

美国山核桃种质资源遗传多样性 ISSR 分析

李 晖¹, 张 瑞¹, 彭方仁^{1*}, 李永荣², 翟 敏²

(1. 南京林业大学林学院, 江苏 南京 210037; 2. 南京绿宙薄壳山核桃科技有限公司, 江苏 南京 210014)

摘要:以 161 个美国山核桃品种及株系、1 个核桃品种和 1 个山核桃品种为试材, 利用 ISSR 分子标记技术对其进行遗传多样性分析。结果表明: 14 条 ISSR 引物在供试品种中共扩增出 56 条谱带, 其中 55 条为多态性条带, 多态性指数达 98%; 供试品种的基因多样性指数为 0.366 8, Shannon 多态性信息指数为 0.542 8; 品种间相似系数范围为 0.29~0.94, 平均为 0.649 6, 表明这些美国山核桃种质资源间的亲缘关系较近。供试品种(单株)的遗传背景比较复杂, 根据聚类分析可将这些品种(株系)划分为 9 个类群。

关键词:薄壳山核桃; ISSR; 遗传多样性

中图分类号: S722

文献标志码: A

文章编号: 1000-2006(2015)04-0007-06

Genetic diversity and identification of pecan by ISSR markers

LI Hui¹, ZHANG Rui¹, PENG Fangren^{1*}, LI Yongrong², ZHAI Min²

(1. College of Forestry, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China; 2. Nanjing Green Universe Pecan Science & Technology Co., Ltd., Nanjing 210014, China)

Abstract: In this study, ISSR markers were used to evaluate the genetic diversity of 161 pecan cultivars and individuals, one walnut cultivar and one *Carya cathayensis* cultivars. A total of 56 bands were yielded by 14 ISSR primers, and 55 were amplified bands (98% polymorphic). Nei's gene diversity H_e and Shannon's information index I were 0.366 8 and 0.542 8, respectively. The Nei's genetic similarity coefficients ranged from 0.29 to 0.94, and the average was 0.649 6, which showed close genetic relationships. According to the results of cluster analysis, the 163 accessions could be divided into 9 groups, which showed that the genetic background was very complex.

Keywords: *Carya illinoensis*; ISSR; genetic diversity

美国山核桃 (*Carya illinoensis*) 为胡桃科山核桃属植物, 是集果用、材用、油用、绿化于一体的多功能经济树种。我国引种美国山核桃已有 100 多年历史, 从美国引进并保存的山核桃品种 100 余个, 但目前普遍存在品种混乱、配置技术不成熟等问题。此外, 国内品种主要采用表型选择, 大果型品种多为 'Mahan' 的实生变异, 遗传基础较窄^[1-4]。相较于国外的栽培情况, 品种资源的优势和潜力未能得到体现, 还有待进一步挖掘。Conner 等^[5]和张日清等^[6-7]采用 RAPD 标记技术分别对 43 个美国山核桃品种和 9 个美国山核桃栽培群体 45 个单株的种子进行了群体结构分析。Grauke 等^[8]利用 19 个 SSR 标记对 49 个美国山核桃品种进行了鉴定和遗传多样性评估。而针对大批量美

国山核桃品种以及国内品种资源进行分子标记的研究尚未见报道。笔者通过利用 ISSR 分子标记技术对 161 个美国山核桃品种及株系、1 个核桃 (*Juglans regia*) 品种、1 个山核桃 (*Carya cathayensis*) 品种进行遗传分析, 旨在明确美国山核桃品种间的遗传关系, 更全面、系统地在分子水平上揭示整个基因组的遗传变异和遗传多样性, 为美国山核桃品种鉴定和杂交育种提供理论参考。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

试验材料为来源于江苏省南京绿宙薄壳山核桃科技有限公司收集的 161 个美国山核桃品种及株系(其中包括 50 个美国引进品种、27 个国内选

收稿日期: 2014-04-21

修回日期: 2015-02-21

基金项目: 国家林业公益性行业科研专项项目(201304711); 江苏高校优势学科建设工程资助项目(PAPD)

