

基于 SSR 标记的 100 份葡萄资源亲缘关系和群体遗传结构分析

赵旗峰, 黄丽萍, 王 敏, 刘晓婷, 张晓萍, 马小河*

(山西农业大学果树研究所, 山西太谷 030815)

摘要:【目的】通过表型性状鉴定分析,从山西太谷国家葡萄种质资源圃内保存的资源中,筛选出不同葡萄种质资源进行 SSR 分析,揭示这些不同来源的葡萄种质资源之间的亲缘关系和群体遗传结构,为葡萄种质资源的科学管理和分子标记辅助育种提供参考。【方法】以 100 份葡萄种质为材料,依据基因组 DNA 测序挖掘出的 SSR 引物数据,筛选出 33 对多态性核心引物,根据标准分子质量记录扩增 DNA 多态性条带,获得数据矩阵。利用每对 SSR 引物在 100 份葡萄种质资源中的等位基因组成,计算 33 对 SSR 引物的位点多态性信息含量(PIC)、100 份葡萄种质资源个体间的 Nei's 遗传距离,并利用 MEGA 7.0 软件构建 NJ 邻接聚类树,推断葡萄原始集合与核心集合的遗传结构。【结果】100 个样本中的 33 对 SSR 标记共检测到 423 个等位基因,每对引物扩增条带数 4~26 条,平均扩增条带数为 12.82 条。葡萄种质资源之间的 Nei's 遗传距离为 0.4~0.8,占资源总量的 97.80%。通过遗传结构分析并预测其最佳分组数 K 为 2,即葡萄核心集合主要分为 2 个亚群,分别为欧亚种群的鲜食葡萄和杂种群,其中杂种群涵盖了欧美杂种、美洲种、中国野生种及欧亚种的酿酒品种。来自国外的美洲种的砧木和来自山西的野葡萄聚在一起,同时与欧美杂种和酿酒品种也聚为一类。可能是由于人为选种和选用目的的不同造成各品种之间遗传背景的混杂。这一结论还需进一步研究证明。【结论】33 对引物将 100 份葡萄分为两个集群,第一集群主要为葡萄亚种鲜食葡萄品种,第二集群主要包含了欧亚种酿酒品种、欧美杂种、美洲种、中国野生种 4 个亚种群。

关键词: 葡萄; SSR 分子标记; 亲缘关系; 遗传结构

中图分类号: S663.1

文献标志码: A

文章编号: 1009-9980(2021)08-1217-14

Genetic relationship and population genetic structure analysis of 100 accessions of grape germplasm resources based on SSR markers

ZHAO Qifeng, HUANG Liping, WANG Min, LIU Xiaoting, ZHANG Xiaoping, MA Xiaohe*

(Pomology Institute of Shanxi Agricultural University, Taigu 030815, Shanxi, China)

Abstract: 【Objective】100 accessions of grape resources were selected from the National Grape Germplasm Resource Center in Taigu, Shanxi through phenotypic character identification for SSR analysis in order to reveal their genetic relationship and population genetic structure and provide references for the scientific management of grape germplasm resources and molecular marker-assisted breeding. 【Methods】The modified CTAB was used to extract the genomic DNA of the tested grape germplasm. Based on the SSR primers extracted from the grape genome sequencing, 33 pairs of core polymorphic primers were screened out, and the DNA was amplified according to standard molecular weight records using capillary electrophoresis technology. According to the polymorphic bands, the data matrix was obtained. The number of alleles N_a (N_a), the number of effective alleles (N_e), the Shannon's information index (I), the expected heterozygosity (He), and the observed heterozygosity were calculated using Gen Al Ex6.503 software. At the same time, Gen Al Ex6.503 software were used to count the allelic composi-

收稿日期: 2020-09-21 接受日期: 2021-05-09

基金项目: 农业农村部保种项目(111821301354052002); 科技部资源平台专项(NHGRC2020-NH12-2); 国家现代农业产业技术体系专项(CARS-29-yz-5); 院优势课题组自选项目(YCX2018D2YS05)

作者简介: 赵旗峰, 男, 研究员, 硕士, 研究方向为果树资源与育种。Tel: 13935492764, E-mail: gssqfzhao@163.com

*通信作者 Author for correspondence. Tel: 13835473581, E-mail: 13835473581@qq.com

tion of each pair of SSR primers in 100 accessions of grape germplasm resources, including the number of rare alleles ($\leq 1\%$), the number of common alleles (1% - 20%), and the most common allele (20%). The site polymorphism information content (PIC) of 33 pairs of SSR primers and the Nei's Genetic distance between 100 accessions of grape germplasm resources were calculated using Power Marker software. The NJ adjacent cluster trees of 100 grape germplasm resources based on the Nei's genetic distance were constructed using MEGA7.0 software. The STRUCTURE software was used to infer the genetic structure of the original grape set and the core set based on the Bayesian clustering analysis method. The population number (K) was set to 1-10, and each K value was simulated 10 times, and the number of iterations (length of burn-in period) was set. The Markov Chain Monte Carlo (MCMC) at the beginning was 100 000 times, and the MCMC after no-count iterations was 1 000 000 times. Finally, the structure results were imported into the online website Structure Harvester to predict and determine the best K value (number of groups). **【Results】**A total of 423 alleles were detected in 33 pairs of SSR markers in 100 accessions of grape germplasm resources. Each pair of primers amplified 4 to 26 bands, and the average number of amplified bands was 12.82. The number of rare alleles ($\leq 1\%$) in the allele composition amplified by 33 pairs of SSR primers in 100 accessions of grape germplasm resources ranged from 0 to 9, with an average of 3.39, and the total number of alleles (1%-20%) was 8.26, and the most common number of alleles ($>20\%$) was 1.67. The Nei's genetic distance between 100 grape germplasm resources was about 0.4 to 0.8, accounting for 97.80% of the total resources, 48.22% was about 0.6 to 0.7. 27.17% is about 0.5 to 0.6, 17.03% was about 0.7 to 0.8. The NJ genetic clustering tree was built based on the genetic distance using software. The 100 accessions of grape germplasm resources were divided into 4 groups. In order to further understand the genetic relationship between different grape germplasms, a principal coordinate analysis (PCoA) was performed on 100 accessions of grape germplasm resources based on the genetic distance matrix. From the results, The best dividing group number of K was 2, which meant the core set of grape could be divided into two subgroups. In general, the two populations were the fresh grape populations and the hybrid populations including European hybrids, American hybrids, Chinese wild species and European wine-making varieties. By the analysis of our research results, the rootstocks from American species and the wild species from Shanxi were clustered together. Meanwhile, they were also clustered together with the European and American hybrids and the wine-making varieties. The reason for this might be the mix of the genetic background of the varieties due to the artificial breeding and selection for different purpose. Although the clustering results were basically consistent with the geographical origins of the various groups, there were also 1 rootstock species and 1 wild species in Eurasian species, or European and Asian hybrids in Eurasian species. The analysis was due to the expansion The process was not a complete genome sequence, so there were some varieties that just did not show up. The specific reasons need to analyze further. In addition, the first of the two clusters were mainly the table grape varieties of grape subspecies, and the second cluster mainly included four subpopulations of Eurasian wine-making varieties, European and American hybrids, American species, and Chinese wild species. From the results, it could be seen that the varieties of Eurasian species appeared in different clusters due to different usages; and several other species were also clustered in this cluster. The analysis of the reason may be due to the difference in the amount of ancient or traditional genes caused by the difference in the degree of evolution or the way of evolution. **【Conclusion】**This article provided new evidences for analysis of the genetics relationship between the wild species and the cultivated varieties through genetic relationship of genotypes and analysis of gene structures.

