

湖北海棠的等位酶变异和遗传多样性研究

康明 黄宏文*

(中国科学院武汉植物所/武汉植物园, 武汉 430074)

摘要: 采用超薄平板微型聚丙烯酰胺等电聚焦电泳方法对湖北海棠(*Malus hupehensis*)的9个野生居群和2个人工栽培居群的等位酶变异和遗传多样性进行了初步研究。通过对12个酶系统29个酶位点的检测,结果表明湖北海棠有25个酶位点的等位基因频率分布差异非常显著,有10个居群发现稀有等位基因,并有11个(37.9%)重复位点;湖北海棠的遗传多样性水平很高,等位基因平均数 $A = 2.127$ 、多态位点百分率 $P = 74.927$ 、平均预期杂合度 $He = 0.376$ 、居群间的基因分化系数 $G_{ST} = 0.224$ 。与其他苹果属植物相比,湖北海棠具有中等丰富的遗传变异水平。居群间的基因流仅为 $Nm = 0.866$,表明遗传漂变是影响居群遗传变异和遗传结构的一个重要因素。

关键词: 居群遗传学, 基因频率, 遗传结构, 基因流

中图分类号: Q347

文献标识码: A

文章编号: 1005-0094(2002)04-0376-10

Allozymic variation and genetic diversity in *Malus hupehensis* (Rosaceae)

KANG Ming, HUANG Hong-Wen*

Wuhan Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430074

Abstract: Allozymic variation and genetic diversity were evaluated among nine wild and two cultivated populations of *Malus hupehensis* using isoelectric focusing in thin-layer polyacrylamide slab gels. Twenty-nine loci of 12 enzyme systems were detected and used for population genetic analysis, revealing that the distribution of allele frequencies of 25 loci were significant at $P \leq 0.01$. Nineteen locally rare alleles were found in 10 populations sampled in the study. Of 29 loci, 11 (37.9%) were duplicate loci. A high level of genetic diversity was detected in *M. hupehensis*, with mean number of alleles per locus $A = 2.127$, percentage of polymorphic loci $P = 74.927$, and mean expected heterozygosity $He = 0.376$. The relative magnitude of differentiation among populations is significantly higher than those of other long-lived woody plants ($G_{ST} = 0.224$). Compared with other *Malus* spp., this species has a moderate level of genetic variability. Gene flow among populations is only $Nm = 0.866$, suggesting that gene drift plays an important role in influencing genetic variation and determining genetic structure.

Key words: population genetics, gene frequency, genetic structure, gene flow

湖北海棠(*Malus hupehensis*)是原产我国的蔷薇科(Rosaceae)苹果亚科(Maloideae)苹果属(*Malus*)植物,主要分布于我国湖北、四川、山东、河南、浙江、甘肃等十多个省市,以川东、鄂西地区最多(俞德浚,1974)。湖北海棠为典型的异源三倍体 $2n = 3X = 51$,主要以无融合生殖方式繁殖后代(Sax,1931; Dermen,1936; Sampson,1969)。Schmidt通过对自然授粉条件下苹果属植物无融合生殖能力的多年观

察,证实湖北海棠的无融合生殖能力在苹果属植物中最高,为94%(邓家祺,1983)。湖北海棠因其无融合生殖特性及其应用价值,一直受到国内外的广泛重视(周志钦,李育农,1995; Olien,1987; Schmidt,1988)。Schmidt(1988)认为湖北海棠具有无融合生殖能力强、种子不带病毒、抗性强等优良性状,适合作苹果砧木,但同时也有矮化效果不明显和种子发芽率低等缺陷。我国研究人员分别对湖北海棠作苹

果砧木的丰产性、耐涝性、耐热性、抗寒性以及抗病性的敏感性做了初步研究(成明昊,李晓林,1990;王焕玉等,1990;雷振亚等,1994;杨静慧,杨焕婷,1996;张贵,成明昊,1999),结果表明湖北海棠砧具有矮化或半矮化、早产丰产、耐涝、耐湿热、耐寒等优点。最近,Benson & Lamboy(2001)用 SSR 技术分析了 65 份湖北海棠材料,发现湖北海棠种内存在很高的遗传变异。湖北海棠有多种类型,诸如大叶型湖北海棠、小叶型湖北海棠、平邑甜茶、巴东海棠、泰山海棠等,各个类型在形态、过氧化物同工酶谱带、无融合生殖能力、抗性等方面都有很大差异(湖北农科院果茶所苹果组,1978;杨波,明宗贤,1993;周志钦等,1998)。

近年来,已有不少关于用等位酶技术研究果树种质资源遗传多样性的报道,如板栗(*Castanea*) (Huang *et al.*, 1998a)、泡泡果(*Asimina*) (Huang *et al.*, 1998b)、核桃(*Juglans*) (Fornari *et al.*, 1999)、山核桃(*Carya*) (Ruter *et al.*, 1999)、杨梅(*Myrica*) (Cheng *et al.*, 2000)等,而关于苹果属植物野生资源的遗传多样性研究较少。Dickson *et al.*(1991)用等位酶技术研究了分布于北美的窄叶海棠(*M. angustifolia*)、野香海棠(*M. coronaria*)、草原海棠(*M. ioensis*)和澳湟金海棠(*M. fusca*)的遗传多样性;Lamboy *et al.*(1996)用同样的方法分析了新疆野海棠(*M. sieversii*)野生居群的遗传多样性,但国内外未见关于湖北海棠野生居群遗传多样性的报道。

我国栽培植物遗传资源的保护形势非常严峻,野生和野生近缘种保存极少,果树种质资源的流失尤为严重(黄宏文,1998)。虽然苹果属植物野生资源非常丰富,已定名的有 37~60 种,其中 24 种起源于中国(李育农,1989),但现代栽培苹果的遗传基础却很狭窄,而且苹果属植物的基因流失日趋严重,一些古老品种拥有的抗性如抗黑心病等特性在现代栽培品种中几乎已经丢失。有证据表明,在现代栽培苹果的发展过程中,有 100 多个性状已经丢失(Way *et al.*, 1990)。有些物种如沙金海棠(*M. Sargentii*)、乔劳斯基海棠(*M. tshnoskii*)已经处于濒危状态。尽管利用湖北海棠无融合生殖特性作苹果砧木受到质疑(Olien,1987;Schmidt,1988),但湖北海棠所具有的多种抗性如耐热、耐涝、耐寒以及抗黑心病、锈病、根癌病、苹果棉蚜(Olien,1987)、白粉病

