

# 巨峰系葡萄主栽品种的 SRAP 遗传多样性分析与 MCID 法快速鉴定

张中海<sup>1</sup>, 张安世<sup>1\*</sup>, 高登涛<sup>2</sup>, 魏志峰<sup>2</sup>

(1. 焦作师范高等专科学校理工学院, 河南 焦作 454000; 2. 中国农业科学院郑州果树研究所, 郑州 450009)

**摘要:**为探讨巨峰系葡萄种质的遗传关系, 该研究利用 SRAP 标记对 24 个巨峰系葡萄品种进行遗传多样性分析, 并应用人工绘制品种鉴别示意图(MCID)法建立品种鉴定图(CID)。筛选出 12 对引物对 24 个巨峰系葡萄品种进行 PCR 扩增, 共扩增出 126 个条带, 其中多态性条带 99 条, 多态性比率为 78.57%。各引物观测等位基因数( $N_a$ )、有效等位基因数( $N_e$ )、Nei's 基因多样性指数(H)和 Shannon's 信息指数(I)的平均值分别为 1.785 7、1.358 1、0.217 6 和 0.338 8。24 个巨峰系葡萄品种的遗传相似系数(Genetic Similarity Coefficient, GS)在 0.619 0~0.960 3, 变幅为 0.341 3。表明 24 个巨峰系葡萄品种间的遗传差异较小。利用 UPGMA 构建 24 个巨峰系葡萄种质资源的聚类树状图, 在遗传相似系数为 0.72 处可将 24 个巨峰系葡萄品种分为 3 组, 第 I 组有 22 个品种, 第 II 组为奥林匹亚, 第 III 组为黑丰。利用 6 对引物扩增的多态性谱带构建了 24 个巨峰系葡萄品种的 CID 图, 利用此图可以找出区分任意 2 个品种的引物, 为巨峰系葡萄品种鉴定提供科学依据。

**关键词:**葡萄; 品种; SRAP; 遗传多样性; 人工绘制植物品种鉴别图(MCID)法

中图分类号: S663.1; Q943

文献标识码: A

文章编号: 2096-5877(2022)04-0038-05

## Genetic Diversity Analysis of Main Kyoho Grapevine Series Cultivars Based on SRAP Markers and Rapid Identification by MCID Method

ZHANG Zhonghai<sup>1</sup>, ZHANG Anshi<sup>1\*</sup>, GAO Dengtao<sup>2</sup>, WEI Zhifeng<sup>2</sup>

(1. School of Science, Jiaozuo Normal College, Jiaozuo 454000; 2. Zhengzhou Fruit Research Institute, CAAS, Zhengzhou 450009, China)

**Abstract:** In order to explore the genetic relationship among the germplasm resources of Kyoho grapevine series, the genetic diversity of 24 cultivars was analyzed by SRAP marker, and the cultivar identification diagram (CID) was constructed by using the manual cultivar identification diagram (MCID). 12 primers were screened for PCR amplification of 24 cultivars. A total of 126 bands were generated, of which 99 bands were polymorphic bands (78.57%). The average value of observed number of alleles ( $N_a$ ), effective number of alleles ( $N_e$ ), Nei's gene diversity (H) and Shannon's information index (I) were 1.7857, 1.3581, 0.2176 and 0.3388, respectively. The genetic similarity coefficient among 24 cultivars ranged from 0.6190 to 0.9603, with a range of 0.3413. The above results indicate that the genetic differences among the tested cultivars were small. The dendrogram of 24 cultivars was constructed using UPGMA. They can be divided into 3 groups at genetic similarity coefficient of 0.72, of which there were 22 cultivars in Group I, while Group II was Olympia and Group III was Heifeng. CID of 24 cultivars was constructed using polymorphic bands by 6 primers, by using CID we can find the primers that distinguish any two cultivars, providing scientific basis for the identification of Kyoho grapevine series.

