

基于 SSR 标记的 8 个山荆子 居群遗传多样性和遗传关系分析

王雷宏¹, 郑玉红², 汤庚国³

[1. 安徽农业大学林学与园林学院, 安徽 合肥 230036; 2. 江苏省·中国科学院植物研究所(南京中山植物园), 江苏 南京 210014;
3. 南京林业大学森林资源与环境学院, 江苏 南京 210037]

摘要: 采用 10 对 SSR 引物对 8 个山荆子 [*Malus baccata* (L.) Borkh.] 居群 140 个单株的基因组总 DNA 进行 PCR 扩增, 并据此对 8 个居群的遗传多样性和遗传关系进行了分析。结果表明: 用 10 对 SSR 引物共扩增出 91 条带, 多态性条带百分率达 100.00%。8 个居群的遗传多样性参数差异较大, 有效等位基因数为 1.437 9~1.535 0, Nei's 基因多样性指数为 0.256 0~0.309 2, Shannon 信息指数为 0.376 7~0.459 2, 多态性条带百分率为 64.84%~85.71%。居群间的有效等位基因数为 1.616 9, Nei's 基因多样性指数为 0.355 1, Shannon 信息指数为 0.528 5, 均明显高于居群内; 8 个居群间的基因流为 1.739 5, 基因分化系数为 0.223 3, 显示居群间的基因交换较多。UPGMA 聚类分析结果表明: 在 Nei's 遗传距离 0.148 6 处, 8 个居群被分为 3 组, 河北塞罕坝居群单独为一组, 山西五台山居群和北京东灵山居群为一组, 其余 5 个居群为一组。据此推测: 山荆子起源于中国华北和东北地区, 山西灵空山、黑龙江小兴安岭、吉林长白山和山西中条山居群可能是其遗传多样性的核心居群。

关键词: 山荆子; 居群; 遗传多样性; 遗传关系; SSR 标记; 聚类分析

中图分类号: Q946-33; S661.9 文献标志码: A 文章编号: 1674-7895(2012)01-0042-05

Analyses of genetic diversity and genetic relationship of eight populations of *Malus baccata* based on SSR marker WANG Lei-hong¹, ZHENG Yu-hong², TANG Geng-guo³ (1. School of Forestry and Landscape of Architecture, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China; 2. Institute of Botany, Jiangsu Province and the Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210014, China; 3. College of Forest Resources and Environment, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2012, 21(1): 42-46

Abstract: PCR amplification of total genomic DNA from 140 individuals of eight populations of *Malus baccata* (L.) Borkh. was carried out by using ten pairs of SSR primers, and hereby, their genetic diversity and genetic relationship were analyzed. The results show that there are totally 91 bands amplified by ten pairs of SSR primers and percentage of polymorphic band is 100.00%. The difference of genetic diversity parameters of eight populations is great, and effective number of allele is 1.437 9-1.535 0, Nei's gene diversity index is 0.256 0-0.309 2, Shannon information index is 0.376 7-0.459 2, percentage of polymorphic band is 64.84%-85.71%. The effective number of allele, Nei's gene diversity index and Shannon information index among eight populations are 1.616 9, 0.355 1 and 0.528 5, respectively, which is obviously higher than those within population. The gene flow and gene differentiation coefficient of eight populations are 1.739 5 and 0.223 3, respectively, indicating that the gene exchange among populations is more. The result of UPGMA cluster analysis shows that eight populations of *M. baccata* are divided into three groups where Nei's genetic distance is 0.148 6. In which, the population in Saihanba of Hebei Province is a group individually, two populations in Mt. Wutai of Shanxi Province and Mt. Dongling of Beijing City are a group, the other five populations are a group. Based on these results, it is presumed that *M. baccata* is originated from the North and Northeast of China, *M. baccata* populations in Mt. Lingkong of Shanxi Province, Xiaoxing'anling of Heilongjiang

收稿日期: 2011-01-19

基金项目: 安徽省自然科学基金资助项目(10040606Q18)

作者简介: 王雷宏(1977—), 男, 山西五台人, 博士, 讲师, 主要从事树木学教学与科研工作。

Province, Mt. Changbai of Jilin Province and Mt. Zhongtiao of Shanxi Province may be core populations of genetic diversity.

