

云南红豆杉天然群体内同工酶遗传变异的研究

吴丽圆, 陈少瑜, 项伟

(云南省林业科学院 云南省森林植物培育与开发利用重点实验室, 昆明 650204)

摘要 采用水平淀粉凝胶电泳技术, 对分布于金沙江流域的云南红豆杉天然群体的 10 种酶系统同工酶的遗传变异进行了研究。在谱带遗传分析的基础上确定了 15 个酶基因座及其等位基因。其中有 14 个酶基因座属多态, 只有一个单态基因座 ($ME-3$)。14 个多态基因座中 4 个基因座遗传变异小, 对该天然群体的遗传变异贡献不大, 其余 10 个基因座遗传变异丰富, 对该天然群体的遗传变异贡献大。该天然群体具有明显丰富的遗传变异性, 多态基因座比率 $P=0.933$, 等位基因平均数 $A=2.90$, 平均期望杂合度 $He=0.290$ 。紫杉醇含量与群体遗传变异有着密切的关系。

关键词 云南红豆杉; 同工酶; 遗传变异

中图分类号: S722.3 文献标识码: A

文章编号: 0253-977X(2001)03-0237-06

Genetic Variation of Isoenzyme within Natural Population of *Taxus yunnanensis* in Yunnan of China

WU Li-yuan, CHEN Shao-yu, XIANG Wei

(Yunnan Provincial Key Laboratory of Cultivation & Development of Forest Plant, Yunnan Academy of Forest Science, Kunming 650204, China)

Abstract Genetic variation of ten isoenzymes was studied within population of *Taxus yunnanensis* Cheng et L. K. Fu in the Jinsha River Valley using the method of horizontal starch gel electrophoresis. On the basis of banding analysis eight enzyme systems, presumably coded by fifteen isoenzyme loci and their alleles were scored, and fourteen were polymorphic with only one monomorphic locus ($ME-3$). Among them, four polymorphic loci with inevident genetic variation made little contribution to genetic variation of this population and other ten polymorphic loci with evident genetic variation made great contribution to genetic variation of this population. Isoenzyme data indicated high level of genetic variability in this population with $P=0.933$, $A=2.90$, $He=0.290$. The taxol content had close relation to genetic variation of population.

Key words *Taxus yunnanensis*; isoenzyme; genetic variation

红豆杉属 (*Taxus* L.) 植物是提取新型抗癌药物紫杉醇 (taxol) 的原料。在云南省有较多分布的云南红豆杉 (*Taxus yunnanensis* Cheng et L. K. Fu), 其紫杉醇的含量仅次于短叶红豆杉 (*T. brevifolia*) 而比其他红豆杉高几倍^[1]。由于分布地域不同, 云南红豆杉植株中紫杉醇的含量差异很大, 同一分布

区, 不同个体间紫杉醇含量也存在明显差异^[2]。本研究选择紫杉醇平均含量较高的一个天然群体, 利用同工酶电泳技术, 研究天然群体内同工酶的遗传变异规律, 旨在了解云南红豆杉天然群体内遗传多样性与紫杉醇含量的关系, 为合理利用、保存云南红豆杉基因资源及其改良提供科学依据。

收稿日期: 2000-04-10, 修回日期: 2000-11-16

基金项目: 中国林科院林业部林木培育重点实验室开放研究基金资助项目

作者简介: 吴丽圆 (1967-), 女 (汉), 云南个旧人, 硕士学位, 助理研究员, 专业方向: 植物遗传育种。Tel: 0871-5216722。

1 材料与方 法

1.1 采样及样品处理

分布于金沙江领域的云南红豆杉天然群体,其紫杉醇平均含量较其他分布区高^[2]。1998年10~11月,从该地区分单株采集36株云南红豆杉的种子,每株树采100粒左右的种子,分单株净种后,将纯净种子置于0℃左右保存备用。

