

检测葡萄无核基因DNA 探针的合成与应用^{*}

王跃进¹, L am i kan ra O lu so la²

(1 西北农林科技大学 园艺学院, 陕西 杨陵 712100;

2 Center for Viticultural Science, Florida A & M University, Tallahassee, FL 32307 U SA)

[摘 要] 利用细菌质粒M 13 克隆葡萄无核基因的RA PD 标记UBC-269₄₅₀后, 采用自动荧光DNA 序列分析仪对其测序。结果表明, UBC-269₄₅₀由484 对核苷酸及其特定序列构成。按照该序列, 人工合成两个寡聚核苷酸5'CCA GT TCACT CTCAA TAGGT CC3 和5'CCA GT TCGCC CGTAA ATG3 分别作引物, 当用获得该标记及其序列的亲本和无核杂种后代作模板进行PCR 分析, 凡是可以扩增出约590 bp 片段即为无核基因携带者和表达者。进一步用其原始无核祖先无核白和商业无核品种及C₇₈₋₄₇ × B₅₂₋₁₂₂ 杂交组合后代做模板进行PCR 扩增, 凡出现约590 bp 的特殊标记即为无核基因携带者和无核性状表达者。研究结果证明, 18 bp 寡聚核苷酸5'CCA GT TCGCC CGTAA ATG 3 具有检测葡萄无核基因的探针作用, 定名为检测葡萄无核基因的探针1 号(GSL P1)。

[关键词] 葡萄无核基因; DNA 序列; DNA 探针

[中图分类号] S663 103 6

[文献标识码] A

[文章编号] 1000-2782(2002)03-0042-05

葡萄无核性状是商业生产中一种特殊性状的标志, 无核葡萄也是备受消费者喜爱的鲜食和制干的重要品种之一。在美国, 无核葡萄作为商业栽培品种及育种亲本有其特殊应用价值。传统的无核葡萄杂交育种是有核 × 无核的杂交方式。现在, 利用胚挽救技术使传统的有核 × 无核的杂交组合可以改变为无核 × 无核的组合, 在幼果发育及种子败育前的特定时期, 取幼小的胚珠进行胚挽救(Embryo Rescue)成苗, 使后代无核杂种出现率极大提高^[1]。本研究在作者获得无核基因RA PD 标记的基础上, 对其进行序列分析, 并依据所获DNA 序列人工合成寡聚核苷酸, 以期获得检测葡萄无核基因的DNA 探针。

1 材料和方法

1.1 材 料

所用材料有无核白(Tompson Seedless)、百乐无核(Perlette)、闪光无核(Flame Seedless)、奥兰多无核(Orlando Seedless)、无核 Fresno、P₇₉₋₁₀₁ 和Dovine; 杂交组合B₇₂₋₂₁₆ × B₄₅₋₁₈₇及其杂种后代, C₉₁ 杂交组合(C₇₈₋₄₇ × B₅₂₋₁₂₂) 的父本B₅₂₋₁₂₂ 及其杂种后代23 株。

1.2 方 法

从葡萄植株中提取模板DNA, 按照王跃进等^[2]

的方法, 采用Q IA quick gel extraction kit (Q iagen) 从琼脂胶中分离提取与纯化RA PD 标记的DNA 片段, 用M 13 克隆该片段后进行序列分析。采用自动荧光DNA 测序分析仪(型号373A) 及文献[3]的方法对RA PD 标记测序, 依据RA PD 标记的DNA 序列, 利用DNA 合成仪人工合成两个寡聚核苷酸, 其序列分别为5'CCA GT TCACT CTCAA TAGGT CC3 和5'CCA GT TCGCC CGTAA ATG3'; 分别用作引物进行PCR 分析。PCR 分析以及RA PD 技术操作参照王跃进等^[2, 4]的方法进行。

