

# 葡萄种质资源的 RAPD 分析

李玉玲, 白实践, 骆强伟, 廖新福

(新疆维吾尔自治区葡萄瓜果开发研究中心, 新疆 鄯善 838200)

**摘 要:**以采自新疆维吾尔自治区葡萄瓜果开发研究中心的 180 份葡萄材料为试材, 采用改良 CTAB 法提取葡萄 DNA, 进行了 RAPD 分析; 同时从已发表文章中选出 96 个适合于葡萄 RAPD 分析所用随机引物进行引物筛选, 旨在对供试葡萄品种进行亲缘关系的分析。结果表明: DNA 产率和纯度都较好, 产率绝大多数都在 100 ng/ $\mu$ L 以上, 可以用于 RAPD 分析; 筛选出的 21 个条带较多且清晰的引物, 通过聚类分析, 180 份材料共分为 7 类。

**关键词:**葡萄; RAPD; 聚类分析

中图分类号: S 663.102.4 文献标识码: A 文章编号: 1001-0009(2011)24-0133-05

葡萄属于葡萄科(Vitaceae Lindl)葡萄属(Vitis), 是世界上栽培历史最长, 产量最大的果树种类之一, 种质资源丰富。在长期的进化和栽培历史中形成了许多种群和品种群。现在世界上存在的葡萄品种大约有 14 000 个。由于葡萄种内变异很大, 加上种间的自然杂交以及世界范围内对葡萄的广泛繁殖, 使得葡萄的分类鉴定十分困难。近年来, 分子生物学技术中 DNA 指纹图谱的不断发展和完善, 把种质资源的研究提高到一个新水平。其中 RAPD 技术具有许多优点, 得到广泛应用。但由于其自身的局限性, 如稳定性和重复性较低等, 不同的材料在不同的实验室都会有不同结果。已经有许多学者利用 RAPD 标记对葡萄进行了抗病性、遗传多样性等方面的研究<sup>[1-3]</sup>, 该研究旨在对供试的 180 个葡萄品种进行亲缘关系的分析。

## 1 材料与方法

试验于 2009 年 11 月 2 日至 2010 年 1 月 30 日在西北农林科技大学园艺学院, 农业部西北园艺种质资源利用重点开放实验室、陕西省农业分子生物学重点实验室进行。

### 1.1 试验材料

该试验所用葡萄材料均采自新疆维吾尔自治区葡萄瓜果开发研究中心共计 180 份(表 1), 选取健壮、无病害的嫩叶, 放于 -40℃ 冰箱保存。

第一作者简介: 李玉玲(1977-), 女, 硕士, 园艺师, 现主要从事葡萄育种工作。E-mail: xingyu143508@yahoo.com.cn。

责任作者: 骆强伟(1961-), 男, 本科, 研究员, 现主要从事葡萄育种研究工作。E-mail: luowqwt@sohu.com。

基金项目: 新疆维吾尔自治区科技基础条件平台建设资助项目(PI0707); 现代农业产业技术体系建设专项资金资助项目(CARS-30-yz-5)。

收稿日期: 2011-09-21

## 1.2 试验方法

**1.2.1 DNA 的提取** 采用改良 CTAB 法提取葡萄 DNA。取冷冻叶片置于研钵中, 用液氮研磨至粉末。转入 2 mL 离心管, 加入 760  $\mu$ L 65℃ 预热的 CTAB 提取缓冲液和 20  $\mu$ L  $\beta$ -巯基乙醇, 温和混匀, 加入等体积的氯仿: 异戊醇(24:1)抽提, 温和而彻底地混合均匀, 65℃ 保温 30 min(每隔 10 min 混匀 1 次), 取出后, 降至室温, 在室温下离心(12 000 r/min 10 min)。上清液转移至洁净离心管, 加入等体积的氯仿: 异戊醇(24:1)抽提 1 次, 吸取上清液后加入 2 倍体积的预冷无水乙醇或等体积的异丙醇, 温和混匀, 可见絮状沉淀, 室温静置 30 min 后挑出置于另一离心管中, 用 75% 乙醇, 无水乙醇洗涤 2 次。倒出无水乙醇, 将沉淀物在超净工作台上短暂吹干。将沉淀物溶于 500  $\mu$ L TE, 加入 RNase A 至终浓度 20 mg/ $\mu$ L, 并于 37℃ 保温 30 min。加入等体积的氯仿: 异戊醇(24:1)抽提, 温和而彻底的混合均匀, 在室温下离心(12 000 r/min 10 min)。取上清液加入 1/10 体积的 3 mol/L NaAc 和 2 倍体积预冷无水乙醇(-20℃)轻轻混匀, -20℃ 静置 1~2 h, 挑出 DNA 用 70% 乙醇, 无水乙醇洗涤 2 次。吹干样品并溶解于 20  $\mu$ L 的 TE 溶液中备用。

