

葡萄种质资源的 RAPD 分析

袁维凤, 徐凯, 徐德聪, 钱玉梅 (1. 宿州学院化生系, 安徽宿州 234000; 2. 安徽农业大学园艺系, 安徽合肥 230036)

摘要 对15个葡萄品种进行RAPD分析。从60条随机引物中筛选出10个多态性引物用于DNA扩增,共扩出71条DNA带,其中多态性DNA带47条,占总数的66.2%。通过聚类分析,分成4大类,美洲葡萄类群康可、奇妙无核自成一类,与欧亚种、欧美杂种分开;其中森田尼无核、无核白遗传关系近,最先聚在一起。该结果显示,欧亚类群遗传差异较大,具有丰富的遗传多样性,证明RAPD技术能在DNA分子水平上揭示葡萄遗传背景及亲缘关系。

关键词 葡萄种质资源; RAPD; 遗传多样性

中图分类号 S663.1 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2006)23-6130-02

Analysis of Grape Germplasm Resources with the Technique of RAPD

YUAN Wei-feng et al (Department of Chemistry and Biology, Suzhou College of Anhui, Suzhou, Anhui 234000)

Abstract 15 genotypes of grape (*Vitis* L.) were analyzed with RAPD. Ten primers screened from 60 primers could amplify clearly and stably 71 bands. 47 bands were examined for randomly amplified polymorphic DNA, which occupied 66.2%. The relationships among the 15 varieties based on their genetic distances were clustered with analysis method of the dendrogram. These varieties can be classified into 4 groups by cluster analysis, which *V. labrusca* L. was separated from *V. vinifera* L. and *V. vinifera* L. × *V. labrusca* L. and *Vitis* *Vinifera* L. Centennial seedless and *V. vinifera* cv. Thompson seedless had a close genetic relationship, which was firstly clustered. The result indicated that *V. vinifera* L. had a large difference on genetic distances and genetic diversity. It was proved that RAPD technique can successfully reveal the genetic variation and the genetic relationships of grape.

Key words Grape germplasm resource; RAPD; Genetic diversity

RAPD作为一种快速简便、安全灵敏的DNA分子标记技术,已被广泛应用于植物种群划分、系谱分析、亲缘关系及基因定位等研究领域。P. This 利用3个引物产生的RAPD标记将30个葡萄砧木品种一一区分,并发现一些特异标记为某一个种葡萄所特有^[1]。罗素兰^[2]对起源于我国的83个野葡萄种质的变种或杂种进行RAPD分析,根据聚类分析的结果认为菱叶葡萄和秦岭葡萄是中国野生葡萄中起源最古老的类型之一。笔者对15个葡萄品种进行RAPD分析,评价品种间遗传多样性及变异幅度,检测葡萄不同品种之间的遗传关系,为葡萄资源研究和育种提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材料 欧亚和欧美类群森田尼无核、红提玫瑰、黑比诺、克林巴马克、早黑宝、巨峰、京亚等,美洲类群康可、奇妙无核等,共15份不同葡萄材料,取自北京林业果树研究所。

1.2 方 法

1.2.1 葡萄基因组DNA提取。参考王关林等^[3-5]的CTAB法(有改动)。取0.5g幼嫩叶片置于研钵中在-20℃速冻数小时,迅速磨碎后置于1.5ml Eppendorf离心管中;加入300μl 60℃预热的CTAB提取缓冲液(含0.4%β-巯基乙醇)和150μl 2%PVP,温和混匀。置水浴锅内60℃温浴30min,水浴后加入300μl 氯仿/异戊醇抽提,轻摇离心管将其混匀,13000r/min离心5min。取上清液至另一离心管,加入等体积氯仿/异戊醇,温和混匀,13000r/min离心5min。将上清液转移至新离心管中,加入2/3倍体积预冷异丙醇,混匀,有絮状沉淀,10000r/min离心5min,小心去上清液,用70%乙醇(含NaAc)洗涤,自然吹干,溶解在20μl高盐TE中备用。

