

用同工酶研究水杉群体的遗传结构

张文英¹ 李明鹤²

(1 华南农业大学林学院, 广州, 510642; 2 华中农业大学林学系)

摘要 应用同工酶分析技术, 分析了水杉原产地 3 个天然小群体的遗传结构。结果表明, 水杉群体具有较高的分子变异水平, 3 个小群体的多态座位百分率达 $83.3\% \pm 0.072$, 等位基因平均数为 2.94 ± 0.380 , 平均期望杂合度为 0.3873 ± 0.0079 。小群体间的分化程度不高, 3 个小群体平均遗传距离为 0.0857 ± 0.0318 ; 同工酶测定的总变异中, 91.4% 的变异来自小群体内, 仅 8.6% 的变异来自小群体间。

关键词 水杉; 同工酶; 聚丙烯酰胺凝胶电泳; 群体遗传结构

中图分类号 S722.31

了解树木自然群体的遗传结构是进行树木遗传改良的基础。随着同工酶技术的广泛应用, 人们以同工酶作为遗传标记来研究树木群体的变异模式和机理、了解群体间和群体内基因多样性的分布信息等(Adams, 1983)。

水杉(*Metasequoia glyptostroboides* Hu et Cheng)原产于我国鄂、湘、川 3 省交界处, 是珍贵孑遗树种之一。本研究利用同工酶技术, 从分子水平上探讨水杉群体的遗传结构, 为遗传改良提供理论依据。

1 材料与方法

原产地水杉大树多为分散生长, 本研究根据不同地域分布划分为 A、B、C 3 个小群体。从 49 个单株上分株采集球果并编号, 每株采集球果 20 ~ 250 个, 分别净种后在 0 ℃ 以下保存, 用于同工酶分析。

1.1 同工酶测定

采用不连续双垂直板聚丙烯酰胺凝胶电泳, 对 3 个小群体 49 个单株的种子胚乳进行同工酶测定, 共测定以下 6 种酶系统: 谷氨酸草酰乙酸转氨酶(GOT; E.C.2.6.1.1), α -淀粉酶(α -AMY; E.C.3.2.1.1), 苹果酸酶(ME; E.C.1.1.1.40), 苹果酸脱氢酶(MDH; E.C.1.1.1.27), 6-磷酸葡萄糖异构酶(PGI; E.C.5.3.1.9), 酯酶(EST; E.C.3.1.1.2)。样品的提取、电泳的凝胶和缓冲系统、电泳条件以及 6 种酶的染色方法另文报导(张文英, 1994)。

1.2 资料整理与分析

由酶的缩写字母代表该酶系统, 酶的缩写加连字号和数字来区别酶的座位。各座位上等位基因依迁移率 Rf 值不同分别用 a, b, c, ..., o 等表示, 不表达等位基因(Null allele)用 o 表示。

采用如下同工酶座位变异的度量指标:

1.2.1 多态座位百分率(P) 经同工酶测定所得多态座位数占测定总座位数的百分比率即为 P 。当群体中某座位有 0.01 以上频率的复等位基因共存时, 该座位就称为多态的, 否

1993-09-01 收稿

则就是单态的(根井正利, 1983)。

1.2.2 等位基因平均数(A)

$$A = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n a_i$$

式中: a_i = 第 i 个座位上的等位基因数;

n = 同工酶测定的座位总数(Brown et al, 1983)。

1.2.3 平均期望杂合度(H_e)

$$H_e = 1/n \sum_{i=1}^e h_{e_i}$$

式中: $h_{e_i} = 1 - \sum_j P_{ij}^2$, 为第 i 个座位上的期望杂合度, P_{ij} 为第 i 个座位上第 j 个等位基因的频率(根井正利, 1983)。

1.2.4 固定指数(F)

$$F = 1 - (H_o / H_e)$$

式中: H_o 为实际观察杂合度; H_e 为理论期望杂合度。用 F 检验群体中实际杂合体比率与理论期望杂合体比率的偏离程度及原因(Wright, 1965)。

1.2.5 异交率(t)

$$t = (1 - F) / (1 + F)$$

t 值大于 1, 表示杂合体超过 Hardy-Weinberg 期望值, t 值小于 1 则纯合体过量(Wright, 1965)。

1.2.6 基因分化系数(G_{ST})

