

中国西南区野生狗牙根抗寒相关性状与 SSR 标记关联分析

袁小情¹, 刘岳华¹, 刘珊¹, 聂刚¹, 苟文龙², 刘伟¹

(1. 四川农业大学 动物科技学院, 四川 成都 611130; 2. 四川省草原科学研究院, 四川 成都 611731)

摘要:利用 SSR(Simple Sequence Repeat)标记对 52 份狗牙根(*Cynodon dactylon*)的抗寒相关性状进行关联分析。结果表明:狗牙根的抗寒性状变异丰富,其中半致死温度(LT₅₀)及恢复生长率的变异系数分别为 40.69%、18.37%;形态性状中茎粗变幅最大,其次是叶长、叶色和株高,变异系数达 20.00%以上;相关分析表明,枯黄期、绿期及恢复生长率与叶宽、株高间呈极显著正相关($P < 0.01$),LT₅₀与叶宽、株高间呈显著负相关($P < 0.05$),而叶宽与叶长、株高、叶色间呈极显著正相关($P < 0.01$);群体结构分析表明 52 份材料可分为 5 个类群;利用一般线性模型(GLM)鉴定到 10 个与抗寒相关性状显著关联的标记,其中绿期与标记 89 显著相关($P < 2.71 \times 10^{-5}$),恢复生长率与标记 12 显著相关($P < 2.71 \times 10^{-5}$),解释率为 19.94%~39.29%。该研究结果可早期发现优异种质,缩小筛选范围,降低筛选成本和工作量,加快狗牙根育种进程。

关键词:狗牙根;抗寒性状;SSR;关联分析

中图分类号:S543 **文献标志码:**A **文章编号:**1009-5500(2020)06-0024-09

DOI: 10.13817/j.cnki.cyycp.2020.06.004

狗牙根(*Cynodon dactylon*)是多年生暖季型草坪草,同时可作为牧草及固土护坡植物^[1-2]。狗牙根对低温十分敏感,气温低于 15 ℃时,叶片变浅失绿,草坪质量降低^[3]。低温不仅限制狗牙根的分布范围,同时也限制其推广应用^[4-5]。

在国内外狗牙根新品种选育工作中,对其耐寒性进行评价与鉴定是学者们关注的热点和焦点。刘建秀等^[6]研究表明,狗牙根随着纬度的增加叶片变长变宽,植株增高,地下根茎分布下移,并认为这可能是其对低温适应的结果。景艳杰等^[7]的研究结果显示,狗牙根叶片越宽大、越长,株高越高,其抗寒性也越强。Akbari 等^[8]根据脯氨酸、抗氧化酶、叶绿素、电导率等指标,对伊朗狗牙根材料进行了抗寒性评价。吴彦奇等^[9]采用冷冻恢复生长法,根据测定的 10 个狗牙根牧

草品种受低温胁迫后的再生长量评价其耐寒性。近二十年,四川农业大学草学系在中国西南地区的大部分省市均采集到了狗牙根的野生材料,建立了原始资源圃,并对其生物学性状、抗逆性、坪用性状等开展了相关的研究,结果表明西南地区的狗牙根表型变异丰富、坪用质量高、抗寒性较强,具有新品种选育和利用价值^[10-12]。

随着测序技术的不断发展,大量分子标记开发、关联分析已被广泛用于多种性状相关基因的发掘研究中。关联分析方法不仅可以用于自然群体的图谱构建,而且具有快速、成本低、作图分辨率较高等特点,是一种对复杂性状进行遗传解剖的有效方法^[13]。该技术已成功应用于小麦(*Triticum aestivum*)^[14]、苜蓿(*Medicago Sativa*)^[15]等的分子标记或候选基因与重要表型性状之间的关联鉴定。此外,在分析非生物胁迫抗性相关基因与标记之间的联系时,使用关联分析可以揭示抗性特征,例如大麦的耐盐性^[16]、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)的抗病性^[17]、多年生黑麦草(*Lolium perenne*)的干旱和水淹耐受性^[18]、高羊茅(*Festuca elata*)的热胁迫耐受性^[19-20]、狗牙根对镉的

收稿日期:2020-03-23; 修回日期:2020-04-15

基金项目:四川省教育厅重点项目(18ZA0387)

作者简介:袁小情(1994-),女,四川高县人,硕士研究生。

E-mail:1443924964@qq.com

刘伟为通讯作者。E-mail:lwgrass@126.com

耐受性^[21]等。狗牙根属于自然群体,基因组信息较少,通过构建作图群体的方式获得与抗性相关的数量性状位点较困难,标记与抗性之间的关联信息不多。因此,本研究拟结合前期抗寒性状的测定,利用 SSR 标记进行关联分析,挖掘与抗寒性状相关的标记。利用挖掘出的与抗寒性状相关的标记,可在早期进行材料选择,缩小筛选范围,降低筛选成本和工作量,加快

