

DOI: 10.3969/j.issn.1000-3142.2014.06.002

凌瑶,杨树萍,张新全,等. 西南地区野生狗牙根种质资源的 SSR 与 AFLP 联合分析[J]. 广西植物,2014,34(6):734-741

Ling Y, Yang SQ, Zhang XQ, et al. Joint analysis of SSR and AFLP on wild *Cynodon dactylon* germplasm of southwest China[J]. Guihaia, 2014, 34(6): 734-741

西南地区野生狗牙根种质资源的 SSR 与 AFLP 联合分析

凌瑶¹, 杨树萍³, 张新全^{2*}, 陈仕勇²

(1. 四川农业大学 新农村发展研究院, 四川 雅安 625014; 2. 四川农业大学 草业科学系, 四川 雅安 625014; 3. 甘孜州农产品质量安全中心, 四川 康定 626000)

摘要: 为了制定科学的资源保护策略、促进其开发利用以及新品种的选育,对西南地区 55 份野生狗牙根材料,联合采用 SSR 和 AFLP 方法分析其遗传多样性。通过进行引物筛选,筛选出有效引物组合 18 对和 11 对; SSR 和 AFLP 扩增总条带 353 和 626 条,多态性条带 267 和 592 条,平均每对引物扩增出多态性条带 19.61 和 53.83 条,多态性位点百分率为 75.10% 和 94.57%。聚类分析表明 $GS=0.806$ 时,可将所有供试材料分成 6 个组群,当 $GS=0.82$ 时,可将第 VI 个组群分成 4 个小组,当 $GS=0.836$ 时,第 VI 组群中第 3 小组的 14 个材料分为 3 个组群基于 Shannon 多样性指数,类群内的遗传变异占总变异的 67.41%,类群间的遗传变异占总变异的 32.59%。基于 Nei 氏无偏估计的遗传一致度的聚类分析表明,各生态地理类群间的遗传分化与其所处的生态地理环境具有一定的相关性。通过两种标记的相关性分析,表明 SSR 和 AFLP 标记之间具有显著的相关性,而且相关性较高,证明供试材料的聚类和其生态地理环境间有一定的相关性;采用 SSR 和 AFLP 两种联合分析,结果会更加合理和有效。

关键词: 狗牙根; 种质资源; SSR 标记; AFLP 标记; 遗传多样性

中图分类号: Q949 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2014)06-0734-08

Joint analysis of SSR and AFLP on wild *Cynodon dactylon* germplasm of southwest China

LING Yao¹, YANG Shu-Ping³, ZHANG Xin-Quan^{2*}, CHEN Shi-Yong²

(1. Institute for New Socialist Countryside Development, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China;

2. Department of Grassland, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China; 3. Center for Agricultural Food Quality and Safety of Tibetan Autonomous Prefecture of Ganzi, Kangding 626000, China)

Abstract: In order to guide the introduction and utilization of germplasm resources, to provide a scientific basis for molecular marker-assisted breeding and to select parents for breeding programs accurately, in the study SSR and AFLP markers were employed to investigate the genetic diversity and relationships of 55 wild accessions of *Cynodon dactylon* of Southwest China. By the screening of primer, 18 pairs of SSR and 11 pairs of AFLP primers were selected and used for the present study. Eighteen primer pairs of SSR and eleven primer pairs of AFLP produced a total of 353 and 626 bands, including 267 and 592 polymorphic bands, averaged 19.61 and 53.83 polymorphic bands per primer pair. The percentages of polymorphic bands in average were 75.10% and 94.57%. By the analysis of the cluster, when the GS was 0.806, the 55 accessions were classified into six major groups, GS was 0.82, the VI of the group was

收稿日期: 2013-12-05 修回日期: 2014-03-28

基金项目: 国家科技支撑计划项目(2011BAD17B03, 2013BAD20B07); 国家现代牧草产业技术体系(CARS-35)。

作者简介: 凌瑶(1978-), 女, 四川雅安人, 博士, 副研究员, 研究方向为草种质资源创新及育种, (E-mail) lingyao23@163.com。

*通讯作者: 张新全, 教授, 博士生导师, 研究方向为牧草及草坪草育种与种质资源, (E-mail) zhangxq@sicau.edu.cn。

divided into four groups, GS was 0.836, group 14 material in Part VI of the group was divided into three groups. Genetic differentiation between or within six eco-geographical groups of *C. dactylon* was estimated by Shannon's diversity index, and the results showed that 67.41% genetic variance existed within group, and 32.59% genetic variance was among groups; Based on Nei's unbiased measures of genetic identity, UPGMA cluster analysis of six eco-geographical groups of *C. dactylon* indicated that there was a correlation between genetic differentiation and eco-geographical habits among the groups. Further indicated that using the both markers to analysis of the genetic diversity of *C. dactylon* was more reasonable and effective.

