

# 泡核桃 SSR 标记开发及在遗传多样性研究中的应用

陈少瑜<sup>1,2</sup>, 宁德鲁<sup>1,2\*</sup>, 吴涛<sup>1,2</sup>, 肖良俊<sup>1,2</sup>, 林红丁<sup>3</sup>, 朱云凤<sup>1,2</sup>,  
贺娜<sup>1,2</sup>, 潘莉<sup>1,2</sup>

(1. 云南省林业科学院, 云南 昆明 650201; 2. 云南省木本油料工程技术研究中心, 云南 昆明 650201; 3. 西南林业大学, 云南 昆明 650224)

**摘要:**在泡核桃转录组数据分析的基础上开发 SSR 标记, 从中筛选多态性高、稳定性好的标记, 对泡核桃、北方核桃及两者的杂交品种(核桃、美国引进核桃以及泡核桃和核桃的杂交品种)共 15 个品种(系)进行遗传多样性分析。结果表明, 开发的 11 对引物对 15 个样本扩增结果多态性较高, 稳定性较好, 多态性信息量 PIC 平均为 0.302 3; 基于遗传相似性系数聚类显示 15 个样本在相似性系数为 0.33 处聚为 3 组。可为进一步遗传图谱构建、基因定位及分子辅助育种等研究提供科学依据。

**关键词:**泡核桃; 北方核桃; 杂交品种; SSR 标记; 遗传多样性

**中图分类号:**S718.43      **文献标志码:**A      **文章编号:**1001-7461(2017)03-0091-06

## Development of SSR Markers in *Juglans sigillata* and Its Application in Genetic Diversity Analysis

CHEN Shao-yu<sup>1,2</sup>, NING De-lu<sup>1,2\*</sup>, WU Tao<sup>1,2</sup>, XIAO Liang-jun<sup>1,2</sup>, LIN Hong-ding<sup>3</sup>,  
ZHU Yun-feng<sup>1,2</sup>, HE Na<sup>1,2</sup>, PAN Li<sup>1,2</sup>

(1. Yunnan Academy of Forestry, Kunming, Yunnan 650201, China; 2. Woody Oil Engineering Research Center of Yunnan Province, Kunming, Yunnan 650201, China; 3. Southwest Forestry University, Kunming, Yunnan 650224, China)

**Abstract:** Based on the transcriptomic data of *Juglans sigillata*, SSR markers were developed, from which the polymorphic and stable markers were screened out. The genetic diversity of 15 varieties were analyzed, including varieties in *J. sigillata*, *J. regia* and their hybrid varieties. The results showed that 11 pairs of developed SSR primers used for formal PCR amplification of 15 varieties had relatively high polymorphism (with average PIC 0.302 3) and better stability. Cluster analysis showed that 15 samples were divided into 3 groups when the genetic similarity coefficient was 0.33. The study would lay a foundation for the further study of genetic map construction, gene location and molecular assistant breeding selection.

**Key words:** *Juglans sigillata*; *Juglans regia*; hybrid variety; SSR marker; genetic diversity

泡核桃(*Juglans sigillata*)又称云南核桃、漾濞核桃,为胡桃科(Juglandaceae)胡桃属(*Juglans* L.)树种,我国西南特有种,广泛分布于西南地区(云南、贵州及四川西部、西藏南部最为集中)<sup>[1]</sup>。泡核桃栽培历史悠久,种质资源非常丰富,其中不乏大量的优质、特异资源,具有很高的营养与经济的利用及开发价值。对泡核桃丰富的遗传资源进行分子标记开发

及遗传多样性研究,可为特异资源的挖掘、分子标记辅助育种提供指导。

SSR 标记(simple sequence repeat, 微卫星标记或简单重复序列标记, SSR)广泛分布于基因组的不同位置<sup>[2]</sup>。由于单个微卫星位点重复单元数量上的变异,导致 DNA 片段长度的多态性,而且 SSR 重复数目变化很大,可以揭示比 RFLP 高得多的多态

