

葡萄品种 DNA 指纹数据库的构建及遗传多样性分析

李贝贝^{1,2}, 姜建福¹, 张颖¹, 樊秀彩¹, 孙海生¹, 张国海², 刘崇怀¹

(¹中国农业科学院郑州果树研究所, 郑州 450009; ²河南科技大学林学院, 洛阳 471000)

摘要: 利用 SSR 分子标记技术对 314 份葡萄品种进行了 DNA 指纹数据库构建和遗传多样性分析, 为葡萄品种鉴定、亲缘关系分析和植物品种权保护提供科学依据。结果表明: 9 对引物共扩增出 199 个等位基因, 多态性位点为 199 个, 多态性比率达 100%, 每个标记检测到的位点数在 17~31 之间, 平均为 22.1 个; 多态性信息含量 (PIC) 值变幅在 0.793~0.886 之间, 平均值为 0.839。本研究发现 3 组同名异物品种和 9 组疑似同物异名品种, 除此之外的 290 份品种中, 70 份品种仅需 1 对引物即可区分开, 其余品种需要引物组合来实现品种之间的区分。最少选用 8 对引物即可完全区分开 290 份葡萄品种。最终利用 8 对多态性 SSR 引物构建了 314 份供试材料的 DNA 指纹数据库, 聚类分析结果表明: 263 份二倍体供试材料可被分为真葡萄亚属和圆叶葡萄亚属两大类, 而真葡萄亚属又被分为 15 个亚类。51 份多倍体供试材料被分为 3 组, 聚类结果与供试材料已知的系谱来源基本吻合。

关键词: 葡萄; SSR; DNA 指纹数据库; 遗传多样性

DNA Fingerprinting and Genetic Diversity Analysis of Grape (*Vitis vinifera* L.) Cultivars Based on SSR Markers

LI Bei-bei^{1,2}, JIANG Jian-fu¹, ZHANG Ying¹, FAN Xiu-cai¹,

SUN Hai-sheng¹, ZHANG Guo-hai², LIU Chong-huai¹

(¹Zhengzhou Fruit Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450009;

²College of Forestry, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471000)

Abstract: This study attempts to construct a DNA fingerprint database and analyze the genetic diversity of 314 grape accessions based on the genomic DNA simple sequence repeats (SSR), with the aim of providing a scientific reference for the cultivar identification, genetic analysis and plant varieties protection. By using 9 SSR primer sets, 199 alleles were detected, of which the polymorphic loci were 199 and the ratio of polymorphism was 100%. Each SSR marker detected 17-31 alleles (with an average of 22.1). The polymorphic information content ranged from 0.793 to 0.886, with an average of 0.839. Three accessions were homonyms and 9 accessions were synonyms. In the remaining 290 grape accessions, seventy cultivars could be identified with one primer pair and the other cultivars could be identified with primer combinations. The 290 cultivars could be completely distinguished from each other with only 8 primer pairs. In summary, DNA fingerprint database of the 314 grape cultivars was constructed by using 8 SSR primer sets. Cluster analysis of the fingerprint database showed that the 263 diploids could be divided into two groups: Subgen. *Euvitis* Planch. and Subgen. *Muscadinia* (Planch.) Rehder. The former group were further divided into 1 large group and 14 small groups. 51 polyploids were divided into 3 groups. The clustering results were basically in good agreement with the family tree of the tested cultivars.

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

收稿日期: 2017-09-11 修回日期: 2017-10-12 网络出版日期: 2018-02-09

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20180209.0857.008.html>

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项 (CARS-29); 中央级科研院所基本科研业务费专项 (1610192016604); 中国农业科学院科技创新工程专项经费项目 (CAAS-ASTIP-2017-ZFRI)

第一作者研究方向为葡萄种质资源。E-mail: 15236289703@163.com

通信作者: 刘崇怀, 研究方向为葡萄种质资源。E-mail: liuchonghuai@caas.cn

张国海, 研究方向为果树种质资源开发与利用。E-mail: zgh_ly@163.com

葡萄属于葡萄科 (Vitaceae) 葡萄属 (*Vitis* L.) 植物,是世界范围内最重要的果树作物之一,具有重要的经济价值。我国是世界葡萄主要栽培国之一,截止到 2014 年,我国葡萄栽培面积达 76.72 万 hm^2 ,产量 1254.6 万 $\text{t}^{[1]}$ 。目前世界上已报道的葡萄品种有 6000~10000 个^[2],其中保存于我国资源圃的种质资源约有 3000 份^[3]。葡萄种质资源丰富,由于其为无性繁殖,扦插繁殖容易,不同地区之间品种交流频繁。同时,由于部分引种或地方品种没有确切的科学名称,致使出现同物异名和同名异物现象^[4]。品种混乱问题给葡萄生产造成很大损失,也给葡萄种质资源的有效利用带来很大困难。传统的种质鉴定方法以形态学为主,易受环境条件及主观因素的影响。此外,在育种工作中,由于骨干亲本的集中使用,葡萄品种间的遗传差异越来越小,使得依据形态特征进行品种鉴定愈加困难。因此,开展葡萄种质资源遗传多样性和构建 DNA 指纹数据库研究,对其种质资源鉴定、管理、品种审定及知识产权保护具有重要意义。

DNA 分子标记是研究种质资源遗传多样性及品种鉴定的有效手段,在葡萄中得到广泛应用^[4-6]。其中 SSR (Simple Sequence Repeat, 简单重复序列) 标记以其多态性高、信息量高、实验稳定性和重复性强、操作简单方便、对 DNA 质量要求低、呈共显性遗传等独特优势,成为目前构建 DNA 指纹数据库首选的标记技术^[7]。国外很多科研工作者在利用 SSR 分子标记技术鉴定品种这方面已经做了大量的研究。M. R. Thomas 等^[8]、J. E. Bowers 等^[9-10]相继在 1993 年、1996 年及 1999 年报道了 7 个适合葡萄品种鉴定的 SSR 引物: VVS2、VVMD5、VVMD7、VVMD32、VVMD28、VVMD27、VVMD25。1999 年, K. M. Sefc 等^[11]为了丰富 SSR 标记多态性,又开发了 2 对 SSR 引物: VrZAG79 和 VrZAG62。因该 9 对引物均匀分布于葡萄的 19 对染色体上且具有高的多态性,被国外视为通用引物,并在不同国家得到广泛应用。目

前,部分农作物的 SSR 指纹数据库的构建已陆续开展,例如,西瓜^[12]、水稻^[13]、小麦^[14]、黄瓜^[15]、苹果^[16]等,利用 SSR 标记构建葡萄 DNA 指纹数据库也已具有一定的基础。E. Kiss 等^[17]构建了 109 个葡萄品种的 SSR 指纹图谱。杜晶晶^[18]利用 9 对 SSR 引物构建了 80 个葡萄品种的有效分子身份证。宪立杰等^[19]应用 19 对 SSR 核心引物初步构建了 45 个葡萄品种的 SSR 基因型指纹库,为鉴定葡萄品种或品系提供了基础数据。李雪雁等^[20]选用 19 对核心 SSR 引物对 75 份葡萄种质进行研究,并建立了一套适合于葡萄 DNA 指纹图谱构建的技术体系,为葡萄品种鉴定提供了依据。尹玲等^[21]利用 6 对 SSR 引物成功区分我国新育成的 24 份葡萄种质,并建立了 24 份葡萄品种的 SSR 指纹图谱,为品种鉴定、亲缘关系分析以及植物品种权保护提供参考依据。国际上,法国、德国、意大利等利用 9 对国际通用引物建立了葡萄品种分子数据库 (www.vivc.de),在线为葡萄科研工作者提供查询服务,为国际上葡萄品种的鉴定与交换奠定了基础。但遗憾的是,该数据库中不包含欧美杂种和中国育成品种。本研究利用国际通用的 9 对引物对 314 个葡萄品种进行了 DNA 指纹数据库的构建及遗传多样性的分析,为葡萄品种鉴定、亲缘关系研究及葡萄遗传育种提供理论依据,并与国际数据库接轨。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料于 2015 年 5 月采自中国农业科学院郑州果树研究所国家果树种质郑州葡萄圃,共计 314 个葡萄品种,包括 263 份二倍体葡萄种质和 51 份多倍体葡萄种质(表 1)。采取植株顶端幼嫩叶片,分别用锡箔纸包装,保存于冰盒中带回实验室,将用锡箔纸包装的叶片放于液氮中冷处理 10 min,最后保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱中。

