

薄壳山核桃种质资源的 SSR 标记分析及数字指纹构建

赵娟^{1a,1b}, 朱凯凯^{1a,1b}, 鲍佳书^{1a,1b}, 徐惠强², 李新芝², 黄金勇², 谭鹏鹏^{1a,1b}, 彭方仁^{1a,1b,①}

(1. 南京林业大学; a. 南方现代林业协同创新中心, b. 林学院, 江苏南京 210037; 2. 江苏省林木种苗管理站, 江苏南京 210036)

摘要: 为了建立一套薄壳山核桃(*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch)种质资源分子鉴别体系,本研究从薄壳山核桃 SSR 引物库中筛选出 10 对目的条带清晰、检测结果稳定的引物,对 SSR 标记进行染色体定位分析,基于 66 份薄壳山核桃样本叶片总 DNA 的扩增结果对每个 SSR 标记的遗传多样性和供试样本的 UPGMA 聚类结果进行分析,在此基础上筛选核心标记,利用种质信息编码和指纹码构建供试样本的数字指纹。结果表明:供试 10 个 SSR 标记位于薄壳山核桃的 8 条染色体上,其中,Chr05 染色体上的标记最多,分别为 Ciz023、Ciz064 和 PM-CIN4,其余染色体上各只有 1 个标记。供试 SSR 标记的观测等位基因数为 3~9,有效等位基因数为 2.0~6.2,Shannon's 信息指数为 0.923~2.009,观测杂合度为 0.000~0.701,期望杂合度为 0.492~0.839,多态信息含量为 0.482~0.821。聚类结果表明:在遗传相似系数为 0.262 处,供试 66 份样本被分成 2 组,并在遗传相似系数为 0.438 处,进一步细分为 6 个亚组。根据 10 个 SSR 标记的多态信息含量筛选出 4 个核心标记,即 PM-CIN4、Ciz25、Ciz033 和 Ciz023,可区分出 62 份样本。利用种质信息编码和指纹码成功构建了 62 份样本的数字指纹。综上所述,供试薄壳山核桃样本间的遗传相似性较大,构建的数字指纹能够快速、高效鉴别供试的绝大多数样本。

关键词: 薄壳山核桃; SSR 标记; 遗传多样性; 聚类分析; 数字指纹

中图分类号: Q946-33; S664.1 文献标志码: A 文章编号: 1674-7895(2023)02-0010-08

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7895.2023.02.02

SSR marker analysis and digital fingerprint construction of germplasm resources of *Carya illinoensis* ZHAO Juan^{1a,1b}, ZHU Kaikai^{1a,1b}, BAO Jiashu^{1a,1b}, XU Huiqiang², LI Xinzhi², HUANG Jinyong², TAN Pengpeng^{1a,1b}, PENG Fangren^{1a,1b,①} (1. Nanjing Forestry University: a. Co-Innovation Center for Sustainable Forestry in Southern China, b. College of Forestry, Nanjing 210037, China; 2. Jiangsu Forest Tree Seedling Management Station, Nanjing 210036, China), *J. Plant Resour. & Environ.*, 2023, 32(2): 10-17

Abstract: To establish a molecular identification system for germplasm resources of *Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch, 10 pairs of primers with clear target bands and stable detection results were screened out from the SSR primer library of *C. illinoensis* in this study. Chromosomal localization analysis was performed for SSR markers, and the genetic diversity of each SSR marker and UPGMA cluster result of test samples were analyzed based on the amplification result of total DNA in leaves of 66 *C. illinoensis* samples. On the basis, the core markers were screened, and the digital fingerprints of test samples were constructed by using germplasm information code and fingerprint code. The results show that the 10 test SSR markers are located on 8 chromosomes of *C. illinoensis*, in which, the markers on chromosome Chr05 are the most, which are Ciz023, Ciz064, and PM-CIN4, while there is only one marker on the other chromosomes each. The numbers of observed alleles of test SSR markers are 3-9, the numbers of effective alleles are 2.0-6.2, the Shannon's information indexes are 0.923-2.009, the observed heterozygosities are 0.000-0.701, the expected heterozygosities are 0.492-0.839, and the

收稿日期: 2022-10-24

基金项目: 薄壳山核桃提质增效关键技术示范与推广([2022]TG04); 江苏省种质资源圃建设项目

作者简介: 赵娟(1997—),女,宁夏固原人,硕士研究生,主要从事薄壳山核桃种质资源方面的研究工作。

①通信作者 E-mail: frpeng@njfu.edu.cn

引用格式: 赵娟,朱凯凯,鲍佳书,等.薄壳山核桃种质资源的 SSR 标记分析及数字指纹构建[J].植物资源与环境学报,2023,32(2):10-17.

polymorphism information contents are 0.482–0.821. The cluster result shows that 66 test samples can be divided into 2 groups at the genetic similarity coefficient of 0.262, and can be further divided into 6 subgroups at the genetic similarity coefficient of 0.438. Four core markers namely PM-CIN4, Ciz25, Ciz033, and Ciz023 are screened out according to the polymorphism information contents of 10 SSR markers, which can identify 62 samples. The digital fingerprint of 62 test samples is successfully constructed by using germplasm information code and fingerprint code. Overall, the genetic similarities among test samples of *C. illinoensis* are relatively great, and the constructed digital fingerprints can identify most test samples rapidly and efficiently.

