

Study on Germplasm of *Leymus chinensis*

羊草种质资源研究

(第二卷)

刘公社 李晓霞 等◎著



科学出版社

羊草种质资源研究

(第二卷)

刘公社 李晓霞 等 著

科学出版社

北京

内 容 简 介

羊草是欧亚大陆东部广泛分布的多年生草本植物,是我国北方草原生态环境保护的关键乡土草种,也是草食家畜的优质饲草。我国对羊草有着系统的研究,资源优势明显。本书著者及其团队在出版《羊草种质资源研究》(第一卷)的基础上,对近5年微观领域的最新研发成果进行了系统性整理,撰写了《羊草种质资源研究》(第二卷),本卷的特色在于:采用新一代测序技术对羊草进行转录组高通量深度测序,建立了国际上首个羊草基因资源信息平台;基于羊草基因数据库,从分子水平上深入研究了羊草耐牧等关键科学问题,并克隆和验证了一批羊草特异的新基因。全书共分十一章,内容包括:羊草转录组测序及数据库建设、羊草刈割相关基因表达谱分析、羊草刈割伤口对BSA的响应、羊草DREB家族基因功能研究、羊草WRKY家族基因结构和功能分析、羊草新功能基因的克隆及功能研究、羊草对除草剂的抗性研究、羊草对水分的响应规律分析、羊草的水肥需求特性研究、羊草有性生殖研究进展、施肥对羊草种子产量的影响。

本书对于从事羊草和其他乡土草种质资源和基因资源研究的科研工作者具有重要的参考价值,对于草地管理及优质饲草开发从业人员具有重要实用价值。

图书在版编目(CIP)数据

羊草种质资源研究. 第2卷 / 刘公社等著. — 北京: 科学出版社, 2015.10

ISBN 978-7-03-045138-5

I. ①羊… II. ①刘… III. ①羊草-种质资源-研究 IV. ①S545.024

中国版本图书馆CIP数据核字(2015)第153369号

责任编辑: 李秀伟 / 责任校对: 郑金红

责任印制: 徐晓晨 / 封面设计: 北京铭轩堂广告设计有限公司

科 学 出 版 社 出 版

北京东黄城根北街16号

邮政编码: 100717

<http://www.sciencep.com>

北京京华虎彩印刷有限公司 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2015年10月第 一 版 开本: 720×1000 1/16

2015年10月第一次印刷 印张: 17 插页: 8

字数: 330 000

定价: 108.00 元

(如有印装质量问题, 我社负责调换)

热烈祝贺刘公社团队羊草种质
资源系列研究成果隆重出版

任继周

2015年5月

任继周院士题词

本书由以下项目联合资助，特此鸣谢

国家科技部 973 计划项目“中国西部牧草、乡土草遗传及选育的基础研究”——“牧草、乡土草重要基因的挖掘与功能验证”课题（2007—2011）；973 计划项目“重要牧草、乡土草抗逆优质高产的生物学基础”——“牧草、乡土草繁殖性状的生物学基础研究”课题（2014—2018）；国家自然科学基金“羊草抗盐相关转录因子基因的克隆与功能研究”项目（2011—2013）；国家自然科学基金“羊草低温相关未知功能基因的克隆与功能分析”项目（2012—2016）；中国科学院“羊草种质资源研究和利用”农业项目（1995—2015）

著者名单

主要著者 刘公社 李晓霞

著作完成人 (按姓氏汉语拼音排序)

陈双燕	程丽琴	董晓兵	郝明德
黄欣	贾俊婷	李晓峰	梁烨
马甜	马兴勇	彭献军	齐冬梅
沈月	孙洪仁	闫学青	张乐新
赵爱国			

序 言

对乡土植物的驯化、选育与利用始终是科学研究和生产实践的重要内容，就某种意义而言，农业发展史也是对野生动植物认识、驯化、选育与利用的历史。尤其是近年来，可持续发展已成为时代主题，如何充分发挥和利用乡土植物的优异特性更是各国科学家高度关注并积极研究的领域。适应这一形式，美国创办了《乡土植物》(*Native Plant*)刊物，全面反应这一领域的成果与动态。各国开展的工作主要集中在两个方面：一方面是将具有优异特性的野生乡土植物驯化为栽培品种，直接服务于农牧业生产，如新西兰科学家利用野生车前含有单宁的特性，将其驯化为栽培品种，作为黑麦草白三叶混播草地的组分之一，用于克服放牧家畜的臃胀病；另一方面，各国科学家努力挖掘乡土植物的优异基因资源改良牧草或作物品种，也取得了非常好的进展。