Key words: Grape; SSR molecular marker; Genetic relationship; Genetic structure

葡萄属于葡萄科(Vitaceae)葡萄属(*Vitis* L.),是栽培历史最悠久的植物之一。中国的葡萄栽培始于2000多年前的汉武帝时期^[1],是葡萄属植物的原产国之一。据不完全统计,目前我国入圃保存的葡萄种质资源约有3000份^[2],品种繁多,种质资源、基因资源极为丰富^[3-4],对这些资源进行多样性评价,可以有效地保护植物遗传多样性,为培育不同特性的新品种提供基本材料;另外,由于定向培育新品种使种间缺乏基因流动,遗传背景越来越狭窄,新品种培育和抵御病虫害等方面都有较大的弊端。因而综合地利用各种方法,特别是利用现代分子生物学技术来研究作物遗传多样性,对提高葡萄育种、种质资源管理及保护水平,具有重要的理论意义和实际意义。山西太谷国家葡萄种质资源圃目前保存了17个种669份葡萄种质资源,为了加快对圃内保存资源的开发利用进程,对其进行亲缘关系和群体遗传结构的研究意义重大,同时也可作为葡萄核心种质资源的构建和遗传育种等提供支撑。

DNA标记技术被广泛应用于种质资源的遗传多样性研究。其中SSR标记技术以其不受环境、发育时期、器官等限制的优越性,具有更高的可靠性和效率,更容易从分子水平上研究物种的亲缘关系、种质资源保存、构建图谱及辅助育种等,已成为当前品种鉴定的主要技术^[5-6]。同时SSR标记在葡萄种质资源鉴别、揭示和区分同名异物、同物异名等方面已经得到广泛应用。Thomas等^[7]研究认为,SSR标记可以把葡萄种、种间杂交品种和纯种品种正确区分。Botta等^[8]的研究结果也证明,利用SSR标记对葡萄种质资源和品系遗传多样性进行分析,具有较高的可靠性和重要的现实意义。Martínez等^[9]利用SSR技术分析了南美葡萄品种的遗传多样性;温景辉等^[10]、方连玉等^[11]利用SSR标记对葡萄种质进行了多态性分析,成功地将山葡萄品种、欧亚种及美洲杂种区分开。吴子龙等^[12]利用SSR标记对8个山葡萄及山欧杂种葡萄品种进行了区分。邹瑜等^[13]利用SSP技术对70份毛葡萄种质资源进行了多样性分析,阐明了毛葡萄种质的亲缘关系。郭春苗等^[14]利用SSP技术对葡萄品种(系)的遗传多样性进行了分析,在一定程度上反映了品种之间的亲缘关系。VVVS2^[7]、VVMD5^[15]、VVMD7^[15]、VVMD25^[16]、VVMD27^[16]、VVMD28^[16]、VVMD32^[16]、VrZAG79^[17]、VrZAG62^[17]这9对SSR引物已作为国际上葡萄品种

鉴定的通用标记^[18]。尹玲等^[19]、成冰^[20]、杨航宇等^[21]、李贝贝等^[22]也利用国际通用的SSR标记分别构建了不同份数葡萄品种的遗传图谱。王富强等^[23]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与国际品种鉴定接轨,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。为了对国家果树种质资源太谷葡萄圃保存的种质资源进行深入鉴定评价,笔者在本研究中利用SSR分子标记对100份葡萄种质资源进行遗传多样性分析,揭示这些不同来源的葡萄种质资源之间的亲缘关系和群体遗传结构,为葡萄种质资源的科学管理和分子标记辅助育种提供参考。

1 材料和方法

1.1 材料

根据表型特征,从国家果树种质资源太谷葡萄圃保存的资源中选取了100份葡萄种质资源^[24],2016年采集葡萄幼嫩叶片,液氮处理后-70℃保存备用。具体名称见表1。

1.2 方法

1.2.1 基因组DNA提取 取新鲜叶片在液氮中充分研磨成粉末,并转移至1.5 mL的离心管中,加入600 μL 65℃预热的Buffer PCB和12 μL β-巯基乙醇,震荡混匀,置于65℃水浴25 min,加入等体积的氯仿,充分混匀,12 000 r·min⁻¹离心5 min。吸取上层水相至干净的1.5 mL的离心管中,加入等体积Buffer BD,颠倒混匀3~5次,再加等体积的无水乙醇,充分混匀后用移液器将其全部加入到吸附柱中,室温静置2 min,10 000 r·min⁻¹离心1 min,倒掉收集管中废液,将吸附柱放回收集管中,加入500 μL Wash Solution,10 000 r·min⁻¹离心1 min,倒掉收集管中废液,将吸附柱放回收集管中,12 000 r·min⁻¹离心2 min,取出吸附柱,放入1个新的1.5 mL离心管中,在吸附膜中央加入50 μL TE Buffer,静置3 min,12 000 r·min⁻¹离心2 min,得到DNA溶液,置于-20℃保存。

1.2.2 SSR-PCR扩增及电泳 以前期葡萄基因组测序挖掘出的SSR引物为基础,从中筛选出了33对核心多态引物(表2)。SSR-PCR扩增在3730XL测序序列分析仪上进行。PCR反应体系为25 μL,其中

表 1 试验材料

Table 1 Materials used in the experiment

编号 品种 No. Cultivar	来源 Source	亲本 Parent	用途 Use	编号 品种 No. Cultivar	来源 Source	亲本 Parent	用途 Use
1 郑州早红 Zhengzhouzao-hong	中国河南 Henan, China	欧亚种 <i>Vitis vinifera</i> L.	鲜食 Table grape	51 保尔加尔 Boulgal	小亚细亚 Asia Minor	欧亚种 <i>V. vinifera</i> L.	鲜食 Table grape
2 早黄 Zaohuang	中国陕西 Shaanxi, China	欧亚种 <i>V. vinifera</i> L.	鲜食 Table grape	52 齐姆干 Zimgan	不详 Unkown	欧亚种 <i>V. vinifera</i> L.	鲜食 Table grape
3 京早 Jingzao	中国北京 Beijing, China	欧亚种 <i>V. vinifera</i> L.	鲜食 Table grape	53 胜利 Pobeda	苏联 The Soviet Union	欧亚种 <i>V. vinifera</i> L.	鲜食 Table grape
4 红汁加美 Gamay Teinturier	法国 France	欧亚种 <i>V. vinifera</i> L.	鲜食 Table grape	54 牛奶 Niunai	中国 China	欧亚种 <i>V. vinifera</i> L.	鲜食 Table grape
5 苏哈克 Шултак	苏联 The Soviet Union	欧亚种 <i>V. vinifera</i> L.	鲜食 Table grape	55 瓦留斯金 Walluskin	苏联 The Soviet Union	欧亚种 <i>V. vinifera</i> L.	酿酒 Wine grape
6 早玛瑙 Zaomanao	中国北京 Beijing, China	欧亚种 <i>V. vinifera</i> L.	鲜食 Table grape	56 拉客特 Laket	苏联 The Soviet Union	欧亚种 <i>V. vinifera</i> L.	鲜食 Table grape
7 莎巴珍珠 Perle de Czaba	匈牙利 Hungary	欧亚种 <i>V. vinifera</i> L.	鲜食 Table grape	57 白卡库尔 Кокур Белый	苏联 The Soviet Union	欧亚种 <i>V. vinifera</i> L.	鲜食 Table grape
8 绯红 Caedinat	美国 American	欧亚种 <i>V. vinifera</i> L.	鲜食 Table grape	58 沙巴什 Chabache	苏联 The Soviet Union	欧亚种 <i>V. vinifera</i> L.	鲜食 Table grape
9 京秀 Jingxiu	中国北京 Beijing, China	欧亚种 <i>V. vinifera</i> L.	鲜食 Table grape	59 黑谢列克西 Black cherokee	苏联 The Soviet Union	欧亚种 <i>V. vinifera</i> L.	鲜食 Table grape
10 公酿1号 Gongniang No.1	中国吉林 Jilin, China	山欧杂种 Hybrid of <i>V. amurensis</i> and <i>V. vinifera</i>	酿酒 Wine grape	60 黑马依斯克 Black Musk	苏联 The Soviet Union	欧亚种 <i>V. vinifera</i> L.	鲜食 Table grape
11 公酿2号 Gongniang No.2	中国吉林 Jilin, China	山欧杂种 Hybrid of <i>V. amurensis</i> and <i>V. vinifera</i>	酿酒 Wine grape	61 表链罗也尔 Albert Royal	法国 France	欧亚种 <i>V. vinifera</i> L.	鲜食 Table grape
12 梅醇 Meichun	中国吉林 Jilin, China	欧亚种 <i>V. vinifera</i> L.	酿酒 Wine grape	62 匈牙利之光 Gloria Hungariae	匈牙利 Hungary	欧亚种 <i>V. vinifera</i> L.	鲜食 Table grape
13 凤凰51 Fenghuang No.51	中国大连 Dalian, China	欧亚种 <i>V. vinifera</i> L.	鲜食 Table grape	63 意大利里斯林 Italian liplin	意大利 Italy	欧亚种 <i>V. vinifera</i> L.	鲜食 Table grape
14 恰吾什 Chawush	土耳其 Turkey	欧亚种 <i>V. vinifera</i> L.	鲜食 Table grape	64 意大利 Ltalial	意大利 Italy	欧亚种 <i>V. vinifera</i> L.	鲜食 Table grape
15 藤稔 Fujiminori	日本 Japan	欧美杂种 Hybrids of <i>V. vinifera</i> and <i>V. labrusca</i>	鲜食 Table grape	65 佳里酿 Carignan	西班牙 Spain	欧亚种 <i>V. vinifera</i> L.	酿酒 Wine grape
16 哈特蜜 Khatmi	苏联 The Soviet Union	欧亚种 <i>V. vinifera</i> L.	鲜食 Table grape	66 玫瑰香 Muscat Hamburg	英国 British	欧亚种 <i>V. vinifera</i> L.	鲜食 Table grape
17 依斯比沙 Ispissar	苏联 The Soviet Union	欧亚种 <i>V. vinifera</i> L.	鲜食 Table grape	67 加浓玫瑰 Cannon Hall	英国 British	欧亚种 <i>V. vinifera</i> L.	鲜食 Table grape
18 无核黑 Kichmich noir	苏联 The Soviet Union	欧亚种 <i>V. vinifera</i> L.	鲜食 Table grape	68 金后 Golden Queen	英国 British	欧亚种 <i>V. vinifera</i> L.	鲜食 Table grape
19 金星无核 Venus seedless	美国 American	欧美杂种 Hybrids of <i>V. vinifera</i> and <i>V. labrusca</i>	鲜食 Table grape	69 仙索 Cinsault	法国 France	欧亚种 <i>V. vinifera</i> L.	酿酒 Wine grape
20 京亚 Jingya	中国北京 Beijing, China	欧美杂种 Hybrids of <i>V. vinifera</i> and <i>V. labrusca</i>	鲜食 Table grape	70 法国兰 Blue French	奥地利 Austria	欧亚种 <i>V. vinifera</i> L.	酿酒 Wine grape
21 粉红特拉明纳 Traminer roter	奥地利 Austria	欧亚种 <i>V. vinifera</i> L.	鲜食 Table grape	71 赤霞珠 Cabernet Sauvignon	法国 France	欧亚种 <i>V. vinifera</i> L.	酿酒 Wine grape
22 黑赛尔 Seibel Noir	法国 France	欧美杂种 Hybrids of <i>V. vinifera</i> and <i>V. labrusca</i>	鲜食 Table grape	72 柔丁香 Roudingxiang	不详 Unkown	欧美杂种 Hybrids of <i>V. vinifera</i> and <i>V. labrusca</i>	鲜食、酿酒 Table grape/ Wine grape
23 白香蕉 Baixiangjiao	美国 American	欧美杂种 Hybrids of <i>V. vinifera</i> and <i>V. labrusca</i>	鲜食 Table grape	73 维金拉斯 Vergennes	苏联 The Soviet Union	欧美杂种 Hybrids of <i>V. vinifera</i> and <i>V. labrusca</i>	鲜食 Table grape
24 苏60-36-4 Su60-36-4	苏联 The Soviet Union	欧亚种 <i>V. vinifera</i> L.	鲜食 Table grape	74 外明红 Wyoming Red	美国 American	美洲种 <i>V. labrusca</i>	鲜食、酿酒 Table grape/ Wine grape

