

基于 SSR 分子标记的葡萄品种遗传多样性分析

郭印山, 牛早柱, 石广丽, 郭 权, 薛瑞媛, 郭修武

(沈阳农业大学 园艺学院, 辽宁 沈阳 110866)

摘 要:以 15 份葡萄品种为试材, 采用 SSR 分子标记技术, 研究了 15 份葡萄品种资源的遗传多样性。结果表明:从 245 对引物中筛选出 49 对清晰、稳定性好的多态性引物。49 对引物在 15 份材料中共扩增出 235 条带, 均为多态性条带, 多态性百分率为 100%。每对引物扩增的等位点数为 2~9 个, 相似性系数分析结果表明, 供试的 15 份葡萄材料的遗传相似系数为 0.660~0.860, 其平均遗传相似系数为 0.760。聚类分析表明, 在遗传相似系数 0.672 处, 15 份葡萄材料可分为三大类群。第一大类包括 2 份欧美杂种(*V. vinifera* L. × *V. labrusca* L.) 和 1 份美洲种(*V. labrusca* L.) 品种; 第二大类为 8 份欧亚种(*V. vinifera* L.) 葡萄品种; 第三大类包括 2 份山欧杂种(*V. amurensis* Rupr. × *V. vinifera* L.) 和 2 份山葡萄(*V. amurensis* Rupr.) 品种。可见, 欧亚种和美洲种葡萄亲缘关系相对较近, 而山葡萄与二者亲缘关系相对较远。这些引物中, VMC-NG4B9、VMC3G9 能将 15 个葡萄品种区分开, 为今后开展葡萄品种指纹图谱构建奠定基础。

关键词:葡萄; SSR; PCR; 聚类分析; 亲缘关系

中图分类号:S 663.103.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)07-0089-04

葡萄属葡萄科葡萄属多年生落叶藤本植物, 是当今世界重要的果树作物, 是仅次于柑橘的世界第二大水果。除用作鲜食外, 还可用于酿酒、制汁, 具有较高的经济价值和社会价值。目前全世界保存的葡萄资源估计约为 5 000~15 000 个品种^[1], 仅我国葡萄种质资源圃中保存就有约 2 000 份^[2]。研究葡萄种质资源的亲缘关系及遗传多样性, 对葡萄育种、种质资源管理及其保护具有重要意义^[3]。葡萄在形态结构, 经济特征和抗逆性方面有极其丰富的变异, 这使得传统的根据形态特征来进行葡萄的分类鉴定越来越受到限制^[4]。SSR 分子标记是建立在 PCR 基础上的一种 DNA 分子标记。它为共显性遗传, 多态性高^[5], 可在分子水平分析种质资源的遗传多样性。用于葡萄资源遗传多样性的分析已多有

报道。张萌等^[6]利用 8 对 SSR 引物分析了安徽黄山地区 40 份野生刺葡萄资源的遗传多样性, 结果表明刺葡萄的基因流限制于短距离, 黄山地区的刺葡萄主要以有性繁殖为主; 温景辉等^[7]曾用 18 对 SSR 引物对 360 份山葡萄资源进行了遗传多样性研究, 结果表明我国山葡萄种质资源遗传多样性极为丰富。目前, SSR 标记广泛应用于遗传多样性和品种的评估。现利用 SSR 标记技术, 从分子水平探讨 15 份葡萄资源的遗传多样性, 为有效利用 DNA 标记评价葡萄种质资源提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料取自沈阳农业大学葡萄品种资源圃。选取 15 份葡萄品种, 包括“金星无核”、“火星无核”、“康可”、“无核白鸡心”、“红宝石无核”、“玫瑰香”、“意大利”、“京玉”、“赤霞珠”、“雷司令”、“霞多丽”、“北冰红”、“左优红”、“双优”和“双红”。

1.2 试验方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取与检测 参照王军等^[8]的改良 CTAB 法, 从葡萄幼叶中提取基因组 DNA。DNA 浓度和质量的检测采用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测和 Nanodrop ND-2000 核酸蛋白仪测定。将浓度稀释至 30 ng/ μ L 置于一 20℃ 冰箱保存备用。

1.2.2 SSR 扩增 PCR 反应为 16 μ L 的反应体系,

第一作者简介:郭印山(1977-), 男, 博士, 副教授, 硕士生导师, 研究方向为果树遗传育种与生物技术。E-mail: guoyinshan77@126.com.

