

自然定居青冈幼苗的亲本分析^{*}

陈小勇 宋永昌

(华东师范大学环境科学系 上海 200062)

提 要 采用遗传排除法和似然分析法进行青冈幼苗的亲本分析。共采用了 5 个等位酶多态位点, 累积排除概率为 71.57%。采用遗传排除法仅能为 1 株幼苗确定唯一的亲本, 其余幼苗均有多个亲本。似然分析揭示出各幼苗有 1 或 2 对亲本, 分析表明由成体自交形成的幼苗占 41.18%, 与种群个体间交配的概率也较大, 为 17.65%。成体之间的繁殖成功率变化较大, 有 9 个个体的繁殖成功率为 0。个体 24 的繁殖成功率最大, 占总的 39.4%, 种群外花粉和种子对幼苗的贡献率达 18.4%。根据幼苗与亲本间的距离计算的种子扩散距离以 5 ~ 10 m 最多, 占 62.5%; 其次为 10 ~ 15 m, 而扩散距离为 0 ~ 5 m 的种子比例最小; 虽然青冈主要是以重力扩散种子, 但由于坡度较大(30°), 加上树冠遮荫对种子萌发和幼苗生长的影响, 形成以上种子扩散格局。

关键词 遗传排除, 似然分析, 亲本分析, 幼苗, 青冈

中图分类号: Q346+.5 文献标识码: A 文章编号: 1000-470X(2000)03-0174-07

ANALYSIS OF PARENTAGE FOR NATURALLY ESTABLISHED SEEDLINGS OF *CYCLOBALANOPSIS GLAUCA*

Chen Xiaoyong Song Yongchang

(Department of Environmental Sciences, East China Normal University Shanghai 200062)

Abstract Parentage of *Cyclobalanopsis glauca* seedlings in a small population was analyzed by genetic exclusion and most-likely analysis using five polymorphic isozymic loci. The cumulative exclusion probability was 71.57%. Genetic exclusion only identified one parent pair for one seedling, and most seedlings have more than one pair of parent. Likelihood analysis identified one or two parent pairs for the seedlings. 41.18% of the total seedlings were grown from seeds produced by selfing and 17.65% of the seedlings were from seeds fertilized with pollen out of the population. Reproductive success (RS) of adults varied greatly. RS of nine adults was 0, and individual No. 24 had the highest RS(39.4%). The RS of plants out of the population was 18.4%. Dispersal distances of *C. glauca* seeds calculated according to the distance of seedling to parent were mainly 5 ~ 10 m(62.5%), secondly was 10 ~ 15 m and only 3.1% was < 5m. Though gravity is the main mechanism of seed

收稿日: 1999-03-22, 修回日: 1999-07-14。第一作者: 男, 1967年8月出生, 副教授(博士), 主要从事分子生态学、种群生态学和污染生态学方面的研究和教学工作。

^{*} 国家自然科学基金资助项目(39370135)。

dispersal, there were less seeds with short-distance dispersal due to high slope (30°) and effects of tree canopy on the seed germination and seedling development.

Key words Genetic exclusion, Likelihood analysis, Parentage analysis, Seedling, *Cyclobalanopsis glauca*

交配系统包括控制亲本基因重新组合到子代过程的所有属性, 以前的研究主要集中在异交率的估测, 由于种群中亚结构化、近交、个体间繁殖贡献率的差异等因素都影响着种群的交配系统^[1,2], 因此, 要详尽分析种群的交配系统, 必须确定种群内各个体实际参与交配并形成后代的情况。虽然理论上对这些因素的影响已有分析, 然而由于分析后代(种子和幼苗)的亲本很困难, 野外验证很少进行, 虽有一些研究检测种群内花粉流动^[3]以及雌性个体的结实^[4], 但并不能有效地反映个体(尤其是雄性)对后代的繁殖贡献率, 这有赖于对后代进行亲本分析。

