

基于 SLAF-seq 技术的葡萄种质遗传多样性分析

李贝贝^{1,*}, 张 恒^{1,2,*}, 姜建福¹, 张 颖¹, 樊秀彩¹, 房经贵^{2,**}, 刘崇怀^{1,**}

(¹ 中国农业科学院郑州果树研究所, 郑州 450009; ² 南京农业大学园艺学院, 南京 210095)

摘 要: 利用简化基因组测序技术 (SLAF-seq) 对 304 份葡萄种质进行测序, 最终获得 466 618 个 SLAF 标签, 其中多态性 SLAF 标签 392 374 个。通过序列分析, 获得 481 192 个有效单核苷酸 (SNP) 多态标记, 并基于这些 SNP 分析和构建了 304 个葡萄种质的群体结构和系统发生树。结果表明, SLAF-seq 技术能高效、低廉地开发出大量可用于群体遗传分析的 SNP 标记。通过构建进化树分析发现, 欧亚种、欧美杂种及野生种葡萄彼此分开, 其中姊妹系品种及具有亲子代关系的品种各自聚在一起, 中国葡萄地方品种与国外古老葡萄品种的亲缘关系最近, 且起源及遗传背景不详的古老葡萄品种与野生种的亲缘关系较改良品种更近。该结果可为后期进一步研究葡萄的起源进化提供参考, 同时为构建 SNP 指纹数据库提供了基础数据。

关键词: 葡萄; SLAF-seq; SNP; 遗传多样性

中图分类号: S 663.1

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2019) 11-2109-10

Analysis of Genetic Diversity of Grape Germplasms Using SLAF-seq Technology

LI Beibei^{1,*}, ZHANG Heng^{1,2,*}, JIANG Jianfu¹, ZHANG Ying¹, FAN Xiucui¹, FANG Jinggui^{2,**}, and LIU Chonghuai^{1,**}

(¹ Zhengzhou Fruit Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450009, China; ² College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: In this study, 304 *Vitis* accessions were used as experimental materials for sequencing by specific-locus amplified fragment sequencing (SLAF-seq). In total, 466 618 high quality SLAF tags were obtained, including 392 374 polymorphic SLAF tags. A total of 481 192 single nucleotide polymorphisms (SNPs) were obtained by sequence analysis. The phylogenetic relationship and population structure of 304 *Vitis* accessions were analyzed based on the SNP dataset, which suggests that SLAF-seq can be used to develop a large number of SNPs for population genetic analysis, efficiently and cheaply. The clustering results showed that *V. vinifera*, Euro-America hybrid and wild species were distinguished from each other, among which sister lines and varieties with parent-child relationship were clustered together, respectively. In addition, the Chinese grape landraces have a close relationship with the ancient Eurasian grape varieties, and the ancient grape varieties with unknown origin and genetic background are

收稿日期: 2019-07-26; **修回日期:** 2019-11-05

基金项目: 国家现代农业产业技术体系建设专项资金项目 (CARS-29-yz-1); 中国农业科学院科技创新工程专项经费项目 (CAAS-ASTIP-2018-ZFRI)

* 并列第一作者

** 通信作者 Author for correspondence (E-mail: liuchonghuai@caas.cn, fanggg@njau.edu.cn)

closer to the wild species than the improved varieties. These results provide references for further study of the origin and evolution of grapes, and provide empirical data for the establishment of SNP fingerprint database.

Keywords: grape; SLAF-seq; SNP; genetic diversity

研究分析葡萄种质资源的遗传多样性、亲缘关系及群体结构,可以揭示其遗传特性,为后期进一步研究葡萄的起源进化提供参考,并为种质鉴定、资源利用及育种等提供依据。

随着现代分子生物技术的发展,分子标记越来越广泛地应用于群体间遗传多样性及亲缘关系分析等。已报道采用 RAPD (Vidal et al., 1999; 吴红 等, 2008)、AFLP (Ren & Timko, 2001; Aradhya et al., 2013)、SSR (Grassi et al., 2003; Riaz et al., 2018; Zhang et al., 2018)、ISSR (Argade et al., 2009; 张永辉 等, 2011; Jing & Wang, 2013; Motha et al., 2018) 等分子标记技术研究葡萄遗传多样性、亲缘关系及群体结构,取得了很大进展。但这些分子标记技术存在一定的局限性,如 RAPD 技术的试验稳定性和重复性较差, AFLP 技术操作复杂、成本较高, ISSR 标记对体细胞遗传变异的检测效率低。由于不同分子生物技术的局限性,所得结果也存在差异。

SLAF-seq (Specific Locus Amplified Fragment Sequencing) 是基于高通量测序技术发展起来的一种简化基因组深度测序技术。通过生物信息学方法设计最佳试验方案,构建 SLAF-seq 文库,筛选特异性长度的 DNA 片段 (SLAF-seq 标签),利用高通量测序技术获得海量序列,通过软件分析比对,在全基因组范围开发出大量特异性 SNP 标记。SNP 标记已广泛应用于多种作物亲缘关系及遗传变异分析 (Heffelfinger et al., 2014; 石璇 等, 2016; 俞超 等, 2017)、性状关联分析 (张恒 等, 2017) 和遗传连锁图谱构建 (高风云 等, 2017; Guo et al., 2018), 其具有准确性高、通量高、成本低等优点。SLAF-seq 技术测序深度高、成本低,已经在甘薯 (苏文瑾 等, 2016)、水稻 (彭强 等, 2016)、大豆 (Zhao et al., 2015) 上成功应用。李余良等 (2018) 利用 SLAF-seq 技术对 81 份玉米种质进行了遗传多样性分析,结果表明,原始亲本源于同一地方的品种亲缘关系较近,同时发现了异名同种、不同世代同种的现象,为纠正种质间关系、理清系谱提供了基础数据。Feng 等 (2018) 利用简化基因组测序技术对甘薯栽培种及不同倍性的近缘野生种的遗传多样性和进化关系进行分析,结果表明,栽培种和六倍体近缘野生种 (*Ipomoea trifida*) 的遗传关系最近,进一步验证了栽培甘薯可能起源于 *Ipomoea trifida* (6x)。本试验中利用 SLAF-seq 技术测定了 304 份葡萄种质材料的基因序列,获得全基因组范围内稳定性高、特异性强的 SNP 标记。基于开发的 SNP 标记对葡萄品种间的遗传多样性及群体结构进行分析,旨在从基因组水平揭示不同种质之间的遗传关系。

