

中国野生葡萄抗白粉病基因的 RAPD 标记

王跃进¹, 张剑侠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 热带作物生物技术国家重点实验室, 海南 海口 571101)

[摘 要] 利用随机扩增多态性 DNA (RAPD) 技术, 对抗病×感病的葡萄种间杂交组合白河-35-1×佳利酿的亲本及其 F₁ 代的 24 株杂种进行了抗白粉病的遗传分析, 从 196 个随机引物中获得了 1 个与中国野生葡萄抗白粉病基因连锁的 RAPD 标记 OPV 03-1380, 并在中国野生葡萄华东株系和欧洲葡萄品种中进行了分析验证。

[关键词] 中国野生葡萄; 白粉病; 抗病基因; RAPD

[中图分类号] S663.1

[文献标识码] A

[文章编号] 1000-2782(2001)01-0001-05

葡萄白粉病 (*Uncinla necator* (Schw.) Burr) 是为害葡萄最为严重的真菌病害之一, 遍布于世界各葡萄产区^[1]。欧洲葡萄 (*V. vinifera* L.) 不抗白粉病, 美洲葡萄 (*V. labrusca* L.) 及其品种虽对白粉病抗性较强, 但由于果实品质低劣, 生产上的应用受到了限制。中国野生葡萄资源丰富, 没有美洲葡萄的“狐臭味”, 而且拥有丰产性好、抗病抗逆性强等特点^[2]。大量研究表明^[3~6], 中国野生葡萄的一些种和株系对真菌病害有极强的抗性, 是抗白粉病的重要种质。因此, 研究中国野生葡萄的抗白粉病基因, 不仅具有理论价值, 而且具有重要的育种现实意义。

近年来已有不少通过 RAPD 分析获得与目的基因连锁的 RAPD 标记的研究报道, 并已在苹果^[7]、枳^[8]、草莓^[9]等果树上获得了与抗病基因连锁的 RAPD 标记。但对中国野生葡萄进行抗病基因的 RAPD 标记尚未见报道。本研究在 1998~1999 年对中国野生葡萄、欧洲葡萄及其种间杂种抗白粉病田间自然鉴定的基础上, 对中国野生葡萄抗白粉病基因进行了 RAPD 标记。

1 材料和方法

1.1 材料

供试材料共 40 份, 包括西北农林科技大学葡萄种质资源圃中保存的中国野生葡萄、欧洲葡萄和种间杂种 F₁ 代。

1.2 试剂和仪器

RAPD 分析在热带作物生物技术国家重点实验室进行。所用 196 个 RAPD 引物均为 Operon 公司

产品, 其中 OPV 03 序列为 5'-CTCCCTGCAA-3'; Taq DNA 聚合酶、PCR Buffer 为华美公司产品, dNTPs 为 Promega 公司产品。PCR 仪为 PE480 型。

1.3 DNA 的提取

参照王跃进等^[10]的改良 CTAB 法, 从葡萄萌动的芽或嫩梢中提取 DNA。

1.4 RAPD 反应参数

反应混合物内含 10 倍 PCR Buffer (500 mmol/L KCl, 100 mmol/L Tris-HCl pH 9.0, 质量分数 1% Triton X-100) 2.5 μL, 1.5 mmol/L MgCl₂, dATP、dCTP、dTTP、dGTP 每种各 200 μmol/L, 随机引物 1 μL, 模板 DNA 20 ng, Taq DNA 聚合酶 1.5 μmol/min, 用双蒸水补充到总体积为 25 μL, 加 25 μL 石蜡油并加盖。反应参数: 94℃ 预变性 5 min 后; 94℃ 变性 1 min, 36℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 2 min, 共 45 个循环, 最后 72℃ 保温 8 min。反应停止后加溴酚兰 2 μL 进行电泳。

扩增产物采用质量分数 1.5% Agarose 凝胶电泳 (含 EB 0.5 μg/mL), 1×TAE 作电泳缓冲液。电泳结束后将凝胶置于紫外透射分析仪上观察照相。RAPD 反应重复 2 次。