收稿日期:2016-08-04 修回日期:2017-03-03

基金项目:国家自然科学基金(31660214);国家科技支撑计划课题(2011BAD46B01)。

作者简介:陈少瑜,女,研究员,研究方向:林木育种及资源利用。E-mail:sherry9872@163.com

\* 通信作者:宁德鲁,男,研究员,研究方向:木本油料良种选育及栽培技术。E-mail:ningdelu@163.com

性<sup>[3]</sup>,越来越广泛地应用于遗传多样性的研究中。国内外基于 SSR 标记的核桃遗传多样性研究已有报到,但基本集中于黑核桃(*J. nigra*)和核桃(*J. regia*)<sup>[4-11]</sup>,而且大多采用的 SSR 引物是从黑核桃开发出来的 30 条引物中筛选出来的<sup>[4-6,12-14]</sup>。本研究以泡核桃转录组数据为基础开发其 SSR 标记,并从中筛选具有多态性且稳定性好的引物,进行泡核桃遗传多样性分析和应用,以期为进一步遗传图谱构建、基因定位及分子辅助育种等研究提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

分析材料采自 15 份核桃品种(系)单株(表 1)。采集当年萌发的新叶装入纸袋、标记、带回实验室,放于装有硅胶的保鲜盒中干燥,用于提取基因组 DNA。小沙壳采自云南省临沧市云县爱华镇头道水箐沟村河对门山(24°16' N, 100°3'E,海拔1 720 m),其余均来自云南省林业科学院云南省昆明树木园核桃资源圃(25°08'N, 102°45'E,海拔1 950 m)。

表 1 15 个供试核桃品种

Table 1 Walnut cultivars used in the experiment

品种	来源
大泡( <i>J. sigillata</i> ‘Dapao’)	实生选育
三台( <i>J. sigillata</i> ‘Santai’)	实生选育
大沙壳 ( <i>J. sigillata</i> ‘Dashake’)	实生选育
小沙壳 ( <i>J. sigillata</i> ‘Xiaoshake’)	实生选育
维 2( <i>J. spp.</i> ‘Wei 2’)	实生选育
新疆核桃( <i>J. regia</i> )	新疆引种
新新 2 号 ( <i>J. regia</i> ‘Xinxin 2’)	新疆引种
哈特利( <i>J. regia</i> ‘Hartley’)	美国引种
艾米格( <i>J. regia</i> ‘Amigo’)	美国引种
强特勒( <i>J. regia</i> ‘Chandler’)	美国引种
云新 301	( <i>J. sigillata</i> ‘Santai’) × ( <i>J. regia</i> ‘Xinzao13’)
云新 303	( <i>J. sigillata</i> ‘Santai’) × ( <i>J. regia</i> ‘Xinzao13’)
云新 306	( <i>J. sigillata</i> ‘Santai’) × ( <i>J. regia</i> ‘Xinzao13’)
云新 14(云新高原)	( <i>J. sigillata</i> ‘Yangpao’) × ( <i>J. regia</i> ‘Yunlin A7’)
云新 34(云新云林)	( <i>J. sigillata</i> ‘Yangpao’) × ( <i>J. regia</i> ‘Yunlin A7’)

### 1.2 试验方法

1.2.1 SSR 标记开发 取云南省昆明树木园核桃资源圃内的泡核桃品种漾濞大泡核桃和三台核桃幼叶。送诺禾致源生物信息科技有限公司完成 Illumina Hiseq2000 转录组测序<sup>[15]</sup>。

用软件 MicroSatellite (MISA) 对 62 415 条 Unigene 进行 SSR 位点查找。查找标准:单、二、三、四、五、六核苷酸的最小重复次数分别为 10、6、5、5、5、5 次,并且 SSR 位点侧翼序列长度≥50 bp。

用 Primer5 和 Oli907 软件进行引物设计和评价。设计引物时设置的主要参数为:GC 含量 40%~70%,退火温度 58~63 ℃,引物长 18~25 bp,预期扩增产物长度 100~300 bp,且无二级结构和二聚体。引物命名为 YAFW 加序号,如 YAFW-1。根据 SSR 位点查询结果,共设计合成 154 对 SSR 引物,由上海捷瑞生物工程有限公司合成。

用 1 个 DNA 的混合模板(取 4 个核桃品种单株,漾濞大泡核桃、三台核桃、强特勒及哈特利的 DNA 样品等量混合)对选取合成的 154 对引物进行初步筛选。DNA 混合模板经 SSR-PCR 扩增,2%琼脂糖凝胶电泳检测,初步选出带型清晰、与预期大小相符的目的片段的 SSR 引物。再以 7 个 DNA 模板(大泡、三台、新新 2 号、强特勒、哈特利、云新 301、云新 14)和 1 个 ddH<sub>2</sub>O 做阴性对照复筛。经 PCR 扩增及电泳检测,确定多态性高且稳定性好的引物用以所有样品的扩增。

