

葡萄无核性状分子标记通用性验证

张泉^{1,2}, 刘崇怀², 樊秀彩², 张颖², 孙磊², 姜建福^{2*}, 郭大龙^{1*}

(¹河南科技大学园艺与植物保护学院, 河南洛阳 471000; ²中国农业科学院郑州果树研究所, 郑州 450000)

摘要:【目的】利用葡萄自然群体对已有9个无核分子标记进行评价,验证其无核检测通用性效果,为加快无核葡萄新品种选育进程提供技术支持。【方法】以88个无核种质和120个有核种质组成的自然群体为试材,对国内外已发表的9个常用葡萄无核分子标记进行通用性验证。【结果】SCAR类型标记GSLP1-569、SCC8-1080和SCF27-2000的鉴定准确率分别为57.12%、72.20%和75.38%,无核检测率分别为90.51%、79.18%和67.82%。SSR类型标记p1-VvAGL11、p2-VvAGL11、p3-VvAGL11、5U_VviAGL11、VMC7F2和VVSD10的鉴定准确率分别是88.47%、67.43%、71.94%、68.47%、67.99%和61.60%,无核检测率分别是87.74%、77.22%、90.72%、90.80%、79.10%和63.03%;卡方分析表明与无核表型极显著相关的等位点分别是250 bp、171 bp、195 bp、315 bp、197 bp和105 bp。【结论】SCAR标记SCF27-2000和SSR标记p1-VvAGL11准确率高,综合表现最优,适用于无核葡萄新品种的分子辅助选择。

关键词:葡萄;无核;分子标记;准确率;验证

中图分类号:S663.1

文献标志码:A

文章编号:1009-9980(2024)07-1438-14

Validation of the generality of molecular markers for seedless fruit in grape

ZHANG Quan^{1, 2}, LIU Chonghuai², FAN Xiucui², ZHANG Ying², SUN Lei², JIANG Jianfu^{2*}, GUO Dalong^{1*}

(¹College of Horticulture and Plant Protection, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471000, Henan, China; ²Zhengzhou Fruit Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450000, Henan, China)

Abstract: 【Objective】The natural population of grape (*Vitis vinifera* L.) was used to evaluate the universality of 9 molecular markers for seedless fruit in order to provide technical support for the breeding of new seedless grape varieties. 【Methods】DNA was extracted from healthy and young samples of a natural population consisting of 88 seedless germplasmes and 120 nucleated germplasmes. PCR amplification was performed using 9 reported molecular markers for seedless fruit of grape. Then, the PCR products were detected by 1.5% agarose gel electrophoresis and capillary electrophoresis, and the specific bands were analyzed. The accuracy rate and seedless detection rate were calculated respectively to verify the versatility of 9 molecular markers for seedless fruit of grape. 【Results】Among 208 grape germplasmes, 16 germplasmes were detected by SCAR marker GSLP1-569, including 14 seedless germplasmes and 2 seeded germplasmes. The 14 seedless varieties were Summer Black, Changwuhebai Etc. among others. And, among them, 12 germplasmes were Thompson Seedless and its derivatives. The identification accuracy and nuclear-free detection rate were 57.12% and 90.51%, respectively. Additionally, the 1080 bp specific band was amplified by SCC8-1080 in 53 seedless germplasmes and 19 seeded germplasmes, and the statistical identification accuracy and seedless detection rate were 72.20% and 79.18%, respectively. Moreover, the 2000 bp specific band was amplified by SCF27-2000 in 87

收稿日期:2023-09-18

接受日期:2024-05-02

基金项目:河南省自然科学基金重点基金项目(232300421112);宁夏回族自治区农业育种专项(NXNYZZ202101);郑州市重大科技创新专项—优质无核葡萄新品种选育与应用(2020CXZX0082);财政部和农业农村部:国家现代农业产业技术体系(CARS-29-yc-1);中国农业科学院科技创新工程专项经费项目(CAAS-ASTIP-2017-ZFR1)

作者简介:张泉,男,在读硕士研究生,研究方向为葡萄种质资源。E-mail:18437900856@163.com

*通信作者 Author for correspondence. E-mail:jiangjianfu@caas.cn; E-mail:guodalong@haust.edu.cn

seedless germplasmes and 55 seeded germplasmes. The statistical identification accuracy and seedless detection rate were 75.38% and 67.82%, respectively. Furthermore, a total of 6 isotopic point and 8 genotypes were detected by the SSR marker p1-VvAGL11. The chi-square test showed that the allele 250 bp was significantly correlated with the nuclear-free phenotype and 257 bp was significantly correlated with nucleated phenotype. The genotype 250/250 was significantly correlated with the nuclear-free phenotype, and the genotype 257/257 was significantly correlated with the nuclear phenotype. The statistical identification accuracy and nuclear-free detection rate of the marker were 88.47% and 87.74%, respectively. A total of 3 isotopic point and 5 genotypes were detected by the marker p2-VvAGL11. The chi-square test showed that the allele 171 bp was significantly correlated with the nuclear-free phenotype. The 158 bp was significantly correlated with the nuclear phenotype. The genotype 158/171 was significantly correlated with the seedless phenotype, and the genotype 158/158 was significantly correlated with the nuclear phenotype. The accuracy of marker identification and seedless detection rate were 67.43% and 77.22%, respectively. A total of 14 isotopic point and 30 genotypes were detected by the marker p3-VvAGL11. The chi-square test showed that the allele 195 bp was significantly correlated with the nuclear-free phenotype and 185 bp was significantly correlated with the nucleated phenotype. The genotype 185/195 was significantly associated with the nuclear-free phenotype. The genotype 185/185 was significantly correlated with the nuclear phenotype, and the accuracy and nuclear-free detection rate of the marker were 71.94% and 90.72%, respectively. A total of 24 isotopic point and 75 genotypes were detected by the marker 5U_VviAGL11. The chi-square test indicated that the allele 315 bp was significantly correlated with the nuclear-free phenotype and 305 bp was significantly associated with nucleated phenotype. The genotype 307/315 was significantly correlated with the nuclear-free phenotype. The accuracy and nuclear-free detection rate of the marker were 68.47% and 90.80%, respectively. A total of 8 isotopic point were detected in the marker VMC7F2, and the allele 197 bp was significantly correlated with the seedless phenotype by chi-square test. 199 bp was significantly correlated with one phenotype. The genotype 197/199 was significantly associated with the nuclear-free phenotype. The genotype 199/199 was significantly correlated with the nuclear phenotype, and the accuracy and non-nuclear detection rate of the marker were 67.99% and 79.10%, respectively. A total of 9 isotopic point and 21 genotypes were detected by the marker VVSD10. The chi-square test showed that the allele 105 bp was significantly correlated with the nuclear-free phenotype, and the genotype 105/105 was significantly correlated with the nuclear-free phenotype. The identification accuracy and nuclear-free detection rate of the marker were 61.60% and 63.03%, respectively. 【Conclusion】 Among the SCAR type markers, SCF27-2000 had the highest accuracy and true positive rate, and the performance was the best. And, GSLP1-569 was more suitable for the hybrid offspring of Thompson seedless series. Among the SSR markers, p1-VvAGL11 had good accuracy and seedless detection rate, and the false negative and false positive were low, showing the best performance, while p3-VvAGL11 and 5U_VviAGL11 had higher seedless detection rate, and 5U_VviAGL11 contained more genetic information.

