

中华结缕草遗传分化的 RAPD 分析

李亚, 佟海英

(江苏省植物研究所南京中山植物园, 江苏南京 210014)
(中国科学院)

摘要: 中华结缕草 (*Zoysia sinica* Hance.) 在我国是分布于东部沿海地区的一个受威胁禾草, 形态上还有一个分布在海边的变种, 长花中华结缕草 (*Z. sinica* var. *nipponica* Ohwri)。采用 10 条随机引物对采自我国不同地区 7 个居群的 105 个个体进行了 RAPD 扩增, 对结果的 AMOVA 分析表明, 中华结缕草组间遗传分化不显著, 遗传变异只占总变异的 4.84%, 居群间遗传变异占总遗传变异的 24.71%, 出现了显著的遗传分化, 大部分变异存在于居群内部, 占总变异的 70.44%。不同数据处理方法得到了类似的结果, 都支持哈迪-温伯格平衡的假设。其中宁国汪溪居群和射阳海边居群变异最大, 歙县新安江居群遗传变异最小。考虑到中华结缕草遗传结构和变异的这些特性, 在取样策略、保护和育种方法上, 都应该以群居为主, 同时兼顾主要的异地居群。

关键词: 中华结缕草; RAPD; 遗传多样性; 遗传分化

中图分类号: Q943 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2004)04-0345-05

Genetic differentiation in *Zoysia sinica* populations revealed by RAPD markers

LI Ya, TONG Hai-ying

(Institute of Botany, Jiangsu Province and the Chinese Academy of Science, Nanjing 210014, China)

Abstract: *Zoysia sinica* Hance. is an endangered grass distributed in east foreland of China, a variety, named *Z. sinica* var. *nipponica* Ohwri, grow on the coastland. RAPDs with 10 screened primers were conducted to access the genetic diversity of 105 plants of 7 populations collected in different region of China. About 4.84%, 30% and 70% genetic variation was detected among groups, among populations and within populations respectively. Similar results that all agree with Hardy-Weiberg equilibrium were acquired by different analysis methods. The highest genetic diversity exists among populations from Ningguo of Anhui Province and Sheyang of Jiangsu Province, the lowest genetic diversity exists among populations from Shexian of Anhui. Regard of such genetic structure and variation, population should be put important attention on sample policy, conservation and breeding method, at the same time, attention should be given to other populations.

Key words: *Zoysia sinica*; RAPD; genetic diversity; genetic differentiation

植物种群的遗传结构反映了种的长期进化历史(迁移、生境片段化和种群隔离)、基因突变、遗传漂变、交配系统、基因流以及选择等不同过程之间的相互作用, 是遗传多样性保护、植物遗传改良等的重要基础。随机扩增多态性(Random amplified poly-

morphic DNA, RAPD) 技术通过聚合酶链式反应(Polymerase chain reaction, PCR) 而迅速发展成为居群内和居群间遗传多样性研究的主流技术(钱韦等, 2001; 张富民等, 2002), 在包括 *Zoysia* (Choi 等, 1997) 在内的许多植物上得到了广泛的应用, 为我们

收稿日期: 2003-08-22 修订日期: 2003-11-20

作者简介: 李亚(1968-), 男, 安徽阜阳市人, 博士, 副研究员, 主要从事资源植物学研究。

理解居群遗传结构的这种复杂性提供了方便。

中华结缕草 (*Zoysia sinica* Hance.) 在我国主要分布于山东、安徽、江苏和浙江等省区, 主要生长于滨海地区的沙质土壤和山区, 具有较强的抗盐、抗干旱、耐瘠薄和耐践踏能力, 是近年来比较受推崇的国产优异草坪草种质资源, 也是结缕草属 (*Zoysia* Willd.) 中形态性状变异最大的种类 (李亚等, 2002)。由于大范围的围滩和开山种地, 该种目前已经处于濒危状态而出现在国家二级保护植物的名单上。本研究的目的在于, 通过对中华结缕草居群遗传结构和遗传分化的研究, 为科学和有效地确定种质资源取样策略、核心种质筛选以及确定资源保护和利用策略奠定基础, 同时探讨 RAPDs 技术用于

