

利用 SSR 标记对垂穗披碱草和老芒麦进行物种鉴定和遗传变异分析

张成林¹, 郭志慧¹, 张新全¹, 白史且², 张昌兵², 李平³, 马啸¹

(¹ 四川农业大学动物科技学院, 成都 611130; ² 四川省草原科学研究院, 成都 611731;

³ 四川省甘孜藏族自治州畜牧科学研究所, 康定 626000)

摘要: 垂穗披碱草 (*Elymus nutans*) 和老芒麦 (*Elymus sibiricus*) 皆为花序下垂类披碱草属物种, 高海拔地区的 *E. sibiricus* 的部分变异类型也具有小穗紧密排列等特征, 与 *E. nutans* 在形态学性状上具有较多的交叉, 造成野外种质资源采集时进行直接的田间鉴定存在困难。本研究利用 12 对小麦族 SSR 引物对 8 份垂穗披碱草和 10 份老芒麦种质进行遗传变异和物种鉴定分析, UPGMA 聚类分析表明供试材料明显可依据物种差异划分成两大类, 主向量分析 (PCoA) 与聚类分析的结果保持一致。种质间遗传相似系数分析和分子方差分析 (AMOVA) 也表明种间变异远高于种内。另外, 本研究筛选出 3 对引物, ESGS79 和 ESGS155 能够在垂穗披碱草材料中扩增出特异性条带, Xgwm311 能够在老芒麦材料中扩增出特异性条带, 这 3 对引物能够作为区分垂穗披碱草和老芒麦的依据, 为野外种质资源的收集以及田间育种工作提供指导。

关键词: 老芒麦; 垂穗披碱草; SSR 标记; 遗传变异; 物种鉴定

An Analysis of Species Identification and Genetic Divergence of Drooping Wildrye (*Elymus nutans*) and Siberian Wildrye (*E. sibiricus*) by SSR Markers

ZHANG Cheng-lin, GUO Zhi-hui, ZHANG Xin-quan, BAI Shi-qie, ZHANG Chang-bing, LI Ping, MA Xiao

(¹ College of Animal Science and Technology, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130;

² Sichuan Academy of Grassland Science, Chengdu 611731; ³ Institute of Animal Husbandry of Garze Autonomous Prefecture of Sichuan Province, Kangding 626000)

Abstract: *Elymus nutans* and *Elymus sibiricus*, common species of *Elymus* genus of Triticeae tribe, are both tall-growing, perennial bunchgrass with drooping inflorescence. When collecting wild germplasm in field survey, there are some difficulties in rapid and accurate identification of the two similar species due to some overlapped morphological characters such as dense spikelets in some *E. Sibiricus* collections from upper elevations. We used SSR primers from different sources to characterize genetic variance on a total of 18 accession of *E. nutans* and *E. sibiricus*. The 12 selected primers produced 152 well defined bands, and the percentage of polymorphism was 88.6%. Two main clusters corresponded exactly to two species are shown in an arithmetic average (UPGMA) dendrogram, which is in agreement with the results of principal coordinate analysis (PCoA) analysis. The analysis of molecular variance (AMOVA) and the t-test of Dice coefficients among accessions revealed genetic divergence between the two species was much higher than that within species. Furthermore, we screened out 3 primers, in which ESGS79 and ESGS155 are able to amplify the specific bands to *E. nutans* accession, while Xgwm311 could amplify specific bands to *E. sibiricus*. These primers

收稿日期: 2015-06-18 修回日期: 2015-07-28 网络出版日期: 2016-04-06

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20160406.1414.040.html>

基金项目: 国家牧草产业技术体系项目 (CARS-35-05); 四川省科技支撑计划 (2013ZC1635、2015SZ0200)

第一作者研究方向为高原牧草资源创新与利用。E-mail: mr_zhangcl@126.com

通信作者: 马啸, 研究方向为草种质资源创新与育种。E-mail: maroar@126.com,

张新全, 研究方向为草种质资源创新与育种。E-mail: zhangxq@sicau.edu.cn

will provide guidance and convenience for the wild germplasm collection and breeding.