Key words: *Cynodon dactylon*; germplasm resource; SSR marker; AFLP marker; genetic diversity

狗牙根(*Cynodon dactylon*)又名行仪芝、绊根草、铁线草、百慕大草,植株低矮,繁殖力强,抗旱,耐践踏,质地较细,色泽好,是全球暖季型草坪草中坪用价值最高、应用最广泛的草种之一(Gatschet *et al.*, 1994; Taijaferro, 1995)。主要生长于温暖湿润的热带及亚热带地区。在我国主要分布于黄河以南各省,以及新疆、西藏等西北高原地区(陈静波等, 2012),甚至海拔 4 000 m 的喜马拉雅山也有分布。由于分布范围广,生境类型丰富,野生狗牙根具有丰富的遗传多样性。如何利用野生狗牙根丰富的遗传多样性来进行物种保护和改良,选育出较为优良的品种,必须在收集野生狗牙根种质资源的同时,采用分子方法获取有用信息,为遗传图谱构建、基因定位、遗传多样性分析、种质鉴定、DNA 指纹图谱构建以及标记辅助选择等提供科学数据。

SSR(simple sequence repeat 简单重复序列),又称微卫星(microsatellite),是一种基于 DNA 长度多态性的分子标记技术,广泛分布于真核生物基因组的编码区和非编码区。目前已被广泛应用于遗传图谱构建、基因定位、遗传多样性分析、种质鉴定、DNA 指纹图谱构建以及标记辅助选择等方面(李丹婷等, 2012)。新疆、甘肃等地通过野生狗牙根遗传多样性的研究,繁育出了适合于当地地理气候条件的狗牙根新品系。西南各省区复杂的气候生境条件蕴藏着丰富的狗牙根资源,但对西南各省区大量有代表性的野生狗牙根种质做遗传多样性研究较少,严重影响了适合西南区狗牙根新品系的繁育。本研究利用 AFLP 和 SRAP 分子标记技术,探讨供试材料间的遗传差异,为了更有效地利用西南区野生狗牙根优良基因,开展新品系的选育具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试材料为四川农业大学草业科学系收集的

55 份野生狗牙根资源。采集的材料栽种于四川农业大学农场资源圃,采集地见图 1 和表 1。

1.2 基因组 DNA 提取

采用改进的 CTAB 法提取试验材料的基因组 DNA,用 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量。通过测定紫外光吸收值来测定 DNA 浓度和纯度,利用 0.8% 琼脂糖电泳检查 DNA 完整性。−20 °C 储存,供 SSR 和 AFLP 扩增使用。

1.3 SSR 与 AFLP 分析

1.3.1 AFLP 和 SRAP 引物筛选 分别从 200 对和 300 对引物组合中筛选出符合标记条件的 18 对(表 2)和 11 对(表 3)SSR 和 AFLP 引物。

1.3.2 AFLP 和 SRAP 分析 SSR 分析的扩增方法参照凌瑶等(2012),改良后应用。AFLP 分析:采用双酶切技术对总 DNA 进行酶切。*Eco*RI 和 *Mse*I 酶切样品 DNA 后,与特定接头连接,通过 *Eco*RI 和 *Mse*I 预扩引物进行预扩增后选扩。具体见齐晓芳等(2010)改良后的方法。

1.3.3 PAGE 检测 6% 聚丙烯酰胺变性凝胶电泳分离选择性扩增产物,银染显色,参照许绍斌等(2002)的方法。

1.4 数据统计

只选清晰可辨的电泳条带,以 1 和 0 分别记录条带的有无。在相同片段位置上有带记为 1,无带记为 0。联合两矩阵,采用 NTSYSpc 2.10 软件分析,得到种质联合鉴别聚类图和主坐标图,进行一致性分析。据 Nei *et al.*(1979)和 Nei(1972)相似系数法分别计算各个种间的遗传相似性系数(genetic similarity, GS)和遗传距离(genetic distance, GD, $GD = 1 - GS$),聚类用不加权组平均法(un-weighted pair-group method using an arithmetic average, UPGMA)(Wachira *et al.*, 1995)进行。用 NTSYSpc(Persson *et al.*, 2001)软件按照 Nei-Li 进行并作图对两种标记所得到的遗传相似性系数矩阵进行 Mantel 检测。各种质及其生态地理类群间的遗传

