

中国野生葡萄果实抗白腐病基因 RAPD 标记的克隆及序列分析*

徐 炎¹, 王跃进¹, 周 鹏², 张剑侠¹, 王西平¹

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

[摘 要] 以感病×抗病的葡萄种间杂交组合白玉霓×塘尾的F₁代及塘尾自交一代33个单株为试验材料, 采用BSA法和RAPD技术, 对155个随机引物进行筛选, 从中获得了1个与中国野生葡萄抗白腐病基因连锁的RAPD标记OPP09-760。用Wizard DNA Clean-up System试剂盒回收纯化RAPD遗传标记OPP09-760, 连接于pGEM E-T-Easy Vector上并克隆测序, 得到OPP09-760的全序列, 其长度为766 bp。根据两端序列设计特异PCR扩增引物作为合成中国野生葡萄抗白腐病检测探针的基础, 用于检测葡萄抗白腐病种质和分子标记辅助育种。

[关键词] 中国野生葡萄; 白腐病; RAPD; 克隆; 测序

[中图分类号] S436.631.1+3

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2002)06-0085-04

葡萄白腐病 [*Coniophthora diploidiella* (Speg) Sacc] 俗称“水烂”或“穗烂”, 是葡萄上危害果实的一种重要的真菌病害^[1]。目前, 葡萄白腐病在世界各个葡萄产区不同程度地危害葡萄生产, 尤其是单一栽培欧洲葡萄的高温多雨地区, 严重影响葡萄及其加工产品(葡萄酒、葡萄干、葡萄酱等)的品质和产量。因此, 选育优质高产、抗病力强的新品种, 已成为葡萄育种工作者一项极为重要的任务。现代果树育种的理论和实践证明, 为了选育优质高产的多抗性品种, 最有效的途径是用品质优良的栽培品种与经过鉴定的近缘野生种杂交。中国是葡萄属植物的重要起源地之一, 中国野生葡萄没有美洲种的“狐”臭味, 抗病抗逆性强。中国野生葡萄和欧洲葡萄杂交亲和性优于圆叶葡萄, 通过杂交可以有效地利用抗病性, 所以中国野生葡萄是迄今公认的抗病育种种质资源^[2,3]。因而利用中国野生葡萄对白腐病的抗性与品质优良的欧洲葡萄品种杂交, 培育优良的抗病品种, 是葡萄育种家的首要任务。本研究利用RAPD技术, 采用BSA (Bulked Segregant Analysis) 法^[4], 获得了与中国野生葡萄果实抗白腐病基因相连锁的RAPD遗传标记OPP09-760。其目的在于将获得的RAPD标记OPP09-760克隆测序, 并进行序列分析, 为合成中国野生葡萄抗白腐病探针奠定基础, 用于检测葡萄抗病种质和分子标记辅助育种。

1 材料与方法

1.1 材料

中国野生葡萄刺葡萄塘尾及其杂种后代, 取自西北农林科技大学葡萄种质资源圃。随机引物OPP09购自Operon公司。Taq DNA聚合酶、dNTPs及PCR Marker购自上海Sangon公司。T₄-DNA ligase, Wizard DNA Clean-up System试剂盒和pGEM-7zf (+) (T-Easy Vector) 试剂盒购自Promega公司。

1.2 方法

DNA的提取和纯化 葡萄基因组DNA的提取采用改良CTAB法^[5], 用质量浓度8 g/L的琼脂糖凝胶电泳检测DNA的浓度和纯度。葡萄RAPD反应体系参照文献[5, 6]方法进行。

DNA扩增反应体系 在100 μL反应体系中加入10X PCR反应缓冲液10 μL, dNTPs 10 μL, 25 mmol/L MgCl₂ 8.0 μL, Taq DNA聚合酶1.2 (6 U/μL), 10 bp随机引物OPP09 4 μL, 100 ng DNA模板4 μL (25 ng/μL), ddH₂O 58.8 μL。反应条件: 94 预变性5 min, 94 变性1 min, 37 退火1 min; 72 延伸1 min, 共30个循环, 最后72 延伸10 min, 停止于4 。

