

葫芦苏铁遗传多样性的等位酶分析

简曙光¹, 吴梅¹, 刘念^{2*}

(1. 中国科学院华南植物园, 广东广州 510650; 2. 仲恺农业技术学院, 广东广州 510225)

摘要: 采用等位酶技术, 分析了葫芦苏铁 5 个居群的遗传多样性。分析 6 个酶系统, 共获得了 13 个基因位点, 结果表明: 葫芦苏铁具有较高水平的遗传变异性, 多态位点百分率(P)为 56.9%, 等位基因平均数 $A=1.62$, 等位基因多样性指数 $H_o=0.105$, $H_e=0.164$, 居群杂合体过量的位点为 50%。居群遗传结构分析表明, 大部分遗传变异(93.6%)存在于居群内($F_{ST}=0.064$), 居群间分化程度甚微。根据葫芦苏铁的居群遗传结构式样并结合相关研究, 提出了就地保护所有居群, 迁地保护从东一、王下和水田三个大居群取样的保护策略。

关键词: 葫芦苏铁; 等位酶; 遗传多样性

中图分类号: Q943 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2005)06-0566-04

Genetic diversity of *Cycas changjiangensis* detected by allozyme analysis

JIAN Shu-guang¹, WU Mei¹, LIU Nian^{2*}

(1. *South China Botanical Garden, Academia Sinica, Guangzhou, 510650, China*; 2. *Horticulture Department, Zhong Kai Agriculture Technique College, Guangzhou 510225, China*)

Abstract: Genetic diversity of 5 natural populations of *Cycas changjiangensis* were investigated by using allozyme analysis. Allozyme data for 13 loci of 6 enzymes demonstrate high levels genetic variation within populations, the mean percentage of polymorphic loci(P) was 56.9%. The mean number of alleles per locus(A) was 1.62. Mean observed heterozygosity(H_o) was 0.105, and mean expected heterozygosity(H_e) was 0.164. Half of the Wright's F-statistics showed negative values. The analysis on population genetic structure indicated that most variation(93.6%) resided within populations, with $F_{ST}=0.064$, thus mean the genetic differentiation between populations was low. On the basis of this study and other studies have been achieved, we put forward the in-situ conservation scheme of all populations, and ex-situ conservation of sampling from the Dongyi, Wangxia and Shuitian populations of *Cycas changjiangensis*.

Key words: *Cycas changjiangensis*; Allozyme; Genetic diversity

苏铁属植物起源古老, 在研究种子植物起源与演化及古地理、古气候的变迁等方面有重要意义, 所有种类均为国家一级保护植物。葫芦苏铁(*Cycas changjiangensis* N. L.) 仅分布于海南省西部昌江县坝王岭方圆约 70 km² 的范围, 目前发现有 7 个居

群, 居群的大小顺序如下: 东一, 原有 10 000 余株, 现仅剩 1 000 余株; 东六、原有 10 000 余株, 现仅剩不到 2 000; 王下山脚, 仍有 3 000 多株; 王下山顶, 原有 5 000 多株, 现仅剩数十株; 水田, 约 1 000 株; 五仙桥, 不足 100 株; 雅加, 不足 100 株。葫芦苏铁

收稿日期: 2004-10-12 修订日期: 2005-02-04

基金项目: 国家自然科学基金(30070062); 广东省自然科学基金(000975); 广东省环保局科技开发项目(970165); 华南植物园所长基金(2002-3293)资助[Supported by the National Natural Science Foundation of China(30070062); Natural Science Foundation of Guangdong Province(000975); Foundation for Science and Technology Developing of Environment Protection Department of Guangdong Province(970165); South China Botanical(2002-3293)].

