

小毛茛居群分化研究(Ⅱ)——居群遗传变异的等位酶分析

汪小凡¹, 靳宝锋², 庞新安², 张竞男²

(1. 武汉大学植物发育生物学教育部重点实验室, 湖北武汉 430072; 2. 武汉大学生命科学学院, 湖北武汉 430072)

摘要: 采用聚丙烯酰胺凝胶电泳技术检测小毛茛的3个地点共6个居群的遗传变异。对4个酶系统7个酶位点的基因型频率的聚类分析, 结果表明: 小毛茛居群遗传分化主要与居群所在生境因素相关, 与地理位置之间仅有不显著的相关性。等位酶分析与形态变异研究的结果基本吻合。

关键词: 小毛茛; 居群分化; 等位酶分析

中图分类号: Q949 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2002)01-0071-03

Primary studies on differentiation of populations in *Ranunculus ternatus* Thunb. (Ⅱ) — Allozyme analysis on genetic differentiation of populations

WANG Xiao-fan¹, JIN Bao-feng², PANG Xin-an², ZHANG Jing-nan²

(1. Key Laboratory of MOE for Plant Developmental Biology, Wuhan University, Wuhan 430072, China;

2. College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China)

Abstract: Genetic differentiation of six populations in *Ranunculus ternatus* Thunb. from three locations was detected by using the vertical slab polyacrylamide gel electrophoresis. Based on the genotype frequencies assessed from seven loci of four enzymes, the result of cluster analysis indicated that, genetic variation of populations in the species is mainly correlated with its habitat but with its geographic factors. The allozyme analysis is correspond to the studies of morphological variances.

Key words: *Ranunculus ternatus*; population differentiation; allozyme analysis

同工酶(isozyme)技术以及在此基础上发展起来的等位基因酶(allozyme, 简称等位酶)分析方法, 在高等植物的系统与进化生物学研究中的各个方面已得到广泛应用^[1,2]。在毛茛属(*Ranunculus*)中, 小毛茛(猫爪草 *R. ternatus* Thunb.)、禺毛茛(*R. Can-*

toniensis DC.)等种也有过同工酶方面的工作^[3,4]。在前文对小毛茛居群内和居群间形态变异所作探讨的基础上, 本研究试图利用等位酶分析方法研究小毛茛的居群间的遗传分化式样及其与地理和生态因素的关系。

收稿日期: 2000-04-13

作者简介: 汪小凡(1965-), 男, 湖北红安人, 博士, 从事植物系统学与进化生物学研究。

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 39870082)部分资助

1 材料和方法

1.1 材料来源

供试材料取自河南、湖北二省 3 个地点 6 个居

群,每一地点的 2 个居群的空间距离约 200~300 m,其中居群 LJ-2 中的个体在形态特征上明显区别于其他居群的个体。每居群采集约 30 株移栽到实验室中。取样时间为 1999 年 3~4 月。凭证标本存于

表 1 材料来源

Table 1 Origin of the materials

序号 Serial number	居群代码 Code of populations	地点 Locality	样本量 Numbers of individuals	凭证标本 Vouchers
1	LJ-1	湖北武昌珞珈山	30	X. F. Wang 9901
2	LJ-2	Luojia Hill, Wuchang, Hubei	30	X. F. Wang 9902, 9903
3	SZ-1	湖北武昌狮子山	30	X. F. Wang 9904
4	SZ-2	Shizi Hill, Wuchang, Hubei	30	X. F. Wang 9905
5	XY-1	河南信阳	30	X. F. Wang 9906
6	XY-2	Xinyang, Henan	30	X. F. Wang 9907, 9908

武汉大学生命科学院植物标本馆(WH)。

1.2 制样和电泳

每植株取健康幼叶 1 片,分别加 0.2 mL 的 Tris-HCl 提取缓冲液^[1],在冰浴中研磨提取,离心(12 000 r/min, 0.5 min),冷冻备用。采用垂直板不连续聚丙烯酰胺凝胶^[2],分离胶浓度 10%, pH8.9, 胶板规格 102 mm(长)(96 mm(宽)(1 mm(厚);浓缩胶浓度 4%, pH6.8, 点样槽 14~19 个/板;点样量 8~12 (μ g)/样品;电极缓冲液为 Tris-甘氨酸缓冲液(0.04 mol/L, pH8.3);稳压 240 v,电泳时间约为 3.5 h。同工酶染色参考 Soltis 等(1983)的方法^[3]。

