

八面山银杉林的遗传多样性和群体分化*

¹葛颂 ¹王海群 ²张灿明 ¹洪德元

¹(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)

²(湖南林业科学研究所,长沙 410004)

摘要 采用水平淀粉凝胶电泳技术对分布于湖南八面山的濒危植物银杉(*Cathaya argyrophylla* Chun et Kuang)的遗传多样性和群体分化进行了初步研究。对13个酶系统25个等位酶位点的检测表明,该地区的银杉林群体遗传变异水平很低,多态位点比率 $P = 0.28$,等位基因平均数 $A = 1.36$,平均期望杂合度 $He = 0.100$;但3个小群体间存在着明显的遗传分化,基因分化系数高达 $G_{ST} = 0.26$,明显不同于其它裸子植物的报道。八面山银杉林低水平的遗传变异和明显的群体分化,一方面反映了银杉的古老性和残遗性,另一方面也说明在银杉的进化过程中可能发生了严重的遗传漂变,而且群体之间的基因流明显受阻。

关键词 银杉,遗传多样性,群体分化

GENETIC DIVERSITY AND POPULATION DIFFERENTIATION OF *CATHAYA ARGYROPHYLLA* IN BAMIAN MOUNTAIN

¹Ge Song, ¹Wang Hai-qun, ²Zhang Can-ming and ¹Hong De-yuan

¹(Laboratory of Systematic and Evolutionary Botany, Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093)

²(Hunan Research Institute of Forestry, Changsha 410004)

Abstract Genetic diversity and population differentiation of the endangered plant *Cathaya argyrophylla* Chun et Kuang were studied in three populations in Bamian Mountain using the method of horizontal starch gel electrophoresis. Allozyme data for 25 loci of 13 enzymes indicated low level of genetic variability in this region with $P = 0.28$, $A = 1.36$ and $He = 0.100$. In contrast, there existed high degree of population differentiation among the three populations with G_{ST} value as high as 0.26, which was very different from the published results of other coniferous species. The low intrapopulation variability and strong interpopulational heterogeneity of *C. argyrophylla* in Bamian Mountain could be the impacts from several factors including stochastic processes such as genetic drift, and restricted gene flow between populations.

Key words *Cathaya argyrophylla*, Genetic diversity, Population differentiation

物种的遗传多样性是长期进化的产物,也是其生存和发展的前提。对稀有和濒危物种遗传多样性和群体遗传结构的研究,是揭示其进化历史和适应潜力的基础,也是进一步探讨稀有和濒危的机制,从而为制定科学的保护措施提供重要依据^[1]。银杉是我国特有的裸子植物单种属,世界著名的“活化石”植物。由于第四纪冰川的袭击,这一曾在第三

收稿日期:1995-11-20 接受日期:1996-03-13

* 国家自然科学基金“八五”重大项目资助(3939150)。

纪广布欧亚大陆的物种如今仅残存于我国中亚热带的大娄山东段和越城岭支脉以及八面山的局部地区,个体数不到 5 000 株,分布在广西、四川、贵州和湖南等 4 省区的 8 个地点^[2,3]。由于银杉生长缓慢,结实量小,种子发芽率低,加上天然更新困难,正濒临灭绝。尽管对银杉的分类和分布、种群结构、生殖生物学特点以及保护和繁殖等进行了一些研究^[2~5],但迄今对银杉这一重要类群的遗传多样性仍一无所知。本研究作为银杉遗传多样性研究的一部分,采用酶电泳技术,对人为活动相对较弱且群落学和生态学研究开展较为深入的八面山天然银杉群体进行研究,旨在了解银杉在该地区的遗传变异水平、群体分化大小,为进一步从整个分布区范围内来探讨银杉的群体遗传结构和进化历史以及采取相应的保护措施提供资料。

