

# 海雀稗种质资源 RAPD 分子标记的遗传多样性研究

解新明, 卢小良, 孙雄松, 董朝霞, 郭和蓉

(华南农业大学 南方草业中心, 广东 广州 510642)

**摘要:**以来自广东省海雀稗的 3 个野生居群和 1 个草坪型栽培品种为材料, 采用 RAPD 分子标记技术对其遗传多样性及在居群内和居群间的大小和分布格局进行了分析. 结果发现, 20 条引物共扩增出 176 条带, 其中 114 条带为多态性带, 占总带数的 64.77%. 从 Shannon 信息指数分析的结果来看, 居群内、居群间和总居群的遗传多样性指数分别为 0.023 0、0.276 7 和 0.299 7, 遗传分化系数为 0.923 3, 表明在总的遗传变异中, 有 92.33% 的变异存在于居群间, 而只有 7.67% 的变异存在于居群内, 充分反映了海雀稗无性繁殖的内繁育系统在遗传变异调节中的重要作用. UPGMA 聚类分析的结果表明, 来自 4 个居群的所有个体被分为 2 支, 一支包括栽培品种和番禺居群, 另一支包括珠海居群和广州市区居群, 这一聚类结果与植株的高矮和茎的粗细等形态特征有一定的相关性.

**关键词:**海雀稗; 种质资源; RAPD; 遗传多样性

中图分类号: S54

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2004)S2-0010-06

## Genetic diversity of seashore paspalum (*Paspalum vaginatum*) based on RAPD molecular markers

XIE Xin-ming, LU Xiao-liang, SUN Xiong-song, DONG Zhao-xia, GUO He-rong

(South Pratacultural Center, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

**Abstract:** Using the materials (*Paspalum vaginatum* Sw.) of three natural populations and one turfgrass cultivar from Guangzhou, Panyu and Zhuhai in Guangdong Province, the genetic diversities and their distribution pattern within and among populations were analyzed by means of RAPD molecular markers. The results showed that a total of 176 reproducible RAPD fragments were produced by using 10-mer random primers, with an average of 8.8 fragments per primer. One hundred and fourteen fragments (64.77% of the total observed) were polymorphic. By analysis of Shannon information index, the genetic diversity indexes within and among populations were 0.023 0 and 0.276 7 respectively, and the genetic diversity index of whole population was 0.299 7. The genetic differentiation coefficient was 0.923 3, which illustrated that total genetic variations among populations was 92.33% and variations within populations was only 7.67%. It also indicate that the inbreeding system of vegetative multiplication of seashore paspalum play an important role in adjusting the genetic variation of this species. UPGMA cluster analysis showed that all individuals from four populations were divided into two clades. One included turfgrass cultivar (Hawaii grass) and population Panyu, and another included population Guangzhou and population Zhuhai. The results are consistent with the morphological characteristics such as height and diameter of culm.

**Key words:** *Paspalum vaginatum*; germplasm resource; RAPD; genetic diversity

海雀稗 *Paspalum vaginatum* Sw. 是一种具有重要 两用植物. 广泛分布于两半球的沿海地区, 在美国南  
经济价值和生态价值的种质资源, 是牧草兼草坪草 部、非洲、澳大利亚及太平洋沿岸国家最为丰富<sup>[1]</sup>.

收稿日期: 2004-09-18

作者简介: 解新明(1963-), 男, 副教授, 博士; 通讯作者: 卢小良(1954-), 男, 副教授.

基金项目: 农业部 948 项目 (202102); 华南农业大学博士科研启动基金 (2004B006)

在中国主要分布于台湾、云南、广东和海南等省<sup>[2,3]</sup>。作为草坪草,海雀稗已在世界热带与亚热带地区广为种植,可用于高尔夫球场、足球场、棒球场、英式橄榄球场、机场、家用草坪、商用景观绿地、路边及排水性能差的地域草坪建植。作为牧草,海雀稗具有较高的营养价值和适口性,其草质脆嫩,品质好,叶量大,在我国的广东省已被当地农民自发地使用了 50 年。与雀稗属的其他 8 种植物相比,其粗蛋白质含量(16.76%)最高,而粗纤维的含量(23.43%)又是 9 种植物中最低的<sup>[2,4~6]</sup>。在水土保持方面,由于海雀稗具有很强的生长势和扩展能力,其匍匐茎贴靠地表,茎节上的不定根和根系对土壤有一定的固着力,从而使它具有较强的防止土壤冲刷流失的能力。该种植物可自然生长于海滨、沼泽、沙地等多种生境,适宜的 pH 范围为 3.6~10.2。能耐宽范围的水资源,对再循环水、工业废水、生活污水和海水均有很强的再利用能力,可在厌氧性土壤中正常生长,对土壤重金

