

核桃遗传改良及种质评价的分子标记研究进展

刘 岩, 辛培尧, 许玉兰, 何承忠, 段安安, 周 军

(西南林学院 西南山地森林保育与利用省部共建教育部重点实验室, 云南 昆明 650224)

摘 要: 分子标记技术应用于核桃的遗传改良及种质资源评价, 可快速而准确地获得其相关遗传信息。现对 RAPD、AFLP 及 ISSR 等分子标记在核桃上的应用进行了概述, 继而在此基础上探讨了存在的问题并提出建议。

关键词: 核桃; 遗传改良; 种质资源; 分子标记; 进展; 问题及建议

中图分类号: S 664.1 **文章标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)14-0213-05

核桃(*Juglans regia* L.)为胡桃科(Juglandaceae)核桃属(*Juglans*)坚果和木本油料树种^[1], 原为中国古老的栽培植物之一, 又名胡桃。核桃在我国 24 个省区都有广泛的栽培和分布, 其面积和产量均居世界首位^[2]。核桃种仁营养丰富, 含有多种植物脂肪、蛋白质、不饱和脂肪酸、碳水化合物以及磷、钙、铁、钾等矿物元素和 VB、VC 与 VE, 是世界传统的坚果食品。核桃在长期的栽培过程中表现出了很多特有的优良性状, 如早实性、孤雌生殖以及物种的多样性等。核桃的早实性研究对于核桃品种改良以及实现高产高效有重要意义^[3-6]。核桃种类繁多, 种植广泛, 同名异种亲缘关系区分混乱的现象普遍, 解决上述问题可以借助孢粉学^[7]、形态学^[8]、同工酶^[9]、核型分析^[10-11]、等位酶基因型指纹^[12]等方法, 采用分子标记技术对核桃进行识别及其亲缘关系探讨, 可以为其在种间分类的研究上提供依据。

在现代生物技术快速发展的今天, 分子标记技术也得到了突飞猛进的发展, 至今已产生了几十种分子标记技术, 这些技术被广泛应用到植物的遗传育种、基因组作图、基因定位、植物亲缘关系鉴别、基因库构建以及基因克隆等各个研究领域^[13]。分子标记技术具有快速、方便、直观、成本低等特点, 可应用于核桃品种的鉴别及指纹图谱的构建。从而控制和实现核桃的早实性以及研究核桃花芽分化^[4]等问题。采用分子标记技术对核桃进行识别及其亲缘关系探讨, 可为其提供种间分类研究

的理论依据。

1 分子标记技术

1.1 RAPD

随机扩增多态性 DNA (Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD) 是 20 世纪 90 年代发展起来的一种分子标记技术, 简单、快速、易行, 通常用于寻找 2 组 DNA 样品间的多态性差异^[14-15]。RAPD 技术多应用于各种农作物如蔬菜和粮食作物的特异基因的标记及遗传转化^[16-18], 而在木本植物上的应用相对较少, 主要集中在各种果树如核桃、板栗、桃等上^[19-21]。

1.2 RFLP

限制性片段长度多态性 (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP), 这种多态性是由于限制性内切酶酶切获得 DNA 片段大小的变异引起的。RFLP 是最早产生并发展的以分子杂交为基础的 DNA 标记技术。RFLP 标记具有共显性、信息完整、重复性和稳定性好等优点^[22]。由于上述优点, RFLP 技术曾被广泛的应用于各种农作物如水稻、小麦、玉米等的遗传图谱构建。

1.3 AFLP

扩增片段长度多态性 (Amplified Fragment Length Polymorphism, AFLP) 是最早由荷兰 Keygene 公司科学家 Zabeau 和 Vos^[23]发明的一种 DNA 分子标记技术, 是在 RFLP 和 RAPD 的基础上发展起来的, 兼具 RFLP 的可靠性和 RAPD 的简便性。AFLP 技术广泛应用于植物分类、图谱构建、基因分离、品种鉴定、系统发育、分子标记辅助选择育种等多个方面。

