中国水青冈种内种间遗传多样性的初步研究^{*}

李俊清

(北京林业大学森林资源与环境学院, 北京 100083)

摘 要 本文利用凝胶电泳法研究了亮叶水青冈(*Fagus lucida*)、巴山水青冈(*F. pashanica*)和米心水青冈(*F. engleriana*)的遗传多样性。所测定的酶系统包括:过氧化物酶(PX₁和PX₂)、磷酸葡萄糖脱氢酶(PGD)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷氨酸草酰乙酸转氨酶(GOT₁和GOT₂)、异柠檬酸脱氢酶(IDH)、甲基萘醌还原酶(MNR)、葡萄糖磷酸变位酶(PGM₁和PGM₂)和苹果酸脱氢酶(MDH₂) 8种酶系统,测定和分析了3种水青冈的等位基因频率和遗传距离指标,为进一步研究水青冈属各种间的亲缘关系和进化提供了科学依据。

关键词 种群,遗传多样性,等位酶,变异

Studies on intra- and inter- species gene diversity of Chinese beeches /Li Junqing //CHINESE BIODIVERSITY. —1996 4(2) 63~68

Based on gel electrophoresis method, the gene diversity of *Fagus lucida*, *F. pashanica* and *F. engleriana* was studied in this paper. The allozymes determined include peroxidase (PX₁ and PX₂), phosphogluconate-dehydrogenase (PGD), superoxide dismutase (SOD), glutamate-oxaloacetate-transaminase (GOT₁ and GOT₂), isocitrate-dehydrogenase (IDH), menadione reductase (MNR), phosphoglucomutase (PGM₁ and PGM₂), and malate dehydrogenase (MDH₂). We have determined and analysed the allelic frequency and the genetic distances of the three beeches, and provided some scientific information for the further studies of taxonomic relations and systematic evolution of the beeches.

Author's address College of Forest Resources & Environment, Beijing Forestry University, Beijing 100083

Key words population, genetic diversity, allozyme, variance

1 前言

水青冈属(*Fagus*)植物均为落叶乔木,在欧洲和北美洲各有一种,且构成温带地区的顶极植被。该属植物在我国有6种,是亚热带山地落叶阔叶林和常绿落叶阔叶混交林的建群种^[1]。资料表明,第三纪时水青冈属植物广泛分布于北半球各大陆,在中国北从黑龙江^[2],南到四川和西藏都有化石记录,目前的分布区是随着气候变迁逐步退缩演化的结果。尽管中国是该属植物种类最丰富的地区,但其属种的分布区也有缩小的趋势^[3]。

水青冈属树种均为二倍体,染色体数为 $2n=24$,水青冈也是自花授粉率极低的异花同株树种^[4]。靠个体和种间的基因流交换促进遗传分化;另外,中国水青冈分布区的气候和地形条件复杂,常常2~3种水青冈集中分布在同一地区。环境条件的多样性和物种的多样性,必然导致水青冈属植物的遗传变异的多样性^[5]。甚至使其分类问题变得更加复杂,种与种之间的

收稿日期:1995-02-24,接受日期:1995-05-03
^{*} 国家自然科学基金资助项目。法国波尔多大学 B. COMPS 教授对本文的试验分析给予帮助,在此表示感谢

界限更加模糊^[6]。本文考虑了上述事实,选择3种水青冈的5个种群(Population),研究其遗传多样性,试图为进一步从分子水平上揭示该属植物的种间亲缘关系和进化特征提供基础科学依据。

2 研究方法

2.1 取样:亮叶水青冈的3个种群分别于春秋两季,从广西桂林地区(25°41'N、111°20'E)的猫儿山自然保护区和龙胜县里骆林场获取,取样时注意不同地形环境和每两株之间距离保持在30~50 m之间。巴山水青冈和米心水青冈各选择一个种群,均取自四川省南江县国营林场(32°42'N、107°2'E)。其方法是从每株树上剪下2个40~50 cm长、并至少带有15个芽的枝条。每个种群的样本数量为30~60株。