(Batlle & Alston,1994)等,对苹果的育种有重要价值。本研究采用等位酶技术,对湖北海棠 9 个野生居群和 2 个人工迁地保护群体进行等位酶变异和遗传多样性分析,旨在揭示湖北海棠等位酶水平上的遗传多样性及居群遗传结构,为湖北海棠种质资源的收集、保存和评价提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 植物材料

实验材料的采集于 2001 年 9~10 月进行,分别在湖北海棠自然分布区的集中分布地湖北兴山县、神农架、保康县和山东泰山,共采集到 9 个野生居群,并对湖北省农科院果茶所迁地保护的 2 个人工栽培群体进行取样。野生居群按随机取样原则,每个居群取样数为 20~25 株,野外植株少于 20 株的居群则全部采集,其中仅神农架的千家坪居群取样数少于 20 株。人工栽培居群根据在资源圃的定植时间划分为 2 个人工迁地保育的混合居群。取样试材为成熟种子,各居群生境特点及采样数见表 1。

1.2 酶提取、电泳及染色

用改进的三号提取缓冲液(Wendel & Weeden, 1989),在冰浴条件下研磨种子(25 mg/120 μ L),提取酶。研磨液在 5000 rpm 下离心 5 min,即可上样、电泳。电泳采用超薄平板微型聚丙烯酰胺等电聚集方法(黄宏文,2000)。电泳结束后,用缩减 1/2 量的 Wendel & Weeden(1989)配方进行染色。通过广泛测试,最后选取表 2 所列的 12 个酶系进行居群遗传分析。

1.3 酶谱判读

酶谱 DIA、IDH、ME、PGD、PGI、PGM 的位点和等位基因的确定参照 Weeden & Lamb(1985,1987)在研究苹果属植物时采用的方法,其他酶谱的位点和等位基因的确定参照 Weeden & Wendel(1989)、王中仁(1996)、Huang *et al.*(1994)的方法。在 12 个酶系中,共确定了 29 个等位基因位点,酶的名称及各酶系的位点数见表 2。

1.4 数据分析

按 Nei(1987)的方法计算各位点的等位基因频率,输入 Biosys-1(Swofford & Selander,1981),分别计算各居群的等位基因平均数 A 、多态位点百分率 P 、平均预期杂合度 Hd (Nei,1973)和卡平方 χ^2 。同

表 1 湖北海棠 11 个居群的采样地点、生境和采样数
Table 1 Location, habitat and sampling size of 11 populations of *Malus hupehensis*

居群 Population	地点 Location	海拔 Altitude (m)	生境 Habitat	采样数 Sampling size
欧店 Oudian	保康县欧店镇 Oudian, Baokang County, Hubei	1200	山坡,散生于密林中 Hillside, sparely grown in dense forests	20
板庙 Banmiao	兴山县榛子乡 Zhengzi, Xingshan County, Hubei	1200	山坡,散生于灌木丛中 Hillside, sparely grown in shrubs	22
大九湖 Dajiuhu	神农架林区大九湖乡 Dajiuhu, Shennongjia, Hubei	1900	河边,密集成片生长 Riverside, densely grown	21
河坪 Heping	兴山县榛子乡 Zhengzi, Xingshan County, Hubei	1200	山坡,散生于灌木丛中 Hillside, sparely grown in shrubs	22
千家坪 Qianjiaping	神农架林区木鱼镇 Muyu, Shennongjia, Hubei	2000	山顶,密集、成片生长于草地中 Mountain's summit, densely grown in grassland	15
后坪 Houping	兴山县三阳乡 Sanyang, Xingshan, Hubei	1400	稀疏、生长在山沟边 Sparely grown in valleys	23
三阳 Sanyang	兴山县三阳乡 Sanyang, Xingshan County, Hubei	1400	山坡,散生于灌木丛中 Hillside, sparely grown in shrubs	21
泰山 A Taishan A	山东泰山 Taishan, Shandong	1540	山顶,密集、成片生长 Mountain's summit, densely grown	22
泰山 B Taishan B	山东泰山 Taishan, Shandong	1540	山顶,密集、成片生长 Mountain's summit, densely grown	22
金水 A Jinshui A	湖北农科院果茶所 Institute of Fruit & Tea, HAAS	30	种质资源圃 Germplasm nursery	23
金水 B Jinshui B	湖北农科院果茶所 Institute of Fruit & Tea, HAAS	30	种质资源圃 Germplasm nursery	21

表 2 染色的酶系和位点数
Table 2 The 12 enzymes and number of loci

中文名称 Chinese name	英文名及缩写 English name and abbreviation	代号 Code of enzyme	位点数 Number of loci
酸性磷酸酶	Acid phosphatase (ACP)	E. C. 3. 1. 3. 2	2
乙醇脱氢酶	Alcohol dehydrogenase (ADH)	E. C. 1. 1. 1. 1	2
还原型辅酶 I 心肌黄酶	NAD(P)H- Diaphorase (DIA)	E. C. 1. 6. 2. 2	3
酯酶	Esterase (EST)	E. C. 3. 1. 1. -	5
6-磷酸葡萄糖脱氢酶	Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH)	E. C. 1. 1. 1. 49	2
β-半乳糖苷酶	β-Galactosidase (GAL)	E. C. 3. 2. 1. 23	3
异柠檬酸脱氢酶	Isocitrate dehydrogenase (IDH)	E. C. 1. 1. 1. 42	1
苹果酸酶	Malic enzyme (ME)	E. C. 1. 1. 1. 40	1
6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶	Phosphogluconate dehydrogenase (PGD)	E. C. 1. 1. 1. 44	2
磷酸葡萄糖异构酶	Phosphoglucoisomerase (PGI)	E. C. 5. 3. 1. 9	2
磷酸葡萄糖变位酶	Phosphoglucomutase (PGM)	E. C. 5. 4. 2. 2	4
过氧化物酶	Peroidase (PRX)	E. C. 1. 11. 1. 7	2

