

苜蓿种质资源遗传关系的 ISSR 分析

李 红¹, 李 波², 赵洪波², 杨蔚然², 杨 翌¹

(1. 黑龙江省畜牧研究所, 黑龙江 齐齐哈尔 161000;

2. 齐齐哈尔大学生命科学与农林学院, 黑龙江 齐齐哈尔 161006)

摘要:利用 ISSR 分子标记技术研究了来自国内外的 30 份苜蓿(*Medicago L.*)材料的遗传多样性,为其遗传改良和分子标记辅助育种提供依据。结果表明:10 个 ISSR 引物共扩增出 112 条带,其中 59 条带是多态性谱带,多态性比率平均值为 74.5%,平均每个引物扩增出 11.2 条带。用 POPEGENE 32 软件分析多态性指数和有效等位基因数的平均值分别为 0.3727 和 1.4280,遗传多样性水平较高。利用扩增结果进行遗传距离分析,构建了分子树状图,可以把 30 份材料划分为 3 个类群,第 1 类包括准格尔、敖汉、肇东等 19 份种质材料;金达苜蓿单独划分为 1 类;第 3 类包括和平、德宝等 10 份种质材料。

关键词:苜蓿;种质资源;ISSR

中图分类号:S541.9;Q943

文献标识码:A

文章编号:1007-0435(2012)01-0096-06

ISSR Analysis of Alfalfa Germplasm Resources

LI Hong¹, LI Bo², ZHAO Hong-bo², YANG Wei-ran², YANG Zhao¹

(1. Farming Research Institute of Heilongjiang, Qiqihar, Heilongjiang Province 161006, China;

2. School of Life Science and Agriculture and Forestry Qiqihar University, Qiqihar, Heilongjiang Province 161006, China)

Abstract: Inter-simple sequence repeat (ISSR) techniques were used to identify the genetic diversity of 30 brome germplasms collected from China and abroad. This study provided scientific basis for genetic improvement and molecular marker-assisted breeding of alfalfa (*Medicago L.*). Results showed that a total of 112 bands were amplified by 10 ISSR primers, in which 59 bands were polymorphic. The average percentage of polymorphic bands was 74.5%. Each primer amplified 11.2 DNA bands on average. Mean values of polymorphism index and effective alleles were 0.3727 and 1.4280 by POPEGENE 32 software analysis. Based on the results of amplifying, the genetic distance was analyzed and a tree diagram was constructed using SPSS 17.0 algorithm. The 30 alfalfa germplasms were classified into 3 groups. The first group included Zhungeer, Aohan, Zhaodong and 19 other germplasm, the second group included Jinda and the third group included Heping, Debao and 10 other germplasms.

Key words: Alfalfa; Germplasm resources; ISSR

苜蓿(*Medicago L.*)是世界上最重要的豆科牧草,抗逆性强,适应范围广,能生长在多种类型的气候、土壤环境下,其茎叶中富含蛋白质、矿物质,以及多种维生素^[1]。

苜蓿遗传资源是苜蓿育种和遗传改良的基础。分子标记是以 DNA 多态性为基础的遗传标记,已经成为苜蓿遗传育种研究和种质资源评价的有力工具。1995 年傅骏骅^[2]通过 17 个引物的扩增谱带来识别不同的苜蓿品种,魏臻武^[4]于 2004 年利用分子

标记检测苜蓿品种(系)的 DNA 分子标记多态性,构建苜蓿品种的 DNA 指纹图谱,筛选出 36 个 RAPD 引物,8 个 SSR 引物和 12 个 ISSR 随机引物^[2~5]。

ISSR 为随机引物,引物长度在 20 bp 左右,采用与常规 PCR 相同的条件,其稳定性比 RAPD 好,ISSR 标记为显性标记,可以揭示整个基因组的一些特征,符合孟德尔遗传规律,具有稳定性好,多态性高,试验操作简单、快速、用时少等优点,因此该技术

收稿日期:2011-07-25;修回日期:2011-10-17

基金项目:“十二五”国家科技支撑项目(2011BAD17B01);黑龙江省重大科技攻关项目(GA09B301-1);黑龙江省科技攻关项目(GA09B109-1)资助

