

# 基于 SSR 分子标记的核桃种质资源分子身份证构建

马庆国<sup>1</sup>, 宋晓波<sup>1</sup>, 贺君星<sup>1</sup>, 周 晔<sup>1</sup>, 黄 勇<sup>2</sup>, 张俊佩<sup>1,①</sup>, 裴 东<sup>1</sup>

(1. 林木遗传育种全国重点实验室 国家林业和草原局林木培育重点实验室 中国林业科学研究院林业研究所, 北京 100091;  
2. 福建省林业科学研究院, 福建 福州 350012)

**摘要:** 采用 13 对 SSR 引物对 54 份核桃 (*Juglans* spp.) 样本的基因组 DNA 进行了扩增, 对这些引物对应位点的遗传多样性进行了分析; 在此基础上, 剔除扩增条带缺失超过 5% 的引物, 将剩余引物按照区分率从高到低排序并组合, 筛选出能够完全区分供试核桃样本的引物组合; 根据筛选出的引物组合中每对引物的扩增结果构建供试核桃样本的分子指纹图谱, 并结合各核桃样本的基本信息、选育历史等, 利用二维码技术生成每个核桃样本的分子身份证。结果表明: 本研究共检测到 107 个等位基因, 供试引物对应位点的观测等位基因数为 3~16, 均值 8.2; 有效等位基因数为 2.2~7.9, 均值 4.2; 观测杂合度为 0.10~0.57, 均值 0.42; 期望杂合度为 0.55~0.88, 均值 0.72; Shannon's 信息指数为 0.86~2.36, 均值 1.60; Nei's 基因多样性指数为 0.54~0.87, 均值 0.72; 多态信息含量为 0.44~0.86, 均值 0.68。总体来看, 引物 WGA04 和 WGA79 对应位点的遗传多样性指数较高。剔除引物 WGA331、WGA332 和 WGA376 后, 其余引物的区分率为 5.56%~24.07%。2 对引物组合中, WGA04-WGA70 的区分率最高 (72.22%), 以其为基础组成 3 对引物组合, 其中 WGA04-WGA70-WGA79、WGA04-WGA70-WGA202、WGA04-WGA70-WGA89 和 WGA04-WGA70-WGA01 的区分率为 100.00%。利用 WGA04-WGA70-WGA79 构建的分子身份证包含各核桃样本的基础信息和简介。研究结果显示: 基于 SSR 分子标记构建的分子身份证可快速、准确鉴定供试核桃种质资源, 并可用于核桃种质资源知识产权保护。

**关键词:** 核桃; 种质资源; SSR 分子标记; 遗传多样性; 分子身份证

中图分类号: Q946-33; S664.1 文献标志码: A 文章编号: 1674-7895(2023)02-0001-09  
DOI: 10.3969/j.issn.1674-7895.2023.02.01

**Establishment of molecular identity cards of walnut (*Juglans* spp.) germplasm resources based on SSR molecular marker** MA Qingguo<sup>1</sup>, SONG Xiaobo<sup>1</sup>, HE Junxing<sup>1</sup>, ZHOU Ye<sup>1</sup>, HUANG Yong<sup>2</sup>, ZHANG Junpei<sup>1,①</sup>, PEI Dong<sup>1</sup> (1. State Key Laboratory of Tree Genetics and Breeding, Key Laboratory of Tree Breeding and Cultivation of the State Forestry and Grassland Administration, Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China; 2. Fujian Academy of Forestry Sciences, Fuzhou 350012, China), *J. Plant Resour. & Environ.*, 2023, 32(2): 1-9

**Abstract:** The genomic DNA of 54 walnut (*Juglans* spp.) samples were amplified with 13 pairs of SSR primers, and the genetic diversity of corresponding loci of these primers was analyzed; on the basis, the primers with amplification bands missing more than 5% were discarded, the residual primers were ranked and combined according to the identification rate from high to low, and the primer combinations which can completely identify the test walnut samples were screened; the molecular fingerprints of the test walnut samples were established according to the amplification result of each pair of primers in the screened primer combinations, and the molecular identity card of every walnut sample was established by using two-dimensional code technology combining the basic information, breeding history, etc. of each walnut

收稿日期: 2022-09-28

基金项目: “十四五”国家重点研发计划项目(2019YFD1001603); 福建省属公益类科研院所基本科研专项(2020R1009008); 核桃产业国家创新联盟资助项目(NAWI)

作者简介: 马庆国(1983—), 男, 山东沂南人, 博士, 副研究员, 主要从事特色经济林种质资源研究。

①通信作者 E-mail: zhangjunpei@caf.ac.cn

引用格式: 马庆国, 宋晓波, 贺君星, 等. 基于 SSR 分子标记的核桃种质资源分子身份证构建[J]. 植物资源与环境学报, 2023, 32(2): 1-9.

sample. The results show that 107 alleles are detected in total in this study, and the numbers of observed alleles at the corresponding loci of the test primers are 3–16, with an average of 8.2; the numbers of effective alleles are 2.2–7.9, with an average of 4.2; the observed heterozygosities are 0.10–0.57, with an average of 0.42; the expected heterozygosities are 0.55–0.88, with an average of 0.72; the Shannon's information indexes are 0.86–2.36, with an average of 1.60; the Nei's gene diversity indexes are 0.54–0.87, with an average of 0.72; the polymorphism information contents are 0.44–0.86, with an average of 0.68. Overall, the genetic diversity indexes of the corresponding loci of primers WGA04 and WGA79 are relatively high. After discarding primers WGA331, WGA332, and WGA376, the identification rates of the other primers are 5.56%–24.07%. In combinations of two pairs of primers, the identification rate of WGA04-WGA70 is the highest (72.22%), and combinations of three pairs of primers are formed on this basis, among them the identification rates of WGA04-WGA70-WGA79, WGA04-WGA70-WGA202, WGA04-WGA70-WGA89, and WGA04-WGA70-WGA01 are 100.00%. The molecular identity cards established with WGA04-WGA70-WGA79 contain basic information and introduction of each walnut sample. It is suggested that the established molecular identity cards based on SSR molecular markers can identify the test walnut germplasm resources rapidly and accurately, and they can be used in intellectual property protection of walnut germplasm resources.

