

不同采样策略对细距堇菜遗传多样性估算的影响

李昂 王可青 葛颂*

(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)

摘要: 采用水平淀粉凝胶电泳技术对分布于北京金山、檀柘寺、香山、樱桃沟的细距堇菜 (*Viola tenuicornis* W. Beck.) 的遗传变异和群体分化进行了初步研究。对 8 个酶系统 11 个等位酶位点的检测表明, 该种在上述地区的遗传变异水平明显高于多年生草本的平均值, 多态位点百分率 $P = 72.7\%$, 等位基因平均数 $A = 2.4$, 平均期望杂合度 $H_e = 0.243$; 群体间的遗传分化略小于多年生草本的平均值, 杂和性基因多样度的比率 $F_{st} = 0.196$ 。检测了空间距离对遗传相似性的影响, 发现二者无明显的相关性。研究了不同采样方法对遗传学估测的影响, 表明对该物种的群体进行取样时每群体取 30 株时有较充分的代表性, 小于 20 个个体的取样可能引起遗传多样性估测出现大的偏差, 尤其是 A 和 H_e 2 个指标易受样本大小的影响。

关键词: 等位酶; 遗传变异; 群体分化; 细距堇菜

中图分类号: Q346+.5 文献标识码: A 文章编号: 0577-7496(2000)10-1069-06

Genetic Diversity Within and Among Populations of *Viola tenuicornis* with Reference to Sampling Strategies

LI Ang, WANG Ke-Qing, GE Song*

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

Abstract: Genetic diversity and population differentiation of *Viola tenuicornis* W. Beck. were studied in nine populations in Beijing using horizontal starch gel electrophoresis. Allozyme data for 11 loci of 8 enzymes indicated high level of genetic variability in this region with $P = 72.7\%$, $A = 2.4$ and $H_e = 0.243$. In contrast, the population differentiation was lower than the average of other perennial herb with $F_{st} = 0.196$. It was found that distances among populations had little effect on population differentiation. A sample of 30 individuals could well represent a population, but less than 20 individuals per population might lead to significant bias in the estimation of genetic parameters, in particular the values of A and H_e .

Key words: allozyme; genetic diversity; population differentiation; *Viola tenuicornis*

群体的遗传结构是一个物种最基本的特征之一, 与物种自身的进化历史和生物学特性有关, 同时也受各种进化因素的影响^[1]。尽管 20 世纪 60 年代以来, 酶电泳技术被广泛应用于植物群体遗传学研究, 但相对于栽培植物(如农作物、林木等)来说, 人们对大量野生植物遗传多样性和群体遗传结构的认识还相当不足^[2,3]。另一方面, 尽管等位酶技术已成为遗传多样性检测和群体遗传结构研究中的常规方法^[1,3,4], 但由于目前利用的等位酶位点仍然有限, 群体中取样个体的数目和采样方式会对各种群体遗传参数的估算产生一定的影响^[5,6]。因此, 采样策略是群体遗传学研究中不可忽视的问题, 尤其是对群体和个体数目有限的稀有和濒危物种, 确定正

确的采样策略对保护措施的制定具有重要意义^[6,7]。

细距堇菜为堇菜科堇菜属多年生草本植物, 分布范围广、适应性强, 我国北方大部分地区、云南以及朝鲜、前苏联远东地区均有分布^[8]。由于该属植物具有特殊的繁殖方式和种子传播机制, 不少学者对其开花特性、花部形态学、生殖特点、细胞学和群体扩散的方式开展了一些初步的研究, 表明该种为兼性生殖的二倍体植物($2n = 24$)^[8-11], 但国内外尚未见到对其遗传多样性的研究。本研究应用等位酶电泳技术对细距堇菜的遗传多样性和群体遗传结构进行了初步研究。与此同时, 以细距堇菜为材料研究了不同取样策略对遗传参数估算的影响。

