

葡萄感白粉病基因的 RAPD 标记及其序列分析

张剑侠,王跃进,徐伟荣,张艳艳

(西北农林科技大学 园艺学院,陕西 杨凌 712100)

【摘 要】 【目的】为葡萄抗白粉病育种的辅助选择提供理论依据。【方法】以抗病中国野生葡萄白河-35-1 与感病的欧洲葡萄佳利酿杂交亲本及其 F₁、F₂ 代为试材,通过对 520 个随机引物的筛选,从佳利酿中获得了葡萄感白粉病基因的 RAPD 标记 OPV06-1100,并在欧洲葡萄、中国野生华东葡萄和美洲野生葡萄中进行了分析验证。【结果】经克隆、测序,RAPD 标记 OPV06-1100 实际长度为 1 016 bp。该标记与欧洲葡萄黄酮醇合成酶基因有 92%的同源性,与 13 条欧洲葡萄叶片非生物胁迫数据库的 EST 序列有 89%~97%的同源性;与 3 条来自欧洲葡萄感染葡萄皮尔斯病原菌后转录反应获得的 EST 序列有 93%~95%的同源性;与拟南芥感白粉病基因 *PMR6* 序列有 27.1%的同源性。【结论】OPV06-1100 为葡萄属植物感白粉病基因的 RAPD 标记。该标记为认识葡萄感病基因和基因组以及标记辅助育种奠定基础。

【关键词】 葡萄;白粉病;感病基因;RAPD 标记;序列分析

【中图分类号】 S663.1 【文献标识码】 A 【文章编号】 1671-9387(2008)02-0111-08

RAPD marker and its sequence analysis of susceptible gene to
Uncinula necator in *Vitis*

ZHANG Jian-xia,WANG Yue-jin,XU Wei-rong,ZHANG Yan-yan

(College of Horticulture ,Northwest A & F University ,Yangling ,Shaanxi 712100 ,China)

Abstract: 【Objective】 The study is to provide theoretical basis for selecting *Vitis* resistance *Uncinula necator* in breeding. 【Method】 RAPD analysis was carried out by using the parents and their F₁ and F₂ individuals of interspecific hybridization combination Baihe-35-1×Carignane (Resistant×Susceptible). A total 520 random primers were screened on the DNA of resistant and susceptible materials. OPV06-1100, a RAPD marker of susceptible gene to *Uncinula necator* in *Vitis* was obtained from *V. vinifera* cultivar Carignane, and was tested among *V. vinifera* cultivars, *V. pseudoreticulata* of Chinese wild *Vitis* species and clones, American wild *Vitis* species and clones (varieties) and *Parthenocissus* Planch. 【Result】 The length of the RAPD marker is 1 016 bp by cloning and sequencing. Additionally, the sequence of OPV06-1016 was analysed. OPV06-1100 shows 92% identity with *V. vinifera* *FLS5* gene for flavonol synthase, shows 89% to 97% identity with 13 EST sequence abiotic stressed leaves of *V. vinifera*, shows 93% to 95% identity with 3 EST sequence from *V. vinifera* infected with *Xylella fastidiosa*, shows 27.1% identity with gene *PMR6* from *Arabidopsis thaliana* of the susceptibility to *Uncinula necator*. 【Conclusion】 OPV06-1100 is a PAPD marker linked to *Uncinula necator* susceptible genes in *Vitis*. The marker will provide a foundation to know susceptible genes and genomic of grape as well as marker-assisted breeding.

* 【收稿日期】 2007-03-08
【基金项目】 国家自然科学基金项目(30170653)
【作者简介】 张剑侠(1964—),男,河南偃师人,副教授,博士,主要从事葡萄种质资源与生物技术育种研究。
E-mail: zhangjx666 @ 126. com
【通讯作者】 王跃进(1958—),男,陕西三原人,教授,博士生导师,主要从事葡萄种质资源与生物技术育种研究。
E-mail: wangyuejin @263. net

Key words: *Vitis*; *Uncinula necator*; susceptible gene; RAPD marker; sequence analysis

葡萄白粉病 (*Uncinula necator* (Schw.) Burr.) 是一种世界性的葡萄真菌病害,造成的危害程度不一,各国均有报道^[1-4]。在葡萄种质资源中,以欧洲葡萄的品质最好,因而在生产上得到广泛栽培,但其抗病性差,每年需多次喷药防病,这不仅增加了生产成本,而且污染环境。因此,利用野生葡萄与欧洲葡萄杂交以培育抗病的优质葡萄新品种,是解决问题的根本途径。在植物遗传育种中一般通过表现型间接地对基因型进行选择,但由于葡萄植株高大、占地多、生长季较长,存在选择效率低的缺点。如果能直接对基因型进行选择,将极大地提高选择效率,而分子标记技术为实现对基因型的直接选择提供了可能^[5]。由于分子标记与目的基因相连锁,利用分子标记的有无(即目的基因的存在与否)对杂种幼苗进行取舍,缩小杂种群体,即可提高育种效率。目前标记辅助选择(Marker assisted selection, MAS)在农作物育种上的应用已取得较大成效^[6-8],在葡萄及其他果树育种上也有报道^[9-16]。但标记辅助葡萄育种主要集中在获得抗病基因标记方面^[13-16],对感病基因标记的研究报道极少^[17]。