第一作者: 李晖, 硕士。* 通信作者: 彭方仁, 教授。E-mail: frpeng@njfu.edu.cn。

引文格式: 李晖, 张瑞, 彭方仁, 等. 美国山核桃种质资源遗传多样性 ISSR 分析[J]. 南京林业大学学报: 自然科学版, 2015, 39(4): 7

育品种及84个公司初选的优良株系)、1个核桃(*Juglans regia*)品种、1个山核桃(*Carya cathayensis*)品种(表1)。以美国山核桃幼叶作为

提取基因组DNA的供试材料,于2012年5月1日采集,置于密封袋中,做好标记,用冰盒带回实验室,存放于-70℃冰箱内备用。

表1 试验用美国山核桃种质资源信息

Table 1 Details of accessions of *Carya illinoensis* Koch used for this experiment

序号 No.	品种名称 cultivar name	引种地 origin	序号 No.	品种名称 cultivar name	引种地 origin	序号 No.	品种名称 cultivar name	引种地 origin
1	'Pawnee'	美国	56	'建德35'	浙江建德	111	'灵东1-3'	江苏南京
2	'Mahan'	美国	57	'建德63'	浙江建德	112	'灵东1-7'	江苏南京
3	'金华'	浙江金华	58	'建德64'	浙江建德	113	'亚林23'	浙江
4	'绍兴'	浙江绍兴	59	'建德100'	浙江建德	114	'博东5'	江苏南京
5	'Shoshoni'	美国	60	'I西1'	江苏南京	115	'吴实2'	江苏
6	'Cheyenne'	美国	61	'I西2'	江苏南京	116	'吴实3'	江苏
7	'Elliott'	美国	62	'I西3'	江苏南京	117	'Kiowa'	美国
8	'开普费尔'	美国	63	'I西4'	江苏南京	118	'红星'	美国
9	'福雷'	美国	64	'II西1'	江苏南京	119	'博东6'	江苏南京
10	'Wichita'	美国	65	'II西2'	江苏南京	120	'Mohawk×stark'	美国
11	'植保'	江苏南京	66	'II西11'	江苏南京	121	'James(U.D.A)'	美国
12	'Schley'	美国	67	'II东14'	江苏南京	122	'Gibson(IL)'	美国
13	'草坪'	江苏南京	68	'II东21'	江苏南京	123	'Harris Super'	美国
14	'南京148'	江苏南京	69	'III北5'	江苏南京	124	'Saubert'	美国
15	'山核桃'	浙江	70	'III北6'	江苏南京	125	'Posey'	美国
16	'Xiaocao'	河南	71	'III北12'	江苏南京	126	'钟山'	江苏南京
17	'盲1'	江苏南京	72	'III北41'	江苏南京	127	'Mohawk×stark'	美国
18	'中山25'	江苏南京	73	'III南14'	江苏南京	128	'莫愁'	江苏南京
19	'Westem'	美国	74	'III南17'	江苏南京	129	'Desirable'	美国
20	'廖西1'	江苏南京	75	'III南19'	江苏南京	130	'Cape Fear'	美国
21	'核桃'	陕西	76	'III南24'	江苏南京	131	'Forkert'	美国
22	'Tejas'	美国	77	'III南45'	江苏南京	132	'Curtis'	美国
23	'Caddo'	美国	78	'III南48'	江苏南京	133	'Osage'	美国
24	'Choctaw'	美国	79	'III南50'	江苏南京	134	'Colby'	美国
25	'高王1'	江苏	80	'IV13'	江苏南京	135	'Moreland'	美国
26	'吴半前'	江苏南京	81	'IV东17'	江苏南京	136	'Sumner'	美国
27	'仇1'	江苏	82	'IV西28'	江苏南京	137	'Melrose'	美国
28	'仇2'	江苏	83	'V东3'	江苏南京	138	'Jackson'	美国
29	'仇13'	江苏	84	'V东4'	江苏南京	139	'Mississippi10'	美国
30	'仇16'	江苏	85	'V东12'	江苏南京	140	'Prilop'	美国
31	'物1'	江苏南京	86	'V西5'	江苏南京	141	'Wallops'	美国
32	'物2'	江苏南京	87	'V西17'	江苏南京	142	'Witte'	美国
33	'物3'	江苏南京	88	'V西18'	江苏南京	143	'Oconee'	美国
34	'物9'	江苏南京	89	'V西45'	江苏南京	144	'Baker'	美国
35	'物10'	江苏南京	90	'VI3'	江苏南京	145	'Lucas'	美国
36	'物11'	江苏南京	91	'VII9'	江苏南京	146	'Canton(MO)'	美国
37	'物13'	江苏南京	92	'VIII-5'	江苏南京	147	'Chickasaw'	美国
38	'物14'	江苏南京	93	'N501'	江苏南京	148	'Islanal'	美国
39	'物15'	江苏南京	94	'N502'	江苏南京	149	'Stuart'	美国
40	'鲁1'	山东	95	'N702'	江苏南京	150	'Success'	美国
41	'鲁2'	山东	96	'N703'	江苏南京	151	'Cao 2'	美国
42	'鲁3'	山东	97	'N704'	江苏南京	152	'Dacao'	美国
43	'鲁4'	山东	98	'S204'	江苏南京	153	'Ovata'	美国
44	'鲁5'	山东	99	'S301'	江苏南京	154	'Gloria Grande'	美国
45	'鲁10'	山东	100	'S303'	江苏南京	155	'Sioux'	美国
46	'水塔2'	江苏南京	101	'S306'	江苏南京	156	'灵东4-12'	江苏南京
47	'水塔6'	江苏南京	102	'S401'	江苏南京	157	'Farley'	美国
48	'水塔13'	江苏南京	103	'S408'	江苏南京	158	'中山18'	江苏南京
49	'建德1'	浙江建德	104	'兰北1'	江苏南京	159	'灵东1-10'	江苏南京
50	'建德2'	浙江建德	105	'董3'	山东	160	'中山19'	江苏南京
51	'建德3'	浙江建德	106	'董6'	山东	161	'吴办1'	江苏南京
52	'建德6'	浙江建德	107	'晋城10'	山西	162	'中山26'	江苏南京
53	'建德25'	浙江建德	108	'晋城14'	山西	163	'VIB'	江苏南京
54	'建德28'	浙江建德	109	'晋城15'	山西			
55	'建德30'	浙江建德	110	'晋城17'	山西			

