

山羊草属二倍体物种亲缘关系的 RAPD 分析

蔡从利, 王建波, 朱英国

(武汉大学植物发育生物学教育部重点实验室, 湖北 武汉 430072)

摘要 利用 24 个随机引物对山羊草属 12 个二倍体物种的亲缘关系进行了 RAPD 分析, 对扩增出的 304 条带进行聚类分析。结果发现 (1) Sitopsis 组内各物种的亲缘关系与前人的研究基本一致 (2) *Ae. mutica* 与 Comopyrum 组的各物种亲缘关系较近 (3) *Ae. uniaristata* 与同组的另两个物种亲缘关系较远, 应将其从该组中独立出来 (4) *Ae. caudata* 与 *Ae. umbellulata* 为亲缘关系较近的两个物种。

关键词 山羊草属; 二倍体; 亲缘关系; RAPD

中图分类号: Q349

文献标识码: A

文章编号: 0253-977X(2001)03-0229-05

RAPD Analysis on the Relationship among the Diploid Species in *Aegilops*

CAI Cong-li, WANG Jian-bo, ZHU Ying-guo

(Key Laboratory of MOE for Plant Developmental Biology, Wuhan University, Wuhan, Hubei 430072, China)

Abstract RAPD analysis was performed by a set of 24 arbitrary primers to 12 diploid species in *Aegilops*. Results were observed based on the examination of 304 RAPD fragments. The relationship in the Section Sitopsis is consistent with the former investigation. *Ae. mutica* had a relatively close relationship with the species of the Section Comopyrum. *Ae. uniaristata* had a far relationship with the other two species of the Section Comopyrum, indicating that it should be excluded from this section. *Ae. caudata* and *Ae. umbellulata* had a close relationship.

Key words : *Aegilops*; diploid species; relationship; RAPD

山羊草属 (*Aegilops*) 是禾本科 (Poaceae) 小麦族 (Triticeae) 中的一个重要属, 该属约有 24~25 种, 其中 12 个种为二倍体, 其余的则是由不同二倍体杂交和多倍化后形成的异源四倍体或六倍体。在小麦族中山羊草属与小麦属 (*Triticum*) 亲缘关系最密切, 在栽培小麦的起源和进化中起着重要作用, 是小麦育种的重要遗传资源, 研究该属二倍体的亲缘关系对于认识优良基因的遗传背景和多倍体的起源与进化都具有重要的意义。Eig 等根据形态和地理分布的差异将山羊草属分为 6 个组: 其中 *Ae. speltoides*、*Ae. bicornis*、*Ae. longissima*、*Ae. sharonen-*

sis 等物种属于 Sitopsis 组; *Ae. umbellulata* 属于 Polyeides 组; *Ae. caudata* 属于 Cylindropyrum 组; *Ae. comosa*、*Ae. heldreichii* 和 *Ae. uniaristata* 属于 Comopyrum 组; *Ae. mutica* 属于 Amblyopyrum 组; *Ae. squarrosa* 属于 Vertebrata 组^[1]。Kihara 总结前人和自己的研究, 按照该属二倍体物种基因组的组成和相似程度将它们分为 C、M、S 三个类群: 其中 C 类群包括 *Ae. caudata* 和 *Ae. umbellulata*; M 类群包括 *Ae. comosa*、*Ae. heldreichii*、*Ae. uniaristata*、*Ae. mutica* 和 *Ae. squarrosa*; S 类群包括 *Ae. speltoides*、*Ae. bicornis*、*Ae. longissima* 和

收稿日期: 2000-06-19; 修回日期: 2000-11-13

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(批准号: 39770056)

作者简介: 蔡从利(1974-)男, 硕士, 研究方向: 植物进化遗传学

通讯联系人: 王建波(1964-)男, 博士, 教授, 专业: 植物遗传学。Tel: 027-87682213, E-mail: jbwang@whu.edu.cn