时,计算总居群的基因多样性 H_T 、居群内的基因多样性 H_S 、居群间的基因多样性 D_{ST} 和基因分化系数 G_{ST} (Nei, 1987)。

2 结果与分析

2.1 等位酶分析

部分等位酶图片见图 1,通过对湖北海棠 11 个

居群 12 个酶系的分析,在 29 个酶位点上共鉴定出 81 个等位基因图谱,各位点的等位基因频率分布如表 3 所示。

从各等位基因在居群中的频率分布可以看出,只有 *Pgd-1* 和 *Pgd-2* 在各居群中均表现为单态位点。*Est-5* 只在欧店、大九湖居群表现出多态性,*Pgm-3* 只在板庙、金水 B 居群表现出多态性,*Prx-1*

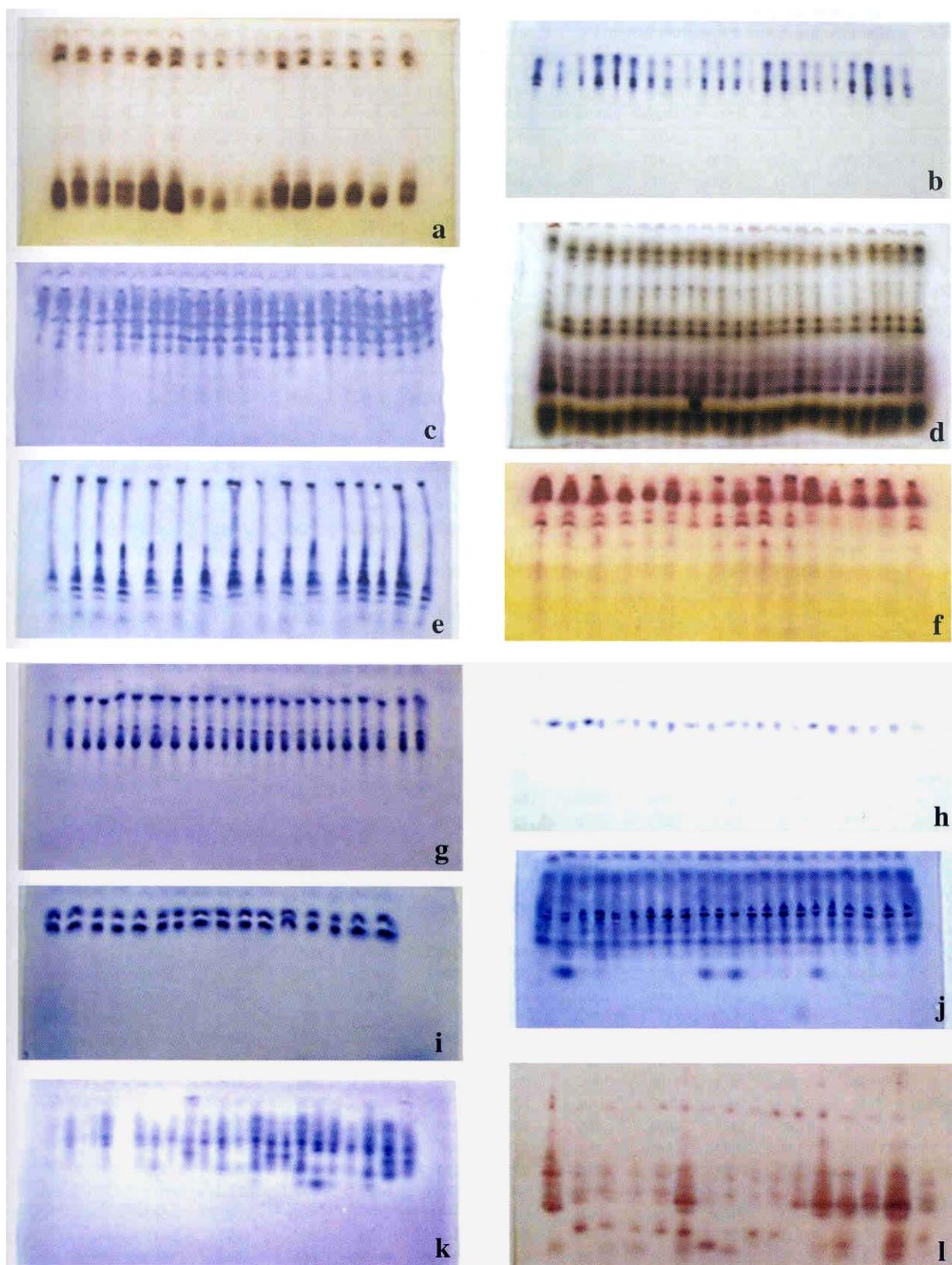


图1 湖北海棠部分等位酶照片

Fig.1 Gel pictures of *Malus hupehensis*

a,ACP; b,ADH; c,DIA; d,EST; e,G6PDH; f,GAL; g,IDH; h,ME; i,PGD; j,PGI; k,PGM; l,PRX