**Key words:** *Juglans* spp.; germplasm resource; SSR molecular marker; genetic diversity; molecular identity card

核桃 (*Juglans* spp.) 具有多种重要的经济价值, 在全世界许多地区被广泛栽培和利用。中国为核桃的原产地之一, 拥有丰富的核桃种质资源<sup>[1-2]</sup>。截至 2020 年底, 中国的核桃种植面积达到  $7.822 2 \times 10^6$  hm<sup>2</sup>, 总产量为  $4.795 9 \times 10^6$  t, 居世界首位<sup>[3]</sup>。20 世纪 60 年代以来, 中国的核桃引种和杂交育种工作不断取得进展, 涌现出大量的自主知识产权核桃品种。据不完全统计, 截至 2021 年, 共有国家级审(认)定良种 17 个、省级审(认)定良种 239 个<sup>[4]</sup>。近年来, 中国在核桃种质资源调查、收集和保存方面的工作力度不断加大, 随着“全国核桃遗传资源调查编目”、科技基础性工作专项“华北山区经济树种种质资源收集和保存”以及正在执行的科技基础资源调查专项“主要木本油料植物种质资源调查”等全国范围的核桃种质资源基础性工作的开展, 国内核桃种质资源保存数量迅速增加<sup>[4]</sup>。

核桃属于雌雄同株异花植物, 在同域和邻域个体间极易发生反复的种间和种内杂交, 从形态上看存在诸多的中间类型, 并且, 有些品种在形态上非常相似, 因此, 依据表型性状对核桃种质资源进行准确分类难度很大。在苗木(接穗)市场流通中, 由于缺乏可用于品种鉴定的明显表型性状, 导致同物异名、同名异物问题屡见不鲜, 苗木品种混杂、以次充好现象频发, 严重影响了国内核桃苗木市场的秩序, 阻碍了核桃良种的推广和应用。

通过分子标记技术构建核桃种质资源的分子身

份证, 能够快速、有效地解决核桃种质资源的同名异物和同物异名问题, 避免重复性收集和保存, 有利于核桃种质资源的鉴定评价和共享利用。利用分子身份证对商品化核桃品种进行溯源, 能够保障核桃良种在市场流通过程中的纯正性, 有利于保护相关品种的知识产权、保障种植户权益。简单重复序列 (simple repeat sequence, SSR) 又被称为微卫星序列, 为目前遗传多样性分析和植物品种鉴定广泛应用的分子标记之一<sup>[5-12]</sup>。国际植物新品种保护联盟 (International Union for the Protection of New Varieties of Plants, UPOV) 生化和分子生物技术工作组 (Working Group on Biochemical and Molecular Techniques, and DNA-Profiling in Particular, BMT) 将 SSR 标记作为植物品种鉴定和分子身份证构建的最佳分子标记<sup>[13]</sup>, 目前研究者已利用 SSR 标记构建了许多植物品种的分子身份证<sup>[14-18]</sup>。近年来, 已有学者采用 SSR 分子标记技术进行了核桃种质资源指纹图谱分析及分子身份证构建研究<sup>[19-22]</sup>, 但这些研究的样本规模和遗传背景均存在局限性, 尚不能实现对核桃种质资源的快速、准确鉴定。

鉴于此, 笔者采用应用较为成熟的 13 对 SSR 引物<sup>[23-26]</sup>, 对中国核桃主栽区广泛栽植的 54 份核桃样本进行了基因组 DNA 扩增和遗传多样性分析, 以“最少引物鉴定最多种质资源”为标准<sup>[27]</sup>, 筛选高效引物组合并构建各样本的分子身份证, 以期快速、准确鉴定核桃种质资源提供理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

供试54份核桃样本的基本信息见表1。其中,

编号1~41为胡桃(*J. regia* Linn.),编号42~49为泡核桃(*J. sigillata* Dode),编号50~54为泡核桃和胡桃的杂交后代。于2022年春,采集所有样本成龄植株中部外围向阳面的健康幼叶,置于冰盒中带回实验室后立即提取基因组DNA。