Key words: Grape; Seedless; Molecular marker; Accuracy; Verify

葡萄 (*Vitis vinifera* L.) 是葡萄科葡萄属植物, 被广泛应用于鲜食、酿酒、制汁、制干等^[1]。无核葡萄因其食用方便, 口感佳, 而深受消费者喜爱, 因此无核已成为国内外葡萄育种工作的重要目标之一^[2-3]。

葡萄童期较长, 无核表型仅能在成年结果植株

中进行筛选, 造成无核葡萄新品种选育进程缓慢^[4]。DNA 标记技术的发展, 为植物育种提供了新的方向, 通过标记辅助选择 (Marker assisted-selection, MAS) 可以实现对目标性状在幼苗期的鉴定, 缩短育种周期^[5]。因此, 筛选准确高效的葡萄无核

分子标记对育种工作有重要意义。目前国内外基于葡萄无核主要位点 SDI (Seed Development Inhibitor, 种子发育抑制) 开发了一系列无核分子标记^[6-7], 主要包括序列特征扩增区 (Sequence Characterized Amplified Region, SCAR) 和简单重复序列 (Simple Sequence Repeats, SSR) 两种标记^[8-10]。MEJÍA 等^[11] 通过集群分离分析法 (Bulk Segregant Analysis, BSA), 利用红宝石无核×苏丹娜的杂交群体开发了 SCAR 标记 SCF27-2000, 该标记可以结合无核相关基因扩增出 2.0 kb 的特异性片段。GSLP1-569 是王跃进等^[12] 采用自动荧光 DNA 序列分析仪对葡萄无核基因的 RAPD 标记 UBC-269450 进行测序后, 按照该序列人工合成的寡聚核苷酸, 利用该标记可以对携带无核基因或表达无核性状的葡萄 DNA 扩增出约 590 bp 的特殊片段。马亚茹等^[13] 通过红地球×森田尼无核及 F₁ 杂交群体开发了 SSR 标记 VvSD10, 可以在 111 bp 等位点对葡萄无核性状进行鉴定。现有的葡萄无核分子标记准确率多在特定杂交群体中进行验证, 验证效率与亲本关联度较高, 但在自然群体中的鉴定效率尚不明确, 不能满足葡萄无核育种需求^[14]。

笔者在本试验中在国内外研究的基础上, 对已报道的 3 个 SCAR 标记和 6 个 SSR 标记进行通用性验证, 以期从中筛选出适用于自然群体的葡萄无核分子标记, 为加快无核葡萄新品种选育进程提供技术参考。

1 材料和方法

1.1 材料

试验于 2022—2023 年在中国农业科学院郑州果树研究所进行。试验共 208 份种质, 包含无核种质 88 份和有核种质 120 份 (表 1), 试验所用材料均保存于国家葡萄种质资源圃 (郑州)。

1.2 DNA 提取

取葡萄健康幼嫩叶片, 液氮研磨, 采用 CTAB 植物基因组 DNA 快速提取试剂盒 (北京艾德莱生物科技有限公司) 提取叶片基因组 DNA。利用 Nano-Drop 1000 spectrophotometer (Thermo Scientific) 紫外分光光度计检测 DNA 浓度和纯度, 然后将 DNA 浓度稀释到工作液质量浓度 (约 20 ng·μL⁻¹), 保存于 -20 °C, 用于后续试验。

1.3 无核分子标记选择及 PCR 扩增条件

选用 9 个已报道的与葡萄无核表型相关的分子

标记 (表 2), 引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成, 含 FAM 荧光探针的 SSR 引物由北京擎科生物科技股份有限公司合成。

PCR 反应体系如下: SCAR 标记 PCR 反应体系 25 μL: 2×Taq Master Mix 15 μL, 正、反向引物各 1 μL (20 μmol·L⁻¹), DNA 模板 (20 ng·μL⁻¹) 2 μL, ddH₂O 6 μL。反应程序为: 95 °C 预变性 3 min; 95 °C 变性 10 s, 适宜 T_m 值退火 10 s, 72 °C 延伸 1 min, 35 个循环; 72 °C 延伸 5 min, 扩增产物 4 °C 保存。SSR 标记 PCR 反应体系 30 μL: 1×TSE101 金牌 Mix 27 μL, 正、反向引物各 1 μL, DNA 模板 1 μL。反应程序为: 98 °C 预变性 3 min; 98 °C 变性 10 s, 适宜 T_m 值退火 10 s, 72 °C 延伸 5 min, 37 个循环, 扩增产物 4 °C 保存。

1.4 PCR 产物检测

SCAR 标记的 PCR 扩增产物采用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳 25~30 min (恒压 150 V), 使用 UV 凝胶成像仪拍照记录。SSR 标记的 PCR 扩增产物通过琼脂糖凝胶电泳 (2 μL 样品+6 μL 溴酚蓝), 300 V 电压下 12 min, 获取鉴定胶图, 通过胶图确定模板浓度, 加无菌水稀释后采用荧光毛细管电泳 (ABI 3730 XL 遗传分析仪) 进行验证。

1.5 数据处理

参考马亚茹等^[13]、Baldi 等^[18] 和 Vihinen^[19] 的方法分别计算真阳性 (True Positive, TP)、真阴性 (True Negative, TN)、假阳性 (False Positive, FP)、假阴性 (False Negative, FN)、准确率 (Accuracy) 和无核检测率 (Nuclear-free Detection Rate, NDR)。

准确率=(TP+TN)/(TP+FP+TN+FN)×100%, 无核检测率=TP/(TP+FP)×100%。并利用 SPSS 软件对样本表型与不同的 SSR 标记的等位点及基因型之间进行卡方 (χ²) 独立性检验 (p<0.05), 用于评估表型和试验数据之间的关联程度。

2 结果与分析

2.1 SCAR 标记验证及不同标记间准确率比较

在 208 个葡萄种质中验证 SCAR 类型无核标记的通用性。结果如表 3 所示, 标记 GSLP1-569 在葡萄种质间的鉴定准确率和无核检测率分别是 57.12% 和 90.51%。检测到的 16 个种质包含 14 个无核种质和 2 个有核种质, 其中 11 个无核种质是无核白及其衍生后代, 可见 GSLP1-569 适合针对无核白及其后代的检测。标记 SCC8-1080 分别在 53 个无

表 1 208 个葡萄种质信息
Table 1 Information on 208 grape germplasm

序号 Code	种类 Species	种质名称 Germplasm name	有核/无核 Seeded/Seedless	杂交亲本 Parent	材料来源 Origin
1	Vv	午夜美人 Midnight Beauty	无核 Seedless	17-138×Fantasie Seedless	美国 America
2	Vv	郑引 1436 Zhengyin1436	无核 Seedless	89345-090-144×89361-091-364	美国 America
3	Vv-VI	郑引 1437 Zhengyin1437	无核 Seedless	91171-094-492×Sugra Twentythree	美国 America
4	Vv	郑引 1713 Zhengyin1713	无核 Seedless	97148-027-365×Sugra Thirtyone	美国 America
5	Vv-VI	金星无核 Venus Seedless	无核 Seedless	Alden×Ny4600	美国 America
6	Vv	塔尔那乌 Taphay	无核 Seedless	Angoor Kalan×Kichmich Rond	苏联 The Soviet Union
7	Vv	奇妙无核 Qimiao Wuhe	无核 Seedless	B36-27×P64-18	美国 America
8	Vv	郑引 2022 Zhengyin2022	无核 Seedless	Bar1×35-22+4	美国 America
9	Vv	甜蜜蓝宝石 IFG6	无核 Seedless	Beita Mouni×C 22-121	美国 America
10	Vv-VI	郑引 1434 Zhengyin1434	无核 Seedless	红无籽露 Black Monukka×Sugra Five	美国 America
11	Vv	郑引 2021 Zhengyin2021	无核 Seedless	C.R.×Grapaes	美国 America
12	Vv	秋无核 Autumn Seedless	无核 Seedless	Calmeria×白玫瑰香 Muscat of Alexandria	美国 America
13	Vv-VI	深红无籽 Shenhong Wuhe	无核 Seedless	Emperador×Sultanina	美国 America
14	Vv	红脸无核 Blush Seedless	无核 Seedless	Emperor×E4-87	美国 America
15	Vv	红宝石无核 Ruby Seedless	无核 Seedless	Emperor×Pirovano	美国 America
16	Vv	黑爱默无核 Black Emerald Seedless	无核 Seedless	Fresno A69-190×C84-116	美国 America
17	Vv-VI	郑引 1839 Zhengyin1839	无核 Seedless	Gar 4×Gzr 1	美国 America
18	Vv	红光无核 Flame Seedless	无核 Seedless	Gargulo 4320×Red Malaga	美国 America
19	Vv	郑引 1901 Zhengyin1901	无核 Seedless	Gaw 1×Gzvw 5	美国 America
20	Vv	郑引 1838 Zhengyin1838	无核 Seedless	Gaw 5×Gzvw 4	美国 America
21	Vv	无核白鸡心 Centennial Seedless	无核 Seedless	Gold×Emperor	美国 America
22	Vv	黎明无核 Dawn Seedless	无核 Seedless	Gold×波尔莱特 Perlette	美国 America
23	Vv	红无籽露 0367 Black Monukka 0367	无核 Seedless	Ichkimar×Sultanina	伊朗 Iran
24	Vv-VI	火星无核 Mars Seedless	无核 Seedless	Island Belle×Ark1339	美国 America
25	Vv	美丽无核 Beauty Seedless	无核 Seedless	Koenigin Der Weingarten×黑无核 Black Seedless	美国 America
26	Vv-VI	无核蜜 Honey Seedless	无核 Seedless	巨峰×康可无核 Kyoho×Concord Seedless	日本 Japan
27	Vv	郑引 1616 Zhengyin1616	无核 Seedless	红地球×秋无核 Red Globe×Autumn Seedless	美国 America
28	Vv	粉红无核 Pink Seedless	无核 Seedless	Red Malaga×Tifafih Ahmer	美国 America
29	Vv-VI	郑引 1435 Zhengyin1435	无核 Seedless	红地球 Red Globe×069-172	美国 America
30	Vv-VI	范诺萨无核 Vanerssa Seedless	无核 Seedless	Seneca×N.Y.	美国 America

注:表中无核包含残核。Vv, 欧亚种; Vv-VI, 欧美杂种; Va-Vv, 山欧杂种。

Note: There are seedless in the table including rudimental seed. Vv, *V. vinifera*; Vv-VI, *V. vinifera*-*V. labrusca*; Va-Vv, *V. amurensis*-*V. vinifera*.

