

牛鞭草品种EST-SSR指纹图谱构建及遗传多样性分析

黄秀, 曾捷, 聂刚, 刘欢, 黄琳凯*, 张新全*, 蒋晓梅, 张瑜, 张博涛

(四川农业大学草业科学系, 四川 雅安 625014)

摘要: 为探讨牛鞭草(*Hemarthria* spp.)品种间的遗传多样性, 从 86 对 EST-SSR 引物中筛选出 8 对引物对牛鞭草属 6 个品种进行指纹图谱的构建及遗传多样性分析。结果表明, 8 对 EST-SSR 引物对牛鞭草属 6 个品种共扩增出 193 条清晰条带, 多态性条带 161 条, 多态性比例为 83.4%。每条引物的多态信息含量(PIC)为 0.480 ~ 0.695, 平均为 0.602。UPGMA 聚类分析表明, 牛鞭草属 6 个品种在相似系数为 0.652 处可分为两大类群。8 对 EST-SSR 引物均能将 6 个品种完全区分开, 以 3 对 EST-SSR 引物扩增的电泳图谱为基础, 建立了牛鞭草属 6 个品种的指纹图谱标准模式图, 每个品种都有唯一的指纹图谱。牛鞭草属 6 个品种的平均 Nei's 基因多样性指数为 0.333, 平均 Shannon 信息指数为 0.496, 品种间的相似系数介于 0.399 ~ 0.782 之间。可见, 牛鞭草属植物品种的遗传多样性较丰富, 种间差异明显。

关键词: EST-SSR; 牛鞭草属; 品种; DNA 指纹图谱; 遗传多样性

doi: 10.3969/j.issn.1005-3395.2014.02.009

Construction of Fingerprinting and Genetic Diversity Analysis of *Hemarthria* Cultivars by EST-SSR

HUANG Xiu, ZENG Jie, NIE Gang, LIU Huan, HUANG Lin-kai*, ZHANG Xin-quan*, JIANG Xiao-mei, ZHANG Yu, ZHANG Bo-tao

(Department of Grassland Science, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China)

Abstract: In order to understand the genetic diversity of *Hemarthria* cultivars, the DNA fingerprints of six *Hemarthria* cultivars were constructed by using 8 pairs of EST-SSR primers screened from 86 pairs, and the genetic diversities among them were analyzed. The results showed that eight pairs of ESR-SSR primers totally amplified 194 bands, in which 161 bands were polymorphic bands, accounting for 83.4%. The polymorphic information content (PIC) ranged from 0.480 to 0.695, with an average of 0.602. The UPGMA analysis showed that six cultivars of *Hemarthria* could be divided into two groups at the similarity coefficient of 0.652, and 6 cultivars could be completely separated by eight pairs of ESR-SSR primers. Based on electrophoretogram amplified by 3 pairs primers, the standard DNA fingerprinting for 6 *Hemarthria* cultivars were constructed, and each cultivars had a unique fingerprint. The average Nei's genetic diversity and Shannon's information index were 0.333 and 0.496, respectively. The similarity coefficient of 6 cultivars of *Hemarthria* ranged from 0.399 to 0.782. Therefore, it was suggested that 6 cultivars of *Hemarthria* had rich genetic diversity and significant differences between species.

Key words: EST-SSR; *Hemarthria*; Cultivar; DNA fingerprinting; Genetic diversity

收稿日期: 2013-07-19

接受日期: 2013-10-18

基金项目: 四川省育种攻关项目(2011YZGG-11); 国家现代牧草产业技术项目(CARS-35-05); 教育部博士点新教师基金项目(20115103120004); 四川农业大学大学生科研兴趣计划项目(20131155)资助

作者简介: 黄秀(1991 ~), 女, 硕士; 研究方向为草类植物资源及育种研究。E-mail: huangxiu4017@163.com

* 通讯作者 Corresponding authors. E-mails: 3165443@qq.com; zhangxq@sicau.edu.cn

牛鞭草属(*Hemarthria* R. Br.)植物是禾本科(Gramineae)黍亚科(Panicoideae A. Br.)多年生草本,分布较广,种类较多,全世界有近20种,其中扁穗牛鞭草(*H. compressa*)和高牛鞭草(*H. altissima*)的产量高、品种好、适应能力强,是我国热带、亚热带地区重要的多年生禾本科牧草之一^[1]。目前世界范围内牛鞭草属共登记了7个品种,分别为我国育成登记的3个扁穗牛鞭草栽培品种‘广益’、‘重高’和‘雅安’以及美国登记的4个高牛鞭草品种‘Redalta’、‘Greenalta’、‘Bigalta’和‘Floralta’^[2-5]。牛鞭草因其具有生长速度快、再生力强、产量高、适应性和抗逆性较强、水土保持能力优良等优点,已在热带、亚热带地区得到广泛利用,为当地畜牧业发展和生态环境建设作出了突出贡献,在草地农业系统中占有重要地位^[6-8]。

