

DOI:10.11829/j.issn.1001-0629.2015-0472

廖丽, 王晓丽, 刘建秀, 刘洋, 白昌军, 徐毓皎, 张欣怡, 王志勇. 地毯草种质资源 ISSR 标记遗传多样性分析. 草业科学, 2016, 33(4): 608-614.

Liao L, Wang X L, Liu J X, Liu Y, Bai C J, Xu Y J, Zhang X Y, Wang Z Y. Analysis of genetic diversity of *Axonopus compressus* using ISSR markers. Pratacultural Science, 2016, 33(4): 608-614.

地毯草种质资源 ISSR 标记遗传多样性分析

廖丽¹, 王晓丽¹, 刘建秀², 刘洋¹, 白昌军³,
徐毓皎¹, 张欣怡¹, 王志勇¹

(1. 热带作物种质资源保护与开发利用教育部重点实验室 海南大学农学院, 海南 海口 570228;

2. 江苏省中国科学院植物研究所, 江苏 南京 210014; 3. 中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所, 海南 儋州 571737)

摘要:地毯草(*Axonopus compressus*)是华南地区使用的多年生草本植物,本研究通过 ISSR 标记对华南地区 64 份地毯草种质资源的遗传多样性和亲缘关系进行分析。结果表明,25 对 ISSR 引物共扩增出 208 条清晰谱带,大小在 300~1 500 bp,其中多态性条带有 196 条,多态性比率为 94.23%,25 对引物扩增条带数在 4~15 条,平均每对引物 8.32 条,遗传相似系数是 0.46~0.99。通过 UPGMA 方法对 64 份地毯草材料进行聚类分析。结果表明,来自相同采集地区的材料并没有完全聚在一类,供试材料间出现较大的遗传差异。本研究结果可为今后开展地毯草种质资源遗传保护、品种鉴定、新品种选育提供基础。

关键词:地毯草;种质资源;ISSR;遗传多样性

中图分类号:S540.3

文献标识码:A

文章编号:1001-0629(2016)4-0608-07*

Analysis of genetic diversity of *Axonopus compressus* using ISSR markers

Liao Li¹, Wang Xiao-li¹, Liu Jian-xiu², Liu Yang¹, Bai Chang-Jun³,
Xu Yu-jiao¹, Zhang Xin-yi¹, Wang Zhi-yong¹

(1. Key Laboratory of Protection and Developmental Utilization of Tropical Crop Germplasm Resources, Ministry of Education, College of Agronomy Hainan University, Haikou 570228, China;

2. Institute of Botany, Jiangsu Province and Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210014, China;

3. Tropical Pasture Research Center, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Danzhou 571737, China)

Abstract: *Axonopus compressus* is perennial herbaceous plants and used in south China. Genetic diversity of 64 carpetgrass accessions (cultivar) was analyzed using the ISSR markers. The results showed that 25 ISSR primers generated 208 distinct bands (300~1 500 bp), 196 (94.23%) of which were polymorphic bands. The number of observed bands ranged from 4 to 15, with average of 8.3. The genetic similarity coefficient is between 0.46~0.99. Unweighted pair-group method with arithmetic means (UPGMA) clustered 64 accessions (cultivar) into three groups, and not all samples from the same region belonged to the same group. ISSR markers has potential in marker-assisted breeding and the assessment of genetic diversity in wild germplasm resources of car-

* 收稿日期:2015-08-24 接受日期:2015-12-08

基金项目:国家自然科学基金项目(31060266);海南省自然科学基金项目(310031)

第一作者:廖丽(1981-),女,江西乐安人,副教授,博士,研究方向为植物种质资源遗传多样性与质量评价。E-mail:liaoli@hainu.edu.cn

通信作者:王志勇(1979-),男,江西乐平人,副教授,博士,研究方向为热带草坪草种质资源遗传多样性与遗传育种。

E-mail:wangzhiyong@hainu.edu.cn

petgrass.

