

# 基于 SSR 技术对七十五份栽培葡萄品种的鉴定研究

李雪雁, 梁海永, 宪立杰, 杨敏生

(河北农业大学, 河北省林木种质资源与森林保护重点实验室, 河北 保定 071000)

**摘 要:**以 75 份葡萄栽培品种为试材, 采用 SSR 分子标记技术, 研究建立一套适合于葡萄 DNA 指纹图库构建的技术体系, 为葡萄种质资源的鉴定和亲缘关系分析提供依据。结果表明: 选用 19 对核心引物, 共扩增出 89 个多态性位点, 利用 DPS 软件, 对其进行聚类分析, 75 份葡萄种质的遗传相似系数在 0.028 3~0.887 3, 平均遗传相似系数为 0.475 39。依据用途, 初步分为鲜食葡萄和酿酒葡萄两大类, 并根据品种来源, 大致分为了欧美杂种、美洲杂种和欧亚种。

**关键词:**葡萄; SSR 标记; 聚类分析

**中图分类号:**S 663.102.4 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)13-0115-05

葡萄 (*Vitis vinifera*) 属葡萄科 (Vitaceae) 葡萄属 (*Vitis* L.) 落叶藤本植物, 是世界最古老的植物之一。葡萄原产于欧洲、西亚和北非一带, 在中国长江流域以北各地均有栽培, 主要产于新疆、甘肃、山西、河北、山东等地。葡萄的用途广泛, 可以鲜食、酿酒、药用及提取色素等。生产实践证明, 优良品种对葡萄增加产量和改善品质起着至关重要的作用<sup>[1]</sup>。选用优良葡萄树品种是生产的基础, 同时, 培育和种植新品种也是生产可持续发展的有效途径。现在, 我国葡萄育种研究和生产经营

开始向商业化转移, 越来越多的企业与集体投资产业。由于葡萄新品种蕴涵着巨大的经济利润, 在品种归属上, 侵权行为越来越严重, 产权纠纷案件频发, 极大地损害了消费者与育种者的利益, 影响了农业生产和经济秩序。因此, 建立一套准确、快捷的有关葡萄品种真伪等相关鉴定的检测体系势在必行<sup>[2-10]</sup>。

该研究以 75 份葡萄品种为材料, 通过筛选主带清晰、稳定性好、分布均匀且尽可能少的 SSR 标记, 用于构建葡萄品种的 DNA 指纹库, 利用 Data Processing System 软件对所得数据进行分析, 对其进行聚类分析, 以期有效利用 SSR 标记评价葡萄种质资源遗传多样性及亲缘关系提供理论依据, 为如今的品种侵权案件提供科学依据, 对葡萄育种、种质资源管理及其保护具有重要意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

2011 年 5 月在郑州果树研究所国家果树种质

**第一作者简介:**李雪雁(1989-), 女, 硕士研究生, 现主要从事树木分子标记及葡萄和梨等指纹图库的建立等研究工作。E-mail: 853464281@qq.com.

**责任作者:**梁海永(1973-), 男, 本科, 副教授, 硕士生导师, 现主要从事林业生物技术等研究工作。

**基金项目:**国家林业局林业公益性行业科研专项资助项目(201104039)。

**收稿日期:**2015-01-19

**Abstract:** Using twenty materials in ornamental kale (*Brassica oleracea* L. var. *acephala* DC.) as material, using microspore culture, influence factors of embryogenesis, plant regeneration and the subculture of multiple shoots were studied systematically. The results showed that the genotype was one of the most important factors to embryogenesis. Fifteen genotypes produced embryos with a seventy-five percent induction ratio. The optimal sucrose concentration was also associated with genotypes. In different genotypes, the best ratio of 6-BA and NAA was 1 : 1 or 2 : 1. Compared with B<sub>5</sub> medium, MS was better in plant regeneration. The best subculture duration shoots was 15 days with an average propagation coefficient of 10.3.