结缕草属遗传分化研究的可行性。

1 材料与方法

1.1 材料

根据中华结缕草的地理分布, 分别在山东、安徽、江苏、浙江的不同地区采集 7 个居群, 每个居群取样 15 株 (表 1)。取样时, 居群内个体间距离都在 20 m 以上, 以避免取自同一克隆的材料。单株取回后于玻璃温室中盆栽培养。经过鉴定, 其中射阳、大丰两个居群为长花中华结缕草 (*Zoysia sinica* Hance var. *nipponica* Ohwri), 其余 5 个居群为中华结缕草。居群取样地点及相关数据参见表 1。

表 1 中华结缕草居群取样地点

Table 1 Sampled populations of *Zoysia sinica* Hance in China with accession and location

居群 Population	地理分布 Location	生境情况 Habitat	经度(°) Longitude	纬度(°) Latitude	样本数 Sample size
ZS01	江苏省射阳县 Sheyang county, Jiangsu Province	射阳港海滩 Beach nearby Sheyang harbor	120.50	33.70	15
ZS02	江苏省大丰市 Dafeng county, Jiangsu Province	王港闸附近海滩 Beach nearby sluice of Wang harbor	120.91	33.60	15
ZS03	浙江省舟山市 Zhoushan county, Zhejiang Province	普陀岛海边山坡 Hillside nearby beach of Putuo island	122.15	30.05	15
ZS04	安徽省歙县 She county, Anhui Province	江边沙地 Sandy bank of the Xinanjiang	118.25	29.50	15
ZS05	安徽省宁国市 Ningguo, Anhui Province	汪溪河边草地 Meadow on the bank of Wang river	119.15	30.76	15
ZS06	江苏省句容市 Jurong, Jiangsu Province	田埂 Ride of the field	119.15	32.05	15
ZS07	山东省胶州市 Jiaozhou, Shandong Province	胶州湾海边沙地 Seashore sand in Jiaozhou harbor	120.00	36.43	15

1.2 方法

选取幼嫩叶片 0.5 g, 带回实验室, 采用 CTAB 法提取总 DNA。RAPD 扩增反应在 PE9600 PCR 仪上进行, 经过筛选, 选用 10 条随机引物。反应条件经过比较和优化, 确定为 25 μ L 的 PCR 反应液内含: 模板约 50 ng, 1 U Taq 酶, 10 \times Buffer 缓冲液 2.5 μ L, 2.0 mmolL⁻¹ MgCl₂, 四种 dNTP 各 0.20 mmolL⁻¹, 0.5 μ molL⁻¹ 引物。PCR 扩增条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min, 然后进行 45 个循环: 94 $^{\circ}$ C 变性 15 s, 36 $^{\circ}$ C 复性 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 90 s, 循环结束后 72 $^{\circ}$ C 5 min。PCR 产物在含有 EB 的 1.4% 琼脂糖凝胶中电泳, 以 100 bp Marker (GeneRuler 100 ladder, Fermentas UAB, Inc.) 作为标准分子量对照, EPSON 紫外自动成像仪照相。引物及扩增条带见表 2。

1.3 数据分析

RAPD 是显性标记, 同一引物迁移率一致的条

带假设是同源的, 根据扩增阳性(1)和扩增阴性(0)记录电泳谱带, 形成原始数据矩阵(数据未列出), 三种方法进行数据处理: (1) 将条带的有无视为表征性状, 用 AMOVAPRE (ver. 1.01, Mark Mullier, 1998) 构建组文件以及居群文件, 由于 AMOVA-PRE 可供选择的距离系数有限, 采用 RAPDistance (ver. 1.31, John Armstrong etc.) 计算 Jaccard 遗传距离, 构建距离矩阵文件, 以此数据为基础, 最后采用 WINAMOVA (ver. 1.04, Laurent Excoffier, 1992) 进行分子方差分析。(2) 假定群体处于哈迪-温伯格平衡 (Hardy-Weinberg equilibrium) 条件下, 通过隐性基因型频率的估算来计算各基因及基因型的频率, 用 POPGENE32 (ver. 1.31, Francis C. Yeh) 计算观测等位基因数 (A)、有效等位基因数 (Ae) 和基因多样性指数 (He) 来反映居群内不同结构层次的遗传多样性和变异水平, 同时计算居群总基因

