

doi:10.11733/j.issn.1007-0435.2026.03.009

引用格式:富贵,刘玉萍,苏旭,等.基于全长转录组的扇穗茅单拷贝核基因引物开发[J].草地学报,2026,34(3):829—839  
FU Gui, LIU Yu-ping, SU Xu, et al. Development of Single-copy Nuclear Genes Primer Based on Full-length Transcriptome for *Littledealea racemosa*[J]. Acta Agrestia Sinica, 2026, 34(3):829—839

## 基于全长转录组的扇穗茅单拷贝核基因引物开发

富 贵<sup>1,2,4</sup>, 刘玉萍<sup>1,3,4</sup>, 苏 旭<sup>1,3,4\*</sup>, 才让扎西<sup>1</sup>, 曲荣举<sup>1</sup>, 刘 涛<sup>1</sup>, 毛轩睿<sup>1</sup>

(1. 青海师范大学生命科学学院, 青海 西宁 810008; 2. 青海民族大学生态环境与资源学院, 青海 西宁 810007;  
3. 青海师范大学/青海省青藏高原生物多样性形成机制与综合利用重点实验室, 青海 西宁 810008;  
4. 青海师范大学/高原科学与可持续发展研究院, 青海 西宁 810016)

**摘要:**为探明扇穗茅(*Littledealea racemosa*)核基因单拷贝序列基本特征及筛选有效的单拷贝核基因分子标记,本研究基于扇穗茅三代全长转录组数据,利用OthorFinder软件进行了单拷贝同源基因的检索,并通过PCR扩增和群体检测实验,筛选出了10对扇穗茅单拷贝核基因分子标记引物。研究结果表明:扇穗茅转录组共检测到48 219个CDS编码区,每个转录本平均编码区为1.57个;基于转录组CDS氨基酸序列共检索到301条单拷贝核基因序列,最终筛选出10对扩增效果良好并具有种内变异的单拷贝核基因引物;扇穗茅64个个体在10对单拷贝核基因引物中均成功扩增,基因序列多态性存在广泛变异,分离位点数(S)大小为13~42,平均值为24.4,单倍型数(h)大小为16~32,平均值为23.7;平均核苷酸差异数(k)大小为2.275~16.497,平均值为7.686;单倍型多样性( $H_d$ )大小为0.776~0.896,平均值为0.841;核苷酸多样性( $\pi$ )大小为 $3.05 \times 10^{-3}$ ~ $15.61 \times 10^{-3}$ ,平均值为 $10.50 \times 10^{-3}$ ;Watterson参数( $\theta_w$ )大小介于 $3.27 \times 10^{-3}$ ~ $9.92 \times 10^{-3}$ ,平均值为 $6.21 \times 10^{-3}$ ;遗传分化结果显示,扇穗茅15个居群遗传变异主要存在于居群内;利用10个单拷贝核基因序列,构建的5个禾本科物种系统发育树系统发育关系一致。本研究开发的10对扇穗茅单拷贝核基因引物,可为后期扇穗茅属物种系统发育及资源保护利用等方面的研究提供更为丰富的候选标记。

**关键词:**扇穗茅;转录组;单拷贝核基因;系统发育

中图分类号:S543.9

文献标识码:A

文章编号:1007-0435(2026)03-0829-11

## Development of Single-copy Nuclear Genes Primer Based on Full-length Transcriptome for *Littledealea racemosa*

FU Gui<sup>1,2,4</sup>, LIU Yu-ping<sup>1,3,4</sup>, SU Xu<sup>1,3,4\*</sup>, CAIRANG Zha-xi<sup>1</sup>, QU Rong-ju<sup>1</sup>, LIU Tao<sup>1</sup>, MAO Xuan-rui<sup>1</sup>

(1. School of Life Sciences, Qinghai Normal University, Xining, Qinghai Province 810008, China; 2. College of Ecological Environmental and Resources, Qinghai Minzu University, Xining, Qinghai Province 810007, China; 3. Key Laboratory of Biodiversity Formation Mechanism and Comprehensive Utilization of the Qinghai-Xizang Plateau in Qinghai Province, Qinghai Normal University, Xining, Qinghai Province 810008, China; 4. Academy of Plateau Science and Sustainability, Qinghai Normal University, Xining, Qinghai Province 810016, China)

**Abstract:** To clarify the basic characteristics of single-copy nuclear gene sequences in *Littledealea racemosa* and obtain effective single-copy nuclear gene molecular markers, the single-copy homologous genes were identified using OthorFinder software based on third-generation full-length transcriptome data of *L. racemosa* in this study. And then through PCR amplification and population testing experiments, 10 pairs of single-copy nuclear gene molecular marker primers for *L. racemosa* were successfully developed. The results showed that a total of 48 219 CDS (coding sequence) regions were detected in the *L. racemosa* transcriptome, with an average of 1.57 coding regions per transcript. A total of 301 single-copy nuclear gene sequences were obtained based on the amino acid sequences of transcriptome CDS and finally, 10 pairs of single-copy nuclear gene primers were obtained, which

收稿日期:2025-05-06;修回日期:2025-06-16

基金项目:青海省自然科学基金面上项目:扇穗茅属种质资源遗传多样性研究及优异种质资源筛选(2026-ZJ-912M);2025年度青海省“昆仑英才·高端创新创业人才”项目资助

作者简介:富贵(1987-),男,汉族,甘肃天水人,副教授,主要从事青藏高原植物系统进化和物种适应性研究,E-mail: qhmdfg@163.com;

\*通信作者 Author for correspondence, E-mail: xusu8527972@126.com

demonstrated effective amplification performance and exhibited intraspecific variation. A total of 64 individuals of *L. racemosa* were successfully amplified through all 10 pairs of single-copy nuclear genes primers. The gene sequences exhibited extensive variation in polymorphism. The number of segregating sites ( $S$ ) ranged from 13 to 42, with an average of 24.4. The number of haplotypes ( $h$ ) ranged from 16 to 32, with an average of 23.7. The average number of nucleotide differences ( $k$ ) ranged from 2.275 to 16.497, with an average of 7.686. The haplotype diversity ( $H_d$ ) ranged from 0.776 to 0.896, with an average of 0.841. The nucleotide diversity ( $\pi$ ) ranged from  $3.05 \times 10^{-3}$  to  $15.61 \times 10^{-3}$ , with an average of  $10.50 \times 10^{-3}$ , and the Watterson's estimator ( $\theta_w$ ) ranged from  $3.27 \times 10^{-3}$  to  $9.92 \times 10^{-3}$ , with an average of  $6.21 \times 10^{-3}$ . The genetic differentiation results showed that the genetic variation of 15 populations of *L. racemosa* mainly existed within populations. Phylogenetic trees constructed using the 10 single-copy nuclear genes demonstrated congruent relationships among five Poaceae species. The 10 pairs of *L. racemosa* single-copy nuclear gene primers developed in this study, providing abundant candidate markers for future research on phylogeny, and resource conservation and utilization for *Littledalea* species.

**Key words:** *Littledalea racemosa*; Transcriptome; Single-copy nuclear genes; Phylogeny

在真核生物细胞内,核基因作为重要的遗传物质,携带有调控生物生长、发育与遗传的关键信息,能够编码多种具有不同重要功能的蛋白。核基因在物种间表现出显著的序列变异特征。序列变异能够完整保留双亲的遗传印记,因此,能够全面、精准地揭示物种复杂的演化历程与进化轨迹,成为解析生物进化的重要分子标记,为分子系统学研究提供了详实的信息基础<sup>[1-3]</sup>。核基因序列按照其序列重复程度可分为重复序列和单拷贝序列。单拷贝核基因(Single-copy nuclear genes, SCNGs)是指基因组中仅存在一个或少数几个拷贝的核基因序列,因其进化速率适中、保守性较强,且能够有效区分直系同源(Orthologs)和旁系同源(Paralogs),近年来在系统发育、物种界定、遗传多样性分析等领域展现出重要应用价值。SCNGs作为一种核蛋白编码基因,受重组影响较小,能够长时间保留双亲等位基因,其包含的遗传信息丰富<sup>[4-5]</sup>,Sang早在2002年就指出,这种特性对于揭示物种杂交事件以及多倍体起源等复杂问题,提供了有力的支持<sup>[6]</sup>。因此,SCNGs已在近缘物种,尤其是属内系统发育、物种界定及物种形成研究中被大量使用<sup>[2,7-8]</sup>。随着二代测序技术的迅猛发展,非模式植物的转录组和全基因组测序变得更加简便,这为研究核基因信息提供了大量的基础数据。通过转录组和基因组数据,进行SCNGs标记筛选,大大提高了SCNGs的筛选效率<sup>[9]</sup>。譬如,Huang等<sup>[10]</sup>基于转录组数据,开发出了适用于地黄属(*Rehmannia*)物种系统发育研究的12对SCNGs引物。付义等<sup>[11]</sup>基于疏花软紫草(*Arnebia szechenyi*)转录组数据筛选出大量具稳定性和较高多态性丰富的SCNGs序列,这些序列能够有效地应用于探讨软紫草属(*Arnebia*)植物的系统进化和物种形成研究。Fu等人<sup>[12]</sup>在其研究中,运用浅层基因组测序技术,成

