

溪塔刺葡萄与5个野生葡萄的ISSR标记分析

魏泽平

(宁德市农业科学研究所 福建福安 355017)

[摘要]: 本文以溪塔刺葡萄和5个野生葡萄为材料, 利用 ISSR-PCR 标记技术, 对6个葡萄品种进行了标记扩增。结果表明, 溪塔刺葡萄与同是刺葡萄的金枝2号相似系数0.69, 差异较大, 说明溪塔刺葡萄可能是福建福安特有的刺葡萄品种。

[关键词]: 溪塔刺葡萄; 葡萄; 刺葡萄; ISSR

刺葡萄 (*Vitis davidii* Foëx), 葡萄科 (Vitaceae) 葡萄属真葡萄亚属东亚种群的一个种^[1], 广泛分布于陕西、甘肃、华中、华南及西南等地^[1, 2]。是我国南方丘陵山区一种宝贵的野生葡萄种质资源^[1]。福安溪塔刺葡萄是生长在福建省福安市溪塔葡萄沟的野生刺葡萄, 是福建省特有的刺葡萄品种。

ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) 标记技术分别由 Zietkiewicz^[3] 和 Wu^[4] 等人在1994年提出。它是建立在SSR基础上发展起来的一项新的标记技术, 由于其引物设计简单, 多态性高, 重复性好, 能够提供更多的信息, 已在许多动植物的种质鉴定、遗传作图、基因定位、遗传多样性等研究方面得到应用^[5]。

本文旨在利用ISSR分子标记方法, 对6种野生葡萄资源进行标记分析, 研究溪塔刺葡萄在分子水平上和其他野生葡萄资源的差异, 为溪塔刺葡萄的品种鉴定及栽培育种提供基础。

1 材料

1.1 供试材料

本试验共采集供试样品6份, 分别于2010年4月25日采自福建省宁德市农业科学研究所以及2010年5月7日采自南平市建阳, 供试样品详细目录见表1。

1.2 材料采集

新鲜嫩叶有利于DNA的提取, 所以本试验所有样品均采摘无病虫害的新鲜嫩叶。首先, 在保温箱底部放一层冰袋, 将采摘的叶片放入自封袋中, 并做好标记, 放入保温箱, 将保温箱密封带回。在实验室, 用清水冲洗叶片并风干, 装入自封袋, 做好标记。用液氮速冻后放入-40℃的冰箱中备用。

2 方法

2.1 样品DNA的制备

参考Stewart^[6]等人有关快速提取DNA的方法, 并略加改进。提取的DNA采用1%的琼脂糖凝胶电泳检测其纯度及完整性。利用紫外分光光度计检测DNA备测液260nm和280nm的吸光度A₂₆₀和A₂₈₀, 计算备测DNA的纯度、浓度和产率^[7]。根据计算所得的DNA浓度, 将DNA样品溶液用TE缓冲溶液稀释成20ng/μL备用。

2.2 ISSR-PCR扩增反应体系

ISSR-PCR扩增反应体系参照唐宇宏^[8]、吴子^[9]龙等人的方法, 并加以改进, 作为初始反应体系。PCR反应体系为:

反应体系总体积为20 μL, DNA模板 (20 ng/μL) 2 μL, 10× Buffer (含Mg²⁺) 2 μL, 引物 (10 μmol/L) 0.5 μL, dNTP (10 mmol/L) 0.4 μL, TaqDNA聚合酶 (5U/μL) 0.3 μL。

ISSR-PCR反应程序参照唐宇宏等人的方

法^[8]，并加以改进。ISSR反应程序为：

94℃预变性1.5min；94℃变性40s；53℃退火1min；72℃延伸1.5min（40个循环）；最后72℃延伸5min后于4℃保存。

3 结果与分析

3.1 ISSR-PCR扩增产物电泳结果

从60条ISSR通用引物中筛选出5个条带清晰、亮度适中、带型稳定的引物，对6个葡萄品种进行ISSR-PCR扩增。扩增结果如图1~5所示：

3.2 聚类结果

表 1 供试材料
Table1 Materials used for ISSR analysis

编号 No.	品种名称 Cultivars Name	品种类型 Variety Type	亲本 Parents
1	溪塔刺葡萄	东亚种群	——
2	金枝 2 号	东亚种群	刺葡萄品系
3	左山 1 号	东亚种群	野生山葡萄中选出
4	桂葡 1 号	毛葡萄	毛葡萄改良
5	北醇	山欧杂交种	山葡萄×玫瑰香
6	左优红	山欧杂交种	左山二×小红玫瑰

