

越橘属植物EST-SSR分子标记开发及遗传多样性分析

孙海悦, 郭瑞雪, 徐鉴, 田友文, 董梅, 董坤, 李亚东*

吉林农业大学园艺学院, 长春130118

摘要: 以84份越橘种质为材料, 从NCBI公共数据库下载22 402条越橘属(*Vaccinium*) EST序列, 通过CAP3组装软件将EST序列拼接成11 541条unigene序列, 其中2 076条unigene序列含有2 679个SSR位点。二核苷酸和三核苷酸重复是主要的SSR类型, 约占SSR总数的96.01%。利用Primer Premier 5.0软件设计81对引物, 其中55对引物在供试越橘种质中扩增出理想的PCR产物, 55对引物均有多态性。聚类分析结果显示, 在遗传相似系数为0.70时, 可以将供试越橘种质分成两大类。越橘EST-SSR标记可以用于种质鉴定与遗传多样性分析。

关键词: 越橘; 分子标记; EST-SSR; 遗传多样性

越橘是杜鹃花科(Ericaceae)越橘属(*Vaccinium*)植物, 其中蓝果类型俗称为蓝莓(blueberry)(李亚东等2008)。全世界的越橘属植物约有400多个种, 广泛分布于北半球冷凉地区和南美高山地区(Vander Kloet 1988)。我国约有91个种, 28个变种, 主要分布于东北和西南地区(郝瑞1979)。栽培最为广泛的越橘主要为矮丛越橘(*V. angustifolium*)、北高丛越橘(*V. corymbosum*)、半高丛越橘(*V. corymbosum* × *V. angustifolium*)、南高丛越橘(*V. australe*)和兔眼越橘(*V. ashei*)品种群(王慧亮等2010)。目前, 随着国内外品种的不断引进, 栽培品种的数目持续增加, 在品种的传播过程中时常发生同名异物、同物异名等现象, 且越橘栽培品种的遗传背景狭窄, 增大了品种鉴定的难度, 因此需要建立高效、可靠的越橘品种鉴定体系及亲缘关系分析方法, 以降低育种的盲目性和栽培生产过程中的损失。

近年来, DNA分子标记技术在果树研究领域得到了广泛应用(Hemmat等1994; Yadav等2011), 特别是简单重复序列(simple sequence repeat, SSR)标记, 因其具有高度的多态性、较好的稳定性和重复性获得了广泛应用(李海波等2017; 李珊珊等2014; 陈全求等2008)。根据SSR来源不同, 可分为基因组SSR (genomic-SSR)和表达序列标签SSR (expressed sequence tag-SSR, EST-SSR), 基因组SSR标记开发成本较高(罗兵等2013)。随着测序技术的不断发展, 已有越来越多的EST序列可供于开发分子标记。目前, EST-SSR标记已被广泛应用于植物遗传连锁图谱构建、亲缘关系分析、遗传多样性研究(Morgante等2002; Rota等2005), 例如苹果(宋尚伟等2013)、梨(王西成等2010)、砂梨(崔海

荣等2010)、刺梨(鄢秀芹等2015)、黑莓(Lewers等2008)、梅(上官凌飞等2010)、荔枝(孙清明等2011)、草莓(董清华等2011; 王静等2011)、猕猴桃(廖娇等2011)、软枣猕猴桃(王佳卉2014)、柑橘(韩国辉2012)、核桃(齐建勋等2011)、香蕉(王静毅等2008)、甘蔗(黄启星等2012)、杜鹃(李美芹等2016)等。

分子标记技术在越橘研究上也有一定的应用(Debnath等2012)。Aruna等(1993)利用RAPD (random amplified polymorphic DNA)标记对19个兔眼越橘品种的亲缘关系进行了分析; Boches等(2006)使用20个EST-SSR和8个基因组SSR引物, 区分了60多个越橘品种(系), 其中包括半高丛品种群、南高丛品种群、北高丛品种群、野生品系; 於虹等(2009)利用ISSR (inter simple sequence repeat)分子标记对由北美引种到南京的7个南高丛越橘品种、9个南高丛越橘实生选择系、12个兔眼越橘品种进行了分子鉴别和亲缘关系分析; 崔建民等(2010)利用SSR技术对93份越橘种质资源的遗传多样性和亲缘关系进行了分析; Schlautman等(2015)利用ISSR、EST-SSR、EST-PCR对102个野生蔓越橘和5个栽培蔓越橘品种进行了遗传多样性研究。

本研究拟对NCBI公共数据库中的越橘EST序列进行SSR位点分析, 解析越橘EST-SSR的发生频率和特点, 开发新的EST-SSR引物, 并对越橘种质

收稿 2017-10-09 修定 2018-02-08

资助 吉林省科技发展计划项目(20160203009NY、20170414023-GH、20180201076NY)和吉林省省级产业创新专项资金项目(2018C011)。

* 通讯作者(blueberryli@163.com)。

资源进行遗传多样性分析, 以期为越橘种质资源的利用和育种实践提供有效的分子标记手段。

1 材料与方法

1.1 植物材料

本试验所用的84份越橘(*Vaccinium*)种质资源(表1)取自吉林农业大学小浆果资源圃, 包括矮丛越橘(*V. angustifolium* Aiton)、半高丛越橘(*V. corymbosum* L.×*V. angustifolium* Aiton)、南高丛越橘(*V. australe* Small)、北高丛越橘(*V. corymbosum* L.)、红豆越橘(*V. vitis-idaea* L.)。取新鲜幼嫩叶片, 经液氮处理后置于-80℃超低温冰箱保存。

1.2 基因组DNA的提取

采用改良的CTAB法(栾雨时和包永明2005)提取越橘基因组DNA, 用0.8%的琼脂糖凝胶电泳检测DNA质量, 在凝胶成像系统中观察并拍照记录。用紫外分光光度计在260和280 nm处检测DNA的吸光度, 测定DNA浓度和纯度。根据DNA原液浓度, 将每份样品的DNA稀释到终浓度100 ng·μL⁻¹, 于-20℃冰箱中保存备用。

1.3 EST获取与处理

从NCBI公共数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)下载越橘属EST序列, 利用CAP3程序进行序列拼接。

1.4 SSR位点的鉴定

使用简单序列重复识别工具SSRIT (simple sequence repeat identification tool, <http://gramene.org/db/markers/ssrtool>)筛选SSR; 搜索SSR位点的标准是二核苷酸最少重复6次, 三核苷酸最少重复5次, 四核苷酸及以上最少重复4次。

1.5 EST-SSR引物设计

引物设计原则为: SSR位点距序列两端大于50 bp, 引物(G+C)含量为40%~60%, 引物长度为18~24 bp, 复性温度为50~60℃, 上下游引物复性温度相差小于5℃, 产物片段大小为150~350 bp。用Primer Premier 5.0软件设计81对引物, 即NX-1~81(冯怡等2011)。