我国是世界草地资源大国，据全国第一次草原普查资料显示，饲用植物达6700余种之多，充分利用和发挥草地植物多样性十分丰富的优势，改良退化农田与草地是我国科技工作者的一项重要任务，也是治理退化土地资源的快捷途径。我国草地工作者在该领域已取得了突出的进展，20世纪70年代，山丹军马场便创造了驯化、选育垂穗披碱草、老芒麦等优良乡土草，大规模生产种子，建植人工草地，服务畜牧业生产的范例。我国目前已育成的牧草品种当中，驯化选育的乡土草种约占1/3。在挖掘利用优异性状基因、改良牧草品种方面也取得了可喜的进展。

羊草是我国众多乡土草种中性状十分优异者，广泛分布于我国北方各地，其具有适应性广、抗逆性强、产量高、饲用价值好等特点。以羊草为主要建群种的羊草草原是欧亚大草原东端的主要植被类型，在当地的畜牧业生产、环境保护和社会发展中发挥着不可替代的作用。羊草的优异特性很早就引起了我国学者的关注，自20世纪50年代初，东北师范大学、内蒙古大学和中国科学院综考会等单位的学者便对羊草及羊草草原开展了持续不断的研究，经过几代人的不懈努力，取得了丰硕成果。自20世纪80年代以来，内蒙古农业大学、中国农业科学院草原研究所和吉林省生物研究所等单位的学者们先后驯化、选育并通过国家草品种审定委员会审定了6个羊草品种，为利用和保存羊草这一优良种质做出了重要贡献。

正是基于对乡土草种和羊草的上述认识，以兰州大学草地农业科技学院为第一承担单位的学者们在科技部的支持下于2007年启动了973计划项目“中国

西部牧草、乡土草遗传及选育的基础研究”。2011年结题后,2014年又延续了第二个项目“重要牧草、乡土草抗逆优质高产的生物学基础”。项目组对包括羊草在内的我国最主要数种牧草和乡土草开展了较为深入系统的研究。正是在先后执行这两个973计划项目中,我得以结识了刘公社研究员。

刘公社研究员任职于中国科学院植物研究所,在长期的共同合作中我逐渐得知,他早年留学于法国,1986年获得博士学位后回国效力,在中国科学院植物研究所做博士后,合作导师为中国科学院院士王伏雄先生,他是我国20世纪80年代最早回国开展研究的博士后之一,出站后继续在植物研究所工作,研究范围主要涉及向日葵和羊草,并曾主持中国科学院在内蒙古多伦县实施的“中国北方农牧交错带可持续发展技术研究”重点项目,取得了一系列成果,奠定了坚实而广泛的理论基础。多年来,他的研究团队建成了羊草种质资源库,收集保存有我国最多的羊草种质资源。在北京、塞北等地分别建立了羊草种质资源圃和育种圃,指导研究生开展研究,并自己身体力行,2014年刘公社研究员选育的羊草新品种‘中科1号’羊草通过了国家草品种审定委员会的审定,成为了我国又一个育成的羊草新品种,这对于以从事基础研究为主的中国科学院科技工作者来说是十分难能可贵的,更加值得称道的是他没有满足于育成了羊草新品种,而是积极努力使这一新品种在生产中发挥作用,先后风尘仆仆地奔波于我国“三北”各地,与有关政府部门和企业联系,在河北张家口市塞北区、宁夏盐池县、甘肃酒泉市、内蒙古锡林郭勒盟和呼伦贝尔市等地建立了多个羊草种子繁殖基地和栽培示范基地,体现了从基础研究、应用研究、品种选育到示范推广的系统性研发特色。

刘公社研究员在第一个973计划项目中主持了“牧草、乡土草重要基因的挖掘与功能验证”的课题,在第二个项目中主持了“牧草、乡土草繁殖性状的生物学基础研究”课题。在近十年的合作研究中,我作为项目的首席科学家,他作为课题负责人,我们合作愉快,他对学术的敏锐和对科学问题探索的执着给我留下了深刻的印象,可能正是这种对科学的不懈追求、奋力攀登精神才使他取得了一系列的研究成果。

