

杜鹃花EST-SSR标记的开发及遗传多样性分析

李美芹^{1,2}, 潘叶羽², 钱萍仙², 卢丹², 明萌^{1,2}, 饶慧云², 刘蓉², 谢晓鸿², 吴月燕^{2,*}

¹上海海洋大学水产与生命学院, 上海201306; ²浙江万里学院生物与环境学院, 浙江宁波315100

摘要: 从NCBI公共数据库下载2 535条杜鹃花相关表达序列标签(expressed sequence tags, EST), SSR位点搜索共得到435个位点。利用Primer5.0对重复单元数较大的30个SSR位点设计引物, 通过混合基因池进行引物初筛, 25对引物可扩增出条带; 利用非变性聚丙烯酰胺凝胶(PAGE)研究25对SSR引物的PCR扩增特点。14个SSR位点为多态性, 各位点的等位基因介于2~5个, 平均等位基因数3.8个; 观望杂合度 H_o 、期望杂合度 H_e 、多态信息含量PIC范围分别为0~0.8333、0.0816~0.7172、0.0767~0.6471; 多态位点中有5个高度多态、7个中度多态和2个低度多态。非加权配对算术平均法(UPGMA)聚类分析结果表明: 开发的14个EST-SSR标记能有效鉴定种质资源, 对于杜鹃花品种的鉴定与遗传多样性分析具有重要应用价值。

关键词: 杜鹃花; EST-SSR; PAGE; 遗传多样性

杜鹃花是杜鹃花科(Ericaceae)杜鹃花属(*Rhododendron*)植物的总称, 又称为山踯躅、山石榴、映山红等(李波等2011), 属常绿或落叶灌木, 花种类繁多, 花色绚丽, 花、叶兼美, 素有木本花卉之王的称号, 具有极高的观赏和药用价值(张艳红2007)。杜鹃花新种质资源的开发多依靠杂交育种, 选择遗传距离和亲缘关系较远的亲本进行远缘杂交对于开发丰富、有价值的新种质至关重要(兰熙等2012)。目前, 杜鹃花种质资源分类混乱、亲缘关系复杂, 给杂交育种选择亲本带来困难, 难以实现育种目标。随着分子标记技术的发展, 利用分子标记技术探究种质资源亲缘关系的问题已经成为一种趋势。目前, 许多学者利用不同的分子标记方法对杜鹃花种质资源多样性进行了研究。肖政等(2015)利用15条ISSR引物研究25份杜鹃花遗传多样性, 共得到210条多态性条带, 将25份种质资源聚成两类; 陈建梅等(2014)利用ITS条形码技术分析了北京云蒙山22份杜鹃花材料的遗传多样性; 吴月燕等(2013)利用SRAP分子标记技术对西洋杜鹃的分类和遗传多样性进行了研究; 李辛雷(2012)利用SSR、AFLP分子标记技术研究杜鹃红山茶的遗传多样性; 周兰英(2008)利用RAPD分子标记技术研究43种杜鹃花属植物的遗传多样性和亲缘关系。

简单重复序列(simple sequence repeat, SSR)又称微卫星DNA (microsatellite DNA), 是广泛存在于真核和原核生物基因组中1~6个核苷酸基元串联重复而成的DNA序列(Tautz和Renz 1984), 具有多态性高, 共显性, 通用性高等特点(贾继增1995)。根据SSR来源可将SSR分为基因组SSR和EST-SSR。传统的基因组SSR标记开发需要构建基因组文库,

对克隆进行逐一鉴定, 造成费时、费力且成本高的现象(张增翠和侯喜林2004; 陈怀琼等2009); 而EST-SSR来源于基因表达区域, 可直接反映基因的多样性, 在不同物种间具有良好的通用性(Powell等1996), EST-SSR标记不仅具有传统SSR标记多态性高、重复性好与共显性等特点, 而且无需构建基因组文库, 无需进行杂交和测序, 并且开发成本低。近年来, 大量快速增长的EST数据已成为SSR的重要来源, 基于EST序列开发SSR标记在梨(王西成等2010; 吕彦霞等2015)、荔枝(向旭等2010; 孙清明等2011)、桃(Vendramin等2007)、核桃(齐建勋等2011)、猕猴桃(廖娇等2011)、小桐子(杨春和刘爱忠2011)、小麦(潘海涛等2010)、金银花(蒋超等2012)、杨树(宋跃朋等2010)、甘蓝(陈琛等2010)和大白菜(李丽等2009)等多种植物中均有报道。在杜鹃花属植物中, 王书珍等(2014)对1 323条EST序列进行了整理分析, 得到65个SSR位点, 为杜鹃花的遗传多样性分析提供了依据; Nian等(2010)开发了15个马缨杜鹃微卫星位点并研究了杜鹃花的遗传结构和同族杜鹃花的基因流向; Tan等(2009)利用FIASCO方法从映山红上开发了8个标记; Dendauw等(2001)开发了8对标记引物, 其中6对有较好的扩增效果和多态性。到目前为止, 国内外仅有少量关于杜鹃花EST-SSR分子标记建立研究的报道。

收稿 2015-12-28 修定 2016-02-25

资助 宁波市重大科技专项(2014C11002)和浙江省重中之重学科“生物工程”开放基金(KF2015008)。

* 通讯作者(E-mail: wyynb2009@163.com)。

浙江宁波地区是杜鹃花原产地之一, 种质资源丰富, 主要包括本地原始种质资源、引进种质资源以及本地杂交种质资源等, 由于种质资源引进过程中音译问题、杂交育种的种质资源命名随意性及种属关系不当等问题造成了种质资源分类混乱的现象, 出现了一物多名或一名多物等现象, 给杜鹃花种质资源的进一步开发带来了很大的困难。另外, 杂交育种是杜鹃花选育中的主要手段, 杂交育种过程中, 盲目的选择育种亲本, 极易造成新种质资源开发过程中的人力、物力的浪费, 解决我国杜鹃花种质资源的系统分类问题是杜鹃花种质资源发展的迫切要求(刘晓青等2011)。本研究以宁波地区的原始种、杂交育种和园林绿化中常用的杜鹃花种质资源为研究材料, 旨在通过分析杜鹃花的EST序列中的SSR位点, 开发杜鹃花EST-SSR引物, 探究宁波地区杜鹃花种质资源的遗传多样性及其遗传结构, 为杜鹃花的系统分类和新种质资源的开发提供技术支持和理论指导。