表1 (续)
Table 1 (Continued)

编号 品种 No. Cultivar	来源 Source	亲本 Parent	用途 Use	编号 品种 No. Cultivar	来源 Source	亲本 Parent	用途 Use
25 爱地朗德 Adirondac	美国 America	欧亚种 <i>V. vinifera</i> L.	鲜食 Table grape	75 罗也尔玫瑰 Royal Rose	美国 America	欧亚种 <i>V. vinifera</i> L.	酿酒 Wine grape
26 紫珍香 Zizhenxiang	中国辽宁 Liaoning, China	欧美杂种 Hybrids of <i>V. vinifera</i> and <i>V. labrusca</i>	鲜食 Table grape	76 黑虎香 Heihuxiang	美国 America	美洲种 <i>V. labrusca</i>	酿酒 Wine grape
27 伊丽莎白 Elizabeth Grape	匈牙利 Hungary	欧亚种 <i>V. vinifera</i> L.	鲜食 Table grape	77 蜜尔斯 Mills	美国 America	欧亚种 <i>V. vinifera</i> L.	酿酒 Wine grape
28 早生白 Zaoshengbai	法国 France	欧亚种 <i>V. vinifera</i> L.	鲜食 Table grape	78 摩尔多瓦 Moldova Grape	摩尔多瓦 Moldova	欧亚种 <i>V. vinifera</i> L.	酿酒 Wine grape
29 葡萄园皇后 Queen of vinyard	匈牙利 Hungary	欧亚种 <i>V. vinifera</i> L.	鲜食 Table grape	79 白阿布尔格 White alberger grape	苏联 The Soviet Union	欧亚种 <i>V. vinifera</i> L.	鲜食 Table grape
30 里斯林格 Riesling	德国 Germany	欧亚种 <i>V. vinifera</i> L.	酿酒 Wine grape	80 阿鲁什丁玫瑰 Arushidine rose	苏联 The Soviet Union	欧亚种 <i>V. vinifera</i> L.	鲜食 Table grape
31 阿登纳玫瑰 Adenauer rose	法国 France	欧亚种 <i>V. vinifera</i> L.	酿酒 Wine grape	81 芳香拉查基 Aromatic ratchaki grape	保加利亚 Bulgaria	欧亚种 <i>V. vinifera</i> L.	鲜食 Table grape
32 26-84-3	中国 China	欧亚种 <i>V. vinifera</i> L.	鲜食 Table grape	82 五味子 Wuweizi	不详 Unkonwn	欧美杂种 Hybrids of <i>V. vinifera</i> and <i>V. labrusca</i>	酿酒 Wine grape
33 维多利亚 Vitoria	罗马尼亚 Romanian	欧亚种 <i>V. vinifera</i> L.	鲜食 Table grape	83 品丽珠 Cabernet Franc	法国 France	欧亚种 <i>V. vinifera</i> L.	酿酒 Wine grape
34 奥古斯特 Auguste	罗马尼亚 Romanian	欧亚种 <i>V. vinifera</i> L.	鲜食 Table grape	84 红地球 Red globe	美国 America	欧亚种 <i>V. vinifera</i> L.	鲜食 Table grape
35 里扎马特 Rizamat	苏联 The Soviet Union	欧亚种 <i>V. vinifera</i> L.	鲜食 Table grape	85 奥山红宝石 Red Italia	巴西 Brasilia	欧亚种 <i>V. vinifera</i> L.	鲜食 Table grape
36 无核白鸡心 Centennial Seedless	美国 America	欧亚种 <i>V. vinifera</i> L.	鲜食 Table grape	86 黑大粒 Exotic	美国 America	欧亚种 <i>V. vinifera</i> L.	鲜食 Table grape
37 京丰 Jingfeng	中国北京 Beijing, China	欧亚种 <i>V. vinifera</i> L.	鲜食 Table grape	87 粉红葡萄 Flame Tokay	苏联 The Soviet Union	欧亚种 <i>V. vinifera</i> L.	鲜食 Table grape
38 驴奶 Lūnai	中国 China	欧亚种 <i>V. vinifera</i> L.	鲜食 Table grape	88 美人指 Manicure finger	日本 Japan	欧亚种 <i>V. vinifera</i> L.	鲜食 Table grape
39 龙眼 Longyan	中国 China	欧亚种 <i>V. vinifera</i> L.	鲜食 Table grape	89 霞多丽 Chardonnay	匈牙利 Hungary	欧亚种 <i>V. vinifera</i> L.	酿酒 Wine grape
40 瑰宝 Guibao	中国山西 Shanxi, China	欧亚种 <i>V. vinifera</i> L.	鲜食 Table grape	90 峰后 Fenghou	中国北京 Beijing, China	欧美杂种 Hybrids of <i>V. vinifera</i> and <i>V. labrusca</i>	鲜食 Table grape
41 艳红 Yanhong	中国北京 Beijing, China	欧亚种 <i>V. vinifera</i> L.	鲜食 Table grape	91 Ru140	意大利 Italy	美洲种 <i>V. labrusca</i>	砧木 Rootstock
42 早玫瑰 Zaomeigui	中国陕西 Shaanxi, China	欧亚种 <i>V. vinifera</i> L.	鲜食 Table grape	92 R110	法国 France	冬葡萄×沙地 <i>V. borlandieri</i> Planch× <i>V. rup-</i> <i>estris</i> Scheele	砧木 Rootstock
43 巨峰 Kyoho	日本 Japan	欧美杂种 Hybrids of <i>V. vinifera</i> and <i>V. labrusca</i>	鲜食 Table grape	93 SO4	德国 Germany	冬葡萄×河岸 <i>V. borlandieri</i> Planch × <i>V. ri-</i> <i>paria</i> Michaux	砧木 Rootstock
44 红富士 Red Fuji	日本 Japan	欧美杂种 Hybrids of <i>V. vinifera</i> and <i>V. labrusca</i>	鲜食 Table grape	94 自由 Freedom	不详 Unkonwn	不详 Unkonwn	砧木 Rootstock
45 黑奥林 Heiorin	日本 Japan	欧美杂种 Hybrids of <i>V. vinifera</i> and <i>V. labrusca</i>	鲜食 Table grape	95 和谐 Harmony	不详 Unkonwn	不详 Unkonwn	砧木 Rootstock
46 大宝 Dabao	日本 Japan	欧美杂种 Hybrids of <i>V. vinifera</i> and <i>V. Labrusca</i>	鲜食 Table grape	96 美砧 American Rootstock	不详 Unkonwn	不详 Unkonwn	砧木 Rootstock

