白皮松的保育遗传学研究 I . 基因保护分析

李 斌¹ 顾万春¹ 周世良²

1 (中国林业科学院林业所种质资源室, 北京 100091)

2 (中国科学院植物研究所系统与进化植物学重点实验室, 100093)

摘要 : 在白皮松主要分布区抽取了 10 个天然群体进行酶电泳分析 , 共测定了 16 种酶系统 , 得到 31 个清晰酶位点和 53 个等位基因。按照基因频率进行分类 , 53 个基因中有 32 个全局基因、14 个广域基因、6 个局域基因和 1 个特异基因。通过计算机模拟建立基因捕获曲线的结果表明 , 随机抽取 5 个群体可平均捕获 99.9% 的基因。群体的等位基因频率与地理生态因子的相关分析表明 , *Idh* 与 *Pgi-2* 两个位点的基因频率呈现明显的梯度变异。该项研究为有效保护白皮松天然群体的基因资源提供了依据。

关键词 : 白皮松 , 等位酶 , 梯度变异 , 基因保护

中图分类号 : S791.243 , Q16 文献标识码 : A 文章编号 : 1005 - 0094(2003)01 - 0028 - 09

Conservation genetics of *Pinus bungeana*. I . Gene conservation analysis

LI Bin¹ , GU Wan-Chun¹ , ZHOU Shi-Liang²

1 Research Institute of Forestry , Chinese Academy of Forestry , Beijing 100091

2 Laboratory of Systematic and Evolutionary Botany , Institute of Botany , Chinese Academy of Sciences , Beijing 100093

Abstract : *Pinus bungeana* is an endemic pine with typical fragmented distribution in central and north-western China. Its genetic diversity is gradually decreasing and needs to be conserved. For strengthening its genetic resources conservation , ten populations were sampled in the main distribution areas of *Pinus bungeana* and studied by starch gel electrophoresis on 16 enzyme systems. On the basis of analysis of allozyme bands , 31 loci and 53 alleles were coded , among which , there were 32 essential genes , 14 wide-spread genes , six sporadic genes and one unique gene. Differences exist in the number and type of genes among populations. The central population P4 had the largest number of genes , and the marginal populations P1 , P7 and P10 had the least , but they had more rare and unique genes. Sampling capture curve analysis indicated that the captured genes increased when the sampled populations increased , and 99.9% out of the whole gene pool of ten populations would be captured when five populations were randomly selected. Correlation analysis showed that gene frequency on loci *Idh* and *Pgi-2* had gradient variation trends which were in accord with most of the phenotypic characteristics. This study provides the basis for gene conservation in natural populations of *P. bungeana*.

Key words : *Pinus bungeana* , allozyme , gradient variation , gene conservation

白皮松(*Pinus bungeana*)是分布于我国中部、西北及华北等地的重要抗旱针叶树种 , 是生态林业工程建设的优良树种 , 因其独特的树皮和优美的干型 , 在城市园林绿化中也得到越来越广泛的应用。据报道 , 白皮松曾广泛分布于我国西北陕、甘、晋诸省 , 但

自唐代以后 , 由于历年战乱的破坏和滥伐 , 目前资源量已大大减少 , 呈现明显的片段化分布 , 有些群体数量极少 , 成为残次分布群体(赵焱等 , 1995) , 导致遗传多样性下降 , 因此加强白皮松遗传资源的研究和保护具有较大的现实意义。近 10 年来相继开展了

基金项目 : 国家十五攻关项目“ 林木种质保存技术创新与利用研究 ”(2001 - 13) 和国家基础性工作项目“ 林木种质资源收集保存 ”(1999 , 2000 , 2001)

收稿日期 : 2002 - 05 - 16 ; 接受日期 : 2002 - 09 - 15

作者简介 : 李斌 , 男 , 1969 年出生 , 博士生 , 主要从事林木种质资源保存、评价和利用研究。Email : libin@rif.forestry.ac.cn

针对白皮松的研究。崔克明等(1997)曾对白皮松形成层活动周期中过氧化物酶、脂酶同工酶做过研究,对了解白皮松形成层的活动规律起到了一定的作用;Wang & Szmidi (1993)以及 Wang *et al.* (1999, 2001)用分子标记研究了包括白皮松在内的亚洲松树种的起源及遗传多样性,认为白皮松与单维管束亚属的其他松树种有较大差异,构成 1 个单独的世系,对进一步研究白皮松群体的遗传多样性具有重要的参考价值;王小平等(1998, 2000)对白皮松的种子性状等进行了研究;李斌等(2002)对白皮松表型多样性进行了报道。但迄今为止,尚未见到在同工酶或 DNA 水平上直接探讨白皮松保育遗传学的相关报道。

保育遗传学即运用遗传学的原理和研究手段,以遗传多样性的研究和保护为核心的一门新兴学科(Woodruff, 1989)。随着分子生物学与群体遗传学相结合,近十多年来,关于保育遗传学的研究日益增多(Kim *et al.*, 1994; Frankham, 1995; Avise & Hamrick, 1996; Goldstein *et al.*, 2000),但野生或天然资源的保育遗传学研究仍十分缺乏。如何根据等位基因的频率多度划分等级,进而制定核心种质保存的样本策略,使样本量大量精简而被保存的遗传多样性不受损失或仅受极少量损失,已成为保育遗传学或种质资源学家们探索的关键问题之一(Brown, 1989; Spagnoletti & Qualset, 1993; 顾万春等, 1998; Hu & Xu, 2000)。

