

酿酒白葡萄品种的 SSR 分析与鉴定

成冰, 张京芳*, 马正强, 王月晖, 张贝贝

(西北农林科技大学 林学院, 陕西 杨陵 712100)

摘要:利用筛选出的 14 对引物对 13 个酿酒白葡萄品种进行 SSR 分析与鉴定,共扩增出 312 个条带,多态性条带共 283 个(多态性条带率为 90.71%),特异性条带共 78 个(特异性条带率为 25.00%);13 个品种均有特征性引物,二号白香和雷司令有 5 个特征性引物;VrZAG79 条带总数、多态性条带和特异性条带均为最多(是 7 个品种的特征性引物),且所有品种的遗传差异性较大;14 对引物的鉴别效率为 15.38%(VVMD5)~100%(VrZAG62, VVIb66),即 VrZAG62, VVIb66 可分别鉴定该 13 个酿酒白葡萄品种且每个引物的鉴别效率差异很大。

关键词:葡萄酒;葡萄品种;SSR

中图分类号:S663.1

文献标志码:A

文章编号:1001-7461(2014)-02-0103-04

SSR Analysis and Identification of Grape Cultivars for Making White Wine

CHENG Bing, ZHANG Jing-fang*, MA Zheng-qiang, WANG Yue-hui, ZHANG Bei-bei

(College of Forestry, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: Fourteen SSR primers screened were adopted to identify 13 grape cultivars used to make white wine. Three hundreds and twelve bands were altogether obtained from the amplification, including 283 polymorphic bands (90.71%) and 78 specific bands (25.00%). All the 13 cultivars maintained specific primers. For the cultivars *Yarly Madeleine* and *Riesling*, there were five specific primers each. Among 14 primers, VrZAG79, which was the specific primer for seven cultivars, owned more total bands, polymorphic bands and specific bands, indicating large difference among different cultivars. The identification efficiency of 13 cultivars ranged between 15.38%(VVMD5)~100%(VrZAG62, VVIb66). Large difference was shown among different cultivars and two primers (VrZAG62, VVIb66) could identify all the cultivars respectively.

Key words: wine; grape; SSR

葡萄富含糖、有机酸、维生素、矿物质和氨基酸等,具有抗氧化延缓衰老、预防心脑血管疾病、补益和兴奋大脑神经等多种保健功能^[1-2]。生产优质葡萄酒,首先要有优良葡萄品种,其次是良好的环境条件^[3]。因此,酿酒葡萄育种是葡萄酒产业中一项重要内容。葡萄历史悠久,长期的地理条件、自然气候和选育杂交等,形成了极丰富的品种资源,但其造成很多同名异物,同物异名的现象,导致鉴定葡萄品种比较困难^[4-5]。目前,品种鉴定的方法有多种,以

分子标记技术为基础的 DNA 指纹鉴定(RFLP, RAPD, AFLP, SSR, ISSR 等)技术因其准确可靠、简单快捷等优点,应用较多^[4,6-7]。在多种分子标记方法中,SSR 在基因组中分布广泛,重复性高,多态性丰富,且对 DNA 质量要求较低,适于检测大量群体,是检测技术中较好的方法^[8-10]。本研究利用 14 种 SSR 引物对 13 个酿酒葡萄品种进行品种鉴定,以期葡萄育种工作提供参考。

