

植物遗传多样性和系统学研究中的等位酶分析*

王中仁

(中国科学院植物研究所系统与进化植物学开放研究实验室, 北京 100093)

摘要 本文对“等位酶”概念、等位酶分析方法在植物遗传多样性和系统学研究中的应用的范围(包括种上和种下)进行了介绍和讨论,并对其优点和缺点进行了评论。认为等位酶分析是研究生物遗传多样性的重要方法,并为系统学和进化研究进入分子水平开辟了广阔而实用的前景,但使用分子资料并不意味着可以抛弃形态、细胞等其他方面的资料,它们的关系是互相补充,而决不是互相代替。

关键词 等位酶,同工酶,遗传多样性,分子系统学

Allozyme analysis in studies of plant genetic diversity and systematics/Wang Zhongren//CHINESE BIODIVERSITY. —1994,2(1):38~43

The concept of allozyme and the application of the allozyme analysis technique in the studies of plant genetic diversity and systematics are introduced and discussed with comments on its advantage and weakness. Allozyme analysis is an important method to studying the genetic diversity of organisms, and has opened a broad prospects for the studying of systematics and evolution with molecular data. However, the use of the molecular data does not mean that the morphological, cytological and other data can be instead, but they are complementary each other.

Author's address Laboratory of Systematic & Evolutionary Botany, Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093

Key words allozyme, isozyme, genetic diversity, molecular systematics

生物多样性的研究和保护是目前世界普遍关注的问题,其实,与此有关的部分工作已经进行了几个世纪,系统学(分类学)就是探索、描述和解释生物多样性的学科之一,进化研究自从达尔文1859年提出进化论以来也进行了一百多年了,只不过是物种水平而已。生物多样性无论从种上还是种下来说,归根到底都是遗传上的多样性。在二十世纪初期,由于显微镜的发明,促进了染色体的研究和细胞遗传学的发展,对生物学起了巨大的推动作用,使生物多样性的研究从种的多样性的研究深入到了种下和种内的细胞水平。染色体资料对遗传多样性的了解是非常重要的,但它作为众多基因的“大包装”,我们看不到在它内部的每个基因的变化细节,对染色体数目一样和形态都相似的种,或同一个居群(population)内的不同个体来说,单纯用形态学和细胞学手段研究遗传多样性就失去了分辨能力。本世纪五十年代以来,分子生物学的手段(特别是蛋白质和DNA分析技术)的提高,则使我们看到这些变化成为可能,生物多样性的研究从而深入到了居群内个体间的分子水平。其中,等位酶资料作为基因变异的标记首先作出了贡献,正如 Stebbins 所说,1957年以后酶一直在生物学各分支学科中起着关键的作用^[1]。

近一二十年来分子生物学资料的应用和迅速积累,是与使分子的变化成为可见的实验方法的

不断改进分不开的,这些方法越来越变得简单易行、安全、并且花费相对低廉,逐渐走出专业生物化学家的实验室,为广大生物学工作者所使用,用“水平切片淀粉凝胶电泳方法”进行同工酶分析就是这样,它正在变成生物学研究中的一种常规手段,作为对有机体 DNA 的转录和翻译的直接产物——“同工酶”的分析,在获取分子水平的资料、探索生物居群的遗传学结构、研究生物遗传多样性和系统与进化生物学的工作中将起着重要的作用。

1 “等位酶”和“分子系统学”的概念

酶——电泳技术始于三十年代(Tieelius 1937),Smithies 1955 年开始使用淀粉凝胶来电泳蛋白质,Hunter 和 Markert 1957 年采用组织化学的染色方法使得特定酶(Enzyme)的位置在胶上能够被看见,从而发现了在同一个体内各种酶的多种分子形式,虽然当时并未能给予这些带以正确的解释,但电泳加组织化学染色,这就是“酶谱”技术。然而,对于这些不止一条的带,当时被认为都是污染或人工因素造成的降解的分子,并未给予注意。