本试验以中国野生华东葡萄与欧洲葡萄的种间杂种为试材,获得了葡萄感白粉病基因的 RAPD 标记,并对该标记进行了克隆测序与序列分析,旨在为认识葡萄感病基因和基因组以及将感病基因标记应用于辅助育种提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

中国野生华东葡萄与欧洲葡萄的种间杂交(白河-35-1×佳利酿)F₁代(6-12-1、6-12-2、6-12-3、6-12-4、6-12-5、6-12-6和6-12-7)、F₂代,以及中国野生华东葡萄(湖南-1、白河-35-1、白河-35-2、白河-13、白河-13-1、广西-1、广西-2、商南-1和商南-2)、欧洲葡萄(佳利酿、白玉霓、黑玫瑰、大粒红无核、粉红玫瑰、小白玫瑰、玫瑰香、五月紫、雷司令、白诗南和法国兰)、美洲野生葡萄(甜冬葡萄、美洲葡萄 Y157、加州葡萄 Gold Hill #1、沙地葡萄 A. De Serres、河岸葡萄、峡谷葡萄、山平氏葡萄、冬葡萄、圆叶葡萄 Alachua 和 Conquister)和爬山虎,均由西北农林科技大学葡萄种质资源圃中保存;2个圆叶葡萄品种 Alachua 和 Conquister 叶片,由西北农林科技大学葡萄酒学院的王华教授提供。

1.2 方法

1.2.1 葡萄抗病性鉴定 参照王跃进等^[18]的方法进行,于2004和2005年7~8月份,采用田间自然鉴定的方法,鉴定葡萄对白粉病的抗性,叶片感病指数取2年的平均值。

1.2.2 葡萄基因组 DNA 的提取及 RAPD 反应 参照王跃进等^[18]的方法进行。

1.2.3 RAPD 标记的获得 以抗病的中国野生华东葡萄株系白河-35-1×感病的欧洲葡萄品种佳利酿亲本及其 F₁代抗病单株 6-12-6、感病单株 6-12-2 的 DNA 为模板,通过对 520 个随机引物的筛选,获得多态性引物。用多态性引物对白河-35-1×佳利酿 F₁、F₂代群体进行 RAPD 分析,获得感病基因的 RAPD 标记。

1.2.4 用 RAPD 标记对葡萄种质资源的分析 用 1.2.3 中获得的 RAPD 标记,对欧洲葡萄、中国野生华东葡萄和美洲野生葡萄进行分析验证。

1.2.5 RAPD 标记的克隆测序 用 UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒,从凝胶上回收特异标记的 DNA 片段。用于转化的大肠杆菌为 DH5 α 。感受态细胞制备和连接产物的转化参照文献^[19]的方法。在涂布 X-Gal/IPTG 的 LB 平板上进行蓝白斑筛选,白色菌斑通常为阳性克隆。阳性克隆用甘油保存,送 Sangon 公司测序。

1.2.6 RAPD 标记的生物信息学分析 利用 BLAST 在 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)的 nr 数据库中,对获得的葡萄感白粉病基因 RAPD 标记序列进行同源性比较。利用 NCBI 数据库的 ORF Finder 功能,对获得的分子标记序列进行开放阅读框架(ORF)分析。

2 结果与分析

2.1 RAPD 标记 OPV06-1100 的初步获得

通过对随机引物的筛选,获得的特异引物 OPV06 在感病亲本佳利酿及 F₁代感病单株 6-12-2 中均存在 1 条约 1 100 bp 的 DNA 片段,而在抗病亲本白河-35-1 和 F₁代抗病单株 6-12-6 中均不存在该 DNA 片段,将该 DNA 片段命名为 OPV06-1100。用该引物对白河-35-1×佳利酿亲本及其 F₁代 7 个单株的扩增结果(图 1 和表 1)显示,在感病亲本佳利酿及 F₁代感病单株 6-12-2、6-12-3 和抗病单株 6-12-4 中均存在 1 100 bp 的 DNA 片段,而在抗病亲

本白河-35-1 及 F₁ 代抗病单株 6-12-5、6-12-6 和感病单株 6-12-1、6-12-7 中均不存在该 DNA 片段。初步推断 OPV06-1100 是来自于欧洲葡萄佳利酿感白粉病基因的 RAPD 标记。

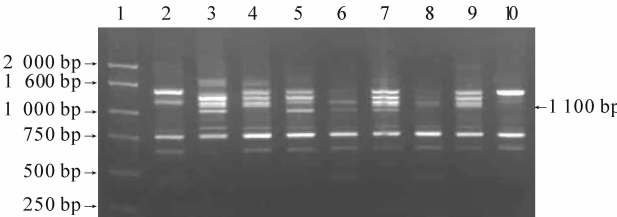


图 1 引物 OPV06 对白河-35-1×佳利酿亲本及其 F₁ 代单株的扩增结果

1. PCR marker; 2. 白河-35-1; 3. 佳利酿; 4. 6-12-1; 5. 6-12-2; 6. 6-12-3; 7. 6-12-4; 8. 6-12-5; 9. 6-12-6; 10. 6-12-7

Fig. 1 RAPD amplification in parents and their F₁ individuals of combination Baihe-35-1×Carignane with primer OPV06

