

# 互花米草育性基因 *Pollen Tube Blocked 1* 自然变异及表达与其自交结实的相关性

乔红梅, 周佳文, 张宜辉, 李庆顺\*

(厦门大学环境与生态学院, 教育部滨海湿地生态系统重点实验室, 福建 厦门 361102)

**摘要:** 互花米草 (*Spartina alterniflora*) 作为我国当前主要入侵植物之一, 其高纬度地区种群的结实率显著高于低纬度的种群, 推测很可能发生了自交进化。为研究其内在遗传机制, 选取 8 个不同纬度地区的互花米草种群为材料, 对影响种子结实的主效基因 *PTB1* (称 *SaPTB1*) 进行扩增并测序以检测单核苷酸多态性位点 (SNPs), 通过实时荧光定量 PCR 方法检测其表达, 并通过套袋实验检测种群的自交结实情况。结果显示 *SaPTB1* 中存在两个 SNPs 位点, 其中一个位点的变异导致了天冬氨酸和天冬酰胺的替换, 即单倍型 1 (Hap.1) 和单倍型 2 (Hap.2), 两种单倍型广泛分布于整个沿海地区, 与结实率无明显相关性。该基因在最高纬度和最低纬度的两个种群中表达量高于其他种群。对不同种群的自交结实情况分析表明中国的互花米草具有一定的自交结实能力, 尤其在 *SaPTB1* 表达量最高的两个种群中, 其自交结实率也是最高的, 说明 *SaPTB1* 的表达对互花米草的结实具有重要影响。

**关键词:** 互花米草; *PTB1* 基因; 结实率; 入侵植物

**中图分类号:** Q 945.5      **文献标志码:** A

互花米草 (*Spartina alterniflora* Loisel.) 为禾本科 (Poaceae) 米草属 (*Spartina*) 六倍体 ( $2n=62$ ) 多年生草本植物<sup>[1]</sup>, 起源于美洲大西洋沿岸和墨西哥湾的潮间带<sup>[1]</sup>, 目前已在全球范围入侵, 包括美国的太平洋沿岸、欧洲的大西洋沿岸以及亚洲的东部地区, 其中中国是最大的入侵区域<sup>[1-3]</sup>。据文献记载, 在 1979 年从美国佐治亚州 (Georgia) 的萨佩洛岛 (Sapelo Island)、北卡罗来纳州 (North Carolina) 的莫尔黑德城 (Morehead City) 以及佛罗里达州 (Florida) 的坦帕湾 (Tampa Bay) 收集 3 种生态型的互花米草引入我国福建省罗源湾试种, 后来分别被称为 G 型、N 型和 F 型, 随后人工收集种子引种到我国沿海的其他地区<sup>[1-2, 4]</sup>。

**收稿日期:** 2020-09-05      **录用日期:** 2020-12-09

**基金项目:** 国家重点研发计划 (2017YFC0506102)

**\*通信作者:** liqq@xmu.edu.cn

由于其生长和繁殖速度快，很快向种植地南北两个方向入侵，现在已遍布于南起广东至辽宁的整个沿海地区，成为我国首批 16 种入侵物种之一<sup>[5]</sup>，极大地影响了全国沿海滨海湿地的养殖业与生态安全。

导致互花米草成功入侵的重要原因之一是它的生殖方式，包括有性生殖和无性生殖两种。无性生殖以地下的根状茎为繁殖器官通过分蘖的方式向外扩大种群斑块；有性生殖所产生的种子，是其远距离扩张的主要途径<sup>[1-2, 4]</sup>。有性生殖过程主要是通过风媒传播进行，由于柱头具有捕捉花粉的特性，花柱伸出先于花粉囊裂，使得授粉方式主要以异花传粉、异交结实为主<sup>[6]</sup>。早期入侵到旧金山湾的互花米草开花但结实很少甚至不结实，研究发现这主要是由于自交不亲和的原因导致的，自交的胚胎因无法正常生长而败育，尤其在营养等竞争激烈的环境中，这种近交衰退程度达到最高<sup>[7]</sup>。随后互花米草和当地物种叶米草发生杂交，形成了杂交种群，而这些杂交种群在初期能够自花授粉并形成幼苗<sup>[8]</sup>。Liu 等<sup>[9-10]</sup>研究发现，入侵到中国的互花米草，结实率在野外呈现随纬度梯度变化的趋势，即高纬度地区的种群的结实率显著高于低纬度地区。随后 Qiao 等<sup>[11]</sup>的研究又发现，互花米草自引入中国后发生了种群间的遗传混合，使得一些优势基因相互组合形成超级基因型，具体表现为不仅有很强的分蘖能力还具有很高的结实率，这些性状在高纬度地区受到自然选择进而形成了很强的入侵能力；不仅如此，移栽到温室环境中的种群也表现出相同的趋势，推测北方的种群可能发生了自交进化。然而到底是哪些基因的影响导致了结实这一性状的南北差异还不得而知。

