

葡萄砧木品种的SSR分析

王雯染^{1,2}, 杨哲¹, 杨航宇^{1,2}, 王军^{1,2*}

(¹中国农业大学食品科学与营养工程学院葡萄与葡萄酒研究中心, 北京 100083;

²农业部葡萄酒加工重点实验室, 北京 100083)

摘要:【目的】分析葡萄砧木品种遗传多样性。【方法】利用17对SSR引物对21个葡萄砧木品种、3个欧亚种酿酒葡萄品种进行扩增。【结果】共获得195个等位基因, 片段大小为87 bp(VVIV52)~265 bp(Vrzag79), 观测杂合度(H_o)为0.46~0.96, 期望杂合度(H_e)为0.57~0.94, Shannon多样性指数(I)为1.10~2.62, 多态性百分率为100%, 所选引物的遗传多态性高, 适宜用作葡萄砧木品种的遗传多样性分析。在单个引物鉴定品种方面, VVMD5效率最高, 可鉴定19个品种; VVS3和UDV-058效率最低, 仅能鉴别2个品种。选择2对引物组合可以大大提高鉴定效率, 选择VVMD5 & VVS4等组合可将全部供试种质资源鉴定出来, 鉴定效率达100%, 体现了SSR标记在品种鉴定上的高效性。对扩增结果进行聚类分析, 在遗传相似系数0.74处, 欧亚种酿酒葡萄与砧木品种各自聚为一类, 且亲缘关系较近的砧木品种聚在一起, 聚类结果符合砧木品种选育时的亲缘关系。【结论】利用SSR分子标记能有效地鉴定葡萄砧木品种和进行遗传多样性分析。

关键词: 葡萄砧木; SSR分子标记; 品种鉴定; 遗传多样性

中图分类号: S663.1

文献标志码: A

文章编号: 1009-9980(2018)01-0011-09

Analysis of grape rootstocks by SSR markers

WANG Wenran^{1,2}, YANG Zhe¹, YANG Hangyu^{1,2}, WANG Jun^{1,2*}

(¹Center for Viticulture and Enology, College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China; ²Key Laboratory of Viticulture and Enology, Ministry of Agriculture, Beijing 100083, China)

Abstract:【Objective】The rootstock varieties of grape commonly used in China are mostly selected from Europe and America, some rootstock varieties have been confused during the course of introduction. Moreover, many grape rootstock varieties have similar genetic background and similar morphology, which are difficult to identify by traditional morphological characters. Therefore, the correct identification of grape rootstock varieties is of great significance for efficient utilization and protection of the rootstock resources. Simple sequence repeat (SSR) is a molecular genetic marker based on PCR technology. SSR marker has been widely used in genetic identification, relationship analysis, genetic map construction, and pedigree reconstruction of grape germplasm resources for its advantages of high polymorphism, good repeatability, codominant inheritance and strong specificity. This study was carried out to analyze the genetic relationship and genetic diversity of grape rootstocks.【Methods】21 grape rootstocks and 3 varieties of *Vitis vinifera* varieties ‘Cabernet Sauvignon’ ‘Chardonnay’ ‘Syrah’ were amplified by 17 pairs of SSR primers, such as VVS2, VVMD5, VVMD7, VVMD27, Vrzag62, Vrzag79 and so on. Genomic DNA of grape leaf samples was extracted by modified CTAB method. Genomic SSR-PCR was amplified using the following amplification systems and procedures: The system included 2 μ L, 10 \times PCR buffer, 1 U *Taq* enzyme, 0.2 mmol \cdot L⁻¹ dNTP, 1.5 mmol \cdot L⁻¹ Mg²⁺, 0.4 μ mol \cdot L⁻¹ primer (each), 50 ng DNA template, and ddH₂O supplementation to 20 μ L. The PCR reaction was carried out on the Prime G02 PCR instrument produced by Bibby Scientific. The running amplification reaction program was as follows: an initial denaturation 94 $^{\circ}$ C for 5 min, denaturation at 94 $^{\circ}$ C for 30 s, annealing at 50–60 $^{\circ}$ C for 30 s, extension at 72 $^{\circ}$ C for 40 s, reac-

收稿日期: 2017-07-31 接受日期: 2017-10-24

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项基金(CARS-29)

作者简介: 王雯染, 在读硕士研究生, 研究方向为葡萄砧木SSR。Tel: 18801379011, E-mail: WWR0130@cau.edu.cn

*通信作者 Author for correspondence. Tel: 010-62738537, E-mail: jun_wang@cau.edu.cn

tion of 35 cycles, last extension at 72 °C for 10 min. The same template was repeated twice. SSR-PCR amplification products were analyzed by 8% denatured polyacrylamide gel electrophoresis and amplification products were subjected to capillary electrophoresis to determine the fragment size of each locus. 【Results】17 pairs of SSR primers showed higher genetic polymorphism, a total of 195 alleles were amplified in 21 rootstock varieties and 3 *Vitis vinifera* varieties, and the number of alleles amplified by each primer was 5–17. VVMD27 and Vrzag47 amplified 17 alleles and VVS3 amplified 5 alleles. The fragment sizes were 87 bp (VVIV52)–265 bp (Vrzag79), the average number of effective alleles (N_e) of 17 amplified loci were 7.21. Among the primers used, VVS29 and VVMD27 amplified 2.27 and 12.26 effective alleles, respectively. The observed heterozygosity (H_o) was 0.46–0.96, and the average observed heterozygosity (H_o) of each primer was 0.78. The expected heterozygosity (H_e) was 0.57–0.94, and average expected heterozygosity (H_e) was 0.83, The H_e value of VVS29 was the lowest, and the H_e value of VVMD27 was the highest. The Shannon diversity index (I) was 1.10–2.62, and the average Shannon diversity index was 2.04 and the percentage of polymorphic loci was 100%. The I value of UDV–058 was the lowest, and the I value of Vrzag47 was the highest. Distinctive alleles contributed greatly to the identification of grape varieties, except for primers VVS4 and VVII52, the other primers amplified distinctive alleles in 21 rootstock varieties and 3 *Vitis vinifera* varieties, among the primers used, VMC8G6 amplified 7 distinctive alleles. The genetic polymorphism of the selected primers was high and suitable for genetic diversity analysis of grape rootstock varieties. In single primer identification, VVMD5 was the most efficient and could identify 19 varieties. VVS3 and UDV–058 had the lowest efficiency, and only 2 varieties could be identified by them. 2 pairs of primer combinations could greatly improve the efficiency of identification. The identification efficiency of the combination of primers VVMD27 & UDV–058, VVS2 & VVMD5 is 83.3%. The combination of VVMD5 & VVS4, VMC1B11 & VVS4 could be used to identify all the tested rootstock germplasm resources, and the identification efficiency was 100%. SSR markers showed high efficiency in grape rootstock variety identification. Cluster analysis of the amplified results showed that the genetic similarity coefficients among the 24 grape varieties were 0.74–0.99. The grape rootstocks and wine grape varieties studied were separated into two clusters by UPGMA with the similarity index of 0.74. The 21 stock varieties could be divided into 2 subgroups with the genetic similarity coefficient of 0.752. The first subgroup contained 4 rootstock varieties, and the second subgroup contained 17 rootstock varieties. The clustering results were consistent with the behaviors of grape rootstocks in breeding. 【Conclusion】SSR markers can effectively identify the variety of grape rootstock and use for genetic diversity analysis.