1. PCR marker; 2. Baihe-35-1; 3. Carignane; 4. 6-12-1; 5. 6-12-2; 6. 6-12-3; 7. 6-12-4; 8. 6-12-5; 9. 6-12-6; 10. 6-12-7

表 2 和图 2 显示, 亲本 6-12-2 为高感白粉病, 存

表 2 6-12-2(白河-35-1×佳利酿)自交后代的抗病表现及 RAPD 分析结果

Table 2 Resistance phenotype and RAPD analysis of self-pollination of the clone 6-12-2 (Baihe -35-1×Carignane)							
亲本或自交后代 Parents or offsprings	感病指数(SI) Susceptibility index	表现型 Phenotype	OPV06-1100	亲本或自交后代 Parents or offsprings	感病指数(SI) Susceptibility index	表现型 Phenotype	OPV06-1100
6-12-2	69.93	HS	+	2-47	23.50	R	—
2-1	48.61	S	+	2-48	27.65	S	+
2-2	46.29	S	+	2-49	28.38	S	—
2-3	35.55	S	+	2-50	14.14	R	+
2-4	46.69	S	+	2-51	12.89	R	+
2-5	37.68	S	+	2-54	26.20	S	+
2-7	62.34	HS	+	2-55	27.61	S	+
2-8	29.83	S	+	2-56	22.58	R	+
2-9	36.83	S	+	2-57	10.85	R	+
2-10	59.21	HS	+	2-58	16.17	R	+
2-13	48.41	S	+	2-59	30.09	S	+
2-15	48.79	S	+	2-60	41.68	S	—
2-16	13.50	R	—	2-61	21.15	R	+
2-17	7.02	R	+	2-62	35.28	S	+
2-18	21.00	R	+	2-63	29.18	S	+
2-19	30.06	S	+	2-64	35.31	S	+
2-20	34.05	S	+	2-65	32.73	S	+
2-21	42.87	S	+	2-66	19.29	R	—
2-22	7.42	R	—	2-67	24.36	R	—
2-23	53.90	HS	—	2-68	14.85	R	+
2-24	38.50	S	—	2-69	22.00	R	—
2-25	21.93	R	+	2-70	27.26	S	+
2-30	35.08	S	+	2-71	21.00	R	+
2-37	12.24	R	+	2-72	14.18	R	+
2-38	9.67	R	+	2-73	21.14	R	+
2-39	12.70	R	—	2-74	13.58	R	+
2-42	14.81	R	+	2-75	15.09	R	+
2-43	16.60	R	+	2-76	20.22	R	+
2-44	11.46	R	+	2-77	21.79	R	+
2-45	10.43	R	+	2-78	10.50	R	+
2-46	9.32	R	+				

在感病标记 OPV06-1100, 在其 60 个自交后代群体单株中, 28 个感病单株有 24 株存在这一标记, 32 个抗病单株有 7 株不存在这一标记。

表 1 白河-35-1×佳利酿组合亲本及其 F₁ 代单株的抗病表现及 RAPD 分析结果

Table 1 Resistance phenotype and RAPD analysis of parents and their F ₁ individuals of combination Baihe-35-1×Carignane			
亲本或 F ₁ 代 Parents or F ₁ individuals	感病指数(SI) Susceptibility index	表现型 Phenotype	OPV06-1100
白河-35-1 Baihe-35-1	7.23	R	—
佳利酿 Carignane	49.27	S	+
6-12-1	55.27	HS	—
6-12-2	69.93	HS	+
6-12-3	51.53	HS	+
6-12-4	24.38	R	+
6-12-5	22.44	R	—
6-12-6	23.93	R	—
6-12-7	44.56	S	—

注: R. 抗病; S. 感病; HS. 高感; +. 存在; —. 不存在。下表同。
Note: R. Resistance; S. Susceptible; HS. High susceptible; +. Present; —. Absent. The same as below.