2.2 处理:在实验室内去掉芽鳞,取芽和一部分枝条的韧皮部,研磨后离心,取上清液,放入-20℃冰箱内贮藏待用。

2.3 分析:采用两种凝胶电泳做8种酶系统11个位点的分析。其中过氧化物酶(PX₁和PX₂)、磷酸葡萄糖酸脱氢酶(PGD)、超氧化物歧化酶(SOD)和谷氨酸草酰乙酸转氨酶(GOT₁和GOT₂)用聚丙烯酰胺凝胶电泳法;异柠檬酸脱氢酶(IDH)、甲基萘醌还原酶(MNR)、葡萄糖磷酸变位酶(PGM₁和PGM₂)和苹果酸脱氢酶(MDH₂)用淀粉凝胶电泳法^[5,7]。

2.4 计算:

①基因频率 $X_i = [2(ii) + \sum ij] / 2N$ (ii)代表纯合子;jj代表包含一个i等位基因的杂合子数;N代表种群个体数量。

②基因多样性 某位点的基因多样性观测值为 $h = 1 - \sum x_i^2$

③遗传距离 $D = -\ln I$, $I = P_{xy} / (P_x P_y)^{1/2}$, $P_{xy} = \sum x_i y_i$, x_i 和 y_i 代表种群x和种群y在同一基因位点上第i个等位基因的频率, $P_x = \sum x_i^2$, $P_y = \sum y_i^2$,表2中“平均X”一栏是所有位点 P_{xy} 、 P_x 和 P_y 的平均值^[8]。

3 结果

3.1 基因频率 亮叶水青冈3个种群的共同特点是共有基因数量多,频率高。但不同种群在各基因位点上的频率差别较大,其中同种群同在猫儿山取样的条件下,春秋两季的2个种群就在4个基因位点上(PX₂, GOT₁, MNR和MDH₂)出现6条非共有基因酶带,可见不同季节植物体内等位基因的频率有明显变化。另外即使在同一季节取样(秋季),2个种群因相距甚远(约100 km)也有差别,如在PX₂位点上,里骆林场的种群缺少PX₂-13基因酶带;MDH₂位点上,猫儿山的种群缺少MDH₂-109,-77和-70三条基因酶带,地理隔离也同样对同一物种的基因频率有影响(表1)。所以,季节变化和地理位置条件都对每个位点的基因频率有一定程度的影响。

巴山和米心水青冈都是在春季取样,它们与猫儿山春季取样的亮叶水青冈为同批样品,有较强的可比性。从表1中可以看出,亮叶和巴山水青冈出现相等等位基因的位点较多,米心水青冈与它们出现相等等位基因的位点较少,如PX位点上米心水青冈的PX₁-92、PX₁-82、PX₂-10和PX₂-6是与其它两种完全不同的基因酶带。亮叶水青冈具有PX₁-104、PGD-112、GOT₁-90、IDH-100、PGM₁-106、MGH₂-85和MDH₂-70等稀有基因的酶带,其频率均较低,最大只有0.190,而在SOD-100、和PGM-96各位点上只有一条单型等位基因。相反,巴山水青冈除IDH-132等位基因外,其它所有位点上的等位基因均与其它的酶带2种共存。米心水青冈不

表 1 中国水青冈种内种间基因频率分布
Table 1 Intra- and inter-species gene frequencies of Chinese beeches