将总群体基因多样性(H_T)分解为小群体内基因多样性(H_s)和小群体间基因多样性(D_{ST})两部分, 从而求出群体内和群体间基因多样性相对量。即, $H_T = H_s + D_{ST}$, 则,

$$\begin{aligned} G_{ST}\% &= D_{ST}/H_T \times 100\% \\ &= (H_T - H_s)/H_T \times 100\% \end{aligned}$$

G_{ST} 反映了群体间变异占总变异量的比值大小, 是度量群体分化的理想指标(根井正利, 1983; Brown et al, 1983)。

1.2.7 遗传距离(D)

$$D = -\ln I, I = J_{XY}/\sqrt{J_X \cdot J_Y}$$

其中: $J_X = \frac{1}{n} \sum_i \sum_j X_{ij}^2$; $J_Y = \frac{1}{n} \sum_i \sum_j Y_{ij}^2$; $J_{XY} = \frac{1}{n} \sum_i \sum_j X_{ij} \cdot Y_{ij}$

式中: X_{ij} = X 群体第 i 个座位第 j 个等位基因的频率; Y_{ij} = Y 群体第 i 个座位第 j 个等位基因的频率。

D 是基因频率的函数, 表示两个特定群体间的遗传差异(根井正利, 1983)。

2 结果与分析

所分析的 6 种酶系统共受 16 个座位控制, 所有座位均为多态座位(张文英, 1994)。在此主要利用这些酶座位作为遗传标志进行群体遗传结构的分析。

2.1 群体的变异水平和平衡状况

2.1.1 水杉群体各座位的等位基因频率 根据同工酶谱带统计水杉总群体以及每个小群体在各座位上的等位基因频率,列于表 1。

表 1 多态座位的等位基因频率

座 位	等位基因	总群体等位 基因频率	小 群 体 等 位 基 因 频 率			
			A	B	C	平 均
Got-1	a	0.295 9	0.289 5	0.416 7	0.222 2	0.309 5
	b	0.551 1	0.552 6	0.500 0	0.583 3	0.545 3
	c	0.040 8	0.052 6	0.000 0	0.055 6	0.036 0
	o	0.112 2	0.105 3	0.083 3	0.138 9	0.109 2
Got-2	a	0.989 8	0.973 7	1.000 0	1.000 0	0.991 2
	o	0.010 2	0.026 3	0.000 0	0.000 0	0.008 8
Got-3	a	0.989 8	0.973 7	1.000 0	1.000 0	0.991 2
	b	0.010 2	0.026 3	0.000 0	0.000 0	0.008 8
α -Amy-1	a	0.857 1	0.868 4	0.769 2	0.911 8	0.849 8
	o	0.142 9	0.131 6	0.230 8	0.088 2	0.150 2
α -Amy-2	a	0.551 0	0.526 3	0.076 9	0.941 2	0.514 8
	b	0.244 9	0.157 9	0.615 4	0.058 8	0.277 4
	c	0.142 9	0.210 5	0.230 8	0.000 0	0.147 1
	d	0.020 4	0.000 0	0.076 9	0.000 0	0.025 6
	e	0.040 8	0.105 3	0.000 0	0.000 0	0.035 1
Me-1	a	0.166 7	0.210 5	0.166 7	0.117 6	0.164 9
	o	0.833 3	0.789 5	0.833 3	0.882 4	0.835 1
Me-2	a	0.385 4	0.368 4	0.416 7	0.382 4	0.389 2
	b	0.281 3	0.315 8	0.291 7	0.235 3	0.280 9
	c	0.291 7	0.315 8	0.166 7	0.352 9	0.278 5
	d	0.020 8	0.000 0	0.083 3	0.000 0	0.027 8
	o	0.020 8	0.000 0	0.041 6	0.029 4	0.023 6
Mdh-1	a	0.437 5	0.342 1	0.458 3	0.529 4	0.443 3
	b	0.010 5	0.000 0	0.000 0	0.029 4	0.009 8
	o	0.552 0	0.657 9	0.541 7	0.441 2	0.546 9
Mdh-2	a	0.937 5	1.000 0	1.000 0	0.823 5	0.941 2
	b	0.062 5	0.000 0	0.000 0	0.176 5	0.058 8
Mdh-3	a	0.989 6	1.000 0	1.000 0	0.970 6	0.990 2
	b	0.010 4	0.000 0	0.000 0	0.029 4	0.009 8
Pgi-1	a	0.022 7	0.000 0	0.000 0	0.071 4	0.023 8
	b	0.227 3	0.055 6	0.333 3	0.357 2	0.248 7
	c	0.022 7	0.055 6	0.000 0	0.000 0	0.018 5
	d	0.068 2	0.111 1	0.000 0	0.071 4	0.060 8
	e	0.056 8	0.111 1	0.000 0	0.035 3	0.049 0
	f	0.022 7	0.055 6	0.000 0	0.000 0	0.018 5
	g	0.068 2	0.111 1	0.000 0	0.071 4	0.060 8
	h	0.045 5	0.111 1	0.000 0	0.000 0	0.037 0
	i	0.022 7	0.000 0	0.000 0	0.071 4	0.023 8

