

应用 RAPD 特异标记分析拟鹅观草属 部分物种的基因组组成

丁春邦, 周永红, 杨瑞武, 张利, 郑有良

(四川农业大学小麦研究所, 四川都江堰 611830)

摘要: 选用小麦族中 8 个基本基因组 (E, H, I, P, St, W, Ns, R) 的特异 RAPD 引物进行 PCR 扩增检测, 分析 *Pseudoroegneria gracillima*, *P. kosaninii*, *Roegneria alashanica* 和 *R. magnicaespes* 这 4 个四倍体物种的基因组组成。结果表明: *P. gracillima*, *P. kosaninii*, *R. alashanica* 和 *R. magnicaespes* 中除了含有 St 或经修饰的 St 基因组外, 都不含 E, H, I, P, W, Ns 和 R 基因组, 由此推断 *P. gracillima* 和 *P. kosaninii* 至少含有一个 St 或经修饰的 St 基因组, 另一个基因组是否为 Y 基因组, 需要进一步研究证实。结合前人细胞遗传学研究的结果, 推断 *R. alashanica* 和 *R. magnicaespes* 为同源四倍体或部分同源四倍体, 其基因组组成为 StStStSt 或 St₁St₁St₂St₂。因此, 结合外部形态特征以及前人细胞遗传学、分子标记研究和核型分析的结果, 推断 *R. alashanica* 和 *R. magnicaespes* 与 *P. elytrigoides* 一样, 也可能是在中国分布的四倍体拟鹅观草属物种, 为系统整理和研究国产拟鹅观草属物种及其地理分布提供了 DNA 分子水平上的资料。

关键词: 拟鹅观草属; RAPD; 基因组特异标记; 基因组组成

中图分类号: Q943.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2005)03-0249-05

The genome constitutions of some *Pseudoroegneria* species assessed by genome-specific RAPD markers

DING Chun-bang, ZHOU Yong-hong, YANG Rui-wu,
ZHANG Li, ZHENG You-liang

(Triticeae Research Institute, Sichuan Agricultural University, Dujiangyan 611830, China)

Abstract: To analyze the genome constitutions of four tetraploid species, i. e. *Pseudoroegneria gracillima*, *P. kosaninii*, *Roegneria alashanica* and *R. magnicaespes*, eight different genome-specific RAPD primers were selected for PCR amplification reaction. The results indicated that these four tetraploid species had the St or slightly modified St genome but lacked the E, H, I, P, W and Ns genomes. It was concluded that *P. gracillima* and *P. kosaninii* contained at least one St or slightly modified St genome, while the other genome needed to be further studied if it was Y genome. According to genome-specific RAPD markers and the studies on cytogenetics, *R. alashanica* and *R. magnicaespes* were both auto-or allo-tetraploid species with StStStSt or St₁St₁St₂St₂ genomes. Therefore, it may suggest that *R. alashanica* and *R. magnicaespes* may be the species of *Pseudoroegneria* in China based on the morphology, cytogenetics, molecular marker and karyotypes. This study will also provide DNA molecular data for classification of *Pseudoroegneria* in China.

Key words: *Pseudoroegneria*; RAPD; genome-specific markers; genome constitutions

收稿日期: 2004-04-08 修订日期: 2004-07-20

基金项目: 国家自然科学基金(30270099); 四川省教育厅、科技厅资助项目。

作者简介: 丁春邦(1966-), 女, 四川富顺县人, 博士生, 副教授, 主要研究方向: 植物细胞遗传学与生物系统学。

拟鹅观草属 (*Pseudoroegneria* (Nevski) A. Löve) 是 Löve (1980) 以 Nevski (1934) 隶属于冰草属 (*Agropyron* Gaertn.) 偃麦草亚属 (subgen. *Elytrigia* Desv.) 的拟鹅观草组 (sect. *Pseudoroegneria* Nevski) 为基础, 以 *Pseudoroegneria strigosa* (M. Bieb.) A. Löve 为模式建立的禾本科 (Poaceae) 小麦族 (Triticeae) 的一个多年生小属, 约 15~20 种, 主要分布于中东、高加索、中亚以及北美西部。本属植物多为草原和草甸的组成成分, 是优良的牧草, 并具有抗寒、抗旱的特性, 是禾谷类育种家和牧草学家利用的重要基因资源。