1.2.2 葡萄DNA扩增及电泳检测。用筛选好的引物对15个品种进行一一扩增,将样品所需的ddH₂O、dNTPs、Buffer、Primer、Taq酶、模板混合后,在PCR热循环仪中进行扩增。

PCR扩增反应体系:模板DNA为1μl(50~200ng),10×PCR Buffer 2μl, MgCl₂ 2.0mmol/L, dNTP 0.2mmol/L, TaqDNA聚合酶1U, Primer 0.2μmol/L,剩下的用ddH₂O来补充到25μl。反应循环参数为:94℃预变性5min,94℃变性50s,37℃退火55s,72℃延伸90s,40个循环,72℃延伸10min。反应结束后,用1.2%琼脂糖凝胶(含EB 0.5μg/ml)电泳1~2h,检测PCR产物并放入紫外凝胶成像仪内检测、照相。

1.2.3 数据统计及聚类分析。RAPD电泳结果重复2次,大部分带型可重复,少数不能重复者忽略不计。每一个RAPD谱带均可看作一遗传位点,扩增条带的有、无分别记为1和0。按照欧氏距离平方(Squared Euclidean Distance)进行计算和聚类分析,比较不同葡萄品种间的遗传距离和一致度。

2 结果与分析

2.1 葡萄基因组DNA的提取 和其他植物相比,葡萄含有较多的色素、酚类及多糖等次生物质,提取的DNA常埋于粘稠的胶状物中,呈深褐色,难以用于扩增反应。同时提取材料部位也对DNA提取效果有影响,当选取成熟的叶片时,提取DNA溶液的颜色比幼叶深;用幼嫩叶片提取的DNA较好,这是由于幼叶中含较少的色素、酚类及多糖等物质。笔者采用CTAB法并附加适量的PVP和β-巯基乙醇,去除酚类,防止酚类化合物氧化从而使溶液变褐,且可直接通过离心或氯仿/异戊醇抽提去除,使所提的DNA呈无色絮状沉淀或少数略带淡黄色,DNA片段完整。

2.2 引物筛选及扩增结果 以森田尼无核、巨峰葡萄材料为试材,对选用的60个随机引物进行筛选,大多引物能扩增出若干条带。从中选出10个扩增条带清晰、多态性好的随机引物作为RAPD分析引物(表1),而没有扩增产物或扩增条带很少以及重复性差的随机引物均被淘汰。

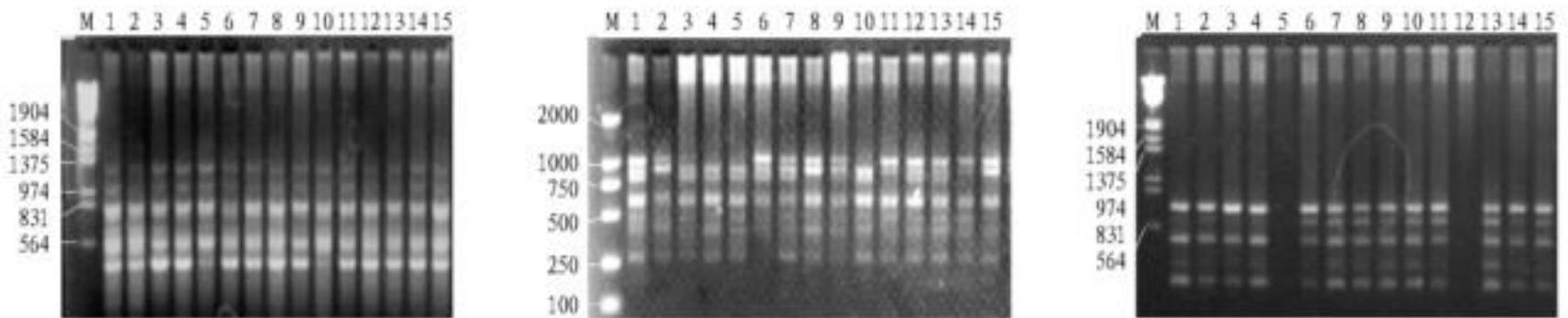
用筛选出的10个引物对15份葡萄品种一一进行扩增反应,结果共扩增出71条带,其中多态性DNA带47条,占总数的66.2%。每个引物扩增的条带数目为5~10,平均1个引物扩出7.1条带,产生条带最多的引物是OPG06(10条),最少的为引物OPS12(5条)。扩出的DNA带大小在100bp