遗传资源的开发和利用对促进牛鞭草生产十分重要,目前对牛鞭草属种质资源的基础研究相对薄弱,登记品种均为野生驯化而来^[2]。长期的引种和自然选择使牛鞭草属品种间形态相似,造成识别牛鞭草属品种困难。因此,对牛鞭草属品种资源进行正确的评价,开展牛鞭草属品种资源遗传多样性和资源鉴定研究,对其品种真实性进行鉴定、知识产权的保护和新品种培育具有重要意义。

分子标记技术由于具有快速简便,不受环境影响等优点,已被广泛应用于种质资源遗传多样性分析^[9-11]、品种指纹图谱及纯度鉴定^[12-14]、遗传连锁图谱构建^[15-16]等方面。利用分子标记技术进行遗传多样性分析及建立DNA指纹图谱则是正确评价种质资源、鉴别品种品系和选择杂交亲本的有力工具。目前用于种质资源遗传多样性分析和资源鉴定研究的标记技术主要有RFLP (Restriction fragment length polymorphism, 限制性片段长度多态性)、SSR (Simple sequence repeat, 简单重复序

列)、AFLP (Amplified fragment length polymorphism, 扩增片段长度多态性)、RAPD (Randomly amplified polymorphic DNA, 随机扩增多态性DNA)及小卫星等。EST-SSR (Expressed sequence tags SSR)是存在于表达序列标签(Expressed sequence tags)中的简单重复序列, EST-SSR兼具了SSR共显性、多态信息含量高、简单快速、重复性好的优点以外,还克服了SSR开发费用昂贵的缺点,且可在近缘物种之间通用,目前已经在植物上得到广泛应用^[17-21]。

陈永霞等^[22]和范彦等^[23-24]利用EST-SSR和RAPD等分子标记仅对扁穗牛鞭草的遗传多样性进行了分析。目前尚没有关于牛鞭草属品种EST-SSR指纹图谱构建及遗传多样性分析方面的研究报告。因此,本研究以牛鞭草属6个品种为研究对象,通过EST-SSR标记技术建立牛鞭草属品种的DNA指纹图谱标准模式图,并对其遗传多样性进行分析,以期对牛鞭草属植物的种质资源管理、新品种选育、以及品种的知识产权保护等方面的研究提供一定的理论依据。

1 材料和方法

1.1 供试材料

本研究选取世界范围内登记的牛鞭草属(*Hemarthria*)植物6个品种(表1),‘Floralta’因在生产上利用较少,暂时没有收集到。其中3份品种材料营养体来自美国基因库,其余3份品种材料采自四川农业大学草业科学系科研基地。2013年1月采摘各材料的新鲜幼嫩叶片,放入装有变色硅胶的收集带中干燥,叶片彻底干燥后存放于-80℃冰箱保存。因牛鞭草为严格营养体繁殖材料,品种内单株间遗传背景一致,故1个品种只选取1株提取DNA。

表1 牛鞭草属的6个品种

Table 1 Six cultivars of *Hemarthria* tested

编号 No.	登记号 Accession No.	来源 Resource	物种 Species	品种 Cultivar
1	PI299993	南非德兰士瓦 Transvaal, South Africa	高牛鞭草 <i>H. altissima</i>	‘Redalta’
2	PI299994	南非林波波河 Limpopo, South Africa	高牛鞭草 <i>H. altissima</i>	‘Greenalta’
3	PI299995	南非德兰士瓦 Transvaal, South Africa	高牛鞭草 <i>H. altissima</i>	‘Bigalta’
4		广西广益 Guangyi, Guangxi	扁穗牛鞭草 <i>H. compressa</i>	‘广益’ ‘Guangyi’
5		四川雅安 Ya’an, Sichuan	扁穗牛鞭草 <i>H. compressa</i>	‘雅安’ ‘Yaan’
6		重庆 Chongqing	扁穗牛鞭草 <i>H. compressa</i>	‘重高’ ‘Chonggao’

