

葡萄种间杂交 F_1 代的 RAPD 分析*

王西平¹, 王跃进^{1*}, 周 鹏², 郑学勤²

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

[摘 要] 从 260 个随机引物中筛选出多态性丰富的 25 个引物进行中国野生葡萄商-24 与欧洲葡萄龙眼种间杂交 F_1 代的 RAPD 分析。据对 219 个 RAPD 标记的统计分析结果表明, 不分离标记、按 1:1 或 3:1 比例正常分离的标记、偏离孟德尔分离比例的标记和异常分离的标记分别占 49.8%, 40.6%, 7.3% 和 2.3%。双亲共有标记中 75.0% 不发生分离, 是不分离标记的主体。单亲特有标记中 55.4%~65.3% 发生正常分离, 是 1:1 分离标记的主体。商-24 特有标记中不分离标记占 20.4%, 而龙眼特有标记中不分离标记占 36.9%, 商-24 基因组中纯合基因位点比例要低于龙眼基因组中纯合基因位点的比例。异常分离的标记是指非亲本 RAPD 标记, 本研究出现了 5 个异常分离的标记。符合 1:1 或者 3:1 分离比例的特有 RAPD 标记, 可分别用于构建商-24 和龙眼的遗传连锁图谱, 双亲共有标记可用于构建双亲的遗传连锁图谱。

[关键词] 葡萄; 种间杂交; RAPD 分析

[中图分类号] S663.103.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9387(2002)06-0081-04

自 1990 年 Williams 等^[1]和 Welsh 等^[2]首创 RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) 技术以来, RAPD 已广泛应用于动植物遗传连锁图谱的构建^[3~5]、目的性状基因标记^[6,7]、种质资源遗传多样性研究^[8,9]等各个方面。遗传连锁图谱既是遗传研究的重要内容, 又是作物资源、育种及分子克隆等许多应用研究的理论依据和基础^[10]。利用 RAPD 技术构建遗传连锁图谱需要有回交、测交或 F_2 分离群体, 这对多年生果树来说并不容易。Hemmat 等^[3]在传统果树杂交育种理论的基础上, 提出“双假测交战略”(Double pseudotestcross strategy), 利用多年生果树遗传上高度杂合的特点, 杂交后代就相当于 F_1 自交, 产生 F_2 代群体, 即以 F_1 代作为作图群体, 使多年生果树遗传作图的难题迎刃而解。而利用 F_1 群体构建 RAPD 遗传连锁图谱, 必须首先了解 RAPD 在 F_1 代的分离情况。本研究对中国野生葡萄和欧洲葡萄种间杂交后代进行了 RAPD 分析, 以期开展葡萄遗传连锁图谱的构建奠定基础。

1 材料与方法

材 料 中国野生葡萄毛葡萄商-24 (*Vitis quinquangularis* Shang-24) 与欧洲葡萄龙眼 (*Vitis*

Vinifera cv. Longyan) 及商-24 与龙眼种间杂交 F_1 代植株 48 个。以上材料取自西北农林科技大学园艺学院葡萄种质资源圃。

葡萄基因组 DNA 的提取 葡萄基因组 DNA 的提取采用改良 CTAB 法^[7]。

RAPD 分析 10 碱基随机引物购自美国 Operon 公司, dNTPs 和 TaqDNA 聚合酶购自北京经科化学试剂公司, PCR 仪为美国 PE 公司生产的 Gene Amp PCR System 480 基因扩增仪。在 25 μ L RAPD 反应混合液中, 含 Mg^{2+} 1.0 mmol/L, dNTPs 100 μ mol/L, 模板 20 ng, TaqDNA 聚合酶 0.2 μ L (5 U/ μ L), 随机引物 4 pmol/L, 上浮 25 μ L 矿物油。PCR 扩增程序为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 然后 94 $^{\circ}$ C 1 min, 36 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 共 45 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。扩增产物在含 EB 0.5 μ g/mL 的琼脂糖凝胶上电泳。电泳结束后观察照像。