Key words: Grape rootstocks; SSR markers; Variety identification; Genetic diversity

简单序列重复 (simple sequence repeat, SSR) 又称微卫星 (microsatellite), 是近年来发展起来的基于 PCR 的一种新型分子遗传标记^[1-2]。由于 SSR 分子标记具有多态性高、重复性好、共显性遗传、技术简单、特异性强等优点, 已成为种质资源鉴定、亲缘关系分析、系谱重建和遗传图谱构建等领域首选的分子标记技术之一^[3-8], 在生物基因组研究中被广泛应用。随着 SSR 标记技术的广泛应用, 其在葡萄方面也有大量利用的报道。SSR 标记对于葡萄品种传播过程中出现的同名异物和同物异

名现象具有极好的鉴别效用。Gonzalez 等^[9]用 12 对 SSR 引物对采自西班牙的 73 份葡萄资源进行分析发现, ‘Garnacha’ ‘Tinto Basto’ 和 ‘Machina’, ‘Tortosi’ 和 ‘Rojal’, ‘Moravio’ 和 ‘Bobal’ 为同物异名。Ulanovsky 等^[10]采用 RAPD 和 SSR 分子标记证明了 Monastel 和 Monastrell 名下的几个品种为同名异物品种, 对 2 种分子标记技术进行比较发现, SSR 标记的结果较简单且可靠。SSR 广泛分布于整个植物基因组中, 表现出丰富的多态性, 且亲缘关系越近, SSR 片段长度差异越小。因此, SSR 标

记可应用于亲缘关系分析和系谱重建等,又由于SSR标记为共显性遗传,可以克服同工酶、RAPD等标记在系谱研究上的局限性^[11-12]。Bowers等^[13]对51个欧亚种葡萄的24个SSR位点进行了分析,得出‘品丽珠’和‘长相思’是‘赤霞珠’亲本的结论。Laucou等^[14]利用20对SSR引物对已知1个亲本的砧木品种‘Fercal’进行分析,证明了‘B.C. n°1B’是其母本,而‘31 Richter’是其父本,同时证明了‘白玉霓’才是‘B.C. n°1B’的父本,而非‘鸽笼白’。SSR位点大量分布于基因组的各个位置以及其高度的变异性,使其成为构建高密度遗传图谱的有力工具。Adam-Blondon等^[15]以‘西拉’和‘歌海娜’的杂交F₁代群体和‘Riesling’的自交F₁代群体为材料,利用245个SSR标记构建了双亲的连锁图和整合图,在连锁组上定位了123个新的SSR标记。遗传图谱的构建不仅可以用来检测控制重要经济性状的位点,而且有助于利用图谱对相关基因进行克隆^[1]。

我国葡萄栽培上常用的砧木品种多为欧美国家选育,引种途径很多,一些砧木品种在引入过程中和引入后出现了混乱现象,而且许多砧木品种亲缘关系较近,形态相似,用传统的形态学标记难以辨识,这都不利于砧木种质资源的研究和品种的推广利

用。因此,正确鉴定砧木品种对砧木资源的管理、利用和保护具有重要的意义。笔者利用17对SSR引物对21个葡萄砧木品种进行扩增,并以3个欧亚种葡萄酿酒品种为对照,进行葡萄砧木品种的鉴定和遗传多样性分析,从而为有效利用SSR标记评价砧木种质资源的遗传多样性、分析亲缘关系和鉴定品种提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

5个葡萄砧木品种的幼叶采自北京市密云县,3个欧亚种葡萄品种‘赤霞珠’‘霞多丽’‘西拉’的幼叶采自中国农业大学上庄实验站葡萄种质资源圃。采样时选择5~10枚幼叶装入冰盒中带回实验室。15个砧木品种的枝条引自新西兰,解除休眠后扦插,成活后待嫩叶展开长度为3~5 cm时,采集2~3枚嫩叶,装入冰盒中带回实验室。带回实验室的葡萄幼叶样品液氮速冻后置于-80℃冰箱保存,用于基因组DNA的提取。砧木品种‘1613 C’的DNA样品来自美国康奈尔大学,为预先提取的基因组DNA干粉样品,加入100 μL 1×TE缓冲液(北京宝如亿生物技术有限公司)溶解,-20℃冰箱保存。供试材料名称及来源见表1。

