

用 RAPD 分析多年生黑麦草品种间遗传多样性

宁婷婷¹, 张再君¹, 金诚赞², 朱英国^{1*}

(1. 武汉大学生命科学学院, 植物发育生物学教育部重点实验室, 武汉 430072; 2. 朝鲜国家科学院生物分院植物研究所, 平壤)

摘要: 多年生黑麦草是世界上应用最广泛的冷季型草坪草兼牧草之一, 具有建植快速, 分蘖能力强, 适口性良好等特点。为了评价其品种间的遗传多样性, 选取了多年生黑麦草的 14 个草坪型品种和 2 个意大利黑麦草品种用 RAPD 进行遗传多样性分析, 并且对每个品种的几项坪用特性进行了观察。61 个引物共扩增出 408 条带, 多态条带比率(PPB)为 89.95%。聚类分析结果表明, 多年生黑麦草品种之间的遗传多样性较低, 相似系数分布于 44.55%~95.69% 之间。一年生黑麦草的 2 个品种 Top One 和 Avance 没有单独聚成一类, 而是与 14 个多年生黑麦草品种混合聚在一起, 而且 Avance 与其他多年生黑麦草之间的相似系数较高。聚类结果与形态特征没有明确的对应关系。

关键词: 多年生黑麦草; 意大利黑麦草; RAPD; UPGMA; 遗传多样性

中图分类号: Q346+.5

文献标识码: A

文章编号: 1000-470X(2005)01-0027-05

Genetic Polymorphism of Ryegrass Cultivars Detected by RAPDs

NING Ting-Ting¹, ZHANG Zai-Jun¹, JIN Cheng-Zan², ZHU Ying-Guo^{1*}

(1. Key Laboratory of MOE for Plant Development Biology, College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China;

2. Institute of Plant Science, National Academy of Science, Pyongyang, Korea)

Abstract: Perennial ryegrass is clearly one of the most important and widely used forage and turf grasses, exhibiting rapid establishment, good tillering ability and high acceptability to livestock. The genetic relationship of 16 ryegrass cultivars, including 2 accessions annual cultivars and 14 entries perennial cultivars, from different breeding company were analyzed using 61 RAPD markers, the morphological characters were also observed. 61 RAPD primers generated 408 bands, of which 367 bands (89.95%) were polymorphism; It showed that the genetic polymorphism in these cultivars was low, the coefficient among the cultivars fell between 44.55%~95.69%. Dendrogram obtained using these molecular markers is not in agreement with their separated morphologic character. High correlation was not observed between the two annual ryegrass cultivars.

Key words: Perennial ryegrass; Annual ryegrass; RAPD; UPGMA; Genetic diversity

多年生黑麦草(*Lolium perenne* L.)原产于西南欧、北非及亚洲西南, 1677 年英国作为牧草而首先进行人工栽培, 目前已在欧洲、南美、北美洲, 新西兰、澳大利亚沿海和高地广泛栽培利用, 因其建植快速、分蘖能力强, 以及极好的适口性而成为世界上最重要的牧草之一, 后来又因为其极耐践踏、持久性强、外观美丽而被作为一种草坪草在全世界温带地区受到欢迎^[1]。1961 年问世的“NK-100”是世界上第一个草坪型多年生黑麦草品种, 1967 年“Manhattan”和 1970 年“Pennfine”的育成, 标志着草坪型多

年生黑麦草培育和应用进入了一个高峰时期^[2]。现在, 草坪型多年生黑麦草的育种目的多集中在提高抗性、耐低修剪的能力, 以及培育叶色更深, 生长更加缓慢、低矮、整齐的草坪型多年生黑麦草。我国从 20 世纪 80 年代以后开始大量引进草坪型黑麦草, 仅仅十几年的时间已有 100 多个多年生黑麦草的优良草坪草品种在我国园林绿化和草坪生产中得到广泛的应用, 到 2000 年我国约使用草坪型多年生黑麦草 3500 吨, 可见, 多年生黑麦草成为我国最主要的冷季型草坪草之一^[1]。

