

华东地区青冈种群的等位酶变异*

陈小勇**

(厦门大学生物系, 厦门 361005)

宋永昌

(华东师范大学环境科学系, 上海 200062)

摘要 华东地区6个青冈(*Cyclobalanopsis glauca* (Thunb.) Oerst.)种群等位酶变异的检测结果表明, 青冈种群的遗传变异较大, 每位点含有的等位基因较多, 平均为2.3个, 种水平的平均每位点等位基因数目为2.4。种群水平有效等位基因数目为1.446, 种水平为1.467。Hardy-Weinberg平衡检验表明, 青冈种群中不少位点偏离该平衡, 其原因是种群内含有较多的纯合子, 表现为多数位点的固定指数大于0, 其中有9个位点的固定指数与0的偏差达到显著水平。

关键词 基因频率; 有效等位基因数目; Hardy-Weinberg平衡; 固定指数; 青冈

The allozymic variation of *Cyclobalanopsis glauca* populations in East China Chen Xiao-Yong (Department of Biology, Xiamen University, Xiamen 361005), Song Yong-Chang (Department of Environmental Sciences, East China Normal University, Shanghai 200062), *J. Plant Resour. & Environ.* 1995, 4(4): 10~16

Cyclobalanopsis glauca, an evergreen broadleaved woody plant species, widely distributes in subtropical area of China. 6 populations in East China were chosen to study their allozymic variation. *C. glauca* maintains high genetic variation. At the population level, mean number of alleles per loci is 2.3 (range from 2.1 to 2.5) lower than that of species level (2.4). The effective numbers of alleles of 6 populations are 1.310 to 1.659 (mean 1.446), while at the species level it is 1.467. Chi-square test indicates a deviation from Hardy-Weinberg equilibrium, which is caused by excess of homozygotes in populations, in a few loci.

Key words gene frequency; effective number of allele; Hardy-Weinberg equilibrium; fixation index; *Cyclobalanopsis glauca* (Thunb.) Oerst.

植物种群的等位酶变异已有较多的报道^[15,17], 我国也开展了一些工作^[6~8,12,13], 其中以针叶树种居多, 阔叶树较少涉及^[11]。已有的研究表明, 广泛分布的物种往往有较大的遗传变异^[15,17], 青冈(*Cyclobalanopsis glauca* (Thunb.) Oerst.)是壳斗科常绿树种, 广泛分布于我国长江流域, 是亚热带常绿阔叶林和常绿落叶阔叶混交林的优势树种之一, 对其遗传变异尚不清楚。本文就基因频率及遗传平衡分析青冈种群的等位酶变异。

1. 材料和方法

1.1 研究地点植被概况

本文研究的6个种群分别位于安徽黄山、江苏宜兴和句容、浙江天童和杭州等5个地点(图

收稿日期 1995-04-12

* 国家自然科学基金资助项目(批准号 39370135)

** 野外采样得到蔡飞、阎传海、张庆费、吴化前等同志的帮助, 特此致谢!

1)。涉及的区域属于我国亚热带东部(湿润)常绿阔叶林亚区域。按吴征镒^[8],黄山、杭州、宜兴属于浙皖山丘,青冈、苦槠(*Castanopsis sclerophylla* Schott)林,栽培植被区,地带性植被为常绿阔叶林。在黄山,研究地点设黄山风景区西部的小岭,样品采自青冈、甜槠(*Castanopsis eyrei* Tutch.)群落中;宜兴种群位于宜兴小黑沟,设在以落叶树种为主的群落中,青冈散生其中;杭州的两个种群分别设在黄龙洞(中性土壤, pH 6.75, 以落叶树种为主的群落类型)和九溪(酸性土壤, pH 4.58, 较纯的青冈群落)。天童属于浙闽山丘,甜槠、木荷(*Schima superba* Gardn. et Champ.)林区^[5],但栲树(*Castenopsis fargesii* Franch.)、木荷林是天童的典型植被类型^[4],青冈零星分布其中;句容宝华山比较偏北,属于江淮丘陵,落叶栎类、苦槠、马尾松(*Pinus massoniana* Lamb.)林区,地带性植被类型以壳斗科的落叶栎类为主,并含有少量常绿阔叶树种的混交林,外貌接近于落叶阔叶林,有少量耐寒树种,如青冈、紫楠(*Phoebe sheareri* Gamble)、冬青(*Ilex purpurea* Hassk.)、女贞(*Ligustrum lucidum* Ait.)等,呈星散分布状态^[5]。

