

山葡萄种质资源 SSR 遗传多样性分析

温景辉^{1,2}, 申海林², 邹利人², 陈 蕾², 刘洪章¹

(1. 吉林农业大学 生命科学学院, 吉林 长春 130118; 2. 吉林省农业科学院 果树研究所, 吉林 公主岭 136100)

摘要: 对360份山葡萄种质资源进行了遗传多样性分析研究。从245对引物中筛选出18对用于供试材料的SSR扩增;单条引物扩增条带为4~13条,平均9.44条;扩增产物长度介于150~1 000 bp,以200~750 bp的扩增片段居多;18对引物共扩增出170条带,其中多态性条带167条,多态性百分率为98.2%;Shannon's多样性指数(I)为1.778051。某些品种(系)产生了特有SSR标记带,共5条,占2.95%。

关键词: 山葡萄;SSR;遗传多样性

中图分类号: S 663.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2011)14-0102-03

我国山葡萄(*Vitis amurensis* Rupr.)资源丰富,是酿造葡萄酒的主要原料,也是葡萄抗寒、抗病育种的优异种质资源^[1]。目前,有关山葡萄的遗传多样性研究主要集中在表型上,分子生物学的快速发展为葡萄资源在DNA水平上的研究提供了必要手段。SSR(Simple sequence repeat)即简单重复序列,具有多态性高、重复性好、共显性遗传、技术简单、特异性强等优点^[2]。SSR标记在分子辅助育种中有着重要作用^[3,4],已成为居群遗传学研究、种质资源鉴定、亲缘关系分析和图谱构建首选的分子标记之一^[5-7]。

该研究以国家山葡萄资源圃现存的360份山葡萄种质为材料,采用SSR分子标记技术,研究山葡萄种质资源遗传多样性,旨在为我国山葡萄种质资源的进一步收集、鉴定和创新利用等提供科学依据。

1 材料与试验方法

1.1 试验材料

试验材料为360份山葡萄种质资源,取自于中国农科院左家特产研究所山葡萄资源圃和吉林省农业科学院果树所葡萄圃。选取树势健壮、生长良好的新梢幼嫩叶片,每品种取10~15片叶,擦拭叶面灰尘,按品种分别装入预先编号的塑封袋内,放入冰壶带回实验室,即进行DNA提取。