狗牙根育种进程。

1 材料和方法

1.1 供试材料

供试材料为 50 份西南地区野生狗牙根资源和 2 份国外材料(表 1)。

表 1 供试材料及来源地

Table 1 Test materials and sources

材料	采集地	材料	采集地	材料	采集地	材料	采集地
Sau9933	四川汶川	Sau9918	四川雅安	Sau9948	四川广元	Sau02044	重庆垫江
Sau9934	四川汶川	Sau02058	四川荣经	Sau9956	四川广元	Sau02045	重庆梁平
Sau9935	四川茂县	Sau02059	四川荣经	Sau02001	四川绵阳	Sau9966	重庆朱家镇
Sau9936	四川茂县	Sau02064	四川芦山	Ly97021	四川遂宁	Sau9968	重庆杨家坪
Sau02032	四川甘洛	Sau02067	四川洪雅	Sau02017	四川都江堰	Sau02021	贵州贵阳
Sau02033	四川越西	Sau02069	四川洪雅	Sau9939	四川南充	Sau02023	贵州独山
Sau0085	四川西昌	Sau00100	四川夹江	Sau9961	四川南充	Sau02027	云南小哨
Sau02012	四川金川	Sau00101	四川夹江	Sau9964	四川南充	Sau02054	云南巧家
Sau02013	四川金川	Sau9919	四川眉山	Sau9958	四川南充	XZ1	西藏米林
Sau02014	四川金川	Sau9922	四川宜宾	Ly98008	四川自贡	XZ2	西藏察隅
Sau0094	四川攀枝花	Sau9928	四川宜宾	Sau02037	四川自贡	XZ3	西藏察隅
Sau0095	四川攀枝花	Ly98017	四川宜宾	Sau02039	四川自贡	Tifway	美国
Sau99005	四川广元	Sau02042	四川宜宾	Sau02040	四川自贡	Tifeagle	美国

1.2 试验地

试验地在四川农业大学崇州(E 103° 39′、N 30° 33′,海拔 501 m)基地资源圃,该地区土壤类型为紫色土,pH 6.30,有机质 37.6 g/kg,全氮 2.03 g/kg,有效磷 10.2 mg/kg,速效钾 101.1 mg/kg^[22]。该地区属于亚热带湿润季风气候,年平均气温 15.9℃,最热月 7 月平均气温为 25.0℃,最冷月 1 月平均气温为 5.4℃,年均日照时数为 1 161.5 h,年均降水量 1 012.4 mm。

1.3 测定内容及方法

在前期的研究中已对材料进行绿期、半致死温度、匍匐茎恢复生长率的测定,对其抗寒性进行了初步鉴定^[23]。

形态性状测量:对供试狗牙根材料的叶长与叶宽(直立茎顶部倒数第三片叶片的长度和宽度)、株高(生殖枝高度)、茎粗及茎节间长(茎基部第 3 个节间)进行测定,随机取样 10 株,取其均值。

SSR 分子标记:参照前人发表的引物^[24-28],选择 52 对 SSR 引物序列(上海金斯瑞生物技术有限公司合成)(表 2)。每份材料取顶端叶片,用植物 DNA 试剂盒提取总 DNA^[29]。仅对清晰和明确的多态性条带进

行分析,将每个引物的 SSR 片段记为有(1)或无(0)^[30-31]。使用 Structure 软件计算群体结构^[32]。关联分析使用 Tassel 5.0 的 GLM 程序,性状与标记之间显著关联的阈值设为 $P < 0.05/185 \approx 2.71 \times 10^{-5}$ ^[33]。

2 结果与分析

2.1 西南野生狗牙根抗寒相关性状的表型变异分析

枯黄、返青情况可直接反映狗牙根自然状态下的抗寒性,半致死温度和低温处理后的恢复生长率可间接反映其在实验室控制条件下的抗寒能力,而形态性状可反映狗牙根对环境的适应差异。在冬季自然降温情况下,狗牙根大多在 12 月下旬到次年 1 月上旬枯黄,3 月中下旬返青,绿期 290 d 左右。半致死温度为 $-9.00 \sim -1.72^\circ\text{C}$ 。各低温处理后的恢复生长率为 18.06% ~ 42.36% (表 3)。材料 Sau02040、Sau02013、Sau02014、XZ2 及 Sau9956 抗寒性较强;Sau9961、Sau9964、Sau02067、Sau9922 及 Sau9928 抗寒性较弱;其余材料抗寒性中等。各形态性状变异丰富,叶长 1.60~17.90 cm;叶片宽度 1.05~5.06 mm;

