

扁穗冰草 rDNA - ITS 序列测定及分析*

周学丽¹ 杨路存² 李桂全³ 童世贤¹

(1. 青海省铁卜加草原改良试验站, 共和 813000; 2. 中国科学院西北高原生物研究所, 西宁 810001;
3. 青海久实虫草生物科技有限公司, 西宁 810000)

提 要: 提取青藏高原环湖地区扁穗冰草 35 个样品的 DNA, 采用 PCR 产物直接测序的方法, 对扁穗冰草 rDNA 的 ITS 区(包括 ITS-4 和 ITS-5)进行序列测定。结果表明: 扁穗冰草 ITS 序列总长度为 649bp, 其中有 17 个变异位点, 扁穗冰草物种水平的 Hd、Pi 分别为 0.916 和 0.00320, 表明扁穗冰草物种水平上的遗传多样性相对较高。AMOVA 分析表明, 扁穗冰草大部分的遗传变异发生在居群内(77.62%), 在系统发育树中, 虽然 4 个地区样品聚为 3 支, 但是每一支中不同地区的个体混杂在一起。

关键词: 扁穗冰草; ITS 序列; rDNA

中图分类号: Q75

文献标识码: A

扁穗冰草(*Agropyron cristatum* (L.) Gaertn) 也称冰草、野麦子、羽状小麦草, 须根系, 根系发达, 茎秆直立, 丛生。在我国东北、西北及内蒙古自治区等地有野生种分布, 并已栽培利用, 在国外分布于欧洲、西伯利亚、中亚地区和蒙古, 对土壤的适应性较广, 是高寒、干旱、半干旱地区最耐旱的多年生优良牧草之一, 在年降水量 230-380mm 的地区生长良好^[1]。扁穗冰草耐寒性强, 可在 -40℃ 低温下安全越冬, 可作为干旱地区水土保持和绿化植物, 生态价值较高^[2-3]。

青藏高原的环青海湖地区分布着大面积的扁穗冰草, 关于扁穗冰草的研究在基因的克隆及表达^[4-8] 方面较多, 株系选择^[9] 方面也有研究, 而对于 ITS 方面的报道较少。高等植物中的核 rDNA 基因是高度重复的串联序列单位, 18S、5.8S 和 26S rDNA 联结在一起, 作为一个转录单位。18S-26S 核 rDNA 之间的内转录间隔区 ITS(internal transcribed spacer) 被 5.8S 分为 ITS1 和 ITS2 两部分, 由于所受的选择压力较小, DNA 碱基替换速率较快, 加上较大的拷贝数、适中的长度和快速的同步进化等特点, 是研究许多植物类群系统演化和发育的重要分子标记, 特别适合研究被子植物属下类群的系统演化关系^[10-13]。ITS 区序列进化速率较快, 且与植物生活型呈相关性, 近年来已被广泛用于植物种内变异和种间、近缘属间的分子系统学研究^[14-18]。文中基于 rDNA-ITS 序列对采集于环青海湖地区的 4 个扁穗冰草居群的遗传关系进行分析, 探讨环湖地区扁穗冰草资源的遗传结构和亲缘关系, 对扁穗冰草的资源保护及可持续利用具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为 4 个居群的 35 个扁穗冰草样品, 于 2013 年采自青藏高原环湖地区的海西、海北和海南地区。采样时每个种群选取代表性成年植株 8-15 株, 个体间距离 5-10m。野外采集新鲜、完整的植物幼嫩叶片, 置于盛有硅胶的塑胶袋中干燥保存。地理位置、经纬度及样本大小(表 1)。

表 1 扁穗冰草居群采样表

Table 1 Material sources of *A. cristatum*

采样地	居群	海拔(m)	经度(E)	纬度(N)	样本数
海西	乌兰	3560	98°27'	36°38'	13
海北	刚察	3260	100°13'	37°17'	8
	海晏	3010	100°21'	36°40'	6
海南	同德	3276	100°09'	35°09'	8

