

燕麦草 (*Arrhenatherum elatius*) 多倍体复合体的 等位酶多样性研究

葛学军

(中国科学院华南植物研究所, 广州 510650)

John D. Thompson

(法国功能生态学和进化生态学研究中心)

摘要 对欧洲及地中海地区燕麦草复合体 27 个居群的等位酶电泳调查表明, 燕麦草复合体维持比较高的等位酶多样性 ($H_e=0.447$, $A=3.29$), 亚种间遗传分化较小 ($G_{ST}=0.053$); 在四个亚种内, 也维持着比较高的多样性 ($H_e:0.325-0.533$), 各亚种内的基因多样性主要存在于居群之内, 居群间分化较小。四倍体的基因多样性高于二倍体的。燕麦草复合体内居群间基因流较高, 表明燕麦草繁育方式主要为风媒远交。对 Nei 氏标准遗传距离的 UPGMA 聚类结果表明, 四倍体是从二倍体有鳞茎的 *ssp. baeticum* 中产生的。

关键词 燕麦草; 等位酶多样性; 多倍体

ALLOZYME DIVERSITY IN POLYPLOID COMPLEX OF *ARRHENATHERUM ELATIUS*

Ge Xuejun

(South China Institute of Botany, Academia sinica, Guangzhou 510650)

John D. Thompson

(Centre d'Ecologie Fonctionnelle et Evolutive, CNRS, B.P.5051, 34033 Montpellier CEDEX 01, France)

Abstract A total of 27 populations of *Arrhenatherum elatius* collected from Europe and Mediterranean area were sampled and scored for electrophoretic variation at 3 loci. The level of genetic diversity was high in *A. elatius* and its four subspecies ($H_e:0.325-0.533$). The total gene diversity in each subspecies was mainly maintained within populations. There were high gene flow estimates among populations ($G_{ST}:0.035-0.1459$). The tetraploid subspecies exhibited higher diversity than diploid subspecies. The result of UPGMA on Nei's standard genetic distance showed that the tetraploid form was derived from the bulbiferous diploid plants.

Key words *Arrhenatherum elatius*; Allozyme diversity; Polyploid

等位酶分析早已表明, 在植物种内等位酶多样性的数量和格局存在着相当多的变异。通过对

一个种的等位酶分析, 就可以推断居群内的遗传变异和结构, 了解种内居群间的遗传分化, 由此还可以推断居群间的基因流大小、繁育隔离程度及它们的历史渊源关系。

多倍体在被子植物进化中发挥着重要作用。据 Grant 估计, 大约 47% 的分类群是多倍体^[1]。多倍性具有增加一个种的遗传变异、进化及生态幅的潜力^[2]。尽管在农业生产上为了达到增产、抗病及杂交育种等目的, 广泛地使用多倍体, 但是对野生种中多倍体的适应价值则了解很少, 对多倍体进化的详细研究就更少^[3]。

燕麦草复合体是一个多倍体复合体, 它包括二个二倍体亚种 *ssp. baeticum* 和 *ssp. sardoum*, 及二个四倍体亚种 *ssp. bulbosum* 和 *ssp. elatius*。二个二倍体亚种主要分布在地中海周围, 二个四倍体亚种则在欧洲广泛分布。据观察, 四倍体亚种对于环境变化的适应很快, 具有较强的扩展、迁移能力及存活能力。在此复合体中, 一个二倍体亚种 *ssp. baeticum* 和一个四倍体亚种 *ssp. bulbosum* 在其根须基部长有小鳞茎, 可行无性生殖。

本文的目的就是利用等位酶标志, 测定燕麦草复合体内的遗传变异水平及其结构, 比较不同亚种间的系统关系, 并对四倍体的起源进行探讨。

1 材料和方法

1.1 材料 代表 4 个亚种的 27 个居群分别采自英国、法国、西班牙及摩洛哥。从每一植株的穗上取一粒种子萌发, 长大后栽培在作者 Thompson 所在单位的温室中。

1.2 提取方法 取幼嫩的叶子, 在 0℃ 的器皿中切碎、研磨。器皿中加有干净的石英砂, 使用 Tris-HCl 缓冲液; 然后在低温离心机中离心, 取其上清液, 存放在 -80℃ 冰柜中备用。