虽然与 DNA 标记相比,等位酶实验的分析方法已成为传统方法,但通过遗传分析找到基因位点,能有效地度量群体遗传变异的大小及其分布(Crawford, 1990; 葛颂, 1994),因此它对于在基因位点的水平上研究保育遗传学、进化生态学和分子生态学,仍具有广阔而实用的前景(王中仁, 1996)。本研究以白皮松为试材,在同工酶实验的基础上,进行了基因频率的等级划分和梯度变异分析,进而讨论了白皮松天然群体基因保护的抽样策略,以期为我国白皮松天然资源的保育遗传学研究与实践提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

所用材料均取自我国中部及西北地区的白皮松天然林,共 10 个群体(P1、P2、P3、P4、P5、P6、P7、P8、P9、P10),这 10 个白皮松群体的地理位置详见图 1

和表 1。10 个群体中,有 7 个群体(P3、P4、P5、P6、P8、P9、P10)分单株采集球果和种子,即每群体随机确定 30 棵母株,每株随机采集 15~20 个未开裂成熟球果;另外 3 个群体(P1、P2、P7)因单株采种有困难,所以采取混合样本。所有采回的球果分别干燥、脱籽、净种,最后保存在冷藏库(5~10℃)下备用。由于裸子植物种子可分离出二倍体的胚和单倍体的胚乳(雌配子体),故直接利用单倍体胚乳的电泳酶谱来分析其等位基因是否符合孟德尔分离规律,从而确定谱带所代表的酶位点。

1.2 方法

每单株随机抽取自由授粉种子 30~50 粒(部分种子用于交配系统分析),在湿润培养皿中置于 25℃ 的恒温箱中培养,待种子露白后,剥取每粒种子的单倍体胚乳用于实验。分别取每粒胚乳加 2 滴重蒸水(与马来酸、复杂磷酸、Tris-盐酸等提取液作对比之后,认为用重蒸水作提取液最好),在冰浴条件下研磨提取酶样品。沁子(wick)按常规制成 2 mm × 6 mm 大小,直接吸取研磨后的提取液。每单株平均分析 6~8 粒种子的胚乳。混合群体每群体测定 120 粒种子。实验中,将每 2 粒胚乳混合一起研磨提取,上样电泳。采用水平切片淀粉凝胶电泳技术(王中仁, 1996),通过大量对比实验,选出 3 种电极缓冲液和相应的凝胶缓冲系统分别用于不同的酶系统。电泳在 4℃ 冰箱中进行,为防止电流过胶使胶变热,在胶板上均匀放置冰盒,冰盒与胶之间用玻璃板隔开。待溴酚蓝移至电泳槽顶端时停止电泳,切胶染色(Soltis *et al.*, 1983; 王中仁, 1996)。染色后即时记录谱带和照相。在基因频率统计的基础上,按照基因在群体的分布频率进行基因分类、样本捕获曲线分析(Kim *et al.*, 1994)和基因频率的 EGA 生态梯度变异趋势分析(李斌等, 2002)。

2 结果与分析

根据大量的预备实验,从 23 种酶系统中筛选出 16 种分离良好、谱带清晰的酶系统(表 2)。根据不同酶谱带在个体和群体中的分布,参考裸子植物有关酶系统的文献,尤其是松属植物的等位酶分析资料,最终确定了 31 个清晰位点(表 2),其中多态位点 17 个(具有 2 个等位基因的位点 12 个,具有 3 个等位基因的位点 5 个),多态位点百分率为 54.8%。共检测出等位基因 53 个,平均等位基因数为 1.74。

图 1 白皮松分布区与采样点位置图
Fig.1 Distribution map and the locations of sampled populations of *Pinus bungeana*.

表 1 白皮松 10 个群体采样地点的地理生态因子
Table 1 Geographical and ecological factors of collection sites of seeds and cones of *Pinus bungeana*

生态因子 Ecological factor	群体 Population									
	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
纬度 Latitude	31°48"	32°58"	33°30"	33°53"	33°55"	36°12"	35°10"	34°06"	34°05"	34°36"
经度 Longitude	104°57"	107°51"	106°10"	109°27"	106°15"	111°21"	113°02"	106°02"	105°58"	106°12"
海拔 Altitude (m)	950	1050	1170	1200	1530	1160	1450	950	1130	1031
年均温 Mean annual temperature (°C)	15.9	13.4	12.1	13.1	11.4	10.1	14.3	9.5	8.2	8.5
年降水量 Annual precipitation (mm)	1143	880	939	883.3	650.5	550	620	630	630	636
土壤类型 Soil type	SAC	SAL	SAL	SAL	SAL	LIT	SAC	SAL	SAL	SAL

Note : P1 , 四川江油 Jiangyou , Sichuan ; P2 , 陕西西乡 Xixiang , Shaanxi ; P3 , 甘肃徽县 Huixian , Gansu ; P4 , 陕西蓝田 Lantian , Shaanxi ; P5 , 甘肃两当 Liangdang , Gansu ; P6 , 山西临汾 Linfen , Shanxi ; P7 , 河南沁阳 Qinyang , Henan ; P8 ~ P12 , 甘肃左家 A Zuojia A , Gansu ; P9 , 甘肃左家 B Zuojia B , Gansu ; P10 , 甘肃天水 Tianshui , Gansu ; SAL , 微碱性 Slight alkaline ; SAC , 微酸性 Slight acid ; LIT , 中性 Litmusless .

