

葡萄种质遗传多样性的 SSR 分析及指纹库构建

宪立杰, 刘兴菊, 李雪雁, 梁海永, 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:以取自郑州果树研究所的 45 个葡萄品种为试材, 利用 SSR 标记技术对其进行了遗传多样性分析。结果表明: 利用 19 对基本核心引物对位于不同染色体上的 SSR 位点进行 PCR 扩增, 共扩增出 76 条带, 其中包括 74 条多态性条带。每对引物可检测到等位点数为 2~5 个, 多态率为 66.7%~100%。通过聚类分析结果表明, 在遗传距离为 0.41 处, 45 份葡萄材料可分为三大类群。对供试葡萄品种的不同引物的扩增产物进行检测, 得到了每个品种在一组位于不同染色体的 SSR 位点上的基因型图谱, 从而初步建立一个供试葡萄品种的 SSR 基因型指纹库。这为利用 SSR 标记鉴定葡萄品种或品系提供了基础数据。

关键词:葡萄; SSR; 遗传多样性; 指纹库

中图分类号:S 663.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)11-0087-04

葡萄(Grapes)为葡萄属(*Vitis*)落叶藤本植物, 葡萄是人类最早栽培的果树之一, 占全世界水果产量的 1/4 左右; 其营养价值很高, 可加工成葡萄汁、葡萄干和葡萄酒等。葡萄的种类全世界有 8 000 多种, 我国有 500 种以上, 按品种可分为鲜食葡萄品种和酿酒葡萄品种。由于葡萄属植物不同种间及品种间在解剖形态、经济性状和抗逆性方面有着极其丰富的变异, 葡萄资源的分类鉴定十分困难^[1]。葡萄资源的分类基本上以形态学标记为主, 随着生物技术的发展, 更需要从 DNA 水平对物种的亲缘关系进行研究。

SSR(Simple Sequence Repeat)即 DNA 的简单重复序列, 是一种具稳定性、可重复性、强特异性、共显性等诸多优点的分子标记技术, 比 RFLP 标记操作简单和快速, 在基因定位、遗传作图、品种鉴定等方面得到了广泛的应用。目前, SSR 标记已经在葡萄基因组作图、进化关系、品种鉴定等研究领域展示出巨大的应用潜力^[2-8]。SSR 标记可作为联系遗传图谱、序列信息以及最终的表型差异三者之间的重要纽带。该研究选取了 45 个鲜食葡萄品种, 利用位于不同染色体上的 SSR 位点进行 PCR 扩增研究, 从分子水平上探讨 45 份葡萄种质的亲缘关系, 为有效利用 DNA 标记评价葡萄种质资源亲缘关系提供理论依据。对葡萄育种、种质资源管理及其保护具有重要意义。

第一作者简介:宪立杰(1987-), 女, 硕士研究生, 现主要从事树木分子标记及葡萄指纹图库的建立等研究工作。

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:2013-01-16

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试的 45 个葡萄品种取自郑州果树研究所国家果树种质(郑州)葡萄圃。采集葡萄幼嫩叶片, 低温下带回实验室, 于超低温冰箱中保存备用。

dNTP、*Taq* DNA 聚合酶、20 bp DNA Marker 购自 TaKaRa 公司。所有 PCR 引物由上海生工生物工程公司合成。PCR 反应使用 Biometer 公司的 TG 型 PCR 循环仪。

表 1 供试的葡萄品种

Table 1 Grape varieties for test

编号 No.	品种 Grape varieties	编号 No.	品种 Grape varieties
1	“摩尔多瓦”	24	“信浓乐”
2	“尼加拉”	25	“选拔巨峰”
3	“莎加蜜”	26	“伊豆锦”
4	“罗曼尔”	27	“早康可”
5	“申秀”	28	“二伯娜”
6	“玫瑰后”	29	“玫野黑”
7	“美洲白”	30	“秀特玫瑰”
8	“吉香”	31	“龙宝”
9	“吉峰”	32	“阿特巴格”(紫)
10	“康太”	33	“郑康 1 号”
11	“田野黑”	34	“郑黑”
12	“田野红”	35	“着色香”
13	“斯蒂本”	36	“状元红”
14	“山东大紫”	37	“沪培 2 号”
15	“密尔紫”	38	“黑虎香”
16	“玫瑰怡”	39	“早熟黑虎香”
17	“秋蜜”	40	“早巨选”
18	“茉莉香”	41	“信依红”
19	“蜜汁”	42	“夕阳红”
20	“甜峰”	43	“晚霞”
21	“维金纳斯”	44	“纽约玫瑰香”
22	“先峰”	45	“Black seedless”
23	“香悦”		