Key words: *Axonopus compressus*; germplasm; ISSR; genetic diversity

Corresponding: Wang Zhi-yong E-mail: wangzhiyong@hainu.edu.cn

地毯草 (*Axonopus compressus*), 别名大叶油草, 属禾本科地毯草属多年生草本植物, 暖季型草坪草。其中地毯草属约有 40 个种, 在我国主要分布在热带和亚热带等气候温暖湿润地区, 但是地毯草不耐寒, 气温变低时叶色就会呈现紫红色, 植株枯黄, 影响观赏价值和使用价值^[1]。目前世界各国对地毯草种质资源的研究还只停留在一些简单的调查上, 还没有把性状的鉴定与控制性状的基因以及基因的传递和变异规律的研究结合起来, 但在地毯草属的形态多样性^[2-4]、抗逆性^[5-9]、分子标记^[10-11]等方面的研究较多。

目前, ISSR 标记技术^[12]具有操作简单、成本低、快速灵敏、多态性高、所需 DNA 量少以及无需预知研究对象的基因组序列等优点, 同时也具有 SSR 的稳定性。且 ISSR 标记技术已经广泛地应用于品种鉴定^[13]、遗传多样性分析^[14-17]等研究, 然而, 地毯草种质资源分子标记研究甚少^[10-11, 18]。席嘉宾等^[19]利用 15 个野生地毯草品系建立了 ISSR 的反应体系并进行了遗传多样分析。本研究在此基础上, 利用 ISSR 标记对国内外 63 份野生地毯草种质和 1 份育成品种的遗传多样性和亲缘关系进行研究, 为今后地毯草种质开发利用提供基础。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

64 份材料分别来源于中国的海南、广州、广西、云南、福建和贵州以及澳大利亚(表 1), 种植在海南大学儋州校区农学院基地并统一管理。

1.2 基因组 DNA 的提取和检测

地毯草基因组 DNA 的提取参照改良的 CTAB 法^[20], 并做了适当的修改。取 DNA 原液 5 μL , 加入 1 μL 的上样缓冲液, 混匀, 然后用 0.8% 琼脂糖凝胶进行电泳检测(其中电泳缓冲液为 0.5 \times TBE, 电压 3~4 $\text{V} \cdot \text{cm}^{-1}$ 电泳 30 min), 最后稀释成 50 $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 备用。

1.3 ISSR-PCR 扩增体系

ISSR 反应体系(20 μL)和扩增程序为^[16, 19]: 2 μL 10 \times buffer (100 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl pH 8.3, 500 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl, 15 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MgCl_2); 1.8 μL 2.5

$\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ dNTP, 1 μL 50 ng 模板 DNA; 1 μL 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$ ISSR 引物(表 2); 1 μL 5 U $\cdot \mu\text{L}^{-1}$ Taq DNA 聚合酶; 无菌去离子水补足 20 μL 。PCR 反应程序为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 45 s, 45~55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 90 s, 共 45 个循环; 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.4 ISSR-PCR 扩增产物凝胶电泳检测

扩增结束后, 取扩增产物 8.5 μL 与 2 μL 6 \times Loading Buffer (TaKaRa) 混匀, 在 1.5% 琼脂糖凝胶上电泳, 电压 4 $\text{V} \cdot \text{cm}^{-1}$, 时间 1.5~2 h, 电泳缓冲液为 0.5 \times TBE, 电泳结束后取出凝胶, 在凝胶成像仪上检测照相, 进行分析。

1.5 数据处理与分析

根据 ISSR 扩增出来的电泳图谱进行人工读带, 对电泳图谱上清晰可辨且可重复出现的条带记为“1”, 无则记为“0”, 从而生成原始数据矩阵, 根据 UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Means Cluster Analysis) 法对数据进行遗传相似性聚类分析。遗传相似系数 (GS) = $2 N_{ij} / (N_i + N_j)$, 式中, N_j 为第 j 个品种的扩增条带数目, N_i 为第 i 个品种的扩增条带数, N_{ij} 代表第 i, j 个品种间共有的扩增条带数^[21]。

