

# 中国野生葡萄果实抗炭疽病基因的 RAPD 标记

王跃进<sup>1</sup>,徐 炎<sup>1</sup>,张剑侠<sup>1</sup>,周 鹏<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> 西北农林科技大学园艺学院,杨凌 712100;<sup>2</sup> 中国热带农业科学院热带作物生物技术国家重点实验室,海口 571101)

摘要:以葡萄种间杂交组合 88-110[毛葡萄 83-4-96(♀) × 欧洲葡萄粉红玫瑰]的 F<sub>1</sub> 群体为试材,运用 RAPD 技术,采用集群分离分析(bulked segregant analysis,BSA)法进行中国野生葡萄抗炭疽病基因连锁的分子标记研究。获得了与抗炭疽病基因相连锁的 RAPD 标记:OPC15-1300,并在 50 株杂种后代、中国野生葡萄 8 种 32 个株系、14 个欧洲葡萄品种中证明了该标记是可以遗传的。

关键词:中国野生葡萄;炭疽病;抗病性;RAPD

## Identification of RAPD Markers Linked to Ripe Rot Resistant Gene in Wild Grapes Native to China

WANG Yue-jin<sup>1</sup>, XU Yan<sup>1</sup>, ZHANG Jian-xia<sup>1</sup>, ZHOU Peng<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> College of Horticulture, North West Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling 712100;

<sup>2</sup> National Key Biotechnology Laboratory for Tropical Crops, CATAS, Haikou 571101)

Abstract: Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) was employed to detect molecular markers linked to ripe rot (*Gloeosporium fructigenum* Berk) resistant gene in the wild grapes (*Vitis*) native to China. RAPD markers OPC15-1300 was linked to ripe rot resistant gene using 88-110 cross combination F<sub>1</sub> of *V. quinqueangularis* Rehd [83-4-96(♀)] × *V. vinifera* L. (Muscat Rose). The marker was verified in 88-110 cross combination F<sub>1</sub>, Chinese wild grapes and *V. vinifera* L. (European grape cultivars). This work has provided a solid basis for molecular marker-assisted selection (MAS) for disease resistance and cloning of disease resistant genes possibly.

Key words: Chinese wild grapes; *Gloeosporium fructigenum*; Disease resistance; RAPD

葡萄炭疽病(*Gloeosporium fructigenum* Berk)又名晚腐病,是葡萄重要真菌病害之一。在国内外广泛分布,发病严重的年份,造成果实大量腐烂,对产量和品质影响很大。此病除危害葡萄外,还能侵害苹果、梨等多种果树。目前生产上栽培的葡萄品种大多不抗炭疽病,主要以化学防治为主。中国野生葡萄不仅抗多种病害<sup>[1]</sup>,而且不携带美洲种的“狐臭”味,是葡萄抗病育种的重要种质资源。利用中国野生葡萄自身的抗病性,培育抗病品种进行栽培是控制这一病害最经济有效的方法。

本文在对中国野生葡萄、欧洲葡萄及其种间杂

种 F<sub>1</sub> 代进行抗炭疽病的田间自然鉴定基础上,利用随机扩增多态性 DNA 标记(RAPD)技术<sup>[2,3]</sup>,建立抗病基因与分子标记之间的紧密连锁关系,为分子标记辅助抗病育种提供依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

以葡萄种间杂交组合 88-110(毛葡萄 83-4-96(♀) × 欧洲葡萄粉红玫瑰)的 F<sub>1</sub> 群体 50 个单株(表),中国野生葡萄毛葡萄(*V. quinqueangularis* Rehd)83-4-96(♀)、83-4-94(♀)、83-4-49(♀)、83-4-

收稿日期:2001-01-31

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39770525,39970524)及高校博士点基金资助项目(980701)的部分研究内容

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及生物技术育种教学与科研工作。Tel:029-7092095;

