

‘蛇龙珠’葡萄新株系遗传多样性的SSR、ISSR 和 *VvmybA1* 基因片段分析

陈小宇¹, 刘林德^{1*}, 葛宜和¹, 张莉¹, 李记明^{2*}, 姜文广², 裴广仁²

(¹鲁东大学生命科学学院, 山东烟台 264025; ²烟台张裕集团有限公司·
山东省葡萄酒微生物发酵技术重点实验室, 山东烟台 264001)

摘要:【目的】探究‘蛇龙珠’8个新株系的亲缘关系和遗传多样性, 选育出具有推广价值的‘蛇龙珠’新株系。【方法】以‘蛇龙珠’8个新株系(E01~E08)为样品, 近缘品种‘品丽珠’‘赤霞珠’等为对照, 利用SSR、ISSR分子标记和 *VvmybA1* 基因序列进行遗传多样性和亲缘关系分析。【结果】利用14对SSR引物对10份葡萄材料进行基因组DNA的扩增, 通过聚类分析得出只有‘蛇龙珠’E06与其他7个株系有差异, 另外7个株系聚为一类。利用11个ISSR引物进一步研究得出, ‘蛇龙珠’E02(栖霞北)和E03(栖霞南)聚为一类, 遗传距离与地理距离一致, E05(莱山)和E08(开发区)聚为一类, E01、E04、E06、E07之间差异显著。分析 *VvmybA1* 基因片段的差异探讨‘蛇龙珠’8个新株系的遗传差异, 得出‘蛇龙珠’E01、E02、E04、E05、E06、E07的 *VvmybA1* 基因亲缘关系较近, 聚为一支。‘蛇龙珠’E08和E03的 *VvmybA1* 基因分别单独聚为一支。【结论】利用SSR和ISSR可以显示‘蛇龙珠’8个新株系的亲缘关系, 在区别‘蛇龙珠’8个株系时首先考虑遗传距离而不是地理距离。这些葡萄样品的 *VvmybA1* 基因片段的遗传多样性较低, 在近期进化史上 *VvmybA1* 基因较稳定, 在过去一段历史未发生种群扩张。

关键词: ‘蛇龙珠’葡萄; 遗传多样性; SSR; ISSR; *VvmybA1*

中图分类号: S663.1 文献标志码: A 文章编号: 1009-9980(2017)02-0145-12

Analysis on genetic diversity of wine grape ‘Cabernet Gernischt’ (*Vitis vinifera*) new strains by SSR, ISSR and *VvmybA1*

CHEN Xiaoyu¹, LIU Linde^{1*}, GE Yihe¹, ZHANG Li¹, LI Jiming^{2*}, JIANG Wenguang², PEI Guangren²

(¹School of Life Sciences, Ludong University, Yantai 264025, Shandong, China; ²Yantai Changyu Group Corporation Ltd. · Shandong Province Key Laboratory of Wine Microbial Fermentation Technology, Yantai 264001, Shandong, China)

Abstract:【Objective】‘Cabernet Gernischt’ (*Vitis vinifera* L.) is one of the most widely grown red grape for making wine in Jiaodong Peninsula of Shandong province. The aim of this study is to investigate genetic diversity of eight new strains of ‘Cabernet Gernischt’ (E01–E08) for screening new excellent clone(s). 【Methods】Young leaves of ‘Cabernet Gernischt’ (E01–E08), ‘Cabernet Sauvignon’, ‘Cabernet Franc’ and ‘Pinot Noir’ were collected from Changyu garden. The total genomic DNA was extracted by using Ezup Column Plant Genomic DNA Purification Kit. 14 SSR (simple sequence repeats) primers and 11 ISSR (inter-simple sequence repeat) primers were employed according to previous study. SSR and ISSR data were scored with presence (1), absence (0) and each band were regarded as a locus. Jaccard similarity matrix was constructed by NTSYS-pc 2.1 software. Based on the similarity matrix, a dendrogram showing the genetic relationships between the strains and cultivars was constructed by using the unweighted

收稿日期: 2016-07-21 接受日期: 2016-10-27

项目基金: 烟台市科技发展计划(2012JH204); 泰山产业领军人才工程; 国家高技术研究发展计划(2013AA102108)

作者简介: 陈小宇, 女, 在读硕士研究生, 研究方向为种群群落生态学。Tel: 13054509142, E-mail: 13054509142@163.com

*通信作者 Author for correspondence. Tel: 13573566099, E-mail: linde_liu@163.com; Tel: 13953507389, E-mail: zyljm@163.com

pair group method with arithmetic average (UPGMA). The number of loci (N), effective number of alleles (N_e), Nei's gene diversity (H), Shannon's information index (I) and percentage of polymorphic loci (P) were calculated by using POPENE1.32. *VvmybA1* product was amplified by using primers of K and S. PCR amplification products that yielded single, well-defined band were harvested for sequencing. The purification was performed with SanPrep Column DNA Gel Extraction Kit. The *VvmybA1* sequences were aligned with sequence data obtained by using BioEdit version 7.0.5 and ClustalX 2.0. Phylogenetic trees based on Neighbor-Joining methods were created by using MEGA 5.0. Three neutrality tests were constructed with DnaSP 5.0. 【Results】A total of 139 bands were amplified from 14 SSR primers, of which 69 were polymorphic loci. The effective number of alleles (N_e) of the SSR primers ranged from 1.021 6 (VMC4F3) to 1.590 1 (VrZAG25). The Nei's gene diversity (H) ranged from 0.019 5 (VMC4F3) to 0.322 0 (VrZAG25). Shannon's information index (I) ranged from 0.040 5 (VMC4F3) to 0.467 3 (VrZAG25). The genetic similarity coefficients between strains and cultivars ranged from 0.567 7 to 0.974 4. Eight strains of 'Cabernet Gernischt' were divided into 2 groups based on UPGMA. The first cluster had only 'Cabernet Gernischt' E06, and the second cluster contained seven strains. A total of 96 clear DNA fragments were amplified from 11 ISSR primers. The mean similarity index of all strains and cultivars was 0.825 6, and ranged from 0.734 7 ('Cabernet Gernischt' E04 and 'Point Noir') to 0.938 8 ('Cabernet Gernischt' E02 and 'Cabernet Gernischt' E03). The effective number of alleles (N_e) of the ISSR primers ranged from 1.072 1 (UBC817) to 1.584 8 (UBC807). The Nei's gene diversity (H) ranged from 0.062 8 (UBC826) to 0.335 1 (UBC835), and Shannon's information index (I) ranged from 0.090 2 (UBC826) to 0.505 7 (UBC835). The cluster dendrogram was constructed by UPGMA. 'Cabernet Gernischt' E02 (north of Qixia) and E03 (south of Qixia) classified into one group. The genetic distance between them accorded with the geographic distance. E05 (Laishan) and E08 (Development zone) were classified into one group, There were significant differences among E01, E04, E06 and E07. The lengths of the *VvmybA1* gene sequence of 11 strains and cultivars were 905–914 bp, the GC contents varied from 42.1% to 43.5%. The *VvmybA1* gene sequence of 11 strains and cultivars showed a low level of diversity ($H_d=0.673$, $P_i=0.002 21$). The analysis of *VvmybA1* gene fragment sequence alignment showed that there was only a deletion in coding regions, but there were five base substitutions in non-coding regions. The results of three neutralities indicated that there was a non departure from neutrality expectation for gene *VvmybA1* of 11 strains and cultivars. According to the phylogenetic tree of the gene sequence, analysis of all polymorphisms did not provide a consensus tree depicting the geographical partitioning of the species. By analyzing the differences among *VvmybA1* gene fragments for investigating the genetic diversity of 'Cabernet Gernischt', it was concluded that *VvmybA1* genes of 'Cabernet Gernischt' E01, E02, E04, E05, E06 and E07 had close relationship, which could be clustered into one group. *VvmybA1* genes of 'Cabernet Gernischt' E03 and E08 were different from those of the other six strains. 【Conclusion】The results revealed that ISSR could be a good tool for evaluation of genetic diversity among the grape strains and cultivars. It was suggested that the genetic distance between the different strains should be firstly considered rather than the geographic distance for identifying the different strains of 'Cabernet Gernischt'. The *VvmybA1* gene sequences of 11 strains and cultivars showed a low level of diversity, and should not be used as genetic markers for strain identification of 'Cabernet Gernischt'.

