

四川核桃良种 SSR 指纹图谱构建 及遗传多样性分析

周于波¹, 朱 鹏¹, 龚 伟^{1*}, 王景燕¹, 闫思宇¹, 吴开志²

(1 四川农业大学 林学院, 林业生态工程四川省重点实验室, 成都 611130; 2 四川省林木种苗站, 成都 610081)

摘 要: 为构建四川核桃良种指纹图谱, 分析遗传多样性, 增强品种间的区分能力, 该研究利用 SSR 标记技术, 对四川 29 个核桃良种进行遗传多样性和聚类分析。结果表明: (1) 11 对 SSR 引物共检测到 121 个基因型和 80 个等位基因, 平均每个位点 7.273 个等位基因和 11 个基因型。 (2) 11 个位点的平均有效等位基因数为 3.644, 平均观察杂合度为 0.645, 平均期望杂合度为 0.718, 平均香农信息指数为 1.518, 平均多态信息含量为 0.680。 (3) 采用引物组合法利用引物 wga001、wga032 和 zmz02 构建了 29 个核桃品种的指纹图谱。 (4) 聚类分析结果表明, 29 个核桃品种按照品种类型优先聚类, 四川本地核桃品种聚类关系与地理来源没有明显的相关性。研究认为, 选用的 11 个 SSR 标记能够较好地运用于四川核桃品种的遗传多样性研究 ($PIC > 0.5$); 29 个四川核桃品种间亲缘关系较近, 遗传基础相对较窄。

关键词: 核桃; 良种; SSR; 遗传多样性

中图分类号: Q346⁺.5; Q789

文献标志码: A

SSR Fingerprint Construction and Genetic Diversity Analysis of Elite *Juglans regia* Cultivars in Sichuan

ZHOU Yubo¹, ZHU Peng¹, GONG Wei^{1*}, WANG Jingyan¹, YAN Siyu¹, WU Kaizhi²

(1 Sichuan Provincial Key Laboratory of Ecological Forestry Engineering, College of Forestry, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China; 2 Forest Seedling Station of Sichuan Province, Chengdu 610081, China)

Abstract: In this study, we investigated the fingerprint and genetic diversity of Sichuan elite *Juglans regia* cultivars to improve the identification ability for cultivars. The SSR markers were applied for genetic diversity and cluster analysis of 29 elite *J. regia* cultivars. The results showed that: (1) 121 genotypes and 80 alleles were identified by the 11 SSR markers, and per primer pair has 7.273 alleles and 11 genotypes. (2) Mean effective allele number (N_e), heterozygosity (H_o), expected heterozygosity (H_e), shannon's index (I) and polymorphic information contents (PIC) of the 11 SSR markers were 3.644, 0.645, 0.718, 1.518 and 0.680, respectively. (3) The fingerprint of 29 *J. regia* cultivars were constructed by primer combination method using primers wga001, wga032 and zmz02. (4) Cluster analysis showed that the 29 *J. regia* cultivars were classified according to the priority of variety type. There is no obvious correlation among cluster relationship and geographical origin of the local *J. regia* cultivars in Sichuan. The results suggested that the 11 SSR markers can be applied to analyze the genetic diversity of walnut varieties in Sichuan

收稿日期: 2018-04-03; 修改稿收到日期: 2018-05-31

基金项目: 四川省林业厅项目 (20140312); 四川省科技厅项目 (2016NYZ0035, 2017NFP0051, 2017NFP0126)

作者简介: 周于波 (1996—), 男, 在读硕士研究生, 主要从事经济林培育研究。E-mail: 949800124@qq.com

* 通信作者: 龚 伟, 教授, 主要从事经济林培育研究。E-mail: gongwei@sicau.edu.cn

($PIC>0.5$); the genetic relationship of 29 Sichuan *J. regia* cultivars was relatively close, and theirs genetic basis are relatively narrow.

Key words: *Juglans regia*; improved cultivars; SSR; genetic diversity

核桃 (*Juglans regia* L.) 又名胡桃, 胡桃科 (Juglandaceae) 核桃属 (*Juglans*) 植物, 落叶乔木, 与扁桃、腰果、榛子并称为世界著名四大干果^[1]。核桃是中国传统果树, 主要分布于中国云南、四川、新疆、贵州等地。四川是核桃种植大省, 环境的多态性使四川核桃的种质资源十分丰富, 形成了许多优良的地方品种。自 20 世纪 60 年代开始, 四川陆续从新疆、辽宁、云南等地引进优良品种, 但由于气候差异过大, 北方和云南核桃品种在四川独特的生态环境中表现出环境适应性不佳, 落花落果严重等问题^[2]。基于此, 育种工作者^[2-5]利用云南的优良品种与适应于四川气候的乡土品种杂交获得了一批早实优良核桃品种, 即‘川早’系列。近年来, 越来越多的核桃品种通过四川省林木品种审定委员会的审(认)定并投入到生产中^[6], 但在品种多样化的同时, 由于核桃嫁接技术的成熟和核桃苗木时期无法通过表型将亲缘关系较近的品种区分开等原因, 核桃品种在引种和推广过程中“同物异名”或“同名异物”的情况时有发生。另外, 由于缺乏准确有效的苗木鉴定方法, 也导致许多劣质种苗以次充好流入市场, 不仅严重影响了良种持有人和种植户的利益, 也严重影响了核桃产业的健康发展。因此, 建立一种有效的苗木品种鉴定的方法, 对保证核桃种苗质量和促进核桃产业发展尤为重要和迫切。