同工酶——Markert 和 Moller 1959 报道了乳酸脱氢酶在不同组织、不同个体以及不同种里的不同形式的存在,这就导致了“同工酶(Isozyme)”概念的产生:有机体常常产生酶的多种形式,即催化同一反应的不同分子形式。也可以说:对一个材料进行电泳,并进行组织化学染色以后,在胶上所看到的一组带,它们是催化同一生化反应的、在电场中的运动性质稍有不同的酶的多种形式,它们就是“同工酶”。但当时并不知道它们的遗传学基础,后来随着资料的积累,对酶谱上的带的遗传学内容有了认识,术语的概念也更精确了。

等位酶——Prakash et al.^[2]提出了把同一基因位点的不同等位基因所编码的一种酶的不同形式叫做“等位酶(Allozyme)”,把它从广义的“同工酶”的概念中分了出来。从此,对表型酶谱的遗传学分析有了更深的意义,除去生理和人为因素在酶谱中的干扰,酶谱作为基因编码的产物,由于模板作用,酶蛋白质中多肽链上的氨基酸顺序(通过 RNA)直接反应了 DNA 链上碱基对的顺序,其变化能很好地代表 DNA 分子的变化,表明等位基因和位点变化的存在。因此,同工酶分析方法被正式列入分子系统学的方法。“Allozyme”一词的中文译法在字典中过去被译为“〔同种〕异型酶”,但实际上这里的字头“Allo-”是来自等位基因“Allele”,而不是一般所说的“异”,意思是“等位基因酶”,为了方便,这里使用简称其为“等位酶”,以便强调其遗传学含义。了解到酶蛋白可以作为基因变异的标记后,等位酶电泳作为一个很实用的工具,可以帮助回答居群遗传学结构分析、系统学研究或标本鉴别等工作中的许多问题,因此,它在遗传学和其他有关生物学各分支学科中都迅速地发展了起来。

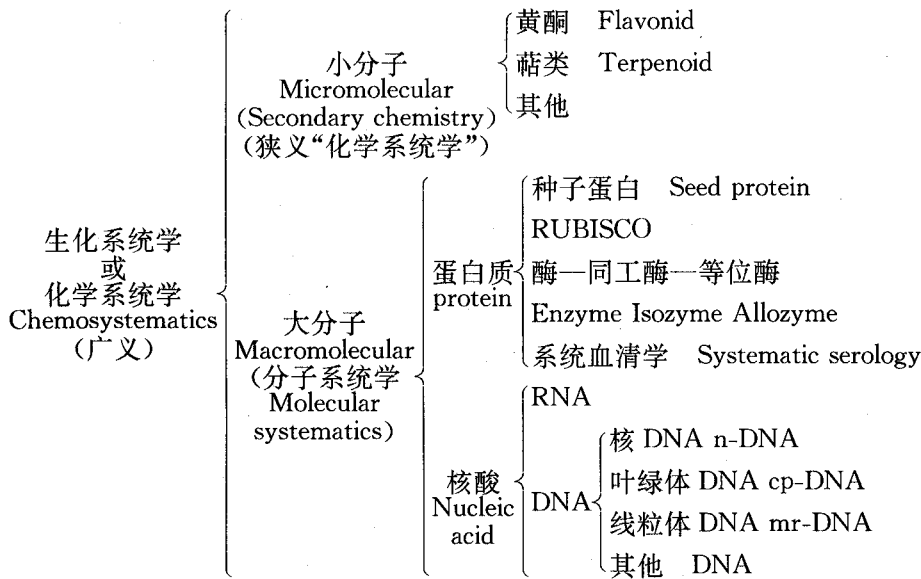
早期“同工酶”的概念是广义的,该术语的复杂性在于它不仅指各位点内的不同基因之间的产物,而且指所观察到的全部带,它包括了不同基因位点和同一位点的不同等位基因所编码的同一种酶,以及转录后的酶变体等所有酶电泳后的表现型。但近期的文献(如:Gottlieb 1983; Buth 1984; Weeden 和 Wendel 1989 等)使用的“同工酶”定义则是狭义的,它仅指由不同基因位点所编码的同一种酶的不同形式:“等位酶”是广义同工酶中的一部分;对转录后产生的酶变体,属次生的同工酶,它们中有的可能是由实验条件引起的分子变化,未必都存在于天然生物体内,没有相对应的编码基因,不再处理为同工酶。