1.2 样品的采集

在样地中一般间隔5 m以上,选择胸径 ≥ 5 cm的植株或实生苗,采集当年萌生的嫩叶,迅速携至实验室内,在-20℃冷冻贮藏待用。电泳前,取新鲜的叶片1份加提取缓冲液^[20]10份(W:V),在低温下研成匀浆,4000 rpm冷冻离心15 min,上清液置于冰箱中待用。样品尽快测完。

1.3 遗传多态检测方法

采用垂直板型不连续聚丙烯酰胺凝胶电泳法^[3,10],浓缩胶和分离胶的浓度分别为2.5%和7.0%,pH值分别为6.7和8.9,凝胶配方见朱广廉等编的《植物生理学实验指导》^[3]。电泳开始后,首先以1 mA/孔的电流电泳1 h,待样品



图1 华东地区6个青冈种群的地理位置

Fig 1 Geographical locations of 6 populations of *C. glauca* in East China

进入分离胶后,将电泳槽移入4℃冰箱内,加大电流至2 mA/孔,继续电泳约3 h,当溴酚蓝指示剂至离末端约1 cm处,停止电泳,剥胶,染色。对10余种酶进行染色,其中一些酶染色效果差,用于分析的有5种酶(表1),共10个位点。过氧化物酶及酯酶的染色采用胡能书和万贤国^[10]的方法,苹果酸脱氢酶和谷氨酸草酰乙酸转氨酶采用 Pasteur 等^[19]的配方,超氧化物歧化酶的凝胶染色参照罗广华、王爱国^[9]的方法进行。

同工酶谱是基因的表现型,既包括基因的直接产物,也包括转录后的修饰产物,因此用谱带的多少来反映遗传变异存在很大的误差。等位酶分析是根据酶谱判断其遗传基础,因而常用来检测生物种群的遗传变异^[1]。各个体的基因型判译参照王中仁^[1,2]及 Pasteur 等^[19]的方法进行。过氧化物酶(POD)有两个基因位点(POD-1, POD-2),两个位点都有4个等位基因(表1)。酯酶(EST)也有两个基因位点(EST-1, EST-2),分别有4和6个等位基因(表1)。超氧化物歧化酶(SOD)有3个位点(SOD-1, SOD-2和 SOD-3),其中 SOD-1和 SOD-3在所有个体中都表现相同的谱带,都为纯合子;SOD-2仅在天童种群中有杂合子,并且频率很低,在其他种群中也皆为纯合子(表1)。谷氨酸草酰乙酸转氨酶(GOT)有4个位点区带,其中两个(GOT-1和 GOT-

2)比较清晰,另两个有时不能显色,故不分析。GOT-2含有两个等位基因(A,B),GOT-1中一般都是纯合体(AA),杂合体(AB)仅出现一次。苹果酸脱氢酶(MDH)的谱带也由几个位点控制,但只有MDH-1比较清晰,其他位点的产物染色效果不大好。MDH-1位点的酶谱表现为纯合子,都为一条谱带。

表1 青冈种群10个酶位点等位酶谱带的迁移率

Tab 1 Migration rates of the bands of allozymes of 10 loci in *Cyclobalanopsis glauca* populations

位点 Locus	谱带 Bands					
	A	B	C	D	E	F
POD-1	0.446	0.482	0.506	0.530		
POD-2	0.227	0.255	0.278	0.306		
EST-1	0.715	0.744	0.782	0.815		
EST-2	0.526	0.558	0.590	0.612	0.644	0.683
SOD-1	0.728					
SOD-2	0.602	0.516				
SOD-3	0.455					
GOT-1	0.360	0.408				
GOT-2	0.315	0.262				
MDH-1	0.681					