表 1 供试材料

Table 1 Wild *Cynodon dactylon* accessions used in this study

编号 Accession number	采集地 Origin	生境 Habitat	海拔 Altitude (m)	编号 Accession number	采集地 Origin	生境 Habitat	海拔 Altitude (m)
1	四川, 汶川 Wenchuan, Sichuan	路边 Roadside	1 210	29	四川, 宜宾 Yibin, Sichuan	荒地 Wasteland	260
2	四川, 茂县 Maoxian, Sichuan	荒地 Wasteland	1 480	30	四川, 宜宾 Yibin, Sichuan	江边 Riverside	250
3	四川, 茂县 Maoxian, Sichuan	荒地 Wasteland	1 460	31	四川, 宜宾 Yibin, Sichuan	江边 Riverside	250
4	四川, 汶川 Wenchuan, Sichuan	路边 Roadside	1 310	32	重庆, 梁平 Liangping, Chongqing	河边 Riverside	400
5	四川, 金川 Jinchuan, Sichuan	路边 Roadside	2 150	33	重庆, 梁平 Liangping, Chongqing	路边 Roadside	380
6	四川, 金川 Jinchuan, Sichuan	路边 Roadside	1 310	34	重庆, 长寿 Changshou, Chongqing	林地 Woodland	305
7	四川, 雷波 Leibo, Sichuan	河滩 Flood land	1 200	35	重庆, 长寿 Changshou, Chongqing	河滩 Flood land	140
8	四川, 会东 Huidong, Sichuan	路边 Roadside	—	36	重庆, 合川 Hechuan, Sichuan	河滩 Flood land	130
9	四川, 宁南 Ningnan, Sichuan	路边 Roadside	—	37	重庆, 嘉陵 Jialing, Chongqing	林地 Woodland	230
10	四川, 西昌 Xichang, Sichuan	河滩 Flood land	1 380	38	重庆, 万州 Wanzhou, Chongqing	码头 Shipline	150
11	四川, 西昌 Xichang, Sichuan	河滩 Flood land	1 380	39	重庆, 万州 Wanzhou, Chongqing	路边 Roadside	490
12	四川, 冕宁 Mianning, Sichuan	田埂 Field ridge	1 774	40	重庆, 云阳 Yunyang, Chongqing	河滩 Flood land	160
13	四川, 越西 Yuexi, Sichuan	路边 Roadside	—	41	贵州, 荔波 Libo, Guizhou	河滩 Flood land	370
14	四川, 攀枝花 Panzhihua, Sichuan	路边 Roadside	1 100	42	贵州, 荔波 Libo, Guizhou	河滩 Flood land	360
15	四川, 攀枝花 Panzhihua, Sichuan	林地 Woodland	1 120	43	贵州, 独山 Dushan, Guizhou	路边 Roadside	950
16	四川, 攀枝花 Panzhihua, Sichuan	草地 Grassland	1 200	44	贵州, 独山 Dushan, Guizhou	田埂 Field ridge	970
17	四川, 米易 Miyi, Sichuan	山坡 Hillside	1 620	45	贵州, 独山 Dushan, Guizhou	路边 Roadside	810
18	四川, 盐边 Yanbian, Sichuan	田埂 Field ridge	1 150	46	贵州, 独山 Dushan, Guizhou	路边 Roadside	890
19	四川, 雅安 Ya'an, Sichuan	草地 Grassland	600	47	西藏, 八一 Bayi, Tibet	花园 Garden	3 080
20	四川, 宝兴 Baoxing, Sichuan	山坡 Hillside	1 010	48	西藏, 察隅 Chayu, Tibet	路边 Roadside	2 550
21	四川, 紫经 Yingjing, Sichuan	路边 Roadside	720	49	西藏, 察隅 Chayu, Tibet	路边 Roadside	2 460
22	四川, 天全 Tianquan, Sichuan	河边 Riverside	740	50	西藏, 察隅 Chayu, Tibet	路边 Roadside	2 030
23	四川, 芦山 Lushan, Sichuan	山坡 Hillside	630	51	西藏, 察隅 Chayu, Tibet	路边 Roadside	1 750
24	四川, 芦山 Lushan, Sichuan	河边 Riverside	685	52	云南小哨溪 Xiaoshao, Yunnan	沟边 Groove	1 900
25	四川, 宜宾 Yibin, Sichuan	河滩 Flood land	240	53	云南小哨 Xiaoshao, Yunnan	路边 Roadside	1 910
26	四川, 宜宾 Yibin, Sichuan	江边 Riverside	255	54	云南, 昆明 Kunming, Yunnan	路边 Roadside	1 720
27	四川, 宜宾 Yibin, Sichuan	河滩 Flood land	245	55	云南巧家 Qiaojia, Yunnan	路边 Roadside	841
28	四川, 宜宾 Yibin, Sichuan	路边 Roadside	340				

表 2 SSR 引物序列

Table 2 Sequences of SSR primers

引物组合 Primer combination	上游碱基序列/下游碱基序列 (5'-3') Forward/reverse of sequence (5'-3')	引物组合 Primer combination	上游碱基序列/下游碱基序列 (5'-3') Forward/reverse of sequence (5'-3')
SG26	TGGCGGACATCCTATT GGAGAGCCCGTCACTT	SG25	CCTCCTTTTCTCCTCCTCCC TCAGAATCCTAGCCACCGTTG
W6	GTCCAGCTCTCGGATCTTGG TGCATCCAAACAAGCCATGC	R45	ATCGTTGCCTCGTAACAACC ACCTGCAACTGCCAGAAGAG
M31	GAAGTCGCTGATGAGAACGTAACC GCTAGCTAGTGTGAGTTCTTCCGC	R38	GTCATCTACCACACCCAGCC CTTGGTCCAACCCGAACCTTA
S1	TCACCAGACCACCAGCTTC GAGAACGGGCCAAGGTACT	S11	GAGGGCGTACAGGAAGAACA CCGAGAAGGACTTGGTGAAG
M26	CTGTCGTAAGAGCGCCAACAG GTCTGAACGATGAACAGTACACGC	SG29	AATGAGGAAAATATGAAACAAGTACCAA AATAACAAGCGCAACTATATGAACAATAAA
SG3	CCAACCGAGTCGCTGATG GTGGACTCTGTGGGGCACTG	W17	GTGGCAGGCAGGCAAGCAAG TGACGAGCTCATCGTCGTAG
SG22	TGGGCAGGGTATCTAACTGA GCC TTTTCTGAGCCTTGA	S5	GTGGACGATGGATGGATCA ATCACCCTGCCTCTCACAA
M22	GAGAGGTCGTCGTCGCTACTG GAGACCAGATTCTTGAACGGTAA	R2	AAGTCCGTCGACAGGATGAG GCT GCTCTTCTTGTGGCTA
SG20	TGTATGGCCTAGCTTATCT CAACAAGCCAACCTAAA	M48	TGGACGATCTGCTTCTTCAGG GAAGGCTTCTCTCGAGTAGGTC

