

# DNA 分子标记技术在葡萄砧木改良上的应用

韩斌, 刘长江, 袁军伟, 马爱红, 郭紫娟, 赵胜建

(河北省农林科学院昌黎果树研究所, 昌黎 066600)

**摘要:** 葡萄砧木具有抗葡萄根瘤蚜和线虫等土传虫害、抗寒、抗旱、耐盐碱等优良特性, 可调控葡萄生长和品质, 利用葡萄抗逆砧木进行嫁接栽培已成为葡萄产业发展的必然趋势。因此, 开展葡萄砧木改良研究具有十分重要的意义。随着生物技术的发展, DNA 分子标记技术已广泛应用于葡萄砧木改良研究, 本文对近 10 年分子标记技术在葡萄砧木品种鉴定、系谱分析、遗传图谱构建等方面的研究应用进行了综述, 并指明未来葡萄砧木的研究方向。

**关键词:** 葡萄砧木; DNA 分子标记; 品种鉴定; 系谱分析; 遗传图谱

## Application of DNA Molecular Marker Technology in Grapevine Rootstocks Improvement

HAN Bin, LIU Chang-jiang, YUAN Jun-wei, MA Ai-hong, GUO Zi-juan, ZHAO Sheng-jian

(Fruit Research Institute, Hebei Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Changli 066600)

**Abstract:** Grapevine rootstocks have a natural resistance to soil-borne pests such as phylloxera (*Daktulosphaira vitifoliae* Fitch) and nematode, to abiotic stress such as cold hardiness, drought, and salinity, and also to improve the scion vigor and quality. Therefore, grafting cultivated varieties to resistant rootstocks has become the inevitable trend in the grape industry. For this reason, it is of great significance for developing new grapevine rootstocks varieties. The advance and uses of DNA molecular marker technology in grapevine rootstocks improvement in recent ten years are reviewed including identifying grapevine rootstock cultivars, pedigree analysis, and constructing the genetic map. In addition, the research and application prospects of this technology in grapevine rootstocks are presented.

**Key words:** grapevine rootstock; DNA molecular marker; cultivar identification; pedigree analysis; genetic map

葡萄属于葡萄科 (Vitaceae) 葡萄属 (*Vitis*) 植物, 为多年生落叶藤本, 是第 4 个完成全基因组测序的开花植物<sup>[1]</sup>。葡萄自根栽培历史悠久, 19 世纪中期葡萄根瘤蚜在欧洲爆发, 对葡萄生产造成了毁灭性打击, 因此科学工作者们致力于寻求抗根瘤蚜的葡萄砧木, 从而推动了葡萄砧木育种和砧木抗性的研究<sup>[2]</sup>。我国葡萄砧木研究起步较晚, 且多限于抗寒性方面, 随着生物技术尤其是分子标记技术的快速发展, 对葡萄砧木抗病虫机理以及砧木对接穗品种重要农艺性状影响的研究成为新的热点。

进入 21 世纪以来, DNA 分子标记技术发展日新月异。从发展进程上, 可把 DNA 分子标记分成 3 个阶段: 一是以 Southern 杂交技术为核心的分子标记 (如 RFLP), 此类标记被称为第 1 代分子标记; 二是以 PCR 技术为核心的分子标记 (如 STS、RAPD、AFLP 和 SSR 等), 称为第 2 代分子标记; 单核苷酸多态性 (SNP) 标记被称为第 3 代分子标记。目前, DNA 分子标记技术广泛应用于葡萄品种鉴定、系谱分析、遗传图谱的构建、基因克隆等方面, 本文综述了分子标记技术在葡萄砧木改良上的应用进展。

收稿日期: 2013-07-31 修回日期: 2013-09-24 网络出版日期: 2014-04-08

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20140408.0857.030.html>

**基金项目:** 现代农业产业技术体系建设专项基金 (CARS-30); 河北省财政专项-人才队伍建设专项基金 (2012055005)

第一作者主要从事葡萄种质资源及分子辅助育种研究。E-mail: hanbin986@163.com

通信作者: 赵胜建, 主要从事葡萄种质资源及遗传育种研究。E-mail: tablegrape@163.com

## 1 品种鉴定

葡萄砧木品种多是美洲葡萄 (*V. labrusca*)、河岸葡萄 (*V. riparia*)、沙地葡萄 (*V. rupestris*)、冬葡萄 (*V. blandieri*)、甜冬葡萄 (*V. cinerea*)、峡谷葡萄 (*V. arizonica*) 和山葡萄 (*V. amurensis*) 种间杂交, 或与欧亚种葡萄杂交后经多代回交获得<sup>[3]</sup>。葡萄砧木的广泛使用已有 200 余年的历史, 很多葡萄砧木品种被引种到原产地以外的地区, 难免出现品种的混杂; 又因为许多砧木品种亲缘关系较近, 即使是经验丰富的育种家也很难从形态上准确区分<sup>[4]</sup>。因此, 造成了同物异名和同名异物现象。随着分子标记技术的发展, 使葡萄砧木品种鉴定变得简单。这种鉴定结果不仅客观, 而且不受砧木生长的环境条件和砧木本身生长状况的影响。