**Keywords:** *Brassica oleracea* L. var. *acephala* DC. ; microspore; embryogenesis; plant regeneration; propagation

(郑州)葡萄圃收集了75个葡萄品种。采取顶端嫩叶,分别用封闭的塑料袋包装,保存在冰盒中,及时送回实验室,−80℃超低温冰箱中保存,整个试验在河北农业大学林学院林木育种实验室完成。供试材料见表1。

## 1.2 试验方法

1.2.1 DNA的提取方法 采取改良的CTAB法提取DNA。取200 mg新鲜干净葡萄叶片于1.5 mL离心管中,做好标记,加液氮迅速研磨成粉末,加入1 000  $\mu\text{L}$  预

处理液,充分混匀,离心去上清,再加入1 000  $\mu\text{L}$  预处理液,如此反复预处理3次。去除存在于细胞质中的糖和多酚类杂质,收集细胞核。

1.2.2 DNA样品纯度和浓度检测 用重蒸水做空白对照,取1  $\mu\text{L}$  DNA原液于紫外分光光度计上测定波长260、280 nm的吸光值及DNA浓度,将符合要求的DNA样品用双蒸水稀释成浓度为50 ng/ $\mu\text{L}$ 备用。

表1

供试材料

Table 1

Grape cultivars used in this study

序号 No.	名称 Name	N 倍体 N ploidy	品种来源 Full source	果实用途 Fruit uses	序号 No.	名称 Name	N 倍体 N ploidy	品种来源 Full source	果实用途 Fruit uses
1	尼加拉	二倍体	欧美杂种	鲜食	39	阿拉卡其	二倍体	欧亚种	鲜食
2	罗曼尔	二倍体	欧美杂种	鲜食	40	阿克塔那衣	二倍体	欧亚种	鲜食
3	玫瑰后	二倍体	欧美杂种	鲜食	41	阿可达依	二倍体	欧亚种	鲜食
4	美洲白	二倍体	欧美杂种	鲜食	42	底拉哥	二倍体	欧亚种	鲜食
5	吉峰	二倍体	欧美杂种	鲜食	43	红萨福尔克	二倍体	欧美杂种	鲜食
6	田野黑	二倍体	欧美杂种	鲜食	44	巴士	二倍体	欧美杂种	鲜食
7	田野红	二倍体	欧美杂种	鲜食	45	爱欧娜	二倍体	欧美杂种	鲜食
8	斯蒂本	二倍体	欧美杂种	鲜食	46	惠	二倍体	欧亚种	鲜食
9	玫瑰怡	二倍体	欧美杂种	鲜食	47	琥珀	二倍体	欧美杂种	鲜食
10	秋蜜	二倍体	欧美杂种	鲜食	48	阪琢	二倍体	欧美杂种	鲜食
11	茉莉香	二倍体	欧美杂种	鲜食	49	斯立潘	二倍体	欧美杂种	鲜食
12	早康可	二倍体	欧美杂种	鲜食	50	黑×国	二倍体	欧美杂种	鲜食
13	二伯娜	二倍体	欧美杂种	鲜食	51	蓓蕾玫瑰	二倍体	欧美杂种	鲜食
14	秀特玫瑰	二倍体	欧美杂种	鲜食	52	大阪	二倍体	欧美杂种	鲜食
15	阿特巴格	二倍体	欧亚种	鲜食	53	弗列奥	二倍体	欧亚种	酿酒
16	郑康1号	二倍体	欧美杂种	鲜食	54	伏罗希	二倍体	欧亚种	酿酒
17	黑虎香	二倍体	美洲杂种	鲜食	55	浮德卡别涅	二倍体	欧亚种	酿酒
18	早熟黑虎香	二倍体	美洲杂种	鲜食	56	福司令	二倍体	欧亚种	酿酒
19	哈佛德	二倍体	欧美杂种	鲜食	57	盖北塞	二倍体	欧亚种	酿酒
20	阿克塔那	二倍体	欧亚种	鲜食	58	盖吾沙	二倍体	欧亚种	酿酒
21	香槟	二倍体	美洲杂种	鲜食	59	甘桑	二倍体	欧亚种	酿酒
22	一品香	二倍体	欧美杂种	鲜食	60	高尔丹	二倍体	欧亚种	酿酒
23	阿富汗	二倍体	欧亚种	鲜食	61	戈定	二倍体	欧亚种	酿酒
24	阿芳	二倍体	欧亚种	鲜食	62	达拉依	二倍体	欧亚种	酿酒
25	阿达玫瑰	二倍体	欧亚种	鲜食	63	哪露丝	二倍体	欧亚种	酿酒
26	阿古西	二倍体	欧亚种	鲜食	64	赤霞珠	二倍体	欧亚种	酿酒
27	卡托巴	二倍体	欧美杂种	鲜食	65	大黑葡萄	二倍体	欧亚种	酿酒
28	歌德	二倍体	欧美杂种	鲜食	66	杜马	二倍体	欧亚种	酿酒
29	笛吹	二倍体	欧美杂种	鲜食	67	大宛红	二倍体	欧亚种	酿酒
30	罗也尔玫瑰	二倍体	欧美杂种	鲜食	68	法国兰	二倍体	欧亚种	酿酒
31	紫玉	二倍体	欧美杂种	鲜食	69	粉红万特灵	二倍体	欧亚种	酿酒
32	高砂	二倍体	欧美杂种	鲜食	70	粉红西万尼	二倍体	欧亚种	酿酒
33	白玫瑰	二倍体	欧美杂种	鲜食	71	格兰月	二倍体	欧亚种	酿酒
34	紫珍香	二倍体	欧美杂种	鲜食	72	哥劳万纳	二倍体	欧亚种	酿酒
35	紫水晶	二倍体	欧美杂种	鲜食	73	格费考那立	二倍体	欧亚种	酿酒
36	郑巨2号	二倍体	欧美杂种	鲜食	74	粉红尤拉皮	二倍体	欧亚种	酿酒
37	金玫瑰	二倍体	欧美杂种	鲜食	75	多米纳	二倍体	欧亚种	酿酒
38	阿米利亚	二倍体	欧美杂种	鲜食					