1 材料与方法

1.1 试验材料及其基因组 DNA 提取和检测

304 份葡萄种质材料 (详见表 2) 取自中国农业科学院郑州果树研究所国家果树种质郑州葡萄圃。萌芽期取其嫩叶,于液氮中速冻后放 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

采用改良的 CTAB 法 (Murray & Wf, 1980) 提取 304 份葡萄种质的基因组 DNA,利用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的完整性,并利用 1000C (美国 Nanodrop, ND-1000 型) 检测 DNA 的浓度及纯度,以确保所提 DNA 质量满足测序要求 (即 OD_{260} 与 OD_{280} 的比值分布在 1.8~2.0 之间)。最后用超纯水将浓度统一调至 $50\text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.2 酶切方案的确定

根据葡萄 (*V. vinifera*) 基因组大小 (486 Mb) 以及 GC 含量 (33.41%) 等信息, 选取葡萄基因组作为参考基因组进行酶切预测。参考基因组地址为 ftp://ftp.ensemblgenomes.org/pub/release-23/plants/fasta/vitis_vinifera/dna/。利用 SLAF 酶切预测软件对参考基因组进行电子酶切预测, 选择最适酶切方案。组装出的基因组大小为 416 Mb, GC 含量为 39.08%。

1.3 基因组测序、SLAF 标签分析及 SNP 分析

根据选定的最适酶切方案, 对检测合格的样品基因组 DNA 分别进行酶切建库。对得到的酶切片段 (SLAF 标签) 进行 3'端加 A 处理、连接 Dual-index (Kozich et al., 2013) 测序接头、PCR 扩增、DNA 纯化、混样、切胶选取目的片段, 再进行文库质检, 合格后用 Illumina HiSeq 2500 (美国 Illumina 公司, HiSeq 2500 型) 进行双端测序。同时, 选用水稻 ‘日本晴’ (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*) (Goff et al., 2002) 作为对照进行测序来监控评估试验过程是否正常及选定酶切组合的有效性。

利用 Dual-index 对测序得到的原始数据进行识别, 根据以下原则过滤: reads \geq 10% 未知的核苷酸被过滤; reads \geq 30% 低质量的核苷酸被过滤; reads 在 3'端是低质量的也被过滤。得到高质量的双端 clean reads, 然后进行测序质量和数据量的评估。通过对照数据评估酶切效率、比对率及选择片段长度, 以判断实验过程的有效性和准确性。利用 BWA (Li & Durbin, 2009) 软件将测序得到的 clean reads 比对到参考基因组上, 并使用 GATK (McKenna et al., 2010) 和 SAMtools (Li et al., 2009a) 两种软件开发 SNP。以两种软件开发获得的 SNP 交集作为最终可靠的 SNP 标记数据。

1.4 群体遗传结构和亲缘关系分析

对所开发的 SNP 标记根据完整度 > 0.8 , 次要等位基因频率 (MAF) > 0.05 的标准进行过滤 (Sunseri et al., 2018), 基于筛选出的高一致性的群体 SNP, 运用统计软件 MEGA5 (Tamura et al., 2011) 及 Admixture (Alexander et al., 2009), 对群体进行进化树和群体结构分析。

2 结果与分析

2.1 建库评估和测序质量评估

利用 SLAF 酶切预测软件分析, 确定酶切组合为 *Rsa* I + *Hae* III, 酶切片段长度在 314 ~ 464 bp 的片段定义为 SLAF 标签, 预测可得到 165 981 个 SLAF 标签。

本试验中的对照基因组 (‘日本晴’ 水稻) 大小为 374.30 Mb, 通过 SOAP2 软件 (Li et al., 2009b) 将对照的测序序列 (reads) 与其参考基因组进行比对。结果显示试验双端比对效率为 87.99%, *Rsa* I + *Hae* III 的酶切效率为 92.87%。这些数据显示选定的酶切方案的可行性, 并且说明 SLAF 建库正常。测序质量值 (Q) 是评估高通量测序单碱基错误率的重要指标, Q 值越高表示单碱基测序错误率越低。本试验从 304 个葡萄品种中共获得 636.82 百万序列 (Mreads), 测序平均 Q30 (某碱基测序出错的概率为 0.001, 则该碱基的 Q 为 30) 为 90.98%, 平均 GC 含量为 39.08%。Q30 数据表明了测序质量高, 测序结果可靠。

2.2 SLAF 标签开发及 SNP 信息统计

对 304 份葡萄样品进行测序, 共得到 663.59 M clean reads。通过序列分析, 从 304 份葡萄材料

中共开发 466 618 个 SLAF 标签, 其中多态性 SLAF 标签有 392 374 个, 每个样品的平均测序深度为 $8.09 \times$ 。通过对多态性 SLAF 标签进行分析, 共获得 4 241 729 个群体 SNP 标记。根据完整度 > 0.8 , 次要等位基因频率 (MAF) > 0.05 过滤, 共得到 481 192 个高一致性的群体 SNP。不同染色体上的 SLAF 标签与 SNP 标记的分布见表 1, 葡萄约有 4.16 亿个碱基, 大约每 1 kb DNA 序列长度上有一个 SNP。简化基因组测序正常, 可用于后续的遗传关系分析。

表 1 SLAF 标签及 SNP 位点在各染色体上的数量统计
Table 1 The number of SLAF labels and SNP loci on each chromosome

染色体编号 Chromosome ID	多态性 SLAF 标签数 Polymorphic SLAF number	筛选后 SNP 位点 Filter SNP number	染色体编号 Chromosome ID	多态性 SLAF 标签数 Polymorphic SLAF number	筛选后 SNP 位点 Filter SNP number
1	18 975	21 338	12	15 265	20 848
2	15 434	19 285	13	16 313	21 775
3	16 922	20 164	14	18 749	23 153
4	19 879	24 341	15	21 472	26 744
5	20 345	24 997	16	16 612	21 481
6	25 036	28 547	17	16 458	20 734
7	17 306	22 225	18	18 744	25 187
8	17 509	23 845	19	18 230	23 025
9	14 704	19 565	随机区域 Random region	25 735	28 791
10	25 432	26 692	不确定区域 Indeterminate region	13 600	16 545
11	19 654	21 910	共计 Total	392 374	481 192

