

欧洲刺槐种源群体遗传结构和多样性

杨敏生¹, Heike Hertel², Volker Schneck²

(1. 河北农业大学, 保定 071000; 2. Institute for Forest Genetics and Forest Tree Breeding, Federal Research Centre for Forestry and Forest Products, D-15377 Waldsiversdorf, Germany)

摘要:对来自欧洲和美国的 18 个刺槐种源子代进行了等位酶分析。可进行遗传分析的 7 个酶系统 (*Amy*, *Fe*, *Lap*, *Idh*, *Mdh*, *6Pgd*, *Skd*) 中有 14 个基因位点, 其中 12 个位点具有多态性。每个多态位点平均等位基因数 (A/L) 变化在 1.56~3.67 之间, 平均基因型数 (G/L) 变化在 1.61~7.11 之间, 平均等位基因有效数目 (A_e) 变化在 1.02~2.50 之间, 预期杂合度 (H_e) 变化在 0.02~0.56 之间。不同种源群体之间也存在较大的遗传差异, 在 8 个德国种源中, 各群体的 A 、 A_e 和 H_e 等相对较小, 但不同群体间差异较大。各位点等位基因频率在不同种源群体间变化也较大, 表明德国各种源群体内遗传变异相对较小, 但群体间差异较大。来自匈牙利和斯洛伐克的 8 个种源群则相反, 各群体的 A 、 A_e 和 H_e 等相对较大, 而不同种源群体间差异则较小, 各位点等位基因频率在种源群体间变化相对一致, 表明这两个国家的种源群体内变异较大, 但不同种源群体间差异较小。欧洲的刺槐种源并未形成明显的地理变异模式, 而且欧洲的种源和来自原产地的美国种源相比, 没有发现明显的差异。经过 Hardy-Weinberg 平衡检测证明, 88.41% 位点符合 H-W 遗传平衡, 表明各群体基因频率和基因型频率保持较高的稳定性, 且种源内的变异大于种源间变异, 94.8% 的变异存在于种源内个体间。欧洲刺槐的遗传改良存在巨大的潜力, 但应主要集中在群体内个体改良上, 通过个体选择可取得较大的遗传增益。

关键词:刺槐; 种源群体; 等位酶; 遗传结构; 遗传多样性

Genetic diversity and population structure of *Robinia pseudoacacia* provenances from middle Europe

YANG Min-Sheng¹, Heike Hertel², Volker Schneck² (1. Agricultural University of Hebei, 071000, China; 2. Institute for Forest Genetics and Forest Tree Breeding, Federal Research Centre for Forestry and Forest Products, D-15377 Waldsiversdorf, Germany). *Acta Ecologica Sinica*, 2004, 24(12): 2700~2706.

Abstract: The seeds from 18 provenance populations of *Robinia pseudoacacia* distributing in the middle Europe and the United States were collected and planted in a nursery in Waldsiversdorf, Germany. Using the leave from the two years old seedlings as materials, the genetic diversity and population genetic structure of the provenances were studied. Using starch gel and polyacrylamide gel electrophoresis, 7 enzyme systems (Amylase, Fluorescent esterase, Leucine aminopeptidase, Isocitrate dehydrogenase, Malate dehydrogenase, 6-Phosphogluconate dehydrogenase and Shikimate dehydrogenase) that could make the genetic analysis were tested. Twelve of the 14 loci studied showed detectable polymorphism. There were significant differences among the polymorphism loci. The number of alleles per locus (A/L) and the number of genotypes per locus (G/L) changed from 1.56 to 3.67 and 1.61 to 7.11, respectively. The effective number of alleles per locus (A_e) ranged from 1.02 to 2.50 and the expected heterozygosity (H_e) from 0.02 to 0.56. Among the allele frequencies, some biggish differences were found in the same locus. At many loci, some genes in some provenance populations appeared with very low frequency or they did not appear.

Large genetic differences existed in different provenance populations. The mean number of alleles per locus, the mean

基金项目:国家农业部中德农业合作资助项目

收稿日期:2003-08-14; **修订日期:**2004-05-10

作者简介:杨敏生(1962~), 男, 回族, 内蒙古多伦县人, 博士, 教授, 主要从事林业生物技术和树木抗逆生理研究。

Foundation item: Agricultural cooperation item between China and Germany

Received date: 2003-08-14; **Accepted date:** 2004-05-10

Biography: YANG Min-Sheng, Ph. D., Professor, mainly engaged in forest biotechnology and tree stress physiology. E-mail: deu100@hotmail.com

effective number of alleles per locus and the mean expected heterozygosity were relatively less in 8 Germanic provenance populations. However, among different provenance populations big differences and evident changes in these population genetics parameters occurred, indicating that in the 8 Germanic provenance populations, the genetic differentiation within the groups was relatively less, whereas among the groups was relatively greater. In contrast, in the 8 provenance populations from Hungary and Slovakia, these population genetics parameters within the groups were relatively greater, but differences among the groups were relatively less. The allele frequency per locus changed accordantly among the groups of the provenance populations, and this made it clear that the differentiation within the groups of the provenance populations was more biggish compared with that among the groups.

No evident geographic patterns of the *Robinia pseudocacia* seed sources happened and the difference between provenance populations from Europe and the United States was not observed. The Hardy-Weinberg equilibrium test indicated that 88.41% of loci had no significant deviations from H-W genetic equilibrium. The allele and the genotype frequencies remained a relatively high stability among each groups. The mean coefficient of gene differentiation (G_{st}) was 0.052, suggesting that 5.2% of the allozyme variability was attributed to the differentiation among the provenance populations while the remaining 94.8% resided within the different provenance populations. We may conclude that the potential in improvement of *Robinia pseudocacia* is great and the initial selections in the breeding programs should concentrate on intrapopulation variation.