在 16 个酶系统中 , 氨基肽酶(AMP)没有出现多态位点 , 只有 2 个单态位点(图 2 , 表 2 , 表 3)。

2.1 基因频率在群体间的分布与变异

分别统计 10 个群体 31 个位点 53 个等位基因出现的频数 , 然后除以总观测个数 , 得到各基因的频率(表 3)。在等位基因频率统计的基础上 , 根据基因频率的大小对基因进行等级划分 , 可将等位基因按照出现的频率大小分为 4 类(Kim *et al.* , 1994) : (1) 在所有群体均出现的基因为全局基因(essential gene) (2) 出现频率小于 1.0 大于 0.3 的为广域基因(widespread gene) (3) 出现频率小于或等于 0.3 大于 1/*n* 的为局域基因(sporadic gene) (4) 只在一个群体出现的基因为特异基因或独有基因(unique

gene)(Kim *et al.* , 1994)。从表 3 可以看出 , 14 个单态位点的基因和 16 个多态位点(*Pgm* 位点除外) 的大量基因在 10 个群体均有分布 , 另外 , *Aco* 和 *Mdh-2* 两个位点出现 2 个大量基因(*a* , *b*) , 所以总共 53 个等位基因中有 32 个基因在每个群体均有分布 , 所以称这 32 个基因为全局基因 ; 出现群体大于 3 个群体小于 10 个群体的基因 14 个 , 因而称这 14 个基因为广域基因 ; 出现群体大于 1 个小于 4 个的基因为局域基因 , 共有 6 个 ; 只在单个群体出现的基因只有 1 个 *Fba-1-b* , 只在边缘群体 P7 中出现(图 1) , 称之为特异基因。各群体的等位基因数存在较大差异 , 其中拥有等位基因最多的是中心群体 P4 (图 1) , 等位基因数为 50 个 ; 边缘群体 P1、P7 和

图2 部分白皮松同工酶谱照片

Fig.2 Representative gel pictures of *Pinus bungeana*

a:AAT; b:ACO; c:ADH; d:AMP; e:IDH; f:DIA; g:FBA; h:MNR;
i:ME; j:GDH; k:G6PD; l:MDH; m:PGI; n:PGD; o:PGM; p:SKD.

表 2 16 种酶系统及其位点数目
Table 2 Sixteen enzyme systems and their number of loci

名称 Enzyme name	缩写 Abbrev.	酶代码 EC No.	位点数 No. of loci	多态位点数 No. of polymorphic loci	缓冲液系统 Buffer system
天冬氨酸转氨酶 Aspartase aminotransferase	AAT	2. 6. 1. 1	3	1	S6
乌头酸酶水合酶 Aconitate hydratase	ACO	4. 2. 1. 3	1	1	S6
乙醇脱氢酶 Alcohol dehydrogenase	ADH	1. 1. 1. 1	2	1	W2
氨基肽酶 Aminopeptidase(包括亮氨酸氨基肽酶 LAP)	AMP	3. 4. 11. 1	2	0	S6
心肌黄酶 Diaphorase	DIA	1. 6. 2. 2	4	1	W2
果糖二磷酸醛缩酶 Fructose-bisphosphate aldolase	FBA	4. 1. 2. 13	2	2	S1
谷氨酸脱氢酶 Glutamate dehydrogenase	GDH	1. 4. 1. 2	2	1	W2
葡萄糖脱氢酶 Glucose-6-phosphate dehydrogenase	G6PD	1. 1. 1. 49	1	1	W2
异柠檬酸脱氢酶 Isocitrate dehydrogenase	IDH	1. 1. 1. 42	1	1	W2
苹果酸脱氢酶 Malate dehydrogenase	MDH	1. 1. 1. 37	3	2	W2
苹果酸酶 Malic enzyme	ME	1. 1. 1. 40	2	1	W2
维生素 K 还原酶 Menadione reductase	MNR	1. 6. 99. 2	2	1	W2
6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶 6-phosphogluconate dehydrogenase	PGD	1. 1. 1. 44	2	1	S1
磷酸葡萄糖异构酶 Phosphoglucoisomerase	PGI	5. 3. 1. 9	2	1	S1
磷酸葡萄糖变位酶 Phosphoglucomutase	PGM	5. 4. 2. 2	1	1	S1
莽草酸脱氢酶 Shikimate dehydrogenase	SKD	1. 1. 1. 25	1	1	S6

P10 的等位基因数较少 ,分别为 43、41、40 个 ,但是却拥有较多的局域基因和特异基因。每个群体平均等位基因数为 44. 2。

2. 2 基因频率的地理生态梯度变异分析

选取 17 个多态位点的大量基因(总群体出现频率最大者) ,分别与纬度、经度、海拔高度及综合生态梯度值(李斌等 ,2002)进行相关分析。结果显示 ,共有 4 个位点与上述 4 个地理生态因子分别达到显著相关 :其中与纬度和经度显著相关的为 *Idh-a* ;与海拔高度显著相关的为 *Aco-a* 和 *Me-1-a* ;与 EGA 显著相关的为 *Idh-a* 和 *Pgi-2-α* (表 4)。

