

RAPD和 ISSR 分子标记对 果蔗种质资源的遗传多样性研究

潘大仁^{a*}, 曾惠阳^a, 陈观水^a, 周以飞^b, 高毅^b, 张剑亮^b

(福建农林大学, a. 生命科学学院, b. 作物科学学院, 福州 350002)

摘要:利用 RAPD 与 ISSR 分子标记技术对 40 份不同地方果蔗种质的遗传多样性进行分析。从供试材料中筛选到具有多态性的 RAPD 引物 23 条, ISSR 引物 28 条。23 条 RAPD 引物共扩增出 250 条带, 多态性条带比率为 70%, 相似系数变化范围在 0.68-1.00 之间; 28 条 ISSR 引物共扩增出 301 条带, 多态性条带比率为 77.1%, 相似系数变化范围在 0.66-1.00 之间。根据两种标记的结果, 用 UPGMA 法对 40 份果蔗种质材料进行聚类分析, 结果表明, RAPD 和 ISSR 均将 40 份果蔗种质分为 4 类: 第 I 类为 32 份地方果蔗品种, 包括福建、江西、浙江、广西、云南等地的品种; 第 II 类为外引黑皮果蔗 *Badila* 和丰城紫皮果蔗; 第 III 类为杂交种白饴、歪干担、肚度、温岭果蔗以及人工杂交选育的果蔗品种 474; 第 IV 类只有广东的黄皮果蔗。这两种标记的聚类结果相关分析表明, 它们存在呈极显著相关($r=0.9746$)。但 ISSR 标记比 RAPD 标记可检测到更大的遗传变异。

关键词: 果蔗; 遗传多样性; RAPD; ISSR

中图分类号: Q341

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2007)03-0183-008

Genetic Diversity of Chewing Cane Germplasms Using RAPD and ISSR Markers

PAN Da-ren^{a*}, ZENG Hui-yang^a, CHEN Guan-shui^a,
ZHOU Yi-fei^b, GAO Yi^b, ZHANG Jian-liang^b

(a. College of Life Science, b. College of Crop Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract: Random amplified polymorphic DNA (RAPD) and inter-simple sequence repeat (ISSR) molecular markers were used to detect the genetic diversity among 40 chewing cane germplasms. Polymorphism was identified by 23 RAPD primers and 28 ISSR primers in the germplasms. Two hundred and fifty bands were generated by RAPD with polymorphic bands accounting for 70% and similarity coefficient ranging from 0.68 to 1.00. And 301 bands were produced by ISSR with polymorphic bands accounting for 77.1% and similarity coefficient within 0.66 to 1.00. The germplasms were divided into 4 clusters by UPGMA: Cluster I composed of 32 individuals from Fujian, Jiangxi, Zhejiang, Guangxi, Yunnan; Cluster II containing cvs. *Badila* and *Fengchengzipi*; Cluster III covering hybrids (*Baishan*, *Waigandan*, *Dudu*, *Wenling* and artificial hybrid 474); Cluster IV only including cv. *Huangpi*. The significant correlation between RAPD and ISSR markers was observed ($r=0.9746$). ISSR was more suitable for the analysis of genetic diversity.

Key words: Chewing cane; Genetic diversity; RAPD; ISSR

收稿日期: 2006-11-06

接受日期: 2007-01-31

基金项目: 国家自然科学基金项目(30370900)资助

* 通讯作者 Corresponding author

果蔗(*Chewing cane*)是一种天然果用的蔗品,具有皮薄、质脆、汁多、清甜可口、营养丰富等特点,有解渴充饥、消除疲劳、健齿提神、清凉解毒的功效。全国各地原有许多优良的地方品种^[1-4]。目前果蔗的种植面积正逐年不断扩大,全国种植面积已达 20 公顷,而且有逐渐由南往北扩大。由于长期缺乏研究,导致果蔗品种杂乱退化,遗传背景狭窄,加之忽视栽培管理,致使病害严重,品质下降,产量降低。因此,迫切需要对果蔗种质资源的多样性进行研究,评价目前果蔗种质的遗传分布和发掘利用优异的种质资源,为将来果蔗新品种的培育选择合适的亲本。

遗传多样性不仅表现在表型性状上的差别,更重要的是表现在蛋白质、染色体和 DNA 水平上的差异。分子标记的发展为从 DNA 水平检测品种及品系间的遗传多样性提供了有利的工具。在 DNA 分子标记中, RAPD 标记和 ISSR 标记在植物遗传多样性研究中被广泛运用并获得了成功。而通过 RAPD 和 ISSR 标记方法探讨果蔗种质资源遗传多