2 结果与分析

经过对UBC-269₄₅₀ 测序并分析, 结果表明, UBC-269₄₅₀ 由484 对核苷酸及其特定序列构成(图1), 所以葡萄无核基因的RA PD 标记应为UBC-269₄₈₄。将随机引物UBC-269 的核苷酸序列5'CCA GT TCGCC 3 与RA PD 标记UBC-269₄₈₄ 的序列进行对比, 发现在第40~ 49 核苷酸序列区域存在着5'CCA GT TCGCC3 完全相同的序列。按照所获DNA 序列, 在其与UBC-269 相同序列基础上向3' 延伸了8 个核苷酸, 形成18 bp 的寡聚核苷酸, 其序列为5'CCA GT TCGCC CGTAA ATG 3'; 合成的另一寡聚核苷酸序列为5'CCA GT TCACT

* [收稿日期] 2001-11-27

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(39970524); 美国从事博士后研究课题USDA 资助项目的部分内容

[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与生物技术育种研究。

CTCAA TAGGT CC 3'; 分别以这两个合成的寡聚核苷酸作为引物, 用国际商品栽培的无核品种无核白、百乐无核、闪光无核、Fresno 无核、奥兰多无核、Dovine 和有籽品种皇帝、亚历山大、玫瑰香和黑汗等做模板, 以 18 个寡聚核苷酸作引物时, 在无核品种上扩增出约 590 bp 的多态性 DNA 片段, 而以 22 个寡聚核苷酸作引物, 没有区分性多态性 DNA 片段出现(图 2)。用原来获得 UBC-269₄₈₄ 的双亲及部

分杂种做模板, 以合成的 18 个寡聚核苷酸作为引物进行扩增, 无核性表现者获得了约 590 bp DNA 片段(图 3)。另外, 选用无核葡萄育种 C₉₁ 杂交组合父本 B₅₂₋₁₂₂ 及其杂种后代作模板扩增, 凡出现约 590 bp 的多态性 DNA 片段即为无核杂种单株或无核品种(图 4), 所以寡聚核苷酸 5' CCA GT TCGCC CG-TAA ATG 3' 作引物, 具有检测葡萄无核基因存在与表达的功能。

GAA TTCGGCTTCCA GTTCGCCCA GTTCGCCCA GTTCGCCCA GTT	45
CGCCCGTAAA TGGGGA CAA TCTGCA TCGTTAAACGTGTTGTGTA	90
TTTTGAA GTGGGGGAA GGTCAA GAACAAAA GCA CCA TTACCTTT	135
GTA TTCCAA TACTTTGAA TGGGCCTAA GCGCTTTGGACCAAACTT	180
ACGCAA TGGGACTTTCA TACAAA TA TTGGTCGCGTCAA GCA TCAC	225
CA GTGA TCCAA CA GGAAAA GCA GGGGGGGGGGA GGGGGTCTTGTG	270
TGCTGCTTTN TAAAAAACCTGTA TTGACTTCGTGA GTGTGGCCTG	315
CACCTGTTTGTGGA TA GCTTTTATGTGTA CTGCCA TTTCA GTGNC	360
TGCA GGCA CGTGCTTTTGA GA GTA GGA CTA TTGA GA GTGACA G	405
GGA GTAA CCAA TGGTGGCCTGAAAA GGGGGA GTGCCGGTA GACGC	450
ATGA GTGGCGTTA TTGTA GGC GA ACTGGGAA TTC	484

图 1 RAPD 标记 UBC-269₄₈₄ 的核苷酸序列及组成

Fig 1 Nucleic acid sequence and components of analyzed data obtained from RAPD marker UBC-269₄₈₄ linked to seedless gene in grapevines