致谢: 日本京都大学 Taihachi Kawahara 博士和中国农科院作物品种资源研究所杨欣明先生提供实验种子, 在此一并致谢。

Ae. sharonensis, 每个类群内的物种具有相似的基因组和较近的亲缘关系^[2]。这些分类方法为以后的研究奠定了基础,但是随着更多形态学、细胞学和分子生物学证据的积累,一些争议相继出现,如 *Sitopsis* 组内各物种的相互关系、*Ae. mutica* 的分类地位、*Ae. uniaristata* 与同组的其他物种的相互关系等,很多问题到现在还没有定论,有必要进行深入研究^[3,4,5]。

RAPD 技术自其发明后即被广泛地运用于遗传多样性和系统发育研究。Wei 等用该技术研究了小麦族 22 个二倍体物种基因组的相互关系,张继益等用此方法对旱麦草属 11 份材料的亲缘关系进行了研究,得到了与其他研究方法基本相同的结论,证明

表 1 实验材料及其主要特征

Table 1 Materials and their major characters used in this study

序号	种名	基因组	分类地位	来源*
1	<i>Aegilops bicornis</i>	S ^h S ^b	Sect. <i>Sitopsis</i>	ICGR Ae4
2	<i>Ae. longissima</i>	S ^h S ^l	Sect. <i>Sitopsis</i>	ICGR Ae154
3	<i>Ae. speltoides</i>	SS	Sect. <i>Sitopsis</i>	ICGR Ae49
4	<i>Ae. searsii</i>	S ^h S ^s	Sect. <i>Sitopsis</i>	KU 4-6
5	<i>Ae. sharonensis</i>	S ^h S ^{sh}	Sect. <i>Sitopsis</i>	ICGR Ae29
6	<i>Ae. squarrosa</i>	DD	Sect. <i>Vertebrata</i>	ICGR Ae46
7	<i>Ae. mutica</i>	TT	Sect. <i>Amblyopyrum</i>	KU 5521
8	<i>Ae. caudata</i>	CC	Sect. <i>Cylindropyrum</i>	ICGR Y45
9	<i>Ae. umbellulata</i>	UU	Sect. <i>Polyeides</i>	ICGR Y137
10	<i>Ae. uniaristata</i>	NN	Sect. <i>Comopyrum</i>	KU 19-3
11	<i>Ae. comosa</i>	MM	Sect. <i>Comopyrum</i>	ICGR Y258
12	<i>Ae. heldreichii</i>	M ^h M ^h	Sect. <i>Comopyrum</i>	KU 18-2

* KU 指日本京都大学,ICGR 指中国农业科学院作物品种资源研究所。

1.2 方法

采用 CTAB 微量法提取植物总 DNA,具体操作参见 Doyle 等的方法^[9]。

PCR 反应在 PE480 型 PCR 仪上进行,引物采用 Sangon 公司的 10bp 随机引物。反应体系 25 μ L: 1 \times PCR 缓冲液[10mmol/L Tris-HCl (pH 8.3), 50mmol/L KCl, 0.001% gelatin], 1.5mmol/L MgCl₂, 0.5 μ mol/L 随机引物, 320 μ mol/L dNTPs, 约 30ng 模板 DNA, 1U Taq 酶, 超纯水补至 25 μ L, 上覆 30 μ L 矿物油。扩增程序如下: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5min, 然后 94 $^{\circ}$ C 变性 1min, 36 $^{\circ}$ C 退火 1min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1.5min, 共 40 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7min。电泳检测: 取扩增产物加适量点样缓冲液后, 在含有 0.5g/L 溴化乙锭的 1.6% 琼脂糖胶中以 1 \times TAE 为缓冲液电泳 2~3 h (4~5V/cm), 然后在紫外灯下观察照相。

它是研究植物亲缘关系和系统发育的一种有效手段^[6,7]。对于山羊草属,孔秀英等用这种方法研究了该属 5 个基本基因组的系统发育关系^[8],但对所有二倍体物种系统发育关系的研究还没有进行。本文用 RAPD 方法研究山羊草属 12 个二倍体物种基因组之间的相似性及分化程度,旨在为进一步明确这些物种的亲缘关系,并为研究该属多倍体物种的起源与进化打下基础。