Harris 1966 年首次把同工酶分析用于人类,Harris 和 Hopkinson^[3]在“人类遗传学酶电泳手册”一书中对酶催反应的化学基础作了详细的总览,使等位酶电泳分析的染色原理、方法和技术更趋于实用和系统化了,为在其他生物类群中的使用也奠定了基础。紧接着就是在动物研究中被广泛使用,随着资料的积累和方法上的需要,Richardson 等^[4]出版了“等位酶电泳——动物系统学和居群

研究手册”。

在植物研究中使用同工酶资料则起步稍晚,Gottlieb^[5,6]首次用于种子植物,Soltis 等^[7]开始用于蕨类植物,Cummins 和 Wyatt^[8]在苔藓植物的遗传多样性、系统学和进化研究中也使用同工酶资料。随着动物和植物等各领域使用的电泳方法的不断改进,在近十几年来,在植物系统学家中开始迅速普及,形成了高潮,爆炸式积累的等位酶分析资料,连同近十年来迅速发展的 DNA 分析以及其他大分子研究所获取的资料,对系统学和进化生物学已经开始形成了另一次新的巨大冲击。运用等位酶和 DNA 分析技术研究居群的遗传结构和关系(小进化)和估计种上类群间的亲缘关系和系统发育重建(大进化)的巨大潜力,使得它们从“化学系统学”或“生化系统学”中分化了出来,形成了一门新的学科——“分子系统学”,它包括了研究生物种内和种间的遗传多样性以及它们之间的进化过程 and 关系^[9,10,11]。

“分子系统学”和“化学系统学”的研究对象和关系可示意于下表:



同工酶分析不仅可以用来揭示生物居群遗传学结构,了解居群内、种内、种间乃至种上遗传多样性的情况;而且还可以用来判断其繁育系统的性质,生殖方式;结合居群的生态条件进行同工酶分析和 DNA 分析,则还可以了解生物适应生态环境的遗传学基础,近几年来,另一门新的学科——“分子生态学”的研究也已经从“生化生态学”分离了出来,开始形成并迅速发展。这几方面的工作的结合对生物多样性的研究,对种质资源的调查、保护和利用,特别是对珍稀濒危植物提出有效的保护和复壮方案,都将会起到重要作用。

科学和技术总是分不开的,在一定情况下,技术水平决定着科学研究的水平。我国虽然已有人在水产、林业、农业或动物遗传研究中作过一些同工酶电泳的工作,但普遍使用的是垂直的板状聚丙烯酰胺凝胶电泳,电泳所检验的酶也大都局限于在个体发育过程中易变的过氧化物酶和酯酶,对观察到的酶谱大多是作描述性的比较报道,没有对酶谱进行遗传学解释和分析,加上多为个别取样,而不是居群取样,因而从酶谱上很难获取有价值的规律性的结论。对淀粉凝胶电泳虽然有人作过尝试,但由于所用方法不成熟、不统一等原因,其结果不稳定,缺乏可重复性和准确性。而在国际上,经济高效的“水平切片淀粉凝胶电泳等位酶分析”方法正越来越成熟,已被广泛使用。在国内的

植物系统学和进化研究中,虽然有少数报道使用了同工酶资料,但是,他们直接把酶谱上带的多少、迁移率的差异作为数量性状进行聚类分析,这将是非常危险的,会导致完全错误的结论。

2 等位酶分析应用的范围

等位酶分析方法有着较宽的应用范围,对研究种以下的类群的居群遗传学结构、遗传多样性、繁育系统、探查无性系、地理变异、种间界线、近期系统发育重建、标本鉴定、推断杂种或多倍体的亲本、类群间的亲缘性等都有着巨大的潜力。cp-DNA 限制性位点分析方法具有类似的功能,目前发展也迅速,两者结合使用,在植物生物多样性的研究中正起着越来越大的作用。