1.6 EST-SSR引物筛选

将设计的ESR-SSR引物交由苏州金唯智生物科技有限公司合成。选择‘蓝丰’、‘美登’、‘北陆’

表1 供试越橘种质资源

Table 1 The list of *Vaccinium* germplasm for test

编号	品种(系)	种	编号	品种(系)	种	编号	品种(系)	种	编号	品种(系)	种
1	‘蓝丰’	①	22	‘日升’	①	43	‘HL5’	①	64	‘美登’	④
2	‘瑞蓝’	①	23	‘奥林匹亚’	①	44	‘HL9’	①	65	‘斯卫克’	④
3	‘康维尔’	①	24	‘早蓝’	①	45	‘HL11’	①	66	‘芬蒂’	④
4	‘艾朗’	①	25	‘都克’	①	46	‘种植者’	①	67	‘坤蓝’	④
5	‘蓝线’	①	26	‘晚蓝’	①	47	‘鲁贝尔’	①	68	‘芝妮’	④
6	‘蓝乐’	①	27	‘吉拉’	①	48	‘维口’	①	69	‘CA-206’	④
7	‘斯巴坦’	①	28	‘爱玛蓝’	①	49	‘米德’	①	70	‘NB-3’	④
8	‘埃利奥特’	①	29	‘瑞卡’	①	50	‘吉早’	①	71	‘伊妹儿’	④
9	‘奈尔森’	①	30	‘考林’	①	51	‘钱德勒’	①	72	L11杂交后代	④
10	‘奇伯瓦’	③	31	‘绚丽’	①	52	‘北春’	③	73	L13杂交后代	④
11	‘达柔’	①	32	‘普鲁’	①	53	‘北空’	③	74	‘甜心’	①
12	‘蓝塔’	①	33	‘奴依’	①	54	‘北蓝’	③	75	‘自由’	①
13	‘北极星’	③	34	‘伯林’	①	55	‘北陆’	③	76	‘奥罗拉’	①
14	‘伯克利’	①	35	‘博尼法西’	①	56	‘慧蓝’	③	77	‘德雷珀’	①
15	‘泽西’	①	36	‘艾文豪’	①	57	‘5415’	③	78	‘比乐西’	②
16	‘雷格西’	①	37	‘艾玛’	①	58	‘圣云’	③	79	‘久比力’	②
17	‘麦格’	①	38	‘Small Fruit’	①	59	‘蓝金’	③	80	‘蓝天’	①
18	‘喜莱’	①	39	‘Jgdrzej’	①	60	‘普特’	③	81	‘哈迪蓝’	①
19	‘赫伯特’	①	40	‘HL2’	①	61	‘MS’	①	82	‘娜娜’	⑤
20	‘布里吉塔’	①	41	‘HL3’	①	62	‘0901’	①	83	‘布鲁赫罗西’	⑤
21	‘托柔’	①	42	‘HL4’	①	63	‘0902’	①	84	‘北国红霞’	⑤

①: 北高丛越橘(*V. corymbosum*); ②: 南高丛越橘(*V. australe*); ③: 半高丛越橘(*V. corymbosum*×*V. angustifolium*); ④: 矮丛越橘(*V. angustifolium*); ⑤: 红豆越橘(*V. vitis-idaea*)。

用于引物筛选。PCR反应体系为20 μL , 含10 \times PCR buffer (Mg^{2+} Plus) 2 μL 、dNTPs (2.5 mmol $\cdot\mu\text{L}^{-1}$) 1.6 μL 、*Taq*酶(5 U $\cdot\mu\text{L}^{-1}$; TaKaRa) 0.1 μL 、DNA模板 (10 ng $\cdot\mu\text{L}^{-1}$) 0.4 μL 、上下游引物各0.8 μL 、 ddH_2O 14.3 μL 。PCR扩增程序为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性1 min; 然后进行33个循环, 每个循环包括95 $^{\circ}\text{C}$ 变性30 s, 50~60 $^{\circ}\text{C}$ 退火30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸30 s; 循环结束后72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸5 min。

PCR反应产物利用6%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 上样完毕后在300 V电压下电泳1 h, 电泳结束后进行银染显色, 干燥后用Alpha Imager HP凝胶成像系统拍照记录。

1.7 多态性检测及聚类分析

对PCR扩增效果较好的引物进行越橘种质资源多态性分析, 反应条件及反应程序同1.6节, 根据不同引物组合调整退火温度。电泳结果用DL 1 000 DNA marker进行比对, 确定DNA片段的相对大小, 在相同迁移位置有扩增条带的记作1, 无扩增条带的记作0, 建立0、1矩阵。根据SSR位点统计信息, 利用NTSYSpc 2.10 e软件获得样品间的遗传相似度, 并以此进行聚类分析, 构建聚类树。

2 实验结果

2.1 越橘EST中SSR的总体特点及出现频率

从NCBI公共数据库下载22 402条越橘属EST序列, 通过CAP3组装软件将EST序列拼接成11 541条unigene序列, 总长度为7 275 463 bp, 平均长度为630 bp, 包括3 358条contigs和8 183条singlets。对unigene序列进行SSR搜索, 结果显示, 共检索到2 679个SSR位点, 占全部unigene序列总数的23.21%; 含SSR位点的unigene序列共计2 076条, 占总序列数的17.99%。在这2 076条序列中, 发现包含2个SSR位点的unigene序列361条, 包含3个SSR位点的有80条, 包含4个SSR位点的有17条, 包含5个SSR位点的序列有6条。

检测出的2 679个SSR位点中, 从二核苷酸至七核苷酸重复都有出现, 但各核苷酸出现的频率不同。二核苷酸和三核苷酸重复类型占主导地位, 共占SSR总位点数的96.01%; 其次是四核苷酸、六核苷酸、五核苷酸重复, 占SSR总位点数的4.60%; 而七核苷酸重复最少, 仅占0.04% (表2)。

表2 越橘EST中SSR出现频率

Table 2 Frequency of SSRs occurred in ESTs of *Vaccinium*

重复类型	基元种数	SSR位点数	占全部SSR位点的比例/%
二核苷酸	11	2 007	74.92
三核苷酸	54	565	21.09
四核苷酸	41	52	1.94
五核苷酸	20	26	0.97
六核苷酸	27	28	1.05
七核苷酸	1	1	0.04
总计	154	2 679	100.00

2.2 越橘的EST-SSR特性

搜索的越橘EST-SSR中, 共观察到154种重复基元, 其中三核苷酸和四核苷酸重复种类最多, 分别为54和41种, 其次为六核苷酸、五核苷酸、二核苷酸重复, 分别为27、20、11种(表2), 七核苷酸重复种类最少, 仅为1个GAAGAAG。而在重复类型中, 虽然三核苷酸的重复种类多, 占总重复基元类型总数的35.06%, 但是出现频率却低于二核苷酸, 仅占二核苷酸SSR位点的28.15%。在二核苷酸重复基元中, 以CT/AG重复基元最多, 其次是TC/GA。三核苷酸重复基元类型中以GAA/TTC、AGA/TCT这两种类型所占比例最高, 为三核苷酸的主要重复基元。在所有重复基元中CT/AG出现频率最高, 其次为TC/GA、AG/CT、GA/TC (表3)。

