# 基于 SSR 标记的云南省核桃种质资源 遗传多样性及核心种质构建

吴 涛1,陈少瑜1,肖良俊2,宁德鲁2,潘 莉2,贺 娜2,朱云凤2

(<sup>1</sup>云南省林业和草原科学院/国家林业局云南珍稀濒特森林植物保护和繁育重点实验室/云南省森林植物培育与开发利用重点实验室, 昆明 650201;<sup>2</sup>云南省林业和草原科学院经济林研究所,昆明 650201)

摘要:利用 SSR 分子标记技术对云南省 14 个州市 1061 份核桃种质资源进行遗传多样性分析,在此基础上,通过最小距离逐步取样法构建核心种质并进行了核心种质的多样性检测。结果表明,19 对 SSR 引物共检测到 322 个等位基因,每对引物平均 16.95 个, Shannon 信息指数(I)平均为 1.3375,期望杂合度(He)平均为 0.6040, Nei's 遗传多样性指数(Nei)平均为 0.6043,数据表明云南核桃种质资源具有较为丰富的遗传多样性。遗传多样性在各州市分布不均,其中,迪庆州核桃资源的遗传多样性相对最高,最低的是临沧地区。基于遗传距离的 UPGMA 聚类结果,以 5%~30% 的取样比例分别构建初级种质(PC)、次级种质(SC)、核心种质 -1(CC-1)、核心种质 -2(CC-2)等 4 个核心种质,经遗传多样性分析及 t 检验,最终确定 10.84% 取样比例、115 份样本量的核心种质 -1(CC-1)为云南核桃资源的核心种质。

关键词:核桃; SSR 分子标记; 种质资源; 遗传多样性; 核心种质

# Genetic Diversity Analysis and Core Collection Construction of Walnut Germplasm in Yunnan Province

WU Tao<sup>1</sup>, CHEN Shao-yu<sup>1</sup>, XIAO Liang-jun<sup>2</sup>, NING De-lu<sup>2</sup>, PAN Li<sup>2</sup>, HE Na<sup>2</sup>, ZHU Yun-feng<sup>2</sup>
(1Laboratory for Conservation and Breeding for Rare, Endangered and Endemic Forest Plants of State Forestry Administration/Yunnan Provincial Key Laboratory for Cultivation and Utilization of Forest Plants/Yunnan Academy of Forestry and Landgrass, Kunming 650201; Institute of Economic Forest Trees, Yunnan Academy of Forestry and Landgrass, Kunming 650201)

**Abstract:** Genetic diversity of 1061 walnut germplasm from 14 prefectures and cities of Yunnan Province was analyzed by SSR molecular marker technique. On the basis of this, a core collection was constructed through least distance stepwise sampling (LDSS) and tested for its diversity. The results showed that 322 alleles were detected by 19 pairs of SSR primers (on average 16.95 per pair of SSR primer). The means of Shannon's information index (I), expected heterozygosity (He) and Nei's gene diversity (Nei) were respectively 1.3375, 0.6040 and 0.6043, which indicated a relatively high genetic diversity of the germplasm. The genetic diversity distributed differently among the 14 prefectures and cities. Diqing Prefecture had the highest genetic diversity while Lincang had the lowest. Sampling rates of 5%-30% were taken for construction of the primary core collection, secondary core collection, core collection-1 and core collection-2, on the basis of UPGMA clustering results. With the genetic diversity analysis and t-test, the core collection-1 with 10.84% sampling rate and 115 samples was determined to be the core collection of walnut germplasm in Yunnan.

Key words: Juglans sigillata Dode, SSR molecular markers; germplasm resources; genetic diversity; core collection

收稿日期: 2019-08-13 修回日期: 2019-09-10 网络出版日期: 2019-10-10

URL: http://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20190813001

第一作者研究方向为林木遗传育种, E-mail: ynafwt@126.com

通信作者: 陈少瑜, 研究方向为林木遗传育种及资源利用, E-mail: sherry9872@163.com

基金项目: 国家自然科学基金项目(31660214); 云南省重大科技专项计划子专题(2018ZG002-01)

Foundation project: National Natural Science Foundation of China (31660214), Special Subprogram of Major Science and Technology Project of Yunnan Province (2018ZG002-01)

遗传多样性是物种在长期的进化过程中通过遗传变异对环境适应的产物,是物种在长期复杂的生境变化过程能够可持续生存和发展的重要基础。对种质资源的遗传多样性进行准确的评价,可以为亲本选配、后代遗传变异程度及杂种优势水平的预测提供预见性的指导,提高育种效率;对种质资源遗传结构和遗传分化状况的了解可以更高效地保护和利用种质资源。