2 结果与分析

2.1 ISSR 标记对地毯草种质扩增的多态性分析

本研究按最佳反应程序及体系最终从 ISSR 801 到 ISSR 900 共 100 对引物中筛选出 25 对稳定性好、多态性高、条带清晰且重复性好的引物, 用于 64 份地毯草种质的扩增。25 对引物共扩增出 208 条条带清晰谱带, 大小在 300~1 500 bp, 其中多态性条带有 196 条, 单对引物扩增条带数在 4~15 条, 平均每对引物 8.32 条, 多态性比率为 94.23% (表 2)。引物 ISSR 811 扩增产物的多态性条带数为 15 条, 其多态性最丰富, 但是 ISSR 856 的扩增产物图谱最清晰(图 1)。

2.2 遗传相似性分析

相似系数是用来比较群体或个体间亲缘关系的远近程度, 相似系数越高, 则说明材料间亲缘关系越近, 遗传背景一致性越强。64 份地毯草种质遗传相似系

表1 供试材料

Table 1 Experimental materials

序号 No.	品系(种) Accessions (species)	来源 Origin	序号 No.	品系(种) Accessions (species)	来源 Origin
1	A2	海南儋州 Danzhou, Hainan	33	A82	广西扶绥 Fusui, Guangxi
2	A3	海南定安 Ding'an, Hainan	34	A83	福建厦门 Xiamen, Fujian
3	A4	海南定安 Ding'an, Hainan	35	A84	福建漳浦 Zhangpu, Fujian
4	A5	海南儋州 Danzhou, Hainan	36	A86	福建长泰 Changtai, Fujian
5	A7	海南白沙 Baisha, Hainan	37	A87	广西大新 Daxin, Guangxi
6	A15	海南琼海 Qionghai, Hainan	38	A88	广西扶绥 Fusui, Guangxi
7	A16	海南三亚 Sanya, Hainan	39	A94	广西崇左 Chongzuo, Guangxi
8	A19	海南文昌 Wenchang, Hainan	40	A95	格林纳达 Grenada
9	A23	海南万宁 Wanning, Hainan	41	A97	云南腾冲 Tengchong, Yunnan
10	A25	广西贵港 Guigang, Guangxi	42	A98	广东怀集 Huaiji, Guangdong
11	A28	海南澄迈 Chengmai, Hainan	43	A99	广东怀集 Huaiji, Guangdong
12	A30	海南琼中 Qiongzong, Hainan	44	A100	广东佛岗 Fogang, Guangdong
13	A34	海南乐东 Ledong, Hainan,	45	A101	广西桂平 Guiping, Guangxi,
14	A37	海南儋州 Danzhou, Hainan,	46	A102	海南屯昌 Tunchang, Hainan
15	A38	海南海口 Haikou, Hainan	47	A103	海南五指山 Wuzhishan, Hainan
16	A41	云南勐海 Menghai, Yunnan	48	A105	海南昌江 Changjiang, Hainan
17	A42	海南乐东 Ledong, Hainan	49	A106	广西合浦 Hepu, Guangxi
18	A45	广东英德 Yingde, Guangdong	50	A107	广西合浦 Hepu, Guangxi
19	A46	澳大利亚 Australia	51	A108	广西合浦 Hepu, Guangxi
20	A47	云南河口 Hekou, Yunnan	52	A111	广西玉林 Yulin, Guangxi
21	A49	贵州册亨 Ceheng, Guizhou	53	A113	广东雷州 Leizhou, Guangzhou
22	A51	福建漳浦 Zhangpu, Fujian	54	A114	海南海口 Haikou, Hainan
23	A52	广西梧州 Wuzhou, Guangxi	55	A116	广东茂名 Maoming, Guangdong
24	A54	广东惠州 Huizhou, Guangdong	56	A118	广东电白 Dianbai, Guangdong
25	A57	福建漳州 Zhangzhou, Fujian	57	A120	广西玉林 Yulin, Guangxi
26	A58	广东广州 Guangzhou, Guangdong	58	A121	广东雷州 Leizhou, Guangdong
27	A59	福建南靖 Nanjing, Fujian	59	A122	广东徐闻 Xuwen, Guangdong
28	A63	云南芒市 Mangshi, Yunnan	60	A123	广东廉江 Lianjiang, Guangdong
29	A67	云南芒市 Mangshi, Yunnan	61	A126	广东遂溪 Suixi, Guangdong
30	A70	云南瑞丽 Ruili, Yunnan	62	A139	海南琼中 Qiongzong, Hainan
31	A72	云南瑞丽 Ruili, Yunnan	63	A140	广西上思 Shangsi, Guangxi
32	A81	福建长泰 Changtai, Fujian	64	A141	海南五指山 Wuzhishan, Hainan