表1 供试核桃样本的基本信息

Table 1 Basic information of the test walnut (*Juglans* spp.) samples

编号 No.	样本名称 Sample name	类别 Type	保存单位 Conservation unit
1	薄丰 Baofeng	选育品种 Bred variety	河南省林业科学研究院 Henan Academy of Forestry
2	北京 861 Beijing 861	选育品种 Bred variety	北京市农林科学院林业果树研究所 Institute of Forestry and Pomology, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences
3	川核 1 号 Chuanhe No. 1	选育品种 Bred variety	四川省林业科学研究院 Sichuan Academy of Forestry
4	川核 2 号 Chuanhe No. 2	选育品种 Bred variety	四川省林业科学研究院 Sichuan Academy of Forestry
5	川核 3 号 Chuanhe No. 3	选育品种 Bred variety	四川省林业科学研究院 Sichuan Academy of Forestry
6	川核 4 号 Chuanhe No. 4	选育品种 Bred variety	四川省林业科学研究院 Sichuan Academy of Forestry
7	川核 5 号 Chuanhe No. 5	选育品种 Bred variety	四川省林业科学研究院 Sichuan Academy of Forestry
8	川核 6 号 Chuanhe No. 6	选育品种 Bred variety	四川省林业科学研究院 Sichuan Academy of Forestry
9	川核 8 号 Chuanhe No. 8	选育品种 Bred variety	四川省林业科学研究院 Sichuan Academy of Forestry
10	川核 10 号 Chuanhe No. 10	选育品种 Bred variety	四川省林业科学研究院 Sichuan Academy of Forestry
11	川核 11 号 Chuanhe No. 11	选育品种 Bred variety	四川省林业科学研究院 Sichuan Academy of Forestry
12	福兰克蒂 Franquetee	选育品种 Bred variety	山东省果树研究所 Shandong Institute of Pomology
13	哈特利 Hartley	选育品种 Bred variety	山东省果树研究所 Shandong Institute of Pomology
14	晋龙 1 号 Jinlong No. 1	选育品种 Bred variety	山东省果树研究所 Shandong Institute of Pomology
15	晋龙 2 号 Jinlong No. 2	选育品种 Bred variety	山西省林业科学研究院 Shanxi Academy of Forestry
16	礼品 2 号 Lipin No. 2	选育品种 Bred variety	辽宁省经济林研究所 Liaoning Institute of Economic Forest
17	辽宁 1 号 Liaoning No. 1	选育品种 Bred variety	辽宁省经济林研究所 Liaoning Institute of Economic Forest
18	辽宁 3 号 Liaoning No. 3	选育品种 Bred variety	辽宁省经济林研究所 Liaoning Institute of Economic Forest
19	辽宁 4 号 Liaoning No. 4	选育品种 Bred variety	辽宁省经济林研究所 Liaoning Institute of Economic Forest
20	绿波 Lübo	选育品种 Bred variety	河南省林业科学研究院 Henan Academy of Forestry
21	鲁果 4 号 Luguo No. 4	选育品种 Bred variety	山东省果树研究所 Shandong Institute of Pomology
22	清香 Qingxiang	选育品种 Bred variety	河北农业大学 Hebei Agricultural University
23	陕核 2 号 Shanhe No. 2	优良无性系 Superior clone	西北农林科技大学 Northwest A & F University
24	陕核 3 号 Shanhe No. 3	优良无性系 Superior clone	西北农林科技大学 Northwest A & F University
25	维纳 Vina	选育品种 Bred variety	山东省果树研究所 Shandong Institute of Pomology
26	温 185 Wen 185	选育品种 Bred variety	新疆林业科学院 Xinjiang Academy of Forestry
27	吾斯曼 Wusiman	农家种 Landrace	新疆林业科学院 Xinjiang Academy of Forestry
28	西扶 1 号 Xifu No. 1	选育品种 Bred variety	西北农林科技大学 Northwest A & F University
29	西扶 2 号 Xifu No. 2	选育品种 Bred variety	西北农林科技大学 Northwest A & F University
30	西林 1 号 Xilin No. 1	选育品种 Bred variety	山西省林业科学研究院 Shanxi Academy of Forestry
31	西林 2 号 Xilin No. 2	选育品种 Bred variety	山西省林业科学研究院 Shanxi Academy of Forestry
32	香玲 Xiangling	选育品种 Bred variety	山东省果树研究所 Shandong Institute of Pomology
33	新丰 Xinfeng	选育品种 Bred variety	新疆林业科学院 Xinjiang Academy of Forestry
34	新光 Xinguang	选育品种 Bred variety	新疆林业科学院 Xinjiang Academy of Forestry
35	新温 179 Xinwen 179	选育品种 Bred variety	新疆林业科学院 Xinjiang Academy of Forestry
36	新温 233 Xinwen 233	选育品种 Bred variety	新疆林业科学院 Xinjiang Academy of Forestry
37	新新 2 Xinxin 2	选育品种 Bred variety	新疆林业科学院 Xinjiang Academy of Forestry
38	新早丰 Xinzaofeng	选育品种 Bred variety	新疆林业科学院 Xinjiang Academy of Forestry
39	元丰 Yuanfeng	选育品种 Bred variety	山东省果树研究所 Shandong Institute of Pomology
40	扎 343 Zha 343	选育品种 Bred variety	新疆林业科学院 Xinjiang Academy of Forestry
41	中林 5 号 Zhonglin No. 5	选育品种 Bred variety	山西省林业科学研究院 Shanxi Academy of Forestry
42	大姚三台核桃 Dayaosantaihetao	选育品种 Bred variety	云南省林业和草原科学院 Yunnan Academy of Forestry and Grassland

续表1 Table 1 (Continued)

编号 No.	样本名称 Sample name	类别 Type	保存单位 Conservation unit
43	华宁大白壳核桃 Huaningdabaike	选育品种 Bred variety	云南省林业和草原科学院 Yunnan Academy of Forestry and Grassland
44	华宁大砂壳核桃 Huaningdashake	选育品种 Bred variety	云南省林业和草原科学院 Yunnan Academy of Forestry and Grassland
45	丽 53 Li 53	选育品种 Bred variety	云南省林业和草原科学院 Yunnan Academy of Forestry and Grassland
46	维 2 号 Wei No. 2	选育品种 Bred variety	云南省林业和草原科学院 Yunnan Academy of Forestry and Grassland
47	昌宁细香核桃 Changningxixiang	选育品种 Bred variety	云南省林业和草原科学院 Yunnan Academy of Forestry and Grassland
48	永 11 号 Yong No. 11	选育品种 Bred variety	云南省林业和草原科学院 Yunnan Academy of Forestry and Grassland
49	漾濞泡核桃 Yangbipaohetao	选育品种 Bred variety	云南省林业和草原科学院 Yunnan Academy of Forestry and Grassland
50	云新 301 Yunxin 301	选育品种 Bred variety	云南省林业和草原科学院 Yunnan Academy of Forestry and Grassland
51	云新 303 Yunxin 303	选育品种 Bred variety	云南省林业和草原科学院 Yunnan Academy of Forestry and Grassland
52	云新 306 Yunxin 306	选育品种 Bred variety	云南省林业和草原科学院 Yunnan Academy of Forestry and Grassland
53	云新高原核桃 Yunxingaoyuan	选育品种 Bred variety	云南省林业和草原科学院 Yunnan Academy of Forestry and Grassland
54	云新云林核桃 Yunxinyunlin	选育品种 Bred variety	云南省林业和草原科学院 Yunnan Academy of Forestry and Grassland

## 1.2 方法

**1.2.1 叶片基因组 DNA 提取** 采用改良的 CTAB 法<sup>[23]</sup> 提取供试 54 份核桃样本叶片基因组 DNA,先用体积分数 75%乙醇清洗 2 次,再用 250  $\mu\text{L}$  1 $\times$ TE 缓冲液(pH 8.0)溶解,使用 NanoDrop 8000 超微量紫外分光光度计(美国 Thermo Fisher 科技公司)检测提取的基因组 DNA 浓度,并用 1 $\times$ TE 缓冲液稀释至质量浓度 25  $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ,置于 4  $^{\circ}\text{C}$  冰箱中保存、备用。