1.2 引物

用于SSR-PCR反应的18对引物是根据加拿大哥伦比亚大学公布的序列设计,由上海生物工程公司合

成,每对引物合成20D,-20℃冰箱保存备用。所用引物序列及退火温度见表1。

1.3 山葡萄基因组DNA的提取及扩增产物检测

采用王军改良CTAB方法^[8]进行山葡萄叶片基因组DNA提取。PCR扩增产物用6%聚丙烯酰胺凝胶电泳,银染检测。

表1 18对引物序列及退火温度

Table 1 Sequence and annealing temperature of 18 primers

引物名称 Primer name	序列 Sequence	退火温度 Annealing temperature/℃
Vmc9a2.1-23	F: AGCTCGGCTAGCTGCAAAATG; R: ACCCTTCCTCTCAAAACCC	66
VVMD31	F: CAGTGG TTTTCTTAAAGTTCAAGG; R: CTCTGTGAAAGAGGAAGAGACGC	56
VVMD19-48	F: TGAAATATCATCAATGCTCTCTCTCC; R: GGTGATATGCTTCCTTTTCCC	56
UDV-017-113	F: TTTTGTGGAAGCTTCATGGAAG; R: AATGGCATTAAAGCTTTTCCG	56
UDV-025-121	F: GGATAAATGCTTGTCTGTCG; R: TGGCCCTTATATCATAGATGTGT	56
UDV-033-128	F: TTGTCCCTTTT TAGCTCAATG; R: TCTGCATAAGGGGTGATTAAGA	56
UDV-048-140	F: GCACCTG TGTGTGCACTCT; R: CCTTCTCACAACCAACTC	56
UDV-050-141	F: TAATGGCCCTTACAACAGC; R: AGCTTCACTGCCAAAGGATG	56
UDV-054-144	F: TGCCAATGGTTGACAAGATG; R: CTGGGACATGTAAGCAATCG	56
UDV-059-148	F: GAAGCATTT CAGTTGGTGTAGG; R: CCCATCAAGCATT TTTGTGC	56
UDV-060-149	F: CCTGCCACACCAATAGAA; R: TGGGGTAAAACTGGGTGTTT	56
UDV-067-155	F: TCATGGACTCACAATCTCAAA; R: TGACTGGATGAAGGACAGTTTC	56
UDV-088-169	F: CCATGCACACACGCACAT; R: CCACCAAACAAGTGGAGGTT	56
UDV-134-208	F: CTAAGAAAG AATG TTTGAGTGAAA; R: GGCTAGCCAAC TTTTAAACTA	51
VMC6f1-213	F: AAGGAGGACTTGAGATG TAGTA; R: GAGTAAGAGAGAAGCAAGAAA	59
VVS29-216	F: CCCCAGGCTCTGAAAACAAT; R: TGCAAAGCAAATAAAGCTTCCA	58
VMC7b1-219	F: CACGCAATCTCATTT CACAAA; R: TGGTTTAGG TGACCAAACCTTTA	61
VMC7b3-229	F: TCAGATATGGAAGAACACCACA; R: ACTAGAAAATGCACAATCTCCC	61

第一作者简介: 温景辉(1963-),男,在读博士,研究员,现主要从事葡萄栽培与育种工作。E-mail: wj51777@126.com。

责任作者: 刘洪章(1957-),男,博士,教授,现从事生物技术研究工作。E-mail: lh2999@126.com。

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项资金资助项目

(nycytx-30)。

收稿日期: 2011-04-19

1.4 分子标记方法

采用了 SSR 标记技术进行遗传多样性分析^[9]。采用 20 μ L 反应体系, 其中: 1 \times PCR Buffer, 引物 0.3 μ mol/L, 模板 DNA 30 ng, dNTP 0.2 mmol/L, *Taq* DNA 聚合酶 1.0 U。PCR 扩增反应在美国 PE 公司生产的 PTC-100 基因扩增仪上进行。扩增程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min, 95 $^{\circ}$ C 变性 40 s, 50~66 $^{\circ}$ C 退火 40 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 60 s, 35 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。

每对 SSR 引物检测 1 个位点, 根据条带的有无统计所有二元数据, 每个标记位点以 1 和 0 记录等位基因的有和无, 有带记为 1, 无带记为 0, 缺失值记为 9。用 NYSYS-pc2.10e 统计软件对数据进行分析, 按 Jaccard 公式计算品种间的相似系数, 以非加权类平均法(UPGMA)进行聚类分析并建立树状图。将从 SSR 标记中得到的原始数据输入计算机, 通过 Excel 电子表格计算各参数。

1.5 遗传多样性评价参数

选择等位基因数、等位基因频率(q_i)、有效等位基因数(A_e)、Shannon's 多样性信息指数(I)等指标评价遗传多样性^[9]。

公式:

有效等位基因数(A_e):

$$A_e = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n 1 / \left(\sum_{j=1}^{m_i} q_{ij}^2 \right);$$

Shannon's 多样性信息指数(I):

$$I = - \frac{\sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^{m_i} q_{ij} \ln q_{ij}}{n};$$

其中, q_{ij} 是第 i 个性状第 j 个等位基因的频率; m_i 是第 i 个性状等位基因的数目; n_i 第 i 个位点分子标记基因型的种数, n 是分析的分子标记位点数。