通过分析遗传相似性进行谱系构建在人类种群中已得到充分的发展和广泛的应用^[5,6], 这个方法的目的是确定个体间的亲-子关系。由于对个体的母本较易确定, 因而在自然种群中, 进行较多的是父性分析, 这也在一些植物种群中得到应用^[7,8]。然而对于植物幼苗来说, 双亲预先均不清楚, 有关的亲本分析做得较少^[9]。在植物种群中, 植株的空间分布可以直接测定, 计算亲本-幼苗间的距离可以测定种子的扩散格局; 亲本确定后, 种群内花粉扩散也是可以测定的; 另外根据特定成体的交配对数和后代数, 可以评价它们的繁殖成功率, 进而估算个体和基因型的适合度。因此, 确定幼苗的双亲是详尽判译种群结构的基础^[9], 并逐渐成为生态学和种群遗传学交叉研究的一个焦点。然而有关自然植物种群谱系分析方面的研究在我国尚未见报道。笔者以我国常绿阔叶林的优势树种青冈(*Cyclobalanopsis glauca*)为例, 进行了自然定居幼苗亲本分析的探讨。

1 材料和方法

1.1 研究种群和基因型测定

本文采用的数据来自陈小勇^[10]。研究地点位于安徽省黄山风景管理区(N29°43', E118°17')西部的小岭, 该地是以青冈、甜槠(*Castanopsis eyrei*)为优势种的常绿阔叶林, 海拔约为 420 m, 坡度 30°, 坡向 SE35°。土壤 pH 值为 4.21, 含氮量为 0.602%, 含磷量 0.111% P₂O₅。研究的目标种群是一个与其他青冈种群相对隔离的小种群, 面积约 600 m², 共有 26 棵成体和 19 棵实生幼苗。将各成体和实生幼苗定位, 测定两两之间的距离。由于青冈可以以萌条的形式进行繁殖, 定位时以最粗者为准。1994 年 11 月, 取当年萌生的嫩叶, 迅速带回实验室, 尽快测定基因型。

基因型的测定采用不连续聚丙烯酰胺凝胶电泳进行。共分析了 10 余种酶系统, 有 5 个具清晰可判的酶谱, 其中有 5 个是多态位点, 它们是过氧化物酶(*Pod*, 2 个多态位点)、酯酶(*Est*, 2 个多态位点)和谷氨酸草酰乙酸转氨酶(*Got*, 1 个多态位点)。基因型的遗传判译见文献[11]。多态位点的等位基因频率见表 1。

1.2 遗传排除(genetic exclusion)法

这个方法简单且直接, 主要参照 Ellstrand^[12]的方法进行。对每个幼苗来说, 根据成体

基因型产生配子的组合能否得到该幼苗的基因型, 将不能形成幼苗基因型的个体组合排除在亲-子关系之外, 其余的亲本对都有可能 是幼苗的亲本。排除概率的计算参

照 Smouse 和 Meagher^[3]的方法进行。

1.3 似然分析(likelihood analysis) 法

主要参照 Meagher 和 Thompson^[9]的方法, 根据不同基因型间结合形成后代的孟德尔分离规律, 以及种群中各基因型的频率估计成体与后代间的遗传相似性。对不同亲本对之间的结果进行比较, 与子代具最高相似性的交配对就作为幼苗的亲本。

2 结果

2.1 遗传排除法结果

根据 5 个多态位点可以计算各位点的排除概率(表 1), 5 个位点的累积排除概率为 71.5%, 其中 *Pod*-1 的排除概率最高, 为 32.59%。表 2 是形成各幼苗遗传上可能的交配格局, 由表 2 可知, 绝大多数的幼苗具有多个亲本。虽然存在较大的排除概率, 但幼苗中仅有 1 个可

表 1 多态位点的等位基因频率和排除概率

Table 1	Exclusion probability and allelic frequencies of polymorphic loci						
位点	等位基因 Allele					排除概率	累积概率
Locus	1	2	3	4	5	Exclusion probability	Cumulative probability
<i>Pod</i> -1	0.077	0.250	0.077	0.596		0.3259	0.3259
<i>Pod</i> -2	0.750	0.250				0.1523	0.4286
<i>Est</i> -1	0.115	0.289	0.577	0.019		0.3068	0.6039
<i>Est</i> -2	0.039	0.058	0.846	0.039	0.019	0.1741	0.6728
<i>Got</i> -2	0.192	0.808				0.1311	0.7157

表 2 安徽省黄山风景管理区小岭自然定居幼苗遗传上可能的交配格局

Table 2 Genetically possible mating patterns for seedlings observed undergoing established in Huangshan Scenic Area, Anhui Province