**1.2.2 RAPD 反应体系** 反应体系为 25  $\mu$ L, 成分包括 500 mmol/L KCl, 100 mmol/L Tris-HCl(pH 9.0, 25℃), dATP、dCTP、dGTP、dTTP 各 250  $\mu$ mol/L, 1 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.15  $\mu$ mol/L 的引物, 28 ng 的模板 DNA, 1 U Taq DNA 聚合酶。RAPD 反应扩增程序为: 94℃ 预变性 2 min, 94℃ 变性 1 min, 36℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 2 min, 39 个循环。72℃ 延伸 10 min, 4℃ 保温。

**1.2.3 引物的筛选** 选用“火焰无核”、“醉诗仙”、“克瑞森无核”、“无核紫”为模板。从已发表文章中选出 96 个适合于葡萄 RAPD 分析的随机引物进行引物筛选<sup>[4-10]</sup>, 选用扩增重复性好, 带清晰且较多的引物。

表 1 用于 RAPD 分析的葡萄品种

Table 1 Grape cultivars used in RAPD analyses

序号 Number	材料名称 Name of material	序号 Number	材料名称 Name of material	序号 Number	材料名称 Name of material
1	“火焰无核”	61	“白哈什哈尔”	121	“醉诗仙”
2	“无核白鸡心”	62	“俄罗斯康可”	122	“黑佳酿”
3	“昆香无核”	63	“哈什哈尔”	123	“白达拉依”
4	“哈特米”	64	“特别黑大粒”	124	“白羽霓”
5	“无核白”	65	“红马拉加”	125	“巴娜蒂”
6	“温宿红葡萄”	66	“尼加拉”	126	“伊犁大白葡萄”
7	“红宝石无核”	67	“阿克塔尔”	127	“谢克兰格”
8	“紫珍香”	68	“黑比诺”	128	“白佳美”
9	“皇家秋天”	69	“盖吾沙”	129	“伏尔加顿”
10	“红阿尔纳”	70	“芳香拉查基”	130	“米勒吐尔高”
11	“列比尔”	71	“苏 67”	131	“索索葡萄”
12	“新郁”	72	“绿葡萄”	132	“白比诺”
13	“巴勒斯坦”	73	“沙比”	133	“其里干”
14	“贵妃玫瑰”	74	“瑰宝”	134	“红脸无核”
15	“高息”	75	“大考尔门”	135	“早黑园”
16	“基米亚特”	76	“微红白”	136	“瓦沙玫瑰”
17	“红旗特早”	77	“泽香”	137	“黑沙留”
18	“黑曼道克”	78	“无核紫”	138	“卡氏玫瑰”
19	“平顶黑”	79	“加浓玫瑰”	139	“贵妃玫瑰”
20	“粉红亚都蜜”	80	“郁金香”	140	“白葡萄”
21	“凤凰 51”	81	“白雅”	141	“沙捷宝”
22	“京秀”	82	“红希拉”	142	“黄卡拉斯”
23	“乍娜”	83	“和田红”	143	“628”
24	“玫瑰红”	84	“假黄葡萄”	144	“马赫宝”
25	“也力阿克”	85	“瑞比尔”	145	“淑女红”
26	“布杰苏里”	86	“马拉基”	146	“8028”
27	“红地球”	87	“力扎马特”	147	“假卡”
28	“赤霞珠”	88	“白沙斯拉”	148	“龙眼”
29	“光荣”	89	“蛇龙珠”	149	“优无核”
30	“奥地利”	90	“阿里阿克”	150	“大粒无核白”
31	“黑油亮”	91	“黑哈利”	151	“红葡萄”
32	“黑阿尔那”	92	“台木 G”	152	“京早晶”
33	“夏白”	93	“千欢”	153	“甜葡萄”
34	“布吉苏里”	94	“吐鲁番红葡萄”	154	“紫鸡心”
35	“埃里求凡”	95	“西万尼”	155	“李子香”
36	“阿特巴戈”	96	“维多利亚”	156	“母契洛尼”
37	“奇妙无核”	97	“贝达”	157	“圣诞玫瑰”
38	“奥地利无核”	98	“可维丁卡”	158	“公酿一号”
39	“黑布瑞克”	99	“紫沙斯拉”	159	“花叶哈什哈尔”
40	“维多利亚”	100	“艾麦纳”	160	“布罗基罗然西”
41	“黑玫瑰”	101	“里比”	161	“烟 74”
42	“曼瓦吉”	102	“雷司令”	162	“墨玉葡萄”
43	“北塞魂”	103	“奥古斯特”	163	“白莲子”
44	“梅醇”	104	“波宋尼”	164	“秋马奶”
45	“奥林匹亚”	105	“巴柯”	165	“白赛比尔”
46	“黑贝蒂”	106	“黑多内”	166	“酒神”
47	“河岸葡萄”	107	“赫什无核”	167	“绿木纳格”
48	“新浦雅”	108	“恰乌斯”	168	“哈尼”
49	“法国兰”	109	“苏珊玫瑰”	169	“马奶子”
50	“棕葡萄”	110	“阿里戈特”	170	“木纳格”
51	“白诗南”	111	“红马奶”	171	“马里瓦西亚”
52	“粉红特拉明”	112	“粉红无核”	172	“红德桑”
53	“伊莎贝拉”	113	“伊犁香葡萄”	173	“紫丁香”
54	“紫长粒”	114	“瓶儿”	174	“乌兹别克玫瑰”
55	“维金纳斯”	115	“狮雷司令”	175	“杨格尔”
56	“苏 21”	116	“红木纳格”	176	“白拉查基”
57	“玫瑰魁”	117	“高妻”	177	“普利文玫瑰”
58	“那多尔”	118	“长穗无核白”	178	“底来特”
59	“牛心”	119	“白根地”	179	“西拉”
60	“克里木考尼松”	120	“北红”	180	“莫利沙”