2 结果与分析

2.1 群体内遗传多样性分析

从 245 对引物中筛选出 18 对用于葡萄材料的 SSR 扩增, 扩增的谱带清晰, 多态性丰富。单条引物扩增的条带为 4~13 条, 平均 9.44 条。扩增产物长度介于 150~1 000 bp, 以 200~750 bp 的扩增片段居多。扩增条带数最少的引物为 VVS29-216, 扩增条带为 4 条; 扩增条带数最多的引物为 UDV-017, 达 13 条。18 对引物共扩增出 170 条带, 其中多态性条带 167 条, 多态性百分率为 98.2%(表 2)。可见, SSR 标记检测葡萄遗传多样性的效率很高。

360 份山葡萄种质资源的平均等位基因频率(q_i) 为 0.106169, 有效等位基因数(A_e) 为 5.240862, Shannon's 多样性指数(I) 为 1.778051, 表明山葡萄种质资源的遗传多样性较为丰富。

表 2 18 对引物扩增总带数及多态性

Table 2 The total number of bands and polymorphism of 18 primers

引物名称 Primer name	扩增总带数 Total bands	多态性带数 Number of polymorphic bands	多态百分率 Percentage of polymorphism/%
Vmc9a2.1	12	12	100
VVMD31	10	10	100
VVMD19	5	5	100
UDV-017	13	13	100
UDV-025	9	9	100
UDV-033	11	11	100
UDV-048	10	10	100
UDV-050	12	11	90
UDV-054	12	12	100
UDV-059	10	10	100
UDV-060	7	7	100
UDV-067	9	9	100
UDV-088	10	10	100
UDV-134	8	8	100
VMC6f1	9	9	100
VVS29	4	3	75
VMC7b1	8	7	87.5
VMC7b3	11	11	100
平均	9.44	9.28	98.2

2.2 山葡萄种质的特有 SSR 标记

在 SSR-PCR 扩增中, 有的品种(系)产生了特有带, 可作为重要的分子性状用于品种鉴定。360 份供试材料中, 特有条带共 5 条, 占 2.95%。其中, VVMD31 引物在‘左红一’、‘75-1-104’、‘74002’上各产生 1 条特有带; UDV-017 引物在‘73132’上产生 1 条特有带; UDV-050 引物在‘友 35-9-2 ϕ ’上产生 1 条特有带(表 3)。

表 3 360 份山葡萄种质的特有 SSR 标记

Table 3 SSR specific marks of 360 *V. amurensis* Rupr.

gemplasm resources			
引物名称 Primer name	材料 Material	特有带数目 Number of specific bands	特有带片段大小 Fragment size/bp
VVMD31	左红一	1	1 000
VVMD31	75-1-104	1	800
VVMD31	74002	1	500
UDV-017	73132	1	300
UDV-050	友 35-9-2 ϕ	1	500

3 讨论

山葡萄种质资源的遗传多样性研究是葡萄物种起源进化、优异基因资源挖掘、育种材料改良的工作基础^[10-11]。育种资源的遗传多样性信息获取可以通过多种途径, 如早期的形态鉴定、生化测试等, 但这些传统方法难以准确揭示材料间的遗传差异。SSR 分子标记技术具有信息量大、效率高、共显性、不受环境限制和影响等特点, 标记范围一般可覆盖整个基因组, 已广泛用于葡萄的遗传多样性分析^[12-13]。该研究利用了高效稳定的 18 对 SSR 引物, 对 360 个山葡萄品种(系)进行扩增, 共产生了 170 条扩增带, 其中多态性带有 167

条,占扩增总带数的 98.2%, Shannon's 多样性指数为 1.778051,在 SSR-PCR 扩增中,有的品种(系)产生了特有带,可作为重要的分子性状用于品种鉴定,360 份供试材料中,特异性条带有 5 条,占 2.95%。可见,SSR 检测山葡萄遗传多样性的效率很高,是山葡萄品种(系)间系谱关系分析、品种鉴定的有效工具。

我国山葡萄种质具有丰富的遗传多样性,在以往山葡萄育种过程中利用较多的亲本有吉林省野生种质‘双庆’、‘左山一’、‘左山二’等,对其它山葡萄种质资源的发掘利用还相对较少,建议在今后的葡萄育种工作中应扩大亲本选择范围,加大优异种质资源的选择力度,以丰富我国的葡萄种质资源,加速育种进程。