Key words: *Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch; SSR marker; genetic diversity; cluster analysis; digital fingerprint

薄壳山核桃 [*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch], 又名美国山核桃、长山核桃, 原产于美国和墨西哥北部, 为一种全世界著名的干果树种^[1], 集经济、生态和社会效益于一身^[2-6]。由于引种渠道较多, 薄壳山核桃的同名异物及同物异名问题十分严重, 给薄壳山核桃优良品种的大面积推广造成了极大困难^[7]。目前, 人们主要根据薄壳山核桃花、果、叶片等器官的形态特征进行品种鉴别, 但这些形态特征的稳定性较差, 易受环境和气候等因子的影响。而且, 当前薄壳山核桃主要栽培品种的遗传基础狭窄, 部分品种间的表型差别较小, 不易区分。另外, 薄壳山核桃幼苗期可供品种鉴别的形态指标更少, 依靠表型性状准确鉴别品种难度很大。而且, 很多表型性状主要依靠人为观察和测量, 观测结果必然存在一定的偏差, 可靠性较低^[8]。因此, 亟待建立一个准确、高效鉴别薄壳山核桃品种的方法。

利用分子标记技术鉴别植物品种可不受环境、气候及个体生长发育状况等因子的影响, 并且能够快速、有效地区分开植物的不同品种^[9]。近年来, 分子标记技术已广泛应用于植物分子指纹图谱构建和品种鉴定研究^[10-12]。SSR (simple sequence repeat) 标记为一种以特异引物 PCR 为基础的分子标记技术, 是一类由 1~6 个核苷酸为单位的串联重复 DNA 序列, 对应位点的多态性一般较高^[13-14]。近年来, SSR 标记被广泛用于植物遗传多样性分析、亲缘关系鉴定、遗传图谱构建、全基因组关联分析和 QTL 性状定位等研究^[15-22], 已经成功分析了银杏 (*Ginkgo biloba* Linn.)^[23]、杨树 (*Populus* spp.)^[24-25]、文冠果 (*Xanthoceras sorbifolium* Bunge)^[26]、华北落叶松 [*Larix gmelinii* var. *principis-rupprechtii* (Mayr) Pilg.]^[27]、核桃 (*Juglans regia* Linn.)^[28] 等林木的种质资源特征, 并构建了相应的遗传图谱。

近年来, 尽管国内外研究者利用 SSR 标记技术对薄壳山核桃的遗传多样性、分子指纹图谱、分子身份证等进行了相关研究^[29-37], 但这些研究涉及的薄壳山核桃样本较少, 并且未建立一套完整的薄壳山核桃种质资源分子鉴别体系。鉴于此, 本研究从薄壳山核桃 SSR 引物库中筛选出 10 对目的条带清晰、检测结果稳定的引物, 对 SSR 标记进行染色体定位分析, 并基于供试 66 份薄壳山核桃样本叶片总 DNA 的扩增结果对每个 SSR 标记的遗传多样性和供试样本的聚类结果进行分析, 在此基础上筛选核心标记, 构建供试样本的数字指纹, 为利用 SSR 标记技术高效鉴别薄壳山核桃种质资源提供参考。

1 材料和方法

1.1 材料

供试 66 份薄壳山核桃样本中, 美国引进品种有 ‘Caddo’、‘Cape Fear’、‘Cheyenne’、‘Choctaw’、‘Elliott’、‘Mahan’、‘Mohawk’、‘Pawnee’、‘Sioux’、‘Surprize’、‘Wichita’、‘Tejas’、‘Stuart’、‘Chickasaw’、‘Kanza’、‘Excel’、‘Schley’、‘Summer’、‘Desirable’、‘Mandan’、‘Waco’、‘Moneymaker’、‘Creek’、‘Forkert’、‘Odom’、‘Barton’、‘Jackson’、‘Podsednik’、‘Gra Cross’、‘El Mart’、‘Success’、‘Oconee’、‘Nacono’、‘Graf’、‘Seven’、‘Kiowa’、‘Oconce’、‘Baker’、‘41-19-20’、‘148’, 国内选育品种有 ‘金华’ (‘Jinhua’)、‘绍兴’ (‘Shaoxing’)、‘莫愁’ (‘Mochou’)、‘茅山 1 号’ (‘Maoshan No. 1’)、‘亚林 10 号’ (‘Yalin No. 10’)、‘亚林 13 号’ (‘Yalin No. 13’)、‘亚林 20 号’ (‘Yalin No. 20’)、‘亚林 21 号’ (‘Yalin No. 21’)、‘亚林 23 号’ (‘Yalin No. 23’)、‘亚林 25 号’ (‘Yalin No.

25')、'亚林 35 号'('Yalin No. 35')、'亚林 42 号'('Yalin No. 42')、'亚林 46 号'('Yalin No. 46')、'赣选 1 号'('Ganxuan No. 1')、'南林 1 号'('NJFU No. 1')、'南林 2 号'('NJFU No. 2'), 优良单株有南林优株及南林单株 1 号至 9 号。于 2021 年 5 月 3 日, 在江苏省句容市后白镇江苏省薄壳山核桃种质资源库中每份样本随机选择 3 株植株, 采集生长良好、叶色嫩绿且无病虫害的新鲜叶片, 每株采集 3 份样品, 每份约 20 枚叶片。将采集的叶片置于放有干冰的泡沫盒中带回实验室, 置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存、待用。

