

中/国/资/源/生/物/研/究/系/列

苦楝聚合群体遗传多样性研究 与核心种质构建

程诗明 顾万春/著



科学出版社

苦楝聚合群体遗传多样性研究 与核心种质构建

程诗明 顾万春 著

科学出版社

北 京

内 容 简 介

本书针对苦楝散生点状分布特性,依据散生树种聚群理论与实验模式,在苦楝全分布区中分层抽取 24 个群体及 729 个个体,进行了表型多样性、梯度变异、表型区划及 DNA 分子标记(AFLP)遗传多样性研究;同步进行了苦楝子代苗期性状多样性研究;构建了苦楝核心种质保存的样本策略,提出了苦楝遗传多样性保护策略,并营建了苦楝多点异地保存林。全书分为 8 章。

本书可供高校和科研院所农林遗传资源相关专业研究人员和学生参考使用。

图书在版编目(CIP)数据

苦楝聚合群体遗传多样性研究与核心种质构建/程诗明,顾万春著.

—北京:科学出版社,2014.3

(中国资源植物研究系列)

ISBN 978-7-03-040025-3

I. ①苦… II. ①程…②顾… III. ①苦楝-群体遗传学-遗传多样性-研究②苦楝-种质资源-研究 IV. ①S792.33

中国版本图书馆CIP 数据核字(2014)第 042964 号

责任编辑:张会格/责任校对:钟 洋

责任印制:赵德静/封面设计:耕者设计工作室

科学出版社出版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

北京源海印刷有限责任公司 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2014 年 3 月第 一 版 开本:720×1000 1/16

2014 年 3 月第一次印刷 印张:10 1/4 插页:4

字数:193 000

定价:78.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

前 言

苦楝(*Melia azedarach* L.)为速生、多功能、可综合利用的乡土树种,是高效、低毒的广谱植物源农药之一;呈连续的点状分布,资源分散,破坏严重。对现有苦楝乡土野生资源进行收集、保存及遗传多样性测定评价,为科学合理地保护苦楝种质资源、遗传改良、筛选优异种质进行“林—药”一体的规模化和产业化生物农药开发奠定坚实基础。

国内外首次在苦楝物候区划与物候多样性研究的基础上,针对苦楝散生点状分布特性,依据散生树种聚群理论与实验模式,在苦楝全分布区中分层抽取 24 个群体及 729 个个体。按照群体间、群体内个体间两个层次,采集单果及叶片材料,进行了表型多样性、梯度变异及表型区划的研究;在苦楝表型区划的基础上进一步分层抽取 8 个苦楝群体,每群体 30 个个体,进行了 DNA 分子标记(AFLP)遗传多样性研究;同步进行苦楝子代苗期性状多样性研究;并对表型、DNA 分子标记(AFLP)及子代苗期性状的遗传多样性参数进行了耦合研究;构建出苦楝核心种质保存的样本策略,提出了苦楝遗传多样性保护策略,并营建了苦楝多点异地保存林。本书的研究内容和结果有以下 6 个部分。

1. 苦楝物候区划与物候多样性的研究

对中国苦楝全分布区的 70 个气象观测点的 8 年(1994~2001 年)物候观测数据进行量化分析评价,应用主成分、聚类分析等方法,将苦楝全分布区划分为 11 个物候区;对每个物候区进行物候多样性分析及物候多样性梯度分析等,研究提出苦楝物候多样性梯度变异与特征,为遗传多样性研究提供生态遗传依据与内容,也为苦楝种子区划和种苗调拨、种质资源收集保存提供了科学依据。

2. 表型多样性研究

苦楝表型多样性极其丰富。方差分析表明,苦楝 6 组 18 个表型性状在群体间和群体内都存在极显著差异($\alpha=0.01$);叶片、单果、单果种子数、核果、种子、千粒重 6 组表型性状的变异系数分别是 24.59%、13.24%、16.82%、11.52%、11.5%、26.96%,平均为 17.44%;群体间平均变异系数为 14.01%;12 个表型性状的重複力平均值为 0.50;表型分化系数群体间(54.47%)大于群体内(45.53%)。

将 5 个地理气候因子及对应的苦楝 18 个表型性状因子进行典型相关分析,第一典范变量的特征根为 0.9979($\alpha=0.01$,水平极显著),占全部特征根的 78%;跟进主成分分析将二元坐标降为一维数据轴,即表型性状梯度值,苦楝表型性状具很强的东北—西南地理梯度变异模式特点。用通径分析揭示出各表型性状对表型性状梯度值的直接作用和间接作用,从侧面证实了繁殖器官性状稳中求变的事实。

对 18 个苦楝表型性状,根据主成分分析和聚类分析,将中国分布苦楝表型多样性划分为 5 个大区及 10 个亚区,对各群体内个体所在表型区进行了回判检验,证明区划结果可靠性达 93.8%。