2.3 群体遗传结构分析

2.3.1 系统发育树分析

基于筛选出的高一致性 SNP 标记, 通过 MEGA5 (Tamura et al., 2011) 软件, 运用 Neighbor-joining (Saitou & Nei, 1987) 算法, 对 304 份葡萄种质之间的遗传关系进行分析并构建进化树 (图 1)。可以看出, 所有野生材料聚在一起, 形成组 I, 其中包括分类地位未定的 ‘小黑葡萄’; 其余驯化的栽培品种被分为两大类, 所有欧亚种品种聚为组 II, 所有欧美杂种品种聚为组 III (表 2, 图 1)。

表 2 304 份葡萄种质资源的组别
Table 2 The group of 304 grape germplasm resources

所在组数 Group in phylogenetic tree	种类/种群 Species/ population	种质名称 (编号) The name of germplasm (code)
I	东亚种群 East-Asia Vitis species	蓼萼 <i>Vitis bryoniifolia</i> Bge. (370), 华东葡萄 <i>Vitis pseudoreticulata</i> W.T.Wang (369), 葛藟葡萄 <i>Vitis flexuosa</i> Thunb. (361), 菱叶葡萄 <i>Vitis hancockii</i> Hance (360), 刺葡萄 <i>Vitis davidii</i> (Roman. Du Caill.) Foëx (372), 秋葡萄 <i>Vitis romanetii</i> Roman. Du Caill ex Planch. (371), 桦叶葡萄 <i>Vitis betulifolia</i> Diels & Gilg (363), 变叶葡萄 <i>Vitis piasezkii</i> Maxim (362), 毛葡萄 <i>Vitis heyneana</i> Roem. & Schult. (367), 桑叶葡萄 <i>Vitis ficifolia</i> Bge. (365), 山葡萄 <i>Vitis amurensis</i> Rupr (364), 腺枝葡萄 <i>Vitis adenoclada</i> Hand.-Mazz. (366)
	未知 Unknown	小黑葡萄 Xiaohei Grape (340)
II-1	欧亚种 <i>V. vinifera</i>	特别黑大粒 Tebie Heidali (194), 黄蜜斯 Huangmisi (142), 夏白 Xaibai (202), 秋白 Qiubai (182), 龙眼 Longyan (154), 黑鸡心 Heijixin (130), 李子香 Lizixiang (152), 洋葡萄 Pinger (206), 瓶儿 Pinger (174), 驴奶 Lünai (155), 玛瑙 Manao (161), 马奶 Manai (159), 白胡沙涅 Khoussaine Blanc (97), 克林巴马克 Khoussaine Khelim Barmak (149), 牛心 Niuxin (170), 恰齐瓦赫 Qiaqiwahe (178), 皇家无核 Autumn Royal (317), 美人指 Manicure Finger (163), 依斯比沙里 Wujiakeayi (212), 吾家克阿依 Wujiakeayi (200), 微红白 Weihongbai (196), 和田红 Hetianhong (128), 梅鹿辄 Merlot (351), 白达拉依 Baidalay (95), 里扎马特 Rizamat (153), 高蓓蕾 High Bailey (123)

