

SSR 标记对大颖针禾种群遗传结构的研究

孙秀霞, 齐妍婷, 王建明, 陆爽, 张霞

(石河子大学 生命科学院, 新疆 石河子 832000)

摘要: 以大颖针禾 7 个不同地理种群 100 个样本为研究对象, 利用 SSR 技术从群体水平进行遗传结构的研究。结果表明: 大颖针禾遗传多样性丰富, $Nei's$ 基因多样性指数 $H=0.2244$, $Shannon$ 多样性指数 $I=0.3355$, 这 2 个指标都在 YT 种群最高, MSS 种群最低; 大颖针禾种群的遗传分化系数 $F_{st}=0.5475$, 即在总的遗传变异中有 54.75% 存在于种群间, 种群间遗传距离 GD 变幅为 0.0871 ~ 0.2441, 地理距离和遗传距离之间无相关性; 通过聚类分析, 以遗传距离 0.14 为标准, 大颖针禾种群可划分为 4 个类群。

关键词: 大颖针禾; SSR 标记; 遗传多样性; 遗传结构

中图分类号: S 543⁺.9 文献标识码: A 文章编号: 1001-0009(2010)09-0139-04

长期以来, 由于人类活动的频繁增加, 沙漠化情况越来越严重。在新疆南北两大沙漠的边缘区域, 随着农垦事业的不断发展, 绿洲—沙漠过渡带和沙漠边缘的草本植物种群的生境破碎化趋势正在加剧^[1]。此外, 我国北方广大地区国土沙漠化、荒漠化严重, 且目前还不能有效阻止这一进程, 近年频繁发生的沙尘暴就是最好证据。试验证明, 植物措施是防治沙尘暴的有效方法之一^[2], 而草本植被最能对荒漠起沙过程起阻止作用。此外, 沙尘暴也与我国大范围的草原、荒漠和沙漠草本植被退化有直接的关系, 对于这些环境的生态恢复, 采取人工辅助的方式促进自然草本植被的恢复。

从植物自然分布规律可以观察到, 在某些地区, 随环境水量由多到少的梯度变化, 植物区系中禾本科草本植物所占比例逐渐增多。禾草类植物大多以其良好的旱生适应特性, 强烈的分蘖克隆能力和密集的地上地下构件分布等特征而成为优秀的固沙植物。大颖针禾 (*Stipagrostis grandiglumis* (Roshev.) Tzvelev), 隶属禾本科针禾属, 为多年生草本植物。在我国主要分布于甘肃敦煌, 新疆南部和内蒙古, 从安西、敦煌沿阿尔金山麓, 经新疆库姆塔格沙漠直至塔克拉玛干沙漠东部和南部的边缘地带, 多生于水道边、流动沙地、丘间低地或沙山上^[3-4]。大颖针禾是超旱生植物, 可适应年降水量在 250 mm 以下的沙质荒漠地区^[4], 是优异的固沙禾草。

第一作者简介: 孙秀霞(1985-), 女, 硕士, 研究方向为植物遗传学。
E-mail: sunxiuxia1985@yahoo.com。
通讯作者: 张霞(1964-), 女, 教授, 现主要从事遗传学教学及科研工作。
基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30660031)。
收稿日期: 2010-01-13

种群的遗传结构就是遗传变异, 即基因和基因型在时间和空间上的分布式样, 其包括种群内遗传变异和种群间遗传分化^[5]。研究种群的遗传结构及其影响因子, 是探讨植物的适应性、物种形成过程和分化式样、进化的基础内容, 对于濒危物种、具重要生态功能物种的保护和生态恢复都可提供可靠的分子依据。SSR 标记由于具有遗传方式简单、多态性好、操作简便、重复性好、稳定可靠等特点, 而被认为是生物种群遗传结构与变异研究中极有价值的分子遗传标记^[6]。现利用 SSR 标记, 从分子水平探讨大颖针禾自然种群的遗传结构, 填补 SSR 标记技术在大颖针禾资源遗传研究领域的空白, 为制定科学的保护策略及今后的持续利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