1 材料和方法

1.1 采样

于1998年4~5月从北京金山(T01、T02)、檀柘寺(T03)、樱桃沟(T04、T05、T06)、香山(T07、T08、T09)的9个细距堇菜(*Viola tenuicornis* W. Beck)天然群体采得206株个体,进行了等位酶检测。各群体采样个体数详见表2,9个采样群体地理分布如图1(图中圈的大小与取样面积基本成正比)。

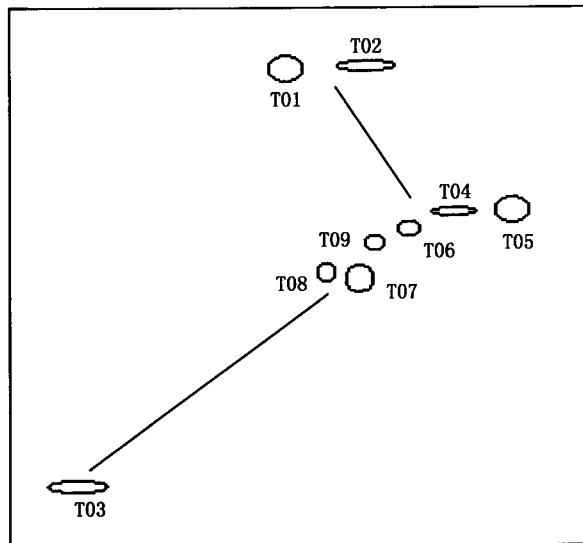


图1. 细距堇菜采样群体分布图。

Fig. 1. Distribution map of *Viola tenuicornis* populations sampled in this study.

The nine populations were sampled in Beijing at Jinshan (T01 and T02), Tanzhesi (T03), Yingtaogou (T04, T05 and T06), and Xiangshan (T07, T08 and T09) respectively. The circles are in directly proportional to sample areas in size.

在其中2个群体(T05、T07)中,采用了两种方法进行群体取样,以探讨不同取样方法对群体遗传参数估算的影响:(1)将采样点划分为并排的4或3个小块,即将群体T05分成面积约2 m×8 m的4块(个体1~12、13~22、23~32、33~42),将群体T07

分成约2 m×8 m的3块(个体1~13、14~23、24~28)。用每一小块及它们的不同组合分别代表该群体进行各种参数估算;(2)从群体中分别随机抽取10、20、30个个体来代表该群体进行参数估算。

1.2 酶的提取、凝胶电泳和染色

取单株茎上部嫩叶,加1~2滴Tris-马来酸提取液(pH 7.5)在冰上研磨,用7 mm×2 mm的滤纸小条蘸吸匀浆液,上胶电泳(或保存于-70℃超低温冰箱,化冻时加2%巯基乙醇,再上样电泳)。采用水平板淀粉凝胶电泳技术,所用淀粉为美国Sigma公司产品(S-4501),胶的浓度为12%。所用凝胶缓冲系统、酶的组织化学染色方法均根据王中仁^[12]的方法稍有改动。

1.3 等位酶分析及数据处理

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,越靠近正极的位点以越小的数字表示。若每个基因位点有多个等位基因,则依照靠近阳极的次序,在该位点数字后面再加上小写英文字母a、b、c等^[7]。

遗传多样性以常规的多态位点百分率(P , percentage of polymorphic loci)、等位基因平均数(A , average number of alleles per locus)、平均期望杂合度(H_e , average expected heterozygosity)和观察杂合度(H_o , average observed heterozygosity)来度量。用Wright的 F 统计量(F_{st})和遗传一致度(I) (genetic identity)来衡量群体之间遗传分化的大小。

各参数的计算通过Biosys-1软件来完成,其意义和计算方法详见文献^[12]。

2 实验结果

共测定了8种酶系统,得到了11个等位酶位点。所测酶系统的种类、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2。