由图1可以看出, 不同核苷酸数目的重复基元的重复次数差异很大。二核苷酸重复基元组成的SSR共有14种重复次数类型, 主要为6次重复; 三核苷酸重复基元组成的SSR有14种重复次数类型, 主要为5次重复; 4次及4次以上核苷酸重复基元组成的SSR共5种重复次数类型, 主要为4次重复。在所有核苷酸重复次数中, 以6次重复为主要重复次数, 其次是5次重复, 而18次重复最少, 可见随着组成SSR重复基元核苷酸数目的不断增多, 重复基元的重复次数减少。

由图2可以看出, 越橘EST-SSR的位点长度主要集中在11~15 bp, 其次是16~20 bp, ≥ 36 bp的很少。其中, 分布在11~15 bp的有1 148个, 占总数的42.85%; 16~20 bp的有542个, 占总数的20.23%; 21~25 bp的有357个, 占总数的13.33%; 26~30 bp的有208个, 占总数的7.76%; 31~35 bp的有219个, 占总数的8.17%; 36~40 bp的有67个, 占总数的2.50%, 而长度 ≥ 41 bp的有138个, 占总数的5.15%。

表3 越橘EST中SSR重复基元的特点

Table 3 Characteristics of SSR repeat motifs in *Vaccinium* ESTs

重复类型	重复基元	数量	发生频率/%	所占比例/%	重复类型	重复基元	数量	发生频率/%	所占比例/%
二核苷酸	AC	15	0.56	0.75	四核苷酸	ATGG	1	0.04	1.92
	AG	386	14.41	19.23		ATGT	1	0.04	1.92
	AT	26	0.97	1.30		ATTT	1	0.04	1.92
	CA	32	1.19	1.59		CAAC	1	0.04	1.92
	CT	635	23.70	31.64		CCAA	1	0.04	1.92
	GA	338	12.62	16.84		CCAT	2	0.07	3.85
	GT	7	0.26	0.35		CCTC	1	0.04	1.92
	TA	29	1.08	1.44		CCTT	1	0.04	1.92
	TC	500	18.66	24.91		CTCC	1	0.04	1.92
	TG	35	1.31	1.74		GAAA	2	0.07	3.85
三核苷酸	CG	2	0.07	0.10	GAGC	1	0.04	1.92	
	GC	2	0.07	0.10	GATC	1	0.04	1.92	
	AAC	9	0.34	1.59	GATT	1	0.04	1.92	
	AAG	26	0.97	4.60	GCGA	1	0.04	1.92	
	ACA	8	0.30	1.42	GCTC	1	0.04	1.92	
	ACC	7	0.26	1.24	TACA	2	0.07	3.85	
	ACG	7	0.26	1.24	TATC	1	0.04	1.92	
	ACT	3	0.11	0.53	TATG	1	0.04	1.92	
	AGA	40	1.49	7.08	TCGC	1	0.04	1.92	
	AGC	13	0.49	2.30	TCTC	1	0.04	1.92	
	AGG	12	0.45	2.12	TGAA	1	0.04	1.92	
	AGT	2	0.07	0.35	TGAG	1	0.04	1.92	
	ATA	2	0.07	0.35	TGTT	2	0.04	3.85	
	ATC	1	0.04	0.18	TTAA	1	0.04	1.92	
	ATG	8	0.30	1.42	TTCT	1	0.04	1.92	
	ATT	3	0.11	0.53	TTGA	1	0.04	1.92	
	CAA	11	0.41	1.95	TTGC	1	0.04	1.92	
	CAC	24	0.90	4.25	TTTA	2	0.07	3.85	
	CAG	23	0.86	4.07	TTTC	1	0.04	1.92	
	CAT	3	0.11	0.53	TTTG	1	0.04	1.92	
	CCA	26	0.97	4.60	五核苷酸	AAAAC	2	0.07	7.69
	CCG	22	0.82	3.89		AAAAG	2	0.07	7.69
	CCT	21	0.78	3.72		AAACT	2	0.07	7.69
	CGA	8	0.30	1.42		AAATA	1	0.04	3.85
	CGC	1	0.04	0.18		AAGAA	2	0.07	7.69
	CGG	8	0.30	1.42		AATCA	1	0.04	3.85
	CGT	2	0.07	0.35		AGAAA	1	0.04	3.85
	CTA	2	0.07	0.35		AGGAG	1	0.04	3.85
	CTC	22	0.82	3.89		AGTTT	1	0.04	3.85
	CTG	9	0.34	1.59		CTCTC	1	0.04	3.85
	CTT	21	0.78	3.72		GCATC	1	0.04	3.85
	GAA	48	1.79	8.50		TCCGC	1	0.04	3.85
GAG	13	0.49	2.30	TCCTC		1	0.04	3.85	
GAT	6	0.22	1.06	TCTCT		1	0.04	3.85	
GCA	13	0.49	2.30	TCTGG		1	0.04	3.85	
GCC	3	0.11	0.53	TCTTC		1	0.04	3.85	
GCG	4	0.15	0.71	TGTCG	1	0.04	3.85		
GCT	5	0.19	0.88	TTGGT	3	0.11	11.54		
GGA	14	0.52	2.48	TTTCT	1	0.04	3.85		
GGC	10	0.37	1.77	TTTGG	1	0.04	3.85		

表3 (续)

重复类型	重复基元	数量	发生频率/%	所占比例/%	重复类型	重复基元	数量	发生频率/%	所占比例/%
四核苷酸	GGT	4	0.15	0.71	六核苷酸	AAAAAT	2	0.07	7.14
	GTC	4	0.15	0.71		AAACAG	1	0.04	3.57
	GTG	9	0.34	1.59		AAAGAA	1	0.04	3.57
	TAA	4	0.34	0.71		AACAAT	1	0.04	3.57
	TAC	1	0.04	0.18		AACCCT	1	0.04	3.57
	TAT	1	0.04	0.18		AAGGAG	1	0.04	3.57
	TAG	1	0.04	0.18		AAGGTC	1	0.04	3.57
	TCA	4	0.15	0.71		AGATAG	1	0.04	3.57
	TCC	12	0.45	2.12		AGGCCG	1	0.04	3.57
	TCT	21	0.78	3.72		CAACAG	2	0.07	7.14
	TGA	1	0.04	0.18		CAGAAA	1	0.04	3.57
	TGC	4	0.15	0.71		CCCCAT	1	0.04	3.57
	TGG	15	0.56	2.65		CCCCCG	1	0.04	3.57
	TTA	3	0.11	0.53		CCGTGT	1	0.04	3.57
	TTC	17	0.63	3.01		CCTGCT	1	0.04	3.57
	TTG	4	0.15	0.71		CTCCCT	1	0.04	3.57
	AAAG	2	0.07	3.85		CTCCTG	1	0.04	3.57
	AAAT	4	0.15	7.69		CTCTCC	1	0.04	3.57
	AAGA	3	0.11	5.77		CTCTCT	1	0.04	3.57
	AAGG	1	0.04	1.92		GTCACA	1	0.04	3.57
	AATA	1	0.04	1.92		TATCTA	1	0.04	3.57
	ACGA	1	0.04	1.92		TCCAAA	1	0.04	3.57
	AGAA	1	0.04	1.92		TCCGTG	1	0.04	3.57
	AGAC	1	0.04	1.92		TGAAGA	1	0.04	3.57
ATAC	1	0.04	1.92	TTTAAT	1	0.04	3.57		
ATAT	1	0.04	1.92	TTTTTC	1	0.04	3.57		
ATCC	1	0.04	1.92	七核苷酸	GAAGAAG	1	0.04	100.00	

