

湖南四种尾矿环境下的狗牙根遗传多样性的 RAPD 分析

袁长春¹, 施苏华¹, 赵运林²

(1. 中山大学生命科学学院, 广东广州 510275; 2. 湘潭师范学院生物系, 湖南湘潭 411201)

摘要: 选择湖南 4 种有代表性的有色金属尾矿地所生长的野生狗牙根作为研究对象, 并以正常生境下的野生狗牙根作为对照, 采用 RAPD 技术分析了这些特别环境下的狗牙根的遗传多样性。17 条 10 个核苷酸长的引物用于 PCR 扩增, 共得到 432 条 DNA 带。检测位点 160 个, 其中多态位点 134 个, 占 83.75%。各个类群间的 Jaccard 相似系数平均为 0.4475 ± 0.0806 , 遗传距离平均为 0.3825 ± 0.0712 。结果显示生长于这些不同尾矿环境下的狗牙根种群在遗传本质上均产生了明显的分化, 完全可以根据其尾矿基质的不同而划分为不同的生态型或品种, 甚至可能处理为新的变种。狗牙根种群具有丰富的遗传多样性, 作为先锋植物可为尾矿的复垦提供更多的品种选择。

关键词: 狗牙根; 尾矿; RAPD; 遗传多样性

中图分类号: Q943 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2003)01-0036-05

Genetic diversity analysis of *Cynodon dactylon* (L.) Pers. from the four different tailing mines of Hunan by RAPD

YUAN Chang-chun¹, SHI Su-hua¹, ZHAO Yun-lin²

(1. School of Life Sciences, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China; 2. Department of Biology, Xiangtan Normal University, Xiangtan 411201, China)

Abstract: The genetic diversity level of the population of *Cynodon dactylon* (L.) Pers. from four main tailing mines in Hunan Province was determined by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. One sample of *C. dactylon* living in normal habitat from Xiangyang town of Hengnan County was used as comparing group. Seventeen 10-mer oligonucleotide primers were used for DNA amplification, and 432 DNA bands were generated. Total 160 loci were detected, of which 134 (83.75%) were polymorphic. The mean value of Jaccard's coefficient of similarity is 0.4475 ± 0.0806 among the taxa, the mean value of genetic distance is 0.3825 ± 0.0712 . The result indicated that the high genetic diversity existed in the population of *Cynodon dactylon* distributed at the four different tailing minerals, and it is reasonable to divide them into four different ecotypes or varieties respectively, depending upon the type of tailing minerals. Therefore, *Cynodon dactylon* will give more options of the pioneer plants out for resurrection of the tailing mine based on its rich genetic diversity.

Key words: *Cynodon dactylon* (L.) Pers.; tailing mine; random amplified polymorphic DNA (RAPD); genetic diversity

收稿日期: 2002-02-22; 修订日期: 2002-04-09

基金项目: 国家杰出青年基金项目(39825104); 湖南省教委资助项目(96108)。

作者简介: 袁长春(1964-), 男, 湖南湘潭人, 博士, 副教授, 从事植物分子生物学研究。

狗牙根(*Cynodon dactylon* (L.) Pers.), 又名草板筋、马拌草、铺地草, 属禾本科画眉草亚科多年生杂草^[1]。原产非洲, 广泛分布于热带、亚热带和暖温带地区, 在我国主要分布于黄河流域以南, 多生长于村庄附近、道旁河岸、荒地山坡及草地^[2]。为优良饲料, 又耐放牧, 根状茎药用, 可清血^[3]。其根茎蔓延力很强, 为良好的固堤保土植物和铺建草地的良种, 常用以铺建草坪或球场。由于其根茎再生能力强, 繁殖系数高, 耐贫瘠, 同时也是旱田、果园、路边及旷野较难控制的杂草之一^[4]。