2 结果与分析

2.1 特异引物筛选

以抗病亲本白河-35-1、感病亲本佳利酿及其 F₁ 代抗病单株 13-6-6、感病单株 13-6-3 的 DNA 为模板对 196 个随机引物进行筛选。结果表明, 在抗病亲本与感病亲本之间引物 OPH14、OPJ16、OPV03 可以扩增约

〔收稿日期〕 2000-06-16

〔基金项目〕 国家自然科学基金资助项目 (39770525)、高校博士点基金 (980701) 和教育部资助年青优秀教师基金项目

〔作者简介〕 王跃进 (1958-), 男, 陕西三原人, 教授, 博士生导师, 主要从事果树种质资源与生物技术育种研究。

620, 750 和 1 380 bp 的多态性DNA 片段(图 1)。



图 1 以白河-35-1、佳利酿、13-6-6、13-6-3 为模板筛选引物

泳道 1 PCR Marker; 2, 6, 10 模板为白河-35-1; 3, 7, 11 模板为佳利酿; 4, 8, 12 模板为 13-6-6;
5, 9, 13 模板为 13-6-3; 2~ 5 引物为 OPH14; 6~ 9 引物为 OPJ16; 10~ 13 引物为 OPV 03

Fig 1 Screen primers with Baihe-35-1, Carignane, 13-6-6 and 13-6-3

Lane 1 PCR Marker; 2, 6, 10 Baihe-35-1; 3, 7, 11 Carignane; 4, 8, 12 13-6-6; 5, 9, 13 13-6-3; 2~ 5 Primer OPH14;
6~ 9 Primer OPJ16; 10~ 13 Primer OPV 03

2 2 抗病基因 RA PD 标记 OPV 03-1380 的获得

用获得的 3 个特异引物分别对白河-35-1 × 佳利酿组合的两个亲本及其 F₁ 代 24 株杂种进行 RA PD 分析确证, 发现引物 OPV 03 在抗病亲本白河-35-1 及 F₁ 代 20 株抗病单株的 19 株中均扩增出一

约 1380 bp 的 DNA 片段, 而在感病亲本佳利酿及 F₁ 代 4 株感病单株的 3 株中均未出现这一 DNA 片段(图 2, 表 1), 这表明 OPV 03-1380 与华东葡萄株系白河-35-1 的抗白粉病性状有连锁关系, 为白河-35-1 抗白粉病基因的 RA PD 标记。

表 1 白河-35-1 × 佳利酿组合亲本及 F₁ 代单株对白粉病的抗性表现及 OPV03 的分析结果

Table 1 The resistant phenotype of parents and F₁ generation of Baihe-35-1 × Carignane combination to powdery mildew and the analytical results with primer OPV 03

亲本或后代 Parents or F ₁ individuals	表现型 Phenotype	OPV 03-1380	后 代 F ₁ individuals	表现型 Phenotype	OPV 03-1380
白河-35-1	R	+	18-9-5	R	+
Baihe-35-1	R	+	18-8-6	R	+
佳利酿	S	-	18-7-9	R	+
Carignane	S	-	18-8-7	R	+
13-6-6	R	+	18-9-12	R	+
6-12-6	R	+	18-5-4	R	+
13-6-4	R	+	8-6-6	R	+
6-12-1	R	+	18-3-4	R	+
8-8-1	R	+	18-8-4	R	+
13-6-1	R	+	6-12-2	S	-
6-12-5	R	+	13-6-5	S	+
8-2-9	R	+	18-8-11	R	-
13-6-3	S	-	6-12-4	R	+
13-6-2	S	-			
18-4-4	R	+			

注: R. 抗病; S. 感病; +. 存在; -. 不存在。下表同。

Note: R. Resitant; S. Susceptible; +. Presence; -. Absence The same as below.

