

天然红松群体遗传多样性的 RAPD 分析

夏 铭¹, 周晓峰², 赵士洞³

(1. 浙江大学生命科学学院, 杭州 310029; 2. 东北林业大学森林资源与环境学院, 哈尔滨 150040; 3. 中国科学院地理科学与资源研究所, 北京 100101)

摘要:用 RAPD 技术分析了分布于中国东北的 3 个红松(*Pinus koraiensis* Seib. et Zucc.)天然群体的遗传多样性及群体间的遗传分化。38 个随机引物共检测到 241 个可重复的位点, 其中多态位点 139 个, 占总位点的 57.68%。Shannon 信息指数和 Nei 指数的统计结果都表明, 红松种内的遗传变异主要存在于群体内, 凉水群体的遗传多样性水平高于黑河、虎林群体。群体内平均遗传相似度为 0.927, 群体间为 0.845。红松现阶段相对偏低的遗传多样性水平与第四纪冰期所遭受的严重打击和人类近期的干扰有较大关系。

关键词:红松; 群体; RAPD; 遗传多样性; 遗传分化

RAPD analysis on genetic diversity of natural populations of *Pinus koraiensis*

XIA Ming¹, ZHOU Xiao-Feng¹, ZHAO Shi-Dong² (1. College of Life Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China; 2. College of Forest Resources and Environment, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China; 3. Institute of Geographical Science and Resources, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract: Genetic diversity and differentiation of three natural populations of *Pinus koraiensis* in Northeast China were studied with the method of RAPD. Through the amplification with 38 random primers, 241 repeatable loci in which 139 were polymorphic were detected. Percentage of polymorphic loci was 57.68%. According to the measurement of Shannon index and Nei's index, genetic diversity of *Pinus koraiensis* mainly distributed within population. In the studied populations of *Pinus koraiensis*, the level of genetic diversity of PLS was higher than that of PHH and PHL. The average genetic similarity within populations was 0.927, that among populations was 0.845. The relative low level of genetic diversity in *Pinus koraiensis* was largely connected with the serious attack during glacier of the Quaternary Period and the interference from human activities.

Key words: *Pinus koraiensis*; population; RAPD; genetic diversity; genetic differentiation

文章编号: 1000-0933(2001)05-0730-08 中图分类号: Q945, S718.55 文献标识码: A

红松(*Pinus koraiensis* Seib. et Zucc.)是我国东北山地的地带性顶极植被类型——红松阔叶林的优势树种, 主要分布于中国东北、朝鲜半岛、俄罗斯远东南部, 在日本的本州、四国也有间断分布^[1]。红松因其树体高大通直, 材质优良而具有很高的经济价值, 是主要的用材树种之一。近年来, 红松的天然分布正在缩小, 而一个物种的稳定存在与其群体的遗传多样性水平和遗传结构密切相关, 因此有必要对红松的天然群体进行深入的遗传分析。同时, 对物种遗传结构的研究有助于阐明物种的适应机制和预测物种的进化潜力。

RAPD 技术作为一种简便、快速、易行的分子标记技术, 近年来被广泛地应用于木本植物遗传多样性和遗传结构的研究中, 已经对多脂松(*Pinus resinosa*)^[2], 黑云杉(*Pinus mariana*)^[2], 欧洲赤松(*Pinus sylvestris*)^[3], 白云杉和恩氏云杉(*Picea glauca* 和 *P. engelmannii*)^[4], 银杉(*Cathaya argyrophylla*)^[5], 墨

基金项目: 国家自然科学基金重大基金(39899370)及国家林业局重点课题(96-28)资助项目

收稿日期: 2000-09-06 修回日期: 2000-10-10

作者简介: 夏 铭(1969~), 男, 河北乐亭, 博士。主要从事植物遗传研究。

西哥丁香(*Gliricidia sepium*)^[6], 辐射松(*Pinus radiata*)^[7], 欧洲山杨(*Populus tremuloides*)^[8]等树种进行了报道。

本研究用 RAPD 技术对分布于中国东北境内的 3 个红松天然群体的遗传多样性、群体内和群体间的遗传变异进行了研究,为合理地保护、利用与开发红松遗传资源提供可靠的科学依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料