1.2 试验方法

用改良十六烷基三甲基溴化铵(Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide,CTAB)法提取葡萄基因组 DNA,反应前用微量紫外进行 DNA 质量与浓度检测。

1.2.1 反应体系 反应液体积为 10 μ L,其中含:

1 \times PCR buffer,引物 0.4 μ mol/L,模板 DNA 30 ng,dNTP 0.2 mmol/L,Taq DNA 聚合酶 0.5 U。

1.2.2 引物选择 分别从葡萄的 19 对染色体上选择 19 个 SSR 位点(表 2)。

表 2 引物选择
Table 2 Primers Selection

引物 Primers name	连锁群 Groups	正向引物序列(5'~3') Forward primer sequence	反向引物序列(5'~3') Reverse primer sequence
Vchr1a	1	TTCATACCTTGCAGGGAGCTA	TGATTTCATTCCTCAATTC
Vchr2b	2	CTCTCTGGGAACAAGTCTGT	GTTGCTGGATTGTGGAAGG
Vchr3a	3	CAATCATATGAGCAAGGCATGT	GCTTCTGAAATTTGTGTCCA
Vchr4a	4	CAACTGGGATCCAAGACCTC	CAGCTTCACAGGTAACCACA
Vchr5c	5	CCCATCAGTTTGCTATGAA	TTTGATCTTGTATGTGCTGTAC
Vchr6a	6	AATGTTGAGCTTTGGGCTTG	CCAATCTTCCATACCTCAAAA
Vchr7b	7	AAAGGGCCTAAACTCTTAATACTTG	TGCTTTATAGACACTAACCCACAA
Vchr8a	8	ACCCACTGCCACTCTCTCAT	AAATCTCGGGATCCTTTTG
Vchr9a	9	GCGACAGCATCACTTCAATC	GAATTGCCAAGGACAAGGAG
Vchr10b	10	CCATGTCCAACCGAAACAAC	CAGAAATCTCGTGTGCTCA
Vchr11a	11	GGGATAAGGTGAAGCCTCA	ATGCTTGGTATCTGGCAACC
Vchr12a	12	GCTTTAAATGTAGATTAGGGCACTC	TCCATGTTGTTTGTCTTTTC
Vchr13a	13	TGGCAGAGCAAATGAATCAA	TTGGATGGATTGGAATGACC
Vchr14b	14	CAATTGAACACTTACACTCACAATCA	TGTGACTAAAGGTTATTAGCAGGA
Vchr15a	15	CAATCCCAACAGTTCCATGA	CGTTTCTCCTTCGGACAAG
Vchr16b	16	ATAAGCGCTGACTTTGTGA	CCAGGAGATCAACCACCATT
Vchr17c	17	CCATGTTCCATCCCACTTCT	CGTACGTACAAAATCTTGGGATAC
Vchr18a	18	TTCCACCGGTAAATATGA	CATCCAAACATCACGCTGAG
Vchr19a	19	TGGATTACCAATTGTCTCA	CGAGGATACCAACAAGATGAA

1.2.3 PCR 扩增反应 SSR 扩增体系反应程序为:94℃预变性 4 min;94℃变性 1 min,52~55℃退火 1 min,72℃延伸 1 min,30 个循环;最后 72℃延伸 7 min,4℃保存 20 min。

1.2.4 电泳 扩增产物在 8%非变性聚丙烯酰胺凝胶中电泳分离,PCR 产物加入等体积的 6 \times Loading Buffer,每个加样孔加样量为 3 μ L,加样后,在 230 V 电压下电泳 90 min。电泳完毕取出进行 AgNO₃ 染色:0.1% Ag-NO₃ 银染 10 min;水洗后用显色液(1.5% NaOH,0.4% 甲醛)显色,直至条带清晰为止,照相并记录。

