

不同种群海南粗榧(*Cephalotaxus mannii*)遗传多样性研究

向志强¹, 刘玉成², 杜道林³

(1. 湖南怀化师专生物系, 湖南怀化 418008; 2. 西南师范大学生命科学学院, 重庆 400715; 3. 海南师范学院生物系, 海南海口 571158)

摘要: 采用垂直板型凝胶电泳技术, 对海南粗榧5个种群的遗传多样性进行了研究, 结果表明: 海南粗榧遗传多样性水平低, 多态位点比率 $P=0.33$, 等位基因平均数 $A=1.33$, 平均期望杂合度为 $H_e=0.135$, 观察杂合度 $H_o=0.139$, 黎母山种群所具有的相对丰富的遗传多样性使其成为保护和科研的重点。

关键词: 种群; 海南粗榧; 遗传多样性

中图分类号: Q948 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2002)03-0209-05

Study on genetic diversity of *Cephalotaxus mannii* populations

XIANG Zhi-qiang¹, LIU Yu-cheng², DU Dao-lin³

(1. Department of Biology, Huaihua Normal College, Huaihua 418008, China; 2. Department of Life Sciences, Southwest China Normal University, Chongqing 400715, China; 3. Department of Biology, Hainan Teachers College, Haikou 571158, China)

Abstract: The paper applied the vertical slab gel electrophoresis method to study the genetic diversity of *Cephalotaxus mannii* populations. The following results were drawn: *Cephalotaxus mannii* maintained relatively low level of genetic diversity with $p=0.33$, $A=1.33$, $H_e=0.135$ and $H_o=0.139$. The relative richness of its genetic diversity made Mt. Limu become the centre of protection and scientific research.

Key words: populations; *Cephalotaxus mannii*; genetic diversity

遗传多样性是生物多样性重要组成部分, 是生态系统多样性和物种多样性的基础^[1], 它既是长期进化的产物, 又是生存和发展的前提^[2]。进化生物学研究遗传多样性动态变化, 而保护生物学的目标之一就是保护物种遗传多样性^[3]。因此, 无论从进化论角度, 还是保护生物学角度, 物种遗传多样性研究是前提和基础, 而且对稀有濒危物种的研究, 也还

是进一步探讨稀有濒危机制, 制定科学保护措施的重要依据^[4]。

海南粗榧(*Cephalotaxus mannii*)为常绿乔木, 三尖杉科三尖杉属的一种残遗植物, 主要分布于东亚和中南半岛北部, 主产我国海南省^[5,6]。因根、茎、叶和果实都含有抗癌功效的生物碱^[5~7], 引起人们注意。由于遭到过度采伐利用, 植株生长缓慢, 结实率

收稿日期: 2000-09-14

作者简介: 向志强(1969-), 男, 湖南邵阳人, 在读博士生, 讲师, 从事植物生态学和人口、资源、环境经济学研究。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39660018)

低,种子萌发困难,难以形成更新种群。目前数量稀少,据 1992 年调查,胸径 10 cm 以上的林木在海南不过 1 300 株,已濒临灭绝边缘,被列入中国植物红皮书,并被确定为国家二级重点保护植物^[5-9]。因此,加强这一资源恢复、保存和系统研究,迫在眉睫。本文采用垂直板型凝胶电泳对分布在海南省的 5 个种群遗传多样性大小进行研究,以期为进一步系统研究海南粗榧遗传多样性水平和种群分化奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料采集和处理

根据海南粗榧地理分布,选择了 5 个群体行研究,它们分别为坝王岭、尖峰岭、黎母山、卡法岭、吊

罗山。5 个种群的环境资料见表 1。于 1998 年 5~6 月,在上述种群选择胸径>15 cm 成年植株采集当年萌生的嫩叶,冷冻下迅速带至实验室,尽快处理:0.1 g 叶片加 1 mL 0.1 mol/L Tris-HCl 提取缓冲液,冰浴研磨^[10], -4 °C 下 10 000 r/min 离心 10 min,弃沉淀,上清液于 -70 °C 冰箱贮存待用^[10,11]。5 个种群采集株数分别为:11 株、16 株、10 株、13 株、11 株,雌雄株大致相等。所采集的林木间距 30~50 m。

