

白骨壤种群不同年龄级的遗传多样性和遗传分化

黎中宝, 林 鹏

(厦门大学生命科学学院, 福建 厦门 361005)

摘要: 采用垂直板型聚丙烯酰胺凝胶电泳测定了白骨壤(*Avicennia marina*) 种群不同年龄级的遗传多样性和遗传分化. 白骨壤种群在不同年龄级维持有较高的遗传多样性, 观察杂合度为 0.300, 期望杂合度为 0.180. 遗传分化非常低, 遗传分化系数为 0.024, 表明总的遗传变异中有 2.4% 来自不同年龄级的白骨壤. 遗传距离和遗传一致度均值分别为 0.005 和 0.995, 基因流流畅, $Nm = 10.39$. 白骨壤种群不同年龄级的遗传分化远小于空间动态上的白骨壤的遗传分化.

关键词: 等位酶; 遗传多样性; 遗传分化; 白骨壤

中图分类号: Q 346+.5

文献标识码: A

近年来, 种群遗传多样性和遗传分化研究广被重视, 其中多以等位酶作为遗传标记, 探讨物种的遗传结构^[1,2]. 这在很大程度上可为生物育种、引种驯化、生物多样性保护和森林经营等方面提供理论依据. 红树林是生长在热带、亚热带海岸潮间带的一种常绿木本植物群落, 自然分布于我国的海南、广西、广东、福建和台湾五省区的沿海地带, 它具有胎生、抗盐及富含丹宁等特性, 这使得它与其它陆生植物群落存在着很大差别. 虽然已对红树植物在生理生态、能量生态和污染生态方面开展了较为详尽的研究工作^[3-6], 但对其遗传结构研究并不多见. Goodall 和 Stoddart^[7] 两人(1989) 研究了澳州的红海榄(*Rhizophora stylosa*) 的种群遗传结构, 发现种群间没有遗传上的分化($F_{ST} = 0.023$). 黄生^[8] 对分布于台湾的秋茄(*Kandelia candel*) 种群遗传结构的研究发现生长在沼泽区内较干燥地带的秋茄和长在潮湿地带的秋茄遗传上的分化程度低($F_{ST} = 0.043$). 本实验是以广布种白骨壤(*Avicennia marina*) 为代表, 对白骨壤种群不同年龄级开展研究的, 旨在探讨白骨壤种群不同年龄级的遗传多样性和遗传分化.

收稿日期: 2000-04-07

基金项目: 国家教育部博士学科点专项科研基金资助项目(1999038410)

作者简介: 黎中宝(1968-) 男, 博士

1 材料和方法

1.1 样品的采集和处理

白骨壤种群采自厦门市东屿(24°28' N, 118°05' E), 在选定的种群样地中, 株与株之间的距离相隔 5 m 以上随机采集 1 年生、3~5 年生、6~8 年生(根据白骨壤茎节间数目判断) 幼嫩的白骨壤叶片, 保持叶片新鲜不变质, 迅速携至实验室内处理, 在-20℃ 冷冻贮藏, 尽快测完, 由于红树植物富含单宁^[9], 因此将提取酶缓冲液^[10,11] 进行改进, 以磷酸钾缓冲液代替 Tris-HCl 缓冲液(25 cm³, 0.1 mol/dm³ 磷酸钾缓冲液, pH7.5, 内含 0.019 g KCl, 0.05 g MgCl₂, 0.01 g EDTANa₂, 5 g PVP-K30, 0.08 g 偏亚硫酸钠, 1 g 四硼酸钠, 0.25 cm³ 巯基乙醇). 冰浴研成匀浆, 4 000 r/min 冷冻离心 15 min, 弃去沉淀, 上清液备用.

1.2 电泳及等位酶分析

电泳采用垂直板型不连续聚丙烯酰胺凝胶(PAGE) 电泳, 浓缩胶和分离胶的浓度分别为 2.5% 和 7.0%, pH 分别为 6.7 和 8.9. 本实验共检测 5 个酶系统 10 个酶位点(表 1).

表 1 本研究所用酶系统、E. C. 代码、位点数目

Tab.1 The Enzyme systems, E. C. No. and numbers of loci in this study

酶系统	天冬氨酸转氨酶 (AAT)	酯酶 (EST)	乙醇脱氢酶 (ADH)	苹果酸酶 (ME)	苹果酸脱氢酶 (MDH)
E. C. 代码	E. C. 2.6.1.1	E. C. 3.1.1.-	E. C. 1.1.1.1	E. C. 1.1.1.40	E. C. 1.1.1.37
位点数目	2	3	1	1	3

1.3 计算方法

遗传变异的计算: 多态位点百分率(P): $P = (k/n) \times 100\%$, k - 多态酶位点的数目, n - 所测定酶位点的总和. 多态位点的标准按 Nei 氏(1975)^[12] 的 0.99 划分, 即最常见的等位基因出现的频率小于或等于 0.99.