**Key words:** Grape; Cultivar; SRAP; Genetic diversity; Manual cultivar identification diagram (MCID)

巨峰葡萄是由日本民间育种学家大井上康用

康贝尔早生的巨型四倍体突变品种石原早生作母本, 与露萨基的巨型四倍体突变品种森田尼作父本杂交育成<sup>[1]</sup>, 以巨峰葡萄为亲本或其后代为育种材料选育的系列品种统称为巨峰系葡萄, 巨峰葡萄也已成为我国葡萄育种中的骨干亲本<sup>[2]</sup>。巨峰系葡萄果粒大、品质优良, 被世界各地广泛种植, 深受消费者喜爱。随着巨峰系葡萄生产的不断扩大, 地区间的品种交流日益频繁, 品种间的

收稿日期: 2020-05-24

基金项目: 中国农业科学院科技创新工程专项经费项目(CAAS-ASTIP-2015-RIP-04); 国家重点研发计划项目(2018YFD0201300)

作者简介: 张中海(1978-), 男, 讲师, 硕士, 主要从事园艺植物栽培研究。

通讯作者: 张安世, 男, 硕士, 教授, E-mail: aszhang1212@163.com

遗传关系也日益复杂,因此,有必要对巨峰系葡萄品种的遗传特性进行深入研究。

目前,分子标记技术已成为植物遗传多样性分析中重要的研究工具<sup>[3]</sup>。Li等<sup>[4]</sup>开发了一种新型分子标记技术SRAP,该技术操作简便、多态性高、稳定性好,主要针对真核基因的开放阅读框(open reading frames, ORF)进行扩增,能有效对性状进行跟踪<sup>[5]</sup>,在植物遗传多样性分析、种质资源鉴定、遗传图谱绘制等研究中有广泛应用<sup>[6-8]</sup>。

人工绘制品种鉴别示意图(manual cultivar identification diagram, MCID)法是基于DNA分子标记快速鉴定品种的方法,能充分、直观地反映不同引物,鉴别区分不同品种的图谱关系。

目前,MCID法已应用在柿<sup>[9]</sup>、茶树<sup>[10]</sup>、萝卜<sup>[11]</sup>等植物品种的鉴定中,而基于随机扩增多态性DNA(Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD)分子标记的葡萄MCID法品种鉴定也有成功应用<sup>[12-13]</sup>。本研究在已有系谱<sup>[1-2,14]</sup>的基础上,对生产上24个巨峰系葡萄主栽品种进行了SRAP分析,并利用MCID法建立CID图谱,以期为葡萄种质资源的鉴定和新品种选育提供分子水平的科学依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验材料

供试的24个巨峰系葡萄品种材料均由中国农业科学院郑州果树研究所葡萄种质资源圃提供(表1)。每个品种选取3株,每株采集2枚健康的幼叶,分别用封闭的塑料袋包装,保存于冰盒,及时送回实验室,置于-80℃超低温冰箱中保存备用。

表1 供试材料

| 编号 | 品种名称 | 编号 | 品种名称   |
|----|------|----|--------|
| 1  | 高妻   | 13 | 井川1055 |
| 2  | 高墨   | 14 | 巨峰     |
| 3  | 黑奥林  | 15 | 龙宝     |
| 4  | 黑潮   | 16 | 蜜汁     |
| 5  | 红富士  | 17 | 藤稔     |
| 6  | 红伊豆  | 18 | 天秀     |
| 7  | 红山彦  | 19 | 伊豆锦    |
| 8  | 红瑞宝  | 20 | 信浓乐    |
| 9  | 红井川  | 21 | 先锋     |
| 10 | 红皇后  | 22 | 黑丰     |
| 11 | 京亚   | 23 | 奥林匹亚   |
| 12 | 京优   | 24 | 蜜红     |

### 1.2 葡萄基因组DNA的提取

每个巨峰系葡萄品种取3片不同植株的幼嫩

叶片混合,采用改良CTAB法<sup>[15]</sup>提取葡萄基因组DNA,所得DNA用紫外分光光度法和琼脂糖凝胶电泳法检测其质量及完整性,并将模板DNA浓度稀释至20 ng/ $\mu$ L, -20℃保存备用。