收稿日期:2013-06-02 修回日期:2013-09-23

基金项目:公益性行业(农业)科研专项(200903043)。

作者简介:成冰,女,硕士研究生,研究方向:果蔬深加工及综合利用。E-mail:blithe0404@hotmail.com

*通信作者:张京芳,女,教授,理学博士,研究方向:食品资源营养及功能活性物质。E-mail:z_jf008@163.com

1 材料与方法

1.1 DNA 的提取

2012 年 5 月于新疆玛纳斯县中信国安葡萄酒有限公司资源圃手工采摘 13 个酿酒葡萄的嫩叶,该品种及代码为:1. 霞多丽 (*Chardonnay*), 2. 雷司令 (*Riesling*), 3. 白玉霓 (*Ugni Blanc*), 4. 鸽笼白 (*Colombard*), 5. 米勒 (*Muller Thurgau*), 6. 和田红 (*Hetianhong*), 7. 长相思 (*Sauvignon Blanc*), 8. 琼瑶浆 (*Traminer*), 9. 赛美容 (*Semillon*), 10. 爱格丽 (*Ecolly*), 11. 阿沙捷尼 (*A3aTeHü*) 12. 白比诺 (*Pinot Blanc*), 13. 二号白香 (*Yarly Madeleine*)。根据 Lodhi 的 CATB 法 (略有改进) 提取基因组 DNA, 利用琼脂糖凝胶 (0.8%) 与核酸检测仪检测 DNA 质量、浓度与纯度, 并将 DNA 样品浓度稀释至 30 ng/ μ L 备用。

1.2 SSR 引物及 PCR 反应

本研究筛选出 14 种引物, 引物序列如表 1。PCR 反应体系中其退火温度为 VMC4C6 (51 $^{\circ}$ C), VMC4D4 (61 $^{\circ}$ C), VrZAG62 (52 $^{\circ}$ C), VrZAG67 (45 $^{\circ}$ C), VrZAG79 (52 $^{\circ}$ C), VVIb01 (57 $^{\circ}$ C), VVIb66 (57 $^{\circ}$ C), VVIi51 (57 $^{\circ}$ C), VVMD5 (45 $^{\circ}$ C), VVMD7 (52 $^{\circ}$ C), VVMD27 (54 $^{\circ}$ C), VVMD36 (56 $^{\circ}$ C), VVS2 (55 $^{\circ}$ C), VVS4 (55 $^{\circ}$ C)。总反应体系为 25 μ L, 包括 12.5 μ L Mix, 9.5 μ L 水, 1 μ L 引物及 1 μ L DNA。反应程序为: 1) 95 $^{\circ}$ C, 5 min; 2) 94 $^{\circ}$ C, 5 min; 退火温度, 1 min; 72 $^{\circ}$ C, 1 min; 此过程 35 个循环; 3) 72 $^{\circ}$ C, 10 min。存放于 4 $^{\circ}$ C 保存。结果利用 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测, 银染显色, 并统计条带。

2 结果与分析

2.1 SSR 引物扩增

聚丙烯酰胺凝胶电泳结果如表 2, 利用 14 引物

(表 1) 对 13 个酿酒白葡萄品种进行遗传变异分析, 扩增条带为 8 (VMC4D4) — 51 (VrZAG79) 个, 共 312 个条带, 条带较多的还有 VrZAG62 (37 个) 和 VVIi51 (34 个); 多态性条带为 6 (VMC4D4) ~ 51 (VrZAG79) 个, 共 283 个, 多态性条带率为 90.71%, VrZAG62、VrZAG79 和 VVMD5 扩增的样品的多态性条带率为 100%, 即仅用此 3 个引物之一即可鉴别所有品种; 特异性条带为 0 (VVIb66) ~ 20 (VrZAG79) 个, 共 78 个, 特异性条带率为 25.00%, 特异性条带较多的还有 VVIi51 (10 个) 和 VrZAG62 (8 个)。因此, VrZAG79 条带总数、多态性条带和特异性条带均为最多, 且所有品种的遗传差异性较大。

郝宇^[17]等利用 12 对引物对 39 个葡萄品种进行 SSR 分析, 共扩增 155 条谱带, 多态性带 149 个 (占总条带的 96.13%), 特异性条带 8 个 (5%)。其中 VrZAG62、VrZAG67、VVS2、VVS4 分别扩增出 12、24、11 个和 16 个条带。此研究的谱带、特异性谱带、VrZAG62 和 VVS2 外的条带均低于本研究结果 (VrZAG62 和 VVS2 分别扩增出 37、17 个条带)。