1.2.4 RAPD 产物的观察 反应结束后,PCR 产物置 4℃ 冰箱中保存备用,或直接用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳分离,电极缓冲液为 1×TAE 电泳缓冲液(50×TAE 缓冲液:2 mmol/L Tris-Acetic acid,50 mmol/L EDTA pH 8.0),在电压 110 V,电泳 40~60 min,在凝胶成像系统下观察照相。

### 1.3 数据记录及统计

根据电泳图谱中带的有无(有 Present=1,无 Absent=0)记载得到数据。应用 NTSYSpc(2.10 版)进行聚类分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 葡萄基因组 DNA 的提取

采用改良的 CTAB 法提取的 DNA 产率和纯度都较好,DNA 在干燥后基本都为白色,产率绝大多数都在 100 ng/μL 以上, $A_{260}/A_{280}$  的比值在 1.7~2.0 之间,可以用于 RAPD 分析,电泳检测结果见图 1。消化 RNA 以后的电泳检测结果见图 2。

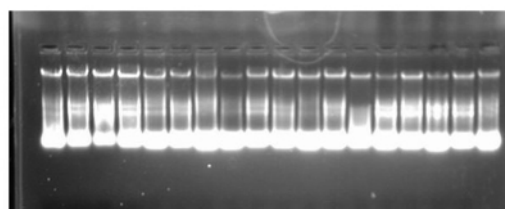


图 1 CTAB 法提取的葡萄 DNA

Fig. 1 DNA extracted with CTAB method

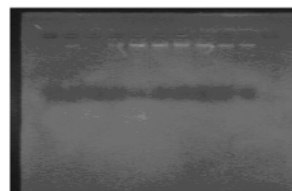


图 2 RNA 消化后葡萄总 DNA

Fig. 2 DNA digested the extracted RNA

### 2.2 不同引物的扩增结果

以 4 个品种的 DNA 为模板,从 96 个引物中筛选出了 21 个条带较多且清晰的引物,见表 2。

表 2 供试材料 DNA 随机扩增所用引物

Table 2 RAPD primer used for amplification

引物 Primer	碱基序列 5'-3' Base sequence 5'-3'	引物 Primer	碱基序列 5'-3' Base sequence 5'-3'
Y02	CATCGCGCA	S7	GGTGACGAG
P672	TACCGTGGCG	P601	CCGCCCACTG
P697	CGCAGGTCAC	S31	CAATCGCCGT
V10	GGACCTGCTG	OPU13	GGCTGTGTTC
OPW02	ACCCCGCCAA	S4	CACCCCTTG
S35	TTCCGAACCC	OPJ07	CCTCTGACA
SI469	TGCCACGAGG	J13	CCACACTACC
S391	ACGATGAGCC	S2123	GTGCCACTTC
SI99	GAGTCAGCAG	S03	CAGAGGTCCC
W01	CTCAGTGTCC	W97295	TTCCGCTCTG
S274	CTGCTGAGCA		

然后用这 21 个引物对 29 个葡萄品种的 DNA 样品进行扩增。对于扩增较为理想的 13 个引物进行条带统计(图 3)。13 个引物扩增出了 122 条 DNA 带,平均每个引物 9.38 条。

