



草业科学研究系列专著

针茅属植物分子生态学

韩冰 赵萌莉 珊丹 编著



科学出版社

内 容 简 介

本书对针茅属植物的分类、地理分布及生态生物学特性、分子生态学研究进行了总结介绍。在野外群落调查与个体形态差异分析的基础上,利用等位酶电泳、蛋白质多态性、DNA分子标记、基因克隆等分子生态学的基本原理和方法,对针茅属植物种群的遗传结构、不同地理分布区的种群遗传分化,以及不同放牧强度干扰下和不同退化草地等级下针茅的遗传变异进行了系统的研究,并对质膜水孔蛋白基因进行了克隆与比对分析。

本书可供草业科学、植物生态学、草地资源管理、保护生物学、植物分子行为生态学、植物保护遗传学、分子进化和系统地理学等专业领域从事研究、教学、生产部门的科技人员及相关专业的研究生参考。

图书在版编目(CIP)数据

针茅属植物分子生态学/韩冰,赵萌莉,珊丹编著. —北京:科学出版社, 2011

(草业科学研究系列专著)

ISBN 978-7-03-030733-0

I. 针… II. ①韩… ②赵… ③珊… III. 禾本科牧草—植物生态学:分子生物学 IV. ①Q948.1②S543

中国版本图书馆CIP数据核字(2011)第060110号

责任编辑:韩学哲 贺窑青/责任校对:桂伟利

责任印制:钱玉芬/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>

源海印刷有限责任公司印刷

科学出版社编务公司排版制作

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2011年4月第 一 版 开本: B5 (720×1000)

2011年4月第一次印刷 印张: 18 1/2

印数: 1—1 800 字数: 358 000

定价: 75.00 元

(如有印装质量问题, 我社负责调换)

序 言

《草业科学研究系列专著》是内蒙古农业大学草业科学国家重点学科和草地资源教育部重点实验室等建设项目的重要成果之一。该重点学科和实验室源远流长，底蕴深厚。从 1958 年建立我国第一个草原专业开始，半个世纪以来，他们立足于内蒙古丰富的草地资源，经过几代人筚路蓝缕，开拓前进。《草业科学研究系列专著》就是他们在草业科学教学和研究的漫长道路上，铢积寸累的厚重成果。

这一系列专著涉及了牧草种质资源与牧草育种，牧草栽培与利用，草产品加工，草地生态系统，草地资源监测、评价和合理利用，草原啮齿类动物防治等众多领域。尤其在牧草远缘杂交、雄性不育、冰草转基因以及草地健康和服务等方面，取得了很大成就，赢得了国内外学界认可。

我国是草地资源大国，草原面积占国土面积的 41.7%，居世界第二位。草原与森林共同构成了我国生态屏障的主体。草业“事关国家生态安全和食物安全，事关资源节约和环境友好型社会建设，事关经济社会全面协调可持续发展”（杜青林，2006，《中国草业可持续发展战略》序言）。这也正是我国新兴的草业科学面临的重大历史任务。

我们欣慰地看到，《草业科学研究系列专著》由科学出版社组织出版，对这一重大历史任务作出了正面响应。这一系列专著不仅是内蒙古农业大学草业科学国家重点学科和草地资源教育部重点实验室的宝贵成果，也是我国草业学界对祖国崛起的精诚贡献。

我祝贺《草业科学研究系列专著》的出版。衷心祝愿这一系列专著与它所代表的学术集体相偕发展，不断壮大。

中国工程院院士

任继周

序于 2009 年建国 60 周年端午节

前 言

针茅草原通常是指各种针茅属植物占优势的天然草原。据统计,我国有 20 种针茅属植物是天然草地上的优势种,组成了不同类型的针茅草原。针茅草原是亚洲中部草原区特有的中温型草原代表类型之一,在我国内蒙古草原区有大面积的分布。由于受东南季风的影响,内蒙古高原由东至西随热量和水分状况的变化使针茅属植物呈现出水平地带性分布,如内蒙古东部地区分布有贝加尔针茅(*Stipa baicalensis*)、大针茅(*Stipa grandis*);中部地区分布有克氏针茅(*Stipa krylovii*)、本氏针茅(*Stipa bungeana*);西部地区分布有石生针茅(*Stipa klemenzi*)、短花针茅(*Stipa breviflora*)、戈壁针茅(*Stipa gobica*)和沙生针茅(*Stipa glareosa*)。在特定的生境条件下,针茅属植物成为不同草地植物群落的建群种或优势种,形成的针茅类草原成为一类不容忽视的、重要的草地类型。针茅草原不仅是草原畜牧业可持续发展的物质基础,同时在保持草地生态系统平衡、维持良好生态环境等方面都具有重要作用。众多学者从针茅植物个体、种群、群落、生态系统及草地畜牧业发展等多层面、多角度对针茅属植物进行了深入细致的研究,为草原畜牧业的持续发展作出了突出的贡献。