材料与方法

1 试验材料

供试杜鹃花(*Rhododendron* sp.)样品取自宁波北仑万景杜鹃园、四明山国家森林公园和宁波植物园, 根据Chamberlain等(1996)提出的8个杜鹃花亚属分类系统, 将24个种质资源进行分类: ‘闹羊花’归类到羊躑躅亚属; ‘映山红’、‘满山红’、‘溪畔杜鹃’和‘夏红’归类到映山红亚属; ‘马银花’和‘刺毛杜鹃’归类到马银花亚属; ‘云锦杜鹃’归类到常绿杜鹃亚属; 其余材料均未进行系统分类。供试材料详细信息见表1。

2 试验方法

2.1 DNA提取

采用改良CTAB法(Porebski等1997)提取杜鹃花叶片基因组DNA, 并针对其自身多糖含量丰富、叶表绒毛量多的特性, 利用固体聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、5%PVP溶液和β-巯基乙醇去除叶片中的多糖类物质。核酸纯度测定仪(Smart Spec Plus, BIO-RAD)测定样品浓度及纯度, 取3.0 μL DNA样品与1.0 μL 6×Loading Buffer混匀后用1.0%琼脂糖凝胶电泳检测DNA样品完整性和纯度, 核酸染料(全式金, R322)显色, DL1, 5000 Marker (Bio Basic

表1 供试杜鹃花材料

Table 1 *Rhododendron* accessions for the experiment

编号	品种名称	来源	亚属	备注
1	‘紫鹤’	日本	未知	引进种
2	‘闹羊花’	中国	羊躑躅亚属	原种
3	‘粉鹤’	日本	未知	引进种
4	‘琉球红’	日本	未知	引进种
5	‘白鹤’	日本	未知	引进种
6	‘天女舞’	未知	未知	未知
7	‘恰恰’	美国	未知	引进种
8	‘粉红泡泡’	美国	未知	引进种
9	‘小叶毛鹃’	西欧	未知	引进种
10	‘秋水波’	中国	未知	杂交种
11	‘华顶杜鹃’	中国	未知	未知
12	‘肯特’	比利时	未知	引进种
13	‘十二乙重’	中国	未知	杂交种
14	‘红苹果’	中国	未知	杂交种
15	‘绿色光辉’	美国	未知	引进种
16	‘溪畔杜鹃’	中国	映山红亚属	原种
17	‘映山红’	中国	映山红亚属	原种
18	‘满山红’	中国	映山红亚属	原种
19	‘牡丹红’	西欧	未知	引进种
20	‘夏红’	中国	映山红亚属	杂交种
21	‘刺毛杜鹃’	中国	马银花亚属	原种
22	‘马银花’	中国	马银花亚属	原种
23	‘美人笑’	西欧	未知	引进种
24	‘云锦杜鹃’	中国	常绿杜鹃亚属	原种

Inc)为标准分子量对照, 紫外凝胶成像系统成像观察。根据检测结果稀释DNA至50 ng·μL⁻¹, 供后续PCR扩增实验使用, 保存于-20℃冰箱备用。

2.2 EST-SSR位点筛选

从NCBI (National Center for Biotechnology Information)公共数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>)下载杜鹃花2 535条EST序列(截至2015年11月), 保存为Fasta格式。用BioEdit编辑EST序列, 剔除小于150 bp的EST序列, 利用简单重复序列鉴定工具(Simple Sequence Repeat Identification Tool, SSRIT) (<http://archive.gramene.org/db/markers/ssrtool>)在线软件分析EST序列, 查找SSR位点。参数设置标准: 重复基元一核苷酸、二核苷酸、三核苷酸、四核苷酸、五核苷酸和六核苷酸最少重复次数分别为12次、6次、4次、3次、3次、3次(王书珍等2014; 廖娇等2011; 陈琛等2010)。

2.3 EST-SSR引物设计

对筛选出含有SSR位点的EST序列, 剔除SSR

位点旁邻序列小于30 bp的EST序列后, 利用Primer 5.0进行引物设计, 引物长度18~20 bp, GC含量40%~60%, Tm值50~65°C之间, 产物长度100~350 bp。引物设计原则: 无发卡结构, 无二聚体, 无错配, 并且尽量无交叉二聚体。利用Oligo6.0软件对所设计出的引物进行评价分析, 选取引物评分在90~100之间, 确保可扩增出目的片段; 由于SSR位点侧翼序列为保守序列, 为保证目标序列的扩增性, 一般将目标产物的长度控制在100~350 bp之间。设计的引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

2.4 EST-SSR引物筛选

选取6个观赏性状差异较大的品种‘紫鹤’、‘琉球红’、‘恰恰’、‘美人笑’、‘映山红’和‘云锦杜鹃’的基因组DNA等量混合构建混合基因池。引物初步筛选条件: 将所有引物在 Mg^{2+} 浓度为2.5 mmol·L⁻¹、Tm 56°C条件下, 用混合基因池模板进行PCR扩增, 反应体系10 μL: 1×Buffer, 2.0 mmol·L⁻¹ MgCl₂, 0.2 mmol·L⁻¹ dNTPs, 0.25 mmol·L⁻¹的上下游引物, 0.5 U的DNA Polymerase, 以及2.5 ng的DNA模板, 加ddH₂O补齐体系。PCR扩增反应在Eppendorf公司生产的Mastercycler普通梯度PCR仪上进行。初步筛选反应程序: 94°C预变性4 min; 94°C变性40 s, 56°C退火40 s, 72°C延伸1 min, 35个循环; 72°C延伸7 min; 4°C保存。PCR扩增产物利用1.5%的琼脂糖凝胶电泳检测, 核酸染料染色, 紫外凝胶成像系统成像观察。选取扩增结果为明显的单一条带或两条条带(亮带较弱带强2倍以上)的引物保留(刘果等2012), 用于SSR多态性分析。

