

第九章 遗传多样性及其检测方法^①

葛 颂 洪德元

1 引言

遗传多样性是生物多样性的重要组成部分，一方面，任何一个物种都具有其独特的基因库和遗传组织形式，物种的多样性也就显示了基因（遗传）的多样性（施立明，1990；Millar 和 Libby，1991）；另一方面，物种是构成生物群落进而组成生态系统的基本单元，生态系统多样性离不开物种的多样性，也就离不开不同物种所具有的遗传多样性，因此，遗传多样性是生态系统多样性和物种多样性的基础，通常谈及生态系统多样性或物种多样性时也就包含了各自的遗传多样性（陈灵芝等，1996，广义地讲，遗传多样性就是生物所携带遗传信息的总和，但一般所指的遗传多样性是指种内的遗传多样性，或称遗传变异。

遗传变异是生物体内遗传物质发生变化而造成的一种可以遗传给后代的变异，正是这种变异导致生物在不同水平上体现出的遗传多样性，居群（Population，又译种群、群体）水平、个体水平、组织和细胞水平以及分子水平（Moritz 和 Hillis，1990）。通常，遗传多样性最直接的表达形式就是遗传变异性的 高低。然而，对任何一个物种来说，个体的生命很短暂，由个体构成的居群或居群系统（宗、亚种、种）才在时间上连绵不断，才是进化的基本单位（Stebbins，1950，Dobzhansky，1953）。这些居群或居群系统在自然界有其特定的分布格局（式样），故遗传多样性不仅包括遗传变异高低，也包括遗传变异分布格局，即居群的遗传结构（Hamrick，1989）。例如，对大范围连续分布的异交植物来说，遗传变异的大部分存在于居群之内；而对以自交为主的植物来说，居群之间的遗传变异明显增大（Hamrick 和 Goldt，1990）。对那些更为极端的以无性繁殖为主的植物来说，每个无性集群（Colony）在大部分位点上都是纯合的，形态变异也很小。但不同的无性集群之间都有很大或明显的差异，因为遗传变异分布在无性集群之间（Grant，1991）。因此，居群遗传结构上的差异是遗传多样性的一种重要体现，一个物种的进化潜力和抵御不良环境的能力既取决于种内遗传变异的大小，也有赖于遗传变异的居群结构（Grant，1991；Millar 和 Libby，1991）。

对遗传多样性的研究具有重要的理论和实际意义。首先，物种或居群的遗传多样性大小是长期进化的产物，是其生存（适应）和发展（进化）的前提（Soltis 和 Soltis，1991）。一个居群（或物种）遗传多样性越高或遗传变异越丰富，对环境变化的适应能力就越强，越容易扩展其分布范围和开拓新的环境，即使对无性繁殖占优势的种也不例外（Huenneke，1991）。理论推导和大量实验证据表明，生物居群中遗传变异的大小与其进化速率成正比（Ayala 和 Valentine，1979）。因此，对遗传多样性的研究可以揭示物种或居群的进化历史（起源的时间、地点、方式），也能为进一步分析其进化潜力和未来的命运提供重要的资料（Soltis 和 Soltis，1991），尤其有助于物种稀有或濒危原因及过程的探讨（Millar 和 Libby，1991；陈灵

^①本文得到国家自然科学基金“八五”重大项目（39391500）资助。邹喻莘教授、汪小全先生提供有关资料，谨致谢意。

芝等, 1993)。其次, 遗传多样性是保护生物学研究的核心之一。不了解种内遗传变异的大小、时空分布及其与环境条件的关系, 我们就无法采取科学有效的措施来保护人类赖以生存的遗传资源(基因), 来挽救濒于绝灭的物种, 保护受到威胁的物种。“对于我们所不了解的对象, 我们是无法保护的”(Falk 和 Holsinger, 1991)。对珍稀濒危物种保护方针和措施的制定, 如采样策略、迁地或就地保护的选样等等, 都有赖于我们对物种遗传多样性的认识(Schaal 等, 1991; 陈灵芝等, 1993)。再者, 对遗传多样性的认识是生物各分支学科重要的背景资料, 古老的分类学或系统学几百年来都在不懈地探索、描述和解释生物界的多样性, 并试图建立一个能反映自然或系统发育关系的阶层系统以及建立一个便利而实用的资料(信息)存取或查寻系统(Heywood, 1976; Moritz 和 Hillis, 1990), 对遗传多样性的研究无疑有助于人们更清楚地认识生物多样性的起源和进化, 尤其能加深人们对微观进化的认识, 力动植物的分类、进化研究提供有益的资料, 进而为动植物育种和遗传改良奠定基础。

其实, 遗传多样性研究的重要性早就为人们所关注, 也因此而成为本世纪上半叶遗传学的主攻方向, 只是生物学家们一直苦于找不到度量遗传变异有效而又准确的方法(Hubby 和 Lewontin, 1966)。随着生物科学, 特别是遗传学和分子生物学的迅猛发展, 遗传多样性度量在技术和方法上经历了一个不断完善提高的过程, 但仍然是困扰生物学家们的待解难题(Schaal 等, 1991)。本文将简要回顾遗传多样性研究的历史, 然后对当前检测遗传多样性的主要方法及其优缺点作一评述, 旨在为我国遗传多样性研究提供一些背景知识, 推动我国尚属薄弱环节的遗传多样性研究的开展。

2 遗传多样性研究的历史回顾及研究方法的发展

早在上个世纪, 生物进化论的创始人达尔文就在其划时代巨著《物种起源》(1859)中用大量的史料和证据揭示了生物中普遍存在的变异现象, 并发现大部分变异都有遗传的倾向。虽然达尔文并不知道遗传变异是如何产生的, 而且错误地用“泛生说”来解释遗传的机理, 但遗传变异的重要意义已引起了他的高度重视, 并被看成是生物进化的源泉。因为遗传变异为生物进化提供了原始材料, 没有遗传变异, 达尔文进化论的核心——自然选择就不能起作用, “自然选择就是对遗传变异的差异性繁殖”(Ayala 和 Valentine, 1979)。

然而, 达尔文对遗传变异的研究仅停留在观察、描述和简单试验的阶段, 这也受当时生物学发展水平所限。随着孟德尔定律的重新发现(1900)和随后遗传学的发展, 生物学家们将遗传学的基本定律运用到生物居群中, 对自然居群中到底存在着多少遗传变异——这一与进化直接有关的问题——进行了广泛的研究和长时间的争论, 由此相应出现了两种截然不同的学说(理论)(Ayala 和 Valentine, 1979)。一种是古典(Classical)假说, 为遗传学家 H. J. Muller 及其追随者所拥护。他们认为生物居群中的个体几乎在所有基因位点上都是“野生型”等位基因的纯合体, 生物自然居群中遗传变异很少, 进化起因于偶然发生的有利突变。与此相对, 以 T. Dobzhansky 为代表的平衡(Balance)假说认为, 生物居群在许多位点上都有两个以上的等位基因(复等位基因), 不存在“野生型”或“正常型”之别, 而且居群中的个体在大部分基因位点上都是杂合的, 也即生物自然居群中存在大量的遗传变异, 进化是许多位点上等位基因种类和频率的逐渐改变。为此, 本世纪四五十年代, 两个学派都在进行广泛的研究以寻找各自的证据, 但研究的手段基本上是建立在形态学和染色体水平上。随着来自果蝇(*Drosophila*)、瓢虫(*Harmonia*)以及其它一些动植物研究资料的不断积累, 尤其是对

果蝇染色体倒位多态现象的研究 (Dobzhansky, 1953), 充分证实自然居群中确实存在着大量的遗传变异。事实上, 生物自然居群中的遗传变异早已为人们所注意, 并在长期的动植物引种驯化和遗传改良中被有意无意地加以利用。正是由于自然界的生物存在大量的遗传变异, 才使人们在长期的动植物品种改良方面取得了巨大的成效, 创造了许多家养动物和作物新品种或使其产量质量更符合人们的期望, 例如在玉米的遗传改良中, 通过对高蛋白含量品系的选择, 已使一些品种的蛋白质含量从 10.9% 增加到 19.4%; 而对低蛋白含量品系的选择, 又使一些品种的蛋白质含量从 10.9% 降低到 4.9% (Ayala 和 Kiger, 1984)。可以说, 人工选择在许多家养或栽培物种的无数经济性状上都获得了成功, 包括乳牛、猪、羊、家禽、玉米、水稻、小麦以及果蝇等许多实验动植物, 这些成功的选择充分说明生物居群中几乎在每一个性状上都有遗传变异存在 (Ayala 和 Valentine, 1979)。