1 材料和方法

1.1 采样及样品处理

位于湘东资兴、桂东、酃县三县交界处的八面山,为罗霄山脉的支脉,是银杉(*Cathaya argyrophylla* Chun et Kuang)几个残遗分布区中最东的一处。在八面山东北侧支脉海拔 1 100~1 350 m 山坡的中部、下部和溪谷中,残存了丝毛坪、脚盆寮、小淘寮和九山 4 个相对孤立的银杉小群体,其群落学特点和种群动态特征已有详细报道^[4,5]。1993 年 10 月,从上述地区分单株采集球果,脱籽、净种后,将纯净种子置于 0 ℃左右保存备用。由于银杉结实量很低,小淘寮群体只采到 2 株个体的球果,故不做进一步分析。其余 3 个小群体的采样株数分别为:丝毛坪 12 株,脚盆寮 17 株和九山 10 株。

1.2 酶电泳实验

取每个单株的种子 20 粒左右置于培养皿中浸泡 10 d 以上,然后剥取胚乳(单倍体),用 0.2 mL 磷酸缓冲液(pH 7.5)匀浆,再用 7 mm × 3 mm 滤纸小条蘸吸匀浆液,上胶电泳。采用水平式淀粉凝胶电泳技术,所用水解淀粉为美国 Sigma 公司产品(S-4 501),淀粉胶浓度为 12%。采用 3 种凝胶缓冲系统对 18 种酶系统进行检测,获得 13 种酶系统共 25 个等位酶位点(表 1)。所用凝胶缓冲系统均根据 Soltis 等^[6]稍加调整而成:Ⅰ. citrate/histidine (pH 7.0);Ⅱ. sodium-borate(pH 8.6)/tris-citrate(pH 7.8);Ⅲ. histidine-citrate (pH 5.7)。酶的组织化学染色法详见文献^[6,7]。

1.3 等位酶分析及数据处理

每一个体均分析 7~15 粒种子胚乳(雌配子体)以确定该个体的基因型。等位酶位点和等位基因的确定,详见文献^[8]。等位酶和等位基因的命名如下:酶的缩写字母代表该酶系统,连字符后的数字代表不同位点,愈靠正极的位点以愈小的数字表示。对同一位点来说,将最常见谱带(等位基因)定为 100,其它谱带(等位基因)则用相对于最常见谱带的迁移率的 % 值代表^[8]。

遗传多样性以常规的多态位点比率(P)(proportion of polymorphic loci)、等位基因平均数(A)(Average number of alleles per locus)、平均期望杂合度(He)(average expected heterozygosity)和观察杂合度(Ho)(average observed heterozygosity)来度量。用 Nei^[9]的基因分化系数(G_{ST})(coefficient of gene differentiation)和遗传一致度(I)(genetic identity)来衡量群体之间遗传分化的大小。以上各遗传参数的意义和计算方法详见文献^[9,10]。

2 实 验 结 果

本研究共测定了 18 种酶系统,其中 13 种酶系统获得了清晰和稳定的谱带。对单倍体胚乳电泳谱带的遗传分析表明,这 13 种酶系统共受 28 个基因位点编码,其中 3 个位点的酶谱显色太弱或分离效果不佳,不做进一步分析。因此,本文以上述 13 种酶系统 25 个位点为遗传标记进行群体遗传学分析。这些酶系统的种类、编码位点数目和检测所用的凝胶缓冲系统详见表 1。一些单态位点及多态位点的电泳谱带式样见图版 I。