大颖针禾样本取自 7 个不同的地理种群, 共 100 份, 种群的地理信息、代号和取样数目见表 1。试验采取随机取样, 个体采集间距大于 5 m, 采集时取无病虫害的叶片, 分株丛编号将叶片装入信封置于阴凉处自然风干。

表 1 大颖针禾种群样本采集信息

种群代号	取样地点	经度(E)	纬度(N)	海拔/m	取样数目
MF	新疆民丰县	82°05'	36°44'	1 670	11
YT	新疆于田县	81°48'	36°49'	1 435	22
QM	新疆且末县	86°39'	38°43'	988	11
MSS	甘肃敦煌鸣沙山	94°40'	40°05'	1 300	4
CB	新疆策勒县波斯坦公社	81°20'	36°24'	2 020	11
SS	新疆鄯善县	89°50'	42°44'	-23	15
AKS	甘肃敦煌阿克塞沙湾	94°21'	39°45'	1 520	26

1.2 试验方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取及检测 参考华山新麦草 DNA 的提取方法^[7]提取基因组 DNA, 并根据实际情况

略做改进。0.8%的琼脂糖凝胶电泳检测其质量,紫外分光光度计测定其浓度、纯度,最后将 DNA 稀释至 50 ng/ μ L,于-20℃下保存备用。

1.2.2 SSR 扩增及扩增产物的检测 参考已发表的羽毛针禾^[8]和野生水稻的相关文献,共筛选出扩增效果好、多态性高的 20 对 SSR 引物用于研究。引物由上海捷锐生物工程公司合成,相关信息见表 2。SSR 扩增反

应在 My Cycle (BiosinRAD)扩增仪上进行,采用 25 μ L 反应体系:1 \times buffer (10 mM Tris HCl, 50 mM KCl, pH 8.3)、2.5 mM MgCl₂、0.2 mM dNTPs、正反向引物各 1.0 μ M、1 U *Taq* 聚合酶、50 ng 模板 DNA、ddH₂O 12.5 μ L。反应程序为:94℃预变性 5 min; 94℃变性 45 s 50℃退火 45 s, 72℃延伸 1 min, 36 个循环; 72℃延伸 10 min, 4℃保存。

表 2 SSR 引物的序列及扩增结果

引物	正向引物序列	反向引物序列	N	P/ %
RM20A	ATCTTGTCCTCG AGG TC AT	GAAACAGAGGCACATTTCATTG	16	84.21
RM21	ACAGTATTCCGTAGGCAAGG	GCTCCATGAGGCTGTACAG	12	100
RM72	CCGGCGATAAACAATGAG	GCATCGGTCCTAAC TAAGGG	18	85.71
RM118	CCAATCGGAGCCACCGAGAGC	CACATCCTCCA GCGACGCCGAG	7	43.75
RM135	CTCTGTCCTCCCGCGTCCG	TCAGCTTCTGCCCCGCTCCT	8	57.14
RM167	GATCCAGCGTGAGGAACACGT	AGTCCGACCAAGGTGCGTTGTC	10	47.62
RM205	CTGGTTCTGTATGGAGCAG	CTGGCCCTTCACGTTTCAGTG	8	53.33
RM216	GCATGCGGATGGTAAAG	TGTATAAACACACACGCCA	12	70.59
RM230	GCCAGACCGTGATGTTTC	CACCGCAGTCACTTTTCAAG	11	57.89
RM239	TACAAAATGCTGGGTACCCC	ACATATGGGACCCACCTGTC	9	64.29
RM240	CCTTAATGGGTAGTGTGCAC	TGTAACCATTCCTTCATCC	5	35.71
RM253	TCCTTCAAGAGTGCAAAACC	GCA TTGTCATGTCGAAGCC	8	44.44
RM267	TGCAGACATAGAGAAGGAAGTG	AGCAACAGCACAACTTGATG	10	58.82
RM282	CTGATTCCACACACTTGTGC	GATTCCACGTCAGGATCTTC	7	50
RM289	TTCCATGCCACACAAGCC	CTGTGCACGAACTTCCAAG	11	64.71
RM324	CTGATTCCACACACTTGTGC	GATTCCACGTCAGGATCTTC	23	92
RM331	GAACCAGAGGACAAAATGC	CATCATACTTTGCAGCCAG	16	69.57
RM334	GTTTCAGTGTTTCACTGCCACC	GACTTTTGATCTTTGGTGACG	7	43.75
RM335	GTACACACCAATCGAGAAG	GCTCTATGCGAGTATCCATGG	14	77.78
RM341	CAAGAAACCTCAATCCGAGC	CTCC TCCCGATCCCAATC	13	81.25