2.5 SSR位点分析

用筛选出的引物对24个杜鹃花个体进行SSR位点的多态性检测及最适温度的确定, PCR反应产物利用8%的非变性聚丙烯酰胺凝胶(PAGE)于北京六一仪器厂生产的DYY-II型垂直板电泳仪中电泳分离。电泳缓冲液为1×TBE, 电压180 V, 电流180 mA, 电泳时间为2~3 h, EB染色, 用Biorad凝胶成像系统检测电泳结果。选取PCR扩增效果最好的25对引物进行杜鹃花的SSR多态性分析, 反应条件及反应程序同引物筛选部分, 不同引物组合的最适退火温度见表2。根据电泳结果, 统计SSR位点信息, 在相同迁移位置有带的记为1, 无带的记

为0, 建立0、1矩阵, 利用Popgen32软件处理结果, 获得评价多态性位点的遗传学参数: 等位基因数(Na)、期望杂合度(He)、观测杂合度(Ho)、多态信息含量(PIC)、哈迪-温伯格平衡(Hardy-Weinberg Equilibrium, HWE)及遗传距离(genetic distance, GD)并利用遗传距离进行聚类分析, 构建24份种质资源的聚类进化树。

实验结果

1 SSR位点分布、频率和特点

利用SSRIT共筛选出435个SSR位点, 占总EST序列17.1%。由图1可知, 重复基元数较高的为二核苷酸和三核苷酸, 单核苷酸相对较低, 四核苷酸, 五核苷酸和六核苷酸只占极少数, 表明杜鹃花中SSR重复基元分布不平衡, 主要分布在二核苷酸和三核苷酸。

2 杜鹃花SSR位点的筛选

为检测所开发EST-SSR标记的可用性, 选择SSR位点重复性较高的引物30对进行合成, 包括二核苷酸、三核苷酸和六核苷酸重复基元的SSR位点的引物并以‘紫鹤’、‘琉球红’、‘恰恰’、‘美人笑’、‘映山红’和‘云锦杜鹃’6个杜鹃花品种的混合DNA池为模板进行梯度PCR扩增, 筛选出可扩增引物25对, 有效扩增率为83.3%; 对24个杜鹃花品种进行多态性分析, 共筛选出多态引物14对, 多态率为46.7%。表明利用杜鹃花EST序列开发EST-SSR标记是可行的。

3 EST-SSR引物评价

由表2可知, 14个SSR多态性位点在杜鹃花24个个体中共获得47个等位基因, 多态位点的等位基因数为2~5个, 平均等位基因数为3.36个, 其中R01、R07二个位点的等位基因数为5个。观测杂合度、期望杂合度分别为0.000~0.8333、0.0816~0.7172。PIC值是衡量群体变异程度的重要参数, 24个多态位点的PIC值介于0.0767~0.6471, 平均值为0.4208, 其中有5个高度多态位点(PIC>0.5)、7个中度多态位点(0.25<PIC<0.5)、2个低度多态位点(PIC<0.25)。图2为R01~R14位点在24个样品中多态性扩增情况。

4 14个SSR位点对杜鹃花群体的多态性评价

图3的UPGMA聚类分析结果表明: 24份杜鹃

表2 杜鹃花14个EST-SSRs标记的特征
Table 2 Characteristics of 14 EST-SSRs for azalea

位点	引物序列(5'→3')	重复模式	产物长度/bp	退火温 度/°C	等位基因 数(Na)	观望杂合 度(Ho)	期望杂合 度(He)	多态信息 含量(PIC)	P值
R01	AAAGGCTGTAGCAACAACCTG GTTTCAGGGTGTCTTTAGGG	(cct) 4	180~300	54.5	5	0.3750	0.5027	0.4585	0.0000
R02	ACGGGACGAGAATCTACCAC CTATCACCCCAAGTCCAACA	(ctcggc)3	160~250	56.3	2	0.8333	0.4965	0.3680	0.0007
R03	GGAAAACATTGAGGAAGAAC GGTCATCTTCATCCATCAAA	(agacaa)3	160~220	52.5	2	0.1667	0.1560	0.1411	0.7025
R04	CACCCCTTTACTACAACCTGG TTGAACCTAACCCGAAGATA	(acctca)3	160~250	58.7	3	0.4167	0.3449	0.2930	0.6887
R05	TTGAATCGGTTAGAGAAGGC AGAAGGAATGTCCATCAGCA	(tct) 5	180~300	56.7	4	0.5000	0.7066	0.6326	0.2227
R06	ACGAGGAGAGGAGGCAAAAC TGATGGAGCCGACCTAAATG	(ag) 9	126~200	59.3	4	0.5000	0.7172	0.6471	0.0188
R07	TCTACTTTTCCCAACGCTCC ACCCCTTTCAATAGTCACC	(cca)10	180~240	58.5	5	0.2500	0.3041	0.2869	0.0000
R08	ACTTTTCCCAACGCTCCTCT CAAACCTTAGCCAGTCCCA	(cca)10	180~300	59.7	4	0.4583	0.6702	0.5887	0.0197
R09	CGTCAAGAAACCTCCAGAAG GTATTACAAAGCGAGCCCAT	(tactag) 3	160~250	57.5	2	0.0000	0.0816	0.0767	0.0000
R10	ATAGCAGCAGTAGCAACCGC CGTTCTGAGCAGTGAGTTCG	(agg)5	140~220	60.3	4	0.2917	0.5523	0.4498	0.0820
R11	ATTAGGATAACACAGGCAAG ACAACAAACGATAGAAGACG	(tg)7	225~325	54.9	2	0.7083	0.4672	0.3528	0.0095
R12	GCTGAGAATGCTACGGAGAC AGTGCTACCGACACAGAATA	(at)11	160~250	58.1	3	0.0000	0.5922	0.5020	0.0000
R13	TATTGTAAACCAGGAGGGCA GTCCCCTTCTGGTGATGTCT	(ag)31	160~250	58.9	3	0.2917	0.5257	0.4563	0.0055
R14	CCCCAATCACTTGCCACTTT TTTGGAGGAAGCGGCTAAGA	(ct)17	200~300	58.7	4	0.6250	0.7083	0.6375	0.3340
平均值	—	—	—	—	3.3571	0.3869	0.4875	0.4208	—