### 1.3 引物筛选与SRAP-PCR扩增

从100对SRAP引物中筛选出谱带清晰、重复性好的引物用于24个巨峰系葡萄品种的遗传多样性研究与CID图的绘制。SRAP引物根据张捷等<sup>[16]</sup>公布的引物序列(包括10个正向引物Me1~Me10和10个反向引物em1~em10)。PCR反应体积10  $\mu$ L,包含1.1  $\mu$ L DNA、正反引物各0.8  $\mu$ L(引物浓度为10  $\mu$ mol/L)、5.0  $\mu$ L 2 $\times$ Taq Master-Mix和2.3  $\mu$ L RNase-Free water。SRAP-PCR扩增程序为:94℃ 5 min; 94℃ 1 min, 35℃ 1 min, 72℃ 1.5 min, 5个循环; 94℃, 1 min, 51℃ 1 min, 72℃ 1.5 min, 35个循环; 72℃ 7 min。4℃保存。扩增产物用1.5%琼脂糖凝胶分离。

### 1.4 数据统计与分析

对SRAP引物的扩增条带进行比较,从中筛选出12对多态性高且条带清晰的引物,并对各引物的扩增条带进行统计分析,有条带记为“1”、无条带记为“0”,据此构建“1”和“0”矩阵。利用POPGENE 1.32软件计算各遗传多样性参数特征值,包括多态性位点百分率(PPL)、观测等位基因数( $N_a$ )、有效等位基因数( $N_e$ )、Nei's基因多样性(H)和Shannon's多样性指数(I)。用NTSYS-pc 2.0软件构建UPGMA聚类图。

### 1.5 CID图谱绘制

选取PCR扩增产物清晰、多态性好的引物对24个巨丰系葡萄品种进行鉴定。首先,任意选择其中一个引物PCR扩增的指纹图谱,根据在相同的电泳迁移率处特征性谱带的有无进行统计。具有某一特征性谱带的归为一组,无此谱带的归为另一组。如果该特征性谱带被某一品种单独具有或缺失,则该品种被直接鉴别出来。按此方法逐步增加引物对每个小组进行区别、再分组,直至将所有葡萄品种鉴别。最后,根据每组的鉴别结果,人工绘制CID图谱,并在CID图谱的相应位置上标注所用的引物及多态性谱带大小(bp)。

## 2 结果与分析

### 2.1 SRAP扩增结果及遗传多样性分析

利用10个正向引物(Me1~Me10)与10个反向引物(em1~em10)两两配对,组成100对SRAP引物组合,对24个巨峰系葡萄品种进行PCR扩增,

选取其中12个多态性高、条带清晰的引物组合 (Me1~em5, Me2~em3, Me2~em9, Me2~em10, Me3~em9, Me4~em3, Me4~em5, Me4~em8, Me6~em1, Me6~em4, Me7~em7, Me9~em8) 进行统计分析,结果显示,12对引物共扩增出126个条带,其中99个条带具有多态性,多态性位点百分率(PPL)为78.57%。利用POPGENE 1.32软件计算各引物的观测等位基因数( $N_a$ )、有效等位基因数( $N_e$ )、 $N_ei$ 's 基因多样性指数(H)和Shannon's 信息指数(I)的平均值分别为1.785 7、1.358 1、0.217 6和0.338 8,说明24个巨峰系葡萄品种间遗传多样性水平较低。

## 2.2 UPGMA 聚类分析

利用NTSYS-pc软件计算品种间的遗传相似系数(GS),结果表明,24个巨峰系葡萄品种两两间的GS在0.619 0~0.960 3,平均值为0.762 0,变幅为0.341 3,说明供试品种间遗传差异较小。聚类分析表明(图1),在GS为0.72处可将24个巨峰

系葡萄品种分为3组。第I组包括22个品种:高妻、先锋、伊豆锦、高墨、黑奥林、黑潮、红皇后、巨峰、京优、红山彦、信浓乐、红富士、红瑞宝、红伊豆、红井川、龙宝、天秀、井川1055、蜜红、京亚、藤稔和蜜汁;第II组为奥林匹亚(含有欧亚种血缘);第III组为黑丰(含有山葡萄血缘)。第I组又可分为3个小组,第1小组分布了11个品种,其中有5个品种属于巨峰与康能玫瑰的杂交后代(高妻、信浓乐、伊豆锦、黑潮和红山彦),3个属于巨峰与巨鲸的杂交后代(黑奥林、红皇后和京优);第2小组分布了10个品种,其中有8个属于巨峰与康能玫瑰的杂交后代(红富士、红瑞宝、红伊豆、红井川、龙宝、天秀、井川1055和藤稔),1个属于巨峰与巨鲸的杂交后代(京亚);第3小组仅蜜汁一种,属于巨峰与巨鲸的杂交后代。上述结果与预期存在一定差异,但从整体上看该聚类结果与巨峰系葡萄的系谱基本吻合。

