

分子生态学研究进展*

胡志昂 王洪新

(中国科学院植物研究所 北京 100093)

摘要 介绍了这个新学科的基本内容,其特征是DNA标记的应用。结合我国最近几年动植物自然种群的分子研究,介绍国际分子生态学各个领域的进展:①分子生态学的技术;②分子种群生物学;③分子环境遗传学;④分子适应。实验结果显示:只要方法灵敏,DNA具有最高水平的多样性。即使是原先认为遗传变异很少的大熊猫和野生大豆,使用灵敏的方法,也能证实生物个体遗传组成的唯一性,种群内DNA的高度多态性,不同景观生态类型种群之间低水平遗传分化,说明自然种群绝大多数多态DNA位点是中性、近中性突变。至今没有发现盐渍条件下植物个体耐盐性水平与多态DNA有相关性,更证实这一点。发现少数多态DNA位点与形态分化有关或呈明显的地理梯度,暗示其适应意义。自然种群这两种生态学功能不同的多态DNA的存在,说明有必要重新讨论遗传多样性研究和保存中的取样策略。分子遗传研究也指导生态系统和物种的保育。文章最后从分子生物学的方法论和已经阐明的生态过程的众多分子信息提出分子生态学的新思路,建议分解生态系统,找出一个或少数物种和环境构成生态系统的基本功能单位,研究所涉及的基因及基因对基因的相互作用,进一步提议首先分析最简单的生态系统里发生的专一过程的分子细节。

关键词: DNA标记,个体唯一性,遗传分化,基因流,适应,生态系统功能基本单位。

ADVANCES IN MOLECULAR ECOLOGY

Hu Zhiang Wang Hongxin

(Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100093, China)

Abstract After giving a brief account on recent advances of molecular ecology, this new field of ecological sciences has been characterized by using DNA markers. Based on molecular works on natural populations of animals and plants, which have been done in Chinese Academy of Sciences in recent 5 years, advances of molecular ecology were reviewed according to the journal Molecular Ecology: techniques used in molecular ecology, molecular population biology, molecular environmental genetics, molecular adaptation. Experimental results showed that DNA diversity was the richest one in all aspects of genetic diversity. Even in captive populations of the giant panda and natural populations of a precise inbreeder—the wild soybean (*Glycine soja*) which previously were considered as the species with a low level of genetic variation, experimental results showed that individuals had their uniqueness of genetic composition when sensitive detecting methods were used. Much higher level of DNA diversity within populations and a low level of genetic differentiation among

* 本工作得到国家攀登项目,国家基金委高技术项目,中国科学院重大和重点项目的支持。

收稿日期:1997-03-10,修改稿收到日期:1997-09-06。

populations indicated that most of polymorphic DNA was caused by neutral or near-neutral mutations which was confirmed by the unrelatedness between salt tolerance levels and polymorphic DNAs of individuals in natural populations of wild soybean under saline conditions. A few polymorphic DNAs were found to be related with morphological differentiation, and it showed clinic variation which implied adaptative. Sampling strategy of monitoring and conserving genetic diversity should be modified to meet the needs of conservation of adaptative characters. Molecular genetics has also applied to workout plans for ecosystem and species conservation. Finally from methodology and philosophy of molecular biology some new ideas and concepts were suggested. One is characterization of basic functioning unit of ecosystems for further gene and gene-gene interaction studies.

Key words: DNA marker, individual uniqueness, genetic differentiation, gene flow, adaptation, functioning unit of ecosystem.

1992年《Molecular Ecology》创刊,标志着分子生态学已经成为生态学的一个新分支学科。发刊词中Burke等^[1]提出分子生态学是应用分子生物学方法为生态学和种群生物学各领域提供革新见解。该杂志刊登下列4个方面的论文:①分子种群生物学:种群遗传学和进化遗传学;行为生态学;保育生物学。②分子环境遗传学:种群生态学和基因流;重组生物环境释放的生态问题;自然环境中的遗传交换。③分子适应:遗传分化和生理适应;环境对基因表达的效应。④关于分子生态学的技术发明:物种鉴定的分子技术;发明新的探针;研究种群的序列和引物。该期刊最初两年共发表文章77篇,其中76篇涉及DNA序列的变异,以植物为对象的仅5篇。1994年Bachmann^[2]在“植物分子生态学中的分子标记”综述中定义分子生态学为应用分子生物学方法研究生态和种群生物学的新兴学科,引用了156篇论文,无一不是DNA水平的工作。文中把等位酶标记作为DNA标记的参照物,讨论了DNA标记的优点。1996年Wayne^[3]“保护遗传学”简介了分子遗传技术在各个水平生物多样性保育中的应用,其中提到具体研究工作的都是线粒体DNA(mtDNA)的多样性。从中可以看出分子生态学涉及的分子标记指的是DNA标记。显然是为分子生态学从方法学上确定了一个边界,与同工酶、蛋白质多样性为遗传标记的生化遗传学相区别(biochemical genetics杂志为代表,创刊于1963年)。在应用DNA标记的同时,辅以同工酶等标记,相互印证,可以更好地揭示生物变异的生态学意义。这也说明分子生态学主要是由生化遗传学发展来的。本文立足于我国最近几年野生动植物种群的分子研究,从上述4个方面系统介绍国际分子生态学各个领域的进展。应该指出,这4个方面是相互联系的。作为一门实验学科,首先要有适当的研究方法和技术来检测种群DNA的变异,鉴定个体的基因型,得到种群遗传结构的各种参数。从中了解遗传分化和基因流,并探讨适应意义。所以,分4个方面只是侧重点不同。本文首先介绍探针、序列和引物,即分子生态学的技术发明。随后分别讨论这些技术在分子生态学各个领域中应用所获得的成果。最后根据分子遗传学向生物学各个领域渗透的历史经验,提出研究的新思路和新概念,作为分子生态学今后发展趋势的推测,供讨论。