在 0.5 \times TBE 缓冲系统下采用 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳对扩增产物进行检测,并使用 DNA Marker 标定分子量。采用硝酸银染色,用数码相机拍照并保存。

1.3 数据统计及分析方法

选择扩增强且具有代表性的条带进行统计,有带赋值“1”,无带赋值“0”。根据每个个体产生的条带位置确定基因型,从而将原始图形数据转化为数字数据。统计每个引物的多态性条带数 *N* 及多态性比率 *P*。利用 POPGENE version 1.31 软件^[9] 计算观察等位基因数 *N_a*、有效等位基因数 *N_e*、*Nei's* 基因多样性指数 *H*、*Shannon* 多样性指数 *I*、总种群基因多样性 *H_t*、种群内基因多样性 *H_s*、遗传分化系数 *F_{st}*、基因流 *Nm* 以及种群间的无偏差 *Nei* 遗传相似系数和遗传距离。根据 *Nei* 氏遗传距离及遗传相似系数,利用软件 NTSYS—pc version 2.10 采用非加权算术平均数聚类 *UPGMA* 方法进行聚类分析^[10]。

2 结果与分析

2.1 SSR 引物扩增结果分析

选取的 20 对 SSR 引物的扩增带型均清晰稳定,多态性高,如引物 RM341 (图 1) 所扩增的部分谱带。在 100 份大颖针禾样本中共检测到 225 条多态性谱带,分

子量变异范围约为 100~1 500 bp。每对引物检测到的多态性带数及其所占的比例见表 2。不同引物检测到的多态性带数差异较大,变幅为 5 (RM240)~23 (RM324),平均为 11.25。此外,不同引物的多态性比率差异较大,最大为 100% (RM21),最低为 35.71% (RM240),平均为 64.13%。

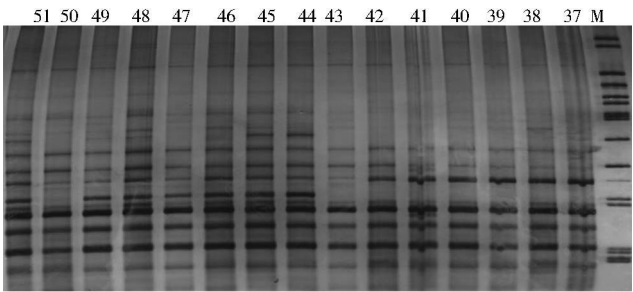


图 1 引物 RM341 的部分扩增结果

2.2 种群的遗传多样性及遗传结构分析

从表 3 可以看出,大颖针禾不同种群的遗传多样性差异很大。其中,观察等位基因数 *N_a* 变幅为 1.1561 (MSS)~1.4220 (YT),有效等位基因数 *N_e* 变幅为

1.1164(MSS)~1.2891(YT)。 *Nei's* 基因多样性指数 *H* 变幅为 0.0646~0.1624, 种群水平的平均值为 0.1013, 物种水平为 0.2244。 *Shannon* 多样性指数 *I* 的变化范围为 0.0937~0.2375, 种群水平的平均值为 0.1490, 物种水平是 0.3355。从 *Nei's* 基因多样性指数 *H* 和 *Shannon* 多样性指数 *I* 来看, 7 个种群遗传多样性水平从高到低的顺序为: YT> AKS> MF> SS> QM> CB> MSS。大颖针禾种群的遗传分化系数 *Fst* 为 0.5475, 即在总的遗传变异中有 54.75% 存在于种群间。其总种群基因多样性 *Ht* 为 0.2240, 种群内基因多样性 *Hs* 为 0.1014。大颖针禾 7 个种群间的基因流 *Nm* 非常有限, 仅为 0.4133, 反映出种群间隔离程度较大, 并促进了种群内的遗传分化。