1.2.2 基因组 DNA 提取及 SSR-PCR 扩增 基因组 DNA 提取采用改进 CTAB 法<sup>[16]</sup>,提取的 DNA 用 Nanodrop 2000 超微量紫外可见分光光度计(Thermo Scientific)检测 OD 值,确定 DNA 的浓度与纯度。采用琼脂糖凝胶进行 DNA 的完整性检测。将所有样品稀释至 20 ng · μL<sup>-1</sup>, -20℃保存备用。

以 15 份稀释保存的 DNA 样品为模板,复选确定的 SSR 引物作为扩增引物,进行 SSR-PCR 扩增。

SSR-PCR 反应体系:

2×ES TaqMaster Mix	10.0 μL
Forward Primer	0.4 μL
Reverse Primer	0.4 μL
Template DNA	1.0 μL
RNase-Free Water	8.2 μL
Total	20.0 μL

SSR-PCR 扩增程序:

94℃	预变性	5 min	
94℃	变性	30 s	} 14 cycles
60℃	退火	30 s	
72℃	延伸	1 min	
94℃	变性	30 s	} 19 cycles
57℃	退火	30 s	
72℃	延伸	1 min	
72℃	终延伸	1 min	
12℃		∞	

体系中所用的 2×ES TaqMaster Mix(北京康为世纪生物科技有限公司)由 Es Taq DNA Polymerase、PCR Buffer、Mg<sup>2+</sup>、dNTPs 以及 PCR 稳定剂和增强剂组成的预混体系。

扩增产物用 6%的聚丙烯酰胺凝胶(PAGE 胶)电泳分离,电泳完成后银染检测(10%乙醇固定 5 min,1%硝酸氧化 5 min,0.1%硝酸银染色 30 min,3%碳酸钠显色,然后 10%的乙酸固定,每个步骤完成后均用去离子水冲洗),之后凝胶成像系统拍照或扫描。

1.2.3 条带统计及遗传分析 读取电泳图谱上位点的长度,按顺序记录不同的等位基因,等位基因的“有”和“无”分别记为“1”和“0”,构建 0/1 数据矩阵,将 0/1 数据、扩增的总条代数和样品名称录入软件 Excel,用 GeneMapper4.0 软件进行扩增结果的多态性分析;用软件 Nedit 读取数据,将数据保存为“.nts”的格式后,用 NTsys2.10e 软件计算各品种

(系)间遗传相似系数并生成聚类图。

## 2 结果与分析

### 2.1 泡核桃 SSR 位点及分布特征

经过 MISA 软件筛选,在泡核桃转录组的 62 415条 Unigene 序列中共发现 11 632 个 SSR 位点,分布在 10 268 条 Unigene 中,其中 1 364 条 Unigene 含 2 个及 2 个以上的 SSR 位点,SSR 的分布频率(SSR 位点总数与 Unigene 总数的比值)为 18.64%。以全部 Unigene 总长度为 43 696 782 bp 计算,泡核桃转录组序列中平均 3.76 kb 发现 1 个 SSR 位点。泡核桃转录组中 SSR 的主要重复类型是单核苷酸重复,占 SSR 位点总数的 46.77%,其次为二核苷酸重复和三核苷酸重复,分别占 SSR 总数的 39.17%和 12.84%,其余核苷酸重复类型的数量较少,仅 1.22%(表 2)。

表 2 泡核桃转录组 SSR 分布特征

Table 2 SSR Distribution characteristics of transcriptome sequencing in *J. sigillata*