表 2 用于狗牙根 SSR 分析的引物序列

Table 2 Primer sequences for SSR analysis of bermudagrass

引物名称	引物	引物名称	引物
S1	F:AATGAGATTGCTGATGTGGATG R:TCTTCTTCATGCCTCGGTTTAC	5	F:CCCTCTATAGAAGCTTTTGT R:CTCTTGCCAATAATTACACG
S4	F:CCTTGTTCAAACCTGCTCCCTAC R:AAGATGATAACCAGAGATCCGC	9	F:GCCATGAGATTCGTTGGAAG R:ATTTCCAAACTGGCCGGCAA
GU170368	F:GGGGAGGAATGCTAGAATGA R:AGGGCTAGTGGAAGTCCAAA	12	F:GTGAACTAGAGTGTTATAGTC R:TGTTACAGTAATTTTCAGAGC
GU170366	F:GAGGCCTCTTGGTGGATAAAA R:AGCTCGCTCTTGAGCTATGG	33	F:GGCAAGACAGTTTTTCGTCCT R:CGATGGTACTCGACATAAAC
CDCA77-78	F:GAAGATGTCATCACGATGGG R:CGTACGACCGAGTTCTCTGA	36	F:AAAGAGCCTAGAACTTGTGC R:TCCGGATAGAATATGTGCGA
CDCA133-134	F:CACCCATTACAGTGAGCACC R:TGCTTGGAACAACCTTCTG	37	F:TATAGAAGCACCCGTTGCCTC R:TCAAGCATCGATGCTTTCCG
CDCA155-156	F:CTCCCTCGTCCATTTTCATTT R:CGTTGGCACTCACTACCAGT	38	F:AGCCTTCATCCGAAACAGAG R:GAGCAGAGTGATTGTTTGGC
CDCA491-492	F:CTTGGTCTTGGGTCCTTGT R:AGCTCAAGCACCATTGTCAG	46	F:GGGGGAAATTAAGCACTCAG R:GCAATCGACTATCCTAGAGT
CDGA1795-1796	F:TTCGTGGACTCTGGCTATTG R:GCCCAGGTAACGTGTTCTTT	48	F:TACCTGCAGAAACATATAGC R:AACTTAGCATTACACCTCC
CDATG1999-2000	F:CCAGGTTTCGCATCAGATA R:TGCATATCATGAACACGACG	89	F:GGGCAAGACAGTTTTTCATCC R:CAGCTTAGATGGTACTTTCGC
CDE375-376	F:AGACGTTTCAGCGTCGTCTAC R:TGCACACATCCAGCAGTGA	101	F:GCTATACACATGTGCAGCGT R:GATGATTTCGAGCACAGCAG
CDE127-128	F:GGAAAGAATCAAGGACCGAC R:GAGCAACTGAGCAAGCAAAG	109	F:TCTTAATCCATGATGCCGAT R:GGAACCTAACACCGTGAGTG
CDE215-216	F:ACCACAAGCCAAACCCTACT R:AAGTCGAGGTTGAGGTGCTT	111	F:TTCCTGAAGTCGATGGGTAA R:TGACTTGGAGACATGAGCAA

表 3 狗牙根抗寒性状分析

Table 3 Analysis on cold resistance trait of bermudagrass

性状	最小值(最早日期)	最大值(最迟日期)	平均数	变异系数/%
2017 年返青期/(年-月-日)	2017-03-11	2017-03-26	—	21.92
2017 年枯黄期/(年-月-日)	2017-12-16	2018-01-15	—	24.03
2017 年绿期/d	277	308	290	2.46
2018 年返青期/(年-月-日)	2018-03-09	2018-03-26	—	21.16
2018 年枯黄期/(年-月-日)	2018-12-12	2019-01-14	—	23.84
2018 年绿期/d	275	306	289	2.41
半致死温度(LT ₅₀)/℃	-9	-1.72	-4.6	40.69
恢复生长率/%	18.06	42.36	30.34	18.37
叶宽/mm	1.05	5.06	3.05	24.30
株高/cm	1.80	36.24	19.88	28.32
叶长/cm	1.60	17.9	7.18	38.75
茎粗/mm	0.29	6.00	1.01	49.68
叶色	1.00	5.00	3.21	31.49

株高 1.80~36.24 cm; 茎粗为 0.29~6.00 mm(表 3)。Sau02040、Sau02033、Sau02021 及 XZ1 植株高大、叶片宽大; Sau9919、Sau9964、Sau9933 及 Ly98017 植株低矮、叶片细腻、质地纤细。

2.2 西南野生狗牙根抗寒性状间相关性分析

对野生狗牙根抗寒性状进行相关性分析, 结果表明, 绿期、恢复生长率分别与半致死温度呈显著负相关 ($P < 0.05$), 绿期与恢复生长率呈显著正相关 ($P <$

0.05)。叶宽与叶长、株高、叶色间呈极显著正相关 ($P < 0.01$); 叶长与株高呈显著正相关 ($P < 0.05$)。枯黄期、绿期与叶宽、株高、叶长及叶色间呈极显著正相关 ($P < 0.01$); 恢复生长率与叶宽、株高间呈显著正相关 ($P < 0.05$); 而 LT_{50} 与叶宽、株高间呈显著负相关 ($P < 0.05$) (表 4)。说明植株高大、叶片宽大的狗牙根, 其抗寒性也较强。