多样性(H_t)、各居群基因多样性(H_s)和基因分化系数(G_{st}), 计算居群间的 Nei 无偏遗传一致度和遗传

距离, 来反映居群间遗传分化。(3) 以表型数据为基础, 计算 Shannon 信息多样性指数: $H = -\sum P_i \cdot \log P_i$ 。

表 2 引物和 105 个个体中得到的 RAPD 标记
Table 2 Primers employed and RAPD markers obtained for the 105 individuals studied

引物 Primer	序列 Sequence (5'-3')	扩增条带大小 最小-最大 Size min-max (bp)	条带数 Number of bands		
			多态条带 Polymorphic	单态条带 Monomorphic	总和 Total
A12	TCGGCGATAG	300-1 400	5	3	8
A14	TCTGTGCTGG	500~1 000	5	1	6
A17	GACCGCTTGT	400~1 300	7	0	7
B09	TGGGGGACTC	400~1 200	6	1	7
B10	CTGCTGGGAC	250~1 200	12	1	13
C07	GTCCCGACGA	300~1 400	6	3	9
C08	TGGACCGGTC	300~1 300	4	2	6
D09	CTCTGGAGAC	400~1 300	5	1	6
D12	CACCGTATCC	350~1 100	6	1	7
D17	TTTCCCACGG	500~1 400	8	2	10

表 3 中华结缕草居群 RAPD 分析的遗传多态性
Table 3 RAPD polymorphism of population of *Zoysia sinica* Hance. in China

居群 Population	Nb	Npb	PPB	Nb/p	I
ZS01(射阳, Sheyang)	79	39	49.37	3.9	0.296 5
ZS02(大丰, Dafeng)	79	35	44.30	3.5	0.255 4
ZS03(普陀山, Putuo)	79	38	48.10	3.8	0.282 7
ZS04(歙县, SheXian)	79	30	37.97	3.0	0.228 5
ZS05(宁国, Ningguo)	79	41	51.90	4.1	0.298 7
ZS06(句容, Jurong)	79	35	44.30	3.5	0.259 4
ZS07(胶洲, Jiaozhou)	79	39	49.37	3.9	0.279 3

Nb: 条带总数; Npb: 多态性条带总数; PPB: 多态性条带比率; Nb/p: 单位引物多态性比率; I: 香农信息多样性指数

Nb: No. of RAPD bands; Npb: No. of polymorphic bands; PPB: Percentage of polymorphic bands; Nb/p: No. of polymorphic bands per primer; I: Shannon's Information index [Lewontin (1972)]

H : 信息多样性指数, P_i 为扩增产物存在的频率。

计算居群内遗传多样性 H_{pop} 和种内多样性 (H_{sp})。并辅以 SPSS 9.0 在 RAPD 表型基础上的个体间聚类分析。

2 结果与分析

2.1 居群内遗传多样性

10 条 RAPD 随机引物对中华结缕草样品的扩增结果见表 2、表 3。7 个居群的 105 个个体, 共扩

增出 79 条 RAPD 条带, 大小在 250~1 400 bp 之间, 其中 64 条带为多态性条带, 占条带总数的 81.01%。从多态位点百分率(PPB)、单位引物多态性比率(Nb/p)、香农信息多样性指数(I)三个多样性参数来看, 各居群内的遗传变异都比较大, 但各参数在居群间的差异比较小。按照各居群遗传变异由高向低的顺序, PPB 值表现为居群 ZS05>ZS01=ZS07>ZS03>ZS02=ZS06>ZS04; Nb/p 值表现为居群 ZS05>ZS01=ZS07>ZS03>ZS02=ZS06>ZS04; I 值表现为居群 ZS05>ZS01>ZS03>ZS07>ZS06>ZS02>ZS04。可见不同参数得到的遗传变异的大小也不完全相同, 但反映的趋势大体是一致的。来自宁国汪溪的居群和来自射阳海边的居群变异最大, 而来自歙县新安江的居群遗传变异最小。