表 1 电泳检测所用酶系统、凝胶缓冲系统和位点数目
Table 1 The enzyme systems and electrophoretic data

酶系统 Enzyme system	缩写 Abbreviation	酶分类编码 EC No.	缓冲系统 Gel buffer	位点数目 No. of loci
天冬氨酸转氨酶 Aspartate aminotransferase	AAT	EC 2.6.1.1	I	3
乙醇脱氢酶 Alcohol dehydrogenase	ADH	EC 1.1.1.1	I	1
心肌黄酶 Diaphorase	DIA	EC 1.6.2.2	II	3
果糖二磷酸醛缩酶 Fructose-bisphosphate aldolase	FBA	EC 4.1.2.13	II	2
异柠檬酸脱氢酶 Isocitrate dehydrogenase	IDH	EC 1.1.1.42	I	2
亮氨酸氨基肽酶 Leucine-amino peptidase	LAP	EC 3.4.11.1	III	2
苹果酸脱氢酶 Malate dehydrogenase	MDH	EC 1.1.1.37	III	2
苹果酸酶 Malic enzyme	ME	EC 1.1.1.40	III	1
磷酸葡萄糖脱氢酶 Phosphogluconate dehydrogenase	PGD	EC 1.1.1.44	III	1
磷酸葡萄糖异构酶 Phosphoglucoisomerase	PGI	EC 5.3.1.9	II	2
磷酸葡萄糖变位酶 Phosphoglucomutase	PGM	EC 2.7.5.1	I	2
莽草酸脱氢酶 Shikimate dehydrogenase	SKD	EC 1.1.1.25	III	1
磷酸丙糖异构酶 Triosephosphate isomerase	TPI	EC 5.3.1.1	II	3

表 2 八面山银杉群体在 7 个多态位点上的基因频率
Table 2 Allele frequencies at seven polymorphic loci in the three populations of *Cathaya argyrophylla* in Bamian Mountain

位点 Locus	等位基因 Allele	小群体 Population			总群体 Total
		丝毛坪 Simaoping	脚盆寮 Jiaopenliao	九山 Jiushan	
Aat-2	100	0.900	0.875	1.000	0.914
	108	0.100	0.125	0.000	0.086
Fba-1	100	0.786	0.933	0.750	0.844
	110	0.214	0.067	0.250	0.156
Idh-1	100	0.813	0.875	0.857	0.853
	115	0.187	0.125	0.143	0.147
Lap-1	100	0.813	0.531	0.786	0.677
	112	0.187	0.469	0.214	0.323
Mdh-2	100	0.937	0.969	0.000	0.711
	95	0.063	0.031	0.000	0.032
	145	0.000	0.000	1.000	0.257
Me	100	0.812	0.406	0.833	0.632
	105	0.188	0.594	0.167	0.368
Pgi-2	100	0.875	0.625	0.143	0.572
	112	0.125	0.344	0.857	0.414
	106	0.000	0.031	0.000	0.014

2.1 遗传变异性

对整个八面山银杉群体的分析表明,在所确定的 25 个等位酶位点上只有 7 个位点为多态的(有 2 个以上等位基因)(图版 I, 6~10),其余 18 个位点(Aat-1、Aat-3、Adh、Dia-1、Dia-2、Dia-3、Fba-2、Idh-2、Pgd、Mdh-1、Mdh-3、Pgi-1、Pgm-1、Pgm-2、Skd、Tpi-1、Tpi-2、Tpi-3)均为单态位点(只有 1 个等位基因)(图版 I, 1~5, 7~10),多态位点比率为 0.280。表 2 为上述 7 个多态位点的等位基因种类及其在 3 个小群体和总群体中的频率。由表 2 可见,7 个多态位点中只有 Mdh-2 和 Pgi-2 有 3 个等位基因,其余多态位点只有 2 个等位基因。将表 2 数据计算出的群体变异水平的几个指标列于表 3。由表 3 可见,不管是每个小群体为单位还是以整个八面山银杉林为单位,遗传多样性水平都较低,多态位点比率不超过 0.280, H_e 不超过 0.100。实际观测的杂合体比率与理论期望比率相当,差异不显著,故固定指数 F 值均接近于 0,未达到统计显著水平。

表 3 八面山银杉林群体的遗传变异性指标*

Table 3 Genetic variability in the three populations of *Cathaya argyrophylla* in Bamian Mountain*

小群体 Population	P	A	H_e	H_o	F
丝毛坪 Simaoping	0.280	1.28	0.071	0.066	0.070
脚盆寨 Jiapenliao	0.280	1.32	0.084	0.092	-0.095
九山 Jiushan	0.200	1.20	0.059	0.058	0.017
总群体 Total	0.280	1.36	0.100	0.077	0.230

* 根据全部 25 个位点的计算值。Calculations based on all 25 loci.

