



广西植物

Guihaia

ISSN 1000-3142, CN 45-1134/Q

《广西植物》网络首发论文

题目： 同域分布垂穗披碱草和达乌力披碱草遗传多样性和遗传结构分析
作者： 路兴旺， 刘博， 陶小燕， 窦全文
网络首发日期： 2020-01-10
引用格式： 路兴旺， 刘博， 陶小燕， 窦全文. 同域分布垂穗披碱草和达乌力披碱草遗传多样性和遗传结构分析. 广西植物.
<http://kns.cnki.net/kcms/detail/45.1134.q.20200109.1242.004.html>



网络首发：在编辑部工作流程中，稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定，且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式（包括网络呈现版式）排版后的稿件，可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定；学术研究成果具有创新性、科学性和先进性，符合编辑部对刊文的录用要求，不存在学术不端行为及其他侵权行为；稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准，正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性，录用定稿一经发布，不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容，只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认：纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊（光盘版）》电子杂志社有限公司签约，在《中国学术期刊（网络版）》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版，以单篇或整期出版形式，在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊（网络版）》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物（ISSN 2096-4188，CN 11-6037/Z），所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

和遗传结构分析同域分布垂穗披碱草和达乌力披碱草遗传多样性

路兴旺^{1,2}, 刘博^{1,2}, 陶小燕^{1,2}, 窦全文^{1,3}✉

(1. 中国科学院西北高原生物研究所, 中国科学院高原生物适应与进化重点实验室, 西宁, 810008; 2. 中国科学院大学, 北京, 100049; 3. 中国科学院西北高原生物研究所, 青海省作物分子育种重点实验室, 西宁, 810008)

✉通信作者 窦全文, 博士, 研究员, 主要从事植物遗传资源研究, (E-mail)douqw@nwipb.cas.cn

摘要 披碱草属 (*Elymus* L.) 是禾本科 (Poaceae) 小麦族 (Triticeae) 中的一个多年生属, 该属在青藏高原地区有广泛分布, 多数物种是草原和草甸的组成成分, 许多种类为品质优良的牧草。垂穗披碱草 (*E. nutans*) 和达乌力披碱草 (*E. dahuricus*) 同为禾本科小麦族披碱草属异源六倍体物种, 染色体组组成皆为 StYH。为探究垂穗披碱草遗传多样性形成的内在机制, 本研究利用微卫星 (SSR) 分子标记, 对采自青藏高原地区同域分布的垂穗披碱草和达乌力披碱草两个居群共 58 个个体进行遗传多样性和遗传结构分析, 结果表明: 8 对引物在垂穗披碱草和达乌力披碱草扩增条带分别为 163 条和 124 条, 多态性位点百分率 (PPB) 分别为 89.71% 和 76.07%, 多态性信息含量 (PIC) 分别介于 0.583~0.929 和 0.524~0.830 之间。垂穗披碱草遗传多样性 ($H_e=0.69$, $I=1.34$, $P_p=100\%$) 高于达乌力披碱草 ($H_e=0.53$, $I=0.80$, $P_p=93.75\%$), 同域分布的垂穗披碱草和达乌力披碱草居群, 垂穗披碱草呈现出更高的遗传多样性。AMOVA 分子变异显示两个物种居群内遗传变异分别 80.92% 和 63.62%, 而居群间遗传分化水平较低。遗传结构分析揭示两个物种间有基因流存在。综合分析结果认为该地区种间杂交基因渗透引起的种内遗传分化在这两个物种多样性形成中可能起着重要的作用。

关键词 垂穗披碱草; 达乌力披碱草; 遗传多样性; 遗传结构; SSR 标记

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201909011

Genetic diversity and genetic structure in populations of sympatric *E. nutans* and *E. dahuricus*

LU Xingwang^{1,2}, LIU Bo^{1,2}, TAO Xiaoyan^{1,2}, DOU Quanwen^{1,3}✉

(1. Key Laboratory of Adaptation and Evolution of Plateau Biota, Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810008, Qinghai, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 3. Key Laboratory of Crop Molecular Breeding of Qinghai Province, Xining 810008)

Abstract *Elymus* L. is a perennial genus in the Triticeae family of Poaceae, which is widely distributed in the Qinghai-Tibet Plateau. Most species are components of grasslands and meadows, and many species are good quality pasture. *E. nutans* and *E. dahuricus* are both belonging to Triticeae family (*Elymus* L.), which are heterologous hexaploidy, with StYH chromosome composition. In order to further explore the intrinsic mechanism of the genetic diversity of *E. nutans*, this study used SSR molecular markers to analyze the genetic diversity and genetic structure of 58 individuals from two codomain populations of *E. nutans* and *E. dahuricus* collected from the Qinghai-Tibet Plateau. The results showed that there were 163 and 124 amplified bands in 8 pairs of primers in *E. nutans* and *E. dahuricus*, respectively. The percentages of polymorphic loci (PPB) was 89.71% and 76.07%, respectively, and the polymorphism information content (PIC) was between 0.583-0.929 and 0.524-0.830, respectively. The genetic diversity of *E. nutans* ($H_e=0.69$, $I=1.34$, $P_p=100\%$) was higher than that of *E. dahuricus* ($H_e=0.53$, $I=0.80$, $P_p=93.75\%$). *E. nutans* and *E. dahuricus* showed higher genetic diversity. The AMOVA molecular variation showed that the genetic variation within the population of the two species was 80.92% and 63.62%, respectively, while the level of genetic differentiation among populations was low. Genetic structure analysis revealed the presence of gene flow

基金项目: 青海省重大科技项目 (2018-NK-A2)

作者简介: 路兴旺 (1990-), 男, 甘肃礼县人, 硕士研究生, 研究方向为牧草遗传多样性。(E-mail)2268013394@qq.com

Fund: Supported by the major science and technology program of Qinghai (2018-NK-A2)

网络首发时间: 2020-01-10 08:40:26 网络首发地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/45.1134.q.20200109.1242.004.html>

between the two species. It is concluded that intraspecific genetic differentiation caused by interspecific hybridization may play an important role in the diversity formation of these two species.