Fax:029-7092095;E-mail:wangyj@public.xa.sn.cn

85(♀)、泰山-12、渭南-3、高-24;刺葡萄(*V. davidii* Foex)塘尾、雪峰、福建-4、济南-1、略阳-4;裂叶刺葡萄(*Var. inqiangensis* L. X. Niu)宁强-6;复叶葡萄(*V. Piasezkii* Maxim)留坝-9、甘肃-91、留坝-8;(秋)复叶葡萄(*V. spp*)眉县-6、留坝-7;蔓葡萄(*V. Thunbergii* Sieb. et zuce)安林-3、泰山-1;秋葡萄(*V. romanetii* Romam)留坝-11、江西-1(♀)、江西-2(♀)、平利-2、平利-7、留坝-1;山葡萄(*V. amurensis* Rupr)左山1号、左山75097、通化三号、双优;华

东葡萄(*V. Pseudoreticulata* W. T. Wang)白河-35-1、白河-13-1,欧洲葡萄(*V. vinifera* L)粉红玫瑰(Muscat Rose)、小白玫瑰(Muscat Blanc)、白诗南(Chenin Blanc)、白玉霓(Ugni Blanc)、黑比诺(Pinot Noir)、霞多丽(Chardonnay)、法国兰(Blue French)、红地球(Red Globe)、品丽珠(Cabernet Franc)、梅鹿特(Merlot)、五月紫(Maisky Noir)、佳丽酿(Carignane)、赤霞珠(Cabernet)、巴库斯(Bacchus)。以上材料均取自西北农林科技大学葡萄种质资源圃。

表 杂交组合[83-4-96(♀)×粉红玫瑰]亲本及 F<sub>1</sub> 代对炭疽病的抗性<sup>1)</sup>

Table The resistance of the cross parents between 83-4-96(♀) and Muscat Rose and F<sub>1</sub> hybrids to Ripe Rot

亲本及 F <sub>1</sub> 代 Parents and F <sub>1</sub> hybrids	R or S	OPCl 5-1300	F <sub>1</sub> 代 F <sub>1</sub> hybrids	R or S	OPCl 5-1300	F <sub>1</sub> 代 F <sub>1</sub> hybrids	R or S	OPCl 5-1300	F <sub>1</sub> 代 F <sub>1</sub> hybrids	R or S	OPCl 5-1300
83-4-96(♀)	R	+	1-2-9	R	+	1-5-1	R	+	1-8-4	R	+
粉红玫瑰 Muscat Rose	S	-	1-2-10	R	+	1-5-2	R	-	1-8-5	R	+
1-1-2	R	+	1-2-11	R	+	1-5-3	R	+	1-9-1	R	+
1-1-3	S	-	1-2-12	R	+	1-6-1	R	+	1-9-3	S	-
1-1-4	S	-	1-3-1	R	+	1-6-3	S	-	1-9-4	S	-
1-1-6	R	+	1-3-3	S	-	1-7-1	R	+	1-9-5	S	-
1-1-7	R	+	1-3-4	R	+	1-7-2	R	+	1-9-6	R	+
1-1-8	S	-	1-3-6	R	+	1-7-3	S	-	2-1-3	S	-
1-2-3	R	+	1-3-7	R	+	1-7-4	S	-	2-1-4	R	+
1-2-4	S	-	1-3-8	R	+	1-7-7	R	+	2-1-5	R	-
1-2-6	S	-	1-4-1	R	+	1-8-1	R	+	2-1-7	R	+
1-2-7	R	+	1-4-3	R	+	1-8-2	R	+	2-1-8	R	+
1-2-8	S	-	1-4-6	S	-	1-8-3	R	+	2-1-11	S	-

<sup>1)</sup> R:抗病 resistant; S:感病 susceptible; +:有 present; -:无 absent

## 1.2 方法

**1.2.1 抗病性田间自然鉴定** 田间自然鉴定于发病盛期(7~9月)在葡萄种质资源圃进行,参照贺普超<sup>[1,4]</sup>的抗白腐病、炭疽病鉴定方法,在田间自然条件下,每隔1周调查不同葡萄材料果实的感病情况,每份材料随机选20个果穗或500粒果实,按果穗感病果粒百分率的大小分级记录,计算感病指数。