基于基因频率矩阵, 用 Popgen 32 对中华结缕草居群内平均观察等位基因数(A)、平均有效等位基因数(Ae)和 Nei 基因多样性指数(He)等基因多样性评价的结果见表 4。比较表 3 和表 4, 以基因多样性参数对中华结缕草居群的评价结果与作为表型性状所得到结果比较类似, 各遗传多样性参数仍以宁国汪溪和射阳海边居群变异最大, 大丰海边和歙县新安江居群变异最小。

2.2 居群间遗传分化

由于来自海边盐生生境的种源和来自内陆甜土地区的种源不仅在生境上而且在形态上都有一定的差异, 因此把它们分成两组, 其中来自射阳和大丰的

两个居群为一组,是长花中华结缕草,其余为一组,是中华结缕草。在 Jaccard 距离系数矩阵的基础上,

表 4 中华结缕草居群的基因多样性
Table 4 Gene diversity of populations of *Zoysia sinica* Hance in China

居群 Population	A	Ae	He
ZS01(射阳, Sheyang)	1.493 7	1.372 7	0.205 3
ZS05(宁国, Ningguo)	1.519 0	1.359 1	0.204 1
ZS03(普陀山, Putuo)	1.481 0	1.350 8	0.194 7
ZS07(胶州湾, Jiaozhou)	1.493 7	1.336 6	0.190 7
ZS06(句容, Jurong)	1.443 0	1.320 1	0.178 3
ZS02(大丰, Dafeng)	1.443 0	1.308 3	0.174 5
ZS04(歙县, SheXian)	1.379 7	1.280 1	0.157 3

A: 等位基因平均数; Ae: 有效等位基因数; He: 基因多样性指数。
A: mean allele number; Ae: effective allele number; He: Nei's gene diversity.

用 AMOVA 进行的遗传变异分子方差分析见表 5。组间的遗传变异只占总变异的 4.84%, 遗传变异主要存在于居群内, 占 70.44%, 居群间变异占 24.71%, 出现了显著的遗传分化。基于表型分析的香农多样性指数进行的居群间遗传分化的统计结果与 AMOVA 分析的结果类似, 居群内遗传变异占总变异的 69.39%, 居群间的遗传变异只占总变异的 30.61%, 而根据 Nei 基因多样性指数估算的居群间遗传分化(表 8), 相对较高, 达 34.37%。居群间分化的另一个现象, 就是居群特有带。在本实验所得到的 79 条扩增带中, 没有一个带型表现为居群特有带, 却有 15 条带表现为居群共有带。Nei(1978)无偏遗传一致度和遗传距离(表 6)分析也可以看出, 遗传一致度值都大于 0.8, 而大部分居群间 Nei 遗传距离都在 0.2 以下。遗传分化最大的出现在射阳

表 5 中华结缕草居群的 AMOVA 分析

Table 5 Analysis of molecular variance of 105 individuals of *Zoysia sinica* Hance using RAPD

谱系结构 Source of variance	巢式分析 Nested analysis			居群间分析 Analysis among population			组间分析 Analysis among groups			p-Value
	%	SSD	VC	%	SSD	VC	%	SSD	VC	
组间 Among groups	4.84	0.958 6	0.006 7	—	—	—	11.69	0.958 6	0.016 3	0.099 9
居群间/组内 Among populations (within groups)	24.71	3.063 3	0.034 3	28.06	4.021 8	0.038 2	—	—	—	<0.001 0
居群内 Within populations	70.44	9.587 0	0.097 8	71.94	9.587 0	0.097 8	88.31	12.650 3	0.122 8	0.999 0

SSD: 方差总和 Sum of squared deviation; VC: 变异组分 Variant component; 1000 次 permutation 显著性检测 Significance tests after 1000 permutations.

表 6 Nei 无偏遗传一致度(右上角)和遗传距离(左下角)

Table 6 Nei's Unbiased Measures of Genetic Identity(above diagonal) and genetic distance (below diagonal).

