

· 农业生物技术 ·

基于 SSR 分子标记的沙枣遗传多样性分析和指纹图谱构建

王梓煦¹, 曾郅涵¹, 秦孝天¹, 李子航¹, 童宇航², 刘克林², 李庆卫^{1*}

1 北京林业大学 园林学院 林木资源高效生产全国重点实验室, 北京 100083

2 北京市绿地养护管理事务中心, 北京 102211

王梓煦, 曾郅涵, 秦孝天, 李子航, 童宇航, 刘克林, 李庆卫. 基于 SSR 分子标记的沙枣遗传多样性分析和指纹图谱构建[J]. 生物工程学报, 2024, 40(10): 3530-3547.

WANG Zixu, ZENG Zhihan, QIN Xiaotian, LI Zihang, TONG Yuhang, LIU Kelin, LI Qingwei. Genetic diversity and fingerprinting of *Elaeagnus angustifolia* based on SSR molecular markers[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(10): 3530-3547.

摘要: 为了促进沙枣新品种选育、种质资源鉴定保护和生态经济型沙枣产业综合发展, 对沙枣 (*Elaeagnus angustifolia*) 种质资源进行遗传多样性分析, 构建 DNA 指纹图谱, 挖掘沙枣种质来源和遗传背景。本研究采用多态性好、条带清晰、重复性好的 11 对引物, 利用简单重复序列 (simple sequence repeats, SSR) 分子标记技术, 对甘肃省和北京市来源的 150 份沙枣材料的遗传多样性进行了研究, 基于遗传距离进行非加权组平均法 (unweighted pair-group method with arithmetic means, UPGMA) 聚类分析, 基于贝叶斯模型的 Structure v2.3.3 软件解析 150 份种质的遗传结构。在遗传多样性分析中, 平均等位基因数为 (number of alleles, N_a) 7.636 4, 平均有效等位基因数 (number of effective alleles, N_e) 为 2.832 6, 平均 Shannon 信息指数 (Shannon genetic diversity index, I) 为 1.178 1, Nei's 平均基因多样性指数 (Nei's gene diversity index, H) 为 0.582 1, 平均观测杂合度 (observed heterozygosity, H_o) 为 0.489 9, 平均期望杂合度 (expected heterozygosity, H_e) 为 0.584 0, 平均多态信息含量 (polymorphism information content, PIC) 为 0.535 4, 平均遗传相似性系数 (genetic similarity, GS) 为 0.831 5, 表明所研究的沙枣之间具有显著的遗传差异和丰富的遗传多样性。聚类分析将 150 份材料划分为 3 个类群, 平均遗传距离 (genetic distance, GD) 为 0.422 9, 聚类结果和地理来源并不完全一致。Structure 群体结构分析将供试材料分为 2 个种群。利用 8 对多态信息含量最高的引物, 构建了

资助项目: 国家重点研发计划(2020YFD1000500); 北京园林绿化增彩延绿科技创新工程(2019-KJC-02-10); 北京市园林绿化局《沙枣培育技术规程》制定标准项目(20211245); 北京林业大学建设世界一流学科和特色发展引导专项资金项目(2019XKJS0324)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2020YFD1000500), the Beijing Landscaping Color Extension Green Science and Technology Innovation Project (2019-KJC-02-10), the Beijing Municipal Bureau of Landscape Architecture and Greening "Technical Regulations for Cultivation of Jujube" Development Standard Project (20211245), and the Special Funds Project for Building World-class Disciplines and Characteristic Development Guided by Beijing Forestry University (2019XKJS0324).

*Corresponding author. E-mail: lqw6809@bjfu.edu.cn

Received: 2024-04-02; Accepted: 2024-04-29; Published online: 2024-05-20

150 份沙枣材料的指纹图谱。本研究成功构建了甘肃和北京沙枣种质资源的 DNA 指纹图谱, 阐明了其亲缘关系, 为沙枣种质资源鉴定、优异种质筛选、园林应用和分子辅助育种工作提供了理论依据。
关键词: 沙枣; 遗传多样性; 简单重复序列分子标记; 指纹图谱

Genetic diversity and fingerprinting of *Elaeagnus angustifolia* based on SSR molecular markers

WANG Zixu¹, ZENG Zhihan¹, QIN Xiaotian¹, LI Zihang¹, TONG Yuhang², LIU Kelin², LI Qingwei^{1*}

¹ National Key Laboratory for Efficient Production of Forest Resources, School of Landscape Architecture, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China

² Beijing Greenland Maintenance and Management Centre, Beijing 102211, China

Abstract: DNA fingerprinting can reveal the genetic diversity of *Elaeagnus angustifolia* germplasm resources and clarify the source and genetic background of *E. angustifolia* germplasm, which are the preconditions for the breeding of new varieties, the identification and protection of germplasm resources, and the comprehensive development of the *E. angustifolia* industry considering both ecological and economic benefits. We employed 11 pairs of primers with high polymorphism, clear bands, and high reproducibility to analyze the genetic diversity of 150 *E. angustifolia* germplasm accessions from Gansu and Beijing by the simple sequence repeat (SSR) molecular markers. We then employed the unweighted pair-group method with arithmetic means (UPGMA) to perform the cluster analysis based on genetic distance and analyzed the genetic structure of the 150 germplasm accessions based on a Bayesian model in Structure v2.3.3. The genetic diversity analysis revealed the mean number of alleles (N_a) of 7.636 4, the mean number of effective alleles (N_e) of 2.832 6, the mean Shannon genetic diversity index (I) of 1.178 1, the mean Nei's gene diversity index (H) of 0.582 1, the mean observed heterozygosity (H_o) of 0.489 9, the mean expected heterozygosity (H_e) of 0.584 0, the mean polymorphism information content (PIC) of 0.535 4, and the mean genetic similarity (GS) of 0.831 5. These results suggested that the *E. angustifolia* germplasm resources we studied exhibited significant genetic differences and rich genetic diversity. The cluster analysis revealed that the tested materials can be classified into 3 groups, with the main genetic distance (GD) of 0.422 9. The clustering results were not completely consistent with the geographic origin. The population structure analysis classified the germplasm accessions into 2 populations. We used 8 pairs of primers with high PIC to construct the fingerprints of 150 *E. angustifolia* germplasm accessions. The present study successfully constructs the DNA fingerprints and clarified the genetic relationship of the *E. angustifolia* germplasm resources in Gansu and Beijing, providing a theoretical basis for germplasm resource identification, breeding of elite varieties, application in gardening, and molecular-assisted breeding of *E. angustifolia*.

Keywords: *Elaeagnus angustifolia*; genetic diversity; simple sequence repeat (SSR) molecular marker; fingerprint

沙枣(*Elaeagnus angustifolia*)被誉为“荒漠宝树”,为胡颓子科胡颓子属的直立落叶乔木或小乔木^[1],具有耐旱、耐盐碱、生长快等特点,且生态、药用和经济价值突出,是我国雨养林业的典型树种和三北科学固沙的珍贵经济林树种。同时沙枣的叶、花、果也极具观赏潜力。目前全世界大约有 80 多个沙枣品种,中国是沙枣主产地之一^[2]。目前沙枣品种分类尚不明确,遗传背景复杂,研究人员^[3]对甘肃省沙枣种质资源调查后发现,沙枣的存在数量较少且长势衰弱,栽培管理、资源保护及开发研究都较为落后,长期以来会导致种质混杂,影响沙枣产业化发展。因此,对现有沙枣种质资源进行鉴定、理清种质种源亲缘关系和群体结构、构建指纹图谱,是科学保护沙枣种质资源多样性、良种选育和园林应用推广的关键。

简单重复序列(simple sequence repeats, SSR)又被称为微卫星 DNA,相较于传统标记,具有重复性较好、多态性高、操作简单、共显性标记、DNA 需求量少而材料质量的要求不高等优势。可用于遗传图谱构建^[4]、遗传多样性^[5]、群体遗传结构^[6]、亲缘关系鉴定^[7]等,并且在胡颓子属植物的研究中也得到应用。Nawaz 等^[8]使用微卫星标记(expressed sequence tag-simple sequence repeat, EST-SSR)标记对 8 个不同种群的 300 个胡颓子属沙棘(*Hippophae rhamnoides*)进行遗传多样性分析,表明吉尔吉特-巴尔蒂斯坦地区的沙棘具有较高的等位基因丰富度和遗传多样性。Wang 等^[9]利用 SSR 标记评估了 110 份 7 个野生种群的翅果油树(*Elaeagnus mollis*)的遗传多样性和分化情况。Ma 等^[10]使用 SSR 标记结合表型聚类分析区分 *E. moorcroftii* 和 *E. angustifolia*,发现形态数据和 SSR 数据之间具有很强的相关性。Liu 等^[11]挖掘了胡颓子属翅果油树中 9 597 对 SSR 特异性引物并验证了其中 100 对的有效性,该研究

证明了 EST-SSR 标记可用于 *E. mollis* 的种群遗传学研究和辅助育种。DNA 指纹图谱可以快速而精准地进行品种鉴定,对亲缘关系分析、新品种登记和品种知识产权保护具有重要作用,已经成功应用于胡颓子属沙棘^[12]。目前,沙枣在分子水平的研究主要涉及的研究内容是遗传多样性和亲缘关系分析^[13-14]。Uzun 等^[13]利用随机扩增多态性 DNA (random amplification of polymorphic DNA, RAPD)和 SSR 标记对 56 份沙枣的果实特征和遗传变异进行研究,发现除了其中两个基因型,其他基因型都可以被引物完全区分,且沙枣具有丰富的遗传多样性。刘昱洲^[15]采用简单序列重复区间标记(inter-simple sequence repeat, ISSR)标记对 6 个种源沙枣进行遗传多样性分析,理清了各个种源间的亲缘关系。然而目前为止,SSR 技术在沙枣构建指纹图谱中尚未见使用。