表 4 狗牙根种源抗寒性状间的相关分析

Table 4 The correlation analysis of cold resistance traits in bermudagrass

	2017 返青期	2017 枯黄期	2017 绿期	2018 返青期	2018 枯黄期	2018 绿期	恢复率	半致死温 度 LT_{50}	叶宽	株高	叶长	茎粗	叶色
2017 返青期	1.000												
2017 枯黄期	-.372**	1.000											
2017 绿期	.908**	-.401**	1.000										
2018 返青期	-.464**	.966**	-.435**	1.000									
2018 枯黄期	0.172	.839**	0.106	.752**	1.000								
2018 绿期	-0.025	.853**	0.057	.870**	.890**	1.000							
恢复率	0.115	0.253	0.123	0.240	.332*	.335*	1.000						
半致死温度 LT_{50}	-0.054	.322*	0.011	.350*	.293*	.403**	.314*	1.000					
叶宽	-0.107	.588**	-0.097	.595**	.604**	.608**	.312*	.349*	1.000				
株高	-0.165	.603**	-0.118	.627**	.573**	.617**	.311*	.366**	.621**	1.000			
叶长	-0.013	.584**	-0.081	.572**	.637**	.603**	0.083	0.270	.630**	.489**	1.000		
茎粗	0.104	0.139	0.125	0.172	0.219	.281*	-0.006	0.087	0.264	0.100	.399**	1.000	
叶色	0.073	.381**	0.054	.383**	.469**	.442**	0.227	0.173	.581**	.293*	.356**	0.168	1.000

注: * 和 ** 分别表示在 0.05 和 0.01 水平显著和极显著相关

2.3 基于 SSR 标记的狗牙根遗传多样性分析

从 52 对引物中筛选出 26 对用于 PCR 扩增, 电泳后的结果为图 1。共得到 185 个等位基因, 其中有 167 个具有多态性, 占总基因的 90.27%, 大多集中在 100~300 bp。引物 33、101 和 109 扩增出的条带最多, 为 11 条, 而 CDATG1999-2000 扩增的条带最少, 仅为 3 条。多态性信息指数为 0.27~0.44, 平均为 0.3187 (表 5)。对扩增条带进行统计得到遗传相似矩阵, 依据 Nei-Li 相似系数 (GS) 分析材料间的遗传关系。52 份狗牙根材料的 GS 为 0.44~0.91, 平均为 0.64。

Sau9934(汶川) 和 Sau9935(汶川) 的相似系数 (0.91) 最大, 遗传距离小。而 Sau9934(汶川) 和 Sau9928(宜宾) 的相似系数 (0.46) 最小, 遗传距离大。

2.4 西南野生狗牙根的遗传群体结构分析

使用样本的等位变异频率特征类型数 K 来估算最适群体数, 群体结构分类标准为 Q 值 > 0.7 , 否则定为混合群体。 ΔK 在 $K=5$ 时出现拐点 (图 2), 表明供试材料亚群数目应为 5。群体结构聚类中, 第 1 类群 (绿色) 有 3 份, 均采自西藏地区; 第 2 类群 (紫色) 有 2 份, 均采自美国; 第 3 类群 (黄色) 包含 7 份, 均采自阿