居群编号 Population ID	1	2	3	4	5	6	7
ZS01	—	0.915 3	0.877 1	0.817 0	0.811 5	0.887 0	0.851 3
ZS02	0.088 5	—	0.838 6	0.888 9	0.808 5	0.918 2	0.875 9
ZS03	0.131 2	0.176 1	—	0.811 4	0.920 0	0.886 7	0.867 7
ZS04	0.202 2	0.117 8	0.209 0	—	0.831 1	0.894 2	0.854 3
ZS05	0.208 8	0.212 5	0.083 3	0.185 0	—	0.883 0	0.867 3
ZS06	0.119 9	0.085 4	0.120 3	0.111 8	0.124 5	—	0.900 3
ZS07	0.161 0	0.132 5	0.141 9	0.157 4	0.142 4	0.105 0	—

海边居群和歙县新安江边的居群、射阳海边居群和宁国汪溪河边的居群、大丰海边居群和宁国汪溪的居群以及普陀岛海边居群和歙县新安江居群之间, Nei 无偏遗传一致度值都小于 0.82, 而 Nei 遗传距离都大于 0.2; 遗传分化最小的存在于射县海边居群和大丰海边居群、普陀岛海边居群和宁国汪溪的居群、大丰海边居群和句容居群以及句容居群和胶

州湾海边居群之间, 无偏遗传一致度值都在 0.9 以上, Nei 遗传距离值则基本都在 0.1 以下(句容农田的居群和胶州湾海边居群的 Nei 遗传距离值为 0.105 0)。

利用 SPSS 9.0 进行中华结缕草居群个体间表型聚类分析的结果(数据和树状图未列出), 虽然每个居群都有部分来自同一居群的个体聚在一个组,

但没有一个居群的个体全部聚在一起,而是分散在不同的组中。

表 7 由 Shannon 多样性指数估算的居群间遗传分化
Table 7 Partitioning of the genetic diversity among and within 7 populations of *Zoysia sinica* Hance in China estimated by Shannon's diversity index

居群 Population	Hpop	Hsp	Hpop /Hsp	(Hsp-Hpop) /Hsp
ZS01	13.021 4	16.645 4	0.782 3	0.217 7
ZS02	10.587 9	16.645 4	0.636 1	0.363 9
ZS03	11.713 1	16.645 4	0.703 7	0.296 3
ZS04	11.388 1	16.645 4	0.684 2	0.315 8
ZS05	13.612 9	16.645 4	0.817 8	0.182 2
ZS06	10.117 0	16.645 4	0.607 8	0.392 2
ZS07	10.405 9	16.645 4	0.625 2	0.374 8
平均值 Mean	11.549 4	16.645 4	0.693 9	0.306 1

Hpop: 居群内遗传多样性 Within-population genetic diversity; Hsp: 种遗传多样性 Total genetic diversity; Hpop/Hsp: 居群内遗传多样性比例 Proportion of genetic within-population; (Hsp-Hpop)/Hsp: 居群间遗传多样性比例 Proportion of genetic diversity among populations.

表 8 中华结缕草 7 个居群的遗传分化(Nei 指数估算)
Table 8 Genetic differentiations among 7 populations of *Zoysia sinica* estimated by Nei's index

引物 Primer	Ht	Hs	Gst	Nm
a12	0.152 7	0.107 8	0.129 7	2.393 9
a14	0.324 5	0.257 2	0.174 0	1.889 0
a17	0.349 6	0.244 4	0.324 2	1.591 6
b09	0.370 6	0.231 2	0.315 9	0.964 4
b10	0.311 9	0.136 6	0.440 7	1.996 6
c07	0.193 1	0.146 8	0.145 7	1.981 5
c08	0.250 2	0.107 2	0.344 7	0.725 2
d09	0.250 7	0.165 0	0.330 8	2.320 8
d12	0.316 9	0.241 2	0.197 7	1.866 2
d17	0.321 6	0.257 5	0.179 0	3.588 9
平均 Mean	0.284 1	0.186 4	0.343 7	0.954 8

Ht: 总基因多样性 Total gene diversity; Hs: 居群内基因多样性 Within-population gene diversity; Gst: 居群间遗传分化 Genetic differentiation among populations.

