

## 基于 SRAP 标记的刺葡萄亲缘关系分析

刘昆玉<sup>1,2</sup>, 徐丰<sup>1,2</sup>, 石雪晖<sup>1,2\*</sup>, 钟晓红<sup>1,2</sup>, 杨国顺<sup>1,2</sup>, 倪建军<sup>1,2</sup>

(1.湖南农业大学 园艺园林学院, 湖南 长沙 410128; 2.湖南省葡萄工程技术研究中心, 湖南 长沙 410128)

**摘 要:** 运用 SRAP 标记对分布在湖南省内的 21 份刺葡萄资源进行遗传多样性与亲缘关系分析。结果表明: 从 84 对 SRAP 引物组合中筛选出的 7 个引物组合中共扩增出 61 条带, 其中有 34 条稳定的多态性条带, 多态性比率为 55.7%; 运用 NTSYS 软件计算出 21 份材料的成对遗传相似系数为 0.80~0.99, 在遗传相似系数 0.92 处可将全部材料划分为 3 个类群; UPGMA 聚类分析表明, 在湖南省境内分布的刺葡萄有 6 个基本类型, 并推测出了农大 1 号至农大 9 号育种材料(2003 年由湖南农业大学运用秋水仙素处理不同地区刺葡萄种籽得到的诱变材料, 由于经过 3 次搬迁, 现已遗失亲本档案)的亲本。

**关 键 词:** 刺葡萄; 亲缘关系; SRAP 标记

中图分类号: S321

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2012)06-0607-05

## Relationship analysis for *Vitis davidii* Foëx with SRAP molecular markers

LIU Kun-yu<sup>1,2</sup>, XU Feng<sup>1,2</sup>, SHI Xue-hui<sup>1,2\*</sup>, ZHONG Xiao-hong<sup>1,2</sup>, YANG Guo-shun<sup>1,2</sup>, NI Jian-jun<sup>1,2</sup>

(1.College of Horticulture and Landscape, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; 2.Hunan Provincial Engineering Research Center for Grapes, Changsha 410128, China)

**Abstract:** Sequence-related amplified polymorphism (SRAP) molecular markers were used to detect the genetic diversity and relationship of 21 accessions of *Vitis davidii* Foëx. From 84 pairs of primers, 7 pairs were selected out. Sixty-one clear bands were amplified using these 7 pairs of primers, of which 34 were stable morphological bands, accounting for 55.7% of total bands. Revealed by NTSYS software, the genetic similarities of 21 accessions ranged from 0.80 to 0.99. Cluster analysis showed that 21 accessions were classified into 3 cluster groups with genetic similarity of 0.92. UPGMA cluster analysis showed that there are 6 types of *Vitis davidii* Foëx in Hunan, and we successfully deduced the suspected parents (which were lost during 3-time relocations) of Nongda No.1 to No.9 which come from different regions of *Vitis davidii* Foëx seeds by colchicine treatment.

**Key words:** *Vitis davidii* Foëx; relationship; sequence related amplified polymorphism

刺葡萄(*Vitis davidii* Foëx)为葡萄科葡萄属真正葡萄亚属东亚种群的一个种, 广泛分布于陕西、甘肃、华中、华南及西南等地, 在湖南省西部和南部山区分布较多, 长期以来一直处于野生状态, 是中国南方丘陵山区一种宝贵的野生葡萄种质资源<sup>[1-2]</sup>。刺葡萄对黑痘病、白腐病、炭疽病等具有很强的抗性<sup>[3-4]</sup>, 已成为葡萄耐湿热和抗病育种的宝贵资源。在湖南省境内, 刺葡萄除在怀化地区及湖南西部雪

峰山脉与武陵山脉分布较多外<sup>[5]</sup>, 在长沙、浏阳、张家界等地区也有分布<sup>[6-8]</sup>。关于刺葡萄类型鉴定的报道尚少, 文献[6]只报道了湖南省有 1 个变种的刺葡萄野生资源。刺葡萄都是采用扦插繁殖<sup>[9]</sup>, 扦插成活率因品系不同而存在很大的差别<sup>[10]</sup>。笔者前期开展的刺葡萄植物学性状研究<sup>[7]</sup>并不能很好地区分各类型的亲缘关系, 不能找到育种材料农大 1 号至农大 9 号(2003 年由湖南农业大学运用秋水仙素处理不

