

用 DNA 探针检测我国栽培的无核葡萄及辅助育种初探

王跃进¹ 杨英军^{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, 杨凌 712100; ² 热带作物生物技术国家重点实验室, 海口 571101)

摘 要: 用葡萄无核基因的特异探针 18 bp (5' CCAGTTCGCCCGTAAATG 3') 检测了我国栽培的 21 个无核葡萄品种和 9 个有核对照品种的无核性, 证实了该探针可以对葡萄无核基因进行准确的检测和鉴定; 通过该探针对有核 × 无核 (红地球 × 红光无核) 杂交后代无核性状的鉴定, 并对照大田结果, 证明了 18 bp 检测葡萄无核基因探针具有预测葡萄无核性状的作用。

关键词: 葡萄; 无核基因; 遗传标记; 探针

中图分类号: S 663.1; Q 781 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2002) 02-0105-04

近年来, 国际鲜食葡萄生产和消费的总趋势是无核、大粒^[1], 无核葡萄所创造的经济价值占有重要地位^[2]。因而, 无核育种是当今世界葡萄育种的重要方向^[3]。过去, 无核葡萄育种主要采用传统的有核 × 无核杂交方式, 这种组合方式不仅获得的无核单株率低, 而且费时耗力, 选择效果较差。后来, Ramming 等采用无核 × 有核、无核 × 无核的杂交组合方式, 结合胚挽救技术, 获得了较高的无核株率^[4]。近年来, 随着分子生物学技术的发展, 特别是分子标记可以对杂种进行早期无核性状的鉴定^[2,5~7], 极大地加速了无核葡萄的选育进程。本研究是建立在王跃进等^[6]以 RAPD 技术成功地在苗期检测了葡萄无核基因, 并获得了检测是否存在葡萄无核基因的 18 bp 无核探针的基础上, 以该探针检测我国栽培的无核品种和无核育种材料, 并对葡萄育种材料进行无核性状的早期预测选择。

1 材料与方法

1.1 材料

两类材料取自新疆鄯善葡萄研究中心, 一类是 21 个无核品种和 9 个有核品种 (表 1), 另一类是红地球 (有核) × 红光无核 (无核) 杂种后代 25 株。

1.2 方法

18 bp 引物 (王跃进申请的检测葡萄无核基因及无核性状的探针, 专利号为 CN1182794A, 序列为 5' CCAGTTCGCCCGTAAATG 3')、dNTPs、Taq DNA 聚合酶、PCR Marker 以及其他生化试剂分别购自华美、上海生工和 Sigma 等国内外试剂公司。PCR 仪为 PE480 型, 紫外分光光度计为 BECKMAN DU-70 型。葡萄基因组 DNA 提取参考王跃进等方法^[8]进行。

PCR 反应总体积为 25 μL , 其中包括 10 × PCR buffer (500 mmol L^{-1} KCl, 100 mmol L^{-1} Tris-HCl, pH 9.0, 1% Triton X-100) 2.5 μL , 25 mmol L^{-1} MgCl₂ 0.5 μL , dNTPs (2.5 mmol L^{-1}) 2.5 μL , Taq 酶 (5 U/ μL) 0.2 μL , 18 bp 引物 (4 $\mu\text{mol L}^{-1}$) 5 μL , 模板 30 ng, 并以 ddH₂O 补足 25 μL , 加盖 25 μL 矿物油。反应程序为 94 预变性 5 min, 然后 94 30 s, 36 30 s, 72 90 s, 共 45 个循环, 最后在 72 保持 10 min, 取下用 1.4% 琼脂糖凝胶 (含 0.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ EB) 进行电泳分离, 电极缓冲液为 1 × TAE, 5 V cm^{-1} 电压电泳 40 min ~ 1 h, 紫外灯观察、记录并照相。

收稿日期: 2001 - 05 - 29; 修回日期: 2001 - 09 - 28

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39970524); 农业部 948 项目 (981043); 高校博士点基金资助项目

*现在洛阳农业高等专科学校工作。

2 结果与分析

2.1 18 bp 特异引物检测葡萄无核品种

用 18 bp 特异引物对所有供试品种进行 PCR 特异扩增。结果表明，所有无核品种均扩增产生了约 590 bp 的 DNA 片段，而所有的有核品种均未扩增产生该片段（图 1，表 1），进一步证明了 18 bp 特异的检测葡萄无核基因探针扩增产生的约 590 bp 特异片段也存在于我国栽培的无核品种中。