自从 M. Thomas 等<sup>[5]</sup>在 1993 年首次报道了 SSR 标记用于葡萄品种鉴定以来, 许多科研人员利用分子标记技术对本地的葡萄砧木品种进行了鉴定。Y. Y. Hur 等<sup>[6]</sup>利用 RAPD 和 SSR 2 种分子标记技术对韩国葡萄砧木和野生葡萄的亲缘关系进行研究, 将韩国的葡萄砧木和野生葡萄分成 4 个组群。A. Oualkadi 等<sup>[7]</sup>对 211 个摩洛哥当地葡萄品种、INRA (French National Institute for Agricultural Research) 引种的葡萄品种以及邻国安哥拉和突尼斯的葡萄品种 (包括酿酒葡萄、鲜食葡萄、制干葡萄和砧木葡萄), 利用 20 个细胞核 SSR (nSSR) 分子标记和 3 个叶绿体 SSR (cpSSR) 分子标记进行分析, 结果发现起源于欧洲的葡萄品种群与摩洛哥本地品种群存在明显差异, 摩洛哥品种群是独立进化的, 该结果预示着摩洛哥可能也是葡萄的起源地之一。

V. Laucou 等<sup>[8]</sup>利用分布于 19 条葡萄染色体上 20 个 SSR 分子标记分析了 INRA 葡萄资源库的 4370 个收录品种, 其中包括 *Vitis vinifera* subsp. *sativa* 葡萄品种 3727 个, *Vitis vinifera* subsp. *sylvestris* 葡萄品种 80 个, 种间杂交品种 364 个, 砧木品种 199 个。经过分析共获得了 2836 个 SSR 多态性分子标记, 其中 *sativa* 亚种 2323 个, *sylvestris* 亚种 72 个, 种间杂种 306 个, 砧木 135 个; 共检测到 524 个等位基因, 平均每个标记检测到 26.2 个等位基因。2323 个欧亚种葡萄共检测到 338 个等位基因, 平均每个标记检测到 16.9 个等位基因。平均遗传多样性值为 0.797, 杂合度为 0.76, 遗传变异范围为 0.2~1。种间杂种和砧木品种的遗传多样性值分别为 0.865 和 0.839, 均高于葡萄栽培品种的 0.769, *sylvestris* 亚

种的遗传多样性值最低为 0.708。同时发现个别无性系品种发生微小的遗传变异。H. Huang 等<sup>[9]</sup>利用 EST-SSR 分析了圆叶葡萄 ‘Summit’ 和 ‘Noble’ 2 个品种基因型的多态性和杂合性, 发现二者有 90 个相同的 SSR 位点和 50 个特异的 SSR 位点。A. Sabir 等<sup>[10]</sup>利用 AFLP 技术分析了 19 个葡萄砧木品种, 共获得了 416 条片段, 其中多态性片段有 357 条, 多态性达到 86%, 经聚类分析将 19 个品种分成了 5 大类。

分子标记技术对无性系和体细胞突变体同样可以准确鉴定。C. Popescu 等<sup>[11]</sup>利用 AFLP 对离体培养花药植株的遗传变异特征进行分析, 发现与母株相比较其基因组都发生了变异。M. K. Panda 等<sup>[12]</sup>运用 RAPD 技术对多次继代获得的新植株和母株基因组进行对比分析, 未发现重组或突变基因。M. Alizadeh 等<sup>[13]</sup>利用 RAPD 和 ISSR 对葡萄砧木品种 DogRidge、SO4 和 ARI-H-144 的组织培养多次继代后代的遗传多样性进行分析, 未发现有重组变异产生。J. A. Cabezas 等<sup>[14]</sup>通过研究发现 ‘Binova’ 是 ‘SO4’ 的突变体, 二者除花型外其他性状完全一致, 其区别在于 ‘Binova’ 为雌性花, 而 ‘SO4’ 为雄性花。

## 2 系谱分析

分子标记技术不仅可以识别亲本品种和后代, 而且可以构建品种的亲缘关系系谱。V. Laucou 等<sup>[15]</sup>利用 SSR 标记对葡萄砧木品种 ‘Fercal’ 的亲缘关系进行研究, 发现 ‘Fercal’ 的母本为 ‘B. C. n 1B’, 父本为 ‘31 Richter’。T. Dzhambova 等<sup>[16]</sup>确定了 MK4 的亲本为 ‘Mavrud’ 和 ‘Rupestris du Lot’。A. Garris 等<sup>[17]</sup>对砧木品种 ‘Freedom’ 的系谱进行重建, 发现其亲本为 ‘1613-59’ 和 ‘Dog Ridge 5’, 而 ‘1613-59’ 来自于 ‘1613C’ 的无性系; 进一步研究发现 ‘1613C’ 的父本是砧木品种 ‘3306C’ (*V. riparia* × *V. rupestris*)。