1.2.3 PCR反应体系和扩增程序 PCR反应在10  $\mu\text{L}$  体系中:5  $\mu\text{L}$  2×Taq MasterMix,0.5  $\mu\text{L}$  Forward Primer,

0.5  $\mu\text{L}$  Reverse Primer,1  $\mu\text{L}$  Template DNA,3  $\mu\text{L}$  RNase-Free Water。PCR扩增程序的条件为:95℃ 5min;94℃

1min,50~55℃ 1min,72℃ 1min,30 个循环,72℃ 延伸 7min,4℃ 保存。

1.2.4 引物筛选 SSR 引物根据 genotyping 报道的葡萄引物序列由上海生工生物技术有限公司合成。选用了 19 对葡萄基因组 SSR 引物,以 20 个葡萄基因组 DNA 为模板,按照优化的 SSR 反应程序,筛选多态性稳定且丰富的 SSR 引物。19 对 SSR 引物均匀地分布在葡萄基因组的 19 对染色体上,由上海生物工程有限公司合成。

1.2.5 聚丙烯酰胺凝胶电泳 PCR 产物用扩增产物在 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶中电泳分离,对谱带做好记录、统计。

1.3 数据分析

将 SSR 分子标记统计基因型转化为 0-1 数据,利用 DPS v3.01 采用类平均法对 0-1 数据聚类分析计算葡萄两两品种间的遗传相异系数,列出相异系数矩阵。

