

# 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

刘有春<sup>1</sup>, 刘成<sup>1</sup>, 杨艳敏<sup>1</sup>, 孙斌<sup>1</sup>, 刘硕<sup>1</sup>, 袁兴福<sup>2\*</sup>, 魏永祥<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>辽宁省果树科学研究所, 辽宁营口 115009; <sup>2</sup>辽宁省农业科学院, 沈阳 110161)

**摘要:**【目的】遗传结构分析能够提供个体的血统来源及组成信息,是遗传关系分析的重要手段。研究越橘栽培种和中国野生种的遗传结构差异,以期为我国越橘育种中野生越橘资源的发掘、利用提供遗传背景依据。【方法】筛选EST-SSR引物并对越橘属84份种质资源的基因组DNA进行PCR扩增,利用ABI 3730xl DNA遗传分析仪进行毛细管电泳分离,统计条带并计算遗传多样性指数,利用STRUCTURE软件构建遗传结构图并进行基于Nie's遗传距离的聚类分析和主成分分析。【结果】1)从54对EST-SSR引物中筛选到8对高多态性引物,共检测到101个等位变异,平均值12.63,有效等位基因数( $N_e$ )、Shannon's多态性信息指数( $I$ )、观察杂合度( $H_o$ )、期望杂合度( $H_e$ )平均值分别为8.711、2.262、0.523和0.860,多态性信息含量(PIC)为0.640~0.915,平均值为0.845,所选引物多态性高。2)贝叶斯遗传结构分析表明,当K=4时, $\Delta K$ 最大,供试材料被划分为4个类群,类群S1主要是红豆越橘(*Vaccinium vitis-idaea*)和蔓越橘(*V. macrocarpon*),以红果类型为特征;类群S2主要是笃斯越橘(*V. uliginosum*),以抗寒为特征;类群S3主要包括南高丛越橘(*V. corymbosum* SHB)和兔眼越橘(*V. ashei*),以低需冷量为特征;类群S4主要包括北高丛越橘(*V. corymbosum* NHB)和半高丛越橘(*V. corymbosum* HHB),以高需冷量为特征,表明越橘种质资源内部存在明显的遗传结构差异,4个类群与材料的抗寒性、低温需冷量特性等有明显的对应关系。3)N-J聚类分析和主成分分析结果表明,野生越橘与引进的栽培品种之间亲缘关系较远。4)供试84份材料中Q值 $\geq 0.6$ 的品种占91.67%,绝大多数供试越橘资源遗传背景较单一。【结论】从国外引进的越橘栽培种和我国野生种间存在一定程度的基因交流,不存在绝对的生殖隔离,可以通过杂交的方式获得变异植株,实现越橘种质创新和遗传基础拓宽,应加大我国野生越橘资源的发掘和利用。

**关键词:**越橘;栽培种;野生种;EST-SSR标记;遗传结构

中图分类号:S663.9

文献标志码:A

文章编号:1009-9980(2017)08-0956-12

## Genetic structure analysis of the cultivated blueberry (*Vaccinium* spp.) species and wild species in China based on EST-SSR markers

LIU Youchun<sup>1</sup>, LIU Cheng<sup>1</sup>, YANG Yanmin<sup>1</sup>, SUN Bin<sup>1</sup>, LIU Shuo<sup>1</sup>, YUAN Xingfu<sup>2\*</sup>, WEI Yongxiang<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>Liaoning Institute of Pomology, Yingkou 115009, Liaoning, China; <sup>2</sup>Liaoning Academy of Agricultural Sciences, Shenyang 110161, Liaoning, China)

**Abstract:** 【Objective】Blueberries, belonging to the genus *Vaccinium* of family Ericaceae, including high-bush blueberries (*Vaccinium corymbosum*), rabbiteye blueberries (*V. ashei*) and low-bush blueberries (*V. augustifolium*) are the most recognized commercially cultivated species in the world. Some wild species of this genus are unique to cold resistance, drought resistance and fruit nutritions, and are valuable resources for the germplasm innovation and also broaden the genetic basis of the blueberry. An understanding of the genetic structural differences, relationship and genetic backgrounds among cultivated blueberries and wild species have crucial meanings, and guide the breeding programs accompanied by genetic exploration and utilization of the wild blueberry species. 【Methods】Conducted a total of 84 tests including 58 cultivat-

收稿日期: 2017-04-25 接受日期: 2017-05-26

基金项目: 国家科技支撑计划(2013BAD02B04-05); 辽宁省博士启动基金(201501118)

作者简介: 刘有春, 博士, 从事果树种质资源与遗传育种研究。Tel: 18641713730, E-mail: liuyouchun911@126.com

\*通信作者 Author for correspondence. Tel: 024-31029746, E-mail: lgwdzx@163.com; E-mail: laasy@189.cn

ed varieties from abroad and 26 wild types from China. DNA was extracted from the young leaves of the plants using a CTAB method with modification. PCR reactions were carried out in a final volume of 15  $\mu\text{L}$  containing 3  $\mu\text{L}$  template DNA ( $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 0.2  $\mu\text{L}$  forward primer ( $2.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 1.0  $\mu\text{L}$  M13 (labeled with 6-FAM, NED, VIC or PET), 1.2  $\mu\text{L}$  reverse primer ( $2.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 7.5  $\mu\text{L}$  Mix-*Taq* (CWBIO, China) and 2.1  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$  (CWBIO, China). PCR amplification conditions were as follows: 94  $^\circ\text{C}$  for 5 min, 35 cycles of 95  $^\circ\text{C}$  for 30 s, 52  $^\circ\text{C}$  for 45 s and 72  $^\circ\text{C}$  for 45 s, and a final extension at 72  $^\circ\text{C}$  for 10 min. All reactions were conducted using a thermal cycler (Veriti 96, Applied Biosystems, Foster City, USA). The PCR products were separated by capillary electrophoresis using a ABI3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, USA). After PCR amplification confirmation with 2.0% agarose gel, nest-PCR multiplex sets were made based on fluorescence-labeled M13 primers. For nest-PCR multiplexing, 1  $\mu\text{L}$  of 6-FAM, VIC-, NED- and 0.5  $\mu\text{L}$  PET labeled PCR products representing different SSRs were combined in 13  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$  1  $\mu\text{L}$  mixed product which was then added to 7  $\mu\text{L}$  Hi-Di formamide containing 0.07  $\mu\text{L}$  GeneScan™ 500 LIZ® as the internal size standard, denatured for 7 min at 95  $^\circ\text{C}$ , quick chilled on ice for 5 min, and loaded on a ABI3730xl DNA Analyzer. The fragment analysis was performed by using GeneMapper v4.0 software (Applied Biosystems, Foster City, USA). The genetic structure was investigated by using software STRUCTURE and Principal Coordinate Analysis (PCA) and a neighbor-joining tree cluster which was analyzed based on Nie's genetic distance and applied through software PowerMarker.【Results】1) Totally, 101 polymorphic alleles were obtained with 8 EST-SSR primer pairs, which were screened from a total of 54 EST-SSR primer pairs, with an average of 12.63 alleles per locus. The average of effective alleles ( $N_e$ ), Shannon's index ( $I$ ), observed heterozygosity ( $H_o$ ) and expected heterozygosity ( $H_e$ ) per locus were 8.711, 2.262, 0.523 and 0.860, respectively, and the polymorphic information content (PIC) ranged from 0.640 to 0.915 with an average of 0.845, indicating a high polymorphism. 2) Genetic structure analysis based on the Bayesian method indicated that  $\Delta K$  reached maximum when  $K=4$ , all the 84 tested blueberry accessions were clustered into 4 groups: S1, which is given priority to lingonberry (*V. vitis-idaea*) and cranberry (*V. macrocarpon*) and characterized by red fruit; S2, which is given priority to bog bilberry (*V. uliginosum*) and characterized by being highly cold-resistant; S3, which is given priority to southern highbush (*V. corymbosum* SHB) and rabbitterry (*V. ashei*) blueberry, and characterized by having a low chilling requirement; S4, which is given priority to northern highbush (*V. corymbosum* NHB) and half-highbush (*V. corymbosum* HHB) blueberries and characterized by having a high chilling requirement, the above results showed an obvious genetic structure within *Vaccinium* spp. 3) Both the results of neighbor-joining tree cluster analysis and principal component analysis (PCA) identified large genetic differences that existed between the cultivated species and wild species of China; 4) The Q value of the 84 tested blueberry accessions higher than 0.6 accounted for 91.67%, which were considered an individual assigned unequivocally to a cluster, with single genetic components.【Conclusion】Obvious genetic structure and distantly relationships existed between the cultivated species and wild species of China, however, there was a limited amount of cultivated varieties with an ancestry of wild species (with S1 or S2 components) and this indicates that there was introgression between the cultivated variety and wild species. This shows that you can obtain variant plants through hybridization to innovated germplasm and broaden the genetic basis for blueberries, which also should enhance the exploitation and utilization of wild blueberry resources in China.

