

葡萄同源四倍体 F_2 群体的遗传变异分析

项晓冬, 高玉坤, 崔江慧, 任根增, 魏世林, Zakeyeldinn E. A. Khalid, 常金华
(河北农业大学农学院, 保定 071000)

摘要: 多倍体杂交育种已成为葡萄新品种选育的重要途径, 本研究使用 20 个形态学性状和 25 对 SSR 分子标记, 对二倍体玫瑰香、四倍体玫瑰香、巨峰、四倍体玫瑰香与巨峰杂交 F_1 巨玫和 F_2 群体进行遗传变异分析。形态学性状分析表明, 在 F_2 群体中 14 个形态学性状变异系数高于 20%, F_2 群体平均 Shannon 信息指数为 1.14, 平均 Nei's 遗传多样性指数为 0.62, 群体有丰富的遗传多样性。性状之间表现出显著的相关性, 幼叶叶背绒毛密度与新梢节间绒毛密度 ($r=0.203$) 极显著相关, 与成熟叶下表面绒毛密度 ($r=0.128$) 显著相关, 主成分分析可以在二维上直观反映出 F_2 单株与亲本表型的相似程度。25 对 SSR 标记共扩增出 127 条带, 平均多态性信息含量 (PIC) 为 0.26, 后代群体平均 Shannon 信息指数为 0.49, 平均 Nei's 遗传多样性指数为 0.32。形态学性状和 SSR 聚类分析发现, F_2 群体中大部分单株与 F_1 巨玫相似, 同时也出现一些与父母本遗传距离较远的单株, 为未来葡萄四倍体品种选育提供了良好材料。

关键词: 四倍体葡萄; F_2 群体; 形态学性状; SSR 标记; 遗传变异; 聚类分析

Genetic Variation Analysis in F_2 Population from Autotetraploid Grape Hybrid

XIANG Xiao-dong, GAO Yu-kun, CUI Jiang-hui, REN Gen-zeng, WEI Shi-lin,
Zakeyeldinn E. A. Khalid, CHANG Jin-hua
(College of Agronomy, Hebei Agricultural University, Baoding 071000)

Abstract: Breeding for tetraploid hybrids has become an optimal strategy in grape breeding. In the present study, we deployed 20 morphological traits and 25 simple sequence repeat (SSR) markers to access the genetic diversity of 278 genotypes. These materials contained four grape varieties (Muscat Hamburg, tetraploid Muscat Hamburg, Kyoho and Hybrid F_1 Jumei by crossing of Kyoho and tetraploid Muscat Hamburg) and 274 individuals from Jumei's F_2 population. The morphological variation analysis revealed the average Shannon information index and the average Nei's genetic diversity index of 1.14 and 0.62, respectively. The coefficient of variation of 14 traits was higher than 20% and significant correlations were found among some characteristics. Prostrate hairs density of lower side of young leaf was significantly positively correlated with Hairs density on internode of shoot ($r=0.203$) and Prostrate hairs density of lower side of mature leaf ($r=0.128$). By principal component analysis (PCA) and cluster analysis, the morphological traits showed eight principal components (PC1-PC8) explained approximately 60.99% of the total variance of the 278 genotypes, and the first three major PCs contributed to approximately 30.08%. The two-dimensional graph of PC1 and PC2 directly reflected the similarity between the phenotype of F_2 population and its parents. The cluster analysis of 278 materials based on 20 morphological traits resulted in four main groups. Further genetic variation and diversity evaluation in 278 grapes materials was done using 25 SSR markers. 127 bands totally were generated by 25 SSR markers using PCR amplification,

收稿日期: 2018-12-04 修回日期: 2018-12-27 网络出版日期: 2019-01-23

URL: <http://www.doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20181204003>

第一作者研究方向为葡萄遗传育种, E-mail: xiangxd0029@126.com

通信作者: 常金华, 研究方向为作物遗传育种, E-mail: jhchang2006@126.com

基金项目: 河北省重点基础研究 (15962905D)

Foundation project: Hebei Province Key Basic Research Foundation Project (15962905D)

including 52 polymorphic fragments. SSR analysis indicated, in the population, the average polymorphism information content (PIC) value was 0.26, the average Nei's genetic diversity index was 0.32, and the average Shannon information index was 0.49. The result showed that these SSR markers were able to distinguish genetic variation among genotypes. The SSR cluster analysis based on UPGMA illustrated that the similarity coefficient ranged from 0.38 to 1.00 and cluster analysis in 0.47 similarity coefficient can divide 278 grapes genotypes accessions into five groups. These results based 20 morphological traits and 25 SSR markers would be valuable for genetic diversity analysis and helpful in breeding selection. PCA and clustering analysis revealed that most of tetraploid F_2 individuals were similar to Jumei (F_1). The remaining individuals showed genetic differentiation with their parents, and they served as good materials for future selection and breeding for new tetraploid grape varieties.

Key words: tetraploid grape; F_2 population; morphological traits; SSR markers; genetic variation; clustering analysis

葡萄属于葡萄科 (Vitaceae)、葡萄属 (*Vitis* L.) 的多年生落叶藤本植物, 是世界上主要的果树作物之一^[1]。在葡萄育种中, 四倍体杂交是获得大粒、优质、无核、抗病等优良性状四倍体葡萄新品种的主要途径^[2]。四倍体因基因型复杂、基因的分离重组形式多样, 使得后代遗传变异类型丰富, 且纯合速率慢^[3]。准确地把握这些变异, 对于四倍体葡萄杂交亲本的选择、杂交后代的鉴定、以及遗传多样性研究具有重要意义^[4]。利用表型性状结合分子标记检测植物遗传变异, 可以有效提高品种选择的效率, 缩短育种年限^[5], 在萝卜、橄榄、黄杨等遗传变异研究中均有应用^[6-8]。分子标记技术可以对杂交亲本和后代单株进行大规模的基因型鉴定^[9], Sana 等^[10]用 9 个 SSR 标记检测到 64 个栽培品种丰富的遗传变异。多倍体葡萄后代在形态解剖、经济性状和抗逆性方面有着极其丰富的变异, 对形态学性状进行鉴定和准确描述, 有助于植物育种者对重要性状进行研究和选择^[11]。在葡萄表型的研究中, 宋润刚等^[12]发现, 杂交后代的霜霉病抗性均发生显著分离, 表现出连续分布。郭印山等^[13]发现葡萄杂交后代主要香气物质呈广泛分离。然而, 利用多元分析对葡萄四倍体杂交后代遗传多样性和变异特点的研究较少。

本试验以大粒、优质、抗病的巨峰和色泽亮丽、香味浓郁的四倍体玫瑰香为亲本, 构建了包含 274 个单株的四倍体 F_2 群体。利用形态学性状调查结合 SSR 标记技术对 F_2 群体进行遗传变异分析, 以期阐明同源四倍体后代遗传多样性水平及遗传变异特征, 为葡萄四倍体杂交新品种的早期定向选择提供依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试材料为种植于河北农业大学育种中心的二倍体玫瑰香 (Muscat Hamburg)、染色体加倍获得的四倍体玫瑰香 (tetraploid Muscat Hamburg)、巨峰 (Kyoho)、 F_1 巨玫 (Jumei) (巨峰 ♀ × 四倍体玫瑰香 ♂) 4 个主要品种和巨玫自交得到的 274 个 F_2 单株。2016 年将 F_2 种子于温室中育苗。2017 年 4 月, 将 274 个生长状态良好的 F_2 单株定植于河北农业大学三分厂育种中心, 进行常规管理。2018 年对亲本和 F_2 单株进行性状调查。

1.2 性状调查和倍性分析

参考《葡萄种质资源描述规范和数据标准》的方法, 调查 4 个主要品种及 274 个 F_2 单株的 14 个形态学性状 (表 1) 和 4 个主要品种的 16 个果实性状^[14]。参考宋军阳等^[15]的方法测量 4 个主要品种及 274 个 F_2 单株的成龄叶叶总长 (L_t)、叶总宽 (W_t), 主叶脉由中间至一侧叶脉 L_1 、 L_2 、 L_3 、 L_4 的长度, 上侧裂到着柄点的长度 OB, 下侧裂到着柄点的长度 UB, 并计算成龄叶 6 个数量性状 $A=L_2/L_1$ 、 $B=L_3/L_1$ 、 $C=L_4/L_1$ 、 $I'=OB/L_2$ 、 $I=UB/L_3$ 、 $R=L_t/W_t$, 每个单株选择 3 个叶片作为重复, 计算平均值。使用流式细胞仪对 4 个主要品种和随机选取的 10 个 F_2 单株进行 DNA 含量分析以检测倍性^[16]。

1.3 DNA 提取和 SSR 分子标记分析

以葡萄幼叶为试材, 采用改良 CTAB 法提取样品基因组 DNA^[17]。在 2017 年, 根据参考文献^[18]选用 240 对 SSR 引物对亲本进行扩增, 筛选出在亲本中表现出多态性的引物对 F_2 群体进行扩增。

