昆明学院学报 2014,36(6):23~26 CN 53-1211/G4 ISSN 1674-5639
Journal of Kunming University

弥勒市8个主栽葡萄品种亲缘关系的ISSR鉴定

张永福,陈泽斌,彭声静,牛燕芬,郑 旰,莫丽玲,韩 丽*
(昆明学院 农学院,云南 昆明 650214)

摘要:为探明弥勒市8个主栽葡萄品种的亲缘关系,研究以这8个葡萄品种为材料,利用ISSR分子标记技术进行基因组多态性检测,从40条ISSR随机引物中筛选出10条用于ISSR扩增.结果显示,筛选出的这10条引物共扩增出81条谱带,其中66条为多态性谱带,多态性百分率较高,为79.9%;根据ISSR的扩增结果进行相似性系数分析,8个葡萄品种的遗传相似性系数在0.50~0.78之间,平均为0.647;通过UPGMA进行聚类分析,在遗传相似性系数为0.58处,8份试材分为2大类群,其中第1大类群包含3份欧美杂种品种和1份未知来源品种,第2大类群包含4份欧亚种品种.由此推测未知来源的这一品种属于欧美杂交种品种.

关键词:葡萄;ISSR;亲缘关系;聚类分析
中图分类号:S663.1 **文献标识码**:A **文章编号**:1674-5639(2014)06-0023-04

ISSR Identification of Genetic Relationship of the 8 Main Grape Cultivars in Mile

ZHANG Yong-fu, CHEN Ze-bin, PENG Sheng-jing, NIU Yan-fen, ZHENG Xu, MO Li-ling, HAN Li*
(College of Agriculture, Kunming University, Yunnan Kunming 650214, China)

Abstract: In order to explore the genetic relationship of 8 main grape cultivars in Mile city, the 8 grape cultivars were used as materials for analyzing their genome polymorphism by ISSR markers. 10 primers selected from 40 primers were used for ISSR amplification. The results show a total of 81 bands were amplified by the 10 primers, of which 66 bands were polymorphic bands, and the percentage of polymorphic band was 79.9%. According to the results of PCR amplification of ISSR, similarity coefficient was analyzed. The genetic similarity coefficient was 0.50—0.78 in 8 grape cultivars, and the average was 0.647. The clustering analysis was constructed by UPGMA method. The 8 grape cultivars were divided into two major groups while the similarity coefficient was 0.58. The first group included 3 cultivars of Euro-American hybrids and 1 cultivar of un-known clones. The second group included 4 cultivars of *Vitis vinifera*. Therefore, a cultivar of unknown origin belongs to the Euro-American hybrids.

Key words: grape; ISSR; genetic relationship; cluster analysis

葡萄属植物在数万年前已遍布北半球,为起源最古老的被子植物之一,由于大陆分离和冰河时期的影响,发展形成了60多个种[1],分布于世界温带或亚热带地区.我国约有38个种,其中葡萄(*Vitis vinifera* L.)是世界著名的水果和酿酒原料,栽培历史悠久[2].据统计[3]全世界葡萄品种有8 000个以上,但这很可能并不符合实际情况,因为不同地区及国家之间交流频繁,引种中误命名及重命名的情况多有发生,同名异物或同物异名现象十分普遍[4].另外,种系间尤其是芽变系间的差异并不十分明显,也给品种的区分带来困难.过去主要采用的形态鉴别法容易受到环境条件和观察者主观因素的双重影响,而且形态鉴别一般需要涉及果实经济性状,在结果之前难以进行[4],但通过DNA标记技术可以较好地解决这一问题.

开展对果树同一种中的不同品种的亲缘关系及遗传多样性研究,对果树种质资源收集、核心种质保存、乃至新品种的选育均具有十分重要的意义,特别是像葡萄这类品种繁多的果树[5].在各应用广泛的DNA分子标记中,来源于植物基因组中丰富的简单序列重复的ISSR(英文全写为inter-simple sequence repeat polymorphic DNA),是一种由2~4个随机的核苷酸锚定在微卫星序列的3'或5'端组成的单引物进行重复序列间DNA的PCR扩增[6].与之前的RFLP和RAPD标记技术相比,ISSR标记技术操作简便、易于掌握,仅需使用少量的模板DNA,所得到的结果可重复性高.正是由于这些优点,该标记被广泛地应用于分析果树种间或品种间的亲缘关系[7]、分析遗传多样性[8]、确定各种果树的核心种质、鉴定果树新品种[9-10]及构建遗传连锁图谱等[11-12].本研究通过改良CTAB法从葡萄幼叶中提取基因组DNA,然后应用操作简便的ISSR分子标记技术,研究了云南省弥勒市东风管理局主栽的8个葡萄品种的亲缘关

收稿日期:2014-09-09
作者简介:张永福(1981—),男,云南弥勒人,副教授,博士,主要从事果树和观赏园艺遗传育种研究.
*通讯作者:韩丽(1970—),女,云南弥勒人,高级讲师,硕士,主要从事农业生态方面的研究,E-mail:1034883776@.com.