Key words: *Vitis vinifera* 'Cabernet Gernischt'; Genetic diversity; SSR; ISSR; *VvmybA1*

葡萄(*Vitis vinifera* L.)隶属葡萄科(Vitaceae)葡萄属(*Vitis*),‘蛇龙珠’(‘Cabernet Gernischt’)作为中国特有的葡萄品种,广泛分布于胶东地区,引进100多年来,对其种源众说纷纭、莫衷一是^[1-2]。无性系选种是品种改良的重要途径,如何准确鉴定新品系、提高选种效率、避免盲目引种备受人们关注。简单重复序列(simple sequence repeats, SSR)也叫微卫星DNA(microsatellite DNA),是由5~100个基序(motif)串联重复而形成的DNA序列单元,重复的基序一般由1~6个碱基组成,如(GA)_n、(GATA)_n^[3],在植物中最常见的是(AT)_n^[4]。因为SSR的进化速率明显高于其他形式的DNA,所以SSR序列的多态性相对较高。在真核生物的基因组中随机分布着10⁴~10⁵个SSR位点,这些SSR序列组成了丰富的多态性位点,这些多态性位点可以作为遗传标记加以利用^[5-6]。温景辉等^[7]利用SSR将山葡萄、欧亚种等20份葡萄材料分为4大类。梁武军等^[8]利用流式细胞仪技术分析三倍体葡萄柚的倍性,并利用SSR分子标记鉴定其不同倍性后代植株的来源。尹玲等^[9]采用荧光标记SSR引物及毛细管电泳技术对24份我国新育成的葡萄品种进行亲缘关系分析,并建立DNA指纹图谱。

简单重复序列区间(inter-simple sequence repeat, ISSR)是以PCR为基础,由于简单、快速、高效、稳定性高且无需预先知道序列信息,为许多生物尤其是植物,提供一个可靠的标记系统,扩增2个已知相反方向的微卫星重复序列区间的DNA^[10-11]。国内外利用ISSR区分不同的葡萄品种、分析种质间的遗传多样性已有较多的报道^[12-14]。

*MybA1*基因属于R2R3 *Myb*家族,在葡萄属中编码一个控制花青素合成途径的转录因子^[15]。在已栽培的葡萄属中,已经确定了108个R2R3-*Myb*相关基因,19条染色体中几乎都有分布^[16]。*VvMybA*家族由3个基因簇(*VvMybA1*、*VvMybA2*和*VvMybA3*)构成,位于2号染色体上,它们通过调节*UFGT*的表达参与控制不同的花色,*VvmybA1*基因在欧亚葡萄和欧美杂种葡萄中分布较广^[17]。

分子标记技术不受环境和植物发育时期的影响,是揭示DNA序列多态性和检测基因变异的理想研究方法^[18]。笔者利用ISSR、SSR和*VvmybA1*基因片段3种方法分析11份酿酒葡萄样品的亲缘关系,以期鉴别出酿酒葡萄‘蛇龙珠’新株系提供新的依

据,为选育出具有更大推广价值的‘蛇龙珠’新品系积累基础数据,为有效利用DNA分子标记提供理论基础。

1 材料和方法

1.1 材料

‘蛇龙珠’8个新株系(E01:蓬莱;E02:栖霞北;E03:栖霞南;E04:幸福;E05:莱山;E06:龙口;E07、E08:烟台开发区)以及‘品丽珠’‘赤霞珠’‘黑比诺’材料,分别编号1~11。

1.2 基因组总DNA的提取及SSR的扩增

DNA的提取用Ezup柱式植物基因组DNA抽提试剂盒(Sangon, Biotech. Shanghai. Cat.: SK8262)进行,然后用1%(w)琼脂糖凝胶电泳检测。筛选出条带清晰并且多态性高的14对引物,引物参考相关文献^[19-20]。PCR采用25 μL反应体系,其中含10×buffer 2.5 μL(含Mg²⁺),dNTPs 2 μL(2.5 mmol·L⁻¹),引物1.25 μL,1 U *Taq*聚合酶,20 ng的模板DNA。PCR反应程序为:94 °C预变性5 min;94 °C变性30 s,48~63 °C退火30 s,72 °C延伸1 min,共进行36个循环;72 °C总延伸10 min。PCR产物经6%(m/V)的聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后,银染显色。

1.3 基因组总DNA的提取及ISSR的扩增

DNA的提取参照1.2的方法,筛选出条带清晰、多态性好的11条引物,引物参照相关文献^[6,12]。PCR采用25 μL反应体系,其中含10×buffer 2.5 μL(含Mg²⁺),dNTPs 2 μL(2.5 mmol·L⁻¹),引物1.25 μL(10 μmol·L⁻¹),1 U *Taq*聚合酶,20 ng的模板DNA。PCR反应程序:94 °C预变性2 min;94 °C变性30 s,50~54 °C退火30 s,72 °C延伸45 s,进行34个循环;72 °C延伸8 min,4 °C保存。PCR产物在1.0%(w,下同)琼脂糖凝胶上电泳分离,凝胶成像系统下观察。

1.4 基因组总DNA的提取及*VvmybA1*基因的扩增、克隆与测序

DNA扩增使用引物K和S^[21]。PCR采用50 μL反应体系,其中含10×buffer 5 μL, Mg²⁺ 4 μL(25 mmol·L⁻¹),dNTPs 4 μL(2.5 mmol·L⁻¹),引物1.25 μL(10 μmol·L⁻¹),1 U *Taq*聚合酶,50 ng的模板DNA。PCR反应程序:94 °C预变性2 min;94 °C变性30 s,55 °C退火30 s,72 °C延伸45 s,进行35个循环;72 °C延伸10 min,4 °C保存。PCR产物在1.0%琼脂糖凝胶上电泳分离,凝胶成像系统下观察。在长波紫外

灯下,选择 *VvmybA1* 基因的目的条带割胶回收,纯化后送至上海生工进行双向测序。

1.5 数据统计与分析

利用 POPENE1.32 分析 SSR 与 ISSR 的遗传多态性,利用 NTSYS-pc 2.1 软件进行聚类分析。*VvmybA1* 基因片段测序成功后,将测序结果进行拼接,在 NCBI 上的 BLAST 程序与已提交的‘黑比诺’*VvmybA1* 基因序列进行同源性比对。利用软件 BioEdit version 7.0.5 和 ClustalX 2.0 将测序的 11 个样品进行序列比对,MEGA 5.0 进行系统发育分析,采用邻接法(neighbour joining, NJ)构建系统发育树,以 Bootstrap 作 1 000 次可信度分析。核苷酸多样性(P_i)、单倍型多样性(H_d)、中性检测运用 DnaSP5.0 软件进行。

2 结果与分析

2.1 SSR 分析

2.1.1 SSR 多态性分析 筛选出 14 对多态性好的引物(表 1),共扩增出 139 条条带,其中多态性条带为 69 条。等位基因数 N 为 2~12,平均每个位点的等位基因数为 4.9;多态性位点百分比最高的是 VVMD7,达 100%,最低的为 VMC4F3,为 20.00%,平均值 59.80%;有效等位基因数 N_e 为 1.021 6 (VMC4F3)~1.590 1 (VrZAG25),平均值 1.288 9; Nei' s 基因多样性为 0.019 5 (VMC4F3)~0.322 0 (VrZAG25),平均值 0.171 1;香浓信息指数 I 最低为 0.040 5 (VMC4F3),最高为 0.467 3 (VrZAG25),平均值 0.263 4。

