

越橘叶片转录组 SSR 发掘及其多态性研究

方茜, 张园园, 杨钰婷, 黄苗苗, 符巧丽, 周慧莎, 陈文荣, 宗宇*, 郭卫东*

(浙江省特色经济植物生物技术研究重点实验室, 浙江师范大学化学与生命科学学院, 浙江金华 321004)

摘要: 对高丛越橘品种‘布里吉塔’叶片转录组序列进行了简单重复序列 (SSR) 位点搜索和分析, 发现了 22 058 个 SSR 位点, 总发生频率为 21.32%。SSR 重复类型以二核苷酸发生频率最高 (77.70%), 三核苷酸次之 (21.45%)。选用 53 对 SSR 引物在 8 个越橘属植物中进行 PCR 扩增, 筛选出 15 对条带清晰且能稳定扩增的 SSR 核心引物。使用核心引物对 39 份越橘属种质进行分析, 有效等位基因数最大值为 7.11 (VcSSR19), 最小值为 1.41 (VcSSR41), 平均值为 3.90。香农多样性指数变化范围是 0.64 ~ 2.31, 平均值为 1.55。观察杂合度和期望杂合度的变化范围分别是 0.050 ~ 0.900 和 0.293 ~ 0.870, 平均值分别为 0.457 和 0.677。使用 5 对引物可以完全区分 39 份种质中的 38 份。南高丛越橘品种‘莱格西’和‘蓝雨’与蔓越橘品种、越橘属野生种具有更近的亲缘关系, 是与野生种进行杂交育种的合适种质。

关键词: 越橘; 转录组; SSR; 亲缘关系; 多态性

中图分类号: S 663.9

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2018) 07-1359-12

SSR Mining and Polymorphism Analysis in Leaf Transcriptome of Blueberry

FANG Qian, ZHANG Yuanyuan, YANG Yuting, HUANG Miaomiao, FU Qiaoli, ZHOU Huisha, CHEN Wenrong, ZONG Yu*, and GUO Weidong*

(Zhejiang Provincial Key Laboratory of Biotechnology on Specialty Economic Plants, College of Chemistry and Life Sciences, Zhejiang Normal University, Jinhua, Zhejiang 321004, China)

Abstract: Simple sequence repeat (SSR) loci were searched and analyzed in the leaf transcriptomic sequence of *Vaccinium corymbosum* ‘Brigitta’. The frequency of SSR was 21.32%, accounting for 22 058 SSR loci. The highest type of SSR motif was dinucleotides with the frequency of 77.70%, followed by trinucleotides with the frequency of 21.45%. Fifty-three random pairs of primers were used to perform polymerase chain reaction (PCR) in 8 accessions in *Vaccinium* genus. A total of 15 pairs of core primers with clear and stable amplification bands were screened from above primers. Genetic diversity of 39 accessions in genus of *Vaccinium* was estimated using the 15 core primers. The results showed that the maximum number of effective alleles was 7.11 (VcSSR19) and the minimum value was 1.41 (VcSSR41), with an average value of 3.90. The average of Shannon diversity index was 1.55, ranging from 0.64 to

收稿日期: 2018-01-02; **修回日期:** 2018-06-15

基金项目: 浙江省自然科学基金项目 (LQ16C150001); 浙江省农业新品种选育重大科技专项 (2016C02052-9); 浙江省“重中之重”学科生物学开放基金项目; 浙江师范大学博士基金科研项目

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: gw@zjnu.cn, yzong@zjnu.cn)

2.31. The range of observed heterozygosity and expected heterozygosity were 0.050 - 0.900 and 0.293 - 0.870, with mean values of 0.457 and 0.677, respectively. Five polymorphic loci could be used to distinguish 38 accessions. Southern highbush blueberry cultivars 'Legacy' and 'Bluerainare' were more closely related to cranberry cultivars and wild relatives of *Vaccinium*, which would be suitable cultivars for cross breeding with wild species in *Vaccinium*.

Keywords: blueberry; transcriptome; SSR; phylogenetic relationship; polymorphism

越橘 (blueberry) 是杜鹃花科 (Ericaceae) 越橘属 (*Vaccinium*) 植物, 原产于北美洲。自 20 世纪初期驯化栽培以来, 已在世界范围内广泛种植 (孙海悦和李亚东, 2014)。中国从 1983 年开始引种栽培并形成了东北地区、山东半岛、长江流域和云贵高原 4 个主产区。但是当前中国的越橘生产面临两个主要问题: (1) 品种名音译和意译同时存在, 导致种苗混乱, 使得种植户遭受重大经济损失 (徐娜 等, 2008; 郭照东 等, 2015); (2) 主栽品种几乎全部引自国外, 栽培过程中已经出现适应性差、建成果园逐年减产等情况。因此, 亟需建立越橘品种的快速高效鉴别方法, 筛选适合中国生态环境的新种质。

中国越橘属野生资源非常丰富, 已经报道的有 90 余种, 分属于 13 个不同的亚属, 集中分布在中国南部和西南地区 (方瑞征, 1986)。苍山越橘 (*V. delavayi*)、乌鸫果 (*V. fragile*)、无梗越橘 (*V. carlesii*)、乌饭树 (*V. bracteatum*) 和江南越橘 (*V. mandarinorum*) 等野生种具有耐湿热气候, 对生物胁迫和非生物胁迫耐受能力强等特性, 具有重要利用价值 (崔建民 等, 2010; 孙海悦和李亚东, 2014)。杂交过程中, 如果亲本遗传距离较远, 会出现授粉受精不良或杂交不育等现象; 亲缘关系过于密切又无法拓宽栽培品种的遗传背景; 因此准确评价杂交备选资源间的亲缘关系是资源利用的重要前提 (於虹 等, 2009; Bian et al., 2014; 刘有春 等, 2017)。

微卫星标记 (Simple sequence repeat, SSR) 已经广泛应用于果树指纹图谱构建 (陈昌文 等, 2011; 徐雷锋 等, 2014; 高源 等, 2016; 包文泉 等, 2017)、亲缘关系分析 (於虹 等, 2009; 郭照东 等, 2015) 和遗传多样性评价 (孙海悦 等, 2016; 叶宇芸 等, 2017) 等相关研究中, 但基于转录组的越橘 SSR 分子标记开发、特征图谱构建和亲缘关系分析等报道较少。

本研究中利用从越橘转录组中发掘的 SSR 引物, 以越橘品种、蔓越橘品种和越橘属野生种为材料进行了引物的有效性验证和遗传多样性分析, 并构建了部分越橘属植物的 SSR 特征图谱, 分析了越橘属植物间的亲缘关系, 以期越橘品种的快速鉴别和新种质的创建提供参考。

