

葡萄品种SSR分子鉴定体系的建立及应用

王富强^{1a}, 李贝贝^{1,2a}, 樊秀彩¹, 张颖¹, 刘崇怀^{1*}, 姜建福^{1*}

(¹中国农业科学院郑州果树研究所, 郑州 450009; ²西北农林科技大学葡萄酒学院, 陕西杨凌 712100)

摘要:【目的】筛选一套适合我国葡萄品种鉴定标准的SSR分子标记,用于构建葡萄品种DNA指纹图谱库,为国内葡萄新品种保护、品种登记和市场维权等提供技术支撑。【方法】基于国内外已报道的葡萄SSR标记,对不同葡萄品种进行PCR扩增,筛选验证相关标记,并分析其遗传多样性和鉴别效率。【结果】以76个葡萄品种为材料,从137个SSR标记中选出30个扩增结果稳定、多态性高、退火温度一致且在染色体上均匀分布的SSR标记;使用‘赤霞珠’‘霞多丽’和‘红地球’3个品种验证30个标记的稳定性和可靠性,并确定‘霞多丽’‘红地球’为参照品种;遗传多样性分析显示,30个标记的多态性高,在52份材料中共获得309个等位基因,变化范围为4~16个,VVMD28标记扩增等位基因数最多,其次是VVS2和VMC1C10,Vchr17a标记最少,PIC值变化范围在0.40~0.88,均值为0.75,最高的为VrZAG79标记;聚类分析结果与52个品种的系谱关系基本一致;仅用VMC4F3-1标记可区分25个品种,最多使用8个标记可完全区分52个品种。【结论】从137个葡萄标记中筛选出30个标记,构建了一套适用于中国的葡萄SSR分子标记体系,同时为保证鉴定效率和国际品种鉴定接轨,选择VVMD28、VVMD32、VVMD27、VrZAG79、VVMD7、VrZAG62、VVMD25、VVS2、VVMD5这9个标记作为体系的核心引物,其他标记作为扩展引物。

关键词:葡萄;SSR标记;遗传多样性分析;聚类分析;品种鉴定

中图分类号:S663.1

文献标志码:A

文章编号:1009-9980(2020)09-1281-13

Establishment and application of SSR molecular identification system in grapevine

WANG Fuqiang^{1a}, LI Beibei^{1,2a}, FAN Xiucui¹, ZHANG Ying¹, LIU Chonghuai^{1*}, JIANG Jianfu^{1*}

(¹Zhengzhou Fruit Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450009, Henan, China; ²College of Enology, Northwest A & F University, Yangling 712100, Shaanxi, China)

Abstract: 【Objective】A set of SSR (Simple Sequence Repeat) molecular markers adapting to the identification standards of grape cultivar was screened to construct a DNA fingerprint database of grape cultivar to provides technical support for protection of new grape cultivar, registration of cultivar and maintenance of market rights in China. 【Methods】Based on the grape SSR markers reported by the predecessors, six grape cultivars representing different species, ploidy and consumptions were used for PCR amplification. The clear and stable SSR markers were initially selected under detection by agarose gel electrophoresis. SSR markers were checked by detecting 8% non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis using PCR amplification of 24 representative grape cultivars. Then, combining with fluorescent capillary electrophoresis detection technology, the final SSR markers were selected according to the PCR amplification of 52 new grape cultivars bred recently in China. We selected ‘Cabernet Sauvignon’ ‘Chardonnay’ and ‘Red Globe’ as test materials, the selected markers were sent to Beijing Microread Genetics Technology Co., Ltd and Suzhou Genewiz Biotechnology Technology Co., Ltd for capillary electrophoresis detection (Model: ABI 3730 XL) to check the consistency and stability of the

收稿日期:2020-02-15 接受日期:2020-06-03

基金项目:现代农业产业技术体系建设专项(CARS-29-yz-1);农业行业标准制定和修订及农产品质量认证项目(2016-28);中国农业科学院科技创新工程专项经费(CAAS-ASTIP-2019-ZFRD)。

作者简介:王富强,男,硕士,研究方向为葡萄种质资源。Tel:15038077049,E-mail:82101185031@caas.cn。a为共同第一作者。李贝贝,女,博士,研究方向为果树种质资源。Tel:15236289703,E-mail:15236289703@163.com

*通信作者 Author for correspondence. Tel:13703939601,E-mail:liuchonghuai@caas.cn;Tel:15824868197,E-mail:jiangjianfu@caas.cn

markers. In order to correct and eliminate the errors caused by different instruments, different test batches, several common and representative reference cultivar with less variation were identified. We used GeneMapper ID v3.2 software to read the fragment size, exported the data in Excel format, and manually analyzed and corrected the fluorescence data obtained. The peaks were recorded as “1”, the non-peaks were recorded as “0”, and the missing data was recorded as “999” to form a “1/0” matrix. Excel 2019 was used to calculate the number of variant alleles, genotypes, and frequency of occurrence in the population. PIC-CALC Version 0.6 software was used to calculate polymorphism information content (PIC). Using the software NTSYS-pc 2.10 and the unweighted group average method (UPGMA), the detected data were clustered and compared with 52 new grape cultivars. The pedigree relationship was evaluated for the accuracy and reliability of the selected markers, and finally the Chinese grape SSR molecular marker system were established.【Results】At first, using the DNA template of the six cultivars of ‘Chardonnay’ ‘Red Globe’ ‘Summer Black’ ‘Kyoho’ ‘Concord’ ‘Beta’, 137 grape SSR markers were amplified by PCR, and 84 markers were selected as clear and stable markers. Secondly, 38 SSR markers with clear stability and high polymorphism were selected from 24 representative cultivars. Finally, 30 SSR markers with stable amplification results, high polymorphism, relatively consistent annealing temperature and uniform distribution on chromosomes were selected from 52 representative cultivars, in which the optimal annealing temperatures of 22 SSR markers and other 8 SSR markers were 56 °C and 58 °C, respectively. The stability and reliability of the 30 markers were verified using 3 cultivars ‘Cabernet Sauvignon’ ‘Chardonnay’ and ‘Red Globe’, then ‘Chardonnay’ and ‘Red Globe’ were identified as reference varieties and the size of standard variant fragments was determined. Analysis of genetic diversity showed that the 30 markers obtained PIC values of not less than 0.40 in the 24 material populations and the 52 material population, among which 9 commonly used markers had PICs greater than 0.50 in different populations. The PIC values had a range of 0.40-0.88, with an average value of 0.75 in the 52 material populations, in which VrZAG79 marker had the highest PIC value. A total of 309 alleles were obtained in the 52 material populations, ranging from 4 to 16, and VVMD28 marker was found with the most amplified alleles, followed by VVS2 and VMC1C10 markers, and Vchr17a marker with the least amplified alleles. The clustering results showed that the genetic similarity coefficient among the 52 varieties was 0.76-0.96, and when the genetic similarity coefficient was 0.76, the 52 cultivars could be divided into two categories. It was considered that the set of SSR markers could distinguish diploids and polyploidys. Besides, *V. vinifera* were closely related to *V. vinifera-V. labrusca*, while Chinese wild grapes were more distantly related to other grape species. The cluster analysis map was relatively consistent with the pedigree maps of the 52 cultivars. In particular, several groups of sister breeds were well clustered together, but there were differences. Just 9 markers that are used internationally could distinguish 43 cultivars with the identification efficiency of 82.7%, while 25 cultivars could be distinguished by only using VMC4F3-1 marker. Using the five marker combinations VMC4F3-1, VVS2, VrZAG79, Vchr9b and Vchr4a, 49 cultivars could be distinguished with the identification efficiency of 94.2%. We used up 8 marker combinations (VMC4F3-1, VVS2, VrZAG79, Vchr9b, Vchr4a, VrZAG62, VVMD27, and Vchr13b) to completely distinguish the 52 cultivars.【Conclusion】30 grape SSR molecular markers were screened out of 137 markers, and a set of grape SSR molecular marker system was constructed. The core markers of the system were VVMD28, VVMD32, VVMD27, VrZAG79, VVMD7, VrZAG62, VVMD25, VVS2, VVMD5 which could ensure the identification efficiency and international cultivar identification at the same time.