本研究采用 SSR 分子标记的方法,对我国甘肃和北京引种的 150 份沙枣进行遗传多样性和亲缘关系分析,为沙枣的品种分类、新品种保护提供有效鉴别的分子检测工具。并根据 SSR 标记引物建立沙枣种质资源 DNA 指纹图谱,为沙枣资源的鉴定和保护、科学研究和产业应用提供理论支撑。

1 材料与方 法

1.1 材 料

本研究供试材料来源包含两部分:张掖地区调查初筛的 44 株沙枣成年单株,采样地点包括甘州区许家庄(东经 100°28'33"、北纬 38°58'31",海拔 1 467 m)、润泉湖公园(东经 100°28'06"、北纬 38°57'04",海拔 1 479 m)、九龙江林场(东经 100°33'36"、北纬 38°56'36",海拔 1 500 m)和张掖国家湿地公园(东经 100°27'04"、北纬 38°58'32",海拔 1 460 m);从甘肃地区收集同一批一年生沙枣实生苗 500 株(苗木规格一致,

株高均为 50 cm), 栽植于北京市黄垓苗圃沙枣实生苗繁育基地和北京市白浮沙枣实生苗繁育基地, 经过一年的观察记录, 最终再选育出 106 株长势优良沙枣二年生实生苗。两地区共 150 份沙枣优良观赏单株材料(附表 1、2, 所有附表和附图已提交国家微生物科学数据中心, 编号: NMDCX0000282)。材料采集时间为 2019 年 9–10 月, 随机采集每株植株当年生枝条顶端的幼嫩叶片 10 枚, 迅速放入提前准备好的锡纸袋中, 并置于液氮中暂存, 之后放入 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存。

1.2 方法

1.2.1 沙枣基因组 DNA 提取及检测

DNA 提取参照天根植物基因组 DNA 提取试剂盒(DP360)上的操作步骤进行。

1.2.2 引物筛选

沙枣 SSR 引物来源于国内外已发表的胡颓子属的相关文献, 根据文献初步确定了 86 对引物^[5-6,14,16-22]。SSR 引物序列由北京睿博兴科生物技术有限公司合成。随机选取 8 个沙枣的基因组 DNA 样品(样本编号为 BF30、BF33、BF45、DX16、DX36、DX48、Z17、Z21)进行引物筛选。利用

这 8 个样品和 86 对引物进行 PCR 扩增, 并由北京睿博兴科生物技术有限公司完成多态性检测, 最终筛选出 11 对能够稳定扩增出清晰条带的引物, 11 对引物序列见表 1。

1.2.3 SSR-PCR 扩增反应

筛选到 11 对稳定的多态性引物后, 利用 SSR-PCR 反应体系对 150 个 DNA 样品进行 PCR 扩增。优化后的 PCR 扩增的反应体系和反应程序参照 Nawaz 等^[8]的方法。将得到的 PCR 扩增产物用毛细管电泳进行检测。

1.2.4 数据分析

利用 Genemarker V2.2.0 读取 150 个样品的基因型数据, 获得 150 个沙枣的 EXCEL 位点信息表和 PDF 峰图。将 EXCEL 格式的表格进行转码, 利用 Dataformater 软件转换数据格式^[23]。利用 Popgene 32 软件计算观测等位基因数(number of alleles, N_a)、有效等位基因数(number of effective alleles, N_e)、Shannon 信息指数(Shannon genetic diversity index, I)、Nei's 基因多样性指数(Nei's gene diversity index, H)、期望杂合度(expected heterozygosity, H_e)、观测杂合度(observed heterozygosity, H_o)的相关数据指标,

表 1 SSR 引物序列表

Table 1 The list of SSR primer sequences

Primer name	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')
RO20	TCCCATACCCAGCACAAAGG	CAGTCGGGCGTCATCAGCCATGAGGAA TTGAAGGGTG
RO97	GGAAACAGCTATGACCATCGGACTGCTTTGAACCCCTC	AAGCCACTCAGCCTATCTAC
RO367	CAGTCGGGCGTCATCAGTAGGAAGTTGGAGCTCTGC	GTTGGAATTGCCGGTTGGG
RO851	GGTCTAAGAGCTTCAAGTGGC	CAGTCGGGCGTCATCAGGAGATTCTGA CCTGTGATAAG
CGY8	CAAAAGCAAAAGGAAGTAGCG	ACGTACATATGCTTCAATTTCCAC
CGY9	GCATCCAGAGGCTTCACCTAA	CTCCAGTGCTCCACTACCACAA
CGY13	AATCACAGTAGAAGATGAGCAAACAA	AGGCCACAAACCACTATTAGCA
HS111	ACAACCTCAGTCCGTACATATGGT	GCGGCTGGAATCATCTTGGG
HS227	CCTTAGCATCACCAAAGCGC	CCTTGTGTGCACATTTCTGCA
GHS304	TTCTGTGAGTGCTGGGTTAGCTT	GCTTATTGCGGAGAAGAAGAACAA
HR06	CAACAAAATACAATTCGGAAAC	AATAGGAGACACAGAGGCTTC

并使用 PIC_CALC 软件计算引物的多态信息含量(polymorphism information content, PIC)。

使用 Structure 2.3.3 软件,对 150 份沙枣材料进行群体结构分析,参数可参照 Nawaz 等^[8]的方法设置。参照 Evanno 等^[24]提出的 ΔK 值分析法来确定合适的 K 值,并进行 K 值折线图和群体遗传结构图绘制。

1.3 核心引物的筛选与指纹图谱的构建

以引物的多态信息含量为依据选取 11 对引物作为核心引物。根据 150 个沙枣样品中各引物扩增片段对应的编号,构建 150 份沙枣种质的 DNA 指纹图谱。

2 结果与分析

2.1 DNA 浓度与纯度质量检测

150 份沙枣样品 DNA 的 OD_{260}/OD_{280} 比值的变化范围为 1.6–1.8,浓度在 103.19–359.43 ng/ μ L 之间,均能够满足后续 PCR 实验的要求(表 2)。

2.2 沙枣遗传多样性水平分析

通过荧光 PCR 扩增和毛细管电泳检测,获得 150 个沙枣样品的各位点上等位基因片段大小(附图 1,所有附表和附图已提交国家微生物科学数据中心,编号:NMDCX0000283)。根据

得到的 150 份沙枣 SSR 的扩增结果,利用 Popgene 软件计算出 11 对引物的多态性信息(表 3)。150 个样品中共检测到 84 个等位位点,每个位点观测等位基因(N_a)平均为 7.636 4,其中引物 CGY8 最多为 13,引物 HS227 最少为 2;有效等位基因(N_e)在 1.148 8–4.510 4 之间,平均为 2.832 6,其中引物 RO367 最多为 4.510 4,而引物 HS111 最少为 1.148 8; Shannon 信息指数(I)的范围在 0.306 3–1.745 4 之间,平均为 1.178 1; Nei's 基因多样性指数(H)的变化范围为 0.129 6–0.778 3,平均为 0.582 1;观测杂合度(H_o)在 0.034 2–0.859 1 之间,平均为 0.489 9,而期望杂合度(H_e)在 0.130 0–0.780 9 之间,均值为 0.584 0;多态信息含量(PIC)的值在 0.124 6–0.749 0 之间,平均为 0.535 4,均值大于 0.5。因此,11 对引物具有较高的 PIC 值,表明能够满足于供试的 150 份沙枣材料的遗传变异研究。

2.3 沙枣种质资源的遗传相似性系数

通过 SSR 标记分析发现,150 份沙枣供试材料间的遗传相似性系数(GS)的均值为 0.831 5(图 1)。其中 BF11 和 BF14, Z26 和 Z27, Z10 和 Z11 的遗传相似系数最大(0.976 7),说明这

表 2 部分 DNA 样品浓度与纯度检测结果

Table 2 The detection results of concentration and purity of selected DNA samples

Number	OD_{260}/OD_{280}	Concentration (ng/ μ L)	Number	OD_{260}/OD_{280}	Concentration (ng/ μ L)
BF1	1.68	328.56	DX4	1.74	206.17
BF2	1.76	271.33	DX5	1.60	297.72
BF3	1.71	248.15	DX6	1.61	175.06
BF4	1.63	164.17	DX7	1.79	258.02
BF5	1.79	359.43	Z1	1.72	161.52
BF6	1.65	105.80	Z2	1.62	243.77
BF7	1.68	148.21	Z3	1.65	215.90
DX1	1.66	223.05	Z4	1.63	197.31
DX2	1.66	116.23	Z5	1.75	103.19
DX3	1.64	170.11	Z6	1.74	307.21

