



華夏英才基金學術文庫

刘公社 李晓峰 等 著

# 羊草种质资源研究



科学出版社

江南大学图书馆



91625226



华夏英才基金学术文库

# 羊草种质资源研究

刘公社 李晓峰 等 著

本书由华夏英才出版基金、国家“973”项目、国家科技支撑项目、国家自然科学基金、中国科学院方向性项目等资助出版



科学出版社

北京

## 内 容 简 介

羊草 (*Leymus chinensis*) 是欧亚大陆草原区东部的关键物种, 研究和利用羊草, 对改善这一地区的生态环境状况和促进草地畜牧业的可持续发展具有十分重要的战略意义。本书著者的研究团队已对羊草开展了十多年的研究, 获得了大量的重要数据和成果, 现整理成册, 奉献给读者。全书共分十二章, 内容包括: 赖草属植物基因组的分子系统学、种质资源的大田评价和遗传多样性分析、羊草种质资源的 AFLP 分子标记评价、形态与分子标记用于羊草种质鉴定、羊草种质资源中维生素 E 含量的评价、羊草结实率低下的细胞学和分子基础、羊草无性繁殖的生物学评估、羊草对刈割的响应规律、羊草耐牧机制、羊草 cDNA 文库的构建及果聚糖水解酶的分离与鉴定、DREB 转录因子的克隆与功能验证、生物技术在羊草中的应用。

本书对从事牧草种质资源 (特别是乡土草基因资源)、遗传育种、保护和利用的科研工作者具有重要参考价值, 对草原植被和生态研究、草地生态环境管理和草业科学的从业人员也具有一定的实用价值。

### 图书在版编目 (CIP) 数据

羊草种质资源研究/刘公社, 李晓峰等著. —北京: 科学出版社, 2011  
(华夏英才基金学术文库)

ISBN 978-7-03-030365-3

I. ①羊… II. ①刘…②李… III. ①羊草-种质资源-研究 IV. ①S545.024

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2011) 第 027967 号

责任编辑: 莫结胜 刘 晶/责任校对: 林青梅

责任印制: 钱玉芬/封面设计: 陈 敬

科学出版社出版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码: 100717

<http://www.sciencep.com>

中国科学院印刷厂印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

\*

2011 年 5 月第 一 版 开本: B5 (720×1000)

2011 年 5 月第一次印刷 印张: 17 3/4 插页: 6

印数: 1—1 200 字数: 352 000

定价: 70.00 元

(如有印装质量问题, 我社负责调换)

开发羊草良种  
资源再现草原  
牧歌美景

庚寅年冬

李振书



## 前 言

生物资源是国家战略性资源。重要经济植物种质资源的研究和利用是生物资源研究领域的重要组成部分，具有广阔的发展前景。

羊草 (*Leymus chinensis*) 又称碱草，是禾本科“牧草之王”，分布于欧亚大陆草原区的东部，是草原的主要建群种。羊草是我国有较好优势的植物资源，主要分布于吉林、黑龙江、内蒙古和河北北部地区。羊草草场是优良的天然放牧场和割草场，在发展草原畜牧业和北方生态环境保护方面具有举足轻重的地位。

长期以来，羊草草原缺乏科学管理，草地超载放牧，造成草地退化、土壤沙化和盐渍化，导致草地生产力衰退、生物多样性降低、草原生态环境恶化。北方草原大面积的退化和荒漠化不仅制约当地牧民的生存和发展，而且也严重影响下游的水资源和空气质量（如导致沙尘暴）。针对这些问题，有必要采取各种措施，遏止草地退化和荒漠化的扩大。采用草原乡土物种恢复和改良草地被认为是安全有效的根本措施。羊草就是我国北方草原有代表性的乡土物种。目前国内外在羊草种质资源和基因资源方面尚缺乏系统研究，严重影响了羊草优良种质的开发和利用。因此，亟须收集、保存和评价羊草种质资源，深入研究羊草高产、优质、抗逆（如抗旱、抗寒、耐盐碱及耐牧）的分子机理，加快培育出用于建设人工草地和改良天然草原的优良品种。

我们团队开展羊草资源研究始于 20 世纪 90 年代中期。时任中国科学院副院长的李振声院士基于对我国粮食安全现状的深入分析，提出中国的食物生产要在保护利用 18 亿亩<sup>①</sup>耕地的基础上，从 60 亿亩草地和广阔的海洋中发掘利用新的资源。在李振声院士的积极倡导和大力支持下，羊草资源的系统研究工作开始启动。在科技部“973”项目、中国科学院知识创新项目、科技部攻关项目、国家人事部、国家自然科学基金项目等的相继资助下，这项研究得以不断延续和深入。

经过多年的工作积累，我们团队已经收集了中国、蒙古国及其他地区分布的几百份羊草种质资源。我们建立了北京和塞北两个种质资源圃，对大部分种质进行了多年种植研究，发现和培育了一批高产抗逆资源。我们采用叶绿体基因和核基因序列对羊草所属的赖草属植物进行了分子系统学分析。通过生殖生物学研究我们发现，羊草属于配子体型自交不亲和性植物，实验证明羊草自交