Key words: *Robinia pseudocacia*; provenance population; allozyme; genetic diversity; population genetic structure

文章编号:1000-0933(2004)12-2700-07 中图分类号:S72 文献标识码:A

刺槐(*Robinia pseudoacacia* L.)原产于美国东部的 Appalachian、Ouachita 和 Ozark 山区^[1]。现已在世界上许多国家栽种。17 世纪初刺槐引入欧洲后,得到迅速繁殖应用。在德国刺槐的栽植面积达到了 1.3 万 hm^2 , 主要分布在德国东部。在 Brandenburg 州, 1997 年刺槐的面积达到了 7200 hm^2 。但到目前为止,德国刺槐的育种活动很少。种源是指从同一树种分布区范围由有不同地点收集的种子或其它繁殖材料,种源试验是林木遗传改良的重要手段,通过种源试验可以确定树种的地理变异模式,遗传多样性及为种源试验地提供优良种子产地。在德国以至整个欧洲尚没有成规模的刺槐种源试验,也没有固定种源的种子供应产地,但对其生长和干形等调查发现,不同地区的刺槐种源存在较大差异^[2~4]。2001 年开始,德国林木遗传育种研究所从欧洲刺槐主要分布区及美国收集了 18 个刺槐次生种源种子,开展了全面的种源试验,探索欧洲刺槐次生种源的变异模式,并在此基础上进行刺槐群体和个体改良。

等位酶(allozyme)是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,作为结构基因编码的产物,其变化能很好地代表 DNA 分子水平上的变化,表明等位基因变化的存在。等位酶的遗传和表达遵循孟德尔定律,酶位点的不同等位基因都是等显表达的,从酶谱上可以直接分析识别出编码它们的等位基因,且能统计出等位基因频率和基因型频率;作为一种稳定的基因组标志比形态特征更直接地反映了遗传信息^[5,6]。等位酶分析方法是了解天然居群的遗传结构、基因丰富程度以及栽培植物种质资源遗传多样性的重要手段。本文利用等位酶标记技术,对 18 个来自欧洲中部和美国的刺槐种源子代群体遗传结构和多样性进行了研究,为探索刺槐的种源变异和种源选择提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料

从德国、匈牙利、斯洛伐克 3 个刺槐主要分布的欧洲国家及原始分布地区美国收集了 18 个刺槐种源种子。其中,1~8 号为来自德国的种源,主要分布在德国东部刺槐分布区;9,10 为斯洛伐克种源,分布在斯洛伐克西南部;11~16 为来自匈牙利种源,其中 11、12、13 号分布在匈牙利中部,14、15、16 分布在东部;17,20 号为来自美国种源,分布在美国东部。来自欧洲的 16 个种源均为本地种子起源的栽培群体,并经过至少一代自我更新。2 个美国种源为天然原始群体。欧洲种源所在地气候条件相对一致,海拔高度变化在 80~150m,年平均温度 8.2~10.5℃,年平均降雨量 503~690mm。从各种源群体中采集充分混合的种子,于 2001 年播种于德国东部刺槐主要分布区勃兰登堡州的 Wardesiversdorf 苗圃中,代表 18 个种源群体后代,2002 年夏季实验开始时,每日采集新鲜叶片研磨,提取酶液,进行等位酶分析。每个种源测定 50 个样本,总计测定了 900 个样本。

1.2 试验方法

(1)酶系统及电泳 本项研究测定了 7 个酶系统。各种酶性质及描述见表 1。主要采用水平切片淀粉凝胶电泳分离酶。

(2)酶液提取 取新鲜叶片约 0.5g,加入 600 μl 提取缓冲液,研磨均匀,放入滤纸条(3mm×11mm),浸约 10min 后,蘸吸匀浆,以备上样电泳。酶提取液组成如下:50ml 磷酸缓冲液(pH7.0),2.2g 抗坏血酸,2.2g PVP,150mg DIECA。用 NaOH 调至 pH 7.0。用时取上述母液 3ml,加入巯基乙醇 30 μl 。

表 1 检测的酶系统基本情况

Table 1 Isozyme system analyzed in the experiment

酶种类 Isozyme system	缩写 Abbreviation	国际编号 EC No.	基因位点 Isozyme locus	酶性质 Characteristic	等位 基因数 Allele	电泳方式
淀粉酶 Amylase	Amy	3. 2. 1. 1	A	多态 Polymorphism	5	聚丙烯酰胺电泳
			B	多态 Polymorphism	3	Polyacrylamide gel
荧光酯酶 Fluorescent esterase	Fe	3. 1. 1. X	A	难以识别 Bad identification	—	淀粉凝胶系统 III
			B	多态 Polymorphism	4	Starch gel System III
			C	多态 Polymorphism	4	
亮氨酸氨基肽酶 Leucine aminopeptidase	Lap	EC 3. 4. 11. 1	A	多态 Polymorphism	4	淀粉凝胶系统 II
			B	多态 Polymorphism	4	Starch gel System II
异柠檬酸脱氢酶 Isocitrate dehydrogenase	Idh	EC 1. 1. 1. 42	A	多态 Polymorphism	4	淀粉凝胶系统 I
						Starch gel System I
苹果酸脱氢酶 Malate dehydrogenase	Mdh	EC 1. 1. 1. 37	A	多态 Polymorphism	3	淀粉凝胶系统 I
			B	多态 Polymorphism	3	Starch gel System I
6-硫磷酸葡萄糖酸脱氢酶 6-Phosphogluconate dehydrogenase	6-Pgd	EC 1. 1. 1. 44	A	单态 Monomorphism	1	淀粉凝胶系统 I
			B	多态 Polymorphism	2	Starch gel System I
			C	多态 Polymorphism	2	
莽草酸脱氢酶 Shikimate dehydrogenase	SKdh	EC 1. 1. 1. 25	A	多态 Polymorphism	3	淀粉凝胶系统 I
						Starch gel System I