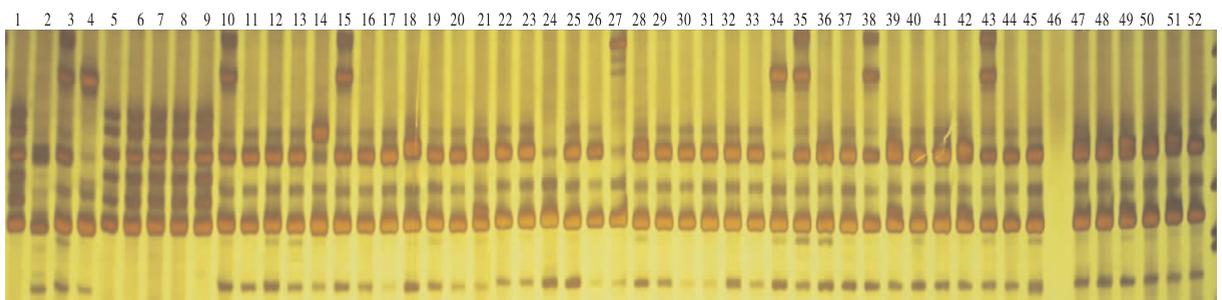


图 1 引物组合 5 电泳图

Fig. 1 SSR polymorphism in bermudagrass accessions with primer 5

表 5 26 对 SSR 多态性统计
Table 5 Polymorphic statistics of 26 SSR markers

引物序号	等位基因数	多态性个数	基因多样性 (%)	多态信息含量 PIC
5	9	9	100.00	0.304 1
9	8	6	75.00	0.335 0
12	9	6	66.67	0.356 1
33	11	8	72.73	0.308 4
36	6	6	100.00	0.365 0
37	5	4	80.00	0.339 1
38	6	6	100.00	0.362 8
46	6	5	83.33	0.328 5
48	7	7	100.00	0.390 2
89	11	11	100.00	0.427 2
101	11	11	100.00	0.367 9
109	7	7	100.00	0.441 4
111	6	6	100.00	0.382 3
CDE127-128	7	6	85.71	0.327 1
CDCA133-134	7	6	85.71	0.335 7
CDCA155-156	6	6	100.00	0.354 8
CDE215-216	5	5	100.00	0.318 3
CDCA491-492	8	7	87.50	0.334 3
CDGA1795-1796	7	7	100.00	0.345 0
CDATG1999-2000	3	3	100.00	0.310 2
GU170366	5	4	80.00	0.267 0
GU170368	7	6	85.71	0.388 5
CDE375-376	7	7	100.00	0.363 2
CDCA77-78	6	5	83.33	0.295 9
S1	5	3	60.00	0.340 1
S4	10	10	100.00	0.415 8

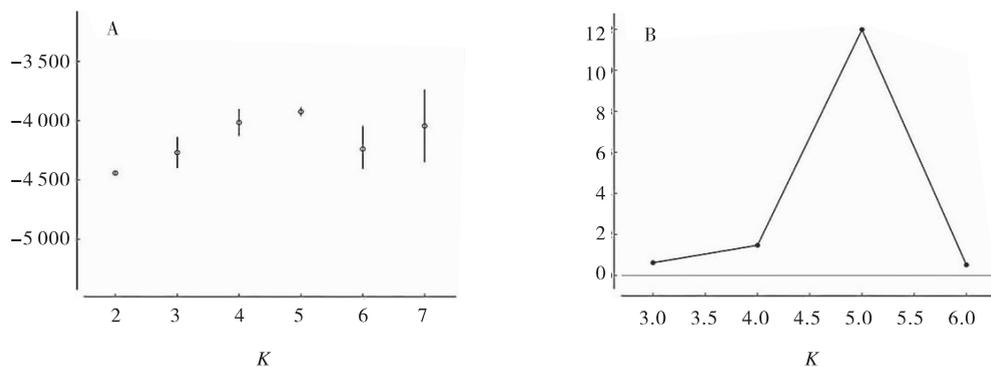


图 2 K 值划分依据 (K=5)

Fig. 2 The basis of K value deviation (K=5)

注:A:K 值与 $\ln P(D)$ 值的折线图;B:K 值与 ΔK 的折线图

坝地区;第 4 类群(红色)包含 10 份,采自云南、贵州、西昌等地;第 5 类群(蓝色)包含 22 份,采自南充、雅安、宜宾、重庆等地,来源混杂。其余 8 份材料为混合类群。

2.5 基于 SSR 标记的抗寒性状关联分析

利用 GLM 模型鉴定到 10 个显著关联的标记,其中茎粗与标记 33、CDCA491-492 及标记 5 显著相关 ($P < 2.71 \times 10^{-5}$),两年的绿期和两年平均绿期与标记 89

显著相关($P < 2.71 \times 10^{-5}$),恢复生长率与标记 12 显著相关($P < 2.71 \times 10^{-5}$),叶宽与标记 5、标记 12 显著相关

($P < 2.71 \times 10^{-5}$),株高与标记 5 显著相关($P < 2.71 \times 10^{-5}$),解释率为 19.94%~39.29%(表 6)。

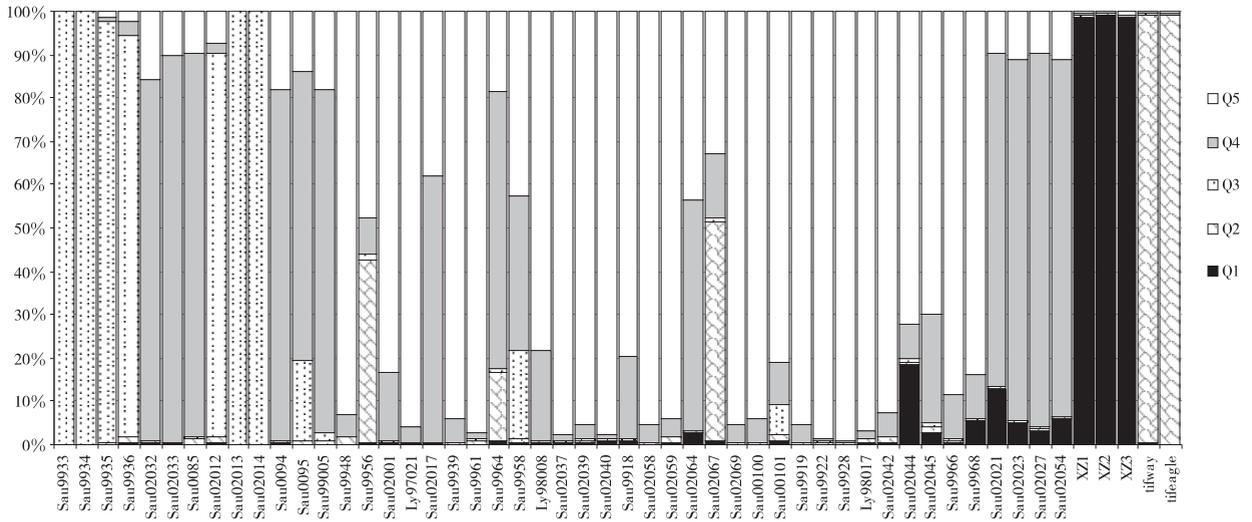


图 3 52 份狗牙根材料的数学模拟分群($K=5$)

