

葡萄无核基因的 SCAR 标记及 Southern blot 分析*

杨英军¹, 王跃进^{1*}, 周 鹏², 王西平¹, 张剑侠¹

(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] 根据无核基因特异 RAPD 标记的序列进行分析, 合成 1 对特异引物 P₁+P₃ (序列分别是 P₁: 5' CTC ATC TTC TTG ATG GTG AT 3'; P₃: 5' AAG TGA AGA ACA TCA TTA AGA AC 3'), 对 30 个葡萄材料进行 PCR 扩增, 成功地将 RAPD 标记转换成 SCAR 标记。并对含有该标记序列的重组质粒进行 *Hind* III 和 *Spe* I 双酶切, 获得的 310 bp 片段回收后制成探测葡萄无核基因存在与否的杂交探针, 成功地对 7 个葡萄品种进行 Southern blot 分析, 实现了分子标记检测葡萄无核基因的目的。

[关键词] 葡萄无核基因; SCAR 标记; Southern blot 分析

[中图分类号] S663 103 2

[文献标识码] A **[文章编号]** 1671-9387 (2002) 06-0077-04

王跃进等^[1]利用 RAPD 技术获得了葡萄无核基因的约 590 bp 特异标记, 该标记具有探测葡萄无核基因存在与否的特异功能, 已在国外的一部分无核品种、杂交育种的材料和一部分来源未明的无核材料中得到证实。近期, 又在所收集到的中国栽培无核品种和几个杂交组合中得以验证, 从而证明该特异标记不仅在国外品种和育种材料特异扩增产生, 而且在中国的无核品种和育种材料中也特异扩增产生, 以它的出现与否准确地地区分了葡萄果实的有核与无核性状, 实践上证明了该特异标记具有广泛的普适性和通用性。本研究通过对该片段的序列分析, 设计合成两对 PCR 特异引物, 将该标记转换为单一位点出现与否的 SCAR 标记, 同时进行了酶切位点分析, 制备了无核杂交探针, 对 7 个葡萄品种进行了 Southern blot 分析, 用以探测葡萄基因组中是否含有无核基因, 从而实现用分子标记快速准确地检测葡萄无核品种的目的。

1 材料与方法

1.1 材料

葡萄材料 21 个葡萄无核品种: 香无核、大粒无核白、无核紫、长穗无核白、普西那、乌霞勒那赛里、无核白、美丽无核、大粒无核红、京紫晶、红光无核、黎明无核、艾买那、康耐尔、底来特、波尔来特、汤姆逊无核、波法尔、粉红无核、京早晶

和赫姆诺德, 以 9 个有核品种为对照: 瑞比尔、喀什哈尔、红地球、圣诞玫瑰、藤稔、红木那格、新葡一号、黑大粒和红富士。

生化试验 DNA 探针标记试剂盒 DIG-Labelling kit 购自 Promega 公司, dNTPs、Taq DNA 聚合酶、限制性内切酶和其他生化试剂购自北京科化学试剂经营公司。

1.2 方法

DNA 提取和杂交操作 葡萄基因组 DNA 提取参考文献 [2] 进行, 杂交探针制备按试剂盒说明书进行, 杂交膜制备和杂交操作参见文献 [3] 进行。

特异 PCR 引物 依据测序结果^[1]和引物设计原则^[4]设计引物。P₁: 5' CTC ATC TTC TTG ATG GTG AT 3' (20 bp); P₃: 5' AAG TGA AGA ACA TCA TTA AGA AC 3' (23 bp)。其中 P₁ 为正向引物, P₃ 为反向引物。

PCR 扩增反应 PCR 反应总体积为 25 μ L, 包括 10 $\times$ buffer (500 mmol/L KCl, 100 mmol/L Tris-HCl, pH 9.0, 质量分数 1% Triton $\times$ 100) 25 μ L, 25 mmol/L MgCl₂ 0.5 μ L, 2.5 mmol/L dNTPs 2.5 μ L, 5 μ mol/(min $\cdot\mu$ L) Taq 酶 0.2 μ L, 双引物 (4 μ mol/L) 各 1 μ L, 模板 DNA 30 ng, 以 ddH₂O 补足 25 μ L。混匀后在 PE2400 型 PCR 仪上进行反应, 反应条件为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 设置不同的退火温度 (51, 53, 55, 57 $^{\circ}$ C), 时间 30 s, 72 $^{\circ}$ C 90 s, 共

* [收稿日期] 2001-11-19

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (39970524); 农业部 948 项目 (981043)