### 2.3 聚类分析

利用计算机软件 FluorChemFC2 统计 RAPD 数据,用 NTsys 2.10e 软件计算各品种间的遗传距离,进而得到树型图。由图 4 可知,供试的 180 份材料在系数 0.718 左右可以被分为 7 类。第 1 类有“火焰无核”、“昆香无核”、“无核白鸡心”、“哈特米”、“红阿尔那”、“温宿红葡萄”、“列比尔”、“基米亚特”、“平顶黑”、“粉红亚都蜜”、“皇家秋天”、“黑曼道克”、“新郁”、“红旗特早”、“乍娜”、“凤凰 51”、“贵妃玫瑰”、“红宝石无核”、“巴勒斯坦”、“紫珍香”、“玫瑰红”、“布吉苏里”、“埃里求凡”、“光荣”、“赤霞珠”、“奥地利”、“奥地利无核”、“夏白”、“阿特巴戈”、“黑阿尔那”、“布杰苏里”、“曼瓦吉”、“北塞魂”、“梅醇”、“奥林匹亚”、“奇妙无核”、“黑玫瑰”、“黑贝蒂”、“新浦雅”、“棕葡萄”、“白诗南”、“维金纳斯”、“粉红特拉明”、“伊莎贝拉”、“紫长粒”、“尼加拉”、“牛心”、“那多尔”、“白哈什哈尔”、“哈什哈尔”、“红马拉加”、“苏 21”、“玫瑰魁”、“俄罗斯康可”、“特别黑大粒”、“阿克塔尔”、“黑比诺”、“盖吾沙”、“苏 67”、“大考尔门”、“微红白”、“绿葡萄”、“瑰宝”、“泽香”、“无核紫”、“白雅”、“和田红”、“假黄葡萄”、“红希拉”、“瑞比尔”、“力扎马特”、“蛇龙珠”、“马拉基”、“加浓玫瑰”、“雷司令”、“京秀”、“法国兰”;第 2 类有“也力阿克”、“瓶儿”、“早黑园”、“北红”、“狮雷司令”、“河岸葡萄”、“墨玉葡萄”、“酒神”、“白沙斯拉”、“阿里阿克”、“红地球”、“黑哈利”、“西万尼”、“白赛比尔”、“千欢”、“苏珊玫瑰”、“伊犁香葡萄”、“吐鲁番红葡萄”、“恰乌斯”、“波宋尼”、“阿里戈特”、“巴柯”、“维多利亚”、“奥古斯特”、“可维丁卡”、“紫沙斯拉”、“艾麦纳”、“红马奶”、“赫什无核”、“粉红无核”、“里比”、“红木纳格”、“高妻”、“醉诗仙”、“黑佳酿”、“长穗无核白”、“白根地”、“白达拉依”、“米勒吐尔高”、“白羽霓”、“谢克兰格”、“巴娜蒂”、“伊犁大白葡萄”、“伏尔加顿”、“索索葡萄”、“其里干”、“红脸无核”、“白比诺”、“瓦沙玫瑰”、“黑沙留”、“卡氏玫瑰”、“贵妃玫瑰”、“沙捷宝”、“淑女红”、“假卡”、“大粒无核白”、“京早晶”、“628”、“马赫宝”、“8028”、“红葡萄”、“甜葡萄”、“母契洛尼”、“圣诞玫瑰”、“公酿一号”、“白葡萄”、“黄卡拉斯”、“李子香”、“龙眼”、“优无核”、“紫鸡心”、“花叶哈什哈尔”、“紫丁香”、“秋马奶”、“白莲子”、“白拉查基”、“普列文玫瑰”、“乌兹别克玫瑰”、“杨格尔”、“红德桑”、“西拉”、“莫利沙”、“哈尼”、“马奶子”、“马里瓦西亚”、“底来特”、“布罗基罗然西”、“绿木纳格”、“木纳格”;第 3 类有“黑多内”;第 4 类的有“高息”;第 5 类有“台木 G”、“贝达”;第 6 类有“克里木考尼松”;第 7 类有“芳香拉查基”、“沙比”。