表 3 SSR 位点多态性信息表

Table 3 Polymorphism information of SSR loci

Primer	Na	Ne	I	H	Ho	He	PIC
GHS304	4	3.069 4	1.250 9	0.674 2	0.700 0	0.676 5	0.625 8
CGY9	12	4.156 3	1.628 9	0.759 4	0.260 0	0.761 9	0.720 7
HR06	11	3.700 4	1.582 3	0.729 8	0.713 3	0.732 2	0.688 3
HS111	5	1.148 8	0.306 3	0.129 6	0.034 2	0.130 0	0.124 6
CGY13	9	2.835 4	1.297 3	0.647 3	0.859 1	0.649 5	0.599 5
RO367	11	4.510 4	1.745 4	0.778 3	0.793 3	0.780 9	0.749 0
RO97	5	2.573 0	1.062 5	0.611 4	0.466 7	0.613 4	0.531 0
HS227	2	1.359 1	0.434 1	0.264 2	0.233 3	0.265 1	0.229 4
RO20	9	3.135 6	1.424 5	0.681 1	0.641 9	0.683 4	0.637 6
CGY8	13	2.652 7	1.500 4	0.623 0	0.140 0	0.625 1	0.599 8
RO851	3	2.017 7	0.726 3	0.504 4	0.546 7	0.506 1	0.383 8
$\bar{x}\pm s$	7.636 4	2.832 6 \pm 1.060 1	1.178 1 \pm 0.490 3	0.582 1 \pm 0.207 0	0.489 9 \pm 0.282 5	0.584 0 \pm 0.207 7	0.535 4 \pm 0.203 9

些种质亲缘关系最近。而 DX31 与 DX7 遗传相似系数最小(0.674 0), 表明 DX31 和 DX7 的亲缘关系相对较远。此外, BF17 和 BE27, BF21 和 DX32, BF3 和 DX36, DX10 和 DX29, DX46 和 DX50, Z30 和 Z35 之间的遗传相似性系数大于 0.95, 说明这些种质之间遗传背景相差较小, 亲缘关系较近。150 份材料的遗传相似系数值大多分布在 0.8–0.9 之间(图 2), 占 72.04%, 相似系数介于 0.6–0.7 的占比最少, 为 0.29%, 这表明 150 份沙枣材料整体上遗传相似度较高。

2.4 沙枣种质资源的聚类分析

基于 Nei's 遗传距离, 利用 UPGMA 方法对 150 份沙枣材料进行聚类分析, 结果表明, 150 份材料被划分为 3 大类群(图 3)。为了后续更好地比较不同组群间的差异, 其中 II 类可以进一步划分出 3 个亚类, 共 5 小类。从聚类图可以发现, 来源地相同的沙枣资源在各个类群中穿插分布, 地理分化并不明显, 但也存在部分同一来源的沙枣资源成簇出现的现象, 如 Z4、Z2 均来自甘州区许家庄境内, Z10、Z11 均来自张掖润泉湖公园, Z26、Z27 均来自九龙江林场北侧。此外, 也有部分不同来源的沙枣资源遗传距离特别近, 如 Z19 和 DX21, DX7 和 Z28, BF7

和 Z38 等。

在第 I、II、III 类群中, 分别包括 20 份、93 份和 37 份材料。第 I 类群中张掖地区沙枣的主要特征为树冠散乱、株高较高、叶扁圆且叶色较深、偏银灰、果实呈长椭球形且果实黄白带白斑。北京地区沙枣的主要特征为叶片圆而宽、叶色偏深灰绿。第 II 类群中分为 3 个亚类, 分别包含 11、50、32 份材料。第 II₁ 类群中无张掖地区沙枣聚集, 北京地区沙枣的主要特征为树冠峭立、长势优良、整体种质较少, 说明遗传多样性比较简单。第 II₂ 类群中张掖地区沙枣的主要特征为树型较为美观、叶色较银灰、果量偏少。北京地区沙枣的主要特征为树冠张开。第 II₃ 类群中张掖地区沙枣的主要特征为树冠峭立、果实呈长椭球形、叶片呈长椭圆形。北京地区沙枣的主要特征为株型美观且生长速度快、叶片狭长。第 III 类群张掖地区沙枣的主要特征为树形散乱, 果实颜色鲜艳, 趋于橙红或橙黄, 果实形状趋于扁平。北京地区沙枣的主要特征为树冠张开、叶色鲜亮(表 4、表 5)。结果发现, 北京引种甘肃地区的沙枣与甘肃张掖的沙枣遗传距离相对较近, 遗传相似系数相对较高, 性状表现相似, 亲缘关系相对较近。

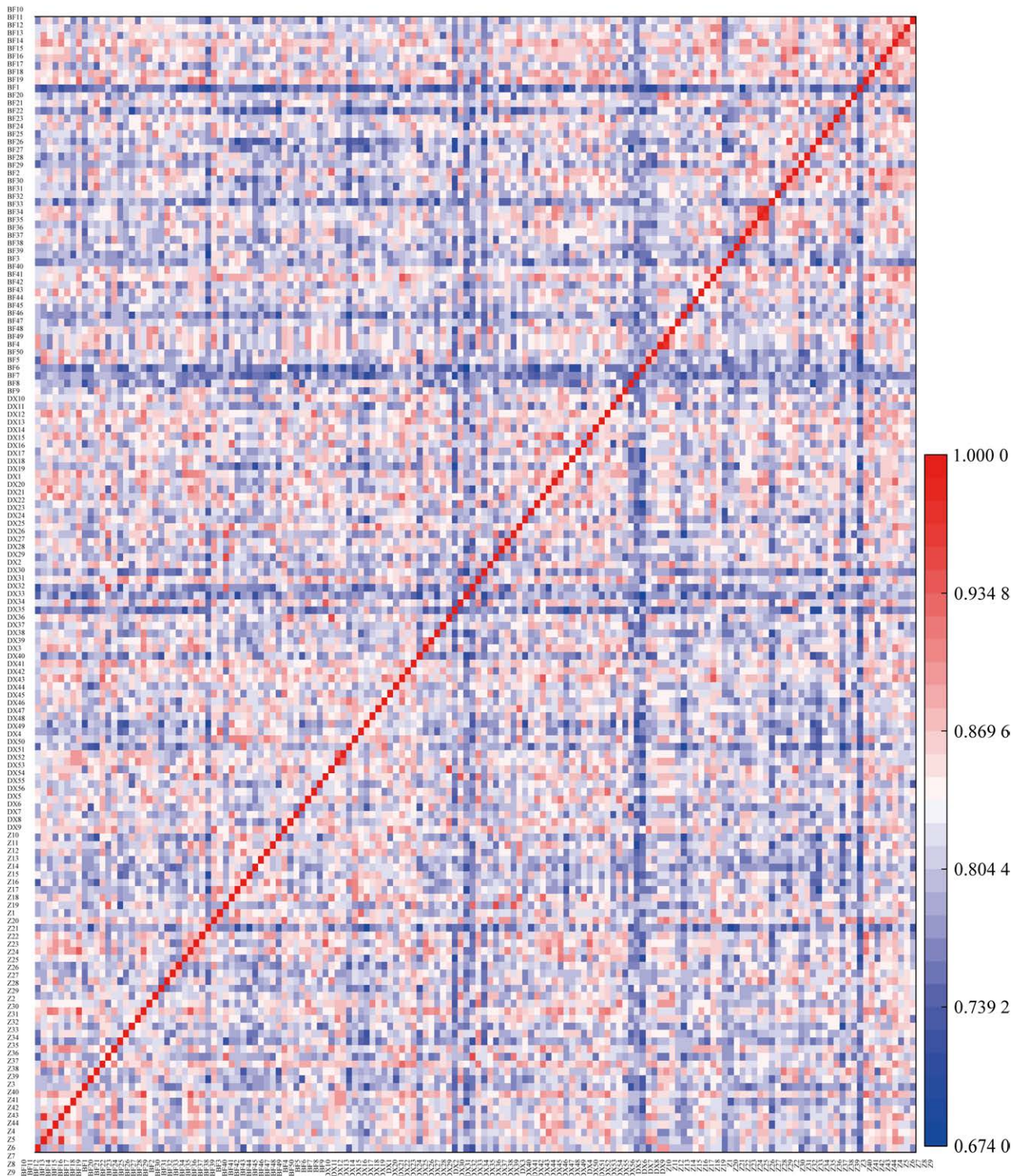


图 1 150 份供试材料的遗传相似系数热图

Figure 1 Heat map of genetic similarity coefficient of 150 tested materials.

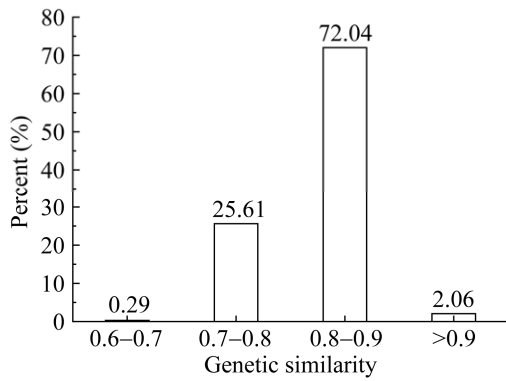


图 2 150 份供试材料的遗传相似系数
Figure 2 The genetic similarity coefficient of 150 tested materials.