续表 2

所在组数 Group in phylogenetic tree	种类/种群 Species/ population	种质名称 (编号) The name of germplasm (code)
II -2	欧亚种 <i>V. vinifera</i>	粉红亚依苏娜 Fenhong Yayisuna (120), 白哈丽丽 Khalili Blanc (96), 克里木考尼松 Kelimukaonisong (148), 苏丹尼 Sultanick Rose (192), 库特赛塔 Kutesaita (150), 齐查卡普列 Qichakapulie (177), 白鸡心 Baijixin (98), 意大利玫瑰 Rose D Italia (214), 紫鸡心 Zijixin (225), 巧吾什 Qiaowushi (180), 粉红阿里蔓登 Fenhong Alimandeng (117), 哈特巴尔 Hatebaer (127), 黑夏尼 Heixiani (133), 日鲁捷维 Rilueijie (183), 布杰苏里 Bujisuli (319), 阿古西 Angour siokh (87), 芳香拉查基 Mathias Aromatic (114), 白拉查基 White Rozaki (99), 粉红拉查基 Fenhong Lachaji (118), 红加利亚 Hungaria (136), 西瓦兹 Xiwazi (288), 布拉金涅 Bulajinnie (106), 青紫 Qingzi (277), 佳利酿 Carignan (349), SG (292), 小白葡萄 Xiaobai Grape (204), 白玉霓 Ugni blanc (343), 法国兰 Blue French (345), 雷司令 Riesling (350), 布列其罗然西 Bulieqiluoraxi (107), 贵人香 Italian Riesling (347), 赤霞珠 Cabernet Sauvignon (344), 蛇龙珠 Cabernet Gernischet (354), 品丽珠 Cabernet Franc (353), 西拉 Syrah (356), 霞多丽 Chardonnay (355), 琼瑶浆 Traminer (352), 白比诺 Pinot Blanc (342), 黑比诺 Pinot Noir (346), 灰比诺 Pinot Gris (348), 着色香 Zhuosexiang (71), 黑佳酿 Heijianiang (341)
II -3	欧美杂种 <i>V. vinifera</i> - <i>V. labrusca</i> 欧亚种 <i>V. vinifera</i>	Black Diamond (327), 黑墨 Heimo (131), 奥迪亚 Otilia (233), 利伐尔 Lival (287), 紫地球 Zidiqiu (321), 黑玫瑰 Black Muscat (299), 罗马尼亚 Gros Colman (157), 红古沙 Gousale Kara (135), 西营 Xiyang (262), Mutant of Thompson Seedless (329), 无核白 Thompsons Seedless (258), 埃木布腊德 Emberad (231), 桑多哈尼 Sangduohani (257), 红无籽露 Hongwuzilu (242), 康耐诺 Kangnainuo (247), 那赛里 Nasaili (255), 杨格尔 Yanggeer (265), 洛迪 Rodi (158), 秋无核 Autumn Seedless (256), 泼发尔 Madh Pa Fare (236), Kamea (326), 波尔莱特 Perlette (235), 黎明无核 Dawn Seedless (251), 红光无核 Flame Seedless (239), 美丽无核 Beauty Seedless (253), 新葡 2 号 Xipu 2 (264), 无核紫 Black Monukka (261), Gold (336), Sivan (309), 皇家秋天 Star Light (323), Gold Star (324), Mystery (325), Hod (328), 凤凰 51 Fenghuang 51 (121), 金田翡翠 Jintianfeicui (316), 香妃 Xaingfei (203), 90-1 (85), 绯红 Cardinal (116), 马琳格尔 Precocce de Malinger (160), 琼尼 Joanna Charnice (181), 西莱特 Selecta (201), 潘诺尼亚 Pannuoniya (173), 京秀 (307), 京丰无核 Jingfeng Seedless (244), 京早晶 Jingzaojing (245), 碧香无核 Bixiang Seedless (249), 无核玫瑰 Rose Seedless (259), 早玛瑙 Zaomanao (218), 爱神玫瑰 Aishenrose (232), 红斯地 Hongsidi (291), 京可晶 Jingkejing (146), 京紫晶 Jingzijing (246), 比昂扣 Rosario Bianco (104), 红罗莎里奥 Rosario Rosso (137), 斯堪地拜格 Skendberg (103), 瓦尔瑟 Waerse (279), 阿佛阿丽 Afuali (101), 伊犁莎白 Elisabeth Grape (211), 森田尼 Centenial (184), 保尔加尔 Boulgal (102), 维多利亚 Victoria (197), 葡萄园皇后 Queen-of-vineyard (175), 比赛尔 Julski Beaser (105), Jan-87 87-1 (84), 神农金皇后 Shennongjinhuaughou (331), 红莲子 Honglianzi (27), 京玉 Jingyu (167), 奥古斯特 Augusta (90), 格拉卡 Greaca (124), 奥林匹亚 Olympia (92), 超宝 Chaobao (108), 红意大利 Ruby Okuyama (140), 意大利 Italia (213), 摩尔多瓦 Moldova (53), 布朗无核 Bronx Seedless (237), 红萨福尔克 Suffolk Red (29), 贵妃玫瑰 Guifei Rose (19), 红双味 Hongshuangwei (30), 翠峰 Cuifeng (1)
II -4	欧美杂种 <i>V. vinifera</i> - <i>V. labrusca</i> 欧亚种 <i>V. vinifera</i>	巧保 2 号 Qiaobo 2 (179), 秀特玫瑰 Rose Ciutat (69), 伊犁香葡萄 Yilixiang Grape (210), 谢花红 Muscat Mathiasz Janosne (205), 派卡尔 Paikaer (171), 那多尔 Naduoer (168), 芳香葡萄 Fangxiang (115), 芳香 Fangxiang (113), 苏 46 号 Su 46 (191), 济南早红 Jinanzaohong (144), 黑彭斯 Pensal Blanco (132), 小白玫瑰 Muscat Blanc (357), 派克斯 Aromatic of Pecs (172), 米哈尔 Mihaer (164), 红亚力山大 Flame Muscat (139), 德苏拉乌苏姆 Djoura Ousium (109), 红地球 Red Globe (339), 金田红 Jintianhong (318), 泽玉 Zeyu (221), 泽香 Zexiang (220), 胜利花药 2 号 Shengli Huayao 2 (189), 胜利 Shengli (188), 沈阳玫瑰 Shenyang Rose (187), 玫瑰香 Mascat Hamburg (162), 早玫瑰 Zao Rose (219), 登瓦斯玫瑰 Misket Dounvasi (110) 秋红宝 Qiuheibao (306), 圣诞玫瑰 Christmas Rose (190), 秋黑宝 Qiuheibao (308), 早黑宝 Zaoheibao (216), 早康宝 Zaokangbao (305), 瑰宝 Guibao (125), Jade Seedless (81), 粒丽特 Lilit (334), 红宝石无核 Ruby Seedless (240), 红脸无核 Blush Seedless (241), G1235 (302), G1230 (301), 蒙丽莎无核 Melissa Seedless (254), 克瑞森无核 Crimson Seedless (80), 安那玛利亚 Annamaliya (294), 11-43 (86), 早金香 Zaojinxiang (217), 紫珍珠 Zizhenzhu (227), 普列文玫瑰 Mascat Plevenski (176), 郑州早红 Zhengzhouzaohong (222), 安娜马利亚 Annamaria (89), 伊尔玛 Kocsias Irma (208), 奥利文 Irsay Oliver (91), 索罗门 Madeleine Solomon (193), 安吉文 Madeleine Angevine (88), 夏白 Xiabai (314), 基拉尔 Jilaer (143), 佛斯玫瑰 Fusi Rose (122), 紫桃 Zitao (226), 紫丰 Zifeng (224), 黑汉 Black Hamburg (129), 艾尔威因 Aierweiyin (5)

续表 2		
所在组数 Group in phylogenetic tree	种类/种群 Species/ population	种质名称 (编号) The name of germplasm (code)
III-1	欧美杂种 <i>V. vinifera</i> - <i>V. labrusca</i>	金手指 Golden Finger (298), 贵妇人 Guifuren (271), 茉莉香 Molixiang (54), 巨峰玫瑰 Jufeng Rose (282), 巨玫瑰 Ju Rose (42), 夕阳红 Xiyanghong (65), 状元红 Zhuangyuanhong (45), 华夫葡萄 Huafu Grape (286), 蜜红 Honey Red (51), 龙宝 Ryuho (46), 红伊豆 Beniizu (33), 天使玫瑰香 Muscat Angel (61), 金玫瑰 Golden Muscat (37), 白香蕉 Baixiangjiao (9), 吉峰 Jifeng (36), 红香蕉 Hongxiangjiao (31), 脆红 Cuihong (12), 香悦 Xiangyue (67), 斯帕汉堡 Sipahanbao (297), 加拿大玫瑰 Canada Muscat (145), 沈农香丰 Shennongxiangfeng (333), 紫珍香 Zizhenxiang (74), 沈农硕丰 Shennong Shuofeng (332), 天康玫瑰 Tiankang Rose (278), 黑丰 Heifeng (295), 田野黑 Tano Black (62), 高砂 Takasago (17), 醉人香 Zuirenxiang (296), 红富士 Beni Fuji (26), 红瑞宝 Beni Zuiho (28), 田野红 Tano Red (63), 藤稔 Fujiminori (60), 紫玉 Shigyoku (72), 信浓红 Xinnonghong (68), 户太 8 号 Hutai 8 (35), 巨峰 Kyoho (40), 峰寿 Fengshou (15), 峰后 Fenghou (14), 伊豆锦 Izu Nishiki (70), 高墨 Takasumi (16), 蜜汁 Mizhi (52), 黑蜜 Honey Black (24), 黑奥林 Black Olympia (21), 红奥林 Red Olympia (25), 戈尔比 Geerbi (304), 先峰 Xianfeng (66), 京优 Jingyou (39), 音田 Otoda (215), 京亚 Jingya (38), 申秀 Shenxiu (57), 莎加蜜 Sagami (56)
III-2	欧美杂种 <i>V. vinifera</i> - <i>V. labrusca</i>	沪培 2 号 Hupei 2 (76), 牡丹红 Mudanhong (165), 蜜尔紫 Mills (50), 白奥林 Baiaolin (41), 希姆劳德 Ximulaode (263), 奥拉皇后 Queenora (234), 累克芒特 Lakemont (250), 范讷萨无核 Vanerssa Seedless (238), 康能无核 Canadice (248), 金星无核 Venus (3), 纽约玫瑰香 New York Rosexiang (47), 二伯娜 Urbana (77), 玫瑰魁 Governor Rose (315), 黑贝蒂 Herbert (22), 俄罗斯康可 Russian Concord (79), 卡托巴 Catawba (43), 蓓蕾玫瑰 Muscat Bailey (10), 大阪 48202 Daban48202 (13), 斯蒂本 Steuben (59), 罗曼尔 Rommel (48), 巴士 Bath (8), 琥珀 Hupo (34), 无核蜜 Honey Seedless (260), Reliance (330), 火星无核 Mars (243), 维金娜斯 Vergennes (64), 碧绿珠 Lady Washington (11), 美洲白 Meizhoubai (49), 尼加拉 Niagara (55), 紫早 Zizao (73), 哈佛德 Hartford (20), 香槟 Champion (78), Rosebelle (338), 红星 Hongxing (32), 康拜尔 Campbell (44)