**1.2.2 葡萄基因组 DNA 的提取及其 RAPD 反应体系建立** 葡萄基因组 DNA 的提取采用改良 CTAB 法<sup>[5]</sup>,葡萄 RAPD 反应体系参照 Wang<sup>[5]</sup>的方法进行。

**1.2.3 中国野生葡萄抗炭疽病基因连锁的 RAPD 标记筛选** 采用 Michelmore 的 BSA 法<sup>[6]</sup>进行引物的初选。根据 88-110 组合的杂交 F<sub>1</sub> 代,在田间自然条件下对炭疽病的抗性表现,各取抗、感病 5 个植株的 DNA 等量混合构成 1 对抗病与感病的 DNA 混合样。然后以 88-110 亲本 83-4-96(♀),粉红玫瑰, F<sub>1</sub> 抗病 DNA 混合样, F<sub>1</sub> 感病 DNA 混合样为模

板,用 Operon 公司的 10bp 随机引物进行 PCR 扩增筛选与抗炭疽病基因连锁的 RAPD 标记,重复 3 次。

**1.2.4 RAPD 标记的验证** 以 88-110 组合[毛葡萄 83-4-96(♀)×欧洲葡萄粉红玫瑰]的双亲及 F<sub>1</sub> 代抗病、感病单株及其它葡萄抗病、感病种质为模板,用获得具有区分特异性的引物 OPCl 5-1300 进一步进行 PCR 扩增验证。

## 2 结果与分析

### 2.1 葡萄材料抗炭疽病的田间自然鉴定结果

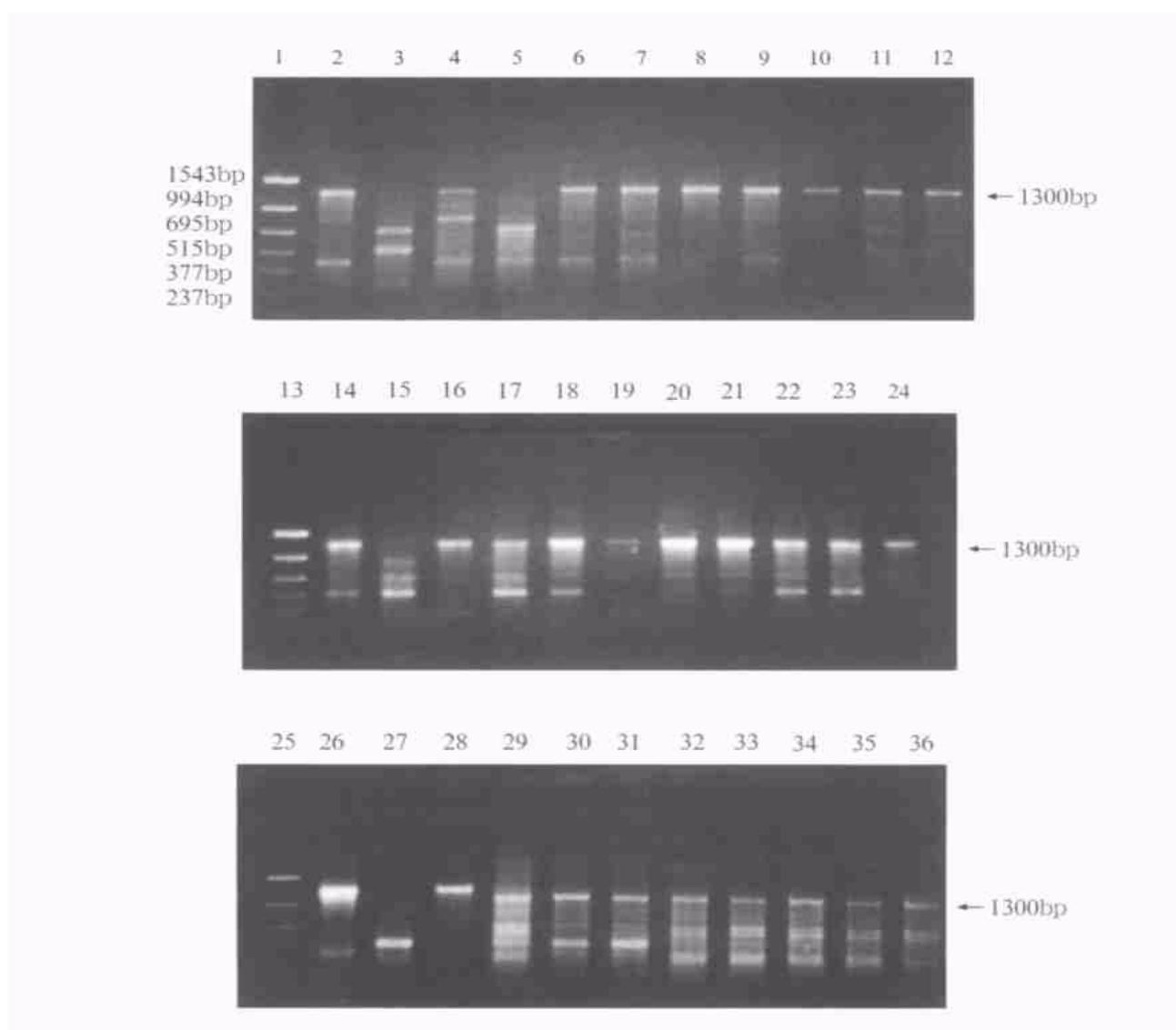
**2.1.1 中国野生葡萄和欧洲葡萄抗炭疽病表现** 中国野生葡萄 8 种 32 个株系在田间自然条件下,均表现出极强的抗病性,种间及种内不同株系间没有表现出抗性差异。14 个欧洲葡萄栽培品种除佳利酿表现抗病外,其余的均感炭疽病,只是感病程度有所差异。对以上两类葡萄材料进行田间自然鉴定,为进一步的 PCR 特异扩增验证奠定了良好的基础。