Key words: *Malus baccata* (L.) Borkh.; population; genetic diversity; genetic relationship; SSR marker; cluster analysis

山荆子 [*Malus baccata* (L.) Borkh.] 是苹果属 (*Malus* Mill.) 脱萼组 (Sect. *Gymnomeles* Koehne) 种类中分布范围最广的一个种, 集中分布于中国, 为东亚分布型, 是典型的多型性发达种^[1]。山荆子生长速度快、易繁殖, 与苹果 (*M. pumila* Mill.) 嫁接后亲和力强、耐寒性强, 是东北、华北和西北山区苹果嫁接的主要砧木材料; 山荆子花、果美丽, 果实、种子、嫩叶和木材等均具有很高的经济价值, 是苹果属的珍贵野生植物资源^[2]。有关该种形态变异、遗传多样性等方面的研究表明: 山荆子居群间的遗传分化和亲缘关系较为复杂^[3-6]。Nei^[7]认为: 物种表型进化是由相互作用的基因突变引起的, 不同分类等级物种的表型多样性是新突变和遗传基因的累积产物, 新突变基因通过自然选择和基因漂变被纳入基因组中并产生遗传保守性, 从而影响表型进化的方向; Rouzine 等^[8]通过对植物的病毒学实验, 认为: 低多样性居群受中性变异控制, 高多样性居群受自然选择控制, 不同物种的遗传变异差异明显。因此, 探明山荆子的居群遗传

结构和遗传分化规律及地理居群的多样性是阐明其系统进化和演化的主要途径, 对山荆子的物种起源和遗传进化研究具有重要意义。

作者采用 SSR 标记技术对山荆子主要分布区的 8 个居群 140 个单株的遗传多样性、居群遗传结构以及居群间的亲缘关系进行了分析, 以期为该种的起源和地理演化规律研究提供一定的实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料

选取分布于黑龙江、吉林、河北、山西和北京等地的 8 个山荆子居群进行取样, 各居群的概况见表 1。每个居群随机选取 20 株以上生长状况良好的植株作为样株, 总株数不足 20 株的居群则全部选为样株, 8 个居群共计 140 个样株。在样株上采集健康的幼嫩叶片, 用变色硅胶迅速干燥并带回实验室, 常温条件下保存、备用。

表 1 供试的 8 个山荆子居群概况

Table 1 Status of eight populations of *Malus baccata* (L.) Borkh. tested

居群编号 No. of population	采集地 Locality	经度/(°) Longitude	纬度/(°) Latitude	海拔/m Altitude	样株数 Number of sample individual
1	河北塞罕坝 Saihanba of Hebei Province	E 117.51	N 42.30	1 400	21
2	山西灵空山 Mt. Lingkong of Shanxi Province	E 112.09	N 36.65	1 550	33
3	黑龙江小兴安岭 Xiaoxing'anling of Heilongjiang Province	E 129.39	N 47.73	296	12
4	山西管涔山 Mt. Guancen of Shanxi Province	E 111.98	N 38.67	1 545	10
5	吉林长白山 Mt. Changbai of Jilin Province	E 127.49	N 42.24	1 190	18
6	山西中条山 Mt. Zhongtiao of Shanxi Province	E 111.69	N 35.42	1 200	23
7	山西五台山 Mt. Wutai of Shanxi Province	E 113.77	N 38.76	1 600	10
8	北京东灵山 Mt. Dongling of Beijing City	E 115.48	N 40.01	1 300	13

1.2 方法

参照 Doyle 等^[9]的 CTAB 法提取叶片基因组总 DNA。将获得的 DNA 溶解于灭菌双蒸水中, -20 °C 贮存、备用。根据文献^[10-12]确定 30 对引物进行扩增反应预实验, 通过预实验筛选出扩增条带丰富、信号强的 10 对引物用于 SSR 扩增反应。引物均由上海英骏生物工程技术有限公司合成。

采用 PE-9700 PCR 仪(美国 GeneAmp 公司)进行 SSR-PCR 扩增反应, PCR 反应相关试剂均购自宝生物工程(大连)有限公司。反应体系总体积 10 μL, 包含 0.4 μmol · L⁻¹ 的 dATP、dGTP、dCTP 和 dTTP, 1 × Taq DNA 聚合酶缓冲液(含有 10 mmol · L⁻¹ Tris-HCl、50 mmol · L⁻¹ KCl 和体积分数 0.1% Trion X-100, pH 8.4), 2.5 mmol · L⁻¹ MgCl₂, 0.5 U Taq DNA