属及有机化学物质也有较强的吸收、代谢和解毒能力,因此是清洁污水,治理被污染土壤的有效植物。然而,目前我国除了对草坪草品种(夏威夷草)进行了引种栽培外,对本地资源的研究、开发和利用却极为稀少。为了能加快对这种资源的开发利用,本文采用 RAPD 分子标记技术对广东省的 3 个天然居群和 1 个栽培品种进行了分析,试图为该种植物的引种驯化和品种选育提供有益的帮助。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

材料采自广东省的广州市区、番禺及珠海市的 3 个天然居群和 1 个栽培品种(夏威夷草)(表 1),并种植于引种园。考虑到海雀稗无性繁殖的特点,每个居群选取了 4~5 个单株个体:即栽培品种 5 份,其他 3 个地区均 4 份,均为单株取样,共 17 份材料。

表 1 居群代码、采集地和生境特点

Tab. 1 Population codes, localities and habitats

| 居群代码 | 采集地    | 生境特点    |
|------|--------|---------|
| HA   | 华南农业大学 | 红壤土栽培品种 |
| GZ   | 广州市区   | 酸性红壤土草丛 |
| ZH   | 珠海     | 海滨群落    |
| PY   | 番禺     | 冲积土草丛   |

### 1.2 方法

1.2.1 DNA 的提取、扩增和电泳检测 采用 CTAB 法<sup>[7]</sup>对植物新鲜叶片进行总 DNA 提取。扩增反应在美国 MJ 公司 PTC-100™热循环仪上进行。反应体积 20  $\mu\text{L}$ , 内含 1  $\times$  buffer,  $\text{MgCl}_2$  2  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , dNTP 100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , Taq DNA 聚合酶 1 U, 引物 0.5  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 总 DNA 模板 30 ng。扩增反应程序为 94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 4 min, 然后进入循环, 每个循环 94  $^{\circ}\text{C}$  变性 1 min, 36  $^{\circ}\text{C}$  退火 1 min, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 1.5 min, 共 45 个循环, 最后再延伸 7 min。扩增产物在 1  $\times$  TAB 缓冲系统中, 用含有 EB(0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 的 14 g/L 的琼脂糖电泳分离, 同时以 Lambda DNA/III + EcoRI Marker 作为相对分子质量标记, 电压 4.9 V/cm, 时间 1.5 h, 上海产 ZF 紫外透射反射分析仪上观察并拍照。以上试剂均购自上海生物工程公司。

1.2.2 数据处理 RAPD 扩增产物以 0 或 1 统计建立二元数据矩阵, 扩增带存在时赋值 1, 否则赋值 0。计算 Jaccard 相似形系数( $S_{JA}$ )和遗传距离( $D$ ,  $D = 1$

$- S_{JA}$ )<sup>[8]</sup>, 并用 MEGA2 软件进行 UPGMA 聚类分析。另外, 在分析中还采用了多态位点百分率( $P$ )和 Shannon 信息指数<sup>[9,10]</sup>等参数对海雀稗的遗传多样性进行分析。