2.1 种下应用

2.1.1 了解天然居群的遗传学结构。在居群生物学研究中,等位酶可以作为稳定的基因组的标记或者作为居群遗传学结构精确的估算标准。如:通过研究酶蛋白质等位基因的频率、多型位点的百分数 P 、每个位点等位基因的平均数 A 、每个位点的杂合度 H 、固定指数 F 、基因多样性 G_{st} 和 F —统计量等指标,可以初步了解一个种分布范围内的各居群内的基因丰富程度,描述一个种内的各居群内和居群间的等位基因的组成、分布情况,和等位基因在空间上和时间上变化。

从空间上来说,用等位基因的地理分布可以推断居群内的遗传学变异和结构,了解种内居群间的遗传差异,由此还可以推断它们之间的基因交流和繁殖隔离情况,从而推断居群间的历史情况。已有的同工酶资料表明,广布种往往包含有明显的遗传差异^[12],在形态上区别细微的不同细胞型或地理宗,过去被定为同一个广布种的类群,有的经同工酶分析探测出了明显区别,实际上是一个种的复合体,或者是由不同的地理或生态亚种、变种所组成的^[13,14]。

通过等位酶变异大小的比较,可以推断居群间的历史情况,迁徙方向,散布出去的居群的遗传结构往往比原来的居群单调得多,具有较少的等位基因或杂合性^[15]。这是“瓶颈作用”(Bottleneck effect)造成的,迁移到另一个地方定居的个体,它们只携带了一部分等位基因,由于地理或生态完全隔离或部分隔离的原因,它们不能和原来具有丰富等位基因的居群中的个体很好地进行基因交流,或者只能通过一个狭窄的通道——“瓶颈”进行交流,所以等位基因单调的情况得以长期保持。瓶颈作用可以是空间上的、生态上的,也可以是时间上的,在一个居群生存的历史时期内,如果有一段时间环境条件变化或恶化,某些等位基因的频率就可能下降或被淘汰,另一些等位基因的频率就可能上升。

在调查生物遗传多样性的工作中,等位酶分析目前占有最重要的位置。对于具有同样的染色体数目的同一个种的不同居群和不同个体的遗传上的多样性的调查,同工酶分析技术可以揭示其遗传上的变异。从保护的角度来讲,等位酶分析可以对种内变异性的的大小、基因的地理分布进行初步评估、发现稀有等位基因等,这对保护濒危种的遗传多样性、建立基因库、复壮濒危种都可以从酶基因的角度提出有遗传学根据的建议方案。

常规的方法对无融合生殖类群的无性系的遗传多样性的了解无能为力,然而,运用同工酶和等位酶分析则可以进行探查。

2.1.2 探查居群的繁育系统和交配类型。通过对等位酶杂合频率和固定指数的计算可以了解一个种是内繁育(Inbreeding,包括自花授粉、蕨类植物配子体内或配子体间自交、无融合结籽、无配孢子繁殖和营养繁殖等),还是外繁育(Outbreeding,包括异花授粉、蕨类植物配子体间交配等),推断它是有性生殖还是无融合生殖,散布方式等^[16]。在对珍稀濒危物种进行生殖生物学的研究中,等位酶分析将提供极有价值的遗传学资料说明其繁殖方式和状况,帮助找出繁殖上致濒的可能原因。

蕨类植物的精子必须通过自由水才能到达颈卵器中和卵子结合,完成授精作用,在天然情况

下,很难观察其授精情况,加上其两性的配子体,同一母株产生的大量孢子又常散落在一起,因此,它们一直被认为大多是通过配子体内或配子体间自交而进行内繁育的。但是,近些年的等位酶资料表明:蕨类植物居群中的杂合率却很高,表现出了明显的外繁育的特征,说明大多数蕨类植物存在着一种防止自交的机制^[17]。

2.1.3 父系分析。子代的酶基因来自双亲酶基因的组合,等位酶分析作为一种又快又准、可以立刻看到结果的手段,已被广泛地应用于包括人类在内的各种生物种内的父系分析(亲子鉴定),并已被用来检测天然居群繁育系统研究中亲本来源关系,即基因流的来源。