重复单元类型	数量/条	比例/%	主要重复单元
单核苷酸	5 440	46.77	A /T,C /G
二核苷酸	4 556	39.17	GA/TC,AG/CT,AT/AT,TA/TA,CA/TG,AC/GT,GC/GC,CG/CG
三核苷酸	1 494	12.84	GAA/TTC, AAG/CTT, AGA/TCT, AAT/ATT, CTC/GAG, GGA/TCC, ATC/GAT, GCA/TGC, CCA/TGG, ATA/TAT, TAA/TTA, AGC/GCT, CAG/CTG, AGG/CCT,ACC/GGT
四核苷酸	122	1.05	TATT/AATA, TTTA/TAAA, GAAA/TTTC, TTAT/ATAA, TATG/CATA, AT-AC/GTAT, AAAT/ATTT, AAAG/CTTT, AGAC/GTCT, TGCA/TGCA, AGAA/TTCT,ATGC/GCAT,ATGT/ACAT,TGTA/TACA
五核苷酸	12	0.10	AAAAT/ATTTT,AAATC/GATTT,ATCCA/TGGAT,CCTCT/AGAGG,GAAGC/GCTTC,GATCG/GCATC,GCTCG/CGAGC,GGCAT/ATGCC,TACAA/TTGTA,TCCCT/AGGGA,TCTTT/AAAGA,TTATA/TATAA
六核苷酸	8	0.07	AGGCGA/TCGCCT, ATCTTT/AAAGAT, TGCTCG/CGAGCA, GAGCAA/TT-GCTC,GCCCCT/AGGGGC,GATGAG/CTCATC,GCAGTA/TACTGC,GGACAG/CTGTCC
合计	11 632	100	

### 2.2 泡核桃 SSR 引物筛选

基于泡核桃转录组测序拼接数据及分析,从 11 632个 SSR 位点中随机选取 154 个二核苷酸~六核苷酸重复位点设计引物,共设计合成 154 对 SSR 引物。用 DNA 混合模板对 154 对引物进行初步筛选,再分别用 7 个 DNA 模板进行复筛,最终确定 11 条多态性且稳定性好的引物用以 15 份样品的扩增。11 条引物序列信息及部分扩增结果(表 3、图 1)。

### 2.3 11 对 SSR 引物扩增结果的多态性

用 GeneMapper4.0 软件进行扩增结果的多态性分析,11 对效果好的 SSR 引物,在 15 个样本中共检测到 31 个等位基因(表 4),大小 150~300 bp 之

间,平均每对引物检测到 2.82 个等位基因,多态性信息量(PIC)为 0.122 7~0.429 5,平均为 0.302 3。有 2 个标记(YAFW-25 和 YAFW-101)为低度多态位点(0<PIC<0.25),其他 9 个标记为中度多态位点(0.25<PIC<0.5),无高度多态位点(PIC>0.5),YAFW-32 位点 PIC 最高(PIC 为 0.4295)。

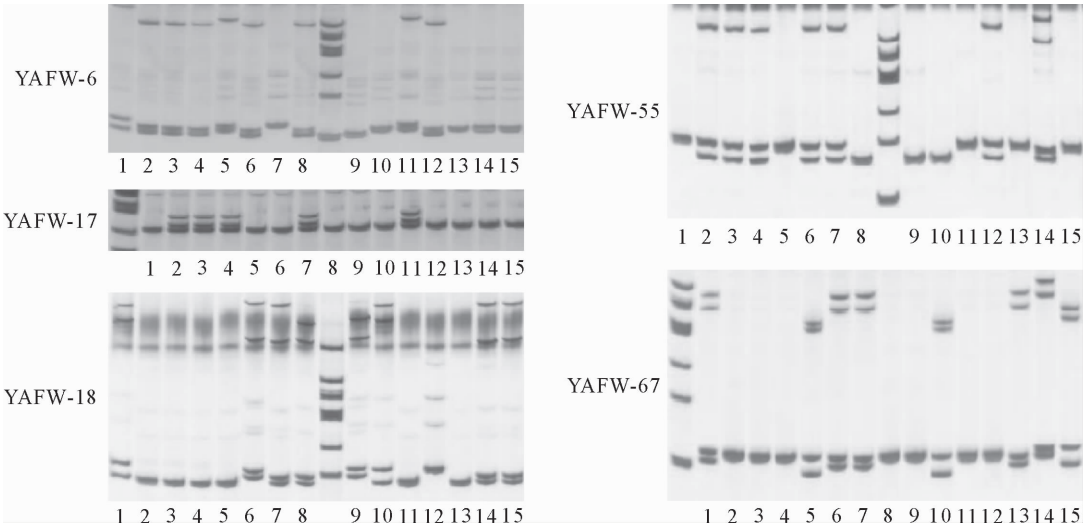
### 2.4 各品种的遗传关系及聚类分析

依据 15 份样品在 11 个 SSR 标记检测出的 31 个等位基因,计算样品间的遗传相似系数(Dice),并基于相似性系数进行聚类(图 2)表明,在遗传相似系数为 0.33 时,15 份核桃样品分为 3 组:Ⅰ组仅有云新 301 一个杂交品种样品;Ⅱ组共有 7 个样品,包括以漾濞大泡核桃、三台核桃、小沙壳、大沙壳为主