1.3 电泳 水平淀粉凝胶电泳, 淀粉浓度为 12%。将上清液用双层 3×10mm Whatman 3 号滤纸片吸取, 然后插入凝胶中, 在 5℃ 下进行电泳。选用了 Poulik^[4] 和 Second^[5] 电泳缓冲液系统, 染色方法见 Lumaret^[6]。

1.4 数据处理

为了度量居群内的遗传变异进行了下列统计: 等位基因平均数 (A); 有效等位基因数 (Ae); 居群水平的有效等位基因数 (Aep); 基因多样性 (He)。在种和亚种水平上, 上述统计值为各居群统计的平均。

对于居群间的分化度量, 采用了 Nei^[7] 氏基因多样性法。H_T 为总居群的基因多样性, H_S 为亚居群内基因多样性, D_{ST} 为亚居群间基因多样性, G_{ST} 为基因分化系数。还计算了 Wright 的基因流估计 (Nm_w), 这里 $Nm_w = (1 - G_{ST}) / 4G_{ST}$ 。

为了比较居群间的亲缘关系及探讨多倍体的可能起源, 计算了所有居群配对的遗传一致度 (I) 和遗传距离 (D)^[8,9], 并对遗传距离进行了 UPGMA 聚类, 作出树状进化图。

2 实验结果

2.1 酶系统及酶谱解释

我们对 27 个居群的 6 个酶系统进行了电泳分析, 这 6 种酶是: 磷酸葡糖异构酶 (PGI)、乙

醇脱氢酶 (ADH)、谷氨酸转氨酶 (GOT)、过氧化物酶 (POX)、酸性磷酸酶 (PAC) 及酯酶 (EST)。由于后三种酶的酶谱非常复杂, 故暂时没有对其进行遗传学解释。GOT、ADH、PGI 每一种酶只有一个位点。已知的亚基组成及遗传实验表明, 这三种酶均为二聚体酶。其中 PGI 展现了 10 个等位基因, ADH 有 5 个等位基因, GOT 有 6 个等位基因 (见表 1)。

表 1 四个亚种中 PGI、ADH 和 GOT 的等位基因频率 (%)
Table 1 Mean allele frequencies (%) of PGI, ADH and GOT for four subspecies of *A. elatius*

Alleles	ssp. <i>baeticum</i>	ssp. <i>sardoum</i>	ssp. <i>bulbosum</i>	ssp. <i>elatius</i>
PGI	1.33	1	1.5	
	1.25	1	1.8	0.4
	1.17	10	20.3	13.2
	1.10			2.7
	1.00	55	73.8	67.9
	0.90			2
	0.83	28	2.1	11
	0.75	2		2.2
	0.60	3	0.3	0.8
	0.40			0.4
ADH	1.15		1.3	0.35
	1.10	37	4.3	43.6
	1.00	13	60.3	22.6
	0.94			1.3
	0.88	50	35.4	33.5
GOT	1.18		0.5	0.8
	1.09		1	1.4
	1.00	93	92.4	67.6
	0.90			0.9
	0.80	7	7.6	28.9
	0.60			0.02

PGI = 磷酸葡萄糖异构酶 Phosphoglucosomerase; ADH = 乙醇脱氢酶 Alcohol dehydrogenase; GOT = 谷氨酸转氨酶 Glutamate transaminase

2.2 种和亚种的遗传变异水平

所有居群的等位基因平均数 (A) 是从 1.67 到 4.67, 平均为 3.29; 有效等位基因数 (A_{ep}) 是从 1.1 到 2.5, 平均为 2.0; 基因多样性 (H_e) 是从 0.084 至 0.558, 平均为 0.447。

每一个亚种的遗传变异水平见表 2。在四个亚种中, 四倍体二亚种的有效等位基因数和基因多样性均高于二倍体二亚种, 表现出较高的遗传变异水平。

2.3 居群间、亚种间的遗传分化

燕麦草总的基因多样性 (H_T) 为 0.514, 亚种内的基因多样性 (H_s) 为 0.487, 基因分化系数 (G_{ST}) 为 0.053。

表 2 四个亚种的等位酶变异统计
Table 2 Summary of allozyme variation for four subspecies of *A. elatius*

Taxon	A	A _{ep}	H _e
ssp. <i>baeticum</i>	4	2.04	0.396
ssp. <i>sardoum</i>	2.95	1.66	0.325
ssp. <i>bulbosum</i>	3.2	2.16	0.51
ssp. <i>elatius</i>	3.32	2.13	0.533

A = Mean number of alleles per locus; A_{ep} = Effective number of alleles per locus at population level; H_e = Genetic diversity index.