1.4 SSR 与 ISSR

简单重复序列 (Simple sequence repeats, SSR) 是由 1~6 个碱基为重复单元的串联重复序列, 在大多数真核生物基因组中均有广泛分布^[24]。ISSR (Inter-simple sequence repeat) 是由 SSR 发展起来的一种新的分子标记

第一作者简介: 刘岩(1985-), 男, 云南楚雄人, 硕士, 研究方向为林木遗传育种。

通讯作者: 周军(1962-), 男, 硕士, 教授, 现从事果树基因工程方面教学和研究工作。E-mail: houjunbo@163.com。

基金项目: 西南林学院云南省重点学科森林培育学资助项目(XKZ200906); 西南林学院校级重点建设学科林木遗传育种资助项目(XKX200904); 西南林学院面上基金资助项目。

收稿日期: 2010-04-05

属于微卫星标记^[25]。ISSR引物是利用SSR重复序列在5'或3'末端加上2~4个随机选择但是通常是简并的核苷酸作为引物,对传统意义上的SSR之间的DNA序列进行PCR扩增^[26]。ISSR在发现基因多态性方面非常有用,其不需要预先获知序列,又克服了RFLP技术的局限性和RAPD技术的假阳性,所以ISSR分子标记被看成是一种较新的基因标记技术。ISSR多为显性标记,不能区分一个位点扩增的DNA片段,在引物的筛选上具有随机性,并且对循环扩增退火温度的掌握要求严格。

2 分子标记技术在核桃研究中的应用

2.1 核桃DNA提取方法的研究

核桃的分子标记技术中DNA提取质量的差异直接影响到试验的成功与否。核桃为多年生果树,由于采样时间较晚等原因,其体内酚类、多糖等次生物质含量较高,对其核酸的提取造成了很大的障碍。目前,核桃DNA提取中主要应用的方法有常规CTAB法和改进CTAB法^[27-29]。

与常规的CTAB法相比,采用改良的CTAB法提取的核桃全基因组DNA质量及纯度均较高^[30-32]。常规CTAB法得到的DNA中含有些许棕色物质,张虎平等^[33]利用常规CTAB提取法,采取树冠外围上方叶片做为试验材料,所提取的DNA中仍含有杂质,进一步研究还发现用氯仿、苯酚和乙醇很难将其溶解去除,且多糖污染DNA造成胶状物总是聚集于点样孔,形成亮带。而改进的CTAB法提取DNA,不论新叶老叶,均可获得高纯度的DNA,可以有效降低多糖和酚类物质对DNA提取液的污染。张虎平等^[33]、樊靖等^[28]在研究中均采用核桃幼嫩叶片做为试验材料,发现利用氯化钠等高浓度盐可以去除核桃叶片DNA中的多糖等次生物质,在研磨前加入PVP与 β -巯基乙醇配合使用,可以助研和有效地阻止酚类物质的氧化,在细胞核裂解前采用低速离心可以有效的将细胞核与酚类物质、多糖分离;另外,王国安等^[34]利用核桃树冠外围上方叶片DNA建立RAPD-PCR反应体系,其研究结果表明,采用过分简化的DNA提取技术,可能影响到DNA的提取质量,从而导致扩增失败,不能使分子标记产生有效的扩增结果。

2.2 RAPD分子标记技术在核桃中的应用

在核桃的RAPD标记中,RAPD技术可能并非想象的那么简单。在RAPD反应体系中各组分的浓度、DNA扩增中各步骤的温度和时间等,均会直接影响扩增效果,所以在试验过程中如何获取高纯度的基因组DNA和通过试验确定PCR的扩增条件,建立最优的PCR反应体系显得尤为重要。在PCR反应体系中, Mg^{2+} 浓度