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

Enzyme system	Abbreviation	EC No.	Gel buffer ¹⁾	No. of loci
Aspartate aminotransferase	AAT	E. C. 2.6.1.1	6	2
Diaphorase	DIA	E. C. 1.6.2.2	6	2
Isocitrate dehydrogenase	IDH	E. C. 1.1.1.42	1b	1
Leucine-amino peptidase	LAP	E. C. 3.4.11.1	6	2
Phosphogluconate dehydrogenase	PGD	E. C. 1.1.1.44	1b	1
Phosphoglucoisomerase	PGI	E. C. 5.3.1.9	1b	2
Phosphoglucomutase	PGM	E. C. 2.7.5.1	1b	1
Shikimate dehydrogenase	SKD	E. C. 1.1.1.25	1b	1

1) 6, Borax/Tris-citric acid buffer (pH 8.6); 1b, 4 mol/L citric acid, trisodium salt/0.01 mol/L L-histidine monohydrochloride buffer (pH 7.0).

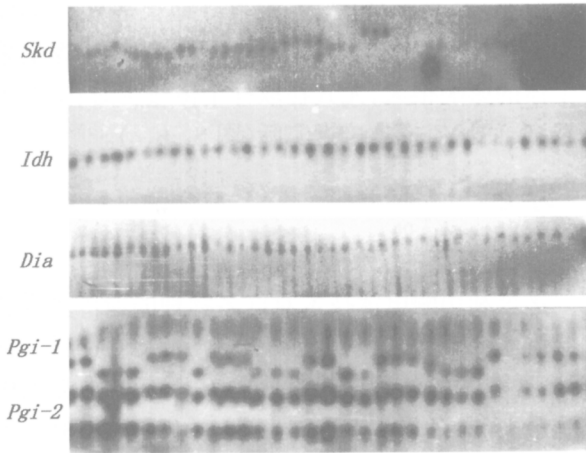


图2. 酶电泳图谱。

Fig. 2. Zymograms of four enzyme systems.

2.1 遗传变异水平和群体分化

对细距堇菜 9 个群体的分析表明,在所测定的 11 个位点中,有 3 个位点 (*Idh*、*Dia-1*、*Pgi-1*) 是单态的(只有 1 个等位基因),其余 8 个位点 (*Aat*、*Dia-2*、*Lap-1*、*Lap-2*、*Pgd*、*Pgi-2*、*Pgm*、*Skd*) 是多态的(有 2 个以上等位基因),其中 *Lap-1*、*Lap-2* 和 *Pgm* 有 3 个等位基因;*Aat*、*Dia-2* 和 *Pgi-2* 有 4 个等位基因;*Pgd* 和 *Skd* 有 5 个等位基因。根据上述等位基因种类和频率计算出 9 个群体及总群体的遗传学参数列于表 2。总群体的多态位点百分率(P)为 72.7%,等位基因平均数(A)为 2.4,平均期望杂合度(H_e)为 0.243,固定指数(F)为 -0.075。表明总群体中,72%左右的位点是多态的,每个位点平均有 2.4 个等位基因,若群体为随机交配则会有大约 24% 的杂合体。 A 和 P 参数 T05 群体均为最大,T06 群体均为最小。杂合位点比率和平均期望杂合度均以 T05 为最高, F 值除群体 T07 明显大于 0 之外,其他群体均接近或小于 0。

表 2 细距堇菜的遗传变异性指标

Table 2 Genetic variability in 9 *Viola tenuicornis* populations in Beijing

Population	N	A	P	H_o	H_e	F
T01	25	2.4	45.5	0.255	0.232	-0.099
T02	13	2.0	54.5	0.210	0.212	0.009
T03	26	2.1	45.5	0.290	0.218	-0.330
T04	26	1.7	45.5	0.235	0.189	-0.243
T05	42	2.6	72.7	0.333	0.297	-0.121
T06	11	1.6	36.4	0.204	0.193	-0.057
T07	28	2.2	54.5	0.185	0.255	0.275
T08	20	2.0	45.5	0.181	0.183	0.011
T09	15	1.9	54.5	0.214	0.192	-0.115
Species	206	2.4	72.7	0.226	0.243	-0.075

N , number of enumerated loci; A , average expected heterozygosity; P , percentage of polymorphic loci; H_e , average expected heterozygosity; H_o , average observed heterozygosity.