3 结论与讨论

(1) 中华结缕草遗传变异比较丰富, 主要存在于居群内, 不同方法所得结果都在 70% 左右 (65.63% ~ 71.94%), 居群之间遗传变异占 30% (28.06% ~ 34.37%) 左右, 已经出现显著的遗传分化。这与中

华结缕草异花受粉, 同时又与无性繁殖的繁育系统有关。来自海边的长花中华结缕草和内陆的中华结缕草居群(句容居群除外)的 RAPD 数据与形态特点的关系基本一致的, 但遗传分化不显著。不同方法所得到的结果都显示, 来自宁国汪溪的居群和来自射阳海边的居群变异最大, 歙县新安江边的居群遗传变异最小。其中来自江苏大丰的长花中华结缕草居群和来自句容的中华结缕草居群之间的遗传距离小于大多数中华结缕草之间的遗传距离, 还有待于进一步的研究、核实。

(2) 考虑到中华结缕草遗传结构和变异的这些特性, 在取样策略、保护以及遗传育种方法, 都应该以居群内部的遗传变异为主, 同时兼顾不同居群。也就是说, 在收集育种材料以及其它目的的取样时, 应在同一个居群内设置更多的取样个体, 尽量将所有变异单株都收集在内, 在考虑就地保护措施的时候, 应该少设置保护区的个数而尽量扩大单个居群保护区的面积。

(3) 本研究没有对相同迁移率谱带的同源性假设进行验证。Thormann 等(1994)将 RAPD 产物标记作探针的杂交结果表明, 与探针片断迁移率一致的带有时并不同源, 但这种情况仅发生在种间。同时比较了 RFLP 和 RAPD 标记在种内和种间得出的结果, 发现虽然在种以上等级的结果相差甚远, 说明在迁移率一致的带中, 可能存在序列不同但分子量相同的几条带, RAPD 无法区分, 但在种内水平上的结果是完全吻合的, Castagna 等(1997)用 RFLP 和 RAPD 比较研究也得出了相同的结论, 说明在种内水平上这种同源性假设是有依据的。

(4) 利用显性标记(包括 RAPD)对自然居群的遗传结构进行分析, 一般有两类方法: 第一类是把条带看作两个复等位基因的位点系统, 在假定居群处于 Hardy-Weinberg 平衡的条件下估计出基因频率; 另一类是不进行哈迪-温伯格平衡的假设, 利用条带的表型来估计遗传多样性, 包括 AMOVA 巢式方差分析和香农多样性指数的阶层分析。本研究利用这几种分析方法所得到的结果基本一致, 都支持哈迪-温伯格平衡状态的假设。表明这几种方法都适合于中华结缕草居群遗传分化的分析。

参考文献:

Castagna R, Gnocchi S, *et al.* 1997. Genetic variability of
(下转第 366 页 Continue on page 366)

类与含量,确定合理的施肥方式,使所施肥料可缓解重金属离子对作物的危害,真正的促进作物的生长。

本实验研究了 N、P、K 共同施用, Cu 对小麦种子萌发和幼苗生长的影响,至于 N、P、K 分别施

表 1 施用 N、P、K 肥后,不同质量浓度的 Cu 对小麦叶绿素含量的影响
Table 1 Effects of fertilizer on the contents of chlorophyll of wheat with Cu

Cu 浓度 Cu concentration (mg/L)	处理组叶绿素含量(mg/g) Contents of chlorophyll in treatment group			对照组叶绿素含量(mg/g) Contents of chlorophyll in control group		
	叶绿素 a Chl a	叶绿素 b Chl b	总叶绿素 Total chl	叶绿素 a Chl a	叶绿素 b Chl b	总叶绿素 Total chl
0	1.008	0.368	1.376	0.984	0.404	1.384
20	1.100	0.496	1.596	1.092	1.568	2.660
50	1.140	1.412	2.552	1.080	2.212	3.292
80	1.060	0.920	1.580	1.040	1.212	2.252
150	1.001	0.325	1.326	1.048	0.520	1.608
300	0.989	0.173	1.162	1.052	0.512	1.594