---

① 1 亩 $\approx$ 666.67m<sup>2</sup>。

结实率低下而杂交结实率较高。我们采用了 454 测序技术开展了羊草转录组的研究，建立了羊草抗逆相关的基因数据库，克隆了数个耐盐碱、耐寒及与品质相关的重要基因。

我们团队的研究特色在于从微观角度利用现代实验手段和方法逐步把羊草研究从宏观描述推进到种质资源和基因资源的发掘及关键问题的机理研究上。这些研究成果为羊草的遗传育种提供了理论指导，并对加速我国北方草原生态环境治理和人工栽培草地建设、推动畜牧业的可持续发展具有现实意义。我们很高兴把已经取得的研究成果与大家共同分享，同时也欢迎各位同仁批评指正和提出宝贵建议。

刘公社

2011 年 2 月 28 日

# 目 录

## 前言

|                               |    |
|-------------------------------|----|
| 第一章 赖草属植物基因组的分子系统学.....       | 1  |
| 引言.....                       | 1  |
| 第一节 研究材料、关键技术和方法 .....        | 10 |
| 第二节 研究取得的重要进展 .....           | 16 |
| 第三节 研究结论与讨论 .....             | 23 |
| 第四节 小结与展望 .....               | 28 |
| 参考文献 .....                    | 30 |
| 第二章 种质资源的大田评价和遗传多样性分析 .....   | 38 |
| 引言 .....                      | 38 |
| 第一节 研究材料、关键技术和方法 .....        | 40 |
| 第二节 研究取得的重要进展 .....           | 43 |
| 第三节 研究结论与讨论 .....             | 48 |
| 第四节 小结与展望 .....               | 50 |
| 参考文献 .....                    | 51 |
| 第三章 羊草种质资源的 AFLP 分子标记评价 ..... | 54 |
| 引言 .....                      | 54 |
| 第一节 研究材料、关键技术和方法 .....        | 56 |
| 第二节 研究取得的重要进展 .....           | 60 |
| 第三节 研究结论与讨论 .....             | 65 |
| 第四节 小结与展望 .....               | 66 |
| 参考文献 .....                    | 67 |
| 第四章 形态与分子标记用于羊草种质鉴定 .....     | 71 |
| 引言 .....                      | 71 |
| 第一节 研究材料、关键技术和方法 .....        | 72 |
| 第二节 研究取得的重要进展 .....           | 73 |
| 第三节 研究结论与讨论 .....             | 77 |
| 第四节 小结与展望 .....               | 79 |
| 参考文献 .....                    | 79 |
| 第五章 羊草种质资源中维生素 E 含量的评价 .....  | 81 |
| 引言 .....                      | 81 |

|                                             |            |
|---------------------------------------------|------------|
| 第一节 研究材料、关键技术和方法 .....                      | 82         |
| 第二节 研究取得的重要进展 .....                         | 83         |
| 第三节 研究结论与讨论 .....                           | 86         |
| 第四节 小结与展望 .....                             | 87         |
| 参考文献 .....                                  | 88         |
| <b>第六章 羊草结实率低下的细胞学和分子基础 .....</b>           | <b>89</b>  |
| 引言 .....                                    | 89         |
| 第一节 研究材料、关键技术和方法 .....                      | 93         |
| 第二节 研究取得的重要进展 .....                         | 99         |
| 第三节 研究结论与讨论 .....                           | 116        |
| 第四节 小结与展望 .....                             | 121        |
| 参考文献 .....                                  | 123        |
| <b>第七章 羊草无性繁殖的生物学评估 .....</b>               | <b>128</b> |
| 引言 .....                                    | 128        |
| 第一节 研究材料、关键技术和方法 .....                      | 130        |
| 第二节 研究取得的重要进展 .....                         | 132        |
| 第三节 研究结论与讨论 .....                           | 139        |
| 第四节 小结与展望 .....                             | 141        |
| 参考文献 .....                                  | 142        |
| <b>第八章 羊草对刈割的响应规律 .....</b>                 | <b>144</b> |
| 引言 .....                                    | 144        |
| 第一节 研究材料、关键技术和方法 .....                      | 145        |
| 第二节 研究取得的重要进展 .....                         | 151        |
| 第三节 研究结论与讨论 .....                           | 159        |
| 第四节 小结与展望 .....                             | 162        |
| 参考文献 .....                                  | 163        |
| <b>第九章 羊草耐牧机制 .....</b>                     | <b>165</b> |
| 引言 .....                                    | 165        |
| 第一节 研究材料、关键技术和方法 .....                      | 166        |
| 第二节 研究取得的重要进展 .....                         | 170        |
| 第三节 研究结论与讨论 .....                           | 181        |
| 第四节 小结与展望 .....                             | 185        |
| 参考文献 .....                                  | 186        |
| <b>第十章 羊草 cDNA 文库的构建及果聚糖水解酶的分离与鉴定 .....</b> | <b>190</b> |
| 引言 .....                                    | 190        |
| 第一节 研究材料、关键技术和方法 .....                      | 191        |