Key words *Elymus nutans*; *Elymus dahuricus*; genetic diversity; genetic structure; SSR

垂穗披碱草 (*Elymus nutans* Griseb.) 属禾本科 (Poaceae)、小麦族 (Triticeae)、披碱草属 (*Elymus* L.) 多年生物种, 在青藏高原地区分布范围很广, 从海拔 1000m 谷地至海拔 5000m 的高山均具有分布 (Lu, 1993)。垂穗披碱草呈现广泛的生态适应性和极强的抗旱、抗寒性 (Ren et al., 2010)。在高寒地区, 垂穗披碱草生长旺盛, 特别适合作为草场优质牧草, 同时其草种被人工驯化后, 广泛应用于青藏高原生态草地的修复治理以及人工草地的建制 (马玉寿等, 2006; 梁国玲等, 2011)。

达乌力披碱草 (*Elymus dahuricus* Turcz. Ex Griseb) 与垂穗披碱草同属披碱草属, 都为异源六倍体物种 ($2n=42$), 在染色体组成上与垂穗披碱草相同, 染色体组合为 StStHHYY。达乌力披碱草作为优良牧草, 广泛分布于中亚、俄罗斯、蒙古、中国、韩国、日本和印度北部 (Baum et al., 2011; 颜济和杨俊良, 2013)。相对于垂穗披碱草, 达乌力披碱草在青藏高原地区分布区域较小, 局部区域与垂穗披碱草重叠分布。利用 SSR 和 ISSR 标记研究表明, 我国境内达乌力披碱草遗传多样性较高, 并认为青海高原东部及周边地区为我国达乌力披碱草发生分化的地理分界区域, 且在该地区发现特殊的分化类型 (李永祥, 2005)。

青藏高原垂穗披碱草具有丰富的遗传变异特性, 无论在形态学 (张建波等, 2009; 德英等, 2011; 陈仕勇等, 2016)、细胞学 (Dou et al., 2009, 2011)、生化标记 (Miao et al., 2011)、分子标记 (Chen et al., 2009; Chen et al., 2013; Yan et al., 2009; 彭语洛等, 2018) 等方面, 垂穗披碱草均呈现出丰富的遗传变异特性。而达乌力披碱草仅在遗传多样性研究评价方面有少量报道 (李永祥等, 2005)。前人研究认为地理环境因素在垂穗披碱草遗传多样形成中起着重要作用 (严学兵等, 2007; Chen et al., 2009), 环境因素在长期自然选择过程中可以塑造不同生态型的多样性形成, 但是物种内部内在的遗传多样性形成及维持机制对物种多样性形成起着决定作用, 而关于这方面的研究鲜有报道。由于垂穗披碱草和达乌力披碱草染色体组成相似, 并且同域分布时两个物种所处外界环境相同, 因此本实验通过比较分析两个同域分布物种的遗传多样性及遗传结构, 旨在深入了解种间杂交基因渗透在青藏高原地区同域分布的垂穗披碱草和达乌力披碱草遗传多样性形成的内在机制中的作用。

1 材料与方法

1.1 供试材料

实验材料采自青藏高原青海湖地区同一区域, 材料来源和编号如表 1 所示。

表1 本实验所用材料信息
Table 1 Information of materials in this study

种名 Species name	群体 Population	样地 Sample plot	地理位置 Site	纬度 (N) 经度 (E) Latitude (N)/ Longitude (E)	海拔 Altitude (m)	样本数 Sample size
垂穗披碱草 <i>Elymus nutans</i>	nw19-	青海湖东	青海省 海南州	N36° 33'/E100° 43'	3155 m	19
	En-	青海湖西	青海省 海北州	N36° 58'/E100° 53'	3079 m	14
达乌力披碱草 <i>E. dahuricus</i>	Eda-	青海湖东	青海省 海南州	N36° 33'/E100° 43'	3155 m	11
	Ed-	青海湖西	青海省 海北州	N36° 58'/E100° 53'	3079 m	14

1.2 方法

1.2.1 基因组总 DNA 提取

取垂穗披碱草和达乌力披碱草各 20 粒种子，单粒置于培养皿中，待种子萌发长出幼根时，移栽到瓦盆中，待其长出 3~4 片叶子时，采用改良 CTAB 法 (Allen et al., 2006) 提取基因组总 DNA。提取的 DNA 浓度和质量用紫外分光光度计 (Nanodrop2000c, Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) 和 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.2 多态性引物筛选

选用 53 对老芒麦 SSR 引物 (Lei et al., 2014) 和 37 对 EST-SSR 引物 (Zhou et al., 2016)，以及对应的优化反应条件和体系，随机挑选 5 份垂穗披碱草和 5 份达乌力披碱草 DNA 进行 PCR 扩增。待扩增完成后，应用 8% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳检测，筛选出扩增条带清晰、杂带少、扩增结果稳定的引物，待用。

1.2.3 SSR 扩增和 PAGE 电泳

本实验扩增体系和反应程序如下：反应总体积 25 μL ，其中含 Takara 公司的 10 \times PCR Buffer 2.5 μL ，2.5 mmol/L 的 dNTP 2.5 μL ，上下游引物各 1 μL ，DNA 模板 (50 ng/ μL) 1 μL ，rTaq 酶 0.3 μL ，dd H₂O 补足 25 μL 。PCR 反应程序：94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min；94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s，50 $^{\circ}\text{C}$ /60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s，72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s，共 35 个循环；最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。PCR 产物采用 8% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳，300 V 电压下电泳 50 min，嗅化乙锭 (EB) 染色，并用 BIO-RAD 自动凝胶成像系统照相保存。

1.2.4 数据分析

SSR 为共显性分子标记，依据 PAGE 电泳图读取基因型数据，参照夏寒冰等 (2009) 提出的分子标记基因型数据转换为二元矩阵方法，将得到的“0、1”二元矩阵数据导入 NTSYS-pc 软件。在 NTSYS 软件中基于 Dice 遗传相似系数 (GS 值)，采用非加权平均法 (UPGMA) 作聚类分析；利用 POPGENE1.32 软件计算等位基因 (N_a)、有效等位基因 (N_e)、期望杂合度 (H_e)、观察杂合度 (H_o)、香农多样性指数 (I)、多态性位点百分率 (P_p) 和多态性信息含量指数 (PIC)；利用 ARLIQUIN 3.5 对群体进行分子方差分析 (AMOVA)，计算居群间和居群内分化系数，并作比较。

2 结果与分析

2.1 SSR 多态性引物筛选

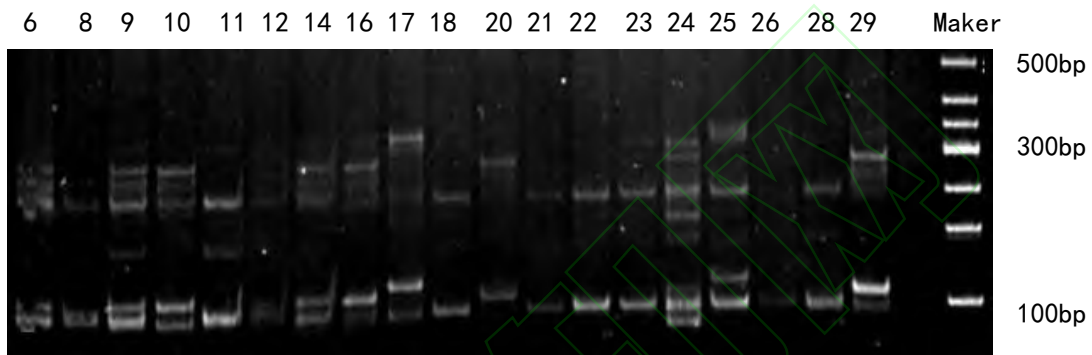
本实验选出 8 对扩增条带清晰、多态性良好的引物 (表 2)，对同域分布的垂穗披碱草和达乌力披碱草进行 SSR 电泳分析。