Key words: Grape; SSR marker; Genetic diversity analysis; Cluster analysis; Cultivar identification

葡萄为葡萄科(Vitaceae)葡萄属(*Vitis* L.)多年生藤本植物,分布范围广,品种数目繁多^[1]。据国际葡萄品种目录VIVC(Vitis International Variety Catalogue)统计,截止到目前至少有23 000个(<http://www.vivc.de/>)葡萄品种信息获得了注释,仅我国保存各类葡萄种质资源达3 000份^[2]。由于葡萄扦插繁殖容易,使得部分不法苗木商随意更改品种名称,炒作品种,以迎合生产者对品种新、奇、特的需求,造成同物异名、同名异物现象严重,极大损害了育种家的利益,为葡萄产业的健康发展留下隐患^[3]。而传统的形态学品种鉴定易受环境条件及人为因素的影响,耗时长,专业技术要求高^[4],特别是同一骨干亲本选育出的新品种鉴别难度更大^[5],使得品种鉴定工作的开展越发困难。

近年来,SSR(Simple Sequence Repeat,简单重复序列)标记技术以其多态性高、稳定性强、操作简单、对DNA质量要求低等优势,成为当前品种鉴定的主要技术^[6-7]。国外已将VVS2^[8]、VVMD5^[9]、VVMD7^[9]、VVMD25^[10]、VVMD27^[10]、VVMD28^[10]、VVMD32^[10]、VrZAG79^[11]、VrZAG62^[11]这9对SSR引物作为国际上葡萄品种鉴定的通用标记^[12]。尹玲等^[4]、杨航宇等^[13]、李贝贝等^[14]也利用国际通用的SSR标记分别构建了不同份数的葡萄品种遗传图谱,而国际上的葡萄品种以欧亚种为主,中国作为世界葡萄东亚种群的集中分布区^[1],拥有丰富且独特的种质资源,仅靠国际上的几对标记已无法区分中国的葡萄品种^[15-17]。此外,随着我国育成葡萄新品种数量与葡萄品种资源管理需求的日益加剧,国内急需开发一套适用于中国的葡萄SSR标记鉴定体系。

2016年,《葡萄品种鉴定SSR分子标记法》被列为农业行业标准制定项目,在相关项目的支持下,笔者试图筛选一套符合我国葡萄品种鉴定标准的SSR分子鉴定体系,为国内葡萄新品种保护、品种登记和市场维权等提供技术支撑。

1 材料和方法

1.1 材料

试验所用葡萄品种(包括砧木)资源共计76份,均于2018年6月采自中国农业科学院郑州果树研究所国家果树种质郑州葡萄圃。其中24份为特意选择的具备不同种性、不同倍性、不同用途等特点的代表性品种,主要用于方法的有效性验证和标记筛选;

其余52份材料为近年来新育成的品种(表1)。采样要求:选取葡萄新梢顶端2~4枚幼嫩叶片,用锡箔纸包装并区别标记,液氮冷处理8~10 min,保存在-80℃超低温冰箱备用^[14]。

1.2 葡萄DNA提取

使用艾德莱生物公司的CTAB植物基因组DNA快速提取试剂盒,提取叶片DNA,并用超纯水将质量浓度稀释至50 ng·μL⁻¹, -20℃保存备用。

1.3 SSR标记选择和PCR扩增

选用的标记全部来自葡萄上已报道的相关标记(表2)。引物由上海生工生物工程公司合成,含有HEX和6-FAM两种荧光探针的引物由北京阅微基因技术有限公司合成。

PCR反应使用20 μL体系:10×PCR缓冲液(Mg²⁺ plus)2.0 μL, dNTP(25 mmol·L⁻¹)2.0 μL,上游引物(10 μmol·L⁻¹)1.0 μL,下游引物(10 μmol·L⁻¹)1.0 μL, *Taq* DNA聚合酶(5 U·μL⁻¹)0.2 μL, DNA模板(50 mg·L⁻¹)1 μL, ddH₂O 12.8 μL。PCR反应程序为:94℃预变性4 min;94℃变性30 s, 50~58℃退火30 s, 72℃延伸45 s,共35个循环;72℃延伸10 min。具体退火温度依据设计进行筛选。若杂带、伪带较多,应适当提高退火温度;若条带很弱或空白,则降低退火温度^[12]。

1.4 PCR产物检测

1.4.1 2%琼脂糖凝胶电泳检测 初选扩增的PCR产物经2%琼脂糖凝胶电泳25~30 min(恒压130 V),使用凝胶成像仪拍照记录。

1.4.2 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测 复选时利用聚丙烯酰胺凝胶电泳检测。在PCR扩增产物中加入5 μL 6×上样缓冲液混匀,采用8%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离扩增产物,银染,观察条带并记录数据。

1.4.3 荧光毛细管电泳检测 标记精选和验证时用ABI 3730 XL全自动基因分析仪检测PCR产物。检验前将每个孔位加入PCR产物1.0 μL、分子量内标和甲酰胺混合液(0.5:8.5,体积比)9 μL;95℃变性3 min。

1.5 标记验证

选择‘赤霞珠’‘霞多丽’和‘红地球’为试材,将精选出的标记分别送至北京阅微基因有限公司和苏州金唯智生物科技有限公司进行毛细管电泳检测(型号:ABI 3730 XL),验证标记使用的一致性和稳

表 1 76 个供试品种的信息

Table 1 The information of 76 test cultivars

编号 Code	品种 Cultivar	倍性 Ploidy	种类/种群 Species/ Population	来源 Origin	编号 Code	品种 Cultivar	倍性 Ploidy	种类/种群 Species/ Population	来源 Origin
1	赤霞珠 Cabernet Sauvignon	2x	Vv	法国 France	39	玉珍香 Yuzhenxiang	2x	Vv	中国 China
2	梅鹿辄 Merlot	2x	Vv	法国 France	40	短枝玉玫瑰 Duanzhizhuyumeigui	2x	Vv	中国 China
3	霞多丽 Chardonnary	2x	Vv	法国 France	41	玉波 1 号 Yubo No.1	2x	Vv	中国 China
4	玫瑰香 Muscat Hamburg	2x	Vv	英国 England	42	玉波 2 号 Yubo No.2	2x	Vv	中国 China
5	红地球 Red Globe	2x	Vv	美国 America	43	凌砧 1 号 Lingzhen No.1	2x	Va-Vv	中国 China
6	美人指 Manicure Finger	2x	Vv	日本 Japan	44	紫地球 Zidiqu	2x	Vv	中国 China
7	烟 73 Yan 73	2x	Vv	中国 China	45	华葡脆玉 Huapucuiyu	2x	Vv	中国 China
8	黑比诺 Pinot Noir	2x	Vv	法国 France	46	丽红宝 Lihongbao	2x	Vv	中国 China
9	无核白鸡心 Centennial Seedless	2x	Vv	美国 America	47	无核翠宝 Wuhecuibao	2x	Vv	中国 China
10	巨峰 Kyoho	4x	Vv-Vl	日本 Japan	48	早康宝 Zaokangbao	2x	Vv	中国 China
11	巨玫瑰 Jumeigui	4x	Vv-Vl	中国 China	49	秋黑宝 Qiuheibao	2x	Vv	中国 China
12	户太 8 号 Hutai No.8	4x	Vv-Vl	中国 China	50	卓越玫瑰 Zhuoyuemeigui	2x	Vv	中国 China
13	夏黑 Summer Black	3x	Vv-Vl	日本 Japan	51	云楚无核 Yunchuwuhe	2x	Vv	中国 China
14	金手指 Gold Finger	2x	Vv-Vl	日本 Japan	52	神州红 Shenzhouhong	2x	Vv	中国 China
15	阳光玫瑰 Shine Muscat	4x	Vv-Vl	日本 Japan	53	郑州早玉 Zhengzhouzaoyu	2x	Vv	中国 China
16	藤稔 Fujiminori	4x	Vv-Vl	日本 Japan	54	卓越黑香蜜 Zhuoyuehexiangmi	2x	Vv	中国 China
17	京亚 Jingya	4x	Vv-Vl	中国 China	55	小红玫瑰 Xiaohongmeigui	2x	Vv	中国 China
18	峰光 Fengguang	4x	Vv-Vl	中国 China	56	着色香 Zhuosexiang	2x	Vv-Vl	中国 China
19	月光无核 Yueguangwuhe	3x	Vv-Vl	中国 China	57	碧玉香 Biyuxiang	2x	Vv-Vl	中国 China
20	5BB	2x	Vb-Vr	奥地利 Austria	58	索味浓 Sauvignon Blanc	2x	Vv	法国 France
21	SO4	2x	Vb-Vr	德国 Germany	59	抗砧 5 号 Kangzhen No.5	2x	Ih	中国 China
22	贝达 Beta	2x	Vl-Vr	美国 America	60	特拉蜜 Roter Traminer	2x	Vv	法国 France
23	北冰红 Beibinghong	2x	Va-Vv	中国 China	61	小白玫瑰 Xiaobaimeigui	2x	Vv	中国 China
24	康可 Concord	2x	Vl	美国 America	62	野酿 2 号 Yeniang No.2	2x	Vh	中国 China
25	红特沙 Hongtesha	2x	Vv	中国 China	63	红艳香 Hongyanxiang	2x	Vv	中国 China
26	红美 Hongmei	2x	Vv	中国 China	64	波尔莱特 Perlette	2x	Vv	美国 America
27	水晶红 Shuijinghong	2x	Vv	中国 China	65	华葡紫峰 Huapuzifeng	2x	Vv-Vl	中国 China
28	郑艳无核 Zhengyanwuhe	2x	Vv-Vl	中国 China	66	贵园 Guiyuan	4x	Vv-Vl	中国 China
29	郑美 Zhengmei	2x	Vv	中国 China	67	烟葡 1 号 Yanpu No.1	3x	Vv-Vl	中国 China
30	庆丰 Qingfeng	2x	Vv-Vl	中国 China	68	华葡黑峰 Huapuheifeng	4x	Vv-Vl	中国 China
31	红艳无核 Hongyanwuhe	2x	Vv	中国 China	69	峰光 Fengguang	4x	Vv-Vl	中国 China
32	翠香宝 Cuixiangbao	2x	Vv	中国 China	70	丛林玫瑰 Conglinmeigui	4x	Vv-Vl	中国 China
33	郑葡 2 号 Zhengpu No.2	2x	Vv	中国 China	71	春光 Chunguang	4x	Vv-Vl	中国 China
34	郑葡 1 号 Zhengpu No.1	2x	Vv	中国 China	72	蜜光 Miguang	4x	Vv-Vl	中国 China
35	福园 Fuyuan	2x	Vv	中国 China	73	瑞紫香 Ruizixiang	4x	Vv-Vl	中国 China
36	夏至红 Xiazhihong	2x	Vv	中国 China	74	红蜜香 Hongmixiang	4x	Vv-Vl	中国 China
37	玉波黄地球 Yubohuangdiqiu	2x	Vv	中国 China	75	玫香宝 Meixiangbao	4x	Vv-Vl	中国 China
38	凌丰红 Lingfenghong	2x	Va-Vv	中国 China	76	瑞峰 Ruifeng	4x	Vv-Vl	中国 China