扩增片段的分离和克隆 利用Wizard DNA Clean-up System kit回收纯化目标带, 按产品说明书并略作改进。回收纯化产物直接与pGEM-T-

* [收稿日期] 2001-12-19

[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)

[作者简介] 徐 炎 (1972-), 男, 河南潢川人, 助教, 在读博士, 主要从事果树种质资源与生物技术育种研究。

Easy 载体连接^[7], 转化大肠杆菌 *E. coli* DH5 α 菌株感受态细胞, 在 X-gal/IPTG Amp^r 培养基上挑取白色菌落, 用碱法小批量抽提质粒, 并电泳酶切鉴定。

DNA 序列测定与分析 DNA 序列测定由上海 Sangon 公司完成, 使用 PE 公司生产的核酸序列分析仪 (ABI 377 DNA Sequencer) 从两端进行测序。将所测 DNA 序列输入电脑, 用 PC gene 软件分析。

2 结果与分析

2.1 中国野生葡萄抗白腐病基因连锁标记筛选

从白玉霓 $\times$ 塘尾组合 F₁ 代和塘尾自交一代中分别取 10 株抗病单株的 DNA 和 10 株感病单株的

DNA 构成抗感 DNA 混合样, 采用 BSA 法, 使用 Operon 公司生产的 A, B, C, D, G, H, J, O, P, Q, R, S, U, V, W 共 15 个引物系列的 155 个引物进行扩增, 从中筛选出大小一致、重复性好、扩增条带清晰可辨、具多态性的特异引物 OPP09 (5'-GTGGTCCGCA-3')。特异引物 OPP09 在种间杂交组合白玉霓 $\times$ 塘尾及塘尾自交一代的 33 个单株中, 抗病的 20 个单株均有 760 bp 的多态性片段, 而感病的 13 个单株则没有 (图 1, 表 1 (R 代表抗病, S 代表感病; + 代表出现 760 bp 特异带, - 代表不出

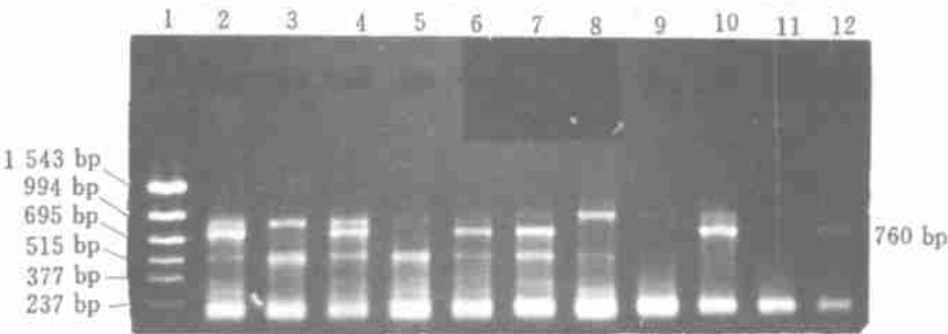


图 1 中国野生葡萄抗白腐病基因相连锁的 RAPD 标记

1 PCR makers; 2 塘尾; 3 白玉霓; 4 抗病混合样; 5 感病混合样; 6 15-8-1; 7 15-8-2; 8 14-6-2; 9 14-6-3; 10 15-8-5; 11 15-8-6; 12 15-8-7

Fig 1 The RAPD maker OPP09-760 linked to white-rotresistance genes in grape samples using primer OPP09

1 PCR makers; 2 Tangwei; 3 UgniBlanc; 4 The resistant pool; 5 The susceptible pool; 6 15-8-1; 7 15-8-2; 8 14-6-2; 9 14-6-3; 10 15-8-5; 11 15-8-6; 12 15-8-7