3. DNA 分子标记遗传多样性研究

苦楝群体间与群体内遗传多样性真实存在。在苦楝表型多样性研究的样本中分层随机抽样 8 个群体 240 个个体基因组研究中,采用 7 对 AFLP 引物共获得 658 条清晰谱带,其中 650 条为多态带,方差分析结果表明,基因谱带频率在群体间差异极显著($\alpha=0.01$),方差分量贡献率在群体间占 27.26%,群体内占 72.74%;发现 13 条特异谱带。各群体多态位点百分率为 51.4%~76.29%(种水平为 98.78%);等位基因数(A)为 1.541~1.7629(种水平为 1.9878);有效等位基因数(A_e)为 1.1724~1.3231(种水平为 1.3247);Shannon 信息指数(I)为 0.1790~0.3077(种水平为 0.3322);遗传多样性(H_t)为 0.1101~0.1969(种水平为 0.2060)。各引物对检测到遗传分化系数(G_{st})为 0.1130~0.3053(种水平为 20.43%);基因流 N_m 为 1.1378~3.9226(种水平为 1.9477)。遗传一致度平均为 0.946;遗传距离平均为 0.056 32,根据遗传一致度进行非加权成对算术平均法(UPGMA)聚类分析。

4. 苦楝聚合群体子代苗期性状多样性研究

苦楝苗期性状多样性丰富。苦楝苗期性状变异系数均值为 18.74%,群体间表型分化系数为 44.55%,群体内的变异大于群体间的变异;苗高和地径单株遗传力分别为 0.52 和 0.36,家系遗传力分别为 0.722 和 0.617,苗高与地径遗传相关系数为 0.751;苦楝苗高生长呈典型的“S”型生长曲线,在不同观测周期中,群体间、群体内家系间生长节律经 t 检验具不同程度的差异显著性。

5. 苦楝遗传多样性的耦合研究

通过苦楝物候多样性、表型多样性、DNA 标记多样性及子代苗期性状多样性 4 个方面的研究,揭示出苦楝在遗传多样性参数、遗传多样性的梯度变异、遗传多样性分布中心、样本策略等方面耦合性较好。根据以上几个层次的耦合研究,确定苦楝的遗传多样性中心呈“倾斜带状”,在西北部陇南、渭南一带延续至华中、华东一带。

6. 苦楝聚合群体核心种质构建与种质资源保存

综合苦楝物候性状、表型性状和 AFLP 分子标记及苗期性状多样性研究,对苦楝整体资源分析比较,拟合出苦楝群体间、群体内个体间样本策略,并对苦楝种质资源的保护提出“8+1”群体(每个苦楝亚区至少有 1 个苦楝群体),每群体保存 28 个个体的苦楝种质资源保护方案;在苦楝核心种质构建的基础上,营建了苦楝多点异地保存林。

综合上述研究,揭示了苦楝在物候多样性、表型多样性、DNA 标记基因谱带多样性及苗期性状多样性等遗传多样性的未知规律和现状,为苦楝种质资源保存和利用提供了多层次遗传背景和遗传多样性参数,核心种质的构建为科学合理保护苦楝遗传基因资源起到了积极作用,在散生乡土树种聚群保存和遗传多样性研究方面进行了开拓性和有意义的探索。

本研究得到了“十五”国家攻关“林木种质资源保存与技术创新利用研究”(2001BA511B10)、“十五”国家攻关“林木基因资源保护与创新利用”(2004BA525B10)及国家重大基础性工作项目“林木种质资源收集、保存及整理”(2000DEA10002)的资助,特此谢忱!

程诗明

2014 年 1 月 8 日于北京

目 录

前言

第 1 章 绪论	1
1.1 苦楝遗传资源学研究进展及其展望	1
1.1.1 苦楝的分布及物候学特点	1
1.1.2 苦楝遗传资源学研究进展	2
1.1.3 展望	6
1.2 遗传多样性研究的样本策略与参数估算	7
1.2.1 遗传多样性的含义	7
1.2.2 遗传多样性的表现层次	7
1.2.3 遗传多样性评价的样本策略	7
1.2.4 遗传多样性参数的估算	10
1.3 苦楝聚合群体遗传多样性研究的目的意义及研究内容	12
1.3.1 研究目的和意义	12
1.3.2 研究的主要内容及技术路线	12
第 2 章 苦楝物候区划与物候多样性的研究	17
2.1 材料与方法	17
2.1.1 物候资料的收集整理	17
2.1.2 物候指标的确定	18
2.1.3 数据处理与分析方法	18
2.2 结果与分析	23
2.2.1 苦楝物候区划	23
2.2.2 苦楝物候多样性分析	26
2.2.3 物候多样性梯度分析	29
2.3 小结与讨论	29