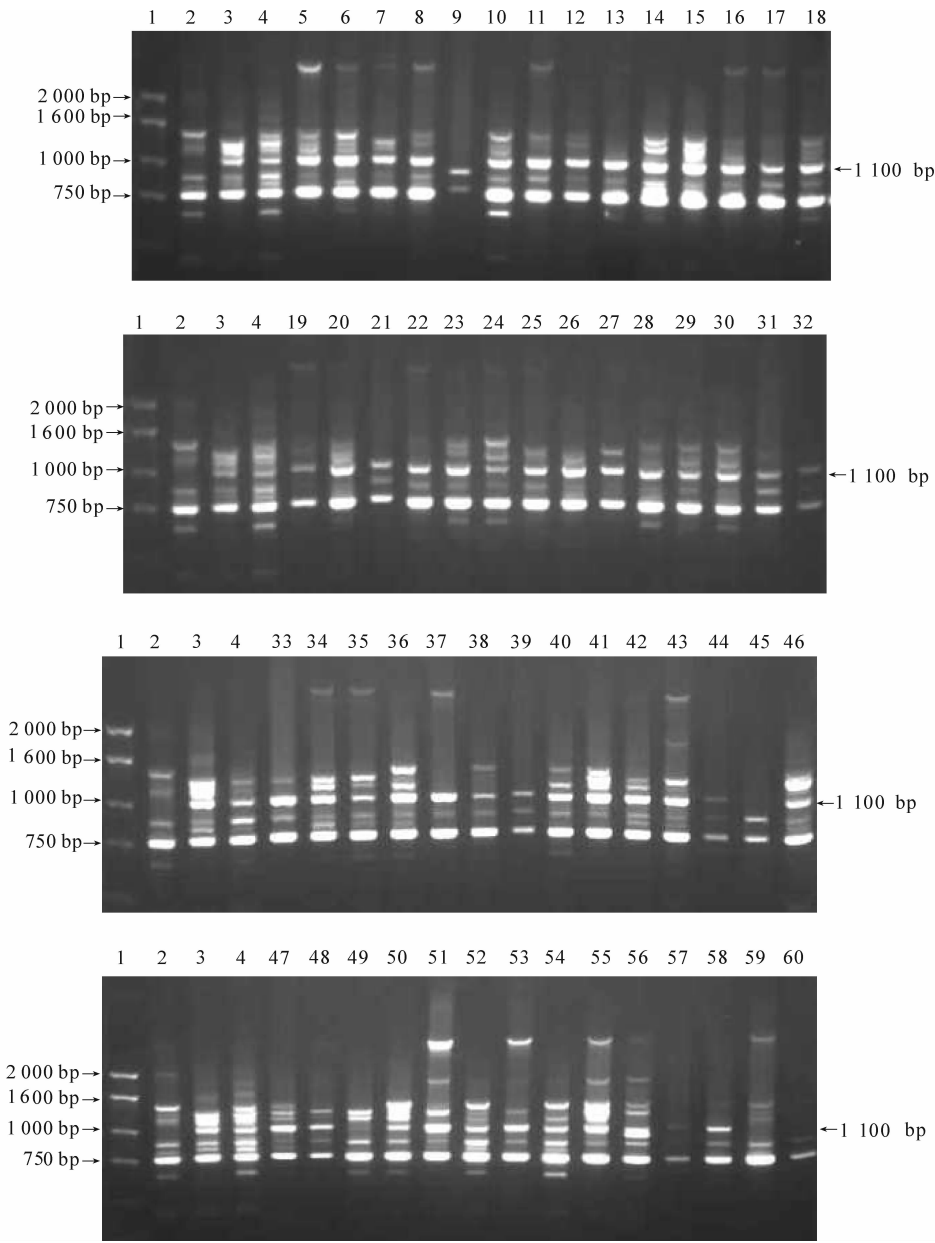


图 2 引物 OPV06 对 6-12-2(白河-35-1×佳利酿)自交后代的扩增结果

1. PCR marker;2. 白河-35-1;3. 佳利酿;4. 6-12-2;5~60. F₂ 代单株

Fig. 2 Amplified results of RAPD in of self-pollination of the clone 6-12-2 (Baihe-35-1 × Carignane)with primer OPV06

1. PCR marker;2. Baihe-35-1;3. Carignane;4. 6-12-2;5—60. F₂ individuals

2.2 RAPD 标记 OPV06-1100 在欧洲葡萄、中国野生华东葡萄和美洲野生葡萄中的分析验证

用引物 OPV06 对欧洲葡萄的 RAPD 验证结果(图 3 和表 3)显示,供试的 11 个感病品种中均存在 OPV06-1100 的 RAPD 标记,因此可判断该标记为感病的欧洲葡萄所共有。

用引物 OPV06 对中国野生华东葡萄 9 个株系的 RAPD 分析结果(图 4 和表 3)显示,除高感白粉病株系湖南-1 中存在 OPV06-1100 外,抗病株系白

河-35-1、白河-13、白河-13-1、广西-1 及感病株系白河-35-2、广西-2、商南-1、商南-2 中均不存在该标记。

用引物 OPV06 对美洲野生葡萄及爬山虎的 RAPD 分析结果(图 5 和表 3)显示,在抗病的加州葡萄 Gold Hill#1、峡谷葡萄、冬葡萄及圆叶葡萄品种 Conquerster 中均存在 OPV06-1100 标记,其他抗病种、株系或品种及爬山虎中均不存在该标记,这表明 OPV06-1100 为葡萄属植物感白粉病基因的 RAPD 标记,由于一些抗病葡萄中也存在该感病基