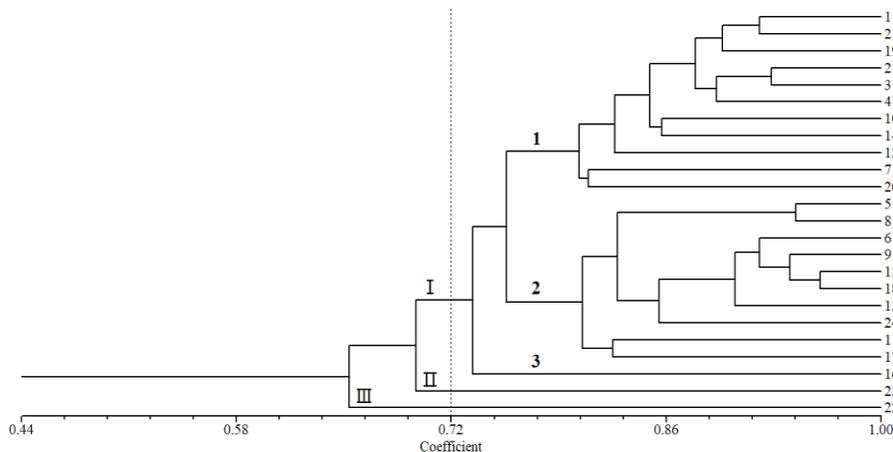


图1 24个巨峰系葡萄种质的UPGMA聚类图

## 2.3 SRAP 分子标记鉴定与CID图谱的构建

利用筛选出的12对SRAP引物,以条带清晰、特异性强、重复性好为原则,选取其中6对引物组合  $P_1$  (Me1~em5)、 $P_2$  (Me2~em3)、 $P_3$  (Me2~em9)、 $P_4$  (Me4~em5)、 $P_5$  (Me6~em1) 和  $P_6$  (Me7~em7),用于鉴别所有参试品种,构建24个巨峰系葡萄品种的CID图(图2)。图2中特征性谱带用(+)表示,没有特征性谱带的表示为(-)。首先根据引物组合  $P_6$  扩增的大小为1 000 bp、500 bp 和460 bp 的3条特征性谱带的有无将24个品种分成7组,其中特征性谱带1 000 bp(-)、500 bp(-) 和460 bp(+) 只有1号品种,特征性谱带1 000 bp(-)、500 bp(-) 和460 bp(-) 只有12号品种,被直接鉴别出来。之后再利用更多的引物将其余5组所有品种鉴别出来。最后根据6对引物及相应谱带信息绘制24个巨峰系葡萄品种的CID图。

## 3 讨论

本研究通过SRAP标记分析可知:24个巨峰系葡萄品种的多态性位点百分率为78.57%,高于丁洁菲等<sup>[17]</sup>采用RAPD标记技术分析22个葡萄品种的74%的检测结果,但低于葡萄的其他同类研究结果<sup>[18-21]</sup>,其原因可能与研究者采用的分子标记类型、研究对象的种类和数量不同及引物的多少等因素有关。利用POPGENE 1.32软件计算得到的各引物遗传多样性参数( $N_a$ ,  $N_e$ , H, I)平均值较低,品种间的遗传相似系数平均值较高,变幅较小,说明24个巨峰系葡萄的遗传多样性处于较低水平,因此,巨峰系葡萄在人工定向杂交选育过程中,其遗传多样性水平有逐渐降低的趋势。