基因位点 locus	等位基因 编 号 No. of allele	亮 叶 水 青 冈 <i>Fagus lucida</i>			巴山水青冈 <i>F. pashanica</i>	米心水青冈 <i>F. engleriana</i>
		mc	lq	mq		
PX ₁	104	0.190	0.271	0.407		
	102	0.420	0.356	0.373	0.700	
	98	0.390	0.373	0.220	0.300	
	92					0.333
	82					0.667
PX ₂	52	0.150	0.051	0.093	0.217	
	39	0.460	0.526	0.373	0.400	
	33		0.025	0.127		
	26	0.390	0.398	0.373	0.383	
	13			0.034		
	10					0.889
	6					0.111
PGD	112	0.110	0.112	0.105		
	100	0.410	0.293	0.272	0.75	0.333
	92					0.204
	84	0.300	0.371	0.526	0.233	0.463
	70	0.180	0.224	0.097	0.017	
SOD	112				0.467	0.185
	100	1.000	1.000	1.000	0.533	0.815
GOT ₁	105				0.050	0.111
	100	0.900	0.881	0.952	0.800	0.852
	95	0.090	0.119	0.048	0.150	0.037
	90	0.010				
GOT ₂	79	0.025	0.119	0.264	0.033	0.426
	70	0.475	0.449	0.443	0.200	0.574
	61	0.500	0.432	0.292	0.767	
IDH	132				0.050	
	116	0.920	0.941	0.915	0.950	0.722
	100	0.080	0.059	0.085		
	84					0.278
MNR	100	0.850	0.805	0.814	0.800	0.685
	74		0.195	0.186		
	63	0.150			0.200	
	26					0.315
PGM ₁	110				0.167	0.056
	106	0.020	0.069	0.063		
	100	0.730	0.638	0.473	0.483	0.944
	93	0.250	0.293	0.464	0.350	
PGM ₂	90				0.050	0.074
	86	1.000	1.000	1.000	0.950	0.926
MDH ₂	118					0.019
	109		0.042			
	100	0.850	0.845	0.932	0.917	0.815
	85	0.140	0.095	0.068		
	77		0.009		0.083	0.167
	70	0.010	0.009			

表中 mc , lq 和 mq 分别代表猫儿山春季 , 里骆林场秋季和猫儿山秋季样品
Where : mc , lq and mq represent the spring sample of Maoershan , autumn samples of Liluo Forest Farm and Maoershan , respectively.

但在 PX 位点上 ,而且在 PGD-92、IDH-84 和 MDH₂-118 等也有其它 2 种不存在的基因酶带 ,同样这些基因的出现频率也较低。

上述基因频率变化的主要特征是 :亮叶水青冈 3 个种群间的基因频率不同 ,采样时间和地理位置都是影响基因频率变化的因素。不同种间的特点是共有基因频率高 ,而稀有基因频率低。亮叶水青冈的稀有基因数量最多 ,巴山水青冈最少。米心水青冈 PX 位点的所有基因酶带均属其特有 ,这是其它两种从未发现的。

3.2 基因多样性 亮叶水青冈 3 种群间的平均基因多样性相似 ,尽管各种群的基因频率各异 ,但其平均值无明显差异。从表 2 各基因位点多样性数值看 ,PGD ,PX₁ 和 PX₂ 较高 ,再通过表 1 进行对比发现 ,在这些高基因多样性位点上有两个明显特点 :一是等位基因数量多 ;二是各位点等位基因频率分布均匀。基因多样性变化范围 0 ~ 0.714 ,两个极值均出现在亮叶水青冈(表 2)。由于亮叶水青冈在 SOD 和 PGM₂ 位点上只具有一条基因酶带 ,所以其多样性为 0 ,但在 PGD 等位点上除具有较多的基因酶带外 ,频率较高 ,多样性也最高。

表 2 中国水青冈种内种间多样性比较
Table 2 Intra- and inter-species gene diversity of Chinese beeches

基因位点 locus	亮叶水青冈 <i>Fagus lucida</i>			巴山水青冈 <i>F. pashanica</i>	米心水青冈 <i>F. engleriana</i>
	mc	lq	mq		
PX ₁	0.635	0.661	0.647	0.420	0.222
PX ₂	0.612	0.562	0.696	0.646	0.197
PGD	0.697	0.714	0.629	0.383	0.633
SOD	0.000			0.498	0.302
GOT ₁	0.182	0.210	0.091	0.335	0.260
GOT ₂	0.524	0.598	0.649	0.371	0.489
IDH	0.147	0.111	0.156	0.095	0.401
MNR	0.255	0.314	0.303	0.320	0.432
PGM ₁	0.404	0.502	0.557	0.616	0.106
PGM ₂	0.000			0.095	0.137
MDN ₂	0.258	0.275	0.127	0.152	0.308
平均 X	0.338	0.359	0.350	0.357	0.317