系,从 DNA 水平上为评价葡萄品种资源的遗传多样性及确定核心种质提供理论依据.

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料来源于云南省弥勒市东风管理局,其中包括 3 个欧美杂种品种、4 个欧亚种品种和 1 个未知来源品种,见下表 1. 试验在云南大学植物遗传育种与改良实验室进行.

1.2 基因组 DNA 的提取及检测

采用改良 CTAB 法从葡萄幼叶中抽提基因组 DNA. 具体方法如下:1)称取 0.1 ~0.2 g 葡萄幼叶于研钵中,加入少量液氮、PVP 及 β-巯基乙醇充分研磨成糊状,再加入 800 μL 65 ℃预热的 2 ×CTAB,充分混匀后转入 2 mL 离心管;2)65 ℃中水浴 30 min,并轻轻摇动几次;3)加入等体积的氯仿/异戊醇[V(氯仿):V(异戊醇) = 24:1],室温放置 10 min;4)10 000 r/min,4 ℃离心 10 min;5)取上清液于另一支 1.5 mL 的离心管中,重复步骤 3)和 4);6)取上清加入 2/3 体积(-20 ℃预冷)异丙醇,颠倒混匀,可看到絮状 DNA 沉淀,置于 -20 ℃冰箱 2 h;7)10 000 r/min,4 ℃离心 10 min,弃上清,再用体积分数为 70% 乙醇 500 μL 清洗沉淀,8 000 r/min 离心 2 min,弃上清;8)将沉淀风干后溶于 300 μL TE,加入 1 μL Rnase A 液,37 ℃水浴 30 min;9)取出后 10 000 r/min,4 ℃离心 10 min,取上清,重复步骤 6)和 7);10)将所得 DNA 溶于 100 μL TE 中,-20 ℃保存备用.

表 1 葡萄材料

编号	品种名称	来源	采集地
1	玫瑰蜜(Rose honey)	欧美杂交种(Euro-American hybrids)	1 ~8 来自云南省弥勒市东风管理局
2	水晶(Shuijing)	欧美杂交种(Euro-American hybrids)	
3	红玫瑰(Red rose)	欧美杂交种(Euro-American hybrids)	
4	红地球(Red globe)	欧亚种(*Vitis Vinifera*)	
5	京秀(Jingxiu)	欧亚种(*Vitis vinifera*)	
6	青提 (Qingti)	欧亚种(*Vitis Vinifera*)	
7	早黑蜜(Zaoheimi)	欧亚种(*Vitis vinifera*)	
8	超级无核(Chaojiwuhe)	未知(Un-known)	

取 5 μL 提纯后的 DNA 溶液,于 1.0% 琼脂糖凝胶(含 EB 0.5%)电泳,在紫外透射反射分析仪下观察分析其 DNA 的质量浓度与纯度.

1.3 DNA 扩增和电泳

采用 20 μL 反应体系,其中含 11.8 μL dd H_2O, 2 μL 10 ×PCR buffer,2.5 mmol/L $MgCl_2$,0.15 mmol/L dNTPs,1.5 U Taq DNA 聚合酶,40 ng 模板 DNA, 0.5 μmol/L 引物.

ISSR 引物由北京奥科生物技术公司合成,序列由加拿大哥伦比亚大学(UBC)提供[13]. 其余本试验用于 ISSR-PCR 扩增的 Taq DNA 聚合酶、Marker DL 2 000 以及 dNTPs 由上海生物工程公司提供.

PCR 反应在德国 Eppendorf 公司生产的 PCR 仪上进行,程序设置为:预变性 5 min 94 ℃→变性 35 s 94 ℃(35 个循环)→退火 45 min 52 ℃(35 个循环)→延伸 1 min 72 ℃(35 个循环)→延伸 7min 72 ℃→4 ℃保存. 扩增后的产物在质量浓度为 0.5 μg/mL EB 的 1.2% 琼脂糖凝胶上进行电泳分离,在紫外透射反射仪下观察,数码拍照,人工记录数据.