采用 Wright 的 F 统计量来测定群体之间遗传分化的大小。由表 3 可见, $F_{st} = 0.196$,即在总的遗传变异中,有 19.6% 的变异存在于群体之间。计算出群体两两间的遗传距离和相似性,并作出聚类图(图 3)。差异最大的两个群体为 T08 和 T09,其相似性系数为 0.806。

表 3 基因多样性及群体遗传分化

Table 3 Gene diversity and genetic differentiation among 9 populations at 8 polymorphic loci

Locus	F_{is}	F_{it}	F_{st}
<i>Aat</i>	0.372	0.508	0.206
<i>Dia-2</i>	0.576	0.605	0.068
<i>Lap-1</i>	0.194	0.238	0.054
<i>Lap-2</i>	0.400	0.556	0.260
<i>Pgd</i>	-0.468	-0.308	0.109
<i>Pgi-2</i>	-0.430	-0.280	0.105
<i>Pgm</i>	0.443	0.651	0.374
<i>Skd</i>	0.042	0.394	0.367
Mean	-0.096	0.119	0.196

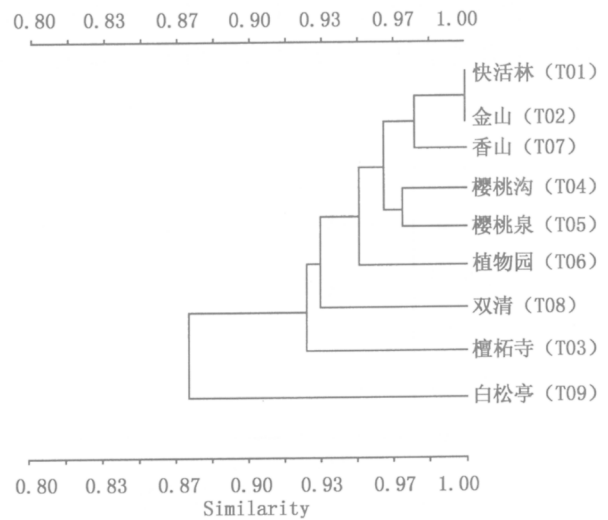


图 3. 群体间遗传相似性图。

Fig. 3. Phenogram of genetic similarity for 9 populations.

根据地图估算出各群体间的空间距离,遗传相似性与空间距离二者的相关系数为0.1167, $t = 0.68$, $P < 0.5$, 说明空间隔离对群体的遗传分化没有显著影响。

2.2 取样方法对遗传学参数估测的影响

2.2.1 方法1 将群体 T05 划分为面积基本相同的小块(2 m × 8 m),从中分别取 1、2、3、4 个小块代表该群体进行遗传学运算,所得参数分别对不同样本组合所覆盖的面积占群体总面积的比例作图(图4)。可见依样本覆盖群体面积不同,各遗传学参数均有一定变化。样本覆盖面积相同时,根据来自不同部位的样本计算出的结果有很大差异,尤其是样本覆盖面积较小时,遗传参数估算值的变化更大。群体 T07 的处理结果相同。

2.2.2 方法2 从采样个体较多的 T05 群体中,按 10、20、30 个个体 3 个级别进行随机抽样,来代表该群体进行遗传学计算,每个级别随机重复抽样 10 次。所得结果见图 5。由图可见,多态位点百分率(P)的估算受采样个体数目的影响很小,即使在每

群体只采 10 个个体时,也能很好地代表整个群体(只有一次偏离)(图 5, a)。而 A 和 H_e 的估算受采样个体的影响很大,尤其在取样个体较少时;采样个体越多,估计值也越接近实际(图 5, b, c)。