种子结实是一个受多基因调控的数量性状。目前，有关育性基因的研究在水稻中多有报道。其中雌性不育基因 *PTBI* (*Pollen Tube Blocked 1*) 具有 E3 泛素化的特性，可以通过泛素化作用抑制下游的花粉管生长有抑制作用的负调控因子，促进花粉管的生长，进而影响受精过程，是影响结实率的一个主效基因<sup>[12]</sup>。在水稻中，*PTBI* 基因被定位在第 5 号染色体的短臂上，实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 发现不同株系的结实率与该基因的表达量成正相关，同时过表达会使得结实率高于野生型，证明了 *PTBI* 对结实具有重要作用<sup>[12-13]</sup>。

互花米草与水稻同为禾本科植物，针对其结实率这一性状的南北差异现象，提出两个待解决的科学问题：不同种群的结实率差异是否与 *SaPTBI* 的变异及表达情况有关？入侵中国的互花米草是否发生了自交进化现象？为此，本研究选取种植于温室的 8 个种群，克隆 *SaPTBI* 并进行测序，寻找 SNPs 位点，同时比较该基因在不同种群的表达情况，并采取套袋实验来统计自交结实率。

# 1 实验材料与方法

## 1.1 实验材料准备

在 2013 年 9 月—2014 年 10 月期间,沿中国海岸线,南北跨越 2000 km,在纬度为 39.05° N (Tianjin) 到 20.90° N (Guangdong) 的地区,按照纬度梯度从南至北采集互花米草的种子,每个纬度梯度采集一个种群,每个种群包括 10 个个体,共 10 个种群<sup>[1, 2, 4]</sup>。为了避免采集到相同克隆斑块的样本,不同个体之间间隔大于 30 m,将种子带回厦门大学翔安校区的同质园 (24.62° N, 118.31° E) 中进行种植,随后每年用根状茎进行繁殖培育以确保植株的连续生长,把用相同植株的根状茎培育而来的幼苗分盆,形成克隆植株,得到和原种群的遗传背景完全相同的一批克隆植株。其中克隆种群用来采集雌蕊,原种群供套袋实验以收集种子 (图 1)。