(3)淀粉胶的制备、电泳和染色 称取 30g 半溶性淀粉和 3g 蔗糖,加入 250ml 凝胶缓冲液,煮沸溶解制成淀粉凝胶。上好样的胶板在 95A 稳流条件下电泳 4h。根据不同酶所需最佳条件,采用 3 个电泳系统,分别为:Tris-柠檬酸(pH7. 5,系统 I)、硼酸锂/Tris(pH8. 1,系统 II)和硼酸钠/Tris(pH8. 2,系统 III)。电泳结束后,取下胶板,用割胶模板和割胶弓将胶板水平割成均匀的 4~6 片,最上面一层弃去不用,按各种酶系统的染色配方配制染色液进行染色^[5,7]。

淀粉酶采用聚丙烯酰胺凝胶电泳,电泳方法参照 Hertel^[7]提供的方法。

(4)等位酶分析 根据染色后胶片上显示出来的电泳谱带进行位点判读,区分位点并判断基因型。共分析了 7 个具有多态性位点的酶系统,即淀粉酶(Amy)、荧光酯酶(Fe)、亮氨酸氨基肽酶(Lap)、异柠檬酸脱氢酶(Idh)、苹果酸脱氢酶(Mdh)、6-硫磷酸葡萄糖酸脱氢酶(6Pgd)、莽草酸脱氢酶(Skd)。

1.3 数据分析

将测定的 900 个样本不同基因位点基因型数据进行统计分析,根据 Hattermer 等^[6]和王中仁^[5]提供的方法计算各项群体遗传学参数和多样性指标:每个位点等位基因数(A/L)、每位点基因型数(G/L)、每个位点的等位基因有效数目(Ae)、等位基因的基因频率(p),每个位点预期杂合度(He)及 Nei^[8]的基因多样性参数(各群体内基因多样性 H_s 、总群体的基因多样性 H_T 、各群体间的基因多样性 D_{ST} 、基因分化系数 G_{ST}),所有计算均采用 SAS 统计软件在计算机上完成。

2 结果与分析

2.1 每位点等位基因数变异

经过 7 种酶系统的检测,获得 14 个等位酶位点,其中 12 个为多态性位点。各多态性位点等位基因数目列于表 2。各基因位点等位基因数不同,在种水平上变化在 2 到 5 之间,其中,Amy-A 多态性最明显,在种水平上有 5 个等位基因,但在不同种源群体中并未完全表现,平均等位基因数仅为 2. 94。Fe-B、Fe-C、Lap-A、Lap-B、Idh 各含有 4 个等位基因,Amy-B、Mdh-B、Skd 各含有 3 个等位基因,Mdh-A、6Pgd-B、6Pgd-C 各含有 2 个等位基因,其中 Mdh-A 多态性最不明显,在所有种源群体中,有 8 个为单态型的。不同种源群体间存在一定差异,来自德国的 8 个种源群体(1~8 号),平均每位点等位基因数均较低,为 2. 68,但 3 号种源例外。来自匈牙利、斯洛伐克的 8 个种源(9~16 号)和美国的 2 个种源种源平均每位点等位基因数均较高,分别为 2. 82 和 2. 91,特别是来自匈牙利的 6 个种源(11~16 号),平均等位基因数高且种源间变化比较小。

2.2 每位点等位基因有效数目变异

平均每个位点的等位基因数目不能全面反映等位基因的频率及其在群体中的重要性,如一些等位基因频率很低,它们在群体的遗传结构中的重要性较小,但等位基因数目却很大。而每个位点的等位基因有效数目(Ae)反映了在群体中起作用的等位基因数目,在研究群体遗传结构中具有重要作用。在各群体的多态性位点中,各位点等位基因有效数目变化在 1. 02~2. 50 个,Fe-B、Idh 和 Skd 的 Ae 值较高,而 Mdh-A 最低。从表 3 还可以看出,18 个种源群体间也存在明显的差异,8 个德国群体的 Ae 平均值较低,为 1. 61,且群体间变异较大;斯洛伐克和匈牙利的 8 个种源的 Ae 平均值较高,为 1. 75,且群体间差异很小。

表 2 各种源群体和基因位点等位基因数(A/L)