表 1 (续)

Table 1 (Continued)

编号 品种 No. Cultivar	来源 Source	亲本 Parent	用途 Use	编号 品种 No. Cultivar	来源 Source	亲本 Parent	用途 Use
47 红瑞宝 Benzuiho	日本 Japan	欧美杂种 Hybrids of <i>V. vinifera</i> and <i>V. labrusca</i>	鲜食 Table grape	97 绛县野葡萄 3 Jiangxian Amurensis No.3	中国山西 Shanxi, China	不详 Unkonwn	中国野生种 Chinese wild <i>Vitis</i>
48 粉红沙斯拉 Pink sasla	埃及 Egypt	欧亚种 <i>V. vinifera</i> L.	鲜食 Table grape	98 绛县野葡萄 4 Jiangxian Amurensis No.4	中国山西 Shanxi, China	不详 Unkonwn	中国野生种 Chinese wild <i>Vitis</i>
49 粉红太妃 Тайфи Розовый	叙利亚 Syria	欧亚种 <i>V. vinifera</i> L.	鲜食 Table grape	99 绛县野葡萄 9 Jiangxian Amurensis No.9	中国山西 Shanxi, China	不详 Unkonwn	中国野生种 Chinese wild <i>Vitis</i>
50 小白玫瑰 Muscat blanc	苏联 The Soviet Union	欧亚种 <i>V. vinifera</i> L.	酿酒 Wine grape	100 绛县野葡萄 5 Jiangxian Amurensis No.5	中国山西 Shanxi, China	不详 Unkonwn	中国野生种 Chinese wild <i>Vitis</i>

表 2 33 对 SSR 引物序列信息

Table 2 33 Sequence of SSR primers

引物名称 Primer name	正向序列 (5'-3') Forward sequence (5'-3')	反向序列 (5'-3') Reverse sequence (5'-3')
Scu11vv	AATTGATAGTGCCACGTTCTCGCC	AATTGATAGTGCCACGTTCTCGCC
UDV-067	TCATGGACTCACATCCTCAA	TGAGTGGATGAAGGACAGTTC
VMC4D4	GTCTTGTAATGGAACCAACTGC	AGATTGACCTGGACCTGAAACT
VMC4F3	AAAGCACTATGGTGGGTGTA	TAACCAATACATGCATCAAGGA
VMC7H3	TCAGATATTGAAGAACACCACA	ACTAGAAAATGCACAATCTCCC
VMC9a2.1	AGCTCGCTAGCTGCAAAATC	ACCCTTCCCTCTTCAAAAACCC
VMD7	AGAGTTGCGGAGAACAGGAT	CGAACCTTACACGCTTGAT
Scu15vv	GCCTATGTGCCAGACCAAAAAC	TTGGAAGTAGCCAGCCCAACCTTC
SsrVrZAG15	GGATTTGGCTGTAGTTTTGTGAAG	ATCTCAAGCTGGGCTGTATTACAAT
SsrVrZAG25	CTCCACTTCACATCACAGGCATGC	CGGCCAACATTTACTCATCTCTCCC
VChr3a	CAATCATATGAGCAAGGCATGT	GCTTCTGAAATTTGTGTCCA
VChr4a	CAACTGGGATCCAAGACCTC	CAGCTTACAGGTAACCACA
VChr5c	CCCATCAGTTTGCCATGAA	TTTGATCTTGTATTGTGCTGTTAC
VMC1B11	CTTTGAAAATTCCTTCCGGGTT	TATTCAAAGCCACCCGTTCTCT
VMC4H5	GATTTGTGACACTTGTGTAGCG	CAAGTGGAAAGCAATCTAGGAA
VMD6	ATCTCTAACCTAAAACCAT	CTGTGCTAAGACGAAGAAGA
VMD31	CAGTGGTTTTCTTAAAGTTTCAAGG	CTCTGTGAAAGAGGAAGAGACGC
VRZAG21	TCATTCACACTGCAATCATCGGC	GGGGCTACTCCAAAGTCAGTTCTTG
VRZAG29	ATAACCAGGACAAGTTA TTCAAGCC	ACCCAATTGACCATCTTTTATGCTG
VRZAG67	TCCTGCCGGCGATAACCAAGCTATG	ACCTGGCCCGACTCCTCTTGATGC
VRZAG83	ACGCAACGGCTAGTAAATACAACGG	GGCGGAGGCGGTAGATGAGAGGGCG
VRZAG93	TATGGAGGGACCGAGGTGGGCTAGG	GCACTCTTCGACGTTAAACAAAGCC
VRZAG112	TGGCTCCATACTGCTTCACGTAGGC	CGTTTAAAGCCAGCTGAATCTTGGG
Vvc6	GGTTGAGGACTGACCATTGAC	ACAATCCAAGAAGCATCCTAT
VVIH54	CCGCACTTGTGTTGAATTTTACG	CAAACCGTTTTTACACCAGCAG
VVIN73	TACTTCACCTAACAATACAGCT	AATACATAAGGTGAAGATGCTT
VVIP31	TATCCAAGAGACAAATCCCAC	TTCTCTGTTTCTGCAAATGG
VVIP60	GGGGAATAACTAAATTGAGGAT	GTATGAATGCGGATAGTTTGTG
VVIV67	TATAACTTCTCATAGGGTTTCC	TTGGAGTCCATCAAATTCATCT
VVMD21	GGTTGTCTATGGAGTTGATGTTGC	GCTTCAGTAAAAAGGGATTGCG
VVMD32	TATGATTTTTAGGGGGGTGAGG	GGAAAGATGGGATGACTCGC
VVS1	ACAATTGGAAACCGCTGGAG	CTTCTCAATGATATCTAAAACCATG
VVS4	CCATCAGTGATAAAACCTAATGCC	CCCACCTTGCCCTTAGATGTTA

包括 1 μL 模板 DNA, 0.2 μL 5 U $\cdot \mu\text{L}^{-1}$ TaKaRa *Taq* 酶, 2.5 μL *Taq* buffer, 2.0 μL 25 mmol $\cdot \text{L}^{-1}$ MgCl_2 , 0.5 μL 10 mmol $\cdot \text{L}^{-1}$ dNTP, 0.5 μL 引物 F, 0.5 μL 引物 R, 17.8 μL H_2O 。PCR 反应程序为: 95 $^\circ\text{C}$ 预变性 3 min; 95 $^\circ\text{C}$ 变性 30 s, 60 $^\circ\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^\circ\text{C}$ 延伸 30 s, 10 个循环; 95 $^\circ\text{C}$ 变性 30 s, 55 $^\circ\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^\circ\text{C}$ 延伸 30 s, 20 个循环, 72 $^\circ\text{C}$ 修复延伸 6 min。扩增产物通过 Fragment AnalyzerTM 全自动毛细管电泳检测。

1.2.3 数据统计分析 根据标准分子质量记录扩增 DNA 多态性条带(片段), 获得数据矩阵。利用 GenAlEx6.5 软件^[25] 计算等位基因数(number of alleles, N_a), 有效等位基因数(effective number of alleles, N_e)、Shannon's 信息指数(Shannon's information index, I)、期望杂合度(expected heterozygosity, H_e)、观测杂合度(observed heterozygosity, H_o)、Nei's 遗传多样性(Nei's gene diversity index, H), 并统计每对 SSR 引物在 100 份葡萄种质资源中的等位基因组成, 包括稀有等位基因数($< 1\%$)、共有等位基因数($1\% \sim 20\%$)、最常见的等位基因数($> 20\%$)。利用 Power Marker 软件计算 33 对 SSR 引物的位点多态性信息含量(PIC)、100 份葡萄个体间的 Nei's 遗传距离^[26], 并利用 MEGA 7.0 软件^[27] 基于 Nei's 遗传距离构建 100 份葡萄种质资源的 NJ 邻接聚类树; 利用 STRUCTURE 软件^[28] 基于贝叶斯聚类分析方法推断葡萄原始集合与核心集合的遗传结构, 其中群体数目(K)设为 1~10, 对每个 K 值模拟运算 10 次, 设不作数迭代(lengthofburn-inperiod)开始时的马尔科夫链蒙特卡洛(MCMC)为 100 000 次, 不作数迭代后的 MCMC 为 1 000 000 次, 最后将 Structure 结果导入在线网站 Structure Harvester^[29-30] 预测确定最佳的 K 值(分组数)。