种质资源是植物遗传改良的物质基础,然而,目 益庞大的种质资源数量却给种质的收集保存和遗传 改良带来繁缛的工作、低下的效率。由此, Frankel 等[1-2]提出并逐步发展了核心种质(core collection) 的概念,即采用一定的方法选取最小的种质资源数 量以最大程度地代表种质资源的遗传多样性[3]。 相较农作物核心种质构建的研究,林木核心种质的 构建起步较晚,涉及的树种也有限,近10年国内相 关研究主要涉及的树种有白桦[4]、新疆野苹果[5]、 桂花<sup>[6]</sup>、灰楸<sup>[7]</sup>、欧洲黑杨<sup>[8]</sup>、贵州野生刺梨<sup>[9]</sup>和 水青树<sup>[10]</sup>等。袁海涛等<sup>[11]</sup>根据 SSR 分子标记数 据,采用最小距离逐步取样法对4457份新疆野核 桃(Juglans regia L.)构建了24个核心样本集,并进 行了 24 个样本集 Nei's 基因多样性指数和 Shannon 信息指数的比较,结果选取了431份资源作为核心 种质,对核心种质代表性的检验表明所构建的核心 种质可以很好地代表初始种质; 王红霞等[12]报道 了 131 份核桃资源基于 AFLP 分子标记的核心种质 构建,研究采用逐步聚类法、10%的取样比例构建 了13份资源构成的核心种质,对核心种质遗传多 样性评价的结果显示核心种质多态位点保留率为 75.4%,能代表原始种质的遗传信息。

目前构建核心种质的数据来源主要有基于形态标记和分子标记两类数据,对于树体高大、多年生林木来说,资源的收集和保存较为困难、表型数据的获取需要较长的年限。以 DNA 多态性为基础的分子标记不受植物生长期和环境影响,较形态标记更适合遗传多样性评价和核心种质构建<sup>[13]</sup>。

云南省是深纹核桃(Juglans sigillata Dode)的原生地之一,核桃遗传资源丰富,分布广泛,栽培历史悠久,种植面积及其坚果品质、产量和产值均居全国之首<sup>[14]</sup>。云南省山地面积占全省总面积的94%,复杂的地形地貌、多样的生态环境和明显的立体气候,导致核桃类型繁多,种质资源极其丰富<sup>[15]</sup>。经调查全省16个州市的127个县皆有核桃的分布,丰富的种质资源为其进一步的开发利用奠定了基础。

然而,因缺乏深入和系统的基础研究,再加上核桃树体高大、寿命长、分布广以及异花授粉造成的实生后代遗传基础复杂多样等原因,给云南核桃种质资源的收集、保存管理和开发利用带来困难。因此,本研究在 SSR 标记的遗传多样性分析基础上,构建云南省核桃种质资源的核心种质,为资源的进一步科学研究及高效利用提供参考。

# 1 材料与方法

#### 1.1 供试材料及来源

基于全省核桃种质资源调查收集的材料情况,对收集到的14个州市的1061份核桃种质资源进行SSR分子标记的遗传多样性研究和核心种质构建,种质资源的来源及样本数量见表1,其中包括农家品种、审(认)定品种、优良单株和天然实生单株。每份资源以采集的单株(二倍体)穗条作为1个样本,取穗条韧皮提取DNA。

表 1 云南省核桃种质资源来源及样本容量

Table 1 Origins and sample sizes of walnut germplasm for analysis

	anaiysis		
序号	来源(代码)	样本数量	海拔(m)
No.	Origin (code)	Sample size	Altitude
1	保山市(BS)	32	535~3781
2	楚雄州(CX)	50	556~3657
3	大理州(DL)	86	730~4295
4	迪庆州(DQ)	129	1486~6740
5	红河州(HH)	41	76~3074
6	昆明市(KM)	25	1500~2800
7	丽江市(LJ)	89	1015~5596
8	临沧地区(LC)	8	450~3504
9	怒江州(NJ)	90	738~5128
10	普洱市(PE)	42	376~3306
11	曲靖地区(QJ)	231	695~4017
12	文山州(WS)	60	107~2991
13	玉溪市(YX)	25	1502~2614
14	昭通地区(ZT)	153	267~4040

#### 1.2 试验方法

SSR 分子标记试验包括基因组 DNA 提取、引物筛选及扩增体系的建立。具体方法分别参见文献 [16-18]。用已经筛选出的 19 对多态性高且稳定性好的 SSR 引物(表 2)进行核桃种质资源 SSR-PCR 扩增,引物的相关信息见文献 [19]。

