

# 葡萄无核基因分子标记及应用

王 刚, 魏 蓉

(1. 西北农林科技大学 园艺学院, 陕西 杨凌 712100; 2. 农业部西北地区园艺作物生物学与种质创制重点实验室, 陕西 杨凌 712100;  
3. 西北农林科技大学 旱区作物逆境生物学国家重点实验室, 陕西 杨凌 712100)

**摘 要:**无核葡萄是鲜食与制干葡萄的重要组成部分。当前市场上无核葡萄品种较少的主要原因是无核葡萄抗病性差、果粒小、产量低, 因此优质无核葡萄品种选育成为当前葡萄育种领域的重要课题。育种过程中有核后代所占比例较大及童期较长在一定程度上制约无核葡萄育种的进度。无核基因分子标记技术的引入可以高效的在幼苗期检测出该品系是否为无核葡萄, 有效的排除有核后代, 加速无核葡萄育种进程。该文主要从葡萄无核标记的研究进展、在科研实践中的应用、存在问题以及未来发展方向等研究进行了综述。

**关键词:**葡萄; 无核; 分子标记; 育种

**中图分类号:**S 663.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)04-0178-04

世界葡萄与葡萄酒组织公布数据显示, 2000~2011年, 世界鲜食葡萄的产量由 1 520 万 t 增加到 2 230 万 t, 其中 2011 年中国鲜食葡萄产量约为 600 万 t<sup>[1]</sup>。无论鲜食还是制干, 无核葡萄品质均优于有核品种, 消费者更偏好于无核葡萄<sup>[2]</sup>。然而中国市场上鲜食葡萄普遍为大粒有核品种, 出现该问题的主要原因是市场上可供接受的无核品种较少, 因此选育大粒无核品种已是国内外葡萄生产中急需解决的问题。在无核葡萄育种领域, 当前应用较多的是胚挽救技术, 该技术的出现有效解决了无核葡萄育种中母本只能为有核品种的问题, 大幅度提高了育种效率, 但依然面临胚挽救育种过程中胚的发育率与萌发率太低及 3 a 或者 3 a 以上的生产周期并且大面积的占用土地, 使育种者很难种植大量的群体用于筛选优良品系<sup>[2]</sup>等问题。葡萄无核基因分子标记技术能够在早期育种阶段排除掉那些有核的品系, 在一定程度上减少了育种的成本。

## 1 葡萄无核及遗传规律简述

同其它被子植物一样, 种子败育型的无核葡萄种子发育过程复杂, 受到多方面的调控, 目前人们对其分子水平的发育调控机理依然了解甚少。Doligez 等<sup>[3]</sup>研究显示葡萄的无核与果实重量是数量性状遗传, 且无核性状的表现遗传上由 1 个主效位点和 2 个微效位点控

制; 为确定无核性状是由哪些基因所控制, Uri 等<sup>[4]</sup>以 ‘Thomson seedless’ 及其有核芽变为材料, 通过对不同发育时期花序构建 SSH 文库, 获得差异表达基因叶绿体伴侣蛋白基因 21, 对番茄和烟草中的该基因沉默后可导致其种子败育, 该研究同时也表明种子败育型无核葡萄与有核葡萄在花发育期间在基因表达上存在有一定差异; Uri 等<sup>[5]</sup>最新研究显示泛素延伸蛋白基因 *S27a* 对 “无核白” 种子发育有显著的作用。Wang 等<sup>[6]</sup>发现无核葡萄 *VvCBP1* 钙结合蛋白基因对胚珠的发育有一定的影响, 随后将该基因转入番茄中显示, 番茄种子明显变少; Mejia 等<sup>[7]</sup>研究显示 *VvAGL11* 基因在种子败育无核葡萄胚发育的过程中起关键的作用。有关无核基因的论述先后经历了单显性基因说<sup>[8]</sup>、互补显性基因说<sup>[9]</sup>、多隐性基因说<sup>[10]</sup>、单隐性说<sup>[11]</sup>与数量性状说<sup>[12-16]</sup>等, 随着对无核基因研究的深入, 可以初步得出, 葡萄多个基因在不同时期与阶段对葡萄种子的发育进行调控。