表 1 葡萄种质资源的名称及编号

Table 1 The name and number of the 314 grape germplasm resources

编号 Code	品种名称 Accessions	编号 Code	品种名称 Accessions	编号 Code	品种名称 Accessions
1	里扎马特	6	粉红葡萄	11	6-28
2	奥古斯特	7	绯红	12	济南早红
3	森田尼无核	8	瑰宝	13	京丰
4	无核白鸡心	9	黑天鹅	14	京可晶
5	圆白	10	红亚历山大	15	京玉

表 1(续)

编号 Code	品种名称 Accessions	编号 Code	品种名称 Accessions	编号 Code	品种名称 Accessions
16	葡萄园皇后	55	金田翡翠	94	皇室红
17	普列文玫瑰	56	皇家无核	95	黑香蕉
18	胜利	57	金田美指	96	贵妃玫瑰
19	圣诞玫瑰	58	高千穗	97	红双味
20	维多利亚	59	红地球	98	红香蕉
21	魏可	60	紫地球	99	90-1
22	香妃	61	秋黑	100	维金娜斯
23	白玉霓	62	天山	101	金星无核
24	泽玉	63	晶红宝	102	一品香
25	郑州早红	64	沈农金皇后	103	着色香
26	郑州早玉	65	紫翠无核	104	紫丰
27	紫珍珠	66	紫甜	105	摩尔多瓦
28	爱神玫瑰	67	红罗莎里奥	106	阳光玫瑰
29	白无核	68	烟 73	107	郑艳无核
30	大无核	69	白佳美	108	金手指
31	碧香无核	70	北醇	109	康拜尔早生
32	粉红无核	71	北红	110	无核白
33	红宝石无核	72	北玫	111	无核白(阿富汗)
34	红脸无核	73	大黑葡萄	112	无核白(宁夏)
35	皇家秋天	74	贵人香	113	无核白(巩义)
36	京丰无核	75	黑多内	114	贵州水晶
37	京早晶	76	烟 74	115	尼加拉
38	京紫晶	77	梅鹿辄 ISV-FV4	116	云南水晶
39	黎明无核	78	梅鹿辄 181	117	康可
40	美丽无核	79	品丽珠 327	118	艾尔威因
41	蒙丽莎无核	80	品丽珠 214	119	白香蕉
42	秋无核	81	瑞都红玫	120	康拜尔
43	无核紫	82	瑞都脆霞	121	瑞必尔
44	优无核	83	瑞都无核怡	122	阿特巴格
45	巴拉蒂	84	瑞都香玉	123	白布瑞克
46	红巴拉多	85	魏天子	124	白达拉依
47	黑巴拉多	86	克瑞森无核	125	黑鸡心
48	早康宝	87	87-1	126	红鸡心
49	秋红宝	88	粉红亚都蜜	127	喀什哈尔
50	丽红宝	89	郑果大无核	128	白老虎眼
51	无核翠宝	90	粒丽特	129	白油亮
52	金田蓝宝石	91	白羽	130	贝加干
53	金田玫瑰	92	超宝	131	玫瑰香
54	京香玉	93	秋王	132	大青葡萄

表 1(续)

编号 Code	品种名称 Accessions	编号 Code	品种名称 Accessions	编号 Code	品种名称 Accessions
133	和田红	172	西营	211	武汉葡萄 2 号
134	和田绿葡萄	173	白葡萄	212	桑叶葡萄(青天河 6 号)
135	黑破黄	174	玫瑰蜜	213	山葡萄(北京东灵山)
136	黑葡萄(新疆)	175	红玫瑰	214	野葡萄(武汉植物园 1 号)
137	红马奶	176	那布古珠	215	野葡萄(木札岭 1 号)
138	红葡萄(新疆)	177	白拉齐娜	216	华东葡萄(信阳 10)
139	意大利	178	赤霞珠	217	腺枝葡萄(广西)
140	花白	179	达拉依	218	毛葡萄(广西)
141	黄满集	180	佳利酿	219	美丽葡萄(1104)
142	假卡	181	卡拉	220	毛葡萄(南湾湖 1402)
143	库斯卡其	182	雷司令	221	斐莫(WT-8)
144	李子香	183	梅鹿辄(七 24)	222	刺葡萄(梅岭山 1301)
145	驴奶	184	琼瑶浆	223	桦叶葡萄(嵩县)
146	红木纳格	185	霞多丽	224	秋葡萄(青要山)
147	绿木纳格	186	小白玫瑰	225	变叶葡萄(灵宝无毛)
148	木拉格	187	黑比诺	226	变叶葡萄(灵宝)♀
149	绿葡萄	188	品丽珠	227	网脉葡萄(卢氏 2 号)
150	马奶	189	黑葡萄	228	网脉葡萄(卢氏 1 号)
151	马热子	190	零蛋葡萄	229	葛藟葡萄(三清山)
152	墨玉葡萄	191	脆葡萄	230	野葡萄(湖南)
153	牡丹红	192	蛇龙珠	231	萨米特
154	牛奶	193	红莲子	232	普利亚特河岸葡萄(0920)
155	牛心	194	二伯娜	233	洛特沙地葡萄(0904)
156	潘诺尼亚	195	香槟	234	槭叶葡萄(1296)
157	平顶黑	196	关口葡萄	235	甜山葡萄(1847)
158	瓶儿	197	托县葡萄	236	河岸葡萄(1849)
159	其里干	198	邢台顺德府	237	山谷葡萄(1387)
160	巧吾什	199	云南葡萄(元谋 2 号)	238	夏葡萄(1717)
161	莎巴珍珠	200	云南葡萄(元谋 3 号)	239	河口葡萄
162	桃克可努克	201	桦叶葡萄(元谋凉山)	240	左优红
163	夏白	202	云南葡萄(湖南)	241	哈桑
164	谢克兰格	203	云南葡萄(会同 3 号)	242	北冰红
165	亚历山大	204	武汉葡萄(信阳)	243	225Ru
166	也力阿克	205	网脉葡萄(宝天曼 2 号)	244	1103P
167	伊犁葡萄	206	云南葡萄 2 号	245	代克赛
168	伊犁香葡萄	207	网脉葡萄(宝天曼 1 号)	246	弗莱
169	紫红型葡萄	208	秋葡萄(南召)	247	朱姆博
170	红无籽露	209	桦叶葡萄(四川泸定 1 号)	248	普赖德
171	索索葡萄	210	桦叶葡萄(四川泸定 2 号)	249	Fercal

表 1(续)

