

中国狗牙根(*Cynodon dactylon*) 优良选系的 RAPD 分析

郑玉红, 刘建秀^①, 陈树元

[江苏省植物研究所(南京中山植物园), 江苏南京 210014]
中国科学院

摘要: 对采自中国不同地区的 6 份狗牙根 [*Cynodon dactylon* (L.) Pers.] 优良选系进行了 RAPD 分子标记实验。选用 15 个引物共扩增出 438 条带, 平均每个引物扩增出 29 条带, 其中多态性带 415 条, 多态性位点百分率达到 59.02% ~ 75.49%。各选系间遗传相似性系数差异较大(0.408 ~ 0.672), 说明各选系间在 DNA 水平上存在着丰富的遗传多样性, 与新品种 C106(爬地青)相比, 各选系还存在一定的改良空间。实验结果也表明, RAPD 分子标记可成功地用于中国狗牙根优良选系遗传多样性的研究及品种鉴定。

关键词: 狗牙根; RAPD; 遗传多样性

中图分类号: S602.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0978(2005)02-0006-04

RAPD analysis of merit selections of *Cynodon dactylon* in China ZHENG Yu-hong, LIU Jian-xiu^①, CHEN Shu-yuan (Institute of Botany, Jiangsu Province and the Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210014, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2005, 14(2): 6-9

Abstract: The experiment of RAPD molecular marker was conducted on 6 merit selections of *Cynodon dactylon* (L.) Pers. in China. 438 bands were amplified by 15 primer sequences, 415 polymorphic bands were produced, average 29 bands from each primer, average percentage of polymorphic band of 6 selections reached to 59.02% - 75.49%. The genetic similarity coefficients among 6 selections were obviously different (0.408 - 0.672). The results suggested that there is abundant genetic diversity among different selections on DNA level. Compared with the new cultivar C106, the other selections can be improved further. Besides, the results also proved that the RAPD molecular marker can be successfully used to research the genetic diversity and new variety identification of *C. dactylon*.

Key words: *Cynodon dactylon* (L.) Pers.; RAPD; genetic diversity

在过去的几十年中,分子生物学的新方法、新技术层出不穷。用分子生物学手段研究草坪植物和牧草,已成为发展趋势之一。RAPD(random amplified polymorphic DNA, 随机扩增多态性 DNA)分子标记技术是 1990 年由 Williams 等^[1]和 Welsh 等^[2]同时发展起来的,具有操作简便、费用低、所用设备简单、实验周期短等特点^[3,4],已成功地应用于狗牙根^[5]、野牛草 [*Buchloë dactyloides* (Nutt.) Engelm.]^[6-8]等草坪植物及苜蓿 (*Medicago sativa* L.)^[9]等牧草的分子生物学研究。

Sweeney 等人的研究表明^[5], RAPD 标记能有效确定草坪草的变异。对中国苜蓿地方种源的 RAPD 分子标记的聚类分析结果表明:各实验种源的亲缘关系与地理分布相关,其遗传差异比北美种

源小^[9]。Sweeney 等人还以多年生黑麦草 (*Lolium perenne* L.) 为实验材料,对 RAPD 标记时 DNA 的大量制样和微量制样的差别进行了研究^[10]。然而到目前为止,在国内尚未开展有关狗牙根种质资源 RAPD 研究的报道。

本研究拟从 DNA 水平上采用 RAPD 分子标记方法对江苏省·中国科学院植物研究所经系统选育法选出的 6 个中国狗牙根选系进行遗传多样性分析,以期为狗牙根种质资源多样性的研究及其品种鉴定提供实验依据。

收稿日期: 2004-02-23

基金项目: 江苏省科技攻关资助项目(BE2001350)

作者简介: 郑玉红(1976-),女,河南潢川人,博士研究生,主要从事草坪植物资源和抗性生理方面的研究。

^① 通讯作者

1 材料和方法

1.1 实验材料

实验所用的6份狗牙根[*Cynodon dactylon* (L.) Pers.]选系产地见表1。其中C106是江苏省·中国科学院植物研究所用系统选育法育出的新品种,登记商品名为‘爬地青’,其余均为经过初步驯化的有望成为新品种的优良选系。引种后均统一种植于

南京中山植物园试验苗圃。该试验地位于北纬32°02',东经118°28',年平均降雨量1 013 mm。试验地土壤有机质含量为(5.098 ± 0.669)%,全氮含量为(0.2123 ± 0.0187)%,速效磷含量为(11.20 ± 2.44 × 10⁻⁴)%,速效钾含量为(257.4 ± 26.0 × 10⁻⁴)%,土壤pH值7.08 ± 0.11,土壤肥力中等且分布均匀。每份材料占地0.7 m²,依株距0.1 m、行距0.2 m种植,试验地实行统一管理。

