

DOI:10.11829/j.issn.1001-0629.2016-0371

罗小燕,张瑞花,贾庆麟,王文强,白昌军,丁西朋.柱花草 EST-SSR 标记在山蚂蝗中的可转移性与应用.草业科学,2016,33(11):2237-2247.

Luo X Y, Zhang R H, Jia Q L, Wang W Q, Bai C J, Ding X P. Analysis and application of transferable EST-SSR markers from *Stylosanthes* to *Desmodium*. Pratacultural Science, 2016, 33(11): 2237-2247.

柱花草 EST-SSR 标记在山蚂蝗中的 可转移性与应用

罗小燕,张瑞花,贾庆麟,王文强,白昌军,丁西朋

(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:为鉴定山蚂蝗(*Desmodium*)种质资源的遗传背景及亲缘关系,选取 92 对柱花草(*Stylosanthes* spp.)EST-SSR 标记和来自 8 个种的 16 份山蚂蝗材料,分析柱花草 EST-SSR 标记在山蚂蝗中的通用性,并对 8 种山蚂蝗进行亲缘关系分析。研究结果表明,柱花草 EST-SSR 标记在 8 种山蚂蝗种的可转移率为 63.04%~73.91%,其中 50 对可在全部 8 种山蚂蝗中进行有效扩增。16 对多态性 EST-SSR 标记在 16 份山蚂蝗种质中共检测到等位基因 35 个,平均 2.19 个。聚类分析表明,16 份山蚂蝗种质可分为 5 类,与形态学划分结果相似。可见,柱花草 EST-SSR 标记在山蚂蝗上具有较高的可转移性,可应用于山蚂蝗种质资源评价及亲缘关系研究。

关键词:山蚂蝗;柱花草;EST-SSR 标记;可转移性;亲缘关系分析

中图分类号:S540.32;Q943.2

文献标志码:A

文章编号:1001-0629(2016)11-2237-11*

Analysis and application of transferable EST-SSR markers from *Stylosanthes* to *Desmodium*

Luo Xiao-yan, Zhang Rui-hua, Jia Qing-lin, Wang Wen-qiang, Bai Chang-jun, Ding Xi-peng

(Institute of Tropical Crops Genetic Resources, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Danzhou 571737, China)

Abstract: To identify genetic background and relationships of *Desmodium* varieties, 92 *Stylosanthes* EST-SSR markers and 16 varieties from 8 *Desmodium* species were used to assess the transferability of *Stylosanthes* EST-SSR markers in *Desmodium* genus and analyze the genetic relationships among 8 *Desmodium* species. The results indicated that the transferability of *Stylosanthes* EST-SSR markers across 8 *Desmodium* species ranged from 63.04% to 73.91%, and 50 markers of them could produce reliable amplification in all 8 *Desmodium* species. A total of 35 alleles were generated by 16 polymorphic markers with an average of 2.19 among 16 *Desmodium* varieties. Cluster analysis showed that 16 *Desmodium* varieties can be divided into 5 clusters, which was similar to the classification based on morphology. Therefore, *Stylosanthes* EST-SSR markers showed high transferability in *Desmodium*, and it would be suitable for germplasm evaluation and genetic relationships analysis of *Desmodium*.

Key words: *Desmodium*; *Stylosanthes*; EST-SSR marker; transferability; genetic relationship analysis

Corresponding author: Ding Xi-peng E-mail: xipding@163.com;

Bai Chang-jun E-mail: baichangjun@126.com

* 收稿日期:2016-07-01 接受日期:2016-08-24

基金项目:中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(1630032013002);海南地区国家草品种区域试验和“三性”测试和现代产业体系牧草岗位科学家经费(CRASG35)

第一作者:罗小燕(1980-),女,湖北罗田人,研究实习员,硕士,主要从事热带牧草种质资源评价与选育。E-mail: luoxiaoyan@gmail.com

通信作者:丁西朋(1982-),男,河南封丘人,副研究员,博士,主要从事热带牧草遗传育种研究。E-mail: xipding@163.com

白昌军(1967-),男,甘肃民勤人,研究员,博士,主要从事热带牧草种质资源和栽培利用研究。E-mail: baichangjun@126.com

山蚂蝗属(*Desmodium*)植物为一年或多年生草本或灌木豆科植物,起源于东亚、墨西哥和巴西,是热带亚热带地区重要的植物资源^[1]。山蚂蝗具有适应强、生长迅速、生物量大、叶片蛋白含量高的特点,是极具潜力的高蛋白饲料资源,具有较好的饲用和综合利用价值^[2-3]。山蚂蝗属植物在全球约有 350 种,而在中国分布有 27 个种 5 个变种^[4],多数山蚂蝗为二倍体($2n=2x=22$)^[5]。目前,关于山蚂蝗植物系统发育研究主要以形态学分类为主,但山蚂蝗植物种类繁多,有些种和亚种间的形态特征非常相近,形态学鉴定非常困难,存在较多同种异名或同名异种的现象^[6-7]。国内外有学者利用随机扩增多态性 DNA (random amplified polymorphic DNA, RAPD)、扩增片段长度多态性(amplified fragment length polymorphism, AFLP)、扩增共有序列遗传标记(amplified consensus genetic markers, ACGM)及同工酶等分子标记对山蚂蝗种质资源进行了遗传多样性及种间亲缘关系分析,但因研究手段和材料的不同,其研究结果也存在一定差异,所以开展研究山蚂蝗属种间的亲缘关系对山蚂蝗种质资源研究与利用尤为重要^[8-11]。

简单重复序列(simple sequence repeat, SSR),又称微卫星(microsatellite),是一类由 1~6 个碱基组成的串联重复序列,基于 SSR 序列的 SSR 标记,是一种基于 DNA 长度多态性的分子标记技术^[12]。根据其来源的不同,SSR 标记可分为基因组 SSR 标记和 EST-SSR 标记两种^[13]。SSR 标记具有数量丰富、多态性高、共显性、操作简单等多个优点,是种质资源遗传多样性分析、遗传连锁图谱构建、基因定位和分子标记辅助育种的理想工具^[13-16]。但 SSR 标记的开发成本较高,在遗传背景研究较薄弱的物种中应用非常有限。分子标记的种间通用性是降低其开发成本,提高利用效率,促进遗传学基础较薄弱物种分子遗传学研究的重要途径^[17]。山蚂蝗和柱花草(*Stylosanthes* spp.)作为我国南方重要牧草资源,均为豆科蝶形花亚科的草本或灌木植物,亲缘关系较近。因此,本研究以前期开发的柱花草 EST-SSR 标记为基础^[18],通过属间通用性分析开发在山蚂蝗中可用的 SSR 标记,并对山蚂蝗种间亲缘关系进行分析,本研究将为山蚂蝗遗传学研究提供重要的分子标记工具,为其系统发育学研究提供更多分子水平上的依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