表 1 葡萄形态学性状赋值表
Table 1 Grading scales of the morphological traits in grape

编号 No.	性状 Traits	分级 Grading scale				
1	嫩梢形态	1 闭合	3 半张开	5 全张开		
2	新梢节间匍匐绒毛密度	1 无或极疏	3 疏	5 中	7 密	
3	成熟枝条表面形状	1 光滑	2 罗纹	3 条纹	4 棱角	
4	幼叶上表面颜色	1 黄绿	3 绿	5 红棕色	7 酒红色	
5	幼叶花青素着色程度	1 无或极浅	3 浅	5 中	7 深	9 极深
6	幼叶叶背绒毛密度	1 无或极疏	3 疏	5 中	7 密	9 极密
7	成龄叶横截面形状	1 平	2 V 形	3 内卷	4 外卷	5 波状
8	成龄叶上裂刻深度	1 极浅	2 浅	3 中	4 深	
9	成龄叶上裂刻基部形状	1 U 形	2 V 形			
10	成龄叶叶柄洼开叠	1 极开张	2 开张	3 半开张	4 轻度开张	5 闭合
11	成龄叶叶柄洼基部形状	1 U 形	2 V 形			
12	成龄叶叶脉限制叶柄洼	1 不限制	2 限制			
13	成龄叶锯齿形状	2 双侧直	3 双侧凸	4 一侧凹一侧凸	5 两侧直与突皆有	
14	成龄叶下表面绒毛密度	1 无或极疏	3 疏	5 中	7 密	9 极密

PCR 反应程序为: 94 ℃ 预变性 5 min; 94 ℃ 变性 45 s、52~61 ℃ 退火 45 s、72 ℃ 延伸 45 s, 35 个循环; 最后 72 ℃ 延伸 10 min, 4 ℃ 保存。扩增产物在 12% 非变性聚丙烯酰胺凝胶中电泳分离, 银染显色, 照相并记录结果^[19]。

1.4 数据分析

利用 SPSS 17.0 软件对形态学性状进行差异显著性、遗传变异统计分析、主成分分析 (PCA) 和 Spearman 系数相关性分析^[9, 20], 统计参数包括平均值、最大值、最小值、标准差、变异系数、偏度和峰度。使用 NTSYS 统计软件创建 20 个形态学性状第 1 主成分和第 2 主成分 (PC1/PC2) 散点图^[21]。参考沈红香等^[5]的方法, 对 6 个数量性状进行 7 级分类并转换为数值 1~7 (s 为标准差), 1 级 $\leq X-3s$, 7 级 $>X+3s$, 每级相差 1s。使用 POPGENE32 分析 F₂ 群体的遗传多样性, 并用 Microsoft Excel 绘制形态学性状频次分布图。使用 PowerMarker 3.25 计算所有供试材料的距离矩阵并导入 MEGA6.0, 用 UPGMA 法绘制聚类图^[22]。

每对 SSR 引物扩增的多个等位位点有带赋值为“1”, 无带赋值为“0”, 使用 POPGENE32 软件计算有效等位基因数 (Ne)、Shannon 信息指数 (I)、Nei's 基因多样性指数 (He) 和多态性位点百分率 (PPB)^[23]。使用 PowerMarker 3.25 计算引物多态性信息含量 (PIC), 绘制聚类图。

2 结果与分析

2.1 亲本性状差异分析和倍性鉴定

对二倍体玫瑰香、四倍体玫瑰香、巨峰和巨玫的性状调查结果见表 2, 与二倍体相比, 四倍体玫瑰香幼叶花青素着色程度降低、叶被绒毛增多, 果实增大, 但保持了果皮颜色、果肉香味和质地不变, 综合性状优于原二倍体玫瑰香。巨峰具有大粒、抗病性强的优点, 而且在果皮颜色、可溶性固形物含量、果肉香味类型等方面与玫瑰香有明显差异, 这表明二者是一对优异的杂交组合。巨玫保持了两个亲本的优良性状, 在果皮颜色、果粉厚度、果粒大小和果肉香味方面与四倍体玫瑰香更相似。对随机选取的 10 个 F₂ 单株用流式细胞仪检测 DNA 含量, 测定结果显示 (图 1), 四倍体玫瑰香、巨峰、巨玫和 10 个 F₂ 单株的 DNA 分子荧光强度为 65383.01~79588.24, 约为二倍体玫瑰香 (36949.69) 的 2 倍, 表明这些植株是四倍体。

2.2 亲本及后代形态学性状分析

2.2.1 形态学性状变异及分离分析 图 2 分别显示了部分后代新梢形态、幼叶颜色、幼叶绒毛密度和成龄叶绒毛密度的差异。变异系数是群体遗传变异潜能的一个度量值^[4], 274 个 F₂ 单株的 20 个形态学性状统计结果见表 3, 幼叶叶背绒毛密度的变异系数最高 (CV=85.09%), 而 $R=L/W_1$ 的变异系数最低 (CV=6.38%), 其中 14 个性状变异系数值均高于 20%, 达到较高程度变异。

表 2 亲本表型性状调查结果
Table 2 The phenotypic variations on multiple traits between both parents

编号 No.	性状 Traits	二倍体玫 瑰香 Muscat Hamburg	四倍体 玫瑰香 Tetraploid Muscat Hamburg	巨峰 Kyoho	巨玫 Jumei	编号 No.	性状 Traits	二倍体 玫瑰香 Muscat Hamburg	四倍体 玫瑰香 Tetraploid Muscat Hamburg	巨峰 Kyoho	巨玫 Jumei
1	果穗紧密度	紧	中	中	中	19	成熟枝条表面形状	2	3	2	1
2	果粒形状	椭圆形	椭圆形	椭圆形	椭圆形	20	幼叶上表面颜色	3	1	5	3
3	果粉厚度	薄	厚	薄	厚	21	幼叶花青素着色 程度	7	1	3	3
4	果皮颜色	黑紫	黑紫	紫红	黑紫	22	幼叶叶背绒毛密度	7	9	5	3
5	果粒重量 (g)	4.6b	7.2a	7.5a	6.8a	23	成龄叶横截面形状	5	1	5	5
6	果粒纵径 (cm)	1.8	2.4	2.9	2.6	24	成龄叶上裂刻深度	3	2	1	1
7	果粒横径 (cm)	1.6	2.3	2.5	2.4	25	成龄叶上裂刻 基部形状	2	1	2	2
8	果粒大小 (cm ²)	2.88c	5.52b	7.25a	6.24b	26	成龄叶叶柄洼开叠	3	2	4	3
9	果皮厚度	中	中	厚	薄	27	成龄叶叶柄洼 基部形状	1	2	2	1
10	果皮涩味	无	无	有	无	28	成龄叶叶脉 限制叶柄洼	2	2	1	1
11	果汁颜色	深	深	中	深	29	成龄叶锯齿形状	5	3	5	5
12	果肉汁液	多	多	多	多	30	成龄叶下表面 绒毛密度	1	5	1	3
13	果肉香味	玫瑰香	玫瑰香	草莓香	玫瑰香	31	$A=L_2/L_1$	0.86	0.88	0.84	0.95
14	果肉香味程度	中	浓	淡	浓	32	$B=L_3/L_1$	0.57	0.64	0.63	0.76
15	果肉质地	较软	较软	有肉囊	有肉囊	33	$C=L_4/L_1$	0.32	0.34	0.42	0.56
16	可溶性固形物 含量 (%)	17.1c	17.5c	19.1b	21.2a	34	$R=L_i/W_i$	1.08	1.01	1.08	0.97
17	嫩梢形态	3	5	1	5	35	$I'=OB/L_2$	0.52	0.61	0.62	0.6
18	新梢节间匍匐 绒毛密度	1	3	1	1	36	$I=UB/L_3$	0.74	0.85	0.77	0.77

同行数据后不同小写字母表示差异显著水平 ($P<0.05$)
Different normal letters indicate significant difference at 0.05 level