1.2 基因组DNA的提取

对每份牛鞭草属品种材料选取健康幼嫩叶片, 采用植物基因组 DNA 提取试剂盒(天根生化科技有限公司)提取 DNA。并用分光光度计及 1% 的琼脂糖凝胶电泳对 DNA 的浓度与纯度进行检测。将合格 DNA 样品放置于 -20°C 冰箱中保存备用。

1.3 EST-SSR的PCR扩增与检测

牛鞭草属植物 EST-SSR 标记引物序列参考 Kantety 等^[25]开发的禾本科通用引物, 由上海生工生物工程技术有限公司合成。PCR 扩增反应优化体系总体积为 $15\ \mu\text{L}$: 模板 DNA $1.2\ \mu\text{L}$, $2 \times \text{Taq PCR MasterMix}$ (康为世纪生物科技有限公司) $7.5\ \mu\text{L}$, 正反向引物各 $1.2\ \mu\text{L}$ ($10\ \text{pmol}\ \mu\text{L}^{-1}$), ddH_2O 补齐体积。EST-SSR 的 PCR 扩增程序为: 94°C 预变性 5 min; 然后 94°C 变性 1 min, 52°C 退火 1 min, 72°C 延伸 1.5 min, 共 35 个循环; 最后 72°C 延伸 10 min, 于 4°C 保存。PCR 扩增产物用 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶(丙烯酰胺: 甲叉丙烯酰胺 = 19 : 1, $7.5\ \text{mol}\ \text{L}^{-1}$ 尿素, $1 \times \text{TBE}$ 缓冲液)进行检测。样品点样 $5\ \mu\text{L}$, 以博瑞克公司的 D2000 Marker 为对照, $400\ \text{V}$ 电压下电泳 140 min, 银染法显影, 照相保存。

1.4 数据统计和处理

对 EST-SSR 标记扩增产物的电泳图谱进行人工比对、校正, 统计强带或清晰弱带, 按照扩增条带的分子量从大到小编号和读取, 有扩增条带出现记为“1”, 无条带出现记为“0”, 建立原始矩阵。根据原始矩阵, 统计 EST-SSR 标记扩增产物的条带总数和多态性条带数, 计算多态性条带百分率(PPB)

和引物多态性信息含量(PIC), $\text{PIC}_i = 1 - \sum P_{ij}^2$, 其中, PIC_i 表示标记 i 的多态性信息含量, P_{ij} 表示标记 i 的第 j 个带型出现的频率, 标记 i 的总带型从 1 到 n 。利用 NTSY-PC2.10 软件对建立的原始矩阵采用 UPGMA 法进行聚类分析。对能完全区分开牛鞭草属 6 个品种的 EST-SSR 引物用于指纹图谱构建, 由 1 和 0 组成的字串即构成数字指纹, 用 Excel 2007 软件转换为指纹图谱标准模式图。采用 POPGEN v1.32 软件计算 Shannon 信息多样性指数(I), Nei's 遗传多样性指数(He)等群体遗传参数。

2 结果和分析

2.1 EST-SSR扩增多态性分析

用全部供试材料的基因组 DNA 对 86 对 EST-SSR 引物进行多态性筛选, 基于扩增条带清晰、多态性丰富、稳定性强的原则, 共选出 8 对多态性较理想的 EST-SSR 引物(图 1)。8 对引物在供试材料中共扩增出 193 条清晰可辨条带, 其中 161 条多态性条带, 多态性百分率为 83.4%, 扩增片段长度为 $100 \sim 250\ \text{bp}$ 。平均每对引物扩增条带数为 24.1 条, 多态性条带为 20.1 条。同时, 每条引物的多态信息含量(PIC)为 $0.480 \sim 0.695$, 平均 0.602 (表 2)。说明 Kantety 等^[25]开发的禾本科通用引物能应用于牛鞭草的分子遗传多样性研究。