1.2 方法

1.2.1 叶片总 DNA 的提取及质量检测 按照安全型植物 DNA 小量提取试剂盒(上海迈跟生物科技有限公司)说明书中的操作步骤提取各种质资源的叶片总 DNA, 利用 Nanodrop 2000 超微量分光光度计(美国 Thermo Fisher 科技公司)检测叶片总 DNA 的浓度, 并稀释成质量浓度为 $50\text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 的溶液, 置于

$-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存、备用。

1.2.2 SSR 引物筛选及 SSR 标记染色体定位 在薄壳山核桃 SSR 引物库^[37-40]中初步筛选出 80 对多态信息含量大于 0.5 的 SSR 引物, 利用这些 SSR 引物对 'Caddo'、'Cape Fear'、'Cheyenne'、'Mahan'、'Mohawk' 和 'Pawnee' 的叶片总 DNA 进行扩增反应。反应体系总体积 $20\text{ }\mu\text{L}$, 包含叶片总 DNA 溶液 $1\text{ }\mu\text{L}$ 、 $2\times\text{Taq PCR Mix } 10\text{ }\mu\text{L}$ 、正向和反向引物各 $1\text{ }\mu\text{L}$ 、 $\text{ddH}_2\text{O } 7\text{ }\mu\text{L}$ 。反应程序: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min; $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s、相应退火温度退火 10 s、 $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, 共 34 个循环; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min, 最后于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。扩增反应结束后, 利用质量体积分数 1% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物的完整性。扩增产物直接送武汉爱基百客生物科技有限公司进行聚丙烯酰胺凝胶电泳检测。根据检测结果筛选出 10 对扩增条带清晰、检测结果稳定的 SSR 引物, 用于供试 66 份薄壳山核桃样本的 SSR 标记分析。这些引物的信息见表 1。

表 1 用于薄壳山核桃样本 SSR 标记分析的引物信息

Table 1 Primer information for SSR marker analysis of *Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch samples

引物 Primer	基序 Motif	引物序列(5'→3')		Primer sequence (5'→3')	退火温度/ $^{\circ}\text{C}$ Annealing temperature	片段长度/bp Fragment length
		正向引物 Forward primer	反向引物 Reverse primer			
Ciz023	(ATA) ₈	TCTGTAGTGGATGCTAAATGCAA	GCATGGCATTGGTTTCTCT		59	164
Ciz074	(AT) ₈	AAGGCATATAACACGATCCCA	CAAGCAACTTTCTCGAGGATATG		59	274
Ciz064	(TA) ₆	AACGTGCGCGTTAAAGTGC	TACGACAGGCCCATCTTCTC		59	175
Ciz025	(TC) ₆	CCGGACGTTGTGTAATGAGA	TCGTGAAAAGAGAGGGATTG		59	228
Ciz033	(AT) ₈	TGAACAAAGCGGATGAGAGA	ATGCAGCTGGAAATTGACCT		59	259
Ciz026	(GA) ₂₀	TGGTTTGAAGGCATTGTGAA	TCATGTCTCTTGTCTCGGT		59	229
Ciz021	(TC) ₁₅	GAGCGTCTCTCATTCTCC	CAGACAGTGAACCCCTGCAA		59	196
Ciz003	(TTA) ₆	TGCCGTCATAGGAAGAAAGG	AAAGCCATTGGCACGTTAG		59	178
PM-CIN4	(CTT) ₂ , (CTT) ₁₂	GGCATCAGAGAAGGCTCCT	CTCACCCGTCTCTAGGGCTA		57	112
PM-CIN22	(CTT) ₁₀ , (TTA) ₂	TTACTTTTGGATTATTTGTATCATATCTTCT	CCAACAAGGGAAGCCAACCTT		54	103

使用 Phytozome 在线网站 (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/blast-search>) 将 10 个 SSR 标记序列在薄壳山核桃基因组^[41]中比对, 从而进行 SSR 标记染色体定位, 使用 Ttools v1.098722 软件绘制每个标记在染色体上的位置^[42]。

1.2.3 SSR 标记分析 利用筛选出的 10 对引物对 66 份薄壳山核桃样本的叶片总 DNA 进行扩增反应, 反应体系总体积和扩增条件均与引物筛选实验一致, 并将扩增产物直接送武汉爱基百客生物科技有限公司进行聚丙烯酰胺凝胶电泳检测。

以 66 份薄壳山核桃样本扩增出的谱带为原始矩阵, 同一标记有条带记为“1”、无条带记为“0”、缺失

记为“999”, 构建“0”、“1”矩阵数据。利用 GenAlEx 6.5 软件^[43-44]计算每个标记的观测等位基因数、有效等位基因数、Shannon's 信息指数、观测杂合度、期望杂合度, 利用 PIC_calc0.6 软件^[45]计算每个标记的多态信息含量。利用 Microsoft tools 计算供试样本间的遗传相似系数^[46-48], 以山核桃 (*C. cathayensis* Sarg.) 为外类群对供试薄壳山核桃样本进行 UPGMA 聚类分析, 利用 NTSYS 2.1 软件绘制聚类图。

1.2.4 数字指纹构建 按照 SSR 标记多态信息含量从大到小排序, 以多态信息含量最高的标记为基础, 逐步增加标记数量, 直至将绝大多数供试薄壳山核桃样本区分开, 此时的标记为核心标记。将各个核心标

记扩增条带的位置转化为数字,即指纹码。用种质信息编码和指纹码构建每个样本的数字指纹,其中,种质信息编码中的种质资源类别依据《薄壳山核桃遗传资源调查编目技术规程》^[49]编码。