图1 EST-SSR位点核酸分布特征
Fig.1 EST-SSR loci nucleic acid distribution characteristics

花种质资源聚成9类, 如羊躑躅亚属的‘闹羊花’和‘十二乙重’、‘天女舞’聚成一类; 马银花亚属的‘马银花’和‘刺毛杜鹃’聚成一类; 常绿杜鹃亚属的‘云锦杜鹃’和‘华顶杜鹃’、‘溪畔杜鹃’聚成一类; 映山

红亚属的‘映山红’和‘满山红’聚成一类; ‘琉球红’、‘小叶毛鹃’、‘粉鹤’、‘紫鹤’和‘白鹤’聚成一类。‘溪畔杜鹃’和‘夏红’同属映山红亚属, 但未聚成一类, 可能与杜鹃花种质资源混乱的杂交有关。

讨 论

目前, 鉴于EST-SSR开发的简便高效性, 越来越多的研究者倾向于利用EST-SSR开发EST-SSR引物。忻雅等(2006)利用15对EST-SSR引物28个白菜品种进行PCR扩增, 发现7对引物显示多态性, 占引物总数的46.7%; 上官凌飞等(2011)对杏的EST-SSR标记进行开发, 设计的50对引物40对可扩增出理想条带, 25对可扩增出多态性, 有效扩增率为80%, 多态性占62.5%; 本研究设计了30对EST-SSR引物, 其