Teleki 系砧木是目前世界上使用最广泛的葡萄砧木, 其主要品种有 Teleki-Fuhr SO4, Teleki-Kober 5BB, Teleki 5C, Teleki-Kober 125AA 和 Teleki 8B。一些学者认为 Teleki 是由冬葡萄 (*V. berlandieri*) 和河岸葡萄 (*V. riparia*) 杂交获得, 但是其真实性一直没有确切证实。分子标记技术的不断发展, 为开展 Teleki 系谱关系的研究创造了条件, 许多学者利用 SSR 标记对 Teleki 系砧木品种的亲缘关系进行初步分析<sup>[18]</sup>。在此基础上, G. Jahnke 等<sup>[19]</sup>利用覆盖全部染色体的 19 个 SSR 分子标记对 Teleki 系的品种

进行系谱分析,发现 Teleki 5C 和 Teleki-Kober 5BB 这 2 个品种在遗传背景上表现出较大差异,二者并非是来自同一个无性系,具有不同基因型。这一结果得到了 P. Poczai 等<sup>[20]</sup>的证实,通过叶绿体 DNA 分子标记研究 Teleki 的系统发育,研究还发现一部分 Teleki 品种与河岸葡萄聚为一类;另一部分 Teleki 品种与北美的冬葡萄种形成一个姊妹类群。进化树的结果证明 Teleki 系的母本来自不同的祖先;Teleki-Kober 5BB 和 Teleki-Kober 125AA 这 2 个品种的母本均来自河岸葡萄。

### 3 遗传图谱的构建

分子标记技术不仅可用于阐明复杂形状的遗传学基础,而且可用于遗传连锁图谱的构建。遗传图谱是研究质量性状和数量性状遗传的基础,对标记辅助选择、图位克隆,以及将标记整合到物理图谱和基因组序列上具有重要意义<sup>[21]</sup>。利用已鉴定的、基因特异的分子标记构建高密度遗传图谱,检测紧密连锁或共遗传的性状,确定控制数量性状的遗传因子数量和所处的位置已成为葡萄砧木研究的热点<sup>[22]</sup>。

#### 3.1 抗病分子标记与遗传图谱的构建

葡萄病害主要由真菌、病毒和细菌引起。葡萄真菌性病害主要有霜霉病、白粉病、白腐病、灰霉病等;葡萄病毒性病害主要有葡萄扇叶病、葡萄卷叶病、葡萄斑点病等;葡萄细菌性病害主要有葡萄皮尔斯病、葡萄根癌病等<sup>[23]</sup>。在过去的 10 多年中,国内外研究者致力于构建遗传图谱,为寻找与数量性状位点相连锁的标记做了大量研究。

L. J. Welter 等<sup>[24]</sup>以抗真菌病的‘Regent’和易感真菌病的‘Lemberger’杂交后代群体构建遗传图谱,该图谱包括 19 个连锁组,全长 1631 cM,标记的平均距离为 4.67 cM。发现了一个与葡萄白粉病抗性性状相关的主效 QTLs (quantity trait locus)、与葡萄霜霉病抗性性状相关的一个主效 QTLs 和一个微效 QTLs。

F. M. Moreira 等<sup>[25]</sup>以 2 个独立杂交后代群体构建遗传图谱,群体 I 是由易感葡萄霜霉病的‘Moscatto’和抗病的河岸葡萄杂交后代组成,群体 II 是由‘VRH3082 1-42’(圆叶葡萄和山葡萄杂交后代)和‘SK77 5/3’的 F<sub>1</sub>组成,获得了群体 I 和群体 II 2 张独立的遗传图谱,其全长分别为 1037.2 cM 和 651 cM。在群体 I 遗传图谱的第 7 连锁组上发现与葡萄霜霉病抗性性状密切相关的 QTLs,同时发现一

些微效的 QTLs 分布在第 8、12 和 17 连锁组上。而在群体 II 遗传图谱上仅获得抗葡萄霜霉病微效的 QTLs,分布在第 1、6 和 7 连锁组上,但是在这 2 张遗传图谱上未获得同源的 QTLs。