2 结果与分析

2.1 33 对 SSR 引物的等位基因组成

利用 33 对 SSR 引物在 100 份葡萄种质资源中共检测到 423 个等位基因, 每对引物扩增条带数为 4~26 条, 平均每对引物扩增条带数为 12.82 条。33 对 SSR 引物在 100 份葡萄资源中扩增的等位基因组成中稀有等位基因数($< 1\%$) 范围为 0~9 个, 平均等位基因数有 3.39 个, 共有等位基因数($1\% \sim 20\%$) 为 8.26 个, 最常见的等位基因数($> 20\%$) 为 1.67 个(表 3)。

表 3 100 份葡萄样品中 33 个 SSR 位点的等位基因组成
Table 3 Allelic composition of the 33 SSR loci in the 100 grape samples

SSR 引物 SSR primer	稀有等位 基因数 Rare allele < 1%	共有等位 基因数 Common allele 1%~ 20%	最常见的等 位基因数 Most frequent allele >20%	总等位 基因数 Total (each pair of SSR loci)
Scu11vv	0	5	1	6
UDV-067	4	5	2	11
VMC4D4	4	3	2	9
VMC4F3	7	12	2	21
VMC7H3	2	16	1	19
VMC9a2.1	9	16	1	26
VMD7	1	13	1	15
Scu15vv	0	4	2	6
SsrVrZAG15	4	8	0	12
SsrVrZAG25	1	7	1	9
VChr3a	5	12	0	17
VChr4a	4	4	1	9
VChr5c	2	8	1	11
VMC1B11	1	8	2	11
VMC4H5	3	8	1	12
VMD6	4	7	2	13
VMD31	1	2	2	5
VRZAG21	1	1	2	4
VRZAG29	0	7	1	8
VRZAG67	5	14	0	19
VRZAG83	1	4	3	8
VRZAG93	7	6	1	14
VRZAG112	2	15	0	17
Vvc6	1	7	1	9
VVIH54	0	5	1	6
VVIN73	3	5	1	9
VVIP31	5	18	1	24
VVIP60	7	9	1	17
VVIV67	9	16	0	25
VVMD21	3	6	2	11
VVMD32	9	10	2	21
VVS1	4	3	2	9
VVS4	3	5	2	10
总数 Total	112	269	42	423
平均 Mean	3.39	8.16	1.27	12.82

2.2 SSR 引物多态性分析

从 70 对 SSR 引物中筛选出 33 对能扩增出清晰稳定条带的引物(表 4)。结果表明, 33 对引物均能扩增出稳定清晰的 DNA 条带。33 对 SSR 引物共扩增出 351 条 DNA 条带, 多态性条带比率(PPB)为 99.39%, 每对引物扩增条带数 4~21 条, 平均每对引物扩增条带数为 10.64 条, 扩增条带大小范围为 87~

表 4 33 对 SSR 引物在 100 份材料中的多态信息

Table 4 Polymorphism of 33 SSR primers in the 100 grape samples

基因座 Locus	等位基因数 <i>N_a</i>	有效等位基因数 <i>N_e</i>	Shannon's 信息指数 <i>I</i>	观测杂合度 <i>H_o</i>	期望杂合度 <i>H_e</i>	Nei's 遗传多样性 <i>H</i>	多态性信息含量 <i>PIC</i>
Scu11vv	6.000	2.182	1.110	0.455	0.542	0.551	0.517
UDV-067	11.000	4.102	1.699	0.000	0.756	0.756	0.721
VMC4D4	9.000	2.533	1.223	0.677	0.605	0.613	0.565
VMC4F3	21.000	7.491	2.353	0.830	0.867	0.867	0.854
VMC7H3	19.000	8.969	2.507	0.620	0.889	0.889	0.879
VMC9a2.1	26.000	4.771	2.329	0.727	0.790	0.794	0.785
VMD7	15.000	7.717	2.291	0.786	0.870	0.875	0.863
Scu15vv	6.000	3.794	1.466	0.596	0.736	0.742	0.699
SsrVrZAG15	12.000	1.884	1.163	0.490	0.469	0.469	0.456
SsrVrZAG25	9.000	5.460	1.822	0.867	0.817	0.824	0.800
VChr3a	17.000	8.551	2.362	0.720	0.883	0.883	0.872
VChr4a	9.000	3.423	1.472	0.740	0.708	0.708	0.671
VChr5c	11.000	5.106	1.911	0.980	0.804	0.804	0.782
VMC1B11	11.000	6.079	2.008	0.940	0.836	0.836	0.816
VMC4H5	12.000	4.901	1.963	0.910	0.796	0.796	0.779
VMD6	13.000	5.302	1.934	0.570	0.811	0.811	0.788
VMD31	5.000	2.448	1.035	0.970	0.592	0.592	0.507
VRZAG21	4.000	2.680	1.060	0.980	0.627	0.627	0.556
VRZAG29	8.000	3.140	1.516	0.600	0.682	0.682	0.652
VRZAG67	19.000	8.937	2.456	0.840	0.888	0.888	0.878
VRZAG83	8.000	4.220	1.601	0.800	0.763	0.763	0.725
VRZAG93	14.000	3.428	1.684	0.636	0.708	0.714	0.689
VRZAG112	17.000	9.567	2.462	0.845	0.895	0.901	0.893
Vvc6	9.000	2.196	1.266	0.396	0.545	0.579	0.559
VVIH54	6.000	4.298	1.626	0.970	0.767	0.767	0.738
VVIN73	9.000	1.582	0.901	0.230	0.368	0.368	0.358
VVIP31	24.000	10.976	2.757	0.704	0.909	0.912	0.907
VVIP60	17.000	5.616	2.113	0.538	0.822	0.844	0.829
VVIV67	25.000	12.305	2.773	0.788	0.919	0.920	0.915
VVMD21	11.000	3.110	1.435	0.807	0.678	0.737	0.700
VVMD32	21.000	6.163	2.234	0.770	0.838	0.838	0.821
VVS1	9.000	2.478	1.160	0.980	0.597	0.597	0.521
VVS4	10.000	2.590	1.249	0.580	0.614	0.614	0.545
平均 Mean	12.818	5.091	1.786	0.707	0.739	0.744	0.716

406 bp。所有引物中,编号 VMC9a2.1 的引物扩增条带数最多,为 21 条,在引物评价种质资源遗传多样性的方法中,扩增条带数越多说明引物鉴别力越强,因此,VMC9a2.1 为鉴别能力较强的引物,可作为种群内多样性鉴别的首选引物。检测到有效等位基因数(*N_e*)的变化范围是 1.582~12.305,平均为 5.091。根据 BOTSTEIN 等提出衡量基因变异程度高低的多态性信息量指标 *PIC*:*PIC* ≥ 0.5 时,该引物为高度多态性信息引物;0.25 ≤ *PIC* < 0.5,为中度多态性信息引物;*PIC* < 0.25,为低度多态性信息引物。本

研究中 *PIC* 变幅在 0.358~0.915,平均为 0.716,均为高度或重度多态性信息引物。基因多样性(*H*)变化范围为 0.368~0.920,平均为 0.744。

2.3 100 份葡萄种质遗传距离分析

2.3.1 遗传距离及聚类分析 对 100 份葡萄种质资源进行 Nei's 遗传距离分析,遗传距离为 0.4~0.8,占总量的 97.80%(图 1)。48.22%的为 0.6~0.7,27.17%的为 0.5~0.6,17.03%的为 0.7~0.8。利用 MEGA 7.0 软件基于遗传距离建立 NJ 遗传聚类树(图 2),发现 100 份葡萄分为 2 组,第 1 组(I 组)基本为我国自育

