

## 福建省戴云山区马尾松天然群体 同工酶遗传变异的研究\*

荣文琛 周志春

(中国林业科学研究院亚热带林业研究所)

**关键词** 马尾松; 天然群体; 同工酶; 遗传结构

天然群体包含大量数量和质量性状变异,前者易受环境条件影响,后者则几乎完全受遗传因素控制。长期以来,人们主要利用表型性状借助数量遗传理论来研究群体的遗传变异,直到近十多年才开始借生物化学技术作林木遗传学分析。本研究以福建省15个马尾松垂直和水平分布的天然群体为对象,利用同工酶位点探讨马尾松群体的遗传结构,了解马尾松垂直和水平群体在各种酶类多态位点上的变异幅度和趋势。

### 一、材料和方法

#### (一) 材料收集

1982年在福建省戴云山德化地区马尾松天然林中采种。从海拔400 m至1200 m,每隔100 m沿等高线隔30—50 m选取4株同龄级优势木单株采种,(No 4—12)。水平方向则从戴云山脉向北向西每隔50 km左右采种,组成水平群体组,分别为崇安(I)、建阳(II)、建瓯(III)、尤溪(V)、武平(W<sub>01</sub>)和漳平(W<sub>04</sub>)。

#### (二) 样品提取和电泳染色

对15个采种群体(见表2),每群体测定4个单株,每单株分析7粒种子。种子浸泡24 h后低温层积、室温催芽,俟胚根露白即剥取胚乳和胚磨样,加TBE(0.1 M Tris + 0.01 M 硼酸 + 0.01 M EDTA 浸提液)0.2 ml,离心20 min(转速15 000转/min)。

使用聚丙烯酰胺凝胶垂直板状电泳,不连续缓冲系统,低温电泳并染色。

分析酶类为谷氨酸草酰乙酸转氨酶(GOT)、乳酸脱氢酶(LDH)和苹果酸脱氢酶(MDH)。由于针叶树胚乳为单倍体,可直接分析同工酶遗传是否符合孟德尔分离规律,从而确定同工酶谱带所代表的位点和等位基因。每个单株分析7粒种子时,假定杂合单株的两个等位基因符合1:1分离,则漏掉一个等位基因(即错将杂合体定为纯合体)的概率仅为 $\left(\frac{1}{2}\right)^6 = 0.0156$ 。

本文于1989年元月30日收到。

\*本文由南京林业大学[陈岳武]、黄敏仁先生指导完成,系研究生硕士学位论文的一部分。福建沙县官庄林场郑如晃、周材恭、杨再玉、陈敏旋等同志协助材料收集,南京林业大学徐立安、许农等老师给予大力支持,84届毕业生陈正德、邹荣领同学参加实验,谨此一并致谢。

### (三) 统计参数

1. 期望杂合率( $h_e$ )  $h_{e_i} = 1 - \sum_j P_{ij}^2$ , 式中  $h_{e_i}$  为第  $i$  个位点上的期望杂合率;  $P_{ij}$  为第  $i$  个位点上第  $j$  个等位基因的频率。所有测定位点( $n$ )上期望杂合率的均值为平均期望杂合率( $H_e$ ):  $H_e = \frac{1}{n} \sum h_{e_i}$  [1]。

2. 多态位点率( $P$ ) 即经同工酶测定为多态的位点占总位点的比例。

3. 每位点等位基因均数( $A$ )  $A = \frac{1}{n} \sum a_i$ , 式中  $a_i$  为第  $i$  个位点上的等位基因数。

4. 基因分化系数( $G_{ST}$ ) 将总的基因多样性( $H_T$ )分解为群体内( $H_S$ )和群体间( $D_{ST}$ )两部分, 从而估算其相对比率:  $H_T = H_S + D_{ST}$ ,  $G_{ST} = D_{ST}/H_T$  [2]。

5. 遗传距离( $D$ ) 是度量群体分化的常用指标, 表示两特定群体间的遗传差异。  $D = L_n(\sqrt{J_x \cdot J_y} / J_{xy})$ , 式中  $J_x = \frac{1}{n} \sum_i \sum_j x_{ij}^2$ ,  $J_y = \frac{1}{n} \sum_i \sum_j y_{ij}^2$ ,  $J_{xy} = \frac{1}{n} \sum_i \sum_j x_{ij} \cdot y_{ij}$ ,  $x_{ij}$ 、 $y_{ij}$  分别为  $x$ 、 $y$  两群体第  $i$  个位点上第  $j$  个等位基因的频率 [1]。