**Key words:** Blueberry; Cultivated species; Wild species; EST-SSR marker; Genetic structure

越橘,又名蓝莓,杜鹃花科(Ericaceae)越橘属(*Vaccinium* spp.)植物,全世界越橘属植物约有400

个种<sup>[1]</sup>,我国东北和西南地区分布该属野生种<sup>[2-3]</sup>。高丛越橘(*Vaccinium corymbosum*)(包括南高丛、北

高丛和半高丛)、兔眼越橘(*V. ashei*)、矮丛越橘(*V. angustifolium*)是世界范围内商品化栽培的种,对其遗传多样性和种间亲缘关系等基础研究取得了重要进展,认为越橘品种的遗传多样性较低,遗传基础狭窄<sup>[4-6]</sup>;半高丛越橘是高丛越橘和矮丛越橘杂交获得的一种类型,对于3者的亲缘关系,研究结果显示,半高丛越橘与矮丛越橘的亲缘关系更近<sup>[7-8]</sup>。对于原产我国的野生越橘,即东北地区的笃斯越橘(*V. uliginosum*)、红豆越橘(*V. vitis-idaea*)、蔓越橘(*V. macrocarpon*),西南地区的乌饭树(*V. bracteatum*)、乌鸦果(*V. fragile*)等,遗传背景及野生种与栽培种的亲缘关系等方面的研究相对缺乏,仅笃斯越橘和红豆越橘在少数研究中有涉及<sup>[5,9]</sup>,尤其缺乏我国西南地区野生种越橘的遗传信息,是野生资源用于育种的瓶颈。然而目前的研究显示,东北的笃斯越橘、红豆越橘除具有极强的抗寒性外,更大的价值在于笃斯越橘果实的花青苷含量和抗氧化活性远高于栽培品种<sup>[10-11]</sup>,红豆越橘粗提物具有很强的抗癌活性<sup>[12]</sup>;云南的乌饭树、乌鸦果、樟叶越橘(*V. dunalianum*)等具有巨大的药用潜力<sup>[13]</sup>。可见,我国的野生越橘资源在抗性、果实营养成分等方面独具特色,是越橘育种中不可或缺的宝贵资源,也是越橘种质

创新和拓宽遗传基础的可用试材,所以掌握栽培种与野生种的亲缘关系、遗传背景对于野生资源利用具有重要意义。

基于模型的遗传结构分析能够从DNA水平上展示试材的遗传结构和个体的遗传组成,明确每个个体的血统来源和不同基因型间遗传信息的交流情况,是分析多类型试材遗传背景的有效手段。基于上述分析,笔者在广泛收集半高丛越橘、高丛越橘(北高丛和南高丛)、兔眼越橘等引进栽培种,笃斯越橘、红豆越橘、乌鸦果、乌饭树等原产我国野生种的基础上,开展基于贝叶斯模型的越橘栽培种和几个中国野生种的遗传结构分析,结合主成分分析(PCA)和聚类分析,探讨栽培种与野生种的亲缘关系,旨在为我国越橘育种主干亲本遴选和野生越橘资源利用提供遗传背景依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

供试材料为越橘属主要种的资源,共计84份,其中原产中国的野生类型26份,从国外引进的越橘品种或杂交后代58份,材料涉及越橘属的8个种,品种系谱及种分类信息详见表1。采样于5月中旬(展

表1 84份越橘资源信息

Table 1 List of 84 blueberry accessions

编号 No.	分类 Taxon	材料 Accession	系谱或类型 Pedigree/Type	原产地 Origin
1	笃斯越橘 <i>V. uliginosum</i>	笃斯01 Bog bilberry-01	野生 Wild	中国黑龙江 Heilongjiang, China
2	笃斯越橘 <i>V. uliginosum</i>	笃斯02 Bog bilberry-02	野生 Wild	中国黑龙江 Heilongjiang, China
3	笃斯越橘 <i>V. uliginosum</i>	笃斯03 Bog bilberry-03	野生 Wild	中国黑龙江 Heilongjiang, China
4	笃斯越橘 <i>V. uliginosum</i>	笃斯04 Bog bilberry-04	野生 Wild	中国黑龙江 Heilongjiang, China
5	笃斯越橘 <i>V. uliginosum</i>	笃斯05 Bog bilberry-05	野生 Wild	中国黑龙江 Heilongjiang, China
6	笃斯越橘 <i>V. uliginosum</i>	笃斯06 Bog bilberry-06	野生 Wild	中国黑龙江 Heilongjiang, China
7	笃斯越橘 <i>V. uliginosum</i>	笃斯07 Bog bilberry-07	野生 Wild	中国黑龙江 Heilongjiang, China
8	笃斯越橘 <i>V. uliginosum</i>	笃斯08 Bog bilberry-08	野生 Wild	中国黑龙江 Heilongjiang, China
9	笃斯越橘 <i>V. uliginosum</i>	笃斯09 Bog bilberry-09	野生 Wild	中国黑龙江 Heilongjiang, China
10	笃斯越橘 <i>V. uliginosum</i>	笃斯10 Bog bilberry-10	野生 Wild	中国黑龙江 Heilongjiang, China
11	笃斯越橘 <i>V. uliginosum</i>	笃斯11 Bog bilberry-11	野生 Wild	中国黑龙江 Heilongjiang, China
12	笃斯越橘 <i>V. uliginosum</i>	笃斯12 Bog bilberry-12	野生 Wild	中国黑龙江 Heilongjiang, China
13	笃斯越橘 <i>V. uliginosum</i>	笃斯13 Bog bilberry-13	野生 Wild	中国黑龙江 Heilongjiang, China
14	红豆越橘 <i>V. vitis-idaea</i>	红豆01 Llingonberry-01	野生 Wild	中国黑龙江 Heilongjiang, China
15	红豆越橘 <i>V. vitis-idaea</i>	红豆02 Llingonberry-02	野生 Wild	中国黑龙江 Heilongjiang, China
16	红豆越橘 <i>V. vitis-idaea</i>	红豆03 Llingonberry-03	野生 Wild	中国黑龙江 Heilongjiang, China
17	红豆越橘 <i>V. vitis-idaea</i>	红豆04 Llingonberry-04	野生 Wild	中国黑龙江 Heilongjiang, China
18	红豆越橘 <i>V. vitis-idaea</i>	红豆05 Llingonberry-05	野生 Wild	中国黑龙江 Heilongjiang, China
19	红豆越橘 <i>V. vitis-idaea</i>	红豆06 Llingonberry-06	野生 Wild	中国黑龙江 Heilongjiang, China
20	蔓越橘 <i>V. macrocarpon</i>	蔓越橘C6 Cranberry-C6	野生 Wild	中国吉林 Jilin, China
21	蔓越橘 <i>V. macrocarpon</i>	蔓越橘C8 Cranberry-C8	野生 Wild	中国吉林 Jilin, China
22	蔓越橘 <i>V. macrocarpon</i>	蔓越橘C13 Cranberry-C13	野生 Wild	中国吉林 Jilin, China
23	乌饭树 <i>V. bracteatum</i>	乌饭树 Wufanshu	野生 Wild	中国云南 Yunnan, China
24	乌鸦果 <i>V. fragile</i>	乌鸦果01 Wuyaguo-01	野生 Wild	中国云南 Yunnan, China
25	乌鸦果 <i>V. fragile</i>	乌鸦果02 Wuyaguo-02	野生 Wild	中国云南 Yunnan, China
26	乌鸦果 <i>V. fragile</i>	乌鸦果03 Wuyaguo-03	野生 Wild	中国云南 Yunnan, China

表1(续) Table 1(Continued)

