

柚品种的等位酶变异研究

张太平*, 彭少麟, 王峥峰, 凌定厚

(中国科学院华南植物研究所, 广东 广州 510650)

摘要: 研究了柚的 48 个品种的等位酶变异。利用等位酶分析技术对柚的酯酶 (EST)、6-磷酸葡萄糖异构酶 (PGI)、6-磷酸葡萄糖变位酶 (PGM)、莽草酸脱氢酶 (SKD)、超氧化物歧化酶 (SOD) 共 5 个酶系统的 10 个等位酶基因座进行了分析。除 PGI-1、PGI-2 两个基因座外, 其它 8 个均为多态性基因座; 10 个等位酶基因座共观察到的等位基因 25 个, 平均每个基因座的有效等位基因数目为 1.55, 基因多样性 0.2805。柚的品种间具有较为丰富的等位酶标记遗传多样性, 但柚类种质资源群体总的遗传多样性水平偏低。柚的较低的有效等位基因数目与基因多样性可能由于人工选择及资源流失造成。

关键词: 柚; 等位酶; 遗传多样性

中图分类号: Q946.5

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2001)01-0055-08

ALLOZYME VARIATION IN POMELO [CITRUS GRANDIS (L.) OSBECK]

ZHANG Tai-ping*, PENG Shao-lin, WANG Zheng-feng, LING Ding-hou

(South China Institute of Botany, the Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China)

Abstract: Allozyme variation was examined in 48 pomelo cultivars from the collection nursery of the Chinese Academy of Agricultural Sciences. Ten loci observed in 5 enzyme systems, Esterase (EST), Phosphoglucosomerase (PGI), Phosphoglucosomutase (PGM), Shikimate dehydrogenase (SKD), and Superoxide dismutase (SOD) were encoded by 25 alleles. Except for 2 loci of PGI, all other 8 loci were polymorphic. Effective number of alleles per locus was 1.55, and the expected heterozygosity was 0.2805, which were comparatively low. Pomelo cultivars are rich in allozymic genetic diversity. Lower level of total germplasm diversity is probably due to a long history of artificial selection and gene loss.

Key words: Pomelo; *Citrus grandis* (L.) Osbeck; Allozyme; Genetic diversity

“等位酶” (allozyme) 指的是核基因编码的不同基因座的等位基因相对应的酶。实际上等位酶是同工酶的一种特殊形式, 有时也叫等位同工酶。“等位酶”分析技术已基本成熟, 它的基本要求是按个体提取具活性的酶然后电泳、染色。所以准备材料时要注意严格按个体取样, 保持酶不被失活, 电泳完毕, 进行特异性酶染色以得到可见的等位酶带谱^[1-3]。为正确解释等位酶带

收稿日期: 2000-06-15

基金项目: 中日美国国际合作华南退化坡地绿色食品生产及保护与提高生物多样性研究项目 (199906); 中国科学院院地合作项目 (1999 年度); 广东省科技百强创新工程项目 (1999-2000 年度)。

*现工作地址: 华南理工大学造纸与环境工程学院环境科学与工程系, 广州 510641

A、B、C 三种类型的酶带。

栽培植物由于人工选育驯化、遗传变异和近亲繁殖等因素, 老的品种及育种系被淘汰, 造成遗传多样性流失, 遗传单一, 由此造成栽培植物群体在遗传多样性水平上远远低于野生群体, 出现遗传多样性“瓶颈”^[18,19]。柚的种质资源具有较为丰富的等位酶标记遗传多样性, 其品种间等位酶多态性基因座百分率高达 80%。但另一方面, 柚品种间的有效等位基因数目为 1.55, 基因多样性 0.2805, 不管是在野生植物还是在栽培植物中都是较低的。柚的栽培品种大部分是通过从自交或杂交甚至有柑桔属的种间杂交的后代中选育, 一般从中选取具有优良经济属性的个体, 以酸柚或柑桔属其他种作为砧木, 然后通过嫁接等方式进行无性繁殖, 大量的育种材料被淘汰, 柚类品种中只有少数是通过有性繁殖。柚的遗传多样性主要存在于品种间, 所以每一品种材料都是一份宝贵的遗传资源, 在种质资源保护中尤其要注意不同品种特别是传统的地方品种的收集与保护。