早期研究遗传变异主要是在染色体和表型水平上进行的。虽然在染色体水平上发现了大量动植物自然居群中的变异 (Stebbins, 1950; Dobzhansky, 1953), 尤其是染色体结构上的变异, 但这些变异的检测往往要借助于一定的细胞学或杂交等手段, 且无法准确地定量。因此, 尽管 Dobzhansky 对果蝇自然和实验居群中染色体变异进行了大量出色的工作, 但就连他本人在其代表作《遗传学与物种起源》(第三版, 1953) 中也不得不承认“在自然居群中所获得的遗传变异性的知识还远远不够”。

在表型水平上研究遗传变异最常用的方法就是利用能够起到遗传(基因)标记作用的表型性状, 包括符合孟德尔遗传定律的质量(单基因)性状(如豌豆的花色、种子形状, 果蝇的眼色、翅形, 人类的 ABO 血型等)以及居群中出现的一些稀有突变(如植物的白化、花柱异长等)。由于生物居群中这类单基因性状很少, 而且一些稀有突变往往对生物体具有有害效应(如致死、半致死), 故传统方法所利用的形态标记只能代表极少数的基因位点, 而且这些位点都是多态的, 因为只有在发现相对等位基因存在后(如豌豆花色的白花基因和红花基因; 果蝇眼色的白眼基因和红眼基因等等), 才能确定位点的存在。例如, 人类的 ABO 血型受单位点上三个复等位基因控制, 通过对人类居群中 A 型、B 型、AB 型和 O 型四种血型表型的研究, 可以得到该位点上等位基因的种类和频率以及在居群中的多态性。但是, 我们并不能根据 ABO 血型基因位点的多态性来推断人类基因组中其它基因位点的多态性, 因为 ABO 血型基因位点的变异并不一定也不可能代表整个基因组的变异。即使我们选取了一大批符合遗传规律的单基因位点, 由于它们都是多态的(单态的我们检测不出来), 仍不能作为整个基因组的随机样本(代表)。换言之, 利用表型性状检测出的基因位点十分有限, 而且这些位点都是可变的(多态的), 因此无法知道基因组中不变位点的比例, 也就无法客观地度量遗传变异的大小 (Merrell, 1981)。另一方面, 在表型水平上还可通过时多基因决定的数量性状进行研究来分析控制这些数量性状表达的一大批基因位点的变异情况, 如研究生物的适合度 (Fitness) (生活力、结实量等) 及常见的形态性状等。然而, 由于这些数量性状既受遗传因素的控制也受环境条件的影响, 加上决定这些性状表达的都是一些效果微小、交互作用明显的多基因系统, 研究的困难很大。

尽管到本世纪中期, 自然居群中存在大量的遗传变异已为大量的观察实验以及对表型性状和染色体的研究所证实, 但由于技术上的原因却一直无法回答遗传变异的实际大小和居群的遗传结构 (Hubby 和 Lewontin, 1966; Ayala 和 Valentine, 1979)。1966 年, 可以说是遗传变异研究以至进化研究历史上发生重要转折的一年。Hubby、Lewontin、Johnson 和

Harris 分别报道了利用凝胶电泳技术结合酶的特异性染色对果蝇和人类居群遗传变异的定量研究，“打开了一种用全新方法研究天然居群变异的大门”（Merrell, 1981）。他们所用的方法就是后来在系统学和进化研究领域被广泛应用的同工酶电泳技术（Isozyme electrophoresis）（Murphy 等, 1990; 葛颂, 1994）。酶是基因的产物, 是基因表达的结果, 酶蛋白多肽链结构中的氨基酸序列, 是由 DNA 结构基因所携带的遗传信息决定的。同工酶电泳技术就是针对同种酶不同分子形式（同工酶）的电泳谱带分析, 来识别控制这些谱带表达的基因位点和等位基因, 从而达到在基因水平上研究生生物体的目的。虽然同工酶谱带也是一种表型, 但通过一定的分析方法能够快速而简便地识别出编码这些谱带的基因位点和等位基因（Wendel 和 Weeden, 1989）, 尤其是选取一批受单位点不同等位基因编码的同工酶（即等位酶）作为整个基因组的随机样本, 可以比较客观地度量生物遗传变异的大小并作为遗传标记研究其它相关问题（Soltis 和 Soltis, 1989; 葛颂, 1994）。同工酶（等位酶）在生物界普遍存在, 并以共显性方式表达; 而且酶电泳技术测定等位基因变异（替代）比较灵敏, 方法简单, 获取结果迅速。更为重要的是, 在我们选定一批酶系统或位点作为遗传标记时是根据现有成熟的酶电泳技术和染色方法而定的, 并未考虑这些酶系统或位点在样本中的变异情况, 可变（多态）或不变（单态）的酶系统或位点均是同等对待的。因此, 一批同工酶基因位点的变异可以较为客观地代表整个基因组的变异, 可以对任何物种或居群的结果进行比较, 这是区别于以往任何检测遗传变异方法或手段的核心（Ayala 和 Valentine, 1979）。正因如此, 酶电泳技术的应用被看成是进化论迅速发展的重要原因之一（Ayala 和 Valentine, 1979）, 是当前分子系统学中应用最广泛的手段（Crawford, 1990; Moritz 和 Hillis, 1990）。随着等位酶水平上研究工作的大量开展以及研究的不断深入, 酶电泳技术的一些弱点

或局限也被人们逐渐认识到。由于酶电泳技术只能检测编码酶蛋白的基因位点, 所检测的位点数目也受现行酶电泳和染色方法所限而不可能很多（最常用的酶系统一般在 30 个左右）。因此, 一批等位酶位点的变异并不一定代表整个基因组的变异; 而且有一些“隐藏”的变异性可能无法通过酶电泳技术检测出来, 故酶电泳技术可能会低估遗传变异的水平（Merrell, 1981）, 进入 80 年代, 分子生物学和分子克隆技术的发展带来了一系列检测遗传多样性更为直接的方法, 即直接测定遗传物质本身—DNA 序列的变异。由于分析的对象就是 DNA, 故遗传变异可以不依赖任何水平的表型而直接度量, 避免了根据表型性状来推断基因型时出现的许多问题。如今, 原则上已能够做到对任何生物基因组中任何片段进行分析, 包括 DNA 的编码区和非编码区, 保守区和高变区, 以及核内 DNA 和细胞器 DNA。所以, 来源于 DNA 的遗传标记几乎是无穷的, 克服了等位酶遗传标记数量有限的不足。例如, 根据 1990 年的统计, 利用限制性内切酶分析已揭示出 2000 多个人类 DNA 多态位点（Avice, 1994）。此外, 不同的 DNA 片段产生变异的分子机制不同, 所包含的进化历史信息不同, 可以用于不同目的的分析。纵观早期的 DNA—DNA 分子杂交, 80 年代兴起的 RFLP 以及后来的“小卫星”高变序列的 DNA 指纹图谱（Moritz 和 Hillis, 1990; Schaal 等, 1991）, 直至新近发展起来的 RAPD 方法（Williams 等, 1990）, 都得益于分子生物学技术的发展和革新, 也预示着更多新方法的出现。因此, 虽然利用 DNA 技术来检测遗传多样性是近十年来才发展起来的新手段, 有关的研究报道还有限, 但 DNA 技术日新月异的发展预示着未来分子系统学研究的美好前景, 也说明根据 DNA 资料来估测遗传多样性具有巨大的应用潜力。

3 检测遗传多样性的主要方法

如前所述,检测遗传多样性的方法随生物学,尤其是遗传学和分子生物学的发展而不断提高和完善,从形态学水平、细胞学(染色体)水平、生理生化水平逐渐发展到分子水平。然而,不管研究是在什么层次上进行,其宗旨都在于揭示遗传物质的变异。目前任何检测遗传多样性的方法,或在理论上或在实际研究中都有各自的优点和局限,还找不到一种能完全取代其它方法的技术(Schaal等,1991)。因此,包括传统的形态学、细胞学,以及同工酶和DNA技术在内,各种方法都能提供有价值的资料,都有助于我们认识遗传多样性及其中物学意义。下面我们将通过一些实例对检测遗传多样性的几种主要手段及其研究成果作初步的介绍。由于我们的专业和研究方向所限,大部分实例以对植物的研究为主。