表 3 为 13 个酿酒白葡萄品种的特征性引物。由表 3 可知, 13 个品种均有特征性引物, 赛美容和鸽笼白仅有 1 个特征性引物, 分别为 VrZAG62 和 VVMD36, 二号白香有 5 个特征性引物, 分别是 VrZAG62、VrZAG67、VrZAG79、VVMD7 和 VVS2, 雷司令亦有 5 个特征性引物, 分别是 VrZAG67、VrZAG79、VVMD7、VVMD36 和 VVS2。VrZAG79 为霞多丽、长相思、白玉霓、白比诺、二号白香、雷司令、琼瑶浆等 7 个品种的特征性引物, 而 VVIb01、VVMD27 和 VVS2 仅可分别特殊标记 2 个品种, 而 VMC4D4 和 VVIb66 扩增的所有品种均无特异性条带。

表 1 SSR 引物名称及序列
Table 1 Sequence of SSR primers

| 引物名称 | 引物序列 (5'-3') | 参考文献 |
|-------------------------|-----------------------------|-------------------------------------|
| VMC4C6 ^[11] | CTCCATCCCTATCTCATCAG | CTCTAACACCCAATCTCACA |
| VMC4D4 ^[12] | GTCTTGTAATGGAACCAACTGC | AGATTGACCTGGACCTGAAACT |
| VVIb01 ^[13] | TGACCCTCGACCTTAAATCTT | TGGTGAGTGCAATGATAGTAGA |
| VVIb66 ^[13] | CCACTAGTGGTCAGAAAAGAAG | TTGTATTGTGTGCCTCTTCTCA |
| VVIi51 ^[13] | ATCCCAAGAGAACCAAGAAACT | GCTGATCTCAGTGCATATGTTG |
| VVMD5 ^[14] | CTAGAGCTACGCCAATCCAA | TATACCAAAAATCATATTCCTAAA |
| VVMD7 ^[14] | AGAGTTGCGGAGAACAGGAT | CGAACCTTCACACGCTTGAT |
| VVMD27 ^[14] | GTACCAGATCTGAATACATCCGTAAGT | ACGGGTATAGAGCAAACGGTGT |
| VrZAG62 ^[14] | GGTGAAATGGGCACCGAACACACGC | CCATGTCTCTCCTCAGCTTCTCAGC |
| VrZAG79 ^[14] | AGATTGTGGAGGAGGAACAAACCGR | TGCCCCCATTTTCAAACCTCCCTCCC |
| VVS2 ^[14] | CAGCCCGTAAATGTATCCATC | AAATTCAAAAATTCTAATTCAACTGG |
| VVS4 ^[15] | CCATCAGTGATAAAACCTAATGCC | CCCACCTTGCCCTTAGATGTTA |
| VVMD36 ^[16] | TAAAAATAATAATAGGGGACACGGG | CAACTGTAAAGGTAAGACACAGTCC |
| VVMD ^[16] | ACCTGGCCCGACTCCTCTGTATGC | TCCTGCCGCGGATAACCAAGCTATG |
| | | M. S. Grando <i>et al.</i> , (2003) |
| | | J. L. Chacón <i>et al.</i> , (2012) |

表 2 14 个 SSR 引物对 13 个酿酒白葡萄品种的扩增情况
Table 2 Amplifications of 14 pairs of SSR PRIMERS