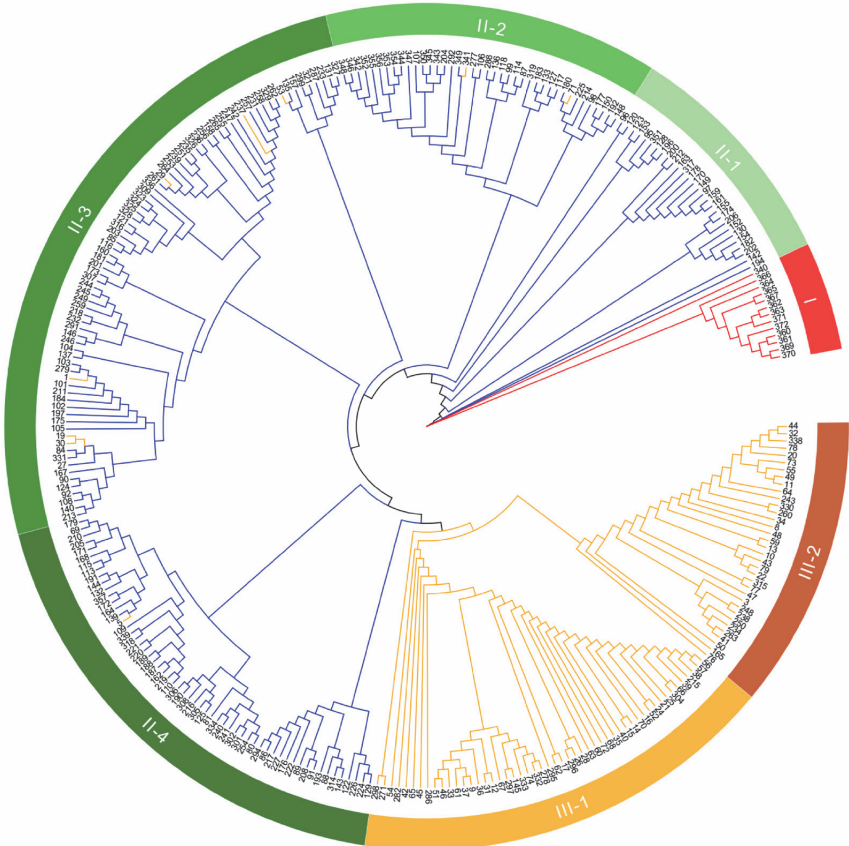


图 1 304 个葡萄种质材料的进化树 (304 个种质详见表 2)

Fig. 1 The evolutionary tree of 304 grape accessions (304 grape accessions were presented in table 2)

欧亚种 (组 II) 被分为 4 个亚组。亚组 1 (II-1) 主要包括来自于新疆等地区的古老地方品种, 如 ‘牛心’、‘和田红’、‘马奶’、‘龙眼’、‘秋白’ 和 ‘夏白’ 等, 其遗传背景及来源不详; 亚组 2 (II-2) 是一些源于亚洲或前苏联的古老葡萄品种, 如 ‘克里木考尼松’ 和 ‘齐查卡普列’ 等, 以及一些源于欧洲的古老葡萄品种, 如 ‘黑夏尼’、‘赤霞珠’、‘黑比诺’ 和 ‘雷司令’ 等, 本亚组的大部分品种亲本无法追溯; 亚组 3 (II-3) 绝大多数是后期育成品种, 可以追溯到亲本, 主要是含有 ‘无核白’ 血缘的无核品种, 以及一些含有 ‘葡萄园皇后’ 或 ‘Dodrelyabi’ 血缘的有核品种; 亚组 4 (II-4) 主要包含一些具有 ‘白玫瑰香’ 血缘的葡萄品种。本亚组中绝大多数品种为后期育成, 可追溯到亲本。本组中, 大多数中国育成的品种聚在一起, 如 ‘沈阳玫瑰’、‘早玫瑰’、‘泽香’ 和 ‘泽玉’ 等, 大多数源于国外的品种聚在一起, 如 ‘小白玫瑰’、‘芳香葡萄’ 和 ‘派克斯’ 等。

欧美杂种 (组 III) 分为 2 个亚组。具有 ‘巨峰’ 或 ‘玫瑰香’ 血缘的葡萄品种聚在一起形成亚组 1 (III-1), 该亚组品种主要来源于日本和中国。其余具有 ‘康可’ 血缘的葡萄品种聚在一起形成亚组 2 (III-2), 且该亚组品种主要来源于美国。

2.3.2 群体结构分析

基于筛选的有效 SNP, 通过 Admixture (Alexander et al., 2009) 软件, 从基因组水平分析了 304 份葡萄种质的群体结构。将拥有最低交叉验证错误率的分群数确定为最优分群数。最优分群数为 10 (图 3), 说明 304 份葡萄种质被分为 10 类。