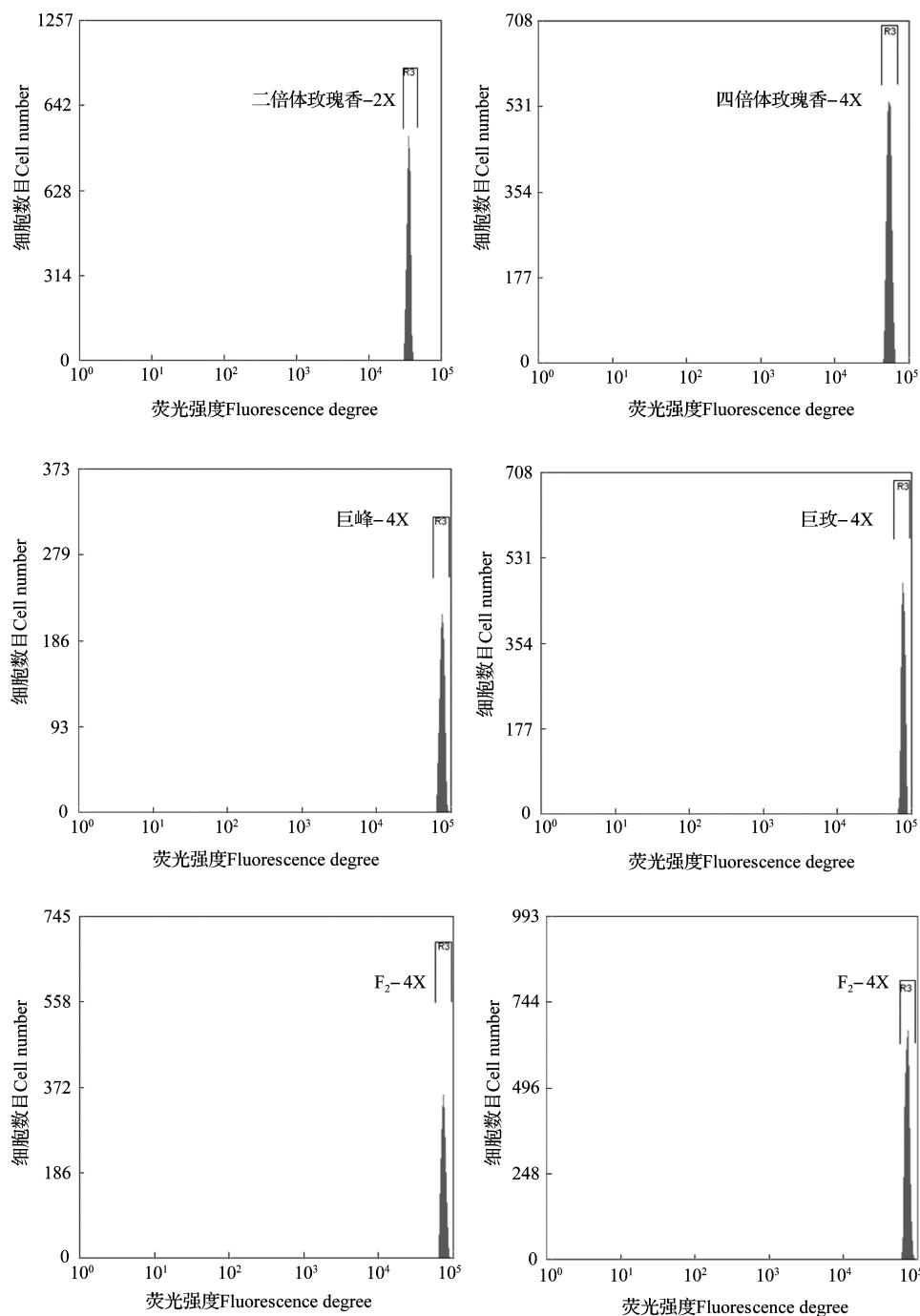


图 1 部分葡萄材料的二倍体与四倍体流式细胞仪倍性鉴定

Fig.1 The ploid graph of some diploid and tetraploid grape by flow cytometry

对于 F_2 群体 274 个单株形态学性状的频次分析发现 (图 3), 嫩梢形态分为 3 种, 其中 152 个单株表现为半开张占 55.5%。幼叶上表面颜色为黄绿和绿色的单株分别为 101 个和 102 个, 占比较大, 分别为 36.9% 和 37.2%; 幼叶叶背绒毛密度为极疏的单株数量最多, 为 172 个, 占比 62.8%, 此性状与巨玫相同; 幼叶花青素着色程度着色浅的单株 108 个, 占比 39.4%, 此性状与四倍体玫瑰香和巨玫相同。

新梢节间绒毛密度极疏的单株数量最多, 为 134 个占比, 48.9%; 119 个单株成熟枝条表面形状为条纹, 占比 43.4%。成龄叶性状中频次最高的单株数量分别为: 上裂刻深度中等 149 个 (占比 54.4%)、锯齿形状两侧直与突皆有 130 个 (占比 47.4%)、下表面绒毛密度疏 121 个 (占比 44.2%)、横截面形状 V 型 107 个 (占比 39.1%), 而叶柄洼开叠的最高频次和次高频次间差异较小。将成龄叶上裂刻基部形

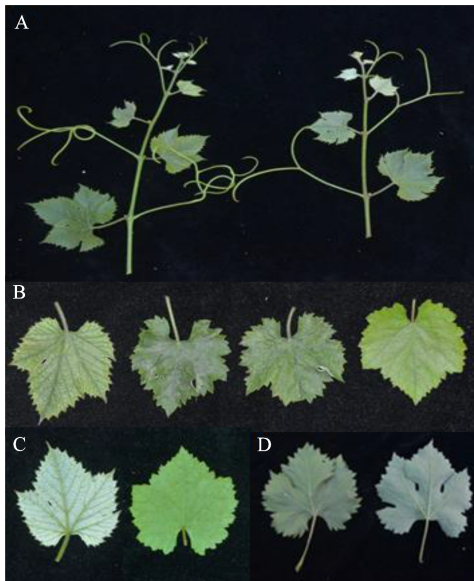
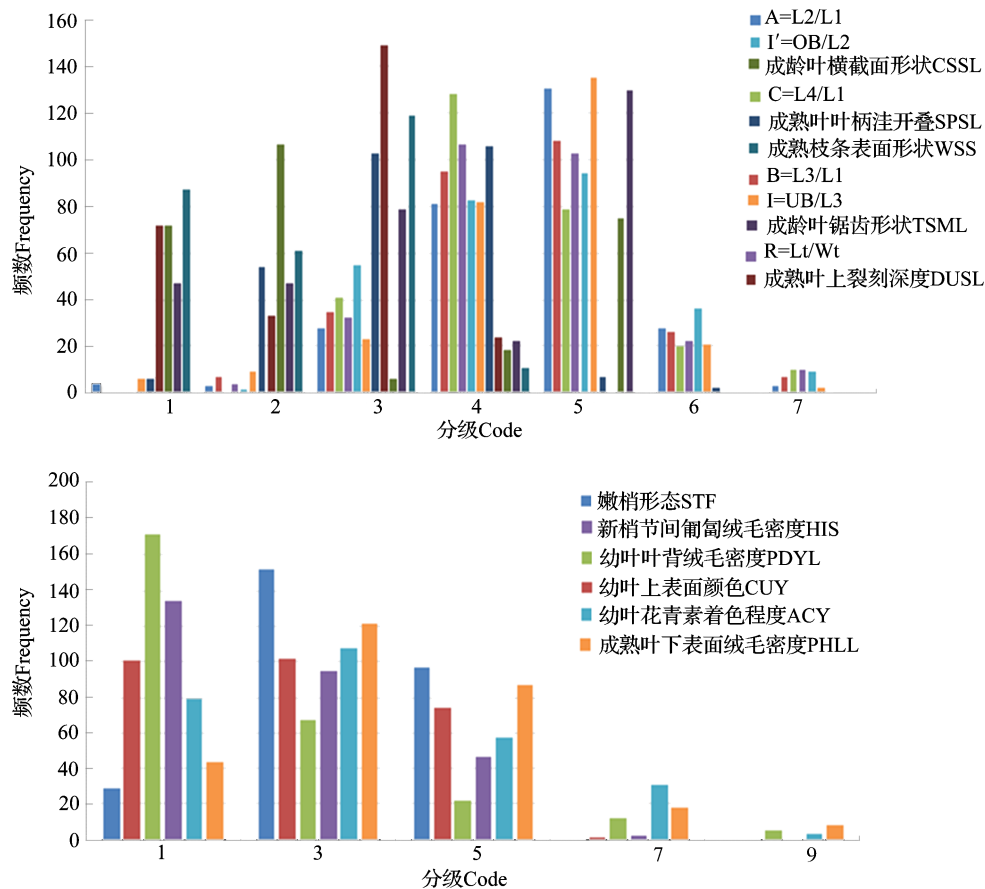


图2 部分 F_2 单株嫩梢和叶片形态学性状
Fig.2 The shoot tip and leaf morphological traits of part of F_2 hybrids

状、叶柄洼基部形状和叶脉限制叶柄洼 3 个性状分两级,群体的最高频次单株数量分别为 223 个、169 个、229 个。

通过偏度和峰度 (± 1) 范围结合 F_2 群体形态学性状频次分布图 (图 3), 发现 F_2 群体在嫩梢形态、幼叶花青素着色程度、成龄叶上裂刻深度、成龄叶叶柄洼开叠、成龄叶下表面绒毛密度、 $I'=OB/L_2$ 性状中的频次符合正态分布, 在新梢节间匍匐绒毛密度、幼叶上表面颜色、幼叶叶背绒毛密度、 $A=L_2/L_1$ 、 $B=L_3/L_1$ 、 $C=L_4/L_1$ 、 $R=L_t/W_t$ 、 $I=UB/L_3$ 呈偏正态分布, 说明这些性状是受多基因控制的数量性状。其中 A 和 C 的峰度高于 8, 表明此性状在群体中分布比较集中。另外, 成熟枝条表面形状、成龄叶横截面形状、成龄叶锯齿形状不符合正态分布, 且出现两个峰, 说明此性状受主效基因影响。从表 3 结果来看, 该群体在形态学性状上表现出较高的遗传变异潜力, 为选择优良单株提供了更多可能。