2 结果和分析

2.1 SSR 标记染色体定位

染色体定位结果(图 1)表明:供试 10 个 SSR 标记分布在薄壳山核桃的 Chr01、Chr02、Chr03、Chr04、Chr05、Chr10、Chr12 和 Chr16 染色体上。其中,Chr05 染色体上分布的 SSR 标记最多,分别为 Ciz023、Ciz064 和 PM-CIN4;其余 7 条染色体上各只分布 1 个 SSR 标记。

2.2 SSR 标记的遗传多样性分析

统计结果(表 2)显示:供试 10 个 SSR 标记的观测等位基因数为 3~9,均值为 6.2;有效等位基因数为 2.0~6.2,均值为 3.5;Shannon's 信息指数为 0.923~2.009,均值为 1.402;观测杂合度为 0.000~0.701,均值为 0.213;期望杂合度为 0.492~0.839,均值为

0.691;多态信息含量为 0.482~0.821,均值为 0.656。值得注意的是,除 Ciz026 标记外,其余 9 个 SSR 标记的多态信息含量均高于 0.5,表明这些标记在供试薄壳山核桃样本中的多态性较高。10 个 SSR 标记中,PM-CIN4 标记的上述指标均最大;除期望杂合度外,Ciz026 标记的上述指标均最小。

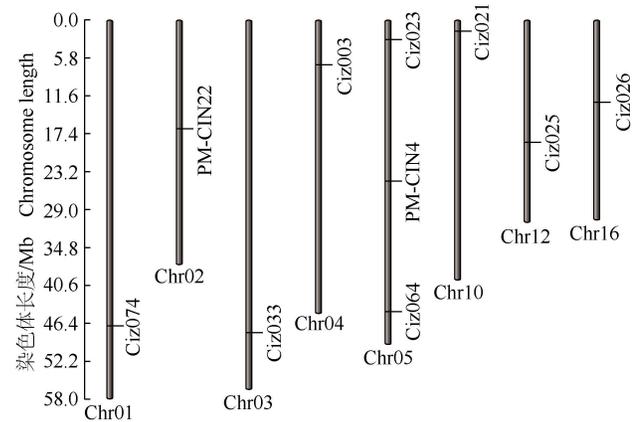


图 1 供试 SSR 标记在薄壳山核桃染色体上的定位
Fig. 1 Localization of test SSR markers on chromosomes of *Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch

表 2 基于薄壳山核桃样本扩增结果的 SSR 标记遗传多样性分析

Table 2 Genetic diversity analysis of SSR markers based on amplification results of *Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch samples

标记 Marker	观测等位基因数 Number of observed alleles	有效等位基因数 Number of effective alleles	Shannon's 信息指数 Shannon's information index	观测杂合度 Observed heterozygosity	期望杂合度 Expected heterozygosity	多态信息含量 Polymorphism information content
Ciz023	7	4.1	1.566	0.582	0.756	0.709
Ciz074	4	3.1	1.258	0.075	0.676	0.633
Ciz064	6	3.1	1.313	0.030	0.675	0.615
Ciz025	8	4.1	1.746	0.015	0.791	0.758
Ciz033	8	4.0	1.601	0.194	0.750	0.730
Ciz026	3	2.0	0.923	0.000	0.569	0.482
Ciz021	6	3.1	1.282	0.015	0.673	0.598
Ciz003	5	3.2	1.272	0.149	0.686	0.674
PM-CIN4	9	6.2	2.009	0.701	0.839	0.821
PM-CIN22	6	2.0	1.049	0.373	0.492	0.543
均值 Average	6.2	3.5	1.402	0.213	0.691	0.656

2.3 薄壳山核桃样本聚类分析

以山核桃为外类群,利用遗传相似系数对 66 份薄壳山核桃样本进行 UPGMA 聚类分析,结果见图 2。在遗传相似系数为 0.130 处,供试 66 份薄壳山核桃样本聚为一组,山核桃单独为一组,说明薄壳山核桃和山核桃存在明显的遗传差异。供试 66 份薄壳山核桃样本间的遗传相似系数为 0.130~1.000,且多数样本间的遗传相似系数在 0.570~1.000 之间,说明供试

薄壳山核桃样本间的遗传相似性较大。

在遗传相似系数为 0.262 处,供试 66 份薄壳山核桃样本被分成 2 组,其中, I 组包含‘Desirable’、‘Waco’等 60 份样本, II 组包含‘Odom’、南林单株 5 号等 6 份样本。

在遗传相似系数为 0.438 处, I 组可细分为 4 个亚组: I₁ 亚组包括 4 份样本,均为美国引进品种; I₂ 亚组包括‘Mahan’、‘Pawnee’等 20 份样本; I₃ 亚组

包括‘金华’、‘莫愁’和‘绍兴’等25份样本；I₄亚组包括‘Cheyenne’、‘Baker’等11份样本。在遗传相似系数为0.438处，II组可细分为2个亚组，其中，南林单株6号单独为II₂亚组，其余5份样本为II₁亚组。