作者简介: 简曙光(1972-), 男, 江西九江人, 博士, 助理研究员, 从事植物生态学及分子生态学研究。

* 通讯联系人(Author for correspondence)

茎干基部呈葫芦形, 茎干直径、高度, 大孢子叶和种子直径均较海南苏铁 (*C. hainanensis*) 小 (刘念, 1998)。它是近年发现的濒危物种, 我们从不同学科角度对其开展深入研究, 试图探讨其濒危原因, 进而提出有效保护策略。

酶电泳技术自二十世纪 70 年代用于植物居群研究, 为居群遗传结构和生物进化研究带来了突破性进展, 也为植物系统进化研究提供了新的手段和途径 (葛颂, 1994; Gottlieb, 1981)。借助于一定的遗传分析方法, 酶电泳技术可以准确地确定一批符合遗传标记特点的等位酶位点, 能有效地度量居群或类群中的遗传变异和分化, 进而探讨类群间的遗传关系, 为类群的划分和系统发育推断提供基本资料 (葛颂, 1994; 葛颂等, 1998)。有关苏铁属植物的等位酶分析, 国内外曾有研究和报道 (陈潭清等, 1996; Yang 等, 1996; Lin 等, 2000)。如 Yang (1996) 根据等位酶实验结果, 指出亚洲东南部是苏铁科的起源中心, 中国的苏铁不是单系起源, 台东苏铁 (*C. tai-tungensis*)、苏铁 (*C. revoluta*) 和攀枝花苏铁 (*C. panzhihuaensis*) 是一个自然类群, 依据遗传变异的

特点, 他指出攀枝花苏铁要做迁地保护, 须从 3 个居群里选取种源才能保存 95% 的基因, 而多歧苏铁则仅从一个居群取样即可。又如刘念的同工酶实验结果 (陈潭清等, 1996) 表明苏铁属可分为 4 个类群。他们的实验结果都表明苏铁属植物在分子水平上的进化是十分缓慢的, 这与其两亿多年来形态变化不大相对应。本文用等位酶标记手段来研究葫芦苏铁居群的遗传变异和遗传分化, 探讨葫芦苏铁居群的遗传结构及分化程度, 为葫芦苏铁濒危机制的揭示和保护策略提供有益的资料。

1 材料和方法

1.1 采样及处理

采样居群的地理位置、生境及采样个体数见表 1。采样时间为 4 月上旬, 因无当年生嫩叶, 取样部位均为上年生羽叶近顶部的小叶片。取 100~150 mg 小叶材料, 加入 5 号提取缓冲液 (Soltis 配方 3 200 μL ; 提取液: 材料 = 2 : 1) 研磨 (Wendel 等, 1989), 研磨液在 5 000 rmin^{-1} 下离心 5 min 后, 在冷

表 1 葫芦苏铁各居群的分布地点、生境及采样个体数

Table 1 Distribution, habitat and number of collections of all five natural populations of *Cycas changjiangensis*

居群号 Population	地点 Location site	生境 Habitat	采样株数 No. of collections
东一 DongYi(DY)	109°08.7" E, 19°09.8" N	900 m, 山坡灌草丛 (900 m in shrub grassland on slope)	20
五仙桥 Wuxianqiao(WQ)	109°16.7" E, 19°04.5" N	700 m, 稀疏常绿阔叶林下 (700 m in open evergreen broad-leaved forests)	11
王下 Wanxia(WX)	109°08.1" E, 18°54.58" N	780 m, 石灰岩疏林下 (780 m, in open limestone forests)	25
水田 Shuitian(ST)	109°20.6" E, 19°09.9" N	580 m, 马尾松林下 (580 m, in open <i>Pinus massoniana</i> forests)	24
雅加 Yajia(YJ)	109°23.7" E, 19°06.1" N	650 m, 稀疏常绿阔叶林下 (650 m, in open evergreen broad-leaved forests)	20

冻状态下保存。

1.2 电泳

采用黄宏文 (2000) 改进的 Mulcahy 等的超薄平板聚丙烯酰胺电聚焦系统 (IEF-PAGE)。

(1) 上样: 在低温状态下 (胶下放冰), 用 1 mm^2 的 Watman 3 号滤纸制作的纸蕊子吸取上清液 (酶液), 加在距阳极 3~4 mm 处, 样品间距约 1 mm, 每块胶可上 25 个样。

(2) 电泳: 电泳槽用一塑料槽代替, 从下至上放置冰袋、纤维海绵布, 玻璃板和橡胶垫, 最后将上过的凝胶玻璃板放在橡胶垫上。电泳前先将两条 8 mm \times 70 mm 的滤纸条紧贴凝胶的较长的两条边, 吸取正极 (pH3.5)、负极 (pH10) 缓冲液润湿滤纸