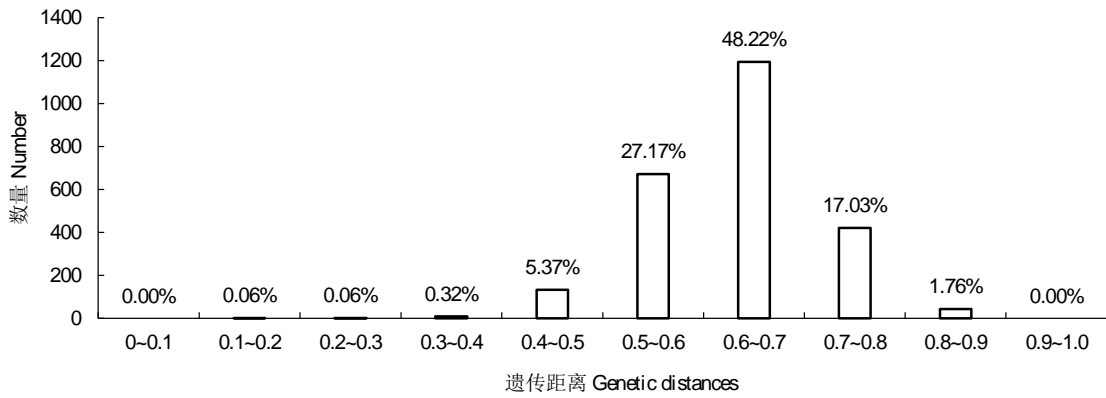
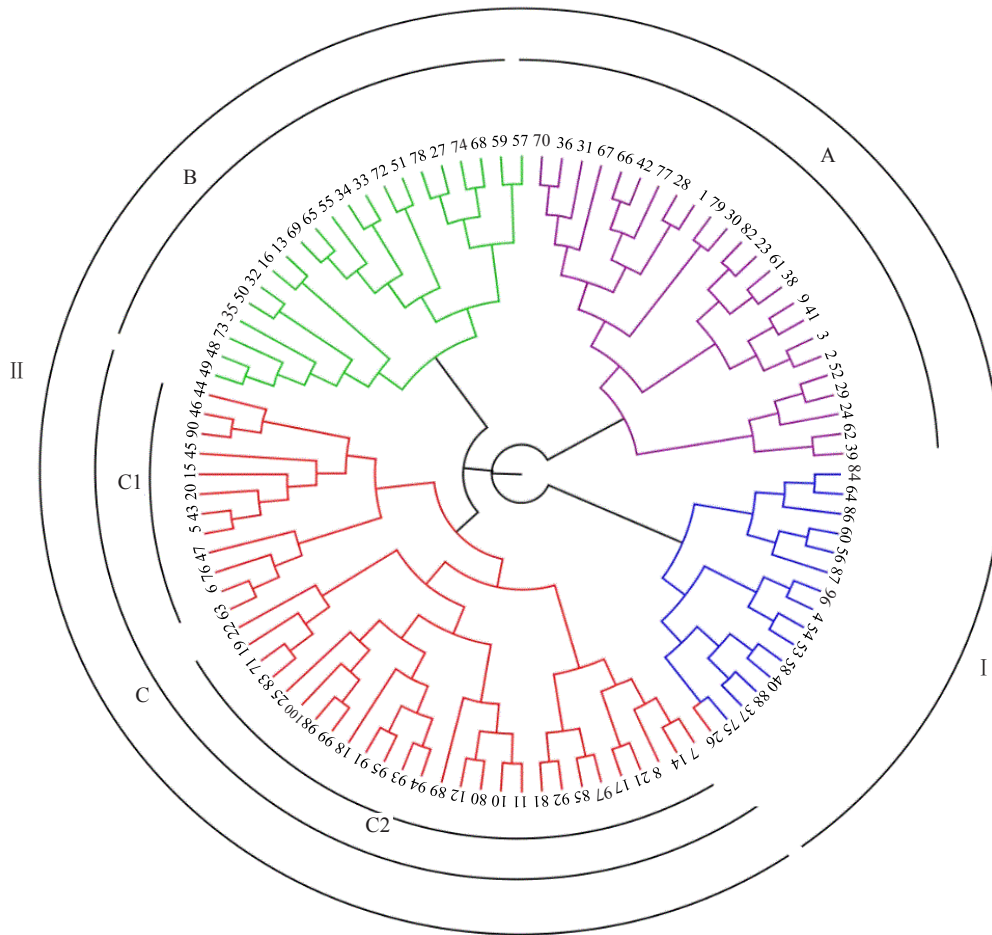


图 1 Nei's 遗传距离分布

Fig. 1 Nei's genetic distance distribution



图中材料编号同表 1。I 组基本为我国自育品种或亲本为我国古老品种的欧亚种的鲜食葡萄资源群,II 组可分为 A、B、C 三个亚组,其中 A 亚组多为来源于苏联及亚美尼亚高加索等地的欧亚种鲜食资源群,B 亚组多为来源于欧洲大陆的欧亚种鲜食兼用葡萄资源群,C 亚组又可分为 C1、C2 两个次亚组,C1 次亚组主要为欧美种群鲜食葡萄资源,C2 次亚组主要为欧亚种酿酒葡萄资源及野生砧木资源群。

Codes of materials are same as Table 1. Group I was the fresh grape resource of Eurasian variety, was basically from China's self-cultivation varieties or whose parents were ancient varieties of China, group II was divided into three subgroups A, B, and C, subgroup A was the fresh grape resource of Eurasian variety, was mostly from the Soviet Union or Armenia Caucasus and other places. Subgroup B was fresh grape resource, was mostly from European European, subgroup C was divided into two sub-group including C1, C2, sub-group C1 was mainly European and American fresh grape resource, sub-group C2 subgroups was mainly European wine grape varieties and wild rootstock varieties.

图 2 基于 Nei's 遗传距离的 NJ 聚类树

Fig. 2 NJ clustering tree based on Nei's genetic distance

品种或亲本为我国古老品种的欧亚种的鲜食葡萄资源群;第2组(II组)较为复杂,可分为A、B、C 3个亚组,其中A亚组多为来源于苏联及亚美尼亚高加索等地的欧亚种鲜食葡萄资源群,B亚组多为来源于欧洲的欧亚种鲜食兼用葡萄资源群,C亚组又可分为C1、C2 2个次亚组,C1次亚组主要为欧美种群鲜食葡萄资源,C2次亚组主要为欧亚种酿酒葡萄资源及野生砧木资源群。聚类结果表明:(1)分子标记分析的亲缘关系与其遗传背景具有显著相关性,鲜食、酿酒、砧木等用途不能成为区别的有效依据;(2)亲缘关系与亲本有一定的关系,但取决于其遗传力,SSR能较准确地检测基因型之间的遗传背景与遗传

关系;(3)欧美杂种与欧亚酿酒葡萄品种及野生种质资源的亲缘关系较近。

2.3.2 主坐标分析 为了进一步了解不同葡萄种质间的遗传关系,利用GenAlEx6.503基于遗传距离矩阵对100份葡萄种质资源进行了主坐标分析(PCoA)(图3)。结果显示,在变量PC1和变量PC2在2个主成分(PC)上的投影中,PC1占总量的4.81%,表示两组间差异中可以解释全面分析结果的4.81%,PC2(主成分2)表示两组间差异中可以解释全面分析结果的4.03%,点与点之间的距离越小越相似,反之差异越大,从图中可看出两组间应该有明显的差异性。

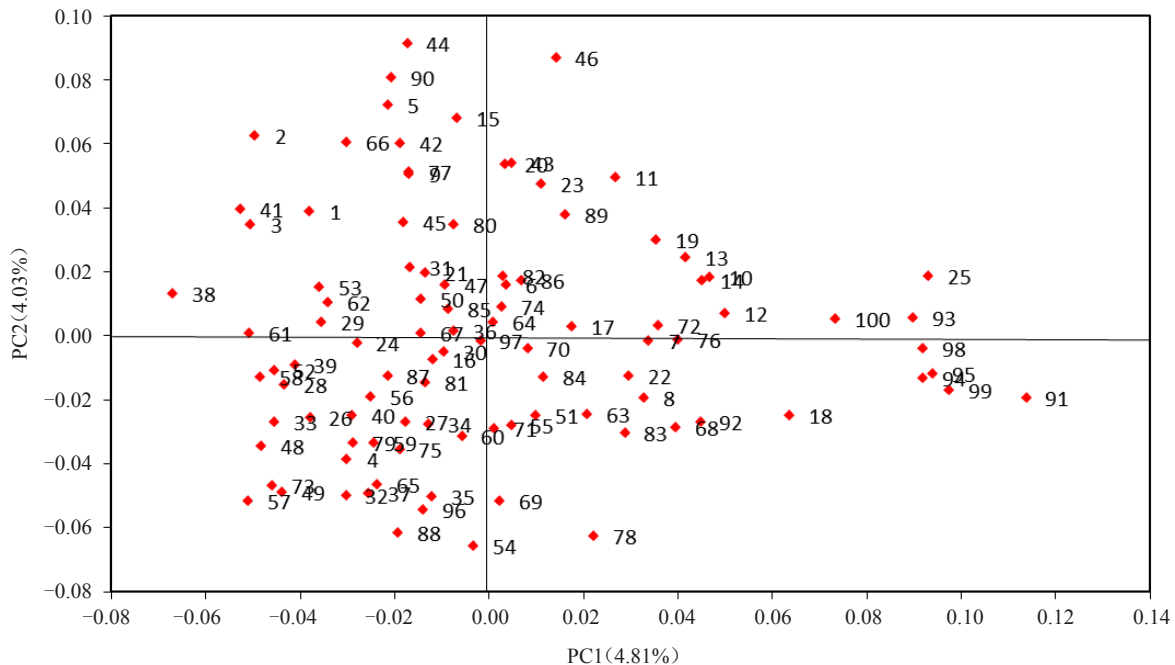


图3 100份葡萄种质的主坐标分析

Fig. 3 Main coordinate analysis of 100 grape germplasms

2.3.3 遗传结构分析 利用STRUCTURE软件对100份葡萄种质进行遗传结构分析并预测其最佳K值,结果得出当 ΔK 达到最大值时(表5, $\Delta K=786.57$),K的最佳分组数为2(图1-A~B),即葡萄核心集合主要分为2个集群。STRUCTURE软件支持主要群体之间差异,对个别群体之间的细微差异,尤其是个别混合群体之间差异存在的分析不显著。