## 2 结果与分析

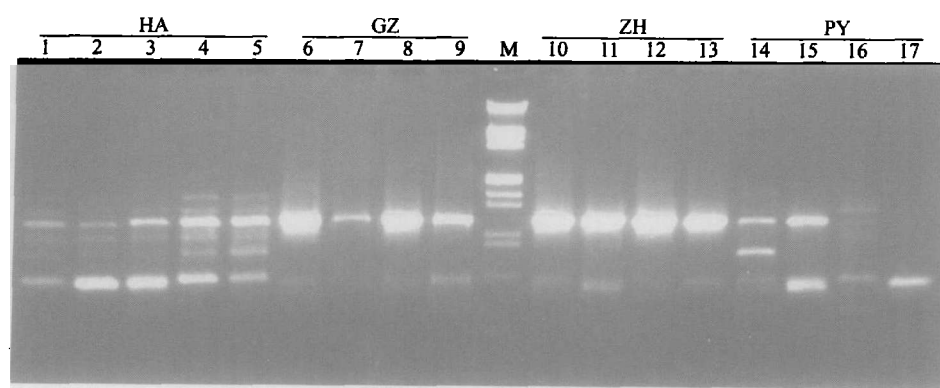
### 2.1 RAPD 产物的多态性及其分布格局

从表 2 可以看出, 20 个引物检测的条带从 5~15 不等。多态位点百分率在 40.00%~87.50% 之间随引物的不同而变化。就总体而言, 20 条引物共扩增出 176 条带, 平均每条引物 8.8 条带, 其中 114 条带为多态性带, 多态位点百分率为 64.77%, 表明海雀稗具有相对较高的遗传变异水平。引物 S110, S135 和 S140 的扩增结果见图 1~3。利用 Shannon 信息指数, 我们对居群内、居群间及总居群的遗传多样性指数进行了分析(表 3), 结果发现, 随着引物的不同, 居群内的多样性指数在 0~0.085 1 之间变化, 平均值为 0.023 0; 总居群的多样性指数在 0.154 2~0.430 3 之

表2 引物、序列和扩增结果

Tab. 2 Primers, sequences and amplified results

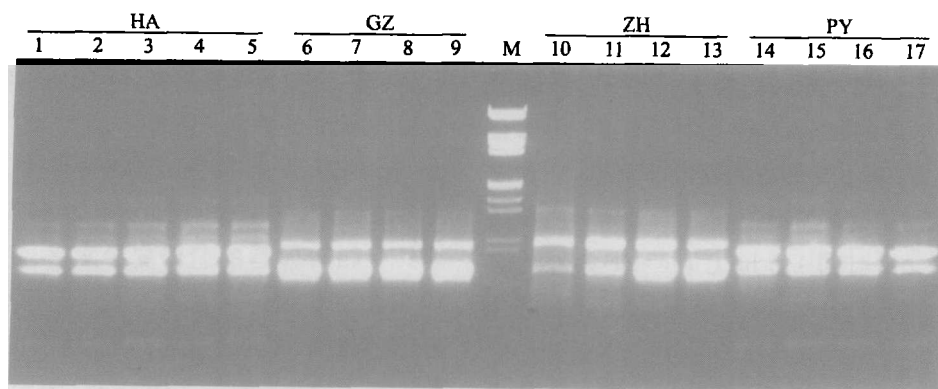
| 引物   | 序列(5' - 3') | 扩增带数 | 多态性带数 | 多态位点百分率/% |
|------|-------------|------|-------|-----------|
| S101 | GGTCGGAGAA  | 11   | 7     | 63.64     |
| S102 | TCGGACGTGA  | 8    | 4     | 50.00     |
| S106 | ACGCATCGCA  | 9    | 5     | 55.56     |
| S108 | GAAACACCCC  | 9    | 6     | 66.67     |
| S109 | TGTAGCTGGG  | 15   | 11    | 73.33     |
| S110 | CCTACGTCAG  | 9    | 8     | 66.67     |
| S111 | CTTCGGCAGT  | 7    | 5     | 71.42     |
| S116 | TCTCAGCTGC  | 6    | 4     | 66.67     |
| S117 | CACTCTCCTC  | 11   | 9     | 81.82     |
| S121 | ACGGATCCTG  | 7    | 3     | 42.86     |
| S122 | GAGGATCCCT  | 5    | 2     | 40.00     |
| S128 | GGGATATCGG  | 8    | 4     | 50.00     |
| S129 | CCAAGCTTCC  | 9    | 5     | 55.56     |
| S131 | TTGGTACCCC  | 5    | 3     | 60.00     |
| S135 | CCACTACTCC  | 9    | 7     | 77.78     |
| S136 | GGAGTACTGG  | 10   | 7     | 70.00     |
| S140 | GGTCTAGAGG  | 8    | 7     | 87.50     |
| S142 | GGTCCGGGAA  | 10   | 6     | 60.00     |
| S145 | TCAGGGAGGT  | 9    | 5     | 55.56     |
| S148 | TCACCACGGT  | 11   | 6     | 54.55     |
| 总计   |             | 176  | 114   | 64.77     |