针茅的分子生态学研究始于 20 世纪末,本书作者对分布于内蒙古草原的针茅属植物的遗传结构、遗传多样性进行研究,以揭示放牧利用及不同退化等级草地针茅属植物的遗传变异,期望为草地利用与管理、草地生态建设、草地退化生态恢复提供科学的指导和理论依据。本研究得到了国家自然科学基金(30060015、30440051、30860196、30360022)、教育部优秀青年骨干教师奖励计划、农业部草原资源与生态重点开放实验室基金、内蒙古自然科学基金(20001303、200508010407、20050810407、20080404MS0508)、国家科技部项目(2007CB106800、2008BAD95B00、2009A40020201)、农业部行业公益项目(20090306)、内蒙古科学技术攻关项目(20030601)、内蒙古科技厅项目(20071923、20071501、20080706、20091403)、内蒙古大学高层次人才基金、内蒙古农业大学博士基金项目的资助;在野外的群落调查采样中得到了协作单位锡林郭勒盟草原站,陈巴尔虎旗、苏尼特右旗、苏尼特左旗、多伦县、正蓝旗等各旗县草原站的大力支持。

本书是《草业科学研究系列专著》之一,参加本书编写和参与本研究野外及实验室工作的人员还有张红梅、李红梅、王艳芳等同志。编写期间承蒙韩国栋教授的支持与指教。索永生先生、高新磊、史铁伟、海丽丽、宋旭红、于涛、张佳

佳、郝晓红等对文稿进行了校对，谨此表示感谢！

虽然本书作者在编写过程中态度认真而严谨，收集并阅读整理了大量的相关资料，但由于水平有限，本书在很多方面尚有不足与欠缺，敬请专家和读者指正。

作 者

2011年3月

目 录

前言

第一章 绪论	1
第一节 分子生态学	1
一、概念	1
二、主要研究内容	3
三、技术方法	5
四、展望	8
第二节 植物分子生态学研究方法	8
一、分子标记及其发展	8
二、植物分子生态学研究中的常用技术	9
第三节 植物分子生态学研究内容	15
一、植物种群遗传变异与遗传结构	15
二、植物分子行为生态	19
三、植物保护遗传学	20
四、分子进化和系统地理学	24
第四节 草原植物分子生态学研究	31
第二章 针茅属植物与针茅草原	33
第一节 针茅属植物分类与形态特征	33
一、针茅属植物分类	33
二、属的特征	35
三、组的特征	36
四、种的特征	37
第二节 针茅属植物生态生物学特性	45
一、种子萌发	46
二、幼苗生长	47
三、分蘖特性	48
四、枝条生长	50
五、根系发育	52
第三节 针茅属植物分布	52
一、水平地带分布	54
二、垂直地带分布	57

第四节 内蒙古针茅草原及其分布	58
一、针茅草原	59
二、气候特征	61
三、土壤特性	62
四、群落组成	63
第三章 针茅属植物遗传结构及遗传多样性	74
第一节 不同地理种群表型性状	74
一、大针茅构件	74
二、克氏针茅形态	79
三、种子形态与种子蛋白	85
四、形态特征与遗传分化	91
第二节 不同地理种群遗传多样性	97
一、大针茅	97
二、克氏针茅	104
三、短花针茅	113
第三节 不同地理种群同工酶分析	117
一、样地概况	117
二、酶谱带及遗传相似系数	117
三、同工酶变化	118
第四节 典型草原区针茅的遗传结构	119
一、大针茅	119
二、克氏针茅	121
第五节 遗传多样性与气候因子	126
一、样地概况	126
二、多态位点	127
三、Shannon-Wiener 指数与 Nei' 指数	128
四、遗传距离	128
五、遗传多样性与气候因子相关性	129
六、遗传距离与气候因子相关性	132
第六节 针茅属种间遗传关系	134
一、内蒙古中东部草原区针茅种间关系	134
二、内蒙古中西部草原区针茅种间关系	137
第四章 放牧及草地退化与种群遗传结构	142
第一节 放牧利用与草地退化	142
一、放牧对植物影响及植物响应	144
二、草地退化	150
第二节 长期放牧压力下针茅种群遗传结构	152