Table 2 Mean number of alleles per locus and per provenance population

种源 Provenance	Amy		Fe		Lap		Idh	Mdh		6Pgd		Skd	平均 Mean
	A	B	B	C	A	B		A	B	B	C		
1	3	2	3	2	3	3	3	1	2	2	2	3	2.42
2	2	2	3	3	3	3	4	1	2	2	2	3	2.50
3	4	3	4	3	3	4	3	2	2	2	2	3	2.92
4	3	2	4	3	3	3	4	2	2	2	2	3	2.75
5	3	2	3	4	3	4	4	1	2	2	2	3	2.75
6	3	3	3	3	3	3	4	1	2	2	2	3	2.67
7	3	2	3	2	3	4	4	1	3	2	2	3	2.67
8	3	2	4	3	3	4	4	1	2	2	2	3	2.75
9	3	2	3	3	3	4	3	2	2	2	2	3	2.67
10	3	2	4	4	3	4	4	1	2	2	2	3	2.83
11	3	2	4	4	3	4	4	2	2	2	2	3	2.92
12	3	2	4	3	4	3	4	2	2	2	2	2	2.75
13	3	2	4	4	3	4	4	2	2	2	2	3	2.92
14	3	2	4	4	3	3	4	2	2	2	2	3	2.83
15	3	2	4	3	3	4	4	2	2	2	2	3	2.83
16	3	2	4	3	3	4	4	2	2	2	2	3	2.83
17	4	2	4	4	4	4	3	1	3	2	2	3	3.00
20	1	3	4	4	3	4	3	2	3	2	2	3	2.83
平均 Mean	2.94	2.17	3.67	3.28	3.11	3.67	3.72	1.56	2.17	2.00	2.00	2.94	
种 Species	5	3	4	4	4	4	4	2	3	2	2	3	

表 3 各种源群体和位点等位基因有效数目(Ae)

Table 3 Effective number of alleles per locus and per provenance population

种源 Provenance	Amy		Fe		Lap		Idh	Mdh		Pgd		Skd	Mean
	A	B	B	C	A	B		A	B	B	C		
1	1.84	1.81	1.59	1.60	1.61	1.33	1.76	1.00	1.81	1.57	1.70	2.77	1.62
2	1.79	1.27	2.08	1.08	1.77	2.26	2.84	1.00	1.77	1.68	1.99	2.17	1.66
3	1.67	2.04	3.20	1.60	1.90	1.56	2.02	1.02	1.89	1.63	1.65	2.50	1.76
4	1.39	1.57	2.36	1.41	1.37	1.30	2.31	1.02	2.00	1.79	1.42	2.15	1.57
5	1.81	1.45	1.94	1.45	1.79	1.23	2.17	1.00	1.84	1.70	1.96	1.92	1.61
6	1.52	1.64	1.71	1.25	1.61	1.37	2.64	1.00	1.87	1.42	1.79	2.46	1.58
7	1.88	1.96	1.15	1.75	1.45	1.58	1.28	1.00	2.02	1.11	1.13	1.59	1.41
8	1.56	1.84	2.50	1.46	1.65	1.36	2.53	1.00	1.96	1.20	1.69	2.53	1.64
9	1.20	1.97	2.79	2.16	2.09	1.53	2.22	1.02	1.94	1.56	1.57	2.28	1.73
10	1.89	1.86	3.15	1.40	2.13	1.95	2.37	1.00	2.00	1.96	1.89	2.36	1.85
11	1.72	1.87	3.09	1.37	1.86	1.59	2.40	1.08	1.95	1.74	1.81	1.89	1.75
12	1.51	1.95	2.89	1.71	2.00	1.69	2.26	1.02	2.00	1.39	1.92	1.96	1.75
13	1.52	1.99	2.67	1.62	1.72	1.43	2.10	1.02	1.92	1.53	1.95	2.17	1.71
14	1.85	1.87	2.47	1.36	2.27	1.56	2.20	1.06	1.98	1.50	1.84	2.18	1.75
15	1.99	2.00	2.76	1.48	1.88	1.68	2.47	1.02	2.00	1.55	1.93	2.07	1.79
16	1.46	1.92	3.42	1.15	1.83	1.75	2.22	1.02	1.89	1.39	1.34	2.56	1.65
17	1.43	1.91	3.53	1.62	1.95	1.50	2.39	1.00	2.07	1.79	1.40	2.13	1.73
20	1.00	1.38	1.63	1.37	1.83	2.29	2.76	1.13	2.31	1.27	1.60	2.06	1.57
平均 Mean	1.61	1.79	2.50	1.49	1.82	1.61	2.28	1.02	1.96	1.54	1.70	2.20	

2.3 每个位点等位基因频率变异

18 个种源群体不同位点平均等位基因频率列于表 4。同一位点不同等位基因频率存在差异,如 Amy-B 共有 3 个等位基因,2 个等位基因出现的频率较高,在 18 个群体中 B1 的平均基因频率为 0.354,B2 的基因频率为 0.644, B3 的基因频率仅为 0.002,仅在第 3、6 和第 20 号种源群体中出现。Fe-B 的 4 个等位基因中,B2 和 B3 出现的频率较高,B1 和 B4 频率较低;IDH 中 A2、A3 出现的频率最高,A4 出现的频率最低。Skd 中 A1 和 A2 基因频率高,A3 仅为 0.08。其它基因位点也存在相同趋势。图 1 列出了部分基因位点等位基因频率变化。从不同群体基因频率分布看,也存在较大差异。德国的 8 个种源群体大部分基因位点基因频率分布差异较大,而匈牙利和斯洛伐克的 8 个群体间基因频率分布的模式基本一致,变化较小。

2.4 Hardy-Wenberg 平衡检测

对 18 个种源群体 12 个基因位点进行 Hardy-Weinberg 遗传平衡检测(表 5),结果表明,所有群体中 88.41%位点符合 H-W 平衡。表明绝大部分位点等位基因间是随机组合的,基因频率的变化在世代传递中处于相对稳定状态。偏离 H-W 平衡比例较高的等位酶位点是 Lap-A 和 Lap-B,共有 12 个群体位点未达到 0.05 显著符合。