表 3 湖北海棠居群 29 个位点的等位基因频率

Table 3 Allele frequencies of 29 isozyme loci of *Malus hupehensis* populations

位点 Locus	居群 Population											χ^2
	欧店 Oudian	板庙 Banmian	大九湖 Dajiuhu	河坪 Heping	千家坪 Qianjiaping	后坪 Houping	三阳 Sanyang	泰山 A Taishan A	泰山 B Taishan B	金水 A Jinshui A	金水 B Jinshui B	
<i>Acp-1</i>												102.414 **
A	1.000	.667	.500	.667	.222	1.000	1.000	.667	.667	.522	.667	
b	.000	.333	.500	.333	.778	.000	.000	.333	.333	.478	.333	
<i>Acp-2</i>												50.257 **
a	.351	.333	.117	.409	.222	.319	.333	.333	.333	.565	.267	
b	.684	.667	.850	.591	.645	.667	.667	.667	.667	.435	.650	
c	.084	.000	.033	.000	.133	.014	.000	.000	.000	.000	.083	
<i>Adh-1</i>												174.740 **
a	.667	.333	.667	.333	.667	.333	.333	.667	.667	.667	.667	
b	.333	.667	.333	.667	.333	.667	.667	.333	.333	.333	.333	
<i>Adh-2^Z</i>												120.480 **
a	1.000	1.000	.667	1.000	1.000	.667	.667	1.000	1.000	1.000	1.000	
b	.000	.000	.333	.000	.000	.333	.333	.000	.000	.000	.000	
<i>Dia-1^Z</i>												116.709 **
a	.667	.667	.667	.667	.667	.667	.667	.333	.455	.667	.667	
b	.333	.333	.333	.333	.333	.333	.333	.333	.333	.333	.333	
c	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.333	.212	.000	.000	
<i>Dia-2^Z</i>												210.858 **
a	.150	.258	.873	.348	.667	.333	.571	.333	.333	.130	.383	
b	.367	.455	.127	.258	.333	.116	.111	.667	.652	.203	.583	
c	.483	.287	.000	.394	.000	.551	.318	.000	.015	.667	.034	
<i>Dia-3^Z</i>												202.152 **
a	.117	.000	.508	.197	.533	.377	.492	.333	.288	.217	.333	
b	.200	.697	.429	.515	.222	.406	.333	.667	.636	.783	.667	
c	.683	.303	.063	.288	.156	.217	.175	.000	.076	.000	.000	
d	.000	.000	.000	.000	.089	.000	.000	.000	.000	.000	.000	
<i>Est-1</i>												.823 ^{NS}
a	.741	.667	.667	.667	.667	.667	.667	.667	.667	.667	.667	
b	.259	.333	.333	.333	.333	.333	.333	.333	.333	.333	.333	
<i>Est-4^Z</i>												21.218 *
a	.667	.667	.683	.333	.756	.667	.667	.667	.667	.667	.667	
b	.333	.333	.317	.667	.244	.333	.333	.333	.333	.333	.333	
<i>Est-5^Z</i>												380.061 **
a	.250	1.000	.079	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	
b	.733	.000	.921	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	
c	.017	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	
<i>Est-6</i>												150.891 **
a	.544	.444	.176	.379	.467	.667	.746	.667	.667	.667	.500	
b	.316	.556	.456	.621	.533	.333	.254	.333	.333	.333	.500	
c	.140	.000	.368	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	
<i>Est-7</i>												64.403 **
a	.750	.667	.684	.606	.378	.667	.746	.667	.333	.667	.567	
b	.250	.333	.298	.288	.533	.333	.254	.333	.667	.333	.433	
c	.000	.000	.018	.106	.089	.000	.000	.000	.000	.000	.000	
<i>G6pdh-1</i>												98.368 **
a	.018	.450	.333	.333	.333	.333	.048	.333	.333	.333	.333	
b	.088	.183	.333	.667	.333	.333	.365	.333	.333	.333	.333	
c	.894	.367	.333	.000	.333	.333	.587	.333	.333	.333	.333	
<i>G6pdh-2</i>												108.261 **
a	.667	.365	.460	.606	.667	.667	.667	.667	.667	.667	.583	
b	.000	.333	.333	.333	.000	.333	.349	.015	.333	.333	.417	
c	.333	.302	.207	.061	.333	.000	.254	.318	.000	.000	.000	
<i>Gal-1</i>												91.991 **
a	.316	.470	.383	.273	.133	.261	.238	.333	.333	.333	.267	
b	.684	.333	.517	.424	.400	.420	.381	.333	.333	.450	.583	

表 3(续) Table 3(continued)