幼苗号 No. seedling	基因型* Genotype	交配格局(个体×个体) Mating pattern(individual×individual)
27	<i>bbedb/bdcedb</i>	(8, 9, 12, 13, 14, 17, 21, 26) × (8, 9, 14, 22, 26)
28	<i>dbcd b/d bcd db</i>	(10, 15, 19, 20, 21, 23, 24, 25, 26) × (10, 15, 19, 20, 21, 23, 24, 25, 26)
29	<i>bbedb/bdcedb</i>	(8, 9, 12, 13, 14, 17, 21, 26) × (8, 9, 12, 13, 14, 17, 21, 26)
30	<i>bbeeb/cbeeb</i>	外来种子
31	<i>d bce b/d dceb</i>	23×外来花粉
32	<i>bbedb/bdcedb</i>	(8, 9, 12, 13, 14, 17, 21, 26) × (8, 9, 12, 15)
33	<i>dbcd b/d bcd db</i>	同 28
34	<i>d bad b/d bcd b</i>	(2, 4, 7) × (10, 15, 19, 20, 21, 23, 24, 25, 26)
35	<i>bbedb/bdcedb</i>	同 27
36	<i>d bcd b/d dcd b</i>	(10, 15, 19, 20, 21, 23, 24, 25, 26) × (10, 20, 25, 26)
37	<i>dbcd b/d bcd db</i>	同 28
38	<i>dbcd b/d bcd db</i>	同 28
39	<i>dbcd b/d bcd db</i>	同 28
40	<i>d bcd a/d bcd b</i>	(18, 19, 20, 21, 25, 26) × (10, 15, 19, 20, 21, 23, 24, 25, 26)
41	<i>d bcb b/d dceb</i>	外来种子
42	<i>d bdb b/d bcb b</i>	(3, 4, 5, 6, 7, 10) × 外来花粉
43	<i>d bceb/d bcd b</i>	(10, 15, 19, 20, 21, 23, 24, 25, 26) × 外来花粉
44	<i>abceb/d bbeeb</i>	(13, 14) × 3
45	<i>d bcd b/d dcd b</i>	同 36

* 位点的排列顺序为 *Pod*-1, *Pod*-2, *Est*-1, *Est*-2, *Got*-2。
* The order of the loci is *Pod*-1, *Pod*-2, *Est*-1, *Est*-2, *Got*-2.

以确定唯一的亲本, 另有 1 个幼苗存在 2 个亲本对。进一步分析表明, 17 棵幼苗中, 含有 11~40 个亲本对的幼苗最多, 有 6 株, 占 1/3; 有 5 棵幼苗的亲本对大于 70(图 1)。

2.2 似然分析结果

对各幼苗计算所有亲本对的似然值, 得分值最高的确定为唯一的亲本对, 分析结果见表 3。8 棵幼苗具 1 个分值最高的亲本对, 其余幼苗有 2 个亲本对的似然分值最大。亲本对之间的距离反映了种群内的交配格局, 即花粉传播距离, 图 2 表明青冈种群内以自交形式形成的幼苗比例最高, 占 41.18%; 其次为距离相隔 10 m 以上的个体间的交配。与种群外扩散来的花粉交配形成的幼苗占 17.65%(图 2)。

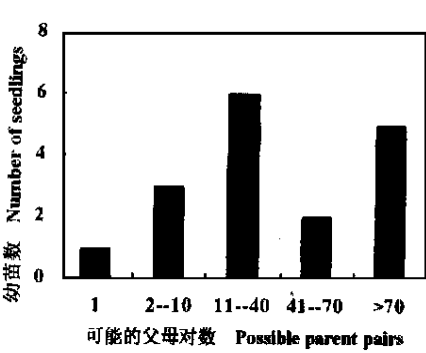
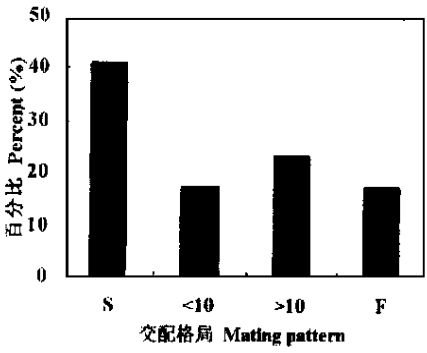