与酶的用量是首要考虑的重要因素,不适宜的Taq酶浓度会导致出现非特异性扩增带和扩增产物量减少, Mg^{2+} 为Taq酶的激活剂,其影响酶的活性以及合成的可靠性。相关研究表明,当Taq酶为0.75 U, Mg^{2+} 浓度为3.5 mM组合时扩增背景暗,带型均匀^[33-34]。邹喻萍等^[35]、李晋涛^[36]认为模板浓度在一定的范围内并不会影响扩增条带的增减,但是会对扩增产量有影响。当模板DNA浓度为40 ng时的扩增产率高,带型均匀,结果稳定。研究还显示,在反应缓冲液中加入小牛血清蛋白(BSA)4 μ g时有助于酶活力的稳定^[34]。而杨恩等^[37]以漾濞核桃与三台核桃叶片为试验材料,进行RAPD反应体系优化时发现,BSA的作用甚微,可以不用,且明显节约试验成本。

RAPD标记可以应用于核桃的种质资源鉴定,确定其亲缘关系。Orel等^[38]在对核桃与铁核桃的研究中,利用RAPD技术对其叶绿体DNA进行标记,结果表明,核桃与铁核桃之间具有非常近的亲缘关系。这个结果与前人所做的细胞学^[8]、形态学^[38]、同工酶^[39]鉴定结果相似。

核桃的早实性是一种重要的基因资源,参照近等基因系法与分群法,通过寻找与早实性相关的RAPD标记,可以进一步开展核桃早实性分子标记辅助选择(MAS)及其基因定位和基因克隆工作。张虎平等^[40]、王国安等^[41]利用RAPD技术对核桃的早实性进行分析,均成功筛选出一条710 bp的特异片段(OPG15710),分析认为这个特异片段很可能为与核桃早实性相关的RAPD标记。而杨克强等^[42]、王晓梅等^[43]、彭建营等^[44]利用混合分离群体法(Bulked segregant analysis,BSA)^[45]也获得了相关性状的分子标记。

SCAR标记是一种由RAPD技术转化过来的实用性技术,其使用常规PCR仪,简便、易行、对操作人员无特殊要求,结果稳定,重复性好^[46]。共显性的SCAR标记则综合了RAPD和RFLP二者的优点^[47-49]。有研究者利用RAPD技术对新疆核桃早实性的分子标记研究中扩增得到一条710 bp的早实核桃特异片段,之后成功根据克隆测序结果将其转化为重复性和特异性更好的SCAR标记^[50]。

可见,利用RAPD(SCAR)分子标记对核桃种质资源的遗传多样性及早实性进行研究,充分考虑RAPD对所研究问题的适宜性,认真细致优化并严格控制反应体系,可以快速获得相对准确的试验结果,为进一步开展核桃的育种工作打下坚实的基础。

2.3 AFLP分子标记技术在核桃中的应用

核桃经长期的异花授粉和自然选择,其遗传背景

比较复杂^[51]。利用 AFLP 技术对核桃的遗传多样性进行准确的评价, 可为亲本选配、后代遗传变异以及辅助选择育种提供理论指导。由于物种间的差异, 酶切连接的基因组 DNA 用量、酶切连接时间、预扩增产物稀释倍数等关键技术参数均有所不同, 所以需要通过对核桃基因组 AFLP 分析模板的制备和反应体系进行优化, 摸索出适合核桃 AFLP 的试验方案。