表2 SSR筛选多态性引物信息
Table 2 The polymorphic primers by SSR screen

序号 No.	引物名称 Primer Name	正向/反向 Forward/ Reverse	引物序列(5'-3') Primer Sequences (5'-3')	退火温度($^{\circ}\text{C}$) Annealing Temperature	等位 基因 Allele
1	ES-82	F R	ATTGACAAGCTCCTTGCAGAGAT TTTTTCTTCTGGATTCTTCCC	60	4
2	ESGS-117	F R	CGAGCGAGGTAAAAAGTATA GTTGTCACGTTTGAAGCAAGT	50	4
3	ES-176	F R	GTATTGGTCTCCTTAGCCTGGTC ATGATTCCCAGGACAAAAGTAT	60	6
4	ES-179	F R	GCATGTCCTTTCCAAGAACTATA TGCTCCAATCAAACAATTAATCA	60	5
5	ESGS-183	F R	GTCACGTTTGAAGCAAGTA GGCGAGGTAAAAAGTATAG	50	3
6	ESGS-266	F R	CACAGAGCGAGTTGGTT TTGTCACGTTTGAAGCA	50	4
7	ESGS-278	F R	CTCTTGAACACTCAVGCAC GAGGAAAAATGTAGCACTT	50	2
8	ESGS-328	F R	CCCTTCTGCTTCTCCCTTTC GTGCGTTGAGCGAAGTTGG	52	3

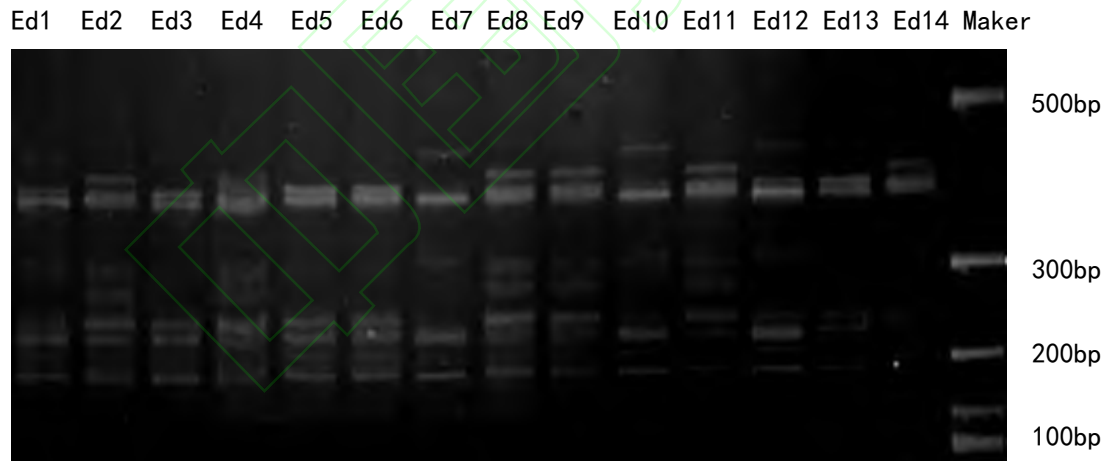
2.2 SSR 多样性分析

在 90 对 SSR 引物中, 筛选出 8 对扩增条带清晰且稳定的多态性引物, 8 对 SSR 引物在垂穗披碱草中扩增片段介于 100~500 bp 之间 (图 1)。在 33 份垂穗披碱草中 (居群 1 和居群 2) 共检测到 243 条带, 每个引物扩增产生的多态性带在 22~41 条, 平均每个引物产生 30.38 条带, 其中多态性带为 27.25 条; 每个引物多态性百分率在 57.14%~100% 之间, 平均多态性条带百分率为 89.71%, 多态性信息含量 (PIC) 在 0.583~0.924 之间, 平均值为 0.841 (表 3)。在 25 份达乌力披碱草 (居群 1 和居群 2) 中扩增片段在 100-500 bp 之间, 共检测到 163 条带, 其中多态性带为 124 条, 平均多态性位点百分率为 76.07%, 每个引物产生的多态性带在 6~26 条, 平均每个引物产生 20.37 条带, 多态性带 15.5 条; 多态性信息含量 (PIC) 在 0.524~0.830 之间, 平均值为 0.708 (表 3)。结果表明垂穗披碱草的扩增条带多态性显著高于达乌力披碱草。



注: 垂穗披碱草 Nw-居群

Note: The Nw- of *Elymus nutans* population



图注: 达乌力披碱草 Ed-居群

Note: The Ed- of *E. dahuricus* population

图 1 SSR 引物 ES-82 在垂穗披碱草和达乌力披碱草不同个体中扩增产物 PAGE 电泳图
Fig. 1 PAGE patterns of amplification products of SSR primer ES-82 in *Elymus nutans* and *E. dahuricus*

表3 SSR引物在供试材料中扩增及多态性
Table 3 Amplification and polymorphism of SSR primers in test materials

引物 Primer	垂穗披碱草 <i>Elymus nutans</i>				达乌力披碱草 <i>E. dahuricus</i>			
	总条带数 TNB	多态性条带数 NPB	多态性条带比率 (%) PB	多态性信息含量 PIC	总条带数 TNB	多态性条带数 NPB	多态性条带比率 (%) PB	多态性信息含量 PIC
ES-82	26	25	96.15%	0.816	15	12	80%	0.804
ES-176	26	25	96.15%	0.867	24	21	87.50%	0.671
ES-179	22	22	100%	0.583	13	13	100%	0.554
ESGS-117	23	20	86.96%	0.867	20	13	65%	0.811
ESGS-183	41	39	95.12%	0.895	23	19	82.61%	0.790
ESGS-266	31	30	96.78%	0.877	16	14	87.5%	0.677
ESGS-278	39	37	94.87%	0.891	30	26	86.67%	0.830
ESGS-328	35	20	57.14%	0.929	22	6	27.27%	0.524
总计 Total	243	21	89.71%		163	124	76.07%	
均值 Mean	30.38	27.25	90.39%	0.841	20.37	15.50	77.07%	0.708

