

葡萄属植物种质资源遗传多样性的 RAPD 分析*

侯鸿敏,李慧娥,肖 欢,王西平*

(西北农林科技大学 园艺学院,农业部西北园艺植物种质资源与应用重点开放实验室,陕西杨凌 712100)

摘 要:以起源于中国的野葡萄 12 个种 23 个株系、欧美杂种 6 个品种、河岸葡萄 3 份、15 个欧洲葡萄品种共 47 份材料为试材,采用 RAPD 技术对葡萄属植物种质资源遗传多样性进行研究。从 520 个随机引物中获得 16 个多态性好的引物用于 RAPD 分析,共获得 DNA 条带 258 个,其中多态性条带 186 个,DNA 条带大小介于 100~3 500 bp 之间。应用 STATISTICA 获得了 47 份葡萄材料树谱图,供试材料可分为 6 类。欧洲葡萄、欧美葡萄杂种、河岸葡萄与中国野葡萄亲缘关系较远。在中国野葡萄中,山葡萄与其他种亲缘关系较远,刺葡萄次之。

关键词:葡萄;RAPD;种质资源;遗传多样性

中图分类号:Q946-33

文献标识码: A

文章编号:1004-1389(2010)03-0154-05

Genetic Diversity Based on Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) in *Vitis*

HOU Hongmin,LI Huie,XIAO Huan and WANG Xiping*

(College of Horticulture,Key Laboratory of Northwest Horticulture Plant Germplasm and Application of Agriculture Ministry,Northwest A&F University,Yangling Shaanxi 712100,China)

Abstract: Genetic diversity among 47 genotypes of grape,including a set of 23 genotypes of 12 wild *Vitis* species native to China,six inter-specific hybrids (*V. vinifera* × *V. labrusca*),three clones of *V. riparia*,and fifteen *V. vinifera* L. cultivars,was investigated based on RAPD analysis. Sixteen polymorphic random primers were selected for the further analysis from the screening of 520 oligonucleotide primers. A total of 186 polymorphic RAPD markers among 258 bands,size ranging from 100 bp to 3500 bp,were produced from the 16 selected primers. Relationships among the 47 clones or accessions based on their genetic distances were clustered using unweighted pair-group method arithmetic average (UPGMA) analysis in a dendrogram. Forty-seven grape species were clustered to six groups. The largest distance was found between *V. vinifera*,*V. riparia*,inter-specific hybrid (*V. vinifera* × *V. labrusca*) and the wild grapes native to China. Among the wild *Vitis* species native to China,the largest distance was found between *V. amurensis* and the other wild species.

Key words: Grape; RAPD; Germplasm resource ; Genetic diversity

葡萄属于葡萄科葡萄属,共有 70 余种。关于葡萄属植物种质资源的遗传多样性,前人曾用形态学、细胞学和同功酶技术作过一些研究和探讨,

但由于该属内种间易杂交,中间型、过渡型性状普遍,加之易受环境和生长发育时期的影响,给葡萄属植物分类和种质资源多样性研究带来许多困

* 收稿日期:2009-08-12 修回日期:2009-10-15
基金项目:国家自然科学基金(30871701 和 30671446);教育部新世纪优秀人才支持计划及陕西省自然科学基金计划(2005C106)项目资助。
作者简介:侯鸿敏(1985 —),女,在读博士研究生,研究方向为果树生物技术与育种。E-mail:houghongmin@163.com
* 通讯作者:王西平,教授,博导,主要从事果树生物技术与育种及园艺植物种质资源与生物技术研究。E-mail:wan-gxiping@nwsuaf.edu.cn

难^[1-3]。近年来,随着现代生物技术的快速发展,DNA 分子标记技术将种质资源的研究提高到了一个崭新水平^[4],为果树品种鉴定和亲缘关系研究提供了有效的手段。随机扩增多态性 DNA (Randomly amplified polymorphic DNA,RAPD) 技术作为近年来发展最快的一种分子标记技术,由于它具有样品用量少(通常 15~25 ng)、灵敏度高、特异性强和检测容易的特点,且此技术简单易行、分析自动化,实验成本低,因而已被广泛应用于果树的亲缘关系、品种鉴定和遗传多样性研究中。近年对葡萄属植物的研究也有一些报道。Gogorcena 等^[5]先后对 31 个栽培葡萄品种进行 RAPD 分析,从中选出可重复带型,可正确区分所有品种的无性系等。王跃进等^[6]用 RAPD 技术在幼苗期鉴定了圆叶葡萄和真葡萄亚属的杂交种,获得了多态性片段。张立平等^[7]用 RAPD 技术对葡萄属的 20 个种、4 个变种、5 个品种及 4 个不同类型进行分析,供试材料可分为 9 类和 1 个特殊型,起源于中国的东亚类群分属于 8 个类型,圆叶葡萄单独为 1 个类型。本研究采用 RAPD 技术和类平均法^[8]对起源于中国的野生葡萄、欧美杂种、河岸葡萄、欧洲葡萄等 47 份葡萄材料进行分类和遗传多样性研究,探讨种间及种内的遗