责任作者:郭修武(1959-), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向为果树遗传育种与生物技术。E-mail: guoxw1959@163.com.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31000894, 31372021); 国家现代农业产业技术体系建设专项基金资助项目(CRAS-30-yz-6); 辽宁省葡萄科技创新团队资助项目(2014204004); 高等学校博士点基金资助项目(20102103120003); 辽宁省教育厅资助项目(L2010492); 沈阳市人才资源开发专项资助项目(201107)。

收稿日期:2015-12-15

表 1 15 份葡萄种质资源

Table 1 15 grape resources

编号 Code	材料名称 Cultivar	来源 Origin
1	“金星无核”“Venus seedless”	<i>V. vinifera</i> L. × <i>V. labrusca</i> L.
2	“火星无核”“Mars seedless”	<i>V. vinifera</i> L. × <i>V. labrusca</i> L.
3	“康可”“Concord”	<i>V. labrusca</i> L.
4	“无核白鸡心”“Centennial seedless”	<i>V. vinifera</i> L.
5	“红宝石无核”“Ruby seedless”	<i>V. vinifera</i> L.
6	“玫瑰香”“Muscat Hamburg”	<i>V. vinifera</i> L.
7	“意大利”“Italia”	<i>V. vinifera</i> L.
8	“京玉”“Jingyu”	<i>V. vinifera</i> L.
9	“赤霞珠”“Cabernet Sauvignon”	<i>V. vinifera</i> L.
10	“雷司令”“Riesling”	<i>V. vinifera</i> L.
11	“霞多丽”“Chardonnay”	<i>V. vinifera</i> L.
12	“北冰红”“Beibinghong”	<i>V. amurensis</i> Rupr. × <i>V. vinifera</i> L.
13	“左优红”“Zuoyouhong”	<i>V. amurensis</i> Rupr. × <i>V. vinifera</i> L.
14	“双优”“Shuangyou”	<i>V. amurensis</i> Rupr.
15	“双红”“Shuanghong”	<i>V. amurensis</i> Rupr.

包括 10 ng 的 DNA, $MgCl_2$ 2.0 mmol/L, dNTPs 100 μ mol/L, 每对引物各 0.3 μ mol/L, 1×PCR buffer, *Taq* DNA 聚合酶 0.8 U。采用 S1000TM PCR 仪进行扩增。扩增的程序为 94℃ 预变性 4 min; 94℃ 变性 1 min, 退火 1 min, 72℃ 延伸 1 min, 进行 25 个循环; 最后 72℃ 延伸 7 min。扩增产物在 5% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳中分离, 银染染

色。PCR 试剂购自北京赛百盛生物公司, 引物由北京鼎国生物技术公司合成。

1.3 项目测定

电泳图谱的每条带均为 1 个分子标记, 代表 1 个引物的结合位点。按照条带的有无, 统计所有的二元数据, 有带记作 1, 无带记为 0。

1.4 数据分析

根据二元数据计算多态性位点百分数, 采用 NTSYS 统计分析软件对数据进行分析, 品种间的相似系数按 Jaccard 公式计算, 以非加权类平均法 (UPGMA) 进行聚类分析, 并建立遗传关系图。

2 结果与分析

2.1 引物的多态性分析

从 245 对引物中筛选出了 49 对条带清晰、多态性丰富的引物用于 15 个葡萄品种的遗传多样性研究。单条引物扩增出的条带数为 2~9 条, 平均 4.79 条。共扩增出 235 条带, 片段大小均在 100~500 bp。多态性条带的百分率为 100% (图 1)。由此可见, SSR 分子标记技术检测葡萄遗传多样性的效率很高, 表明供试葡萄资源间的遗传多样性较为丰富。