**2.1.2 种间杂交  $F_1$  代抗炭疽病表现** 在田间自然鉴定条件下,88-110组合[83-4-96(♀)×粉红玫瑰]杂交  $F_1$  代对炭疽病的抗性表现抗、感分离,在所鉴定的50个单株中,抗病的有33株,感病的有17株(表)。上述  $F_1$  代单株抗病与感病表型的分离是构建抗病与感病的DNA混合样和筛选中国野生葡萄抗炭疽病基因相连锁的RAPD遗传标记的理论基础。

## 2.2 中国野生葡萄抗炭疽病基因连锁的RAPD标记的筛选

以88-110组合亲本毛葡萄83-4-96(♀),粉红

玫瑰, $F_1$ 代抗病DNA混合样与  $F_1$ 代感病DNA混合样为模板,使用Operon公司生产的A、B、C、D、G、H、J、L、N、O、P、R、S、U、V、W、Z共17个随机引物进行扩增,从中筛选出大小一致、重复性好、扩增条带清晰可辨的连锁标记OPC15-1300(图1)。该标记只在抗病亲本83-4-96(♀)及  $F_1$ 代抗病DNA混合样中出现,而在感病亲本粉红玫瑰及  $F_1$ 代感病DNA混合样中没有出现。因此,初步推断OPC15-1300与中国野生葡萄抗炭疽病基因相连锁。



1,13,25.PCR Markers; 2,14,26.83-4-96(♀); 3,15,27.粉红玫瑰; 4,28.抗病混合样; 5,29.感病混合样; 6~12,16~24.抗病后代; 30~36.感病后代

1,13,25.PCR Markers; 2,14,26.83-4-96(♀); 3,15,27.Muscat Rose; 4,28.The resistant pool; 5,29.The susceptible pool; 6~12,16~24.The resistant progenies; 30~36.The susceptible progenies