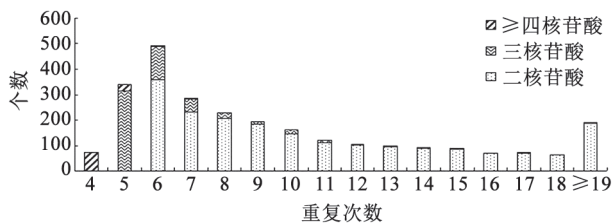


图1 越橘EST中不同SSR重复基元的重复次数分布情况
Fig.1 The distribution of repeat number of different SSR repeat motifs in *Vaccinium* ESTs

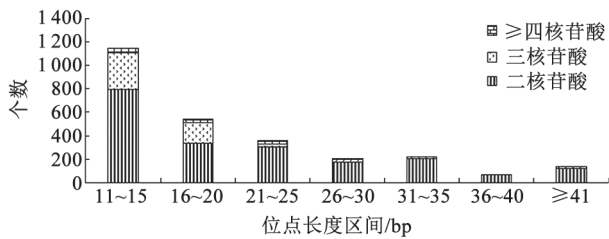


图2 越橘EST序列中SSR位点长度分布
Fig.2 The length distribution of SSR loci in *Vaccinium* ESTs

2.3 越橘EST-SSR引物的有效性检测及多态性分析

在81对符合引物筛选条件的EST-SSR引物中, 有55对引物均扩增出理想的PCR产物, 有效扩增率为67.91%, 说明利用越橘EST序列开发EST-SSR分子标记是可行的。图3为引物NX-24的扩增情况, 其他不同引物的扩增及其显示的多态性见表4。

2.4 越橘种质资源的遗传多样性分析

为了评价所开发的EST-SSR标记的可利用性, 用具有SSR位点的55对引物对84个越橘种质进行聚类分析。遗传关系分析结果表明, 这些引物可以将84个越橘种质区分开来, 且种质遗传相似系数在0.70~0.97, 说明越橘84份种质资源的遗传多样性较低。聚类结果基本符合越橘分类, 表明EST-SSR分子标记可应用于越橘品种的聚类分析和遗传多样性分析。在遗传相似系数为0.70时, 可以将84个越橘种质可分为两大类, 第I类为81个越橘种质; 第II类为3个红豆越橘品种。在遗传相似系数

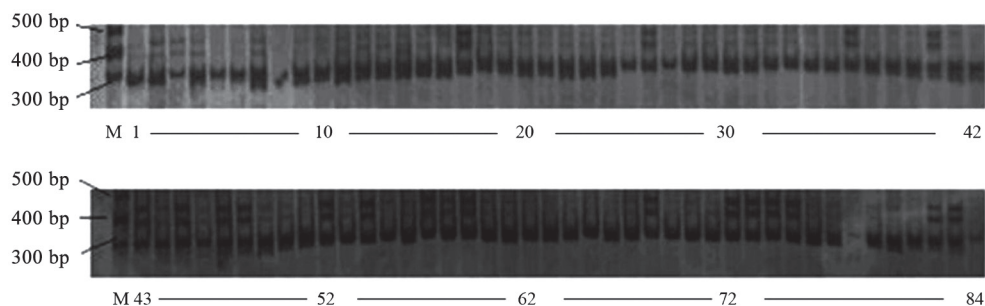


图3 用引物NX-24扩增的84个越橘品种的PCR产物

Fig.3 PCR amplification profile in 84 *Vaccinium* germplasms by NX-24 primers

M: DL 500 DNA marker; 1~84: 84个越橘种质的编号。

为0.81时,第1类的81个越橘种质被分为3个亚类:第1亚类是以高丛越橘为主,包含北高丛越橘、半高丛越橘、高丛越橘的杂交后代,94%的越橘种质被聚为一类,反映出这些种质具有较相似的遗传背景;第2亚类为矮丛越橘,分别为‘坤蓝’、‘芬蒂’、‘斯卫克’、‘CA-206’、‘芝妮’;第3亚类为北高丛越橘中的‘艾文豪’和‘钱德勒’(图4)。

3 讨论

本研究通过CAP3软件对NCBI公共数据库的22 402条越橘属EST序列进行去冗余和SSR位点搜索,得到了2 679个SSR位点,占全部unigene序列总数的23.21%,这与柑橘的21.6% (Jiang等2006)相似,远远高于草莓的2.67% (董清华等2011)、香蕉的5.3% (王静毅等2008)、甘蔗的7.26% (黄启星等2012)、梅的9.24% (上官凌飞等2010)、荔枝的16.53% (孙清明等2011)。造成这种差异的主要原因可能是物种间SSR位点的真实差异。前人研究表明,绝大多数植物以二核苷酸和三核苷酸为主要重复类型(Rota等2005),如香蕉(王静毅等2008)、甘蔗(黄启星等2012)等。本研究发现,越橘中二核苷酸类型(74.92%)的频率高于三核苷酸重复类型(21.09%),这与Sook等(2005)、孙清明等(2011)的结果相似。

本研究设计的81对引物中有55对具有扩增产物,引物有效扩增率为67.91%,且这55对引物均有多态性,占可扩增引物的100%。董清华等(2011)根据草莓EST-SSR设计60对引物,其中42对引物具有扩增产物,引物有效扩增率为70%,其中36对引物

具多态性,占可扩增引物的85.7%。可见与草莓相比,越橘EST-SSR引物有效扩增率稍低,但是引物多态性所占比例高。这可能是部分引物设计的EST序列对应的基因组序列上含有内含子,从而引起引物间序列过长或引物无法与模板DNA互补配对,导致PCR无法正常扩增所致。