位点 Locus	居群 Population											χ^2
	欧店 Oudian	板庙 Banmian	大九湖 Dajiuhu	河坪 Heping	千家坪 Qianjiaping	后坪 Houping	三阳 Sanyang	泰山 A Taishan A	泰山 B Taishan B	金水 A Jinshui A	金水 B Jinshui B	
c	.000	.197	.100	.303	.334	.319	.365	.333	.333	.217	.150	96.345 **
d	.000	.000	.000	.000	.133	.000	.016	.000	.000	.000	.000	
<i>Gal-2^Z</i>												
a	.450	.333	.233	.333	.333	.333	.222	.667	.667	.333	.350	516.935 **
b	.483	.379	.467	.667	.578	.595	.397	.333	.333	.580	.400	
c	.067	.288	.300	.000	.089	.072	.381	.000	.000	.087	.250	
<i>Gal-3</i>												
a	1.000	1.000	.286	.091	.089	1.000	.857	.333	.409	.000	.333	50.167 **
b	.000	.000	.333	.788	.089	.000	.143	.667	.591	1.000	.767	
c	.000	.000	.381	.121	.778	.000	.000	.000	.000	.000	.000	
d	.000	.000	.000	.000	.044	.000	.000	.000	.000	.000	.000	
<i>Idh-2</i>												
a	.579	.561	.508	.531	.489	.394	.556	.333	.409	.565	.333	120.530 **
b	.421	.439	.492	.469	.489	.591	.428	.667	.591	.333	.500	
c	.000	.000	.000	.000	.022	.015	.016	.000	.000	.102	.167	
<i>Me-1</i>												
a	.250	.288	.333	.348	.112	.623	.175	.258	.576	.333	.333	98.188 **
b	.667	.712	.667	.424	.400	.377	.508	.560	.424	.565	.484	
c	.083	.000	.000	.288	.444	.000	.254	.182	.000	.102	.183	
d	.000	.000	.000	.000	.044	.000	.063	.000	.000	.000	.000	
<i>Pgd-1</i>												
a	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	160.133 **
<i>Pgd-2</i>												
a	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	
<i>Pgi-1^Z</i>												
a	.050	.106	.143	.273	.133	.000	.095	.76	.121	.333	.200	105.754 **
b	.317	.318	.238	.333	.356	.333	.333	.273	.333	.333	.333	
c	.633	.576	.619	.394	.333	.609	.572	.651	.546	.333	.467	
d	.000	.000	.000	.000	.178	.058	.000	.000	.000	.000	.000	
<i>Pgi-2^Z</i>												
a	.500	.333	.524	.030	.578	.406	.524	.667	.333	.667	.333	244.344 **
b	.467	.667	.428	.667	.422	.464	.365	.333	.667	.333	.667	
c	.033	.000	.048	.303	.000	.130	.111	.000	.000	.000	.000	
<i>Pgm-2^Z</i>												
a	.667	.333	.333	.333	.333	.333	.333	.364	.333	.333	.333	270.924 **
b	.333	.667	.667	.500	.356	.667	.667	.333	.333	.667	.500	
c	.000	.000	.000	.167	.311	.000	.000	.303	.333	.000	.167	
<i>Pgm-3^Z</i>												
a	1.000	.333	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	.800	184.343 **
b	.000	.667	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.200	
<i>Pgm-4</i>												
a	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	.333	1.000	.333	.333	1.000	1.000	113.490 **
b	.000	.000	.000	.000	.000	.333	.000	.333	.333	.000	.000	
c	.000	.000	.000	.000	.000	.333	.000	.333	.333	.000	.000	
<i>Pgm-5</i>												
a	1.000	.333	.967	.955	.933	1.000	.952	1.000	1.000	.957	.750	233.833 **
b	.000	.667	.033	.045	.067	.000	.048	.000	.000	.043	.250	
<i>Prx-1</i>												
a	.167	.333	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	113.490 **
b	.833	.667	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	
<i>Prx-2</i>												
A	.200	.000	.333	.000	.133	.333	.333	.000	.000	.000	.217	184.343 **
B	.433	.333	.000	.485	.244	.667	.667	.667	.667	.333	.333	
C	.367	.667	.566	.515	.623	.000	.000	.333	.333	.406	.333	
D	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.261	.117	

注 Z 表示具有重复等位基因的位点；NS, *, ** 分别代表不显著、在 $P \leq 0.05$ 和 $P \leq 0.01$ 水平下的显著性Note: Z: duplicate allele locus; NS, *, **: nonsignificant or significant at $P \leq 0.05$ or $P \leq 0.01$, respectively

只在板庙、欧店居群表现出多态性 3 个位点在其他各居群中均表现为单态位点。在欧店居群中发现有 *Est-5^b*、*Est-5^c*、*Est-6^c* 和 *Prx-1^a* 等 4 个稀有基因;在板庙居群中发现稀有基因 *Prx-1^a*;在大九湖居群中发现稀有基因 *Est-5^b* 和 *Est-6^c*;在千家坪居群中发现有 *Dia-3^d*、*Gal-1^d*、*Gal-3^d*、*Me-1^d* 和 *Pgi-1^d* 等 5 个稀有基因;在后坪居群中发现稀有基因 *Pgi-1^d*;在三阳居群中发现稀有基因 *Gal-1^d* 和 *Me-1^d*;在泰山 A 和泰山 B 居群中发现稀有基因 *Dia-1^c*;在 2 个人工居群中发现稀有基因 *Prx-2^d*, 共在 11 个位点上发现 19 个稀有基因。另外, *Adh-2*、*Dia-1*、*Dia-2*、*Dia-3*、*Est-4*、*Est-5*、*Gal-2*、*Pgi-1*、*Pgi-2*、*Pgm-2* 和 *Pgm-3* 等 11 个位点具有复等位基因, 在酶谱中表现出固定杂合 (fixed heterozygosity) 的特性。通过 χ^2 对等位基因频率分布的检测表明, 在所有的多态位点中, 只有 *Est-1* 和 *Est-4* 的等位基因频率在各居群的分布分别为无显著差异和差异显著, 其余各位点等位基因频率的分布差异均非常显著。

2.2 居群的遗传多样性分析

每个位点的平均等位基因数 (*A*)、多态位点百分率 (*P*)、平均期望杂合度 (*He*) 是反映居群遗传多样性的常用指标。从表 4 可以看出, 湖北海棠各居群的平均等位基因数 (*A*) 非常接近 (*A* = 2.0 ~ 2.3), 最多为千家坪 (*A* = 2.3)。多态位点百分率 *P* = 69.0 ~ 79.3, 其中, 板庙、大九湖、金水 B 的多态性最高, 多态位点百分率 (*P*) 均为 79.3, 同时这 3 个居群的平均期望杂合度 (*He*) 也比较高, 分别为 0.392、

0.388 和 0.405; 金水 A 的多态位点百分率最低 (*P* = 69.0); 其次为欧店、河坪、后坪、三阳居群, 多态位点百分率 (*P*) 均为 72.4。多态位点百分率最高和最低的为金水的 2 个居群, 可能因为它们是迁地保育的人工居群, 金水 B 个体是多点采集的复合群体, 而金水 A 个体的来源比较单一。总的来看, 湖北海棠具有很高的遗传多样性, 居群多样性指标 *A*、*P*、*He* 平均分别为 2.127、74.927 和 0.376。

2.3 居群的遗传分化

居群间的基因多样性参数见表 5。湖北海棠 27 个多态位点总居群的平均基因多样 $H_T = 0.484$, 居群内的平均基因多样 $H_S = 0.401$ 。不同位点的分化程度不同, 位点 *Est-5*、*Gal-3*、*Pgm-3*、*Pgm-4* 分化强烈; 位点 *Dia-1*、*Est-4*、*Gal-1*、*Idh-2*、*Pgi-1* 的分化很小; 而位点 *Est-1* 则基本上没有分化, 居群间平均基因分化系数 $G_{ST} = 0.224$, 表明有 22.4% 的遗传变异存在于居群间, 77.6% 的遗传变异存在于居群内。