P. Blasi 等<sup>[26]</sup>以欧亚种葡萄和山葡萄杂交后代为群体构建遗传图谱,该图谱共包括 19 个遗传连锁组,全长 975 cM。发现了一个与葡萄霜霉病抗性紧密连锁的 QTLs,被定位在第 14 连锁组上,并将其命名为 Rvp8 (resistance to plasmopara viticola 8)。F. Schwander 等<sup>[27]</sup>将抗葡萄霜霉病的 2 个主效 QTLs—Rpv3 和 Rpv10 分别定位在第 18 和第 9 连锁组上,证明霜霉病抗性是由多基因调控的。经过进一步研究,将 Rpv10 精确定位在 2.1 cM 的范围,其大小为 314 kb,研究还发现在该区域内包括 8 个 NBS-LRR (nucleotide binding/leucine-rich repeat) 类型的 RGA (resistance gene analog)。这一成果为霜霉病抗性早期鉴定以及开展分子标记辅助育种创造条件。

G. Di Gaspero 等<sup>[28]</sup>以‘霞多丽’×‘Bianca’和‘赤霞珠’×‘20-3’2 个杂交后代群体及亲本构建整合图谱,该图谱共包括 19 个同源连锁组,全长 1676 cM,相邻两标记平均距离 3.6 cM。发现了 173 个与抗性位点紧密连锁的 RGA,而且这些 RGA 位点主要集中在 7 个连锁组上,分别是第 3、7、9、12、13、18 和 19 连锁组。

A. F. Krivanek 等<sup>[29]</sup>以沙地葡萄和峡谷葡萄及其杂交后代为试材,研究抗皮尔斯病性状在后代群体中遗传分布规律。在此基础上,A. F. Krivanek 等<sup>[30]</sup>利用抗、感皮尔斯病的峡谷葡萄及其杂交后代构建遗传图谱,利用 SSR 标记定位了一个与抗皮尔斯病相关的主效 QTLs—PdR1 (Pierce’s disease resistance 1)。

植株缺失铁元素会导致黄叶病发生,P. F. Bert 等<sup>[31]</sup>以耐、不耐铁缺失的葡萄品种赤霞珠和河岸葡萄‘Ripraia Gloire’及杂交后代群体构建遗传图谱,将与抗黄叶病相关的主效 QTLs 定位在第 13 连锁组上,这对开展黄叶病致病机理研究具有重要意义。

#### 3.2 抗虫分子标记与遗传图谱的构建

葡萄虫害主要是地下害虫,如根瘤蚜、线虫等。因其深藏于土中难以有效防控,在葡萄栽培历史上曾造成巨大灾害。目前,防控这些虫害的唯一有效方法是采用砧木嫁接栽培。因此,随着分子标记技术发展,科研工作者纷纷构建与抗虫性状紧密连锁的遗传图谱,进而对抗虫机理展开深入的研究。

线虫 (*Nematodes*) 主要危害葡萄根部并且传播病毒病, 如葡萄扇叶病、皮尔斯病等。C. Me 等<sup>[32]</sup> 运用 RAPD 技术对与葡萄根结线虫 (root-knot nematodes) 抗性相关分子标记进行研究, 发现了 6 条相关的基因片段, 其片段大小在 300 ~ 3000 bp 之间。K. M. Lowe<sup>[33]</sup> 以香槟尼葡萄 ‘Ramsey’ 和河岸葡萄 ‘Riparia Gloire’ 杂交后代为群体构建遗传图谱, 该图谱包括 19 个连锁组, 全长 1304.7 cM, 相邻 2 个标记平均距离 6.8 cM。研究获得了一个与根结线虫抗性性状紧密相关的 QTLs, 将其定位在第 18 连锁组上。K. Xu 等<sup>[34]</sup> 以抗、感剑线虫 (*Xiphinema index*) 的峡谷葡萄及杂交后代群体构建遗传图谱, 定位了一个与剑线虫抗性相关的主效 QTLs, 命名为 XiR1 (*Xiphinema index* resistance 1), 并且将 XiR1 定位在第 19 号染色体的 VMC5a10 标记附近。C. F. Hwang 等<sup>[35]</sup> 也报道了与剑线虫抗性相关的 QTLs, 以 *V. arizonica* 为试材构建遗传图谱, 并确定了抗标准剑线虫的 QTLs 位于第 19 连锁组上, 将其命名为 XiR1。在此基础上, 又利用 3 个 BAC 文库构建了物理图谱, 确定了 XiR1 的大小为 115 kb, 并且对 3 个可能的 NBS-LRR 基因序列进行了分析。