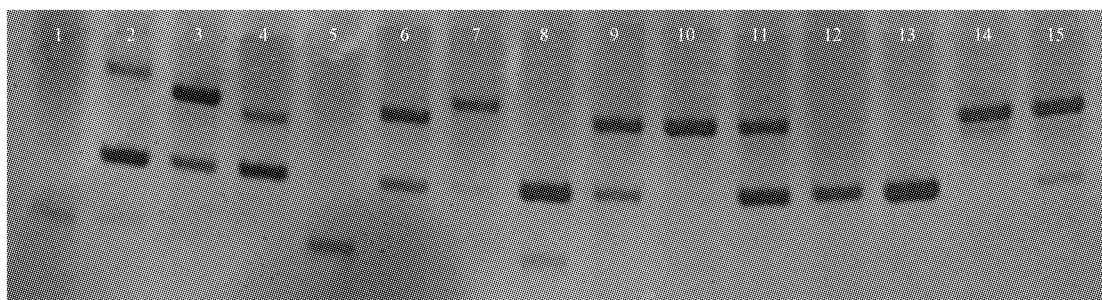


图 1 15 份葡萄种质的 SSR 分析结果

Fig. 1 SSR amplification results of 15 *Vitis* cultivars

2.2 指纹图谱的构建

根据 SSR 标记数据, 以 2 对引物为基础, 构建了 15 个葡萄品种的指纹图谱。引物编号分别为 VMCNG4B9、VMC3G9。引物 VMC3G9 扩增中, “北冰红”、“康可”、“双优”、“左优红”、“双红”具有特殊的带型, 能很好地与其余的种质区分开。引物 VMCNG4B9 扩增中, “金星无核”、“火星无核”、“白鸡心”、“赤霞珠”、“双优”、“雷司令”和“左优红”具有特殊的带型。综合 2 个引物的 SSR 数据, 15 份葡萄品种的 SSR 指纹图谱互不相同, 可以为品种鉴别提供依据。

2.3 15 个葡萄品种的聚类分析

从图 2 中可以看出, 所采用的 15 份葡萄材料的遗传相似系数为 0.660~0.860, 平均遗传相似系数为

0.760。在遗传相似系数为 0.672, 15 份葡萄材料可以分为三大类群。

第一大类包括 3 份葡萄资源: 2 份欧美杂种品种 (“金星无核”和“火星无核”) 和 1 份美洲种品种 (“康可”)。当遗传相似系数为 0.800, “金星无核”和“火星无核”这 2 个品种聚为一类。在遗传相似系数为 0.721 处, “康可”与“金星无核”、“火星无核”聚为一类。

第二大类包括 8 份欧亚种葡萄品种 (“白鸡心”、“红宝石无核”、“玫瑰香”、“意大利”、“京玉”、“赤霞珠”、“雷司令”和“霞多丽”)。当遗传相似系数为 0.727, 该群分为 2 个亚群: 鲜食葡萄和酿酒葡萄, 前者包括 “白鸡心”、“红宝石无核”、“玫瑰香”、“意大利”和“京玉”; 后者包括 “赤霞珠”、“雷司令”和“霞多丽”。在鲜食葡萄中, “京玉”

葡萄是“意大利”与“葡萄园皇后”的杂种后代,所以“京玉”和“意大利”的遗传相似系数最大,为 0.838。“玫瑰香”作为“意大利”的亲本,在遗传相似系数为 0.826 处,“玫瑰香”和“意大利”、“京玉”聚为一类。在酿酒葡萄中,当遗传相似系数为 0.792,“雷司令”和“霞多丽”聚为一类。在遗传相似性系数为 0.755 处,“赤霞珠”和“雷司

令”、“霞多丽”聚为一类。

第三大类包括 2 份山欧杂种(“北冰红”、“左优红”)和 2 份山葡萄(“双优”、“双红”)。当遗传相似系数为 0.808,“双优”、“双红”聚为一类。而“左优红”、“北冰红”在遗传相似系数为 0.769,与山葡萄聚为一类。试验结果表明,山欧杂种与山葡萄有较近的亲缘关系。