传关系,为葡萄育种研究提供分子系统学资料。

1 材料与方法

1.1 葡萄材料

供试葡萄材料取自西北农林科技大学葡萄种质资源圃,包括起源中国的野葡萄 12 个种 23 个株系,欧美种间杂种 6 个品种,河岸葡萄 3 份,15 个欧洲葡萄品种共 47 份材料(表 1)。

1.2 葡萄基因组 DNA 的提取

葡萄基因组 DNA 的提取采用改良 CTAB 法^[9]。

1.3 DNA 扩增和琼脂糖凝胶电泳

从 Operon 公司购置的 OPA01~OPZ20 共 26 个系列的 520 个随机引物用于 RAPD 扩增,筛选出条带清晰,多态性好的引物用于进一步分析。RAPD 反应体系和反应程序参照文献^[12]的方法进行。扩增产物跑 1.2% 琼脂糖凝胶电泳约 40 min,在紫外透射仪下照相,分析统计结果。

1.4 葡萄材料分类和遗传多样性分析

用筛选出多态性好的随机引物分别扩增 47 份葡萄材料 DNA,记录每份 DNA 的 RAPD 带型,有带时赋 1,无带时赋 0,建立(0,1)矩阵,用 STATISTICA 软件进行聚类分析。

表 1 试验用葡萄材料
Table 1 Grape materials used in this experiment

种 Species	编号 No.	株系 Clone	种 Species	编号 No.	品种 Cultivar
毛葡萄 <i>V. quinquangularis</i> Read	1	商-24 Shang-24	斐斐葡萄 <i>V. adstricta</i> Hance 欧美杂种 Interspecific hybrid (<i>V. vinifera</i> × <i>V. labrusca</i>)	25	雪峰 Xuefeng
	2	83-4-96 ♂		26	泰山-1 Taishan-1
	3	83-4-94 ♂		27	京超 Jingchao
	4	泰山-12 Taishan-12		31	巨峰 Kyoho
Berlandier-riparia	5	SO4 Selection Oppenheim	欧洲葡萄 <i>V. vinifera</i> L.	41	先峰 Pioneer
桑叶葡萄 <i>V. ficifolia</i> Bunge	6	桑叶葡萄		42	高墨 Takasumi
复叶葡萄 <i>V. piasezkii</i> Maxim	7	留坝-8 Liuba-8		43	早生高墨 Early-Takasumi
秋葡萄 <i>V. romanetii</i> Roman	18	宁固-1 Ninggu-1		44	富士 Fujiminori
	8	江西-2 Jiangxi-2		28	雷司令 Riesling
	19	江西-1 Jiangxi-1		29	先索 Cinsaut
	20	平利-7 Pingli-7		30	蜜红 Honny Red
华北葡萄 <i>V. bryoniifolia</i> Bunge	21	留坝-11 Liuba-11		32	龙眼 Longyan
	11	安林-2 Anlin-2 ♂		33	玫瑰香 Muscat Rose
	9	Pulliat		34	乍那 Zana
	10	Beaumont		35	佳利酿 Carignane
秦岭葡萄 <i>V. qinlingensis</i> P. C. He	12	秦岭葡萄 Qinling Putao		36	白玉霓 Ugli Blanc
山葡萄 <i>V. amurensis</i> Rupr.	13	通化-3 Tonghua-3		37	品丽珠 Cabernet Franc
华东葡萄 <i>V. pseudoreticulata</i> W. T. Wang	14	商南-1 Shangnan-1		38	红地球 Red Globe
	15	广西-1 Guangxi-1		39	赤霞珠 Cabernet sauvignan
	16	留坝-7 Liuba-7		40	瑞必尔 Ribier
秋复叶葡萄 <i>V. spp.</i> (Qiufuyie)	17	白河-40 Baihe-40		45	爱格丽 Ecolly
麦黄复叶葡萄 <i>V. baihensis</i> L. X. Niu	22	略阳-4 Lueyang-4		46	梅鹿特 Merlot
刺葡萄 <i>V. davidii</i> Foex	23	宁强-6 Ningqiang-6		47	凤凰-51 Fenghuang-51
	24	塘尾 Tangwei			

