

珙桐的等位酶位点变异分析^{*}

李建强 张敏华 黄宏文 蔡清

(中国科学院武汉植物研究所 武汉 430074)

ON THE ALLOZYMIC LOCI VARIATION OF DAVIDIA IN VOLUCRATA

L i Jianqiang Zhang Minhua^{**} Huang Hongwen CaiQing

(Wuhan Institute of Botany, The Chinese Academy of Sciences Wuhan 430074)

关键词 珙桐, 等位酶位点, 变异, 电泳

Key words Davidia involucrata, Allozymic loci, Variation, Electrophoresis

中图分类号: Q 941⁺. 2 文献标识码: A 文章编号: 1000-470X (2000) -03-0247-03

1869 年法国人 A mm and David 在四川宝兴县穆坪首次采到珙桐的标本, 并由 Baillon H. E. 定名为 *Davidia involucrata*。该种发表后, 立即引起世界植物学家们的关注^[1]。由于珙桐生境的特殊性, 以及其在自然条件下种子萌发率很低的生殖生物学特性和它在植物系统学上的特殊地位^[2], 珙桐被确定为我国的一级保护植物。因珙桐花序下的大苞片形状酷似飞鸽, 故在国外有“中国鸽子树”的美称^[1], 是世界上著名的园林观赏树种。为了科学地制定出对珙桐的保育策略, 我国的植物学工作者曾对珙桐的繁殖生物学、栽培技术和群落生态学特征进行了调查研究^[3~ 5]。本研究的目的是采用同工酶凝胶电泳的方法, 检测出珙桐居群内和居群间在等位酶位点上的多态性和遗传变异程度、基因交流的程度和水平, 为珙桐的保护生物学研究提供保育遗传学方面的证据。

1 珙桐的地理分布

珙桐是东亚植物区系中国-日本植物亚区华中区系的代表性种类, 分布范围约在北纬 26°46' ~ 32°43', 东经 98°6' ~ 111°2' 的广阔地域, 包括湖北西部和西北部、湖南西南部、陕西东南部、甘肃南部、四川西部、贵州东北部和西北部, 以及云南东北部和西北部山地, 共 7 个省 40 多个县市^[3~ 6]。珙桐的分布区基本上是连续的, 呈马蹄形状分布, 惟有滇西北贡山的珙桐居群偏离了其分布区中心, 形成明显的间断分布。在这个区域内的东部, 垂直分布多见于海拔 600~ 2 400 m 范围, 而在西部则出现在海拔 1 400~ 3 200 m 之间。珙桐集中分布的区域包括四川盆地西北缘的邛崃山地卧龙保护区和西南缘的大小凉山, 以及川鄂湘黔交界的武陵山地。调查结果表明, 在四川峨眉山、卧龙保护区, 贵州的梵净山和湖北五峰后

收稿日: 1999-06-25, 修回日: 1999-07-26 第一作者: 男, 1954 年生, 研究员, 从事植物系统学和植物保育遗传学研究

* 中国科学院生物分类学和区系特别支持项目。

** Present address: School of Forest Resources, University of Arkansas at Monticello, AR 71656, USA.

河自然保护区仍保存有个体数量较大的珙桐群落。由于区域环境条件的差异，经常观察到一些有明显变异的类型：珙桐花序通常是2个苞片，有些植株却具有3~4个苞片，多见于湖南、贵州一带；一些植株叶片的表面、背面和叶脉都具有一层灰白色的柔毛，长2~5 mm，叶片较大。

2 珙桐等位酶位点的变异与遗传多样性

2.1 材料与方法

2.1.1 样品采集与制备 珙桐果实样品取样以居群为单位^[7]，分别采自湖北神农架林区、五峰后河自然保护区、利川星斗山自然保护区、长阳县、巴东送子园乡和四川灌县6个居群。每个居群随机选取20棵结果的树，每棵树上随机取成熟果实10粒。果实取回后去掉果肉，置于冰箱中冷藏(4~8℃)备用。凭证标本均存放于中国科学院武汉植物研究所标本馆(HB)。