注:编号 1~24 是代表品种,编号 25~76 是国内近年新育成品种。Vv 是欧亚种;Vl 是美洲种;Vv-Vl 是欧美杂种;Vl-Vr 是美河杂种;Vb-Vr 是冬河杂种;Va-Vv 是山欧杂种;Vh 是毛葡萄;Ih 是种间杂种。

Note: Codes No. 1-24 mean representative cultivar, and codes No. 25-76 mean new breeds varieties in China in recent years. Vv means *V. vinifera*; Vl means *V. labrusca*; Vv-Vl means *V. vinifera*-*V. labrusca*; Vl-Vr means *V. labrusca*-*V. riparia*; Vb-Vr means *V. berlandieri*-*V. riparia*; Va-Vv means *V. amurensis*-*V. vinifera*; Vh means *V. heyneana*; Ih means Interspecific hybrid.

表 2 137 个标记名称及来源

Table 2 137 marker names and sources

标记名称 Marker name	标记个数 Number of marker	参考文献 Reference	标记名称 Marker name	标记个数 Number of marker	参考文献 Reference
VMC2B3(1), VMC8D1(1), VrZAG29(1), VVMD26(1), VVS29(1), VrZAG93(2), VMC8F10(3), VMC6E10(5), VMC9B5(5), VMC2F10(6), VMC4G6(6), VMC5C5(6), VMC5H5(7), VMC8D11(7), VVMD6(7), VMC1E8(8), VMC5H2(8), VMC1C10(9), VMC5C1(9), VMC6G1(11), VVMD8(11), VMC8G6(12), VMC8G9(12), VMC3D12(13), VVS1(13), VMC2A5(14), VMC2B11(14), VMC2C3(14), VMC6E1(14), VRZAG112(14), VMC5G8(15), VMC5A1(16), VMC5E9(19)	33	[18]	VrZAG21(4), VrZAG64(10)	2	[27]
Vchr5a(5), Vchr5b(5), Vchr5c(5), Vchr7b(7), Vchr8a(8), Vchr8b(8), Vchr9a(9), Vchr13a(13), Vchr15a(15), Vchr18a(18), Vchr19a(19), Vchr19b(19)	12	[19]	Vchr1b(1), Vchr1c(1), Vchr2a(2), Vchr3a(3), Vchr4a(4), Vchr6a(6), Vchr7a(7), Vchr9b(9), Vchr10a(10), Vchr10b(10), Vchr11a(11), Vchr11b(11), Vchr12a(12), Vchr12b(12), Vchr13b(13), Vchr13c(13), Vchr14a(14), Vchr14b(14), Vchr14b(14), Vchr15b(15), Vchr16a(16), Vchr16b(16), Vchr17a(17), Vchr17b(17), Vchr18b(18)	24	[28]
VVIP60(1), VVMD28(3), VVMD32(4), VVMD27(5), VVMD7(7), VMC1B11(8), VVMD25(11), VMC4F3(12), VVIN73(17)	9	[20]	VMC4D4(4), VMC7H3(4), UDV-060(5), VMC4H5(6), VrZAG25(10), VrZAG67(10), UDV-048(11), UDV-088(13), VVC62(14), VMC7B1(19)	10	[29]
VChr2c(2), VMC5G7(2), VVIB01(2), Vchr7c(7), VMC7A4(7), VMC6D12(9), Vchr18c(18)	7	[21]	VMC4F8(1), VVMD21(6), VVIQ52(9), VVIV37(10), VVIH54(13), VVIV67(15), VVIN16(18), VVIP31(19)	8	[30]
VrZAG83(4), VVS16(15), VVMD17(18)	3	[22]	UDV-041(5), UDV-017(11), UDV-050(14), VMC9A2-1(19)	4	[31]
VMC4C6(5), VVS4(8), VVC34(14)	3	[17]	VrZAG79(5), VrZAG62(7)	2	[11]
UDV-125(8), VMC5G6-1(8), UDV-117(18)	3	[23]	VMC3C9(8), VMC3B12(13)	2	[32]
VMC4H6(9), UDV-123(14), UDV-015(15)	3	[24]	VVS5(6)	1	[33]
VMC4F3-1(12), VVMD24(14)	2	[25]	Vchr17c(17)	1	[34]
Vchr1a(1), Vchr2b(2)	2	[26]	UDV-033(14)	1	[35]
VVMD36(3), VVIB66(8)	2	[13]	SCU06(17)	1	[36]
			VVS2(11)	1	[8]
			VVMD5(16)	1	[9]

注:括号内数字为标记所在的染色体号。

Note: The number in brackets mean the chromosome number where the marker is located.