条, 确保电极丝浸在电极缓冲液中。样品均从正极向负极电泳, 电压控制为 50、100、200、300、400 V 各 15 min。

1.3 染色

酶的组织化学染色用液染法染色 (黄宏文, 2000), 对 6 种酶系统进行检测, 获得 13 个等位酶位点。

1.4 统计分析

等位酶位点的确定是根据葫芦苏铁染色体的倍性 ($2n=22$), 同时依据酶的亚基数目及多聚体酶同一位点的等位基因编码的亚基不能杂合的原理对各个酶系统的酶谱进行解释 (Wendel 等, 1989)。从阳极到阴极, 依次用位点 1、位点 2、……等表示, 每个位点内的不同等位基因从阳极到阴极用字母 a、b、c

...等表示。

数据分析使用 Biosys-1 软件 (Swofford 等, 1981), 分析指标有每一居群的等位基因平均数 (A)、多态位点百分率 (P)、平均观察杂合度 (Ho)、平均预期杂合度 (He)。此外, 采用 F 统计值和遗传

一致度 (I) (genetic identity) 来衡量居群间遗传分化程度和遗传相似性, 遗传分化用 Wright (1978) 的 F 统计量 $(1-F_{IS}) \times (1-F_{ST}) = (1-F_{IT})$ 来度量, 其中的 FIS 和 FIT 分别表示整个物种的基因频率和居群平均的基因频率偏离 Hardy-Weinberg 遗传平衡的程

表 2 葫芦苏铁 5 个居群的遗传多样性 (平均值±SD)

Table 2 Genetic diversity in 5 populations of *Cycas changjiangensis* (mean±SD)

居群 Population	等位基因平均数(A) Effective number of alleles	多态位点百分率(P) Percentage of polymorphic loci	平均观察杂合度(Ho) Observed heterozygosity	期望杂合度(He) Expected heterozygosity
DY	1.6±0.1	61.5%	0.081±0.026	0.156±0.049
WQ	1.7±0.1	53.8%	0.126±0.052	0.181±0.047
WX	1.7±0.1	61.5%	0.145±0.050	0.189±0.050
ST	1.5±0.1	46.2%	0.119±0.042	0.153±0.054
YJ	1.6±0.1	61.5%	0.054±0.024	0.139±0.041
平均 Average	1.62±0.1	56.9±6.9	0.105±0.037	0.164±0.021

度, F_{ST} 则表示居群间的遗传占总遗传变异的比率。

2 结果与分析

2.1 基因水平的遗传变异性

葫芦苏铁 5 个居群的 6 个酶系统, 13 个基因位点中有 10 个是多态的, 其中, DIA-1, DIA-2 和 DIA-3 为单态位点。多态位点百分率为 46.2%~61.5% (平均为 56.9%), 水田居群明显低于其它居群, 每个位点等位基因平均数 (A) 为 1.62。观察杂合度 (Ho) 为 0.105, 雅加居群最小 (0.054), 其次为东一居群 (0.081), 其它 3 个居群均在 0.1 以上。预期杂合度 (He) 为 0.164, 各居群间差异不大 (表 2)。

2.2 葫芦苏铁的居群结构 (分化程度)

表 3 给出了葫芦苏铁 5 个居群 10 个多态位点的 F 统计分解值。在葫芦苏铁 5 个居群中, 杂合体过量位点有 ACP-5、DIA-4、EST-5、EST-6 和 EST-7 等五个位点, 其它位点杂合体比率均小于期望值。遗传变异的绝大部分 (93.6%) 存在于居群内, 而仅 6.4% 存在于居群间。与其它裸子植物和其它苏铁植物相比, 葫芦苏铁居群间的遗传分化度 ($F_{ST} = 0.064$) 较低。由 $N = (1-F_{ST}) / 4 F_{ST}$ 算出基因流 $N = 3.656$, 与其它裸子植物和其它苏铁植物相比, 葫芦苏铁居群间基因流较大。

为了进一步分析居群间的遗传分化程度, 计算出了 Nei 的遗传一致度 (I) 和遗传距离 (D) (数值未列出), 各居群间遗传相似性很高 (0.97~1.00), 均高于所有物种的平均值 (0.956) (Gottlieb, 1981), 而遗传距离则在 0~0.03 之间。