1 材料与方法

1.1 越橘属植物基因组 DNA 的提取

2016 年 5 月分别从云南、贵州、浙江等野外山区和浙江师范大学越橘属植物种质资源圃采集越橘属植物 39 份 (表 1), 每份样品取健康幼嫩叶片用于 DNA 提取。

采用改良 CTAB 法 (Doyle, 1987) 提取基因组 DNA, 使用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量, 使用微量分光光度计 NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, US) 测定 DNA 浓度, 并稀释至 $20 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 保存备用。

表 1 本研究中使用的 39 份越橘属植物
Table 1 Thirty-nine accessions in genus *Vaccinium* used in the present study

采集地 Sampling site	资源类型 Germplasm type	序号 Number	资源名称 Accession name
浙江师范大学越橘属植物种质资源圃 Germplasm nursery of plants in genus <i>Vaccinium</i> in Zhejiang Normal University	越橘品种 Blueberry cultivar	北高丛越橘品种 Northern highbush blueberry cultivar	1 伯克利 Berkeley
		2 蓝丰 Bluecrop	
		3 布里吉塔 Brigitta	
		4 杜克 Duke	
		5 艾克塔 Echota	
		6 埃利奥特 Elliott	
		7 泽西 Jersey	
		8 瑞卡 Reka	
		南高丛越橘品种 Southern highbush blueberry cultivar	9 安娜 Anna
		10 比洛克西 Biloxi	
		11 蓝雨 Bluerain	
		12 绿宝石 Emerald	
		13 海岸 Gulfcoast	
		14 珍珠 Jewel	
		15 莱格西 Legacy	
		16 盛世 Millennia	
		17 薄雾 Misty	
		18 奥尼尔 O'Neal	
		19 奥扎克蓝 Ozarkblue	
		20 晨号 Reveille	
		21 夏普蓝 Sharpblue	
		22 明星 Star	
		兔眼越橘品种 Rabbiteye blueberry cultivar	23 蓝美人 Bluebelle
		24 蓝宝石 Bluegem	
		25 贵蓝 Nobilis	
		蔓越橘品种 Cranberry cultivar	26 霍利斯特 Hollister
27 麦克法林 McFarlin			
28 贝恩 Bain			
29 史蒂文斯 Stevens			
云南苍山 Cangshan Mountain, Yunnan	越橘属野生种 Wild species	30 苍山越橘 <i>V. delavayi</i>	
贵州黔东南苗族侗族自治州 Dong Autonomous Prefecture, Guizhou	越橘属野生种 Wild species	31 乌鸢果 <i>V. fragile</i>	
昆明玉案山 Yu'an Mountain, Kunming	越橘属野生种 Wild species	32 江南越橘 <i>V. mandarinorum</i>	
云南西双版纳 Xishuangbanna, Yunnan	越橘属野生种 Wild species	33 云南越橘 1 <i>V. duclouxii</i> 1	
		34 云南越橘 2 <i>V. duclouxii</i> 2	
		35 云南越橘 3 <i>V. duclouxii</i> 3	
浙江凤阳山 Fengyang Mountain, Zhejiang	越橘属野生种 Wild species	36 无梗越橘 1 <i>V. henryi</i> 1	
		37 无梗越橘 2 <i>V. henryi</i> 2	
		38 乌饭树 1 <i>V. bracteatum</i> 1	
		39 乌饭树 2 <i>V. bracteatum</i> 2	

1.2 转录组数据来源

选取长势一致、无病虫害、具 2 个主枝的‘布里吉塔’高丛越橘 2 年生苗, 将其置于 1/2Hoagland 培养液中培养 7 d 后进行 150 mmol · L⁻¹ 氯离子胁迫处理, Cl⁻ 处理使用 MgCl₂、KCl、CaCl₂ 和 NH₄Cl 的混合溶液, 浓度设置参照 Kingsbury 和 Epstein (1986) 的报道, 以 1/2Hoagland 营养液培养处理作为对照。2014 年 7 月取对照和处理 2 d 后主枝中部的幼嫩叶片进行总 RNA 的提取和纯化, 每个处理重复 3 次。将纯化好的 RNA 反转录合成一链 cDNA, 使用 Illumina TruseqTM RNA sample prep Kit 方法构建文库, 利用 Hiseq2500 测序平台测序, 拼接得到 Unigene 库(数据未发表), 测序数据于 2014 年 11 月完成初步分析。

1.3 SSR 位点的检测和筛选

以组装后的 Unigene 为检索序列, 使用 Perl 语言脚本 MicroSatellite (MISA) (<http://pgrc.ipk-gatersleben.de/misa/>) 进行 SSR 位点检测。搜寻条件的设置为: 重复片段 2 ~ 6 个核苷酸, 2 个核苷酸重复的最小重复次数为 6 次, 其余核苷酸重复最小次数为 5 次。

1.4 SSR 引物设计和筛选

使用软件 BatchPrimer 3 (You et al., 2008) 对每条包含 SSR 位点的序列进行引物设计。初步筛选长度 18 ~ 28 bp, 退火温度 55 ~ 65 °C, 预期扩增产物长度 150 ~ 500 bp 的引物。将初筛后的引物与 Unigene 进行 BLAST 比对, 去除无效引物。随机挑选 53 对引物委托英潍捷基(上海)贸易有限公司合成。使用越橘品种‘贵蓝’、‘蓝丰’、‘珍珠’、‘奥尼尔’、夏普蓝’, 蔓越橘品种‘麦克法林’和‘贝因’以及越橘属野生种乌饭树 1 等 8 份种质对引物进行 PCR 预扩增, 选取条带清晰、大小吻合的引物作为预筛引物。用 39 份越橘属植物进行 SSR 有效性验证和遗传多样性分析, 筛选核心引物。SSR-PCR 参考 Schuelke (2000) 的方法, 反应条件、PCR 产物的处理以及 SSR 基因分型参考宗宇等 (2016) 的进行。

1.5 遗传多样性分析

使用 GenAlEx 6.501 (Peakall & Smouse, 2006, 2012) 计算 SSR 位点多态性参数——有效等位基因数 (Effective number of alleles)、香农多样性指数 (Shannon's diversity index)、观察杂合度 (Observed heterozygosity)、期望杂合度 (Expected heterozygosity) 和固定系数 (Fixation index)。观察杂合度和期望杂合度表示 SSR 位点中杂合态的加权比例, 其取值范围为 0 ~ 1; 固定系数表示 SSR 位点等位基因频率的变异系数, 其取值范围为 -1 ~ 1。对 39 份资源进行主坐标分析 (Principal Coordinates Analysis, PCoA), 使用 POPULATION 1.2 (Langella, 2000) 软件基于遗传距离 D_a (Nei et al., 1983) 构建聚类树, 通过主坐标分析和聚类树揭示不同越橘种质的亲缘关系和遗传背景。