表 4 刺槐各种源群体平均每位点等位基因频率变化

Table 4 Average allele frequency per locus of *Robinia pseudoacacia*

Amy-A					Amy-B			Fe-B				Fe-C				Idh			
A1	A2	A3	A4	A5	B1	B2	B3	B1	B2	B3	B4	C1	C2	C3	C4	A1	A2	A3	A4
0.00	0.76	0.03	0.21	0.00	0.35	0.64	0.00	0.06	0.48	0.33	0.13	0.04	0.80	0.13	0.02	0.10	0.36	0.52	0.02
Lap-A					Lap-B				Mdh-A		Mdh-B		6Pgd-B		6Pgd-C		Skd		
A1	A2	A3	A4	B1	B2	B3	B4	A1	A2	B1	B2	B3	B1	B2	C1	C2	A1	A2	A3
0.13	0.71	0.16	0.00	0.04	0.78	0.13	0.05	0.01	0.99	0.51	0.49	0.01	0.23	0.77	0.31	0.70	0.48	0.44	0.08

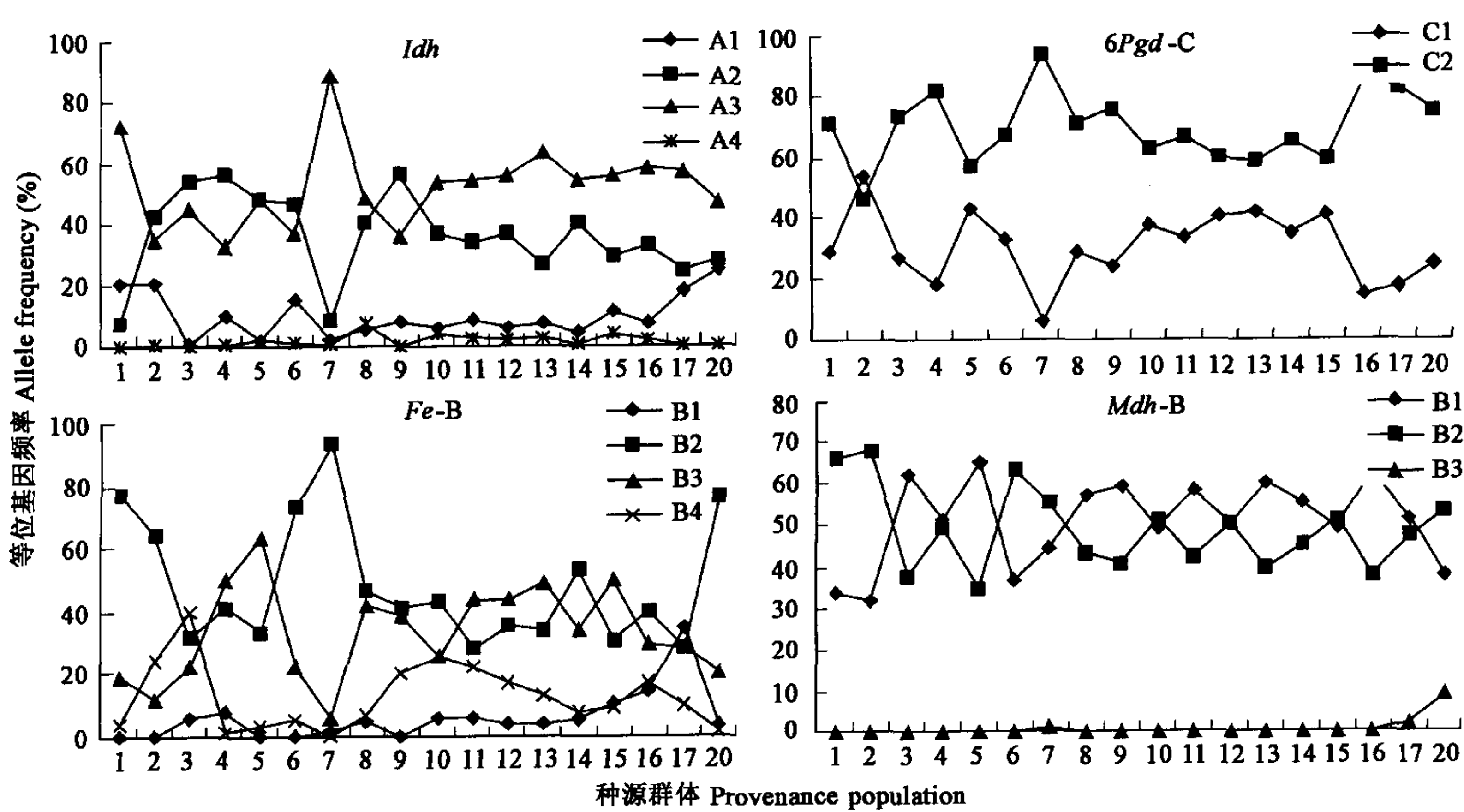


图 1 各种源群体部分位点等位基因频率变化

Fig. 1 Allele frequencies of provenance populations in some loci

2.5 不同基因位点预期杂合度

根据 Hardy-WenberG 平衡定律可估算出不同基因位点预期杂合度(H_e),即杂合位点的百分数。预期杂合度越高,群体的遗传结构越复杂。因为 H_e 的大小与位点变异呈正相关,所以他又被称为“基因多样性”或“遗传多样性指数”。从表 6 可以看出,不同位点上各群体预期杂合度变化在 0.02~0.56 之间。除了 $Mdh-A$ 外,其它位点均存在杂合子。 $Fe-B$ 、 Idh 和 Skd 的预期杂合度较高, $Mdh-A$ 的预期杂合度最小,只有 0.02,在 18 个种源群体中有 8 个群体为单态性的,没有杂合子存在。比较不同种源群体平均预期杂合度也可以看出,8 个德国种源群体的平均预期杂合度较小,平均值为 0.38,群体间差异较大;而斯洛伐克和匈牙利的 8 个群体预期杂合度平均值较高,为 0.43,群体间变异幅度小。