Idh-a 与纬度、经度、海拔高度和 EGA 均成正相关 ,也即呈东北—西南走向 :越往东北或者海拔越高 ,则 *Idh-a* 的频率越高 ;反之越低。与 *Idh-a* 特性相似的是 *Aco-a* ,只是 *Aco-a* 主要受海拔高度的影响 ,与纬度和经度相关不显著。*Pgi-2-a* 则与生态因子成反比关系 ,形成西南—东北走向 :越往西南或海拔越低 ,则 *Pgi-2-a* 的频率越高。*Me-1-a* 与海拔高成反比 ,海拔越低频率越高。

2. 3 基因捕获曲线与取样分析

本文测定的群体和同工酶都属于样本而不是总体 ,因此适合采用计算机随机模拟取样分析方法 (Kim *et al.* ,1994) ,通过随机取样建立基因捕获曲线。从图 3 可以看出 ,随着抽取的群体数增加 ,捕获的基因数递增 ,递增的速率逐渐减慢 ;当群体数达到

一定数量时 ,捕获的基因数趋于平稳。具体结果是 :随机抽样 1 ~ 4 个群体可分别达到平均捕获 78. 3 %、89. 8 %、95. 8 %、98. 2 % 的基因 ,随机抽样 5 个群体可以达到捕获 99. 9 % 的等位基因(见图 3)。然后采取随机减少参试群体的模拟 ,结果每减少 1 个群体 ,则总等位基因数平均减少 1 个(图 4) ,说明总参试群体的数量本身也会影响到最后抽样的结果 ,这对基因保护和试验群体的取样都具有借鉴意义。

3 讨论与结论

3. 1 白皮松等位基因丰富程度

树种的等位基因丰富程度不但可以反映该树种的遗传多样性高低 ,直接影响其遗传资源的抽样保护策略 ,而且可在一定程度上反映该树种的系统发育地位。根据基因分布与分类分析 ,白皮松 53 个等位基因中绝大部分为全局基因和广域基因 ,占 46 个 ;局域基因与特异基因很少 ,仅 7 个。各群体间等位基因数存在一定差异 ,介于 40 ~ 50 个之间 ,平均 44. 2 个。说明白皮松等位基因总体水平不丰富 ,但群体间仍然存在变异。白皮松平均等位基因数 $A = 1. 74$,与松属中其他树种相比处于偏下水平(表 5)。

3. 2 基因频率的梯度变异

同工酶位点不同等位基因的频率随着地理生态梯度呈现渐变趋势 ,国内外均有相关报道(Hamrick & Allard , 1972 ; Mitton *et al.* , 1980 ; Bergmann &

表 3 白皮松 10 个群体等位基因频率分布统计
Table 3 Allele frequency of 10 populations of *Pinus bungeana*