**1.2.2 扩增反应及电泳检测** 参考 Chen 等<sup>[21]</sup> 的方法,采用应用较为成熟的 13 对 SSR 引物(表 2)对提取的基因组 DNA 进行扩增反应。扩增体系总体积为 20.0  $\mu\text{L}$ ,包括 10 $\times$ Buffer 2.0  $\mu\text{L}$ 、2.5  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  dNTPs 1.6  $\mu\text{L}$ 、10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  上游和下游引物各 1.6  $\mu\text{L}$ 、5 U  $\cdot \mu\text{L}^{-1}$  TaqDNA 聚合酶 0.3  $\mu\text{L}$ 、25  $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  DNA 模板 2.0  $\mu\text{L}$ ,用超纯水补足剩余体积。扩增程序:

94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min;94  $^{\circ}\text{C}$  变性 45 s、各引物相应退火温度退火 45 s、72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 45 s,共 35 个循环;72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 7 min 后,于 4  $^{\circ}\text{C}$  保存。使用 ABI 3730XL 全自动 DNA 测序仪(美国 ABI 公司)对扩增产物进行毛细管电泳检测。

**1.2.3 数据分析** 利用 GeneMarker v 2.2.0 软件读取电泳条带并记录条带大小,条带缺失记为“999”,构建原始数据矩阵。利用 POPGENE version 1.31 软件<sup>[28]</sup> 计算所有 SSR 引物对应位点的观测等位基因数、有效等位基因数、观测杂合度、期望杂合度、Shannon's 信息指数和 Nei's 基因多样性指数<sup>[29]</sup>。利用 CERVUS Version 3.0.7 软件计算多态信息含量。

**1.2.4 分子身份证构建** 剔除扩增条带缺失超过 5%的引物<sup>[30]</sup>,参考高源等<sup>[31]</sup> 的方法筛选构建分子身份证的引物组合。先将引物按照区分率(即引物区

表 2 用于 SSR 分子标记分析的引物信息

Table 2 Information of primers used for SSR molecular marker analysis

引物 Primer	引物序列(5'→3') Primer sequence (5'→3')		退火温度/ $^{\circ}\text{C}$ Annealing temperature
	正向引物 Forward primer	反向引物 Reverse primer	
WGA01	ATTGGAAGGGAAGGAAATG	CGCGCACATACGTAATCAC	60
WGA04	TGTAATTGGGGAATGTFCA	TGGGAGACACAATGATCGAA	55
WGA70	AAACCACCTAAAACCTGCA	ACCCATCCATGATCTTCCAA	55
WGA72	AGGGCACTCCCTTATGAGGT	CAGTCTCATTCCTTTTCC	58
WGA76	CACTGTGGCACTGCTCATCT	TTCGAGCTCTGGACCACC	55
WGA79	ACCCATCTTTCACGTGTGTG	TGCCTAATTAGCAATTCCA	55
WGA89	TGTTGCATTGACCCACTTGT	TAAGCCAACATGGTATGCCA	56
WGA118	TGTGCTCTGATCTGCCTCC	GGGTGGGTGAAAAGTAGCAA	60
WGA202	CCCATCTACCGTTGCACTTT	GCTGGTGGTTCTATCATGGG	60
WGA321	TCCAATCGAAACTCCAAAGG	GTCCAAAGACGATGATGGA	55
WGA331	TCCCCCTGAAATCTTCTCCT	CGGTGGTGTAAAGGCAAATG	57
WGA332	ACGTCGTTCTGCACTCCTCT	GCCACAGGAACGAGTGCT	60
WGA376	GCCCTCAAAGTGATGAACGT	TCATCCATATTTACCCCTTTCC	55



分样本数占供试样本总数的百分比)从高到低排序,依次两两组合,根据扩增结果统计各引物组合的区分率;选取区分率最高的引物组合,继续增加引物,直到将全部样本区分开。

根据引物组合中各引物的扩增结果,将样本扩增条带按照 SSR 标记所在染色体编号由小到大排列,作为其分子指纹<sup>[32]</sup>;结合样本的基本信息、选育历史、主要特性、栽培技术要点等信息,利用在线二维码

生成器(<https://cli.im/>)生成可扫描的分子身份证。

## 2 结果和分析

### 2.1 SSR 引物对应位点的遗传多样性分析

采用 13 对 SSR 引物对供试 54 份核桃样本的基因组 DNA 进行扩增反应,共检测到 107 个等位基因。各引物对应位点的遗传多样性分析结果见表 3。

表 3 用于核桃样本 SSR 分子标记分析的引物对应位点的遗传多样性

Table 3 Genetic diversity at corresponding loci of primers for SSR molecular marker analysis of walnut (*Juglans* spp.) samples

引物 Primer	观测等位基因数 Number of observed alleles	有效等位基因数 Number of effective alleles	观测杂合度 Observed heterozygosity	期望杂合度 Expected heterozygosity	Shannon's 信息指数 Shannon's information index	Nei's 基因 多样性指数 Nei's gene diversity index	多态信息含量 Polymorphism information content
WGA01	7	3.7	0.27	0.74	1.55	0.73	0.69
WGA04	16	7.7	0.53	0.88	2.36	0.87	0.86
WGA70	8	5.2	0.47	0.82	1.83	0.81	0.78
WGA72	6	2.7	0.13	0.58	1.16	0.58	0.53
WGA76	6	2.5	0.56	0.61	1.22	0.60	0.56
WGA79	12	7.9	0.49	0.88	2.22	0.87	0.86
WGA89	8	4.0	0.57	0.76	1.65	0.75	0.72
WGA118	8	2.9	0.57	0.66	1.48	0.65	0.63
WGA202	10	3.9	0.38	0.75	1.70	0.74	0.72
WGA321	7	2.5	0.50	0.61	1.29	0.60	0.57
WGA331	3	2.2	0.10	0.55	0.86	0.54	0.44
WGA332	7	3.9	0.43	0.75	1.58	0.74	0.71
WGA376	9	5.5	0.46	0.83	1.86	0.82	0.80
均值 Average	8.2	4.2	0.42	0.72	1.60	0.72	0.68

结果显示:引物对应位点的观测等位基因数为 3~16,均值 8.2;有效等位基因数为 2.2~7.9,均值 4.2;观测杂合度为 0.10~0.57,均值 0.42;期望杂合度为 0.55~0.88,均值 0.72;Shannon's 信息指数为 0.86~2.36,均值 1.60;Nei's 基因多样性指数为 0.54~0.87,均值 0.72;多态信息含量为 0.44~0.86,均值 0.68。总体来看,引物 WGA04 和 WGA79 对应位点的遗传多样性较高,引物 WGA331 对应位点的遗传多样性最低。