6.  $X^2$  检验 用  $X^2$  分析检验基因型比率实测值与理论值的相符程度以及群体之间等位基因频率差异的显著程度, 公式(Guries 等, 1981)为:  $X^2 = 2N \sum_i \sigma_{P_i}^2 / \bar{P}_i$ , 式中  $\sigma_{P_i}^2$  为第  $i$  个位点上等位基因频率的方差,  $\bar{P}_i$  为第  $i$  个位点上等位基因频率的加权平均值,  $N$  = 群体中的个体总数。

## 二、结果与分析

### (一) 酶谱分析

对分析酶类各研究其中一个位点: GOT-C、LDH-B 和 MDH-B (酶谱如图 1 所示)。其它位点变化单调一致, 不适于作遗传分析。

酶	胚、乳	胚
GOT	== -- -- ----	== == --
LDH	== -- == --	== == == -- --
MDH	== -- --	== -- ==

图 1 马尾松种子胚乳、胚的 GOT、LDH、MDH 同工酶酶谱

GOT-C 具有 4 个不同的等位基因, 表达为 1—3 条酶带, 由  $C_1$ 、 $C_2$ 、 $C_3$ 、 $C_4$  4 个等位基因控制, 其中  $C_4$  为无效等位基因( $n_0$ )控制。LDH-B 由 5 个等位基因控制。MDH-B 由 4 个不同的等位基因控制, 酶带分别为 1 或 2 条。

### (二) 群体的变异水平

1. 等位基因频率 据同工酶谱带统计, 各群体各位点上的等位基因频率见表 1。对于一

表 1 等位基因频率实测值与理论值的 $X^2$ 检验

位 点	群 体	同工酶表现型的频率分布	$X^2$ 值	位 点	群 体	同工酶表现型的频率分布	$X^2$ 值
GOT-C	$N_{04}$	$C_1:C_2$ —8:8	0	GOT-C	$N_{10}$	$C_1:C_2$ —10:16	1.38
	$N_{05}$	$C_1:C_2$ —12:13	2.31		$N_{11}$	$C_1:C_2$ —17:3	9.80*
	$N_{06}$	$C_1:C_2$ —23:4	13.37*		$N_{12}$	$C_1:C_2$ —7:2	2.78
	$N_{07}$	$C_1:C_2$ —21:7	7.00*	LDH-B	$N_{05}$	$B_1:B_2$ —1:7	4.50*
	$N_{08}$	$C_1:C_2$ —7:10	0.53		$N_{10}$	$B_1:B_2$ —10:9	0.05
	$N_{09}$	$C_1:C_2$ —16:13	0.31		$N_{12}$	$B_1:B_2$ —6:4	0.40

个位点只有两个等位基因的酶类，假设减数分裂时随机分配，则单株的种样中同工酶表现型分配符合孟德尔分离比率1:1。这方面已有若干例证，如Shen等(1980)对欧洲赤松标号无性系的GOT-A位点分析中发现，399粒属 $A_1$ ，422粒属 $A_2$ ，1:1分离的 $X^2$ 值为2.10。但本试验中多数位点具有两个等位基因的单株种子中同工酶表现型分配与1:1比例差异较大。这可能有两方面的原因，一是试验样本较小，可能产生较大的抽样误差，二是大孢子母细胞的不等分离。但若以同一海拔群体为单位来衡量，则发现部分与孟德尔分离比率有较好的拟合性(表1，表中\*示 $P > 0.05$ ，与1:1比率有显著偏离)。

2. 基因变异的若干参数 据等位基因频率估计值，求得各位点杂合率和平均杂合率(表2)。分析表明，马尾松群体在测定位点上有84.4%为多态位点，平均等位基因数为1.88，期望杂合率为35.6%，在垂直群体内高达42.1%。

