

10种披碱草属植物的 RAPD 分析 及其系统学意义*

¹周永红 ¹郑有良 ¹杨俊良 ¹颜济 ²贾继增

¹四川农业大学小麦研究所 四川都江堰 611830

²中国农业科学院品种资源研究所 北京 100081

Phylogenetic relationships among ten *Elymus* species based on random amplified polymorphic DNA

¹ZHOU Yong-Hong ¹ZHENG You-Liang ¹YANG Jun-Liang ¹YAN Ji ²JIA Ji-Zeng

¹(Triticeae Research Institute, Sichuan Agricultural University, Dujiangyan 611830)

²(Institute of Crop Germplasm Resources, Chinese Academy of Agricultural Science, Beijing 100081)

Abstract Ten species of *Elymus* (Poaceae: Triticeae) were analyzed using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. Thirty-four decamer oligonucleotide random primers from Opron Technologies were used for polymorphic selection. 25 (73.53%) produced polymorphic products. A total of 136 bands amplified from 16 primers were selected for RAPD analyses. The data were used to generate Nei's similarity coefficients and to construct a dendrogram using UPGMA in NTSYS programs. The result showed that: (1) Three tetraploid species, *E. sibiricus* L., *E. caninus* (L.) L. and *E. lanceolatus* (Scribner et Smith) Gould, were clustered in one group, while seven hexaploid species, *E. nutans* Griseb., *E. dahuricus* Turcz., *E. brachyaristatus* A Löve, *E. submuticus* (Keng) Keng f., *E. tangutorum* (Nevski) Hand.-Mazz., *E. excelsus* Turcz. and *E. cylindricus* (Franch) Honda, were clustered in another group. The relationship between the tetraploid and the hexaploid species was remote; (2) *E. caninus* was closely related to *E. sibiricus*. This result supported that *Roegneria canina* (L.) Nevski was treated as *Elymus caninus*; (3) *E. nutans* was closely related to *E. dahuricus*; (4) *E. brachyaristatus* and *E. submuticus* were morphologically similar and sympatric in distribution, but there were certain differences between them in the nucleotide sequences. Both of them were related to *E. nutans* and *E. dahuricus*; (5) *E. excelsus* was closely related to *E. cylindricus*, and they were clustered with *E. tangutorum*; (6) RAPD results are basically comparable with those obtained from studies on morphology and cytology. It is a useful supplementary method for assessing the genetic relationships among *Elymus* species.

Key words *Elymus*; RAPD analysis; Phylogenetic relationship; Genome; Morphology

摘要 利用随机扩增多态性 DNA(RAPD)技术分析了 10 种披碱草属植物,即:*Elymus sibiricus* L., *E. caninus* (L.) L., *E. lanceolatus* (Scribner et Smith) Gould, *E. nutans* Griseb., *E. dahuricus* Turcz., *E. tangutorum* (Nevski) Hand.-Mazz., *E. brachyaristatus* A Löve, *E. submuticus* (Keng) Keng f., *E. cylindricus* (Franch) Honda 和 *E. excelsus* Turcz.。对 34 个 OPRON 公司十聚体随机引物进行多态性筛选,25 个(75.53%)能产生多态性。16 个引物产生的 136 个 DNA 片断,用于计算种间 Nei 氏遗传相似性系数分析,在 NTSYS 程序中利用 UPGMA 构建系统发育树状图。分析结果表明:(1)四倍体和六倍体

物种各自聚为一支,它们之间的亲缘关系较远;(2)*E. sibiricus* 和 *E. caninus* 亲缘关系较近,支持把 *Roegneria caninus* (L.) Nevski 归入 *Elymus*; (3)*E. nutans* 和 *E. dahuricus* 亲缘关系密切;(4)形态相似、地理分布一致的 *E. brachyaristatus* 和 *E. submuticus* 存在着一定程度的核苷酸序列的差异,它们与 *E. nutans* 和 *E. dahuricus* 有一定的亲缘关系;(5) *E. excelsus* 与 *E. cylindricus* 的亲缘关系较近,它们又与 *E. tangutorum* 有亲缘关系;(6)RAPD 结果与形态学和细胞学等分析结果基本一致,RAPD 分析方法将为 *Elymus* 系统分类提供 DNA 水平上丰富的资料。