很明显, 柚的人工选育过程不可避免地会丧失某些特定基因, 降低柚的种内遗传多样性。过去各地都保存着大量的地方品种或原始栽培品种及育种材料, 但随着工业的发展, 农业的集约化, 各地一般都采用遗传单一的现代高产栽培品种(系), 原始的栽培品种、育种系、突变体等被大量淘汰, 品种逐渐单一化, 大量的遗传资源被破坏。如不注意对传统品种、育种系、突变体的保护, 可能会进一步造成柚的遗传多样性“瓶颈”。

参考文献:

- [1] Wendel N F, Weeden J F. Visualization and interpretation of plant isozyme [A]. In: Soltis D E, Soltis P S. Isozymes in Plant Biology [M]. Portland, Oregon, USA: Dioscorides Press, 1989, 5-45.
- [2] 王中仁. 植物等位酶分析 [M]. 北京: 科学出版社, 1994.
- [3] Soltis D E, Soltis P S. Isozymes in Plant Biology [M]. Portland, Oregon, USA: Dioscorides Press, 1989, 87-105.
- [4] Parker P G, Snow A A, Schug M D, et al. What molecules can tell us about populations: choosing and using a molecular marker [J]. Ecology, 1998, 79(2):361-382.
- [5] Chamberlain J R. Isozyme variation in *Calliandra calothyrsus* (Leguminosae): Its implications for species delimitation and conservation [J]. Amer J Bot, 1998, 85(1):37-47.
- [6] Garvin D F, Weeden N F. Isozyme evidence supporting a single geographic origin for domesticated tepary bean [J]. Crop Sci, 1994, 34:1390-1395.
- [7] Rider C C, Taylor C B. Isozymes [M]. Chapman and Hall, 1980, 3-12.
- [8] Weeden N F, Emmo A C. Isozyme characterization of Kentucky bluegrass cultivars [J]. Can J Plant Sci, 1985, 65: 985-994.
- [9] 李军, 陶芸, 郑师章, 等. 同工酶水平上野生大豆种群内分化的研究 [J]. 植物学报, 1995, 37(9):669-676.
- [10] 方德秋, 章文才, 肖顺元. 应用同工酶进行柑橘分类和进化研究 [J]. 植物分类学报, 1993, 31(4):329-352.
- [11] Hartl D L, Clark A G. Principles of Population Genetics [M]. 2nd ed. Sunderland MA: Sinauer Associates, 1989, 125.
- [12] 陈家宽, 杨继. 植物进化学 [M]. 武汉: 武汉大学出版社, 1994, 153-194.

酶液提取 酶提取缓冲液参见方德秋^[10]、王中仁^[2]配制,取冰冻保鲜叶片 0.5 g,加入 5 ml 提取缓冲液(0.1 mol/L Tris-HCl 缓冲液, pH8.0, 内含 0.45 mol/L 蔗糖, 0.006 mol/L 维生素 C, 0.006 mol/L L-半胱氨酸, 0.002 mol/L EDTA-Na₂, 14 mmol/L β -巯基乙醇), 研磨匀浆, 在 0℃、12000×g 下离心 30 min, 将上清液倒入干净离心管, -30℃保存备用。

酶电泳 采用不连续双垂直板聚丙烯酰胺凝胶电泳法。分离胶浓度 6%—10%, 浓缩胶 2.5%—3.75%, 电泳缓冲液为 pH8.3 的 Tris-甘氨酸或 pH8.5 的 Tris-柠檬酸缓冲液。电泳前取适量的冰冻酶液在冻冷的比色板上解冻后上样。电泳在 4℃ 的冰箱中进行, 采用恒流法, 每样品槽电流强度为 1.5—2.0 mA。