1 材料和方法

1.1 材料

本实验所用山羊草属 12 个二倍体物种及其相关特征见表 1。

将重复性好的带用于统计,将有带赋值为 1,无带赋值为 0。用 RAPDDIST 程序计算各样品间的 Nei 氏遗传距离 D , $D = 1 - 2N_{xy} / (N_x + N_y)$, 其中 N_x 为样品 x 具有带的条数, N_y 为样品 y 具有带的条数, N_{xy} 为两样品共有带的条数。用 PHYLIP3.5c 软件包的 Neighbor 程序按 UPGMA 方法 (Unweighted pair group method with arithmetic mean) 进行聚类分析。

2 结果与分析

对 Sangon 公司的 140 个 10bp 引物进行筛选,选择能够扩增出清晰、稳定带的引物 (共 24 个) 进行正式扩增并参与统计。这些引物共扩增出 304 条带,每个引物扩增出的带在 4~20 条之间,平均每个引物扩增出约 12.3 条带。在 304 条带之中,仅有

17 条带为各物种所共有(5.59%),其余的 287 条带都表现出多态性,表明山羊草属各二倍体物种之间

的分化程度很高。图 1 分别是引物 S250 和 S324 扩增产物经电泳所形成的带谱。

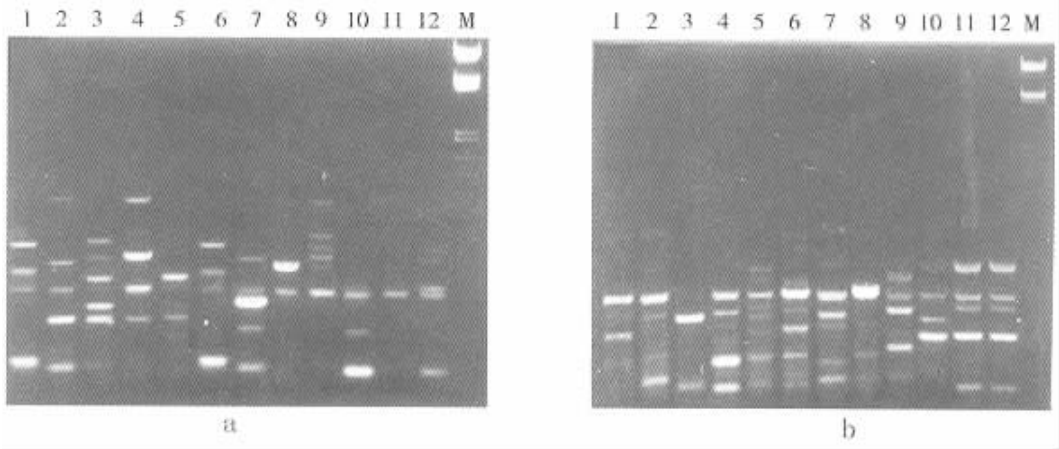


图 1 引物 S250(a)和 S324(b)扩增产生的 RAPD 带谱

Fig.1 RAPD patterns generated by primers S250 and S324

Numbers upon the lanes represent the accession listed in Table 1. M indicates λ DNA/*EcoRI* + *HindIII* marker.

Nei 氏遗传距离见表 2 ,UPGMA 聚类分析所得的树状图见图 2。从聚类图看,以遗传距离 $D = 0.45$ 为阈值,山羊草属 12 个二倍体物种可分为 A、B、C 三支。在 A 支里面, *Ae. bicornis*、*Ae. sharonensis*、*Ae. longissima* 和 *Ae. searsii* 等 4 个物种聚成一小支; *Ae. speltoides* 和 *Ae. squarrosa* 则聚成另

一小支。B 支由 *Ae. comosa*、*Ae. heldreichii*、*Ae. mutica* 和 *Ae. uniaristata* 等 4 个物种组成,其中前两者最先聚在一起,它们再和 *Ae. mutica* 聚在一起,最后和 *Ae. uniaristata* 聚在一起。C 支由 *Ae. caudata* 和 *Ae. umbellulata* 2 个物种组成。

