

李贝贝,刘崇怀,姜建福,等. 葡萄品种分子鉴定研究进展及展望[J]. 江苏农业科学,2017,45(15):15-20.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.15.004

# 葡萄品种分子鉴定研究进展及展望

李贝贝<sup>1,2</sup>, 刘崇怀<sup>2</sup>, 姜建福<sup>2</sup>, 张颖<sup>2</sup>, 樊秀彩<sup>2</sup>, 张国海<sup>1</sup>

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

**摘要:**品种鉴定是葡萄种质资源保存、研究、开发利用以及新品种品种权保护的重要依据。随着分子生物学技术的深入发展,出现了多种基于 DNA 水平的分子标记技术用于品种鉴定。本文综述了目前国内外几种主要的分子标记技术(AFLP、RAPD、SSR、ISSR、SRAP、SNP、iPBS)在葡萄品种鉴定中的应用与研究进展,并阐述了各种标记方法的基本原理和特点,以期今后葡萄品种鉴定提供参考依据。

**关键词:**葡萄;分子标记;品种鉴定;研究进展;基本原理;特点

**中图分类号:**S663.101 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2017)15-0015-06

葡萄为葡萄科(Vitaceae)葡萄属(*Vitis* L.)植物,是世界范围内栽培最广泛的树种之一,目前世界已经报道的葡萄品种有6 000~10 000个<sup>[1]</sup>。在葡萄的生产过程中,优良品种是提高葡萄质量和种植效益的必要条件,也是其产业持续发展的重要保障,回顾我国葡萄产业的发展历程,每一个快速发展时期都伴随着新品种的引进、选育与推广,新品种对促进葡萄产业的发展发挥着越来越重要的作用<sup>[2]</sup>。

葡萄多为无性繁殖,扦插繁殖容易,不同地区之间品种交流频繁,导致其种类和品种繁多,同名异物及同物异名现象严重<sup>[3]</sup>。另外,由于国内现阶段的种苗市场管理还不完善,部分不法苗木商为了自身利益,导致市场上以劣充优、以假乱真现象时有发生<sup>[4]</sup>。因此,为了保护育种者的权益及保证葡萄产业健康发展,对葡萄品种进行快速、准确可靠的鉴定显得尤为重要。同时,随着我国加入世贸组织和国际植物新品种保护联盟后,一个新品种的推广、产权保护都必须提供该品种特有的鉴定标记<sup>[5]</sup>。而传统的品种鉴定都以形态学标记为主,该方法易受环境及季节的影响,且鉴定时间长、工作量大。此外,由于新品种选育技术的同质化,品种之间的形态差异也越来越小,目测区分植株性状就显得越来越困难。

近年来,随着分子生物学技术的发展与成熟,使根据遗传物质DNA在不同生物个体之间的差异来鉴别生物物种成为可能,并且取得了显著成果。分子标记技术是一种以DNA多态性为基础,通过检测DNA分子由于缺失、插入、易位、倒位、重排或存在长短与排列不一的重复序列等机制而产生多态性的技术<sup>[6]</sup>,该技术不受环境因素及发育阶段的影响,具有快

速、简单、准确、可靠、稳定、经济等特点。国际植物品种权保护联盟(International Union for the Protection of New Varieties of Plants,简称UPOV)也将DNA分子标记鉴定作为农作物品种DUS(distinctness uniformity and stability)测试的辅助手段<sup>[7]</sup>。已经发展起来的分子标记多达60多种,应用较广的主要有AFLP、RAPD、SSR、ISSR、SRAP、SNP以及iPBS等。目前,DNA分子标记鉴定技术已在多种作物上开展了广泛的研究,在葡萄品种的鉴定方面取得了很大的进展,本文对目前国内外7种主要的分子标记技术原理以及在葡萄品种鉴定上的应用进展作一综述,以期今后葡萄品种鉴定技术的选择提供参考依据。

## 1 国内外葡萄品种的鉴定技术

### 1.1 RAPD 技术

随机扩增多态DNA(random amplified polymorphic DNA, RAPD)分子标记发展于1990年<sup>[8-9]</sup>,它是以基因组DNA为模板,利用人工合成的单链随机引物(一般8~10 bp)对其进行PCR扩增,通过凝胶电泳检测扩增片段,从而得到多态性标记的一种技术。RAPD标记简便、快速、成本低,无须了解基因组序列信息,DNA用量少,基于以上优点,被广泛应用于种质资源鉴定及遗传关系分析等方面<sup>[10-14]</sup>。

1997年,Stavarakakis利用15个RAPD标记鉴别了8个希腊品种,结果表明,RAPD标记技术适合用于葡萄品种鉴定<sup>[15]</sup>。王军等利用RAPD标记技术分别分析了中国野生葡萄和鲜食葡萄,认为RAPD标记技术可有效区分葡萄种质,是一种快速、经济实用的分子标记技术<sup>[16-17]</sup>。Bajraktari等以Rahovec的6个主栽品种为材料,利用10对高效的RAPD引物对其进行鉴定分析,鉴定结果与形态学检测的结果完全一致,6份种质均被区分开,排除了同名异物的存在<sup>[18]</sup>。2008年,李玉霞等依据RAPD技术对蛇龙珠葡萄的来源和亲缘关系进行了分析,认为蛇龙珠可能为法国的嘎赫姆奈赫,而非以前被认为的品丽珠<sup>[19]</sup>。随后,2012年李红娟等利用RAPD分子标记对8个蛇龙珠营养系进行遗传多样性分析,并将其与赤霞珠和品丽珠之间的亲缘关系进行验证,结果显示蛇龙珠的5个营养系之间没有任何差别,其余3个营养系之间却存