表1 24份葡萄品种及来源
Table 1 List of 24 grapevine varieties and collected place

品种编号 Variety No.	品种 Variety	来源 Origin	采集地 Collected place
1	3309 C	河岸葡萄×沙地葡萄 <i>V. riparia</i> × <i>V. rupestris</i>	新西兰 New Zealand
2	S04	冬葡萄×河岸葡萄 <i>V. berlandieri</i> × <i>V. riparia</i>	新西兰 New Zealand
3	101-14	河岸葡萄×沙地葡萄 <i>V. riparia</i> × <i>V. rupestris</i>	新西兰 New Zealand
4	110 R	冬葡萄×河岸葡萄 <i>V. berlandieri</i> × <i>V. riparia</i>	新西兰 New Zealand
5	洛特 Rupestris du Lot	沙地葡萄 <i>V. rupestris</i>	新西兰 New Zealand
6	5 C	冬葡萄×河岸葡萄 <i>V. berlandieri</i> × <i>V. riparia</i>	新西兰 New Zealand
7	5 BB	冬葡萄×河岸葡萄 <i>V. berlandieri</i> × <i>V. riparia</i>	新西兰 New Zealand
8	Dog Ridge	山平氏葡萄 <i>V. champinii</i>	新西兰 New Zealand
9	Fercal	冬葡萄×333EM <i>V. berlandieri</i> ×333EM	新西兰 New Zealand
10	哥洛尔 Gloire	河岸葡萄 <i>V. riparia</i>	新西兰 New Zealand
11	Ramsey	山平氏葡萄 <i>V. champinii</i>	新西兰 New Zealand
12	420 A	冬葡萄×河岸葡萄 <i>V. berlandieri</i> × <i>V. riparia</i>	新西兰 New Zealand
13	Schwarzman	河岸葡萄×沙地葡萄 <i>V. riparia</i> × <i>V. rupestris</i>	新西兰 New Zealand
14	和谐 Harmony	1613 C×Dog Ridge	新西兰 New Zealand
15	140 R	冬葡萄×沙地葡萄 <i>V. berlandieri</i> × <i>V. rupestris</i>	新西兰 New Zealand
16	1103 P	冬葡萄×沙地葡萄 <i>V. berlandieri</i> × <i>V. rupestris</i>	中国北京密云 Miyun, China
17	Florilush	Dog Ridge×Tampa <i>V. champinii</i> × <i>V. vinifera</i>	中国北京密云 Miyun, China
18	贝达 Beta	河岸葡萄×美洲葡萄 <i>V. riparia</i> × <i>V. labrusca</i>	中国北京密云 Miyun, China
19	Ganzin 1	欧亚种葡萄×沙地葡萄 <i>V. vinifera</i> × <i>V. rupestris</i>	中国北京密云 Miyun, China
20	Salt Creek	<i>V. doaniana</i>	中国北京密云 Miyun, China
21	1613 C	欧亚种×河岸葡萄×沙罗尼司葡萄 <i>V. vinifera</i> × <i>V. riparia</i> × <i>V. solonis</i>	美国 USA
22	赤霞珠 Cabernet Sauvignon	欧亚种葡萄 <i>V. vinifera</i>	中国北京上庄 Shangzhuang, China
23	霞多丽 Chardonnay	欧亚种葡萄 <i>V. vinifera</i>	中国北京上庄 Shangzhuang, China
24	西拉 Shiraz	欧亚种葡萄 <i>V. vinifera</i>	中国北京上庄 Shangzhuang, China

1.2 方法

1.2.1 葡萄基因组 DNA 提取 葡萄叶片基因组 DNA 提取采用王军等^[6]的改良 CTAB 法。

1.2.2 基因组 SSR-PCR 扩增 (1)引物选择。从文

献报道的 56 对引物中,筛选出 17 对条带清晰、多态性高的引物用于本项研究,试验筛选出的引物信息见表 2。

(2)PCR 反应体系和程序。根据预试验,建立

表 2 17 对 SSR 引物序列、退火温度和目标片段长度

Table 2 List of 17 pairs of SSR primer sequence, annealing temperature and target size

引物名称 Primer name	序列 Sequence	退火温度 Annealing temperature/°C	目标片段大小 Target size/bp	参考文献 Reference
VVS2	F:CAGCCCGTAAATGTATCCATC R:AAATTCAAAATCTAAATCAACTGG	56	121~149	[17]
VVMD5	F:CTAGAGCTACGCCAATCCAA R:CTAGAGCTACGCCAATCCAA	54	224~264	[17]
VVMD7	F:AGAGTTGCGGAGAACAGGAT R:CGAACCTTCACACGCTTGAT	54	229~263	[17]
VVMD27	F:ACGGTATAGAGCAAACGGTGT R:GTACCAGATCTGAATACATCCGTAAGT	54	172~214	[17]
Vrzag62	F:GGTGAATGGGCACCGAACACACGC R:CCATGTCTCTCCTCAGCTTCTCAGC	54	172~220	[17]
Vrzag79	F:AGATTGTGGAGGAGGGAACAAACCG R:TGCCCCCATTTTCAAACCTCCCTCC	54	235~265	[17]
Vrzag21	F:GGGGTACTCCAAAGTCAGTTCTTG R:TCATTCACCTCACTGCATTTCATCGGC	54	189~215	[18]
Vrzag47	F:GGTCTGAATACATCCGTAAGTATAT R:ACGGTGTGCTCTCATTTGTCATTGAC	55	151~195	[19]
VVS3	F:TGCCCTATCAATTAAGTTCACCTA R:TCCACTTTGATATATTGATGATT	52	203~219	[20]
VVS4	F:CCATCAGTGATAAAACCTAATGCC R:CCCACCTTGCCCTTAGATGTTA	52	167~189	[20]
VVS29	F:CCCCAAGGCTCTGAAAACAAT R:TGCAAAGCAAATAAAGCTTCCA	56	169~189	[21]
VMC8A7	F:GCAGCAACTCTTTACACACCG R:GTGGGAGCACTGGTTGCTTTAG	55	152~186	[18]
VMC1B11	F:CTTTGAAAATTCTTCCGGGTT R:TATTCAAAGCCACCCGTTCTCT	55	166~196	[22]
VMC8G6	F:TCAGTAATCAGGAGCTTCCCG R:TGGAGTGGGGATATGGAAATG	55	129~171	[22]
VVII52	F:AGATTTAGAGACGAAAAAGGGT R:CTTGATCTTTAGTTGCAGTCTG	54	87~99	[22]
VVIV37	F:GGTAGACCTTGAAATGAAGTAA R:TTTTCTCCCTACTTTAACTTC	54	141~161	[22]
UDV-058	F:GGGCTCTGTGTGCACTGTA R:TCATCCTCATTCTGCTGGTG	56	147~167	[23]

