

利用微卫星标记鉴定扁蓿豆种质资源

李鸿雁^{1,2}, 李志勇², 米福贵¹, 卢新雄³, 师文贵²

(1. 内蒙古农业大学, 内蒙古 呼和浩特 010010; 2. 中国农业科学院 草原研究所, 内蒙古 呼和浩特 010010;
3. 中国农业科学院 作物品种资源研究所, 北京 100081)

摘要:对扁蓿豆种质资源进行遗传多样性和亲缘关系分析, 为育种者选择亲本和种质资源的开发提供理论依据。采用微卫星分子标记对来自内蒙古野生扁蓿豆种质资源 50 份材料进行鉴定。用 8 份扁蓿豆基因组 DNA 从 89 对截形苜蓿 SSR 引物中鉴定筛选出扩增带单一、稳定清晰且多态性强的 18 对引物。用这 18 对引物, 对扁蓿豆材料的 DNA 进行 SSR 扩增, 以研究其遗传多态性。结果共检测到 109 个等位位点, 平均每对引物扩增出 6.1 个等位位点。6 对 SSR 引物 BI4BO3, MTIC272, MAL369471, MTIC237, MTIC188 和 MTIC27 对于检测扁蓿豆遗传变异最有效。供试材料间遗传距离介于 0.023 6~ 0.807 5, 平均遗传距离为 0.177 8。聚类分析构建了亲缘关系树状图, 大致分为 9 大类。

关键词:扁蓿豆; 微卫星标记; 多态性聚类分析

中图分类号: S542 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2008)03-0067-05

Appraisal of *Medicago Ruthenica* Germplasms by SSR Markers

LI Hong-yan^{1,2}, LI Zhi-yong², MI Fu-gui¹, LU Xin-xiong³, SHI Wen-gui²

(1. Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010010, China; 2. Grassland Institute of Chinese Academy of Agriculture Sciences, Hohhot 010010, China; 3. Institute of Crop Science, Chinese Academy of Agriculture Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: Eighteen reproducible and informative SSR primer pairs were selected from the 89 pairs of primers of *Medicago truncatula*. In 8 genome DNA of *Medicago ruthenica*. And a representative set of 50 wild *Medicago ruthenica* genetic resources from Inner Mongolian were analyzed by SSR methodology using the informative primer pairs for their diversity of genetic. The results showed a total of 109 alleles were detected with an average of 6.1 alleles per SSR primer pair. According to integrated evaluation, 6 SSR primer pair, BI4BO3, MTIC272, MAL369471, MTIC237, MTIC188 and MTIC27 were most effective for genetic diversity studies on *Medicago ruthenica*. The genetic distances among the germplasms ranged between 0.023 6 and 0.807 5 with their average at 0.177 8. By cluster analysis with sum of squares for microsatellite showed that 50 accessions can be divided into 9 groups with different characteristics which could afford reference in deeper research on *Medicago ruthenica*.

Key words: *Medicago ruthenica*; Microsatellite; Polymorphism; Cluster analysis

微卫星 DNA (Microsatellite) 也称简单重复序列 (Simple sequence repeat, SSR), 由 1~6 个核苷酸组成的短序列 (又称核心序列) 首尾衔接重复多次构成, 在基因组中串连重复排列。不同遗传材料重复次数的可变性, 导致了 SSR 长度的高度变异性, 这一变异性正是 SSR 标记产生的基础。微卫星的突变率很高, 从而产生了很多等位基因, 导致了微卫星的高

度多态性^[2]。微卫星标记还具有简单的孟德尔遗传方式, 能用 PCR 扩增, 提供高质量的信息以及在单个微卫星位点上可做共显性的等位基因分析的优点。近年来, 微卫星技术广泛应用于水稻^[3]、中间偃麦草^[2]、小麦^[4]、玉米^[4]、大豆^[5,6]、苜蓿^[7,8]、多枝赖草^[7]等植物的遗传多样性分析、分类研究、遗传图谱构建、基因定位和分子标记辅助育种中。

收稿日期: 2008-03-20

基金项目: 国家科技基础条件平台建设项目 (2006DKA21001-26); 农业部作物种质资源保护项目 (NB307-2130135-42)