利用遗传距离数据进行聚类分析 (UPGMA) 法可构建一个聚类图 (图 1), 可见葫芦苏铁 5 个居群间的遗传分化不明显, 可能与居群间的距离不远有关。

表 3 葫芦苏铁 5 个居群 10 个多态位点的 F 统计值

Table 3 Summary of F-statistics at 10 loci of 5 populations in *C. changjiangensis*

Locus	F _{IS}	F _{IT}	F _{ST}
AAT-1	0.815	0.828	0.068
ACP-1	0.280	0.289	0.013
ACP-5	-0.077	-0.065	0.011
DIA-4	-0.207	-0.172	0.029
EST-1	0.534	-0.547	0.028
EST-2	-0.134	-0.054	0.071
EST-3	-0.112	-0.052	0.053
EST-4	-0.113	-0.061	0.047
MDH-1	0.722	0.757	0.124
PRX-3	0.950	0.954	0.084
Mean	0.342	0.384	0.064

3 讨论

根据 Hamrick 等对 220 个属、662 个物种的分析及 Lin 等的综合分析报道 (表 4), 葫芦苏铁的居群内多态位点百分率为 $P = 56.9\%$, 与裸子植物平均值接近, 高于濒危物种平均值, 在苏铁类植物中亦居于较高水平; 平均期望杂合度指数 ($He = 0.164$) 高于所有物种平均值 (0.150) 及裸子植物 (0.151), 及高于濒危物种 (0.056), 与 *C. siamensis* (0.134) 接近, 但高于其它苏铁植物; 平均观察杂合度 ($Ho = 0.105$) 也与 *C. siamensis* (0.114) 接近, 但明显高于其它苏铁植物。葫芦苏铁的大部分变异存在于居群

之内,5 个居群的 F_{ST} 仅为 0.064,远低于所有物种的平均值(0.228)及濒危物种平均值(0.151),稍低于裸子植物平均值(0.073),但明显高于 *C. taitungensis*。杂合体过量位点达 50%,较一般濒危物种都要高。

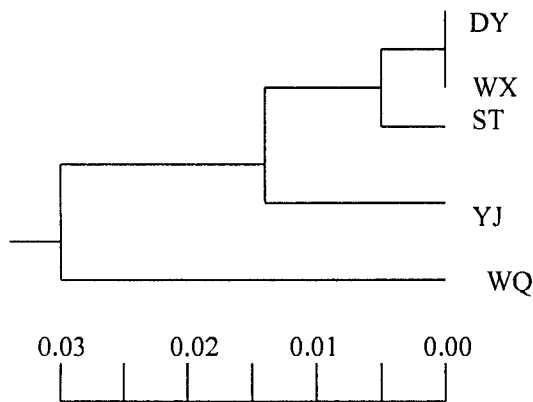


图 1 葫芦苏铁 5 个居群遗传距离(D)聚类图
Fig. 1 Cluster dendrogram of 5 populations of *C. changjiangensis* based on genetic distance (D)

表 4 葫芦苏铁和其它植物类群遗传变异水平和居群分化的比较(引自 Hamrick 等,1979;Lin 等,2000)

Table 4 Genetic variation and population differentiation for *C. changjiangensis* as compared to other plant groups

植物类群 Plant groups	遗传变异性 Genetic variation				居群分化 Population differentiation (F_{ST})
	A	P(%)	Ho	He	
所有物种 All species	1.97	51.3	—	0.150	0.228
濒危物种 Endemic	1.48	26.3	—	0.056	0.141
裸子植物 Gymnosperms	1.83	53.4	—	0.151	0.073
<i>Cycas changjiangensis</i>	1.62	56.9	0.105	0.164	0.064
<i>C. taitungensis</i>	1.07	2.5	0.014	0.013	0.034
<i>C. pectinata</i>	1.82	58.8	0.066	0.076	—
<i>C. pectinata</i> var. <i>elonga</i>	1.41	29.4	0.069	0.078	—
<i>C. siamensis</i>	1.48	58.9	0.114	0.134	—
<i>C. siamensis</i> ssp. <i>clivicola</i>	1.47	41.2	0.036	0.036	—
<i>Zamia pumila</i>	1.21	16.7	0.047	0.041	—
<i>Macrozamia communis</i>	1.61	50.0	—	0.045	—

注:A、P、Ho、He 等同表 2。Note: A, P, Ho, He, the same as Table 2.