呈现在读者面前的《羊草种质资源研究》(第二卷),是继2011年该书第一卷出版后的又一力作,是作者在中国科学院有关项目和前述两个973计划项目长期稳定的资助下取得的部分重要研究成果,体现了作者从表型评价—基因型分析—再到表型创新这一学术思路指导下的乡土植物羊草的系统性研究积累。全书分为十一章,其中前六章主要介绍了在分子水平的研究成果,包括羊草转录组高通量测序及羊草基因资源信息平台建设、羊草耐牧等关键科学问题分子调控网络研究和羊草多个抗逆新基因的功能研究等。七至十一章依次介绍了羊草对除草剂的抗性、对水分的响应、水肥需求特性、有性生殖和施肥对种子生产的影响。每一章都包括引言、关键技术与研究方法、研究取得的重要进展、研究结论与讨

论、小结与展望等内容，章末附有参考文献，全书结构统一、严谨。如果说《羊草种质资源研究》（第一卷）所介绍的重点是羊草种质资源的表型评价研究成果，那么该书的重点则是呈现了羊草基因型的研究成果，该书内容代表了当前国内外对重要乡土草种羊草的研究水平，在植物基因资源研究、草业科学、畜牧学和生态学领域具有重要参考价值，对国内外牧草和乡土草资源的开发利用具有借鉴意义。从早期的“东北羊草草原调查报告”，到2004年祝廷成教授主编出版的《羊草生物生态学》，2011年刘公社研究员等出版的《羊草种质资源研究》（第一卷），再到该书，这一系列论著的出版不仅记录了我国几代科技工作者对羊草这一重要乡土草的研究成果，也反映了学科发展和学术水平不断提高的轨迹。

我祝贺《羊草种质资源研究》（第二卷）的出版。

谨以为序。



中国工程院院士

兰州大学草地农业科技学院教授
草地农业系统国家重点实验室主任

2015年8月6日

前 言

羊草为异源四倍体 ($2n=4x=28$) 植物, 基因组约为 10 Gb。在 2006 年, 由于羊草过大的基因组和较高的杂合度, 以及全基因组测序技术尚不成熟且成本很高, 为了研究羊草这样一种基因组信息几乎为零的非模式植物, 刘公社研究团队选择了转录组测序路线直接获取了羊草海量功能基因信息。本研究团队先后采用 454 和 Illumina 测序技术对羊草逆境胁迫处理 (低温、高盐和刘割)、不同发育时期幼穗、羊草生殖器官 (成熟柱头、子房) 等进行了转录组高通量深度测序, 并利用丰富的基因信息建立了国际首个羊草基因组数据库。基于这个数据库, 本研究团队对刘割、创伤和 BSA 沉积差异基因进行表达谱分析, 从分子水平上研究植物响应草食家畜啃食的分子机制, 提出了草-动物相互作用的分子界面概念。基于这个数据库, 发掘了一批羊草未知功能基因序列, 并对基因功能进行全面系统研究, 获得多个具有自主知识产权及明确功能的抗逆新基因, 为理解乡土草逆境适应性机制, 为小麦、水稻、玉米等作物分子改良提供了新的功能基因。

羊草作为我国北方草原的关键草种, 受到学界的持续关注, 然而其多年生习性、结实少和基因组大且复杂等特点, 使得研究工作步履艰难, 进展缓慢。本研究团队采用了持久战的研发策略, 经过二十多年持之以恒的探索, 建立起一条实用高效的种质资源发掘技术路线: 种质资源收集—表型研究—基因型分析—种质创新。在此基础上, 已收集国内外羊草种质资源 1000 余份, 培育出高产优质抗逆的‘中科 1 号’、‘中科 2 号’、‘中科 3 号’羊草新品种。此外, 还针对我国羊草产业化遇到的关键问题, 采用前沿技术开展了羊草除草剂抗性研究、水肥需求特性研究等, 为下一步羊草研发成果服务于草原生态建设和草业发展奠定基础。