作者简介: 李鸿雁 (1964-), 女, 辽宁锦州人, 副研究员, 在读博士, 主要从事牧草种质资源的研究。

通讯作者: 米福贵 (1959-), 男, 内蒙古凉城人, 教授, 博士生导师, 主要从事牧草遗传育种研究。

扁蓿豆 (*Medicago ruthenica*) 是豆科 (*Leguminosae*) 苜蓿属 (*Medicago*) 多年生草本植物, 具有抗旱、耐寒、耐贫瘠、耐践踏等特点, 适宜高寒地区生长, 扁蓿豆叶量大, 茎、叶、花序比为 42: 53: 5; 适口性好, 羊和马四季嗜食, 是理想的抓膘催乳的植物; 在利用上是牧刈兼用型, 也是一种营养价值和产量较高的优良牧草, 与苜蓿相比, 它在适应性、抗旱性和耐寒等方面优于紫花苜蓿 (*Medicago sativa* L.), 可与黄花苜蓿 (*Medicago falcata* L.) 相媲美^[11]。在改良草场, 建立人工草地, 防治水土流失等方面起了很大的作用。目前对扁蓿豆的研究主要集中在生态特性^[12]、抗性鉴定^[13]、形态特征^[14]、生物学特性^[15]以

及杂交育种^[16]的选育等领域, 但在 DNA 水平上研究其遗传多样性还未见报道。本研究旨在利用 SSR 标记技术对扁蓿豆种质资源进行遗传多样性和亲缘关系分析, 为育种者进行选择亲本和扁蓿豆种质资源的开发利用提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

以中国农业科学院草原研究所国家牧草中期库收集保存的 50 份内蒙古野生扁蓿豆作为研究对象 (表 1)。

表 1 50 份供试扁蓿豆种质材料的基本情况

Tab. 1 The information of 50 tested *Medicago ruthenica* germplasm materials

编号 Code	原产地 Origin	经度 Longitude	纬度 Latitude	海拔/m Altitude	年均温/℃ Mean annual temperature	年均降水/mm Annual precipitation
1	锡盟白音锡勒牧场 ximengBaiyinxi	41°55'	111°08'	1400.0	4.3	139.0
2	锡盟白音锡勒牧场 ximengBaiyinxi	41°55'	111°08'	1400.0	4.3	139.0
3	锡盟白音锡勒牧场 ximengBaiyinxi	43°02'	115°13'	1000.0	1.7	294.9
4	锡盟白音锡勒牧场 ximengBaiyinxi	43°02'	115°13'	1000.0	1.7	294.9
5	锡盟白音锡勒牧场 ximengBaiyinxi	44°52'	117°06'	1300.0	1.7	290.4
6	锡盟白音锡勒牧场 ximengBaiyinxi	44°52'	117°06'	1300.0	1.7	290.4
7	锡盟锡林浩特 ximengXilinhaote	43°51'	114°16'	927.0	4.3	140.0
8	锡盟锡林浩特 ximengXilinhaote	43°51'	114°16'	927.0	4.3	140.0
9	锡盟锡林浩特 ximengXilinhaote	43°57'	116°04'	989.5	2.1	346.4
10	锡盟锡林浩特 ximengXilinhaote	43°57'	116°04'	989.5	2.1	346.4
11	锡盟锡林浩特 ximengXilinhaote	43°57'	116°04'	989.5	2.1	346.4
12	锡盟灰腾梁 ximenghuitengliang	43°05'	111°13'	1100.0	1.7	290.4
13	锡盟灰腾梁 ximenghuitengliang	43°07'	111°08'	1050.0	1.7	290.4
14	锡盟灰腾梁 ximenghuitengliang	43°07'	111°10'	1000.0	1.7	290.4
15	锡盟西苏旗 ximengXisuqi	45°23'	119°03'	960.0	0.7	245.0
16	锡盟西苏旗 ximengXisuqi	45°23'	119°04'	1540.0	0.7	245.0
17	锡盟西苏旗 ximengXisuqi	44°47'	119°04'	1540.0	0.7	245.0
18	通辽大青沟 Tongliadaqinggou	43°43'	122°37'	165.0	6.3	440.9
19	通辽大青沟 Tongliadaqinggou	43°43'	122°37'	165.0	6.3	440.9
20	通辽大青沟 Tongliadaqinggou	43°36'	122°37'	165.0	6.3	440.9
21	通辽大青沟 Tongliadaqinggou	43°36'	122°16'	178.5	6.3	394.7
22	通辽大青沟 Tongliadaqinggou	43°36'	122°16'	178.5	6.3	394.7
23	通辽大青沟 Tongliadaqinggou	43°36'	122°16'	178.5	6.3	394.7
24	赤峰市 Chifeng	42°16'	118°58'	571.1	2.5	361.0
25	赤峰市 Chifeng	46°11'	120°58'	568.1	2.5	355.0
26	赤峰市 Chifeng	40°17'	116°20'	560.7	2.5	350.0
27	赤峰市 Chifeng	42°16'	118°58'	571.1	2.5	361.0
28	赤峰市 Chifeng	46°11'	120°58'	568.1	2.5	355.0
29	赤峰市 Chifeng	40°17'	116°20'	560.7	2.5	350.0
30	海拉尔市 Hailaer	49°13'	119°45'	612.8	-1.5	350.5
31	海拉尔市 Hailaer	49°13'	119°45'	612.8	-1.5	350.5
32	呼和浩特市 Huhehaote	40°49'	111°41'	1063.0	2.1	543.1
33	呼和浩特市 Huhehaote	40°33'	110°31'	1328.0	7.0	350.0
34	呼和浩特市 Huhehaote	40°33'	110°31'	1328.0	7.0	350.0
35	呼和浩特市 Huhehaote	40°23'	111°48'	1151.9	7.0	417.5
36	呼和浩特市 Huhehaote	40°33'	110°31'	1328.0	7.0	350.0
37	呼和浩特市 Huhehaote	40°49'	110°31'	1328.0	7.0	350.0
38	武川县 Wuchuan	40°47'	110°31'	1200.0	2.5	360.4