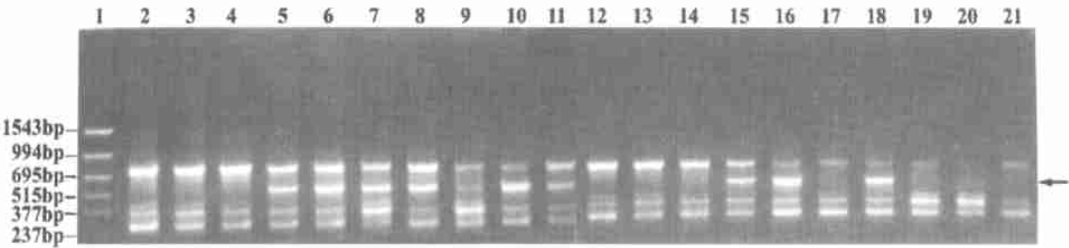


图 1 18 bp 引物扩增葡萄品种的结果

1. PCR Marker; 2. 瑞比尔（有核）; 3. 红地球（有核）; 4. 圣诞玫瑰（有核）; 5. 无核白（无核）; 6. 大粒无核白（无核）;
7. 长穗无核白（无核）; 8. 汤姆逊无核（无核）; 9. 波尔来特（无核）; 10. 波法尔（无核）; 11. 红光无核（无核）;
12. 红木那格（有核）; 13. 新葡一号（有核）; 14. 黑大粒（有粒）; 15. 黎明无核（无核）; 16. 无核紫（无核）;
17. 京紫晶（无核）; 18. 康耐尔（无核）; 19. 大粒无核红（无核）; 20. 粉红无核（无核）; 21. 红富士（有核）。

Fig. 1 RAPD profiles of grape cultivars using the 18 bp primer

1. PCR Marker; 2. Ribier (seeded); 3. Red Globe (seeded); 4. Christmas Rose (seeded); 5. Sultanina (seedless);
6. Big-berry Sultanina (seedless); 7. Long-bunch Sultanina (seedless); 8. Thompson seedless (seedless); 9. Perlette (seedless);
10. Bofer (seedless); 11. Flame seedless (seedless); 12. Hongmunnge (seeded); 13. Xinpu 1 (seeded); 14. Exotie (seeded);
15. Dawn seedless; 16. Black Monukka (seedless); 17. Jingzijing (seedless); 18. Canner (seedless);
19. Daliwuhong (seedless); 20. Blush seedless (seedless); 21. Beni Fuji (seeded).

表 1 SCAR 标记在葡萄品种中的表现

Table 1 Identification of the grape cultivars with the SCAR marker

品种 Cultivars	有核/ 无核 Seeds/ seedless	SCAR 标记 SCAR Marker	品种 Cultivars	有核/ 无核 Seeds/ seedless	SCAR 标记 SCAR Marker
香无核 Xiangwuhe	无核 Seedless	+	艾买那 Aimaia	无核 Seedless	+
大粒无核白 Big-berry Sultanina	无核 Seedless	++	康耐尔 Canner	无核 Seedless	++
瑞比尔 Ribier	有核 Seeded	-	底来特 Delight	无核 Seedless	+
无核紫 Black Monukka	无核 Seedless	++	圣诞玫瑰 Christmas Rose	有核 Seeded	-
长穗无核白 Long-bunch Sultanina	无核 Seedless	++	波尔来特（百乐）Perlette	无核 Seedless	++
普西那 Puxina	无核 Seedless	+	汤姆逊无核 Thompson seedless	无核 Seedless	++
乌霞勒那赛里 Wuxialenasaili	无核 Seedless	+	波法尔 Bofer	无核 Seedless	++
喀什哈尔 Kashihar	有核 Seeded	-	藤稔 Fujiminori	有核 Seeded	-
无核白 Sultanina	无核 Seedless	++	粉红无核 Blush seedless	无核 Seedless	+
红地球 Red Gobe	有核 Seeded	-	京早晶 Jingzaojing	无核 Seedless	++
美丽无核 Beauty seedless	无核 Seedless	+	红木那格 Hongmunage	有核 Seeded	-
大粒无核红 Daliwuhong	无核 Seedless	+	赫姆诺德 Himrod	无核 Seedless	++
京紫晶 Jingzijing	无核 Seedless	+	新葡一号 Xinpu 1	有核 Seeded	-
红光无核 Flame seedless	无核 Seedless	++	黑大粒 Exotie	有核 Seeded	-
黎明无核 Dawn seedless	无核 Seedless	++	红富士 Beni Fuji	有核 Seeded	-

注：++、+表示带的亮度，- 表示无该带。
Note: “++” and “+” indicate the brightness of the band, “-” indicates the absence of the band.