第3章 苦楝群体表型多样性的研究	32
3.1 材料与方法	32
3.1.1 材料与样本	32
3.1.2 分析方法	35
3.2 结果与分析	38
3.2.1 表型性状数据正态性检验	38
3.2.2 表型性状数据基本参数统计分析	39
3.2.3 苦楝表型性状方差分析	41
3.2.4 表型性状参数估算	51
3.2.5 苦楝表型多样性的梯度变异	59
3.2.6 苦楝表型多样性区划	63
3.3 小结	68
3.4 讨论	69
第4章 苦楝群体 AFLP 分子标记遗传多样性的研究	71
4.1 材料与方法	72
4.1.1 实验材料	72
4.1.2 实验方法	73
4.2 结果与分析	78
4.2.1 AFLP 荧光分子标记实验结果	78
4.2.2 苦楝群体 AFLP 分子标记遗传多样性评价	80
4.3 小结	88
4.4 讨论	89
第5章 苦楝聚群子代苗期性状多样性研究	91
5.1 材料与方法	91
5.1.1 苦楝苗期试验	91
5.1.2 苗期性状多样性测定	92
5.2 结果与分析	93
5.2.1 苦楝育苗结果	93

5.2.2 苦楝子代苗期性状多样性	94
5.3 小结与讨论	99
第6章 苦楝遗传多样性的耦合研究	100
6.1 实验样本组成	100
6.2 遗传多样性参数耦合	101
6.2.1 遗传分化的耦合	102
6.2.2 表型与 AFLP 多样性参数的耦合	103
6.3 UPGMA 聚类结果的耦合	105
6.4 苦楝表型、DNA 水平多样性参数梯度变异的耦合	106
6.5 苦楝遗传多样性样本策略的耦合	106
第7章 苦楝聚合群体核心种质构建与种质资源保存	107
7.1 材料与方法	107
7.1.1 苦楝核心种质样本策略的拟合	107
7.1.2 苦楝种质资源的保存	108
7.2 结果与分析	110
7.2.1 苦楝核心种质样本策略	110
7.2.2 种质资源的保存	114
7.3 小结与讨论	114
第8章 结论与讨论	115
8.1 结论	115
8.2 讨论	116
参考文献	117
附表	125
图版	

第1章 绪 论

1.1 苦楝遗传资源学研究进展及其展望

苦楝(*Melia azedarach* L.)属于楝科(Meliaceae)楝属(*Melia*)^[1,2],为速生、多功能、可综合利用树种。它具驱虫、耐腐、吸附烟尘能力强的特性;根、皮、花、果均可入药,有“天然杀虫剂”之美誉,是高效、低毒的广谱植物源农药之一^[3];木材白度高、抗虫,是优良的家具材;是观花、观果树种^[4,5],聚伞花序,淡紫色,具芳香味,两性花,异交为主。

1.1.1 苦楝的分布及物候学特点

1. 水平分布

苦楝在我国分布广泛,水平分布为北纬 18°~40°,南至海南崖县;北到河北保定和山西运城、陕西渭南、陇南地区;东至台湾、沿海各省;西到四川、云南保山^[1,2]。

2. 垂直分布

苦楝垂直分布范围一般是海拔 6~800m。广东、浙江沿海地区在海拔 6m 以上;长江以南地区苦楝多分布在海拔较低的旷野、池边、溪边、农村的房前屋后和山脚边;黄河流域的山西、陕西、河南、山东、河北等地,多生于海拔 200m 以下的平原、丘陵和农村“四旁”,在太行山、伏牛山海拔 500m 处仍有分布;西部的甘肃、四