1.2 总 DNA 的提取与检测

以佟兆国等^[9]改良 CTAB 法为基础,提取美国山核桃叶片基因组 DNA。DNA 提取与纯化后,用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳对 DNA 浓度和纯度进行初步检测,再用蛋白核酸测定仪进行定量检测,并将 DNA 稀释到约 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 备用。

1.3 ISSR-PCR 体系的建立与优化

ISSR 标记所用引物选自加拿大哥伦比亚大学 (UBC) 所设计的 100 个随机引物,选取 1 个 DNA 模版对 100 个 ISSR 引物进行 PCR 扩增,筛选能扩增出多态性条带的引物,再另外选取 2 个地域距离相对较远的模版 DNA 对初次筛出的引物进行复筛,最终筛选出 14 条扩增条带多、信号强且稳定性高的引物用于 PCR 扩增,所筛选出的引物由南京金斯特科技有限公司合成。PCR 扩增总体积为 25 μL ,其中 *Taq* DNA 聚合酶 0.625 U, dNTP (含 Mg^{2+}) 0.4 mmol/L,引物 0.8 $\mu\text{mol}/\text{L}$,模版 DNA 40 ng,不足部分用 ddH₂O 补足。PCR 扩增程序采用 Touch-Down PCR: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 45 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 30 个循环, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。PCR 产物使用 1.5% 的琼脂糖凝胶 (含 EB) 于 140 V 恒定电压下电泳,电泳结果用自动凝胶成像系统拍照分析。ISSR-PCR 扩增

反应在美国伯乐公司 My Cycle PCR 扩增仪上进行。

1.4 数据处理

将筛选出的引物所扩增的 ISSR-PCR 产物用琼脂糖凝胶电泳分离,所得的电泳图谱中的每个条带均视为一个引物的结合位点。选用清晰、重复性好的条带进行分析,用人工读带法,按条带的有或无分别赋值,扩增条带有记为 1,无记为 0。