表 1(续) 多态座位的等位基因频率

座 位	等位基因	总群体等位	小 群 体 等 位 基 因 频 率			
		基 因 频 率	A	B	C	平 均
Pgi - 2	j	0.0227	0.0000	0.0000	0.0714	0.0238
	o	0.4205	0.3888	0.6667	0.2500	0.4352
Pgi - 3	a	0.5455	0.5833	0.5833	0.4643	0.5436
	b	0.4091	0.3889	0.4167	0.4286	0.4114
	c	0.0227	0.0278	0.0000	0.0357	0.0212
	o	0.0227	0.0000	0.0000	0.0714	0.0238
Est - 1	a	0.5106	0.7222	0.5833	0.2353	0.5136
	o	0.4894	0.2778	0.4167	0.7647	0.4864
Est - 2	a	0.0106	0.0278	0.0000	0.0000	0.0093
	b	0.0851	0.0000	0.3333	0.0000	0.1111
	c	0.0532	0.0556	0.0417	0.0588	0.0520
	d	0.0106	0.0278	0.0000	0.0000	0.0093
	e	0.4893	0.6389	0.3750	0.4118	0.4752
	f	0.0213	0.0000	0.0000	0.0588	0.0196
	g	0.0851	0.0556	0.0000	0.1765	0.0774
	h	0.0214	0.0000	0.0000	0.0588	0.0196
	o	0.2234	0.1943	0.2500	0.2353	0.2265
Est - 3	a	0.2234	0.2222	0.2083	0.2353	0.2219
	b	0.1489	0.1667	0.2500	0.0588	0.1585
	c	0.1277	0.0833	0.0000	0.2647	0.1160
	d	0.1170	0.1667	0.0000	0.1471	0.1046
	e	0.0106	0.0000	0.0417	0.0000	0.0139
	f	0.0213	0.0000	0.0833	0.0000	0.0278
	g	0.1064	0.0833	0.1667	0.0822	0.1127
	o	0.2447	0.2778	0.2500	0.2059	0.2446

利用表 1 中基因频率计算出衡量群体变异水平的几个指标列于表 2。

表 2 3 个小群体的遗传参数

小群体	多态座位百分率	等位基因平均数	平均期望杂合度	固定指数	异交率
	P/%	A	H _e	F	t
A	87.5	3.13	0.3826	0.6495	0.2125
B	75.0	2.50	0.3964	0.6095	0.2426
C	87.5	3.19	0.3830	0.6454	0.2155
平均	83.3	2.94	0.3873	0.6348	0.2235
(±SE)	(±0.0722)	(±0.3802)	(±0.0079)		

如果这些酶座位具有代表性, 就可以认为在这 3 个水杉群体中, 约有 83% 的基因座位是多态的, 平均每个座位上有 2.94 个等位基因, 若群体为随机交配群体, 就会有大约 38% 的杂合体。