3.1 形态学水平

从形态学或表型性状上来检测遗传变异是最古老也最简便易行的方法。由于表型和基因型之间存在着基因表达、调控、个体发育等一系列复杂的中间环节,如何根据表型性状上的差异来反映基因型上的差异就成为用形态学方法检测遗传变异的关键。通常所利用的表型性状主要有两类。一是符合孟德尔遗传规律的单基因性状(如质量形态性状、稀有突变等),另一类是根据多基因决定的数量性状(如大多数形态性状、生活史性状)。

Erickson(1945)对*Clematis fremontii* var. *riehlii*的研究就是早期利用形态性状来研究植物天然居群遗传变异的一个很好的例子。Erickson对该类群的分布范围和式样、居群结构和动态、生境特点、生活史特性、授粉生物学以及居群变异和分化进行了多年十分深入细致地研究。他发现该类群只分布于密苏里(Missouri)偏东相邻二十县约400平方英里的范围内,生长在特殊的石灰岩荒地上,并形成一种特定的空间分布格局。首先是个体组成集落(Aggregate)(平均含个体97株),再由集落组成草片(Glade)(平均含个体约1000株),草片进一步组成群丛(Cluster),许多群丛一起构成了小区(Region),在类群的整个分布范围(Range)内有许多的小区。由于对居群的空间结构十分清楚,Erickson(1945)选取了1个单基因性状和5个数量性状对该类群的居群遗传结构进行研究。所用的单基因性状是花瓣尖色斑的有无,5个数量性状为花瓣长、宽,花瓣边缘宽和卷曲度以及叶片形态。结果表明,花瓣带色斑个体的频率在小区之间的差异达到极显著水平,而在草片之间无显著差异,而且带色斑个体频率由南向北明显增多,呈地理梯度(Cline)变异。5个数量性状的统计分析表明,小区之间及小区内草片之间在全部性状上均出现明显的差异。与色斑频率一样,花瓣卷曲度也显示出由南向北的梯度变异。而同一草片的不同集落之间只在叶形上出现明显分化。结合种子散布机制、授粉和生殖特点,Erickson认为该类群在很小的范围(草片)内就存在遗传上的分化,居群的有效大小为几百株个体(Erickson,1945)。Learn和Schaal(1987)采用核糖体DNA(rDNA)来研究该类群的遗传分化,结果和上述来自形态性状的分析十分相似,居群在同一草片内就出现亚分化,并推测遗传漂变、基因交流受阻是导致遗传分化的主要原因。类似出现许多地理或生态上遗传分化的研究还很多,这些分化具遗传基础,因此是种内遗传多样性的一种体现(Schaal等,1991),这已被早期经典的实验分类学或生态遗传学研究所证实(Turesson,1922; Clausen等,1948)。

由于天然居群中,单基因性状很少,用其作为遗传标记来研究遗传多样性主要还是针对一些具有重要经济价值的农作物、林木和园艺作物及其野生近缘种(Allard等,1968; Price

等, 1985), 而且多利用这类单基因标记来研究交配系统、基因流和选择等进化因素(Hamrick, 1989)。相比之下, 针对数量性状的研究则由来已久, 通过对这些数量性状的研究同样能分析居群的遗传变异水平和遗传结构, Clausen 等(1948)对 *Achillea lanulosa* 生态型的研究就是被广泛引用的例子。这类研究已在大量的植物天然居群中开展, 并取得了许多有价值的资料。研究的性状包括具有系统学价值的形态性状, 也包括与植物适应相关的生理和生活史特性(如习性、物候、结实量、种子萌发和休眠、生活力等)(Venable, 1984)。由于这类表型性状的变异往往具有适应和进化上的意义, 对其进行研究不仅能初步了解类群遗传变异的大小, 更有助于了解生物适应和进化的方式, 机制及其影响因素(Schaal 等, 1991)。因此, 不少研究试图从形态学水平上对稀有种和广布种的遗传变异进行对比研究。在 *Becium* 属中, Wild 和 Heyting(1966)利用叶片长、宽性状对稀有种 *B. homblei* 和广布种 *B. obovatum* 的遗传变异进行了初步研究, 发现广布种的变异性比稀有种明显大, Primack(1980)利用标本馆及野外采集的居群标本对车前属(*Plantago*)稀有种和广布种的形态变异进行了研究。他把该属 28 个种按地理分布范围从大到小归为 5 类, 广布种的分布范围可遍及几个大陆, 而稀有种分布范围则仅限于美国东南的局部地区, 研究的性状为分类上比较重要的 4 个生殖器官性状。结果表明, 不管是以整个物种为单位还是以种内居群为单位, 表型性状变异的大小与该种分布范围大小无关, 不同性状间变异系数的相关性也很弱。因此, Primack 认为在车前属中广布种和稀有种的遗传变异量是相近的, 一些种稀有的主要原因不在遗传方面而起因于历史或生态因素(Primack, 1980)。

表 1 黑云杉 10 个球果和种子性状的重复力及各等级变异在总变异中所占百分比

性状	球果	球果	球果	上部种	上部种	中部种	中部种	基部种	基部种	种子
	长	宽	干重	鳞长	鳞宽	鳞长	鳞宽	鳞长	鳞宽	重量
重复力	0.567	0.521	0.554	0.290	0.343	0.534	0.507	0.398	0.242	-
变异来源	居群间	21.4	9.0	17.6	14.9	16.3	24.0	18.1	34.7	45.7
	居群内	46.3	50.6	46.9	36.5	23.6	43.1	43.0	20.3	20.3
	个体内	32.2	40.4	35.5	48.6	60.1	32.9	38.9	45.0	34.0

(摘自 Khalil, 1984)

在许多针叶用材树种中, 不少研究以采自天然居群或林分的针叶、球果和种子为材料研究居群的变异、分化及其与环境因子的关系(Lester, 1968; Khalil, 1974, 1984; Parker 和 Maze, 1984)。尤其是设计一套有效的采样方案并结合多元统计分析方法, 可以揭示出这些性状受遗传控制的大小, 进而估计居群遗传变异的式样和遗传结构。例如, Khalil(1974, 1984)分别对加拿大 Newfoundland 地区的白云杉(*Picea glauca*)和黑云杉(*P. mariana*)天然居群的球果形态进行了遗传学研究。在对黑云杉的研究中, Khalil(1984)以等级方式从整个 Newfoundland 岛采集球果样本, 并对 9 个球果形态和 1 个种子重量性状进行测定。采样分三个等级, 即 22 个居群(第一等级)、每个居群选 10 个单株(第二等级)、每个单株采 20 个球果(第三等级)。然后利用方差、相关、回归等统计学方法对整个类群进行多方面的研究。首先, 他发现不同性状以及同一性状在不同居群中遗传变异所占比重不同, 即重复力(遗传力的估计值)有差异, 但重复力值均很高(统计显著), 说明这些性状明显受遗传控制, 尤其是球果长、宽、干重、中部种鳞长和宽受遗传的强烈控制(重复力值见表 1)。同时, 巢式设计方差分析表明, 所有性状在三个层次上的差异均达统计显著, 但受遗传控制比较强的几个个性

状(除中部和基部种鳞长和宽外)最大部分变异(42.96%~50.59%)存在于居群内的个体间(表1),这和以往其它针叶树的研究结果很相似(Lester, 1968; Balut, 1969; Khalil, 1974);最后,回归分析表明球果形态性状与地理和气候因子高度相关(Khalil, 1984)。最近, Maley 和 Parker(1993)根据 19 个球果和种子性状及 14 个针叶性状,对北美短叶松(*Pinus banksiana*)天然居群的遗传变异进行了类似的研究,发现绝大部分变异存在于林分(居群)内个体之间及同一个体之内,只有 1.6%~18.9%(依不同性状而别)的总变异序在于采样居群之间。

在利用数量性状来研究遗传变异时,还有另一种更为科学和严密的方法,即数量遗传学方法。这种方法是通过特定的杂交试验和后代测定来分析性状在亲子代间的传递规律,将影响数量性状变异的遗传因素同环境因素区分开来,确定遗传因素在性状变异中的相对重要性;同时分析遗传和环境交互作用,甚至可以估算控制数量性状多基因的位点数目(Falconer, 1981)。数量遗传学方法估算的许多重要遗传参数(如狭义遗传力、加性方差、遗传协方差等),不仅能用来度量居群之间和之内遗传变异的大小,而且能推断类群中已发生过的进化事件(如选择)以及预期未来进化因素将如何影响类群(Billington 等, 1988; Schaal 等, 1991),这时珍稀濒危物种保护措施的制定和实施(如就地保护或迁地保护)具有重要的价值(Schaal 等, 1991)。迄今,对天然居群进行数量遗传学分析的研究报道还非常少(Mitchell-Olds, 1986; Billington 等, 1988),主要是因为这类研究必须进行严谨的试验设计和繁重的杂交和子代测定工作,而且对寿命很长的木本多年生植物及杂交难以实施的类群很难开展(Schaal 等, 1991)。