数范围为 0.46~0.99。遗传相似系数最高的是来自广西合浦的 A107 和 A108 品系,相似系数为 0.99,表示亲缘关系最近;亲缘关系最远的是来自广东惠州的 A54 品系和广东遂溪的 A126 品系,其遗传相似系数为 0.46,表明这些种质具有比较高的遗传多样性。

2.3 ISSR 标记的聚类分析

用 UPGMA 法对 64 份地毯草材料进行聚类分析(图 2),从绘出的树状聚类图可以看出,在遗传相似系

数 0.74 处,将 64 份地毯草种质材料分为 3 类:第 I 类由 25 个材料组成,分别来自海南(A2、A3、A4、A5、A7、A15、A16、A37、A30、A38、A102、A141)、福建(A57、A59、A81、A83、A84)、广东(A45、A58、A99)、广西(A82)、云南(A47、A63)、贵州(A49)和澳大利亚(A46);第 II 类也包括 25 个材料,分别来自海南(A19、A114、A139、A105)、福建(A51)、广东(A98、A113、A118、A116、A121、A123、A122、A126、A100)、广西

表2 ISSR 分析所用的引物序列和扩增结果

Table 2 Primer sequences and amplified results of ISSR analysis

引物名称 Primer	引物序列 Primer sequence (5'-3')	退火温度 Annealing temperature/ °C	扩增条带总数 Total number of bands	多态性条带数 Number of polymorphic bands	多态性比率 Percentage of polymorphic bands/%
ISSR807	(AG)8T	52	9	9	100.00
ISSR809	(AG)8G	52	11	10	90.91
ISSR811	(GA)8C	52	15	15	100.00
ISSR815	(CT)8G	52	4	4	100.00
ISSR816	(CA)8T	52	6	6	100.00
ISSR823	(TC)8C	52	5	4	80.00
ISSR824	(TC)8G	52	6	5	83.33
ISSR825	(AC)8T	52	9	8	88.89
ISSR826	(AC)8C	52	6	5	83.00
ISSR827	(AC)8G	52	7	5	71.00
ISSR836	(AG)8YA	52	7	7	100.00
ISSR840	(GA)8YT	52	7	7	100.00
ISSR844	(CT)8RC	52	6	6	100.00
ISSR851	(GT)8YG	52	6	5	83.33
ISSR855	(AC)8YT	55	15	14	93.33
ISSR856	(AC)8YA	55	11	11	100.00
ISSR857	(AC)8YG	55	12	11	91.67
ISSR859	(TG)8RC	55	7	7	100.00
ISSR860	(TG)8RA	55	6	4	66.67
ISSR873	(GACA)4	55	14	14	100.00
ISSR878	(GGAT)4	55	4	4	100.00
ISSR880	(GGAGA)3	55	6	6	100.00
ISSR888	BDB(CA)7	55	9	9	100.00
ISSR895	AGAGTTGGTAGCTCTTGATC	55	11	11	100.00
ISSR899	CATGGTGTTGGTCATTGTTCC	55	9	9	100.00
合计 Total			208	196	94.23
平均 Average			8.32	7.84	94.23

(A94、A101、A106、A107、A108、A111、A120、A140)和云南(A72、A97、A95);第Ⅲ类包括14份种质,分别来自海南(A23、A28、A34、A42、A103)、广东(A54)、广西(A52、A87、A88、A25)、云南(A41、A63、A67、A70)和福建(A86),从聚类结果来看,来自相同采集地区的材料并没有完全聚在一类,供试材料间出现较大的遗传差异。

3 讨论与结论

由于ISSR标记具有较好的稳定性和多态性^[13]。ISSR标记在研究植物遗传多样性方面被认为是一种

非常有效的方法并具有很大的应用潜质^[12,22-24]。在本研究中,通过ISSR标记分析了64份地毯草种质,显示出了丰富的多态性,这表明ISSR标记用于研究地毯草遗传多样性的可行性,这与席嘉宾等^[19]对野生地毯草的研究结果一致。