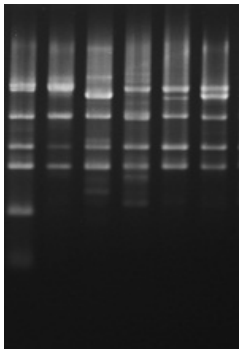


图 1

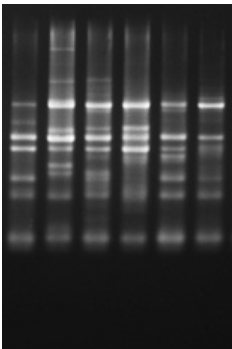


图 2

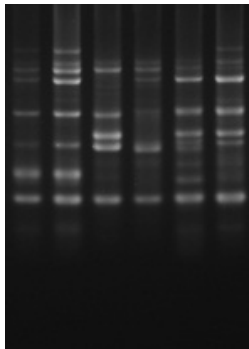


图 3

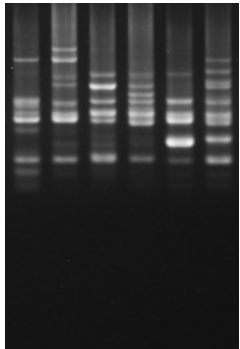


图 4

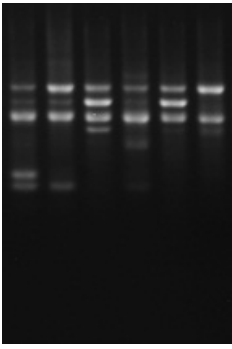


图 5

注：图 1~5 分别是引物 UBC815、UBC834、 UBC 842、 UBC 855 、UBC 879；图上编号 1~6 分别表示 1、溪塔刺葡萄，2、金枝 2 号，3、左山 1 号，4、桂葡 1 号，5、北醇，6、左优红。

6个葡萄资源的ISSR-PCR聚类结果如图6，其总的相似系数范围为0.57~0.69，说明6个葡萄资源的亲缘关系较远。其中溪塔刺葡萄与金枝2号的相似度最高为0.69，说明在6个葡萄资源中溪塔刺葡萄与金枝2号的遗传关系最近。另外，北醇与左优红在相似系数0.63处聚为一类，与其同属于山欧杂交种的遗传学背景相一致。

4 结论

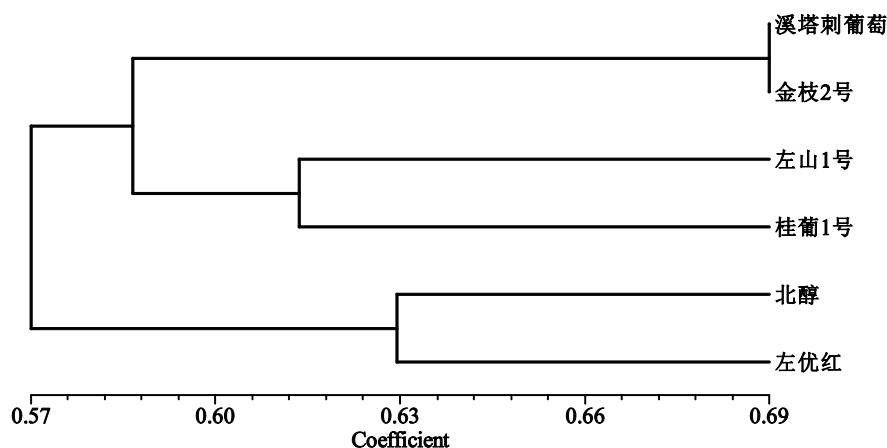


图 6

利用5条ISSR引物对溪塔刺葡萄与5种野生葡萄进行ISSR-PCR扩增，对其产物电泳并观察拍照。从图1~5可以看出，同属于刺葡萄的溪塔刺葡萄和金枝2号有所差异，每条引物均能获得差异条带。虽然溪塔刺葡萄和金枝2号虽都属于刺葡萄，但其ISSR标记位点有所不同，说明它们是生长在不同地区的不同刺葡萄品种。溪塔刺葡萄与同是东亚种群的左山1号相比，其差异较大，说明溪塔刺葡萄与左山1号虽同属东亚种群，但其亲缘关系较远。溪塔刺葡萄与桂葡1号（毛葡萄）、北醇（山欧杂交种）和左优红北醇（山欧杂交种）等野生葡萄品种也存在较大差异，说明其基因组差异较大，亲缘关系较远。

从6个葡萄资源的ISSR-PCR聚类结果可以看出，总的相似系数范围为0.57~0.69，显示它们之间的差异较大，亲缘关系较远。其中相似度最高的是溪塔刺葡萄与金枝2号，相似度达0.69，说明其遗传关系最近，与它们同属于刺葡萄的生物学背景相一致。尽管在聚类结果中溪塔刺葡萄与金枝2号最先聚合形成一类，但其相似系数为0.69，说明其基因组差异较大，很难认定其是同一品种。这也就是说，溪塔刺葡萄应是属于刺葡萄种群中与金枝2号背景不同的

另一品种。另外，北醇与左优红同属于山欧杂交种，具有相同的遗传学背景，而在聚类分析中，它们以相似系数0.63聚为一类，从而与它们的共同背景相应正。说明ISSR标记是准确的，结果是可靠的。

参考文献

- [1] 徐丰, 石雪晖, 杨国顺, 等. 湖南不同类型刺葡萄植物学性状研究 [J]. 中外葡萄与葡萄酒. 2010, 8-12
- [2] 邓洁红, 谭兴和, 王锋, 等. 刺葡萄皮花色苷的分离及检定 [J]. 中国食品学报, 2010, 10 (1): 200-206
- [3] Zietkiewicz, E., Rafalski, A., Labuda, D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification[J]. Genomics, 1994, 20 (2): 176-183
- [4] Wu, K., Jones, R., Danneberger, L., et al. Detection of microsatellite polymorphisms without cloning[J]. Nucleic acids research, 1994, 22 (15): 3257
- [5] 孙洪, 程静, 詹克慧, 等. ISSR 标记技术及其在作物遗传育种中的应用 [J]. 分子植物育种, 2005, 3 (1): 123-127

(下转第8页)