编号 No.	分类 Taxon	材料 Accession	系谱或类型 Pedigree/Type	原产地 Origin
27	半高丛越橘 <i>V. corymbosum</i> (HHB)	北陆 Northland	Berkeley(Jersey×Pioneer)×(Lowbush×Pioneer seeding)	美国密执安州 Michigan, United States
28	半高丛越橘 <i>V. corymbosum</i> (HHB)	北蓝 Northblue	Mn-36×(B-10×US-3)	美国明尼苏达大学 University of Minnesota, United States
29	半高丛越橘 <i>V. corymbosum</i> (HHB)	北村 Northcountry	B-6×R2P4	美国明尼苏达大学 University of Minnesota, United States
30	半高丛越橘 <i>V. corymbosum</i> (HHB)	黑珍珠 Blackpearl	不详 Unknown	*
31	半高丛越橘 <i>V. corymbosum</i> (HHB)	北极星 Polaris	B15 (G-65×Ashworth)×Bluetta	美国密执安州 Michigan, United States
32	北高丛越橘 <i>V. corymbosum</i> (NHB)	蓝丰 Bluecrop	(Jersey×Pioneer)×(Stanley×June)	美国新泽西 New Jersey, United States
33	北高丛越橘 <i>V. corymbosum</i> (NHB)	伯克利 Bberkeley	Jersey×Pioneer	美国新泽西 New Jersey, United States
34	北高丛越橘 <i>V. corymbosum</i> (NHB)	杜克(大连) DuKe (Dalian)	(Ivanhoe×Earliblue)×192-8 (E-30×E-11)	美国新泽西 New Jersey, United States
35	北高丛越橘 <i>V. corymbosum</i> (NHB)	泽西实生 Jersey seeding	Jersey seeding	*
36	北高丛越橘 <i>V. corymbosum</i> (NHB)	EJ 31	Earliblue×Jersey	*
37	北高丛越橘 <i>V. corymbosum</i> (NHB)	杜克(熊岳) DuKe (Xiongyue)	(Ivanhoe×Earliblue)×192-8 (E-30×E-11)	美国新泽西 New Jersey, United States
38	北高丛越橘 <i>V. corymbosum</i> (NHB)	早蓝 Earliblue	Stanley×Weymouth	美国新泽西 New Jersey, United States
39	北高丛越橘 <i>V. corymbosum</i> (NHB)	早蓝实生 Earliblue seeding	Stanley×Weymouth	*
40	北高丛越橘 <i>V. corymbosum</i> (NHB)	达柔 Darrow	(Wareham×Pioneer)×Bluecrop	美国 United States
41	北高丛越橘 <i>V. corymbosum</i> (NHB)	布理吉塔 Brigitta	Lateblue{Herberd{Stanley×(Jersey×Pioneer)}×Coville}实生 Seeding	澳大利亚 Australia
42	北高丛越橘 <i>V. corymbosum</i> (NHB)	喜来 Sierra	US 169×G-156	美国新泽西 New Jersey, United States
43	北高丛越橘 <i>V. corymbosum</i> (NHB)	莱格西 Legacy	Elizabeth×US 75	美国新泽西 New Jersey, United States
44	北高丛越橘 <i>V. corymbosum</i> (NHB)	日出 Sunrise	G-180×ME-US 6620	美国新泽西 New Jersey, United States
45	北高丛越橘 <i>V. corymbosum</i> (NHB)	陶柔 Toro	Earliblue×Ivanhoe	美国新泽西 New Jersey, United States
46	北高丛越橘 <i>V. corymbosum</i> (NHB)	蓝片 Bluechip	Croatan×US11-93	美国北卡罗来纳州 North Carolina, United States
47	北高丛越橘 <i>V. corymbosum</i> (NHB)	埃利奥特 Elliott	Burlington×US 1 [Dixi×(Jersey×Pioneer)]	美国新泽西 New Jersey, United States
48	北高丛越橘 <i>V. corymbosum</i> (NHB)	北卫 Patroit	(Dixi×Michigan LB-1)×Earliblue	美国 United States
49	北高丛越橘 <i>V. corymbosum</i> (NHB)	蓝光 Blueray	(Jersey×Pioneer)×(Stanley×June)	美国新泽西 New Jersey, United States
50	北高丛越橘 <i>V. corymbosum</i> (NHB)	瑞卡 Reka	E118 (Asworth×Earliblue)×Bluecrop	新西兰 New Zealand
51	北高丛越橘 <i>V. corymbosum</i> (NHB)	泽西 Jersey	Rubel×Grover	美国 United States
52	北高丛越橘 <i>V. corymbosum</i> (NHB)	蓝鸟 Bluejay	Berkeley×Michigan241 (Pioneer×Taylor)	美国新泽西 New Jersey, United States
53	北高丛越橘 <i>V. corymbosum</i> (NHB)	克瑞顿 Croatan	Weymouth×F6 (Stanley×Crabbe4)	美国 United States
54	北高丛越橘 <i>V. corymbosum</i> (NHB)	爱国者 Patriot	Dixi{(Jersey×Pioneer)×Stanley}×Michigan LB-1×Earliblue	美国缅因州 Maine, United States
55	北高丛越橘 <i>V. corymbosum</i> (NHB)	蓝塔 Bluetta	(North Sedgwick×Coville)×Earliblue	美国新泽西 New Jersey, United States
56	北高丛越橘 <i>V. corymbosum</i> (NHB)	双迪 D-II	不详 Unknown	美国 United States
57	北高丛越橘 <i>V. corymbosum</i> (NHB)	奥罗拉 Aurora	Brigitta×Eliliot	美国密执安州 Michigan, United States
58	北高丛越橘 <i>V. corymbosum</i> (NHB)	利珀蒂 Liberty	Brigitta×Eliliot	美国密执安州 Michigan, United States
59	北高丛越橘 <i>V. corymbosum</i> (NHB)	赫伯特 Herberd	Stanley×(Jersey×Pioneer)	美国 United States
60	北高丛越橘 <i>V. corymbosum</i> (NHB)	塞拉 Sierra	US 169×G-156	美国新泽西 New Jersey, United States
61	北高丛越橘 <i>V. corymbosum</i> (NHB)	迪克西 Dixi	(Jersey×Pioneer)×Stanley	美国新泽西 New Jersey, United States
62	北高丛越橘 <i>V. corymbosum</i> (NHB)	钱德勒 Chandler	Darrow×M-23 [Berkeley×18-9(GM-3×CU-5)]	美国 United States
63	南高丛越橘 <i>V. corymbosum</i> (SHB)	海岸 Gulfcoast	G-180×US 75	美国 密西西比州 Mississippi, United States
64	南高丛越橘 <i>V. corymbosum</i> (SHB)	蓝宝石 Sapphire	不详 Unknown	*

表1(续) Table 1(continued)

编号 No.	分类 Taxon	材料 Accession	系谱或类型 Pedigree/Type	原产地 Origin
65	南高丛越橘 <i>V. corymbosum</i> (SHB)	奥尼尔 O'Neal	Wolcott×Fla 4-15	美国北卡罗来纳州 North Carolina, United States
66	南高丛越橘 <i>V. corymbosum</i> (SHB)	夏普蓝 Sharpblue	Florida 61-5×Florida 63-12	美国佛罗里达大学 University of Florida, United States
67	南高丛越橘 <i>V. corymbosum</i> (SHB)	N3	不详 Unknown	*
68	南高丛越橘 <i>V. corymbosum</i> (SHB)	N5	不详 Unknown	*
69	南高丛越橘 <i>V. corymbosum</i> (SHB)	密斯提 Misty	Fla 67-1×Avonblue	美国佛罗里达大学 University of Florida, United States
70	南高丛越橘 <i>V. corymbosum</i> (SHB)	乔治宝石 Georgiagem	[G-132×US75 (Fla.4B×Bluecrop)	美国乔治亚州 Georgia, United States
71	南高丛越橘 <i>V. corymbosum</i> (SHB)	比洛克西 Biloxi	Sharpblue×US329	美国农业部 Department of Agriculture, United States
72	南高丛越橘 <i>V. corymbosum</i> (SHB)	绿宝石 Emerald	FL91-69×NC1528	美国 United States
73	南高丛越橘 <i>V. corymbosum</i> (SHB)	珠宝 Jewel	不详 Unknown	美国 United States
74	南高丛越橘 <i>V. corymbosum</i> (SHB)	军号 Reveille	NC1171×Fla61-7	美国北卡罗来纳州 North Carolina, United States
75	南高丛越橘 <i>V. corymbosum</i> (SHB)	库帕 Cooper	G-180×US 75	美国 密西西比州 Mississippi, United States
76	矮丛越橘 <i>V. angustifolium</i>	美登 Blomidon	Augusta×541	加拿大 Canada
77	兔眼越橘 <i>V. ashei</i>	精华 Choice	T-31 (Satilla×Callaway)	美国佛罗里达州 Florida, United States
78	兔眼越橘 <i>V. ashei</i>	Rb 5	不详 Unknown	*
79	兔眼越橘 <i>V. ashei</i>	灿烂 Brightwell	Tifblue×Menditoo	美国北卡罗来纳州 North Carolina, United States
80	兔眼越橘 <i>V. ashei</i>	Rb 13	不详 Unknown	*
81	兔眼越橘 <i>V. ashei</i>	杰兔 Premier	Myers×BlackGiant	美国北卡罗来纳州 North Carolina, United States
82	兔眼越橘 <i>V. ashei</i>	园蓝 Gardenblue	Myers×Clara	美国乔治亚州 Georgia, United States
83	兔眼越橘 <i>V. ashei</i>	粉蓝 Powderblue	Menditoo×Tifblue	美国北卡罗来纳州 North Carolina, United States
84	兔眼越橘 <i>V. ashei</i>	梯扶蓝 Tifblue	Eihel×Clara	美国乔治亚州 Georgia, United States

注:HHB. 半高丛越橘;NHB. 北高丛越橘;SHB. 南高丛越橘;\*表示原产地不详或实生后代。

Note: HHB. Half-highbush blueberry; NHB. Northern highbush blueberry; SHB. Southern highbush blueberry; \* mean origin unknown or seedling progeny.