2.2 群体分化大小

由表 3 数据可见,与整个八面山银杉林相比,群体水平上的多样性明显偏低,这说明有相当一部分遗传变异存在于几个小群体之间。为此,采用基因分化系数来测定群体之间遗传分化的大小(表 4)。由表 4 可见,小群体间的基因分化系数 $G_{ST} = 0.26$,即在总的遗传变异中,有 26% 的变异存在于小群体间。7 个多态位点中,有 3 个位点上的等位基因频率在群体之间有显著的分化。其中, Mdh-2 位点发生了等位基因的固定,九山群体全为

表 4 基因多样性分析及群体分化的显著性检验*

Table 4 Analysis of gene diversity and degree of differentiation at seven polymorphic loci among the three populations*

位点 Locus	H_T	H_S	D_{ST}	G_{ST}	χ^2
Aat-2	0.157	0.152	0.005	0.032	2.24
Fba-1	0.263	0.250	0.013	0.049	3.43
Idh-1	0.251	0.250	0.001	0.004	0.28
Lap-1	0.437	0.401	0.036	0.082	5.74
Mdh-2	0.427	0.061	0.366	0.857	119.98***
Me	0.465	0.379	0.086	0.185	12.95**
Pgi-2	0.501	0.350	0.151	0.301	42.14***
平均值 Mean	0.100	0.074	0.026	0.260	

* H_T 、 H_S 和 D_{ST} 的平均值为全部 25 个位点的平均值; G_{ST} 平均值由 H_T 、 H_S 和 D_{ST} 的平均值计算得到 [$G_{ST} = (H_T - H_S) / H_T$]。Means of H_T , H_S and D_{ST} are averages of all 25 loci; Mean for G_{ST} is computed from the mean values for H_T , H_S and D_{ST} .

** . $P < 0.01$; *** . $P < 0.001$.

等位基因 145 的纯合体(图版 I, 10b), 而该等位基因在另 2 个小群体中不存在(表 2)。小群体两两之间的 I 值分别为 0.989(丝毛坪和脚盆寮)、0.942(丝毛坪和九山)以及 0.934(脚盆寮和九山), 九山群体与另 2 个小群体之间 I 值最低, 这说明遗传分化主要存在于九山与其它小群体之间。

3 讨 论

等位酶电泳技术是目前检测遗传多样性最为普遍的方法, 而裸子植物则是迄今研究最为详细的类群之一^[11,12]。Hamrick 和 Godt^[11]总结了 80 种裸子植物等位酶研究的结果, 平均多态位点比率 $P = 0.709$, 平均期望杂合度 $He = 0.173$, 基因分化系数 $G_{ST} = 0.068$ 。也就是说, 平均起来看, 裸子植物中有近 71% 的基因位点为多态位点, 17% 的个体为杂合体, 群体间变异量只占总遗传变异量的 6.8%。这一结果表明, 以松杉类为主的裸子植物与其它双子叶或单子叶植物相比, 具有明显丰富的遗传变异性和较小的群体间分化^[11,12]。由于裸子植物寿命长、风媒异花授粉、结实量大、基因交流频繁, 十分有利于维持高水平的遗传变异和低水平的群体间分化^[12]。因此, 即使在很小的分布范围内, 裸子植物群体也会包含整个物种所具有的大部分遗传变异, 这已被许多松杉类物种的研究证实。例如, El-Kassaby 和 Sziklai^[13]采用 27 个等位酶位点对花旗松(*Pseudotsuga menziesii*) 4 个不同海拔群体共 42 个单株进行了检测, 结果 $P = 0.540$, $He = 0.171$, $G_{ST} = 0.068$; Linhart 等^[14]对西黄松(*P. ponderosa*) 6 个相邻小群体的等位酶检测发现, $P = 0.95$, $He = 0.289$, $G_{ST} = 0.037$; 对马尾松 5 个相邻天然林的研究得出 $P = 0.645$, $He = 0.216$, $G_{ST} = 0.024$ ^[15]。