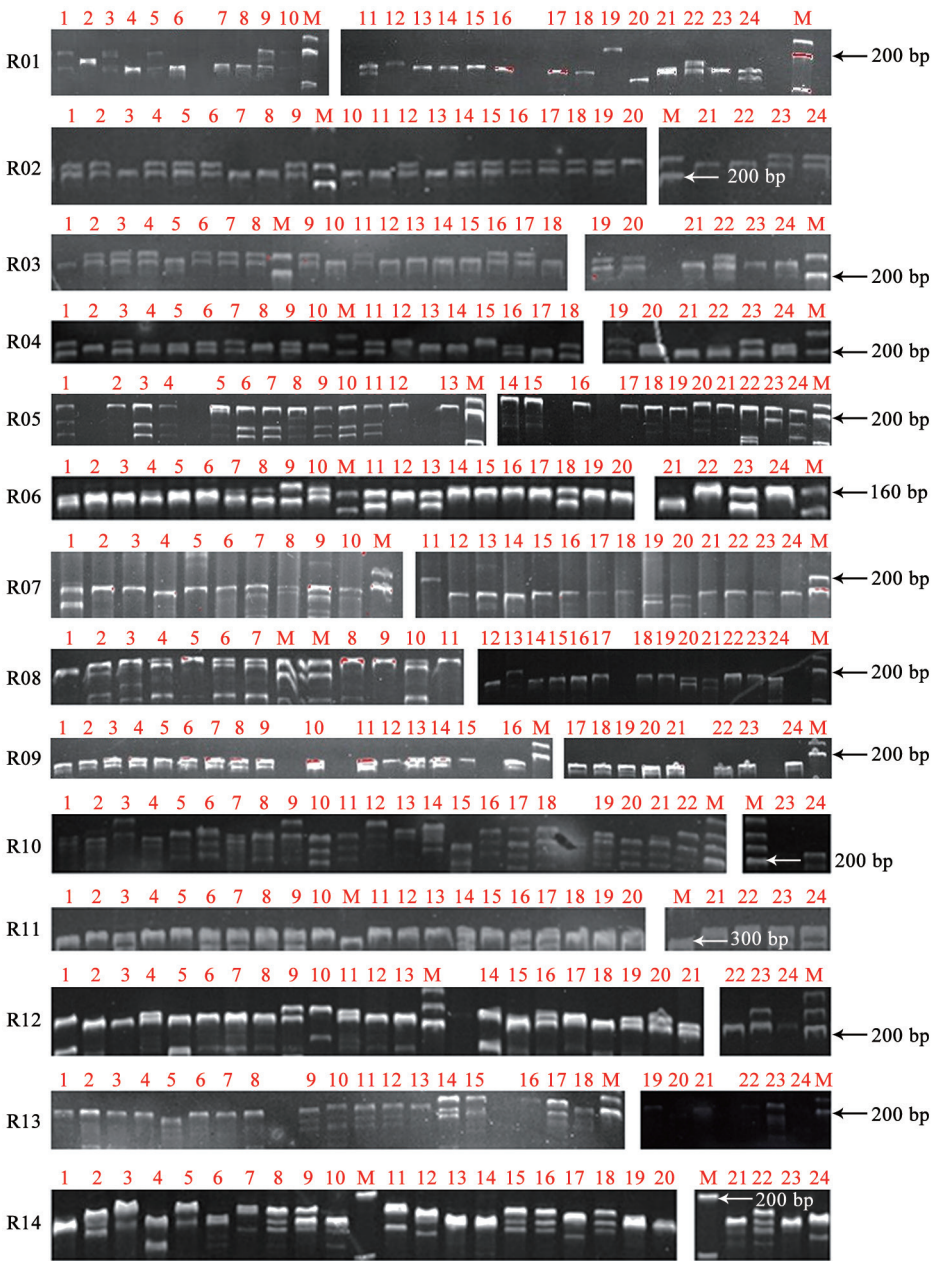


图2 R01~R14位点在24杜鹃花种间的多态性

Fig.2 Polymorphisms showed 24 azalea cultivars with locus R01–R14

R01~R14为14个位点的扩增图。1: ‘紫鹤’; 2: ‘闹羊花’; 3: ‘粉鹤’; 4: ‘琉球红’; 5: ‘白鹤’; 6: ‘天女舞’; 7: ‘恰恰’; 8: ‘粉红泡泡’; 9: ‘小叶毛鹃’; 10: ‘秋水波’; 11: ‘华顶杜鹃’; 12: ‘肯特’; 13: ‘十二乙重’; 14: ‘红苹果’; 15: ‘绿色光辉’; 16: ‘溪畔杜鹃’; 17: ‘映山红’; 18: ‘满山红’; 19: ‘牡丹红’; 20: ‘夏红’; 21: ‘刺毛杜鹃’; 22: ‘马银花’; 23: ‘美人笑’; 24: ‘云锦杜鹃’; M: 20 bp DNA Ladder Marker。

中25对引物可扩增出条带, 有效扩增率为83.3%, 多态性占46.7%。说明以EST序列开发的SSR引物扩增效率较高, 能有效反应种质资源的遗传多样性, 为探究生物遗传多样性提供了丰富的资源。

在杜鹃花EST序列中搜索到435个SSR位点, 占EST序列的17.1%, 该比率高于廖娇等(2011)猕

猴桃的14.1%, 上官凌飞等(2010)梅的9.2%, 但低于Jiang等(2006)柑橘的21.6%。不同物种间的SSR位点的差异多是由于物种间SSR信息差异或物种在GenBank中可用来分析的EST数量不同、搜索SSR位点的软件算法不同及设定参数的不同等原因造成的。随着EST数据库的容量不断增大, EST-SSR

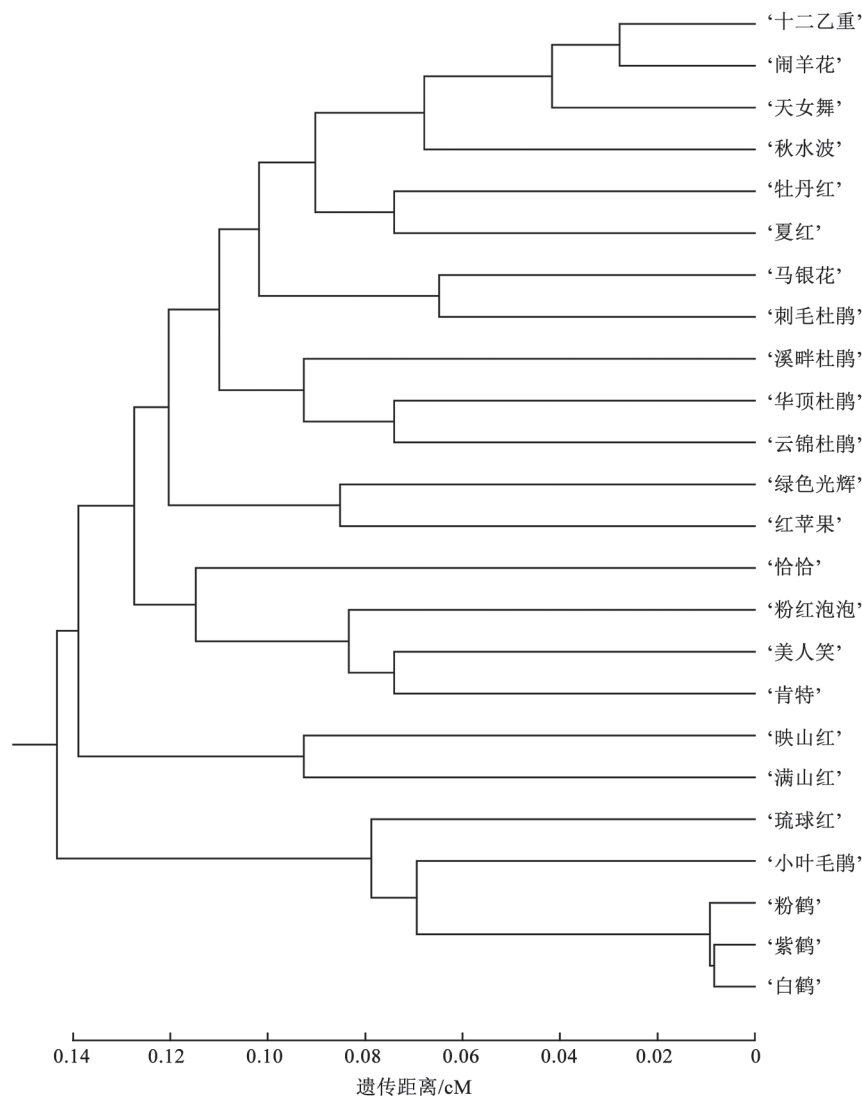


图3 24个杜鹃花品种聚类分析树状图
Fig.3 Dendrogram of 24 azalea varieties clustering analysis

标记的开发将进入新的阶段, 设定物种间的SSR位点的标准, 将给SSR标记的开发带来很大便利, 但设定标准后, 相对减少了SSR位点开发的丰富性。目前, 大多数植物EST序列的SSR位点重复基元多为二、三碱基重复, 陈琛等(2010)在甘蓝的EST-SSR中, 二核苷酸和三核苷酸占优势重复基元类型。蒋超等(2012)研究金银花的EST-SSR发现SSR重复多为二核苷酸和三核苷酸, 与本试验的研究一致。在EST-SSR开发过程中, 二至四个核苷酸重复基元的开发, 成功率相对较高。

