

利用 SSR 构建薄壳山核桃主要品种的分子身份证

张成才, 王亚萍, 王开良, 常 君, 任华东, 姚小华
(中国林业科学研究院亚热带林业研究所, 杭州 311400)

摘要: 薄壳山核桃是著名的干果和木本油料树种, 当前存在“同名异物、同物异名”现象影响产业发展。本研究在薄壳山核桃基因组中筛选到 80 个简单重复序列 (SSR), 利用 8 个品种的基因组 DNA, 对 80 对 SSR 引物进行筛选, 初筛到 23 对目标条带清晰、检测结果稳定的引物, 发现它们分布于 13 条染色体上。进一步在 Pawnee、Mahan、Stuart 等 36 个常用品种中开展基因分型, 共检测到 70 个等位位点; 其中 18 对引物具有遗传多态性, 检测到的等位基因数介于 2~8, 多态性信息含量 (PIC) 介于 0.03~0.72。聚类分析发现, 各个样本按照遗传背景聚类, 不同品种之间遗传距离介于 0.026~0.636, 同一品种的不同来源个体之间遗传距离介于 0~0.0127。按 PIC 值从大到小的顺序, 依次增加引物的数量, 直至能够区分每个品种, 发现最少可使用 Ciz91、Ciz85、Ciz81、Ciz140 和 Ciz107 等 5 个标记实现所有品种的有效区分, 进而将这组引物确定为核心引物组。最后, 使用核心引物组分别构建每个品种特异的分子指纹图谱、分子身份证条形码和二维码。本研究结果为薄壳山核桃品种鉴别、种苗纯度检测、品种追溯等提供了理论基础。

关键词: 薄壳山核桃; 品种鉴定; 分子标记; SSR; 指纹图谱; 分子身份证

Construction of Molecular IDs for Major Cultivars in Pecan (*Carya illinoensis*) Using SSR Markers

ZHANG Cheng-cai, WANG Ya-ping, WANG Kai-liang, CHANG Jun, REN Hua-dong, YAO Xiao-hua
(Research Institute of Subtropical Forestry, Chinese Academy of Forestry, Hangzhou 311400)

Abstract: Pecan [*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch] is an important woody oil plant and a famous nut tree species, which has been widely cultivated in China. Adequate identification of different cultivars is showing the top priority in marketing. This study aimed to develop SSR markers which would be used for analyzing the pecan genetic diversity and constructing the molecular fingerprint and IDs. A total of 80 primer pairs were used for analyzing the polymorphisms in eight cultivars. Twenty-three (28.75%) SSR primer pairs from 13 chromosomes could amplify the target fragments. These primers were further used for genotyping in 45 samples of 36 pecan cultivars, such as Pawnee, Mahan, Stuart, Kanza and Shawnee, and produced a total of 70 alleles in all samples. Eighteen primer pairs were detected with polymorphisms in different cultivars, showing the number of alleles (N_A) ranged from 2 to 8, and the polymorphism information content (PIC) values from 0.03 to 0.72. The genetic distance between different cultivars ranged from 0.026 to 0.636, and the genetic distance between samples from different sources of the same cultivar ranged from 0 to 0.0127. A dendrogram generated by the UPGMA method suggested three groups, of which group I contained 32 cultivars and most of them have the genetic backgrounds of Schley, Success, and Major. Group II and Group III contained three and one cultivars, respectively. By use of (at least) five SSR primer pairs, including Ciz91, Ciz85, Ciz81, Ciz140, and Ciz107, all the cultivars were classified. These primers were selected as core SSR markers to construct molecular fingerprints

收稿日期: 2022-06-11 修回日期: 2022-08-05 网络出版日期: 2022-08-31

URL: <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20220611001>

第一作者研究方向为木本油料树种遗传改良, E-mail: zhangchengcai-1@163.com

通信作者: 任华东, 研究方向为木本油料育种与培育, E-mail: renhd@163.com

姚小华, 研究方向为木本油料育种与培育, E-mail: yaohx168@163.com

基金项目: 国家自然科学基金青年项目 (31800575)

Foundation project: National Natural Science Foundation of China (31800575)

and IDs. The molecular IDs were illustrated as bar codes and QR codes. Collectively, this study provided markers applicable for the cultivar identification and traceability in pecan, which has implication in the progress of pecan cultivation and production.

Key words: *Carya illinoensis*; cultivar identification; molecular marker; SSR; DNA fingerprints; molecular ID

薄壳山核桃[*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch]原产于美国和墨西哥,属于胡桃科山核桃属植物^[1],基因组大小约为 690 Mb,染色体数 $2n=32$ ^[2],种仁含油率可达 70% 以上,富含不饱和脂肪酸、多酚、类黄酮、维生素和甾醇等功能成分,其中不饱和脂肪酸占总脂肪酸含量的 90% 左右,是优质干果和高档木本食用油源树种^[1,3-4]。我国引种薄壳山核桃已有一百余年的历史,目前已在 22 个省、市、自治区种植,总面积超过 100 万亩。该树种集果用、油用、材用和绿化等多用途于一身,具有较好的发展前景^[1],近年来种植规模不断提高。

薄壳山核桃育成品种达千余个,但生产中大规模应用的品种仅几十个^[5],在我国经系统区域适应性评价证明适应性和丰产性良好的品种数量更少。当前,我国主栽品种多从国外引种,因引种不规范和品种名称翻译不规范等原因,造成存在“同名异物、同物异名”等现象。该树种雌雄同株异花,雌雄花期不遇,需搭配授粉树才能保证授粉,再加上不同品种区域适应性有差异,若授粉品种与主栽品种不匹配,容易对种植企业造成较大损失。当前主栽品种和骨干亲本遗传基础狭窄,不同品种之间性状相似度很高。植物特异性、一致性和稳定性(DUS)测试是国际植物新品种保护联盟规定开展新品种鉴定的主要方法^[6],但表型特征易受环境和栽培措施的影响而表现不稳定,再加上种苗所表现的表型性状数量有限,近似品种区分难度很大。因此亟需建立一种准确率高、操作简便、判别结果稳定的薄壳山核桃品种鉴定方法。

分子标记能直接检测 DNA 水平的差异,不依赖于表型性状,稳定性强、可重复性好,近年来已广泛应用于植物的分子指纹图谱、分子身份证和品种鉴别研究^[7-10]。在薄壳山核桃中分子标记技术已有所应用,基于 AFLP、SSR 标记开展了遗传差异、遗传多样性研究^[11-12];使用 RAPD 建立了 43 个品种指纹图谱^[13];使用 RAPD、AFLP、SNP 构建了遗传连锁图^[14-15];利用 SNP 标记开展了开花类型相关的全基因组关联分析^[5]。在我国,RAPD^[16]、ISSR^[17]、SSR^[18-20]、SCAR^[21]等技术已应用于薄壳山核桃遗传多样性和品种鉴别的研究。然而当前薄壳山核桃

品种鉴别技术以显性标记为主^[13],可用的共显性标记数量少^[19],或依赖复杂的技术和昂贵设备^[5],使得相关研究滞后。

SSR 又称微卫星,是由 1~6 个核苷酸串联重复的序列,在基因组中广泛分布,具有共显性、重复性好、多态性高、易于检测等优点^[12]。相较于 SNP 标记,SSR 单个标记的多态性信息含量高、无需昂贵的检测设备,是构建 DNA 指纹图谱的首选标记^[8],特别是在近似品种的鉴别方面优势显著^[6],已广泛应用于各种植物品种和种质资源鉴定研究^[22],并在此基础上实现种苗纯度测定和品种追溯。近年来,薄壳山核桃高质量基因组数据已经发布^[2,23],为基于全基因组范围筛选 SSR 位点,大规模开发 SSR 标记奠定了基础^[19]。Zhang 等^[19]基于全基因组筛选的 9145 对高质量 SSR 引物,为薄壳山核桃品种鉴定研究提供了候选位点。