收稿日期:2016-04-13

基金项目:现代农业产业技术体系建设专项(编号:CARS-30-yz-1);国家科技基础性工作专项(编号:2012FY110100-1-5);中国农业科学院科技创新工程专项(编号:CAAS-ASTIP-2015-ZFRI)。

作者简介:李贝贝(1990—),女,河南洛阳人,硕士研究生,主要从事果树种质资源研究。E-mail:15236289703@163.com。

通信作者:张国海,博士,教授,主要从事果树种质资源开发与利用研究。E-mail:zgghly@163.com。

在一定的差别,提出了蛇龙珠在遗传基础上与品丽珠有一定的差异,应属不同品种<sup>[20]</sup>。Zhao 等用基于 RAPD 标记的 MCID 法完成了对葡萄品种的鉴定,该方法对将来葡萄品种鉴定以及新品种权保护具有重要意义<sup>[21-23]</sup>。El-Sayed 等仅用 1 对 RAPD 引物就将 Thompson Seedless、Red Roomy、Palomino、Rish Baba、Ruby Seedless、Beauty Seedless、Superior 和 Flame Seedless 等 8 个葡萄品种区分开,再次证明了 RAPD 标记鉴定葡萄品种的可行性<sup>[24]</sup>。另外,RAPD 标记还可用于区分芽变品种,如张国海成功地应用 RAPD 分子标记鉴定了巨峰及其芽变品种 98-2、京亚及其芽变品种洛浦早生<sup>[25]</sup>。RAPD 分子标记以其独特的优势在 20 世纪 90 年代前期得到了广泛的应用,但在实际应用中也存在一定的缺陷,其稳定性和重复性较差,这主要是因为该种标记是显性标记,不能区别纯合体和杂合体。

## 1.2 AFLP 技术

扩增片段长度多态性(amplified fragment length polymorphism, AFLP)标记是由荷兰科学家 Zabeau 等发明的一种分子标记技术<sup>[26-27]</sup>。其基本原理是利用成对的限制性内切酶对基因组 DNA 进行酶切,酶切片段与人工接头(与酶切片段含有共同黏末端)连接,并通过引物(引物由接头,酶切位点和 2~3 个核苷酸组成)扩增得到大量 DNA 片段,最后通过聚丙烯酰胺凝胶电泳对扩增片段多态性进行检测。AFLP 技术结合了 RFLP 与 RAPD 等 2 种分子标记技术的优点,既有前者的可靠性,又有后者的灵敏性。

AFLP 技术以其重复性好、多态性高、分辨率高等优势常被用于葡萄无性系变异或突变品种的鉴定<sup>[28-29]</sup>。该技术可以解决同工酶标记、形态学、生物化学等不能解决的问题。Scott 等成功地应用 AFLP 技术鉴定了火焰无核及其早熟突变体,这也是首次利用 AFLP 标记成功鉴定突变体<sup>[30]</sup>。Cervera 等利用 AFLP 分子标记技术对 35 个鲜食品种及 2 个 Napoleon 无性系变异品种(N10-7、N76-7)进行鉴定,分别使用 2 个引物组合[2E(+ACC,+ACT)/M+CAT,2E(+ACC,+ACT)/M+CTG]和 1 个引物组合[2E(+ACC,+ACT)/M+CTT]将鲜食品种和无性系变异品种区分开,结果表明,AFLP 技术是鉴定无性系变异品种的一种有效方法<sup>[31]</sup>。超藤葡萄是藤稔的芽变品种,二者亲缘关系十分接近,鲍露等应用传统的形态标记以及 RAPD 分子标记不易将其区分开,而利用 AFLP 标记成功地将其区分开,这突显了 AFLP 标记的重复性强、多态性丰富的优点<sup>[32]</sup>。2011 年,Vlba 等采用 SSR 标记与 AFLP 标记成功地鉴别开一对同物异名品种(Glianico Nero 与 Aglianico del Vulture Nero),而早在 2001 年 Costacurta 已提出了这样的猜测,Vlba 等对其进行了验证,认为 AFLP 是区分同名异物或同物异名品种的有效方法<sup>[33]</sup>。无性系筛选是葡萄品种改良的重要方法,近年来育种家在无性系筛选方面也做了很多工作,Manjari Naveen 是依据形态学筛选出的一个无核白鸡心的无性系变异品种,2013 年 Shinde 等对 Manjari Naveen 与无核白鸡心的 DNA 进行了 AFLP 分析,结果显示 Manjari Naveen 与无核白鸡心为 2 个不同的品种<sup>[34]</sup>。虽然 AFLP 分子标记稳定性好、准确性高、能有效区分亲缘关系较近的品种,但其对 DNA 质量要求较高,并且操作复杂、成本较高。

## 1.3 ISSR 技术

简单重复间序列(inter simple sequence repeat,ISSR)是基于微卫星标记(SSR)发展而来的一种分子标记,由 Zietkiewicz 等于 1994 年提出<sup>[35]</sup>。它是在微卫星序列的 3'端或 5'端锚定 2~4 个核苷酸,以其为引物对 SSR 之间的 DNA 片段进行扩增。ISSR 技术即利用了丰富的 SSR 序列信息,同时又克服了 RFLP 技术的局限性和 RAPD 的假阳性<sup>[36]</sup>,以其简单迅速、多态性丰富、稳定高效等特点被广泛应用于品种鉴定、亲缘关系鉴定、遗传多样性分析以及遗传图谱构建等方面。