1.2 酶电泳实验

电泳集中在 1998 年 7~10 月进行,采用垂直板型不连续聚丙烯酰胺凝胶电泳,浓缩胶和分离胶浓度分别为 2.5% 和 7%,pH 分别为 6.7 和 8.9,凝胶系统的制备参照文献[12,13]。电极缓冲液为 Tris-甘氨酸,pH=8.3。采用稳压电泳(U=150 v),待溴

表 1 五个种群的环境资料

Table 1 The environmental data of five populations

种群点 Population distribution	纬度 Latitude	经度 Longitude	海拔 Elevation (m)	坡度 Slope degree	坡向 Slope direction	年均降 雨量(mm) Average precipitation per year	7 月均温 Average temperature on July	1 月均温 Average temperature on January	土壤厚 度(cm) Soil depth	pH	土壤有机 质(%) Organic matter of the soil
坝王岭 Mt. Bawang	18°48'	109°53'	920	5°	SW10°	1 421	24.3	14.7	21.4	4.0	6.48
尖峰岭 Mt. Jian	18°40'	108°51'	942	11°	SW40°	1 602	23	14.1	27.9	6.0	5.08
卡法岭 Mt. Kafa	18°48'	109°29'	640	15°	WS5°	1 562	23.3	14.5	18.6	6.5	4.24
黎母山 Mt. Limu	19°10'	109°46'	1 010	38°	NE5°	1 933	22.9	12.5	15.3	4.0	6.48
吊罗山 Mt. Diaoluo	18°48'	109°53'	680	25°	WN10°	1 822	23.5	15.7	30	5.5	4.23

表 2 电泳检测所用酶系统和位点数目

Table 2 The enzyme systems and numbers of loci

酶系统 Enzyme system	缩写 Abbreviation	酶分类编码 EC No.	位点数目 No. of loci
氨基肽酶 Aminopeptidase	AMP	E. C. 3. 4. 11. 1	1
脂酶 Esterase	EST	E. C. 3. 1. 1	3
磷酸葡萄糖异构酶 Phosphoglucosomerase	PGI	E. C. 5. 3. 1. 9	1
过氧化物酶 Peroxidase	PER	E. C. 1. 11. 1. 7	1
超氧化物歧化酶 Superoxide dismutase	SOD	E. C. 1. 15. 1. 1	2
苹果酸酶 Malic enzyme	ME	E. C. 1. 1. 1. 40	1
谷氨酸脱氢酶 Glutamate dehydrogenase	GDH	E. C. 1. 4. 1. 2	3
莽草酸脱氢酶 Shikimate dehydrogenase	SKD	E. C. 1. 1. 1. 25	1
苹果酸脱氢酶 Malate dehydrogenase	MDH	E. C. 1. 1. 1. 37	2

酚蓝前沿移至距分离胶起点 7.5 cm 处,停止电泳,剥胶染色,染色液配方参照文献[11,15]。待酶带清晰后,摄影并画下酶带位置图。

1.3 等位酶分析

共检测 16 种酶系统,获得 9 种酶系统(表 2)共

15 个等位酶位点。据电泳图谱写出个体基因型,计算各种群各等位酶位点的等位基因频率,等位酶位点及等位基因的确定,详见文献[11,15]。

1.4 数据处理

在等位基因频率基础上,采用 5 种常规方法来

估测种群体内遗传多样性: 多态位点比率(P)、等位基因平均数(A)、等位基因有效数(Aei)、期望杂合度(He)、观察杂合度(Ho)^[11-16,17]。

2 结 果

在所得到的 9 种酶系统中共确定了 15 个等位

酶位点, 其中, Sod-2、Per、Est-1、Est-2、Amp 5 个位点为多态位点(有 2 个以上的等位基因), 其余 10 个位点为单态位点, 多态位点比率为 0.33。5 个多态位点都只有 2 个等位基因, 其中 Sod-2 有 3 种基因型, 酶谱呈现出 3 条带, 其蛋白质结构可能是一种双聚体; 其他 4 个位点仅有 2 种基因型, 酶谱只出现 2 条

表 3 五个种群多态位点的等基因频率及杂合度

Table 3 Allelic frequencies and heterozygosities at polymorphic loci in the five populations