关键词 披碱草属; RAPD 分析; 亲缘关系; 染色体组; 形态学

披碱草属 *Elymus* L. 是禾本科 Poaceae 小麦族 Triticeae 中的一个多年生属,它的经济价值很大,不仅为优良的牧草,而且许多物种含有抗普通小麦和大麦的一些病虫害和抗逆基因,常被作物育种家选作麦类作物远缘杂交的对象,进行转基因研究(Jiang *et al.*, 1994; Sharma & Gill, 1983)。自 1753 年林奈建立该属以来,曾经有过多大的变动,其分属界限也有很大差异。按照历史上不同分类学家的处理,披碱草属曾经包括了冰草属 *Agropyron* Gaertn.、狷草属 *Asperella* Humb.、稜轴草属 *Taeniatherum* Nevski、鹅观草属 *Roegneria* Koch、赖草属 *Leymus* L. 和偃麦草属 *Elytrigia* Desv. (Runemark & Heneen, 1968; Hitchcock, 1951; Gould, 1947)。该属也被处理为只含有几个物种的小属(Nevski, 1934)。近年来,从细胞学、细胞遗传学、形态解剖学、数量分类和同工酶等方面对广义的 *Elymus* 进行了大量的研究(Baum *et al.*, 1995; Lu, 1993; Jaask, 1992; 陈守良, 徐克学, 1989; 刘玉红, 1985; Dewey, 1984)。目前分歧较大的分类处理是将鹅观草属与披碱草属合并为一属,即 *Elymus* (Löve, 1984; Dewey, 1984),还是将其划分为独立的属(蔡联炳, 1997; Baum *et al.*, 1995; 郭本兆, 1987)。

自 90 年代以来,随机扩增多态性 DNA(RAPD)分析已被证明为植物遗传多样性研究和系统学研究的一个有用而简单的工具(Wei *et al.*, 1997; Demeke & Adams, 1994)。它有成本低、分析速度快、仅需极微量的 DNA 即能获得丰富的多态性特征等优点(Caetano-Anolles *et al.*, 1991),已被广泛应用于种间、品种间、亚种或居群或不同基因组间的分类、遗传和进化关系等方面的研究(施苏华等, 1998; 孔令让等, 1998; 冯丽春等, 1997; Wei & Wang, 1997)。本文选用 8 种国产 *Elymus* 物种(含 StH、StYH 染色体组),以北欧 *E. caninus* 和北美 *E. lanceolatus* 为对照,进行 RAPD 分析,旨在为解决它们的分类问题和种间关系提供新的分子证据,并为披碱草属植物种质资源的保护和利用提供科学依据。

1 材料和方法

本实验在北京中国农业科学院作物品种资源研究所农业部作物种质与生物技术开放实验室完成。

10 种披碱草属植物的来源及供试植株数见表 1,凭证标本藏于四川农业大学小麦研究所种质资源库。

取同一物种 9 至 16 株的幼嫩叶片,混合得 3 g 用于 DNA 提取。总 DNA 的提取参照 Sharp *et al.* (1988)的方法。PCR 扩增反应在 20 μ l 反应体系中进行:1 \times PCR buffer (10 mmol/L Tris.Cl, pH 8.3, 1.5 mmol/L MgCl₂, 50 mmol/L KCl, 0.001% gelatin), dNTP

表 1 材料来源
Table 1 The origin of materials

序号 No.	物种名称 Species	染色体数目 Chromosome No.	染色体组组成 Genomes	采集地 Origin	凭证 Voucher	样品植株数 No. of plants
1	<i>E. sibiricus</i> L.	28	StStHH	甘肃合作 Hezuo, Gansu	Y2906	16
2	<i>E. nutans</i> Griseb.	42	StStYYHH	四川若尔盖 Roergi, Sichuan	Y9521	10
3	<i>E. dahuricus</i> Turcz.	42	StStYYHH	新疆塔什库尔干 Tashiguergan, Xinjiang	Y9522	9
4	<i>E. tangutorum</i> (Nevski) Hand.-Mazz.	42	StStHHHH	甘肃临夏 Linxia, Gansu	Y9527	13
5	<i>E. submuticus</i> (Keng) Keng f.	42	-	青海兴海 Xinghai, Qinghai	Y2887	12
6	<i>E. cylindricus</i> (Franch) Honda	42	-	新疆阿克陶 Aketao, Xinjiang	Y9526	10
7	<i>E. brachyaristatus</i> A Löve	42	-	四川红原 Hongyuan, Sichuan	Y2709	15
8	<i>E. excelsus</i> Turcz.	42	-	四川红原 Hongyuan, Sichuan	82-58	11
9	<i>E. caninus</i> (L.) L.	28	StStHH	Molle, Sweden	Y2730	9
10	<i>E. lanceolatus</i> (Scribner et Smith) Gould	28	StStHH	Pulman, U. S. A.	D-3542	16