1.4 试验数据的获得与分析

根据各 ISSR 分子标记在相同电泳迁移率,即相同相对分子质量片段的有无进行统计,得到所有位点的二元数据,扩增出 DNA 条带的记为 1,没有扩增出条带的记为 0. 相似性系数用 NTSYS pc 2.10e 软件进分析,聚类分析(UPGMA)用非加权配对算术平均法,最后绘制亲缘关系树系图.

2 结果与分析

2.1 提取的基因组 DNA 检测结果及多态性分析

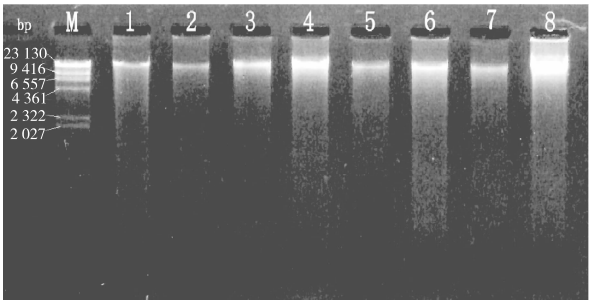
由下图 1 可看出,从 1 ~8 号试验材料中均抽提出了 ISSR 分子标记所需的基因组 DNA,其中 4 号和 8 号试材的 DNA 提取质量浓度较高,而 2 号和 5 号的质量浓度较低,各试验材料的 DNA 样品质量浓度和纯度均达到了 ISSR-PCR 的要求,可用于扩增.

ISSR 引物筛选使用的材料是 4 号和 8 号葡萄品种,用这两个品种的材料对 40 条 ISSR 引物进行了筛选,其中扩增条件清晰、多态性条带较高的有 10 条,因此确定用这 10 条引物进行本试验葡萄材料的扩增(见下表 2). 这些筛选出的引物能够扩增出清晰的谱带,且具有丰富的多态性(见下图 2). 这 10 条引物共扩增出 81 条谱带,其中多态性谱带为 66 条,多态性百分率为 79.9%. 在这 10 条引物中,所有引物扩增所获得的谱带数在 4 ~12 条之间,平均为 8 条,扩增后所获得的 DNA 片段长度在 100 ~3 000 bp 之间,其中多数片段长度为 500 ~2 000 bp. 引物 ISSR23 扩增谱带数最多,其碱基序列号为 $(CT)_8(AG)G$,扩增出 12 条谱带;扩增谱带数最少的引物为 ISSR22,碱基序列号为 $(CT)_8T$,扩增出的

谱带数为 4 条. 其中,多态性百分率最高的引物为 ISSR06,碱基序列号为 $(CT)_8(AG)C$,多态性达 100%;多态性最低的为 ISSR32,碱基序列号为 $(CACGAC)_4$,多态性为 67%. 由此可见,通过 ISSR 分子标记技术分析葡萄品种遗传多样性的效率较高,试验结果也反映了葡萄品种的遗传多样性极为丰富.

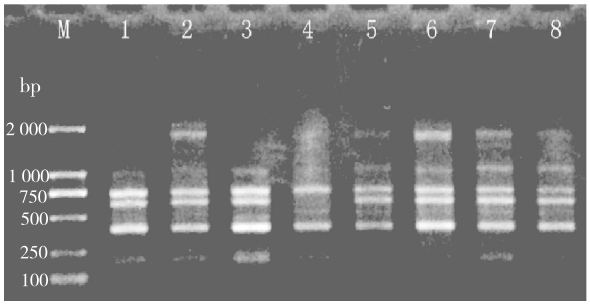
表 2　不同引物的碱基序列及 ISSR 扩增结果

引物编号	引物碱基序列(5'-3')/%	扩增总带数/条	多态性带数/条	多态性位点百分率/%
ISSR06	$(CT)_8(AG)C$	10	10	100
ISSR21	$(CT)_8(AG)T$	11	9	82
ISSR22	$(CT)_8T$	4	3	75
ISSR23	$(CT)_8(AG)G$	12	10	83
ISSR25	$(AG)_8CG$	9	7	78
ISSR26	$(GA)_8(CT)G$	8	6	75
ISSR28	$(GT)_8(CT)C$	9	8	89
ISSR30	$(TG)_8(AG)G$	5	4	80
ISSR31	$(CA)G_5$	7	5	71
ISSR32	$(CACGAC)_4$	6	4	67
总计		81	66	799
平均		8.1	6.6	79.9



M. λDNA/Hind Ⅲ.

图1　改良CTAB法提取葡萄DNA的电泳结果



1～8葡萄样品(泳道顺序同表1)