聚合酶, 20 ng 模板 DNA, 0.4 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 上下游引物, 双蒸水补足至 10 μL 。扩增程序为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 4 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ ~ 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 共 35 个循环反应; 最后于 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。扩增产物置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存。

用质量体积分数 10% 的聚丙烯酰胺凝胶对扩增产物进行电泳检测, 采用 50 bp Marker [购自宝生物工程(大连)有限公司] 进行分子量标记, 电压 240 V, 电泳时间 1 h。电泳结束后用银染法染色, 染色方法为: 凝胶先用体积分数 10% 乙醇和体积分数 0.5% 冰乙酸混合溶液固定 12 min, 然后用质量体积分数 0.2% AgNO_3 水溶液处理 12 min; 水洗后用含质量体积分数 1.5% NaOH 、体积分数 0.4% 甲醛和质量体积分数 0.02% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 的混合液显色 5 ~ 10 min, 至谱带清晰为止。染色结束后, 将凝胶用自来水冲洗干净, 用 FR-200A 凝胶成像系统(上海复日科技有限公司) 观察电泳结果并拍照。

表 2 8 个山荆子居群的 SSR-PCR 扩增结果

Table 2 Amplified results of SSR-PCR of eight populations of *Malus baccata* (L.) Borkh.

引物 Primer	5'→3' 序列 5'→3' sequence		退火温度/ $^{\circ}\text{C}$ Annealing temperature	扩增条带数 Number of amplified band	多态性条带数 Number of polymorphic band
	上游序列 Forward sequence	下游序列 Reverse sequence			
CH02a08	GAGGAGCTGAAGCAGCAGAG	ATGCCAACAAAAGCATAGCC	60	11	11
CH02b12	GGCAGGCTTTACGATTATGC	CCCCTAAAAGTTCACAGGC	60	13	13
CH04e03	TTGAAGATGTTTGGCTGTGC	TGCATGTCTGTCTCCTCCAT	60	9	9
CH04g09	TTGTGCGACAAGCCAGTTTA	GAAGACTCATGGGTGCCATT	60	11	11
GD96	CGGCGGAAAGCAATCACCT	GCCAGCCCTCTATGTTCCAGA	55	11	11
GD100	ACAGCAAGGTGTGCGGTAAGAAGGT	TGCGGACAAAGGAAAAAAAAAAGTG	55	8	8
Hi01d06	GGAGAGTTCCTGGGTCCAC	AAGTGCACCCACACCTTAC	60	9	9
Hi04d02	TTCGTGGCTGAGAAAGGAGT	GTTTGTACGGTGCATTGTGAAAG	60	9	9
Hi04f09	ACTGGGTGGCTTGATTTGAG	GTTTCAACTCACACCCTCTACATGC	60	6	6
U78949	TTTGTCTACTCTGATCTTAACCAA	CAGCATCGCAGAGAACTGAG	60	4	4

2.2 居群的遗传多样性分析

根据 SSR 标记分析结果得出的 8 个山荆子居群的遗传参数见表 3。由表 3 可知: 吉林长白山山荆子居群的有效等位基因数最大, 为 1.535 0; 山西中条山山荆子居群的 Nei's 基因多样性指数和 Shannon 信息指数最高, 分别为 0.309 2 和 0.459 2; 河北塞罕坝居群的有效等位基因数和 Nei's 基因多样性指数最低, 分别为 1.437 9 和 0.256 0; 山西管涔山居群的 Shannon 信息指数最低, 为 0.376 7。吉林长白山居群和山西中条山居群的多态性条带最多, 均为 78 条; 山西五台山居群的多态性条带最少, 仅 59 条。从居群

1.3 数据分析

人工判读条带, 并应用 POPGENE v1.31 软件^[13] 计算等位基因数、有效等位基因数、Nei's 基因多样性指数、Shannon 信息指数和多态性条带百分率; 基于等位基因频率, 在假设遗传平衡的条件下, 计算居群间的基因分化系数 (G_{st}) 和基因流 (N_m), 并用 UPGMA 法进行聚类分析。