采集将进行同工酶分析植株距地面约0.5m处的树干新皮(指除去陈旧老皮部分),风干、粉碎,再风干至恒重后备用。

1.2 酶电泳实验

由于裸子植物的种子可分离出二倍体的胚和单倍体的胚乳(雌配子体),故可直接利用单倍体胚乳的电泳酶谱来分析是否符合 Mendal 分离规律,从而确定谱带所代表的基因座和等位基因。每单株随机取自由授粉的成熟种子10~20粒,分别剥取每粒种子的胚乳(单倍体),加入2滴提取缓冲液,在冰浴中研磨提取。提取缓冲液为王中仁的简单磷酸提取缓冲液^[3]。沁子(wicks)选用新华Ⅲ号滤纸,制成2mm×6mm大小,直接吸取研磨后的提取液。采用水平切片淀粉凝胶电泳技术,使用王中仁设计,由北京六一仪器厂生产的“SG-WZ”170ml水平切片淀粉凝胶电泳槽,所用水解淀粉为美国Sigma公司产品(S-4501),淀粉胶浓度12%。通过大量对比实验,选出1种电极缓冲液和相应的凝胶缓冲系统用于10种酶系统,该缓冲系统为#R:0.04mol/L Tris-0.105 mol/L 柠檬酸/0.009 mol/L Tris-0.005 mol/L L-盐酸组氨酸(pH 8.0)。

电泳在4℃冰箱中进行,采用60mA稳流电泳6h,待溴酚蓝移至电泳槽顶端,停止电泳,切胶染色。染色液配方(包括液染和胶染)采用Soltis等^[4]和王中仁^[3]配方。染色后即时记录谱带和照相,并将电泳效果好的胶片制成久干片。

1.3 紫杉醇含量测定

采用高效液相色谱法,详见文献^[2]。

1.4 同工酶分析及数据处理

云南红豆杉的成熟种子可分离出二倍体的胚和单倍体的胚乳(雌配子体),如果用单倍体胚乳的同工酶谱带分析酶基因座和等位基因,则无论是单聚体酶,还是二聚体酶,甚至是三聚或四聚体酶,每个基因座只显示一条谱带,其位置又直接代表一个等

位基因,因此,分析单株树一定数量的雌配子体,具多态基因座的,其同工酶的表型分离应为1:1,具单态基因座的,其同工酶表型是一致的,没有分离,这样便可直接从酶谱读出单株的基因型,计算群体各基因座的等位基因频率。(将杂合基因型错定为同质基因型的概率为 $(1/2)^{k-1}$,其中k为分析的雌配子体数,若每个单株分析10个雌配子体,错定基因同型的概率为0.002)。

同工酶基因座表示法和等位基因命名法详见文献^[5]。由酶的缩写字母代表该酶系统,连字符后的数字代表该酶的不同基因座,愈靠近正极的基因座以愈小的数字表示^[5]。同一基因座中,愈靠近正极的等位基因(迁移率愈大)以A代表,其次以B代表,照此类推。

以各基因座的等位基因频率为基本数据,用下述5个标准尺度,作遗传学方面的分析研究。(1)多态基因座比例($P\%$ proportion of polymorphic loci); (2)平均每个基因座的等位基因数($A\%$ mean number of alleles per locus); (3)平均每个基因座的等位基因的有效数目($Ae\%$ mean effective number of alleles per locus); (4)平均杂合性的预期值($He\%$ mean expected heterozygosity); (5)平均杂合性的观察值($Ho\%$ mean observed heterozygosity)。

以上各遗传参数的意义和计算方法详见文献^[6]。

2 实验结果

2.1 种子胚乳同工酶谱带类型及酶基因定位

本研究共测定了10种酶系统,这些酶系统的种类和检测所用的缓冲系统详见表1。云南红豆杉种子胚乳的部分同工酶电泳图谱见图1,10种同工酶谱带类型、基因座及等位基因组成情况归纳于图2。