根据 Löve (1984) 和 Dewey (1984) 的分类系统, 拟鹅观草属的基本基因组为 St 基因组, 有二倍体 ($2n=14, StSt$)、同源四倍体 ($2n=28, StStStSt$) 和部分同源四倍体 ($2n=28, St_1St_1St_2St_2$)。St 基因组是小麦族中一半以上物种的基因组供体, St 基因组与其它基因组组合, 构成了一些多倍体属, 比如披碱草属 (*Elymus* L.)、偃麦草属 (*Elytrigia* Desv.)、鹅观草属 (*Roegneria* C. Koch.)、仲彬草属 (*Kengyilia* Yen et Yang)、猬草属 (*Hystrix* Moench)、裂颖草属 (*Sitanion* Raf.) 和蓝茎草属 (*Pascopyrum* A. Löve) (Dewey, 1984)。然而, 拟鹅观草属物种的染色体数目和基因组组成还没有完全被确定, 比如: *P. gracillima* (Nevski) A. Löve 和 *P. kosaninii* (Nabelek) A. Löve 的基因组组成。

在中国, 拟鹅观草属目前只有 *P. strigosa* (M. Bieb.) A. Löve 和 *P. cognata* (Hackel) A. Löve 两个物种, 但《中国植物志》(郭本兆, 1987) 和各地方植物志中都未记载这个属。在小麦族的系统分类研究中, 发现分布于我国的阿拉善鹅观草 (*R. alashanica* Keng)、昌都鹅观草 (*R. elytrigioides* Yen et J. L. Yang) 和大丛鹅观草 (*R. magnicaespes* (D. F. Cui) L. B. Cai) 这 3 个四倍体物种在形态上与拟鹅观草属的特征极为相似 (颜济等, 1984; 崔大方, 1990; 蔡联炳, 1997)。Lu (1994) 应用细胞遗传学的方法对昌都鹅观草 (*R. elytrigioides*) 的基因组进行了分析, 发现它的基因组为 $St_1St_1St_2St_2$, 按照 Löve (1984) 和 Dewey (1984) 的观点, 已把它从鹅观草属组合到拟鹅观草属中 *P. elytrigioides* (Yen et J. L. Yang) B. R. Lu。周永红等 (1999a) 选用鹅观草属 26 个物种进行了 RAPD 分析, 发现阿拉善鹅观草和大丛鹅观草与其余分析的 24 个鹅观草属物种存在着极大的遗传差异。张新全等 (1999) 的细胞遗传学研究表明, 阿拉善鹅观草和大

丛鹅观草含有一个 St 基因组而不含 Y 基因组, 另一个基因组到底是什么还需进一步研究。

本世纪 90 年代初发展起来的随机扩增多态性 DNA (RAPD) 技术为植物系统与进化和遗传变异研究提供了新的手段 (Williams 等, 1990; 周永红等, 1999b; Zhou 等, 2000a, 2000b)。Wei 等 (1995) 用 RAPD 方法对小麦族中 8 个基本基因组 (E、H、I、P、St、W、Ns、R) 之间的关系进行研究, 所得结论与经典细胞遗传学方法所得结论相吻合, 并且发现了 29 个这些基因组特异的 RAPD 片段, 同时将这些特异片段应用于多倍体物种基因组组成分析。本试验在 Wei 和 Wang 的研究基础上, 选用小麦族中 8 个基本基因组的特异 RAPD 引物进行 PCR 扩增检测, 分析 *P. gracillima*、*P. kosaninii*、*R. alashanica* 和 *R. magnicaespes* 这 4 个四倍体物种的基因组组成。