1.3 等位酶分析及数据处理

根据所获得的酶谱,采用稳定、可靠的同工酶位点,确定每一居群中每一个体在每一酶位点的基因型对每个位点的不同等位基因,统计各居群在不同位点的基因型频率。用各位点基因型频率为性状,不同居群作为 OUT's,数据经过标准化后,采用欧氏距离系数、UPGMA 法进行聚类分析,所用程序为 STATISTICA 中的 cluster analysis 程序。

2 结果

2.1 等位酶位点及基因型频率

本研究共得到 7 个酶系统的酶谱,但对 4 个酶系统中的清晰稳定的 7 个位点作出判读(表 2),其中除酯酶(EST)为 4 个位点外,尽管天冬氨酸转氨酶(AAT)、谷氨酸脱氢酶(GDH)和苹果酸酶(ME)酶谱上可见到至少 2 个位点,但均只能采用其中最可靠的 1 个位点作等位酶分析。各居群在不同位点的基因型频率见表 3,表中明显可见,居群 LJ-2

表 2 用于等位酶分析的酶系统和酶位点

Table 2 The enzyme systems and the genetic loci

酶系统 Enzyme system	缩写 Abbreviation	酶分类编码 EC No.	位点数目 No. of loci
天冬氨酸转氨酶 Aspartate aminotransferase	AAT	EC 2.6.1.1	1
酯酶 Esterase	EST	EC 3.1.1.—	4
谷氨酸脱氢酶 Glutamate dehydrogenase	GDH	EC 1.4.1.2	1
苹果酸酶 Malic enzyme	ME	EC 1.1.1.40	1

表 3 各居群在不同位点上的基因型频率

Table 3 Genotype frequencies in populations

位点 Locus	基因型 Genotype	居群 Population					
		LJ-1	LJ-2	SZ-1	SZ-2	XY-1	XY-2
Est-1	aa	0.87	0	0.42	0.93	0.83	0.57
	ab	0.03	0.97	0.29	0.07	0.13	0.33
	bb	0.10	0.03	0.29	0	0.04	0.10
Est-2	aa	0.03	0	0	0	0	0.05
	ab	0.23	0	0.18	0.04	0.04	0.38
	bb	0.74	1.00	0.82	0.96	0.96	0.57
Est-3	aa	0.03	0	0	0	0	0
	ab	0.27	0	0.11	0.07	0.14	0.19
	bb	0.70	1.00	0.89	0.93	0.86	0.81
Est-4	aa	0.44	1.00	0.60	0.52	0.52	0.86
	ab	0.06	0	0.13	0.08	0	0
	bb	0.50	0	0.27	0.40	0.48	0.14
Aat-1	aa	0.11	0	0	0	0.96	0.05
	ab	0.29	0	0	0.04	0.04	0.33
	bb	0.60	1.00	1.00	0.96	0	0.48
Gdh-1	aa	0.13	0	0.06	0.06	0	0.29
	ab	0	0	0	0.03	0.04	0
	bb	0.87	1.00	0.94	0.91	0.96	0.71
Me-1	aa	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00

各个位点几乎均为单态,而 XY-1 中多态性水平相对较高。但由于本研究所得到的等位酶资料偏少,不足以以常规方法计算居群内和居群间遗传多样

性的各项指标。此外,本研究中也得到苹果酸脱氢酶(MDH)、过氧化物酶(PER)和莽草酸脱氢酶(SKD)等的较为清晰的酶谱,但判读困难,尚有待于进一步分析。

2.2 居群水平的聚类

以表 3 中列举的基因型频率为性状,采用距离系数,用 UPGA 法对小毛茛的不同居群进行聚类分析,结果见图 1。

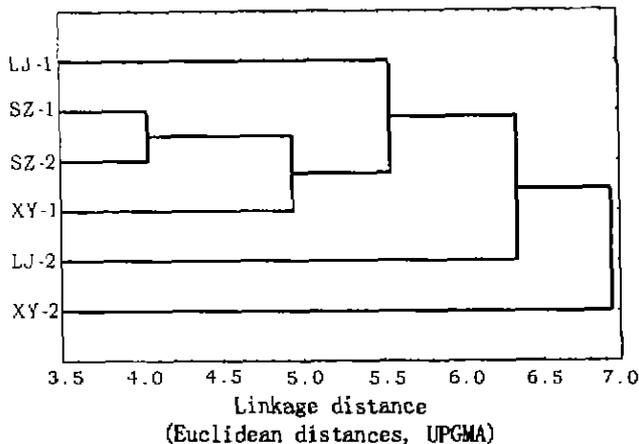


图 1 基于基因型频率对小毛茛居群作出的聚类图

Fig. 1 Cluster analysis of populations in *Ranunculus ternatus* Thunb., based on allozymic data