Argade 等以印度的 43 份无籽葡萄品种(欧亚种)为材料,利用 ISSR 分子标记方法对其进行鉴定,筛选出的 14 个多态性引物能够准确地将样本区分开,其中有 3 对 ISSR 引物(UBC857、888 和 890)能将该 42 个无籽葡萄品种全部清楚地区分开<sup>[37]</sup>。Hassan 等依据表型、ISSR 标记对 3 份埃及葡萄品种进行分析,经 UPGMA 软件聚类发现 Red Romy 与 Matrouh 亲缘关系较近,与 Bez El-anza 较远,认为 ISSR 标记适合于葡萄品种鉴定<sup>[38]</sup>。2014 年,Choudhary 等用 ISSR 分子标记技术,采用 10 对 ISSR 引物对 Nanasaheb purple、Sonaka、Thompson seedless 和 Ganesh 的遗传变异进行了分析,再次证明 ISSR 标记用于葡萄品种鉴定的可行性<sup>[39]</sup>。钱春等利用 ISSR 分子标记方法分别鉴定了白香蕉及其芽变品种和巨峰及其芽变株系,结果表明,ISSR 标记能有效用于芽变鉴定<sup>[40-41]</sup>。李继洋等对新疆 19 份葡萄品种的 DNA 进行了 ISSR 分析,建立了 14 个葡萄品种的 DNA 指纹图谱,为葡萄品种的快速鉴定奠定了基础<sup>[42]</sup>。张永辉等应用 ISSR 技术分析了 81 份葡萄品种的遗传关系,根据聚类结果,将误定为毛葡萄的毛葡萄 1099 确定为桑叶葡萄,并确定福建野葡萄和华东葡萄 1058 属于同物异名材料<sup>[43]</sup>。张娜以新疆的 137 份葡萄种质为试验材料,采用 ISSR 标记对其遗传多样性进行了分析,根据聚类结果得知新疆本地葡萄品种并非野生种,而是由欧亚种演变而来的<sup>[44]</sup>。综上所述,ISSR 技术适合用于葡萄品种鉴定,但 ISSR 也存在一定的缺点,即其只是部分共显性,不能有效区分检测位点的纯合与杂合。

## 1.4 SRAP 技术

相关序列扩增多态性(sequence-related amplified polymorphism,SRAP)发展于 2001 年,由美国加州大学的 Li 等提出<sup>[45]</sup>。其原理是利用设计的引物对开放阅读框(open reading frames,ORFs)进行扩增<sup>[46]</sup>,正向引物对外显子进行扩增,反向引物对内含子和启动子区域进行扩增,由于不同物种以及个体间的内含子、启动子和间隔序列存在很大的变异,从而扩增出多态性片段。SRAP 分子标记技术具有操作简单、可靠性好、重复性好等特点,且优于 AFLP、ISSR 和 RAPD,在种质资源遗传多样性分析以及品种鉴定上得到广泛应用。

苑炜建立了适于葡萄 SRAP 分析的技术体系,应用 SRAP 分析标记评价了 156 份葡萄种质的亲缘关系及遗传多样性水平<sup>[47]</sup>。Guo 等利用 19 对 SRAP 引物区分开了包括欧亚种、欧美杂种、中国野生种在内的 76 份葡萄种质,其中包含洛浦早生与京亚、98-1 与绯红、98-2 与巨峰,表明 SRAP 也可鉴定芽变品种<sup>[48]</sup>。Liu 等以中国野生葡萄为试验材料,应用 SRAP 技术对其遗传多样性进行了分析,在遗传相似系数为 0.84 处可清楚地区分开所有品种,聚类结果也验证了桑叶葡萄是毛

葡萄的亚种<sup>[49]</sup>。张旭彤等也利用 SRAP 标记技术对中国野生葡萄进行了研究,进一步证明了 SRAP 标记鉴定葡萄品种的可行性<sup>[50-53]</sup>。但是,SRAP 标记也存在一定的限制,其没有通用的退火温度,研究者需要对不同植物材料的退火温度进行摸索,从而延长了 SRAP 标记的试验周期,且 SRAP 是针对 ORFs 区域进行扩增,对基因组的扩增范围有限。

### 1.5 SNP 技术

单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism,SNP)分子标记是在 1996 年由 Lander 提出的第 3 代 DNA 遗传标记<sup>[54]</sup>,是指基因组 DNA 序列上单个碱基的变异所引起的 DNA 序列多态性,这种变异是由单个碱基的转换、颠换所致。SNP 标记是用于检测种内个体间遗传变异的分子单位最小的技术,稳定性好、数量巨大且分布广泛,其多样性是目前所有分子标记中最丰富的一种。目前 SNP 已广泛应用于遗传多样性分析、品种鉴定等方面。