3 讨论

3.1 细距堇菜的遗传变异和群体分化

迄今利用酶电泳技术对许多物种的遗传多样性和群体遗传结构进行了检测,积累了大量资料。据统计,乔灌木的各种多样性指标在所有植物类别中都是最高的,平均多态位点百分率(P)为 75.3%,等位基因平均数(A)为 2.56;多年生草本植物平均多态位点百分率(P)为 26.3%,等位基因平均数(A)为 1.44^[13]。本研究结果显示,细距堇菜各群体的平均值 A 为 2.4, P 为 72.7%,均高出多年生草本的平均值,而接近乔灌木的水平。以 Wright 的 F_{st} 来衡量,本种群体间变异占 19.6%,略低于 Hamrick 和 Godt^[14] 统计的多年生草本的平均值 23.3%。总群体 F 值为负,在某些位点(如: Pgd 、 $Pgi-2$) F 值的负

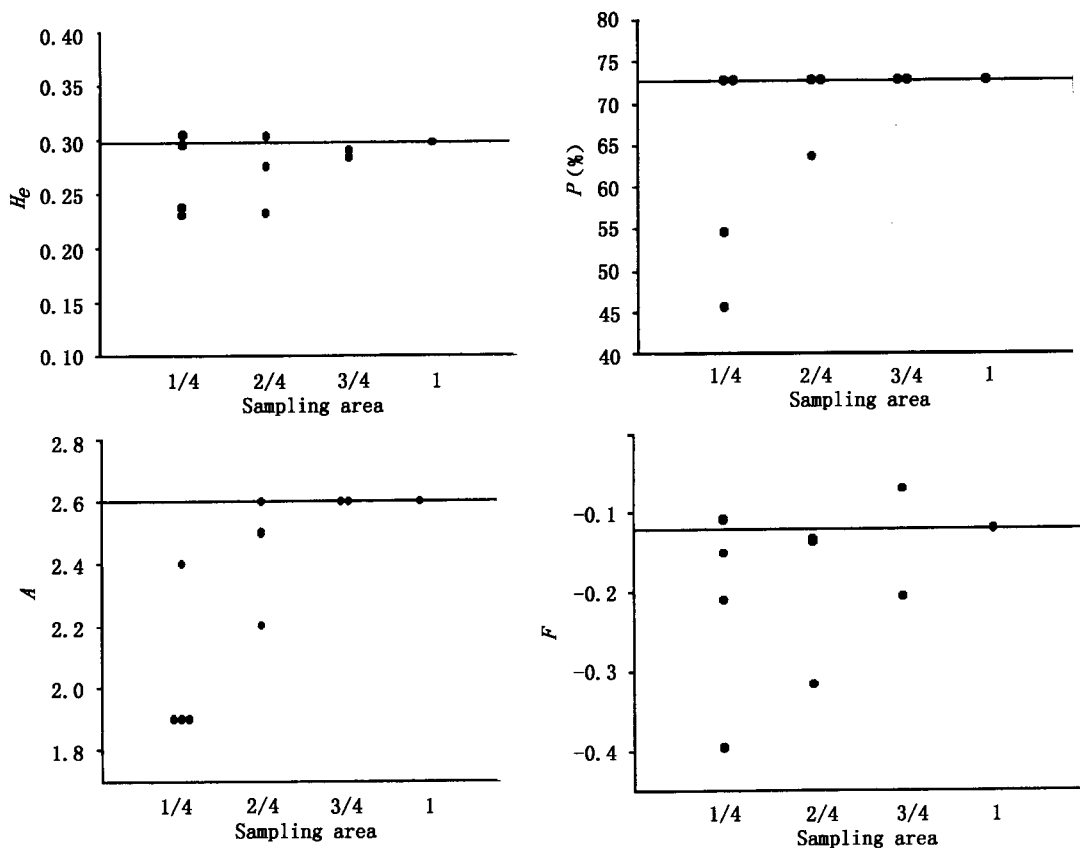


图4. 遗传参数与取样面积之间的关系(图中水平线为根据全部采样个体所得的数值)。

Fig. 4. Correlation between genetic parameters and sampling areas.