本研究的聚类结果表明:在第I组的第1小组中,先锋是高妻和伊豆锦的共同亲本,三者聚

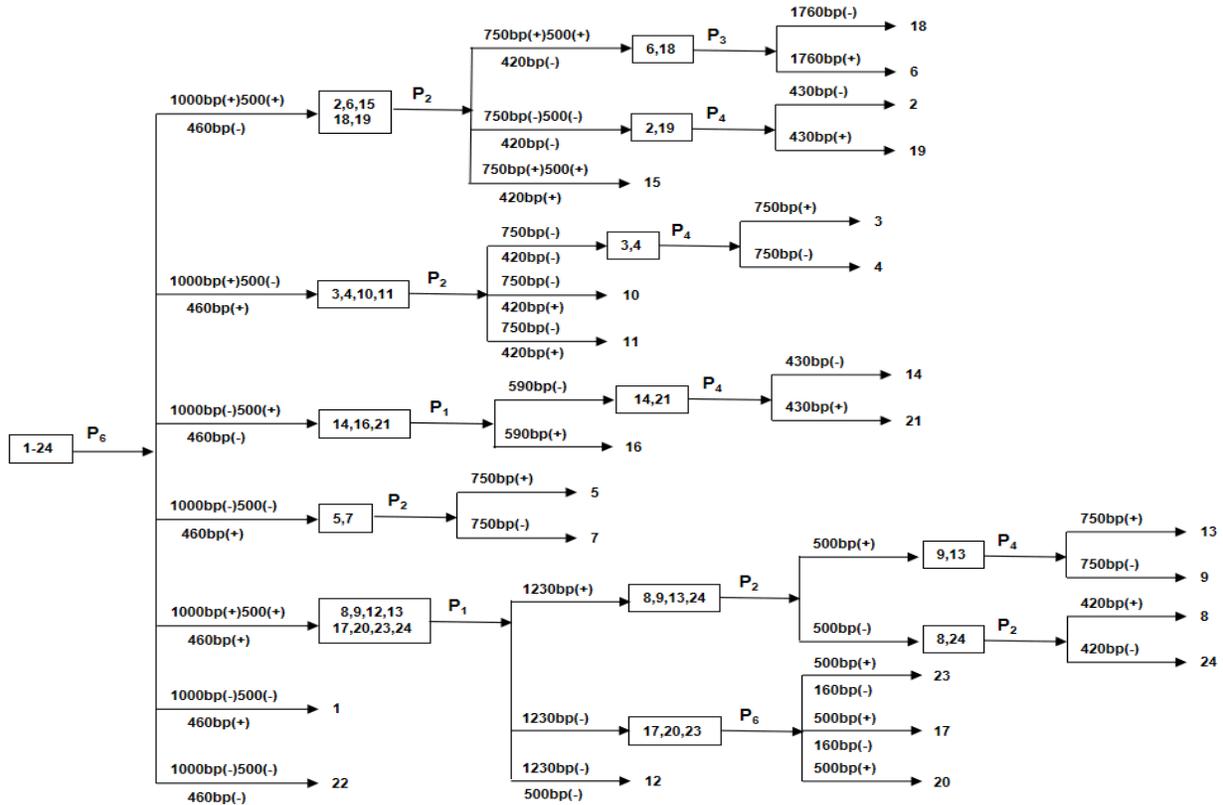


图2 6对SRAP引物鉴别区分24个巨峰系葡萄品种的MCID示意图

在一起;奥林匹亚作为蜜汁的亲本,两者也有很高的相似性。在第2小组中,红富士和红瑞宝是黑潮与金玫瑰的杂交后代,两者首先聚类;红井川、天秀和井川 1055 具有共同的亲本先锋,三者聚在一起。因此,SRAP分析基本反映了巨峰系葡萄品种间的遗传关系。但是,该聚类结果与预期也存在一定差异。如京亚和京优是通过黑奥林实生选育的品种,两者并未聚在一起;作为先锋与康能玫瑰的杂交后代,天秀和伊豆锦并没有首先聚类,而是和亲缘关系较远的龙宝直接聚在一起,且显示出极高的遗传相似性。这些现象说明同一种质资源可以通过芽变变异和有性杂交等不同的选育方法得到表型差别较大的品种<sup>[15]</sup>。因此,巨峰系葡萄在多代选育后遗传关系变得复杂,深入研究巨峰系葡萄品种间的遗传关系对以后的育种工作具有一定的指导意义。

随着分子生物学的发展,DNA分子标记技术已经成为理想的品种鉴定技术<sup>[22]</sup>。而基于DNA分子标记技术的MCID法能直观、准确地展示利用不同引物,鉴别区分不同品种的图谱关系,使现有的分子标记技术在品种鉴定的准确性、鉴定规模上得以大幅度提升。利用这一方法,已经在多种植物品种鉴定中得以充分展示。王玉娟等<sup>[12]</sup>利用MCID法对72个葡萄品种进行了基于RAPD标