编号 Code	品种名称 Accessions	编号 Code	品种名称 Accessions	编号 Code	品种名称 Accessions
250	8B	272	沈阳玫瑰	294	先锋
251	抗砧 1 号	273	秋黑宝	295	郑黑
252	抗砧 3 号	274	晚黑宝	296	紫珍香
253	贝达	275	秀玉	297	醉人香
254	110R	276	瑰香怡	298	春光
255	Ru140	277	黑奥林	299	峰光
256	420A	278	红奥林	300	宝光
257	520A	279	白奥林	301	蜜光
258	5BB	280	红富士	302	霞光
259	5C	281	户太 8 号	303	公主红
260	S04(0905)	282	藤稔	304	申华
261	1103	283	京优	305	申丰
262	3309Couderc	284	甜峰	306	申玉
263	110(1224)	285	98-2	307	沈农硕丰
264	沪培 1 号	286	巨峰	308	沈农香丰
265	沪培 2 号	287	贵园	309	黑宝石
266	红标无核	288	状元红	310	光辉
267	新美无核红	289	黑色甜菜	311	巨玫瑰
268	月光无核	290	茉莉香	312	辽峰
269	夏黑	291	田野黑	313	瑞峰无核
270	立川无核	292	田野红	314	海玉珠
271	早黑宝	293	夕阳红		

编号 1 ~ 263 的葡萄品种为二倍体;编号 264 ~ 314 的葡萄品种为多倍体

The code of diploids is 1-263, the code of polyploids is 264-314

1.2 基因组 DNA 提取

采用 TIANGEN 植物基因组 DNA 提取试剂盒,对 314 份葡萄种质的基因组 DNA 进行提取。利用 1% 的琼脂糖凝胶对提取完的葡萄 DNA 溶液进行检测。利用 NanoDrop1000 微量紫外可见分光光度计检测 DNA 的纯度和含量,将浓度统一调至 50 ng/ μ L, -20°C 保存备用。

1.3 引物选择与合成

选用国际上通用的品种鉴定或指纹数据库建立的多态性较高的引物。引物 VrZAG62、VrZAG79^[11]、VVS2^[8]、VVMD5、VVMD7^[9]、VVMD28、VVMD32、VVMD27、VVMD25^[10] 的正向引物 5' 端使用荧光标记, VrZAG62、VrZAG79、VVS2、VVMD5、VVMD7 使用 5' - FAM 标记, FAM 为羟基荧光素; VVMD28、VVMD32、VVMD27、VVMD25 使用 5' - HEX 标记, HEX 为六氯荧光素。所有引物均由北京阅微基因有

限公司合成。

1.4 PCR 扩增及产物检测

采用 20 μ L PCR 反应体系: 10 \times Buffer (含 Mg^{2+}) 2.0 μ L, dNTPs (2.5 mmol/L) 2.0 μ L, DNA 模板 (50 ng/ μ L) 2.0 μ L, EXTaq 酶 (5 U/ μ L) 0.2 μ L, 上下游引物 (10 mmol/L) 各 1.0 μ L, ddH₂O 补足 20 μ L。扩增程序为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 4 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 适温退火 30 s (不同引物, 退火温度不同), 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 45 s, 共 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min; 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。扩增产物采用毛细管电泳检测; 在 96 孔样板的每个孔中分别加 1 μ L 稀释后的 PCR 产物, 0.5 μ L ROX500 分子量内标和 8.5 μ L 甲酰胺, 500 r/min 离心 10 s, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 3 min, 于 ABI 3730XL 全自动基因测序仪上进行电泳检测。

1.5 数据统计与分析

毛细管荧光电泳结束后, 利用软件 GeneMapper

v3.25 对 ABI 3730XL 分析软件中导出的原始数据进行分析,最终分析结果以 Excel 形式导出,并对所得的荧光数据进行人工分析和校正。对最终得到的多态性片段进行统计,有峰的记为“1”,无峰的记为“0”,缺失数据记为“999”,形成“1/0”矩阵。利用 PopGene version. 32 软件计算扩增产物多态性百分率(*PPB*, percentage of polymorphic band)、等位基因数、基因型数;利用 PIC_CALC Version 0.6 软件计算多态性信息含量(*PIC*, polymorphism information content)值。

对于多倍体葡萄种质,利用 NTSYS-PC 2.1 软件 Similarity 模块中的 Qualitative data 程序计算各个品种间的遗传相似系数,生成遗传相似系数矩阵,采用非加权组平均法(UPGMA, unweighted pair group with arithmetic mean)方法生成聚类图。对于二倍体葡萄种质,利用软件 PowerMarker 3.25 进行

聚类,并生成聚类图。

2 结果与分析

2.1 SSR 引物扩增结果多态性分析

本试验选用的国际通用的 9 对 SSR 引物均表现出较高的多态性。利用该 9 对 SSR 引物在 314 份供试材料中进行扩增,共扩增出 199 条带,均具有多态性,表明葡萄基因组 DNA 的多态性,揭示了不同葡萄品种间的遗传差异。每对引物平均扩增出 22.1 条带,其中引物 VVMD28 扩增得到的等位基因数最多,为 31 个;VrZAG79 扩增得到的等位基因数最少,为 17 个(表 2)。本试验选用的 9 对 SSR 引物,其 *PIC* 值变化范围为 0.793~0.886(表 2),引物中没有低度多态性引物。表明该 9 对 SSR 引物能以较高的信息量反映出葡萄品种的基因型多样性水平,能够用于分析葡萄种质资源的遗传多样性水平。

表 2 SSR 引物扩增情况

Table 2 The genotyping results by SSR markers

引物 Primer	基因型个数 Number of genotypes	等位基因数 Number of alleles	多态性位点数 Number of polymorphic alleles	多态性百分率(%) <i>PPB</i>	产物大小(bp) Product size	多态性信息 含量 <i>PIC</i>
VVMD28	128	31	31	100	211~281	0.886
VVMD32	76	22	22	100	216~270	0.801
VVMD27	75	21	21	100	171~217	0.797
VrZAG79	90	17	17	100	234~268	0.873
VVMD7	100	19	19	100	229~263	0.862
VrZAG62	91	23	23	100	170~216	0.831
VVMD25	83	22	22	100	228~282	0.793
VVS2	113	21	21	100	121~165	0.867
VVMD5	87	23	23	100	221~289	0.844
合计 Total		199				
平均 Mean	88	22.1				0.839

2.2 葡萄 DNA 指纹数据库的构建

本试验参考薛华柏等^[22]的方法构建 DNA 指纹数据库。对 314 个葡萄品种利用 9 对 SSR 引物进行 PCR 扩增及毛细管电泳检测,并对检测结果进行条带统计。首先统计出每对引物在参试葡萄品种中的基因型数目,将引物按照基因型数目由多到少进行排序;在第一个位点上,将所有葡萄品种的基因型数据按升序进行排序,并将唯一的基因型数据标示颜色背

景,表明对应的品种已被区分开,对于在第 1 个 SSR 位点上未被区分开的品种,再在第 2 个 SSR 位点上,将所有葡萄品种的基因型数据按升序进行排序,并将参与排序部分唯一的基因型数据及对应于前面 SSR 位点的基因型数据进行背景颜色标(示),说明相应品种被区分出来。按照以上步骤在 SSR 位点上依次进行排序,直到所有的供试品种均被标(示)背景颜色为止。在构建的指纹数据表中,所有葡萄品种的

SSR 基因型数据均被标示了背景颜色(除贵州水晶、云南水晶、关口葡萄、黑葡萄、牛奶、脆葡萄、木拉格、圆白等 14 个品种外,它们都存在对应的同物异名品种),进一步说明了利用这 9 对 SSR 核心引物可以将供试材料区分开。其中仅需 1 对引物就可从 314 份供试材料中区分出来的葡萄品种有 70 个,即代克赛、

早黑宝、白奥林、沪培 1 号、霞多丽等;最多需要 8 对引物才能从供试品种中区分出来的葡萄品种有 2 个,即魏天子、梅鹿辄(七 24)。因此,本研究最终利用 VVMD28、VVMD7、VVS2、VrZAG79、VrZAG62、VVMD32、VVMD5、VVMD27 共 8 对引物来构建葡萄品种 DNA 指纹数据库,详见表 3(数据未完全显示)。