一、形态分析	152
二、RAPD 分析	158
三、ISSR 分析	164
第三节 退化系列针茅种群遗传多样性	171
一、样地概况	171
二、株丛结构	173
三、等位酶分析	175
四、RAPD 分析	180
五、退化系列草地针茅遗传多样性	190
第五章 针茅属植物土壤种子库遗传多样性	193
一、土壤种子库	193
二、土壤种子库种群遗传多样性	198
第六章 内蒙古针茅属植物地理替代与水孔蛋白 <i>PIP1</i> 基因	210
第一节 植物的适应性与地理替代	210
一、植物的适应性	210
二、内蒙古高原针茅属植物的地理替代	211
三、7 种针茅植物样地气候和植被特征	212
第二节 植物水孔蛋白及其研究进展	215
一、植物水孔蛋白的发现及结构	215
二、植物水孔蛋白的分类、分布及 <i>PIP</i> 蛋白	218
三、功能调节及其对干旱的响应	221
第三节 针茅属植物水孔蛋白 <i>PIP1</i> 基因序列	223
一、引物序列及 PCR 扩增、产物纯化	223
二、 <i>PIP1</i> 基因的克隆及鉴定	225
三、 <i>PIP1</i> 基因序列	227
第四节 针茅属植物 <i>PIP1</i> 基因多态性	232
一、第 1 外显子和第 1 内含子 PCR-SSCP 分析	232
二、基因型频率和等位基因频率	238
三、基因型的地理分布	239
第五节 针茅属植物地理替代与水孔蛋白 <i>PIP1</i> 基因	240
一、针茅属植物 <i>PIP1</i> 基因序列分析	240
二、 <i>PIP1</i> 基因外显子氨基酸序列分析	250
三、 <i>PIP1</i> 基因进化树与针茅属植物的地理替代分析	262
主要参考文献	266

第一章 绪 论

分子生态学(molecular ecology)是应用分子生物学的原理和方法研究生命系统与环境系统相互作用的生态机理及分子机制的科学,是生态学与分子生物学相互渗透交叉形成的一门学科,产生于 20 世纪 70 年代末至 80 年代初。其研究的内容主要是在分子水平上揭示种群遗传多样性和遗传结构、分子环境遗传学、系统地理学和分子适应以及在其他生命层次所出现的生态现象的分子机制。分子生态学的理论和方法对传统学科有巨大的促进作用,同时对生态安全、环境与人类健康等重大问题将产生深远的影响。分子生态学研究方法将继续向所有与生态、种群和进化有关的学科领域全面渗透,并将不断取得开拓性成果,这已经成为学科发展的时代特点和大趋势。

近 20 年来,许多宏观生物学问题,如种群遗传学、生态学、进化生物学、保护生物学和生物地理学等问题,从理论机制研究到实际操作等方面都有了很大发展,这在很大程度上归功于分子生态学研究方法的引入。总体上分子生态学推动生态学的发展主要有以下 4 点。①分子生态学形成以前,生态学从个体、种群、群落和生态系统等组织水平上进行研究,主要研究宏观的生态学,是对群落、种群和个体进行描述性、观测性及积累性的研究。分子生态学使研究方法从描述性、观测性、积累性向严格的实验科学转移,主要表现在分子生态学利用分子生物学的理论和方法从分子水平上通过各种严格的实验来进行研究,具有严格的实验科学性。②分子生态学研究结果具有可重复性和共享性。③分子生态学研究方法可脱离生命系统进行。④分子生态学能结合分子层面及其他层次的研究结果来解决长期悬而未决的科学问题(戈峰, 2008)。

第一节 分子生态学

一、概念

近些年,在世界范围内相继出现了粮食和能源短缺、环境污染、人口膨胀、资源枯竭等社会问题,研究者在寻求这些问题的发生原因及解决这些问题的过程中,逐渐认识到生态学在保持和推动人类社会进步及发展中的重要作用,因而,生态学引起人们越来越多的重视,并获得了迅速的发展。近代生态学由于引进了其他学科的新技术、新思想,并与相关学科交叉渗透产生了许多分支学科,如生态遗传

学、生殖生态学、生理生态学、数学生态学、社会生态学等,这些新思想、新技术的引入使生态学的研究所涉及的领域更加广阔,不仅在个体、种群、群落和生态系统等层次上描述了生物体对不同生态环境的反应,而且还揭示了这些反应的机制。