表 1 OPP09 对种间杂交组合白玉霓 $\times$ 塘尾和塘尾自交亲本及 F₁ 代单株的分析结果

Table 1 RAPD analysis of interspecific F₁ hybrids of cross and of self-pollination F₁ hybrids of cross generated by primer OPP09

亲本及 F ₁ 代 Parents and F ₁	抗性表现 Resistance phenotype	OPP09-760	亲本及 F ₁ 代 Parents and F ₁	抗性表现 Resistance phenotype	OPP09-760
塘尾 Tangwei	R	+	14-7-13	S	-
白玉霓 UgniBlanc	S	-	塘尾 Tangwei	R	+
14-6-1	R	+	15-8-1	R	+
14-6-2	S	-	15-8-2	R	+
14-6-3	S	-	15-8-4	R	+
14-6-4	S	-	15-8-5	R	+
14-6-5	R	+	15-8-6	R	+
14-6-7	S	-	15-8-7	R	+
14-6-8	S	-	15-7-1	R	+
14-6-9	R	+	15-7-2	R	+
14-7-2	S	-	15-7-3	R	+
14-7-3	S	-	15-7-4	R	+
14-7-4	S	-	15-7-5	R	+
14-7-5	S	-	15-7-6	R	+
14-7-7	S	-	15-7-7	R	+
14-7-9	S	-	15-7-8	R	+
14-7-11	R	+	15-7-9	R	+
14-7-12	S	-	15-9-1	R	+

2 2 RA PD 标记OPP09-760 克隆和测序

PCR 扩增产物在 3 端是粘性末端, 多出 1 个碱基 A, 而 pGEM -T-载体在 3 端加上 1 个碱基 T, 这样 PCR 产物纯化后可直接同 T-V ector 进行连接。将与中国野生葡萄刺葡萄塘尾抗白腐病基因连锁的 RA PD 标记OPP09-760, 用W iazrd DNA Clean-up System 试剂盒回收。连接 T 载体, 转化大肠杆菌感受态细胞。涂在含 X-gal, IPTG 和 Amp^r 的 LB 平板上进行筛选, 挑选白色菌落培养^[8]。用碱裂解法提取质粒 DNA, 电泳筛选出滞后质粒, 经 E coR I 酶切鉴定有外源 DNA 片段插入的重组克隆(图 2)。用核酸序列分析仪对上述样品进行序列分析, RA PD 标记 OPP09-760 的长为 766 bp (表 2)。对测序结果经 PC gene 软件分析, 该 DNA 片段不具有封闭或者开放性阅读区间, 不具有基因的结构, 属于与抗白腐病基因连锁的 DNA 片段。

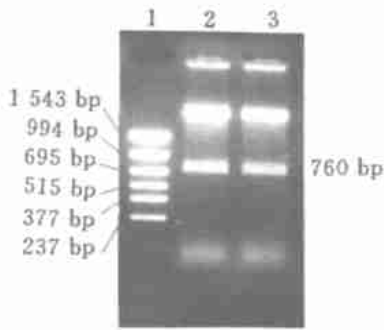


图 2 重组质粒的酶切结果 (EcoR I)

1 PCR marker; 2, 3 重组质粒的酶切结果

Fig 2 Identification of RA PD marker OPP09-760 recombinant plasm ids by restriction enzyme