表 3 部分葡萄品种在 8 个 SSR 位点的 DNA 指纹数据

Table 3 The fingerprinting dataset of a subset of grape cultivars

品种 Cultivar	SSR 位点 SSR sites							
	VVMD28	VVMD7	VVS2	VrZAG79	VrZAG62	VVMD32	VVMD5	VVMD27
槭叶葡萄	211/241	249/249	123/139	252/256	186/192	232/234	261/263	181/185
代克赛	213/215	243/243	145/147	242/242	212/212	244/244	229/229	207/211
山谷葡萄	213/241	249/263	139/143	252/256	188/196	232/234	263/263	203/207
5BB	213/249	231/263	139/147	248/256	196/210	256/256	233/263	187/207
5C	213/249	229/263	143/147	248/256	196/208	258/258	233/263	199/207
SO4	213/249	229/263	143/147	248/256	196/208	256/256	233/263	199/207
京紫晶	215/215	237/247	135/143	244/256	186/200	246/268	231/237	175/191
萨米特	215/215	243/243	145/147	252/252	210/210	244/244	229/229	207/211
弗莱	215/215	233/241	147/153	252/252	196/210	244/244	223/229	193/211
朱姆博	215/215	241/241	147/147	252/252	196/196	244/244	237/247	207/211
普赖德	215/215	241/241	145/147	242/252	196/196	244/244	223/237	193/207
早黑宝	215/215/241/241	241/241/245/245	149/149/153/153	236/236/236/236	186/186/190/190	246/246/268/268	225/225/229/229	175/175/181/181
白奥林	215/223/223/255	233/237/245/245	121/123/133/149	244/244/248/262	184/200/200/202	246/246/268/268	231/233/235/235	181/181/191/191
春光	215/223/241/255	237/245/245/247	121/131/131/147	236/236/248/252	184/186/190/190	246/246/254/268	225/229/229/233	175/175/181/181
宝光	215/223/241/255	237/245/245/247	121/133/141/141	236/236/244/256	184/186/190/190	246/246/254/268	225/225/229/229	175/175/181/181
蜜光	215/223/241/255	237/241/245/247	121/133/141/147	236/244/244/256	184/186/186/190	236/246/254/268	225/225/229/229	175/175/181/181
沪培 1 号	215/223/255	237/237/245	123/131/133	240/244/256	186/186/202	236/236/268	229/229/235	181/181/191
霞多丽	215/225	237/241	135/141	240/242	186/194	236/268	231/235	177/185
黑巴拉多	215/227	237/251	123/149	248/248	186/186	246/268	233/235	177/181
红玫瑰	215/227	233/245	123/131	244/256	200/202	236/242	225/229	183/185
无核白	215/241	237/251	143/149	244/256	186/186	246/246	231/231	177/191
无核白(阿富汗)	215/241	237/237	141/149	254/256	186/186	246/270	229/231	191/191
无核白(宁夏)	215/241	251/251	139/149	244/254	186/186	246/252	231/237	177/191
巨玫瑰	223/233/241/255	233/233/247/247	131/131/133/133	240/240/244/248	184/184/190/202	236/236/268/268	233/233/235/235	175/175/181/181
夏黑	223/241/255	237/247/249	131/131/131	240/244/244	186/186/186	236/236/268	229/229/233	177/177/181
巴拉蒂	223/255	237/241	121/145	244/248	186/202	236/268	229/233	175/181
烟 73	225/225	241/245	131/135	242/256	186/202	258/268	223/235	177/185
黑葡萄(新疆)	231/231	241/247	133/151	248/254	186/192	252/268	225/243	181/191

阴影的指纹数据为相应品种的 SSR 特征指纹数据

Shadow data are the characteristic fingerprinting data of their corresponding cultivars

2.3 聚类分析

2.3.1 二倍体葡萄品种的遗传多样性分析 依据 9 对引物对 263 份葡萄品种的扩增结果构建的“1/0”矩阵,计算两两品种间的遗传相似系数,其变幅为 0.410~1.00,其中遗传相似系数为 1.00 的品种是一些疑似同物异名品种。利用 UPGMA 法构建遗传关系聚类图(图 1)。聚类结果表明:圆叶葡萄亚属(Subgen. *Muscadinia* (Planch.) Rehder) 的 5 份圆叶葡萄(*V. rotundifolia* Michx.), 即弗莱、朱姆博、萨米特、代克赛、普赖德,在截距 0.33 处与属于真葡萄亚属(Subgen. *Euvitis* Planch.) 的品种分开,单独聚为一类(由黑色空心正方形标注)。除圆叶葡萄外,其余 258 份材料在截距 0.25 处分为 15 个亚类。

A 亚类包含有 198 个葡萄品种,占有所有材料的 75.3%。A 亚类在截距 0.24 处又可分为 2 个小类,即 A1 和 A2。

A1 小类包括 178 个品种,主要是欧亚种葡萄,其中含有 64 个古老的中国地方品种,如牛奶、红葡萄、红鸡心、驴奶、大青葡萄、喀什哈尔、索索葡萄、黑鸡心等材料。A1 小类在截距 0.21 处又可以分为 3 个组,即组 I(由黄色实心三角形标注)、组 II(由蓝色实心菱形、黄色空心正方形、红色实心三角形标注)和组 III(由玫红色实心正方形标注)。组 I 中含有 18 个葡萄品种,其中来自法国的葡萄品种基本全部聚在本组,本组中来源于西藏的品种那布古珠与赤霞珠聚在一起;蛇龙珠与品丽珠聚在一起,与其他酿酒品种相比,蛇龙珠与品丽珠的亲缘关系最近,此结果与姚玉新等^[23]和宋来庆等^[24]的研究结果一致。组 II 中共有 108 个葡萄品种,70.4% 的品种是来自中国,组 II 在截距 0.19 处可分为 3 个亚组,即亚组①(由红色实心三角形标注)、亚组②(由黄色空心正方形标注)、亚组③(由蓝色实心菱形标注)。亚组①中含有 7 个品种,除了京早晶外,其余 6 个均为中国地方品种,并且存在一组同物异名品种,即黑鸡心与黑葡萄。亚组②中有 20 个品种,具有瑰宝血缘的品种聚在本亚组,本亚组还包括一组同物异名品种,即阿特巴格与红葡萄(新疆);本亚组中姊妹系品种直接聚在一起,例如,丽红宝和无核翠宝及晶红宝和早康宝,均为瑰宝和无核白鸡心杂交选育而成。此外,本亚组中一些无核品种也聚在一起,例如,晶红宝、早康宝与无核白鸡心;郑果大无核、京丰无核及优无核。亚组③包括 81 个品种,含有莎巴珍珠及玫瑰香血缘的品种大多聚集在本亚组中,共占 40.7%。济南早红、胜利、郑州早红、金田玫瑰均以

玫瑰香为亲本,它们直接与玫瑰香聚在一起。另外,姊妹系品种直接聚在一起,奥古斯特和京玉均由意大利和葡萄园皇后杂交选育而成。还有一些品种与亲本直接聚在一起,例如,超宝和其亲本之一的葡萄园皇后,香妃和其亲本之一的绯红,紫珍珠和其亲本之一的莎巴珍珠等。本亚组中有 3 对芽变品种均被区分开,即济南早红与 6-28、亚历山大与红亚历山大、绯红与 90-1。本亚组中的红双味、贵妃玫瑰、红香蕉、黑香蕉属于欧美杂种,因其具有玫瑰香或莎巴珍珠的血缘而与欧亚种聚在一起。组 III 包括 52 个品种,中国地方品种占 59.6%,48.4% 的中国地方品种聚集在本组中。其中,地方品种出现了较多的同物异名现象,例如,绿木纳格和木纳格;脆葡萄、马奶和牛奶等。本组中的大部分无核品种聚在一起,例如,京紫晶、大无核、无核白、无核白(阿富汗)、无核紫、秋无核、无核白(宁夏)、白无核、红无籽露、西营、黎明无核、无核白、无核白(巩义)。此外,紫甜无核、紫脆无核和金田美指均以牛奶为亲本,三者与牛奶聚在一起,黑巴拉多与其亲本之一的红巴拉多聚在一起,金田蓝宝石与其亲本之一的秋黑也聚在一起。