2 结果与分析

2.1 葡萄属植物基因组 DNA 多态性

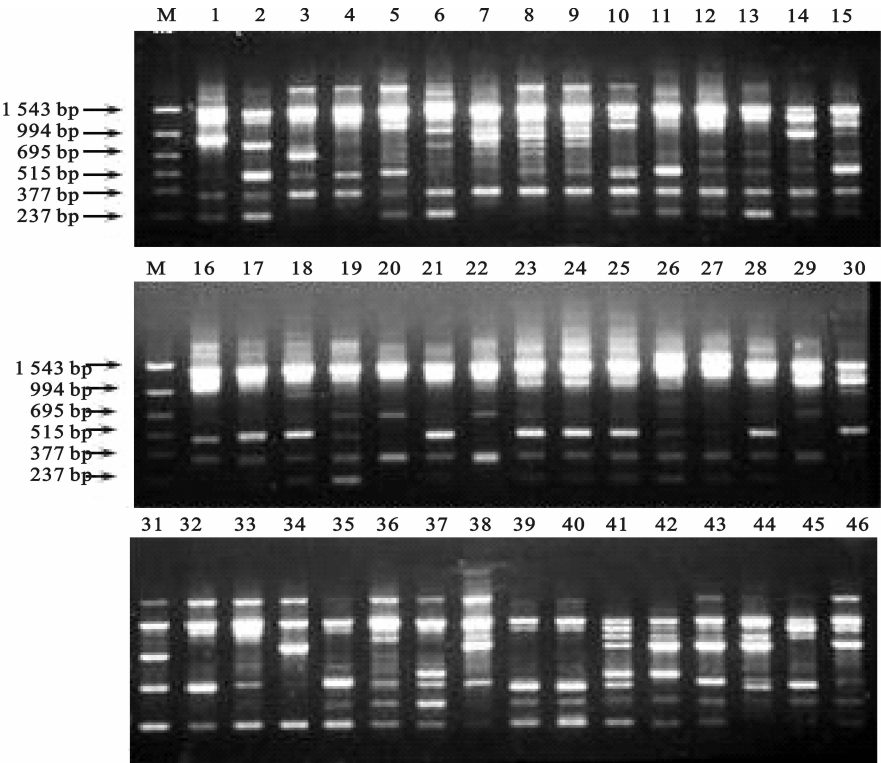
首先以毛葡萄商-24 的 DNA 为模板,从 OPA01~OPZ20 等 26 个系列的 520 个随机引物中选出 16 个条带清晰,多态性好的引物用于葡萄种质资源遗传多样性分析(表 2)。结果表明,所有 47 份葡萄材料中,16 个引物共获得 DNA 条带 258 个,其中多态性条带 186 个,约占总条带数的

72.1%。不同引物产生的条带数不同(图 1),引物 OPB06 扩增的条带最多为 24 个,引物 OPU20 最少为 7 条,平均每个引物获得 DNA 条带 16.1 个。扩增 DNA 条带大小介于 100~3 500 bp 之间,大多数介于 200~2 200 bp 之间。47 份葡萄材料中,每个引物扩增总的条带数也不同,毛葡萄最多 138 条,龙眼、红地球、刺葡萄宁强-6 较少,介于 89~102 条之间。

表 2 随机引物及 DNA 扩增条带

Table 2 DNA bands amplified by random primers in grape materials

引物 Primer	序列 Sequence	总条带 Total bands of amplification	多态性条带数 Polymorphic bands	每模板平均条带 Average amplified bands per template	多态性百分率/% Percent of polymorphism
OPA15	5'TTCCGAACCC	15	10	6.5	66.7
OPB06	5'TGCTCTGCCC	24	20	10.0	83.3
OPB12	5'CCTTGACGCA	18	14	6.5	77.8
OPQ03	5'GGTCACCTCA	17	12	7.5	70.6
OPW02	5'ACCCGCCCAA	14	9	5.5	64.3
OPW01	5'CTCAGTGTCC	21	15	7.5	71.4
OPJ03	5'TCTCGCTTG	15	11	7.0	73.3
OPO07	5'CAGCACTGAC	10	6	5.0	60.0
OPV02	5'AGTCACTCCC	21	13	9.0	61.9
OPV05	5'TCCGAGAGGG	11	7	4.5	63.6
OPJ13	5'CCACACTACC	19	13	7.5	68.4
OPJ19	5'GGACACCACT	16	13	8.0	81.2
OPU20	5'ACAGCCCCCA	7	4	3.5	57.1
OPQ04	5'AGTGCCTGA	23	16	8.5	69.6
OPJ07	5'CCTCTCGACA	12	6	6.0	50.0
OPV07	5'GAAGCCAGCC	15	8	5.0	53.3
Total bands		258	186		