本研究所用材料为来自 8 个种的 16 份山蚂蝗材料(表 1),其中 7 份为卵叶山蚂蝗,2 份圆叶舞草,2 份绒毛山蚂蝗,异果山绿豆、异叶山蚂蝗、度尼山蚂蝗、糙伏山蚂蝗和灰色山蚂蝗各 1 份。全部材料均由中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所热带牧草研究中心提供。本研究选用的 92 对柱花草 EST-SSR 引物均由上海生工生物工程技术有限公司合成(表 2),试验中所用的 dNTPs、Taq DNA 聚合酶、 $10\times$ Buffer(含 Mg^{2+})及 Marker DL 2000 等试剂均购自北京全式金生物技术有限公司。

1.2 基因组 DNA 提取

从试验基地选择新鲜的山蚂蝗幼嫩叶片,迅速放入冰盒带回实验室,利用改良 CTAB 法进行山蚂蝗基因组 DNA 抽提^[19]。通过 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳和 NanoVue 超微量分光光度计(GE healthcare)对基因组 DNA 进行质量和浓度测定,然后将浓度统一稀释至 $100\text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$,置于一 $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.3 PCR 扩增和电泳检测

PCR 扩增体系和反应程序均参照丁西朋等^[20]所述。扩增体系为 $20\text{ }\mu\text{L}$,包括: $100\text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 的基因组 DNA $1\text{ }\mu\text{L}$, $5\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的正向和反向引物各 $1\text{ }\mu\text{L}$, $10\times$ PCR Buffer(含 Mg^{2+}) $2\text{ }\mu\text{L}$, $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 dNTPs $0.4\text{ }\mu\text{L}$, $5\text{ U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 的 Taq 聚合酶 $0.3\text{ }\mu\text{L}$,剩余体积用 ddH₂O 补足。反应程序为: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min ; $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s , $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s , $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 40 s , 38 个循环; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min , $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。PCR 扩增产物经 8% 聚丙烯酰胺凝胶电泳后,通过银染法染色,拍照记录后统计数据。

1.4 数据分析

用 Marker DL 2000 作为扩增产物分子量的参照,采用“0,1”系统对清晰的电泳条带进行统计,在同一位点处,没有条带的记为“0”,有条带的记为“1”。将统计结果汇总到 Excel 表格中建立二进制矩阵。利用 POPGENE 1.32 软件进行分析,计算每对多态性标记的遗传多样性参数,包括等位基因数(number of alleles, Na)、等位基因频率(allele frequency)、观察杂合度(observed heterozygosity, Ho)、期望杂合度(expected heterozygosity, He)和 Shannon 指数(I)^[21]。根据等位基因频率按公式(1)计算每个标记的多态性信息

含量(polymorphic information content, PIC)。

$$PIC=1-\sum_{i=1}^n P_i^2-\sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2P_i^2 P_j^2.$$

式中:*n* 表示每个位点检测到的等位基因数量,*P_i*、*P_j* 表示第*i*、*j* 个等位基因出现的频率^[22]。利用 NTSYS-pc2.1e 软件,分析材料间的遗传相似系数(genetic similarity,GS),然后利用 GS 采用非加权数据分析法(UPGMA)对供试材料进行聚类分析^[23],并通过

FreeTree 软件^[24]采用 1 000 次重抽样对聚类图进行 bootstrap 分析。

2 结果与分析

2.1 柱花草 EST-SSR 标记在山蚂蝗中的通用性

选用 92 对柱花草 EST-SSR 标记对 16 份山蚂蝗材料进行 PCR 扩增(图 1),结果表明,92 对标记中有

表 1 16 份供试山蚂蝗材料信息
Table 1 Information of 16 *Desmodium* materials in this study

编号 Code	材料名称 Material name	来源地 Origin
A1	卵叶山蚂蝗 CIAT350	国际热带农业中心
	<i>D. ovalifolium</i> CIAT350	International Center for Tropical Agriculture
A2	卵叶山蚂蝗 CIAT13111	国际热带农业中心
	<i>D. ovalifolium</i> CIAT13111	International Center for Tropical Agriculture
A3	卵叶山蚂蝗 CIAT13117	国际热带农业中心
	<i>D. ovalifolium</i> CIAT13117	International Center for Tropical Agriculture
A4	卵叶山蚂蝗 CIAT13289	国际热带农业中心
	<i>D. ovalifolium</i> CIAT13289	International Center for Tropical Agriculture
A5	卵叶山蚂蝗 CIAT13647	国际热带农业中心
	<i>D. ovalifolium</i> CIAT13647	International Center for Tropical Agriculture
A6	卵叶山蚂蝗 CIAT13082	国际热带农业中心
	<i>D. ovalifolium</i> CIAT13082	International Center for Tropical Agriculture
A7	卵叶山蚂蝗 CIAT3666	国际热带农业中心
	<i>D. ovalifolium</i> CIAT3666	International Center for Tropical Agriculture
B8	糙伏山蚂蝗 TF00927	国际热带农业中心
	<i>D. strigillosum</i> TF00927	International Center for Tropical Agriculture
C9	圆叶舞草 050225274	中国热带农业科学院
	<i>D. gyroides</i> 050225274	Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences
D10	异叶山蚂蝗 CIAT13651	国际热带农业中心
	<i>D. heterophyllum</i> CIAT13651	International Center for Tropical Agriculture
E11	绒毛山蚂蝗 TF00969	澳大利亚国际热带农业研究中心
	<i>D. velutinum</i> TF00969	Australian Centre for International Agricultural Research
F12	度尼山蚂蝗 CIAT46362	国际热带农业中心
	<i>D. rensonii</i> CIAT46362	International Center for Tropical Agriculture
C13	圆叶舞草 CIAT3001	国际热带农业中心
	<i>D. gyroides</i> CIAT3001	International Center for Tropical Agriculture
G14	异果山绿豆 CIAT3787	国际热带农业中心
	<i>D. heterocarpon</i> CIAT3787	International Center for Tropical Agriculture
H15	灰色山蚂蝗 CPI46561	国际热带农业中心
	<i>D. incanum</i> CPI46561	International Center for Tropical Agriculture
E16	绒毛山蚂蝗 CIAT13218	国际热带农业中心
	<i>D. velutinum</i> CIAT13218	International Center for Tropical Agriculture