记的分子鉴定;张晓莹等<sup>[13]</sup>在RAPD标记的基础上构建了191个欧亚葡萄品种的CID图;戚建锋等<sup>[9]</sup>利用MCID法对72个柿地方品种进行了基于SSR标记的快速鉴定。本研究利用MCID法选用6对SRAP引物构建了24个巨峰系葡萄主栽品种的CID图,可以对24个巨峰系葡萄品种进行快速鉴定。随着巨峰系葡萄新品种的不断选育,当需要鉴定更多巨峰系葡萄品种时,可以该CID图为基础进行,必要时可以增加新的引物来区分更多的新品种,进一步丰富CID图的指纹信息,使得该CID图的鉴定范围得以拓宽,为后续的葡萄品种鉴定奠定基础。

参考文献:

[ 1 ] 李怀福. 巨峰系葡萄品种演化及分类的研究[J]. 园艺学报, 2003, 30(2): 131-134.  
 [ 2 ] 孟聚星, 姜建福, 张国海, 等. 我国育成的葡萄新品种系谱分析[J]. 果树学报, 2017, 34(4): 393-409.  
 [ 3 ] 杨 晶, 张金鹏, 张晓旭, 等. 菜豆种质资源的ISSR分析及特异性标记的筛选[J]. 吉林农业科学, 2014, 39(2): 28-32, 50.  
 [ 4 ] Li G, Quiros C F. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in Brassica[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2001, 103: 455-461.  
 [ 5 ] 龙治坚, 范理璋, 徐 刚, 等. SCoT分子标记在植物研究中的应用进展[J]. 植物遗传资源学报, 2015, 16(2): 336-343.

- [ 6 ] 杨永,王豪杰,张学军,等.新疆甜瓜地方种质资源遗传多样性的SRAP分析[J].植物遗传资源学报,2017,18(3):436-448.
- [ 7 ] 傅巧娟,李春楠,沈国正,等.一串红新品种红运的选育与SRAP鉴定[J].分子植物育种,2018,16(6):2053-2059.
- [ 8 ] 李佳奇,于卓,杨东升,等.基于SRAP分子标记的冰草遗传连锁图谱构建[J].西北植物学报,2019,39(1):76-83.
- [ 9 ] 戚建锋,李晓鹏,王文然,等.利用基于SSR标记的MCID法鉴定72个柿地方品种[J].植物遗传资源学报,2018,19(5):895-903.
- [ 10 ] 黄丹娟,马建强,马春雷,等.基于SSR荧光标记的MCID快速鉴定13个湖北茶树品种[J].南方农业学报,2018,49(6):1045-1052.
- [ 11 ] 许园园,刘哲,娄丽娜,等.基于MCID法的萝卜品种快速鉴定[J].江苏农业学报,2016,32(6):1384-1389.
- [ 12 ] 王玉娟,张彦,房经贵,等.利用基于RAPD标记的MCID法快速鉴定72个葡萄品种[J].中国农业科学,2012,45(14):2913-2922.
- [ 13 ] 张晓莹,张彦,宋长年,等.利用基于DNA标记的人工绘制植物品种鉴别图(MCID)法快速鉴定欧亚葡萄品种[J].农业生物技术学报,2012,20(6):703-714.
- [ 14 ] 杨治元.玫瑰香系葡萄品种系谱分析[J].中国果树,2006(2):20-22.
- [ 15 ] 张安世,邢智峰,刘永英,等.苔藓植物DNA不同提取方法的比较分析[J].河南科学,2009,27(5):559-562.
- [ 16 ] 张捷,李勤霞,张萍,等.基于SRAP分子标记新疆野核桃的遗传多样性分析[J].植物遗传资源学报,2016,17(2):239-245.
- [ 17 ] 丁洁菲,毛娟,赵举鹏,等.葡萄品种亲缘关系的RAPD标记分析[J].甘肃农业大学学报,2013,48(6):82-87.
- [ 18 ] 李琳,魏灵珠,程建徽,等.24份葡萄种质亲缘关系的ISSR分析[J].浙江农业学报,2013,25(4):772-776.
- [ 19 ] 王发明,李洁维,叶开玉,等.41份葡萄种质遗传多样性的ISSR和SCoT对比分析[J].广西植物,2017,37(1):1-8.
- [ 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):115-116.
- [ 21 ] 郭印山,牛早柱,石广丽,等.基于SSR分子标记的葡萄品种遗传多样性分析[J].北方园艺,2016(7):89-92.
- [ 22 ] 高玉江,侯佳贤,郑亚杰,等.分子标记技术在落叶果树上的应用[J].吉林农业科学,2005,30(1):57-60.