综上所述,葫芦苏铁居群表现出较高的遗传变异性及居群间低遗传分化程度,这一方面可能是由其自身遗传机制决定,另一方面可能由于所取的几个居群间距离较小(最远的也不过 30 km),分布范围狭窄的缘故。

Hamrick 等(1979,1987,1989,1992)的研究结果表明,影响居群遗传变异大小的主要因素依次为

繁育系统、分布范围和习性。遗传变异最高的植物类群是那些寿命长、地理分布广、异交为主、风媒传粉、结实率高且存在于演替阶段末期群落中的物种。苏铁属植物为多年生木本,其寿命很长(可达千年以上),以异交为主,结实量大,且历史上地理分布较广,这些特征均有利于居群遗传变异的保持和积累,也是本研究发现存在较高遗传变异性的主要原因,与葫芦苏铁形态变异较大相吻合,对苏铁属其它物种的研究也得出了类似的结果(Yang 等,1996)。

影响居群间基因流大小及居群遗传结构的因素很多,如繁育系统、分布范围、种子传播机制、演替阶段等(Hamrick 等,1989)。葫芦苏铁分布范围狭窄,仅分布于海南省昌江县坝王岭方圆几十公里的地方,由于雄花先熟(早熟约 20 d),虫媒传粉和动物传播种子等因素,导致居群间基因流增大,从而避免居群间出现过高的分化。

保护物种从某种意义上讲,就是保护其遗传多样性。本研究中,葫芦苏铁居群内遗传变异大,而居群间遗传分化较低,基因流大,因此,无论是迁地保护或是就地保护,选取几个大的居群比从不同居群取少量个体进行保护更为有效。理论上只要保护好东一、王下和水田这几个居群,就可以有效地保护葫芦苏铁的遗传多样性,实际情况是由于人为因素的影响,有些居群破坏严重,如五仙桥居群仅存 20 余株,也应加强保护。因此,我们建议就地保护应保护所有居群,迁地保护可从东一、王下和水田这三个生态环境不同且生存植株较多的居群中取种源。

本实验得到中国科学院武汉植物研究所郎萍博士和黄宏文研究员的大力帮助,谨致热忱谢意!

参考文献:

刘念. 1998. 海南苏铁一新种[J]. 植物分类学报, 36(6): 552-554.
 吴梅, 黄向旭. 1999. 葫芦苏铁的核型分析[J]. 热带亚热带植物学报, 7(3): 207-209.
 黄宏文. 2000. 超薄平板微型聚丙烯酰胺凝胶的等电聚焦电泳方法介绍一种高效、快速的生物同工酶分析方法[J]. 武汉植物学研究, 18(3): 224-228.
 Cheng TQ(陈潭清), Wang DY(王定跃), Liu N(刘念). 1996. An Isoenzymes Study *Cycas* in China[A]. In: Wang FX(王发祥), Liang HB(梁惠波), Cheng TQ(陈潭清) (eds). *Cycads in China*[M]. Guangzhou: Guangdong science and technology press, 191-198.
 Ge S(葛頌). 1994. Isozyme and Plant Evolutionary Biology [A]. In: Cheng JK(陈家宽), Yang J(杨继). *Plant Evolu-* (下转第 561 页 Continue on page 561)