|                                     |            |
|-------------------------------------|------------|
| 第二节 研究取得的重要进展·····                  | 205        |
| 第三节 研究结论与讨论·····                    | 221        |
| 第四节 小结与展望·····                      | 227        |
| 参考文献·····                           | 227        |
| <b>第十一章 DREB 转录因子的克隆与功能验证</b> ····· | <b>231</b> |
| 引言·····                             | 231        |
| 第一节 研究材料、关键技术和方法·····               | 234        |
| 第二节 研究取得的重要进展·····                  | 237        |
| 第三节 研究结论与讨论·····                    | 241        |
| 第四节 小结与展望·····                      | 245        |
| 参考文献·····                           | 246        |
| <b>第十二章 生物技术在羊草中的应用</b> ·····       | <b>251</b> |
| 引言·····                             | 251        |
| 第一节 研究材料、关键技术和方法·····               | 254        |
| 第二节 研究取得的重要进展·····                  | 257        |
| 第三节 研究结论与讨论·····                    | 268        |
| 第四节 小结与展望·····                      | 270        |
| 参考文献·····                           | 271        |
| 后记·····                             | 274        |
| 彩图                                  |            |

# 第一章 赖草属植物基因组的分子系统学

**摘要** 羊草 (*Leymus chinensis*) 隶属于禾本科 (Gramineae) 小麦族 (Triticeae Dumort.) 赖草属 (*Leymus* Hochst.), 该属是一个异源多倍体属, 有 34 个物种。赖草属未知基因组的起源一直争论不休, 其倍性范围从四倍体 ( $2n=4x=28$ )、八倍体 ( $2n=8x=56$ ) 直到十二倍体 ( $2n=12x=84$ )。新麦草属 (*Psathyrostachys* Nevski) 只含有  $N_s$  一个基因组, 有 9 个物种。这 2 个属都是多年生牧草, 具有抗旱、抗病和耐盐碱等生物学特性。应用核糖体转录间隔区 (internal transcribed spacer, ITS) 序列和叶绿体 *trnL-F* 序列, 作者对 13 个赖草属物种、小麦族 18 个属 (40 份二倍体材料) 及 *Elymus californicus* 和 *Bromus catharticus* 共计 57 份材料进行了系统发育分析。ITS 序列分析表明, 赖草属分别与新麦草属和小麦族中一个未知属在进化上具有密切关系。ITS 谱系树表明, 赖草属内部存在大量分化, 该属物种具有多次起源的特征。*trnL-F* 序列分析表明, 赖草属植物的母本, 部分来自  $N_s$  基因组, 部分来自  $X_m$  基因组。这可能与赖草属植物的地理分布有关, 分布于欧亚大陆的物种其母本是新麦草属, 而分布于北美洲的大部分物种其母本是  $X_m$  基因组。*trnL-F* 序列分析还表明, *E. californicus* 和赖草属未知的基因组具有密切关系。以上研究结果表明: ①从分子层面证明, 赖草属的未知基因组并非来自薄冰草属 (*Thinopyrum* Löve), 或是一个修正的新麦草基因组, 其基因组组成应是  $N_sN_sX_mX_m$ ; ②赖草属物种的母本, 部分来自  $N_s$  基因组, 部分来自  $X_m$  基因组, 这可能与赖草属物种的地理分布有关; ③*E. californicus* 的母本是  $X_m$  基因组, 父本是  $N_s$  基因组, 该物种应从披碱草属转移至赖草属。

**关键词** 赖草属; 基因组; ITS; *trnL-F*; 异源多倍体; 分子系统发育

## 引言

自赖草属 (*Leymus* Hochst.) 从披碱草属 (*Elymus* Linn.) 独立出来以后, 由于赖草属植物具有的重要经济价值和生态价值, 以及作为普通小麦 (*Triticum aestivum*) 的三级基因库, 人们广泛认识到赖草属植物的重要性。用于研究赖草属系统发育的主要方法包括: 核型分析、属间杂交、属内杂交、FISH、GISH 和染色体配对等。但是迄今为止, 赖草属的基因组组成仍没有定论, 不同物种之间的进化关系和倍性加倍问题也未有研究报道。此外, 赖草属植物起源于新麦草属 (*Psathyrostachys* Nevski) 的具体什么物种也仍不清楚 (Dewey, 1976; Peterson *et al.*,

2004; Wang *et al.*, 2006; Fan *et al.*, 2009)。

## 一、赖草属植物的系统发育和进化

### (一) 赖草属植物的分布与分类

赖草属在我国又称滨麦属,是禾本科早熟禾亚科(Pooideae)小麦族(Triticeae)大麦亚族(Hordeinae)中的多年生植物类群。赖草属在全世界约有38个种,它们在全球的分布非常广泛,从北海海岸[如沙生赖草(*L. arenarius*)]、中亚[如窄颖赖草(*L. angustus*)]到东亚(如羊草)、阿拉斯加[如滨麦(*L. mollis*)]和北美洲的西部[如灰色赖草(*L. cinereus*)和无芒赖草(*L. triticoides*)]都有(Jensen *et al.*, 1990)。中国的赖草属植物约有20种,2变种,它们被划分为3个组,即多穗组、少穗组和单穗组,主要分布于新疆、甘肃、宁夏、内蒙古、吉林、辽宁、黑龙江、四川、陕西、河北、山西(中国科学院中国植物志编委会,1987)。