表 1 (续) Table 1 (Continued)

序号 Code	种类 Species	种质名称 Germplasm name	有核/无核 Seeded/Seedless	杂交亲本 Parent	材料来源 Origin
31	Vv-VI	布朗无核 Bronx Seedless	无核 Seedless	Sy 8536×Sultanina	美国 America
32	Vv-VI	蜜无核 Seedless Honey	无核 Seedless	TchéKirdesiz	日本 Japan
33	Vv	索索葡萄 Suosuo	无核 Seedless	不详 Unknown	中国 China
34	Vv-VI	粒丽特 Lilit	无核 Seedless	不详 Unknown	日本 Japan
35	Vv	黑无核 Black Seedless	无核 Seedless	不详 Unknown	阿塞拜疆 Azerbaijan
36	Vv-VI	立川无核 Lichuan Wuhe	无核 Seedless	不详 Unknown	日本 Japan
37	Vv	无核紫 Black Monukka	无核 Seedless	不详 Unknown	中亚 Central Asia
38	Vv	紫大无核 Zida Wuhe	无核 Seedless	不详 Unknown	不详 Unknown
39	Vv	黑脆无核 Heicui Wuhe	无核 Seedless	不详 Unknown	美国 America
40	Vv	玉无核♀ Jade Seedless ♀	无核 Seedless	不详 Unknown	智利 Chile
41	Vv	白无核 Baiwuhe	无核 Seedless	不详 Unknown	中国 China
42	Vv	大无核紫(黑) Dawuhezi(hei)	无核 Seedless	不详 Unknown	不详 Unknown
43	Vv	大无核紫(红) Dawuhezi(hong)	无核 Seedless	不详 Unknown	不详 Unknown
44	Vv	红无籽露 0368 Black Monukka 0368	无核 Seedless	不详 Unknown	伊朗 Iran
45	Vv	京丰无核 Jingfeng Wuhe	无核 Seedless	不详 Unknown	中国 China
46	Vv	瓦特康无核 Watcom Seedless	无核 Seedless	不详 Unknown	苏联 The Soviet Union
47	Vv	无核白 Thompsons Seedless	无核 Seedless	不详 Unknown	中亚 Central Asia
48	Vv	无核玫瑰 Wuhe Meigui	无核 Seedless	不详 Unknown	中国 China
49	Vv	无核紫 0746 Black Monukka 0746	无核 Seedless	不详 Unknown	中亚 Central Asia
50	Vv	克里那 Krina	无核 Seedless	不详 Unknown	不详 Unknown
51	Vv-VI	元田 314♀ Yuantian314♀	无核 Seedless	不详 Unknown	不详 Unknown
52	Vv	昆诺无核 Queenora Seedless	无核 Seedless	不详 Unknown	美国 America
53	Vv	俄罗斯无核 Russian Seedless	无核 Seedless	不详 Unknown	阿塞拜疆 Azerbaijan
54	Vv	奥地利无核 Austrian Seedless	无核 Seedless	不详 Unknown	不详 Unknown
55	Vv	京可晶 Jingkejing	无核 Seedless	法国兰×玛纽卡 Blue French×Manuka	中国 China
56	Vv	早康宝 Zaokangbao	无核 Seedless	瑰宝×无核白鸡心 Guibao×Centennial Seedless	中国 China
57	Vv	丽红宝 Lihongbao	无核 Seedless	瑰宝×无核白鸡心 Guibao×Centennial Seedless	中国 China
58	Vv	无核翠宝 Wuhe Cuiobao	无核 Seedless	瑰宝×无核白鸡心 Guibao×Centennial Seedless	中国 China
59	Vv	岳碧无核 Yuebi Wuhe	无核 Seedless	红地球×京早晶 Red Globe×Jingzaojing	中国 China
60	Vv	云楚无核 Yunchu Wuhe	无核 Seedless	红地球×无核白鸡心 Red Globe×Centennial Seedless	中国 China
61	Vv	岳秀无核 Yuexiu Wuhe	无核 Seedless	红地球×无核白鸡心 Red Globe×Centennial Seedless	中国 China
62	Vv	克瑞森无核 Crimson Seedless	无核 Seedless	皇帝 Emperor×C33-199	美国 America
63	Vv	紫脆无核 Zicui Wuhe	无核 Seedless	皇家秋天×牛奶 Autumn Royal×Niunai	中国 China

表 1 (续) Table 1 (Continued)

序号 Code	种类 Species	种质名称 Germplasm name	有核/无核 Seeded/Seedless	杂交亲本 Parent	材料来源 Origin
64	Vv-VI	郑艳无核 Zhengyan Wuhe	无核 Seedless	京秀×布朗无核京秀 Jingxiu×Bronx Seedless	中国 China
65	Vv-VI	夏黑 Summer Black	无核 Seedless	巨峰×无核白 Kyoho×Thompsons Seedless	日本 Japan
66	Vv-VI	巨峰无核 Jufeng Wuhe	无核 Seedless	巨峰 Kyoho	中国 China
67	Vv	蒙丽莎无核 Melissa Seedless	无核 Seedless	克里森无核 Crimson Seedless×B40-208	美国 America
68	Vv	爱神玫瑰 Aishenmeigui	无核 Seedless	玫瑰香×京早晶 Mascat Hamburg×Jingzaojing	中国 China
69	Vv-VI	脆红宝 Cuihongbao	无核 Seedless	玫瑰香×克瑞森无核 Mascat Hamburg×Crimson Seedless	中国 China
70	Vv	皇家无核 Royal Seedless	无核 Seedless	牛奶×皇家秋天 Niunai×Autumn Royal	中国 China
71	Vv	京紫晶 Jingzijing	无核 Seedless	葡萄园皇后×马纽卡 Queen of Vineyard×Manuka	中国 China
72	Vv	京早晶 Jingzaojing	无核 Seedless	葡萄园皇后×无核白 Queen of Vineyard×Thompsons Seedless	中国 China
73	Vv	碧香无核 Bixiang Wuhe	无核 Seedless	葡萄园皇后×意大利 Queen of Vineyard×Italia	中国 China
74	Vv	红艳无核 Hongyan Seedless	无核 Seedless	森田尼无核×红地球 Centennial Seedless×Red Globe	中国 China
75	Vv	郑果大无核 Zhengguodawuhe	无核 Seedless	无核白 Thompsons Seedless	中国 China
76	Vv	优无核 Superior Seedless	无核 Seedless	瓦特康无核 Watcom Seedless	美国 America
77	Vv	岳红无核 Yuehong Wuhe	无核 Seedless	红地球×无核白鸡心 Red Globe×Centennial Seedless	中国 China
78	Vv	早无核白 Zaowuhebai	无核 Seedless	无核白 Thompsons Seedless	中国 China
79	Vv-VI	科玉无籽 Keyu Wuhe	无核 Seedless	无核白鸡心 Centennial Seedless	中国 China
80	Vv	长穗无核白 Changsuwuhebai	无核 Seedless	无核白 Thompsons Seedless	中国 China
81	Vv	大无核白 Dawuhebai	无核 Seedless	无核白 Thompsons Seedless	中国 China
82	Vv	宁夏无核白 Ningxia Wuhebai	无核 Seedless	无核白 Thompsons Seedless	中国 China
83	Vv-VI	康能无核 Canadice	无核 Seedless	无核白 Thompsons Seedless	中国 China
84	Vv-VI	沪培 1 号 Hupei No. 1	无核 Seedless	希姆劳德 Himrod Seedless	美国 America
85	Vv	三本提 Sanbenti	无核 Seedless	喜乐×巨峰 Xile×Kyoho	中国 China
86	Vv-VI	瑞峰无核 Ruifeng Wuhe	无核 Seedless	夏黑 Summer Black	中国 China
87	Vv	瑞都无核怡 Ruidu Wuheyi	无核 Seedless	先锋 Pione	中国 China
88	Vv	红标无核 Hongbiao Wuhe	无核 Seedless	香妃×红宝石无核香妃 Xiangfei×Ruby Seedless	中国 China
89	Vv-VI	皇冠 Huangguan	有核 Seeded	郑州早红×巨峰 Zhengzhou Zaohong×Kyoho	中国 China
90	Vv	香妃 Xiangfei	有核 Seeded	Lincecumii×凯旋 Triumph	日本 Japan
91	Vv-VI	维纳斯无核 Venus Seedless	有核 Seeded	73-7-6×绯红 Cardinal	中国 China
92	Vv	北塞魂 Petite Bouschet	有核 Seeded	Alden×Ny4600	美国 America
93	Vv-VI	蓓蕾玫瑰 Muscat Bailey	有核 Seeded	阿拉蒙 Aramon×Teniturier Du Cher	法国 France
94	Vv	琼尼♀ Joanne Charmice♀	有核 Seeded	蓓蕾×玫瑰香 Bailey×Muscat Hamburg	日本 Japan
95	Vv	小白玫瑰 Muscat Blanc	有核 Seeded	Bermestia Bianca×Agostenga	美国 America
96	Vv	意大利 Italia	有核 Seeded	Bertille Seyve 822×Bertille Seyve 872	苏联 The Soviet Union
				比坎×玫瑰香 Bicans×Muscat Hamburg	意大利 Italy