20 μL PCR 反应体系,反应缓冲液、dNTP 和 *Taq* 酶购自宝生物工程(大连)有限公司,引物由上海生工公司合成。体系含 2 μL 10 \times PCR buffer, 1 U *Taq* 酶, 0.2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ dNTP, 1.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Mg^{2+} , 0.4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 引物(上下游), DNA 模板 50 ng, 用 ddH₂O 补齐 20 μL 。PCR 反应在 Bibby Scientific 公司生产的 Prime G02 型 PCR 仪上进行。94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 50~60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 40 s, 35 个循环; 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。相同模板重复扩增 2 次。

(3)PCR 扩增产物检测。以北京市密云县采集的砧木为模板进行引物筛选, SSR-PCR 扩增产物采用 8%(ω) 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测其多态性。

1.2.3 SSR-PCR 产物片段大小的确定 通过聚丙

烯酰胺凝胶电泳,筛选出条带清晰、多态性好的 17 对引物,按上述反应体系及程序重新进行 PCR 扩增,扩增产物送苏州金唯智生物科技有限公司进行毛细管电泳,利用 GenemapperV3.2 进行条带分析,确定每个位点的片段大小。

1.3 数据分析

用软件 popgene32 计算 17 对引物扩增的等位基因数(N_a)、有效等位基因数(N_e)、观测杂合度(H_o)、期望杂合度(H_e)、Shannon 多样性指数(I)和多态性位点百分比;计算成对品种间 Jaccard(J)遗传相似系数,并根据遗传相似系数,利用非加权平均法(UPGMA)对供试材料进行聚类分析, J 系数的计算及 UPGMA 聚类分析由软件 NTSYSpc Version 2.10e 完成。

2 结果与分析

2.1 遗传多样性分析

17对SSR引物均表现出较高的遗传多态性(表3),在21个砧木品种和3个欧亚种葡萄品种上共扩增出195个等位基因,片段大小为87 bp(VVIV52)~265 bp(Vrzag79)。每对引物扩增的等位基因数为5~17个,其中VVMD27和Vrzag47扩增出的位点最多,为17个等位基因;VVS3扩增出的位点最少,为5个等位基因,平均等位基因数为11.47个。扩增得到17个位点的平均有效等位基因数(N_e)为7.21个,其中VVS29最少(2.27个),VVMD27最多(12.26个)。

各引物的平均观测杂合度(H_o)为0.78,VVS3和VVS29的 H_o 最低,为0.46;VMC8G6、VVMD27和Vrzag21的 H_o 最高,为0.96。各引物的期望杂合度(H_e)为0.57~0.94,VVS29最低,VVMD27最高,平均期望杂合度为0.83。Shannon多样性指数(I)为1.10~2.62,UDV-058最低,Vrzag47最高,平均Shannon多样性指数为2.04。所有引物的多态性条带百分比均为100%,证明所选引物的遗传多态性高。除引物VVS4和VVII52外,其余引物在24个葡萄品种上均扩增出特征性条带,其中VMC8G6最多,扩增出7个特征性位点(表3)。特征性位点对葡萄品种鉴定贡献极大。

表3 17对SSR引物的遗传多态性指标

Table 3 Genetic parameters calculated for the 17 SSR loci

引物名称 Primer name	等位基因数 Detected alleles number, N_a	有效等位基因数 Effective number of alleles, N_e	观测杂合度 Observed heterozygosity, H_o	期望杂合度 Expect heterozygosity, H_e	多样性指数 Shannon's index, I	多态性带数 Polymorphism alleles	多态性位点百分比 Rate of polymorphism alleles/%	特征带数 Distinctive alleles number
VVS2	13	8.11	0.75	0.90	2.28	13	100	5
VVMD5	13	7.78	0.83	0.90	2.27	13	100	4
VVMD7	14	10.29	0.92	0.92	2.45	14	100	4
VVMD27	17	12.26	0.96	0.94	2.65	17	100	4
Vrzag62	16	10.47	0.83	0.92	2.52	16	100	5
Vrzag79	10	6.00	0.88	0.85	1.99	10	100	3
Vrzag21	13	9.60	0.96	0.91	2.40	13	100	1
Vrzag47	17	11.88	0.92	0.94	2.62	17	100	3
VVS3	5	2.66	0.46	0.64	1.18	5	100	1
VVS4	8	5.36	0.79	0.83	1.87	8	100	0
VVS29	7	2.27	0.46	0.57	1.18	7	100	1
VMC8A7	12	5.07	0.79	0.81	1.96	12	100	3
VMC1B11	13	10.29	0.92	0.92	2.44	13	100	1
VMC8G6	15	8.53	0.96	0.90	2.36	15	100	7
VVII52	6	2.59	0.63	0.63	1.28	6	100	0
VVIV37	10	7.07	0.67	0.88	2.11	10	100	1
UDV-058	6	2.29	0.50	0.58	1.10	6	100	3
平均 Average	11.47	7.21	0.78	0.83	2.04	11.47	100	2.71

2.2 品种鉴定

在单个引物鉴定品种方面,VVMD5效率最高,可鉴定19个品种;VVS3和UDV-058效率最低,仅能鉴别2个品种(表4)。选择2对引物组合可以大大提高鉴定效率,选择引物VVMD27 & UDV-058、VVS2 & VVMD5、VVS4 & Vrzag21等组合各有2个品种无法鉴定,鉴定效率为83.3%,选择VVMD5 & VVS4、VMC1B11 & VVS4以及Vrzag62 & VVS4等组合即可将全部供试种质资源鉴定出来,鉴定效率达100%,体现了SSR标记在品种鉴定上的高效性(表5)。