因 RAPD 标记,因此推测该感病基因可能普遍存在于葡萄中,而且可能是多基因家族。

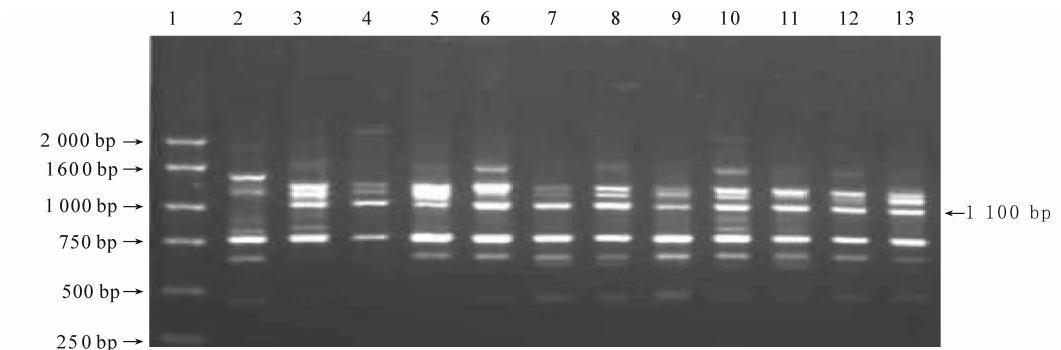


图 3 引物 OPV06 对 11 个欧洲葡萄品种的扩增结果

1. PCR marker;2. 白河-35-1;3. 佳利酿;4. 白玉霓;5. 黑玫瑰;6. 大粒红无核;7. 粉红玫瑰;8. 小白玫瑰;
9. 玫瑰香;10. 五月紫;11. 雷司令;12. 白诗南;13. 法国兰

Fig. 3 RAPD amplification in cultivars of *V. vinifera* with primer OPV06

1. PCR marker;2. Baihe-35-1;3. Carignane;4. Ugni Blanc;5. Black Rose;6. Dalihong Seedless;7. Muscat Rose;
8. Muscat Blanc;9. Muscat Hamburg;10. May Perple;11. White Riesling;12. Chein Blanc;13. Blue French

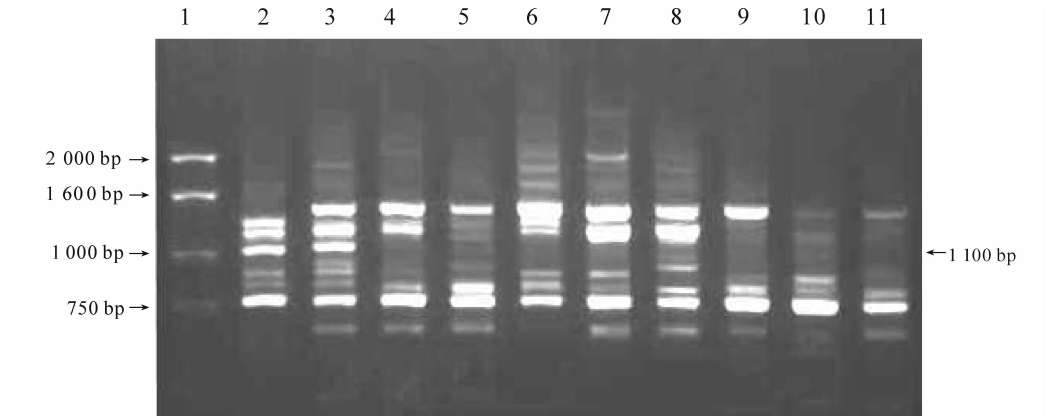


图 4 引物 OPV06 对 9 个中国野生华东葡萄株系的扩增结果

1. PCR marker;2. 佳利酿;3. 湖南-1;4. 白河-35-1;5. 白河-35-2;6. 白河-13;7. 白河-13-1;8. 广西-1;9. 广西-2;10. 商南-1;11. 商南-2

Fig. 4 RAPD amplification in 9 clones of *V. pseudoreticulata* with primer OPV06

1. PCR marker;2. Carignane;3. Hunan-1;4. Baihe-35-1;5. Baihe-35-2;6. Baihe-13;7. Baihe-13-1;8. Guangxi-1;
9. Guangxi-2;10. Shangnan-1;11. Shangnan-2

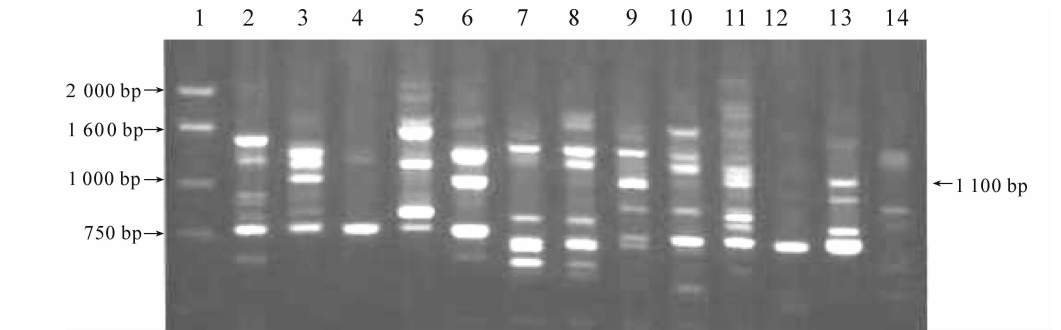


图 5 引物 OPV06 对美洲野生葡萄 9 种 10 株系及爬山虎的扩增结果

1. PCR marker;2. 白河-35-1;3. 佳利酿;4. 甜冬葡萄;5. Y157;6. Gold Hill # 1;7. A. De Serres;8. 河岸葡萄;9. 峡谷葡萄;
10. 山平氏葡萄;11. 冬葡萄;12. Alachua;13. Conquister;14. 爬山虎

Fig. 5 RAPD amplification in American wild *Vitisspecies* and *Parthenocissus Planch.* with primer OPV06

1. PCR marker;2. Baihe-35-1;3. Carignane;4. *V. cinerea*;5. Y157;6. Gold Hill # 1;7. A. D Serres;8. *V. riparia*;
9. *V. arizonic*;10. *V. champini*;11. *V. berlandieri*;12. Alachua;13. Conquister;14. *Parthenocissus Planch.*