表 1 (续) Table 1 (Continued)

序号 Code	种类 Species	种质名称 Germplasm name	有核/无核 Seeded/Seedless	杂交亲本 Parent	材料来源 Origin
97	Vv-VI	特别黑大粒 Tebie Heidali	有核 Seeded	黑罕×巴勒斯坦 Black Hamburg×Palestine	日本 Japan
98	Vv	卡三多列 Kasanduolie	有核 Seeded	Black Queen×赤霞珠 Cabernet Sauvignon	日本 Japan
99	Vv	红地球 Red Globe	有核 Seeded	C12-80×S45-48	美国 America
100	Vv	维多利亚 Victoria	有核 Seeded	绯红 Cardinal×Afus Ali	罗马尼亚 Romania
101	Vv	奥托玫瑰 Muscat Otonel	有核 Seeded	夏斯拉 Chasselas×Loire Muscat	法国 France
102	Vv	阿登纳玫瑰 Muscat Adenauer	有核 Seeded	夏斯拉 Chasselas×Loire Muscat	法国 France
103	Vv	西比利考维 Sibirkovy	有核 Seeded	Coama Alba×Bulanyi	苏联 The Soviet Union
104	Vv	伊尔玛 Koesias Irma	有核 Seeded	Ezereves Magyaroszag×Thalloczy Lajos	匈牙利 Hungary
105	Vv	红汁加美 Gamay Teinturier	有核 Seeded	Gamay Teinturier De Bouze	法国 France
106	Vv	牛奶 Niunai	有核 Seeded	Golden Hamburg×白玫瑰香 Muscat of Alexandria	中国 China
107	Vv	波坦 Portan	有核 Seeded	Grenache Noir×Portugieser Blau	法国 France
108	Vv-VI	先锋 Piône	有核 Seeded	巨峰 Kyoho×Cannon Hall Muscat	日本 Japan
109	Vv-VI	大平地拉洼 Taihei Delaware	有核 Seeded	Labrusca×Aestivalis	日本 Japan
110	Vv	黑克里木 Noirde crime	有核 Seeded	Magdeleine Noire Des Charentes×Prunelard	苏联 The Soviet Union
111	Vv	考特 Cot	有核 Seeded	Magdeleine Noire Des Charentes×Prunelard	法国 France
112	Vv	罗吉玫瑰 Muscat Violet Commonn	有核 Seeded	Muscat A	葡萄牙 Portugal
113	Vv	派克斯 Aromatic of Pecs	有核 Seeded	玫瑰香 Muscat Hamburg×Ciclopica	匈牙利 Hungary
114	Vv-VI	金玫瑰 Golden Muscat	有核 Seeded	玫瑰香 Muscat Hamburg×Diamond	美国 America
115	Vv-VI	纽约玫瑰 New York Muscat	有核 Seeded	玫瑰香 Muscat Hamburg×Ontario	美国 America
116	Vv	阿达玫瑰 Muscat Adda	有核 Seeded	白玫瑰香 Muscat of Alexandria	罗马尼亚 Romania
117	Vv	红加利亚 Hungaria	有核 Seeded	Olasz Rizling×Ezerjo	匈牙利 Hungary
118	Vv	安娜马利亚 Annamaria	有核 Seeded	Perle Von Csaba×David	意大利 Italy
119	Vv	黑佳美 Gamay Noir	有核 Seeded	Pinot×Heunisch Weiss	西班牙 Spain
120	Vv	奥利文 Irsay Oliver	有核 Seeded	Pozsonyi×Perle Von Csaba	匈牙利 Hungary
121	Vv	圣诞玫瑰 Christmas Rose	有核 Seeded	S44-3Sc×9-1170	美国 America
122	Vv	1452/75	有核 Seeded	晚红蜜 Saperavi×Areni Sev	苏联 The Soviet Union
123	Vv	黑比诺 Pinot Noir	有核 Seeded	Savagnin Blanc	法国 France
124	Vv	奥坡托 Oporto	有核 Seeded	Savagnin Blanc	奥地利 Austria
125	Vv	玫瑰香 Muscat Hamburg	有核 Seeded	Schiava Grossa×白玫瑰香 Muscat of Alexandria	英国 Britain
126	Vv-VI	霍里冈 Horigaon	有核 Seeded	Seyval×Schuyler	美国 America
127	Vv-VI	郑引 1433 Zhengyin 1433	有核 Seeded	Sugraone	美国 America
128	Vv	西拉 174 Syrah Clone 174	有核 Seeded	西拉 Syrah	法国 France
129	Vv	红帕万 Kapa	有核 Seeded	Tavkveri×Khimdogny	苏联 The Soviet Union

表 1 (续) Table 1 (Continued)