- Jinn TL, Chen YM, Lin CY. 1995. Characterization and physiological function of class I low-molecular-mass, heat shock protein complex in soybean[J]. *Plant Physiol*, **108**: 693-701.
- Krause GH, Weis E. 1984. Chlorophyll fluorescence as a tool in plant physiology, II interpretation of fluorescence signals [J]. *Photosyn Res*, **5**: 139-157.
- Lin ZF(林植芳), Li SS(李双顺), Lin GZ(林桂珠), et al. 1984. Superoxide dismutase activity and lipid peroxidation in relation to senescence of rice leaves(超氧化物歧化酶及脂酯过氧化与水稻叶片衰老的关系)[J]. *Acta Bot Sin*(植物学报), **26**(6): 605-615.
- Murchie EH, Chen YZ, Hubbart S, et al. 1999. Interactions between senescence and leaf orientation determine in situ patterns of photosynthesis and photoinhibition in field-grown rice[J]. *Plant Physiol*, **119**: 553-563.
- Oren-Shanir, Pick U, Avron M. 1990. Plasma membrane potential of the alga *Dunaliella* and its relation to osmoregulation[J]. *Plant Physiol*, **93**: 403-408.
- Patterson BD, Payne LA, Chen YZ, et al. 1984. An inhibitor of catalase induced by cold chilling-sensitive plants [J]. *Plant Physiol*, **76**: 1014-1018.
- Peng CL(彭长连), Chen SW(陈少薇), Lin ZF(林植芳), et al. 2000. Detection of antioxidative capacity in plants by scavenging organic free radical DPPH[·] (用有机自由基 DPPH[·] 法评价植物抗氧化能力)[J]. *Prog Biochem Biophys*(生物化学与生物物理进展), **27**(6): 367-370.
- Schreiber U, Schliwa U, Bilger W. 1986. Continuous recording of photochemical and non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer[J]. *Photosyn Res*, **10**: 51-62.
- Sarry JE, Montillet JL, Sauvaire Y, et al. 1994. The protective function of the xanthophyll cycle in photosynthesis [J]. *FEBS Lett*, **353**: 147-150.
- Schreiber U, Armond PA. 1978. Heat-induced changes of chlorophyll fluorescence in isolated chloroplast and related heat-damage at the pigment level[J]. *Biochim Biophys Acta*, **502**: 138-151.
- Wang SJ(王淑俭), Gao ZY(高远志), Peng WB(彭文博), et al. 1994. Comprehensive evaluation on heat resistance of different wheat varieties(小麦不同品种抗热性综合评价)[J]. *Acta Agric Univ Henan*(河南农业大学学报), **28**(4): 339-343.
- Weis E, Berry JA. 1988. Plant and high temperature stress [A]. In: Long SP, Woodward FI(Eds.). *Plant and Temperature*[M]. Symp Soc Exp Biol, Cambridge Company of Biologist, **42**: 129-346.

(上接第 569 页 Continue from page 569)

- tionary Biology[M]. Wuhan: Wuhan University Press, 153-208.
- Gottlieb LD. 1981. Electrophoretic evidence and plant populations[J]. *Prog Phytochem*, **7**: 1-46.
- Ge S(葛颂), Hong DY(洪德元). 1998. Biosystematic studies on *Adenophora potaninii* Korsh. Complex(Campanulaceae) IV. Allozyme variation and differentiation[J]. *Acta Phytotax Sin*(植物分类学报), **38**(6): 431-438(in Chinese).
- Hamrick JL, Godt MJW. 1992. Sherman-broyles SL. Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species [J]. *New Forests*, **6**: 95-124.
- Hamrick JL, Linhart YB, Mitton JB. 1979. Relationships between life history characteristics and electrophoretically detectable genetic variation in plant[J]. *Ann Rev Ecol Syst*, **10**: 173-200.
- Hamrick JL, Godt MJW. 1989. Allozyme diversity in plant species[A]. In: Brown AHD, Clegg M T, Kahler AL(eds). *Plant Population Genetics, Breeding, and Genetic Resources* [M]. Sunderland, Mass: Sinauer. **6**: 95-124.
- Hamrick JL. 1987. Gene flow and distribution of genetic variation in plant populations[A]. In: Urbanka K. *Differentiation Patterns in Higher Plants*[M]. New York: Academic Press, 53-67.
- Lin TP, Sun YC, Lo HC, et al. 2000. Low genetic diversity of *Cycas taitungensis* (Cycadaceae), an endemic species in Taiwan, revealed by allozyme analysis[J]. *Taiwan J For Sci*, **15**(1): 13-9.
- Swofford DL, Selander RB. 1981. Biosys-1[C]. University of Illinois Urbana-Champaign.
- Wendel JF, Weeden NF. 1989. Visualization and interpretation of plant isozyme[A]. In Soltis; D E Soltis P S. *Isozyme in Plant Biology*[M]. Portland: Dioscorides Press, 9-63.
- Yang SL, Meerow AW. 1996. The *Cycas pectinata* (Cycadaceae) complex; genetic structure and gene flow[J]. *Int J Plant Sci*, **157**(4): 468-483.