葡萄根瘤蚜在不断的进化过程中发生协同进化, 致使原本具有根瘤蚜抗性的砧木品种正在丧失其抗性<sup>[36]</sup>。因此, 揭示葡萄砧木对根瘤蚜的抗性机理, 培育抗根瘤蚜新种质成为当前研究热点。T. L. Roush 等<sup>[37]</sup> 运用 SSR 和 AFLP 标记对抗、感根瘤蚜的砧木及杂交后代群体构建遗传图谱, 初步获得了一些与葡萄根瘤蚜抗性相关的分子标记, 为进一步开展根瘤蚜抗性研究创造条件。L. Blank 等<sup>[38]</sup> 以高抗葡萄根瘤蚜的 ‘Börner’ 为试材, 获得了与抗性相关的超敏反应基因。J. Zhang 等<sup>[39]</sup> 以易感葡萄根瘤蚜的 V3125 (*V. vinifera* ‘Schiava grossa’ × ‘Riesling’) 和抗葡萄根瘤蚜的砧木品种 ‘Börner’ 杂交后代为群体, 构建遗传图谱, 该图谱包括 19 个连锁群, 全长 1155.98 cM, 标记的平均距离为 4.8 cM。发现抗葡萄根瘤蚜的 QTLs 位于第 13 连锁组上, 并且获得了 2 条与葡萄根瘤蚜抗性密切相关的分子标记, 为开展葡萄根瘤蚜分子辅助育种创造条件。

### 3.3 其他重要性状分子标记与遗传图构建

S. Riaz 等<sup>[40]</sup> 利用 nSSR、EST-SSR 和 EST-RFLP 等 3 种分子标记技术对沙地葡萄 ‘D8909-15’ 和 *V. arizonica* ‘F8909-17’ 及其  $F_1$  ‘9621’ 群体分别构建遗传图谱, 母本 ‘D8909-15’ 的遗传图谱包括 18 个连锁组, 全长 865.0 cM, 相邻两标记平均距离为

5.4 cM, 父本 ‘F8909-17’ 遗传图谱包括 19 个连锁组, 全长 1055.0 cM, 相邻两标记平均距离为 6.7 cM,  $F_1$  ‘9621’ 群体遗传图谱则包括 19 个连锁组, 全长 1154.0 cM, 相邻两标记平均距离为 5.5 cM。将 3 张遗传图谱整合, 在整合图谱上有 94 个新分子标记被定位到各连锁组上, 同时发现与开花类型相关的 QTLs 在整合图谱和父本遗传图谱的排列顺序基本一致, 都被定位在第 2 连锁组上; 将与抗皮尔斯病相关的 QTLs-PdR1 精确定位在整合图第 14 连锁组上的 VMCNg3h8 和 VVIN64 两标记之间。

S. Riaz 等<sup>[41]</sup> 于 2012 年完成了圆叶葡萄 (*V. rotundifolia*,  $2n = 40$ ) 遗传图谱的构建, 以圆叶葡萄品种 ‘Fry’ 和 ‘Trayshed’ 为作图群体, 母本 ‘Fry’ 遗传图谱分布在 18 条染色体上, 全长 879 cM, 将 212 个 SSR 标记定位在图谱上, 相邻两标记的平均遗传距离为 4.1 cM, 但是在第 6 号染色体上没有得到多态性标记。父本 ‘Trayshed’ 遗传图谱分布在 19 条染色体上, 全长 841 cM, 将 191 个 SSR 标记定位于图谱上。将两图谱整合, 获得了分布在 19 条染色体, 全长 1088 cM 的整合图谱, 共将 314 个分子标记定位在整合图谱上, 其中有 66% 的标记与以往报道的欧亚种葡萄相一致。每条染色体上标记数量在 5 ~ 35 个之间。然而圆叶葡萄第 20 号染色体未能标定在遗传图谱上, 推测其原因可能是: 圆叶葡萄是古老葡萄 (ancient grape,  $n = 21$ ) 向现代葡萄 (present-day grape,  $n = 19$ ) 进化的过渡类型, 其第 20 号染色体恰恰是现代葡萄缺失的 2 条染色体之一。因此, 来源于现代葡萄基因组序列的 SSR 标记不适用于圆叶葡萄。

葡萄栽培品种为雌雄同株、两性花, 而葡萄砧木品种因其起源较早多为雌雄异株、单性花。前人研究发现与葡萄花类型相关的基因位于葡萄第 2 号染色体上, 随着葡萄全基因组测序的完成, 遗传图谱和物理图谱的构建技术不断成熟, 这为葡萄花类型相关基因的深入研究奠定了基础, I. Fechter 等<sup>[42]</sup> 将欧亚种葡萄品种 (‘Schiava Grossa’ × ‘Riesling’) 与雄性砧木品种 ‘Börner’ 杂交, 对杂交后代进行研究, 构建了与花类型相关的全长 143 kb 的物理图谱, 该图谱遗传距离为 0.5 cM。研究获得了与雌花型密切相关的分子标记, 该标记在雄花型和两性花型中不表达, 可用于杂交后代群体中雌株的早期鉴定, 有助于提高培育优良母本的育种效率。