根据形态学和遗传学证据,赖草属从小麦族中分离出来的观点得到了国内外很多国家分类学家的承认(Pilger, 1954; Keng, 1965; Tzvelev, 1976; Melderis, 1980; Barkworth and Atkins, 1984; Dewey, 1984; Löve, 1984; Dubcovsky *et al.*, 1997)。赖草属植物绝大部分具有如下形态特征:发达的根茎,叶片常内卷且质地较硬,小穗常以1~5枚簇生,小穗轴多、少扭转,致使颖与稃体的位置改变而不在一个平面上,颖从披针形至窄披针形或锥刺状变化;小穗含有2个以上小花,颖具3~5脉,为锥刺状者仅具1脉;外稃披针形,无芒或具小尖头,内稃的脊上具有细刺毛或无毛,子房被毛;颖果扁长圆形(Barkworth and Atkins, 1984; 智丽和滕中华, 2005),其模式种是沙生赖草,  $2n=8x=56$ ,产于欧洲。

根据Tzvelev (1976)和Löve (1984)的观点,赖草属包含4个组,即:①*Leymus* Hochst. 组,代表物种是北美洲的*L. mollis*和*L. arenarius*,以及欧洲的大赖草(*L. racemosus*);②*Aphanoneuron* (Nevski) Tzvelev 组,代表物种是欧亚大陆的*L. angustus*和赖草(*L. secalinus*);③*Anisopyrum* (Griseb.) Tzvelev 组,代表物种是欧亚大陆的羊草、分枝赖草(*L. ramosus*)、多枝赖草(*L. multicaulis*),以及北美洲的含糊赖草(*L. ambiguus*)、盐生赖草(*L. salinus*)、*L. condensatus*、*L. triticoides*、灰赖草(*L. cinereus*)、新生赖草(*L. innovatus*)和*L. flavescens*;④*Malacurus* (Nevski) Tzvelev 组,代表物种是欧亚大陆的*L. lanatus*。其中,*Leymus*组和*Anisopyrum*组在北美洲和欧亚大陆均有分布,而*Aphanoneuron*组和*Malacurus*组只分布于欧亚大陆(Hole *et al.*, 1999)。

### (二) 赖草属植物的基因组组成

到目前为止,人们普遍认为赖草属物种的基因组公式是  $N_s N_s X_m X_m$ , 其中

N<sub>s</sub> 来自新麦草属。新麦草属可能有 9 个多年生物种, 为二倍体或同源四倍体 (Vogel *et al.*, 1999; Peterson *et al.*, 2004)。根据形态学、属间杂种减数分裂时的染色体配对、DNA 杂交模式及重复序列变异等方面的证据, 人们普遍认为赖草属物种起源于新麦草属 (Dewey, 1976; Wang and Hsiao, 1984; Löve, 1984; Zhang and Dvorak, 1991; Wang and Jensen, 1994; Orgaard and Heslop-Harrison 1994a, 1994b; Sun *et al.*, 1995a; Dubcovsky *et al.*, 1997; Bödvarsdóttir and Ananthawat-Jónsson, 2003; Wang *et al.*, 2006)。

凡星等 (2009) 对禾本科小麦族狷草属 (*Hystrix* Moench) 及其近缘属赖草属、新麦草属、*Thinopyrum*、*Lophopyrum*、拟鹅观草属 (*Roegneria* Koch)、大麦属 (*Hordeum* Linn.) 和披碱草属的植物谱系共 23 个类群的单拷贝核 *Pgk1* 基因序列进行了系统发育分析。结果发现, *Pgk1* 基因序列在 *L. arenarius* 和 *P. juncea* 中有 81 bp 的 Stowaway 家族 DNA 转座元件插入, 而在 *Hy. duthiei*、*Hy. duthiei* ssp. *longearistata* 和 *L. akmolinensis* 中有 29 bp Copia 家族的反转录转座元件插入。利用最大似然法和贝叶斯法进行的系统发育分析表明: 狷草属模式种 *Hy. patula* 与披碱草属、拟鹅观草属和大麦属具有密切的亲缘关系; 狷草属的其他物种 *Hy. duthiei*、*Hy. duthiei* ssp. *longearistata*、*Hy. coreana* 和 *Hy. komarovii* 与新麦草属和赖草属植物亲缘关系密切。研究结果支持将 *Hy. patula* 从狷草属转移到披碱草属中, 而 *Hy. duthiei*、*Hy. duthiei* ssp. *longearistata*、*Hy. coreana* 和 *Hy. komarovii* 应转移到赖草属中。一些研究者对此进行了验证, 他们选用 5 个禾本科染色体组特异的 RAPD 引物 (S<sub>t</sub>、H、N<sub>s</sub>、E<sup>e</sup>、E<sup>b</sup>), 对东北狷草 (*Hy. komarovii*) 等 5 个狷草属及其 8 个近缘属物种进行 PCR 扩增, 结果发现, *Hy. komarovii* 具有 N<sub>s</sub> 染色体组特异的 RAPD 标记, 而没有 S<sub>t</sub>、H、E<sup>e</sup> 和 E<sup>b</sup> 特异的 RAPD 标记, 表明 *Hy. komarovii* 含有 N<sub>s</sub> 染色体组, 而不含 S<sub>t</sub> 和 H 染色体组, 其染色体组组成可能与 *Hy. duthiei*、*Hy. coreana* 和 *L. arenarius* 一样, 具有 N<sub>s</sub>X<sub>m</sub> 染色体组。根据染色体组分类原理, 支持将东北狷草划分到赖草属中 (黄燕等, 2009)。