A2 小类主要是欧美杂种葡萄,包含有尼加拉、阳光玫瑰、康拜尔早生等,其中还包括一份带有玫瑰香味的欧亚种葡萄,即红玫瑰。供试材料中具有草莓香味的品种主要聚集在本小类中。康拜尔又叫康拜尔早生,是由 Moore Early × (Belvidere × 玫瑰香) 杂交育成^[25],具有康可的血缘^[26],在本亚类中两者均与康可聚在一起,但是康拜尔与康拜尔早生的带型却不相同,两者为同名异物品种。另外本亚类中尼加拉、贵州水晶、云南水晶、关口葡萄带型完全一致,可能属于同物异名品种。

B 亚类共有 9 个葡萄品种,均为中国野生葡萄及其衍生品种,北冰红和哈桑含有山葡萄血缘,聚在一起。两份变叶葡萄(*V. piasezkii* Maxim.), 即变叶葡萄(灵宝)和变叶葡萄(灵宝无毛)聚在一起。

C 亚类只包括 1 个中国野生葡萄,即秋葡萄(青要山)(*V. romaneti* Rom. Cail.).

D 亚类包括 25 个葡萄品种,除山葡萄(北京东灵山)和左优红外,其他 23 份材料均属于美洲种群,其中的 8B、5C、5BB 具有冬葡萄血缘,三者聚在一起;具有山葡萄血缘的左优红与山葡萄(北京东灵山)聚在一起;Ru140 与 110R 因具有相同的亲本—Berlandieri Resseguier No. 2 而直接聚在一起。

E 亚类包括 3 个中国野生葡萄,即腺枝葡萄(广

西)(*V. adenoclada* Hand. -Mazz.)、毛葡萄(广西)(*V. heyneana* Roem. & Schult.)和美丽葡萄(*V. bellula* (Rehder) W. T. Wang)。美丽葡萄(*V. bellula* (Rehder) W. T. Wang)又叫小叶毛葡萄,在中国葡萄属系统检索表中,美丽葡萄与毛葡萄均属于毛葡萄组,所以美丽葡萄与毛葡萄的关系较其他中国野生葡萄较近。

F亚类仅包括1个中国野生葡萄,即华东葡萄(信阳)。

G亚类包括葛藟葡萄(三清山)和野葡萄(木札岭1号)2个中国野生葡萄。

H亚类包括1份桑叶葡萄(*V. heyneana* Roem. & Schult. subsp. *Ficifolia* (Bunge) C. L. Li)及桑叶葡萄(青天河6号)和2份桦叶葡萄(*V. betulifolia* Diels & Gilg),即桦叶葡萄(泸定1号)和桦叶葡萄(泸定2号),两者均收集于四川,属于中国野生葡萄。

I亚类包括1份武汉葡萄(*V. wuhanensis* C. L. Li)即武汉葡萄(信阳)和1份来自于云南元谋的桦叶葡萄。

J亚类仅包括1个中国野生葡萄,即云南葡萄(会同3号)。

K亚类包括4个云南葡萄(*V. yunnanensis* C. L. Li)和1个刺葡萄,即云南葡萄(元谋3号)、云南葡萄2号、云南葡萄(元谋2号)、云南葡萄(湖南)和刺葡萄(梅岭山),均为中国野生葡萄。

L亚类包括1份河口葡萄(*V. hekouensis* C. L. Li)。

M亚类包括武汉葡萄及武汉葡萄2号。

N亚类包括4个来自不同地方的网脉葡萄(*V. wilsoniae* H. J. Veitch),即网脉葡萄(卢氏1号)、网脉葡萄(卢氏2号)、网脉葡萄(宝天曼1号)和网脉葡萄(宝天曼2号),4个网脉葡萄均来自河南省。另外还包括一份收集于武汉植物园的野葡萄。

O亚类只包括1份来自湖南的野葡萄。

在聚类分析中,葡萄属中的圆叶葡萄亚属与真葡萄亚属能聚类分开,其中真葡萄亚属中的中国野生葡萄大部分都单独聚为一类,说明中国野生葡萄与欧亚种、欧美杂种及美洲种的葡萄亲缘关系较远,而欧美杂种与欧亚种葡萄聚为了一大类,进而说明两者的亲缘关系较近。此外,由聚类结果可知,栽培品种聚为了一大类,而中国野生葡萄分支较多,共聚了14个小类,说明了野生葡萄的遗传基础更宽泛,栽培品种遗传基础较狭窄。该分类结果从DNA水平上反映了这些葡萄种质的亲缘关系,为葡萄育种的亲本选择提供理论依据。

同时,聚类结果表明遗传关系较近的品种容易聚在一起,且同一育种单位培育的品种大多聚在同一类群内,例如,山西省农业科学院果树研究所培育的瑰宝、秋红宝、早康宝、丽红宝、无核翠宝、晶红宝聚在A1小类组II的亚组②。北京市农林科学院林业果树研究所培育的瑞都无核怡、紫珍珠、爱神玫瑰、香妃聚集在A1小类组II的亚组③。另外来自新疆的葡萄品种主要集中于A1小类的组III中。从聚类图中还可以看到,中国的61份地方品种中存在同名异物及同物异名现象,说明了我国地方品种名称较混乱。

此外,本研究将61份中国葡萄地方品种的基因型数据与国外欧洲葡萄品种分子数据库(www.vivc.de)中的数据进行比对,发现5个中国地方品种与国外数据库中品种的基因型一致,即和田红和KuldzhinskII,库斯卡奇和Emerald seedless,绿木纳格和Gissary,茨中教堂和Baco noir,伊犁香葡萄和Muscat fleur d'oranger,可能是相同品种。另外还发现卡拉和Foster's White Seedling的基因型只差一个位点(VrZAG79)不一致。

2.3.2 多倍体葡萄品种的遗传多样性 根据9对SSR引物的扩增数据构建的多态性数据矩阵,利用NTSYS-PC 2.1软件,采用DICE相似系数计算供试材料两两品种间的遗传相似系数,形成遗传相似系数矩阵,供试品种的遗传相似系数变化范围为0.56~0.97。由供试品种间遗传相似系数变幅可看出,供试品种间的遗传差异较大,遗传基础较丰富。

根据遗传相似系数矩阵利用UPGMA法对供试品种进行聚类,从而形成聚类图(图2)。由聚类图可以看出,在相似系数为0.67处,51份葡萄品种可以分为3组,即I、II、III。I组郑黑单独聚为一类,郑黑的来源不详。II组由晚黑宝和秋黑宝组成,两者均属于欧亚种且亲本相同,均由瑰宝和秋红杂交选育而成。III组包含品种数量较多,除了沈阳玫瑰及早黑宝外,其他均为欧美杂种葡萄,主要为巨峰系的品种。通过本聚类图可以看出,姊妹系品种大多聚为一类,例如,春光、宝光和蜜光的亲本均是巨峰和早黑宝,与早黑宝直接聚在一起。沈农硕丰和沈农香丰均是紫珍珠的后代,三者直接聚在一起。由聚类结果可看出,51份葡萄品种均被区分开,但整体的相似系数较高,说明了优良性状的育种目标导致葡萄遗传背景变得狭窄,所以在葡萄育种工作中大力拓展育种基础是首要重要任务。