Dong 等设计 9 对 SNP 引物成功地区分开了 16 个葡萄品种,结果证实 SNP 标记可用于葡萄品种鉴定以及遗传多样性分析<sup>[55]</sup>。Riahi 等利用 73 个 SNP 标记对 44 份突尼斯葡萄品种的 *VvmybA1* 基因、*VvmybA2* 基因进行分析,研究品种之间的亲缘关系及遗传多样性,结果分别用 27 个 SNP 标记和 22 个 SNP 标记区分开了 22 份突尼斯栽培种以及 22 份突尼斯野生种,认为开发的 2 套 SNP 标记对今后的品种鉴定有巨大的帮助<sup>[56]</sup>。Ghaffari 等同样也以突尼斯葡萄品种为试验材料,采用 SNP 分子标记技术对其中的 29 份野生种与 28 份栽培种的亲缘关系进行了分析,结果表明,突尼斯的野生种并非是当地品种,可能来自其他地区,同时发现 2 个错误命名品种(Turki 与 Reine de Vignes)<sup>[57]</sup>。Cabezas 等通过对挑选出的 11 个样本进行重测序并获得了 300 多个 SNP 标记,对其进行分析后最终筛选出 48 个均匀分布于葡萄 19 条染色体上的具有高分辨率的 SNP 标记,将其作为葡萄基因分型的一套标准,并利用该标准成功鉴定了来自世界各地的一组葡萄品种,充分证明 SNP 分子标记技术的可靠性及稳定性<sup>[58]</sup>。所有这些研究都证实了 SNP 分子标记可以用于葡萄品种的鉴定。但是用于检测 SNP 的 DNA 芯片设计成本高,且由于 DNA 样品的复杂性,有些 SNP 不能被检测到。

### 1.6 SSR 技术

简单重复序列(simple sequence repeat,SSR)别称微卫星 DNA(microsatellite DNA),由 Moore 等于 1991 年创立<sup>[59]</sup>,是一类由 1~6 个碱基为重复单元组成的简单串联重复序列。这些简单重复序列均匀、随机、广泛地分布于真核生物的基因组上,具有丰富的多态性。其基本原理是根据 SSR 两端的保守互补序列设计 1 对特异引物,利用 PCR 对其进行扩增,因重复单元的个数不同,扩增片段长度就产生了差异,从而体现出 SSR 座位上的多态性。SSR 分子标记具有标记数量多、多态性高、信息量高、试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,已经成为目前分子标记技术的热点,在国内外得到了广泛的应用。

Thomas 等相继在 1993、1996、1999 年报道了 VVS2、VVMD5、VVMD7、VVMD32、VVMD28、VVMD27、VVMD25<sup>[60-62]</sup>等 7 个适合葡萄品种鉴定的 SSR 引物。1999 年,Sefc 等为了丰富 SSR 标记多态性,又开发了 2 对 SSR 引

物 VrZAG79 和 VrZAG62<sup>[63]</sup>。因该 9 对引物均匀分布于葡萄 19 条染色体上且具有高的多态性而被国外视为通用引物,并且法国、意大利、德国、瑞士、美国等国研究者利用该 9 对引物构建了数据库。2006 年 Kiss 等利用 SSR 分子标记方法构建了 109 个葡萄品种的 SSR 指纹图谱,可以方便其他研究者利用该指纹图谱进行品种鉴定<sup>[64]</sup>。韩国研究者 Cho 等利用 SSR-PCR 标记技术对 30 个葡萄品种进行了鉴定,研究表明 Jinok 与康拜尔早生相似系数为 1,可能为同一品种,同时仅用 3 对 SSR 引物(VVIt60、VVIn61、VVItu20)就将剩余的 28 份种质区分开<sup>[65]</sup>。Durán 等采用 SSR 技术从分子水平上分析了阿根廷品种 Pedro Giménez 和西班牙品种 Pedro Ximénez 的差异,证明了两者并非是同一品种,并认为 Pedro Giménez 是 Muscat of Alexandria 和 Criolla Chica 的后代<sup>[66]</sup>。Jahnke 等依据 SSR 分子标记技术完成了砧木品种的分析鉴定<sup>[67]</sup>。2015 年 Mihaljevic 等以克罗地亚和黑山的 284 个地方品种为试验材料,利用 9 对 SSR 引物对其进行遗传多样性分析,结果检测出 25 个之前未曾报道过的基因型,并将得到的数据与欧洲数据库以及其他已报道的相关研究结果进行比对,发现了一些新的同名异物和同物异名品种<sup>[68]</sup>。SSR 分子标记还可用于亲本鉴定<sup>[69]</sup>、无性系鉴定<sup>[70-71]</sup>以及同物异名和同名异物品种的鉴定<sup>[72-74]</sup>。目前国内也开展了 SSR 标记鉴定葡萄品种的研究,例如樊秀彩等以山葡萄、河岸葡萄以及 239 株二者的杂交后代为材料,从 12 对 SSR 引物中筛选出 7 对能扩增出父本特异条带的引物,作为杂种鉴定的标记,利用该 7 对特异引物对供试材料进行快速鉴定,结果表明,杂交后代中有 161 株被确认为真杂种,认为 SSR 标记可有效地对葡萄属种间杂种进行鉴定<sup>[75]</sup>。杜晶晶应用 9 对 SSR 引物鉴别了 80 份葡萄种质,并构建了 80 份葡萄种质的有效分子身份证<sup>[76]</sup>。李慧等利用 SSR 标记和 IRAP 标记对关口葡萄的亲缘关系进行了分析,结果表明关口葡萄属于欧美杂交种,既不是尼加拉也不是白香蕉<sup>[77]</sup>。成冰等对 13 个酿酒白葡萄品种进行了 SSR 分析与鉴定,研究表明引物 VrZAG62 和 VVItb66 都可以将这 13 个酿酒白葡萄品种区分开<sup>[78]</sup>。宪立杰等对取自中国农业科学院郑州果树研究所葡萄资源圃的 45 份葡萄种质进行了 SSR 分析,利用 19 对核心引物扩增出 76 条带,其中 74 条具有多态性,并利用 SSR 标记初步建立了一个 SSR 基因型指纹库,为鉴定葡萄品种或品系提供了基础数据<sup>[79]</sup>。郭春苗等以新疆 44 个适宜制干葡萄品种为试材,从 52 对引物中筛选出 8 对多态性高的引物并对其进行 SSR 分析,利用 4 条引物构建了品种 DNA 指纹图谱,通过统计测验可将 44 份葡萄种质区分开来,认为 SSR 分子标记技术可准确地鉴定葡萄品种<sup>[80]</sup>。李雪雁等以 75 个葡萄栽培品种为材料,选用 19 对核心 SSR 引物对其进行研究,建立了一套适合于葡萄 DNA 指纹图谱构建的技术体系,为葡萄种质资源的鉴定提供了依据<sup>[81]</sup>。尹玲等对我国新育成的 24 份葡萄种质进行了 SSR 分析,结果表明,所用的 6 对 SSR 引物可以明确地区分开供试葡萄品种,还能正确地鉴定出品种的倍性,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<sup>[82]</sup>。研究者普遍认为,SSR 分子标记具有高的多态性,非常适用于葡萄品种鉴定和 DNA 指纹图谱的构建。