尾矿是由于选矿后的废水、废渣及所遗弃的一些低品位的矿石淤积而成, 通常含有较高浓度的不同金属离子, 营养贫乏, 其生态环境十分恶劣。湖南素有“有色金属之省”之称, 多种有色金属矿贮量大, 且开采时间长, 工艺落后, 加上环保意识淡薄, 因而形成相当规模的不同尾矿, 长期缺乏治理和恢复。近年来, 国家逐渐重视矿区生态环境的恢复和改善, 除采用先进的采矿工艺外, 尾矿的复垦也是一个重要的途径。通常, 由于尾矿地环境胁迫作用强, 一般的植物很难生长。因而选择合适的复垦植物, 尤其是先锋植物是最基本也是最关键的一步。通过对湖南境内的规模较大、开采历史较长、环境污染较为严重的 4 个有色金属矿区, 即水口山铅锌矿、常宁柏坊铜矿、湘潭锰矿以及衡阳二七二铀矿等实地野外观察发现, 禾本科植物狗牙根能够生长在这些生境条件十分恶劣的尾矿地, 加上其容易栽培和管理, 且繁殖速度快, 因而是一种较好的尾矿复垦的先锋植物。从外部形态上来看, 生长在这些特殊环境下的狗牙

根彼此之间以及与生长于正常环境下的狗牙根并无两样, 而且在某些所观察的尾矿地, 狗牙根经过多年的生长和繁衍, 已经形成较大规模的群落。但是, 是否它们在内在遗传本质上也表现出一致性, 抑或分化程度如何, 以及在实际生产应用中应如何选择品种资源, 尚未见相关报道。

随机扩增多态性 DNA (random amplified polymorphic DNA, RAPD) 分析已被证明为研究植物遗传多样性和种群分化的有用工具之一^[5~8], 具有简便、灵敏度高、分析速度快、仅需微量的 DNA 即能获得丰富的多态性特征等优点, 已被广泛用于植物属下等级的分类, 尤其是品种鉴定等方面的研究。通过选择湖南有代表性的 4 种主要有色金属尾矿环境下生长的狗牙根作为研究对象, 并用正常生境条件下生长的狗牙根作为对照, 采用 RAPD 分析方法研究彼此间的差异, 旨在探讨狗牙根种群的遗传多样性及其适应这些特殊环境的本质, 为筛选适合有色金属尾矿复垦的狗牙根品种提供一定依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

狗牙根(*Cynodon dactylon* (L.) Pers.) 不同样品分别采自湖南湘潭、常宁、衡阳及水口山等不同矿区尾矿地(表 1), 对照组采自湖南衡南县向阳镇。每个样地各取 20 株有代表性的植株作为一个样品, 清洗干净后用硅胶干燥保存。在每个取样点各采凭证标本 3 份, 凭证标本保存于中山大学植物标本室。

表 1 实验材料(狗牙根)的编号与来源

Table 1 Number and sources of experimental materials(*Cynodon dactylon*)

| 编号 No. | 地点 Collection source | 采集株数 Number of samples | 时间 Date | 凭证标本 Voucher |
|--------|----------------------|------------------------|-------------|--------------|
| 1 | 湖南湘潭锰矿 | 20 | 1998. 4. 14 | Zhao980414 |
| 2 | 湖南常宁柏坊铜矿 | 20 | 1998. 4. 11 | Kang980411 |
| 3 | 湖南水口山铅锌矿 | 20 | 1998. 4. 10 | Kang980410 |
| 4 | 湖南衡阳二七二厂铀尾矿 | 20 | 1998. 4. 13 | Zhao980413 |
| 5 | 湖南衡南县向阳镇 | 20 | 1998. 4. 12 | Kang980412 |

1.2 方 法

1.2.1 总 DNA 提取与纯化 采用 2×CTAB 法^[9] 提取植物总 DNA。DNA 纯化按照下列步骤进行: 100 μL DNA 1×TE 溶液加入 3 倍体积的 6 M NaI, 5 μL 玻璃粉 1×TE 溶液, 混匀, 室温放置 5 min; 8 000 r/m 离心 2 min, 弃上清液; 加洗脱液 200 μL(含 0.2 M NaCl, 10 mM Tris-HCl pH8.0, 1

mM EDTA, 50% Ethanol), 混匀, 8 000 r/m 离心 2 min, 弃上清液, 重复洗脱 3 次; 晾干, 加 100 μL 1×TE; 50 °C 保温 15~20 min 至沉淀完全溶解; 10 000 r/m 离心 10 min, 将上清液移至新管, 弃沉淀, -20 °C 保存备用。