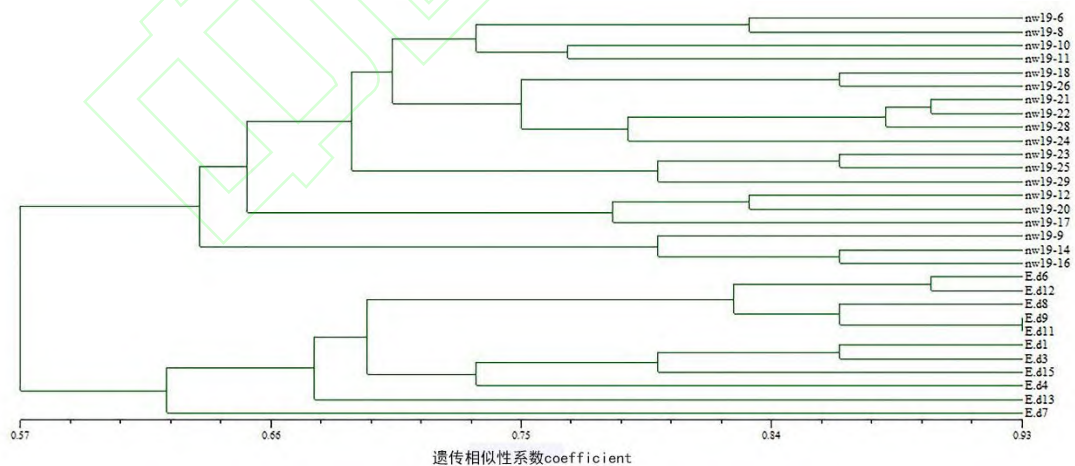
注：TNB. 总条带数；NPB. 多态性条带数；PB. 多态性条带比率；PIC. 多态性信息含量。

Note: TNB. Total bands; NPB. Polymorphic bands; PB. percentage of polymorphic fragments; PIC. Polymorphism information content.

2.3 遗传相似系数及聚类分析

在 NTSYS 软件中基于 Dice 遗传相似性系数 (GS 值) 计算同域分布垂穗披碱草和达乌力披碱草居群的遗传相似系数。总群体遗传相似系数 (GS) 在 0.083~0.919 之间, 变幅为 0.836, 平均值为 0.434。居群 1, 30 份供试材料间的 GS 值在 0.091~0.880 之间, 平均 GS 值为 0.487; 居群 2, 28 份供试材料之间的遗传相似性系数在 0.125~0.966 之间, 平均值为 0.489。垂穗披碱草和达乌力披碱草遗传相似性系数在 0.083~0.919 之间, 变幅为 0.836, 平均值为 0.434。在垂穗披碱草材料中, 遗传相似性系数在 0.071~0.919 之间, 平均值为 0.426; 达乌力披碱草材料中, 遗传相似性系数在 0.095~0.966 之间, 平均值为 0.604。

基于遗传相似系数 GS, 采用 UPGMA 法可以将垂穗披碱草和达乌力披碱草明显分开 (图 2 和图 3)。

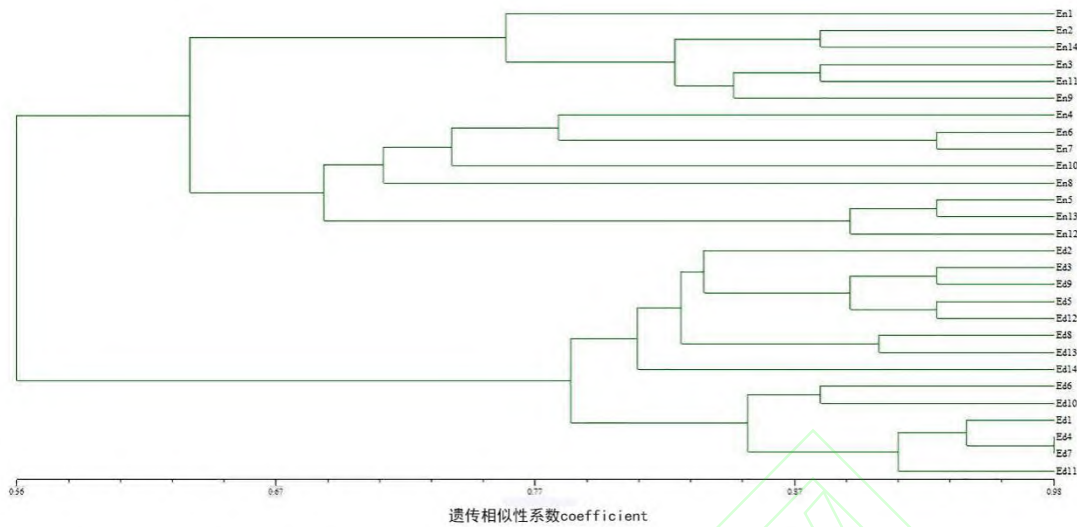


注：nw19-为垂穗披碱草居群编号；E.d 为达乌力披碱草居群编号。

Note: nw19- is the number of *Elymus nutans* population; E.d is the number of *E.dahuricus* population.

图 2 基于 UPGMA 构建的垂穗披碱草和达乌力披碱草聚类分析图 (居群 1)

Fig. 2 Clustering analysis of *Elymus nutans* and *E. dahuricus* based on UPGMA (Population 1)



图注: En-为垂穗披碱草居群编号; Ed 为达乌力披碱草居群编号。

Note: En- is the number of *Elymus nutans* population; Ed is the number of *E. dahuricus* population.

图 3 基于 UPGMA 构建的垂穗披碱草和达乌力披碱草聚类分析图 (居群 2)

Fig. 3 Clustering analysis of *Elymus nutans* and *E. dahuricus* based on UPGMA (Population 2)

2.4 遗传多样性分析

POPGENE 分析表明 (表 4): 同域分布垂穗披碱草的各个多样性指数都显著高于达乌力披碱草。居群 1 垂穗披碱草的多样性指数 ($N_a=4.63$, $N_e=3.00$, $H_e=0.61$, $I=1.15$, $P_p(\%)=100\%$) 均大于达乌力披碱草 ($N_a=2.50$, $N_e=2.17$, $H_e=0.49$, $I=0.77$, $P_p(\%)=87.5\%$); 居群 2 垂穗披碱草多样性指数 ($N_a=6.00$, $N_e=4.11$, $H_e=0.77$, $I=1.53$) 也均大于达乌力披碱草 ($N_a=2.50$, $N_e=2.25$, $H_e=0.56$, $I=0.77$)。从类群水平来看, 垂穗披碱草的遗传多样性平均值 ($N_a=5.32$, $N_e=3.56$, $H_e=0.69$, $I=1.34$, $P_p(\%)=100\%$) 明显大于达乌力披碱草多样性指数平均值 ($N_a=2.50$, $N_e=2.21$, $H_e=0.53$, $I=0.80$, $P_p(\%)=93.75\%$)。