黄茂如和强鸿良(1984)根据表型和来源, 将杜鹃花品种分成4类, 主要有东鹃、西鹃、春鹃和夏鹃。目前, 我国普遍认可的杜鹃花分类方式, 主要

是东鹃、西鹃、春鹃、夏鹃和高山杜鹃。这种分类多依据开花时间和引种地等外在表现信息进行分类, 难以达到规范化、合理化的分类目的; 并且杜鹃花属植物杂交品种数量繁多, 种间形态各异; 品种名称与地方俗名的混用以及国外引进品种音译的不规范等各种问题, 均使得传统的分类方法已无法对杜鹃花属植物亲缘关系做出更为准确分析。而EST-SSR分子标记的开发则为该方面的研究提供了一种新的手段。本研究UPGMA聚类结果分析表明: ‘云锦杜鹃’和‘华顶杜鹃’聚成一类, 表明‘华顶杜鹃’可能是‘云锦杜鹃’的地理变种; 马银花亚属的‘马银花’和‘刺毛杜鹃’聚成一类; 映山红亚属的‘映山红’和‘满山红’聚成一类, 分类结果表

明SSR分子标记技术能从分子水平给杜鹃花分类提供更为科学的依据,对研究杜鹃花系统位置和亲缘关系时具有很大的应用价值。对未知分属杜鹃花聚类分析可知‘十二乙重’和‘天女舞’可能是以‘闹羊花’或羊躑躅亚属的其他种质作为亲本杂交而成的;‘牡丹红’和‘夏红’聚成一类,可以推测‘牡丹红’与映山红亚属植株有一定的关系;‘绿色光辉’、‘红苹果’、‘恰恰’、‘粉红泡泡’、‘美人笑’和‘肯特’这些杂交西鹃与原种‘云锦杜鹃’亲缘关系较近,可推测其杂交亲本可能是‘云锦杜鹃’,系统分类可以划分到常绿杜鹃亚属。

参考文献

- Chamberlain D, Hyam R, Argent G, Fairweather G, Walter K (1996). The Genus *Rhododendron*: Its Classification and Synonymy. Edinburgh, UK: Royal Botanical Garden Edinburgh
- Chen C, Zhuang M, Li KN, Liu YM, Yang LM, Zhang YY, Cheng F, Sun PT, Fang ZY (2010). Development and utility of EST-SSR marker in cabbage. *Acta Horti Sin*, 37 (2): 221–228 (in Chinese with English abstract) [陈琛, 庄木, 李康宁, 刘玉梅, 杨雨梅, 张扬勇, 程斐, 孙培田, 方智远(2010). 甘蓝EST-SSR标记的开发与应用. *园艺学报*, 37 (2): 221–228]
- Chen HQ, Sui C, Wei JH (2009). Summary of strategies for developing SSR primer. *Mol Plant Breed*, 7 (4): 845–851 (in Chinese with English abstract) [陈怀琼, 隋春, 魏建和(2009). 植物SSR引物开发策略简述. *分子植物育种*, 7 (4): 845–851]
- Chen JM, Wang ZY, Zhang LN, Xu M, Yuan Y, Zhang KZ, Wang J, Cui JT (2014). Explored genetic diversity of Beijing Yunmeng Mountain *Rhododendron* based on ITS barcode technology. *Chin Agric Sci Bull*, 30 (25): 43–48 (in Chinese with English abstract) [陈建梅, 王钊宇, 张立娜, 徐曼, 袁园, 张克中, 王杰, 崔金腾(2014). 基于ITS条形码技术分析北京云蒙山杜鹃花属遗传多样性. *中国农学通报*, 30 (25): 43–48]
- Dendaaw J, De Riek J, Arens P, Vosman B, Van Bockstaele E, De Loose M (2001). Development of sequence tagged microsatellite site (STMS) markers in azalea. *Acta Horti*, 546: 193–197
- Huang MR, Qiang HL (1984). *Azalea*. Beijing: China Forestry Publishing House, 1–119 (in Chinese) [黄茂如, 强鸿良(1984). 杜鹃花. 北京: 中国林业出版社, 1–119]
- Jia JZ (1995). Molecular germplasm diagnostics and molecular marker-assisted breeding. *Sci Agric Sin*, 29 (4): 1–10 (in Chinese with English abstract) [贾继增(1995). 分子标记种质资源鉴定和分子标记育种. *中国农业科学*, 29 (4): 1–10]
- Jiang C, Yuan Y, Liu GM, Huang LQ, Wang XM, Yu J, Chen M (2012). EST-SSR identification of *Lonicera japonica* Thunb. *Acta Pharm Sin*, 47 (6): 803–810 (in Chinese with English abstract) [蒋超, 袁媛, 刘贵明, 黄璐琦, 王绪敏, 于军, 陈敏(2012). 基于EST-SSR的金银花分子鉴别方法研究. *药学报*, 47 (6): 803–810]
- Jiang D, Zhong GY, Hong QB (2006). Analysis of microsatellites in citrus unigenes. *Acta Genet Sin*, 33 (4): 345–353
- Lan X, Zhang LH, Zhang JZ, Cui HX, Jiang CD, Shi L (2012). Research progress of *Rhododendron* breeding. *Acta Horti Sin*, 39 (9): 1829–1838 (in Chinese with English abstract) [兰熙, 张乐华, 张金政, 崔洪霞, 姜闯道, 石雷(2012). 杜鹃花属植物育种研究进展. *园艺学报*, 39 (9): 1829–1838]
- Li B, Zeng K, Zhu P, Cui P, Wu YY (2011). Study on induction of callus and buds of *Rhododendron hybridum*. *Jiangsu Agric Sci*, 39 (4): 51–54 (in Chinese) [李波, 曾孔, 朱平, 崔鹏, 吴月燕(2011). 西洋杜鹃愈伤组织和芽诱导的研究. *江苏农业科学*, 39 (4): 51–54]
- Li L, He WM, Ma LP, Liu PY, Xu HM, Xu JB, Zheng XY (2009). Construction Chinese cabbage (*Brassica rapa* L.) core collection and its EST-SSR fingerprint database by EST-SSR molecular markers. *Geno Appl Biol*, 28 (1): 76–88 (in Chinese with English abstract) [李丽, 何伟明, 马连平, 刘庞源, 徐海明, 徐家柄, 郑晓鹰(2009). 用EST-SSR分子标记技术构建大白菜核心种质及其指纹图谱库. *基因组学与应用生物学*, 28 (1): 76–88]
- Li XL (2012). Genetic diversity and endangered mechanism of *Camellia azalea* Wei (PhD thesis). Beijing: Chinese Academy of Forestry, 1–124 (in Chinese with English abstract) [李辛雷(2012). 杜鹃红山茶遗传多样性及濒危机制(博士学位论文). 北京: 中国林业科学研究院, 1–124]
- Liao J, Huang CH, Gu QQ, Qu XY, Xu XB (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, 曲雪艳, 徐小彪(2011). 猕猴桃EST-SSR引物筛选及通用性分析. *果树学报*, 28 (6): 1111–1116]
- Liu G, Xie YJ, Zhang DQ, Gu ZJ (2012). Studies on quick screening of EST-SSR primers based on genomic DNA mixing pool. *J Central South Univ For Tech*, 32 (9): 124–129 (in Chinese with English abstract) [刘果, 谢耀坚, 张党权, 谷振军(2012). 基于基因组DNA混合池的EST-SSR引物快速筛选方法研究. *中南林业科技大学学报*, 32 (9): 124–129]
- Liu XQ, Su JL, Li C, Liu XH (2011). Bottleneck and countermeasures of *Rhododendron* horticulture industry development in China. *Jiangsu Agric Sci*, 39 (3): 14–16 (in Chinese) [刘晓青, 苏家乐, 李畅, 刘晓宏(2011). 我国杜鹃花产业发展的瓶颈及对策. *江苏农业科学*, 39 (3): 14–16]
- Lv YX, Sun ZD, Wang FZ, Shen LM, Yu XL (2015). Development and application of SSR primers based on the EST and genomic sequences in pear. *Mol Plant Breed*, 13 (7): 1559–1577 (in Chinese with English abstract) [吕彦霞, 孙志栋, 王芳展, 沈立铭, 余小林(2015). 基于梨EST和基因组序列SSR引物的批量开发与应用. *分子植物育种*, 13 (7): 1559–1577]
- Nian W, Zhang CQ, Yang JB, Zhang JL (2010). Development and characterization of 15 microsatellite loci for *Rhododendron delavayi* Franch. (Ericaceae). *Hortic Sci*, 45 (3): 457–459
- Pan HT, Wang JJ, Wang YY, Qi ZL, Li SS (2010). Development and mapping of EST-SSR markers in wheat. *Sci Agric Sin*, 43 (3): 452–461 (in Chinese with English abstract) [潘海涛, 汪俊君, 王盈盈, 齐照良, 李斯深(2010). 小麦EST-SSR标记的开发和遗传作图. *中国农业科学*, 43 (3): 452–461]
- Porebski S, Bailey LG, Baum BR (1997). Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant Mol Biol Rep*, 15 (1): 1–6