在每一个亚种内, 基因多样性又被分解为居群内的和居群间的多样性。在 *ssp. sardoum* 中, 尽管它展现出最低的总的基因多样性 ($H_T=0.415$), 但是它 14.59% (G_{ST}) 的多样性被分解到居群之间, 而 *ssp. baeticum* 虽然总的基因多样性比 *ssp. sardoum* 高 ($H_T=0.428$), 但只有 3.55% 的基因多样性发生在居群之间。

在四倍体二亚种中, *ssp. bulbosum* 总的基因多样性在四个亚种中最大, 但只有 5.95% 的基因多样性分解在居群之间, 而 *ssp. elatius* 的基因分化系数要略大一些, 为 8.1%。

在观察到的 21 个等位基因中, 有 1 个等位基因为二倍体二亚种所特有, 9 个等位基因为四倍体二亚种特有。其中 2 个为四倍体的 *ssp. bulbosum* 特有。这些基因的频率均很低。采用 Wright 公式对各亚种的基因流估计值见表 3。其中 *ssp. baeticum* 内居群之间的基因流最大, *ssp. sardoum* 的最小。在整个种内, 基因流估计值为 4.47。

表 3 四个亚种的基因多样性分解统计和基因流估计值

Table 3 Nei's (1973) statistics of genetic diversity and estimates of gene flow for four subspecies of *A. elatius*

Taxon	H_S	H_T	D_{ST}	G_{ST}	Nmw
<i>ssp. baeticum</i>	0.423	0.428	0.015	0.035	6.89
<i>ssp. sardoum</i>	0.354	0.415	0.061	0.1459	1.46
<i>ssp. bulbosum</i>	0.537	0.571	0.034	0.0595	3.95
<i>ssp. elatius</i>	0.489	0.532	0.043	0.081	2.8
<i>A. elatius</i>	0.487	0.514	0.027	0.053	4.47

表 4 四个亚种间的 Nei 氏遗传一致度和遗传距离

Table 4 Nei's standard genetic identity and genetic distance among four subspecies of *A. elatius* (Distance: top right; Identity: bottom left)

	1	2	3	4
<i>ssp. baeticum</i> (1)	—	0.134	0.085	0.061
<i>ssp. sardoum</i> (2)	0.874	—	0.161	0.118
<i>ssp. bulbosum</i> (3)	0.918	0.851	—	0.007
<i>ssp. elatius</i> (4)	0.940	0.888	0.992	—

在复合体所有居群可能的 351 个配对中, 平均遗传一致度为 0.847, 范围是从 0.446 到 0.991, 这说明了种内不同居群之间存在着很大的差异。但是四个亚种间的遗传一致度是从 0.851 到 0.992, 平均为 0.911(见表 4)。一般来讲, 同一分类群内居群间的平均遗传一致度大于 0.90^[10]。将燕麦草四个亚种作为一个复合体种的处理看来是合适的。在四个亚种内, 各居群配对间的平均遗传一致度从 0.839 至 0.959(见表 5), 其中只有 *ssp. bulbosum* 的值小于 0.90, 说明了这一亚种内居群间的差异较大。在四个亚种间居群配对的平均遗传一致度中, *ssp. sardoum* 和 *ssp. bulbosum* 居群间配对的值最小, 同时变化也最大 (0.424-0.992), 说明了这两个亚种的差异最大。

表 5 四个亚种内居群间配对遗传一致度的平均值及其变异范围

Table 5 Matrix of genetic identities averaged over populations from four subspecies

	<i>ssp. baeticum</i> (1)	<i>ssp. sardoum</i> (2)	<i>ssp. bulbosum</i> (3)	<i>ssp. elatius</i> (4)
1	0.929 (0.893-0.961)			
2	0.818 (0.613-0.910)	0.959 (0.914-0.991)		
3	0.805 (0.576-0.943)	0.741 (0.424-0.992)	0.839 (0.563-0.984)	
4	0.854 (0.737-0.974)	0.874 (0.655-0.981)	0.869 (0.675-0.973)	0.938 (0.858-0.978)