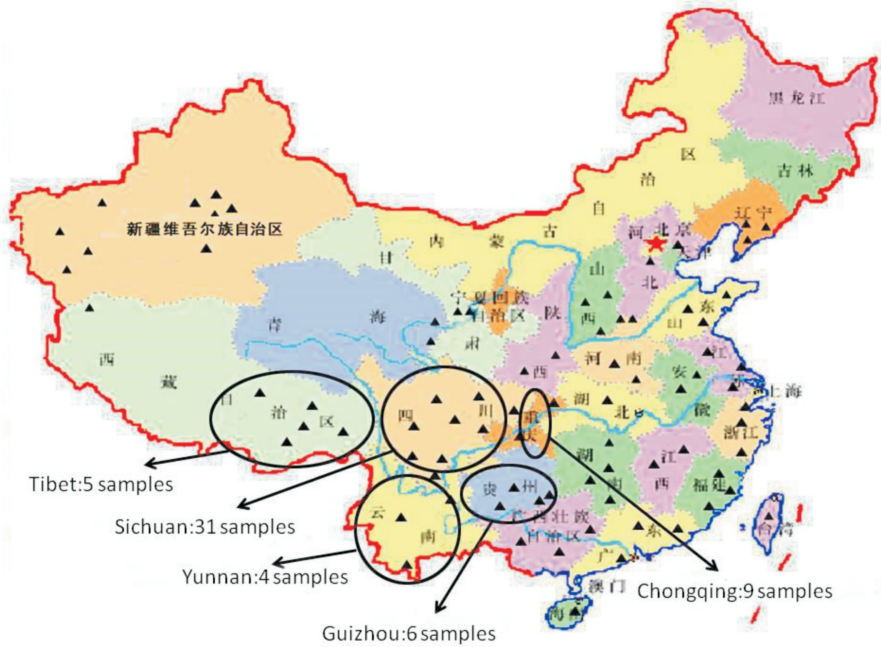


图 1 供试 55 个野生狗牙根材料采样地分布图

Fig. 1 Geographical map showing the location of 55 samples of wild *Cynodon dactylon*

表 3 AFLP 引物序列

Table 3 Sequences of AFLP primers

<i>Eco</i> RI	碱基序列 (5'-3') Sequense (5'-3')	<i>Mse</i> I	碱基序列 (5'-3') Sequense (5'-3')
E-AAC	GACTGCGTACCAATTCAAC	M-CTC	GATGAGTCCTGAGTAACTC
E-ACA	GACTGCGTACCAATTACACA	M-CTG	GATGAGTCCTGAGTAACTG
E-ACT	GACTGCGTACCAATTCACACT	M-CAC	GATGAGTCCTGAGTAAACAC
E-ACT	GACTGCGTACCAATTCACACT	M-CTA	GATGAGTCCTGAGTAACTA
E-ACC	GACTGCGTACCAATTCACC	M-CAT	GATGAGTCCTGAGTAAACAT
E-ACG	GACTGCGTACCAATTCACG	M-CTA	GATGAGTCCTGAGTAACTA
E-ACG	GACTGCGTACCAATTCACG	M-CTG	GATGAGTCCTGAGTAACTG
E-ACG	GACTGCGTACCAATTCACG	M-CTT	GATGAGTCCTGAGTAACTT
E-AGC	GACTGCGTACCAATTCAGC	M-CTG	GATGAGTCCTGAGTAACTG
E-ACG	GACTGCGTACCAATTCACG	M-CAC	GATGAGTCCTGAGTAAACAC
E-ACA	GACTGCGTACCAATTACACA	M-CTT	GATGAGTCCTGAGTAACTT

多样性,根据 Nei 氏基因多样性指数来估计(车永和等,2004)。

2 结果与分析

2.1 SSR 和 AFLP 分析

SSR 和 AFLP 扩增总条带分别为 353 和 626 条,多态性条带分别为 267 和 592 条,平均每对引物扩增出的多态性条带分别为 19.61 和 53.83 条,PPB 为 75.10%和 94.57%。引物等位位点多态性信息含量 PIC 变幅为 0.1668~0.4565,平均值为 0.3307。SG26 的多态性信息含量最高为 0.4565,W17 的

PIC 最低为 0.1668。AFLP 扩增的 DNA 片段集中在 100~500 bp,引物等位位点多态性信息含量 PIC 变幅为 0.305 3~0.672 5,平均值为 0.448 3。E-AGC-M-CTG 的多态性信息含量最高为 0.672 5,E-ACG-M-CTG 的 PIC 最低为 0.305 3(表 4)。

2.2 55 份野生狗牙根资源的 UPGMA 聚类结果

合并两个标记,采用非加权类平均法(UPGMA)聚类分析。聚类分析图显示(图 6),相似系数 GS=0.806 时,可将所有供试材料分为 6 个组群。

第 I 组群为云南组群(4 个材料);29 号为四川宜宾的材料,其形态学优势明显,构成 II 类;第 III 组群为西藏组群(5 个材料);第 IV 组群为攀西地区

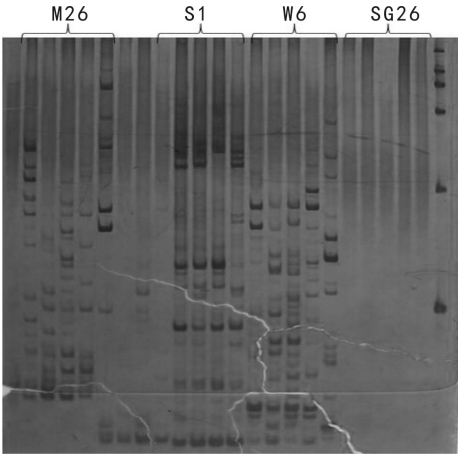


图 2 部分 SSR 引物的筛选
Fig. 2 Amplification results of different SSR primers

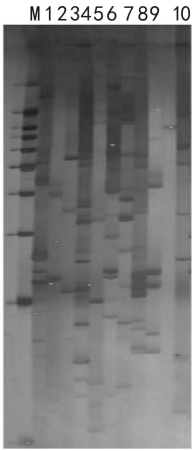


图 3 E-ACT-M-CTA 引物的 AFLP 筛选
Fig. 3 Amplification result of E-ACT-M-CTA primers of AFLP