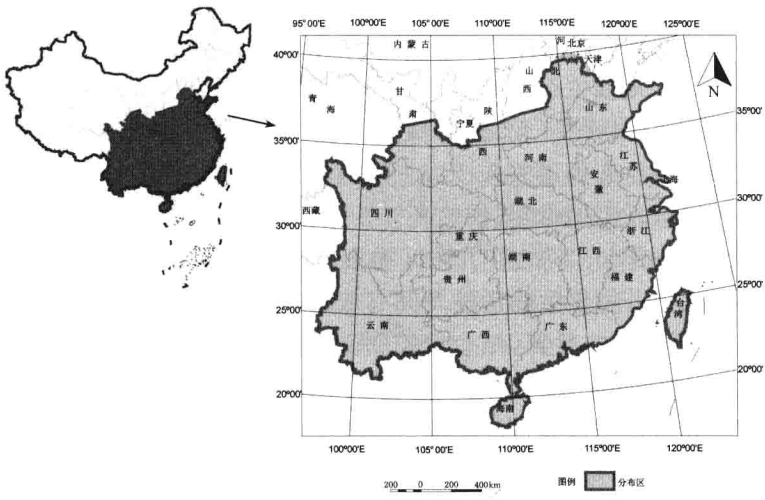


图 1-1 苦楝中国自然分布图

Fig. 1-1 The distribution map of *Melia azedarach* L. in China

川一般分布在海拔 800m 以下;云南南部思茅地区在海拔 1500m 处仍有苦楝分布^[1,2,4]。苦楝自然分布区如图 1-1 所示。

3. 物候学特点

苦楝物候期呈梯度变异^[4]。苦楝因其物候变化具有很强的气候指示性,并被气候学研究应用^[6]。作者根据中国苦楝全分布区的 70 个气象观测点的 8 年(1994~2001 年)物候观测数据,将我国苦楝全分布区划分为 11 个物候区,为我国苦楝种苗的合理调拨、种质资源保存提供了科学依据。

1.1.2 苦楝遗传资源学研究进展

1. 生化水平变异

1) 产地变异

苦楝不同产地具有不同亚种和生态型的分化,化学成分及生物活性差异极大。赵善欢和张兴^[7]在研究苦楝根皮和树皮的杀虫作用时就已经注意到苦楝果实的生物活性及其活性成分因产地而异,这种现象 Oelrichs 等^[8]有过类似的报道。王义^[9]收集了河南郑州,贵州沿河,湖南沅江,广东乐昌、斗门与广州,海南三亚与琼山府城等苦楝果,发现大陆苦楝果除广东斗门外,其余对菜青虫毒性都很低,1%氯仿抽提物对菜青虫校正死亡率都在 43.8% 以下,而海南苦楝果高达 90.6%~96.9%。张民力等^[10]应用高效液相色谱对我国苦楝的树皮、果实及叶片中川楝素(也称苦楝素)含量进行了测定,发现采自不同地区苦楝样本中川楝素的含量差别较大:树皮中的川楝素含量以贵州的沿河、陕西的西乡较高;果中仅含微量或测不出。张兴^[11]研究得出,中国苦楝因分布区不同,其果实形态及大小都有差异,生物活性差异极大,且测定了中国不同地区苦楝树皮生物活性及川楝素含量,发现所有苦楝树皮材料均含有川楝素,但含量不同,认为中国西南地带(即云南、贵州、四川至陕西南部)存在“地域生态型差异”。苦楝韧皮样品中最高的可达 5.160mg/g,低的仅有 0.241mg/g,相差 21 倍之多。这种含量上的差异,与其生长区的地理环境、土壤和气候条件等生态因素关系极大。川楝素含量较高的地区,如贵州、四川、陕西等地均为山区或丘陵地带,气候的多样性造就了苦楝生态型的多样性。在某些相邻地区如湖南西部与广东也存在中间类型。汪文陆采用薄板层析和高效液相色谱法比较不同地区苦楝果生物活性及其有效成分,发现海南省三亚—琼山一带苦楝与广东苦楝有明显的差异,结合已有的资料分析,可以认为存在不同的生态型^[12];并从 13 省区采样分析发现,树皮的氯仿提取物对斜纹夜蛾与菜粉蝶幼虫的拒食活性以贵州省沿河、陕西省武功产为最高,以广东省乐昌、浙江省临安、湖南省沅江产次之;以河南省郑州、海南省三亚产较差,且从苦楝果实中分离出了苦楝醇、苦楝新醇、苦楝二醇、苦楝三醇等化合物^[13]。华南农业大学^[14]研究指出,楝树中川楝素含量与其生长区的地理位置、环境、土壤和气候条件的生态因素有关。国外对

苦楝的研究也有类似的报道^[15~17]。

2) 部位变异

a. 皮部

在根皮、干皮中的主要苦味成分为川楝素,其含量为0.4%~1%,即川楝素和异川楝素^[18~21],两者互为同分异构体,分子式为 $C_{30}H_{38}O_{11}$ 。赵善欢和张兴^[22]也证实苦楝根皮和树皮中的主要杀虫有效成分为川楝素。此外,在根皮里还含有印楝波灵A、印楝波灵B、芩皮酮、葛杜宁、苦楝酮、苦内脂、苦洛内脂及苦楝三醇等;在干皮中还有正三烷、 β -谷留醇、葡萄糖和其他微量成分;杨光忠等^[23]从茎皮中提取分离并鉴定了5个微量酚性化合物,它们的结构分别为阿魏酸二十六醇酯、阿魏酸二十四醇酯、阿魏酸二十五醇酯、阿魏酸二十七醇酯、阿魏酸二十八醇酯;并且曾从日本产苦楝的韧皮部中得到一种与山道年具有类似杀虫作用的化合物 $C_9H_8O_4$ (熔点 $m:154^{\circ}C$),还分离出香荚兰酸和 d_1 -儿茶精,能驱除蛔虫与短膜绦虫。