1 材料和方法

1.1 材料

为了探讨 *P. gracillima*、*P. kosaninii*、*R. alashanica* 和 *R. magnicaespes* 这 4 个四倍体物种的基因组组成, 本试验选用了拟鹅观草属 (含 St 基因组) 的 4 个二倍体物种 (*P. spicata* (Pursh) A. Löve、*P. strigosa* (M. Bieb.) A. Löve、*P. libanotica* (Hackel) A. Löve、*P. stipifolia* (Zern, ex Nevski) A. Löve) 和 3 个四倍体物种 (*P. geniculata* (Trin.) A. Löve、*P. tauri* (Boiss & Bal.) A. Löve、*P. elytrigioides* (Yen et J. L. Yang) B. R. Lu) 以及含 E 基因组的二倍体物种 *Elytrigia bessarabicum* (Savul. & Rayss) A. Löve、含 H 基因组的二倍体物种 *Hordeum stenotachys* Godr.、含 P 基因组的二倍体物种 *Agropyron cristatum* (L.) Gaertn.、含 I 基因组的二倍体物种 *Hordeum bulbosum* L.、含 R 基因组的二倍体物种 *Secale cereale* L.、含 Ns 基因组的二倍体物种 *Psathyrostachys juncea* (Fisch.) Nevski 和含 W 基因组的二倍体物种 *Australopyrum retrofractum* (Vickery) A. Löve 作对照。所用材料的编号、分类群、染色体数目、基因组组成、采集地及凭证标本列于表 1。所有材料均种植于四川农业大学小麦研究所多年生种质圃, 腊叶标本保存于四川农业大学小麦研究所植物标本室 (SAUTI)。

1.2 方法

每份材料取约 3 g 新鲜幼嫩叶片用于 DNA 提

取,总 DNA 的提取参照 Sharp 等(1988)的方法。选用 Wei 等(1995)发现的小麦族中 8 个基本基因组(E、H、I、P、St、W、Ns、R)的特异 RAPD 引物。PCR 扩增反应在 25 μ L 反应体系中进行:1 \times PCR buffer(10 mmol/L Tris-HCl, pH8.3, 50 mmol/L KCl, 0.001% gelatin), 1.5 mmol/L MgCl₂, dNTP 各 100 μ mol/L, 特异引物 0.2 μ mol/L, Taq DNA 聚合酶 1 U, 模板 DNA 20 ng, 上覆 25 μ L 液体石蜡

油。在 PTC-200 PCR 仪中按下列程序进行扩增反应:94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 每循环 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 36 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 共 50 个循环。完成最后一个循环后,在 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。以 1 \times TAE 为缓冲液,将扩增产物在含有 0.5 mg/L 溴化乙锭(EB)的 1% 琼脂糖凝胶中电泳分离。凝胶成像仪 Gel Doc 2000TM (Bio-Rad) 上观察照像。分子量大小用 100 bp DNA 标记。

表 1 供试材料

Table 1 Materials used in this study

编号 No.	分类群 Taxon	染色体数目 Chromosome No.	基因组组成 Genome constitutions	采集地 Locality	凭证标本 Voucher
1	<i>Pseudoroegneria spicata</i>	14	StSt	美国华盛顿州 Washington, United States	PI232123
2	<i>P. strigosa</i>	14	StSt	中国新疆 Xinjiang, China	PI499638
3	<i>P. libanotica</i>	14	StSt	伊朗 Iran	PI330687
4	<i>P. stipifolia</i>	14	StSt	前苏联 Former Soviet Union	PI314058
5	<i>P. geniculata</i>	28	St ₁ St ₁ St ₂ St ₂	俄罗斯联邦 Russian Federation	PI565009
6	<i>P. gracillima</i>	28	—	前苏联 Former Soviet Union	PI420842
7	<i>P. kosaninii</i>	28	—	土耳其 Turkey	PI237636
8	<i>P. tauri</i>	28	StStPP	伊朗 Iran	PI380652
9	<i>P. elytrigoides</i>	28	St ₁ St ₁ St ₂ St ₂	中国西藏 Xizang, China	ZY2001
10	<i>Roegneria alashanica</i>	28	StSt— —	中国宁夏 Ninxia, China	ZY2003
11	<i>R. magnicaespes</i>	28	StSt— —	中国新疆 Xinjiang, China	Y9512
12	<i>Elytrigia bessarabicum</i>	14	EE	伊斯坦尼亚 Estonia	PI531711
13	<i>Hordeum stenostachys</i>	14	HH	阿根廷 Argentina	PI531791
14	<i>Agropyron cristatum</i>	14	PP	前苏联 Former Soviet Union	PI277352
15	<i>H. bulbosum</i>	14	II	阿富汗 Afghanistan	PI317434
16	<i>Secale cereale</i>	14	RR	英联邦 United Kingdom	PI414080
17	<i>Psathyrostachys juncea</i>	14	NsNs	前苏联 Former Soviet Union	PI406468
18	<i>Australopyrum retrofractum</i>	14	WW	澳大利亚 Australia	PI533013