SPSL: Shape of petiole sinus of mature leaf, DUSL: Depth of upper sinuses of mature leaf, CSSL: Cross-sectional shape of mature leaf, TSML: Teeth shape of mature leaf, WSS: Woody shoot surface shape, STF: Shoot tip form, CUIY: Color of the upper side of young leaf, PDYL: Prostrate hairs density of lower side of young leaf, HIS: Hairs density on internode of shoot, ACY: Anthocyanin colouration intensity of young leaf, PHLL: Prostrate hairs density of lower side of mature leaf. The same as below

图3 F_2 群体形态学性状频次分布图
Fig.3 Distribution patterns of morphological traits in F_2 population

表 3 F₂ 群体形态学性状变异及遗传多样性
Table 3 Morphological traits variation and the genetic diversity of F₂ population

编号 No.	性状 Traits	代码 Unit	最小值 Min.	最大值 Max.	均值 Mean	标准差 SD	变异系数 (%)CV	偏度 Skew	峰度 Kurt	Nei's 多样性 He	Shannon 信息 指数 I
1	嫩梢形态	分级	1	5	3.49	1.26	36.02	-0.21	-0.63	0.57	0.93
2	新梢节间匍匐绒毛密度	分级	1	7	2.40	1.54	64.17	0.67	-0.72	0.62	1.05
3	成熟枝条表面形状	分级	1	4	2.19	0.93	42.47	-0.10	-1.33	0.67	1.19
4	幼叶上表面颜色	分级	1	7	2.82	1.60	56.67	0.21	-1.28	0.66	1.11
5	幼叶花青素着色程度	分级	1	9	3.35	2.01	59.85	0.57	-0.43	0.71	1.34
6	幼叶叶背绒毛密度	分级	1	9	2.20	1.87	85.09	1.73	2.63	0.55	1.05
7	成龄叶横截面形状	分级	1	5	2.70	1.58	58.37	0.52	-1.38	0.71	1.33
8	成龄叶上裂刻深度	分级	1	4	2.45	0.97	39.59	-0.43	-1.07	0.62	1.15
9	成龄叶上裂刻基部形状	分级	1	2	1.80	0.40	22.17	-1.53	0.32	0.32	0.50
10	成龄叶叶柄洼开叠	分级	1	6	3.22	0.89	27.48	-0.15	-0.06	0.68	1.26
11	成龄叶叶柄洼基部形状	分级	1	2	1.39	0.49	35.18	0.44	-1.82	0.48	0.67
12	成龄叶叶脉限制叶柄洼	分级	1	2	1.82	0.38	20.99	-1.71	0.92	0.29	0.47
13	成龄叶锯齿形状	分级	2	5	3.85	1.19	30.83	-0.31	-1.52	0.67	1.21
14	成龄叶下表面绒毛密度	分级	1	9	3.74	1.85	49.44	0.58	0.41	0.68	1.30
15	A=L ₂ /L ₁	比值	0.34	1	0.80	0.07	9.22	-1.75	8.79	0.67	1.33
16	B=L ₃ /L ₁	比值	0.43	0.77	0.58	0.05	9.09	0.51	1.29	0.71	1.40
17	C=L ₄ /L ₁	比值	0.25	0.79	0.37	0.06	17.31	2.05	8.32	0.68	1.31
18	R=L _t /W _t	比值	0.79	1.23	1.03	0.07	6.38	-0.06	1.73	0.69	1.37
19	I'=OB/L ₂	比值	0.31	0.87	0.56	0.11	19.85	0.38	-0.19	0.74	1.44
20	I=UB/L ₃	比值	0.44	0.95	0.76	0.08	10.56	-1.08	2.11	0.66	1.34
均值 Mean										0.62	1.14

He: Nei's genetic diversity index, I: Shannon's Diversity Index, the same as below

通过 Spearman 相关系数分析性状间的显著相关性(表 4)。幼叶叶背绒毛密度与新梢节间绒毛密度($r=0.203$)极显著相关,与成龄叶下表面绒毛密度($r=0.128$)显著相关,对植株 3 个部位绒毛密度的分析可以看出,幼叶叶背绒毛密度与新梢和成龄叶的绒毛密度都存在正相关关系。成龄叶叶柄

洼开叠与成龄叶横截面形状($r=0.181$)、成龄叶叶柄洼基部形状($r=0.177$)、成龄叶叶脉限制叶柄洼($r=-0.304$)、 $C=L_4/L_1$ ($r=0.261$)、 $R=L_t/W_t$ ($r=0.241$)极显著相关,说明成龄叶的叶柄洼性状与叶型有关的多个性状之间有显著的相关性。

表 4 F₂ 群体 20 个形态学性状的 Spearman 相关系数Table 4 Spearman correlation coefficient among 20 morphological traits in F₂ population

Spearman 相关系数 Spearman's rank correlation coefficient	嫩梢 形态 STF	幼叶 上表面 颜色 CUI	幼叶花 青素着 色程度 ACY	幼叶背 毛密度 PDYL	新梢节 间匍匐 绒毛密 度 HIS	成熟 叶柄注 开叠 SPSL	成熟 枝条表 面形状 WSS	成熟 横截 面形状 CSSL	成熟 上裂 深度 DUSL	成熟 上裂刻 基部形 状 SBUL	成熟 叶柄注 基部形 状 SBPL	成熟 叶脉限 制叶柄 注 LRPL	成熟 锯齿形 状 TSM	成熟 下表面 绒毛密 度 PHLL	A= L ₂ /L ₁	B= L ₃ /L ₁	C= L ₄ /L ₁	R= L ₁ /W ₁	I'= OB/L ₂	I= UB/L ₃
嫩梢形态 STF	1																			
幼叶上表面颜色 CUI	0.012	1																		
幼叶花青素着色程度 ACY	-0.005	0.279**	1																	
幼叶背毛密度 PDYL	-0.166**	0.087	0.124*	1																
新梢节间匍匐绒毛密度 HIS	-0.049	0.008	0.054	0.203**	1															
成熟叶柄注开叠 SPSL	0.204**	-0.012	-0.101	-0.163**	0.065	1														
成熟枝条表面形状 WSS	0.081	0.031	0.046	-0.101	-0.044	0.035	1													
成熟叶横截面形状 CSSL	-0.098	-0.001	0.001	0.076	0.044	0.181**	-0.027	1												
成熟叶上裂刻深度 DUSL	-0.067	0.027	-0.106	-0.023	-0.023	-0.077	-0.064	0.042	1											
成熟叶上裂刻基部形状 SBUL	0.008	0.084	0.101	-0.008	0.014	0.006	0.096	-0.048	-0.367**	1										
成熟叶柄注基部形状 SBPL	-0.099	-0.069	-0.054	0.132*	0.061	0.177**	0.006	0.155**	-0.142*	0.121*	1									
成熟叶脉限制叶柄注 LRPL	0.092	0.022	0.075	0.014	0.009	-0.304**	0.032	-0.328**	0.031	0.025	-0.083	1								
成熟叶锯齿形状 TSM	0.105	0.024	-0.021	0.033	-0.095	0.095	-0.013	0.077	-0.019	0.024	0.021	0.008	1							
成熟叶下表面绒毛密度 PHLL	0.048	0.023	-0.097	0.128*	0.051	0.193**	-0.001	0.200**	0.200**	-0.220**	-0.069	-0.097	0.057	1						
A=L ₂ /L ₁	-0.159**	0.113	0.031	-0.006	-0.051	-0.137*	0.062	-0.012	-0.002	0.019	0.034	0.008	0.055	-0.051	1					
B=L ₃ /L ₁	-0.068	0.072	0.114	0.004	-0.028	-0.156**	0.081	0.024	0.095	-0.027	-0.022	-0.028	0.031	0.053	0.490**	1				
C=L ₄ /L ₁	0.049	-0.053	-0.073	-0.024	0.004	0.261**	0.018	0.101	0.044	0.016	0.064	-0.07	-0.011	0.158**	0.097	0.326**	1			
R=L ₁ /W ₁	0.136*	-0.023	-0.039	0.006	0.009	0.241**	-0.066	0.036	-0.144*	0.056	-0.003	-0.089	-0.011	-0.01	-0.463**	-0.428**	-0.037	1		
I'=OB/L ₂	0.025	-0.058	0.044	-0.031	0.022	0.125*	-0.008	-0.095	-0.434**	0.188**	-0.047	-0.057	-0.055	-0.016	-0.339**	-0.106	0.089	0.313**	1	
I=UB/L ₃	-0.028	-0.027	0.045	0.011	0.033	0.045	0.011	-0.122*	-0.375**	0.170**	-0.021	0.001	0.047	-0.048	-0.102	-0.203**	-0.048	0.181**	0.511**	1

** 表示 0.01 水平差异显著, * 表示 0.05 水平差异显著

*: 0.01 level extremely significant differences, *: 0.05 level significant differences. SBUL: Shape of the base of upper sinuses of mature leaf, SBPL: Shape of the base of petiole sinus of mature leaf, LRPL: Leaf vein restriction on petiole of mature leaf. The same as below