2 结果和分析

2.1 SSR 扩增结果分析

采用 10 对 SSR 引物对 8 个山荆子地理居群 140 个单株的基因组总 DNA 进行 SSR 扩增, 引物的序列及扩增结果见表 2。10 对引物共扩增出 91 条带, 平均每对引物扩增出 9.1 条带, 多态性条带百分率达 100.00%。其中, 引物 CH02b12 扩增出的条带最多, 达 13 条; 引物 U78949 扩增出的条带最少, 仅 4 条。

的多态性条带百分率来看, 山西五台山居群最低, 为 64.84%; 吉林长白山居群和山西中条山居群最高, 均为 85.71%。

由表 3 还可以看出: 供试的 8 个山荆子居群间的有效等位基因数为 1.616 9, Nei's 基因多样性指数为 0.355 1, Shannon 信息指数为 0.528 5, 多态性条带百分率达 100.00%, 居群间的各项遗传多样性指数均高于居群内。

2.3 居群的聚类分析结果

基于 Nei's 遗传距离获得的 8 个山荆子居群的 UPGMA 聚类结果见图 1。在 Nei's 遗传距离 0.148 6

表 3 基于 SSR 标记分析的 8 个山荆子居群的遗传多样性分析结果

Table 3 Analysis results of genetic diversity of eight populations of *Malus baccata* (L.) Borkh. based on SSR marker analysis

居群编号 ¹⁾ No. of population ¹⁾	等位基因数 Number of allele	有效等位基因数 Effective number of allele	Nei's 基因多样性指数 Nei's gene diversity index	Shannon 信息指数 Shannon information index	多态性条带数 Number of polymorphic band	多态性条带百分率/% Percentage of polymorphic band
1	1.714 3	1.437 9	0.256 0	0.381 9	65	71.43
2	1.846 2	1.531 0	0.305 6	0.453 2	77	84.62
3	1.736 3	1.463 2	0.270 4	0.402 0	67	73.63
4	1.659 3	1.460 8	0.257 9	0.376 7	60	65.93
5	1.857 1	1.535 0	0.306 8	0.455 5	78	85.71
6	1.857 1	1.532 1	0.309 2	0.459 2	78	85.71
7	1.648 4	1.459 2	0.260 8	0.380 9	59	64.84
8	1.670 3	1.451 8	0.259 4	0.381 3	61	67.03
居群间 Among populations	2.000 0	1.616 9	0.355 1	0.528 5	91	100.00

¹⁾ 1: 河北塞罕坝居群 Population in Saihanba of Hebei Province; 2: 山西灵空山居群 Population in Mt. Lingkong of Shanxi Province; 3: 黑龙江小兴安岭居群 Population in Xiaoxing'anling of Heilongjiang Province; 4: 山西管涔山居群 Population in Mt. Guancen of Shanxi Province; 5: 吉林长白山居群 Population in Mt. Changbai of Jilin Province; 6: 山西中条山居群 Population in Mt. Zhongtiao of Shanxi Province; 7: 山西五台山居群 Population in Mt. Wutai of Shanxi Province; 8: 北京东灵山居群 Population in Mt. Dongling of Beijing City.

处, 8 个居群被分成 3 个大组: 第 1 组包括山西五台山居群和北京东灵山居群; 第 2 组包括山西中条山居群、吉林长白山居群、黑龙江小兴安岭居群、山西灵空山居群和山西管涔山居群; 第 3 组仅含河北塞罕坝 1 个居群。由图 1 可见: 发生明显地理分化的是山西五台山居群、北京东灵山居群、山西管涔山居群和河

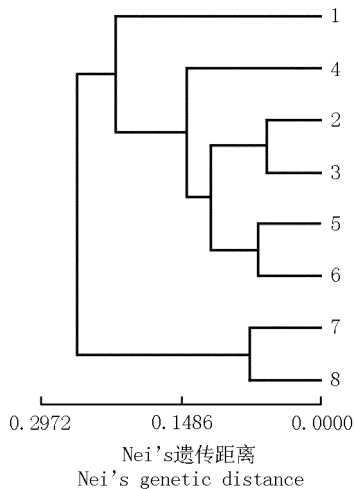
北塞罕坝居群; 山西灵空山居群、黑龙江小兴安岭居群、吉林长白山居群和山西中条山居群可能是山荆子的多样性核心居群。山西五台山居群和北京东灵山居群的地理位置较近, 遗传关系也最近, 而其他居群间的遗传关系与地理位置没有明显的相关性。