1.4 统计方法

1.4.1 基因(或等位基因)频率 等位基因频率的无偏估计和方差参照 Nei^[8]的方法进行。最常见等位基因的频率 ≤ 0.99 ,则该位点为多态位点。

1.4.2 有效等位基因数目(Ae) 反映多态位点上等位基因多样性^[14],计算方法如下:

$$Ae = 1 / \sum p_i^2$$

种水平相应参数是将6个种群合并当作1个种群进行计算。

1.4.3 Hardy-Weinberg 平衡检验 参照 Pasteur *et al.*^[19]的方法进行。

1.4.4 固定指数的计算和检验 采用 Nei^[18]的方法进行。

2. 结 果

2.1 青冈种群的等位基因频率

不同地点6个青冈种群中10个位点的等位基因频率见表2,可以发现青冈种群的遗传变异较大,在所有10个位点中,SOD-1、SOD-3、GOT-1、MDH-1四个位点(黄山种群 GOT-1位点含有0.6%的等位基因 B,低于1%的标准,因此也作纯合子处理)在所有种群都只有一条相同的带,为纯合子;天童种群中位点 SOD-2含有等位基因 B,但频率很低,仅为1.1%,而其他种群都只含等位基因 A,其他5个是多态位点。多态位点的等位基因频率存在一些差异(表2),位点 POD-1以等位基因 D 和 B 的频率较高,但宜兴种群中以等位基因 C 的频率最大;句容种群位点 EST-1的等位基因的频率比较均匀,而其他几个种群中等位基因 C 的频率大于0.5,EST-2也有类似现象,等位基因 D 的频率除句容种群小于0.5外,其他种群等位基因 D 的频率为0.634~0.869。

6个青冈种群平均每位点等位基因数目都比较接近,范围为2.1~2.5(表2)。平均为2.3,低于种水平的平均每位点等位基因数目(2.4),种群内多态位点的平均等位基因数目相差较大,最大的为5(EST-2),平均为3.516(表2),也低于种水平,种水平多态位点平均等位基因数目为4.0。

表2 青冈种群的等位基因频率

Tab 2 Allelic frequencies of *Cyclobalanopsis glauca* populations

位点 Locus	等位基因 Allele	种群等位基因频率 Allelic frequencies of populations					
		黄山 Huangshan 82*	天童 Tiantong 44	句容 Jurong 39	宜兴 Yixing 39	黄龙洞 Huanglongdong 33	九溪 Jiuxi 45
POD-1	A	0.036±0.014	0.011±0.011	0.077±0.030	0.103±0.034	0.031±0.022	0.068±0.027
	B	0.235±0.033	0.511±0.053	0.269±0.050	0.090±0.032	0.469±0.062	0.398±0.052
	C	0.060±0.018	0.159±0.039	0.090±0.032	0.538±0.056	0.031±0.022	0.023±0.016
	D	0.669±0.037	0.318±0.050	0.564±0.056	0.269±0.050	0.469±0.062	0.511±0.053
POD-2	A	—	0.023±0.016	0.026±0.018	0.013±0.013	0.015±0.015	0.102±0.032
	B	0.717±0.035	0.795±0.043	0.885±0.036	0.885±0.036	0.697±0.057	0.682±0.050
	C	0.012±0.008	0.034±0.019	0.013±0.013	—	0.167±0.046	0.091±0.031
	D	0.271±0.035	0.148±0.038	0.077±0.030	0.103±0.034	0.121±0.040	0.125±0.035
EST-1	A	0.096±0.023	0.179±0.042	0.308±0.052	0.218±0.047	0.303±0.057	0.321±0.051
	B	0.151±0.028	0.155±0.039	0.256±0.049	0.077±0.030	0.076±0.033	0.107±0.034
	C	0.747±0.034	0.607±0.053	0.436±0.056	0.705±0.052	0.621±0.060	0.560±0.054
	D	0.006±0.006	0.060±0.026	—	—	—	0.012±0.012
EST-2	A	—	—	0.013±0.013	—	—	—
	B	0.084±0.022	0.122±0.036	0.115±0.036	0.039±0.022	—	0.012±0.012
	C	0.030±0.013	0.134±0.038	0.359±0.054	0.092±0.033	0.078±0.034	0.036±0.020
	D	0.825±0.029	0.634±0.053	0.269±0.050	0.776±0.048	0.797±0.050	0.869±0.037
	E	0.054±0.018	0.098±0.033	0.244±0.049	0.039±0.022	0.125±0.041	0.036±0.020
	F	0.006±0.006	0.012±0.012	—	0.053±0.026	—	0.048±0.023
SOD-1	A	1.000±0.000	1.000±0.000	1.000±0.000	1.000±0.000	1.000±0.000	1.000±0.000
SOD-2	A	1.000±0.000	0.989±0.011	1.000±0.000	1.000±0.000	1.000±0.000	1.000±0.000
	B	—	0.011±0.011	—	—	—	—
SOD-3	A	1.000±0.000	1.000±0.000	1.000±0.000	1.000±0.000	1.000±0.000	1.000±0.000
GOT-1	A	0.994±0.006	1.000±0.000	1.000±0.000	1.000±0.000	1.000±0.000	1.000±0.000
	B	0.006±0.006	—	—	—	—	—
GOT-2	A	0.127±0.026	0.080±0.029	0.154±0.041	0.064±0.028	0.212±0.050	0.205±0.043
	B	0.873±0.026	0.920±0.029	0.846±0.041	0.936±0.028	0.788±0.050	0.795±0.043
MDH-1	A	1.000±0.000	1.000±0.000	1.000±0.000	1.000±0.000	1.000±0.000	1.000±0.000
每位点平均等位基因数目 Number of alleles per loci		2.1	2.5	2.3	2.2	2.1	2.4