收稿日期: 2004-05-13, 修回日期: 2004-07-08。

作者简介: 宁婷婷(1981—), 女, 在读硕士研究生, 现从事植物发育遗传研究。

* 通讯作者。

多年生黑麦草是自交不亲和的,在自然状态下很容易与其他种包括意大利黑麦草(*Lolium multiflorum* Lam.)和羊茅属(*Festuca* L.)的植物发生天然杂交,且杂种可育,所以在自然状态下多年生黑麦草有很多变种,这为育种提供了很好地遗传资源,但同时因为这种种群内部的异质性使得品种之间的遗传关系变得很复杂。而且多年生黑麦草商业品种大都是“综合种”,也就是同一个品种的每一粒种子的基因型都有可能不同^[3]。在建植草坪时,为了提高其整体表现和持久性,一般采用几个品种混播,而且要求混播品种之间具有较高的遗传多样性。多年生黑麦草的形态特征较为相似,各部结构器官细微,受环境影响变异较大,通过形态特征进行品种鉴定,以及品种间遗传关系分析不仅费时费力且受主观因素影响较大。

利用表型特征、同工酶,以及各种分子标记技术研究黑麦草遗传多样性已经开展了很多年,不同的方法对于不同水平类群遗传多样性的敏感性是不一样的,有些方法只适合应用于种之间,有些则适合于自然居群内,而有些可以很好地分析品种之间的遗传多样性^[4]。RAPD-PCR (random amplified polymorphic DNA-PCR)即基于 PCR 反应随机扩增的 DNA 多态性分析,是近十几年发展起来的一种分子

标记方法,因为具有多态性高、快速、简便,无需预先了解所研究物种的基因组结构等特点,在很多物种种下水平遗传多样性的检测、种间或属间遗传关系的讨论,以及遗传图谱的构建等方面发挥了重要的作用。

为了评价多年生黑麦草品种之间的遗传多样性,我们选取了目前我国应用较广泛14个多年生黑麦草的草坪型品种,另外选取了与多年生黑麦草亲缘关系很近的意大利黑麦草的2个品种,结合形态学特征对16个品种进行了RAPD分析,以期更好地了解品种之间的遗传关系,对草坪建植起指导作用。

1 材料和方法

1.1 植物材料

多年生黑麦草(*Lolium perenne* L.)的 14 个品种和意大利黑麦草(*L. multiflorum* Lam.)的 2 个品种的种子分别从北京克劳沃种业和百绿集团北京代理处购买。品种名称和育种公司见表 1。每个品种取 200 粒种子种植在 25℃ 恒温的培养室中,长至幼苗期,剪取叶片,放置在一20℃ 冰箱,提取 DNA。另外分别取 200 粒种子于立冬和立夏之日播种在直径 20 cm 的花盆中,定期观察记录各品种的株型、叶色、叶片宽度等,比较各品种在寒冷和炎热条件下的抗性表现。

表 1 品种编号、名称及来源
Table 1 Numbers and origins of cultivars investigated in the present study

编号 No.	品种名称 Cultivars	来源 Origins	种名 Species
L01	APM/APM	美国辛普劳捷克林 U. S. A Simplot jacklin	多年生黑麦草 Perennial ryegrass
L02	凯帝莎 Caddishack	美国辛普劳捷克林 U. S. A Simplot jacklin	多年生黑麦草 Perennial ryegrass
L03	佳丽 2# Calypso 2	美国罗伯特种 U. S. A Robert seed	多年生黑麦草 Perennial ryegrass
L04	匹克威 Pickwick	丹麦丹农 Denmark agriculture company	多年生黑麦草 Perennial ryegrass
L05	冠军 Topone	美国辛普劳捷克林 U. S. A Simplot jacklin	意大利黑麦草 Annual ryegrass
L06	首相 Primer	荷兰百绿 Holland barenbrug	多年生黑麦草 Perennial ryegrass
L07	顶峰 Pinnacle	荷兰百绿 Holland barenbrug	多年生黑麦草 Perennial ryegrass
L08	萨卡尼 Sakini	丹麦丹农 Denmark agriculture company	多年生黑麦草 Perennial ryegrass
L09	托亚 Taya	丹麦丹农 Denmark agriculture company	多年生黑麦草 Perennial ryegrass
L10	百保 Barball	荷兰百绿 Holland barenbrug	多年生黑麦草 Perennial ryegrass
L11	百德萨 Ardesa	荷兰百绿 Holland barenbrug	多年生黑麦草 Perennial ryegrass
L12	百乐 Barrage	荷兰百绿 Holland barenbrug	多年生黑麦草 Perennial ryegrass
L13	百丽 Acredo	荷兰百绿 Holland barenbrug	多年生黑麦草 Perennial ryegrass
L14	百客来 Barclay	荷兰百绿 Holland barenbrug	多年生黑麦草 Perennial ryegrass
L15	旺饲 Avance	丹麦丹农 Denmark agriculture company	意大利黑麦草 Annual ryegrass
L16	卓越 Eminent	丹麦丹农 Denmark agriculture company	多年生黑麦草 Perennial ryegrass

注: L01~L16 为供试样品。
Note: L01-L16 represents the accession number.

