

不同居群狗牙根 RAPD 分析

梁慧敏

(江苏农林职业技术学院, 江苏 句容 212400)

摘要:利用 RAPD 分子标记和形态特征观察研究了中国部分地区野生和坪用型及国外引进商业品种狗牙根 28 个居群的遗传差异。20 个寡聚核苷酸引物扩增共得到 326 个标记条带,其中 314 条为多态性带,占 96.32%,平均每个引物 15.7 个多态位点,证明试验材料之间存在复杂的遗传背景,有丰富的遗传多样性。聚类结果结合形态学特征分析,28 个狗牙根居群可划分为 A、B、C 三大类型,A 类包含 12 个居群,相似系数 0.251 0~0.054 1,证明遗传差异较大,多态性较为丰富,从外部形态看这类叶片长而宽、质地较粗,主要包括广州、浙江、无锡、南京及青岛等地的野生类型;B 类有 9 个居群,相似性系数 0.233 9~0.121 6,说明遗传基础比较狭窄,相对遗传距离较近,外部形态看这类叶片短而中、质地纤细,主要为从国外和国内其他城市引进的草坪型居群;C 类包括 7 个居群,相似系数范围 0.500~0.143,说明各居群间变异范围更大,主要为山东内陆不同地区的居群。

关键词:狗牙根; RAPD 分子标记; 遗传多样性; 聚类分析

中图分类号:S543⁺.903.2;Q943 **文献标识码:**A **文章编号:**1004-5759(2010)01-0258-05

* 本项研究以收集到的 28 份国内野生和坪用型及国外引进商业品种种质资源(居群)为材料,通过随机扩增多态性 DNA(randomly amplified polymorphic DNA, RAPD)技术进行居群之间的遗传差异分析并结合形态学观察划分出不同的类型,为狗牙根(*Cynodon dactylon*)的遗传分类学研究提供分子水平的参考,并为开展狗牙根分子育种研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 植物材料

供试的 28 个狗牙根居群来源地及编号列于表 1。其中 1~12 号,22~28 号为中国普通野生型,13~21 号为坪用型品种。

1.2 RAPD 分子标记

1.2.1 植物基因组 DNA 的提取 从种质圃中的 28 个狗牙根居群中,每个居群随机选取 10 个单株,混和剪取新鲜幼嫩叶片 10~20 mg,用冰壶带回实验室流水冲洗干净,灭菌 ddH₂O 冲洗 3 遍,吸水纸吸干水分后用改良的 CTAB 方法^[1](cetyltrimethyl ammonium bromide,十六烷基三甲基溴化胺)提取总 DNA。

1.2.2 RAPD 的 PCR 扩增与检测 DNA 扩增在 PTC DNA Engine™ systems PCR(DNA 聚合酶反应技术)仪上进行,PCR 反应体系为 20 μL^[2,3],反应条件:94℃预变性 5 min,94℃变性 1 min,36℃复性 1 min,72℃延伸 2 min,共 45 个循环,最后 72℃延伸 10 min,PCR 扩增产物在 1%浓度的琼脂糖凝胶中电泳,溴化乙锭染色,在凝胶成像系统中拍照,保存图片。

1.2.3 引物筛选 筛选了 Opron 公司生产的 220 个 10 bp 的随机引物,选择扩增条带丰富、重复性好的 20 个引物进行 RAPD 试验,所使用的引物序列及扩增结果见表 2。

1.2.4 数据分析 对重复性好的扩增片段在 0.25~2.00 kb 收集 RAPD 数据。记录时只记录那些谱带清晰、并在重复试验中稳定出现的带,不分强弱,并设对照。每个样品的扩增条带按有或无记录,存在时赋值为 1,否则赋值为 0。统计多态性位点,计算多态位点百分率,并计算各居群 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,采用类平均法(UPGMA)对遗传距离矩阵进行聚类分析,建立遗传关系聚类图。