杂合度(H): 即杂合位点的百分数. 期望杂合度(即平均遗传多样性) $He = \sum_{i=1}^n \left(1 - \sum_{j=1}^{m_i} q_{ij}^2\right) / n$, 观察杂合度 $Ho = \sum_{i=1}^n \left(1 - \sum_{j=1}^{m_i} p_{ij}\right) / n$. 其中 q_{ij} 为第 i 个位点上第 j 个等位基因的频率, p_{ij} 为第 i 个位点上第 j 个等位基因观察到的纯合基因型频率. m_i 为第 i 个位点上的测定到的等位基因的总数.

平均每位点有效等位基因数 $Ae = \sum_{i=1}^n \left(1 / \sum_{j=1}^{m_i} q_{ij}^2\right) / n$, q_{ij} 为第 i 个位点上第 j 个等位基因的频率. 固定指数 $F = 1 - Ho/He$.

总种群中所有等位基因的 F_{ISK} 加权平均值为

$$F_{IS} = \sum_k (\bar{p}_k - \bar{p}_k^2) F_{ISK} / \sum_k (\bar{p}_k - \bar{p}_k^2)$$

总种群中所有等位基因的 F_{ITK} 加权平均值为

$$F_{IT} = \sum_k (\bar{p}_k - \bar{p}_k^2) F_{ITK} / \sum_k (\bar{p}_k - \bar{p}_k^2)$$

总种群中所有等位基因的 F_{STK} 加权平均值为

$$F_{ST} = \sum_k (\bar{p}_k - \bar{p}_k^2) F_{STK} / \sum_k (\bar{p}_k - \bar{p}_k^2)$$

其中, $\bar{p}_k =$ 总种群中第 k 个等位基因的频率平方的平均值, $\bar{p}^2_k =$ 总种群中第 k 个等位基因的频率的平均值.

遗传分化的测定: 基因分化系数 $G_{ST} = D_{ST}/H_T$, 其中 D_{ST} 为种群间的基因多样性; H_T 为基因多样性总量.

遗传距离 D 和遗传一致度 I 采用 Nei 氏 (1987)^[13] 的标准.

$$I = \frac{\sum_k \sum_i X_i Y_i}{\sum_k X_i^2 + \sum_k Y_i^2} \quad D = - \ln I$$

其中, X_i 为在居群 X 中位点 k 第 i 个等位基因的频率; Y_i 为在居群 Y 中位点 k 第 i 个等位基因的频率; k 为指定位点; i 为指定位点的等位基因. 基因流采用 Wright (1965)^[14] 的 F_{ST} 法统计出的 F_{ST} 值来计算: $Nm = (1 - F_{ST})/4F_{ST}$, 式中 Nm 表示基因流, F_{ST} 表示种群间的分化度(在多位点的情况下 $F_{ST} = G_{ST}$).

2 实验结果

2.1 白骨壤种群不同年龄级的遗传多样性

根据电泳酶谱分析结果, 白骨壤不同年龄级的等位基因频率见表 2. 从表 2 可知, 随时间的变化, 有 4 个等位基因 (Est-1B, Est-1E, Mdh-3B, Mdh-3C) 的频率发生了变化. 由表 2 的数据进行遗传学计算, 其结果列于表 3.

从表 3 可见白骨壤种群在不同年龄级的平均每位点等位基因数目 A 为 1.50, 有效等位基因数目 A_e 为 1.38. 多态位点百分数 P 为 36.7. 观察杂合度和期望杂合度都比较高, 观察杂合度平均为 $H_o = 0.300$. 期望杂合度平均为 $H_e = 0.180$, 而且, A_e 和 H_e 随年龄的变化而增加.