2.6 基因位点的多样性分析

从总群体的各多态位点的角度来看,Nei 的群体内的基因多样性 (H_s)、总群体的基因多样性(H_T)、各群体间的基因多样性(D_{ST})及基因分化系数(G_{ST})各不相同(见表 7),其中位点 $Fe-B$ 的 H_s 和 H_T 最大,分别为 0.561 和 0.635,而位点 $Mdh-A$ 的 H_s 和 H_T 最小,分别为 0.021 和 0.022,表明刺槐在位点 $Fe-B$ 上的基因多样性最为丰富,而位点 $Mdh-A$ 最为匮乏;另一方面,位点 $Fe-B$ 的 D_{ST} 和 G_{ST} 最大,分别为 0.074 和 0.116;而位点 $Mdh-A$ 的 D_{ST} 和 G_{ST} 最小,分别为 0.001 和 0.020,说明在种源群体间,位点 $Fe-B$ 的基因分化程度最高,而位点 $Mdh-A$ 的基因分化程度最低。另外,各位点 G_{ST} 的平均值为 0.052,这又进一步说明在总的遗传变异中,只有 5.2% 的变异存在于种源间,而 94.8% 的变异存在于种源内,即种源内的变异大于种源间变异。

2.7 遗传参数与生态环境相关性分析

将各项遗传参数(A/L 、 G/L 、 A_e 、 H_e)与不同种源群体所在地年均温和年平均降雨量进行相关分析(表 8),考察主要气候因子对种源群体遗传结构的影响。结果表明,各项遗传参数与年均温和降雨量没有明显的相关性,仅平均每位点等位基因数(A/L)与年均温达到显著水平,相关系数为 0.552。

3 讨论

来自同一树种不同地理区域的种源群体,由于长期在不同气候土壤条件下生长发育,各种源群体的遗传组成在空间和时间

上并不是绝对均匀、随机分布的,而常常是非随机分布、存在着变化的。因此物种及其多样性的群体内存在地理群体间变异和群体内个体变异。这种变异表现在生理、形态等多方面。通过种源试验可以探明种源群体间的这种遗传差异和多样性水平。等位酶受基因控制,在一定程度上反映了生物的系统发育。等位酶与蛋白质相似,在进化中具有一定的保守性,比形态特征可更直接地反映群体的遗传信息,可以用来对树木种群遗传结构进行研究,并对不同种群之间的遗传差异进行比较^[9~15]。

表 5 各种源群体不同位点 Hardy-Wenberɡ 平衡定律检测

Table 5 Hardy-Wenberɡ equilibrium test at every alleles locus and every provenance population												
种源 Provenance	Amy		Fe		Lap		Idh	Mdh		6Pgđ		Skđ
	A	B	B	C	A	B		A	B	B	C	
1	0.434	0.080	0.949	0.062	0.006*	0.038*	0.196	—	0.262	0.145	0.055	0.059
2	0.776	0.708	0.460	0.993	0.262	0.000*	0.396	—	0.467	0.123	0.052	0.291
3	0.197	0.656	0.389	0.546	0.115	0.116	0.494	0.943	0.895	0.649	0.008*	0.202
4	0.002*	0.385	0.474	0.552	0.000*	0.593	0.588	0.943	0.570	0.723	0.186	0.243
5	0.092	0.097	0.074	0.991	0.301	0.073	0.990	—	0.938	0.015*	0.023*	0.322
6	0.855	0.378	0.058	0.858	0.126	0.002*	0.109	—	0.013*	0.650	0.320	0.506
7	0.599	0.066	0.234	0.042*	0.423	0.128	0.593	—	0.843	0.034*	0.768	0.447
8	0.834	0.187	0.362	0.581	0.096	0.006*	0.143	—	0.195	0.479	1.000	0.298
9	0.921	0.335	0.121	0.724	0.055	0.706	0.759	0.943	0.621	0.301	0.006*	0.060
10	0.428	0.364	0.126	0.842	0.083	0.001*	0.459	—	0.570	0.243	0.070	0.068
11	0.505	0.084	0.128	0.967	0.193	0.532	0.777	0.768	0.291	0.691	0.356	0.225
12	0.805	0.291	0.052	0.131	0.035*	0.105	0.383	0.943	0.157	0.148	0.556	0.663
13	0.196	0.741	0.134	0.635	0.699	0.470	0.301	0.943	1.000	0.228	0.403	0.417
14	0.936	0.608	0.226	0.001*	0.001*	0.001*	0.897	0.827	0.520	0.498	0.055	0.174
15	0.094	0.786	0.057	0.432	0.818	0.040*	0.798	0.943	0.573	0.670	0.962	0.497
16	0.872	0.239	0.014*	0.468	0.174	0.319	0.814	0.943	0.640	0.148	0.000*	0.285
17	0.332	0.074	0.107	0.486	0.666	0.178	0.136	—	0.464	0.025*	0.589	0.756
20	—	0.422	0.942	0.953	0.000*	0.339	0.806	0.121	0.820	0.335	0.157	0.092

* 在 $P<0.05$ 水平上显著偏离,Hardy-Wenberɡ 平衡 Means significantly deviation from Hardy-Wenberɡ equilibrium on $P<0.05$ level