Key words: *Elymus sibiricus*; *Elymus nutans*; SSR markers; genetic variation; species identification

老芒麦(*E. sibiricus* L.)和垂穗披碱草(*E. nutans* Griseb.)是小麦族(Triticeae)披碱草属(*Elymus*)多年生疏丛性禾草,在我国西北和青藏高原地区被广泛利用^[1-3],两种植物穗型均下垂,在形态上较为相似,且二者的生态幅均比较宽,对寒冷干旱的生态环境具有优良的生态可塑性^[4]。传统上对*E. sibiricus*和*E. nutans*的形态划分通常是以穗状花序的形态及颖先端芒的长短等性状来进行的。根据中国植物志的检索标准;*E. nutans*的穗状花序较紧密,小穗排列多少偏于穗轴的一侧,颖先端具芒尖;而*E. sibiricus*的穗状花序长而疏松,小穗排列不偏于一侧,颖先端具短芒^[5]。在高海拔地区以及某些特殊的生境中,*E. sibiricus*的穗状花序时常会紧密,颖先端的短芒也会变为芒尖,和*E. nutans*在形态特征上存在交叉,按照传统的形态学分类方法很难识别^[6-7]。虽然已有的细胞遗传学研究表明,老芒麦为异源四倍体($2n = 4x = 28$)^[8];垂穗披碱草是异源六倍体($2n = 6x = 42$)^[9],但染色体数目鉴定法对于野外采集大量种质资源或对育种材料进行田间筛选评价、去除异种植株时显得相对费时、费力,而且对于有时很难获得种子的植株(如在过度放牧的情况下,很多披碱草属植物仅能采集到野生居群植株的茎秆或叶片),这时利用细胞学进行鉴定倍性和物种鉴定的难度较大,亟待采用更为快捷有效的分子标记手段。SSR(simple sequence repeat)分子标记,或称为微卫星 DNA(microsatellite DNA),多态性高,在基因组上分布广,且具有共显性的遗传特征和高度的遗传稳定性,在植物遗传多样性和群体遗传结构分析上已经获得广泛应用^[10-13]。目前在老芒麦等披碱草属物种上已开发出一些基因组 SSR 和 EST-SSR 引物^[14-16],而且众多研究表明小麦族很多物种的 SSR 引物在其近缘物种上具有较高的可转移性,这为利用 SSR 标记进行披碱草属植物的遗传学研究提供了便利^[17-22]。

本试验利用 SSR 分子标记分析部分老芒麦和垂穗披碱草种质资源的遗传变异,验证 SSR 标记在分析两物种遗传分化上的有效性,寻找能鉴定两物种的特异 SSR 分子标记,以促进老芒麦和垂穗披碱草的资源收集和田间育种工作的高效开展。

1 材料与方法

1.1 供试材料

本试验采用 18 份披碱草属材料,包括 8 份垂穗披碱草和 10 份老芒麦,其中有 3 个垂穗披碱草品种和 5 个老芒麦品种(表 1),材料由四川农业大学草业科学系、四川省草原科学研究院和美国国家种质资源库(NPGS)提供。

表 1 供试材料信息

Table 1 Information for *Elymus* materials in the study

材料编号 No.	原始编号 或名称 Original code or name	种名 Species	来源 Collection site	育种状态 Breeding status
EN-1	康巴	<i>E. nutans</i>	四川甘孜州道孚县	品种
EN-2	阿坝	<i>E. nutans</i>	四川阿坝州阿坝县	品种
EN-3	甘南	<i>E. nutans</i>	甘肃夏河县	品种
EN-4	昌都	<i>E. nutans</i>	西藏昌都	栽培品系
EN-5	炉霍	<i>E. nutans</i>	四川炉霍县	栽培品系
EN-6	PI639858	<i>E. nutans</i>	四川红原县瓦切乡	野生种质
EN-7	PI639862	<i>E. nutans</i>	四川省康定县	野生种质
EN-8	W622118	<i>E. nutans</i>	四川德格县雀儿山	野生种质
ES-1	川草 2 号	<i>E. sibiricus</i>	四川红原	品种
ES-2	康巴	<i>E. sibiricus</i>	四川康定	品种
ES-3	阿坝	<i>E. sibiricus</i>	四川阿坝	品种
ES-4	同德	<i>E. sibiricus</i>	青海同德	品种
ES-5	青牧 1 号	<i>E. sibiricus</i>	青海同德	品种
ES-6	雅江	<i>E. sibiricus</i>	四川雅江	栽培品系
ES-7	红原	<i>E. sibiricus</i>	四川红原	栽培品系
ES-8	青牧 2 号	<i>E. sibiricus</i>	青海	栽培品系
ES-9	Y1005	<i>E. sibiricus</i>	新疆乌鲁木齐	野生种质
ES-10	Y2002	<i>E. sibiricus</i>	新疆哈巴河	野生种质

1.2 方法

1.2.1 细胞学鉴定 种子萌发采用纸上发芽的方法。每份材料中随机选择 10 粒种子,待其根长至 1~2 cm 时,于当天上午取材料根尖,经过低温处理 24 h 后,再转入卡诺氏固定液(冰醋酸:乙醇=1:3)中固定 24 h。经过 1 mol/L HCl 溶液 60 °C 下恒温解离 8~10 min,再用卡宝品红染色 10 min 后进行压片观察,记录染色体数目。