功获取了杜鹃花属(*Rhododendron*)145个物种的基因组数据,测序深度达1.5~3.5倍。在此基础上,他们借助PhyloCapture技术,对10个低拷贝核基因进行了捕获,并将这些基因数据用于深入探究杜鹃花属植物的分类与进化研究中,为该领域的研究提供了重要的数据支持和新的研究思路。

扇穗茅(*Littledalea racemosa*)作为禾本科(Poaceae)雀麦族(Bromeae)的特有属种,广泛分布于青藏高原海拔2900~5500 m的高寒生态区。该物种在河谷冲积滩、高山灌丛草甸等极端生境中表现出优异的生态适应性<sup>[13]</sup>,其发达的根系兼具防风固沙与水土保持功能。作为高寒牧区优质饲草,扇穗茅不仅具备高营养价值,更因其突出的抗逆性状(耐寒、抗旱、抗病、抗风蚀)成为高寒草甸生态系统与牧草遗传改良的重要种质资源<sup>[14]</sup>。1896年扇穗茅属建立之初,该属只包含一个物种藏扇穗茅(*L. tibetica*)<sup>[15]</sup>,随后,诸多学者基于形态学特征对该属物种进行了分类研究<sup>[13,16-18]</sup>,最终将扇穗茅属物种划分为4个种,扇穗茅、藏扇穗茅、寡穗茅(*L. racemosa*)和帕米尔扇穗茅(*L. alaica*)<sup>[13]</sup>。但周永辉<sup>[19]</sup>基于形态学和分子生物学新近研究表明,原4个扇穗茅属物种可合并成为2个种,扇穗茅和寡穗茅。此后,有研究者对藏扇穗茅叶绿体基因组序列<sup>[20]</sup>,扇穗茅属3个物种(寡穗茅、藏扇穗茅、扇穗茅)生态位模拟<sup>[21]</sup>,扇穗茅染色体核型数目、特征和进化趋势<sup>[22]</sup>,进行了相关研究,但关于扇穗茅遗传多样性、遗传结构、系统进化方面的研究还未见报道。

基于此,本研究拟基于已获得的扇穗茅三代全长转录组数据,开发出适用于扇穗茅属物种群体研究的SCNGs,以期为扇穗茅种质资源遗传多样性、物种界定及空间遗传结构等方面研究提供有效的技术手段,为其种质资源评价,系统进化及环境适应性策略研究提供科学依据,为后续扇穗茅属物种的应用和保护工作提供保障。

1 材料与方法

1.1 供试材料

本研究共选取 15 个天然分布的扇穗茅居群样本,每个居群选择 3~5 个个体,共计 64 个个体,用于 SCNGs 引物多态性分析,在 15 个居群中

选取来自 12 个不同居群且地理距离分布较远的样本各 1 个,用于 SCNGs 引物初筛。群体采样时,居群内个体之间的距离大于 100 m,居群间分布距离大于 20 km,居群间要有明显的河流、道路、山脉等天然地理屏障隔离。样本信息详见表 1。

表 1 供试材料及原产地详细信息  
Table 1 Materials and detailed information of origins

| 居群编号<br>Population<br>code | 采样地<br>Sampling location                          | 纬度<br>Latitude (N) | 经度<br>Longitude (E) | 海拔<br>Altitude/m | 样本数量<br>Sample<br>size |
|----------------------------|---------------------------------------------------|--------------------|---------------------|------------------|------------------------|
| POP1                       | 青海省兴海县 Xinghai County, Qinghai Province           | 35°29'26.6"        | 99°29'57.3"         | 4455             | 5                      |
| POP7                       | 青海省玛多县 Maduo County, Qinghai Province             | 35°15'04.7"        | 98°58'29.2"         | 4219             | 3                      |
| POP13                      | 青海省玛多县 Maduo County, Qinghai Province             | 34°49'23.5"        | 99°02'32.3"         | 4676             | 5                      |
| POP17                      | 青海省玛多县 Maduo County, Qinghai Province             | 34°34'58.9"        | 99°08'03.6"         | 4422             | 5                      |
| POP20                      | 青海省玛沁县 Maqing County, Qinghai Province            | 34°30'13.1"        | 99°10'09.4"         | 4363             | 3                      |
| POP27                      | 青海省玉树市 Yushu City, Qinghai Province               | 33°07'07.9"        | 96°44'13.8"         | 4257             | 3                      |
| POP33                      | 青海省曲麻莱县 Qumalai County, Qinghai Province          | 34°21'55.2"        | 95°40'51.5"         | 4468             | 5                      |
| POP36                      | 青海省曲麻莱县 Qumalai County, Qinghai Province          | 35°05'57.0"        | 93°59'20.4"         | 4508             | 4                      |
| POP40                      | 青海省格尔木市 Geermu City, Qinghai Province             | 35°38'19.2"        | 94°04'09.4'         | 4772             | 5                      |
| POP47                      | 青海省格尔木市 Geermu City, Qinghai Province             | 34°57'21.3"        | 92°57'09.9"         | 4558             | 5                      |
| POP50                      | 青海省格尔木市 Geermu City, Qinghai Province             | 34°47'44.5"        | 92°54'26.0"         | 4664             | 4                      |
| POP54                      | 青海省格尔木市 Geermu City, Qinghai Province             | 34°36'25.3"        | 92°46'31.7"         | 4694             | 5                      |
| POP61                      | 青海省格尔木市 Geermu City, Qinghai Province             | 34°09'13.9"        | 92°22'55.0"         | 4644             | 3                      |
| POP68                      | 青海省格尔木市 Geermu City, Qinghai Province             | 33°48'23.8"        | 92°18'15.6"         | 4607             | 4                      |
| POP70                      | 西藏自治区类乌齐县 Riwoqê County, Xizang Autonomous Region | 30°51'14.2"        | 96°37'19.0"         | 4552             | 5                      |
| 合计 Total                   |                                                   |                    |                     |                  | 64                     |

1.2 试验方法

(1)扇穗茅转录组 CDS 预测

基于课题组通过三代全长转录组测序技术,获得的扇穗茅转录组数据(SRA data: PRJNA1157427),使用 TransDecoder 软件(<https://github.com/TransDecoder/TransDecoder/releases>)进行扇穗茅转录组蛋白质编码序列(Coding sequence, CDS)预测,首先利用 TransDecoder. LongOrfs 进行开放阅读框搜索并获取长读码框序列,默认参数为 100 个氨基酸。使用蛋白质比对软件 DIAMOND 对上一步输出的 transcripts. fasta. transdecoder. pep 在蛋白数据库中进行搜索、比对、寻找同源证据支持,利用 TransDecoder. Predict 预测扇穗茅转录组的编码序列。

(2)SCNGs 获取

基于扇穗茅转录组获得的 CDS 序列,得到 CDS 对应的氨基酸序列(Amino acid sequences, aa),同时选取 3 个禾本科物种氨基酸序列为参考序列,其中二穗短柄草(*Brachypodium distachyon*)和芨芨草(*Achnatherum splendens*)全基因组蛋白序列分别下载自 NCBI(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>)(GCF\_000005505.3)<sup>[23]</sup>和国家基因组数据库(NGDC)(PRJCA006214)<sup>[24]</sup>,沙鞭(*Psam-*

*mochloa villosa*)氨基酸序列为课题组基于转录组获得的 CDS 氨基酸序列<sup>[25]</sup>,每个物种一个文件,并将所有 fasta 文件存于一个目录。运行 OthorFinder 软件<sup>[26]</sup>进行单拷贝同源基因的检索。