2 结果与分析

2.1 中国野生葡萄种间杂交 F_1 代的 RAPD 分析

从 260 个随机引物中筛选出多态性丰富的 25 个引物 (表 1), 用于中国野生葡萄种间杂交 F_1 代的

* [收稿日期] 2001-10-31

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (39770525, 39970524); 高等学校博士点基金资助项目 (980701); 教育部资助年轻优秀教师基金项目

[作者简介] 王西平 (1968-), 男, 陕西蒲城人, 讲师, 在读博士, 主要从事果树种质资源及生物技术育种研究。

* 通讯作者。Correspondence to: WANG Yue-jin

RA PD 分析, 其RA PD 标记分离情况可分为符合孟德尔分离规律、偏离孟德尔分离规律和异常分离 3 类 (表 2)。

表 1 用于 RA PD 分析的引物

Table 1 Primers used for RA PD analysis

引物 Primer	序列 Sequence 5'→3'	引物 Primer	序列 Sequence 5'→3'	引物 Primer	序列 Sequence 5'→3'
OPB07	GGTGACGCA G	OPJ19	GGACCACT	OPV 05	TCCGA GAGGG
OPB12	CCTTGACGCA	OP05	CCCA GTCACT	OPV 17	ACCGGCTTGT
OPB17	AGGGAACGA G	OP016	TCGGCGGTTC	OPV 18	TGGTGGCGTT
OPD13	GGGGTGACGA	OP07	CCCCGA TGGT	OPW 01	CTCA GTGTCC
OPH07	CTGCA TCGTG	OPR14	CA GGA TTCCC	OPW 02	ACCCCGCCAA
OPH08	GAAACACCCC	OPU 15	ACGGGCCA GT	OPW 07	CTGGA CGTCA
OPH16	TCTCA GCTGG	OPU 20	ACA GCCCCCA	OPW 09	GTGA CCGA GT
OPJ03	TCTCCGCTTG	OPV 02	AGTCA CTCCC	OPW 14	CTGCTGA GCA
OPJ13	CCACACTACC				

表 2 葡萄种间杂交 F₁ 代的 RA PD 分析

Table 2 RA PD analysis in F₁ progeny from an interspecific crossing between *V. quinquangularis* and *V. vinifera*

分离方式 Segregation patterns	双亲共有标记 Marker presented in both parents	商-24 特有标记 Marker only presented in Shang-24	龙眼特有标记 Marker only presented in Long yan	合计 Total	频率/% Frequency
不分离 Non-segregation	75	10	24	109	49.8
1:1 和 3:1 分离 1:1 and 3:1 segregation	21	32	36	89	40.6
偏离孟德尔分离比例 Deviation from Mendelian segregation	4	7	5	16	7.3
异常分离 Abnormal segregation				5	2.3

2.1.1 孟德尔分离 RA PD 标记符合孟德尔规律的情况有 RA PD 标记在 F₁ 代不分离、按 1:1 分离和按 3:1 分离等 3 种情况 (表 2)。在 F₁ 代不分离的 RA PD 标记既有双亲共有标记, 也有单亲共有标记。在 109 个不分离标记中, 双亲共有标记有 75 个, 占 68.8%, 而商-24 与龙眼不分离标记共占 31.1%, 可见双亲共有标记是不分离标记的主体, 也反映了 RA PD 标记为显性遗传标记的特征。这类标记在 F₁ 代个体中存在与缺失的理论比例为 48:0, 如双亲共有标记 OPJ19-1000, 商-24 特有标记 OPJ19-1600 和龙眼特有标记 OPJ19-700 在 F₁ 代群体中存在与缺失的实际比例分别为 48:0, 47:1 和 47:1 (图 1-a), 在统计学上符合 48:0 的比例。

F₁ 代按 1:1 分离的 RA PD 标记包括商-24 特有标记, 如 OPD13-700 的实际分离比例为 23:25, 和龙眼特有标记, 如 OPD13-1000 的实际分离比例为 26:22 (图 1-b), 在统计学上符合 24:24 的比例。