各 100 $\mu\text{mol/L}$, 引物 0.2 $\mu\text{mol/L}$, 模板 DNA 20 ng, Taq DNA 聚合酶 1 个单位。对照样品加除总 DNA 以外的以上成分, 用双蒸水代替总 DNA。上覆 25 μl 液体石蜡油。在 PTC-200 PCR 仪中按下列程序进行扩增反应: 94.0 $^{\circ}\text{C}$ 初始变性 1 min 30 s, PCR 循环 50 次, 每循环 94.0 $^{\circ}\text{C}$ 变性 45 s, 36.0 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s, 72.0 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min。最后 1 个循环结束后在 72.0 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。以 1 \times TAE 为缓冲液, 将扩增产物在含有 0.5 g/L EB (溴化乙锭) 的 1.5% 琼脂糖凝胶中电泳, 紫外检测仪上观察照相。

PCR 扩增反应重复一次, 选取可重复的 DNA 带 (包括强带和弱带) 记录。每个样品的扩增带按“有”或“无”记录。“有”赋值为 1, “无”赋值为 0。根据 Nei 和 Li (1979) 的方法计算样品间的简单遗传相似系数 I , $I = 2 N_{ij} / (N_i + N_j)$, 其中, N_i , N_j 为两样品的总扩增带数, N_{ij} 为两样品共有的扩增带数。利用 NTSYS 程序 (Rohlf, 1993), 按非加权算术平均数聚类方法 (UPGMA) 计算种间遗传距离, 建立系统聚类分析树状图。

2 结果与分析

2.1 随机扩增能力和多态性分析

利用 34 个随机引物进行多态性产物筛选, 7 个引物 (占 20.58%) 产生不清晰和无法检测的产物; 2 个引物 (占 5.90%) 产生单一的带; 25 个 (73.53%) 能产生多态性带, 仅选能得到清晰扩增带和对照无假带的 16 个引物进行正式的扩增, 共产生 136 条可区分的 DNA 带, 结果见表 2。最少的在引物 OPA-01, 只获得 2 条带, 最多的在引物 OPR-16, 得

到 17 条带, 平均每引物产生约 9 条带, 其中引物 OPD-20 和 OPR-16 的扩增结果见图 1。

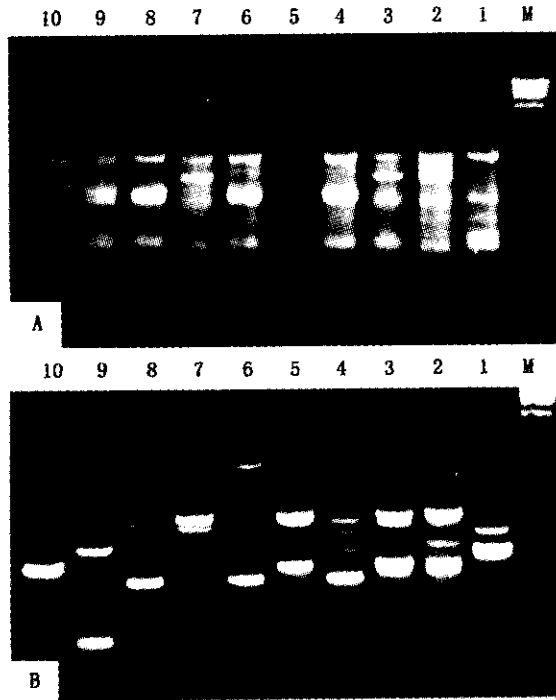


图 1 由 OPD-20(A)和 OPR-16(B)扩增产生的 RAPD 带型(材料编号见表 1, M 为分子量标记)
Fig. 1 RAPD profiles generated by primers OPD-20(A) and OPR-16(B) The materials order was in the same order listed in Table 1. Lambda DNA digested with Hind III was used as molecular weight marker (M)