b. 叶部

从苦楝变种(*Melia azedarach* L. var. *subtripinnata* Miq.)的叶子中分离出两种黄酮体:芸香甘和山茶酚-3-L-鼠李糖-D-葡萄糖苷。

c. 果实

韩玫和汪文陆^[24]从苦楝果实中分离出苦楝新醇、苦楝酮、苦楝醇、苦楝二醇、苦楝三醇、香草醛、香草酸和川楝素。汪文陆等^[25]用提取的化合物对菜青虫和亚洲玉米螟进行生物活性试验发现,几乎所有的活性成分均属于四环三萜类化合物,苦楝酮、苦楝醇和苦楝二醇对这两种试虫均表现出明显的拒食活性及一定胃毒作用;并且这些化合物活性与其分子羟基有密切关系,而与分子内双键关系不大。刘立鼎等^[26]从江西产苦楝果实中分离出了1,4-苯二甲酸二甲酯;从日本产苦楝果实和果皮中除得到苦楝子酮外,还有苦楝酮乙酸酯和去乙酸杜楝脂等。

d. 种子

种子油含多种脂肪酸,其中不饱和酸约占85%,主成分为亚油酸(45%~50%)、油酸(32%~40%)。果实油含肉豆蔻酸、亚油酸、油酸、棕榈酸、棕榈油酸。另含其他苦味成分:苦楝萜酮内酯、苦楝萜醇内酯、苦楝皮萜酮、苦楝萜酸甲酯、苦楝子萜酮、印楝定及印楝醛。此外,含芸苔留烯酮、豆留烯酮、 β -谷留醇-3-O- β -葡萄糖苷等醇类化合物。赵善欢和张兴^[22]测试结果表明,苦楝的根、皮、木质部内对三化螟具有内吸毒杀的活性成分含量较高,而种核内的含量较低。苦楝的杀虫活性成分至少有川楝素、苦楝酮、苦楝醇等3种;活性成分存在的部位主要在韧皮部,果肉中含量低或者无,叶片中无。

3) 季节变异

苦楝活性成分含量随采集季节不同而不同。采皮时期以春末为宜;采果以秋

季为宜。王雪芬等^[27]对川楝素在苦楝皮中的含量的季节变化进行了含量测定,发现在开花期含量特别低,而从结小果开始,含量升高。

2. 种源选择与良种选育

1) 种源选择

苦楝基本上仍处于散生或丛生未改良的状态,分布广泛,自然生态条件差异大,受自然选择和地理生态环境的影响,遗传变异幅度较大,形成许多不同地理生态类型,有着极其复杂而丰富的可供选择的遗传基础。张庆连等^[28]对来自全国 18 个省市的 24 个苦楝种源的遗传基因稳定性、生态环境适应性、生长效应进行了分析,初步揭示了苦楝种内遗传变异性与种源选择的巨大潜力,并且指出各种源抗寒能力呈现由南向北、由东向西逐渐增强的变化模式。

2) 良种选育

时明芝等^[29]利用全省普查选出的 12 个苦楝优良单株和优良类型与当地一般品种做对照,营造测定林。连续 8 年的测定结果证明曹县安仁集的优良单株 G、单县徐寨的优良类型 F 和齐河县焦庙的优良单株 D 生长表现优良,建议在聊城市推广应用。时明芝^[30]探讨了 3 个苦楝优良品种的生长规律和物候期,揭示出苦楝三年生时树高连年生长量最大,五年生时胸径连年生长量最大,且 3 个优良无性系生长期均比对照苦楝长。朱青等^[31]通过对楝树优良无性系多年多点测试,选出 5 个生长表现较好的系号,分别为杜郢、掖县、杭州、冉郟的苦楝和川楝小号。其材积遗传力达到 0.747,遗传增益达到 63.2%。

3. 种质资源研究

由于苦楝的自然分布区广阔、气候和物候差异大、天然分布群体不完整、基本为零星分布,在进行种质资源的异地保存时,宜采用“聚合群体”的种质资源的收集模式。中国林业科学研究院种质资源研究室,于 1991 年开始设置“苦楝种质资源保存、评价和利用”单项研究,已收集江苏、浙江、河南 3 个聚合群体的 90 份种质,于江苏徐州营建了种质保存林。按六年生测定评价,不同群体在物候、生长、干形、开花结实等方面均存在明显差异;群体内家系间也存在一定差异。作者近 3 年来一直从事苦楝遗传多样性保存、评价与利用研究。目前共收集中国大陆分布区的 24 个苦楝群体 729 个单株的苦楝种子及叶片材料(每群体 30~60 个个体),进行了亲代表型多样性、AFLP 分子标记多样性的研究;并于 2004 年春在广西凭祥、江西分宜、河南郑州、北京昌平进行四地点多群体播种育苗试验,测定了不同苦楝群体子代苗期生长节律,这些研究为苦楝遗传多样性保存、评价与利用奠定了坚实的基础。