巴山水青冈和米心水青冈遗传多样性的规律与亮叶水青冈相似 ,不过它们在 11 个位点上都有大于零的基因多样性。一般在同一位点上亮叶水青冈和米心水青冈都呈现共同的多样性变化规律 ,如在 PX₁、PX₂、PGD、GOT₂ 和 PGM₁ 位点上 ,两个树种基因多样性都较高 ,而在 IDH 和 PGM₂ 位点上 ,二者的基因多样性又都较低。总之 3 个种相对比较 ,只有米心水青冈基因多样性低 ,当然在 MDH₁ 位点 3 个树种的基因多样性都是 0 ,没有更多的分析价值 ,故也没有列入表中。

3.3 遗传距离 根据 3 种水青冈 5 个种群之间的基因频率分布 ,得到它们的种内和种间的遗传距离(表 3)。亮叶水青冈的种内变异很小 ,3 个种群之间的遗传距离最大只有 0.047。相比较 ,同种群的不同季节差异大于地理差异。从种间来看 ,巴山水青冈与亮叶水青冈的遗传距离最小。米心水青冈与其它两种的遗传距离都远 ,主要是受基因位点 PX₁ 和 PX₂ 的 P_{xy} = 0 的影响。米心水青冈与亮叶水青冈之间具有最远的遗传距离 ,可见二者都是相互独立、亲缘关系较远的树种。

表 3 中国水青冈种内种间遗传距离比较
Table 3 Intra- and inter-species genetic distances in Chinese beeches

树种 Species	亮叶水青冈 <i>F. lucida</i>		巴山水青冈 <i>F. pashanica</i>	米心水青冈 <i>F. engleriana</i>
	lq	mq		
亮叶水青冈 – mc <i>F. lucida</i>	0.014	0.047	0.006	0.329
亮叶水青冈 – lq <i>F. lucida</i>		0.024	0.023	0.507
亮叶水青冈 – mq <i>F. lucida</i>			0.051	0.323
巴山水青冈 <i>F. pashanica</i>				0.390

4 讨论与结论

上述 3 种水青冈的 5 个种群的遗传多样性分析结果说明 ,每个物种都具有特有的等位基因 ,但这个特有等位基因频率通常又较低 ,以保持同属各种间的一致性。

各不同季节和不同地理环境条件下 ,亮叶水青冈种群间的等位基因频率也不相同 ,这显然受季节气候条件和酶活性的影响 ,表现在基因频率上的差异。不过这种差异并未产生很强的种内遗传分化 ,即它们的遗传距离仍很小 ,可见同种水青冈仍保持其较稳定的遗传结构。

亮叶水青冈特有等位基因和纯合子基因都最多 ,前者增加与其它两种的遗传距离 ,而后者则减少遗传距离。巴山水青冈和亮叶水青冈的共有等位基因数量多、而且这些等位基因频率也高 ,相似系数最大 ,遗传距离最小。遗传距离代表种内和种间的亲缘关系的远近程度和基因流交换的强度 ,由于亮叶水青冈和巴山水青冈不在同一分布区 ,所以排除了相互授粉和种质掺入的可能性 ;而二者具有如此高度相似性的重要途径是由同一种(可能是亮叶水青冈)经过一种长期的生殖隔离 ,而产生新的遗传变异或生态型。米心水青冈由于具有 PX 位点的全部特有等位基因 ,使其与上两种的遗传距离增大。文献^[6]指出 ,巴山水青冈只分布在我国四川南江 ,海拔 1200 ~ 1900m 一带狭小范围内 ;文献^[3]指出中国水青冈属的 5 个种中没有巴山水青冈《中国植被》^[1]也没有巴山水青冈的林型分布和记载。从巴山水青冈缺少特有基因和与亮叶水青冈遗传距离最近的事实考虑 ,它可能是由于亮叶水青冈向西南分布的一个地理变型。