2.5 沙枣种质资源的种群结构

利用 STRUCTURE 软件对供试材料群体进行遗传结构分析^[8,24](图 4), 结果显示, 当 $K=2$ 时, ΔK 出现明显的峰值, 因此, 供试材料分为 2 个亚群更为合理。同时, 150 份沙枣种质资源的群体遗传结构见图 5, 表明大部分材料的遗传背景相对单一, 仅存在极少量个体进行基因交流。

2.6 核心引物的选择和片段对应编码的确定

根据表 3 中的 PIC 值进行从大到小的排序, 经过组合后, 发现选取 PIC 值最大的前 8 对引

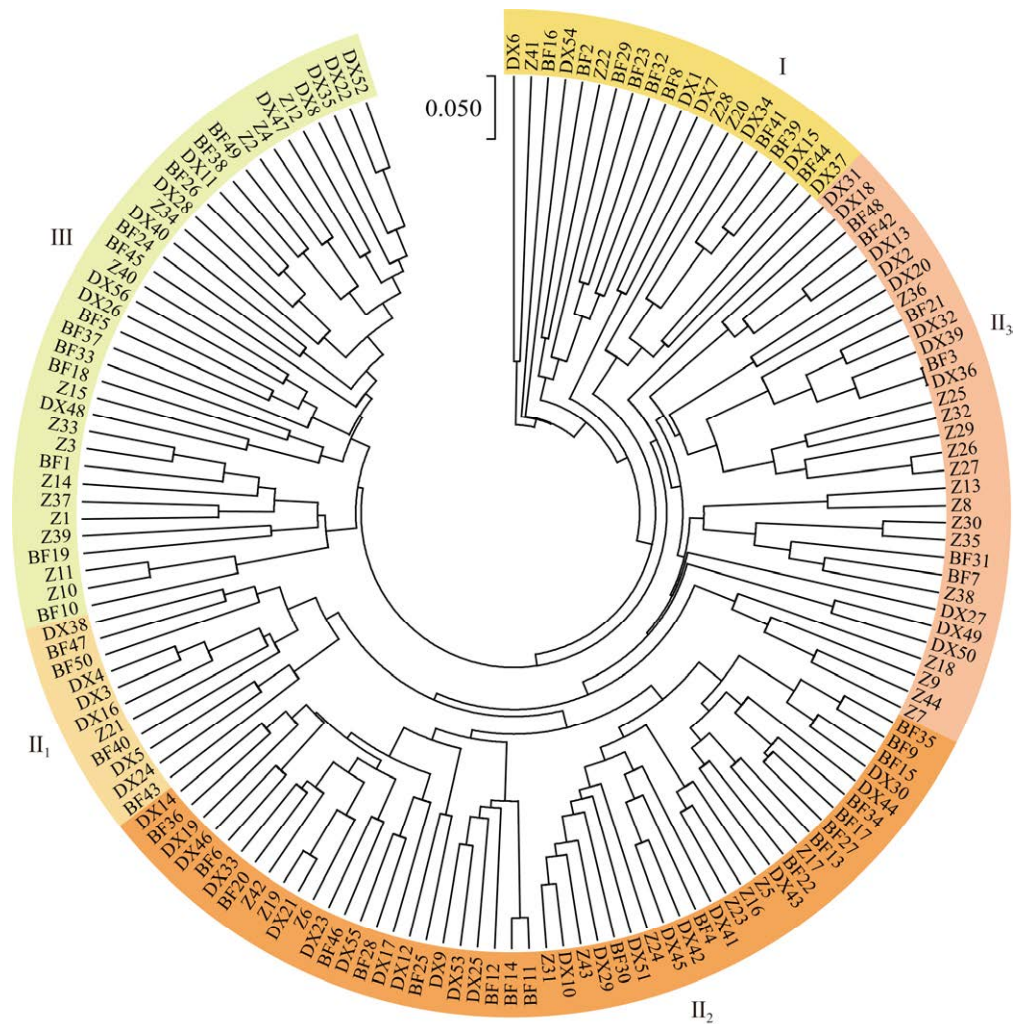


图 3 150 份供试材料的聚类分析图
Figure 3 Cluster dendrogram of 150 tested materials.

表 4 基于聚类分析结果的北京 106 份沙枣不同分组样株表型性状的均值

Table 4 Mean values of phenotypic traits of different groups of sample plants of Beijing 106 *Elaeagnus angustifolia* based on the results of cluster analysis

Group	Grading average of each trait*			Leaf length (cm)	Leaf width (cm)	Leaf shape index	Plant height annual growth (cm)	Branching angle (°)	Diameter annual growth (cm)
	Leaf surface color	Leaf back color	Crown roundness						
Group I	1.937 5	3.437 5	1.875 0	3.897 5	2.218 1	1.775 0	164.125 0	58.937 5	3.843 7
Group II ₁	2.111 1	3.333 3	2.222 2	3.981 1	2.190 0	1.822 2	190.222 2	48.888 9	4.277 8
Group II ₂	2.325 6	3.488 4	1.720 9	3.972 3	2.274 7	1.772 1	165.907 0	62.186 0	3.081 4
Group II ₃	2.058 8	3.764 7	1.875 0	3.972 9	2.112 3	1.894 1	193.764 7	59.764 7	4.405 9
Group III	2.434 8	3.565 2	1.869 6	4.000 0	2.245 7	1.808 6	170.565 2	61.695 7	3.239 1

*: Leaf surface colour is divided into grey olive green (NN137A), grey olive green (NN137B), grey olive green (NN137C), grey olive green (NN137D) and grey-yellowish green (191A), corresponding to grades 1, 2, 3, 4, and 5, respectively; leaf abaxial colour is divided into grey olive green (147B), grey-yellowish green (190A), grey-yellowish green (191A), grey yellow-green (191B) and grey-yellow-green (191D), corresponding to grades 1, 2, 3, 4 and 5, respectively; and crown roundness is classified as crown messy, crown more rounded and crown rounded, corresponding to grades 1, 2 and 3, respectively.

表 5 基于聚类分析结果的甘肃 44 份沙枣不同分组样株表型性状的均值

Table 5 Mean values of phenotypic traits of different groups of sample plants of Gansu 44 *Elaeagnus angustifolia* based on the results of cluster analysis

Group	Grading average of each trait*				Leaf length (cm)	Leaf width (cm)	Leaf shape index	Plant height (cm)	Crown diameter (cm)	Branching angle (°)	Fruit vertical diameter (cm)	Fruit horizontal diameter (cm)	Fruit shape index
	Leaf color	Crown roundness	Fruit color	Fruit yield									
Group I	1.000 0	0.250 0	2.000 0	3.000 0	5.987 5	2.300 0	2.647 5	782.500 0	561.875 0	50.000 0	1.875 0	1.350 0	1.392 5
Group II ₂	1.333 3	1.000 0	1.833 3	1.666 7	5.461 7	2.080 0	2.666 7	670.000 0	387.500 0	53.000 0	1.775 0	1.375 0	1.315 0
Group II ₃	1.176 5	0.705 9	2.176 5	2.117 6	5.620 0	2.056 5	2.832 4	728.235 3	460.000 0	46.882 4	1.803 1	1.346 9	1.344 4
Group III	1.214 3	0.785 7	2.285 7	1.857 1	5.649 3	2.132 9	2.695 0	636.071 4	456.250 0	51.071 4	1.720 8	1.366 7	1.263 3

*: Fruit colour is divided into yellowish-white, orange-yellow, orange-red and red, corresponding to grades 1, 2, 3 and 4, respectively; leaf surface colour is divided into grey-olive-green (NN137A), grey-olive-green (NN137B), grey-olive-green (NN137C), grey-olive-green (NN137D) and grey-yellow-green (191A), corresponding to grades 1, 2, 3, 4 and 5, respectively; leaf dorsum colour is divided into grey-olive green (147B), grey-yellow green (190A), grey-yellow green (191A), grey-yellow green (191B) and grey-yellow green (191D), corresponding to grades 1, 2, 3, 4 and 5, respectively; and crown roundness is classified as crown messy, crown more rounded and crown rounded, corresponding to grades 1, 2 and 3, respectively.

物即可将 150 个沙枣样品完全区分, 选定的 8 对引物 PIC 值均大于 0.5。将最终选定的 8 对引物按 PIC 值由大到小排序为: RO367、CGY9、HR06、RO20、GHS304、CGY8、CGY13、RO97。

各引物扩增所得的各片段对应的编号见表 6。

2.7 沙枣观赏种质资源指纹图谱的构建

根据表 6 各引物扩增片段的编号, 构建了 150 个沙枣优良观赏材料的字母指纹图谱(表 7)。150 个沙枣材料的 SSR 指纹图谱均具有唯一性, 本研究结果可以为北京园林绿化的沙枣观赏新

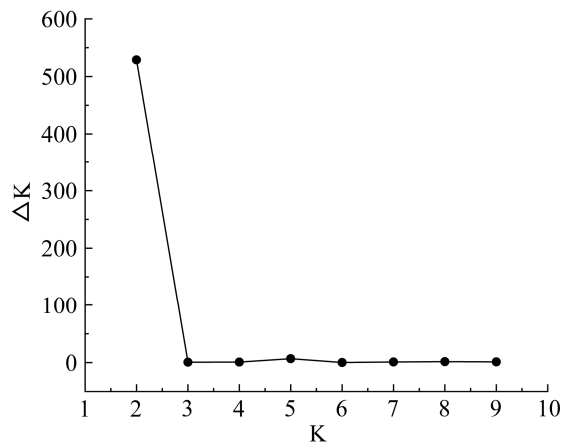


图 4 K 值曲线图

Figure 4 K value curve.

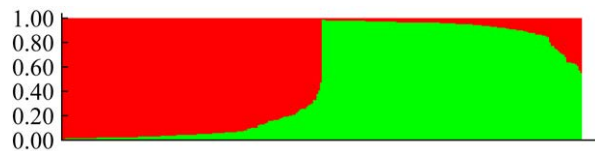


图 5 基于 SSR 标记的 150 份种质资源的群体遗传结构(K=2)

Figure 5 Population genetic structure of 150 germplasm resources based on SSR markers (K=2).