品种名编号同表 1 No. of the 46 samples are the same as Table 1

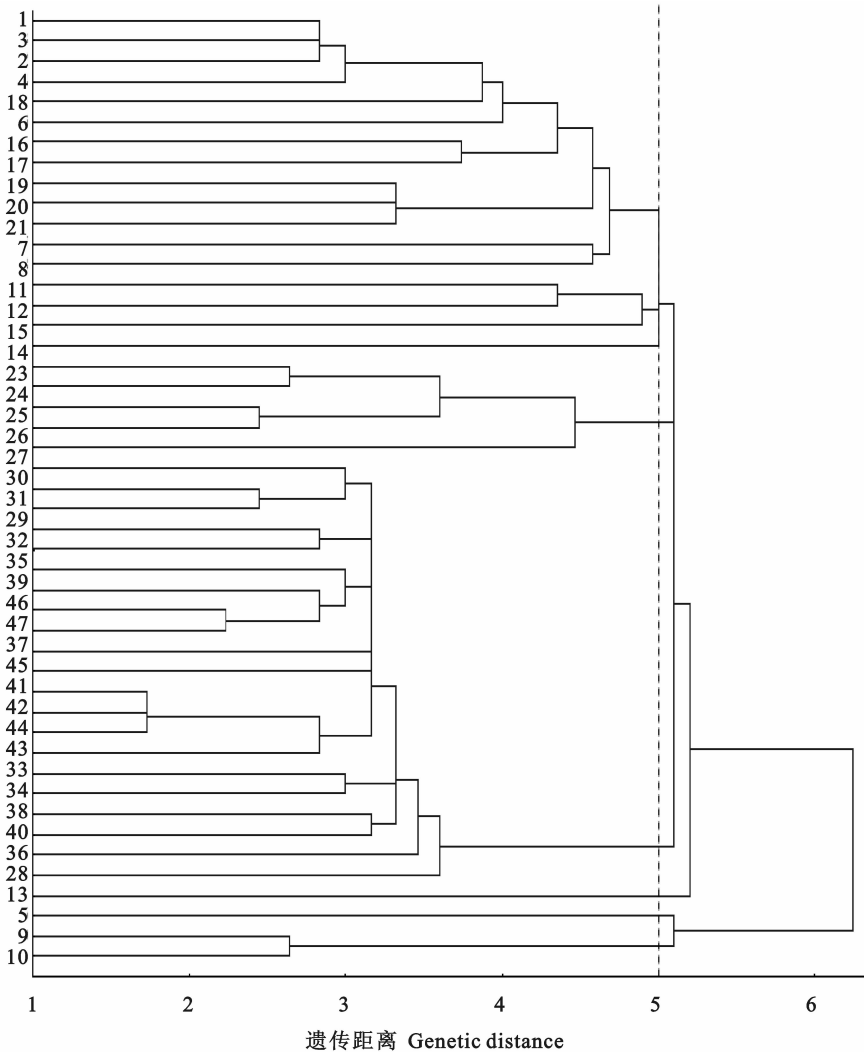
图 1 引物 OPB12 对 46 个葡萄基因型扩增产物的琼脂糖电泳

Fig. 1 RAPD fingerprints amplified by primer OPB12 in 46 grape genotypes

2.2 聚类分析

将 RAPD 扩增条带按 1.4 方法处理,用 STATISTICA 绘制 47 份葡萄材料树状图(图 2)。聚类分析结果表明,欧洲葡萄、欧美葡萄杂种、河岸葡萄与中国野葡萄亲缘关系较远。在中国野葡萄中,山葡萄与其他种亲缘关系较远,刺葡萄次之。按图 2 可把 47 份材料聚为 6 类。Pulliat 和 Beaumont 同属河岸葡萄,聚在第一类。匈牙利选育的 Berlandier-riparia 株系 SO4 与山葡萄株系通化-3 分别聚在第二类和第三类。第四

类是 6 类中最大的一类,包括京超、蜜红、巨峰、先索、龙眼、佳利酿、赤霞珠、梅鹿特、凤凰-51、品丽珠、爱格丽、先峰、高墨、富士、早生高墨、玫瑰香、乍那、红地球、瑞必尔、白玉霓和雷司令。第五类包括刺葡萄的株系略阳-4、宁强-6、塘尾、雪峰和夔夔葡萄株系泰山-1。第六类包括毛葡萄商-24、83-4-94、83-4-96、泰山-12 以及复叶葡萄宁固-1、桑叶葡萄、留坝-7、白河-40、江西-1、平利-7、留坝-11、留坝-8、江西-2、安林-2、秦岭葡萄、广西-1 和商南-1。