括号内为变异范围 Range are given in brackets

聚类分析结果表明(图 1、2), *ssp. baeticum* 和四倍体二亚种亲缘关系较近, 二个四倍体亚种的所有居群可以分为二个部分即对应的二个亚种, 但有几个居群被聚在另外的一个亚种中, 有二个居群, 即 Pop 11 和 19, 它们的位置比较孤立, 和所有其它居群的关系较远。

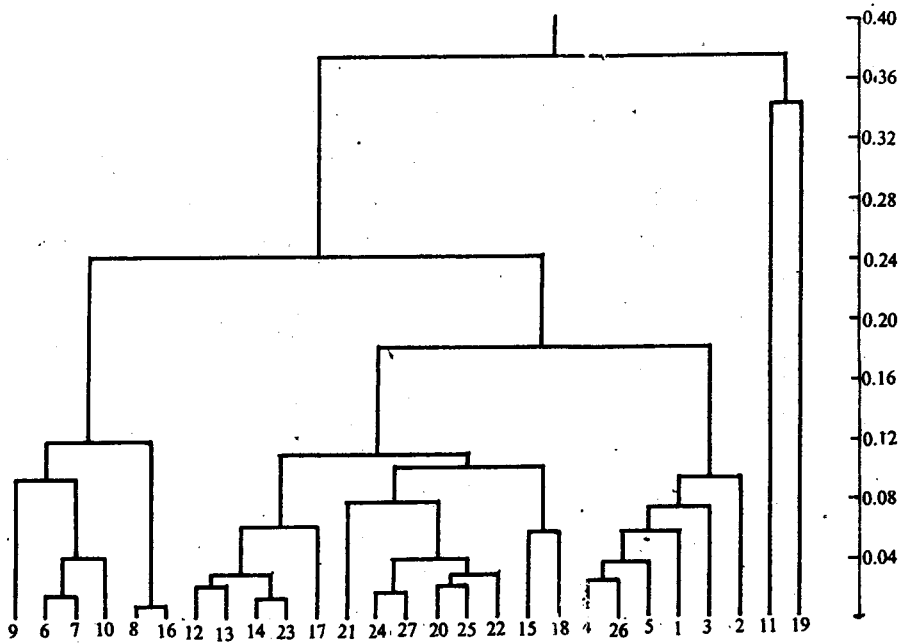


图1 对27个居群配对的Nei氏标准遗传距离的UPGMA聚类树状进化图

Fig. 1 Phenogram of relationships among populations of *Arrhenatherum elatius* complex based on UPGMA clustering of Nei's standard genetic distance values

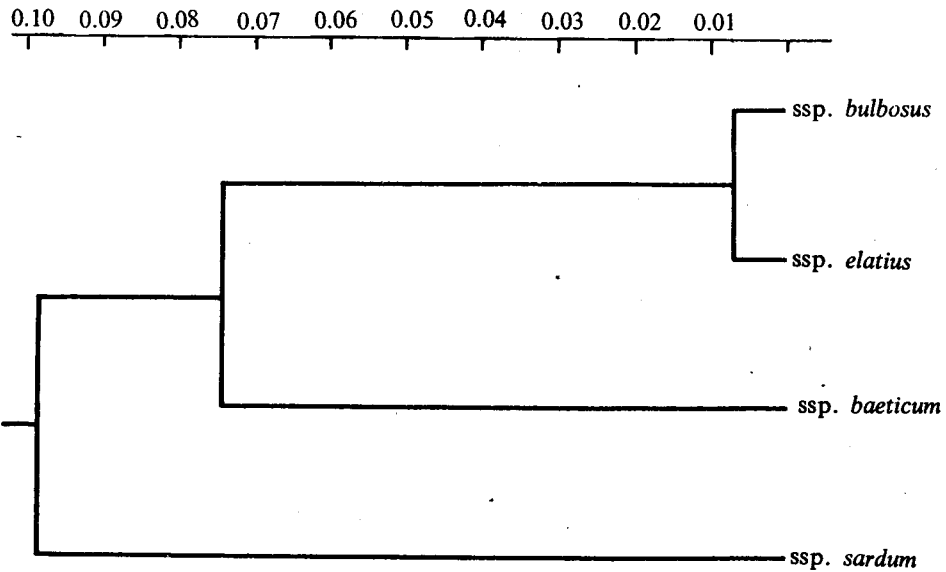


图2 对四个亚种的Nei氏标准遗传距离的UPGMA聚类树状进化图

Fig. 2 Phenogram of relationships among four subspecies of *Arrhenatherum elatius* complex based on UPGMA clustering of Nei's standard genetic distance values