定性。

1.6 参照品种的确

参照品种的选择原则:样品内不同个体间一致性高,容易扩繁保种,尽量以最少的品种数量代表最多的基因型。结合国内葡萄生产实际,确定几个常见且代表性强、无性系数数量少的参照品种,反复检测并确定各标记的参照等位变异片段大小,用于校正和消除不同仪器、不同试验批次等引起的误差。

1.7 数据处理与统计分析

聚丙烯酰胺凝胶电泳:估读条带清晰、多态性高的电泳图,有条带记为“1”,空白记为“0”,缺失记为“999”。

荧光毛细管电泳:使用 GeneMapper ID v3.2 软件(美国应用生物系统公司)读取片段大小,以 Excel 形式导出,并对所得的荧光数据进行人工分析和校正,有峰记为“1”,无峰记为“0”,缺失数据记为

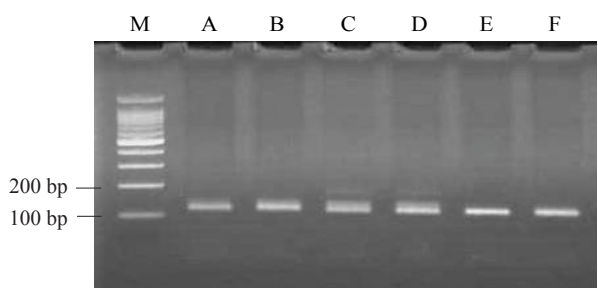
“999”,形成“1/0”矩阵。

使用 Excel 2019 计算变异等位基因的个数、基因型及在群体中发生的频率;利用 PIC-CALC Version 0.6 软件计算多态性信息含量值(polymorphism information content, PIC);利用软件 NTSYS-pc 2.10 (<http://www.exetersoftware.com/cat/ntsyspc/ntsyspc.html>),采用非加权组平均法(UPGMA),对检测的数据进行聚类分析。

2 结果与分析

2.1 SSR 标记的筛选

先用‘霞多丽’‘红地球’‘夏黑’‘巨峰’‘康可’和‘贝达’等 6 个葡萄种质为材料,对 137 个 SSR 标记进行 PCR 扩增及 2% 琼脂糖凝胶电泳检测,发现其中 120 个 SSR 标记能够扩增出目的片段,而且 84 个条带多样且清晰(图 1)。再用表 1 中的 24 份代表品种

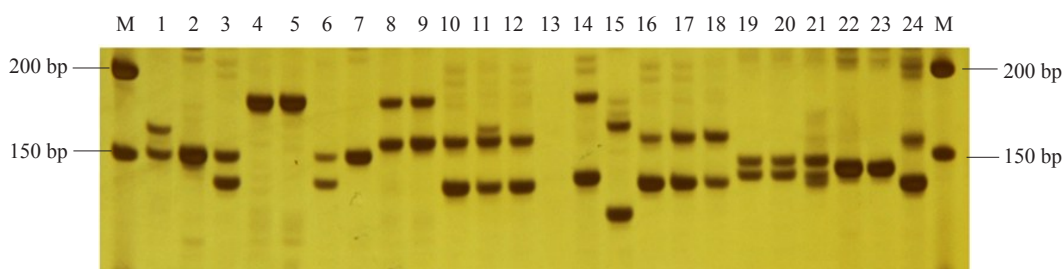


M. 500 bp DNA ladder; A. 霞多丽; B. 红地球; C. 夏黑; D. 巨峰; E. 康可; F. 贝达。

M. 500 bp DNA ladder; A. Chardonnay; B. Red Globe; C. Summer Black; D. Kyoho; E. Concord; F. Beta.

图1 6个葡萄品种使用VMC4F8标记扩增后电泳分析

Fig. 1 The electrophoresis analysis after 6 grape cultivars amplified using VMC4F8



1~24. 24个葡萄代表性品种; M. 500 bp DNA ladder.

1-24. 24 representative grape varieties; M. 500 bp DNA ladder.

图2 标记VVS2对24个代表葡萄品种的扩增结果

Fig. 2 Amplification of 24 representative grape cultivars with VVS2 marker

试材,分别在北京阅微基因有限公司和苏州金唯智生物科技有限公司进行毛细管电泳检测。结果表明,2家公司检测的30个标记的扩增片段在3个品种中的大小一致。为消除同型号不同批次间或不同型号DNA分析仪间可能存在的系统误差,最终选择‘霞多丽’和‘红地球’为参照品种,并确定了在不同标记下可以稳定检测到的标准变异片段大小(表3)。

2.3 遗传多样性分析

30个葡萄SSR标记在24个代表葡萄品种间共检测出196个等位基因变异,平均每个SSR标记的扩增等位基因数为6.53个,变化范围为4~12个,其中VrZAG62扩增等位基因数最多(图3)。30个SSR标记的平均PIC值为0.69,变化范围为0.47~0.87,其中PIC值最高的标记为VVS2, SCU06标记最低,30个标记的PIC值按编号顺序整体呈下降趋势。

对我国新培育的52份葡萄品种扩增后,共获得309个等位基因变异,每个标记平均扩增10.3个,变

材料对初选出的84个标记进行PCR扩增及8%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测,从中筛选到38个多态性高、带型清晰、退火温度相对一致且保证在每条染色体都有分布的标记(图2),占筛选标记总数的27.7%。最后对表1中我国选育的52个葡萄品种使用复选出的38个标记进行PCR扩增,结合毛细管电泳检测技术,经数据统计处理和核对电泳检测成像图谱后,确定出30个扩增稳定、多态性信息含量(PIC)不低于0.4、退火温度控制在56~58℃、均匀分布在染色体上的葡萄SSR标记(表3),占总标记数的21.9%。

2.2 标记验证和参照品种选择

选择‘赤霞珠’‘霞多丽’和‘红地球’3个品种为

化范围为4~16个,其中VrZAG62标记扩增等位基因数11个,较24份材料下获得的等位基因数少了1个,VVMD28最多,其次是VVS2和VMC1C10, Vchr17a标记最少。PIC值变化范围为0.40~0.88,均值为0.75,最高的标记为VrZAG79, Vchr17a标记最低。30个标记的PIC值按编号顺序整体呈下降趋势,但整体水平比在24份材料中获得的PIC值线性变化趋势线高。

2.4 聚类分析及亲缘关系分析

利用NTSYS-pc 2.10软件,根据各品种之间的遗传相似系数,采用UPGMA法对52份葡萄品种进行聚类分析(图4)。聚类结果显示:52份品种之间的遗传相似系数为0.76~0.96,遗传相似系数为0.76时,52个品种可以分为2个大类。

第一大类:全部为二倍体品种,具体在遗传相似系数为0.78时,可以划分为3个亚类。第一亚类:‘野酿2号’,属于毛葡萄属。第二亚类:‘抗砧5号’,属于种间杂种。第三亚类:是遗传关系最复杂和信

表3 30个葡萄SSR标记信息
Table 3 30 SSR markers information for grape

标记编号 Marker No.	标记名称 Marker name	标记类型 Marker type	染色体 Chromosome	退火温度 Annealing Temperature/°C	等位变异 Allelic variation	参照品种 Reference variety	标记序列(5'→3') Marker sequence (5'→3')
P01	VVMD28	A	3	58	215	CD	F: ACAATTCAATGAAAAGAGAGAGAGAGA
					225	CD	R: TCATCAATTCGTATCTCTATTTGCTG
					255	RG	
P02	VVMD32	A	4	58	236	CD	F: GGAAAGATGGGATGACTCGC
					248	RG	R: TATGATTTTTTAGGGGGGTGAGG
					268	CD, RG	
P03	VVMD27	A	5	58	177	CD, RG	F: TACCAGATCTGAATACATCCGTAAGT
					185	CD	R: ACGGGTATAGAGCAAACGGTGT
P04	VrZAG79	A	5	58	240	CD	F: AGATTGTGGAGGAGGGAACAAACCG
					242	CD	R: TGCCCCATTTTCAAACCTCCCTTC
					244	RG	
					256	RG	
P05	VVMD7	A	7	58	237	CD, RG	F: AGAGTTGCGGAGAACAGGAT
					241	CD	R: CGAACCTTCACACGCTTGAT
					247	RG	
P06	VrZAG62	A	7	58	184	RG	F: GGTGAAATGGGCACCGAACACACGC
					186	CD, RG	R: CCATGTCTCTCCTCAGCTTCTCAGC
					194	CD	
P07	VVMD25	A	11	56	236	CD	F: TTCCGTAAAGCAAAAGAAAAAGG
					246	RG	R: TTGGATTTGAAATTTATTGAGGGG
					252	CD, RG	
P08	VVS2	A	11	56	133	RG	F: CAGCCCGTAAATGTATCCATC
					135	CD	R: AAATTCAAAATCTAATTCAAACCTGG
					141	CD	
P09	VVMD5	A	16	56	231	CD	F: CTAGAGCTACGCCAATCCAA
					233	RG	R: TATACCAAAAATCATATTCCTAAA
					235	CD, RG	
P10	VMC4F8	B	1	58	116	CD	F: CATTTCATAGGGTTTTACAGC
					118	RG	R: CTGCCAGTATACTGATTCCTCTC
					122	CD	
					124	RG	
P11	VrZAG93	B	2	56	184	CD, RG	F: GCACTCTTCGACGTTAAACAAAGCC
					210	RG	R: TATGGAGGGACCGAGGTGGGCTAGG
P12	Vchr3a	B	3	56	186	RG	F: CAATCATATGAGCAAGGCATGT
					198	CD	R: GCTTCCTGAAATTTGTGTCCA
P13	Vchr4a	B	4	56	177	CD	F: CAACTGGGATCCAAGACCTC
					185	CD	R: CAGCTTCACAGGTAACCACA
					189	RG	
P14	Vchr6a	B	6	56	170	CD	F: AATGTTGAGCTTTGGGCTTG
					178	CD, RG	R: CCAATTCCTCCATACCTCAAAA
P15	VVMD21	B	6	56	241	RG	F: GGTTGTCTATGGAGTTGATGTTGC
					245	CD	R: GCTTCAGTAAAAAGGGATTGCG
					263	RG	
P16	VVIB66	B	8	56	84	RG	F: CCACTAGTGGTCAGAAAAGAAG
					92	CD	R: TTGTATTGTGTGCCTCTCTCA
					94	RG	