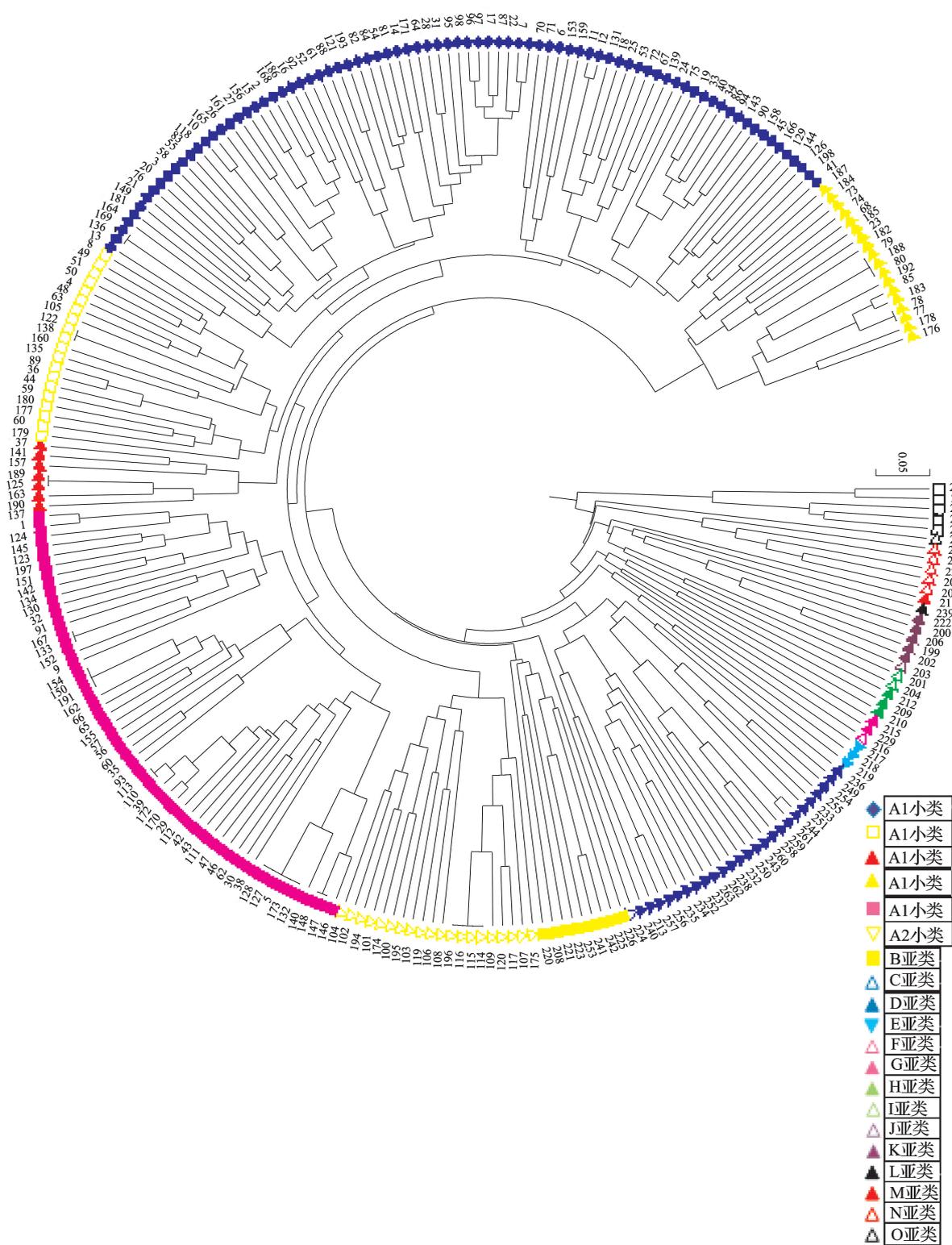


图1 263份葡萄材料的聚类结果
Fig. 1 Dendrogram of 263 grape materials

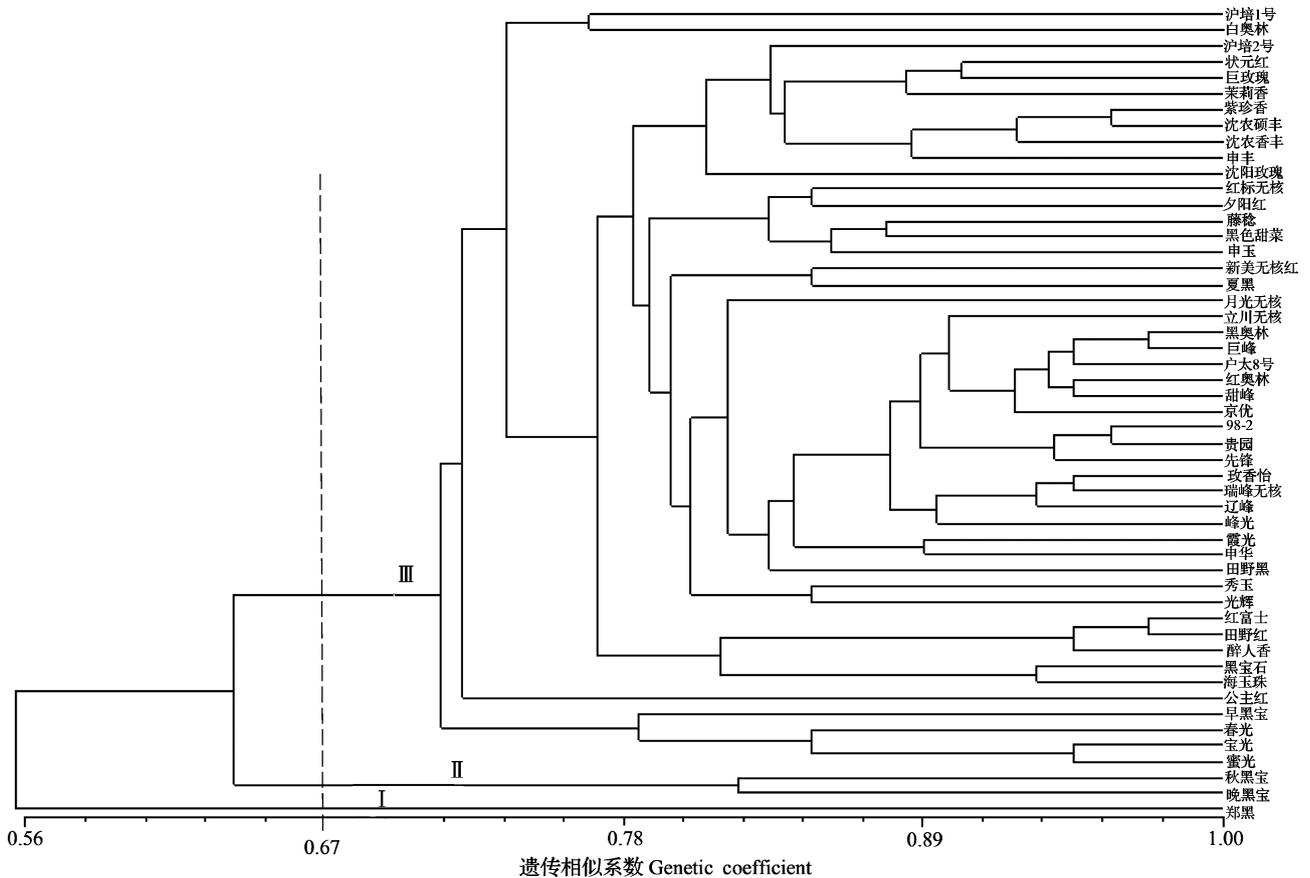


图2 51份葡萄材料的聚类结果
Fig. 2 Dendrogram of 51 grape materials

3 讨论

本研究采用毛细管荧光电泳技术,相比传统的聚丙烯酰胺凝胶电泳技术,该检测技术具有高效率、高通量、操作简单、自动化等优点,在农作物上已得到广泛应用,尤其在进行大规模材料的分析研究时,此方法显得尤为重要。此外,该方法在DNA指纹图谱的构建中已得到广泛应用^[27-28]。