* 收稿日期:2009-01-05;改回日期:2009-02-26

基金项目:江苏高技术研究项目(No. BG2007317),江苏“六大人才高峰”项目(07-G-002)和农业部草地农业生态系统学重点开放实验室开放课题基金资助。

作者简介:梁慧敏(1962-),女,宁夏银川人,研究员,博士。E-mail:lianghuimin0218@126.com

表 1 供试材料的名称与来源

Table 1 Names and sources of experimental materials

编号 Numbers	种(品种)名 Species (Varities)	材料 Materials	来源 Origin	编号 Numbers	种(品种)名 Species (Varities)	材料 Materials	来源 Origin
S1	<i>C. dactylon</i>	GZ	贵州贵阳 Guiyang, Guizhou	S15	Tifgreen	NJ ₅	江苏句容 Jurong, Jiangsu
S2	<i>C. dactylon</i>	WX	江苏无锡 Wuxi, Jiangsu	S16	Tifgreen	NJ ₆	江苏溧阳 Liyang, Jiangsu
S3	<i>C. dactylon</i>	GZ ₁	广东广州 Guangzhou, Guangdong	S17	Tifgreen	NJ ₇	江苏扬州 Yangzhou, Jiangsu
S4	<i>C. dactylon</i>	GZ ₂	广东清远 Qingyuan, Guangdong	S18	Tifway I	NJ ₈	江苏泰州 Taizhou, Jiangsu
S5	<i>C. dactylon</i>	GZ ₃	广东肇庆 Zhaoqing, Guangdong	S19	Tifgreen	GZ ₅	广东广州 Guangzhou, Guangdong
S6	<i>C. dactylon</i>	GZ ₄	广东东莞 Dongguan, Guangdong	S20	Tifway I	GZ ₆	广东深圳 Shenzhen, Guangdong
S7	<i>C. dactylon</i>	ZJ ₁	浙江杭州 Hangzhou, Zhejiang	S21	Tifway I	QD ₃	山东青岛 Qingdao, Shandong
S8	<i>C. dactylon</i>	ZJ ₂	浙江临安 Linan, Zhejiang	S22	<i>C. dactylon</i>	DY	山东东营 Dongying, Shandong
S9	<i>C. dactylon</i>	QD ₁	山东青岛 Qingdao, Shandong	S23	<i>C. dactylon</i>	JN ₁	山东济南 Jinan, Shandong
S10	<i>C. dactylon</i>	QD ₂	山东胶州 Jiaozhou, Shandong	S24	<i>C. dactylon</i>	JN ₂	山东章丘 Zhangqiu, Shandong
S11	<i>C. dactylon</i>	NJ ₁	江苏南京 Nanjing, Jiangsu	S25	<i>C. dactylon</i>	JN ₃	山东历城 Licheng, Shandong
S12	<i>C. dactylon</i>	NJ ₂	江苏句容 Jurong, Jiangsu	S26	<i>C. dactylon</i>	JN ₄	山东长清 Changqing, Shandong
S13	Tifgreen	NJ ₃	江苏南京 Nanjing, Jiangsu	S27	<i>C. dactylon</i>	TN ₁	山东泰安 Tai'an, Shandong
S14	Tifgreen	NJ ₄	江苏江宁 Jiangning, Jiangsu	S28	<i>C. dactylon</i>	TN ₂	山东淄博 Zibo, Shandong