[作者简介] 杨英军 (1968-), 男, 河南洛阳人, 讲师, 硕士, 主要从事果树学教学和研究。现在洛阳农业高等专科学校工作, 河南洛阳 471003。

* 通讯作者。

35 个循环, 72 ℃再延伸 10 min, 停止于 4 ℃, 在质量分数 1.4% 琼脂糖 (加有 0.5 μg/mL EB) 凝胶上分离 PCR 产物, 并观察照相。

2 结果与分析

2.1 SCAR 标记的获得

用 P₁+P₃ 引物对所有供试材料进行 PCR 扩

增, 其扩增结果见图 1, 表 1, P₁+P₃ 引物扩增产生的单一条带准确地区别了葡萄有核与无核品种, 无核品种在约 500 bp 位置处有 1 条带, 而有核品种在该处都没有, 表明由 RAPD 标记转换为 SCAR 标记是成功的。



图 1 P₁+P₃ 引物扩增葡萄品种的结果

1. PCR Marker (1 543, 994, 695, 515, 377, 237 bp); 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)

Fig. 1 The DNA profiles of grape cultivars using the P₁+P₃ 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)

表 1 SCAR Marker 标记在葡萄品种中的表现

Table 1 The results of the SCAR marker in the grape cultivars

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

2.2 Southern blot 分析

2.2.1 杂交探针的制备 对葡萄无核基因 RAPD 标记片段序列酶切位点分析发现, 有 *Spe* I 和 *Hind* III 的单一酶切位点, 用这两种酶处理含有 RAPD 标记片段的质粒, 切下 310 bp 片段 (图 2), 经回收纯化后, 溶于 20 μ L TE (pH 8.0) 中, 取 2 μ L 电泳测浓度后将其余的制成探针。

2.2.2 Southern 杂交 取无核白、红地球等 7 个供试材料基因组 DNA 10~20 μ g, 经 *Spe* I 和

Hind III 双酶切、电泳、印迹、杂交和显色后, 得到杂交结果 (图 3)。由图 3 可见, 无核品种 (Lane 5, 6, 7) 经杂交后均显示有 1 条 310 bp 的杂交带, 与重组质粒经双酶切处理后 (Lane 1) 切下的片段大小一致, 而对照有核品种 (Lane 2, 3, 4) 在相同位置没有杂交带显示。杂交结果表明, 与葡萄无核基因相连锁的分子标记是以单拷贝存在的, 这为今后利用该标记克隆葡萄无核基因奠定了良好的基础。

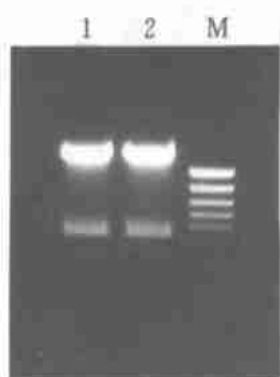


图 2 重组质粒的双酶切结果

1, 2 重组质粒; M. PCR marker

Fig 2 Identification of recombinant plasmid digested with *Hind* III and *Spe* I

1, 2 Recombinant plasmid; M. PCR marker

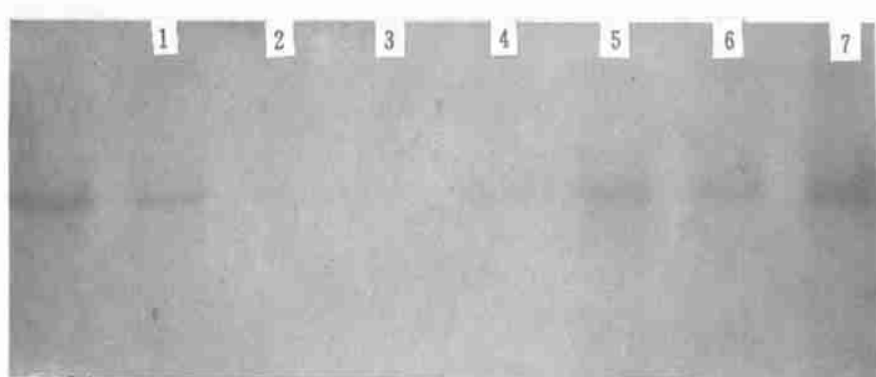


图 3 葡萄品种的 Southern blot 分析

CK 重组质粒/*Hind* III+*Spe* I; 1 无核白; 2 红地球;

3 新葡一号; 4 黑大粒; 5 波尔莱特; 6 红光无核; 7 波法尔

Fig 3 Southern blot analysis of some grape cultivars

CK Recombinant plasmid/*Hind* III+*Spe* I;