本研究的结果表明, 八面山一带几个残存银杉小群体遗传变异水平很低($P = 0.200 \sim 0.280$, $He = 0.059 \sim 0.100$)(表 3), 就以整个八面山银杉林来说, 其遗传多样性水平($P = 0.273$, $He = 0.103$)也只有裸子植物平均值的 $1/3 \sim 2/3$ 。而且, 这 3 个小群体相距不过几公里, 已发生等位基因的固定, 遗传分化很高, 26% 的变异存在于小群体之间, 为上述几个类似研究结果的 5 ~ 10 倍, 是裸子植物平均值的 3 倍多。这意味着在八面山这一局部分布点上, 银杉群体之间的基因流很有限, 不足以维持群体之间的均一。

对许多裸子植物稀有和濒危物种的研究表明, 不同物种遗传变异水平和群体遗传结构有很大差异。如美国加州南部的特有种台地松(*Pinus torreyana*) 现今只有两个相距 280 km 的群体, 59 个等位酶位点的研究表明, 群体之内没有任何变异存在, 而两个群体却在其中 2 个位点上固定了不同的等位基因。这是因为在该种的进化历史上曾发生过群体的急剧减小, 从而导致严重的瓶颈效应(bottleneck effect), 相应出现遗传变异的丧失和群体间的分化^[16]。对广布于北美的脂松(*P. resinosa*) 的研究表明, 更新世冰川活动曾使该种经历了严重的瓶颈效应, 遗传变异大量丧失, 但此后脂松的残遗群体又遇到适宜的环境条件而逐渐扩大了其分布范围, 只是其遗传多样性仍保持在极低的水平上($P = 0.111$)^[17]。由此可见, 上述两个物种各自的进化历史导致其遗传多样性和群体遗传结构明显不同于大多数裸子植物。本文所报道的八面山银杉群体低水平的遗传多样性和明显的群体分化, 大概也和其特定的进化历史有关。根据化石和孢粉的研究, 至少在第三纪, 银杉曾分布于现今法国西南部和俄罗斯远东等地区, 而目前仅间断分布在我国几个局部地点, 并要

求生境具有夏凉冬冷、雨量充沛而排水良好、空气湿度高等特点^[2]。银杉这种孤立的分布和对特殊生境的要求正是其残遗性和古老性的反映。银杉混交林群落学和孢粉学的研究表明,作为第四纪冰川的残遗种,银杉对冰后期大范围的气候变化不太适应,分布区不断退缩^[2],群体的不断缩小必然会导致遗传上的漂变,其直接后果就是遗传变异性的下降和群体间出现分化。从整个分布区范围内对银杉遗传多样性和群体遗传结构的研究正在进行之中。毫无疑问,其结果不仅有助于更清楚地认识银杉的进化历史和生存潜力,而且将为针对银杉采取何种挽救和保护措施提供科学依据。