1.2.2 SSR 引物筛选及 PCR 扩增 经倍性鉴定后的每份材料取 10 株幼苗,等量混合叶片后提取总 DNA。SSR 分子标记试验中采用 4 种来源的引物(表 2)共计 50 对,前缀为 EAG 的引物是源于 *Elymus alaskanus* 的基因组 SSR 引物^[23],前缀为 ESGS 的引物是源于老芒麦的基因组 SSR 引物^[15],前缀为 Elw 的引物是源于 *E. lanceolatus* 和 *E. wawawaiensis* 的 EST-SSR 引物^[24],前缀为 Xgwm 的引物是源于小麦的基因组 SSR 引物和前缀为 WMS 的引物均来自于小麦的基因组 SSR 引物^[25]。随机选择 2 份老

芒麦和 2 份垂穗披碱草材料的 DNA,在 50 对引物中筛选出能够扩增出条带清晰、稳定性高的引物用于下一步试验。SSR-PCR 反应体系(20 μ L):模板 DNA 2 μ L(10 ng/ μ L),上下游引物各 1.5 μ L(10 pmol/ μ L),*Taq* 酶 0.4 μ L(2.5 U/ μ L),Golden easy PCR mix 10 μ L(北京天根公司,其中 5 mL 中含 500 μ mol/L dNTP,20nmol/L Tris-HCl,100 mmol/LKCl,3mmol/L MgCl₂),ddH₂O 补齐。SSR 扩增程序:94 $^{\circ}$ C 3 min,45 个循环(94 $^{\circ}$ C 1 min,适宜退火温度 1 min,72 $^{\circ}$ C 2 min),72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

表 2 本研究用的 SSR 引物序列

Table 2 SSR primer sequences used in this study

引物编号 Primer code	正向序列 Forward sequence(5'→3')	反向序列 Reverse sequence(5'→3')
EAGA103	GACTGCTAAACTAACAACAAAAC	ATCTCACACTGGCTCATGTC
Elw0669s043	CATCTCACGGCAAGTAAATGAACA	TCCGAGATGGGTACAATTTTTAT
ESGS1	GGTGCTGTTTGTGTTCT	GAATGAAAGTTCGGGGTT
ESGS155	GCCACTAATAGGTTTTTTC	CCCCTAACTCACTCACACA
ESGS219	GTCCACAGGTTACTATCC	TAAAAGAAGTGCTCAAATG
ESGS45	GCAAGAGCAAGAGGAAGGAG	AGGCAAGCTGTCAACAAAA
ESGS79	TGGTGACATCTCAAGAACAC	TTCCACACAAAAAATCAGT
WMS169	ACCACTGCAGAGAACACATAGC	GTGCTCTGCTCTAAGTGTGGG
Xgwm190	GTGCTTGCTGAGCTATGAGTC	GTGCCACGTGGTACCTTTG
Xgwm639	CTCTCTCCATTGGTTTTCC	CATGCCCCCTTTTCTG
Xgwm132	TACCAAATCGAAACACATCAGG	CATATCAAGGTCTCCTTCCCC
Xgwm311	TCA CGT GGA AGA CGC TCC	CTA CGT GCA CCA CCA TTT TG

1.2.3 SSR-PCR 扩增产物检测 PCR 完成后,扩增产物进行 6.0% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离。首先进行 150V 电压预电泳 30min,然后 350V 恒压电泳 2h。电泳完成后进行银染,拍照并保存图像。

1.2.4 数据统计 由于老芒麦和垂穗披碱草为异源多倍体,同一对 SSR 引物可能存在多个扩增位点,即单株的条带数一般会多于 2 条,而且本研究采用混合单株 DNA 样品,故这里无法将 SSR 数据以二倍体和共显性方式记录,只能将 SSR 数据视为用 0、1 统计的表型数据,即人工记录每个引物的清晰可辨的扩增片段(不统计分子量低于 50bp 的条带),在相同迁移率位置上,有带记为“1”,无带记为“0”,形成原始二元数据矩阵^[22]。计算每对引物扩增条带的总扩增带数(TNB, total number of bands)、多态性带数(NPB, number of polymorphic bands)、多态性条带百分比(PPB, percentage of polymorphic bands)、多态性信息量(PIC, polymorphic information content)等参数^[2]。对形成的二元数据矩阵用 Dice 系数估算种质材料间的遗传相似性(GS),Dice 系数实际上等同于 Nei-Li 遗传相似

系数^[26]。利用 SPSS18.0 基于 *t* 检验比较两物种种内 GS 系数平均值与总的 GS 平均值的差异。采用 NTSYS-pc 2.20 软件对 GS 系数矩阵利用 UPGMA 法构建表型树状图,并利用主坐标分析(PCoA, principal coordinates analysis)来显示供试材料的三维空间分布格局。聚类分析同时采用 Freetree^[27] 软件基于 bootstrap 分析(1000 次置换)来检验树状图的可靠性和稳健性。对于仅能在老芒麦或者垂穗披碱草所有供试种质上特异出现的条带视为具有物种特异性的条带,所属引物即视为具有物种鉴定效力的引物。