的泡核桃及 3 个杂交品种(云新 303、云新 306 和云新 14);Ⅲ组以新疆核桃、新新 2 号、强特勒、哈特利和艾米格为主的普通核桃、维 2 号及云新 34 号一个杂交品种,共 7 个样品。

表 3 用以所有样品扩增的 11 对 SSR 引物信息  
Table 3 11 pairs of SSR primers used for all samples

引物名称	Primer F (5'-3')	Primer R (5'-3')	SSR 类型
YAFW-6	CCGGAAGCTCAGTTCAAGA	GGTTCCTCCGCAGTTGGTCT	(AAG)5
YAFW-17	TGCCATGTCTTCAGCAGCTT	GGGGGATGTGGGGGTAACAAA	(CTA)6
YAFW-18	GCCTCTCCTCGTGCTCATTT	ACTCGCTACTTTTCAGGCC	(GAA)18
YAFW-25	ACCAAGGCCAACTTCACCAA	GATCTTGCAATAGCGGCAGC	(GA)6
YAFW-32	ATGAGAGCCAGCCAACAGAC	CGAGCGAGCAAGAGAGAGAG	(TC)6
YAFW-38	GGAGCAGGGGTAGGGTTTTC	CACAAACCCCTTCAGAAACCA	(TC)7
YAFW-55	AGTGTGCTCAGCTTGTTACACT	AAGCAGTGGATATGGAGCCG	(TA)10
YAFW-67	AGCTAGCTCTCAAACAACAAGC	ACAAACATGGCAACCTTCGTG	(GCAGTA)8
YAFW-71	AGCTCAACGGTCAAGGAAGG	GGAGAGAGAGAGCTCGGCTA	(TGCTCG)5
YAFW-101	GTAGGATAGTGTGGCGTCGG	CCTCGTCTCCTCCCCTAACA	(TGG)7
YAFW-135	GAAGAGACTCCGTTGCCACA	ACTCCGTCGTTTCCCTGAAC	(GGA)5



注:泳道 1~15 分别为云新 301,云新 303,云新 306,云新 14,云新 34,哈特利,大泡,艾米格,强特勒,新疆核桃,三台,新新 2 号,大沙壳,维 2,小沙壳。

图 1 11 个 SSR 标记对 15 份供试样品的 SSR 扩增结果  
Fig. 1 Electrophoresis patterns amplified with selected SSR markers

表 4 SSR 扩增产物的多态性

Table 4 Polymorphism of the amplified products

引物名称	扩增片段数/个	扩增片段大小/bp	等位基因频率	多态性信息量
YAFW-6	4	150~170	0.054 1~0.729 7	0.362 3
YAFW-17	3	255~280	0.405 4~1.000 0	0.321 4
YAFW-18	4	190~220	0.054 1~0.756 8	0.334 6
YAFW-25	2	285~300	0.297 3~1.000 0	0.208 9
YAFW-32	2	180~200	0.432 4~0.756 8	0.429 5
YAFW-38	2	260~300	0.594 6~0.945 9	0.292 2
YAFW-55	2	180~200	0.729 7~0.891 9	0.293 6
YAFW-67	4	135~155	0.081 1~0.810 8	0.348 4
YAFW-71	4	160~175	0.054 1~0.810 8	0.265 2
YAFW-101	2	200~220	0.108 1~0.973 0	0.122 7
YAFW-135	2	240~250	0.513 5~0.891 9	0.346 2
平均	31		0.500 0	0.302 3