2.1.4 探查居群间分化的程度,为在种下划分亚种、变种提供遗传学依据、或探查和确立种间界线。进化在形态上和在上分子上往往是不一致的,已有资料表明,在等位酶分化的水平上和在形态学标准判断出来的分类群界线、地理分布式样可能很不相同。形态上被定为同一个种的两个“居群”之间可能没有任何基因交流;在形态上明显有区别的“种”,在等位酶分析资料所反映的遗传学关系上又可能几乎完全相同或相互有着密切的基因交流。因此,在分类学中运用等位酶资料,可以增加“种”这个基本分类单位在遗传上的聚合度,帮助选择更可靠的种内或种间的形态鉴别特征。另一方面,对于形态上和细胞学上可以发现某种区别,但又不好下决心进行分类学处理的居群,等位酶分析资料则可以提供划分为种、亚种或变种的根据。

2.1.5 生态遗传学与分子生态学。关于酶分子多样性的适应意义了解得还不多,目前,一些统计研究认为,大多数替换等位基因在选择上是均等的(中性的),但这可能只是由突变率和居群大小所决定的暂时情况。要了解等位酶在适应上的区别,需要研究它们在催化作用上的区别,有生理效果的催化作用上的区别,在自然环境里它们不同生理作用的适应效果上的区别,已经有些这方面的研究。通过对不同生态条件下的居群和同一个居群不同年份等位酶资料的调查,可以了解不同生态地里条件或生态条件变化对等位基因频率、居群遗传结构的影响,由此我们可以推断某些酶等位基因的适应意义,有可能发现和推断生态环境恶化可能引起的遗传结构的改变、某些等位基因减少或增多。如果掌握了基因频率与环境变化的关系,反过来,我们就有可能通过等位酶资料的调查来监测环境的变化。

2.2 种间和种上的应用

2.2.1 系统学和进化研究。植物的外部形态有很大的伸缩性,杂交、多倍体和无融合生殖的存在又常常使原来清楚的形态界线变得模糊,单纯用形态特征来作为系统学和进化研究的根据,有时会产生很多困难,而同工酶则可以作为一种稳定的基因组的标记,用来阐明系统学上的亲缘关系^[18,19]。通过对等位酶资料的遗传学计算,目前,可以对二倍体类群之间的亲缘关系的远近给出一个数量的表示,常用的指标是遗传学相似度(Genetic similarity 或一致度 Genetic identity)和遗传学距离(Genetic distance),从已有等位酶资料的类群的统计结果表明:种子植物属内种间的遗传学一致度约为 0.67,蕨类植物的约为 0.33,种子植物种内居群间的遗传学一致度约为 0.90,蕨类植物的则大于 0.91。同工酶资料也可以用来揭露形态上相近的种之间的遗传学关系。已有电泳证据表明,形态上近似的种有时在遗传上相差甚远,从而可以用来区分隐种(Cryptic species^[20])。

2.2.2 进化的速率和推算分化时间。根据“分子钟”的学说,还可以通过对近缘种的同工酶分析来估计推断类群间分化的时间和迁徙的方面,如:对东亚北美间断分布的鹅掌楸姊妹种之间的分离时间的推算^[21],约为 1.0~1.6 千万年以前;对藿香组植物的分化时间的推断^[22],其近缘种之间的遗传学距离是 0.288~0.673,遗传学一致度是 0.510~0.749,它们分化的时间可能是 1.45~7.0 百万年以前;枫香树属的亚洲种和美洲东北部的种的遗传学一致度和分离时间与鹅掌楸的情况非常相似^[23]。当然,生物进化的历史并不是按照分子钟的速度直线前进的,用同工酶资料估计分化时间