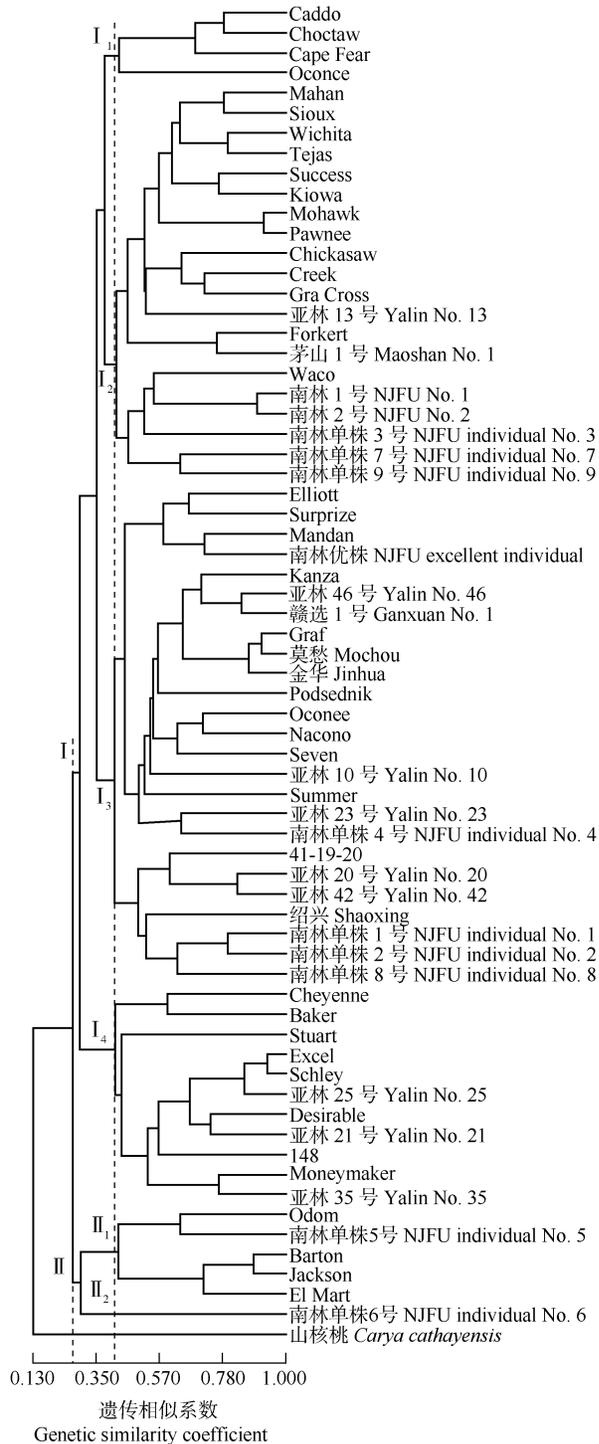


图2 薄壳山核桃样本的UPGMA聚类结果
Fig. 2 UPGMA cluster results of *Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch samples

2.4 核心标记筛选

根据10个SSR标记的多态信息含量，确定核心标记以PM-CIN4为基础，单独使用此标记可鉴别出12份样本，包括‘Cape Fear’、‘Cheyenne’、‘Mahan’、‘Sioux’、‘Surprize’、‘Tejas’、‘Summer’、‘Mandan’、‘Nacono’、‘Baker’、‘41-19-20’、南林优株。PM-CIN4与Ciz025标记组合还可鉴别出26份样本，包括‘Caddo’、‘Choctaw’、‘Elliott’、‘Mohawk’、‘Pawnee’、‘Wichita’、‘Stuart’、‘Waco’、‘Podsednik’、‘Success’、‘Oconee’、‘Kiowa’、‘绍兴’、‘亚林10号’、‘亚林13号’、‘亚林20号’、‘亚林23号’、‘亚林42号’、南林单株1号、南林单株2号、南林单株3号、南林单株4号、南林单株5号、南林单株6号、南林单株7号、南林单株8号。PM-CIN4、Ciz025和Ciz033标记组合还可鉴别出12份样本，包括‘Chickasaw’、‘Kanza’、‘Forkert’、‘Barton’、‘El Mart’、‘148’、‘Desirable’、‘茅山1号’、‘赣选1号’、‘南林1号’、‘南林2号’、南林单株9号。PM-CIN4、Ciz025、Ciz033和Ciz023标记组合还可鉴别出12份样本，包括‘Moneymaker’、‘Creek’、‘Odom’、‘Jackson’、‘Gra Cross’、‘Graf’、‘Seven’、‘Oconee’、‘亚林21号’、‘亚林25号’、‘亚林35号’、‘亚林46号’。综合来看，将PM-CIN4、Ciz025、Ciz033和Ciz023标记结合可鉴别出62份薄壳山核桃样本，故将这4个标记作为核心标记。

2.5 薄壳山核桃种质资源数字指纹构建

利用种质信息编码和指纹码成功构建了62份薄壳山核桃样本的数字指纹，结果见表3。

国外引进品种的数字指纹由13位数字组成，其中，前5位数字为种质信息编码，后8位数字为指纹

表3 62份薄壳山核桃样本的数字指纹
Table 3 Digital fingerprint of 62 *Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch samples

样本 Sample	数字指纹 Digital fingerprint
Caddo	6840424777757
Cape Fear	6840427776757
Cheyenne	6840479776625
Choctaw	6840424337757
Elliott	6840449236615
Mahan	6840417771725
Mohawk	6840426223325
Pawnee	6840426333325
Sioux	6840478337725
Surprize	6840447227715

续表 3 Table 3 (Continued)