* 收稿日期: 2015-10-25。

基金项目: 青海省科学技术厅科技促进新农村计划项目(2013-N-513) 资助。

作者简介: 周学丽(1979-) 女, 硕士, 高级畜牧(草原)师, 主要从事牧草栽培育种工作。E-mail: zhouxuelia@163.com

1.2 方法

1.2.1 总 DNA 的提取

依据改良的 CTAB 法^[19]从硅胶干燥的叶片中提取总 DNA。

1.2.2 PCR 扩增与 DNA 测序

采用通用引物"ITS4"(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')和"ITS5"(5'-GGAAGTAAAAGTCGTA-ACAAGG-3')扩增 nrDNA ITS 序列。扩增反应在 Eppendorf Mastercycler Gradient PCR 仪上进行,反应体系为 25μL,内含 25mmol/L MgCl₂ 2μL、2.5mmol/L dNTPs 2μL、10 μmol/L 引物各 0.6μL、25 ng 模板、10 × buffer 2.5μL 和 1U Taq DNA 聚合酶(TaKaRa)。nrDNA ITS 扩增程序为:95℃ 预变性 3min,95℃ 变性 30s,51℃ 退火 30s,72℃ 延伸 30s,35 个循环,最后延伸 10min^[20]。将 PCR 扩增产物经电泳检测纯化后由上海美吉生物医药科技有限公司测序。

1.2.3 数据分析

用 Clustal X 软件进行序列对位排列,并加以手工适当校正。在所有序列校对正确后,用 DnaSP4.0 程序统计单倍型,并计算居群间基因流值(Nm)。居群内和居群间的基因流用每代雌性个体迁移数(Nm)估计,该值可由公式 $F_{ST} = 1 / (1 + 2 Nm)$ 求出,其中 N 是有效居群大小雌性数目,m 是雌性迁移率。选用 Arlequin 软件进行分子方差分析(AMOVA),计算居群内、居群间的变异方差分布。用 MEGA4.1 软件进行核苷酸组成分析,采用 Kimura-2-Parameter distance 双参数模型(Kimura,1980)计算遗传距离,并用邻接(Neighbor-Joining,NJ)法构建系统树,通过 10000 次重复获得的自展检验(bootstrap)数值标记在分支上。

2 结果与分析

2.1 nrDNA ITS 目的片段的扩增

PCR 扩增体系对不同居群扁穗冰草 nrDNAITS 片段进行扩增,得到单一片段条带,电泳显示条带非常清晰,没有拖带和非特异条带(图 1)。

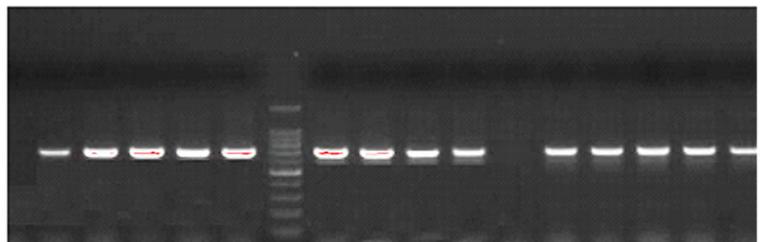


图 1 nrDNA ITS 区域 PCR 扩增电泳结果

Figure 1 The results of PCR amplification on ITS region

2.2 ITS 序列长度及变异

经对位排列,获得青藏高原环湖地区

扁穗冰草 4 个居群的 ITS 序列,碱基序列长度均为 649bp。合并相同的序列共得到 18 个单倍型(H1-H18),

单倍型序列注册于 Genebank 数据库中(正在提交)。通过统计这一片段所有个体的序列发现,碱基 G 和 C 在整个序列中所占比例为 61.92%,略高于 A+T 含量。

18 种单倍型对位排列后得到的 649bp 中共有 17 处变异位点,其中简约信息位点 6 处。

由表 2 可得,在 17 处变异位点中都是由碱基置换造成的(其中 5 处为碱基转换:3 处 T↔A、2 处 C→G,12 处为碱基颠换:1 处 C→T、5 处 G→A、2 处 A→G、2 处 T→G、2 处 C→A)。

表 2 扁穗冰草 ITS 片段 18 种单倍型进行序列比对的变异位点
Table 2 Variable sites of the aligned sequences among 18 haplotypes of the ITS fragment of *A. cristatum*

Haplotype	Variable sites																
H1	T	A	G	G	T	C	T	C	T	C	A	G	G	G	T	G	C
H2	G	.	.	A
H3	G
H4	G	.	.	.	T
H5	.	.	A	.	.	G
H6	G	A
H7	G	A	.	A
H8	A	G
H9	G	.	.	.	A	G
H10	.	G	.	.	A	G
H11	A	G
H12	.	-	.	.	A	G	C	.	.	.
H13	A	G	A	.
H14	G	G
H15	A	G	G
H16	A	G	G	.	A
H17	.	.	.	A	A	G	.	A	.	.	G	.	A
H18	A	G	A