2 结果与分析

2.1 引物筛选及 ISSR 扩增

用筛选出的条带清晰、重复性好、多态性强的 14 条引物对 163 份供试样品进行 PCR 扩增。ISSR 引物的序列组成及多态性水平见表 2,由表 2 可知:从 163 份样品 DNA 中共扩增出 56 条谱带,其中多态性谱带 55 条,平均每个引物扩增出 4 条多态性谱带,多态性条带比例为 98%;引物 UBC825 最多,扩增出 7 条多态性条带,引物 UBC868 最少,只扩增出 2 条多态性条带;产物大小在 100~2 000 bp 之间。不同引物扩增的带数不同,且同一引物不同基因组 DNA 扩增的条带数也不一样,这充分体现了薄壳山核桃基因组 DNA 的多态性,从而说明了不同供试材料之间的遗传差异性。

表 2 筛选出的引物序列及多态性比较

Table 2 Sequences of primers and comparisons of polymorphism

引物编号 No. of primers	引物序列 (5'→3') primer sequence	多态性条带数 number of polymorphic bands	总条带数 number of total bands	多态性百分率/% percentage of polymorphic bands
UBC817	CACACACACACACACAA	4	4	100
UBC825	ACACACACACACACT	7	7	100
UBC836	AGAGAGAGAGAGAGYA	3	3	100
UBC844	CTCTCTCTCTCTCTRC	4	4	100
UBC845	CTCTCTCTCTCTCTRG	5	6	83.3
UBC846	CACACACACACACART	4	4	100
UBC847	CACACACACACACARC	4	4	100
UBC848	CACACACACACACARG	3	3	100
UBC850	GTGTGTGTGTGTGTGTYC	3	3	100
UBC854	TCTCTCTCTCTCTCRG	3	3	100
UBC856	ACACACACACACACYA	3	3	100
UBC858	TGTGTGTGTGTGTGTRT	5	5	100
UBC859	TGTGTGTGTGTGTGRC	5	5	100
UBC868	GAAGAAGAAGAAGAA	2	2	100
总计 total		55	56	98

2.2 扩增产物的多态性分析

利用物种遗传分析软件 Popgene (版本号 1.32) 对统计的 0/1 数据矩阵进行分析,计算 14 条

引物所扩增出的各个特异位点的等位基因平均数、有效等位基因数、基因多样性指数和 Shannon 多态性信息指数。结果表明:163 份供试材料的等位基

因数为 $2.000\ 0 \pm 0.000$, 有效等位基因数为 $1.643\ 5 \pm 0.312\ 3$, 基因多样性指数为 $0.366\ 8 \pm 0.134\ 4$, Shannon 多态性信息指数为 $0.542\ 8 \pm 0.160\ 2$ 。各位点遗传多样性程度存在较大差别, 基因多样性指数最大值为 $0.500\ 0$, 最小值为 $0.101\ 4$; Shannon 多态性信息指数最大为 $0.693\ 1$, 最小为 $0.116\ 4$ 。这4项指标的标准差都较小, 说明估计的精度较高, 因而 ISSR 适用于美国山核桃资料的遗传多样性分析。

2.3 163 份美国山核桃材料的聚类分析

利用 NTSYS 软件按照 UPGMA 法进行聚类分析, 从利用 ISSR 结果构建的亲缘关系树状图中可以看出, 供试品种相似系数为 $0.29 \sim 0.94$, 大部分美国山核桃材料的相似系数值集中在 $0.62 \sim 0.94$ 之间, 说明这些材料间的遗传相似性较大; 而相似系数最小值为 0.29 , 又说明这些材料间存在一定的差异。在薄壳山核桃 ISSR 聚类分析图(图1)中, 当相似系数为 0.586 时, 可以把供试材料分为9个类群:

类群 I 包含 141 个品种, 该类群在相似系数为 0.590 处又可分为 2 个亚群, 亚群 I-1 包括 137 个品种, 在相似系数为 0.601 处又分为 2 个组, 第 1 组包括 131 个品种, 它们在相似系数为 0.603 处又分为 2 个小组, 其中第 1 小组包括 15 个品种, 第 2 小组包括 116 个品种; 类群 II 包括 Cao 2、Gloria Grande 2 个品种; 类群 III 只包括 N703 这 1 个样本; 类群 IV 包括山核桃、核桃 2 个品种; 类群 V 包括 7 个品种 (S303、S306、S401、S408, 兰北 1、Success、Canton); 类群 VI 包括鲁系列 (鲁 3、鲁 4、鲁 5) 3 个品种; 类群 VII 包括 4 个品种; 类群 VIII 包括建德系列 (建德 1、建德 2) 2 个品种; 类群 IX 只包括 III 南 48 这 1 个品种。9 个类群之间的遗传距离如表 3 所示。

