

应用同工酶鉴定黑松林内变异 类型的遗传特性

杨自湘

(中国林业科学研究院林业研究所)

关键词 同工酶; 变异类型; 分类学杂种; 遗传标记

黑松(*Pinus thunbergii* Parl.)原产于日本,引入我国山东烟台沿海地区已有70多年历史^[1],生长优于当地的赤松(*Pinus densiflora* Sieb. et Zucc),抗松干蚧的能力高于赤松。解放后,黑松成为营造海防林的主要造林树种。在选材的黑松林内,约有90%以上的个体是黑松,另有不足10%个体的干形、皮色、树皮开裂、叶形、叶色、冬芽大小、颜色……等都不程度上区别于黑松。李广武等人在这些黑松变异株中选一种形态在黑松与赤松之间的新类型。其抗虫能力近似黑松,生长速度却高于赤松与黑松^[2]。本文目的是希望通过应用同工酶作为“遗传标记”鉴定黑松林内各种变异株及新类型的遗传性,确定它们的起源,为在今后推广中决定采用繁殖方法和提出人工生产同类杂种的可能性。

黑松与赤松都属松科(*Pinaceae* Lindl.)双维管束亚属(Subgen. *Pinus*)油松组(Sect. *Pinus*)。油松组内种间可能产生杂种。日本报道发现赤松与黑松的天然杂种^[3],中国黄松是黑松×马尾松的天然杂种,叶培忠教授还用人工授粉进行了证明^[4]。在山东、辽宁省还发现过油松(*Pinus tabulaeformis* Carr.)与黑松的天然杂种^[5,6]。

从现代生物学的观点可知,同工酶是基因直接表达的产物。同工酶作为“遗传标记”,已成功用于生物学的许多方面,尤其用于属间、种间及品种间人工杂种的鉴定,其方法简便准确^[7,8,9,10,11]。

一、材料*与方法

(一) 材 料

1986年元月在山东省烟台地区北海林场的15年生人工黑松林内,选取黑松11株和李广武等所确认的抗虫优良新类型11株,同时同一林分内选取19株不同于一般黑松的各种形态变异株。另外在附近的人工赤松林内,选取11株赤松。上述材料均采一年生小枝上的针叶作为过氧化物同工酶液的提取材料。黑松的针叶粗硬,深绿色;冬芽大,圆柱状,长椭圆形或圆柱形,银白色;一年生小枝淡黄褐色。赤松针叶较细柔,色嫩绿;冬芽小,矩圆状卵圆形,暗红褐色;一年生小枝淡黄红色^[4]。19个形态变异株的针叶、冬芽及一年生小枝皮色都变异在黑松与赤松之间。将这19个变异株按上述几种形态编号(1—19号)。由倾向黑松型,逐渐

本文于1988年1月13日收到。

* 试材由李广武、霍玉林同志提供,致以谢意。

编排至倾向赤松型。

在同一林分内分别在黑松及黑松新类型单株上各采种20粒，另在赤松林内单株赤松上采种20粒。以休眠种子作为酯酶同工酶的酶液提取材料。

(二) 方法

采用垂直板聚丙烯酰胺凝胶电泳(浓缩胶浓度2.5%，分离胶浓度7.5%)分离同工酶，改良联苯胺染色法染色，分析针叶的过氧化物同工酶；用α-醋酸萘酯作底物分析种子的酯酶同工酶；用徒手横切针叶，观察黑松林内19株形态变异株的针叶树脂道着生位置及数目。

二、结果与讨论

(一) 过氧化物同工酶

1. 11株黑松的过氧化物同工酶表现两种酶谱(图1, 1—2)，其差异在于第1种酶谱具有B带，第2种酶谱没有B带。有10株表现第1种酶谱，占总数91%；有1株表现第2种酶谱，占总数9%。