2 结果与分析

2.1 SSR 多样性分析

经细胞学检测发现,供试老芒麦材料(ES)的体细胞染色体数均为 $2n = 28$,垂穗披碱草材料(EN)的体细胞染色体数均为 $2n = 42$,符合实际的染色体倍性(图 1)。在 50 对引物筛选出 12 对引物,其扩增条带数目较少,分子量介于 100~500 bp 之间,条带强且具有明显多态性和稳定性(表 3)。12 对引物在 8 份老芒麦种质上共检测到 111 条条带,其中

多态性条带有 63 条,多态性比率为 55.21%,平均每对引物扩增出 5.25 条多态性条带,其多态性信息量(PIC)平均值为 0.199。10 份垂穗披碱草种质共检测到 96 条条带,多态性条带有 40 条,多态性比率为 41.77%,引物扩增多态性条带数的平均值为 3.3,其 PIC 平均值为 0.159。而这 12 对引物在全部供试材料上共检测到 152 条条带,多态性条带比率为 88.63%,各引物 PIC 平均值为 0.358,以上各参数均明显高于两物种内各自的同一参数,即总的遗传多样性明显高于种内多样性,这可能是由于垂穗披碱草和老芒麦物种间的遗传分化所造成的。

表 3 SSR 引物在供试材料中的扩增情况及多态性

Table 3 Amplification and polymorphism of the PCR products with SSR primers

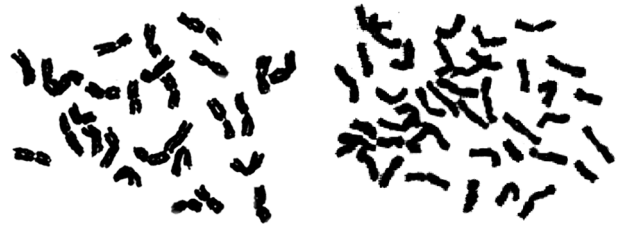
引物 Primers	垂穗披碱草 + 老芒麦 <i>E. nutans</i> + <i>E. sibiricus</i>				垂穗披碱草 <i>E. nutans</i>				老芒麦 <i>E. sibiricus</i>			
	总条带 数 TNB	多态性 条带数 NPB	多态性 条带比率 (%) PB	多态性 信息量 PIC	总条带 数 TNB	多态性 条带数 NPB	多态性 条带比率 (%) PB	多态性 信息量 PIC	总条带 数 TNB	多态性 条带数 NPB	多态性 条带比率 (%) PB	多态性 信息量 PIC
EAGA103	16	16	100	0.356	9	9	100	0.396	12	8	66.7	0.210
Elw0669s043	8	8	100	0.390	5	3	60	0.231	5	3	60.0	0.280
ESGS1	15	10	66.7	0.288	10	1	10	0.038	12	4	33.3	0.132
ESGS155	16	15	93.8	0.370	12	3	25	0.081	10	6	60.0	0.178
ESGS219	22	18	81.8	0.334	13	3	23.1	0.101	16	9	56.3	0.233
ESGS45	12	10	83.3	0.401	8	4	50	0.195	11	6	54.6	0.229
ESGS79	11	10	90.9	0.438	7	3	42.9	0.138	5	1	20.0	0.064
WMS169	8	7	87.5	0.333	2	0	0	0	8	6	75.0	0.218
Xgmw190	13	13	100	0.402	8	5	62.5	0.23	8	4	50.0	0.195
Xgmw639	14	14	100	0.365	9	3	33.3	0.146	12	8	66.7	0.207
Xgwm132	4	3	75	0.335	4	2	50	0.211	2	1	50.0	0.240
Xgwm311	13	11	84.6	0.283	9	4	44.4	0.142	10	7	70.0	0.200
总数 Total	152	135	—	—	96	40	—	—	111	63	—	—
平均值 Average	12.7	11.3	88.63	0.358	8	3.3	41.77	0.159	93	5.25	55.21	0.199

2.2 遗传相似性分析

18 份种质材料间的 Dice 遗传相似性(GS)系数平均值为 0.667。对于老芒麦(ES)材料,其种内的 GS 变幅在 0.756~0.910 之间,平均值为 0.843;对于垂穗披碱草(EN)材料,其种内的 GS 变幅在 0.838~0.948 之间,平均值为 0.884;而垂穗披碱草和老芒麦两物种间的 GS 平均值为 0.420。 t 检验分析表明垂穗披碱草种内 GS 极显著高于两物种间的 GS($t_1 = 74.958, P_1 < 0.001$),老芒麦种内 GS 也极显著高于两物种间 GS($t_2 = 77.103, P_2 < 0.001$)。上述结果表明两物种间的遗传变异明显高于物种内的遗传变异。