制取酶样时，从每10粒果实中随机选取1粒，机械破碎内果皮，取出种子，去掉胚乳，用一完整胚(约50 mg)加上提取缓冲液100 μL，冰浴研磨后把酶样移入1 mL的塑料离心管，冷冻(-20~-30℃)备用。点样前先将酶样离心。

2.1.2 电泳和染色 电泳采用等电聚焦凝胶电泳系统(pH 4~9)^[8]，染色按照Wendel和Weden系统^[9]。对苹果酸脱氢酶(MDH, E.C. 1.1.1.37)、乙醇脱氢酶(ADH, E.C. 1.1.1.1)、酯酶(EST, E.C. 3.1.1.7)、异柠檬酸脱氢酶(IDH, E.C. 1.1.1.42)、苹果酸酶(ME, E.C. 1.1.1.40)、磷酸葡萄糖异构酶(PGI, E.C. 5.3.1.9)、磷酸葡萄糖变位酶(PGM, E.C. 5.4.2.2)、6-磷酸葡萄糖脱氢酶(PGD, E.C. 1.1.4.4)、莽草酸脱氢酶(SKD, E.C. 1.1.1.25)、酸性磷酸酶(ACP, E.C. 3.1.3.2)、还原型辅酶I心肌黄酶(DIA, E.C. 1.6.2.2)、甲酸脱氢酶(FDH, E.C. 1.2.1.2)共12个酶系进行电泳染色实验，其中ACP、EST、PGM、ADH、MDH和DIA染色效果较好，对这6个酶系染色结果进行遗传分析。

2.2 遗传多样性分析

等位基因频率用BDSYS-1进行计算^[10]。计算结果作为GENESTAT-PC(Lewis, 1993)的输入数据^[11]，计算Nei's基因多样性指标：A、P、Hs、Ht、Dst、Gst等^[12]，Nei's标准遗传一致度(I)和遗传距离(D)^[13]。

2.3 结果

分析6个居群6个酶系中的10个位点，*A cp*、*Est-1*、*Est-2*、*P gm-1*、*P gm-2*、*A dh-1*、*A dh-2*、*M dh*、*D ia-1*、*D ia-2*。每居群平均可检测个体数为17.5。10个位点中，*Est-1*、*P gm-1*、*A dh-1*、*D ia-1*、*D ia-2*在所有居群中均为单态。利川居群中7个位点为单态。巴东和四川居群中分别存在稀有等位基因*A dh-2^C*和*A dh-2^A*。

珙桐种水平的遗传多样性(Ht)0.1231，居群水平的遗传多样性(Hs)0.1029，居群间的遗传多样性(Dst)0.0202，基因分化系数(Gst)0.1640。

2.4 讨论

各居群平均遗传一致度及变化范围分别为神农架0.9663，五峰0.9666，利川0.9820，长阳0.9819，巴东0.9693，四川0.9719(见表1)。大小顺序为利川>长阳>四川>巴东>五峰>神农架。遗传一致度反映居群间的亲缘关系的远近程度和基因流交换的程度。以上大小顺序的排列表示利川居群与其它5个居群的相似性程度大于长阳与其它5个居群的相似性程度，余此类推，神农架与其它5个居群的相似性程度最低。这种相似性和居群间的地理位置远近并不相关，出现这种情况是由于风媒传粉，珙桐居群间的基因交流频繁，基因流作用的结果。

遗传多样性统计结果表明，6个居群平均遗传多样性依次为：巴东0.1254，长阳0.1127，神农架0.1123，五峰0.1065，四川0.0841，利川0.0762。前4个居群巴东、长阳、神农架、五峰遗传多样性明显高于后两个居群四川、利川，出现这种现象我们分析是因为在冰川活动时期，神农架、三峡地区由于高山的阻挡作用，使许多植物在此得以幸存，珙桐就是其中一员。可以说神农架、三峡地区是一个植物的避难所，保存中心。冰川退出后，幸存下来的物种便逐渐由这个保存中心向周围散布，散布过程中遗传多样性

表1 6个居群间的 Nei's 遗传一致度(上)和遗传距离(下)

Table 1 Nei's genetic identities (above) and distances (below) among the populations examined