位点 Loci	等位基因 Allele	平均频率 Mean of frequency	群体内基因频率 Gene frequency within populations									
			P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
<i>Aat-1</i>	<i>a</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>Aat-2</i>	<i>a</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>Aat-3</i>	<i>a</i>	0.7975	0.85	0.65	0.9	0.525	0.825	0.525	0.85	0.95	0.975	0.925
	<i>b</i>	0.105	0.05	0.3	0.05	0.325	0	0.025	0.15	0.05	0.025	0.075
	<i>c</i>	0.0925	0.1	0.05	0.05	0.125	0.175	0.425	0	0	0	0
<i>Aco</i>	<i>a</i>	0.799	0.775	0.75	0.975	0.725	0.965	0.8	0.875	0.65	0.725	0.75
	<i>b</i>	0.1885	0.175	0.2	0.025	0.25	0.035	0.2	0.125	0.35	0.275	0.25
	<i>c</i>	0.0125	0.05	0.05	0	0.025	0	0	0	0	0	0
<i>Adh-1</i>	<i>a</i>	0.8175	1	1	0.975	0.325	0.525	0.525	1	1	0.9	0.925
	<i>b</i>	0.1825	0	0	0.025	0.675	0.475	0.475	0	0	0.1	0.075
<i>Adh-2</i>	<i>a</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>Amp-1</i>	<i>a</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>Amp-2</i>	<i>a</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>Dia-1</i>	<i>a</i>	0.83	1	1	1	0.775	0.625	1	1	0	0.975	0.925
	<i>b</i>	0.17	0	0	0	0.225	0.375	0	0	1	0.025	0.075
<i>Dia-2</i>	<i>a</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>Dia-3</i>	<i>a</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>Dia-4</i>	<i>a</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>Fba-1</i>	<i>a</i>	0.9975	1	1	1	1	1	1	0.975	1	1	1
	<i>b</i>	0.0025	0	0	0	0	0	0	0.025	0	0	0
<i>Fba-2</i>	<i>a</i>	0.8875	1	1	1	0.575	0.6	0.725	0.975	1	1	1
	<i>b</i>	0.1125	0	0	0	0.425	0.4	0.275	0.025	0	0	0
<i>G6pd1</i>	<i>a</i>	0.955	1	1	1	0.825	1	1	0.9	0.925	0.9	1
	<i>b</i>	0.045	0	0	0	0.175	0	0	0.1	0.075	0.1	0
<i>G6pd2</i>	<i>a</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>Gdh</i>	<i>a</i>	0.02	0.025	0	0	0	0	0	0	0.175	0	0
	<i>b</i>	0.975	0.95	1	1	1	1	1	1	0.825	0.975	1
	<i>c</i>	0.005	0.025	0	0	0	0	0	0	0	0.025	0
<i>Idh</i>	<i>a</i>	0.83	0.35	0.8	0.975	0.975	0.75	0.95	1	0.775	0.75	0.975
	<i>b</i>	0.17	0.65	0.2	0.025	0.025	0.25	0.05	0	0.225	0.25	0.025
<i>Mdh-1</i>	<i>a</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>Mdh-2</i>	<i>a</i>	0.3025	0.35	0.3	0.2	0.15	0.2	0.2	0.375	0.375	0.475	0.4
	<i>b</i>	0.6875	0.65	0.7	0.8	0.8	0.8	0.775	0.6	0.625	0.525	0.6
	<i>c</i>	0.01	0	0	0	0.05	0	0.025	0.025	0	0	0
<i>Mdh-3</i>	<i>a</i>	0.8425	1	1	0.45	0.925	0.45	0.6	1	1	1	1
	<i>b</i>	0.1575	0	0	0.55	0.075	0.55	0.4	0	0	0	0
<i>Me-1</i>	<i>a</i>	0.92	0.975	1	0.925	1	0.575	0.925	0.975	0.9	0.925	1
	<i>b</i>	0.08	0.025	0	0.075	0	0.425	0.075	0.025	0.1	0.075	0
<i>Me-2</i>	<i>a</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>Mnr-1</i>	<i>a</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>Mnr-2</i>	<i>a</i>	0.6775	0.95	1	0.5	0.625	0.6	0.6	1	0.5	0.5	0.5
	<i>b</i>	0.3225	0.05	0	0.5	0.375	0.4	0.4	0	0.5	0.5	0.5
<i>Pgd-1</i>	<i>a</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>Pgd-2</i>	<i>a</i>	0.795	1	1	1	0.925	0.7	0.9	1	0.5	0.45	0.475
	<i>b</i>	0.205	0	0	0	0.075	0.3	0.1	0	0.5	0.55	0.525
<i>Pgi-1</i>	<i>a</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>Pgi-2</i>	<i>a</i>	0.89	1	1	1	0.7	0.675	0.525	1	1	1	1
	<i>b</i>	0.11	0	0	0	0.3	0.325	0.475	0	0	0	0
<i>Pgm</i>	<i>a</i>	0.66	0.95	0.775	1	0.875	0.35	0.775	1	0.825	0.05	0
	<i>b</i>	0.34	0.05	0.225	0	0.125	0.65	0.225	0	0.175	0.95	1
<i>Skd</i>	<i>a</i>	0.1225	0.15	0.05	0.025	0.2	0.3	0.025	0	0.35	0.125	0
	<i>b</i>	0.06	0	0.225	0.025	0.15	0.075	0.05	0.075	0	0	0
	<i>c</i>	0.815	0.85	0.725	0.925	0.65	0.625	0.925	0.925	0.65	0.875	1
等位基因数 No. of alleles		53	44	41	43	50	47	48	41	43	45	40

表 4 基因频率与生态因子间的相关分析
Table 4 Correlation between gene frequency and ecological factors

酶位点及其 常见基因 Locus and its common alleles	生态因子 Ecological factor			
	纬度 Latitude	经度 Longitude	海拔 Altitude	综合生态 梯度值 EGA
<i>Aat-3-a</i>	-0.21	-0.56 *	-0.14	-0.26
<i>Aco-a</i>	0.005	0.104	0.689 *	0.354
<i>Adh-1-a</i>	-0.33	-0.29	-0.39	-0.43
<i>Fba-2-a</i>	-0.28	-0.29	-0.54 *	-0.47
<i>G6pd-1-a</i>	-0.22	-0.36	-0.04	-0.2
<i>Gdh-b</i>	0.02	0.332	0.401	0.25
<i>Idh-a</i>	0.698 *	0.582 *	0.434	0.702 *
<i>Mdh-2-a</i>	-0.08	-0.25	-0.43	-0.29
<i>Mdh-3-a</i>	-0.2	0.011	-0.49	-0.36
<i>Me-1-a</i>	-0.09	0.225	-0.58 *	-0.31
<i>Mnr-2-a</i>	-0.34	0.359	0.089	-0.12
<i>Pgd-2-a</i>	-0.22	0.446	0.206	0.023
<i>Pgi-2-a</i>	-0.48	-0.4	-0.41	-0.54 *
<i>Pgm-a</i>	-0.08	0.402	0.072	0.035
<i>Skd-c</i>	0.19	0.156	-0.16	0.057