组群(12 个材料)和 1 个阿坝的材料;第 V 组群为贵州组群(6 个材料);第 VI 组群较混杂,包括来自四川阿坝、雅安、宜宾和重庆组群(26 个材料)。

相似系数 $GS=0.82$ 时,第 VI 组群的 26 个材料可分为 4 个小组。雅安的 21 号和 22 号组成第 1 小组;宜宾的 26、27、28、30 号组成第 2 小组;第 3 小组包括 9 个重庆、3 个雅安和 2 个宜宾的材料;5 个阿坝的材料和 1 个宝兴的材料组成第 4 小组。相似系数 $GS=0.836$ 时,第 VI 组群中第 3 小组的 14 个材料分为 3 个分支,来自雅安芦山的 23 号和 24 号聚在一起;9 个重庆的材料聚为一类;而来自宜宾的 2 个材料和 1 个雅安的材料聚在一起。

2.3 遗传差异性分析

用 NTSYS-pc 软件分别计算 SSR 和 AFLP 的

遗传相似性矩阵,并采用 GS 计算方法,获得供试材料相似性矩阵。其 GS 值为 $0.605\sim0.852$,平均遗传距离 GS 等于 0.745 ,其变幅为 0.247 。四川雷波(7 号)和四川会东(8 号)之间的遗传相似系数最小,为 0.2004 。来自西藏的 51 号和云南 53 号相互之间的遗传相似系数最大,为 0.7521 。

2.4 生态地理类群的遗传多样性指数

遗传分化的分析参数,包括遗传距离(GD)、各类群表型多样性(D)、类群的平均表型多样性(H_{group})、物种水平上的表型多样性(H_{sp})、类群内的表型多样性(H_{within})和类群间的表型多样性($H_{between}$)。根据赵汝植(1997)和具体的材料采集生境,将供试材料分为四川阿坝、四川雅安、四川攀西地区、四川宜宾、重庆、云南贵州、西藏(表 5)。各类群的 GD 在 $0.1812\sim0.2216$ 之间,云南贵州的最大,说明云南贵州群体有着丰富的遗传变异。对各生态地理类群而言, $H_{sp}=0.3984$, $H_{group}=0.2686$, $H_{within}=0.6741$, $H_{between}=0.3259$ 。

2.5 两种标记之间的相关性分析

利用 NTSYS-pc 软件分别计算出 SSR 标记和 AFLP 的遗传相似性矩阵并进行相关性检测,结果呈极显著相关,相关系数 $r=0.5462$, $P=0.01$;AFLP 标记和综合数据呈极显著相关,相关性系数 $r=0.8892$, $P=0.01$;SSR 标记和综合数据呈极显著相关,相关性系数 $r=0.9396$, $P=0.01$ 。说明使用这两种分子标记对狗牙根种质材料的遗传多样性分析具有较高的一致性和可信度,而 AFLP 标记更接近于两标记的综合遗传多样性分析,可以推测 AFLP 在狗牙根种质材料的遗传多样性和亲缘关系的分析中可能具有更高的可信度。

3 讨论

本研究利用 SSR 标记和 AFLP 标记获得了 75.10% 和 94.57% 的多态性,说明 SSR 和 AFLP 标记在能有效检测出供试材料的多态性。AFLP 标记的 PPB 高于 SSR 标记的 PPB 19.47 个百分点,表现出了较大优势,充分说明,AFLP 标记比其它分子标记更具有丰富的多态性。这可能与 AFLP 检测基因组的区域涵盖整个基因组,其多态性类型主要是碱基突变、插入、缺失、易位和倒位有关。AFLP 标记没有种属特异性,故能产生较高的多态性(孙小红等,2006)。张燕燕等(2010)利用 SSR、AFLP 和 TRAP

表 4 狗牙根 SRAP 和 SSR 标记的多态性

Table 4 Amplification results from 18 primer combination based on SRAP and SSR markers

SSR 引物对 Primer pair	SSR 扩增 总条带数 Total No. of polymorphic bands	SSR 多态性 条带数 No. of polymorphic bands	SSR 多态 性比率 Percentage of polymorphic bands (%)	SSR 多态性 信息含量 PIC	AFLP 引物对 Primer pair	AFLP 扩增 总条带数 Total No. of polymorphic bands	AFLP 多态性 条带数 No. of polymorphic bands	AFLP 多态 性比率 Percentage of polymorphic bands (%)	AFLP 多态性 信息含量 PIC
SG26	18	16	88.89	0.456 5	E-AAC—M-CTC	41	38	92.68	0.342 4
W6	21	14	66.67	0.351 2	E-ACA—M-CTG	64	58	90.63	0.339 1
M31	25	17	68.00	0.346 4	E-ACT—M-CAC	36	32	88.89	0.316 5
S1	20	12	60.00	0.328 4	E-ACT—M-CTA	47	45	95.74	0.621 2
M26	25	19	76.00	0.383 2	E-ACC—M-CAT	59	59	100.00	0.587 3
SG3	17	14	82.35	0.374 9	E-ACG—M-CTA	65	60	92.31	0.413 8
SG22	26	25	96.15	0.433 9	E-ACG—M-CTG	62	58	93.55	0.305 3
M22	16	12	75.00	0.379 7	E-ACG—M-CTT	62	62	100.00	0.524 6
SG20	16	13	81.25	0.258 5	E-AGC—M-CTG	69	69	100.00	0.672 5
SG25	19	18	94.74	0.412 0	E-ACG—M-CAC	61	55	90.16	0.481 2
R45	14	11	78.57	0.301 6	E-ACA—M-CTT	60	56	93.33	0.327 5
R38	15	12	80.00	0.301 2					
S11	22	15	68.18	0.234 7					
SG29	22	21	95.45	0.356 0					
W17	14	7	50.00	0.166 8					
S5	19	8	42.11	0.302 6					
R2	19	10	52.63	0.278 3					
M48	24	23	95.83	0.285 9					
总和 Total	353	267			总和 Total	626	592		
平均 Average	19.61	14.83	75.1	0.330 7	平均 Average	56.91	53.82	94.57	0.448 3