在本研究中,25对ISSR引物共获得了196条多态性条带,多态性比率为94.23%;席嘉宾等^[2]用优化的ISSR反应体系分析中国野生地毯草种质,得到的多态性比率为89.67%;Wang等^[16]用ISSR标记分析狗牙根的遗传多样性,多态性比率为86.7%,以上结果都显示了ISSR标记具有丰富的遗传多样性。

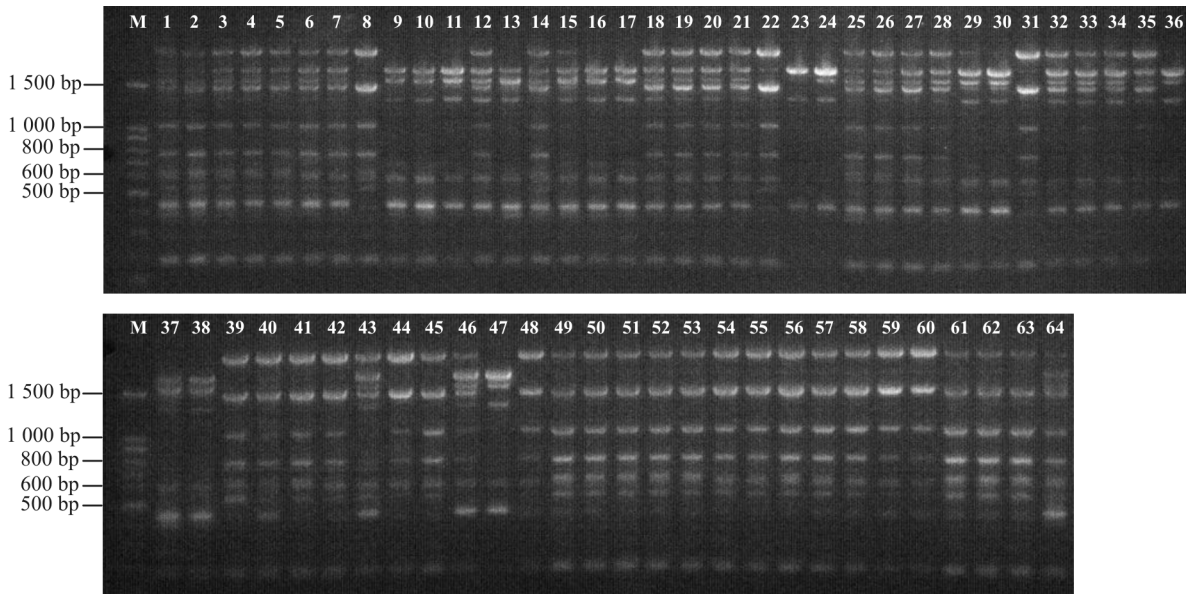


图1 64份材料DNA用ISSR 856引物扩增图谱

Fig.1 ISSR fingerprint amplified with primer No. 856 in 64 DNA of *A. compressus*