F₁ 代按 3:1 分离的 RA PD 标记仅发生在双亲

共有标记上, 如 OPD13-850 的实际分离比例为 37:11 (图 1-b), 在统计学上符合 36:12 的比例。

2.1.2 偏离孟德尔分离规律 F₁ 个体中 RA PD 标记存在与缺失的比例, 在统计学上偏离 1:1 或 3:1 的孟德尔分离比例, 如商-24 特有标记 OPV17-350, 龙眼特有标记 OPW02-550 和双亲共有标记 OPD13-600 (图 1-b) 的实际分离比例分别为 32:16, 35:13 和 29:19, 分别偏离了 24:24, 24:24 和 36:12 的理论比例。

2.1.3 异常分离 异常分离标记是指非亲 RA PD 标记, 即双亲均无但却在 F₁ 代出现, 如 OPV05-1300 的分离比例为 38:10 (图 1-c)。本试验有 5 个异常分离的 RA PD 标记, OPJ13-1200, OPV05-1300, OPV18-900, OPB17-1500 和 OPV18-600。

2.2 不同分离类型 RA PD 标记的出现频率

对扩增多态性丰富的 25 个随机引物产生的 219 个 RA PD 标记, 在中国野生葡萄商-24 与欧洲葡萄龙眼种间杂交 F₁ 代分离情况进行统计分析和 χ^2 测验。结果表明, 不发生分离的 RA PD 标记占

49.8%; 符合1:1和3:1孟德尔分离比例的占40.6%; 偏离孟德尔分离比例的占7.3%; 异常分离的占2.3% (表2)。

在 F_1 代不发生分离的RAPD标记中, 双亲共有标记占68.8%, 商-24特有标记占9.2%, 龙眼所有标记占22.0%。从另一方面来看, 双亲共有标记中75.0%不发生分离, 商-24中不分离标记占20.4%, 龙眼特有标记中不分离标记占36.9%。此结果表明, 双亲共有标记在 F_1 代大多不发生分离, 是不分离标记的主体, 同时表明欧洲葡萄龙眼基因

组中纯合基因位点所占比例高于中国野生葡萄商-24。

在 F_1 代符合1:1或3:1孟德尔分离比例的RAPD标记中, 双亲共有标记、商-24特有标记和龙眼特有标记分别占23.6%, 36.0%和40.4%。双亲共有标记、商-24特有标记和龙眼特有标记中, 符合孟德尔分离比例的分别占21.0%, 65.3%和55.4%。表明单亲特有标记在 F_1 代多发生符合孟德尔规律的分离, 是正常分离标记的主体。