态性的研究在国内外报道甚少。

本研究利用 RAPD 和 ISSR 标记方法对所收集的 40 份来源于全国各地果蔗种质资源进行遗传多样性和亲缘关系分析,并对这两种标记揭示果蔗种质资源多样性的有效性进行比较。本研究旨在为果蔗种质资源的遗传进化、分类、亲本选配等问题提供分子水平的依据,进而为果蔗育种实践,促进果蔗种质资源保护和生产发展奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料

本研究选取 40 份果蔗种质材料(表 1),所有种质材料均来源于福建省农科院甘蔗研究所的资源圃。

1.1.2 RAPD 和 ISSR 引物

100 个 RAPD 引物购自上海生物工程公司(Sangon), 100 个 ISSR 引物购自 University of British

表 1 供试材料的名称和来源

Table 1 Cultivars and origins of chewing cane materials

序号 No.	品种 Cultivar	来源 Origin	形态特性 Traits
1	南安 Nan'an	福建 Fujian	茎皮绿附浅紫,侧芽卵圆形,叶鞘背无毛群,节间细腰形
2	肚度 Dudu	浙江 Zhejiang	茎皮深绿,侧芽卵圆形,叶鞘北毛群少,硬,节间圆筒形
3	白玉 Baiyu	广西 Guangxi	茎皮浅黄绿色,侧芽披尖形,无叶鞘背毛群,节间细腰形
4	永安 Yong'an	福建 Fujian	茎皮黄绿,侧芽卵圆形,芽沟深,无叶鞘背毛群,节间倒圆锥形
5	华安 Huaan	福建 Fujian	茎皮绿附浅紫,侧芽圆鼓形,无叶鞘背毛群,节间圆筒形
6	温州 Wenzhou	浙江 Zhejiang	茎皮黄绿色,侧芽卵圆形,芽沟深,叶鞘背毛群多,节间圆筒形
7	同安 Tong'an	福建 Fujian	茎皮黄紫,侧芽长三角形,芽沟深,无叶鞘背毛群,节间倒圆锥形
8	温岭 Wenling	浙江 Zhejiang	茎皮深绿,侧芽卵圆形,芽沟深,叶鞘背毛群多,节间腰鼓形
9	丰城紫皮 Fengchengzipi	江西 Jiangxi	茎皮紫色,侧芽卵圆形,无明显芽沟,叶鞘北毛群少,节间圆筒形
10	建阳 Jianyang	福建 Fujian	茎皮绿色,侧芽三角形,无叶鞘背毛群,节间细腰形
11	金华 Jinhua	浙江 Zhejiang	茎皮绿色,侧芽三角形,带叶鞘背毛群,节间腰鼓形
12	大田 Datian	福建 Fujian	茎皮浅绿带紫,侧芽三角形,叶鞘背毛群少,节间圆筒形
13	474	福建 Fujian	茎皮黄色,侧芽卵形,节间圆筒形,叶鞘背毛群多
14	宁化 Ninghua	福建 Fujian	茎皮绿色,侧芽三角形,无叶鞘背毛群,节间细腰形
15	荔蒲 Lipu	福建 Fujian	茎皮黄绿,侧芽卵圆形,叶鞘背毛群少,节间细腰形
16	嵛县 Chengxian	福建 Fujian	茎皮绿色,侧芽卵圆形,无叶鞘北毛群,节间细腰形
17	白鱗 Baishan	四川 Sichuan	茎皮紫红,侧芽圆鼓形,无叶鞘背毛群,节间圆筒形
18	崇安 Chong'an	福建 Fujian	茎皮绿色,侧芽三角形,带叶鞘背毛群,节间圆筒形
19	泰宁 Taining	福建 Fujian	茎皮黄绿,侧芽三角形,无叶鞘背毛群,节间腰鼓形
20	邵武 Shaowu	福建 Fujian	茎皮绿色,侧芽卵圆形,无叶鞘背毛群,节间圆筒形
21	黄皮 Huangpi	广东 Guangdong	茎皮黄色,侧芽圆鼓形,节间圆筒形,叶鞘背毛群多

续表 1(Continued)