良种是确保经济林优质丰产的基础,随着薄壳山核桃产业的发展,对于良种苗木的需求迅速增加,品种真伪鉴别成为当前亟待解决的问题。本研究基于前期研究基础,开发一套多态性 SSR 标记,以我国应用较多的 36 个薄壳山核桃品种为材料,开展遗传多样性分析,筛选多态性信息含量高、能够准确区分各个品种的分子标记构建核心引物组,建立品种特异的分子指纹图谱和分子身份证,以期薄壳山核桃品种鉴定、种苗纯度检测、品种追溯、知识产权保护等提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本研究以 36 个薄壳山核桃引种品种为试验材料(表 1),其中 Mahan、Oconee、Mohawk、Creek、Greenriver、Lakota 和 Navaho 等 7 个品种在 1999、2007 和 2008 年分 2~3 次从美国引种。对 36 个不同品种(包括不同年份引种的)分别采样,共得到 45 个样本,均取自中国林业科学研究院亚热带林业研究所,位于浙江省建德市(29°28'N, 119°23'E)的薄壳山核桃种质资源保存基地。春季采集幼叶后迅速使用液氮冷冻,并置于 -80 °C 超低温冰箱冷冻保存。

表 1 36 个薄壳山核桃品种信息

Table 1 The information of 36 pecan cultivars

| 序号 No. | 品种 Cultivar | 来源 Origin | 序号 No. | 品种 Cultivar | 来源 Origin |
|-----------|----------------|---------------------|-----------|----------------|--------------------|
| 1 | Carter | 实生选育 | 19 | Pawnee | Mohawk × Starking |
| 2 | Choctaw | Success × Mahan | 20 | Shawnee | Schley × Barton |
| 3 | Colby | 实生选育 | 21 | Stuart | 实生选育 |
| 4 | Creek | Mohawk × Western | 22 | Waco | Cheyenne × Sioux |
| 5 | Desirable | Russell × Success | 23 | Silverback | 实生选育 |
| 6 | Elliott | 实生选育 | 24 | Barton | Moore × Success |
| 7 | Forkert | Success × Schley | 25 | Graking | 实生选育 |
| 8 | Gloria Grande | Stuart 实生后代 | 26 | Hopi | Schley × McCulley |
| 9 | Greenriver | 实生选育 | 27 | Jayhawk | Giles 实生后代 |
| 10 | Kanza | Major × Shoshoni | 28 | Kiowa | Mahan × Desirable |
| 11 | Lakota | Mahan × Major | 29 | Maramec | Mahan 实生后代 |
| 12 | Mahan | Schley 实生后代 | 30 | Nacono | Cheyenne × Sioux |
| 13 | Major | 种间杂交 | 31 | Posey | 实生选育 |
| 14 | Mcmillan | 实生选育 | 32 | Houma | Desirable × Curtis |
| 15 | Mohawk | Success × Mahan | 33 | Yates68 | Major 实生后代 |
| 16 | Navaho | Apalachee × Wichita | 34 | Shepherd | 实生选育 |
| 17 | Oconee | Schley × Barton | 35 | Deerstand | 实生选育 |
| 18 | Osage | Major × Evers | 36 | Chetopa | 实生选育 |

1.2 DNA 提取及 PCR 检测

使用天根植物基因组 DNA 提取试剂盒提取基因组 DNA, 使用 1% 琼脂糖凝胶和 Quawell Q5000 分光光度计 (Quawell Technology, Inc., 美国) 检测 DNA 完整性和浓度, 并稀释到 50 ng/μL 在 -20 °C 保存备用。从课题组前期建立的候选 SSR 引物库中^[19], 筛选重复基元为 2~4 个碱基的 SSR 共 80 对引物。首先以 Mahan、Oconee、Pawnee、Kanza、Stuart、Creek、Kiowa、Shawnee 的基因组 DNA 为材料, 对 80 对引物进行初筛; 筛选出扩增效果较好的引物, 对 36 个品种的 45 个样本进行基因分型 (表 1)。PCR 反应体系: 2 × Taq PCR MasterMix 10 μL (南京诺唯赞生物科技股份有限公司), 上下游引物各 1 μL, DNA 模板 1 μL, ddH₂O 7 μL。PCR 反应程序: 95 °C 预变性 2 min, 29 个循环包括 94 °C 变性 40 s、特异退火温度退火 45 s、72 °C 延伸 1 min, 最后

72 °C 延伸 7 min, 于 4 °C 保存。使用聚丙烯酰胺凝胶电泳和银染的方法进行目的条带的分离和检测。8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶配方: 30% 制胶液 (29:1) 14 mL (北京索莱宝科技有限公司), 5 × TBE 15 mL, H₂O 20 mL, 10% AP (过硫酸铵) 400 μL, TEMD (四甲基二乙胺) 40 μl。电泳缓冲液为 0.5 × TBE, 使用 AL50 DNA Marker (南京钟鼎生物技术有限公司)。使用通用电泳仪电源 JY300HC (北京君意东方电泳设备有限公司), 180 V, 400 mA 电泳 90~180 min。电泳结束后取出胶, 1 g/L AgNO₃ 溶液染色 10~15 min, 使用显色液 (20 g/L NaOH 溶液, 加入 10 mL 甲醛) 显色 5~8 min, 纯净水漂洗 2 次后置于灯箱上拍照。

1.3 数据处理

人工判读电泳条带, 按照条带由大到小依次赋值 A、B、C、D……, 导入 Popgene 软件的基因型矩阵

要求缺失条带以“.”表示,分别统计每个标记在各样本中的基因型。利用 Popgene 软件(<http://cc.oulu.fi/~jaspi/popgen/popgen.htm>)计算每个标记的观测杂合度(H_o , observed heterozygosity)、期望杂合度(H_e , expected heterozygosity)、等位点数(N_A , number of alleles)、等位基因频率(Allele frequency)等,并按照公式 $PIC=1-\sum P_i^2$ 计算多态性信息含量(PIC , polymorphism information content),其中 P_i 为当前引物第 i 个等位基因出现的频率。计算遗传距离(GD , genetic distance)和遗传相似系数(GS , genetic similarity)^[24],使用 UPGMA 的方法开展 36 个品种,共 45 个样本的聚类分析。利用 NTSYS-pc 软件绘制聚类树。将每个标记所在的序列使用在线软件(<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/blast-search>)比对到薄壳山核桃基因组中^[23],使用 TBtools 软件绘制每个标记在染色体上的分布图^[25]。

1.4 核心引物的筛选和分子身份证构建

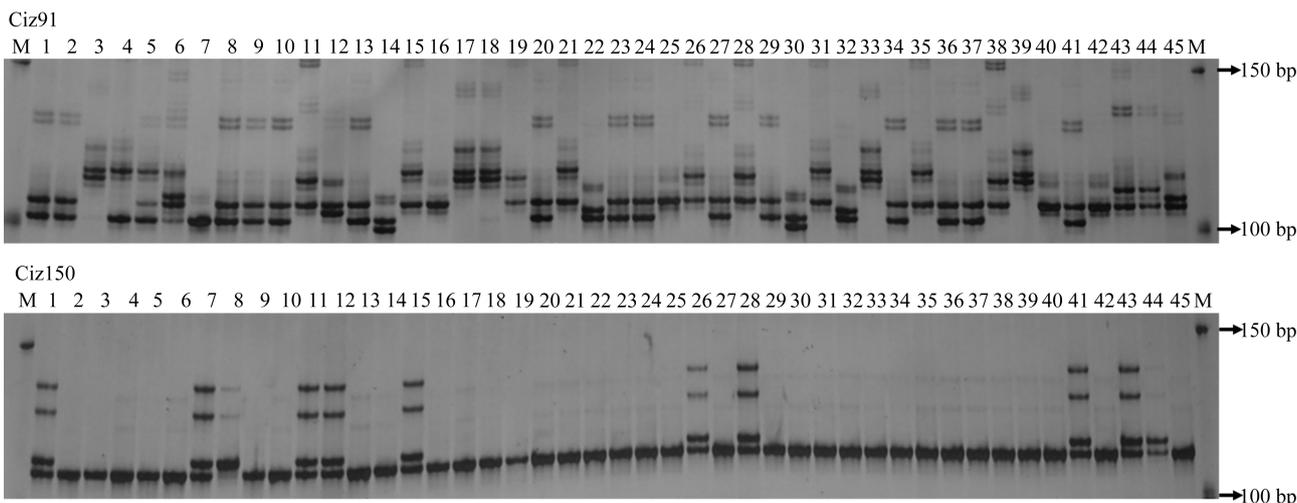
按照 SSR 标记 PIC 值由大到小的顺序,依次增加标记数量进行 36 个品种的聚类分析,筛选能实现所有参试品种有效区分所使用的最少 SSR 引物组