表 3 7 个大颖针禾种群的遗传多样性指标

种群代号	Na	Ne	I	H
QM	1.2514±0.4345	1.1616±0.3172	0.1368±0.2490	0.0924±0.1727
YT	1.4220±0.4969	1.2891±0.3878	0.2375±0.2967	0.1624±0.2079
MF	1.2543±0.4361	1.1743±0.3338	0.1427±0.2580	0.0976±0.1802
AKS	1.3439±0.4757	1.2320±0.3640	0.1923±0.2810	0.1311±0.1959
MSS	1.1561±0.3634	1.1164±0.2885	0.0937±0.2221	0.0646±0.1550
SS	1.2543±0.4361	1.1625±0.3167	0.1376±0.2498	0.0930±0.1733
CB	1.1965±0.3980	1.1192±0.2827	0.1021±0.2205	0.0684±0.1527
Mean	1.2684	1.1793	0.1490	0.1013
Total	1.6445	1.3844	0.3355	0.2244

2.3 种群间的遗传距离和聚类分析

从表 4 可以看出, 7 个种群的遗传相似度分布在 0.7834~0.9166 之间, 其中 QM 和 CB 的遗传相似度最低, MF 和 AKS 的遗传相似度最高。反之, MF 和 AKS 的遗传距离最小为 0.0871, 而 QM 和 CB 的遗传距离最大为 0.2441, 可以看出地理距离和遗传距离并不是一致的。

根据 *Nei's* 遗传距离用 NTSYS 软件对 7 个种群进行 *UPGMA* 聚类分析, 结果如图 2 所示。7 个种群在 0.14 处分为 4 个大支: 第 1 支包含 QM 和 YT 种群; 第 2 支包含 MF 和 AKS 种群; 第 3 支包含 MSS 种群和 SS 种群; CB 种群单独分为第 4 支。

表 4 大颖针禾种群间的遗传相似系数和遗传距离

种群代号	QM	YT	MF	AKS	MSS	SS	CB
QM	****	0.8939	0.8466	0.8385	0.7966	0.8221	0.7834
YT	0.1121	****	0.9004	0.8704	0.8199	0.8425	0.8163
MF	0.1666	0.1049	****	0.9166	0.8141	0.8291	0.8042
AKS	0.1762	0.1388	0.0871	****	0.8487	0.8613	0.8404
MSS	0.2274	0.1985	0.2056	0.1640	****	0.9163	0.8225
SS	0.1959	0.1714	0.1874	0.1493	0.0874	****	0.8747
CB	0.2441	0.2030	0.2179	0.1739	0.1954	0.1339	****

注: 遗传相似系数(斜线上), 遗传距离(斜线下)。

3 讨论与结论

3.1 引物的获得

微卫星侧翼序列在属内种间和亲缘关系接近的属间是相当保守的, 这一特征奠定了微卫星共用引物的理

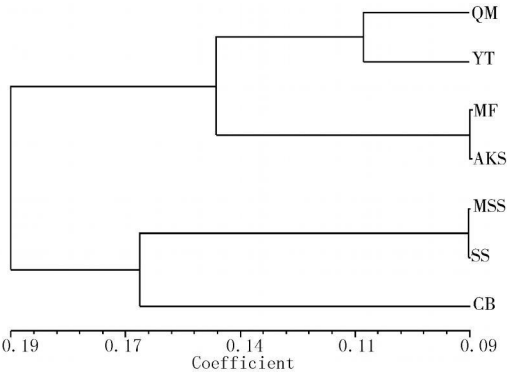


图 2 大颖针禾 7 个种群的 UPGMA 聚类图

论基础。属内种间微卫星共用引物的扩增成功率比较高, 在亲缘关系较近的种间一般能够共用, 而属间共用微卫星主要取决于属间亲缘关系的远近^[11]。该研究参考了羽毛针禾和野生水稻的相关文献, 从 38 对 SSR 引物中筛选出 20 对首次用于大颖针禾的 SSR 标记, 结果显示 20 对 SSR 引物的扩增带型均清晰稳定, 多态性高。这充分证明了 SSR 位点的通用性和保守性, 即 SSR 位点序列在属内种间甚至在科内属间是保守的、相似的。其中, 引物 RM21、RM72、RM20A、RM341、RM335 具有较高的多态性比率(均高于 70%), 可以将其用于大颖针禾进一步的 SSR 标记研究。