所有样本采自红松在中国境内的典型分布区,分别为黑龙江凉水自然保护区、虎林五泡林场和黑河平山林场的天然红松林。采样时分单株随机取当年生幼叶,每两个个体的间距大于 500m,所有样品采自成年树,每个群体样本数为 20 个。采集的针叶用塑料袋装好,放一张湿滤纸以保持湿度,于 0~4℃条件下带回实验室,液氮保存,用于提取 DNA。

1.2 实验方法

1.2.1 DNA 的提取 3 个群体各 20 份样品,采用十六烷基三甲基溴化胺(CTAB)方法^[9],稍做修改后提取基因组 DNA,通过测定紫外光吸收确定 DNA 浓度和纯度,通过琼脂糖电泳检查 DNA 的完整性,-20℃保存备用。

1.2.2 引物的筛选 随机引物采用 Operon 公司的引物系列 A、D、E、F、G,经预备试验选择扩增产物稳定、重复性好的引物对所有个体的基因组 DNA 进行扩增,共用引物 38 个,序列见表 1。

表 1 用于红松 RAPD 分析的随机引物及序列

Table 1 Random oligonucleotide primers and sequences

引物	序列(5'-3')	引物	序列(5'-3')
Primers	Sequences(5'-3')	Primers	Sequences(5'-3')
OPA-01	CAGGCCCTTC	OPA-02	TGCCGAGCTG
OPA-03	AGTCAGCCAC	OPA-04	AATCGGGCTG
OPA-09	GGGTAACGCC	OPA-10	GTGATCGCGA
OPA-11	CAATCGCCGT	OPA-12	TCGCGGATAG
OPA-15	TTCCGAACCC	OPA-17	GACCGCTTGT
OPA-18	AGGTGACCGT	OPA-19	CAAACGTCGG
OPD-01	ACCGCGAAGG	OPD-03	GTCGCCGTCA
OPD-04	TCTGGTGAGG	OPD-05	TGAGCGGACA
OPD-06	ACCTGAACGG	OPD-07	TTGGCACGGG
OPD-12	CACCGTATCC	OPD-15	CATCCGTGCT
OPD-16	AGGGCGTAAG	OPD-19	CTGGGGACTT
OPD-20	ACCCGGTCAC	OPE-02	GGTGCGGGAA
OPE-07	AGATGCAGCC	OPE-12	TTATCGCCCC
OPE-14	TGCGGCTGAG	OPE-02	GAGGATCCCT
OPF-05	CCGAATTCCC	OPF-06	GGGAATTCGG
OPF-07	CCGATATCCC	OPF-08	GGGATATCGG
OPF-12	ACGGTACCAG	OPF-14	TGCTGCAGGT
OPF-15	CCAGTACTCC	OPF-16	GGAGTACTGG
OPG-02	GGCACTGAGG	OPG-08	TCACGTCCAC

1.2.3 RAPD 扩增及产物分离 参照 Williams 等的方法^[10],经条件优化后确定反应体系如下:总体积 20μl,包括 40ng 基因组 DNA,15ng 随机引物,200μmol/L dATP、dCTP、dGTP、dTTP,1U TaqDNA 聚合酶,1.5mmol/LMgCl₂。反应程序为:95℃预变性 5min,40 次热循环,条件为 94℃、1min,36℃、1min,72℃、1min,最后在 72℃下延伸 7min,所有反应在美国 M. J. 公司生产的 PTC-200 热循环仪中进行。扩增产物在 1.2%的琼脂糖凝胶中电泳分离,溴化乙锭染色,透射紫外灯下观察并拍照。

1.3 RAPD 数据的统计

1.3.1 多态位点比率 在某一特定定位点上,若扩增片段出现的频率小于 0.99,则此位点称为多态位点。多态位点比率就是在所有检测到的位点中多态位点所占的比例。

1.3.2 Shannon 表型多样性指数 根据 King 和 Schaal 的方法^[11],利用 Shannon 表型多样性指数来计算群体内和群体间的遗传多样性,计算公式为:

$$H = - \sum P_i \log_2 P_i$$

这里 P_i 为表型频率,即某一扩增带出现的频率。

H 可以有两种水平的遗传多样性, H_{pop} 为群体内的遗传多样性, H_{sp} 为种内总的遗传多样性。

1.3.3 Nei 的遗传分化指数 根据 Nei 的方法^[12],计算群体内和群体间的基因多样性,计算公式为:

$$H = \sum_{i=1}^n (1 - \sum_{j=1}^{mi} q_{ij}^2) / n$$

q_{ij} 为第 i 个位点上第 j 个等位基因的频率, mi 为第 i 个位点上的等位基因数, n 为检测到的位点总数(假设一个位点上有两个等位基因,可以得到显隐性等位基因的频率)。 H_s 为群体内基因多样性, H_T 为种内总的基因多样性, D_{ST} 为群体间的基因多样性, $D_{ST} = H_T - H_s$, G_{ST} 为群体的遗传分化系数, $G_{ST} =$