叶期)选择生长健壮、无病虫害植株,采茎尖幼嫩叶片用液氮速冻后在-70℃冰箱保存备用。所有材料均取自辽宁省果树科学研究所越橘资源圃,资源圃土壤pH值4.8~5.2,高垄栽培,株行距1.0 m×2.0 m,树冠下覆盖粉碎秸秆,垄间覆盖黑色地布,采用微喷灌溉模式。

## 1.2 方法

### 1.2.1 DNA提取、PCR反应及产物检测

DNA提取根据Khanuja等<sup>[14]</sup>的方法并加以优化,DNA提取后稀释冷藏备用。54对EST-SSR引物来自Liu等<sup>[15]</sup>开发的引物,由北京中生柏奥生物科技有限公司合成。PCR反应在15 μL体系中进行,包括3 μL模板DNA(20 mg·L<sup>-1</sup>)、0.2 μL正向引物(2.0 μmol·L<sup>-1</sup>)、1.0 μL M13荧光标记(6-FAM, NED, VIC 或 PET)、1.2 μL反向引物(2.0 μmol·L<sup>-1</sup>)、7.5 μL Mix-Taq(CWBIO, 中国)和2.1 μL水(CWBIO, 中国)。PCR反应参数如下:95℃预变性5 min,95℃变性1 min,52℃复性45 s,72℃延伸45 s,30个循环,72℃延伸10 min。反应在Thermal PCR仪上进行(Applied Biosystems, Foster City, USA)。反应产物进行纯化并稀释500倍,加7 μL甲酰胺和0.07 μL Liz-500 Size-Standard(内标),95℃变性7 min,冰上冷却5 min后,用ABI 3730xl DNA遗传分析仪对PCR产物进行毛细管电

泳分离。

### 1.2.2 数据分析

EST-SSR引物扩增产物经GeneMapper 4.1软件读取的片段大小数值确定等位基因的“有”和“无”,分别记为“1”和“0”。采用PowerMarker V3.25<sup>[16]</sup>软件计算某一位点或材料的等位基因数(number of putative alleles,  $N_a$ )、有效等位基因数(effective allele number,  $N_e$ )、期望杂合度(expected heterozygosity,  $H_e$ )、Shannon's 多态性信息指数(Shannon's information index,  $I$ )和多态性信息含量(polymorphic information content, PIC)等指数。

利用软件STRUCTURE 2.2对供试材料进行基于贝叶斯(Bayesian)数学模型的遗传结构分析。先设定类群数目(K)为2~10,将MCMC(Markov Chain Monte Carlo)的不作数迭代(length of burn-in period)设为10 000次,再将不作数迭代后的MCMC设为100 000次,每个K值运行5次,以似然值最大为原则选取一个合适的K值,计算各材料的Q值(第i份试材EST-SSR位点变异源自第K类群的概率),绘制基于模型的遗传结构图。

利用PowerMarker V3.25软件<sup>[16]</sup>,根据Nei's遗传距离通过Neighbor-Joining算法进行无根树状遗传关系聚类并进行主成分分析(principal coordinate analysis, PCA)。

## 2 结果与分析

### 2.1 供试EST-SSR引物多态性分析

供试的54对EST-SSR引物是从栽培越橘品种‘鲁贝尔’(‘Rubel’)的EST序列开发而来<sup>[15]</sup>。本研究利用原产中国的5个野生种材料(共计26份)对54对EST-SSR引物进行初步筛选,共筛选出多态性高、重复性最好的8对EST-SSR引物(占供试引物的14.8%)作为试材基因型分析的引物(表2)。8对EST-SSR引物对84份越橘材料进行扩增,共产生

101个等位变异,每个位点的等位变异数( $N_a$ )为5(VC116)~18(VC063),平均每个EST-SSR引物扩增12.63个等位变异。有效等位变异数( $N_e$ )变异范围为3.266(VC116)~12.519(VC063),平均为8.711个。Shannon’s多样性指数( $I$ )变异范围为1.334(VC116)~2.673(VC063),平均为2.262。观察杂合度( $H_o$ )、期望杂合度( $H_e$ )平均值分别为0.523和0.860,8个位点的PCI均大于0.5,变化范围为0.640~0.915,平均值为0.845,上述结果均表明供试引物多态性高。

表2 筛选的8个EST-SSR引物序列及其在供试材料中的多态性

Table 2 Primer information and genetic diversity of 8 EST-SSR markers in tested materials

标记 Markers	上游引物序列 Primer forward (5'-3')	下游引物序列 Primer reverse (5'-3')	$N_a$	$N_e$	$I$	$H_o$	$H_e$	PIC
VC063	AACACTAATTGCTCCCTTGA	TGTTAATGCAGCGTAGACAG	18	12.519	2.673	0.846	0.92	0.915
VC024	TAATTTCGACTTGCAGGGTT	TCAGTTATTGCCACTTGGGA	12	8.299	2.294	0.316	0.88	0.869
VC004	TCAGTACCTCTGTCTCTCTCG	GGCATGTTAAAGACGGATAC	15	9.139	2.461	0.316	0.891	0.882
VC002	CAACCTGATTAGCTGGAAAG	AGAATACGGTCGATTAGCAG	15	11.378	2.577	0.625	0.912	0.906
VC113	CGCATCTGCTGTACAAATAA	TCATCAACAACCTTCAAGCAG	14	11.645	2.532	0.368	0.914	0.908
VC013	GTTACAAGCAGGTGGTTAGC	GTATTACAAATGAGGACGCAC	11	4.661	1.953	0.478	0.785	0.769
VC068	TTCAAGAAAGAGCCCTAGTA	GCCATTATTGTCGTAAGGAG	11	8.779	2.271	0.731	0.886	0.875
VC116	ATACATATACGCAACGACCC	GCACCAAAATGGATACAAAT	5	3.266	1.334	0.500	0.694	0.640
平均值 Mean			12.63	8.711	2.262	0.523	0.860	0.845

注: $N_a$ . 观测等位基因数; $N_e$ . 有效等位基因数; $I$ . Shannon’s 指数; $H_o$ . 观测杂合度; $H_e$ . 期望杂合度;PIC. 多样性信息含量。

Note:  $N_a$ . Observed alleles;  $N_e$ . Effective alleles;  $I$ . Shannon’s index;  $H_o$ . Observed heterozygosity;  $H_e$ . Expected heterozygosity; PIC. Polymorphic information content.

### 2.2 基于数学模型的类群划分与遗传结构分析

2.2.1 K值确定 参照Evanno等<sup>[17]</sup>的方法,用 $\Delta K$ 确定合适的K值。由图1可知,根据相邻K值间的最大似然改变率发现,当K=4时,能获得 $\Delta K$ 的最大

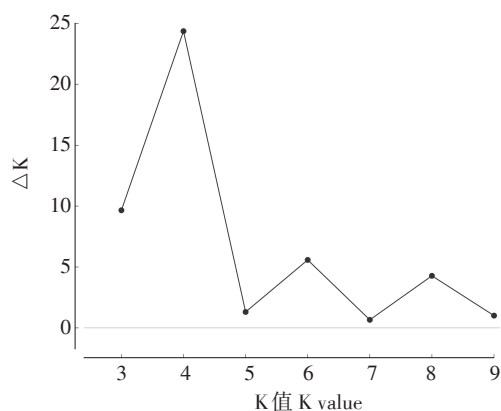


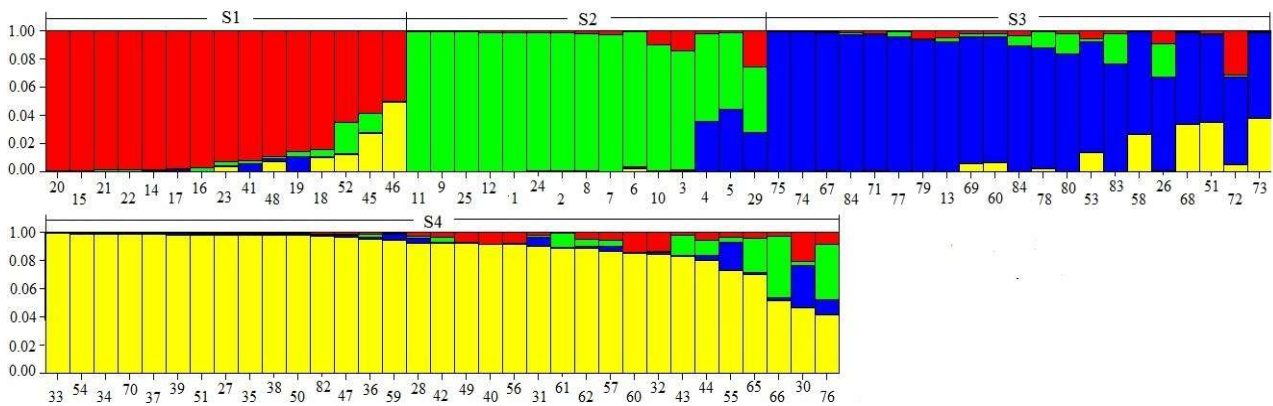
图1 利用 $\Delta K$ 推测84份越橘种质的最优组群数划分  
Fig. 1 The optimal number of groups for the 84 blueberries were determined by using the second order statistics ( $\Delta K$ ) method