序号 Code	种类 Species	种质名称 Germplasm name	有核/无核 Seeded/Seedless	杂交亲本 Parent	材料来源 Origin
130	Vv	阿列阿基可 Aleatico	有核 Seeded	Trollinger×白玫瑰香 Muscat Of Alexandria	意大利 Italy
131	Vv-VI	阳光玫瑰 Shine Muscat	有核 Seeded	安芸津 21×白南 Akitsu-21×Hakunan	中国 China
132	Vv-VI	户太 8 号 Hutai No. 8	有核 Seeded	奥林匹亚 Olympia	中国 China
133	Vv	红巴拉多 Red Barado	有核 Seeded	巴拉蒂×京秀 Barati×Jingxiu	日本 Japan
134	Vv	格拉卡 Greaca	有核 Seeded	比坎×保尔加 Bican×Boulgal	罗马尼亚 Romania
135	Vv-VI	九州 Juuzhou	有核 Seeded	不详 Unknown	日本 Japan
136	VI	康可 Concord	有核 Seeded	不详 Unknown	美国 America
137	VI	香槟 Champion	有核 Seeded	不详 Unknown	美国 America
138	Vv	228	有核 Seeded	不详 Unknown	中国 China
139	Vv	白达拉依 Badarai	有核 Seeded	不详 Unknown	中国 China
140	Vv-VI	安尼斯基 Ayaneskeal	有核 Seeded	不详 Unknown	美国 America
141	Vv	粉红亚依苏娜 Pink Ayisuna	有核 Seeded	不详 Unknown	不详 Unknown
142	Vv-VI	大阪 482020 Osaka482020	有核 Seeded	不详 Unknown	日本 Japan
143	Vv	黄蜜斯♀ Huangmisi ♀	有核 Seeded	不详 Unknown	不详 Unknown
144	Vv	基拉尔♀ Kilar ♀	有核 Seeded	不详 Unknown	匈牙利 Hungary
145	Vv	郑果 4 号 Zhengguo No. 4	有核 Seeded	不详 Unknown	中国 China
146	Vv	郑果 5 号 Zhanguo No. 5	有核 Seeded	不详 Unknown	中国 China
147	Vv	秋白 Qiubai	有核 Seeded	不详 Unknown	中国 China
148	Vv	苏 46 号 Su No. 46	有核 Seeded	不详 Unknown	苏联 The Soviet Union
149	Vv	沃依季诺 Voidino	有核 Seeded	不详 Unknown	保加利亚 Bulgaria
150	Vv	伊犁香葡萄 Yili Xiang	有核 Seeded	不详 Unknown	中国 China
151	Vv	紫桃 Zitao	有核 Seeded	不详 Unknown	不详 Unknown
152	Vv-VI	巨优 Juyou	有核 Seeded	不详 Unknown	中国 China
153	Vv-VI	美洲白 American White	有核 Seeded	不详 Unknown	不详 Unknown
154	Vv	红达拉依 Red Darai	有核 Seeded	不详 Unknown	中国 China
155	Vv	卡姆拉夏 Kamrasha	有核 Seeded	不详 Unknown	苏联 The Soviet Union
156	Vv-VI	凯番西亚♀ Kefancia ♀	有核 Seeded	不详 Unknown	美国 America
157	Vv	库夏兹基 Kucharzky	有核 Seeded	不详 Unknown	苏联 The Soviet Union
158	Vv	切克拉赫 Ceclach	有核 Seeded	不详 Unknown	苏联 The Soviet Union
159	Vv-VI	S.7053	有核 Seeded	不详 Unknown	法国 France
160	Vv	依及 Yiji	有核 Seeded	不详 Unknown	不详 Unknown
161	Vv	栅栏 Zhalan	有核 Seeded	不详 Unknown	不详 Unknown
162	Vv	SV12308	有核 Seeded	不详 Unknown	美国 America

表 1 (续) Table 1 (Continued)

序号 Code	种类 Species	种质名称 Germplasm name	有核/无核 Seeded/Seedless	杂交亲本 Parent	材料来源 Origin
163	Vv-VI	郑果 16号 Zhengguo No. 16	有核 Seeded	不详 Unknown	中国 China
164	Vv	泰纳特 Tenate	有核 Seeded	不详 Unknown	法国 France
165	Vv-VI	绅士无核 Squire Seedless	有核 Seeded	不详 Unknown	美国 America
166	Vv	1288/38	有核 Seeded	不详 Unknown	苏联 The Soviet Union
167	Vv	绯红 Cardinal	有核 Seeded	粉红葡萄×瑞必尔 Flame Tokay×Ribier	美国 America
168	Vv	金田翡翠 Jingtian Feicui	有核 Seeded	凤凰 51×维多利亚 Phoenix 51×Victoria	中国 China
169	Vv-VI	摩尔多瓦 Moldova	有核 Seeded	古扎丽卡拉 Guzalikala×Sv12375	摩尔多瓦 Moldova
170	Vv-VI	京亚 Jingya	有核 Seeded	黑奥林 Black Olimpia	中国 China
171	Vv	紫丰 Zifeng	有核 Seeded	黑汉×尼加拉 Black Hamburg×Niagara	中国 China
172	Vv-VI	藤稔 Fujiminori	有核 Seeded	红蜜×先锋 Hongmi×Pione	日本 Japan
173	Vv-VI	巨皇 Juhuang	有核 Seeded	红香蕉×葡萄园皇后 Hongxiangjiao×Queen of Vineyard	中国 China
174	Vv	紫甜无核 Zitian Wuhe	有核 Seeded	皇家秋天×牛奶 Autumn Royal×Niumai	中国 China
175	Vv	白根地 Pinot Blanc	有核 Seeded	灰比诺 Piont Gris	法国 France
176	Vv-VI	状元红 Zhuangyuanhong	有核 Seeded	巨峰×瑰香怡 Kyoho×Meixiangyi	中国 China
177	Vv-VI	春光 Chunguang	有核 Seeded	巨峰×早黑宝 Kyoho×Zaoheibao	中国 China
178	Vv-VI	红义 Hongyi	有核 Seeded	巨峰 Kyoho	日本 Japan
179	Vv-VI	峰后 Fenghou	有核 Seeded	巨峰 Kyoho	中国 China
180	Vv	里扎马特 Rizamat	有核 Seeded	可口甘×帕尔肯特 Katta Kyprah×Palkent	苏联 The Soviet Union
181	Vv	安吉文 Angivin	有核 Seeded	马林格尔早生×皇家玛德林 Malling Early×Royal Madeline	法国 France
182	Vv	早熟玫瑰香 Zaoshu Meiguixiang	有核 Seeded	玫瑰香 Mascat Hamburg	中国 China
183	Vv-VI	脆红 Cuihong	有核 Seeded	玫瑰香×白香蕉 Mascat Hamburg×Triumph	中国 China
184	Vv-VI	月光 Yueguang	有核 Seeded	玫瑰香×巨峰 Mascat Hamburg×Kyoho	中国 China
185	Vv	泽玉 Zeyu	有核 Seeded	玫瑰香×龙眼 Mascat Hamburg×Longyan	中国 China
186	Vv	济南早红 Jinan Zaohong	有核 Seeded	玫瑰香×葡萄园皇后 Mascat Hamburg×Queen of Vineyard	中国 China
187	Vv	郑州早红 Zhengzhou Zaohong	有核 Seeded	玫瑰香×莎巴珍珠 Mascat Hamburg×Pearl of Csaba	中国 China
188	Vv	北政佳 Beimeijia	有核 Seeded	玫瑰香×山葡萄 Mascat Hamburg×Vitis amurensis Rupr.	中国 China
189	Va-Vv	北醇 Beichun	有核 Seeded	玫瑰香×山葡萄 Mascat Hamburg×Vitis amurensis Rupr.	中国 China
190	Vv	烟 73 Yan73	有核 Seeded	玫瑰香×紫北塞 Mascat Hamburg×Alicante Bouschet	中国 China
191	Vv-VI	金手指 Gold Finger	有核 Seeded	美人指 Manicule Finger×Seneca	日本 Japan
192	Vv	黑巴拉多 Black Barado	有核 Seeded	米山 3号×红巴拉多 Mishan 3×Red Barado	日本 Japan
193	Vv	京秀 Jingxiu	有核 Seeded	潘诺尼亚 Pannoniavinesa×60-33	中国 China
194	Vv	京丰 Jingfeng	有核 Seeded	葡萄园皇后×红无籽露 Queen of Vineyard×Black Monukka	中国 China
195	Vv	巧保 2号 Qiaobao No. 2	有核 Seeded	巧吾斯×保尔加 2号 Tchaouch×Boulgal 2	保加利亚 Bulgaria

表 1 (续) Table 1 (Continued)

序号 Code	种类 Species	种质名称 Germplasm name	有核/无核 Seeded/Seedless	杂交亲本 Parent	材料来源 Origin
196	Vv-VI	甬优1号 Yongyou No. 1	有核 Seeded	藤稔 Minoru Fujica	中国 China
197	Vv	无核白1号 Wuhebai No. 1	有核 Seeded	无核白 Thompsons Seedless	中亚 Central Asia
198	Vv	无核白3号 Wuhebai No. 3	有核 Seeded	无核白 Thompsons Seedless	中亚 Central Asia
199	Vv	黑玫瑰 Black Muscat	有核 Seeded	无核紫×瑞必尔 Black Monukka×Ribier	美国 America
200	Vv	早夏香 Zaoxiaxiang	有核 Seeded	夏黑 Summer Black	中国 China
201	Vv	早夏无核 Zaoxia Wuhe	有核 Seeded	夏黑 Summer Black	中国 China
202	Vv	春香无核 Chunxiang Wuhe	有核 Seeded	夏黑 Summer Black	中国 China
203	Vv	莎巴珍珠 Pearl of Csaba	有核 Seeded	匈牙利玫瑰×奥托涅玫瑰 Hungarian Rose×Otone Rose	匈牙利 Hungary
204	Vv-VI	沪培2号 Hupei No. 2	有核 Seeded	杨格爾×紫珍珠 Younger×Zizhenxiang	中国 China
205	Vv	葡萄园皇后 Queen of Vineyard	有核 Seeded	伊丽莎白×莎巴珍珠 Elizabeth Grape×Pearl of Csaba	匈牙利 Hungary
206	Vv	瑰宝 Guibao	有核 Seeded	依斯比沙果×维拉玫瑰 Isbisa Fruit×Vila Rose	中国 China
207	Vv	美人指 Manicure Finger	有核 Seeded	优尼坤×巴拉蒂 Unikon×Barati	日本 Japan
208	Vv	谢花红 Muscat Mathiasz Janosne	有核 Seeded	紫沙斯拉×奥托玫瑰 Purple Sassilla×Muscat Ottonel	匈牙利 Hungary