#### 1.3 统计分析方法

1.3.1 遗传多样性分析 对 SSR 检测结果进行峰图的分析和等位基因的读取,用 GenAIEx 6.5 软件计算等位基因数, POPGENE version 1.32 软件计算分析 19 个位点对于所有种质资源以及各来源地群体的遗传多样性参数<sup>[20]</sup>,其中包括观察等位基因数(Na<sub>c</sub>observed number of alleles)、有效等位基因数(Ne<sub>c</sub>effective number of alleles,)、观察杂合度(Ho<sub>c</sub>observed heterozygosity,)、期望杂合度(He<sub>c</sub>expected heterozygosity,)、Shannon信息指数(I<sub>c</sub>Shannon's information index,)、Nei's 遗传多样性指数(Nei, Nei's gene diversity)。

1.3.2 核心种质构建及遗传多样性评价 用 POPGENE version 1.32 软件计算各份种质资源的遗传距离(D, genetic distance)和遗传一致度(I, genetic identity),根据遗传距离运用 NTSYSpc 2.11a 软件进行所有种质资源的 UPGMA 聚类分析, Mega 6.06 软件绘制聚类图。核心种质构建主要包括取样比例和取样方法两个方面的内容。(1)取样比例:根据国内外诸多核心种质构建的研究报道,核心种质的大小一般占原始群体的 5%~30%,本研究将按照原始群体 30% 左右、20% 左右、10% 左右和 5% 左右的取样比例逐步聚类构建初级核心种质(PC, primary collection)、次级核心种质(SC, secondary collection)、核心种质 -1(CC-1, core collection-1)和核心种质 -2(CC-2, core collection-2)。(2)取

样方法:根据种质资源的聚类结果,采用最小距离逐步取样法(LDSS, least distance stepwise sampling)<sup>[21-22]</sup>:找出遗传距离最小的一个组,随机删除该组2个样品之一,保留另一个样品;如果组中包含2份以上样品,选取一个样品进入下一轮聚类。

用 t 检验来检测每次聚类形成的核心种质,即 PC、SC、CC-1 和 CC-2 的期望杂合度 (He)、Shannon 信息指数 (I) 和 Nei's 遗传多样性指数 (Nei),直到核心种质的参数与原始群体的参数开始有显著差异时,则选择上一个与原始群体没有显著差异的核心种质作为最核心种质 [ $^{23}$ ]。同时通过 SPSS19.0 软件进行 PC 群体、SC 群体和 CC 群体 Nei's 遗传多样性指数 (Nei)、Shannon 信息指数 (I) 和期望杂合度 (He) 的 t 检验评价核心种质的遗传多样性状况。

## 2 结果与分析

#### 2.1 云南省核桃种质资源的遗传多样性

2.1.1 19 对 SSR 引物扩增结果的多态性分析 表 2 列出了 19 对 SSR 引物对 1061 份云南省核桃种质资源的扩增及遗传多样性评价结果。由表可见,19 对引物共扩增出 322 个等位基因,平均每对引物 16.95 个,其中扩增出等位基因数量最多的引物是 CUJRB307,共 27 个,最少的是 JSI73,只有 7 个。等位基因片段大小范围为 72~281 bp。

表 2 19 对引物的扩增结果及多样性状况

Table 2 Amplification results and genetic parameters from the 19 polymorphic SSR markers

引物 Primer	片段大小范围 (bp) Fragment size	观察等位 基因数 <i>N</i> a	有效等位 基因数 <i>N</i> e	Shannon 信息 指数 <i>I</i>	观察杂合度 Ho	期望杂合度 He	Nei's 遗传多样 性指数 <i>N</i> ei
CUJRA123	172~196	13	3.572	1.477	0.4221	0.7200	0.7204
CUJRA124	127~173	20	1.990	1.279	0.2844	0.4976	0.4978
CUJRA206a	170~214	18	3.431	1.792	0.2709	0.7085	0.7089
CUJRB012	72~126	19	2.888	1.607	0.5104	0.6537	0.6540
CUJRB103a	122~172	23	2.676	1.546	0.3701	0.6263	0.6266
CUJRB218	131~172	20	4.348	1.791	0.6508	0.7700	0.7704
CUJRB220	108~192	25	5.065	1.949	0.6476	0.8025	0.8029
CUJRB305	93~159	22	1.610	0.895	0.2171	0.3788	0.3790
CUJRB307	100~188	27	5.008	2.011	0.6352	0.8003	0.8007
CUJRB317	106~142	17	3.947	1.741	0.6547	0.7467	0.7470
CUJRC310	138~162	8	2.681	1.112	0.4241	0.6269	0.6272
CUJRD204a	115~169	13	2.086	0.830	0.2739	0.5206	0.5209