值,当K=5时,K的似然值急剧下降,故将供试84份材料划分为4个亚群。

2.2.2 类群遗传结构划分与Q值分析 利用STRUCTURE 2.2对EST-SSR引物产生的101个等位变异进行结构分析,结果表明,当K=4时,84份供试越橘材料可划分成4个不同的类群(图2),不同颜色表示不同的类群,分别用S1(红色)、S2(绿色)、S3(蓝色)和S4(黄色)表示。

S1类群(红色):包括15份种质,主要是红豆越橘和蔓越橘,占该类群总数的60.0%,果实成熟时均为红色,多数Q值大于0.95,表明种质来源单一,与其他亚组基因交流少。另有3份高丛越橘品种Q值小于0.8的品种(52、45和46)聚在该亚群,表明其具有混合来源,如52和45含有较多S2和S4的遗传背景,而46含有约50%的S4的遗传背景。

S2类群(绿色):包含15份种质,主要是笃斯越



横坐标表示不同材料的编号,纵坐标为不同基因型个体所占遗传背景的比例。

X-axis represents different material number, Y-axis represents the proportion of different genotype sharing the genetic background.

图2 基于混合模型的84份越橘种质的遗传结构

Fig. 2 The genetic structure of the 84 blueberries based on a mixed model

橘,占该类群总数的80%,除3号和10号外,Q值大于0.95,表明种质来源单一,与其他亚组基本无基因交流。另有2份试材(4和5)含有S3的遗传背景,29号含有S1和S3的混合遗传背景。

**S3类群(蓝色):**共21份种质,主要是南高丛越橘和兔眼越橘,占该类群总数的66.67%,其中有7份种质遗传背景比较复杂,按Q值大小依次是83、58、26、68、51、72和73号,从类型上来看,有乌鸫果(26)、北高丛(51和58)以及南高丛(68,72和73)越橘品种,基因交流相对比较频繁。

**S4类群(黄色):**包含的种质数量最多,为33份,绝大多数为北高丛越橘、半高丛越橘品种,还包括3份南高丛品种(70、66和76)、1份兔眼品种(82),仅有的1份矮丛越橘(76)也在该亚群内。

计算供试越橘种质在各个亚群中的Q值(第i材料其基因组变异源于第K类群的概率)分布,按照吴承来等<sup>[18]</sup>的观点,将 $Q \geq 0.6$ 视为遗传背景单一, $Q < 0.6$ 视为具有混合来源,遗传背景复杂。分析供试材料的Q值发现,77个越橘种质(91.67%)在某一类群中的Q值大于0.6,其中Q值大于0.9的品种占供试材料总数的59.52%,说明大多数种质血缘相对比较单一,而仅有7个越橘品种(占8.33%)在任何一个类群中的Q值均小于0.6,表明这些种质具有混合来源,遗传组成比较复杂(表3)。

### 2.3 供试越橘资源的PCA分析

应用PowerMarker V3.25<sup>[16]</sup>对供试84份越橘种质进行PCA分析(PC1和PC2的累积方差贡献率为

80.28%)。如图3所示,原产我国的野生越橘和引进栽培越橘品种在空间上的分布是明显分离的(兔眼越橘除外),说明它们之间的亲缘关系较远,与材料的地理来源明显相关。其中原产我国的野生资源(笃斯、红豆、蔓越橘、乌饭树、乌鸫果)分布在主成分坐标轴的右侧,且彼此紧密地混聚在一起,说明供试的野生资源遗传基础总体较为狭窄,且彼此较其他种相近,而引进的越橘品种(半高丛、北高丛和南高丛越橘)则呈现了广泛、均匀分布的特征,表明它们的遗传背景和多样性较供试的野生资源丰富。

### 2.4 供试越橘资源的聚类分析

将包含越橘栽培品种和中国野生种的84份资源通过Nei's方法计算遗传距离,利用UPGMA方法对基因型数据进行聚类分析,绘制了相邻链接无根树状模式图。如图4所示,84份越橘形成3个主要类群。Cluster I:主要是二倍体的笃斯越橘(黑色)和六倍体的兔眼越橘(紫色);Cluster II:高丛越橘品种群,主要包括4份半高丛品种(蓝色)、25份北高丛品种(红色)和10份南高丛品种(绿色),均属于四倍体;Cluster III:主要是原产中国的野生种,包括6份红豆越橘(褐色)、3份蔓越橘(橘色)、3份乌鸫果(浅粉色)、1份乌饭树(灰色,23),1份矮丛越橘(军绿色,76)等二倍体材料和以及4份来自其他类型的材料。综上,从聚类分析中发现引进的栽培品种与原产中国的多数野生种单独聚类,表明栽培种与野生种亲缘关系较远。

表3 84份越橘的遗传结构

Table 3 Population structure of the 84 blueberry accessions

编号 No.	Q1	Q2	Q3	Q4	类群 S	编号 No.	Q1	Q2	Q3	Q4	类群 S	编号 No.	Q1	Q2	Q3	Q4	类群 S
1	0.014	0.981	0.003	0.002	2	29	0.257	0.460	0.275	0.009		57	0.052	0.042	0.037	0.869	4
2	0.013	0.976	0.009	0.002	2	30	0.204	0.031	0.295	0.469		58	0.003	0.003	0.723	0.271	3
3	0.140	0.844	0.004	0.012	2	31	0.021	0.008	0.070	0.901	4	59	0.007	0.003	0.046	0.943	4
4	0.015	0.622	0.360	0.003	2	32	0.133	0.005	0.013	0.848	4	60	0.137	0.004	0.004	0.856	4
5	0.009	0.546	0.440	0.006		33	0.003	0.002	0.002	0.992	4	61	0.004	0.098	0.007	0.892	4
6	0.005	0.955	0.018	0.022	2	34	0.004	0.004	0.003	0.989	4	62	0.044	0.050	0.015	0.891	4
7	0.027	0.967	0.004	0.003	2	35	0.004	0.007	0.005	0.983	4	63	0.017	0.008	0.622	0.354	3
8	0.016	0.975	0.004	0.005	2	36	0.008	0.022	0.019	0.952	4	64	0.020	0.017	0.895	0.068	3
9	0.005	0.988	0.004	0.003	2	37	0.004	0.007	0.003	0.986	4	65	0.037	0.246	0.014	0.703	4
10	0.099	0.891	0.006	0.003	2	38	0.007	0.006	0.006	0.981	4	66	0.024	0.440	0.015	0.520	
11	0.004	0.990	0.004	0.002	2	39	0.004	0.003	0.009	0.984	4	67	0.005	0.005	0.981	0.009	3
12	0.008	0.985	0.003	0.004	2	40	0.079	0.003	0.003	0.915	4	68	0.003	0.005	0.654	0.338	3
13	0.049	0.024	0.924	0.002	3	41	0.915	0.024	0.057	0.004	1	69	0.020	0.022	0.900	0.057	3
14	0.980	0.012	0.005	0.002	1	42	0.029	0.039	0.006	0.926	4	70	0.005	0.005	0.003	0.987	4
15	0.991	0.003	0.002	0.004	1	43	0.015	0.149	0.005	0.831	4	71	0.017	0.006	0.965	0.011	3
16	0.970	0.024	0.004	0.002	1	44	0.057	0.106	0.031	0.806	4	72	0.314	0.012	0.620	0.054	3
17	0.978	0.003	0.016	0.002	1	45	0.585	0.133	0.008	0.274		73	0.005	0.004	0.606	0.385	3
18	0.836	0.055	0.005	0.103	1	46	0.494	0.005	0.007	0.494		74	0.003	0.002	0.988	0.006	3
19	0.851	0.039	0.107	0.004	1	47	0.010	0.010	0.012	0.968	4	75	0.004	0.003	0.989	0.004	3
20	0.992	0.003	0.003	0.002	1	48	0.888	0.014	0.024	0.074	1	76	0.085	0.387	0.110	0.418	
21	0.984	0.011	0.003	0.002	1	49	0.067	0.005	0.003	0.925	4	77	0.005	0.037	0.955	0.004	3
22	0.983	0.011	0.004	0.002	1	50	0.005	0.009	0.007	0.979	4	78	0.006	0.110	0.858	0.027	3
23	0.923	0.032	0.008	0.037	1	51	0.004	0.006	0.006	0.984	4	79	0.054	0.009	0.935	0.002	3
24	0.012	0.980	0.004	0.004	2	52	0.647	0.223	0.005	0.125	1	80	0.020	0.144	0.830	0.005	3
25	0.006	0.987	0.003	0.003	2	53	0.054	0.024	0.782	0.140	1	81	0.033	0.070	0.894	0.003	3
26	0.087	0.236	0.669	0.008	3	54	0.005	0.003	0.003	0.990	4	82	0.009	0.008	0.007	0.975	4
27	0.005	0.003	0.010	0.983	4	55	0.030	0.037	0.200	0.734	4	83	0.021	0.208	0.769	0.002	3
28	0.025	0.014	0.033	0.929	4	56	0.074	0.004	0.007	0.914	4	84	0.008	0.018	0.971	0.003	3