1 Sultanina; 2 Red Globe; 3 Xinpu 1; 4 Exotie;

5 Perlette; 6 Flame seedless; 7 Bofer

3 讨论

葡萄无核育种一直是葡萄育种的重要方面^[5]。传统的无核育种和品种鉴定只有等植株结果后根据果实的有核与无核表现情况才能做出选择和判断, 因而育种效率较低, 育种年限长。DNA 分子标记技术的发展使无核葡萄育种效率的提高成为现实。目前, 已有许多学者利用分子标记技术在葡萄无核育种上进行了有益的探索^[6~10]。王跃进等^[11]利用 RAPD 标记技术成功地获得了检测葡萄无核基因存在与否的寡核苷酸序列, 该序列具有准确检测葡萄果实有核与无核性状的特异功能, 是葡萄无核育种中分子标记技术成功应用的范例, 也是葡萄无核育种方法的重大突破。

本研究在对 18 bp 特异引物扩增产生的约 590 bp 特异无核标记片段进行测序的基础上, 设计合成

了两对引物, 将无核标记转换为约 500 bp SCAR 标记。由于 SCAR 标记的引物比 RAPD 的引物长 10 多个碱基, 且为双引物, 其退火温度可以提高到 50~60 (本研究采用 50), 其不稳定的因素就可克服。通过对与葡萄无核基因相连锁的 RAPD 标记转换为仅扩增 1 条带的 SCAR 标记, 也证实了 SCAR 标记所具有的优越性。而且, 通过利用已报道的葡萄基因组 DNA 快速提取技术^[2], 以及本研究将葡萄无核基因相连锁的 RAPD 标记转换为 SCAR 标记和扩增产物检测技术的实用化, 完成了一套葡萄无核基因育种的分子标记辅助选择选编。利用该技术系统仅 1~2 个操作熟练的人员, 在 1~2 h 内即可检测大量的育种材料。因而, 本研究所建立的葡萄无核育种分子标记辅助选择技术具有简单、迅速、实用与费用低等优点, 完全可以在葡萄无核育种中应用。Southern blot 分析结果表明, 该

葡萄无核基因分子标记在基因组中是以单拷贝存在 良好的基础。
的, 为今后利用定位克隆技术分离无核基因打下了

[参考文献]

- [1] 王跃进, L am i kanra O. 检测葡萄无核基因DNA 探针的合成与应用 [J]. 西北农林科技大学学报 (自然科学版), 2002, 30 (3): 42 - 46
- [2] 王跃进, L am i kanra O. 葡萄 RAPD 分析影响因子的研究 [J]. 农业生物技术学报, 1997, 5 (4): 387- 391
- [3] [美] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T, 等. 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, 1999
- [4] 周 鹏. 引物间同源性和裂口对 PCR 扩增的影响 [J]. 生命科学研究, 2000, 4 (1): 35- 40
- [5] 沈德绪. 果树育种学 [M]. 北京: 农业出版社, 1992. 285- 301.
- [6] Wang Y J, L am i kanra O, 卢 江. Identification of genetic marker linked to seedless gene in grape using RAPD [J]. 西北农业大学学报, 1997, 25 (5): 1- 10
- [7] Strien M J, Ben-Hayyim G, Spiegler P. Identifying molecular genetic markers associated with seedlessness in grape [J]. J Amer Soc Hort Sci, 1996, 121 (5): 758- 763
- [8] Qu Xiang Ping, Lu Jiang. Genetic diversity in muscadine and American bunch grapes based on randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis [J]. J Amer Soc Hort Sci, 1996, 121 (6): 1020- 1023
- [9] 王跃进, L am i kanra 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- 23
- [10] Lahogue F, This P, Bouguet A. Identification of a codominant scarmarker linked to the seedlessness character in grapevine [J]. Theor Appl Genet, 1998, 97 (5- 6): 950- 959

SCAR marker linked to seedless genes in grapes and southern blot analysis

YANG Ying-jun¹, WANG Yue-jin^{1*}, ZHOU Peng², WANG Xi-ping¹, ZHANG Jian-xia¹

(1 College of Horticulture, Northwest Sci-tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 The National key Biotechnology Lab for Tropical Crops, Haikou, Hainan 571101, China)

Abstract: This paper reported a rapid detection of genetic marker linked to seedless genes in 30 grape varieties using SCAR marker and Southern blot analysis. One pair of specific primers were designed based on the sequence analysis of the RAPD marker linked to seedless genes in grapes, and synthesized to perform PCR. The RAPD marker was transformed into SCAR marker successfully. Two restriction enzymes were selected to digest recombinant plasmids and the genome DNA of seven seeded and seedless grape cultivars. The 310 bp specific fragment obtained from recombinant plasmids was made into a probe after DIG labelling to detect the seedless genes in grapes. The digested genome DNA showed the existence of the seedless genes in seedless cultivars using southern blot, whereas the seeded ones were not.

Key words: seedless gene in grape; SCAR marker; southern blot