表 6 各种源群体和基因位点预期杂合度(He)

Table 6 Expected heterozygosity of alleles per locus and per provenance population (He)													
种源 Provenance	Amy		Fe		Lap		Idh	Mdh		Pgđ		Skđ	Mean
	A	B	B	C	A	B		A	B	B	C		
1	0.46	0.45	0.37	0.38	0.38	0.25	0.43	0.00	0.45	0.37	0.41	0.64	0.38
2	0.44	0.21	0.52	0.08	0.44	0.56	0.65	0.00	0.44	0.40	0.50	0.54	0.40
3	0.40	0.51	0.69	0.37	0.47	0.36	0.51	0.02	0.47	0.39	0.39	0.60	0.43
4	0.28	0.37	0.58	0.29	0.27	0.23	0.57	0.02	0.50	0.44	0.30	0.54	0.37
5	0.45	0.31	0.48	0.31	0.44	0.19	0.54	0.00	0.46	0.41	0.49	0.48	0.38
6	0.34	0.39	0.42	0.20	0.38	0.27	0.62	0.00	0.47	0.30	0.44	0.59	0.37
7	0.47	0.49	0.13	0.43	0.31	0.37	0.22	0.00	0.50	0.10	0.11	0.37	0.29
8	0.36	0.46	0.60	0.32	0.39	0.26	0.60	0.00	0.49	0.17	0.41	0.61	0.39
9	0.17	0.49	0.64	0.54	0.52	0.35	0.55	0.02	0.48	0.36	0.37	0.56	0.42
10	0.47	0.46	0.68	0.29	0.53	0.49	0.58	0.00	0.50	0.49	0.47	0.58	0.46
11	0.42	0.47	0.68	0.27	0.46	0.37	0.58	0.08	0.49	0.43	0.45	0.47	0.43
12	0.34	0.49	0.65	0.42	0.50	0.41	0.56	0.02	0.50	0.28	0.48	0.49	0.43
13	0.34	0.50	0.63	0.38	0.42	0.30	0.52	0.02	0.48	0.35	0.49	0.54	0.41
14	0.46	0.47	0.60	0.27	0.56	0.36	0.55	0.06	0.50	0.33	0.46	0.54	0.43
15	0.50	0.50	0.64	0.33	0.47	0.41	0.60	0.02	0.50	0.35	0.48	0.52	0.44
16	0.32	0.48	0.71	0.13	0.46	0.43	0.55	0.02	0.47	0.28	0.26	0.61	0.39
17	0.30	0.48	0.72	0.38	0.49	0.33	0.58	0.00	0.52	0.44	0.29	0.53	0.42
20	0.00	0.27	0.39	0.27	0.45	0.56	0.64	0.11	0.57	0.21	0.38	0.51	0.36
平均 Mean	0.36	0.43	0.56	0.31	0.44	0.36	0.55	0.02	0.49	0.34	0.40	0.54	

本研究对来自欧洲和美国的 18 个刺槐种源群体中 7 个酶系统的 12 个多态性位点遗传结构和多样性进行了研究。在这 12 个多态性位点中,平均等位基因数变化在 1.56~3.67 之间,平均基因型数变化在 1.61~7.11 之间,平均等位基因有效数目变化在 1.02~2.50 之间,平均预期杂合度变化在 0.02~0.56 之间。表明基因位点间存在明显的差异。将各种源群体作为一个种群,可知在种水平上各位点等位基因数变化在 2~5 个,各基因位点形成的基因型数变化在 1~10 个。种水平各位点等位基因数高于种源水平,表明等位基因数较多的基因位点中,并不是所有的等位基因及基因型组合均在各种源群体中出现,而且同一位点各等位基因频率间和基因型频率间存在较大差异。许多位点某些基因在各种源群体中出现频率极低或未出现,这可能和基因的进化速度有关系。一般认为,等位基因数目越多,频率分布越均匀的位点,其变异性就越高。从上述研究结果推断,在欧洲的刺槐种群具有较大的遗传变异性,存在较为广泛的遗传多样性。

大约在 300a 前刺槐从美洲引种到德国和欧洲其它地区, 目前已在欧洲广泛分布, 成为当地的重要造林树种。本文研究表明来自欧洲的不同种源群体之间存在较大的遗传差异。在 8 个德国种源中, 各群体的等位基因数、平均基因型数、平均每位点等位基因有效数目和平均每位点预期杂合度数值相对较小, 但不同群体间差异较大, 各位点等位基因频率在不同种源群体间变化也较大, 表明德国各种源群体内遗传变异相对较小, 但群体间差异较大。来自匈牙利和斯洛伐克的 8 个种源群体则相反, 各群体的不同位点等位基因数、平均基因型数、平均每位点等位基因有效数目和平均每位点预期杂合度数值相对较大, 而不同种源群体间差异则较小, 各位点等位基因频率在种源群体间变化相对一致, 表明这两个国家的种源群体内变异较大, 但不同种源群体间差异较小。从上述研究结果中可以发现, 虽然刺槐引入欧洲超过 300 多年, 但并未形成明显的地理变异模式, 各种源在 12 个基因位点上的变异与地理及气候条件并未发现明显相关性。而且欧洲的种源和来自原产地的美国种源相比, 没有发现明显的差异, 说明刺槐作为外来树种引入欧洲后仍保持较高的遗传稳定性, 这一点从 Hardy-Weinberg 平衡检测中也可以得到验证, 在检验的 207 个不同种源群体位点中, 88.41% 位点符合 H-W 遗传平衡定律, 没有发生显著偏移, 表明各群体基因频率和基因型频率保持较高的稳定性。