1 分子生态学的技术

Burke 1992提出分子生态学技术包括探针、序列和引物^[1],即3类检测生物自然种群DNA序列多态性的方法:①利用探针显示限制性内切酶识别专一DNA序列的特性,显示限制片段长度多态性(RFLP);②引物对模板专一识别的扩增片段长度多态性(AFLP)^[4,5];③DNA序列分析。

1.1 RFLP RFLP最初比较简单,例如先用各种限制性内切酶消化哺乳动物纯化的mtDNA,后用琼脂糖电泳和溴乙锭染色就可以看到个体间酶切片段长度的不同。植物的mtDNA分子量大,而且个体内分子异质性(一个细胞有不同大小的mtDNA分子),因此很少用作标记。植物叶绿体DNA(简称ctDNA,或cpDNA)有动物mtDNA一样的高考贝数的优点;但分子量大,酶切后片段多,琼脂糖电泳分不清楚。多数

cpDNA 多态性的研究是用 Southern^[5]方法:先用放射性同位素标记一段 cpDNA 作为探针;植物总 DNA 用限制酶消化后用琼脂糖电泳分离并原位转到硝酸纤维素膜上。固定后用探针在膜上进行 DNA-DNA 杂交,放射自显影显示与探针同源的酶切片段在长度上的变化。这个方法不需要纯化叶绿体 DNA。后来发明多种非放射性标记方法^[7],避免了使用放射性同位素带来的麻烦,而且有探针寿命长可反复使用的优点。但是 RFLP 实验过程很长,而且需要较大量的高纯度 DNA。探针制备很费功夫,所以多数实验室是向别的实验室要来系统学上较近物种 DNA 某片段的克隆。但是,正如 Bachmann 指出的,生态学上最主要是研究核基因组^[2]。以 cDNA 为探针检测单拷贝序列,一般只限于作物,因为事先必须构建 cDNA 文库并筛选出多态的序列方可用作探针。核基因组进化速度比 cpDNA 快,非近缘种的探针不能借用。Jeffreys 等^[8]发现人小卫星 DNA(几百碱基的重复序列)的高度 RFLP 多态性,称为 DNA 指纹,最初用于法医鉴定,后来很快用于各种动植物。另有用(GATA)_n等寡核苷酸探针^[9],检测2~4核苷的简单序列重复多态性(SSRP),又称微卫星 DNA 标记,杂交谱有很多位点,信息量很大。随着多聚酶链式反应(PCR)的发明,RFLP 的方法简单化,先根据多态 DNA 两翼的保守序列,设计和合成通用引物进行 PCR,然后进行扩增产物的 RFLP。1993年出版一项专利,申请者称选择性限制片段扩增(SRFA),后来又简称为 AFLP。方法是先用限制酶消化 DNA,然后连接上 adapter,最后进行 PCR 和电泳显示。实际上是用 PCR 显示的 RFLP,作者以为还是叫 SRFA 为好,而且1991年的文献^[2]已出现 AFLP。

1.2 AFLP 生态学上应用 DNA 标记主要在90年代,即在发明 PCR 的基础上,出现了各种显示 AFLP 的方法。PCR 是在已知序列的基础上,用专一的一对引物识别各自的模板上的扩增子(amplicon),扩增两者中间的序列。AFLP 是用一个短的随机引物(random primer)进行 PCR,模板 DNA 有多个扩增子,可以扩增出多个产物而可能出现多态现象。优点是事先不需要了解任何 DNA 序列的信息,只要从市场上购买引物,就可以用于任何生物 DNA 多样性的检测,而且只要很少纯度不高的模板 DNA,所以近年来报道极多,尤其是用于植物,大有取代 RFLP 的趋势。根据所用引物和电泳、显示方法的不同,基本上分3种引物:①随机扩增多态 DNA(RAPD)^[10];②随意引发的 PCR(AP-PCR)^[11];③DNA 扩增指纹 DAF^[2]。三者的异同见表1。

表1 3种随机引物扩增多态性方法的异同

Table 1 Comparison among 3 methods of randomly amplified polymorphic DNA

方法 Method	引物长度 Primer length	引物浓度 Concentration of primer	退火温度 Annealing temperature	电泳分离 Electrophoretic method	显示方法 Detecting method	扩增产物数 Number of amplified band
RAPD	10mer	0.3 μ M	36 C	琼脂糖	溴乙锭染色	1~10
AP-PCR	18~32	1~10	30,72 C	PAG	放射自显影	3~50
DAF	5~8	3~30	30 C	PAG	银染	10~100

注:PAG 为聚丙烯酰胺凝胶

因为 AP-PCR 需要放射性同位素标记,DAF 要银染,都不及 RAPD 简单方便。而且,RAPD 谱条较少,如果只看几条荧光最强的带,统计工作也很简单,所以该方法被广泛使用。但是作者以前的研究发现用琼脂糖凝胶电泳分离的单个分子量为3.5kb,溴乙锭荧光带用 pUC19 可以克隆到0.5到4.0kb 的各种片段,所以怀疑单带是多个分子的混合物。胡志昂等^[12]先把大豆、野生大豆和辽东栎的 RAPD 产物用低熔点琼脂糖凝胶分离,随后分别切下各个荧光单带,在70℃或95℃下融化后直接加在含有6M 脲的3%~5%聚丙烯酰胺凝胶的加样槽中,用 Caetano-Arolles 等的 DAF 方法电泳分离和银染^[4]。结果发现单个荧光带包括1~10条银染带,相邻荧光带分享很多共同的银染带。最近,切下单个银染带经过反复扩增后用 pGEM-T 质粒克隆。酶切、PAGE 和银染证明白色菌落质粒所带的插入都是相同分子量的。序列分析显示在 pGEM-T 唯一的 EcoRV 的切口的 T 和该质粒外加的 T 后面,是 RAPD 或 DAF 引物的序列,证明克隆了扩增产物。因此,作者认为 RAPD 产物用 PAGE 分离和银染更能反映实际的片段组成。PAGE 的高分辨率显示出 RAPD