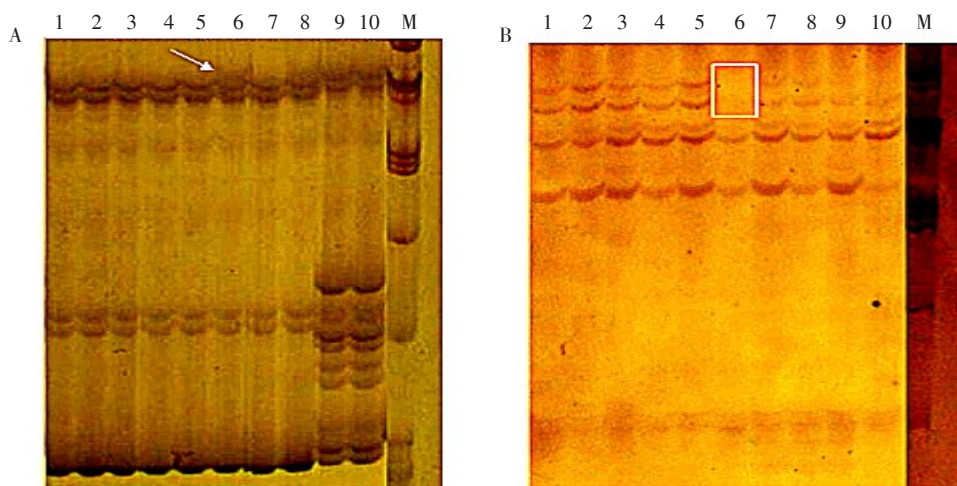
表 1 SSR 引物的序列信息

Table 1 Sequence information of the SSR primers

引物名称 Primer name	序列 Sequence(5'-3')	等位基因数 Number of loci, N	有效等位基因数 Effective number of alleles, N_e	Nei' s 基因多样性 Nei' s gene diversity, H	香农信息指数 Shannon's infor- mation index, I	多态性位点百分比 Percentage of polymor- phic loci, $P/\%$
VMC4F3	F: AAAGCACTATGGTGGGTGTAAA R: TAACCAATACATGCATCAAGGA	1	1.021 6	0.019 5	0.040 5	20.00
VVS2	F: CAGCCCGTAAATGTATCCATC R: AAATTCAAAATTCCTAATTCAACTGG	4	1.347 9	0.211 9	0.330 5	80.00
VVIv37	F: TTTTCTCCCTACTCTTAACTTC R: GGTAGACCTTGAAATGAAGTAA	2	1.217 2	0.118 4	0.178 0	40.00
VVIv67	F: TATAACTTCTCATAGGGTTTCC R: TTGGAGTCCATCAAATTCATCT	2	1.348 0	0.185 4	0.262 3	40.00
VVMD7	F: AGAGTTGCGGAGAACAGGAT R: CGAACCTTCACACGCTTGAT	8	1.434 9	0.264 9	0.413 2	100.00
VVMD8	F: TAACAAACAAGAAGAGGAAT R: AGCACATCCACAACATAATG	5	1.229 3	0.135 4	0.213 2	55.56
VVMD31	F: CAGTGGTTTTTCTTAAAGTTTCAAGG R: CTCTGTGAAAGAGGAAGAGACGC	2	1.036 0	0.032 5	0.067 5	33.33
VVMD32	F: TATGATTTTTTAGGGGGTGAGG R: GGAAAGATGGGATGACTCGC	12	1.351 2	0.218 8	0.349 0	92.31
VrZAG21	F: TCATTCACTCACTGCATTCATCGGC R: GGGGCTACTCCAAAGTCAGTTCTTG	4	1.222 6	0.151 3	0.250 1	66.67
VrZAG25	F: CTCCACTTCACATCACATGGCATGC R: CGGCCAACATTTACTCATCTCTCCC	4	1.590 1	0.322 0	0.467 3	80.00
VrZAG62	F: GGTGAAATGGGCACCGAACACACGC R: CCATGTCTCTCCTCAGCTTCTCAGC	11	1.454 2	0.251 3	0.365 4	64.71
VrZAG64	F: GAAAGAAACCCAACGCGGCACG R: TGCAATGTGGTCAGCCTTTGATGGG	3	1.204 0	0.120 3	0.181 3	37.50
VrZAG79	F: AGATTGTGGAGGGAACAAACCG R: TGCCCCCATTTTCAAACCTCCCTTCC	4	1.342 0	0.199 2	0.296 3	57.14
scu15vv	F: GCCTATGTGCCAGACCAAAAAC R: TTGGAAGTAGCCAGCCCAACCTTC	7	1.243 0	0.164 8	0.272 6	70.00
平均值 Mean		4.9	1.288 9	0.171 1	0.263 4	59.80

2.1.2 遗传关系分析 与其他 7 个‘蛇龙珠’品系相比, E06 在引物 scu15 的扩增图上多了 1 条约 500 bp

的条带,但 E06 在引物 VVIv67 的扩增图上却少了 2 条约 500 bp 的条带(图 1)。利用 NTSYS-PC 2.1 软件



M. Marker;1. E01;2. E02;3. E03;4. E04;5. E05;6. E06;7. E07;8. E08;9. 品丽珠;10. 赤霞珠。
M. Marker;1. E01;2. E02;3. E03;4. E04;5. E05;6. E06;7. E07;8. E08;9. Cabernet Franc;10. Cabernet Sauvignon.

图1 供试样品引物 scu15(A)和 VVIv 67(B)的SSR电泳分析
Fig. 1 SSR patterns of scu15 (A) and VVIv 67 (B) in tested samples

计算出相似系数(表2),从表中看出,E06在遗传上与其他7个‘蛇龙珠’新株系存在差异,它们之间的相似系数为0.974 4;而其他7个‘蛇龙珠’新株系之间的相似系数均为1.000 0,说明仅从相似系数的角度看,这

7个新株系完全相同。‘蛇龙珠’8个株系(E01~E08)与‘赤霞珠’的相似系数为0.567 7;‘蛇龙珠’E06与‘品丽珠’的相似系数为0.784 3,‘蛇龙珠’E01~E05、E07、E08与‘品丽珠’的相似系数为0.812 9。

表2 基于SSR分子标记的10份葡萄种质之间的遗传相似系数
Table 2 The similarity coefficient between pairs of 10 materials based on SSR

	E01	E02	E03	E04	E05	E06	E07	E08	品丽珠 Cabernet Franc	赤霞珠 Cabernet Sauvignon
E01	1.000 0									
E02	1.000 0	1.000 0								
E03	1.000 0	1.000 0	1.000 0							
E04	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0						
E05	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0					
E06	0.974 4	0.974 4	0.974 4	0.974 4	0.974 4	1.0000				
E07	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	0.974 4	1.000 0			
E08	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	0.974 4	1.000 0	1.000 0		
品丽珠 Cabernet Franc	0.812 9	0.812 9	0.812 9	0.812 9	0.812 9	0.784 3	0.812 9	0.812 9	1.000 0	
赤霞珠 Cabernet Sauvignon	0.567 7	0.567 7	0.567 7	0.567 7	0.567 7	0.567 7	0.567 7	0.567 7	0.618 4	1.000 0

图2是基于SSR分子标记数据的构建的UPG-MA聚类图,结果显示,在遗传系数0.57处,10份葡萄样品分为2大类,其中‘蛇龙珠’8个新株系(E01~E08)聚为一小类,又与‘品丽珠’聚为一大类,‘赤霞珠’单独聚为一类。在‘蛇龙珠’8个株系中,E06明显不同于其他7个‘蛇龙珠’新株系。

2.2 ISSR分析

2.2.1 ISSR多态性分析 筛选出来的条带清晰的引物见表3,把筛选得到的11条扩增稳定、多态性丰富的引物进行统计分析,引物UBC815的扩增结果见图3。11条引物共扩增出了96条带,平均每个位点中有4.9个等位基因;平均有效等位基因数为1.325 4;多态性位点百分比最高的是UBC815,为89.75%,最低的是UBC826,为14.29%,平均多态性