表4 垂穗披碱草和达乌力披碱草遗传多样性指数

Table 4 Genetic diversity index of *Elymus nutans* and *E. dahuricus*

种类 Species	居群 Population	等位 基因 N_a	有效等位基 因 N_e	期望杂 合度 H_e	香农 指数 I	多态性位点百分 率 $P_p(\%)$
垂穗披碱草 <i>Elymus nutans</i>	1	4.63	3.00	0.61	1.15	100%
	2	6.00	4.11	0.77	1.53	100%
平均值 Mean		5.32	3.56	0.69	1.34	100%
达乌力披碱草 <i>E. dahuricus</i>	1	2.50	2.17	0.49	0.77	87.5%
	2	2.50	2.25	0.56	0.83	100%
平均值 Mean		2.50	2.21	0.53	0.80	93.75%

2.5 两披碱草种内居群遗传分化

居群遗传结构分析表明, 两种披碱草均存在居群遗传分化, 垂穗披碱草的居群分化系数 ($G_{ST}=0.034$) 明显低于达乌力披碱草 ($G_{ST}=0.070$), 表明这两种披碱草的种内居群间遗传变异占总遗传变异的 3.4% 和 7.0%, 各自的绝大多数变异来自于各居群内 (96.6% 和 93%) (表 5)。根据遗传分化系数 (G_{ST}) 计算得到两物种的居群间基因流较显著, 分别为 $N_m=9.030$ 和 $N_m=5.053$ (表 5)。不同位点居群遗传分化程度存在差异, 在垂穗披碱草居群间, 位点 ES-82 和 ESGS-328 遗传分化程度最高 ($G_{ST}=0.051$), 位点 ESGS-117 遗传分化程度最低 ($G_{ST}=0.014$); 而在达乌力披碱草中, 位点 ES-82 的分化程度最高 ($G_{ST}=0.248$), ESGS-117 的遗传分化程度最低 ($G_{ST}=0.031$) (表 5)。

表5 垂穗披碱草和达乌力披碱草居群的遗传多样性
Table 5 Genetic diversity of *Elymus nutans* and *E. dahuricus* populations

位点 Locus	垂穗披碱草 <i>Elymus nutans</i>					达乌力披碱草 <i>E. dahuricus</i>				
	H_t	H_s	D_{ST}	G_{ST}	N_m	H_t	H_s	D_{ST}	G_{ST}	N_m
ES-82	0.604	0.573	0.031	0.051	4.652	0.399	0.300	0.099	0.248	0.758
ESGS-117	0.809	0.798	0.011	0.014	17.607	0.650	0.630	0.020	0.031	7.815
ES-176	0.581	0.552	0.029	0.050	4.750	0.473	0.450	0.023	0.049	4.852
ES-179	0.626	0.603	0.023	0.037	6.507	0.534	0.500	0.034	0.064	3.656
ESGS-183	0.806	0.789	0.017	0.021	11.655	0.572	0.552	0.020	0.035	6.893
ESGS-266	0.739	0.722	0.017	0.024	10.167	0.517	0.495	0.022	0.043	5.564
ESGS-278	0.734	0.719	0.015	0.020	12.250	0.629	0.595	0.034	0.054	4.380
ESGS-328	0.693	0.658	0.035	0.051	4.652	0.618	0.595	0.023	0.037	6.507
平均值 Mean	0.699	0.677	0.022	0.034	9.030	0.549	0.034	0.034	0.070	5.053

注: H_t . 种群总遗传多样性; N_m . 种群内遗传多样性; D_{ST} . 居群间遗传多样性; G_{ST} . 遗传分化系数; N_m . 基因流。下同。

Note: H_t . Diversity in population total gene diversity; N_m . Diversity within populations; D_{ST} . Genetic diversity among populations; G_{ST} . Genetic differentiation coefficient; N_m . Gene flow. The same below.

分子方差结果分析表明垂穗披碱草和达乌力披碱草的遗传变异主要存在于居群内。垂穗披碱草居群内遗传变异水平 (80.92%) 大于达乌力披碱草居群内 (63.62%)，垂穗披碱草种内居群间的遗传变异固定指数 ($F_{st}=0.19$) 低于达乌力披碱草种内居群间 ($F_{st}=0.36$)，两物种种内的居群遗传分化均达到显著水平 ($P<0.001$) (表 6)。AMVOA 分析得到的遗传变异固定指数 (F_{st}) 和 Wright 的 F 统计量的 F_{st} 相当，都可得到不同地理分布居群间的基因流。根据公式 $N_m=0.25(1-F_{st})/F_{st}$ ，得到垂穗披碱草居群间的基因流 ($N_m=1.066$) 显著大于达乌力披碱草居群间的基因流 ($N_m=0.444$)，且两者均低于各自基于 G_{st} 计算的基因流 (表 5)，由此说明地理居群间发生基因交流不显著，对居群的遗传分化并不能起到重要的作用。

表6 垂穗披碱草和达乌力披碱草居群的分子方差分析 (AMOVA)
Table 6 AMOVA analysis of *Elymus nutans* and *E. dahuricus* populations

变异来源	自由度	方差和	变异组分	变异百分比	固定指数	P 值
Source of variation	Df	Sum of squares	Variance component	Percentage of variation	Fixation index	P value
垂穗披碱草居群 <i>Elymus nutans</i> population						
居群间	1	28.906	0.764	19.08%	$F_{st}=$	$P<$
Among populations					0.19	0.001
居群内 Within population	66	213.682	3.240	80.92%		
总和 Total	67	242.588	4.003	100%		
达乌力披碱草居群 <i>E. dahuricus</i> population						
居群间	1	37.678	1.455	36.38%	$F_{st}=$	$P<$
Among populations					0.36	0.001
居群内 Within population	48	123.542	2.544	63.62%		
总和 Total	49	161.220	3.999	100%		

2.6 同域分布居群披碱草种间遗传分化

为了检测同域分布的垂穗披碱草和达乌力披碱草两近缘物种间是否存在群体遗传结构的相互影响，本实验对两个同域分布的垂穗披碱草和达乌力披碱草群体进行了研究，结果表明：同域分布披碱草种间的遗传分化系数 (G_{st}) 平均仅为 0.054，说明同域分布的垂穗披碱草和达乌力披碱草居群的遗传多样性主要存在于两近缘种内 (94.6%)，仅有 5.2% 分布于两物种间；同域分布的种间的基因流 (N_m) 达到了 4.443 (表 7)，这揭示了在同域分布的这两种披碱草属种间存在明显的基因交流，两个地区的同域分布的居群种间遗传分化分别为 0.057 和 0.050，二者的差异程度不明显，这两种披碱草的基因流 (N_m) 也很接近，分别为 4.136 和 4.750，说明不同地区同域分布的这两种披碱草种间基因有明显基因流且交流程度很接近。

表7 同域分布垂穗披碱草和达乌力披碱草群体种间的遗传分化
Table 7 Genetic differentiation between *Elymus nutans* and *E. dahuricus* in sympatric species