近年来,SSR分子标记已被广泛应用于品种鉴定、遗传多样性分析及指纹图谱构建等方面。在这些研究中,所选用的SSR引物及检测方法各不相同,从而导致同一品种在不同研究之间的比较很难实现。本研究所选的9对高多态性SSR引物来自法国、德国、意大利等7个国家的相关实验室共同筛选^[29],可有效解决不同实验室之间的数据整合,有利于丰富国际葡萄品种数据库。目前,该9对引物已被广泛应用,但相同引物在各个研究中扩增所得等位基因数及多态性信息指数存在差异,例如本研究利用VrZAG79引物扩增出17条条带、片段范围在234~268之间、*PIC*值为0.873,而N. Stajner

等^[30]的扩增为13条、大小在238~260之间、*PIC*值为0.834。F. Carimi等^[31]的研究为10条、大小在226~258之间、*PIC*值为0.736。这可能与研究所选取葡萄种质种类及数量有关。

DNA指纹数据库给予每个品种唯一的指纹身份证,在判断某品种是否为新品种时,可以直接将申请品种的DNA指纹数据和指纹数据库中的数据进行比对,即可进行初步的判定。对于以不同名称来申请新品种的可预先将其排除,与常规的DUS测试相比,能够大幅度减少工作量。因此,DNA指纹数据库可以作为新品种DUS测试的辅助工具。利用DNA分子标记构建指纹数据库的一般原则是用尽量少的引物区分开尽量多的品种,因此就要求所用标记的多态性要高。多态性信息含量(*PIC*)是用来衡量SSR引物多态性高低的一个重要指标。1980年,D. Botstein等^[32]首先提出了衡量基因变异程度高低的的多态性信息量指标,指出当 $PIC > 0.5$ 时,该引物为高度多态性信息引物,当 $0.25 \leq PIC \leq 0.5$ 时,该引物为中度多态性信息引物,当 $PIC < 0.25$ 时,该引物为低度多态性信息引物。本研究所用引

物的 PIC 值均大于 0.7,均为高度多态性引物。其中 VVMD28 扩增得到 31 个等位基因,基因型数 128 个,多态性信息含量为 0.886。93.9% 的供试品种仅用 4 对引物即可区分开来,表明所采用的 SSR 标记技术具有较强的特异性,获得的指纹数据差异明显,为品种鉴定奠定了基础,进一步说明了 SSR 分子标记对葡萄品种进行鉴定的可行性。部分品种如伊犁葡萄与和田红,黑葡萄(新疆)与紫红型葡萄,白葡萄与白老虎眼,尼加拉与贵州水晶、关口葡萄、云南水晶等的遗传相似系数为 1.00,可能是同物异名品种,建议进行田间 DUS 测试鉴定。

本研究的遗传多样性分析表明,中国野生葡萄及美洲种群葡萄分别归为一类,欧亚种与欧美杂种归为一大类,且美洲种与欧亚种和欧美杂种的关系较近。该结果与方连玉等^[33]及温景辉等^[34]的结果类似,他们均利用 SSR 分子标记对野生种、欧亚种、欧美杂种、美洲种葡萄种质进行了遗传多样性分析,两者聚类结果均表明,欧亚种、欧美杂种与美洲种的亲缘关系较近,且野生种单独聚为一类。此外,本研究中巨峰系多倍体品种聚为一大类,该聚类结果与尹玲等^[21]的结果类似。在本研究中,康拜尔和康拜尔早生是同一品种,可能是圃内保存的品种出差所致。另外,伊犁香葡萄的来源不详,其基因型数据与 Muscat fleur d'oranger 一致,而与小白玫瑰在每个位点上都有一个等位基因相同。据报道,小白玫瑰是 Muscat fleur d'oranger 的亲本之一^[35],因此猜测小白玫瑰可能是伊犁香葡萄的亲本之一。从聚类图中,发现 A 类群中的无核白、宁夏无核白、西营、红无籽露等几个无核品种聚在一起,其中西营的亲本不详,但它与红无籽露的基因型数据只在引物 VrZAG79 上有差异,所以推测两者的亲缘关系较近。刘崇怀等^[36]对 37 份无核葡萄品种的形态特征进行调查,并对所得数据进行统计分析,也得到了相同的结果。除此之外,本研究在 61 份地方品种中发现存在同名异物和同物异名现象。其中无核白与无核白(宁夏)、无核白(阿富汗)为同名异物品种,后两者与前者在 3 个 SSR 位点上(VrZAG62、VVMD27 和 VVMD28)基因型完全相同,它们在每一个位点上至少有一个等位基因相同,所以它们可能是亲子关系,另外,无核白(宁夏)和无核白(阿富汗)成熟期比无核白早,且两者的结实率与无核白相比较好。黑葡萄(山西)和黑葡萄(新疆)也属于同名异物品种,据记载黑葡萄(新疆)是新疆地方品种^[24],而其他被称为黑葡萄的品种可能是因为当地农民根据果

皮颜色而命名。

贵州水晶、云南水晶和关口葡萄与美国品种尼加拉具有完全相同的基因型数据,并且前三者与尼加拉也具有相似的形态学特征,幼嫩梢尖均为绿黄色,嫩叶为灰绿色,成熟的叶片为深绿色,果实表皮颜色均是黄绿色,果粒形状为近圆形,并且果肉具有浓烈的麝香味。因此,推测关口葡萄、云南水晶、贵州水晶可能是尼加拉的别称。黑鸡心在山西清徐被称为黑葡萄,实则两者可能为同一品种^[37]。另外,绿木纳格的维吾尔语名为木纳格,红葡萄(新疆)的维吾尔语名为阿特巴格,牛奶葡萄在新疆被称为马奶葡萄,在山西被称为脆葡萄,它们可能是同一品种^[26]。另外,喀什哈尔葡萄在新疆也被称为白葡萄,且喀什哈尔、大青葡萄是圆白葡萄的别称,所以它们可能为同物异名品种^[26],而白老虎眼是河北的一个地方品种,与白葡萄带型一致。类似情况还发生在黑葡萄(新疆)和紫红型葡萄上,两者均来自新疆,且具有相同基因型,推测紫红型葡萄可能是黑葡萄(新疆)的别称。对于不能确定的疑似同物异名品种建议进行田间 DUS 测试鉴定,来进一步确定其身份。

另外,通过与欧洲葡萄品种分子数据库的比对,5 组疑似同物异名品种中,和田红和 KuldzhinskII 已经被证实为同物异名品种(<http://www.vivc.de/index.php?r=passport%2Fview&id=6548>)。因卡拉和 Foster's White Seedling 的基因型数据只在一个位点上有差异(VrZAG79),推测 Foster's White Seedling 在传入中国后发生了变异。A. Milla-Tapia 等^[38]认为葡萄品种进入一个新环境后,为了适应特定的环境,葡萄在生长过程中可能会发生变异。聚类分析表明,大部分具有相同遗传背景的种质聚为了一类,当然也存在没有聚在一起的情况,这充分体现了葡萄丰富的遗传多样性和不同种质资源之间所拥有的复杂的遗传结构。本研究为新品种的选育和保护及品种鉴定提供了理论依据,为葡萄产业的可持续发展奠定了基础。

葡萄种质资源丰富,本研究开展之前还未见大规模地构建葡萄 DNA 指纹数据库的相关报道。本研究仅采用了 314 份葡萄种质,且随着葡萄品种不断地增加,该 9 对引物的鉴别能力可能会逐渐降低,所以在保证质量的前提下,需要进一步丰富完善引物的数量。本研究仅是初步构建了一个指纹数据库,以 Excel 表格形式呈现出来,不利于共享,而且在进行品种鉴定时,需要与指纹数据表中数据进行人工比对,难度大、耗时、耗力,也容易出现人为错