1.3 数据分析

有 DNA 扩增带记为 1,无带记为 0。利用 NT-SYSp 2.10e 软件进行 Jaccard 相似性分析,并通过非加权配对算术平均法(UPGMA)进行聚类分析,建立亲缘关系图。

2 结果与分析

2.1 45 个葡萄品种鉴定的 SSR 分析

19 对引物扩增条带清晰、重复性好、特异性高。由表 3 可知,19 对引物在 45 个葡萄品种中共在 76 个位点

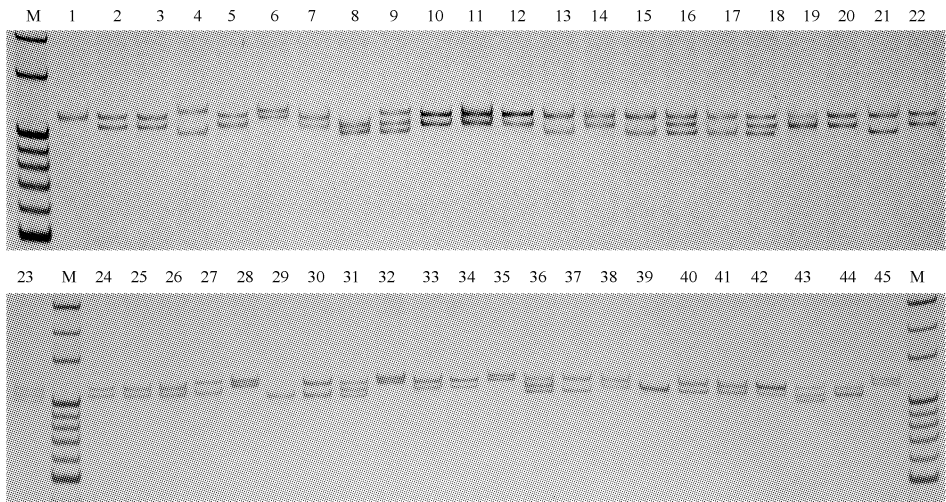


图 1 采用的引物 Vchr1a 在 45 个葡萄品种中的扩增结果

注:M;20 bp DNA Ladder Marker;1~45 见表 1。

Fig.1 SSR-PCR profiles of 45 *Vitis* cultivars using Vchr1a primer

Note:M;20 bp DNA Ladder Marker;1~45 are the same as below.

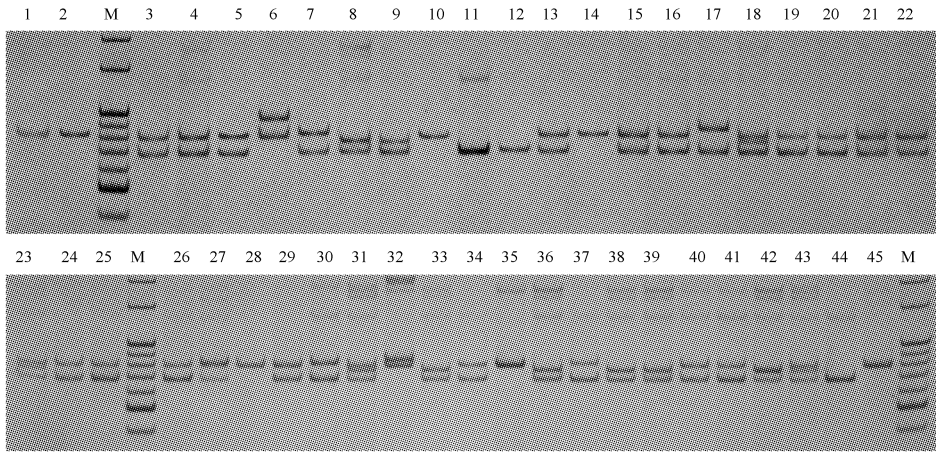


图2 采用的引物 Vchr18a 在 45 个葡萄品种中的扩增结果

注:M;20 bp DNA Ladder Marker;1~45 见表1。

Fig.1 SSR-PCR profiles of 45 *Vitis* cultivars using Vchr18a primer

Note:M;20 bp DNA Ladder Marker;1~45 are the same as below.

