

利用 SSR 标记与毛细管电泳对 甘蔗属进行的遗传分析

梁俊^{1,2,3,4}, PAN Yong-Bao⁶, 李杨瑞^{1,2,4,5*}, 方锋学^{2,3,4}

(1. 广西大学 广西亚热带生物资源保护利用重点实验室, 南宁 530004; 2. 中国农业科学院 甘蔗研究中心, 南宁 530007; 3. 农业部 甘蔗品质监督检验测试中心, 南宁 530007; 4. 国家糖料改良中心 广西甘蔗品种改良分中心, 南宁 530007; 5. 广西作物遗传改良生物技术重点开放实验室, 南宁 530007; 6. USDA-ARS, Sugarcane Research Unit, 5883 USDA Road, Houma, LA 70360, U. S. A.)

摘要: 为探讨甘蔗属内不同种之间的遗传多样性, 利用 SSR 标记与毛细管电泳技术, 对来自甘蔗属 3 个不同种的 12 个材料 19 对引物进行检测, 共检测到 229 个 DNA 多态性条带, 19 对引物扩增的 DNA 条带范围集中在 100~260 bp 之间。12 个甘蔗材料的 Jaccard 遗传相似度, 最小 0.09, 最大 0.65, 平均为 0.26。通过遗传相似性系数分析, UPGMA 聚类图内 12 个甘蔗材料可分为两个群, 三个割手密种材料分为一个亚群, 甘蔗栽培品种与甘蔗热带种合为一个亚群。结果表明: 热带种比割手密种具有和甘蔗栽培品种更亲近的遗传关系; SSR 分子标记与毛细管技术结合, 相比别的分子标记技术或电泳技术, 具有更准确、简便、自动化等优点。

关键词: 简单重复序列 (SSR); 甘蔗; 毛细管电泳

中图分类号: Q943 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2010)01-0106-06

Assessment of genetic diversity in *Saccharum* using SSR markers and capillary electrophoresis

LIANG Jun^{1,2,3,4}, PAN Yong-Bao⁶, LI Yang-Rui^{1,2,4,5*}, FANG Feng-Xue^{2,3,4}

(1. Guangxi Key Laboratory of Subtropical Bioresources Conservation and Utilization, Guangxi University, Nanning 530004, China; 2. Sugarcane Research Center, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Nanning 530007, China; 3. Sugarcane Quality Inspection and Test Center at Nanning, Ministry of Agriculture, Nanning 530004, China; 4. Guangxi Sugarcane Variety Branch, National Sugar Crops Improvement Center, Nanning 530007, China; 5. Guangxi Crop Genetic Improvement and Biotechnology Lab, Nanning 530007, China; 6. USDA-ARS, Sugarcane Research Unit, 5883 USDA Road, Houma, LA 70360, U. S. A.)

Abstract: This study was conducted to assess the genetic diversity amongst 12 *Saccharum* clones from 3 species using 19 SSR markers and capillary electrophoresis (CE). A total of 229 DNA bands were generated showing a size range between 100 and 260 bp. Based on the SSR data, the Jaccard's genetic similarity coefficients ranged from a minimum of 0.09 between CP72-1210 (cultivar) and In81-142 (*S. spontaneum*) to a maximum 0.65 between GX87 (*S. spontaneum*) to GX86 (*S. spontaneum*). In the dendrogram using UPGMA method, the 12 *Saccharum* clones were clustered into two groups. The three *S. spontaneum* clones formed a single group, while the three *S. officinarum* clones clus-

收稿日期: 2009-04-20 修回日期: 2009-10-14

基金项目: 国家科技支撑计划项目 (2007BAD30B00); 广西区回国基金 (桂科回 0991011); 广西自然科学基金 (桂科基 0639009); 广西甘蔗分子遗传与品种改良研究重点实验室建设项目 [Supported by the National Science and Technology Supporting Program of China (2007BAD30B00); the Science Foundation of Guangxi (0991011, 0639009)]

作者简介: 梁俊 (1976-), 男, 博士生, 从事甘蔗育种研究. (E-mail) jliang@gxaas.net.