2.2 白骨壤种群不同年龄级的遗传分化

白骨壤种群不同年龄级的遗传分化非常低, 总的遗传多样性为 0.1784, 基因分化系数 G_{ST} 为 0.024 (表 4), 表明总的遗传多样性有 2.4% 来自不同年龄级的白骨壤之间. 而这一结果与 $F_{ST} = 0.023$ 一致 (表 5), 与在多位点的情况下 F_{ST} 近似等于 G_{ST} 结论一致. 采用

表 2 白骨壤种群不同年龄级的等位基因频率
Tab. 2 The Allele frequencies in different age of *Avicennia marina* population

位点	等位基因	1 年生	3 ~ 5 年生	6 ~ 8 年生
AAT-1	A	0.500	0.500	0.500
	B	0.000	0.000	0.000
	C	0.000	0.000	0.000
	D	0.000	0.000	0.000
	E	0.500	0.500	0.500
AAT-2	A	0.000	0.000	0.000
	B	1.000	1.000	1.000
EST-1	A	0.000	0.000	0.000
	B	0.500	0.439	0.394
	C	0.106	0.061	0.000
	D	0.106	0.061	0.000
	E	0.500	0.439	0.394
EST-2	A	0.000	0.000	0.000
	B	1.000	1.000	1.000
EST-3	A	0.000	0.000	0.000
	B	1.000	1.000	1.000
ADH-1	A	0.000	0.000	0.000
	B	1.000	1.000	1.000
ME-1	A	0.000	0.000	0.000
	B	0.000	0.000	0.000
	C	1.000	1.000	1.000
MDH-1	A	0.500	0.500	0.500
	B	0.000	0.000	0.000
	C	0.500	0.500	0.500
MDH-2	A	1.000	1.000	1.000
MDH-3	A	0.000	0.000	0.000
	B	0.000	0.061	0.303
	C	1.000	0.939	0.697

Wright 的 F_{ST} 法计算出多态位点基因流很大, $Nm = 10.39$ (表 5). 分化小的种群往往保持有较大的基因流, 不同年龄级的白骨壤种群也遵循这一规律, 基因流 $Nm > 1$, 说明种群间不会有较大的分化.

表 3 白骨壤种群不同年龄级的遗传变异性指标

Tab. 3 Indexes of genetic variability in different age of *Avicennia marina* population (parentheses are the standard errors)

参 数	1 年生	3 ~ 5 年生	6 ~ 8 年生	种群水平
每位点等位基因数 A	1.30	1.60	1.60	1.50
多态位点百分数 $P\%$	30	40	40	36.7
有效等位基因数 A_e	1.300	1.368	1.473	1.38
期望杂合度 H_e	0.152(0.077)	0.175(0.082)	0.212(0.089)	0.180
观察杂合度 H_o	0.300(0.153)	0.300(0.153)	0.300(0.153)	0.300

注: 括号内是标准差

表 4 白骨壤种群不同年龄级的基因多样性的分配和分化

Tab. 4 Apportionment of gene diversity and differentiation in different age of *Avicennia marina* population

位点	总遗传多样性 H_T	年龄级内遗传多样性 H_S	年龄级间遗传多样性 D_{ST}	基因分化系数 G_{ST}
Aat-1	0.500	0.500	0.000	0.000
Aat-2	0.000	0.000	0.000	0.000
Est-1	0.590	0.560	0.030	0.051
Est-2	0.000	0.000	0.000	0.000
Est-3	0.000	0.000	0.000	0.000
Adh-1	0.000	0.000	0.000	0.000
Me-1	0.000	0.000	0.000	0.000
Mdh-1	0.500	0.500	0.000	0.000
Mdh-2	0.000	0.000	0.000	0.000
Mdh-3	0.194	0.182	0.012	0.062
全部位点	0.1784	0.1742	0.0042	0.024

表 5 白骨壤种群不同年龄级的多态位点的 F-统计和基因流

Tab. 5 Summary of F-statistics and gene flow of Polymorphic loci in different age of *Avicennia marina* population

位点	年龄级近亲交配系数 F_{IS}	各年龄级近亲交配系数 F_{IT}	年龄级间分化度 F_{ST}	基因流 Nm
Aat-1	-1.000	-1.000	-1.000	
Est-1	-0.691	-0.670	0.013	
Mdh-1	-1.000	-1.000	0.000	
Mdh-3	1.000	1.000	0.161	
平均	-0.695	-0.656	0.023	10.39

既然不同年龄级的白骨壤存在着很低的遗传分化($G_{ST} = 0.024$),那么不同年龄级的白骨壤的遗传距离就很小,平均 D 为 0.005. 3 ~ 5 年生与 1 年生白骨壤的遗传距离最小, D 为 0.000, 即没有变异, 而 6 ~ 8 年生与 1 年生白骨壤遗传距离较大, D 为 0.010, 变化范围不大(0.000 ~ 0.010). 遗传一致度的数值也表明了 3 个不同年龄级的白骨壤的相似程度很大, 平均为 0.995. 3 ~ 5 年生与 1 年生白骨壤相似程度高达 1.000, 而 6 ~ 8 年生与 1 年生白骨壤相似程度较小为 0.990(表 6). 说明不同年龄级的白骨壤相似程度非常高.