3.2 遗传多样性及遗传结构

遗传多样性是每种生物所固有的特性, 是长期适应与进化的产物。对于任何一个物种来说, 其遗传多样性越丰富, 对环境变化的适应能力就越强, 就越容易扩展其分布范围和开拓新的环境^[3]。大颖针禾的 *Nei's* 基因多样性指数 *H* 明显高于单子叶植物 *Nei's* 遗传多样性的平均值 0.1909^[13], 这可能与其生存环境有关。Rand^[14] 对以色列石鸡 (*Alectoris chukar*) 种群遗传结构的研究表明, 年平均降水量与种群的遗传多样性呈显著负相关, 干旱区的种群有更高的遗传多样性。这在一定程度上解释了大颖针禾具有较高遗传多样性的原因。大颖针禾的 *Nei's* 基因多样性指数 *H* 和 *Shannon* 多样性指数 *I* 均明显高于羽毛针禾, 主要原因在于所检测 SSR 位点的数量和分布以及材料多样性的差异。7 个种群中, MSS 种群的遗传多样性水平最低, 这可能与位于风景旅游区, 有大量的人畜活动, 原生境受到干扰或破坏有关。很多物种的遗传多样性研究结果表明, 物种生境的破坏, 不仅缩小物种适宜的生存环境, 而且增加了近亲个体的交配机会, 这可能是导致种群灭绝和遗传变异丢失的重要原因^[15]。

遗传结构是通过物种群体内和群体间的遗传分化来体现的。基因流是影响群体内部和群体之间遗传变异程度的重要因素^[16]。基因流的大小可以反映群体遗

传结构的大小,一般来说,基因流大的物种,种群间遗传分化小,大的基因流可以阻止群体间的遗传分化;反之,种群间的遗传分化大。大颖针禾 7 个种群间的基因流 Nm 非常有限,仅为 0.4133,说明大颖针禾种群间遗传分化大。遗传距离可表示不同种群之间遗传差异的程度,遗传距离越大,说明种群间亲缘关系越远。7 个种群的遗传距离分布在 0.0871 ~ 0.2441 之间,其中 MF 和 AKS 的遗传距离最小,而 QM 和 CB 的遗传距离最大。聚类分析结果显示,地理距离和遗传距离并不是一致的,这可能与不同种群的生存环境、生活史特性、分布范围、繁育系统等因素有关。

3.3 大颖针禾的保护及利用

保护物种,从某种意义上说就是保护物种的遗传多样性或进化潜力。一个物种的遗传分化系数 F_{st} 高,表明该物种的遗传变异主要存在于种群间,就需要选取较多的种群才能保护其遗传多样性。在实际取样时,对于一个基因流较小, F_{st} 为 0.6 的物种,至少要取 6 个种群才能保护其 95% 的遗传多样性^[9]。大颖针禾 F_{st} 为 0.5475,且基因流较小,因此至少要取 5 ~ 6 个种群进行保护。对于遗传多样性水平最高的 YT 种群应给予重点保护。此外,对于生境遭到严重破坏,种群小的 MSS 种群也应给予重点保护。大颖针禾在长期进化过程中形成了一系列适应沙生环境生态的生物学特征:茎秆纤细有弹性,叶片线形且韧性大,这使其耐风蚀;基部保留枯死的老叶鞘,根具沙套等特点可耐高温和严寒;叶片强烈纵卷,具地下和水平根系使其抗旱。考察时发现,在很多沙丘的顶部,只有大颖针禾生存,且一簇簇,生机盎然。因此,可将其作为固定沙地,防止沙丘活化的先锋禾草。参考羽毛针禾^[17],可对大颖针禾进行人工辅助更新或人工栽培,以利增加其沙生植被的密度。满足治沙保护环境的需要后,也可以将其作为牧草加以利用,从而达到一种良性循环。