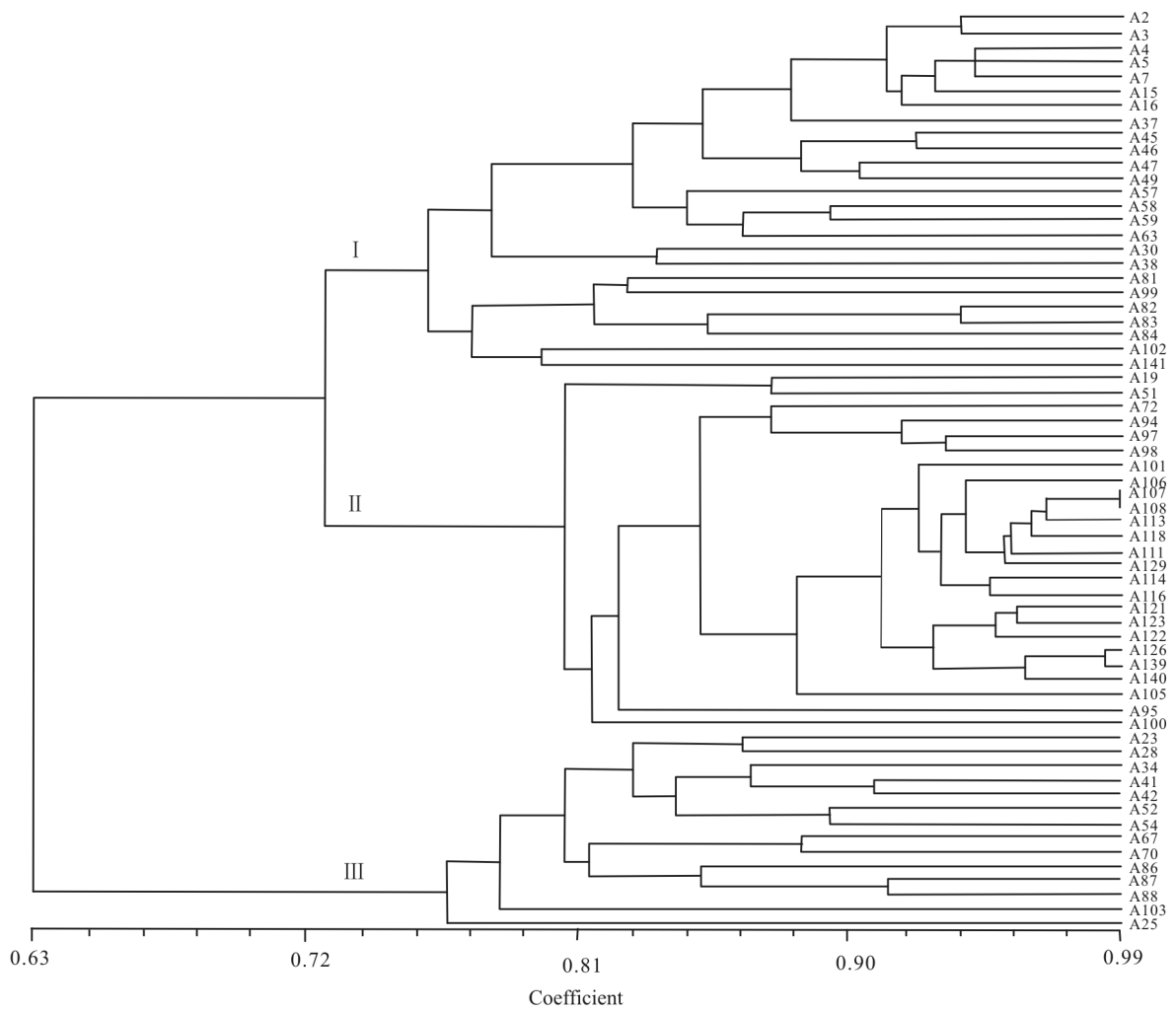


图2 64份地毯草种质的ISSR聚类分析结果

Fig.2 UPGMA cluster analysis based on ISSR genetic identities among 64 *A. compressus* accessions

从 64 份地毯草的聚类分析结果来看,具有相同或相近地理来源的材料被聚在了一类,但也有不同来源的材料被聚在一类。这种现象也出现在其它种类中^[11,16-18,25]。出现这种现象的原因主要有以下 4 个方面:1)有相同地理来源的材料虽然来自相同的环境,但由于育种材料和选择方向的复杂性,可能会出现遗传差异比较大的类型,因此,相同地理来源的材料被归入不同的类群;2)受环境的影响,在长期适应环境的过程中物种也会出现性状趋同的现象,造成不同性状间的交叉;3)地毯草属于多倍体^[20],在决定遗传分化中起了重要作用^[18],因此,为了进一步了解不同地毯草种

质间的关系,在本研究的基础上,还需进一步分析地毯草的倍性,因为倍性分布可能取决于环境的影响,或者基因型的进化和历史发展^[26-28]。对狗牙根(*Cynodon dactylon*)^[29]和类地毯草(*A. affinis*)^[18]遗传多样性和倍性的研究也得到了类似结果。4)地毯草是多年生禾本科草和异型杂交繁育体系,也可导致丰富的遗传变异^[16,18],另外,有大的生态隔离也是必要的,例如:琼州海峡就可导致海南省和其它省份间种质的高变异,这种地理分布可以显著影响一个物种的遗传多样性。