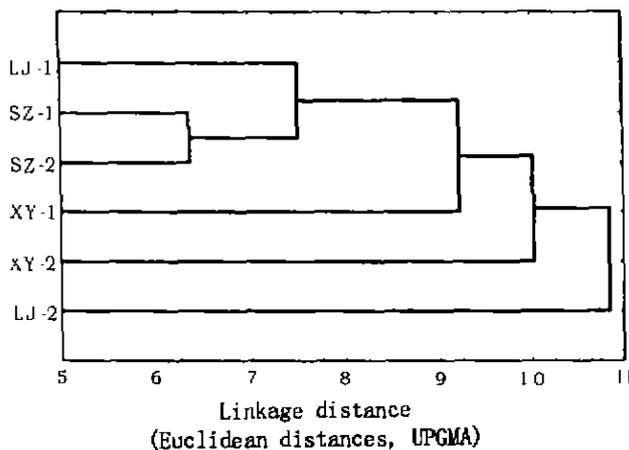


图 2 基于基因型频率和形态特征对小毛茛居群作出的聚类图

Fig. 2 Cluster analysis of populations in *Ranunculus ternatus* Thunb., based on allozymic and morphological data

由图 1 可见,小毛茛居群 LJ-1、SZ-2、SZ-1、XY-2 结合较为紧密,它们彼此之间相似性水平较高,XY-1、LJ-2 与其他居群距离较远。这一结果表明小毛茛各居群之间存在不同水平的遗传分化。将这一

聚类图与前文中以形态性状作出的聚类图相比较,可以发现它们的共同之处:居群 LJ-1 与 LJ-2 的结合距离较远,而 SZ-1 与 SZ-2 之间结合紧密。

为更为全面地反映小毛茛居群分化,作者将等位酶性状与形态性状相结合,再进行聚类分析,结果见图 2。

3 讨 论

3.1 影响小毛茛遗传分化的因素

地理条件通常是影响植物种内遗传分化的主要因素。对小毛茛而言,地理因素对物种遗传分化起一定作用,从基因型频率的聚类结果来看,分布于湖北武昌的居群 LJ-1 与 SZ-1、SZ-2 结合较为紧密正好反映了这一点。但作者认为地理因素对小毛茛居群分化的影响是有限的,居群 LJ-2 与 LJ-1 之间地理距离最近,在聚类分析时的结合距离却是最远的。同时,值得注意的是,生境因素对小毛茛居群的遗传分化的影响是起主要作用,在聚类分析时与其他居群结合距离较远的居群 LJ-2 生境明显有别于其他。小毛茛花粉流距离较为局限,花粉以距离散布为主^[5],居群之间缺少基因交流,这也是导致 LJ-1 和 LJ-2 这样紧密邻接的居群之间差异显著的重要原因之一。

由于本研究取样范围不足以反映小毛茛整个分布区的情况,用于等位酶分析的酶系统及基因位点的数目也较少,要弄清小毛茛地理分布与居群遗传分化的关系还要做进一步的工作。

3.2 小毛茛形态变异与同工酶变异的关系

生于独特生境的小毛茛居群 LJ-2 中的个体在形态上与同种其他居群有明显差异,植株较高,基生叶为圆形,无花瓣多于 5 片的植株。用等位酶分析的结果作出的聚类也表明 LJ-2 居群与其他居群有较大差异,这反映出其形态变异与同工酶变异的相关性。从基因型频率来看,LJ-2 居群在所研究的各位点上基因型有高度的一致性,这可能是其生境的选择作用造成的,同时由于该居群中未出现特有的等位基因,甚至稀有基因型的频率几近于 0,所以从等位酶性状的聚类结果来看该居群不及具较多稀有等位基因的 XY-2 更加远离其他居群。