D_{ST}/H_T 。

1.3.4 RAPD 标记共享度和遗传距离

根据 Nei 和 Li 的方法^[13],计算 RAPD 片段共享度(F),公式为:

$$F = (2N_{xy}) / (N_x + N_y)$$

其中 N_{xy} 为 x 、 y 两个个体或两个群体共同拥有的 RAPD 标记数; N_x 、 N_y 为 x 、 y 两个个体或两个群体各自拥有的 RAPD 标记数。

2 实验结果

用 38 个随机引物对 3 个天然红松群体共 60 个个体的基因组 DNA 进行了 RAPD 分析,每个引物检测到的位点数在 2~11 个之间,扩增 DNA 片段的长度介于 300~2500bp 之间。38 个随机引物共检测到 241 个位点,平均每个引物检测到 6.34 个位点。

2.1 多态位点比率

3 个红松群体的总位点数、多态位点数及多态位点比率见表 2。

表 2 红松种内及群体内多态位点比率

Table 2 Percentage of polymorphic loci within species and populations of *P. koraiensis*

群体 Popula- tions	样本数 No. of samples	位点数 No. of loci	多态位点数 No. of polymor- phic loci	多态位点比率 Percentage of polymorphic loci
PLS	20	227	121	0.5330
PHL	20	216	114	0.5278
PHH	20	215	108	0.5023
Total	60	241	139	0.5768

PLS 为红松凉水群体,PHL 为红松虎林群体,PHH 为红松黑河群体。

在凉水群体中,38 个引物共检测到 227 个位点,其中多态位点 121 个,占 53.30%;虎林群体中总位点数 216 个,多态位点 114 个,多态位点比率为 52.78%;黑河群体中检测到的 215 个位点中,108 个为多态位点,占全部位点的 50.23%。3 个群体的 60 个个体中,检测到的位点总数为 241 个,其中多态位点 139 个,种内多态位点比率为 57.68%,按检测到的多态位点比率排序,各红松群体顺序为:凉水群体>虎林群体>黑河群体。

2.2 用 Shannon 表型多样性指数计算红松遗传多样性

用 Shannon 指数计算了 3 个天然红松群体的群体内、群体间的遗传多样性,以及各自在总变异中所占的比例,见表 3 及表 4。

由表 3 可见,由于不同的随机引物检测的位点数及多态性均有所不同,按各个引物所估计的遗传多样性值有较大的差异,变化幅度从 0~2.3958。各红松群体内平均遗传多样性中,凉水群体最高(0.6584),虎林群体其次(0.5836),黑河群体最低(0.5819),可以看到,凉水群体的遗传多样性明显高于其他两群体,虎林与黑河群体则相差不大。

由表 4 可见,由不同引物的扩增结果估计的红松群体间遗传分化也有很大差异,从 OPG-02 的 0.0104 至 OPA-10 的 0.6681。综合来看,红松平均群体内遗传多样性值为 0.6078,平均种内遗传多样性值为 0.9707。在总遗传变异中,有 65.59% 存在于群体内,群体间遗传变异只占总变异的 34.41%,也就是说,经 Shannon 指数估测,由 38 个引物检测的 3 个天然红松群体间的遗传分化为 34.41%。

2.3 用 Nei 指数估算红松基因多样性

用 Nei 指数对 3 个红松群体的群体内、群体间基因多样性和遗传分化进行了估测,结果见表 5,表 6。

由表 5 可见,各群体内平均基因多样性的顺序为:凉水群体>黑河群体>虎林群体,与 Shannon 指数的统计结果稍有不同,一致之处是凉水群体的基因多样性水平较明显地高于另外两个群体。