表 2 引物、序列和扩增结果

Table 2 List of primers, their sequences and amplified results

引物 Primer	序列 Sequence (5'~3')	总带数 Total bands	多态性带数 Percentage bands	多态位点比率 Polymorphic (%)
OPG10	AGGGCCGTCT	13	11	84.62
OPJ5	CTCCATGGGG	11	11	100.00
OPJ10	AAGCCCAGAG	13	13	100.00
OPJ13	CCCACTACC	16	16	100.00
OPJ15	TGTAGCAGGG	13	12	92.31
OPG18	TGGTCGCAGA	17	17	100.00
OPN2	ACCAGGGGCA	16	15	93.75
OPN6	GAGACGCACA	12	12	100.00
OPN8	ACCTCAGCTC	17	17	100.00
OPN9	TGCCGGCTTG	20	19	95.00
OPN10	ACAACCTGGGG	12	11	91.67
OPN12	CACAGACACC	22	21	95.45
OPN14	TCGTGCGGGT	19	18	94.74
OPN15	CAGCGACTGT	16	16	100.00
OPN16	AAGCGACCTG	22	19	86.36
OPN18	GGTGAGGTCA	14	14	100.00
OPS11	AGTCGGGTGG	22	21	95.45
OPS12	CTGGGTGAGT	14	14	100.00
OPS13	GTCGTTCTCTG	21	21	100.00
OPS19	GAGTCAGCAG	20	20	100.00

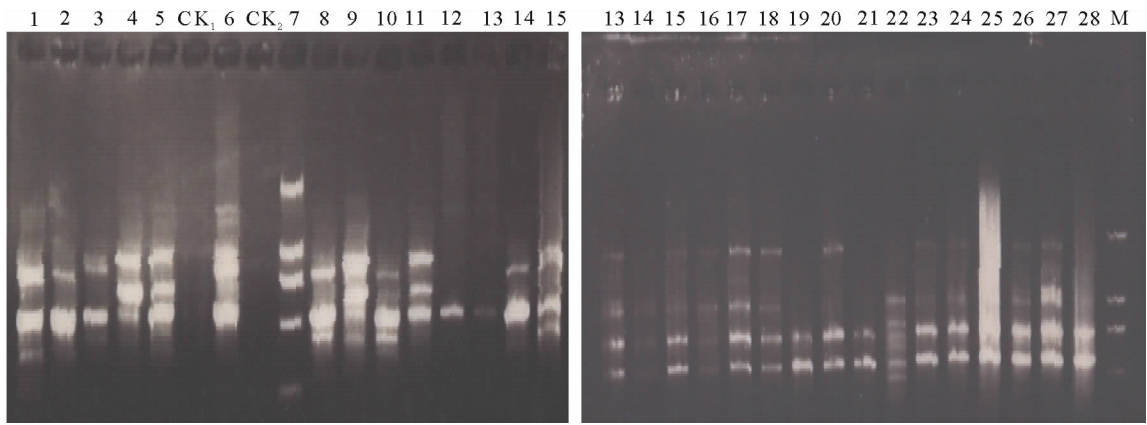


图 1 引物(左图:OPN2、右图:OPN10)扩增的 RAPD 带型

Fig. 1 RAPD polymorphisms generated by primers (left: OPN2, right: OPN10)

M 为 DGL 2000 标准分子量; CK₁ 和 CK₂ 分别为无样和无 Taq 酶的对照; 数字 1~28 所代表的材料名称见表 1 M is DGL 2000 DNA marker; CK₁ and CK₂ are control of no sample and no Taq enzyme; 1-28 is the number of experiment material (see table 1)

2 结果与分析

2.1 RAPD 标记

首先用 2 个不同生态点的野生狗牙根和 1 个坪用型狗牙根为材料, 筛选合适的引物。再用初选出来的引物对供试的 28 份材料进行扩增, 最后选取 20 个具有多态性且扩增效果重复性好的引物进行 RAPD 分析。为了保证在不同次反应中条件的一致性和可比性, 在每次扩增时, 都选取同样 2 个样品作对照, 以确定 RAPD 反应结果的稳定性, 在本研究中, RAPD 反应的平均稳定性为 80% 左右。

2.2 不同居群狗牙根的多态性

所有引物均产生多态性 DNA, 多态位点共计 314 个, 范围为 11~21 个, 平均 15.7 个多态位点/引物(图 1)。在本项试验中平均 96.32% 的有记录的带是多态的(表 2)。由于这 28 份材料分别来源于国内多个市县的地理位置, 代表了国内野生狗牙根的部分区域, 另外也包括少部分国外育成品种(主要三倍体), 但这些育成品种由于引进中国时间较长又在国内不同地区之间进行交换种植, 很难说它们遗传性状不会发生变异。以上试验结果揭示出中国野生狗牙根不同居群间, 国外引进品种的不同居群间存在着复杂的遗传背景, 也存在着丰富的遗传多样性。