AFLP 分析过程中的首要步骤是酶切反应, 在二步法中内切酶和连接酶都处于最佳活性状态, 可以有效的获得连接产物^[52]。对核桃遗传多样性的研究发现, 在酶切连接过程中采用 7 h 酶切, DNA 片段呈弥散状, 酶切充分, 连接采用 16℃ 过夜效果较好, 在选择性扩增过程中, 将预扩增产物稀释 5 倍后再进行扩增比较合适, 可以获得足够的模板, 也可获得适于 AFLP 分析的电泳图谱^[53]。其次 AFLP 分子标记中的银染技术要求较高, 条件苛刻, 容易造成污染。王林等^[54]在对核桃 AFLP 银染体系的研究中提出, 在银染过程中可以采用 10% 的乙酸固定 30 min, 双蒸水漂洗 3 次, 每次 2 min, 放入染色液 (0.1% 的硝酸银 + 0.16% 的 37% 的甲醛) 染色 30 min, 双蒸水漂洗 5~10 s, 放入预冷的显色液 (3% 的 Na₂CO₃ + 0.16% 的甲醛), 全部条带都出现时在 10% 的乙酸中停显 2~3 min。目前银染是代替同位素标记的最好检测方法, 但是银染过程相对复杂, 要求水与试剂不含有离子杂质, 难度较高^[52, 54-55]。另外, AFLP 分析技术的另一个关键是基因组 DNA 是否充分酶切, DNA 的酶切完全与否直接影响 AFLP 的指纹图谱质量^[53]。

陈梁华等^[56]通过 AFLP 技术对四川核桃资源的遗传多样性进行了分析, 以四川省 3 个野生核桃 (*Juglans regia*) 种群和 1 个野生铁核桃 (*J. sigillata*) 种群共 46 个样品为试验材料, 通过试验发现核桃与铁核桃其种群间遗传分化不大, 显示 AFLP 分析可以较好地反映群体遗传结构以及群体间的遗传分化。王红霞等^[53]以辽宁 1 号、辽宁 2 号、辽宁 3 号、辽宁 6 号、辽宁 8 号为试材, 筛选出 20 对多态性高的 AFLP 引物组合, 获得了清晰的指纹图谱, 用于分析核桃的种质资源多样性。Kafkas 等^[57], Bayazit 等^[58]将 AFLP 技术应用于核桃的品种基因型鉴定、遗传结构和遗传多样性评价等方面, 并取得了一定的成果。

AFLP 体系具有准确性、高效性、实用性等特点, 建立核桃的 AFLP 体系, 可应用于核桃的图谱构建、分子标记辅助育种、品种鉴定、QTL 分析、杂种优势预测等多方面的研究。

2.4 SSR 与 ISSR 分子标记技术在核桃中的应用

ISSR 标记操作简单, 成本低, 不需要预知基因组序

列信息, 扩增产物的特异性更强, 稳定性更高, 需要建立 ISSR-PCR 反应体系, 现 PCR 反应体系和反应程序通常采用 Daniel Potter 建立的反应体系^[59]。退火温度明显影响扩增谱带式样, 由于 ISSR 引物的长短不一, T_m 值的差异也较大, 因此在特定的反应条件下, 不同的引物具有不同的退火温度, 通常引物的退火温度往往比其 T_m 值低 2~5℃^[60]。而陈少瑜^[61]在试验中发现有些引物如 ISSR16 的 T_m 值为 57℃, 但是试验表明其最佳退火温度为 48.8℃, 相差 8.2℃。

钱韦等^[62]在通过 RAPD 与 ISSR 技术分析野生稻的过程中指出, ISSR 分子标记技术应用于遗传多样性研究时比 RAPD 技术具有更多如扩增产物特异性更强和稳定性更高等优点, ISSR 标记能够获得单位引物多态位点的能力高于 RAPD。陈少瑜等^[61]以昆明树木园当年萌发的漾濞核桃新叶为试材, 通过试验建立了漾濞核桃 ISSR-PCR 反应体系。在此反应体系的基础上, 对云南省 11 个主要栽培品种进行了 ISSR 分子标记研究, 结果共检测出位点 102 个, 其中多态性位点 62 个, 建立了 11 个品种的指纹图谱^[64], 为核桃的种质资源划分, 亲缘关系确定提供了良好的依据。ISSR 分子标记技术应用于核桃品种鉴别及指纹图谱构建, 具有快速高效、可靠性强等特点, 而且可以在苗期对品种进行鉴定, 为苗木鉴定推广提供一个可靠的依据^[63]。