2 结果与分析

本试验根据 Wei 等(1995)的研究结果,选用了 8 个特异 RAPD 引物,即 OPB-08₅₀₀ (St 特异)、OPC-15₂₉₀ (E 特异)、OPW-05₇₀₀ (H 特异)、OPM-07₃₀₀ (I 特异)、OPH-01₇₅₀ (R 特异)、OPC-08₅₈₄ (P 特异)、OPC-09₅₄₈ (Ns 特异)和 OPR-16₅₇₀ (W 特异),用这 8 个引物对供试的 18 份材料进行 PCR 扩增,扩增结果列于表 2。

从表 2 可以看出,OPB-08₅₀₀ (St 特异)在 1~11 号材料中都有特异性条带,而在其它材料中则没有(图 1),说明 *P. gracillima*、*P. kosaninii*、*R. alashanica* 和 *R. magnicaespes* 这 4 个四倍体物种中至少含有一个 St 或经修饰的 St 基因组。其余 7 个引物 OPC-15₂₉₀ (E 特异)、OPW-05₇₀₀ (H 特异)、OPM-

07₃₀₀ (I 特异)、OPH-01₇₅₀ (R 特异)、OPC-08₅₈₄ (P 特异)、OPC-09₅₄₈ (Ns 特异)和 OPR-16₅₇₀ (W 特异)在 *P. gracillima*、*P. kosaninii*、*R. alashanica* 和 *R. magnicaespes* 中都没有相应的特异性条带出现,而在其它材料中则有各自相应的特异性条带出现,说明 *P. gracillima*、*P. kosaninii*、*R. alashanica* 和 *R. magnicaespes* 中都不含 E、H、I、P、W、Ns 和 R 基因组。由此推断 *P. gracillima* 和 *P. kosaninii* 至少含有一个 St 或经修饰的 St 基因组,另一个基因组是否为 Y 基因组,需要进一步研究证实。张新全等(1999)通过细胞遗传学研究,发现 *R. alashanica* 和 *R. magnicaespes* 含有一个 St 基因组,而不含 Y 基因组。因此,可以推断 *R. alashanica* 和 *R. magnicaespes* 为同源四倍体或部分同源四倍体,其基因组成为 StStStSt 或 St₁St₁St₂St₂。

近年来,Löve(1984)和 Dewey(1984)等以基因

组作为划分小麦族属的标准,拟鹅观草属含 St 基因组,鹅观草属含 StY 或 StHY 基因组。Lu(1994)根据基因组分析的结果,已把 *R. elytrigoides* 从鹅观草属组合到拟鹅观草属中 *P. elytrigoides*。在形态上,*R. alashanica*、*R. magnicaespes* 和 *P. elytrigoides* 都为多年生丛生草本,穗状花序疏松,狭长,小穗单生,紧贴穗轴,这些特征都与拟鹅观草属的特

征相似。*P. elytrigoides* 与 *R. alashanica* 的区别仅在于其根状茎显著较长,穗较长且小穗数较多(5~12枚)(颜济等,1984),而 *R. magnicaespes* 与 *R. alashanica* 的区别在于其秆基部草质不坚硬,形成较大的草丛,小穗轴密被微毛(崔大方,1990)。蔡联炳(1997)从形态上把 *P. elytrigoides* 处理为 *R. alashanica* 的一变种。