注:编号同表1。

Note: The numbers are the same as Table 1.

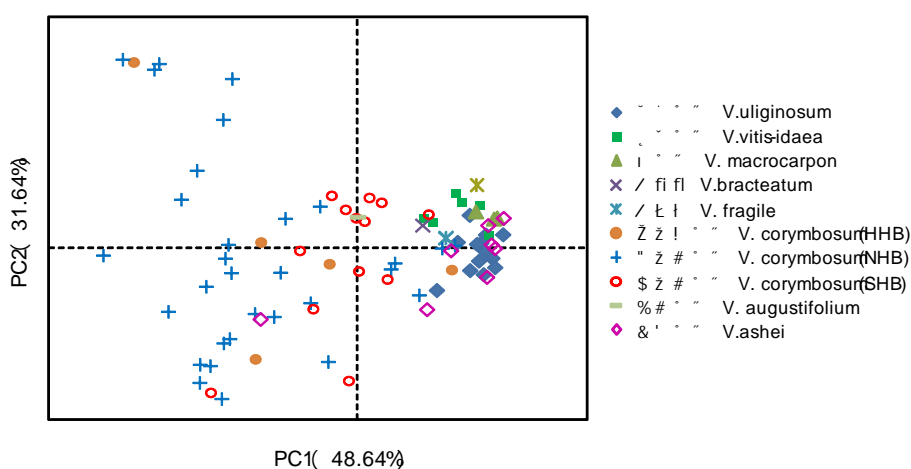


图3 84份越橘资源的主成分分析

Fig. 3 Principal coordinate analysis of the 84 blueberry accessions



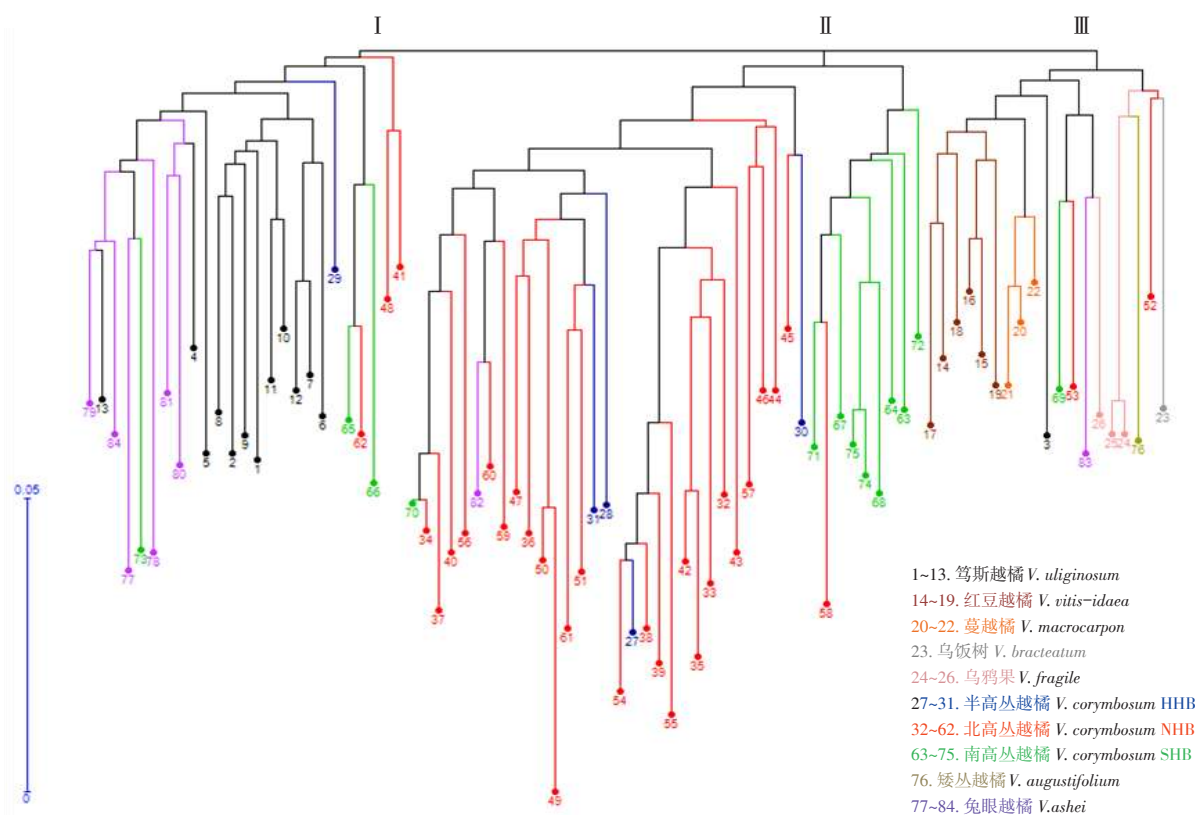


图 4 基于 Nie 氏遗传距离的 84 份越橘的邻-接树

Fig. 4 Neighbor-joining tree of the 84 blueberry accessions based on Nie genetic distances using 8 EST-SSR markers

### 3 讨 论

#### 3.1 EST-SSR 标记等位变异位点分析

表达序列标签(EST)数据库是开发 SSR 标记的有效资源,越橘 EST-SSR 标记也陆续被开发,不同研究中 EST-SSR 标记等位变异位点存在差异。本研究平均每个 EST-SSR 引物扩增 12.63 个等位变异,Boches 等<sup>[4]</sup>采用的 20 个 EST-SSR 引物平均能检测到 12.64 个等位变异,而郭瑞雪<sup>[6]</sup>利用自主开发的 55 对 EST-SSR 引物平均扩增 7 个多态性等位变异,本研究 and Boches 等<sup>[4]</sup>采用的 EST-SSR 引物扩增的平均多态性等位变异位点数远高于郭瑞雪<sup>[6]</sup>的结果,可能的原因:一是本研究 and Boches 等<sup>[4]</sup>均对标记进行了二次筛选,供试引物本身的多态性水平高;二是试材种类均较丰富,包括南高丛、北高丛、半高丛和野生等多种越橘类型,而郭瑞雪<sup>[6]</sup>采用的试材类型相对较单一。

一般认为遗传标记在自然群体中的等位基因数量越多,该基因座的多态性越高,而当多态性位点达到或超过 70 个时,得到的遗传信息较为可靠<sup>[19-20]</sup>。

此外,Xie 等<sup>[21]</sup>提出了衡量基因变异程度高低的多态性信息量指标 PIC,认为  $PIC > 0.5$  时,该引物为高度多态性信息引物; $0.25 < PIC < 0.5$ ,为中度多态性信息引物; $PIC < 0.25$ ,则为低度多态性信息引物。本研究采用了从 54 对 EST-SSR 筛选到的 8 对重复性好的引物用于基因型分析,PIC 平均值为 0.845,为高多态性引物,共检测到 101 个等位变异,平均每个 EST-SSR 引物扩增 12.63 个等位变异,可见供试 EST-SSR 引物能为本研究提供可靠的遗传信息。