表 2 92 对柱花草 EST-SSR 标记信息

Table 2 Information of 92 EST-SSR markers from *Stylosanthes*

标记 Marker	重复单元 Repeat unit	正向引物(5'-3') Forward primer (5'-3')	反向引物(5'-3') Reverse primer (5'-3')	预期大小 Expected size/bp
RM1	(TCA) ₆	TGATGGCAACACAGGAAGAA	CGCGAAAGAATGCACTAACA	110
RM3	(ATT) ₆	GAGGCATTAGACGTGGTGGT	GGGGAACCGTTCTTCTTACC	273
RM5	(CCCGGA) ₄	CGGGTCATCCAGAACCTTTA	GCTGGTGGATCCTCTTGGA	220
RM7	(ATT) ₆	CCATCCTCAAAATCTCCAA	CAATGGGTTTCAGCTGCTTTT	268
RM10	(AAC) ₆	GGGATCGTGTTCCTACTGGT	TGGTCGTTGATTCCTTCCTC	155
RM14	(ATT) ₆	CCGGAACCTTTAGCAACAACAA	CAACTCAAAGCACAAAGCCAA	241
RM17	(ATC) ₆	TTGATGAGAAGAGGCAGAGGA	CCAACTTGCGTTGCTTTGAT	243
RM18	(ATTAAC) ₄	CCTAATGGATGGCTACGGAA	GAGAGCAGAATATTGGGGCA	226
RM19	(GCA) ₆	AGATGGAGCTGCTGGGTCTA	ACAGGAGAGAAGGGTCAGCA	171
RM22	(GCA) ₆	CTTGCAGCTTTGCACTGAAG	CCACTCCTCCCTATGCTTGA	276
RM23	(CAC) ₆	GAACAGCCAGATCAGCACAA	CAGAGAGTTCCAAGGGTCCA	259
RM25	(GAT) ₆	ACCCCTTGTTGTTTCATCAGC	TCATCACTGAACAAGGCACC	188
RM37	(GGC) ₆	GGAAGCTGCTCGATTACGAC	CCTTCATTCCCCTCTCCAAT	272
RM40	(AAG) ₇	AGCATCAACCACCACAACAA	CTGATGAAAGGCTCTGCTCC	153
RM41	(CAT) ₆	GCGAAGCTTCAAGAAGAGCA	TGGCTTCGAGATGCTGTATG	169
RM43	(TCCTTA) ₄	TGCGCCCATCTTATATCCTC	GCAAAAGGAGCTTGTTCAAG	180
RM47	(ATG) ₆	GTTATGGGGCTTTTGGGATT	CATGCAATCCCCATCTCTCT	187
RM48	(CTC) ₆	AAGTGCCAACTCATCACAA	GTGATTCGACCAAACGAACC	229
RM52	(AAC) ₆	TTGTATGGAACTCGGAGCC	CGGGAACGAGTGGTGACTAT	225
RM54	(CAT) ₆	GGACACTGGCATTCACCTCT	CTTGTACAGACTCCGAGCCC	179
RM55	(TCA) ₆	TTCTCTCTGGTGCTGGAGT	TGATCATGTGCTTCCAGAGC	100
RM56	(AAT) ₆	ATCCCAGCAACGATTTCAAG	TCTTCTTCACTGCTGCTGCT	163
RM60	(TCA) ₆	TCAAAAACAGGAGGAGGTGG	AATCCATGATCCCACCAATG	167
RM61	(ATG) ₆	GGAAATCCTTCAAGCACCAA	GATTACTGGGCCGCTTATGA	143
RM63	(ATC) ₇	GCGATACGAGGCTACCCTACA	TGCTCAACTCCCTTCCTAAATG	160
RM65	(GAT) ₆	CAACCATATGCGAGGTTGTG	GTCCCCAACCTTGTTGCTAA	202
RM71	(TGA) ₇	CCTCCAACCTCAAGAGCAAC	GTTTCTTGAGCGACGCTTTC	229
RM77	(TTA) ₆	CAAGCTTTGGCTGAGCTTCT	CTCCCCTGTCATTTCTTCCA	238
RM86	(CCA) ₆	TTCACCAACAAAAGGTGCAG	GCTCTTTGTTTCCAAGGCTG	136
RM87	(AGG) ₆	AGTTCCAACACAGGTGGAG	AACCACTGCGGTATGAGTCC	203
RM92	(CAT) ₆	AAGCACTTCTAAGCCCCCTC	GGTGGTCAACAACAGAGGAAA	254
RM105	(CAA) ₆	CCCGTTTTTGATAAAAAACCA	CCGCTAATTGGAAAGGTGAA	248
RM107	(CAA) ₆	CTTGCAGCTTCACCACCATA	TCCAAATCAAGCCATGATGA	213
RM110	(CAT) ₇	CCAAAGGCTCCCATATCAA	TGCAAACACAGCACAAAGTCA	135
RM113	(CAT) ₆	TCCCCATCAATGCTGTTGTA	TAGCTTTGTTGCCGATTCT	262
RM116	(TCT) ₆	CCATTGTTCCCACACACAAA	CACTCCCTTGTAAGGACCCA	140
RM118	(GGTTCC) ₄	CAATGGTTTCCGCTGGTAGT	GGAGCAAAGTGCTGAAAAGG	152
RM128	(TGG) ₇	AATGGAACTGGGTTC AACG	TGGACTGTGCTCACTCCTTG	151
RM129	(TGGCTC) ₄	GTCATCCGAGCACTTCGATT	CAGACCACCAAAGTCAAGCA	148
RM130	(GAA) ₆	GTTAGGGCTCGCAATAGCAC	TCGTCTCTTCTCCCTCAAC	224
RM134	(AAG) ₆	GTATCAGGAGAGACGAGGCG	CTGAGGAGGAGCGGTAGTTG	248
RM138	(TTG) ₆	CGAGTGCTTGGAAGAAGGG	AGAGGAAGCGATCAAAACGA	261
RM139	(ATC) ₇	TGTCGAATCCCTTTGTAGCC	CTACTGCTGACGGTGTTCCA	202
RM145	(ATC) ₆	ATGCCAATCATCTTCCCCAA	AATGCGAGTGAGGATTCGTT	117
RM149	(GATTTT) ₄	ATTTAATCGCCCCAATTC	GTGGCTAAAGATTCCAGCGA	133