| 引物 | 条带总数/个 | 多态性条带/个 | 特异性条带/个 | 条带总数/个 | 多态性条带率/% | 特异性条带率/% |
|---------|--------|---------|---------|--------|----------|----------|
| VMC4C6 | 11 | 10 | 3 | 11 | 90.91 | 27.27 |
| VMC4D4 | 8 | 6 | 2 | 8 | 75.00 | 25.00 |
| VrZAG62 | 37 | 37 | 8 | 37 | 100.00 | 21.62 |
| VrZAG67 | 16 | 14 | 5 | 16 | 87.50 | 31.25 |
| VrZAG79 | 51 | 51 | 20 | 51 | 100.00 | 39.22 |
| VVIb01 | 15 | 13 | 5 | 15 | 86.67 | 33.33 |
| VVIb66 | 13 | 13 | 0 | 13 | 100.00 | 0.00 |
| VVIi51 | 34 | 31 | 10 | 34 | 91.18 | 29.41 |
| VVMD5 | 13 | 13 | 3 | 13 | 100.00 | 23.08 |
| VVMD7 | 30 | 28 | 7 | 30 | 93.33 | 23.33 |
| VVMD27 | 22 | 20 | 2 | 22 | 90.91 | 9.09 |
| VVMD36 | 32 | 24 | 6 | 32 | 75.00 | 18.75 |
| VVS2 | 17 | 13 | 4 | 17 | 76.47 | 23.53 |
| VVS4 | 13 | 10 | 3 | 13 | 76.92 | 23.08 |
| 总计 | 312 | 283 | 78 | 312 | 90.71 | 25.00 |

表 3 13 个酿酒白葡萄品种扩增的特征性引物

Table 3 Characteristic primers of 13 white wine grapes

| 葡萄品种 | 特征性引物 |
|------|---------------------------------------|
| 霞多丽 | VrZAG62, VrZAG79, VVMD27 |
| 赛美容 | VrZAG62 |
| 鸽笼白 | VVMD36 |
| 长相思 | VrZAG79, VVIb51, VVS4 |
| 白玉霓 | VrZAG79, VVMD36, VVS4 |
| 白比诺 | VrZAG79, VVIb01, VVMD36 |
| 二号白香 | VrZAG62, VrZAG67, VrZAG79, VVMD7, |
| 雷司令 | VVS2 |
| 米 勒 | VrZAG67, VrZAG79, VVMD7, VVMD36, VVS2 |
| 琼瑶浆 | VVIb51, VVS4 |
| 和田红 | VMC4D6, VrZAG79, VVMD7, VVMD27 |
| 阿沙捷尼 | VMC4V6, VVIb01, VVMD7 |
| 爱格丽 | VrZAG67, VVIb51, VVMD36 |
| | VMC4V6, VVMD7 |

2.2 指纹图谱分析

由表 4 知,14 对引物的鉴别效率为 15.38% (VVMD5)－100% (VrZAG62, VVIb66) 即 VrZAG62 和 VVIb66 可分别鉴别所有品种;鉴别效率较高有 VrZAG67, VVMD7 和 VVS4,其均可以鉴别出 11 个样品,而 VVMD5 仅可鉴定出 2 个品种。

表 4 14 种引物的鉴别效率

Table 4 Identification efficiency of 14 primers

| 引物名称 | 鉴别数/个 | 鉴别率/% |
|---------|-------|--------|
| VMC4C6 | 10 | 76.92 |
| VMC4D4 | 5 | 38.46 |
| VrZAG62 | 13 | 100.00 |
| VrZAG67 | 11 | 84.62 |
| VrZAG79 | 9 | 69.23 |
| VVIb01 | 3 | 23.08 |
| VVIb66 | 13 | 100.00 |
| VVIi51 | 8 | 61.54 |
| VVMD5 | 2 | 15.38 |
| VVMD7 | 11 | 84.62 |
| VVMD27 | 7 | 53.85 |
| VVMD36 | 10 | 76.92 |
| VVS2 | 7 | 53.85 |
| VVS4 | 11 | 84.62 |
| 平均 | 8 | 69.82 |

14 对引物的鉴别效率由大至小顺序为: VrZAG62、VVIb66> VrZAG67、VVMD7、VVS4>

VMC4C6、VVMD36 > VrZAG79 > VVIi51 > VVMD27 > VVS2 > VMC4D4 > VVIb01 > VVMD5。张淑静^[2]报道 12 对引物对 39 个葡萄品种的鉴别效率依次为 VVS4 > VrZAG67 > VrZAG62=VVS2,由此可见,相同引物对不同品种的鉴别效率有差异。