作者简介:李红(1960-),女,山东莱芜人,研究员,主要从事牧草与饲料作物育种与栽培研究,E-mail:hljlhong@163.com

被广泛用作研究种质资源遗传多样性及亲缘关系的有效手段^[6~9]。本研究采用 ISSR 分子标记技术对 30 份苜蓿遗传差异性进行分析比较,旨在鉴定苜蓿的遗传多样性,为苜蓿新品种培育和种质资源开发利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料共计 30 份苜蓿种质资源,其中我国地方品种 6 份,育成品种 10 份,国外种质 12 份,野生材料 1 份,未知材料 1 份。30 份苜蓿材料种植于黑龙江省畜牧研究所实验基地(表 1),采集新鲜材料的叶片置于 -80°C 冰箱里保存,用于本试验指标的测定。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取及检测 采用改良的 CTAB 法^[11]提取苜蓿叶片总 DNA,用 0.8%的琼脂糖凝胶电泳检测质量,用 Gene Spec 核酸检测仪检测 DNA 浓度,并将 DNA 浓度稀释为 $10\text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 。

1.2.2 扩增反应体系及程序 ISSR 引物序列参照加拿大哥伦比亚大学(UBC)公布的第 9 套 ISSR 引物序列,引物编号与 UBC 大学公布的相同^[11],引物由上海生工合成,共 40 条,对 30 份苜蓿材料的基因组 DNA 进行 PCR 扩增。

ISSR 扩增反应体积为 $20\text{ }\mu\text{L}$,其中包括: $10 \times$ buffer $2.0\text{ }\mu\text{L}$, Mg^{2+} ($2.0\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) $1.6\text{ }\mu\text{L}$,引物 ($0.2\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) $0.2\text{ }\mu\text{L}$, dNTP ($0.4\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) $0.8\text{ }\mu\text{L}$, DNA (稀释 20 倍) $2.5\text{ }\mu\text{L}$, Taq 酶 ($5\text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$) $0.3\text{ }\mu\text{L}$, ddH₂O $12.6\text{ }\mu\text{L}$ 。

表 1 参试苜蓿种质材料
Table 1 Germplasm of alfalfa

编号 No.	品种(系) Varieties(Strain)	拉丁名 Species name	类型 Type
1	润布勒	<i>Medicago varia</i> Martin. 'Rambler'	引进
2	标准	<i>Medicago sativa</i> L. 'Biaozhun'	地方
3	FD2	<i>Medicago sativa</i> L. 'FD2'	引进
4	草原 1 号	<i>Medicago varia</i> Martin. 'Caoyuan No. 1'	育成
5	草原 2 号	<i>Medicago varia</i> Martin. 'Caoyuan No. 2'	育成
6	草原 3 号	<i>Medicago varia</i> Martin. 'Caoyuan No. 3'	育成
7	新牧 1 号	<i>Medicago varia</i> Martin. 'Xinmu No. 1'	育成
8	新牧 2 号	<i>Medicago varia</i> Martin. 'Xinmu No. 2'	育成
9	公农 1 号	<i>Medicago sativa</i> L. 'Gongnong No. 1'	育成
10	公农 2 号	<i>Medicago sativa</i> L. 'Gongnong No. 2'	育成
11	民途	<i>Medicago sativa</i> L. 'Mintu'	地方
12	苜蓿王	<i>Medicago sativa</i> L. 'King'	引进
13	准格尔	<i>Medicago sativa</i> L. 'Neimeng Zhungeer'	地方
14	美国苜蓿	<i>Medicago sativa</i> L. 'America'	引进
15	野生黄花	<i>Medicago falcata</i> L.	野生
16	Myaril 杂花	<i>Medicago varia</i> Martin. 'Myaril'	未知
17	敖汉	<i>Medicago sativa</i> L. 'Aohan'	地方
18	肇东	<i>Medicago sativa</i> L. 'Zhaodong'	地方
19	蔚县	<i>Medicago sativa</i> L. 'Yuxian'	地方
20	阿尔冈金	<i>Medicago varia</i> Martin. 'Algonquin'	引进
21	中苜 1 号	<i>Medicago sativa</i> L. 'Zhongmu No. 1'	育成
22	WL324	<i>Medicago sativa</i> L. 'WL324'	引进
23	和平	<i>Medicago sativa</i> L. 'Heping'	引进
24	皇后	<i>Medicago sativa</i> L. 'Empress'	引进
25	特高(I)	<i>Medicago sativa</i> L. 'Ultra I'	育成
26	特高(II)	<i>Medicago sativa</i> L. 'Ultra II'	育成
27	俄罗斯苜蓿	<i>Medicago varia</i> L. 'Russia'	引进
28	德宝	<i>Medicago sativa</i> L. 'Derby'	引进
29	赛特	<i>Medicago sativa</i> L. 'Sitel'	引进
30	金达	<i>Medicago sativa</i> L. 'Jinda'	引进