2.3 亲缘关系分析

24个供试葡萄品种的遗传相似系数为0.74~

0.99,在遗传相似系数0.74处,可以将24个供试葡萄品种分为2大类(图1)。第1组包含3个欧亚种葡萄酒品种;第2组包含余下的21个砧木品种,在遗传相似系数0.752处,21个砧木品种又可以分为2个亚组。

第1亚组包含4个砧木品种‘110 R’‘140 R’‘洛特’‘1103 P’,其中‘洛特’是‘140 R’和‘1103 P’的亲本种之一。另外‘110 R’和‘140 R’聚在一起,2者均有冬葡萄的血缘。第2亚组包含17个砧木品种,在遗传相似系数0.79处,这17个砧木品种又可以分为5组。第1组包含6个砧木品种‘哥洛尔’‘1613 C’‘SO4’‘5 C’‘5 BB’和‘Schwarzman’,该组品种中均

表 4 利用 1 对或 2 对引物组合无法鉴别的品种数

Table 4 Number of cultivars remained undistinguished after single and pairwise comparisons of 17 SSR loci

引物名称 Primer name	VVS- 2	VVMD- 5	VVMD-VVMD- 7 27	Vrzag- 62	Vrzag- 79	Vrzag- 21	Vrzag- 47	VVS- 3	VVS- 4	VVS- 29	VMC8- A7	VMC1B- 11	VMC8- G6	VVII- 52	VVIV- 37	UDV- 058
VVS2	8															
VVMD5	2	5														
VVMD7	6	2	9													
VVMD27	4	0	4	6												
Vrzag62	4	2	6	4	11											
Vrzag79	4	2	6	4	4	12										
Vrzag21	4	0	4	4	4	6	11									
Vrzag47	6	4	6	6	4	4	4	10								
VVS3	2	5	7	4	8	7	6	6	22							
VVS4	0	0	0	0	0	0	2	0	9	15						
VVS29	2	3	3	4	6	9	2	6	12	6	17					
VMC8A7	6	2	7	4	4	6	4	6	3	0	3	11				
VMC1B11	2	0	2	2	2	4	2	2	4	0	5	2	9			
VMC8G6	4	4	5	2	4	4	2	4	5	0	5	5	2	9		
VVII52	6	4	8	4	6	7	6	8	11	4	10	6	3	7	20	
VVIV37	6	5	6	4	6	8	6	8	5	0	6	6	2	6	8	13
UDV-058	4	5	6	2	6	4	2	6	12	5	12	4	2	6	10	10 22

表 5 本研究扩增结果与 VIVC 标准数据库比对差异

Table 5 Comparison of profiles obtained in current study and VIVC database

引物名称 Primer name	品种 Variety	本试验 扩增结果 Amplification profile	VIVC 结果 VIVC profile	差值 Size difference
VVS2	赤霞珠 Cabernet Sauvignon	137:149	139:151	-2
	霞多丽 Chardonnay	135:141	137:143	-2
	西拉 Syrah	131:131	133:133	-2
VVMD5	赤霞珠 Cabernet Sauvignon	230:238	234:242	-4
	霞多丽 Chardonnay	232:236	236:240	-4
	西拉 Syrah	224:230	228:234	-4
VVMD7	赤霞珠 Cabernet Sauvignon	237:237	239:239	-2
	霞多丽 Chardonnay	237:241	239:243	-2
	西拉 Syrah	237:237	239:239	-2
VVMD27	赤霞珠 Cabernet Sauvignon	172:186	176:190	-4
	霞多丽 Chardonnay	178:186	182:190	-4
	西拉 Syrah	186:188	190:192	-4
Vrzag62	赤霞珠 Cabernet Sauvignon	188:194	188:194	0
	霞多丽 Chardonnay	188:196	188:196	0
	西拉 Syrah	188:194	188:194	0
Vrzag79	赤霞珠 Cabernet Sauvignon	245:245	247:247	-2
	霞多丽 Chardonnay	241:243	243:245	-2
	西拉 Syrah	243:249	245:251	-2

含有河岸葡萄血缘,其中‘SO4’‘5 C’‘5 BB’聚在一起,3者亲缘关系较近,为河岸葡萄与冬葡萄杂交种砧木;第2组包含‘3309 C’‘贝达’和‘Salt creek’3个砧木品种,‘3309 C’和‘贝达’均含有河岸葡萄血缘;第3组包含‘101-14’‘和谐’‘Fercal’和‘420 A’4个砧木品种,其中‘Fercal’和‘420 A’聚在一起,2者均有冬葡萄血缘;第4组包含‘Florilush’和‘Ganzin 1’

2个砧木品种;第5组包含‘Dog Ridge’和‘Ramsey’,2者均为山平氏葡萄的优选株。

3 讨 论

3.1 遗传多样性

笔者利用筛选出的17对SSR引物对21个葡萄砧木品种和3个欧亚种葡萄酿酒品种进行了遗传多样性分析。17对SSR引物的多态性位点百分率均为100%,扩增出的位点为5~17个。不同实验室扩增得到的位点数量不同,Jahnke等^[18]利用19对SSR引物对93个砧木品种及3个欧亚种葡萄进行扩增,获得的位点数为12(VVIM10)~25(VMC8A7)个;Upadhyay等^[24]利用7对SSR引物扩增了印度葡萄种质资源圃中的21个葡萄砧木品种,得到的位点数为6个(VVMD17 & VVMD5)~12个(VVS4 & VVMD31)。扩增出的位点数量与样本量大小和SSR引物有关。目前,在葡萄的基因组中已开发出600余对SSR引物,其中葡萄微卫星协会(Vitis Microsatellite Consortium, VMC)已经开发出360多条引物^[25]。笔者选择的17对引物中除VVS3多态性稍差外,其余引物多态性较丰富,适宜用作葡萄砧木品种的遗传多样性分析。

观测杂合度(H_o)反映实际群体中某一位点杂合子所占比例,期望杂合度(H_e)反映在实际群体中杂合子所占比例的期望值,杂合度越高,该位点处的基因型越多,遗传变异越丰富。笔者所用引物的