4. 苦楝资源开发利用

苦楝经济价值很高。它的根、皮、干、果、叶、种子都各有用途^[32]。

1) 树根

根内含有糖、胶、蛋白质、其浸出液在医药上可广泛使用,对皮肤病和虚弱症有防效。

2) 树皮

树皮为提取川楝素的原料,是传统医药上的驱虫剂,也是制作牙膏和口腔卫生制剂的有效成分。经抽提的树皮残渣,其纤维长度与阔叶树相似,含木质素较低,总纤维含量达 69.14%,可作造纸原料。Khalil 等^[33]报道苦楝有通便作用,叶能防结石、通小便、调经;皮可作杀虫药和兴奋剂、可抗痉挛;根皮用于驱蛔虫;花能通便利尿、治骨盆病。

3) 枝干

树干是优良的抗白蚁和防虫蛀的木材,是制作家具、工具、雕刻和建房的常用材。

4) 花

花期较长,优良绿化与美化植物,是上等蜜源植物,可提取芳香油。

5) 叶

民间煎叶可治疗溃疡、疖,可进行伤口消毒,具有抗菌、抗病毒作用;苦楝叶富含养分,氮(N)素含量达 4.46%、磷(P)1.3%、钾(K)2.44%,比一般绿肥含量都高,可做肥料,也可用作绵羊、山羊的饲料;其水浸出物或悬浮液有防虫效果。

6) 果实

果实是综合利用的重要部分。种子提取油前需除去皮、肉,二者量约占果重的 50%,可供发酵制酒;因含有较多的碳水化合物,也可用作沼气发生原料。苦楝果实和叶抽提物对水稻种子萌发、发芽和秧苗生长有促进作用,并且试验证明这些活性物质为极性较大的萜类化合物,称为“苦楝生长素类”,能使水稻大幅度增产^[34~37]。张晓晓^[38]研究了楝树籽不同方式的提取物(此为提取方式 N I, N II)对普通铁质淋溶土壤、筒育水耕人为土壤供 N 和 N 肥利用率的影响。国外有文献报道,将楝树籽作为一种天然硝化抑制剂能在 2 周内延缓硝化作用^[39,40],以提高 N 肥利用率。

7) 种子

种子经破碎的种核(壳)可制作活性炭配料或者热固压型粉配料;其种仁可榨

油。油的用途很广,除可驱虫、杀虫外,还是很好的制皂原料;粗油可照明和用作燃料油、润滑油^[41]。由于楝籽油具有一种大蒜气味,需先行脱臭、精炼和净化后方可作日用化工原料。Khalil 等^[33]报道苦楝油可作兴奋剂和强壮剂,从中提取的印楝定有明显的抗炎、抗关节炎作用,对炎症过程的急性、亚急性、慢性期均有疗效。油渣饼占整个种子质量的 80% 以上,它含有 N、P、K 等元素,可作农田底肥、迟效型肥料;也可防治农田害虫。也有人认为楝树的种子粗分含有氨基酸、蛋白质,经提纯脱毒后可用作牛和家禽的饲料,为动物饲料来源。

1.1.3 展望

近几十年来,在苦楝生化物质、开发利用等方面取得不少研究成果^[42,43],但在基础研究方面还有待于加强和深入。

1. 科学地保护现有苦楝遗传资源

苦楝自然分布区广阔,气候和物候差异大,但天然的成片状分布很少,大都为连续的星状分布,资源分散,破坏严重,如盲目利用树皮提取川楝素对资源破坏严重,造成苦楝生物多样性减少,有用基因甚至药性基因的丢失带来的损失将是无法挽回的。因此,不解决苦楝遗传多样性本底研究与种质资源问题,今后应用研究也无从谈起。对于苦楝等散生树种来说,宜采用“聚合群体”的种质资源异地保存模式,要科学测定和评价苦楝全分布区的遗传多样性、遗传结构和分化,应该走苦楝全分布区物候区划→大范围表型多样性研究与表型区划→选择有代表典型群体→DNA 分子标记评价→表型与 DNA 分子标记耦合评价→构建苦楝聚合群体核心种质的技术路线。

2. 挖掘苦楝优良遗传资源,走产业化的道路

苦楝是我国的乡土树种,抗性和适应性强,具很高的遗传基础。因此,对苦楝乡土野生资源进行科学的收集、测定和评价,利用苦楝丰富的遗传变异定向地选育材用或皮用等优良种源,筛选出优异种质用于适应区的规模化发展,进行“林—药”一体的规模化和产业化生物农药开发是当务之急。