HA. 夏威夷草; GZ. 广州市区居群; ZH. 珠海居群; PY. 番禺居群

图1 引物 S110 产生的 DNA 多态性

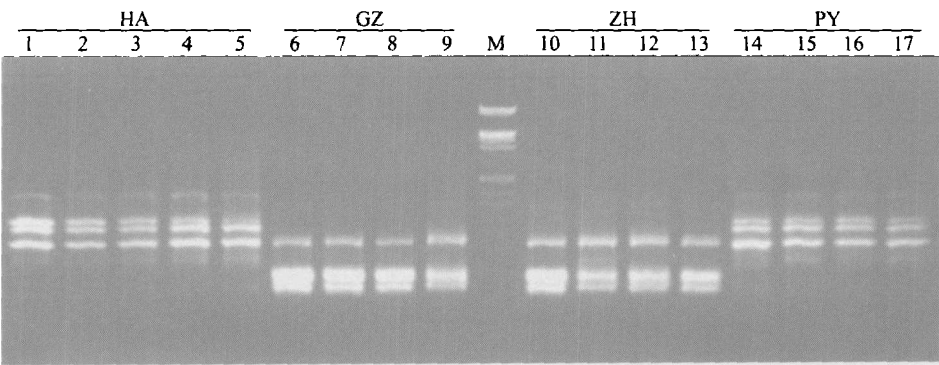
Fig. 1 DNA polymorphisms generated by primer S110



HA. 夏威夷草; GZ. 广州市区居群; ZH. 珠海居群; PY. 番禺居群

图2 引物 S135 产生的 DNA 多态性

Fig. 2 DNA polymorphisms generated by primer S135



HA. 夏威夷草; GZ. 广州市区居群; ZH. 珠海居群; PY. 番禺居群

图 3 引物 S140 产生的 DNA 多态性

Fig. 3 DNA polymorphisms generated by primer S140

表 3 海雀遗传多样性的分布格局

Tab. 3 Distribution patterns of genetic diversities of *Paspalum vaginatum*

| 引物   | 居群内多样性指数 | 总居群的多样性指数 | 居群间多样性指数 | 遗传分化系数  |
|------|----------|-----------|----------|---------|
| S101 | 0.085 1  | 0.245 7   | 0.160 6  | 0.653 6 |
| S102 | 0.000 0  | 0.249 4   | 0.249 4  | 1.000 0 |
| S106 | 0.012 9  | 0.275 6   | 0.262 7  | 0.953 2 |
| S108 | 0.000 0  | 0.332 5   | 0.332 5  | 1.000 0 |
| S109 | 0.004 3  | 0.363 1   | 0.358 8  | 0.988 2 |
| S110 | 0.121 4  | 0.401 9   | 0.280 5  | 0.697 9 |
| S111 | 0.00 0   | 0.358 1   | 0.358 1  | 1.000 0 |
| S116 | 0.013 0  | 0.339 4   | 0.326 4  | 0.961 7 |
| S117 | 0.044 0  | 0.325 2   | 0.281 2  | 0.864 7 |
| S121 | 0.011 1  | 0.154 2   | 0.143 1  | 0.928 3 |
| S122 | 0.015 6  | 0.204 7   | 0.189 1  | 0.923 8 |
| S128 | 0.030 1  | 0.221 2   | 0.191 1  | 0.863 9 |
| S129 | 0.022 6  | 0.254 5   | 0.231 9  | 0.911 3 |
| S131 | 0.000 0  | 0.296 6   | 0.296 6  | 1.000 0 |
| S135 | 0.000 0  | 0.383 5   | 0.383 5  | 1.000 0 |
| S136 | 0.031 5  | 0.320 5   | 0.289 0  | 0.901 7 |
| S140 | 0.015 6  | 0.430 3   | 0.414 7  | 0.963 8 |
| S142 | 0.000 0  | 0.302 6   | 0.302 6  | 1.000 0 |
| S145 | 0.000 0  | 0.279 1   | 0.279 1  | 1.000 0 |
| S148 | 0.053 1  | 0.255 2   | 0.202 1  | 0.791 8 |
| 平均值  | 0.023 0  | 0.299 7   | 0.276 7  | 0.923 3 |