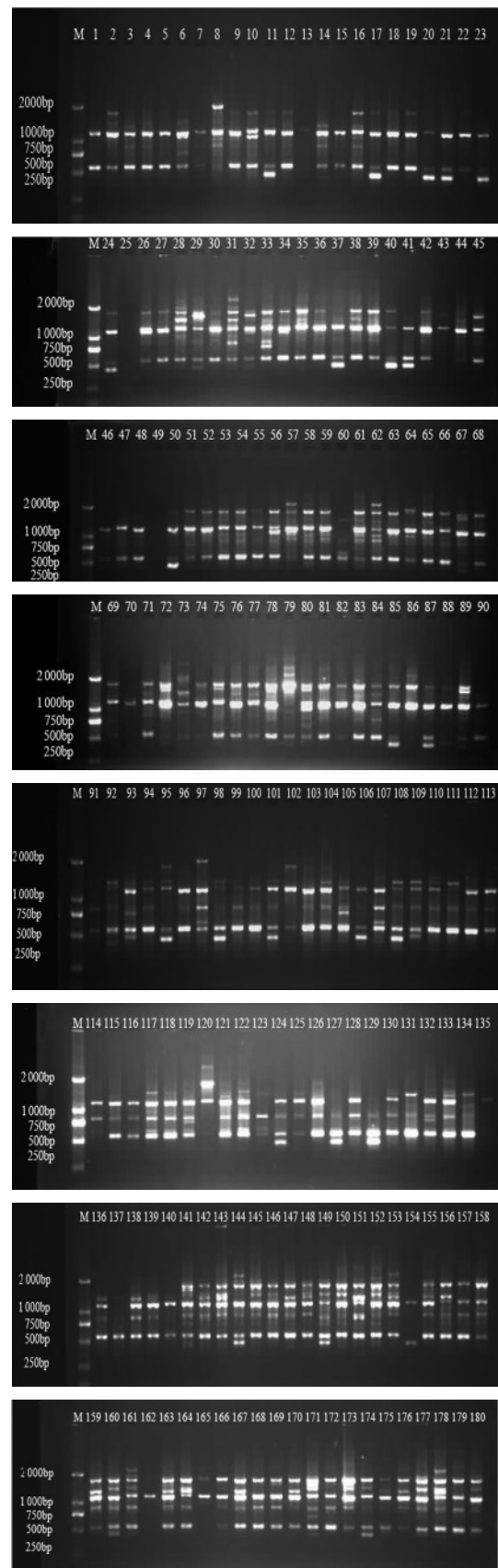