续表 2

标记 Marker	重复单元 Repeat unit	正向引物(5'-3') Forward primer (5'-3')	反向引物(5'-3') Reverse primer (5'-3')	预期大小 Expected size/bp
RM162	(TGA) ₆	GGATGAATTGGAATCCCTTG	CAATCCTTGCCACCTCTCTC	279
RM169	(GCC) ₆	TCGACGGAACAATATCCTCC	AGCGCTGAAAACCTTAACGA	163
RM185	(ACA) ₆	CGATCACCACAACCAACAAC	CATCCAAGAAAGTGGGGTGT	157
RM200	(TCA) ₇	GAGGAGGTCTGTTTGACCCA	TGAGCAGAAGAAGCATTCCA	214
RM207	(AAT) ₆	AATCGCCATTGTACAGTCA	CTAGCCACCTCCATCACCAT	119
RM215	(GGC) ₆	GGTTCAGAGCTCAAACCTGC	CTTCTTCCGGTGATGGTGTT	236
RM226	(AAC) ₆	AAGAAGCATGGATTACCCCC	GCTGTGTGTTCTCCCTTTCC	193
RM243	(GGGATT) ₄	AGAGGGAGGGGCTGAAATTA	ATCTCCCCAAATCAAAACCC	192
RM256	(TTG) ₇	TCTATCTCCATGCACGCAAC	CCACCATGAAATATCGGACA	231
RM265	(TGC) ₆	GCTCTGTTGATCAAACCTCCA	TCACCGTTTTCACCACAGA	148
RM279	(CAC) ₆	GACCCGAGTACTGAACCCAA	GCGACATTGAGCACCTATT	245
RM301	(GCT) ₆	TTGCTACAATGCATCGCTTC	GCTGAGGAGGATCAAAGTGC	177
RM302	(GTT) ₆	GGAGGCTGATGACACGTTTT	CTTCTTACCAAGCACTCGGC	131
RM315	(GGA) ₆	TCGCCCTTGTAAATAACCGTC	TAATCAGGACACCCTCCAGC	159
RM338	(TTC) ₆	GCAGCACTGCATTTCCAATA	ATTGGGAAGGAGACAAGGGT	186
RM354	(TGA) ₆	CACATGGTGAGGAACACTGG	TTCTCTGAACTTTTCCACAAAA	258
RM355	(GTG) ₆	CGGCAGAGAACAGTTAGCCT	AGCAGTGGACAAATGCTGTG	199
RM362	(GCT) ₆	CGGAGAACTTGCTTACGGAG	TTAGATCACGCCCCAAGCTCT	251
RM366	(TTGGAG) ₄	GGAGTTGCAAAGCCAACACT	CCACGTTGTGAGAAGCACAG	195
RM369	(ACACCC) ₄	TCGAAAGGAGCTGGGAATAA	GGGAGGGTTGTGAATGTTTG	212
RM377	(TCA) ₆	TGGAGCACGTTTTGTGAAGA	GGTTTAGTGAAAGCAGAGGCA	250
RM384	(TTC) ₆	ACAGGAAGCTACATACGGCG	CATCCACATTTTGCGATTTG	198
RM388	(TGC) ₆	CCAAGTGTGTTGAGTGGA	CAGACTCATAGGCAGAGCTCAA	233
RM392	(TGCTGA) ₄	GTTTTCGCGGTCTTAACGAG	TGCTGCAGGGGATAAGATTC	254
RM402	(AGA) ₆	TCTCTTGTCAATGGTGGTGA	ACATCCAATCCCTGCAACTC	152
RM417	(AAAC) ₅	AACCAGCAACATAGCAGTATCTGT	ATGCTTGTGGGATGCCTATT	170
RM424	(TGA) ₆	AGATGTGGAGGACTGGATGG	CCTTCCCCTTGAGGAATGTA	227
RM444	(TA) ₈	CAACATCTCACACATGGGGT	TTGCTTTTCTCCATCACCAA	231
RM448	(TTC) ₆	GGTGAAAAGGTTTCATTGC	GCAAGTGAAGATTGCGTGAA	212
RM449	(ATGAT) ₄	ACATCAGCATCTCCATTCCC	TAATGCTGCCCCTTTGATCT	264
RM450	(AGAGG) ₄	GCCTTCAGGATTCAATTCCA	TTTGCCTTCTTTCGATTGGT	193
RM468	(ATTTG) ₄	AAACAAATTGAGCCCTCCCT	GGGTCCAAAACAATCCTTGA	233
RM469	(GGTT) ₅	TGGACAGTAACCTTTCAACCG	TTGGTGAGTGAGATCATTGCTT	243
RM474	(TTCATC) ₄	CAAAGCCATGTTCTTCTGAGG	GACCCAAAGCTTGGATTGAA	219
RM478	(ATTTT) ₄	GCGAGGTGATGGGTTTAGAA	AACCAATGTAGCCCAGCAG	234
RM485	(GGA) ₆	GTATCTTTGGCAGGCTTTGC	AGGATCGTCCAGCTGAGAAA	263
RM486	(AG) ₈	GGGAAAGGAATCTTCTTGC	CGTGGCATCCTCTTCTGTTT	210
RM491	(AAC) ₆	CATGCATGGGACAGATCAAG	GTCCACTCGGAATTTCTTC	276
RM496	(GT) ₈	GGGATTTGACTATAGGAGGCA	TTCTCCCTTCACCTCAGAA	181
RM498	(TC) ₈	TCCTCTCTCAGGAAATCCA	CATCATTTGTGGTTCTGGTGG	248
RM500	(TTAA) ₅	TCTTGAAATTATGCCCTGCC	TCTGCTCTATTTGTGAATCCCAT	242
RM507	(GGT) ₆	TCAATTGAGGTTACAGGCA	GCAGAGCAGTCAATCAGCAG	241
RM511	(CCT) ₆	TCCCACGGATTCCAAAAATA	TGTGGTAGTGCTTCATCGGA	184
RM517	(TTCT) ₅	CTGTTTCTAGCAAAACCGC	AATTGGCGAATGAAGTGAGG	238
RM519	(TTC) ₆	TGATGATGCTTCTGCGATTC	TACAAAGCCACCCTGACTCC	280
RM521	(GCGGGT) ₄	GAGTTGGCTGAGTTTGAGGC	GCCTTTCACAACTTCCAACC	207
RM522	(TAG) ₇	TTCAAGGAAAACCCATCTGC	AGCCTCATCTTGCTTTGGAA	191

70 对标记在山蚂蝗中获得了条带清晰且大小合适的条带,确定为有效引物,占总标记的 76.1%。剩余 22 对标记中有 7 对有多条带(RM40、RM118、RM215、RM377、RM449、RM478 和 RM491)、15 对无扩增产物。

不同柱花草 EST-SSR 标记在山蚂蝗属中的可转移率有所差异。在 70 对有效引物中,有 20 对在至少 1 种山蚂蝗中无扩增产物(表 3),在山蚂蝗属中可转移