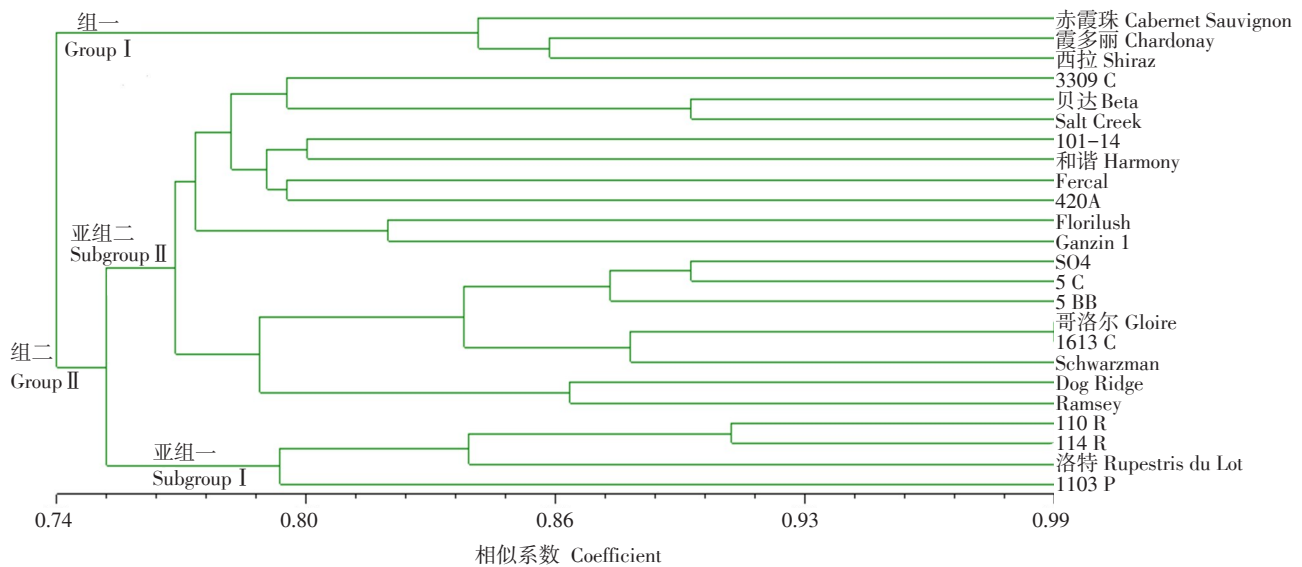


图1 24个葡萄品种的UPGMA聚类分析

Fig. 1 UPGMA dendrogram of 24 grape varieties

观测杂合度为0.46~0.96,期望杂合度为0.57~0.94。Sefc等^[25]利用9对引物扩增164份葡萄种质,得到 H_o 为0.776~0.977, H_e 为0.677~0.819。Martinez等^[26]利用6对SSR引物对25个来自南美的欧亚种葡萄进行扩增,得到 H_o 为0.615~1.000, H_e 为0.712~0.891。本文中引物VVS3和UDV-058在扩增过程中出现大量纯合位点,基因型较稀少,品种鉴别能力差。引物VVMD7、VVMD27、Vrzag21、Vrzag47、VMC1B11、VMC8G6的扩增杂合子比例均在90%以上,扩增出丰富的基因型,显示出了良好的多态性。

有效等位基因数是反映群体遗传变异大小的一个指标,其数值越接近所检测到的等位基因的绝对数,表明等位基因在群体中分布越均匀。本文中VVS29和UDV-058有效等位基因数较少,分别为2.27和2.29个,这是由2个引物扩增结果中均有1条基因频率过高的位点所致。VVMD7和Vrzag21有效等位基因数与实际等位基因数较接近,说明其各条等位基因的基因频率在群体中分布较均匀。

3.2 品种鉴定

SSR标记丰富的多态性,使其广泛应用于葡萄品种的鉴定。This等^[17]研究表明,本文所用到的6对引物(VVS2、VVMD7、VVMD5、VVMD27、Vrzag62、Vrzag79)具有丰富的多态性,可以用来建立葡萄种质资源的标准数据库。本研究中确定的各条等位基因大小,与VIVC标准数据库中相比,除Vrzag62结果完全一致外,其余位点存在一定的差异。在其他

研究中,亦发现不同实验室的结果不完全吻合的情况^[27-29],This等^[17]在没有规定试验方法的前提下,让不同的实验室使用相同引物对相同模板进行扩增,发现不同实验室间扩增位点大小差异通常以该SSR核心基序为单位,成倍的增加或减少。这可能是不同的Taq酶在PCR扩增过程中打滑、插入或缺失一定数量的重复序列所导致。本试验中所有模板均平行扩增2次,结果一致,且与VIVC数据库中相比,同一引物扩增片段均相差相同的bp数,证明本试验结果可信度高,可用于葡萄品种指纹的建立。与此同时,由于差异的普遍存在,在建立品种指纹数据库时应选用一些常见的品种作为对照,以使得不同实验室间的结果具备可比性。因此,笔者选用‘赤霞珠’‘霞多丽’和‘西拉’3个欧亚种酿酒葡萄作为砧木品种SSR指纹数据库建立的对照。

3.3 亲缘关系

葡萄悠久的栽培驯化历史也是漫长的种内、种间基因交流的过程,从而使品种间的谱系更加复杂。SSR标记可以揭示品种间的遗传相似度,从而对系谱的重建提供帮助。Jahnke等^[18]利用19对SSR引物扩增的位点研究了96份葡萄种质的遗传多样性,聚类结果表明,3个欧亚种葡萄‘赤霞珠’‘霞多丽’‘黑比诺’可以和砧木品种完全分开,这与本研究结果一致。笔者利用17对SSR引物的扩增位点,在遗传相似系数0.74处将欧亚种葡萄酿酒品种与非欧亚种砧木品种完全分开,显示出其在DNA水平上的差异。Andrés等^[30]利用9对SSR引物和UPGMA聚类