PCR 扩增反应程序为: 94℃ 预变性 4 min, 94℃ 变性 1 min, 45~53℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 1 min, 40 个循环, 于 72℃ 延伸 7 min。4℃ 保存。

1.2.3 产物检测 PCR 扩增完成后, 取 15 μ L 扩增产物点样于 1.4% 的琼脂糖凝胶上, 在 0.5×TBE 缓冲液中电泳约 1.5 h, UVP 紫外凝胶成像系统中观察拍照。

1.2.4 数据分析 ISSR 扩增产物以“0”, “1”, “9”统计建立 ISSR 数据库。每个可辨带代表一个变异, 在相同迁移位置, 有带记为“1”, 无带记为“0”, 扩增失败或缺失记为“9”。用 SPSS 17.0 分析软件的 Jaccard 方法计算品种间遗传相似系数 (genetic similarity, GS), 根据 Nei-Li 相似系数法求得品种 i 和 j 之间的相似系数 $S_{ij} = 2N_{ij} / (N_i + N_j)$, 其中 N_i 表示品种 i 的条带数目, N_j 表示品种 j 的条带数目, N_{ij} 表示品种 i 和 j 共有的条带数目, 然后用 Within-group linkage 聚类分析, 建立样品间的亲缘关系

树状图; 用 POPEGENE 32 计算 ISSR 扩增产物的多态性指数 (polymorphism information content, PIC), 其中 $PIC = 1 - \sum p_i^2$, p_i 为产物条带的表型; 标记系统的有效等位基因数 (effective number of alleles, NE), 按公式 $NE = 1 / \sum p_i^2$ 来计算。

2 结果与分析

2.1 DNA 扩增结果

从 40 条引物中筛选出 22 条能扩增出条带的引物。由于 ISSR 引物的退火温度不同, 对扩增结果的影响也很大, 本研究利用润布勒、标准、FD₂、草原 1 号 4 个材料对 22 个引物进行了筛选, 退火温度从 45~53℃, 筛选出了 10 条引物, 得到每条引物的最佳退火温度 (表 2)。用筛选的 10 条引物对 30 份种质材料进行 PCR 扩增, 得到 30 份种质的 PCR 产物图 (图 1)。

表 2 苜蓿 ISSR 扩增反应的引物序列、退火温度、扩增条带数、多态性条带数

Table 2 ISSR primer, primer annealing temperature, amplified band numbers, and polymorphic band numbers

序号	引物序列	退火温度/℃	扩增条带数/条	多态性条带/条	多态性比率/%
No.	Primer sequences	Annealing temperature	No. of bands	No. of polymorphic bands	Percent of polymorphic
828	(TG)8A	49	12	9	75
829	(TG)8C	49	10	8	80
830	(TG)8G	50	18	—	—
841	(GA)8YC	52	9	7	78
844	(CT)8RC	52	10	7	70
845	(CT)8RG	51	7	5	71
852	(TC)8RA	53	15	—	—
854	(TC)8RG	53	10	8	80
859	(TG)8RC	53	9	6	67
860	(TG)8RA	55	12	9	75
总数 Total			112	59	74.5
多态性指数 (PIC)				0.3727	
有效等位基因数 (NE)				1.4280	
扩增条带分子量				250~1600 bp 之间	