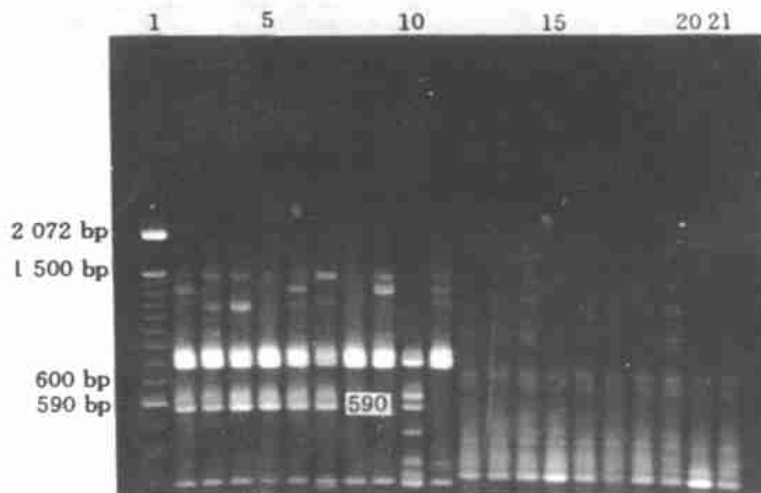


图 2 人工合成两个寡聚核苷酸作引物对国际商业品种的扩增结果

从左至右, 泳道 1. 100 bpDNA 分子标准; 2~ 7 和 12~ 17 依顺序分别为无核白、百乐无核、闪光无核、奥兰多无核、Fresno 无核、Dovine; 泳道 8~ 11 和 18~ 21 依顺序分别为皇帝、亚历山大、玫瑰香和黑汗, 泳道 2~ 11 为 18 个核苷酸构成的寡聚核苷酸作引物, 除有核品种外, 无核品种均拥有约 590 bp 的多态性 DNA 标记, 22 个核苷酸构成的寡聚核苷酸作引物扩增无区分性多态性 DNA 约 590 bp 的标记。

Fig 2 Amplification results of international commercial varieties by two oligomeric nucleic acid primers artificially synthesized

Form left to right, Lane 1. 100 bp DNA marker; Lane 2- 7 and Lane 12- 17 were seedless varieties in order: Thompson Seedless, Perlette, Flame Seedless, Orlando Seedless, Fresno and Dovine; Lane 8- 11 and Lane 18- 21 were Seeded varieties in order: Emperor, Muscat of Alexandria, Muscat Hamburg, and Black Hambert; Lane 2- 11 18 bp oligomer as primer, except seeded varieties, all seedless varieties showed the polymorphisms about 590 bp DNA marker, Lane 12- 17 and Lane 18- 21, both seedless and seeded varieties didn't show the polymorphisms about 590 bp DNA marker using 22 bp Oligomer as primer