## 1.7 iPBS 技术

引物结合位点间扩增 (inter primer binding site, iPBS) 标记是一种新型、简单、快速、高效的分子标记方法,该技术由 Kalendar 等在 2010 年建立<sup>[83]</sup>。它是以长末端重复序列 (long terminal repeats, LTR) 类反转录转座子保守位点设计引物对该类反转录转座子中 2 个引物结合位点 (PBS) 区间进行扩增的一种分子标记技术,与早期基于反转录转座子的分子标记方法不同,不须要预先获知 LTR 的序列。iPBS 标记技术是葡萄种质资源遗传多样性分析及鉴定的一种新的技术手段。近些年, iPBS 标记在杏<sup>[84]</sup>、杨梅<sup>[85]</sup>、雪莲果<sup>[86]</sup>、虎杖<sup>[87]</sup>、牡丹<sup>[88]</sup>等植物上都有所研究。

2014 年张潇玉等以巨峰葡萄为试材, iPBS 引物 2249 为扩增引物,对葡萄 iPBS-PCR 反应体系的各个成分以及退火温度进行优化,利用优化后的 iPBS-PCR 反应体系对 18 份葡萄种质进行扩增检测,获得的条带清晰、稳定且多态性高,为葡萄种质资源鉴定及遗传多样性评价提供了重要的技术支持<sup>[89]</sup>。Guo 等对 35 份葡萄种质进行了 iPBS 分析,利用 15 对 iPBS 引物扩增出 99 条 DNA 谱带,其中 86.3% 具有多态性,由软件 UPGMA 进行聚类,结果表明葡萄栽培种和野生种存在明显的差异,且拥有丰富的遗传多样性<sup>[90]</sup>。iPBS 也存在自身的限制,其对模板 DNA 纯度和片段大小要求较高。iPBS 作为一种刚发展起来的新型分子标记,在葡萄品种鉴定上的应用刚起步。

## 2 小结与展望

葡萄品种的鉴定方法从最初的形态学鉴定发展到同工酶鉴定,再到现在常用的分子标记鉴定,经历了从形态学到分子生物学,从外部到内部的过程。传统的形态学标记及同工酶鉴定易受环境因素的影响,同时也受不同发育时期的限制。而分子标记则不存在上述问题,它是从分子的角度展示了不同品种间存在的差异。本文所介绍的几种 DNA 分子标记技术在葡萄品种鉴定应用中各有优缺点,在鉴定一些不易区分的亲缘关系较近的品种或芽变品种时,可将几种分子标记方法相结合以达到最终目标。DNA 分子标记的发展是永无止境的,今后不仅要加速开发新型的 DNA 指纹技术,还要对现有 DNA 分子标记技术加以改进,建立快速鉴定葡萄品种的方法体系,从而实现品种鉴定的简单化、自动化。

随着分子生物学技术的发展,以 DNA 分子标记为基础的指纹图谱构建逐渐成为热点,因其具有准确可靠、简便快速、易于自动化等优点已成为品种鉴定的重要技术手段。国际植物品种权保护联盟 (UPOV) 在 BMT 测试指南草案中已经将构建 DNA 指纹数据库的标记方法确定为 SSR 和 SNP<sup>[4]</sup>, SSR 标记以其独特的优势,成为当前构建指纹图库以及品种鉴定的首选标记。随着生物技术和互联网信息技术的发展壮大,构建品种 DNA 指纹数据库和全国统一查询平台势在必行。可以在利用形态学鉴定品种的同时,通过筛选适合葡萄品种鉴定的核心引物,建立现有葡萄品种的 DNA 指纹数据库,并利用计算机技术将该指纹数据库与对应品种的形态学数据相结合建立一个平台,从而实现快速鉴定葡萄品种的目的。该平台的建立可以使试验数据在不同实验室得到共享,可有效保护葡萄育成品种的知识产权和育种者的权益,保证