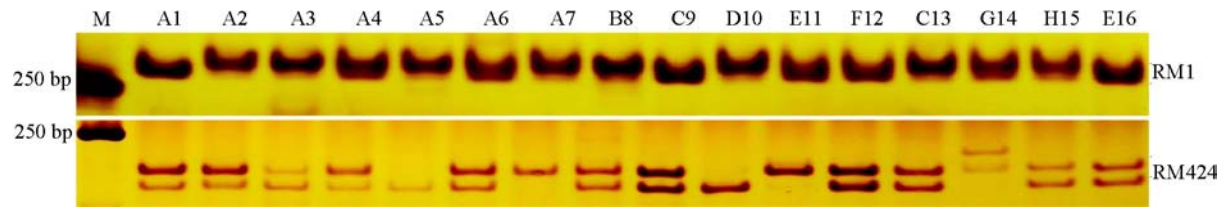


图 1 部分 EST-SSR 标记聚丙烯酰胺凝胶电泳结果

Fig.1 Polyacrylamide gel electrophoresis of partially SSR markers

表 3 20 对柱花草 EST-SSR 标记在 8 种山蚂蝗间的可转移性

Table 3 Transferability of 20 EST-SSR markers from <i>Stylosanthes</i> across 8 <i>Desmodium</i> species									
标记 Marker	卵叶山 蚂蝗 Do	糙伏山 蚂蝗 Ds	圆叶舞 草 Dg	异叶山 蚂蝗 Dh	绒毛山 蚂蝗 Dv	度尼山 蚂蝗 Dr	异果山 绿豆 Dh	灰色山 蚂蝗 Di	可转移率(标记) Transferability (marker)/%
RM354	+	+	+	—	+	—	+	+	75.0
RM18	+	+	+	+	+	—	+	—	75.0
RM17	+	+	—	—	+	—	—	+	50.0
RM25	—	+	+	+	+	+	+	+	87.5
RM169	+	+	+	—	—	—	—	—	37.5
RM392	+	+	+	—	+	—	+	+	75.0
RM129	+	+	+	+	+	—	—	+	75.0
RM500	—	+	—	+	—	+	—	+	50.0
RM507	+	+	—	—	+	—	+	+	62.5
RM134	+	—	—	+	+	+	—	+	62.5
RM116	+	—	+	+	+	+	+	—	75.0
RM302	+	+	+	+	+	—	+	+	87.5
RM355	+	—	—	+	+	—	+	+	62.5
RM61	+	+	—	—	+	—	+	+	62.5
RM511	+	—	+	+	+	—	+	—	62.5
RM522	+	—	—	+	+	—	—	+	50.0
RM71	+	+	+	—	+	+	+	—	75.0
RM128	+	+	+	+	+	+	—	—	75.0
RM369	+	+	—	+	+	+	+	+	87.5
RM315	+	—	+	+	+	+	—	+	75.0
总标记数 * Total marker	68	64	62	63	68	58	62	64	
可转移率(种) Transferability(species)/%	73.91	69.57	67.39	68.48	73.91	63.04	67.39	69.57	

注：* 总标记数包括另外 50 对标记。Do,卵叶山蚂蝗;Ds,糙伏山蚂蝗;Dg,圆叶舞草;Dh,异叶山蚂蝗;Dv,绒毛山蚂蝗;Dr,度尼山蚂蝗;Dh,异果山绿豆 D;Di,灰色山蚂蝗。表 5 同。

Note: * Total marker contains other 50 markers. Do, *D. ovalifolium*; Ds, *D. strigillosum*; Gg, *D. gyroides*; Dh, *D. heterophyllum*; Dv, *D. velutinum*; Dr, *D. rensonii*; Dh, *D. heterocarpon*; Di, *D. incanum*. The same as Table 5.

率为 37.5%~87.5%。其余 50 对标记(占总标记的 54.35%)在 8 种山蚂蝗中均可检测到,表明柱花草 EST-SSR 标记在山蚂蝗属中具有较高的通用性。而 92 对柱花草 EST-SSR 标记在不同种山蚂蝗间的可转移性同样存在明显差异,在 8 种山蚂蝗中的可转移率为 63.04%~73.91%。由此可知,不同种山蚂蝗的遗传背景存在显著差别,因而检测到柱花草 EST-SSR 标记的数量也不同,这表明筛选出的可转移性柱花草 EST-SSR 标记可以对不同种山蚂蝗进行有效区分。

2.2 EST-SSR 标记多态性分析

在 70 对有效标记中共检测到 16 对标记在 16 份山蚂蝗材料间具有多态性(表 4)。16 对多态性 SSR 标记在 16 份山蚂蝗材料中共检测到等位基因 35 个,平均每个标记 2.188 个。各多态性标记的观察杂合度(Ho)和期望杂合度(He)分别为 0.000~0.813 和 0.254~0.647,平均值分别为 0.464 和 0.464。各多态性标记的 PIC 值为 0.215~0.551,平均值为 0.360,其中 RM243 的 PIC 值最高。各多态性的 Shannon 指数变化范围在 0.410~1.036,平均值为 0.672,同样在 RM243 中存在最大值,表明标记 RM243 具有较高的多态性。

2.3 山蚂蝗种质的遗传多样性与聚类分析

利用 NTSYS-pc 2.10e 软件对山蚂蝗种质进行遗传相似系数分析表明,16 份山蚂蝗种质间的遗传相似系数为 0.523~0.952,平均 0.711。其中绒毛山蚂蝗 E11 与 E16 之间遗传相似性系数最大,卵叶山蚂蝗 A6 和异叶山蚂蝗 D10 之间遗传相似性系数最小。对每份山蚂蝗材料与其它材料之间的平均遗传相似系数分析发现,度尼山蚂蝗 F12 与其它材料的平均遗传相似系数最小,为 0.621,说明度尼山蚂蝗 F12 与其它 7 种山蚂蝗材料的亲缘关系较远。基于 EST-SSR 标记数据的 UPGMA 聚类分析表明,在相似系数为 0.730 时,可将 16 份山蚂蝗属材料明显划分为五大类(图 2):A 类包含 7 份卵叶山蚂蝗和 2 份圆叶舞草;B 类包含 1 份糙伏山蚂蝗和 1 份灰色山蚂蝗;C 类由 2 份绒毛山蚂蝗材料组成;D 类包括 1 份异果山绿豆和 1 份异叶山蚂蝗;E 类只含有 1 份度尼山蚂蝗。

2.4 山蚂蝗不同物种间的亲缘关系分析

利用 EST-SSR 数据矩阵对这 8 种山蚂蝗进行相似系数和遗传距离分析发现(表 5),8 种山蚂蝗间的遗传相似系数为 0.524~0.791,其中卵叶山蚂蝗和圆叶舞草间的相似系数最大,度尼山蚂蝗与异果山绿豆间的相似系数最小。在 8 种山蚂蝗中,度尼山蚂蝗与其

表 4 16 对多态性 EST-SSR 标记遗传参数
Table 4 Parameters for 16 polymorphic EST-SSR makers

标记 Marker	等位基因数 Na	观察杂合度 Ho	期望杂合度 He	Shannon 指数 I	多态性信息含量 PIC
RM1	2.000	0.000	0.508	0.685	0.371
RM55	2.000	0.000	0.254	0.410	0.215
RM3	2.000	0.563	0.417	0.594	0.323
RM138	3.000	0.438	0.458	0.787	0.401
RM43	2.000	0.500	0.484	0.662	0.359
RM54	2.000	0.813	0.514	0.691	0.374
RM60	2.000	0.125	0.444	0.621	0.337
RM105	2.000	0.563	0.417	0.594	0.323
RM107	2.000	0.357	0.304	0.469	0.250
RM200	2.000	0.500	0.387	0.562	0.305
RM243	3.000	0.688	0.647	1.036	0.551
RM424	2.000	0.750	0.516	0.693	0.375
RM474	2.000	0.688	0.514	0.691	0.374
RM22	2.000	0.000	0.444	0.621	0.337
RM139	2.000	0.688	0.514	0.691	0.374
RM384	3.000	0.750	0.599	0.939	0.489
平均 Mean	2.188	0.464	0.464	0.672	0.360