3 讨论

3.1 湖北海棠的等位酶变异和遗传多样性

从各位点的等位基因频率分布来看, 在除河坪外的 10 个居群中共发现 19 个地方性稀有基因, 其中欧店和千家坪就分别有 4 个和 5 个, 由于千家坪居群当年挂果树极少, 只采到 15 株样本, 如果扩大采样数目和范围, 可能会发现更多的稀有基因。地方性稀有基因是居群为适应特定的生态环境由突变而产生的, 其存在反映了居群遗传组成上的差异。

表 4 湖北海棠居群内遗传多样性指标 (括号内为标准差)

Table 4 Genetic diversity in *Malus hupehensis* populations (standard errors in parentheses)

居群 Population	<i>N</i>	<i>A</i>	<i>P</i>	<i>He</i>
欧店 Oudian	19.5 (.1)	2.1 (.2)	72.4	.330 (.042)
板庙 Banmiao	21.3 (.2)	2.0 (.1)	79.3	.392 (.040)
大九湖 Dajiuhu	20.8 (.1)	2.2 (.1)	79.3	.388 (.043)
河坪 Heping	21.2 (.7)	2.1 (.1)	72.4	.375 (.045)
千家 Qianjiaping	15.0 (.0)	2.3 (.2)	75.9	.383 (.046)
后坪 Houping	22.9 (.1)	2.1 (.1)	72.4	.369 (.045)
三阳 Sanyang	20.9 (.0)	2.2 (.2)	72.4	.369 (.045)
泰山 A Taishan A	22.0 (.0)	2.0 (.1)	75.9	.382 (.044)
泰山 B Taishan B	22.0 (.0)	2.0 (.1)	75.9	.386 (.044)
金水 A Jinshui A	23.0 (.0)	2.0 (.1)	69.0	.352 (.046)
金水 B Jinshui B	19.9 (.1)	2.2 (.1)	79.3	.405 (.043)
Mean		2.127	74.927	.376

注: *N*: 平均每个位点取样数; *A*: 平均等位基因数; *P*: 多态位点百分率; *He*: 平均期望杂合度

Note: *N*: mean sample size per locus; *A*: mean number of alleles per locus; *P*: percentage of polymorphic loci; *He*: mean expected heterozygosity

表5 湖北海棠居群间基因多样性

Table 5 Genetic diversity (Nei, 1987) among *Malus hupehensis* populations

位点 Locus	H_T	H_S	D_{ST}	G_{ST}
<i>Acp-1</i>	.481	.324	.157	.326
<i>Acp-2</i>	.497	.444	.053	.107
<i>Adh-1</i>	.555	.444	.111	.200
<i>Adh-2</i>	.165	.121	.044	.267
<i>Dia-1</i>	.505	.482	.023	.046
<i>Dia-2</i>	.655	.512	.143	.218
<i>Dia-3</i>	.618	.518	.100	.162
<i>Est-1</i>	.440	.439	.001	.002
<i>Est-4</i>	.457	.436	.021	.046
<i>Est-5</i>	.258	.050	.208	.806
<i>Est-6</i>	.539	.494	.045	.083
<i>Est-7</i>	.489	.456	.033	.067
<i>G6pdh-1</i>	.662	.586	.076	.115
<i>G6pdh-2</i>	.569	.512	.057	.100
<i>Gal-1</i>	.654	.622	.032	.049
<i>Gal-2</i>	.598	.556	.042	.070
<i>Gal-3</i>	.599	.266	.333	.556
<i>Idh-2</i>	.533	.509	.024	.045
<i>Me-1</i>	.596	.540	.056	.094
<i>Pgi-1</i>	.607	.582	.025	.041
<i>Pgi-2</i>	.551	.493	.058	.105
<i>Pgm-2</i>	.585	.474	.111	.190
<i>Pgm-3</i>	.145	.069	.076	.524
<i>Pgm-4</i>	.306	.182	.124	.405
<i>Pgm-5</i>	.188	.115	.073	.241
<i>Prx-1</i>	.087	.066	.021	.241
<i>Prx-2</i>	.637	.530	.107	.168
Mean	.451	.373	.074	.209
Mean (Poly)	.484	.401	.080	.224

注: H_T : 总的基因多样性; H_S : 居群内基因多样性; D_{ST} : 居群间基因多样性; G_{ST} : 基因分化系数

Note: H_T = total genetic diversity; H_S = genetic diversity within populations; D_{ST} = genetic diversity among populations; and G_{ST} = the relative magnitude of differentiation among populations

为尽可能收集到全面反映湖北海棠遗传组成的种质资源,应重视对地方性稀有基因的收集、保护和评价。在分析的 29 个位点中,有 *Adh-2* 等 11 个 (37.9%) 重复位点。重复位点的酶带表现出固定杂合特性,这是异源多倍体等位酶谱的典型特征 (Arft & Ranker, 1998)。Chevreau *et al.* (1985) 在苹果的同工酶分析中发现了多个重复位点,并推测二倍体苹果来源于多倍体,Weeden & Lamb (1987) 也在苹果中发现 19 个位点中有 8 个 (42.1%) 表现固定杂合特性。湖北海棠等位酶的固定杂合特性进一步揭示它是异源多倍体,梁国鲁等 (1996) 通过对苹果属植物小孢子母细胞染色体行为观察,也证实湖北海棠是一个典型的异源三倍体。

