混合

收稿日期 1996-10-08

课题来源 作者在美国从事博士后研究课题 USDA 资助项目的部分内容

作者简介 王跃进, 男, 1958年生, 副教授, 博士

液(24:1),摇匀后,在8 000 r/min下离心10 min;将上清液移入另一洁净的15 mL离心管,加入5 mol/L NaCl 2mL后,再加入2倍体积的冷乙醇(-20℃),轻轻混匀,置入-20℃冰箱中1 h或过夜。挑出似棉絮状的小团,用10 mmol/L的醋酸钠溶液(溶在体积分数76%的乙醇)洗涤30 min后,在10 mmol/L醋酸钠中洗涤30 s,提取的DNA溶于200 μL的TE溶液(10 mmol/L Tris, pH 8.0, 250 mmol/L EDTA)中备用。DNA浓度用1%琼脂糖凝胶电泳估测,电极缓冲液用TBE[10.8 g Tris, 5.5 g Boric Acid, 0.5 mol/L EDTA (pH 8.0) 4 mL,加水稀释1 000 mL]溶液。

表1 本研究所用植物材料

序号	材料	序号	材料
1	♀ Welder	1	♀ Jumbo
2	♂ Orlando Seedless	2	♂ Thompson Seedless
3	W×O.S→F ₁ (杂种)	3	J×T.S→F ₁ (杂种)
4	W×O.S→F ₁ #1	4	♀ Welder
5	W×O.S→F ₁ #3	5	♂ Orlando Seedless
6	W×O.S→F ₁ #4	6	W×O.S→F ₁ (杂种)
7	W×O.S→F ₁ #5	7	W×O.S→F ₁ (杂种)
8	W×O.S→F ₁ #6A	8	W×O.S→ #1
9	W×O.S→F ₁ #7A	9	W×O.S→ #3
10	W×O.S→F ₁ #8A	10	W×O.S→ #4
11	W×O.S→F ₁ #9A	11	W×O.S→ #5A
1	♀ Jumbo	12	W×O.S→ #6A
2	♂ Thompson Seedless	13	W×O.S→ #7A
3	J×T.S→F ₁ (杂种)	14	W×O.S→ #8A

注:表中材料按图1~3中的顺序列出。

1.2.2 引物 购自加拿大的 University of British, 编号为 UBC201~300。每个引物为10个随机排列的单核苷酸;在100个引物中,用圆叶葡萄栽培品种与当地品种筛选区分,选出表2中6个引物。

表2 本研究中所用的引物及其序列

引物	序列	引物	序列
UBC-250	5'-CGA CAG TCCC'	UBC-284	5'-CAG GCG CACA'
UBC-266	5'-CCA CTC TCCG'	UBC-292	5'-AAA CAG CCCG'
UBC-272	5'-AGC GGG CCAA'	UBC-295	5'-CGC GTT CCTG'

1.2.3 PCR反应 反应混合物总体积为25 μL,内含500 mmol/L KCl, 100 mmol/L Tris-HCl(pH 9.0, 25℃), 10% Triton X-100, dATP, dCTP, dGTP, dTTP各250 μmol/L, 1 mmol/L MgCl₂, 0.15 μmol/L的引物, 28 ng的模板DNA, 1U Tag DNA聚合酶(Promega Co. Madison, WI, USA),用双蒸水将体积补到25 μL,用25 μL矿物油覆盖并加盖, DNA扩增用MJ Reserch Thermal Cycler(型号PTC-100)进行40个循环。每个循环包括94℃变性1 min, 35℃下复性2 min, 72℃下延伸2 min, 最后一个循环是在72℃下延伸8 min。反应结束后,PCR产物置4℃冰箱中保存备用,或直接用2.0%琼脂糖凝胶(1% normal molecular grade agarose plus 1% NaSiere GTG agarose, FMC)电泳分离,电极缓

冲液为1倍 TBE,在电压94 V 下电泳约4 h,然后将凝胶在5 g/L 溴化乙锭中染色30 min,在紫外灯下观察照相。每个 PCR 反应至少重复3次,反应产物凝胶电泳时用购自 GIBCO BRL 的100 bp 梯度的标准 DNA 作分子量参照。