Fan 等 (2009) 从赖草属多个物种, 以及相关禾本科的 35 个二倍体谱系中分离了单拷贝核基因 *Acc1*, 发现几乎所有被检测的赖草属植物都存在 2 个不同的 *Acc1* 类型, 由此推断赖草属与新麦草属、冰草属 (*Agropyron* Gaertn.) 和旱麦草属 (*Eremopyrum* Jaub. et. Spach) 这 3 个属的亲缘关系较近, *P. juncea* 是赖草属 N<sub>s</sub> 基因组的提供者, X<sub>m</sub> 基因组可能起源于冰草属和旱麦草属的远古区系; 赖草属植物在 0.11 亿~0.12 亿年前起源于欧亚大陆, 北美洲的赖草属物种可能是通过白令海峡转移过去的。沙莉娜等 (2009) 基于 21 个形态特征, 对 34 个赖草属类群进行了表型分支分析, 结果显示, 赖草属在形态上表现高水平的分化, 在组间及种间均存在着广泛变异, 不支持现有的赖草属分组; 北美洲的赖草属植物与欧亚大陆的赖草属植物亲缘关系较远; *L. duthiei* 和 *L. coreanus* 与

其他赖草植物的亲缘关系较近,支持将其从猓草属划分到赖草属。钟珉茵等(2008)对小麦族的赖草属、冰草属、偃麦草属(*Elytrigia* Desv.)、澳冰草属[*Australopyrum* (Tzvelev) Löve]、拟鹅观草属、新麦草属和大麦属 7 个属 24 个物种的酯酶同工酶和超氧化物歧化酶同工酶进行比较分析发现,*L. chinensis* 与 *Leymus* 的其他 13 个种的亲缘关系较远,与 *H. bogdanii* 的亲缘关系较近,*P. juncea* 与 *Leymus* 的亲缘关系很近,两种同工酶的分析结果与细胞学、形态学及分子标记的研究结果基本一致。Sha 等(2010)利用 2 个单拷贝核基因(*Acc1* 和 *DMC1*)及 1 个叶绿体基因 *trnL-F*,研究了 6 个猓草属物种、9 个赖草属物种、4 个披碱草属物种和 13 个来自于 7 个单倍型属的物种。结果发现,*Hy. coreana*、*Hy. duthiei*、*Hy. duthiei* ssp. *longearistata*、*Hy. komarovii* 和 *Hy. californica* 应当归属于赖草属,而 *Hy. patula* 应归属于披碱草属。

尽管数十年来人们进行了广泛的系统发育关系研究,但是赖草属物种的第 2 个基因组仍不清楚。开始人们猜测这个未知的基因组是薄冰草属的 E 基因组(Löve, 1984),但是随后的细胞学数据和分子数据否定了这一假说(Zhang and Dvorak, 1991; Dvorak and Zhang, 1992; Wang and Jensen, 1994; Hole *et al.*, 1999)。除此之外,还有人认为这个未知的基因组可能来源于新麦草属,即赖草属物种是部分同源多倍体,其基因组公式为  $N_1N_1N_2N_2$  (Zhang and Dvorak, 1991; Bódvarsdóttir and Anamthawat-Jónsson, 2003; 周新成, 2006)。依据二倍体新麦草物种和四倍体赖草属物种杂种的低三价体频率(0.15~0.40),以及新麦草属(16.7 pg/2C)比未知基因组(2.7~7.7 pg/2C)的 DNA 含量高,人们推断赖草属物种不可能是部分同源多倍体(Dewey, 1976; Wang and Hsiao, 1984; Sun *et al.*, 1995a; Vogel *et al.*, 1999)。因此,按照 Wang 等(1994)的提议,人们依然将赖草属物种的基因组公式定义为  $N_sN_sX_mX_m$ ,其中  $X_m$  的起源有待进一步研究。