产物有20~60个分子量不同的片段。而且因为银染的高灵敏度,每次电泳只要加1~3 μ l的扩增产物,达到一次扩增可多次电泳的效果。DAF有30~90条带,显然是因为8mer引物能识别更多的模板DNA位点。虽然有大量的带,但平行扩增显示完全一样的银染谱,证实PAGE方法的再现性^[13]。用这种改良的RAPD,只需少数引物,便可以把辽东栎 *Quercus liaotungensis*、蒙古栎 *Q. mongolica* 和柠条(包括小叶锦鸡儿 *Cargana microphylla*)、中间锦鸡儿(*C. intermedia*)、柠条锦鸡儿(*C. korshinskii*)的单个植株区别开来。可能是因为严格自交的原因,野生大豆(*Glycine soja*)的DNA用某些引物扩增所得带不少,但自然种群不同个体有时有相同的谱,另一些引物显示低水平的多态性,只有少数引物达到栎树和柠条的多态性水平。为了充分显示DNA序列的变异,有相同扩增谱的野生大豆RAPD产物用限制性内切酶消化后再电泳。结果产生数目不等的众多低分子量酶切产物,部分酶切显示出多态性。国外报道DNA在扩增前进行酶切,扩增谱带略有增加或减少。作者实验室得到如此显著的谱型变化,可能是使用了超过量酶的缘故。AFLP结合RFLP使检测DNA多态性的能力达到极高的水平。如果再用变性梯度胶电泳(DGGE)或单螺旋DNA构象多态性(SSCP)等,分辨能力可进一步提高。这些结果也可以解释SRFA就是因为用了PAGE,极大地提高了RFLP的分辨率。PCR也用来扩增小卫星和微卫星DNA。大熊猫曾被认为是遗传多样性贫乏的动物^[14]。昆明动物所张亚平等^[15]克隆了大熊猫的微卫星DNA,从测序结果设计引物进行扩增,发现极高的多态性。其互显性遗传已用于圈养大熊猫的亲缘鉴定。王洪新等^[16]指出,只要方法灵敏,引物足够,即使是原来认为很少遗传变异的野生大豆也可以用实验直接证明哲学家的预言:有性繁殖生物个体遗传组成的唯一性(uniqueness)。

AFLP标记的问题是有孟德尔遗传,非互显性。对于野生大豆一类严格自交植物,1条带就是1个显性纯合位点。对于异交生物每一条带存在两种可能:显性纯合子或杂合子。这种情况下研究自然种群遗传结构只能用Shannon统计方法^[17]测量多样性水平,包括总多样性中种群间的分量,相当于遗传分化系数 G_{ST} 。

1.3 DNA序列分析。最充分揭示DNA多样性的方法是DNA序列分析。生态学上用的最多的是“通用”引物扩增mtDNA、ctDNA或核DNA某些基因、DNA片段,随后还用通用引物直接测序。以前用放射性标记和自显影,现在越来越普遍用荧光标记的自动测序仪。有软件供序列比较。张亚平等^[18]扩增了大熊猫等我国珍稀濒危动物mtDNA的tRNA基因和D-loop。和同工酶研究结果类似^[15],圈养大熊猫种群的tRNA基因没有多态性,但发现21个创立者有9种不同的D-loop序列,即9种单倍型(haplotype)。可以预计核基因的序列分析可望揭示出更高水平多态性。

2 分子种群生物学

2.1 种群遗传学和进化遗传学 种群遗传学(population genetics)历来译为群体遗传学,是用数学模型和实验来研究繁育系统、突变、选择、随机漂变对种群基因频率的影响,也就是生物进化的过程。DNA标记不仅信息量高而且是基因多样性的直接显示,而蛋白质标记是基因的产物,存在转录后及转译后的修饰等问题。笔者的实验室用RAPD和DAF研究了柠条、两种栎树(辽东栎、蒙古栎)和野生大豆自然种群多态DNA在种群内、种群间和种间的分布,发现最有规律的是遗传分化与繁育系统的关系,即自交或近交增加种群间的遗传分化,有利于物种形成。这个结果与数学模型的预计和蛋白质、同工酶众多研究结果的统计^[19]一致。表2列出3属植物自然种群蛋白质和DNA的遗传分化,可以看出种群遗传结构主要由繁育系统决定^[20]。

繁育系统不仅影响遗传结构,而且影响总的遗传多样性。群体遗传学数学模型预计近交或自交在增加遗传分化的同时,降低总的遗传多样性。例如松属多数是高度异交的,遗传多样性水平很高,个别如脂松(*P. resinosa*)高度自交,23个同工酶位点和69个引物进行的RAPD,均没有发现变异^[26]。应该指出该研究用经典的RAPD,如果采用更灵敏的方法如微卫星DNA也会象大熊猫那样检测到DNA多样性。对比表2所列这3属植物,无论是同工酶、种子蛋白或DNA水平,异交及异交为主的栎树和柠条存在高度遗传变异,而自交的野生大豆遗传多样性较低。虽然野大豆在中国、朝鲜、日本和俄国远东地区广泛分布,有时达到相当大的生物量,但不是群落的建群种。栎树和柠条,广而言之,我国生态系统的建群植物^[27]几乎都是异交的。