* 通讯作者 (Author for correspondence, E-mail: liyr@gxaas.com)

** The work was conducted at the USDA-ARS, Sugarcane Research Laboratory, Houma, LA, U. S. A. under a Non-funded Cooperative Agreement (USDA Control No. 410334) between the Sugarcane Research Center, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Nanning 530007 and the USDA-ARS, Sugarcane Research Laboratory, Houma, LA 70360, U. S. A.

tered with the six cultivars, which demonstrated that *S. officinarum* had a closer genetic relationship with cultivars than *S. spontaneum*. The SSR markers data generated based on capillary electrophoresis are more accurate, simpler and automatic as compared to other molecular markers or electrophoresis.

Key words: Simple Sequence Repeats(SSR); sugarcane; capillary electrophoresis

甘蔗属 (*Saccharum*) 系禾本科中的 Andropogoneae 族, 主要有: 热带种 (*S. officinarum*)、割手密 (*S. spontaneum*)、大茎野生种 (*S. robustum*)、印度种 (*S. barber*)、中国种 (*S. sinense*)、野生肉质花穗种 (*S. edule*), 以及当今广泛种植的甘蔗栽培品种 (Daniel 等, 1987)。其个体各为遗传背景十分复杂的异源多倍体或非整倍体, 染色体数目和形态特征等相差很大 (Burner, 1991; Hont 等, 1998; Sreenivasan 等, 1987)。

20 世纪 80 年代之前, 人们主要利用追溯甘蔗属的发源地、统计属内不同个体的形态特征、农艺性状、同工酶分析等方法, 并结合数理统计法, 来推断甘蔗属内种间遗传关系 (Daniel 等, 1987)。之后, 随着分子生物技术的迅速发展, 许多分子标记技术被应用于研究甘蔗属内种间遗传关系。这些分子标记包括 RAPD (Burner 等, 1997; Nair 等, 1999; Harvey 等, 1996), RFLP (Besse 等, 1997; Coto 等, 2002; Jannoo 等, 1999; Lu 等, 1994), AFLP (Besse 等, 1998; Cai 等, 2005; Lima 等, 2002), SSR (Cai 等, 2005; Cordeiro 等, 2000, 2001, 2003; Pan 等, 2006, 2007; Selvi 等, 2003) 等。其中, SSR 分子标记技术具有高多态性、共显性强、操作性与分析简单等特点。

应用 SSR 分子技术进行 PCR 扩增产物分析的电泳方法, 一般有琼脂糖电泳、聚丙烯酰胺凝胶电泳、毛细管电泳等技术。毛细管电泳 (Capillary Electrophoresis, CE) 是 20 世纪 80 年代后期在全球范围内迅速崛起的一种分离分析技术, 具有快速、高效、高灵敏度、易定量、重现性好及自动化等优点, 目前已广泛地应用于小分子、小离子、多肽及蛋白质的分离分析研究, 以及药物成分分析、DNA 测序、DNA 多态性分析等化学、生物技术领域之中 (Kevin 等, 1999)。Cordeiro 等 (2001) 利用 21 对 SSR 引物与毛细管电泳技术结合, 结果有 17 对表现出较高多态性, 此方法也表明甘蔗栽培品种的多态信息含量 (PIC) 较低 (0.23)。在 Cordeiro 等 (2003) 的研究中, 用 6 对 SSR 引物对甘蔗属与其近缘属的 55 个不同材料进行遗传分析, 研究结果表明了甘蔗属与

斑茅具有更亲近的遗传关系。Pan 等 (2006, 2007) 的研究也表明, SSR 技术与毛细管电泳技术相结合, 可为甘蔗属的遗传分析、指纹图谱构建、杂交效率评定等提供可靠、快速的技术方法。

本研究拟用 19 对 SSR 引物与毛细管电泳技术相结合, 对甘蔗属内的栽培品种、割手密、热带种进行遗传分析, 探讨此项技术对于分析甘蔗属遗传关系的可行性。

1 材料与方 法

1.1 材 料

实验共有 12 材料, 其中包括 6 个常规甘蔗品种, 3 个割手密种材料与 3 个热带种材料 (表 1)。

1.2 DNA 提取方法

DNA 提取方法采取 Pan 等 (2000) 的方法, DNA 浓度与纯度分别用分光光度法 (Shimadzu 科学仪器公司生产的 Shimadzu UV-1601 分光光度计) 与琼脂糖电泳法检测 (利用纯净水作负对照)。