Boches等(2006)以北高丛越橘的1 305条EST序列和136条基因组序列为基础开发SSR引物,而本研究采用NCBI上的22 402条越橘属EST序列作为SSR引物设计来源,这批新开发的引物将为越橘属植物的遗传资源研究提供新的分子工具。本研究新开发的55对引物用于84份越橘品种间的遗传多样性分析,相似系数为0.70~0.97,高于崔健民等(2010)的0.09~0.88。半高丛越橘是高丛越橘和矮丛越橘的中间类型,在本研究中半高丛越橘品种和高丛越橘品种聚在同一类中,说明半高丛越橘携带有更多高丛越橘的遗传信息,因而与高丛越橘品种亲缘关系较近,这与崔健民等(2010)的研究相一致。另外,‘艾文豪’和‘钱德勒’为北高丛越橘,但聚类结果未将两者与高丛越橘聚为一类,这可能是由于北高丛越橘种群不仅具有伞房花越橘(*V. corymbosum*)的遗传来源,一些北高丛越橘种群也具有狭叶越橘(*V. angustifolium*)等其他野生越橘的遗传背景,因而在分子水平分类上表现出了差异。从总体来看,目前的越橘品种多为种内杂交或种间杂交,野生越橘资源利用不够丰富,今后的育种工作应重视野生越橘种质资源的利用,重视种、属、组之间的杂交,扩大现有越橘品种的遗传背景。

表4 55对越橘EST-SSR多态性引物的特征

Table 4 Characteristics of the 55 polymorphic EST-SSR primers from *Vaccinium*

引物编号	引物序列(5'→3')	重复基元	退火温度/°C	预期产物长度/bp	扩增条带数	多态性条带数	多态率/%
NX-1	CCATTCAATACAGGAGGCT GTAGGGTTCCACCAGAGG	(GA) ₆	47.5	178	4	4	100.00
NX-2	TTCCACGACGGCAACATC TCAGCATCACCAGCACCA	(TTA) ₅	47.5	338	7	7	100.00
NX-3	CCATTGAAGCCCTAACAC CATCATCAGGACGAGCAG	(TC) ₈	44.5	179	9	4	44.44
NX-4	CTTACCAAAGCAGCAGAC ATGAGCACCAACAGAATG	(GCA) ₅	43.0	164	5	3	60.00
NX-5	ATCCGAACCTCAGTTACAT GGAGTCAACCGAACATAAC	(TC) ₁₇	45.0	308	7	6	85.71
NX-6	ATTGCTCCCCTCTATC CAACAAAACGGCTTCTTAC	(CTCCTG) ₄	45.0	163	7	4	57.14
NX-7	GACCAATACCCAGACAAC ATCCGACCACTACAACAT	(TC) ₁₀	43.0	333	4	4	100.00
NX-8	GTGTTGGTGGCAAAGAGC AGTTGGCATCCATCCTGT	(TTG) ₅	45.0	167	8	3	37.50
NX-9	CGCACATTGAGGAGCATA TTCTCGGACGGAACTGAT	(GAA) ₅	47.0	256	10	10	100.00
NX-10	GCGGAGTCATCGGAGTAT GGTGGTAAGTGGACGGTAG	(CT) ₈	47.0	239	4	3	75.00
NX-11	TCTTCGCATTACTGACGG TGTCTGGTAAAGCCTCCTC	(CT) ₁₂	45.0	190	5	3	60.00
NX-12	CCTTTATCGCAGCCTCTTAT CACAACCAATCCGTCCTTAC	(CTT) ₅	49.5	195	2	1	50.00
NX-13	TGGCGGGACAGATGGTTA ATGCTGCGAGGATGGGTA	(AGG) ₅	50.0	252	8	4	50.00
NX-14	CAACCGCATCTACAAACA AACTGCCAACCTTACCTT	(AG) ₆	43.0	346	5	3	60.00
NX-15	TTGCGTGTGTGGGTCTT AATGGCGTGGTAAATCTG	(CT) ₁₅	44.0	235	9	8	88.89
NX-16	CAACAGCAGAATGGGACG CAGTGAACGACAAATCA	(CCA) ₅	48.5	293	5	1	20.00
NX-17	TGATGAACTTCCCTCCGTCTT ACCGAACCTCGCCTTTGT	(AGC) ₅	53.0	271	4	2	50.00
NX-18	CCAAGATGGAGGAGGAGA GGTGATGCTGATGGGTAT	(CAC) ₈	44.5	312	11	8	72.73
NX-19	GTAGAGGCACGATTGGA CTGACGGACGCTTGATA	(TC) ₇	48.5	179	6	3	50.00
NX-20	TTCGTCCGAGTGAGTGTT ATTCCGAGTCGCCATTAC	(CT) ₁₂	45.5	318	6	3	50.00
NX-21	GAAGTGCAGAGAAGAGGAG CAGAAGAGCAAGGGAAGA	(GA) ₁₃	44.0	301	9	7	77.78
NX-22	CAACAAACTCTCCCTACT TTCCTGCCAAACATACCT	(AG) ₇	44.5	286	3	2	66.67
NX-23	CTCAACCCTATCTCCCTC ATCTACAACGGCAACCTC	(CT) ₁₁	44.5	225	7	6	85.71
NX-24	AACCCATCTCCATTACC TGCCATTAGAACTCGTC	(AGA) ₅	45.5	292	3	1	33.33
NX-25	ATTCGCTCTACATCGC TTGTGCTTGAACGCCTCT	(AG) ₁₅	50.5	282	2	1	50.00
NX-26	GACCCTTCTCCACTAACA CCGCCACTTCATCATCTT	(TC) ₉	43.5	203	9	7	77.78
NX-27	ACCTCCTGCTGTCGTCTT TCTCCACCTCATCCCAAT	(CT) ₆	44.5	248	9	9	100.00

表4 (续)