## 4 新型分子标记的应用

目标起始密码子多态性 (SCoT, start codon tar-

geted polymorphism) 分子标记是在水稻上提出的基于单引物扩增反应 (SPAR, single primer amplification reaction) 的目的基因分子标记方法。此标记结合 ISSR 标记和 RAPD 标记的优点, 操作简单、成本低廉、多态性丰富, 能有效产生与性状联系标记, 有利于辅助育种; 引物设计简单, 并且引物可以通用等。D. L. Guo 等<sup>[43]</sup> 将 SCoT 应用在葡萄品种鉴定上, 利用 36 个 SCoT 标记对 64 个葡萄品种进行分析, 获得了 131 条特异带, 其中多态性条带达到 93.1%, 平均每个标记获得 0.82 条带。通过 UPGMA (unweighted pair-group method with arithmetic means) 聚类分析, 将 64 个葡萄品种分为 4 大类, 分别是欧亚种鲜食品种群、欧美杂种鲜食品种群、欧亚种酿酒品种群和野生葡萄种群。这与以往分类结果相一致, 证明 SCoT 适用于葡萄品种鉴定及亲缘关系研究。

单核苷酸多态性 (SNP, single nucleotide polymorphism) 主要是指在基因组水平上由单个核苷酸的变异所引起的 DNA 序列多态性。基因组上单个核苷酸的变异包括置换、颠换、缺失和插入。SNP 标记的特点为 SNP 数量多、分布广泛, 适于快速、规模化筛查以及 SNP 等位基因频率容易估计、易于基因分型。基于欧亚种葡萄品种‘黑比诺’基因组测序完成的基础, 可利用 SNP 开展葡萄属植物遗传多样性、遗传图谱构建、品种鉴定、分子辅助育种等研究<sup>[44]</sup>。J. Cabezas 等<sup>[45]</sup> 从 330 个 SNP 标记中筛选出 48 个覆盖全部 19 条染色体的 SNP 标记, 这些分子标记可用于葡萄品种鉴定、遗传图谱的构建以及分子标记辅助育种。

反转录转座子 (retrotransposon) 以高拷贝在植物基因组中广泛分布, 具有高度的特异性, 可作为分子标记对植物基因组进行研究。G. Sant'Ana 等<sup>[46]</sup> 利用反转录转座子分子标记 (retrotransposon-based marker) 对葡萄品种鉴定及亲缘关系进行分析, 以 1 个反转录转座子分子标记 Tv1 和 7 个广泛应用的 SSR 分子标记分别对 26 个葡萄品种进行分析, 这 26 个葡萄品种中包括 7 个欧亚种葡萄品种、4 个美洲种群葡萄品种和 15 个葡萄砧木品种。发现除了‘White Niagara’和‘Red Niagara’这 2 个品种无法区分外, Tv1 和 7 个 SSR 分子标记都可以将其余 24 个品种完全区分开。利用聚类分析软件发现 Tv1 可以将 24 个品种聚成 2 大类, 一类是欧亚种葡萄和美洲种葡萄品种群, 另一类是砧木品种群, 这与 SSR 分析结果基本相同。这些结果证明反转录转座子分子标记可以用于葡萄品种鉴定及遗传图谱构建。

## 5 展望

DNA 分子标记技术在葡萄砧木品种鉴定、系谱分析、构建遗传图谱与物理图谱等方面已经得到了广泛的应用, 随着欧亚种葡萄核基因组和叶绿体基因组序列草图的绘制完成<sup>[1,47]</sup>, 随着新型 DNA 分子标记不断出现, 将会有越来越多葡萄基因的结构、功能和调控机理被阐明。葡萄砧木抗性研究和分子标记辅助育种将会得到进一步充实和发展。

我国葡萄砧木研究起步较晚, 在科研中还存在一些问题: (1) 葡萄砧木多为国外品种, 在引种、运输过程中, 苗木发生混淆, 产生同名异物和同物异名的现象, 为科学研究带来不便。(2) 我国葡萄砧木种质资源管理存在不足, 一些珍贵的种质急需收集保存。(3) 随着我国葡萄栽培范围不断扩大, 各个地区对砧木品种特性要求不同, 现有品种表现出一定的不适用性, 急需种质创新。因此, 针对以上存在的问题, 建议加强葡萄砧木资源管理, 构建葡萄砧木的系统发育树; 建立我国葡萄砧木资源及野生资源指纹图谱数据库; 将杂交育种和基因工程育种相结合, 培育适合我国葡萄生产需要的、拥有自主知识产权的葡萄砧木新种质。