间变化,平均值为0.299 7.借鉴等位酶遗传多样性的分析统计方法<sup>[11,12]</sup>,我们求得了居群间的多样性指数及其遗传分化系数,其变化范围分别在0.143 1~0.414 7和0.653 6~1.00 0之间变化,平均值分别为0.276 7和0.923 3.由于其遗传分化系数为0.923 3,表明在总的遗传变异中,有92.33%的变异存在于居群间,而只有 7.67%的变异存在于居群内.很显然,居群间的遗传变异大于居群内的变异,说明海雀种无性繁殖的内繁育系统(inbreeding system)在其遗传变异的调节中起到了重要作用.

2.2 聚类分析

根据 Jaccard 系数求得 17 个样品间的遗传距离,

并建立矩阵(表 4),利用 UPGMA 聚类法进行聚类分析.结果(图 4)表明,所有 17 个样品被分为两支,一支包括栽培品种(HA)和番禺居群(PY);另一支包括广州市区居群(GZ)和珠海居群(ZH),而且这两支之间的遗传分化极为明显.但就每一分支而言,其两居群间的遗传分化并不明显.这一结果似乎与它们之间的外部形态特征有一定的相关性,其中栽培品种和番禺居群的共同特征是植株较为低矮,茎秆纤细,茎节间短,几乎所有的叶鞘都长于节间;而来自珠海和广州市区的居群,其植株高大,茎秆粗壮,匍匐茎长可达 1 m,茎节间长,仅基部的叶鞘长于节间.这种相关性是偶然的巧合还是必然的联系尚需进一步证实.

表4 Jaccard 系数遗传距离矩阵

Tab. 4 Genetic distance matrix based on Jaccard's similarity coefficients

| 品种 | 1     | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     | 7     | 8     | 9     | 10    | 11    | 12    | 13    | 14    | 15    | 16    | 17 |
|----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|----|
| 1  |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |    |
| 2  | 0.033 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |    |
| 3  | 0.048 | 0.016 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |    |
| 4  | 0.048 | 0.048 | 0.063 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |    |
| 5  | 0.033 | 0.016 | 0.016 | 0.048 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |    |
| 6  | 0.582 | 0.595 | 0.592 | 0.595 | 0.595 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |    |
| 7  | 0.588 | 0.601 | 0.598 | 0.601 | 0.601 | 0.009 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |    |
| 8  | 0.585 | 0.599 | 0.595 | 0.599 | 0.599 | 0.018 | 0.009 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |    |
| 9  | 0.590 | 0.604 | 0.592 | 0.604 | 0.595 | 0.017 | 0.009 | 0.018 |       |       |       |       |       |       |       |       |    |
| 10 | 0.583 | 0.580 | 0.576 | 0.588 | 0.580 | 0.034 | 0.042 | 0.051 | 0.050 |       |       |       |       |       |       |       |    |
| 11 | 0.577 | 0.574 | 0.571 | 0.582 | 0.582 | 0.058 | 0.050 | 0.059 | 0.058 | 0.041 |       |       |       |       |       |       |    |
| 12 | 0.581 | 0.594 | 0.591 | 0.594 | 0.594 | 0.059 | 0.067 | 0.076 | 0.075 | 0.074 | 0.081 |       |       |       |       |       |    |
| 13 | 0.584 | 0.598 | 0.594 | 0.598 | 0.598 | 0.009 | 0.017 | 0.076 | 0.026 | 0.025 | 0.050 | 0.050 |       |       |       |       |    |
| 14 | 0.094 | 0.063 | 0.063 | 0.109 | 0.063 | 0.595 | 0.601 | 0.599 | 0.595 | 0.580 | 0.574 | 0.594 | 0.598 |       |       |       |    |
| 15 | 0.080 | 0.048 | 0.048 | 0.094 | 0.064 | 0.090 | 0.596 | 0.594 | 0.599 | 0.575 | 0.569 | 0.589 | 0.593 | 0.064 |       |       |    |
| 16 | 0.127 | 0.111 | 0.110 | 0.141 | 0.096 | 0.589 | 0.595 | 0.593 | 0.589 | 0.573 | 0.584 | 0.579 | 0.591 | 0.081 | 0.097 |       |    |
| 17 | 0.065 | 0.033 | 0.048 | 0.079 | 0.048 | 0.090 | 0.596 | 0.594 | 0.599 | 0.575 | 0.569 | 0.589 | 0.593 | 0.064 | 0.033 | 0.888 |    |