The horizontal line indicates the values calculated based on all sampled individuals. The sampling area is divided into four grades, i. e., 1 represents sampling 100% individuals; 1/4, 2/4, and 3/4 represent sampling 25%, 50%, and 75% individuals, respectively. A , H_e , P , and F are the same as in Table 2.

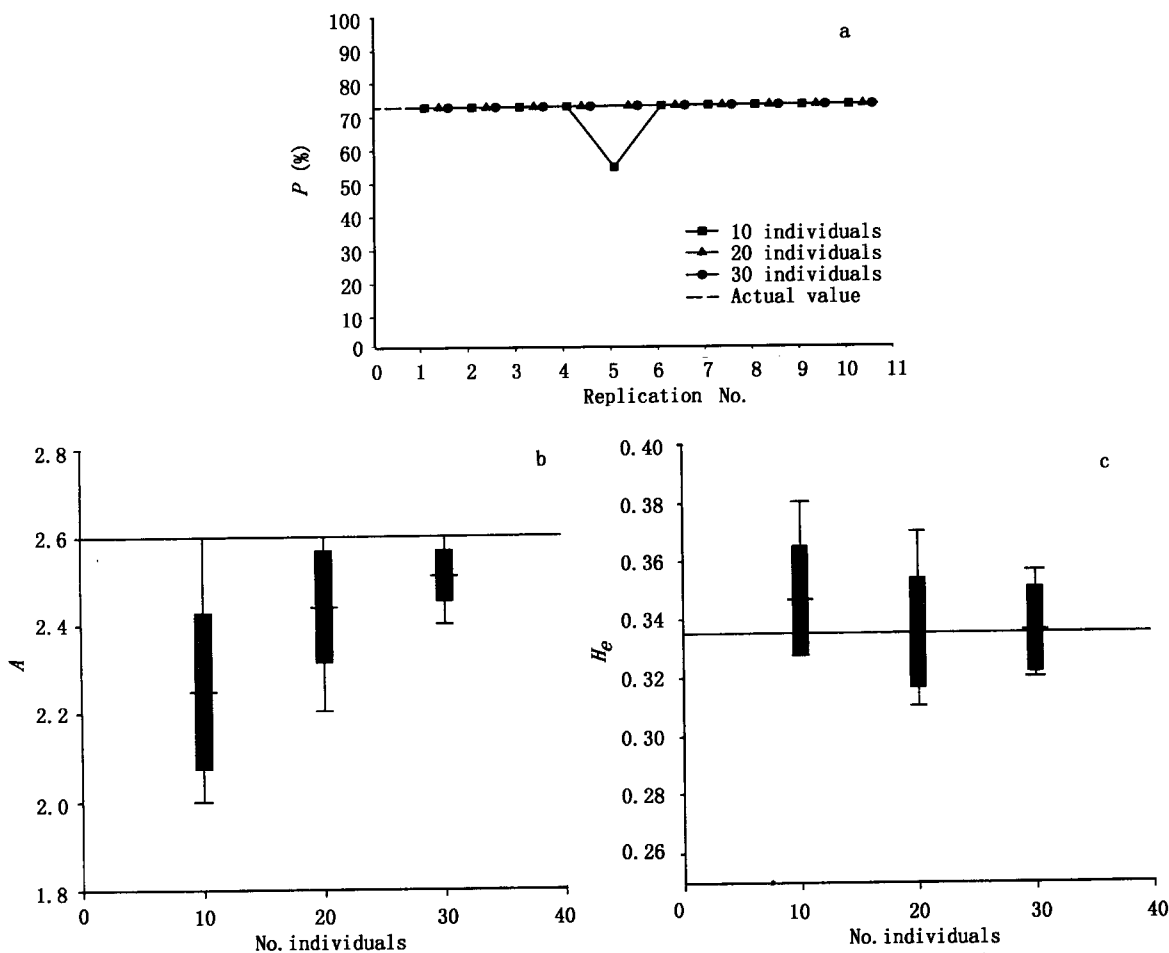


图 5. 遗传参数和取样个体数之间的关系(图中水平线为根据全部采样个体所得到的数值, 实心柱代表标准差, 柱中横线代表平均值)。

Fig. 5. Correlation between genetic parameters and sampling numbers.