1.2.2 PCR 扩增及产物的分析 PCR 扩增反应条件如下: 20 μL 反应体积; 1×Taq 酶 buffer(Sangon

公司);约 2~4 ng 模板 DNA;2.0 mmol/L MgCl₂; 200 μmol/L dNTP(Sangon 公司); Taq 酶 1 个单位(Sangon 公司); 15 ng/20 μL 引物(Operon 公司)。空白对照用三蒸水代替模板 DNA,其余的成分不变。

PCR 扩增按下列程序进行:94 °C 4 min,一个循环;94 °C 1 min~35 °C 2 min~72 °C 2 min,45 个循环;72 °C 7 min 一个循环,结束。PCR 扩增完成后,取 15 μL 扩增产物点样于 ρ=1.4% 琼脂糖凝胶上,在 1×TAE 缓冲液中电泳,稳压(4 v/cm),电泳约 3 h 30 min,2 Kb ladder DNA 用作分子量标记。凝胶在 0.5 μg/mL EB(溴化乙锭)中染色约 40 min,紫外光下检测和照像。

1.2.3 数据分析 在电泳图谱上每一 DNA 片段被看作一个可区分的分子标记,同一标记位点有带者(包括强带和弱带)记作 1,缺乏记作 0,选取长度在 200~2 200 bp 并且可重复的 DNA 带记录待分析。各个样品间的相似性系数采用如下公式计算^[10]: Jaccard 相似性系数 $S_j = a/(a+b+c)$ (a 为 2 个种共有的带数, b 为 B 种有 C 种无的带数, c 为 C 种有 B 种无的带数);遗传距离采用下列公式计算^[11]: $D =$

$1-F, F = 2a/(2a+b+c)$ (D 为遗传距离, F 为 Czekanowski 相似性系数,其它各字母代表内容与上式相同)。采用 Phylip3.6 软件,选用 UPGMA 法对所求得的相似性系数和距离系数矩阵进行聚类分析,构建树系图。

2 结果

2.1 随机引物的筛选

对 120 条 10 个核苷酸长的随机引物(Operon 公司产品)进行筛选。仅选用能得到清晰扩增带,对照无假带或假带弱,加总 DNA 后这些假带消失的引物,共筛选出 17 条(表 2)进行正式扩增。

2.2 扩增结果

用 17 条引物对 5 个分类群的总 DNA 进行扩增,共得到 432 条可区分的 DNA 带,检测位点 160 个,其中多态位点 134 个,占 83.75%。最多的在引物 OPD-11 共获得 43 条带,最少的在引物 OPD-02 共获得 15 条带,17 个引物在每个样品中扩增的片段总数平均为 86 条,其中引物 OPA-11 和 OPD-20 的扩增结果见图 1。

表 2 用于本研究的引物及其序列

Table 2 The primers used in this study and their sequences

| 引物 Name of primer | 序列(5'~3') Sequence(5'~3') | 引物 Name of primer | 序列(5'~3') Sequence(5'~3') | 引物 Name of primer | 序列(5'~3') Sequence(5'~3') |
|----------------------|------------------------------|----------------------|------------------------------|----------------------|------------------------------|
| OPA-01 | CAGGCCCTTC | OPD-11 | AGCGCCATTG | OPI-20 | AAAGTGCGGG |
| OPD-05 | TGAGCGGACA | OPD-16 | AGGGCGTAAG | OPC-08 | TGGACCGGTG |
| OPC-11 | AAAGCTGCGG | OPG-11 | TGCCCGTCGT | OPD-02 | GGACCCAACC |
| OPA-11 | CAATCGCCGT | OPD-03 | GTCGCCGTCA | OPC-04 | CCGCATCTAC |
| OPA-15 | TTCCGAACCC | OPD-18 | GAGAGCCAAC | OPD-20 | ACCCGGTCAC |
| OPG-05 | CTGAGACGGA | OPI-16 | TCTCCGCCCT | | |