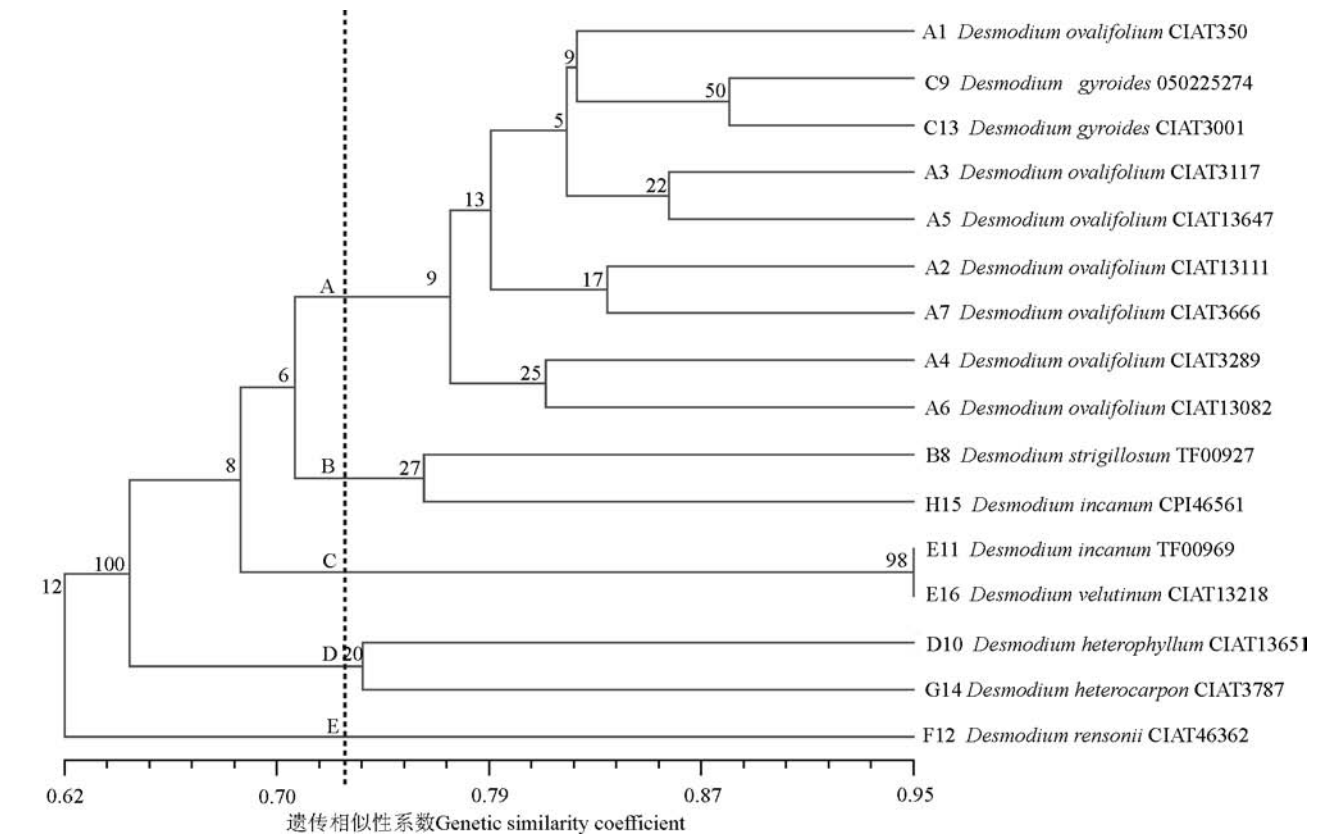


图 2 基于 EST-SSR 标记的 16 份山蚂蝗种质的 UPGMA 树状图

Fig.2 Dendrogram of 16 *Desmodium* germplasm based on EST-SSR analysis

表 5 不同山蚂蝗种间的遗传距离(斜对线上方)和相似系数(斜对线下方)

Table 5 Genetic distance (below diagonal) and genetic similarity (above diagonal) matrixes between different <i>Desmodium</i> species								
山蚂蝗种	卵叶山	糙伏山	圆叶舞	异叶山	绒毛山	度尼山	异果山	灰色山
<i>Desmodium</i> species	蚂蝗 Do	蚂蝗 Ds	草 Dg	蚂蝗 Dh	蚂蝗 Dv	蚂蝗 Dr	绿豆 Dh	蚂蝗 Di
卵叶山蚂蝗 Do		0.269	0.209	0.374	0.299	0.367	0.293	0.303
糙伏山蚂蝗 Ds	0.731		0.346	0.333	0.333	0.405	0.357	0.238
圆叶舞草 Dg	0.791	0.654		0.417	0.321	0.321	0.345	0.250
异叶山蚂蝗 Dh	0.626	0.667	0.583		0.429	0.452	0.262	0.333
绒毛山蚂蝗 Dv	0.701	0.667	0.679	0.571		0.358	0.405	0.333
度尼山蚂蝗 Dr	0.633	0.595	0.679	0.548	0.642		0.476	0.405
异果山绿豆 Dh	0.707	0.643	0.655	0.738	0.595	0.524		0.262
灰色山蚂蝗 Di	0.697	0.762	0.750	0.667	0.667	0.595	0.738	

它种的相似系数均值最低,为 0.619,说明度尼山蚂蝗与其它种的亲缘关系较远,与聚类分析结果吻合。遗传距离分析结果与相似系数分析结果相反,卵叶山蚂蝗和圆叶舞草间的遗传距离最小为 0.209,度尼山蚂蝗与异果山绿豆间的遗传距离最大,为 0.476。

3 讨论与结论

3.1 讨论

分子标记是作物遗传学研究和分子育种的重要工

具,相对于其它基于 PCR 的分子标记,SSR 标记因具有数量丰富、多态性高、共显性、操作简单、重复性好等优点而被广泛应用于水稻(*Oryza sativa*)、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)等模式植物和玉米(*Zea may*)、油菜(*Brassica napus*)、小麦(*Triticum aestivum*)等大田作物的遗传学研究和分子育种^[12,25]。但对于遗传学基础薄弱的植物来说,SSR 标记的开发成本较高。然而研究^[26-27]表明 SSR 标记在近缘物种乃至远缘物种基因组间的具有一定的通用性,因此,对遗

传学基础较弱的物种,物种间转移法已成为一种廉价、快捷获得 SSR 标记的有效途径。对 1 205 对绿豆 (*Vigna radiata*) SSR 标记进行筛选,获得了 603 (50.0%)、883 (73.3%) 和 983 (81.6%) 对分别在豇豆 (*V. unguiculata*)、小豆 (*V. angularis*) 和饭豆 (*V. umbellata*) 中有效的 SSR 标记^[17]。水稻和甘蔗 (*Saccharum officinarum*) SSR 标记在竹子 (*Bambusa* spp.) 中的通用性比率分别为 44.9% 和 75%^[28];对 382 对玉米 SSR 标记和 100 对甘蔗 EST-SSR 标记在禾本科芒属上的通用性研究^[29]表明,其可转移率分别为 10.29% 和 13.00%。山蚂蝗是热带亚热带地区重要的豆科牧草,当前山蚂蝗 SSR 标记的缺失严重限制了其遗传学研究及分子育种进展。本研究分析了 92 对柱花草 EST-SSR 标记在山蚂蝗属中的通用性,发现柱花草 EST-SSR 标记在山蚂蝗中的可转移率为 77.78%,明显高于苜蓿 EST-SSR 标记在山蚂蝗属中的可转移率(54.17%),说明柱花草与山蚂蝗的亲缘关系更近,柱花草 EST-SSR 标记在山蚂蝗中具有较好的通用性^[9]。本研究使用 16 对多态性 EST-SSR 标记对山蚂蝗遗传多样性进行分析,发现 16 对 EST-SSR 标记可以对 16 份山蚂蝗种质进行有效区分,说明本研究利用物种间转移法获得的在山蚂蝗有效的柱花草 EST-SSR 标记可作为山蚂蝗遗传学研究的有效工具,为山蚂蝗的遗传多样性分析、基因发掘和鉴定、分子标记辅助育种等研究工作提供基础。