表 2 山羊草属 12 个二倍体物种的的 Nei 氏遗传距离*

Table 2 Nei 'genetic distance between 12 diploid species in *Aegilops*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	—											
2	0.2169	—										
3	0.4861	0.3711	—									
4	0.3857	0.3496	0.4385	—								
5	0.2046	0.2744	0.4463	0.4231	—							
6	0.4780	0.3638	0.2294	0.4155	0.4385	—						
7	0.5447	0.5025	0.4861	0.4943	0.5361	0.4005	—					
8	0.5447	0.4231	0.5192	0.4155	0.4700	0.4463	0.4463	—				
9	0.5447	0.4861	0.4700	0.5621	0.5361	0.5276	0.5108	0.4005	—			
10	0.5276	0.4541	0.5192	0.4943	0.5709	0.5276	0.4463	0.4780	0.5447	—		
11	0.4541	0.4620	0.4780	0.4700	0.4943	0.5361	0.3216	0.4385	0.4385	0.4385	—	
12	0.4780	0.4700	0.4541	0.4620	0.5192	0.4943	0.2744	0.4620	0.4943	0.3857	0.1109	—

* 表中各序号与表 1 相同

3 讨 论

山羊草属与小麦属亲缘关系非常接近,因而有关该属系统发育的研究非常多,但是由于该属各物种之间的关系非常复杂,从形态学、细胞学和分子生物学所得的结果还存在许多矛盾,因而有必要进行

更深入的研究。从本研究所得的聚类图看,12 个二倍体物种聚为 A、B、C 三支,除 *Ae. squarrosa* 之外,其他各物种在聚类图上的地位与它们在 Kihara 所确定的三个类群中的地位基本相同,它表明 RAPD 所得的结论与前人的研究基本是相符的,但是在各分支的内部,各物种之间的关系还有待讨论。

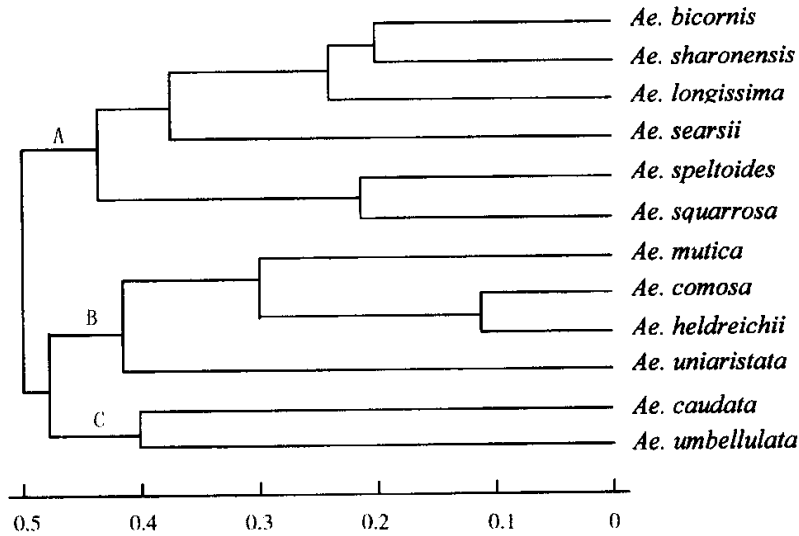


图2 根据 RAPD 数据用 UPGMA 法构建的聚类图

Fig.2 Dendrogram generated based on the RAPD data using UPGMA methods

对 A 支的 6 个物种而言, *Ae. speltooides*、*Ae. bicornis*、*Ae. longissima*、*Ae. sharonensis* 和 *Ae. searsii* 属于 Sitopsis 组, 而 *Ae. squarrosa* 属于 Vertebrata 组。在聚类图上, *Ae. bicornis*、*Ae. sharonensis* 两个物种最先聚在一起, 然后二者和 *Ae. longissima* 聚在一起, 3 个物种遗传距离非常接近, 表明它们有密切的亲缘关系; 然后这三者和 *Ae. searsii* 聚在一起, 最后和 *Ae. speltooides* 聚在一起。这种聚类关系与 Dvorak 等对该组各物种重复序列的研究和 Sasanuma 等的 RFLP 分析结果基本一致^[3, 10], 不过他们的研究表明, *Ae. longissima* 和 *Ae. sharonensis* 亲缘关系更近, 而我们的研究却未能区分这一点。从核型、C-带带型、原位杂交和核 rDNA 的 ITS 序列得到的证据表明 *Ae. speltooides* 与同组其他 4 个物种存在明显差别, 认为应将其从该组独立出来^[5, 11, 12], 我们的研究表明它们的确有差别, 但并不是太明显。对于 *Ae. squarrosa*, 目前还没有证据表明它和 *Ae. speltooides* 的亲缘关系较近, 二者聚在一起的原因还需进一步研究。对 B 支的 4 个二倍体物种之间的亲缘关系, 前人做了很多研究。关于 *Ae. comosa* 和 *Ae. heldreichii*, 二者在形态、核型和重复序列等方面都很相似, 很多研究者都将二者作为一个种的两个亚种^[5, 13], 但 Tanaka 却认为二者为两个不同物种^[14]。在本研究中的所有