$r_{(0.05)} = 0.497$; * represents significance at 0.05 level

图 3 白皮松群体基因捕获曲线
Fig.3 Gene capture curves of populations in *P. bungeana*

图 4 白皮松群体基因丢失的模拟曲线
Fig.4 Gene loss curves of populations in *P. bungeana*

Gregorius ,1993 ;Zhao *et al.* ,2000) ,这对于揭示物种形成过程及其成因具有重要的意义(Endler ,1977)。等位基因的这种随着生态梯度渐变的关系表明 ,遗传变异可通过自然选择得以保持(Zhao *et al.* ,2000)。Bergmann(1978)在对挪威云杉(*Picea abies*)的同工酶研究中 ,发现酶系统 ACPH (Acid phosphatase) 的等位基因频率与纬度和海拔高度的梯度变异有关 ,相似的报道在 *Pinus ponderosa* 研究 中也有。Mitton(1980)报道 ,酶系统 PGM(Phospho- glucomutase) 的等位基因频率也存在梯度变异。这种基因频率的梯度变异暗示了自然选择对基因频率的作用 ,反过来也说明了基因对环境的适应性。但是 ,也有报道称基因频率与生态环境间不存在关联 ,如 Oyama *et al.* (1993)在研究 *Arabis serrata* 等位酶 基因频率的分布时指出 ,虽然 *Arabis serrata* 群体的 表型性状无论在天然生长还是人为控制环境条件下 均表现出随海拔梯度渐变的规律 ,但是其同工酶的 等位基因频率沿海拔梯度变异很小 ,不存在梯度变 异趋势。本研究中 ,在所有的 31 个多态位点中 ,有 4 个位点的等位基因在不同方面表现出了梯度变 异 ,其余 27 个多态位点则变异不明显。说明大多数 基因并不受环境调节 ,只有极少数基因受环境调节 , 形成梯度式变异 ,而且其变异模式与白皮松表型性 状的地理变异基本吻合(李斌等 ,2002) ,这对进一 步研究遗传型与表型的耦合关系具有重要的指导意 义 ,也为适应性状的基因保护提供了依据。

梯度变异也意味着渐变群(clines)的存在 ,起因 于气候历史因素或自然选择的基因频率梯度将导致 在渐变群中出现连锁不平衡(Li & Nei ,1974)。在 最初的渐变群内 ,这种不平衡与选择相互作用 ,将反 过来产生一个基因频率阶梯 ,沿着梯度连续变化的 环境条件可能导致花期不遇 ,从而限制了群体间的 基因流 ,使得基因流动减少。渐变群可通过基因扩 散与自然选择间相互作用来维持一种阶梯平衡 (Felsenstein ,1976) ,而且在平衡状态时 ,这个阶梯 的大小将与基因频率的梯度大小成正比(Barton , 1979)。因此 ,在本研究中 ,白皮松天然群体间存在 明显的遗传分化 ,是因为其群体间基因流受到了限 制 ,难以克服其对自然条件(小环境)的天然选择效 应。基因频率梯度变异的研究结果 ,部分揭示了白 皮松天然群体在同工酶位点的地理变异 ,为进一步

表 5 其他松树树种平均等位基因数测定结果
Table 5 The mean number of alleles (*A*) of other *Pinus* species

序号 No.	种名 Species	群体数 No. of populations	位点数 No. of loci	平均等位基因数 <i>A</i>	文献来源 Source of references
1	日本黑松 <i>Pinus thunbergii</i>	17. 500	18. 500	1. 990	Kim <i>et al.</i> (1994)
2	日本赤松 <i>P. densiflora</i>	25. 000	23. 000	2. 440	Kim <i>et al.</i> (1994) 杨一平等(1989)
3	红松 <i>P. koraiensis</i>	13. 500	24. 500	1. 895	Kim <i>et al.</i> (1994)
4	黑材松 <i>P. jeffreyi</i>	9. 000	31. 500	1. 970	摘自张春晓等(1998)
5	欧洲黑松 <i>P. nigra</i>	13. 667	30. 000	2. 025	摘自张春晓等(1998)
6	欧洲赤松 <i>P. sylvestris</i>	13. 143	26. 500	2. 600	摘自张春晓等(1998)
7	辐射松 <i>P. radiata</i>	2. 333	32. 000	1. 645	摘自张春晓等(1998)
8	长白松 <i>P. sylvestris</i> var. <i>sylvestriformis</i>	2. 000	8. 000	2. 190	杨一平等(1991)
9	瑞士五针松 <i>P. cembra</i>	13. 500	13. 500	1. 700	摘自顾万春等(1998)
10	欧洲白皮松 <i>P. leucodermis</i>	3. 500	23. 000	1. 500	摘自顾万春等(1998)
11	偃松 <i>P. pumila</i>	3. 000	17. 000	2. 300	摘自顾万春等(1998)
12	西伯利亚红松 <i>P. sibirica</i>	9. 000	14. 000	1. 600	摘自顾万春等(1998)
13	中美洲松 <i>P. attenuata</i>	9. 667	26. 333	1. 600	Dvorak <i>et al.</i> (1999) 葛颂等(1988)
14	马尾松 <i>P. massoniana</i>	9. 000	28. 000	2. 200	Huang & Zhang (2000)
15	云南松 <i>P. yunnanensis</i>	15. 000	33. 000	2. 100	虞泓等(1999)
均值 Mean		10. 084	24. 300	1. 982	