2 结果与分析

2.1 SSR 引物多态性

利用筛选出的 19 对引物对 75 份葡萄材料进行扩增,获得 89 个等位基因(表 2),不同引物扩增的等位基因数 2~10 个不等,平均每个位点 5 个等位基因。

表 2 19 对引物对 75 份葡萄材料的扩增结果

Table 2 Amplified results of 75 grape cultivars with 19 SSR primers

序号 No.	引物 Primer	扩增条带 Amplified bands	多态性条带 Polymorphic bands	多态性条带的比例 Proportion of polymorphic bands/%
1	Vchr1a	5	5	100
2	Vchr2b	6	6	100
3	Vchr3a	5	5	100
4	Vchr4a	2	2	100
5	Vchr5c	2	2	100
6	VChr6a	7	7	100
7	VChr7b	2	2	100
8	VChr8a	4	4	100
9	VChr9a	7	7	100
10	VChr10b	5	5	100
11	VChr11a	6	6	100
12	VChr12a	2	2	100
13	VChr13a	5	5	100
14	VChr14b	5	5	100
15	VChr15a	7	7	100
16	VChr16b	3	3	100
17	VChr17c	3	3	100
18	VChr18a	10	10	100
19	VChr19a	3	3	100
总计		89	89	100

由表 2 可以看出,扩增带数最多的为 VChr18a 引物,平均 10 条扩增带,最少的为 Vchr4a、Vchr5c、VChr7b 和 VChr12a 引物,平均 2 条扩增带。在扩增出的 89 个条带中,多态性条带 89 个,多态性条带的百分率为 100%,这充分表明了葡萄基因组 DNA 的多态性,从而说明了不同供试材料之间的遗传差异。

2.2 75 份葡萄品种遗传相似性及聚类分析

试验结果表明,遗传相似系数在 0.028 3~0.887 3,平均遗传相似系数为 0.475 39。数据表明这 75 份葡萄品种间相异系数变化大,能较好的反映各葡萄品种间的差异,说明选取材料具有代表性。