表1 电泳检测所用酶系统和适用的缓冲系统

Table 1 The enzyme systems and the buffer system

酶系统 Enzyme system	缩写 Abbreviation	酶分类编码 EC NO.	缓冲系统 Buffer system
天冬氨酸转氨酶 aspartate aminotransferase	ATT	EC2.6.1.1	#R
谷氨酸脱氢酶 glutamate dehydrogenase	GDH	EC1.4.1.2	#R
异柠檬酸脱氢酶 isocitrate dehydrogenase	IDH	EC1.1.1.42	#R
亮氨酸氨基肽酶 leucine aminopeptidase	LAP	EC3.4.11.1	#R

酶系统 Enzyme system	缩写 Abbreviation	酶分类编码 EC NO.	缓冲系统 Buffer system
苹果酸脱氢酶 malate dehydrogenase	MDH	EC1.1.1.37	# R
苹果酸酶 malic enzyme	ME	EC1.1.1.40	# R
磷酸葡萄糖糖脱氢酶 phosphogluconate dehydrogenase	PGI	EC5.3.1.9	# R
磷酸葡萄糖异构酶 phosphoglucosomerase	PGM	EC2.7.5.1	# R
磷酸葡萄糖变位酶 phosphoglucomutase	PGI	EC2.7.5.1	# R
莽草酸脱氢酶 shikimate dehydrogenase	SKD	EC1.1.1.25	# R

2.2 群体的遗传变异

对单倍体胚乳 10 种酶系统电泳谱带的遗传学分析表明,这 10 种酶系统共受 24 个基因座编码,其中 6 个基因座(即 *ME-1*、*ME-2*、*MDH-1*、*MDH-2*、*PGI-2*、*PGI-3*)的酶谱仅在某些个体表现,2 种酶(共 3 个基因座),即 *GDH* 因酶谱酶带太弱,*LAP* 因酶谱酶带与底色反差小(液染致使底色呈深红色),均未能获得清晰的酶谱照片,故以余下的 8 种酶系统 15 个基因座为遗传学标记进行群体遗传学分析,分析结果见表 2、表 3。

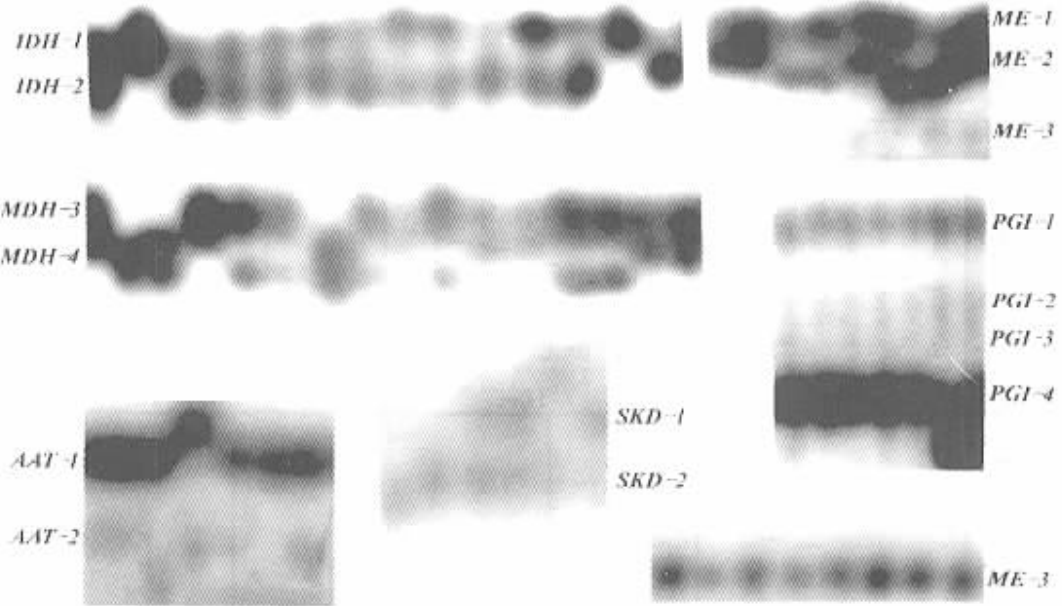


图 1 云南红豆杉种子胚乳的同工酶电泳图谱

Fig.1 Electrophoresis zymogram of isoenzyme in endosperm of *Taxus yunnanensis*

表 2 云南红豆杉天然群体的等位基因频率和杂合性

Table 2 Allele frequencies and heterozygosity at fourteen polymorphic loci of *Taxus yunnanensis*