由此可见,利用表型(形态)性状来研究遗传变异是简便易行且快速的手段,甚至可直接利用野外采集的样本或标本进行分析,如前述 *Clematis*, *Plantago*, *Picea* 等属的研究。如果在此基础上辅助以移栽、子代测定等试验手段,或者应用更为严密的数量遗传学方法,无疑能对研究对象遗传变异的大小有一个基本的认识。正如 Schaal 等(1991)所说,在许多场合,利用形态性状来估测遗传变异是最现实的方法,尤其是当需要在短期内对变异性有所了解或在其它生化方法无法开展之时,形态学手段不失为一种有价值的选择。

3. 2 染色体水平

染色体是遗传物质的载体,是基因的携带者。与形态学变异不同,染色体变异(畸变)必然导致遗传变异的发生,是生物遗传变异的重要来源。早在上个世纪末,De Vries 就在普通月见草(*Oenothera lamarckiana*)中发现了一种突变型,其组织和器官要比普通月见草大得多,因而被定名为一个新种—巨型月见草(*O. gigas*),当时 De Vries 把巨型月见草看成是普通月见草基因突变的产物。然而,十多年后的细胞学研究表明,巨型月见草体细胞染色体数为 $2n=28$,正好比普通月见草染色体数($2n=14$)多一倍,说明染色体数目的变异可以导致遗传性状的改变。后来在大量的动植物细胞学研究中都发现了染色体在数目和结构上的变异,这种变异不仅出现在种间,也经常发生在种内。事实上,在任何生物类群的天然居群中都存在或大或小的染色体变异,这些变异在进化过程中起着十分重要的作用(Stebbins, 1950; Merrell, 1981)。染色体变异主要体现为染色体组型特征的变异,包括染色体数目变异(整倍性或非整倍性)以及染色体结构变异(洪德元, 1990)。

表 2 植物中一些典型的种内染色体数目变异

物种	染色体数目变异	资料来源
整倍性变异		
<i>Artemisia douglasiana</i>	18, 36, 54	洪德元, 1990
<i>Fraxinus chinensis</i>	46, 92, 138	李懋学等, 1991
<i>Lesquerella engelmannii</i>	12, 24, 36, 48	洪德元, 1990
<i>Najas guadalupensis</i>	12, 36, 42, 48, 54, 60	游 浚, 1992
<i>Sedum wrightii</i>	24, 48, 72, 96	洪德元, 1990
整倍性和非整倍性变异		
<i>Cardamine pratensis</i>	16, 24, 28, 30, 32, 38, 40, 42-55, 56, 60, 64, 73, 56-80, 84, 88, 90, 96	Heywood, 1976
<i>Chaenactis douglasii</i>	12, 13, 14, 15, 18, 24, 25, 26, 27, 28, 36, 38	Stussy, 1990
<i>Claytonia virginica</i>	12, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 31, 32, 34, 36, 41, 48, 72	Stussy, 1990
<i>Ottelia alismoides</i>	22, 28, 38, 40, 42, 44, 48, 50, 52, 55, 56, 60, 64, 66, 68, 72, 110, 132	何景彪, 1991
<i>Polygonatum verticillatum</i>	16, 18, 22, 24, 28, 30, 54, 58, 60, 64, 66, 84, 86, 90, 91	杨继等, 1992

种内染色体的整倍性变化在动物中是不常见的, 主要出现在一些孤雌生殖的种类中, 这可能在于多倍体会破坏动物性染色体和常染色体之间的平衡 (Ayala 和 Valentine, 1979; Merrell, 1981)。可是, 多倍性在植物中广泛存在, 大多数有染色体资料的被子植物科都有一些种呈现种内多倍性 (洪德元, 1990)。根据 Lewis 对双子叶植物的统计, 种内多倍性涉及 114 科 660 属大约 2800 个种, 也即大约 7% 的双子叶植物种有种内多倍性。由于未做染色数计数的类群还很多, 实际的多倍性比例会更高。某些多年生草本占优势的科和属, 如毛茛科、蓼科、十字花科、蔷薇科、豆科和菊科等, 种内多倍性非常普遍 (洪德元, 1990)。例如, 在大约 200 个种的委陵菜属 (*Potentilla*) 中就有 60 个种具种内多倍性变化。许多植物种内染色体倍性变化很大 (表 2)。除了整倍性变化外, 染色体数目也可不成倍增加, 即非整倍性变异。尽管非整倍体常造成发育失败或不正常, 因而在进化中的意义不大 (Ayala 和 Valentine, 1979; Merrell, 1981), 但在不少动植物种内, 非整倍性变异仍是很普遍的现象。表 2 列举了一些具有丰富的种内染色体变异的植物种, 许多整倍性变化还伴随着非整倍性变化, 其中十字花科的草甸碎米荠 (*Cardamine pratensis*) 种内就发现了多达 54 种染色体数目, 实属惊人 (Heywood, 1976)。同时, 一些种内会按两种不同基数整倍性地变化。如张大明 (1991) 在对云南、四川、浙江等地麦冬 (*Ophiopogon japonicus*) 9 个居群的检测中, 发现该种有两种染色体基数, $x=17$ 基数的有 $2n=34$ 和 $2n=68$ 两种倍性; $x=18$ 基数的有 $2n=36$ 、72 和 108 种倍性, 而且两种倍性系列各有其最适的生境, $x=17$ 系列的产地多低于 $x=18$ 系列的产地。还有不少研究发现, 即使在同一居群内也会有染色体数目的变化, 如中华地鳖 (*Eupolyphaga sinensis*) 在成都的居群 $2n=23, 24, 25$; 而在昆明的居群 $2n=33, 34, 35$ (施立明, 1990)。植物中的报道就更多, 如表 2 中种内染色体数目变异极大的 *Claytonia virginica* (马齿苋科) 在美国得克萨斯州的一个居群中, 就发现染色体数目可从 $2n=14$ 变化到 $2n=41$ (常见的为 $2n=24\sim 26$ 和 $28\sim 32$), 比例最高的数目逐年不同 (洪德元, 1990)。此外, 超数染

色体（B 染色体）在种内的变化也很大（洪德元，1990；陈灵芝等，1993）。

和染色体数目的多态性相比，染色体结构变异在种内就更为常见。据 White（1978）估计，结构变异的频率大约为 500 个个体中有”一个发生。在某些类群中，变异频率大大超过此数（洪德元，1990），只是由于结构变异不象数目变异那样容易观察和分析。由于果蝇的唾腺染色体比体细胞染色体大几百倍且有明显的横纹，是观察染色体结构变异的极好材料。因而染色体结构变异的研究在果蝇中开展最多，尤其是倒位多态现象。实际上，在实验群体遗传学的初期，作为探索居群中遗传变异的主要线索就是利用果蝇的染色体倒位。在果蝇属中，染色体倒位随物种不同而有很大差别。有些种中，所有的染色体均表现出倒位多态性，如欧洲的 *D. subobscura* 和美洲热带的 *D. willistoni*，在这 2 个种中已鉴别出 40 多种不同的倒位；而在另一些种中，倒位主要集中在某一条染色体上，如北美 *D. pseudoobscura* 中的倒位只出现在第二染色体，其上鉴别出的倒位类型已达 20 多种，而且这些倒位的种类和频率在地理及时间（季节）上均有变化（Ayala 和 Valentine，1979；Merrell，1981）。如在美国加州 *D. pseudoobscura* 居群中最常见的倒位类型是 ST、AR、CH 三种，从 1939 年到 1946 年的调查证实，ST 的频率从 3 月份开始减少，到 6 月最低，随后从夏季开始回升直到 10 月份又达到 3 月的水平；而 CH 的变化正好与 ST 相反，在 6 月份达到最高频率（Dobzhansky，1953）。另一些调查表明，海拔高度不同也将导致倒位频率的变化。如表 3 所示，在加州 Sierra Nevada 山不同海拔高度的居群中，ST 倒位类型的频率随海拔增高而逐渐减小（从 850 英尺处的 46% 减少到 1 万英尺处的 10%）；而 AR 倒位类型的频率则随海拔增高而增大。因此，大量证据表明，染色体的多态现象具有重要的生物学功能，是适应环境的一种重要方式（Dobzhansky，1953）。在植物中，由于玉米的 10 条染色体在形态上可以相互区别，是研究染色体结构变异的好材料。而在植物天然居群中，发现染色体倒位最多的大概是 *Paris* 和 *Paeonia* 两属。Geitler（1937，1938）发现在 Tyrol 这个地区，*Paris quadrifolia* 居群中每个个体都是一个或几个倒位的杂合体，倒位可发生下每条染色体臂上。*Paeonia* 属的一些种也有这类现象（Stebbins，1950）。在植物中，记载过倒位的种类很多，比除果蝇以外动物中的倒位更常见（Dobzhansky，1953），除了倒位外，其它染色体结构上的变异（缺失、重复、易位）在动植物居群中也并非少见，都是构成染色体多态现象的重要因素（Stebbins，1950；Dobzhansky，1953）。