2 结果与分析

2.1 越橘叶片转录组中的 SSR 类型及频率

在北高丛越橘‘布里吉塔’转录组中共发掘出 22 058 个 SSR 位点, 总发生频率为 21.32%, 主要有 5 种类型, 分别为: 二核苷酸、三核苷酸、四核苷酸、五核苷酸和六核苷酸, 其中以二核苷酸 (77.70%) 和三核苷酸 (21.45%) 为主 (表 2)。

表 2 越橘转录组序列中 SSR 重复类型和重复次数分布
 Table 2 Distribution of SSRs with different repeat types and repeat numbers in transcriptomic sequence of blueberry

重复类型 Repeat type	重复次数 Number of repeat									总数 Total	比例/% Percentage
	5	6	7	8	9	10	11	12	> 12		
二核苷酸 Dinucleotide	—	4 106	3 157	3 657	4 028	1 919	251	11	9	17 138	77.70
三核苷酸 Trinucleotide	2 870	1 242	561	49	0	1	2	3	5	4 733	21.45
四核苷酸 Tetranucleotide	124	12	0	0	0	0	0	0	3	139	0.63
五核苷酸 Pentanucleotide	23	3	1	1	0	2	0	0	2	32	0.15
六核苷酸 Hexanucleotide	10	4	0	0	0	0	0	2	0	16	0.07
总数 Total	3 027	5 367	3 719	3 707	4 028	1 922	253	16	19	22 058	
比例/% Percentage	13.72	24.33	16.86	16.81	18.26	8.71	1.15	0.07	0.09		100.00

在二核苷酸重复中, 以 AG/CT 重复基序最多, 占 91.2%, AC/GT 次之, 但仅占 6.10%。二核苷酸基序重复 6 次和 9 次的频率相近, 其次是重复 8 次的二核苷酸, 出现次数为 3 657 次。三核苷酸重复中, 重复 5 次的最多; 重复基序 AAG/CTT 所占的比例最高, 为 31.8%, 重复基序 AGG/CCT 次之, 但所占比例仅有 17.1% (表 3)。

2.2 SSR 引物的筛选及有效性验证

对所有包含 SSR 位点的序列进行引物设计, 共得到 9 306 对 SSR 引物, 去除不符合预设筛选要求的剩余 1 903 对。

表 3 越橘转录组序列中二核苷酸和三核苷酸基序分布比例
Table 3 Percentages of different repeat motifs among dinucleotide and trinucleotide repeats in transcriptomic sequence of blueberry

重复类型 Repeat type	重复基序 Repeat motif	所占比例/% Percentage
二核苷酸 Dinucleotide	AG/CT	91.2
	AC/GT	6.10
	AT/AT	2.40
	CG/CG	0.30
三核苷酸 Trinucleotide	AAG/CTT	31.8
	AGG/CCT	17.1
	ACC/GGT	14.0
	AGC/CTG	12.6
	ATC/ATG	6.95
	CCG/CGG	5.98
	ACG/CGT	4.52
	AAC/GTT	3.97
AAT/ATT	2.24	
	ACT/AGT	0.91

表 4 筛选出的 15 对 SSR 核心引物信息
Table 4 Information of 15 core SSR primers screened

SSR 位点 SSR locus	重复基序 Repeat motif	引物序列 (5'→3') Primer sequence	产物大小/bp Production size
VcSSR1	(GA) *8	F: <Tail>-ACGACCAACGGAAAAATGAG R: AAAAAATCAGGTTTCGGTTCCA	154 ~ 167
VcSSR11	(TCA) *5	F: <Tail>-GCTCCCTCTTTCGCTTCTTT R: CCCCAGAACTATCAGAGCAG	308 ~ 348
VcSSR14	(GT) *7	F: <Tail>-CAGTTGCACATCACCTTG R: ATGGATACATGGACCTTGCC	184 ~ 206
VcSSR18	(AC) *10	F: <Tail>-CTAATTCCTTCCCCAAACC R: TTCCCACTCCGTTGAGAAAC	346 ~ 390
VcSSR19	(CA) *6	F: <Tail>-CCAACCCTCGTACTCTTCCA R: CCCACCTCAGAAAACCGATA	364 ~ 430
VcSSR20	(CT) *6	F: <Tail>-ACACCAAAACCCAGCGGAT R: TTGTCAGGTTCCCGATCTTC	265 ~ 296
VcSSR28	(GT) *6	F: <Tail>-GCAGCGAACCTAAACTCAA R: ACGGAGCTGGCTCACACTAT	279 ~ 315
VcSSR33	(TC) *6	F: <Tail>-GGTTGGGTTTGCCTCTCTC R: ACGCCGTGATCTGCAGTAG	194 ~ 214
VcSSR35	(ACT) *6	F: <Tail>-CCCCACTACTACTTTGCCA R: TATGGCTACGGTTACGGAGG	203 ~ 212
VcSSR37	(CT) *6	F: <Tail>-GCCGCGATACCTTCAAAC R: TGCCCTTCTTCAAGGCAGAT	306 ~ 310
VcSSR41	(GT) *6	F: <Tail>-TCATCACCCGTGTTGTTTAC R: TAAATCATGCGCCCTAATC	219 ~ 227
VcSSR45	(CT) *6	F: <Tail>-AAAACCAAGCGAAGAAAGGG R: CCGGATCAGAAGACGATGAT	198 ~ 222
VcSSR47	(TCA) *5	F: <Tail>-CTCCCTTGTTGTTGTCCT R: CAACCAACCTCATCCTCACC	229 ~ 244
VcSSR50	(TG) *6	F: <Tail>-CTTGAACATGGATTTCGGCTT R: ACAAAGAGGGCTACAGCGA	228 ~ 250
VcSSR53	(AC) *6	F: <Tail>-AAATGGCACGGAAGTGAGAG R: CATGGATTGGAGATCCTGCT	244 ~ 256
尾巴序列 Tail sequence		<FAM>或<HEX>-TGAAAACGACGGCCAGT	

注: “<Tail>.” 表示尾巴序列 (5'→3'); <FAM>和<HEX>分别表示序列 5'端碱基进行羧基荧光素和六氯荧光素修饰。

Note: “<Tail>.” indicated the tail sequence (5' to 3'); <FAM> and <HEX> meant that 5' ends of the sequences were modified by carboxyfluorescein or hexachlorofluorescein, respectively.