未来生态学的发展趋势,一方面在方法论上,将注重宏观与微观研究的结合,向量化、模型化和工程化方向发展;另一方面是学科间的渗透将进一步得到加强,生态学与其他自然科学和社会科学的结合成为必然趋势。总体来说将更加重视人类活动对生态环境的影响和全球变化(祖元刚等,1997)。

当代生态学在方法论上对宏观现象机制的解释,最直接、最明确的方法之一是在生物分子水平上的解释。现代分子生物学实验技术对在生命活动中起重要作用的生物大分子蛋白质、核酸等已经能够明确地显示出结构和功能上的特点,其实验结果能为生态学研究中发现的问题提供分子机制方面的解释。所以,当代生态学研究引入了分子生物学的新技术和新思想,这两门学科相互渗透进而产生了有强大优势和广阔前景的新兴学科——分子生态学,该学科的形成标志是1992年英国生态学学会主办的杂志《分子生态学》杂志的创刊。分子生态学的产生是基于对影响生命活动的外界条件(生态因子)和执行生命活动的基本物质(生物大分子)综合分析的目的来研究生命与环境的关系,因而研究内容包括了宏观与微观两个不同的方面,既研究影响生命活动的外部原因,又研究生命本身对外界条件变化所产生的分子适应对策。

由于研究背景和所在学科不同,所以对分子生态学的解释也有很多。Burke等(1992)认为,分子生态学是运用分子生物学技术方法和思路研究生态学和种群生态学的新兴学科。Smith等(1994)则认为,分子生态学是分子生物学与生态学融合杂交而形成的新学科,是由生态学、遗传学、生物化学、分子生物学和生物化学工作者共同协作来解决以前难以解决的生物学及生态学问题,并认为分子生态学在解决原有问题的同时还应注重当地种或引入物种与环境的关系,以及重组或遗传改变了的生物体向野外环境释放所产生的生态学影响。我国学者在全国首届植物分子生态学研讨会上对分子生态学也进行了广泛而深入的讨论(阎秀峰和高亦珂,1997),认为分子生态学是应用分子生物学的实验手段,在分子水平上研究生命活动与生态环境间相互关系的一门科学,并强调其主要目的是揭示生命有机体对环境变化产生的在分子水平上的协调、适应机制。在向近敏等(1996)出版的《分子生态学》著作中把微生态的部分研究内容也归并为分子生态学的研究领域,从而延伸了分子生态学的内涵。

我国一些学者认为,分子生态学是利用分子生物学技术与方法研究生物对其所处环境的适应以及产生这种适应反应的分子机制。另一些学者则认为,分子生态学是应用分子生物学的技术和手段,在分子水平上研究生命活动和环境相互关

系的一门学科,研究目标是要揭示生命有机体在分子水平上对环境变化产生的响应。黄勇平和朱湘雄(2003)认为分子生态学是生态学与分子生物学相互渗透而形成的一门新兴交叉学科,也属于生态学分支学科之一,其特点是强调在生态学研究宏观现象与微观研究的紧密结合,其优势在于对生态现象的外界作用条件研究的同时还注意分析内部的作用机制。

分子生态学研究生态学的微观研究层次和领域,属于生态学的研究范畴,与普通的生态学不同点是它使用的是分子生物学原理、方法和技术,研究对象是各种生态现象和生态问题,研究层次在基因、酶等分子水平上,研究结论则用酶、基因等生物大分子的活动规律等来表述。分子生态学中的“分子”这一概念同种群生态学或群落生态学中的“种群”和“群落”一样,是生命系统的一个层次,因而只能是生物大分子。分子生态学研究对象中的“环境”不仅是指生物大分子所处的直接环境,即核内或胞内环境,还包括生物体内环境以及生物所处的宏观环境,它们之间的关系十分密切,所以分子生态学中的环境包括影响生物大分子的所有不同层次的环境。另外生物大分子直接接触的环境与传统意义上的环境也有很大区别,其中包括了生物大分子之间的相互作用,同时还包括生物小分子如激素等在信号转导过程中对生物大分子的作用等方面(戈峰, 2008)。

根据以上关于分子生态学的概念,可以看出,分子生态学并非是分子生物学技术在生态研究领域的简单应用,而是生态学和分子生物学相互交叉后的应用,代表着一个新兴的学科,它包含了在生物形态、遗传、生理、生殖等各个水平上的协调适应机制和研究中的取样策略(祖元刚等, 1999)。