## 2 葡萄无核分子标记研究进展

分子标记是以个体间遗传物质内核苷酸序列变异为基础的遗传标记, 是 DNA 水平遗传多态性的直接反映。种子败育型无核葡萄无核分子标记便是基于无核基因, 使用特定引物或者随机引物, 并以待检测目标的 DNA 为模板进行 PCR, 通过对电泳图谱上差异片段的分析与研究, 从而确定这些特异片段是否与无核性状有关。基于 PCR 技术的分子标记因其操作性强且成本较低被广泛应用。1990 年 Striem 等<sup>[17]</sup>使用多态性 DNA 探针针对葡萄品种进行分类, 并进一步说明基于 PCR 方法的分子标记可以用于无核葡萄品种的选育中<sup>[18]</sup>; Striem 等<sup>[15]</sup>使用随机扩增多态性 (RAPD; Random Amplified

**第一作者简介:**王刚(1989-), 男, 硕士研究生, 现主要从事鲜食无核葡萄胚挽救育种等研究工作。E-mail: wanggang827@126.com.

**基金项目:**国家自然科学基金资助项目(31171926); 国家公益性行业(农业)科研专项资助项目(200903044)。

**收稿日期:**2013-11-18

Polymorphic DNA)技术对 160 个 10 bp 引物进行筛选,用‘Early Muscat’和“火焰无核”杂交获得的 82 个杂交后代进行试验,其中超过 70 个引物在杂种后代中表现出多态性,超过 400 个形态学标记被鉴定区分,有 12 个标记明显与种子的干鲜重相关联,作者推断这些标记可能与无核基因有关。

国内较早进行的葡萄无核标记研究是王跃进等<sup>[19]</sup>以‘Thompson Seedless’为试材,使用 RAPD 标记分析获得特异性片段,进一步对 DNA 序列分析后认为该序列与无核白的无核性状相关联。王跃进等<sup>[19]</sup>对葡萄无核基因的 RAPD 标记 UBC-269450 进行克隆测序,分析发现该标记是由 484 对核苷酸及其特定序列构成,随后根据序列设计引物,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,认为凡是可扩增出 590 bp 片段即为无核基因携带者和表达者,随后用无核白等的后代进行检测并予以确认,并将其中 1 条命名为“探针 1 号”(GSLP1);随后杨英军等<sup>[20]</sup>对用 GSLP1 扩增得到的 590 bp 片段进行详细分析后,合成一段特异引物,对 30 个葡萄材料进行 PCR 扩增,成功的将 RAPD 标记转化为 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,并成功对 7 个葡萄品种进行了 Southern blot 分析;杨克强等<sup>[21]</sup>对葡萄无核基因特异标记 39970524-5-564 和 39970524-6-1538 的 DNA 序列克隆测序并进行酶切分析,结果显示标记 39970524-5-564 的长为 564 bp 的特异片段来源于无核葡萄基因组;杨克强等<sup>[22]</sup>通过对葡萄无核基因定位、作图分析后得到,用之前所获得的无核标记 GSLP1、39970524-5 和 39970524-6 引物扩增出的 GSLP1569、39970524-5-564、39970524-6-1538 和 39970524-6-1200 这 4 个片段与无核主效基因 *S* 处于同一连锁群,覆盖基因组 12.3 cM,其中特异标记 39970524-5-564、GSLP1569、39970524-6-1538 和 39970524-6-1200 距无核主效基因的距离分别为 0.6、1.2、4.9 cM 和 11.1 cM。

尽管王跃进等<sup>[19]</sup>对该标记进行了深入研究,但因其品种上的局限性未能在国内外大量应用,现应用较多的葡萄无核标记是 SCC8 与 SCF27。SCC8 标记是由 Lahogue 等<sup>[23]</sup>运用序列特异性扩增区标记(SCAR: Sequence Characterized Amplified Region)技术开发出一个离无核标记更为接近的 SCAR 标记,其中 *scc8*-/*scc8*- 为有核同源基因,SCC8+/*scc8*+ 为无核同源基因,并且 Lahogue 等<sup>[23]</sup>的结果显示存在 1 个主效基因与若干微效基因同是控制着葡萄的无核性状;Ryan 等<sup>[24]</sup>通过对 2 个火焰无核的杂交群体进行检测表明,SCC8 能够在火焰和杂交后代中准确的鉴定葡萄的无核性状与果实的重量。Mejia 等<sup>[25]</sup>运用 RAPD 标记技术对 336 个随