Fig. 3 Mathematical simulation clustering of 52 bermudagrass materials($K=5$)

表 6 与形态性状、抗寒性状相关的 SSR 标记

Table 6 SSR markers related to morphological traits and cold resistance traits

性状	引物	P 值	解释率 $R^2 / \%$
茎粗	33	1.05E-07	39.29
茎粗	CDCA491-492	1.05E-07	39.29
茎粗	5	2.67E-04	21.65
绿期	89	1.64E-05	23.01
绿期	89	3.19E-05	23.03
绿期	89	3.19E-05	23.03
恢复生长率	12	8.11E-05	29.08
叶宽	5	7.15E-05	19.95
叶宽	12	7.19E-05	19.94
株高	5	5.33E-05	25.15

3 讨论

3.1 西南野生狗牙根外部形态与耐寒性的关系及开发利用潜力

由于采集地生境丰富多样,狗牙根的叶长、株高、叶宽及茎粗等性状表现出较大的差异,且叶宽与叶长、株高、叶色间呈极显著正相关($P < 0.01$),叶长与株高间呈显著正相关($P < 0.05$),表明狗牙根叶片越宽、叶片越长、植株越高、颜色越深。这与前人^[34-35]研究结果一致,而丰富的形态差异为狗牙根的开发利用提供可能。材料的抗寒性差异大,且枯黄期、绿期与叶宽、株高、叶长及叶色间呈极显著正相关($P < 0.01$),恢复生长率与叶宽、株高间呈显著正相关($P < 0.05$),而

LT₅₀与叶宽、株高间呈显著负相关($P < 0.05$),表明狗牙根叶片越宽、越长、植株越高、颜色越深,其抗寒性也越强。这与景艳杰等^[7]研究结果大体一致,狗牙根地上部分的形态结构与其抗寒性有关。丰富的形态差异及抗寒性差异使狗牙根具备优良牧草及草坪草开发利用潜力,可从中选育出不同用途且抗寒性强的材料,例如,材料 Sau0085、Sau02040、XZ2 植株高大粗壮、叶量丰富,同时耐寒性强,可开发为优良牧草;Sau9956、Sau02013、Sau02014 质地细腻、植株低矮,可开发为优良草坪草。

3.2 西南野生狗牙根种质的抗寒性状关联分析

形态及抗性是受多基因控制的数量性状,且各性状间有一定的相互作用。在 DNA 水平上利用分子标记对形态、抗性等性状进行关联分析,挖掘相关性状基因位点,对材料进行早期选择,促进了基因挖掘及植物育种的发展。唐露等^[36]分析了鸭茅(*Dactylis glomerata*)产量相关性状的图谱定位,为鸭茅的性状相关基因的挖掘及育种提供了理论依据。郭海林等^[37]分析了结缕草(*zoysia willd*)耐寒性及绿期与 SRAP 标记之间的关系,为结缕草的关联作图和物种改良做出了贡献。张延辉等^[38-39]对狗牙根材料开展了 SRAP、SSR 和 RAPD 标记研究,并对抗寒性状进行关联分析,得到了与抗寒相关的 EST 分子标记。马亮^[40]利用关联分析得到的标记获取了狗牙根抗寒相关的差异序列,克隆得到狗牙根抗寒基因 LTI6A。本

研究中,利用 GLM 模型挖掘出 10 个与茎粗、叶宽、株高等形态性状和绿期、恢复生长率等抗寒相关性状显著关联的标记($P < 2.71 \times 10^{-5}$),这 10 个标记为新发现位点,在早期研究中并未报道。在接下来的研究中,可根据这 10 个标记获取了狗牙根相关性状的差异序列,克隆狗牙根相关基因。也可利用与主要形态、抗寒性状关联的标记对大量狗牙根种质进行筛选,在早期发现表型质量高、抗寒性好的种质,降低成本和工作量,加快新品种培育。

4 结论

利用多样性丰富的 52 份狗牙根构成关联群体,对其抗寒相关性状进行关联分析,利用 GLM 模型检测到 10 个与狗牙根抗寒相关性状显著关联的标记($P < 2.71 \times 10^{-5}$)。研究结果为狗牙根抗寒性状相关基因以及通过分子标记辅助育种加速狗牙根新品种培育提供了有用信息。

参考文献:

[1] Huang S L, Wang C L, Liang J S. Genetic resources and genetic transformation in bermudagrass—a review[J]. Clarivate Analytics Web of Science, 2018, 32(1): 1–9.