刺槐各基因位点的平均基因分化系数 G_{ST} 为 0.052, 表明在总的遗传变异中, 只有 5.2% 的变异存在于种源间, 而 94.8% 的变异存在于种源内个体间, 即种源内的变异大于种源间变异。Hamrick 等^[9]对 73 个木本植物研究表明, 其平均 G_{ST} 为 0.102, Brown 等^[10]估计虫媒花树种的平均 G_{ST} 值为 0.16。对刺槐的研究结果表明, 刺槐在欧洲的 G_{ST} 值低于其它树种, 这一结果也低于 Surles^[1]对美国刺槐原始种源 G_{ST} 等于 0.12 的估计值。分析其原因可能与刺槐在欧洲的栽培历史较短有关系。鉴于刺槐存在较高的遗传变异水平, 而且这种变异主要来源于群体内个体间, 因此刺槐的遗传改良存在巨大的潜力, 但应主要集中在群体内个体改良上, 通过优树选择可取得较大的遗传增益, 而通过种源选择改良的效果相对较小。

References:

[1] Surles S E, Hamrick J L, Bongarten B C. Allozyme in Black locust (*Robinia pseudoacacia*). *Can. J. For. Res.*, 1989, **19**: 471~479.
[2] Ewald D, Naujoks G, Hertel H, et al. Hat die Robinie in Brandenburg eine Zukunft? *Allgem. Forstzeitschr.*, 1992, **14**: 738~740.
[3] Redei Karoly. Black locust (*Robinia pseudoacacia* L.) improvement and management in Hungary. *Forestry Studies in China*, 1999, **11** (2): 42~46.
[4] Keresztesi B. The black locust. *Unasylva*, 1980, **32**: 23~33.
[5] Wang Z R. *Plant allozyme analysis*. Beijing: Science Press, 1996.
[6] Hattermer H H, Bergmann F, Ziehe M. Einführung in die Genetik für Studierende der Forstwissenschaft. J D. Sauerlander's Verlag Frankfurt an Main, 2. Auflage, 1993.
[7] Hertel H, Maurer W D. Biochemical genetic investigations on scots pine (*Pinus sylvestris* L.), *A practical guide to separation methods and zymogram evaluation*. Ed. Saxonian State Institute for Forestry, 1999.
[8] Nei M. Molecular population genetics and evolution. In: By A. Newber and E L Tatum eds. *Frontiers of biology*. Amsterdam.: North-Holland Publishing Co., 1975.
[9] Hamrick J L, Godt M J W, Sherman-Broyles S L. Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. *New For.*, 1992, **6**: 95~124.
[10] Hamrick J L, Godt M J W. Allozyme diversity in plant species. In: By D H Brown, M T Clerg, A L Kahler and B S Weir eds. *Plant population genetic, breeding and genetic resources*. Sinauer, Sunderland, Mass, 1989. 43~63.
[11] Huh M K. Genetic diversity and population structure of Korean alder (*Alnus japonica*; Betulaceae). *Can. J. For. Res.*, 1999, **29**: 1311~1315.
[12] Ellstrand N C, Roose M L. Patterns of genotypic diversity in clonal plant species. *Am. J. Bot.*, 1987, **74**: 123~131.
[13] Brown A H D, Moran G F. Isozymes and the genetic resources of forest trees. In: M. T. Conkle. ed. *Proceedings of a Symposium on Isozymes of North American Forest Trees and Forest Insects*. USA For. Serv. Gen. Tech. Rep. PSW-48, 1981. 1~10.
[14] Konnert M, Ruetz W. Genetic variation of beech (*Fagus sylvatica* L.) provenances in a international beech provenance trial. *Forest Genetics*, 2001, **8**(3): 173~184.
[15] Leinemann L. Inheritance analysis of isozyme phenotypes in tetraploid species using single plant progenies. An example in black thorn (*Prunus spinosa* L.). *Forest Genetics*, 2000, **7**(3): 205~209.

参考文献:

[5] 王中仁. 植物等位酶分析. 北京: 科学出版社, 1996.

表 7 刺槐 12 个多态位点遗传多样性统计参数

Table 7 Total genetic diversity (H_T), genetic diversity within population (H_S), genetic diversity among populations (D_{ST}) and coefficient of gene differentiation (G_{ST}) for 12 loci of *Robinia pseudoacacia*

多态位点 Isozyme locus	H_S	H_T	D_{ST}	G_{ST}
Amy-A	0.361	0.380	0.019	0.050
Amy-B	0.432	0.460	0.028	0.061
Fe-B	0.561	0.635	0.074	0.116
Fe-C	0.313	0.334	0.021	0.063
Lap-A	0.441	0.450	0.009	0.020
Lap-B	0.361	0.372	0.011	0.030
Idh	0.547	0.588	0.041	0.070
Mdh-A	0.021	0.022	0.001	0.020
Mdh-B	0.487	0.506	0.019	0.038
6Pgd-B	0.338	0.354	0.016	0.045
6Pgd-C	0.397	0.423	0.026	0.061
Skd	0.540	0.569	0.029	0.051
平均 Mean	0.400	0.424	0.025	0.052

表 8 遗传参数与气候因子相关系数

Table 8 Correlation coefficient between population genetic parameters and climatic factors

	A/L	G/L	Ae	He
年均温 Temperature	0.552*	0.338	0.302	0.283
降雨量 Precipitation	0.305	0.094	0.048	0.027