1.2 抗性鉴定标准

于室外立冬和立夏播种的 16 个品种,出苗后,在分别经历了连续 1 周以上-10℃ 的冷害胁迫和连续 1 周以上 40℃ 的高温胁迫之后,根据叶片发黄和萎蔫程度判断各品种的耐热性和耐寒性。90% 以上植株叶片维持原有的绿色、没有萎蔫现象出现的鉴定为:耐热/寒;60% 以上植株叶片维持原有的绿色、

没有萎蔫现象出现的鉴定为:耐热/寒性一般;50% 以上植株叶片出现萎蔫发黄的鉴定为:不耐热/寒。

1.3 总 DNA 的提取

采用 CTAB 法提取总 DNA,具体参照葛颂等^[5]的方法。

1.4 RAPD 产物及检测

从 115 个 RAPD 引物中选取了 61 个多态性高、

重复性好的的引物,在 16 个品种之间进行 PCR 扩增,反应体系为:25 μ L 体系 中包括模板 DNA 100 ng、引物100 ng、Taq酶1U、含(NH₄)₂SO₄的10 $\times$ buffer 2.5 μ L [750 mmol/L Tris-HCl (pH8.8), 200 mmol/L (NH₄)₂SO₄, 0.1% Tween 20]、25 mmol/L的MgCl₂ 2.5 μ L。在 PTC-100TMPCR仪上进行如下程序:94 $^{\circ}$ C 5 min;94 $^{\circ}$ C 30 s,37 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 90 s,循环30次;72 $^{\circ}$ C 延伸6 min;反应产物在 2%琼脂糖胶上检测,电压4 V/cm,电泳40 min,用 BIO-RAD Gel Doc 2000凝胶成像系统记录拍照。

1.5 数据分析

同一引物扩增产物中电泳迁移率一致的条带被认为具有同源性。属于同一位点的产物按扩增阳性(1)和扩增阴性(0)记录电泳带谱,形成 RAPD 的表

形数据矩阵用 NTSYS 软件计算相似系数(DICE 系数),并且进行 UPGMA 聚类分析^[5]。

2 试验结果

2.1 形态学观察结果

各品种的形态学特性和抗性观察记录结果见表 2。在观察中发现,多年生黑麦草的 14 个品种之间除了一些坪用品质如叶色、叶宽以及耐寒性和耐热性有或大或小的差别外,在形态上差别很小。但是 2 个意大利黑麦草品种 L05、L15 和其他的多年生黑麦草品种在形态学上可以通过小穗的特征明显区分开来,如意大利黑麦草的外稃光滑、具显著的芒,而多年生黑麦草的外稃无芒;并且意大利黑麦草的小穗含小花数也较多年生黑麦草多。