2.2 EST-SSR引物鉴别力分析与指纹图谱构建

利用 NTSY-PC2.10 软件对每对引物建立的原始矩阵采用 UPGMA 法进行聚类分析, 在遗传相似度为 100% 时, 各品种形成单独一支的数量即为每

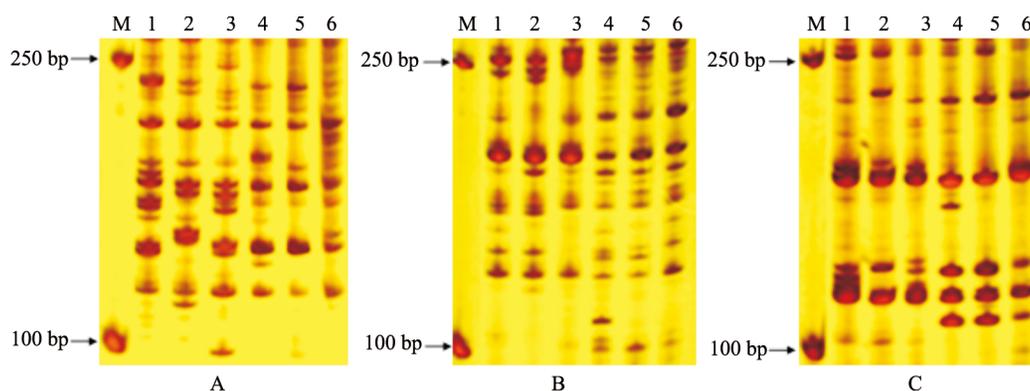


图 1 部分 EST-SSR 引物的扩增结果。A: 引物 cn142; B: 引物 cn186; C: 引物 cn1119。

Fig.1 Amplification results by part of EST-SSR primer. A: cn142; B: cn186; C: cn1119.

表 2 8 对引物序列

Table 2 Sequences of 8 pairs of primer

引物 Primer	序列 Sequence (5' ~ 3')	总条带 Number of total bands	多态性条带 Number of polymorphic bands	多态性百分率 % of polymorphic bands	多态性信息含量 Polymorphic information content
cnl42	F: ACCTGTGCGGCGATGAAT R: CAGGAGCAGGAGAACGTGAA	23	19	82.6	0.581
cnl47	F: GTTGGTCTGCTGCTCACTCG R: CCGACGATGTTGAAGGAGAG	31	29	93.5	0.695
cnl53	F: GACTCGCACGATTCTCCTC R: GCCAGACAACCAATTCAGGT	22	15	68.2	0.480
cnl86	F: CACGAGTGCAGAGCTAGACG R: ACAACAACCCGACTGCTACC	20	15	75.0	0.538
cnl100	F: GGCTCGAGCTTAAAACCTA R: CTCCATCCATTCTTGCCATCT	26	21	80.8	0.559
cnl101	F: CAACAACGTCAACGCCTTC R: GCGTCTTGAACCTCTTGCTCC	22	19	86.4	0.614
cnl119	F: CGTCGTCCTCTGCTGTGAG R: AGGTCGTCCATCTGCTGCT	18	16	88.9	0.690
cnl158	F: CTCATCCCACCACCACCAC R: CCCTGAAGAA GTCGAACACG	31	27	87.1	0.660
总和 Total		193	161		
平均 Average		24.1	20.1	83.4	0.602

对引物所能区分开的供试品种数。引物区分的品种数越多,鉴别力越强。本研究的聚类分析结果表明,筛选出的 8 对 EST-SSR 引物均能将 6 个品种全部区分开,表现出了很高的鉴别能力。因此,以筛选出的 EST-SSR 引物扩增电泳图谱为基础,由 1 和 0 组成的字符串构成数字指纹,再经 Excel 2007 软件转换,建立了基于各引物扩增的 6 个牛鞭草属品种指纹图谱标准模式图(图 2),可见每个品种都有唯一的指纹图谱(带型或基因型),可以比较容易地鉴定牛鞭草属的 6 个品种。

2.3 牛鞭草属品种的遗传多样性分析

利用 POPGENv1.32 软件对牛鞭草属 6 个品种的群体遗传参数进行计算,结果表明,牛鞭草属 6 个品种的平均 Nei's 基因多样性指数为 0.333,平均 Shannon 信息指数为 0.496。就各位点而言,Shannon 信息指数大于基因多样性指数,表明牛鞭草属 6 个品种间存在丰富的遗传多样性。

2.4 聚类分析

以牛鞭草属 6 个品种和 193 个位点的谱带

数据为原始矩阵,品种间的遗传相似系数最大的为 0.782 ('广益'与'雅安'),最小的为 0.399 ('Greenalta'与'广益')。基于遗传相似系数的聚类分析表明,在遗传相似系数为 0.652 处可以很明显地把牛鞭草属 6 个品种分为两大类(图 3)。第 I 类有 'Redalta'、'Greenalta'、'Bigalta' 品种,第 II 类由 '广益'、'雅安'、'重高' 品种组成。在相似系数为 0.724 处,第 I 类又可分为 2 个小组,第 1 小组由 'Redalta' 和 'Greenalta' 2 个品种组成,第 2 小组由 'Bigalta' 品种独自组成;第 II 类也可分为 2 个小组,第 1 小组由 '广益'和'雅安' 2 个品种组成,'重高'独自组成第 2 小组。可见,牛鞭草属品种间的差异明显,来自同一种类、同一地域的牛鞭草品种都聚为同一类。