郝艳宾等^[65]通过 SSR 标记 17 对多态性较高的黑核桃微卫星引物成功分析了核桃属的 12 个种, 得出的结果与经典遗传分类一致, 认为 SSR 用于近缘种多态性分析时位点的等位基因数量较低, SSR 通常用于分析种间同源性。Daniel 等^[59]用 ISSR 标记分析了 48 个核桃品种的遗传关系后也提出了 ISSR 呈经典孟德尔式遗传, 在种间分析上 SSR 更具优势。郝艳宾等^[65]对核桃组中 29 份核桃 (*Juglans regia* L.) 样品、2 份铁核桃 (*J. sigillata* D.) 样品、4 份 *J. sigillata* D. × *J. regia* L. 样品进行 SSR 标记分析, 研究结果显示铁核桃与西藏核桃亲缘关系较近, 应聚为一组, 其结果与杨自湘等^[39]利用传统分类学得出的结果有出入。

在核桃样本的聚类分析中, 不同研究者选用的引物数量与多态性位点数不同, 为了获得可靠的研究结果, 通常采用较多多态位点数, 孟清照^[66]利用 SSR 对 40 个核桃样本的 66 个位点进行了分析, 指出当多态性位点增加到一定数量时, 其增加的位点对于准确性的贡献已有限。该研究还发现, 利用 SSR 标记技术分析秦巴山核桃种源关系时, 得出的结论与利用传统分类得出的结论不一致^[67]。此外, 表达序列标签 (Expressed Sequence Tags, EST) 是从随机选择的 cDNA 克隆中进行 5' 或 3'

端一次测序获得的 cDNA 序列片段, 长度一般在 300~500 bp 左右, 代表 1 个完整基因的一部分。EST-SSR 标记具有与性状连锁、通用性强等特点^[68], 朱艳^[69] 利用 11 对 EST-SSR 引物对核桃属无融合生殖子代 4 个种 5 个样品进行了扩增, 提出了通过核桃 EST 序列开发 EST-SSR 标记是一种有效途径, 验证了核桃 EST-SSR 标记建立的可行性。

3 结论与讨论

由于核桃生长世代周期长, 基因组高度杂合, 限制了诸如近交系等遗传材料的产生, 需要通过基因标记筛选与目的基因连锁的遗传标记, 为基因定位克隆和分子标记辅助选择育种打下坚实的基础, 及早淘汰不符合育种目标的杂种后代, 提高育种效率, 实现早实、优质。分子标记中的 AFLP、ISSR、RAPD 等技术已经越来越广泛的应用到研究核桃的品种改良和亲缘关系鉴别中。分子标记作为一种重要的辅助手段应用于核桃的遗传育种工作中, 可使人们对于核桃的遗传规律更加了解, 从而减少亲本选配的盲目性, 加快育种进程, 缩短育种年限。中国作为世界核桃的原产中心之一, 拥有大量的种质资源, 利用分子标记技术开展核桃种质资源研究对发展核桃生产、开发、综合利用以及培育新品种等具有重要意义。利用分子标记技术对核桃的种质资源进行评价, 收集核桃的重要基因资源, 为核桃育种筛选重要而且丰富的种质材料。

然而, 分子标记在核桃方面的研究, 目前主要应用于分析核桃早实性以及种质资源鉴定, 其它方面涉及的内容较少。可见, 由于分子标记技术的操作难度以及其所能产生的效益限制问题, 在核桃研究中并未广泛应用, 同时分子标记在分类研究上存在与传统分类相抵触的问题, 都有待深入研究解决, 而上述问题的解决需要研究人员更加紧密的交流合作和分子生物学与相关学科更深层次的相互渗透。