2.3 RAPD 数据分析结果

Jaccard 相似性系数以及遗传距离系数计算结果列于表 3,其中 Jaccard 相似性系数值变动范围在 0.313 0~0.605 3 之间,平均为 0.447 5±0.080 6;而遗传距离系数位于 0.245 9~0.493 5 之间,平均为 0.382 5±0.071 2。用 UPGMA 法对所求得的相似性系数和距离系数进行聚类分析,得到 2 个相似的树状分枝图(图 2)。

3 讨论

由表 3 可知,各个居群间的 Jaccard 相似性系数

平均为 0.447 5±0.080 6,遗传距离平均为 0.382 5±0.071 2。Buren 等^[6]用 RAPD 方法研究 *Ranunculus acrifomis* var. *aestivalis* 与几个同属近缘种的关系,种间的最大 Jaccard 相似性系数为 0.473,变种间最小的 Jaccard 相似性系数为 0.520。Kazan 等^[12]用 RAPD 标记研究几个 *Stylosanthes* 种的遗传变异,种间最小的遗传距离为 0.290。上述 4 种尾矿下的狗牙根居群彼此间及其与正常环境条件下居群间的 Jaccard 相似性系数为 0.360 7~0.508 6,均小于 0.520;遗传距离系数为 0.325 7~0.469 9,均大于 0.290。若参考以上报道,表明 4 种尾矿环境条件下的狗牙根种群在遗传上已经产生了明显的

分化,其彼此之间以及与正常生境下的狗牙根之间的差异基本达到了变种的水平。因而可以将上述四种尾矿下的狗牙根划分为 4 种不同的生态型,即锰

矿型、铜矿型、铅锌矿型和铀矿型,至于是否将他们处理为 4 个不同变种,还需要进行进一步的系统学研究。

表 3 居群间的 Jaccard 相似性系数及 1-F 距离系数

Table 3 Jaccard's similarity coefficient and distance coefficient (1-F) between any two samples

| 系数 Coefficient | 样品 Sample | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|-----------------------------------|-----------|---------|---------|---------|---------|---------|
| Jaccard 相似性系数 | 1 | 1.00 0 | — | — | — | — |
| Jaccard's similarity coefficients | 2 | 0.453 7 | 1.000 0 | — | — | — |
| | 3 | 0.360 7 | 0.508 6 | 1.000 0 | — | — |
| | 4 | 0.427 4 | 0.500 0 | 0.455 2 | 1.000 0 | — |
| | 5 | 0.313 0 | 0.429 8 | 0.421 5 | 0.605 3 | 1.000 0 |
| 1 - F 距离系数 | 1 | 0.000 0 | — | — | — | — |
| Distance coefficient(1 - F) | 2 | 0.375 8 | 0.000 0 | — | — | — |
| | 3 | 0.469 9 | 0.325 7 | 0.000 0 | — | — |
| | 4 | 0.401 1 | 0.333 3 | 0.374 4 | 0.000 0 | — |
| | 5 | 0.493 5 | 0.398 8 | 0.407 0 | 0.245 9 | 0.000 0 |