表3(续) Table 3(continued)

标记编号 Marker No.	标记名称 Marker name	标记类型 Marker type	染色体 Chromosome	退火温度 Annealing Temperature/°C	等位变异 Allelic variation	参照品种 Reference variety	标记序列(5'→3') Marker sequence (5'→3')
					98	CD	
P17	Vchr8a	B	8	56	171	CD	F: ACCCACTGCCACTCTCTCAT
					193	RG	R: AAATCTCCGGGATCCTTTTG
					205	CD, RG	
P18	Vchr9b	B	9	56	114	CD, RG	F: AGCGTCATGACAGGTATCAGAA
					132	CD, RG	R: AAAGAATTAATCATTACCATTTCACG
P19	VMC1C10	B	9	56	145	CD	F: CACAGCTGTTCCAAGTCCCA
					157	CD	R: ACAAGCCTTCCGCCACTCTC
					183	RG	
P20	VrZAG67	B	10	56	136	CD, RG	F: ACCTGGCCCCGACTCCTCTTGTATGC
					148	RG	R: TCCTGCCGGCGATAACCAAGCTATG
					150	CD	
P21	VMC4F3-1	B	12	56	168	CD	F: AAAGCACTATGGTGGGTGTA
					174	CD	R: TAACCAATACATGCATCAAGGA
					186	RG	
					198	RG	
P22	Vchr13b	B	13	56	140	RG	F: TAAGCATTCTGGGCTTTTCC
					152	CD	R: TCGTCTATATGCGACCTTGG
P23	Vchr13c	B	13	56	114	RG	F: AGACCCAAGGGCAAGGTACT
					120	CD	R: AACACCGTTAGGCATACTCCA
					123	CD	
P24	VMC5G8	B	15	56	303	RG	F: CATGCACATCTGTTTCACTCT
					311	CD	R: CATCATTGCTTCCAAAAGTCTC
					313	CD	
P25	Vchr16a	B	16	56	107	RG	F: TTCATGTGTGACACCCCTTT
					119	RG	R: AATGTCCATGCTTCAAAATACC
					161	CD	
					169	CD	
P26	Vchr17a	B	17	56	183	CD, RG	F: AGGAAGAGGATTGATCACCA
							R: GTGCCAACCCCTTGCACTATT
P27	SCU06	B	17	58	167	RG	F: CCTAATGCCAGGAAGGTTGC
					171	CD, RG	R: CCCTAGTCTCTCTACCTATCCATG
P28	Vchr18a	B	18	56	149	RG	F: TTCCCACCCGGTAAATATGA
					161	CD, RG	R: CATCCAAACATCACGCTGAG
P29	VVIP31	B	19	56	171	CD	F: TATCCAAGAGACAAATTCCCAC
					177	CD	R: TTCTTTGTTTCTGCAAATGG
					181	RG	
					183	RG	
P30	Vchr19b	B	19	56	160	RG	F: TTTGTTAGGTGTTGTTACCCGTTA
					164	CD, RG	R: ATCTTCTGGCCATGTGGTTC

注:A. 核心标记;B. 扩展标记;CD. 霞多丽;RG. 红地球。

Note: A. Core marker; B. Extended marker; CD. Chardonnay; RG. Red Globe.

息最丰富的一个亚类,包含2个山欧杂种、4个欧美杂种和33个欧亚种。可将这39份品种分为6组:第1组有‘着色香’和‘碧玉香’2个品种,为欧美杂种,均来源于辽宁省盘锦市大洼区唐家镇刘家村,亲缘

关系较近而聚在一起。第2组有‘郑艳无核’‘庆丰’和‘郑美’3个品种,其中‘郑艳无核’和‘庆丰’同为‘布朗无核’和‘京秀’的杂交后代姊妹系,亲缘关系更近,遗传相似性较高,而‘郑美’的亲本为‘郑州早

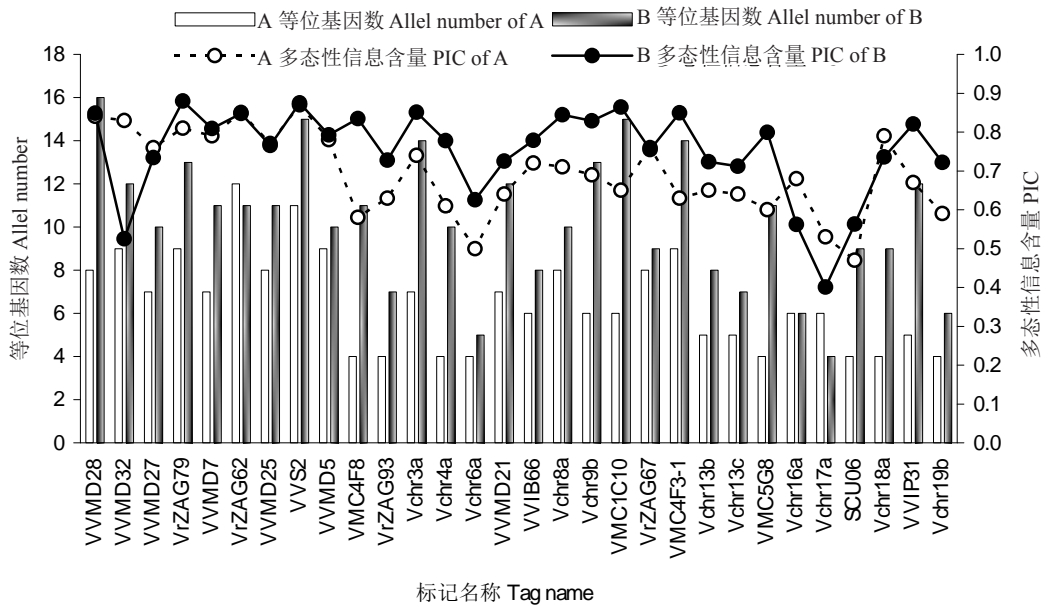


图3 30个SSR标记分别在24份(A)和52份(B)材料中获得的等位基因数和多态性信息含量对比
 Fig. 3 Comparison of the number of alleles and PIC by 30 SSR markers in 24 (A) and 52 (B) materials, respectively

红’和‘美人指’。追溯更深一步的遗传系谱关系,可知‘郑艳无核’‘庆丰’和‘郑美’均有玫瑰香的遗传特性。这就解释了3个品种聚在一起的可能原因。第3组有22个品种,均能找到‘红地球’或‘玫瑰香’,甚至是2个品种杂交的遗传特性。其中‘郑葡1号’和‘郑葡2号’同为‘早玫瑰’和‘红地球’的杂交后代姊妹系而聚在一起;‘短枝玉玫瑰’‘玉波二号’和‘玉波一号’也出自同一杂交姊妹系后代;‘丽红宝’‘无核翠宝’‘秋黑宝’‘早康宝’和‘翠香宝’5个品种单独聚在一起,均为山西省农业科学院培育的‘宝’系列,亲本之一均为‘瑰宝’;而‘福园’‘夏至红’‘玉珍香’‘凌丰红’‘玉波黄地球’等品种也聚在其中,可能与含有‘红地球’系和‘玫瑰香’系的亲缘关系有关。第4组有‘红美’和‘水晶红’,亲本之一均为‘美人指’,单独聚在一起。第5组有8个品种,其中‘红艳香’和‘华葡紫峰’的亲本之一均为‘87-1’,单独聚在一起;‘郑州早玉’‘波尔莱特’也聚类在一起;‘索味浓’‘小红玫瑰’‘特拉蜜’‘小白玫瑰’4个品种因亲本无法追溯,暂时无法解释原因,但从聚类结果中了解到这几个品种可能存在某种遗传相似性。第6组有‘红特沙’和‘卓越黑香蜜’2个品种,其中‘红特沙’的亲本之一‘里扎马特’和‘卓越黑香蜜’的亲本之一‘金手指’均为欧亚种,可能与其果粒均有长粒型的遗传特性有关而聚类在一起。