品种的选育、鉴定、保护提供理论基础和分子依据。

3 讨论

3.1 遗传多样性分析

SSR 分子标记作为 DNA 指纹数据库构建的首选, 是从分子水平上鉴定品种和遗传多样性的有效工具^[25]。Nei's 基因多样性指数(H)、观测杂合度(H_o)、期望杂合度(H_e)、Shannon 多样性指数(I)以及多态信息含量(PIC)是评估群体遗传多样性水平的重要指标^[4,26]。本研究中供试群体 Nei's 基因多样性指数(H)为 0.582 1, 平均期望杂合度(H_e)为 0.584 0, 平均观测杂合度(H_o)为 0.489 9, Shannon 多样性指数(I)为 1.178 1, 多态信息含量(PIC)为 0.535 4, 表明沙

表 6 各引物各扩增片段对应编号

Table 6 The code of fragments of primers

Primer name	Code	Size (bp)	Primer name	Code	Size (bp)		
RO367	A	360	GHS304	D	259		
	B	362		E	271		
	C	364		F	274		
	D	366		G	277		
	E	370		H	280		
	F	372		I	283		
	G	374		A	153		
	H	376		B	161		
	I	380		C	165		
	J	382		D	171		
	K	386		CGY8	A	156	
	CGY9	A			286	B	162
		B			288	C	168
C		290	D	170			
D		294	E	182			
E		296	F	186			
F		298	G	188			
G		300	H	192			
H		304	I	194			
I		306	J	196			
J		308	K	200			
K		310	L	210			
L		316	M	212			
HR06		A	93	CGY13	A	181	
	B	95	B		233		
	C	97	C		235		
	D	99	D		259		
	E	101	E		295		
	F	109	F		297		
	G	111	G		349		
	H	113	H		365		
	I	117	I		369		
	J	119	RO97		A	180	
	K	121			B	183	
	RO20	A			250	C	189
		B	251		D	192	
C		253	E	198			

表 7 150 份沙枣材料的指纹图谱

Table 7 Fingerprints of 150 *Elaeagnus angustifolia*

No.	SSR fingerprinting	No.	SSR fingerprinting
BF1	JBBDEDHAAHLFICC	DX26	AHBBFFDIAALLDFAA
BF2	AJCCDHDDACKLDIAA	DX27	AJBCHHHIAAADFAC
BF3	CJBCDHEHCDAADDAE	DX28	HJEEHHHACHLDFAC
BF4	FHCCEEEACAADFAC	DX29	AECCEFEEACAADFAC
BF5	AHBBBHDHACILDEAA	DX30	HJDDEHDEADAFFCC
BF6	HJDDEHHIAAADIAAC	DX31	HKAEAEDEAAAABDAA
BF7	ABDDEEIBC AADFAA	DX32	CJCCDHEHC DHLADAE
BF8	FHCCEHHHABGGDDAC	DX33	HHDEHDHAAAABDAA
BF9	HHDEHDEAAAADICC	DX34	AACCCHHICCEHDICE
BF10	BFBBEKAHACAADICC	DX35	EJDDEHEHABHHDDCC
BF11	AFCCFH EEAACDAA	DX36	CJADDHEHCDAADFAE
BF12	AABBHHEIBC AADDA	DX37	AACCCHAHABDDDFCC
BF13	EJBBGHAHAAAADFCC	DX38	ACBBCEHIAAADFCC
BF14	AFCCFH EEAADIAA	DX39	CJBBHHEHCDAADIAE
BF15	HJALFH EEAADFCC	DX40	AHBCHHEEACHHBDAA
BF16	CECCFH HIACCCDDCC	DX41	AFEKCEHHACAADFAC
BF17	AABBHHCACAADIAAC	DX42	HJDFEHEHADAADIAAC
BF18	FHDDHIHIACIMDFAC	DX43	AACCHHAHAAAADICC
BF19	IJDDEF EIADGGDFCC	DX44	AHBBHHEIABAACFCC
BF20	AHCCAHHHAAAADDA	DX45	FJBBEHEHAAAADFAC
BF21	CJCCHHEHC DHHBFAE	DX46	HJBBHHHHCACAADIAAC
BF22	AJCCFH EHAADDECC	DX47	HHBBDEE IABHHDGAA
BF23	AADDEHDDABBIBDAA	DX48	AHDDEHEIACGGDIAC
BF24	CHDDDHEEAACCDIAA	DX49	JDDHJ0AAAADIAD
BF25	ACBBFIHHCDAADFAB	DX50	HJBBHI0AAAADIAC
BF26	CFBBEHHHACHHDFAA	DX51	AEDDEEDHABAADICE
BF27	AJBBHHIACAADFAC	DX52	AJBCEHHIABHHDFAA
BF28	EHDDEFH HAAAADIAA	DX53	ABDDHHEEACAADFAA
BF29	HJDDEHEHADBGDIAE	DX54	HJBBFHDEBCHH0AC
BF30	EJBBBEEHDDAADICC	DX55	HHKKEEHIADAADDA
BF31	AJFFEEHIBDAADFAA	DX56	BHBBHHDHAAHLDFAC
BF32	AADDEEHHABHLDFAA	Z1	AABBDDDEHDDLDDCC
BF33	HHBBEHEIACFFDIAC	Z2	AJBDEDEADHHDFAAC
BF34	AHBBFH HIACAADFCC	Z3	AJBEEEHABLLDDCC
BF35	EHBBHHDEAAAADICC	Z4	AJBDHEEA AHHDFAAC
BF36	BHBBEHBHAAAADFAC	Z5	AJDDDEE EAAAADDDCC
BF37	BHBCHJBHABILDIAB	Z6	AFBBEHEHADAADDA
BF38	AADDEHEHAALLDFCC	Z7	AFBCDFEHADAADFAE
BF39	AADFEHHHCDEEDIAC	Z8	AABBDEHHADBBDIAA

(待续)

(续表 7)

No.	SSR fingerprinting	No.	SSR fingerprinting
BF40	AHCCEHAHADAADDCC	Z9	AJDEDFEEDDAADDAA
BF41	ACDKEHHHCDEEDICC	Z10	FHDDEEHHAAMMDFCC
BF42	AHDKFHHHBDAADDAE	Z11	FHDDEEHHAALLDFCC
BF43	AAEKEEEHCDAADDCC	Z12	HJDDEEHAAHHDHAA
BF44	AACCFHBHACBBFICE	Z13	AFEKEEHHADKKDIAA
BF45	AEDDEHBHAAHHDFAE	Z14	AFDIDEEHABHLDIC
BF46	AHEKFHBHADAADFAA	Z15	AHBBEFDHBCGGDIAC
BF47	AHBBEHHIADAADFCC	Z16	AFDKEEEEAAAADCE
BF48	ACDKFHHHCDAACDAE	Z17	FJEEDHHHAAAADFCC
BF49	AACCEHEHAAHHDFFCE	Z18	AEBBDFGHDDAADICC
BF50	ACCCEHBBADAADCEC	Z19	AADKEHHHADAADIAC
DX1	AECCEHEHAAEEDDCC	Z20	CHDJHHDHBDKMDICC
DX2	AAEKFHAHBDILDICE	Z21	AHDKEIAECDAADFAC
DX3	AHBBEHHHADAADIAE	Z22	AJDDDDHDHACAADFEE
DX4	AECCEEAHADAADIAE	Z23	AFBCEHEEABAGDECC
DX5	ACCCEEAHBDAADCEC	Z24	AABBEEEEBDAADICC
DX6	EJCCBDBFBCEMDFAA	Z25	AJDDCEHHBDAADIAC
DX7	AFBCDIAHBDHLDIBE	Z26	FJBBHHEHBDAADFAC
DX8	AECCEFHEIAAHHDAAE	Z27	FJBBHHEHBDAADIAC
DX9	AHCCFHAECAAFIAA	Z28	AFDEDJEHCCHLDEAE
DX10	AHCCEFEHADAADFCC	Z29	FJDKEHHHBCAADAEEA
DX11	CHDDFHHHACHHDFAC	Z30	JBBDEEIABAADIAA
DX12	CDDDFHHHACAABFAC	Z31	AJDDDEEHADAAFICC
DX13	EHCCFHCHBDAADDAE	Z32	JFKCHHHBDJDDAC
DX14	AHDKEHHHADAAFIAC	Z33	AJDDDEHHBDLLDFCC
DX15	AHFFEFHHCDEEDICE	Z34	BJBBDHEHACHHFIAA
DX16	AKEKEFAHADAAFICE	Z35	JBBDEEIABAAEIAA
DX17	ACDEEFHHAADIAA	Z36	AJDEHHEHADLLDFAE
DX18	HHBBEHHHCDAADFEE	Z37	AJBBHHEHCDLLDFCC
DX19	EHCCFHHHADAABDAC	Z38	AABCCEHIABAADIAA
DX20	AACCHHAHBCAABIEE	Z39	GJDEEJDEABCEDFCC
DX21	AECCHHHHADAADIAC	Z40	HHDDBDHHAALLFIAC
DX22	AHKKEHHIABHHDDAC	Z41	GJDHBBDHCDAAABDBD
DX23	AJCCFHHHCDAADIAA	Z42	AHBBEHDHAAACDFAC
DX24	ACGKEIHHBDAADICC	Z43	AJDKEEHAAAADFAC
DX25	EHBBHHEIADAADFAA	Z44	AFDDDFEHBDAADFAE

枣群体内有比较丰富的遗传多样性。本研究获得的 PIC 平均值为 0.535 4 (PIC>0.5), 低于秦永燕等^[22]基于 7 个种群翅果油树的 PIC 平均值 0.619 9 和赵雨欣等^[12]基于 42 个沙棘的 PIC 平