参 考 文 献

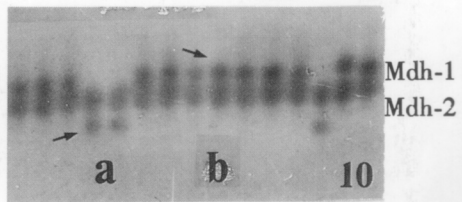
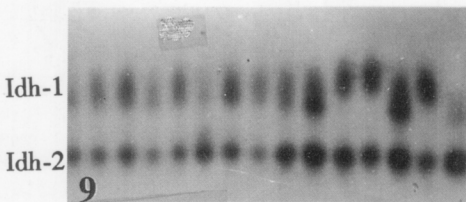
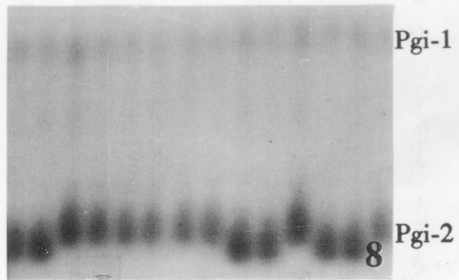
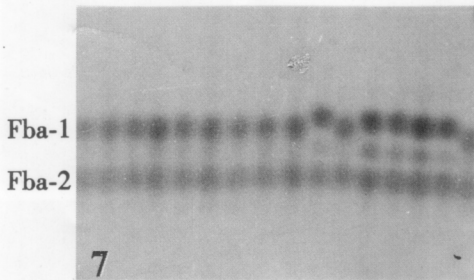
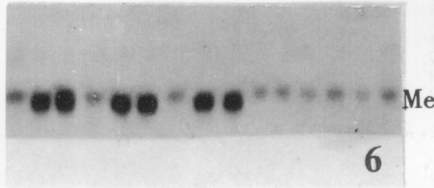
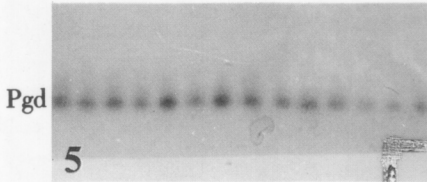
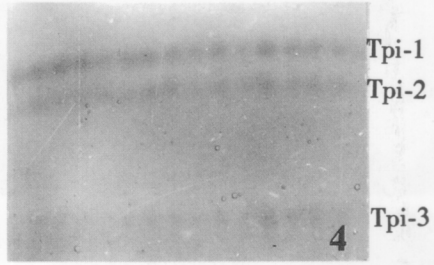
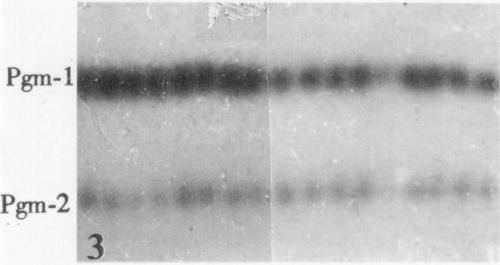
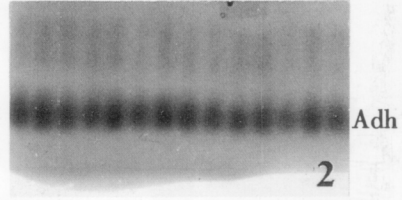
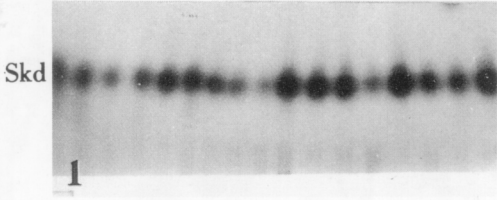
- 1 葛颂,洪德元. 遗传多样性及其检测方法. 见: 钱迎倩, 马克平主编. 生物多样性研究的原理和方法. 北京: 中国科学技术出版社, 1994.
- 2 王伏雄主编. 银杉生物学. 北京: 科学出版社, 1990.
- 3 谢宗强. 中国特有植物银杉及其研究. 生物多样性, 1995. 3: 99 ~ 103
- 4 祁承强, 肖育禧. 湖南省八面山银杉林的群落学分析. 植物研究, 1988. 8: 169 ~ 182
- 5 谢宗强, 陈伟烈, 江明喜等. 八面山银杉林种群的初步研究. 植物学报, 1995. 37: 58 ~ 65
- 6 Soltis D E, Haufler C H, Darrow D C *et al.* Starch gel electrophoresis of ferns: A compilation of grinding buffers, gel and electrode buffers, and staining schedules. *Amer Fern J*, 1983. 73(1): 9 ~ 29
- 7 Wendel J F, Weeden N F. Visualization and interpretation of plant isozymes. In: Soltis D E, Soltis P S eds., *Isozymes in Plant Biology*. Washington DC: Dioscorides Press, 1989. 5 ~ 45
- 8 葛颂, 黄敏仁, 许农. 马尾松 GOT、LDH 和 MDH 同工酶的遗传方式和连锁关系. 遗传学报, 1987. 14: 428 ~ 435
- 9 Nei M. *Molecular Population Genetics and Evolution*. New York: Elsevier, 1975.
- 10 葛颂. 用同工酶定量分析林木群体变异和分化的方法. 西南林学院学报, 1989. 9: 84 ~ 90
- 11 Hamrick J L, Godt M J W. Allozyme diversity in plant species. In: Brown A H D, Clegg M T, Kahler A C *et al* eds., *Plant Population Genetics, Breeding, and Genetic Resources*, Sunderland, Mass: Sinauer, 1990. 43 ~ 63
- 12 El-Kassaby Y A. Genetic variation within and among conifer populations: Review and evaluation of methods. In: Fineschi S, Maluoli M E, Cannata F *et al* eds., *Biochemical Markers in the Population Genetics of Forest Trees*. The Netherlands: Academic Publishing, 1991. 61 ~ 76
- 13 El-Kassaby Y A, Sziklai O. Genetic variation of allozyme and quantitative traits in a selected Douglas-fir population. *Forest Ecol Management*, 1982. 4: 115 ~ 126
- 14 Linhart Y A, Mitton J B, Sturgeon K B *et al.* Genetic variation in space and time in a population of ponderosa pine. *Heredity*, 1981. 46: 407 ~ 426
- 15 葛颂, 王明麻, 陈岳武. 用同工酶研究马尾松群体的遗传结构. 林业科学, 1988. 24: 399 ~ 409
- 16 Ledig F T, Conkle M T. Gene diversity and genetic structure in a narrow endemic, Torrey pine (*Pinus torreyana* Parry ex Carr.). *Evolution*, 1983. 37: 79 ~ 86
- 17 Allendorf F W, Knudsen K L, Blak G M. Frequencies of null alleles at enzyme loci in natural populations of ponderosa and red pine. *Genetics*, 1982. 100: 497 ~ 504