参考文献

- [1] 沈德绪. 果树育种学[M]. 北京: 农业出版社, 1992: 313-315.
- [2] 梅立春, 郭春会, 刘林强. 中美核桃业之差距与对策[J]. 西北农林科技大学学报, 2002, 30(4): 79-82.
- [3] WU Yan-min. A study on the genetic relationship among species in *Juglans* L. using RAPD markers[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2000, 27(1): 17-22.
- [4] 谷瑞升, 郝荣庭. 核桃早实特性的研究现状[J]. 河北农业大学学报, 1991, 14(1): 100-103.
- [5] 杨文衡. 我国的核桃[J]. 河北农业大学学报, 1984, 7(2): 1-8.
- [6] 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.
- [7] 邓煜, 谢碧霞. 核桃科树种的起源与分布[J]. 经济林研究, 2006, 24(2): 35-37.
- [8] 匡可任, 路安民. 中国植物志[M]. 北京: 科学出版社, 1979: 30-35.

- [9] 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): 1362-1372.
- [10] 杨帆. 薄壳山核桃及云南山核桃染色体核型分析[J]. 江西林业科技, 2001(2): 6-7.
- [11] 吕芳德, 杨帆, 张日清. 山核桃属部分种的核型分析[J]. 中南林业学院学报, 2002, 22(1): 47-49.
- [12] 李长林, 高丽, 刘先保, 等. 桃属植物等位酶遗传变异分析及品种基因型指纹利用[J]. 北方园艺, 2008(7): 44-49.
- [13] 李文, 王陶. DNA 分子标记的发展及主要技术[J]. 高新技术, 2008, 30: 1-2.
- [14] Willam J G K, Kubelik A R, Livak K J. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers and useful as genetic markers[J]. *Nucleic Acids Res*, 1990, 18: 6531-6535.
- [15] Welsh J, McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers[J]. *Nucleic Acids Res*, 1990, 18: 7231-7281.
- [16] 李莉, 邵登魁, 钟启文. RAPD 技术在蔬菜种质资源研究中的应用[J]. 青海大学学报(自然科学版), 2007, 25(5): 58-61.
- [17] 杨瑞环, 哈玉洁, 王全. RAPD 技术及其在农作物遗传育种中的应用[J]. 天津农业科学, 1999, 5(4): 13-16.
- [18] 金光辉, 吕文河, 孙秀梅, 等. 分子标记技术在马铃薯晚疫病研究中的应用[J]. 中国农学通报, 2007, 23(3): 75-78.
- [19] Amudha J, Balasubramani G, Mayee C D. RAPD and SCAR markers for leaf curl virus resistance in cotton(*G. hirsutum*)[J]. *Cotton Science*, 2003, 15(3): 168-173.
- [20] 苑克俊, 刘庆忠. 板栗的分子标记及育种研究概况[J]. 落叶果树, 2005(3): 13-15.
- [21] 姜立杰, 杨英军, 张晓明, 等. 桃果实有毛/无毛性状的 SCAR 标记[J]. 园艺学报, 2005, 32(6): 1003-1007.
- [22] 方宣钧, 吴为人, 唐纪良. 作物 DNA 标记辅助育种[M]. 北京: 科学出版社, 2000: 19.
- [23] Zabeau M, Vos P. Selective restriction fragment amplification; a general method for DNA fingerprinting[P]. European Patent Application Publication no. EP 0534858-A1, 1993-03-31.
- [24] 张增翠, 侯喜林. SSR 分子标记开发策略及评价[J]. 遗传, 2004, 26(5): 763-768.
- [25] Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification[J]. *Genomics*, 1994, 20: 176-183.
- [26] 张忠廉, 张丽娟. SSR ISSR 标记技术及其在生药学中的应用进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2008, 11(10): 79-81.
- [27] 张虎平, 牛建新, 王国安, 等. 适于核桃基因标记的 DNA 提取方法[J]. 生物技术, 2003, 13(8): 18-19.
- [28] 樊靖, 刘庆忠, 张俊林, 等. 一种提取核桃基因组 DNA 的改进方法[J]. 山东农业科学, 2008(6): 90-91, 95.
- [29] 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.
- [30] 马轩, 杜雄明. 提取棉花基因组 DNA 的一点探讨[J]. 棉花学报, 2004, 16(1): 40-43.
- [31] 陈静, 王文江. 适于 AFLP 分析的核桃幼叶 DNA 提取方法[J]. 河北农业大学学报, 2004, 27(6): 44-47.
- [32] 李荣, 牛建新, 王林, 等. 适合核桃 AFLP 分析的 DNA 提取方法[J]. 西北农业学报, 2006, 15(3): 175-178.
- [33] 张虎平, 牛建新, 马兵钢, 等. 核桃 DNA 的提取以及 RAPD 体系的优