从表 6 中可以看到,按不同引物估计的红松的遗传分化程度相差较大,最小的 OPD-12 仅有 0.001960,最大的 OPF-15 则有 0.3347,表明遗传变异在基因组中分布很不均一,平均看来,红松群体内基因多样性为 0.2469,种内基因多样性为 0.2964,群体间基因多样性为 0.04943,群体的遗传分化系数为 0.1702。就分化程度而言,Nei 指数的估计值远远低于 Shannon 指数的估计值,前者只有后者的 50% 左右。

2.4 红松群体间的遗传相似度

通过计算群体内个体间和群体间的 RAPD 片段共享度,可以得到群体内和群体间的遗传相似度,结果

列于表 7。

由表 7 可见,红松群体间,以虎林和黑河两群体间遗传相似度最高(0.8521),其次为虎林与凉水群体(0.8515),而凉水与黑河群体的遗传相似度最低(0.8305)。群体内遗传相似度则以虎林群体最大(0.9325),凉水群体最小(0.9194)。

表 3 由 Shannon 表型多样性指数估计的红松群体内遗传多样性

Table 3 Genetic diversity within populations of <i>P. Koraiensis</i> estimated by Shannon index of phenotypic diversity							
引物 Primers	PLS	PHL	PHH	引物 Primers	PLS	PHL	PHH
OPA-01	0.5688	0.5312	0.9634	OPD-15	0.7948	0.6474	0.3361
OPA-02	0.2736	0.8208	0.5472	OPD-16	0.7158	0.6337	0.5937
OPA-03	0.0000	0.1368	0.1368	OPD-19	0.5354	0.5312	0.1368
OPA-04	0.2736	0.2736	0.6337	OPD-20	0.7534	0.3944	0.8365
OPA-09	0.7705	0.6962	0.2736	OPE-02	0.8379	0.7305	0.4104
OPA-10	0.4279	0.2576	0.3986	OPE-07	0.6722	0.6840	0.9587
OPA-11	0.1993	0.7930	0.6097	OPE-12	0.3361	0.3361	0.1368
OPA-12	0.9341	0.9458	1.4415	OPE-14	1.0311	0.6776	0.8990
OPA-15	1.0075	1.4586	1.5722	OPF-02	0.6722	0.5980	0.9049
OPA-17	1.2823	0.3944	0.4729	OPF-05	0.6714	0.1368	0.1368
OPA-18	1.2304	1.0084	1.2745	OPF-06	1.2556	0.6722	0.4729
OPA-19	1.7361	0.6840	1.0578	OPF-07	0.1993	0.0000	0.3113
OPD-01	0.5106	0.3361	0.3944	OPF-08	0.1368	0.1368	0.1368
OPD-03	0.3361	0.4104	0.4104	OPF-12	0.0000	0.3943	0.4104
OPD-04	0.6737	0.6033	0.7641	OPF-14	0.9587	0.8526	0.4729
OPD-05	0.5354	0.6097	0.5312	OPF-15	0.4569	0.3601	0.0000
OPD-06	0.3944	0.4729	0.7144	OPF-16	1.0719	2.3958	0.6680
OPD-07	0.8555	0.5472	0.5472	OPG-02	0.3986	0.3601	0.2736
OPD-12	0.5980	0.2576	0.2576	OPG-08	0.8673	0.3986	1.0169
Ave.	0.6584	0.5836	0.5819				

3 讨论

在已有的 RAPD 研究中,扩增产物的长度一般在 200~2000bp 之间,此范围内的扩增片段被认为是有效、稳定、可重复的^[10]。本研究在 300~2500bp 范围内的扩增片段稳定性、重复性都很好。在 2.5kb 以上也获得一些清晰的条带,但稳定性稍差,为确保结果的准确,这些大片段未做统计。

针对裸子植物的 RAPD 分析虽有开展,但尚不足以表明裸子植物在 DNA 水平上的多态状况,已有的研究中物种间的差异较大。Mosseler 等^[2]对纽芬兰岛多脂松群体进行 69 个引物的 RAPD 分析,发现所有位点均为单态,他们认为这是由于该群体与大陆群体的长期分离导致了遗传多样性的贫乏,同时也与全新世的冰川作用有关。在同时进行的白云杉和黑云杉 RAPD 分析中,多态位点百分率达到 45.28%和 55.80%。Szmidt 等^[3]对欧洲赤松的两个群体的 RAPD 分析中,多态位点比率达到 88.65%。Khasa 和 Dancik^[4]对白云杉和恩氏云杉的 RAPD 分析表明,多态位点分别占总位点的 74%和 70%。汪小全等^[5]对银杉进行了 RAPD 分析,多态位点比率仅为 32%,似乎低水平的遗传多样性是银杉濒危的原因之一。以上松科植物的 RAPD 研究结果各异,与之相比,本研究中获得的红松平均 57.68%的多态位点比率在松科植物中属中等水平。