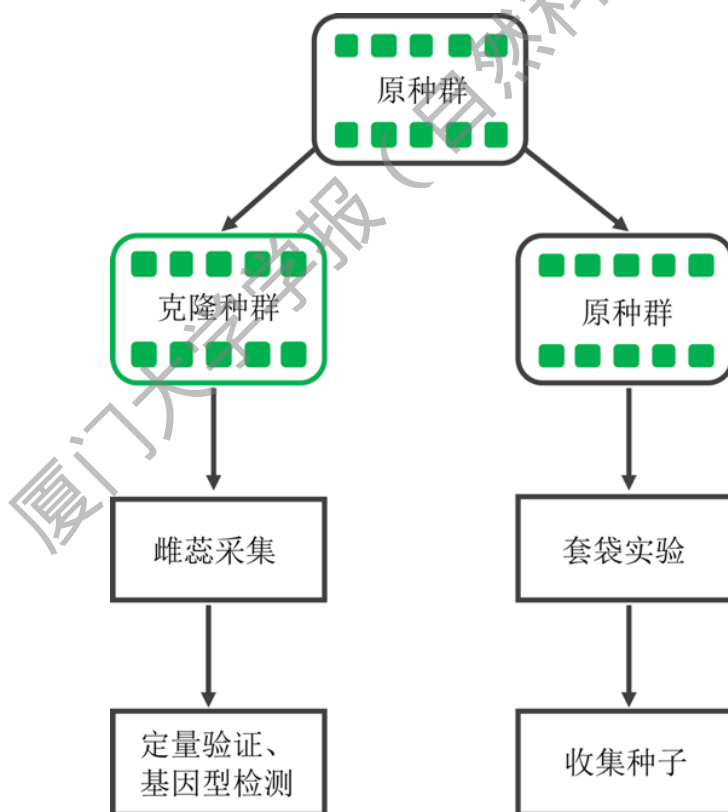


图 1 实验设计示意图

Fig. 1 Schematic diagram of the experimental design

2018 年 6—9 月 (开花季) 进行雌蕊采集。为了保证样品的一致性,每次采样都在上午

9:00—10:00 之间进行, 由于台风和物候等原因, 在 10 个种群中只采集到 8 个种群 (表 1), 每个种群 3 个个体, 共 24 个。采集好的雌蕊放置于液氮保存供后续的 RNA 提取。为了检测植株的自交结实情况, 原种群于开花季将植株的花序用孔径为 0.5 mm 的网袋套住以防止异花授粉 (互花米草作为风媒传粉的植物, 在温室中几乎没有风的条件下, 套袋可以更加有效地减少异花授粉的可能)。同年 11 月统计种子结实情况, 为了保持样品的一致性, 选取和采集雌蕊相同的种群进行结实率计算: 结实率=饱满的种子数/种子总数×100%。

表 1 互花米草样品采集信息

Tab. 1 Sampling information of *Spartina alterniflora*

区域	种群	纬度	经度
山东	东营 (DY)	N38°00'	E118°57'
江苏	盐城 (YC)	N33°42'	E120°34'
上海	崇明 (CM)	N31°32'	E121°58'
浙江	乐清 (YQ)	N28°20'	E121°12'
福建	罗源 (LY)	N26°26'	E119°45'
福建	云霄 (YX)	N23°55'	E117°28'
广东	珠海 (ZH)	N22°25'	E113°37'
广东	雷州 (LZ)	N20°54'	E110°10'

## 1.2 定量验证与基因型检测

用 RNAprep Pure 多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒 (TIANGEN) 提取互花米草雌蕊的总 RNA。提好的 RNA 分别用 NanoDrop 2000 (Thermo) 和凝胶成像系统 (Bio-Rad) 检测其纯度和完整性。将合格的 RNA 反转成 cDNA, 反转过程如下: RNA 600 ng, AccuRT Reaction Mix (4×) 2 μL, 加 DEPC H<sub>2</sub>O 至 8 μL, 42 °C 孵育 2 min; 加 AccuRT Reaction Stopper (5×) 2 μL, All-In-One RT MasterMix (5×) 4 μL, Nuclease-free H<sub>2</sub>O 6 μL, 充分混匀; 先后在 25°C 孵育 10 min, 42°C 孵育 15 min, 85°C 孵育 5 min; 放置冰上, 加入 180 μL Nuclease-free H<sub>2</sub>O, 制成 cDNA 原液, 将原液稀释 10 倍, 制成 cDNA 工作液。在荧光定量 PCR 仪 CFX96 (Bio-Rad) 中进行 RT-qPCR 定量实验, RT-qPCR 反应中所加试剂如下: SYBR Green Mix (Roche, Switzerland) 10 μL, Primer-F/Primer-R 各 0.5 μL, cDNA Template 1 μL, DEPC H<sub>2</sub>O 8 μL。反应条件为 95 °C 3 min; 95 °C 10 sec, 56 °C 10 sec, 72 °C 10 sec, 40 个循环; 95°C 10 sec。原液送至厦门闽博生物技术有限公司测序。互花米草 *SaPTBI* 的基因

序列信息源于前人的研究<sup>[14]</sup>，在该基因的两端设计引物 Primer-F/Primer-R，内参 *Tubulin* 的引物信息 Tubulin-F/Tubulin-R 参考 Baisakh 等<sup>[15]</sup>对互花米草耐盐性基因的定量扩增实验（表 2），以上两对引物均由陌进生物公司合成。

表 2 用于 RT-qPCR 实验的引物信息  
Tab. 2 Primers used for RT-qPCR analysis

引物名称	引物序列	基因
Tubulin-F	5'-CCCTACCCCAGGATCCACTT-3'	内参基因 <i>TUB</i>
Tubulin-R	5'-GGCCTTCTCGGCAGATATCA-3'	
PTB1-F	5'-GTGGGAGAATAGTTGTCCTCTC-3'	目的基因 <i>SaPTB1</i>
PTB1-R	5'-GCCACTTTCCAACAGCCACAC-3'	