2.3 狗牙根居群间遗传关系聚类分析

在由 326 个 RAPD 标记获得的 Nei 相似系数矩阵中各居群间的相似性系数分布范围为 0.500 0~0.054 1。在 28 个供试材料中, 根据相似系数做的树状分支图可将狗牙根分为 A、B、C 三大类群(图 2)。A 类包括 12 个狗牙根居群, Nei 相似性系数分布范围在 0.251 0~0.054 1, 说明这 12 个居群之间的遗传多态性较为丰富; B 类包括 9 个居群, Nei 相似性系数分布范围在 0.233 9~0.121 6, 比起 A 类其基因型之间的遗传基础比较狭窄, 相对遗传距离较近; C 类包括 7 个居群, Nei 相似性系数分布范围在 0.500 0~0.143 0, 比起前 2 类变异范围更大, 相对遗传距离更远。

12 个野生型狗牙根居群所聚成的 A 类, 尽管它们来自于不同的地区, 但在外部形态方面较相似, 主要是质地较粗、叶长而宽, 如果按照地理位置细分, 来自于广州的 4 个居群遗传距离较近, 被聚为一类, 其次是浙江的 2 个居群, 它们又和无锡居群聚为一类, 之后是南京的 2 个居群, 最后是青岛的 2 个居群 Nei 相似系数较接近, 来自贵州的居群与它们之间遗传关系最远。B 类质地纤细、叶短或细中长, 主要为各地从国外、全国其他城市引进的草坪型居群, 所以变异范围较小, 遗传距离较近。C 类主要为山东内陆不同地区居群、各居群间变异范围也很大, 但相近生境遗传距离较近, 如果按地理分布, 来自于济南周边的 4 个居群聚为一类, 泰安的聚为一类, 东营的和它们的遗传距离稍远一些。