2.1.2 群体的平衡状况 据表1数据,计算出各群体在每个座位上的期望杂合度(h_e)和观察杂合度(h_o),以及各座位上的固定指数(F)和异交率(t)值,列于表3。从表2、表3看,每个小群体及总群体的 F 大于零;除Got-2, Got-3, Mdn-3, Pgi-2的 F 为负值外,其余12个座位的 F 值都大于零,说明群体中纯合体过量,杂合体不足,群体处于不平衡状况。3个小群体及总群体的 t 值均小于1;除Got-2, Got-3, Mdh-3, Pgi-2座位的 t 值大于1外,其余12个座位的 t 值都小于1。 t 值偏低,说明很可能存在近交。

表3 各座位上的杂合度(h_e, h_o)、固定指数(F)及异交率(t)值

座 位	杂 合 度		固定指数 F	异交率 t
	期望值 h_e	观察值 h_o		
Got-1	0.584 8	0.501 5	0.142 4	0.750 7
Got-2	0.017 1	0.017 5	-0.023 4	1.047 9
Got-3	0.017 1	0.017 5	-0.023 4	1.047 9
α -Amy-1	0.248 2	0.175 8	0.291 7	0.548 3
α -Amy-2	0.436 5	0.000 0	1.000 0	0.000 0
Me-1	0.272 6	0.000 0	1.000 0	0.000 0
Me-2	0.680 9	0.491 7	0.277 9	0.565 1
Mdh-1	0.490 3	0.140 1	0.714 3	0.166 7
Mdh-2	0.096 9	0.000 0	1.000 0	0.000 0
Mdh-3	0.019 0	0.019 6	-0.031 6	1.065 3
Pgi-1	0.672 5	0.044 4	0.934 0	0.034 1
Pgi-2	0.529 4	0.596 3	-0.126 4	1.289 3
Pgi-3	0.261 7	0.018 5	0.929 3	0.036 6
Est-1	0.415 8	0.055 6	0.866 3	0.071 6
Est-2	0.654 6	0.102 4	0.844 0	0.084 6
Est-3	0.799 5	0.084 9	0.893 8	0.056 1

2.2 群体的分化

2.2.1 基因分化系数(G_{ST}) 据表1数据,计算出总基因变异(H_T),群体内基因变异(H_S),基因分化系数(G_{ST})列于表4。

表4中 H_T , H_S 和 G_{ST} 值在位点间的变动很大,说明不同座位对基因多样度的贡献是不相同的。 G_{ST} 平均值等于8.6%,即小群体间的变异量平均占总变异量的8.6%,而大多数变异,即91.4%的变异存在于小群体内。

以上分析说明这3个水杉群体间的差异很小,分化程度较低,大部分的变异来自小群体内的单株间。这些群体间具有遗传连续性,说明水杉在研究的座位上不存在显著的地理差异。

2.2.2 遗传距离(D) 用Nei(1972)的标准遗传距离(D)来估测两群体间分化的程度和模式,计算出3个小群体两两间的遗传距离见表5。

小群体B和C间的 D 值最大,而地理距离最近;A和C间 D 值最小,而地理距离最远,看出遗传距离 D 与地理距离之间无明显关系。3个小群体间的平均遗传距离 $D=0.0857$,说明这些小群体间有一定的分化,但分化程度较低。

表 4 基因多样度等级分析

座 位	总基因变异	群体内基因变异	基因分化系数
	H_T	H_s	$G_{ST}/\%$
Got-1	0.594 5	0.584 8	1.63
Got-2	0.020 2	0.017 1	15.35
Got-3	0.020 2	0.017 1	15.35
α -Amy-1	0.248 2	0.245 0	1.29
α -Amy-2	0.613 9	0.436 5	28.90
Me-1	0.277 8	0.272 6	1.87
Me-2	0.686 4	0.680 9	0.80
Mdh-1	0.503 8	0.490 3	2.68
Mdh-2	0.117 2	0.096 9	17.32
Mdh-3	0.020 6	0.019 0	7.77
Pgi-1	0.754 3	0.672 5	10.84
Pgi-2	0.534 0	0.529 4	0.86
Pgi-3	0.282 9	0.261 7	7.49
Est-1	0.499 8	0.415 8	16.81
Est-2	0.692 2	0.654 6	5.43
Est-3	0.826 2	0.799 5	3.23
平 均	0.418 3	0.387 1	8.60
(\pm SE)	(\pm 0.277 6)	(\pm 0.261 4)	