2.2.2 基于形态学性状的遗传多样性和聚类分析 依据特征值>1 的标准,主成分分析(PCA)可将 20 个形态学性状降低为 8 个主成分,这些主成分可以解释 60.99% 的总变异(表 5)。第 1 主成分(PC1)占总变异的 11.98%,与群体的成龄叶上裂刻深度(-0.61)、R(0.58)、I'(0.71)、I(0.62)密切相关。第 2 主成分占总变异的 9.79%,主要与成龄叶叶柄洼开叠类型(0.61)、成龄叶横截面形状

(0.57)、成龄叶下表面绒毛密度(0.55)特征相关。第 3 个主成分解释了总变异的 8.31%,与 B(0.49)、成龄叶叶柄洼基部形状(0.43)、成龄叶上裂刻深度(-0.44)有关。其余主成分(PC4~8)占总变异的 30.91%。PC1~3 主要反映的是成龄叶的形态特征,说明成龄叶的特征性状是分析葡萄育种材料形态特征的重要因素,适合用于葡萄后代群体的特征分析。

表 5 F₂ 群体形态学性状的主成分分析
Table 5 The principal component analysis (PCA) in morphological traits of F₂ population

性状 Traits	主成分 Comprehensive indexes							
	PC 1	PC 2	PC 3	PC 4	PC 5	PC 6	PC 7	PC 8
嫩梢形态 STF	0.20	0.14	-0.21	-0.31	0.41	0.44	0.17	0.18
新梢节间匍匐绒毛密度 HIS	0.02	0.01	0.08	0.53	0.02	-0.06	0.20	0.46
成熟枝条表面形状 WSS	0.02	-0.09	0.18	-0.28	0.15	0.25	-0.05	0.43
幼叶上表面颜色 CUY	-0.10	-0.23	0.14	0.34	0.34	0.46	-0.24	-0.06
幼叶花青素着色程度 ACY	0.01	-0.35	0.23	0.36	0.37	0.23	-0.26	-0.01
幼叶叶背绒毛密度 PDYL	-0.19	-0.01	0.15	0.64	0.18	-0.22	0.32	-0.02
成龄叶横截面形状 CSSL	-0.18	0.57	0.26	0.25	-0.11	0.10	-0.22	-0.13
成龄叶上裂刻深度 DUSL	-0.61	0.21	-0.44	0.01	0.04	0.00	-0.06	0.03
成龄叶上裂刻基部形状 SBUL	0.40	-0.24	0.42	-0.04	-0.01	0.18	0.13	0.09
成龄叶叶柄洼开叠 SPSL	0.30	0.61	0.15	-0.04	-0.01	0.37	0.01	0.09
成龄叶叶柄洼基部形状 SBPL	0.03	0.17	0.43	0.09	-0.43	0.12	0.49	0.10
成龄叶叶脉限制叶柄洼 LRPL	-0.04	-0.51	-0.32	-0.07	0.31	-0.09	0.46	0.10
成龄叶锯齿形状 TSML	0.01	0.18	0.09	-0.10	0.31	0.21	0.44	-0.64
成龄叶下表面绒毛密度 PHLL	-0.20	0.55	-0.11	0.20	0.41	-0.10	0.02	-0.02
A=L ₂ /L ₁	-0.35	-0.33	0.41	-0.08	-0.21	0.22	-0.04	-0.15
B=L ₃ /L ₁	-0.49	-0.04	0.49	-0.28	0.34	-0.27	-0.08	0.04
C=L ₄ /L ₁	-0.10	0.39	0.42	-0.32	0.31	-0.32	0.09	0.20
R=L ₆ /W ₁	0.58	0.23	-0.31	0.16	0.02	0.09	0.00	0.06
I'=OB/L ₂	0.71	0.05	0.14	0.02	0.22	-0.41	-0.19	0.01
I=UB/L ₃	0.62	-0.15	0.16	0.03	0.09	-0.23	-0.08	-0.30
特征值 Eigenvalue	2.40	1.96	1.66	1.45	1.34	1.27	1.07	1.05
贡献率(%)	11.98	9.79	8.31	7.23	6.72	6.37	5.34	5.25
Contributive percentage								
累计贡献率(%)	11.98	21.77	30.08	37.31	44.03	50.40	55.74	60.99
Cumulative contributive percentage								

PCA 散点图将供试材料展现在由第 1、第 2 主成分形成的坐标中(图 4),根据在 PC1=0 和 PC2=0 将坐标系分为 4 个区。二倍体玫瑰香、四倍体玫瑰香、巨峰、巨玫分布于 4 个不同的区域内,说明它们的形态学性状有明显差异。274 个 F₂ 单株分布在横、纵坐标 -0.45~0.55 范围内,大部分的 F₂ 单株围绕图中央巨玫分布,但与巨玫距离远近不同,说明杂交后代在形态学性状上发生了不同于亲本的变异。PCA 分析能显示出亲本及后代的遗传差异,适合于遗传多样性的估计和表型特征的描述。

基于形态学性状的聚类分析显示(图 5),供试材料的遗传相似性系数在 0.32~0.68 之间。在相似系数 0.35 处分为 4 个类群,第 I 类群包含巨峰和 3 个 F₂ 单株。第 II 类群包含 12 个 F₂ 单株,第 III 类群包含 90 个 F₂ 单株,第 IV 类群包含 169 个 F₂ 单株和二倍体玫瑰香、四倍体玫瑰香及巨玫。在相似系数 0.42 处可将第 IV 类群分为 3 个亚群,第 IV -1 亚群包含 119 个 F₂ 单株和二倍体玫瑰香,第 IV -2 亚群包含 30 个 F₂ 单株,第 IV -3 亚群包含巨玫、四倍体玫瑰香和 20 个 F₂ 单株,巨玫的形态学性状与四倍体

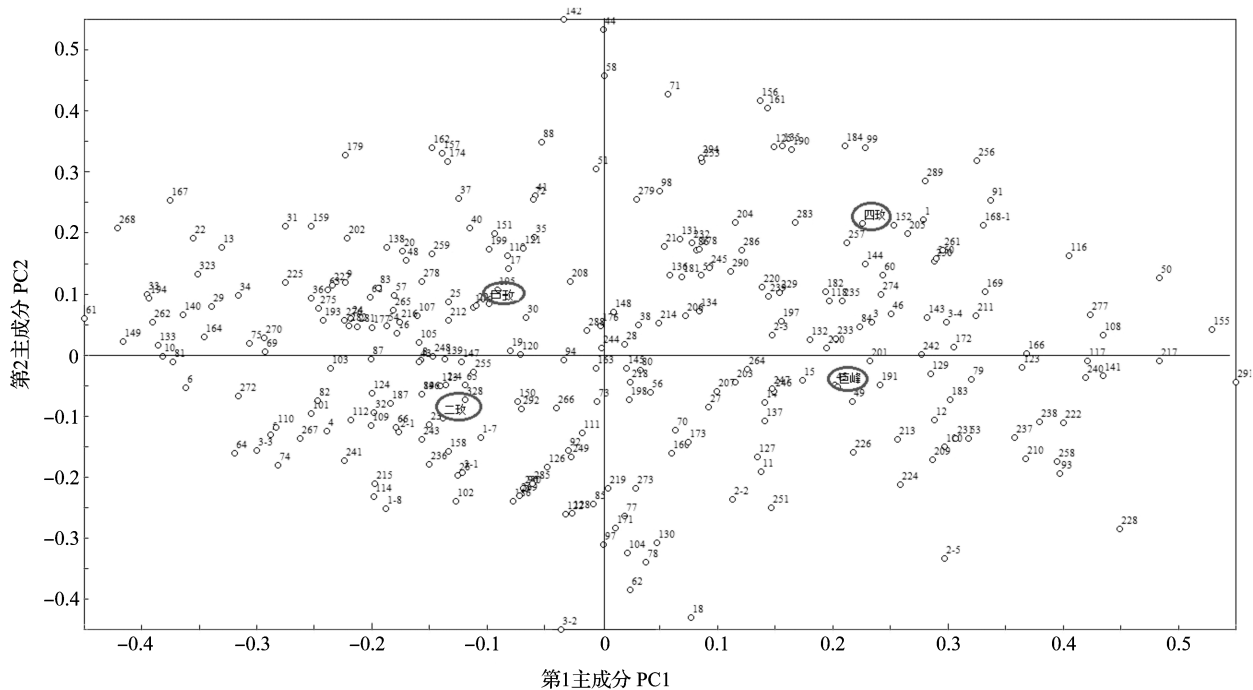


图 4 葡萄 F_2 群体及亲本基于前两个主成分 (PC1/PC2) 的散点图

Fig.4 The scatterplots of the first two principal components of F_2 population and their parents

玫瑰香更相似,第 I、II、III 类群 F_2 单株与巨玫的差异较大,可作为特殊性状选择的材料加以利用。

20 个形态学性状之间的 Shannon 信息指数差异较大,14 个分级性状的平均值为 1.04,而 6 个数量性状的平均值为 1.4,总体均值为 1.14 (表 3)。除嫩梢形态、成龄叶上裂刻基部形状、成龄叶叶柄洼基部形状、成龄叶叶脉限制叶柄洼 4 个性状外,其余性状的 Shannon 信息指数 (I) 均大于 1。总体来看,不同性状之间的多样性指数差异较大,且数量性状的多样性指数高于分级性状,群体的形态学性状遗传多样性较高 (表 3),这给葡萄综合性状改良提供了较大的选择价值。