## 参考文献

- [1] Jaillon O, Aury J M, Noel B, et al. The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla[J]. Nature, 2007, 449 (7161): 463-467
- [2] Alleweldt G, Possingham J. Progress in grapevine breeding[J]. Theor Appl Genet, 1988, 75 (5): 669-673
- [3] 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
- [4] Meredith C P. Grapevine genetics: probing the past and facing the future[J]. Agric Conspec Sci, 2001, 66: 21-25
- [5] Thomas M, Scott N. Microsatellite repeats in grapevine reveal DNA polymorphisms when analysed as sequence-tagged sites (STSs) [J]. Theor Appl Genet, 1993, 86 (8): 985-990
- [6] Hur Y Y, Choi Y J, Kim E J, et al. Analysis of genetic relationship of grape rootstock cultivars and wild *Vitis* species using RAPD and SSR markers[J]. Kor J Breed Sci, 2012, 44: 19-28
- [7] Oualkadi A, Ater M, Messaoudi Z, et al. Genetic diversity of Moroccan grape accessions conserved *ex situ* compared to Maghreb and European gene pools[J]. Tree Genet Genomes, 2011, 7 (6): 1287-1298
- [8] 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
- [9] Huang H, Lu J, Ren Z, et al. Mining and validating grape (*Vitis* L.) ESTs to develop EST-SSR markers for genotyping and mapping[J]. Mol Breeding, 2011, 28 (2): 241-254
- [10] Sabir A, Dogan Y, Tangolar S, et al. Analysis of genetic relatedness among grapevine rootstocks by AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) markers[J]. Int J Food Agric Environ, 2010, 8 (1): 210-213