引物编号	引物序列(5'→3')	重复单元	退火温度/°C	预期产物长度/bp	扩增条带数	多态性条带数	多态率/%
NX-28	CCTCACTGACCGTCGTAT CTCCATCACTGTCCACCA	(CT) ₉	45.0	196	6	5	83.33
NX-29	ACCTGCTTGCTTTGTCTC GTATCAATCCAGCCCTCT	(TGC) ₅	46.5	254	4	3	75.00
NX-30	GTCGTCCTGTCCTCGTTC TTATTCCGTTTCGCTTCC	(CCT) ₅	45.0	257	6	5	83.33
NX-31	TGGAGTTATTGGGTATTTCG CTGCCGTCGTAGTAGTTT	(CAT) ₆	43.5	198	8	6	75.00
NX-32	GATTCAACCCTCTACCAACC ACCAAAGCCCGAACAAAG	(TTC) ₅	49.0	255	5	3	60.00
NX-33	CGAATACTTGAAGAGGTGCTG TGTTGGTTGGGATTGAGA	(CT) ₉	49.0	330	3	2	66.67
NX-34	ACAAGGGAAAGTGGAAGG GTGCGTCATCAACATCGTC	(CGA) ₆	46.0	342	7	6	85.71
NX-35	CAACAACCTCTCCTCCCTCA CAACACCACGACATCTTCTC	(GAA) ₇	49.0	247	6	3	50.00
NX-36	TGGTGGCACTCTTGGATA GAAAGCCTGTAATGGATG	(TC) ₁₆	52.0	181	5	3	60.00
NX-37	GGGCACAACAAAGAGGAG CACAAGCGGAGATGAAGC	(CCT) ₅	47.5	194	5	4	80.00
NX-38	CAGAGCACAGCGAACAAAG AGAGGAAGTGGGCAGAAC	(CT) ₆	47.0	222	13	8	61.54
NX-39	TCAGACCACCAAGCAAAC ATGGGAATCCACAAGTAGG	(TC) ₉	46.5	256	2	1	50.00
NX-40	ACGCATTGAAGGAGAAAAG AAGGTTGGACCACGCTAT	(AG) ₁₉	42.0	302	6	6	100.00
NX-41	AGGGACAAAAGTAGGTGAA GGATGAATCTGCTCGTAT	(GA) ₁₀	41.5	269	10	6	60.00
NX-42	CGCCTGTTCTTACTTGGT TCTTTGGCTTCTCCTCTA	(GA) ₁₁	44.5	350	6	3	50.00
NX-43	GCTTCTTACACCCAACGG AAGGCACATCTACTCCAATC	(GA) ₁₆	47.5	190	6	2	33.33
NX-44	GGCTGGTTTCTGCTGGAT CCCTTTAGATTGGGTGTC	(AG) ₁₇	45.5	151	3	3	100.00
NX-45	GAATCCCAGCGTCACAGA GACAGAATCAGCCCAAGC	(TC) ₁₀	49.5	273	3	3	100.00
NX-46	CACCAACATTGCTCCTAC CATACTTCTTGCTCTG	(GA) ₁₁	41.5	331	6	6	100.00
NX-47	CTTGATGATGGCATTGTTG CCTTCTTGGGAGGGTAT	(CCG) ₇	45.0	163	7	7	100.00
NX-48	GCCAAACCAGCAGACAGT CAGCCGAGCAGTAACATC	(CT) ₂₁	47.0	289	5	3	60.00
NX-49	TAGCACGGTTCTGTTCCT GGTCCATCATCTTCCCT	(GA) ₇	41.0	161	9	3	33.33
NX-50	CACCCAAACAAGGTCAGC GGAAACGAGCACGAAAGT	(GA) ₁₉	45.5	265	5	5	100.00
NX-51	TTGACCGAAACCACTCTT AACCTGATAACCTGAAACT	(CT) ₁₈	43.0	164	10	10	100.00
NX-52	CCACAACACCTACCATC CTCATCAGCCTCTCCTT	(TC) ₁₄	44.5	277	8	5	62.50
NX-53	GCTTGGAGGCATAGTGAT GCAGTAAACGACCGAGGA	(TC) ₁₅	45.5	217	7	6	85.71
NX-54	ATTCCCAACCAACTCCAT CTCTTCTTCTTGCTCC	(AG) ₁₀	46.5	215	5	4	80.00
NX-55	GATTGTTGGTGGTTGGTA TTGTCATTCTTCCCTC	(GA) ₂₁	44.5	269	5	5	100.00

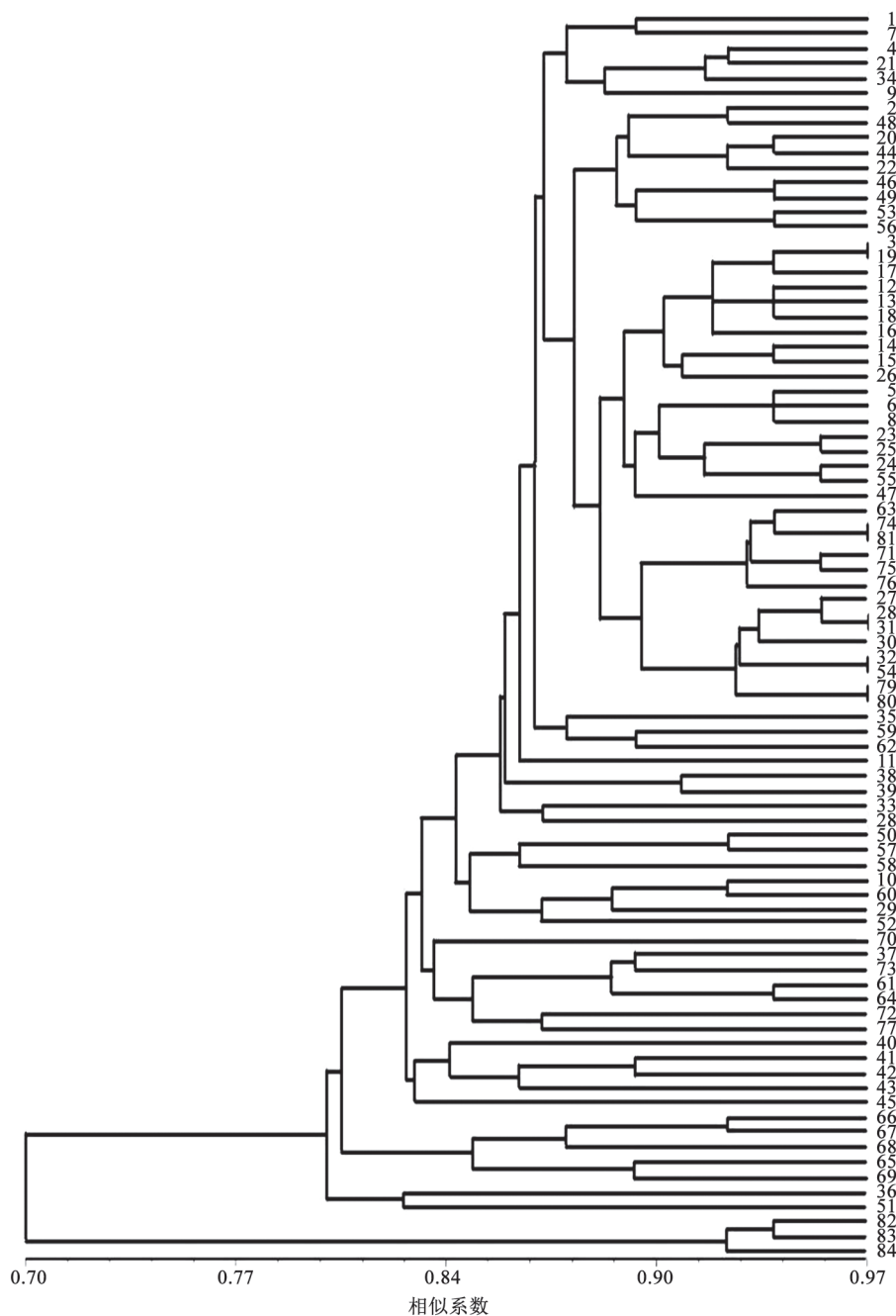


图4 84个越橘种质的聚类分析树状图

Fig.4 Dendrogram of 84 *Vaccinium* germplasms based on Dice's similarity coefficient