的二倍体物种中, *Ae. comosa* 和 *Ae. heldreichii* 最先聚在一起, 二者之间的遗传距离为 0.119, 表明二者亲缘关系非常接近, 但也存在一些差别。关于 *Ae. mutica* 的分类地位, 一直存在较大的争议, *Ae. mutica* 和 *Ae. speltooides* 是山羊草属二倍体中仅有的两个异花传粉物种, 二者都有 B 染色体, 核型相似, 杂交子代染色体配对行为正常, 从这些特征来看二者具有较近的亲缘关系^[4, 13]; 但 C-带研究和原位杂交表明 *Ae. mutica* 与 Sitopsis 组中的 *Ae. bicornis*、*Ae. searsii* 等物种亲缘关系较近^[5, 10, 15]; Dvorak 等研究该属重复片段的差异时却发现 *Ae. mutica* 与 *Ae. comosa*、*Ae. uniaristata* 等聚在一起, 表明它与 Comopyrum 组的物种亲缘关系较近^[10]。从本研究的聚类图上看, *Ae. mutica* 与 *Ae. comosa*、*Ae. heldreichii* 构成一支, 表明它们的亲缘关系较近, 支持 Dvorak 等的结论。关于 *Ae. uniaristata*, 最初的研究认为它与 *Ae. comosa*、*Ae. heldreichii* 的亲缘关系很近, 三者同属 Comopyrum 组, 其基因组是由 M 基因组修饰而来, 并将其基因组符号定为 M^[1, 2]。但后来的研究表明 *Ae. uniaristata* 与同组的其他两个物种的基因组在随体的数目和位置、C-带带型、原位杂交图谱等方面存在很大差异, 应从 Comopyrum 组独立出来, 并将其基因组符号定为 N^[5, 11, 16]。本研究的结果表明 *Ae.*

uniaristata 与 *Ae. comosa*、*Ae. heldreichii* 的遗传距离已达到 0.4385, 大于 *Ae. mutica* 与 *Ae. comosa*、*Ae. heldreichii* 之间的遗传距离, 应将 *Ae. uniaristata* 从 *Comopyrum* 组独立出来。

对于 C 支的 *Ae. caudata* 和 *Ae. umbellulata*, 经过多年的研究现在已经有比较明确的结论。*Ae. caudata* 具 C 基因组, 属于 *Cylindropyrum* 组; *Ae. umbellulata* 具 U 基因组, 属于 *Polyeides* 组。虽然两物种分属不同的组, 但二者亲缘关系较近, 其核型、C-带带型、原位杂交图谱都比较相似, 如二者均具近端部着丝粒, 1 号、5 号染色体具随体, C-带主要为中间带等^[5, 17, 18]; 但二者在异染色质含量、染色体配对行为等方面也表现出较大的差别^[19, 20]。从本研究的结果看, *Ae. caudata* 和 *Ae. umbellulata* 聚为独立一支, 表明它们关系较近, 但其分化距离已达到 0.4005, 说明二者还是有很大的差别。孔秀英等对山羊草属 5 个基本基因组系统发育的 RAPD 分析和王超等对该属核 rDNA 的 ITS 序列的分析都得到类似的结论^[8, 12]。

参 考 文 献 (References):