2. 11株赤松只表现一种酶谱(图1, 3)，没有B带，比黑松多了C'、D、E、F四条酶带。

3. 11株黑松新类型只表现一种酶谱，具A、B、C'、C、D、E、F七条酶带(图1, 4)，正好是黑松与赤松酶带的互补。

4. 19个黑松形态变异株的酶谱排列于图2。第1、2、3号变异株的酶谱完全同于黑松的酶谱，其它变异株的酶谱呈现出从黑松到赤松的酶谱的一系列连续变异形式，其酶带是黑松与赤松的酶带的不同形式的互补。

11株黑松表现出两种酶谱，这是因为黑松种群具有同工酶的多形性，种群内性状的多形性是普遍存在的，这里只是为了寻找黑松的代表酶谱，并不去研究黑松同工酶的多形性与出现频率，所以采用以黑松的第1种酶谱为种的代表酶谱，进行分析比较。



图1 黑松、赤松及黑松新类型的过氧化物同工酶谱
■染色深
▨染色浅
---染色极浅
1—2、黑松 3、赤松 4、黑松新类型

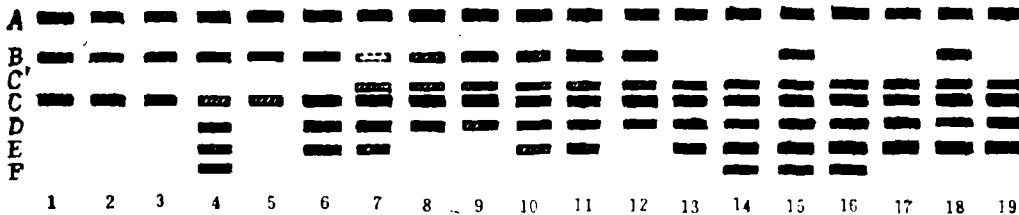


图2 黑松林内19个变异单株的过氧化物同工酶谱

过氧化物同工酶是受等位基因控制的共显性遗传的等位酶，其双亲酶带可同时互补出现在子代酶谱上^[12,13]，黑松新类型酶谱表现为黑松与赤松的酶带互补，说明新类型是黑松与赤松的种间杂种。分类学家在论述种间杂种群时认为，如果两个种之间发生杂交，并多次回交，使得一个种的某些基因或基因组合穿越种间不完全受阻，而转入到另一个种基因组中

去。因而形成一个外形处于双亲之间的不同程度、不同面目的杂种群^[14]。据北海林场负责人介绍，供试材的黑松人工林是用附近的早一代黑松人工林中大树种子营造的，而早一代的黑松林又是由山东半岛其它地方引种而来。现已很难弄清取试材的林分与最初引入中国黑松间的系谱关系。由于黑松与赤松在山东总是交叉种植，这就提供了黑松与赤松杂交与回交的可能。19个变异株的酶谱表现出黑松与赤松酶带的不同程度、不同面目的互补，说明它们是黑松、赤松种间的多次交配的杂种群。因而可以推定黑松新类型是杂种群中的一部分。

(二) 酯酶同工酶

1. 黑松的20粒种子表现的酶谱(图3, 1), 具有 A₁、A₂、A₃ 酶带。

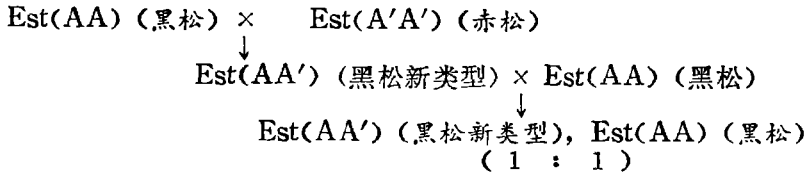
2. 赤松的20粒种子表现的酶谱(图3, 2), 没有 A₁, 多了 A₄ 酶带。

3. 黑松新类型的20粒种子表现出以上二种酶谱(图3, 3—4), 其中有9粒种子表现为第3种酶谱, 有11粒种子表现为第4种酶谱。第3种酶谱就是黑松的酶谱, 第4种酶谱是黑松与赤松酶谱的互补, 同时具有 A₁、A₂、A₃、A₄ 四条酶带。