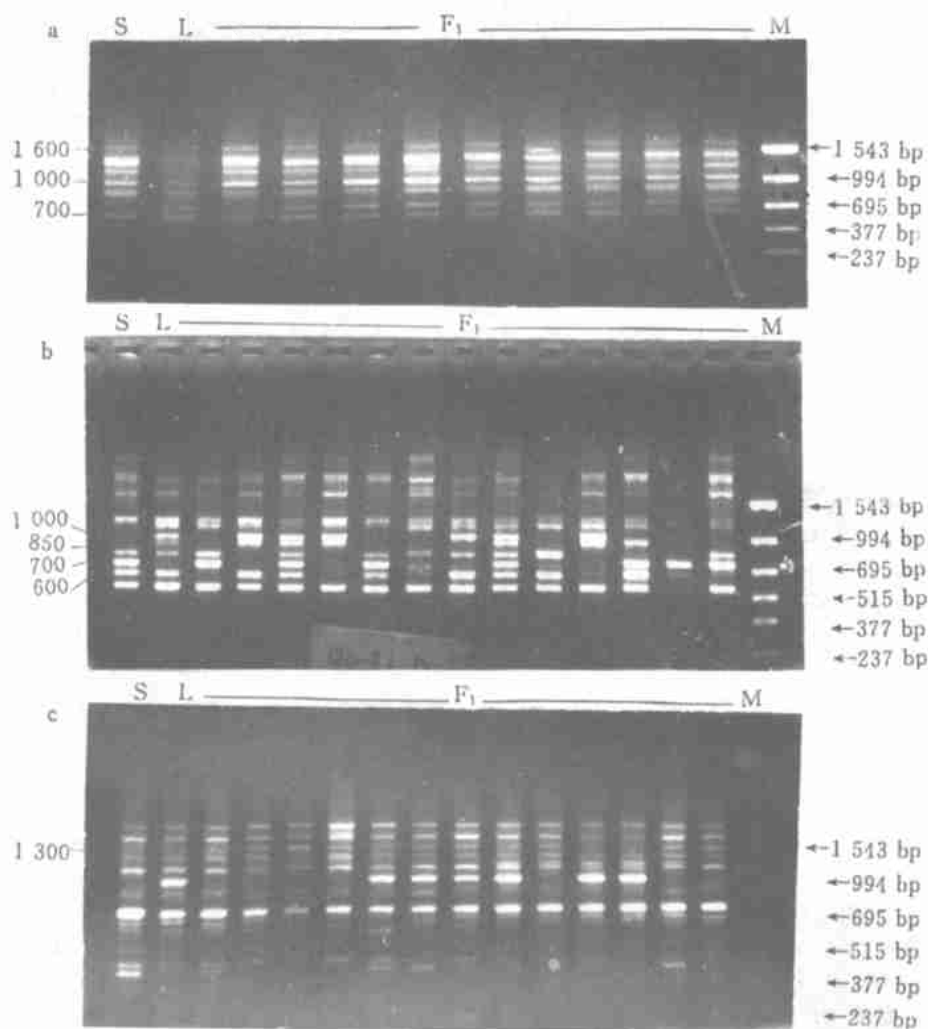


图1 引物OPJ19, OPD13和OPV05产生的RAPD标记在商-24 (S) 与龙眼 (L) 种间杂交 F_1 代的分离情况
a 标记OPJ19-1600仅存在于商-24, 标记OPJ19-1000存在于双亲, 标记OPJ19-700仅存在于龙眼, 三者存在 F_1 群体不发生分离, M为PCR Marker; b 标记OPD13-1000仅存在于龙眼, 标记OPD13-700仅存在于商-24, OPD13-850存在于双亲, 三者均符合孟德尔分离; 标记OPD13-600存在于双亲, 偏离孟德尔分离。c OPV05-1300不存在于双亲, 但出现在 F_1 代个体中。

Fig. 1 Segregation results of the markers amplified by primer OPJ19, OPD13 and OPV05 in F_1 progenies from an interspecific cross between *V. quinquangularis* Shang-24 (S) and *V. vinifera* Longyan (L)

a OPJ19-1600 presents in Shang-24; OPJ19-1000 presents in both parents; OPJ19-700 presents in Longyan. The three exists in F_1 progenies. M stands for PCR marker. b OPD13-1000, OPD13-700 and OPD13-850 show the Mendelian segregation differently present in Longyan, Shang-24 and both parents; OPD13-600 show the non-Mendelian segregation present in both parents. c OPV05-1300 show a segregation in the progenies but absent in both parents.

3 讨 论

关于 RAPD 标记偏离孟德尔分离规律已有报道。Echt 等^[11]、楼程富等^[12]、刘孟军等^[13]、Faure 等^[14]和 Hashizume 等^[15]分别研究了二倍体苜蓿、桑树、苹果、香蕉和西瓜有性后代的 RAPD 遗传行为,均发现了少数偏离后代出现。本研究观察到 7.3% 的 RAPD 标记偏离孟德尔分离规律,如 OPD 13-600 期望分离比例为 36:12,而实际分离比例为 29:19。从已有报道和本研究来看,不规则分离的 RAPD 标记往往集中在少数几个连锁群体,表明不同染色体在杂交过程中“活跃”程度不同,即发生结构重排、缺失、插入和突变等的机率存在变异^[13,15]。

在供试引物中,OPV 05 从商-24 与龙眼的种间杂交 F₁ 分离群体中扩增出双亲均没有的 RAPD 带(OPV 05-1300, 存在:缺失= 38:10)。楼程富等^[12]、Pooler 等^[16]、刘孟军等^[13]分别在桑树、桃和