Shannon 指数估计的红松 3 个群体的遗传多样性分别为凉水群体 0.6584、虎林群体 0.5836、黑河群体 0.5819,群体内平均遗传多样性为 0.6078,种内总遗传多样性为 0.9707,群体间遗传多样性占总多样性的 34.41%。在对其他木本、长寿命、异交植物的 RAPD 分析中,用 Shannon 指数法得到的遗传变异及分化情况各有不同。万芳等^[8]对 8 个天然群体内的平均遗传多样性为 0.65,群体间遗传多样性占总多样性的 2.6%,分化水平很低^[8]。墨西哥丁香的平均群体内遗传多样性为 1.194,种内总遗传变异为 2.976,群体间遗传

传多样性占总多样性的 59.9%,遗传分化程度较高^[6]。与以上植物相比,红松的遗传多样性水平略低,群体间的遗传分化处于中等水平。

表 4 由 Shannon 表型多样性指数估计的红松群体内、群体间遗传多样性及分化

Table 4 Partition of the genetic diversity among and within populations of *P. koraiensis* estimated by Shannon index of phenotypic diversity

引物	群体内遗传多样性	种内总遗传多样性	群体内遗传多样性所占比率	群体间遗传多样性所占比率
Primers	<i>H</i> _{pop}	<i>H</i> _s	<i>H</i> _{pop} / <i>H</i> _s	(<i>H</i> _s - <i>H</i> _{pop})/ <i>H</i> _s
OPA-01	0.6878	1.0822	0.6356	0.3644
OPA-02	0.5472	1.3336	0.4103	0.5897
OPA-03	0.0912	0.1368	0.6667	0.3333
OPA-04	0.3936	0.6472	0.6082	0.3918
OPA-09	0.5801	0.8187	0.7086	0.2914
OPA-10	0.3764	1.1340	0.3319	0.6681
OPA-11	0.5340	0.7174	0.7443	0.2557
OPA-12	1.1071	1.1478	0.9645	0.0355
OPA-15	1.3461	1.8070	0.7449	0.2551
OPA-17	0.7165	1.1033	0.6494	0.3506
OPA-18	1.1711	2.1978	0.5329	0.4671
OPA-19	1.1593	2.3226	0.4991	0.5009
OPD-01	0.4137	0.6895	0.6000	0.4000
OPD-03	0.3806	0.5329	0.7142	0.2858
OPD-04	0.6804	1.3630	0.4992	0.5008
OPD-05	0.5588	0.5689	0.9822	0.0178
OPD-06	0.5272	0.9577	0.5505	0.4495
OPD-07	0.6500	1.0346	0.6283	0.3717
OPD-12	0.3711	0.5434	0.6829	0.3171
OPD-15	0.5928	0.9516	0.6230	0.3770
OPD-16	0.6477	1.2245	0.5290	0.4710
OPD-19	0.4011	0.7219	0.5556	0.4444
OPD-20	0.6614	1.0963	0.6033	0.3967
OPE-02	0.6596	0.9711	0.6792	0.3208
OPE-07	0.7716	1.1546	0.6682	0.3318
OPE-12	0.2697	0.4688	0.5753	0.4247
OPE-14	0.8692	0.8992	0.9666	0.0334
OPF-02	0.7250	1.0155	0.7139	0.2861
OPF-05	0.3150	0.7341	0.4291	0.5709
OPF-06	0.8002	1.5098	0.5300	0.4700
OPF-07	0.1702	0.2731	0.6232	0.3768
OPF-08	0.1368	0.1876	0.7292	0.2708
OPF-12	0.2682	0.3573	0.7506	0.2494
OPF-14	0.7614	0.8079	0.9424	0.0576
OPF-15	0.2723	0.3927	0.6934	0.3066
OPF-16	1.3786	2.2971	0.6001	0.3999
OPG-02	0.3441	0.3477	0.9896	0.0104
OPG-08	0.7609	1.3389	0.5679	0.4321
Ave	0.6078	0.9707	0.6559	0.3441