均值 0.623 0, 相比之前报道^[13]的用于沙棘种质遗传多样性分析的 RAPD、ISSR 标记的 PIC 值 (0.903 1, 0.819 2) 明显要低, 表明相较于沙枣近似种沙棘和翅果油树以及其他标记技术而言,

这些 SSR 标记所在的基因序列在沙枣中具有相对高的保守性, 多态性程度相对较低。PIC 值的高低反映了 DNA 变异程度的高低, 其值越高, 越有利于多态性评估^[7]。其中, 11 对引物中 8 对具有高度多态性, 2 对引物具有中度多态性, 1 对引物具有低多态性, 总体表现出了较高的多态性。本研究中的 Shannon 多样性指数(I)高于 Ma 等^[10]基于 16 个沙枣的 1.066 0。相关研究表明, 等位基因数越多对应位点的多态性程度越高, 且当多态性位点数量大于 70 个时, 该标记的多态信息比较可靠^[27]。本研究多态性位点有 84 个, 等位基因数为 7.636 4, 高于 SSR 引物来源文献[14,16,22]中沙枣的本地和入侵分布区的等位基因数(分别为 4.545 0、4.455 0), 沙棘的等位基因数为 3, 翅果油树的等位基因数为 1.610 9, 也高于 Ma 等^[10]基于 16 个沙枣的等位基因数 5.259 0, 原因可能是供试材料样本数量较前人有所扩增, 涵盖了沙枣主产区, 具有一定的代表性, 说明了引物有较好的鉴别能力。群体遗传变异程度由有效等位基因数体现^[4]。而有效等位基因数(N_e)平均为 2.832 6, 与等位基因数(7.64)之间差异较大, 表明所检测到位点的等位基因在沙枣种质资源中分配不均匀。此外, 平均期望杂合度可以反映群体的遗传一致性程度^[28]。本研究中沙枣平均期望杂合度为 0.584 0, 大于其他植物翅果油树^[20]两个分离种群(AQ 和 NLXKM)的 H_e 值 0.521 6 和 0.511 3, 说明其遗传一致性相对较高, 遗传相似性系数为 0.674 0–0.976 7, 平均为 0.831 5, 说明从群体来看, 沙枣群体的亲缘关系相对较近, 遗传差异小, 分化程度比较有限。

3.2 群体结构分析与聚类分析

利用 Ntsys 软件计算 150 份沙枣材料的遗传相似性系数。从沙枣群体来源来看, 150 份沙枣材料的遗传相似系数均大于 0.6, 遗传相似

性度较高, 分布在 0.800–0.900, 占比 72.04%, 表明沙枣群体间存在较大的基因交流, 或者说遗传上同质化程度较高。原因可能是材料收集于相对集中的地方, 而甘肃省是沙枣的主产区, 导致遗传背景较为单一, 亲缘关系较近, 这与李文秀等^[27]、孔琳琳^[29]等的研究结论相似。因此在今后的选育工作中需注意扩大沙枣种质的遗传背景^[30]。

本研究基于 Nei's 遗传距离利用 UPGMA 方法进行聚类分析, 将 150 份沙枣种质分为 3 大类, 其中第 II 类可分为 3 个亚类。不同来源地的沙枣种质资源并未明显地区分开, 如来自甘肃省张掖的 44 份种质资源除了第 II₁ 类外, 在其他类群均有分布, 发现聚类结果和地理来源并不一致, 这与陈志祥等^[31]、李文秀^[27]等的研究结论一致。推测种质资源的地理来源对遗传差异有一定影响, 但两者并不存在必然联系^[32]。可能是由于甘肃省是沙枣主产区, 群体与外界种质资源交流频繁, 也可能是由于供试资源中许多为栽培种而非野生种有关, 也可能是供试样品来源地地理位置接近、种质间遗传背景相似有关^[33]。此外, 参照曾郅涵等^[34]对甘肃省、北京市沙枣表型聚类分析, 发现形态学标记与 SSR 标记结果大部分不一致, 说明表型性状聚类结果与其在分子水平上聚类的吻合度存有差异。主要原因是 2 种聚类分析依赖的基础数据不同, 150 份沙枣种质材料遗传多样性丰富, 易受环境条件和基因显隐性的影响, 遗传表达不稳定, 表型性状在测定时有一定的误差^[35]; 也有可能是因为 SSR 位点的数目太少。因此在今后的研究中可以开发更多的核心引物, 并且使用形态学标记结合 SSR 分子标记技术的方法更精准地进行种质鉴定。此外, 本研究还发现同一类群中北京引种甘肃地区的沙枣与甘肃张掖的性状相似, 如甘肃张掖的 Z15 和北京大兴引种甘肃的

DX48、甘肃张掖的 Z38 和北京白浮引种的 Z38 等,推测这一类群中种质可能来源于相同(相似)的祖先。

前期的研究中将 $Q \geq 0.600$ 视为血缘相对比较单一, $Q < 0.600$ 视为具有混合来源^[36]。本研究发现供试的 150 份沙枣材料遗传背景简单,基因分化程度有限,遗传变异可能多发生于群体内^[37],该结论与胡颓子属沙棘的群体分析结果相同^[38]。可能是由于这批种质多为栽培种、参与了人工驯化和改良利用有关^[39],也可能是由于胡颓子属沙枣和沙棘多为雌雄异株,雌雄异株物种的自然居群应具有较高的遗传多样性且居群间的分化较小^[40],所以遗传多样性非常丰富是从个体角度来说的,这个结论与本研究得到的群体之间遗传差异不大的结果相吻合^[41]。同时沙枣较强的萌蘖能力有利于保持由变异、固定杂合以及有性繁殖而产生的杂合子,从而维持较高的遗传多样性。并且沙枣是多年生木本植物,长期的生活史可以积累更多变异,这一结论在伞花木^[42]中得以证明。因此,在今后的工作中应针对不同育种目的,使品种群体内部保持相应水平的遗传多样性以挖掘不同目标性状沙枣种质资源,对于选育优质、广适性强的沙枣具有重要指导意义。

3.3 指纹图谱的构建

SSR 标记的检测技术主要为聚丙烯酰胺凝胶电泳检测及毛细管电泳的荧光检测^[29]。近年来荧光测序技术与 SSR 检测技术结合构建品种指纹图谱在樱花^[43]、甜瓜^[30]、山楂^[44]等物种中已经有了一定的应用。相较于传统的凝胶电泳方法,基于荧光标记的毛细管电泳检测方法简单高效,可以准确读出扩增片段大小,更适合大批量种质资源材料的检测。通过对比毛细管电泳数值与现有数据,即可直接完成对未知品种的鉴定^[45],因而该方法构建的指纹图谱相较

于传统检测法准确性更高。目前利用荧光标记的毛细管电泳技术构建沙枣种质资源 SSR 指纹图谱还未见报道。本研究中采用毛细管电泳检测技术结合核心引物的筛选共同构建了 150 份沙枣种质的指纹图谱。

相关研究表明,若 $H > 0.5$ 、 $PIC > 0.5$ 、 $Na \geq 5$,即表明该位点遗传变异程度高,选择余地大,可利用这样的位点进行标记辅助选择^[46]。为了达到用最少的引物鉴定出最多种质的目的,构建指纹图谱的 8 对引物的 H 值均值是 0.688 $1 > 0.5$, Na 均值是 9.25 ≥ 5 , PIC 值均值是 0.644 $0 > 0.5$,符合高度多态性位点的要求,说明所筛选的 8 对引物理论上可区分 150 份沙枣材料,基本能满足未来对沙枣种质鉴定的需求。在今后的沙枣种质资源研究中需要构建更多稳定的 DNA 指纹图谱,为沙枣种质的鉴定分类提供依据。

4 结论

本研究运用表型分析结合分子遗传聚类与相关性分析的方法,揭示了甘肃省沙枣材料具有显著的遗传差异和丰富的遗传多样性,在园林应用、良种选育等方面具有重要意义;利用 8 对引物构建了 150 份沙枣植株的 DNA 指纹图谱库,为今后沙枣种质鉴定与筛选体系的研究提供了技术支撑。

REFERENCES

- [1] SUN M, LIN Q. A revision of *Elaeagnus* L. (Elaeagnaceae) in mainland China[J]. Journal of Systematics and Evolution, 2010, 48(5): 356-390.
- [2] HAMIDPOUR R, HAMIDPOUR S, HAMIDPOUR M, SHAHLARI M, SOHRABY M, SHAHLARI N, HAMIDPOUR R. Russian olive (*Elaeagnus angustifolia* L.): from a variety of traditional medicinal applications to its novel roles as active antioxidant, anti-inflammatory, anti-mutagenic and analgesic agent[J]. Journal of Traditional and Complementary Medicine, 2016, 7(1): 24-29.