走 つ	1	⁄赤	)
죠 2		丝	1

引物 Primer	片段大小范围 (bp) Fragment size	观察等位 基因数 <i>N</i> a	有效等位 基因数 <i>N</i> e	Shannon 信息 指数 I	观察杂合度 Ho	期望杂合度 He	Nei's 遗传多样 性指数 <i>N</i> ei
JH2753	124~189	13	2.408	1.057	0.4784	0.5848	0.5851
ZMZ11	110~173	11	2.324	0.981	0.5607	0.5697	0.5700
JUG13	188~281	17	1.298	0.577	0.1511	0.2296	0.2297
JSI15	183~215	13	2.286	1.145	0.5535	0.5625	0.5628
JSI63	127~207	11	2.217	0.923	0.7419	0.5489	0.5491
JSI71	104~172	25	5.230	2.004	0.6805	0.8088	0.8092
JSI73	142~178	7	1.471	0.694	0.2693	0.3203	0.3205
平均 Mean		16.95	2.976	1.3375	0.4630	0.6040	0.6043

 $N_a$ : observed number of alleles,  $N_e$ : effective number of alleles,  $H_o$ : observed heterozygosity,  $H_e$ : expected heterozygosity, I: Shannon's information index,  $N_e$ : Nei's gene diversity

Shannon 信息指数(I)范围 0.577(JUG13)~2.011(CUJRB307),平均为1.3375;期望杂合度(He)范围 0.2296(JUG13)~0.8088(JSI71),平均为0.6040;Nei's遗传多样性指数(Nei)范围 0.3205(JSI73)~0.8092(JSI71),平均为0.6043。数据表明云南核桃种质资源具有较为丰富的遗传多样性。2.2.2 多样性在州市间的分布 对14个州市的核桃种质资源分别进行遗传多样性分析(表3),结果发现各州市核桃资源的遗传多样性参数有较大差

异,其中迪庆州核桃资源的 Shannon 信息指数(I)、期望杂合度(He)和 Nei's遗传多样性指数(Nei)最高,分别为 1.4029、0.6475 和 0.6449,其次是怒江州的核桃资源,以上参数分别为 1.3343、0.6256 和 0.6220,遗传多样性最低的是临沧地区,各值分别为 0.8264、0.4814 和 0.4497。根据 Shannon 信息指数的大小对各州市核桃资源遗传多样性进行排序,由高至低依次为迪庆、怒江、昭通、曲靖、红河、玉溪、昆明、文山、大理、丽江、保山、楚雄、普洱、临沧。

表 3 各州市核桃群体的遗传多样性

Table 3 Genetic parameters for walnuts of different origins

来源地 Origin	观察等位基因数 Na	有效等位基因数 Ne	Shannon 信息指数 <i>I</i>	观察杂合度 Ho	期望杂合度 He	Nei's 遗传多样性指数 Nei
保山市 BS	5.947	2.716	1.0892	0.5103	0.5445	0.5353
楚雄州 CX	5.737	2.522	1.0502	0.4802	0.5366	0.5311
大理州 DL	7.263	2.458	1.1076	0.4253	0.5382	0.5350
迪庆州 DQ	10.000	3.362	1.4029	0.4613	0.6475	0.6449
红河州 HH	6.684	3.101	1.2346	0.4600	0.6026	0.5951
昆明市 KM	5.789	2.957	1.1914	0.5134	0.6009	0.5888
临沧地区 LC	3.368	2.174	0.8264	0.4070	0.4814	0.4497
丽江市 LJ	7.632	2.439	1.0894	0.4341	0.5352	0.5320
怒江州 NJ	8.632	3.204	1.3343	0.4420	0.6256	0.6220
普洱市 PE	5.579	2.230	0.9758	0.4456	0.4934	0.4873
曲靖地区 QJ	11.316	3.036	1.2899	0.4871	0.5952	0.5939
文山州 WS	7.421	2.776	1.1818	0.4392	0.5723	0.5674
玉溪市 YX	6.053	3.126	1.2300	0.5043	0.6085	0.5962
昭通地区 ZT	10.368	3.059	1.3065	0.4652	0.6031	0.6011

#### 2.2 核心种质的构建及遗传多样性评价

基于遗传距离的 UPGMA 聚类结果,采用最小距离逐步取样法按照 5%~30% 取样比例分别构建了 4个级别的候选核心种质: 初级种质(PC)、次级种质(SC)、核心种质-1(CC-1)及核心种质-2(CC-2),对抽样后获得的各级核心种质进行遗传多

样性分析(表 4)。由表 4 可见,在分析的 5 个遗传 参数种,只有 CC-2 种质的期望杂合度(He)与原始 种质在 0.05 水平表现出显著差异,根据核心种质选择办法,最终选择核心种质 -1(CC-1)为核心种质。核心种质的取样比例为 10.84%,观察等位基因数的保留率为 70.75%。