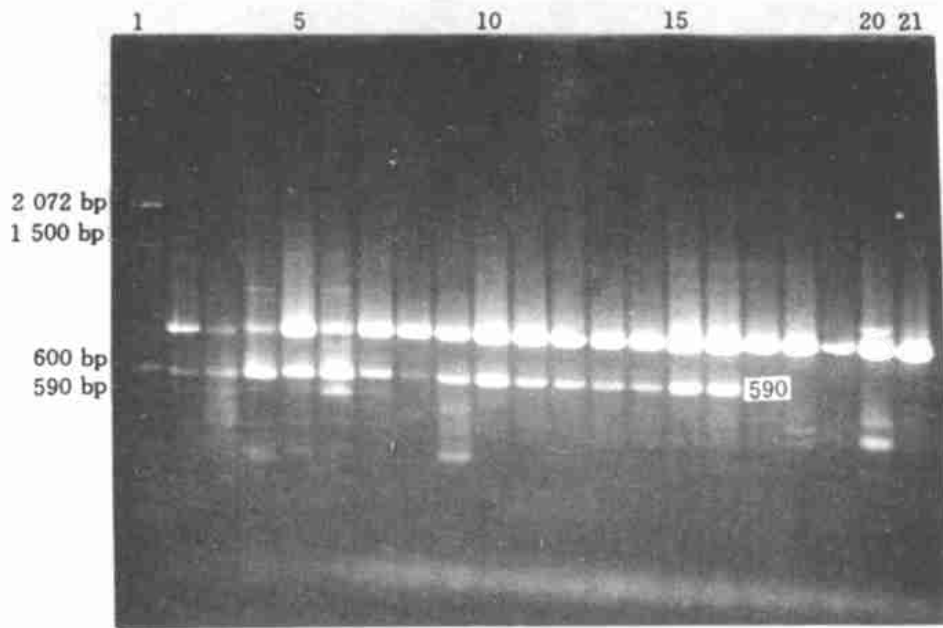


图 3 人工合成 18 bp 寡聚核苷酸引物对 B₇₂₋₂₁₆ × B₄₅₋₁₈₇ 及其后代的扩增结果

从左至右: 泳道 1. 100 bp DNA 分子标准; 2 无核白; 3 百乐无核; 4 奥兰多无核; 5 Fresno 无核; 6 Dovine; 7 B₇₂₋₂₁₆; 8 B₄₅₋₁₈₇; 9 A₅₆₋₇₂; 10 A₅₆₋₆₆; 11 A₅₆₋₂₅; 12 A₅₆₋₉₆; 13 A₅₆₋₃₈; 14 A₅₆₋₅₇; 15 A₅₆₋₇₂; 16 A₅₆₋₇₉; 17 A₅₆₋₆₆; 18 A₅₆₋₉; 19 A₅₆₋₁₀; 20 A₅₆₋₇₀; 泳道 2~16 均拥有约 590 bp 的多态性 DNA 标记, 泳道 17~21 为有核杂种, 无 590 bp 多态性 DNA 片段

Fig 3 Results amplified by 18 bp oligomer as primer

From left to right: Lane 1. 100 bp DNA marker; Lane 2-16 were seedless varieties and hybrids in order: Thompson Seedless, Perlette, Orlando Seedless, Fresno, Dovine, B₇₂₋₂₁₆, B₄₅₋₁₈₇, A₅₆₋₇₂, A₅₆₋₆₆, A₅₆₋₂₅, A₅₆₋₉₆, A₅₆₋₃₈, A₅₆₋₅₇, A₅₆₋₇₂, A₅₆₋₇₉. They were showed the polymorphisms about 590 bp DNA marker. Lane 17-21 were seeded hybrids in order: A₅₆₋₆₆, A₅₆₋₉, A₅₆₋₁₀, A₅₆₋₇₀ and they were not showed the polymorphisms.

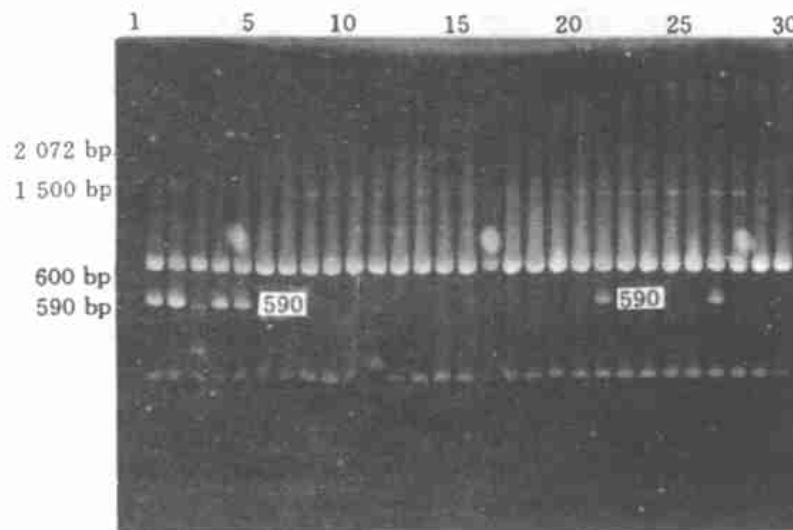


图 4 人工合成 18 寡聚核苷酸引物对 C₉₁ 组合的后代及原始祖先等品种的扩增结果

从左至右: 泳道 1. 100 bp DNA 分子标准; 2 无核白; 3 Fresno 无核; 4 P₇₉₋₁₀₁; 5 Dovine; 6 闪光无核; 7 B₅₅₋₁₂₂; 8 C₉₁₋₆; 9 C₉₁₋₁₂; 10 C₉₁₋₁₃; 11 C₉₁₋₂₂; 12 C₉₁₋₂₇; 13 C₉₁₋₂₉; 14 C₉₁₋₃₂; 15 C₉₁₋₅₈; 16 C₉₁₋₅₅; 17 C₉₁₋₅₆; 18 C₉₁₋₆₃; 19 C₉₁₋₆₇; 20 C₉₁₋₆₉; 21 C₉₁₋₇₁; 22 C₉₁₋₇₂; 23 C₉₁₋₃₃; 24 C₉₁₋₈₁; 25 C₉₁₋₈₉; 26 C₉₁₋₉₆; 27 C₉₁₋₉₉; 28 C₉₁₋₄₀; 29 C₉₁₋₄₁; 30 C₉₁₋₄₄. 泳道 2~6, 22 和 27 显示了约 590 bp 的 DNA 标记, 这些也是无核品种和无核杂种