由图 3 可以看出, 由于每个类群都存在交叉现象, 说明每个类群间的血缘关系相对较近。类群 1 主要包括具有 ‘葡萄园皇后’ 血缘的 35 份欧亚种品种。类群 2 主要包括 29 份 ‘巨峰’ 系欧美杂种品种。类群 3 主要是具有 ‘白玫瑰香’ 血缘的品种, 其中 38 份为欧亚种, 13 份为欧美杂种。类群 4 由 28 份无核品种构成。类群 5 包括 50 份欧亚种品种, 其中大部分为中国地方品种, 少部分源于伊朗、前苏联等国家的古老品种。类群 6 主要包括 43 份源于法国、匈牙利等欧洲国家的古老品种。类群 7 主要包含 14 份源于土耳其欧亚种。类群 8 包含 13 份中国野生葡萄。类群 9 包括 30 份具有 ‘康可’ 血缘的欧美杂种品种。类群 10 包括 11 份具有 ‘玫瑰香’ 血缘的欧美杂种品种。

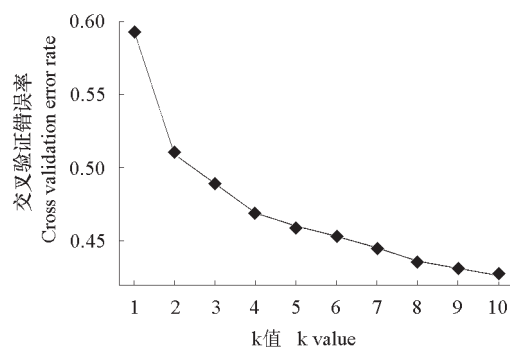


图 2 不同 k 值对应的交叉验证错误率
Fig. 2 Cross validation error rates corresponding to different k values

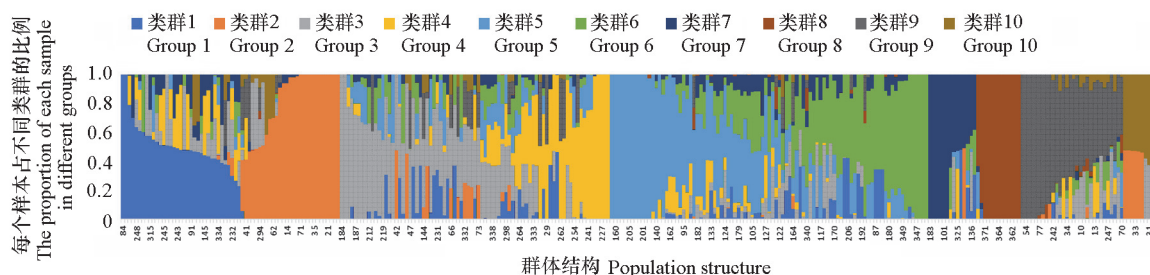


图 3 基于所选 SNP 分析群体结构 (k = 10)
Fig. 3 Analysis of population structure by using identified SNPs (k = 10)

综上, 群体结构分析结果与聚类结果基本一致, 具有相同遗传背景的品种均聚在一起, 说明了聚类的准确性。

3 讨论

本研究利用 SLAF 简化基因组测序技术在葡萄全基因组水平上成功开发出大量 SNP, 利用筛选出的 481 192 个有效 SNP 标记分析了葡萄种质的群体遗传和遗传多样性, 为葡萄种质分类、品种鉴定和分子育种奠定了基础。

聚类分析结果表明, 葡萄欧亚种、欧美杂种及野生种分别归为一类。大多数姊妹系品种聚在一起, 如‘京玉’和‘奥古斯特’等; 具有亲子代关系的品种聚在一起, 如‘瑰宝’、‘早康宝’、‘早黑宝’和‘秋黑宝’等, 该结果与利用 SSR 方法所得结果(李贝贝 等, 2018)一致。本研究个别欧美杂种品种聚在了欧亚种类群中, 例如欧美杂种‘黑佳酿’与欧亚种‘佳丽酿’聚在一起, ‘摩尔多瓦’与欧亚种‘红谷沙’聚在一起, 欧美杂种‘贵妃玫瑰’和‘红双味’与‘葡萄园皇后’聚在一起, 欧美杂种‘布朗无核’与‘无核白’聚为一组等, 出现这种现象的原因是它们之间存在亲子代关系。

聚类分析和群体结构分析结果均显示中国葡萄地方品种聚在一起, 且与国外古老葡萄品种的遗传关系最近。此结果与 Li 等(2017)和 Guo 等(2018)分别利用 SSR 和 SCoT 技术研究葡萄遗传多样性所得结果一致。本研究从基因组水平上对该结果做了进一步验证。遗传背景不详的中国地方品种‘小黑葡萄’与野生种聚在一起, 且紧邻欧亚种, 证实了‘小黑葡萄’是野生种过渡类型的推测(黄非 等, 1993; Li et al., 2017)。从进化树看, 起源及遗传背景不详的古老品种比后期育成品种距离野生种的亲缘关系更近。可能是因为古老葡萄品种基因组中仍保留一些原始的野生型基因, 改良品种由于不同育种目标而使部分基因流失。同样, Zhou 等(2015)利用重测序技术对 302 份大豆野生种及栽培种进行分析发现, 大豆地方品种与野生种的亲缘关系较改良品种近。本研究结果为后期进一步研究葡萄的起源进化提供参考。

随着 SNP 检测技术的不断进步, SNP 标记的检测成本逐渐降低。加之 SNP 标记相比 SSR 标记的一些优势, 如 SNP 标记数量多, 易于实现高通量, 易于基因分型, 适于快速规模化筛查等, 将来在新品种的特异性、真实性鉴定方面将更加依赖于 SNP 标记。目前在水稻上已颁布了基于 SNP 标记法的品种鉴定技术规程(标准号: NY/T 2745-2015), 并且在甘蓝(李志远 等, 2018)、油菜(张昆鹏, 2013)等作物上已构建部分主栽品种的 SNP 指纹数据库, 前者的研究结果验证了 SNP 标记在品种鉴定方面的可行性, 表明构建基于 SNP 标记技术的指纹图谱对于品种特异性和真实性鉴别、种子纯度鉴定具有重要意义。本研究结果为制定葡萄品种鉴定 SNP 标记法以及构建葡萄 SNP 指纹数据库提供了基础数据。此外, 从全基因组范围获得的 SNP 位点也为后续探寻不同葡萄品种的具体分化年限等相关研究提供了依据。