- [11] Popescu C, Falk A, Glimelius K. Application of AFLPs to characterize somaclonal variation in anther-derived grapevines[J]. *Vitis*, 2002, 41(4): 177-182
- [12] Panda M K, Mohanty S, Subudhi E, et al. Assessment of genetic stability of micropropagated plants of *Curcuma longa* L. by cytophotometry and RAPD analysis[J]. *J Integr Plant Biol*, 2007, 3(1): 189-195
- [13] Alizadeh M, Singh S K. Molecular assessment of clonal fidelity in micropropagated grape (*Vitis* spp.) rootstock genotypes using RAPD and ISSR markers[J]. *Iran J Biotech*, 2009, 7(1): 37-44
- [14] Cabezas J A, Martinez-Zapater J M, Wolf T. Genetic characterization of closely related rootstocks varieties based on AFLP and SAMPL markers[C]//ISHS Acta Horticulturæ: VIII International Conference on Grape Genetics and Breeding, 2002, 603: 291-300
- [15] Laucou V, Boursiquot J M, Lacombe T, et al. Parentage of grapevine rootstock 'Fercal' finally elucidated[J]. *Vitis*, 2008, 47(3): 163-167
- [16] Dzhambazova T, Hvarleva T, Hadjinicola A, et al. Characterization of grapevine rootstocks using microsatellite markers[J]. *Biotechnol Biotech Eq*, 2007, 21(1): 58-62
- [17] Garris A, Cousins P, Ramming D, et al. Parentage analysis of Freedom rootstock[J]. *Am J Enol Viticult*, 2009, 60(3): 357-361
- [18] Kocsis L, Podmaniczky P, Taller J, et al. Comparative analysis of the most widespread grapevine rootstock lines in the world, the teleki lines, with microsatellite markers[J]. *Cereal Res Commun*, 2006, 34(1): 773-776
- [19] Jahnke G, Molnár G K, Májer J, et al. Analysis of grape rootstocks by SSR markers[J]. *J Int Sci Vigne Vin*, 2011, 45(3): 1-12
- [20] Pocai P, Hyvönen J, Taller J, et al. Phylogenetic analyses of Teleki grapevine rootstocks using three chloroplast DNA markers[J]. *Plant Mol Biol Rep*, 2012, 31(2): 371-386
- [21] 王军. 生物技术与葡萄遗传育种[J]. *中国农业科学*, 2009, 42(8): 2862-2874
- [22] Staub J E, Serquen F C, Gupta M. Genetic markers, map construction, and their application in plant breeding[J]. *HortScience*, 1996, 31(5): 729-741
- [23] 李慧娥, 郭其强. 葡萄抗病分子育种研究进展[J]. *园艺学报*, 2012, 31(9): 182-190
- [24] Welter L J, Göktürk-Baydar N, Akkurt M, et al. Genetic mapping and localization of quantitative trait loci affecting fungal disease resistance and leaf morphology in grapevine (*Vitis vinifera* L.) [J]. *Mol Breeding*, 2007, 20(4): 359-374
- [25] Moreira F M, Madini A, Marino R, et al. Genetic linkage maps of two interspecific grape crosses (*Vitis* spp.) used to localize quantitative trait loci for downy mildew resistance[J]. *Tree Genet Genomes*, 2010, 7(1): 153-167
- [26] Blasi P, Blanc S, Wiedemann-Merdinoglu S, et al. Construction of a reference linkage map of *Vitis amurensis* and genetic mapping of Rpv8, a locus conferring resistance to grapevine downy mildew[J]. *Theor Appl Genet*, 2011, 123(1): 43-53
- [27] Schwander F, Eibach R, Fechter I, et al. Rpv10: a new locus from the Asian *Vitis* gene pool for pyramiding downy mildew resistance loci in grapevine[J]. *Theor Appl Genet*, 2012, 124(1): 163-176
- [28] Di Gaspero G, Cipriani G, Adam-Blondon A F, et al. Linkage maps of grapevine displaying the chromosomal locations of 420 microsatellite markers and 82 markers for R-gene candidates[J]. *Theor Appl Genet*, 2007, 114(7): 1249-1263
- [29] Krivanek A F, Famula T R, Tenschler A, et al. Inheritance of resistance to *Xylella fastidiosa* within a *Vitis rupestris* × *Vitis arizonica* hybrid population[J]. *Theor Appl Genet*, 2005, 111(1): 110-119
- [30] Krivanek A F, Riaz S, Walker M A. Identification and molecular mapping of *PdRI*, a primary resistance gene to Pierce's disease in *Vitis*[J]. *Theor Appl Genet*, 2006, 112(2): 1125-1131
- [31] 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]. *Theor Appl Genet*, 2013, 126(2): 451-473
- [32] Me C, Gambino G, Cousins P, et al. Molecular markers associated with resistance to the root-knot nematode *Meloidogyne arenaria* from *Vitis mustangensis* [C]//ISHS Acta Horticulturæ 827: IX International Conference on Grape Genetics and Breeding, 2006, 827: 607-610
- [33] Lowe K M. Genetic and molecular mapping studies on a population derived from rootstocks Ramsey (*Vitis champinii*) and Riparia Gloire (*Vitis riparia*) [D]. Davis: University of California, 2007
- [34] Xu K, Riaz S, Roncoroni N C, et al. Genetic and QTL analysis of resistance to *Xiphinema index* in a grapevine cross[J]. *Theor Appl Genet*, 2008, 116(2): 305-311
- [35] Hwang C F, Xu K, Hu R, et al. Cloning and characterization of *XiRI*, a locus responsible for dagger nematode resistance in grape [J]. *Theor Appl Genet*, 2010, 121(4): 789-799
- [36] Lin H, Walker M A, Hu R, et al. New simple sequence repeat loci for the study of grape phylloxera (*Daktulosphaira vitifoliae*) genetics and host adaptation[J]. *Am J Enol Viticult*, 2006, 57(1): 33-40
- [37] Roush T L, Granett J, Walker M A. Genetic control of grape phylloxera resistance in grapevine [C]//The 2003 ESA Annual Meeting and Exhibition, 2003
- [38] Blank L, Wolf T, Eimert K, et al. Differential gene expression during hypersensitive response in Phylloxera-resistant rootstock 'Börner' using custom oligonucleotide arrays[J]. *J Plant Interact*, 2009, 4(4): 261-269
- [39] Zhang J, Hausmann L, Eibach R, et al. A framework map from grapevine V3125 (*Vitis vinifera* 'Schiava grossa' × 'Riesling') × rootstock cultivar 'Börner' (*Vitis riparia* × *Vitis cinerea*) to localize genetic determinants of phylloxera root resistance[J]. *Theor Appl Genet*, 2009, 119(6): 1039-1051
- [40] Riaz S, Krivanek A F, Xu K, et al. Refined mapping of the Pierce's disease resistance locus, *PdRI*, and sex on an extended genetic map of *Vitis rupestris* × *V. arizonica* [J]. *Theor Appl Genet*, 2006, 113(6): 1317-1329
- [41] Riaz S, Hu R, Walker M A. A framework genetic map of *Muscadinia rotundifolia* [J]. *Theor Appl Genet*, 2012, 125(6): 1195-1210
- [42] Fechter I, Hausmann L, Daum M, et al. Candidate genes within a 143 kb region of the flower sex locus in *Vitis* [J]. *Mol Genet Genomics*, 2012, 287(3): 247-259
- [43] Guo D L, Zhang J Y, Liu C H. Genetic diversity in some grape varieties revealed by SCoT analyses [J]. *Mol Biol Rep*, 2012, 39(5): 5307-5313
- [44] Vezzulli S, Micheletti D, Riaz S, et al. A SNP transferability survey within the genus *Vitis* [J]. *BMC Plant Biol*, 2008, 8: 128
- [45] Cabezas J, Ibáñez J, Lijavetzky D, et al. A 48 SNP set for grapevine cultivar identification [J]. *BMC Plant Biol*, 2011, 11: 153
- [46] Sant'Ana G, Ferreira J, Rocha H, et al. Comparison of a retrotransposon-based marker with microsatellite markers for discriminating accessions of *Vitis vinifera* [J]. *Genet Mol Res*, 2012, 11(2): 1507-1525
- [47] Velasco R, Zharkikh A, Troglio M, et al. A high quality draft consensus sequence of the genome of a heterozygous grapevine variety [J]. *PLOS ONE*, 2007, 12: e1326