异交或异交兼近交所形成的高水平遗传多样性是否是物种成为生态系统建群种的条件之一,有待进一步研究证实。

表2 遗传分化和繁育系统的关系

Table 2 Relationship between genetic differentiation and breeding system

植物 Plant	标记 Marker	G_{ST}	杂合子频率 Ho	文献 Literature
野生大豆	同工酶	0.72	0.000	胡志昂、王洪新 1985 ^[21]
野生大豆	同工酶	0.63	0.000	Bult & Kiang 1992 ^[22]
野生大豆	同工酶	0.383	0.004	Yu & Kiang 1994 ^[23]
柠条	种子蛋白	0.075	0.04 ~ 0.43	王洪新等 1994 ^[24]
柠条	同工酶			周永刚等(印刷中)
柠条	DNA	0.17*		魏伟等(待发表)
辽东栎	同工酶	0.035	0.433	钟敏等 1995 ^[25]
辽东栎	RAPD	0.05*		恽锐等(印刷中)
辽东栎-蒙古栎	RAPD	0.15*		恽锐等(印刷中)

*注:用 Shannon 指数表示种群间遗传分化

2.2 行为生态学 主要研究动物的行为,如迁移、栖息地和繁殖等。DNA 标记可以校正野外观察的错误,如鲸^[26]。张亚平等^[15]用微卫星 DNA 进行圈养大熊猫的亲缘鉴定,发现动物园一雌多雄多次交配中,只有个别雄性是有效的,称为有效雄体。该研究结合基因型的鉴定,有助于制订繁殖计划,防止近交衰退。

2.3 保育生物学 分子遗传学在生态系统、物种和基因保育中的作用可以参看 Wayne 的综述^[3]。其中提到热带雨林与热带稀树草原之间生态过渡带的分子遗传研究,发现过渡带的隔离小种群为雨林斑块种群提供新的遗传变异,因此,对现在的热带雨林保护没有包括过渡带的计划提出质疑。毛乌素地区处于典型草原到荒漠之间的生态过渡带,存在各种景观生态类型。笔者实验室分析了优势种柠条种群的 DNA 多样性。魏伟等^①发现环境最为恶劣的硬梁和沙丘种群遗传多样性最低。但是在全部153个 RAPD 位点中,发现8个位点的频率变化和环境水分状况有关,而且就这两个种群频率最高(表3),有的达100%。周永刚等^②用 Brown 等^[29]方法进行了柠条同工酶遗传分析,发现这些环境恶劣的隔离小种群由于部分近交更容易固定新突变,并通过异交渗入两翼的斑块种群。同样说明了生态过渡带保育的重要性。

表3 毛乌素沙地柠条 RAPDs 频率的梯度变化

Table 3 RAPD cline of *Caragana* populations in Maowusu sandy grassland

引物 Primer	OPHO4		OPHO5	OPH19		OPD20		
产物 Product	670	1 240	870	670	350	330	320	280
种群 Population								
复沙滩地	0.38	0.00	0.08	0.00	0.42	0.00	0.00	0.17
复沙软梁	0.70	0.10	0.10	0.10	0.60	0.00	0.40	0.60
沙 丘	0.73	0.11	0.09	0.00	0.73	0.00	0.18	0.91
复沙硬梁	0.83	0.33	0.25	0.09	0.82	0.25	0.42	0.75
硬 梁	1.00	0.22	0.44	0.44	1.00	0.11	0.67	1.00

除了生态系统保育外,物种保育更需要分子遗传研究。新论点是分子遗传确定的“进化上显著的单

①《生态学报》待发表。②待发表。

元(evolutionarily significant unit)作为保育的基本单位。例如新西兰海岸外一些岛屿存在爬行动物 *Sphenodon*, 是该目动物仅有的一个种 *S. punctatus*。分子分析证明其有复杂的进化历史, 实际上是3个分支的分类群, 现在计划分别进行保育^[3]。又如非洲猎狗野生种群最近衰减很快, 东部和西部最为濒危。曾试图从南部引进个体扩大东部种群。分子遗传分析证明南部是遗传上不同的分支, 而且对当地某些疾病能免疫。如果引进东部, 原有种群不能抵御这些疾病反而对东部种群构成威胁, 而整个物种会丢失东部特有的基因。现在这个引种计划已经放弃^[3]。

3 分子环境遗传学

3.1 种群生态学和基因流 高等动物完全异交, 没有自交, 达尔文早就提出近交衰退问题。生境片段化影响基因流, 导致近交(相同或相近基因型之间的交配), 降低个体生活力, 尤其威胁濒危物种的生存。例如佛罗里达黑豹仅存约50只。为防止近交衰退, 计划从得克萨斯引进个体以增加当地种群遗传多样性^[3]。也曾考虑从北美其他地方将狼引入黄石公园, mtDNA 分析证明整个北美狼群有高速基因流, 没有近交问题。植物的繁育系统十分复杂, 有异交、自交和各种中间类型, 甚至营养繁殖和无融合生殖, 是研究基因流和种群生态学的好材料。很有意思的是西北、华北干旱盐渍地区灌木或草本优势种很多是异交兼近交或兼无融合生殖的。除上面提到的柠条兼近交外, 蒿属(*Artemisia*)、芦苇(*Phragmites communis*)等广泛分布的建群种都兼无融合生殖^[30]。这是最节省能量扩大种群、快速基因固定和遗传分化的繁殖方式。可惜, 不少荒漠生态系统的建群种没有繁育系统和基因流的报道, 建议进行分子遗传分析。

3.2 重组生物环境释放和自然环境中的遗传交换 关于遗传上修饰的生物(genetically modified organism, GMO), 主要是转基因动植物环境释放的生态后果是科学界和公众广泛关注的问题。现在已经有证据说明转基因作物的外源基因已转到近缘的杂草。这是一个有激烈争议并涉及伦理道德等需要专门论述的题目, 目前国内已有专家在进行此方面研究。