表 5 狗牙根各生态地理类群的遗传多样性指数

Table 5 Genetic polymorphism indexes of six eco-geographical groups of *Cynodon dactylon*

类群 Group	遗传距离 GD	D	H_0	H_{sp}	H_{group}	H_{within}	$H_{between}$
四川阿坝 A'ba, Sichuan	0.181 2	0.185 6	0.276 4				
四川雅安 Ya'an, sichua	0.192 9	0.192 40	0.289 4				
攀西地区 Panxi region	0.185 7	0.160 9	0.241 6				
四川宜宾 Yibin, sichua	0.182 5	0.182 1	0.269 8				
				0.398 4	0.268 6	0.674 1	0.325 9
重庆 Chongqing	0.182 9	0.162 6	0.248 9				
云南、贵州 Yunnan, Guizhou	0.221 6	0.231 2	0.343 2				
西藏 Tibet	0.217 7	0.141 5	0.211 0				

3 种分子标记对云南勐腊农场发现的 2 株超高产橡胶树云 PR107、云 RRIM501 与正常产量单株 (PR107、RRIM501) 进行遗传分析证实了这点。

本研究采用两种标记合并后在聚类分析,GS=0.806 时,55 份供试材料聚成 6 个组群,来自同一或相似生境的材料聚在一起。西藏类群采自青藏高原,高原气候和土壤条件有其特殊性,聚在一起;此外,云南贵州类群、攀西类群由于独特的生态环境,各自聚类;来自四川宜宾的材料(29 号),因其形态学优势较为明显自成一类,此结果与凌瑶等(2012)在野生狗牙根种质资源 SRAP 与 SSR 的遗传多样

性的研究结果相同。当相似系数 GS=0.82 时,第 VI 组群的 26 个材料可分为 4 个小组,分类结果基本符合地理位置划分。雅安的两个材料 21 号和 22 号组成第 1 小组;宜宾的 26、27、28、30 号组成第 2 小组;在第 3 小组中包括 9 个重庆、3 个雅安和 2 个宜宾的材料。相似系数 GS=0.836 时,第 VI 组群中第 3 小组的 14 个材料分为 3 个类群。来自雅安芦山的 23 号和 24 号材料聚在一起;9 个重庆的材料聚为一类;来自宜宾(2 个)和雅安(1 个)材料聚在混杂在一起,这不符合前人(凌瑶等,2012)聚类结果,却更加符合地理类群的划分。说明两种分子标

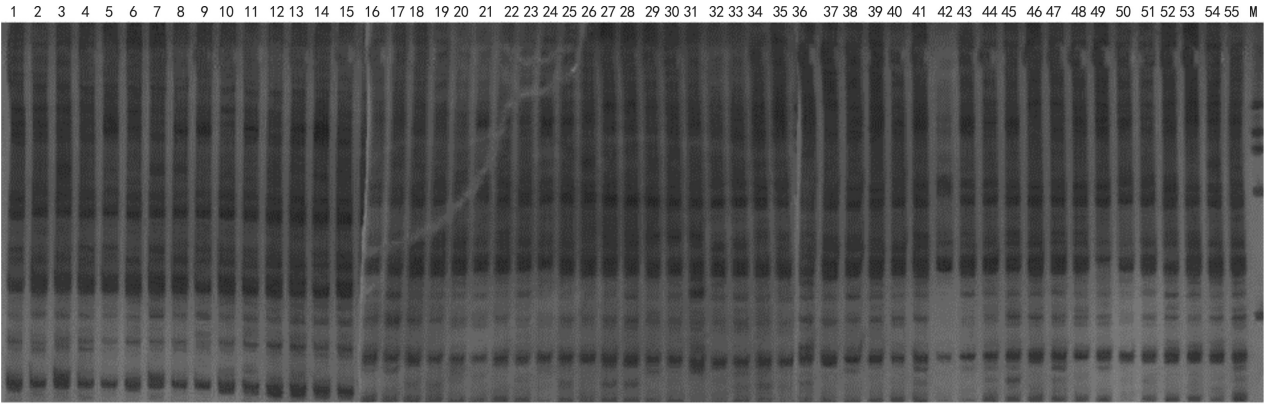


图 4 SSR 引物 W6 对 55 份供试材料扩增图谱 1-55 材料编号同表 1; M: 标准分子量。下同。
Fig. 4 Electrophoretic patterns of 55 *Cynodon dactylon* with SSR primer W6
1-55 are the same as Table 1; M: DNA marker. The same below.