DNA 分子标记是一种新兴的标记技术, 包括限制性片段长度多态性 (RFLP)、随机扩增多态性 DNA (RAPD)、表达序列标签 (EST)、扩增片段多态性 (AFLP)、简单重复序列标记 (ISSR)、简单重复序列 (SSR)、单核苷酸多态性 (SNP) 等都已广泛应用于遗传图谱绘制、杂交子代纯度鉴定和遗传多样性评价等方面^[7]。其中 SSR 标记以其多态性高、共显性遗传、重复性好等特点已经逐渐应用于果树的遗传多样性^[8-10]、指纹图谱构建^[11-12]、亲缘关系^[13]等方面的研究。近年来, SSR 标记在核桃方面的应用主要集中在核桃居群遗传结构分析^[14-15]、新型 SSR 标记的开发^[16-17]等方面, 而在核桃优良品种指纹图谱构建方面的研究较少, 具体运用到地方品种间的鉴定来指导生产实践的研究更是鲜见报道。鉴于此, 本研究采用 SSR 标记对四川地区 29 个核桃良种进行分析, 构建核桃品种指纹图谱, 分析品种间遗

传多样性和亲缘关系, 以期核桃良种资源的鉴定和后续新品种的选育与审(认)定提供参考。

1 材料和方法

1.1 实验材料

试验材料为四川省林木品种审定委员会审(认)定的 29 个核桃良种(表 1), 包括四川本地选育的本地类型核桃品种 18 个(编号 1~18)、杂交类型‘川早’系列 5 个(编号 19~23), 经过引种驯化的北方类型核桃品种 5 个(编号 24~28)、云南类型品种 1 个(编号 29)。29 个核桃品种叶片于 2017 年 4 月上旬采自于四川农业大学崇州基地, 采样时选择新抽生的较嫩叶片, 采集前用无水乙醇清洗消毒, 采集后装入自封袋中, 再放入冰盒中带回实验室备用。

1.2 方 法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 采用宝生物植物 DNA 提取试剂盒 (TaKaRa, Dalian) 提取核桃基因组 DNA。提取的 DNA 利用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测质量、超微量核酸蛋白测定仪 (Nanodrop-2000) 测定 DNA 浓度, 将合格样品浓度稀释到 25 $\mu\text{g/mL}$ 后放入 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱内备用。

1.2.2 SSR 扩增 参考史丽会等^[18]选用的扩增效果较好且稳定的 11 对 SSR 引物(表 2)应用于试验中 29 个品种的 PCR 扩增。荧光引物由成都擎科梓熙生物技术有限公司合成。SSR-PCR 反应体系为 25 μL , 其中 $2\times\text{Es Taq Master Mix}$ (成都晶瑞思生物科技有限公司) 12.5 μL , Primer F 和 R 引物 (10 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 各 1 μL , 模板 DNA (约 25 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$) 2 μL , 最后用 dd H_2O 补充至 25 μL 。PCR 反应程序为: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 4 min; $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, $55\sim60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 35 个循环; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。PCR 产物送至成都擎科梓熙生物技术有限公司进行毛细管电泳分型分析。

1.2.3 数据处理 利用 GeneMapper 4.0 软件对得到的原始数据进行分析并获得扩增片段大小, 获得的数据再根据 GenAlEx 6.5 软件格式进行转换后, 计算每个位点的基因型数 (N_g)、观察等位基因数 (N_a)、有效等位基因数 (N_e)、观察杂合度 (H_o)、期望杂合度 (H_e) 和香农信息指数 (I); 利用 PIC 计算程式 (PIC-calc) 计算多态性信息含量 (PIC)。将扩

表 1 核桃品种名称及选育来源
Table 1 The name and breeding source of *Juglans regia* cultivars