机引物进行筛选,随机片段被命名为 WF27-2000,随后对该片段进行测序分析进而转化成一个 SCAR 标记,将该标记命名为 SCF27,该标记产生 1 条在 2.0 kb 处的特征条带,进一步试验证明该标记能够有效的应用于无核葡萄早期筛选;Korpás 等<sup>[26]</sup>对上述 2 个 SCAR 标记进行了更为深入的研究,其认为 SCC8 和 SCF27 标记与无核特征位点 *sd* I(*sd* I: Seed Development Inhibitor)的关系是必要但不充分的关系,即无核基因都有这 2 个无核标记的特异序列,但有这 2 个标记特异序列的不一定是无核基因;同时其研究结果显示一些有核品种同样也表现出无核品种所具有的等位基因位点,其中‘Chaouch rose’的后代表现出分离的性状,即便在无核品种中也表现出有核品种拥有的等位基因 *sd* I+。

葡萄无核标记的开发并不止上述所列 3 种,Adam-Blondin 等<sup>[27]</sup>运用 SCAR 标记技术,确定 SCP18 在无核葡萄与无核葡萄杂交的后代中是一个与无核相关的分子标记。Karaagac 等<sup>[28]</sup>的研究发现 SSR 标记 VMC7F2 的 198 bp 等位基因微卫星位点被认为与无核数量性状 *sd* I 比较接近,且该标记所标记的无核后代能出现 198 bp 条带的后代能达到 54%。最新报道的 1 个标记是 p3\_VvAGL11。研究结果显示 MADS-box 家族中的 VvAGL11 在种子败育过程中起重要的作用<sup>[7]</sup>,Bergamini 等<sup>[29]</sup>依据该基因序列设计引物获得基因内的标记 p3\_VvAGL11,对通过有核与无核杂交获得的 475 个后代进行检测,发现无核后代中均含有无核相关基因,有核后代中只有 8 个有无核相关基因。由此可以推断其得到了 1 个可以有效排除有核后代的 1 个分子标记。

尽管有关无核标记的研究已取得较大进展,不是所有的无核标记都能正常工作,Li 等<sup>[30]</sup>、Yang 等<sup>[31]</sup>以 2006 年的文献为依据,首先分析该序列为 1 个三联组氨酸蛋白基因,在无核葡萄与有核葡萄中均有该基因,其次提取 11 种有核及无核葡萄的 DNA 对该引物进行 PCR 试验,结果显示,无论是有核还是无核均有 1.5 kb 特异条带,进一步酶切鉴定后发现,均含有特定酶切位点。但需指明的是 Yang 等<sup>[31]</sup>使用的试验材料为有核葡萄“红地球”,无核葡萄“火焰无核”与“无核白”,因此在对以“无核白”与“火焰无核”为母本的后代进行试验时能够有效的标记;另外葡萄的无核与果实重量是数量性状遗传<sup>[3,12,16,32]</sup>,因此无法排除该基因确与无核基因无关。

### 3 葡萄无核分子标记在育种中的应用

随着无核标记的不断完善,无核标记正逐渐被育种工作者应用到实践中。现应用最多的无核标记是 Scott 等<sup>[33]</sup>开发的 SCC8 与王跃进等<sup>[19]</sup>开发的 GSLP1(专利号为 CN1182794A),不过 AFLP 技术也被较早应用在葡萄