- 8–15
- Powell W, Morgante M, Andre C, Hanafey M, Vogel J, Tingey S, Rafalski A (1996). The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Mol Breed*, 2 (3): 225–238
- Qi JX, Hao YB, Zhu Y, Wu CL, Wang WX, Leng P (2011). Studies on germplasm of *Juglans* by EST-SSR markers. *Acta Horti Sin*, 38 (3): 441–448 (in Chinese with English abstract) [齐建勋, 郝艳宾, 朱艳, 吴春林, 王维霞, 冷平(2011). 核桃属种质资源的EST-SSR标记研究. *园艺学报*, 38 (3): 441–448]
- Shangguan LF, Li XY, Ning N, Wang YZ, Zhang Z, Fang JG (2011). Development of EST-SSR markers in apricot. *Acta Horti Sin*, 38 (1): 43–54 (in Chinese with English abstract) [上官凌飞, 李晓颖, 宁宁, 王玉柱, 章镇, 房经贵(2011). 杏EST-SSR标记的开发. *园艺学报*, 38 (1): 43–54]
- Shangguan LF, Li XY, Song CN, Wang XC, Wang YZ, Zhang Z, Fang JG (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, 王西成, 王玉柱, 章镇, 房经贵(2010). 梅EST-SSR标记的开发及利用. *西北植物学报*, 30 (9): 1766–1772]
- Song YP, Jiang XB, Zhang M, Wang ZL, Bo WH, An XM, Zhang ZY (2010). Genetic differences revealed by Genomic-SSR and EST-SSR in poplar. *J Beijing For Univ*, 32 (5): 1–7 (in Chinese with English abstract) [宋跃朋, 江锡兵, 张曼, 王泽亮, 薄文浩, 安新民, 张志毅(2010). 杨树Genomic-SSR与EST-SSR分子标记遗传差异性分析. *北京林业大学学报*, 32 (5): 1–7]
- Sun QM, Ma WC, Ma SP, Zhao JS, Bai LJ, Chen JZ, Cai CH, Xiang X, Ou LX (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, 赵俊生, 白丽军, 陈洁珍, 蔡长河, 向旭, 欧良喜(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]
- Tan XX, Li Y, Ge XJ (2009). Development and characterization of eight polymorphic microsatellites for *Rhododendron simsii* Planch (Ericaceae). *Conserv Genet*, 9 (1): 326–329
- Tautz D, Renz M (1984). Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Res*, 12: 4127–4138
- Vendramin E, Dettori M T, Giovinnazzi J, Giovinnazzi J, Micali S, Quarta R, Verde I (2007). A set of EST-SSRs isolated from peach fruit transcriptome and their transportability across *Prunus* species. *Mol Ecol Notes*, 7: 307–310
- Wang SZ, Zhang CJ, Cheng H, Fang YP, Xiang J, Zheng YL, Jin WB (2014). Analysis of simple sequence repeats information in expressed sequence tag resources of *Rhododendron simsii*. *Hubei For Sci Tech*, 43 (2): 7–10 (in Chinese with English abstract) [王书珍, 张传进, 程华, 方元平, 项俊, 郑永良, 金卫斌(2014). 杜鹃花表达序列标签资源中的微卫星信息分析. *湖北林业科技*, 43 (2): 7–10]
- Wang XC, Jiang SL, Shangguan LF, Cao YF, Qiao YS, Zhang Z, Fang JG (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, 姜淑琴, 上官凌飞, 曹玉芬, 乔玉山, 章镇, 房经贵(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]
- Wu YY, Tao QJ, Li B, Xu DY (2013). An optimal SRAP-PCR system of *Rhododendron hybridum* and its genetic diversity analysis with SRAP marker. *J Zhejiang A&F Univ*, 30 (6): 844–851 (in Chinese with English abstract) [吴月燕, 陶巧静, 李波, 许丹叶(2013). 西洋杜鹃SRAP体系优化及遗传多样性分析. *浙江农林大学学报*, 30 (6): 844–851]
- Xiang X, Ou LX, Chen HB, Sun QM, Chen JZ, Cai CH, Bai LJ, Zhao JS (2010). EST-SSR analysis of genetic diversity in 96 litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) germplasm resources in China. *Geno Appl Biol*, 29 (6): 1082–1092 (in Chinese with English abstract) [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]
- Xiao Z, Su JL, Liu XQ, Li C, He LS, Chen SP (2015). Analysis of genetic diversity of *Rhododendron* germplasm resources based on ISSR markers. *Acta Agric Jiangxi*, 27 (11): 6–10 (in Chinese with English abstract) [肖政, 苏家乐, 刘晓青, 李畅, 何丽斯, 陈尚平(2015). 基于ISSR标记的杜鹃花种质资源遗传多样性分析. *江西农业学报*, 27 (11): 6–10]
- Xin Y, Cui HR, Lu MZ, Yao YL, Jin JQ, Lin YP, Cui SL (2006). Data mining for SSRs in ESTs and EST-SSR marker development in Chinese cabbage. *Acta Horti Sin*, 33 (3): 549–554 (in Chinese with English abstract) [忻雅, 崔海瑞, 卢美贞, 姚艳玲, 金基强, 林容构, 崔水莲(2006). 白菜EST-SSR信息分析与标记的建立. *园艺学报*, 33 (3): 549–554]
- Yang C, Liu AZ (2011). Development of EST-SSR markers from *Jatropha curcas* (Euphorbiaceae) and their application in genetic diversity analysis among germplasms. *Plant Diver Resour*, 33 (5): 529–534 (in Chinese with English abstract) [杨春, 刘爱忠(2011). 小桐子EST-SSR分子标记的开发与种质遗传多样性分析. *植物分类与资源学报*, 33 (5): 529–534]
- Zhang YH (2007). Research advance of *Rhododendron* propagation. *Anhui Agric Sci*, 35 (23): 7170–7171, 7209 (in Chinese with English abstract) [张艳红(2007). 我国杜鹃花的繁育研究进展. *安徽农业科学*, 35 (23): 7170–7171, 7209]
- Zhang ZC, Hou XL (2004). Strategies for development of SSR molecular markers. *Hereditas*, 26 (5): 763–768 (in Chinese with English abstract) [张增翠, 侯喜林(2004). SSR分子标记开发策略及评价. *遗传*, 26 (5): 763–768]
- Zhou LY (2008). The study on relationship and genetic diversity of *Rhododendron* (PhD thesis). Chengdu: Sichuan Agricultural University, 1–107 (in Chinese with English abstract) [周兰英(2008). 杜鹃属植物亲缘关系及遗传多样性研究(博士论文). 成都: 四川农业大学, 1–107]