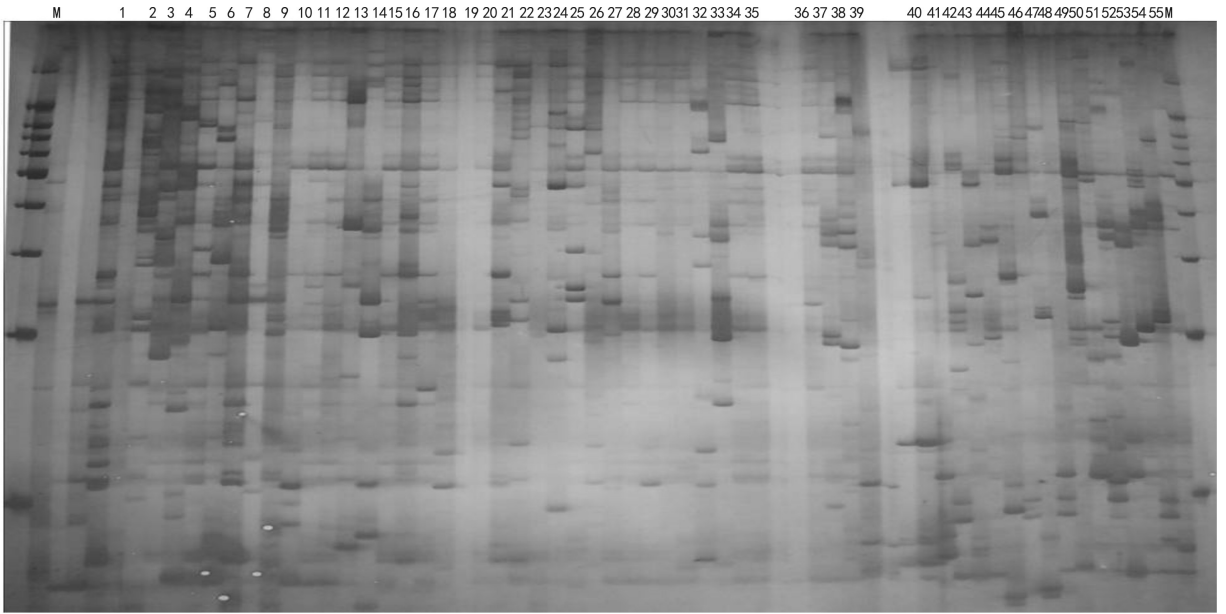


图 5 AFLP 引物 E-ACG-M-CTG 对 55 份供试材料扩增图谱
Fig. 5 Electrophoretic patterns of 55 *C. dactylon* with AFLP primer E-ACG-M-CTG

记结合来研究植物遗传多样性比采用单个分子标记来研究植物遗传多样性,结果更加合理、准确。究其原因,可能是由于西南区地区地形复杂多样,采样地从高山、高原、河边、田埂、路边、河滩等地形地貌,使得西南区地区野生狗牙根资源遗传多样性较明显。

采用 SSR 和 AFLP 标记对生态地理类群的遗传结构分析,来自四川雷波(7 号)和四川会东(8 号)之间的遗传相似系数最小,为 0.200 4。来自西藏的 51 号云南 53 号它们相互之间的遗传相似系数最大,为 0.752 1。这与材料的采样点有关,来自相同地域的材料遗传差异较小,来自生态地理差异性大

的材料遗传差异较大,符合凌瑶等(2012)的研究结果,相隔较远地域,生境差异较大的材料,遗传多样性丰富,供试材料形态学特征差异明显。居群遗传结构决定物种或群体的进化潜力。基于 SSR 和 AFLP 标记使用 Nei 氏遗传多样性、Shannon 多样性指数分析狗牙根居群的遗传结构, H_{sp} (0.398 4)大于 H_{group} (0.268 6), H_{within} (0.674 1)大于 $H_{between}$ (0.325 9),结果表明,在供试材料中的遗传变异在居群间要大于居群内。物种在进化过程中变异程度与物种生存的环境气候条件密切关联。狗牙根在世界范围内广泛分布,各地差异较大的生境

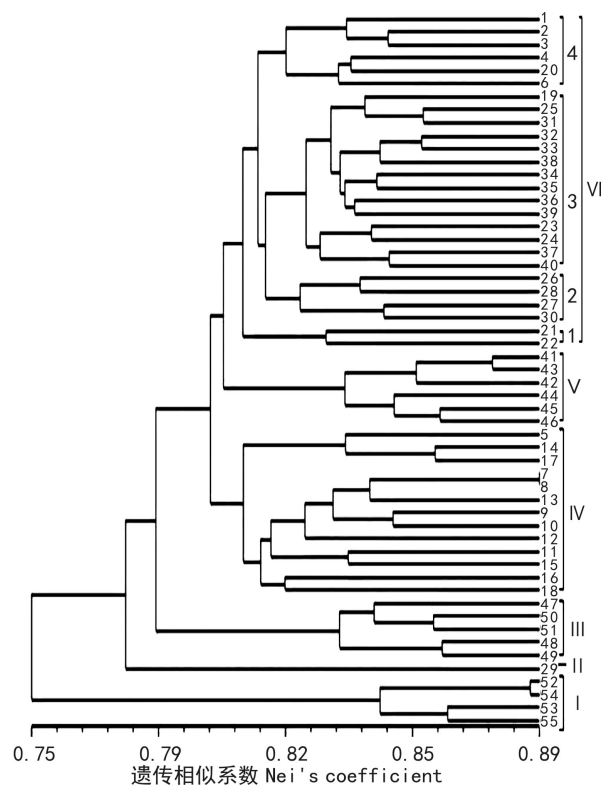


图 6 55 份野生狗牙根亲缘关系及遗传多样性聚类图
Fig. 6 Dendrogram of cluster analysis for 55 *C. dactylon* based on SSR and AFLP markers