2011 年本研究团队出版了《羊草种质资源研究》(默认第一卷), 系统地阐述羊草种质资源的初步研究成果, 重点是资源收集和评价。《羊草种质资源研究》(第二卷) 是对我们近 5 年研究成果的凝集, 重点从基因水平介绍羊草, 从表型评价深入到基因型研究所取得的成果, 涉及基因功能分析、调控网络研究、基因与性状的关联分析等。

上述研究成果对加速我国草原生态环境保护及促进羊草产业化发展、推动

畜牧业可持续发展具有现实意义。我们的研究受到科技部国家重点基础研究发展计划（973 计划）项目、中国科学院农业办公室项目、国家自然科学基金项目等的长期资助。希望本书的出版有助于读者对我国战略植物资源——羊草的研发有更加系统的了解。我们愿意把这些成果与大家分享，但是疏漏之处在所难免，敬请批评指正。

著 者

2015 年 6 月

目 录

第一章 羊草转录组测序及数据库建设	1
引言	1
第一节 研究材料、关键技术和方法	2
第二节 研究取得的重要进展	4
第三节 研究结论与讨论	18
第四节 小结与展望	19
参考文献	20
第二章 羊草刈割相关基因表达谱分析	22
引言	22
第一节 研究材料、关键技术和方法	23
第二节 研究取得的重要进展	25
第三节 研究结论与讨论	33
第四节 小结与展望	35
参考文献	35
第三章 羊草刈割伤口对BSA的响应	38
引言	38
第一节 研究材料、关键技术和方法	46
第二节 研究取得的重要进展	52
第三节 研究结论与讨论	67
第四节 小结与展望	71
参考文献	72
第四章 羊草DREB家族基因功能研究	79
引言	79
第一节 研究材料、关键技术和方法	80
第二节 研究取得的重要进展	90
第三节 研究结果与讨论	97
第四节 小结与展望	106
参考文献	106

第五章 羊草WRKY家族基因结构和功能分析	109
引言	109
第一节 研究材料、关键技术和方法	112
第二节 研究取得的重要进展	123
第三节 研究结论与讨论	133
第四节 小结与展望	136
参考文献	137
第六章 羊草新功能基因的克隆及功能研究	140
引言	141
第一节 研究材料、关键技术和方法	143
第二节 研究取得的重要进展	151
第三节 研究结论与讨论	173
第四节 小结与展望	176
参考文献	177
第七章 羊草对除草剂的抗性研究	182
引言	182
第一节 研究材料、关键技术和方法	184
第二节 研究取得的重要进展	190
第三节 研究结论与讨论	198
第四节 小结与展望	199
参考文献	199
第八章 羊草对水分的响应规律分析	201
引言	201
第一节 羊草群落蒸腾蒸散的变化规律	201
第二节 羊草群落对水分的需求规律	203
第三节 水分对羊草生长的影响	204
第四节 小结与展望	205
参考文献	205
第九章 羊草的水肥需求特性研究	207
引言	207
第一节 研究材料、关键技术和方法	208
第二节 研究取得的重要进展	211
第三节 研究结论与讨论	225
第四节 小结与展望	226

参考文献	227
第十章 羊草有性生殖研究进展	229
引言	229
第一节 羊草有性生殖器官的形成及发育	230
第二节 羊草有性生殖过程	232
第三节 羊草种子的形成及结实	234
第四节 羊草种子特性	235
第五节 小结与展望	237
参考文献	237
第十一章 施肥对羊草种子产量的影响	240
引言	240
第一节 研究材料、关键技术和方法	241
第二节 研究取得的重要进展	242
第三节 研究结论与讨论	250
第四节 小结与展望	251
参考文献	251
后记	253
研究工作照片	
彩图	