注: Y=C, T; R=A, G. “—”表示因加 DNA 标准分子量而缺失的 DNA 条带

Note: Y=C, T; R=A, G. “—” missing bands compared with DNA marker

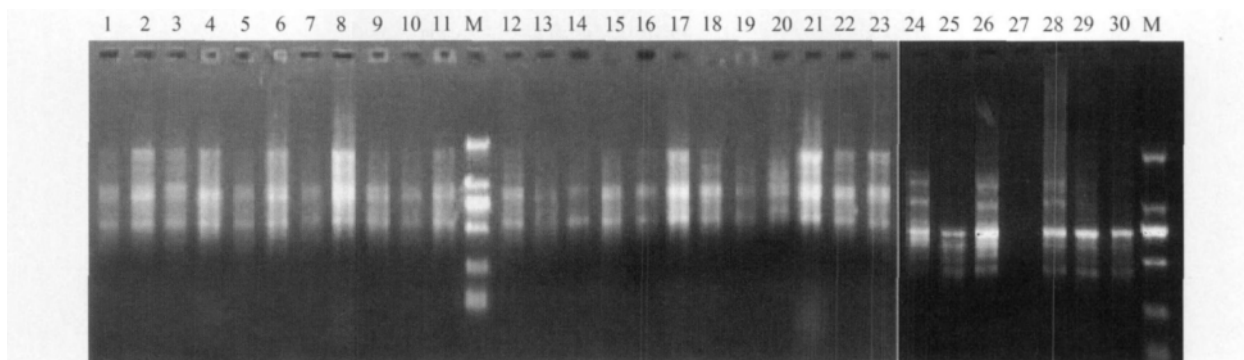


图 1 引物 828 ISSR 扩增图谱

Fig. 1 Amplification map of 828 ISSR primers

所选用的引物对各种植材料均能扩增出特异性条带,10 个 ISSR 引物共扩增出 112 条带,平均每个引物扩增出 11.2 条带,扩增片段大小全部在 250~1600 bp 之间。其中引物 828 和 860 扩增的特异性条带最多,为 9 条,多态性比率平均值为 74.5%,而 830 和 852 号引物扩增出的 DNA 片段没有多态性,用 SPSS 17.0 和 POPGENE 32 软件分析的结果如表 2 所示。由此可见,ISSR 分析能扩增出较多的条带,多态性条带率较高,更能揭示不同种质材料间的遗传多样性。多态性指数和有效等位基因数的平均值为 0.3727 和 1.4280。