聚类分析结果表明同一系列的品种常聚为一类, 如建德系列的多数品种聚在第 2 小组内; 遗传基础相似的品种也被聚为一类, 如‘波尼’和‘马汉’的遗传距离较近; 部分地理来源相同或遗传背景相似的品种能聚在同一类群, 如从美国引进的品种多数聚在一起。78 号品种 III 南 48 形成单独的分支, 表明与其他品种的亲缘关系较远, 可能由于某些因素导致与其他品种缺乏基因交流, 从而导致遗传距离上存在较大差异。

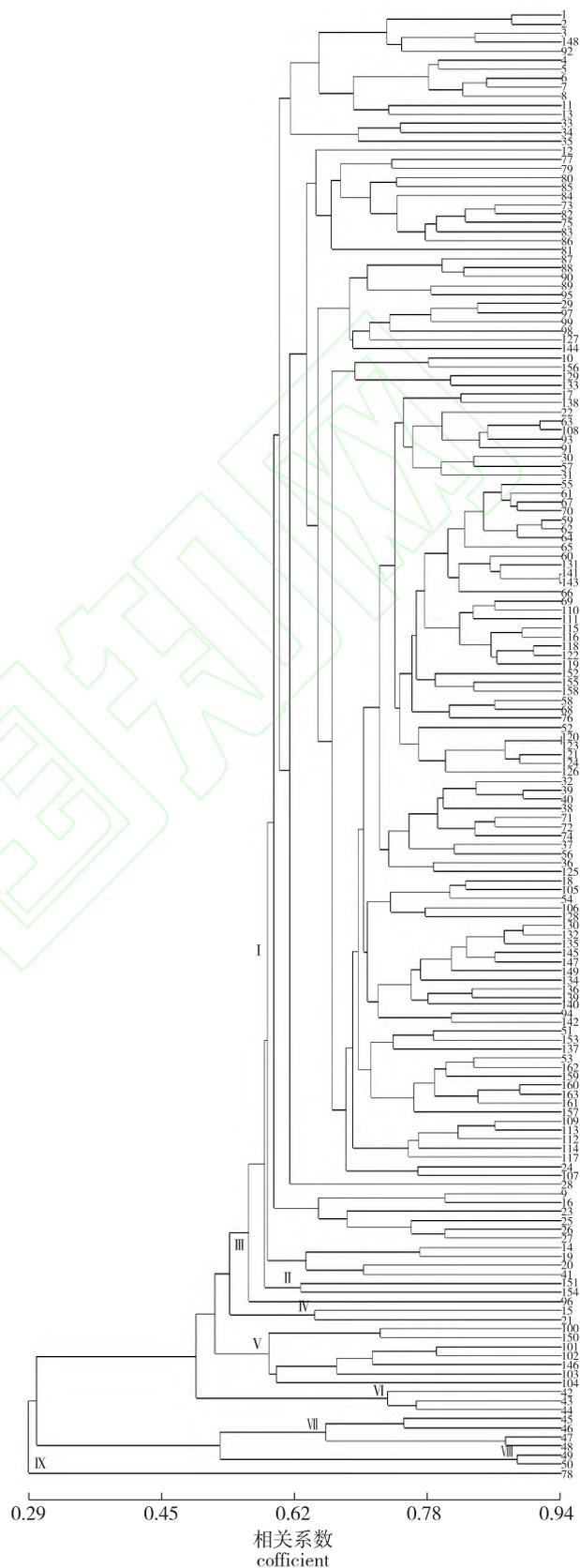


图1 薄壳山核桃种质资源的 ISSR 结果聚类分析图

Fig.1 The map of cluster analysis for *Carya illinoensis*

表 3 Nei's 遗传一致度(右上角)和类群间遗传距离(左下角)
Table 3 Nei's genetic identity (above diagonal) and genetic distance (below diagonal)