表 2 分子标记对应引物名称及信息

Table 2 Molecular marker correspond to primer name and its information

引物类型 Primer type	引物名称 Primer name	引物序列 (5'-3') Primer sequence (5'-3')	退火温度 Annealing temperature/°C	产物大小 Fragment size/bp	参考文献 Reference	
SCAR	SCF27-2000	F: CAGGTGGGAGTAGTGAATG R: CAGGTGGGAGTAGAGATTTGT	58	2000	[11]	
	GSLP1-569	CCAGTTCGCCCGTAAATG	55	569	[12]	
	SCC8-1080	F:GGTGTCAAAGTTGGAAGATGG R:TATGCCAAAAAACAATCC	57	1080	[15]	
	SSR	VMC7f2	F: AAGAAAAGTTTGCAGTTTATGGTG R: AAGATGACAAATAGCGAGAGAGAA	52	198	[16]
		p1_VvAGL11	F:GACACGCGAATTTAATAATCCA R:TTTATGAAACCCGTATTGGTG	51	245	[8]
		p2_VvAGL11	F:TGTACACCAATACGGGTTTCAT R:GTTTGTGGATTTCCGATGT	56	171	[8]
p3_VvAGL11		F:CTCCCTTTCCCTCTCCCTCT R:AAACGCGTATCCCAATGAAG	53	194	[8]	
5U_VvIAGL11	F:CGCCCAATCTCTCTCGCTAT R:GTGCAAAAACGGGTATCCCA	57	319	[17]		
VvSD10	F:GGAAAAATCCATCGCTAACAAAGTATTAATTTCTTCA R:AGAGCTCAITTTGGATTAAGAGCGAGTAATTAATTGT	58	111	[13]		

表 3 SCAR 标记在自然群体中的验证结果

Table 3 Validation results of SCAR markers in natural populations

标记 Marker	无核 Seedless		有核 Seeded		真阳性 TP/%	真阴性 TN/%	假阳性 FP/%	假阴性 FN/%	无核检测率 Accuracy/%	准确率 NDR/%
	+	-	+	-						
GSLP1-569	14	74	2	118	15.91	98.33	16.67	84.09	90.51	57.12
SCC8-1080	53	35	19	101	60.22	84.17	15.83	39.77	79.18	72.20
SCF27-2000	85	3	55	65	96.59	54.17	45.83	3.41	67.82	75.38

注: + 表示标记有特异性条带; - 表示标记无特异性条带。

Note: The + in the Table indicates that the mark has a special type strip; - marks have no specific bands.

核种质和 19 个有核种质中扩增出 1080 bp 的特异性条带, 经统计在 208 个葡萄种质间的鉴定准确率和无核检测率分别是 72.20% 和 79.18%; 标记 SCF27-2000 分别在 87 个无核种质和 55 个有核种质中扩增出 2000 bp 的特异性条带, 在 208 个种质间的鉴定准确率和无核检测率分别是 75.38% 和 67.82%。3 个 SCAR 类型标记中 SCF27-2000 的准确率和真阳性最高; 标记 GSLP1-569 有较高的无核检测率、假阴性和真阴性。鉴定结果表明, 在针对自然群体的检测中 SCF27-2000 综合表现最优, 适用于无核葡萄新品种的 SCAR 分子辅助选择。

2.2 SSR 标记检测标记位点及基因型分析

对 6 个 SSR 无核标记的通用性进行了验证, 结果表明: 6 个标记分别检测到 3~24 个不等的标记位

点, 这些位点大小为 101~321 bp, 标记 p2-VvAGL11 检测到的位点最少, 5U_VviAGL11 检测到的位点最多。每个标记表现最好的标记位点如表 4 所示, 经卡方检验与种子有无均呈极显著相关, 检测出这些位点的种质中无核种质占 41.4%~89.4%, p1-VvAGL11 的 250 bp 占比最高, 同时在 41.7% 的三倍体种质中检测到该位点。这些位点在 56.1%~88.1% 的无核葡萄种质中检测到, 5U_VviAGL11 的 315 bp 占比最高, 在三倍体种质中未检测到该位点。

6 个标记分别检测到 5~75 种数量不等的基因型, 标记 p2-VvAGL11 检测到的基因型数量最少, 5U_VviAGL11 检测到的数量最多。每个标记表现最好的基因型如表 5 所示, 经卡方检验与葡萄种子有无极显著相关。检测到这 6 种基因型的种质中,

表 4 微卫星标记位点分布与无核葡萄种质的相关性

Table 4 Correlation between distribution of microsatellite markers and germplasm of seedless grape

标记 Marker	数量 Number	标记位点 Marker site/bp	频率 Frequency	表型 Phenotype		相关性 Correlation	
				-	+	χ^2	<i>p</i>
p1-VvAGL11	6	250	45.5	161	30	245.595	2.3708E-55**
p2-VvAGL11	3	171	29.5	89	35	37.493	9.17E-10**
p3-VvAGL11	14	195	23.8	88	12	109.218	1.4542E-25**
5U_VviAGL11	24	315	20.0	74	10	87.743	7.4534E-21**
VMC7F2	8	197	28.0	88	31	65.547	5.6739E-16**
VVSD10	9	105	38.8	101	79	22.595	0.000 002**

注: - 表示无核; + 表示有核; * 显著相关 ($p < 0.05$); ** 极显著相关 ($p < 0.01$)。下同。

Note: - in the table means no seeded; + means there are nucleated; * means significant correlation ($p < 0.05$); ** means extremely significant correlation ($p < 0.01$). The same below.

71%~93.3% 的种质为无核表型, 标记 5U_VviAGL11 检测到的种质中无核种质占比最高; 无核种质中 24.4%~86.7% 的种质检测出这 6 种基因型, 其中 p1-VvAGL11 检测到的 250/250 在无核种质中占比最高; 有核种质中仅有 1.7%~24.2% 检测到这 6 种基因型; 5U_VviAGL11 检测到的 307/315 在有核种质中占比最低。

2.3 SSR 标记验证及不同标记间准确率比较

对 6 个 SSR 类型无核标记进行验证, 结果 (表 6) 显示 p1-VvAGL11 准确率最高, 达到 88.47%, 无核检测率为 87.74%。p3-VvAGL11 和 5U_VviAGL11 的无核检测率较高, 分别为 90.72% 和 90.80%, 同时二者的真阴性也最高, 分别为 95.00% 和 95.83%。p1-VvAGL11 真阳性最高, 为 89.44%; 6 个标记假阳性均表现良好, 最

表5 微卫星标记基因型分布与相关性

Table 5 Distribution and correlation of microsatellite markers genotypes

标记 Marker	数量 Number	基因型 Genotype	频率 Frequency	表型 Phenotype		相关性 Correlation	
				-	+	χ^2	<i>p</i>
p1-VvAGL11	8	250/250	42.9	78	12	123.433	1.120E-28**
p2-VvAGL11	5	158/171	47.6	71	29	61.742	3.916E-15**
p3-VvAGL11	30	185/195	32.7	60	8	84.557	3.733E-20**
5U_VviAGL11	75	307/315	7.1	28	2	36.413	1.60E-09**
VMC7F2	21	197/199	36.7	57	20	48.230	3.79E-12**
VVSD10	23	105/105	14.3	22	8	13.274	0.000269**

表6 SSR 标记在自然群体中验证结果

Table 6 Validation results of SSR markers in natural populations

标记 Marker	真阳性 TN/%	真阴性 TN/%	假阳性 FP/%	假阴性 FN/%	无核检测率 NDR/%	准确率 Accuracy/%
p1-VvAGL11	89.44	87.50	12.50	10.56	87.74	88.47
p2-VvAGL11	49.44	85.42	14.58	50.56	77.22	67.43
p3-VvAGL11	48.89	95.00	5.00	51.11	90.72	71.94
5U_VviAGL11	41.11	95.83	4.17	58.89	90.80	68.47
VMC7F2	48.89	87.08	12.92	51.11	79.10	67.99
VVSD10	56.11	67.08	32.92	43.89	63.03	61.60