2 3 OPV 03-1380 在华东葡萄和欧洲葡萄中的进一步分析验证

用引物 OPV 03 对华东葡萄 8 个株系、欧洲葡萄 8 个品种进行扩增, 结果除抗病株系白河-35-1 存在 1380 bp 的 DNA 片段外, 其余感病株系和品种均不

存在这一 DNA 片段(图 3, 图 4), 这与田间抗白粉病自然鉴定结果完全相吻合(表 2)。进一步说明 OPV 03-1380 为中国野生葡萄抗白粉病基因的 RA PD 标记。



图 2 OPV 03 对亲本白河-35-1、佳利酿及其 F_1 代 24 株单株的扩增结果

泳道 1 PCR Marker; 2 白河-35-1; 3 佳利酿; 4 13-6-6; 5 6-12-6; 6 13-6-4; 7 6-12-1; 8 8-8-1; 9 13-6-1; 10 6-12-5; 11 8-2-9; 12 13-6-3; 13 13-6-2; 14 18-4-4; 15 18-9-5; 16 18-8-6; 17 18-7-9; 18 18-8-7; 19 18-9-12; 20 18-5-4; 21 8-6-6; 22 18-3-4; 23 18-8-4; 24 6-12-2; 25 13-6-5; 26 18-8-11; 27 6-12-4

Fig 2 RAPD products obtained from parents Baihe-35-1 and Carignane and their 24 F_1 individuals with primer OPV 03

Lane 1 PCR Marker; 2 Baihe-35-1; 3 Carignane; 4 13-6-6; 5 6-12-6; 6 13-6-4; 7 6-12-1; 8 8-8-1; 9 13-6-1; 10 6-12-5; 11 8-2-9; 12 13-6-3; 13 13-6-2; 14 18-4-4; 15 18-9-5; 16 18-8-6; 17 18-7-9; 18 18-8-7; 19 18-9-12; 20 18-5-4; 21 8-6-6; 22 18-3-4; 23 18-8-4; 24 6-12-2; 25 13-6-5; 26 18-8-11; 27 6-12-4

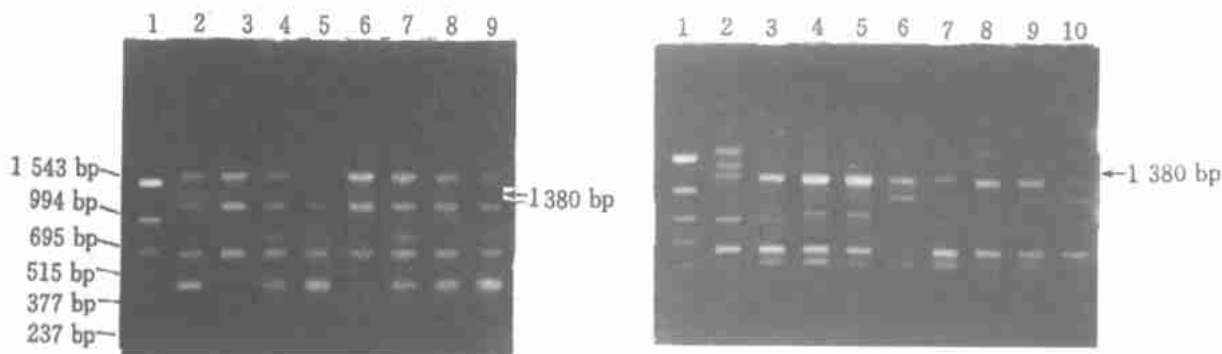


图 3 OPV 03 对华东葡萄的扩增结果

泳道 1 PCR Marker; 2 白河-35-1;
3 白河-35-2; 4 广西-1; 5 广西-2; 6 商南-1;
7 白河-13-1; 8 湖南-1; 9 白河-13

Fig 3 RAPD products obtained from
V. pseudoreticulata with primer OPV 03

Lane 1 PCR Marker; 2 Baihe-35-1; 3 白河-35-2;
4 Guangxi-1; 5 Guangxi-2; 6 Shangnan-1;
7 Baihe-13-1; 8 Hunan-1; 9 Baihe-13

图 4 OPV 03 对欧洲葡萄的扩增结果

泳道 1 PCR Marker; 2 白河-35-1; 3 佳利酿;
4 粉红玫瑰; 5 小白玫瑰; 6 白玉霓;
7 五月紫; 8 先索; 9 雷司令; 10 白诗南