3 讨论

近年来,以 DNA 分子标记为基础的指纹图谱鉴定技术的不断发展与完善,弥补和克服了形态学鉴定及同工酶、蛋白电泳鉴定中的许多缺陷和难题,成为品种鉴定技术中潜力最大的技术,已

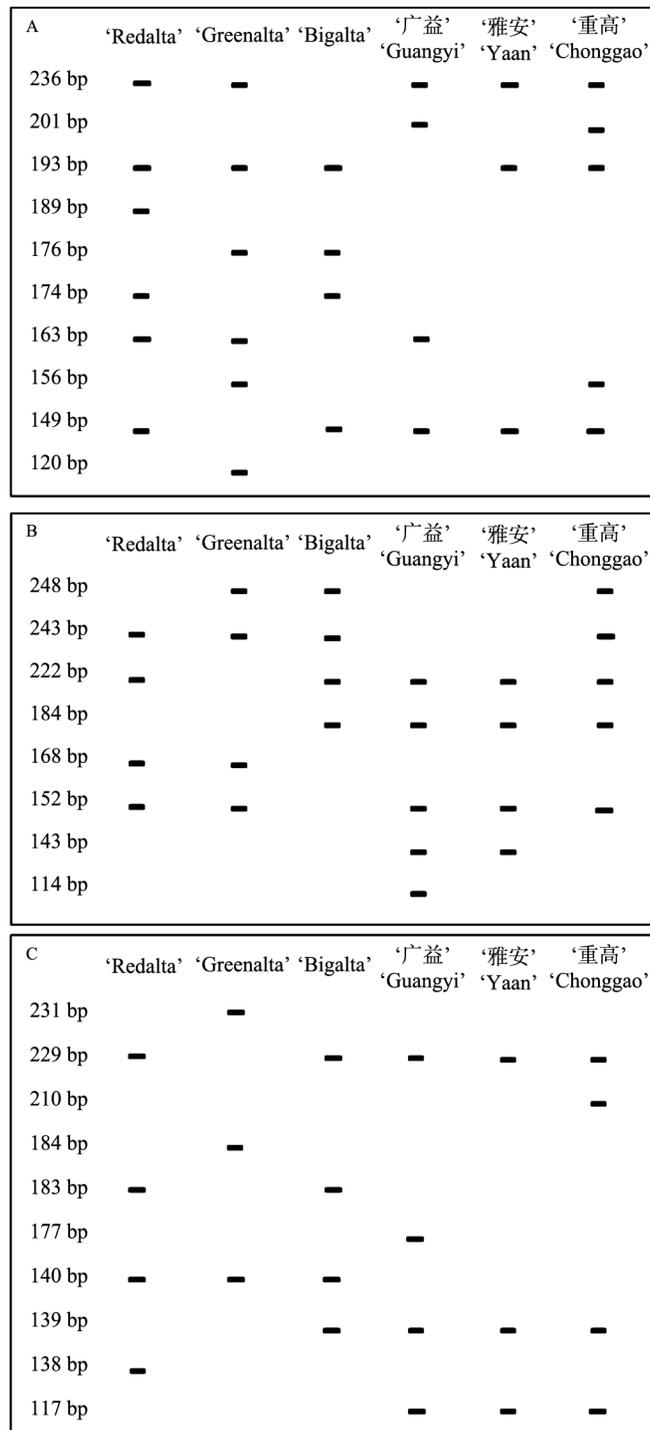


图 2 基于部分 EST-SSR 引物扩增的牛鞭草属 6 个品种指纹图谱标准模式图。A: 引物 cn142; B: 引物 cn186; C: 引物 cn1119。

Fig. 2 EST-SSR fingerprinting for 6 cultivars of *Hemarthria* by part of primer pairs. A: cn142; B: cn186; C: cn1119.