合,以这组引物作为核心引物组,用于后续各个品种分子指纹图谱和分子身份证的构建。根据核心引物在参试品种中的基因型,将 A、B、C、D……依次转换为 1、2、3、4……,缺失位点用“0”替换,构建每个品种特异的分子指纹图谱。将种质资源信息和分子指纹图谱相结合,分别利用条码生成器和二维码生成器(<http://qr-batch.com/>)构建 36 个薄壳山核桃品种分子身份证。

2 结果与分析

2.1 SSR 标记的开发

80 对引物中有 47 对(58.75%)能够在 8 个品种中扩增出目标条带,其中 23 对(28.75%)引物目的条带清晰,杂带少、易于读带(图 1)。进一步使用这 23 对引物(详见 2.3),在 36 个品种的 45 个样本中进行 PCR 扩增(图 1)。将这 23 个标记比对到薄壳山核桃基因组中,发现它们分布于除 Chr7、Chr10 和 Chr13 外的 13 条染色体上,其中 Chr15 和 Chr5 上分别有 3 个和 4 个标记,其余染色体上分布 1~2 个标记(图 2)。



第 1~45 泳道依次为: Kanza, Mohawk, Shawnee, Mahan, Mahan, Osage, Pawnee, Mcmillan, Lakota, Silver back, Carter, Colby, Stuart, Greenriver, Waco, Major, Oconee, Oconee, Navaho, Gloria Grande, Forkert, Choctaw, Creek, Mohawk, Elliott, Barton, Creek, Desirable, Graking, Greenriver, Hopi, Jayhawk, Kiowa, Lakota, Maramec, Mohawk, Nacono, Navaho, Oconee, Posey, Houma, Yates68, Shepherd, Deerstand, Chetopa

From the first to the 45th lanes were Kanza, Mohawk, Shawnee, Mahan, Mahan, Osage, Pawnee, Mcmillan, Lakota, Silver back, Carter, Colby, Stuart, Greenriver, Waco, Major, Oconee, Oconee, Navaho, Gloria Grande, Forkert, Choctaw, Creek, Mohawk, Elliott, Barton, Creek, Desirable, Graking, Greenriver, Hopi, Jayhawk, Kiowa, Lakota, Maramec, Mohawk, Nacono, Navaho, Oconee, Posey, Houma, Yates68, Shepherd, Deerstand, Chetopa; M: DNA Marker

图 1 引物 Ciz91 和 Ciz150 在 45 个参试样本中的电泳谱带

Fig.1 The fingerprint of 45 samples using primers of Ciz91 and Ciz150

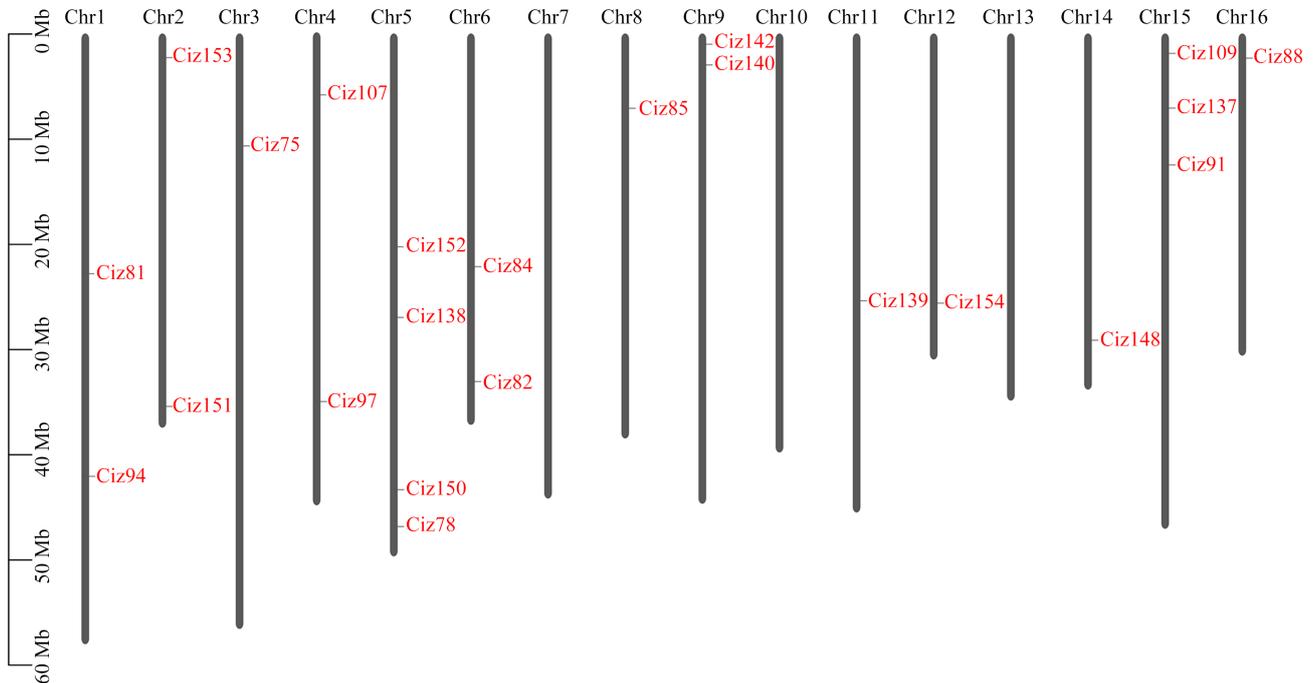


图 2 23 个 SSR 标记在染色体上的分布情况

Fig.2 The distribution of 23 SSR loci on pecan chromosomes

2.2 遗传多样性及聚类分析

统计 23 对引物在 36 个品种中的扩增条带, 使用 Popgene 软件开展数据分析(表 2)。发现有 18 个标记在 36 个品种中具有遗传多态性, 5 个标记在参试品种无多态性。23 个标记检测到的等位基因数(N_A)介于 1~8, 共 70 个等位位点, 平均每个标记检测到 3.04 个位点, 其中 Ciz91 检测到的位点数最多为 8 个, 其次为 Ciz85 和 Ciz152 均检测到 5 个等位基因。18 个多态性标记中, 观测杂合度(H_o)介于 0.03~0.86, 期望杂合度(H_E)0.03~0.73, 多态性信息含量(PI_C)0.03~0.72。同一品种的不同生物学重复之间遗传距离介于 0~0.0127, Oconee(Ciz139)和 Navaho(Ciz75)与各自不同来源样本之间有 1 个位点存在差异, 其余品种与自身不同来源样本之间带型一致。不同品种之间遗传距离介于 0.026~0.636, 其中 Mohawk 与 Graking 的遗传距离较近, 而 Jayhawk 和 Stuart 的遗传距离最远。遗传相似系数在不同品种间介于 0.53~0.97。