References

- Alexander D H, Novembre J, Lange K. 2009. Fast model-based estimation of ancestry in unrelated individuals. *Genome Research*, 19 (9): 1655 - 1664.
- Aradhya M, Wang Y, Walker M A, Prins B H, Koehmstedt A M, Velasco D, Preece J E. 2013. Genetic diversity, structure, and patterns of differentiation in the genus *Vitis*. *Plant Systematics and Evolution*, 299 (2): 317 - 330.
- Argade N C, Tamhankar S A, Karibasappa G S, Patil S G, Rao V S. 2009. DNA profiling and assessment of genetic relationships among important

- seedless grape (*Vitis vinifera*) varieties in India using ISSR markers. Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology, 18 (1): 45 – 51.
- Feng J Y, Li M, Zhao S, Zhang C, Yang S T, Qiao S, Pu Z G. 2018. Analysis of evolution and genetic diversity of sweetpotato and its related different polyploidy wild species *I. trifida* using RAD-seq. BMC Plant Biology, 18 (1): 181.
- Gao Feng-yun, Siqin Bateer, Zhang Hui, Jia Xiao-yun, Yi Liu-xi, Zhou Yu, Li Qiang, Ye Ying-fu, Hou Jian-hua. 2017. High density genetic map of flax based on SLAF-seq technology. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 39 (3): 334 – 341. (in Chinese)
- 高风云, 斯钦巴特尔, 张 辉, 贾霄云, 伊六喜, 周 宇, 李 强, 叶应福, 侯建华. 2017. 基于 SLAF-seq 技术构建亚麻高密度遗传图谱. 中国油料作物学报, 39 (3): 334 – 341.
- Goff S A, Ricke D, Lan T H, Presting G, Wang R, Dunn M, Hadley D. 2002. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*). Science, 296 (5565): 92 – 100.
- Grassi F, Labra M, Imazio S, Spada A, Sgorbati S, Scienza A, Sala F. 2003. Evidence of a secondary grapevine domestication centre detected by SSR analysis. Theoretical and Applied Genetics, 107 (7): 1315 – 1320.
- Guo J, Li C, Teng T, Shen F, Chen Y, Wang Y, Ling Q. 2018. Construction of the first high-density genetic linkage map of pikeperch (*Sander lucioperca*) using specific length amplified fragment (SLAF) sequencing and QTL analysis of growth-related traits. Aquaculture, 497: 299 – 305.
- Heffelfinger C, Fragoso C A, Moreno M A, Overton J D, Mottinger J P, Zhao H, Dellaporta S L. 2014. Flexible and scalable genotyping-by-sequencing strategies for population studies. BMC Genomics, 15 (1): 979.
- Huang Fei, Sheng Bing-cheng, Su Xiao-hong. 1993. Study on the relationship between Suxiaohong grape and some species of *Vitis*. Journal of Nanjing Agricultural University, 16 (4): 49 – 54. (in Chinese)
- 黄 非, 盛炳成, 宿晓红. 1993. 葡萄与葡萄属有关种亲缘关系初探. 南京农业大学学报, 16 (4): 49 – 54.
- Jing Z, Wang X. 2013. Genetic relationship between Chinese wild *Vitis* species and American and European cultivars based on ISSR markers. Biochemical Systematics and Ecology, 46 (3): 120 – 126.
- Kozich J J, Westcott S L, Baxter N T, Highlander S K, Schloss P D. 2013. Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the miseq Illumina sequencing platform. Applied & Environmental Microbiology, 79 (17): 5112 – 5120.
- Li B, Jiang J, Fan X, Zhang Y, Sun H, Zhang G, Liu C. 2017. Molecular characterization of Chinese grape landraces (*Vitis* L.) using microsatellite DNA markers. HortScience, 52 (4): 533 – 540.
- Li Bei-bei, Jiang Jian-fu, Zhang Ying, Fan Xiu-cai, Sun Hai-sheng, Zhang Guo-hai, Liu Chong-huai. 2018. DNA fingerprinting and genetic diversity analysis of grape (*Vitis vinifera* L.) cultivars based on SSR markers. Journal of Plant Genetic Resources, 19 (2): 338 – 350. (in Chinese)
- 李贝贝, 姜建福, 张 颖, 樊秀彩, 孙海生, 张国海, 刘崇怀. 2018. 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, 19 (2): 338 – 350.
- Li H, Durbin R. 2009. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. Bioinformatics, 25 (14): 1754 – 1760.
- Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, Durbin R. 2009a. The sequence alignment/map (SAM) format and SAMtools. Bioinformatics, 25 (16): 2078 – 2079.
- Li R, Yu C, Li Y, Lam T W, Yiu S M, Kristiansen K. 2009b. SOAP2: an improved ultrafast tool for short read alignment. Bioinformatics, 25 (15): 1966 – 1967.
- Li Yu-liang, Suo Hai-cui, Han Fu-guang, Liu Jian-hua, Hu Jian-guang, Gao Lei, Li Wu. 2018. Analysis of genetic diversity of sweet and wax corn germplasms using SLAF-seq technology. Journal of Maize Sciences, 27 (4): 71 – 78. (in Chinese)
- 李余良, 索海翠, 韩福光, 刘建华, 胡建广, 高 磊, 李 武. 2018. 基于 SLAF-seq 技术分析甜、糯玉米种质遗传多样性. 玉米科学, 27 (4): 71 – 78.
- Li Zhi-yuan, Yu Hai-long, Fang Zhi-yuan, Yang Yu-mei, Zhuang Mu, Lü Hong-hao, Zhang Yang-yong. 2018. Development of SNP markers in cabbage and construction of DNA fingerprinting of main varieties. Scientia Agricultura Sinica, 51 (14): 2771 – 2787. (in Chinese)
- 李志远, 于海龙, 方智远, 杨丽梅, 刘玉梅, 庄 木, 吕红豪, 张扬勇. 2018. 甘蓝 SNP 标记开发及主要品种的 DNA 指纹图谱构建. 中国农业科学, 51 (14): 2771 – 2787.
- Mckenna A, Hanna M, Banks E, Sivachenko A, Cibulskis K, Kernysky A. 2010. The genome analysis toolkit: a mapreduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. Genome Research, 20 (9): 1297 – 1303.
- Motha K, Singh S K, Singh A K, Singh R, Srivastav M, Verma M K, Bhardwaj C. 2018. Molecular characterization and genetic relationships of some stress tolerant grape rootstock genotypes as revealed by ISSR and SSR Markers. Plant Tissue Culture and Biotechnology, 28 (1): 77 – 90.
- Murray M G, Wf T. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Research, 8 (19): 4321 – 4325.