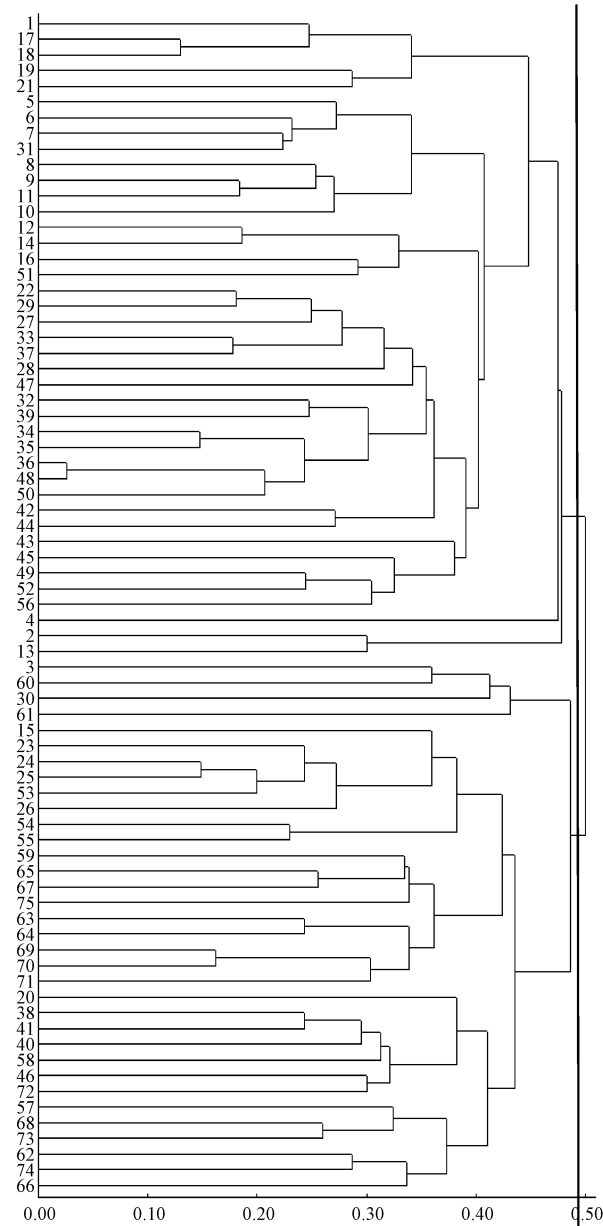


图 1 75 份葡萄品种的聚类分析树状图

Fig. 1 Dendrogram of grape cultivars based on SSR data

通过观察聚类图(图 1)可以发现,在遗传距离大约为 0.49 处可将 75 份葡萄分为两大类,第一大类主要为 35 份欧美杂种的鲜食葡萄,3 份美洲杂种的黑虎香鲜食葡萄系列和 3 份欧亚种葡萄;另一类则为 31 份欧亚种葡萄(其中 9 份为鲜食葡萄,22 份为酿酒葡萄)和 3 份欧美杂种玫瑰后鲜食葡萄系列。

### 2.3 52 份鲜食葡萄品种遗传相似性及聚类分析

对鲜食葡萄共 52 份葡萄品种进行聚类分析,由图 2 可知,遗传相似系数在 0.028 6~0.593 4,平均遗传相似系数为 0.326 1,以平均相异系数 0.47 为尺度,52 份葡萄品种可以分为 5 类,A 组为 2 个玫瑰品种;B 组为美洲白品种;C 组为罗曼尔和二伯娜品种;以上 3 组均为欧美杂种。D 组为 9 个欧亚种和 2 个欧美杂种;E 组为 3 个黑虎香系列的美洲杂种,2 个欧亚种和 31 个欧美杂种。说明我国葡萄种质资源中欧亚种、欧美杂种存在明显的区别。在整个鲜食葡萄品种中,整体的相异系数并不高,也说明了优良性状的育种目标导致葡萄遗传背景变窄,而在育种中大力拓宽遗传基础是葡萄育种的重要任务。

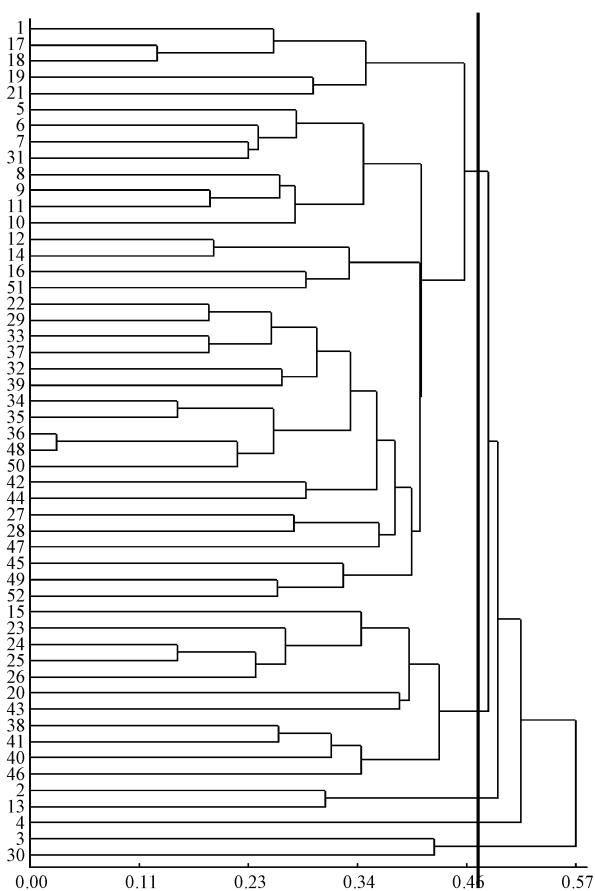
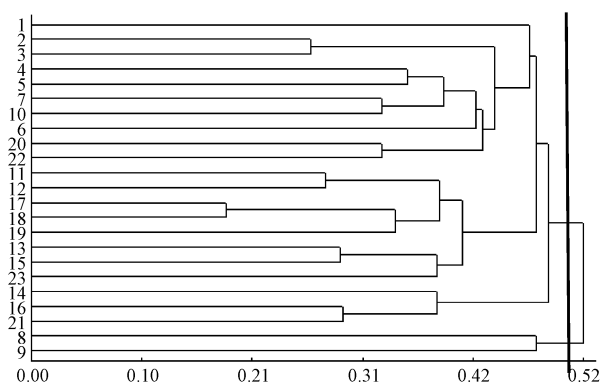