聚类分析发现, 在遗传相似系数为 0.721 时, 可将 36 个品种 45 个样本划分为 3 类, 第 I 类包含 32

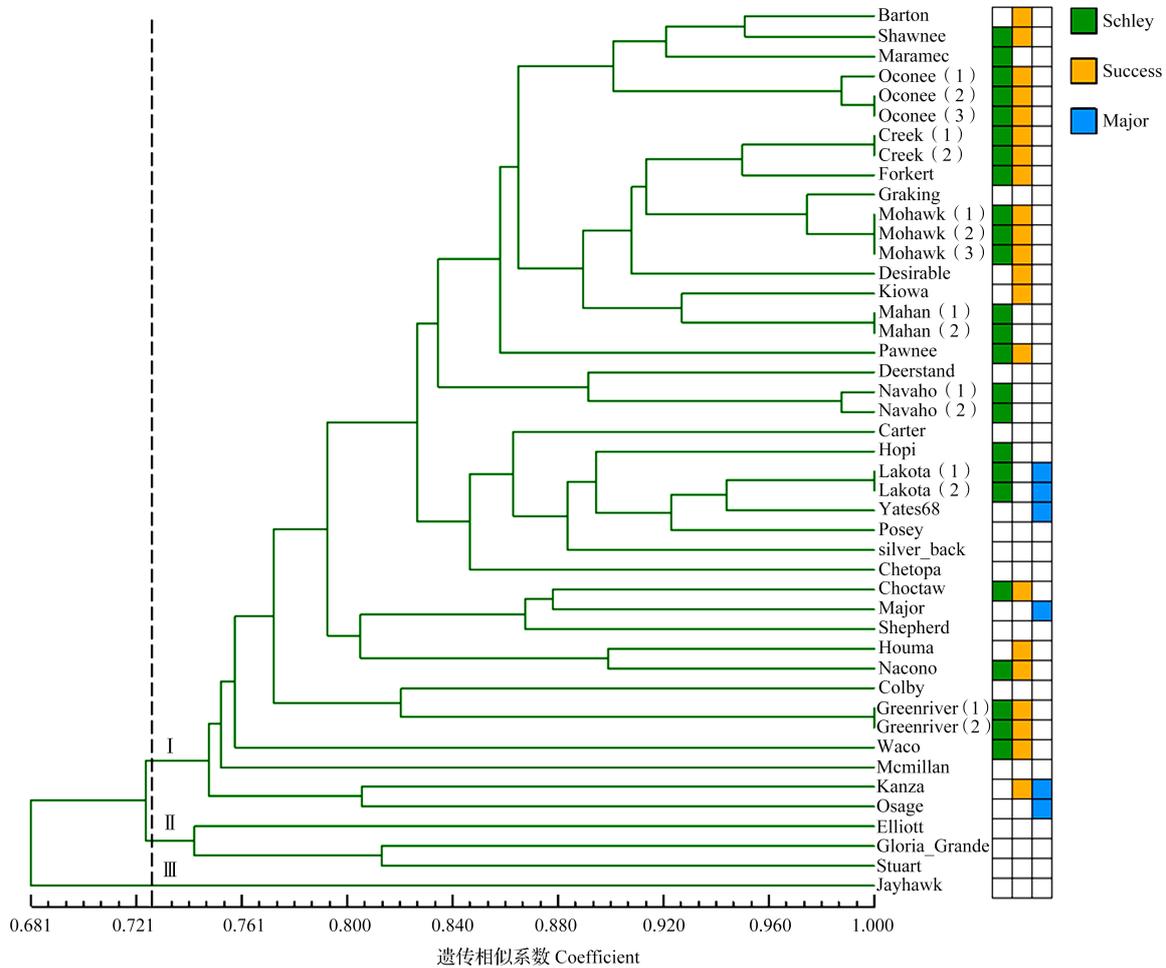
个品种 41 个样本, 第 II 类包含 3 个品种, 第 III 类仅包含 1 个品种。在第 I 类中, 15 个品种具有 Schley 的遗传背景, 15 个品种具有 Success 的遗传背景, 5 个品种具有 Major 的遗传背景, 另外 9 个品种亲本未知(表 1、图 3)。第 II 类中, Elliott 亲本未知, 而 Gloria Grande 是 Stuart 的实生后代。第 III 类仅包含 Jayhawk 1 个品种, 是 Giles 的实生后代。

2.3 核心引物筛选

18 个多态性 SSR 位点中有 6 个位点的 PI_C 值大于 0.5(表 2), 表现出较高的多态性, 其中 Ciz91 的 PI_C 值最高(0.72), 其次为 Ciz85(0.70), Ciz81 和 Ciz140 大于 0.6, Ciz107 和 Ciz142 分别为 0.57 和 0.52。按照每个标记 PI_C 值从大到小的顺序, 依次增加标记数量进行 36 个品种的鉴别, 发现最少可使用 Ciz91、Ciz85、Ciz81、Ciz140 和 Ciz107 等 5 个标记便可实现所有参试品种的有效区分(表 3), 它们分别位于第 15、第 8、第 1、第 9 和第 4 号染色体上(图 2), 属于独立分离。确定这 5 对 SSR 引物作为核心引物组, 用于后续各品种分子指纹图谱和分子身份证的构建。

表 2 23 个 SSR 标记的引物信息
Table 2 The information of 23 SSR loci

| 引物 Primer | 上游引物 Forward primer (5'-3') | 下游引物 Reverse primer (5'-3') | 退火温度 (°C) | 重复 单元 SSR motif | 产物 (bp) | 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 | 多态性 信息含量 PIC |
|--------------|-----------------------------------|-----------------------------------|--------------|-----------------------|------------|--------------------|----------------------|--------------------|--------------------|----------------------|
| Ciz75 | TTGGACTACGTTGAAACACGA | AAAGAAATATTCGGCCAACTTGT | 58 | (CT)6 | 100 | 2 | 1.96 | 0.38 | 0.50 | 0.49 |
| Ciz78 | AGGTCATGTCCACAATCATC | CCTAGAATATGCCAGACAGC | 58 | (TA)9 | 101 | 3 | 1.94 | 0.19 | 0.49 | 0.49 |
| Ciz81 | TGAAAGTGAGATGGTGGTGTG | AAGGACTAGATGGATGCCCA | 58 | (TA)10 | 101 | 4 | 3.01 | 0.47 | 0.68 | 0.67 |
| Ciz82 | CAGTTTCTGTGCCCTTCGAATC | ATGCTCACTTCACCGGAGTT | 58 | (AT)7 | 102 | 2 | 1.31 | 0.11 | 0.24 | 0.24 |
| Ciz84 | CGTTGAACGTCCATTACCAA | CCAAACCACGTTGTGTCTCAC | 58 | (GA)7 | 103 | 2 | 1.06 | 0.06 | 0.05 | 0.05 |
| Ciz85 | CGTCCATTATGAATGAATGAA | TGTAATGACAGACCTATCCACGA | 58 | (AT)7 | 103 | 5 | 3.37 | 0.54 | 0.71 | 0.70 |
| Ciz88 | CGAGGGCAATTAGGACACAT | CATGTTCAACCAACCTCATCG | 58 | (TC)6 | 104 | 1 | 1.00 | 0 | 0 | 0 |
| Ciz91 | GACCACCTTACGTGGGAGAA | GCATCGAGACACATCCTTTG | 58 | (AT)8 | 104 | 8 | 3.59 | 0.86 | 0.73 | 0.72 |
| Ciz94 | TTAGCTGCTTGTAGGCGGT | GCAGCTGCTTTGTTGTTGTT | 58 | (AT)9 | 106 | 4 | 1.56 | 0.33 | 0.36 | 0.36 |
| Ciz97 | TTCTTCGCCGAGTGTCTAT | TCTTGGCAACACAGGTTCTG | 58 | (TC)6 | 180 | 3 | 1.06 | 0.03 | 0.05 | 0.05 |
| Ciz107 | GCTGAGATGCCTAGTGTCTT | AGTCGATTGGCCTCTGATGA | 58 | (AT)9 | 180 | 4 | 2.31 | 0.42 | 0.57 | 0.57 |
| Ciz109 | ATAGCCTCTCAATCCCACC | CATCTGAGCAGATTGCCGTGT | 58 | (AG)6 | 181 | 1 | 1.00 | 0 | 0 | 0 |
| Ciz137 | GTTTCTAGCAGGTGCGGAAG | TGGTCGAAATGGAGTCTCT | 58 | (TATT)5 | 181 | 4 | 1.34 | 0.11 | 0.26 | 0.25 |
| Ciz138 | CCAAACAAATGGACCGTTG | TTCCAAACTAGGCAAAAGCGT | 58 | (ATAA)5 | 115 | 1 | 1.00 | 0 | 0 | 0 |
| Ciz139 | TATGGTGGTGGCCAGTGTGT | TTTCGGCATCCCTCATATGTC | 58 | (TTTA)5 | 120 | 2 | 1.03 | 0.03 | 0.03 | 0.03 |
| Ciz140 | GGCTAGCCTATCATTATTTATGGAA | GATCATCGGGTTTCTGCAIT | 56 | (AAAT)6 | 139 | 4 | 2.53 | 0.58 | 0.61 | 0.60 |
| Ciz142 | CGCATCGATTGGAAGGTTAT | GGACATTTGGTCTTGCATGTG | 56 | (TAAA)6 | 175 | 3 | 2.07 | 0.37 | 0.53 | 0.52 |
| Ciz148 | TGTTTCATCCCTTTCCCTGG | CCTGTATCACGCAATTTGCAG | 58 | (AGCT)5 | 184 | 4 | 1.46 | 0.31 | 0.32 | 0.32 |
| Ciz150 | GGTCTCTCAAGATGCCTTGG | AACTGATCTCTGGTTGCGCT | 58 | (GTC)5 | 100 | 4 | 1.41 | 0.22 | 0.30 | 0.29 |
| Ciz151 | TTATGGAAGCCGAGGATACC | GCCGGATAGCTGGAATGGTTA | 58 | (CAG)5 | 101 | 1 | 1.00 | 0 | 0 | 0 |
| Ciz152 | AAACCGAATTTGCATTCTGC | AGAAACACATTTCCAACCCA | 58 | (AAG)6 | 101 | 5 | 1.68 | 0.33 | 0.41 | 0.41 |
| Ciz153 | CTTAAAGTGAACGGCATCGT | ATGTCTGTTAAACCGGACC | 58 | (AAG)5 | 102 | 2 | 1.38 | 0.28 | 0.28 | 0.28 |
| Ciz154 | AATTATGGGAAGCTGCATGG | ACTTTCCTGCACAAACCCAC | 58 | (GCA)5 | 103 | 1 | 1.00 | 0 | 0 | 0 |
| 均值 Mean | — | — | — | — | — | 3.04 | 1.70 | 0.24 | 0.31 | 0.31 |
| 标准差 SD | — | — | — | — | — | 1.72 | 0.79 | 0.23 | 0.26 | 0.25 |