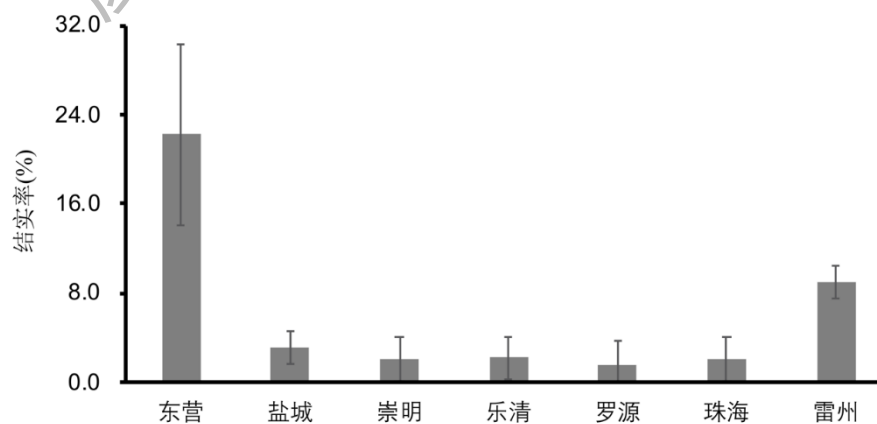
### 1.3 统计方法

采用 SPSS21.0 软件进行统计分析，*SaPTB1* 的表达量和结实率用种群的平均值±标准差表示，两组数据的相关性用皮尔森（Pearson）相关系数表示。

## 2 结果与分析

### 2.1 结实率统计

实验发现套袋自交的互花米草可以观察到结实现象，不是绝对的“自交不亲和”，但空壳数比例很大，各种群的结实率都处于比较低的水平（1%~22%）（图 2）。最高纬度地区的 DY 以及最低纬度地区的 LZ 的结实率较高，分别是 22.22% 和 8.98%；剩余 6 个中纬度和低纬度种群的结实率都很低，只有 1.49%~3.08%。



云霄种群没有收集到数据。

图 2 不同种群互花米草自交结实率比较

Fig. 2 Seed setting rate of self-fertilization in different populations of *S. alterniflora*

## 2.2 *PTB1* 表达情况

对 24 个样品中的 23 个样本的 *SaPTB1* 表达情况进行 RT-qPCR 分析发现, 该基因在 8 个种群中的表达水平都相对较低, 表达量为 0.11~3.26, 无显著差异。种群 DY (1.80) 与 LZ (1.97) 的平均表达量相对较高, 而 YC (1.02)、CM (0.99)、YQ (0.96)、LY (1.19)、XY (1.12)、ZH (0.92) 种群的平均表达量普遍较低 (图 3)。相关性分析结果显示 *SaPTB1* 的表达量和结实率呈正相关, 两组数据的相关系数高达 0.80 ( $p=0.03$ )。