通过 Nei 指数统计的红松群体内遗传多样性平均为 0.2469,群体间遗传分化为 17.02%,这一分化值比 Shannon 指数得到的遗传分化低得多,这与两种统计方法各自的统计原理有关。Shannon 指数只根据扩增产物的有或无来确定某一 DNA 片段的表型频率,而 Nei 指数则假定某一特定位点上有两个等位基因,根据各自的基因频率来计算基因多样性。从遗传学角度出发,Nei 指数的方法似乎更具有生物意义,而 Shannon 指数虽然只是一种表型参数,但它避免了对 RAPD 位点显隐性的探讨,因此对异交植物来讲,应用 Shannon 指数估计遗传多样性是可行的。本研究中,采用两种方法所得到的遗传多样性变化趋势基本相同,遗传变异的分布也大体一致,即大部分遗传变异存在于群体内部。这一点与魏伟等对柠条(*Caragana*

spp.)的 RAPD 分析结果是一致的^[14]。

表 5 由 Nei 指数估计的红松群体内基因多样性

Table 5 Gene diversity within populations of *P. koraiensis* estimated by Nei's index

引物	PLS	PHL	PHH	引物	PLS	PHL	PHH
Primers				Primers			
OPA-01	0.3475	0.2267	0.4500	OPD-15	0.2600	0.2600	0.2175
OPA-02	0.1800	0.1800	0.1800	OPD-16	0.2800	0.2600	0.2510
OPA-03	0.0000	0.1800	0.1800	OPD-19	0.2300	0.2267	0.1800
OPA-04	0.1800	0.1800	0.2600	OPD-20	0.4275	0.2500	0.3267
OPA-09	0.2400	0.2850	0.1800	OPE-02	0.2688	0.2338	0.1800
OPA-10	0.2050	0.3200	0.2550	OPE-07	0.2175	0.1800	0.2963
OPA-11	0.2550	0.2525	0.1988	OPE-12	0.2175	0.2175	0.1800
OPA-12	0.2400	0.2050	0.2457	OPE-14	0.2950	0.2717	0.3517
OPA-15	0.3075	0.3120	0.3700	OPF-02	0.2175	0.2550	0.2825
OPA-17	0.4683	0.2500	0.2050	OPF-05	0.3975	0.1800	0.1800
OPA-18	0.2620	0.2175	0.3140	OPF-06	0.3060	0.2175	0.2050
OPA-19	0.3292	0.1800	0.2250	OPF-07	0.2550	0.0000	0.3750
OPD-01	0.3150	0.2175	0.2500	OPF-08	0.1800	0.1800	0.1800
OPD-03	0.2175	0.1800	0.1800	OPF-12	0.0000	0.2500	0.1800
OPD-04	0.3750	0.3550	0.4375	OPF-14	0.2963	0.2550	0.2050
OPD-05	0.2300	0.1988	0.2267	OPF-15	0.2875	0.4200	0.0000
OPD-06	0.2500	0.2050	0.2983	OPF-16	0.2270	0.3643	0.2150
OPD-07	0.2713	0.1800	0.1800	OPG-02	0.2550	0.4200	0.1800
OPD-12	0.2767	0.3200	0.3200	OPG-08	0.1870	0.2550	0.3125
Ave	0.2567	0.2406	0.2436				

在等位酶水平上对天然红松群体的遗传结构与分化也有报道,杨平等^[15]对 4 个天然红松群体进行了 3 种酶 4 个位点的分析, Kim^[16]对 8 个红松群体进行了 15 种酶 23 各位点的研究,祖元刚等^[17]分析了 3 个红松群体的 10 种等位酶 18 个位点的多样性。对报道的天然红松群体的等位酶研究结果进行统计,红松群体的平均多态位点比率为 70.24%, 平均每个位点的等位基因数为 2.05, 平均期望杂合度为 0.2436, 群体间的遗传分化低于 6%。红松在等位酶水平上检测到的遗传多样性在松属植物中处于中等略低水平, 在植物界中则处于较高水平^[18]。从以上分析可见, 本研究在 DNA 水平上检测到的红松天然群体的遗传多样性与蛋白水平上的研究结果具有一致性。在群体间的遗传分化上, DNA 水平上检测到的遗传分化高于酶水平上的分化, 这可能与编码酶的基因的相对保守性有关。此外, 等位酶分析只能检测到编码区的变异, 对非编码区的变异无法检测, 因此反映出的遗传分化较低。RAPD 技术在检测 DNA 多态时是完全随机的, 对编码区和非编码区的变异均可检测, 因而 RAPD 标记体现出来的遗传分化水平可能更接近实际状况。