括号中的数字显示的是 2 年或 3 年引种的样本; 品种名右侧对应不同颜色方块, 代表该品种具有 Schley (绿色)、Success (黄色) 或 Major (蓝色) 的遗传背景

The numbers in brackets indicate the samples introduced by two or three times; The color squares indicate this cultivar has the genetic background of Schley (green), Success (yellow) or Major (blue)

图 3 36 个品种共 45 个样本的 UPGMA 遗传聚类图

Fig.3 Dendrogram of 45 samples from 36 cultivars based on the 23 SSR loci by UPGMA method

表 3 逐个增加 SSR 引物对品种的区别

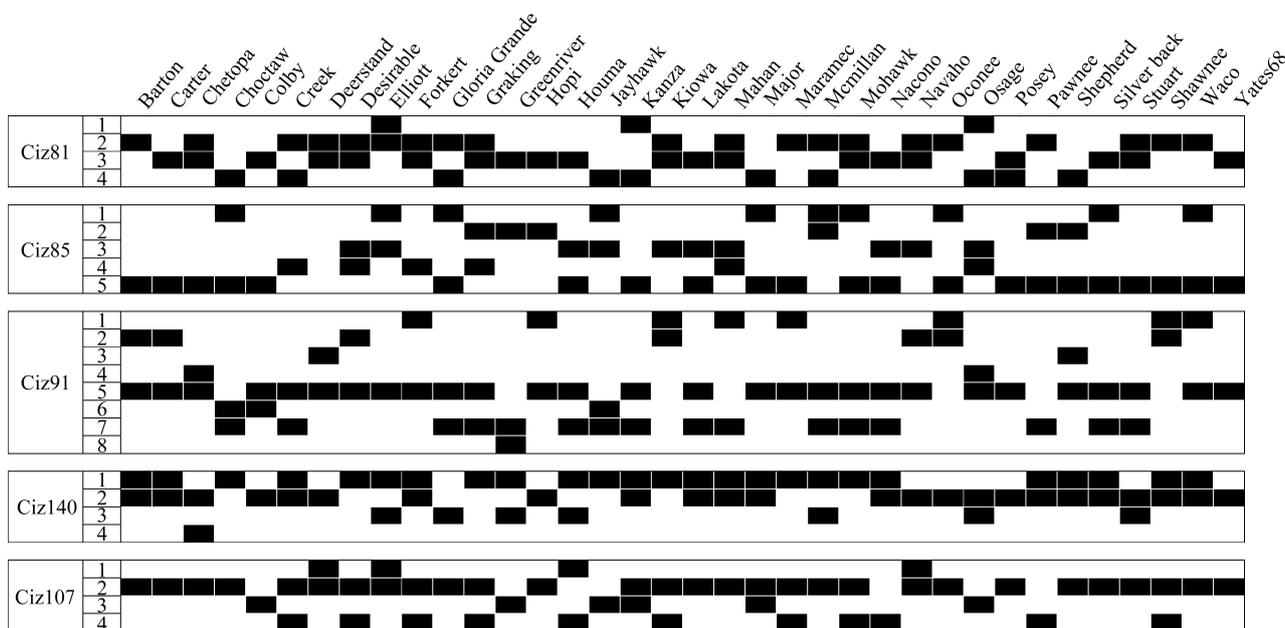
Table 3 The identification of cultivars through gradually increasing SSR primers

| 引物组合 Primers set | 鉴别总数 Total number of cultivars can be identified | 鉴别品种 The cultivars can be identified |
|-------------------------------------|--|---|
| Ciz91 | 4 | Mahan, Colby, Pawnee, Greenriver |
| Ciz91+Ciz85 | 22 | Oconee, Kiowa, Shawnee, Waco, Hopi, Forkert, Maramec, Mahan, Navaho, Desirable, Osage, Chetopa, Elliott, Major, Colby, Mcmillan, Graking, Creek, Jayhawk, Choctaw, Pawnee, Greenriver |
| Ciz91+Ciz85+ Ciz81 | 33 | Oconee, Kiowa, Shawnee, Waco, Hopi, Forkert, Maramec, Mahan, Navaho, Desirable, Barton, Carter, Deerstand, Shepherd, Osage, Chetopa, Elliott, Major, Yates68, Posey, Colby, Mcmillan, Mohawk, Gloria Grande, Silverback, Graking, Creek, Kanza, Stuart, Jayhawk, Choctaw, Pawnee, Greenriver |
| Ciz91+Ciz85 + Ciz81+ Ciz140 | 34 | Oconee, Kiowa, Shawnee, Waco, Hopi, Forkert, Maramec, Mahan, Navaho, Desirable, Barton, Carter, Deerstand, Shepherd, Osage, Chetopa, Elliott, Major, Yates68, Posey, Colby, Mcmillan, Mohawk, Gloria Grande, Silverback, Graking, Houma, Creek, Kanza, Stuart, Jayhawk, Choctaw, Pawnee, Greenriver |
| Ciz91+Ciz85+Ciz81+ Ciz140+Ciz107 | 36 | Oconee, Kiowa, Shawnee, Waco, Hopi, Forkert, Maramec, Mahan, Navaho, Desirable, Barton, Carter, Deerstand, Shepherd, Osage, Chetopa, Elliott, Major, Yates68, Posey, Colby, Mcmillan, Mohawk, Gloria Grande, Silverback, Graking, Lakota, Nacono, Houma, Creek, Kanza, Stuart, Jayhawk, Choctaw, Pawnee, Greenriver |