#### 3.2 供试越橘种质资源遗传结构分析

聚类分析一般依据的是不同基因型间的相似系数或遗传距离,反映的是材料间的亲缘关系,而遗传结构分析依据等位基因位点的频率,在基因型基础上采用基于贝叶斯理论的混合模型,能够提供个体的血统来源、组成信息及不同基因型间遗传信息的交流情况<sup>[22-23]</sup>。近年来已在杏<sup>[24-26]</sup>、苹果<sup>[27]</sup>、梨<sup>[28]</sup>、枣<sup>[29]</sup>等果树上开展了遗传结构分析,在揭示物种的遗传背景、分析遗传多样性等研究方面取得重要进展。

在越橘上,Yang<sup>[30]</sup>开展了基于贝叶斯模型的高丛越橘品种的群体遗传结构分析,89 份高丛越橘形

成3个不同遗传结构,分别是含‘Weymouth’基因的  
近亲类群、北高丛类群和南高丛类群,并结合品种系  
谱、NJ聚类分析了供试品种的遗传多样性、遗传组  
成等,但研究中未涉及野生资源。为了探明引进越  
橘品种和中国野生种越橘的遗传结构,研究利用  
STRUCTURE 2.2软件和84份包含栽培种与我国几  
个野生种的越橘资源推断其遗传结构,根据 $\Delta K$ 将  
供试越橘划分为4个类群,结合植物学及生理特性  
分析,每个类群均存在共同点,其中类群S1以红豆  
越橘和蔓越橘为主,是以红色果实为特征的野生类  
型;类群S2以笃斯越橘为主,笃斯越橘是抗寒性极  
强的野生类型;类群S3以南高丛品种和兔眼越橘为  
主,是低需冷量类型的栽培品种;类群S4则以北高  
丛和半高丛越橘为主,该群以高需冷量为特征,表明  
引进越橘栽培品种和中国的野生种间存在明显的遗  
传结构,且在遗传结构上具有以材料的果实特性、抗  
寒性、低温需冷量为主的分布特征。此外,同类型的  
品种/类型被或多或少地划分到其他亚群,说明亚群  
间存在少量的基因交流。

本研究结果显示,91.67%的越橘种质资源在某  
一类群中的Q值大于0.6,可见供试的绝大多数越橘  
资源血缘来源单一,这可能是由于越橘品种育种过  
程中过度使用主干亲本进行种内杂交造成的。剖析  
引进越橘品种的系谱发现,供试的品种多为优良品  
种互相或者多代杂交获得,其中‘泽西’(‘Jersey’)和  
‘斯坦雷’(‘Stanley’)是主干亲本,在31份北高丛和  
5份半高丛越橘品种中有28个品种含‘泽西’和‘斯  
坦雷’的遗传成分,其中14个品种有‘泽西’的遗传  
成分,如33号和35号品种是‘泽西’的杂交一代,27、  
49、59、52和61号品种是‘泽西’的杂交二代,40、50、  
62、70号是‘泽西’的杂交三代,而57和58号则是  
‘泽西’杂交四代后选出的优良品种;同样也有14份  
是‘斯坦雷’的后代,如38、39、59和61号品种是‘斯  
坦雷’的杂交一代,32、49、45、48和55号品种是‘斯  
坦雷’的杂交二代,31、34、37、41和54号则是其杂  
交三代后选出的优良品种。此外,‘蓝丰’(‘Bluecrop’)、  
‘早蓝’(‘Earlyblue’)、‘先锋’(‘Pioneer’)、  
‘维口’(‘Weymouth’)等也是国外越橘育种中  
使用频率较高的亲本材料,而‘蓝丰’又是‘泽西’  
‘先锋’和‘斯坦雷’的后代,‘早蓝’是‘斯坦雷’和  
‘维口’的后代,近亲杂交和主干亲本的高频率使用使  
得越橘品种间基因交流频繁,导致遗传基础狭窄和遗

传多样性水平低。

### 3.3 越橘栽培种与我国野生种的亲缘关系分析

利用分子标记对原产我国的野生越橘和引进的  
栽培越橘进行遗传多样性分析的报道较少,尹德洁<sup>[9]</sup>  
在对53份越橘栽培品种和24份野生资源进行基于  
SRAP标记的遗传多样性分析时,发现栽培品种与野  
生种的最大遗传相似系数(0.35~0.47)尚不及栽培  
品种之间的最小遗传相似系数,认为现有的越橘栽  
培品种与我国大兴安岭地区分布的野生越橘遗传关  
系较远。同时该研究还发现笃斯越橘与红豆越橘的  
最大遗传相似系数仅0.58,也尚不及笃斯越橘间的  
最小遗传相似系数(0.62),说明笃斯越橘与红豆越  
橘遗传距离较远。就相同材料类型来看,本研究遗  
传结构划分结果显示,越橘栽培品种与野生种被划  
分到3个不同的亚群中,笃斯越橘和红豆越橘也分  
别划分到S2和S1 2个类群。从聚类分析来看,绝大  
多数栽培品种与野生种分开并单独聚成一类,笃斯  
越橘和红豆越橘也分聚在聚类图的两端,主成分分  
析结果也显示,野生越橘和栽培越橘品种在空间上  
的分布是明显分离的(兔眼越橘除外),说明它们之  
间的亲缘关系较远,与材料的地理来源明显相关。  
综上,本研究与尹德洁<sup>[9]</sup>的结果一致,即笃斯越橘和  
红豆越橘间,原产我国的野生越橘与引进的栽培品  
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。

综上所述,尽管引进栽培品种和我国的野生类  
型亲缘关系较远,在DNA水平上单独聚类,形成各  
自的遗传结构,绝大多数资源血缘单一,主要是由于  
野生种( $2n=2x=24$ )和引进栽培品种( $2n=4x=48$ 或  
 $2n=6x=72$ )的染色体倍性<sup>[31]</sup>和地理隔离造成的。同  
类型的品种/类型被或多或少地划分到其他类群,每  
个类群的少数试材包含其他类群的血缘(即含有两  
种或两种以上颜色),尤其是个别栽培品种含有野生  
种的基因(即含有S1和S2类群的成分),说明不同类  
群间,尤其是引进的越橘栽培品种和我国野生种存  
在一定的基因交流。此外,目前已有通过笃斯越橘  
和高丛越橘品种杂交再回交获得品种‘艾朗’,北高  
丛越橘与狭叶越橘杂交获得品种‘普特’等利用远缘  
种质杂交获得优良后代的成功事例<sup>[5]</sup>。

## 4 结 论

引进的越橘栽培品种与我国的野生种之间亲缘

关系远,但也存在一定的基因交流,可见栽培种与野生种之间非绝对的生殖隔离,可以通过杂交的方式获得变异植株,实现越橘种质创新和遗传基础拓宽,野生越橘是育种中不可或缺的宝贵资源,应加大我国野生越橘资源的发掘和利用。