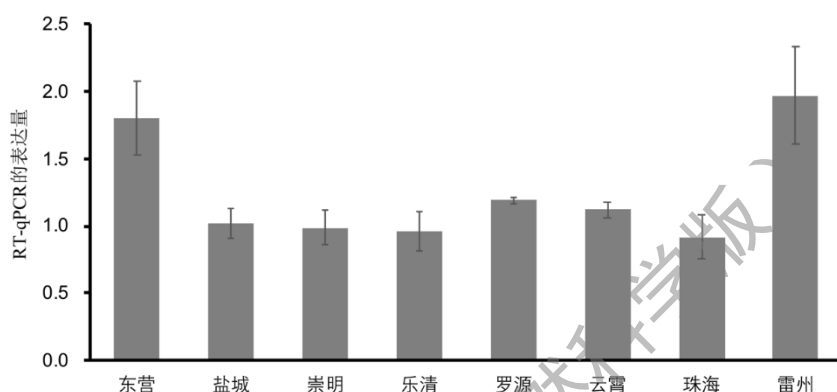


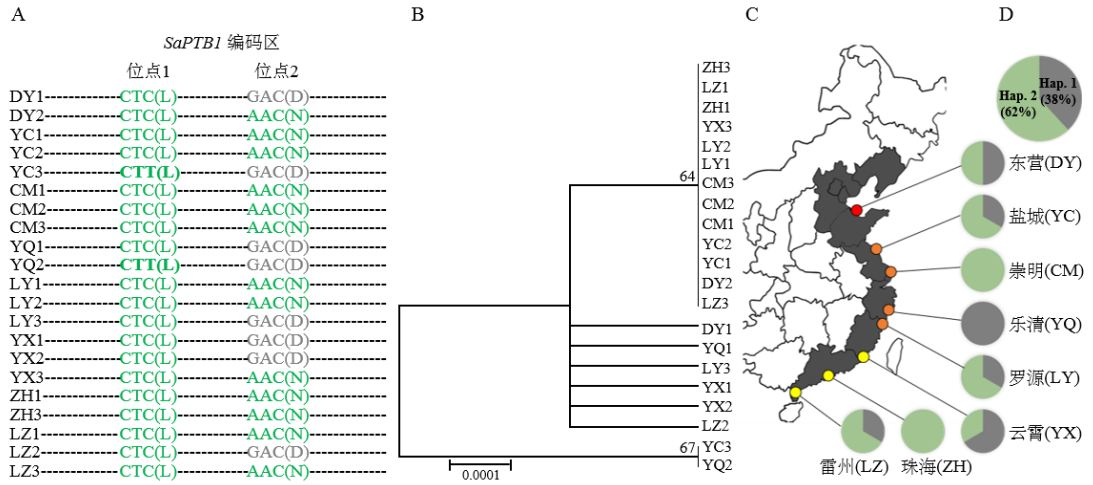
图 3 互花米草 *SaPTB1* 基因在不同种群的相对表达量比较

Fig. 3 *SaPTB1* gene expression levels of in different populations of *S. alterniflora*.

## 2.3 *SaPTB1* 单倍体划分

对互花米草 24 个样品的 *SaPTB1* 的编码序列进行双端测序后, 最终成功获得 21 个样品的数据, 用 Bio-Edit 软件将正向和反向序列进行拼接获得完整的基因序列, 将所有序列进行比对寻找单核苷酸多态性位点 (SNPs) 位点, 再根据双端的测序峰图进行校正, 最终获得 2 个 SNPs 位点: 第 1 个是 C/T 间的替换; 第 2 个是 A/G 间的替换, 共组合成 3 种类型 (C...A; C...G; T...G) (图 4(A)), 系统发育分析结果显示 21 个样品共聚为 3 组, 与碱基替换的分类结果相一致 (图 4(B))。将核酸序列翻译成蛋白质序列后发现, C/T 为同义突变, 碱基的替换不会改变所编码的氨基酸, 密码子 CTC 和 CTT 均编码亮氨酸 (L); A/G 间的转换会导致氨基酸的不同, 密码子 GAC 编码天冬氨酸 (D) 而替换后的 AAC 则编码天冬酰胺 (N) (图 4(A))。把 SNP 位点为 G, 翻译成天冬氨酸的样品划分为单倍体 1 型 (Haplotype 1, Hap. 1), 把 SNP 位点为 A, 翻译成天冬酰胺的样品划分为单倍体 2 型 (Haplotype 2, Hap. 2) (图 4(D))。21 个样品中有 8 个 (DY1、YC3、YQ1、YQ2、LY3、YX1、YX2、LZ2) 为 Hap. 1, 占总样品的 38%; 剩余的 13 个 (62%) 为 Hap. 2 (图 4(D))。对两种类型的种源地进行追溯,

发现两种单倍型几乎都遍布于南北的每一个种群,并没有呈现区域性变异的规律(图 4(C))。



A 中绿色和灰色表示碱基变异位点信息, 括号中为相应的氨基酸; B 中节点数值代表自展值, 下方比例尺为距离标尺; C 和 D 中的绿色和灰色表示两种不同的单倍型, 其中 C 图上的小圆圈红色、橙色、黄色分别表示高纬度、中纬度以及低纬度的种群, DY3、YQ3、ZH2 没有得到数据。

图 4 *SaPTBI* 编码区序列变异信息 (A)、*SaPTBI* 系统发育树 (B)、单倍体的区域分布 (C) 及分类 (D)

Fig. 4 Coding sequence variation of *SaPTBI* (A), phylogeny tree of *SaPTBI* (B), distribution (C) and classification (D) of the haplotypes

### 3 讨论与结论

互花米草中 *SaPTBI* 的编码区发生了同义和非同义位点突变, 这种有意义的突变意味着该基因可能受到了很强的自然选择。然而本研究中两种单倍型没有表现出像结实率那样随纬度梯度而变化的现象, 说明 *SaPTBI* 的序列变异与结实没有显著的相关性。相反, 这可能是由于引种历史的原因造成的, 3 种生态型同时被引种到罗源湾试种后, 收集到的种子又被带到山东、江苏、浙江和福建其他地方, 3 种生态型便分布到了全国各地, 如同本实验中的两个单倍型的分布一样。