基因座 Locus	频率 Frequency	预期值 Expected heterozygosity	观察值 Observed heterozygosity	基因座 Locus	频率 Frequency	预期值 Expected heterozygosity	观察值 Observed heterozygosity
<i>AAT-1</i>				<i>AAT-2</i>			
A	0.014			A	0.111		
B	0.958	0.082	0.083	B	0.583	0.590	0.750
C	0.028			C	0.250		
				D	0.056		
<i>IDH-1</i>				<i>IDH-2</i>			
A	0.214			A	0.162		
B	0.714	0.436	0.500	B	0.691	0.482	0.382
C	0.071			C	0.147		
<i>MDH-3</i>				<i>MDH-4</i>			
A	0.083			A	0.083		

基因座 Locus	频率 Frequency	预期值 Expected heterozygosity	观察值 Observed heterozygosity	基因座 Locus	频率 Frequency	预期值 Expected heterozygosity	观察值 Observed heterozygosity
B	0.778	0.374	0.444	B	0.750	0.408	0.500
C	0.139			C	0.167		
PGD - 1				PGD - 2			
A	0.236			A	0.111		
B	0.653	0.513	0.694	B	0.764	0.394	0.472
C	0.111			C	0.125		
PGI - 1				PGI - 4			
A	0.056			A	0.972		
B	0.833	0.294	0.333	B	0.014	0.055	0.056
C	0.111			C	0.014		
PGM - 1				PGM - 2			
A	0.972			A	0.986		
B	0.028	0.055	0.056	B	0.014	0.028	0.028
SKD - 1				SKD - 2			
A	0.083			A	0.194		
B	0.125	0.299	0.333	B	0.778	0.362	0.444
C	0.764			C	0.028		
D	0.028						