Development of EST-SSR primers for azalea and genetic analysis of cultivars

LI Mei-Qin^{1,2}, PAN Ye-Yu², QIAN Ping-Xian², LU Dan², MING Meng^{1,2}, RAO Hui-Yun², LIU Rong², XIE Xiao-Hong², WU Yue-Yan^{2,*}

¹College of Fisheries and Life, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; ²College of Biology and Environment, Zhejiang Wanli University, Ningbo, Zhejiang 315100, China

Abstract: A total of 2 535 azalea ESTs downloaded from the NCBI database were analyzed, from which 435 ESTs were obtained. Thirty pairs of primers were designed by the software Primer5.0 Plus. Genomic DNA pooling technology was used to quickly screen SSR primers, 25 pairs of EST-SSR primers could amplify fragments. The PCR products of 25 pairs of EST-SSR primers were detected by PAGE. It was revealed from the investigation of polymorphism that 14 SSR locus were polymorphic, the number of alleles of the 14 EST-SSR locus varied from 2 to 5, and the mean value is about 3.8. The range of the observed heterozygosity, the expected heterozygosity and the high polymorphism information content (PIC) values was 0 to 0.8333, 0.0816 to 0.7172, 0.0767 to 0.6471, respectively. There are 5 high polymorphic SSR locus, 7 moderate polymorphic SSR locus, and 2 low polymorphism SSR locus. Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Means (UPGMA) cluster analysis showed that the 14 EST-SSR markers are capable of differentiate the varieties and will be of great importance in azalea genetic analysis.

Key words: azalea; EST-SSR; PAGE; genetic diversity

Received 2015-12-28 Accepted 2016-02-25

This work was supported by Ningbo Science and Technology Major Project (Grant No. 2014C11002) and Top Key Discipline "Bioengineering" Open Fund of Zhejiang Province (Grant No. KF2015008).

*Corresponding author (E-mail: wyynb2009@163.com).