表 3 葡萄种质资源的抗病表现及 RAPD 分析结果

Table 3 Resistance phenotype and RAPD analysis of grape germplasm resources

种 Species	株系或品种 Clones or varieties	感病指数(SI) Susceptibility index	表现型 Phenotype	OPV06-1100
欧洲葡萄 <i>V. vinifera</i>	佳利酿 Carignane	49.27	S	+
	雷司令 White Riesling	44.43	S	+
	五月紫 May perple	28.36	S	+
	白诗南 Chein Blanc	42.50	S	+
	粉红玫瑰 Muscat Rose	39.14	S	+
	小白玫瑰 Muscat Blanc	41.36	S	+
	玫瑰香 Muscat Hamburg	57.43	HS	+
	法国兰 Blue French	85.00	HS	+
	白玉霓 Ugni Blanc	71.78	HS	+
	大粒红无核 Dalihong Seedless	52.39	HS	+
中国野生华东葡萄 <i>V. pseudoreticulata</i>	黑玫瑰 Black Rose	61.24	HS	+
	白河-35-1 Baihe-35-1	7.23	R	—
	白河-35-2 Baihe-35-2	34.29	S	—
	白河-13 Baihe-13	18.79	R	—
	白河-13-1 Baihe-13-1	18.67	R	—
	广西-1 Guangxi-1	16.36	R	—
	广西-2 Guangxi-2	30.36	S	—
	商南-1 Shangnan-1	28.93	S	—
圆叶葡萄 <i>V. rotundifolia</i>	商南-2 Shangnan-2	30.93	S	—
	湖南-1 Hunan-1	67.07	HS	+
河岸葡萄 <i>V. riparia</i>	Alachua	0.00	IS	—
	Conquister	0.00	IS	+
加州葡萄 <i>V. californica</i>	—	18.00	R	—
山平氏葡萄 <i>V. champinii</i>	Gold Hill # 1	15.86	R	+
沙地葡萄 <i>V. rupestris</i>	—	11.86	R	—
冬葡萄 <i>V. berlandieri</i>	A. De Serres	6.15	R	—
美洲葡萄 <i>V. labrusca</i>	—	8.00	R	+
峡谷葡萄 <i>V. arizonica</i>	Y157	19.09	R	—
甜冬葡萄 <i>V. cinerea</i>	—	9.50	R	+
爬山虎 <i>Parthenocissus Planch.</i>	—	12.57	R	—
	—	0.00	R	—

注:IS. 不感病。Note:IS. Insusceptible.

2.3 RAPD 标记 OPV06-1100 的回收、克隆与测序

对获得的葡萄感白粉病基因 RAPD 标记 OPV06-1100 回收,经克隆和蓝白斑筛选,提取质粒 DNA,然后酶切鉴定证实为阳性克隆(图 6)。

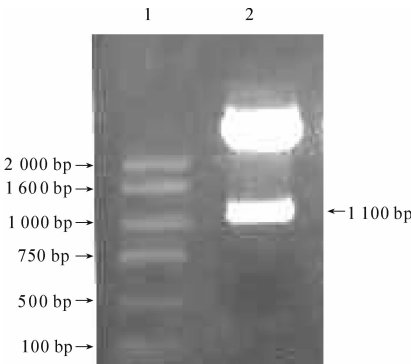


图 6 重组质粒的酶切结果

1. PCR marker;2. 重组质粒(佳利酿)

Fig. 6 Identification of recombination plasmid digested with *EcoR* I

1. PCR marker;2. Recombination (Carignane)

将阳性克隆菌液测序,结果表明,该标记实际长度为 1 016 bp,因此更名为 OPV06-1016。该标记已登录 GenBank,登录号为 DQ493891。

2.4 RAPD 标记 OPV06-1100 的生物信息学分析

对感白粉病基因特异标记序列 OPV06-1100 进行 BLASTn 分析,结果表明,有 79 条来自其他生物的 DNA 序列与其有部分同源性,相似性片段大小为 22~52 bp,比对的统计显著性值(E 值)最小为 2E-11,且与来自于欧洲葡萄的黄酮醇合成酶基因(flavonol synthase)的同源性为 92%。将该标记序列与拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)基因 DNA 序列进行比较,共有 39 条来自拟南芥基因组的核酸序列与 OPV06-1016 序列有 18~24 bp 的同源性,其中拟南芥基因组的 3 条核酸序列与 RNA Polymerase II 转录起始因子有关。在 EST 数据库中 BLASTn 比对结果显示,有 44 条来自欧洲葡萄的 EST 与 OPV06-1016 序列有同源性,其中 27 条与果实不同

发育时期通过建库获得的 EST 有同源性,相似位点片段大小为 50~103 bp,同源性的 91%~98%;与 13 条欧洲葡萄叶片非生物胁迫数据库的 EST 有同源性,相似位点片段大小为 44~102 bp,同源性的 89%~97%;与 1 条从欧洲葡萄不同器官获得的 EST 同源性为 89%;与 3 条欧洲葡萄感染葡萄皮尔斯病原菌后的转录反应获得的 EST 有同源性,相似位点片段大小为 29~100 bp,同源性的 93%~95%。比对结果表明,OPV06-1016 序列与拟南芥感白粉病蛋白基因 *PMR6* 在 8~1 097 碱基间有部分碱基序列相似,同源性的 27.1%。OPV06-1016 序列共有 3 个 ORF,其中最大的一个 ORF 位于 110~265 碱基,包含 156 个碱基,编码 51 个氨基酸,在 BLASTp 中未检测到与其同源的蛋白序列。