2.3 聚类分析与主坐标分析

利用 12 对多态性引物共检测出 135 条多态性片段,对 18 份材料进行基于 UPGMA 法的聚类分析(图 2),在各材料间平均 GS 为 0.667 处,材料被分



A:老芒麦(ES-2,2n=28);B:垂穗披碱草(EN-4,2n=42)

A:*E. sibiricus*(ES-2,2n=28),B:*E. nutans*(EN-4,2n=42)

图 1 老芒麦材料和垂穗披碱草材料的体细胞染色体形态

Fig. 1 The morphology of somatic chromosomes of *E. sibiricus* and *E. nutans*

为老芒麦(I)和垂穗披碱草(II)两大类群。在 GS 为 0.86 处,10 份老芒麦种质被分成 2 个亚组,亚组 Ia 包括了同德老芒麦(ES-4)、青牧 1 号(ES-5)、青牧 2 号(ES-8)这 3 个品种,其余 7 个老芒麦品种归为亚组 Ib。在 GS 为 0.89 处,8 份垂穗披碱草种质也被分为了 2 个亚组,亚组 IIa 包括康巴(EN-1)、昌都(EN-4)、炉霍(EN-5)这 3 个品种(系),亚组 IIb 包括阿坝(EN-2)和甘南(EN-3)这 2 个国审品种和 PI639858、PI639862、W622118 这 3 份来自川西北高原的野生种质。

基于 GS 矩阵的主向量分析(PcoA)的结果表明(图 3),第 1 主向量 C1 解释 64.82% 的遗传变异,第 2 主向量 C2 解释了 5.50% 的遗传变异。依据图 2 中 2 种材料种质的空间关系可以看出,这 18 份材料明显地被分成 2 组,这与 UPGMA 聚类结果保持一致。

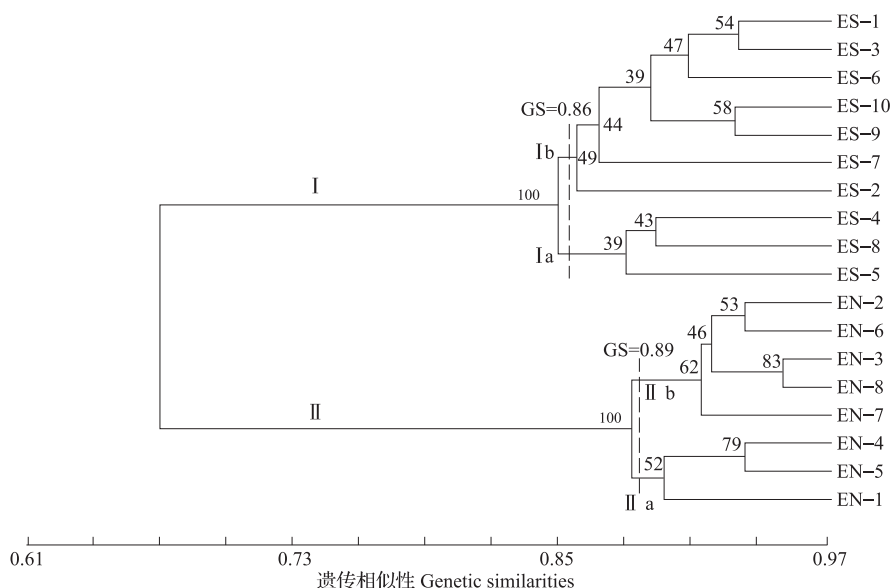


图2 基于 SSR 数据利用 UPGMA 法获得的聚类树形图

Fig. 2 Dendrogram of 18 *Elymus* accessions obtained by UPGMA cluster analysis of from SSR data