- 化[J]. 石河子大学学报, 2003, 12(7): 295-297.
- [34] 王国安, 张虎平, 虎海防, 等. 适于核桃的 RAPD-PCR 反应体系的建立[J]. 新疆农业学报, 2004, 41(1): 61-64.
- [35] 邹喻萍, 汪小全, 雷一丁, 等. 几种濒危植物及其近缘类群总 DNA 的提取与鉴定[J]. 植物学报, 1994, 36(7): 528-533.
- [36] 李晋涛. 水稻幼苗单株 DNA 的提取及其 PCR-RAPD 反应体系的建立[J]. 生物技术, 1998, 8(4): 13-16.
- [37] 杨恩, 陈少瑜, 张雨, 等. 漾濞核桃 RAPD 反应优化体系的建立[J]. 福建林业科技, 2005, 32(4): 25-28.
- [38] Orel G. Characterization of 11 juglandaceae genotypes based on morphology cpDNA and RAPD[J]. Hortscience, 2003, 38(2): 1178-1183.
- [39] 杨自湘, 奚声珂. 胡桃属十种植物的过氧化物同工酶分析[J]. 植物分类学报, 1989, 27(1): 53-57.
- [40] 张虎平, 虎海防, 牛建新, 等. 新疆核桃早实特性及 RAPD 分析[J]. 西北植物学报, 2005, 25(11): 2157-2162.
- [41] 王国安, 张虎平, 虎海防, 等. 核桃早实性状相关联的 RAPD 标记[J]. 果树学报, 2004, 21(5): 485-487.
- [42] 杨克强, 王跃进, 张银东, 等. 核桃早实性状的 RAPD 标记[J]. 园艺学报, 2002, 29(6): 573-574.
- [43] 王晓梅, 宋文芹, 刘松, 等. 与银杏性别相关的 RAPD 标记[J]. 南开大学学报(自然科学版), 2001, 34(3): 116-117.
- [44] 彭建营, 束怀瑞, 孙仲序. 分子标记技术及其在果树种质资源研究上的应用[J]. 山东农业大学学报(自然科学版), 2001, 32(1): 103-106.
- [45] Michelmore P W, Paran I, Kessell R V. Identification of markers linked to disease resistance gene by Bulk Segregant Analysis a rapid method to detect markers in specific regions by using segregation population[J]. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1991, 88(9): 828-832.
- [46] 王斌, 张超良, 翁曼丽, 等. 玉米自交系 8112 特异 SCAR 标记的获得[J]. 高技术通讯, 1999(3): 45-47.
- [47] 张志永, 张劲松, 巩学干, 等. 抗 SMV 栽培大豆种质资源的 SCAR 标记指纹图谱分析[J]. 高技术通讯, 1998(10): 49-52.
- [48] Paran I, Michelmore R W. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce[J]. Theor. Appl. Genet., 1993, 85: 985.
- [49] Manjarez-Sandoval P, Thomas E G, Webb D M. RFLP Genetic Similarity Estimates and Coefficient of Parentage as Genetic Variance Predictors for Soy bean Yield[J]. Crop Science Society, 1993, 37: 698-703.
- [50] 牛建新, 吕建强, 王林, 等. 核桃早实性相关性状的 SCAR 标记[J]. 果树学报, 2008, 25(5): 732-735.
- [51] 韩华柏, 何方. 我国核桃育种的回顾和展望[J]. 经济林研究, 2004, 22(3): 45-50.
- [52] 雷永, 廖伯涛, 王圣玉. 花生 AFLP-银染体系的建立与优化[J]. 花生学报, 2003, 32(增刊): 301-305.
- [53] 王红霞, 张志华, 赵书岗, 等. 核桃种质资源遗传多样性研究中的 AFLP 技术优化及引物筛选[J]. 华北农学报, 2008, 23(1): 50-54.
- [54] 王林, 李荣, 牛建新, 等. 核桃 AFLP 银染体系的建立[J]. 西北农业学报, 2007, 16(2): 116-119.
- [55] 徐明磊, 詹玉丝, 陈晓, 等. 辣椒 AFLP 反应体系的优化与建立[J]. 辣椒杂志, 2008(3): 34-37.
- [56] 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): 1362-1372.
