

板栗在6个同工酶位点上的遗传变异^{*}

张辉^{**} 柳 鎏

(江苏省中国科学院植物研究所, 南京 210014)

Villani F

(Institute of Agriforestry, CNR 0510 Porano (TR), Italy)

摘 要 利用水平板淀粉凝胶电泳技术检验了板栗8个居群在6个同工酶位点(*Per-2*、*Got-2*、*Est-2*、*Gpi-2*、*Idh-1*、*Idh-2*)上的遗传变异(多态位点百分率为97.9%,平均等位基因数为2.54,平均预期杂合值为0.452)。在同一水平上,其遗传多样性水平显著高于欧洲栗。总的基因多样性中,89.2%发生在居群内,10.8%发生于居群间,各居群之间的遗传距离为0.036~0.394,有些居群分化较大,尤其在个别位点上更为明显。初步研究表明,其丰富的遗传变异及其高水平的分化度可能与其生境的多样性、风媒异交等因素造成的长距离的基因漂变有关。

关键词 板栗, 等位酶, 遗传变异

A research on genetic variation of *Castanea mollissima* at six isozyme loci/ Zhang Hui¹⁾, Liu Liu¹⁾, Villani F²⁾

Abstract Allozyme genetic variation at six loci (*Per-2*, *Got-2*, *Est-2*, *Gpi-2*, *Idh-1*, *Idh-2*) in eight populations of *C. mollissima* was investigated using starch gel electrophoresis. The result showed very high genetic variation in the populations with the proportion of polymorphic loci of 97.9% in the average expected heterozygosity of 0.452. In general, about 89.2% of the genetic variation was attributed within populations, while the remaining 10.8% among populations. The genetic distance ranged from 0.036~0.394. There existed obvious difference, especially in a few locus. The primary result indicted the high level of genetic variation and difference could be closely related to the long gene migration flow which attributed to the diversity of its habitat, the outcrossing-winded character and so on.

Key words *Castanea mollissima*, Allozyme, Genetic variation

Author's address 1) Jiangsu Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210014

2) Institute of Agriforestry, CNR 0510 Porano (TR), Italy

板栗(*Castanea mollissima*)分布范围较广(N 40°30'~18°30',南北跨22°),抗逆性强,品质优良,利用价值高,是我国栽培最早的果树之一。它是高度杂合性树种,后代变异大,遗传多样性丰富。南京中山植物园在全国板栗种质资源调查的基础上,将全国板栗划分为6大地方种群,并进行了性状变异等方面的研究^[1]。近年来,王同坤等对板栗不同品种的过氧化物酶进行研究,并利用信息凝聚法,探讨了它们之间的亲缘关系^[2]。温奎等对栽培栗的过氧化物酶进行了数量化分析^[3]。与之相比,国外对欧洲栗(*Castanea sativa*)的研究较为深入。Villani F等人对土耳其、意大利、法国等地的欧洲栗50个居群,约1400个样品的11种同工酶进行研究^[4~6],揭示了其种的遗传变异水平及群体遗传结构,并结合形态、生理、生态等因子进行了相关性研究。

本研究力图在现有研究的基础上,通过水平板淀粉凝胶电泳技术,应用等位酶分析方法,

收稿日期:1997-05-13;接受日期:1998-12-11

^{*} 本研究为中意合作项目,感谢意大利遗传协会的资助。

^{**} 张辉现在中国林科院工作

从分子水平上研究板栗有代表性的同工酶位点的遗传多样性,初步了解其群体遗传结构。这对今后深入研究板栗的遗传多样性中心、迁移路线、起源中心及栗属植物的系统进化研究意义重大。同时对板栗种质资源的发掘、利用及保护提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 采样

以冬季栗芽为实验材料,8 个采样居群分别在全国 5 大板栗地方品种群的分布区内取样(见表 1),每个居群随机取 30 株实生树(居群 5、8 除外)作为样本,每株树分取不同方位的 5 个枝条,每个枝条上至少取 5 个健硕的芽。

表 1 板栗 8 个采样点的地理位置

Table 1 Geographical sites of the eight sampled populations of *C. mollissima*

编号 No.	地方居群 Local population	采集点 Location	北纬 North latitude	东经 East longitude	海拔(m) Altitude
1	长江流域 the Yangtze River valley	江苏溧水 Lishui, Jiangsu	31 34	119 °	96
2	长江流域 the Yangtze River valley	安徽合肥 Hefei, Anhui	32 °	116 38	156
3	西南 Southwest China	云南宜良 Yiliang, Yunnan	24 55	103 1	1532.1
4	西南 Southwest China	云南 Yunnan *	/	/	/
5	东南 Southeast China	福建连城 Liancheng, Fujian	25 48	116 32	317.5
6	华北 North China	江苏新沂(1) Xinyi, Jiangsu(1)	34 20	118 25	27
7	华北 North China	江苏新沂(2) Xinyi, Jiangsu(2)	34 20	118 25	27
8	西北 Northwest China	西北 * * Northwest China	/	/	/