位点 Locus	等位基因 Allele	种群 Population					平均值 Mean
		尖峰岭 Mt. Jian	卡法岭 Mt. Kafa	坝王岭 Mt. Bawang	黎母山 Mt. Limu	吊罗山 Mt. Diaoluo	
Sod-2	A	0.718	0.750	0.591	0.350	0.636	0.609
	B	0.282	0.250	0.409	0.650	0.364	0.391
	Aei	1.68	1.59	1.94	1.83	1.87	1.78
	He	0.405	0.375	0.483	0.455	0.463	0.436
	Ho	0.438	0.308	0.367	0.500	0.545	0.432
Per	A	0.813	0.577	0.727	0.400	0.682	0.640
	B	0.187	0.423	0.273	0.600	0.317	0.360
	Aei	1.44	1.95	1.66	1.92	1.77	1.75
	He	0.304	0.488	0.397	0.480	0.432	0.420
	Ho	0.375	0.538	0.364	0.400	0.456	0.427
Est-1	A	0.750	0.846	0.636	0.250	0.727	0.642
	B	0.250	0.154	0.364	0.750	0.273	0.358
	Aei	1.60	1.35	1.86	1.60	1.66	1.61
	He	0.375	0.261	0.463	0.375	0.397	0.374
	Ho	0.375	0.308	0.545	0.300	0.367	0.379
Est-2	A	0.250	0.192	0.435	0.550	0.367	0.359
	B	0.750	0.808	0.545	0.450	0.633	0.637
	Aei	1.60	1.45	1.98	1.98	1.86	1.77
	He	0.375	0.310	0.496	0.495	0.464	0.428
	Ho	0.375	0.384	0.545	0.500	0.454	0.470
Amp	A	0.907	0.731	0.818	0.400	0.454	0.662
	B	0.093	0.269	0.182	0.600	0.546	0.338
	Aei	1.20	1.65	1.42	1.92	1.98	1.63
	He	0.169	0.393	0.298	0.480	0.496	0.367
	Ho	0.187	0.385	0.365	0.400	0.545	0.376
平均值 ¹⁾	Aei	1.168	1.199	1.257	1.280	1.270	1.235
Mean	He	0.108	0.121	0.142	0.152	0.150	0.135
	Ho	0.117	0.128	0.146	0.140	0.164	0.139
	F	-0.083	-0.058	-0.028	0.079	-0.093	—

¹⁾ 平均值为全部 15 个位点的平均值 (Means are the averages of all 15 loci)

带, 蛋白质结构可能是单聚体。5 个种群平均每个位点基因数都为 1.33, 但平均每个位点有效基因数不同, 分别为 1.168、1.199、1.257、1.280、1.270 (表 3)。海南粗榧 5 个种群期望杂合度较低, 平均为 0.135, 观察杂合度也较低, 平均为 0.139, 实际观测的杂合体比率与理论期望值相当, 固定指数 F 值均接近 0, 未达到统计显著水平, 表明它们的差异不显

著(表 3)。

不同种群的不同基因位点, 基因多样性(期望杂合度)不同, 在种群中, 黎母山群的基因多样性最大(He=0.152), 吊罗山种群次之(He=0.150), 尖峰岭种群最小(He=0.108); 在位点中, Sod-2 最大(He=0.436), Amp 最小(He=0.367) (表 3), 但 5 个种群间各多态位点的配对 T 检验表明, 5 个种群

间的基因多样性的差异并不显著($P < 0.05$)。

3 讨 论

Hamrick 和 Godt 曾对 165 属, 449 种植物等位酶研究结果进行了分析总结^[18], 得出不同类型植物遗传多样性水平的平均值(表 4)。由表可见, 海南粗榧的 P 、 H_e 都较其同类群(裸子植物、长命多年生木本、地区种、异交(风媒)小, 表明海南粗榧遗传多样性水平比同类群植物低; 葛颂也总结过 25 种针叶树种的研究, 指出 P 、 A 、 H_e 的均值分别为 0.615、2.26、

0.206, 可见海南粗榧的遗传多样性也比针叶植物小。Wright 指出, 物种的分布区域通常是影响遗传多样性水平的主要因子, 一般自然分布范围大的种比分布范围小的种包含较多的遗传多样性^[20]。在海南岛, 海南粗榧仅分布在海拔 700~1 100 m 的山地雨林中^[5, 6], 分布范围较窄, 其遗传多样性水平较低与 Wright 观点相吻合。