2.4 分子指纹图谱和分子身份证构建

根据 5 对核心引物在 36 个品种中检测到的带型, 将 A、B、C、D……依次转换为 1、2、3、4……, 构建每个品种特有的分子指纹图谱(图 4)。其中, Ciz91 单个标记即可鉴别 Colby、Greenriver、Mahan 和 Pawnee, Ciz85 可将 Mcmillan 鉴别出来, Ciz81 可鉴别出 Elliott 和 Posey, Ciz140 可鉴别出 Chetopa 和 Gloria Grande, Ciz107 可鉴别出 Houma。进一步将 5 对核心引物在各个品种中的带型转化为 10 位数字作为指纹码, 并

与种质信息编码一同构建品种特有的 15 位分子身份证码。种质信息编码共有 5 位数字, 分为 3 个部分, 第一个数字表示物种信息, 原产于我国的山核桃属植物共有 5 个种, 包括山核桃(*C. cathayensis* Sarg.)、大别山山核桃(*C. dabieshanensis* W. C. Cheng & R. H. Chang)、湖南山核桃(*C. hunanensis* W. C. Liu)、贵州山核桃(*C. kweichowensis* Kuang & A. M. Liu)和云南山核桃(*C. tonkinensis* Lecomte), 薄壳山核桃为引进种, 因此薄壳山核桃首位物种信息编码为 6; 第 2-4 位



数字 1~8 表示对应 SSR 标记所检测到的条带, 扩增产物长度依次递减; 黑色方块表示在对应位置检测到目标条带
 1-8 represent the bands detected by the corresponding SSR locus, The length of the PCR product decreases in order;
 Black squares indicate that the target band was detected at the corresponding position

图 4 36 个品种分子指纹图谱

Fig.4 The fingerprint of 36 cultivars constructed by five core primer pairs

数字为品种原产地信息, 如 156 为中国(国内不同省份可用省份代码替换)、840 为美国; 第 5 位是种质资源类别, 参考《薄壳山核桃遗传资源调查编目技术规程》(LY/T 2804-2017), 1 代表实生资源(群体)、2 代表实生资源(家系)、3 代表实生资源(个体)、4 代表引进品种、5 代表选育品种。以 Pawnee 为例(图 5), 其分子身份证号码为 684042225771244, 表示物种为薄壳山核桃, 是来源于美国的引进品种, 5 个核心标记(Ciz81、Ciz85、Ciz91、Ciz140 和 Ciz107)的电泳带型依次为 22、25、77、12 和 44。最终利用每个品种的 15 位分子身份证编号, 分别制作了品种特有的条形码和二维码(图 6)。



图 5 薄壳山核桃品种 Pawnee 的分子身份证
 Fig.5 Molecular ID of Pawnee of *C. illinoensis* Cultivars

| | | | |
|--|--|---|---|
| Oconee  684042215122222 684042215122222 | Kiowa  684042333121124 684042333121124 | Shawnee  684042255121224 684042255121224 | Waco  684042215151222 684042215151222 |
| Maramec  684042255151124 684042255151124 | Mahan  684042334171222 684042334171222 | Navaho  684042333252212 684042333252212 | Desirable  684042334251124 684042334251124 |
| Deerstand  684042300352212 684042300352212 | Shepherd  684044425351222 684044425351222 | Osage  684041434452333 684041434452333 | Chetopa  684042355452422 684042355452422 |
| Yates68  68404335552222 68404335552222 | Posey  68404345552222 68404345552222 | Colby  684043355562233 684043355562233 | Mcmillan  684042412571322 684042412571322 |
| Gloria Grande  684042415573322 684042415573322 | Silver back  684043315571222 684043315571222 | Houma  684043335571314 684043335571314 | Lakota  684043335571222 684043335571222 |
| Kanza  684041455571223 684041455571223 | Stuart  684042355572322 684042355572322 | Jayhawk  684044413671133 684044413671133 | Choctaw  684044415671122 684044415671122 |
| Hopi  684043322152222 684043322152222 | Forkert  684042344151224 684042344151224 | Barton  684042255251224 684042255251224 | Carter  684043355251222 684043355251222 |
| Elliott  684041213551312 684041213551312 | Major  684044415551223 684044415551223 | Mohawk  684042315571124 684042315571124 | Graking  684042324571124 684042324571124 |
| Nacono  684043335571244 684043335571244 | Creek  684042444571224 684042444571224 | Pawnee  684042225771244 684042225771244 | Greenriver  684043322781333 684043322781333 |

图 6 36 个薄壳山核桃品种的分子身份证

Fig.6 Molecular IDs of 36 pecan cultivars

3 讨论

薄壳山核桃是世界范围著名的木本油料和干果树种,树形优美、材性优良,我国引种已有 100 余年的历史,在我国不同区域表现出良好的适应性和丰产性^[1]。薄壳山核桃引种单位较多,以穗条和种子等多种形式引种,存在引种不规范的问题,导致“同名异物、同物异名”现象^[20];在种苗繁育和流通过程中,因重视不足或过分追求效益,部分种苗品种的真实性存疑。品种是农业生产的核心要素,品种不真实或与预期不符,往往会造成种植户、生产企业和科研单位较大的损失。因此,亟待建立一套比较完善的薄壳山核桃品种高效鉴别技术体系。目前,薄壳山核桃品种鉴别主要根据花、果、叶片等器官的形态特征进行鉴别,但这些形态指标易受环境的影响,稳定性较差。当前主栽品种遗传基础狭窄,品种之间表型差别较小。而苗期可供评估的形态指标更少,依赖表型性状的种苗品种真实性鉴别难度很大。分子标记可检测 DNA 序列的差异,稳定性强、可重复性好,已广泛应用于农林作物的品种和种质鉴别研究^[9,22,26],在鉴别表型近似种质方面优势明显^[6]。SSR 标记和 SNP 是当前品种鉴别研究应用最广泛的两种分子标记,它们广泛分布于基因组中,属于共显性标记,具有重复性好、易于检测等优点^[5,19]。相较于 SNP 标记,单个 SSR 标记多态性信息含量高,成为构建 DNA 指纹图谱的首选标记^[8,19]。然而,薄壳山核桃可用的 SSR 分子标记数量少,基于 SSR 的遗传多样性和品种鉴别研究刚刚起步^[12,19]。前期,Zhang 等^[19]在薄壳山核桃全基因组范围筛选到 9000 余对高质量 SSR 引物,为该物种的遗传育种研究提供了大量候选的分子标记。本研究自主开发了 23 个新 SSR 标记,研究了 36 个引进品种的遗传多样性,其中有 6 个位点的多态性信息含量大于 0.5,属于高多态性位点。

基于 UPGMA 的聚类分析发现,不同品种与其生物学重复均聚在一起,表明这套标记的稳定性和重复性较好。其中两个 Navaho 样本在 Ciz75 位点存在 1 个等位基因的差异,Oconee 的 1 个样本在 Ciz139 标记中与其它两个样本存在差异。相同品种条带存在差异的现象在辣椒、茶树等作物里也有报道^[9,27]。其原因可能是,在利用穗条长期、大规模嫁接繁育过程中,个别个体发生了变异。因此,在品种鉴别过程中,可根据差异引物数量制定详细的鉴别标准,将差异标记数量小于某一阈值的品种判定

为近似品种,进一步增加标记数量,引入遗传距离或遗传相似系数等参数加以区分^[9,28]。不同品种按照亲缘关系聚类。第 I 类中包括 32 个品种,除 9 个亲本未知之外,其它品种均有 Schley、Success 和 Major 其中一到两个品种的血缘(表 1、图 3)。例如,Mahan 是从 Schley 的实生后代中选育而成,又以 Success (母本)和 Mahan (父本)杂交选育了 Mohawk,进一步以 Mohawk 为亲本育成了 Pawnee 和 Creek^[5]。因此,Schley、Success 和 Major 作为骨干亲本为大量品种的选育提供了优良的基因资源,但同时也说明现有品种遗传背景比较狭窄,遗传多样性比较低。本研究用 23 个 SSR 标记,较好的反映了 36 个品种的遗传关系,进一步表明这批 SSR 标记在薄壳山核桃遗传多样性研究中具有较大的应用潜力。