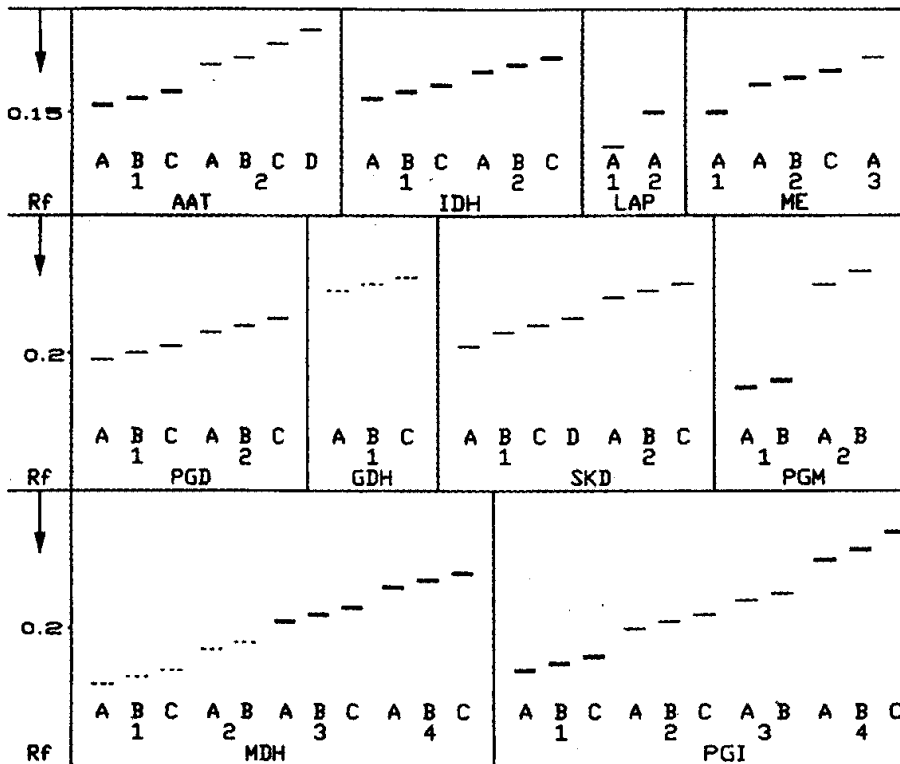


图 2 云南红豆杉种子胚乳的同工酶谱带类型、基因座及等位基因组成情况示意图

图中 1、2、3 等代表不同的基因座，A、B、C 等代表不同的等位基因。

Fig. 2 Schematic map of isoenzyme banding patterns, composing of isoenzyme loci and alleles in endosperm of *Taxus yunnanensis*

digit 1, 2, 3 *et al* indicate different locus; A, B, C *et al* indicate different alleles.

由图 2 可见,分析的 15 个基因座中,只有 1 个基因座(*ME-3*)为单态。14 个多态基因座中,4 个多态基因座(*AAT-1*、*PGI-4*、*PGM-1*、*PGM-2*)杂合性的预期值和观察值相当低,不超过 0.100,这说明这 4 个基因座遗传多样性水平较低,对云南红豆杉天然群体遗传变异的贡献不大,其余 10 个多态基因座(*AAT-2*、*IDH-1*、*IDH-2*、*MDH-3*、*MDH-4*、*PGD-1*、*PGD-2*、*PGI-1*、*SKD-1*、*SKD-2*)杂合性的预期值较高(H_e 最低 0.294,最高 0.590),说明这 10 个基因座遗传多样性水平较高,对云南红豆杉天然群体遗传变异的贡献大。这 10 个多态基因座中,只有 *AAT-2* 和 *SKD-1* 有 4 个等位基因,其有效等位基因数分别为 2.39(*AAT-2*)和 1.65(*SKD-1*),其余 8 个基因座均有 3 个等位基因,他们的有效等位基因数不尽相同,分别为 1.78(*IDH-1*)、1.90(*IDH-2*)、1.58(*MDH-3*)、1.67(*MDH-4*)、2.02(*PGD-1*)、1.63(*PGD*

-2)、1.41(*PGI-1*)、1.55(*SKD-2*)。

表 3 云南红豆杉天然群体遗传变异性指标*

Table 3 Genetic variability parameters of *Taxus yunnanensis**

<i>P</i>	<i>A</i>	<i>A_e</i>	<i>H_e</i>	<i>H_o</i>
0.933	2.9 (.2)	1.52	0.290 (.051)	0.337 (.063)

* : A locus is considered polymorphic if the frequency of the most common alleles does not exceed 0.99

由表 3 可见,云南红豆杉天然群体的遗传变异水平高, $P = 0.933$, $H_e = 0.290$,实际观测的杂合体比率与理论期望比率相当,差异不显著。

2.3 紫杉醇含量与遗传变异的关系

从上述结果已知,分析的 15 个基因座中,有 10 个多态基因座对云南红豆杉天然群体遗传变异的贡献大,因此,将具有代表性的 16 个个体的 10 个酶基因座的基因型与紫杉醇的含量列于表 4。