成功运用于紫花苜蓿(*Medicago sativa*)^[26]、马铃薯(*Solanum tuberosum*)^[27]、萝卜(*Raphanus sativus*)^[28]等植物中。SSR 标记已成为当前各个作物建库研究的首选标记之一^[29],但其开发测序费用极高,限制了它的开发利用。在国际公共数据库中呈指数级增长的 EST 序列促进了 SSR 的应用,成为 SSR 标

记新的重要开发来源。EST-SSR 标记拥有 SSR 标记的优势,且克服了其开发费用高的缺点,是较理想的分子标记之一^[30]。本研究首次将禾本科保守序列 EST-SSR 标记用于牛鞭草属 6 个品种的鉴定上,结果表明,禾本科保守序列 EST-SSR 标记具有较高的多态检出率,筛选出的 8 对引物均能将所

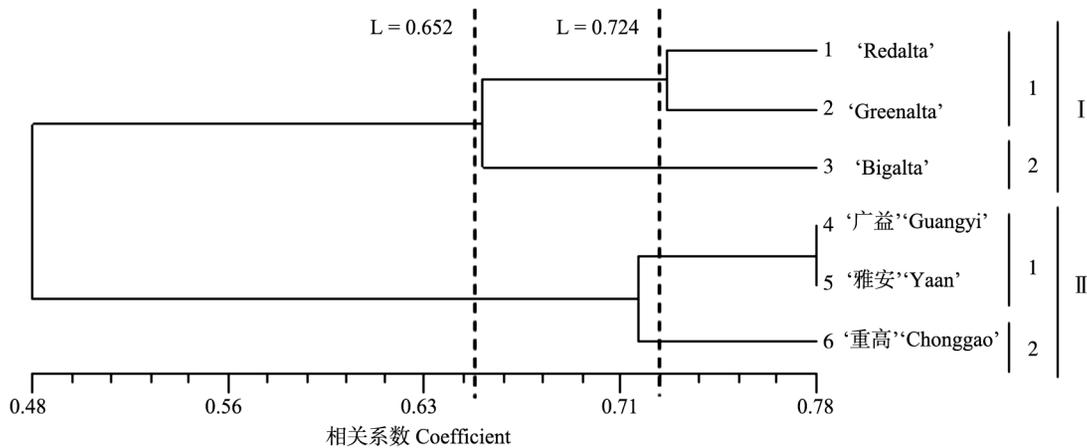


图3 牛鞭草属6个品种的UPGMA聚类图

Fig. 3 UPGMA phylogenetic map of 6 cultivars of *Hemarthria*

有供试品种完全区分开,表现出很高的鉴别力。这表明 EST-SSR 标记技术适用于牛鞭草属品种的指纹图谱构建,能有效地鉴别牛鞭草属6个品种。

牛鞭草属主要靠根茎繁殖,品种内单株间遗传信息一致,其构建的指纹图谱比多花黑麦草(*Lolium multiflorum*)、紫花苜蓿等异花授粉植物构建的指纹图谱重复性更好,鉴别作用明显。目前,构建指纹图谱主要有单引物法、引物组合法^[31-32]和特征谱带法3种方式。本研究筛选出的 EST-SSR 引物具有很高的鉴别能力,均能将所有供试品种完全区分开。因此,本研究采用单引物法,利用能完全区分供试品种的各引物,建立了牛鞭草属6个品种的指纹图谱标准模式图,而且每个品种都有唯一的指纹图谱(带型或基因型)。