表1 多态性引物的扩增结果

引物	序列	扩增带	多态性带	多态率 %
OPH19	CTGACCAGCC	6	3	50.0
OPW01	CTCAGTGICC	8	7	87.5
OPG14	GGATGAGACC	7	6	85.7
OPG06	GTCCTAACC	10	8	80.0
OPW08	GACTGCCCTCT	6	2	33.3
OPH08	GAAACACCCC	7	5	71.4
OPS12	CTGGGTGAGT	5	5	100
OPH05	AGTCGTCCCC	9	6	66.7
OPS01	CTACTGCGCT	7	3	42.9
OPW02	ACCCCGCCAA	6	2	33.3
总计		71	47	66.2

~2.0 kp。引物 OPS01、OPG06 和 OPS12 扩增的 RAPD 产物图谱见图1。这10个引物间的检测效率不同,有的可以区别15个葡萄品种(如引物 OPS12),扩增产物全为多态性带;有的只能显示出某几个葡萄品种的特征带。每个引物所扩增出产物的多态性在各品种中分布数量不同,有些位点仅在个别品种中表现出多态,而有些位点只在个别品种中能检测到。如在引物 OPS01-720b 位点只有品种1、2、3、12 检测到,品种5、12 在引物 OPS12 任何位点均无条带。

2.3 葡萄 RAPD 标记的聚类分析 为了进一步确定葡萄基因型间的遗传关系,利用遗传距离矩阵,进行UPGAM 聚类分



注:1. 康可;2. 奇妙无核;3. 巨峰;4. 京亚;5. 藤稔;6. 森田尼无核;7. 红提玫瑰;8. 皇家秋天;9. 黑比诺;10. 克林巴马克;11. 无核白;12. 红地球;13. 早黑宝;14. 美人指;15. 红罗沙里奥。

图1 葡萄RAPD 扩增的电泳结果(引物 OPS01、OPG06 和 OPS12)

析,建立了15个品种的DNA多态性聚类分析树型图(图2)。由图2可以看出,欧亚品种森田尼无核和无核白遗传距离最近,其次是皇家秋天与克林巴马克;品种红地球与康可、奇妙无核之间遗传差异最大。当遗传距离为17时,可将葡萄材料分为4类:第I类包括6、11、14、15、8、9、10、13号,其中森田尼无核、无核白聚一小类,遗传关系近,它们属无核、东方类品种,并与欧亚种美人指、红罗沙里奥成一组,但差异明显;皇家秋天、克林巴马克、黑比诺、早黑宝为一组,前三者与早黑宝遗传相距较大。第II类为巨峰、藤稔、京亚。第III类为红提玫瑰和红地球。第IV类为美洲葡萄类群康可、奇妙无核,它们与欧亚品种、欧美杂种分开,自成一类。该结果显示,欧亚类群遗传关系复杂,不同品种间遗传差异大,即各品种群间的基因型差异大,各品种群内的基因型也有差异,具有丰富的遗传多样性。