Fig 4 RAPD products obtained from
V. vinifera with primer OPV 03

Lane 1 PCR Marker; 2 Baihe-35-1; 3 Carignane;
4 Мускат розовый 5 Мускат белый
6 Ugni Blanc; 7 Майский черный 8 Cinsaut;
9 White Riesling; 10 Chenin Blanc

表 2 华东葡萄和欧洲葡萄对白粉病的抗性表现及 OPV03 的分析结果

Table 2 The resistant phenotype of *V. pseudoreticulata* and *V. vinifera* to powdery mildew and the analytical results with primer OPV 03

华东葡萄 <i>V. pseudoreticulata</i>	表现型 Phenotype	OPV 03-1380	欧洲葡萄 <i>V. vinifera</i>	表现型 Phenotype	OPV 03-1380
白河-35-1 Baihe-35-1	R	+	佳利酿 Carignane	S	-
白河-35-2 Baihe-35-2	S	-	粉红玫瑰 Мускат розовый	S	-
广西-1 Guangxi-1	S	-	小白玫瑰 Мускат белый	S	-
广西-2 Guangxi-2	S	-	白玉霓 Ugni Blanc	S	-
商南-1 Shangnan-1	S	-	五月紫 Майский черный	S	-
白河-13-1 Baihe-13-1	S	-	先索 Cinsaut	S	-
湖南-1 Hunan-1	S	-	雷司令 White Riesling	S	-
白河-13 Baihe-13	S	-	白诗南 Chenin Blanc	S	-

3 讨 论

关于葡萄对白粉病的抗性遗传, Boubals D^[11] 和李华等^[12] 对欧亚种葡萄的研究认为, 葡萄抗白粉病是由多基因控制, 属于数量性状遗传。Bouquet A^[13] 对圆叶葡萄抗白粉病的研究, Filppenکو 等^[1] 用抗白粉病的欧山杂种自交及与不抗白粉病的欧洲葡萄回交对葡萄抗白粉病的研究, 则认为葡萄对白粉病的抗性是由单基因控制的显性遗传, 属于质量性状。

笔者自 1990 年以来, 以中国野生葡萄和欧洲葡萄及其大量的种间杂种为试材系统地研究了葡萄对白粉病的抗性遗传^[6]。结果表明, 在抗病的中国野生葡萄株系与欧洲葡萄品种杂交的后代中, 表现出显性遗传的特点; 而在感病的中国野生葡萄株系与欧洲葡萄品种的杂交后代中, 表现出微效多基因控制的遗传特点, 即均为感病的亲本其杂交后代中有少量抗病单株的出现。说明中国野生葡萄的抗白粉病基因构成较为复杂, 属于多基因控制。这些基因的作用表现为有主效基因, 也有微效基因。

在对中国野生葡萄抗白粉病遗传研究的基础上, 应用 RAPD 技术标记中国野生葡萄抗白粉病的主效基因。首先从表现型不同, 以白河-35-1 × 佳利酿抗病亲本白河-35-1、感病亲本佳利酿及其 F₁ 代抗病单株 13-6-6、感病单株 13-6-3 为模板进行引

物的筛选, 然后将获得的特异性引物在白河-35-1 × 佳利酿的双亲及其供试的 F₁ 代 24 株单株中扩增, 获得了 1 个抗白粉病基因的 RAPD 标记 OPV 03-1380。最后在华东葡萄株系和欧洲葡萄品种中得到验证。

在本研究的 RAPD 分析中, 出现了一种异常现象, 即特异性 DNA 片段 OPV 03-1380 在白河-35-1 × 佳利酿 F₁ 代的抗病单株 18-8-11 中不出现, 而在感病单株 13-6-5 中出现(图 2、表 1)。分析可能是双亲杂交异源配子配对时, 染色体之间发生了 DNA 片段的交换造成了这一表现型。