上扩增出条带,平均每对引物有 4 个扩增位点,扩增位点数量最多的引物 Vchr1a、Vchr3a、Vchr5c、Vchr18a 为 5 个;19 对引物共扩增出 74 个多态性位点,平均每对引物扩增多态性位点 3.89 个,多态性位点占的比例平均为 96.93%;19 对引物对 45 个葡萄品种的区分率为 100%。

表 3 19 对引物在葡萄品种中的扩增情况

Table 3 Amplification efficiency of 19 pairs of primers

引物 Primers	总的扩增带数 Total amplified bands	多态性扩增带数 The number of polymorphism bands	多态性条带的比例 The percentage of polymorphism bands/%
Vchr1a	5	5	100
Vchr2b	3	3	100
Vchr3a	5	5	100
Vchr4a	3	3	100
Vchr5c	5	5	100
VChr6a	4	3	75
VChr7b	4	4	100
VChr8a	4	4	100
VChr9a	4	4	100
VChr10b	3	3	100
VChr11a	3	2	66.7
VChr12a	4	4	100
VChr13a	4	4	100
VChr14b	4	4	100
VChr15a	4	4	100
VChr16b	4	4	100
VChr17c	4	4	100
VChr18a	5	5	100
VChr19a	4	4	100
总计	76	74	
平均	4	3.89	96.93

2.2 葡萄品种的遗传关系分析

选择了 45 个葡萄材料的 SSR 扩增的 90~300 bp 范围内条带分别赋值,同一位置有带的记为 1,无带的记为 0。根据 19 对引物对 45 个葡萄品种基因组 DNA 的扩增结果,通过计算,建树状聚类图。由图 3 可知,45 个葡萄品种间的遗传距离为 0.01266~0.51227,平均遗传距离为 0.37836;其中,“选拔巨峰”和“伊豆锦”间遗传距离最小,为 0.01266,“尼加拉”和其它品种间遗传距离

均较大,平均为 0.51465。根据扩增结果将参试的 45 个品种聚类,在遗传距离 0.41 处做结合线,可将其划分为三大类:第一类包括“摩尔多瓦”、“罗曼尔”、“着色香”、“秀特玫瑰”品种;第二类为“尼加拉”、“美洲白”、“维金纳斯”、“黑虎香”、“早熟黑虎香”等品种;第三类为“玫瑰后”、“阿特巴格”(紫)、“Black seedless”品种。

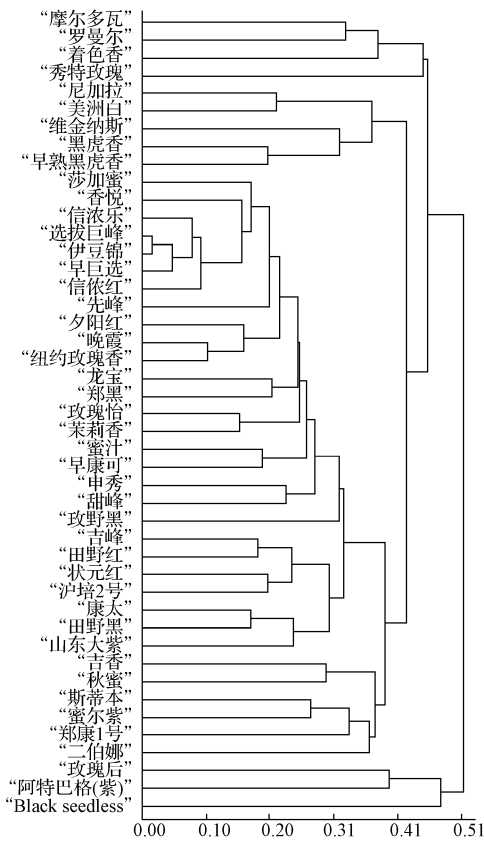


图3 基于 SSR 标记的 45 个葡萄品种的聚类图

Fig.3 UPGMA dendrogram of 45 grape varieties based on SSR results

3 讨论

研究结果表明,利用 SSR 的 19 对基本核心引物标记能够充分揭示葡萄不同品系间存在的遗传差异。引物扩增均具有多态性,多态性最高为 100%,多态性最低为 66.7%,平均多态性为 96.93%。由于选择的引物是对位于不同染色体的 SSR 位点进行 PCR 扩增,因而其扩增的结果更为精确、多态性更高,能够充分揭示葡萄不同品系间的遗传差异。