编号 Code	名称 Variety	选育来源 Source
1	薄壳早 Bokezao	阿坝墨水 Moshui, Aba
2	客龙早 Kelongzao	阿坝墨水 Moshui, Aba
3	珍珠核桃 Zhenzhu	阿坝墨水 Moshui, Aba
4	南核 1 号 Nanhe1	巴中南江 Nanjiang, Bazhong
5	南核 2 号 Nanhe2	巴中南江 Nanjiang, Bazhong
6	通核 0035 Tonghe 0035	巴中通江 Tongjiang, Bazhong
7	通核 0046 Tonghe 0046	巴中通江 Tongjiang, Bazhong
8	通核 0114 Tonghe 0114	巴中通江 Tongjiang, Bazhong
9	通核 0147 Tonghe 0147	巴中通江 Tongjiang, Bazhong
10	巴山乌米籽 1 号 Bashanwumizi 1	达州万源 Wanyuan, Dazhou
11	青川 1 号 Qingchuan 1	广元青川 Qingchuan, Guangyuan
12	盐源早 Yanyuanzao	凉山盐源 Yanyuan, Liangshan
13	石坎紫皮 Shikanzipi	绵阳平武 Pingwu, Mianyang
14	梓森早核 Zisenzaohe	绵阳三台 Santai, Mianyang
15	七曲山核桃 Qiqushan	绵阳梓潼 Zhitong, Mianyang
16	蜀苑 3 号 Shuyuan 3	南充阆中 Langzhong, Nanchong
17	蜀苑 4 号 Shuyuan 4	南充阆中 Langzhong, Nanchong
18	威薄 01 Weibo 01	内江威远 Weiyuan, Neijiang
19	川早 1 号 Chuanzao 1	杂交品种 Hybrid variety
20	川早 2 号 Chuanzao 2	杂交品种 Hybrid variety
21	蜀玲 Shuling	杂交品种 Hybrid variety
22	双早 Shuangzao	杂交品种 Hybrid variety
23	早丰 Zaofeng	杂交品种 Hybrid variety
24	川核早 ^① Chuanhezao	北方引种 Introduced from Northern China
25	川香 ^② Chuanxiang	北方引种 Introduced from Northern China
26	林萍-1 ^③ Linping-1	北方引种 Introduced from Northern China
27	南福 1 号 ^④ Nanfu 1	北方引种 Introduced from Northern China
28	清香 Qingxiang	北方引种 Introduced from Northern China
29	蜀江 2 号 ^⑤ Shujiang 2	云南引种 Introduced from Yunnan, China

注:①原名‘辽核 1 号’;②原名‘香玲’;③原名‘辽核 4 号’;④原名‘新新 2 号’;⑤原名‘云新高原’
Note: ① original name ‘Liaohel 1’; ② original name ‘Xiangling’; ③ original name ‘Liaohel 4’; ④ original name ‘Xinxin 2’; ⑤ original name ‘Yunxingaoyuan’

增片段数据转换成 0、1 二元数据,采用 NTSYS-pc 2.1 计算 Dice 遗传相似性系数并进行 UPGMA(非加权组平均法)聚类分析,绘制亲缘关系树状图。

2 结果与分析

2.1 SSR 扩增结果及遗传多样性

利用 11 对 SSR 荧光引物对 29 个核桃品种进行扩增,扩增结果见表 3。11 对引物共检测到 80 个等位基因,121 个基因型,各引物等位基因数在 5~

12 之间,基因型数在 8~14 之间,平均每对引物观测等位基因数和基因型数分别为 7.273 和 11 个;有效等位基因数为 2.499~4.485,均值为 3.644;观测杂合度为 0.379~0.828,均值为 0.645;期望杂合度为 0.600~0.777,均值为 0.718;香农信息指数为 1.171~1.859,均值为 1.518;多态信息含量为 0.560~0.750,均值为 0.680。SSR 引物均为高多态性引物($PIC > 0.5$),说明选用的 SSR 引物能够较好地用于四川核桃品种遗传多样性分析。

表 2 11 对 SSR 引物信息
Table 2 Information of 11 SSR markers

引物 Primer	重复单元 Repeat	引物序列 Primer sequence(5'→3')		荧光标记 Fluorescence type	退火温度 TA/℃
		正向 Forward	反向 Reverse		
wga001	(GT)nTT(GA)n	ATTGGAAGGGAAGGGAATG	CGCGCACATACGTAAATCAC	6-FAM	60
wga004	(GT)n(GA)n	TGTTGCATTGACCCACTTGT	TAAGCCAACATGGTATGCCA	6-FAM	55
wga009	(GA)n	CATCAAAGCAAGCAATGGG	CCATTGCTCTGTGATTGGG	6-FAM	55
wga032	(CT)n	CTCGGTAAAGCCACACCAATT	ACGGGCAGTGTATGCATGTA	6-FAM	58
wga070	(GA)n	TGTAATTGGGGAATGTTGCA	TGGGAGACACAATGATCGAA	6-FAM	60
wga079	(GA)n	CACTGTGGCACTGCTCATCT	TTCGAGCTCTGGACCACC	6-FAM	60
wga148	(AG)n	GGTGAACTCCCATAGGGGTA	CCAATGCTACTTGCAGAACC	6-FAM	55
zmz05	(AACGCC)n	GGCTTCCTTCCCTTCTAT	GCTGCTTCTGCTTGTCTT	HEX	60
zmz22	(CT)n	TAGTCTCTCTATCACCCCCT	CAACACAATACAAACATCCC	HEX	55
zmz35	(AT)n	GTGTTGGGAGGTTGCAGAAA	ACAGCCACGCCACATAGAGA	HEX	58
zmz39	(AT)n	GGAGTGAAGACGACGACAGA	AAAACAAACCACACGCAGAT	HEX	58

表 3 11 对 SSR 引物扩增结果及多态性信息
Table 3 Results and the polymorphism information of 11 SSR markers