表 4 各级种质资源数量及遗传多样性指标比较

Table 4 Comparison of genetic parameters among collections of different grades

种质 Collection	取样比例 (%) Sampling rate	数量 No.	观察等位 基因数 <i>N</i> a	有效等位 基因数 <i>N</i> e	Shannon 信 息指数 <i>I</i>	期望杂合度 He	Nei's 基因 多样性指数 <i>N</i> ei
原始种质 OC		1061	16.947 4	2.975 5	1.337 5	0.604 3	0.604 0
初级种质 PC	31.48	334	14.578 9	3.633 8	1.518 0	0.664 9	0.663 9
保留率(%)Retention ratio			86.02				
次级种质 SC	21.87	232	13.578 9	3.853 8	1.564 4	0.680 0	0.678 6
保留率(%)Retention ratio			80.12				
核心种质 -1 CC-1	10.84	115	11.989 5	4.080 4	1.601 9	0.697 7	0.694 6
保留率(%)Retention ratio			70.75				
核心种质 -2 CC-2	5.84	62	10.105 3	4.307 7	1.613 6	0.711 4*	0.705 5
保留率(%)Retention ratio			59.63				

<sup>\*</sup>表示在 0.05 水平差异显著

用 Nei's 基因多样性指数 ( $N_{ei}$ )、Shannon's 信息指数 (I) 和杂合度 (He) 这 3 个参数指标对各级种质进行遗传多样性 t 检验 (表 5 )。由表 5 可见, 3 个参数中 CC-2 的期望杂合度 t 值为 0.0403 (小于 0.05 ), CC-2 的 Nei's 基因多样性指数 t 值为 0.0510 (约等于 0.05 ), 而 CC-1 的

3个遗传参数皆与原始种质的差异没有统计学意义,由此选择 CC-2 的上一个与原始群体差异没有统计学意义的 CC-1 作为最终的核心种质可满足核心种质的用最少样本量以最大程度地代表种质资源遗传多样性的宗旨, CC-1 可以代表原始种质的遗传多样性。

表 5 核心种质遗传多样性指标的 t 检验

Table 5 t-test on genetic parameters of collections of different grades

多样性指标 Parameters	种质 Collections	均值 Mean	标准差 Standard deviation	均值差值 Difference between mean	差值标准差 Difference between standard deviation	t 值 t value
Nei's 基因多样性指	OC	0.6040	0.1653			
数 Nei	PC	0.6639	0.1601	-0.0606	0.0515	0.2422
	SC	0.6786	0.1609	-0.0756	0.0515	0.1457
	CC-1	0.6946	0.1559	-0.0933	0.0515	0.0732
	CC-2	0.7055	0.1498	-0.1016	0.0514	0.0510
Shannon 信息指数	OC	1.3375	0.4653			
I	PC	1.5180	0.5033	-0.1806	0.1605	0.2635
	SC	1.5644	0.5058	-0.2270	0.1605	0.16066
	CC-1	1.6019	0.4976	-0.2645	0.1605	0.1028
	CC-2	1.6136	0.5000	-0.2763	0.1605	0.0886

<sup>\*</sup> indicates significantly different at the 0.05 level

0.0403

			700	,		
多样性指标 Parameters	种质 Collections	均值 Mean	标准差 Standard deviation	均值差值 Difference between mean	差值标准差 Difference between standard deviation	t 值 t value
期望杂合度	OC	0.6043	0.1653			
He	PC	0.6649	0.1601	-0.0598	0.0513	0.2468
	SC	0.6800	0.1604	-0.0745	0.0513	0.1503
	CC-1	0.6977	0.1555	-0.0905	0.0514	0.0814

-0.1071

0.1509

表 5(续)

## 3 讨论

#### 3.1 云南省核桃种质资源的遗传多样性

CC-2

0.7114

研究采用的 SSR 19 对引物在 1061 份资源中共扩增出 322 个等位基因,资源 Shannon 信息指数 (*I*)、期望杂合度 (*He*)、Nei's 遗传多样性指数 (*Nei*)平均值分别为 1.3375、0.6040、0.6043,与其他采用相同技术进行的核桃相关研究结果比较<sup>[24-28]</sup>,云南省核桃种质资源具有较为丰富的遗传多样性。

研究对全省14个区域核桃种质资源遗传多样性参数进行比较分析,结果显示14个区域的核桃种质资源遗传多样性分布由高至低依次为迪庆、怒江、昭通、曲靖、红河、玉溪、昆明、文山、大理、丽江、保山、楚雄、普洱、临沧。