葡萄产业健康可持续发展。

## 参考文献:

- [1] Laucou V, Lacombe T, Dechesne F, et al. High throughput analysis of grape genetic diversity as a tool for germplasm collection management [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2011, 122(6): 1233–1245.
- [2] 姜建福, 孙海生, 樊秀彩, 等. 我国葡萄品种权保护现状与分析 [J]. 农业科技管理, 2015, 34(5): 61–65.
- [3] Emanuelli F, Lorenzi S, Grzeskowiak L, et al. Assessment of diversity and genetic structure is an essential step for effective use of grape germplasm collections [C]. III International Symposium on Molecular Markers in Horticulture, 2013: 27–30.
- [4] 沈永宝, 施季森. 植物种或品种鉴定的展望 [J]. 江苏林业科技, 2004, 31(5): 41–45.
- [5] 金伟栋, 洪德林. 杂交水稻品种指纹鉴定研究进展 [J]. 上海农业学报, 2006, 22(1): 104–108.
- [6] 刘静, 何涛, 淳泽. 分子标记技术在石斛属植物中的应用研究进展 [J]. 应用与环境生物学报, 2008, 14(6): 855–862.
- [7] 杨坤, 唐浩, 李祥羽. 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): 1–5.
- [8] Williams J K, Kubelik A R, Livak K J, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers [J]. Nucleic Acids Research, 1990, 18(22): 6531–6535.
- [9] Welsh J, McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers [J]. Nucleic Acids Research, 1990, 18(24): 7213–7218.
- [10] 陈姝, 钱正强, 宫霞, 等. SSR 和 RAPD 2 种分子标记对昆明西山野生蔓蓼葡萄资源遗传多样性分析比较 [J]. 西南农业学报, 2010, 23(6): 2008–2013.
- [11] Ergül A, Marasali B, Ağaoğlu Y S. Molecular discrimination and identification of some Turkish grape cultivars (*Vitis vinifera* L.) by RAPD markers [J]. VITIS – Journal of Grapevine Research, 2002, 41(3): 159.
- [12] 于华平, 房经贵, 张美勇, 等. RAPD 标记用于葡萄、苹果等 7 种果树的品种鉴定的研究 [J]. 江西农业学报, 2009, 21(10): 5–9.
- [13] Wolf T, Eimert K, Ries R. Reliable identification of grapevine rootstock varieties using RAPD PCR on woody samples [J]. Australian Journal of Grape and Wine Research, 1999, 5(2): 34–38.
- [14] 吴红, 常永义, 郝燕, 等. 利用 RAPD 标记研究部分葡萄品种的亲缘关系 [J]. 果树学报, 2008, 25(6): 932–936.
- [15] Stavrakakis M H P. Discrimination of eight Greek grape cultivars. (*Vitis vinifera* L.) by random amplified polymorphic DNA markers [J]. Vitis, 1997, 36(4): 175–178.
- [16] 王军, 葛玉香, 贺普超. RAPD 标记在山葡萄种质鉴定中的应用 [J]. 植物研究, 2004, 24(4): 473–476.
- [17] Frotcher J, Nocentini M, Ruehl E, et al. Quality control: identification of table grape cultivars using RAPD markers [C]. II International Symposium on Biotechnology of Fruit Species, 2012: 193–196.
- [18] Bajraktari Y, Cadri N, Papa S, et al. Ampelographic and random amplified polymorphic DNA (RAPDS) based analysis of six grapevine varieties of Rahovec, Kosovo [J]. Journal of Hygienic Engineering and Design, 2014, 7: 180–185.