3 讨论

3.1 遗传多样性的数量与分布格局

Hamrick 和 Godt^[11] 曾对植物物种的等位酶多样性做了全面的总结。其中在植物物种水平上, 平均等位基因数(A)为 1.96, 基因多样性为 0.15, 基因分化系数为 0.22。相比之下, 燕麦草各居群、各亚种均表现出了较高的多样性水平及较低的分化水平(表 3、4)。

在一系列影响遗传变异水平的因子中, 燕麦草复合体具有一些形成较高遗传变异水平的特征, 如风媒、远交、广泛分布等等^[12]。

Hamrick^[12] 认为, 居群间等位酶变异的分布格局是数个进化因子相互作用的产物。这些因子中, 重要的是选择、居群有效大小及物种传播和扩散其种子、花粉的能力。而起主要作用的就是与花粉传播有关的繁育系统。

根据 Hamrick^[12] 对物种基因流(Nmw)的总结认为, 具自交繁育方式的物种, 其 Nmw 平均值为 0.265, 具风媒远交繁育方式物种的 Nmw 平均值为 4.75。相比而言, 燕麦草的基因分化系数(0.053)和基因流估计值(4.47)均接近于风媒远交物种的基因分化系数平均值(0.068)和基因流估计值的平均值(4.75)^[12]。这反映了燕麦草的繁育方式可能主要为风媒远交。繁育系统实验结果(另文发表)表明, 二倍体二亚种具自交不亲合性, 专性远交。而风媒远交促进了居群间的基因交流, 表现出较低的居群间分化水平。四倍体二亚种由于具有自交亲合性, 可行自交、远交混合繁育方式, 减少了居群间的基因流, 但从 Nmw 值上看, 它们仍以远交为主。二倍体无小鳞茎的 *ssp. sardoum*, 其 Nmw 值最小, 其原因一方面是因为无小鳞茎不能行无性生殖, 另一方面可能是因为无小鳞茎造成了生命周期缩短而形成的。这是因为, 当生命周期缩短时, G_{ST} 有加大的趋势^[13]。

多倍性是一种允许植物增加杂合性, 即遗传多样性的机制。研究结果表明, 四倍体分类群较其相关的二倍体祖先具有较高的等位基因数及较高的基因多样性水平^[14]。从表 2 中可以看出, 燕麦草四倍体二亚种较二倍体二亚种均具有较高的等位基因数和基因多样性。

在四个亚种中, 可行无性生殖有小鳞茎的亚种与四倍体只能行有性生殖无小鳞茎的亚种相比, 在遗传结构上表现出明显的差异。这就是: (1)有小鳞茎的亚种遗传变异水平较高; (2)无小鳞茎的亚种内居群间分化较大, 有小鳞茎的亚种居群间基因流比较强烈, 居群间分化较小。

那些既行有性生殖, 又行无性生殖的居群具有比较高的总的基因多样性和较低的居群分化^[13]。燕麦草四亚种的遗传变异水平及分布就符合这一趋势。

3.2 四倍体起源

借助等位酶电泳资料来推测、验证多倍体起源已在许多类群中成功应用, 如 *Dactylis*^[6]、*Tolmiea*^[15]等。在燕麦草复合体中, 根据形态特征, 推测四倍体是由二倍体祖先染色体加倍形成的。具体讲, 就是由 *ssp. sardoum* 产生 *ssp. elatius*, 由 *ssp. baeticum* 产生 *ssp. bulbosum*。但是聚类结果却表明, 二倍体有鳞茎的 *ssp. baeticum* 和四倍体居群间亲缘关系较近。二个四倍体亚种是共同起源后才发生趋异的。