表 3 苜蓿种质的 Jaccard 相似系数矩阵

Table 3 Jaccard similarity coefficient matrix of alfalfa germplasm

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	
1	1																													
2	.76	1																												
3	.78	.86	1																											
4	.78	.73	.82	1																										
5	.79	.74	.77	.80	1																									
6	.72	.77	.79	.71	.87	1																								
7	.73	.75	.71	.77	.79	.89	1																							
8	.78	.76	.69	.73	.77	.79	.86	1																						
9	.76	.79	.54	.39	.46	.77	.74	.70	1																					
10	.78	.74	.79	.63	.69	.72	.74	.77	.72	1																				
11	.58	.64	.72	.79	.69	.71	.78	.67	.71	.78	1																			
12	.79	.77	.73	.75	.89	.83	.67	.59	.70	.72	.79	1																		
13	.76	.79	.64	.59	.70	.74	.76	.75	.82	.67	.73	.77	1																	
14	.67	.72	.78	.75	.80	.81	.68	.76	.84	.77	.79	.74	.86	1																
15	.78	.72	.77	.74	.75	.83	.86	.81	.79	.73	.75	.83	.64	.89	1															
16	.75	.78	.76	.74	.79	.82	.87	.89	.73	.78	.71	.70	.70	.82	.90	1														
17	.81	.76	.79	.74	.86	.84	.79	.75	.77	.71	.83	.84	.76	.79	.74	.84	1													
18	.81	.73	.83	.74	.70	.68	.71	.83	.78	.72	.77	.86	.71	.70	.87	.70	.91	1												
19	.74	.73	.78	.75	.79	.73	.64	.68	.71	.70	.84	.85	.77	.86	.83	.70	.86	.90	1											
20	.73	.77	.74	.76	.83	.85	.76	.70	.77	.82	.86	.89	.84	.85	.76	.79	.74	.72	.93	1										
21	.73	.75	.75	.76	.83	.75	.71	.62	.68	.78	.72	.82	.84	.84	.71	.86	.85	.83	.84	.89	1									
22	.72	.78	.75	.73	.77	.79	.74	.70	.71	.77	.73	.86	.83	.87	.70	.71	.77	.73	.82	.85	.75	1								
23	.61	.45	.65	.86	.84	.78	.63	.65	.78	.37	.45	.68	.86	.77	.59	.43	.63	.85	.39	.66	.74	.78	1							
24	.70	.76	.79	.81	.82	.73	.84	.82	.70	.65	.74	.78	.87	.81	.89	.37	.48	.86	.75	.77	.73	.71	.70	1						
25	.62	.73	.65	.61	.65	.70	.77	.78	.85	.49	.50	.72	.71	.79	.76	.81	.76	.71	.72	.80	.70	.58	.85	.77	1					
26	.73	.73	.79	.60	.74	.31	.65	.72	.75	.73	.30	.50	.84	.84	.86	.85	.90	.76	.73	.89	.67	.89	.84	.71	.75	1				
27	.67	.60	.70	.67	.60	.54	.62	.64	.63	.58	.68	.67	.71	.77	.83	.77	.73	.70	.64	.77	.76	.67	.79	.83	.54	.79	1			
28	.41	.39	.51	.44	.37	.30	.38	.36	.46	.43	.41	.38	.31	.36	.43	.41	.41	.38	.45	.39	.40	.28	.39	.36	.38	.40	.39	1		
29	.40	.54	.49	.47	.53	.48	.52	.40	.57	.38	.52	.38	.42	.43	.42	.44	.47	.40	.38	.48	.43	.34	.33	.57	.50	.44	.52	.39	1	
30	.43	.36	.47	.45	.47	.46	.48	.47	.46	.41	.42	.40	.42	.42	.40	.43	.58	.44	.56	.45	.42	.43	.41	.29	.50	.32	.29	.50	.52	1

注:因页面排版,故省去了表格内容中小数点前的“0”

Note: For page layout, data in the table were eliminated “0” before decimal point

2.3 ISSR 聚类分析

根据遗传相似性系数,利用 SPSS 17.0 软件进行聚类分析,结果如图 3 所示。当取不同阈值时聚成不同类,若取 20 时,30 份苜蓿可以明显的划分为

2.2 遗传相似性系数分析

基于 ISSR 扩增所产生的 112 条扩增带,计算每 2 份苜蓿材料间的遗传相似性系数(GS),获得了 30 份苜蓿的 Jaccard 相似系数矩阵(表 3)。各材料间的遗传相似性系数在 0.28~0.93 之间,其中阿尔冈金和蔚县间的遗传相似性最大为 0.93,说明它们在品种来源上是来自同一品系。德宝和 WL324 间的相似性系数最小为 0.28,说明它们在亲缘关系上离得最远。整体来看,30 份苜蓿材料间存在着较丰富的遗传多样性,因此,在遗传育种上应选择亲缘关系远的品种杂交,充分利用基因型遗传差异,有利于基因的互补性。

3 大类,第 1 类共 19 份材料,包括润布勒、标准、FD₂、草原 1 号、草原 2 号、草原 3 号、新牧 1 号、新牧 2 号、公农 1 号、公农 2 号、民途、苜蓿王、准格尔、美国苜蓿、野生黄花、Myarile 杂花、敖汉、肇东和赛特

(这 19 份材料又可以分为 3 类, 公农 2 号、民途、苜蓿王、准格尔、美国苜蓿、野生黄花、myarile 杂花、敖汉、肇东这 9 个品种为 1 类, 说明它们的亲缘关系最近; 润布勒、FD₂、标准划为 1 类; 草原 1 号、草原 2 号、草原 3 号、新牧 1 号、新牧 2 号、公农 1 号为 1