- [19]李玉霞,龚玉梅,王振平. 酿酒葡萄品种“蛇龙珠”亲缘关系的 RAPD 分析[J]. 中外葡萄与葡萄酒,2008(3):17-20.
- [20]李红娟,周新明,刘勇强,等. 蛇龙珠亲缘关系鉴定在营养系选种中的应用[J]. 中国农学通报,2012,28(28):153-157.
- [21]Zhao M Z,Zhang Y P,Wu W M,et al. A new strategy for complete identification of 69 grapevine cultivars using random amplified polymorphic DNA(RAPD) markers[J]. Afr. J. Plant Sci,2011,5(4):273-280.
- [22]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.
- [23]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.
- [24]El-Sayed N E,Hashad M M,Shaaban M M,et al. Molecular characterization and discrimination among grapevine cultivars by RAPD markers[J]. Austrilian Journal of Basic and Applied Sciences,2011,5(2):230-235.
- [25]张国海. 两个早熟葡萄芽变品种生物学特性研究与分子鉴定[D]. 武汉:华中农业大学,2010.
- [26]Zabeau M, Vos P. Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting;EP92402629 [P]. 1993-10-20.
- [27]Vos P,Hogers R,Bleeker M,et al. AFLP:a new technique for DNA fingerprinting [J]. Nucleic Acids Research, 1995, 23 (21): 4407-4414.
- [28]Meneghetti S,Calò A,Bavaresco L. A strategy to investigate the intravarietal genetic variability in *Vitis vinifera* L. for clones and biotypes identification and to correlate molecular profiles with morphological traits or geographic origins [J]. Molecular Biotechnology,2012,52(1):68-81.
- [29]Stajner N,Jakse J,Javornik B,et al. Highly variable AFLP and S-SAP markers for the identification of ‘Malbec’ and ‘Syrah’ clones[J]. Vitis,2009,48(3):145-150.
- [30]Scott K D,Ablett E M, Lee L S,et al. AFLP markers distinguishing an early mutant of Flame Seedless grape[J]. Euphytica,2000,113(3):243-247.
- [31]Cervera M T, Cabezas J A, Sánchez - Escribano E, et al. Characterization of genetic variation within table grape varieties(*Vitis vinifera* L.) based on AFLP markers[J]. Vitis, 2000, 39(3): 109-114.
- [32]鲍露,徐昌杰,江文彬,等. 葡萄 AFLP 技术体系建立及其在超藤与藤穗葡萄品种鉴别中的应用[J]. 果树学报,2005,22(4):422-425.
- [33]Alba V, Anaclerio A, Gasparro M, et al. Ampelographic and molecular characterisation of aglianico accessions (*Vitis vinifera* L.) collected in southern Italy[J]. South African Journal of Enology and Viticulture,2011,32(2):164-173.
- [34]Shinde M P, Upadhyay A, Aher L B, et al. Molecular marker analysis to differentiate a clonal selection of Centennial Seedless grapevine[J]. African Journal of Biotechnology,2013,12(14):1594-1597.
- [35]Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) - anchored polymerase chain reaction amplification[J]. Genomics,1994,20(2):176-183.
- [36]张青林,罗正荣. ISSR 及其在果树上的应用[J]. 果树学报,2004,21(1):54-58.
- [37]Argade N C,Tamhankar S A,Karibasappa G S,et al. DNA profiling and assessment of genetic relationships among important seedless grape(*Vitis vinifera*) varieties in India using ISSR markers[J]. Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology,2009,18(1):45-51.
- [38]Hassan N A,El-Homosany A,Gomma A H,et al. Morphological and ISSR polymorphisms in some Egyptian grapes(*Vitis vinefera* L.) collection[J]. World Applied Sciences Journal,2011,15(10):1369-1375.
- [39]Choudhary R S,Zagade V S,Khalakar G D,et al. ISSR based genotypic differentiation of grape (*Vitis Vinifera* L.) [J]. The Bioscan,2014,9(2):823-828.
- [40]钱春. 白香蕉葡萄芽变突变体鉴定及四倍体诱导研究[D]. 重庆:西南大学,2006.
- [41]李琳. 巨峰葡萄芽变株系的鉴定及分子标记分析[D]. 金华:浙江师范大学,2013.
- [42]李继洋,代培红,罗淑萍,等. 基于 ISSR 的葡萄品种亲缘关系分析及其指纹图谱构建[J]. 新疆农业大学学报,2014,37(1):30-34.
- [43]张永辉,刘崇怀,樊秀彩,等. ISSR 标记在中国野生葡萄分类中的应用[J]. 果树学报,2011,28(3):406-412.
- [44]张娜. 葡萄种质资源遗传多样性的 ISSR 分析[D]. 乌鲁木齐:新疆大学,2015.
- [45]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(2/3):455-461.
- [46]杨迎花,李先信,曾柏全,等. 新型分子标记 SRAP 的原理及其研究进展[J]. 湖南农业科学,2013(5):15-17.
- [47]苑炜. 156 份新疆葡萄种质资源分子标记分析[D]. 新疆:新疆农业大学,2013.
- [48]Guo D L, Zhang J Y, Liu C H, et al. Genetic variability and relationships between and within grape cultivated varieties and wild species based on SRAP markers[J]. Tree Genetics & Genomes, 2012,8(4):789-800.
- [49]Liu C H,Fan X C,Jiang J F,et al. Genetic diversity of Chinese wild grape species by SSR and SRAP markers[J]. Biotechnology & Biotechnological Equipment,2012,26(2):2899-2903.
- [50]张旭彤. 中国野生葡萄种质资源的亲缘关系研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2012.
- [51]Jing Z B,Wang X P,Cheng J M. Analysis of genetic diversity among Chinese wild *Vitis* species revealed with SSR and SRAP markers [J]. Genetics and Molecular Research,2013,12(2):1962-1973.
- [52]刘昆玉,徐丰,石雪晖,等. 基于 SRAP 标记的刺葡萄亲缘关系分析[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版),2013,38(6):607-611.
- [53]金炳奎,宗成文,曹后男,等. 山葡萄 SRAP 技术体系的建立及其在品种鉴定中的应用[J]. 吉林农业大学学报,2013,35(2):198.
- [54]Lander E S. The new genomics: global views of biology [J]. Science,1996,274(5287):536-539.
- [55]Dong Q H,Cao X E,Yang G,et al. Discovery and characterization of SNPs in *Vitis vinifera* and genetic assessment of some grapevine