无核性状的筛选;王跃进等<sup>[18]</sup>应用 18 bp 无核探针检测了其栽培的 21 个无核葡萄品种和 9 个有核对照的无核性,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;其后续的试验通过对“红地球”与“红光无核”杂交后代无核性状的鉴定,并对照大田试验结果,证明该 18 bp 检测无核葡萄基因探针具有预测葡萄无核性状的功能;张剑侠等<sup>[34]</sup>利用 GSLP1-569 标记对欧洲无核葡萄品种×中国野生葡萄、无核品种自交共 6 个组合的 127 株胚挽救苗进行了无核筛选,结果显示在 127 株胚挽救苗中检测出拥有无核基因 SCAR 标记的 GSLP1-569 的杂种 27 株;朱瑜等<sup>[35]</sup>通过对以木纳格胚珠为材料进行胚挽救获得的后代用无核标记 GSLP1 进行鉴定,在 45 个株系中有 21 个有目标条带出现。GSLP1 标记是以“无核白”为依托开发的标记,因此该标记对“无核白”后代的检测比较准确,对其它品种及后代的检测则存在一定的偏差<sup>[30]</sup>。SCC8 标记因其可靠性高、适用性广,现为国内外现应用较多的一个无核标记;Akkurt 等<sup>[36]</sup>使用无核标记 SCC8、SCF27 和 VMC7f2 对‘Alphonse Lavallee’与“无核白”杂交的 372 株 F1 杂交后代进行 PCR 检测,用限制性酶 Bgl II 对 SCC8 标记的产物进行酶切鉴定,40 个子代在种子发育抑制位点表现出 SCC8+/SCC8+ 等位基因。利用 SCF27 标记对 80 个子代 DNA 进行扩增并产生条带,174 个后代拥有与无核葡萄关联 VMC7f2 标记所联系的 198 bp 的等位基因,183 个杂合子代被鉴定为无核葡萄的备选体,至少在其中 1 个标记上表现出无核特征。其中有 20 个子代被选择作为种质资源以备后续的研究,因为它们 3 个标记中均表现出无核葡萄的特征。研究结果显示 SSR 标记 VMC2f2 被认为与无核性状相关联最紧密的标记。

Akkurt 等<sup>[37]</sup>对‘Muscat of Hamburg’×‘Sultani’的 314 株杂交 F1 代利用分子标记手段进行无核性状鉴定,所用无核标记分别为 VMC7f2、SCC8 和 SCF27。通过使用 Bgl II 酶切 SCC8 的 PCR 扩增产物后,发现 72 个子代与 SCC8+/SCC8+ 的等位基因表现出类似的位点,使用 SCF27 扩增后产生 2.0 kb 片段的后代有 76 个,用 VMC7f2 标记扩增得到的 198 bp 等位基因的子代共有 118 个体,共计 190 个 F1 代被选为无核子代,它们之中至少携带 1 个与无核相关的条带,后代总共有 13 个个体与 3 个无核标记均表现出相关联的属性。由 Akkurt 等<sup>[29]</sup>的研究结果表明,SSR 标记 VMC7f2 能较为可靠的标记出无核后代,而有核标记 p3\_VvAGL11 标记能够有效的排除到有核后代,二者结合应用所得到的后代理论上全部表现无核性状。

#### 4 问题与展望

当前葡萄无核标记存在较为突出的问题是 1 个标记仅能应用在 1 个品系或者几个品系内及其杂交后代,

无法运用在其它品系(种)<sup>[23,31]</sup>,并且现已开发出的标记绝大多数存在不稳定性<sup>[30-31,38]</sup>,随着与无核相关基因的深入研究,更为准确全面的无核标记会不断被研发出来。未来随着计算机技术的高度发展,基于 DNA 芯片技术的无核标记会逐渐应用于无核葡萄育种,分子标记将不仅仅局限于基于 PCR 技术的分子标记,其它更为可靠的技术会逐渐被应用。