- [3] 谢新平. 甘肃沙区沙枣资源调查及繁殖技术研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学硕士学位论文, 2010.
XIE XP. Study on the resource investigation and technique propagation of *Elaeagnus angustifolia* in desert region of Gansu Province[D]. Yangling: Master's Thesis of Northwest A&F University, 2010 (in Chinese).
- [4] 李子航, 何立飞, 王秀军, 郭林繁, 罗春燕, 李庆卫. 基于 SSR 分子标记的地被菊遗传多样性分析和指纹图谱构建[J]. 生物工程学报, 2023, 39(7): 2839-2860.
LI ZH, HE LF, WANG XJ, GUO LF, LUO CY, LI QW. Genetic diversity analysis and fingerprints of *Chrysanthemum morifolium* based on SSR molecular markers[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(7): 2839-2860 (in Chinese).
- [5] 李霓, 蒋严妃, 苏雪, 陈纹, 张辉, 孙坤. 肋果沙棘北缘居群的遗传多样性与遗传结构[J]. 广西植物, 2016, 36(5): 557-563.
LI N, JIANG YF, SU X, CHEN W, ZHANG H, SUN K. Genetic diversity and genetic structure of the northern margin populations of *Hippophae neurocarpa*[J]. Guihaia, 2016, 36(5): 557-563 (in Chinese).
- [6] 王一. 滨海及岛屿植物大叶胡颓子遗传多样性与群体遗传结构分析[D]. 泰安: 山东农业大学硕士学位论文, 2020.
WANG Y. Analysis of the genetic diversity and population genetic structure of the coastal and island plant *Elaeagnus macrophylla*[D]. Taian: Master's Thesis of Shandong Agricultural University, 2020 (in Chinese).
- [7] 王秀军, 赵彦贝, 王静, 李子航, 张纪堂, 李庆卫. 基于 SSR 分子标记的 175 份蜡梅种质遗传多样性分析和指纹图谱构建[J]. 生物工程学报, 2024, 40(1): 252-268.
WANG XJ, ZHAO YB, WANG J, LI ZH, ZHANG JT, LI QW. Genetic diversity analysis and fingerprinting of 175 *Chimonanthus praecox* germplasm based on SSR molecular marker[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(1): 252-268 (in Chinese).
- [8] NAWAZ M, KRUTOVSKY K, MUELLER M, GAILING O, KHAN A, BUERKERT A, WIEHLE M. Morphological and genetic diversity of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) in the karakoram mountains of northern Pakistan[J]. Diversity, 2018, 10(3): 76.
- [9] WANG YL, QIN YY, DU Z, YAN GQ. Genetic diversity and differentiation of the endangered tree *Elaeagnus mollis* Diels (Elaeagnus L.) as revealed by simple sequence repeat (SSR) markers[J]. Biochemical Systematics and Ecology, 2012, 40: 25-33.
- [10] MA WF, WANG PP, HUANG JH, ZHANG DY, YANG WK, PAN BR, SHI W. The taxonomic relationship between *Elaeagnus moorcroftii* and *E. angustifolia* (Elaeagnaceae) based on morphological similarities and simple-sequence repeat markers[J]. Nordic Journal of Botany, 2021, 39(7): 1-8.
- [11] LIU YL, LI SQ, WANG YY, LIU PY, HAN WJ. *De novo* assembly of the seed transcriptome and search for potential EST-SSR markers for an endangered, economically important tree species: *Elaeagnus mollis* Diels[J]. Journal of Forestry Research, 2020, 31(3): 759-767.
- [12] 赵雨欣, 张哲文, 考惠霞, 孙永江, 辛智鸣, 赵喆, 董树斌, 程瑾. 基于 EST-SSR 标记的沙棘品种鉴定及指纹图谱构建[J]. 生态与农村环境学报, 2024, 40(3): 374-385.
ZHAO YX, ZHANG ZW, KAO HX, SUN YJ, XIN ZM, ZHAO Z, DONG SB, CHENG J. Identification and fingerprint construction of *Hippophae rhamnoides* varieties based on EST-SSR markers[J]. Journal of Ecology and Rural Environment, 2024, 40(3): 374-385 (in Chinese).
- [13] UZUN A, ÇELİK B, KARADENİZ T, YILMAZ KU, ALTINTAŞ C. Assessment of fruit characteristics and genetic variation among naturally growing wild fruit *Elaeagnus angustifolia* accessions[J]. Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 2015, 39: 286-294.
- [14] GASKIN JF, HUFBAUER RA, BOGDANOWICZ SM. Microsatellite markers for Russian olive (*Elaeagnus Angustifolia*; Elaeagnaceae)[J]. Applications in Plant Sciences, 2013, 1(9): 1-3.
- [15] 刘昱洲. 沙枣种质资源遗传多样性研究[D]. 长沙: 湖南农业大学硕士学位论文, 2015.
LIU YZ. Studies on genetic diversity of *Elaeagnus angustifolia* L[D]. Changsha: Master's Thesis of Hunan Agricultural University, 2015 (in Chinese).
- [16] 李珊珊, 曾艳飞, 何彩云, 张建国. 基于沙棘转录组序列开发 EST-SSR 分子标记[J]. 林业科学研究, 2017, 30(1): 69-74.
LI SS, ZENG YF, HE CY, ZHANG JG. Development of EST-SSR markers based on seabuckthorn transcriptomic sequences[J]. Forest Research, 2017, 30(1): 69-74 (in Chinese).
- [17] 蒋严妃. 利用 SSR 分子标记分析棱果沙棘杂交带的遗传结构和基因流[D]. 兰州: 西北师范大学硕士学位论文, 2014.

- JIANG YF. Genetic structure and gene flow in hybrid zone of *Hippophae goniocarpa* as revealed by SSR markers[D]. Lanzhou: Master's Thesis of Northwest Normal University, 2014 (in Chinese).
- [18] 王罗云, 何彩云, 罗红梅, 张建国, 段爱国, 曾艳飞. 沙棘 7 个亚种与 26 个重要品种的遗传多样性[J]. 浙江农林大学学报, 2019, 36(4): 670-677.
- WANG LY, HE CY, LUO HM, ZHANG JG, DUAN AG, ZENG YF. Genetic variation of 7 subspecies and 26 important cultivars in *Hippophae rhamnoides*[J]. Journal of Zhejiang A&F University, 2019, 36(4): 670-677 (in Chinese).
- [19] 叶占洋. 翅果油树遗传多样性和交配系统研究[D]. 北京: 中国林业科学研究院硕士学位论文, 2017.
- YE ZY. Studies on genetic diversity and mating system of *Elaeagnus mollis* Diels[D]. Beijing: Master's Thesis of Chinese Academy of Forestry, 2017 (in Chinese).
- [20] 叶占洋, 王兆山, 李云晓, 饶国栋, 张建国. 中国特有濒危植物翅果油树的 SSR 引物开发及特性[J]. 西北植物学报, 2016, 36(2): 274-279.
- YE ZY, WANG ZS, LI YX, RAO GD, ZHANG JG. Development and characterization of microsatellite markers in the *Elaeagnus mollis* Diels[J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2016, 36(2): 274-279 (in Chinese).
- [21] 许汀, 许璐, 王昊, 拉琼, 孙坤, 张文驹. 基于 5'锚定 PCR 法和磁珠富集法的西藏沙棘多态性 SSR 引物开发[J]. 复旦学报(自然科学版), 2014, 53(4): 543-549.
- XU T, XU L, WANG H, LA Q, SUN K, ZHANG WJ. Development of polymorphic microsatellite markers from *Hippophae tibetana* using 5'-anchored PCR methods and magnetic beads hybridization[J]. Journal of Fudan University (Natural Science Edition), 2014, 53(4): 543-549 (in Chinese).
- [22] 秦永燕, 王玮玲, 张钦弟, 毕润成, 闫桂琴. 濒危植物翅果油树种群的遗传多样性和遗传分化研究[J]. 武汉植物学研究, 2010, 28(4): 466-472.
- QIN YY, WANG YL, ZHANG QD, BI RC, YAN GQ. Analysis on the population genetic diversity of an endangered plant (*Elaeagnus mollis*) by SSR markers[J]. Journal of Wuhan Botanical Research, 2010, 28(4): 466-472 (in Chinese).
- [23] 樊文强, 盖红梅, 孙鑫, 杨爱国, 张忠锋, 任民. SSR 数据格式转换软件 DataFormater[J]. 分子植物育种, 2016, 14(1): 265-270.
- FAN WQ, GAI HM, SUN X, YANG AG, ZHANG ZF, REN M. DataFormater, a software for SSR data formatting to develop population genetics analysis[J]. Molecular Plant Breeding, 2016, 14(1): 265-270 (in Chinese).
- [24] EVANNO G, REGNAUT S, GOUDET J. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study[J]. Molecular Ecology, 2005, 14(8): 2611-2620.
- [25] 冷宇鑫, 闵义, 付阳云, 周奎, 何颖, 文晓鹏. 贵州荞麦重要种质的遗传多样性分析及分子身份证构建[J]. 华中农业大学学报, 2024: 1-10.
- LENG YX, MIN Y, FU YY, ZHOU K, HE Y, WEN XP. Genetic diversity and ID construction of important buckwheat germplasm in Guizhou Province based on SSR markers[J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2024: 1-10 (in Chinese).
- [26] 丁艺冰, 辛旭霞, 冯智尊, 郭娟, 曹越, 陈喜明, 王晓丹, 曹晓宁, SANTRA DK, 陈凌, 乔治军, 王瑞云. 东北春播区糜子核心种质的荧光微卫星标记鉴定[J]. 作物学报, 2024: 1-23.
- DING YB, XIN XX, FENG ZZ, GUO J, CAO Y, CHEN XM, WANG XD, CAO XN, SANTRA DK, CHEN L, QIAO ZJ, WANG RY. Core germplasm identification of proso millet in spring sowing area of Northeast China using fluorescent microsatellite markers[J]. Acta Agronomica Sinica, 2024: 1-23 (in Chinese).
- [27] 李文秀, 李进良, 贺军军, 张华林, 罗萍, 魏滢, 赵美婷. 基于 SSR 标记的砂仁种质资源遗传多样性与群体结构分析[J]. 中国中药杂志, 2022, 47(17): 4618-4626.
- LI WX, LI JL, HE JJ, ZHANG HL, LUO P, WEI Y, ZHAO MT. Genetic diversity and population structure of germplasm resources of *Amomum villosum* based on SSR markers[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2022, 47(17): 4618-4626 (in Chinese).
- [28] 韩嘉琪, 王海平, 宋江萍, 贾会霞, 张晓辉, 李森, 徐楚, 李芝洁, 阳文龙. 基于 SSR 标记的百合资源遗传背景分析[J]. 生物工程学报, 2024, 40(4): 1211-1224.
- HAN JQ, WANG HP, SONG JP, JIA HX, ZHANG XH, LI S, XU C, LI ZJ, YANG WL. Genetic background of lily germplasm resources based on SSR markers[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(4): 1211-1224 (in Chinese).
- [29] 孔琳琳, 孟现东, 王建军, 俞金健, 胡现铭, 林二培, 黄华宏. 彩叶香樟转录组 SSR 鉴定及指纹图谱构建[J]. 农业生物技术学报, 2023, 31(11): 2423-2434.
- KONG LL, MENG XD, WANG JJ, YU JJ, HU XG, LIN EP, HUANG HH. SSR identification of