3. 加强各学科的分工协作,高效合理地开发苦楝资源

苦楝化学成分研究涉及学科较广,如遗传育种学、药理学、临床学、植物保护学、植物生理学等,只有各学科紧密协作,进行系统研究,才能在较短时间内取得较好的研究成果。虽说国内外对苦楝化学成分研究较多,鉴定和报道的化合物有 60 多种,但是国内多数研究者在直接用苦楝的提取物进行生化测试试验、药理试验,对苦楝的分离提纯等方面做的工作较少,尤其对分离出的各纯组分的理化性质研究更少。植物农药一般在阳光或微生物的作用下容易分解,半衰期短,残留降解快,被动物食取后富集基质差,若能对苦楝的各活性成分的理化性质有更多的了解,则更有利于苦楝资源的开发和利用。

我国苦楝遗传资源极为丰富,苦楝生物农药具有广谱、高效、安全、环境相容性好等特点,必将成为 21 世纪农药发展的热点之一。

1.2 遗传多样性研究的样本策略与参数估算

1.2.1 遗传多样性的含义

遗传多样性是生物多样性的基础。广义的遗传多样性是指地球上所有生物所携带的遗传信息的总和,但通常所说的遗传多样性是指种内不同群体之间及其群体内不同个体之间遗传变异的总和^[44~46]。遗传多样性不仅包括遗传变异水平的高低,也包括遗传变异的分布格局,即群体的遗传结构。遗传变异既是生物生存和适应的基础,也是物种发生、选择、进化的基础。一个物种或群体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群体结构。一个物种或群体遗传多样性越大或遗传变异越丰富,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生存环境。物种或群体中遗传变异的大小与进化的快慢成正比^[47~49]。

1.2.2 遗传多样性的表现层次

遗传信息储存在染色体和细胞器基因组的 DNA 序列中,因此,严格说来,遗传多样性都起因于 DNA 分子水平,并表现为以 DNA 分子水平为基础的遗传学中心法则:



遗传信息通过转录和翻译过程决定了多肽链中的氨基酸顺序。由多肽链构成的蛋白质进一步形成细胞和组织,或在生物体内执行不同的功能,引起一系列错综复杂的代谢变化,最后表现出各种各样的形态特征和生理性状。由于大部分分子水平的变异会通过上述过程影响到翻译后的各个层次或水平,遗传多样性同样可以在细胞、器官、生理代谢及形态学水平上表现出来。因此,自然界广泛存在的大量遗传变异体现在不同水平上:群体水平、个体水平、组织水平和细胞水平及分子水平。

1.2.3 遗传多样性评价的样本策略

由于经济和实验可行性,任何植物群体的遗传分析、评价或遗传多样性的测定评价与用于保护的样本不可能太大。科学样本容量的依据,只能是最少的遗传重复、最节省经费、最大限度地包容遗传多样性的样本^[50]。

合理取样是有效保护、利用和研究生物多样性所面临的最基本问题,它在很大程度上受到植物自身的遗传特性、环境条件和取样目的的影响。遗传多样性的取

样策略是指对一定地理分布范围内的生物个体取样时,使样本具有代表性和包含尽可能多的遗传变异的最佳取样方法,包括了取样数目(一个给定区域的群体数和一个群体的个体数)及取样方式。包括哈迪-温伯格平衡定律在内的群体遗传学基本原理是研究取样策略的理论基础,在此基础上可以对群体内的取样个体数及应获取的群体数进行理论计算,同时还可以根据物种群体的遗传结构特点和环境条件的异质性来决定取样的方式。因此,应该依据研究对象本身的特点和取样的目的来确定某一特定区域的群体取样数,以及某一群体内的样本数及取样方式。

1. 群体内取样个体数

通常认为一个群体内最佳的取样数要求包括 95% 以上的等位基因的基因频率大于 0.05^[51]。在不了解群体遗传结构的情况下,根据群体遗传学原理可计算出取样数目对样本所包含的等位基因的影响。Ewens^[52]为此建立了中性无限等位模型:

$$K \approx \theta [\ln(S + \theta) / \theta + 0.6] \quad (1.1)$$

式(1.1)中, $\theta = 4N \times u > 0.1$, $S > 10$, K 指某一位点选择中性的等位基因数目, N 指群体的有效个体数, S 指取样个体数, u 指该位点的突变率。

此模型强调一定数目的样本所包含的等位基因数和样本数的对数成正比。这个结论是在假设平衡的条件下根据中性等位模型得到的,并已被证实也适用于杂合模型、非平衡状态和经验分布等。

这个模型有两个显著的优点:首先,该模型普遍适用于对具有中性性状的群体进行取样;其次,该模型中只有一个不定参数 θ ,它提供了一种简单并且较为可靠的计算方法。因此,这是一个比较折中且简单易用的模型。尤其是在不知道群体遗传结构的情况下,通过这个模型计算出的取样个体数可以作为取样的一个参考值^[53]。