The horizontal line indicates the values calculated based on all sampled individuals; the column represents the standard errors and the bar represents the mean. P , A , and H_e are the same as in Table 2.

偏离尤其明显, 反映了群体中杂合体过多。由于本种未观察到克隆繁殖现象, 因此群体中是否存在某种杂种优势有待进一步研究。

本种较高的遗传变异水平可能与其地理分布广有关^[14]。由于本种分布范围大, 生长于不同的地理环境, 受不同环境选择的机会多, 因此群体间容易产生遗传分化。本种最适生于阴湿环境, 因此不像其近缘耐旱种早开堇菜 (*V. prionatha*) 那样呈现连续分布, 而是在一个大的分布区内形成一些小群体。这些小群体因受小环境选择, 在形态、等位酶等不同水平上均产生了不同程度的变异。另外, 根据汪劲武等^[15, 16]的研究, 本物种与其近缘种斑叶堇菜 (*V. variegata*) 在形态上存在过渡, 不排除它们有杂交的可能, 这也可能是造成该种遗传多样性高的原因。

基因流是影响群体遗传结构的另一关键因素。本种以及堇菜属存在复杂的交配系统, 春花(完全花)具有独特的结构以适应虫媒传粉, 夏花(闭索花)

自花受粉也能结出可育的种子^[9-11]。本研究群体间变异略低于 Hamrick 和 Godt^[14]统计的多年生草本的平均值, 可能与 Hamrick 和 Godt 统计的多为自交物种而本种为兼性交配有关。由于植物群体中只要有少量的异花传粉就能阻止群体出现分化, 所以这种行兼性交配的物种其遗传结构与主要为异花传粉的类群近似^[1]。总群体 F 值为负, 也意味着本物种以异交为主。此外, 本种及其所在属的植物有两种种子散布机制——弹射和由昆虫散布^[11]。昆虫参与种子的传播也可能是造成群体间变异略低的原因之一。

选择、突变和基因流等的共同作用产生了遗传差异, 而空间距离并不一定产生遗传差异^[14]。如本研究中群体 T08 和 T09 之间的遗传差异最大, 但空间距离却最近; 而群体 T01 和 T03 之间的差异很小, 空间距离却相当大。这一方面说明, 即使存在不断的基因流, 强有力的选择也能使彼此相距很近的群

体保持遗传上的差别;另一方面也说明,当选择作用不那么明显时,只要有很小量的基因流便可有效地阻止群体分化^[2,17]。

3.2 取样策略对遗传变异估算的影响

从空间上看,样本所覆盖的面积对遗传参数估算有相当重要的影响。样本覆盖面积占整个群体面积的比例越小,对遗传参数估算引起的偏差可能越大。因此,在进行群体遗传学研究时,首先要注意取样个体应尽可能选自整个群体而不是其中的某一部分。另外,样本在群体中所处的位置对遗传学参数的估测也有影响,根据来自不同位置而面积相同的样本计算出的遗传学参数有很大差异。

从取样数量上看,本研究得出的初步结果是,参数 P 的估算基本不受个体数的影响,而参数 H_e 和 A 的估算则随个体数增加而接近实际值。Sjogren 和 Wyoni^[6]曾就取样个体数对群体遗传学研究的影响进行了一些计算机模拟,认为对于个体数大于 30 的群体,采样个体少于 20 会低估多态性水平。本研究得出类似的结果,即对大群体取样时样本数至少应大于 30 才能得到较准确的遗传参数估算值,而样本数小于 20 时的估算很可能有较大偏差。另外,本研究认为如果所取样本在空间上无法覆盖整个群体,则增加样本数也可在一定程度上弥补这一缺陷。