#### 参考文献

- [1] Oiv. Statistical report on world vitiviniculture[R]. International Organisation of Vine and Wine, 2012.
- [2] Cain D W, Emershad R L, Tarallo R E. In-ovulo embryo culture and seedling development of seeded and seedless grapes (*Vitis vinifera* L.)[J]. Vitis, 1983, 22: 9-14.
- [3] Doligez A, Bouquet A, Danglot Y, et al. Genetic mapping of grapevine (*Vitis vinifera* L.) applied to the detection of QTLs for seedlessness and berry weight[J]. Theor Appl Genet, 2002, 105: 780-795.
- [4] Uri H, Margarita V, Etti O, et al. Silencing of Chaperonin 21, that was differentially expressed in inflorescence of seedless and seeded grapes, promoted seed abortion in tobacco and tomato fruits[J]. Transgenic Res, 2007 (16): 515-525.
- [5] Uri H, Margarita V, Nachman S, et al. The ubiquitin extension protein S27a is differentially expressed in developing flower organs of Thompson seedless versus Thompson seeded grape isogenic clones[J]. Plant Cell Rep, 2009, 28: 1033-1042.
- [6] Wang S Y, Wang Y J, Zhang C H, et al. Molecular cloning and characterization of a novel gene encoding and EF-hand calcium-binding protein related to fruit seedlessness of grapevine[J]. Scientia Horticulturae, 2011, 130: 708-714.
- [7] Mejia N, Soto B, Guerrero M, et al. Molecular, genetic and transcriptional evidence for a role of VvAGL11 in stenospermocarpic seedlessness in grapevine[J]. BMC Plant Biology, 2011(11): 57.
- [8] Stout A B. Breeding for hardy seedless grapes[J]. Proc Amer Soc Hort Sci, 1937, 34: 416-420.
- [9] Bozhinova-Boneva I. Inheritance of seedlessness in grapes[J]. Genet Sel, 1978(11): 399-405.
- [10] Loomis N H, Weinberger J H. Inheritance studies of seedlessness in grape[J]. J Amer Soc Hort Sci, 1979, 104: 181-184.
- [11] Roytchev V. Inheritance of grape seedlessness in seeded and seedless hybrid combinations of grape cultivars with complex genealogy[J]. Am J Enol Vitic, 1998, 49: 302-305.
- [12] Cabezas J A, Cervera M T, Garcia L R, et al. A genetic analysis of seed and berry weight in grapevine[J]. Genome, 2006, 49: 1572-1585.
- [13] Striem M J, Roy P S, Sahar N. The degree of development of the seed coat and the endosperm as separate subtraits of stenospermocarpic seedlessness in grapes[J]. Vitis, 1992, 31: 149-155.
- [14] Striem M J, Hayyim G B, Roy P S. Developing molecular markers for grape breeding, using polymerase chain reaction procedures[J]. Vitis, 1994, 33: 53-54.
- [15] Striem M J, Hayyim G B, Roy P S. Identifying molecular genetic markers associated with seedlessness in grape[J]. J Amer Soc Hort Sci, 1996, 121(5): 758-763.
- [16] Bouquet A, Danglot Y. Inheritance of seedlessness in grapevine (*Vitis vinifera* L.)[J]. Vitis, 1996, 35(1): 35-42.