第一章 羊草转录组测序及数据库建设

摘要 羊草为异源四倍体 ($2n=4x=28$) 植物, 基因组较大, 约为 10 Gb 且杂合性较高。新一代测序技术的出现及快速发展为研究羊草这样一种基因组信息几乎为零的非模式植物提供了新的思路。近年来刘公社研究团队采用新一代 454 高通量测序技术对 5 个不同时期、不同组织和不同处理的样品进行了全转录组测序, 采用 Newbler 2.5 组装得到 87 214 条 Unigene 序列。通过对测序得到的 87 214 条 Unigene 与 NR 蛋白库和 Uniprot 蛋白库比对注释了 54 584 个基因; 通过对差异表达基因分析找到了 3024 个冷响应的基因; SSR 分析鉴定出 3597 个包含 EST-SSR 的基因。通过对羊草特异基因和禾本科特异基因的查找, 共鉴定出 19 954 个禾本科特异的基因和 12 811 个羊草特异的基因; 进化分析表明羊草在进化上与大麦和小麦的亲缘关系更近。此外, 根据生物信息学分析的结果, 构建了首个羊草转录组数据库, 该数据库网站收集了 952 328 条 EST 序列、32 416 条 Contig 序列、118 860 条 Singleton 序列以及其他转录组数据分析的结果, 提供了在线比对、序列下载、查找等功能, 极大地丰富了羊草基因资源数据, 为羊草优异基因的挖掘奠定了基础。

关键词 羊草; 454 高通量测序; 转录组; 数据库; 基因资源

引 言

羊草 [*Leymus chinensis* (Trin.) Tzvel] 作为一种兼具经济价值和生态价值的重要的禾本科牧草, 近十年来, 国内外研究者已经意识到挖掘羊草基因资源的重要性和迫切性。韩国的 Jin 等 (2006) 采集自然生长的植物叶组织经过 Na_2CO_3 胁迫处理构建 cDNA 文库, 并对羊草 998 个 cDNA 克隆进行测序, 得到了叶组织的 869 条 EST 和根组织的 773 条 EST。我国研究者利用抑制消减杂交技术 (suppression subtractive hybridization, SSH) 构建羊草盐碱胁迫消减文库, 通过测序得到了 1920 条序列, 并获得了与盐碱胁迫相关的基因, 如单脱氢抗坏血酸还原酶 (MDAR) 和脱水素 (dehydrin) 基因等 (解莉楠等, 2007)。孔祥军等 (2008) 通过运用 DDRT-PCR 技术, 从 Na_2CO_3 胁迫处理的羊草幼苗中分离到 22 个差异表达的基因片段。王丽娟等 (2009) 采用 SMART 技术, 构建了高质量的 cDNA 文库测序得到了 285 条 EST, 通过筛选得到 117 条非重复基因序列。上述的研究都采用了传统的测序手段, 然而传统的测序方法由于价格昂贵、通量小, 所获得的 EST 数量非常有限。

自 454 Life Sciences 公司首次推出了基于焦磷酸测序法的超高通量基因组测序系统以来,高通量测序技术迅速在生命科学研究的各个领域得到了极其广泛的应用。对基因组测序来讲,太大的基因组(>10 Gb)超出了目前 De novo 组装基因组软件对其内存的要求,客观条件上无法实现组装。杂合度对基因组组装的影响主要体现在不能合并姐妹染色体,从而造成组装后基因组大小较实际的基因组偏大。一般认为如果杂合度高于 0.5% 时组装有一定的难度,杂合度高于 1% 则很难组装出来。羊草是异源四倍体植物,共有 28 条染色体,基因组大小约 10 Gb 且杂合度较高,其基因组的公式是 $N_s N_s X_m X_m$, 其中 N_s 来自新麦草属,而第二个基因组 X_m 的起源尚未确定 (Vogel *et al.*, 1999; Sun *et al.*, 1995; Bödvarsdóttir and Anamthwat-Jónsson, 2003; Liu *et al.*, 2008)。过大的基因组和较高的杂合度使羊草基因组的组装变得非常困难,同时价格昂贵。因此,转录组测序技术为研究羊草这样一种基因组信息几乎为零的非模式植物提供了新的思路。吉林农业大学研究人员利用 454 测序技术,对盐碱胁迫处理后的羊草材料进行了测序,获得了大量的盐碱胁迫相关的基因 EST 序列 (Sun *et al.*, 2013)。