分子身份证是将目标品种的分子指纹图谱进行抽象化,形成品种特异的数字编号,对于品种、种质的鉴别,进一步指导应用均具有重要意义,在桃^[26]、梨^[29]、苹果^[30]、茶树^[31]、核桃^[22]等经济树种物中广泛应用。在薄壳山核桃中的相关研究才刚刚起步,施娟娟等^[32]利用 14 个 SSR 标记研究了 37 个品种的遗传多样性,遗传相似系数介于 0.607~0.955;Zhang 等^[19]利用 30 个 SSR 实现了薄壳山核桃与我国原始分布的 3 个山核桃物种的区分,揭示了 60 个品种、无性系和优株的遗传关系;彭华正等^[21]利用 SCAR 标记实现了 23 个品种的区分;何旭东等^[20]利用 SSR 实现了 25 个品种的区分,遗传相似系数介于 0.62~0.99,并筛选出一组包含 4 个标记的核心引物。然而,当前薄壳山核桃中可用的 SSR 标记数量少^[19],其中部分标记来源于核桃(*Juglans regia*)、山核桃(*C. cathayensis*)等近缘物种^[20],缺乏详细的目标序列信息及染色体分布信息,在大量品种或种质资源准确鉴定方面的效力不足,亟待开发一批数量较多、在染色体上均匀分布的多态性 SSR 标记。本研究对薄壳山核桃基因组中的 80 个 SSR 位点进行了验证,成功开发了 23 个新 SSR 标记,利用同一品种不同来源的样本,验证了这批标记的重复性和稳定性,36 个品种的遗传相似系数为 0.53~0.97 与前人研究相差不大^[20,32];筛选到包含 5 个标记的核心引物组,可实现所有参试品种的有效鉴别。5 个标记检测到的等位基因数依次为:8、5、4、4、4,按引物组合理论上能够区分最大材料数达 2560 个^[33]。在构建的分子身份证中特别加入了种质信息码,包含物种、原产地和种质类型信息,为后续不同山核桃属植物,育成品种、引进品种、家

系、优株等各类种质资源的分子身份证构建提供了参考。

然而,本研究开发的分子标记仅分布于 13 条染色体上,而且分布不均匀,参试品种虽涵盖了当前的主栽品种,但国产品种和育种材料未包含在内,未来将着重开发在基因组中均匀分布的高多态性 SSR 标记;进一步扩大薄壳山核桃品种、种质检测和验证范围,最终形成一套在染色体上分布均匀、多态性信息含量高、重现性好的核心引物组,并且建立基于荧光标记和毛细管电泳的自动化、高通量检测技术,从而为薄壳山核桃品种鉴定、种苗纯度鉴定等提供有效工具。

4 结论

本研究开发了 23 个薄壳山核桃 SSR 标记,分析了 36 个品种的遗传多样性和遗传关系,根据标记的多态性信息含量和品种鉴别能力,确定了 Ciz81、Ciz85、Ciz91、Ciz140 和 Ciz107 等 5 对引物作为核心引物组,能够实现 36 个品种的有效区分,并据此构建了参试 36 个品种的分子指纹图谱和分子身份证,为薄壳山核桃品种鉴定、溯源、种苗真实性和纯度检测等提供了理论基础。

参考文献

- [1] 姚小华,常君,王开良. 中国薄壳山核桃,北京: 科学出版社, 2014
Yao X H, Chang J, Wang K L. The research proceeding of pecan in China. Beijing: Science Press, 2014
- [2] Huang Y, Xiao L, Zhang Z, Zhang R, Wang Z, Huang C, Huang R, Luan Y, Fan T, Wang J, Shen C, Zhang S, Wang X, Randall J, Zheng B, Wu J, Zhang Q, Xia G, Xu C, Chen M, Zhang L, Jiang W, Gao L, Chen Z, Leslie C A, Grauke L J, Huang J. The genomes of pecan and Chinese hickory provide insights into *Carya* evolution and nut nutrition. *GigaScience*, 2019, 8: giz036
- [3] 常君,李川,姚小华,李源,王开良,毛文韬. 薄壳山核桃无性系含油率及脂肪酸组成分析. 西南师范大学学报: 自然科学版, 2017, 42(8): 51-57
Chang J, Li C, Yao X H, Li Y, Wang K L, Mao W T. Analysis on oil percentage and fatty acid composition of clone *Carya illinoensis*. *Journal of Southwest China Normal University: Natural Science Edition*, 2017, 42(8): 51-57
- [4] Zhang C C, Yao X H, Ren H D, Change J, Wang K L. RNA-Seq reveals flavonoid biosynthesis-related genes in pecan (*Carya illinoensis*) kernels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2018, 67(1): 148-158
- [5] Bentley N, Grauke L J, Klein P. Genotyping by sequencing (GBS) and SNP marker analysis of diverse accessions of pecan (*Carya illinoensis*). *Tree Genetics and Genomes*, 2019, 15(1): 1-17
- [6] 徐云碧,王冰冰,张健,张嘉楠,李建生. 应用分子标记技术改进作物品种保护和监管. 作物学报, 2022, 48(8): 1853-1870
Xu Y B, Wang B B, Zhang J, Zhang J N, Li J S. Enhancement of plant variety protection and regulation using molecular marker technology. *Acta Agronomica Sinica*, 2022, 48(8): 1853-1870
- [7] 白晓倩,陈于,张仕杰,赵玉强,王武,朱灿灿. 基于表型性状和 SSR 标记的板栗品种遗传多样性分析及分子身份证构建. 植物遗传资源学报, 2022, 23(4): 972-984
Bai X Q, Chen Y, Zhang S J, Zhao Y Q, Wang W, Zhu C C. Genetic diversity analysis and fingerprinting of chestnut varieties based on phenotypic traits and SSR markers. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2022, 23(4): 972-984
- [8] 李益,马先锋,唐浩,李娜,江东,龙桂友,李大志,牛英,韩瑞玺,邓子牛. 柑橘品种鉴定的 SSR 标记开发和指纹图谱库构建. 中国农业科学, 2018, 51(15): 149-159
Li Y, Ma X F, Tang H, Li N, Jiang D, Long G Y, Li D Z, Niu Y, Han R X, Deng Z N. SSR markers screening for identification of citrus cultivar and construction of DNA fingerprinting library. *Scientia Agricultura Sinica*, 2018, 51(15): 149-159
- [9] 张成才,刘园,姜燕华,吴立赞,王丽鸳,韦康,成浩. SSR 标记鉴定浙江省主要无性系茶树品种的研究. 植物遗传资源学报, 2014, 15(5): 926-931
Zhang C C, Liu Y, Jiang Y H, Wu L Y, Wang L Y, Wei K, Cheng H. Application of SSR markers in cultivar identification of clonal tea plant in Zhejiang province, China. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2014, 15(5): 926-931
- [10] 刘伟,李森,李桂祥,董晓民,高晓兰,张安宁. 应用 SSR 荧光标记法构建山东地方桃种质资源分子身份证. 山东农业科学, 2022, 54(2): 6-13
Liu W, Li M, Li G X, Dong X M, Gao X L, Zhang A N. Using fluorescent labeled SSR markers to establish molecular ID of peach germplasm resources from Shandong province. *Shandong Agricultural Sciences*, 2022, 54(2): 6-13
- [11] Vendrame W A, Kochert G, Wetzstein H Y. AFLP analysis of variation in pecan somatic embryos. *Plant Cell Reports*, 1999, 18(10): 853-857
- [12] Grauke L J, Iqbal M J, Reddy A S, Thompson T E. Developing microsatellite DNA markers in pecan. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 2003, 128(3): 374-380
- [13] Conner P J, Wood B W. Identification of pecan cultivars and their genetic relatedness as determined by randomly amplified polymorphic DNA analysis. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 2001, 126(4): 474-480
- [14] Beedanagari S R, Dove S K, Wood B W, Conner P J. A first linkage map of pecan cultivars based on RAPD and AFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 2005, 110(6): 1127-1137
- [15] Bentley N, Grauke L, Ruhlman E, Klein R R, Kubenka K, Wang X, Klein P. Linkage mapping and QTL analysis of pecan (*Carya illinoensis*) full-siblings using genotyping-by-sequencing. *Tree Genetics & Genomes*, 2020, 16(6): 1-20
- [16] 张日清,何方,吕芳德,栗彬. 美国山核桃群体遗传多样性的 RAPD 分析. 经济林研究, 2001, 19(2): 1-6
Zhang R Q, He F, Lv F D, Li B. Population genetic analysis by randomly amplified polymorphic DNA markers in pecan. *Non-wood Forest Research*, 2001, 19(2): 1-6