一个物种遗传多样性的高低与这个物种的生活 史特征和生态特征密切相关[29],繁育系统、遗传漂 变、基因突变和基因流等内部因素;环境变化、人为 干扰等外部因素也很大程度地影响遗传多样性水平 及分布格局[30]。本研究中的深纹核桃是我国的特 有种,但在我国西南地区分布范围相对较广,云南 全省 127 个县(市)、海拔 850~2900 m 范围皆有分 布。此外,研究区域复杂的地形地貌和多样气候环 境、核桃特有的繁育系统(同株异花、雌雄异熟的风 媒传粉)、长期的自然演变和相互授粉,导致核桃群 体高度杂合而产生较为丰富的遗传多样性。但是另 一方面,核桃的风媒传粉受到地理距离的隔离,以及 土地用涂的改变等导致生境的片段化,又会使得多 样性降低。综合因素作用的结果导致本研究中的 核桃种质资源遗传多样性水平及结构特征。了解 一个树种在其分布区的遗传多样性及分布状况对 于基因保存和优树选择非常重要[31],可以为资源的 科学保护和有效利用提供有益的信息和科学的依 据。14个州市核桃种质资源中迪庆的遗传多样性 最高,其次是怒江,这与它们较为偏远的地理位置、

更为复杂多样的地形地貌和立体气候、较多的样品数量(尤其是野生资源)、较广的分布范围以及相对较少的人为影响相关,这些资源中蕴藏着珍稀和宝贵的遗传信息,在遗传资源保存和选育时应加以注重。

0.0515

#### 3.2 云南省核桃种质资源的核心种质及检验

随机取样和分层聚类取样是构建核心种质两 种主要的取样方法,但其宗旨皆是以较少的资源数 量和遗传重复包含原始种质中最大的遗传变异,而 对于取样比例, Brown [32] 认为多数植物核心种质 的取样比例为5%~10%,也有学者认为对于遗传冗 余为 0.2~0.9 的群体, 20%~30% 的取样比例比较恰 当[33]。李自超等[34]则认为核心种质的取样比例 应该根据具体的物种及其原种质大小和多样性丰 度来决定,原种质越大取样比例越小,遗传多样性 丰度越高取样比例越大,反之亦然。本研究基于19 对 SSR 引物的扩增数据及遗传多样性分析结果, 采用最小距离逐步聚类取样的方法,初步构建了规 模为原种质 10.84%(样本数 115份)的核心种质, 构建的核心种质符合 Brown<sup>[32]</sup>提出的原始样本的 5%~10% 所构成的核心种质代表 70% 以上的遗传 变异的标准,经检验核心种质可以很好地代表原始 种质的遗传多样性。

#### 参考文献

- [1] Frankel O H. Genetic perspectives of germplasm conservation//
  Arber W, Illmensee K, Peacock W J, Starlinger P. Genetic
  manipulation: Impact on man and society. Cambridge, UK:
  Cambridge University Press, 1984: 161-170
- Frankel O H, Brown A H D. Plant genetic resources today: A critical appraisal//Holdon J H W. Crop genetic resources: conservation and evaluation. London: George Allen and Unwin Press, 1984: 249 -257
- [3] Brown A H D. The case for core collection// Brown A H D, Frankel O H, Marshall D R, Williams J T: The use of plant genetic resources. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 1989: 136-156

- [4] 魏志刚,高玉池,刘桂丰,刘关君,杨传平. 白桦核心种质初步构建. 林业科学, 2009, 45(10): 74-80 Wei Z G, Gao Y C, Liu G F, Liu G J, Yang C P. Preliminary construction of core collection of *Betula platyphylla* germplasm. Scientia Silvae Sinicae, 2009, 45(10): 74-80
- [5] 张春雨,陈学森,张艳敏,苑兆和,刘遵春,王延龄,林群.采用分子标记构建新疆野苹果核心种质的方法.中国农业科学,2009,42(2):597-604
  Zhang C Y, Chen X S, Zhang Y M, Yuan Z H, Liu Z C, Wang Y L, Lin Q. A method for constructing core collection of *Malus sieversii* using molecular markers. Scientia Agricultura Sinica,2009,42(2):597-604
- [6] 张维瑞,袁王俊,尚富德. 基于 AFLP 分子标记的桂花品种核心种质的构建. 西北植物学报, 2012, 32(7): 1349-1354
  Zhang W R, Yuan W J, Shang F D. Development of core collection of *Osmanthus fragrants* Lour. cultivars based on AFLP molecular markers. Acta Botanica Boreali—Occidentalia Sinica, 2012, 32(7): 1349-1354
- [7] 李秀兰, 贾继文, 王军辉, 麻文俊, 马建伟, 赵秀玲. 灰楸形态 多态性分析及核心种质初步构建. 植物遗传资源学报, 2013, 14(2): 243-248 Li X L, Jia J W, Wang J H, Ma W J, Ma J W, Zhao X L. Morphological diversity analysis and preliminary construction of core collection of *Catalpa fargesii Bureau*. Journal of Plant Genetic Resources, 2013, 14(2): 243-248
- [8] 曾宪君,李丹,胡彦鹏,黄秦军,苏晓华. 欧洲黑杨优质核心种质库的初步建立. 林业科学, 2014, 50(9): 51-58