图2　引物ISSR26对葡萄基因组DNA的扩增谱带

2.2　聚类分析

下表 3 显示,8 份葡萄材料的遗传相似系数在 0.50 ~0.78 之间,平均为 0.647. 其中,玫瑰蜜和水晶的遗传相似性系数最大,为 0.777 8;玫瑰蜜和青提的遗传相似性系数最小,为 0.506 3. 由下图 3 可知,8 份葡萄品种在遗传相似性系数为 0.58 处被分为 2 大类群. 第 1 大类群包含玫瑰蜜、水晶、红玫瑰等 3 个欧美杂交种品种和 1 个未知来源的品种超级无核. 在第 1 类群中,欧美杂交种葡萄间的平均遗传相似性系数为 0.683,其中玫瑰蜜和水晶最大,为 0.777 8;红玫瑰与玫瑰蜜及红玫瑰与水晶的遗传相似性系数相同,均为 0.691 3;而超级无核与水晶较小,为 0.654 3. 第 2 大类包含红地球、京秀、青提、早黑蜜等 4 个欧亚种品种,其中青提与早黑蜜的遗传相似性系数最大,为 0.740 7;红地球与京秀次之,为 0.716 0;而红球和青提则最小,为 0.666 7. 由于未知来源的葡萄品种超级无核与欧美杂交种品种聚为一类,因此可初步推测该品种也来源于欧美杂交种品种.

表 3　8 个葡萄品种的相似系数矩阵

材料	玫瑰蜜	水晶	红玫瑰	红地球	京秀	青提	早黑蜜	超级无核
玫瑰蜜	1.000 000 0							
水晶	0.777 777 8	1.000 000 0						
红玫瑰	0.691 358 0	0.691 358 0	1.000 000 0					
红地球	0.592 592 6	0.567 901 2	0.580 246 9	1.000 000 0				
京秀	0.604 938 3	0.580 246 9	0.641 975 3	0.716 049 4	1.000 000 0			
青提	0.506 172 8	0.530 864 2	0.543 209 9	0.666 666 7	0.728 395 1	1.000 000 0		
早黑蜜	0.592 592 6	0.592 592 6	0.629 629 6	0.703 703 7	0.691 358 0	0.740 740 7	1.000 000 0	
超级无核	0.703 703 7	0.654 321 0	0.691 358 0	0.691 358 0	0.679 012 3	0.604 938 3	0.716 049 4	1.000 000 0

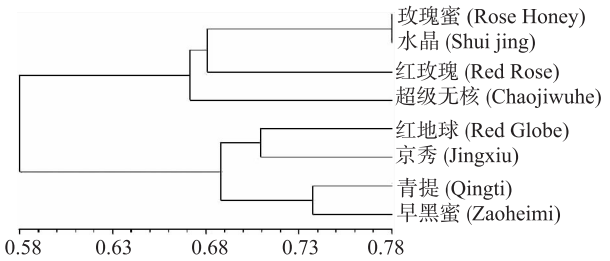


图3 基于ISSR扩增结果绘制的葡萄品种亲缘关系树状图

3 结论与讨论

目前,已有较多的研究[14-16]报道了应用 RFLP, RAPD, AFLP 和 SSR 等分子标记技术对葡萄品种进行鉴定,并分析各品种间的遗传多样性及亲缘关系等. 为了构建 30 个葡萄砧木品种的系统进化树, Cuisset 等[15]通过 RAPD 分子标记技术进行分析,结果发现 RAPD 分子标记所获得的进化树与形态学结果相符,正确反映了供试品种之间的亲缘关系. Bowers 等[14]利用 49 个 RFLP 分子标记,分析了 34 个葡萄品种的遗传相似性系数,发现供试品种之间的平均相似系数为 0.696,其中 33 个欧洲种的葡萄品种平均相似性系数为 0.705,最高达 0.952. 此外,还利用 SSR 分子标记技术成功地鉴定了葡萄酿酒品种 Cabernet Sauvignon 的亲本[16].