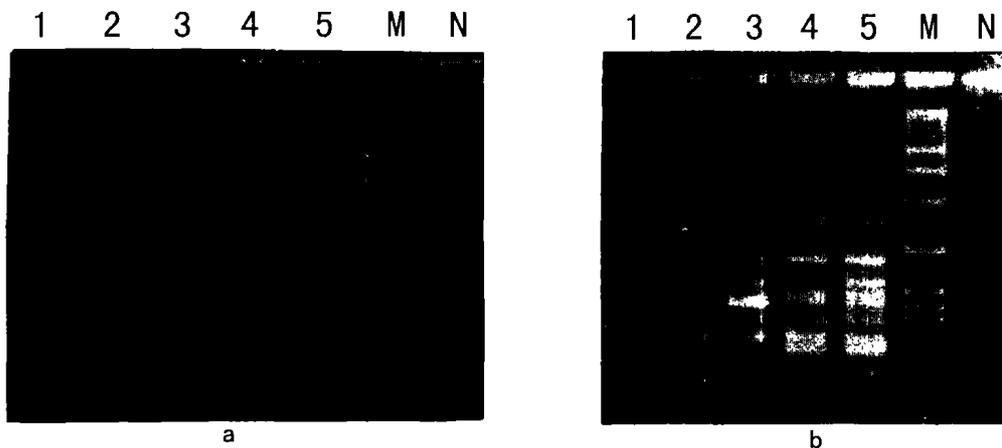


图 1 由随机引物扩增产生的 DNA 带型

Fig. 1 RAPD profiles generated by primer OPA-11(a) and OPD-20(b) respectively

图上面的数字代表的类群见表 1; N:空白对照; M:1 kb ladder DNA Marker; a:引物 OPA-11 扩增产生的 DNA 带; b:引物 OPD-20 扩增产生的 DNA 带.

The number on top refers to the taxa listed in Table 1. N:no DNA template; M:1 kb ladder DNA Marker.

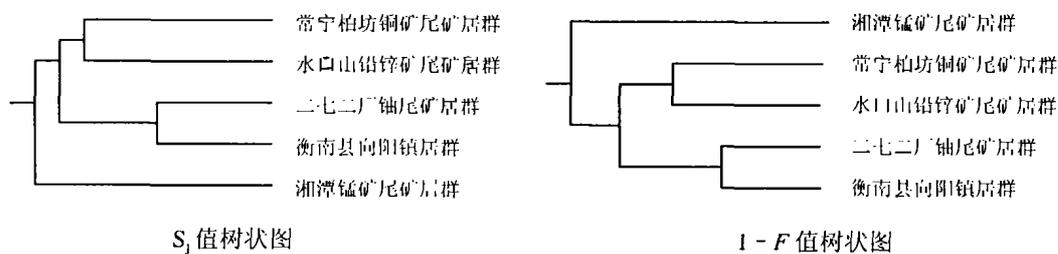


图 2 用 Jaccard 相似性系数(S_j)及遗传距离系数(1 - F 值)经 UPGMA 法聚类分析产生的树状图简化图
Fig. 2 Dendrogram generated by using Jaccard's coefficient of similarity(left)and 1 - F values (UPGMA)

由表 3 和图 2 还可知,生长在锰尾矿下的狗牙根变异最为明显,与其它居群间的 Jaccard 相似性

系数为 0.3887 ± 0.0638 , 遗传距离为 0.4351 ± 0.0556 ; 铜尾矿和铅锌尾矿下的居群稍为接近, Jaccard 相似性系数为 0.5086 , 遗传距离为 0.3257 ; 铀尾矿下的居群与正常环境条件下的居群较为接近, Jaccard 相似性系数 0.6053 , 遗传距离为 0.2459 。由此表明不同类型尾矿的生境条件相差甚远, 不同的金属离子对植物生长的影响也不相同, 锰离子、铜离子和锌离子因为与代谢作用有关而对植物的生长产生较强的影响, 特别锰离子对一些主要代谢过程以及某些酶的活性会产生直接影响, 因而锰尾矿可能对生长在其上的植物有更强的趋异作用。通常, 铀离子并不为植物代谢所必须, 当植物生长在其辐射作用并不强的铀尾矿地时, 其变异程度会相对较低。汪小全等^[13]用 RAPD 分析研究银杉遗传多样性所得亚居群间的遗传距离仅为 0.1623 , 苏应娟等^[14]用 RAPD 方法研究陆均松及罗汉松不同居群所得平均遗传距离分别为 0.1061 和 0.0693 。由此表明, 由不同金属尾矿所造成的生境的差异程度比由于不同纬度和气候条件所造成的生境差异要大得多, 并且来得更快。对生长于其上的植物有相当强的胁迫作用, 除了营养缺乏和水分不足以外, 特别是高浓度的金属离子所产生的毒害作用使得大多数植物不能在其生长。