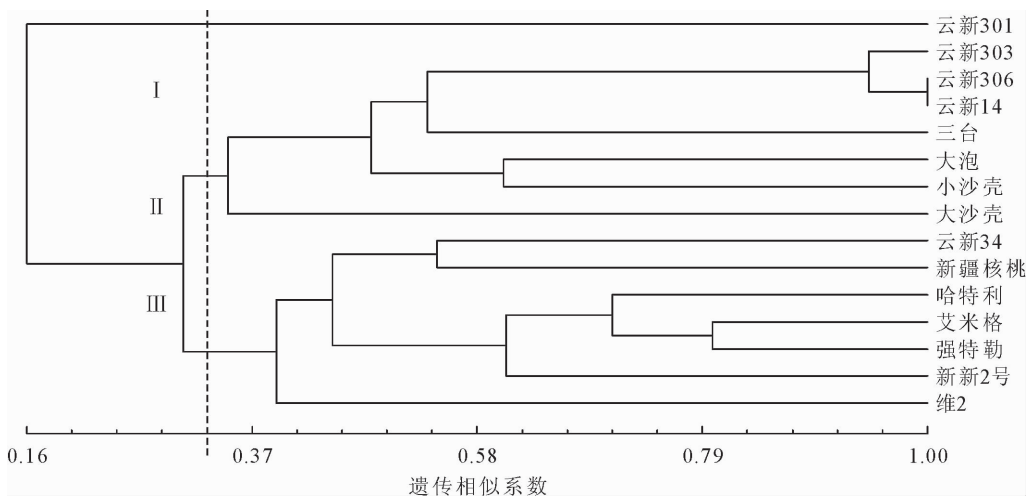


图 2 基于遗传相似性系数的 15 份核桃样品聚类

Fig. 2 The dendrogram of 15 Walnut cultivars based on coefficient of genetic similarity

3 结论与讨论

SSR 分子标记技术由于片段短,突变率高,共显性、重复性好,能从分子水平直接揭示林木的多态性,现已在物种的基因型鉴定、品种保护、多样性研究、基因和 QTL 分析定位、分子标记辅助选择育种、图谱绘制等领域广泛应用<sup>[10,17-18]</sup>。然而开发的物种针对性 SSR 标记尚有限,某种程度上限制了其应用。由于 SSR 标记两端序列保守,所设计的引物必须与两端保守序列互补,因此,需要针对具体物种开发相应的 SSR 标记,这是一项繁琐、工作量大、花费大的工作。至今仅有少量的有关胡桃属树种 SSR 开发及应用的研究报到<sup>[19-21]</sup>,尽管所开发的引物在胡桃属各种中具有一定的通用性,但数量仍非常有限,尤其是针对某一具体种的特异 SSR 引物的开发和应用还很有限。泡核桃已开展一些基于分子标记的遗传研究,主要是采用 RAPD、ISSR、AFLP 标记技术进行遗传多样性和品种鉴别等方面的研究<sup>[22-26]</sup>,还未开展 SSR 标记开发及应用的研究。本研究在前期泡核桃转录组数据基础上,从 11 632 个 SSR 位点随机选取 154 个二核苷酸~六核苷酸重复位点设计引物,通过初选和复选,确定了 11 对多态性高且稳定性好的引物,用于 15 个核桃品种(系)的遗传多样性分析。11 对引物共检测到 31 个等位基因,平均每对引物检测到 2.82 个等位基因,多态性信息量(PIC)为 0.122 7~0.429 5,平均 0.302 3,大多属于中度多态性位点(0.25<PIC<0.5)。

基于遗传相似性系数的聚类分析,基本按照泡核桃、北方核桃 2 个种分成 2 大类,分属于 II 和 III 组,2 个种的 4 个杂交品种分布于 2 大类中,1 个杂交品种单独为 1 组(I 组)。聚类结果中,杂交品种

云新 301 单独为 1 组(I 组),而且与其他 2 组有一定的遗传距离,其原因有待进一步研究;维 2 号是实生选育出的优良品种,从聚类结果看,它与北方核桃有更近的亲缘关系;另外 4 个杂交品种中有 3 个(云新 303,云新 306 和云新 14)皆和母本(泡核桃)聚在一组(II 组),而仅有云新 34 在北方核桃组(III 组),这可能与杂交后代的选择有关。SSR 与同工酶都属于共显性标记,扩增目的片段比较明确,比较适合用于种间亲缘关系的分析<sup>[27]</sup>,本研究开发并用以遗传多样性分析的 SSR 标记数量(仍然)有限,检测到的位点也较少,不能完全反映整个基因组 SSR 标记的多态性的情况,需进一步开发更多的 SSR 标记,构建饱和的 SSR 图谱,为种质资源的种质鉴定、遗传关系、系统进化等研究提供更为客观的科学依据。

参考文献:

[1] 王红霞,张志华,玄立春. 我国核桃种质资源及育种研究进展[J]. 河北林果研究,2007,22(4):387-392.