收稿日期: 2012-10-22

基金项目: 国家农业部农业公益性行业科研项目(nyhy2x07-027); 国家农业产业技术体系建设专项(nycytx-30-zt-06); 湖南省科技厅重点科研项目(2009CK-2010); 湖南省教育厅省级科技计划(成果推广计划)项目(09CY008)

作者简介: 刘昆玉(1963—), 男, 湖南冷水江人, 博士研究生, 副教授, 主要从事葡萄栽培技术与育种研究; \*通信作者, sxh1949@163.com

同地区刺葡萄种籽得到的诱变材料,由于经过3次搬迁,现已遗失亲本档案)的亲本。相关序列扩增多态性(sequence-related amplified polymorphism, SRAP)<sup>[11]</sup>已广泛运用在种质资源遗传多样性分析、构建遗传图谱等方面<sup>[12-15]</sup>。本试验中利用SRAP分子标记分析湖南省刺葡萄资源的遗传多样性与亲缘关系,以期找到农大1号至农大9号的亲本,为刺葡萄资源的利用和刺葡萄育种等提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试材料见表1,其中,农大1号至农大9号取自常德澧县;长青1号为林木山刺葡萄种籽在2003年经秋水仙素处理后得到的材料,保存在湖南农业大学葡萄教学资源圃;长青2号、4号为高山2号经秋水仙素处理后得到的材料,保存在长沙县青山铺曙光葡萄园;其余材料均为当地资源。

表1 试验材料

Table 1 Samples used in the experiment

样本编号	材料名称	来源地
S <sub>1</sub>	农大1号	常德澧县
S <sub>2</sub>	农大2号	常德澧县
S <sub>3</sub>	农大3号	常德澧县
S <sub>4</sub>	农大4号	常德澧县
S <sub>5</sub>	农大5号	常德澧县
S <sub>6</sub>	农大6号	常德澧县
S <sub>7</sub>	农大7号	常德澧县
S <sub>8</sub>	农大8号	常德澧县
S <sub>9</sub>	农大9号	常德澧县
S <sub>10</sub>	长青1号	湖南农业大学
S <sub>11</sub>	长青2号	长沙县
S <sub>12</sub>	长青4号	长沙县
S <sub>13</sub>	白马铺刺葡萄	怀化芷江
S <sub>14</sub>	马颈坳刺葡萄	湘西马颈坳
S <sub>15</sub>	乡葡萄	怀化桐木
S <sub>16</sub>	林木山刺葡萄	湘西林木山
S <sub>17</sub>	涩刺葡萄	怀化桐木
S <sub>18</sub>	大树坳刺葡萄	怀化芷江
S <sub>19</sub>	木叶溪刺葡萄	怀化芷江
S <sub>20</sub>	高山2号	湘西马颈坳
S <sub>21</sub>	白刺葡萄	怀化桐木

### 1.2 方法

试验在国家柑橘改良中心长沙分中心完成。2009年5—9月在刺葡萄种植分布区采集无病虫害的幼嫩叶片,用带标记的样品袋封存后置于冰壶

内,带回实验室,清洗并擦拭干净,用液氮冷冻处理,置于-70℃冰箱保存。

#### 1.2.1 总DNA的提取

剔除每份材料幼嫩叶片中的叶脉,各称取10g,用CTAB法<sup>[12]</sup>进行DNA提取。

#### 1.2.2 SRAP-PCR反应体系构建及其产物检测

参照文献<sup>[12-14]</sup>,共设计引物19条,其中正向引物7条,反向引物12条(表2)。正反引物两两组合成84对引物。引物均由上海生工生物工程技术有限公司合成。PCR反应体积为25μL,其中,MgCl<sub>2</sub>(20mmol/L)2.0μL,dNTP(10mmol/L)0.5μL,双向引物(2.5μmol/L)2.0μL,100ng/μL模板DNA1μL,Taq DNA聚合酶0.5μL以及10×Buffer 2.5μL。SRAP-PCR扩增反应程序:94℃预变性5min;94℃变性1min,35℃退火1min,72℃延伸1min,5个循环;94℃变性1min,50℃退火1min,72℃延伸1min,35个循环;72℃延伸10min。SRAP-PCR扩增产物用1.5%的琼脂糖(含溴化乙锭,EB)恒压电泳,在凝胶成像系统下观察、照相。