### 2.2 最佳引物组合筛选

除引物 WGA331、WGA332 和 WGA376(扩增条带缺失超过 5%)外,其余 10 对引物的区分效果见表 4。结果显示:这些引物区分样本数为 3~13,区分率为 5.56%~24.07%,其中,引物 WGA04 的区分率最高,引物 WGA76 的区分率最低,但总体来看,这些引物的区分率均不高,不能用 1 对 SSR 引物将供试 54 份核桃样本完全区分开。

表 4 不同 SSR 引物对供试核桃样本的区分效果

Table 4 Identification effect of different SSR primers to the test walnut (*Juglans* spp.) samples

引物 Primer	区分样本数 Number of identified samples	区分率/% Identification rate
WGA01	4	7.41
WGA04	13	24.07
WGA70	6	11.11
WGA72	4	7.41
WGA76	3	5.56
WGA79	10	18.52
WGA89	5	9.26
WGA118	5	9.26
WGA202	8	14.81
WGA321	5	9.26
均值 Average	6.3	11.67

采用逐步增加引物数量的方法筛选引物组合,不同引物组合的区分效果见表 5。结果显示:2 对引物

组合中, WGA04-WGA70 的区分率最高, 为 72.22%, 可区分 39 份样本; WGA04-WGA79、WGA04-WGA202 和 WGA04-WGA89 的区分率次之, 均为 68.52%, 均可区分 37 份样本; WGA72-WGA76 的区分率最低 (22.22%), 仅能区分 12 份样本。在区分率最高的引物组合 WGA04-WGA70 中增加 1 对引物, 组成 3 对引物组合, 其中 WGA04-WGA70-WGA79、WGA04-WGA70-WGA202、WGA04-WGA70-WGA89 和 WGA04-WGA70-WGA01 的区分率为 100.00%, 可将供试核桃样本完全区分开。

### 2.3 分子身份证构建

根据引物组合 WGA04-WGA70-WGA79 中 3 对 SSR 引物的扩增结果, 将各样本扩增条带按照 SSR 标记所在染色体编号由小到大排序 (WGA70、WGA79 和 WGA04 分别位于 Chr03、Chr04 和 Chr12 染色体), 即分子指纹 (表 6)。如 ‘薄丰’ (‘Baofeng’) 的分子指纹为 157/157、208/208 和 230/238, 依次代表引物 WGA70、WGA79 和 WGA04 扩增条带的长度。

将分子指纹与样本的相关信息相结合, 构建供试核桃样本的分子身份证 (图 1)。结果显示: 供试核桃

表 5 不同引物组合对供试核桃样本的区分效果

Table 5 Identification effect of different primer combinations to the test walnut (*Juglans spp.*) samples

引物组合 Primer combination	$n^{1)}$	R/% <sup>1)</sup>	引物组合 Primer combination	$n^{1)}$	R/% <sup>1)</sup>	引物组合 Primer combination	$n^{1)}$	R/% <sup>1)</sup>
WGA04-WGA79	37	68.52	WGA202-WGA89	29	53.70	WGA118-WGA01	27	50.00
WGA04-WGA202	37	68.52	WGA202-WGA118	22	40.74	WGA118-WGA72	15	27.78
WGA04-WGA70	39	72.22	WGA202-WGA321	21	38.89	WGA118-WGA76	17	31.48
WGA04-WGA89	37	68.52	WGA202-WGA01	27	50.00	WGA321-WGA01	26	48.15
WGA04-WGA118	34	62.96	WGA202-WGA72	20	37.04	WGA321-WGA72	13	24.07
WGA04-WGA321	32	59.26	WGA202-WGA76	20	37.04	WGA321-WGA76	15	27.78
WGA04-WGA01	32	59.26	WGA70-WGA89	32	59.26	WGA01-WGA72	23	42.59
WGA04-WGA72	28	51.85	WGA70-WGA118	23	42.59	WGA01-WGA76	21	38.89
WGA04-WGA76	30	55.56	WGA70-WGA321	28	51.85	WGA72-WGA76	12	22.22
WGA79-WGA202	31	57.41	WGA70-WGA01	29	53.70	WGA04-WGA70-WGA79	54	100.00
WGA79-WGA70	35	64.81	WGA70-WGA72	22	40.74	WGA04-WGA70-WGA202	54	100.00
WGA79-WGA89	35	64.81	WGA70-WGA76	26	48.15	WGA04-WGA70-WGA89	54	100.00
WGA79-WGA118	25	46.30	WGA89-WGA118	29	53.70	WGA04-WGA70-WGA118	52	96.30
WGA79-WGA321	23	42.59	WGA89-WGA321	25	46.30	WGA04-WGA70-WGA321	52	96.30
WGA79-WGA01	35	64.81	WGA89-WGA01	22	40.74	WGA04-WGA70-WGA01	54	100.00
WGA79-WGA72	20	37.04	WGA89-WGA72	16	29.63	WGA04-WGA70-WGA72	51	94.44
WGA79-WGA76	23	42.59	WGA89-WGA76	19	35.19	WGA04-WGA70-WGA76	52	96.30
WGA202-WGA70	28	51.85	WGA118-WGA321	18	33.33			

<sup>1)</sup>  $n$ : 区分样本数 Number of identified samples; R: 区分率 Identification rate.