(3)样本 DNA 提取

本研究样本 DNA 提取采用改良的 CTAB 法进行<sup>[27]</sup>,对 15 个居群,64 个样本进行 DNA 提取。

(4)SCNGs 引物筛选

基于 OthorFinder 软件运行结果,获得单拷贝的直系同源群序列(Single copy orthologue sequences)文件,选取文件中筛选出的 SCNGs 氨基酸序列,利用 MEGA11 软件<sup>[28]</sup>进行同源性比对,选取同源性较高的 60 个氨基酸序列,对应至相应的转录组序列,利用 Primer Premier 5 软件<sup>[29]</sup>进行引物设计,设计的引物送至北京六合华大基因进行合成。选取 12 个地理距离较远的居群个体进行 PCR 扩增,PCR 扩增程序如下所示,预变性:94.0℃,5 min;变性:94.0℃,50 s;退火:60℃,1 min;延伸:72℃,1 min,进行 36 个循环扩增;最后,72.0℃再延伸 10 min。扩增产物放置 4℃进行保存,扩增成分主要包括,缓冲液,dNTP,上下游引物组,Taq DNA 聚合酶,DNA 模板,各成分所需量如表 2 所示。利用 1% 琼脂糖凝胶电泳进行检测,剔除无条带或有杂带、不

能稳定扩增的引物,最终选择条带单一,且目的片段大小正确的 SCNGs 引物,基于上述筛选出的 SCNGs 引物,进行最适退火温度筛选,设置温度梯度,最终确定筛选出引物的最佳退火温度。

#### (5) SCNGs 群体检测

为验证引物的多态性和稳定性,我们对 10 个 SCNGs 序列进行了群体检测。基于筛选出的扩增效率较高,且扩增条带单一的 10 对 SCNGs 引物,分别对扇穗茅 15 个居群共计 64 个个体进行 PCR 扩增,扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳进行检测,若条带清晰,且无杂带,片段大小合适,则送至北京六合华大基因科技有限公司进行测序,基于测序结果,对 SCNGs 序列特征进行分析。

表 2 PCR 扩增反应体系

Table 2 Amplification reaction system of PCR

| 试剂 Reagent                                                              | 容量<br>Volume/ $\mu\text{L}$ |
|-------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|
| 5 $\times$ Primer STARTM Buffer ( $\text{Mg}^{2+}$ plus)                | 2.5                         |
| dNTP Mixture                                                            | 2.0                         |
| 上游引物 Upstream primer                                                    | 1.0                         |
| 下游引物 Downstream primer                                                  | 1.0                         |
| DNA 模板 DNA template ( $100 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ )         | 2.0                         |
| Taq DNA 聚合酶 Taq DNA polymerase ( $5 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ) | 0.25                        |
| ddH <sub>2</sub> O                                                      | 16.25                       |

#### (6) SCNGs 序列特征分析

利用 MEGA11 软件 (<https://www.megasoftware.net/>),基于测序所获得的样本原始序列色谱峰图进行序列位点校对,其中核基因序列的双峰位点按照 IUPAC 编码标准录入 (R=A/G; Y=C/T; K=G/T; M=A/C; S=C/G; W=A/T)。序列文

件以 Fasta 格式保存;基于 DNAsp 5.10<sup>[30]</sup> 中的 UNPHASE/Genotype 序列模式对核基因序列进行拆分,并计算以下多样性参数,分离位点数 (segregating sites,  $S$ )、核苷酸多样性 (nucleotide diversity,  $\pi$ )、Watterson 核苷酸多样性参数 ( $\theta_w$ )、单倍型多样性 (Haplotype diversity,  $H_d$ )、平均核苷酸差异数 (average number of nucleotide differences,  $k$ )。

#### (7) SCNG 遗传分化和系统发育分析

基于 10 个 SCNGs 扩增序列,使用软件 Arlequin v3.5<sup>[31]</sup> 对 15 个扇穗茅居群进行了分子遗传方差分析,并计算了遗传分化系数 (Within-population differentiation coefficient,  $F_{st}$ )。本研究选择居群 1 (POP1) 中的 1-1 样本 SCNGs 扩增序列代表扇穗茅 SCNGs 序列,同时,在 NCBI 数据库中进行检索和序列同源比对,从而获得同源性较高的 10 个 SCNGs 相关物种的序列信息,并从中选择 4 个禾本科植物,分别为节节麦 (*Aegilops tauschii*),小麦 (*Triticum aestivum*),野生二粒小麦 (*Triticum dicoccoides*) 和水稻 (*Oryza sativa*),下载对应的 10 个单拷贝基因 (表 3);采用 MEGA11 软件中的 MAFFT 模块进行序列比对,去除两端未对齐的碱基位点。通过 MEGA11 软件 Phylogenetic Analysis 模块进行数据分析,利用最大似然法 (Maximum Likelihood),采用 HKY (Hasegawa-Kishino-Yano model) 核苷酸替代模型,设置 Bootstrap 检验设置 1000 次抽样,进行系统发育树的构建,利用 FigTree v1.4.4 (<https://github.com/rambaut/figtree/releases/tag/v1.4.4>) 对系统发育树进行可视化。

表 3 4 个禾本科植物 10 个 SCNGs 序列存取编号

Table 3 Accession numbers of 10 single-copy nuclear gene sequences from four Poaceae plants

| 序列编号<br>Sequences code | 节节麦<br><i>Aegilops tauschii</i> | 小麦<br><i>Triticum aestivum</i> | 野生二粒小麦<br><i>Triticum dicoccoides</i> | 稻米<br><i>Oryza sativa</i> |
|------------------------|---------------------------------|--------------------------------|---------------------------------------|---------------------------|
| S41                    | XM_020292522.3                  | XM_044506695.1                 | XM_037569834.1                        | AK068218.1                |
| S43                    | XM_020333661.3                  | XM_044501464.1                 | XM_037550349.1                        | NM_001401730.1            |
| S47                    | XM_040403410.2                  | XM_044482846.1                 | XM_037555630.1                        | AK064858.1                |
| S48                    | XM_020306681.3                  | XM_044569115.1                 | XM_037606898.1                        | XM_015785883.3            |
| S77                    | XM_020291771.2                  | AK335795.1                     | XM_037569897.1                        | AK102685.1                |
| S78                    | XM_020300432.3                  | XM_044495377.1                 | XM_037559295.1                        | XM_015765792.3            |
| S82                    | XM_015795672.3                  | XM_044532812.1                 | XM_037585383.1                        | XM_045228914.1            |
| S86                    | XM_045228914.1                  | XM_044532812.1                 | XM_037585383.1                        | XM_015795672.3            |
| S87                    | XM_020308370.3                  | XM_044555982.1                 | XM_037596165.1                        | NM_001409352.1            |
| S93                    | XM_020291052.3                  | XM_044541652.1                 | XM_037585649.1                        | AK105990.1                |

## 2 结果与分析

### 2.1 转录组 CDS 编码区预测

利用 TransDecoder 软件对扇穗茅转录组 30 624 个高质量转录本进行 CDS 预测,识别长度设置为至

少为 100 个氨基酸的开放阅读框。最终获得 48 219 个 CDS 编码区,每个转录本平均编码区为 1.57,对 CDS 序列长度进行了统计,CDS 总长度为 5 678 7876 bp,最小长度为 258 bp,最大长度为 8298 bp,CDS 序列长度集中分布在 0~3000 bp 之

间,而大于 6000 bp 的 CDS 数量较少,仅为 75 个,占总 CDS 序列的 0.15%(图 1)。

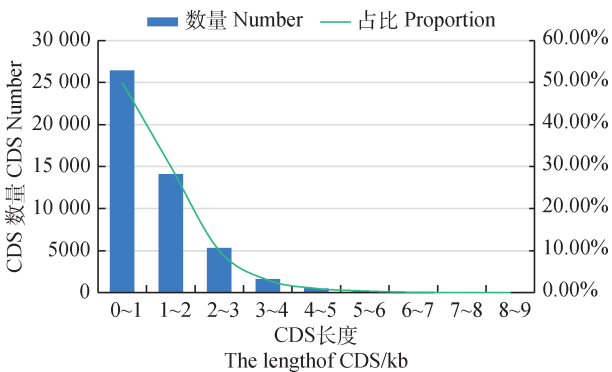


图 1 CDS 序列长度分布统计

Fig. 1 The statistics of CDS sequence length distribution statistics

2.2 SCNGs 引物筛选

基于扇穗茅 CDS 氨基酸序列和 3 个禾本科物种

氨基酸序列,通过运行 OthorFinder 软件共检索到 SCNGs 301 条,对筛选到的 SCNGs 进行同源比对后筛选出 100 条氨基酸序列,对应至扇穗茅转录组序列进行引物设计,参照引物设计原则和标准,用软件 Primer Premier 5 和 Oligo7 设计引物并进行评价后,共合成了 100 对 SCNGs 引物。利用随机选取的 12 个地理距离较远的个体进行了引物初筛,扩增成功的样本每对引物随机选出 1 个个体进行测序,测序结果和目标片段进行比对,确保扩增成功的片段为目的片段,为提高扩增质量,我们对筛选出的引物进行了最佳退火温度的筛选,最初退火温度设置为 60℃,选择 5 个梯度,通过判断扩增条带的质量,确定最佳退火温度(图 2-3)。最终筛选出 10 对扩增效果良好并具有种内变异的 SCNGs 引物,通过 NCBI 序列同源比对,选取同源性最高的注释片段,对筛选出的 SCNGs 进行了功能预测,引物信息详见表 4。