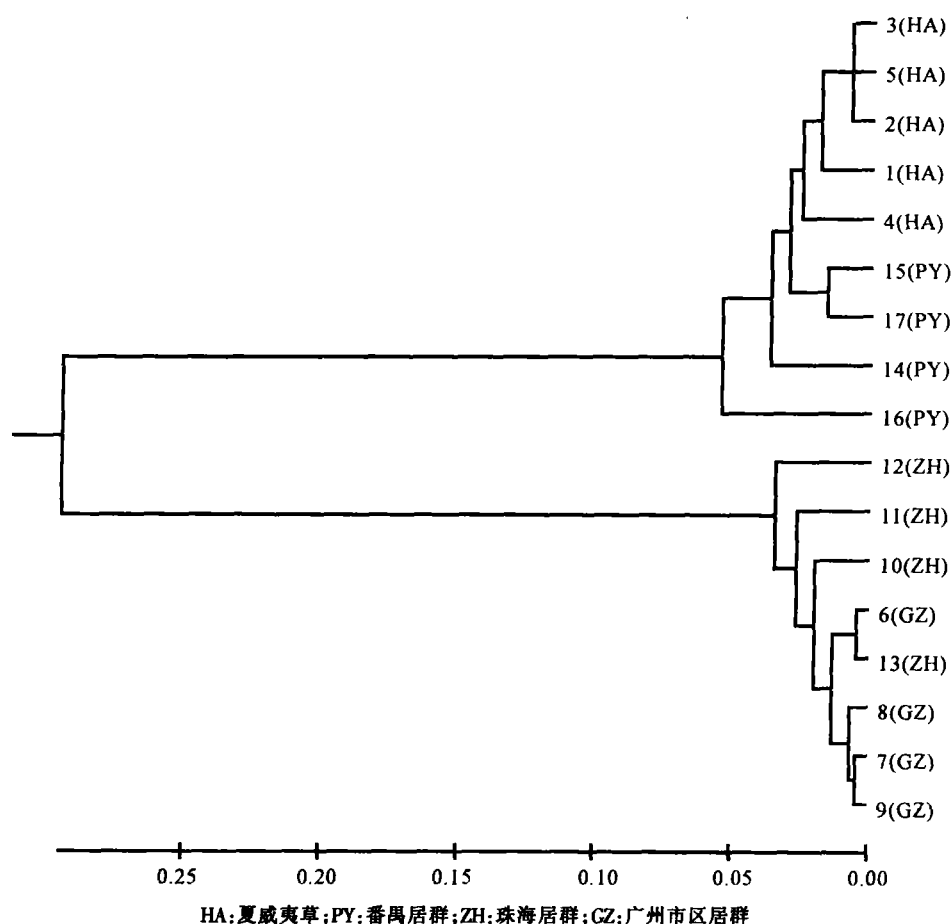


图4 海雀稗 RAPD 分析的聚类图

Fig. 4 UPGMA dendrogram of RAPD analysis of *Paspalum vaginatum* based on Jaccard's genetic distance

### 3 讨论与结论

植物的繁育系统在居群遗传结构的形成过程中起着十分关键的作用,是调节其遗传重组程度的主要因素之一,它不只是起繁殖作用,而且决定着居群内和居群间遗传变异的分布<sup>[11]</sup>。对于异花传粉的外繁育系统(outbreeding system)的居群来说,其大量的变异性被保存在杂合子状态下的隐性基因里,这种变异可以通过居群内的遗传重组被释放出来,因而造成了居群内个体间保持着丰富的遗传多样性,同时外繁育系统还使得居群间保持着强大的基因流,因此又使得大多数高频率的等位基因都出现在每个居群内,造成了居群间的相似性大于差异性,表现出较小的遗传分化<sup>[13]</sup>。然而,对于具内繁育系统的植物(如无融合生殖植物)来说,其遗传变异大都分散在各个居群内,居群间常常表现出自己的遗传结构,即基因型在整个种的分布空间上不是随机分布的,在居群间有着明显的遗传分化<sup>[14]</sup>,因此,往往表现出居群间的遗传分化大于居群内遗传分化的现象。而海雀稗是一种以匍匐茎和根状茎进行无性繁殖的植物,其种子的活力非常小,是一种典型的内繁育系统。RAPD 遗传多样性分析的结果表明,在总的遗传变异中有 92.33% 的变异存在于居群间,而只有 7.67% 的变异存在于居群内,很显然居群间的变异大于居群内,进一步证明了繁育系统在调节植物遗传变异的分布中所起到的重要作用。