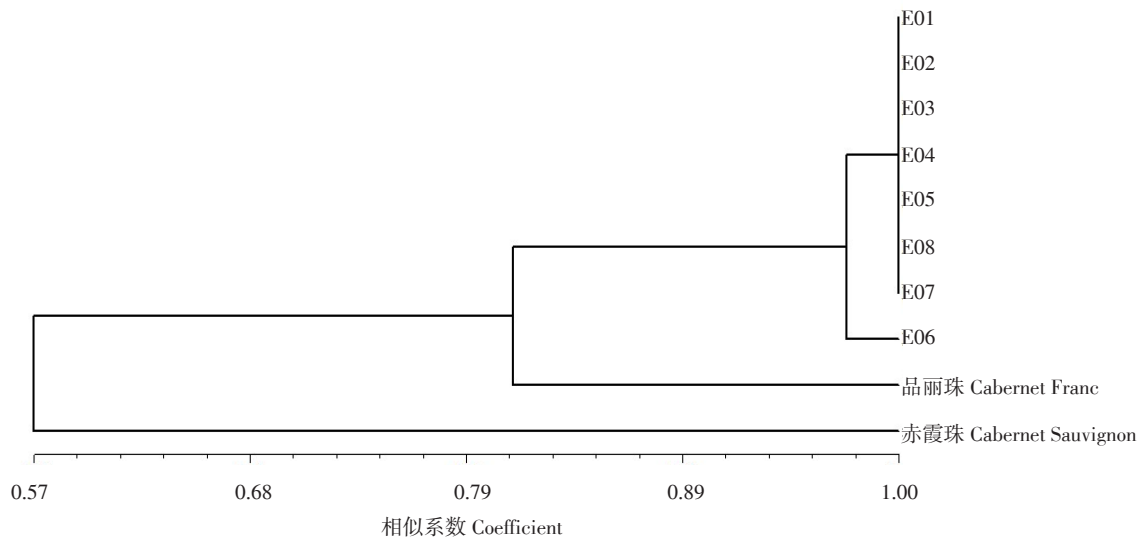
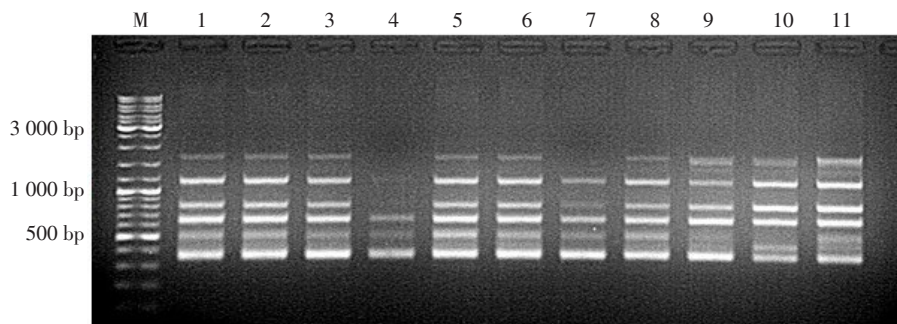


图 2 根据 SSR 结果构建的 10 份葡萄样品亲缘关系的树状分析
Fig. 2 UPGMA dendrogram of 10 *Vitis* varieties determined by SSR analysis

表 3 11 个 ISSR 标记的遗传变异统计

Table 3 Summary of genic variation statistics for 11 ISSR markers

引物名称 Primer name	序列 Sequence (5'-3')	等位基因数 Number of loci, N	有效等位基因数 Effective number of alleles, N_e	Nei's 基因多样性 Nei's gene diversity, H	香农信息指数 Shannon's information index, I	多态性位点百分比 Percentage of polymorphic loci, $P/\%$
UBC807	AGAGAGAGAGAGAGACT	7	1.584 8	0.330 6	0.478 5	77.78
UBC811	GAGAGAGAGAGAGAC	1	1.145 5	0.084 2	0.122 4	20.00
UBC815	CTCTCTCTCTCTCTG	5	1.478 5	0.275 1	0.404 8	89.75
UBC817	CACACACACACACAA	2	1.072 1	0.056 6	0.101 0	33.33
UBC818	CACACACACACACAG	4	1.347 3	0.187 3	0.271 8	50.00
UBC825	ACACACACACACACT	7	1.534 4	0.287 7	0.413 1	70.00
UBC826	ACACACACACACACC	1	1.111 9	0.062 8	0.090 2	14.29
UBC834	AGAGAGAGAGAGAGAGYT	2	1.125 8	0.075 4	0.117 1	28.57
UBC835	AGAGAGAGAGAGAGAYC	10	1.567 3	0.335 1	0.505 7	71.43
UBC848	CACACACACACACARG	5	1.265 6	0.151 9	0.225 8	41.67
UBC856	ACACACACACACACAYA	10	1.345 7	0.196 9	0.298 7	66.67
平均值 Mean		4.9	1.325 4	0.185 8	0.275 4	51.23



M. Marker; 1. E01; 2. E02; 3. E03; 4. E04; 5. E05; 6. E06; 7. E07; 8. E08; 9. 品丽珠; 10. 赤霞珠; 11. 黑比诺。
M. Marker; 1. E01; 2. E02; 3. E03; 4. E04; 5. E05; 6. E06; 7. E07; 8. E08; 9. Cabernet Franc; 10. Cabernet Sauvignon; 11. Pinot Noir.

图 3 待测葡萄 DNA 经引物 UBC815 扩增后的电泳分析
Fig. 3 Gel electrophoresis of ISSR-PCR products of the tested grapes with UBC815 primer

位点百分比为51.23%。有效等位基因数 N_e 为1.072 1(UBC817)~1.584 8(UBC807); $Nei's$ 基因多样性为0.062 8(UBC826)~0.335 1(UBC835),平均值0.185 8;香浓信息指数 I 最低为0.090 2(UBC826),最高为0.505 7(UBC835),平均值0.275 4。

2.2.2 遗传关系分析 供试的11份葡萄材料中,‘蛇龙珠’E01~E08来自烟台不同地区,其他3个近缘品种作为对照。11份样品的相似系数为0.734 7~0.938 8,平均相似系数为0.825 6;‘蛇龙珠’E05、E08

之间的相似系数与‘蛇龙珠’E02、E03之间的相似系数最大,为0.938 8,说明E05与E08,E02与E03亲缘关系很近;其他各株系之间均有一定差异,E06与E01、E02、E03、E04亲缘关系较远;‘蛇龙珠’E04与‘黑比诺’之间的遗传相似系数最小,为0.734 7;‘蛇龙珠’8个新株系中,E01与E06遗传系数最小,为0.816 3(表4)。

为了进一步探索不同株系、品种之间的亲缘关系,通过UPGMA进行聚类分析,结果显示,在遗传

表4 基于ISSR分子标记的11份葡萄种质之间的遗传相似系数
Table 4 The similarity coefficient between pair of 11 materials experimented based on ISSR

	E01	E02	E03	E04	E05	E06	E07	E08	品丽珠 Cabernet Franc	赤霞珠 Cabernet Sauvignon	黑比诺 Pinot Noir
E01	1.000 0										
E02	0.928 6	1.000 0									
E03	0.887 8	0.938 8	1.000 0								
E04	0.846 9	0.877 6	0.857 1	1.000 0							
E05	0.877 6	0.908 2	0.867 3	0.928 6	1.000 0						
E06	0.816 3	0.846 9	0.826 5	0.846 9	0.918 4	1.000 0					
E07	0.826 5	0.857 1	0.836 7	0.877 6	0.887 8	0.846 9	1.000 0				
E08	0.857 1	0.867 3	0.867 3	0.887 8	0.938 8	0.898 0	0.887 8	1.000 0			
品丽珠 Cabernet Franc	0.765 3	0.775 5	0.755 1	0.755 1	0.826 5	0.806 1	0.775 5	0.846 9	1.000 0		
赤霞珠 Cabernet Sauvignon	0.775 5	0.765 3	0.744 9	0.785 7	0.775 5	0.755 1	0.785 7	0.775 5	0.765 3	1.000 0	
黑比诺 Pinot Noir	0.785 7	0.775 5	0.775 5	0.734 7	0.765 3	0.744 9	0.775 5	0.765 3	0.755 1	0.785 7	1.000 0