- [17] Jia X D, Wang T, Zhai M, Li Y R, Guo Z R. Genetic diversity and identification of Chinese-grown pecan using ISSR and SSR markers. *Molecules*, 2011, 16(12): 10078-10092
- [18] Li J, Zeng Y R, Shen D F, Xia G H, Huang Y Z, Huang Y J, Chang J, Huang J Q, Wang Z J. Development of SSR markers in hickory (*Carya cathayensis* Sarg.) and their transferability to other species of *Carya*. *Current Genomics*, 2014, 15(5): 357-379
- [19] Zhang C C, Yao X H, Ren H D, Chang J, Wu J, Shao W Z, Fang Q. Characterization and development of genomic SSRs in pecan (*Carya illinoensis*). *Forests*, 2020, 11(1): 61
- [20] 何旭东, 郑纪伟, 田雪瑶, 教忠意, 窦全琴. 薄壳山核桃品种亲缘关系分析与指纹图谱构建. *林业科学研究*, 2021, 34(4): 95-102
He X D, Zheng J W, Tian X Y, Jiao Z Y, Dou Q Q. Genetic relationship analysis and fingerprint construction of *Carya illinoensis* varieties. *Forest Research*, 2021, 34(4): 95-102
- [21] 彭华正, 金群英, 汪琳悦, 叶华琳, 朱汤军. 薄壳山核桃 SCAR 标记开发及其在品种间的多态性. *经济林研究*, 2021, 39(1): 1-8, 59
Peng H Z, Jin Q Y, Wang L Y, Ye H L, Zhu T J. Development of SCAR marker and its polymorphism in *Carya illinoensis*. *Non-wood Forest Research*, 2021, 39(1): 1-8, 59
- [22] Chen L N, Ma Q, Chen Y K, Wang B Q, Pei D. Identification of major walnut cultivars grown in China based on nut phenotypes and SSR markers. *Scientia Horticulturae*, 2014, 168: 240-248
- [23] Lovell J T, Bentley N B, Bhattarai G, Jenkins J W, Sreedasyam A, Alarcon Y, Bock C, Boston L B, Carlson J, Cervantes K, Clermont K, Duke S, Krom N, Kubenka K, Mamidi S, Mattison C P, Monteros M J, Pisani C, Plott C, Rajasekar S, Rhein H S, Rohla C, Song M, Hilaire R S, Shu S, Wells L, Webber J, Heerema R J, Klein P E, Conner P, Wang X, Grauke L J, Grimwood J, Schmutz J, Randall J J. Four chromosome scale genomes and a pan-genome annotation to accelerate pecan tree breeding. *Nature Communication*, 2021, 12: 4125
- [24] Nei M, Li W H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1979, 76(10): 5269-5273
- [25] Chen C, Chen H, Zhang Y, Thomas H R, Frank M H, He Y, Xia R. TBtools: An integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data. *Molecular Plant*, 2020, 13: 1194-1202
- [26] 陈昌文, 曹珂, 王力荣, 朱更瑞, 方伟超. 中国桃主要品种资源及其野生近缘种的分子身份证构建. *中国农业科学*, 2011, 44(10): 2081-2093
Chen C W, Cao K, Wang L R, Zhu G R, Fang W C. Molecular ID establishment of main China peach varieties and peach related species. *Scientia Agricultura Sinica*, 2011, 44(10): 2081-2093
- [27] 管俊娇, 余志慧, 杨晓洪, 王江民, 张鹏, 黄清梅, 张建华. SSR 标记在辣椒 DUS 测试中的应用研究. *植物遗传资源学报*, 2019, 20(2): 396-405
Guan J J, Yu Z H, Yang X H, Wang J M, Zhang P, Huang Q M, Zhang J H. Study on the application of SSR markers in pepper (*Capsicum annuum* L.) DUS testing. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2019, 20(2): 396-405
- [28] 陆光远, 伍晓明, 张冬晓, 刘凤兰, 陈碧云, 高桂珍, 许鲲. SSR 标记分析国家油菜区试品种的特异性和一致性. *中国农业科学*, 2008, 41(1): 32-42
Lu G Y, Wu X M, Zhang D X, Liu F L, Chen B Y, Gao G Z, Xu K. SSR-based evaluation of distinctness and uniformity of rapeseed (*Brassica napus* L.) varieties under Chinese national official field tests. *Scientia Agricultura Sinica*, 2008, 41(1): 32-42
- [29] 冉昆, 隋静, 王宏伟, 魏树伟, 张勇, 董冉, 董肖昌, 王少敏. 利用 SSR 荧光标记构建山东地方梨种质资源分子身份证. *果树学报*, 2018, 35(S1): 71-78
Ran K, Sui J, Wang H W, Wei S W, Zhang Y, Dong R, Dong X C, Wang S M. Using the fluorescent labeled SSR markers to establish the molecular ID of pear germplasm resources in Shandong. *Journal of Fruit Science*, 2018, 35(S1): 71-78
- [30] 高源, 刘凤之, 王昆, 王大江, 龚欣, 刘立军. 苹果部分种质资源分子身份证的构建. *中国农业科学*, 2015, 48(19): 3887-3898
Gao Y, Liu F Z, Wang K, Wang D J, Gong X, Liu L J. Establishment of molecular ID for some apple germplasm resources. *Scientia Agricultura Sinica*, 2015, 48(19): 3887-3898
- [31] 樊晓静, 于文涛, 蔡春平, 林焜, 王泽涵, 房婉萍, 张见明, 叶乃兴. 利用 SNP 标记构建茶树品种资源分子身份证. *中国农业科学*, 2021, 54(8): 1751-1760
Fan X J, Yu W T, Cai C P, Lin Y, Wang Z H, Fang W P, Zhang J M, Ye N X. Construction of molecular ID for tea cultivars by using of single-nucleotide polymorphism (SNP) markers. *Scientia Agricultura Sinica*, 2021, 54(8): 1751-1760
- [32] 施娟娟, 叶生月, 俞世群, 王正加. 37 个新引进的薄壳山核桃品种遗传多样性 SSR 分析. *安徽农业大学学报*, 2013, 40(1): 42-46
Shi J J, Ye S Y, Yu S Q, Wang Z J. SSR analysis of genetic diversity of the 37 new pecan cultivars. *Journal of Anhui Agricultural University*, 2013, 40(1): 42-46
- [33] 陈亮, 郑宇宏, 范旭红, 孟凡凡, 孙星邈, 张云峰, 王明亮, 王曙明. 吉林省新育成大豆品种 SSR 指纹图谱身份证的构建. *大豆科学*, 2016, 35(6): 896-901
Chen L, Zheng H Y, Fan X H, Meng F F, Sun X M, Zhang Y F, Wang M L, Wang S M. Establishment of SSR fingerprint ID for new soybean varieties in Jilin. *Soybean Science*, 2016, 35(6): 896-901