从中随机挑选并合成了 53 对 SSR 引物进行 PCR 预扩增，筛选出 15 对条带清晰且能稳定扩增的 SSR 核心引物。15 个 SSR 位点中有 12 个位点是二核苷酸重复，3 个为三核苷酸重复；扩增产物大小为 154 ~ 430 bp（表 4），与预期片段大小相符。

2.3 越橘属植物的 SSR 特异等位基因指纹图谱

利用 5 个 SSR 位点（VcSSR11、VcSSR14、VcSSR19、VcSSR28 和 VcSSR33）的特异等位基因可有效鉴别出 39 份越橘种质中的 38 份，包括 21 个高丛越橘品种、3 个兔眼越橘品种、10 个越橘属野生种和 4 个蔓越橘品种。5 个 SSR 位点多态性丰富，每个位点特异等位基因的独立使用均可直接鉴别出多个品种。利用 VcSSR11、VcSSR14、VcSSR19、VcSSR28 和 VcSSR33 位点的特异等位基因片段长度建立了 38 份越橘属植物的 SSR 特征图谱（图 1）。尽管 5 个 SSR 位点在品种鉴别中具有高效性，但仍无法从当前越橘种质区分南高丛越橘品种‘晨号’。

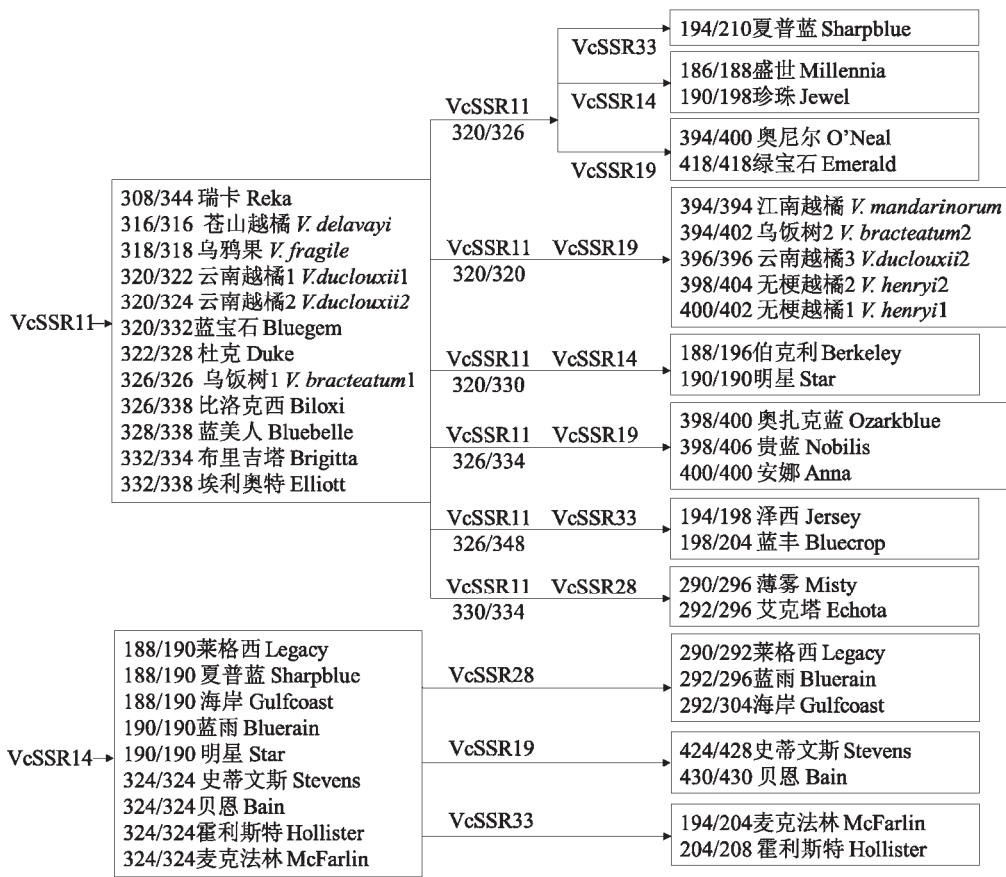


图 1 不同越橘品种、蔓越橘品种及越橘属野生种的 SSR 特异等位基因指纹图谱

Fig. 1 SSR specific alleles fingerprint of wild *Vaccinium* species and different cultivars of blueberry and cranberry

2.4 SSR 位点的遗传多样性

15 对 SSR 引物在所有种质中共扩增得到 144 个等位基因，有效等位基因数的变化范围为 1.41 ~ 7.11，平均值为 3.90，最少的为 VcSSR41，最多的为 VcSSR19。香农多样性指数最小值出现在 VcSSR41

(0.64), 最大值出现在 VcSSR11 (2.31)。观察杂合度的变化范围为 0.050 ~ 0.900, 期望杂合度的变化范围为 0.293 ~ 0.870。表明本研究筛选出的 SSR 位点多态性丰富。固定系数在 SSR 位点 VcSSR35 和 VcSSR45 中为负值, 且显著偏离 0; 其他位点均为正值 (表 5)。

表 5 SSR 核心引物在 39 份越橘属植物中的遗传多样性
Table 5 Genetic diversity of 39 accessions in *Vaccinium* revealed by fifteen core SSR primers

位点 Locus	有效等位基因数 Effective number of alleles	香农多样性指数 Shannon's diversity index	观察杂合度 Observed heterozygosity	期望杂合度 Expected heterozygosity	固定系数 Fixation Index
VcSSR1	2.42	1.18	0.100	0.594	0.829
VcSSR11	6.97	2.31	0.650	0.867	0.241
VcSSR14	5.07	1.89	0.625	0.813	0.221
VcSSR18	2.83	1.46	0.325	0.655	0.498
VcSSR19	7.11	2.29	0.475	0.870	0.447
VcSSR20	2.26	1.12	0.050	0.565	0.910
VcSSR28	5.98	2.22	0.775	0.843	0.069
VcSSR33	4.21	1.79	0.600	0.772	0.213
VcSSR35	2.93	1.19	0.775	0.667	-0.176
VcSSR37	2.14	0.85	0.150	0.539	0.718
VcSSR41	1.41	0.64	0.125	0.293	0.569
VcSSR45	2.70	1.28	0.900	0.638	-0.429
VcSSR47	4.62	1.75	0.600	0.793	0.234
VcSSR50	5.70	2.16	0.550	0.835	0.333
VcSSR53	2.15	1.17	0.150	0.542	0.720
平均值 Mean	3.90	1.55	0.457	0.677	0.360