图1 RAPD标记OPC15-1300在种间杂交组合亲本及  $F_1$ 代单株中的扩增结果

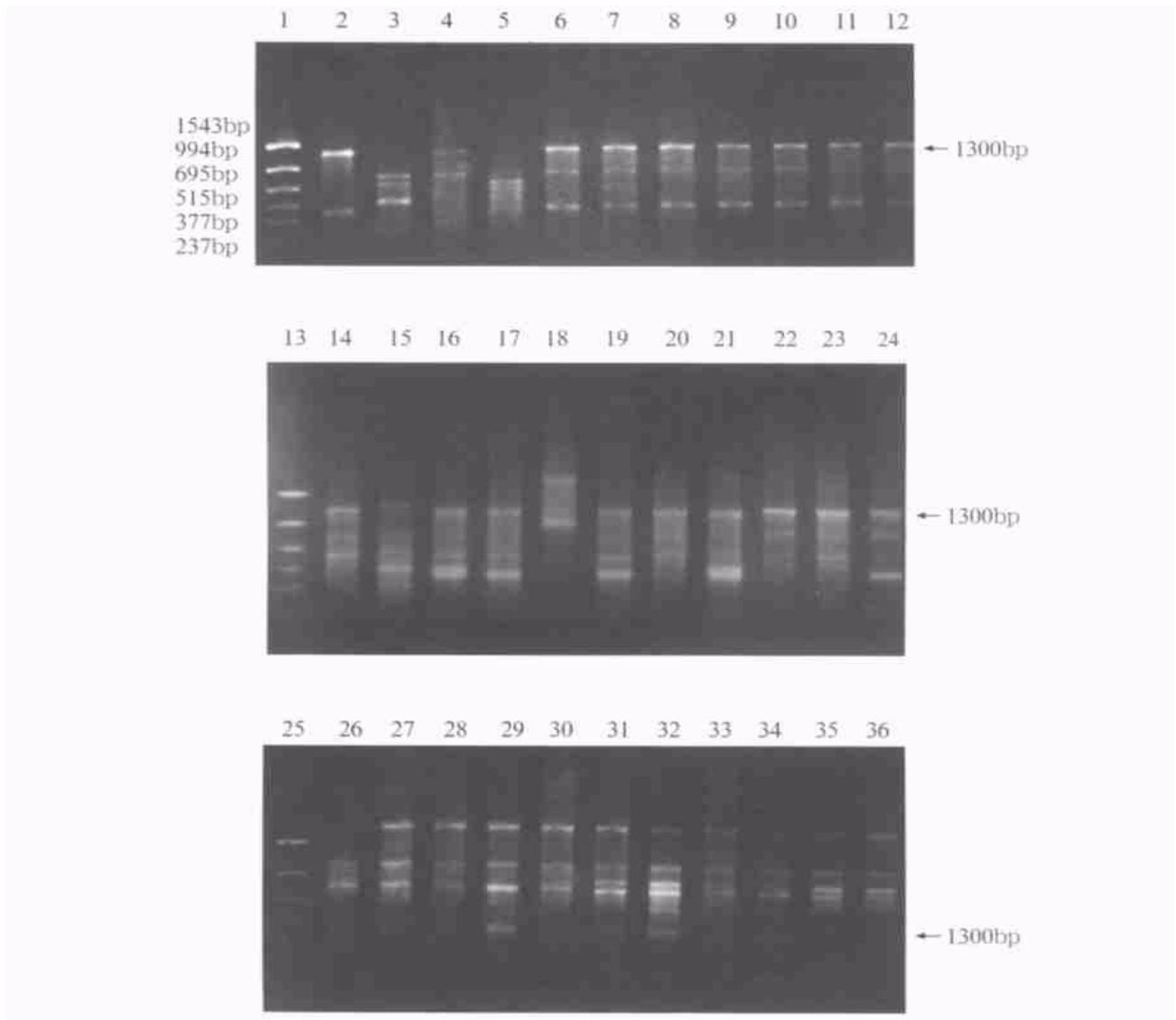
Fig.1 PCR amplification of RAPD of marker in their parents and  $F_1$  hybrids from interspecific hybridization using primer OPC 15