表 2 品种形态学观察结果
Table 2 Morphological characters of cultivars

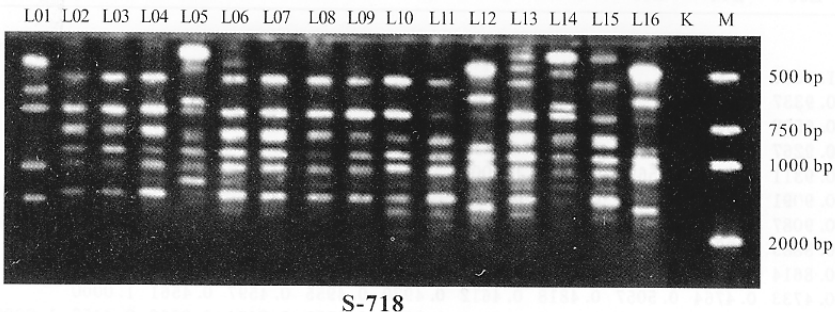
编号 No.	特性 Morphological characters
L01	叶片光滑、柔软,色泽浓绿、亮泽。Dark green,shining,smooth and soft leaves.
L02	叶细,耐热性好,耐寒性好。Slim leaves,good tolerance to cold and torridity.
L03	生长低矮、缓慢,耐热性好。Low plant,slow growth and good tolerance to torridity.
L04	叶片纤细,颜色深绿,耐寒性较强。Slim and dark green leaves,good tolerance to cold.
L05	叶色深绿,生长迅速,株型较高,不耐寒冷和干热。Dark green leaves,rapid growth,high plant and good tolerance to cold and torridity.
L06	株型适中,耐热性好。Moderate height plant and good tolerance to torridity.
L07	叶色较浅,叶片纤细,不耐寒冷和干热。Light green and slim leaves,bad tolerance to cold and torridity.
L08	叶片颜色较浅,生长速度快,株型高,具有较强的耐寒性。Light green leaves,rapid growth,high plant,good tolerance to cold.
L09	叶片柔软纤细,颜色浅,具有较强的耐寒性。Light green,soft and slim leaves,good tolerance to cold.
L10	叶片纤细,淡绿色,生长缓慢,抗旱性和抗寒性好。Light green and slim leaves,slow growth,good tolerance to cold and torridity.
L11	叶片较宽,中绿色,柔软,粗糙。Moderate green,broad,soft and coarse leaves.
L12	叶片较宽,深绿色,株型紧凑低矮,抗热。Dark green and broad leaves,slow and close plant,good tolerance to torridity.
L13	叶片宽,粗糙,株型较高紧凑,生长极慢,耐热性好。Broad and coarse leaves,high but close plant,very slow growth,and good tolerance to torridity.
L14	叶片柔软纤细,株型紧凑低矮。Soft and slim leaves,slow and compact plant.
L15	叶片柔软纤细,颜色深,株型矮,生长快,不耐寒冷和干热。Dark green,soft and slim leaves,low plant,rapid growth,bad tolerance to cold and torridity.
L16	叶片宽,柔软,颜色深绿,株型矮。Broad,soft and dark green leaves,low plant.

注:供试样品序列编号同表 1。
Note: L01—L16 represents,the accession number listed in table 1.

2.2 黑麦草品种之间的遗传多样性

对16个品种进行RAPD扩增后可以看出,扩增

结果清晰,多态性较高,对照未扩增,说明没有污染(图1、图2)。61个引物共扩增出408条带,其中多态性

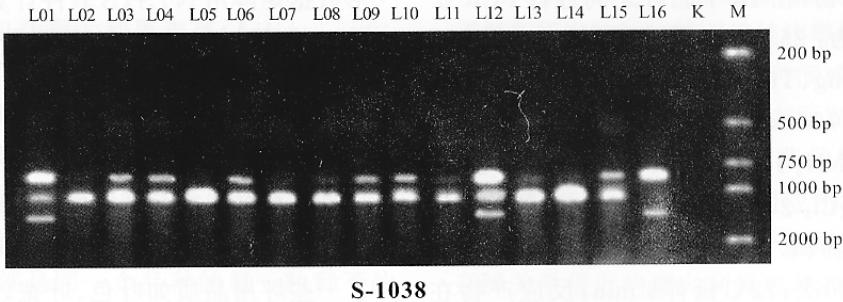


S-718

L01~L16 为供试样品; K 为空白对照; M 为分子量标记 DL2000
L01—L16 represents,the accession number listed in table 1; K indicates the blank contrast; M indicates marker DL 2000

图 1 引物 S-718 扩增结果

Fig. 1 Band profile of the DNA obtained in the RAPD assay using the primer S-718



L01~L16 为供试样品; K 代表空白对照; M 代表分子量标记 DL2000
L01—L16 represents the accession number listed in table 1; K indicates the blank contrast; M indicates marker DL 2000

图 2 引物 S-1038 扩增的结果

Fig. 2 Band profile of the DNA obtained in the RAPD assay using the primer S-1038