2.3 遗传多样性和遗传结构

种群遗传多样性参数统计表明(表 3):在物种水平上,扁穗冰草单倍型多样性 Hd = 0.916,核苷酸多

样性 $P_i = 0.00320$; 在居群水平上,单倍型多样性(H_d)的变化范围为 $0.6000 - 0.9231$ 核苷酸多样性(P_i)变化范围为 $0.001541 - 0.003674$; 其中乌兰居群的遗传多样性最高($H_d = 0.9231, P_i = 0.003674$), 而海晏居群的遗传多样性最低($H_d = 0.6000, P_i = 0.001541$)。

表3 扁穗冰草居群的单倍型、单倍型多样性和核苷酸多样性

Table 3 Geographic origins, sample sizes, rDNA haplotypes diversity (H_d) and nucleotide diversity averaged across loci (P_i) of the 18 *A. cristatum* populations

居群编号	居群	单倍型	单倍型多样性	核苷酸多样性
			H_d	P_i
1	乌兰	H1、H2、H3、H11、H15、H16、H17、H18	0.9231	0.003674
2	刚察	H4、H5、H11、H14	0.7500	0.002311
3	海晏	H3、H6、H7	0.6000	0.001541
4	同德	H8、H9、H10、H11、H12、H13	0.8929	0.001926

基于扁穗冰草 ITS 序列变异的 AMOVA 分析表明,扁穗冰草大部分的遗传变异发生在居群内(77.62%) (表4), 只有 22.38% 的遗传变异发生在居群间, 居群内的遗传分化大于居群间的分化, 说明群体内变异是扁穗冰草的主要变异来源。由 F_{ST} 估算的居群间的基因流(N_m)为 1.734, 表明扁穗冰草各居群间的基因流较高。

表4 扁穗冰草群体遗传变异的分子方差分析(AMOVA)

Table 4 AMOVA analysis of genetic variation in populations of *A. cristatum*

遗传变异来源	方差和	遗传变异组分	遗传变异的组分	显著性检验 P
种群间	8.824	0.24588	22.38	<0.05
种群内	26.433	0.85267	77.62	<0.05

2.4 群体间的系统发育关系

基于 ITS 序列环湖 4 个地区的扁穗冰草样品的系统发育树(图 2)。在系统发育树中, 虽然 4 个地区样品聚为 3 支, 但是每一支中不同地区的个体混杂在一起, 说明彼此之间存在较大的基因流。

3 讨论

本试验将 ITS 标记技术应用于扁穗冰草上, 试验结果能较好地反应扁穗冰草的亲缘关系, 由于 ITS 标记技术直接用于测序上, 其试验结果比起其他分子标记手段就显得更为可信。

3.1 遗传多样性

本实验通过对扁穗冰草 ITS 分析得到其物种水平的 H_d 、 P_i 分别为 0.916 和 0.00320, 表明扁穗冰草物种水平上的遗传多样性相对较高。遗传变异水平受多方面因素影响, 诸如生活型、繁殖方式、基因流、遗传漂变及自然选择和人为干扰等。扁穗冰草的遗传多样性处于较高的水平, 可能与本身的生长特性有关。扁穗冰草是多年生草本, 其分布范围相对较广, 属异花授粉植物, 有利于维持较高的遗传多样性水平。此外, 扁穗冰草高的遗传多样性可能与其进化历史有关。

3.2 遗传结构

群体遗传学认为 F_{ST} 值可以表示群体间的遗传分化程度, 一般 F_{ST} 值在 0.00 - 0.05 之间表示分化较弱, 在 0.25 以上表示遗传分化极大。本研究运用的 ITS 序列得出 $F_{ST} = 0.22$, 表明扁穗冰草间遗传分化较小, AMOVA 分析也表明, 扁穗冰草居群间