表 4 不同酶基因座的个体基因型与相应个体的紫杉醇含量

Table 4 Individual genotypes of ten loci and taxol contents

个体 Individual	酶 基 因 座 Locus										紫杉醇含量(%) Taxol content(%)
	<i>AAT-2</i>	<i>IDH-1</i>	<i>IDH-2</i>	<i>MDH-3</i>	<i>MDH-4</i>	<i>PGD-1</i>	<i>PGD-2</i>	<i>PGI-1</i>	<i>SKD-1</i>	<i>SKD-2</i>	
32	BB	AC	AC	BC	BC	AB	BC	BB	BC	AB	2.19
35	BC	BB	BB	BB	BB	BC	BC	BC	BC	BB	1.37
31	BC	AB	AB	BB	BB	BC	BC	BC	BC	BB	2.07
34	AB	AB	AB	BB	BC	BC	AB	BC	AC	AB	1.82
33	BD	AB	AB	BC	BB	BB	BB	BC	BC	BB	1.69
9	BC	BB	BB	BC	BC	AB	BB	BB	AC	AB	2.01
8	BC	BB	BB	BB	BC	BB	BB	BB	CC	BB	1.15
36	BC	AC	AB	BC	BB	AB	BC	BC	CC	BB	1.96
11	BB	BB	BB	BB	BB	AB	BB	BB	CC	BB	1.01
10	BD	BB	BB	BC	BC	AB	BB	BB	CC	AB	1.74
4	AB	BB	BC	AB	AB	AB	AB	BC	AC	AB	1.89
2	BB	BB	BB	AB	AB	AB	BB	AB	AC	AB	1.34
5	BB	BB	BB	AB	AB	AB	AB	BC	BC	AB	1.69
1	BB	BB	BB	AB	AB	AB	AB	AB	CD	AB	1.44
18	AB	AB	BB	BB	BC	AB	BB	BB	CC	BB	1.33
13	AB	BB	BB	BB	BB	BB	AB	BB	CC	BB	1.03

由表 4 可见,个体紫杉醇的含量与单一酶基因座无直接关系,与多个酶基因座的综合效应有一定关联。

3 讨 论

3.1 云南红豆杉天然群体的遗传变异

许多研究者曾对许多针叶树种的同工酶群体遗传变异作过研究。这些研究结果都证明针叶树是遗传变异较高的树种。葛颂等对 25 个针叶树种的研

究结果进行了总结, $P = 0.615$, $A = 2.26$, $H_e = 0.206$ ^[7],本研究的云南红豆杉天然群体的 $P = 0.933$, $A = 2.90$, $H_e = 0.290$,说明云南红豆杉天然群体的遗传变异水平较高。

形成云南红豆杉天然群体丰富的遗传变异的主要原因是,云南红豆杉寿命长,世代重叠,在选择压作用下,各林级在建立时都保留下各自适宜的基因,因此积累了较多的基因,形成了较广的遗传基础。

3.2 紫杉醇含量与遗传变异的关系

紫杉醇是次生代谢的产物,其含量受遗传、外遗传及环境变化的影响,上述因素相互作用形成个体的表型^[8]。综合前人的工作^[9~11]及表4的结果,可以认为云南红豆杉不同基因座的基因间存在非独立的关系,即存在“共适应基因组”(co-adapted complexes)。如果“共适应基因组”的假设成立的话,那么,可以认为紫杉醇含量与群体遗传变异息息相关,而群体遗传变异源于环境的定向选择。

3.3 云南红豆杉基因资源保存及其改良策略

云南红豆杉多基因座遗传结构的信息对该树种基因资源保存及其改良策略的制定有重要意义。云南红豆杉基因组就地保存的最优抽样策略可能不同于许多单个基因的保存,单个基因保存的样本容量,可能不足以保存基因组。因此,要进一步研究出不同于单基因座模型的抽样理论。

在选择育种方面,假如“共适应基因组”被认为起因于广泛分布的配子不平衡性,群体再分又是引起配子不平衡的主要原因,在这种情形下,遗传改良程序中采用亚群体育种具有明显的优点,可以不断地进行群体内和群体间的轮回选择,充分发掘‘多点上位效应’(multiple peak epistasis)。

参考文献 (References):