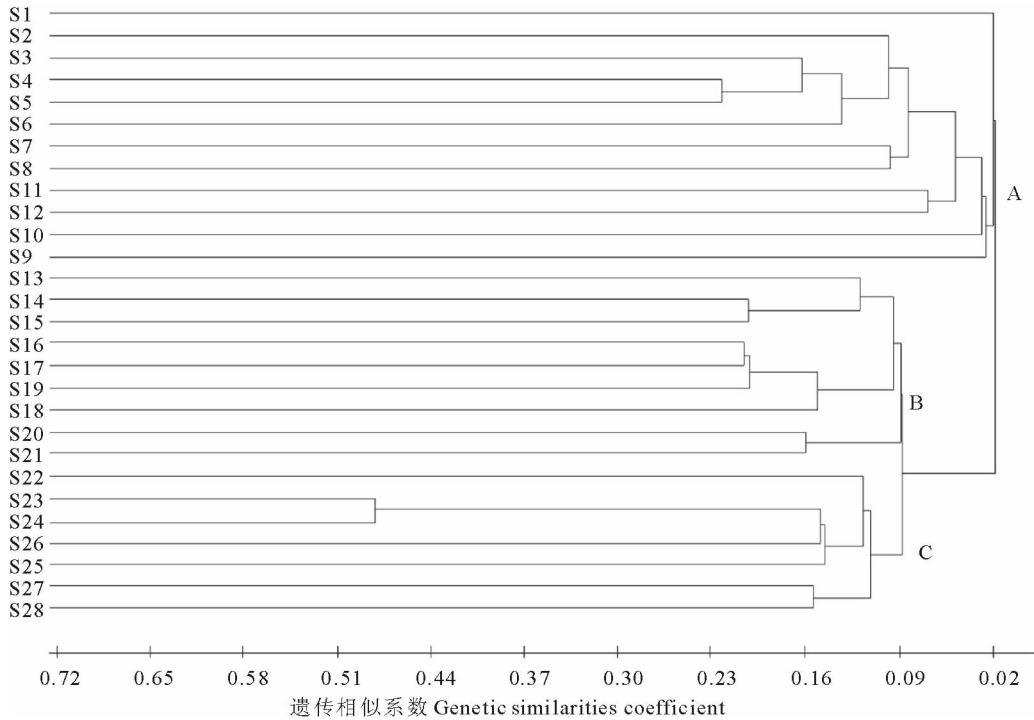


图 2 狗牙根 UPGMA 聚类分析

Fig. 2 UPGMA cluster analysis of *C. dactylon*

3 讨论

狗牙根属分类很困难,至今没有一个完全满意的分类方法^[4]。其种内营养器官的变异远比种内生殖器官的特征变异大^[5]。刘建秀等^[6]指出华东地区狗牙根的外部形态特征与 *C. dactylon* var. *dactylon* 很相近,两者均有粗状到纤细的种源存在,体细胞染色体倍数为 4 倍或 6 倍,由此认为华东地区的狗牙根可能属于 *C. dactylon* var. *dactylon*。由于狗牙根属是一个种类繁多、形态变异复杂、含有二倍体、三倍体、四倍体和六倍体的多年生禾草,无论是从形态学还是细胞学水平上进行的分类都是受几个形态特征或生理生化特性的基因控制,它们在整个遗传信息中所占比例很小,所以这些分类都有不近如人意之处。近年来发展起来的 RAPD 技术可以对基因组的所有序列直接分析,检测基础序列的变化,在 DNA 水平上揭示群体的遗传变异,所以利用 RAPD 指纹图谱建立的 UPGMA 系统树可以反映种内或种间关系、居群间关系和基因组间的关系^[7-14]。

本试验结果表明,20 个引物在 28 份材料之间均具有多态性,其 RAPD 扩增的总多态位点百分率达 96.34%,对于狗牙根基因组 DNA 多态性明显偏高的特点,可以进一步证实众多研究者从生态等角度发现的狗牙根种内拥有大量可供遗传变异选择的基因型,这些丰富的遗传变异的存在,正是狗牙根能形成众多品种的分子基础^[15]。

狗牙根广泛地分布于我国黄河流域及其以南地区,在新疆亦有较广泛的分布,其种质资源非常丰富,在外部性状和抗逆性等方面差异也很大。但近年来由于人类的活动使狗牙根居群范围在迅速缩小,所以很难沿着一个土壤梯度集中取样形成一个渐变群。本试验结果将狗牙根明显地分为 3 类,各类型扩增出了多个特异性片段,且形态相似,地理分布相近的物种聚类在一起^[16-18],暗示着性状表现相似的类型在聚类分析中常常比较靠近,坪用性状表现相近的草坪草品种常有聚类在一起的趋势^[19]。

参考文献:

- [1] 邹玉萍,葛颂王,晓东. 系统与进化植物学中分子标记[M]. 北京:科学出版社,2001:16-17.
- [2] 王志勇,袁学军,刘建秀,等. 狗牙根 SRAP-PCR 反应体系优化及引物筛选[J]. 草业学报,2008,17(3):79-85.
- [3] 隋晓青,王堃. 克氏针茅 ISSR-PCR 反应体系的建立与优化[J]. 草业学报,2008,17(3):71-78.
- [4] Jack R, Harlan J M J, de Wet. Sources of variation in *Cynodon dactylon*(L). Pers[J]. Crop Science, 1969, 9: 774-778.