1.3 PCR 扩增与毛细管电泳

所有材料用 19 对引物进行分析, 引物序列由 ISMC (也称为国际甘蔗微卫星协会, 该协会由澳大利亚的 BSES、毛里求斯糖业研究所、美国佛罗里达糖业协会等 15 个研究机构与团体共同资助成立) 提供 (Cordeiro 等, 2000), 正向引物 5' 端以磷荧光染料标记 (引物的序列见表 1)。

PCR 总反应体系为 10 μ L, 其中 10 ng DNA 样品, 10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.3), 50 mmol/L KCl, 2.5 mmol/L MgCl₂, dATP、dTTP、dGTP 和 dCTP 各 80 mmol/L, 正反向引物各 0.2 mmol/L, Taq DNA 聚合酶 1U (试剂购自罗氏生物药剂公司)。PCR 反应在 96 孔 ABI-9700 型基因扩增仪 (美国应用生物系统公司生产) 上按以下程序运行: 首先 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 随后的 30 个循环为: 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 退火 30 s (不同引物的具体温度见表 1), 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s; 最后 72 $^{\circ}$ C 下延伸 2 min, 4 $^{\circ}$ C 保温。

PCR 的产物在 ABI-3730XL 基因分析仪 (由 ABI 生物公司生产) 上利用毛细管电泳法 (CE) 检

测。每个 CE 样品中含有 1 μ L PCR 产物、0.4 μ L Genescan-500 分子量标准品和 20 μ L 去离子甲酰胺(由 ABI 生物公司生产)。在毛细管电泳过程中, PCR 产物与 Genescan-500 分子量标准品的荧光信号均由基因分析仪自动保存。

1.4 SSR 标记数据分析与遗传分析

用 GeneMapper-V3.0 软件对 ABI-3730XL 基因分析仪收集到的数据进行分析,通过人工分析与软件统计得出不同 SSR 引物对不同甘蔗属材料扩

增得到的 SSR 标记片段。软件可通过将 SSR 标记片段与 Genescan-500 分子量标准品比较,得到不同片段长度大小;有 SSR 标记片段记为“1”,无记为“0”,并进行二维数据统计(Clark, 1988; Levinson 等, 1987; Schlotterer 等, 1992; Weber 等, 1989)。

计算两个甘蔗材料之间的 Jaccard 遗传相似度(Jaccard, 1908),由此相似系数用 UPGMA 法进行聚类分析并绘制遗传树状图,所有计算及绘图均在 NTSYS-PC 统计软件下完成(Rohlf, 1997)。

表 1 甘蔗属种质的编号及其来源

Table 1 List of *Saccharum* clones and their origins

无性系 Clone	种类 Species	来源 Origin	无性系 Clone	种类 Species	来源 Origin
桂糖 8 号(GT8)	栽培品种	中国广西	广西 86-5(GX86)	割手密	中国广西
桂糖 15 号(GT15)	栽培品种	中国广西	广西 87-21(GX87)	割手密	中国广西
云蔗 57-423(Y57-423)	栽培品种	中国云南	IND 81-142(IND81)	割手密	印度
云蔗 71-374(Y71)	栽培品种	中国云南	IN84-068(IN84)	热带种	印度
CP72-1210(CP72)	栽培品种	美国	Green German(Green)	热带种	德国
LCP85-384(LCP85)	栽培品种	美国	LA Purple(LA)	热带种	美国

2 结果与讨论

2.1 SSR 标记分析

由表 3 可知,引物从 12 个材料中共扩增到 10 个条带,条带的大小在 130~162 bp 之间。由表 2 可知,12 个甘蔗材料通过 19 对引物共检测到 229 个多态性条带,平均每个引物可检测到 12.1 个条带,每个甘蔗材料平均可检测到 19.1 个 SSR 标记;19 对引物扩增的条带范围集中在 100~260 bp 之间。引物 SMC851MS 在 12 个材料中扩增到 19 个条带,为最多;引物 SMC36BUQ 与 SMC569CS 只扩增到 7 个条带,为最小。