究竟有几分把握? 仍然是个问题^[24], 但它毕竟可以给出一个粗略的估计。

2.2.3 测定杂种的起源。准确地鉴定杂种的亲本常常是必须的, 当根据形态学、细胞学等方面的证据作出了假定的亲缘关系判断以后, 通常要进行人工杂交, 然后观察子代染色体减数分裂时的行为来验证杂种的起源。然而, 同工酶分析使得亲本的单个位点上的不同等位基因成为可见, 对于两个给定的二倍体种来说, 在一些位点上等位基因通常表现出固定的区别, 所以无论这些二倍体出现在哪儿, 它们的酶谱就会出现在哪儿, 这种反映在酶谱上的等位基因区别都可以用来作为识别二倍体亲本种存在的标志, 使我们能够辨别它们各自对杂种或异源多倍体的贡献。近期产生的杂种或多倍体将表现出亲本类群的等位基因的合成物, 因为这些等位基因所编码的等位酶是共显表达的^[25,26], 通过酶谱中带的多少及组合情况可以了解杂种和多倍体的存在、验证它们来源的假说或推断其亲本来源, 通过多种酶的观察印证, 就足以判断个体或类群间的遗传学来源关系。对于找不到亲本源的带谱, 它们有可能代表了已经绝灭了的二倍体祖先种的遗传学贡献。不仅对三倍体以上的多倍体杂种, 对于在同一个二倍体水平或其他方式进行的杂交、物种形成, 对于无法进行杂交试验的不育杂种的亲本探测, 等位酶电泳分析都提供了研究的有力工具。

2.2.4 测定多倍体植物的起源。多倍体在植物进化中占有重要的位置, 被子植物有近 30% 的种是多倍体 (Stebbins 1950), 蕨类植物则是 45% (Vida 1976), 异源多倍体对分类学来说常常是一个造成混乱的因素, 然而它们的存在、亲本来源关系已被很好地证明并且用公式表示出来的却很少。通过等位酶分析, 杂种亲本的等位基因会表现在它的酶谱上, 无论是种内还是种间多倍体, 也无论是同源还是异源多倍体, 都可以作出估计, 从而对阐明多倍体复合体的亲本来源关系、研究网状进化提供了广阔的前景^[27]。在生物系统研究中, 原来建立在形态学和细胞学基础上的亲缘关系网, 通过同工酶分析的检验, 有的被进一步证实了, 如: 网状进化的经典例子, 阿帕拉契山铁角蕨复合, 笔者 1991 年在田纳西大学对该复合体中有关三倍体杂种 *Asplenium* × *trudellii*、三染色体组杂种 *A.* × *kentuckiense* 和异源四倍体 *A. pinnatifidum* 等部分种之间的关系进行了同工酶分析验证, 结果与用形态学、细胞学和黄酮类化合物分析方法所作的判断完全一致, 有的长期争论不下的亲本来源关系假说, 则被明确地作出了仲裁, 如: 异源四倍体 *Asplenium plenum* 的来源^[26]; 有的从形态学和细胞上难以判断的隐种、多倍体和杂种的亲本、隐复合体则被发现了。

在推断多倍体亲本时也会遇到一些复杂情况, 例如: 在杂交形成多倍体后, 二倍体亲本和杂种四倍体分别仍在进化, 新产生的等位基因变化, 会使原来很清楚的亲本来源关系变得模糊。例如: 其他种的基因流又掺和进来、孤儿等位基因 (Orphan allele)、沉默基因等。由于这些复杂化因素, 看来用同工酶资料推断多倍体亲本的工作, 会随着该多倍体世系的年龄的增加而变得越来越困难。

2.2.5 探讨物种形成。过去生物学中的一些传统的看法, 有的已被等位酶的研究所改变, 例如: 蕨类植物的高染色体数目常被看作是多倍体, 但酶的表现型却表明它们是二倍体^[26], 这被解释为是复份基因通过沉默基因 (Gene silencing) 而二倍化的结果, 产生了多倍体水平上的物种形成^[29]。

对于无融合生殖类群 (如: 种子植物的无融合结籽, 蕨类植物的无配孢子繁殖) 的物种形成和进化过程等, 无法用常规的杂交试验进行遗传学分析, 而等位酶电泳分析则提供了研究可能^[30], 同工酶资料表明, 有些无配孢子繁殖的类群 (如: 二倍体的凤尾蕨 *Pteris cretica* 及其不同倍性的亲缘种) 是通过其可育的卵子和其他有性生殖类群的精子杂交而进化的。此外, 同工酶分析资料还被用来研究通过花粉传播形成的基因流的情况、植物和昆虫的相互作用、表现型和环境的关系、变异性和特有现象、检查形态学或细胞学和多型性之间的一致关系等。 (第 2 期接续)