苹果中观察到非亲本带的出现。Ayliffe 等^[17]也观察到类似的现象,并通过序列分析证明这种现象来源于不同程度的等位核苷酸序列之间形成的异源双链体。Davis 等^[18]在鹰嘴豆和二倍体草莓的作图群体中发现了 10 个长度在 300~1350 bp 的共显性 RAPD 标记,认为这些带是双亲所不具备的异源双链体,其泳动速度低于两个相应的亲本带,在 PCR 扩增前将双亲 DNA 混合可以导致异源双链体的出现。这种由等位 RAPD 产物形成的非亲 RAPD 可提供共显性 RAPD 标记,并且能提供新的 RAPD 多态性,在研究育种行为以及亲缘关系等方面具有重要应用价值。

本研究中,商-24 和龙眼种间杂交 F₁ 群体中有 50.2% 的检出位点发生了分离,其中 80.9% (占检出位点总数的 40.6%) 的位点发生了孟德尔分离,分别可用于中国野生葡萄商-24 和欧洲葡萄龙眼的遗传作图及双亲连锁群间的亲缘性分析。

[参考文献]

- [1] Williams J G K, Kubelik A R, Lirak K J, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers [J]. *Nucleic Acids Res*, 1990, 18: 6531- 6535
- [2] Welsh J, McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers [J]. *Nucleic Acids Res*, 1990, 18: 7231- 7218
- [3] Hemmat M, Weeden N F, Manganaris A G, et al. Molecular marker linkage map for apple [J]. *The Journal of Heredity*, 1994, 85 (1): 4- 11
- [4] Lodhi M A, Daly M J, Ye G N, et al. A molecular marker based linkage map of vitis [J]. *Genome*, 1995, 38: 786- 794
- [5] King G J. Progress in mapping agronomic genes in apple (the European Apple Genome Mapping Projects) [J]. *Euphytica*, 1994, 77: 65- 69
- [6] Michmore R W, Paran I, Kessli 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 populations [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88: 9828- 9832
- [7] Wang Y J, Lamikanra O, Lu J, et al. Identification of genetic marker linked to seedless genes in grape using RAPD [J]. *西北农业大学学报*, 1996, 24 (5): 1- 10
- [8] Xu Hong, Bakalinsky T. Identification of grape (vitis) rootstocks using sequence characterized amplified region DNA markers [J]. *Hortscience*, 1996, 31 (2): 267- 268
- [9] Xu Hong, Wilson Diane J, Arosekar S, et al. Sequence-specific polymerase chain-reaction markers derived from randomly amplified polymorphic DNA markers for fingerprinting grape (vitis) rootstocks [J]. *J Amer Soc Hort Sci*, 1995, 120 (5): 714- 720
- [10] 贾继增. 分子标记种质资源鉴定和分子标记育种 [J]. *中国农业科学*, 1996, 29 (4): 1- 10
- [11] Echt C S, Erdahl L A, McCoy T J. Genetic segregation of randomly amplified polymorphic DNA in diploid cultivated alfalfa [J]. *Genome*, 1992, 35: 84- 87
- [12] 楼程富, 张有做, 周金妹. 桑树有性后代与双亲基因组 DNA 的 RAPD 分析初报 [J]. *农业生物技术学报*, 1997, 5 (4): 397- 403
- [13] 刘孟军, Shin Yong-U K, Yae Byeong-Woo. RAPD 标记在苹果属种间杂交一代的分离方式 [J]. *园艺学报*, 1998, 25 (3): 214- 219
- [14] Faure S, Noyer J L, Horry J P. A molecular marker-based linkage map of diploid bananas (*Musa accuminata*) [J]. *Theoretical Applied Genetics*, 1993, 87 (4): 517- 526
- [15] Hashizume T, Shinamoto I, Harushima Y, et al. Construction of a linkage map for watermelon (*Citrullus lanatus*) using Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) [J]. *Euphytica*, 1996, 90 (3): 265- 273
- [16] Pooler M R, Scorza R. A aberrant transmission of RAPD marker in haploids, doubled haploids, and F₁ hybrids of peach: observation and speculation on causes [J]. *Acta Horticulturae*, 1995, 64 (4): 233- 241
- [17] Ayliffe M A, Lawrence G J, Ellis J G, et al. Heteroduplex molecules formed between allelic sequence cause nonparental RAPD bands [J]. *Nucleic Acid Research*, 1994, 22 (9): 1632- 1636
- [18] Davis T M, Yu H, Haigis K M, et al. Template mixing: a method of enhancing detection and interpretation of codominant RAPD markers [J]. *Theoretical Applied Genetics*, 1995, 91 (4): 582- 588