目前,已有很多专门针对一个物种基因组的网站,植物领域常用的有 TAIR 和 RGAP,而物种转录组的网站则更加普及 (D'Agostino *et al.*, 2007; Grafahrend-Belau *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2008; 2009; Dauchot *et al.*, 2009; Maheswari *et al.*, 2009)。已有研究人员利用第一代的测序技术对羊草进行转录组测序并获得了一些 EST 序列,但与其他作物种和模式植物相比,NCBI 数据库中羊草基因资源信息非常少,羊草基因数据库也未见报道。本章研究采用 454 高通量测序技术通过生物信息学的手段挖掘大量羊草基因资源,并对基因序列深入分析,构建首个羊草基因信息数据库,为羊草这一重要物种的研究提供丰富的基因信息资源,也为今后羊草分子生物学相关研究奠定基础。

第一节 研究材料、关键技术和方法

一、研究材料

454 测序选取的羊草材料是刘公社实验室研发的‘中科 2 号’羊草品种。该研究中共选取了 5 种不同的羊草样品进行测序。具体包括:

- (1) 在田间自然低温驯化后,进行 -40°C 低温胁迫处理的羊草芽样品。
- (2) 在田间自然低温驯化的羊草芽样品 (温度为 -15°C 左右)。
- (3) 在温室 25°C 左右培养出的生长旺盛的羊草的芽样品,作为对照材料。
- (4) 温室 25°C 左右培养的不同时期、不同组织的羊草混合样。
- (5) 温室 25°C 左右培养的羊草的幼穗。

将上述样品迅速取材后,用锡箔纸包裹,投入液氮中, -80°C 超低温冰箱保存。

二、关键技术和方法

(一) 羊草总 RNA 提取

对上述 5 种不同的羊草样品, 采用 Trizol 法进行总 RNA 的提取, 方法如下:

(1) 取 100 mg 样品于液氮中迅速研磨成粉末 (研钵预先用液氮预冷), 立刻加入 1 mL Trizol 试剂, 充分混匀, 转移到 1.5 mL RNase free 的离心管中;

(2) 室温静置 5 min 后, 加入 500 μ L 苯酚/氯仿/异戊醇 (体积比为 25:24:1, pH4.5), 剧烈振荡 15 s, 室温放置 3 min;

(3) 4℃, 12 000 r/min 离心 10~15 min, 样品分成 3 层, RNA 主要在上层的水相中, 转移水相到新的离心管中;

(4) 在得到的水相溶液中加入 200 μ L 新鲜氯仿, 剧烈振荡, 室温放置 2~3 min;

(5) 4℃, 12 000 r/min 离心 10 min;

(6) 将水相转移至新的离心管中, 加入等体积异丙醇沉淀 RNA, 混匀, 室温放置 10 min;

(7) 4℃, 12 000 r/min 离心 10 min, 弃上清。

(8) 加入 1 mL 70% 冰乙醇, 轻轻上下颠倒洗涤离心管壁, 4℃, 12 000 r/min 离心 5 min 重复一次;

(9) 小心弃去乙醇, 沉淀在室温晾干或真空干燥 5~10 min (RNA 样品不要过于干燥, 否则很难溶解);

(10) 加入 80 μ L DEPC 处理的双蒸水, 溶解 RNA (可选 55~60℃温育 10 min);

(11) 电泳检测, 并测 OD 值定量 RNA 浓度。

(二) 454 测序流程

对羊草 5 个不同的组织和处理的样品构建 5 个转录组测序文库。采用 454 测序平台对 5 个文库进行单端测序, 文库 1 和 5 采用的是 GS FLX 的普通试剂进行测序, 其他文库采用的是 GS FLX Titanium (钛试剂) 进行测序。

454 测序的基本原理: 在 DNA 聚合酶、ATP 硫酸化酶、萤光素酶和双磷酸酶的作用下, 将每一个 dNTP 的聚合与一次化学发光信号的释放偶联起来, 通过检测化学发光信号的有无和强度, 达到实时检测 DNA 序列的目的。

454 测序的流程:

(1) 文库的制备: 基因组 DNA/cDNA 片段化处理至 300~800 bp, 经末端修复与特异性接头连接等修饰后变性处理回收单链的 DNA。

(2) 乳液 PCR: 单链 DNA 文库被固定在 DNA 捕获磁珠上, 乳化, 形成油包水的混合物, 每个独特的片段在各自的微反应器里进行独立的扩增, 回收纯化。

(3) 测序反应: 携带 DNA 片段的磁珠被放入 PTP 板中供测序反应使用。