### 2.3 RAPD 标记 OPC15-1300 在杂交后代中的表现

OPC15-1300 是否确实与抗葡萄炭疽病基因相连锁,我们用引物 OPC15 对 88-110 组合  $F_1$  代 50 个单株进一步验证扩增。结果证明,在 33 个抗病单株中除 1-2-5、2-1-5 外,其余 31 个单株均具有 1300bp 的多态性 DNA 片段,这可能与基因重组及突变有关;而在感病杂种单株中不出现约 1300bp 的多态性 DNA 片段(表,图 1)。

### 2.4 RAPD 标记 OPC15-1300 在中国野生葡萄及欧洲葡萄中的表现

以中国野生葡萄 8 种 32 个株系及 14 个欧洲葡萄品种为模板,用随机引物 OPC15 进行 PCR 扩增。在中国野生葡萄的 32 个抗病株系中除留坝-8、安林-3、白河-13-1 外,其余 29 个株系均拥有 OPC15-1300 特异 DNA 片段(图 2),而在 14 个感病的欧洲葡萄品种中均未出现。这进一步表明 OPC15-1300



1,13,25.PCR Markers; 2,14.83-4-96(♀); 3,15.粉红玫瑰; 4.抗病混合样; 5.感病混合样; 6.83-4-49; 7.83-4-94; 8.83-4-85; 9.商-24; 10.渭南-3; 11.泰山-12; 12.83-4-96(♂); 16.塘尾; 17.略阳-4; 18.雪峰; 19.宁强-6; 20.济南-1; 21.福建-4; 22.左山75097; 23.左山1号; 24.北醇; 26.白玉霓; 27.黑比诺; 28.佳丽酿; 29.红地球; 30.法国兰; 31.巴库斯; 32.品丽珠; 33.梅鹿特; 34.五月紫; 35.霞多丽; 36.赤霞珠  
1,13,25.PCR Markers; 2,14.83-4-96(♀); 3,15.Muscat Rose; 4.The resistant pool; 5.The susceptible pool; 6.83-4-49; 7.83-4-94; 8.83-4-85; 9.Shang-24; 10.Weinan-3; 11.Taishan-12; 12.83-4-96(♂); 16.Tangwei; 17.Lueyang-4; 18.Xuefeng; 19.Ninqiang-6; 20.Jinan-1; 21.Fujian-4; 22.Zuoshan75097; 23.Zuoshan-1; 24.Beichun; 26.Ugni Blanc; 27.Pinot Noir; 28.Carignane; 29.Red Globe; 30.Blue French; 31.Bacchus; 32.Cabernet Franch; 33.Merlot; 34.Maisky Noir; 35.Chardonnay; 36.Cabernet

图 2 RAPD 标记 OPC15-1300 在中国野生葡萄与欧洲葡萄中扩增的结果

Fig. 2 PCR amplification of RAPD of marker in Chinese wild *Vitis* and *V. vinifera* using primer OPC 15

是与抗葡萄炭疽病基因连锁的分子标记, OPC15-1300 来自毛葡萄 83-4-96(♀), 是中国野生葡萄特有的抗炭疽病基因的分子标记, 且与主效基因有连锁关系。

### 3 讨论

获得与目的性状连锁的分子标记的有效方法可通过近等位基因系( near isogenic lines, NIL) 和集群分离分析( bulked segregant analysis, BSA) 法<sup>[6]</sup>。NIL 是通过多代轮回交筛选得到的, 品系间的差异主要在于某一目的性状。利用这样的品系可在不需要完整遗传图谱情况下, 有效地获得与目的基因连锁的分子标记。这一方法适用于育种周期短的作物。