4 分子适应

4.1 遗传分化和生理适应 与动物不同, 植物不能逃避环境的胁迫, 是研究适应的好材料。只是分子资料很少。野生大豆能在不同生境条件下生长。通过对比生理特性与遗传组成和环境的关系, 可以探讨生理适应的分子基础。胡志昂、王洪新^[21]首先报道了北京地区野生大豆自然种群等位酶的遗传结构。种群间高遗传分化, 符合近交植物特点。基因频率与生境无关。1300植株无一杂合, 证明是严格自交的。Bult, Kiang^[32], Yu, Kiang^[33]大量位点的分析证实自交性和高度遗传分化。李军等^[31]金华种群研究证实同工酶组成与所在环境没有相关性。王洪新等^[13]对比黄河入海口盐渍野大豆种群与邻近的正常种群植株的耐盐性, 发现盐渍种群平均耐盐性大于非盐渍种群, 主要是因为盐渍种群存在正常种群所没有的高耐盐植株, 其耐盐能力显著高于已知最耐盐的栽培大豆品种: 文丰7号和 Morgan。种群内和种群间存在显著的同工酶变异, 但是植株的同工酶基因型与耐盐水平没有相关性。用上述改进的 RAPD 方法和 RAPD 结合 RFLP 的方法检测到种群内外的 DNA 多样性远高于同工酶, 甚至可以把每个植株相互区别开。但至今还没有找到耐盐植株共有而为盐敏感植株所没有的 RAPD 带或 RAPD-RFLP 产物。钟敏等^[22]对比分析了耐盐大豆品种(文丰7号、Morgan)和敏感品种 Hark 和 Jackson 的 DAF 谱。用8个引物, 就找到3个 DAF 产物是耐盐品种专一的。最近对其中一个进行了再扩增和克隆, 测定的250bp 序列正在研究中, 其中有(TA)_n直接重复序列。现正根据序列设计新引物以便了解其两翼的序列, 进一步探索生理适应的分子基础。植物自然种群耐重金属、耐盐的报道很多, 参见王洪新等^[16]的讨论部分。可惜只有少数涉及同工酶分化, 极少有 DNA 标记的研究。

4.2 遗传分化和形态分化 物种是按形态特征区分的。对比研究占据不同生境的近缘物种 DNA 变异, 可望了解形态分化的分子基础及与环境的关系。属于壳斗科栎属的辽东栎和蒙古栎是我国华北和东北夏绿阔叶林的建群种。两个种典型的形态差别是叶裂片数和壳斗形态不一, 可能与生境有关。在两个种的交错分布区存在中间类型。作者研究的形态上典型的辽东栎来自山西省关帝山, 典型蒙古栎采自黑龙江省帽儿山。北京地区东灵山的辽东栎, 壳斗形态居两种之间, 叶脉和叶裂片数变化很大, 覆盖两个种的变化范

① 恽 锐, 等, 《植物学报》待发。

围。RAPD 和 DAF 的分析^①表明绝大多数扩增产物是2个种3个地区共有的,种间 DNA 多样性仅占两个种总 DNA 多样性的15%。有的扩增带如 OPD08₃₄是辽东栎专一的,北京种群只是部分个体有,而蒙古栎没有。有一些扩增带的频率有显著的地理梯度(cline)。这可以用栎属种间杂交的普遍性来解释。同工酶分析也支持这个解释。最近克隆了某些特征带,对其中一个进行了序列分析。希望用 DNA 序列对形态分化和生态适应作出分子解释。恽锐等^②也研究了北京东灵山两个相隔仅4km 的辽东栎种群。一个生长在阴坡,是中央斑块种群,生境湿润;另一个生长在阳坡是边缘种群,生境干燥。两个种群林下植被发育大不相同。RAPD 和 DAF 分析表明两者之间 DNA 多样性占总多样性的5%,和同工酶研究计算的遗传分化系数接近^[25],可能是强大的基因流抵消了生态环境的作用。观察到的同工酶杂合子频率大于 Hardy-Weinberg 平衡的预期值,说明辽东栎的高度异交性,可能还有杂合子优势。

柠条属豆科锦鸡儿属,分类上包括3个种:典型草原的小叶锦鸡儿(*C. micropylla*)、典型荒漠的柠条锦鸡儿(*C. korshinskii*)和形态居中的中间锦鸡儿(*C. intermedia*)。王洪新等^[33]报道处于草原与荒漠间生态过渡带的毛乌素地区,柠条的形态变异覆盖了上述3个种的变异范围。可能和栎树类似是杂种带对生态过渡带的适应。RAPD 分析^③表明毛乌素地区这个异质景观的过渡地带^[34],作为优势种的柠条有较高的种群间 DNA 分化。种群间 DNA 多样性占全地区总多样性的17%,暗示柠条是有部分近交的异交植物。种子蛋白分析^[24],同工酶和种子蛋白的遗传分析^④证实毛乌素地区柠条的兼性繁育系统。值得注意的是随着景观由滩地向硬梁变化,水分胁迫逐步加重,繁育系统逐渐由完全异交向着近交异交各占一半过渡。作物种群的研究揭示干旱条件下偏向近交的趋势^[35]。虽然机理还不清楚,但可以肯定是植物种群的一种适应策略。毛乌素地区中间锦鸡儿自然种群的生物量随水分状况而异,特别是在硬梁这种极端干旱条件下,水分匮乏严重地限制了植物地上部分的生长和光合面积,近交,尤其是自交比异交节省同化能。典型的异交,如风媒植物绝大多数花粉不会参与受精,构成很大的浪费。把来自水分状况差别很大的不同生境的柠条种子播种在同一块水分状况良好的实验地里,幼苗的生长都很好。3年生幼苗高度可以达到甚至超过生长十几年至几十年的自然种群。说明不同景观条件下植株地上部分生长的差别有一种表型可塑性,也就是说异质景观没有导致生态型的分化。种子蛋白和同工酶分析没有发现景观生态类型专一的位点或等位。RAPD 分析表明没有一个扩增带只出现在某种景观生态型中,表3所列位点地理变异的适应意义有待研究。作为柠条分种特征的荚角长度,看来和一些作物的果实长度一样,主要是遗传决定的^[33]。需要试验更多的 RAPD 引物或 DAF 分析来找到连锁的分子标记,探讨形态适应性分化的分子基础。