狗牙根作为全球广布种, 本身种内变异非常丰富^[15], 即使在正常生境条件下, 随着纬度和气候条件的不同也会在形态显现出一定差异。美国 Harlan J. R. 等根据狗牙根外部形态、地下茎生长习性和体细胞染色体数目, 将其分为 6 个变种^[16], Rochecouste 根据叶毛的排列方式及其类型, 将毛里求斯的狗牙根分为 4 个生物型, Ramakrishnan 根据狗牙根对土壤 Ca^{2+} 的反应, 划分为 3 个生态型, 即喜钙型、中间型和厌钙型^[17]。尾矿环境下的狗牙根作为其种群中的一个特殊类群, 单从形态上并不能发现有何特别之处, 但 RAPD 分析结果表明其内在分化程度出人意料。Gustavo^[18]曾用 DAF 和 ASAP 的方法研究两种狗牙根栽培品种“Tifgreen”和“Tifdwarf”, 发现它们在遗传上具有不稳定性, 不同居群间也有一定的基因型上的差异, 并认为这种差异可能是突变的结果。

目前世界上已培育出很多不同性状的狗牙根品种(包括杂交品种), 但其适应性普遍不如本地野生种类^[15]。结合本研究的结果, 在尾矿复垦中, 应优先选择当地或相同矿种尾矿下的野生狗牙根作为品

种来源。

参考文献:

- [1] 陈守良, 刘亮, 吴珍兰, 等. 中国植物志(第十卷, 第一分册)[M]. 北京: 科学出版社, 1990. 82—85.
- [2] 陈艳宇. 四川野生狗牙根资源研究初报[J]. 四川畜牧兽医, 2000, 27(增刊): 24—27.
- [3] 阿不来提, 石定燧, 杨光, 等. 新疆野生狗牙根研究初报[J]. 新疆农业大学学报, 1998, 21(2): 124—127.
- [4] 沈健英. 狗牙根的生物学特性及其防治研究[J]. 上海农学院学报, 1995, 13(3): 187—192.
- [5] Brauner S, Crawford D J, Stuessy T F. Ribosomal DNA and RAPD variation in the rare plant family Lactoridaceae [J]. *American Journal of Botany*, 1992, 79: 1436—1439.
- [6] Buren R V, Andersen W R, Harper K T, et al. Evaluation the relationship of autumn buttercup (*Ranunculus acrifolius* var. *Aestivalis*) to some close congeners using random amplified polymorphic DNA [J]. *American Journal of Botany*, 1994, 81(4): 514—519.
- [7] Dawson I K, Chalmers K J, Waugh R, et al. Detection and analysis of genetic variation in *Hordeum spontaneum* population from Israel using RAPD markers [J]. *Molecular Ecology*, 1993, 2: 151—159.
- [8] Williams C E, St Clair D A. Phenetic relationships and levels of variability detected by restriction fragment length polymorphism and random amplified polymorphic DNA analysis of cultivated and wild accessions of *Lycopersicon esculentum* [J]. *Genome*, 1993, 36: 619—630.
- [9] Doyle J J, Doyle J L. A rapid isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue [J]. *Phytochem Bull.*, 1987, 19: 11—15.
- [10] 钟扬, 陈家宽, 黄德世. 数量分类的方法与程序 [M]. 武汉: 武汉大学出版社, 1990. 35—81.
- [11] Nei M. *Molecular evolutionary genetics* [M]. New York: Columbia University Press, 1987.
- [12] Kazan K, Manners J M, Cameron D F. Genetic variation in agronomically important species of *Stylosanthes* determined using random amplified polymorphic DNA markers [J]. *Theor Appl Genet*, 1993, 85: 882—888.