136 条带中, 有 25 条(占 18.38%)存在于所有分析的 10 个 *Elymus* 物种中, 111 条(占 81.62%)为多态性带。这说明了这些物种遗传背景的复杂性, 它们存在着丰富的遗传多样性。

2.2 种间遗传关系

Nei 遗传相似系数的计算结果见表 3, 变幅为 0.567~0.859。根据这些相似系数用 UPGMA 法聚类分析, 得到一树状分支图(图 2)。四倍体的 *E. sibiricus*, *E. caninus* 和 *E. lanceolatus* 聚为一支, 而其它供试的 7 个六倍体种聚为另一支。3 个四倍体物种中, *Elymus* 的模式种 *E. sibiricus* 与 *E. caninus* 的遗传关系较它们与 *E. lanceolatus* 的关系更近。在形态和地理分布上它们有较大的差异, *E. sibiricus* 的每穗轴节着生两个小穗; 而 *E. caninus* 和 *E. lanceolatus* 的每穗轴节着生一个小穗。*E. sibiricus* 和 *E. caninus* 无根茎, 自花传粉, 分布于亚洲和欧洲; 而 *E. lanceolatus* 有根状茎, 异花传粉, 分布于北美(Jensen & Chen, 1992)。从染色体组组成来看, 它们同具 StH 染色体组。根据 Dewey (1984)和 Löve(1984)的染色体组分类原则, *Elymus* 具有 StH 染色体组, 这 3 个物种应属于 *Elymus*。然而, 《中国植物志》第 9 卷 3 分册(郭本兆, 1987)把 *E. caninus* 处理成 *Roegneria canina*。RAPD 的结果支持把犬草 *Roegneria canina* 归属于 *Elymus*。

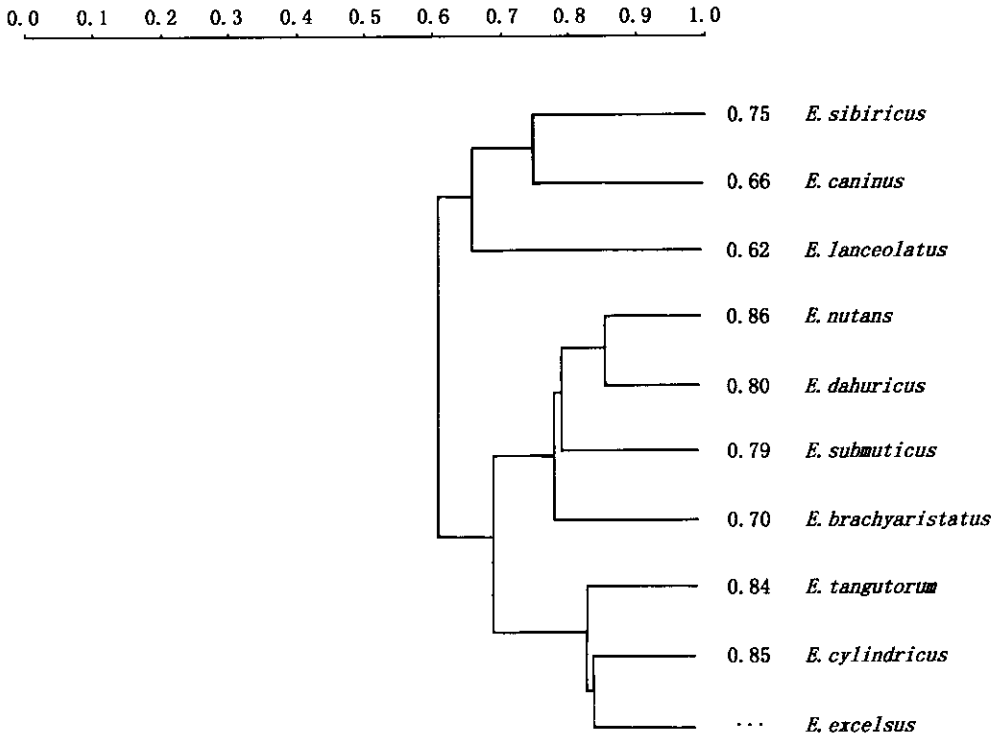


图 2 用 Nei 相似性系数聚类分析产生的树状分支图
 Fig. 2 Dendrogram generated by using Nei's coefficients of similarity (UPGMA)