表 3 加州 Sierra Nevada 山不同海拔高度上 *D. pseudoobscura* 居群第三染色体上不同到到类型的频率

海拔 (英尺)	到到频率表			
	ST	AR	CH	其它
850	46	25	16	13
3000	41	35	14	10
4600	32	37	19	12
6200	26	44	16	14
8000	14	45	27	14
8600	11	55	22	12
10000	10	50	20	20

（摘自 Dobzhansky，1953）

除了数目和结构上的变异外，染色体水平上的多样性还可体现在染色体的形态（着丝点

位置)、缢痕和随体等核型特征上, 这些特征的变异使种内出现细胞型的多样性。如在欧洲绵枣儿 (*Scilla antumnalis*) 中, 已发现了多达 19 种细胞型, 包括多倍性、非整倍性、结构和日染色体等特征上的差异, 且许多细胞型有其特定或最适的分布区 (Hong, 1982)。随着染色体研究技术的不断发展, 如分带技术、细胞原位杂交方法的应用, 无疑能在染色体水平上揭示出更多的遗传多样性。

3. 3 等位酶水平

等位酶是由单位点上等位基因编码的同工酶, 是借助于特定的遗传分析方法确定的一种特殊的同工酶 (Gottlieb, 1981; 葛颂, 1994)。由于等位酶谱带同等位基因之间的明确关系, 使其成为一种十分有效的遗传标记, 是近一二十年来检测遗传多样性应用最普遍的方法, 迄今已积累了十分丰富的资料, 并在采样原则、实验方法、数据处理和结果分析方面形成了一套统一的标准 (Soltis 和 Soltis, 1989; Crawford, 1990), 尤其是建立了度量遗传变异和居群遗传结构的定量指标, 使整个生物界遗传多样性的研究结果可以在共同的基础上进行比较。

表 4 是 Ayala 和 Kiger (1984) 对一些主要动植物天然居群遗传多样性研究的总结, 这些数据都来自等位酶研究的结果, 涉及 125 个动物物种和 69 个植物物种。其中, 多态位点比例 (P) 和平均期望杂合度 (He) 均是衡量遗传多样性水平的指标。前者表示多态位点 (有 2 个以上等位基因的位点) 在总位点中所占的比例; 后者表示在满足遗传平衡条件下, 每个个体带有杂合位点的比例或者在每个位点上呈杂合状态的个体的比例, 由表可见, 各类生物中的遗传变异水平都能以数值的形式表示出来, 这些数据充分说明生物中遗传变异的数量是很高的。以变异水平较低的鸟类为例, 其平均多态位点比例为 0. 145, 平均期望杂合度为 0. 042, 也就是说, 假如鸟类平均有 1 万个结构基因, 则应有 1450 个基因位点是多态的, 平均每个个体大约有 420 个位点是杂合的, 因此每个个体都具有产生 2420 种不同配子的潜力, 由这些配子组合成的基因型种类无疑是个天文数字。这正是自然界无法找到两个遗传基础完全相同个体的原因。从表 4 还可以看出, 无脊椎动物的遗传变异水平比脊椎动物高得多, 前者多态位点比率 (0. 469) 接近后者 (0. 247) 的 2 倍, 而平均杂合度则为后者的 2 倍多 (0. 134 对 0. 060)。植物的变异水平也很高, 接近无脊椎动物的水平。然而, 无论是动物还是植物, 遗传变异水平会依类群或物种生物学特性不同而有很大的差别。如同是植物, 自花授粉物种与异花授粉物种之间在遗传多样性上平均相差 3 倍左右 (表 4)。

表 4 一些主要动植物天然群体种的遗传变异

生物类群	物种数	每个物种平均	多态位点比例	期望杂合度	
		检测位点	(P)	(He)	
无脊椎动物	果蝠	28	24	0. 529	0. 150
	黄蜂	6	15	0. 243	0. 062
	其它昆虫	4	18	0. 531	0. 0151
	海洋动物	14	23	0. 439	0. 0124
	陆地蜗牛	5	18	0. 437	0. 150
	鱼类	14	21	0. 306	0. 078
脊椎动物	两栖类	11	22	0. 336	0. 082
	爬行类	9	21	0. 231	0. 047
	鸟类	4	19	0. 145	0. 042
	哺乳类	30	18	0. 206	0. 051

生物类群		物种数	每个物种平均 检测的位点	多态位点比例 (P)	期望杂合度 (He)
植物	自交种	33	14	0.179	0.058
	异交种	36	11	0.511	0.185
平均	无脊椎动物	57	22	0.469	0.134
	脊椎动物	68	24	0.247	0.060
	植物	69	13	0.345	0.121

(引自 Ayala 和 Kiger, 1984)

研究遗传变异大小为研究物件的进化历史、适应和进化的机制提供了重要的资料, 如前所述, 裸子植物如松属 (Pinus), 大多数物种都具有很高的遗传变异水平, 居群间的遗传分比很小 (见表 5)。然而, Fowler 和 Morris (1977) 对广布于美国北部和加拿大的脂松 (Pinus resinosa) 的等位酶研究发现, 其遗传多样性水平非常低 ($P=0.10$), 结合形态学、物候、木材性状以及地史等研究发现, 脂松遗传多样性水平很低是因为经历过至少一次居群大小的剧烈缩减”, 推测在更新世约 2 万年前冰川作用给该种带来严重的瓶颈 (Bottleneck) 效应。即该种原来广布北美, 由于冰川作用使其分布区不断缩小, 并迁移到美国东南邻的避难所 (现仍有零星单株分布), 最后幸存了少量个体, 现今的分布只是由该种单个“残遗”居群重建的。同样的情况也发生在许多其它裸子植物和被子植物中 (Karron, 1991, Grant, 1991; Millar 和 Libby, 1991)。此外, 伴随着居群缩小而出现的随机遗传漂变、近交等因素均会造成遗传变异的下降, 威胁物种的生存 (Soltis 和 Soltis, 1991)。如已发现大熊猫实际上被隔离为 30 多个小居群, 每个居群不到 50 头甚至不到 10 头 (陈灵芝等, 1993), 这样的居群结构无疑不利于该种的生存和发展。

表 5 不同类型植物的遗传变异水平和居群分化大小

	物种数	P	He	Gst
分类地位				
裸子植物	50~80	0.709	0.173	0.068
双子叶植物	246~338	0.448	0.136	0.273
单子叶植物	80~111	0.592	0.181	0.231
生活型				
一年生	148~190	0.507	0.161	0.357
短命多年生草本	119~159	0.413	0.116	0.233
短命多年生木本	8~17	0.418	0.097	0.088
长命多年生木本	110~131	0.647	0.177	0.076
分布范围				
特有种	52~100	0.400	0.096	0.248
狭域种	82~115	0.451	0.137	0.242
地区种	180~193	0.529	0.150	0.216
广布种	85~105	0.589	0.202	0.210
繁育系统				
自交	78~123	0.418	0.124	0.510
混交、动物	60~85	0.400	0.120	0.216
异交、动物	124~172	0.501	0.167	0.197
异交、风媒	102~134	0.661	0.162	0.099

(摘自 Hamrick 和 Godt, 1990)

等位酶方法不仅能定量地估计遗传变异水平的高低, 还可以有效地度量居群的遗传结构, 即遗传变异在居群中的分布 (Hamrick, 1989)。了解居群的遗传结构对进化和保护生物