* 样本数 Sample size

种群水平的有效等位基因数目为1.310~1.659,平均为1.446(表3)。种水平有效等位基因数目为1.467,两者相差不大。种群间多态位点的有效等位基因数目变化较大,以GOT-2的最少,平均为1.321,POD-1的最大,为2.377;而变化幅度最大的为位点EST-2,范围为1.315~3.647;但所有位点的平均值在各种群之间没有多大差异(表3)。

表3 青冈种群的有效等位基因数目

Tab 3 Number of effective alleles of *Cyclobalanopsis glauca* populations

位点 Locus	黄山 Huangshan	天童 Tiantong	句容 Jurong	宜兴 Yixing	黄龙洞 Huanglongdong	九溪 Jiuxi	平均 Mean
POD-1	1.971	2.576	2.471	2.625	2.265	2.354	2.377
POD-2	1.702	1.524	1.267	1.261	1.892	2.003	1.608
EST-1	1.695	2.336	2.854	1.816	2.068	2.336	2.184
EST-2	1.445	2.249	3.647	1.621	1.532	1.315	1.967
SOD-1	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
SOD-2	1.000	1.023	1.000	1.000	1.000	1.000	1.004
SOD-3	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
GOT-1	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
GOT-2	1.284	1.172	1.352	1.136	1.502	1.482	1.321
MDH-1	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
平均 Mean	1.310	1.488	1.659	1.346	1.425	1.449	1.446

2.2 青冈种群 Hardy-Weinberg 平衡检验

对6个青冈种群的基因型进行 Hardy-Weinberg 平衡检验(表4),结果表明,多态位点中 EST-2在所有种群中都显著偏离 H-W 平衡, EST-1除在句容种群外,也都显著偏离 H-W 平衡。GOT-2除杭州九溪的种群不符合 H-W 平衡外,其余种群都符合该平衡。其他几个位点在部分种群中符合 H-W 平衡。造成这种现象主要是种群中含有过量的纯合子,表现为固定指数(F)较大,多大于0(表5),其中黄山种群的 POD-1、EST-1和宜兴种群的 POD-1位点的 F 与0差异达到极显著水平($P < 0.01$),黄山种群的位点 POD-2、EST-2,句容种群的 POD-1和 EST-2

表4 6个青冈种群的 Hardy-Weinberg 平衡检验

Tab 4 Hardy-Weinberg equilibrium test of six *Cyclobalanopsis glauca* populations