表2 试验引物序列

Table 2 SRAP primers used in the experiment

引物	序列
Me01	5'-TGAGTCCAAACCGGACC-3'
Me02	5'-TGAGTCCAAACCGGTAA-3'
Me03	5'-TGAGTCCAAACCGGAGT-3'
Me04	5'-TGAGTCCAAACCGGACG-3'
Me05	5'-TGAGTCCAAACCGGAGC-3'
Me06	5'-TGAGTCCAAACCGGAAG-3'
Me07	5'-TGAGTCCAAACCGGTGC-3'
Em01	5'-GACTGCGATCGAATTTGC-3'
Em02	5'-GACTGCGATCGAATTCAG-3'
Em03	5'-GACTGCGATCGAATTGAC-3'
Em04	5'-GACTGCGATCGAATTTGA-3'
Em05	5'-GACTGCGATCGAATTCAG-3'
Em06	5'-GACTGCGATCGAATTGCA-3'
Em07	5'-GACTGCGATCGAATTTCTA-3'
Em08	5'-GACTGCGATCGAATTTCTG-3'
Em09	5'-GACTGCGATCGAATTTAC-3'
Em10	5'-GACTGCGATCGAATTTGAG-3'
Em11	5'-GACTGCGATCGAATTGCC-3'
Em12	5'-GACTGCGTACGAATTGTC-3'



续表

样本编号	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>	S <sub>4</sub>	S <sub>5</sub>	S <sub>6</sub>	S <sub>7</sub>	S <sub>8</sub>	S <sub>9</sub>	S <sub>10</sub>	S <sub>11</sub>	S <sub>12</sub>	S <sub>13</sub>	S <sub>14</sub>	S <sub>15</sub>	S <sub>16</sub>	S <sub>17</sub>	S <sub>18</sub>	S <sub>19</sub>	S <sub>20</sub>	S <sub>21</sub>
S <sub>7</sub>	0.81	0.81	0.83	0.83	0.92	0.85	1.00														
S <sub>8</sub>	0.97	0.88	0.99	0.99	0.81	1.00	0.85	1.00													
S <sub>9</sub>	0.98	0.89	0.98	0.98	0.82	0.99	0.83	0.99	1.00												
S <sub>10</sub>	0.92	0.83	0.94	0.94	0.81	0.95	0.82	0.95	0.94	1.00											
S <sub>11</sub>	0.82	0.91	0.87	0.85	0.85	0.86	0.81	0.86	0.85	0.88	1.00										
S <sub>12</sub>	0.81	0.92	0.86	0.83	0.86	0.85	0.80	0.85	0.83	0.87	0.99	1.00									
S <sub>13</sub>	0.97	0.89	0.97	0.96	0.82	0.97	0.80	0.97	0.97	0.91	0.82	0.83	1.00								
S <sub>14</sub>	0.95	0.89	0.98	0.97	0.82	0.97	0.81	0.97	0.97	0.94	0.89	0.88	0.95	1.00							
S <sub>15</sub>	0.82	0.87	0.85	0.82	0.95	0.83	0.92	0.83	0.85	0.86	0.87	0.86	0.82	0.82	1.00						
S <sub>16</sub>	0.97	0.89	0.98	0.97	0.85	0.97	0.81	0.97	0.98	0.94	0.87	0.86	0.97	0.97	0.87	1.00					
S <sub>17</sub>	0.83	0.92	0.88	0.86	0.88	0.87	0.85	0.87	0.86	0.89	0.92	0.93	0.86	0.88	0.92	0.88	1.00				
S <sub>18</sub>	0.83	0.92	0.88	0.86	0.83	0.87	0.80	0.87	0.86	0.89	0.92	0.93	0.86	0.88	0.88	0.88	0.97	1.00			
S <sub>19</sub>	0.86	0.96	0.88	0.86	0.88	0.87	0.82	0.87	0.88	0.87	0.94	0.95	0.88	0.88	0.88	0.90	0.91	0.91	1.00		
S <sub>20</sub>	0.85	0.93	0.89	0.87	0.87	0.88	0.83	0.88	0.87	0.90	0.97	0.97	0.87	0.91	0.87	0.89	0.94	0.94	0.97	1.00	
S <sub>21</sub>	0.96	0.83	0.96	0.96	0.79	0.97	0.82	0.97	0.96	0.93	0.81	0.80	0.95	0.94	0.81	0.94	0.82	0.85	0.82	0.83	1.00

S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, S<sub>3</sub>, ..., S<sub>21</sub>为表1中样本编号。