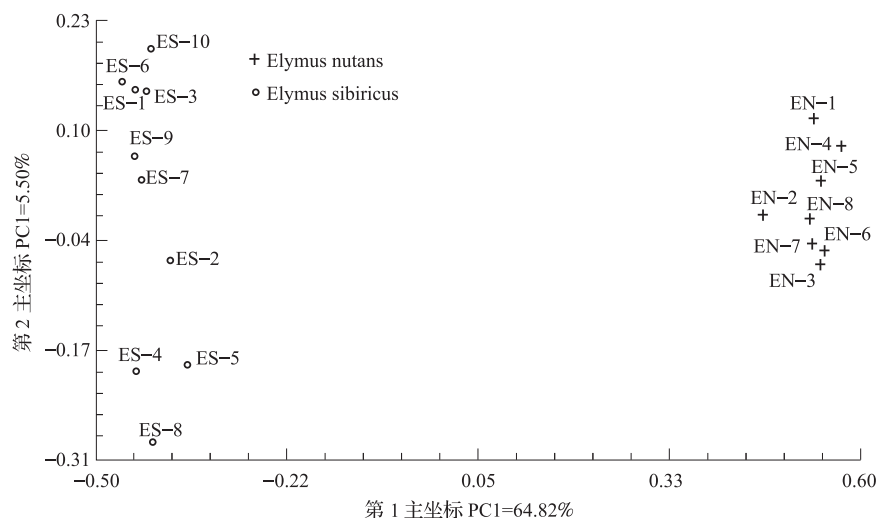


图3 基于 SSR 数据描述 18 份材料间种质遗传关系的主坐标分析二维图

Fig. 3 Principal coordinate analysis depicting genetic relationships among 18 *Elymus* accessions based on SSR data

2.4 AMOVA 分析

基于扩增带(记为 1 的带)和无效带(记为 0 的带)的频率,对供试材料进行群体遗传结构分析。分子方差分析(AMOVA)包括种间和种内的变异,结果表明在总的遗传变异中有 76.10% 发生在两物种间,有 23.90% 发生在物种内,物种间和物种内的变异均为极显著($P < 0.0001$) (表 4)。

2.5 物种特异性的 SSR 引物筛选

本研究寻找的物种特异性 SSR 引物的原则是该引物仅能在垂穗披碱草或老芒麦种内的种质材料上具有特异扩增条带。由于垂穗披碱草的基因组组成为 StStHHYY,老芒麦的基因组组成为 StStHH,仅

表4 材料的 AMOVA 分析

Table 4 Analysis of molecular variance (AMOVA) of 18 *Elymus* materials

变异来源	自由度	方差和	变异组分	变异	P 值
Source of variation	df	Sum of squares	Variance component	Percentage of variation	P values
种间	1	2.04	0.22	76.10%	<0.0001
Among species					
种内	16	1.11	0.07	23.90%	<0.0001
Within species					
总计	17	3.15	0.29		
Total					

能稳定地出现垂穗披碱草材料中的条带可能来自 Y 基因组的额外遗传位点,有可能作为区别老芒麦和垂穗披碱草的较理想的分子标记。利用引物对种质材料进行扩增时发现,引物 ESGS79 在垂穗披碱草中 193 bp 左右和 379 bp 左右分别能扩增出 1 条清晰稳定的特异性条带(图 4),引物

ESGS155 在垂穗披碱草中 236 bp 左右扩增出 1 条特异性条带(图 5),而这 2 个引物在老芒麦材料中对应位置无特异性条带。还发现引物 Xgwm311 能在老芒麦中扩增出 1 条 234 bp 的特异性条带(图 6)。上述引物因具有物种专属性,故而对两物种的鉴定具有非常重要的价值。