学研究尤为重要。因为不同的居群遗传结构是各种进化因素共同作用的结果，决定了物种保护应采取什么样的策略和措施。不久前，Hamrick 和 Godt (1990) 对植物中利用等位酶研究遗传变异的报道进行了总结，包括涉及 165 属、449 种共 653 篇研究结果。他们运用统计学方法从居群和物种两个水平上分析了等位酶多样性与物种系统位置、生活型（习性）、分布地区、分布范围、繁育系统、种子传播方式、生殖模式和演替阶段 8 个因素之间的关系。结果表明，分布地域广、寿命长、基因交流频繁、结实量高以及处于演替阶段末期群落中的物种具有较高的遗传变异水平，而影响居群遗传结构的最重要因素是繁育系统方式和基因文流程度 (Hamrick 和 Godt, 1990)，表 5 是我们从 Hamrick 和 Godt (1990) 的总结中摘录的部分结果，这些数据不仅体现出不同类型植物种具有不同的遗传变异大小，而且定量地表达了居群的遗传结构。其中，Gst 值代表居群间遗传变异占总遗传变异的比值。由表 5 可见，繁育系统方式对居群遗传结构影响最大。自交种平均起来，一半多 (51%) 的遗传变异存在于居群之间；而异交风媒种大部分遗传变异存在于居群之内，只有 9.9% 的遗传变异存在于居群之间，最典型的就是裸子植物，其遗传变异水平是植物中最高的，而遗传变异的绝大部分 (93.2%) 存在于居群之内，这是因为大多数裸子植物种分布范围广、寿命长、风媒异花授粉、结实量高，这些特性都有利于遗传变异的产生和保持，促进了居群之间基因的频繁交流，从而限制了居群间的遗传分化 (葛颂, 1988; Hamrick, 1989)。

Abbott 和 Gomes (1989) 利用 17 个等位酶位点对自交种拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 的 16 个居群进行了遗传多样性测定，发现该种遗传变异水平很低，多态位点比率为 0.165，平均期望杂合度为 0.061，而且大部分 (61.6%) 的遗传变异存在于居群之间。与此成为鲜明对照的是对刚松 (*Pinus rigida*) 的研究。通过利用 15 个等位酶位点对该种 4 个居群的测定，发现多态位点比率高达 0.966，平均期望杂合度为 0.170；可在总的遗传变异中，只有 1.1% 的变异存在于居群之间 ($G_{st}=0.011$) (Hamrick 等, 1979)。因此，如果我们要保存或保护这两个种的遗传资源，就应该有完全不同的采样策略。对刚松来说，应该采集较少的居群而较多的居群内个体，因为遗传变异的绝大部分存在于居群之内；而对拟南芥来说，我们不仅要采集一定的居群内个体，更应采集较多的居群，以免丢失不同居群所贮存的遗传变异。由此可见，对居群遗传结构的了解对保护生物学工作具有指导作用。

正如 Schaal 等 (1991) 所说，等位酶电泳技术的应用极大地扩展了我们对生物遗传变异和进化的认识，没有它，我们对非栽培植物的遗传结构几乎是一无所知。然而，酶电泳技术在我国遗传多样性研究中还远未得到充分利用，尤其是利用电泳技术筛选出一批等位酶位点，并进行遗传多样性研究在我国才刚刚开始，为数不多的研究也主要是涉及具有较大经济价值的动植物类群 (陈灵芝等, 1993)，而且在实验技术和方法上比较落后。鉴于等位酶分析具有实验条件简单、成本较低、结果快速可靠等优点，在我国现有条件下，是值得大力提倡的遗传多样性检测手段。

3. 4 DNA 水平

DNA 是遗传信息的载体，遗传信息就是 DNA 的碱基排列顺序。因此，直接对 DNA 碱基序列的分析和比较是揭示遗传多样性最理想的方法。但是，除了几种模式生物外，要想进行 DNA 全序列分析在可预见的将来都是不现实的 (Avisé, 1994)，更不用说基于个体水平上的检测。因此，目前 DNA 分析技术主要是针对部分 DNA 进行的。从原理上可大致分为两类：一类是直接测序，主要是分析一些特定基因或 DNA 片段的核苷酸序列，度量这些片段

DNA 的变异性；另一类是检测基因组的一批识别位点，从而估测基因组的变异性（Schaal 等，1991；Avisé, 1994）。

直接测序是一件费时、费力、经济投入很大的工作，尤其是在被分析的个体数量较大时不大现实；加上目前测序工作主要是针对一些比较保守的 DNA 片段，如 *Ribisco* 大亚基基因、rDNA 部分片断等等，使序列分析主要应用在动植物系统发育推断和宏观进化研究方面。相比之下，对特定基因组或 DNA 片段识别位点的研究则十分普遍。最常见的是限制性片断长度多态 DNA (RFLP) 方法。RFLP 技术是用特定的方法将核 (n) DNA、叶绿体 (cp) DNA、线粒体 (mt) DNA 或者总 DNA 提取出来，用已知的限制性内切酶消化、电泳印迹，再用 DNA 探针杂交并放射自显影，从而得到与探针同源的 DNA 序列酶切后在长度上的差异。如果是经过纯化的小分子 DNA (如 cpDNA 或 mtDNA)，酶切电泳后可直接显色得到片段长度上的差异 (Avisé, 1994)。换句话说，RFLP 是根据特定限制性内切酶所识别的位点 (碱基数目 4 个到 10 个不等) 是否存在而确定的。对某一特定的限制性内切酶而言，识别位点上碱基的替换 (突变)，DNA 片段上一个或多个碱基对的缺乏或插入以及重组等，均可导致限制件片段长度上的多态性 (Moritz 和 Hillis, 1990)。迄今已分离到的限制性内切酶种类已有 500 多种，各自均有其特异的识别序列 (位点)；而作为探针的 DNA 片段可以来自叶绿体基因组、核糖体 (r) DNA、单拷贝基因 (如 *ADH-1*) 以及高变序列等等 (Schaal 等, 1991)。因此，利用各种限制性内切酶及 DNA 探针进行组合，将能得到一大批 DNA 标记，有效地揭示出 DNA 水平上的遗传多样性。

叶绿体 DNA 是迄今研究最多的一类基因组，其分子量小 (一般在 10 万到 20 万对碱基)、结构简单、单亲遗传，很适合遗传分析；而且 cpDNA 分子进化的速度很慢，比较保守。故早期的大部分研究以 cpDNA 的 RFLP 为遗传标记来揭示种间关系或推断种上的系统发育 (Palmer 等, 1983; Soltis 和 Soltis, 1992)，随着 cpDNA 研究资料的积累，已发现种内居群间和居群内个体间均存在 cpDNA 变异，包括片段的插入或缺失以及碱基的替换 (Schaal 等, 1991; Soltis 和 Soltis, 1992)，因为叶绿体基因组中也有一些片段变异程度较高，对这些区段 RFLP 的研究可以有效地度量种内的变异 (Wagner 等, 1987; Szmidi 和 Wang, 1991)。Neale 等 (1988) 对来自以色列和伊朗野生大麦 (*Hordeum vulgare*) 的 cpDNA 多样性进行了研究，在来自 30 个居群 245 份样品中，检测出了 3 种叶绿体基因型，其中 19 个居群为单态的，6 个为二态的，剩下的 5 个居群含有全部 3 种基因型；而且这些基因型的分布并非随机，野生种的 cpDNA 变异比栽培种更丰富 (Neale 等, 1988)，类似的研究还不少。在 *Brassica napus* 种内已检测的 97 个个体中，就发现了 7 种 cpDNA 变异，甚至在 *Lisianthus skinneri* 的 3 株个体中就发现了 3 种变异类型 (Harris 和 Ingram, 1991)。根据 Harris 和 Ingram (1991) 的统计，已有 60 个类群中报道了种内 cpDNA 变异，而且许多变异是在采样个体数较少时发现的。cpDNA 在种内存在变异不仅说明进行种上系统发育研究时应加大样本中个体的数目，而且意味着 cpDNA 可以成为检测遗传多样性的可靠标记 (Schaal 等, 1991)。与此同时，线粒体 (mt) DNA 是具有潜在应用价值的另一类细胞器 DNA，虽然植物中的线粒体基因组比较复杂，开展的研究还很少 (Ecke 和 Michaelis, 1990)，但在动物的研究中却有不少成果 (Avisé, 1994)。如张亚平和施立明 (1991) 以 20 种限制性内切酶对来自我国 20 个地区以及缅甸、越南共 36 只猕猴 (*Macaca mulatta*) 的 mtDNA 多态性进行了检测，共得到 23 种限制性类型，并据此划分出几个独立的种下类群，对中