4 结论

山葡萄种质资源的多态性百分率为 98.2%, Shannon's 多样性指数(I)为 1.778051,某些品种(系)产生了特有的 SSR 标记带。表明我国山葡萄种质资源的遗传多样性较为丰富,也表明 SSR 标记技术检测山葡萄遗传多样性的效率很高,是山葡萄品种(系)间系谱关系分析、品种鉴定的一个有效工具。

参考文献

- [1] 沈育杰,赵淑兰,杨义明等.我国山葡萄种质资源研究与利用现状[J].特产研究,2006(3):53-57.
[2] 蒋彩虹,王元英,孙玉合.SSR 和 ISSR 标记技术应用进展[J].中国烟草科学,2007,28(2):1-5.

- [3] Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genomic finger printing by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification[J]. Genomics, 1994, 20: 176-183.
[4] 王华忠,吴则东,王晓武,等.利用 SRAP 与 SSR 标记分析不同类型甜菜的遗传多样性[J].作物学报,2008,34(1):37-46.
[5] 朱英,陶刚,刘作易.SSR 分子标记的发展及其在动植物遗传育种中的应用[J].贵州农业科学,2006,34(增刊):93-95.
[6] 刘峰,东方阳,邹继军,等.应用微卫星标记进行大豆种质多样性和遗传分析[J].遗传学报,2000,27(7):628-633.
[7] 郭瑞星,刘小红,荣廷昭,等.植物 SSR 标记的发展及其在遗传育种中的应用[J].玉米科学,2005,13(2):8-11.
[8] 王军,贺普超.山葡萄基因组 DNA 提取及 RAPD 鉴定[J].果树科学,2000,17(2):79-82.
[9] 徐海明.种质资源核心库构建方法的研究及其应用[D].杭州:浙江大学,2005.
[10] 吴子龙.山葡萄种质遗传多样性的 SSR 分析及核心种质初步构建[D].哈尔滨:东北林业大学,2007.
[11] 刘闯萍,王军,沈育杰,等.山葡萄资源核心种质的初步构建[J].植物遗传资源学报,2008,9(3):372-374.
[12] Scott K D, Egger P, Seaton G, et al. Analysis of SSRs derived from grape ESTs[J]. Theor Appl Genet, 2000, 100: 723-726.
[13] 刘闯萍,王军.SSR 标记及其在葡萄上的应用[J].果树学报,2008,25(1):93-101.

(致谢:感谢中国农业科学院特产研究所、东北林业大学林学院林木遗传育种重点实验室和中国农业大学王军教授提供部分试验材料和实验指导等帮助。)

Analysis of Genetic Diversity of *Vitis amurensis* Rupr. Germplasm Resources

WEN Jing-hui^{1,2}, SHEN Hai-lin², ZOU Li-ren², CHEN Lei², LIU Hong-zhang¹

(1. College of Life Sciences Jilin Agricultural University, Changchun, Jilin 130118; 2. Research Institute of Pomology, Jilin Academy of Agricultural Sciences, Gongzhuling, Jilin 136100)

Abstract: The analysis of genetic diversity of 360 *Vitis amurensis* Rupr. germplasm resources was conducted in the paper. 18 pairs of primers were selected from 245 primers for SSR amplification. A single primer amplified 4~13 bands, average 9.44. Amplified product length was between 150~1 000 bp, and the fragments of 200~750 bp were majority. 18 pairs of primers amplified 170 bands totally, and 167 bands were polymorphic. The polymorphic percentage was 98.2% and the Shannon's diversity index (I) was 1.778051. Some materials produced some unique bands in 360 *Vitis amurensis* Rupr. germplasm resources. A total of five unique bands were detected, accounting for 2.95%.

Key words: *Vitis amurensis* Rupr.; SSR; genetic diversity