等位酶染色 共分析了 5 个酶系统, 各酶系统的参数及染色方法见表 2。

表 2 酶系统参数及染色方法

Table 2 Parameters of the isozymes analyzed in the experiment

酶系统名称 Isozymes	缩写 Abbreviations	国际酶学会统一编号 EC No.	染色方法 References for dyeing method
酯酶 Esterase	EST	EC.3.1.1	胡能书 (1986)
6-磷酸葡萄糖异构酶 Phosphoglucoisomerase	PGI	EC.5.3.1.9	王中仁 (1994)
6-磷酸葡萄糖变位酶 Phosphoglucomutase	PGM	EC.2.7.5.1	王中仁 (1994)
莽草酸脱氢酶 Shikimate dehydrogenase	SKD	EC.1.1.1.25	王中仁 (1994)
超氧化物歧化酶 Superoxide dismutase	SOD	EC.1.15.1.1	罗广华等 (1983)

电泳结果的等位酶分析 酶谱分析方法根据王中仁^[2]介绍的等位酶分析技术, 获得各样品的酶基因座及其基因型, 按 PopGene 32 程序要求, 编成数据文件。计算柚的群体遗传结构指标: 等位基因频率 (Allele frequency); 多态性基因座百分率 (P), Nei (1975) 将多态基因座定义为: 当居群中某基因座有二个或二个以上的等位基因且每个等位基因的频率均在 0.01 以上时, 该基因座被称为多态的, 否则即为单态的, 所有多态性基因座占总基因座的百分数称为多态性基因座百分数; 有效等位基因数目 (ne), 结合每个基因座上等位基因的平均数目及其等位基因的频率, 反映每个等位基因在遗传结构中的重要性^[11]; 期望杂合度 (Expected heterozygosity, h_e) 和平均期望杂合度 (Mean expected heterozygosity, H_e), H_e 是根据 Hardy-Wenbergl 平衡定律推算出来的理论杂合度, 在随机交配的居群中 H_e 代表居群中杂合体的比例, 而在非随机交配生物类群中 H_e 只是杂合体的一个理论期望值, 但仍是生物类群遗传变异的理想测度, 故 Nei (1973) 认为应把 H_e 称为“基因多样性 (Gene diversity)”^[12]; 香农信息指数 (Shannon Index SI), 来源于信息论, 表示多样性的一种测度。

2 结果与分析

2.1 同工酶电泳结果

根据王中仁^[2]介绍的等位酶分析技术, 酶的英文名缩写代表酶系统, 其后的数值代表不同基因座, 大写英文字母表示基因型, 出现频率较大的等位基因表示为 A, 其次为 B, 依次类推。当有不表达 (Silent) 的等位基因时, 作为最后一个等位基因。根据实验结果, 对 5 个酶系统进

数目为 1.55, 相对偏低, 这与大部分栽培植物的同工酶研究结果一致。一般认为, 栽培植物的人工选育驯化, 往往导致大量等位基因的流失。进一步从对所有基因座的遗传变异的统计结果来看, 所有基因座的香农信息指数为 0.4784, Nei (1973) 的平均期望杂合度为 0.2805, 在栽培植物中属于中等水平, 参见表 6。

表 3 柚的各品种 10 个基因座的等位酶基因型
Table 3 Allozymic genotype of pomelo cultivars used in the experiment