图3 黑松、赤松及黑松新类型的酯酶同工酶谱
1. 黑松 2. 赤松
3.—4. 黑松新类型

酯酶同工酶与过氧化物同工酶一样也是受等位基因控制, 共显性遗传的同工酶^[12,13]。黑松新类型表现了两种酶谱, 其比率为 1:1.22, 近似 1:1。因而可推论: 新类型是黑松与赤松的杂种, 在它们与黑松回交后, 其子代发生分离, 基因型组合按下图方式进行:



前面材料一节已指出, 20粒黑松种子与20粒黑松新类型种子都采自同一林分。黑松的20粒种子只表现一种酶谱, 说明其母本——黑松控制酯酶同工酶的等位基因是纯合子, 即雌配子间遗传性一致; 其父本——林中自由飞散的花粉粒间控制酯酶同工酶的等位基因也是相同的, 都是纯黑松的花粉。因而新类型所接受的花粉也应是纯黑松花粉, 新类型的子代酯酶谱发生 1:1 的分离是因为其母本——黑松新类型是杂合子, 杂合酶谱是黑松与赤松的互补, 说明新类型就是黑松与赤松的种间杂种。为什么黑松林内有不足10%的形态变异个体, 而林中飞散的花粉仍主要是黑松花粉, 这可能是因为种间杂种产生的花粉少、育性低造成。再加之变异单株数也少, 因而取样不多的种子所接受的花粉都是来自黑松, 这并不排除林中还会存在非纯黑松的花粉。黑松林内花粉粒间遗传性的差异不是本文要探讨的问题。

(三) 针叶树脂道的观察

据李广武等人观察^[2], 黑松的树脂道为中生, 2—7个, 赤松的树脂道为边生, 2—8个, 与中国植物志^[4]描述基本一致。他还观察到黑松新类型的树脂道为混生。我们观察19个变异单株的树脂道的结果见表1。

从表1中可看出样品1、2、3号的树脂道为中生, 2—5个, 与黑松的树脂道着生情况一

表1 19个不同变异单株的树脂道着生情况

样品号		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
树脂道	中生(个)	2	4	4	5	3	2	6	4		3	4	2	3	7	4	3			
	边生(个)							1	2	6	1				2		5	7	5	6

致；17、18、19号的树脂道为边生，5—7个，与赤松的树脂道着生情况一致；7、8、9、10、14、16号的树脂道中生、边生都有，这些变异单株树脂道着生位置特性与过氧化物同工酶谱以及外部形态表现基本吻合，与李广武等人的观察一致。而样品4、5、6、11、12、13、15号的树脂道着生位置为中生，表现为黑松的特点，与它们的外部形态及过氧化物同工酶谱的中间型不一致，由此看来树脂道性状比较保守。

本研究可作如下结论和建议：①黑松引入山东半岛后由于一直与赤松交叉种植，它们之间已产生一部分天然种间杂种群，而黑松新类型是该杂种群中的优良个体，具有速生、抗虫特性，值得推广。由于它们是杂种起源，所以在推广时一定要用无性繁殖方法保持其种性，才能达到预期经营效果。如果采集新类型的种子繁殖，其后代中将有一半的个体恢复原黑松特征。②由于本研究已证明黑松林中的一些优异个体为黑松与赤松的天然杂种，建议最好用人工控制授粉，选配该两种松树的配合力高的组合，大量生产一代天然杂种应用于生产。③如直接应用新类型的种子造林，应研究在苗圃中早期识别杂种，淘汰原始种的技术，或造林后结合间伐，伐去那些典型的黑松类型，保留杂种，以提高林分生产力与抗虫能力。