### 参考文献 References:

- [1] KATHLEEN A K, POWELL E A, LUTEYN J L. Phylogenetic relationships within the blueberry tribe (Vaccinieae, Ericaceae) based on sequence data from MATK and nuclear ribosomal ITS regions, with comments on the placement of *Satyria*[J]. American Journal of Botany, 2002, 89(2): 327-336.
- [2] 郝瑞. 长白山区笃斯越橘资源调查[J]. 园艺学报, 1979, 6(2): 87-93.  
HAO Rui. Investigation of *Vaccinium uliginosum* resource in Chang Bai-shan[J]. Acta Horticulturae Sinica, 1979, 6(2): 87-93.
- [3] 顾娟, 贺善安. 蓝浆果和蔓越橘[M]. 北京: 中国农业出版社, 2001: 15-16.  
GU Yin, HE Shan'an. Blueberry and cranberry[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2001: 15-16.
- [4] BOCHES P, BASSILI NV, ROWLAND L. Genetic diversity in the highbush blueberry evaluated with microsatellite markers [J]. Journal of Amermal Horticultual Science, 2006, 131(5): 674-686.
- [5] 崔建民, 刘红霞, 邹荣任, 梁英海, 李亚东, 温景辉. 越橘种质资源遗传多样性和亲缘关系研究[J]. 果树学报, 2010, 27(3): 373-378.  
CUI Jianmin, LIU Hongxia, ZOU Rongqian, LIANG Yinghai, LI Yadong, WEN Jinghui. Study on genetic diversity and phylogenetic relationship of germplasm resources about *Vaccinium* spp.[J]. Journal of Fruit Science, 2010, 27(3): 373-378.
- [6] 郭瑞雪. 越橘 EST-SSR 分子标记的开发及遗传多样性分析[D]. 长春: 吉林农业大学, 2014.  
GUO Ruixue. Development of EST-derived SSR markers and genetic diversity analysis in *Vaccinium*[D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2014.
- [7] BELL D J, ROWLANF L J, POLASHOCK J J. Suitability of EST-PCR markers developed in highbush blueberry for genetic fingerprinting and relationship studies in lowbush blueberry and related species[J]. Journal of the American Society, 2008, 133(5): 701-707.
- [8] 宋杨, 张红军, 窦连登, 张志东, 李亚东. 越橘品种资源亲缘关系的 ISSR 分析[J]. 中国果树, 2014(6): 17-20.  
SONG Yang, ZHANG Hongjun, DOU Liandeng, ZHANG Zhi-dong, LI Yadong. Relationship of blueberry cultivars based on ISSR marker[J]. China Fruits, 2014(6): 17-20.
- [9] 尹德杰. 蓝莓野生资源和 SRAP 遗传多样性研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2012.  
YIN Dejie. The research of germplasm resources of wild blueberry and genetic diversity of *Vaccinium* ssp. by SRAP analysis[D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2012.
- [10] 刘翠, 陈素华, 陈少云, 董先智. 中国野生笃斯越橘花青素的初步分离和分析[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2009, 25(1): 57-64.  
LIU Cui, CHEN Suhua, CHEN Shaoyun, DONG Xianzhi. Preliminary separation and analysis of anthocyanidins in blueberries of *Vaccinium uliginosum* of China[J]. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2009, 25(1): 57-64.
- [11] 吕春茂, 王新现, 包静, 孟宪军, 董文轩. 越橘果实花色苷的体外抗氧化性[J]. 食品科学, 2010, 31(23): 27-31.  
LÜ Chunmao, WANG Xinxian, BAO Jing, MENG Xianjun, DONG Wenxuan. *In vitro* antioxidant evaluation of anthocyanins from bilberry fruit[J]. Food Science, 2010, 31(23): 27-31.
- [12] 樊梓鸾, 王振宇, 左丽丽, 田双起. 红豆越橘花色苷的分离及功能性研究[J]. 中国林副特产, 2010(5): 1-4.  
FAN Ziluan, WANG Zhenyu, ZUO Lili, TIAN Shuangqi. Separation and functionalities of anthocyanins from *Vaccinium vitisidaea* [J]. Forest By-Product and Speciality in China, 2010(5): 1-4.
- [13] 黄杏娥, 和加卫, 杨正松, 李燕, 和志娇. 云南省越橘属植物资源研究[J]. 植物遗传资源学报, 2014, 5(6): 1287-1294.  
HUANG Xing'e, HE Jiawei, YANG Zhengsong, LI Yan, HE Zhijiao. Resources of *Vaccinium* L. in Yunnan province[J]. Journal of Plant Genetic Resources, 2014, 5(6): 1287-1294.
- [14] KHANUJA S P S, SHASANY A K, DAROKAR M P, KUMAR S. Rapid isolation of DNA from dry and fresh samples [J]. Plant Molecular Biology Reporter, 1999, 17(1): 74-74.
- [15] LIU Y C, LIU D C, WEI Y X, LIU C, YANG Y M, TAO C G, LIU W S. Exploiting EST databases for the development and characterization of EST-SSR markers in blueberry (*Vaccinium*) and their cross-species transferability in *Vaccinium* spp. [J]. Scientia Horticulturae, 2014, 176: 319-329.
- [16] LIU K, MUSE S V. Power marker: an integrated analysis environment for genetic marker analysis[J]. Bioinformatics, 2005, 21(9): 2128-2129.
- [17] EVANNO G, REGNAUT S, GOUDET J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study [J]. Molecular Ecology, 2005, 14(8): 2611-2620.
- [18] 吴承来, 张倩倩, 董炳雪, 李圣福, 张春庆. 我国部分玉米自交系遗传关系和遗传结构解析[J]. 作物学报, 2010, 36(11): 1820-1831.  
WU Chenglai, ZHANG Qianqian, DONG Bingxue, LI Shengfu, ZHANG Chunqing. Analysis of genetic structure and genetic relationships of partial maize inbred lines in China[J]. Acta Agronomica Sinica, 2010, 36(11): 1820-1831.
- [19] 施永泰, 边红武, 韩凝, 潘建伟, 童微星, 朱睦元. 中国江、浙地区栽培大麦遗传资源的 RAPD 研究[J]. 作物学报, 2004, 30

- (3):258-265.  
SHI Yongtai, BIAN Hongwu, HAN Ning, PAN Jianwei, TONG Weixing, ZHU Muyuan. Genetic variation analysis by RAPD of some barley cultivars in China[J]. Acta Agronomica Sinica, 2004, 30(3): 258-265.
- [20] 宏棋斌,侯磊,罗小英,李德谋,肖月华,斐炎,杨开俊,甲错.应用RAPD标记分析川西北高原青稞的遗传背景[J].中国农业科学,2001,34(2):133-138.  
HONG Qibin, HOU Lei, LUO Xiaoying, LI Demou, XIAO Yuehua, FEI Yan, YANG Kaijun, JIA Cuo. Using RAPD for evaluating genetic background among naked barley varieties in Sichun Northwestern region[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2001, 34(2): 133-138.
- [21] XIE W G, ZHANG X Q, CAI H W, LIU W, PENG Y. Genetic diversity analysis and transferability of cereal EST-SSR markers to orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.)[J]. Biochemical Systematics and Ecology, 2010, 38(4): 740-749.
- [22] ZHU C S, GORE M, BUCKLER E S, YU J M. Status and prospects of association mapping in plants[J]. The Plant Genome, 2008, 1(1): 5-20.
- [23] 何倚剑,刘卫东,柳李旺,王倩,崔群香.茄子种质资源遗传多样性和群体结构分析[J].南京农业大学学报,2013,36(5):13-20.  
HE Yijian, LIU Weidong, LIU Liwang, WANG Qian, CUI Qunxiang. Genetic diversity and population structure of eggplant (*Solanum melongena* L.) germplasm[J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2013, 36(5): 13-20.
- [24] 章秋平,刘东成,刘威生,刘硕,张爱民,刘宁,张玉萍.华北生态群普通杏遗传多样性与群体结构分析[J].中国农业科学,2013,46(1):89-98.  
ZHANG Qiuping, LIU Dongcheng, LIU Weisheng, LIU Shuo, ZHANG Aimin, LIU Ning, ZHANG Yuping. Genetic diversity and population structure of the north China populations of apricot (*Prunus armeniaca* L.)[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2013, 46(1): 89-98.
- [25] 何天明,陈学森,高疆生,张大海,徐麟,吴燕.新疆栽培杏群体遗传结构的SSR分析[J].园艺学报,2006,33(4):809-812.  
HE Tianming, CHEN Xuesen, GAO Jiangsheng, ZHANG Dahai, XU Lin, WU Yan. Using SSR markers to study population genetic structure of cultivated apricots native to Xinjiang[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2006, 33(4): 809-812.
- [26] 苑兆和,陈学森,张春雨,何天明,冯建荣,冯涛.普通杏群体遗传结构的荧光AFLP分析[J].园艺学报,2008,35(3):319-328.  
YUAN Zhaohe, CHEN Xuesen, ZHANG Chunyu, HE Tianming, FENG Jianrong, FENG Tao. Population genetic structure in apricot (*Armeniaca* L.) cultivars revealed by fluorescent-AFLP markers[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2008, 35(3): 319-328.
- [27] 张春雨,陈学森,林群,苑兆和,张红,张小燕,刘崇祺,吴传金.新疆野苹果群体遗传结构和遗传多样性的SRAP分析[J].园艺学报,2009,36(1):7-14.  
ZHANG Chunyu, CHEN Xuesen, LIN Qun, YUAN Zhaohe, ZHANG Hong, ZHANG Xiaoyan, LIU Chongqi, WU Chuanjin. SRAP markers for population genetics structure and genetic diversity in *Malus sieversii* from Xinjiang China[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2009, 36(1): 7-14.
- [28] 刘晶.中国豆梨与川梨的遗传多样性和群体遗传结构研究[D].杭州:浙江大学,2013.  
LIU Jing. Studies on genetic diversity and structure of *Pyrus calleryana* and *P. pashia* in China [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2013.
- [29] 刘秀云,李慧,刘志国,赵锦,刘孟军.基于SSR标记的255个枣品种亲缘关系和群体遗传结构分析[J].中国农业科学,2016,49(14):2772-2791.  
LIU Xiuyun, LI Hui, LIU Zhiguo, ZHAO Jin, LIU Mengjun. Genetic diversity and structure of 255 cultivars of *Ziziphus jujuba* Mill. [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2016, 49(14): 2772-2791.
- [30] YANG B. Genetic diversity and population structure of cultivated blueberries (*Vaccinium* section *Cyanococcus* spp.) [D]. North Carolina: North Carolina State University, 2012.
- [31] JAMES J L, JAMES R B, ARLEN D D, KAZIMIERZ P, MAX E A. Genetic resources of temperate fruit and nut crops 1-- blueberry and cranberries (*Vaccinium*) [M]. Wageningen: International Society for Horticultural Science, 1990.