位点 Locus		黄山 Huangshan	天童 Tiantong	宜兴 Yixing	句容 Jurong	黄龙洞 Huanglongdong	九溪 Jiuxi
POD-1	X^2	44.454	10.390	46.578	19.973	2.507	10.628
	自由度	6	6	6	6	6	6
	显著性	***	n.s.	***	***	n.s.	n.s.
POD-2	X^2	7.822	2.540	0.651	3.224	3.543	28.431
	自由度	3	6	3	6	6	6
	显著性	**	n.s.	n.s.	n.s.	***	
EST-1	X^2	30.781	21.475	8.157	7.451	12.193	21.226
	自由度	6	6	3	3	3	6
	显著性	***	***	**	n.s.	***	***
EST-2	X^2	39.686	23.044	18.413	22.991	20.050	19.163
	自由度	10	10	10	10	3	10
	显著性	***	**	**	**	***	**
SOD-2	X^2	—	0.0072	—	—	—	—
	自由度	—	1	—	—	—	—
	显著性	—	n.s.	—	—	—	—
GOT-2	X^2	0.241	3.759	0.184	1.752	2.493	22.776
	自由度	1	1	1	1	1	1
	显著性	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	***

n.s. 不显著 No-significance

** $P < 0.05$ *** $P < 0.01$

以及宜兴种群的 EST-1 和黄龙洞种群 EST-2 的 F 与 0 的差异达到显著水平 ($P < 0.05$)。天童种群有 3 个位点的 F 为负值, 但与 0 的差异都未达到显著水平 (表 5), 其他负的 F 与 0 的差异也未达显著水平。

表 5 6 个青冈种群的固定指数

Tab 5 Fixation indices estimated for six populations of *Cylobalanopsis glauca*

位点 Locus	黄山 Huangshan	天童 Tiantong	句容 Jurong	宜兴 Yixing	黄龙洞 Huanglongdong	九溪 Jiuxi
POD-1	0.3830 ^a	-0.2275	0.3986 ^b	0.6268 ^a	-0.0849	-0.2257
POD-2	0.2703 ^b	-0.1227	0.1505	-0.1170	0.1007	0.0016
EST-1	0.3537 ^a	0.2850	-0.0268	0.3747 ^b	0.0629	0.0857
EST-2	0.2563 ^b	0.1620	0.3276 ^b	-0.0705	0.5602 ^a	-0.0425
SOD-1	—	—	—	—	—	—
SOD-2	—	-0.0089	—	—	—	—
SOD-3	—	—	—	—	—	—
GOT-1	—	—	—	—	—	—
GOT-2	0.0724	0.2281	0.2127	-0.0667	0.1864	0.1057
MDH-1	—	—	—	—	—	—
平均 Mean	0.2671	0.0528	0.1470	0.1495	0.1651	-0.0752
全部位点 All locus	0.2950	0.0453	0.2219	0.3251	0.1277	0.0646

* —: 指仅含一个等位基因, F 值无法计算 —: A single alleles is fixed in the population, hence F is undefined.
a: $P < 0.01$ b: $P < 0.05$

3. 讨 论

青冈在种群和种水平上都维持有较高的遗传变异, Hamrick 和 Godt 对已研究的植物遗传变异进行了统计, 种群水平多态位点百分比平均为 35%^[15], 青冈种群平均为 51.7%; 在种水平上, 青冈与其他植物的均值差不多, 分别为 50% 和 51%。平均等位基因数目也反映了这一点, 其他植物平均等位基因数目的均值为 1.52 (种群水平), 而青冈为 2.3。青冈种群水平和种水平上维持较高的遗传变异是与其广泛分布性有关的, 已有的研究表明, 广泛分布的物种常常维持有较高的遗传变异^[15, 17], 分布范围广, 环境因子变化较大, 选择对不同种群中等位基因的压力不同, 在广泛分布物种多态性的维持中起较大的作用。青冈的一些生活史特征, 如繁殖力强, 生命周期长, 种群世代重叠, 在同一种群中存在不同世代的个体, 也是青冈多样性较高的原因之一^[15]。另外, 青冈遗传变异性较大与青冈种群基因流较大也有关系。