1~84: 84个越橘种质的编号。

参考文献(References)

Aruna M, Ozias-Akins P, Austin ME, et al (1993). Genetic relatedness among rabbiteye blueberry (*Vaccinium ashei*) cultivars determined by DNA amplification using single primers of arbitrary sequence. *Genome*, 36: 971-977

Boches P, Bassil NV, Rowland L (2006). Genetic diversity in

highbush blueberry evaluated with microsatellite markers. *J Am Soc Hortic Sci*, 131 (5): 676-686

Chen QQ, Zhan XJ, Lan JX, et al (2008). Study progress in development of EST (expressed sequence tags). *Chin Agric Sci Bull*, 24 (9): 72-77 (in Chinese with English abstract) [陈全球, 詹先进, 蓝佳祥等(2008). EST分子标记开发研究进展. *中国农业学通报*, 24 (9): 72-77]

- Cui HR, Liu JY, Tong ZG, et al (2010). Development and application of EST-SSRs in sand pear. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*, 30 (8): 1551–1556 (in Chinese with English abstract) [崔海荣, 刘金义, 佟兆国等(2010). 砂梨EST-SSR引物开发及其应用. *西北植物学报*, 30 (8): 1551–1556]
- Cui JM, Liu HX, Zhou RQ, et al (2010). Study on genetic diversity and phylogenetic relationship of germplasm resources about *Vaccinium* spp. *J Fruit Sci*, 27 (3): 373–378 (in Chinese with English abstract) [崔建民, 刘红霞, 邹荣任等(2010). 越橘种质资源遗传多样性和亲缘关系研究. *果树学报*, 27 (3): 373–378]
- Debnath SC, Siow YL, Petkau J, et al (2012). Molecular markers and antioxidant activity in berry crops: genetic diversity analysis. *Can J Plant Sci*, 92: 1121–1133
- Dong QH, Wang XC, Zhao MZ, et al (2011). Development of EST-derived SSR markers and their application in strawberry genetic diversity analysis. *Sci Agric Sin*, 44 (17): 3603–3612 (in Chinese with English abstract) [董清华, 王西成, 赵密珍等(2011). 草莓EST-SSR标记开发及在品种遗传多样性分析中的应用. *中国农业科学*, 44 (17): 3603–3612]
- Feng Y, Zhang ZJ, Zhang SL, et al (2011). Development of walnut EST-SSR markers and primer design. *J Anhui Agric Sci*, 39 (36): 22217–22219, 22276 (in Chinese with English abstract) [冯怡, 张智俊, 张舍龙等(2011). 胡桃EST-SSR标记的筛选及引物设计. *安徽农业科学*, 39 (36): 22217–22219, 22276]
- Han GH (2012). Construction of molecular linkage map and genetic analysis of hybrids and polyploidy of citrus based on EST-SSR, genomic-SSR and SCoT markers (dissertation). Chongqing: Southwest University (in Chinese with English abstract) [韩国辉(2012). 基于EST-SSR、Genomic-SSR和SCoT标记的柑橘连锁图谱构建及杂种和多倍体遗传分析(学位论文). 重庆: 西南大学]
- Hao R (1979). Investigation on the Du-si blueberry in the Chang-bai-shan mountain regions. *Acta Hortic Sin*, 6 (2): 87–93 (in Chinese with English abstract) [郝瑞(1979). 长白山笃斯越橘的调查研究. *园艺学报*, 6 (2): 87–93]
- Hemmat M, Weeden NF, Manganaris AG, et al (1994). Molecular marker linkage map for apple. *J Hered*, 85: 4–11
- Huang QX, Zhang YL, Wang JG, et al (2012). Data-mining and diversity analysis of EST-SSRs from sugarcane. *Chin J Trop Agric*, 32 (12): 33–42, 49 (in Chinese with English abstract) [黄启星, 张雨良, 王俊刚等(2012). 甘蔗EST-SSR标记的开发和多样性分析. *热带农业科学*, 32 (12): 33–42, 49]
- Jiang D, Zhong GY, Hong QB (2006). Analysis of microsatellites in citrus unigenes. *Acta Genet Sin*, 33 (4): 345–353
- Lewers KS, Saski CA, Cuthbertson BJ, et al (2008). A blackberry (*Rubus* L.) expressed sequence tag library for the development of simple sequence repeat markers. *BMC Plant Biol*, 8: 69–76
- Li HB, Wang S, Ding HM, et al (2017). Development of EST-SSR molecular markers based on transcriptome sequencing of *Camellia oleifera*. *Plant Physiol J*, 53 (7): 1267–1278 (in Chinese with English abstract) [李海波, 王珊, 丁红梅等(2017). 普通油茶转录组EST-SSR分子标记开发. *植物生理学报*, 53 (7): 1267–1278]
- Li MQ, Pan YY, Qian PX, et al (2016). Development of EST-SSR primers for azalea and genetic analysis of cultivars. *Plant Physiol J*, 52 (3): 356–364 (in Chinese with English abstract) [李美芹, 潘叶羽, 钱萍仙等(2016). 杜鹃花EST-SSR标记的开发及遗传多样性分析. *植物生理学报*, 52 (3): 356–364]
- Li SS, Sun CY, Jiang SC, et al (2014). SSR molecular markers and its applications in plant genetics and breeding. *Jilin Veg*, (5): 33–38 (in Chinese with English abstract) [李珊珊, 孙春玉, 蒋世翠等(2014). SSR分子标记及其在植物遗传育种中的应用. *吉林蔬菜*, (5): 33–38]
- Li YD, Liu HG, Zhang ZD, et al (2008). The current situation and development trend of China's blueberry industry. *China Fruits*, (6): 67–69, 71 (in Chinese) [李亚东, 刘海广, 张志东等(2008). 我国蓝莓产业现状和发展趋势. *中国果树*, (6): 67–69, 71]
- Liao J, Huang CH, Gu QQ, et al (2011). Mining and transferability analysis of EST-SSR primers in kiwifruit (*Actinidia* spp.). *J Fruit Sci*, 28 (6): 1111–1116 (in Chinese with English abstract) [廖娇, 黄春辉, 辜青青等(2011). 猕猴桃EST-SSR引物筛选及通用性分析. *果树学报*, 28 (6): 1111–1116]
- Luan YS, Bao YM (2005). Bioengineering Experimental Technical Manual. Beijing: Chemical Industry Press, 164–168 (in Chinese) [栾雨时, 包永明(2005). 生物工程实验技术手册. 北京: 化学工业出版社, 164–168]
- Luo B, Sun HY, Xu GM, et al (2013). Research progress of SSR molecular marker. *J Anhui Agric Sci*, 41 (12): 5210–5212, 5246 (in Chinese with English abstract) [罗兵, 孙海燕, 徐港明等(2013). SSR分子标记研究进展. *安徽农业科学*, 41 (12): 5210–5212, 5246]
- Morgante M, Hanafey M, Powell W (2002). Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes. *Nat Genet*, 30: 194–200
- Qi JX, Hao YB, Zhu Y, et al (2011). Studies on germplasm of *Juglans* by EST-SSR markers. *Acta Hortic Sin*, 38 (3): 441–448 (in Chinese with English abstract) [齐建勋, 郝艳宾, 朱艳等(2011). 核桃属种质资源的EST-SSR标记研究. *园艺学报*, 38 (3): 441–448]
- Rota LR, Kantety RV, Yu JK (2005). Nonrandom distribution and frequencies of genomic and EST-derived microsatellite markers in rice, wheat and barley. *BMC Genom*, 6 (1): 23
- Schlautman B, Fajardo D, Bouqie T, et al (2015). Development and validation of 697 novel polymorphic genomic and EST-SSR markers in the American cranberry (*Vac-*