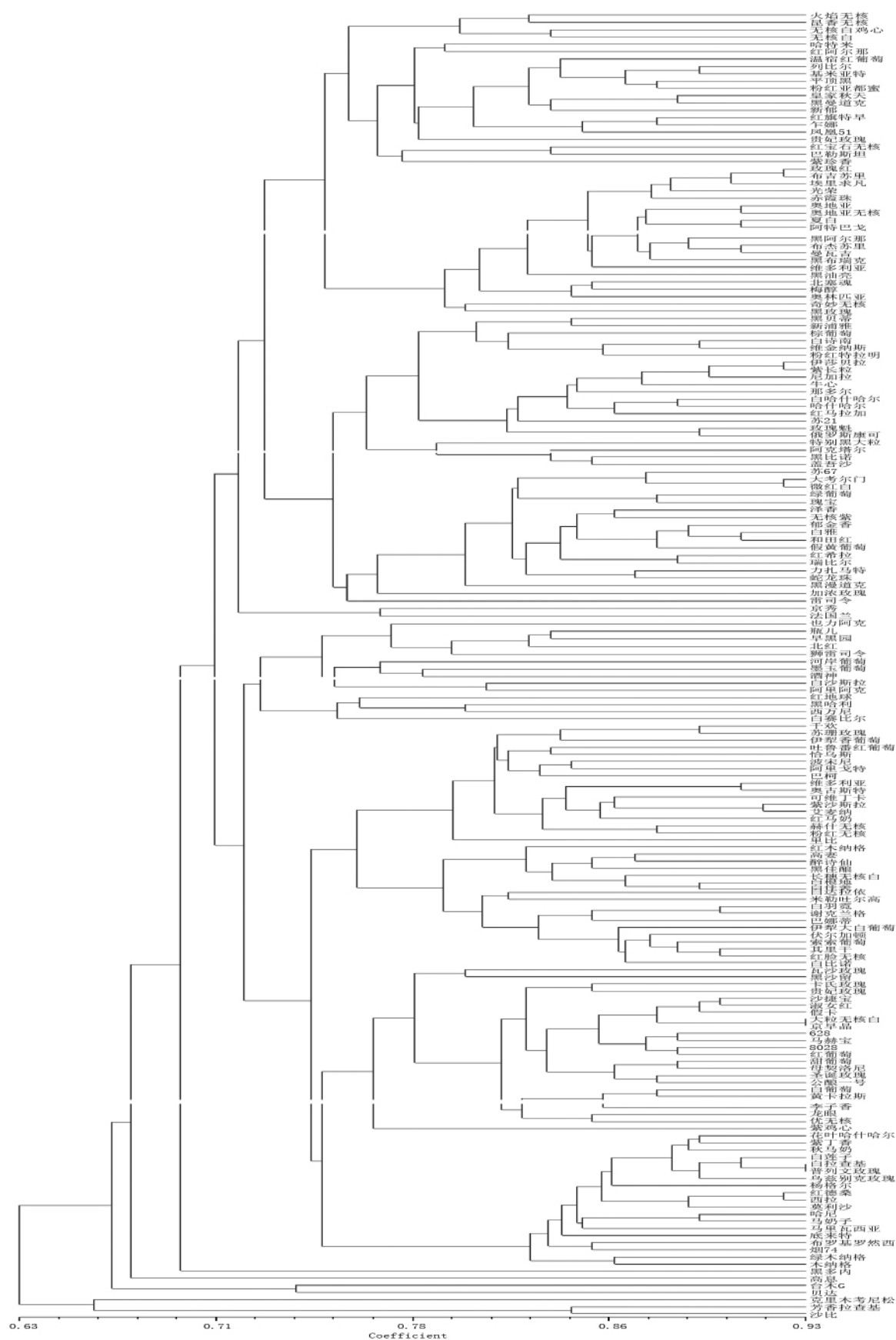