将 19 份具有冬葡萄血缘的砧木和 22 份具有沙地葡萄和河岸葡萄血缘的砧木完全分开。沙地葡萄与冬葡萄杂交选育的‘1103 P’和‘140 R’与其亲本沙地葡萄聚为一类；冬葡萄与河岸葡萄杂交选育的‘S04’‘5C’‘5BB’聚为一类，‘Ramsey’和‘Dog Ridge’同为山平氏葡萄，2 者聚为一类。聚类结果符合砧木品种选育时的亲缘关系，进一步证实了 SSR 标记在葡萄品种系谱重建中的作用。

参考文献 References:

- [1] 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.
LIU Chuangping, WANG Jun. SSR DNA marker and it's application in grapevine[J]. Journal of Fruit Science, 2008, 25 (1): 93-101.
- [2] 陈小宇,刘林德,葛宜和,张莉,李记明,姜文广,裴广仁. ‘蛇龙珠’葡萄新株系遗传多样性的 SSR、ISSR 和 VvmybA1 基因片段分析[J]. 果树学报, 2017, 34(2): 145-156.
CHEN Xiaoyu, LIU Linde, GE Yihe, ZHANG Li, LI Jiming, JIANG Wenguang, PEI Guangren. Analysis on genetic diversity of wine grape ‘Cabernet Gernischt’ (*Vitis vinifera*) new strains by SSR, ISSR and VvmybA1[J]. Journal of Fruit Science, 2017, 34 (2): 145-156.
- [3] LAUCOU V, LACOMBE T, DECHESNE F, SIRET R, BRUNO J P, DESSUP M, DESSUP T, ORTIGOSA P, PARRA P, ROUX C, SANTONI S, VARÈS D, PÉROS J P, BOURSICQUOT J M, THIS P. High throughput analysis of grape genetic diversity as a tool for germplasm collection management[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2011, 122(6):1233-1245.
- [4] EMANUELLI F, LORENZI S, GRZESKOWIAK L, CATALANO V, STEFANINI M, TROGGIO M, MYLES S, MARTINEZ-ZAPATER J M, ZYPRIAN E, MOREIRA F M, GRANDO M S. Genetic diversity and population structure assessed by SSR and SNP markers in a large germplasm collection of grape[J]. BMC Plant Biology, 2013, 13(1): 39.
- [5] CIPRIANI G, SPADOTTO A, JURMAN I, DI GASPERO G, CRESPAN M, MENEGHETTI S, FRARE E, VIGNANI R, CRESTI M, MORGANTE M, PEZZOTTI M, PE E, POLICRITI A, TESTOLIN R. The SSR-based molecular profile of 1005 grapevine (*Vitis vinifera* L.) accessions uncovers new synonymy and parentages, and reveals a large admixture amongst varieties of different geographic origin[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2010, 121 (8):1569-1585.
- [6] CHEN C, ZHOU P, CHOI Y A, HUANG S, JR G F. Mining and characterizing microsatellites from citrus ESTs[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2006, 112(7): 1248-1257.
- [7] LMAZIO S, LABRA M, GRASSI F, SCIENZA A, FAILLA O. Chloroplast microsatellites to investigate the origin of grapevine [J]. Genetic Resources and Crop Evolution, 2006, 53(5): 1003-1011.
- [8] RIAZ S, NANGL G S, EDWALDS K J, MEREDITH C P. A microsatellite marker based framework linkage map of *Vitis vinifera* L. [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2004, 108(5):864-872.
- [9] GONZALEZ M F, MORALES A M, LZQUIERDO P, MARTINEZ J. Genetic characterization of grapevine (*Vitis vinifera* L.) cultivars from Castilla L Mancha (Spain) using microsatellite markers [J]. Vitis, 2007, 46(3): 126.
- [10] ULANOVSKY S, GOGORCENA Y, TODA F M D, ORTIZ J M. Use of molecular markers in detection of synonymies and homonymies in grapevines (*Vitis vinifera* L.) [J]. Scientia Horticulturae, 2002, 92(3): 241-254.
- [11] OHMI C, WAKANA A, SHIRAISHI S. Study of the parentage of grape cultivars by genetic interpretation of GPI-2 and PGM-2 isoenzymes[J]. Euphytica, 1993, 65(3):195-202.
- [12] BUSCHER N, ZYPRIAN E, BACHMANN O, BLAICH R. On the origin of the grapevine variety Muller-Thurgau as investigated by the inheritance of random amplified polymorphic DNA (RAPD) [J]. Vitis, 1994, 33(20): 15-17.
- [13] BOWERS J E, MEREDITH C P. The parentage of a classic wine grape, Cabernet Sauvignon [J]. Nature Genetics, 1997, 16(1): 84-87.
- [14] LAUCOU V, BOURSICQUOT J M, LACOMBE T, DECROOQ S. Parentage of grapevine rootstock ‘Fercal’ finally elucidated [J]. Vitis, 2008, 47(3): 163-167.
- [15] ADAM-BLONDON A F, ROUX C, CLAUX D, BUTTERLIN G. Mapping 245 SSR markers on the *Vitis vinifera* genome: a tool for grape genetics [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2004, 109 (5): 1017-1027.
- [16] 王军,杨传平,刘桂丰. 木本植物基因组 DNA 提取及鉴定[J]. 植物研究, 2006, 26(5): 589-594.
WANG Jun, YANG Chuangping, LIU Guifeng. Extraction of genomic DNA from woody plants and it's identification [J]. Bulletin of Botanical Research, 2006, 26(5): 589-594.
- [17] THIS P, JUNG A, BOCCACCI P, BORREGO J, BOTTA R, COSTANTINI L, CRESPIAN M, DANGL S, EISENHELD C, FERREIRA-MONTEIRO F, GRANDO S, IBANEZ J, LACOMBE T, LAUCOU V, MAGALHAES R. Development of a standard set of microsatellite reference alleles for identification of grape cultivars [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2004, 109(7): 1448-1458.
- [18] JAHNKE G, KOCSISNÉ MOLNÁR G, MÁJER J, SZÖKE B, TARCZAL E, VARGA P, KOCSIS L. Analysis of grape rootstocks by SSR markers [J]. Journal International Des Sciences De La Vigne Et Du Vin, 2012, 45(4): 199-210.
- [19] SEFC K M, REGNER F, TURETSCHKE E, GLÖSSL J, STEINKELLNER H. Identification of microsatellite sequences in *Vitis riparia* and their applicability for genotyping of different *Vitis* species [J]. Genome, 1999, 42(3): 367-373.