### (三) 赖草属植物的细胞学研究

赖草属是一个多倍体属,其核型特征和变异特点是研究该属植物系统学的一个重要部分。我国学者对该属不同倍性物种的核型进行了数次报道,为赖草属的系统分类,以及利用该属植物进行麦类作物与牧草育种积累了重要的细胞学资料(段晓刚, 1984; 段晓刚等, 1991, 1993; 阎贵兴, 1991; 孙义凯等, 1992; 智丽和蔡联炳, 2000; 杨瑞武等, 2004a, 2004b)。智丽和蔡联炳(2000)报道了赖草属 5 个物种的核型,并依据 Tzvelev 的赖草属分类系统,认为穗轴每节具 4 枚至多枚小穗的粗穗赖草(*L. crassiusculus*)应同 *L. racemosus* 一起归属于 *Leymus* 组,穗轴每节仅具 1 枚小穗的若羌赖草(*L. ruoqiagensis*)应同羊草一起归属于 *Anisopyrum* (Griseb.) Tzvel. 组,而穗轴每节具 2~3 枚小穗的 *L. angustus* 属于 *Aphanoneuron* (Nevski) Tzvel. 组。在组的系统发育上, *Leymus* 组

可能是该属较原始的组, *Anisopyrum* (Griseb.) Tzvel. 组较为进化, 而 *Aphanoneuron* (Nevski) Tzvel. 组居于两者之间。*L. angustus* 可以表现出六倍体、十倍体和十二倍体 3 种类型 (孙根楼等, 1990)。杨瑞武等 (2004a) 研究的十二倍体 *L. angustus* 的核型与智丽和蔡联炳 (2000) 报道的四倍体核型具有较大的相似性, 在核型类型、染色体长度比、平均臂比和不对称系数方面十分类似, 差异极小, 表明 *L. angustus* 在由四倍体转变为十二倍体的进化过程中, 其染色体结构没有发生显著变化。

Zhang 等 (2006) 分析了 *Hy. duthiei* ssp. *longearistata* 与 *L. multicaulis* 杂种在减数分裂中染色体的配对情况, 发现每个细胞中平均有 10.47 个二价体, 加上 GISH 上的证据, 他们认为 *Hy. duthiei* ssp. *longearistata* 和 *Hy. duthiei* ssp. *duthiei* 应当归入赖草属。同时, Wang 等 (2006) 利用 FISH 方法研究了 2 个来自于 *L. racemosus* 的串联重复序列 *pLrTaiI-1* 和 *pLrPstI-1* 在新麦草属和赖草属中的分布情况, 结果表明, 新麦草属植物中不存在 *pLrPstI-1* 序列, 绝大部分新麦草属植物存在 *pLrTaiI-1* 序列, 但种间和种内的杂交信号数目都有差异。此外, Anamthawat-Jónsson 和 Bödvarsdóttir (2001) 采用 FISH 方法研究了 18S-28S 核糖体基因在 *L. arenarius* ( $2n=8x=56$ )、*L. racemosus* ( $2n=4x=28$ ) 和 *L. mollis* ( $2n=4x=28$ ) 3 个物种中的分布, 发现每个物种都有 3 个主要的 rDNA 位点, 但 *L. arenarius* 还有另外 3 个次要位点, 其中, *L. arenarius* 和 *L. racemosus* 的 3 个主要位点是一致的, 暗示前者由后者通过杂交或多倍体化进化而来。Orgaard 和 Heslop-Harrison (1994a) 发现在 *P. stoloniformis* 上共有 14 个 rDNA 位点, 而 *L. arenarius*、*L. paboanus* 和 *L. angustus* 分别有 8、16 和 12 个主要的 rDNA 位点, 从而指出 rDNA 位点的数目和倍性水平之间没有关系。

#### (四) 赖草属植物与小麦的远缘杂交

赖草属植物普遍具有广泛的适应性和较强的抗逆性。自 20 世纪 40 年代初苏联首次尝试将赖草属与小麦杂交以来, 国内外学者一直致力于将赖草属优良性状的控制基因导入小麦中。至今已有 10 个物种与小麦杂交成功, 它们分别是 *L. racemosus* (Qi et al., 1997; Kishii et al., 2001, 2004; Liu, 2002; Chen et al., 2005; Oliver et al., 2005)、*L. triticoides*、*L. cinereus*、*L. angustus* (Plourde et al., 1992)、*L. arenarius* (Anamthawat-Jónsson and Bödvarsdóttir, 2003)、*L. chinensis* (Xia and Chen, 1996)、*L. mollis* (Koeber et al., 1995; Anamthawat-Jónsson and Bödvarsdóttir, 2001; Forsstrom and Merker, 2001; Li et al., 2005)、*L. multicaulis* (Plourde et al., 1989a)、*L. secalinus* 和 *L. innovatus* (Plourde et al., 1989b)。杂交成功的 10 个种中, 研究较为系统和深入的是 *L. racemosus* 和 *L. mollis*。