样本 Sample	数字指纹 Digital fingerprint
Wichita	6840426776625
Tejas	6840428666725
Stuart	6840477776656
Chickasaw	6840466772725
Kanza	6840466776611
Summer	6840413886614
Desirable	6840468666624
Mandan	6840439114414
Waco	6840416773322
Moneymaker	6840438666611
Creek	6840468775522
Forkert	6840488665522
Odom	6840416556666
Barton	6840436446646
Jackson	6840466666646
Podsednik	6840415772515
Gra Cross	6840468775525
El Mart	6840466667714
Success	6840418776625
Oconee	6840468443715
Nacono	6840458773315
Graf	6840416447715
Seven	6840466666615
Kiowa	6840415667725
Oconce	6840468775545
Baker	6840469777722
41-19-20	6840435662511
148	6840468665511
绍兴 Shaoxing	63306536667711
茅山 1 号 Maoshan No. 1	63201588668822
亚林 10 号 Yalin No. 10	63301516661311
亚林 13 号 Yalin No. 13	63301566442525
亚林 20 号 Yalin No. 20	63301518447711
亚林 21 号 Yalin No. 21	63301568666611
亚林 23 号 Yalin No. 23	63301566337711
亚林 25 号 Yalin No. 25	63301568666655
亚林 35 号 Yalin No. 35	63301538666644
亚林 42 号 Yalin No. 42	63301518556611
亚林 46 号 Yalin No. 46	63301516556615
赣选 1 号 Ganxuan No. 1	63301516446615
南林 1 号 NJFU No. 1	63301555557722
南林 2 号 NJFU No. 2	63301555556622
南林优株 NJFU excellent individual	63301333447715
南林单株 1 号 NJFU individual No. 1	63301377667712
南林单株 2 号 NJFU individual No. 2	63301377447712
南林单株 3 号 NJFU individual No. 3	63301355661412
南林单株 4 号 NJFU individual No. 4	63301399663312
南林单株 5 号 NJFU individual No. 5	63301399773766
南林单株 6 号 NJFU individual No. 6	63301377884766
南林单株 7 号 NJFU individual No. 7	63301336333322
南林单株 8 号 NJFU individual No. 8	63301349445711
南林单株 9 号 NJFU individual No. 9	63301336443322

码。种质信息编码的第 1 位数字表示物种信息,薄壳山核桃为引进种,因此为“6”;第 2 至第 4 位数字为原产地信息,供试国外引进品种均从美国引种,因此均采用美国代码“840”;第 5 位数字为种质资源类别,引进品种为“4”。指纹码依次为核心标记 PM-CIN4、Ciz025、Ciz033 和 Ciz023 的扩增条带位置。以‘Pawnee’为例,其数字指纹为 6840426333325,表示该样本为美国引进的薄壳山核桃品种,核心标记 PM-CIN4、Ciz025、Ciz033 和 Ciz023 的扩增条带位置依次为 26、33、33 和 25。

国内样本的数字指纹由 14 位数字组成,其中,前 6 位数字为种质信息编码,后 8 位数字为指纹码。种质信息编码的第 1 位数字也表示物种信息,与国外引进品种相同,也为“6”;第 2 至第 5 位数字为原产地信息,以国内各地区的行政区划代码为准,其中,3306 代表浙江省绍兴市,3301 代表浙江省杭州市,3201 代表江苏省南京市;第 6 位数字为种质资源类别,选育品种为“5”,优良单株[实生资源(个体)]为“3”。指纹码也依次为 4 个核心标记的扩增条带位置。以‘绍兴’为例,其数字指纹为 63306536667711,表示该样本为浙江省绍兴市选育的薄壳山核桃品种,核心标记 PM-CIN4、Ciz025、Ciz033 和 Ciz023 的扩增条带位置依次为 36、66、77 和 11。

3 讨论和结论

传统的薄壳山核桃品种选育工作一般是对授粉后产生的杂交子代进行筛选。随着分子生物学技术的不断发展,分子标记技术极大地促进了薄壳山核桃优良品种的选育工作^[50-52]。SSR 标记是近年来发展起来的一种分子标记技术,为典型的共显性标记,不仅能够区分亲缘关系比较近的种类,而且能够鉴别同一杂交组合中的不同个体^[53-54]。本研究利用筛选出的 10 对 SSR 引物成功鉴别出 62 份薄壳山核桃样本。值得注意的是,筛选出的 10 对 SSR 引物对‘Excel’和‘Schley’以及‘金华’和‘莫愁’的扩增条带一致,不能将这 2 组样本区分开,应在后续研究中继续筛选合适的 SSR 引物,达到完全区分这些样本甚至更多样本的目的。

聚类分析结果显示:多数薄壳山核桃样本的遗传相似系数为 0.570~1.000,这可能是由于薄壳山核桃的杂交育种多选择综合性状优良的亲本,可供选择亲

本相对集中。例如:‘Waco’为‘Cheyenne’和‘Sioux’杂交后代选育的品种,三者在遗传相似系数为 0.262 时同属于 I 组;‘Mahan’为‘Wichita’、‘Tejas’和‘Mohawk’的亲本之一,四者在遗传相似系数为 0.438 时同属于 I₂亚组;‘Mohawk’为‘Pawnee’和‘Creek’的亲本之一,三者在遗传相似系数为 0.438 时也同属于 I₂亚组。另外,聚类结果显示供试薄壳山核桃的部分国内样本与美国引进品种间的遗传相似系数较高,说明其亲缘关系较近。

综上所述,供试薄壳山核桃样本间的遗传相似性较大。利用筛选的 10 对 SSR 引物确定的 4 个核心标记(PM-CIN4、Ciz025、Ciz033 和 Ciz023)能够鉴别出 62 份薄壳山核桃样本,并且利用种质信息编码和指纹码成功构建了 62 份薄壳山核桃样本的数字指纹,能够快速、高效鉴别供试的绝大多数样本。