二、主要研究内容

分子生态学研究的内容涉及生态学的许多领域,尤其是这些生态现象的微观活动,如种群的遗传结构和遗传多样性分析、物种形成的种系发生与进化的探讨。分子生态学是生态学的微观研究方向和领域,是在蛋白质、核酸等生物大分子水平上研究和解释有关生态学和环境问题的一门交叉学科。分子生态学主要揭示生态现象与生态规律的发生、演化和发展的分子过程与分子机制,研究基因、DNA、蛋白质等生物活性大分子的生命活动规律,解释生态变化和生态现象的规律。分子生态学在景观破碎化后种群生存力的分析、珍稀濒危物种种群的稳定性、转基因生物与转基因产物释放的生态风险评估等方面也有巨大的研究优势。另外,还可以通过分子生态学的研究对生态学中一些已有定论的问题进行修正和完善,生态学上许多原来尚未解决的或难以确证的课题得到了澄清或新的认识。总之,分子生态学自产生后就显示了其研究的特点和优势,其研究内容主要包括以下几个方面(龙应霞和刘洋, 2006; 黄勇平和朱湘雄, 2003; 张淑萍, 2001; 胡志昂和王

洪新, 1998; Burke et al., 1992)。

(1) 分子种群生物学。研究内容包括种群遗传学和进化遗传学、行为生态学、保育生物学等。在分子层面研究种群与进化的遗传学、行为生态学的机制和保护生态学的分子遗传依据。

(2) 分子环境遗传学。研究内容包括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等, 主要涉及种群生态学与基因漂移的分子证据、遗传工程改良生物体的环境生态效应、自然环境中生物的遗传物质交换与转移、物种间相互作用的分子机制。

(3) 杂交鉴定。研究内容包括自然条件下物种间是否发生杂交、对根据形态特性推断的中间型进行分子鉴定; 研究引进种或外来种是否通过杂交和渐渗杂交的方式适应新的环境, 并与本地种间是否发生杂交。包括对种间自然杂交和渐渗杂交的分子鉴定。

(4) 系统地理学研究。研究内容包括物种地理分布格局、迁移、定居、侵殖和再侵殖过程, 推断物种地理起源。

(5) 分子适应。研究内容包括环境对于基因表达的影响以及遗传分化与生理适应的分子遗传学机制, 即环境对遗传分化和生理适应、基因表达的影响。

(6) 分子生态学技术。主要是在分子生态学领域引入新研究方法和新理论, 或对原有方法进行改进, 如物种鉴定的分子技术、发明新的探针及研究种群的序列和引物等。

分子生态学的产生, 给过去其他经典的生态学难以解决或从未涉及过的问题提供了全新的研究方法。早期生态学的研究主要是在宏观领域, 如物种的个体、种群、群落和生态系统等, 所以观察到的从个体性状到生态系统之间的关系只能是表观特征。而真正决定这些表观特征的正是每一物种的遗传组成及与所处环境的综合作用, 因而引入分子生态学的理论和方法, 可使研究深入到生物体内的各种大分子以及这些分子在微环境中的作用, 进而从宏观与微观结合的角度真实地揭示出生态系统中生物个体和种群间关系的本质。分子生态学的研究, 一方面极大地丰富和发展了生态学原有的理论体系和学科内容, 另一方面它的研究往往针对现实中亟待解决的生态问题, 因而又具有重要的现实意义。它的研究范围非常广泛, 涉及的研究内容也十分丰富, 许多研究课题都是紧紧围绕着生态学领域的一些具有重大理论或现实意义的问题展开的, 所以分子生态学的研究热点是多方面的, 主要有以下几个方面的热点问题(黄勇平和朱湘雄, 2003; 李景文等, 2001)。

(1) 生态适应性的研究。即研究植物对水、温度、盐、重金属等非生物环境的分子反应以及对生物胁迫的反应(McKay et al., 2003; Coberly and Rausher, 2003; Weinig et al., 2003), 包括胁迫生境下植物数量性状的定位、热激反应的生态适应

等(Lexer et al., 2003; 曲桂芹, 2001)。

(2) 分子标记在分子生态学上的应用。近年来, 分子标记(RAPD、AFLP、SSR 和 SNP 等)在分子生态学上的应用很广泛, 分子遗传学的方法在研究行为生态学和种群生物学方面显得日益重要。