UPGMA 聚类分析的结果表明,海雀稗的 3 个天然居群和 1 个栽培品种被分为两支,每一支都具有相似的形态特征,而彼此又表现出一定的间断性,说明无论在形态上还是 DNA 分子水平上,夏威夷草和番禺居群及广州市区居群和珠海居群分别具有更近的遗传关系和更大的相似性。就广州市区居群和珠海居群而言,二者的生境和土壤条件完全不同,前者生长于酸性红壤土上,后者生长于海滨滩涂,但却表现出了十分密切的遗传关系。另外,有 1 个珠海居群的个体落入了广州居群的分支中。由此我们推测,广州市区的海雀稗居群可能是由天然分布于海滨的居群逸生而成,是由于偶然的机会传播而来的,这需要进一步的研究加以验证。对于夏威夷草和番禺居群之间所表现出的密切遗传关系,目前尚不能给出一个明确的解释。但从资源收集和育种的角度来看,根

据它们的形态特征和生境特点,可以对这 3 个居群加以分别选育,低矮茎细的番禺居群可以向着草坪草方向选育,而高大粗壮的广州和珠海居群可向着牧草型方向选育,以适应不同的土壤栽培条件和逆境胁迫。

#### 参考文献:

- [1] LIU Z W, JARRET R L, DUNCAN R R, et al. Genetic relationships and variation among ecotypes of seashore paspalum (*Paspalum vaginatum*) determined by random amplified polymorphic DNA markers[J]. Genome, 1994, 37 (6): 1 011 - 1 017.
- [2] 陈 山. 中国草地饲用植物资源[M]. 沈阳:辽宁民族出版社,1994. 384 - 386.
- [3] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志:第 10 卷,第 1 分册[M]. 北京:科学出版社,1990. 290 - 292.
- [4] 刘国道,罗丽娟. 中国热带饲用植物资源[M]. 北京:中国农业大学出版社,1999. 176 - 179, 502 - 504.
- [5] 欧阳底梅,董闻达. “多用型”水土保持植物——百喜草[M]. 草原与草坪,2000,(2):45.
- [6] 中国农业科学院草原研究所. 中国饲用植物化学成分及营养价值表[M]. 北京:农业出版社,1990. 66.
- [7] DOYLE J, DOYLE J L. A rapid DNA isolation method for small quantities of fresh tissues[J]. Phytochem Bull, 1987, (19):11 - 15.
- [8] KING L M, SCHAAL B A. Ribosomal DNA variation and distribution in *Rudbeckia missouriensis* [J]. Evolution, 1989, (43):1 117 - 1 119.
- [9] XIE X M, YUN J F, YIN J, et al. RAPD analysis of genetic diversity of *Agropyron mongolicum* [J]. Acta Bot Boreal-Sin, 2002, 22(1):56 - 62.
- [10] 恽 锐,王洪新,胡志昂,等. 蒙古栎、辽东栎的遗传分化:从形态到 DNA[J]. 植物学报,1998,40(11):1 040 - 1 046.
- [11] 王中仁. 植物等位酶分析[M]. 北京:科学出版社,1996. 42 - 163.
- [12] NEI M. F-statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations[J]. Ann Human Genet, 1977,(41): 225 - 233.
- [13] 解新明,云锦凤,赵 冰,等. 蒙古冰草遗传多样性的等位酶分析[J]. 草业科学,2001,18(6):6 - 11.
- [14] BROWN A H D. Enzyme polymorphism in plant population [J]. Theoret Pop Biol, 1979, (15):31 - 42.

【责任编辑 周志红】