揭示白皮松的遗传结构与开展其多样性保护利用提供了科学依据。

3. 3 基因保护的抽样策略

按照等位基因在群体内的频率分布进行分类 , 可以为遗传资源保护提供线索。对于共有基因 , 在制定保护计划时不需要考虑 , 因为保护任意一个群体就可以达到保护它们的目的 ; 对于广域基因 , 由于大多数群体都有 , 所以需要避免不包含它们的少数群体 ; 对于局域基因 , 在保护时就必须考虑拥有该基因的群体(如 P1、P4、P5、P8 等) ; 而对于特异基因 , 在保护时可以不予考虑(Kim *et al.* , 1994) , 如果需要考虑时 , 则包含该基因的群体就必须首先被选择 , 如 P7。根据上述分析结果 , 为了尽可能保护所有的等位基因 , 则 P1 和 P7 两个群体是必须要选择的 , 其余群体可考虑 P4、P5、P6 或 P8 等群体。从目前已测定的群体中可以有选择地抽取 5 个群体 (P1、P4、P5、P6、P7、P8) , 就可平均捕获 99. 9% 的现有基因。考虑到采样等方面的困难 , 本次实验虽然经过两次样本采集 , 但并没有包含白皮松全部的天然群体(李斌等 2002) , 而根据本文研究结果 , 参试群体的数量本身会影响抽样结果 , 因此需要考虑保存更多的群体。根据王小平等(1999)对白皮松分布区的气候区划和赵焱等(1995)对白皮松天然分布的研究结果 , 以及作者对白皮松天然分布区的实地考察和研究 , 除了需要在该 10 个群体内抽取 5 个

群体(取上限)外 , 还需增加 2 ~ 3 个群体 , 增加的原则主要是边缘群体 , 如处于白皮松分布区北部的山西孝义群体和处于分布区南部的湖北陨县或湖南的石门群体。其中 , 孝义群体已经采集并保存 , 而南部的边缘群体则有很大的收集难度。但是作为种质资源收集保存 , 不能因为难度大而放弃 , 而且边缘群体可能隐藏着不同寻常的表型和基因型 , 具有不容忽视的保护价值(Jonas & Geber , 1999)。因此 , 白皮松适合保护 7 ~ 8 个群体 , 其中处于中心分布区的群体占 2 ~ 3 个 , 而位于分布区边缘的群体应占大部分 , 以 4 ~ 5 个群体为宜。

致谢 非常感谢王中仁先生和赵阿曼同学在同工酶实验中的指导和帮助。

参考文献

Awise J C and J L Hamrick, 1997. Genetic diversity in North American ginseng (*Panax quinquefolius* L.) grown in Ontario detected by RAPD analysis. *Genome*, **40**: 111 ~ 115
Barton N H, 1979. Gene flow past a cline. *Heredity*, **43**(3): 333 ~ 339
Bergmann F, 1978. The allelic distribution at an acid phosphatase locus in Norway spruce (*Picea abies*) along similar climatic gradients. *Theoretical and Applied Genetics*, **52**: 57 ~ 64
Bergmann F and H R Gregorius, 1993. Ecogeographical distribution and thermostability of isocitrate dehydrogenase (Idh) allozyme in European Silver Fir (*Abies alba*) . *Biochemical Systematics and Ecology*, **21**(5): 597 ~ 605
Brown A H D, 1989. Core collection: a practical approach to genetic resources management. *Genome*, **31**: 818 ~ 824
Crawford D J, 1990. *Plant Molecular Systematics: Macromolecu-*