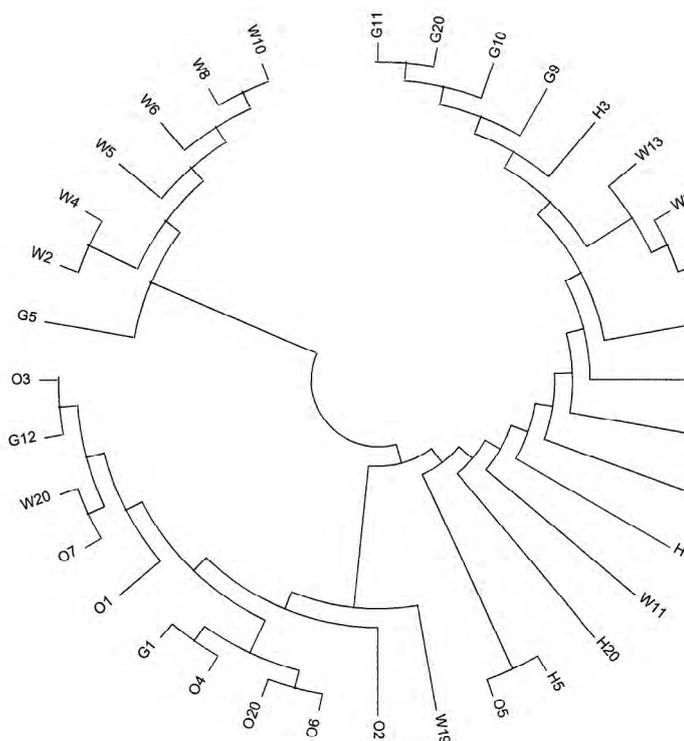


图2 基于 ITS 序列分析得到的 NJ 树
Figure 2 NJ tree based on ITS sequences

的遗传分化较小,这与张红梅^[21-22]等的结论相一致,但与 Diaz 等^[23]用 RAPD 和微卫星方法研究 *E. fibrosus* 的遗传多样性时的发现却相反,说明群体内变异是扁穗冰草的主要变异来源。植物种群遗传结构一般解释为交配系统、种子传播方式、生活史、分布区大小等因素综合作用的结果。与 Nybom^[24]对 116 种植物种群遗传分化系数统计平均值的比较,扁穗冰草野生种群遗传分化系数(0.22)与异交植物的平均值($G_{ST} = 0.22$)一样,异交导致扁穗冰草的遗传分化较低。此外,居群间的基因流也较大($N_m = 1.734$),导致遗传变异主要出现在居群内。

AMOVA 分析表明,扁穗冰草大部分的遗传变异发生在居群间,但在系统发育分析时,18 个单倍型并没有按地理分布形成明显的族群,各地理单元中的单倍型相互混杂,没有明显的地理分化模式。这可能与扁穗冰草的进化历史有关,在青藏高原隆升和第四纪冰期前,扁穗冰草居群可能呈连续分布,基因流频繁,某些古老的单倍型(H1)在居群中广泛分布,居群间遗传差异较小,遗传变异主要存在于居群内个体之间。

4 结论

通过 rDNA 的 ITS 区测序的方法对来自青藏高原环湖地区扁穗冰草 35 个样品的遗传多样性进行分析,结果表明,扁穗冰草 ITS 序列总长度为 649bp,其中有 17 个变异位点,扁穗冰草物种水平的 Hd、Pi 分别为 0.916 和 0.00320,表明扁穗冰草物种水平上的遗传多样性相对较高。AMOVA 分析表明,扁穗冰草大部分的遗传变异发生在居群内(77.62%)。在系统发育树中,虽然 4 个地区样品聚为 3 支,但是每一支中不同地区的个体混杂在一起。