总之,自 1848 年 Hochstetter 首次提出赖草属概念至今,人们在研究与利用赖草属植物方面取得了很大成就,但是也存在一些亟须解决的问题,其中包括:①赖草属未知基因组的确定,不同物种母本和父本的起源;②赖草属不同物种之间的系统发育关系,不同倍性物种之间的进化关系;③赖草属不同物种的遗传多样性和地理分布特征,不同倍性水平与地理分布的关系;④赖草属植物优异特性的利用及其与小麦杂交后代育性恢复的关系;⑤赖草属部分物种的有性生殖能力低(结实率低和发芽率低);⑥赖草属物种基因组加倍的分子机制、不同基因组之间的相互作用和对基因组冲击的适应等。

## 二、nrDNA 的特性及其注意问题

### (一) nrDNA 的协同进化

从整体而言,协同进化(concerted evolution,也称趋同进化)机制能删除旁系同源序列,因而有利于重建精确的植物系统发育树。在没有完全匀质化的条件下,会同时存在多个旁系同源和直系同源 nrDNA(核糖体 DNA)拷贝,这将导致重建系统发育变得更加复杂。多个 rDNA 排列在植物基因组中十分常见,它们可能起源于杂交、多倍体化、基因和染色体部分复制及各种形式的同源和非同源重组。事实上,协同进化机制产生的序列匀质化不可能与物种水平和基因组水平产生的变异同步,所以在任何一个系统中都不可能只存在一种类型的 ITS 序列,即使在非杂交起源的二倍体和多倍体植物中也如此(Baker *et al.*, 2000; Buckler *et al.*, 1997; Campbell *et al.*, 1997; Denduangboripant and Cronk, 2000; Fuertes *et al.*, 1999; Gaut *et al.*, 2000; Gernandt and Liston, 1999; Hartmann *et al.*, 2001; Hughes *et al.*, 2002; Kita and Ito, 2000; Kuzoff *et al.*, 1999; Linder *et al.*, 2000; Mayol and Rossello, 2001; Muir *et al.*, 2001; Widmer and Baltisberger, 1999)。甚至在协同进化已完成或几乎完成的植物谱系中,也不能认为只存在严格的直系同源序列,其中一个原因是存在网状进化、种质渐渗或多倍体事件,它们的发生会导致进化中共存一些短命的 ITS 类型,随后不同后代植物谱系的匀质化方向可能不同。在植物进化历史中,被删除的序列类型可能已无法判断,被保留下来的 ITS 类型可能是旁系同源和直系同源序列的混合体。

### (二) nrDNA 的进化方向

自不同 rDNA 拷贝出现在同一基因组中后,它们可能会经历不同命运。第一种可能性是不同的拷贝共存,相互独立,没有重组和位点间的接触。在这种条件下,ITS 序列数据能反映植物历史上发生的杂交和多倍体化,为植物的父本和母本祖先的推断提供了有力证据。异源多倍体 *Tragopogon mirus* 和 *T. miscellus*



的二倍体祖先分别是 *T. dubius*/*T. porriifolius* 和 *T. dubius*/*T. pratensis*。Soltis 和 Soltis (1991)、Soltis 等 (1995) 发现两个亲本的 rDNA 可以共存。Baumel 等 (2001) 在异源多倍体 *Spartina anglica* (起源于 *S. maritima*/*S. alterniflora*.) 中用 RFLP 也观察到同样的现象。异源多倍体 *Tragopogon* 和 *Spartina* 的形成历史比较短暂,但是在一些具有上百万年进化历史的物种中也观察到了这种现象。在林仙科 (Winteraceae) 中,古老的旁系同源序列被维持至今 (Suh *et al.*, 1993), 它与时间没有关系。在这种情况下,两种或更多的重复类型没有参与匀质化过程,所以不同的核糖体类型得以保存,不同的 ITS 序列可以为植物的谱系发生研究提供重要信息。例如, Ritland 等 (1993) 在 *Mimulus guttatus*, Sang 等 (1995) 在 *Paeonia*, Ainouche 和 Bayer (1997) 在 *Bromus lanceolatus* 和 *B. secalinus*, Campbell 等 (1997) 在 *Amelanchier*, Vargas 等 (1999) 在 *Hedera*, Wissemann (2002) 在 *Rosa* 中的相关研究都证实了这些。

第二种可能性是不同 ITS 类型经历不同程度的重组后共存,这会产生不规则的 ITS 类型,在系统发育树中位于双亲的基部 (McDade, 1995)。在杂种中,基因重组被认为是很普遍的现象 (Barkman and Simpson, 2002; Buckler *et al.*, 1997; Campbell *et al.*, 1997), 这也为无规律 ITS 类型的出现提供了一种解释。例如,在杂种 *Dendrochilum acuiiferum* 的单株中, Barkman 和 Simpson (2002) 对 14 个 ITS 克隆序列进行了分析,发现有 2 个序列的 ITS1 与亲本 *D. stachyodes* 一致,而它们的 ITS2 序列却与另一个推测亲本 *D. grandiflorum* 一致,这表明双亲的核糖体基因之间发生了重组。Ko 和 Jung (2002) 在 *Trichaptum* 中也发现了类似现象,同时发现这些不规则的 ITS 序列在不同染色体的不同位点上。此外,重组不但发生在具有功能的重复类型之间,还发生在具有功能和不具有功能的假基因之间。这一过程无疑将掩盖植物发生史的真相,特别是当我们考虑到假基因化、网状进化和基因重组时。