参考文献

- [1] Delectis Florae Reipublicae Popularis Sinicae Agendae Academiae Sinicae Edit. Florae Reipublicae Popularis Sinicae, Tomus 10(2) [M]. Beijing: Science Press, 1997: 261-263.
中国植物志编辑委员会. 中国植物志, 第10卷第2分册 [M]. 北京: 科学出版社, 1997: 261-263.
- [2] Yang C H, Zhang X Q, Li X L, et al. Study on the agricultural traits and breeding of limpograss (*Hemarthria* R. Br.) [J]. J Sichuan Grass, 2004(9): 8-11.
杨春华, 张新全, 李向林, 等. 牛鞭草资源农艺性状和育种研究 [J]. 四川草原, 2004(9): 8-11.
- [3] Yang C H, Zhang X Q, Li X L, et al. *Hemarthria* germplasm resources and breeding [J]. Acta Prat Sin, 2004, 13(2): 7-12.
杨春华, 张新全, 李向林, 等. 牛鞭草属种质资源及育种研究 [J]. 草业学报, 2004, 13(2): 7-12.
- [4] Quesenberry K H, Dunavin L S, Hodges E M, et al. Registration of redalta, greenalta, and bigalta limpograss I (reg. Nos. 52, 53, and 54) [J]. Crop Sci, 1979, 19(2): 294-294.
- [5] Quesenberry K H, Ocumpaugh W R, Ruelke O C, et al. Registration of 'Floralta' limpograss [J]. Crop Sci, 1987, 27(5): 1087-1087.
- [6] de Carvalho D D, Gonzalez D D, Ghisi O M A A. Agronomic evaluation of seven accessions of *Hemarthria altissima* (Poir.) Stapf et CE Hubb in Pindamonhangaba, Sao Paulo [J]. Rev Soc Brasil Zootecn, 1996, 25(5): 825-836.
- [7] Woods P W, Couchman J N, Barlow H A. Variation and adaptation in limpograss (*Hemarthria altissima*) [J]. Proc New Zealand Grassland Assoc, 1996, 57(1): 49-53.
- [8] Rumball P J, Lambert J P. Plant introduction trials: Performance of some subtropical grasses in Northland [J]. New Zealand J Exp Agri, 1981, 9(1): 79-83.
- [9] Cai Y B, Yang X Y, Chen X G, et al. Establishment and application of SCoT amplification system for macadamia [J]. J Trop Subtrop Bot, 2013, 21(3): 253-258.
蔡元保, 杨祥燕, 陈显国, 等. 澳洲坚果SCoT反应体系的建立及应用 [J]. 热带亚热带植物学报, 2013, 21(3): 253-258.
- [10] Bai J, Hu X, Zhou S T, et al. Genetic diversity of 47 *Cymbidium ensifolium* varieties assessed by SRAP markers [J]. J Plant Genet Resour, 2012, 13(3): 376-380.
白坚, 胡旭, 周淑婷, 等. 47个建兰品种的SRAP遗传多样性分析 [J]. 植物遗传资源学报, 2012, 13(3): 376-380.
- [11] Xue D, Xiao L, Ai X, et al. Genetic diversity of *Miscanthus floridulus* revealed by morphological characters and SSR markers [J]. Acta Prat Sin, 2012, 21(5): 96-106.
薛德, 肖亮, 艾辛, 等. 五节芒表型性状和SSR标记遗传多样性分析 [J]. 草业学报, 2012, 21(5): 96-106.
- [12] Liu J, Zhao Q, Yang Z M. ISSR molecular markers analysis 9 bermudagrass cultivation varieties [J]. Acta Prat Sin, 2012, 21(6): 159-165.
刘君, 赵琴, 杨志民. ISSR分子标记对9种狗牙根的鉴定分析