表1 6个中国狗牙根选系的产地
Table 1 Location of 6 selections of *Cynodon dactylon* (L.) Pers. in China

选系 Selection	采集地 Locality	纬度 Latitude	经度 Longitude	海拔/m Elevation
C106	江苏南京 Nanjing, Jiangsu Province	32°03'	118°52'	30
C134	陕西咸阳 Xianyang, Shaanxi Province	34°25'	108°48'	505
C291	广东阳江 Yangjiang, Guangdong Province	21°56'	111°58'	60
C610	四川成都 Chengdu, Sichuan Province	30°36'	104°00'	580
C615	重庆市 Chongqing City	29°32'	106°33'	-
C649	河南潢川 Huangchuan, He'nan Province	32°09'	115°02'	100

1.2 研究方法

参照 Rogers 等的方法^[11],用 CTAB 法提取叶片总 DNA。参照 Huff 等的方法^[12],用 PE-9600 型扩增仪进行 PCR 扩增,总体积 20 μL 的反应体系中包括:10 × buffer 2 μL, Tris - 牛血清 2 μL, 灭菌双蒸水 11.5 μL, 引物 1.5 μL, 2 mmol · L⁻¹ dNTPs 1 μL, Taqase 0.15 μL, 模板 DNA 2 μL。共使用了 21 个引物(所有引物和 Taqase 均为 Operon 公司产品),并选择扩增条带丰富的 15 个引物进行 RAPD 分子标记实验。0.8% 琼脂糖凝胶水平平板电泳 PCR 扩增产物。

1.3 数据分析

对 15 个完全扩增引物的电泳结果进行量化,有谱带记为 1,无谱带记为 0,统计多态性位点,计算多态位点百分率,并计算各选系 RAPD 分子标记的遗传相似系数,所有数据统计均由 NTSYS - pc (Version 1.8) 软件完成。

2 结果和分析

2.1 狗牙根优良选系的 RAPD 分子标记扩增结果

利用 15 个随机引物从 6 个狗牙根选系中共扩增出 438 条带,其中 415 条为多态性带,多态百分率

达 94.25%,平均每个引物扩增出 29 条带,其中引物 OPA3、OPB5、OPK2 都扩增出了 42 条带。引物 OPA3、OPB4、OPB5、OPC2、OPC13、OPC4、OPB6 和 OPK2 的 RAPD 图谱见图 1。

2.2 狗牙根优良选系 RAPD 分子标记多态位点的比较

6 个狗牙根选系的 RAPD 分子标记多态性分析见表 2。由表 2 可以看出,各优良选系间的基因位点存在着丰富的遗传多态性。其中 C610(采自四川成都)多态位点百分率最高,达 75.49%,C291(采自广东阳江)多态位点百分率最低,达 59.02%。

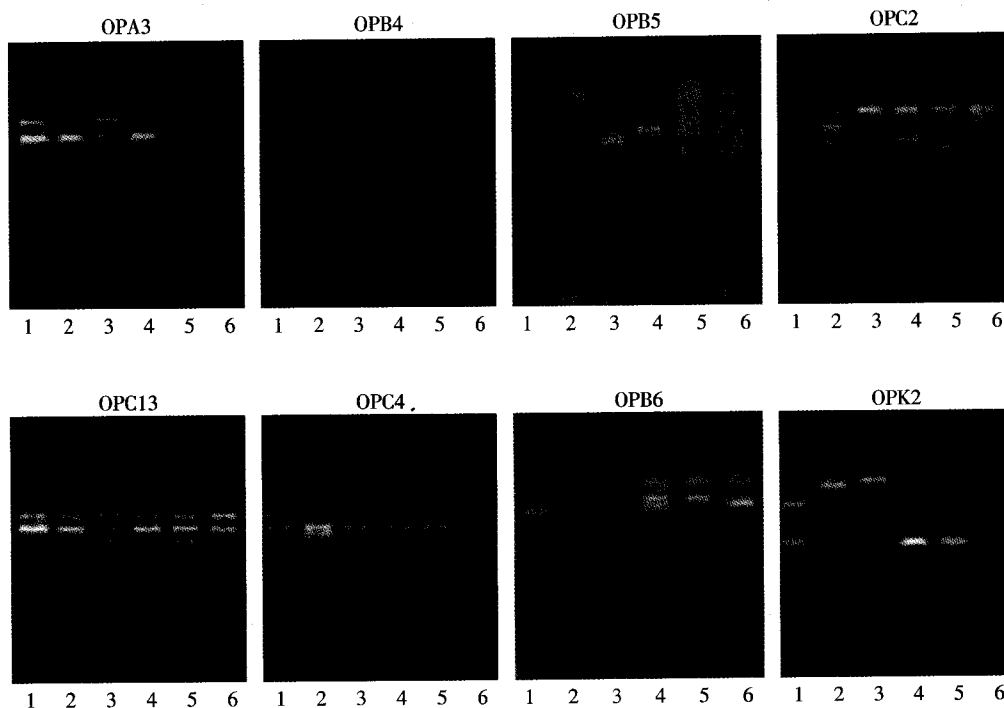
郭海林等^[13]对采自中国各地的 30 份狗牙根居群的染色体倍性进行了观测分析,发现狗牙根种质资源的染色体倍性呈现出高度的异质性,2n、3n、4n、5n、6n 及非整倍体的细胞均存在,不同居群的狗牙根具有不同的倍性水平,甚至在同一居群的不同根尖也存在不同的倍性。6 个狗牙根优良选系 RAPD 分子标记位点所具有的丰富的多态性或许是其染色体倍性高度异质性的一种反映。