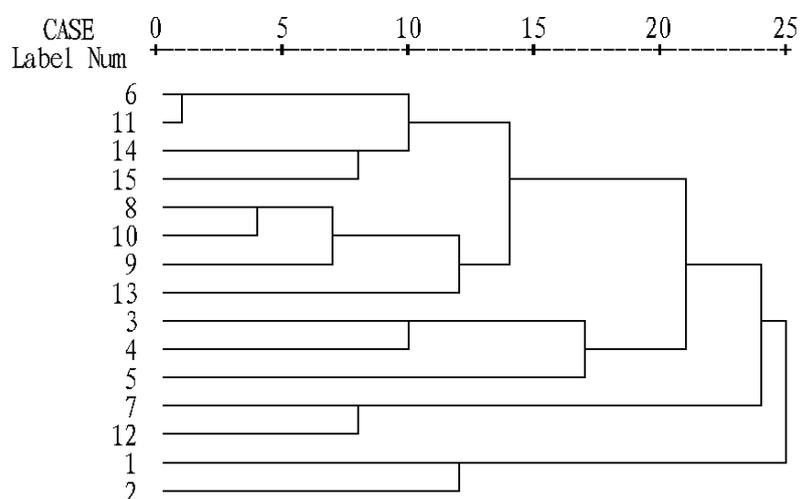


图2 15个葡萄品种的RAPD 聚类

3 小结

葡萄在漫长的进化过程中逐渐形成了许多种群、品种群、变种和生态型,葡萄基因组杂合度高,存在大量多态性,以往采用的形态解剖、生理生化等方法很难对葡萄品种分类、亲缘关系、变异等进行深入的研究与分析,因而限制了葡

萄种质的收集保存、研究和充分利用。RAPD 是利用一系列引物对整个基因组DNA进行多态性检测,检测区域几乎可以覆盖整个基因组,可以检测出不同品种间的微小差异。目前,RAPD技术在果树种质上有较多应用,如果树种质资源鉴定、系谱分析和遗传关系等研究^[6]。笔者对15份葡萄材料进行RAPD研究,共扩增出71条DNA带,其中多态性DNA带47条,占总数的66.2%,说明葡萄种间存在许多基因型的差异,也说明RAPD技术是鉴定基因差异及遗传关系的有效手段。从聚类分析结果来看,大部分种的结果与植物学传统分类及葡萄品种的地理分布相吻合,能清晰看到各品种间的遗传差距和亲缘关系。有的品种虽属同一类群,但存在明显的遗传差异,如早黑宝是山西省果树研究所瑰宝为母本、早玫瑰为父本进行杂交,杂交种子经秋水仙碱处理诱变选育而成的欧亚种四倍体鲜食品种,与欧亚种皇家秋天、克林巴马克、黑比诺相差较大。具有亲缘关系近、遗传差异小的品种很早就聚在一起,如森田尼无核、无核白;美洲葡萄与欧亚类群葡萄分开。因此,在葡萄育种过程中,可以通过分子标记技术对材料进行亲缘关系鉴定及对杂交后代进行亲缘跟踪和定向选择,为杂交育种提供理论依据。

参考文献

- [1] THS P, CUSSET C. Development of stable RAPD markers for the identification of grapevine rootstocks and the analysis of genetic relationships[J]. Am J Erol Vitic, 1997, 48(44): 492-501.
- [2] 罗素兰. 中国野葡萄资源的RAPD标记及其应用研究[D]. 杨凌: 西北农业大学, 1999.
- [3] 王关林, 方宏均. 植物基因工程原理与技术[M]. 北京: 科学出版社, 1998: 370-372.
- [4] DOYLE J J. Isolation of plant DNA from fresh tissue[J]. Focus, 1990, 12: 13-15.
- [5] 王军, 贺普超. 山葡萄基因组DNA提取及RAPD鉴定[J]. 果树科学, 2000, 17(2): 79-82.
- [6] 张颖君, 高慧敏, 张学英. 分子标记在果树种质资源和育种上的应用[J]. 河北农业大学学报, 2003, 26(3): 93-96.