续表

编号 Code	原产地 Origin	经度 Longitude	纬度 Latitude	海拔/m Altitude	年均温/℃ Mean annual temperature	年均降水/mm Annual precipitation
39	武川县 Wuchuan	40°47′	110°31′	1 200.0	2.5	360.4
40	清水河县 Qingshuihe	39°50′	111°43′	1 743.0	7.5	410.0
41	清水河县 Qingshuihe	39°50′	111°43′	1 743.0	7.5	410.0
42	土左旗 Tuzuoqi	40°33′	111°31′	1 328.0	7.0	350.0
43	土左旗 Tuzuoqi	40°33′	111°31′	1 328.0	7.0	350.0
44	土左旗 Tuzuoqi	40°33′	111°31′	1 328.0	7.0	350.0
45	土左旗 Tuzuoqi	40°33′	111°31′	1 328.0	7.0	350.0
46	土左旗 Tuzuoqi	40°33′	111°31′	1 328.0	7.0	350.0
47	四子王旗 Siziwangqi	40°20′	110°20′	1 400.0	3.0	313.8
48	四子王旗 Siziwangqi	42°40′	110°20′	1 400.0	3.0	313.8
49	达茂旗 Damaoqi	41°14′	109°16′	1 375.0	3.4	250.0
50	达茂旗 Damaoqi	41°14′	109°16′	1 375.0	3.4	250.0

1.2 方法

1.2.1 扁蓊豆总 DNA 提取 参照 Sambrook 等^[17]的 CTAB 法略加改进提取扁蓊豆基因组 DNA, 0.8% 琼脂糖凝胶电泳进行检测, 用紫外可见分光光度计测定 260 和 280 nm 波长范围内的吸收光值, 计算 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 的比值以检测 DNA 样品纯度, 检测的

OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值在 1.8~1.9。

1.2.2 SSR 引物 从(2003, Bernadette Julier, BMC Plant Biology) 文献中获得 89 对截形苜蓿的 SSR 引物序列由上海生物工程技术服务有限公司合成, 筛选出的多态性丰富的适合于扁蓊豆 DNA 扩增的 18 对引物(表 2)用于统计分析。