2.2 18 bp 特异探针检测杂交后代

在用 18 bp 特异探针检测我国栽培的无核葡萄品种基础上，又将该探针用于有核品种（红地球）

×无核品种（红光无核）杂交的 25 株后代的无核检测，结果表明，该 18 bp 探针在双亲和后代中有分离，只是在 A80 有核后代中出现了约 590 bp 的 DNA 片段，A102 无核后代中却没有出现这一 DNA 片段，而其它后代分离情况与果实有无核性状的差异完全一致（图 2），说明该探针可以对无核杂交后代进行无核性的鉴定和预测，可用于无核葡萄育种中杂种的预先选择。

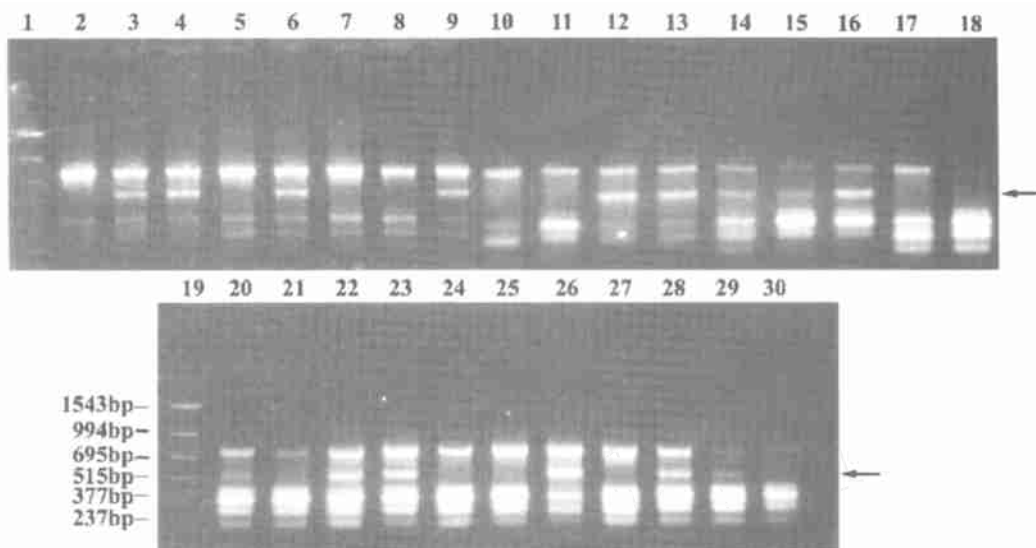


图 2 SCAR 标记在杂交后代部分单株中的分离

Fig. 2 Segregation of SCAR marker in parts of plants of the cross combination

1, 19. PCR marker; 2. 红地球 Red globe (); 3, 20. 红光无核 Flame seedless (); 4. A18; 5. A30; 6. A34; 7. A35; 8. A42; 9. A47; 10. A49; 11. A63; 12. A68; 13. A69; 14. A80; 15. A100; 16. A101; 17. A102; 18. A103; 21. A17; 22. A66; 23. A67; 24. A19; 25. A40; 26. A41; 27. A45; 28. A104; 29. A105; 30. A71。

3 讨论

葡萄无核基因遗传标记研究，国内外均有报道^[1,5,6,10]。王跃进利用 RAPD 技术和 BSA 方法标记并克隆了与葡萄无核基因连锁的遗传标记^[6,7]，在获得并测定了两个遗传标记的序列之后，依据葡萄无核基因 RAPD 标记的 DNA 序列又合成了 18 bp 寡核苷酸序列并用于扩增，从而又获得了连锁更为紧密的约 590 bp 的 SCAR 标记^[6~9]。1996 年 Striem 等^[1]以有核品种 × 无核品种杂交的后代为试材，采用 RAPD 方法建立了 RAPD 标记与葡萄无核 7 个相关性状的回归模型，并用 7 个标记淘汰了 44 % 的有核个体，减少近一半杂种后代个体，提高了育种效率。1998 年 Lahogue 等^[10]利用 RAPD 技术和 SCAR 标记对无核白进行了研究，获得了与无核基因连锁的 RAPD 标记和 SCAR 标记，成功地检测了葡萄无核基因及其性状。