### 2.3 样本相似系数的UPGMA聚类分析

由图3可见,在相似系数为0.92时,非秋水仙素处理的刺葡萄可分为3大类:第1类为乡葡萄;第2类为木叶溪刺葡萄、高山2号、大树坳刺葡萄、涩刺葡萄;第3类为白马铺刺葡萄、林木山刺葡萄、马颈坳刺葡萄、白刺葡萄。3个大类又可以继续划分为6个亚群:第1亚群为白马铺刺葡萄;第2亚群为林木山刺葡萄、马颈坳刺葡萄;第3亚群为白刺葡萄;第4亚群为木叶溪刺葡萄、高山2号;第5亚

群为涩刺葡萄、大树坳刺葡萄;第6亚群为乡葡萄。同时高山2号与长青2号、长青4号的相似系数均为0.97,划分为第2大类;长青1号与林木山刺葡萄的相似系数为0.94,划分为第3大类。农大1号与白马铺刺葡萄为同一个亚群;农大3号、农大4号、农大6号、农大8号、农大9号与林木山刺葡萄为同一个亚群;农大2号与高山2号为同一个亚群;农大5号、农大7号与乡葡萄为同一个亚群。

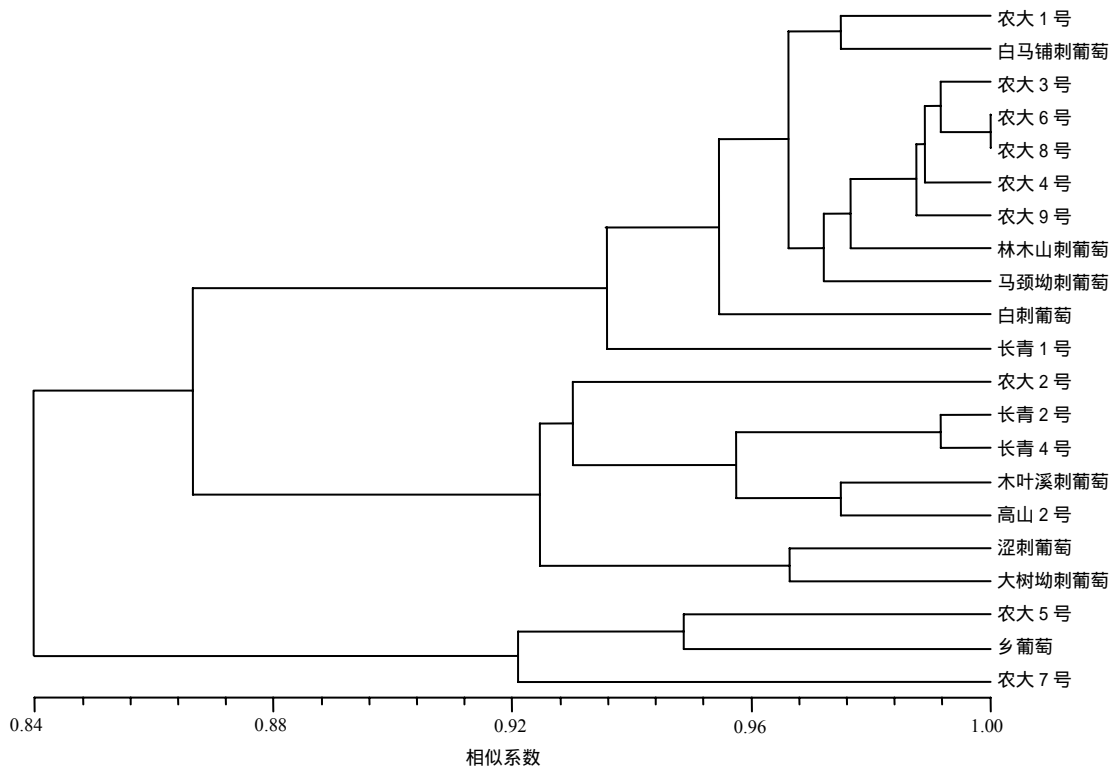


图3 试验样本 SRAP 标记的相似系数聚类结果

Fig.3 Dendrogram for tested samples based on similarity coefficient of SRAP markers

### 3 结论与讨论

本研究中运用SRAP-PCR方法对刺葡萄进行遗传多样性分析,从84对SRAP引物组合中筛选出7组引物组合,共扩增出清晰条带61条,特异性条带34条,多态性比率为55.7%。