表 2 马尾松15个天然群体的杂合率分析

群 体	参 数	各位点杂合率( $h_e$ )			平均杂合率 ( $H_e$ )	多态位点率 ( $P$ )	各位点等位基因 ( $A$ )
		GOT-C	LDH-B	MDH-B			
$N_{04}$		0	0.204	0.571	0.258	0.667	1.88
$N_{05}$		0.362	0.225	0.578	0.388	1.000	1.88
$N_{06}$		0.252	0.611	0.568	0.477	1.000	1.63
$N_{07}$		0.390	0.630	0.497	0.506	1.000	2.38
$N_{08}$		0.500	0.691	0.486	0.559	1.000	2.13
$N_{09}$		0.400	0.532	0.599	0.510	1.000	2.38
$N_{10}$		0.515	0.322	0.488	0.442	1.000	2.00
$N_{11}$		0	0.499	0.480	0.326	0.667	1.63
$N_{12}$		—	0.480	0.495	0.325	1.000	2.20
I		0.444	—	0.571	0.338	1.000	2.00
II		0.420	0.444	0.408	0.482	1.000	1.63
III		0	0.278	0.480	0.253	0.667	1.38
V		0	0.125	0.582	0.236	0.667	1.88
$W_{01}$		0.095	0	0	0.032	0.333	1.50
$W_{04}$		0.185	0	0.480	0.222	0.667	1.63

据每个位点在15个群体中的 $h_e$ 求得平均期望杂合率( $H_e$ )，按大小排列如下：GOT-C(0.255) < LDH-B(0.360) < MDH-B(0.486)，在垂直和水平群体组的 $H_e$ 值亦完全符合这一变化趋势(见表4)。 $H_e$ 在位点间的变化幅度较大，与其它树种的研究结果相接近<sup>[2]</sup>。这说明在进行群体变异研究时，酶系统的选取是很重要的，理想的方法是尽量随机地选取大量

的酶系统及位点。

### (三) 群体的分化

1. 等位基因频率的差异 采用  $X^2$  分析检验各位点上等位基因频率在15个群体间的差异性(表3)。可见各位点等位基因频率的差异, 垂直群体比水平群体要小得多。

表3 各位点等位基因频率及 $X^2$ 检验

位 点	群 体											$X^2$	I	II	III	V	W <sub>01</sub>	W <sub>04</sub>	$X^2$
	N <sub>04</sub>	N <sub>05</sub>	N <sub>06</sub>	N <sub>07</sub>	N <sub>08</sub>	N <sub>09</sub>	N <sub>10</sub>	N <sub>11</sub>	N <sub>12</sub>										
GOT-C	1.000	0.799	0.865	0.781	0.707	0.775	0.696	1.000	—	1.87	0.762	0.762	1.000	1.000	0.951	0.903	2.38		
LDH-B	0.892	0.883	0.624	0.608	0.556	0.684	0.823	0.708	0.721	0.89	—	0.742	0.850	0.935	1.000	1.000	4.56		
MDH-B	0.655	0.650	0.657	0.709	0.717	0.633	0.717	0.721	0.711	2.31	0.655	0.769	0.721	0.647	1.000	0.721	6.54		

2. 遗传距离 为进一步分析15个群体的相似程度, 计算垂直和水平两群体组内各群体的遗传距离, 结果见表4。海拔群体组的遗传距离平均值为 $0.274 \pm 0.029$ , 水平群体组为 $0.426 \pm 0.074$ , 后者的数值与变异均为前者的两倍左右。此外, 水平群体组内存在遗传距离随地理跨度变远而递增的变化趋势。群体I与其余群体的地理跨度最远, 其遗传距离平均值也最大(0.691), 以下依次渐降, 群体II为0.539, 群体III为0.297, 群体V为0.273。这表明地理距离对基因交流确有明显的隔离作用。