巴山水青冈的基因多样性较高 ,它分布范围小 ,交配群体数量少 ,有产生地域或生殖隔离的可能性。而水青冈属的遗传结构除基因流和基因漂移外 ,还依赖于选择和交配系数 ,这些因素常导致种内和种间在时空上的遗传分化和多样性^[9-11]。事实上由于中国水青冈的遗传多样性高 ,如 Comps 等^[12]通过对于欧洲大陆、地中海沿岸、中部高原和低地各种环境条件下的水青冈遗传多样性比较发现 ,地中海地区最高 ,平均值为 0.315^[12] ,而这一数值比我国遗传多样性最低的米心水青冈还小 ,显然中国水青冈高的遗传多样性是种类多和交配范围广的结果。从多样性指标分析 ,巴山水青冈属于某种基因分化产物的可能性较大 ,但由于我们分析的数据还不够充分 ,所以还不能下结论 ,但随着研究工作的深入 ,必将对其地理变迁和系统进化等问题提供满意的答案。

总之 ,通过上述分析 ,得到如下结论 :
(1) 不同季节气候条件和不同地理环境条件下 ,亮叶水青冈种内基因频率和等位基因表

达也不同；

(2)亮叶水青冈和米心水青冈都含有较多的特有等位基因 ,是相对独立和分布范围广泛的树种；

(3)亮叶水青冈与巴山水青冈的亲缘关系最近 ,而米心水青冈与亮叶水青冈和巴山水青冈的亲缘关系都远；

(4)巴山和亮叶水青冈的遗传多样性较高 ,而米心水青冈的遗传多样性较低；

(5)巴山水青冈与亮叶水青冈的遗传距离 ,尤其是同为春季样品条件下 ,远小于亮叶水青冈种内遗传距离 ,可见巴山水青冈很难作为一个独立的种存在。

参 考 文 献

1 吴征镒主编. 中国植被. 北京 :科学出版社 ,1980

2 李景文主编. 黑龙江森林. 北京 :中国林业出版社 ,1993

3 洪必恭 ,安树青. 中国水青冈属植物地理分布初探. 植物学报 ,1993 **35**(3) 229 ~ 233

4 Teissier T , du Cros , Le Hetre. Publications scientifiques et litteraires. Paris :1982

5 Thiebaut B ,R Lumaret ,P Vernet. The bud enzyme of beech (*Fagus sylvatica*). *Silvae Genetic* ,1982 **31** 51 ~ 60

6 张永田 ,黄成就. 壳斗科植物摘录(Ⅱ). 植物分类学报 ,1988 **26**(2) :111 ~ 119

7 Merzeau D , F Di Giusto , B Comps , B Thiebaut , J Letouzez , J Cuyuen. The allozyme variants of beech(*Fagus sylvatica*). *Silvae Genetic* ,1989 **38** :195 ~ 201

8 Pasteur N. , Manuel technique de genetique par electrophoresedes proteines. Paris :Lavoisoer ,1987

9 郭平仲. 群体遗传学导论. 北京 :农业出版社 ,1993

10 Kim Z S. Inheritance of leucine aminopeptidase and acid phosphatase isoenzymes in beech. *Silvae Genetic* ,1979 , **28** 68 ~ 71

11 Muller-Stark G. Genetic differences between “ tolerant ” and “ sensitive ” beeches in environmentally stressed adult forest stand. *Silvae Genetic* ,1985 **34** 241 ~ 247

12 Comps B ,B Thiebaut ,I Sugar ,I Trinajstic ,M Plazibat. Genetic variance of the Crotian beech stands. *Ann. Sci. For.* ,1991 **48** :15 ~ 28