(3) 转基因生物释放的生态学评估。对重组生物提出生态预测, 追踪重组生物的存活、繁殖、扩散和对其他生物的影响是分子生态学关心的热点问题之一(Gueritain et al., 2002)。现在尚无遗传工程改良植物危害环境的直接证据, 但根据以往在引种、育种方面的经验, 以及遗传学、生态学及进化生物学等有关知识, 可以推论遗传工程生物释放于环境可能产生的潜在效应(康乐和张民照, 1995)。例如, 会产生有害生物危害生物群落, 改变生态系统过程甚至直接危害人类。虽然一些学者认为大多数遗传工程生物并不会带来大的风险, 然而人们并不能因此排除它们中的一部分会带来严重的后果。

(4) 保护生物学研究。生物多样性是保护生物学的核心。虽然遗传工程本身在技术上能够增加物种多样性, 但实际上将通过遗传工程改良后的生物投放环境后却会直接和间接将物种多样性减低。另外, 濒危物种的保护是一个被广泛关注的问题, 其研究内容涉及种群生态学、生殖生态学、生理生态学和遗传多样性等领域。在分子水平上揭示濒危植物的内在机制, 并结合宏观方面的研究, 通过综合分析以确定合理的保护措施, 是分子生态学研究关注的热点之一。

(5) 害虫的控制。对植物进行遗传工程改良来防治病虫害的同时, 也存在着转基因抗性植物对目标昆虫或病原物的选择压力, 进而打破原来生态系统的平衡, 使一些非目标性害虫可能在竞争中获得优势。分子生态学许多研究涉及对一些重要害虫进行 mtDNA 比较, 揭示害虫的生物型、生态型和物候型的生态学问题, 为害虫的预测和防控提供了重要的信息(Powers and Turk, 1989)。

(6) 植物行为生态学。到目前为止, 对动物行为生态学研究较多, 植物方面研究较少。有关植物行为生态学处于发展的初期。行为生态学的一个重要特点是把生态学同行为学、遗传学和进化理论结合在一起, 并引入经济学思想, 进行探索研究。分子生态学中所涉及的植物行为生态学研究热点包括: 植物花粉和种子传播、克隆繁殖植物的克隆结构及斑块形成机制、植物有性繁殖和无性繁殖的比例(杨持等, 2002)。

三、技术方法

在 *Molecular Ecology* 杂志上刊登了许多分子生态学的优秀论文, 涉及分子生物学实验技术、技术研究或生态学问题的解释。Schierwater 等(1994)编著的《分子生态学与进化: 方法与应用》(*Molecular Ecology and Evolution: Approaches and Application*)

详细介绍了在生态学、进化生物学、种群生物学、分子系统学及保护遗传学研究中常用的一些分子生物学方法的理论技术。

目前分子生态学主要是利用分子生物学的技术揭示生物大分子在生物个体、种群水平上的异同,因此 DNA 分子变异的研究和应用在分子生态学研究中有重要地位。主要目的是了解执行生命活动的重要生物大分子结构差异与地理种群间或种群内的环境差异的关系或规律,进而分析生物对不同环境在分子水平的适应机制。检测分子变异的技术手段主要包括:①等位酶(allozyme)技术;②DNA 分子标记技术,主要有随机扩增多态性 DNA(random amplified polymorphic DNA, RAPD)、限制性片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism DNA, RFLP)、扩增的限制片段长度多态性(amplified fragment length polymorphism DNA, AFLP)、简单重复序列(simple sequence repeat, SSR,也称微卫星 DNA)、简单序列区间扩增(inter-simple sequence repeat, ISSR)、序列特征化扩增区域(sequence characterized amplified regions, SCAR)、序列标记位点(sequence tagged site, STS)、酶切扩增多态性序列(cleaved amplified polymorphism sequences, CAPS)、DNA 指纹图谱(DNA amplified fingerprinting, DAF)、DNA 测序(DNA sequence)技术等(何田华和葛颂, 2001)。