参考文献(References)

- [1] 席嘉宾,陈平,郑玉忠,杨中艺.中国地毯草野生种质资源调查.草业学报,2004,13(1):52-57.
Xi J B, Chen P, Zheng Y Z, Yang Z Y. An investigation of *Axonopus compressus* germplasm resources in China. Acta Pratacultural Science, 2004, 13(1): 52-57. (in Chinese)
- [2] 席嘉宾,陈平,刘长春,郑玉忠,杨中艺.中国地毯草野生种质资源的形态特征和生物学特性的变异研究.四川草原,2004(12):32-37.
Xi J B, Chen P, Liu C C, Zheng Y Z, Yang Z Y. Study on morphological and biological variation of different wild carpetgrass. Journal of Sichuan Grassland, 2004(12): 32-37. (in Chinese)
- [3] 廖丽,陈玉华,赵亚荣,王晓丽,白昌军,王志勇.地毯草种质资源形态多样性.草业科学,2015,32(2):248-257.
Liao L, Chen Y H, Zhao Y R, Wang X L, Bai C J, Wang Z Y. Morphology diversity of *Axonopus compressus* germplasm. Pratacultural Science, 2015, 32(2): 248-257. (in Chinese)
- [4] 廖丽,黄小辉,胡化广,白昌军,王志勇.地毯草种质资源耐盐性初步评价.草业科学,2012,29(5):704-709.
Liao L, Huang X H, Hu H G, Bai C J, Wang Z Y. Preliminary evaluation of salt tolerance of *Axonopus compressus*. Pratacultural Science, 2012, 29(5): 704-709. (in Chinese)
- [5] 廖丽,黄小辉,白昌军,王志勇.地毯草对铝胁迫响应及临界浓度的研究.热带作物学报,2011,32(7):1235-1239.
Liao L, Huang X H, Bai C J, Wang Z Y. Study on responses of *Axonopus compressus* (Sw.) Beauv. to aluminum stress and critical aluminum concentration. Chinese Journal of Tropical Crops, 2011, 32(7): 1235-1239. (in Chinese)
- [6] Ma L, Kenworthy K E, Lu H J, Cherry R. Genetic variability of reproductive traits in common carpetgrass. Hortscience, 2014, 49(7): 856-858.
- [7] Smith M A, Whiteman P C. Evaluation of tropical grasses in increasing shade under coconut canopies. Agricultural Sciences, 1983, 19(2): 153-161.
- [8] 张静,廖丽,白昌军,王志勇.地毯草耐铝性初步评价.草业科学,2012,29(11):1671-1677.
Zhang J, Liao L, Bai C J, Wang Z Y. Preliminary evaluation on aluminum tolerance of *Axonopus compressus*. Pratacultural Science, 2012, 29(11): 1671-1677. (in Chinese)
- [9] Uddin M K, Juraimi A S, Ismail M R. Growth response of eight tropical turfgrass species to salinity. African Journal of Biotechnology, 2009, 8(21): 5799-5806.
- [10] Wang X L, Li Y, Liao L, Zhang X Y, Bai C J, Wang Z Y. Isolation and characterization of microsatellite markers for *Axonopus compressus* (Sw.) Beauv. (Poaceae) using 454 sequencing technology. Genetics and Molecular Research, 2015, 14(2): 4696-4702.
- [11] Wang X L, Liao L, Zhang X Y, Bai C J, Wang Z Y. Genetic diversity of *Axonopus compressus* (Sw.) Beauv. germplasm based on simple sequence repeat markers. HortScience, 2015, 50(6): 797-800.
- [12] Zieticwicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeats (SSR) anchored polymerase chain reac-