表4 成对群体间的遗传距离值

群体	N <sub>04</sub>	N <sub>05</sub>	N <sub>06</sub>	N <sub>07</sub>	N <sub>08</sub>	N <sub>09</sub>	N <sub>10</sub>	N <sub>11</sub>	N <sub>12</sub>	群体	I	II	III	V	W <sub>01</sub>	W <sub>04</sub>
N <sub>05</sub>	0.546									I	0.637					
N <sub>06</sub>	0.305	0.171								II	0.678	0.187				
N <sub>07</sub>	0.264	0.132	0.105							V	0.633	0.468	0.096			
N <sub>08</sub>	0.348	0.602	0.377	0.584						W <sub>01</sub>	0.820	0.793	0.337	0.144		
N <sub>09</sub>	0.318	0.068	0.254	0.069	0.357					W <sub>04</sub>	0.713	0.609	0.189	0.025	0.058	
N <sub>10</sub>	0.384	0.170	0.127	0.322	0.343	0.207										
N <sub>11</sub>	0.123	0.217	0.059	0.152	0.402	0.159	0.115									
N <sub>12</sub>	0.377	0.226	0.291	0.039	0.707	0.072	0.604	0.279								
$\bar{x}$	0.333	0.267	0.211	0.208	0.465	0.188	0.284	0.188	0.324		0.691	0.539	0.297	0.273	0.430	0.319
$S\bar{d}$	$\pm$ 0.042	$\pm$ 0.070	$\pm$ 0.040	$\pm$ 0.063	$\pm$ 0.051	$\pm$ 0.041	$\pm$ 0.058	$\pm$ 0.039	$\pm$ 0.083		$\pm$ 0.031	$\pm$ 0.102	$\pm$ 0.103	$\pm$ 0.118	$\pm$ 0.319	$\pm$ 0.143

3. 基因分化系数 为了确定同工酶位点上的变异总量在群体间和群体内的分布情况, 对群体变异作基因多样度的等级分析。据表3的等位基因频率资料, 计算出总群体和群体内的基因多样性( $H_T$ 、 $H_S$ )和基因分化系数( $G_{ST}$ ), 结果见表5。表中各参数在位点间变动幅度较大, 说明不同位点对基因多样度的贡献各异, 其中以MDH-B位点表现出相当大的基因杂合性, 其 $H_T$ 和 $H_S$ 值分别超过GOT-C和LDH-B位点的两倍。 $G_{ST}$ 值在垂直、水平群体组分别为0.197和0.493, 说明垂直分布群体间变异平均占总变异量的20%, 大多数变异存在于群体内, 水平分布则群体间和群体内的遗传变异分量大致相等。

表5 群体内和群体间等位基因杂合率分布

位 点	垂 直 群 体				水 平 群 体			
	$H_T$	$H_S$	$D_{ST}$	$G_{ST}$	$H_T$	$H_S$	$D_{ST}$	$G_{ST}$
GOT-C	0.365	0.302	0.063	0.173	0.605	0.191	0.414	0.684
LDH-B	0.599	0.466	0.133	0.222	0.300	0.169	0.131	0.437
MDH-B	0.658	0.529	0.129	0.196	0.655	0.420	0.235	0.359
$\bar{x}$	0.541	0.432	0.108	0.197	0.520	0.260	0.260	0.493
$S_d$	$\pm 0.089$	$\pm 0.068$	$\pm 0.023$	$\pm 0.014$	$\pm 0.111$	$\pm 0.080$	$\pm 0.083$	$\pm 0.098$

综合以上分析,可以得出初步结论:15个马尾松群体间存在相当大的遗传变异,水平分布群体分化比垂直分布群体更为明显。Wright认为,选择会造成高低海拔间树木的不同,但是在同一山上不同海拔之间,比平地上相距数百英里的种群间基因交换频繁得多。这种连续的基因交换有阻止高低海拔的种群产生遗传上差异的趋势<sup>[3]</sup>。本试验的结论与此完全相符。

### 三、问题与讨论

#### (一) 等位基因杂合率的海拔变化

等位基因杂合率在垂直分布群体中的变化趋势极为明显,由低海拔向中海拔递增,然后向高海拔递减,呈抛物线型变化。等位基因杂合率( $H_e$ )与海拔高( $E$ )的二次回归式为: $H_e = -0.47950563 + 0.00251037E - 1.56731602 \times 10^{-6}E^2$ ,式中 $E$ 取值为400~1200m。回归 $F$ 值=28.37\*\*,达极显著。中海拔(800m处)群体平均杂合率最高,原因可能是由于其林相条件和环境条件使自由授粉较为一致,也可能是处于基因交流频繁地区所致。

据报道(Cupta等,1977;Schwarz等,1969),杂种优势与同工酶活性相关,因此选择杂合率较高的林分作母树林、杂合性高的单株作优树具有一定意义。本试验也发现垂直群体子代测定中苗木和幼林生长均呈与其一致的随海拔梯度的抛物线型变化趋势。