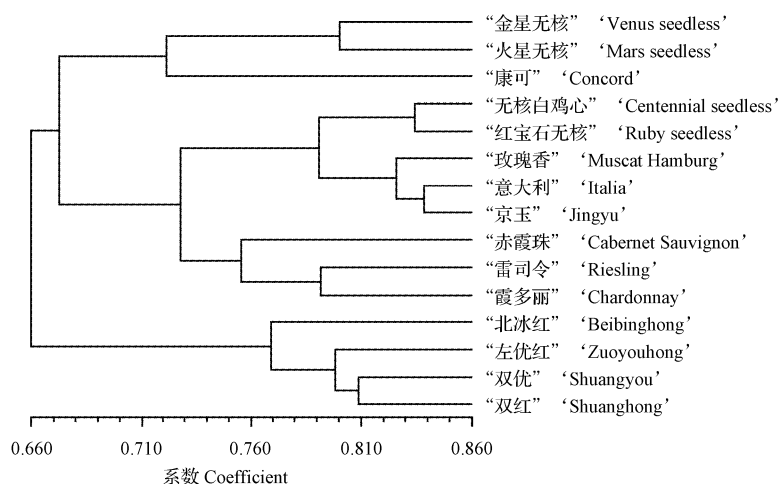


图 2 基于 SSR 结果构建的 15 份葡萄种质的聚类分析图

Fig. 2 Dendrogram of 15 *Vitis* varieties based on SSR results

3 讨论与结论

利用 RFLP、RAPD、AFLP、SSR 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^[9-11]。曹辉庆等^[12]利用 RAPD 分子标记对南方湿热地区葡萄资源的亲缘关系及分布进行了研究,认为日本葡萄的部分品种与广西毛葡萄有些性状相似,毛葡萄和欧亚种的杂种之间也存在相似关系。赵榕等^[13]利用 RAPD 分子标记分析昆明野生蔓蓼葡萄资源,发现不同来源蔓蓼葡萄群体遗传距离和地理分布距离呈正相关的结论。徐丰等^[14]利用 7 对 SRAP 引物,将湖南野生刺葡萄资源分为了 7 个基本类型。可见,分子标记技术是检测遗传多样性、鉴定亲缘关系的有效工具。袁力行等^[15]对比了 RFLP、SSR、AFLP 和 RAPD 4 种分子标记对玉米自交系遗传多样性的分析结果,结果表明,SSR 是较有效的遗传多样性分析工具。由于 SSR 标记为共显性标记,谱带清晰、扩增稳定、重复性好,检测方法简单,带型统计简便,准确度高,因此在植物遗传研究中具有较大的应用潜力。

关于葡萄不同种及品种间的起源与亲缘关系方面也有较多研究。如唐宇宏等^[16]采用 ISSR 分子标记技术分析了黑龙江省西部地区 9 个葡萄品种的亲缘关系,认为山葡萄与欧亚种亲缘关系较近,与美洲种的亲缘关系较远。刘茜等^[17]利用 RAPD 分子标记技术研究 11 个葡

萄品种资源的遗传多样性,结果表明欧亚种群与欧美杂种亲缘关系较近,但和东亚种群亲缘关系较远。

方连玉等^[18]利用 SSR 标记对 15 份葡萄种质进行了遗传多样性分析,表明山葡萄与欧亚种群、美洲种群的亲缘关系较远,欧亚种群与美洲种群之间的亲缘关系较近。该研究以美洲种、欧亚种、山葡萄、山欧杂种、欧美杂种的 15 个葡萄品种资源为试材,利用 SSR 标记探讨葡萄种群的亲缘关系,表明在遗传相似系数 0.672 处可分为三大类群。第一大类包括 2 份欧美杂种葡萄品种和 1 份美洲种葡萄品种,3 种葡萄品种在遗传相似系数为 0.721 时聚为一类,显示出欧美杂种与美洲种有相对较近的亲缘关系;第二大类包括 8 份欧亚种葡萄品种;第三大类包括 2 份山欧杂种葡萄品种和 2 份山葡萄品种,而 2 份山欧杂种葡萄品种在遗传相似系数为 0.769 时与山葡萄聚为一类,表明山欧杂种与山葡萄有相对较近的亲缘关系。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。欧亚种、山葡萄等分别聚为一类,与其地理起源相一致。在欧亚种内,由“意大利”与“葡萄园皇后”杂交产生的后代“京玉”与其亲本“意大利”的遗传相似系数最大,为 0.838,也与其系谱相吻合。

SSR 标记在葡萄品种鉴定及指纹图谱构建中应用也非常广泛。MALETIC 等^[19]通过 SSR 标记证实,克罗

地亚地区的 2 种葡萄栽培品种(‘Plavina’和‘Brajdica’)是同物异名。吴子龙等^[20]利用 9 对 SSR 引物可以很好地把 8 个山葡萄及山欧杂种葡萄品种区分开。该研究利用 2 对引物(VMCNG4B9 和 VMC3G9)建立了 15 份葡萄品种的指纹图谱,显示了 SSR 标记在品种鉴定方面有高度的辨别能力。