根据白骨壤种群不同年龄级之间的遗传距离, 采用平均聚类方法(UPGMA)^[13] 对 3 个不同年龄级的白骨壤进行聚类(图 1), 可知, 3 ~ 5 年生与 1 年生白骨壤之间的距离较小, 6 ~ 8 年生白骨壤差异较大(图 1).

3 讨 论

白骨壤种群的不同年龄级水平维持着较高的遗传多样性, 这和白骨壤的生物学特征有关. 白骨壤在我国是广泛分布于热带、亚热带海岸潮间带的一种常绿木本植物群落, 而广布种往往维持着较高的遗传多样性^[16]. 另外, 白骨壤种群不同年龄级的平均多态位点百分数(P) 和平均遗传多样性(H_e), 都高于一般植物种群的相应均值, (表 7). 这主要是因为 Hamrick 所研究的 165 个属的 653 个类群的植物陆生偏多, 而白骨壤种群受潮汐浸润, 其生态环境与陆生植物截然不同. 另外, 从表 2 可知, 随年龄的变化, 有 4 个等位基因(Est-1B、Est-1E、Mdh-3B、Mdh-3C) 的频率发生变化; 并且, A_e 和 H_e 随年龄的变化而增加(表 3), 由此表明, 白骨壤种群不同年龄级的遗传多样性高, 可能还与白骨壤种群生长的生态环境因素多样性有关.

白骨壤种群不同年龄级之间的分化程度很低, 遗传分化系数 G_{ST} 为 0.024(表 4). 远小于空间动态研究中白骨壤种群的分化度 $G_{ST} = 0.067$ ^[17], 这一研究结果和其他学者研究结果基本一致,

表 6 白骨壤种群不同年龄级的遗传距离和遗传一致度 (下三角为遗传一致度, 上三角为遗传距离)

Tab.6 Genetic identity(below diagonal) and genetic distance(above diagonal) in different age of *A vicennia marina* population

种群	6 ~ 8 年生	3 ~ 5 年生	1 年生
6 ~ 8 年生	—	0.004	0.010
3 ~ 5 年生	0.996	—	0.000
1 年生	0.990	1.000	—

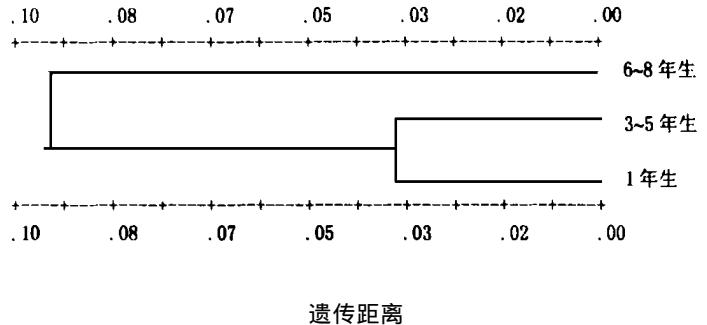


图 1 白骨壤种群不同年龄级的不加权对儿平均聚类法聚类

Fig.1 UPGMA clustering based on genetic distances in different age of *A vicennia marina* population

表 7 白骨壤和其他植物遗传变异比较

Tab.7 Comparison of genetic variation of *A vicennia marina* and other plants

比较指标	白骨壤种群水平	一般植物种群均值 ^[10]
平均等位基因数目 A	1.50	1.52
平均多态位点百分数 P	36.7%	35%
平均遗传多样性 H_e	0.180	0.113

Linhart et al. (1981)^[18] 在 *pinus ponderosa* 种群不同年龄级研究中没有发现显著差异, 认为, 时间上的遗传分化远小于空间上的遗传分化. Gregorius et al. (1986)^[19] 在研究 *Fagus sylvatica* 中, 经过连续两年种子的检测, 得到的遗传分化很小. 不同年龄级的白骨壤种群之间的分化程度很低, 这与用 F -统计量计算出的结果 $F_{ST} = 0.023$ 一致(表 5). Goodall 和 Stoddart^[7] 对澳洲的红海榄的研究结果($F_{ST} = 0.023$), 黄生^[8] 对台湾秋茄种群的研究结果($F_{ST} = 0.043$) 都表明不同生境种群的遗传分化是很低的. 但黎中宝等^[20] 对三种不同生境的桐花树种群的遗传多样性和遗传分化的研究表明遗传分化较高($G_{ST} = 0.127$). 本研究 $F_{ST} = 0.023$ 也表明白骨壤种群不同年龄级的分化程度很低, 这可能与白骨壤种群间基因流很大有关, 研究表明, $Nm = 10.39$, Wright 认为种群间基因流大于 1, 则能发挥均质化作用, 反之, 则表明基因流成了遗传分化的主要原因^[10], 这就克服了虫媒异花授粉导致的不同年龄级的白骨壤分化. 不同年龄级白骨壤基因流大, 这可能与果实随海水漂流传播方式及传粉机制有关.