第三种可能性是在基因组中一种 rDNA 类型占据优势。这种 rDNA 或者是未受污染的一个亲本的重复类型,或是因基因组间重组产生的不规则 ITS 类型。Wendel 等 (1995) 在棉属 (*Gossypium* Linn.) 中发现二倍体祖先和多倍体后代都完成 (或接近完成) 了匀质化过程,并发现匀质化过程具有双向性,棉属中的多倍体与其现存的二倍体 ITS 一致。类似现象也在其他植物系统中得到证明 (Brochmann *et al.*, 1996; Ferguson *et al.*, 1999; Franzke and Hurka, 2000; Fuertes *et al.*, 1999; Roelofs *et al.*, 1997)。通过分析 ITS 序列, Brochmann 等 (1996) 发现异源多倍体 *Saxifraga osloensis* 的 ITS 类型与母本 *S. adscendens* 一致,与父本 *S. tridactylites* 不同。结合植物地理学, Fuertes 等 (1999) 发现新生杂种 *Armeria villosa* subsp. *longiaristata* 在种质渐渗后也发生了偏向性协同进化。



通过协同进化, ITS 存在三种可能的进化命运, 即维持两种类型、产生新的类型和删除一种类型, 应该强调的是, 这三种命运并不相互排斥。在 *Bromus* 中, Ainouche 和 Bayer (1997) 发现异源多倍体 *B. hordeaceus* 只表现一种 ITS 类型, 而异源多倍体 *B. lanceolatus* 和 *B. secalinus* 表现出不止一种 ITS 类型。Sang 等 (1995) 发现 *Paeonia* 的 5 个杂种维持了亲本不同类型的 ITS 序列, 而在另外 10 个杂种中, ITS1 序列来自两个亲本, 所有 ITS2 则来自一个亲本。他们认为在这 10 个杂种中, ITS2 已经完成了协同进化, 而 ITS1 则仍然保持了其多样性。Wisseman (2002) 发现 *Rosa jundzillii* 的 ITS1 序列分别来自 *R. gallica* 和 *R. canina*, 证明了 *R. jundzillii* 的杂种起源。

现在我们对能在数量和质量上影响协同进化 (不均等交换和基因转换) 的生命史和基因组特征知之甚少, 但是毫无疑问, rDNA 的基因组位置和数量具有重要意义。与 rDNA 多重序列靠近染色体中间相比, 当序列靠近端粒时, 位点间的重组事件升高。在前一种情况下, 位点间的重组对染色体可能是有害的 (Arnheim, 1983; Fulnecek *et al.*, 2002; Wendel *et al.*, 1995)。

协同进化的程度受到物种年代间隔和网状进化发生时间的影响。前者很容易理解, 对后者人们做了较多的研究。相对较年轻的异源多倍体 *Tragopogon* (Soltis and Soltis, 1991; Soltis *et al.*, 1995) 和 *Spartina* (Baumel *et al.*, 2001) 维持了双亲的 ITS 类型。在人工 *Armeria* 杂种中,  $F_1$  代中出现了预期的新的 ITS 类型, 但是令人吃惊的是, 在  $F_2$  代中 ITS 就完成了 ITS 的协同进化 (Fuertes *et al.*, 1999), 因此, 协同进化发生在杂种形成的早期阶段。

总之, 协同进化导致基因组内的 rDNA 匀质化不可能是一个瞬时的、完全的过程, 而应该是发生在位点间和位点内水平上的、不完全的、具有不均等进化速率的特征。植物基因组维持了不同的 rDNA, 这不但能反映生物重组的历史, 也能反映不同 ITS 出现后基因组间的相互作用。

### (三) nrDNA 中的假基因

自 Buckler 和 Holtsford (1996a, 1996b) 在玉米 (*Zea mays*) 中发现假基因后, 人们也陆续在其他被子植物中发现了假基因 (Buckler *et al.*, 1997; Hartmann *et al.*, 2001; Kita and Ito, 2000; Mayol and Rossello, 2001; Muir *et al.*, 2001)。假基因的一些特征包括大的缺失、预测的二级结构、GC 含量、序列分化度和甲基化模式 (Buckler and Holtsford, 1996a, 1996b; Buckler *et al.*, 1997)。与具有正常功能的 ITS 相比, ITS 假基因二级结构的稳定性低, 由于去氨基作用, AT 含量较高, 在保守区域相对替换速率较高。同样是研究 *Quercus* 植物谱系, 但 Samuel 等 (1998) 和 Manos 等 (1999) 的结果不同, Mayol 和 Rossello (2001) 指出 Samuel 等的 ITS 序列存在假基因。Buckler 和 Holtsford (1996a, 1996b) 在对玉米的研究中发现, PCR 反应中添加二甲基亚