- tion amplification. *Genomics*, 1994, 20(2): 176-183.
- [13] Fang D Q, Roose M L. Identification of closely related citrus cultivars with inter simple sequence repeat markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 1997, 95(3): 408-417.
- [14] Fernandez M E, Figueiras A M, Benito C. The use of ISSR and RAPD markers for detecting DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity among barley cultivars with known origin. *Theoretical and Applied Genetics*, 2002, 104(5): 845-851.
- [15] Joshi S P, Gupta V S, Aggarwal R K, Ranjekar P K, Brar D S. Genetic diversity and phylogenetic relationship as revealed by inter sequence repeat (ISSR) polymorphism in the genus *Oryza*. *Theoretical and Applied Genetics*, 2000, 100(8): 1311-1320.
- [16] Wang Z Y, Liao L, Yuan X J, Guo H, Guo A, Liu J X. Genetic diversity analysis of *Cynodon dactylon* (bermudagrass) accessions and cultivars from different countries based on ISSR and SSR markers. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2013, 46(2): 108-115.
- [17] 黄文达, 赵学勇, 李玉霖, 罗亚勇, 王少昆, 潘成臣. 不同海拔梯度下小叶锦鸡儿的居群遗传多样性. *草业科学*, 2015, 32(4): 552-559.
Huang W D, Zhao X Y, Li Y L, Luo Y Y, Wang S K, Pan C C. Genetic diversity analysis of *Caragana microphylla* population in different altitude gradients. *Pratacultural Science*, 2015, 32(4): 552-559. (in Chinese)
- [18] Wang Z, Kenworthy K E, Wu Y Q. Genetic diversity of common carpetgrass revealed by amplified fragment length polymorphism markers. *Crop Science*, 2010, 50(4): 1366-1374.
- [19] 席嘉宾, 郑玉忠, 杨中艺. 地毯草 ISSR 反应体系的建立与优化. *中山大学学报*, 2004, 43(3): 57-61.
Xi J B, Zheng Y Z, Yang Z Y. Establishment and optimization of ISSR reaction system for carpetgrass. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni*, 2004, 43(3): 57-61. (in Chinese)
- [20] Delay G. Nombres chromosomiques chez les Phanérogames. *Revue de Cytologie et de Cytophysologie Végétales*, 1951, 12: 361-368.
- [21] Nei M, Li W H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 1979, 76(10): 5269-5273.
- [22] Provan J, Powell W, Waugh R. Analysis of cultivated potato (*Solanum tuberosum*) using inter-microsatellite amplification. *Genome*, 1996, 39(4): 767-779.
- [23] Hodkinson T R, Chase S A, Renvoize M W. Characterization of a genetic resource collection for *Miscanthus* (Saccharinae, Andropogoneae Poaceae) using AFLP and ISSR-PCR. *Annals of Botany*, 2002, 89(5): 627-636.
- [24] Kojoma M, Iida O, Makino Y, Sekita S, Satake M. DNA fingerprinting of *Cannabis sativa* using inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification. *Planta Medica*, 2002, 68(1): 60-63.
- [25] Godwin I D, Aitken E A, Smith L W. Application of inter simple sequence repeat (ISSR) markers to Plant genetics. *Electrophoresis*, 1997, 18(9): 1524-1528.
- [26] Johnson P G, Riordan T P, Arumuganathan K. Ploidy level determinations in buffalograss clones and populations. *Crop Science*, 1998, 38: 478-482.
- [27] Tang R T, Gao G Q, He L Q, Han Z Q, Shan S H, Zhang R C. Genetic diversity in cultivated groundnut based on SSR markers. *Journal of Genetics and Genomics*, 2007, 34(5): 449-459.
- [28] 陈立强, 师尚礼. 42 份紫花苜蓿种质资源遗传多样性的 SSR 分析. *草业科学*, 2015, 32(3): 372-381.
Chen L Q, Shi S L. Genetic diversity of 42 alfalfa accessions revealed by SSR markers. *Pratacultural Science*, 2015, 32(3): 372-381. (in Chinese)
- [29] Wu Y Q, Taliaferro C M, Bai G H, Martin D L, Anderson J A, Anderson M P, Edwards R M. Genetic analysis of Chinese *Cynodon* accessions by flow cytometry and AFLP markers. *Crop Science*, 2006, 46(2): 917-926.