表 5 3 个小群体间的遗传距离 D

小群体	B	C
	A	0.070 9
B		0.122 2
$D(\pm$ SE)		0.085 7(\pm 0.031 8)

3 讨论

迄今在酶座位分子水平上所进行的大量研究表明, 树木群体是生物群体中变异最丰富的群体, 而且树木群体的分化水平都不高, 绝大部分的变异来自群体之内(Mitton, 1983), 本研究中水杉也是这种情况。

群体的交配系统是影响群体遗传平衡状况的因素。Linhart 等(1981)在西黄松(*Pinus ponderosa*)的研究中认为由遗传上具有亲缘关系的个体组成的家系组群会导致大量的近交。其证据之一就是杂合体显著减少, 固定指数正值很高。水杉 3 个小群体中的纯合体明显过量, 异交率偏低, 群体处于不平衡状态。水杉群体的异交率低可能和群体的遗传结构以及群体的起源有关。因为在其原产地, 株数少, 且相互远离, 势必会增加自交、近交的机会。例如湖北利川县谋道乡只有一株原生母树。另外, 历史上可能有群体变得很小的时候, 如解放前, 只有 4 000 余株原生古树, 从而造成近交, 虽然群体中基因交流频繁, 但遗传起源狭窄必然增加近交的机会。此外, 生境条件等因素也会影响到群体的遗传结构。

水杉群体具有较高的遗传变异水平, 群体的变异体现在各个层次上, 个体间的差异是很突出的, 有时群体内个体间的差异超过群体间的差异。所以, 在水杉的遗传改良中, 优良单株的选择是一个不可忽视的重要方面。随机交配会提高杂合体频率, 建立种子园可能有利于提

高后代林分生长量。

参考文献

- 张文英,李明鹤.1994.水杉同工酶遗传变异的研究.华南农业大学学报,15(2):118~123
 根井正利.1983.分子群体遗传学与进化论.王家玉译.北京:农业出版社,89~107
 Adams W T.1983. Application of isozymes in tree breeding. In: Tanksley S D, Orton, T J,eds. Isozymes in Plant Genetics and Breeding, Part A. Amersterdam: Elsevier Science Publishers, 381~400
 Brown A H D, Weir B S. 1983. Measuring genetic variability in plant population. In: Tanksley S D, Orton T J, eds. Isozymes in Plant Genetics and Breeding, Part A. Amersterdam: Elsevier Science Pudlishers, 219~239
 Linhart Y B, Davis M L, Mitton J B.1981. Genetic variation in space and time in a population of Ponderosa pine. Heredity, 46:407~425
 Mitton J B.1983. Conifers. In: Tanksley S D, Orton T J, eds. Isozymes in Plant Genetics and Breeding, Part B. Amersterdam: Elsevier Science Publishers, 443~472
 Wrights S.1965. Some polymorphic isozymes in the seed endosperm of sitka spruce. Evolution, 19:358~420

AN ANALYSIS OF THE POPULATION GENETIC STRUCTURE OF *Metasequoia glyptostroboides* BY ISOZYME TECHNIQUE

Zhang Wenying¹ Li Minghe²

(1 College of Forestry, South China Agr. Univ., Guangzhou, 510642; 2 Dept. of Forestry, Huazhong Agr. Univ.)

Abstract

Population genetic structure in three separate clusters of *Metasequoia glyptostroboides* from their original distribution range was studied by isozyme analysis based on polyacrylamide gel electrophoresis. The results were as follows: The level of genetic variability in the population of *Metasequoia glyptostroboides* was relatively high. The percentage of polymorphic loci(P), average number of alleles per loci (A) and average expected heterozygosity(H_e) were $83.3\% \pm 0.0722$, 2.9375 ± 0.3802 and 0.3873 ± 0.0079 , respectively. Similar to reports for other conifers, the differentiation level among clusters of *Metasequoia glyptostroboides* was relatively low. The average genetic distance(D) among the three clusters was 0.0857 ± 0.0318 . Only 8.6% of the allozyme variability was attributed to the mutation among the clusters while the remaining 91.4% resided within their respective clusters.

Key words *Metasequoia glyptostroboides*; isozyme; polyacrylamide gel electrophoresis; population structure