[2] HAYDEN M J, SHARP P J. Sequence-tagged microsatellite profiling (STMP): a rapid technique for developing SSR markers [J]. Nuc1 Acids Res,2001,29(8):1-8.

[3] 杨丽芳,王芝学,梁海永. 利用 SSR 技术对部分核桃品种(系)亲缘关系分析研究[J]. 安徽农业科学,2013,41(1):49-51,54. YANG L F, WANG Z X, LIANG H Y. Research on phylogenetic relationship of part of walnut varieties ( Strain) by SSR technique[J]. Journal of Anhui Agri. Sci. ,2013,41(1):49-51. (in Chinese)

[4] WOESTE K, BURNS R, RHODES O E, et al. Thirty polymorphic nuclear microsatellite loci from black walnut [J]. Journal of Heredity,2002,93(1):58-60.

[5] FORONI I, RAO R, WOESTE K, et al. Characterisation of *Juglans regia* L. with SSR markers and evaluation of genetic relationships among cultivars and the Sorrento'landrace[J]. J. Hort. Sci. & Biotechnol. ,2005,80(1):49-53.

[6] VICTORY E R, GLAUBITZ J C, RHODES O E, *et al.* Genetic homogeneity in *Juglans nigra* (Juglandaceae) at nuclear microsatellites [J]. American Journal of Botany, 2006, 93(1): 118-126.

[7] ROBICHAUD R L, GLAUBITZ J C, RHODES O E, *et al.* A robust set of black walnut micro satellites for parentage and clonal identification [J]. New Forest, 2006, 32(2): 179-196.

[8] FORONI I, WOESTE K, MONTI L M, *et al.* Identification of ‘Sorrento’ walnut using simple sequence repeats (SSRs) [J]. Genet. Resour. Crop Evol., 2007, 54: 1081-1094.

[9] 郝艳宾, 肖永强, 齐建勋, 等. 微卫星 DNA 在核桃属近缘种同源性分析上的应用[J]. 北京农学院学报, 2006, 21(3): 1-4.

HAO Y B, XIAO Y Q, QI J X, *et al.* Application of microsatellite DNA on analyzing the homology of related species in *Juglans* L. [J]. Journal of Beijing Agricultural College, 2006, 21(3): 1-4. (in Chinese)

[10] 郝艳宾, 黄武刚, 王克建, 等. 我国核桃组 (Sect. *Juglans*) 种质资源的 SSR 标记分析[J]. 果树学报, 2007, 24(5): 620-625.

HAO Y B, HUANG W G, WANG K J, *et al.* Analysis of Sect. *Juglans* germplasm in China by using SSR marker[J]. Journal of Fruit Science, 2007, 24(5): 620-625. (in Chinese)

[11] 杨本芸, 杨敏生, 梁海永, 等. 不同核桃品种的 SSR 分析[J]. 河北农业大学学报, 2008, 31(4): 51-55.

YANG B Y, YANG M S, LIANG H Y, *et al.* SSR analysis of different walnut cultivars[J]. Journal of Agricultural University of Hebei, 2008, 31(4): 51-55. (in Chinese)

[12] 刘晓丽, 陈学森, 张美勇, 等. 普通核桃 (*Juglans regia*) 3 个群体遗传结构的 SSR 分析[J]. 果树学报, 2008, 25(4): 526-530.

LIU X L, CHEN X S, ZHANG M Y, *et al.* Population genetic structure analysis of *Juglans regia* using SSR markers[J]. Journal of Fruit Science, 2008, 25(4): 526-530. (in Chinese)

[13] 王滑, 郝俊民, 王宝庆, 等. 中国核桃 8 个天然居群遗传多样性分析[J]. 林业科学, 2007, 43(7): 120-124.

WANG H, HAO J M, WANG B Q, *et al.* SSR analysis of genetic diversity of eight natural walnut populations in China [J]. Scientia Silvae Sinicae, 2007, 43(7): 120-124. (in Chinese)

[14] 曾斌, 田嘉, 李疆. 新疆核桃 8 个天然群体遗传多样性的 SSR 评价[J]. 新疆农业科学, 2012, 49(12): 2180-2188.