*SaPTBI* 在各种群的表达情况与其自交结实能力密切相关 (相关系数为 0.80,  $p=0.03$ ), 虽然 *SaPTBI* 的表达量在各个种群中都很低, 这可能是由于在开花的季节 (6—9 月) 温室的温度偏高造成的, *SaPTBI* 的表达受到温度的调控, 高温会显著抑制其表达<sup>[12]</sup>。尽管如此, 除了 LZ, 高纬度种群 DY 的平均表达量仍高于其他地区, 研究结果显示表达量最高的两个种群 DY 和 LZ 的自交结实率也是最高的, 分别为 22.22% 和 8.98%, 说明 *SaPTBI* 的表达可能对自交结实具有重要影响。有趣的是, 本研究发现 LZ 这一位于最低纬度的种群也具有较

高的自交结实能力，LZ 种群因种群面积小，处于一个竞争相对较弱的环境<sup>[3]</sup>，有利于自交结实，因此我们推测低纬度种群的结实主要得益于自交结实。在互花米草生活史特点的研究中，Davis 等<sup>[16]</sup>发现若植物入侵初期把较多的力量投入到生殖中，会导致其更易死亡，生存力和生殖力间存在一个平衡。LZ 作为一个低密度的种群<sup>[3]</sup>，很容易经历由于环境影响带来的瓶颈效应和由于花粉限制造成的“阿利效应”（Allee effect）<sup>[17]</sup>，最终造成生殖失败；而自交结实可以帮助种群突破低密度制约，从一定程度上减轻“阿利效应”的影响，实现以自交结实繁殖形成入侵斑块<sup>[18]</sup>，这样的繁殖策略在旧金山湾入侵的互花米草种群中取得了成功。引种到中国的互花米草在早期发生杂交后，杂交种群通过自交结实克服了“阿利效应”，早期的生殖成功不仅保证了种群的存活，更为以后的快速入侵奠定基础。本研究结果显示 *SaPTB1* 在中纬度地区的表达量较低，自交结实率也是最低的，可能是由于中纬度地区的种群对空间和营养的竞争激烈导致的，在竞争激烈的环境中，自交衰退严重<sup>[7]</sup>，结实主要来自于异交结实。而 Liu 等<sup>[9-10]</sup>在 2016 年的研究中所统计的结实率包括了自交结实和异交结实，高纬度地区较高的结实率来自于较高的自交的和异交结实总和，中纬度地区的结实率则主要来自于异交结实，低纬度地区种群结实主要来源于自交结实，互花米草是一种以异交结实为主的植物，其异交结实率远高于自交结实，因此结实率呈现出高纬度（异交+自交）、中纬度（异交）和低纬度（自交）逐渐降低的趋势。

综上所述，本研究证实引种到中国的互花米草具有自交结实能力，并且 *SaPTB1* 功能基因发生了位点变异；同时，该基因的表达与其自交结实能力呈现正相关性。该研究首次探究了互花米草结实差异的内在遗传机制，为预防和控制互花米草入侵提供了一份新的理论依据。由于实验条件的限制，种植于温室的互花米草开花的样本有限，今后还需要进一步开展大样本量的分析。

## 参考文献：

- [1] STRONG D R, AYRES D R. Ecological and evolutionary mis-adventures of *Spartina*[J]. Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics, 2013, 44(1):389-410.
- [2] AN S Q, GU B H, ZHOU C F, et al. *Spartina* invasion in China: implications for invasive species management and future research[J]. Weed Research, 2007, 47(3):183-191.
- [3] ZHANG D H, HU Y M, LIU M, et al. Introduction and spread of an exotic plant, *Spartina alterniflora*, along