2.3 SSR 标记分析

2.3.1 SSR 标记的遗传多样性分析 使用 240 对 SSR 引物对巨峰、四倍体玫瑰香和 F_1 巨玫进行 PCR 扩增,筛选出 25 对条带清晰、具有差异的引物。利用筛选出的引物对二倍体玫瑰香、四倍体玫瑰香、巨峰、巨玫及 274 个 F_2 单株进行分析,共扩增出 127 条 DNA 带,其中多态性条带 52 条,各引物扩增出的条带数在 3~9 之间,引物的多态性百分率在 16.67%~66.67% 之间,平均多态性比率 (PPB) 为 40.94%,其中 VChr18b 和 VChr10b 的多态性比率最高,为 66.67%。不同引物的多态性信息含量 (PIC) 范围为 0.14~0.37,平均为 0.26。结果表明 SSR 分子标记 F_2 群体中具有良好的多态性,可以用

于四倍体葡萄后代群体遗传多样性分析。

SSR 对 F_2 群体的分析显示 (表 6), Nei's 遗传多样性指数 (H_e) 在 0.15~0.49 之间,平均为 0.32; Shannon 信息指数 (I) 在 0.28~0.68 之间,平均为 0.49。其中,引物 VVC71 多态性信息含量 (PIC) 最高,为 0.37,同时该引物得到的观察等位基因数 Nei's 遗传多样性指数 (0.49)、Shannon 信息指数 (0.68) 都最高。上述结果说明 F_2 群体在基因组 DNA 水平上遗传多样性丰富。

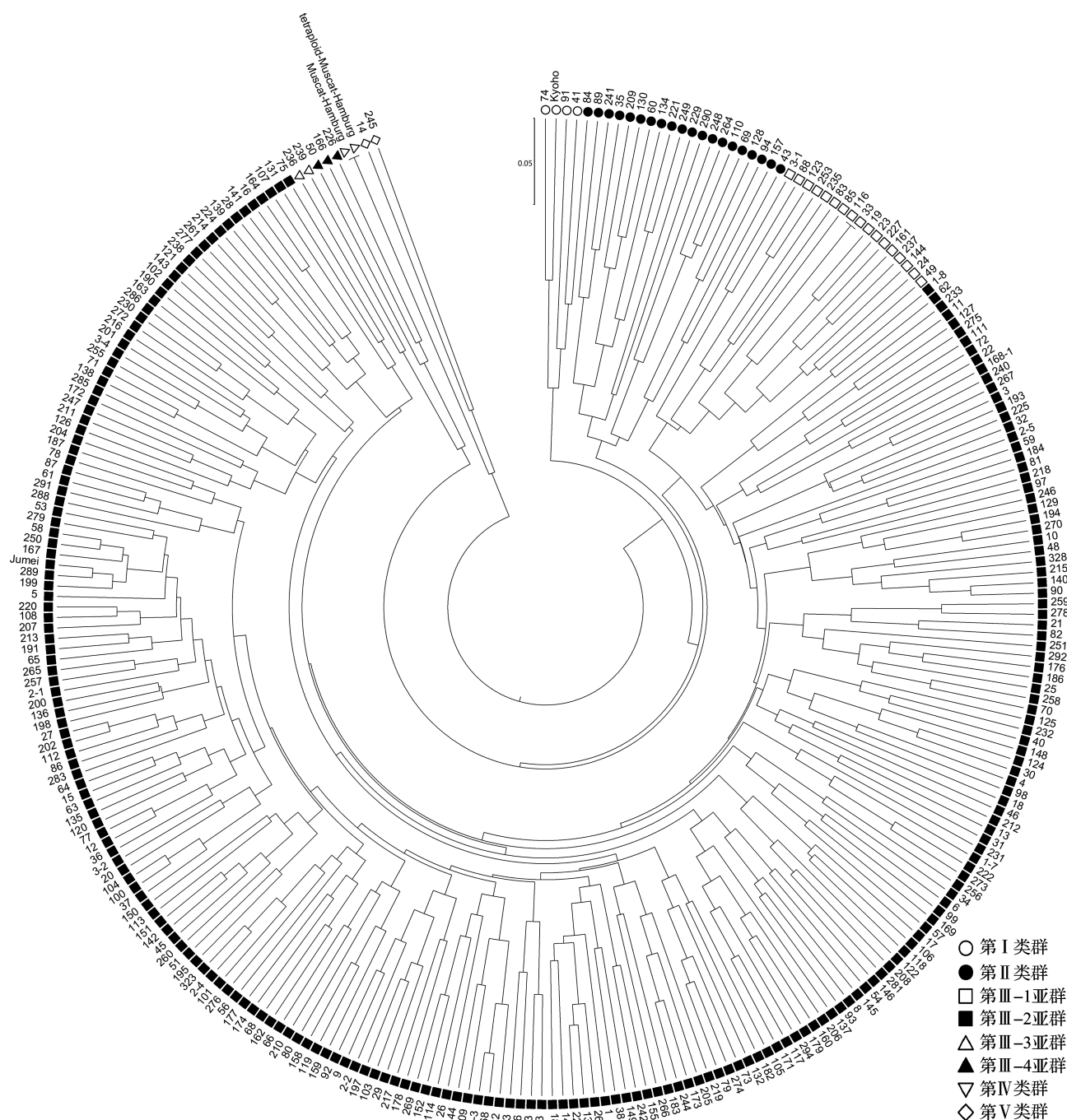
F_2 群体中存在基因分离,引物 VChr18a 在亲本中表现纯合即四倍体玫瑰香 (AAAA) $\times$ 巨峰 (aaaa), F_2 群体中表现显性的单株数为 190,隐性单株数为 81。 F_2 群体比例显性 (A) : 隐性 (a) = 190 : 81。通过卡方测验符合杂交组合 Aaaa 以染色体为单位的分离模式,推测 F_1 巨玫在此位点的基因型为 Aaaa,且表现以染色体为单位分离的细胞学分离行为。由此可见,杂交种巨玫的不同位点的遗传组成模式也存在多样性,这也是后代性状遗传变异多样性的一个重要原因。

2.3.2 基于 SSR 标记的聚类分析 根据 25 对 SSR 标记构建了 278 份材料的聚类图 (图 6),遗传相似系数在 0.38~1.00 之间,在相似系数 0.47 处分为 5 个类群。第 I 类群包含巨峰和 4 个 F_2 单株,第 II 类群包含 19 个 F_2 单株,第 III 类群包含巨玫和 249 个 F_2 单株,第 IV 类群只包含二倍体玫瑰香和四倍体玫瑰香,

表 6 F₂ 群体 SSR 引物信息和扩增 polymorphism of F₂ population
Table 6 SSR primer information and amplified polymorphism of F₂ population