2.3 狗牙根优良选系 RAPD 分子标记遗传相似度分析

狗牙根优良选系分子标记遗传相似系数矩阵见表 3,基于遗传相似系数进行聚类分析所得出的树状

图见图2。可以看出, C615 和 C649 的遗传距离最近, 为 0.328, 二者分别来自重庆和河南潢川, 虽然二者分布区相距较远, 但原生境相似, 均为山地; 其余选系间的遗传距离较远, 最远的为 C134 (采自陕西咸阳) 和 C291 (采自广东阳江), 二者的遗传距离为

0.592, 这也是与其地理分布相一致的。狗牙根优良选系的遗传相似系数差异较大, 说明狗牙根种内选系间遗传变异幅度很大, 其选系间存在丰富的遗传多样性。



1: C106 江苏南京 Nanjing, Jiangsu Province; 2: C134 陕西咸阳 Xianyang, Shaanxi Province;
3: C291 广东阳江 Yangjiang, Guangdong Province; 4: C610 四川成都 Chengdu, Sichuan Province;
5: C615 重庆市 Chongqing City; 6: C649 河南潢川 Huangchuan, He'nan Province

图1 6个中国狗牙根优良选系的RAPD分子标记图谱

Fig. 1 Band patterns of RAPD molecular markers of 6 merit selections of *Cynodon dactylon* (L.) Pers. in China

表2 6个中国狗牙根优良选系RAPD分子标记多态位点统计¹⁾
Table 2 The comparison of RAPD's polymorphic loci among 6 merit selections of *Cynodon dactylon* (L.) Pers. in China¹⁾

选系 Selection	位点总数 Total locus	多态位点数 Polymorphic locus	多态位点百分率/% Rate of polymorphic locus
C106	75	50	66.67
C134	97	72	74.23
C291	61	36	59.02
C610	102	77	75.49
C615	82	57	69.51
C649	66	41	62.12

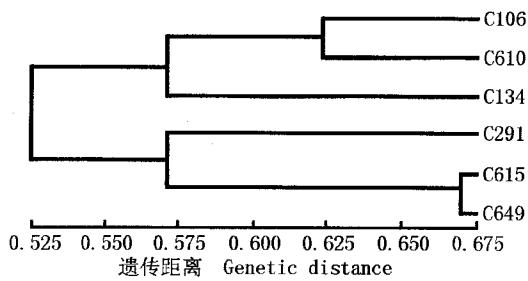
¹⁾ C106: 江苏南京 Nanjing, Jiangsu Province; C134: 陕西咸阳 Xianyang, Shaanxi Province; C291: 广东阳江 Yangjiang, Guangdong Province; C610: 四川成都 Chengdu, Sichuan Province; C615: 重庆市 Chongqing City; C649: 河南潢川 Huangchuan, He'nan Province

表3 6个中国狗牙根优良选系RAPD分子标记遗传相似系数矩阵¹⁾

Table 3 The matrix of genetic similarity coefficients of RAPD molecular markers of 6 merit selections of *Cynodon dactylon* (L.) Pers. in China¹⁾

选系 Selection	C106	C134	C291	C610	C615	C649
C106	1.000					
C134	0.600	1.000				
C291	0.536	0.408	1.000			
C610	0.624	0.544	0.464	1.000		
C615	0.656	0.544	0.520	0.576	1.000	
C649	0.576	0.512	0.624	0.472	0.672	1.000