- [20] THOMAS M R, SCOTT N S. Microsatellite repeats in grapevine reveal DNA polymorphisms when analysed as sequence-tagged sites (STSs)[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1993, 86(8): 985-990.
- [21] LIN H, WALKER M A. Identifying grape rootstocks with simple sequence repeat (SSR) DNA markers[J]. *American Journal of Enology and Viticulture*, 1998, 49(4): 403-407.
- [22] DOLIGEZ A, ADAM-BLONDON A F, CIPRIANI G, GASPERO D, LAUCOU V, MERDINOGLU D, MEREDITH C P, RIAZ S, ROUX C, THIS P. An integrated SSR map of grapevine based on five mapping populations[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2006, 113(3): 369-382.
- [23] DI GASPERO G, CIPRIANI G, ADAM-BLONDON A F, TESTO-LIN R. Linkage maps of grapevine displaying the chromosomal locations of 420 microsatellite markers and 82 markers for R-gene candidates[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2007, 114(7): 1249-1263.
- [24] UPADHYAY A, SABOJI M D, REDDY S, DEOKAR K, KARIBASAPPA G S. AFLP and SSR marker analysis of grape rootstocks in Indian grape germplasm[J]. *Scientia Horticulturae*, 2007, 112(2): 176-183.
- [25] SEFC K M, STEINKELLNER H, GLÖSSL J, KAMPFER S, REGNER F. Reconstruction of a grapevine pedigree by microsatellite analysis[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1998, 97(1/2): 227-231.
- [26] MARTINEZ L E, CAVAGNARO P F, MASUELLI R W, ZUNIGA J R. SSR-based assessment of genetic diversity in South American *Vitis vinifera* varieties[J]. *Plant Science*, 2006, 170(6): 1036-1044.
- [27] CRESPIAN M, MILANI N. The Muscats: a molecular analysis of synonyms, homonyms and genetic relationships within a large family of grapevine cultivars[J]. *Vitis*, 2001, 40(1): 23-30.
- [28] LEFORT F, ROUBELAKISANGELAKIS K K A. Genetic comparison of Greek cultivars of *Vitis vinifera* L. by nuclear microsatellite profiling[J]. *American Journal of Enology and Viticulture*, 2001, 52(2): 101-108.
- [29] ALBA V, BERGAMINI C, GENGGHI R, GASPARRO M, PERNIO-LA R, ANTONACCI D. Ampelometric leaf trait and SSR loci selection for a multivariate statistical approach in *Vitis vinifera* L. biodiversity management[J]. *Molecular Biotechnology*, 2015, 57(8): 709-719.
- [30] ANDRÉS M T, CABEZAS J A, CERVERA M T, BORREGO J, MARTINEZZAPATER J M, JOUVE N. Molecular characterization of grapevine rootstocks maintained in germplasm collections [J]. *American Journal of Enology and Viticulture*, 2007, 58(1): 75-86.

·书 讯·

推介几本草莓研究论(译)著

《草莓研究进展》(第五集)(张运涛,雷家军,王桂霞主编,中国农业出版社,2017年1月出版,单价200元)。这本文集共计106万余字,内容包括特邀报告(英汉对照)、资源与育种、生物技术、栽培生理、生产技术、宏观评述及国外最新研究动态等,内容丰富新颖,对高校、科研单位和技术部门的专业技术人员有重要参考价值。

第七届世界草莓大会译文集-11

《草莓的基本原理——生态与栽培技术》(张运涛,李新贤,雷家军等译校,中国农业出版社,2016年12月出版,单价100元)是由日本著名草莓专家森下昌三博士编著,本书共9章,23万余字,除介绍草莓的基本知识之外,还详细论述了日本草莓的育种历史和最新成就,介绍了日本促成栽培的关键技术及夏秋栽培品种的特性和栽培要点。森下昌三博士从事草莓研究30余年,在草莓育种和栽培方面颇有建树,这是一本很有价值的专著。

第七届世界草莓大会译文集-12

《草莓——历史,育种与生理》(张运涛,雷家军,常琳琳主译,中国农业出版社,2017年1月出版,单价200元)是由已故世界著名草莓专家乔治·达柔教授主编的草莓专著,本书

共计23章,47余万字,详细论述了凤梨草莓诞生的历史、草莓与宗教的关系,重点介绍了英国、美国、法国和德国等西方国家草莓育种的历史和成就。书中还配有大量彩图,这是一本草莓世界领域的经典著作。

第七届世界草莓大会系列译文集-13

《现代草莓生产技术》(张运涛,雷家军,钟传飞等主译,中国农业出版社,2017年1月出版,单价180元)是由美国佛罗里达大学诺尔曼·奇尔德斯教授组织48位草莓专家和生产者编写而成,全书53万字,共分八部分,第一部分介绍了美国草莓发展历史和草莓的基础知识;第二部分论述了草莓高垄地膜覆盖栽培的关键技术;第三部分介绍了草莓病、虫、草防控技术;第四部分和第五部分分别介绍了露地多年栽培和保护地草莓栽培技术;第六部分和第七部分分别论述了草莓采收和加工技术,自采果园的销售策略;第八部分介绍了墨西哥、南非、西班牙和地中海流域各国草莓的生产概况。

以上书目价格包含邮费,另每包加3元挂刷费。邮购时请在备注栏明书名。请注明联系电话以便核实!邮购地址:河南省郑州市未来路南端中国农业科学院郑州果树研究所;收款人:杂志社,电话:0371-65330982。