- transcriptome and fingerprint construction in color-leafed *Cinnamomum camphora*[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2023, 31(11): 2423-2434 (in Chinese).
- [30] 李超, 杨英, 陈伟, 郑贺云, 廖新福, 孙玉萍. 西州密系列甜瓜 SSR 指纹图谱构建及聚类分析[J]. 园艺学报, 2022, 49(3): 622-632.
LI C, YANG Y, CHEN W, ZHENG HY, LIAO XF, SUN YP. Construction of DNA fingerprinting and clustering analysis with SSR markers for the muskmelon of xizhoumi series[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2022, 49(3): 622-632 (in Chinese).
- [31] 陈志祥, 罗小燕, 李拴林, 吴如月, 王文强, 丁西朋. 基于 SSR 标记的木豆种质资源遗传多样性与群体结构分析[J]. 草地学报, 2021, 29(5): 904-911.
CHEN ZX, LUO XY, LI SL, WU RY, WANG WQ, DING XP. Genetic diversity and population structure analysis of the pigeonpea (*Cajanus cajan* L.) germplasm resources based on SSR markers[J]. Acta Agrestia Sinica, 2021, 29(5): 904-911 (in Chinese).
- [32] 王健胜, 侯桂玲, 王二伟, 马爱锄, 程世平. 基于 SSR 标记的 100 份国内外小麦种质遗传多样性分析及 DNA 指纹图谱构建[J]. 山东农业科学, 2023, 55(9): 17-24.
WANG JS, HOU GL, WANG EW, MA AC, CHENG SP. Genetic diversity analysis and DNA fingerprint construction of 100 wheat germplasms from home and abroad based on SSR markers[J]. Shandong Agricultural Sciences, 2023, 55(9): 17-24 (in Chinese).
- [33] 许祎珂, 李爽, 寇佩雯, 刘长乐, 孙晓春, 黄文静. 基于表型性状和 SSR 标记的半夏遗传多样性分析及分子身份证构建[J]. 中国实验方剂学杂志, 2024, 30(5): 134-142.
XU YK, LI S, KOU PW, LIU CL, SUN XC, HUANG WJ. Genetic diversity analysis and molecular ID card construction of *Pinellia ternata* based on phenotypic traits and SSR markers[J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2024, 30(5): 134-142 (in Chinese).
- [34] 曾郅涵, 李庆卫, 遆羽静. 甘肃省张掖市野生沙枣的表型多样性及观赏性分析[J]. 植物资源与环境学报, 2021, 30(4): 12-21.
ZENG ZH, LI QW, TI YJ. Analysis on phenotypic diversity and ornamental of wild *Elaeagnus angustifolia* from Zhangye City of Gansu Province[J]. Journal of Plant Resources and Environment, 2021, 30(4): 12-21 (in Chinese).
- [35] 王彩云, 张翔宇, 成忠均, 武新玲, 柳敏, 周茂嫦, 周雪. 基于表型性状及 SSR 标记的天麻种质资源遗传多样性分析[J]. 中药材, 2024, 47(2): 281-289.
WANG CY, ZHANG XY, CHENG ZJ, WU XL, LIU M, ZHOU MC, ZHOU X. Genetic diversity analysis of *Gastrodia elata* germplasm resources based on phenotypic traits and SSR markers[J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2024, 47(2): 281-289 (in Chinese).
- [36] 卞华, 申晴, 韦海燕, 蒋亚君, 丁西朋, 白昌军. 基于 SSR 标记的柱花草种质资源遗传多样性与群体结构分析[J]. 草业科学, 2019, 36(3): 729-743.
BIAN H, SHEN Q, WEI HY, JIANG YJ, DING XP, BAI CJ. Genetic diversity and population structure analysis of *Stylosanthes* germplasm resources based on SSR markers[J]. Pratacultural Science, 2019, 36(3): 729-743 (in Chinese).
- [37] 陈璇, 郭蓉, 万睿璇, 许艳萍, 张庆滢, 郭孟璧, 郭鸿彦, 杨明. 云南省 5 个雌雄异株工业大麻群体遗传结构评价[J]. 分子植物育种, 2015, 13(9): 2069-2075.
CHEN X, GUO R, WAN RX, XU YP, ZHANG QY, GUO MB, GUO HY, YANG M. Genetic structure of five dioecious industrial hemp varieties in Yunnan[J]. Molecular Plant Breeding, 2015, 13(9): 2069-2075 (in Chinese).
- [38] 李贺, 阮成江, 王莉, 李景滨, 郭海, 田兴军. 基于 RNA-Seq SSR 标记的沙棘种质遗传多样性和群体结构分析[J]. 分子植物育种, 2019, 17(5): 1567-1574.
LI H, RUAN CJ, WANG L, LI JB, GUO H, TIAN XJ. Genetic diversity and population structure analysis of sea buckthorn germplasm based on RNA-seq SSR markers[J]. Molecular Plant Breeding, 2019, 17(5): 1567-1574 (in Chinese).
- [39] 危文亮, 张艳欣, 吕海霞, 王林海, 黎冬华, 张秀荣. 芝麻资源群体结构及含油量关联分析[J]. 中国农业科学, 2012, 45(10): 1895-1903.
WEI WL, ZHANG YX, LV HX, WANG LH, LI DH, ZHANG XR. Population structure and association analysis of oil content in a diverse set of Chinese sesame (*Sesamum indicum* L.) germplasm[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2012, 45(10): 1895-1903 (in Chinese).
- [40] LOVELESS MD, HAMRICK JL. Ecological determinants of genetic structure in plant populations[J]. Annual Review of Ecology and Systematics, 1984, 15: 65-95.
- [41] SALENTIEN EMJ, ZHANG QY, AMADUCCI S, YANG M, TRINDADE LM. New developments in fiber hemp (*Cannabis sativa* L.) breeding[J]. Industrial

- Crops and Products, 2015, 68: 32-41.
- [42] 朱红艳, 康明, 叶其刚, 黄宏文. 雌雄异株稀有植物伞花木(*Eurycorymbus caralerici*)自然居群的等位酶遗传多样性研究[J]. 武汉植物学研究, 2005, 23(4): 310-318.
ZHU HY, KANG M, YE QG, HUANG HW. Allozymic genetic diversity in *Eurycorymbus caralerici* (levl.) rehd. et hand.-mazz., an endemic and dioecious tree in China[J]. Journal of Wuhan Botanical Research, 2005, 23(4): 310-318 (in Chinese).
- [43] 孙泽硕, 蒋冬月, 柳新红, 沈鑫, 李因刚, 屈雨飞, 李永华. 基于 SSR 标记的 42 份樱花品种的聚类分析及 DNA 指纹图谱构建[J]. 园艺学报, 2023, 50(3): 657-668.
SUN ZS, JIANG DY, LIU XH, SHEN X, LI YG, QU YF, LI YH. Cluster analysis and construction of DNA fingerprinting of 42 oriental cultivars of flowering cherry based on SSR markers[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2023, 50(3): 657-668 (in Chinese).
- [44] 秦宇, 郭荣琨, 农惠兰, 王燕, 崔凯, 董宁光. 利用 SSR 荧光标记构建山楂种质分子身份证[J]. 园艺学报, 2024: 1-14.
QIN Y, GUO RK, NONG HL, WANG Y, CUI K, DONG NG. Using the fluorescent labeled SSR markers to establish molecular identity of main hawthorn varieties and hawthorn related species[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2024: 1-14 (in Chinese).
- [45] 毕宁宁, 侯立娜, 王天琪, 阮坤非, 张静菊, 刘忠华. 基于转录组测序的玫瑰及其近缘种遗传多样性分析与指纹图谱构建[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2024(9): 1-15.
BI NN, HOU LN, WANG TQ, RUAN KF, ZHANG JJ, LIU ZH. Genetic diversity analysis and fingerprint construction of *Rosa rugosa* and its related species based on transcriptome sequencing[J]. Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition), 2024(9): 1-15 (in Chinese).
- [46] 陶乃奇, 张斌, 刘信凯, 周和达, 钟乃盛, 严丹峰, 张敏, 高继银, 张文驹. 利用荧光标记 SSR 鉴别 21 个茶花新品种[J]. 植物学报, 2019, 54(1): 37-45.
TAO NQ, ZHANG B, LIU XK, ZHOU HD, ZHONG NS, YAN DF, ZHANG M, GAO JY, ZHANG WJ. Identification of 21 new *Camellia* hybrid varieties by fluorescence-labelled simple sequence repeat markers[J]. Chinese Bulletin of Botany, 2019, 54(1): 37-45 (in Chinese).

(本文责编 郝丽芳)