国猕猴的起源和扩散提供了重要资料（陈灵芝等，1993）。

在系统学和进化研究中，核糖体（r）DNA 常常是被分析的对象，也是迄今研究最多的核基因（Schaal 和 Learn, 1988; Crawford, 1990）。rDNA 编码核糖体 17S, 5.8S 和 27S 亚基，在核基因组中以首尾相连的方式连续排列，拷贝数目从 3000 到 14000 不等，其中的编码区十分保守，很适用于高分等级的系统学研究；而非编码区高度变化，可用于遗传多样性检测和微观进化的研究（Avice, 1994）。Schaal 等（1987）对于蓝绣球属的广布种 *Phlox divaricata* 2 个亚种 8 个居群的 rDNA 进行了详细的研究，结果发现每个居群都有其独特的 rDNA 变异类型，可以根据所含变异类型的数目（2~6 个）把居群区别开来；而且亚种 subsp. *laphamii* 比亚种 subsp. *divaricata* 的变异性低，进一步证实了形态学的推论：亚种 subsp. *laphamii* 是由亚种 subsp. *divaricata* 衍生来的。在 Rogers 等（1986）对 *Vicia faba* rDNA 的研究中，发现单个个体就含有多达 20 种变异类型。此外，在许多针叶树的研究中也发现 rDNA 在居群之间和居群内个体间存在丰富的变异性，包括 rDNA 拷贝数目的变异（Szmidt 和 Wang, 1991），另一方面，在高等真核生物的基因组中存在大量的非编码重复序列，其进化速率很快，体现出高度的多态性，被称为高变（Hypervariable）或小卫星（Minisatellite）DNA（Jeffreys 等，1985）。例如人类的一些小卫星序列散布在整个基因组中，使许多位点呈杂合状态，这些杂合（高变）位点通常超过 90%（Schaal 等，1991）。这些序列在许多动植物物种中都是高度变异的，甚至可以成为基因型所特有的“遗传指纹”，因此利用这些特异性很强的遗传标记可以检测个体之间的差异，故又被称为 DNA 指纹（图谱）技术（Jeffreys 等，1985）。已有一些利用小卫星 DNA 来检测栽培和野生植物变异性的报道，不仅能估计居群之间和之内的遗传多样性，而且能确定居群实际存在的基因型（Schaal 等，1991）。不过，DNA 指纹技术成本较高，限制了其应用的范围（Lewin, 1989）。

虽然 RFLP 是一种十分有效的遗传标记，但 RFLP 分析需要比较完善的包括多种酶切、标记、分子杂交等技术的实验室，而且工作量大、成本高以及放射性标记所存在的安全性问题，使其应用受到一定的限制，随着聚合酶链式反应（PCR）技术的建立，通过利用一对特定的寡核苷酸片段为引物在耐热 Tag DNA 聚合酶催化下，数小时乃至几十分钟内就可将目的基因扩增至上百万倍，这一技术上的发明很快带出了一种新的遗传标记技术——随机扩增多态 DNA（RAPD）技术（Williams 等，1990），并开始应用于遗传育种、进化等许多研究领域，包括遗传多样性检测（卢江，1993）。Huff 等（1993）采用 RAPD 技术检测了禾本科异交种 *Buchloe dactyloides* 4 个居群之间和居群内个体间的遗传多样性。所用的 10 个引物检出了 98 个多态位点，每个居群内都有十分丰富的变异，甚至每个个体在遗传上都很独特；而且居群之间也有明显分化，来自墨西哥的 2 个居群与来自美国得克萨斯州的 2 个居群相比，居群内的变异更大，而居群间变异偏小，墨西哥和美国居群间出现明显的分化。在这个异交种中，遗传变异的式样与以往报道的自交种的情况明显不同（Huff 等，1993）。又如，在以往对脂松形态、等位酶等的研究发现，这个广布种遗传变异水平非常低，并推测是冰川作用的结果（见前述），Mosseler 等（1992）采用 69 个引物对该种进行了验证，结果发现多态性程度很低，明显低于其它裸子植物种，来自 RAPD 的证据完全支持以往的研究结果和推论。类似的研究还很多，这些研究充分说明 RAPD 方法是检测遗传多样性很有潜力的分子生物学手段（卢江，1993; Avice, 1994）。

4 结语

综上所述, 遗传多样性可以体现在从形态到 DNA 的各个不同水平上, 故对其检测的方法可建立在不同层次的研究上。由于上述检测遗传多样性的方法各有其利弊, 在实际应用中应根据具体情况进行选择。通常形态学和细胞学方法能快速地对遗传变异大小有一个大致的了解。等位酶分析在技术上比较成熟, 且能从分子水平上对基因组遗传变异的大小进行较为客观的度量, 而且该方法实验条件简便、快速而经济, 因此在现有的大多数实验室均可开展起来, DNA 分析是未来发展的方向, 应用潜力很大; 且技术上的改进和发展迅速, 尤其是对一些具有较大生物学意义和经济价值的类群, 值得从 DNA 水平进行深入的分析 (Schaal 等, 1991)。但是, 上述各种研究方法并不互相排斥, 都能提供许多有价值的信息。我国是个生物资源十分丰富的国家, 又是生物多样性受到严重威胁的国家之一 (陈灵芝等, 1993)。对生物多样性的认识和研究在我国起步不久, 对其中遗传多样性的研究尤为薄弱 (施立明, 1990; 陈灵芝等, 1993)。不仅研究的类群少, 而且研究的水平低, 甚至对诸如“国宝”大熊猫 (*Ailuropoda melanoleuca*) 和“活化石”银杉 (*Cathaya argyrophylla*) 这类我国特有重要类群遗传多样性的认识还几乎是空白。因此, 尽快采用各种研究方法, 包括传统的形态、细胞、生化技术以及现代分子生物学手段来研究、评估我国生物类群的遗传多样性, 并制定出合理的利用和保护措施, 是我国生物科学工作者义不容辞的责任。

参考文献

- 卢江. 1993. 随机放大多态性 DNA (RAPD) 一种新的分子遗传标记技术. 植物学报, 35 (增刊): 119-127
- 张大明. 1991. 沿阶草族的染色体研究及系统学问题的探讨. 博士学位论文, 中国科学院植物研究所
- 杨继, 汪劲武, 李懋学. 1992. 黄精属细胞分类学研究. III. 国产 6 种黄精的染色体数目和核型. 武汉植物学研究, 10 (3): 201-206
- 何景彪. 中国海菜花属的系统植物学与物种生物学研究. 武汉: 武汉大学出版社
- 陈灵芝 (主编). 1993. 中国的生物多样性 现状及其保护对策. 北京: 科学出版社, 99-113
- 洪德元. 1990. 植物细胞分类学北京, 科学出版社
- 施立明. 1990. 遗传多样性及其保护. 生物科学信息, (2): 158-164
- 游浚. 1992. 中国茨藻属的分类和进化. 武汉: 武汉大学出版社
- 葛颂. 1988. 同工酶与林木群体遗传变异研究. 南京林业大学学报, 12 (1): 68-77
- 葛颂. 1994. 酶电泳资料和系统与进化植物学研究综述. 武汉植物学研究, 12 (1): 71-84
- Dohzhansky, T. 1953. 谈家桢等译. 1964. 遗传学与物种起源. 北京: 科学出版社
- Merrell, D. J. 1981. 黄瑞复等译. 1991. 生态遗传学. 北京: 科学出版社
- Stebbins, G. I. 1950. 复旦大学遗传学研究所译. 1963. 植物的变异和进化. 上海: 上海科学技术出版社
- Abbott, R. J. and M. F. Gomes. 1989. Population genetic structure and outcrossing rate of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Heredity*, 62: 411-418
- Allard, R. W., S. K. Jain and P. L. Workman. 1968. The genetics of inbreeding populations. *Adv. Genet.*, 14: 55-131
- Avise, J. C. 1994. *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. New York: Chapman and Hall
- Ayala, F. J. and J. A. Kiger Jr. 1984. *Modern Genetics*, (2nd ed.). Menlo Park: Benjamin-Cummings
- Ayala, F. J. and J. W. Valentine. 1991. *Evolving: The Theory and Progress of Organic Evolution*.