样品 Sample	基因座 Locus**										样品 Sample	基因座 Locus**									
	L ₁	L ₂	L ₃	L ₄	L ₅	L ₆	L ₇	L ₈	L ₉	L ₁₀		L ₁	L ₂	L ₃	L ₄	L ₅	L ₆	L ₇	L ₈	L ₉	L ₁₀
1*	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AB	AA	AB	AA	25	AB	AA	AA	AA	AB	AA	AB	AB	AA	AA
2	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AB	AA	AB	AA	26	AB	AA	AA	AA	AB	AA	AB	AB	AA	AA
3	AB	AA	AA	AA	AB	AA	AA	AB	AB	AA	27	AB	AA	AA	AA	AB	AA	AB	AA	AA	AA
4	AB	AA	AA	AA	AA	AB	AB	AB	AA	AA	28	AB	AA	AA	AA	AA	AA	AB	AA	AA	AA
5	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AB	AB	AA	AA	29	AB	AA	AA	AA	AA	AA	AB	AA	AA	AA
6	AB	AA	AA	AA	AA	AB	AA	AB	AA	AA	30	BB	AA	AA	AA	CC	AA	AB	AA	AA	BB
7	AB	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AB	AA	AA	31	AB	AA	AA	AA	AA	AB	AB	AB	AA	AA
8	BC	AA	AA	AA	BB	BB	AB	AA	AA	AA	32	BC	AA	AA	AA	AB	BB	AB	AB	AA	AA
9	AA	AA	AA	AA	AB	AA	AB	AB	AA	AA	33	AB	AA	AA	AA	AB	CC	AB	AB	AA	AA
10	BB	AA	AA	AA	AB	CC	AA	AB	AA	AA	34	AB	AA	AA	AA	AB	CC	AB	AA	AA	AA
11	BB	AA	AA	AA	AB	CC	AB	AB	AA	AA	35	AA	AA	AA	AA	BB	AA	AB	AA	AA	AA
12	AA	AA	AA	AA	BB	AA	AB	AA	AA	AA	36	AA	AA	AA	AA	AB	AA	AB	AB	AA	AA
13	BD	AB	AA	AA	AB	BB	CD	AB	AB	AA	37	AA	AA	AA	AA	AB	AA	AB	AA	AA	BB
14	AA	AA	AA	AA	AB	AA	AA	AB	AA	AA	38	AA	AA	AA	AA	AB	AA	AB	AB	AA	AA
15	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AB	AB	AA	AA	39	AA	AB	AA	AA	AA	AB	AB	AA	AB	AA
16	BC	AA	AA	AA	AA	AB	AB	AB	AA	AA	40	AA	AA	AA	AA	AB	AA	AB	AB	AA	AA
17	BC	AA	AA	AA	BB	AA	AB	AA	AA	AA	41	BD	BB	AA	AA	AC	AD	AB	AB	AA	AA
18	BC	AA	AA	AA	AB	AA	AB	AA	AA	AA	42	AB	AA	AA	AA	AB	AA	AB	AA	AA	AA
19	AA	AA	AA	AA	AB	AA	AB	AA	AA	AA	43	BC	AA	AA	AA	AB	BB	AB	AA	AA	AA
20	AA	AB	AA	AA	AB	CC	AB	AB	AA	AA	44	BC	AA	AA	AA	AA	CC	AB	AB	AA	BB
21	AB	AA	AA	AA	AA	AA	AB	AB	AA	AA	45	AB	AA	AA	AA	AC	AA	AB	AB	AA	AA
22	AB	AA	AA	AA	AA	AA	AB	AB	AA	AA	46	BC	AA	AA	AA	AB	CC	AB	AA	AA	AA
23	AB	AA	AA	AA	BB	AA	CD	AA	AA	AA	47	BC	AA	AA	AA	AB	BB	AB	AA	AA	AA
24	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AB	AA	AA	AA	48	AB	AA	AA	AA	AB	AA	AB	AB	AA	AA

* 柚的品种号见表 1。For sample numbers see Table 1.

** L₁₋₁₀ 依次为 EST-1, EST-2, PGI-1, PGI-2, PGM-1, PGM-2, SKD-1, SKD-2, SOD-1, SOD-2。L₁ to L₁₀ represent EST-1, EST-2, PGI-1, PGI-2, PGM-1, PGM-2, SKD-1, SKD-2, SOD-1 and SOD-2, respectively.

表 4 所有测试柚类品种的等位基因频率
Table 4 Allele frequencies in all tested pomelo cultivars

等位基因 Allele	基因座 Locus									
	EST-1	EST-2	PGI-1	PGI-2	PGM-1	PGM-2	SKD-1	SKD-2	SOD-1	SOD-2
Allele A	0.531	0.948	1.000	1.000	0.604	0.688	0.531	0.719	0.948	0.938
Allele B	0.354	0.052			0.354	0.156	0.427	0.281	0.052	0.063
Allele C	0.094				0.042	0.146	0.021			
Allele D	0.021				0.010	0.021				