序号 No.	品种 Cultivar	来源 Origin	形态特性 Traits
22	古田 Gutian	福建 Fujian	茎皮绿附紫, 侧芽卵形突出, 无叶鞘背毛群, 节间圆筒形
23	龙岩 Longyan	福建 Fujian	茎皮黄绿, 侧芽三角形, 无叶鞘背毛群, 节间圆筒形
24	歪娥 Waie	云南 Yunnan	茎皮绿色, 侧芽卵圆形, 叶鞘背毛群少, 节间腰鼓形
25	江西 Jiangxi	江西 Jiangxi	茎皮绿色, 侧芽披尖形, 无叶鞘背毛群, 节间倒圆锥形
26	永嘉 Yongjia	浙江 Zhejiang	茎皮浅紫红, 侧芽卵圆形, 无叶鞘背毛群, 节间细腰形
27	平和 Pinghe	福建 Fujian	茎皮黄绿微紫, 侧芽卵圆形, 无叶鞘背毛群, 节间圆筒形
28	雪蔗 Xuczhe	福建 Fujian	茎皮黄绿, 侧芽三角形, 无叶鞘背毛群, 节间圆筒形
29	江永 Jiangyong	湖南 Hunan	茎皮绿色, 侧芽三角形, 无叶鞘背毛群, 节间圆筒形
30	光泽 Guangze	福建 Fujian	茎皮黄绿, 侧芽圆形, 芽沟深, 无叶鞘背毛群, 节间圆鼓、之字形
31	连江 Lianjiang	福建 Fujian	茎皮黄绿, 侧芽三角形、芽沟深长, 有叶鞘背毛群, 节间圆筒形
32	东乡 Dongxiang	江西 Jiangxi	茎皮绿色, 侧芽卵圆形, 叶鞘背毛群少, 节间腰鼓形
33	歪干担 Waigandan	云南 Yunnan	茎皮紫红, 侧芽卵圆形, 无叶鞘背毛群多, 节间圆筒形
34	丰城青皮 Fengchengqingpi	江西 Jiangxi	茎皮绿微紫, 侧芽圆形, 无叶鞘背毛群, 节间腰鼓形
35	马鞍 Maan	福建 Fujian	茎皮绿色, 侧芽三角形, 芽沟深, 带叶鞘背毛群, 节间圆筒形
36	瑞金 Ruijin	江西 Jiangxi	茎皮浅黄绿, 侧芽卵圆形, 无叶鞘背毛群, 节间圆筒形
37	罗汉 Luohan	贵州 Guizhou	茎皮绿色, 侧芽卵形突出, 叶鞘背毛群少, 节间圆筒形
38	福安 Fu'an	福建 Fujian	茎皮翠绿, 侧芽三角形, 叶鞘背毛群少, 节间圆筒形
39	江西青皮 Jiangxiqingpi	江西 Jiangxi	茎皮绿色, 侧芽披尖形, 无叶鞘背毛群, 节间倒圆锥形
40	Badila	福建 Fujian	茎皮深紫, 侧芽五边形, 突出, 有叶鞘背毛群, 节间圆筒形

Columbia Biotechnology Lab (UBCBL)。

1.2 方法

1.2.1 供试果蔗基因组 DNA 的提取

果蔗基因组 DNA 提取按吴杨等^[9]的方法, 略作修改。

1.2.2 RAPD 引物筛选及其检测

以南安果蔗和 Badila 这两个材料的模板 DNA 对 100 个 RAPD 引物进行筛选, 共筛选出条带清晰、多态性理想的引物 23 个(表 2)。RAPD 反应体系包括 1× PCR buffer, MgCl₂ 1.5 mmol/L, dNTPs 0.2 mmol/L, Taq 酶 1 U, 引物 200 nmol/L, DNA 1 ng μl⁻¹, 双蒸水补足, 终体积 20 μl。热循环程序为: 94℃ 5 min 1 个循环; 94℃ 30 s, 37℃ 30 s, 72℃ 90 s, 35 个循环; 72℃ 10 min 1 个循环。扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 电压 120 V, 电泳 90 min, 经 EB 染色后用 BIO-RAD 公司的 Gel Doc1000 型凝胶成像仪观察并照相。

1.2.3 ISSR 引物筛选及其检测

以南安果蔗和 Badila 这两个材料的模板 DNA 对 100 个 ISSR 引物进行筛选, 共筛选出条带清晰、

多态性理想的引物 28 个(表 2)。ISSR 反应体系包括 1× PCR buffer, MgCl₂ 1.5 mmol/L, dNTPs 0.2 mmol/L, Taq 酶 1 U, 引物 200 nmol/L, DNA 1 ng μl⁻¹, 双蒸水补足, 终体积 20 μl。热循环程序为: 94℃ 5 min 1 个循环; 94℃ 30 s, 50–52℃ 45 s, 72℃ 90 s, 35 个循环; 72℃ 10 min 1 个循环。扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 电压 120 V, 电泳 90 min, 经 EB 染色后用 BIO-RAD 公司的 Gel Doc1000 型凝胶成像仪观察并照相。