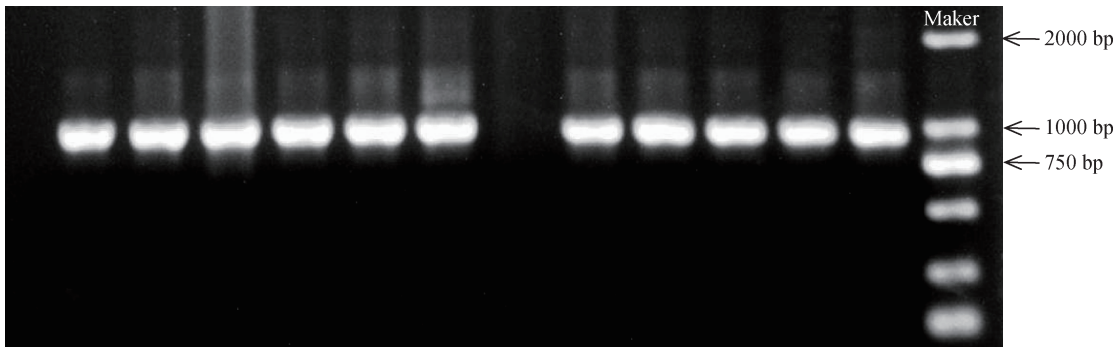


图 2 41 号 SCNG 序列凝胶电泳图

Fig. 2 The diagram of gel electrophoresis for No. 41 single-copy nuclear gene

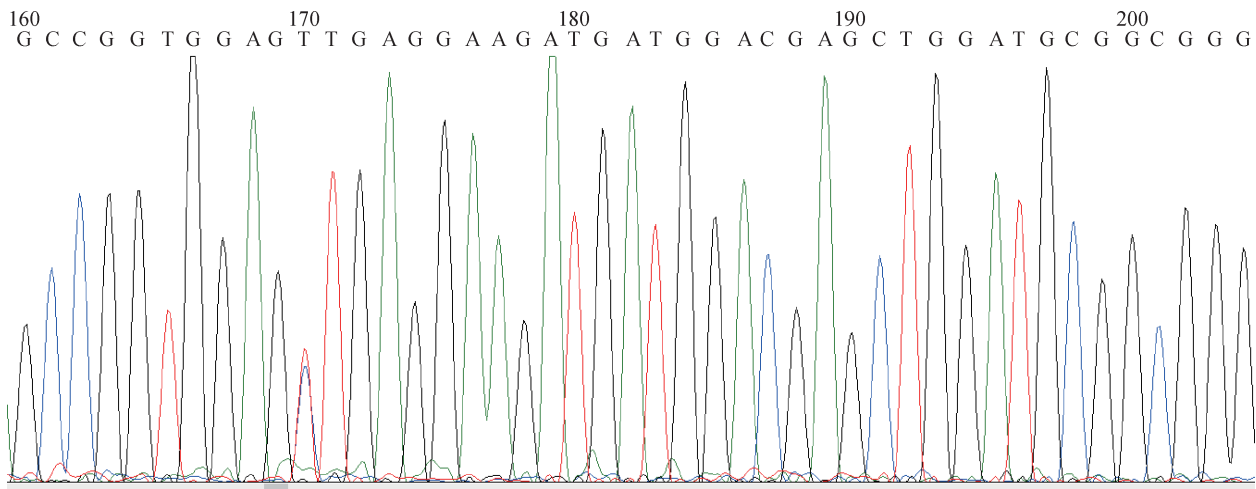


图 3 41 号 SCNG 测序峰图

Fig. 3 The Sequencing peak map of No. 41 single-copy nuclear gene markers

表 4 扇穗茅 10 对 SCNGs 引物序列信息

Table 4 Sequence information of 10 pairs of single copy nuclear gene primers for *L. racemosa*

| 引物编号<br>Primer code | 引物信息<br>Primer information                                                                                                           | 片段长度<br>The size of fragment/bp | T <sub>m</sub> /<br>℃ |
|---------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|-----------------------|
| S41                 | F:5'TTCAGTGAGCGGTGGAAGAGCGTGTT3'<br>R:5'CGGATGAGGCGGACGCAGTTGAT3'                                                                    | 712-750                         | 61.5                  |
| Function            | U-box domain-containing protein 75-like (LOC123085108), mRNA                                                                         |                                 |                       |
| S43                 | F:5'GCTCTTCAGCCGCACGCAGTTTC3'<br>R:5'CCCTTGTTTCCTTTCCACCCACCAC3'                                                                     | 699-768                         | 65.5                  |
| Function            | RAP domain-containing protein, chloroplastic-like (LOC123060241), mRNA                                                               |                                 |                       |
| S47                 | F:5'CTCCACCGCATCGCCAAGA3'<br>R:5'CGACAGTGTAACCATCCACCGTAT3'                                                                          | 850-912                         | 62.5                  |
| Function            | cytochrome b561, DM13 and DOMON domain-containing protein At5g54830-like (LOC123149465), mRNA                                        |                                 |                       |
| S48                 | F:5'GACAAGGAGGACCAGGGCAGGAT3'<br>R:5'CCAAGCCGCTCAGCAGAAGGAT3'                                                                        | 853-899                         | 64.5                  |
| Function            | heat shock 70 kDa protein 8-like (LOC123085156), mRNA                                                                                |                                 |                       |
| S77                 | F:5'AGGAGCAATCAAGGAGCACG3'<br>R:5'ACTTCGCATCTGACAAGCACTG3'                                                                           | 782-820                         | 60.5                  |
| Function            | anaphase-promoting complex subunit 8-like (LOC123145048), mRNA                                                                       |                                 |                       |
| S78                 | F:5'TTCAGGCTCAAATAGCAACCG3'<br>R:5'TTCAGGACCAGTGTAATCCAAGAGT3'                                                                       | 786-820                         | 57                    |
| Function            | uncharacterized LOC123071794 (LOC123071794), mRNA                                                                                    |                                 |                       |
| S82                 | F:5'TCGGATTTCGGAAGGGAC3'<br>R:5'TCATTGTAGTAATCATCATAAGGCAC3'                                                                         | 783-810                         | 57                    |
| Function            | dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component 4 of pyruvate dehydrogenase complex, chloroplastic-like (LOC123111930), mRNA |                                 |                       |
| S86                 | F:5'GGTGCGGCGTCCGTTCAAA3'<br>R:5'CATCCTCCAACACAGGCGTAAGAAG3'                                                                         | 956-1031                        | 62                    |
| Function            | dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component 4 of pyruvate dehydrogenase complex, chloroplastic-like (LOC123111930), mRNA |                                 |                       |
| S87                 | F:5'ATCTCCGCAACCTCCACCTCA3'<br>R:5'CCACCTTCCCTGTCTCAATGTCAA3'                                                                        | 852-876                         | 60.5                  |
| Function            | protein CYPRO4-like (LOC123136574), mRNA                                                                                             |                                 |                       |
| S93                 | F:5'GCTCGGGACCTTCAAATCCAACG3'<br>R:5'GGTTTCCCCACCTCTGTGCCTA3'                                                                        | 632-651                         | 62                    |
| Function            | probable CCR4-associated factor 1 homolog 7 (LOC123121637), mRNA                                                                     |                                 |                       |