表 6 供试核桃样本的分子指纹

Table 6 Molecular fingerprint of the test walnut (*Juglans spp.*) samples

样本名称 Sample name	分子指纹 <sup>1)</sup>	Molecular fingerprint <sup>1)</sup>	样本名称 Sample name	分子指纹 <sup>1)</sup>	Molecular fingerprint <sup>1)</sup>
薄丰 Baofeng	157/157, 208/208, 230/238		晋龙 2 号 Jinlong No. 2	155/155, 196/206, 230/238	
北京 861 Beijing 861	157/157, 208/212, 230/230		礼品 2 号 Lipin No. 2	155/165, 196/208, 238/240	
川核 1 号 Chuanhe No. 1	155/155, 196/212, 230/230		辽宁 1 号 Liaoning No. 1	159/161, 197/205, 204/230	
川核 2 号 Chuanhe No. 2	153/153, 196/206, 230/230		辽宁 3 号 Liaoning No. 3	155/155, 196/196, 230/230	
川核 3 号 Chuanhe No. 3	155/155, 196/196, 320/320		辽宁 4 号 Liaoning No. 4	157/157, 206/206, 230/238	
川核 4 号 Chuanhe No. 4	159/165, 196/196, 152/230		绿波 Lübo	149/149, 196/206, 230/246	
川核 5 号 Chuanhe No. 5	167/167, 206/212, 230/230		鲁果 4 号 Lugu No. 4	159/161, 211/211, 204/230	
川核 6 号 Chuanhe No. 6	159/167, 196/212, 230/230		清香 Qingxiang	155/155, 206/206, 230/230	
川核 8 号 Chuanhe No. 8	159/165, 206/212, 230/230		陕核 2 号 Shanhe No. 2	999/999, 246/246, 230/238	
川核 10 号 Chuanhe No. 10	159/167, 206/212, 230/236		陕核 3 号 Shanhe No. 3	159/159, 207/207, 202/202	
川核 11 号 Chuanhe No. 11	165/167, 196/212, 230/230		维纳 Vina	155/157, 206/208, 232/240	
福兰克蒂 Franquetee	155/157, 206/208, 230/238		温 185 Wen 185	153/165, 196/208, 236/238	
哈特利 Hartley	155/155, 206/206, 230/246		吾斯曼 Wusiman	155/165, 206/206, 230/246	
晋龙 1 号 Jinlong No. 1	155/155, 152/152, 230/230		西扶 1 号 Xifu No. 1	159/159, 197/201, 220/220	

续表6 Table 6 (Continued)

样本名称 Sample name	分子指纹 <sup>1)</sup> Molecular fingerprint <sup>1)</sup>	样本名称 Sample name	分子指纹 <sup>1)</sup> Molecular fingerprint <sup>1)</sup>
西扶 2 号 Xifu No. 2	155/161,197/207,202/220	大姚三台核桃 Dayaosantaihetao	159/161,205/207,230/230
西林 1 号 Xilin No. 1	157/157,196/206,230/236	华宁大白壳核桃 Huaningdabaikē	155/155,210/210,232/232
西林 2 号 Xilin No. 2	999/999,210/210,202/202	华宁大砂壳核桃 Huaningdashake	159/159,210/210,236/236
香玲 Xiangling	155/155,206/208,242/242	丽 53 Li 53	155/163,212/212,230/230
新丰 Xinfeng	155/157,206/208,200/200	维 2 号 Wei No. 2	155/155,196/196,236/236
新光 Xinguang	157/157,210/210,238/238	昌宁细香核桃 Changningxixiang	159/159,210/210,240/240
新温 179 Xinwen 179	157/163,206/208,236/238	永 11 号 Yong No. 11	155/159,210/210,230/230
新温 233 Xinwen 233	157/165,206/206,236/238	漾濞泡核桃 Yangbipaohetao	159/161,207/207,204/230
新新 2 Xinxin 2	157/163,206/208,230/238	云新 301 Yunxin 301	163/163,206/210,230/238
新早丰 Xinzaofeng	153/153,152/152,192/192	云新 303 Yunxin 303	155/159,208/214,232/240
元丰 Yuanfeng	999/999,207/207,230/230	云新 306 Yunxin 306	153/153,208/214,230/230
扎 343 Zha 343	159/161,207/207,204/230	云新高原核桃 Yunxingaoyuan	159/165,206/210,220/236
中林 5 号 Zhonglin No. 5	155/163,206/208,238/238	云新西林核桃 Yunxinyunlin	159/165,196/210,230/236

<sup>1)</sup> 依次示引物 WGA70、WGA79 和 WGA04 扩增条带的长度 Showing the length of amplified bands of primers WGA70, WGA79, and WGA04 in turn.