从反映居群遗传多样性的各个参数来看,湖北海棠的遗传多样性水平 ($A = 2.127$, $P = 74.927$, $He = 0.376$) 明显要比其他多年生木本植物的平均值高 ($A = 1.76$, $P = 49.3$, $He = 0.148$) (Hamrick *et al.*, 1992)。这一方面因为湖北海棠具有高度的无融合生殖兼有异花授粉的有性生殖特性,因此会在增加杂合性的同时,又能通过无融合生殖有效地固定杂合性;另一方面,由于湖北海棠染色体组基数比较高 ($X = 17$) 而且又是多倍体,因而有更高的同工酶水平以及可以容纳和积累更多的变异。和其他苹果属植物相比,湖北海棠也具有较高的遗传多样性, Dickson *et al.* (1991) 用等位酶分析了窄叶海棠 (*M. angustifolia*)、野香海棠 (*M. coronaria*)、草原海棠 (*M. ioensis*) 和澳湟金海棠 (*M. fusa*) 的遗传多样性,结果表明,其平均等位基因数分别为 1.750、1.750、2.083 和 2.083,多态位点百分率在 58% ~ 67% 之间,而 Lamboy *et al.* (1996) 对新疆野海棠 (*M. sieversii*) 的遗传多样性分析表明新疆野海棠有更丰富的遗传多样性 ($A = 2.75$, $P = 94$),这恰恰说明新疆野海棠是现代栽培苹果的祖先 (李育农, 1989)。

3.2 湖北海棠的遗传分化

湖北海棠居群间的分化系数 $G_{ST} = 0.224$,表明湖北海棠居群间的分化程度明显比其他多年生木本植物高 ($G_{ST} = 0.076$) (Hamrick & Godt, 1989),这一点符合湖北海棠无融合生殖特性,在有性生殖受到严格限制的条件下,居群间会因缺乏基因交流而导致分化加剧。由于本研究分析的 11 个居群有 4 个来自湖北兴山县,保康县的 1 个居群也和兴山居群相当接近,可能会导致 G_{ST} 偏低,也就是说,事实上湖北海棠居群间的分化程度要比现有的结果高。

3.3 遗传变异的产生和维持

前人的研究均表明湖北海棠具有高度的无融合生殖特性。理论上讲,湖北海棠居群在遗传上应该是非常稳定的,但从等位酶的变异来看,湖北海棠有很高的遗传多样性。遗传变异的产生是多方面的,诸如 有性生殖、体细胞突变、选择、基因流、遗传漂变及环境和生态因素的影响。湖北海棠是兼性无融合生殖,在适当条件下,能进行异花授粉,从而产生新的基因组合,以保持对环境的适应,尽管有性生殖的几率是很小的,但它仍然是产生湖北海棠遗传变异的主要因素。在有性生殖非常缺乏的植物中,体细

胞突变可能是主导遗传变异的一个主要的因素。高等植物的体细胞突变是很普遍的, Antolin & Strobeck(1985)认为每个位点的突变频率在 10^{-3} 到 10^{-5} 之间, 在有性生殖受到限制时, 子代还能积累更多的体细胞突变(Lynch & Gabriel, 1990), 而且能够探测到的体细胞突变并不一定会导致表型的改变(Silander, 1985)。景士西等(1995)也认为苹果属植物具有较高的基因突变频率。所以, 我们推测体细胞突变可能是产生湖北海棠多样性的另一个主要因素。此外, 根据基因流的计算公式 $Nm = (1 - F_{ST}) / 4F_{ST}$, 计算出湖北海棠的基因流 $Nm = 0.866$, 当 $Nm < 1$ 时, 基因流就不足抵制居群内因遗传漂变而引起的居群分化(Slatkin, 1985)。因此, 遗传漂变也是影响湖北海棠多样性的重要因素。本研究并未发现环境和生态因素与湖北海棠遗传多样性的直接关系, 但是, 在有性生殖受到限制的条件下, 湖北海棠完全有可能在环境和生态因素的选择压力下产生体细胞突变。综上所述, 我们认为湖北海棠遗传多样性的产生是有性生殖、体细胞突变、遗传漂变等多方面因素的综合结果, 无融合生殖则有效地固定了变异并维持其多样性。