2.5 越橘属植物的亲缘关系分析

为阐明 39 份越橘属植物的亲缘关系, 基于基因分型得到的 SSR 等位基因数据, 对其进行了主坐标分析 (PCoA)。结果表明, 2 个主坐标成分可以解释 34.60% 的种质总变异, 其中坐标成分 1 和坐标成分 2 分别为 21.61% 和 12.99%; 3 个主坐标成分可以解释 41.46% 的种质总变异 (数据未列出)。根据坐标分布, 39 份种质可以清晰地划分为 3 组, 分别为越橘品种组、蔓越橘品种组和越橘属野生种组。从越橘品种组的组成可知, 北高丛越橘、南高丛越橘和兔眼越橘品种交错分布。

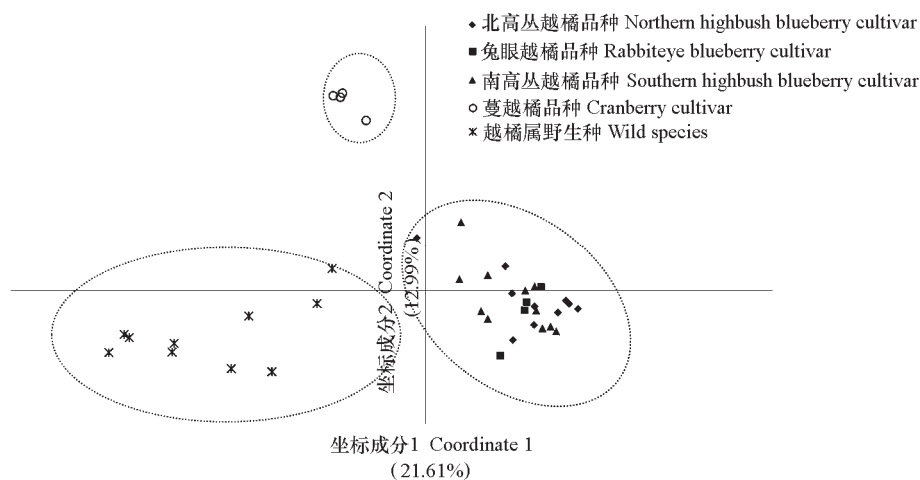


图 2 不同越橘品种、蔓越橘品种及越橘属野生种的主坐标分析

Fig. 2 Principal coordinates analysis of wild *Vaccinium* species and different cultivars of blueberry and cranberry

为进一步分析越橘属植物的遗传背景，对其进行了基于邻接法的聚类分析，结果表明 39 份种质可以聚为 5 组（图 3）。

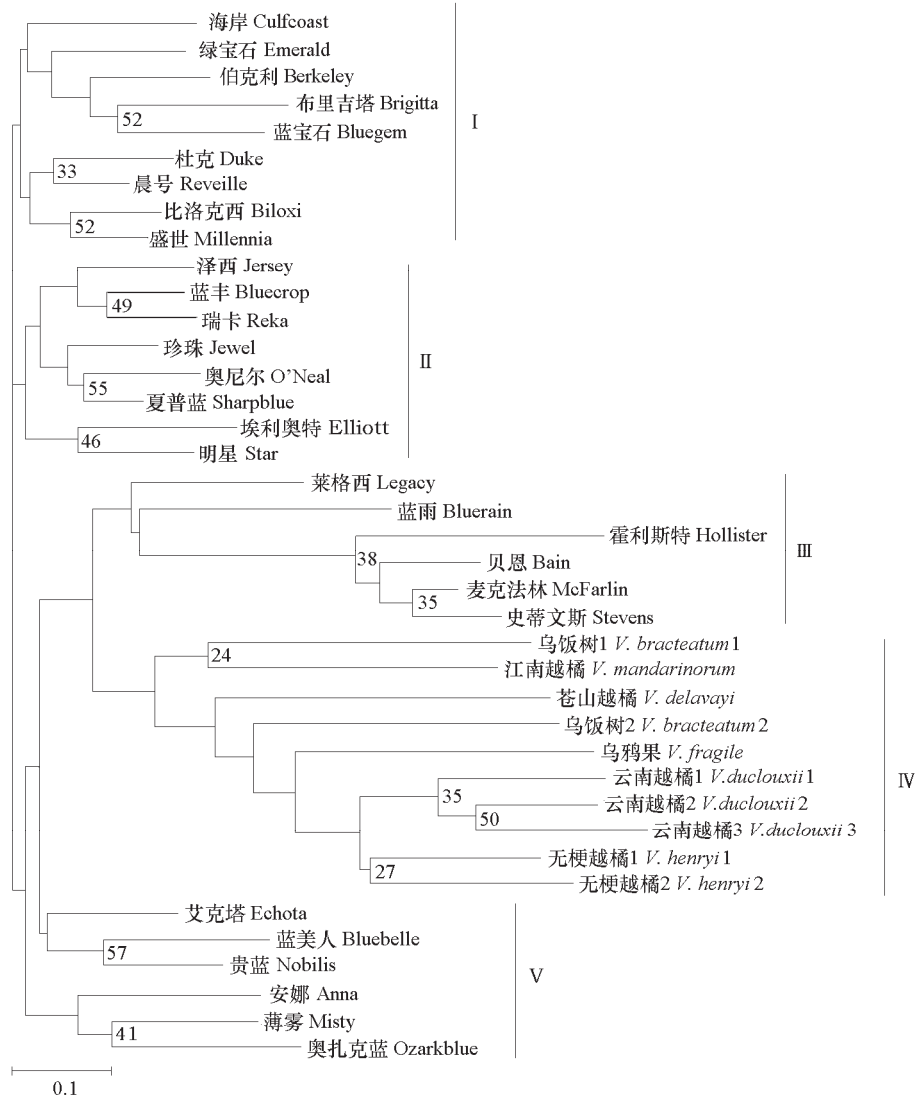


图 3 不同越橘品种、蔓越橘品种及越橘属野生种的聚类树

支上所示数字为自检支持率。

Fig. 3 Phylogenetic tree of wild *Vaccinium* species and different cultivars of blueberry and cranberry

Numbers on the edges indicated the bootstrap values.