参 考 文 献

- [1] 吴中伦等, 1983, 国外树种引种概论, 科学出版社, 147—148。
- [2] 李广武等, 1987, 黑赤松及其对松干蚧、松毛虫抗性的研究, 辽宁林业科技, (2), 4—8。
- [3] 柴田勝, 1981, アカマツ, クロマツおよびその種間交雑種江に関する遺伝, 育種学研究, 林木の育種(120) 4—9。
- [4] 中国科学院中国植物志编辑委员会, 1978, 中国植物志, 科学出版社, 7: 270—272。
- [5] 山东省林科所等, 1979, 三个松类优良自然类型, 山东林业科技, (2), 19—22。
- [6] 烟台地区林科站, 1980, 黑松优良类型调查初报, 烟台林业科技, (1), 17—19。
- [7] 时兴春, 1984, 杂种栗树过氧化物同工酶分析, 林业科技通讯, (8), 9—10。
- [8] Schiavo, F. Co., et., 1983, Identifying natural and parasexual hybrids, isozymes in plant genetics and breeding, Part A (Tanksley, S. D. et., Editors) Elsevier Science Publishers B. V. Amsterdam, 305—312。
- [9] 田岛正啓等, 1977, ヒ, キパーオキシダーゼ・アイソザイムの遺伝分析, 日本林学会誌, 59(5):173—177。
- [10] Arulsekar, S. et., 1985, Isozyme gene markers in juglans species, The Journal of Heredity, 76(2):103—106。
- [11] Parfitt, D. E., et., 1985, Identification of Plum × Peach hybrids by isoenzyme analysis, Hortscience, 20: 246—248。
- [12] Титов А. Ф., 1978 Генетика растительных изоферментов, Успехи Современной Биологии, 85 3, 325—339。
- [13] Полозова Л. Я., 1978, Исследование изоэнзимных спектров как метод изучения структуры популяций древесных пород, научные основы селекции хвойных древесных пород, Издательство, "Наука" 99—114。
- [14] 斯特斯, C. A., 1980(韦仲新等译, 1986), 植物分类学与生物系统学, 科学出版社, 158—178。

USE OF ISOZYME TO IDENTIFY THE INHERITANCE CHARACTERISTICS OF VARIOUS FORMS IN A *PINUS* *THUNBERGII* PARL. PLANTATION

Yang Zixiang

(The Research Institute of Forestry CAF)

Abstract

The pattern of isoperoxidase and isoenzyme separated by gel electrophoresis were applied as "genetic marker" to study various forms collected from a *P. thunbergii* plantation in Shandong province, which has been introduced for over 70 years and is near to a *P. densiflora* plantation.

14 various isoperoxidase patterns have been found in 19 various forms of *P. thunbergii*, which show a combination of different degree and manner of both *P. thunb* and *P. densif*. A new form of *P. thunb* selected from those possesses a resistance to *Matsucoccus matsumurae* (Kwana) and *Dendrolimus spectabilis* Butter better than *P. thunb*. Its isoperoxidase pattern of the needles possesses complementary bands of both *P. thunb* and *P. densif*. Its isoenzyme pattern of seeds is segregated into two parts: 1/2 pattern of the new form and 1/2 pattern of *P. thunb*. All of these come to a conclusion that there are various forms of taxonomic hybrid of *P. thunb* and *P. densif* in the plantation.

Key words: isozyme; various form; taxonomic hybrid; genetic marker

“杨树杂交胚胎学研究”通过成果鉴定

由国家自然科学基金资助, 中国林科院林研所李文钿研究员主持的“杨树杂交胚胎学研究”课题, 历经三年, 于3月23日, 在中国林科院主持下通过了成果鉴定。鉴定委员有中国科学院植物所、遗传所, 北京大学, 北京、南京、东北林业大学, 国家基金委, 林业部科技司和中国林科院的知名专家、教授和有关领导。在评审中一致认为, 本项研究观察了杨树的有性生殖过程的形态发生; 查明了杂交时花粉在异种柱头上的异常行为、受精作用以及获得了一些杂种植株; 研究了种间远缘杂交失败的胚胎原因; 提出了克服不孕性的可能途径; 并对杨树杂交亲本作鉴定和分类。同时认为, 该项研究目的明确, 工作量大, 观察细致, 已达到杨树杂交胚胎学研究的国际水平。

(影)