参考文献:

- [1] 姚小华,常君,王开良,等.中国薄壳山核桃[M].北京:科学出版社,2014:1-2.
- [2] 董凤祥,王贵禧.美国薄壳山核桃引种及栽培技术[M].北京:金盾出版社,2003:1-2.
- [3] 吴国良,张凌云,潘秋红,等.美国山核桃及其品种性状研究进展[J].果树学报,2003,20(5):404-409.
- [4] 张日清,李江,吕芳德,等.我国引种美国山核桃历程及资源现状研究[J].经济林研究,2003,21(4):107-109.
- [5] 常君,李川,姚小华,等.薄壳山核桃无性系含油率及脂肪酸组成分析[J].西南师范大学学报(自然科学版),2017,42(8):51-57.
- [6] ZHANG C C, YAO X H, REN H D, et al. RNA-Seq reveals flavonoid biosynthesis-related genes in pecan (*Carya illinoensis*) kernels[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67(1):148-158.
- [7] BENTLEY N, GRAUKE L J, KLEIN P. Genotyping by sequencing (GBS) and SNP marker analysis of diverse accessions of pecan (*Carya illinoensis*) [J]. Tree Genetics and Genomes, 2019, 15(1):1-17.
- [8] 彭方仁,李永荣,郝明灼,等.我国薄壳山核桃生产现状与产业化发展策略[J].林业科技开发,2012,26(4):1-4.
- [9] 辛业芸.分子标记技术在植物学研究中的应用[J].湖南农业科学,2002(4):9-12.
- [10] 张成才,刘园,姜燕华,等.SSR标记鉴定浙江省主要无性系茶树品种的研究[J].植物遗传资源学报,2014,15(5):926-931.
- [11] 李益,马先锋,唐浩,等.柑橘品种鉴定的SSR标记开发和指纹图谱库构建[J].中国农业科学,2018,51(15):2969-2979.
- [12] 刘伟,李森,李桂祥,等.应用SSR荧光标记法构建山东地方桃种质资源分子身份证[J].山东农业科学,2022,54(2):6-13.
- [13] LI Y C, KOROL A B, FAHIMA T, et al. Microsatellites within genes: structure, function, and evolution [J]. Molecular Biology and Evolution, 2004, 21(6):991-1007.
- [14] GYMREK M, WILLEMS T, GUILMATRE A, et al. Abundant contribution of short tandem repeats to gene expression variation in humans [J]. Nature Genetics, 2016, 48(1):22-29.
- [15] LI D J, DENG Z, QIN B, et al. *De novo* assembly and characterization of bark transcriptome using Illumina sequencing and development of EST-SSR markers in rubber tree (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) [J]. BMC Genomics, 2012, 13:192.
- [16] PARIDA S K, VERMA M, YADAV S K, et al. Development of genome-wide informative simple sequence repeat markers for large-scale genotyping applications in chickpea and development of web resource [J]. Frontiers in Plant Science, 2015, 6:645.
- [17] COLBURN B C, MEHLENBACHER S A, SATHUVALLI V R. Development and mapping of microsatellite markers from transcriptome sequences of European hazelnut (*Corylus avellana* L.) and use for germplasm characterization [J]. Molecular Breeding, 2017, 37:16.
- [18] LI L, FANG Z W, ZHOU J F, et al. An accurate and efficient method for large-scale SSR genotyping and applications [J]. Nucleic Acids Research, 2017, 45(10):e88.
- [19] PICKETT B D, MILLER J B, RIDGE P G. Kmer-SSR: a fast and exhaustive SSR search algorithm [J]. Bioinformatics, 2017, 33(24):3922-3928.
- [20] PARTHIBAN S, GOVINDARAJ P, SENTHILKUMAR S. Comparison of relative efficiency of genomic SSR and EST-SSR markers in estimating genetic diversity in sugarcane [J]. Biotechnology, 2018, 8:144.
- [21] YANG J J, ZHANG J, HAN R X, et al. Target SSR-seq: a novel SSR genotyping technology associate with perfect SSRs in genetic analysis of cucumber varieties [J]. Frontiers in Plant Science, 2019, 10:531.
- [22] LEBEDEV V G, SUBBOTINA N M, MALUCHENKO O P, et al. Transferability and polymorphism of SSR markers located in flavonoid pathway genes in *Fragaria* and *Rubus* species [J]. Genes, 2020, 11:11.
- [23] ZHOU Q, MU K M, NI Z X, et al. Analysis of genetic diversity of ancient *Ginkgo* populations using SSR markers [J]. Industrial Crops and Products, 2019, 145:111942.
- [24] 王世杰,王雪婷,杜向前,等.基于SSR标记的杨树新品种鉴定及核心引物筛选[J].北京林业大学学报,2019,41(7):101-110.
- [25] 刘超凡,张国君,徐刚标.杨树种质SSR指纹数据库构建[J].中南林业科技大学学报,2021,41(2):97-104.
- [26] 申展.基于形态学特性和SSR分子标记的文冠果种质资源评价与选优研究[D].北京:北京林业大学,2017:11-12.
- [27] 范英明,张登荣,于大德,等.河北省华北落叶松天然群体遗