类群 popID	1	2	3	4	5	6	7	8	9
I	* * * *	0.885 2	0.790 3	0.794 7	0.923 6	0.849 4	0.878 8	0.830 1	0.806 1
II	0.122 0	* * * *	0.644 7	0.747 3	0.833 1	0.756 7	0.802 2	0.772 3	0.714 3
III	0.235 4	0.438 9	* * * *	0.666 3	0.678 6	0.703 9	0.612 7	0.542 9	0.581 8
IV	0.229 8	0.291 3	0.406 0	* * * *	0.805 2	0.691 6	0.665 3	0.658 3	0.672 6
V	0.079 5	0.182 6	0.387 8	0.216 6	* * * *	0.847 9	0.869 1	0.821 0	0.816 5
VI	0.163 2	0.278 8	0.351 1	0.368 8	0.165 0	* * * *	0.857 1	0.773 8	0.750 9
VII	0.129 2	0.220 3	0.489 9	0.407 5	0.140 3	0.154 1	* * * *	0.953 1	0.816 3
VIII	0.186 2	0.258 4	0.610 9	0.418 1	0.197 3	0.256 4	0.048 0	* * * *	0.817 0
IX	0.215 6	0.336 4	0.541 6	0.396 5	0.202 7	0.286 5	0.203 0	0.202 2	* * * *

根据遗传距离,利用 UPGMA 法进行聚类分析,可得到 9 个类群的遗传距离树状图(图 2)。结合表 3 可以看出:9 个类群中,遗传距离最近的为类群 VII 与类群 VIII,说明鲁 10 及水塔系列的水塔 2、6、13 与建德系列的建德 1、2 亲缘关系较近;遗传距离最远的为类群 III 与类群 VIII,说明这两个类群内品种间亲缘关系较远。

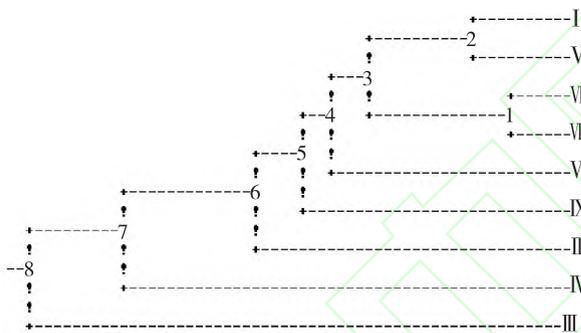


图 2 9 个类群的 UPGMA 聚类分析图

Fig.2 The map of genetic distance analysis for different populations

3 讨 论

分子标记技术已广泛地应用于植物种群的遗传多样性分析^[10-13]。此次研究利用 ISSR 分子标记技术,用 14 条引物对 163 个供试品种进行扩增,所得到的多态性比率为 98%,Shannon 信息指数为 0.542 8,表明扩增位点的多态性水平较高,这与施娟娟等^[14]研究结果相近,明显高于刘广勤等^[15]和 Jia 等^[16]的研究结果。遗传多样性分析结果显示 163 份供试品种的基因多样性指数为 0.366 8,其遗传多样性水平较低,这与 Grauke 等^[8]、刘晓丽等^[17]利用分子技术对美国山核桃品种进行研究,得出其遗传基础较窄的结果一致。这可能是由于从国外引进的美国山核桃品种大多由美国农业部的德克萨斯州试验点提供,来源较为单一,且国内

优选品种大多为国外品种的实生变异,因而遗传多样性相对较低^[1]。然而,小部分我国优选的品种如 S 系列(S303、S306、S401、S408)、鲁系列(鲁 3、鲁 4、鲁 5)和建德系列(建德 1、建德 2)等品种,具有较高的遗传多样性,遗传变异丰富,遗传基础较宽,这与张日清等^[7]运用 RAPD 标记技术对美国山核桃群体遗传多样性进行分析,发现我国的群体遗传差异大于原产地美国的群体遗传差异的结果相似。因此,利用我国特有的美国山核桃种质资源,与美国引种的种质资源相结合,对于开展美国山核桃杂交育种,加快新品种培育进程是十分有利的。