高是VVSD10,为32.92%,最低是p3-VvAGL11,仅为5.00%。整体上p1-VvAGL11综合表现最优,适用于无核葡萄新品种的SSR分子辅助选择。

3 讨 论

葡萄基因型高度杂合,童期长,导致育种进程相对缓慢^[20]。通常对果实无核表型的筛选,只能等植株成年之后才能进行。而利用准确率高的分子标记进行辅助选择育种,可以有效缩短育种年限,提高育种效率,推动无核葡萄育种的进程^[21]。

国内外对开发葡萄无核分子标记进行了系统研究,屈田田等^[22]通过不同葡萄杂交组合实生后代对GSLP1-569进行验证,结果表明其在检测无核白的后代时有着更高的准确性。在本研究中,GSLP1-569检测出的14个无核品种中有11个品种与无核白有遗传关联,证实GSLP1-569较为适合检测无核白及其衍生后代。朱瑜等^[23]利用该标记对木纳格的胚挽救后代进行鉴定,成功获得了21个无核株系。SCC8-1080是Lahogue等^[15]运用BSA技术开发出的离无核位点更近的SCAR标记,也是目前应用较多的标记之一^[22]。Ryan等^[24]通过对火焰无核及其F₁组成的杂交群体进行检测,证实SCC8-1080能准确鉴定F₁中无核表型的植株,宣旭娴^[25]研究表明该标记在无核群体中对残核和三倍体中的无核分型正确率

分别是52.94%和50.00%,在自然群体中其无核分型正确率和无核检测率分别是73.08%和43.18%。在本研究中,该标记的准确率和无核检测率分别是72.20%和79.18%,这种差异可能是试验材料选择差异造成的。SCF27-2000是Mejía等^[11]利用RAPD标记技术通过对随机引物筛选之后进行测序分析转化而成的SCAR标记,宣旭娴^[25]的研究结果表明,该标记在无核群体中对残核、软核和三倍体品种无核分型正确率分别是94.12%、100%和66.67%,在自然群体中的无核分型正确率是92.31%,无核检测率为42.11%。Akkurt等^[26]利用Alphonse Lavalée与无核白的372株F₁杂交后代对SCF27-2000进行验证,结果表明该标记更适用对亲本均为无核的杂交后代进行鉴定。王勇等^[27]利用SCF27-2000在14份葡萄种质资源和火州黑玉3个杂交组合共116株胚挽救后代中检测到84株携带目的基因片段,其中81株与田间鉴定结果吻合,正确率96.4%,并认为该标记是一个显性或主效基因标记,可以用来进行葡萄杂交后代无核单株的早期筛选。

p1-VvAGL11、p2-VvAGL11和p3-VvAGL11是Mejía等^[8]将遗传图谱和物理图谱与欧亚种葡萄的公共基因组序列进行整合,对无核葡萄杂交后代进行QTL分析之后筛选出的三个SSR类型标记,并证实离转录起始点越近的标记越适用于基因的辅助选

择。安栋梁^[28]在自然群体中的验证表明,p3-VvAGL11验证结果最优,无核品种扩增结果中杂合基因型ab的解释率为58.86%,在有核品种扩增结果中纯合基因型BB解释率达到66.67%,可以有效区分种子状况。在针对p3-VvAGL11的研究中Ocarez等^[17]和陈豆豆等^[20]分别认为与194 bp和187 bp标记位点极显著相关,而笔者在本研究结果中表明,195 bp位点与无核表型相关性最显著。在进行相关验证试验时,仪器或试验操作会造成扩增片段长度出现偏差^[29],因此使用该类型标记时,应加入标准样品进行校对,从而减小试验误差。在本研究中,p1-VvAGL11、p2-VvAGL11和p3-VvAGL11在自然群体中鉴定准确率分别是88.47%、67.43%和71.94%,无核检测率分别是87.74%、77.22%和90.72%,相比之下p1-VvAGL11表现出更高的准确性,而p3-VvAGL11则表现出更高的无核检测率。5U_VviAGL11是Ocarez等^[17]根据p3-VvAGL11等位点的分子多样性重新设计的位于VvAGL11启动子区域的SSR标记,含有更丰富的遗传信息。前人验证表明其等位点306 bp与无核表型极显著相关,270 bp和298 bp与无核相关^[20],在本研究中,5U_VviAGL11在自然群体中鉴定准确率和无核检测率分别是68.47%和90.8%。VMC7F2是Cabezas等^[10]利用QTL定位到与葡萄无核性状有关基因后经筛选设计的SSR标记,其198 bp等位点与无核表型显著相关。Akkurt等^[26]使用SCC8-1080、SCF27-2000和VMC7f2在Alphonse Lavallee与无核白的372株F₁杂交后代中进行检测,分别检测到40、80和174个无核株系,并选用了在3个标记中均表现无核特征的20个子代进行研究,结果显示VMC7f2与无核性状关联最紧密。

除笔者在本研究中所用的SCAR和SSR类型标记外,单核苷酸多态性(Simple Nucleotide Polymorphisms, SNP)技术逐渐成为研究热点^[30],Ocarez等^[17]用20K SNP芯片对573个无核单株进行基因分型和精细化QTL定位分析,并根据p3_VvAGL11等位基因的分子多样性重新设计了该标记,得到了SNP标记E7_VviAGL11。随着高通量自动化检测方法的更新换代,基因芯片、高通量检测技术等SNP检测技术也逐渐普及,能够更快速、成本更低且更准确地检测出已知的SNP位点,为无核葡萄育种提供参考。对于育种工作者而言,高效、准确的无核鉴定标记可加快田间育种进度,降低育种成本,促进产业的

健康持续发展。本研究试验材料中,出现个别名称中有“无核”的品种,在田间调查时出现种子充分发育情况,这可能是命名问题或者引种记录错误所致,种子状况以田间调查结果为准。

4 结 论

通过由88份无核种质和120份有核种质组成的葡萄自然群体对3个SCAR无核标记和6个SSR无核标记进行验证,结果表明SCAR类型标记中SCF27-2000准确率和真阳性最高,表现最优,GSLP1-569更适用于无核白系列的杂交后代;SSR标记中p1-VvAGL11有着较高的准确率和无核检测率,且假阴性和假阳性较低,表现最优。

参考文献 References:

- [1] HUSSAIN T, KALHORO D H, YIN Y L. Identification of nutritional composition and antioxidant activities of fruit peels as a potential source of nutraceuticals[J]. *Frontiers in Nutrition*, 2023, 9: 1065698.
- [2] 蒲玉霞. 无核葡萄栽培技术及经济价值[J]. *现代农业科技*, 2018(9): 102.
PU Yuxia. Seedless grape cultivation technology and economic value[J]. *Modern Agricultural Science and Technology*, 2018(9): 102.
- [3] 张泉, 刘婧汇, 姜建福, 刘崇怀. 国内无核葡萄育种成果及特性分析[J]. *中外葡萄与葡萄酒*, 2023(2): 73-79.
ZHANG Quan, LIU Jinghui, JIANG Jianfu, LIU Chonghui. Research progress of domestic seedless grape breeding[J]. *Sino-Overseas Grapevine & Wine*, 2023(2): 73-79.
- [4] FANIZZA G, LAMAJ F, COSTANTINI L, CHAABANE R, GRANDO M S. QTL analysis for fruit yield components in table grapes (*Vitis vinifera*)[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2005, 111(4): 658-664.
- [5] 方宣钧, 吴为人, 唐纪良. 作物DNA标记辅助育种[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 2-6.
FANG Xuanjun, WU Weiren, TANG Jiliang. Crop DNA marker-assisted breeding[M]. Beijing: Science Press, 2001: 2-6.
- [6] ROYO C, TORRES-PÉREZ R, MAURI N, DIESTRO N, CABEZAS J A, MARCHAL C, LACOMBE T, IBÁÑEZ J, TORNEL M, CARREÑO J, MARTÍNEZ-ZAPATER J M, CARBONELL-BEJERANO P. The major origin of seedless grapes is associated with a missense mutation in the MADS-box gene *VvAGL11*[J]. *Plant Physiology*, 2018, 177(3): 1234-1253.
- [7] FISCHER B M, SALAKHUTDINOV I, AKKURT M, EIBACH R, EDWARDS K J, TÖPFER R, ZYPRIAN E M. Quantitative trait locus analysis of fungal disease resistance factors on a molecular map of grapevine[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2004, 108(3): 501-515.
- [8] MEJÍA N, SOTO B, GUERRERO M, CASANUEVA X, HOUEL C, MICCONO M D, RAMOS R, LE CUNFF L, BOURSQUOT J M, HINRICHSSEN P, ADAM-BLONDON A F. Molecular, genetic and transcriptional evidence for a role of *VvAGL11* in stenospermocarpic seedlessness in grapevine[J].