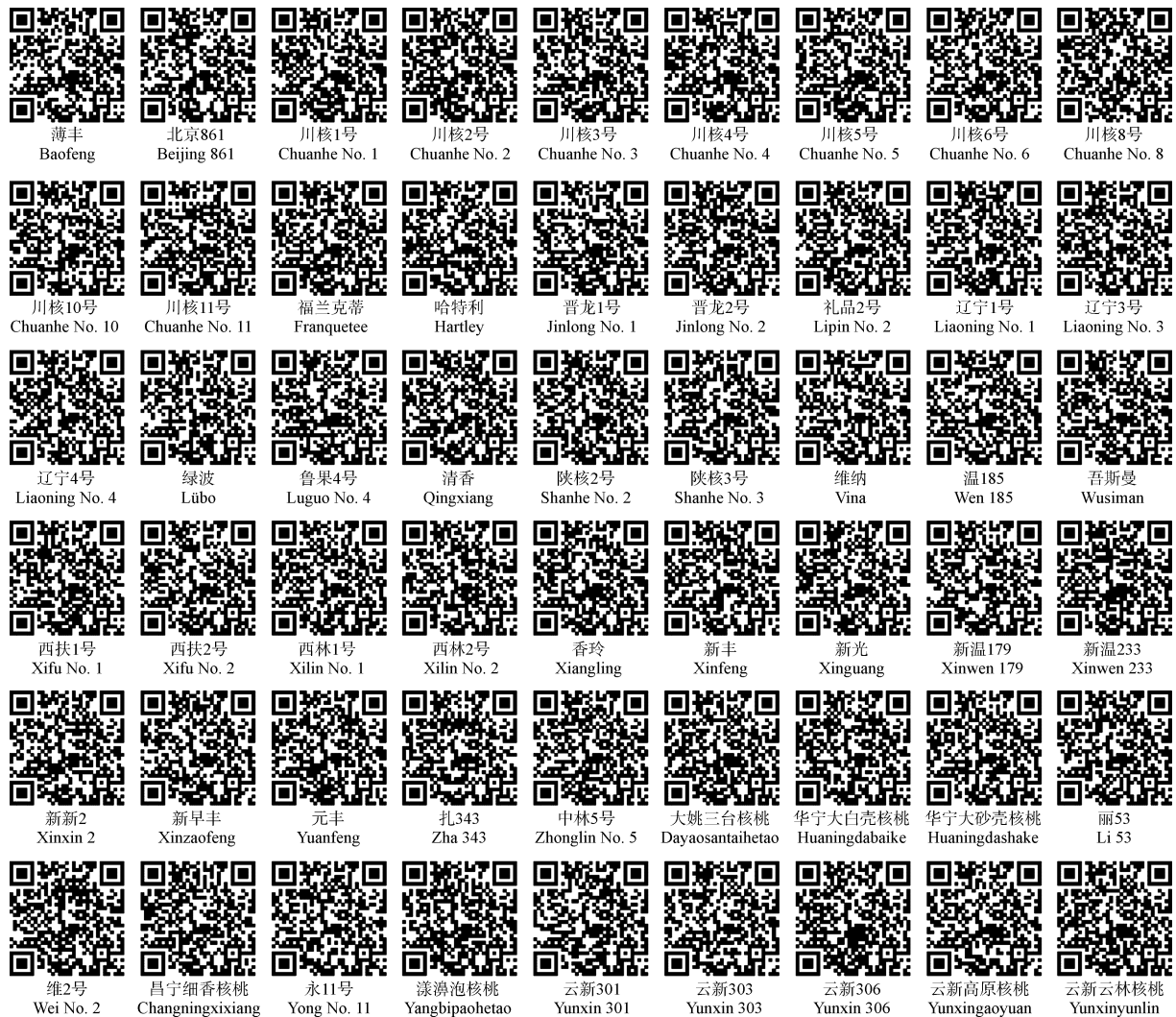


图 1 基于 SSR 分子标记构建的供试核桃样本的分子身份证

Fig. 1 Molecular identity cards of the test walnut (*Juglans* spp.) samples based on SSR molecular marker

样本均有自己的分子身份证,使用者扫码后可显示基础信息和种质资源简介,前者包括种质资源名称、种名、选育或保存单位、分子指纹和 SSR 引物信息,审(认)定良种还标有良种编号;后者包括选育历史、主要特性、适宜栽培区域等。

### 3 讨论和结论

本研究涉及的 54 份核桃样本既包含胡桃、泡核桃、种间杂交种等遗传背景差异很大的材料,也包含全同胞或半同胞子代选育而成的亲缘关系极为相近的材料;这些核桃种质资源以中国自主知识产权品种为主,并包含部分由国外引进的重要种质资源。因此,本研究的选材在一定程度上体现了中国核桃种质资源的现状,具有较好的代表性。本研究利用 13 对 SSR 引物从 54 份核桃样本基因组 DNA 中扩增出 107 个等位基因,基因型呈现多样化特征。这些 SSR 引物的观测杂合度和期望杂合度均值(分别为 0.42 和 0.72)均略低于苹果(*Malus pumila* Mill.)<sup>[31]</sup>和枣(*Ziziphus jujuba* Mill.)<sup>[33]</sup>等植物,与笔者前期的研究结果一致<sup>[34]</sup>。为了确保构建的分子身份证的可靠性,笔者剔除了扩增条带缺失超过 5% 的 SSR 引物,从而较好地避免了标记信息不全对整体鉴定效果的影响。构建分子身份证不仅要求使用的 SSR 引物具有多态性高、稳定性好等优点,还要满足用最少引物区分最多样本的要求。本研究采用逐步扩增法获得了能够区分供试 54 份核桃样本的最小规模引物组合,即 3 对引物组合,不但大大减少了计算量,而且还保证了最终筛选出的引物组合对应位点具有较高的等位基因数和多态信息含量,为核桃种质资源大规模鉴定提供了可能性和可靠性。

SSR 指纹图谱是构建分子身份证的基础,分子身份证是将 SSR 指纹图谱进行数字化转换,从而更加直观、简明地说明相关特征。目前分子身份证构建采用的编码方法主要有 3 类<sup>[31,35-37]</sup>:第 1 类是根据条带的有无将 SSR 指纹图谱转换为由“0”和“1”组成的字符串,以此构建条形码分子身份证;第 2 类是将不同 SSR 引物的扩增条带按从小到大顺序排列,分别赋值后编码;第 3 类是根据带型进行数字编码,按 SSR 引物顺序串联形成一组数据。二维码规模化扩大了条码可容纳的数据量,为指纹信息和种质资源信息等的可视化奠定了基础,从而构建分子身份证<sup>[38]</sup>。本研

究以 SSR 指纹图谱为核心,结合供试核桃样本的基础信息和种质资源简介,利用二维码技术建立了每份核桃样本独特的分子身份证,便于使用者快速获取用于区分供试核桃样本的相关信息。然而,本研究仅构建了 54 份核桃样本的分子身份证,尚未覆盖所有核桃种质资源,仍需后续研究进行补充和完善。

综上所述,利用引物组合 WGA04 - WGA70 - WGA79、WGA04 - WGA70 - WGA202、WGA04 - WGA70 - WGA89、WGA04 - WGA70 - WGA01 可完全区分供试的 54 份核桃样本,构建的分子身份证能够快速、准确鉴定核桃种质资源,亦可用于核桃种质资源知识产权保护。

#### 参考文献:

- [1] 裴东,鲁新政.中国核桃种质资源[M].北京:中国林业出版社,2011:18.
- [2] 贺君星,马庆国,裴东,等.基于核桃参考基因组的 SSR 位点鉴定分析和单态性标记开发[J].林业科学研究,2022,35(6):89-100.
- [3] 国家林业和草原局.中国林业和草原统计年鉴(2020)[M].北京:中国林业出版社,2021:48.
- [4] 马庆国,乐佳兴,宋晓波,等.新中国果树科学研究 70 年:核桃[J].果树学报,2019,36(10):1360-1368.
- [5] ALAVI-SINEY S M, SABA J, NASIRI J. Genetic variability and population genetic structure in autotriploid saffron using allelic phenotypes of microsatellite markers [J]. Scientia Horticulturae, 2022, 299: 111043.
- [6] BAKIR M, DUMANOGLU H, AYGUN A, et al. Genetic diversity and population structure of apple germplasm from Eastern Black Sea region of Turkey by SSRs [J]. Scientia Horticulturae, 2022, 294: 110793.
- [7] LI J, YE C. Genome-wide analysis of microsatellite and sex-linked marker identification in *Gleditsia sinensis* [J]. BMC Plant Biology, 2020, 20: 338.
- [8] PATIL P G, SINGH N V, BOHRA A, et al. Comprehensive characterization and validation of chromosome-specific highly polymorphic SSR markers from pomegranate (*Punica granatum* L.) cv. Tunisia genome [J]. Frontiers in Plant Science, 2021, 12: 645055.
- [9] 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.
- [10] 陈翠萍,刘洋.基于 SSR 标记的藜麦种质资源遗传多样性分析与指纹图谱构建[J].江苏农业科学,2022,50(13):26-31.
- [11] 臧明月,李璇,方炎明,等.基于 SSR 标记的白栎天然居群遗传多样性分析[J].南京林业大学学报(自然科学版),2021,45(1):63-69.
- [12] 于少帅,赵文霞,姚艳霞,等.新疆野苹果和栽培苹果遗传分