植物种质资源是新品种选育、提高农业生产力的基础资源^[30],而遗传多样性和亲缘关系的系统研究不仅与资源的收集、保存和更新密切相关,也是种质资源创新和利用的基础^[31]。传统的山蚂蝗遗传多样性研究主要以植物形态特征为依据,如范小勇等^[6]利用 10 个形态指标对 23 份山蚂蝗种质资源进行聚类分析,最终将其分为 4 类,而刘苗苗等^[7]通过对山蚂蝗的 16 个植物学性状进行统计将 37 份山蚂蝗种质资源分为 6 类。由于山蚂蝗属植物种类繁多、植物学特征复杂多

变,有些种和亚种间的形态特征非常相近,基于传统的形态学特征分类方法很难对这些种进行区分鉴定,因此花粉的显微结构分析和分子标记技术被用于山蚂蝗遗传多样性和亲缘关系分析。对重庆地区 6 种山蚂蝗的花粉显微结构的观察比较发现,圆菱叶山蚂蝗、宽卵叶山蚂蝗和尖叶山蚂蝗的花粉表面纹饰相似,应归为同一亚属^[32]。利用 AFLP 标记对来自 7 个种的 46 份山蚂蝗种质进行遗传多样性及亲缘关系分析,最终将 46 份山蚂蝗种质分为 6 类^[33]。利用 ACGM 和 EST-SSR 两种分子标记对云贵高原的 9 个种 46 份野生山蚂蝗种质遗传多样性研究表明,野生山蚂蝗种质间存在较高的遗传多样性^[9]。但这些关于山蚂蝗遗传多样性的研究选取的材料差较大,所以各研究结果存在一定的差异,但都与《中国植物志》^[34]中传统分类不完全一致。

本研究利用柱花草 EST-SSR 对来自 8 个种的 16 份山蚂蝗材料进行了遗传多样性与亲缘关系分析,发现 16 份山蚂蝗种质间的相似系数为 0.523~0.952,平均 0.711,说明山蚂蝗种质的遗传多样性较为丰富。根据聚类分析在相似系数为 0.730 时将 16 份分为 5 类,结果与形态学分类基本一致,但也有类外,如 A 类中包含圆叶舞草、卵叶山蚂蝗,该结果与刘苗苗等^[7]、贺欣等^[9]和王春梅^[32]较为相近,但与《中国植物志》^[34]分类不一致。所以,要确定山蚂蝗种质之间的亲缘关系,不仅要使用合适的分子标记,还要结合各种质表型的形态多样性和生理生化多样性研究进行综合分析。

3.2 结论

综上所述,柱花草 EST-SSR 标记在山蚂蝗上具有较高的可转移性,在 8 种山蚂蝗种的可转移率为 63.04%~73.91%;利用柱花草 EST-SSR 标记能够有效地对 8 种山蚂蝗进行遗传多样性及亲缘关系分析;本研所得通用性 SSR 标记将成为山蚂蝗种质资源评价及亲缘关系研究的有力工具。

参考文献 References:

- [1] 陈艳琴,周汉林,刘国道.山蚂蝗饲料资源研究进展.草业科学,2010,27(10):173-178.
Chen Y Q, Zhou H L, Liu G D. Review on *Desmodium* as feed resources. Pratacultural Science, 2010, 27(10): 173-178. (in Chinese)
- [2] 李茂,陈艳琴,字学娟,周汉林.山蚂蝗属植物饲用价值评价.中国草地学报,2013,35(6):53-57.
Li M, Chen Y Q, Zi X J, Zhou H L. Feeding values assessment of species of *Desmodium*. Chinese Journal of Grassland, 2013, 35(6): 53-57. (in Chinese)

- [3] 刘苗苗,尹小畅,严琳琳,张瑜,廖丽,白昌军,王志勇.山蚂蝗属(*Desmodium* Desv.)营养期营养成分分析.热带作物学报,2015,36(1):125-131.
Liu M M, Yin X C, Yan L L, Zhang Y, Liao L, Bai C J, Wang Z Y. Analysis of nutrient components at vegetative stage on *Desmodium* Desv. Chinese Journal of Tropical Crops, 2015, 36(1): 125-131. (in Chinese)
- [4] 高成芝,邹琦丽.广西广义山蚂蝗属部分种类的核型及染色体数目报道.广西植物,1995,15(2):166-171.
Gao C Z, Zou Q L. A report on the karyotypes and chromosome numbers of some taxa of *Desmodium* (Sensu Lat.) from Guangxi, Guizhou, 1995, 15(2): 166-171. (in Chinese)
- [5] 刘国道,罗丽娟,白昌军,王东劲,郑学勤.海南豆科饲用植物资源及营养价值评价.草地学报,2006,14(3):254-256.
Liu G D, Luo L J, Bai C J, Wang D J, Zheng X Q. A survey of Hainan island forage legume resources and assessment of their nutritional values. Acta Agrestia Sinica, 2006, 14(3): 254-256. (in Chinese)
- [6] 范小勇,刘国道,虞道耿.山蚂蝗属植物外部形态变异及形态类型研究.安徽农业科学,2010,38(19):10051-10053.
Fan X Y, Liu G D, Yu D G. Exterior morphological variation of *Desmodium* Desv. and research on its morphological type. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2010, 38(19): 10051-10053. (in Chinese)
- [7] 刘苗苗,严琳琳,张瑜,廖丽,白昌军,王志勇.山蚂蝗属(*Desmodium* Desv.)种质资源形态多样性研究.热带作物学报,2014,35(10):1897-1904.
Liu M M, Yan L L, Zhang Y, Liao L, Bai C J, Wang Z Y. Morphological diversity of *Desmodium* Desv. Chinese Journal of Tropical Crops, 2014, 35(10): 1897-1904. (in Chinese)
- [8] Bedolla-Garcia B Y, Lara-Cabrera S I. An assessment of genetic diversity in *Desmodium sumichrasti* (Fabaceae) of central Mexico. Canadian Journal of Botany, 2006, 84(5): 876-882.
- [9] 贺欣,刘国道,刘迪秋,罗富成,黄必志.利用 ACGM 和 EST-SSR 标记对云贵高原野生山蚂蝗属种质的遗传多样性分析.草业科学,2008,17(6):102-111.
He X, Liu G D, Liu D Q, Luo F C, Huang B Z. Analysis of the genetic diversity of *Desmodium* genus using transferred ACGM and EST-SSR markers. Pratacultural Science, 2008, 17(6): 102-111. (in Chinese)
- [10] Heider B, Fischer E, Berndt T, Schultze-Kraft R. Genetic relationships among accessions of four species of *Desmodium* and allied genera (*Dendrolobium triangulare*, *Desmodium gangeticum*, *Desmodium heterocarpon* and *Tadehagi triquetrum*). Tropical Conservation Science, 2009, 2(1): 52-69.
- [11] Yue M F, Zhou R C, Huang Y L, Xin G R, Shi S H, Feng L. Genetic diversity and geographical differentiation of *Desmodium triflorum* (L.) DC. in south China revealed by AFLP markers. Journal of Plant Biology, 2010, 53: 165-171.
- [12] Kalia R K, Mai M K, Kalia S, Dhawan A. Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. Euphytica, 2011, 177(3): 309-334.
- [13] Zane L, Bargelloni L, Patarnello T. Strategies for microsatellite isolation; A review. Molecular Ecology, 2002, 11(1): 1-16.
- [14] Tan C, Wu Y, Taliaferro C M, Samuels T. Development of simple sequence repeat markers for bermudagrass from its expressed sequence tag sequences and preexisting sorghum SSR markers. Molecular Breeding, 2010, 29(1): 23-30.
- [15] 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 among 42 alfalfa accessions revealed by SSR markers. Pratacultural Science, 2015, 32(3): 372-381. (in Chinese)
- [16] 谢文刚,刘文献,张建全,王彦荣.牧草分子遗传连锁图谱及应用.草业科学,2014,31(6):1147-1159.
Xie W G, Liu W X, Zhang J Q, Wang Y R. Molecular genetic linkage map and its application in forage crops. Pratacultural Sciences, 2014, 31(6): 1147-1159. (in Chinese)
- [17] 钟敏,程须珍,王丽侠,王素华,王小宝.绿豆基因组 SSR 引物在豇豆属作物中的通用性.作物学报,2012,38(2):223-230.
Zhong M, Cheng X Z, Wang L X, Wang S H, Wang X B. Transferability of mungbean genomic-SSR markers in other *Vigna* species. Acta Agronomica Sinica, 2012, 38(2): 223-230. (in Chinese)
- [18] Ding X P, Jia Q L, Luo X Y, Zhang L, Cong H Q, Liu G D, Bai C J. Development and characterization of expressed sequence tag-derived simple sequence repeat markers in tropical forage legume *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw. Molecular Breeding, 2015, 35(10): 202.
- [19] 张龙,丁西朋,严玲玲,胡珊珊,白昌军.8 种柱花草属牧草 SSR-PCR 反应体系优化及引物筛选.草业科学,2014,31(2):