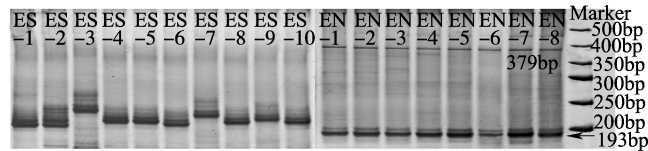


图 4 引物 ESGS79 在 18 份材料上的扩增结果

Fig. 4 The amplification result of primer ESGS79 in 18 *Elymus* materials

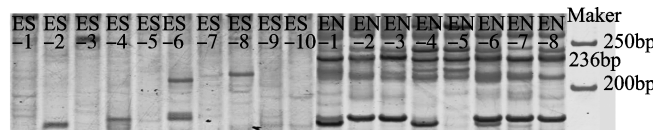


图 5 引物 ESGS155 在材料上的扩增条带图

Fig. 5 The amplification result of primer ESGS155 in 18 *Elymus* materials

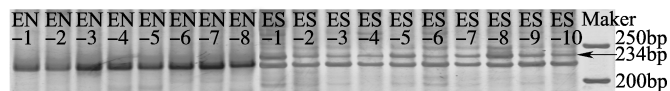


图 6 引物 Xgwm311 在材料上的扩增条带图

Fig. 6 The amplification result of primer Xgwm311 in 18 *Elymus* materials

3 讨论

SSR 分子标记具有丰富的多态性和稳定性,目前在披碱草属种质资源的遗传多样性研究、群体结构分析、指纹图谱的构建等方面的研究已获得广泛利用。严学兵等^[28]评价了不同来源 SSR 标记在我国披碱草属植物的通用性和效率,发现老芒麦(*E. sibiricus*)材料的多态性比率为 79%,垂穗披碱草(*E. nutans*)材料的多态性比率为 82%。鄢家俊等^[1]研究发现青藏高原老芒麦种质的 SSR 多态性比率为 86.44%,高于本研究中的老芒麦材料(PPB = 55.21%)。陈智华^[20]利用小麦 SSR 引物研究青藏高原和新疆野生垂穗披碱草种质的遗传多样性时,发现供试材料的 PPB 高达 99.1%,而吴昊等^[29]利用小麦 SSR 引物对内蒙古老芒麦野生种质的 PPB 约为 77%。李永祥等^[22]利用小麦 SSR 引物对国产披碱草属 12 个物种的遗传多样性分析时发现供试物种的 SSR 多态性比率约为 91%。本研究在老芒麦和垂穗披碱草种质上检测到 SSR 多态性比率分别为 55.21% 和 41.77%,低于前述研究结论,这可能与本研究使用的种质数量较少且地理来源较单一等有关。总体来看,本研究供试材料反映出较高的遗传多样性,从聚

类分析所得的 UPGMA 树状图发现 18 份供试材料明显被分成垂穗披碱草和老芒麦两大类,主向量分析和分子方差分析的结果也能与之相互印证,这表明垂穗披碱草和老芒麦材料的种间遗传差异远远高于种内差异,这同时说明利用 SSR 标记区别鉴定该两物种具有极高的可行性。值得注意的是,包括本研究在内的上述各项研究,均是将 SSR 数据记录为 0、1 表型数据,并非类似二倍体的基因型数据,主要原因是异源多倍体的单个基因型个体所得到的 SSR 条带远远多于二倍体物种。多倍体物种形成和进化过程中形成了众多的基因组重复区域,特别是异源多倍体的不同祖先基因组之间由于遗传渐渗、染色体易位等广泛存在而导致形成大量的并系同源位点(paralogous loci),这些都是很难获取在单个位点上扩增的 SSR 基因型数据的原因^[30-31]。

垂穗披碱草、老芒麦分布广泛,生境多样,在长期适应和进化的过程中,各居群在形态、生理、生态以及遗传特征方面均产生了趋异,某些高海拔地区的老芒麦种质在性状上与垂穗披碱草有部分交叉,尤其是小穗紧密排列,每穗轴节具有较多的小穗数,植株短粗,且茎基部叶鞘或根出叶鞘常具柔毛,穗轴基部常出现较短的分枝^[5],这些交叉性状,使得分

类学鉴定很困难,对野外资源采集鉴定、育种材料保存和评价带来很多障碍,尤其是开展生态遗传学研究时常常采集无种子的植株,鉴定更加困难。雷云霆等^[21]在利用小麦 SSR 引物鉴定青藏高原老芒麦和垂穗披碱草 SSR 分子标记鉴别中筛选出了引物 Xcwem38c,该引物在垂穗披碱草中 150 bp 左右仅能扩增出稳定的特异性条带。而本研究在分析老芒麦和垂穗披碱草两物种遗传筛选出的 3 对引物 (ESGS79、ESGS155、Xgwm311) 也能够分子水平上鉴定垂穗披碱草和老芒麦,这些引物对于披碱草属植物野外种质收集、田间育种等具有很高的指导性和实用性。特别是前 2 对引物具有垂穗披碱草特异的条带,很可能是 Y 基因组上的位点,对于披碱草属物种的系统发育研究也具有潜在的利用价值。当然,本研究所评价的种质份数和地理来源有限,这些引物还需要更多的种质资源来验证其有效性,还可以通过条带克隆、测序,将其转化成特异性更强的 SCAR 标记。