组 I 包括 3 个北高丛越橘品种和 5 个南高丛越橘品种，1 个兔眼越橘品种（‘蓝宝石’）。组 II 与组 I 相似，包含北高丛越橘品种和南高丛越橘品种各 4 个，其中‘泽西’、‘蓝丰’和‘瑞卡’3 个北高丛越橘品种的亲缘关系非常紧密。组 III 以 4 个蔓越橘品种为主，还包括南高丛越橘品种 2 个（‘蓝雨’和‘莱格西’）。组 IV 为 10 个越橘属野生种种质。组 V 由 2 个兔眼越橘品种（‘蓝美人’和‘贵蓝’）、3 个南高丛越橘品种（‘薄雾’、‘奥扎克蓝’和‘安娜’）以及 1 个北高丛越橘品种（‘艾克塔’）组成。组 III 和组 IV 的结果表明越橘品种‘莱格西’和‘蓝雨’与蔓越橘品种、越橘属野生种之间的亲缘关系较之其他越橘品种更紧密。

3 讨论

3.1 越橘转录组中 SSR 位点的分布特征

本研究从 103 460 条 Unigene 序列中共发掘出 22 058 个 SSR 位点, SSR 位点总的发生频率为 21.32%, 高于草莓 (2.67%)、香蕉 (5.3%) 和荔枝 (16.53%) (王静毅 等, 2008; 向旭 等, 2010; 董清华 等, 2011); 与柑橘的 21.74% (Jiang et al., 2006)、刺梨的 20.37% (鄢秀芹 等, 2015) 相近, 但远低于蓝靛果忍冬的 32.51% (张庆田 等, 2016)。出现这些差异的原因是多方面的, 可能是物种间 SSR 位点的真实数量存在差异, 也可能是因为 SSR 位点搜索参数设置不同 (Yue et al., 2014; 鄢秀芹 等, 2015; 张庆田 等, 2016)。此外, 可利用的 EST 数据库中数据信息量以及品种与组织器官来源不同也会造成 SSR 位点检出率的差异 (董清华 等, 2011)。有研究指出, 在各物种 EST-SSR 结构中三核苷酸重复出现的频率最高 (Liang et al., 2009), 少数几种双子叶植物以二核苷酸重复为主要类型 (Kumpatla & Mukhopadhyay, 2005); 但随着相关研究的增加, 包括本研究在内, 在越来越多的双子叶植物转录组 (Yue et al., 2014; 鄢秀芹 等, 2015; 王洋洋 等, 2016; 张庆田 等, 2016) 中发现 SSR 重复基序以二核苷酸为主。

3.2 SSR 位点多态性和越橘品种鉴别

本研究中 15 对 SSR 引物扩增得到的有效等位基因数和观察杂合度高于前人在越橘种质资源和品种 (崔建民 等, 2010; 郭照东 等, 2015) 中的研究结果, 表明所筛选出的 SSR 位点具有更加丰富的多态性。前人的研究以越橘栽培品种为主, 本研究中还包括了蔓越橘品种和越橘属野生种; 野生种通常比栽培种包含更多的遗传变异 (Klepo et al., 2013), 这些自然界中产生的遗传变异是果树育种工作不可或缺的优良资源 (Zamir, 2001)。SSR 特异等位基因构建种质指纹图谱已经广泛应用于园艺植物研究。高源等 (2016) 利用 6 对 SSR 引物区分了 314 份苹果栽培品种, 徐雷锋等 (2014) 使用 20 对引物对 96 份百合种质进行了完全区分。本研究中使用 5 对 SSR 引物完成了 38 份越橘属植物资源的鉴别, 具有较高的区分度。利用这 5 对引物建立了越橘品种的快速鉴别方法, 有助于解决当前品种市场混乱的现象, 为新品种选育过程中亲本的准确选择提供理论基础。对于本研究中未能建立特异等位基因指纹图谱的南高丛越橘品种 ‘晨号’, 可以通过适当增加 SSR 引物数量的方法进行鉴别。

3.3 越橘种质遗传背景和杂交育种

利用 SSR 的基因分型数据, 分别对 39 份越橘属植物进行了主坐标分析和聚类分析, 主坐标分析的结果清晰呈现出越橘品种、蔓越橘品种和越橘属野生种 3 组, 初步表明越橘品种、蔓越橘品种和越橘属野生种之间的遗传背景相对独立。聚类分析的结果与主坐标分析相似, 将越橘品种进一步划分成不同组; 但与南高丛越橘、北高丛越橘和兔眼越橘等品种群划分不一致。由组 I、II 和 V 的聚类结果可知, 越橘品种间遗传背景混杂, 每组中少数种质与其他类群有亲缘关系。越橘品种的大规模选育开始于 1950 年, ‘蓝丰’、‘早蓝’和 ‘泽西’ 等品种是国外越橘育种中使用频率较高的亲本材料 (刘有春 等, 2017), 近亲杂交和一些亲本的高频率利用使得越橘品种间基因交流频繁, 导致育成品种遗传基础狭窄和遗传多样性降低等现象 (郭照东 等, 2015; 刘有春 等, 2017; 吴志娟 等, 2018)。

刘有春等 (2017) 的研究表明笃斯越橘 (*V. uliginosum*) 和红豆越橘 (*V. vitis-idaea*) 与越橘品

种间存在较远的亲缘关系,这可能是由于地理隔离和染色体倍性差异造成的;但引进的越橘品种和中国野生种存在一定的基因交流,本研究结果与之相似。与其他越橘品种相比,‘莱格西’和‘蓝雨’与蔓越橘品种、越橘属野生种具有更近的亲缘关系;频繁的异地引种导致的基因交流和种质间共同的遗传背景等原因均可造成当前这种情况,亦可能由多种因素共同作用导致(忻雅等,2013)。*‘莱格西’*是美国农业部以*‘Chatsworth’* (*V. australe*)和*‘Brooks’* (*V. corymbosum*)等为主要亲本育成的品种,而高丛越橘品种的主要遗传背景来自于*V. corymbosum*,*‘莱格西’*并未与其他高丛越橘聚类在一起,说明其遗传背景很可能更多源自于*V. australe*。杂交育种是越橘新品种选育的重要途径,已有笃斯越橘和高丛越橘品种杂交再回交获得品种*‘艾朗’*、北高丛越橘与矮丛越橘杂交获得品种*‘普特’*等成功事例(崔建民等,2010)。亲缘关系过远可能会导致杂交不育,延长育种周期;亲缘关系过近又无法拓宽新育成品种的遗传背景;因此,若将中国特有的野生种作为育种亲本与越橘品种*‘莱格西’*和*‘蓝雨’*杂交,具有良好的应用前景。