表 2 18 个 SSR 引物序列

Tab. 2 18 SSR primer sequences

引物 Primer	正向序列(5′ to 3′) Forward primer	反向序列(3′ to 5′) Reverse primer	退火温度 /℃ T _a	扩增片段 数目 Amplified band number
MTIC233	GCG TAA CGT AAC AAC ATT CA	AAG GAA CAA TCC CAG TTT TT	55	3
AW584539	TTG ATG GGC AAT ACA TGT CG	GTT GAA GGA AGG TGG TGG TG	59	3
MTIC347	TCG GTG TAT TTC CGT GTT TG	GGT TGA AAT TGA AAG AAG AAT CG	62	3
MTIC258	CAC CAC CTT CAC CTA AGA AA	TGA AAT TCA CAT CAA CTG GA	60	3
MTIC77	GCC GTA TGG TGT TGT TGA TG	TCT TCA TCG CTT TCT TCT ATT TCA	64	4
MSA13293	AGA CAA GCG TGA CAC CCA CT	TCC ATC GCT CTC TCT TTT CC	66	4
BI4B03	GCT TGT TCT TCT TCA AGC TCA C	CTG ACT TGT GTT TTA TGC	56	5
MTIC183	TTC TCT TCA AGT GGG AGG TA	AAA TGG AAG AAA GTG TCA CG	58	5
MTIC249	TAG GTC ATG GCT ATT GCT TC	GTG GGT GAG GAT GTG TGT AT	64	5
MTIC27	CCC CGT TTT TCT TCT CTC CT	CGA TCG GAA CGA GGA CTT TA	63	6
MTIC272	TCT TGT TGT ATC CTC CGA AC	TCC TGA GTT GTA GAG TGA GTG A	63	7
MTIC189	ATG TTG GTG GAT CCF TCT GC	CAA ACC CTT TTC AAT TTC AAC C	61	8
MTIC237	TGG TGA AGA TTC TGT TGT TG	CCC ATA TGC AAC AGA CCT TA	60	8
MTIC93	ACC GTA GCT CCC TTT TCC A	AGC AGG ATT TGG GAC AGT TGT	61	8
MAL369471	AAA CCC TTA GCA CCG ACA	ATT CAC ACA AAC CCA TCT TC	58	8
MTIC451	GGA CAA AAT TGG AAG AAA AA	AAT TAC GTT TGT TTG GAT GC	55	9
MTIC432	TGG AAT TTG GGA TAT AGG AAG	GCC ATA AGA ACT TCC ACT T	58	10
MTIC188	AAT CGG AGA AAC ACG AGC AC	GGC GGT GAA GAA GTA AAC GA	62	10

1.2.3 PCR 反应、电泳和染色 用固定引物 BI4B03 采用正交设计从 PCR 反应组成、扩增程序、电泳检测等环节对 SSR 技术进行了优化, 筛选出各反应因素的最佳水平, 建立了扁蓊豆 SSR-PCR 反应的最佳体系: 25 μL 反应体系中, 含 10 × Buffer(含 Mg²⁺) 5.5 μL, TaqDNA 聚合酶 2.5 U(5 U/μL), 模板 DNA 浓度 3 μL(408 ng), dNTP(10 mmol/L) 0.75 μL, 引物(10 mmol/L) 0.75 μL, ddH₂O 16.25 μL。PCR 反应程序为: 95℃ 预变性 3 min, 94℃ 变性 25 s, 55~

66℃(根据不同引物而定) 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 35 个循环, 72℃ 延伸 10 min, 最后 4℃ 保存。扩增产物经 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳, 恒功率 80 W 30 min。而后进行银染, 先脱色和固定, 水洗, 最后进行染色和显影。