图 版 说 明

图版 I 1~5. 8 个单态位点的酶谱式样, 均为 2 个单株各 7 粒或 8 粒种子胚乳的电泳谱带。6. 多态位点 Me 的酶谱分离式样, 示杂合单株 2 个等位基因 100 和 105 的分离(前 7 份和后 8 份来自 2 个不同的单株)。7~10. 果糖二磷酸醛缩酶(FBA)、磷酸葡萄糖异构酶(PGI)、异柠檬酸脱氢酶(IDH)和苹果酸脱氢酶(MDH)4 个酶系统各一个多态位点(Fba-1、Pgi-2、Idh-1 和 Mdh-1)和一个单态位点(Fba-2、Pgi-1、Idh-2 和 Mdh-2)的酶谱分离式样(a 和 b 为 Mdh-1 位点上的 100 和 145 等位基因)。

Explanation of Plate

Plate I Figs. 1 ~ 5. Band patterns of 14 or 15 megagametophytes from two individuals at the eight monomorphic loci. Fig. 6. Band segregation at Me locus, showing alleles 100 and 105 (former seven and other eight megagametophytes of two heterozygotes, respectively). Figs. 7 ~ 10. Band patterns of one polymorphic locus (Fba-1, Pgi-2, Idh-1 and Mdh-2) and one monomorphic locus (Fba-2, Pgi-1, Idh-2 and Mdh-1) at each of fructose-bisphosphate aldolase (FBA), phosphoglucosomerase (PGI), isocitrate dehydrogenase (IDH) and malate dehydrogenase (MDH), respectively (a, b. alleles 100 and 145, respectively, at Mdh-2 locus).



See explanation at the end of text