青冈种群中不少位点偏离 Hardy-Weinberg 平衡, 并达到显著水平 (表 4), 主要是由于种群中存在过量的纯合子 (杂合子不足), 表现为固定指数大于 0。杂合子不足在许多远交植物中存在^[16], 这种现象可能与青冈的自交和近交有关, 青冈是自交亲合的物种, 杂合率较低, 并且, 个体的交配多是与邻体之间进行的, 而邻体往往与该个体存在亲缘关系, 因此常常发生双亲近交。青冈也可以行无性繁殖, 从而增加近交的程度, 可能也是导致青冈种群中杂合子不足的原因之一。

参 考 文 献

- 1 王中仁. 1994; 生物多样性 2(3): 149~156.
- 2 王中仁. 1994; 生物多样性 2(4): 213~219.
- 3 朱广廉, 钟海文, 张爱琴. 1990; 植物生理学实验指导, 北京大学出版社, 北京. 193~200页.
- 4 宋永昌, 王祥荣. 1995; 浙江天童国家森林公园的植被和区系, 上海科学技术文献出版社, 上海.
- 5 吴征镒主编. 1980; 中国植被, 科学出版社, 北京.
- 6 杨一平, 王述礼, 尹瑞雪. 1985; 森林生态系统研究 5: 151~156.
- 7 杨一平, 尹瑞雪, 张军丽. 1986; 东北林业大学学报 14(2): 34~42.
- 8 杨一平, 尹瑞雪, 张军丽. 1989; 林业科学 25(3): 201~208.
- 9 罗广华, 王爱国. 1983; 植物生理学通讯 (6): 44~45.
- 10 胡能书, 万贤国. 1985; 同工酶技术及其应用, 湖南科学技术出版社, 长沙.
- 11 黄 生. 1994; 生物多样性 2(2): 68~75.
- 12 童再康, 范义荣, 何贤池等. 1993; 福建林学院学报 13(4): 414~420.
- 13 葛 颂, 黄敏仁, 许 农. 1987; 遗传学报 14(6): 428~435.
- 14 Gregorius H R, J Krauhaussen, G Muller-Starch. 1986; *Heredity* 56: 255~262.
- 15 Hamrick J L, M J W Godt. 1990; Allozyme diversity in plant species. In: Brown A H D, M T Clegg, A L Kahler *et al.* (eds.), *Plant Population Genetics, Breeding, and Genetic Resources*. Sinauer Associates Inc., Sunderland, pp 43~63.
- 16 Heywood J S. 1991; *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 22: 335~355.
- 17 Loveless M D, J L Hamrick. 1984; *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 15: 65~95.
- 18 Nei M. 1987; *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York, pp 149~166.
- 19 Pasteur N, G Pasteur, F Bonhomme *et al.* 1988; *Practical Isozyme Genetics (English edition)*. Ellis Horwood Limited, Chichester, pp 174~186.
- 20 Wendel J F, N F Weeden. 1989; Visualization and interpretation of plant isozymes. In: Soltis D E, P S Soltis (eds.), *Isozymes in Plant Biology*, Dioscorides Press. pp 5~45.

(责任编辑: 盛国英)

欢迎订阅中国环境科学学会会刊

环 境 导 报

《环境导报》为综合指导类科技期刊, 曾获江苏省、华东地区及全国优秀科技期刊奖, 1995年5月获江苏省优秀期刊评比“双十佳”殊荣, 收入1993年全球环境百科全书。逢双月20日出版。报刊代号: 28-124, 全年定价: 12.00元。

主旨: 环境与发展。方针: 发挥指导、引导、疏导作用。特色: 内容新颖, 时代感强; 文章精短, 回味无穷; 加工讲究, 开卷舒畅。探讨环境建设的重大热点

问题/研究环境执法理论与实践/推广清洁生产及污染治理实用技术/介绍乡镇环境建设典型与经验/报道环保产业发展势态与产品。栏目: 专论、综述、法制论坛、环境科技、工作研究、产业长廊、乡镇园地、世界环境、港台之窗、知识天地、动态信息、服务台等。

本刊编辑部地址: 南京市梅园新村44号, 邮政编码: 210018, 电话: (025)4410214。