1.2.4 数据分析 在数据处理中, 只分析图片中清晰的条带, 将有带的记录为“1”, 否则为“0”, 按 Dice 系数计算相似系数(S_D), 遗传距离(G_D) 由 G_D = 1 - S_D 得到, 用 NTSYS12.0 软件中 UPGMA(Unweighted

pair group method with arithmetic mean, 算术平均非加权配组法) 进行聚类分析并构建树状图^[18]。

2 结果与分析

2.1 SSR位点的多态性

从89对截形苜蓿 SSR 引物中筛选出扩增带单一、稳定清晰且多态性强的 18 对引物(部分扩增见图 1), 初步表明供试材料遗传明显。用这 18 对引物, 对来自内蒙古的 50 份野生扁蓿豆种质资源的 DNA 进行 SSR 扩增, 以研究其遗传多态性。其中 6 对 SSR 引物 BI4B03, MTIC272, MAL369471, MTIC237, MTIC188 和 MTIC27, 对于检测扁蓿豆遗传变异最有效。结果共检测到 109 个等位位点, 平均每对引物扩增出 6.1 个等位位点。

2.2 SSR 聚类结果分析

供试材料间遗传距离介于 0.023 6~ 0.807 5, 平均遗传距离为 0.177 8。当遗传距离在标尺上显示为 0.30 时可分为 9 大类。第一大类 1 号材料; 第二大类 6 号材料; 第三大类包括 18 份材料, 主要来自锡林郭勒盟, 它又可分为 3 个亚类, 第一亚类包括 3, 49, 11, 14, 12, 16, 17, 50, 15, 19 号材料, 第二亚类包括 4, 9, 5, 13, 7 号材料, 第三亚类包括 10, 21, 20 号

材料; 第四类包括 16 份材料, 主要来自于内蒙古东北部的赤峰、通辽, 它又可分为两个亚类, 第一亚类包括 26, 27, 29, 31, 22, 30, 32, 33, 35, 29, 24, 25, 28, 36 号材料, 第二亚类包括 34, 40 号材料; 第五类包括 10 份材料, 主要来自于内蒙古西部的呼和浩特市、土左旗、四子王旗、武川县等地, 它可分为两个亚类, 第一亚类有 37, 38 号材料, 第二亚类包括 42, 47, 48, 39, 45, 46, 43, 44 号材料; 第六类有 41 号材料; 第七类有 2 号材料; 第八类有号材料 8; 第九类有 18 号材料。可以看出, 聚类结果与地理位置来源关系密切, 与亲缘关系的远近相吻合。

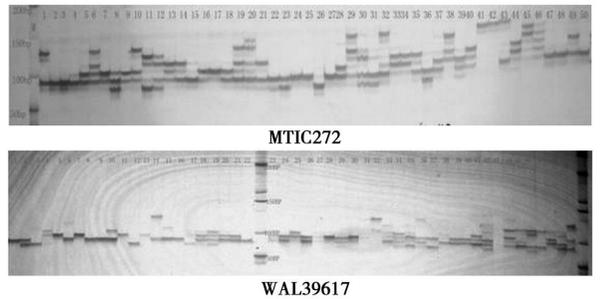


图 1 引物 MTIC272, WAL39617 对 50 份扁蓿豆种质的扩增产物结果

Fig. 1 Amplification results of 50 *Medicago ruthenica* by MTIC272, WAL39617 primers