利用不同 SSR 引物对甘蔗属或其近缘种进行遗传分析时,研究结果是有差异的。Cai 等(2005)用 10 对引物对甘蔗属及其近缘属进行检测,不同甘蔗属及其远缘种平均扩增到条带数在 8.4~13.7 之间。Cordeiro 等(2003)采用毛细管电泳方法,6 对引物一共扩增到 187 个条带。上述研究与本研究结果表明,毛细管电泳检测待定 SSR 的长度、数量均对传统的聚丙烯酰胺凝胶具有更高的精确性,分辨率可高达 1 bp;还具有快速、重复性好、易于定量和适合自动化检测等优点。

2.2 遗传相似性分析

利用 SSR 标记信息,计算出 12 个甘蔗材料的

Jaccard 遗传相似度,最小为 0.09(甘蔗栽培品种 CP72-1210 与割手密 IND81-142 之间),最大为 0.65(两个割手密材料 GX 87 与 GX86 之间),平均为 0.26。割手密材料与甘蔗栽培品种之间的平均遗传相似度为(0.15)小于甘蔗热带种与甘蔗栽培品种之间的平均遗传相似度(0.33)。上述研究结果表明,与甘蔗栽培品种相比较,割手密比热带种有着更远的遗传距离。3 个割手密材料之间的遗传相似度为 0.29,大于甘蔗热带种之间的遗传相似度(0.37)与甘蔗栽培品种之间的平均遗传相似度(0.34)。Cordeiro 等(2003)的研究结果也表明割手密的遗传基础比热带种更广泛,但 Cai 等(2005)的研究结果却相反。本研究认为样品的来源地影响此结论,遗传距离最小(遗传相似度为 0.65)的两个割手密材料 GX86 与 GX87 均来自中国广西证明了此结论。

2.3 聚类分析

由图 1 看出,所有的供试甘蔗材料可分为两群,三个割手密材料分为一个亚群,甘蔗栽培品种与热带种合为一个亚群。其中,甘蔗栽培品种 CP72 和 LCP85,GT8、GT15 和 Y57 分别聚为一类,这两类甘蔗栽培品种都来自于相同或相近的地区,可能与他们采用亲缘相近的亲本杂交有关。IN84 虽然是甘蔗热带种,但并没有与其它两个甘蔗热带种 Green 与 LA 聚为一类,但是三个割手密单独聚为一类,证明了热带种比割手密具有和甘蔗栽培品种

表 2 引物编号及引物扩增信息
Table 2 Information of primer pairs and polymorphic markers

引物名称 Primer	扩增总带数 No. of bands	条带碱基大小 Band size (bp)	退火温度(°C) Annealing temperature	引物序列 Primer sequence
SMC7CUQ	8	158-168	60	GCC AAA GCA AGG GTC ACT AGA(正向) AGC TCT ATC AGT TGA AAC CGA(反向)
SMC18SA	10	130-162	62	ATT CGG CTC GAC CTC GGG AT(正向) AGT CGA AAG GTA GCG TGG TGT TAC(反向)
SMC22DUQ	9	144-163	62	CCA TTC GAC GAA AGC GTC CT(正向) CAA GCG TTG TGC TGC CGA GT(反向)
SMC24DUQ	11	126-142	64	CGC AAC GAC ATA TAC ACT TCG G(正向) CGA CAT CAC GGA GCA ATC AGT(反向)
SMC31CUQ	13	138-179	62	CAT GCC AAC TTC CAA TAC AGA CT(正向) AGT GCC AAT CCA TCT CAG AGA(反向)
SMC36BUQ	7	104-122	64	GGG TTT CAT CTC TAG CCT ACC(正向) TCA GTA GCA GAG TCA GAC GCT T(反向)
SMC278CS	13	140-182	64	TTC TAG TGC CAA TCC ATC TCA GA(正向) CAT GCC AAC TTC CAA ACA GAC T(反向)
SMC334BS	11	146-164	60	CAA TTC TGA CCG TGC AAA GAT(正向) CGA TGA GCT TGA TTG CGA ATG(反向)
SMC336BS	11	141-183	62	ATT CTA GTG CCA ATC CAT CTC A(正向) CAT GCC AAC TTC CAA ACA GAC(反向)
SMC569CS	7	167-235	62	GCG ATG GTT CCT ATG CAA CTT(正向) TTC GTG GCT GAG ATT CAC ACT A(反向)
SMC597CS	16	144-174	64	GCA CAC CAC TCG AAT AAC GGA T(正向) AGT ATA TCG TCC CTG GCA TTC A(反向)
SMC703BS	17	203-220	62	GCC TTT CTC CAA ACC AAT TAG T(正向) GTT GTT TAT GGA ATG GTG AGG A(反向)
SMC851MS	19	128-158	58	ACT AAA ATG GCA AGG GTG GT(正向) CGT GAG CCC ACA TAT CAT GC(反向)
SMC1604SA	17	105-127	58	AGG GAA AAG GTA GCC TTG G(正向) TTC CAA CAG ACT TGG GTG G(反向)
SMC1751CL	11	134-155	60	GCC ATG CCC ATG CTA AAG AT(正向) ACG TTG GTC CCG GAA CCG(反向)
mSSCIR3	10	169-187	60	ATA GCT CCC ACA CCA AAT GC(正向) GGA CTA CTC CAC AAT GAT GC(反向)
mSSCIR43	15	168-252	52	ATT CAA CGA TTT TCA CGA G(正向) AAC CTA GCA ATT TAC AAG AG(反向)
mSSCIR66	13	126-146	48	AGG TGA TTT AGC AGC ATA(正向) CAC AAA TAA ACC CAA TGA(反向)
mSSCIR74	11	211-229	54	GCG CAA GCC ACA CTG AGA(正向) ACG CAA CGC AAA ACA ACG(反向)