References

- Bao Wen-quan, Wuyun Ta-na, Zhao Han, Du Hong-yan. 2017. Identification and fingerprinting construction of accessions of kernel-using apricot by SSR markers. Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition), 45 (6): 163 - 169. (in Chinese)
- 包文泉, 乌云塔娜, 赵罕, 杜红岩. 2017. 基于SSR标记的仁用杏主栽品种鉴别和指纹图谱构建. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 45 (6): 163 - 169.
- Bian Y, Ballington J, Raja A, Brouwer C, Reid R, Burke M, Wang Xin-guo, Rowland L J, Bassil N, Brown A. 2014. Patterns of simple sequence repeats in cultivated blueberries (*Vaccinium* Section *Cyanococcus* spp.) and their use in revealing genetic diversity and population structure. Molecular Breeding, 34 (2): 675 - 689.
- Chen Chang-wen, Cao Ke, Wang Li-rong, Zhu Geng-rui, Fang Wei-chao. 2011. Molecular ID establishment of main China peach varieties and peach related species. Scientia Agricultura Sinica, 44 (10): 2081 - 2093. (in Chinese)
- 陈昌文, 曹珂, 王力荣, 朱更瑞, 方伟超. 2011. 中国桃主要品种资源及其野生近缘种的分子身份证构建. 中国农业科学, 44 (10): 2081 - 2093.
- Cui Jian-min, Liu Hong-xia, Zou Rong-qian, Liang Ying-hai, Li Ya-dong, Wen Jing-hui. 2010. Study on genetic diversity and phylogenetic relationship of germplasm resources about *Vaccinium* spp. Journal of Fruit Science, 27 (3): 373 - 378. (in Chinese)
- 崔建民, 刘红霞, 邹荣仟, 梁英海, 李亚东, 温景辉. 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.
- Dong Qing-hua, Wang Xi-cheng, Zhao Mi-zhen, Song Zhang-nian, Ge An-jing, Wang Jing. 2011. Development of EST-derived SSR markers and their application in strawberry genetic diversity analysis. Scientia Agricultura Sinica, 44 (17): 3603 - 3612. (in Chinese)
- 董清华, 王西成, 赵密珍, 宋长年, 葛安静, 王静. 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. (in Chinese)
- Fang Rui-zheng. 1986. Studies on genus *Vaccinium* in China. Acta Botanica Yunnanica, 8 (3): 239 - 258. (in Chinese)
- 方瑞征. 1986. 中国越桔属的研究. 云南植物研究, 8 (3): 239 - 258.
- Gao Yuan, Wang Kun, Wang Da-jiang, Gong Xin, Liu Li-jun, Liu Feng-zhi. 2016. Molecular ID establishment of apple cultivars by TP-M13-SSR. Acta Horticulturae Sinica, 43 (1): 25 - 37. (in Chinese)
- 高源, 王昆, 王大江, 龚欣, 刘立军, 刘凤之. 2016. 利用TP-M13-SSR标记构建苹果栽培品种的分子身份证. 园艺学报, 43 (1): 25 - 37.
- Guo Zhao-dong, Xia Xiu-ying, An Li-jia, Lv Min, Li Bo, Fang Wen-xiu, Gao Hong-yang. 2015. Genetic relationship analysis and cultivar identification of blueberry based on SSR markers. Journal of Plant Genetic Resources, 16 (5): 1020 - 1026. (in Chinese)
- 郭照东, 夏秀英, 安利佳, 吕敏, 李波, 房文秀, 高弘扬. 2015. 基于SSR标记的越橘亲缘关系分析及品种鉴定. 植物遗传资源学报, 16 (5): 1020 - 1026.
- Jiang D, Zhong Guang-yan, Hong Qi-bing. 2006. Analysis of microsatellites in *Citrus unigenes*. Acta Genetica Sinica, 33 (4): 345 - 353.

- Kingsbury R W, Epstein E. 1986. Salt sensitivity in wheat a case for specific ion toxicity. *Plant Physiology*, 80 (3): 651 - 654.
- Klepo T, De la Rosa Raúl, Satovic Z, León Lorenzo, Belaj A. 2013. Utility of wild germplasm in olive breeding. *Scientia Horticulturae*, 152: 92 - 101.
- Kumpatla S P, Mukhopadhyay S. 2005. Mining and survey of simple sequence repeats in expressed sequence tags of dicotyledonous species. *Genome*, 48 (6): 985 - 998.
- Langella O. 2000. Populations (Logiciel de génétique des populations). CNRS, France. <http://www.bioinformatics.org/~tryphon/populations/>
- Liang X, Chen X, Hong Y, Liu H, Zhou G, Li S, Guo B. 2009. Utility of EST-derived SSR in cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.) and *Arachis* wild species. *BMC Plant Biology*, 9: 35.
- Liu You-chun, Liu Cheng, Yang Yan-min, Sun Bin, Liu Shuo, Yuan Xing-fu, Wei Yong-xiang. 2017. Genetic structure analysis of the cultivated blueberry (*Vaccinium* spp.) species and wild species in China based on EST-SSR markers. *Journal of Fruit Science*, 34 (8): 956 - 967. (in Chinese)
- 刘有春, 刘 成, 杨艳敏, 孙 斌, 刘 硕, 袁兴福, 魏永祥. 2017. 基于EST-SSR标记的越橘栽培种和几个中国野生种的遗传结构分析. *果树学报*, 34 (8): 956 - 967.
- Nei M, Tajima F, Tateno Y. 1983. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. *Journal of Molecular Evolution*, 19 (2): 153 - 170.
- Peakall R, Smouse P E. 2006. GenAlEx 6: genetic analysis in excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Resources*, 6 (1): 288 - 295.
- Peakall R, Smouse P E. 2012. GenAlEx 6.5: genetic analysis in excel. Population genetic software for teaching and research—an update. *Bioinformatics*, 28 (28): 2537 - 2539.
- Schuelke M. 2000. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotechnology*, 18 (2): 233 - 234.
- Sun Hai-yue, Guo Rui-xue, Wang Jia-hui, Gai Yu-zhuo, Liu Yu-shan, Dong Mei, Li Ya-dong. 2016. Development of expressed sequence tag-derived simple sequence and genetic diversity analysis of blueberry. *Journal of Northwest A & F University (Natural Science Edition)*, 44 (12): 172 - 180. (in Chinese)
- 孙海悦, 郭瑞雪, 王佳卉, 盖钰卓, 刘禹姗, 董 梅, 李亚东. 2016. 越橘EST-SSR分子标记的开发及其遗传多样性分析. *西北农林科技大学学报 (自然科学版)*, 44 (12): 172 - 180.
- Sun Hai-yue, Li Ya-dong. 2014. Overview of blueberry breeding in the world. *Journal of Northeast Agricultural University*, 45 (9): 116 - 122. (in Chinese)
- 孙海悦, 李亚东. 2014. 世界蓝莓育种概述. *东北农业大学学报*, 45 (9): 116 - 122.
- Wang Jing-yi, Chen Ye-yuan, Liu Wei-liang, Wu Yao-ting. 2008. Development and application of EST-derived SSR markers for bananas (*Musa nana* Lour.). *Hereditas*, 30 (7): 933 - 940. (in Chinese)
- 王静毅, 陈业渊, 刘伟良, 武耀廷. 2008. 香蕉 EST-SSRs标记的开发与应用. *遗传*, 30 (7): 933 - 940.
- Wang Yang-yang, Shan Wen-qi, Xu Wen-long, Cui Chong-shi, Qu Shu-ping. 2016. Analysis on SSR information in transcriptome and the polymorphism of *Cucurbita maxima*. *Acta Horticulturae Sinica*, 43 (3): 578 - 586. (in Chinese)
- 王洋洋, 单文琪, 徐文龙, 崔崇士, 屈淑平. 2016. 印度南瓜转录组SSR信息分析及其多态性研究. *园艺学报*, 43 (3): 578 - 586.
- Wu Zhijuan, Fang Qian, Li Yongqiang, Chen Wenrong, Zong Yu, Guo Weidong. 2018. Development of retrotransposon-based insertion polymorphism molecular marker and cultivar identification of blueberry. *Acta Horticulturae Sinica*, 45 (4): 753 - 763. (in Chinese)
- 吴志娟, 方 茜, 李永强, 陈文荣, 宗 宇, 郭卫东. 2018. 越橘反转录转座子插入多态性分子标记开发及品种鉴别. *园艺学报*, 45 (4): 753 - 763.
- Xiang Xu, Ou Liang-xi, Chen Hou-bin, Sun Qing-ming, Chen Jie-zhen, Cai Zhang-he, Bai Li-jun, Zhao Jun-sheng. 2010. EST-SSR analysis of genetic diversity in 96 litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) germplasm resources in China. *Genomics and Applied Biology*, 29 (6): 1082 - 1092. (in Chinese)
- 向 旭, 欧良喜, 陈厚彬, 孙清明, 陈洁珍, 蔡长河, 白丽军, 赵俊生. 2010. 中国96个荔枝种质资源的EST-SSR遗传多样性分析. *基因组学与应用生物学*, 29 (6): 1082 - 1092.

