青岛耐冬山茶的多样性 (II) ——居群的遗传多样性分析*

李 力¹⁾ 王仁卿¹⁾ 王中仁²⁾ 王少萍³⁾ 李书耕⁴⁾

1) (山东大学生物系, 济南 250100)

2) (中国科学院植物研究所系统与进化植物学开放研究实验室,
北京 100093)

3) (青岛植物园, 青岛 266071)

4) (山东大学图书馆, 济南 250100)

摘 要 采用等位酶电泳技术, 检测了青岛近海岛屿——长门岩岛、大管岛和浙江普陀山的天然山茶居群的遗传状况, 并与青岛植物园和杭州植物园的栽培山茶居群作了比较。分析结果表明: 青岛近海岛屿山茶居群内的遗传多样性水平较高, 每个位点的等位基因平均数为 2.3, 多态位点比率为 83.3%, 平均观察杂合度与期望杂合度分别为 0.245 及 0.320, 这个结果可以为青岛耐冬山茶的保护提供依据。为了探讨形态分化与等位酶变异之间的关系, 对山茶居群内一些形态特殊类型的酶谱作了比较。

关键词 山茶, 等位酶分析, 遗传多样性, 岛屿效应

The studies of Naidong Camellia biodiversity in Qingdao (II)——Genetic diversity analysis of populations/
Li Li, Wang Renqing, Wang Zhongren, Wang Shaoping, Li Shuwei //CHINESE BIODIVERSITY. —1996,
4(1): 1~6

Allozyme electrophoresis was applied to the genetic diversity analysis of wild *Camellia japonica* populations on Qingdao off-shore island——Changmenyan Island, Daguan Island and of Putuo Mountain in Zhejiang Province, as a comparison, two cultivated camellia populations in Qingdao Botanical Gardens and in Hangzhou Botanical Gardens were analyzed. The result showed that the genetic diversity within island camellia population is high, the mean number of alleles per locus is 2.3; 83.3% of loci are polymorphic on average per population; the mean observed and expected heterozygosities are 0.245 and 0.320 respectively. The result suggested strategies for the conservation of camellia in Qingdao. Allozyme phenotypes of different morphological types were compared in order to find some relationships between morphological variation and allozyme diversity.

Author's address 1) Department of Biology, Shandong University, Jinan 250100

2) Laboratory of Systematic and Evolutionary Botany, Institute of Botany, the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093

3) Qingdao Botanical Garden, Qingdao 266071

4) Library of Shandong University, Jinan 250100

Key words *Camellia japonica*, allozyme analysis, genetic diversity, Island effect

1 前言

山茶属(*Camellia*)因含经济植物茶(*C. Sinensis*)及众多的观赏植物如山茶(*C. japonica*)等而引起学者们的兴趣,关于山茶属植物的形态解剖、分类、生理、生化性质的研究报导较多,而将同工酶技术用于山茶属植物的研究不多,这可能与山茶属植物体中富含次生物质,酶提取困难有关。国内曾报导将同工酶技术用于探讨茶树起源^[1],用于山茶属几种观赏植物的杂种亲本鉴定^[2];而涉及天然居群的研究则见于国外 Wendel 对于日本及韩国山茶居群遗传结构等方面的研究^[3-5]。本文对于青岛近海岛屿山茶居群遗传多样性的探讨,旨在为山东省濒危物种山茶的保护与恢复提供生态遗传学依据。

2 材料与方法

2.1 材料来源与制备

样品采自青岛崂山附近的长门岩岛(CMY)、青岛植物园长门岩山茶样地(ZWY, 1980 年播种),大管岛山茶样地(DGD, 1986 年移植),并将后者代替天然居群取样;同时对浙江普陀山天然山茶居群(PTS)及杭州植物园栽培山茶居群(HZ)取样。取样个体数量取决于居群大小,一般取 20 个样,大管岛取 12 个样;取样时个体间距尽可能大,以避免同宗后代。为使材料中所含酚类物质、单宁较少而酶活性较高,采集植株上当年新萌发的叶芽及花粉制成酶提取液, -80℃ 低温冷冻箱保存。花粉酶提取液中含 0.2 mol/L 磷酸缓冲液, 0.1% 巯基乙醇, 5% 聚乙烯吡咯烷酮(PVP-40T), 10% 二甲亚砜, pH=7.5; 叶芽酶提取液配方参照 Soltis et al.^[6]。

2.2 电泳与染色

采用水平切片淀粉凝胶电泳,缓冲液系统采用 Soltis et al.^[6] 1 号系统,淀粉胶浓度为 12.5%,对谷氨酸草酰乙酸转移酶(GOT)、苹果酸脱氢酶(MDH)、苹果酸酶(ME)、磷酸葡萄糖脱氢酶(PGD)、磷酸葡萄糖异构酶(PGI)、磷酸葡萄糖变位酶(PGM)、莽草酸脱氢酶(SKD)七个酶系统染色,染色参考 Wendel 方法^[7],对其中分辨率较高的 GOT-1, PGI-1, PGI-2, PGD-2, PGM-1, SKD 六个位点进行遗传多样性指标的统计运算。