图4中不同的颜色块代表不同的群体,纵坐标表示各居群中的品种占某居群祖先成分的比例,横坐标为样品编号。从图4中可以看出,根据各个品种的混合比例,将100份供试材料分成2个居群,图4-B中,绿色板块代表欧亚种鲜食葡萄种群,红色板

块代表欧亚种酿酒葡萄、欧美杂种和野生种质资源种群。

3 讨 论

遗传多样性的研究对于了解物种的起源、适应性、基因资源分布情况、基因资源保护、维护物种稳定、挖掘优质资源、培育新种质等方面具有重要意义,通过品种间亲缘关系的研究,可以有效地进行亲本选配,并且对特殊种质进行保护。近年来SSR分子标记技术作为一种比较成熟的分子标记,已广泛用于种质鉴定、亲缘关系分析、遗传多样性等方面的研究。笔者利用SSR毛细管电泳技术对100份葡萄

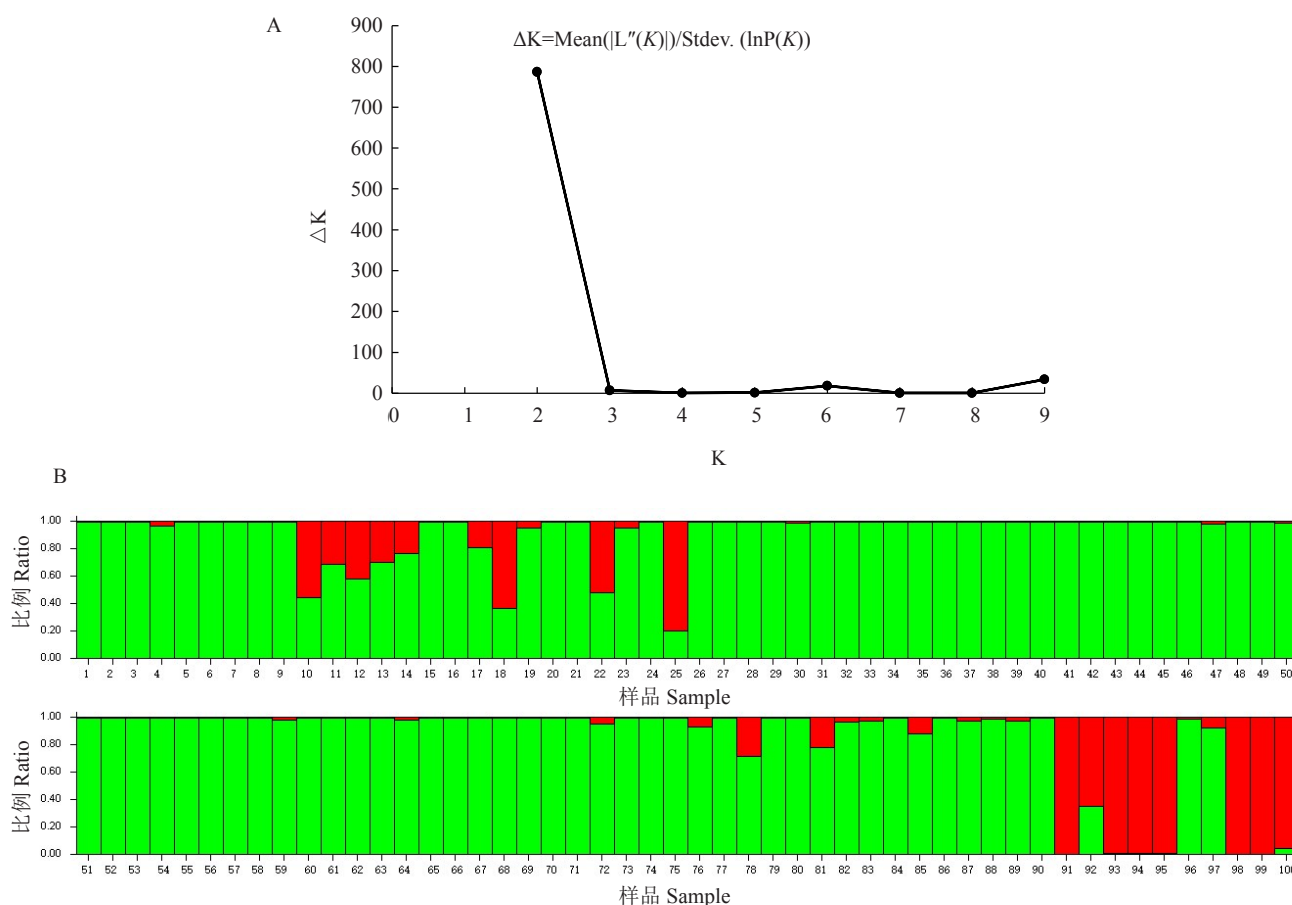
表 5 遗传结构分析中估计最佳分组数(K)

Table 5 Assumption of suitable number of possible clusters (K) for population structure analysis

可能的分组数 Number of possible clusters, K	每个 K 的重复数 Number of runs for each K	Mean LnP(K)	Stdev LnP(K)	Ln'(K)	Ln''(K)	ΔK
1	10	-12 255.640 000	0.183 787	-	-	-
2	10	-11 876.620 000	0.373 571	379.020 000	293.840 000	786.569 949
3	10	-11 791.440 000	65.569 492	85.180 000	436.520 000	6.657 364
4	10	-12 142.780 000	979.985 365	-351.340 000	417.370 000	0.425 894
5	10	-12 911.490 000	2 198.359 161	-768.710 000	1 824.480 000	0.829 928
6	10	-11 855.720 000	92.674 266	1 055.770 000	1 640.430 000	17.701 030
7	10	-12 440.380 000	1 813.314 557	-584.660 000	33.880 000	0.018 684
8	10	-13 058.920 000	2 412.594 555	-618.540 000	1 794.160 000	0.743 664
9	10	-11 883.300 000	57.227 577	1 175.620 000	1 931.610 000	33.753 133
10	10	-12 639.290 000	1 788.903 526	-755.990 000	-	-

注: Mean LnP(K). 每个 K 10 次重复的可能性平均值; Stdev LnP(K). 每个 K 的似然超过 10 次的标准偏差; Ln'(K). K 的连续似然值之间的平均差; |Ln''(K)|. Ln'(K) 的连续值之间的差的绝对值; ΔK=Mean(|Ln''(K)|)/Stdev. (LnP(K)), K=2 时, ΔK 的最大值以粗体文本表示。

Note: Mean LnP(K). Mean of likelihood over 10 runs for each K; Stdev. LnP(K). Standard deviation of likelihood over 10 runs for each K; Ln'(K). Mean difference between successive likelihood values of K; |Ln''(K)|. Absolute value of the difference between successive values of Ln'(K); of LnP(K). ΔK=Mean (|Ln''(K)|)/Stdev(LnP(K)), the maximum value of ΔK at K=2 is indicated with bold text.



A. 基于 L(K)在连续 K 值之间的变化率的增量 K 值分布; B. K=2 的葡萄种质资源遗传结构。

A. Distribution of incremental K values based on the rate of change of L(K) between consecutive K values; B. Genetic structure of grape germplasm resources with K=2.

图 4 葡萄种质资源遗传结构分析

Fig. 4 Analysis of genetic structure of grape germplasm

种质资源亲缘关系和群体遗传结构进行了分析。100个样本中的33个SSR标记共检测到423个等位基因,每对引物扩增条带数4~26条,平均每对引物扩增条带数为12.82条。33对SSR引物在100份葡萄样品中扩增的等位基因组成中稀有等位基因数($< 1\%$)范围为0~9个,平均值为3.39,共有等位基因数($1\% \sim 20\%$)为8.26,最常见的等位基因数($> 20\%$)为1.67。说明所选葡萄种质材料的遗传基础相对狭窄。笔者从70对SSR引物中筛选出33对能扩增出清晰稳定条带的引物,结果表明33对引物均能扩增出351条稳定清晰的DNA条带,多态性条带比率(*PPB*)为99.39%,每对引物扩增条带数4~21条,平均每对引物扩增条带数为10.64条,扩增条带大小范围为87~406 bp。所有引物中,编号VMC9a2.1的引物扩增条带数最多,为21条,在引物评价种质资源遗传多样性的方法中,扩增条带数越多说明引物鉴别力越强,因此,VMC9a2.1为鉴别能力较强的引物,可作为种群内多样性鉴别的首选引物。检测到有效等位基因数(*Ne*)变化范围为1.582~12.305,平均为5.091;位点多态性信息含量(*PIC*)变幅为0.358~0.915,平均为0.716,均为高度或重度多态性信息引物。