在六倍体物种中,又分为两个组,*E. tangutorum*, *E. cylindricus* 和 *E. excelsus* 为一组,表现出较近的亲缘关系。但 *E. excelsus* 与 *E. cylindricus* 的关系较它们与 *E. tangutorum* 的关系更近。而形态上它们之间的差异主要表现在植株大小、叶宽、花序长短、外稃芒长及是否遍生短毛,*E. excelsus* 与 *E. tangutorum* 形态更为接近。另一组为 *E. nutans*, *E. dahuricus*, *E. brachyaristatus* 和 *E. submuticus*。*E. nutans* 和 *E. dahuricus* 聚在一起,其相似系数最大,为 0.859,亲缘关系非常密切。Lu(1993)和 Dewey (1984)报道它们具有 StYH 染色体组,*E. nutans* 与 *E. sibiricus* 关系较远,是否把 *E. nutans*, *E. dahuricus* 同也具有 StYH 染色体组的 *Roegneria kamoji*、*R. tsukushiensis* 等物种放在一起作为一个类群来处理,尚需进一步研究。*E. brachyaristatus* 和 *E. submuticus* 的遗传相似系数为 0.781,亲缘关系较近,但存在着一定程度的核苷酸序列的差异。形态上这 2 个种很难区分,差异较小,仅靠外稃的芒长或有无以及颖先端是否具有小尖头来区分。核型上,*E. brachyaristatus* 比 *E. submuticus* 多一对随体染色体(蔡联炳,冯海生,1997)。*E. brachyaristatus*, *E. submuticus* 与 *E. nutans*, *E. dahuricus* 表现出较近的亲缘关系。

表 2 引物及其序列和扩增结果
Table 2 List of primers, their sequences, and amplification results

引物 Primers	序列 (5'-3') Sequence (5'-3')	总扩增带数 Total bands	多态性扩增带数 Scorable polymorphic bands
OPA-01	5' CAGGCCCTTC 3'	2	1
OPA-02	5' TGCCGAGCTG 3'	5	2
OPA-04	5' AATCGGGCTG 3'	11	10
OPA-05	5' AGGGGTCTTG 3'	11	9
OPB-07	5' GGTGACGCAG 3'	6	4
OPB-08	5' GTCCACACGG 3'	11	11
OPB-10	5' CTGCTGGGAC 3'	11	10
OPB-11	5' GTAGACCCGT 3'	9	9
OPC-12	5' TGTCATCCCC 3'	7	7
OPC-13	5' AAGCCTCGTC 3'	8	8
OPD-17	5' TTCCACACGG 3'	6	5
OPD-19	5' CTGGGGACTT 3'	12	8
OPD-20	5' ACCCGGTCAC 3'	8	5
OPR-13	5' GGAGGACAAG 3'	7	2
OPR-16	5' CTCTGCGCGT 3'	17	17
OPX-02	5' TTCCGCCACC 3'	5	3
总计 Total	16	136	111

表 3 10 个 *Elymus* 物种间的 Nei 相似性系数
Table 3 Similarity among 10 taxa according to the Nei coefficients of similarity

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	1.000									
2	0.690	1.000								
3	0.576	0.859	1.000							
4	0.645	0.681	0.717	1.000						
5	0.586	0.760	0.831	0.705	1.000					
6	0.613	0.676	0.686	0.846	0.701	1.000				
7	0.625	0.797	0.791	0.727	0.781	0.768	1.000			
8	0.667	0.676	0.671	0.839	0.686	0.853	0.708	1.000		
9	0.752	0.603	0.585	0.641	0.567	0.609	0.634	0.637	1.000	
10	0.658	0.623	0.590	0.649	0.602	0.601	0.613	0.591	0.667	1.000

注: 1~10 序号代表的物种顺序同表 1。

Note: the number of 1~10 refers to the species listed in Table 1.