[2] Xu J, Wang Z, Cheng J J. Bermudagrass as feedstock for biofuel production: A review[J]. Bioresource Technology, 2018, 102(17): 7613–7620.

[3] Shi H T, Ye T T, Chan Z L. Nitric oxide-activated hydrogen sulfide is essential for cadmium stress response in bermudagrass (*Cynodon dactylon*) [J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2014, 74: 99–107.

[4] Shi Y, Ding Y, Yang S. Cold signal transduction and its interplay with phytohormones during cold acclimation [J]. Plant and Cell Physiology, 2015, 56(1): 7–15.

[5] Chen L, Fan J B, Hu L X, et al. A transcriptomic analysis of bermudagrass (*Cynodon dactylon*) provides novel insights into the basis of low temperature tolerance[J]. Bio Med Central Plant Biology, 2015, 15(1): 216–238.

[6] 刘建秀, 郭爱桂, 郭海林. 我国狗牙根种质资源形态变异及形态类型划分[J]. 草业学报, 2003, 12(6): 99–104.

[7] 景艳杰, 阿不来提, 孙宗玖, 等. 新疆狗牙根种质资源抗寒性初步鉴定[J]. 新疆农业大学学报, 2009, 32(3): 11–16.

[8] M Akbari, H Salehi, ANiazi. Evaluation of Diversity Based on Morphological Variabilities and ISSR Molecular Markers in Iranian *Cynodon dactylon* (L.) Pers. Accessions to Select and Introduce Cold-Tolerant Genotypes[J]. Molec-

ular Biotechnology, 2018, 60(4): 259.

- [9] ANDERSON J A, WU Y Q. Freeze tolerance of forage bermudagrasses[J]. Grass Forage Science, 2011, 66(3): 449–452.
- [10] 吴彦奇, 刘玲珑, 熊曦, 等. 四川野生狗牙根的利用和资源[J]. 草原与草坪, 2001(3): 32–34.
- [11] 张小艾, 张新全. 西南区野生狗牙根形态多样性研究[J]. 草原与草坪, 2006(3): 35–38.
- [12] 齐晓芳. 野生狗牙根优异种质遗传变异与抗寒性研究[D]. 成都: 四川农业大学, 2010.
- [13] 卜李那, 赵毅强. 全基因组关联分析及其扩展方法的研究进展[J]. 农业生物技术学报, 2019, 27(1): 154–162.
- [14] 张彦军, 苟作旺, 王兴荣, 等. 西北地区和尚头小麦遗传多样性及农艺性状的关联分析[J]. 草业学报, 2019, 28(2): 145–158.
- [15] 刘希强, 张涵, 王学敏, 等. 紫花苜蓿秋眠性的 SSR 标记关联分析[J]. 中国农业科学, 2018, 51(2): 226–232.
- [16] Breseghello F, Sorrells M E. Association mapping of kernel size and milling quality in wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars[J]. Genetics, 2006, 172: 1165–1177.
- [17] Atwell S, Huang Y S, Vilhjmsson B J, et al. Genome-wide association study of 107 phenotypes in Arabidopsis thaliana inbred lines[J]. Nature, 2010, 465: 627–631.
- [18] Sköt L, Humphreys J, Humphreys M O, et al. Association of candidate genes with flowering time and water-soluble carbohydrate content in *Lolium perenne* (L.) [J]. Genetics, 2007, 177: 535–547.
- [19] Yu X, Bai G, Luo N, et al. Association of simple sequence repeat (SSR) markers with submergence tolerance in diverse populations of perennial ryegrass[J]. Plant Science, 2011, 180: 391–398.
- [20] Yu X, Bai G, Liu S, et al. Association of candidate genes with drought tolerance traits in diverse perennial ryegrass accessions[J]. Journal of Experimental Botany, 2013, 64(6): 1537–1555.
- [21] Zhang X, Ervin E H, LaBranche A J. Metabolic defense responses of seeded bermudagrass during acclimation to freezing stress[J]. Crop Sci, 2006, 46: 2598–2605.
- [22] 赵亚妮. 不同氮磷和种植模式下小麦的生长动态、产量及养分效率研究[D]. 成都: 四川农业大学, 2016.
- [23] 袁小情, 严国强, 黄思怡, 等. 中国西南部野生狗牙根种质耐寒性初步鉴定[J]. 草业科学, 2020, 37(2): 287–297.
- [24] 李江华. 106 份狗牙根种质资源的 SRAP、RAPD、SSR 分