(下转第 47 页 Continue on page 47)

- 61—65.
- [39] Rossetto M, Dixon KW, Meney KA, *et al.* In vitro propagation of Chinese Puzzle(*Caustis dioica* Cyperaceae)-a commercial sedge species from Western Australia[J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1992, **30**(1): 65—67.
- [40] 杨海莲, 孙晓璐, 宋 未. 植物内生细菌的研究[J]. *微生物学通报*, 1998, **25**(4): 224—227.
- [41] Knauss J F, Miller J W. A contaminant, *Erwinia carotovora*, affecting commercial plant tissue cultures[J]. *In Vitro*, 1978, **14**: 754—756.
- [42] Cooke DL, Waites WM, Leifert C. Effects of *Agrobacterium tumefaciens*, *Erwinia carotovora*, *Pseudomonas syringae* and *Xanthomonas campestris* on plant tissue cultures of *Aster*, *Cheiranthus*, *Delphinium*, *Iris* and *Rosa*; disease development in vivo as a result of latent infection in vitro [J]. *Zeitschrift fur Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*, 1992, **99**(5): 469—481.
- [43] Debergh PC, Maene LJ. A scheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture [J]. *Scientia Hort.*, 1981, **14**: 335—345.
- [44] 奚元龄, 颜昌敬. 植物组织培养手册[M]. 农业出版社, 1992. 103.
- [45] 曹孜义, 刘国民. 实用植物组织培养技术教程[M]. 甘肃科学技术出版社, 1996. 42—43.
- [46] Karam NS, Al-Majathoub M. In vitro shoot regeneration from mature tissue of wild *Cyclamen persicum* Mill[J]. *Scientia Hort.*, 2000, **86**: 323—333.
- [47] Reuveni O, Shlesinger D R, Lavi U. In vitro propagation of dioecious *Carica papaya* L. [J]. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 1990, **20**: 41—46.
- [48] 肖显华, 王顺珍, 林荣双. 植物材料表面消毒方法的改进[J]. *生物技术*, 1999, **9**(1): 43—45.
- [49] 周 鹏, 郑学勤, 陈向明. 成龄番木瓜的快繁技术[J]. *热带作物学报*, 1995, **16**(2): 66—69.
- [50] 周俊辉, 李宏彬, 杨耀强, 等. 植物组织培养中污染的鉴定与防止初步研究[J]. *微生物学杂志*, 2002, **22**(2): 53—55.
- [51] Chevreau E, Skirvin, RM, Abu Qaoud, *et al.* Adventitious shoot regeneration from leaf tissue of three pear (*Pyrus* sp.) cultivars in vitro[J]. *Plant Cell Reports*, 1989, **7**(8): 688—691.
- [52] Dodds JH, Roberts LW. Some inhibitory effects of gentamicin on plant tissue cultures[J]. *In Vitro*, 1981, **17**: 467—470. [53] Leifert C, Camotta H, Waites WM. Effect of combinations of antibiotics on micropropagated *Clemmatis*, *Delphinium*, *Hosta*, *Iris* and *Photinia* [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1992, **29**(2): 153—160.

(上接第 40 页 Continue from page 40)

- [13] 汪小全, 邹喻莘, 张大明, 等. 银杉遗传多样性的 RAPD 分析[J]. *中国科学(C 辑)*, 1996, **26**(5): 436—441.
- [14] 苏应娟, 王 艇, 黄 超, 等. 陆均松不同居群的 RAPD 分析[J]. *中山大学学报(自)*, 1999, **38**(1): 98—101.
- [15] 刘玲珑, 吴彦奇. 狗牙根种质资源及抗寒性研究进展[J]. *中国草地*, 2000, **6**: 45—50.
- [16] Jack R Harlan, J M J de Wet. Sources of variation in *Cynodon dactylon*[J]. *Crop Sci.*, 1969, **9**: 774—778.
- [17] 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.
- [18] Gustavo Caetano-Anolles. Genetic instability of bermudagrass(*Cynodon*)cultivars'Tifgreen' and'Tifdwarf' detected by DAF and ASAP analysis of accessions and off-types [J]. *Euphytica*, 1998, **101**: 165—173.