引物 Primer	基因型数 N_g	观测等位基因数 N_a	有效等位基因数 N_e	观测杂合度 H_o	期望杂合度 H_e	香农信息指数 I	多态信息含量 PIC
wga001	12	7	3.351	0.655	0.702	1.478	0.663
wga004	13	12	4.485	0.655	0.777	1.859	0.750
wga009	9	5	2.499	0.517	0.600	1.171	0.560
wga032	13	8	3.797	0.586	0.737	1.620	0.705
wga070	10	7	3.778	0.786	0.735	1.508	0.693
wga079	10	6	3.440	0.759	0.709	1.477	0.674
wga148	13	8	4.237	0.828	0.764	1.636	0.727
zmz05	8	5	3.058	0.379	0.673	1.298	0.624
zmz22	14	9	4.269	0.621	0.766	1.768	0.741
zmz35	11	8	3.337	0.517	0.700	1.445	0.652
zmz39	8	5	3.831	0.793	0.739	1.441	0.694
均值 Mean	11	7.273	3.644	0.645	0.718	1.518	0.680

2.2 核桃遗传图谱

构建林木品种 DNA 指纹图谱比较常用的方法是引物组合法,即通过利用尽量少的引物组合来鉴别尽量多的品种,以达到简单经济的目的。当引物的 PIC 大于 0.5 时,表明采用的引物多态性较高、可供信息性较强。试验中选用的引物均为高多态性引物($PIC > 0.5$),均可作为指纹图谱的核心引物,但为使指纹图谱不冗余,利用最少引物组合将全部品种分开,试验综合各项指标分析,最终选择等位基因数、基因型数较多, PIC 较大的 wga001、wga032 和 zmz22 共 3 对引物的扩增片段大小构建 29 个核桃品种的指纹图谱(表 4)。表中以引物名称加上扩

增片段大小作为品种的“指纹”,如‘薄壳早’在 wga001 位点的扩增片段大小为 184 和 188 bp。由表 4 可以看出,29 个核桃品种的指纹图谱互不相同,可用于后续品种的辅助鉴定。

2.3 遗传相似性分析

利用 NTSYS-pc2.1 进行遗传相似系数计算,计算结果显示 29 个核桃品种间的相似系数在 0.580~0.914 之间,平均为 0.731。将品种间遗传相似系数分为 0.500~0.599、0.600~0.699、0.700~0.799、0.800~0.899、0.900~0.999 等 5 个区间并进行统计。由图 1 可知,遗传相似系数在 0.900~0.999 区间的有 1 对(‘盐源早’和‘薄壳早’),为 0.914;

表 4 各核桃品种的指纹图谱

Table 4 Fingerprint map of *J. regia* cultivars

品种 Varieties	引物 Primer		
	wga001	wga032	zmz22
薄壳早 Bokezao	184/188	196	152
客龙早 Kelongzao	190	172/196	158/160
珍珠核桃 Zhenzhu	178/188	196	136/152
南核 1 号 Nanhe 1	188/190	172	136/152
南核 2 号 Nanhe 2	190	196	152
通核 0035 Tonghe 0035	188/190	176	160
通核 0046 Tonghe 0046	188	168/176	152
通核 0114 Tonghe 0114	188	196	156/160
通核 0147 Tonghe 0147	188/190	172/178	136/152
巴山乌米籽 1 号 Bashanwumizi 1	190	176	136
青川 1 号 Qingchuan 1	188/192	178/196	136/152
盐源早 Yanyuanzao	184/188	170	152
石坎紫皮 Shikanzipi	178/190	176/196	152/164
梓森早核 Zisenzaoh	178	196	164
七曲山核桃 Qiqushan	180/190	176/196	148/160
蜀苑 3 号 Shuyuan 3	188	172/196	136/152
蜀苑 4 号 Shuyuan 4	178/188	172/196	136/152
威薄 01 Weibo 01	188	176/196	152
川早 1 号 Chuanzao 1	188	180/196	152
川早 2 号 Chuanzao 2	176/188	178/196	152
蜀玲 Shuling	180/188	178	142/152
双早 Shuangzao	178/180	176/186	156/160
早丰 Zaofeng	178/180	186	142/160
川核早 Chuanhezao	188/190	176/196	158/160
川香 Chuanxiang	188/190	196	146/152
林萍-1 Linping-1	188	172/196	158
南福 1 号 Nanfu 1	188/192	176/196	148/160
清香 Qingxiang	188/192	168/176	136/152
蜀江 2 号 Shuijiang 2	188/190	176/196	142/164

遗传相似系数在 0.500~0.599 区间的有 4 对,其中最小的 1 对为 0.580(‘清香’和‘客龙早’);29 个核桃品种间的遗传相似系数分布在 0.700~0.799 区间的最多,在 0.600~0.699 区间的次之,在 0.800~0.899 区间的较少;且在区间 0.600~0.699 和 0.700~0.799 的占到总数的 86.9%,说明 29 个核桃品种间大多数亲缘关系较近,且大多数品种间的相似系数变幅只有 0.2,遗传基础相对较窄。