参考文献

- [1] 李勇. 扁穗冰草(*Agropyron cristatum* (L.) Gaertn) PLD 克隆及干旱胁迫下 PLD 基因表达和作用[D]. 内蒙古师范大学, 2006.
- [2] 宿俊吉, 柴守诚, 刘伟华, 等. 普通小麦 SSR 和 EST-SSR 引物对冰草通用性的比较分析[J]. 西北植物学报, 2007, 27(7): 1311-1316.
- [3] 徐春波, 米福贵, 王勇. 影响冰草成熟胚组织培养再生体系频率的因素[J]. 草业学报, 2009, 18(1): 80-85.
- [4] 史铁伟, 李勇, 韩冰, 康虹丽. 扁穗冰草 PLD 基因 cDNA 序列克隆及生物信息学分析[J]. 浙江大学学报(理学版), 2010, 37(6): 691-699.
- [5] 张楠. 扁穗冰草抗逆相关基因的克隆和表达特性分析[D]. 西北农林科技大学, 2011.
- [6] 张楠, 张林生, 邢媛, 刘兰, 李嘉宏. 扁穗冰草脱水素基因的克隆和表达特性分析[J]. 草地学报, 2012, 20(1): 139-145.
- [7] 张楠, 朱维宇, 苏君艺, 张林生. 扁穗冰草转录因子基因的克隆和表达特性的分析[J]. 草业科学, 2011, 28(9): 1618-1622.
- [8] 焦志军, 韩冰, 王树彦, 黄文华, 赵萌莉. 渗透胁迫下扁穗冰草生理变化与 PLD 基因的表达差异[J]. 内蒙古农业科技, 2014(4): 1-3.
- [9] 温超. 扁穗冰草种质材料研究与株系筛选[D]. 内蒙古农业大学, 2008.
- [10] Rogers S O, Bendich A J. Ribosomal DNA genes in plants: variability in copy number and in the intergenic spacer[J]. Plant Molecular Biology, 1987, 9: 509-520.
- [11] Baldwin B G, Sanderson M J, Porter J M, et al. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny[J]. Annals of the Missouri Botanical Garden, 1995, 82: 247-277.
- [12] Soltis D E, Soltis P S. Choosing an approach and an appropriate gene for phylogenetic analysis[A]. In: Soltis D E, Soltis P S, Doyle J J, eds. Molecular Systematics of Plants. II [M]. DNA Sequencing. Boston: Kluwer Academic Publication, 1998: 1-42.
- [13] 王建波, 张文驹, 陈家宽. 核 rDNA 的 ITS 序列在被子植物系统与进化研究中的应用[J]. 植物分类学报, 1999, 37(4): 407-416.
- [14] 张宏意, 石祥刚. 不同产地何首乌的 ITS 序列研究[J]. 中草药, 2007, 38(6): 911.
- [15] 余永邦, 秦民坚, 梁之桃, 等. 不同产区太子参的 rDNA ITS 区序列的比较[J]. 植物资源与环境学报, 2003, 12(4): 1.
- [16] 严寒静, 房志坚, 余世孝. 不同种源何首乌的 ITS 序列分析及其亲缘关系研究[J]. 西北植物学报, 2008, 28(5): 9-22.
- [17] 蒋玲艳, 郭志刚, 王翀, 等. 中国不同地区绞股蓝 ITS 序列分析[J]. 中草药, 2009, 40(7): 1123.
- [18] 闫坤, 赵楠, 李宏庆. 地黄属种间亲缘关系研究[J]. 西北植物学报, 2007, 27(6): 1112.
- [19] Doyle J, Doyle J. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf material[J]. Phytochemical Bulletin, 1987, 19(6): 11-15.
- [20] Guo S-S, Zhang G-R, Guo X-Z, et al. Genetic diversity and population structure of *Schizopygopsis younghusbandi* Regan in the Yarlung Tsangpo River inferred from mitochondrial DNA sequence analysis[J]. Biochemical Systematics and Ecology, 2014, 57: 141-151.
- [21] 张红梅, 赵萌莉, 李青丰, 等. 内蒙古地区大针茅群体遗传多样性 RAPD 研究[J]. 草地学报, 2003, 11(2): 170-177, 188.
- [22] 张红梅, 赵萌莉, 李青丰, 等. 放牧压力下大针茅群体遗传多样性的 RAPD 分析[J]. 干旱区资源与环境, 2005, 19(5): 185-189.
- [23] Diaz O B, Sun G L, Bjomsalomon B, et al. Levels and distribution of allozyme and RAPD variation in populations of *Elymus fibrosus* (Schrenk) Tzvel. (Poaceae) [J]. Genetic Resources and Crop Evolution, 2000, 47: 11-24.
- [24] Nybom H. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants[J]. Molecular Ecology, 2004, 13(5): 1143-1155.

Sequence determination and analysis of the ITS region of nuclear ribosomal DNA in *Agropyron cristatum* (L.) Gaertn

ZHOU Xueli¹ , YANG Lucun² , LI Guiquan³ , TONG Shixian¹

(1. Tiebujia Grassland Improvement Experiment Station ,Gonghe 813000 ,China;

2. Northwest Institute of Plateau Biology , Chinese Academy of Sciences , Xining 810008 , China;

3. Qinghai Jiushi Chongcao Biotech. Co. Ltd , Xingning 810000 ,China)

Abstract: DNAs of 35 samples of *Agropyron cristatum* (L.) Gaertn in the alpine region around Qinghai Lake area were extracted. The sequence of rDNA ITS region (including ITS -4 and ITS -5) were determined by the direct of PCR products. The results showed that the full length of *A. cristatum* (L.) Gaertn ITS was about 649bp , The numbers of variable sites was 17 respectively. Haplotype diversity (Hd) and nucleotide diversity (Pi) at the species level were 0.873 and 0.00407 , respectively , which indicated that *A. cristatum* had a high level of genetic diversity. Molecular variance analysis (AMOVA) indicated that high genetic differentiation (77.62%) existed within population. The phylogenetic tree based on NJ method suggested that although the populations were clustered into three groups , individuals from different region mixed together. This information provided an important molecular basis for the classification and determination of *A. cristatum* (L.) Gaertn genus.

Key words: *Agropyron cristatum* (L.) Gaertn; sequences of internal transcribed spacers; ribosomal DNA