作者还注意到小毛茛花瓣数目与等位酶位点
(下转第 70 页 Continue on page 70)

距离(D)研究结果表明,9个居群之间变异很小, I 值的变化范围为0.784~1.000, D 值变化范围在0.001~0.244。居群之间的遗传距离最大为鹿寨和柳州;南宁与武鸣、雁山与永福之间差异最小,只有0.001,其相似数最大近为1.000。根据遗传一致度所做的聚类分析,结果表明距离与蜈蚣蕨居群相互之间的关系(图1)。

蜈蚣蕨是一种适应性强,分布广的常见蕨类植物,它的遗传多样性程度比较高,同时孢子传播距离较远,居群间基因交流快速而频繁,使居群间的等位基因组成差异小。在等位基因频率组成上虽有一定差异,但差异较小。在小范围内,等位基因的组成和频率变异符合距离模型(distance model),即其差异随着空间距离的增大而增大,如南部居群⁽⁶⁾。而在大空间范围内,距离模型的变异规律不适合广西蜈蚣蕨居群的等位基因组成和频率变化。从遗传距离和遗传一致度的计算结果看,空间距离的远近并不与遗传距离和遗传一致度成相关关系,聚类分析的结果也证明了这一点(图1)。

在不同地理环境条件下,蜈蚣蕨居群间等位基因频率不是完全相同,表现出了一定的遗传差异,不过这种差异并未产生很强的种内遗传分化,即它们的遗传距离很小,表明居群内基因交流的频繁程度。蜈蚣蕨不同居群保持着稳定的遗传结构,其居群遗传多样性程度居中等偏上水平。

参考文献:

- [1] 王中仁. 中国凤尾蕨属细胞学的初步研究[J]. 植物分类学报, 1989, 27(6): 421—438.
- [2] Mitton J, Linhart Y, Sturgeon K. Allozyme polymorphisms detected in mature needle tissue of ponderosa pine[J]. *Journ. Heredity*, 1979, 64: 271—280.
- [3] Soltis D E, Haufler C H, Gastony G J. Starch gel electrophoresis of ferns: A compilation of Grinding buffers, gel and electrode buffer, and staining schedules[J]. *Amer. Fern J.*, 1983, 73: 908—913.
- [4] 王中仁. 植物等位酶分析[M]. 北京: 科学出版社, 1996.
- [5] Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from small number of individuals[J]. *Genetics*, 1978, 89: 583—590.
- [6] Hamrick J L, Godt M J W. Allozyme diversity in plant species[A]. In: Brown A H D, Clegg M T, Kahler A L, et al. eds., *Plant Population Genetics, Breeding, and Genetic Resources*. Sunderland Massachusetts: Sinauer, 1989, 43—63.
- [7] Nei M. Genetic distances between populations[J]. *Am. Natur.*, 1972, 106: 283—292.
- [8] 周琼, 周厚高, 谢庆武, 等. 南宁地区蜈蚣蕨居群遗传多样性[J]. 广西农业生物科学, 1999, 18(4): 239—242.

(上接第73页 Continue from page 73)

上的基因型之间的关系,仅在LJ-1居群中发现多于5花瓣的植株在AAT-1位点上基因型均为杂合型(ab),反过来看,AAT-1位点上基因型为杂合型的植株绝大多数花瓣多于5片,只有个别另外。这一方面的研究有重要价值,但还有待深入。

参考文献:

- [1] 王中仁. 植物等位酶分析[M]. 北京: 科学出版社, 1996.
- [2] 胡能书, 万贤国. 同工酶技术及其应用[M]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1985.

- [3] 徐玲玲, 廖亮, 等. 禹毛茛复合体及其近缘种过氧化物同工酶研究[J]. 武汉植物学研究, 1997, 15(1): 43~48.
- [4] 徐玲玲, 廖亮. 猫爪草和肉根毛茛的同工酶研究[A]. 中国植物学会. 中国植物学会六十五周年年会学术报告及论文摘要汇编[C]. 北京: 中国林业出版社, 1998. 148.
- [5] 王金平, 李天煜, 汪小凡, 等. 小毛茛(*Ranunculus ternatus* Thunb.)花粉流潜能初探[J]. 广西植物, 1999, 19(3): 225~228.