3 讨论

植物的抗病和感病是事物的两个方面,研究植物的感病性与植物的抗病性同等重要。Vogel 等^[20]获得了 1 个拟南芥感白粉病基因 *PMR6*,为研究植物感病的分子机制提供了依据。罗素兰等^[17]获得了欧洲葡萄感霜霉病基因的 RAPD 标记 OPO10-835,其可用于葡萄抗霜霉病育种的辅助选择。

本研究以抗病亲本白河-35-1、感病亲本佳利酿及其 F₁ 代抗病单株 6-12-6、感病单株 6-12-2 为模板,筛选出了特异引物 OPV06,该引物在感病材料中均存在约 1 100 bp 的 DNA 片段,而在抗病材料中不存在,进一步的 RAPD 分析表明,1 100 bp 的 DNA 片段存在于 F₁ 代感病单株 6-12-2、6-12-3 及抗病单株 6-12-4 中,而在抗病单株 6-12-5 和 6-12-6 及感病单株 6-12-1、6-12-7 中均不存在。在感病亲本 6-12-2 自交的 60 株群体中,28 株感病单株有 24 株存在这一标记,抗病的 32 株有 7 株不存在这一标记。此外,该标记存在于供试的 11 个感病欧洲葡萄品种及中国野生华东葡萄高感株系湖南-1 中;抗病的美洲野生葡萄中,加州葡萄、峡谷葡萄、冬葡萄和圆叶葡萄品种 Conquister 中均存在这一标记,其他种和株系(或品种)及爬山虎均不存在,因此认为 OPV06-1100 为葡萄属植物感白粉病基因的 RAPD 标记。从 RAPD 分析结果可以推测,葡萄中应普遍存在感病基因,而且可能为多基因家族,只是感病基因的作用相对于抗病基因会因葡萄材料的不同而有差异。在欧洲葡萄中,由于不存在主效抗病基因,抗病性由微效多基因控制^[21],感病基因的作用效果明显强于抗病基因,因而植株表现出感病。高感白粉

病的中国野生华东葡萄株系湖南-1 表现出与欧洲葡萄相似的情况。抗病的野生葡萄中存在主效抗病基因^[21],但也存在感病基因,只是抗病基因的作用明显强于感病基因,因而植株表现出抗病性,这可能是一些抗病葡萄材料也存在感病基因标记的原因。因此,在实际应用中,应结合抗白粉病基因分子标记的有无,对存在这一感病标记的杂种单株可考虑淘汰,而保留存在抗病基因标记和不存在感病基因标记的单株。

进一步对 OPV06-1100 回收和克隆测序,可知其实际长度为 1 016 bp,故将该标记确切命名为 OPV06-1016。利用生物信息学工具,对获得的基因标记序列进行 BLASTn 相似性比较,可以获取查询序列可能具有的功能。对 RAPD 标记 OPV06-1016 进行相似性分析可知,该标记与 79 条来自其他生物的 DNA 序列有部分同源性,且与欧洲葡萄的黄酮醇合成酶基因的同源性为 92%;与 3 条欧洲葡萄感染葡萄皮尔斯病原菌后转录反应获得的 EST 有同源性,相似位点片段大小为 29~100 bp,同源性的 93%~95%;与拟南芥感白粉病蛋白基因 *PMR6* 在 8~1 097 碱基间有部分碱基序列相似,同源性的 27.1%,这些信息将会为研究葡萄基因及感病基因标记的应用提供依据。

【参考文献】

- [1] Roy R R, Ramming D W. Varietal resistance of grape to the powdery mildew fungus, *Uncinula necator* [J]. Fruit Varieties Journal, 1990, 44: 149-155.
- [2] 贺普超,王跃进,王国英,等. 中国葡萄属野生种抗病性研究 [J]. 中国农业科学, 1991, 24(3): 50-56.
He P C, Wang Y J, Wang G Y, et al. The studies on the disease-resistance of *Vitis* wild species originated in China [J]. Scientia Agricultura Sinica, 1991, 24(3): 50-56. (in Chinese)
- [3] Chavan S B, Khandge S V, Varshneya M C, et al. Influence of weather on conidia formation in powdery mildew of grape [J]. Indian phytopath, 1995, 48(1): 40-44.
- [4] Evans K J, Whisson P L, Stummer B E, et al. DNA markers identify variation in Australian population of *Uncinula necator* [J]. Mycol Res, 1997, 101(8): 923-932.
- [5] 方宣钧,吴为人,唐纪良. 作物 DNA 标记辅助育种 [M]. 北京: 科学出版社, 2002.
Fang X J, Wu W R, Tang J L. DNA marker assisted breeding in crops [J]. Beijing: Science Press, 2002. (in Chinese)
- [6] 刘志勇,孙其信,李洪杰,等. 小麦抗白粉病基因 *Pm21* 的分子鉴定和标记辅助选择 [J]. 遗传学报, 1999, 26(6): 673-682.
Liu Z Y, Sun Q X, Li H J, et al. Molecular identification and Marker-assisted selection of *Pm21* gene conferring resistance to powdery mildew in wheat [J]. Acta Genetica Sinica, 1999, 26