1.2.4 统计分析方法

应用 Viler Lourmat VDS 公司提供的 Bio ID++ 软件进行电泳谱带检测, 手工检带除去因胶版上亮点、点样孔、条带粘连引起的计算机误检。对于同一引物的扩增产物, 迁移率相同的条带记为 1 个位点, 扩增阳性赋值为 1, 阴性赋值为 0, 输入 Excel 2000 中建立特征数据矩阵用于进一步分析。任一位点若有 1 个个体不同于其他个体即为 1 个多态性位点, 根据表征数据矩阵计算单位引物多态性条带及多态性条带百分率 (the percentage of polymorphic band, PPB)。根据 Nei-Li^[10] 相似系数法分别计算各个品种间的遗传相似性系数 (genetic similarity, GS)

表 2 所用的 RAPD 和 ISSR 引物列表
Table 2 The list of RAPD and ISSR primer sequences

RAPD				ISSR			
编号 No.	序列 Sequence	编号 No.	序列 Sequence	编号 No.	序列 Sequence	编号 No.	序列 Sequence
S7	GGTGACGCAG	S380	GTGTCGCGAG	#822	(TC)8A	#845	(CT)8RG
S61	CTACGGAGGA	S387	AGGCGGGAAC	#824	(TC)8G	#850	(GT)8YC
S88	TCACGTCCAC	S456	TCGGCGGTTC	#807	(AG)8T	#851	(GT)8YG
S91	TGCCCGTCGT	S466	GTGGGCTGAC	#808	(AG)8C	#846	(CA)8RT
S94	GGATGAGACC	S486	GAGCGCCTTG	#834	(AG)8YT	#847	(CA)8RC
S97	ACGACCGACA	S488	CTCCAGCGGA	#810	(GA)8T	#860	(TG)8RA
S99	GTCAGGGCAA	S516	CTCTGCGCGT	#811	(GA)8G	#855	(AC)8YT
S102	TCGGACGTGA	S1025	GTCGTAQCGG	#812	(GA)8A	#856	(AC)8YA
S105	AGTCGTCCCC	S1071	CAGTGTGCTC	#840	(GA)8YT	#857	(AC)8YG
S119	CTGACCAGCC			#842	(GA)8YG	#868	(GAA)6
S120	GGGAGACATC			#813	(CT)8T	#873	(GACA)4
S124	GGTGATCAGG			#814	(CT)8A	#878	(GGAT)4
S143	CCAGATGCAC			#815	(CT)8G	#886	VDV(CT)7
S154	TGCGGCTGAG			#844	(CT)8RC	#888	BDB(CA)7

和遗传距离(genetic distance, GD) ($GD=1-GS$), 聚类用不加权组平均法(un-weighted pair-group method using an arithmetic average, UPGMA)^[7]进行。用 NTSYS-pc[®]软件按照 Nei-Li 进行并作图对两种标记所得到的遗传相似性系数矩阵进行相关性分析。

2 结果和分析

2.1 扩增产物的多态性

40 份果蔗种质的 RAPD-PCR 扩增结果见图 1。

23 个 RAPD 引物对供试材料的 DNA 进行扩增, 并对扩增条带进行统计分析。RAPD 反应扩增的条带大小一般在 300–3 000 bp 之间。23 个 RAPD 引物共扩增出 250 条带, 平均每个引物扩增出 10.9 条带, 多态性条带数为 175 条, PPB 为 70%。

40 份果蔗种质的 ISSR-PCR 扩增结果见图 2。28 个 ISSR 引物对供试材料的 DNA 进行扩增, 并对扩增条带进行统计分析。在 28 个引物中, 有 23 个二核苷酸重复序列, 1 个三核苷酸重复序列, 2 个