类); 金达苜蓿单独划分为第 2 类; 第 3 类包括 10 个品种: 蔚县、阿尔冈金、中苜 1 号、WL324、和平、皇后、特高(I)、特高(II)、俄罗斯和德宝。聚类划分突出了 30 份苜蓿材料间的差异性, 由此可见, ISSR 可用于苜蓿遗传多样性和聚类分析的研究。

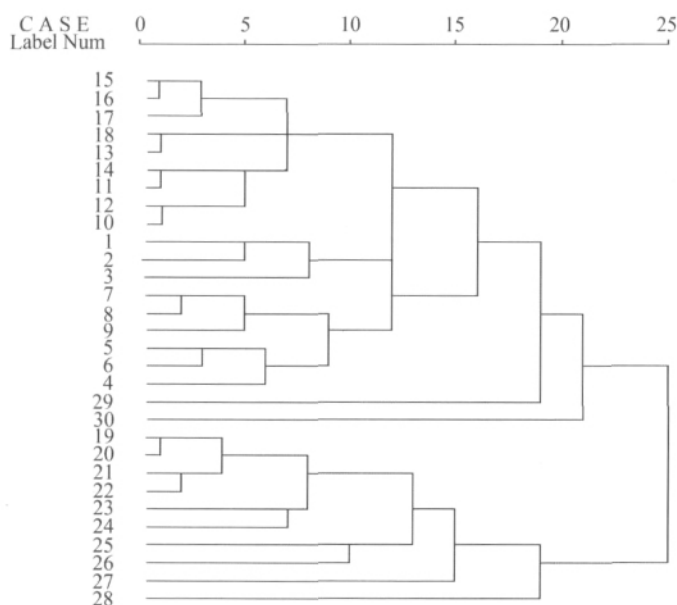


图 2 苜蓿种质资源的聚类分析树状图

Fig. 2 Dendrogram of 30 alfalfa germplasms

3 讨论

分子标记从 DNA 水平揭示品种间的差异性和相关性^[12], 本研究采用 ISSR 分子标记和聚类分析方法, 对 30 份苜蓿的遗传多样性进行了分析, 根据判定的苜蓿品种亲缘关系, 反映出我国苜蓿地方品种间的遗传关系以及国外引进品种与我国地方品种的遗传距离。聚类结果表明, 国内品种包括标准、敖汉、肇东等, 这些国内品种亲缘关系较近, 都聚为一大类, 但彼此之间又可以划分为 3 类, 说明中国地方品种之间产生了较大的差异, 我国苜蓿地方品种遗传基础广阔, 表现出较强的地域性。民途和美国苜蓿亲缘关系较近, 公农 2 号和苜蓿王亲缘关系也较近, 说明这些国内品种是从国外品种选育而来。和平、蔚县、中苜 1 号这些国内品种和其他国外品种, 如阿尔冈金、WL324、皇后、特高(I)、特高(II)、俄罗斯和德宝划分为第 3 类。在这些国外品种中, 赛特和德宝间的遗传距离最小, 是因为二者均引自荷兰, 遗传变异较小, 同样, WL324 和皇后苜蓿均引自美国, 所以其遗传距离较小, 遗传变异也较小。孙其信^[10]在研究小麦 (*Triticum aestivum*) 遗传多样性

时也得到了相似的结论, 即来自不同地区的品种(品系), 大部分可按地理来源分为一类。

植物杂种优势的产生在一定程度上取决于亲本间的遗传差异, 遗传差异大说明其亲缘关系较远, 杂交后代的杂种优势较大^[13]。从 DNA 分子水平上, 查明亲本及其杂种间的遗传差异大小, 对选配亲本杂交组合及其杂种优势利用评价有重要的理论指导价值。本研究中单独划分一类的金达苜蓿在遗传距离上和绝大多数的国内品种较接近, 而和其他国外品种遗传距离较远, 因此用它与其他国外品种杂交可能会产生较大的杂种优势。俄罗斯品种与其他品种间的遗传距离也较远, 这可能与引自俄罗斯有关。因此, 俄罗斯与其他品种之间杂交, 也可能产生较大的杂种优势。ISSR 可以较好地确定苜蓿种质资源的遗传多样性和亲缘关系, 能够为杂交育种亲本选择组配提供有价值的分子水平上的信息。