张萌等<sup>[16]</sup>运用SSR分子标记分析安徽黄山地区野生刺葡萄的遗传多样性,发现刺葡萄群体遗传距离和地理分布呈正相关,高海拔山区的刺葡萄与外界刺葡萄的基因交流少。湖南省刺葡萄的主要分布区域集中在雪峰山脉沿线,在地理位置上受到很好的隔离,保证了群内的相对稳定性。本试验样本控制在刺葡萄类群中,种群间的成对相似系数为0.80~0.99,其遗传多样性并不丰富,刺葡萄类群间的遗传距离均较近,说明所取刺葡萄样本的纯度较高。聚类分析结果表明,在遗传相似系数0.92处划分的3类群体中,群体内的个体基本上分布在某一地区。所筛选出的引物能够区分出各刺葡萄样本的地理分布类群,表明本方法的精确度较高,可用于鉴定遗传背景较近的葡萄品种或种类。

本研究是在育种材料亲本信息不详,且通过植物学性状研究无法分辨的情况下运用SRAP标记进行鉴定与分析的。长青1号、长青2号、长青4号的分类结果表明,运用SRAP-PCR分析经秋水仙素处理刺葡萄种籽得到的加倍体材料能够有效辨识出其亲本。结合笔者前期开展的植物学性状研究<sup>[7]</sup>,可以推测:农大1号的亲本为白马铺刺葡萄;农大3号、农大4号、农大6号、农大8号、农大9号的亲本为林木山刺葡萄或马颈坳刺葡萄;农大2号的亲本为高山2号或木叶溪刺葡萄;农大5号、农大7号的亲本为乡葡萄。

基于刺葡萄叶形特征及果实性状的聚类分析结果<sup>[7]</sup>表明:白刺葡萄果实为黄绿色,与其他所有刺葡萄的果实不相同,因此,被单独列为一类。本研究结果与其有较大差异,这可能是由SRAP标记的多态性基因与刺葡萄果实色素形成相关的基因未重叠所导致的。

### 参考文献:

- [1] 贺普超. 葡萄学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1999.
- [2] 熊兴耀, 王仁才. 葡萄新品种[J]. 园艺学报, 2006, 33(5): 11, 65.
- [3] 石雪晖, 陈祖玉, 刘昆玉, 等. 野生刺葡萄果实品质及愈伤组织诱导初探[J]. 中外葡萄与葡萄酒, 2005(5): 4-6.
- [4] 孔庆山. 中国葡萄志[M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2004: 28.
- [5] 牛立新, 贺普超. 我国葡萄属野生种形态特性的研究[J]. 葡萄栽培与酿酒, 1995(4): 15-17.
- [6] 魏文娜, 王琦熔. 湖南野生葡萄资源调查及研究[J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 1991, 17(3): 447-451.
- [7] 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(3): 8-12.
- [8] 罗彬彬, 石雪晖, 杨国顺, 等. 湖南省部分地区刺葡萄调查及植物学性状观测[J]. 中外葡萄与葡萄酒, 2010(9): 17-23.
- [9] 王国英, 王永刚. 我国葡萄野生种扦插生根特性的初步研究[J]. 陕西农业科学, 1987(4): 26-27.
- [10] 周俊, 石雪晖, 秦丹, 等. 刺葡萄自然发酵酿酒研究[J]. 酿酒科技, 2009(1): 21-22.
- [11] Li G, Quiros C F. Sequence-related amplified polymorphism(SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: Its application to mapping and gene tagging in Brassica[J]. Theor Appl Genet, 2001, 103: 455-461.
- [12] 徐建华, 杨虹琦, 杨程, 等. 烟草 DNA 的提取与 SRAP 反应体系优化[J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2009, 35(3): 257-259.
- [13] 李达, 吴莉英, 唐前瑞, 等. 非洲菊 SRAP 标记的 DNA 模板制备及反应体系优化[J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2008, 34(2): 196-199.
- [14] 温岚, 喻春明, 王延周, 等. 苜蓿多胚苗遗传多样性的 SRAP 标记分析[J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2011, 37(3): 243-247.
- [15] 张大乐, 李锁平, 雷进生, 等. 利用 SSR 标记对 12 个啤酒大麦品种的聚类分析和主坐标分析[J]. 河北农业大学学报, 2007, 30(3): 26-31.
- [16] 张萌, 练春兰, 松木悠, 等. 基于 SSR 分子标记的安徽黄山地区野生刺葡萄的遗传多样性分析[J]. 江西农业学报, 2012, 24(6): 9-12.

责任编辑: 王赛群

英文编辑: 罗维