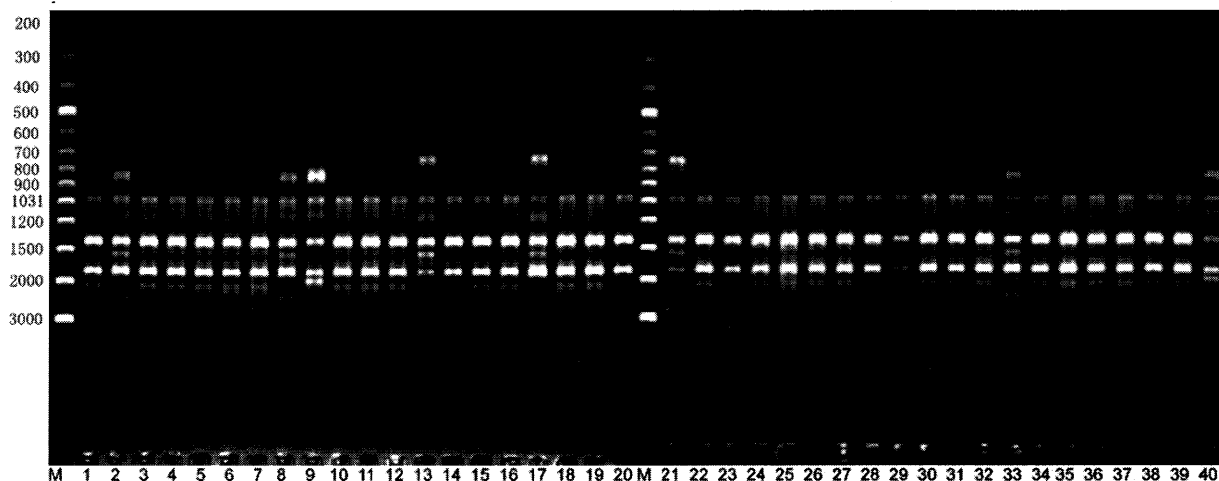


图 1 40 份果蔗种质 DNA 的 RAPD 图谱

Fig. 1 RAPD-PCR amplification of DNA from 40 chewing cane germplasms using primer S488

1–40: 见表 1 seen in Table 1; M: Marker.

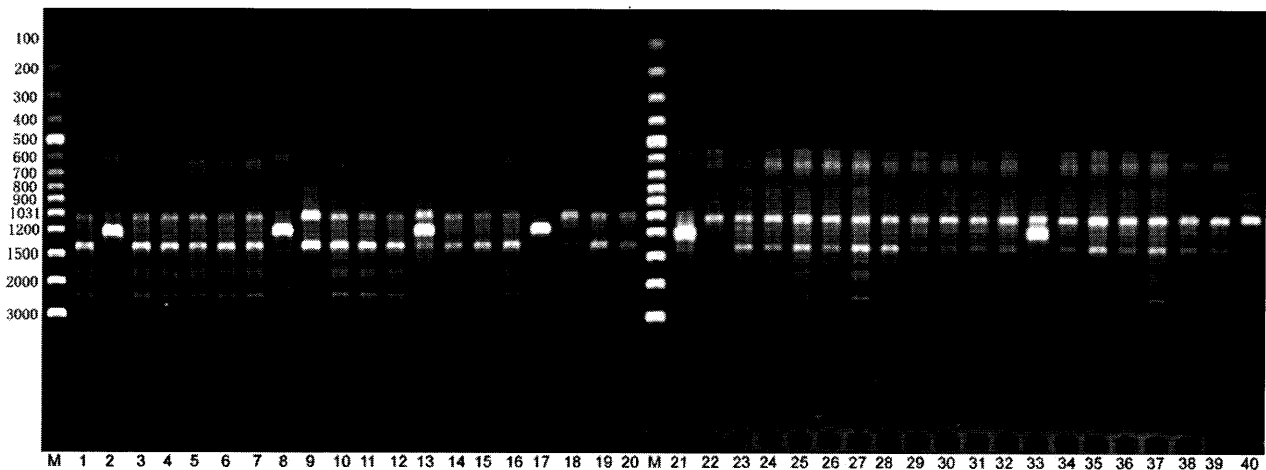


图2 40份果蔗种质DNA的ISSR图谱

Fig. 2 ISSR-PCR amplification of DNA from 40 chewing cane germplasm samples using primer UBC#824

1-40: 见表1 seen in Table 1; M: Marker.