2.3 SCNGs 验证

(1) 序列多态性分析

为进一步验证所筛选出 10 对 SCNGs 引物的通用性和扩增效率,基于 15 个居群 64 个个体对筛选出的 10 对 SCNGs 引物进行了 PCR 扩增,64 个个体在 10 对 SCNGs 引物下均成功扩增,10 对 SCNGs 多态性参数存在广泛变异,分离位点数(*S*)大小介于 13~42 之间,平均值为 24.4;单倍型数(*h*)大小介于 16~32 之间,平均值为 23.7;平均核苷酸差异数(*k*)大小介于 2.275~16.497 之间,平均值为 7.686;单倍型多样性(*H<sub>d</sub>*)大小介于 0.776~0.896 之间,平均值为 0.841;核苷酸多样性( $\pi$ )大小介于  $3.05 \times 10^{-3}$ ~ $15.61 \times 10^{-3}$  之间,平均值为  $10.50 \times 10^{-3}$ ;Watterson 参数( $\theta_w$ )大小介于  $3.27 \times 10^{-3}$ ~ $9.92 \times 10^{-3}$  之间,平均值为  $6.21 \times 10^{-3}$ 。S47 引物核苷酸多态性最高,各多态性参数明显高于其他引物,S77 和 S86 相较其他引物表现出较低的核苷酸多态性,各引物扩增序列多态性参数值详见表 5。

表 5 扇穗茅 10 对 SCNGs 群体多态性

Table 5 Polymorphism of 10 pairs of single copy nuclear gene primers for *L. racemosa*

| 引物编号<br>Primer code | <i>S</i> | <i>h</i> | <i>k</i> | <i>H<sub>d</sub></i> | $\pi$<br>( $\times 10^{-3}$ ) | $\theta_w$<br>( $\times 10^{-3}$ ) |
|---------------------|----------|----------|----------|----------------------|-------------------------------|------------------------------------|
| S41                 | 31       | 22       | 11.216   | 0.843                | 15.14                         | 7.71                               |
| S43                 | 25       | 27       | 6.357    | 0.876                | 8.31                          | 6.02                               |
| S47                 | 42       | 32       | 16.497   | 0.890                | 21.15                         | 9.92                               |
| S48                 | 35       | 32       | 12.507   | 0.855                | 15.61                         | 8.05                               |
| S77                 | 15       | 19       | 2.373    | 0.871                | 3.05                          | 3.56                               |
| S78                 | 18       | 16       | 6.056    | 0.776                | 8.48                          | 4.65                               |
| S82                 | 20       | 19       | 7.906    | 0.783                | 11.56                         | 5.39                               |
| S86                 | 13       | 18       | 2.275    | 0.896                | 3.11                          | 3.27                               |
| S87                 | 15       | 23       | 4.772    | 0.843                | 6.21                          | 3.60                               |
| S93                 | 30       | 29       | 6.899    | 0.873                | 12.36                         | 9.91                               |
| 平均 Mean             | 24.4     | 23.7     | 7.686    | 0.841                | 10.50                         | 6.21                               |

注:*S*,分离位点数;*h*,单倍型数;*k*,平均核苷酸差异数;*H<sub>d</sub>*,单倍型多样性; $\pi$ ,核苷酸多样性; $\theta_w$ ,Watterson 参数

Note: *S*, Segregating sites; *h*, Number of haplotype; *k*, Average number of nucleotide differences; *H<sub>d</sub>*, Haplotype diversity;  $\pi$ , Nucleotide diversity;  $\theta_w$ , Watterson parameter

(2) 遗传分化分析

为对扇穗茅群体遗传变异来源和遗传分化进行

分析,本研究基于 SCNGs 数据,对 15 个居群 64 个扇穗茅个体,基于 Arlequin 软件进行了 AMOVA 分子变异方差分析,研究结果显示,10 个 SCNGs 序列所揭示的 15 个扇穗茅居群遗传变异组成相似,主要来源于居群内个体之间,居群内遗传变异占总变异的平均值为 95.42%,居群间遗传变异仅占总变异的

4.58%。10 个 SCNGs 序列遗传分化指数值为  $-0.0812\sim 0.2352$ ,其中 S41,S47,S78,S82,S87 和 S93 6 个 SCNGs 序列  $F_{st}$  值呈不显著负值;S43,S77 和 S86 呈显著正值,但遗传分化指数均较小,15 个扇穗茅居群存在较低程度的遗传分化,10 个 SCNGs 序列在进化程度上表现出差异性(表 6)。

表 6 15 个扇穗茅居群分子变异方差分析

Table 6 Analysis of molecular variance for fifteen populations of *Littledealea racemosa*

| 引物编号<br>Primer code | 变异来源<br>Source of variation | 自由度<br>df | 方差总和<br>Sum of squares | 变异组成<br>Variance components | 变异所占百分比<br>Percentage of variation/% | 遗传分化<br>系数 Fixation index |
|---------------------|-----------------------------|-----------|------------------------|-----------------------------|--------------------------------------|---------------------------|
| S41                 | 居群间 Among populations       | 14        | 52.929                 | -0.2414 Va                  | -4.32                                | $F_{st} = -0.0432$        |
|                     | 居群内 Within populations      | 113       | 659.267                | 5.8342 Vb                   | 104.32                               |                           |
| S43                 | 居群间 Among populations       | 14        | 124.914                | 0.7587 Va                   | 23.52                                | $F_{st} = 0.2352^{**}$    |
|                     | 居群内 Within populations      | 113       | 278.750                | 2.4668 Vb                   | 76.48                                |                           |
| S47                 | 居群间 Among populations       | 14        | 85.204                 | -0.2855 Va                  | -3.47                                | $F_{st} = -0.0347$        |
|                     | 居群内 Within populations      | 113       | 962.242                | 8.5154 Vb                   | 103.47                               |                           |
| S48                 | 居群间 Among populations       | 14        | 115.877                | 0.2672 Va                   | 4.26                                 | $F_{st} = 0.0426$         |
|                     | 居群内 Within populations      | 113       | 678.342                | 6.0030 Vb                   | 95.74                                |                           |
| S77                 | 居群间 Among populations       | 14        | 46.295                 | 0.2800 Va                   | 23.26                                | $F_{st} = 0.2326^{**}$    |
|                     | 居群内 Within populations      | 113       | 104.408                | 0.9240 Vb                   | 76.74                                |                           |
| S78                 | 居群间 Among populations       | 14        | 23.180                 | -0.1813 Va                  | -6.01                                | $F_{st} = -0.0601$        |
|                     | 居群内 Within populations      | 113       | 361.367                | 3.1979 Vb                   | 106.01                               |                           |
| S82                 | 居群间 Among populations       | 14        | 21.497                 | -0.3193 Va                  | -8.12                                | $F_{st} = -0.0812$        |
|                     | 居群内 Within populations      | 113       | 480.542                | 4.2526 Vb                   | 108.12                               |                           |
| S86                 | 居群间 Among populations       | 14        | 39.817                 | 0.2254 Va                   | 19.57                                | $F_{st} = 0.1957^{**}$    |
|                     | 居群内 Within populations      | 113       | 104.675                | 0.9263 Vb                   | 80.43                                |                           |
| S87                 | 居群间 Among populations       | 14        | 31.507                 | -0.0179 Va                  | -0.75                                | $F_{st} = -0.0075$        |
|                     | 居群内 Within populations      | 113       | 271.508                | 2.4027 Vb                   | 100.75                               |                           |
| S93                 | 居群间 Among populations       | 14        | 40.353                 | -0.0749 Va                  | -2.17                                | $F_{st} = -0.0217$        |
|                     | 居群内 Within populations      | 113       | 397.725                | 3.5197 Vb                   | 102.17                               |                           |

注:\*\* $P < 0.01$  为极显著

Note:\*\* $P < 0.01$  indicates highly significant

2.4 SCNGs 系统进化研究

基于 10 个 SCNGs,利用 MEGA11 软件构建的 5 个禾本科物种系统发育树结果表明,10 个 SCNGs 在 5 个禾本科物种中系统发育关系一致。稻米单独形成一个进化分支,另一分支由扇穗茅、节节麦、小麦和野生二粒小麦构成,扇穗茅单独形成一个分支和节节麦、小麦和野生二粒小麦构成的亚支形成姐妹分支,而且 Bootstrap(BP)值均大于 80,分支支持率较高。小麦、野生二粒小麦和节节麦三个物种之间的亲缘关系在 10 对 SCNGs 核基因中表现出差异性,如在 S41 SCNGs 片段中,节节麦和野生二粒小麦亲缘关系较近(BP=62),而 S43 SCNGs 系统发育显示,节节麦和小麦呈现出更近的亲缘关系,而且分支支持率较高(BP=99),但基于 S48 SCNGs 构建的系统发育树又不同于以上两种情形,野生二粒小麦和小麦呈现出较近的亲缘关系(BP=99)(图 4)。