海南岛山系以五指山为中心, 黎母山、坝王岭、尖峰岭、吊罗山座落四周^[21]。黎母山种群预期杂合度和观察杂合度都比其它四个种群高, 显示黎母山

表 4 植物不同类型的遗传变异水平及种群分化程度(摘自 Hamrick 和 Godt)

Table 4 Genetic diversity of different plants from Hamrick & Godt

不同类型植物 Plants types	物种数 Numbers of species	P	H_e	G_s
分类地位 Taxonomical ranking				
裸子植物 Gymnosperm	55-80	0.709	0.173	0.068
双子叶植物 Dicotyledon	246-338	0.448	0.136	0.273
单子叶植物 Monocotyledon	80-111	0.592	0.181	0.231
生活型 Life form				
一年生 An annual plant	146-190	0.507	0.161	0.357
短命多年生草本 Short-lived perennial herbaceous plant	119-159	0.413	0.116	0.233
短命多年生草本 Short-lived perennial woody plant	8-17	0.418	0.097	0.088
长命多年生木本 Long-lived perennial woody plant	110-131	0.647	0.177	0.076
分布范围 Spread scope				
特有种 Endemic species	52-100	0.400	0.096	0.248
窄域种 Narrow species	82-115	0.451	0.137	0.248
地区种 Aboriginal species	180-193	0.529	0.150	0.116
广布种 Eurytopic species	85-105	0.589	0.202	0.210
繁育系统 Breeding system				
自交 Inbred	78-123	0.418	0.124	0.510
混交(动物) Mixed breeding (animal)	60-85	0.400	0.120	0.216
异交(动物) Outbred (animal)	124-172	0.501	0.167	0.197
异交(风媒) Outbred (anemophilous plant)	102-134	0.661	0.162	0.099

种群具有较高的遗传多样性水平。针叶树种种群边缘区和中心区遗传多样性研究结果表明^[22], 中心区种群的遗传多样性通常比边缘区高, 而海南粗榧分布边缘区的黎母山种群的遗传多样性较高, 与这一结论不相吻合。其主要原因可能与海南岛盛行的风向有关。因为海南粗榧在海南岛可能曾经数量较多且连续分布, 种群间有强大的基因流。种子的扩散, 花粉的传播都是以风为动力, 风是影响基因流数量、方向的一个重要因素。海南岛属热带季风气候, 夏季盛行东南偏东风, 冬季偏行东北风, 春秋两季为季风环流转换的过渡季节, 且春季有短期的西南风^[21]。在地理位置上, 坝王岭、尖峰岭、黎母山为鹦歌岭山系, 坝王岭—尖峰岭组成了与鹦歌岭—黎母

山平行的山脉; 而吊罗山与卡法岭为五指山系, 五指山—卡法岭也可近似地看为与吊罗山相平行的山脉, 岛上的所有山体呈东北—西南走向, 因而, 黎母山位于五指山、吊罗山西偏北, 坝王岭北偏东方, 无论是夏季的东南风, 还是春季的西南风, 带到黎母山的其它种群的基因流很多, 长期与其它种群的基因交互作用, 于是具有了比其它种群较丰富的遗传多样性。而接近海南粗榧分布中心区五指山的卡法岭种群遗传多样性水平较低, 由此可以预计分布中心区五指山种群遗传多样性可能也不会太高。

4 结 论

(1) 海南粗榧种群遗传多样性水平低, 低于一

般的裸子植物和针叶植物,因此,把海南粗榧列为国家二级珍稀濒危重点保护植物,具有科学性和合理性,但海南粗榧不仅遗传多样性水平低,而且数量少,较少的现存数量很易发生基因漂变,使遗传基因丢失^[11],所以还应加大保护力度。

(2)海南粗榧种群遗传多样性水平低,表明对环境适应力不强,生存力较弱,表现在生理生态上的特性为生长缓慢,结实率低,种子萌发困难^[20]。这是海南粗榧珍稀濒危的内因。而破坏性的开发,台风的袭击,动物对球果种子的侵食,只是它珍稀濒危的外因。因此对海南粗榧这样适应力和生存力本就较弱的濒危物种,要使它完全摆脱濒危境地,仅就地保护远远不够,还必须复壮及迁地保护,以扩大种群数量和分布区域,提高遗传多样性水平。