到目前为止,仅有较少的研究通过 ISSR 标记技术分析葡萄品种的遗传多样性. Moreno 等[17]报道了利用 2 种电泳方法和 12 个 ISSR 引物均不能在不同来源的 12 个变异葡萄品种单株中检测到多态性,可见,这些单株虽然表现型发生了改变,但其基因型发生的分化还不明显. 此外,为了分析山葡萄、欧亚种与美洲种 3 者之间的遗传距离,唐宇宏等[18]通过 ISSR标记技术对黑龙江西部的 9 个葡萄品种进行分析,并较好的将其区分开来. 本研究选取云南省弥勒市东风管理局栽培的 8 个葡萄品种,利用 ISSR 分子标记技术探讨了这 8 个品种的亲缘关系,结果表明,未知来源的 1 个品种超级无核与 3 个欧美杂交种品种聚合成一大类群,从而推测该品种也属于欧美杂交种品种,这与其形态特征的分析结果一致. 欧美杂种的 3 个品种玫瑰蜜、水晶、红玫瑰在遗传相似系数为 0.68 处分为两个亚类,玫瑰蜜与水晶遗传相似性系数最大,为 0.778,二者聚为一组,红玫瑰单独聚为一组. 欧亚种的 4 个品种红地球、京秀、青提、早黑蜜在遗传相似性系数为 0.686 处分为两个亚类,红地球与京秀聚为一组,说明这两个品种的遗传相似性系数相对较大,青提与早黑蜜聚为另一组,也说明两者的遗传相似系数也相对较大. 本研究表明,可通过 ISSR 分子标记技术对葡萄种质资源及品种之间的亲缘关系进行分析及分类,为葡萄新品种选育及杂种亲本的选择选配提供理论依据.

[参考文献]

[1] 孙庆山. 中国葡萄志[M]. 北京:中国农业科学技术出版社,2004.

[2] 李朝銮. 中国植物志:第四十八卷(第二分册)[M]. 北京:科学出版社,1998:136.

[3] 杨庆山. 葡萄生产技术图书[M]. 郑州:河南科学技术出版社,2000.

[4] 林顺权. 园艺植物生物技术[M]. 北京:高等教育出版社,2005:325-326.

[5] YE G N, SOYLEMEZOGL G, WEEDN N F, et al. Analysis of the relationship between grapevine cultivars, reports and clones via DNA finger printing[J]. Vitis, 1998, 37 (1): 33 – 38.

[6] ZIETKIEWICZ E, RAFASKI A, LABUDA D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification[J]. Genomics, 1999, 20: 176 – 183.

[7] POTTER D, GAO F Y, AIELLO G, et al. Inter-simple sequence repeat markers for fingerprinting and determining genetic relationships of walnut (Juglans regia) cultivars[J]. Journal of the American Society for Horticultural Science, 2002, 127: 75 – 81.

[8] REGNER F, STADLBAUER A, EISENBELD C, et a1. Molecular makers for genotyping grapevine and for identifying clones of traditional varieties[J]. Acta Horticulturae, 2001, 546: 331 – 341.

[9] GOULAO L, OLIVEIRA C M. Molecular characterization of cultivars of apple (Malus domestica Borkh.) using micro satellite (SSR and ISSR) markers[J]. Euphytica, 2001, 122: 81 – 89.

[10] MONTE C L, GOULAO L, OLIVERIRA C. ISSR analysis of cultivars of pear and suitability of molecular markers for clone discrimination [J]. J Amer Soc Hort Sci, 2001, 126: 517 – 522.

[11] ROOSE M L, FENG D, CHENG F S, et a1. Mapping the citrus genome[J]. Acta-Horticulturae, 2000, 535: 25 – 32.

[12] SANKAR A A, MOORE G A. Evaluation of inter-simple sequencerepeat analysis for mapping in Citrus and extension of the geneticlinkage map [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2001, 102: 206 – 214.

[13] 张青林, 罗正荣. ISSR 及其在果树上的运用[J]. 果树学报, 2004, 21(1): 54 – 58.

[14] BOWERS J E, MEREDITH C P. Genetic similarities among winegrape cultivars revealed by restriction fragment-length polymorphism (RFLP) analysis[J]. J Amer Soc Hort Sci, 1966, 121 (4): 620 – 624.

[15] CUISSET T P, BOURSIQUOT J M. Development of stable RAPD markers for the identification of grapevine rootstocks and the analysis of genetic relationships [J]. AmJ Enol Vitic, 1997, 48 (4): 492 – 501.

[16] BOWERS J E, MEREDITH C P. The parentage of classic wine grape, cabernet sauvignon[J]. Nature Genetics, 1997, 16(1): 84 – 87.

[17] MORENO S, MARTIN J P, ORTIZ J M. Inter-simple sequence repeats PCR for characterization of closely related grapevine germplasm[J]. Euphytica, 1998, 101: 117 – 125.

[18] 唐宇宏, 白庆武, 林佳志. 黑龙江西部葡萄种质的 ISSR 分析[J]. 高师理科学刊, 2004, 24(4): 46 – 48.