2.4 聚类分析

29 个核桃品种间遗传相似系数为 0.580~0.914,平均为 0.731。其中来自阿坝州黑水县的品

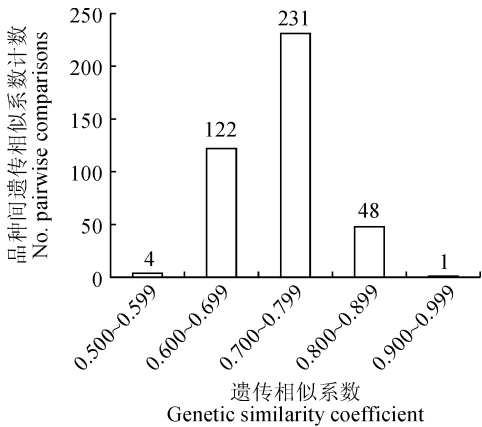


图 1 29 个核桃品种间遗传相似系数区间
Fig. 1 Genetic similarity coefficient range of 29 walnut cultivars

种‘客龙早’和北方引种的‘清香’核桃遗传相似系数最小,为 0.580,亲缘关系最远;来自阿坝州黑水县的‘薄壳早’和来自凉山州盐源县的‘盐源早’遗传相似系数最大,为 0.914,亲缘关系最近。对 29 个核桃品种进行 UPGMA 聚类结果如图 2,对聚类结果进行 Cophenetic 相关性检验发现,相关系数 $r = 0.727$,表明聚类结果较好。以遗传相似系数 0.66 为阈值,29 个核桃品种可分为 2 个类群,其中从云南引种的‘蜀江 2 号’单独聚为 1 个类群(Ⅱ),另外 28 个品种聚为 1 个类群(Ⅰ),表明云南类型品种‘蜀江 2 号’与其他类型的品种间亲缘关系较远。以遗传相似系数 0.73 为阈值,可以将第Ⅰ类群分为 6 个组;a 组包括‘巴山乌米籽 1 号’、‘通核 0147’、‘青川 1 号’、‘南核 1 号’、‘威薄 01’、‘石坎紫皮’、‘梓森早核’、‘蜀苑 4 号’、‘珍珠核桃’、‘通核 0114’、‘南核 1 号’、‘通核 0046’共 12 个四川本地类型品种及‘川早 1 号’、‘川早 2 号’和‘蜀玲’共 3 个杂交类型核桃品种;b 组包括‘客龙早’、‘通核 0035’和‘蜀苑 3 号’共 3 个本地类型品种及‘林萍-1’和‘川香’共 2 个引自北方类型品种;c 组包括 2 个亲缘关系最近的本地类型品种‘薄壳早’和‘盐源早’;d 组引自北方类型品种‘川核早’单独聚为 1 组;e 组包括 2 个引自北方类型品种‘南福 1 号’和‘清香’及 1 个本地类型品种‘七曲山核桃’;f 组包括 2 个杂交类型品种‘双早’和‘早丰’。总体来看,29 个核桃品种根据品种类型优先聚类,即第Ⅰ类群的 a、c 组主要是四川本地类型核桃,b、d、e 组主要是北方引进品种,f 组是 2 个杂交类型品种单独聚类,第Ⅱ类群的云南核桃单独聚类;四川本地类型品种的聚类结果表现出与地理来源没有明显的相关性。