- [5] 刘建秀, 贺善安, 刘永东, 等. 华东地区狗牙根形态分类及其坪用价值[J]. 植物资源与环境, 1996, 5(3): 18-22.
- [6] 刘建秀, 郭爱桂, 郭海林. 我国狗牙根种质资源匍匐性的研究[J]. 中国草地, 2002, 24(2): 12-15.
- [7] 张颖, 周永红, 张利, 等. 鹅观草属、披碱草属、狷草属和仲彬草属物种的 RAMP 分析及系统学意义[J]. 西北植物学报, 2005, 25(2): 368-375.
- [8] Mengistu L W, Mueller-Warrant G W, Barker R E. Genetic diversity of *Poa annua* in western Oregon grass seed crops[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2000, 101(122): 70-79.
- [9] Casler M D, Rangel Y, Stier J C, et al. RAPD marker diversity among creeping bentgrass clone[J]. Crop Science, 2003, 43(2): 688-693.
- [10] Fernandez Y S N, Somers D J, Coulman B E. Estimating the genetic relationship of hybrid brome grass to smooth brome grass and meadow brome grass using RAPD markers[J]. Plant Breed, 2001, 120(2): 149-153.
- [11] Golembiewski R C, Danneberger T K, Sweeney P M. Potential of RAPD markers for use in the identification of creeping Bentgrass cultivars[J]. Crop Science, 1997, 37: 212-214.
- [12] 郑玉红, 刘建秀, 陈树元. 中国狗牙根(*Cynodon dactylon*)优良选系的 RAPD 分析[J]. 植物资源与环境学报, 2005, 14(2): 6-9.
- [13] 刘欢, 慕平, 赵桂琴. 基于 AFLP 的燕麦遗传多样性研究[J]. 草业学报, 2008, 17(6): 121-127.
- [14] 唐燕琼, 胡新文, 郭建春, 等. 柱花草种质遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 草业学报, 2009, 18(1): 57-64.
- [15] 解新明, 卢小良. 利用 RAPD 标记分析狼尾草属牧草品种间的遗传关系[J]. 草业学报, 2005, 14(2): 52-56.
- [16] 丁春邦, 周永红, 杨瑞武, 等. 应用 RAPD 分子标记探讨拟鹅观草属的种间关系[J]. 草业学报, 2005, 14(1): 38-43.
- [17] Scheefa E A, Casler M D, Jung G. Development of species-specific SCAR markers in bentgrass[J]. Crop Science, 2003, 43(1): 345-349.
- [18] 薛丹丹, 郭海林, 郑铁琦, 等. 结缕草属植物杂交后代杂种真实性鉴定——SRAP 分子标记[J]. 草业学报, 2009, 18(1): 72-79.
- [19] 田志宏, 邱永福, 严寒, 等. 用 RAPD 标记分析高羊茅的遗传多样性[J]. 草业学报, 2007, 16(1): 58-63.

Analysis on different populations of *Cynodon dactylon* by RAPD

LIANG Hui-min

(Jiangsu Agriculture and Forestry Profession Technology College, Jurong 212400, China)

Abstract: Genetic differences of 28 *Cynodon dactylon* populations were examined by RAPD and morphological observation. Using 20 oligonucleotide primers, 326 bands were obtained of which 314 (96.32%) were polymorphic, an average of 15.7 per primer. A complicated genetic background and abundant genetic diversity were found in the experimental germplasms. According to cluster and morphological analysis, the 28 *C. dactylon* populations could be classified into three types of which type A (12 populations) had a genetic similarity coefficient ranging between 0.251 0 and 0.054 1. The comparative genetic differences of this type were larger with more abundant polymorphisms than the other types. The leaves of type A were long and wide with a hard texture. This type included germplasms from Guangzhou, Zhejiang, Wuxi, Nanjing, Qingdao. Type B involved 9 populations with a genetic similarity coefficient of 0.233 9—0.121 6. The genetic difference was less and genetic relationship closer than in type A. The leaves were shorter and the texture finer. Type B included varieties introduced from other cities and other countries. Type C consisted of 7 populations collected from interland regions of Shandong province. They had a genetic similarity coefficient of 0.500—0.143 showing a large genetic difference.

Key words: *Cynodon dactylon*; RAPD marker; genetic diversity; cluster analysis