美国山核桃目前在我国的分布范围以江苏、浙江、云南较为集中。云南大理,江西南昌,浙江建德、富阳,河南洛宁、郑州,江苏南京、溧水,山东聊城等地,已有局部规模性发展^[2]。聚类图显示,163 个供试品种株系可分为 9 个大类群。其中类群 I 最多,其他 8 个类群较少,且各类群与类群 I 的遗传距离都较近,类群 III 最远为 0.235 4,类群 II 最近为 0.122 0。部分地理来源相同的品种聚在同一类群,如 III 系列和建德系列的大部分品种均聚合在一起。此外,类群 IV 中的核桃和山核桃虽为不同属植物,但两者在相似系数为 0.641 处聚为同一类群,且未与美国山核桃品种聚在一起,刘晓丽等^[17]认为这两大栽培类型通过基因水平上的不断交流,遗传距离可能在逐步缩小。

多数美国品种的相似系数值在 0.57~0.94 之间,分布相对集中,与 Grauke 等^[8]利用 SSR 分子标记分析美国山核桃亲缘关系的研究结果相似。这可能是由于美国山核桃大部分品种由杂交育种而得,而育种人员多倾向于选育综合性状优良的材料,因而亲本相对集中。如‘施莱’作为‘马汉’和‘马罕开普费尔’的亲本,‘施莱’与‘开普费尔’、‘施莱’与‘开普费尔’、‘马汉’与‘施莱’的相似系

数分别为0.67、0.72、0.57,3个品种的遗传距离较近,与Jia等^[16]研究结果一致。Conner等^[5]认为引起基因遗传变异的原因与地理距离、生境条件、栽培管理强度和苗木繁殖方式等有较大关系。部分我国优选的品种和美国引进的品种亲缘关系很近,如‘钟山’、‘莫愁’等是我国历史上选育的品种,而‘施莱’、‘威奇塔’等是从美国引进的品种,这两类同被聚在类群I亚群I-1第1组第2小组中;‘南京148’和‘福雷’相似系数为0.48,被聚类在一起。这可能是由于国外品种引进以后,受到当地气候条件和种植方式的影响,不断引种驯化和人工选育使美国山核桃品种间不断异交而呈现出较近的亲缘关系^[5];另一方面也可能是引进过程中由于人为原因,将品种名称自行音译而出现同物异名、同名异物的现象,从而造成遗传距离较近。该研究所取材料均来自于人工建立的群体,而非天然群体,因此繁殖方式、人工干预强度可能成为影响其遗传分化程度的因素^[5]。分子标记作为传统分类方法的补充,可以减少环境条件和形态描述产生的误差,为进一步选择优良品种奠定基础^[18]。

综上,由美国引进和我国选育的美国山核桃品种遗传多样性水平较低,遗传基础较窄。应充分利用我国特有的美国山核桃种质资源,通过杂交等遗传方法聚合有利基因,尽量扩大育种材料的遗传基础。

参考文献(References):

[1] 彭方仁,李永荣,梁有旺,等.我国薄壳山核桃生产现状与产业化发展策略[J].林业科技开发,2012,4(1):1-4.
Peng F R, Li Y R, Liang Y W, et al. Production status and industrialization development strategy of *Carya illinoensis* in China [J]. China Forestry Science and Technology, 2012, 4(1): 1-4.

[2] 董凤祥,王贵禧.美国薄壳山核桃引种及栽培技术[M].北京:金盾出版社,2003.
Dong F X, Wang G X. Pecan introduction and cultivation techniques [M]. Beijing: Jindun Publishing House, 2003.

[3] 吴国良,张凌云,潘秋红,等.美国山核桃及其品种研究性状的[J].果树学报,2003,20(5):404-409.
Wu G L, Zhang L Y, Pan Q H, et al. Advances in study of pecan and its cultivar's characteristics [J]. Journal of Fruit Science, 2003, 20(5): 404-409.

[4] 张日清,李江,吕芳德,等.我国引种美国山核桃历程及资源现状研究[J].经济林研究,2003,21(4):107-109.
Zhang R Q, Li J, Lv F D, et al. Historical survey of the introduced pecan tree in China: Distribution and resource estimate [J]. Economic Forest Researches, 2003, 21(4): 107-109.

[5] Conner P J, Wood B W. Identification of pecan cultivars and their genetic relatedness as determined by randomly amplified polymorphic DNA analysis [J]. J Amer Soc Hort Sci, 2001, 126: 474-480.