四核苷酸重复序列, 2个5' 简并重复序列。对于所有供试材料, (CT)_n 重复序列扩增特异条带数最多, 其次为其互补链(GA)_n 引物; 但互补序列引物并非都是如此, 如6个(TG)_n 重复序列只有1个引物扩增出条带, 而(AC)_n 有3个, 这可能与引物5' 端或3' 端的2-4个随机核苷酸有关。ISSR反应扩增的片段大部分集中在300-3000 bp。28个引物共扩增出301条带, 平均每个引物扩增出10.8条带, 多态性条带数为232条, PPB为77.1%。

以上结果表明: 果蔗基因组中含有丰富的二核苷酸串联重复序列(CT/GA)。RAPD和ISSR两种标记都能产生各自有效的多态性条带, 但多态性水平和检测水平各不相同, 从PPB上看, ISSR标记略高于RAPD标记。

2.2 供试材料的遗传分析

扩增结果采用Nei-Li相似系数(GS)的计算方法, 得到供试材料两种标记的遗传相似性矩阵。RAPD扩增结果GS值在0.68-1.00之间, 平均为0.88; ISSR扩增结果的GS值在0.66-1.00之间, 平均为0.86。这表明, ISSR标记的遗传相似系数值的范围比RAPD稍大, 平均GS值小于RAPD。相对而言, ISSR标记比RAPD标记可检测到更大的遗传变异。

2.3 供试材料的聚类分析

基于遗传相似系数, 计算各供试材料间的遗传距离GD($GD=1-GS$), 利用UPGMA法对供试材料

进行聚类分析, 结果见图3。RAPD和ISSR两种标记获得了相似但不完全相同的聚类图。

根据树状聚类图, 可将40份果蔗种质分成4类: 第I类为32份不同地区的地方果蔗品种; 第II类包括外引黑皮果蔗Badila和丰城紫皮果蔗; 第III类包括四川的白鳝、云南的歪干担及人工杂交选育的果蔗品种474亚类, 以及浙江的肚度和温岭果蔗亚类; 第IV类是糖果兼用型果蔗品种—广东黄皮果蔗为单独的一类。第I类果蔗种质较杂, 它们之间的GS值都在0.90以上, 亲缘关系极为相近。第II类中的外引黑皮果蔗和丰城紫皮果蔗之间的GS值为0.94, 亲缘关系较近, 而与其他38份果蔗种质的GS在0.64-0.76之间, 亲缘关系较远。第III类从形态学上和同工酶分析上已初步鉴定为杂交种的类似果蔗品种^[2]。第IV类是来自广东的黄皮果蔗, 为独立的个类, 由于是从糖蔗中筛选出的类似果蔗品种, 与其他果蔗品种之间的亲缘关系相对较远。

2.4 RAPD和ISSR标记的相关分析

对RAPD和ISSR标记的相似性系数矩阵进行相关性分析。结果表明, RAPD和ISSR标记的相关系数为0.9746, 呈极显著相关。这进一步验证了两种标记聚类结果的相似性。