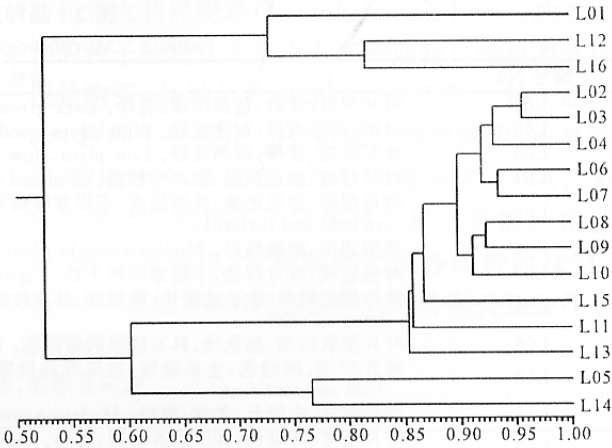
的带有 367 条,多态条带比率 (PPB, proportion of polymorphic bands) 为 89.95%, 平均每个 RAPD 引物可获得 6 个多态条带, 分子量为 200 bp~2 000 bp。

由聚类分析结果 (图 3) 可以看出, 2 个意大利黑麦草的牧草品种 L05 和 L15 并没有单独地聚在一起, 而是混杂在多年生黑麦草各品种之间。而且从相似系数矩阵 (表 3) 可看出, 两者之间的相似系数也比较低, 为 0.585 6, 反而 L15 与多年生黑麦草品种之间的相似系数要高, 除了与 L01、L12、L14 之间的相似系数小于 0.600 0 外, 与其他品种的相似系数都高于 0.800 0。

相似系数最高的是 L02 和 L03, 为 0.9569, 最低的是 L12 和 L13, 为 0.4455。

聚类图反映出黑麦草品种之间的遗传多样性较低, 相似系数集中在 0.4455~0.9569 之间, 其中 L02、L03、L04、L06、L07、L08、L09、L10、L15、L11、L13 之间的相似系数在 0.8500~0.9500 之间。如果以 0.8500 为阈值, 可以分为 3 个类群: L01、L12、L16 为一个类群; L02、L03、L04、L06、L07、L08、

L09、L10、L11、L13、L15 为一个类群; L05、L14 为一个类群。



L01~L16 为供试样品
L01—L16 represents the accession number listed in table 1

图 3 黑麦草 16 个品种的 RAPD 聚类分析树状图
(横坐标代表 DICE 相似系数)

Fig. 3 The dendrogram of 16 cultivars constructed by UPGMA cluster analysis revealed by RAPD
(The abscissa represents the DICE coefficient)

表 3 黑麦草 16 个品种的相似系数矩阵
Table 3 Pairwise similarity matrix of cultivars

L01	L02	L03	L04	L05	L06	L07	L08	L09	L10	L11	L12	L13	L14	L15	L16	
L01	1.0000															
L02	0.6069	1.0000														
L03	0.6218	0.9569	1.0000													
L04	0.6132	0.9294	0.9337	1.0000												
L05	0.5333	0.5687	0.5598	0.5499	1.0000											
L06	0.6227	0.9180	0.9267	0.9135	0.5574	1.0000										
L07	0.6119	0.9271	0.9311	0.9082	0.5694	0.9349	1.0000									
L08	0.6345	0.9052	0.9091	0.9051	0.5735	0.8946	0.9129	1.0000								
L09	0.6396	0.9002	0.9087	0.8857	0.5940	0.8945	0.9124	0.9234	1.0000							
L10	0.6114	0.8802	0.8889	0.8894	0.5623	0.8889	0.8932	0.9046	0.9187	1.0000						
L11	0.6176	0.8431	0.8614	0.8514	0.5539	0.8330	0.8321	0.8775	0.8729	0.8759	1.0000					
L12	0.7232	0.4828	0.4733	0.4764	0.5057	0.4818	0.4612	0.4920	0.4955	0.4597	0.4561	1.0000				
L13	0.6032	0.8517	0.8744	0.8550	0.5742	0.8558	0.8409	0.8565	0.8571	0.8494	0.8366	0.4455	1.0000			
L14	0.5306	0.6542	0.6509	0.6523	0.7664	0.6605	0.6311	0.6308	0.6499	0.6313	0.5845	0.5215	0.6462	1.0000		
L15	0.5962	0.8586	0.8722	0.8571	0.5856	0.8578	0.8719	0.8635	0.8835	0.8718	0.8638	0.4519	0.8521	0.5966	1.0000	
L16	0.7347	0.5000	0.4906	0.4988	0.5047	0.5081	0.4780	0.5093	0.5217	0.4627	0.4879	0.8163	0.4764	0.5023	0.4890	1.0000

注: 供试样品序列编号同表 1。
Note: L01—L16 represents the accession number listed in table 1.