- cinium macrocarpon* Ait.). *Molecules*, 20 (2): 2001–2013
- Shangguan LF, Li XY, Song CN, et al (2010). Development of EST-SSR markers in *Prunus mume* and its application. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*, 30 (9): 1766–1772 (in Chinese with English abstract) [上官凌飞, 李晓颖, 宋长年等(2010). 梅EST-SSR标记的开发及利用. 西北植物学报, 30 (9): 1766–1772]
- Song SW, Zhang HT, Zhang FM, et al (2013). Development of apple EST -SSR primers and phylogenetic analysis of some cultivars. *J Fruit Sci*, 30 (4): 509–515 (in Chinese with English abstract) [宋尚伟, 张恒涛, 张芳明等(2013). 苹果EST-SSR引物的开发及部分品种亲缘关系分析. 果树学报, 30 (4): 509–515]
- Sook J, Abbott A, Jesudurai C (2005). Frequency, type, distribution and annotation of simple sequence repeats in Rosaceae EST. *Funct Integr Genomics*, 5: 136–143
- Sun QM, Ma WC, Ma SP, et al (2011). Characteristics of SSRs derived from ESTs and development of EST-SSR markers in litchi (*Litchi chinensis* Sonn.). *Sci Agric Sin*, 44 (19): 4037–4049 (in Chinese with English abstract) [孙清明, 马文朝, 马帅鹏等(2011). 荔枝EST资源的SSR信息分析及EST-SSR标记开发. 中国农业科学, 44 (19): 4037–4049]
- Vander Kloet SP (1988). *The Genus Vaccinium in North America*. Ottawa: Canadian Government Publishing Centre Supply and Services, 201
- Wang HL, Zhang HQ, Xiao JP, et al (2010). A survey of blueberry breeding research. *J Zhejiang Agric Sci*, (3): 474–481 (in Chinese) [王慧亮, 张慧琴, 肖金平等(2010). 蓝莓育种研究概况. 浙江农业科学, (3): 474–481]
- Wang J, Zhao MZ, Yu HM, et al (2011). Development and utilization of EST-SSR marker in strawberry. *J Fruit Sci*, 28 (4): 721–726 (in Chinese with English abstract) [王静, 赵密珍, 于红梅等(2011). 草莓EST-SSR标记的开发与应用. 果树学报, 28 (4): 721–726]
- Wang JH (2014). Development of EST-derived SSR markers in *Actinidia arguta* and genetic diversity analysis (dissertation). Changchun: Jilin Agricultural University (in Chinese with English abstract) [王佳卉(2014). 软枣猕猴桃EST-SSR分子标记的开发及遗传多样性分析(学位论文). 长春: 吉林农业大学]
- Wang JY, Chen YY, Liu WL, et al (2008). Development and application of EST-derived SSR markers for bananas (*Musa nana* Lour.). *Hereditas*, 30 (7): 933–940 (in Chinese with English abstract) [王静毅, 陈业渊, 刘伟良等(2008). 香蕉EST-SSRs标记的开发与应用. 遗传, 30 (7): 933–940]
- Wang XC, Jiang SL, Shangguan LF, et al (2010). Development of EST-derived SSR markers for pear and evaluation of their application in pear genetic diversity analysis. *Sci Agric Sin*, 43 (24): 5079–5087 (in Chinese with English abstract) [王西成, 姜淑苓, 上官凌飞等(2010). 梨EST-SSR标记的开发及其在梨品种遗传多样性分析中的应用评价. 中国农业科学, 43 (24): 5079–5087]
- Yadav HK, Ranjan A, Asif MH, et al (2011). EST-derived SSR markers in *Jatropha curcas* L.: development, characterization, polymorphism, and transferability across the species/genera. *Tree Genet Genomes*, 7: 207–219
- Yan XQ, Lu M, An HM (2015). Analysis on SSR information in transcriptome and development of molecular markers in *Rosa roxburghii*. *Acta Horti Sin*, 42 (2): 341–349 (in Chinese with English abstract) [鄢秀芹, 鲁敏, 安华明(2015). 刺梨转录组SSR信息分析及其分子标记开发. 园艺学报, 42 (2): 341–349]
- Yu H, Gu Y, He SA, et al (2009). Identification of blueberry cultivars and evaluation of their genetic relationship by ISSR technique. *J Jilin Agric Univ*, 31 (5): 512–515 (in Chinese with English abstract) [於虹, 顾姻, 贺善安等(2009). 越橘品种的ISSR鉴定及其亲缘关系分析. 吉林农业大学学报, 31 (5): 512–515]

Development of EST-SSR molecular markers for *Vaccinium* and genetic diversity analysis

SUN Hai-Yue, GUO Rui-Xue, XU Jian, TIAN You-Wen, DONG Mei, DONG Kun, LI Ya-Dong*

College of Horticulture, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China

Abstract: A total of 22 402 *Vaccinium* EST sequences were downloaded from NCBI for analyzing 84 *Vaccinium* germplasms, and were assembled into 11 541 unigenes by CAP3 software. Among these unigenes, 2 076 unigenes contained 2 679 SSR loci. Di-nucleotide and tri-nucleotide repeats are major SSR type, accounting for 96.01% of the total SSRs. The 81 EST-SSR primers were designed by Primer Premier 5.0, of which 55 pairs of primers amplified expected PCR products and had polymorphic. Cluster analysis showed that 84 blueberry germplasms were grouped into two clusters at the genetic similarity coefficient of 0.70. The EST-SSR markers can be used for germplasm identification and genetic analysis in *Vaccinium*.

Key words: *Vaccinium*; molecular markers; EST-SSR; genetic diversity

Received 2017-10-09 Accepted 2018-02-08

This work was supported by the Project of Science and Technology Development of Jilin Province (20160203009NY, 20170414023GH and 20180201076NY) and Special Fund Project of Provincial Industrial Innovation in Jilin Province (2018C011).

*Corresponding author (blueberryli@163.com).