3 结果

3.1 酶谱

对应于叶中酶谱,花粉中一般仅表达细胞溶质酶,不表达叶绿体酶。GOT、PGD、PGI 为二聚体酶,叶中有两个位点表达;SKD 为单体酶,仅在叶中表达一个位点;ME 在叶中酶活性低,而在花粉中酶活性高,由于带与带间分辨率低常表现为有高低浓淡差异的一条带;PGM 为单体酶,叶片中表达位点为 PGM-1, PGM-2(材料活性低时, PGM-2 不显带),花粉中表达位点为 PGM-2 及 PGM-3;MDH 带易扩散,带间分辨率低,有待于进一步分析。见图 1 及图 2。

3.2 山茶居群遗传多样性度量

青岛及浙江 5 个山茶居群遗传多样性指标如下:每个位点等位基因平均数为 2.3,多态位点比率为 83.3%,平均观察杂合度与期望杂合度分别为 0.245 及 0.320;5 个居群固定指数均大于 0,见表 1。表 2 是 5 个居群间遗传距离(Wright, 1978)及图 3 根据该遗传距离所做聚类分析,反映了遗传距离与地理距离的一致性。

3.3 不同形态类型山茶等位酶谱的比较

为了了解山茶形态学差异与等位酶表现型之间有无相关性,将7种形态有差异的山茶酶谱进行比较,发现:对于同一个酶系统,不同形态类型的样品酶谱可能相同或不同,但对于7个酶系统的组合,不同的形态类型能被区分开来;另外,同一种形态类型因取样地点或个体的不同,对于同一个酶系统酶谱可能存在微小差异(见图4)。

图1 等位酶酶谱

Fig. 1 Allozyme phenotype

PGI、MDH、ME 样品1~15为叶芽,16~30为花粉;PGM 样品1~12为叶芽,13~24为花粉。
PGI、MDH、ME channel 1~15 are samples of leaf, channel 16~30 are samples of pollen; PGM channel 1~12 are samples of leaf, channel 13~24 are samples of pollen

图2 等位酶酶谱

Fig. 2 Allozyme phenotypes

表 1 山茶居群遗传变异水平

Table 1 Genetic variation within populations of camellia

居群 Population	取 样 大 小 Sample size	每个位点等位 基 因 平 均 数 Average num- ber of alleles per locus	多态位点比率 Proportion of polymorphic loci	平均观察 杂合度 Average observed heterozygosity	平均期望 杂合度 Average expected heterozygosity	固定指标 Fixation index
CMY	21.0	2.3	83.3	0.254	0.317	0.199
DGD	12.0	2.0	83.3	0.161	0.340	0.466
PIS	16.0	2.5	83.3	0.260	0.339	0.233
平均(mean)	16.3	2.3	83.3	0.232	0.332	0.300
ZWY	20.0	2.5	83.3	0.258	0.301	0.143
HZ	20.0	2.2	83.3	0.275	0.307	0.104
平均(mean)	17.8	2.3	83.3	0.246	0.321	0.229

表 2 山茶居群间遗传距离

Table 2 Genetic distance between the populations of Camellia (Prevosti distance, Wright 1978)

居群 Population	CMY	DGD	ZWY	PTS
CMY				
DGD	0.184			
ZWY	0.095	0.254		
PTS	0.233	0.229	0.258	
HZ	0.264	0.215	0.287	0.113

图 3 山茶居群聚类图 (遗传距离据 Wright, 1978)

Fig.3 Cluster analysis of camellia populations (Wright's prevosti distance, 1978)

4 讨论

4.1 山茶居群遗传多样性水平

据 Hamrick 对 165 属 449 种植物的统计结果,植物居群内平均多态位点比率为 34%,平均期望杂合度为 0.11;植物物种水平的平均多态位点比率为 50%,平均期望杂合度为 0.15^[8];近年来所报导的针叶树种平均期望杂合度可达 20~30%。与这些结果相比较,近海岛屿山茶居群的遗传多样性水平较高,类似的结果也在日本、韩国的山茶居群中检测到了:多

	I	Ⅱ	Ⅲ	Ⅳ _a	Ⅳ _b	V _a	V _b	Ⅵ _a	Ⅵ _b	Ⅶ
PGD	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
PGI	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
SKD	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
GOT	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
MDH	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
PGM	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
ME	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

图 4 青岛耐冬山茶的形态变异类型酶谱比较

Fig. 4 Comparison among allozyme phenotypes of Naidong camellia morphic variation types

I—多雄蕊型 Ⅱ—钟型 Ⅲ—长蕊型(样品为花粉) Ⅳ_a—小花型(采自长门岩,样品为花粉) Ⅳ_b—小花型(采自植物园)
V_a、V_b—缺瓣型 Ⅵ_a—反卷型(采自长门岩) Ⅵ_b—反卷型(采自植物园) Ⅶ—碗状花型