葡萄种群的划分以其原产地、形态解剖结构和亲缘关系为主要依据^[24]。笔者对100份葡萄种质资源的遗传多样性和群体结构进行了聚类分析,从中可以看出:(1)同一种类能够聚到一起,说明聚类结果可以很好地体现种质的种类或亲缘关系,但鲜食、酿酒、砧木等用途不能成为区别的有效依据;(2)不同地域的种质资源,用途相同的也能够聚到一起,说明聚类结果不能很好地体现地域特性(例如,来源不同的酿酒品种聚在一起);(3)欧美杂种聚在一起,说明这些材料有相同或相近的亲本;(4)欧美杂种与欧亚酿酒葡萄品种及野生种质资源亲缘关系较近。原因可能是人工干预较少及含有古老的基因,但还有待进一步证明。在遗传水平上的分类结果与各种群分类基本一致,将100份葡萄种质资源分为两大类群,两大类群中又可分为4个亚群。其中欧亚种中鲜食和酿酒葡萄较近,然后是欧美杂种、野葡萄和砧木类,这与唐宇宏等^[31]、刘茜等^[32]、方连玉等^[11]利用分子标记研究葡萄资源亲缘关系的结果一致;而欧亚、欧美杂种与中国野生葡萄资源、砧木资源相距较远,此研究结果与温景辉等^[10]、张萌^[33]的研究结果一致;

聚类结果虽然与各种群的地理起源基本一致,但是也存在在欧亚种中出现1份砧木品种和1份野生种或在欧亚种中出现欧美杂种的现象,原因可能是在扩增过程中不是全基因组序列,因此存在有些品种刚好没有表现出来的现象,具体原因还需进一步分析。另外,2个集群中第1个主要为葡萄亚种鲜食葡萄资源,第2集群主要包含了欧亚种酿酒资源、欧美杂种、美洲种、中国野生种4个亚种群。从结果来看,欧亚种的品种由于不同的用途出现在不同的集群中;而另外的几个种也聚在了这个集群中。这可能是进化程度或进化方式不同,导致含有古老或传统基因的量存在差异。

4 结 论

利用33对SSR引物对100份葡萄品种进行分析,从遗传结构分析并预测其最佳分组数为2,即葡萄核心集合主要分为2个集群。2个集群中第1个主要为葡萄亚种鲜食葡萄品种,第2集群主要包含了欧亚种酿酒品种、欧美杂种、美洲种、中国野生种4个亚种群。不同进化程度或进化方式在葡萄遗传结构中发挥了较重要的作用,影响了不同产地间葡萄种质资源的结构组成。

参考文献 References:

- [1] 张振文. 葡萄品种学[M]. 西安:西安地图出版社,2000.
ZHANG Zhenwen. Grape variety[M]. Xi'an: Xi'an Map Publishing House, 2000.
- [2] 任国慧,吴伟民,房经贵. 我国葡萄国家级种植资源圃的建设现状[J]. 江西农业学报,2012,24(7):10-13.
REN Guohui, WU Weimin, FANG Jinggui. Current situation of the construction of National Grape Planting Resource Nursery in China[J]. Acta Agriculturae Jiangxi, 2012, 24(7): 10-13.
- [3] 孔庆山. 中国葡萄志[M]. 北京:中国农业科学技术出版社,2004.
KONG Qingshan. Chinese grape chronicles[M]. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, 2004.
- [4] 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.
- [5] 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 pearcultivars[J]. Journal of Fruit Science, 2015, 32(6): 1028-1035.
- [6] 李益, 马先锋, 唐浩, 李娜, 江东, 龙桂友, 李大志, 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.
- [7] THOMAS M R, SCOOT 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.
- [8] BOTTA R, SCOTT S, EYNARD L, THOMAS M R. Evaluation of microsatellite sequence-tagged site markers for characterizing *Vitis vinifera* cultivars[J]. Vitis, 1995, 34(2):99-102.
- [9] MARTÍNEZ L E, CAVAGNARO P F, MASUELLI R W L, ZÚIGA M. SSR-based assessment of genetic diversity in South American *Vitis vinifera* varieties[J]. Plant Science, 2006, 170(6): 1036-104.
- [10] 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. SSR analysis of genetic relationship of 20 grape germplasm[J]. Journal of Fruit Science, 2011, 28(5):782-786.
- [11] 方连玉, 王军, 许雷. 15份葡萄种质遗传多样性的SSR分析[J]. 分子植物育种, 2010, 8(3):511-515.
FANG Lianyu, WANG Jun, XU Lei. SSR analysis of genetic diversity of 15 grape germplasm[J]. Molecular Plant Breeding, 2010, 8(3):511-515.
- [12] 吴子龙, 王军, 沈育杰, 路文鹏. 8个山葡萄及山欧杂种葡萄品种的SSR分析[J]. 植物遗传资源学报, 2008, 9(1):105-109.
WU Zilong, WANG Jun, SHEN Yujie, LU Wenpeng. SSR analysis of 8 varieties of mountain grape and mountain-European hybrid grape[J]. Journal of Plant Genetic Resources, 2008, 9(1): 105-109.
- [13] 邹瑜, 杨柳, 黄大辉, 吴代东, 张进忠, 赵明, 林茜, 潘永杰, 林贵美, 韦绍龙. 70份毛葡萄种质资源遗传多样性的SSR分析[J]. 南方农业学报, 2013, 44(12):1943-1948.
ZOU Yu, YANG Liu, HUANG Dahui, WU Daidong, ZHANG Jinzhong, ZHAO Ming, LIN Qian, PAN Yongjie, LIN Guimei, WEI Shaolong. SSR analysis of genetic diversity of germplasm resources of 70 fur grapes[J]. Journal of Southern Agriculture, 2013, 44(12):1943-1948.
- [14] 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 Qiming, LU Chunsheng. Genetic diversity analysis and fingerprinting of grape varieties based on SSR markers[J]. Xinjiang Agricultural Sciences, 2015, 52(11): 2051-2058.
- [15] 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.
- [16] 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.
- [17] 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.
- [18] 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.
- [19] 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.
- [20] 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.
- [21] 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.
- [22] 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 Chonghui. 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.

- [23] 王富强,李贝贝,樊秀彩,张颖,刘崇怀,姜建福. 葡萄品种 SSR 分子鉴定体系的建立及应用[J]. 果树学报,2020,37(9): 1281-1293.
WANG Fuqiang, LI Beibei, FAN Xiucui, ZHANG Ying, LIU Chonghuai, JIANG Jianfu. Establishment and application of SSR molecular identification system in grapevine[J]. Journal of Fruit Science,2020,37(9): 1281-1293.
- [24] 欧阳寿如. 葡萄的品种及其研究[M]. 太原:山西人民出版社, 1980.
OUYANG Shouru. Variety and research of grape[M]. Taiyuan: Shanxi People's Publishing House,1980.
- [25] PEAKALL R, SMOUSE P E. GenAlEx6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update[J]. Bioinformatics,2012,28(19):2537-2539.
- [26] SAITOU N, NEI M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees[J]. Molecular Biology & Evolution,1987,14:406-425.
- [27] KUMAR S, STECHER G, TAMURA K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version7.0 for bigger data sets[J]. Molecular Biology & Evolution,2016,33(7):1870-1874.
- [28] PRITCHARD J K, STEPHENS M, DONNELLY P. Inference of population structure using multilocus genotype data[J]. Genetics,2000,155(2):945-959.
- [29] EARL D A, VONHOLDT B M. Structure harvester: a website and program for visualizing structure output and implementing the Evanno method[J]. Conservation Genetics Resources,2012, 4(2):359-361.
- [30] EVANNO G, REGNAUT S, GOUDET J. Detectin the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study[J]. Molecular Ecology,2005,14(8):2611-2620.
- [31] 唐宇宏,白庆武,林佳志,李波. 黑龙江省西部葡萄的 ISSR 分析[J]. 高师理科学刊,2004,24(4):46-48.
TANG Yuhong, BAI Qingwu, LIN Jiazhi, LI Bo. ISSR analysis of grape in western Heilongjiang province[J]. Journal of Science of Teachers' College and University,2004,24(4):46-48.
- [32] 刘茜,刘玉冰,韩德胜,王刚. 葡萄的随机扩增多态性 DNA 研究[J]. 兰州大学学报(自然科学版),2004,40(5):65-68.
LIU Qian, LIU Yubing, HAN Desheng, WANG Gang. A study on random amplification polymorphism DNA grapevine[J]. Journal of Lanzhou University (Natural Sciences),2004,40(5):65-68.
- [33] 张萌. 基于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. Genetic diversity analysis and variety identification of grape germplasm resources based on molecular markers [D]. Nanjing:Nanjing Agricultural University,2012.