更亲近的遗传关系。

3 讨论

当今甘蔗栽培品种的细胞质主要来自于 20 世纪初的“高贵化育种”的后代(Daniels 等, 1987), 种质基础狭窄是当前中国甘蔗育种研究可持续发展的首要限制因素。割手密、大茎野生种等甘蔗属的野生资源具有抗旱、抗寒、抗不同病虫害等优良性状, 而且不少材料与甘蔗栽培品种遗传差异较大, 对拓宽甘蔗栽培品种的种质基础有极大的利用价值。了

解它们之间的遗传关系及杂种优势是有效利用甘蔗野生资源的前提, 但甘蔗属不同种及其近缘属的遗传关系还是一个引起争论的问题(Daniels 等, 1987), 利用新的生物技术解决此争论对于甘蔗育种具有重要的现实意义。

在 SSR 分子标记的检测技术中, 毛细管电泳法与聚丙烯酰胺凝胶电泳检测法相比具有快速、微量、分辨率高、重复性好、易于定量和适合自动化检测等优点(Cai 等, 2005; Cordeiro 等, 2000, 2001, 2003; Pan 等, 2006, 2007; Selvi 等, 2003)。它与 PCR 和其它技术(如 AFLP, SNP)的结合将会有逐渐取代

表 3 SSR 片段大小分布图 (以引物 SMC18SA 为例)
Table 3 Distribution of SSR DNA markers among 12 sugarcane clones

无性系 Clone	不同大小的 SSR 片段分布 Distribution of SSR markers (bp)									
	130	137	140	143	144	147	150	153	154	162
CP72	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0
LCP85	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0
GT8	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0
GT15	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1
Y57	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0
Y71	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0
GX86	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0
GX87	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0
IND81	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0
IN84	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0
Green	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0
LA	0	1		0	1	1	1	0	0	0

表 4 SSR 标记得到的 12 个甘蔗无性系间的遗传相似系数
Table 4 Genetic similarity among twelve sugarcane clones using SSR markers

无性系 Clone	CP72	LCP85	GT8	GT15	Y57	Y71	GX86	GX87	IND81	IN84	Green	LA
CP72	1.00											
LCP85	0.44	1.00										
GT8	0.27	0.30	1.00									
GT15	0.21	0.27	0.38	1.00								
Y57	0.37	0.33	0.41	0.57	1.00							
Y71	0.32	0.33	0.19	0.33	0.31	1.00						
GX86	0.17	0.14	0.11	0.19	0.19	0.19	1.00					
GX87	0.15	0.13	0.10	0.14	0.17	0.20	0.65	1.00				
IND81	0.09	0.11	0.14	0.14	0.14	0.14	0.10	0.11	1.00			
IN84	0.26	0.30	0.22	0.33	0.34	0.28	0.10	0.13	0.16	1.00		
Green	0.31	0.32	0.39	0.32	0.35	0.22	0.22	0.23	0.18	0.30	1.00	
LA	0.41	0.45	0.33	0.35	0.47	0.23	0.16	0.17	0.13	0.34	0.46	1.00