- 析[D]. 乌鲁木齐:新疆农业大学,2011.
- [25] Harris-Shultz K R, Milla-Lewis S R, Brady J A. Transferability of SSR and RGA markers developed in *Cynodon* spp. to *Zoysia* spp[J]. Plant Molecular Biology Reporter,2012,30(5):1264-1269.
- [26] Tan C, Wu Y, Taliaferro C M, *et al.* Selfing and outcrossing fertility in common bermudagrass under open-pollinating conditions examined by SSR markers[J]. Crop Science,2014,54(4):1832.
- [27] Wang Z, Wu Y, Martin D L, *et al.* Identification of vegetatively propagated turf bermudagrass cultivars using simple sequence repeat marker[J]. Crop Science,2010,50(5):2103-2111.
- [28] Kamps T L, Williams N R, Ortega V M, *et al.* DNA polymorphisms at bermudagrass microsatellite loci and their use in genotype fingerprinting[J]. Crop Science,2011,51(3):1122.
- [29] 刘捷. 植物基因组 DNA 提取试剂盒提取玉米基因组 DNA 的条件优化[J]. 种子世界,2017(11):22-23.
- [30] 张延辉,李江华,孙强,等. 106 份狗牙根材料的 SRAP 分析[J]. 草原与草坪,2013,33(2):1-10.
- [31] 陈云,闫伟红,吴昊,等. 干旱胁迫下老芒麦遗传多样性分析[J]. 草原与草坪,2014,34(2):11-17.
- [32] 文浩,艾辛,蒋建雄,等. 采用 SSR 分子标记鉴定荻与南荻 F1 杂交种的真实性[J]. 草原与草坪,2013,33(4):7-11.
- [33] Gang N, Lu T, Ya J Z, *et al.* Development of SSR Markers Based on Transcriptome Sequencing and Association Analysis with Drought Tolerance in Perennial Grass *Miscanthus* from China[J]. Frontiers in Plant Science,2017,8:801-812.
- [34] 齐晓芳. 野生狗牙根优异种质遗传变异与抗寒性研究[D]. 成都:四川农业大学,2010.
- [35] 姚运法,洪建基,曾日秋. 狗尾草遗传多样性 SRAP 分析[J]. 甘肃农业大学学报,2013,48(4):105-109.
- [36] 唐露,黄琳凯,赵欣欣,等. 四倍体鸭茅产量及其构成因素的 QTL 定位[J]. 草业学报,2018,27(11):70-79.
- [37] Guo H L, Xuan J P, Liu, *et al.* Association of molecular markers with cold tolerance and green period in zoysia-grass (*zoysia willd*)[J]. Breeding Science,2012,62(4):320-327.
- [38] 张延辉,于辉,马亮,等. 狗牙根抗寒相关性状与分子标记的关联分析[J]. 新疆农业大学学报,2016,39(3):191-197.
- [39] 马亮,张延辉,帕提古丽·麦麦提敏,等. 利用 SSR、EST-SSR 标记构建狗牙根抗寒种质数字图谱[J]. 中国草地学报,2015,37(6):22-29.
- [40] 马亮. 新疆狗牙根抗寒基因的克隆和功能初步验证[D]. 乌鲁木齐:新疆农业大学,2016.

Association of SSR markers with cold-tolerance traits in wild bermudagrass (*Cynodon dactylon*) of southwest China

YUAN Xiao-qing¹, LIU Yue-hua¹, LIU Shan¹, NIE Gang¹,
GOU Wen-long², LIU Wei¹

(1. Department of Grassland Science, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China;

2. Sichuan Academy of Grassland Science, Chengdu 611731, China)

Abstract: Using simple sequence repeat (SSR) markers to perform association analysis on 52 copies of bermudagrass (*Cynodon dactylon*) for cold resistance-related traits. The results showed that the variation of cold-tolerant traits of bermudagrass were rich, and the coefficient of variation of semi-lethal temperature (LT₅₀) and recovery growth rate are 40.69% and 18.37%, respectively; the greatest variation had been observed in stem diameter, followed by leaf length, leaf color, and plant height, with a variation coefficient of more than 20.00%; the correlation analysis showed that there were the significant positive correlation ($P < 0.05$) between withering

period, stolon regrowth rate, green period and leaf width, plant height, leaf length, and leaf color ($P < 0.01$), LT_{50} was significantly negatively correlated with leaf width and plant height ($P < 0.05$), while leaf width was extremely significantly positively correlated with leaf length, plant height, and leaf color ($P < 0.01$); the analysis of population structure shows that 52 materials can be divided into 5 groups; ten markers significantly associated with cold resistance were identified by general linear model (GLM), the green phase was significantly correlated with the primer 89 ($P < 2.71 \times 10^{-5}$), the recovery rate of growth was significantly correlated with primer 12 ($P < 2.71 \times 10^{-5}$), and the contribution rate ranged from 19.94% to 39.29%. The findings of this study can be useful for early germplasm evaluation, reduce selection range, decrease screening cost and workload, and accelerate the breeding process, respectively.

Key words: *Cynodon dactylon*; cold resistance traits; SSR; association analysis