根据上述结果作者认为植物的不同性状对环境有不同的敏感性。自然种群中生理特征的变异有适应性,如野生大豆的高抗盐植株仅出现于盐渍种群。某些形态特征也可能是适应性性状,如锦鸡儿果实长度、栎树的叶形随环境梯度而变化。盐渍条件下野生大豆自然种群个体间在同工酶、种子蛋白和 DNA 序列的变异基本上与抗盐性无关。栎树和锦鸡儿的同工酶和 DNA 变异主要分布在种群内,种群间的变异与地理景观和生境关系不大,表现出中性及近中性性质。影响遗传变异的时间和空间分布的主要是植物的生活史特性,特别是繁育系统及寿命,也与其分布的历史有关。因此,以前只根据同工酶一类中性基因地理分布来确定基因资源保护的取样策略将会丢失具有重要经济价值的适应性基因。今后应着重开展环境敏感基因遗传分化的研究。这个论点和作者以前提出的植物形态进化和分子进化是不同机理的两种过程的观点一致^[36]。

4.3 环境对基因表达的影响 这原是动植物、微生物环境生理学和分子生物学的研究领域,有大量报道。植物方面可参看“植物分子生物学”^[37]一书的抗病、抗旱和抗盐等有关章节。如研究植物在水分逆境条件下基因表达的变化,可以先从鉴定逆境蛋白着手分离基因^[38]。如培养植物细胞在适应高盐培养基时大量积累渗透蛋白^[39]。它的含量与培养基 NaCl 浓度或植株根周围的盐含量有极显著的相关性。作者实验室构建了蕃茄 NP24蛋白(一种渗透蛋白)cDNA 反向插入 pBI121质粒 GUS 基因的重组分子,借助土壤杆菌转化烟草。Northern 杂交证明转基因烟草根的渗透蛋白 mRNA 的积累被反义技术阻断,但植株抗盐性没有显著

①恽锐等,《植物学报》待发表。②魏伟,等。待发。③周永刚,等。待发表。

变化。逆境蛋白是生物对环境胁迫的一种反应,可以作为生物所处状况的一个客观指示,但是,逆境蛋白不一定是抗逆的原因,可能是平行发生的现象。因此,在生理适应的研究中转基因技术对鉴定 DNA 序列的功能是必不可少的。

总之,中国科学院最近几年已全面建立了各种检测 DNA 多样性的方法,有的进行了改良,成功地用于研究野生动植物种群。说明我国的分子生态学无论在技术上还是在探讨问题的深度方面,均已经与国际水平全面接轨。

5 分子生态学的发展趋势

分子生态学刚刚兴起,但发展很快。可以预计,随着各种检测 DNA 多样性方法的发明和广泛使用,各种生物种群的遗传结构将得到进一步阐明,指导生物多样性的保育。适应性基因的克隆及其分子分析可望揭示适应的起源并建立一个统一的进化理论。但是,作者认为分子生态学更重要的是从功能上阐明生态学过程的分子机理。近几十年分子遗传学向生物学各个领域渗透,细胞学演变为细胞生物学,出现发育生物学,生物学逐渐成为一门精确的科学。分子遗传学的强大有力主要不是其方法、技术的精巧,更重要的是充分吸收了物理、化学的成果、哲学和方法论,因而阐明了生命活动的本质。高等动植物基因组有约10万个编码蛋白质的顺反子,加上重复序列,共有百万甚至亿计的相对独立的基本活动单位。生物化学和分子生物学坚持物理和化学的认识论,事物的无限可分性,把复杂的生命活动逐一分割为单个酶促反应进行研究,精确的遗传性和高度变异性被逐步简化找出基本单位——基因。通过严格的单因子实验,确凿无疑地逐个阐明每个步骤、每个基因的结构和功能。随后研究各个基本单位的相互关系,最后综合出一幅无比复杂的生命图。1992年德国 Behringer Mannheim 公司出版的两个整版的代谢图只是生命活动中物质能量流动过程的摘要。