Fig 4 Results amplified by 18 oligomer as primer in the C₉₁ combination and the initial progenitor varieties

From left to right: Lane 1. 100 bp DNA marker; Lane 2-6 were seedless varieties in order: Thompson Seedless, Fresno, P₇₉₋₁₀₁, Dovine, Flame Seedless. Lane 7-30 were seeded parent and hybrids from C₉₁ combination. Lane 2-6, Lane 22, and Lane 27 displayed the polymorphisms about 590 bp DNA marker, and also these varieties and hybrids expressed seedless trait.

3 讨 论

本研究获得的 RAPD 标记 UBC-269₄₈₄ 从来源讲, 来自无核葡萄原始祖先无核白基因组 DNA 的一部分, 而且这个片段出现在杂种 A₅₆₋₁₃ 上, 而无核白和 A₅₆₋₁₃ 本身是无核性状表现非常明显的, 在无核性的表现与划分上又是完全一致的 (按种子痕迹均为 9 级^[2])。所以, 选取了这一特殊的 DNA 片段, 对无核白和 A₅₆₋₁₃ 拥有的约 450 bp 的 DNA 片段进行分离、纯化、克隆及测序分析。

在获得 UBC-269₄₈₄ 时, 所用随机引物为 UBC-269, 其序列构成 5' CCA GT TCGCC 3'; 按照 PCR 原理, 无核白和 A₅₆₋₁₃ 的基因组 DNA 中就有与 5' CCA GT TCGCC 3' 互为配对的序列, 而另一条链中有这个随机引物的序列构成。根据序列分析结果, 从第 40~49 的碱基构成区域正是如此 (图 1)。为了克服 RAPD 标记的随机性, 依据 UBC-269₄₈₄ 的序列分析结果人工合成两个寡聚核苷酸作引物, 用葡萄无核品种或杂种作为模板 DNA 扩增, 结果是 5' CCA GT TCGCC CGTAA ATG 3' 具有专一性的扩增效果, 凡出现约 590 bp 的 DNA 片段者即为葡萄无核基因携带者和无核性状表现者, 而 5' CCA GT TCACT CTCAA TAGGT CC 3' 无专一性扩增效果 (图 2)。所以, 初步确定来自 UBC-269₄₈₄ 的 5' 端第 40~57 的核苷酸序列 5' CCA GT TCGCC CGTAA ATG 3' 具有检测葡萄无核基因存在与否的功能, 初步定名为检测葡萄无核基因的探针 1 号 (GSL P1)。

在获得 UBC-269₄₈₄ 的序列中, 在第 280 和 359 处出现了差错 (2 个错误/484 bp), 测序结果的准确率是 99.95%, 高于 Tracy 等^[3] 的测序结果 99.40% (3 个错误/500 bp)。

以本研究获得的 UBC-269₄₈₄ 的全部序列作为一个支点, 在此基础上合成 GSL P1 引物对模板

DNA 扩增, 又获得了约 590 bp 的 DNA 分子标记。无论是欧洲无核葡萄品种的无核白、百乐无核、闪光无核等, 还是欧美杂交的遗传构成极为复杂的奥兰多无核, 它们的共同特征性状表现为无核, 而其他性状差异甚大, 但当用 GSL P1 检测时, 它们拥有共同的约 590 bp DNA 片段 (图 3, 图 4)。也就是说, 在 RAPD 基础上, 对无核葡萄进行 SCARs 分析, 依据特殊序列合成的寡聚核苷酸作引物, 获得的约 590 bp 的多态性 DNA 片段比 UBC-269₄₈₄ 更接近葡萄无核基因的位点, 或者是位点的邻近区域。扩增出约 590 bp 的片段完全准确地出现在无核品种或无核杂种及无核品系上的结果比葡萄无核基因的 RAPD 标记应用更广泛, 检测效果准确, 这一结果既方便了葡萄无核基因的连锁标记及遗传作图, 又丰富与扩大了该领域的研究范围。由一个支点发展成现在的两个 DNA 片段, 特别是约 590 bp 的片段, 对其进一步研究从这个片段向无核位点区域接近, 将具有染色体步移、逐渐邻近无核基因位点区域或处于位点的邻近区域作用。