- 传多样性分析[J]. 植物遗传资源学报, 2014, 15(3): 465-471.
- [28] CHEN L N, MA Q G, CHEN Y K, et al. Identification of major walnut cultivars grown in China based on nut phenotypes and SSR markers[J]. *Scientia Horticulturae*, 2014, 168: 240-248.
- [29] GRAUKE L J, MENDOZA-HERRERA M A, MILLER A J, et al. Geographic patterns of genetic variation in native pecans[J]. *Tree Genetics and Genomes*, 2011, 7(5): 917-932.
- [30] ZHANG C, YAO X, REN H, et al. Characterization and development of genomic SSRs in pecan (*Carya illinoensis*) [J]. *Forests*, 2020, 11: 61.
- [31] HE X D, ZHENG J W, TIAN X Y, et al. Genetic relationship analysis and fingerprint construction of *Carya illinoensis* varieties [J]. *Forest Research*, 2021, 34(4): 95-102.
- [32] 何旭东, 郑纪伟, 田雪瑶, 等. 薄壳山核桃品种亲缘关系分析与指纹图谱构建[J]. 林业科学研究, 2021, 34(4): 95-102.
- [33] 戴晓港, 房芝馨, 胡雪纯, 等. 薄壳山核桃全基因组 SSR 分析及多态性引物筛选[J]. 分子植物育种, 2021(24): 8199-8207.
- [34] 张成才, 王亚萍, 王开良, 等. 利用 SSR 构建薄壳山核桃主要品种的分子身份证[J]. 植物遗传资源学报, 2022, 23(6): 1835-1846.
- [35] 施娟娟, 叶生月, 俞世群, 等. 37 个新引进的薄壳山核桃品种遗传多样性 SSR 分析[J]. 安徽农业大学学报, 2013, 40(1): 42-46.
- [36] 焦思宇, 赵璐璐, 刘晓倩, 等. 33 份薄壳山核桃品种种质资源的遗传多样性分析[J]. 阜阳师范学院学报(自然科学版), 2019, 36(2): 36-39, 56.
- [37] GRAUKE L J, IQBAL M J, REDDY A S, et al. Developing microsatellite DNA markers in pecan[J]. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 2003, 128(3): 374-380.
- [38] ZHANG C C, YAO X H, REN H D, et al. Characterization and development of genomic SSRs in pecan (*Carya illinoensis*) [J]. *Forests*, 2020, 11: 61.
- [39] 姚小华, 王开良, 任华东, 等. 薄壳山核桃优新品种和无性系开花物候特性研究[J]. 江西农业大学学报, 2004, 26(5): 675-680.
- [40] 李雪, 徐迎春, 李永荣, 等. 薄壳山核桃不同品系开花物候期特性观测[J]. 江苏林业科技, 2010, 37(6): 18-21, 28.
- [41] LOVELL J T, BENTLEY N B, BHATTARAI G, et al. Four chromosome scale genomes and a pan-genome annotation to accelerate pecan tree breeding[J]. *Nature Communications*, 2021, 12: 4125.
- [42] CHEN C J, CHEN H, ZHANG Y, et al. TBtools: an integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data[J]. *Molecular Plant*, 2020, 13: 1194-1202.
- [43] AMIRIYAN M, SHOJAEIYAN A, YADOLLAHI A, et al. Genetic diversity analysis and population structure of some Iranian fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) landraces using SRAP markers[J]. *Molecular Biology Research Communications*, 2019, 8(4): 181-190.
- [44] PEAKALL R, SMOUSE P E. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research: an update[J]. *Bioinformatics*, 2012, 28(19): 2537-2539.
- [45] NAGY S, POCZAI P, CERNÁK I, et al. PICcalc: an online program to calculate polymorphic information content for molecular genetic studies[J]. *Biochemical Genetics*, 2012, 50: 670-672.
- [46] KAVAN D, MAN P. MSTools—web based application for visualization and presentation of HXMS data [J]. *International Journal of Mass Spectrometry*, 2011, 302(13): 53-58.
- [47] KOSMAN E. Nei's gene diversity and the index of average differences are identical measures of diversity within populations [J]. *Plant Pathology*, 2003, 52: 533-535.
- [48] MUELLER L D. A comparison of two methods for making statistical inferences on Nei's measure of genetic distance [J]. *Biometrics*, 1979, 35: 757-763.
- [49] 国家林业局. 薄壳山核桃遗传资源调查编目技术规程: LY/T 2804—2017[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017: 9-12.
- [50] 刘广勤, 王鹏良, 周蓓蓓, 等. 薄壳山核桃 SRAP 标记体系的优化和遗传多样性分析[J]. 江苏农业学报, 2010, 26(5): 1037-1042.
- [51] 张日清, 何方, 吕芳德, 等. 美国山核桃群体遗传多样性的 RAPD 分析[J]. 经济林研究, 2001, 19(2): 1-6.
- [52] 吴文龙, 阎连飞. 薄壳山核桃的引种栽培[J]. 江苏林业科技, 2003, 30(1): 11-13.
- [53] 谷艳鹏, 张泽人, 孙涛, 等. 基于 EST-SSR 标记的花楸树和少叶花楸杂交 F₁ 代群体的杂种鉴定及遗传关系分析[J]. 植物资源与环境学报, 2022, 31(4): 65-73.
- [54] 王亮, 韦继光, 葛春峰, 等. 基于 SSR 标记分析蓝莓品种 '蓝美 1 号' 自由授粉子代遗传多样性及群体遗传结构[J]. 植物资源与环境学报, 2022, 31(3): 35-43.

(责任编辑: 佟金凤)