2 结果与讨论

所用引物能扩增出1~9条或更多的 DNA 片段,通过琼脂糖凝胶电泳可以清楚地分离显示出来(图1~3),杂种拥有双亲各自的特殊 DNA 片段或亲本某一特殊 DNA 片段,如图1中从左到右的第13~15泳道,第15泳道是杂种拥有母本 Welder 大约300 bp 和父本约500 bp 的特殊 DNA 片段。第35~37泳道中,第37显示了杂种拥有母本 Welder 约300 bp 的特殊 DNA 片段,同时又拥有父本 Orlando Seedless 约500 bp 的特殊 DNA 片段。图2第4,7,10,13条泳道分别为同一杂种在不同引物扩增后的特殊 DNA 片段,这些 DNA 片段中,既有来自母本的,也有来自父本的 DNA 片段,如第4和第10泳道中杂种有约350 bp,第7和第8泳道中父本与杂种一致的约500 bp 的片段。图3也指明了杂种在引物 UBC-250参与扩增后,不仅拥有1 400,1 440和380 bp 来自父本的 DNA 片段,而且拥有来自双亲不同的 DNA 片段。实验结果说明,利用不同引物进行 RAPD 扩增,不仅可以扩增出丰富的多态性 DNA,而且还扩增了区分双亲与真假杂种的特殊 DNA 片段。在 Welder×Orlando Seedless 组合中,UBC-266扩增的约350 bp,UBC-272扩增的约500 bp,UBC-292扩增的约 650 bp(图1)和 UBC-250扩增的约1 400和1 440 bp(图3)即可作为来自无核父本无核白的特殊 DNA 片段标记。在 Jumbo×Thompson Seedless 组合中,UBC-266扩增的约350 bp,UBC-272扩增的约500 bp,UBC-292扩增的约350 bp,UBC-295扩增的约650 bp(图2)以及 UBC-250扩增的约 380,1 400和1 440 bp 即可作为来自无核父本无核白和奥兰多无核的特殊 DNA 片段标记(图3)。上述两个组合中,母本为不同的圆叶葡萄栽培品种,父本虽均为无核栽培品种,但其遗传组成并非一致。无核白属欧洲栽培品种中拥有无核性状的亲本;奥兰多无核为欧美杂种,其遗传组成极为复杂,二者仅在无核性上是一致的。但在二者作为模板,由引物 UBC-266、UBC-272、UBC-295参与扩增下分别获得约350,500和650 bp 的 DNA 片段却带有相对一致的特点。此外,二者由引物 UBC-250扩增获得的1 400和1 440 bp 的 DNA 片段也是相同的。所以,UBC-266,UBC-272,UBC-295,UBC-250和 UBC-292不仅作为特殊引物可以扩增出与无核父本相似的 DNA 特殊片段,而且除 UBC-292外,UBC-266,UBC-272,UBC-295和 UBC-250在两个不同组合的杂种中扩增出与无核亲本相同的 DNA 片段。因此,RAPD 技术及所获的分子标记可作为无核杂交育种检测无核性的早期选择依据。另一方面,在远缘杂交育种中,RAPD 可用作检测亲本与杂种的 DNA 关系及其来源,又是早期区分确定真假杂种快速、简便、有效的手段。

本研究所用的 DNA 快速提取方法简便易行,提取 DNA 产量高、纯度好,仅用0.5 g 幼叶提取即可获得足量的 DNA,完全适合 PCR 分析,相对同工酶分析,RAPD 结果稳定、重复性强、结果一致。相比 RFLP 分析,RAPD 用样量少、操作简便易行、花费低、时间短,又不需同位素示踪。所以 RAPD 突出的优点是:①鉴定所需样品材料少,一个幼芽即可得到足量 DNA 用于 PCR 扩增。因此,对营养生长期较长才能进入结果的多年生果树,利用 RAPD 技术在早期鉴定性状标记是非常有效的。另一方面,PCR 是根据模板 DNA 进行扩

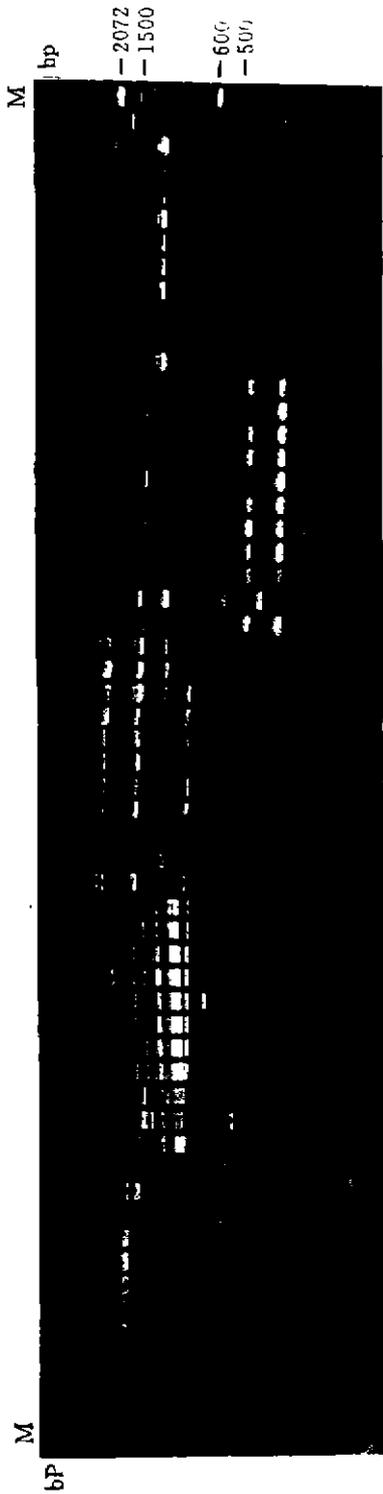


图 1 Welder 与 Orlando Seedless 及其杂种的 RAPD 标记

从左至右,第 1,57 泳道分别为 100 bp DNA 分子标记标准,2~12,13~23,24~34,35~46,47~56 为 Welder×Orlando Seedless 及其杂种
分别用引物 UBC-266,UBC-272,UBC-284,UBC-292 和 UBC-295 扩增后获得的多态性 DNA 片段