- Peng Qiang, Ye Sheng-xin, Huang Long, Zhang Da-shuang, Liu Ying, Wu Jian-qiang, Zhang Yu-shan, Zhu Su-song. 2016. Construction of a high-density genetic map in rice by using specific-length amplified fragment sequencing (SLAF-seq) technology. *Molecular Plant Breeding*, 14 (8): 2127 – 2132. (in Chinese)
- 彭强, 叶生鑫, 黄龙, 张大双, 刘颖, 吴健强, 张玉珊, 朱速松. 2016. 运用 SLAF-seq 技术构建水稻高密度遗传图谱. *分子植物育种*, 14 (8): 2127 – 2132.
- Ren N, Timko M P. 2001. AFLP analysis of genetic polymorphism and evolutionary relationships among cultivated and wild *Nicotiana* species. *Genome*, 44 (4): 559 – 571.
- Riaz S, De Lorenzis G, Velasco D, Koehmstedt A, Maghradze D, Bobokashvili Z, Failla O. 2018. Genetic diversity analysis of cultivated and wild grapevine (*Vitis vinifera* L.) accessions around the Mediterranean basin and Central Asia. *BMC Plant Biology*, 18 (1): 137.
- Saitou N, Nei M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution*, 4 (4): 406 – 425.
- Shi Xuan, Wang Ru-yuan, Tang Jun, Li Zong-yun, Luo Yong-hai. 2016. Analysis of interspecific SNPs in sweetpotato using a reduced-representation genotyping technology. *Acta Agronomica Sinica*, 42 (5): 641 – 647. (in Chinese)
- 石璇, 王茹媛, 唐君, 李宗芸, 罗永海. 2016. 利用简化基因组技术分析甘薯种间核苷酸多态性. *作物学报*, 42 (5): 641 – 647.
- Su Wen-jin, Zhao Ning, Lei Jian, Wang Lian-jun, Chai Sha-sha, Yang Xin-sun. 2016. SNP sites developed by specific length amplification fragment sequencing (SLAF-seq) in sweetpotato. *Scientia Agricultura Sinica*, 49 (1): 27 – 47. (in Chinese)
- 苏文瑾, 赵宁, 雷剑, 王连军, 柴沙沙, 杨新笋. 2016. 基于 SLAF-seq 技术的甘薯 SNP 位点开发. *中国农业科学*, 49 (1): 27 – 47.
- Sunseri F, Lupini A, Mauceri A, De Lorenzis G, Araniti F, Brancadoro L, Mercati F. 2018. Single nucleotide polymorphism profiles reveal an admixture genetic structure of grapevine germplasm from Calabria, Italy, uncovering its key role for the diversification of cultivars in the Mediterranean Basin. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 24 (3): 345 – 359.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28 (10): 2731 – 2739.
- Vidal J R, Moreno S, Gogorcena Y, Masa A, Ortiz J M. 1999. On the genetic relationships and origins of six grape cultivars of Galicia (Spain) using RAPD markers. *American Journal of Enology and Viticulture*, 50 (1): 69 – 75.
- Wu Hong, Chang Yong-yi, Hao Yan, Wu Yu-xia. 2008. Identifying grape cultivars and evaluating their genetic relationship by RAPD markers. *Journal of Fruit Science*, 25 (6): 932 – 936. (in Chinese)
- 吴红, 常永义, 郝燕, 吴玉霞. 2008. 利用 RAPD 标记研究部分葡萄品种的亲缘关系. *果树学报*, 25 (6): 932 – 936.
- Yu Chao, Chen Yu, Wang Cai-sheng, Chen Jia-yi, Jin Cong-biao. 2017. SNP sites development by specific length amplification fragment sequencing (SLAF-seq) and genetic analysis in red pitaya. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 38 (4): 591 – 596. (in Chinese)
- 俞超, 陈煜, 汪财生, 陈佳怡, 金从标. 2017. 基于 SLAF-seq 技术的红心火龙果 SNP 位点开发及遗传分析. *热带作物学报*, 38 (4): 591 – 596.
- Zhang Heng, Liu Zhong-jie, Fan Xiu-cai, Zhang Chuan, Cui Li-wen, Liu Chong-huai, Fang Jing-gui. 2017. Genome-wide association mapping of berry shape traits via the reduced representation sequencing in grape. *Acta Horticulturae Sinica*, 44 (10): 1959 – 1968. (in Chinese)
- 张恒, 刘众杰, 樊秀彩, 张川, 崔力文, 刘崇怀, 房经贵. 2017. 葡萄果粒形状简化基因组关联分析. *园艺学报*, 44 (10): 1959 – 1968.
- Zhang Kun-peng. 2013. Studies on Rapeseed variety fingerprints and mapping of gene of the down-curly leaf by use of SNP markers in *Brassica napus* L. [M. D. Dissertation]. Nanjing: Nanjing Agricultural University. (in Chinese)
- 张昆鹏. 2013. 利用 SNP 标记构建油菜品种指纹图谱及定位下卷叶性状基因的研究[硕士论文]. 南京: 南京农业大学.
- Zhang X, Gong P, Shi Y, Wang Y, Zhang C. 2018. Genetic inter-relationships among Chinese wild grapes based on SRAP marker analyses. *Vitis*, 57 (4): 151 – 157.
- Zhang Yong-hui, Liu Chong-huai, Fan Xiu-cai, Zhang Ying, Sun Hai-sheng, Peng Bin, Jiang Jian-fu. 2011. Application of ISSR markers in taxonomy of Chinese wild grape. *Journal of Fruit Science*, 28 (3): 406 – 412. (in Chinese)
- 张永辉, 刘崇怀, 樊秀彩, 张颖, 孙海生, 彭斌, 姜建福. 2011. ISSR 标记在中国野生葡萄分类中的应用. *果树学报*, 28 (3): 406 – 412.
- Zhao X, Han Y, Li Y, Liu D, Sun M, Zhao Y. 2015. Loci and candidate gene identification for resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean (*Glycine max* L. Merr.) via association and linkage maps. *Plant Journal*, 82 (2): 245 – 255.
- Zhou Z, Jiang Y, Wang Z, Gou Z, Lyu J, Li W, Fang C. 2015. Resequencing 302 wild and cultivated accessions identifies genes related to domestication and improvement in soybean. *Nature Biotechnology*, 33 (4): 408 – 414.