但果树为多年生植物, 育种周期长, 基因组高度杂合, 获得与目的基因紧密连锁的分子标记, 通常按照 Michelmore 等<sup>[6]</sup>建立的 BSA 法进行研究是可行的。Michelmore 等创造的这一技术成功地在大白菜中筛选出了与 Dm5/8 区连锁的标记。Yang 和 Korbarss<sup>[7]</sup>应用 BSA 法筛选出了 8 个与苹果抗黑星病的基因(Vf) 连锁的 RAPD 标记。Gmitter 等<sup>[8]</sup>应用 BSA 法寻找到了 8 个与抗柑橘速衰病(CTV) 基因连锁的 RAPD 标记, 并绘制了连锁图谱。王跃进等<sup>[5,9]</sup>用 BSA 法获得了葡萄无核基因连锁的 RAPD 标记, 而且认为这一标记是与主效基因之一相连锁的。本文也采用了 BSA 法, 获得了中国野生葡萄抗炭疽病基因连锁的分子标记 OPC15-1300, 并且可以通过杂交向后代遗传。

关于葡萄抗炭疽病的遗传, 国内外尚未见报道。贺普超等<sup>[4]</sup>通过中国葡萄属野生种对炭疽病抗性的研究认为, 中国野生葡萄对炭疽病表现出高度的抗性, 我们的研究结果也进一步证明了中国野生葡萄及其部分杂种对炭疽病具有较强的抗性。本研究获得的抗葡萄炭疽病基因的连锁标记 OPC15-1300 来自野生种毛葡萄 83-4-96(♀), 而且进一步研究证明该标记可以向后代遗传, 并广泛地存在于其他中

国野生葡萄种中而在欧洲葡萄栽培品种中不存在该遗传标记。因此, 我们认为 OPC15-1300 是中国野生葡萄特有的抗炭疽病基因的分子标记。今后, 在利用中国野生葡萄对炭疽病的抗性时, 结合常规杂交育种可以利用该 RAPD 标记进行分子标记辅助育种, 以加速育种进程。另一方面, 进一步对该标记克隆测序, 进行 SCAR 标记及抗炭疽病基因定位与作图, 可以有效地克隆和利用中国野生葡萄的抗炭疽病基因。

### References

- [1] He P C, et al. Study on the resistances of wild *Vitis* species Native to China to grape white rot. *China Fruit*, 1988, 1:5 - 8. (in Chinese)  
贺普超, 等. 中国葡萄属野生种抗白腐病的鉴定研究. 中国果树, 1988, 1:5 - 8.
- [2] Welsh J, et al. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acid. Res.* 1990, 18:7213 - 7218.
- [3] Williams J G K, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acid. Res.* 1990, 18:6531 - 6535.
- [4] He P C, et al. Study on the resistances of wild *Vitis* species Native to China to grape ripe rot. *Journal of Fruit Science*, 1990, 7(1):7 - 12. (in Chinese)  
贺普超, 等. 我国葡萄属野生种对炭疽病抗性的研究. 果树科学, 1990, 7(1):7 - 12.
- [5] Wang Y J, et al. Identification of genetic marker linked to seedless genes in grape using RAPD. *Acta Universitatis Agriculturae Boreali-occidentalis*, 1996, 24(5):1 - 10. (in Chinese)  
Wang Y J, et al. Identification of genetic marker linked to seedless genes in grape using RAPD. 西北农业大学学报, 1996, 24(5):1 - 10.
- [6] Michelmore R W, et al. Identification of markers linked to disease resistance genes by bulked segregating populations. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1991, 88:9828 - 9832.
- [7] Yang, Korbarss. Screening apples for OPD20/600 using Sequence-specific primers. *Theor. Appl. Genet.* 1996, 92:263 - 266.
- [8] Gmitter J G Jr, et al. A localized linkage map of the citrus tristeza virus resistance gene region. *Theor. Appl. Genet.* 1996, 92(6):688 - 695.
- [9] Wang Y J, et al. Analysis of sequencing the RAPD maker linked to seedless genes in grapes. *Acta Universitatis Agriculturae Boreali-occidentalis*, 1997, 25(4):1 - 5. (in Chinese)  
Wang Y J, et al. Analysis of sequencing the RAPD Maker Linked to Seedless Genes in Grapes. 西北农业大学学报, 1997, 25(4):1 - 5.