3 讨论

一直以来,叶绿体和线粒体基因序列在物种系统发育研究中发挥着很重要的作用,但其均为单亲遗传,尤其植物种间自然杂交发生率高,所以所包含的遗传信息有限,并不能全面揭示物种间的系统发育关系和动态进化历史<sup>[2]</sup>。SCNGs 因其进化速率适中、保守性较强,且能够有效区分直系同源和旁系同源基因,近年来在系统发育、物种界定、遗传多样性分析等领域展现出重要的应用价值。随着测序技术的不断发展和测序成本的下降,转录组测序在植物分子生物学研究中已经普及<sup>[32-34]</sup>,转录本中的序列大多为蛋白编码基因,且包含大量变异位点信息,基于转录组开发出的分子标记相对保守,序列变异稳定,因此被广泛用于 SCNGs 标记筛选<sup>[35-37]</sup>。大多数被子植物中的单拷贝直系同源基因具有同源性,因此,可

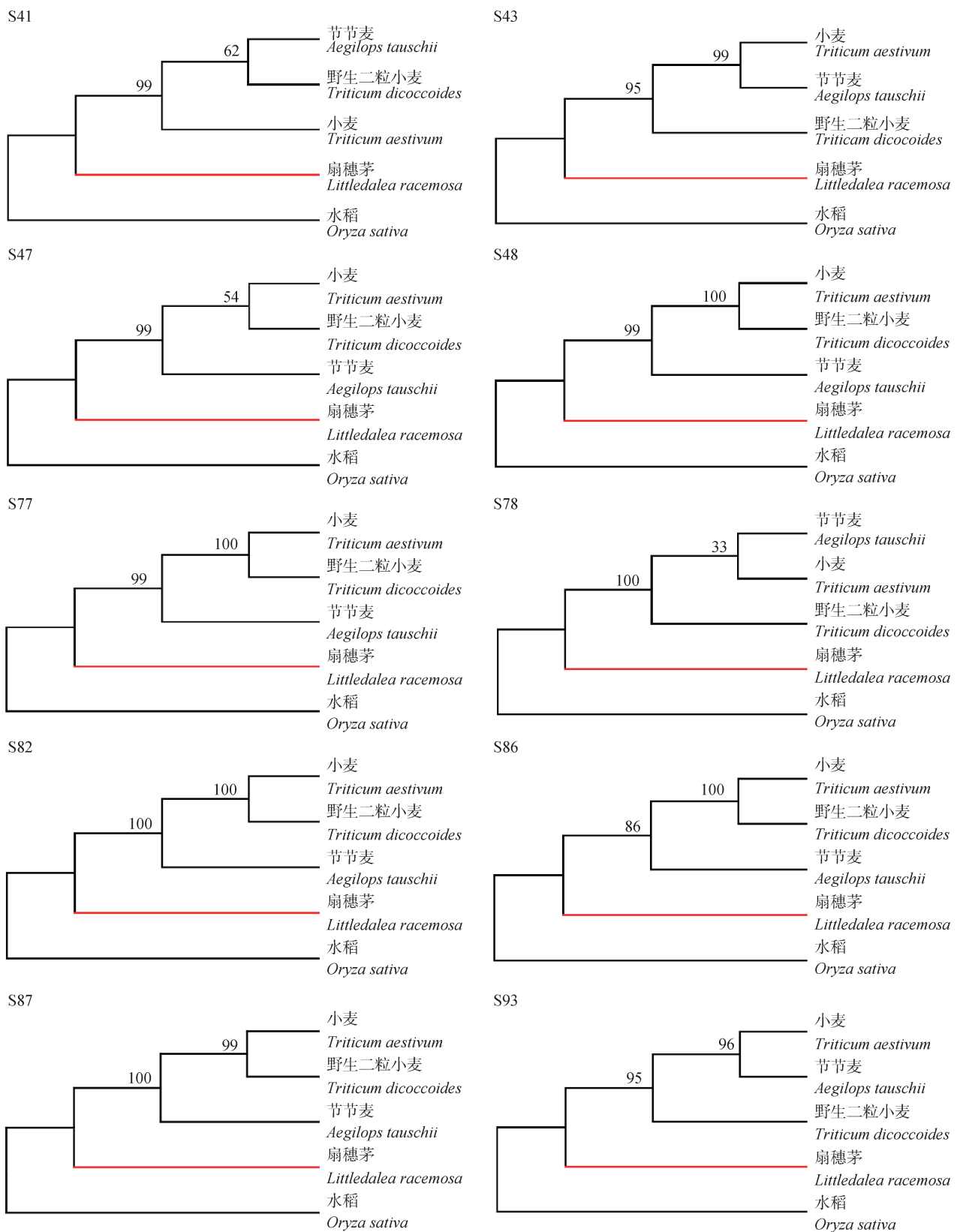


图 4 基于 10 个 SCNGs 序列构建的 5 个种的系统发育关系

Fig. 4 Phylogenetic relationships of five species generated from the ten single-copy nuclear gene sequences

以利用物种转录本 CDS 编码的氨基酸序列和已公布的其他亲缘关系较近的物种基因组编码的氨基酸序

列进行比对,筛选出 SCNGs,前人研究已证明了该方法在 SCNGs 开发方面的有效性<sup>[38-39]</sup>。

本研究基于扇穗茅转录组 CDS 氨基酸序列和 3 个禾本科物种氨基酸序列,通过运行 OthorFinder 软件共检索到 301 条 SCNGs 序列,经过序列同源性比对后,最终筛选出 100 条氨基酸序列所对应的转录本序列,并进行了引物设计,我们在引物筛选过程中发现,SCNGs 的扩增效率较低,这可能源于 SCNGs 在 DNA 中拷贝数低,扩增较为困难,此外,转录组存在可变剪切<sup>[40]</sup>,容易导致基于转录本设计的引物无法在基因组中成功扩增,或者扩增的片段与预期片段不一致。在引物筛选过程中,扩增失败,条带不单一,或形成引物二聚体的引物占大多数。当然也有一些引物对虽然成功扩增了目的序列,但未能检测到种内变异。经过引物筛选,最终筛选出 10 个扩增效果较好并具有种内变异的 SCNGs,筛选效率为 10%。前人对其他物种使用相同方法开发 SCNGs 的筛选效率表现出差异性,如中国白栎组(*Quercus*)物种 SCNGs 开发效率为 (19/566)<sup>[41]</sup>、宽叶香蒲(*Typha latifolia*)开发效率为 (14/121)<sup>[38]</sup>、色木枫(*Acer pictum*)开发效率为 (26/166)<sup>[42]</sup>,相比较而言,基于转录组开发 SCNGs 成功率相对较低,具体原因可能和单个的基因重复事件或全基因组基因重复和高度的序列变异有关<sup>[43]</sup>。基于 15 个居群 64 个扇穗茅个体对筛选出的 10 对 SCNGs 引物进行了群体检测,研究发现,10 个 SCNGs 序列多态性参数存在广泛变异,均表现出极为丰富的多态性,其中  $H_d$  平均值为 0.841,  $\pi$  平均值为 0.011, Grant 等<sup>[44]</sup>认为  $H_d$  和  $\pi$  分别大于 0.5 和 0.005 时说明该序列包含丰富的遗传多样性,二者的值越大多样性程度越高,由此可见,本研究开发出的 10 个 SCNGs 引物扩增片段具有丰富的多态性。基于 10 个 SCNGs 对扇穗茅 15 个居群遗传分化研究结果表明,15 个扇穗茅遗传变异主要存在于居群内,居群间存在较低程度的遗传分化,前人对禾本科遗传变异组成研究发现,遗传变异的组成在不同物种上呈现出较大的差异,如短花针茅(*Stipa breviflora*)<sup>[45]</sup>、多年生黑麦草(*Lolium perenne*)<sup>[46]</sup>变异主要存在于居群内,其比例分别为:71.79% 和 94.00%;冰草(*Agropyron cristatum*)<sup>[47]</sup>、雀麦(*Bromus japonicus*)<sup>[48]</sup>变异主要存在于居群间,其比例分别为:58.00%,63.00% 和 63.72%。遗传变异的组成和物种寿命、繁殖方式及进化阶段有一定的关系。生长周期长、异交、演替阶段晚期的物种,种群内遗传变异水平较高,反之种群间一般具有高水平的遗传变异<sup>[49]</sup>。扇穗茅群体遗传变异主要存