- [57] Kafkas S, Ozkan H, Sutyemez M. DNA polymorphism and assessment of genetic relationships in walnut genotypes based on AFLP and SAMPL markers[J]. J. Amer. Soc. Hort. Sci, 2005, 130: 585-590.
- [58] Bayazit S, Kazan K, Gülbitti S, et al. AFLP analysis of genetic diversity in low chill requiring walnut (*Juglans regia* L.) genotypes from Hatay, Turkey[J]. Scientia Horticulturae, 2007, 111, 394-398.
- [59] Daniel Potter, Fangyou Gao. Inter-simple Sequence Repeat Markers for Fingerprinting and Determining Genetic Relationships of Walnut (*Juglans regia*) Cultivars[J]. J. Amer. Soc. Hort. Sci, 2002, 127(1): 75-81.
- [60] 桂腾琴, 乔爱民, 孙敏, 等. 果梅种质资源亲缘关系的 ISSR 分析[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(27): 12957-12959.
- [61] 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): 56-61.
- [62] 钱韦, 葛颂, 洪德元. 采用 RAPD 和 ISSR 标记探讨中国疣粒野生稻的遗传多样性[J]. 生态学报, 2002, 42(7): 741-750.
- [63] 陈少瑜, 杨恩, 范志远, 等. 漾濞核桃 ISSR-PCR 反应体系的建立[J]. 西部林业科学, 2007(4): 109-112.
- [64] 陈少瑜, 杨恩, 习学良, 等. 云南主要核桃品种的 ISSR 分子鉴别[J]. 经济林研究, 2006, 24(4): 41-45.
- [65] 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, 3(21): 1-4.
- [66] 孟清照. 核桃品种遗传多样性的 SSR 标记分析[D]. 昆明: 西南林学院, 2008: 45.
- [67] 奚声珂. 我国胡桃属 (*Juglans* L.) 种质资源与核桃 (*Juglans regia* L.) 育种[J]. 林业科学, 1987, 23(3): 342-350.
- [68] Gupta 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.
- [69] 朱燕, 郝艳宾, 王克建, 等. 核桃 EST-SSR 信息分析与标记的初步建立[J]. 果树学报, 2009, 26(3): 394-398.

Current Progress of Molecular Markers on Genetic Improved and Germplasm Evaluation of Walnut

LIU Yan, XIN Pei-yao, XU Yu-lan, HE Cheng-zhong, DUAN An-an, ZHOU Jun

(Southwest Forestry College Key Laboratory for Forest Resources Conservation and Use in Southwest Mountains of China, Kunming, Yunnan 650224)

Abstract: Applying molecular marker in the genetic improvement and the germplasm resources assessment of walnuts could help us to get the relative genetic information quickly and accurately. On the basis of summarizing the applications of RAPD, AFLP and ISSR in the researchment of walnuts, we investigated the present problems and put forward some reasonable proposals to the problems.

Key words: walnut; heredity improve; germplasm resource; molecule mark; to make headway; problem and proposal