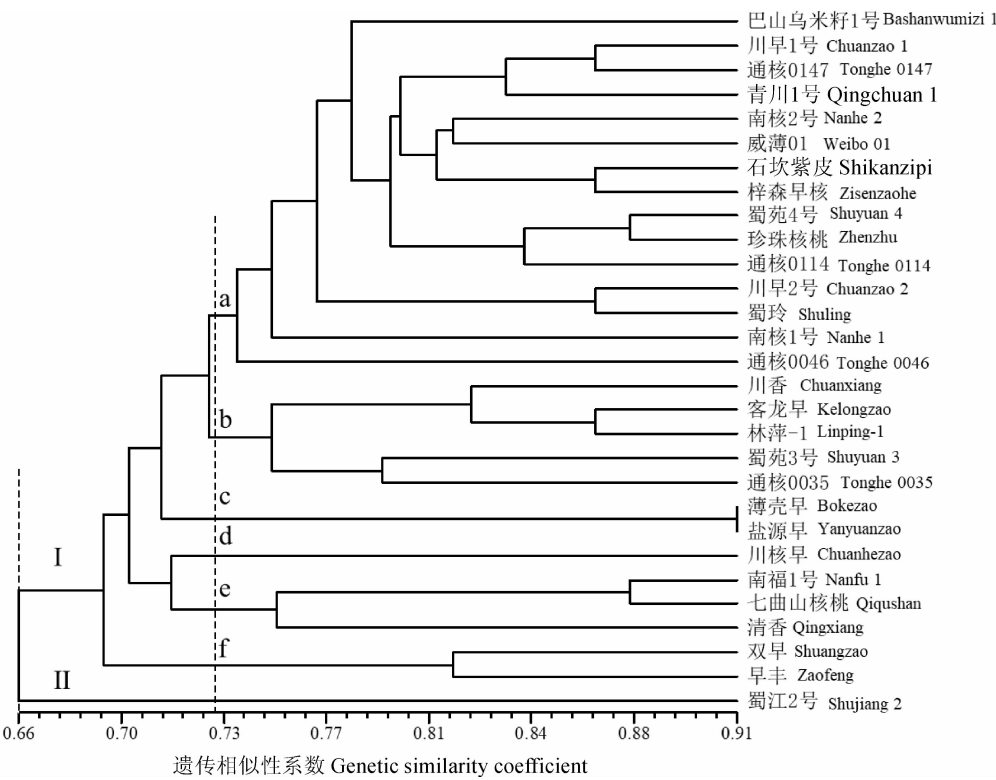


图 2 基于 SSR 标记的 29 个品种的 UPGMA 聚类图

Fig. 2 Clustering figure (UPGMA) of 29 walnut varieties based on SSR markers

3 讨 论

中国核桃产业的发展最严重的问题之一是品种混杂^[19-20]。目前,中国核桃品种的鉴定领域仍然是以表观性状与经济性状为主,其中以 2011 年制定的《植物新品种特异性、一致性和稳定性测试指南——核桃属》标准最具权威性。但在品种多样化的同时,有些亲缘关系较近的核桃品种仅靠表型性状很难准确区分,因此能够反映植物 DNA 水平变异且具有多态性、高效性等特点的 SSR 分子标记已逐渐运用于核桃的品种鉴定研究中^[21]。陈凌娜^[22]利用 12 对 SSR 引物对 35 个北方主栽核桃品种进行了 DNA 分型分析发现,12 对引物的 PIC 含量变幅为 0.53~0.87,平均为 0.73,4 对引物结合就能将供试的 35 个品种分开,充分体现了 SSR 标记用于鉴定的高效性。本研究中,11 对多态性引物对四川 29 个核桃品种扩增结果显示,仅使用其中 3 对 SSR 引物组合(wga001、wga032、zmz22)即可将 29 个核桃品种完全分开,引物的可鉴定性较强。另外,本研究所采用的 11 对引物均为高多态性引物($PIC > 0.5$),可供信息性较强,可运用于以后的四川核桃遗传多样性研究。

基于 11 个 SSR 标记的聚类分析结果显示,29

个核桃品种根据品种类型优先聚类,第 I 类群的 a 组基本上是四川本地的乡土核桃品种,还包括‘川早 1 号’、‘川早 2 号’和‘蜀玲’3 个杂交类型核桃品种。这一结果与高源等^[23]和张瑞萍等^[24]利用 SSR 技术对苹果种质资源亲缘关系分析中栽培品种和当地品种及野生品种聚在一起的情况类似。这可能与 3 个杂交核桃品种的父本是四川本地的核桃品种^[2],携带的四川本地核桃血统较多有关。b 组、d 组主要是从北方引进的核桃品种,而‘客龙早’、‘蜀苑 3 号’、‘通核 0035’和‘七曲山核桃’4 个乡土核桃品种与其聚在一起,亲缘关系较近,可能与四川引进北方品种历史较长,本地核桃与北方核桃进行了广泛的基因交流,而这几个品种可能是从北方核桃与本地核桃种质资源自然杂交后代中选育出来的有关。f 组的 2 个杂交核桃品种聚为 1 组,亲缘关系较近,可能是‘双早’和‘早丰’的父本和母本都一致的缘故,而母本相同的‘川早’系列的 5 个品种没有完全聚在一起,可能是因为‘川早’系列的父本是本地核桃,母本是‘云南云新’系列^[2-5],两者的遗传关系较远,子代间存在一定的遗传分化。本研究还发现,四川本地核桃品种的聚类结果与选育的地理来源没有直接的相关关系:来源相同且亲缘关系较近的品种只有 1 对,即来自绵阳的‘梓森早核’与‘石坎紫皮’;亲缘

关系最近的‘薄壳早’和‘盐源早’地理选育来源较远;还有一部分来自同一选育来源地的几个品种分散在几个组中。这与张明泽等^[25]对黔南茶树种质资源的研究结果类似,可能与四川核桃广泛引种交流导致一部分优良基因在不同地区渗入有关^[25-27]。

遗传相似系数是判断品种间亲缘关系及遗传基础的标准之一。遗传相似系数越大,亲缘关系越近,遗传相似系数的变幅越大,供试材料的遗传基础越宽^[27-28]。本研究中 29 个核桃品种间遗传相似系数为 0.580~0.914,变幅为 0.334,且处于 0.600~0.799 区间内的占到 86.9%。因此,供试的 29 个品

种亲缘关系较近,遗传基础相对较窄。这与陈良华等^[29]对四川核桃遗传多样性研究得出的四川 4 个野生核桃群体的遗传相似性较大的研究结果相似。本研究还发现,母本和父本都相同且遗传距离较远的四川乡土核桃品种和云南核桃杂交的‘川早’系列(‘川早 1 号’、‘蜀玲’、‘早丰’)在聚类时并未聚在一起,而且遗传相似系数相对较小,遗传变异较大,杂种优势较强。因此,建议以后四川核桃品种选育多利用杂交育种方法,并尽量选择遗传距离较远的亲本。

参考文献:

[1] 田荣欢,刘迪秋,陈朝银,等. 核桃分子生物学研究进展[J]. 生物技术通报, 2010, (11): 19-24.
TIAN R H, LIU D Q, CHEN C Y, *et al.* Research on molecular biology of walnuts (*Juglans*)[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2010, (11): 19-24.