居群 Population	1	2	3	4	5	6	平均Means
1 神农架 Shennongjia		0.9963	0.9646	0.9691	0.9587	0.9426	0.9663
2 五峰 Wufeng	0.0037		0.9717	0.9797	0.9431	0.9421	0.9666
3 利川 Lichuan	0.0361	0.0287		0.9989	0.9800	0.9949	0.9820
4 长阳 Changyang	0.0314	0.0205	0.0011		0.9733	0.9886	0.9819
5 巴东 Badong	0.0422	0.0586	0.0202	0.0270		0.9914	0.9693
6 四川 Sichuan	0.0591	0.0597	0.0051	0.0115	0.0087		0.9719
平均 Means	0.0345	0.0342	0.0182	0.0183	0.0313	0.0288	

会有所丢失。我们初步推测珙桐的散布方向呈现自东向西, 在本研究中表现出自鄂西向川东的趋势。因此可解释本研究发现的, 神农架、三峡地区珙桐4个居群遗传多样性高于其它2个居群的现象。巴东和四川居群中分别存在稀有等位基因 A_{dh-2^C} 和 A_{dh-2^A} , 可能是散布过程中发生基因漂变的结果。黄宏文关于栗属植物遗传多样性研究也发现神农架、三峡地区的栗属植物居群遗传多样性高于其它地区的现象^[14]。

珙桐的基因分化系数 Gst 为0.1640, 只有16.4%的变异存在于居群间。所以珙桐的遗传变异主要存在于居群内。因此, 在制定保护策略时要注意以下几点: 在进行迁地保护的同时应加强原产地的就地保护。在迁地栽培过程中, 珙桐的遗传多样性已经失去了许多, 若用它们的嫩枝扦插和嫁接, 其本质只是无性繁殖物质的转移, 因此要保护珙桐的遗传多样性, 就要加强对原产地的就地保护。对人工采摘种子进行限制, 这样才能保证珙桐林的更新。由于珙桐的遗传多样性绝大多数存在于居群内, 各保护点应维持足够数量的个体数。

参 考 文 献

- 1 Sargent C S. *Plantae Willsoniana*. Cambridge: The University Press, 1916, 2: 255~ 257
- 2 Edye R S. Comprehending *Cornus*: Puzzles and progress in the systematics of the Dogwoods. *Bot Rev*, 1988, 54: 233~ 351
- 3 王献溥, 李俊清, 张家勋. 珙桐的生物生态学特性和栽培技术. *广西植物*, 1995, 15(4): 347~ 353
- 4 贺金生, 林洁, 陈伟烈. 我国珍稀特有植物珙桐的现状及其保护. *生物多样性*, 1995, 3(4): 213~ 221
- 5 杨一川, 李体俊. 四川峨眉山的珙桐群落的初步研究. *植物生态学与地植物学丛刊*, 1989, 13(3): 270~ 276
- 6 傅立国主编. *中国植物红皮书(第1册)*. 北京: 科学出版社, 1991. 474~ 475
- 7 Bowerstock P R, Moritz C. Sampling design. In: Hillis D M, Moritz C (eds). *Molecular Systematics*. Sunderland: Massi Sinauer, 1990. 13~ 24
- 8 Huang H W, Dane F, Norton J. Genetic analysis of 11 polymorphic isozyme loci in chestnut species and characterization of chestnut cultivars by multi-locus allozyme genotypes. *J Amer Hort Sci*, 1994, 119(4): 840~ 849
- 9 Wendel J F, Weeden N F. Visualization and interpretation of plant isozymes. In: Soltis D E, Soltis P S (eds). *Isozymes in Plant Biology*. Portland, OR: Dioscorides Press, 1989. 9~ 63
- 10 Swofford D L, Selander R B. BIOSYS-1: a FORTRAN program for the comprehensive analysis of electrophoretic data in population genetics and systematics. *J Heredity*, 1981, 72: 281~ 283
- 11 Lewis P, Whitkus R. Genestat for microcomputers. *Amer Soc Pl Tax Newsl*, 1993, 2: 15~ 16
- 12 Nei M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1973, 70: 3321~ 3323
- 13 Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 1978, 89: 583~ 590
- 14 黄宏文. 从世界栗属植物研究的现状看中国栗属资源保护的重要性. *武汉植物学研究*, 1998, 16(2): 171~ 187