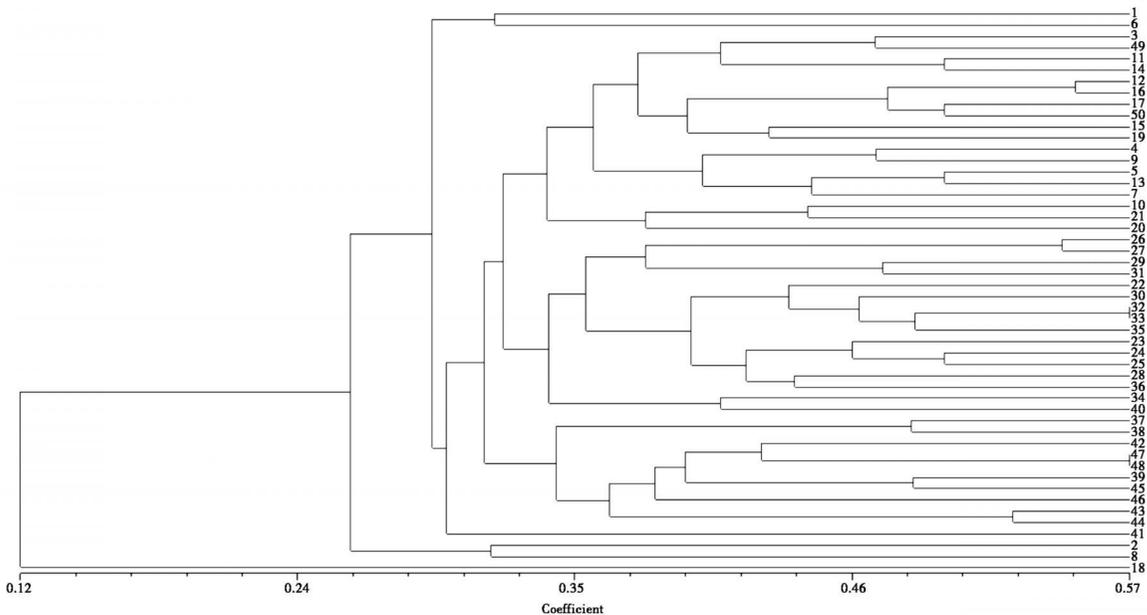


图 2 50 份供试材料扁蓿豆的 SSR 聚类图

Fig. 2 The cluster map of the 50 *Medicago ruthenica* germplasm by SSR

3 讨论

微卫星标记在研究牧草居群基因组的亲缘关系、基因漂流、遗传多样性及其种质资源保护上具有很大的潜力^[19]。微卫星位点两侧的序列是独特的, 其分子标记的优点: ① 高度丰富且均匀分布; ④具有

丰富的多态性; ④共显性; ④不受环境、季节和生育期的影响; ④允许就单一位点给出相关的解释和遗传分析; ④利用已发表文章中给出的引物序列很容易在其他试验室开展试验。近几年, 在已经发表的 DNA 序列的调查中显示牧草微卫星位点具有丰富的多态性, 微卫星标记在牧草上的应用不断增加, 而

且从中获得了丰富的遗传信息。孙建萍等^[20]利用 6 对引物对来源于不同地区的 16 份披碱草种质资源的遗传多样性进行了分析, 共检测出 26 个等位位点, 平均每对引物所产生的平均等位基因数为 4.3 个位点; 许占友等^[21]将 SSR 标记和农艺性状间进行比较, 探索利用 SSR 标记鉴定大豆种质的遗传多样性。王黎明等^[22], 郭光艳等^[23]的研究表明该技术的结的果显示, 利用 SSR 对大豆种质进行鉴定是可行的。本研究中, 18 对引物共检测到 109 个等位位点, 平均每对引物扩增出 6.1 个等位位点。结合前人的研究经验表明, SSR 表现出较高的多态性和稳定性。

扁蓿豆为苜蓿属中的一个野生种, 同时具有生态适应性广、耐贫瘠、抗寒、抗旱、营养价值较高的特点, 可以用来作为亲本与紫花苜蓿杂交, 以改善紫花苜蓿的抗寒性。是改良和育成新品种的巨大基因库, 利用分子标记开展多基因聚合育种是未来育种的前途所在, 借助截形苜蓿等模式牧草的分子标记研究成果, 有助于尽快获得豆科牧草的大量标记和高密度图谱。同时, 不能忽视形态学、遗传学等基础研究工作。而且要积极获取国外研究的最新信息, 及时将国外研究的先进成果与技术应用于我国扁蓿豆种质资源的研究中, 逐步缩小与国际先进水平的差距。在扁蓿豆种质资源的保种及其应用方面, 应进一步健全中期库的管理, 对其进行分子标记、分子克隆、创建基因平台, 为种质创新打下坚实的基础, 同时为核心种质的建立创造条件, 加强扁蓿豆遗传资源的利用, 对经过鉴定可在生产中直接利用的种质材料及时扩繁种子, 积极在生产中推广利用。

致谢: 衷心感谢中国农业科学院草原研究所的李兴酉助研在 DNA 提取中给予的热情帮助, 内蒙古农业大学的硕士研究生宁红梅在试验操作过程、试验数据处理给予的大力帮助。

参考文献:

[1] Panaud O, Chen X, McCouch S R, Frequency of microsatellite sequence in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *Mol Genet*, 1995, 38: 1170-1176.