致谢: 北京大学的汪劲武教授在采样过程中给予了耐心的帮助和指导,在此表示衷心的感谢。

参考文献:

- [1] Ge S(葛颂). Retrospective and prospective of population genetic structure in plants. Li C-S(李承森). *Advances in Plant Sciences*. Vol. 1. Beijing: China High Education Press, 1998. 1 - 16. (in Chinese)
- [2] Ge S(葛颂). Electrophoretic data and studies of plant systematics and evolution. *Wuhan Bot Res* (武汉植物学研究), 1994, **12**: 71 - 84. (in Chinese)
- [3] Schaal B A, Leverich W J, Rogstad S H. Comparison of methods for assessing genetic variation in plant conservation

biology. Falk D A, Holsinger K E. *Genetics and Conservation of Rare Plants*. New York: Oxford University Press, 1991. 123 - 134.

- [4] Ge S(葛颂), Wang H-Q(王海群), Zhang C-M(张灿明), Hong D-Y(洪德元). Genetic diversity and population differentiation of *Cathaya argyrophylla* in Bamian mountain. *Acta Bot Sin* (植物学报), 1997, **39**: 268 - 271. (in Chinese)
- [5] Archie J W. Statistical analysis of heterozygosity data: Independent sample comparisons. *Evolution*, 1985, **39**: 623 - 637.
- [6] Sjogren P, Wyoni P. Conservation genetics and detection of rare alleles in finite populations. *Conserv Biol*, 1994, **8**: 267 - 270.
- [7] Ge S. Population genetic structure and conservation of an endangered conifer, *Cathaya argyrophylla* (Pinaceae). *Int J Plant Sci*, 1998, **159**: 351 - 357.
- [8] Wang Q-R(王庆瑞). *Flora Reipublicae Popularis Sinicae Tomus 51*. Beijing: Science Press, 1991. 47 - 49. (in Chinese)
- [9] Andrew J B. Floral evolution in *Viola*. *Ann MO Bot Gard*, 1974, **61**: 781 - 793.
- [10] Beattie A J, Lyons N. Seed dispersal in *Viola* (Violaceae): Adaptations and strategies. *Amer J Bot*, 1975, **62**: 714 - 722.
- [11] Ohkawaq K, Higashi S. Relative importance of ballistic and ant dispersal in two diplochorous *Viola* species (Violaceae). *Oecologia*, 1994, **100**: 135 - 140.
- [12] Wang Z-R(王中仁). *Plant Allozyme Analysis*. Beijing: Science Press, 1996. (in Chinese)
- [13] Ge S(葛颂). Allozyme and population genetics research of trees. *J Nanjing For Univ* (南京林业大学学报), 1988, **1**: 68 - 77. (in Chinese)
- [14] Hamrick J L, Godt M J W. Allozyme diversity in plant species. Brown A H D, Clegg M T, Kahler A L. *Plant Population Genetics, Breeding, and Genetic Resources*. Sunderland: Sinauer, 1990. 43 - 63.
- [15] Wang J-W(汪劲武), Yang J(杨继). A preliminary study of the genus *Viola* in Hebei Province and Beijing region. *Bull Bot Res* (植物研究), 1988, **8**: 123 - 137. (in Chinese)
- [16] Yang J(杨继), Wang J-W(汪劲武). A further study of the genus *Viola* in Hebei Province. *Acta Phytotaxon Sin* (植物分类学报), 1989, **27**: 197 - 204. (in Chinese)
- [17] Grant V. *The Evolutionary Process: A Critical Study of Evolutionary Theory*. 2nd ed. New York: Columbia University Press, 1991.

(责任编辑: 梁 燕)