(责任编辑:刘洪霞)

(上接第4页)因此滨海稻区发展轻简化栽培的水稻湿润直播很必要;水稻湿润直播药剂拌种、包衣,能大大提高出苗率和抗逆性;滨海稻区土壤含盐量高,出苗前田间水层经自然落干后田面出现裂缝以及出苗后至建立水层前土壤表面出现盐渍时,傍晚灌水泡田3~5 cm水层,次日清晨排净;播种前应排净田间水,田面达到无积水;水稻湿润播种时间不要太早,播期比插秧时间提前10 d左右为宜,并选择冷尾暖头时期播种;水稻湿润田块尽量早整平,播前要上水泡田封药,出苗后也要及时防草、除草,杂草太大了草害不好控制,影响稻苗生长。随着直播技术的逐渐成熟,滨海稻区直播产量会趋近或超过机插秧,经济效益和社会效益都会大大提高。

#### 参考文献:

- [ 1 ] 王洋,张祖立,张亚双,等.国内外水稻直播种植发展概况[J].农机化研究,2007(1):48-50.
- [ 2 ] 蔡意中.水稻稳产、高效轻型栽培技术研究[J].上海农业科技,1989(4):12-13.
- [ 3 ] 张洪程.直播稻种植科学问题研究[M].北京:中国农业科学技术出版社,2009:3-5.
- [ 4 ] 谢正荣,郭秧全,沈小妹,等.太湖农区水稻不同类型品种及播期对生育期与实产的影响初探[J].上海农业学报,2000,16(1):28-32.
- [ 5 ] 陈兴国,梅少华,查向斌,等.水稻机械精量穴直播技术应用与示范[J].湖北农业科学,2010,49(5):1038-1041.
- [ 6 ] 王国忠,彭斌,陆峥嵘,等.直播水稻物质生产特点及其高产调控技术研究[J].上海农业学报,2002,18(2):32-37.
- [ 7 ] 顾掌根,王岳钧.水稻直播栽培高产机理研究初报[J].作物研究,2001,15(2):5-8,12.
- [ 8 ] 黄礼庆,宋光锋,杨松,等.偏早熟水稻品种进行直播种植适应性及播期的研究[J].大麦与谷类科学,2008(2):12-14.
- [ 9 ] 顾春军,王治雄,戴国忠.水稻不同播种方式对产量影响试验[J].上海农业科技,2012(3):46.
- [ 10 ] 杨海生.播期对江苏不同类型水稻品种生育期和产量形成的影响[D].扬州:扬州大学,2000.
- [ 11 ] 王夫玉,张洪程.播期对淮北粳稻产量构成因素的影响[J].上海交通大学学报(农业科学版),2001,19(3):211-215.
- [ 12 ] 李秀芬,贾燕,黄元才,等.播栽期对水稻产量和产量构成因素及生育期的影响[J].生态学杂志,2004,23(5):98-100.
- [ 13 ] 秦阳,王伯伦,王术.播期对水稻品种产量及构成因素的影响[J].垦殖与稻作,2003(3):17-19.
- [ 14 ] 何广生,崔凯,高志坤,等.不同播期对天隆优619产量及品质的影响[J].东北农业科学,2018,43(6):13-15.
- [ 15 ] 池忠志,姜心禄,郑家国.不同种植方式对水稻产量的影响及其经济效益比较[J].作物杂志,2008(2):73-75.
- [ 16 ] 袁晓丹,赵国臣,柳参奎,等.东北地区杂草稻主要农艺性状的评价[J].吉林农业科学,2006,31(6):6-9.

(责任编辑:刘洪霞)