第二大类:共有11个品种,全部为多倍体品种,

均含有‘巨峰’系亲本的遗传基因。其中,‘瑞峰’首先与其他品种区分开,可能与亲本‘峰后’和‘沈阳玫瑰’的亲缘关系同其他多倍体品种稍远有关。而‘春光’和‘蜜光’两个品种,同为‘早黑宝’和‘巨峰’杂交后代姊妹系,亲缘关系最近,其遗传相似系数较高。‘瑞紫香’和‘红蜜香’均来自同一单位育成的新品种,也聚类在一起。

2.5 品种鉴别效率

参照薛华柏等^[6]的SSR数据处理方法,构建52个葡萄新品种的DNA指纹图谱,经过比对分析得出:使用国际上通用的9个标记(VVMD28、VVMD32、VVMD27、VrZAG79、VVMD7、VrZAG62、VVMD25、VVS2、VVMD5)只能区分开43个品种;而仅用VMC4F3-1标记可区分开25个品种;使用VMC4F3-1、VVS2和VrZAG79三个标记组合能够区分开44个品种;最多使用8个标记组合(VMC4F3-1、VVS2、VrZAG79、Vchr9b、Vchr4a、VrZAG62、VVMD27、Vchr13b)可以把52个品种完全区分开(图5)。

3 讨论

综合国内外SSR分子标记在葡萄上的应用现状,可以看出我国与国际发达国家相比尚存在一定的差距:我国虽作为世界葡萄东亚种群的集中分布区,拥有独具特色且丰富的种质资源,但在目前研究

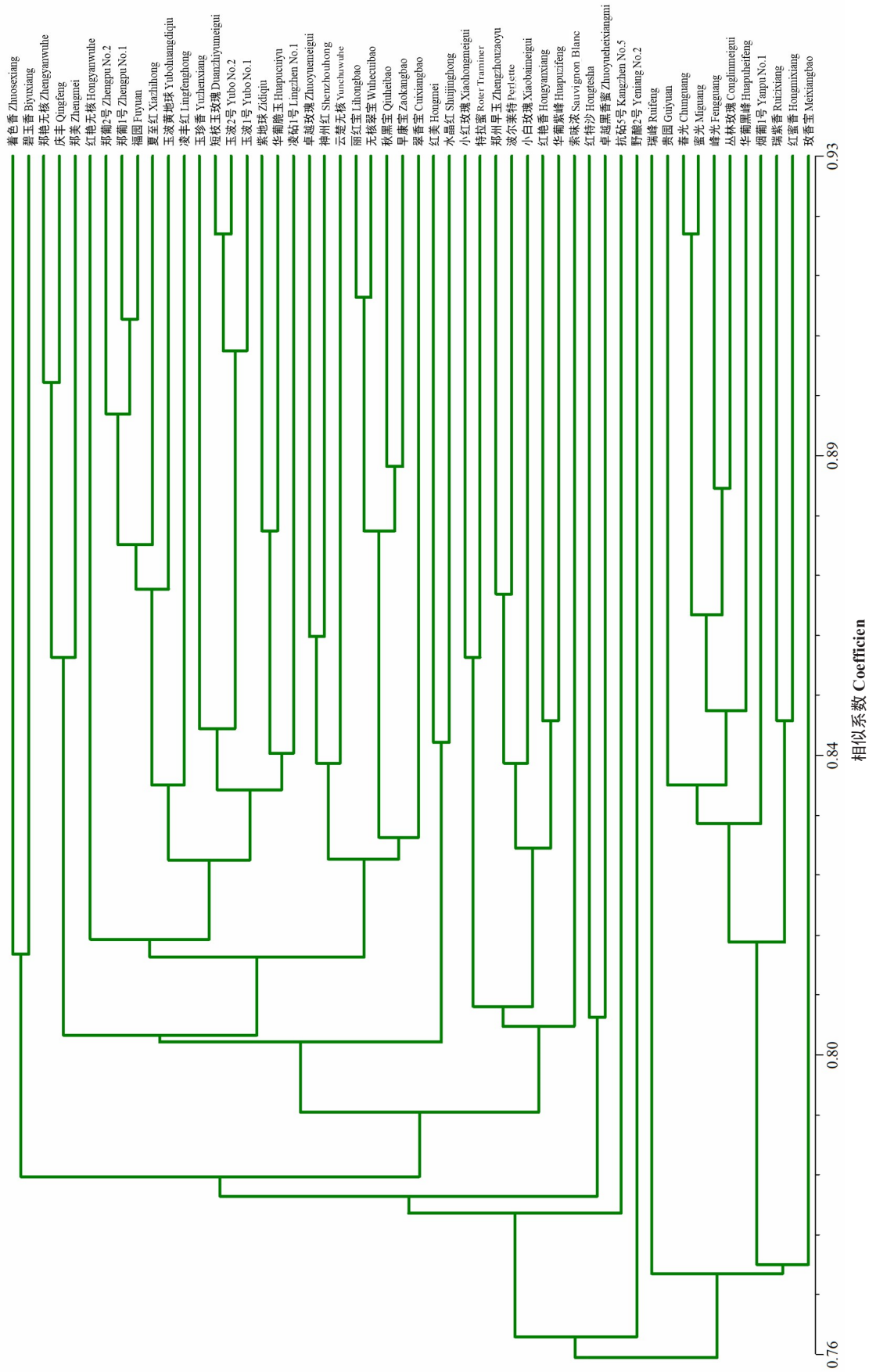
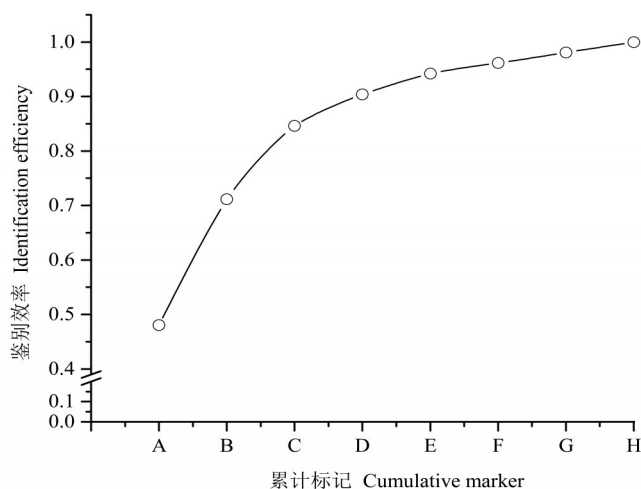


图 4 52 个葡萄新品种的遗传相似聚类分析
 Fig. 4 Genetic similarity clustering map of 52 new grape cultivars



A. VMC4F3-1; B. VVS2; C. VrZAG79; D. Vchr9b; E. Vchr4a; F. VrZAG62; G. VVMD27; H. Vchr13b.

图5 可以区分52个葡萄品种的SSR分子累计标记效率

Fig. 5 Cumulative SSR molecular marker efficiency for 52 grape cultivars

中还存在鉴定材料的种性不够多元化^[37-38]和标记的混杂使用等现象^[13,29,31]。为此,本研究充分结合《植物品种鉴定DNA指纹方法总则》(NY/T 2594—2016)的要求,基于前人研究报道整理出137个葡萄SSR分子标记,从中筛选出30个高效稳定的葡萄SSR标记,其中有22个标记和8个标记的最适退火温度分别为56℃和58℃,后期如果能把最适退火温度统一到一个值,将会更进一步地缩短扩增时间,减少扩增成本,并可提高效率。此外,笔者选择‘霞多丽’和‘红地球’为参照品种来避免因同型号不同批次间或不同型号DNA分析仪间可能造成的系统误差,并确定在不同标记下可以稳定检测到的标准变异片段大小,使建立的标准体系更具参考性。

从遗传多样性分析来看,该30个标记无论在24份材料群体中还是在52份材料群体中获得PIC值都不低于0.40,其中国际上通用的9个标记在不同群体中获得的PIC值均大于0.50,而且当群体扩大到52个时,PIC值大于0.80的标记从5个提升到12个,获得的等位基因总数也从196个增加到309个,平均有10.30个等位基因。此外,从不同群体下获得的PIC值趋势线来看,52份材料群体的趋势线整体水平要比24份材料群体的高,这也与李贝贝等^[15]的研究结论有一定的相似性。