- Xin Ya, Ruan Song-lin, Ma Hua-sheng, Wang Shu-zhen, Fang Xian-ping, Xiao Wen-fei, Wu Gen-liang. 2013. Establishment of DNA fingerprinting and analysis of genetic relationship among main strawberry (*Fragaria ananassa*) cultivars in Southern China. *Acta Agriculurae Universitatis Jiangxiensis*, 35 (2): 307 - 312. (in Chinese)
- 忻 雅, 阮松林, 马华升, 王淑珍, 方献平, 肖文斐, 吴根良. 2013. 基于SSR和SCAR标记的草莓主栽品种指纹图谱构建及亲缘关系分析. *江西农业大学学报*, 35 (2): 307 - 312.
- Xu Lei-feng, Ge Liang, Yuan Su-xia, Ren Jun-fang, Yuan Ying-ying, Li Ya-nan, Liu Chun, Ming Jun. 2014. Using the fluorescent labeled SSR markers to establish molecular identity of lily germplasms. *Acta Horticulturae Sinica*, 41 (10): 2055 - 2064. (in Chinese)
- 徐雷锋, 葛 亮, 袁素霞, 任君芳, 袁迎迎, 李雅男, 刘 春, 明 军. 2014. 利用荧光标记SSR构建百合种质资源分子身份证. *园艺学报*, 41 (10): 2055 - 2064.
- Xu Na, Xia Xiu-ying, He Jian-hua, Wei Li-jun, Zhang Lu-jie. 2008. RAPD analysis of some introduced blueberry cultivars in northern China. *Journal of Fruit Science*, 25 (5): 736 - 739. (in Chinese)
- 徐 娜, 夏秀英, 贺建华, 魏立君, 张鲁杰. 2008. 中国北方引种的部分越橘品种的RAPD分析. *果树学报*, 25 (5): 736 - 739.
- Yan Xiu-qin, Lu Min, An Hua-ming. 2015. Analysis on SSR information in transcriptome and development of molecular markers in *Rosa roxburghii*. *Acta Horticulturae Sinica*, 42 (2): 341 - 349. (in Chinese)
- 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.
- Ye Yu-yun, Wang Qing-ming, Ma Jian-wei, Zhang Yin-ping, Chen Qi-yang, Tang Hao-ru, Zhang Yong. 2017. SSR analysis on genetic diversity of peach cultivars and comparison of different genetic similarity coefficients. *Journal of South China Agricultural University*, 38 (3): 39 - 45. (in Chinese)
- 叶宇芸, 王清明, 马建伟, 张银平, 陈其阳, 汤浩茹, 张 勇. 2017. 基于SSR标记的桃品种遗传多样性分析及遗传相似系数比较. *华南农业大学学报*, 38 (3): 39 - 45.
- You F M, Huo Na-xin, Gu Yong-qiang, Luo Ming-cheng, Ma Ya-qin, Hane D, Lazo G R, Dvorak J, Anderson O D. 2008. Batchprimer3: A high throughput web application for PCR and sequencing primer design. *BMC Bioinformatics*, 9: 253.
- Yu Hong, Gu Yin, He Shan-an, Jiang Yan-qin. 2009. Identification of blueberry cultivars and evaluation of their genetic relationship by ISSR technique. *Journal of Jilin Agricultural University*, 31(5): 512 - 515. (in Chinese)
- 於 虹, 顾 姻, 贺善安, 姜燕琴. 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.
- Yue Xiao-Yan, Liu Guo-Qin, Zong Yu, Teng Yuan-Wen, Cai Dan-Ying. 2014. Development of genic SSR markers from transcriptome sequencing of pear buds. *Journal of Zhejiang University Science B*, 15 (4): 303 - 312.
- Zamir D. 2001. Improving plant breeding with exotic genetic libraries. *Nature Reviews Genetics*, 2 (12): 983 - 989.
- Zhang Qing-tian, Li Xiao-yan, Yang Yi-ming, Fan Shu-tian, Ai Jun. 2016. Analysis on SSR information in transcriptome and development of molecular markers in *Lonicera caerulea*. *Acta Horticulturae Sinica*, 43 (3): 557 - 563. (in Chinese)
- 张庆田, 李晓艳, 杨义明, 范书田, 艾 军. 2016. 蓝靛果忍冬转录组SSR信息分析及其分子标记开发. *园艺学报*, 43 (3): 557 - 563.
- Zong Yu, Wang Yue, Zhu You-yin, Shao Xu, Li Yong-qiang, Guo Wei-dong. 2016. Development and validation of SSR markers based on transcriptomic data of Chinese cherry (*Prunus pseudocerasus*). *Acta Horticulturae Sinica*, 43 (8): 1566 - 1576. (in Chinese)
- 宗 宇, 王 月, 朱友银, 邵 娟, 李永强, 郭卫东. 2016. 基于中国樱桃转录组的SSR分子标记开发与鉴定. *园艺学报*, 43 (8): 1566 - 1576.