UBC-269₄₈₄ 的全部序列可以作为合成 DNA 探针的依据, 进一步用于研究葡萄无核基因及其邻近区域; GSL P1 可以做为葡萄无核育种中检测葡萄无核基因和性状表达的探针, 在杂交后代的幼苗期即可进行结果前早期筛选鉴定与检测, 凡出现约 590 bp 者为无核基因的携带者。本研究获得的 DNA 探针在葡萄无核育种研究上的应用可以节省人力、物力与提高育种效率, 可以作为分子标记辅助杂交育种与胚挽救获得无核杂种的有效手段, 加速无核葡萄育种进程和提高育种效果, 至少节省 6~8 年。下一步的研究是将该探针用于大量葡萄无核杂种分离群体中, 采用分子生物学手段和 M ap maker 对葡萄无核基因进行定位与作图。

[参考文献]

- [1] Barlass M, Rammings DW, Davis H P. In ovule embryo culture; a breeding technique to rescue seedless X seedless table grape crosses[J]. Australian Grape Grower and Winemaker, 1988, 259: 123-125
- [2] Wang Y J, Lamkanra L u J, et al. Identification of genetic marker linked to seedless gene in grape using RAPD[J]. 西北农业大学学报, 1996, 24(5): 1-10
- [3] Tracy E T, Mulcahy S L. A simple method for direct automated sequencing of PCR fragment[J]. Bio Techniques, 1991, 11: 68-75
- [4] 王跃进, Lamkanra 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

Application and synthesis on the DNA probe for detecting seedless genes in grapevine

WANG Yue-jin, Lamikanra O²

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

2 Center for Viticultural Science, Florida A & M University, Tallahassee, FL 32307 USA)

Abstract Bacteriophage M13 was used for cloning the RAPD marker linked to the Seedless genes in grapevine, fluorescence-based specific DNA sequences 484 bp were obtained by an automated fluorescent DNA sequencer systems (Model 373A Version 2.0). Based on the sequences obtained, two oligomers were artificially synthesized and additionally used as specific primers for amplifying the parents and seedless hybrids with the sequence. Thus, the DNA band about 590 bp was obtained, this was the carrier and expression of seedless genes of grapevine. The initial Thompson seedless, and commercial seedless varieties, and the hybrids from another seedless combination were further used as template DNA for amplification with specific oligomers. The about 590 bp specific fragment suggested that those were carrier and expression of seedless genes of grapevine. Therefore, our research showed that the oligomer 5'-CCA GT TCGCC CGTAA ATG3' as the DNA probe would be used to identify seedless genes of the materials and hybrids from seedless grape breeding program with PCR assay, so that it is named probe No. 1 for detecting the seedless genes of grapevine.

Key words: grapevine seedless genes; DNA sequence; DNA probe

(上接第 41 页)

Fertilizer application model on winter wheat with plastic film mulching in Weibei Dryland

REN Guang-xin, YANG Gai-he, ZHANG Zheng-mao, NIE Jun-feng

(Agriculture Research Centre for Arid and Semiarid Areas, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract The mathematical model has been set up to describe the relationships of grain yield to nitrogen, phosphorus and potassium in different precipitation years by means of the design of the regression-orthogonal combination in this study. From the model, the optimum amount of fertilizers is simulated. Economical object yield is obtained according to the ratio of fertilizers output to input. The amount and the ratio of applying fertilizer directly affect WUE. The WUE of film mulched wheat is increased with the amount of fertilizers, especially phosphorus and nitrogen, but the effect of potassium is smaller.

Key words: film mulched wheat; fertilizer application model; Weibei dryland