对分子标记技术的选择要根据所需解决的问题来定,并非所采用的分子标记方法越新、越难就越好。对于种群水平的研究,灵敏的分子标记能提供更多的信息,能够检测其中的多样性水平及其种群间的相互关系,但要求所获得的信息应该重复性好、稳定性高、可比性高,同时利于种群的遗传结构、等位基因频率以及种群间的遗传分化研究等,并要求便于统计分析,适合这类分析的方法有等位酶、RFLP、RAPD、SSR 等。STS、SCAR、CAPS 主要在遗传育种领域用于辅助选择和图谱的构建;STS 结果稳定可靠,可作为比较遗传图谱和物理图谱的共同位标;SCAR 标记是显性遗传,可以快速检测大量个体,结果稳定性好、重现性高,待检 DNA 间的差异可直接通过有无扩增产物来显示,被广泛用于辅助选择、构建遗传图谱等;CAPS 是一类共显性分子标记,优点是避免了 RFLP 分析中膜转印这一步骤,又保持了 RFLP 分析的精确性。另外,由于很多限制性内切核酸酶均可对扩增 DNA 酶切,所以检测到多态性机会较大,广泛用于植物基因的分型、定位、图位克隆和分子鉴定等方面的研究,是大多数植物遗传育种领域检测 DNA 多态性的首选技术。与之相比内转录间隔区(internal transcribed spacer, ITS)、18S rDNA(18S rRNA 基因)等的 DNA 序列片段相对保守,在个体间很少发生变化,更适于分析物种水平以上类群之间的差异。

但实际操作时,很难划定这些不同的测定位点和分子标记的选取界线,所以根据具体的研究对象和研究目的来决定分子标记时应考虑效率和费用,同时也要考虑分析 DNA 片段或 PCR 扩增产物的流程,几种分子标记的特点对比见表 1-1。

表 1-1 植物种群研究中分子标记的对比分析

标记名称	RFLP	RAPD	AFLP	SSR	ISSR	SCAR	STS	CAPS
创立者及年代	Grodzicker et al., 1974	Welsh et al., 1990	Zebeau and Vos, 1993	Litt et al., 1989	Zietkiewicz, 1994	Paran, 1993	Olson, 1989	Akopyanz, 1992
主要原理	限制性酶切 Southern 杂交	随机 PCR 扩增	限制性酶切 PCR 扩增	PCR 扩增	随机 PCR 扩增	特异 PCR 扩增	特异 PCR 扩增	PCR 扩增产物 限制性酶切
核心技术	电泳及分子杂交	电泳及 PCR	电泳及 PCR	电泳及 PCR	电泳及 PCR	电泳及 PCR	电泳及 PCR	电泳及 PCR
技术难度	中	较高	高	高	较高	较高	高	高
探针或引物 来源	特定序列 DNA 探针	9-10bp 随机引物	特定引物	特异引物	以 2-, 3-, 4 核苷酸为基元的不同 的重复次数作为 引物	RAPD 特征带测 序设计的特异 引物	RFLP 探针序列, Alu-因子, YAC, Cos-mid 插入末端序 列设计引物	特异引物
基因组中 丰富度	中等	很高	高	高	高	中等	中等	中等
多态性水平	中等	较高	非常高	高	高	高	中等	中等
检测基因组 区域	单/低拷贝区	整个基因组	整个基因组	重复序列	重复序列间隔的 单拷贝区	整个基因组	单拷贝区	整个基因组
可检测座位数	1-4	1-10	20-100	1-5	0-50	1	1	1
可靠性	高	中	高	高	高	高	高	高
遗传特性	共显性	显性/共显性	共显性/显性	共显性	显性/共显性	共显性	显性/共显性	共显性
DNA 质量 要求	高 5-30pg	中 10-100ng	很高 50-100ng	中 10-100ng	中 2-100ng	中 5-100ng	高 50-100ng	高 50-100ng
序列信息	否	否	否	需	否	需	需	需
放射性同位素	通常用	不用	通常用	不用	不用	不用	不用	不用
实验周期	长	短	较长	短	短	短	短	短
开发成本	高	低	高	高	低	高	高	高

资料来源: 阮成江等, 2005。

四、展望

分子生态学的发展通过寻找新的遗传标记,将会进一步扩充研究的内涵与外延。21 世纪在完成人类、水稻(*Oryza sativa*)、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)等生物的基因组测序之后,生命科学在基因组科学研究所积累的数据和研究平台上将会得到突飞猛进的发展。基因组学的发展为人们认识生命科学的奥秘打开了一扇窗口,但要更好地利用基因组,就离不开分子生态学。人类在认识和改造宏观世界的过程中认识到合理利用资源和保护环境的重要性,因而在微观方面也汲取教训,在研究任何基因时都要注意基因与环境的关系及对环境的影响。

分子生态学在 21 世纪的生态学研究中将占很大的比重,将在生物生态学规律的机理、生物种群行为和自我调节机制、生物的适应性和物种形成机制、生物与环境相互作用关系、协调人与自然的关系等领域取得重大进展和突破(阮成江等, 2005)。