在于居群内,可能和该物种本身的生物学特性及分布区环境有关。

基于 10 个 SCNGs 构建的 5 个物种系统发育树显示,稻米属于稻亚科(Oryzoideae)单独形成一个分支,而其余 4 个物种属于早熟禾亚科(Pooideae)聚为另一分支,三个小麦族(Triticeae)物种聚为一个亚支,而这一结果也和目前最新的禾本科物种系统发育研究结果一致<sup>[50]</sup>。三个小麦族物种系统进化关系在 10 个 SCNGs 序列上表现出差异性,主要原因可能和普通小麦的复杂进化过程有关。普通小麦是通过栽培二粒小麦(AABB)与野生的节节麦(DD)经过天然杂交而形成<sup>[51]</sup>,杂交后代的多倍化和谱系筛选不完全可能使得 10 个 SCNGs 序列在进化关系上呈现出的一致性,因此 10 个 SCNGs 序列所构建的系统发育树使得三个小麦族物种亲缘关系表现出差异性<sup>[52-53]</sup>。综上所述,基于扇穗茅转录组数据开发的 10 个 SCNGs 序列,包含丰富的遗传信息,具有丰富的多态性,这些单拷贝核基因序列为后期扇穗茅属物种界定,物种形成和群体进化历史研究提供丰富而有效的分子标记。

## 4 结论

本研究以青藏高原特有种扇穗茅为研究对象,基于三代全长转录组数据,检测到 48 219 个 CDS 编码区,通过转录组 CDS 氨基酸序列检索到了 301 条单拷贝核基因序列,利用 PCR 扩增技术,对检测到的单拷贝核基因序列进行了引物筛选,最终筛选出 10 对扩增效果良好并具有种内变异的单拷贝核基因引物。扇穗茅群体检测结果表明,10 个单拷贝核基因序列各多态性参数如下,分离位点数( $S$ )、单倍型数( $h$ ),平均核苷酸差异数( $k$ )、单倍型多样性( $H_d$ )、核苷酸多样性( $\pi$ )和 Watterson 参数( $\theta_w$ )平均值分别为 24.4, 23.7, 7.686, 0.841,  $10.50 \times 10^{-3}$  和  $6.21 \times 10^{-3}$ 。15 个扇穗茅居群遗传变异主要存在于居群内,遗传分化指数在 10 个单拷贝核基因序列计算结果中表现出差异性。基于 10 个单拷贝核基因构建的 5 个禾本科物种系统发育树可明确形成 3 个进化分支,扇穗茅和小麦族 3 个物种表现出较近的亲缘关系。本研究开发的 10 对扇穗茅单拷贝核基因引物扩增序列具有丰富的遗传多态性,可为扇穗茅属物种界定、遗传多样性分析、系统发育重建及资源保护利用等研究提供更为丰富的候选标记。

## 参考文献

- [1] LU L, FRITSCH P W, CRUZ B C, et al. Reticulate evolution, cryptic species, and character convergence in the core East Asian clade of *Gaultheria* (Ericaceae)[J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2010, 57(1):364-379
- [2] 刘勉, 张彩飞, 黄建勋, 等. 利用低拷贝核基因重建菊科紫菀亚科族间系统发育关系[J]. *植物学报*, 2015, 50(5):549-564  
LIU M, ZHANG C F, HUANG J X, et al. Phylogenetic reconstruction of tribal relationships in Asteroideae (Asteraceae) with low-copy nuclear genes[J]. *Chinese Bulletin of Botany*, 2015, 50(5):549-564
- [3] JAMES T Y, KAUFF F, SCHOCH C L, et al. Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny[J]. *Nature*, 2006, 443(7113):818-822
- [4] 白伟宁, 张大勇. 植物亲缘地理学的研究现状与发展趋势[J]. *生命科学*, 2014, 26(2):125-136  
BAI W N, ZHANG D Y. Current status and future directions in plant phylogeography[J]. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2014, 26(2):125-136
- [5] SHEN H, JIN D M, SHU J P, et al. Large-scale phylogenomic analysis resolves a backbone phylogeny in ferns[J]. *Giga Science*, 2017, 7(2):1-11
- [6] SANG T. Utility of low-copy nuclear gene sequences in plant phylogenetics[J]. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 2002, 37(3):121-147
- [7] LI J H. Sequences of low-copy nuclear gene support the monophyly of *Ostrya* and paraphyly of *Carpinus* (Betulaceae)[J]. *Journal of Systematics and Evolution*, 2008, 46(3):333-340
- [8] 王群, 李同建, 韩兴杰, 等. 基于低拷贝核基因 GBSSI 的蕁毛茛复合系统进化研究[J]. *广西植物*, 2014, 34(5):575-581  
WANG Q, LI T J, HANG X J, et al. Phylogenetic analysis of *Ranunculus cantoniensis* complex based on low copy nuclear gene GBSSI[J]. *Guihaia*, 2014, 34(5):575-581
- [9] ZHANG D X, HEWITT G M. Nuclear DNA analyses in genetic studies of populations: practice, problems and prospects[J]. *Molecular Ecology*, 2003, 12(3):563-584
- [10] HUANG J, ZENG S Y, ZHAO J H, et al. Genetic variation and phylogenetic relationships among *Rehmannia* (Scrophulariaceae) species as revealed by a novel set of single-copy nuclear gene markers[J]. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2016, 66:43-49
- [11] 付义, 何承忠, 巨苗苗, 等. 基于转录组的疏花软紫草低拷贝核基因引物开发[J]. *西南林业大学学报*, 2016, 36(3):86-90  
FU Y, HE C Z, JU M M, et al. The development of low-copy nuclear gene primers based on transcriptome for *Arnebia szechenyi*[J]. *Journal of Southwest Forestry University*, 2016, 36(3):86-90
- [12] FU C N, MO Z Q, YANG J B, et al. Testing genome skimming for species discrimination in the large and taxonomically difficult genus *Rhododendron*[J]. *Molecular Ecology Resources*, 2022, 22(1):404-414
- [13] 刘亮, 郭本兆. 中国植物志(第九卷 第二册)[M]. 北京: 科学出版社, 2002:377-380  
LIU L, GUO B Z. *Flora of China* (Volume 9 book 2)[M]. Beijing: Science Press, 2002:377-380.
- [14] 吕婷, 刘玉萍, 周勇辉, 等. 青藏高原扇穗茅属的分类现状及种质资源收集[J]. *湖北农业科学*, 2018, 57(22):11-13  
LÜ T, LIU Y P, ZHOU Y H, et al. Germplasm collection and taxonomic review of *Littledealea* (Poaceae) in the Qinghai-Tibet Plateau[J]. *Hubei Agricultural Sciences*, 2018, 57(22):11-13
- [15] HOOKER J D. *Flora of British India*[M]. London, Reeve & Co, 1897:2472-2473
- [16] TZVELEV N N. *Planta asiae centralium* [M]. Aedibus: Nauka, 1968:173-174
- [17] 吴征镒. 西藏植物志(第五卷)[M]. 北京: 科学出版社, 1987:138-139  
WU Z Y. *Flora of Xizang* (Volume 5)[M]. Beijing: Science Press, 1987:138-139
- [18] 卢生莲. 扇穗茅属, 青海植物志(第四卷)[M]. 西宁: 青海人民出版社, 1999:72-74  
LU S L. *Littledealea*, *Flora of Qinghai* (Volume 4) [M]. Xining: Qinghai People's Publishing House, 1999:72-74
- [19] 周勇辉. 青藏高原特有属——扇穗茅属的物种界定研究[D]. 西宁: 青海师范大学, 2017:61-68  
ZHOU Y H. Species delimitation of *Littledealea* (Poaceae), an endemic genus from the Qinghai-Tibet Plateau [D]. Xining: Qinghai Normal University, 2017:61-68
- [20] 刘玉萍, 吕婷, 朱迪, 等. 青藏高原特有属——藏扇穗茅叶绿体基因组测序及序列分析[J]. *植物研究*, 2018, 38(4):518-525  
LIU Y P, LYU T, ZHU D, et al. Sequencing and alignment analysis of the complete chloroplast genome of *Littledealea tibetica*, an endemic species from the Qinghai-Tibet Plateau[J]. *Bulletin of Botanical Research*, 2018, 38(4):518-525
- [21] 刘涛, 刘玉萍, 吕婷, 等. 基于 Biomod 2 组合模型预测青藏高原特有属扇穗茅属物种的潜在分布[J]. *草地学报*, 2020, 28(6):1650-1656  
LIU T, LIU Y P, LYU T, et al. Potential distribution of *Littledealea*, an endemic genus from the Qinghai-Tibet Plateau, predicted by biomod2 models[J]. *Acta Agrestia Sinica*, 2020, 28(6):1650-1656
- [22] 杨萍, 苏旭, 刘玉萍, 等. 扇穗茅不同居群染色体数目及核型分析[J]. *草地学报*, 2022, 30(7):1712-1720  
YANG P, SU X, LIU Y P, et al. Chromosome number and karyotype analysis from different populations of *Littledealea racemosa*[J]. *Acta Agrestia Sinica*, 2022, 30(7):1712-1720
- [23] VOGEL J P, GARVIN D F, MOCKLER T C, et al. Genome sequencing and analysis of the model grass *Brachypodium distachyon*[J]. *Nature*, 2010, 463(7282):763-768
- [24] REN G P, JIANG Y Y, LI A, et al. The genome sequence provides insights into salt tolerance of *Achnatherum splendens* (Gramineae), a constructive species of alkaline grassland[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2022, 20(1):116-128
- [25] 毛轩睿, 苏旭, 刘玉萍, 等. 沙鞭全长转录组测序及生物信息学分析[J]. *草地学报*, 2023, 31(6):1673-1681  
MAO X R, SU X, LIU Y P, et al. Full-length transcriptome sequencing and bioinformatic analysis of *Psammodloa villosa* (Poaceae)[J]. *Acta agrestia Sinica*, 2023, 31(6):1673-1681
- [26] EMMS D M, KELLY S. OrthoFinder: phylogenetic orthology inference for comparative genomics [J]. *Genome Biology*, 2019, 20(1):238
- [27] DOYLE J J, DOYLE J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue[J]. *Phytochemical Bulletin*, 1987, 19(1):11-15
- [28] TAMURA K, STECHER G, KUMAR S. MEGA11: Molecular evolutionary genetics analysis version 11 [J]. *Molecular*