参考文献

- [1] 鄢家俊,白史且,常丹,等. 青藏高原老芒麦种质遗传多样性的 SSR 分析[J]. 中国农学通报,2010,26(9):26-33
- [2] 顾晓燕,郭志慧,张新全,等. 老芒麦种质资源遗传多样性的 SRAP 分析[J]. 草业学报,2014,23(1):205-216
- [3] 张妙青,王彦荣,张吉宇,等. 垂穗披碱草种质资源繁殖相关性遗传多样性研究[J]. 草业学报,2011,20(3):182-191
- [4] 陈功,贺兰芳. 高寒地区两种老芒麦生态适应性和生产性能评价[J]. 草业科学,2004,21(9):39-42
- [5] 郭本兆. 中国植物志[M]. 北京:科学出版社,1987:7-104
- [6] 卢红双,徐柱,马玉宝,等. 披碱草属穗型下垂类种质的形态学鉴定及其聚类分析[J]. 云南农业大学学报,2008,23(2):150-157
- [7] 卢宝荣. *E. nutans* 和 *E. sibiricus*, *E. Burchan-buddae* 的形态学鉴定及其染色体组亲缘关系的研究[J]. 植物分类学报,1994,32(6):504-513
- [8] Dewey D R. The genomic system of classification as a guide to intergeneric hybridization with the perennial Triticeae [M]// Gustafson J P. Gene manipulation in plant improvement. New York:Plenum Press,1984:209-279
- [9] Lu B. Meiotic studies of *Elymus nutans* and *E. jacquemontii* (Poaceae, Triticeae) and their hybrids with *Pseudoroegneria spicata* and seventeen *Elymus* species[J]. Plant System Evol,1993,186(3-4):193-212
- [10] Powell W, Machray G C, Provan J. Polymorphism revealed by simple sequence repeats[J]. Trends Plant Sci,1996,1(7):215-222
- [11] Varshney R K, Graner A, Sorrells M E. Genic microsatellite markers in plants: features and applications[J]. TRENDS in Biotechnology,2005,23(1):48-55
- [12] 张彩英,李喜焕,常文锁,等. 应用 SSR 标记分析大豆种质资源的遗传多样性[J]. 植物遗传资源学报,2008,9(3):308-314
- [13] 束爱萍,刘增兵,余丽琴,等. 水稻 SSR 标记的遗传多样性研究进展[J]. 植物遗传资源学报,2013,14(5):778-783
- [14] Sun G, Salomon B, Bothmer R V. Characterization of microsatellite loci from *Elymus alaskanus* and length polymorphism in several *Elymus* species (Triticeae: Poaceae) [J]. Genome,1998,41(3):455-463
- [15] Lei Y, Zhao Y, Yu F, et al. Development and characterization of 53 polymorphic genomic-SSR markers in Siberian wildrye (*Elymus sibiricus* L.) [J]. Conser Genet Resour,2014,6(4):861-864
- [16] Gustafson P, Bushman B S, Larson S R, et al. Development and annotation of perennial Triticeae ESTs and SSR markers[J]. Genome,2008,51(10):779-788
- [17] Kuleung C, Baenziger P S, Dweikat I. Transferability of SSR markers among wheat, rye, and triticale[J]. Theor Appl Genet,2004,108(6):1147-1150
- [18] Wang Y, Wang C, Zhang H, et al. Genetic analysis of wheat (*Triticum aestivum* L.) and related species with SSR markers [J]. Genet Resour Crop Evol,2013,60(3):1105-1117
- [19] Gu X, Guo Z, Ma X, et al. Population genetic variability and structure of *Elymus breviflorus* (Poaceae: Triticeae) endemic to Qinghai-Tibetan Plateau inferred from SSR markers[J]. Biochem System Ecol,2015,58:247-256
- [20] 陈智华. 青藏高原野生垂穗披碱草种质的遗传多样性研究[D]. 雅安:四川农业大学,2009
- [21] 雷云霆, 窦全文. 青藏高原老芒麦和垂穗披碱草 SSR 分子标记鉴别[J]. 草业科学,2012,29(6):937-942
- [22] 李永祥, 李斯深, 李立会, 等. 披碱草属 12 个物种遗传多样性的 ISSR 和 SSR 比较分析[J]. 中国农业科学,2005,38(8):1522-1527
- [23] Sun G, Salomon B, Bothmer R V. Characterization of microsatellite loci from *Elymus alaskanus* and length polymorphism in several *Elymus* species (Triticeae: Poaceae) [J]. Genome,1998,41(3):455-463
- [24] Mott I W, Larson S R, Jones T A, et al. A molecular genetic linkage map identifying the St and H subgenomes of *Elymus* (Poaceae: Triticeae) wheatgrass [J]. Genome,2011,54(10):819-828
- [25] Roder M S, Korzun V, Wendehake K, et al. A microsatellite map of wheat [J]. Genetics,1998,149(4):2007-2023
- [26] Nei M. Analysis of gene diversity in subdivided populations [J]. Proc Natl Acad Sci,1973,70(12):3321-3323
- [27] Hampl V, Pavlcek A, Flegr J. Construction and bootstrap analysis of DNA fingerprinting-based phylogenetic trees with the freeware program FreeTree; application to trichomonad parasites [J]. Inter J System Evol Microbiol,2001,51(3):731-735
- [28] 严学兵, 王塍, 周禾, 等. 不同来源 SSR 标记在我国披碱草属植物的通用性和效率评价[J]. 草业学报,2008,17(6):112-120
- [29] 吴昊, 曲志才, 闫伟红, 等. 老芒麦野生种质资源遗传多样性的 SSR 分析[J]. 曲阜师范大学学报:自然科学版,2013,39(4):73-78
- [30] Saha M C, Cooper J D, Mian M A R, et al. Tall fescue genomic SSR markers: development and transferability across multiple grass species [J]. Theor Appl Genet,2006,113(8):1449-1458
- [31] Hu X, Wang J, Lu P, et al. Assessment of genetic diversity in broomcorn millet (*Panicum miliaceum* L.) using SSR markers [J]. J Genet Genom,2009,36(8):491-500