- coastal marshes of China[J]. *Wetlands*, 2017, 37(6):1-13.
- [4] XU G W, ZHUO R Z. Preliminary studies of introduced *Spartina alterniflora* Loisel in China (I)[J]. *Journal of Nanjing University (Natural Science)*, 1985, 40:212-225.
- [5] 杨东, 万福绪. 外来入侵种互花米草的研究进展[J]. *植物保护*, 2014, 40(2):5-10.
- [6] 苑泽宁, 石福臣, 李君剑, 等. 天津滨海滩涂互花米草有性繁殖特性[J]. *生态学杂志*, 2008, 27(9):1537-1542.
- [7] DAEHLER C C. Inbreeding depression in smooth cordgrass (*Spartina alterniflora*, Poaceae) invading San Francisco[J]. *American Journal of Botany*, 1999, 86(1):131-139.
- [8] SLOOP C M, AYRES D R. The rapid evolution of self-fertility in *Spartina* hybrids (*Spartina alterniflora* × *foliosa*) invading San Francisco Bay, CA[J]. *Biological Invasions*, 2009, 11:1131-1144.
- [9] LIU W W, MAUNG-DOUGLASS K, STRONG D R, et al. Geographical variation in vegetative growth and sexual reproduction of the invasive *Spartina alterniflora* in China[J]. *Journal of Ecology*, 2016, 104(1):173-181.
- [10] LIU W W, STRONG D R, PENNINGS S C, et al. Provenance-by-environment interaction of reproductive traits in the invasion of *Spartina alterniflora* in China[J]. *Ecology*, 2017, 98(6):1591-1599.
- [11] QIAO H M, LIU W W, ZHANG Y H, et al. Genetic admixture accelerates invasion via provisioning rapid adaptive evolution [J]. *Molecular Ecology*, 2019, 28(17):4012-4027.
- [12] LI S C, LI W B, HUANG B, et al. Natural variation in *PTBI* regulates rice seed setting rate by controlling pollen tube growth[J]. *Nature Communications*, 2013, 4:2793.
- [13] 叶书梅. 水稻结实率控制基因 *PTBI* 的自然变异和驯化分析 [D]. 四川: 四川农业大学, 2015.
- [14] YE W B, WANG T T, WEI W, et al. The full-length transcriptome of *Spartina alterniflora* reveals the complexity of high salt tolerance in monocotyledonous halophyte[J/OL]. *bioRxiv*, 2019. <http://dx.doi.org/10.1101/680819>.
- [15] BAISAKH N, SUBUDHI P K, VARADWAJ P. Primary responses to salt stress in a halophyte, smooth cordgrass (*Spartina alterniflora* Loisel.)[J]. *Functional Integrative Genomics*, 2008, 8(3):287-300.
- [16] DAVIS H G. r-Selected traits in an invasive population[J]. *Evolutionary Ecology*, 2005, 19(3):255-274.
- [17] DAVIS H G, TAYLOR C M, LAMBRINOS J G, et al. Pollen limitation causes an Allee effect in a wind-pollinated invasive grass (*Spartina alterniflora*) [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2004, 101(38):13804-13807.

[18] DAEHLER C C. Variation in self-fertility and the reproductive advantage of self-fertility for an invading plant (*Spartina alterniflora*)[J]. Evolutionary Ecology, 1998, 12(5):553-568.

## **Natural variation and expression of fertility gene *Pollen Tube Blocked 1 (PTB1)* and its correlation with self-fertilization of *Spartina alterniflora***

QIAO Hongmei, ZHOU Jiawen, ZHANG Yihui, LI Qingshun\*

(Key Laboratory of the Coastal and Wetland Ecosystems, Ministry of Education ,College of the Environment & Ecology, Xiamen University, Xiamen 361102, China)

**Abstract:** *Spartina alterniflora* is one of the most invasive plant species in China. Previous study showed that populations in high latitude areas have higher seed setting rate than that in low latitude, leading to speculation of evolution of self-fertility. To study the genetic mechanism, we selected 8 populations of *S. alterniflora* as materials to clone and sequence *SaPTB1*, a major gene that affects seed setting in rice, to identify single nucleotide polymorphisms (SNPs). The results showed that two SNPs were found in *SaPTB1* and one of them led to an amino acid substitution, forming two haplotypes. The two haplotypes were widely distributed in the whole coastal area of China and had no obvious correlation with seed setting rate. RT-qPCR quantification showed that two populations in highest (DY) and lowest latitudes (LZ) had distinct higher expression level than others. Moreover, statistically significant results of bagging experiment in self-fertilization seed setting indicated that populations of *S. alterniflora* in China have the ability of self-fertility especially for the DY and LZ populations. Our study suggests that the expression of *SaPTB1* has important influence on seed setting rate of *S. alterniflora*.

**Keywords:** *Spartina alterniflora*; *PTB1* gene; self-fertility; invasive plant