¹⁾ C106: 江苏南京 Nanjing, Jiangsu Province; C134: 陕西咸阳 Xianyang, Shaanxi Province; C291: 广东阳江 Yangjiang, Guangdong Province; C610: 四川成都 Chengdu, Sichuan Province; C615: 重庆市 Chongqing City; C649: 河南潢川 Huangchuan, He'nan Province



C106: 江苏南京 Nanjing, Jiangsu Province; C610: 四川成都 Chengdu, Sichuan Province; C134: 陕西咸阳 Xianyang, Shaanxi Province; C291: 广东阳江 Yangjiang, Guangdong Province; C615: 重庆市 Chongqing City; C649: 河南潢川 Huangchuan, He'nan Province

图2 6个中国狗牙根优良选系 RAPD 分子标记遗传相似系数树状图

Fig. 2 Dendrogram of the genetic similarity coefficients of RAPD molecular marker of 6 merit selections of *Cynodon dactylon* (L.) Pers. in China

另外, C106与C615的遗传相似系数最大(0.656),与C291的遗传相似系数最小(0.536),这都说明与C106相比,各选系还存在一定的改良空间。这也是对狗牙根进行进一步改良的前提。

3 结论和讨论

由以上实验结果可知:在DNA水平上,6个狗牙根优良选系间的多态性位点丰富,且遗传相似系数差异较大,说明狗牙根各选系间存在着丰富的遗传变异,这为狗牙根的遗传改良奠定了遗传学基础。另外,狗牙根生存繁衍的生态环境千变万化,正是这种丰富的遗传多样性为狗牙根适应复杂的气候和地理环境提供了遗传学基础,并使该种狗牙根广布全球成为可能,同时,也为充分开发利用狗牙根种质资源奠定了基础。丰富的多态性位点和清晰的DNA谱带也说明RAPD分子标记可成功地应用于狗牙根优良选系间遗传多样性的研究及品种鉴定。

参考文献:

- [1] Williams J K, Kubelik A R, Livak J, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers [J]. *Nucleic Acids Res*, 1990, 18: 6531 - 6535.
- [2] Welsh J, McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers [J]. *Nucleic Acids Res*, 1990, 18: 7213 - 7218.
- [3] 卢江. 随机放大多态性DNA(RAPD)——一种新的分子标记技术[J]. *植物学报*, 1993, 35(增刊): 119 - 127.
- [4] Clark M S. 植物分子生物学实验手册[M]. 顾红雅, 瞿礼嘉主译. 陈章良主校. 北京: 高等教育出版社, 施普林格出版社, 1998. 236 - 251.
- [5] Sweeney P M, Golembiewski R, Danneberger T K. Random amplification polymorphic DNA analysis of dry turfgrass seed [J]. *Hort Sci*, 1996, 31(3): 400 - 401.
- [6] Wu L, Lin H. Identifying buffalograss [*Buchloe dactyloides* (Nutt.) Engelm.] accessions breeding lines using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers [J]. *Journal of the American Society of Horticultural Science*, 1994, 119(1): 126 - 130.
- [7] Golembiewski R, Pannooerget T K, Sweeney P M. Potential of RAPD markers for use in the identification of creeping bentgrass cultivars [J]. *Crop Sci*, 1997, 37(1): 212 - 214.
- [8] Huff D R, Peakall R, Smouse P E. RAPD variation within and among natural population of out-crossing buffalograss [*Buchloe dactyloides* (Nutt.) Engelm.] [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1993, 86(8): 927 - 934.
- [9] 李拥军, 苏加楷. 中国苜蓿地方种源亲缘关系的研究 I RAPD 标记 [J]. *草业学报*, 1999, 8(3): 46 - 53.
- [10] Sweeney P M, Danneberger T K. Random amplified polymorphic DNA in perennial ryegrass: a comparison of bulk samples vs. individuals [J]. *Hort Sci*, 1994, 29(6): 624 - 626.
- [11] Rogers S O, Bendich A J. Extraction of DNA from plant tissues [J]. *Plant Mol Biol Annual*, 1988, A6: 1 - 6.
- [12] Huff D R. RAPD characterization of heterogeneous perennial ryegrass accessions [J]. *Crop Sci*, 1997, 37(2): 557 - 564.
- [13] 郭海林, 刘建秀, 郭爱桂, 等. 中国狗牙根染色体数变异初报 [J]. *草地学报*, 2002, 10(1): 69 - 73.

(责任编辑: 惠红)