[2] 肖千文,周兰英,胡庭兴,等. 早实核桃新品种‘川早 2 号’[J]. 园艺学报, 2012, **39**(11): 2 317-2 318.
XIAO Q W, ZHOU L Y, HU T X, *et al.* A new early-maturing walnut cultivar ‘Chuanzao 2’[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2012, **39**(1): 2 317-2 318.

[3] 周兰英,肖千文,蒲光兰. 早实核桃新品种‘蜀玲’的选育[J]. 安徽农业科学, 2009, **37**(23): 10 964-10 978.
ZHOU L Y, XIAO Q W, PU G L. Breeding of new early-fruited walnut variety ‘Shuling’[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2009, **37**(23): 10 964-10 978.

[4] 蒲光兰,肖千文,周兰英. 早实核桃新品种‘川早 1 号’[J]. 园艺学报, 2011, **38**(10): 2 025-2 026.
PU G L, XIAO Q W, ZHOU L Y. A new early-fruited walnut cultivar ‘Chuanzao 1’[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2011, **38**(10): 2 025-2 026.

[5] 肖千文,肖刚前,周兰英,等. 早熟薄皮核桃新品种‘双早’[J]. 园艺学报, 2013, **40**(1): 179-180.
XIAO Q W, XIAO Q G, ZHOU L Y, *et al.* A new early-maturing and thin shell walnut cultivar ‘Shuangzao’[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2013, **40**(1): 179-180.

[6] 吴佐英,白杰健,邵开茂. 早实核桃新品种‘青川 1 号’[J]. 园艺学报, 2013, **40**(12): 2 531-2 532.
WU Z Y, BAI J J, SHAO K M. A new precocious walnut cultivar ‘Qingchuan 1’[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2013, **40**(12): 2 531-2 532.

[7] 陈 霞,陈少瑜,陆 斌,等. 分子标记及其在核桃种质资源研究中的应用[J]. 现代农业科技, 2009, (14): 347-350.
CHEN X, CHEN S Y, LU B, *et al.* Molecular markers and its applications in germplasm research of walnut[J]. *Modern Agricultural Science and Technology*, 2009, (14): 347-350.

[8] 艾呈祥,秦志华,王 洁,等. 山东牛心柿群体遗传多样性和亲缘关系的 SSR 分析[J]. 果树学报, 2013, **30**(4): 558-562.
AI C X, QIN Z H, WANG J, *et al.* Genetic diversity and relationship analysis of oriental persimmon (*Diospyros kaki*) populations in Shandong by SSR[J]. *Journal of Fruit Science*, 2013, **30**(4): 558-562.

[9] EBRAHIMI A, FATAHI R, ZAMANI Z. Analysis of genetic diversity among some persian walnut genotypes (*Juglans regia* L.) using morphological traits and SSRs markers[J]. *Scientia Horticulturae*, 2011, **130**(1): 146-151.

[10] 肖志娟,翟梅枝,王振元,等. 微卫星 DNA 在分析核桃遗传多样性上的应用[J]. 中南林业科技大学学报, 2014, **34**(2): 55-61.
XIAO Z J, ZHAI M Z, WANG Z Y, *et al.* Application of microsatellite DNA on analyzing genetic diversity of *Juglans regia*[J]. *Journal of Central South University of Forestry & Technology*, 2014, **34**(2): 55-61.

[11] 薛华柏,杨 健,王 龙,等. 29 个梨品种 SSR 特征指纹数据表的构建[J]. 果树学报, 2015, **32**(6): 1 028-1 035.
XUE H B, YANG J, WANG L, *et al.* Construction of SSR characteristic fingerprinting data table for 29 pear cultivars[J]. *Journal of Fruit Science*, 2015, **32**(6): 1 028-1 035.

[12] 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): 3 887-3 898.
GAO Y, LIU F Z, WANG K, *et al.* Establishment of molecular ID for some apple germplasm resources[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2015, **48**(19): 3 887-3 898.

[13] WANG H, WU W, PAN G, *et al.* Analysis of genetic diversity and relationships among 86 persian walnut (*Juglans regia* L.) genotypes in Tibet using morphological traits and SSR markers[J]. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 2015, **90**(5): 563-570.

[14] HAN H, WOESTE K, HU Y H, *et al.* Genetic diversity and population structure of common walnut (*Juglans regia*) in China based on EST-SSRs and the nuclear gene phenylalanine ammonia-lyase (PAL)[J]. *Tree Genetics & Genomes*,

2016, **12**(6): 111-122.

[15] VISCHI M, CHIABA C, RARANCIUC S, *et al.* Genetic diversity of walnut (*Juglans regia* L.) in the eastern Italian alps[J]. *Forests*, 2017, **8**(3): 81-94.