  Zeng X J, Li D, Hu Y P, Huang Q J, Su X H. A preliminary study on construction of high-quality core collection of *Populus nigra*. Scientia Silvae Sinicae, 2014, 50(9): 51-58
- [9] 鲁敏,鄢秀芹,白静,张怀山,王道平,安华明. 基于 EST-SSR 标记与果实品质性状的贵州野生刺梨核心种质构建. 园艺学报,2017,44(8):1486-1495
  Lu M, Yan X Q, Bai J, Zhang H S, Wang D P, An H M. Construction of core collection in wild *Rosa roxburghii* from Guizhou province using EST-SSR markers and fruits quality traits. Acta Horticulturae Sinica, 2017, 44(8): 1486-1495
- [10] 段帆,张欢,李珊,田忠琼,甘小洪. 利用 ISSR 分子标记构建 濒危植物水青树核心种质. 亚热带植物科学,2018,47(2): 101-106

  Duan F, Zhang H, Li S, Tian Z Q, Gan X H. Core collection construction of endangered plant *Tetracentron sinense* based on ISSR molecular marker. Subtropical Plant Science, 2018 47 (2): 101-106
- [11] 袁海涛,董玉芝,王肇延. 用最小距离逐步取样法构建野核桃核心种质. 浙江农业科学, 2012 (7): 972-974

  Yuan H T, Dong Y Z, Wang Z Y. Core collection construction of *Juglans regia* using least distance stepwise sampling method.

  Journal of Zhejiang Agricultural Science, 2012, (7): 972-974
- [12] 王红霞,赵书岗,高仪,玄立春,张志华. 基于 AFLP 分子标记的核桃核心种质的构建. 中国农业科学, 2013, 46(23): 4985-4995
  Wang H X, Zhao S G, Gao Y, Xuan L C, Zhang Z H. A Construction of the core-collection of *Juglans regia* L. based on AFLP molecular markers. Acta Horticulturae Sinica, 2013, 46
- [13] 杨汉波,张蕊,王帮顺,徐肇友,周志春.基于SSR标记的木

(23): 4985-4995

- 荷核心种质构建. 林业科学, 2017, 53(6): 37-45 Yang H B, Zhang R, Wang B S, Xu Z Y, Zhou Z C. Construction of core collection of *Schima superba* based on ssr molecular markers. Scientia Silvae Sinicae, 2017, 53(6): 37-45
- [14] 陆斌. 云南核桃的特性与品质. 经济林研究, 2009, 27(2): 137-140

  Lu B. Characteristics and quality of *Juglans sigillata*. Nonwood Forest Research, 2009, 27(2): 137-140
- [15] 张雨,董润泉,习学良.云南核桃种质资源现状及开发利用. 西北林学院学报,2004,19(2):38-40 Zhang Y, Dong R Q, Xi X L. Germplasm resource of walnut in Yunnan and its exploitation and utilization. Journal of Northwest Forestry University, 2004, 19(2):38-40
- [16] 杨恩,陈少瑜,张雨,范志远,习学良. 漾濞核桃叶片基因组DNA的两种提取方法效果比较. 西部林业科学,2005,34(4):72-75 Yang E, Chen S Y, Zhang Y, Fan Z Y, Xi X L. Comparison on effect between two methods of DNA extraction from leaves

of Juglans sigillata. Journal of West China Forestry Science,

[17] 陈少瑜, 宁德鲁, 吴涛, 肖良俊, 林红丁, 朱云凤, 贺娜, 潘莉. 泡核桃 SSR 标记开发及在遗传多样性研究中的应用. 西北 林学院学报, 2017, 32(3): 91-96 Chen S Y, Ning D L, Wu T, Xiao L J, Lin H D, Zhu Y F, He N, Pan L. Development of SSR markers in *Juglans sigillata* and its application in genetic diversity analysis, Journal of Northwest Forestry University, 2017, 32(3): 91-96

2005, 34 (4): 72-75

- [ 18 ] Chen L N, Ma Q G, 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
- [19] 肖良俊, 陈少瑜, 宁德鲁, 吴涛, 贺娜. 滇西北深纹核桃 (Juglans sigillata) 种质资源遗传多样性研究. 云南农业大学学报: 自然科学版, 2018, 33 (4): 597-604