(下转第 88 页)

[8] 萨姆布鲁克, 弗里克, 曼尼阿蒂斯 分子克隆实验指南 [M]. 第 2 版 金冬雁, 黎孟枫, 译 北京: 科学出版社, 1995

Cloning and sequencing of RAPD marker linked to white rot disease resistant gene in wild grapes native to China

XU Yan¹, WANG Yue-jin¹, ZHOU Peng², ZHAN Jian-xia¹, WANG Xi-ping¹

(1 College of Horticulture, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China)

(2 National Key Biotechnology Laboratory for Tropical Crops, CATAS, Haikou, Hainan 571101, China)

Abstract: Bulk segregant analysis (BSA), randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) methods were used to tag the white rot-resistant genes of grape molecular markers, parents and their 33 individuals of F₁ and F₁ progeny resulting from a cross 91-5 between Tangwei (*Vitis davidii*), white rot-resistant and Ugni Blanc (*V. vinifera*), white rot-susceptible. Among 155 Operon primers giving distinct band patterns, one RAPD marker OPP09-760 was tightly linked to a major gene resistant to *Coniothyrium diploidiella*. OPP09-760 fragment was reclaimed by Wizard DNA Clean-up system from electrophoresis gel, and cloned in T-easy Vector, then sequenced from two sides. The DNA fragment OPP09-760 was actually 766 bp. It is suggested that the sequence of RAPD marker OPP09-760 might be used as a basis for synthesizing the specific PCR primers and the probe for detecting grape white rot-resistant in disease resistant breeding and molecular marker assisted selection (MAS).

Key words: Chinese wild *Vitis*; white-rot disease; RAPD; cloning; sequencing

(上接第 84 页)

RAPD analysis in an interspecific F₁ hybrid of grapes

WANG Xi-ping¹, WANG Yue-jin¹, ZHOU Peng², ZHENG Xue-qin²

(1 College of Horticulture, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 National Key Biotechnology Laboratory for Tropical Crops, CATAS, Haikou, Hainan 571101, China)

Abstract: RAPD analysis in an interspecific F₁ hybrids of grapes was studied using 25 primers screening from 260 oligonucleotide random primers. According to the segregation patterns, RAPD markers were grouped into three types: Normal Mendelian inheritance with Segregation ratio of nearly 1:1 (as a result of Aa×aa or aa×Aa), 3:1 (as a result of Aa×Aa) or 1:0 (non-segregation, as result of AA×AA, AA×aa, AA×Aa, Aa×AA and aa×AA), deviation from Mendelian segregation ratios, non-parental markers, absent in both parents but present in progenies. Basing on statistics of 219 RAPD markers, there exist 49.8% non-segregation markers, 40.6% 1:1 and 3:1 Mendelian segregation markers, 7.3% markers deviating from Mendelian segregation ratios and 2.3% abnormal segregation markers. 75.0% markers presenting in both parents did not segregate and 55.4%-65.3% markers presenting in only one parent show Mendelian segregation. Non-segregation markers accounted for 20.4% of the markers presented only in Shang-24 and 36.9% of those presented only in Longyan, the results suggested that Longyan genome contains more pure loci than Shang-24. These provide the foundation for construction of grape genetic linkage map.

Key words: grape; interspecific hybridization; RAPD analysis