相似系数0.77处,11份葡萄样品可分为2个类群(图4),第一类群包含9份葡萄资源,第2类群包括‘赤霞

珠’和‘黑比诺’;在遗传系数0.778处,9份葡萄资源又分为2大亚群,第一亚群主要是欧亚种,包括‘蛇

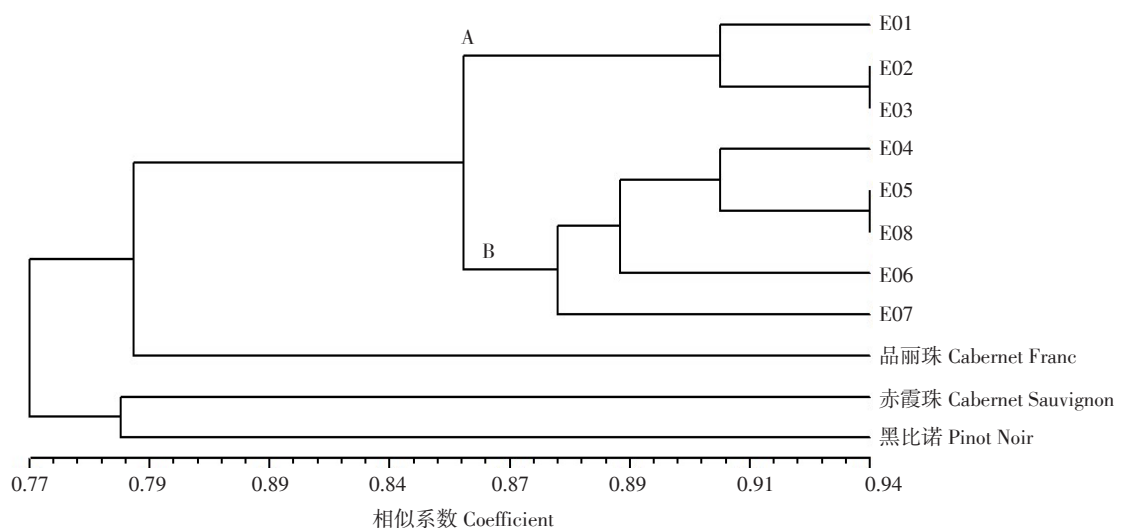


图4 根据ISSR结果构建的11份葡萄材料亲缘关系树状分析
Fig. 4 UPGMA dendrogram of 11 Vitis varieties determined by ISSR analysis

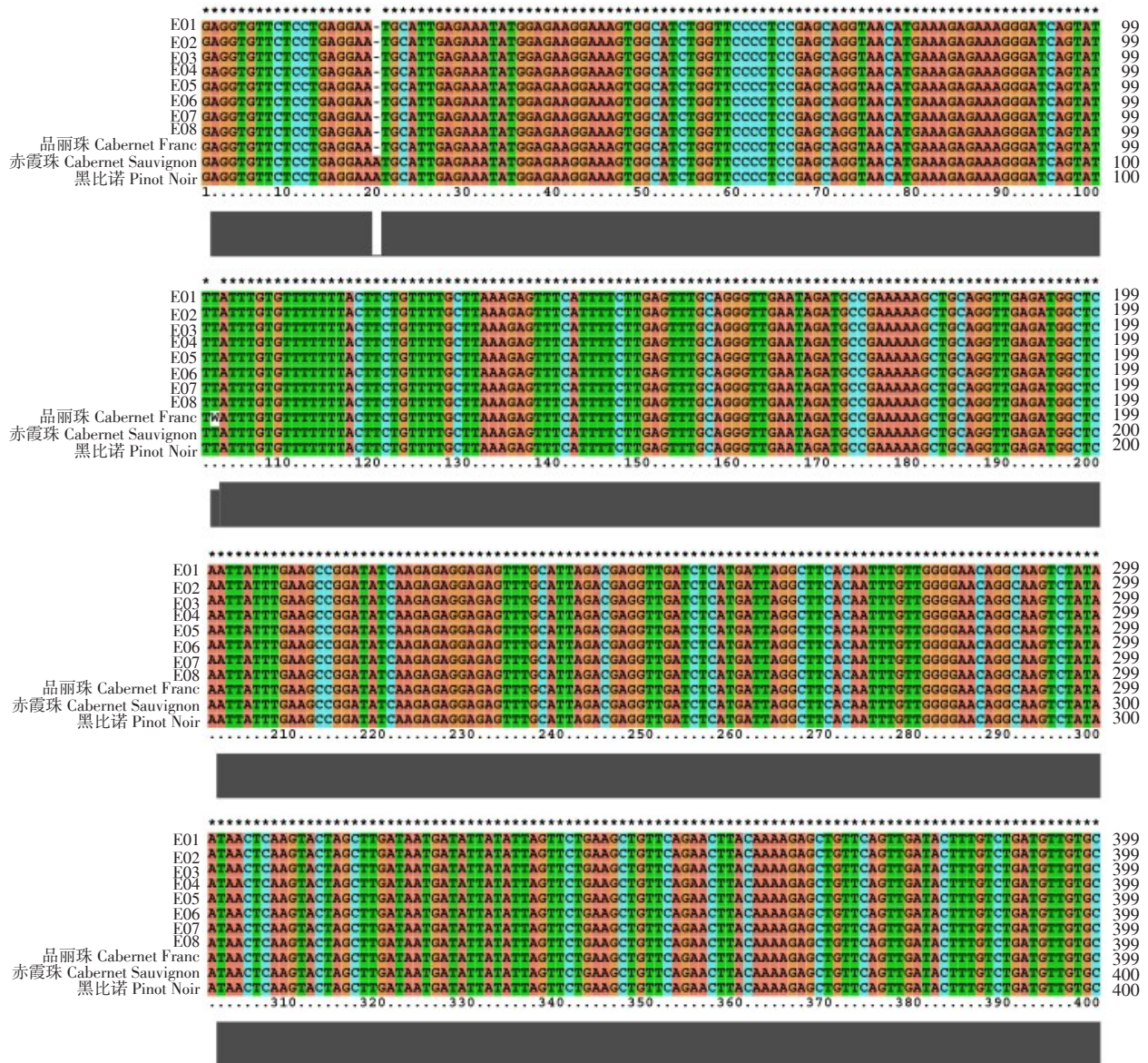
龙珠’8个新株系(E01~E08),第二亚群是‘品丽珠’;第一亚群在0.858处分为A、B 2组,A组包括E01、E02、E03。B组包括E04、E05、E06、E07、E08。来自栖霞北的‘蛇龙珠’E02和栖霞南的‘蛇龙珠’E03聚为一类,莱山的‘蛇龙珠’E05和开发区的‘蛇龙珠’E08聚为一类,这说明来自栖霞的2个‘蛇龙珠’株系未发生遗传分化,而莱山地区和开发区的‘蛇龙珠’在遗传上具有相似的地方。

2.3 *VvmybA1* 基因片段的遗传多样性分析

2.3.1 *VvmybA1* 基因片段的序列比对 利用NCBI上的BLAST对目的片段进行同源性比对,结果显示其与‘黑比诺’*VvmybA1* 基因序列(GenBank 登录号

DQ277696.1)的同源性高达99%,*VvmybA1* 基因片段的序列比对结果见图5,11个样品的克隆片段大小为905~914 bp,GC含量为42.1%~43.5%。‘蛇龙珠’8个新株系核苷酸序列有差异,经BioEdit version 7.0.5软件分析发现该基因片段起始密码子是ATG位于9~11 bp,终止密码子是TGA位于353~356 bp,开放读码框长347 bp,能编码115个氨基酸。从*VvmybA1* 基因片段的序列对比图中可以看出,包括编码区在内的部分核苷酸序列表现出高度一致,说明这些品种的*VvmybA1* 基因可能来源于亲缘关系较近的少数基因或者同一个基因^[22]。