3 讨论

从聚类结果和表形特征对照来看,两者找不到明确的对应关系,如相似系数最高的 2 个品种 L02 和 L03,只有耐热性好这一个共同点。而相似系数最低的 2 个品种 L12 和 L13 却可以找到诸如抗旱、耐热、低矮紧凑等共同生长特性。这与前人的研究结果是一致的^[4]。Roldan -Ruiz 等^[4]用 AFLP、STS 和形态学特征分别对 16 个多年生黑麦草的品种进行聚类,结果 3 种方法得到的结果不一致,特别是形态学特征与两种分子标记之间、亲缘关系较远的品种差别更大。他们对于这一现象的解释是:完全不同的种质资源通过选育可以得到表型上一致的品种,而同一种质资源可以通过不同的选育方法得到表型差别很大的品种。因而表型的一致与否不一定能完全反映遗传关系。

建植草坪为了得到均一的形态表现,要求所选用品种的形态特征尽可能一致,如株型、颜色等,但是同时为了提高其抵抗外界生物及非生物胁迫的能力,则要求品种之间具有较高的遗传多样性。在我们检测的 14 个多年生黑麦草品种中,L12 和 L13 都是叶片较宽、株型紧凑、耐热性好的品种,而且两者之间的相似系数只有 0.4455,这 2 个品种适合混播建植草坪。L08 和 L09 虽然在外形上较一致,都是叶片纤细,叶色浅,具有较强的抗旱和耐寒性的品种,但是两者之间的相似性系数却也高达 0.9187,这 2 个品种混播尽管得到的草坪外部表观均一,但却存在着种群遗传结构脆弱的缺点。

意大利黑麦草和多年生黑麦草都是世界上应用很广泛的牧草和草坪草,虽然两者在外形上很容易区分,但是在天然状态下因为花期重叠,很容易发生杂交,这种情况在羊茅属和黑麦草属之间也时常发生。羊茅属共有 450 个种,黑麦草 8 个种,两个属在

形态上很容易区分,但是草地羊茅(*F. pratensis*)不能与其他的羊茅杂交却可以与多年生黑麦草自然杂交产生羊茅黑麦草杂交种,被称为 *Festulolium*。苇状羊茅和多年生黑麦草也有类似的情况^[6]。黑麦草属和羊茅属的这种特点也是让许多分类学家感到困惑的地方。其实欧洲的分类学家曾经建议把多年生黑麦草和意大利黑麦草归在一个种下面,变成亚种,至少可以说黑麦草属是一个杂种的混合群体,而多年生黑麦草和意大利黑麦草分别代表了两个极端类型;法国的分类学家的研究表明,多年生黑麦草是由硬黑麦草(*L. rigidum*)的一个类群的瓶颈效应进化而来,而意大利黑麦草是由同一个祖先进化而来。它们共同的祖先以及两者基因组之间的相似性表明,两者的亲缘关系是很近的。我们的试验结果也证实了这一点。

参考文献:

- [1] 刘自学,陈光耀. 草坪草品种指南[M]. 北京:中国农业出版社,2002. 110—113.
- [2] James A. Murphy Perennial Ryegrass Varieties for New Jersey[DB/OL]. Rutgers Cooperative Extension/Resource Center Services. <http://www.rce.rutgers.edu/pubs/pdfs/fs989.pdf>,2002.
- [3] David R huff. RAPD characterization of heterogeneous perennial ryegrass cultivars[J]. *Crop Sci*,1997,37:557—564.
- [4] Roldan-Ruiz I, Eeuwijk F A van, Gilliland T J, Dubreuil P, Dillmann C, Lallemand J, Loose M De, Baril C. P. A comparative study of molecular and morphological methods of describing relationships between perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) varieties [J]. *Theor Appl Genet*, 2001, 103: 1138—1150.
- [5] 邹喻苹,葛颂,王晓东. 系统与进化植物学中的分子标记[M]. 北京:科学出版社,2001. 16—17.
- [6] 米福贵. 意大利黑麦草和苇状羊茅属间杂交的细胞学研究[J]. 草地学报,1995,3:10—14.