- BMC Plant Biology, 2011, 11: 57.
- [9] DOLIGEZ A, BERTRAND Y, DIAS S, GROLIER M, BALLESTER J F, BOUQUET A, THIS P. QTLs for fertility in table grape (*Vitis vinifera* L.)[J]. Tree Genetics & Genomes, 2010, 6(3):413-422.
- [10] COSTANTINI L, BATTILANA J, LAMAJ F, FANIZZA G, GRANDO M S. Berry and phenology-related traits in grapevine (*Vitis vinifera* L.): From quantitative trait loci to underlying genes[J]. BMC Plant Biology, 2008, 8:38.
- [11] MEJÍA N, HINRICHSSEN P. A new, highly assertive scar marker potentially useful to assist selection for seedlessness in table grape breeding[J]. Acta Horticulturae, 2003(603):559-564.
- [12] 王跃进, OLUSOLA L. 检测葡萄无核基因 DNA 探针的合成与应用[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2002, 30(3):42-46.
WANG Yuejin, OLUSOLA L. Application and synthesis on the DNA probe for detecting seedless genes in grapevine[J]. Journal of Northwest A & F University (Natural Science Edition), 2002, 30(3):42-46.
- [13] 马亚茹, 冯建灿, 刘崇怀, 樊秀彩, 孙海生, 姜建福, 张颖. 葡萄无核性状的 SSR 新分子标记开发及应用[J]. 中国农业科学, 2018, 51(13):2622-2630.
MA Yaru, FENG Jiancan, LIU Chonghuai, FAN Xiucui, SUN Haisheng, JIANG Jianfu, ZHANG Ying. Development and application of SSR new molecular marker for seedless traits in grape[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2018, 51(13):2622-2630.
- [14] 郭丹丹, 钟云鹏, 方金豹, 黄武权, 任建杰, 齐秀娟. 猕猴桃性别分子标记在软枣猕猴桃中的通用性验证[J]. 果树学报, 2019, 36(5):549-556.
GUO Dandan, ZHONG Yunpeng, FANG Jinbao, HUANG Wuquan, REN Jianjie, QI Xiujuan. Validation of kiwifruit sex molecular markers in *Actinidia arguta*[J]. Journal of Fruit Science, 2019, 36(5):549-556.
- [15] LAHOUE F, THIS P, BOUQUET A. Identification of a co-dominant scar marker linked to the seedlessness character in grapevine[J]. Theoretical and Applied Genetics, 1998, 97(5):950-959.
- [16] CABEZAS J A, CERVERA M T, RUIZ- GARCÍA L, CARREÑO J, MARTÍNEZ-ZAPATER J M. A genetic analysis of seed and berry weight in grapevine[J]. Genome, 2006, 49(12):1572-1585.
- [17] OCAREZ N, JIMÉNEZ N, NÚÑEZ R, PERNIOLA R, MARSI-CO A D, CARDONE M F, BERGAMINI C, MEJÍA N. Unraveling the deep genetic architecture for seedlessness in grapevine and the development and validation of a new set of markers for *VviAGL11*-based gene-assisted selection[J]. Genes, 2020, 11(2):151.
- [18] BALDI P, BRUNAK S, CHAUVIN Y, ANDERSEN C A, NIELSEN H. Assessing the accuracy of prediction algorithms for classification: An overview[J]. Bioinformatics, 2000, 16(5):412-424.
- [19] VIHINEN M. How to evaluate performance of prediction methods? Measures and their interpretation in variation effect analysis[J]. BMC Genomics, 2012, 13(Suppl. 4):S2.
- [20] 陈豆豆, 关利平, 贺亮亮, 宋银花, 章鹏, 刘三军. 葡萄无核基因分子标记的通用性鉴定[J]. 中国农业科学, 2021, 54(22):4880-4895.
CHEN Doudou, GUAN Liping, HE Liangliang, SONG Yinhu, ZHANG Peng, LIU Sanjun. Commonality identification of molecular markers linked to seedless genes in grape[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2021, 54(22):4880-4895.
- [21] 刘琦瑛. 无核葡萄胚挽救影响因素研究与分子标记辅助选择[D]. 杨凌:西北农林科技大学, 2022.
LIU Qiying. Study on influencing factors of embryo rescue of seedless grape and marker assisted selection[D]. Yangling: Northwest A & F University, 2022.
- [22] 屈田田, 张剑侠, 骆强伟, 王跃进. 无核葡萄抗寒抗病胚挽救育种应用研究[J]. 果树学报, 2017, 34(2):157-165.
QU Tiantian, ZHANG Jianxia, LUO Qiangwei, WANG Yuejin. A study on the application of seedless grapevine breeding for cold-hardness and disease-resistance using embryo rescue[J]. Journal of Fruit Science, 2017, 34(2):157-165.
- [23] 朱瑜, 夏培蓓, 伍新宇, 蔡军社, 李宁, 彭银双, 罗淑萍. 木纳格葡萄胚挽救苗的获得及其无核性状分子鉴定[J]. 新疆农业大学学报, 2012, 35(1):22-24.
ZHU Yu, XIA Peibei, WU Xinyu, CAI Junshe, LI Ning, PENG Yinshuang, LUO Shuping. Acquisition of embryo rescue seedlings of Munake grape and identification of its seedless character molecular[J]. Journal of Xinjiang Agricultural University, 2012, 35(1):22-24.
- [24] RYAN F J, RAMMING D W. Application of a molecular marker for berry seed size to two populations of grapevines (*Vitis* sp.) developed in a breeding program[J]. HortScience, 2005, 40(4):1069.
- [25] 宣旭娴. 不同无核类型葡萄果实性状鉴定及其无核标记的评价、开发与应用[D]. 南京:南京农业大学, 2021.
XUAN Xuxian. Identification of fruit characters of different seedless grape types and evaluation, development and application of seedless markers[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2021.
- [26] AKKURT M, ÇAKIR A, SHIDFAR M, ÇELIKKOL B P, SÖYLEMEZOĞLU G. Using SCC8, SCF27 and VMC7f2 markers in grapevine breeding for seedlessness via marker assisted selection[J]. Genetics and Molecular Research, 2012, 11(3):2288-2294.
- [27] 王勇, 李玉玲, 孙锋, 伍国红, 骆强伟, 李超, 白世践, 郑贺云. 利用 SCAR 标记 SCF27 对葡萄无核性状的鉴定研究[J]. 分子植物育种, 2018, 16(4):1197-1207.
WANG Yong, LI Yuling, SUN Feng, WU Guohong, LUO Qiangwei, LI Chao, BAI Shijian, ZHENG Heyun. Seedless traits identification of grape (*Vitis vinifera*) by using SCAR makers SCF27[J]. Molecular Plant Breeding, 2018, 16(4):1197-1207.
- [28] 安栋梁. 葡萄无核性状 SSR 标记的验证及葡萄乙烯释放量全基因组关联分析[D]. 郑州:河南农业大学, 2018.
AN Dongliang. The verification of SSR markers for seedless trait and genome-wide association study of ethylene production in grape[D]. Zhengzhou: Henan Agricultural University, 2018.
- [29] 刁庶, 蒋川东, 田宝凤, 王春杰. 误差理论与数据处理课程综合性实验平台设计[J]. 吉林大学学报(信息科学版), 2023, 41(6):969-975.
DIAO Shu, JIANG Chuandong, TIAN Baofeng, WANG Chunjie. Design of comprehensive experimental platform for error theory and data processing[J]. Journal of Jilin University (Information Science Edition), 2023, 41(6):969-975.
- [30] ROY S, EZATI P, RHIM J W. Fabrication of antioxidant and antimicrobial pullulan/gelatin films integrated with grape seed extract and sulfur nanoparticles[J]. ACS Applied Bio Materials, 2022, 5(5):2316-2323.