在52个葡萄品种聚类分析中,使用该30个标记绘制的聚类图与其系谱关系具有一致性。诸如‘郑艳无核’和‘庆丰’,‘春光’和‘蜜光’,‘短枝玉玫瑰’‘玉波1号’和‘玉波2号’,‘郑葡1号’和‘郑葡2号’

这4组品种,每组内的品种均为姊妹系,亲缘关系极为相似,在聚类图中也很好地聚在一起。而毛葡萄属的‘野酿2号’和种间杂种的‘抗砷5号’明显同其他品种分离开,这与温景辉等^[35]的分类结果相似,均认为野生种葡萄与其他品种的亲缘关系较远。另外,从聚类图中可以看出多倍体和二倍体品种有着明显的分类,与尹玲等^[4]获得的结论一致。不同的是,本试验首次整合了近年来较好的标记,并筛选出可靠、鉴别效率更高的标记组合,为葡萄新品种保护等工作提供重要技术参考。

在品种鉴定效率上,参照国内水稻(NY/T 1433—2014)、棉花(NY/T 2595—2014)、大豆(NY/T 2634—2014)、枣(LY/T 2426—2015)等作物SSR分子鉴定标准,认为仅用国际上通用的9个标记不足以完全区分开52个品种,这可能与选择的材料中存在多个姊妹系品种和近似种有关,而仅用VMC4F3-1标记能区分25个品种,仅用VVS2标记能区分23个品种,仅用VVMD8标记能区分12个品种,使用VMC4F3-1、VVS2、VrZAG79、Vchr9b、Vchr4a、VrZAG62、VVMD27、Vchr13b共8个标记组合就可能把52个品种全部区分开,说明该套标记的鉴定效率比较理想。

综上,充分证明本试验筛选的30个SSR标记具有一定的可靠性和实用性。为提高鉴定效率,同时保证与国际品种鉴定标准接轨,在具体使用中,将VVMD28、VVMD32、VVMD27、VrZAG79、VVMD7、VrZAG62、VVMD25、VVS2、VVMD5这9对国际通

用引物列为核心标记。一旦这 9 个核心标记鉴别不开,再选择使用其余的 21 个扩展标记,从而有效降低鉴定成本,提高鉴定效率和准确性,更便于实际操作。

4 结 论

通过初选、复选、精选、验证等过程,最终从 137 个标记中筛选出 30 个葡萄 SSR 标记,构建了一套适用于中国的葡萄 SSR 分子标记体系,其中为保证鉴定效率和国际品种鉴定接轨,选择 VVMD28、VVMD32、VVMD27、VrZAG79、VVMD7、VrZAG62、VVMD25、VVS2、VVMD5 这 9 个标记作为体系的核心标记。

参考文献 References:

- [1] 孔庆山. 中国葡萄志[M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2004: 16.
KONG Qingshan. Chinese grapevines[M]. Beijing: Chinese Agricultural Science and Technology Press, 2004: 16.
- [2] 段长青, 刘崇怀, 刘凤之, 王忠跃, 刘延琳, 徐丽明. 新中国果树科学研究 70 年: 葡萄[J]. 果树学报, 2019, 36(10): 1292-1301.
DUAN Changqing, LIU Chonghuai, LIU Fengzhi, WANG Zhongyue, LIU Yanlin, XU Liming. Fruit scientific research in New China in the past 70 years: Grape[J]. Journal of Fruit Science, 2019, 36(10): 1292-1301.
- [3] 李贝贝, 刘崇怀, 姜建福, 张颖, 樊秀彩, 张国海. 葡萄品种分子鉴定研究进展及展望[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(15): 15-20.
LI Beibei, LIU Chonghuai, JIANG Jianfu, ZHANG Ying, FAN Xiucui, ZHANG Guohai. Progress and prospect of molecular identification of grape varieties[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2017, 45(15): 15-20.
- [4] 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.
- [5] 王玉娟, 张彦, 房经贵, 刘崇怀, 宋长年, 孙欣. 利用基于 RAPD 标记的 MCID 法快速鉴定 72 个葡萄品种[J]. 中国农业科学, 2012, 45(14): 2913-2922.
WANG Yujuan, ZHANG Yan, FANG Jinggui, LIU Chonghuai, SONG Changnian, SUN Xin. Rapid identification of 72 grape cultivars by using RAPD markers-based MCID method[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2012, 45(14): 2913-2922.
- [6] 薛华柏, 杨健, 王龙, 王苏珂, 张慧蓉, 乔玉山, 章镇, 李秀根. 29 个梨品种 SSR 特征指纹数据表的构建[J]. 果树学报, 2015, 32(6): 1028-1035.
XUE Huabai, YANG Jian, WANG Long, WANG Suke, ZHANG Huirong, QIAO Yushan, ZHANG Zhen, LI Xiugen. Construction of SSR characteristic fingerprinting data table for 29 pear cultivars [J]. Journal of Fruit Science, 2015, 32(6): 1028-1035.
- [7] 李益, 马先锋, 唐浩, 李娜, 江东, 龙桂友, 李大大, 牛英, 韩瑞玺, 邓子牛. 柑橘品种鉴定的 SSR 标记开发和指纹图谱库构建[J]. 中国农业科学, 2018, 51(15): 149-159.
LI Yi, MA Xianfeng, TANG Hao, LI Na, JIANG Dong, LONG Guiyou, LI Dazhi, NIU Ying, HAN Ruixi, DENG Ziniu. SSR markers screening for identification of citrus cultivar and construction of DNA fingerprinting library[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2018, 51(15): 149-159.
- [8] 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.
- [9] BOWERS J E, DANGL G S, VIGNANI R, MEREDITH C P. Isolation and characterization of new polymorphic simple sequence repeat loci in grape (*Vitis vinifera* L.) [J]. Genome, 1996, 39(4): 628-633.
- [10] BOWERS J E, DANGL G S, MEREDITH C P. Development and characterization of additional microsatellite DNA markers for grape[J]. American Journal of Enology and Viticulture, 1999, 50(3): 243-246.
- [11] SEFC K M, REGNER F, TURETSCHKE E, GLSSL 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.
- [12] 李贝贝. 葡萄 DNA 指纹数据库的构建及品种鉴定[D]. 洛阳: 河南科技大学, 2017.
LI Beibei. Construction of DNA fingerprint database and identification of cultivar for grape[D]. Luoyang: Henan University of Science and Technology, 2017.
- [13] 成冰, 张京芳, 马正强, 王月晖, 张贝贝. 酿酒白葡萄品种的 SSR 分析与鉴定[J]. 西北林学院学报, 2014, 29(2): 103-106.
CHENG Bing, ZHANG Jingfang, MA Zhengqiang, WANG Yuehui, ZHANG Beibei. Analysis and identification of wine white grape varieties by SSR[J]. Journal of Northwest Forestry University, 2014, 29(2): 103-106.
- [14] 杨航宇, 杨哲, 何非, 陈为凯, 王军. 43 份葡萄种质遗传多样性的 SSR 分析[J]. 中外葡萄与葡萄酒, 2018(1): 1-8.
YANG Hangyu, YANG Zhe, HE Fei, CHEN Weikai, WANG Jun. Genetic diversity of 43 grape germplasms revealed by SSR markers[J]. Sino-Overseas Grapevine & Wine, 2018(1): 1-8.
- [15] 李贝贝, 姜建福, 张颖, 樊秀彩, 孙海生, 张国海, 刘崇怀. 葡萄品种 DNA 指纹数据库的构建及遗传多样性分析[J]. 植物遗传资源学报, 2018, 19(2): 338-350.
LI Beibei, JIANG Jianfu, ZHANG Ying, FAN Xiucui, SUN Haisheng, ZHANG Guohai, LIU Chonghuai. DNA fingerprinting and genetic diversity analysis of grape (*Vitis vinifera* L.) cultivars based on SSR markers [J]. Journal of Plant Genetic Resources, 2018, 19(2): 338-350.
- [16] 王雯染, 杨哲, 杨航宇, 王军. 葡萄砧木品种的 SSR 分析[J]. 果树学报, 2018, 35(1): 11-19.
WANG Wenran, YANG Zhe, YANG Hangyu, WANG Jun. Analysis of grape rootstocks by SSR markers[J]. Journal of Fruit Science, 2018, 35(1): 11-19.
- [17] 樊秀彩, 张颖, 姜建福, 孙海生, 焦健, 刘崇怀. SSR 分子标记鉴定山葡萄和河岸葡萄种间杂种[J]. 西北植物学报, 2012, 32