3 讨论

3.1 果蔗种质的遗传多样性评价

我国是甘蔗起源地之一, 地方果蔗品种的栽培

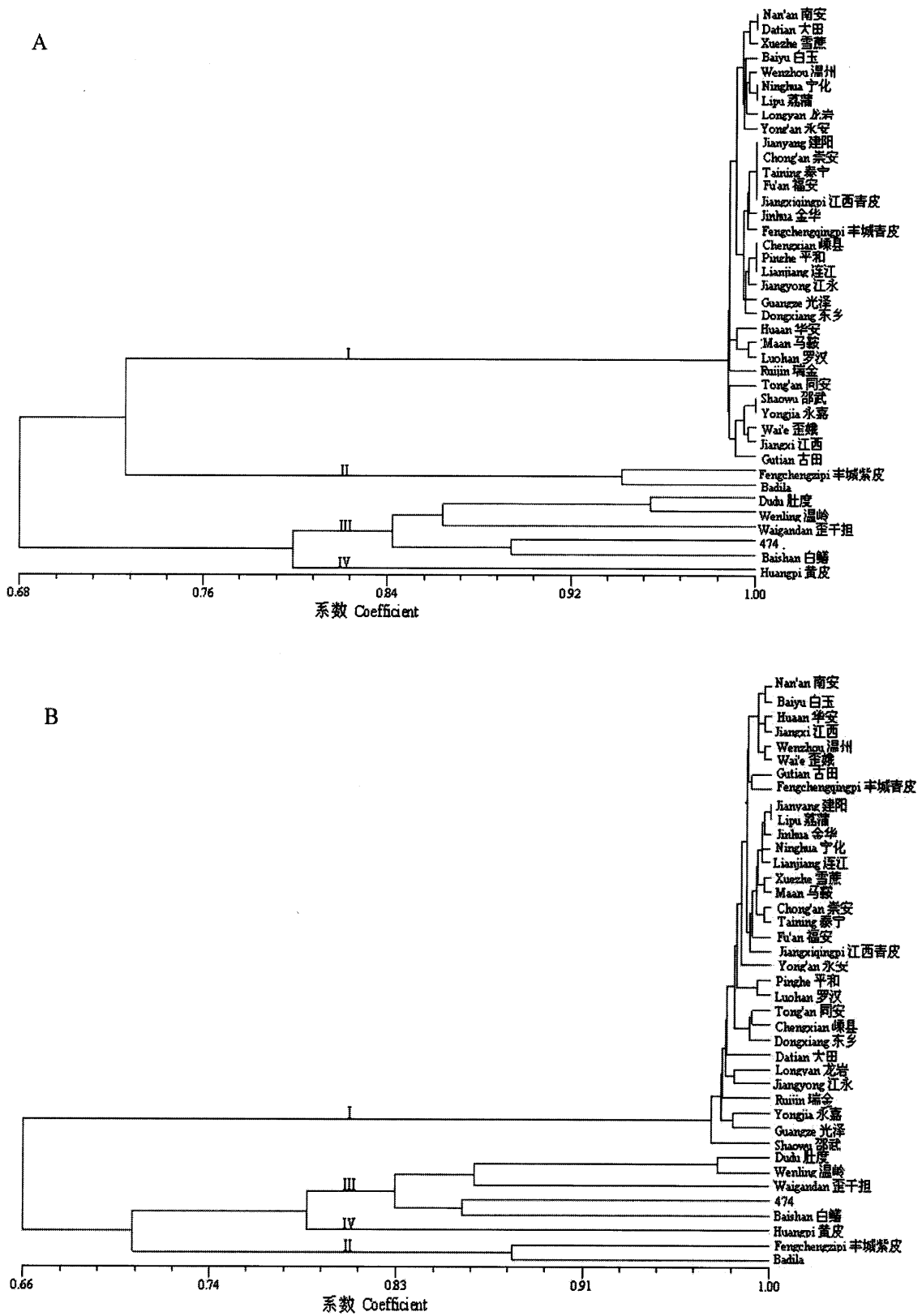


图 3 基于 RAPD(A)和 ISSR(B)标记的供试材料聚类图

Fig. 3 Dendrograms illustrating the phylogenetic relationship among 40 chewing cane germplasm based on RAPD (A) and ISSR (B) markers

历史悠久,种质资源极为丰富,加之糖蔗杂交育种的发展,也使果蔗新类型不断增加,从植物学性状和生物学性状等方面表现出较高的遗传差异^[9]。现有的果蔗栽培品种分为两大类:第1类是最主要的,栽培范围最广、面积最大的甘蔗,属热带种;第2类是以热带种为母本杂交选育而成的品种。染色体核型研究表明:各类果蔗染色体核型变化较大,而且各地果蔗品种之间相互引种,其种质相互渗透。因此,对果蔗的起源、演化和分类历来没有定论。

本研究供试的甘蔗品种中,用 RAPD 和 ISSR 技术都能扩增出各自的多态性谱带,反映了果蔗种质丰富的遗传多态性。RAPD 和 ISSR 获得的 PPB 分别是 70.0%和 77.1%。这表明 RAPD 和 ISSR 两种标记系统都能产生各自有效的多态性带,但多态性水平及检测水平各有不同,从多态条带比率、平均多态条带上看,ISSR 标记均高于 RAPD 标记。这可能是由于 ISSR 引物含有重复序列,与它结合的靶序列在 DNA 复制过程中存在滑动和不均等交换现象,使它们在不同品种或个体之间的重复次数差异较大,易引起引物结合位点和两结合位点之间的片段长度差异^[11-14]。

3.2 果蔗种质资源遗传相似性评价

本研究中,RAPD 和 ISSR 的平均 GS 值分别为 0.88 和 0.86,后者略小于前者。因此,相对而言,ISSR 比 RAPD 可检测到更高的个体间遗传差异。聚类分析的结果表明,RAPD 和 ISSR 两种标记获得了相似但不完全相同的聚类树,40 个供试材料在阈值为 0.84 处均可以明显的划分为 4 个类群。两种标记间的相关系数 r 值为 0.9746,说明它们在 0.01 水平呈极显著相关。另外,第 I 类中大部分地方果蔗品种的 GS 值都在 0.90 以上,亲缘关系极为相近,推测可能是同种异名的果蔗品种,或在进化过程中,由于各自的生态环境和人为的长期选择,种质的相互渗透而形成。第 III 类将肚度、温岭、歪干担等归为一组,这也在形态学上和同工酶分析上鉴定为杂交种的类似果蔗品种的结果相一致。然而,两种标记之间也存在一定的差异性。差异的主要原因可能为^[10-14]:(1)ISSR 标记和 RAPD 标记所检测的基因座位不同,由于 RAPD 标记检测的是颠倒重复序列及其间片段,而 ISSR 标记检测的是重复序列间片段;(2)和所使用的引物有关,RAPD 引物是任意序列的 10 mer,ISSR 引物是 15-24 bp 的重复锚定引