参考文献

- 成明昊, 李晓林, 1990. 苹果砧木资源的耐涝性. 中国果树, 2: 9 ~ 13
- 邓家祺, 1983. 对无融合生殖苹果砧木育种的贡献——论无融合生殖的遗传. 国外农学—果树, 3: 7 ~ 11
- 湖北省农科院果茶所苹果组, 1978. 湖北海棠矮生类型资源调查. 中国果树, 1: 8 ~ 10
- 黄宏文, 1998. 保育遗传学与植物遗传资源的保育策略. 武汉植物学研究, 16(4): 346 ~ 358
- 黄宏文, 2000. 超薄平板聚丙烯酰胺凝胶的等电聚焦方法. 武汉植物学研究, 18(3): 224 ~ 228
- 雷振亚, 明宗贤, 董秀华, 1994. 湖北海棠苹果砧木丰产性调查. 湖北农业科学, 4: 44 ~ 45
- 李育农, 1989. 世界苹果和苹果属植物基因中心的研究初报. 园艺学报, 16(2): 101 ~ 107
- 梁国鲁, 李育农, 李晓林, 1996. 中国苹果属植物小孢子减数分裂染色体系统研究. 西南农业大学学报, 18(4): 298 ~ 307
- 景士西, 吴禄平, 李宝江, 1995. 果树遗传变异的特点初探. 遗传, 17(1): 40 ~ 44
- 王焕玉, 刘福昌, 张尊平, 1990. 苹果无融合生殖型砧木对潜隐病毒的抗性. 中国果树, 2: 23 ~ 25
- 王中仁, 1996. 植物等位酶分析. 北京: 科学出版社.
- 杨波, 明宗贤, 1993. 过氧化物同工酶在湖北海棠的分类及矮化预选上的应用. 湖北农业科学, 10: 15 ~ 16
- 杨静慧, 杨焕婷, 1996. 苹果砧木耐热性研究. 西南农业大学学报, 18(3): 217-220
- 俞德浚, 1974. 中国植物志(第36卷). 北京: 科学出版社, 378
- 张云贵, 成明昊, 1999. 十九种苹果属植物的抗寒性鉴定. 西南园艺, 27(1): 5-8
- 周志钦, 安华明, 杨方云, 吴练荣, 1998. 苹果属植物种内和种间无融合生殖能力研究. 西南农业大学学报, 20(2): 114 ~ 116
- 周志钦, 李育农, 1995. 苹果属植物无融合生殖研究进展——文献综述. 园艺学报, 22(4): 341 ~ 347
- Antolin M F and C Strobeck, 1985. The population genetics of somatic mutation in plants. *American Naturalist*, 126: 52 ~ 62
- Arft A M and T A Ranker, 1998. Allopolyploid origin and population genetics of the rare orchid *Spiranthes diluvialis*. *American Journal of Botany*, 85(1): 110 ~ 122
- Battle I and F H Alston, 1994. Isozyme aided selection in the transfer of mildew (*Podosphaera leucotrica*) resistance from *Malus hupehensis* to the cultivated apple. *Euphytica*, 77: 11 ~ 14
- Benson L L and W F Lamboy, 2001. Molecular identification of *Malus hupehensis* (tea crabapple) accessions using Simple Sequence Repeats. *Hortscience*, 36(5): 961 ~ 966
- Cheng Y P, C T Chien and T P Lin, 2000. Population genetics of geographically restricted and widespread species of *Myrica* (Myricaceae). *Journal of Heredity*, 91(1): 61 ~ 66
- Chevreau E, Y Lespinasse and M Gallet, 1985. Inheritance of pollen enzymes and polyploid origin of apple (*Malus × domestica* Borkh). *Theoretical and Applied Genetics*, 71: 268 ~ 277
- Dermen H, 1936. Aposporic parthenogenesis in a triploid apple, *Malus hupehensis*. *Journal of Arnold Arboretum*, 17: 90 ~ 105
- Dickson E E, S Kresovich and N F Weeden, 1991. Isozymes in North American *Malus* (Rosaceae): hybridization and species differentiation. *Systematic Botany*, 16: 363 ~ 375
- Fornari B, F Cannata, M Spada and M E Malvolti, 1999. Allozyme analysis of genetic diversity and differentiation in European and Asiatic walnut (*Juglans regia*) populations. *Forest Genetics*, 6(2): 115 ~ 127
- Hamrick J L and M J W Godt, 1989. Allozyme diversity in plant species. In: A H D Brown, M T Clegg, A L Kahler, B S Weir (eds.), *Plant Population Genetics, Breeding, and Genetic Resources*. Sinauer, Sunderland: , 43 ~ 63
- Hamrick J L, M J W Godt and S L Sheman-Broyles, 1992. Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. *New Forests*, 6: 95 ~ 124
- Huang H, F Dane and J D Norton, 1994. Genetic analysis of 11 polymorphic isozyme loci in chestnut species and characterization of chestnut cultivars by multilocus allozyme genotypes. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 119(4): 840 ~ 849
- Huang H, F Dane and T L Kubisiak, 1998a. Allozyme and RAPD analysis of the genetic diversity and geographic vari-

- ation in wild population of the American chestnut (Fagaceae). *American Journal of Botany*, **85** (7): 1013 ~ 1021
- Huang H, D R Layne and D E Riemenschneider, 1998b. Genetic diversity and geographic differentiation in Pawpaw (*Asimina triloba*) populations from nine states as revealed by allozyme analysis. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **123**: 635 ~ 641
- Lamboy W F, J Yu, P L Forsline and N F Weeden, 1996. Partitioning of allozyme diversity in wild populations of *Malus sieversii* L. and implications for germplasm collection. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **121** (6): 982 ~ 987
- Lynch M and W Gabriel, 1990. Mutation load and the survival of small populations. *Evolution*, **44**: 1725 ~ 1737
- Nei M, 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of National Academy Sciences, USA*, **70** (12): 3321 ~ 3323
- Nei M, 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York
- Olien W C, 1987. Apomictic crabapples and their potential for research and fruit production. *Hortscience*, **22** (4): 541 ~ 546
- Ruter B, J L Hamrick and B W Wood, 1999. Genetic diversity within provenance and cultivar germplasm collections versus natural populations of pecan (*Carya illinoensis*). *Journal of Heredity*, **90** (5): 521 ~ 528
- Sampson D R, 1969. Use of leaf color marker gene to detect apomixis in *Malus* species and observation on the variability of apomictic seedling. *Canadian Journal of Plant Science*, **49**: 409 ~ 416
- Sax K, 1931. The origin and relationship of *Pomoideae*. *Journal of Arnold Arboretum*, **12**: 3 ~ 22
- Schmidt H, 1988. Criteria and procedures for evaluating apomictic rootstocks for apple. *Hortscience*, **23** (1): 104 ~ 107
- Silander J A, 1985. Microevolution in clonal plant. In: J B C Jackson, L W Buss and R E Cook (eds.), *Population Biology and Evolution of Clonal Organisms*. Yale University Press, New Haven, CT, 107 ~ 152
- Slatkin M, 1985. Gene flow in natural populations. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **16**: 393 ~ 430
- Swofford D F and Selander R B, 1981. *Biosys-1 (release 1) Users Manual*. University of Illinois, Urban-Champaign
- Way R D, H S Aldwinckle, R C Lamb, A Rejman, S Sansavini, T Shen, R Watkins, M N Westwood, and Y Yoshida, 1990. Apple (*Malus*). In: J N Moore and J R Ballington Jr (eds.), *Genetic Resources of Temperate Fruit and Nut Crops*. International Society of Horticultural Sciences, Wageningen, The Netherlands, 3 ~ 62
- Weeden N F and J F Wendel, 1989. Genetics in plant isozymes. In: D E Solits and P S Solits (eds.), *Isozymes in Plant Biology*. Dioscorides Press, Potland, Ore., 46 ~ 72
- Weeden N F and R C Lamb, 1985. Identification of apple cultivars by isozyme phenotypes. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **110** (4): 509 ~ 515
- Weeden N F and R C Lamb, 1987. Genetics and linkage analysis of 19 isozyme loci in apple. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **112** (5): 865 ~ 872
- Wendel J F and N F Weeden, 1989. Visualization and interpretation of plant isozymes. In: D E Solits and P S Solits (eds.), *Isozymes in Plant Biology*. Dioscorides Press, Potland, Ore., 5 ~ 45

(责任编辑:时意专)