参考文献:

- [1] Spieth P T. Gene flow and genetic differentiation[J]. *Genetic*, 1974, 78:961- 965.
- [2] Hokanson S C, Isebrands J G, Jensen R J, et al. Isozymes variation in oaks of the Apostle Islands in Wisconsin: genetic structure and levels of inbreeding in *Quercus rubra* and *Q. ellipsoidalls* (Fagaceae) [J]. *American Journal of Botany*, 1993, 80(11):1 349- 1 357.
- [3] 林鹏. 红树林研究论文集(1980~1989)(第一集)[C]. 厦门: 厦门大学出版社, 1990. 99~230.
- [4] 林鹏. 红树林研究论文集(1990(1992))(第二集)[C]. 厦门: 厦门大学出版社, 1993. 1~144.
- [5] 林鹏. 红树林研究论文集(1993(1996))(第三集)[C]. 厦门: 厦门大学出版社, 1999. 1~168.
- [6] 林鹏. 中国红树林生态系[M]. 北京: 科学出版社, 1997. 284- 316.
- [7] Goodall J A, Stoddard J A. Techniques for the electrophoresis of mangrove tissue[J]. *Aquat. Bot.*, 1989, 35:197- 207.
- [8] 黄生. 秋茄(*Kandelia condet*) 的区域性种群遗传结构[J]. *生物多样性*, 1994, 2(2):68~75.
- [9] 林鹏. 红树林[M]. 北京: 海洋出版社, 1984. 21~34.
- [10] 王中仁. 植物等位酶分析[M]. 北京: 科学出版社, 1996. 77~119.
- [11] Mitton J B, Linhart Y B, Sturgeon K B, et al. Allozyme polymorphisms detected in mature needle tissue of ponderosa pine[J]. *J. Hered.*, 1979, 70:86~89.
- [12] Nei M. molecular population genetic and evolution[M]. Amsterdam and New York: North Holland Publ. Co., 1975. 16~48.
- [13] Nei M. molecular evolutionary genetic[M]. New York: Columbia Univ. Press, 1987. 63~97.
- [14] Wright S. The interpretation of population structure By F -statistics with special regard to systems of mating[J]. *Evolution*, 1965, 19:395~420.
- [15] Hamrich J L. Differentiation patterns in Higher plants. Gene flow and distribution of genetic variation in plant populations[M]. In: urbanska Ked., New York: Academic Press, 1987. 53~67.
- [16] Hamrick J L, Linhart Y B. Relationships between life history characteristics and electrophoretically detectable genetic variation in plants[J]. *Ann Rev Evol systemen*, 1979, 10:173~200.
- [17] 黎中宝. 红树植物桐花树和白骨壤遗传变异与分化的生态遗传学研究. 厦门大学博士毕业论文[C]. 2000.
- [18] Linhart Y B, J B Mitton. Genetic control of allozymes of shikimate dehydrogenase in ponderosa pine

[J]. *Heredity*, 1981, 46: 407 ~ 426.

[19] Gregorius H R, J Krauhausen. Spatial and temporal genetic differentiation among the seed in a stand of *Fagus sylvatica* L[J]. *Heredity*, 1986, 57: 255 ~ 262.

[20] 黎中宝, 林鹏, 邓传远. 三种不同生境的桐花树种群的遗传多样性和遗传分化[J]. 台湾海峡, 2000, 19 (3): 379- 385.

Genetic Diversity and Differentiation in Different Age of *Avicennia marina* Population

LI Zhong-bao, LIN peng

(School of Life-Science, Xiamen Univ. , Xiamen, 361005, China)

Abstract: Genetic diversity and genetic differentiation in different age of *Avicennia marina* population were measured with the assay of vertical slab polyacrylamide gel electrophoresis. The results showed that there was of relatively high level of genetic diversity in different age of *A. marina* population. The observed heterozygosities was 0.300, and the expected heterozygosity was 0.180. The coefficient of gene differentiation in different age was 0.024, which showed that 2.4% of total heterozygosity came from *A. marina* populations in different age. The genetic distance and genetic identity in different age were 0.005 and 0.995 respectively. The gene flow was smooth, Nm was 10.39. The genetic differentiation in different age is much less marked than differentiation in space.

Key words: allozyme; genetic diversity; genetic differentiation; *avicennia marina*