参考文献

- [1] 钱亦兵,张立运,吴兆宁.工程行为对古尔班通古特沙漠植被的破坏及恢复[J].干旱区研究,2001,18(4):47-51.
- [2] 赵哈林,李胜利,张铜会等.科尔沁沙地退化草地封育效果及其评价[J].中国沙漠,1998,18(增刊2):47-50.
- [3] Chen S L, Phillips S M. Flora of China[M]. 中国植物志,2002:22-23.
- [4] 崔乃然.新疆植物志(第六卷)[M].乌鲁木齐:新疆科技卫生出版社,1996:51.
- [5] 葛颂.植物群体遗传结构研究的回顾和展望[M]//李承森.植物科学进展(第一卷).北京:高等教育出版社,1998:1-30.
- [6] Goldstein A R, L Linares, Cavalli-som, et al. An evaluation of genetic distances for use with microsatellite loci[J]. Genetics, 1995, 139: 463-471.
- [7] 王丽.珍稀濒危植物华山新麦草的胚胎学及其遗传多样性研究[D].西安:西北大学,2005.
- [8] 邓必建.羽毛针禾繁育系统的研究[D].石河子:石河子大学,2007.
- [9] Francis C Y, Yang R C. POPGENE VERSION 1.31 Microsoft window-bases freeware for Population Genetic Analysis quick user guide[J]. University of Alberta And Tim Boyle Centre for International Forestry Research, 1999.
- [10] Rohlf F J. NTSYS-pc numerical taxonomy and multivariate analysis system version 2.1 user guide[J]. New York: Exeter Publications, 2000.
- [11] Thelma B, Clarisse P S, Gecele M P, et al. Cross-species transfer of nuclear microsatellite markers: potential and limitations[J]. Molecular Ecology, 2007, 16: 3759-3767.
- [12] 解新明, 锦锦凤. 植物遗传多样性及其检测方法[J]. 中国草地, 2000 (6): 51-59.
- [13] Nybom H, Bartish I V. Effects of life history traits and sampling strategies on genetic diversity estimates obtained with RAPD marker in plants[J]. Perspect. Plant Ecol. Evol. Syst., 2000(3): 93-114.
- [14] Randi E. Genetic structure of chukar (A letoris chukar) population in Island[J]. Auk, 1994 11(2): 216-226.
- [15] 李群. 濒危植物延龄草 (*Trillium tschonoskii*) 的遗传多样性研究[D]. 成都: 四川大学, 2004.
- [16] Kumar A, Rogstad S H. A hierarchical analysis of microsatellite DNA diversity in Gambel oak (*Quercus gambelii* Nutt. Fagaceae) [J]. Mol. Ecol. 1998(7): 859-869.
- [17] 买买提·依提. 羽毛三芒草 (*A. pennata*) 的生态生物学特性及其评价[J]. 干旱区研究, 1990, 7(2): 52-55.

Analysis of Genetic Structure by SSR Markers in *Stipagrostis grandiglumis* Populations

SUN Xiu-xia, QI Yan-ting, WANG Jian-ming, LU Shuang, ZHANG Xia

(College of Life Science, Shihezi University, Shihezi, Xinjiang 832003)

Abstract: Taking 100 individuals from seven populations of *Stipagrostis grandiglumis* as experiment material, Using the SSR on the basis of group level on the genetic structure was studied. The results showed that high level of genetic diversity was detected, Nei's gene diversity index was 0.2244 and Shannon diversity index was 0.3355. Those two index all had maximal level in YT and lowest level in MSS. The genetic differentiation (F_{st}) was 0.5475. It suggested that 54.75% genetic variation existed among populations. The genetic distance (GD) ranged from 0.0871 to 0.2441. There was nonsignificant correlation between geographical distance and genetic distance. The results of *UPGMA* indicated that with 0.14 as the standard genetic distance the *Stipagrostis grandiglumis* populations were classified into 4 groups.

Key words: *Stipagrostis grandiglumis*; simple sequence repeats markers; genetic diversity; genetic structure