[2] 赵君, 苏翻身, 于长虹, 等. 几种常用的分子标记技术的比较[J]. *内蒙古农业科技*, 1999(3): 32-33.

[3] Bryan G J, Collins A J, Stephenson P, *et al.* Isolation and characterization of micro satellite from hexaploid bread wheat [J]. *Theor Appl Genet*, 1997, 5(94): 557-563.

[4] Bryan G J, Collins A J, Stephenson N P, *et al.* Isolation and characterization of micro satellite from hexaploid bread wheat

[J]. *Theor Appl Genet*, 1997, 5(94): 557-563.

[5] 王铁固, 库丽霞, 陈彦惠, 等. 利用 SSR 分析玉米群体的遗传变异[J]. *华北农学报*, 2005, 20(5): 13-16.

[6] Rongwe N J, Akkaya M S, Bhagwat A A, *et al.* The use of microsatellite DNA marker for soybean genotype identification [J]. *Theor Appl Genet*, 1995, 90: 43-48.

[7] 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.

[8] 刘志鹏, 杨青川, 呼天明, 等. 用 SSR 标记研究不同耐盐特性四倍体紫花苜蓿的遗传多样性[J]. *作物学报*, 2006, 32(4): 630-632.

[9] 李恋. 生物技术在植物育种上的新应用[J]. *内蒙古农业科技*, 2006(3): 52-54, 56.

[10] 肖海峻, 孟利前, 李玉冰. ISSR 分子标记及其在植物遗传育种中的应用[J]. *内蒙古农业科技*, 2006(4): 31-33, 42.

[11] 宁布, 杜一民, 陈山. 内蒙古扁蓿豆属植物研究草地生物多样性保护研究[M]. 呼和浩特: 内蒙古大学出版社, 1995.

[12] 杨青川, 耿华珠, 孙彦. 十种扁蓿豆生态型的研究[J]. *草业科学*, 1995(2): 13-16.

[13] 石凤翎, 郭晓霞, 高翠萍. 扁蓿豆抗旱形态解剖结构观察与分析[J]. *干旱地区农业研究*, 2005, 23(2): 115-119.

[14] 额尔敦嘎日迪. 内蒙古中东部野生扁蓿豆形态特征多变量分析[J]. *中国草地学报*, 2006, 28(4): 87-90.

[15] 乌日娅, 雍世鹏, 包贵平. 扁蓿豆生态生物学特性的比较研究[J]. *中国草地*, 1994(2): 1-7.

[16] 李红, 罗新义, 王殿魁, 等. 扁蓿豆与肇东苜蓿杂交育种的研究[J]. *中国草地*, 1990(6): 20-23.

[17] Sambrook J, Russell D W. 分子克隆试验指南[M]. 黄培常, 译. 3 版. 北京: 科学出版社, 2002.

[18] 韩文革, 于晓春. 聚类分析在鹰嘴豆农艺性状分类上的应用[J]. *内蒙古农业科技*, 2006(6): 40-41, 45.

[19] Condit R, Hubbell. Abundance and DNA sequence of two base repeat regions in tropical tree genomes[J]. *Genomes*, 1991, 32: 66-71.

[20] 孙建萍, 袁庆华. 利用微卫星分子标记研究我国 16 份披碱草遗传多样性[J]. *草业科学*, 2006, 8(23): 40-44.

[21] 许占友, 邱丽娟, 常汝镇, 等. 利用 SSR 标记鉴定大豆种质资源[J]. *中国农业科学*, 1999, 32(1): 40-48.

[22] 王黎明, 李兴锋, 刘树兵, 等. 小麦微卫星标记在中间偃麦草中通用性研究[J]. *华北农学报*, 2007, 22(6): 50-52.

[23] 郭光艳, 李瑞芬, 张敬原, 等. 小麦微卫星引物对多枝赖草基因组 DNA 扩增的研究[J]. *华北农学报*, 2004, 19(1): 1-4.