图 1 形成幼苗遗传上可能的亲本对
Fig. 1 Genetically possible parent pair for the seedlings



S- 自交 (Selfing);
F- 与外来花粉交配 (Mate with foreign pollen)
图 2 似然分析的交配格局
Fig. 2 Mating patterns from likelihood analysis

根据似然分析结果可以发现, 不同个体的繁殖成功率存在很大的差异, 繁殖成功率最大的是个体

24, 若以所有个体繁殖成功率累积为 100% 计, 个体 24 的成功率为 39.4%, 而个体 1、4、8、10、11、16、17、21、26 的繁殖成功率为 0(图 3)。种

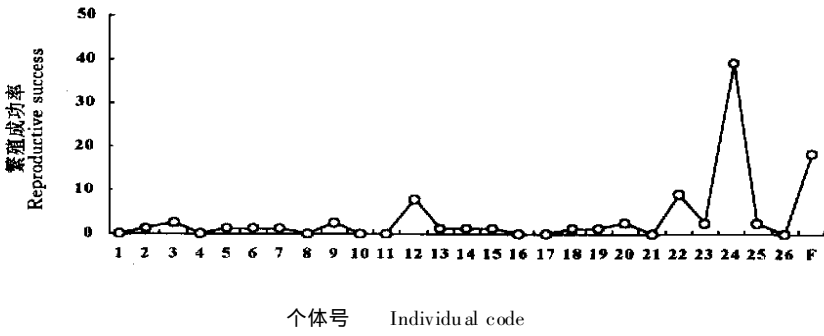
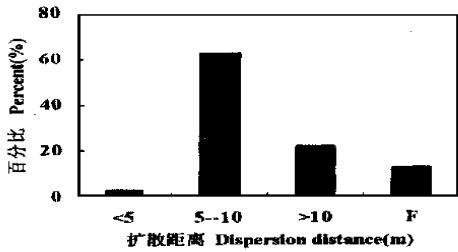


图 3 青冈个体的繁殖成功率
Fig. 3 Reproductive success of different *Cyclobalanopsis glauca* individuals

群外个体以花粉和种子扩散的形式对种群内幼苗的作用也比较大, 占总繁殖成功率的 18.4%。

根据幼苗与亲本的距离, 也可以计算出青冈种子的扩散距离。以幼苗到亲本的平均距离代表青冈种子的扩散距离, 计算结果见图 4。由图 4 可知, 扩散距离为 5~10 m 的种子百分比最大, 占 62.5%, 其次为 10~15 m。青冈虽然主要是由重力扩散种子, 但扩散距离在 5 m 以内的种子发育成幼苗的比例很低, 仅有 3.1%(图 4)。



F- 种群外扩散 (From out of the population)

图 4 青冈种子的扩散距离

Fig. 4 Dispersal distance of seeds of *Cyclobalanopsis glauca*

3 讨论

利用遗传排除法分析幼苗的亲本虽然比较简单,但不能有效地获得唯一或少数亲本,效果较差^[4]。黄山小岭青冈种群虽然只有19个实生幼苗,但仅能为1株幼苗确定唯一的亲本对,这与其他植物中的情况基本一致^[7]。虽然Ellstrand^[2]在*Raphanus sativus*中成功地分析出果实中存在多个父本,Broyles和Wyatt^[5]在*Asclepias exaltata*中能判断出85%种子的父本,但在自然种群中,由于很多个体的交配可以形成幼苗的配子组合,因而排除所有的非亲本仅剩唯一的亲本几乎是不可能的^[7,14]。遗传排除法的效果与非连锁多态位点数目和每位点上等位基因数目有关,数目越多,效果越好^[6]。另外,每个位点上各等位基因的频率也与排除效果有关^[7]。Chakraborty等人^[6]从理论分析认为,等位酶分析不能完全满足遗传排除法所需的位点和等位基因数目。新的DNA技术(如RFLP、RAPD等)也不能达到要求^[6]。