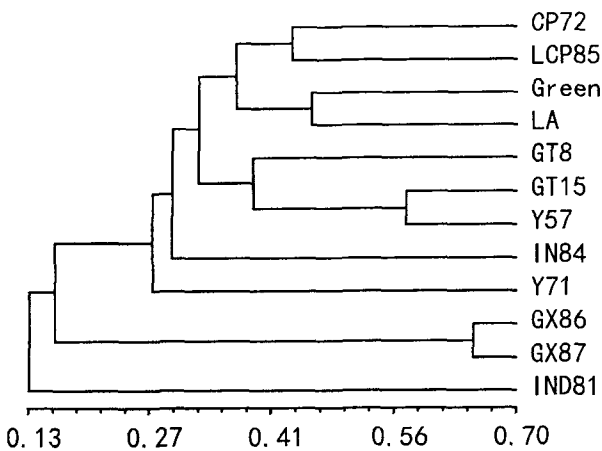


图 1 基于 SSR 标记数据绘制的 DUPGMA 聚类图
Fig. 1 Dendrogram from the cluster analysis by UDPGMA algorithm using SSR markers

传统的琼脂糖电泳和聚丙烯酰胺凝胶电泳的趋势。

本研究的结果与采用 RAPD(Nair 等, 1999)、RFLP(Lu 等, 1994)、SSR 与 AFLP(Cai 等, 2005) 的相类似: 割手密均可与甘蔗属内其它野生种或栽培种分开为不同的类群。甘蔗栽培品种与热带种在进行聚类分析时, 均可聚在同一类群内, 这与 20 世纪初的“高贵化育种”(Daniels 等, 1987) 中不断采用甘蔗热带种进行回交有一定的关系。Lu 等(1994) 也用 RFLP 分子标记证明了此结果。

本研究 12 个甘蔗属 3 个不同种的材料都能被所用的 SSR 标记完全区分, 特别是基于毛细管电泳的 SSR 荧光标记术, 大大提高了精确度和效率, 可为涉及知识产权争议品种的鉴定中提供 DNA 水平的证据。SSR 标记在甘蔗种质资源中具有丰富多态性和可重复性等的优点可为建立甘蔗种质资源指纹图、甘蔗属及其近缘属的遗传分析、甘蔗杂种鉴别提供可靠的技术。总体上看, 本研究中甘蔗栽培品

种的遗传相似程度较高,遗传基础相对较狭窄。为了更有效地拓宽甘蔗栽培品种的遗传背景,并有效利用甘蔗属及其近缘属的优良遗传胞质,建议利用与甘蔗栽培品种遗传距离更大的野生资源与甘蔗栽培品种杂交,可能会达到更佳的效果。

参考文献:

- Daniels J, Roach BT. 1987. Taxonomy and evolution, in sugarcane improvement through breeding[M]. New York; Elsevier press: 7—84
- Besse P, McIntyre CL, Berding N. 1997. Characterisation of *Erianthus* sect. *Ripidium* and *Saccharum* germplasm (*Andropogoneae*; *Saccharinae*) using RFLP markers[J]. *Euphytica*, **93**:283—292
- Besse P, Taylor G, Carrol B, et al. 1998. Assessing genetic diversity in a sugarcane germplasm collection using an automated AFLP analysis[J]. *Genetica*, **104**:143—153
- Burner DM. 1991. Cytogenetic analyses of sugarcane relatives (*Andropogoneae*; *Saccharinae*) [J]. *Euphytica*, **54**:125—133
- Burner DM, Pan YB, Webster RD. 1997. Genetic diversity of North American and Old World *Saccharum* assessed by RAPD analysis [J]. *Genet Res Crop Evolution*, **44**:235—240
- Cai Q, Aitken KS, Fan YH, et al. 2005. A preliminary assessment of the genetic relationship between *Erianthus rockii* and the 'Saccharum complex' using microsatellite (SSR) and AFLP markers[J]. *Plant Sci*, **169**:976—984
- Clark JM. 1988. Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by prokaryotic and eukaryotic DNA polymerases[J]. *Nucleic Acids Res*, **16**:9 677—9 686
- Cordeiro GM, Taylor GO, Henry RJ. 2000. Characterisation of microsatellite markers from sugarcane (*Saccharum* sp.), a highly polyploid species [J]. *Plant Sci*, **155**:161—168
- Cordeiro GM, Casu R, Henry RJ, et al. 2001. Microsatellite markers from sugarcane (*Saccharum* spp.) ESTs cross transferable to *Erianthus* and sorghum [J]. *Plant Science*, **160**:1 115—1 123
- Cordeiro GM, Pan YB, Henry RJ. 2003. Sugarcane microsatellites for the assessment of genetic diversity in sugarcane germplasm [J]. *Plant Sci*, **165**:181—189
- Coto O, Cornide MT, Calvo D, et al. 2002. Genetic diversity among wild sugarcane germplasm from Laos revealed with markers [J]. *Euphytica*, **123**:121—130
- Harvey M, Botha FC. 1996. Use of PCR-based methodologies for the determination of DNA diversity between *Saccharum* varieties [J]. *Euphytica*, **89**:257—265
- Hont AD, Ison D, Alix K, et al. 1998. Glaszmann J. C. Determination of basic chromosome numbers in the genus *Saccharum* by physical mapping of ribosomal RNA genes [J]. *Genome*, **41**:221—225
- Jaccard P. 1908. Nouvelles recherches sur la distribution florale [J]. *Bull Soc Vaud Sci Nat*, **44**:223—270
- Jannoo NL, Seguin GM, Domaingue R, et al. 1999. Molecular investigation of the genetic base of sugarcane cultivars [J]. *Theor Appl Genet*, **99**:171—184
- Kevin DA. 1999. Overview of capillary electrophoresis and capillary electrochromatography [J]. *J Chromatography*, **856**:443—463
- Levinson G, Gutman GA. 1987. Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution [J]. *Mol Biol Evol*, **4** (3):203—221
- Lima MLA, Garcia AAF, Oliveira KM, et al. 2002. Analysis of genetic similarity detected by AFLP and coefficient of parentage among genotypes of sugar cane (*Saccharum* spp.) [J]. *Theor Appl Genet*, **104**:30—38
- Lu YH, Hont AD, Walker DIT, et al. 1994. Relationships among ancestral species of sugarcane revealed with RFLP using single copy maize nuclear probes [J]. *Euphytica*, **78**:7—18
- Nair NV, Sreenivasan TV, Mohan M. 1999. Analysis of genetic diversity and phylogeny in *Saccharum* and related genera using RAPD markers [J]. *Genetic Resources and Crop Evolution*, **46**:73—79
- Pan YB, Burner DM, Legendre BL. 2000. An assessment of the phylogenetic relationship among sugarcane and related taxa based on the nucleotide sequence of 5S rRNA intergenic spacers [J]. *Genetica*, **108**:285—295
- Pan YB. 2006. Highly polymorphic microsatellite DNA markers for sugarcane germplasm evaluation and variety identity testing [J]. *Sugar Tech*, **8**:246—256
- Pan YB, Scheffler BE, Richard EP. 2007. High-through molecular genotyping of commercial sugarcane clone with microsatellite (SSR) markers [J]. *Sugar Tech*, **9**:176—181
- Rohlf FJ. 1997. NTSYS-PC: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System [M]. New York; Applied Biostatistics, Version 2.1
- Schlotterer C, Tautz D. 1992. Slippage synthesis of simple sequence DNA [J]. *Nuc Acids Res*, **20**:211—215
- Selvi A, Nair NV, Mohapatra T, et al. 2003. Evaluation of maize microsatellite for genetic diversity analysis and fingerprinting in sugarcane [J]. *Genome*, **46**:394—403.
- Sreenivasan TV, Ahloowalia BS, Heinz DJ. 1987. Taxonomy and evolution, in sugarcane improvement through breeding [M]. New York; Elsevier press:211—253
- Weber JL, May PE. 1989. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction [J]. *Am J Hum Genet*, **44**:388—396