本研究利用 18 bp 检测葡萄无核基因探针，首先在供试的 30 个葡萄品种中进行检测，以是否扩增产约 590 bp 的特异标记为目的，准确地地区分了葡萄有核品种和无核品种，其检测结果与品种有无核性状完全相符（图 1、表 1），再次从实践上证明了该探针的设计是正确的，具有检测葡萄无核基因存在与表达的功能。在此基础上，将该探针用于有核品种与无核品种杂交组合的后代进行果实有核与无核性状的预测（图 2）。本研究中，拥有 590 bp 片段与没有该片段的杂交后代单株比例为 13 : 12，而调查发现果实无核性状与有核性状单株比例为 14 : 11，其中杂交后代中有一无核后代 A102 没有 590 bp，而有核后代 A80 却拥有 590 bp，这很可能是杂交时，双亲出现了染色体片段的交换所致。本研究的实践意义是利用 18 bp 检测葡萄无核基因存在与表达的 DNA 探针进行分子标记辅助育种、提高育种效率，加速育种进程。下一步的研究是通过对该片段的回收克隆、测序，而作为锚定位点，通过染色体步移，可望分离得到该无核基因，为定向改良葡萄品种的无核性提供依据。

参考文献:

- 1 Sriem MJ, Ben-Hayyim G, Spiegel-Roy P. Identifying molecular genetic markers associated with seedlessness in grape. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 1996, 121 (5): 758 ~ 763
- 2 Ledbetter C A, Ramming D W. Seedlessness in grapes. *Horticultural Reviews*, 1989, 11: 159 ~ 181
- 3 沈德绪主编. 果树育种学. 北京: 农业出版社, 1994. 285 ~ 299
- 4 Ramming D W, Ledbetter C A, Tarillo R. Hybridization of seedless grapes. *Vitis*, special Issue, 1990, 439 ~ 444
- 5 王跃进, Lamikanra O, Schell L, 等. 用 RAPD 分析鉴定葡萄属远缘杂种. *西北农业大学学报*, 1997, 25 (3): 16 ~ 20
- 6 Wang YJ, Lamikanra Lu J. Identification of genetic marker linked to seedless gene in grape using RAPD. *Acta Universitatis Agriculturae Boreali-Occidentalis*, 1996, 24 (5): 1 ~ 10
- 7 Wang YJ, Lamikanra O. Analysis of sequencing the RAPD marker linked to seedless gene in grapes. *Acta Universitatis Agriculturae Boreali-Occidentalis*, 1997, 25 (4): 1 ~ 5
- 8 王跃进, Lamikanra O. 葡萄 RAPD 分析影响因子的研究. *农业生物技术学报*, 1997, 5 (4): 387 ~ 391
- 9 王跃进. 加速无核葡萄品种选育的新技术. *西北农业学报*, 1997, 6 (5): 81 ~ 83
- 10 Lahogue F, This P, Bouguet A. Identification of a codominant scar marker linked to the seedlessness character in grapevine. *Theor. Appl. Genet.*, 1998, 97 (5 ~ 6): 950 ~ 959

Detecting the Seedless Characteristics of the Grapes in China with DNA Probe and DNA Marker Assistant Selection

Wang Yuejin¹, Yang Yingjun¹, Zhou Peng², Zhang Jianxia¹, and Wang Xiping¹

(¹ College of Horticulture, Northwest Normal University of Agriculture and Forestry, Yangling 712100, China; ² The National Key Biotechnology Lab. for Tropical Crops, Haikou 571101, China)

Abstract: The paper reported the detection proficiency of the seedlessness in 21 seedless grape cultivars and 9 seeded ones using a specific primer which was a probe available for detecting seedless genes in grapes' genome. The results showed that the specific probe could be accurately used in the cultivars cultured in China. The preselection of seedlessness was also reached in cross combination 'seeded cultivars (Red Globe) × seedless one (Flame seedless)' progenies. It furthermore demonstrated that the seedlessness in grapes was controlled by multigenes and the specific genetic marker was linked to one of the seedless genes in grapes.

Key words: Grapes; Seedless genes; Genetic marker; DNA probe



《中国木本植物种子》

全书共收集 492 属、1276 个种 (含变种和亚种)。按属或种简要记述生长习性、分布、用途和开花结实特点;着重描述果实的采收、种子调制、种子储藏、发芽前的种子处理、发芽测定、播种等主要生产环节的要点。参与撰稿的多达 70 余人,都是国内知名学者专家。本书融集体智慧之大成,汇科学研究之精华,既总结生产实践的先进经验,又验之于撰稿人的直接知识;记载翔实,描述准确,数据来源于实际。每个属或种均配有种子外观图和剖视图,种子发芽进程图。具有先进性、科学性和实用性,可供植物工作者、园林工作者、院校师生以及基层技术人员、行政管理人员参考。

定价: 200.00 元 (含邮费)

购书者请通过邮局汇款至北京中关村南大街 12 号中国农科院蔬菜花卉所《园艺学报》编辑部,邮编 100081。