生态学系统和生态学过程,同样是复杂的系统,作者认为应该简化进行分析,首先找出基本单位。生态系统功能中生物多样性的作用是生物多样性科学的核心课题^[40],也应该是生态学核心课题之一。通过毛乌素生态过渡带优势种生态遗传学研究,作者认为生态系统存在基本功能单位。例如毛乌素地区东部的覆沙滩地、软梁地、覆沙软梁地、固定沙丘、覆沙硬梁和硬梁地均有中间锦鸡儿分布^[27]。根据1993年7月的野外调查,坡顶基岩裸露的硬梁上零星分布生长矮小的中间锦鸡儿。坡下部有浅覆沙,出现百里香(*Thymus serpyrum* var. *mongolicus*)及其他植物。进入软梁和滩地,中间锦鸡儿群落的植物种类进一步增加,植株生长逐渐改善。证实水是毛乌素沙地的限制因子^[34]的论断。硬梁上还存在其他生物。锦鸡儿荚果里时有一种象甲,估计是开花时把卵产在子房里,幼虫以发育的种子为食,蛹长在种皮里,外形与种子无异。荚果成熟开裂时和种子一起散落地,能跳跃,最终进入岩石缝隙准备越冬。种子外形可避开小型食虫蚯蚓的捕食。另有一种寄生蜂寄生于象甲蛹,可能起抑制象甲种群的作用。虽然受精机理不清,但套袋实验证明中间锦鸡儿自花不育^[41]。估计,象甲寄生的同时进行了传粉。有柠条根瘤高固氮活性的报道;而且发现根瘤有超乎寻常的高吸氢酶活性,可以回收根瘤拟菌体固氮酶放氢不可避免要浪费的同化能^[42]。柠条经常处于水分胁迫和氮素缺乏的生境,导致地上部分生长量少和低叶面积。光合产物(能量)能否有效地被利用于固氮及蛋白质、核酸合成,对于植物的生长,包括根系的生长,以及在初级生产量基础上整个生态系统功能的维持至关重要。一种有高吸氢活性高效固氮的根瘤菌共生耐水分胁迫的柠条植物,加上为维持高遗传多样性所必须的由昆虫传粉实现低耗能的异交系统适应于贫脊的岩石生境可说是一种当地最简单的实现物质和能量循环的功能生态系统。作者提议这个由一种植物、一种固氮细菌、一种传粉昆虫相互共生并与缺水、缺氮的环境所组成的相互适应复合体可以称为当地生态系统的基本功能单位,英文可以称为 *ecosystem* 或 *ecoson* 或 *econ*,包括最低限度的物种和遗传多样性;一个优势种和两个关键种。随着环境的改善,适于生长的动植物和微生物种类逐渐增加,转化出毛乌素地区多种多样的生态系统。这时除了共生关系之外,出现竞争、捕食等更多的相互作用。基本功能单位的分子研究可以在已有的用 RAPD 对硬梁上中间锦鸡儿逐株基因型分析的基础上,再逐株对比分析根瘤菌和象甲的基因型。分析根际根瘤菌自然种群的遗传结构,不同基因型根瘤菌与各个植株根毛细胞的相互识别,吸氢酶基因的表达及对固氮效率的影响等。锦鸡儿的自交不亲和基因及其表达,象甲在子房产卵的选择机理,这些都是协同进化的分子研究。分子遗传学、发育生物学、

细胞生物学已经为这些研究提供了途径、甚至是技术细节,例如已有根瘤菌分种、分亚种和品系的各种专一引物和探针,有自然菌群 DNA 变异的报道。有关根-根瘤菌相互识别的分子机理,吸氢酶及其基因克隆,自交不亲和基因及其糖蛋白产物等均有大量工作积累。锦鸡儿生态系统基本功能单位的深入研究还应该包括基质的物理化学分析及生物与基质的相互作用。

从毛乌素地区延伸开来,进一步讨论我国生态系统的基本单位,可以找到更为简单的陆地生态系统,特别是在极端生境下。例如在我国北方沿海重盐渍土壤几乎到处可以看到由盐地硷蓬(*Suaeda maritima* var. *salsa*=*S. salsa*)单独一种组成的群落,除了细菌和微生物没有考察外,找不到其他生物。与毛乌素沙地相比,这里并不缺水,只是水中盐浓度太高,其他植物不能从中吸收水分。盐地硷蓬通过组织和细胞的分室性渗透调整,利用外界丰富的 Na^+ 、 K^+ 、 Cl^- 等离子,使得细胞水分吸收系统的水势低于环境,保证了水分供应^[13]。

盐渍条件下有充分的矿质供应,包括 NO_3^- ,所以生物固氮不是维持当地生态系统功能的必需条件之一。可能最基本的条件是光合作用以及由此产生的同化能力所驱动的包括糖酵解、三羧酸循环、蛋白质和核酸合成,支持细胞的分裂、分化和伸长,实现一定的生物量。在类似的盐渍生境,有时可以找到纯芦苇群落或盐地硷蓬-芦苇混合群落,因为芦苇也有耐高盐的能力。所以维持生态系统功能的可以是系统发育上相距很远的物种。物种可以替代,耐高盐能力(由一个或若干耐盐基因编码)必不可少。所以生态系统功能,即生态系统的能流物流,实质上是一系列基因的相互作用。分子生态学应该加强 DNA 序列生态学功能的研究。

总之,从上述讨论可以看出在生态学中应用分子生物学方法有助于深入了解很多生态学过程,特别是生态系统的结构与功能。生态学在分子生物学的全面渗透下,将进入一个全新的发展阶段,即分子生态学时期。