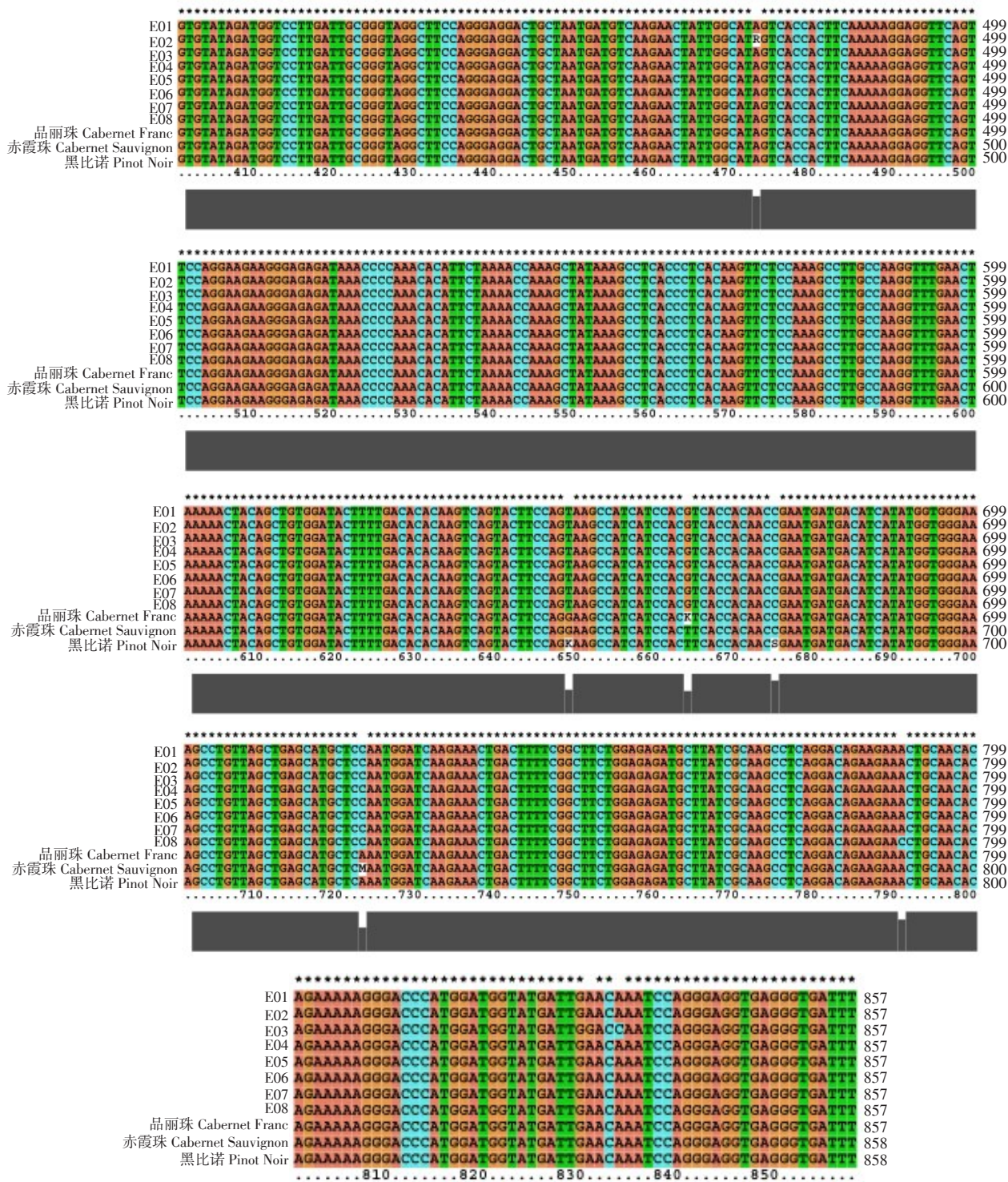
VvmybA1 基因的编码区在9~356 bp,在编码区,



表示相似性 100%。 indicate 100% identity on sequence.

图 5 *VvmybA1* 基因片段序列比对

Fig. 5 The sequences alignment of *VvmybA1* gene segments



表示相似性 100%。 indicate 100% identity on sequence.

图5 (续)
Fig. 5 (continued)

‘蛇龙珠’8个株系以及‘品丽珠’在20 bp位置缺失1个碱基。在非编码区,‘蛇龙珠’与‘赤霞珠’、品丽珠’相比,在649 bp位置发生基因颠换(G/T);‘蛇

龙珠’与‘黑比诺’相比,在664 bp位置发生基因颠换(T/G);‘蛇龙珠’E08与其他7个株系相比,在791 bp位置发生基因颠换(C/A);‘蛇龙珠’E03与

其他 7 个株系相比,在 831 bp 位置发生基因转换 (A/G);‘蛇龙珠’E03 在 834 bp 位置发生基因颠换 (A/C)。

2.3.2 中性检验 利用 DnaSP5.0 软件将测序得到的核苷酸序列进行遗传多样性分析,得出其多态性位点数为 6,突变位点数为 6,单倍型数量为 4,核苷酸多样性 (P_i) 为 0.002 21,单倍型多样性 (H_d) 为 0.673。Tajima's D、Fu and Li's D、Fu and Li's F 3 种中性检验均为负值(表 5),且不显著,符合中性进化模型,说明这些葡萄样品在近期进化史上 *VvmybA1* 基因较稳定,在过去一段历史未发生种群扩张。

表 5 供试样品的基因多态性及中性检验
Table 5 Genetic diversity and genes neutrality for the studied samples

	<i>VvmybA1</i> 基因片段 Gene segment of <i>VvmybA1</i>
多态性位点 S	6
突变位点 E_{ta}	6
单倍型数量 h	4
单倍型多样性 H_d	0.673±0.123
核苷酸多样性 P_i	0.002 21
Tajima's D	-0.374 83 (NS, $P>0.01$)
Fu and Li's D	-0.439 52 (NS, $P>0.01$)
Fu and Li's F	-0.477 58 (NS, $P>0.01$)

2.3.3 进化树分析 为了确定‘蛇龙珠’8 个新株系,以及‘品丽珠’‘赤霞珠’和‘黑比诺’的关系,用 MEGA5.0 软件中的 NJ 方法构建进化树(图 6),‘蛇龙珠’E01、E02、E04、E05、E06、E07 和‘赤霞珠’‘黑比诺’的 *VvmybA1* 基因亲缘关系较近,聚为一支;发生了基因颠换的‘蛇龙珠’E08 和 E03 的 *VvmybA1* 基因单独聚为一支。不能通过 *VvmybA1* 基因片段聚类分

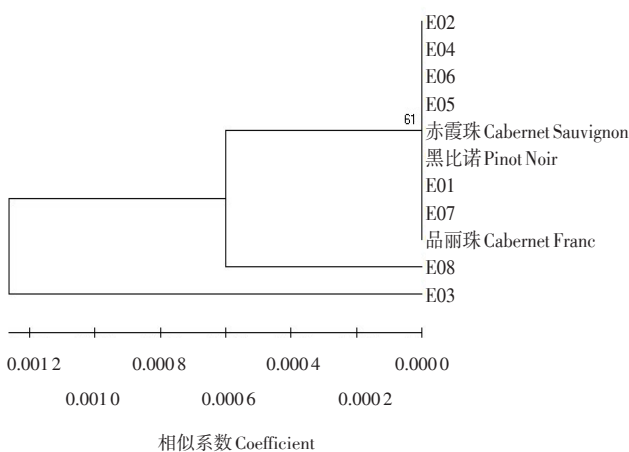


图 6 不同材料 *VvmybA1* 基因片段的系统进化树分析

Fig. 6 Phylogenetic tree of *VvmybA1* gene from different samples

析把‘蛇龙珠’其他 5 个株系还有‘赤霞珠’‘品丽珠’‘黑比诺’区分开来。

3 讨论

‘蛇龙珠’作为中国酿酒葡萄的主栽品种之一,其亲缘关系备受关注,ISSR 和 SSR 是分析植物遗传多样性的高效分子标记^[23-24]。姚玉新等^[25]曾利用 RAPD 和 SSR 技术分析,得出‘蛇龙珠’作为一个独立的品种,与‘赤霞珠’‘品丽珠’等存在基因差异,并且不同地区之间的‘蛇龙珠’存在基因差异。李玉霞等^[26]认为,‘蛇龙珠’大概是法国的‘嘎赫姆奈赫’,而不是以前被认为的‘品丽珠’。