[16] 陈凌娜, 马庆国, 张俊佩, 等. 核桃 BES-SSR 的开发及在遗传多样性分析中的应用[J]. 北京林业大学学报, 2014, **36**(6): 24-29.

CHEN L N, MA Q G, ZHANG J P, *et al.* Development of BES-SSR markers in walnut and its application in genetic diversity analysis[J]. *Journal of Beijing Forestry University*, 2014, **36**(6): 24-29.

[17] 陈少瑜, 宁德鲁, 吴 涛, 等. 泡核桃 SSR 标记开发及在遗传多样性研究中的应用[J]. 西北林学院学报, 2017, **32**(3): 91-96.

CHEN S Y, NING D L, WU T, *et al.* Development of SSR markers in *Juglans sigillata* and its application in genetic diversity analysis[J]. *Journal of Northwest Forestry University*, 2017, **32**(3): 91-96.

[18] 史丽会, 朱 鹏, 魏 童, 等. 核桃品种微卫星标记的筛选与鉴别[J]. 果树学报, 2016, **33**(7): 783-793.

SHI L H, ZHU P, WEI T, *et al.* SSR screening and identification of walnut (*Juglans regia*) cultivars[J]. *Journal of Fruit Science*, 2016, **33**(7): 783-793.

[19] 李留春. 云南省核桃产业实现又好又快发展的理性思考[J]. 林业调查规划, 2010, **35**(3): 64-67.

LI L C. Rational thinking on achieving walnut industry's a good and quick development in Yunnan Province[J]. *Forest Inventory and Planning*, 2010, **35**(3): 64-67.

[20] 韩华柏, 朱益川, 余凌帆, 等. 四川核桃生产现状与产业化发展对策[J]. 经济林研究, 2003, **21**(4): 138-140.

HAN H B, ZHU Y C, YU L F, *et al.* Walnut production status and industrialization proposal for Sichuan Province[J]. *Economic Forest Researches*, 2003, **21**(4): 138-140.

[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] 陈凌娜. 核桃重要种质遗传分析及主栽品种指纹鉴定[D]. 北京: 北京林业大学, 2014.

[23] 高 源, 刘凤之, 曹玉芬, 等. 苹果属种质资源亲缘关系的 SSR 分析[J]. 果树学报, 2007, **24**(2): 129-134.

GAO Y, LIU F Z, CAO Y F, *et al.* Analysis of genetic relationship for *Malus* germplasm resources by SSR markers[J]. *Journal of Fruit Science*, 2007, **24**(2): 129-134.

[24] 张瑞萍, 林高星, 阎振立, 等. 基于 SSR 标记的苹果砧木资源的亲缘关系分析[J]. 分子植物育种, 2017, **15**(7): 2 847-2 855.

ZHANG R P, LIN G X, YAN Z L, *et al.* Genetic relationship analysis of apple rootstock resources based on SSR markers[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2017, **15**(7): 2 847-2 855.

[25] 张明泽, 姚玉仙, 陈世军. 黔南 60 份茶树种质资源遗传多样性的 SSR 分析[J]. 西北植物学报, 2016, **36**(6): 1 117-1 124.

ZHANG M Z, YAO Y X, CHEN S J. Genetic diversity analysis of tea germplasm in Qiannan prefecture by SSR markers[J]. *Acta Boreali-Occidentalia Sinica*, 2016, **36**(6): 1 117-1 124.

[26] 张淑青, 刘冬成, 刘威生, 等. 普通杏品种 SSR 遗传多样性分析[J]. 园艺学报, 2010, **37**(1): 23-30.

ZHANG S Q, LIU D C, LIU W S, *et al.* Analysis of genetic diversities in apricot cultivars (*Prunus armeniaca* L.) with simple sequence repeat (SSR) markers[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2010, **37**(1): 23-30.

[27] 宋常美, 文晓鹏, 杨尔泰. 贵州樱桃种质资源的 ISSR 分析[J]. 园艺学报, 2011, **38**(8): 1 531-1 538.

SONG C M, WEN X P, YANG E T. Cherry germplasm from Guizhou Province analyzed by ISSR markers[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2011, **38**(8): 1 531-1 538.

[28] 张志仙, 何道根, 朱长志, 等. 青花菜种质资源遗传多样性的 SSR 分析[J]. 浙江农业学报, 2017, **29**(2): 228-235.

ZHANG Z X, HE D G, ZHU C Z, *et al.* Genetic diversity analysis of *Brassica oleracea* L. var. *italica* with SSR markers[J]. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 2017, **29**(2): 228-235.

[29] 陈良华, 胡庭兴, 张 帆, 等. 用 AFLP 技术分析四川核桃资源的遗传多样性[J]. 植物生态学报, 2008, **32**(6): 1 362-1 372.

CHEN L H, HU T X, ZHANG F, *et al.* Genetic diversities of four *Juglans* populations revealed by AFLP in Sichuan Province, China[J]. *Journal of Plant Ecology*, 2008, **32**(6): 1 362-1 372.

(编辑:宋亚珍)