[6] 张日清,何方,吕芳德,等.美国山核桃群体遗传多样性的RAPD分析[J].经济林研究,2001,19(2):1-6.
Zhang R Q, He F, Lv F D, et al. Population genetic analysis by randomly amplified polymorphic DNA markers in pecan [J]. Eco-

nomical Forest Researches, 2001, 19(2): 1-6.

[7] 张日清,吕德芳,谭晓风,等.美国山核桃主要栽培样品的RAPD鉴定[J].经济林研究,2004,22(4):1-5.
Zhang R Q, Lv F D, Tan X F, et al. Identification of main varieties of American hickory by RAPD [J]. Economic Forest Researches, 2004, 22(4): 1-5.

[8] Grauke L J, Iqbal M J, Reddy A S, et al. Developing microsatellite DNA markers in pecan [J]. J Amer Soc Hort Sci, 2003, 128(3): 374-380.

[9] 佟兆国,王富荣,章镇,等.一种从果树成熟叶片提取DNA的方法[J].果树学报,2008,25(1):122-125.
Tong Z G, Wang F R, Zhang Z, et al. A method for DNA extraction from mature leaves of fruit trees [J]. Journal of Fruit Science, 2008, 25(1): 122-125.

[10] 于小玉,喻方圆,刘建兵,等. ISSR在油茶品种鉴别和遗传多样性分析中的应用[J].南京林业大学学报:自然科学版,2013,37(1):61-66.
Yu X Y, Yu F Y, Liu J B, et al. Identification and genetic diversity analysis of *Camellia oleifera* varieties using ISSR marker [J]. Journal of Nanjing Forestry University: Natural Sciences Edition, 2013, 37(1): 61-66.

[11] 彭方仁,吴莺莺,郝明灼,等.利用ISSR和SRAP标记分析油茶遗传多样性[J].南京林业大学学报:自然科学版,2012,36(5):19-25.
Peng F R, Wu Y Y, Hao M Z, et al. Genetic diversity of *Camellia oleifera* using ISSR and SRAP markers [J]. Journal of Nanjing Forestry University: Natural Sciences Edition, 2012, 36(5): 19-25.

[12] 马红勃,祁建民,李延坤,等.烟草SRAP和ISSR分子遗传连锁图谱构建[J].作物学报,2008,34(11):1958-1963.
Ma H B, Qi J M, Li Y K, et al. Construction of a molecular genetic linkage map of tobacco based on SRAP and ISSR markers [J]. Acta Agronomica Sinica, 2008, 34(11): 1958-1963.

[13] 张晨东,杨志新,张聪,等.44份香料烟品种ISSR遗传多样性分析[J].热带作物学报,2012,33(12):2144-2149.
Zhang C D, Yang Z X, Zhang C, et al. ISSR analysis of genetic diversity for 44 oriental tobacco cultivars [J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2012, 33(12): 2144-2149.

[14] 施娟娟,叶生月,俞世群,等.37个新引进的薄壳山核桃品种遗传多样性SSR分析[J].安徽农业大学学报,2013,40(1):42-46.
Shi J J, Ye S Y, Yu S Q, et al. SSR analysis of genetic diversity of the 37 new pecan cultivars [J]. Journal of Anhui Agricultural University, 2013, 40(1): 42-46.

[15] 刘广勤,王鹏良,周蓓蓓,等.薄壳山核桃SRAP标记体系的优化和遗传多样性分析[J].江苏农业学报,2010,26(5):1037-1042.
Liu G Q, Wang P L, Zhou B B, et al. Optimization of SRAP marker reaction system and genetic diversity for *Carya illinoensis* Koch [J]. Jiangsu Journal of Agricultural Sciences, 2010, 26(5): 1037-1042.

[16] Jia X D, Wang T, Zhai M, et al. Genetic diversity and identification of Chinese-Grown pecan using ISSR and SSR markers [J]. Molecules, 2011, 16(12): 10078-10092.

[17] 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.

[18] 肖志娟,翟梅枝,许静,等.不同核桃品种的ISSR标记分析[J].北方园艺,2013(4):103-107.
Xiao Z J, Zhai M Z, Xu J, et al. Analysis of different Walnut Varieties by ISSR Marker [J]. Northern Horticulture, 2013(4): 103-107.