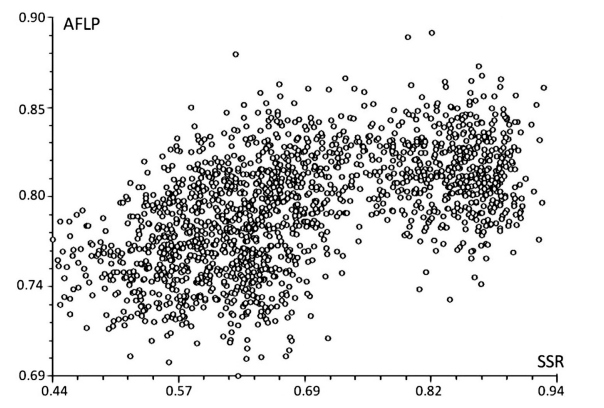


图 7 供试材料 SSR 标记与 AFLP 标记间基于遗传相似系数矩阵的相关性分析
Fig. 7 Scatter plots showing pairwise comparisons between the Nei and Li's coefficients as calculated from SSR and AFLP analyses across the germplasm

造就野生狗牙根有较高的变异水平,而且狗牙根的无性繁殖方式及异花授粉也决定其拥有较高的遗传多样性。这些都促使我们要加快野生种的收集和保护,尽可能的保护其生态和地理环境的多样性。随

着生物技术水平 and 研究手段的深入发展,应用新的生物学技术来保护和改良野生优质的狗牙根种质,为其优良种质基因的挖掘、新品种的选育和保护以及种质创新等方面有重要的意义。

参考文献:

Burton GW. 1965. Breeding better bermudagrass[C]//Process IX: Internation Grassland Congress, Jan. Brazil; Sao Paulo, 93—96

Chen JB(陈静波), Liu JX(刘建秀). 2012. Salinity tolerance evaluation and mechanisms in bermudagrass(*Cynodon spp.*) (狗牙根抗盐性评价及抗盐机理研究进展)[J]. *Acta Pratac Sin*(草业学报), **21**(5): 302—310

Chen SY(陈仕勇), Ma X(马啸), Zhang XQ(张新全), *et al.* 2010. Optimization of AFLP in *Elymus* (Poaceae) (披碱草属物种 AFLP 体系优化)[J]. *J Sichuan Agric Univ*(四川农业大学学报), **28**(4): 467—470

Cai LY(蔡丽艳), Shi FL(石凤翎), Li ZY(李志勇), *et al.* 2011. Establishment and optimization of cDNA-AFLP reaction system for Alfalfa(苜蓿 cDNA-AFLP 反应体系的建立和优化)[J]. *Seed*(种子), **30**(8): 1—4, 8

Che YH(车永和), Li LH(李立会), He BR(何蓓如). Sampling strategy for genetic diversity in *Agropyron gaertn* based on gliadin(冰草属(*Agropyron gaertn*)植物遗传多样性取样策略基于醇溶蛋白的研究)[J]. *J Plant Genet Resour*(植物遗传资源学报), **5**: 216—221

Doyle JJ. 1991. DNA protocols for plants-CTAB total DNA isolation[M]//Hewitt GM, Johnston A. *Molecular Techniques in Taxonomy*. Berlin, Germany: springer-Verlag Press: 283—293

Gatschet MJ, Taliaferro CM, Anderson JA, *et al.* 1994. Cold acclimation and alterations in protein synthesis in bermudagrass erowns[J]. *J Am Soc Hortic Sci*, **119**(3): 477—480

Li DT(李丹婷), Non BX(农保选), Liu KQ(刘开强), *et al.* 2012. Construction of core collection and genetic diversity of landrace rice resources(*Oryza sativa*) in Guangxi(广西地方稻种资源核心种质构建和遗传多样性分析)[J]. *Guihaia*(广西植物), **32**(1): 94—100

Li CQ(李长青), Yu Z(于卓), Ma YH(马艳红), *et al.* 2009. AFLP analysis on new Hybrid Lines between 11A of sorghum and 3 kinds of Sudangrass(高粱 11A 与 3 种苏丹草杂交新品种的 AFLP 分析)[J]. *Chin J Grassl*(中国草地学报), **2**(31): 34—40

Ling Y(凌瑶), Zhang XQ(张新全), Chen SY(陈仕勇), *et al.* 2012. Genetic diversity of *Cynodon Dactylon* germplasm by SRAP and SSR markers(野生狗牙根种质资源 SRAP 与 SSR 的遗传多样性)[J]. *Sci Agric Sin*(中国农业科学), **45**(10): 2 040—2 051

Nei M, Li WH. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases[J]. *Proc Nat Acad Sci USA*, **76**(10): 5 269—5 273

Nei M. 1972. Genetic distance between populations[J]. *Am Nat*, **106**: 283—292

Persson K, Diaz O, von Bothmer R. 2001. Extent and patterns of RAPD variation in landraces and cultivars of rye(*Secale cereale* L.) from Northern Europe[J]. *Hereditas*, **134**: 237—243

(下转第 815 页 Continue on page 815)