注: * 为南京中山植物园引入的云南种质 The germplasm introduced from Yunnan by Nanjing Botanical Garden

* * 为南京中山植物园引入的西北种质 The germplasm introduced from Northwest China by Nanjing Botanical Garden

1.2 电泳

电泳酶液提取参照 Villani F^[4]作法,并略加以修改,配置 100 ml 提取液,内含 0.01 M Tris 1.20 g,EDTA 0.208 g, PVP 4 %, DTT 0.210 g, 巯基乙醇 100 ~ 1000 μl , pH 7.3。

分析的 4 种酶体系及电泳系统如下:PER, GPI(A &B 体系)^[7], GOT(Poulic 体系)^[8], IDH (TC 体系 ,pH 6.5)^[9]。

1.3 遗传分析方法

遗传分析方法根据 Wendel 等^[10]作法,记录各位点的基因型。各等位基因频率见表 2。本研究中,当某位点有 0.01 以上频率的复等位基因共存时,该位点为多态,否则为单态。采用常用遗传多样性指标(多态位点百分率 *P*,平均每个位点的等位基因数 *A*,预期杂合度 *He*)对各位点进行分析。

2 结果与分析

通过 5 个酶系统的 6 个同工酶位点的研究,发现存在 19 个等位基因,见表 2。其中除居群 5 中 *Gpi-2* 位点表现为单态外,其他位点均为多态位点。基因频率的多态位点分析,可以通过衡量单态位点平均效应分析不能观察到的位点间的交互作用。

表 2 板栗的等位基因频率表
Table 2 Allelic gene frequencies of *C. mollissima*

位点 Loci	等位基因 Allele	居 群 Population							
		1	2	3	4	5	6	7	8
<i>Per-2</i>	A	0.571	0.556	0.543	0.396	0.680	0.500	0.446	0.342
	B	0.429	0.444	0.348	0.583	0.320	0.500	0.554	0.658
	C	0.000	0.000	0.109	0.021	0.000	0.000	0.000	0.000
<i>Gor-2</i>	A	0.327	0.463	0.462	0.381	0.320	0.050	0.240	0.184
	B	0.019	0.000	0.135	0.000	0.000	0.250	0.040	0.368
	C	0.654	0.444	0.346	0.619	0.680	0.700	0.720	0.447
	D	0.000	0.093	0.058	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
<i>Gpi-2</i>	A	0.000	0.054	0.038	0.107	0.000	0.154	0.000	0.054
	B	0.731	0.768	0.808	0.696	0.982	0.692	0.870	0.839
	C	0.269	0.179	0.154	0.196	0.018	0.115	0.130	0.107
<i>Est-2</i>	A	0.000	0.000	0.040	0.071	0.000	0.048	0.212	0.115
	B	0.432	0.464	0.340	0.304	0.400	0.333	0.058	0.538
	C	0.568	0.536	0.620	0.625	0.600	0.619	0.731	0.346
<i>Idhr-1</i>	A	0.000	0.038	0.000	0.120	0.000	0.060	0.063	0.000
	B	0.518	0.692	0.447	0.500	0.404	0.280	0.333	0.118
	C	0.482	0.269	0.553	0.380	0.596	0.660	0.604	0.882
<i>IDH-2</i>	A	0.625	0.611	0.396	0.426	0.625	0.180	0.250	0.095
	B	0.196	0.037	0.604	0.574	0.232	0.820	0.750	0.905
	C	0.179	0.352	0.000	0.000	0.143	0.000	0.000	0.000

* 居群编号同于表 1 Population numbers correspond to those in Table 1

在所分析的位点中,*Gor-2* 位点上的变异相对复杂,居群 3 中出现 4 个等位基因,其他居群分别出现 2 或 3 个。相对而言,*Per-2* 位点的情况较为简单,仅居群 3、4 拥有频率很低的等位基因 *Per-2*。平均每一位点上的等位基因数(A)在一定程度上能反映多态位点百分率(P)无法反映的多样性。就居群水平而言,根据常用的遗传变异量 A , He (预期杂合度)的公式算出, A 的变动范围为 2.0~2.8,平均值为 2.52; He 最高值为 0.498(居群 4),最低为 0.379(居群 8),就这个位点上的遗传变异情况而言,西南居群的遗传多样性最为丰富。