表 2 基因组特异性 RAPD 标记的结果

Table 2 Amplification results generated by genome-specific RAPD marker

编号 No.	分类群 Taxon	基因组组成 Genome constitutions	基因组特异性 RAPD 标记 Genome-specific RAPD marker							
			OPB- 08 ₅₀₀ (for St)	OPC- 15 ₂₉₉ (for E)	OPW- 05 ₇₀₀ (for H)	OPM- 07 ₃₀₀ (for I)	OPH- 01 ₇₅₀ (for R)	OPC- 08 ₅₃₄ (for P)	OPC- 09 ₅₄₈ (for Ns)	OPR- 16 ₅₇₀ (for W)
1	<i>P. spicata</i>	StSt	+	-	-	-	-	-	-	-
2	<i>P. strigosa</i>	StSt	+	-	-	-	-	-	-	-
3	<i>P. libanotica</i>	StSt	+	-	-	-	-	-	-	-
4	<i>P. stipifolia</i>	StSt	+	-	-	-	-	-	-	-
5	<i>P. geniculata</i>	St ₁ St ₁ St ₂ St ₂	+	-	-	-	-	-	-	-
6	<i>P. gracillima</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-
7	<i>P. kosaninii</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-
8	<i>P. tauri</i>	StStPP	+	-	-	-	-	+	-	-
9	<i>P. elytrigoides</i>	St ₁ St ₁ St ₂ St ₂	+	-	-	-	-	-	-	-
10	<i>R. alashanica</i>	StSt- -	+	-	-	-	-	-	-	-
11	<i>R. magnicaespes</i>	StSt- -	+	-	-	-	-	-	-	-
12	<i>E. bessarabicum</i>	EE	-	+	-	-	-	-	-	-
13	<i>H. stenostachys</i>	HH	-	-	+	-	-	-	-	-
14	<i>A. cristatum</i>	PP	-	-	-	-	-	+	-	-
15	<i>H. bulbosum</i>	II	-	-	-	+	-	-	-	-
16	<i>S. cereale</i>	RR	-	-	-	-	+	-	-	-
17	<i>P. juncea</i>	NsNs	-	-	-	-	-	-	+	-
18	<i>A. retrofractum</i>	WW	-	-	-	-	-	-	-	+

注:“+”表示有特异性带;“-”表示无特异性带。

Note: “+” indicates the presence of the genome-specific marker; “-” indicates the absence of the genome-specific marker.

图 1 由引物 OPB-08₅₀₀ (St 特异) 扩增产生的 RAPD 图谱Fig. 1 RAPD polymorphism generated by primer OPB-08₅₀₀ (for St)

材料编号同表 1, M 代表 DNA marker: 100 bp DNA Ladder Plus. The material order from 1 to 18 was described in the same order as in Table 1. M: GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus marker.

丁春邦等(2004)通过核型分析,发现 *R. alashanica* 和 *R. magnicaespes* 的核型与 *P. elytrigoides* 的核型相似,均为 2A 型,根据 Oinuma(1953)的结论“基因组与核型有平行的演化性质”,推断 *R. alashanica* 和

R. magnicaespes 具有与 *P. elytrigoides* 相似的基因组,即含有 St₁St₁St₂St₂ 基因组。

因此,从本试验 RAPD 特异标记分析的结果与前人细胞遗传学(张新全等,1999)和分子标记研究

(周永红等,1999)的结果以及核型分析和外部形态特征看,*R. alashanica* 和 *R. magnicaespes* 与 *P. elytrigoides* 一样,也可能是在中国分布的四倍体拟鹅观草属物种,有必要将 *R. alashanica* 和 *R. magnicaespes* 从鹅观草属组合到拟鹅观草属中,这需要进一步的研究证实。

参考文献:

- 郭本兆. 1987. 中国植物志 9(3)[M]. 北京: 科学出版社.
- Cai LB(蔡联炳). 1997. A taxonomical study on the genus *Roegneria* C. Koch from China(中国鹅观草属的分类研究)[J]. *Acta Phytotax Sin*(植物分类学报), 35(2): 148-177.
- Cui DF(崔大方). 1990. New taxa of *Elymus* L. from Xinjiang(新疆披碱草属的新分类群)[J]. *Bull of Bot Res*(植物研究), 10(3): 25-38.
- Dewey DR. 1984. The genomic system of classification as a guide to intergeneric hybridization with the perennial Triticeae[A]. In: Gustafson JP(ed). *Gene Manipulation in plant improvement*[C]. New York: Plenum, 209-280.
- Ding CB(丁春邦), Zhou YH(周永红), Zheng YL(郑有良), et al. 2004. Karyotypes of six species and two subspecies in *Pseudoroegneria* and three species in *Roegneria*(拟鹅观草属 6 种 2 亚种和鹅观草属 3 种植物的核型研究)[J]. *Acta Phytotax Sin*(植物分类学报), 42(2): 162-169.
- Löve A. 1980. IOPB chromosome number reports. LXVI. Poaceae-Triticeae-Americanae[J]. *Taxon*, 29(1): 163-169.
- Löve A. 1984. Conspectus of the Triticeae[J]. *Feddes Report*, 95(4): 425-521.
- Lu BR. 1994. Meiotic analysis of the intergeneric hybrids between *Pseudoroegneria* and tetraploid *Elymus*[J]. *Cathaya*, 6(1): 1-14.
- Nevski SA. 1934. Tribe Hordeae Benth[A]. In: Komarov VL, Roshevits RY, Shishkin BK(eds). *Flora USSR*[C]. Leningrad: Academy of Science Press USSR, 2: 590-728.
- Oinuma T. 1953. Karyomorphology of cereals. [X]. Karyotype alteration in *Aegilops* and *Triticum* and relationship between karyotype and genome[J]. *Japanese J Genetic*, 28(2): 219-226.
- Sharp PJ, Kreis M, Shewry PR, et al. 1988. Location of β -amylase sequences in wheat and its relatives[J]. *Theor Appl Genet*, 75(2): 286-290.
- Wei JZ, Wang RR-C. 1995. Genome and specific markers and genome relationship of diploid perennial species in Triticeae based on RAPD analyses[J]. *Genome*, 38(12): 1230-1236.
- Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, et al. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers[J]. *Nucleic Acid Res*, 18(2): 6531-6535.
- Yan J(颜济), Yang JL(杨俊良). 1984. A new species of *Roegneria* from Xizang(Tibet)(西藏地区鹅观草属一新种)[J]. *Acta Bot Yunnan*(云南植物研究), 6(1): 75-76.
- Zhang XQ(张新全), Wu BH(伍碧华), Yan J(颜济), et al. 1999. Cytogenetic studies of F₁ hybrids of *R. magnicaespes*, *R. grandis* and *R. alashanica*(Poaceae: Triticeae)(阿拉善鹅观草、大鹅观草和大丛鹅观草杂种的细胞学研究)[J]. *Acta Prataculturae Sin*(草业学报), 8(4): 23-28.
- Zhou YH(周永红), Yang JL(杨俊良), Zheng YL(郑有良), et al. 1999a. RAPD study on inter-species relationships in *Roegneria*(Poaceae: Triticeae)(用 RAPD 分子标记探讨鹅观草属的种间关系)[J]. *Acta Bot Sin*(植物学报), 41(10): 1076-1081.
- Zhou YH(周永红), Zheng YL(郑有良), Yang JL(杨俊良), et al. 1999b. Phylogenetic relationships among ten *Elymus* species based on random amplified polymorphic DNA(10 种披碱草属植物的 RAPD 分析及其系统学意义)[J]. *Acta Phytotax Sin*(植物分类学报), 37(5): 425-432.
- Zhou YH, Zheng YL, Yang JL, et al. 2000a. Relationships among *Kengyilia* species assessed by RAPD markers[J]. *Acta Phytotax Sin*, 38(6): 515-521.
- Zhou YH, Zheng YL, Yang JL, et al. 2000b. Relationships among species of *Hystrix* Moench and *Elymus* L. assessed by RAPDs[J]. *Gene Resour and Crop Evol*, 47(1): 191-196.