- (11): 2195-2200.
FAN Xiucui, ZHANG Ying, JIANG Jianfu, SUN Haisheng, JIAO Jian, LIU Chonghuai. Identification of interspecific hybrids derived from *Vitis riparia* × *Vitis amurensis* by SSR marker [J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2012, 32(11): 2195-2200.
- [18] VOUILLAMOZ J F, ARNOLD C. Microsatellite pedigree reconstruction provides evidence that ‘Muller-Thurgau’ is a grandson of ‘Pinot’ and ‘Schiava Grossa’ [J]. Vitis, 2010, 49(2): 63.
- [19] TOMIC L, STAJNER N, JOVANOVIĆ C T, CVETKOVIĆ M, JAVORNIK B. Identity and genetic relatedness of Bosnia and Herzegovina grapevine germplasm [J]. Scientia Horticulturae, 2012, 143: 122-126.
- [20] LAUCOU V, LACOMBE T, DECHESNE F, SIRET R, BRUNO J P, DESSUP M. High throughput analysis of grape genetic diversity as a tool for germplasm collection management [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2011, 122(6): 1233-1245.
- [21] ZAROURI B, VARGAS A M, GAFORIO L, ALLER M, DE ANDRÉS M T, CABEZAS J A. Whole-genome genotyping of grape using a panel of microsatellite multiplex PCRs [J]. Tree Genetics & Genomes, 2015, 11(2): 1-15.
- [22] 张萌. 基于 SSR 分子标记的葡萄种质资源遗传多样性分析及品种鉴定 [D]. 南京: 南京农业大学, 2012.
ZHANG Meng. Analysis of genetic diversity and cultivar identification of grapevine germplasm resources based on SSR molecular markers [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2012.
- [23] GHEORGHE R N, POPESCU C F, PAMFIL D, CIOCIRLAN C N, SESTRAS R. Genetic diversity of some Romanian grapevine cultivars as revealed by microsatellite markers [J]. Romanian Biotechnological Letters, 2010, 15(2): 26-31.
- [24] LIU C H, FAN X C, JIANG J F, GUO D L, SUN H S, ZHANG Y, FANG J G. Genetic diversity of Chinese wild grape species by SSR and SRAP markers [J]. Biotechnology & Biotechnological Equipment, 2012, 26(2): 2899-2903.
- [25] BASHEER-SALIMIA R, LORENZI S, BATARSEH F, MORENO-SANZ P, EMANUELLI f, GRANDO M S. Molecular identification and genetic relationships of Palestinian grapevine cultivars [J]. Molecular Biotechnology, 2014, 56(6): 546-556.
- [26] 李雪雁, 梁海永, 宪立杰, 杨敏生. 基于 SSR 技术对七十五份栽培葡萄品种的鉴定研究 [J]. 北方园艺, 2015(13): 115-119.
LI Xueyan, LIANG Haiyong, XIAN Lijie, YANG Minsheng. Identification of 75 cultivated grape varieties based by SSR technology [J]. Northern Horticulture, 2015(13): 115-119.
- [27] 李慧, 罗正荣, 张青林. 基于 SSR 和 IRAP 标记的‘关口葡萄’亲缘关系分析 [J]. 果树学报, 2014, 31(6): 1040-1046.
LI Hui, LUO Zhengrong, ZHANG Qinglin. Genetic relationship analysis of ‘Guankou-putao’ by SSR and IRAP markers [J]. Journal of Fruit Science, 2014, 31(6): 1040-1046.
- [28] CIPRIANI G, MARRAZZO M T, DI GASPERO G, PFEIFFER A, MORGANTE M, TESTOLIN R. A set of microsatellite markers with long core repeat optimized for grape (*Vitis* spp.) genotyping [J]. BMC Plant Biology, 2008, 8(1): 127.
- [29] 杜晶晶, 刘国银, 魏军亚, 刘德兵, 杨小振. 基于 SSR 标记构建葡萄种质资源分子身份证 [J]. 植物研究, 2013, 33(2): 232-237.
DU Jingjing, LIU Guoyin, WEI Junya, LIU Debing, YANG Xiaozhen. Establishment of molecular ID for grape germplasm based on SSR markers [J]. Bulletin of Botanical Research, 2013, 33(2): 232-237.
- [30] BESLİC Z, TODIĆ S, KORAC N, LORENZI S, EMANUELLI f, GRANDO M S. Genetic characterization and relationships of traditional grape cultivars from Serbia [J]. Vitis, 2012, 51(4): 183.
- [31] 郭春苗, 李宁, 周晓明, 樊丁宇, 谢辉, 张付春, 潘明启, 卢春生. 基于 SSR 标记的葡萄品种 (系) 遗传多样性分析与指纹图谱构建 [J]. 新疆农业科学, 2015, 52(11): 2051-2058.
GUO Chunmiao, LI Ning, ZHOU Xiaoming, FAN Dingyu, XIE Hui, ZHANG Fuchun, PAN Mingqi, LU Chunsheng. Analysis of genetic diversity and construction of DNA fingerprinting for grape (*Vitis vinifera* L.) cultivars based on SSR markers [J]. Xinjiang Agricultural Sciences, 2015, 52(11): 2051-2058.
- [32] 郭明晓. 葡萄早熟芽变的主要生理特性, 解剖学观察及分子鉴定研究 [D]. 洛阳: 河南科技大学, 2014.
GUO Mingxiao. The physiological, anatomical and molecular analysis of grape early bud mutation and their parents’ characteristics [D]. Luoyang: Henan University of Science and Technology, 2014.
- [33] 郝宇, 张淑静, 张世红, 梁海永. 葡萄品种资源的 SSR 鉴定及遗传多样性分析 [J]. 河北农业大学学报, 2010, 33(1): 54-59.
HAO Yu, ZHANG Shujing, ZHANG Shihong, LIANG Haiyong. SSR identification and analysis of genetic diversity of grape cultivars [J]. Journal of Agricultural University of Hebei, 2010, 33(1): 54-59.
- [34] 宪立杰, 刘兴菊, 李雪雁, 梁海永, 杨敏生. 葡萄种质遗传多样性的 SSR 分析及指纹库构建 [J]. 北方园艺, 2013(11): 87-90.
XIAN Lijie, LIU Xingju, LI Xueyan, LIANG Haiyong, YANG Minsheng. SSR analysis of genetic diversity of grape germplasm and construction of fingerprint database [J]. Northern Horticulture, 2013(11): 87-90.
- [35] 温景辉. 基于 SSR 分子标记的山葡萄种质遗传多样性研究与核心种质构建 [D]. 长春: 吉林农业大学, 2011.
WEN Jinghui. Study on genetic diversity of *Vitis amurensis* Rupy. germplasm based on SSR molecular markers and construction of core germplasm [D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2011.
- [36] GUO D L, ZHANG Q, ZHANG G H. Characterization of grape cultivars from China using microsatellite markers [J]. Czech Journal of Genetics and Plant Breeding, 2013, 49(4): 164-170.
- [37] 董志刚, 李晓梅, 谭伟, 赵旗峰, 王敏, 黄丽萍, 刘伟, 马小河, 杨兆亮, 唐晓萍, 王兰. 基于 SSR 标记的葡萄品种鉴别和指纹图谱构建 [J]. 分子植物育种, 2018, 16(11): 3605-3614.
DONG Zhigang, LI Xiaomei, TAN Wei, ZHAO Qifeng, WANG Min, HUANG Liping, LIU Wei, MA Xiaohu, YANG Zhaoliang, TANG Xiaoping, WANG Lan. Identification and fingerprinting construction of *Vitis vinifera* variety based on SSR markers [J]. Molecular Plant Breeding, 2018, 16(11): 3605-3614.
- [38] 王慧玲, 闫爱玲, 孙磊, 张国军, 王晓玥, 徐海英. 13 个中国葡萄优新品种的分子身份证构建 [J]. 生物技术通报, 2016, 32(4): 137-142.
WANG Huiling, YAN Ailing, SUN Lei, ZHANG Guojun, WANG Xiaoyue, XU Haiying. Molecular ID establishment of 13 Chinese newly-developed grape cultivars [J]. Biotechnology Bulletin, 2016, 32(4): 137-142.