此外,应用 F -统计量(F -Statistics)来检测各个同工酶位点基因型的实际比例与 Hardy-Weinberg 理论预期比例的偏离程度^[11],有关结果见表 3。研究表明,实际比例偏离理论预期值。同时,选用 F_{ST} 值来度量居群间的分化程度。6 个多态位点的 F_{ST} 值的平均值为 0.108,即总的遗传变异有 10.8%出现于居群间,而 89.2%出现于居群内。

进一步用 Nei(1972)^[12]作遗传相似值 I 及遗传距离 D 分析,比较各居群在这 6 个位点上的遗传分化程度,结果如下:各居群两两之间的 D 值变动范围为 0.036~0.394。以 D 值为基础,用 UPGMA 法作聚类,得到的树系图更直观显示了居群之间的遗传分化情况及亲缘关系的远近。此外,从图 1 可看出,属于长江流域品种群的居群与东南品种群的居群较其他居群

关系更为密切,居群 2 与居群 8,即东南品种群与西北品种群的遗传一致性 I 值最小,亲缘关系最远。

表 3 板栗与欧洲栗在 6 个位点上遗传多样性的比较

Table 3 Comparison of genetic diversity level between <i>C. mollissima</i> and <i>C. sativa</i> at six loci				
参数 Parameter	位 点 Loci	欧洲栗 ^[6] <i>C. sativa</i>	板栗 <i>C. mollissima</i>	差异值 Difference value
He	<i>Per-2</i>	0.481	0.492	- 0.011
	<i>Gor-2</i>	0.138	0.512	- 0.374
	<i>Gpi-2</i>	0.410	0.323	0.087
	<i>Est-2</i>	0.329	0.497	- 0.168
	<i>Idhr-1</i>	0.490	0.466	0.024
	<i>Idhr-2</i>	0.025	0.423	0.398
平均 Mean				
He		0.312	0.452	- 0.14
P		75.5 %	97.9 %	- 22.4 %
A		2.41	2.52	- 0.11
F_{st}		-	0.108	-

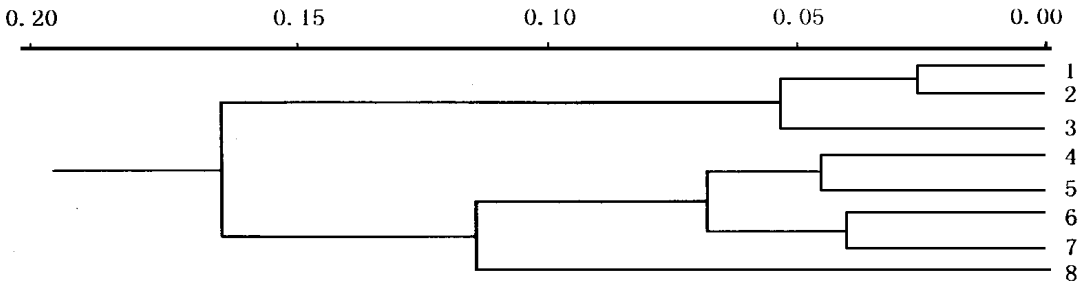


图 1 板栗 8 个居群的遗传距离聚类图
Fig. 1 UPGMA dendrogram based on Nei 's genetic distance of eight populations tested

3 讨论

3.1 通过 5 个酶系统的 6 个同工酶位点的分析表明,板栗为多态性物种,其平均预期杂合度为 0.468,多态位点百分率高达 97 %,遗传变异较大,且随纬度的变化,存在一定的分化,形成渐变模式。从同属中世界上被广泛栽培的美洲栗(*Castanea dentata*)和欧洲栗的情况来看,美洲栗的 He 值为 0.1083, P 值为 63.14 %^[13];欧洲栗中,以土耳其居群的遗传多样性水平最高^[6]。表 3 揭示了板栗与欧洲栗(土耳其)在同样的同工酶位点上的遗传变异水平的差异情况。在本研究中的 6 个位点上,这两个种的等位酶的类型、多态位点的基因组合、等位基因的频率及多样性值等均有显著差异,这种差异在 *Gor-2* 位点及 *Idhr-2* 位点上表现得尤为突出,多样性差异值(He) 分别为 0.374 和 0.398,各位点的遗传变异情况较复杂,某些位点上欧洲栗的遗传变异值高于板栗,但从整体水平而言板栗的 He 、 P 、 A 值均显著高于欧洲栗(土耳其)。值得指出的是,本研究样本选择方面,由于各方面条件的限制,取样存在一定的缺憾,但仍在各地方品种群的分布区域内进行的,抽样还是具有一定的代表性和科学性。其次,对于本研究所包括的 6 个位点作为整个基因组一个样本的随机性和代表性不能高估,但就从这 6 个位点所获得的遗传信息来看,可以认为板栗的遗传变异高于欧洲栗。