- [J]. 草业学报, 2012, 21(6): 159–165.
- [13] Ge Y Y, Zhang F, Shen X L, et al. Analysis of genetic diversity and construction of fingerprint of *Vriesea* by ISSR [J]. *Sci Agri Sin*, 2012, 45(4): 726–733.
葛亚英, 张飞, 沈晓岚, 等. 丽穗凤梨ISSR遗传多样性分析与指纹图谱构建 [J]. *中国农业科学*, 2012, 45(4): 726–733.
- [14] Wu Y T, Zhang T Z, Guo W Z, et al. Detecting polymorphism among up land cotton (*Gossypium hirsutum* L.) cultivars and their roles in seed purity of hybrids with SSR markers [J]. *Cott Sci*, 2001, 13(3): 131–133.
武耀廷, 张天真, 郭旺珍, 等. 陆地棉品种SSR标记的多态性及用于杂交种纯度检测的研究 [J]. *棉花学报*, 2001, 13(3): 131–133.
- [15] 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(1): 37–45.
- [16] Shao Y J, Wu W W, Shen S X, et al. Genetic study on genic male sterility of pepper and its application in hybrid breeding [J]. *J Trop Subtrop Bot*, 2013, 21(1): 93–99.
邵元健, 吴雯雯, 沈素香, 等. 辣椒雄性核不育基因的遗传研究及其在杂交育种中的应用 [J]. *热带亚热带植物学报*, 2013, 21(1): 93–99.
- [17] Gupta P K, Balyan H S, Sharma P C, et al. Microsatellites in plants: A new class of molecular markers [J]. *Curr Sci*, 1996, 70(1): 45–54.
- [18] Holton T A, Christopher J T, McClure L, et al. Identification and mapping of polymorphic SSR markers from expressed gene sequences of barley and wheat [J]. *Mol Breed*, 2002, 9(2): 63–71.
- [19] Zhang L Y, Bernard M, Leroy P, et al. High transferability of bread wheat EST-derived SSRs to other cereals [J]. *Theor Appl Genet*, 2005, 111(4): 677–687.
- [20] Saha M C, Rouf M M A, Eujayl I, et al. Tall fescue EST-SSR markers with transferability across several grass species [J]. *Theor Appl Genet*, 2005, 109(4): 783–791.
- [21] Thiel T, Michalek W, Varshney R, et al. Exploiting EST databases for the development and characterization of gene-derived SSR-markers in barley (*Hordeum vulgare* L.) [J]. *Theor Appl Genet*, 2003, 106(3): 411–422.
- [22] Chen Y X, Zhang X Q, Xie W G, et al. Genetic diversity of *Hemarthria compressa* germplasms from southwestern china based on EST-SSR markers [J]. *Acta Prat Sin*, 2011, 2(6): 245–253.
陈永霞, 张新全, 谢文刚, 等. 利用EST-SSR标记分析西南扁穗牛鞭草种质的遗传多样性 [J]. *草业学报*, 2011, 2(6): 245–253.
- [23] Fan Y, Li F, Zhang X Q, et al. Genetic diversity of *Hemarthria compressa* germplasm detected by inter-simple sequence repeat (ISSR) [J]. *Acta Prat Sin*, 2007, 16(4): 76–81.
范彦, 李芳, 张新全, 等. 扁穗牛鞭草种质遗传多样性的ISSR分析 [J]. *草业学报*, 2007, 16(4): 76–81.
- [24] Fan Y, Xu Y D, Jiang A, et al. Genetic diversity of *Hemarthria compressa* germplasms in southwest China by SRAP analysis [J]. *Genom Appl Biol*, 2010, 29(1): 63–70.
范彦, 徐远东, 蒋安, 等. 中国西南区扁穗牛鞭草种质遗传多样性的SRAP分析 [J]. *基因组学与应用生物学*, 2010, 29(1): 63–70.
- [25] Kantety R V, Rota M L, Matthews D E, et al. Data mining for simple sequence repeats in expressed sequence tags from barley, maize, rice, sorghum and wheat [J]. *Plant Mol Biol*, 2002, 48(5/6): 501–510.
- [26] Wei Z W. DNA fingerprint of *Medicago sativa* variety genomes using SSR, ISSR and RAPD [J]. *Acta Prat Sin*, 2004, 13(3): 62–67.
魏臻武. 利用SSR、ISSR和RAPD技术构建苜蓿基因组DNA指纹图谱 [J]. *草业学报*, 2004, 13(3): 62–67.
- [27] Shi J, Song B T, Jin K J, et al. Genetic diversity and fingerprinting of 50 pigmented potato (*Solanum tuberosum* L.) genotypes with SSR markers [J]. *J Agri Biotechn*, 2012, 20(4): 362–371.
石景, 宋波涛, 金开建, 等. SSR标记的彩色马铃薯遗传多样性分析及指纹图谱构建 [J]. *农业生物技术学报*, 2012, 20(4): 362–371.
- [28] Liu L W, Zhao L P, Gong Y Q, et al. DNA fingerprinting and genetic diversity analysis of late-bolting radish cultivars with RAPD, ISSR and SRAP markers [J]. *Sci Hort*, 2008, 116(3): 240–247.
- [29] Teng H T, Lü B, Zhao J R, et al. DNA fingerprint profile involved in plant variety protection practice [J]. *Biotechn Bull*, 2009(1): 1–6.
腾海涛, 吕波, 赵久然, 等. 利用DNA指纹图谱辅助植物新品种保护的可能性 [J]. *生物技术通报*, 2009(1): 1–6.
- [30] Li L, He W M, Ma L P, et al. Construction chinese cabbage (*Brassica rapa* L.) core collection and its EST-SSR fingerprint database by EST-SSR molecular markers [J]. *Genom Appl Biol*, 2009, 28(1): 76–88.
李丽, 何伟明, 马连平, 等. 用EST-SSR分子标记技术构建大白菜核心种质及其指纹图谱库 [J]. *基因组学与应用生物学*, 2009, 28(1): 76–88.
- [31] Xu Z D, Zhao L Y, Zhang L, et al. Analysis of genetic diversity and construction of fingerprint of *Rosa rugosa* by SRAP [J]. *Sci Agri Sin*, 2011, 44(8): 1662–1669.
徐宗大, 赵兰勇, 张玲, 等. 玫瑰SRAP遗传多样性分析与品种指纹图谱构建 [J]. *中国农业科学*, 2011, 44(8): 1662–1669.
- [32] Tong H L, Feng S P, He J H, et al. Establishment of fingerprinting for pineapple (*Ananas comosus*) by SSR marker [J]. *J Fruit Sci*, 2011, 28(2): 240–245.
童和林, 冯素萍, 贺军虎, 等. 菠萝微卫星指纹图谱的构建 [J]. *果树学报*, 2011, 28(2): 240–245.