3 讨论

传统上划分 *Elymus* 和它的近缘属 *Roegneria* 的形态特征依据是: *Elymus* 的每穗轴节着生 2 至多个小穗, 而 *Roegneria* 每穗轴节着生 1 个小穗。我们野外考察和对各植物标本馆标本观察中, 发现它们变异幅度较大。在肥沃条件下偶见 *Roegneria* 一些物种的每穗轴节着生 2 至多个小穗的现象, 而 *Elymus* 在土壤瘠薄和干旱的条件下会出现每穗轴节小穗单生的情况, 这给属内种一级的分类和鉴定带来不少困难。近年来, Dewey 和 Löve 等以染色体组作为划分小麦族属的标准, *Elymus* 的模式种 *E. sibiricus* 具 StH 染色体组, 而 *Roegneria* 的模式种 *R. caucasica* 具 StY 染色体组, 为澄清小麦族一些属的界

限、属种系统起源和演化提供了可靠的资料。但在具体处理过程中,对属的界限仍存在着分歧。Baum 等(1995)通过数理形态分析, *Roegneria* 的内稃短于外稃,等长时内稃顶端钝圆或平截;而 *Elymus* 的内、外稃等长,内稃顶端急尖。蔡联炳(1997)则认为 *Roegneria* 具花序狭长,穗轴节间延伸,单生小穗纤瘦,颖、稃无脊,小花不逐节脱落等特征。因而从形态学和细胞学特征上确立了 *Roegneria* 和 *Elymus* 的界限。以 DNA 分析技术为基础的植物分子系统学的发展,推动着小麦族系统学的深入研究。在大量研究工作的基础上,将更客观地反映小麦族属间和种间系统关系。因此,传统分类学必须接受现代实验分类学(细胞学、生化标记、分子细胞遗传学和分子系统学)的验证。

本研究利用 16 个引物共产生 136 条 RAPD 扩增带,虽然所用的引物不多,但能从 136 个位点对供试的 10 个物种进行了检测,这种效率是形态性状、细胞学特征和 RFLP 等方法无法比拟的。结果表明 *Elymus* 中四倍体和六倍体物种各自聚为一支。*E. sibiricus* 与 *E. caninus* 的亲缘关系较近,支持细胞学将 *R. canina* 放入 *Elymus* 的结果(Dewey, 1984; Löve, 1984)。细胞遗传学研究表明, *E. nutans* 和 *E. dahuricus* 具 StYH 染色体组(Lu, 1993),本研究表明它们亲缘关系很近。它们与 *Roegneria* 中的 *R. kamoji*、*R. tsukushiensis* 和 *R. humidora* 的 StYH 染色体组是否同源,如何处理这些物种,还需进一步研究。在分析的 *Elymus* 物种间有较大的 RAPD 遗传变异,存在丰富的遗传多样性。形态差异较小,难以区分,而地理分布一致的 *E. brachy-aristatus* 和 *E. submuticus* 亲缘关系较近,但仍存在一定程度的核苷酸序列的差异,是独立的两个生物学物种,这和核型分析的结果一致(蔡联炳,冯海生,1997)。本研究的结果基本上同形态学、细胞学和同工酶等分析结果相吻合。因此,RAPD 分析将是小麦族系统学研究的有效补充手段。

由于 RAPD 所用的随机引物是 10 bp 的寡聚核苷酸,同时,扩增反应还会受到模板 DNA 用量、dNTP、MgCl₂ 及 Taq 酶浓度等诸多因素影响,因而 RAPD 技术较其它分子标记(如 RFLP)稳定性差,限制了它更广泛的应用。本实验注重扩增所用的反应条件和体系的相对固定一致,其扩增结果的稳定性较好。类似的报道很多(孔令让等,1998; Wei et al., 1997; Rafalski et al., 1995)。总之,在传统的分类基础上,利用现代 DNA 分析技术,将会为 *Elymus* 植物的系统学研究提供更可靠的依据。

参 考 文 献

- Baum B R, Yang J-L, Yen C, 1995. Taxonomic separation of *Kengyilia* (Poaceae: Triticeae) in relation to nearest related *Roegneria*, *Elymus*, and *Agropyron*, based on some morphological characters. *Pl Syst Evol*, 194: 123~132
- Caetano-Anolles G, Bassam B J, Gresshoff P M, 1991. DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. *Bio Technology*, 9: 553~556
- CAI L-B (蔡联炳), 1997. A taxonomical study on the genus *Roegneria* C. Koch from China. *Acta Phytotax Sin* (植物分类学报), 35 (2): 147~177
- CAI L-B (蔡联炳), FENG H-S (冯海生), 1997. Study on karyotypes of 3 species of *Elymus*. *Acta Bot Borreal-Occident Sin* (西北植物学报), 17 (2): 238~241
- CHEN S-L (陈守良), XU K-X (徐克学), 1989. Discussion the validity of *Roegneria* C. Koch (Gramineae) as genus by numerical taxonomic method. *Acta Phytotax Sin* (植物分类学报), 27 (3): 190~196
- Demeke T, Adams R P, 1994. The use of PCR-RAPD analysis in plant taxonomy and evolution. *PCR Tech-*