- Biology and Evolution, 2021, 38(7):3022-3027
- [29] LALITHA S. Primer premier 5[J]. Biotech Software & Internet Report: The computer software Journal for Scient, 2000, 1(6):270-272
- [30] LIBRADO P, ROZAS J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data[J]. Bioinformatics, 2009, 25(11):1451-1452
- [31] EXCOFFIER L, LISCHER H E L. Arlequin suite ver 3. 5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows[J]. Molecular Ecology Resources, 2010, 10(3):564-567
- [32] 黄勋, 金健, 余洁, 等. 羽叶三七的转录组测序与三萜皂苷生物合成的关键酶基因的识别[J]. 基因组学与应用生物学, 2017, 36(6):2531-2538
- HUANG X, JIN J, YU J, et al. Transcriptome sequencing of *Panax pseudoginseng* and identification of key enzyme genes in triterpenoids saponin biosynthesis[J]. Genomics and Applied Biology, 2017, 36(6):2531-2538
- [33] 赵彦花, 区又君, 温久福, 等. 基于转录组测序技术的黄唇鱼 SSR 分子标记筛选[J]. 南方农业学报, 2019, 50(9):2078-2087
- ZHAO Y H, QU Y J, WEN J F, et al. Development of SSR markers in *Bahaba flavolabiata* by transcriptome sequencing[J]. Journal of Southern Agriculture, 2019, 50(9):2078-2087
- [34] 张健. 石莼属绿藻转录组测序及适应性进化机制研究[D]. 青岛: 青岛科技大学, 2021: 7-8
- ZHANG J. Transcriptome sequencing and environmental adaptation analysis of *Ulva* [D]. Qingdao: Qingdao University of Science and Technology, 2021: 7-8
- [35] 刘巧云. 黄栌属(漆树科)系统发育基因组学及生物地理学研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2022: 33-42
- LIU Q Y. Phylogenomic and biogeographical study of *Cotinus* Mill. (Anacardiaceae) [D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2022: 33-42
- [36] QI X P, LI Y K, GUO C, et al. A well-resolved fern history of nuclear phylogeny reveals the evolutions transcription factor families [J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2018, 127:961-977
- [37] ZENG L P, ZHANG Q, SUN R R, et al. Resolution of deep angiosperm phylogeny using conserved nuclear genes and estimates of early divergence times[J]. Nature Communications, 2014, 5:4956
- [38] 陈吉雯. 宽叶香蒲(*Typha latifolia*)单拷贝核基因标记的开发及谱系地理学研究[D]. 武汉: 武汉大学, 2020: 21-31
- CHEN J W. Development of single-copy nuclear gene markers and phylogeographic study of *Typha latifolia* [D]. Wuhan: Wuhan University, 2020: 21-31
- [39] 王鹏行. 基于单拷贝核基因紫堇属分子系统学研究[D]. 郑州: 河南农业大学, 2024: 19-27
- WANG P X. Molecular systematics of *Corydalis* DC. based on single-copy nuclear genes[D]. Zhengzhou: Henan Agricultural University, 2024: 19-27
- [40] LI Y P, DAI C, HU C G, et al. Global identification of alternative splicing via comparative analysis of SMRT-and Illumina-based RNA-seq in strawberry[J]. The Plant Journal, 2017, 90(1):164-176
- [41] 陈君. 中国白栎组单拷贝核基因标记的开发及系统发育关系研究[D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2017: 17-19
- CHEN J. Development of single-copy nuclear gene markers and phylogeny research of section *Quercus* in China [D]. Beijing: Chinese Academy of Forestry, 2017: 17-19
- [42] 邓雅文, 陈荣樟, 鲍蕾, 等. 基于色木枫转录组数据的核低拷贝基因引物开发[J]. 北京师范大学学报(自然科学版), 2022, 58(6):844-852
- DENG Y W, CHEN R Z, BAO L, et al. Low-copy nuclear gene primers based on transcriptome data of *Acer pictum* [J]. Journal of Beijing Normal University (Natural Science), 2022, 58(6):844-852
- [43] SALSC J. In silico archeogenomics unveils modern plant genome organisation, regulation and evolution [J]. Current Opinion in Plant Biology, 2012, 15(2):122-130
- [44] GRANT W A S, Bowen B W. Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from sardines and anchovies and lessons for conservation[J]. Journal of Heredity, 1998, 89(5):415-426
- [45] 赵磊. 基于 SSR 标记的短花针茅种群遗传多样性与遗传结构分析[D]. 呼和浩特: 内蒙古大学, 2015: 17-24
- ZHAO L. Assessment of genetic diversity and population genetic structure in chinese *stipa breviflora* using SSR markers [D]. Hohhot: Inner Mongolia University, 2015: 17-24
- [46] 曾令霜, 张晨晨, 张敬, 等. 多年生黑麦草种质 SSR 分子标记遗传多样性分析[J]. 草业科学, 2022, 39(1):75-84
- ZENG L S, ZHANG C C, ZHANG J, et al. Genetic diversity analysis of perennial ryegrass germplasm by SSR molecular markers. Pratacultural Science, 2022, 39(1):75-84
- [47] 杨靖. 内蒙古 28 份冰草种质资源材料遗传多样性的研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2023: 18-23
- YANG J. Study on the genetic diversity of 28 *Agropyron cristatum* germplasm resources in Inner Mongolia [D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2023: 18-23
- [48] 李琦. 麦田雀麦生物生态学特性与遗传多样性研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2017: 58-62
- LI Q. Study on the bioecological characters and genetics diversity of Japanese brome in wheat field [D]. Taian: Shandong Agricultural University, 2017: 58-62
- [49] NYBOM H, BARTISH I V. Effective of life history traits and sampling strategies on genetic diversity estimates obtained with RAPD markers in plants [J]. Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematic, 2000, 3(2):93-114
- [50] ZHANG T K, HUANG W C, ZHANG L. et al. Phylogenomic profiles of whole-genome duplications in Poaceae and landscape of differential duplicate retention and losses among major Poaceae lineages[J]. Nature communications, 2024, 15:3305
- [51] MARCUSSEN T, SANDVE S R, HEIER L, et al. Ancient hybridizations among the ancestral genomes of bread wheat [J]. Science, 2014, 345(6194):1250092
- [52] MELESHKO O, MARTIN M D, KORNELIUSSEN T S, et al. Extensive genome-wide phylogenetic discordance is due to incomplete lineage sorting and not ongoing introgression in a rapidly radiated bryophyte genus [J]. Molecular Biology and Evolution, 2021, 38, (7):2750-2766
- [53] BJORNSEN S, VERBRUGGEN H, UPHAM N S, et al. Reticulate evolution: detection and utility in the phylogenomics era [J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2024, 201:108197

(责任编辑 刘婷婷)