参考文献

- [1] LOPES M S, SEFC K M, DIAS E E, et al. The use of microsatellites for germplasm management in a Portuguese grapevine collection[J]. Theoretical and Applied Genetics, 1999, 99(3-4): 733-739.
- [2] 任国慧, 吴伟民, 房经贵, 等. 我国葡萄国家级种质资源圃的建设现状[J]. 江西农业学报, 2012, 24(7): 10-13.
- [3] YE G N, SPYLEMEZOGLU G, WEEDEN N F et al. Analysis of the relationship between grapevine cultivars, reports and clones via DNA fingerprinting[J]. Vitis, 1998, 37(1): 33-38.
- [4] 贺普超. 葡萄学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1999: 20.
- [5] 邱芳, 伏健民, 金德敏, 等. 遗传多样性的分子检测[J]. 生物多样性, 1998, 6(2): 143-150.
- [6] 张萌, 练春兰, 松木悠, 等. 基于 SSR 分子标记的安徽黄山地区野生刺葡萄的遗传多样性分析[J]. 江西农业学报, 2012, 24(6): 9-12.
- [7] 温景辉, 申海林, 邹利人, 等. 山葡萄种质资源 SSR 遗传多样性分析[J]. 北方园艺, 2011(14): 102-104.
- [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] BOWRES J E, MEREDITH C P. Genetic similarities among wine grape cultivars revealed by restriction fragment-length polymorphism(RFLP) analysis[J]. J Amer Soc Hort Sci, 1966, 121(4): 620-624.
- [10] THIS P C, OURSIQUOT J M. Development of stable RAPD markers for the identification of grapevine rootstocks and the analysis of genetic relationships[J]. Am J Enol Vitic, 1997, 48(4): 492-501.
- [11] BOWRES J E, MEREDITH C P. The parentage of classic wine grape, Cabernet Sauvignon[J]. Nature Genetics, 1997, 16(1): 84-87.
- [12] 曹辉庆, 李杨瑞, 彭宏祥. 利用 RAPD 分子标记对南方湿热地区葡萄资源的亲缘关系及分类研究[J]. 西南农业学报, 2004, 17(1): 61-64.
- [13] 赵榕, 钱正强, 王焕冲, 等. 昆明西山野生蔓蓼葡萄资源及其遗传多样性分析[J]. 云南大学学报, 2010, 32(6): 710-714.
- [14] 徐丰. 湖南省刺葡萄植物学形态特征与遗传多样性研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2010.
- [15] 袁力行, 傅骏骅, WARBURTON M, 等. 利用 RELP, SSR, AFLP 和 RAPD 标记分析玉米自交系遗传多样性的比较研究[J]. 遗传学报, 2000, 27(8): 725-733.
- [16] 唐宇宏, 白庆武, 林佳志, 等. 黑龙江省西部葡萄的 ISSR 分析[J]. 高师理科学刊, 2004, 24(4): 46-48.
- [17] 刘茜, 刘玉冰, 韩德胜, 等. 葡萄的随机扩增多态性 DNA(RAPD)的研究[J]. 兰州大学学报(自然科学版), 2004, 40(5): 2-4.
- [18] 方连玉, 王军, 许雷, 等. 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.
- [19] MALETIC E, SEFC M, STEINKELLNER H, et al. Genetic characterization of Croatian grapevine cultivars and the detection of synonymous cultivars in neighboring regions[J]. Vitis, 1999, 38: 79-83.
- [20] 吴子龙, 王军, 沈育杰, 等. 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.

Genetic Diversity Analysis of Grape Resources Based on SSR Markers

GUO Yinshan, NIU Zaozhu, SHI Guangli, GUO Quan, XUE Ruiyuan, GUO Xiuwu

(College of Horticulture, Shenyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning 110866)

Abstract: Taking 15 grape resources as test materials, using SSR molecular marker method, the genetic diversity for 15 grape resources was researched. The results showed that among 245 SSR markers, 49 distinct and stability markers were selected to conduct the amplification for the 15 grape resources, in total of 235 polymorphic bands were got, the polymorphic percentage were 100%. The number of allelic loci for each primer were ranged from 2 to 9, based on the SSR amplification results, used the software of NTSYSpc2. 10e to conduct the Jaccard correlation coefficient analysis for the 15 grape resources, the result was between 0.660—0.860, the average genetic correlation coefficient was 0.760. After UPGMA clustering analysis, the 15 grape resources could be divided into 3 groups. The first group contained 2 resources crossed by *V. vinifera* L. and *V. labrusca* L. and 1 resource from *V. labrusca* L.; the second group contained 8 *V. vinifera* L. resources; the third group contained 2 resources crossed by *V. amurensis* Rupr. and *V. vinifera* L. and 2 *V. amurensis* Rupr. resources. It showed that the *V. vinifera* L. and *V. labrusca* L. had the nearest genetic relationship, the genetic relationship of *V. amurensis* Rupr. was farther to *V. vinifera* L. and *V. labrusca* L.. The primers of VMCNG4B9, VMC3G9 could separate these 15 grape resources, they could lay the foundation for the grape finger-print in the future.

Keywords: grape; SSR; PCR; clustering analysis; genetic relationship