本研究采用 ISSR 标记, 揭示基因组中随机基因位点的多态性, 以便研究苜蓿各品种间的亲缘关系, 由于反应体系很小, 所以对试验精确程度的要求很高, 对各成分浓度要求十分严格^[14,15]。试验操作中, 在各模板浓度一致的前提下, 各反应成分的混合

成为关键。在初步接触 ISSR 技术时,需反复摸索反应条件和确定反应体系,但随着对该项技术的熟练掌握和对试验条件的严格控制,ISSR 技术能够获得较好的重复结果。

4 结论

4.1 本试验筛选出 10 条 ISSR 引物并对其退火温度进行了筛选,在该体系基础上找到了最适宜的退火温度。运用 10 个引物在 30 个材料间共扩增出 112 条带,其中多态性条带 59 条,多态位点百分率为 74.5%,说明绝大多数位点产生了变异。

4.2 通过聚类分析,揭示了 30 个苜蓿种质的亲缘关系,可划分为 3 大类,第 1 类包括润布勒、标准、FD₂、草原 1 号、草原 2 号、草原 3 号、新牧 1 号、新牧 2 号、公农 1 号、公农 2 号、民途、苜蓿王、准格尔、美国苜蓿、野生黄花、myarile 杂花、敖汉、肇东和赛特共 19 个;金达苜蓿单独划分为第 2 类;第 3 类包括蔚县、阿尔冈金、中苜 1 号、WL324、和平、皇后苜蓿、特高(I)、特高(II)、俄罗斯和德宝共 10 个。

参考文献

- [1] 王鑫,马永祥,李娟. 紫花苜蓿营养成分及主要生物学特征[J]. 草业科学,2003,20(10):39-40
- [2] 傅骏骅,Pauls K P. 应用 RAPD 分子标记识别苜蓿种群关系[J]. 作物杂志,1995(6):28
- [3] 李拥军. 中国苜蓿地方品种遗传多样性及亲缘关系的研究[D]. 北京:中国农业科学院,1998:1-14
- [4] 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
- [5] 王根旺. 中国苜蓿种质资源及育种前景分析[J]. 甘肃农业,2005(2):31-34
- [6] 郭江波,赵来喜. 中国苜蓿育成品种遗传多样性及亲缘关系研究[J]. 中国草地,2004,26(1):9-13
- [7] Rathaparkhe M B, Santra D K, Tullu A, *et al.* Identification of inter simple sequence repeat (ISSR) markers associated with seed size in wheat[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2001, 102:726-732
- [8] 刘振虎,卢欣石,葛军. 遗传标记在苜蓿遗传多样性研究中的应用[J]. 草业科学,2004,21(11):26
- [9] 王晓娟,孙月华,杨晓莉,等. 苜蓿遗传图谱构建及其应用[J]. 草业学报,2008,17(3):119-127
- [10] 孙其信. 利用 RAPD 标记研究小麦品种间的遗传差异[J]. 农业生物学报,1996,4(2):103-110
- [11] 马向丽,毕玉芬. 云南野生苜蓿和逸生苜蓿资源遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 中国草地学报,2010,32(6):34-38
- [12] 张雪婷,师尚礼. 陇东野生紫花苜蓿的遗传特异性分析[J]. 草地学报,2009,17(3):343-348
- [13] 周亚星,于卓,马艳红,等. 散穗高粱与苏丹草杂种的 ISSR 分析[J]. 草地学报,2009,17(6):718-722
- [14] 王瑜,袁庆华. 紫花苜蓿 ISSR-PCR 反应体系的建立与优化[J]. 草地学报,2007,15(3):212-215
- [15] 王方,袁庆华. 冰草 ISSR-PCR 反应体系的建立与优化[J]. 草地学报,2009,17(3):354-357

(责任编辑 李美娟)