- 化与变异特征[J]. 江苏农业学报, 2020, 36(5): 1274-1281.
- [13] International Union for the Protection of New Varieties of Plants. Guidelines for DNA-profiling: molecular marker selection and database construction (“BMT guidelines”) [EB/OL]. (2021-09-21) [2022-07-30]. [https://www.upov.int/edocs/infdocs/en/upov\\_inf\\_17.pdf](https://www.upov.int/edocs/infdocs/en/upov_inf_17.pdf).
- [14] LI L, XU X, WU P, et al. Establishment of molecular identity cards for *Cucumis melo* cultivars using SSR markers [J]. HortScience, 2018, 53(2): 138-143.
- [15] UDDIN N, ALI N, NISAR M, et al. SSR-based population structure, molecular diversity and identity cards of *Ziziphus* species from Pakistan and China [J]. Genetic Resources and Crop Evolution, 2021, 68(6): 2391-2409.
- [16] LI C, WU J, LI Q, et al. Development of simple sequence repeat markers from functional genes and establishment of molecular identity for tree peony [J]. Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology, 2021, 31(1): 22-36.
- [17] GUAN C, ZHANG Y, YANG P, et al. Germplasm conservation, molecular identity and morphological characterization of persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) in the NFGP of China [J]. Scientia Horticulturae, 2020, 272: 109490.
- [18] 王宇晴, 李乔巧, 阚文亮, 等. 利用SSR分子标记构建甜菜登记品种的分子身份证[J]. 江苏农业科学, 2022, 50(18): 289-294.
- [19] 周于波, 朱 鹏, 龚 伟, 等. 基于SSR标记的川西南泡核桃良种DNA指纹图谱构建及聚类分析[J]. 分子植物育种, 2018, 16(17): 5683-5689.
- [20] 周于波, 朱 鹏, 龚 伟, 等. 四川核桃良种SSR指纹图谱构建及遗传多样性分析[J]. 西北植物学报, 2018, 38(7): 1254-1261.
- [21] 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.
- [22] 梁 燕, 韩传明, 周继磊, 等. 山东核桃良种SSR指纹图谱及分子身份证的构建: 基于毛细管电泳分析[J]. 中国农学通报, 2022, 38(15): 113-121.
- [23] WOESTE K, BURNS R, RHODES O, et al. Thirty polymorphic nuclear microsatellite loci from black walnut [J]. The Journal of Heredity, 2002, 93: 58-60.
- [24] DANGL G S, WOESTE K, ARADHYA M K, et al. Characterization of 14 microsatellite markers for genetic analysis and cultivar identification of walnut [J]. Journal of the American Society for Horticultural Science, 2005, 130(3): 348-354.
- [25] WANG H, PEI D, GU R S, et al. Genetic diversity and structure of walnut populations in central and southwestern China revealed by microsatellite markers [J]. Journal of the American Society for Horticultural Science, 2008, 133(2): 197-203.
- [26] WANG H, PAN G, MA Q, et al. The genetic diversity and introgression of *Juglans regia* and *Juglans sigillata* in Tibet as revealed by SSR markers [J]. Tree Genetics and Genomes, 2015, 11: 804.
- [27] 邱 杨, 李锡香, 李清霞, 等. 利用SSR标记构建萝卜种质资源分子身份证[J]. 植物遗传资源学报, 2014, 15(3): 648-654.
- [28] YEH F C, YANG R C, BOYLE T. POPGENE Version 1.31: Microsoft Windows-Based Freeware for Population Genetic Analysis [M]. Edmonton: Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, 2000: 11-23.
- [29] NEI M. Analysis of gene diversity in subdivided populations [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1973, 70(12): 3321-3323.
- [30] 胡振帮, 高运来, 齐照明, 等. 作物分子身份证构建软件ID analysis的编制[J]. 中国农业科学, 2016, 49(12): 2255-2266.
- [31] 高 源, 刘凤之, 王 昆, 等. 苹果部分种质资源分子身份证的构建[J]. 中国农业科学, 2015, 48(19): 3887-3898.
- [32] 管俊娇, 杨晓洪, 王江民, 等. 云梗系水稻品种分子身份证的构建[J]. 江苏农业学报, 2018, 34(6): 1201-1206.
- [33] 闫芬芬, 郑兴娟, 罗 智, 等. 枣和酸枣杂交后代遗传多样性的SSR分析[J]. 西北林学院学报, 2018, 33(3): 91-97.
- [34] 马庆国. 中国核桃品种的遗传多样性研究 [D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2012: 82.
- [35] 徐雷锋, 葛 亮, 袁素霞, 等. 利用荧光标记SSR构建百合种质资源分子身份证[J]. 园艺学报, 2014, 41(10): 2055-2064.
- [36] 张 嘉, 刘爱青, 张淑玲, 等. 利用荧光标记SSR绘制中国芍药品种分子身份证[J]. 北京林业大学学报, 2016, 38(6): 101-109.
- [37] 段 豪, 徐建华, 王紫阳, 等. 落叶松属种类及其杂交子代‘中山杉’系列品种的SSR指纹图谱构建及遗传关系分析[J]. 植物资源与环境学报, 2020, 29(4): 11-18, 44.
- [38] 陈小红, 林元香, 王 倩, 等. 基于高基元SSR构建黍稷种质资源的分子身份证[J]. 作物学报, 2022, 48(4): 908-919.

(责任编辑: 佟金凤)