误。如果将这些数据整合成一个系统,构建成一个葡萄指纹数据库管理系统,将会大大提高工作效率。

本实验室拟构建一个葡萄指纹数据库管理系统,包括3个方面内容,一是进行信息资料的整合,包括品种信息(名称、种性、来源)、引物信息(引物名称、序列信息、位置、退火温度)及形态信息;二是进行数据类资料的整合,其包括DNA指纹数据和形态学性状数据;三是图片类资料的整合,其包括形态性状的图片及扩增产物的电泳图。本研究所构建的指纹数据库仅包含了以上部分内容,主要是葡萄品种信息数据、引物信息数据和SSR指纹数据,其余工作需要补充。另外,本研究只对314份葡萄种质进行了SSR分析,其结果仅能反映部分葡萄品种的遗传多样性,不能代表我国整体葡萄种质资源的遗传多样性水平。因此,在今后的研究中,将会不断完善充实DNA指纹数据库。

参考文献

- [1] 晁无疾. 调整提高,转型升级,促进我国葡萄产业稳步发展[J]. 中国果菜,2015(9):12-14
- [2] Laucou V, Lacombe T, Dechesne F, et al. High throughput analysis of grape genetic diversity as a tool for germplasm collection management[J]. Theor Appl Genet, 2011, 122(6):1233-1245
- [3] 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
- [4] Li B, Jiang J, Fan X, et al. Molecular characterization of Chinese grape landraces (*Vitis L.*) using microsatellite DNA markers[J]. HortScience, 2017, 52(4):533-540
- [5] Gross B L, Volk G M, Richards C M, et al. Identification of "duplicate" accessions within the USDA-ARS national plant germplasm system malus collection[J]. J Am Soc Hort Sci, 2012, 137(5):333-342
- [6] Urrestarazu J, Miranda C, Santesteban L G, et al. Recovery and identification of grapevine varieties cultivated in old vineyards from navarre (northeastern spain) [J]. Sci Hort, 2015, 191:65-73
- [7] 滕海涛, 吕波, 赵久然, 等. 利用DNA指纹图谱辅助植物新品种保护的可能性[J]. 生物技术通报, 2009(1):1-6
- [8] Thomas M R, Scott N S. Microsatellite repeats in grapevine reveal DNA polymorphisms when analysed as sequence-tagged sites (STSs) [J]. Theor Appl Genet, 1993, 86(8):985-990
- [9] Bowers J E, Dangl G S, Vignani R, et al. Isolation and characterization of new polymorphic simple sequence repeat loci in grape (*Vitis vinifera L.*) [J]. Genome, 1996, 39(4):628-633
- [10] Bowers J E, Dangl G S, Meredith C P. Development and characterization of additional microsatellite DNA markers for grape [J]. Amer J Enol Viticult, 1999, 50(3):243-246
- [11] Sefc K M, Regner F, Turetschek E, et al. Identification of microsatellite sequences in *vitis riparia* and their applicability for genotyping of different *vitis* species [J]. Genome, 1999, 42(3):367-373
- [12] 范建光, 张海英, 宫国义, 等. 西瓜DUS测试标准品种SSR指纹图谱构建及应用[J]. 植物遗传资源学报, 2013, 14(5):892-899
- [13] 肖子发. 利用SSR标记构建杂交水稻品种DNA指纹数据库[D]. 长沙:中南大学, 2011
- [14] 李莉, 王俊峰, 颜廷进, 等. 基于SSR标记的山东省小麦DNA指纹图谱的构建[J]. 植物遗传资源学报, 2013, 14(3):537-541
- [15] 苗晗, 张圣平, 顾兴芳, 等. 中国黄瓜主栽品种SSR遗传多样性分析及指纹图谱构建[J]. 植物遗传资源学报, 2014, 15(2):333-341
- [16] 高源, 刘凤之, 王昆, 等. 基于TP-M13-SSR指纹图谱的中国原产苹果属植物分子身份证的建立[J]. 植物遗传资源学报, 2015, 16(6):1290-1297
- [17] Kiss E, Kozma P, Halász G, et al. Pedigree of carpathian basin and hungarian grapevine cultivars based on microsatellite analysis [C]//Proceedings of the IX International Conference on Grape Genetics and Breeding, Udine, Italy, 2006, 827:221-224
- [18] 杜晶晶. 基于SSR标记的葡萄遗传多样性分析及分子身份证构建[D]. 海口:海南大学, 2013
- [19] 宪立杰, 刘兴菊, 李雪雁, 等. 葡萄种质遗传多样性的SSR分析及指纹图谱构建[J]. 北方园艺, 2013(11):87-90
- [20] 李雪雁, 梁海永, 宪立杰, 等. 基于SSR技术对七十五份栽培葡萄品种的鉴定研究[J]. 北方园艺, 2015(13):115-119
- [21] 尹玲, 张晨, 向江, 等. 我国新育成葡萄品种SSR指纹图谱的建立[J]. 果树学报, 2015, 32(3):366-373
- [22] 薛华柏, 杨健, 王龙, 等. 29个梨品种SSR特征指纹数据表的构建[J]. 果树学报, 2015, 32(6):1028-1035
- [23] 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
- [24] 宋来庆, 尹克林, 翟衡, 等. 蛇龙珠葡萄品种亲缘关系的RAPD分析[J]. 中国农学通报, 2005, 21(7):87-90
- [25] 李世诚, 金佩芳, 李宏义, 等. 康拜尔早生葡萄的引种及制汁适应性试验[J]. 上海农业科技, 1989(1):6-8
- [26] 孔庆山. 中国葡萄志[M]. 北京:中国农业科学技术出版社, 2004:189
- [27] 王瑞, 张福耀, 程庆军, 等. 利用SSR荧光标记构建20个高粱品种指纹图谱[J]. 作物学报, 2015, 41(4):658-665
- [28] 陈世军, 张明泽, 姚玉仙, 等. 基于SSR标记的黔南茶树种质资源DNA指纹图谱构建[J]. 植物遗传资源学报, 2017, 18(1):106-111
- [29] This P, Jung A, Boccacci P, et al. Development of a standard set of microsatellite reference alleles for identification of grape cultivars [J]. Theor Appl Genet, 2004, 109(7):1448-1458
- [30] Stajner N, Rusjan D, Korosec-Koruzza Z, et al. Genetic characterization of old slovenian grapevine varieties of *Vitis vinifera L.* by microsatellite genotyping [J]. Am J Enol Viticult, 2011, 62(2):250-255
- [31] Carimi F, Mercati F, Abbate L, et al. Microsatellite analyses for evaluation of genetic diversity among sicilian grapevine cultivars [J]. Genet Resour Crop Evolution, 2010, 57(5):703-719
- [32] Botstein D, White R L, Skolnick M, et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms [J]. Amer J Hum Genet, 1980, 32(3):314-331
- [33] 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
- [34] 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
- [35] Anna S, Danielatello M, Manna C. Genetics and ampelography trace the origin of muscat fleur d'oranger [J]. Am J Enol Viticult, 2008, 59(2):200-204
- [36] 刘崇怀, 帖锋, 潘兴, 等. 无核葡萄品种资源性状的聚类分析[J]. 果树学报, 2006, 23(4):531-533
- [37] 靳德伟, 杨瑞山. 清徐葡萄[J]. 山西果树, 1982(1):64-66
- [38] Milla-Tapia A, Gómez S, Moncada X, et al. Naturalised grapevines collected from arid regions in northern chile exhibit a high level of genetic diversity [J]. Aust J Grape Wine R, 2013, 19(2):299-310