[15] WU T, XIAO L J, CHEN S Y, *et al.* Transcriptomics and comparative analysis of three *Juglans* species: *J. regia*, *J. sigillata* and *J. cathayensis* [J]. Plant Omics Journal, 2015, 8(4): 361-371.

[16] 杨恩, 陈少瑜, 张雨, 等. 漾濞核桃叶片基因组 DNA 的两种提取方法效果比较[J]. 西部林业科学, 2005, 34(4): 72-75.

YANG E, CHEN S Y, ZHANG Y, *et al.* Comparison on effect between two methods of DNA extraction from leaves of *Juglans sigillata* [J]. Journal of West China Forestry Science, 2005, 34(4): 72-75. (in Chinese)

[17] 樊蓉, 樊军锋, 李周岐. 9 个白杨品种 SSR 指纹图谱构建及遗传关系的研究[J]. 西北林学院学报, 2015, 30(3): 76-80.

FAN R, FAN J F, LI Z Q. Fingerprinting and genetic relatedness of 9 varieties in *Populus* L. Sect. *Populus* using SSR markers [J]. Journal of Northwest Forestry University, 2015, 30(3): 76-80. (in Chinese)

[18] 黄秦军, 苏晓华, 张香华, 等. SSR 分子标记与林木遗传育种 [J]. 世界林业研究, 2002, 15(3): 14-21.

HUANG Q J, SU X H, ZHANG X H, *et al.* Microsatellite marker and its application in tree genetics and breeding [J]. World Forestry Research, 2002, 15(3): 14-21. (in Chinese)

[19] 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, DI 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. (in Chinese)

[20] 高玉娜, 赵登超, 孙永泉, 等. 核桃属材用核桃 SSR 标记的遗传多样性分析 [J]. 西北农业学报, 2011, 20(9): 129-134.

GAO Y N, ZHAO D C, SUN Y Q, *et al.* SSR analysis of genetic diversity of walnut used for timber [J]. Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica, 2011, 20(9): 129-134. (in Chinese)

[21] 黄少勇. 新疆部分核桃资源 EST-SSR 遗传多样性分析及引物通用性研究 [D]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学, 2013. 4.

[22] 陈少瑜, 杨恩, 张雨, 等. 云南主要核桃品种的 ISSR 分子鉴别 [J]. 经济林研究, 2006, 4(4): 41-45.

[23] 陈少瑜, 张雨, 陆斌, 等. 云南省优良核桃品种三台核桃与普通泡核桃的 ISSR 分子鉴别 [J]. 福建林学院学报, 2011, 31(2): 120-125.

CHEN S Y, ZHANG Y, LU B, *et al.* Molecular identification of elite cultivar Santai and general tie of *Juglans sigillata* based on ISSR-PCR in Yunnan [J]. Journal of Fujian College of Forestry, 2011, 31(2): 120-125. (in Chinese)

[24] 陈少瑜, 杨恩, 张雨, 等. 云南核桃品种遗传多样性的 RAPD 和 ISSR 标记研究 [J]. 河北林果研究, 2007, 22(1): 57-61.

[25] 陈少瑜, 张雨, 陆霞, 等. 27 份核桃种质资源亲缘关系的 ISSR 分析 [J]. 西北林学院学报, 2012, 27(4): 108-112.

CHEN S Y, ZHANG Y, CHEN X, *et al.* Genetic relationship of 27 walnut germplasm resources based on ISSR markers [J]. Journal of Northwest Forestry University, 2012, 27(4): 108-112. (in Chinese)

[26] 宁德鲁, 马庆国, 张雨, 等. 云南省核桃品种遗传多样性的 FISH-AFLP 分析 [J]. 林业科学研究, 2011, 24(2): 189-193.

NING D L, MA Q G, ZHANG Y, *et al.* FISH-AFLP analysis of genetic diversity on walnut cultivars in Yunnan Province [J]. Forest Research, 2011, 24(2): 189-193. (in Chinese)

[27] 王滑, 阎亚波, 张俊佩, 等. 应用 ITS 序列及 SSR 标记分析核桃与铁核桃亲缘关系 [J]. 南京林业大学学报: 自然科学版, 2009, 33(6): 35-38.

WANG H, YAN Y B, ZHANG J P, *et al.* Application of ITS sequence and SSR markers to study the relationship between *Juglans regia* and *Juglans sigillata* [J]. Journal of Nanjing Forestry University: Natural Science Edition, 2009, 33(6): 35-38. (in Chinese)