图 2 52 份鲜食葡萄品种的聚类分析树状图

Fig. 2 Dendrogram of 52 table grape cultivars based on SSR data

### 2.4 23 份酿酒葡萄品种遗传相似性及聚类分析

对酿酒葡萄共 23 份葡萄品种进行聚类分析,由图 3 可知,遗传相似系数在 0.196 7~0.560 9,平均遗传相似系数为 0.402 8,以平均相异系数为 0.5 为尺度,23 份葡萄品种可以分为 2 类,A 组高尔丹与戈定品种,最先聚为一类;B 组包含品种数量较多,均是欧亚种葡萄。



注:图中 1~23 编号与表 1 的 53~75 编号对应。

Note: 1~23 in figure code with that of the 53~75 Numbers in table 1.

图 3 23 份酿酒葡萄品种的聚类分析树状图

Fig. 3 Dendrogram of 23 wine grape cultivars based on SSR data

## 3 讨论

葡萄种群的形成与其起源的地理气候特征密切相关,地理因素和不同生态条件是形成物种分化的最直接原因。而种群的划分主要是以地理分布和一些表型性状为依据。利用 RFLP、RAPD、AFLP、ISSR 等分子标记技术进行葡萄品种鉴定、分析种质间的遗传多样性、品种间的亲缘关系等方面已有较多的报道应用。SSR 标记进行葡萄种群间亲缘关系的研究也有些报道,多数利用的随机的 SSR 标记位点<sup>[2-3]</sup>。方连玉等<sup>[4]</sup>利用 SSR 标记对 15 份葡萄种质进行了遗传多样性分析,将 15 份葡萄材料分为两大类群。第一类为 7 份山葡萄资源和 2 个山欧杂交品种,第二类包含 3 个欧亚种品种、2 个欧美杂种品种和 1 个美洲杂种品种,说明了欧亚种与美洲种之间亲缘关系较近。温景辉等<sup>[5]</sup>利用 SSR 标记对 20 份葡萄材料进行了基因组多态性分析,从 245 对引物中筛选出 19 对用于葡萄的 SSR 扩增。共扩增出 144 条带,均为多态性条带,多态性百分率为 100%。通过 UPGMA 进行聚类分析,在遗传相似系数 0.665 处,20 份葡萄材料可分为四大类群。第一类包含欧洲葡萄、美洲种群的种间杂种和欧美杂种;第二类包含我国南方野生资源刺葡萄、毛葡萄、复叶葡萄、菱状叶葡萄、蓼萼葡萄和华东葡萄;第 3 类为山欧杂种;第 4 类为山葡萄,山葡萄与欧亚种、美洲杂种的亲缘关系较远,欧亚种与美洲种之间