品种名编号同表 1 No. of samples are the same as Table 1

图 2 47 个葡萄品种的 RAPD 聚类分析树状图

Fig. 2 Tree diagram of 47 cultivars based on RAPD marker

3 讨论

RAPD 作为一种简便、快速、安全和高灵敏度的分子标记,已广泛应用于葡萄种间以及种内品种间的遗传多样性和亲缘关系分析,并得到较好

结果。Loureiro 等^[10]对来自 18 个不同地区的欧洲葡萄 Albarino,4 个与 Albarino 有亲缘关系的品种,2 个错误命名的品种,用 20 个 RAPD 引物和 6 个微卫星位点进行分析,结果证明了这些异名的品种都是 Albarino。Qu 等^[11]用 RAPD 分析

了圆叶葡萄和美洲河岸葡萄的遗传多样性,结果表明圆叶葡萄与河岸葡萄、欧洲葡萄的亲缘关系较远。吴红等^[12]对部分葡萄品种进行 RAPD 分析,认为葡萄品种间遗传一致度与品种的遗传背景有关。在本研究中,利用 RAPD 技术对葡萄的 47 个品种进行遗传多样性分析,检测到的葡萄种质多态性百分率都在 50% 以上,最高达到了 83.3%,说明葡萄种质具有较丰富的遗传多样性。

在聚类分析中,把两个样品聚为一类的依据有两种,样品间的相似性系数和样品间的距离。本研究利用 RAPD 标记对 47 份葡萄品种进行了分析,并绘制了亲缘关系树形图,从图上可以清晰看到各品种间的遗传差距和亲缘关系。聚类分析结果表明,欧洲葡萄、欧美葡萄杂种、河岸葡萄与中国野葡萄亲缘关系较远,这与牛立新、贺普超^[3]用性状分类的研究结果相一致。在中国野葡萄中,晁无疾^[1]根据同工酶研究认为毛葡萄是中国葡萄属植物中比较古老的类型,其他种分化形成时间相对较晚,牛立新^[3]的研究结果认为,菱叶葡萄与其他种类关系最远,而本研究结果表明,山葡萄与其他种亲缘关系较远。但是从牛立新^[3]、张立平^[7]及本研究结果分析认为,毛葡萄为古老类型的观点值得商榷。关于中国野生葡萄进化、起源及其古老的类型拟需综合性状特征、分子标记等手段进一步研究,为葡萄育种工作提供更系统更科学的分类资料。

参考文献：

[1] 晁无疾,袁志发. 我国葡萄属植物分类与亲缘关系的探讨[J]. 西北农业大学学报,1990,18(2): 7-11.

[2] 刘三军,孔庆山. 我国野生葡萄分类研究[J]. 果树科学, 1995,12: 224-227.

[3] 牛立新,贺普超. 我国野生葡萄属植物系统分类研究[J]. 园艺学报,1996,23: 209-212.

[4] Vanechoutle M. DNA fingerprinting techniques for micro-organisms. A proposal for classification and nomenclature. Mol Biotechnol,1996,6:115-142.

[5] Gogorcena Y. Evaluation of RAPD maker consistency for detection of polymorphism on apricot [J]. Scientific Horticultural,1994,59:163-167.

[6] 王跃进,卢 江. 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):17-20.

[7] 张立平,林伯年,沈德绪,等. 葡萄属 RAPD 分类研究[J]. 园艺学报,1998,25(2): 191-193.

[8] NEI M,LI W H. Mathematical mode for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases [J]. Proc Natl Acad Sci USA,1979,76: 5269-5273.

[9] 罗素兰,贺普超,郑学勤,等. 中国野生葡萄遗传多样性的 RAPD 分析[J]. 植物学报,2001,43 (2): 158-163.

[10] LoureiroM D,Martinez M C. Molecular marker analysis of *Vitis vinifera*Albarino and some similar grape vine cultivars [J]. J Amer Soc Hort Sci,1998,125(5):842-949

[11] QU X,LU J,LAMIKANRA O. Genetic diversity in Muscadine and American bunch grapes based on randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis [J]. J Amer Soc Hort Sci,1996,121:1020-1023.

[12] 吴 红,常永义,郝 燕,等. 利用 RAPD 标记研究部分葡萄品种的亲缘关系[J]. 果树学报,2008,25(6): 932-936.