#### (二) 遗传差异的保持

遗传学上常难以确定,引起自然群体内蛋白质变异的原因,究竟是由平衡的选择所保持,还是代表中性突变的漂移多态性。中性突变假设下的平衡群体的遗传变异水平,取决于有效群体含量( $N_e$ )和突变率( $u$ )。Stewart(1976)据每位点杂合度理论值推导式 $H = M/(1-M)$ (式中 $M = 4uN_e$ ,Kimura等,1964)推导出单个位点杂合性方差理论值为: $V_{(H)} = 2M/(1+M)^2 \cdot (2+M)(3+M)$ ,式中 $M$ 值可由 $H$ 的实测值得得, $V_{(H)}$ 的理论值即可求得。比较 $V_{(H)}$ 的理论值和实测值即可检验中性突变假设。

表6给出本试验分析位点上 $H$ 、 $M$ 及 $V_{(H)}$ 的理论值,据 $\bar{M} = 0.176$ 得出 $V_{(H)} = 0.076$ 。突变率一般为 $10^{-4} - 10^{-5}$ ,有效群体含量为 $10^3$ ,则 $M = 4 \times 10^{-2}$ ,两者从数量级看是极其吻合的。这说明可用中性突变假设来解释马尾松群体的杂合性变异。

表 6 各群体分析位点杂合性方差理论值

位 点	群 体	N <sub>04</sub>	N <sub>05</sub>	N <sub>06</sub>	N <sub>07</sub>	N <sub>08</sub>	N <sub>09</sub>	N <sub>10</sub>	N <sub>11</sub>	N <sub>12</sub>	I	II	III	V	W <sub>01</sub>	W <sub>04</sub>
		GOT-C	H	0	0.362	0.252	0.390	0.500	0.400	0.515	0	—	0.444	0.420	0	0
	M	0	0.266	0.201	0.281	0.333	0.286	0.340	0	—	0.307	0.296	0	0	0.087	0.156
	V <sub>(H)</sub>	0	0.045	0.040	0.046	0.048	0.046	0.048	0	—	0.047	0.047	0	0	0.023	0.034
LDH-B	H	0.204	0.225	0.611	0.630	0.691	0.532	0.322	0.499	0.480	—	0.444	0.278	0.125	0	0
	M	0.169	0.184	0.379	0.387	0.409	0.347	0.243	0.333	0.324	—	0.307	0.218	0.111	0	0
	V <sub>(H)</sub>	0.036	0.038	0.050	0.050	0.050	0.049	0.043	0.048	0.048	—	0.047	0.041	0.027	0	0
MDH-B	H	0.579	0.578	0.568	0.497	0.486	0.599	0.488	0.480	0.495	0.571	0.408	0.480	0.582	0	0.480
	M	0.367	0.366	0.362	0.332	0.327	0.375	0.323	0.324	0.331	0.363	0.290	0.324	0.368	0	0.324
	V <sub>(H)</sub>	0.049	0.049	0.049	0.048	0.048	0.049	0.048	0.048	0.048	0.049	0.046	0.048	0.049	0	0.048

## 参 考 文 献

- [1] 大羽滋, 1983, 群体遗传, 科学出版社, 110—114。  
 [2] Nei M. et al., 1977, Drift variation of Est statistics obtained from a finite number of isolated populations, *Theor. Pop. Biol.*, 307—325。  
 [3] 乔纳森 W. 赖特, 1976(郭锡昌等译, 1981), 森林遗传学, 中国林业出版社, 215—220。

## A STUDY ON GENETIC VARIATION AMONG MASSON PINE NATURAL POPULATIONS BY ISOZYME DISTRIBUTIONS IN DAIYUN MOUNTAIN AREA OF FUJIAN PROVINCE

Rong Wenchen    Zhou Zhichun

(The Research Institute of Subtropical Forestry CAF)

**Abstract** Genetic structures between and within 15 masson pine populations were studied by vertical and horizontal isozyme distributions in Fujian Province. The results indicated that there were great deviations among them with heterogeneity of allelic frequency being 0.357. Through genetic distance and gene division index analysis, it was discovered that there were more divergences among horizontal populations than among vertical ones. This paper also discussed the heterogeneity gradient along latitude and genetic deviation's maintenance.

**Key words** masson pine; vertical population; isozyme; genetic structure