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^[2-10]。方连玉等^[6]利用 SSR 标记对 15 份葡萄种质进行了遗传多样性分析。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^[6]。该研究根据扩增结果将参试的 45 个品种聚类,通过聚类树状图,以 0.41 处为结合线,将 45 份供试葡萄品种分为三大类。“摩尔多瓦”、“秀特玫瑰”、“着色香”等葡萄品种,由于同属于欧美杂交种,其亲本多为玫瑰系葡萄品种,因而遗传距离接近,同属于一类;“选拔巨峰”、“伊豆锦”、“早巨选”品种,同属于日本“巨峰”群品种,是从日本“巨峰”实生苗或其系统中选拔出来的,其相似性系数高,遗传距离小,同属于一类;而“莎加蜜”品种为日本“巨峰”实生苗中选拔的优良欧美杂交种,“罗曼尔”品种为欧美玫瑰系品种,2 个品种由于其亲本不为同一家系,因而在遗传距离上相差较大,划分为不同的 2 类。

利用聚丙烯酰胺凝胶电泳技术对供试葡萄品种的不同引物的扩增产物进行了检测,得到了每个品种在一组 SSR 位点上的基因型图谱,从而初步建立了一个供试葡萄品种的 SSR 基因型图谱库,为建立中国葡萄品种的

SSR 基因型数据库奠定了基础,也证明了 SSR 分子标记技术应用于葡萄品种鉴定和品种权保护是可行的。

SSR 分析技术将在 DNA 水平上鉴别不同品种存在的差异,从而科学、准确地判断特定品种的特异性、一致性和稳定性,为保护育种产权、登记新品种、鉴定和检测果树品种苗木真实性和纯度提供客观、科学和准确的技术保障,推动我国果树苗木向着规范化、制度化和法制化的方向快速发展。这显示了 SSR 标记在品种鉴定方面有高度辨别能力。SSR 不仅可以用于阐明种内遗传多样性的研究,而且可用来分析种间的亲缘关系,是一种直接可靠而又不可缺少的手段。

参考文献

- [1] 贺普超. 葡萄学[M]. 北京:中国农业出版社,1999:20.
- [2] 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.
- [3] Bowers J E, Dangel 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.
- [4] Scott K D, Eggler P, Seaton G, et al. Analysis of SSRs derived from grape ESTs[J]. Theor Appl Genet, 2000, 100(5): 723-726.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] 张淑静, 杨敏生, 梁海永, 等. 葡萄 SSR 反应体系的优化[J]. 河北林果研究, 2008, 23(3): 281-286.
- [8] 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.
- [9] 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.
- [10] 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.

SSR Analysis of Genetic Diversity and Fingerprint Database Construction of Grape Germplasm

XIAN Li-jie, LIU Xing-ju, LI Xue-yan, LIANG Hai-yong, YANG Min-sheng

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

Abstract: Taking 45 grape varieties collected from Zhengzhou Fruit Research Institute as materials, the genetic analysis of them were analyzed using SSR markers technology. The results showed that 19 basic core primers for PCR amplification of SSR loci were located on different chromosomes, 76 bands were amplified, including 74 polymorphic bands. No. of allelic loci detected by each pair of primer ranged from 2 to 5, with the polymorphic rate of 66.7%~100%. Through the cluster analysis showed that 45 grape materials could be divided into 3 groups in the genetic distance of 0.41. Detection of different primers amplified products of the grape varieties tested, the genotype maps of each species in a set of SSR loci in different chromosomes were gotten. Grape varieties SSR genotype fingerprint library were preliminarily established, which provided a basic data for identification of grape varieties or lines using SSR markers.

Key words: grape; SSR; genetic diversity; fingerprint database