引物名称 Primers	正向序列 (5'-3') Forward primer	反向序列 (5'-3') Reverse primer	退火温度 (℃) Tm	SSR 总带数 Total number of SSR bands	多态性位点 百分率 (%) PPB	有效等位基 因数 Ne	Nei's 遗传 多样性指数 He	Shannon 信息指数 I	多态性 信息含量 PIC
VMC1A12	AAATTGCTTTGAATGAACACTG	GAACATAAATGAAGCTGGAAAAAGA	54	3	33.33	1.77	0.43	0.63	0.34
VVIN56	ATGTAATTACCGGTCAATGAGTT	TTCTTGTTTTTGCTATCTATCC	53	6	50.00	4.56	0.34	0.52	0.28
VMC7H3	GACTATATAAACCTCTCTCCCAA	GAGTACTGTACTTCTTCAGCCA	57	7	28.57	2.47	0.19	0.34	0.17
VMC3H5	CATGTAGGTGTAGCTTACATTTC	GACACAAAGACTCTATTCTCTCAA	56	7	28.57	2.77	0.28	0.45	0.24
VMC2H4	ACCAGGTGTGCCTATAAGAAATC	TCTCTGGAACATCCAAATCAAC	56	5	20.00	1.45	0.31	0.49	0.26
VVIP26	CCTCTTTAAATTGCACAACTTGG	CTTGCAATGAGGATTTTGTGG	56	4	25.00	1.43	0.30	0.48	0.26
VVC71	GAGATGTGTGCTTCTGTGAGTT	GGCATGCAAAACGACACAT	57	4	25.00	1.97	0.49	0.68	0.37
VMC6D12	ATTTTCCCTGGAAACAAAGTGG	CTCTCTTTTCCGAAATTTGGGGT	59	6	16.67	1.85	0.46	0.65	0.35
VMC3G8.2	CGTACGAATATCTGCGCTAAA	GAGCGCAGCTGATAAATGAAAA	58	5	60.00	4.46	0.31	0.47	0.25
VMC9G4	AAATGTGCAAGTTGAAGAGGGA	AGACCGTTCAAAACAAGCAAAATG	58	6	50.00	4.25	0.27	0.42	0.22
VMC5H11	AAGCCCTCATGTGCCATACTAA	TGCTCAACACAGCTTCTTGAATTC	55	5	20.00	1.64	0.39	0.58	0.31
VMC5H5	ATGGCCTCCCTACAAAAAGAAAC	TACTTGCCCAATGGGTAATGAC	58	9	44.44	6.72	0.39	0.58	0.31
VVMD7	AGAGTTGCGGAGAACAGGAT	CGAAACCTTCACACGCTTGAT	58	7	57.14	5.81	0.30	0.47	0.25
VMC2C3	AATATTGTAGAAATGGTGCTTTT	TGCAATCCCAATTATATCTCTT	53	4	25.00	1.90	0.47	0.67	0.36
VrZAG30	TGTTAAACCTAGAAAAATTTCATCAA	CATATGACCAATGTCACTAAATTAAAT	53	7	42.86	5.38	0.43	0.62	0.33
VVS3	TCGACTTTGATATATTGATGATT	TGCCCTATCAAAATTAGTTCACCTA	53	5	40.00	2.86	0.30	0.48	0.26
VMC8D1	AAAGCGGTAGCTCAGACACA	GGCGGTTGAGCTCTGCTTATC	61	4	25.00	1.20	0.17	0.31	0.15
TT251F02	TCCCTTTTTAICTCTAICT	ATGGGTAATTATGGACACAA	50	4	50.00	2.36	0.15	0.28	0.14
VChr13a	TGGCAGAGCAAAATGAATCAA	TTGGATGGATTGGAATGACC	52	6	50.00	2.92	0.29	0.46	0.24
VChr18b	ATACGCAATGATCACAGCA	CATTTTCTCCATGGCCTCAT	53	3	66.67	4.26	0.32	0.50	0.27
VChr17a	AGGAAGAGGATTGATCACCA	GTGCCAACCCCTTGCACTATT	54	4	50.00	2.78	0.28	0.45	0.24
VChr18a	TTCCCACCCGGTAAATATGA	CATCCAAACATCACGCTGAG	53	5	60.00	4.52	0.32	0.49	0.26
VChr10b	CCATCTCCAACCCGAAACAAC	CAGAAATCTCGTGTGCTCA	57	3	66.67	2.54	0.18	0.29	0.15
VChr11b	TGAGTTGAGCTATTGGCTTTGA	AGCAACTCTGTCCATCCATGT	55	4	50.00	2.66	0.24	0.39	0.21
VChr19b	TTTGTTAGGTGTTGTACCCGTTA	ATCTTCTGGCCATGTGGTTC	59	4	50.00	3.11	0.35	0.54	0.29
均值 Mean				5.08	40.94	3.11	0.32	0.49	0.26

PPB: Percentage of polymorphic bands, Ne: Effective number of alleles, PIC: Polymorphism information content

图 6 葡萄 F_2 群体和亲本 SSR 聚类图Fig.6 Dendrogram of cluster analysis based on SSR for F_2 population and their parents

规律是杂交实生苗早期鉴定和预先选择的重要理论依据^[25]。对形态学性状的评估是研究植物遗传变异的有效方法,形态学性状的测定结果代表了材料间的表型变异情况^[26]。本试验中,同源四倍体葡萄 F_2 群体的 20 个形态学性状中,14 个性状的变异系数大于 20%, F_2 群体性状的最大值与最小值构成的性状分离区间都处于一个较大的范围内,存在超亲分离现象,且出现了双亲不具有的性状,这是由于基因重组导致 F_2 群体均含有正向和负向两个方向的

超亲基因型。这些超亲表型有助于在后代选择出不同于双亲的优异个体,为多倍体新品种的选育提供了丰富的资源。

SSR 标记具有共显性和高多态性的优点,是评估遗传多样性和种质资源鉴定的有效分子方法^[27]。在本试验中,SSR 分析的遗传多样性结果表明 F_2 群体遗传多样性丰富。但形态学性状反映出的遗传多样性水平高于 SSR 标记。另外,同一个性状的变异系数和多样性指数的表现并不一致。如幼叶叶背

绒毛密度的变异系数最大,但是它的 Nei's 多样性指数和 Shannon 信息指数却较低, $R=L_i/W_i$ 的变异系数最小,而 Nei's 多样性指数和 Shannon 指数却均高于平均值。可见,这 2 个指标在反映遗传变异时的内涵是不同的。本研究对形态学性状采用了聚类分析和主成分分析,主成分分析能在二维上反映出种质之间的距离,因此,在遗传多样性的研究中将系统聚类分析和主成分分析结合起来使用,可以为种质遗传多样性的研究提供更全面的信息,结果的准确性才可以不断提高^[28]。在群体的遗传多样性分析中,可参考多个指标进行综合评价。

本研究发现,基于形态学性状数据的聚类结果与 SSR 标记聚类结果不完全一致。造成这种不同的原因包括多个方面,(1)形态学评价时选用的性状数量及其重要性程度是多样性评价的重要因素^[29],本研究选用的主要是成龄叶和幼叶的性状,还需进一步增加其他类型性状以减小误差;(2)本研究的 F_2 群体是同源四倍体杂交后代的分离群体,且亲本有不同亚种的遗传背景,由于四倍体同一基因位点含有 4 个等位点,同一基因位点存在多种组合形式(AAAA、AAAa、AAaa、Aaaa、aaaa),在杂合基因型个体中,SSR 标记无法区分在同一位点含有不同剂量基因的个体。在同一位点显隐性基因剂量的不同也是形态性状差异的一个重要原因;(3)表型特征是基因间相互作用结果的表现,而且易受环境条件影响,而分子标记只能体现植物 DNA 片段的有无,不能反映剂量大小和基因的互作对形态性状的影响^[28,30];(4)从后代遗传位点的分离推测,巨玫(F_1)在不同位点的基因型可能存在单式(Aaaa)、复式(AAaa)、三式(AAAa)多种形式,因而造成后代遗传分离和表型变异的多样性。二倍体和四倍体玫瑰香在形态学性状上有很大差异,通过形态学性状聚类图可以发现它们的遗传距离较大,但在 SSR 聚类中两个品种没有表现出差异,这是由于二倍体玫瑰香与四倍体玫瑰香遗传组成相同,只在基因剂量上存在差异,而表型受基因剂量效应、基因间相互作用及环境差异共同影响。另外,形态学性状聚类中,119 个后代单株与二倍体玫瑰香聚为一类,可以推测基因重组使得 F_2 单株中来源于四倍体玫瑰香的遗传物质剂量发生变化,这会导致部分后代表型性状与二倍体玫瑰香更相似。

本研究中,形态学性状的主成分分析、聚类分析和 SSR 的聚类分析存在较高的一致性,在形态学性状聚类中第Ⅳ类群中 169 个单株,占 F_2 群体总

数的 61.7% 与巨玫聚为一类,在 SSR 聚类第Ⅲ-2 亚群中 224 个单株,占 F_2 群体总数的 81.8% 与巨玫聚为一类,在主成分的二维图也可看出大多后代群体与巨玫遗传距离更近,与双亲一致的个体很少。这是由于在四倍体遗传重组过程中,纯合速率比相应二倍体显著减慢, F_2 群体中杂合个体所占比例很大,可在多代中维持基因的杂合性,维持较长时间的杂种优势^[3]。同时,在后代中也出现了与亲本差异均较大的独立分组,表明四倍体后代中也存在超亲分离现象。在育种过程中,可以根据不同的育种目标,有针对性地分别在不同分组中,结合分子标记、细胞学和农艺性状观察,选择表现出遗传变异且具有某些优良特性的个体,减小早期选择的盲目性,加快杂交后代的选育进程。

参考文献

- [1] 李贝贝,姜建福,张颖,樊秀彩,孙海生,张国海,刘崇怀. 葡萄品种 DNA 指纹数据库的构建及遗传多样性分析. 植物遗传资源学报, 2018, 19(2): 338-350
Li B B, Jiang J F, Zhang Y, Fan X C, Sun H S, Zhang G H, Liu C H. DNA fingerprinting and genetic diversity analysis of grape (*Vitis vinifera* L.) cultivars based on SSR markers. Journal of Plant Genetic Resources, 2018, 19(2): 338-350
- [2] Tang X P, Chen J, Ma X H, Dong Z G, Zhao Q F, Li X M, Tan W. A series of polyploid grape cultivars and their structural identification of ploidy character. Acta Horticulturae, 2015, 1082: 63-68
- [3] 陈绍江,宋天明. 植物细胞遗传学. 2 版. 北京: 科学出版社, 2009: 136-143
Chen S J, Song T M. Plant Cytogenetics. 2nd edition. Beijing: Science Press, 2009: 136-143
- [4] Vafae Y, Ghaderi N, Khahdivi A. Morphological variation and marker-fruit trait associations in a collection of grape (*Vitis vinifera* L.). Scientia Horticulturae, 2017, 225: 771-782
- [5] 沈红香,赵天田,宋婷婷,姚允聪,高俊平. 观赏海棠‘王族’自然杂交后代的遗传多样性分析. 园艺学报, 2011, 38(11): 2157-2168
Shen H X, Zhao T T, Song T T, Yao Y C, Gao J P. Genetic diversity analysis in natural hybrid progeny of ornamental crabapple, malus ‘Royalty’. Acta Horticulturae Sinica, 2011, 38(11): 2157-2168
- [6] Lee O N, Han Y P. Assessment of genetic diversity in cultivated radishes (*Raphanus sativus*) by agronomic traits and SSR markers. Scientia Horticulturae, 2017, 223: 19-30
- [7] Kaya H B, Cetin O, Kaya H S, Sahin M, Sefer F, Tanyolac B. Association mapping in Turkish olive cultivars revealed significant markers related to some important agronomic traits. Biochemical Genetics, 2016, 54(4): 506-533
- [8] 张冬林,胡东燕,李建华,托马兹·安勒斯考. 从形态和分子特性来探讨美国长木植物园黄杨种质之间的关系(英文). 中南林业科技大学学报, 2008, 28(4): 1-7
Zhang D L, Hu D Y, Li J H, Tomasz A. Relationship of *Buxus* L. accessions from Longwood Gardens based on