Menlo Park; Benjamin-Cummings

Balut, S. 1969. Variability of larch cones as an indication of provenance. *Acta. Agrar. Silv.*, 9: 3-109

Billington, H. L., A. M. Mortimer and T. McNelly. 1988. Divergence and genetic structure in adjacent grass populations. I. Quantitative genetics. *Evolution*, 42: 1267-1277

Clausen, J. D., D. D. Keck and W. M. Hiesey. 1948. Experimental studies on the nature of species. III. Environmental responses of climatic races of *Achillea*. Carnegie Institute of Washington. Publ. No. 1948. 581: 1-129

Crawford, D. J. 1990. *Plant Molecular Systematics: Macromolecular Approaches*. New York: Wiley

Ecke, W. and G. Michaelis. 1990. Comparison of chloroplast and mitochondrial DNA from five morphologically distinct *Beta vulgaris* cultivars: sugar beet, fodder beet, beet root, foliage beet, and Swiss Charel. *Theor. Appl. Genet.*, 79: 440-442

Erickson, R. O. 1945. The *Clematis fremontii* var. *riehlii* population in the Ozarks. *Ann. Missouri Bot. Gard.*, 32: 413-460

Falconer, D. S. 1981. *Introduction to Quantitative Genetics*. (2nd ed.), London: Longman

Fowler, D. P. and R. W. Morris. 1977. Genetic diversity in red pine: evidence for low genic heterozygosity. *Can. J. For. Res.*, 7: 343-347

Gottlieb, L. D. 1981. Electrophoretic evidence and plant populations. *Prog. Phytochem.*, 7: 1-46.

Grant, V. 1991. *The Evolutionary Process: A Critical Study of Evolutionary Theory*. (2nd ed.). New York: Columbia University Press

Hamrick, J. L. and M. J. W. Godt. 1990. Allozyme diversity in plant species. In Brown, A. H. D., M. T. Clegg, A. L. Kahler and B. S. Weir (eds.). *Plant Population Genetics, Breeding, and Genetic Resources*. Sunderland: Sinauer, 43-63

Hamrick, J. L., Linhart, Y. B. and Mitton, J. B. 1979. Relationships between life history characteristics and electrophoretically detectable genetic variation in plant. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, 10: 173-200

Harris, S. A. and R. Ingram. 1991. Chloroplast DNA and biosystematics: The effects of intraspecific diversity and plastid transmission. *Taxon*, 40: 393-412

Hevwood, V. H. 1976. *Plant Taxonomy*, (2nd ed.). Edward Arnold

Hong, D. Y. 1982. Cytotype variation and polyploidy in *Scilla autumnalis* L. *Hereditas*, 97: 227-237

Hubby, J. L. and R. C. Lewontin. 1966. A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural Populations. I. The number of alleles at different loci in *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics*, 54: 577-594

Huenneke, L. F. 1991. Ecological implications of genetic variation in plant populations. In Falk, D. A. and K. E. Holsinger (eds.). *Genetics and Conservation of Rare Plants*. New York, Oxford University Press, 31-44

Huff, D. R., R. Peakall and P. E. Smouse. 1993. RAPD variation within and among natural populations of outbreeding buffalograss (*Buchloe dactyloides* Engelm.). *Theor. Appl. Genet.*, 86: 927-934

Jeffrey, A. T., V. Wilson and S. L. Thein. 1985. Individual-specific 'fingerprints' of human DNA. *Nature*, 316: 76-79

Karron, J. D. 1991. Patterns of genetic variation and breeding systems in rare plant species. In Falk, D. A. and K. E. Holsinger (eds.). *Genetics and Conservation of Rare Plants*. New York: Oxford University press, 87-98

Khalil, M. A. K. 1974. Genetics of cone morphology of white spruce. *Can. J. Bot.*, 52: 15-21

Khalil, M. A. K. 1984. Genetics of cone morphology of black spruce in Newfoundland, Canada. *Sil.*

Genet. , 33: 101-109

Learn, G. H. Jr. and B. A. Schaal. 1987. Population subdivision for ribosomal DNA repeat variants in *Clematis fremontii*. *Evolution*, 41: 433-438

Lester, D. T. 1968. Variation in cone morphology of balsam fir, *Abies balsamea*. *Rhodora*, 70: 83-94

Lewin, R. 1989. Limits to DNA fingerprinting. *Science*, 243: 1549-1551

Maley, M. L. and W. H. Parker. 1993. Phenotypic variation in cone and needle characters of *Pinus banksiana* in northwestern Ontario. *Can. J. Bot.* , 71: 43-51

Millar, C. I. and W. J. Libby. 1991. Strategies for conserving clinal, ecotypic, and disjunct population diversity in widespread species. In Falk, D. A. and K. E. Holsinger (eds.). *Genetics and Conservation of Rare Plants*. New York: Oxford University Press, 149-170

Mitchell-Olds, T. 1986. Quantitative genetics of survival and growth in *Impatiens capensis*. *Evolution*, 40: 107-117

Moritz, C. and D. M. Hillis. 1990. Molecular systematics: context and controversies. In Hillis, D. M. and C. Moritz (eds.). *Molecular Systematics*. Sunderland: Sinauer, 1-11

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

Murphy, R. W., J. W. Sits, D. G. Buth and C. H. Hauffer. 1990. Proteins I: Isozyme electrophoresis. In: Hillis D. M., Moritz C. (eds.). *Molecular Systematics*. Sunderland: Sinauer, 45-126

Neale, D. B., M. A. Saghai-Marouf, R. W. Allard, Q. Zhang, R. A. Jorgensen. 1988. Chloroplast DNA diversity in populations of wild and cultivated barley. *Genetics*, 120: 1105-1110

Palmer, J. D., C. R. Shields, D. B. Cohen and T. J. Orton. 1983. Chloroplast DNA evolution and the origin of amphidiploid Brassica species. *Theor. Appl. Genet.* 65: 181-189

Parker, W. H. and J. Maze. 1984. Intraspecific variation in *Abies lasiocarpa* from British Columbia and Washington. *Amer. J. Bot.* , 71: 1057-1059

Price, S. C., K. N. Schumaker, A. L. Kahler, R. W. Allard and J. E. Hill. 1984. Estimates of population differentiation obtained from enzyme polymorphisms and quantitative characters. *J. Hered.* , 75: 141-142

Primack, R. B. 1980. Phenotypic variation of rare and widespread species of *Plantago*. *Rhodora*. 82: 87-96

Rogers, S. O., S. Honda and A. J. Bendich. 1986. Variation in the ribosomal rDNA genes among individuals of *Vicia faba*. *Pl. Mol. Biol.* , 6: 339-345

Schaal, B. A., W. J. Leverich and J. Nieto-Sotelo. 1987. Ribosomal DNA variation in the native plant, *Phlox divaricata*. *Mol. Biol. Evol.* , 4: 611-621

Schaal, B. A., W. J. Leverich and S. H. Rogstad. 1991. Comparison of methods for assessing genetic variation in plant conservation biology. In Falk, D. A. and K. E. Holsinger (eds.). *Genetics and Conservation of Rare Plants*. New York: Oxford University Press, 123-134

Soltis, D. E. and P. S. Soltis (eds.). 1989. *Isozymes in Plant Biology*. Portland: Dioscorides Press

Soltis, P. S. and D. E. Soltis. 1991. Genetic variation in endemic and widespread plant species: examples from Saxifragaceae and *Polystichum*. *Aliso*, 13: 215-223

Soltis, D. E., P. S. Soltis and B. G. Milligan. 1992. Intraspecific chloroplast DNA variation: systematic and phylogenetic implications. In Soltis P. S., D. F. Soltis and J. J. Doyle (eds.) . *Molecular Systematics of Plants*. New York: Chapman and Hall, 117-150

- Stuessy, T. F. 1990. *Plant Taxonomy*. New York: Columbia University Press
- Szmidt, A. E. and X. R. Wang. 1991. DNA markers in forest genetics. In MullerStarch G. and M. Ziehe (eds.). *Genetic Variation in European Populations of Forest Tree*. Frankfurt: Sauerlander's Verlag, 79-94
- Turesson. G. 1922. The genotypical response of the plant species to the habitat. *Heredilas*, 3: 211-350.
- Venable. D. L. 1984. Using intra-specific variation to study the ecological significance and evolution of plant life-histories. In Dirzo R. and J. Sarukhan (eds.). *Perspectives on Plant Population Ecology*. Sunderland: Sinauer, 166-187
- Wagner, D. G., G. R. Furnier. M. A. Saghai-Marooof, S. M. Williams. D. P. Dancik and R. W. Allard. 1987. Chloroplast DNA polymorphisms in lodgepole and jack pines and their hybrids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84: 2097-2100
- Wendel, J. F. and N. F. Weeden. 1989. Visualization and interpretation of plant isozymes. In Soltis, D. E. and P. S. Soltis (eds.). *Isozymes in Plant Biology*. Portland: Dioscorides Press, 5-45.
- Wild, H. and A. Heyting. 1966. An analysis of variation of leaf dimensions in *Becium homblei* Duvign. et Plancke and *Becium obovatum* N. E. Br. *Botaniska Notiser*, 119: 349-357
- Williams, J. G. K, A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski and S. V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.*, 18: 6531-6563