图 3 11 号引物扩增电泳图谱

Fig. 3 Electrophoretogram of RAPD amplification of primer 11



### 3 讨论

RAPD 技术对提取的 DNA 质量要求较低,采用 CTAB 法提取的 DNA 纯度和含量都较高,可用于 RAPD 分析,RNA 去除后 DNA 的纯度更高,一定程度上保证了 RAPD 试验结果的准确性。国内外研究者利用 RAPD 技术对部分果树树种进行了研究,普遍认为 RAPD 分析可以达到对果树不同种质资源进行鉴定的要求。且 RAPD 技术经济实用易于操作,适合于大规模的分析工作,因此,RAPD 技术完全适用于葡萄品种的鉴定。

从树型图上可看出,部分的分类结果与传统的分类方法一致主要分为欧亚种和欧美杂交种,即得到的第 1 和第 2 类,但是也出现了与传统分类不相符合的情况,例如高妻属于欧美杂交种和红地球、吐鲁番红葡萄、木纳格等欧亚种葡萄相混合。发生以上情况的原因,可能是其一这些品种在栽培过程发生了变异;二是在引种栽植时混淆了品种;三可能是葡萄苗的命名比较混杂,供苗商没能提供真正与品种名字相符的品种。另外在 RAPD 分析过程中有的在 DNA 的提取中存在糖类物质没有去除干净的情况,对试验有一定影响,同时由于这次所取样品较多,取材没能做到一致性,由

于取材多,扩增产物在多块胶上电泳,对后期的分析增加了难度,增加了一定的人为因素,影响试验结果。

### 参考文献

- [1] Luo S L, He P, Zheng X, et al. Genetic diversity in wild grapes native to China based on randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis [J]. Acta Bot. Sinica, 2001, 43(2): 158-163.
- [2] Wang X P, Wang Y J, Zhou P, et al. RAPD analysis of *Vitis* to anthracnose resistant gene [J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2000 (4): 361-364.
- [3] 张文娥. 中国葡萄属野生种抗寒性鉴定与抗寒基因的 RAPD 标记 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2005.
- [4] 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.
- [5] 罗明明, 王永清. 用 RAPD 技术分析葡萄品种亲缘关系 [J]. 安徽农业科学, 2005, 33(6): 1002-1003, 1009.
- [6] 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.
- [7] 罗素兰. 中国野葡萄资源的 RAPD 标记及其应用的研究 [D]. 杨凌: 西北农业大学, 1999.
- [8] 夏慧. 葡萄品种遗传多样性的 RAPD 分析 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2005.
- [9] 罗明明. 葡萄品种亲缘关系及分类的 RAPD 分析 [D]. 雅安: 四川农业大学, 2005.
- [10] 黄远飞. 葡萄种质资源 RAPD 分析及亲缘关系研究 [D]. 长沙: 湖南农业大学, 2005.

## Analysis of Grape Germplasm Resources with the Technique of RAPD

LI Yu-ling, BAI Shi-jian, LUO Qiang-wei, LIAO Xin-fu

(Development and Research Center of Grapes and Melon in Xinjiang Uygur Autonomous Region, Shanshan, Xinjiang 838200)

**Abstract:** Improved CTAB method was used to abstract DNA of 180 grape materials from Development and Research Center of Grapes and Melon in Xinjiang Uygur Autonomous Region and RAPD analysis was also conducted. Totally 96 primers, selected from published papers, were used for screening of suitable random primer of grape RAPD analysis, in order to assess genetic distance of the tested material. The results showed that the yield and purity of DNA were all good. The yield of DNA was mostly over 100 ng/ $\mu$ L and could be used in RAPD analysis. Totally 21 primers with clear and multiple bands were screened and 180 tested materials were divided into 7 categories after cluster analysis.

**Key words:** grape; RAPD; cluster analysis

## 蔬菜深加工三大走向

一是蔬菜蜜饯崭露头角。胡萝卜脯、南瓜脯、西红柿脯、甘薯脯等相继面世,甚至连西瓜皮、辣椒也加入蜜饯原料行列,蔬菜蜜饯微甜、微酸、微辣、微咸,营养全面,风味独特,深受消费者喜爱。

二是蔬菜面点异军突起。其中最具代表性的当推将面粉与蔬菜汁、蔬菜泥拌和烘制而成的蔬菜面包,如胡萝卜、菠菜、香菜、豌豆、洋葱面包已初见端倪,是很理想的方便食品。有些地区新研制的芋头、南瓜、木耳、香菇等蔬菜面包,对某些病症还有食疗效果;此外,添加不同菜泥、菜汁的饼干、烘糕、糖果也已陆续上市,因配料科学、口味各异,销售前景看好。

三是蔬菜饮料方兴未艾。西红柿、胡萝卜、芹菜、卷心菜等与乳酸酪混合制得的菜汁饮料,是当今西方一些发达国家的畅销商品。蔬菜与茶、咖啡、牛奶配制的菜味咖啡、菜味奶酪、番茄茶及菜汁型啤酒等,在国际市场上贸易量逐年上升。在国内,物美价廉的胡萝卜汁等已成为市场新宠,具有清凉、滋补功能的西瓜汁、冬瓜汁等日渐受消费青睐,给日趋繁荣的饮料市场增添了新的风味品种。