用时如何影响 Cu 对小麦种子的萌发和幼苗的生长,我们将在下一步进行更为详尽的研究。

本文得到了孙存华教授和张健副教授的热情指导,在此表示衷心的感谢。

参考文献:

- 王秀奇. 1996. 基础生物化学实验(第二版)[M]. 北京: 高等教育出版社, 205-209.
- 朱云集, 王晨阳, 马元喜, 等. 1997. 铜胁迫对小麦根系生长发育及生理特性的影响[J]. 麦类作物, (5): 49-51.
- 汤章城. 1984. 逆境条件下植物体内脯氨酸累积及其可能的意义[J]. 植物生理学通讯, 20(1): 15-26.
- 张志良. 1990. 植物生理实验指导[M]. 北京: 高等教育出版社, 88-91, 154-155, 259-260.
- Chang HY(常红岩). 2000. Advances in the study of plants copper toxicity(植物铜素毒害研究进展)[J]. *J of Shandong Agric Univ(Natural Science)* 山东农业大学学报(自然科学版), 2: 227-230.

Chen HM(陈怀满), Zheng CR(郑春荣), Wang SQ(王慎强), et al. 2001. Effect of soil polluted by different heavy metal sources on rice(不同来源重金属污染的土壤对水稻的影响)[J]. *Rural Eco-Environment*(农村生态环境), 17(2): 35-40.

Liu DY(刘登义), Wang YB(王友保). 2002. Effects of Cu and As on germination and seedling growth of crops(Cu, As 对作物种子萌发和幼苗生长影响的研究)[J]. *Chinese J of Appl Ecol*(应用生态学报), 13(2): 179-182.

Yuan L(袁玲), Zhu LL(祝莉莉), He GC(何光存). 2000. Role of Cu²⁺ and Ag²⁺ in seeds germination and seedlings growth of rice(Cu²⁺, Ag²⁺ 在水稻种子萌发及幼苗生长中的作用)[J]. *Hubei Agric Sci*(湖北农业科学), (2): 24.

Zhang SG(张士功). 1999. Effect of salicylic acid on self-resistance of wheat (*Triticum aestivum*l)(水杨酸对小麦高盐毒害的缓解作用)[J]. *Chin J Appl Environ Biol*(应用与环境生物学报), 5(3): 264-267.

(上接第 349 页 Continue from page 349)

- the wild diploid wheat *Triticum urartu* revealed by RFLP and RAPD markers[J]. *Theor Appl Genet*, 88: 818-823.
- Choi JS, Ahn BJ, et al. 1997. Classification of Zoysiagrasses (*Zoysia* spp.) native to the southwestern coastal regions of Korea using RAPDs[J]. *J Kor Soc Hort Sci*, 38(6): 789-795.
- Li Y(李亚), Ling PP(凌萍萍), Liu JX(刘建秀). 2002. Morphological diversity of above-ground part of *Zoysia* spp. in China(中国结缕草属植物 *Zoysia* spp. 地上部分形态类型多样性)[J]. *Journal of Plant Resources and Environment*(植物资源与环境学报), 11(4): 33-39.
- Qian W(钱韦), Ge S(葛松). 2001. Analysis of popula-

tion genetic structure by using dominate markers(居群遗传结构研究中显性标记数据分析方法初探)[J]. *Acta Genetica Sinica*(遗传学报), 28(3): 244-255.

Thormann CE, Ferreira ME, et al. 1994. Comparison of RFLP and RAPD markers to estimating genetic relationships within and among cruciferous species[J]. *Theor Appl Genet*, 88: 973-980.

Zhang FM(张富民), Ge S(葛松). 2002. Data analysis in population genetics I. Analysis of RAPD data with AMOVA(群体遗传学研究中的数据处理方法 I. RAPD 数据的 AMOVA 分析)[J]. *Biodiversity Science*(生物多样性), 10(4): 438-444.