统计表明, 红松凉水群体的遗传多样性水平高于黑河、虎林群体, 这种现象可能与多种因素相关。凉水群体位于红松分布的中心区, 样品采自保护区的原始天然林, 生境范围较宽, 群体数量大, 人为干扰很少, 原始林中群落结构复杂, 物种丰富, 气候、土壤、局部生境都很适合红松生长, 有利于遗传变异的积累, 而虎林、黑河群体位于红松分布的边缘区, 仅存天然次生林, 生境相对较窄, 分布不连续, 群体数量少, 加上人为干扰频繁, 可能造成遗传多样性的丢失, 而红松的遗传多样性一旦损失, 恢复的速度极慢, 因此边缘区群体内的遗传多样性较低, 从而形成目前红松群体内遗传多样性分布不均的格局。

表 6 由 Nei 指数估计的红松群体内、群体间基因多样性及遗传分化

Table 6 Genetic differentiation and gene diversity within and among populations of *P. koraiensis* estimated by Nei's index

引物	群体内基因多样性	总基因多样性	群体间基因多样性	遗传分化系数
Primers	H_s	H_T	D_{ST}	G_{ST}
OPA-01	0.3141	0.3925	0.07810	0.1989
OPA-02	0.1800	0.2250	0.04500	0.2000
OPA-03	0.1200	0.1800	0.06000	0.3333
OPA-04	0.2067	0.2474	0.04070	0.1645
OPA-09	0.2350	0.3268	0.09180	0.2809
OPA-10	0.2600	0.3233	0.06330	0.1958
OPA-11	0.2354	0.2846	0.04920	0.1729
OPA-12	0.2302	0.3010	0.07080	0.2352
OPA-15	0.3298	0.3468	0.01700	0.04902
OPA-17	0.3078	0.3488	0.04100	0.1175
OPA-18	0.2645	0.3037	0.03920	0.1291
OPA-19	0.2447	0.3375	0.09280	0.2750
OPD-01	0.2608	0.2957	0.03490	0.1180
OPD-03	0.1925	0.2447	0.05220	0.2133
OPD-04	0.3892	0.4332	0.04400	0.1016
OPD-05	0.2185	0.2461	0.02760	0.1121
OPD-06	0.2511	0.2933	0.04220	0.1439
OPD-07	0.2104	0.2123	0.001900	0.008950
OPD-12	0.3056	0.3062	0.0006000	0.001960
OPD-15	0.2458	0.2605	0.01470	0.05643
OPD-16	0.2639	0.2970	0.03310	0.1114
OPD-19	0.2122	0.2741	0.06190	0.2258
OPD-20	0.3347	0.3638	0.02910	0.07999
OPE-02	0.2275	0.2775	0.05000	0.1802
OPE-07	0.2313	0.3124	0.08110	0.2596
OPE-12	0.2050	0.3010	0.09600	0.3189
OPE-14	0.3061	0.3638	0.05770	0.1586
OPF-02	0.2517	0.3124	0.06070	0.1943
OPF-05	0.2525	0.2984	0.04590	0.1538
OPF-06	0.2428	0.2933	0.05050	0.1718
OPF-07	0.2100	0.2982	0.08820	0.2958
OPF-08	0.1800	0.2134	0.03440	0.1565
OPF-12	0.1433	0.1962	0.05290	0.2696
OPF-14	0.2521	0.2577	0.005600	0.02173
OPF-15	0.2358	0.3544	0.1186	0.3347
OPF-16	0.2688	0.3161	0.04730	0.1496
OPG-02	0.2850	0.3124	0.02740	0.08771
OPG-08	0.2515	0.3106	0.05910	0.1903
As方数据	0.2469	0.2964	0.04943	0.1702