- morphological. Journal of Central South University of Forestry and Technology, 2008, 28(4): 1-7
- [9] Emanuelli F, Lorenzi S, Grzeskowiak L, Catalano V, Stefanini M, Troggio M. Genetic diversity and population structure assessed by SSR and SNP markers in a large germplasm collection of grape. BMC Plant Biology, 2013, 13(39): 1-17
- [10] Sana G, Nejib H, Lalla H Z, Ali F, José M M, Javier I. Genetic identification and origin of grapevine cultivars (*Vitis vinifera* L.) in Tunisia. American Journal of Enology and Viticulture, 2013, 64: 4538-4544
- [11] Leao P C S, Cruz C D, Motoike S Y. Genetic diversity of table grape based on morphoagronomic traits. Scientia Agricola, 2011, 68(1): 42-49
- [12] 宋润刚, 郑永春, 路文鹏, 沈育杰, 范书田, 杨义明, 李晓红, 林兴桂. 山葡萄种间杂交 F_1 - F_4 代对霜霉病抗性的遗传分析. 果树学报, 2008(1): 33-39
Song R G, Zheng Y C, Lu W P, Shen Y J, Fan S T, Yang Y M, Li X H, Lin X G. Genetic analysis of resistance to Plasmopara viticola disease in progenies (F_1 - F_4) derived from interspecific hybridization with *Vitis amurensis*. Journal of Fruit Science, 2008(1): 33-39
- [13] 郭印山, 杨晓旭, 苏凯, 牛早柱, 刘镇东, 李成祥, 李坤, 郭修武. 葡萄杂交后代果实香气物质含量及遗传倾向研究. 中外葡萄与葡萄酒, 2017(4): 36-39
Guo Y S, Yang X X, Su K, Niu Z Z, Liu Z D, Li C X, Li K, Guo X W. Research on aroma substance content and genetic tendency of hybrid offspring in grape berries. Sino-Overseas Grapevine & Wine, 2017(4): 36-39
- [14] 刘崇怀, 陈俊, 沈育杰. 葡萄种质资源描述规范和数据标准. 北京: 中国农业出版社, 2006: 12-80
Liu C H, Chen Y, Shen Y J. The description and data standard for grape (*Vitis*). Beijing: China Agriculture Press, 2006: 12-80
- [15] 宋军阳, 于大永, 王西平. 葡萄叶片数量化研究. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2015, 43(2): 142-148
Song J Y, Yu D Y, Wang X P. Analysis on quantification of grape leaf. Journal of Northwest A & F University: Natural Science Edition, 2015, 43(2): 142-148
- [16] 崔金鑫, 李月梅, 张蕊婧, 赵瑞, 张吉军. 利用流式细胞仪鉴定山楂种质资源的倍性. 北方园艺, 2016(1): 84-86
Cui J X, Li Y M, Zhang R J, Zhao R, Zhang J J. Flow cytometric analysis and sorting of plant chromosomes. Northern Horticulture, 2016(1): 84-86
- [17] Murray M G, Thompson W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Research, 1980, 8(19): 4321-4325
- [18] Silvia V, Michela T, Giuseppina C, Angelica J, Dustin C, Andry Z, Marco S, Stella G, Roberto V, Anne F A B, Mark T, Patrice T. A reference integrated map for cultivated grapevine (*Vitis vinifera* L.) from three crosses, based on 283 SSR and 501 SNP-based markers. Theoretical & Applied Genetics, 2008, 117(4): 499-511
- [19] 张路红. 光皮树 F_1 代早期性状遗传多样性分析与 SSR-PCR 体系构建. 长沙: 中南林业科技大学, 2017
Zhang L H. Genetic diversity of seeding traits in F_1 progeny of swida wilsoniana and establishment of SSR-PCR system. Changsha: Central South University of Forestry & Technology, 2017
- [20] 殷冬梅, 张幸果, 王允, 崔党群. 花生主要品质性状的主成分分析与综合评价. 植物遗传资源学报, 2011, 12(4): 507-512, 518
Yin D M, Zhang X G, Wang Y, Cui D Q. Principal component analysis and comprehensive evaluation on quality traits of peanut parents. Journal of Plant Genetic Resources, 2011, 12(4): 507-512
- [21] 孔秋生. 萝卜种质资源遗传多样性和亲缘关系的研究. 武汉: 华中农业大学, 2003
Kong Q S. Studies on genetic diversity and relatives of radish germ plasm resource. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2003
- [22] 张萌. 基于 SSR 分子标记的葡萄种质资源遗传多样性分析及品种鉴定. 南京: 南京农业大学, 2012
Zhang M. Analysis of genetic diversity and cultivar identification of grapevine germplasm resources based on SSR molecular markers. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2012
- [23] 贺丹, 唐婉, 刘阳, 蔡明, 潘会堂, 张启翔. 尾叶紫薇与紫薇 F_1 代群体主要表型性状与 SSR 标记的连锁分析. 北京林业大学学报, 2012, 34(6): 121-125
He D, Tang W, Liu Y, Cai M, Pan H T, Zhang Q X. Linkage analysis of phenotypic traits of *Lagerstroemia caudata* and *L. indica* F_1 population using SSR markers. Journal of Beijing Forestry University, 2012, 34(6): 121-125
- [24] 杨占辉, 高亦珂, 刘菁芸, 张启翔. 野鸢尾和射干种间杂交 F_2 代主要性状变异分析. 中国农业大学学报, 2014, 19(1): 67-73
Yang Z H, Gao Y K, Liu J Y, Zhang Q X. Variation analysis of important ornamental traits in F_2 hybrids of *Iris dichotoma* and *I. domestica*. Journal of China Agricultural University, 2014, 19(1): 67-73
- [25] 孙继峰, 刘玉梅, 方智远, 刘二艳, 袁素霞, 李占省, 杨丽梅, 庄木, 张扬勇, 孙培田. 青花菜相同亲本的 DH 与 F_2 群体遗传多样性的比较. 园艺学报, 2012, 39(6): 1090-1098
Sun J F, Liu Y M, Fang Z Y, Liu E Y, Yuan S X, Li Z S, Yang L M, Zhuang M, Zhang Y Y, Sun P T. The comparison analysis of genetic diversity between DH population and F_2 population derived from the same two parents in *Brassica oleracea* var. *italica*. Acta Horticulturae Sinica, 2012, 39(6): 1090-1098
- [26] 高奇超. 引进美国制汁葡萄品种农艺生物学性状鉴定研究. 杨凌: 西北农林科技大学, 2011
Gao Q C. Identification of agronomic and biological characters of being introduced grape varieties for juicing from USA. Yangling: Northwest A & F University, 2011
- [27] 马静, 孙建昌, 安永平, 王兴盛, 张振海, 韩龙植. 基于 SSR 标记的宁夏水稻遗传多样性分析. 植物遗传资源学报, 2013, 14(5): 826-832
Ma J, Sun J C, An Y P, Wang X S, Zhang Z H, Han L Z. Analysis of genetic diversity with population of japonica rice from Ningxia using microsatellite markers. Journal of Plant Genetic Resources, 2013, 14(5): 826-832
- [28] 高伟. 四倍体棉种的遗传多样性分析. 武汉: 华中农业大学, 2010
Gao W. Analysis on genetic diversity of tetraploid species of gossypium. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2010
- [29] 江建华, 倪皖莉, 管叔琪, 于欢欢, 肖美华. 126 份花生品种主要农艺性状遗传多样性分析. 中国农学通报, 2014, 30(3): 117-123
Jiang J H, Ni W L, Guan S Q, Yu H H, Xiao M H. Analysis of genetic diversity of main agronomic traits in 126 peanut varieties. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2014, 30(3): 117-123
- [30] Ekhvaia J, Akhalkatsi M. Morphological variation and relationships of Georgian populations of *Vitis vinifera* L. subsp. *sylvestris* (C. C. Gmel.) Hwgi. Flora, 2010, 205: 608-617