亲缘关系较近。

该研究采用不同染色体上的 SSR 位点对 75 个葡萄品种的遗传多样性进行了分析,共扩增出 89 条带,均为多态性条带,多态性百分率为 100%。也证明了所采用引物具有很高的多态性水平,而且均匀分布。该研究根据扩增结果将参试的 75 个品种聚类,通过观察聚类图(图 1)可以发现,在遗传距离大约为 0.49 处可将 75 份葡萄分为两大类,第一大类主要为 35 份欧美杂种的鲜食葡萄,3 份美洲杂种的黑虎香鲜食葡萄系列和 3 份欧亚种葡萄;另一类则为 31 份欧亚种葡萄(其中 9 份为鲜食葡萄,22 份为酿酒葡萄)和 3 份欧美杂种玫瑰后鲜食葡萄系列。通过对果皮颜色的分析,发现美洲杂种多为紫色,欧亚种多为黄绿色,欧美杂种果皮颜色则比较丰富,既有紫色、黄绿色,也有红色的品种。分别对鲜食葡萄和酿酒葡萄进行聚类分析,其中鲜食葡萄类,大致将欧亚种和欧美杂种区分开,说明我国葡萄种质资源中欧亚种、欧美杂种存在明显的区别,在育种过程中,也存在追求欧美杂种、欧亚种杂交种的存在,酿酒葡萄类发现其整体的遗传相似系数并不高,也说明了优良性状的育种目标导致葡萄遗传背景变窄,而在育种中大力拓宽遗传基础是葡萄育种的重要任务。

## 参考文献

- [1] 刘鑫铭. 葡萄种质表型遗传多样性分析及初级核心种质构建[D]. 洛阳:河南科技大学,2010.
- [2] 张立平. 葡萄属 RAPD 分类研究[J]. 园艺学报,1998,25(2):191-194.
- [3] 张立平,林伯年,沈德绪,等. 葡萄属植物核糖体基因的 RFLP 分析[J]. 园艺学报,1997,24(4):385-387.
- [4] 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.
- [5] 温景辉,申海林,邹利人,等. 20 份葡萄种质亲缘关系的 SSR 分析[J]. 果树学报,2011,28(5):782-786.
- [6] 蔡斌,李成慧,姚泉洪,等. 葡萄全基因组 SSR 分析和数据库构建[J]. 南京农业大学学报,2009,32(4):28-32.
- [7] Adam-Blondon A F,Roux C,Claux D,et al. Mapping 245 SSR markers on the *Vitis vinifera* genome;a tool for grape genetics[J]. Theor Appl Genet, 2004,109(5):1017-1027.
- [8] Thomas M R,Scott N S. Microsatellite repeats in grapevine reveal DNA polymorphisms when analyzed as sequence-tagged sites(STSs)[J]. Theor Appl Genet,1993,86(6):985-990.
- [9] 姚玉新,左方梅,翟衡,等. ‘蛇龙珠’等酿酒葡萄品种的 DNA 分析[J]. 园艺学报,2005,32(4):604-608.
- [10] Scott K D,Eggle P,Seaton G,et al. Analysis of SSRs derived from grape ESTs[J]. Theoretical and Applied Genetics,2000,100(5):723-726.

## Identification of SSR in 75 Cultivated Grape Varieties

LI Xueyan,LIANG Haiyong,XIAN Lijie,YANG Minsheng

(Key Lab of Genetic Resources of Forest and Forest Protection of Hebei Province,Hebei Agricultural University,Baoding,Hebei 071000)

**Abstract:** In this experiment,75 parts of grape cultivars were selected as test materials,using SSR molecular markers to study the establishment of a suitable grape DNA fingerprinting technology to build library system for the identification and genetic relationship grape germplasm resources,to provide the basis for analysis. The results showed that the choice of 19 pairs of core primers were amplified 89 polymorphic loci by DPS software,its cluster analysis,75 parts of the grape germplasm genetic similarity coefficient 0.028 3—0.887 3 average genetic similarity coefficient was 0.475 39. According to use,initially divided into table grape and wine grape into two categories,depending on the variety and origin,divided into the European and American hybrids,American hybrids and Eurasian species.

**Keywords:** grape;simple sequence repeat makers;cluster analysis