3.2 Hamrick & Godt 曾总结了 165 个属的 449 个植物种的等位酶分析资料^[14],研究表明,居群水平上影响遗传变异大小的因素依次为繁育系统、分布范围、生活型、分类地位及种子传播机制。繁育系统是植物内部遗传机制和外部环境条件之间相互作用的一种形式,是物种最根本的特征之一,也是影响植物居群遗传结构最重要原因之一。板栗为风媒异花授粉植物,其花粉能在空气中传播达 200 m 之遥。传播范围广,扩散力强,基因频繁,因而维持遗传变异的能力强,产生新的遗传变异的机会也多,居群间的趋异成分也就越小,仍以 Hamrick & Godt 的统计为例,异交风媒的物种水平、居群水平上的 P 值分别为 0.661, 0.497; H_e 值分别为 0.162, 0.418。与之相比,板栗的变异无论从物种水平还是群体水平,均高于风媒异交种的平均水平。同时板栗种遗传变异的 89.2% 发生于群体内, 10.8% 发生于群体间,这一结论也与上述分析相吻合。

本研究中的取样实际上是在各品种群的分布范围内进行的。地方品种群的划分,主要根据各地自然条件、社会经济条件及栽培历史的差异,形成了品种特征特性的区域性差异。同一地区中,生境条件相似,各品种间亲缘关系较近,彼此授粉的机会较多,又因“邻里效应”,品种间遗传一致性较高。因此,本研究所得出的各群体之间的关系也正反应了各品种群间的亲缘关系。

参 考 文 献

- 1 柳鏊,蔡剑华,张宇和. 板栗. 北京:科学出版社,1988
- 2 王同坤,于凤鸣. 不同品种过氧化物酶同工酶研究. 河北农业大学学报,1988,15(2):65~67
- 3 温奎,张士遵. 栽培栗过氧化物酶的数量化分析. 华北农学报,1990,5(3):16~18
- 4 Villani F, Benedetti S, Paciucci M et al. Genetic variation and differentiation between natural populations of chestnut (*Castanea sativa* Mill) from Italy. In: Hattemer H and Fineschi S (eds.), *Biochemical Markers in the Population Genetics of Forest Tree*, Netherlands: SPB Academy Publishing, 1990, 91~103.
- 5 Villani F, Pigliucci M, Benedetti S et al. Genetic differentiation among Turkish chestnut (*Castanea sativa* Mill.) populations. *Heredity*, 1991, 66:131~136
- 6 Villani F, Pigliucci M, Lauteri M et al. Congruence between genetic, morphometric and physiological data on differentiation of Turkish chestnut (*Castanea sativa* Mill.). *Genome*, 1992, 35:251~256
- 7 Ashton G C, Braden W H. Serum globulin polymorphism in mice. *Aust. J. Biol. Sci.* 1961, 14: 248~253
- 8 Poulic M D. Starch gel electrophoresis in a discontinuous system of buffers. *Nature (London)*, 1957
- 9 Muller-storck C. Genetic differences between 'tolerant' and 'sensitive' beech (*Fagus sylvatica* L.) in an environmentally stressed adult forest stand. *Silvae Genetica*, 1985, 34(6): 241~247
- 10 Wendel J F, Weecen N F. Visualization and interpretation of plant isozymes. In: Solitis E D, Soltis P S (eds.), *Isozymes in Plant Biology*, Portlant: Dioscorides Press, 1989
- 11 Wright S. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to system of mating. *Evolution*, 1965, 19: 395~420
- 12 Nei M. Genetic distance between population. *Amer. Nat.*, 1972, 106:283~292
- 13 Hung H W, Dane F. Allozyme diversity in Chinese, Seguin and American chestnut (*Castanea* spp.) *Theor. Appl. Genet.*, 1994, 8: 981~985
- 14 Hamrick J L, Godt M J W. Allozyme diversity in plant species. In: Brown A H, Clegg M T, Kahler A L (eds.), *Plant population genetics, breeding and genetics resources*, Sunderland, Mass: Sinauer, 1990, 43~63