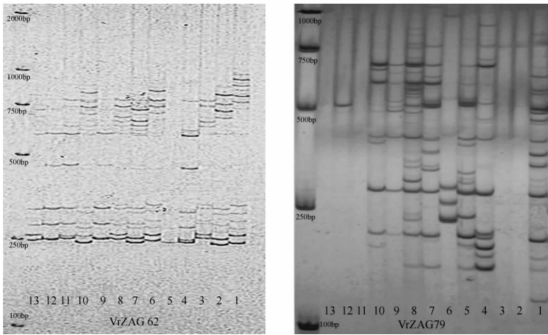


图 1 VrZAG62 与 VrZAG79 聚丙烯酰胺电泳

Fig.1 Genomic DNA fingerprints of primer VrZAG62 and VrZAG79

3 结论与讨论

本文所选引物是借鉴前人的研究结果^[11-16]及数据库,在 3 次筛选后选出了 14 种多态性高,且重复性好的引物进行试验。DNA 指纹图谱分析常用的方法为特征谱带法和引物组合法^[5]。本研究首先利用特征引物区分品种,再考虑组合法,每个引物的鉴别效率差异很大。如 2 个引物 (VrZAG62, VVIb66)可分别鉴定所有品种。而利用组合法也可达到相同效果,如 2 个引物组合:VrZAG67 分别与 VMC4C6、VrZAG79、VVIb01、VVIi51、VVS2 或 VVS4 均可鉴别所有品种;VMC4C6 分别与 VrZAG79、VVMD7、VVMD36 或 VVS4 均可鉴别所有品种;VVIi51 与 VVS4 可鉴别所有品种;VVMD7 分别与 VVMD36、VVS2 或 VVS4 均可鉴

别所有品种;VVS2 与 VVS4 可鉴别所有品种。同时多个引物组合也可鉴别所有品种,如 VVMD5、VrZAG79 与 VVMD7 组合等。14 对引物对 13 个酿酒白葡萄品种进行扩增,总条带共 312 个,多态性条带率为 90.71%,共 283 个,特异性条带率为 25.00%,共 78 个。其中,VrZAG79 条带总数,多态性条带和特异性条带均为最多,且所有品种的遗传差异性较大。13 个品种均有特征性引物,VrZAG79 是 7 个品种的特征性引物,而 VMC4D4 和 VVIb66 扩增的所有品种均无特异性条带。14 对引物的鉴别效率为 15.38%(VVMD5)~100%(VrZAG62,VVIb66)。特异性条带是相对的,因此如果鉴定品种增多,应相应增加引物数量,以达到更好的鉴定效果或者利用引物组合法,从而大大提高鉴别效率。

参考文献:

[1] 苏占胜. 宁夏酿酒葡萄产量与气象条件的关系[J]. 干旱气象, 2012, 30(1):59-65.
SU Z S. Relationship between wine grapes yield and weather conditions in Ningxia[J]. Journal of Arid Meteorology, 2012, 30(1):59-65. (in Chinese)

[2] 张淑静. 葡萄 SSR 反应体系的建立及遗传多样性分析[D]. 河北:河北农业大学, 2008.
ZHANG S J. Establishment of SSR reaction system and analysis of genetic diversity of grape cultivars[D]. Hebei: Agricultural University of Hebei, 2008. (in Chinese)

[3] 罗国光. 酿酒葡萄产量与质量的关系及其调控[J]. 中国果树, 1999 (2): 47-48.
LUO G G. Relationship and regulation of grape yield and quality[J]. China Fruits, 1999(2):47-48. (in Chinese)

[4] 王姣,刘崇怀,樊秀彩,等. 葡萄种类和品种鉴定技术研究进展[J]. 植物遗传资源学报, 2008, 9(3): 401-405.
WANG J, LIU C H, FAN X C, *et al.* Progress on identification technique of grape species and cultivars[J]. Journal of Plant Genetic Resource, 2008, 9(3): 401-405. (in Chinese)