- 232-242.
- Zhang L, Ding X P, Yan L L, Hu S N, Bai C J. Optimization of SSR-PCR system and primers screening of eight species of *Stylosanthes*. Pratacultural Science, 2014, 31(2): 232-242. (in Chinese)
- [20] 丁西朋, 罗小燕, 贾庆麟, 白昌军. 圭亚那柱花草新 EST-SSR 标记验证及其在柱花草属上的转移. 热带作物学报, 2015, 36(10): 1759-1768.
- Ding X P, Luo X Y, Jia Q L, Bai C J. Transferability of novel EST-SSR markers in *Stylosanthes guianensis* across the species of *Stylosanthes*. Chinese Journal of Tropical Crops, 2015, 36(10): 1759-1768. (in Chinese)
- [21] Yeh F C, Yang R C, Boyle T. POPGENE, the user-friendly shareware for population genetic analysis. Edmonton, AB, Canada: Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, 1999.
- [22] Botstein D, White R L, Skolnick M, Davis R W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. The American Journal of Human Genetics, 1980, 32(3): 314-331.
- [23] Rohlf F J. NTSYS-pc Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, Version 2.10, New York: Exeter Software, 2000.
- [24] Hampl V, Pavlicek A, Flegel J. Construction and bootstrap analysis of DNA fingerprinting-based phylogenetic trees with the freeware program FreeTree: Application to trichomonad parasites. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2001, 51: 731-735.
- [25] 王瑞晶, 李培英, 张延辉. 偃麦草 EST-SSR 标记开发及应用. 草业科学, 2016, 33(8): 1526-1535.
- Wang R J, Li P Y, Zhang Y H. Development of *Elytrigia repens* EST-SSR markers and its application. Pratacultural Science, 2016, 33(8): 1526-1535. (in Chinese)
- [26] 邓绍勇, 温强, 李康琴, 叶金山, 朱培林. 大青属植物通用性 SSR 引物筛选及应用. 中草药, 2014, 45(22): 3317-3322.
- Deng S Y, Wen Q, Li K Q, Ye J S, Zhu P L. Screening and application of SSR primers in plants of *Clerodendrum* L. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2014, 63(22): 3317-3322. (in Chinese)
- [27] Lim G A, Jewell E G, Li X, Erwin T A, Love C, Batley J, Spangenberg G, Edwards D. A comparative map viewer integrating genetic maps for *Brassica* and *Brabidopsis*. BMC Plant Biology, 2007, 7: 40-45.
- [28] Sharma R K, Gupta P, Sharma V, Sood A, Mohapatra T, Ahujaa P S. Evaluation of rice and sugarcane SSR markers for phylogenetic and genetic diversity analyses in bamboo. Genome, 2008, 51(2): 91-103.
- [29] 卢玉飞, 蒋建雄, 易自力. 玉米 SSR 引物和甘蔗 EST-SSR 引物在芒属中的通用性研究. 草业学报, 2015, 21(5): 86-95.
- Lu Y F, Jiang J X, Yi Z L. Study on the transferability of maize SSR and sugarcane EST-SSR markers to *Miscanthus* (Poaceae). Acta Pratacultuae Sinica, 2015, 21(5): 86-95. (in Chinese)
- [30] 翟夏杰, 张蕴薇, 黄顶, 王堃. 中美牧草育种的现状与异同. 草业科学, 2016, 33(6): 1213-1221.
- Zhai X J, Zhang Y W, Huang D, Wang K. Status, similarities and differences on forage breeding in USA and China. Pratacultural Science, 2016, 33(6): 1213-1221. (in Chinese)
- [31] 戎郁萍, 曹喆, 赵秀芳, 赵来喜. 美国植物种质资源的收集、保存、利用与评价. 草业科学, 2007, 24(12): 22-25.
- Rong Y P, Cao Z, Zhao X F, Zhao L X. The collection, conservation, utilization and evaluation of plant germplasm USA. Pratacultural Science, 2007, 24(12): 22-25. (in Chinese)
- [32] 王春梅. 山蚂蝗属植物种质资源的 AFLP 分析. 兰州: 甘肃农业大学硕士学位论文, 2005.
- Wang C M. AFLP analysis of *Desmodium* Desv. spp. germplasm resources. Master Thesis. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2005. (in Chinese)
- [33] 张渝文, 李鑫. 重庆地区山蚂蝗属的花粉形态. 渝州大学学报, 1992(4): 30-35.
- Zhang Y W, Li X. Pollen morphology of *Desmodium* Desv. in Chongqing. Journal of Yuzhou University, 1992(4): 30-35. (in Chinese)
- [34] 中国科学院中国植物志编委会. 中国植物志. 北京: 科学出版社, 1995: 14.
- Editorial Committee of Chinese Journal of Plant of Chinese Academy of Sciences. Flora of China. Beijing: Science Press, 1995: 14. (in Chinese)

(责任编辑 王芳)