在利用中国野生葡萄抗白粉病基因方面, 传统的方法主要是用中国野生葡萄与欧洲葡萄杂交, 通过杂种在田间多年的自然或人工接种筛选鉴定, 以期选育出抗病性强的新品种。RAPD 技术的应用, 为利用基因标记加速抗病育种进程提供了新的途径。中国野生葡萄抗白粉病基因 RAPD 标记 OPV 03-1380, 可以用作筛选鉴定抗病杂种的 DNA 依据, 在幼苗期即可淘汰感病的单株, 保留抗病的单株, 这将大大缩短育种年限, 提高育种的效率。此外, 这一 RAPD 标记能够用作进一步研究的支点, 向抗病基因的位点步移, 以至最终分离到抗病基因和将抗病基因转至优良的欧洲葡萄品种中去, 提供了研究的基础。

[参考文献]

- [1] Filippenko IM, Shtin L T. Inheritance of resistance to Downy and Powdery mildew in hybrids European vines with *V. amurensis*[J]. Plant Breeding Abstracts, 1975, 45(10): 677.
- [2] 王跃进. 中国葡萄属野生种质资源的研究利用[J]. 中国野生植物, 1989, (2): 11- 13
- [3] 贺普超, 王国英. 我国葡萄属野生种霜霉病抗性的调查研究[J]. 园艺学报, 1986, 13(2): 17- 24
- [4] 贺普超, 任治邦. 我国葡萄属野生种对炭疽病抗性的研究[J]. 果树科学, 1990, (1): 7- 12
- [5] 贺普超, 王跃进, 王国英, 等. 中国葡萄属野生种抗病性的研究[J]. 中国农业科学, 1991, 24(3): 50- 56
- [6] Wang Y, Liu Y, He P, et al. Evaluation of foliar resistance to *Uncinula necator* in Chinese wild *Vitis* Species[J]. Vitis, 1995, (3): 159- 164
- [7] Yang H, Korban S S. Screening apples for OPD 20/600 using sequence-specific primers[J]. Theor Appl Genet, 1996, 92: 263- 266
- [8] Gmitter F G Jr, Xiao S Y, Huang S, et al. A localized linkage map of the citrus tristeza virus resistance gene region[J]. Theor Appl Genet, 1996, 92: 688- 695
- [9] Haymes K M, Henken B, Davis T M, et al. Identification of RAPD markers linked to *Phytophthora fragariae* resistance gene (Rpf) in the cultivated strawberry[J]. Theor Appl Genet, 1997, 94: 1097- 1101.
- [10] 王跃进, Lamikanra O, Schell L, 等. 用 RAPD 分析鉴定葡萄属远缘杂种[J]. 西北农业大学学报, 1997, 25(3): 16- 20
- [11] Boubals D A. Study of the factors responsible for the resistance of Vitaceae to vine powdery mildew (*U. necator* Schw. Burr.) and their mode of inheritance [J]. Plant Breeding Abstracts, 1961, (32): 946
- [12] 李 华, 张振文. 欧亚种葡萄白粉病抗性及其稳定性研究[J]. 园艺学报, 1992, 19(1): 23- 28
- [13] Bouquet A. *Vitis* × *Muscadine* hybridization: A new way in grape breeding for disease resistance in France[J]. Symposium on grape Breeding, 1980: 44- 61.

RAPD marker of resistance gene to *Uncinula necator* in Chinese wild *Vitis*WANG Yue-jin¹, ZHANG Jian-xia¹, ZHOU Peng², ZHENG Xue-qin²

(1 College of Horticulture, Northwest Science and Technology University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 National Key Biotechnology Laboratory for Tropical Crops, Chinese Academy of Tropical Agricultural Science, Haikou, Hainan 571101, China)

Abstract The genetic analysis of the resistance to powdery mildew of Chinese wild *Vitis* was carried out with the parents and 24 F₁ individuals of interspecific hybridization combination Baihe-35-1 × Carignane (Resistant × Susceptible) by Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) technique. A total of 196 random primers were screened on the DNA of resistant and susceptible materials OPV 03-1380, a RAPD marker, which linked to powdery mildew resistant gene in Chinese wild *Vitis*, was obtained. Additionally, the OPV 03-1380 was tested among clones of *V. pseudoreticulata* of Chinese wild *Vitis* and varieties of *V. vinifera*.

Key words Chinese wild *Vitis*; powdery mildew; resistance gene; RAPD