采用似然分析基本上能够确定各幼苗的双亲,确定率高于遗传排除法。在本研究中,每个青冈幼苗都能找到1或2对亲本(表3),由于这种方法优于遗传排除法,已被不少研究者应用于植物中。但这种方法也有2个缺陷:①不能充分利用数据,因为不是所有的后代(尤其是幼苗中)都能确定亲本。虽然在本文中基本上能确定亲本,但由于是一个很小的种群,幼苗和成体数目都比较少。而在大种群中,由于候选个体太多,只有少数个体能被确定亲本,如在*Chamaelirium luteum*中取样的2255个后代中,只有1/4的后代的数据可以利用^[3]。②这种方法对纯合子有利,在特定基因位点上,纯合子的得分总是高于杂合子,因而带来一定的偏差,这种现象在位点数目较少时尤为突出^[7],青冈也可能受到这种现象的影响,种群中个体24为纯合子,有10个幼苗的亲本与它有关,而且根据似然分析结果,有5个幼苗是由它自交形成的(表3)。

表 3 各幼苗最可能的亲本
Table 3 Most likely parent for seedlings

幼苗号 No. Seedling	相似分值最高的亲本对 Parent pair with highest value of likelihood	幼苗号 No. Seedling	相似分值最高的亲本对 Parent pair with highest value of likelihood	幼苗号 No. Seedling	相似分值最高的亲本对 Parent pair with highest value of likelihood
27	12 × 9 12 × 22	34	2 × 24 7 × 24	41	外来种子
28	24 × 24	35	12 × 9 12 × 12	42	5 × 外来花粉 6 × 外来花粉
29	12 × 12	36	20 × 24 25 × 24	43	24 × 外来花粉
30	外来种子	37	24 × 24	44	3 × 13 3 × 14
31	23 × 外来花粉	38	24 × 24	45	20 × 24 25 × 24
32	12 × 12 12 × 15	39	24 × 24		
33	24 × 24	40	18 × 24 19 × 24		

青冈是雌雄同株的、风媒传粉的自交亲合物种, 采用多位点分析程序计算的青冈种群自交率为 66.8%^[7]。笔者采用亲本分析得到的自交率为 41.18%, 低于前面的结果^[7]。这可能与笔者测定的是野外自然萌发而来的幼苗, 一些近交或自交形成的个体由于近交衰退等原因存活率低有关, 因为青冈种群的近交衰退程度不低^[7]。邻体间的交配不如相隔一定距离(10~20 m)的多, 这反映了成功的花粉传播以 10~20 m 之间为多。另外, 与种群外传来的花粉间的交配也比较高, 达 17.65%, 远高于虫媒传粉的 *Rhap hanus sativus* 中的 3%^[8]。这与本文所研究的种群较小, 且与其他青冈种群相隔不远有关; 另外, 青冈是风媒传粉植物, 以花粉为媒介的基因流也比较大^[9]。在动物传粉的 *Chamaelirium luteum* 中, 花粉的扩散距离为 10.4 ± 0.4 m, 与青冈中差不多。花粉散布距离的分布曲线属于尖峰分布, 与正态分布存在显著的差异^[9], 近距离个体间的交配比较多。

青冈成熟个体间的繁殖成功率存在较大的差异, 最高的接近 40%; 同时, 也有 9 个个体的繁殖成功率为 0(图 3), 这个结论与采用亲本拆分法得到的相同^[10], 说明了不同个体之间的适合度也存在较大的差异。同一种群中不同个体适合度的差异在其他一些植物中早已有发现^[2, 21, 22], 造成这种现象的原因是多方面的, 如不同个体花粉产量的差异、雄性和雌性竞争和近交、远交衰退或各种交配不育机制等都可以导致个体间繁殖成功率的差异。

根据幼苗与亲本之间的距离计算青冈种子的扩散距离大多为 5~10 m, 而 5 m 以内的很少, 同时, 青冈散布距离很远的成功的种子也不多。青冈种子主要是以重力传播, 具贮存习性的啮齿动物(如松鼠)也能起一定的散布作用, 一般来说, 重力散布的种子多集中在母树附近。然而, 一方面由于种群所处地点坡度较大(30°), 另一方面仅考虑了成功的种子在树冠下由于遮荫作用对种子萌发和幼苗生长的影响, 因而本文得到的结果与最初想象的种子散布格局并不完全一致。值得一提的是, 5~10 m 的间隔与青冈成体之间的平均距离差不多, 反映了成体遮荫对种子成功萌发并长成幼苗有很大的影响。Meagher 和 Thompson^[9]在 *Chamaelirium luteum* 中根据幼苗与母株间的距离计算的种子扩散距离平均为 10.1 ± 0.4 m, 比一般所认为的草本植物中的要高, 他们认为也是由于仅考虑了成功种子的缘故。