[5] 艾呈祥,秦志华,陶吉寒,等. 32 个柿主栽品种 SSR 图谱构建及遗传变异分析[J]. 西北植物学报, 2011, 31(11): 2185-2191.
AI C X, QIN Z H, TAO J H, *et al.* SSR Fingerprints and genetic variations of the 32 persimmon major cultivars[J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2011, 31(11):2185-2191. (in Chinese)

[6] 冷翔鹏,刘崇怀,房经贵,等. 巨峰葡萄系谱的 SSR 与 RAPD 分析[J]. 西北植物学报, 2011, 31(8): 1560-1566.
LENG X P, LIU C H, FANG J G, *et al.* Analysis of pedigree of dyoho grape vine series with SSR and RAPD [J]. Acta Bo-

tanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2011, 31(8):1560-1566. (in Chinese)

[7] 刘春英,樊军锋,高建社,等. 杨树新杂种的 SSR 分析及鉴定[J]. 西北林学院学报 2013, 28 (2): 70-73.
LIU C Y, FAN J F, GAO J S, *et al.* Simple sequence repeat analysis and identification of new *populus hybrid*[J]. Journal of Northwest Forestry University, 2013, 28 (2): 70-73. (in Chinese)

[8] 陈艺,郭军战,李辉,等. 15 个果桑无性系指纹图谱的构建[J]. 西北林学院学报, 2011, 26 (6): 62-65.
CHEN Y, GUO J Z, LI H, *et al.* Fingerprints construction of 15 fruit mulberry (*Morus* spp.) clones[J]. Journal of Northwest Forestry University, 2011, 26(6):62-65. (in Chinese)

[9] GORYSLAVETS S, RISOVANNA V, BACILIERI R *et al.* A parentage study of closely related ukrainian wine grape varieties using microsatellite markers[J]. Cytology and Genetics, 2010, 44(2):95-102.

[10] JAHNKE G, MÁJER J, VARGA P, *et al.* Analysis of clones of pinots grown in hungary by SSR markers[J]. Scientia Horticulturae, 2011, 129:32-37.

[11] LORENZIS G D, IMAZIO S, BIAGINI B, *et al.* Pedigree reconstruction of the Italian grapevine aglianico (*Vitis vinifera* L.) from campania[J]. Molecular Biotechnology, 2013, 54(2):634-642.

[12] BERT P F, BORDENAVE L, DONNART M, *et al.* Mapping genetic loci for tolerance to lime-induced iron deficiency chlorosis in grapevine rootstocks (*Vitis* sp.) [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2013, 126(2):451-473.

[13] AGAR G, YILDIRIM N, ERCISLI S, *et al.* Determination of genetic diversity of *Vitis vinifera* cv. *kabarcik* populations from the coruh Valley using SSR markers[J]. Biochemical Genetics, 2012, 50(5/6):476-483.

[14] KARATASA H, DEEIRMENCIB D, VELASCOC R, *et al.* Microsatellite fingerprinting of homonymous grapevine (*Vitis vinifera* L.) varieties in neighboring regions of South-East Turkey [J]. Scientia Horticulturae, 2007, 114(3):164-169.

[15] GRANDO M S, BELLIN D, EDWARDS K J, *et al.* Molecular linkage maps of *Vitis vinifera* L. and *Vitis riparia* Mchx. [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2003, 106 (7): 1213-1224.

[16] CHACÓN J L, GARCÍA E, MARTÍNEZ J, *et al.* Comparison of aromatic composition of an endangered variety (*Albilla Dorada*) with other recognized aromatic varieties[J]. Vitis, 2012, 51(1):15-17.

[17] 郝宇,张淑静,张世红,等. 葡萄品种资源的 SSR 鉴定及遗传多样性分析[J]. 河北农业大学学报, 2010, 33(1):54-59.
HAO Y, ZHANG S J, ZHANG S H, *et al.* SSR identification and analysis of genetic diversity of grape cultivars[J]. Journal of Agricultural University of Hebei, 2010, 33(1):54-59. (in Chinese).