居群 Population	H_t	H_s	D_{st}	G_{st}	N_m
居群 1 Population 1	0.583	0.550	0.033	0.057	4.136
居群 2 Population 2	0.678	0.644	0.034	0.050	4.750
平均值 Mean	0.631	0.597	0.034	0.054	4.443

3 讨论

高原地区垂穗披碱草呈现丰富的遗传变异性, 对于该地区垂穗披碱草遗传多样性研究一向受到高原生态学家和牧草育种者的重视。Yan 等 (2009) 对来自青藏高原不同海拔高度的 14 个垂穗披碱草居群共 300 多个个体, 利用 AFLP 标记进行了遗传多样性评价, 结果揭示不同居群位点多态性比例在 33.21%~77.80% 之间, 总体为 73.52%; 基因多样性指数 (H_e) 在 0.2194~0.3592 之间, 总体为 0.4285; 香农指数 (I) 在 0.3550~0.5491 之间, 总体为 0.6198。Chen 等 (2013) 对来自不同海拔高度的 50 多份垂穗披碱草材料, 利用 SSR 标记进行了遗传性评价, 结果揭示不同居群间位点多态性比例在 54.86%~74.31% 之间, 基因多样性指数在 0.1629~0.1987 之间, 香农指数在 0.2579~0.3119 之间。我们利用 SSR 标记对来自 2 个不同居群的 58 个个体遗传多样进行检测, 结果显示平均位点多态性比例达 93.75%, 基因多样性指数在 0.61~0.77 之间, 总体为 0.69, 香农指数在 1.15~1.53 之间, 总体为 1.34。在本项研究中揭示的垂穗披碱草遗传多样性指标均高于前人结果, 这与不同研究中采用的分子标记类型不同有关, 因为不同分子标记类型, 多态性高低不同, 最终导致研究结果差异的出现。Yan 等 (2009) 利用的 AFLP 标记, 得出多态性位点比例在 66.3%~83.4% 之间, 平均为 75.0%, 本研究中 SSR 标记多态性位点比例在 51.2%~96.2% 之间, 平均为 90.4%。Chen 等 (2013) 利用的 SSR 标记来源于普通小麦和 *E. alaskanus*, 在垂穗披碱草中位点多态性比例为 66.7%~100%, 平均为 91.4%, 但是平均多态性条数 (7.33) 和多态性信息含量 (0.224) 远低于本研究 SSR 标记揭示的结果 (分别为 27.3 和 0.84)。究其原因, 是因为本研究中利用的 SSR 标记来自于和垂穗披碱草同域分布的近缘物种老芒麦 (*E. sibiricus* L.), 因此这些 SSR 标记在垂穗披碱草中更容易扩增出基因组中存在的多态性位点。

本项研究揭示垂穗披碱草遗传多样性高于同域分布的达乌力披碱草, 但是在遗传结构上两个物种有相似之处。垂穗披碱草和达乌力披碱草自交结实率很高, 为典型的自花授粉植物 (Lu, 1993; 德英等, 2015)。通常自花授粉植物的遗传结构模式中, 大部分的遗传变异应存在于居群间 (Fahima et al., 1999), 但是本文对青藏高原地区同域分布垂穗披碱草和达乌力披碱草遗传结构分析表明, 垂穗披碱草和达乌力披碱草居群内遗传变异 (96.6% 和 93.0%) 显著高于居群间遗传变异 (3.4% 和 7.0%), 遗传变异主要存在于居群内个体间。AMOVA 分析表明, 垂穗披碱草和达乌力披碱草居群内遗传变异分为 80.92% 和 63.62%, 居群间遗传变异仅为 19.08% 和 36.38%。同样, 前人利用不同遗传标记也揭示垂穗披碱草居群内部遗传多样性高于居群间的遗传结构特性 (Yan et al., 2009; Chen et al., 2013)。Yan 等 (2010) 进一步对高原地区垂穗披碱草遗传结构分析, 认为由牲畜放牧带动种子产生的强基因流有可能是造成这种结果的原因。垂穗披碱草形态学显著区别于达乌力披碱草, 垂穗披碱草下垂以及长的颖芒等特性似乎有利于种子通过动物毛发进行传播, 但是达乌力披碱草直立、短芒或无芒的穗型似乎不利于这种传播方式。老芒麦为垂穗披碱草近缘物种, 同样为青藏高原广为分布的优质牧草, 老芒麦在外部形态上与垂穗披碱草非常相似, 野外环境很难从形态学上区分二者。李永祥 (2005) 对中国境内老芒麦 (包括来自青海的老芒麦居群) 进行了遗传结构分析, 结果表明老芒麦符合自花授粉植物的遗传结构特点, 居群内遗传多样性指数为 0.30, 居群间为 0.41, 占全部多样性的 58%。同为和垂穗披碱草形态相似的优质牧草物种, 但老芒麦和垂穗披碱草在遗传结构特性上并不一致。由此我们推测, 高原地区垂穗披碱草和老芒麦的群体遗传结构可能并不被流动放牧显著影响。

达乌力披碱草为达乌力披碱草复合群下的一个物种, 达乌力披碱草复合群包含披碱草、麦宾草 (*Elymus tangutorum* (Nevski) Hand.-Mazz)、肥披碱草 (*Elymus excelsus* Turcz. ex Griseb.)、圆柱披碱草 (*Elymus cylindricus* (Franch.) Honda) 等 (卢生莲等., 1987; Lu., 1993; Baum et al., 2011; 颜济和杨俊良等, 2013)。Agafonov (2001) 对达乌力披碱草复合群物种的种间从形态学、贮藏蛋白和分子等三个不同水平上进行了详细的研究, 建议在合适的范围内定义为种内关系。李永祥 (2005) 利用 SSR 和 ISSR 对中国境内达乌力披碱草复合群种间亲缘关系进行了研究, 结果表明在 SSR 和 ISSR 水平上几乎无法区分达乌力披碱草和圆柱披碱草。在本项研究中达乌力披碱草取样地区为达乌力披碱草复合群物种多样性分布地区, 同域分布有圆柱披碱草、麦宾草、肥披碱草等, 同时考虑到该地区为达

乌力披碱草复合群在该地区有特殊分化类型存在(李永祥, 2005), 因此我们认为本文中揭示的达乌力披碱草遗传多样性特性和遗传结构特点更有可能归因于达乌力披碱草居群内部已经存在的遗传分化。同样, 我们推测同域分布的垂穗披碱草居群内存在的大量遗传变异, 可能来源于该群体中存在的不同遗传分化类型。