- [17] Striem M J, Roy P S, Baron I, et al. Genomic DNA fingerprinting of *Vitis vinifera* by the use of multi-loci probes[J]. *Vitis*, 1990, 29: 223-227.
- [18] Wang Y J, Lamikanra O. Analysis of sequencing the RAPD marker linked to seedless genes in grapes[J]. *Acta Univ Agric Boreali-occidentalis*, 1997, 25(4): 1-5.
- [19] 王跃进, Lamikanra 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.
- [20] 杨英军, 王跃进, 周鹏, 等. 葡萄无核基因的 SCAR 标记及 Southern blot 分析[J]. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 2002, 30(6): 77-80.
- [21] 杨克强, 王跃进, 张今今, 等. 用限制性酶切和 Southern 杂交对葡萄无核基因分子标记的分析[J]. *农业生物技术学报*, 2005, 13(3): 294-298.
- [22] 杨克强, 王跃进, 张今今, 等. 无核葡萄基因定位与作图的研究[J]. *遗传学报*, 2005, 32(3): 297-302.
- [23] Lahogue F, This P, Bouquet A. Identification of a codominant scar marker linked to the seedlessness character in grapevine[J]. *Theor Appl Genet*, 1998, 97: 950-959.
- [24] Ryan F J, Ramming D W. Application of a molecular marker for berry seed size to two populations of grapevines (*Vitis* sp.) developed in a breeding program[J]. *Hortscience*, 2005, 40(4): 1069.
- [25] Mejia N, Hinrichsen P. A new, highly assertive SCAR marker potentially useful to assist selection for seedlessness in table grape breeding[J]. *Acta Horticulturae*, 2003, 603: 559-564.
- [26] Korpás A, Baránek M, Pidra M, et al. Behaviour of two SCAR markers for seedlessness within Central European Varieties of grapevine[J]. *Vitis*, 2009, 48(1): 33-42.
- [27] Adam-Bondon A F, Esnault F L, Bouquet A, et al. Usefulness of two SCAR markers for marker-assisted selection of seedless grapevine cultivars[J]. *Vitis*, 2001, 40(3): 147-155.
- [28] Karaagac E, Vargas A M, Andrés M T, et al. Marker assisted selection fro seedlessness in table grape breeding[J]. *Tree Genetics and Genomes*, 2012 (8): 1003-1015.
- [29] Bergamini C, Cardone M F, Anaclerio A, et al. Validation assay of p3\_VvAGL11 marker in a wide range of genetic background for early selection of stenospermocarp in *Vitis vinifera* L [J]. *Mol Biotechnol*, 2013, 54: 1021-1030.
- [30] Li Z J, Dhekney S A, Gray D J. Molecular characterization of a SCAR marker purportedly linked to seedlessness in grapevine (*Vitis*) [J]. *Mol Breeding*, 2010, 25: 637-644.
- [31] Yang K Q, Wang Y J, Zhang J J, et al. Analysis of restriction sites and Southern blotting of two molecular markers linked to grape seedless gene[J]. *Chinese Journal of Agricultural Biotechnology*, 2006, 3(1): 13-17.
- [32] Costantini L, Battilana J, Grando M S, et al. Berry and phenology-related traits in grapevine (*Vitis vinifera* L.): From Quantitative Trait Loci to underlying genes[J]. *BMC Plant Biology*, 2008(8): 38-55.
- [33] Scott K D, Ablett E M, Lee L S, et al. AFLP markers distinguishing an early mutant of Flame Seedless grape[J]. *Euphytica*, 2000, 113: 245-249.
- [34] 张剑侠, 王勇, 王跃进, 等. 利用分子标记对无核抗病葡萄杂交后代的辅助选择[J]. *东北农业大学学报*, 2010, 41(6): 55-63.
- [35] 朱瑜, 夏培蓓, 伍新宇, 等. 木纳格葡萄胚挽救苗的获得及其无核性状分子鉴定[J]. *新疆农业大学学报*, 2012, 35(1): 22-24.
- [36] Akkurt M, Cakir A, Shidfar M, et al. Using SCC8, SCF27 and VMC7f2 markers in grapevine breeding for seedlessness via marker assisted selection[J]. *Genetics and Molecular Research*, 2012, 11(3): 2288-2294.
- [37] Akkurt M, Cakir A, Shidfar M, et al. Using seedlessness-related molecular markers in grapevine breeding for seedlessness via marker-assisted selection into Muscat of Hamburg × Sultani progeny[J]. *Turk J Biol*, 2013, 37: 101-105.
- [38] Adam-blondon A F, Lahogue-esnault, Bouquet A, et al. Usefulness of two SCAR markers for marker - assisted selection of seedless grapevine cultivars[J]. *Vitis*, 2001, 40(3): 147-155.

## Molecular Markers and Application of Seedless Grape Gene

WANG Gang, WEI Rong

(1. College of Horticulture, Northwest Agricultural and Forestry University, Yangling, Shaanxi 712100; 2. Key Laboratory of Biology and Genetic Improvement of Horticultural Crops (Northwest Region), Ministry of Agriculture, Yangling, Shaanxi 712100; 3. Key Laboratory of Crop Stress Biology in Arid Areas, Northwest Agricultural and Forestry University, Yangling, Shaanxi 712100)

**Abstract:** Seedless grape (*Vitis vinifera* L.) is a great part in grapes produced for fresh and raisin consumption. There exist few varieties of seedless grapes in current market due to poor disease resistance, small fruits and low yield. So selecting high-quality seedless grape has become an important issue in grape breeding. The breeding progress is somewhat hindered by a large percentage of offspring made up by seeded grapes, and its long juvenile phase. Applying marker assisted selection (MAS) in breeding process can effectively discern and eliminate seeded germplasm, thus facilitate the breeding for seedless grapes. Research advances, problems and future directions of seedless grape molecular marker were reviewed in this paper.

**Key words:** grape; seedless; molecular marker; breeding