- nology: Current Innovation CRC Press. 179~191
- Dewey D R, 1984. The genome system of classification as a guide to intergeneric hybridization with the perennial Triticeae. In: Gustafson J P ed. Gene Manipulation in Plant Improvement. New York: Plenum. 209~280
- FENG L-C (冯丽春), YANG G-W (杨光伟), YU M-D (余茂德), ZHANG X-Y (张孝勇), XIANG Z-H (向仲怀), 1997. Study of relationships among species in *Morus* L. using random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Scientia Agricultura Sinica* (中国农业科学), 13 (1): 52~56
- Gould F W, 1947. Nomenclatural changes on *Elymus* with a key to the Californian species. *Madrono*, 9: 120~128
- Hitchcock A S, 1951. Manual of the Grasses of the United States. 2nd edition revised by Chase A. Washington D C: USDA Misc Pub 200 US Gov't Printing Office
- Jaask V, 1992. Isoenzyme variation in the grass genus *Elymus* (Poaceae). *Hereditas*, 117: 11~22
- Jensen K B, Chen S L, 1992. An overview: Systematic relationships of *Elymus* and *Roegneria* (Poaceae). *Hereditas*, 116: 127~132
- Jiang J M, Friebe B, Gill B S, 1994. Recent advances in alien gene transfer in wheat. *Euphytica*, 73: 199~212
- KONG L-R (孔令让), DONG Y-C (董玉琛), JIA J-Z (贾继增), 1998. Random amplified polymorphism of DNA analysis in *Aegilops tauschii*. *Acta Bot Sin* (植物学报), 40 (3): 223~227
- KUO P-C (郭本兆), 1987. *Fl Reip Pop Sin* (中国植物志). Beijing: Science Press. 9(3): 7~104
- LIU Y-H (刘玉红), 1985. Studies on the karyotypes of 11 species of *Elymus* from China. *Jour of Wuhan Bot Res* (武汉植物学研究), 3 (4): 323~330
- Löve A, 1984. Conspectus of the Triticeae. *Feddes Repert*, 95: 425~521
- Lu B R, 1993. Biosystematic investigations of Asiatic wheat-grasses *Elymus* L. (Triticeae: Poaceae). Ph D Dissertation, The Sweden Univ Agric Sci, Svalov, Sweden
- Nei M, Li W H, 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 76: 5269~5273
- Nevski S A, 1934. Tribe XIV Hordeae Bentham. In: Komarov V L, Roshevits R Y, Shishkin B K eds. *Flora URSS*. Leningrad. 2: 590~728
- Rafalski J A, Morgante M, Powell W, Vogel J M, Tingey S V, 1995. Generating and using DNA markers in Plant. In: Birren B, Lai E eds. *Analysis of Non-mammalian Genomes—A Practical Guide*. Boca Raton: Academic Press. 75~134
- Rohlf F J, 1993. NTSYS-pc. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. Version 1.80. Exeter Software, Setauket, New York
- Runemark H, Heneen W K, 1968. *Elymus* and *Agropyron*, a problem of generic delimitation. *Bot Not*, 21: 51~79
- Sharma H C, Gill B S, 1983. Current status of wide hybridization in wheat. *Euphytica*, 32: 17~31
- Sharp P J, Kreis M, Shewry P R, Gale M D, 1988. Location of β -amylase sequences in wheat and its relatives. *Theor Appl Genet*, 75: 286~290
- SHI S-H (施苏华), TANG S-Q (唐绍清), CHEN Y-Q (陈月琴), QU L-H (屈良鹤), ZANG H-T (张宏达), 1998. Phylogenetic relationships among eleven yellow-flowered *Camellia* species based on random amplified polymorphic DNA. *Acta Phytotax Sin* (植物分类学报), 36 (4): 317~332
- Wei J Z, Campbell W F, Wang R R-C, 1997. Genetic variability in Russian wild-rye (*Psathyrostachys juncea*) assessed by RAPD. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 44: 117~125
- Wei J Z, Wang R R-C, 1997. Genome- and species-specific markers and genome relationships of diploid perennial species in Triticeae based on RAPD analyses. *Genome*, 38: 1230~1236