从等位基因分布上看, 在二倍体二亚种中, PGI (0.75) 为有鳞茎的 *ssp. baeticum* 的独特基因, 而这个等位基因在四倍体二亚种中均存在, 也说明了二倍体的 *ssp. baeticum* 可能是四倍体

的一个祖先。

四倍体中具有9个等位基因在推断的二倍体祖先中不存在。那么同源多倍体起源的假设就值得重新考虑。它可能是通过杂交形成的异源多倍体,今后可通过测定“固定杂合性”来验证。如果是异源多倍体,就需要进行更多的野外采集,来寻找验证其它的可能的亲本。

在图1中,居群11和19的位置比较孤立,它们均属于四倍体有鳞茎的 *ssp. bulbosum*。在居群11中,其PGI (1.10)的频率很高,而居群19中,GOT (0.60)的频率很高。其它居群的PGI (1.10)和GOT (0.60)频率均很低。其原因可能是因为附近有其它二倍体祖先,而我们却没有采集到。这两个居群和其它居群配对的遗传距离值也最大,平均为0.35 (0.189–0.805)和0.34 (0.158–0.856)。

在二倍体 *ssp. baeticum* 聚类群中,属于四倍体 *ssp. elatius* 的居群26也在里面。它的GOT酶固定指数(F)为0.40,表示本居群有中等程度的自交,与其它四倍体居群间的基因流较少。它的遗传变异水平较低,与二倍体二亚种的相似。

四倍体有鳞茎的 *ssp. bulbosum* 居群间存在着较大的差异 ($I = 0.839, 0.563 - 0.984$)。这可能是由于从二倍体中演生出来后,又发生了分化。这些居群可能不属于一个亚种。

参考文献

- 1 Grant V. Plant Speciation (2nd ed). Columbia University Press, New York, 1981
- 2 Hunziker J H, Schall B A. Isozyme variation in diploid tropical and octoploid subtropical-temperate species of *Bulnesia*. *J Heredity*, 1983, 74:358–360
- 3 Thompson J D, Lumaret R. The evolutionary dynamics of polyploid plants: origin, establishment and persistence. *Trends in ecology and evolution*, 1992, 7:302–307
- 4 Poulik M D. Starch gel electrophoresis in a discontinuous system of buffers. *Nature*, 1957, Lond., 180:1477
- 5 Second G. Origin of the genic diversity of cultivated rice (*Oryza spp.*): study of the polymorphism scored at 40 isozyme loci. *Jpn J Genet*, 1982, 57:25–57
- 6 Lumaret R. Structure genetique d'un complexe polyploide *Dactylis glomerata* L. Thesis Montpellier. France, 1981
- 7 Nei M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Pro Nat Acad Sci, USA*, 1973, 70:3321–3323
- 8 Nei M. Genetic distance between populations. *American Naturalist*, 1972, 106:283–292
- 9 Nei M. *Molecular Population Genetics and Evolution*. Amsterdam: North Holland Publ. Co., 1975
- 10 Crawford D. Phylogenetic and systematic inferences from electrophoretic studies. In Tanksley S O, Orton T J eds. *Isozymes in Plant Genetics and Breeding, Part A*, Elsevier, Amsterdam, 1983, 257–287
- 11 Hamrick J L, Godt M J W. Allozyme diversity in plant species. In: Brown A H D et al. eds. *Plant Population genetics, Breeding, and Genetic Resources*. Sinauer. Sunderland, MA. 1990, 43–63
- 12 Hamrick J L. Isozymes and analysis of genetic structure in plant populations. In: Soltis D E, Soltis P S eds. *Isozymes in Plant Biology*, Portland, Oregon: Dioscorides Press, 1989, 87–105
- 13 Loveless M D, Hamrick J L. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. *Ann Rev Ecol Syst*, 1984, 15:65–95
- 14 Brett G P, Bayer R J. Genetic diversity in the tetraploid sanddune endemic *Deschampsia mackenzieana* and its widespread diploid progenitor *D. cespitosa* (Poaceae). *Amer J Bot*, 1995, 82(1):121–130
- 15 Soltis D E, Rieseberg L H. Autopolyploidy in *Tolmiea monziesii* (Saxifragaceae): Genetic insights from enzyme electrophoresis. *Amer J Bot*, 1986, 73(2):310–318