态位点比率为 66.2%,平均观察杂合度与期望杂合度分别为 0.230 及 0.265,每个位点等位基因平均数为 2.16^[3]。山茶除了具有木本、异交(自交高度不亲合^[8])、虫媒、重力散布种子等特点,还具有类似裸子植物的长命特征,并保留有通过残茎萌生植株的营养繁殖方式,因而山茶物种本身具有较高的遗传多样性水平。作为岛屿居群,青岛近海长门岩岛、大管岛与大陆隔离时间不长(距今约 1 万年),且包括山茶在内的亚热带树种曾经在全国范围内广泛分布^[9],因而现在受到隔离的岛屿山茶居群虽然较小,但仍保持了较高的遗传多样性水平。

4.2 遗传多样性水平与经、纬度之间的关系

将青岛近海岛屿居群(36°N)CMY、DGD 与浙江普陀山居群 PTS(30°N)相比较(见表 1),遗传多样性水平差别不大,通常纬度效应中体现了居群起源方向,而在这个比较中纬度范围可能还不够大,因而未能反映出来。

与日本、韩国山茶居群(30°N~36°N 范围内)的遗传多样性指标相比较,青岛及浙江山茶居群遗传多样性水平较高,表现出经度效应,该结果可作为推论中国可能是山茶遗传多样性中心的一个证据。

4.3 形态变异与等位酶差异

稳定的形态变异是有遗传学基础的、能够反映到基因水平的检测,由于等位酶是等位基因编码的产物,可作为基因的标志,因此当对等位酶随机检测时,稳定的形态分化类型就会表现出差异,这是将等位酶分析用于植物分类工作的理论依据。但由于等位酶分析方法尚存在一定局限性——检测的敏感性及酶基因位点对于整个基因组的代表性,因而对于任一选择的酶

系统,不同的形态分化类型可能表现不出等位酶差异;对于同一种形态分化类型,某个酶系统可能会存在等位基因的差异,前者可通过多个酶系统组合来克服以达到区分目的,后者要经过酶系统的筛选。根据不同研究目的,等位酶分析的具体应用也有差别,一般经过多个酶系统的组合及酶系统的必要筛选可以达到研究目的的要求。等位酶分析用于栽培品种的分类鉴定有较多成功的报导^[5、10、11]

5 结论

青岛近海岛屿山茶居群虽然较小,但居群内保持了较高的遗传多样性水平,多态位点比率、每个位点等位基因平均数、平均观察杂合度及期望杂合度分别为 83.3%、2.3、0.245、0.310,均高于 Hamrick 报导的植物居群平均遗传多样性水平。由于居群小,遗传漂变的结果使得所有居群均偏离 Hardy-Weinberg 平衡,呈现纯合体过量,杂合体不足。鉴于青岛近海天然山茶居群分布的岛屿面积较小,因而保护生境,保护整个居群,防止居群个体数量继续减少是必须的。

参 考 文 献

- 1 鲁成银,刘维华,李名君. 茶树起源的同工酶初探. 茶叶科学, 1991, 6:10~11
- 2 王仲朗,夏丽芳. 应用过氧化物酶同工酶鉴定山茶属植物杂种 F_1 代的研究. 云南植物研究, 1992, 14 (4):423~429
- 3 Wendel J F, C R Parks. Genetic diversity and population structure in *Camellia japonica*. *Amer. J. Bot.*, 1985, 72 (1):52~65
- 4 Wendel J F, C R Parks. Genetic control of isozyme variation in *Camellia japonica*. *The Journal of Heredity*, 1982, 73:197~204
- 5 Wendel J F, C R Parks. Cultivar identification in *Camellia japonica* using allozyme polymorphism. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 1983, 108:290~295
- 6 Soltis D E et al. Starch Gel electrophoresis of ferns: a complication of grinding buffers, gel and electrode buffers, and staining schedules. *Am. Fern. J.*, 1983, 73:9~27
- 7 Wendel J F, N F Weeden. Visualization and interpretation of plant isozymes. In: Soltis D E, P S Soltis (eds.), *Isozyme in plant biology*. Portland, Oregon: Discorides Press, 1989, 87~105
- 8 Hamrick J L, M J Golt. Allozyme diversity in plant species. In: Brown A H D, M T Clegg, A L Kahler et al. (eds.), *Plant population genetic, breeding, and genetic resources*. Sunderland: Sinauer Associates, 1989, 43~63
- 9 青岛山茶资源课题组. 青岛山茶资源考察报告. 青岛, 1984
- 10 Carter G E, M M Brock. Identification of peach cultivars through protein analysis. *Hort Science*, 1980, 15: 292~293
- 11 Carlos F Q. Identification of alfalfa plants by enzyme electrophoresis. *Corp Science*, 1980, 20:262~264