(3)有研究表明:杂合度愈高的群体,对环境适应力和生存力也愈强^[29]。黎母山预期杂合度和观察杂合度都比其它 3 个种群高,显示黎母山的海南粗榧具有比其它 3 个种群较强的适应力和生存力。因此,黎母山种群应为保护、复壮和科研取材的重点。

参考文献:

- [1] 陈灵芝. 中国的生物多样性——现状及保护对策[M]. 北京: 科学出版社, 1993. 99—113.
- [2] Soltis P S, D E Soltis. Genetic variation in endemic and widespread plant species: examples from Saxifragaceae[J]. *Polystichum Aliso*, 1991. **13**: 215—223.
- [3] 周世良, 张 方, 王中仁. 杭州石茅茛和石香薷的遗传多样性研究[J]. 遗传学报, 1998. **25**(2): 173—180.
- [4] 葛 颂, 王海群, 张明灿. 八面山银杉林的遗传多样性和群体分化[J]. 植物学报, 1997. **39**(3): 266—271.
- [5] 王献溥, 王有生. 海南粗榧濒危的原因和保护措施[J]. 广西植物, 1994. **14**(4): 369—372.
- [6] 王有生, 崔雯涛, 王献溥. 海南粗榧生物生态学特性初步研究[J]. 植物资源与环境, 1992. **1**(2): 63—64.
- [7] 中国科学院昆明植物研究所. 云南植物志[M]. 北京: 科学出版社, 1986. **4**: 109—116.
- [8] 王有生. 救救抗癌奇木——海南粗榧[J]. 植物杂志, 1990. **3**: 8—9.
- [9] 中国科学院植物研究所. 中国植物红皮书——濒危植物(第一册)[M]. 北京: 科学出版社, 1992. 24.
- [10] 陈小勇, 王希华, 宋永昌. 华东地区青冈种群的遗传多样性及遗传分化[J]. 植物学报, 1997. **39**(2): 149—155.
- [11] 王中仁. 植物等位酶分析[M]. 北京: 科学出版社, 1996.
- [12] 华南热带农业大学植物生理生化教研室. 生物化学实验技术[M]. 1994. 38—84.
- [13] 中山大学生物系生化微生物学教研室. 生化技术导论[M]. 沈阳: 人民教育出版社, 1979. 241—245.
- [14] Soltis D E, et al. Starch gel electrophoresis of ferns: A compilation of grinding buffers, gel and electrode buffers, and staining schedules [J]. *Amer Fern*, 1983. **73**(1): 9—29.
- [15] 葛 颂, 黄敏仁, 许 农. 马尾松 GOT、LOH 和 MDH 同工酶的遗传方式和连锁关系[J]. 遗传学报, 1987. **14**: 428—435.
- [16] 杨一平, 尹瑞雪, 张军丽, 等. 红皮云杉自然群体遗传多样性及遗传分化的研究[J]. 植物学报, 1993. **35**(6): 458—465.
- [17] Nei M. Molecular population genetics and evolution [M]. New York: Elsevier, 1975.
- [18] Hamrick J L, Godt M J W. Allozyme diversity in plantspecies [A]. In: Brown A H D, et al. Plant population genetics, breeding, and genetic resources [C]. Sunderland Mass: Sinauer, 1990. 43—63.
- [19] 葛 颂. 同工酶与林木群体遗传变异研究[J]. 南京林业大学学报, 1988. **1**: 68—75.
- [20] 李镇宇. 红桧五个族群同位酶变异之研究[D]. 国立台湾大学, 硕士论文.
- [21] 吴郁文, 韩渊采, 黄远略, 等. 我国的海南岛[M]. 北京: 商务印书馆, 1978. 18—26; 36—48.
- [22] Guries R P, F T Leding. Genetic structure of populations and differentiation of forest trees[A]. In: Proceedings of a symposium on isozymes of north American forest trees insects[C]. USDA for. Serv. Gen. Tech. ReP, 1981. Psw—48, PP. 42—47.