但是在实际取样过程中往往对取样有一定的要求,例如,要求样本应包含群体 95% 以上的遗传变异,或者要求样本包含基因频率小于 0.05 的稀有等位基因。Brown 和 Moran^[54]为此提出了下面的计算公式:

$$S \approx 3 / [(F - 2) \ln(1 - p)] \quad (1.2)$$

式(1.2)中, S 指样本数, F 指群体的近交系数,即个体在某个基因位点上从上代获得两个相同的等位基因的概率,通常它的值为 $-1 \sim 1$ ^[55], p 指基因频率。这个模型要求已知目标群体的近交系数,对一个已知其遗传结构的群体来说很容易计算出最佳的样本采集数。

Sjögren 和 Wyöni^[56]提出了一个针对有限群体的假设模型。假定群体内共有 N 个个体,该群体不显著偏离哈迪-温伯格平衡,具有两个等位基因的位点上的常见等位基因频率为 p ,稀有等位基因频率为 q ,并且 $p \gg q$, n 为样本数:

$$P^- = \prod_{i=0}^{2n-1} [(p2N - i) / (2N - i)]$$

$$P^+ = 1 - P^- \quad (1.3)$$

式(1.3)中, P^- 指样本中包含常见等位基因 p 的概率, P^+ 指样本中包含稀有等位基因 q 的概率。

用计算机程序模拟计算在不同 N 值和 P 值情况下, 使 $P^+ \gg 0.95$ 的 n 值, 当 P 值为 0.95 时, 随着群体内个体数 N 的增加, 样本数 n 也不断增加, 当群体增加到无限大 ($N \rightarrow \infty$) 时, n 值被固定为 30。因此按照 Sjögren 和 Wyöni^[56] 的假设, 要检测到频率为 5% 的稀有等位基因, 取样数至少要达到 30 个个体 ($P^+ \geq 0.95$)。

因此在不知道某一物种生物学特性和遗传背景的情况下, 对一个群体进行资源保护时, 其随机取样数目可以确定在 30 个左右。如果该植物为异交, 可以适当降低样本的数量; 如果该植物为自交, 可以适当增加样本的数量。

2. 群体内取样的空间样式

群体内的取样个体数确定以后, 还要考虑样本的空间分布。异交尤其是风媒物种个体间的基因交流较充分, 遗传变异的分布通常比较均匀, 与空间距离没有显著的相关性。但是很多物种由于受其繁育系统、种子和花粉传播机制的影响, 群体内的遗传变异并不是完全随机分布的。通常自交和无性繁殖的物种个体间的基因交流受到限制, 遗传变异的分布呈斑块状。同时, 生境异质性也会导致群体内遗传变异存在一定的空间分布格局。

Epperson^[57]、Sokal 和 Owen^[58]、何田华^[59] 等将空间自相关分析用于群体遗传结构分析。空间自相关是一种统计方法, 可以用来检测和量化从多个标定点中取样值变异的空间依赖性, 能够较好地揭示遗传变异的空间分布格局, 从而确定遗传变异的空间分布是否随机, 如果群体内的遗传变异呈斑块状分布, 那么斑块的大小如何等^[59]。这些研究为遗传多样性的取样策略提供了重要的参考。

空间自相关分析是认识空间分布特征、选择适宜的空间尺度来完成空间分析的最常用的方法。目前, 普遍使用空间自相关系数——Moran I 指数, 其计算公式如下:

$$I = \frac{N}{W_{ij}} \times \frac{\sum \sum W_{ij} (x_i - \bar{x})(x_j - \bar{x})}{\sum (x_i - \bar{x})^2} \quad (1.4)$$

式(1.4)中, N 表示空间实体数目; x_i 表示空间实体的属性值; $\bar{x}$ 是 x 的平均值; $W_{ij} = 1$ 表示空间实体 i 与 j 相邻, $W_{ij} = 0$ 表示空间实体 i 与 j 不相邻。

I 的值为 $-1 \sim 1$, $I = 1$ 表示空间自正相关, 空间实体呈聚合分布; $I = -1$ 表示空间自负相关, 空间实体呈离散分布; $I = 0$ 则表示空间实体是随机分布的。 W_{ij} 表示实体 i 与 j 的空间关系, 它通过拓扑关系获得。

在一个足够大的有效大小已知的群体中, 考虑到原生群体内个体间近交(包括自交)等影响, 抽样不存在亲缘关系(相对位置距离应等于或大于邻舍区, 一般要求 30~50m 的间距)的个体, 组建群体内样本^[50]。

3. 群体取样数

Hamrick 等^[60] 提出用遗传分化系数 (G_{st}) 来估算一个物种内应取样的群体数。