  Xiao L J, Chen S Y, Ning D L, Wu T, He N. Study on the genetic diversity of germplasm resources of Juglans sigillata in northwest Yunnan. Journal of Yunnan Agricultural University: Natural Science, 2018, 33 (4): 597-604
- [ 20 ] Yeh F C, Yang R C, Boyle T, Ye Z H, Mao J X. POPGENE, the user-friendly shareware for population genetic analysis. Molecular Biology and Biotechnology Center, University of Alberta, Canada, 1997
- [21] Wang J C, Hu J, Xu H M. A strategy on constructing core collection by least distance stepwise sampling. Theoretical and Applied Genetics, 2007, 115 (1): 1-8
- [ 22 ] Upadhyaya H D, Ortiz R. A mini core subset for capturing diversity and promoting utilization of chickpea genetic resources in crop improvement. Theoretical and Applied Genetics, 2001, 102: 1292-1298
- [23] 刘新龙,刘洪博,马丽,李旭娟,徐超华,苏火生,应雄美,蔡青,范源洪. 利用分子标记数据逐步聚类取样构建甘蔗杂交品种核心种质库. 作物学报, 2014, 40(11): 1885-1894 Liu X L, Liu H B, Ma L, Li X J, Xu C H, Su H S, Ying X M, Cai Q, Fan Y H. Construction of sugarcane hybrids core collection by using stepwise clustering sampling approach with molecular marker data. Acta Agronomica Sinica, 2014, 40(11):

1885-1894

- [24] 王滑,郝俊民,王宝庆,裴东. 中国核桃 8 个天然居群遗传多样性分析. 林业科学, 2007, 43 (7): 120-124 Wang H, Hao J M, Wang B Q, Pei D. SSR analysis of genetic diversity of eight natural walnut populations in China. Scientia Silvae Sinieae, 2007, 43 (7): 120-124
- [25] 刘晓丽,陈学森,张美勇,陈晓流,何天明,张立杰,张春雨.普通核桃(Juglans regia)3个群体遗传结构的 SSR 分析.果树学报,2008,25(4):526-530 Liu X L, Chen X S, Zhang M Y, Chen X L, He T M, Zhang L J, Zhang C Y. Population genetic structure analysis of Juglans regia using SSR markers. Journal of Fruit Science, 2008, 25(4):526-530
- [26] 徐永杰, 韩华柏, 王滑, 陈凌娜, 马庆国, 裴东. 大巴山区核桃实生居群的坚果表型和遗传多样性. 林业科学, 2016, 52 (5): 111-118

  Xu Y J, Han H B, Wang H, Chen L N, Ma Q G, Pei D. Phenotypic and genetic diversities of nuts of walnut (Juglans regia) populations originated from seedlings in Daba
- [ 27 ] Wang H, Pei D, Gu R S, Wang B Q. Genetic diversity and structure of walnut populations in central and southwestern China revealed by microsatellite markers. Journal of the American Society for Horticultural Science, 2008, 133 ( 2 ): 197-203

Mountains. Scientia Silvae Sinicae, 2006, 52 (5): 111-118

[ 28 ] Victory E R, Glaubitz J C, Rhodes O E, Woeste K E. Genetic homogeneity in *Juglans nigra* ( Juglandaceae ) at nuclear microsatellites. American Journal of Botany, 2006, 93 (1): 118-126

- [ 29 ] Hamrick J L, Godt M J W, Sherman-Broyles S L. Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. New Forests, 1992, 6: 95-124
- [30] 文亚峰,韩文军,吴顺. 植物遗传多样性及其影响因素. 中南林业科技大学学报, 2010, 30(12): 80-87 Wen Y F, Han W J, Wu S. Plant genetic diversity and its influencing factors. Journal of Central South University of Forestry & Technology. 2010, 30(12): 80-87
- [31] 廖柏勇,王芳,陈丽君,刘明骞,欧阳昆晞,阙青敏,惠文凯,李培,陈晓阳. 基于 SRAP 分子标记的苦楝种质资源遗传多样性分析. 林业科学, 2016, 52(4): 48-58
  Liao B Y, Wang F, Chen L J, Liu M Q, Ouyang K X, Que Q M, Hui W K, Li P, Chen X Y. Genetic diversity of germplasm resources of *Melia azedarach* revealed by SRAP markers. Scientia Silvae Sinicae, 2016, 52(4): 48-58
- [ 32 ] Brown A H D. Core collection: a practical approach to genetic resources management. Genome, 1989, 31 (2): 818-824
- [ 33 ] Shashidhara G, Hema M V, Koshy B, Farooki A A. Assessment of genetic diversity and identification of core collection in sandalwood germplasm using RAPDs. The Journal of Horticultural Science & Biotechnology, 2003, 78 (4): 528-536
- [34] 李自超,张洪亮,曾亚文,杨忠义,申时全,孙传清,王象坤. 云南地方稻种资源核心种质取样方案研究.中国农业科学, 2000,33(5):1-7 Li Z C, Zhang H L, Zeng Y W, Yang Z Y, Shen S Q, Sun C Q, Wang X K. Study on sampling schemes of core collection of local varieties of rice in Yunnan, China. Scientia Agricultura Sinica, 2000,33(5):1-7