- (6):673-682. (in Chinese)
- [7] 罗彦长,王守海,李成茎,等. 应用分子标记辅助选择培育抗稻白枯叶病光敏核不育系‘3418S’[J]. 作物学报,2003,29(3):402-407.
- Luo Y C,Wang S H,Li C Q,et al. Breeding of the photo-period-sensitive genetic male sterile line ‘3418S’ resistant to bacterial bright in rice by molecular marker assisted selection [J]. Acta Agronomica Sinica,2003,29(3):402-407. (in Chinese)
- [8] 徐 勇,张海英,唐国斌,等. 西瓜抗枯萎病育种分子标记辅助选择的研究[J]. 遗传学报,2000,27(2):151-157.
- Xu Y,Zhang H Y,Tang G B,et.al. Studies of molecular Marker-assisted-selection for resistance to *Fusarium wilt* in watermelon (*Citrullus lanatus*) breeding [J]. Acta Genetica Sinica,2000,27(2):151-157. (in Chinese)
- [9] Lecouls A C,Bergougnoux V,Rubio-Cabetas M J,et al. Marker-assisted selection for the wide-spectrum resistance to root-knot nematodes conferred by the Ma gene from myrobalan plum (*Prunus cerasifera*) in interspecific prunus material [J]. Molecular Breeding,2004,13:113-124.
- [10] 王鸿霞,叶乃好,李文生,等. 樱桃树种间杂种的早期分子鉴定[J]. 中国科学院研究生院学报,2006,23(5):671-675.
- Wang H X,Ye N H,Li W S,et al. Molecular pre-identification of interspecies hybrids in prunus [J]. Journal of the Graduate School of the Chinese Academy of Science,2006,23(5):671-675. (in Chinese)
- [11] Dolbo M A,Ye G N,Weeden H,et al. Marker-assisted selection for powdery mildew resistance in grape[J]. J Amer Soc Hort Sci,2001,126(1):83-89.
- [12] 王跃进,杨英军,周 鹏,等. 用 DNA 探针检测我国栽培的无核葡萄及辅助育种初探[J]. 园艺学报,2002,29(2):105-108.
- Wang Y J,Yang Y J,Zhou P,et. al. Detecting the seedless characteristics of the grapes in China with DNA probe and marker assistant selection [J]. Acta Horticulturae Sinica,2002,29(2):105-108. (in Chinese)
- [13] 王跃进,张剑侠,周 鹏,等. 中国野生葡萄抗白粉病基因的 RAPD 标记[J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版,2001,29(1):1-5.
- Wang Y J,Zhang J X,Zhou P,et al. RAPD marker of resistance gene to *Uncinula necator* in Chinese wild *Vitis* [J]. Jour of A & F University:Natrual Science Edition,2001,29 (1):1-5. (in Chinese)
- [14] 张剑侠. 中国野生葡萄抗病基因标记及辅助育种应用研究[D]. 陕西杨凌:西北农林科技大学,2006.
- Zhang J X. Gene markers of disease-resistance of Chinese wild *Vitis* and their application of breeding for morlecular assistant selection[D]. Yangling,Shaanxi:Northwest A & F University,2006. (in Chinese)
- [15] Wang Y J,Zhang J X,Wang X P,et al. RAPD markers linked to the disease resistance genes in Chinese wild *Vitis* [J]. Acta Hort,2003,625:97-105.
- [16] Luo S L,He P C,Zhou P,et al. Identification of molecular genetic markers tightly linked to downy mildew resistant genes in grape[J]. Acta Genetica Sinica,2001,28(1):76-82.
- [17] 罗素兰,郑学勤,贺普超,等. 葡萄感霜霉病基因 RAPD 标记的序列分析[J]. 生物学杂志,2000,17(4):18-19.
- Luo S L,Zheng X Q,He P C,et al. Analysis of sequencing the RAPD marker linked to the downy mildew-susceptible genes in grapes[J]. Journal of Biology,2000,17(4):18-19. (in Chinese)
- [18] 王跃进,贺普超,张剑侠. 葡萄抗白粉病鉴定方法的研究[J]. 西北农业大学学报,1999,27(5):6-10.
- Wang Y J,He P C,Zhang J X. Studies on the methods of resistance to *Uncinula necator* in *Vitis* [J]. Journal of Nothwestern Agriculture University,1999,27(5):6-10. (in Chinese)
- [19] 萨姆布鲁克 J,拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南[M]. 3 版. 黄培堂,译. 北京:科学出版社,2002.
- Sambrook J,Russell D W. Morlecular cloning: a laboratory manual[M]. 3rd ed. Translated by Huang P Y. Beijing:Science Press,2002. (in Chinese)
- [20] Vogel J,Raab T K,Schiff C,et al. *PMR6*, a pectate lyase like gene required for powdery mildew susceptibility in Arabidopsis[J]. Plant Cell,2002,14:2095-2106.
- [21] 李 华. 葡萄优质抗病育种新的杂交育种方法[J]. 西北农业大学学报,1989,17(2):112-114.
- Li H. New breeding plant in grape genetic improvement for quality and resistance to diseases[J]. Journal of Nothwestern Agriculture University,1989,17(2):112-114. (in Chinese)