图 2 Jumbo 与 Thompson Seedless 及其杂种的 RAPD 标记

从左至右,第 1 及最后 1 条泳道为 100 bp DNA 分子标准,2~4,5~7,8~10,11~13 为 Jumbo×Thompson Seedless 及其杂种分别用 UBC-266,UBC-272,UBC-292 和 UBC-295 扩增后获得的多态性 DNA 片段

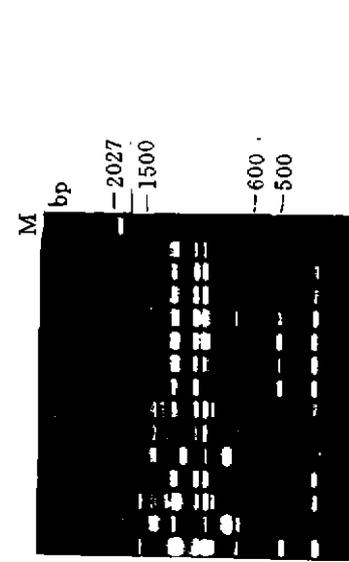


图 3 Jumbo 与 Thompson Seedless 和 Welder 与 Orlando Seedless 及其后代的 RAPD 标记

从左至右,第 1~3,4~14 泳道分别为 Jumbo×Thompson Seedless 和 Welder×Orlando Seedless 及其后代用引物 UBC-250 扩增后获得的多态性 DNA 片段,第 15 条为 100 bp DAN 分子标记标准

增, DNA 的构成及结构的稳定性增强了实验结果的准确性。②鉴定所需时间短、效率高、重复性好。所以, 用 RAPD 技术在幼苗期鉴定葡萄远缘杂种, 以至扩大到植物育种中, 是一种直接、准确、快速鉴定的有效方法。

参 考 文 献

- 1 Chaparro J X, Goldy R G, Mowrey BD *et al.* Identification of *Vitis vinifera* × *Muscadine rotundifolia* small hybrids by starch gel electrophoresis. *Hortscience*, 1989, 24, 128~130
- 2 Rammig D W, Emerahad R L, Tarallo R. C₄₁₋₅, a stenospermocarpic seedless *Vitis vinifera* × *Vitis rotundifolia* hybrid developed by embryo rescue. *International Symposium on Table Grape Production*, 1994, 123~124
- 3 Olmo H P. The potential role of (*Vinifera* × *rotundifolia*) hybrid in grape variety improvement. *Experientia*, 1986, 42, 921~926
- 4 Doyle J J, Doyle J L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 1990, 12, 13~15
- 5 Welsh J, McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res*, 1990, 18, 7213~7218
- 6 Williams J G K, Kubelik A R, Livak K J *et al.* DNA polymorphisms amplified as arbitrary primers are useful genetic markers. *Nucleic Acids Res*, 1990, 18, 6531~6535
- 7 肖顺元, Frederick G, Gmitter Jr *et al.* RAPD 分析——鉴定柑桔体细胞杂种的快速方法. *遗传*, 1995, 17(4), 40~42
- 8 Martin G B, Williams J G K, Tanksley S D. Rapid identification of markers linked to pseudomonas resistance gene in tomato using random primers and near isogenic lines. *Proc Natl Acad Sci(USA)*, 1991, 88, 2336~2340
- 9 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 genomic regions using segregating population. *Proc Natl Acad Sci (USA)*, 1991, 88, 9828~9832
- 10 Striem M J, Ben-Hayim G, Spiegel-Roy P. Developing molecular genetic markers for grape breeding, using polymerase chain reaction procedure. *Vitis*, 1994, 33, 53~54

Identification of Hybrids Derived from *Vitis rotundifolia* × *Vitis vinifera* by RAPD Analysis

Wang Yuejin¹ Lamikanra O.² Schell L.² Lu Jlang²

(¹ Department of Horticulture, Northwestern Agricultural University, Yangling, Shaanxi 712100)

(² The Center for Viticultural Sciences, Florida A&M University, FL 32307 USA)

Abstract The identification of hybrids derived from *Vitis rotundifolia* × *Vitis vinifera* cultivar was carried out using RAPD techniques during seedling stage. The results showed the DNA polymorphisms of 1400, 1440, 350 and 500 bp were amplified by random primers of UBC-250, UBC-266, and UBC-272 and targeted to the molecular markers from seedless parents when the hybrids DNA were used as the templates from two cross combinations. Therefore, the hybrids, of both true and false would be determined by these molecular genetic markers before fruit production.

Key words RAPD, *Vitis rotundifolia*, *Vitis* hybrid, molecular genetic marker