参 考 文 献

- 1 Barrett S C H, Eckert C G. Variation and evolution of mating systems in seed plants. In: Kawana S ed. *Biological Approaches and Evolutionary Trends in Plants*. London: Academic Press, 1990. 229~254
- 2 Muller-Starck G, Ziehe M. Reproductive systems in conifer seed orchard. 3. Female and male fitnesses of individual clones realized in seeds of *Pinus sylvestris* L. *Theor Appl Genet*, 1984, **69**: 173~177
- 3 陈小勇. 植物基因流及其在濒危植物保护中的作用. *生物多样性*, 1996, **4**: 97~102
- 4 Harper J L. *Population Biology of Plants*. London: Academic Press, 1977.
- 5 Valentin J. Paternity index and attribution of paternity. *Hum Hered*, 1984, **34**: 255~257
- 6 Thompson E A. Likelihood inference of paternity. *Am J Hum Genet*, 1987, **39**: 285~287
- 7 Snow A A, Lewis P O. Reproductive traits and male fertility in plants: empirical approaches. *Annu Rev Ecol Syst*, 1993, **24**: 331~351
- 8 Broyles S B, Wyatt R. Paternity analysis in a natural population of *Asclepias exaltata*: multiple paternity, functional gender, and the "pollen donation hypothesis". *Evolution*, 1990, **44**: 1454~1468

- 9 Meagher T R, Thompson E. Analysis of parentage for naturally established seedlings of *Chamaelirium luteum* (Liliaceae). *Ecology*, 1987, **68**: 803 ~ 812
- 10 陈小勇. 青冈生态遗传学研究 I. 上海: 华东师范大学博士学位论文, 1995.
- 11 陈小勇, 宋永昌. 华东地区青冈种群等位酶变异的研究. 植物资源与环境, 1995, **4**(4): 10 ~ 16
- 12 Ellstrand N C. Multiple paternity within the fruits of the wild radish, *Raphanus sativus*. *Am Nat*, 1984, **123**: 819 ~ 828
- 13 Smouse P E, Meagher T R. Genetic analysis of male reproductive contributions in *Chamaelirium luteum* (L.) Gray (Liliaceae). *Genetics*, 1994, **136**: 313 ~ 322
- 14 陈小勇. 自然植物种群的亲本分析及其在生态学研究中的应用. 生态学杂志, 1999, **18**(2): 30 ~ 35
- 15 Meagher T R. Analysis of paternity within a natural population of *Chamaelirium luteum*. I. Identification of most-likely male parents. *Am Nat*, 1986, **128**: 199 ~ 215
- 16 Chakraborty R, Meagher T R, Smouse P E. Parentage analysis with genetic markers in natural populations. I. The expected proportion of offspring with unambiguous paternity. *Genetics*, 1988, **118**: 527 ~ 536
- 17 陈小勇, 宋永昌. 黄山钓桥青冈种群的交配系统与近交衰退. 生态学报, 1997, **17**(5): 462 ~ 468
- 18 Devlin B, Ellstrand N C. Male and female fertility variation in wild radish, a hermaphrodite. *Am Nat*, 1990, **136**: 86 ~ 107
- 19 陈小勇, 王希华, 宋永昌. 华东地区青冈种群的遗传多样性和遗传分化. 植物学报, 1997, **39**(2): 149 ~ 155
- 20 陈小勇, 宋永昌. 黄山青冈个体繁殖贡献率. 生态学报, 1999, **19**(5): 677 ~ 682
- 21 Schoen D J, Stewart S C. Variation in male reproductive investment and male reproductive success in white spruce. *Evolution*, 1986, **40**: 1109 ~ 1120
- 22 Devlin B, Ellstrand N C. Male and female fertility variation in wild radish, a hermaphrodite. *Am Nat*, 1990, **136**: 86 ~ 107