‘蛇龙珠’8 个新株系之间 SSR 聚类分析结果显示,只有‘蛇龙珠’E06 与其他 7 个株系有差异,另外 7 个株系聚为一类。ISSR 结果显示,‘蛇龙珠’E02 和 E03 聚为一类,遗传距离与地理距离一致,E05 和 E08 聚为一类,E01、E04、E06、E07 之间差异显著。这也说明在区别‘蛇龙珠’2 个株系时首先考虑遗传距离而不是地理距离^[6]。ISSR 和 SSR 都能得出‘蛇龙珠’E06 与其他‘蛇龙珠’株系有显著差异,平均每个位点的等位基因数量相同,为 4.9,Nei's 基因多样性、香浓信息指数、多态性百分位点的百分比差异不显著,并且‘蛇龙珠’与‘赤霞珠’亲缘关系较远,与‘品丽珠’亲缘关系较近,这与前人研究一致^[25]。

李红娟等^[27]利用 RAPD 技术得出‘蛇龙珠’E03、E04、E06、E07、E08 为同一类型,‘蛇龙珠’E01、E02、E05 有差别。运用 ISSR 分子标记可以将‘蛇龙珠’8 个新株系区分开,但是与李红娟等^[27]的试验结果有所不同,可能是由于 2 种方法试验原理不同、引物的数量不同、2 种分子标记在基因组 DNA 的分布不同,或扩增部位潜在的进化机制特性等造成的^[28]。增加 SSR 引物的数量,扩大 SSR 标记对基因组的检测区间,或许可以将‘蛇龙珠’8 个新株系的样本分开。本试验的 SSR 和 ISSR 结果显示,大多数引物的 Nei's 基因多样性 (H)、香浓信息指数 (I)、多态性百分位点的百分比 (P) 均不高,例如 Jing 等^[29]利用 ISSR 研究 70 份葡萄材料得出 $H=0.23$, $I=0.37$, $P=98.33\%$,而本研究中只有 11 份葡萄材料,得出 $H=0.171 1$, $I=0.040 5$, $P=59.80\%$ 。Martinez 等^[19]利用 SSR 研究 25 个南美葡萄品种,得到每对引物的平均等位基因数目 (N) 为 9.67,平均有效等位基因数目 (N_e) 为 5.958,其中引物 VrZAG62 的 N_e 最高,为 9.191。而本研究中, $N=4.9$,

$N_e=1.2889$ 。引物 VrZAG25 的 N_e 最高,为 1.5901,这也说明了供试样品的 SSR 位点多态性较低。

11 份葡萄样品的 *VvmybA1* 基因片段序列的编码区仅存在一个基因缺失,非编码区有 5 个碱基替换,其中包括 1 个腺嘌呤到鸟嘌呤的基因转换,4 个嘌呤到嘧啶的基因颠换,果皮颜色均为紫黑色,可能这些碱基突变并未影响蛋白质的表达。前人研究得出水稻、玉米、凹叶木兰的核苷酸多样性 (P_i) 分别为 0.0035、0.0063~0.0096、0.0178^[30-32],本研究中这 11 份样品的 *VvmybA1* 基因片段的 P_i 为 0.00221,根据 P_i 和 H_d 的数值越大,其多样性程度越高,遗传多样性越丰富的原则,这 11 份样品的 *VvmybA1* 基因片段的遗传多样性较低。焦健等^[33]通过分析 14 个中国野生葡萄样品的 *VvmybA1* 基因,发现中国野生种葡萄株系 *VvmybA1* 基因存在一些特有序列或突变,这些突变可以很好地将自身与其他葡萄株系(品种)区分开,而通过供试样品 *VvmybA1* 基因片段的进化树分析,并没有把‘蛇龙珠’其他 5 个株系还有‘赤霞珠’‘品丽珠’‘黑比诺’有效地进行聚类分析。扩增片段成为遗传标记的关键是其具有多态性^[34]。通过试验得出 *VvmybA1* 基因片段在‘蛇龙珠’8 个新株系的分类研究中不适宜做遗传标记,这可能是由于近期进化史上 *VvmybA1* 基因遗传多样性较低,基因较稳定,只存在少量的基因差异,也可能发生基因重组或种间杂交。

通过不同的方法对‘蛇龙珠’进行遗传水平的多样性研究,寻找不同株系之间的基因差异。建议今后可以多收集、保存具有不同地域特色的‘蛇龙珠’种质资源,利用分子标记或者直接测序方法加以鉴别,从而防止酿酒葡萄遗传多样性的丧失,在品种选育过程中将遗传背景相似的聚为一类,避免重复选种。

参考文献 References:

- [1] 罗国光. 葡萄品种‘蛇龙珠’是否就是‘品丽珠’—关于‘蛇龙珠’的起源探讨[J]. 果树学报, 1999, 16(3): 161-164.
LUO Guoguang. Red wine grape variety ‘Cabernet Gemischt’—a wrong name translated into Chinese a century ago [J]. Journal of Fruit Science. 1999, 16(3): 161-164.
- [2] 尹克林. 蛇龙珠与赤霞珠葡萄品种的判别鉴定研究[J]. 西南大学学报(自然科学版), 1998, 20(3): 207-211.
YIN Kelin. Determination of wine grape varieties ‘Cabernet Gemischt’ and ‘Cabernet Sauvignon’ [J]. Journal of Southwest Agricultural University (Natural Science Edition), 1998, 20(3): 207-211.
- [3] 刘闯萍,王军. SSR 标记及其在葡萄上的应用[J]. 果树学报, 2008, 25(1): 93-101.
- [4] LIU Chuangping, WANG Jun. SSR DNA marker and its application in grapevine[J]. Journal of Fruit Science, 2008, 25(1): 93-101.
- [5] MORGANTE M, OLIVIERI A M. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics[J]. Plant Journal, 1993, 3(1): 175-182.
- [6] HUANG H, LU J, XU X, YANG X Q, LIANG S, WU J. EST-SSRs characterization and in-silico alignments with linkage map SSR loci in grape (*Vitis L.*) genome[J]. Genes & Genomics, 2012, 34(1): 19-26.
- [7] JING Z B, WANG X P, CHENG J M. Analysis of genetic diversity among Chinese wild *Vitis* species revealed with SSR and SRAP markers[J]. Genetics & Molecular Research, 2013, 12(2): 1962-1973.
- [8] 温景辉,申海林,邹利人,陈蕾,刘洪章. 20 份葡萄种质亲缘关系的 SSR 分析[J]. 果树学报, 2011, 28(5): 782-786.
WEN Jinghui, SHEN Hailin, ZOU Liren, CHEN Lei, LIU Hongzhang. Analysis of genetic relationship among 20 *Vitis* germplasm resources by SSR markers[J]. Journal of Fruit Science, 2011, 28(5): 782-786.
- [9] 梁武军,解凯东,谢宗周,徐强,伊华林,郭文武. 三倍体葡萄柚实生后代多倍体的发掘与 SSR 遗传鉴定[J]. 果树学报, 2015, 32(1): 13-18.
LIANG Wujun, XIE Kaidong, XIE Zongzhou, XU Qiang, YIN Hualin, GUO Wenwu. Exploitation of polyploids from open-pollinated triploid grapefruit progenies and their genetic identification by SSR molecular markers[J]. Journal of Fruit Science, 2015, 32(1): 13-18.
- [10] 尹玲,张晨,向江,张雅丽,安云鹤,徐海英,赵胜建,郭修武,卢江. 我国新育成葡萄品种 SSR 指纹图谱的建立[J]. 果树学报, 2015, 32(3): 366-373.
YIN Ling, ZHANG Chen, XIANG Jiang, ZHANG Yali, AN Yunhe, XU Haiying, ZHAO Shengjian, GUO Xiuwu, LU Jiang. The SSR fingerprinting of grapevine cultivars newly-developed in China[J]. Journal of Fruit Science, 2015, 32(3): 366-373.
- [11] GHOSH J. Molecular diversity analysis of flower colour variants of *Butea monosperma* (Lam.) Taub. using inter simple sequence repeats[J]. The Bioscan, 2013, 8(3): 969-974.
- [12] CHOUDHARY R S, ZAGADE V S, KHALAKAR G D, SINGH N K. ISSR based genotypic differentiation of grape (*Vitis vinifera L.*) [J]. The Bioscan, 2014, 9(2): 823-828.
- [13] BUYUKALACA S. Genetic relationship of grape cultivars by ISSR (inter-simple sequence repeats) markers[J]. European Journal of Horticultural Science, 2008, 73(2): 84-88.
- [14] KARIMI M R, DEHVARI V, HAJIYAN M. Genetics diversity of some grape genotypes by ISSR and RAPD markers[J]. European Journal of Horticultural Science, 2011, 76(5): 201-207.
- [15] 李琳,魏灵珠,程建徽,梅军霞,吴江. 24 份葡萄种质亲缘关系的 ISSR 分析[J]. 浙江农业学报, 2013, 25(4): 772-776.