lar Approaches, Wiley, New York, 3 ~ 69

- Cui K M (崔克明) and Z M Zhang (张仲鸣), 1997. Changes of peroxidase and Esterase isozyme during periodicity of cambial activity in *Pinus bungeana*, *Universitatis Pekinensis* (北京大学学报), **33**(2): 189 ~ 196 (in Chinese)
- Dvorak W S, J L Hamrick and G R Hodge, 1999. Assessing the sampling efficiency of ex situ gene conservation efforts in natural pine populations in central America. *Forest Genetics*, **6**(1): 21 ~ 28
- Endler J A, 1977. *Geographic Variation, Speciation and Clines*. Princeton University Press, New Jersey
- Felsenstein J, 1976. The theoretical population genetics of aviable selection and migration. *Annual Review of Genetics*, **10**: 253 ~ 280
- Frankham R, 1995. Conservation genetics. *Annual Review of Genetics*, **29**: 305 ~ 327
- Ge S (葛颂), M X Wang (王明麻) and Y W Chen (陈岳武), 1988. An analysis of population genetics structure of masson pine by isozyme technique. *Scientia Silvae Sinicae* (林业科学), **24**(4): 399 ~ 409
- Ge S (葛颂), 1994. Electrophoretic data and studies of plant systematics and evolution. *Journal of Botanical Research* (武汉植物学研究), **12**(911): 71 ~ 84 (in Chinese)
- Goldstein P Z, R Desalle, G Amato and A P Vogler, 2000. Conservation genetics at the species boundary. *Conservation Biology*, **11**: 120 ~ 131
- Gu W C (顾万春), Q Wang (王棋), Y T You (游应天) and C L Sun (孙翠玲), 1998. *Introduction to Forestry Genetic Resources*. China Science and Technology Press, Beijing, 1 ~ 296 (in Chinese)
- Hamrick J L and R W Allard, 1972. Microgeographical variation in allozyme frequencies in *Avena barbata*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, **69**: 2100 ~ 2104
- Hu J, J Zhu and H M Xu, 2000. Methods of constructing core collections by stepwise clustering with three sampling strategies based on the genotypic values of crops. *Theoretical and Applied Genetics*, **101**: 264 ~ 268
- Huang Q Q and Y X Zhang, 2000. Study on the genetic structure in *Pinus massoniana* (masson pine) populations. *Silvae Genetica*, **49**(4-5): 190 ~ 195
- Jonas C S and M A Geber, 1999. Variation among populations of *Clarkia unguiculata* (Onagraceae) among altitudinal and latitudinal gradients. *American Journal of Botany*, **86**(3): 333 ~ 343
- Kim Z S, C H Yi and W Seok, 1994. Genetic variation and sampling strategy for conservation in *Pinus* species. In: Z S Kim and H H Hans (eds.), *Conservation and Manipulation of Genetic Resources in Forestry*. Kwang Moon Kag, Seoul, 294 ~ 319
- Li B (李斌), W C Gu (顾万春) and B M Lu (卢宝明), 2002. A study on phenotypic diversity of seeds and cones characteristics in *Pinus bungeana*. *Biodiversity Science* (生物多样性), **10**(2): 181 ~ 188 (in Chinese)
- Li W H and M Nei. 1974. Stable linkage disequilibrium without epistasis in subdivided populations. *Theoretical Population Biology*, **5**: 173 ~ 183
- Mitton J B, K B Sturgeon and M L Davis, 1980. Genetic differentiation in ponderosa pine along a steep elevational transect. *Silvae Genetica*, **29**: 100 ~ 103
- Oyama K, I Motomi, Y Tetsukazu and O Mikio, 1993. Low genetic differentiation among populations of *Arabis serata* (Brassicaceae) along an altitudinal gradient. *Journal of Plant Research*, **106**: 143 ~ 148
- Soltis D E, C H Haufler, D C Darrow and G J Gastony, 1983. Starch gel electrophoresis of ferns: a complication of grinding buffers, gel and electrode buffers, and staining schedules. *American Fern Journal*, **73**: 9 ~ 27
- Spagnoletti P L and C O Qualset, 1993. Evaluation of five strategies for obtaining a core subset from a large genetic resources collection of durum wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, **87**: 295 ~ 304
- Wang X R, A E Szmidi and O Savolainen, 2001. Genetic composition and diploid hybrid speciation of a high mountain pine, *Pinus densata*, native to the Tibetan Plateau. *Genetics*, **159**: 337 ~ 346
- Wang X R, Y Tsumura, H Yoshimaru, K Nagasaka and A E Szmidi, 1999. Phylogenetic relationships of Eurasian pines (*Pinus*, Pinaceae) based on chloroplast *rbcl*, *matK*, *rpl20-rps18* spacer, and *trnV* intron sequences. *American Journal of Botany*, **86**: 1742 ~ 1753
- Wang X R and A E Szmidi, 1993. Chloroplast DNA-based phylogeny of Asian *Pinus* species. *Plant Systematics and Evolution*, **188**(3-4): 197 ~ 211
- Wang X P (王小平) and J L Wang (王九龄), 1998. Extraction, separation and biological measurement of endogenous growth regulating substance of seeds of *Pinus bungeana*. *Seed* (种子), (5): 19 ~ 22 (in Chinese)
- Wang X P (王小平), J L Wang (王九龄) and J L Liu (刘晶兰), 1999. Climatic regionalization on the distribution area of *Pinus bungeana*. *Scientia Silvae Sinicae* (林业科学), **35**(4): 101 ~ 106 (in Chinese)
- Wang X P (王小平), J L Liu (刘晶岚) and J L Wang (王九龄), 2000. Variation of dormancy characteristic of different *Pinus bungeana* seed sources. *Journal of Applied Ecology* (应用生态学报), **11**(1): 9 ~ 12 (in Chinese)
- Wang Z R (王中仁), 1996. *Plant Allozyme Analysis* (植物等位酶分析). Science Press, Beijing, 1 ~ 196 (in Chinese)
- Woodruff D S, 1989. The problems of conserving genes and species. In: D Weston and M Pearl (eds.), *Conservation for the Twenty-first Century*. Oxford University Press, New York, 76 ~ 88
- Yang Y P (杨一平), S L Wang (王述礼) and R X Yin (尹瑞雪), 1989. Study on the isozyme variation within and among populations of Korean Pine. *Scientia Silvae Sinicae* (林业科学), **25**: 201 ~ 207
- Yang Y P (杨一平), R X Yin (尹瑞雪) and J L Zhang (张军丽), 1991. Study on isozyme genetic diversity of natural populations in *Pinus sylvestrisformis*. *Journal of Northwest Forestry University* (东北林业大学学报), **19**(5): 17 ~ 25
- Yu H (虞泓), W Qian (钱韦) and R F Huang (黄瑞复), 1999. Allozyme method in study on population genetics of *Pinus yunnanensis*. *Acta Botanica Yunnanica* (云南植物研究), **68** ~ 80
- Zhao G F, F Francois and K Philippe, 2000. Gene frequency distributions of *Anthoxanthum alpinum* along the altitudinal gradients in Swiss Alps. *Chinese Biodiversity* (生物多样性), **8**(1): 95 ~ 102 (in Chinese)
- Zhao Y (赵焱), X Z Zhang (张学忠) and X A Wang (王孝安), 1995. Study on geographical distribution trend of natural stands of *Pinus bungeana*. *Acta Botanica Boreal-Occident Sinicae* (西北植物学报), **15**(2): 161 ~ 166 (in Chinese)
- Zhang C X (张春晓), Y Li (李悦) and X H Shen (沈熙环), 1998. A review on forest trees genetic diversity at the isozyme level. *Journal of Beijing Forestry University* (北京林业大学学报), **20**(3): 58 ~ 66

(责任编辑: 时意专)