- cultivars[J]. *Scientia Horticulturae*, 2010, 125(3): 233–238.
- [56] Riahi L, Ayari B, Zoghalmi N, et al. High efficiency and informativeness of a set of SNP molecular markers in Tunisian local grapevines discrimination [J]. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2013, 51: 175–183.
- [57] Ghaffari S, Hasnaoui N, Zinelabidine L H, et al. Genetic diversity and parentage of Tunisian wild and cultivated grapevines (*Vitis vinifera* L.) as revealed by single nucleotide polymorphism (SNP) markers[J]. *Tree Genetics & Genomes*, 2014, 10(4): 1103–1112.
- [58] Cabezas J A, Ibáñez J, Lijavetzky D, et al. A 48 SNP set for grapevine cultivar identification[J]. *BMC Plant Biology*, 2011, 11(1): 153.
- [59] Moore S S, Sargeant L L, King T J, et al. The conservation of dinucleotide microsatellites among mammalian genomes allows the use of heterologous PCR primer pairs in closely related species[J]. *Genomics*, 1991, 10(3): 654–660.
- [60] Thomas M R, Scott N S. Microsatellite repeats in grapevine reveal DNA polymorphisms when analysed as sequence – tagged sites (STSs)[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1993, 86(8): 985–990.
- [61] 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.
- [62] Bowers J E, Dangl 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.
- [63] 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.
- [64] Kiss E, Kozma P, Halász G, et al. Pedigree of carpathian basin and hungarian grapevine cultivars based on microsatellite analysis [C]. IX International Conference on Grape Genetics and Breeding, 2006: 221–224.
- [65] Cho K H, Bae K M, Noh J H, et al. Genetic diversity and identification of korean grapevine cultivars using SSR markers[J]. *Korean Journal of Breeding Science*, 2011, 43(5): 422–429.
- [66] Duran M F, Agueero C B, Martinez L E. Assessing the identity of the variety ‘Pedro Gimenez’ grown in Argentina through the use of microsatellite markers [J]. *Revista de La Facultad de Ciencias Agrarias*, 2011, 43(2): 193–202.
- [67] Jahnke G, Molnar G K, Majer J, et al. Analysis of grape rootstocks by ssr markers[J]. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, 2011, 45(4): 199–210.
- [68] Mihaljević M Ž, Anhalt U M, Rühl E, et al. Cultivar identity, intravarietal variation, and health status of native grapevine varieties in Croatia and Montenegro[J]. *American Journal of Enology and Viticulture*, 2015, 66(4): 531–541.
- [69] Huber F, Roeckel F, Schwander F, et al. A view into American grapevine history: *Vitis vinifera* cv. ‘Semillon’ is an ancestor of ‘Catawba’ and ‘Concord’ [J]. *Vitis*, 2016, 55(2): 53–56.
- [70] Nikkhah R, Ghaderi N. Identification of grapevine clone genotypes by microsatellite markers [C]. II International Symposium on Underutilized Plant Species (Crops for the Future – Beyond Food Security), 2011: 791–796.
- [71] Troshin L, Milovanov A, Zviagin A. Molecular marker screening of new promising wine grape clones [J]. *Vitis*, 2015, 54(S1): 105–106.
- [72] García – Muñoz S, Lacombe T, de Andrés M T, et al. Grape varieties (*Vitis vinifera* L.) from the Balearic Islands: genetic characterization and relationship with Iberian Peninsula and Mediterranean Basin [J]. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 2012, 59(4): 589–605.
- [73] Beslic Z, Todic S, Korac N, et al. Genetic characterization and relationships of traditional grape cultivars from Serbia [J]. *Vitis*, 2012, 51(4): 183–189.
- [74] Crespan M, Calo A, Giannetto S, et al. ‘Sangiovese’ and ‘garganega’ are two key varieties of the Italian grapevine assortment evolution[J]. *Vitis*, 2008, 47(2): 97–104.
- [75] 樊秀彩, 张颖, 姜建福, 等. SSR 分子标记鉴定山葡萄和河岸葡萄种间杂种[J]. *西北植物学报*, 2012, 32(11): 2195–2200.
- [76] 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.
- [77] 李慧, 罗正荣, 张青林. 基于 SSR 和 IRAP 标记的“关口葡萄”亲缘关系分析[J]. *果树学报*, 2014, 31(6): 1040–1046.
- [78] 成冰, 张京芳, 马正强, 等. 酿酒白葡萄品种的 SSR 分析与鉴定[J]. *西北林学院学报*, 2014, 29(2): 103–106.
- [79] 宪立杰, 刘兴菊, 李雪雁, 等. 葡萄种质遗传多样性的 SSR 分析及指纹库构建[J]. *北方园艺*, 2013(11): 87–90.
- [80] 郭春苗, 李宁, 周晓明, 等. 基于 SSR 标记的葡萄品种(系)遗传多样性分析与指纹图谱构建[J]. *新疆农业科学*, 2015, 52(11): 2051–2058.
- [81] 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.
- [82] 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.
- [83] Kalendar R, Antonius K, Smykal P, et al. iPBS: a Universal method for DNA fingerprinting and retrotransposon isolation[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2010, 121(8): 1419–1430.
- [84] Baranek M, Meszaros M, Sochorova J, et al. Utility of retrotransposon – derived marker systems for differentiation of presumed clones of the apricot cultivar Velkopavlovicka [J]. *Scientia Horticulturae*, 2012, 143(143): 1–6.
- [85] 郭志海, 王鹏凯, 郗红丽, 等. 杨梅 iPBS – PCR 反应体系的建立与优化[J]. *江苏农业科学*, 2015, 43(11): 51–54.
- [86] Ziarovská J, Fernández E C, Bezo M. Developing the iPBS strategy for yakon germplasm evaluation[J]. *The Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 2013, 2(1): 1967–1979.
- [87] 陈静, 陈新, 何忠宝, 等. 不同产地虎杖基于 iPBS 技术的遗传多样性研究[J/OL]. (2012–02–29) [2016–01–20]. <http://www.paper.edu.cn/html/releasepaper/2012/02/1106/>.
- [88] 张曦, 侯小改, 郭大龙, 等. 利用 iPBS 技术克隆牡丹反转录转座子 LTR 序列[J]. *植物学报*, 2014, 49(3): 322–330.
- [89] 张潇玉, 郭大龙, 郭明晓, 等. 葡萄 iPBS – PCR 反应体系的优化[J]. *果树学报*, 2014, 31(3): 508–513.
- [90] Guo D L, Guo M X, Hou X G, et al. Molecular diversity analysis of grape varieties based on iPBS markers[J]. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2014, 52: 27–32.