披碱草属物种呈现复杂的网状进化特征, 不同物种间杂交基因渗透普遍存在, 种间杂交基因渗透在披碱草属物种多样性及遗传多样性形成中起着重要的作用(Sun et al., 2014; Wu et al., 2016)。青藏高原地区为披碱草属物种多样性分布区域, 在该地区存在丰富四倍体和六倍体披碱草属物种(卢生莲等, 1987; 刘尚武等, 1999), 研究表明垂穗披碱草和 13 种四倍体披碱草和 4 种六倍体披碱草物种间很容易杂交获得种子(Lu, 1993), 另外在该区不同披碱草属物种间天然杂种高频率发生(相吉山, 2008; 刘晓燕, 2017; 陈丽丽等, 2018; 路兴旺等, 2019)。同倍性或不同倍性物种间杂交在后代中产生较高的染色体变异(Lipman et al., 2013; Chester M, et al., 2012), 在我们的前期研究中发现垂穗披碱草群体中存在高频率染色体变异(Dou et al. 2009; 2017)。因此, 我们认为垂穗披碱草与同域分布的近缘物种间存在的种间杂交基因渗透有可能对于该群体的遗传分化起着重要的作用。与垂穗披碱草相比, 达乌力披碱草复合群物种的核型相对保守, 该复合群物种均具有 2 对物种特异性易位染色体存在(Dou et al., 2011; Yang et al., 2017), 物种特异性易位染色体被认为在多倍体形成初期在核质互作中对细胞质的育性恢复和基因组稳定化选择中起着重要的作用(Gill, 1991), 因此达乌力披碱草和垂穗披碱草虽然都为基因组相似的同倍体物种, 但是达乌力披碱草特殊的核质稳定机制可能对与不同披碱草物种间杂交基因渗透具有一定的阻碍作用, 达乌力披碱草种群遗传分化更倾向与复合群内其他物种间的杂交基因渗透。本文揭示的同域分布的垂穗披碱草遗传多样性高于达乌力披碱草, 相对于达乌力披碱草, 这可能是由于垂穗披碱草更易与其他更多物种发生杂交基因渗透。本研究揭示了不同居群中垂穗披碱草和达乌力披碱草之间有基因流存在, 但是达乌力披碱草特殊的核质互作机制, 可能在维持达乌力披碱草物种稳定性方面起着关键的作用。

参考文献:

- [1] AGAFONOV AV, BAUM BR, BAILEY LG, et al., 2001. Differentiation in the *Elymus dahuricus* complex (Poaceae): evidence from grain proteins, DNA, and crossability[J]. *Hereditas*, 135(2-3): 277-289.
- [2] ALLEN G, FLORES-VERGARA M, KRASYNANSKI S, et al., 2006. A modified protocol for rapid DNA isolation from plant tissues using cetyltrimethylammonium bromide[J]. *Nat. Protocols*, 1(5): 2320.
- [3] BAUM BR, YANG JL, YEN C, et al., 2011. A taxonomic synopsis of the genus *Campeiostrachys* Drobov[J]. *J Syst Evol*, 49(2): 146-159.
- [4] CHEN LL, ZHANG CB, LI DX, et al., 2018. Observation of fertility and chromosome characteristics of *Elymus natural hybrid*[J]. *Pratac Anim Husb*, 239(3): 19-21. [陈丽丽, 张昌兵, 李达旭, 等. 披碱草属天然杂种育性及染色体特征研究[J]. 草业与畜牧, 2018(3): 19-21.]
- [5] CHEN SY, CHEN ZH, ZHOU QP, et al., 2016. Study on morphological diversity of *Elymus nutans* germplasm resources from Qinghai-Tibetan plateau[J]. *Chin J Grassl*, 38(1): 27-33. [陈仕勇, 陈智华, 周青平, 等. 2016. 青藏高原垂穗披碱草种质资源形态多样性分析[J]. 中国草地学报, 38(1): 27-33.]
- [6] CHEN SY, MA X, ZHANG XQ, et al., 2009. Genetic variation and geographical divergence in *Elymus nutans* Griseb. (Poaceae: Triticeae) from West China[J]. *Biochem Syst and Ecol*, 37(6): 716-722.
- [7] CHEN SY, ZHANG XQ, MA X, et al., 2013. Assessment of genetic diversity and differentiation of *Elymus nutans* indigenous to Qinghai-Tibet Plateau using simple sequence repeats markers[J]. *Can J Plant Sci*, 93(6): 1089-1096
- [8] CHESTER M, GALLAGHER JP, SYMONDS VV, et al., 2012. Extensive chromosomal variation in a recently formed natural allopolyploid species, *Tragopogon miscellus* (asteraceae)[J]. *Pnas*, 109(4): 1176-1181.
- [9] DE Y, MU HB, LIU XL, et al., 2011. Morphological diversity of plant ear among 8 wild *Elymus* species[J]. *Pratac Sci*, 28(9): 1623-1631. [德英, 穆怀彬, 刘新亮, 等. 2011. 披碱草属 8 种野生牧草居群穗部形态多样性[J]. 草业科学, 28(09): 1623-1631.]
- [10] DE Y, WU JM, MU HB, et al., 2015. Study on mating system of three *Elymus* spp[J]. *J plant Genet Resour*, 16(4): 903-906. [德英, 乌吉玛, 穆怀彬, 等. 2015. 3 种披碱草属 (*Elymus*) 牧草交配系统研究[J]. 植物遗传资源学报, 16(4): 903-906.]
- [11] DOU QW, CHEN ZG, LIU YA, et al., 2009. High frequency of karyotype variation revealed by sequential FISH and GISH in plateau perennial grass forage *Elymus nutans*[J]. *Breeding Sci*, 59(5): 651-656.
- [12] DOU QW, YU F, LI Y, et al., 2017. Molecular karyotype variation revealed in indigenous *Elymus nutans* in the Qinghai plateau[J]. *Plant Diversity*, 39(3): 117-122.
- [13] DOU QW, Zhang TL, Tsujimoto H, 2011. Physical mapping of repetitive sequences and genome analysis in six *Elymus* species by in situ hybridization[J]. *J Syst Evol*, 49(4): 347-352.
- [14] FAHIMA T, SUN GL, Beharav A, et al., 1999. RAPD polymorphism of wild emmer wheat populations, *Triticum dicoccoides*, in Israel[J]. *Theor Appl Genet*, 98(3-4):434-447.
- [15] GILL BS. 1991. Nucleocytoplasmic interaction (NCI) hypothesis of genome evolution and speciation in polyploid plants[C] // Proceedings