- [1] 陈末名,张佩玲.云南红豆杉抗肿瘤成份研究[J].药学学报,1991,26(10):747.
- [2] 项伟,阮德春,张宏杰,等.不同产地云南红豆杉紫杉醇的含量分析[J].云南林业科技,1996,2:74~76.
- [3] 王中仁.植物等位酶分析[M].北京:科学出版社,1996,77~137.
- [4] Soltis D E, Haulfer C H, Darrow D C, et al. Starch Gelelectrophoresis of Ferns: A Compilation of Grinding Buffers, Gel and Electrode Buffers, and Staining Schedules [J]. Amer Fern J, 1983, 73(1):9~29.
- [5] 葛颂,黄敏仁,许农.马尾松 GOT、LDH 和 MDH 同工酶的遗传方式和连锁关系[J].遗传学报,1987,14:428~435.
- [6] 葛颂.用同工酶定量分析林木群体变异和分化的方法[J].西南林学院学报,1989,9:84~90.
- [7] 葛颂,王明麻,陈岳武.用同工酶研究马尾松群体的遗传结构[J].林业科学,1988,24:399~499.
- [8] Wheeler N C, Jech K S, Masters S A, et al. Genetic Variation and Parameter Estimates in *Taxus brevifolia* (Pacific yew) [J]. Can J For Res, 1995, 25:1913~1927.
- [9] 张茂钦.云南珍稀濒危树种生态生物学研究[M].昆明:云南大学出版社,1998,140~145.
- [10] 易能君,施季森,王明麻.林木群体遗传多样性和多位点遗传结

构[J].生物多样性,1996,4(3):153~159.

- [11] 尹嘉庆,王达明,李莲芳.云南省红豆杉资源及发展策略[J].云南林业,1995,2:9~10.
- [12] 李新华,贺善安,盛宁.红豆杉迁地保护中天然种群的形成[J].植物资源与环境,1999,8(1):38~41.

· 会 讯 ·

首届网络时代的生命科学与生物产业研讨会在京召开

[本刊讯] 为了迎接信息经济与生物经济时代的来临,中国遗传学会、《遗传》杂志与宝芝林商务网联合主办的首届网络时代的生命科学与生物产业研讨会于2001年4月8~11日在北京劳动大厦隆重召开。来自全国近三十个省、市、自治区的350多名代表参加了大会,20多家生物技术企业参加大会展览。大会执行主席李绍武主持会议,大会名誉主席、中国科协副主席李振声院士致开幕词,他指出:“我们举办这次会议的初衷,就是研讨生物技术与信息技术的结合问题,交流生命科学与生物产业的成果与进展情况,加强学科间的合作与沟通,促进生物技术与信息产业的发展,努力缩小与发达国家的差距。”怎样缩小这个差距呢?我认为一是要加强投入;二是要培养人才、合理使用人才,吸引人才,稳定人才队伍;三是要走知识创新之路,开发具有自主知识产权的产品。”

中国农业大学吴常信院士、中国农业科学院范云六院士也作了大会报告或主持会议。王钦南教授、杨焕明教授、邵鹏柱教授、王兴智教授以及荷兰国家生物信息中心 Jack 教授等50余人分别作了大会报告,内容涉及人类与医学、植物科学、动物科学、微生物学、生物信息学、生物技术、信息技术等诸多方面,是一次多学科、全方位的大型学术交流活动。会后代表们还参观了中国科学院基因组信息中心暨北京华大基因研究中心,参观了北京锦绣大地农业股份有限公司。代表们反映,这次会议选题新颖、内容丰富、学科面广,通过参加会议和参观,开阔了眼界、结识了朋友,学到了新知识,收获很大,希望今后继续举办此类学术活动。

大会名誉主席、中国科学院遗传研究所朱祯副所长作大会总结并致闭幕词。他说:“这次会议由学术单位与企业联合组织,是一种有益的探索和尝试,为今后举办此类活动积累了经验。希望大家今后继续保持联系,互通信息,在适当的时间、适当的地点,就适当的选题,我们再次相聚。朱祯教授指出:为了增强研究所的创新实力、促进学科的发展,进一步凝炼科技目标,早日进入中国科学院知识创新体系,遗传研究所与发育生物学研究所已于今年2月14日正式整合,组建中国科学院遗传与发育生物学研究所。我们相信,经过一段时间的努力,一个开放的遗传与发育生物学研究所将以崭新的面貌展现在世人面前,一个生机勃勃的遗传与发育生物学研究所将为中国的生物技术产业做出重要的贡献!最后,朱祯宣布:首届网络时代的生命科学与生物产业研讨会胜利闭幕!”