红松为演替的顶极群落中的优势树种,分布地域广,寿命长达 300~400a 以上,风媒传粉,这样的树种应该具有较高的遗传变异水平^[19]。然而从本研究的结果来看,红松种内的遗传多样性在木本植物中处于中等水平,这可能与红松的演化史有关。红松在第四纪经历了 5 次大冰期和 9 次小冰期,分布区和群体数量都明显萎缩^[20],使其种内的遗传多样性遭到严重损失,形成“瓶颈效应”(Bottleneck effect),给红松冰期后遗传多样性的恢复造成很大困难,类似的情况在多脂松中也有报道^[2]。又由于红松为长寿植物,其遗传变异的积累需要相当长的时间,因而红松种内遗传多样性水平略低于应有的水平。另一个造成红松遗传多样性减少的原因是人类对红松的过度采伐和生产活动导致的生态条件的恶化以及红松分布区的缩小,近一个世纪以来人类的干扰已成为红松遗传资源减少的主要因素,因此有必要加强对天然红松的保护和积极的人为扩展,为保护群体的稳定存在创造有利的基因资源。

参考文献

[1] 马建路,庄丽文,陈 动,等. 红松的地理分布. 东北林业大学学报, 1992, **20** (5): 40~47.

[2] Mosseler A, Egger K N and Hughes G A. Low levels of genetic diversity in red pine confirmed by random amplified polymorphic DNA markers. *Can. J. For. Res.*, 1992, **22**: 1332~1337.

[3] Szmidt A E, Wang X R and Lu M Z. Empirical assessment of allozyme and RAPD variation in *Pinus sylvestris* (L.) using haploid tissue analysis. *Heredity*, 1996, **76**: 412~420.

[4] Khasa P D and Dancik B P. Rapid identification of white-Engelmann species by RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.*, 1996, **92**: 46~52.

[5] 汪小全,邹喻辛,张大明,等. 银杉遗传多样性的 RADP 分析. 中国科学(C 辑),1996,**26**(5):436~441.

[6] Chalmers K J, Waugh R, Sprent J I, *et al.* Detection of genetic variation between and within populations of *Gliricidia sepium* and *G. maculata* using RAPD markers. *Heredity*, 1992, **69**: 465~472.

[7] Hong Y P, Hipkins V D and Strauss S H. Chloroplast DNA diversity among trees, populations and species in the California closed -cone pine(*Pinus radiata*, *P. miuricata* and *P. attanuata*). *Genetics*, 1993,**135**:1187~1196.

[8] Yeh F C, Chong D K X and Yang R C. RAPD variation within and among natural populations of trembling aspen (*Populus tremuloides* Michx.) from Alberta. *The Journal of Heredity*, 1995, **86**(6): 454~459.

[9] Doyle J J and Doyle J L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 1990, **12**(1): 13~15.

[10] Williams J G K, Kubelik A R, Livak K J, *et al.* DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 1990, **18**: 6531~6535.

[11] King L M and Schaal B A. Ribosomal-DNA variation and distribution in *Rudbeckia missouriensis*. *Evolution*, 1989, **43**(5): 1117~1119.

[12] Nei M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1973, **70**: 3321~3323.

[13] Nei M and Li W H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1979, **76**: 5269 5273.

[14] 魏 伟,王洪新,胡志昂,等. 毛乌素沙地柠条群体分子生态学初步研究:RAPD 证据. 生态学报,1999,**19**(1):16~22.

[15] 杨一平,王述礼,尹瑞雪. 红松群体内和群体间同工酶变异的研究. 林业科学,1989,**25**(3):201~207.

[16] Kim Zin Such,Sook Woo Lee. Genetic diversity and structure of natural population of *Pinus koraiensis* in Korea. *Forest Genetics*,1994,**1**(1):41~49.

[17] 祖元刚,张恒庆,颜廷芬,等. 天然红松林等位酶研究. 植物研究,1999,**19**(1):75~79.

[18] 葛 颂,洪德元. 遗传多样性及其检测方法. 见:陈灵芝主编. 生物多样性研究的原理与方法. 北京:中国科技出版社,1994. 123~140.

[19] Hamrick J L and Godt M J W. Allozyme diversity in plant species. In Brown A D H, Clegg M T, Kahler A L and Weir B J. *Population Genetics, Breeding, and Genetic Resources*. Sunderland: Sinauer,1990, 43~63.

[20] 马建路. 天然红松混交林的演化史. 东北林业大学学报, 1997, **25** (5): 66~70.

表 7 红松群体内、群体间的遗传相似度

Table 7 Genetic similarity within and among populations of *P. koraiensis*

群体 Populations	PLS	PHL	PHH
PLS	0. 9194		
PHL	0. 8515	0. 9325	
PHH	0. 8305	0. 8521	0. 9290