物,因为不同的引物检测得到的多态性不一样,而且多态性片段数随着引物数量的增加而增加,必然引起遗传距离的变化。

果蔗是遗传背景比较复杂的一类作物,具有丰富的变异类型,种质资源研究是筛选优质果蔗的基础。从本研究结果来看,应用 ISSR 技术检测其遗传背景,是一种有效的方法,今后,将结合对特异片段进行克隆测序,进一步研究其功能基因,同时结合农艺现状的分析,以期为优异果蔗品种的选育提供基础。

参考文献

- [1] Institute of Sugarcane and Canesugar Science, Ministry of Light Industry. The Sugarcane Varieties in China [M]. Guangzhou: Guangdong Sciences & Technology Publishing House, 1991.(in Chinese)
- [2] Zhang C G(张成贵), Yang J(杨健), Ma G Q(马贵奇), et al. Discussion on chewing cane breeding [J]. Sugarcane (甘蔗), 2003, 10(4): 34-38.(in Chinese)
- [3] Wang S Q(王水琦), Wang Z L(王子琳), Pan S M(潘世明), et al. The present production situation of fruit cane and its developmental strategies [J]. Fujian J Agri Sci (福建农业学报), 2000(3):1-4.(in Chinese)
- [4] Pan D R, Chen G S, Dong Y L, et al. Agronomic and quality characters of different chewing cane cultivars [C] // International association of professionals in sugar and integrated technologies. Proceeding of International Symposium on Technologies to Improve Sugar Productivity in Developing Countries. Beijing: China Agriculture Press, 2006: 159-165.
- [5] Wu Y(吴杨), Zhou H(周会), Pan D R(潘大仁). PCR detection of nematode resistant gene in sugar cane [J]. Acta Agron Sin (作物学报), 2006, 32(6): 939-942.(in Chinese)
- [6] Nei M, Li W H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1979, 76(10): 69-73.
- [7] Sneath P H, Sokal R R. Numerical Taxonomy: the Principles and Practice of Numerical Classification [M]. San Francisco: W. H. Freeman, 1973: 573.
- [8] Rohlf F J. NTSYS-pc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System [M]. Version 2.0. New York: Exeter Software, Applied Biostatistics Inc., 1998.
- [9] Wang Z L(王子琳), Wang S Q(王水琦), Zeng R Q(曾日秋). Analysing the isodynamic esterase of garden cane varieties [J]. Sugarcane Canesugar (甘蔗糖业), 1993, (4): 23-25.(in Chinese)
- [10] Zhou Y Q(周延清), Jing J Z(景建洲), Li Z Y(李振勇), et al. Assessment of genetic diversity of *Rehmanniaglutinosa* germplasm detected by RAPDs and ISSRs [J]. Genetics (遗传), 2004, 26(6): 922-928.(in Chinese)
- [11] An Z W, Sun A H, Cheng H, et al. Genetic diversity among wild

- and cultivated accessions of *Hevea brasiliensis* (rubber tree) detected by RAPDs and ISSRs [J]. *J Trop Subtrop Bot*, 2005, 13 (3): 246–252.
- [12] Fang D Q, Roose M L. Identification of closely related citrus cultivars with inter-simple sequence repeat markers [J]. *Theor Appl Genet*, 1997, 95: 408–417.
- [13] Kojima T, Nagaoka T, Noda K, et al. Genetic linkage map of ISSR and RAPD markers in Einkorn wheat in relation to that of RFLP markers [J]. *Theor Appl Genet*, 1998, 96: 37–45.
- [14] Liu W B(刘万勃), Song M(宋明), Liu F Z(刘富中), et al. Assessment of genetic diversity of melon (*Cucumis melo*) germplasm based on RADP and ISSR [J]. *J Agri Biotechn (农业生物技术学报)*, 2002,10(3): 231–236.(in Chinese)