1 PCR marker; 2, 3 Restriction enzyme recom binant plasm ids

表 2 葡萄抗白腐病基因 RA PD 标记OPP09-760 的序列

Table 2 Sequence of RA PD karker OPP09-760 to grape white rot resistant gene

5	<u>GTGGTCCGCA</u>	A GGA GTGAA G	TTCCCGGACT	AA GGACA GTG
AA	TTCCAA GG	AA GCA CGGTC	A GTA TTCTAG	AAA GA GTACC
TG	CAA TCCCA	CCGGCCA CGT	A TTCA TA GCC	ACCTTTGGCA
TG	CAA TCCCA	CCGGCCA CGT	GTTTTCA TCC	TTCTAA TTCT
TCA	TGCA TGG	CTTCAAAA GC	TGA TA TTCAA	AA GTACAA TT
TT	CAAA TTA T	TTAA TTCCA	CAACTTTTCA	TTCTTCCTTA
GA	GTTT TACT	TCACAAAAA	TCCAA TTTCA	A TAAA TTTT
GCT	GTCA TTT	CCTCTCCGTC	TACCA TTTT	TTTCCTTAA T
TT	TAAA TAAA	TTTTT TTT	TCACGTTT TG	AA TAAA TGTG
AA	TACGA TTT	TCA TAA TTCC	AAAA TAA TA G	AA TTTA TA GA
AT	TAA TTCA T	GCTAAAA GAA	A TCGGGCTT	GGTGGGGCCC
AAAA	TA TGA G	ACA TTCGCCA	A TCAA TTA TT	GA TTTT TTA T
TG	CTA TA TTT	TGA TCGAACA	TTGACTAA TT	TCTGCCTTGA
TT	TATGACA T	GGTGGA TTA T	TCTTTACTTG	TCCGCTAA CC
AT	GTTTCCA T	GA TA GCA CA T	CA TCA TTCGC	CGTTAA GGTG
CA	TCTTA TAC	CTGA TCA TCA	TTA TTTA TTT	A TCCA TTA TC
AT	GCATGACT	TGCTA GTACA	CCCTTGA TCA	TTA TTTGGTG
TCC	CAA TTA	ATCAA TTAA T	TGTCA CATT T	CTCTTAACTA
A	TTA GTA GA G	ACCTTGCTA T	AGTA TA TTA T	A TACTTTCTC
AA	TAGGTAAC	CTGA TC TGCG	<u>GACCA C3'</u>	

注: 5 端画线部分为随机引物OPP09 的序列, 3 端其互补序列。

Note: 5 'underlined parts represent sequence of random primer OPP09, 3 ' represent its complementary sequence

3 讨 论

本研究使用商品化 pGEM -T-Easy V ector 成功地克隆了目的 PCR 片段。经过对重组质粒大量抽提纯化, 克隆测序获得了 OPP09-760 全序列。这一方面为将 RA PD 标记转换为以 PCR 为基础的 SCAR 标记进行检测提供了 DNA 分子水平依据; 另一方面为继续筛选新的抗白腐病基因的分子标记提供了突破点, 为今后利用 RA PD 标记进行抗白腐病基因定位与作图, 以及利用图谱克隆 (map-based-cloning) 抗病基因提供了有力的分子证据。

[参考文献]

[1] 曹若彬 果树病理学 [M] 上海: 上海科学技术出版社, 1978

[2] 王跃进, 贺普超 葡萄白腐病和黑痘病抗性鉴定方法 [J] 西北农业大学学报, 1988, 16 (3): 17- 32

[3] 贺普超, 王跃进, 王国英, 等 中国葡萄属野生种抗病研究 [J] 中国农业科学, 1991, 24 (3): 50- 56

[4] Michmore RW, Paran, Kessli RV, et al Identification of markers linked to seedless resistance genes bulked segregating populations [J] Proc Nat Acad Sci USA, 1991, 88: 9928- 9932

[5] Wang Y J, Lan kanra O, Lu J, et al Identification of genetic marker linked to seedless, genes in grape using RA PD [J] 西北农业大学学报, 1996, 24 (5): 1- 10

[6] 王跃进, 王西平, 周 鹏, 等 中国野生葡萄抗黑痘病基因的 RA PD 标记 [J] 园艺学报, 2000, 27 (5): 321- 325

[7] 王桂荣, 郭予元, 徐 广, 等 甜菜夜蛾 GOBP2 基因的克隆及序列测定 [J] 中国农业科学, 2001, 34 (6): 619- 625

[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