参 考 文 献

- 1 Burke T, Seidler R, Smith H. Editorial. *Molec. Ecol.* 1992, 1:1
- 2 Bachmann K. Molecular markers in plant ecology. *New Phytol.* 1994, 126:403~418
- 3 Wayne R. Conservation genetics; apply anywhere. *World Conservation*, 1996, 1:15~17
- 4 Caetano-Anolles G, Bassam BJ, Gresshoff PM. DNA fingerprinting using very short oligonucleotide primers *Bio/Technol.* 1991, 9:553~556
- 5 胡志昂,王洪新. 研究遗传多样性的原理和方法. 见:生物多样性研究的原理和方法. 中国科学院生物多样性委员会编. 北京:科学出版社,1994. 117~122
- 6 Southern E M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 1975, 98:503~517
- 7 王洪新,董夫贵,胡志昂. 生物大分子的非放射性标记和检测. *植物学通报*, 1993, 10:7~9
- 8 Jeffreys A J, Wilson V, Thein S L. Hypervariable minisatellite regions in human DNA. *Nature*, 1985, 314:67~73
- 9 Nybom H, Ramse J, Kaemmer D, et al. Oligonucleotide DNA fingerprinting detects a multiallelic locus in birch (*Betula pendula*). *Molecular Ecol.* 1992, 1:65~67
- 10 Williams J G K, Kubelik A R, Livak K J, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acid Res.* 1990, 18:6531~6538
- 11 Welsh J, McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* 1990, 18:7 213~7 218
- 12 胡志昂,恽锐,钟敏,等. 检测植物 DNA 扩增多样性方法的比较和改进. *植物学报*, 1997, 39:138~144
- 13 Gresshoff P M, MacKezic A K. Low experimental variability of DNA profiles generated by arbitrary primer based amplification (DAF) of soybean. *Chinese J. Bot.* 1994, 6:1~6
- 14 宿兵,施立明,何光昕,等. 大熊猫遗传多样性的蛋白电泳研究. *科学通报*, 1994, 39:742~745
- 15 张亚平,王文,宿兵等. 大熊猫微卫星 DNA 的筛选及其应用. *动物学研究*, 1995, 16:301~306

- 16 王洪新,胡志昂,钟敏等.盐渍条件下野大豆群体的遗传分化和生理适应:同工酶和随机扩增多态DNA研究.植物学报,1997,39:29~34
- 17 King L M, Schaal B A. Ribosomal DNA variation and distribution in *Rudbeckia missouriensis*. *Evolution*, 1989, 43: 117~119
- 18 张亚平, Ryder OA, 范志勇, 等. 大熊猫 DNA 序列变异和遗传多样性研究. 中国科学, 1997, 27: 139~144
- 19 Hamrick J L, Godt M J W. Allozyme diversity in plant species. in: *Plant Population Genetics, Breeding, and Genetic Resources*. Brown A H D, et al eds. Sinauer Associates Inc. Sunderland, Mass. USA, 1990, 43~63
- 20 王洪新, 胡志昂. 植物的繁育系统、遗传结构和遗传多样性保护. 生物多样性, 1996, 4: 92~96
- 21 胡志昂, 王洪新. 北京地区野大豆天然群体遗传结构. 植物学报, 1985, 27: 599~604
- 22 Bult C J, Kiang Y T. Electrophoretic and morphological variation within and among natural population of wild soybean *Glycine soja* Sieb. & Zucc. *Bot. Bull. Acad. Sci.* 1992, 33: 111~122
- 23 Yu H, Kiang Y T. Genetic variation in South Korean natural populations of wild soybean. *Euphytica* 1993, 68: 213~221
- 24 王洪新, 胡志昂, 钟敏, 等. 毛乌素沙地锦鸡儿种群种子蛋白多样性及其生态学意义. 生态学报, 1994, 14: 372~380
- 25 钟敏, 王洪新, 胡志昂, 等. 干旱和湿润生境条件下辽东栎群体的遗传结构及其适应意义的初步研究. 植物学报, 1995, 37: 661~668
- 26 Mosseler A J, Egger K N, Innes D J. Life history and the loss of genetic diversity in red pine. *Amer. J. Bot* 1993, 80: abstract 240
- 27 陈灵芝, 赵士洞, 王恩明. 生态系统多样性. 见: 中国的生物多样性. 陈灵芝主编. 北京: 科学出版社, 1993. 114~163
- 28 Hoelzel A R. Conservation genetics of whales and dolphins. *Molecular Ecology*, 1992, 1: 119~125
- 29 Brown A H D, et al. Estimation of the mating system of *Eucalyptus obliqua* L'Herit by using allozyme polymorphisms. *Aust. J. Bot.* 1975, 23: 931~949
- 30 Fryxell P A. Mode of reproduction of higher plants. *The Botan. Rev.* 1957, 23: 135~233
- 31 李军, 陶芸, 郑师章, 等. 同工酶水平上野生大豆种群内分化的研究. 植物学报, 1995, 37: 669~676
- 32 Zhong M, Hu Z A, Gresshoff P M. Search for molecular markers of salt tolerance of soybean by DNA Amplification Fingerprinting. *Soybean Genetics Newsl*, 1997, 24: 81~82
- 33 王洪新, 胡志昂, 钟敏等. 毛乌素沙地锦鸡儿种群形态变异. 生态学报, 1994, 14: 366~371
- 34 张新时. 毛乌素沙地的生态背景及其草地建设的原则与优化模式. 植物生态学报, 1994, 18: 1~16
- 35 Clegg M T. Measuring plant mating systems. *Bioscience*, 1980, 30: 814~818
- 36 Hu Z A, Wang H X. Discrepancy between molecular and morphological evolution in plants. *Chinese J. Bot.* 1994, 6: 168~176
- 37 荆玉祥, 匡廷云. 李德葆主编. 见: 植物分子生物学. 北京: 科学出版社, 1995
- 38 胡志昂, 王洪新. 植物抗旱耐盐基因研究进展, 荆玉祥等编. 见: 植物分子生物学. 北京: 科学出版社, 1995. 204~213
- 39 Singh N K, Handa A K, Hasegawa P M et al. Proteins associated with adaptation of culture tobacco cells. *Pl. Physiol.* 1985, 79: 126~137
- 40 DIVERSITAS. *DIVERSITAS: An international programme of biodiversity science*. Operational Plan. 1996.
- 41 徐朗然, 郝秀英, 杨喜林, 等. 柠条同中间锦鸡儿的杂交和分类. 中国植物学会55周年年会学术论文摘要汇编. 北京 1988. 188
- 42 关桂兰, 苏云, 王卫卫, 等. 新疆干旱区豆科根瘤菌代谢与固氮作用. 干旱区研究, 1990, 7: 9~14