- of the Kihara Memorial International Symposium on cytoplasmic engineering in wheat. Yokohoma, Japan: 48-53.
- [16] LEI YT, ZHAO YY, YU F, et al., 2014. Development and characterization of 53 polymorphic genomic SSR makers in Siberian wildrye (*Elymus sibiricus* L.) [J]. *Conserv Genetics Resour*, 6(4): 861-864.
- [17] LI YX. 2005. Genetic diversity study of *Elymus* species originated from China[D]. Taian: Shandong Agriculture University. [李永祥, 中国境内披碱草属植物的遗传多样性研究[D]. 泰安: 山东农业大学.]
- [18] LIANG GL, ZHOU QP, YAN HB, et al., 2011. Evaluation agronomic characters and productivity of seven accessions of wild *Elymus nutans* Griseb. in Alpine areas [J]. *Chin J Grassl*, 33 (6): 51-56. [梁国玲, 周青平, 颜红波, 等. 2011. 高寒地区野生垂穗披碱草农艺性状及生产性能评价[J]. *中国草地学报*, 33 (6): 51-56.]
- [19] LIPMAN MJ, CHESTER M, SOLTIS PS, et al., 2013. Natural hybrids between *Tragopogon mirus* and *T. miscellus* (asteraceae): a new perspective on karyotypic changes following hybridization at the polyploid level[J]. *Am J Bot*, 100(10): 2016-2022.
- [20] LIU SW, 1999. *Flora Qinghaiica* (Volume 4) [M]. Xining: Qinghai People's Publishing Press. [刘尚武, 1999. *青海植物志* (第四卷) [M]. 西宁: 青海人民出版社.]
- [21] LIU XY, 2017. Genomic constitution of natural hybrids of *Elymus* from Hongyuan, Sichuan[D]. Chengdu: Sichuan Agricultural University. [刘晓燕. 川西北高原披碱草属天然杂种的染色体组组成研究[D]. 成都: 四川农业大学, 2017.]
- [22] LU BR, 1993. Meiotic studies of *Elymus nutans* and *E. jacquemontii* (Poaceae, Triticeae) and their hybrids with *Pseudoroegneria spicata* and seventeen *Elymus* species[J]. *Plant Syst Evol*, 186(3-4): 193-212.
- [23] LU SL, SUN YH, LIU SW, et al., 1987. *Flora reipublicae popularis sinicae: Tomus 9 (3)* [M]. Beijing: Science Press. [卢生莲, 孙永华, 刘尚武, 等. 1987. *中国植物志* (第九卷第三分册) [M]. 北京: 科学出版社.]
- [24] LU XW, DOU QW, LIU B, et al., 2019. Cytogenetic identification on interspecific hybrids in genus *Elymus* L. spontaneously occurred in Qinghai plateau[J]. *Bull Bot Res*, 39 (6): 846-852. [路兴旺, 窦全文, 刘博, 等., 2019. 青海高原披碱草属种间天然杂种的细胞学鉴定[J]. *植物研究*, 39 (6): 846-852.]
- [25] MA YS, SHI JJ, DONG QM, et al., 2006. Effect of artificial control measure on *Elymus nutans* sown grassland vegetation in "Black-Soil-Type" degraded grassland [J]. *Qinghai J Anim Veter Sci*, 36 (2): 1-3. [马玉寿, 施建军, 董全民, 等, 2006. 人工调控措施对“黑土型”退化草地垂穗披碱草人工植被的影响[J]. *青海畜牧兽医杂志*, 36 (2): 1-3.]
- [26] MIAO JM, ZHANG XQ, CHEN SY, et al., 2011. Gliadin analysis of *Elymus nutans* Griseb. from the Qinghai-Tibetan Plateau and Xinjiang[J]. *Grassl Sci*, 57(3): 127-134.
- [27] PENG YL, ZHOU QP, CHEN SY, et al., 2018. Genetic diversity of *Elymus nutans* germplasm resources from the Qinghai-Tibet Plateau in China detected by SSR markers[J]. *Pratac Sci*, 35 (5): 1080-1089. [彭语洛, 周青平, 陈仕勇, 等, 2018. 青藏高原垂穗披碱草种质资源遗传多样性的 SSR 分析[J]. *草业科学*, 35 (5): 1080-1089.]
- [28] REN F, ZHOU H, ZHAO XQ, et al., 2010. Influence of simulated warming using OTC on physiological-biochemical characteristics of *Elymus nutans* in alpine meadow on Qinghai-Tibet Plateau[J]. *Acta Ecol Sin*, 30(3):166-171.
- [29] SUN GL. 2014. Molecular phylogeny revealed complex evolutionary process in *Elymus* species[J]. *J Syst Evol*, 52 (6): 706--711.
- [30] WU PP, ZUO HW, SUN GL, et al., 2016. Comparison of gene flow among species that occur within the same geographic locations versus gene flow among populations within species reveals introgression among several *Elymus* species[J]. *J Syst Evol*, 54(2): 152-161.
- [31] XIA HB, LU BR, 2009. Software for transforming co-dominant genotype scores into binary data matrix: its application to genetic diversity research[J]. *J Plant Genet Resour*, 10 (1): 97-102. [夏寒冰, 卢宝荣. 2009. 共显性分子标记基因型数据转换为二元型数据的处理软件及其在研究种质资源遗传多样性中的意义[J]. *植物遗传资源学报*, 10 (1): 97-102.]
- [32] XIANG JS, 2008. Genetic identification of natural hybrids from wild relative species in tribe Triticeae in Qinghai-Tibet Plateau[D]. Xining: Qinghai university. [相吉山, 青藏高原地区小麦族野生近缘植物天然杂种的遗传鉴定[D]. 西宁: 青海大学.]
- [33] YAN XB, GUO YX, LIU FY, et al., 2010. Population structure affected by excess gene flow in self-pollinating *Elymus nutans* and *E. burchan-buddae* (Triticeae: Poaceae)[J]. *Popul Ecol*, 52(1): 233-241.
- [34] YAN XB, GUO YX, ZHAO C, et al. Intra-population genetic diversity of two wheatgrass species along altitude gradients on the Qinghai-Tibetan Plateau: its implication for conservation and utilization[J]. *Conserv Genet*, 2009, 10(2): 359.
- [35] YANG C, ZHANG H, CHEN W, et al., 2017. Genomic constitution and intergenomic translocations in *Elymus dahuricus* complex revealed by multicolor GISH[J]. *Genome*, 60 (6): 510-517.
- [36] YEN J, YANG JL, 2013. *Biosystematics of Triticeae: Vol. 5* [M]. Beijing: China Agricultural Press: 1-216. [颜济, 杨俊良, 2013. *小麦族生物系统学* (第五卷) [M]. 北京: 中国农业出版社: 1-216.]
- [37] ZHANG JB, BAI SQ, ZHANG XQ, et al., 2009. Study on ear characters of *Elymus nutans* Griseb. in the northwestern plateau of Sichuan province[J]. *J Sichuan Univ (Nat Sci Ed)* 46 (5): 1505-1509. [张建波, 白史且, 张新全, 等, 2009. 川西北高原不同野生垂穗披碱草种群穗部形态研究[J]. *四川大学学报* (自然科学版), 46 (5): 1505-1509.]
- [38] ZHOU Q, LUO D, MA LC, et al., 2016. Development and cross-species transferability of EST-SSR makers in Siberian wildrye (*Elymus sibiricus* L.) using illumina sequencing[J]. *Sci Rep*, 6: 20549.