总之,分子生态学将从更高层次规范人类的行为,真正地从生命的本质和大统一的角度去协调人与自然的关系。

第二节 植物分子生态学研究方法

一、分子标记及其发展

广义的分子标记包含蛋白质标记和 DNA 标记。在分子生物学的形成与发展过程中,蛋白质的研究应用早于 DNA,其相关标记手段在植物分子生态学研究中的应用也是如此。典型的蛋白质分子标记出现于 20 世纪 60 年代,即等位酶标记,该方法曾被广泛应用于种群生态学中的种群内与种群间等位基因频率的确定、种群适合度以及种群间分异度的研究,并获得了巨大成就。但由于等位酶保守性高而缺乏足够的变异,非常有限的信息量在研究种群内个体间的遗传关系时受到局限(邹喻苹等, 2001)。

狭义的分子标记仅指 DNA 标记。RFLP 标记是出现较早的 DNA 分子标记,它是通过限制性内切核酸酶切割 DNA 产物的差异来显示样本间的差异,始于 20 世纪 70 年代。此后产生的更多的 DNA 分子标记是以 DNA 聚合酶链式反应技术为前提的。1983 年,美国科学家 Mullis 发明了体外快速扩增特定基因或 DNA 序列的方法,该技术在分子生物学领域掀起了一次革命,还直接推动了生态学、考古学等许多学科领域里研究手段的革新,并在此基础上先后又出现了 RAPD 标记、AFLP 标记及 SSR 标记等。

DNA 分子标记弥补了蛋白质标记信息量有限的缺点。选择合适的技术手

段甚至可以检测到种内个体间单个核苷酸碱基的差异,而且 DNA 标记所代表的遗传特征在同一生物体的各个生长发育时期和不同器官中都是稳定的,消除了个体本身蛋白质表达差异的影响。DNA 分子标记比蛋白质分子标记和其他植物形态标记具有以下优点:①不受植物生长发育时期的影响;②取样没有组织器官差异性;③与基因表达与否无关;④DNA 分子标记的数量几乎是无限的;⑤当 DNA 分子标记是共显性标记时,可对隐性经济性状进行选择;⑥不受环境因素影响。同时用于 DNA 标记分析实验所需材料量很少,配合 PCR 扩增时,仅需纳克(ng)级水平的 DNA,并且材料易于获得,从化石到活体都可以得到。

DNA 标记手段虽然发展较晚,但在研究领域的应用远比蛋白质标记更快。可以根据研究的目和自身实验室条件,选择合适的分子标记手段。不论什么样的分子标记都是通过一定的方式来显示生物本身所具有的分子特征,进而揭示物种间的遗传特性和亲缘关系,并进一步推测物种在时空上的分布与进化规律以及生物与环境之间的相互作用和影响。

二、植物分子生态学研究中的常用技术

植物分子生态学是应用分子生物学的研究手段来解决植物生态学领域的问题。分子标记虽然形式多样、各具特点,但在植物分子生态学研究过程中应用的原理却是一致的。下面对植物分子生态学研究中的常用技术进行简单介绍(阮成江等, 2005)。

(一) 蛋白质标记

蛋白质标记的发展基础是蛋白质具有多态性。蛋白质分析程序一般都包含蛋白质的提取、分离纯化和分析三大步骤。蛋白质的提取主要是通过机械或化学手段使细胞破碎后蛋白质能溶解在提取介质中,根据不同蛋白质(包括酶)在不同的溶解介质中的溶解特性差异将不同蛋白质初步分离,如溶解在水、稀盐、稀酸、稀碱和有机溶剂中,然后通过蛋白质的盐析、等电点沉淀、透析、超滤、凝胶过滤、电泳、离子交换色谱、亲和色谱等进一步分离纯化。在以往的植物分子生态学研究中,等位酶(allozyme)分析技术是应用最广的蛋白质分子标记手段,等位酶作为遗传标记在分子生物学应用中的研究开始于 20 世纪 60 年代,并曾在多个领域因取代形态标记而获得了巨大的成就。在同一基因位点上不同等位基因编码的同种酶的不同分子形式称为等位酶,等位酶的组成是由遗传决定并且不受环境的影响,该酶谱的变化实际上反映的就是基因型的差异,即等位基因及位点的变化。等位酶分析技术由于操作简单,该分析手段仍在某些领域被广泛使用。