- LI Lin, WEI Lingzhu, CHENG Jianhui, MEI Junxia, WU Jiang. Analysis on genetic relationship of 24 germplasm resources by ISSR markers[J]. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 2013, 25(4): 772-776.
- [15] PEROS J P, LAUNAY A, BERGERE G, LACOMBE T, THIS P. *MybA1* gene diversity across the *Vitis* genus[J]. *Genetica*, 2015, 143(3): 373-384.
- [16] MATUS J T, AQUEA F, ARCE-JOHNSON P. Analysis of the grape MYB R2R3 subfamily reveals expanded wine quality-related clades and conserved gene structure organization across *Vitis* and *Arabidopsis* genomes[J]. *BMC Plant Biology*, 2008, 8(1): 1-15.
- [17] KOBAYASHI S, GOTO-YAMAMOTO N, HIROCHIKA H. Retrotransposon-induced mutations in grape skin color[J]. *Science*, 2004, 304(5673): 982.
- [18] AKHARE A A, SAKHARE S, KULWAL P, DHUMALE D, KHARKAR A. RAPD profile studies in *Sorghum* for identification of hybrids and their parents[J]. *International Journal of Integrative Biology*, 2008, 3(1):18-24.
- [19] MARTINEZ L E, CAVAGNARO P F, MASUELLI R W, ZUNIGA M. SSR-based assessment of genetic diversity in South American *Vitis vinifera* varieties[J]. *Plant Science*, 2006, 170(6): 1036-1044.
- [20] AGAR G, YILDIRIM N, ERCISLI S, ERGUL A, YUKSEL C. Determination of genetic diversity of *Vitis vinifera* cv. Kabarcik populations from the Coruh valley using SSR markers[J]. *Biochemical Genetics*, 2012, 50(5/6): 476-483.
- [21] 付晓伟, 焦健, 刘崇怀, 樊秀彩, 姜建福, 张颖. 山葡萄及其杂种 Myb 相关基因的基因型及 VvmybA1 片段的分析[J]. *果树学报*, 2014, 31(3):353-361.
- FU Xiaowei, JIAO Jian, LIU Chonghuai, FAN Xiucui, JIANG Jianfu, ZHANG Ying. Genotyping Myb-related genes in *Vitis amurensis* and its hybrids and characterizing the VvmybA1 fragment sequences[J]. *Journal of Fruit Science*, 2014, 31(3):353-361.
- [22] 慕茜, 吴伟民, 房经贵, 孙欣, 上官凌飞, 赵密珍. 不同葡萄品种的 VvmybA1 基因型及其特征性 DNA 片段的序列分析[J]. *园艺学报*, 2011, 38(11): 2075-2084.
- MU Qian, WU Weimin, FANG Jinggui, SUN Xi, SHANGGUAN Lingfei, ZHAO Mizhen. Genotyping VvmybA1 in 59 grapevine cultivars and characterization of the DNA fragment sequences [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2011, 38(11):2075-2084.
- [23] GALVAN M Z, BOMET B, BALATTI P A, BRANCHARD M. Inter simple sequence repeat (ISSR) markers as a tool for the assessment of both genetic diversity and gene pool origin in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.)[J]. *Euphytica*, 2003, 132(3): 297-301.
- [24] ERFANI J, EBADI A, ABDOLLAHI H, FATAHI R. Genetic diversity of some pear cultivars and genotypes using simple sequence repeat (SSR) markers[J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2012, 30(5): 1065-1072.
- [25] 姚玉新, 左方梅, 翟衡, 刘来馨. ‘蛇龙珠’等酿酒葡萄品种的 DNA 分析[J]. *园艺学报*, 2005, 32(4):604-608.
- YAO Yuxin, ZUO Fangmei, ZHAI Heng, LIU Laixin. The RAPD and SSR analysis of ‘Cabernet Shelongzhu’ and other wine grape cultivars [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2005, 32(4):604-608.
- [26] 李玉霞, 龚玉梅, 王振平. 酿酒葡萄品种“蛇龙珠”亲缘关系的 RAPD 分析[J]. *中外葡萄与葡萄酒*, 2008(3):17-20.
- LI Yuxia, GONG Yumei, WANG Zhenping. Analysis on genetic diversity of wine grape Cabernet Gernischt by RAPD[J]. *Sino-Overseas Grapevine & Wine*, 2008(3):17-20.
- [27] 李红娟, 周新明, 刘勇强, 李记明. ‘蛇龙珠’亲缘关系鉴定在营养系选种中的应用[J]. *中国农学通报*, 2012, 28(28): 153-157.
- LI Hongjuan, ZHOU Xinming, LIU Yongqiang, LI Jiming. The application of phylogenetic analysis on selection new clones of ‘Cabernet Gernischt’ [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2012, 28(28):153-157.
- [28] POWELL W, MORGANTE M, ANDRE C, HANAFEY M, VOGEL J, TINGEY S, RAFALSKI A. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis[J]. *Molecular Breeding*, 1996, 2(3): 225-238.
- [29] JING Z B, WANG X P. Genetic relationship between Chinese wild *Vitis* species and American and European cultivars based on ISSR markers[J]. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2013, 46: 120-126.
- [30] CAICEDO A L, WILLIAMSON S H, HERNANDEZ R D, BOYKO A, FLEDEL-ALON A, YORK T L, POLATO N R, OLSEN K M, NIELSEN R N, MCCOUCH S R, BUSTAMANTE C D, PURUGANAN M D. Genome-wide patterns of nucleotide polymorphism in domesticated rice[J]. *PLoS Genetics*, 2007, 3(9): 1745-1756.
- [31] TENAILLON M I, SAWKINS M C, LONG A D, GAUT R L, DOEBLEY J F, GAUT B S. Patterns of DNA sequence polymorphism along chromosome 1 of maize (*Zea mays* ssp. *mays* L.)[J]. *PNAS*, 2001, 98(16): 9161-9166.
- [32] 王佳媛, 吴传芳, 唐亚. 基于 SNP 分子标记的凹叶木兰遗传多样性初步研究[J]. *广西植物*, 2012, 32(4): 542-547.
- WANG Jiayuan, WU Chuanfang, TANG Ya. Preliminary study on genetic diversity of *Magnolia sargentiana* (Magnoliaceae) through SNP marker[J]. *Guihaia*, 2012, 32(4):542-547.
- [33] 焦健, 刘崇怀, 樊秀彩, 张颖, 孙海生, 姜建福, 李民. 中国野生种葡萄 mybA 转录因子 SNP 特征分析[J]. *植物遗传资源学报*, 2013, 14(5):885-891.
- JIAO Jian, LIU Chonghuai, FAN Xiucui, ZHANG Ying, SUN Haisheng, JIANG Jianfu, LI Min. Characterization of SNP associated with mybA transcription factor in Chinese wild grapes[J]. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2013, 14(5):885-891.
- [34] 陈全求, 詹先进, 蓝家祥, 黄云. EST 分子标记开发研究进展 [J]. *农业生物技术科学*, 2008, 24(9):72-77.
- CHEN Quanqiu, ZHAN Xianjin, LAN Jiayang, HUANG Yun. Study progress in development of EST (expressed sequence tags) [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2008, 24(9):72-77.