- [1] Eig A. Monographisch - kritische übersicht der Gattung *Aegilops* [M]. Rep Spec Nov Reg Vegetabil, Publ Selbverlag Dahlen bei Berlin. 1929, 55 :1 ~ 128.
- [2] Kihara H. Considerations on the evolution and distribution of *Aegilops* species based on the analyser - method [J]. Cytologia, 1954, 19 :336 ~ 357.
- [3] Sasanuma T, Miyasita N T. Wheat phylogeny determined by RFLP analysis of nuclear DNA. 3. Intra-and inter-specific variations of five *Aegilops* species [J]. Theor Appl Genet, 1996, 92 : 928 ~ 934.
- [4] Ohta S. Phylogenetic relationship of *Aegilops mutica* Boiss. with the diploid species of congeneric *Aegilops-Triticum* complex, based in the new method of genome analysis using its B - chromosomes [J]. Mem Coll Agric Kyoto Univ, 1991, 137 :1 ~ 116.
- [5] Badaeva E D, Friebe B, Gill B S. Genome differentiation in *Aegilops* 1. distribution of highly repetitive DNA sequences on chromosomes of diploid species [J]. Genome, 1996, 39 :293 ~ 306.
- [6] Wei J Z, Wang R R-C. Genome-and species-specific markers and genome relationships of diploid perennial species in Triticeae based on RAPD analysis [J]. Genome, 1995, 38 :1230 ~ 1236.
- [7] 张继益, 董玉琛, 贾继增, 等. 旱麦草属种质资源的随机扩增多态性 DNA (RAPDs) 分析 [J]. 遗传学报, 1999, 26 :54 ~ 60.
- [8] 孔秀英, 高春民, 贾继增, 等. 山羊草属五个基本基因组系统发育的 RAPD 分析 [J]. 植物学报, 1999, 41 :393 ~ 397.
- [9] Doyle J T, Doyle J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue [J]. Phytochemical Bulletin, 1987, 19 :11 ~ 15.
- [10] Dvorak J, Zhang H B. Reconstruction of the phylogeny of the genus *Triticum* from variation in repeated nucleotide sequences [J]. Theor Appl Genet, 1992, 84 :419 ~ 429.
- [11] Badaeva E D, Friebe B, Gill B S. Genome differentiation in *Aegilops*. 2. physical mapping of 5S and 18S - 26S ribosomal RNA gene families in diploid species [J]. Genome, 1996, 39 :1150 ~ 1158.
- [12] 王 超, 施苏华, 王建波, 等. 山羊草属二倍体物种核 rDNA ITS 区序列及其系统发育关系分析 [J]. 植物学报, 2000, 42 :507 ~ 511.
- [13] Chennaveeraiah M S. Karyomorphologic and cytotaxonomic studies in *Aegilops* [J]. Acta Horti Gotob, 1960, 23 :85 ~ 186.
- [14] Tanaka M. The relationship of the M and Mu genomes of *Aegilops* [J]. Wheat Inf Serv, 1985, 60 :39.
- [15] Friebe B, Badaeva E D, Hammer K, et al. Standard karyotypes of *Aegilops uniaristata*, *Ae. mutica*, *Ae. comosa* ssp. *comosa* and ssp. *heldreichii* (Poaceae) [J]. Plant Syst Evol, 1996, 202 :199 ~ 210.
- [16] Teoh S B, Hutchinson J. Interspecific variation in C - banded chromosomes of diploid *Aegilops* species [J]. Theor Appl Genet, 1983, 65 :31 ~ 40.
- [17] Kimber G, Abu - Baker M. The genomic relationship of *Triticum dichasians* and *T. umbellulatum* [J]. Z Pflanzenzucht, 1981, 87 : 265 ~ 273.
- [18] Miller T E. Chromosome pairing of intergenetic amphiploids as a means of assessing genome relationships in the Triticeae [J]. Z Pflanzenzucht, 1981, 87 :69 ~ 78.
- [19] Friebe B, Schubert V, Bluthner W D, et al. C-banding pattern and polymorphism of *Aegilops caudata* and chromosomal constitutions of the amphiploid *T. aestivum* - *Ae. caudata* and six derived chromosome addition lines [J]. Theor Appl Genet, 1992, 83 : 589 ~ 596.
- [20] Friebe B, Jiang J, Tuleen N, et al. Standard karyotype of *Triticum umbellulatum* and the identification of *T. umbellulatum* chromatin in common wheat [J]. Theor Appl Genet, 1995, 90 :150 ~ 156.