2.4 居群间的基因分化分析

对 8 个山荆子居群进行基因分化分析, 居群间的基因分化系数(G_{st})为 0.223 3, 说明在总的遗传变异中有 22.33% 存在于居群间; 基因流(N_m)为 1.739 5, 说明居群间的基因交换较多。

3 结论和讨论

采用 10 对 SSR 引物对 8 个山荆子居群的基因组总 DNA 进行 PCR 扩增, 根据其基因位点多态性可知: 山西中条山居群的遗传多样性最高, 其 Nei's 基因多样性指数(H)为 0.309 2, Shannon 信息指数(I)为 0.459 2; 山西灵空山居群的遗传多样性也较高, H 为 0.305 6, I 为 0.453 2。陈曦等^[5] 根据山荆子居群的 RAPD 分析结果, 认为山西灵空山居群的遗传多样性最高($H=0.304 5, I=0.452 6$)。虽然 2 种方法的结果不一致, 但从绝对数值来看, 二者差异不大。本研究结果表明: 与苹果属植物的遗传多样性^[14] 相比, 山荆子居群间的遗传多样性($H=0.355 1, I=0.528 5$) 明显低于苹果属野生种 ($H=0.86, I=2.07$) 及苹果砧木 ($H=0.76, I=1.63$), 其原因与居群划分方法的不



1: 河北塞罕坝居群 Population in Saihanba of Hebei Province; 2: 山西灵空山居群 Population in Mt. Lingkong of Shanxi Province; 3: 黑龙江小兴安岭居群 Population in Xiaoxing'anling of Heilongjiang Province; 4: 山西管涔山居群 Population in Mt. Guancen of Shanxi Province; 5: 吉林长白山居群 Population in Mt. Changbai of Jilin Province; 6: 山西中条山居群 Population in Mt. Zhongtiao of Shanxi Province; 7: 山西五台山居群 Population in Mt. Wutai of Shanxi Province; 8: 北京东灵山居群 Population in Mt. Dongling of Beijing City.

图 1 基于 SSR 标记分析结果的 8 个山荆子居群的 UPGMA 聚类图
Fig.1 UPGMA cluster dendrogram of eight populations of *Malus baccata* (L.) Borkh. based on SSR marker analysis result

同有关;但本研究结果与苹果属其他种类,如新疆野苹果 [*Malus sieversii* (Ledeb.) Roem.]^[8]、湖北海棠 [*M. hupehensis* (Pamp.) Rehd.]^[15]、变叶海棠 [*M. toringoides* (Rehd.) Hughes]^[16] 和小金海棠 (*M. xiaojinensis* Cheng et Jiang)^[17] 等种类的遗传多样性水平相近。

聚类分析结果表明:在 Nei's 遗传距离 0.148 6 处,供试的 8 个山荆子居群被分成 3 组,居群间的 Nei's 遗传距离最大值为 0.227 4,与 RAPD 标记的聚类分析结果相似(RAPD 标记的 Nei's 遗传距离最大值为 0.224 9)^[5]。但是,同一地域内小居群间基于 SSR 和 RAPD 标记的遗传关系分析结果并不完全一致,其中山西中条山和管涔山居群以及黑龙江小兴安岭居群的差异较大,推测这些山荆子居群在遗传上可能具有特定的杂合性和分化方向,也可能与这些居群处于从随机进化向定向进化的过渡状态有关。

基于 SSR 标记的 8 个山荆子居群的遗传组成和基因流大小与其 RAPD 标记^[5] 和 ISSR 分析^[18] 的结论基本一致,按照 Wright^[19] 的理论,表明山荆子群体相对稳定,不存在遗传漂变,但分化程度较高。聚类结果显示:地理位置相近的居群并没有聚在一起,如山西五台山居群、北京东灵山居群和山西管涔山居群地理位置相近,但仅前二者紧密相聚,山西管涔山居群则与中部的核心居群聚在一起。推测山荆子的迁移扩散可能是从核心居群向外扩展,由于同区域内小居群间基因流不对称或不均等,加之特定地理居群可能受到强有力的外界选择压力,产生了遗传分化。结合“多样性中心就是起源中心”的理论推测:山荆子起源于我国的华北和东北地区,向四周扩散后在基因流不对称和生境的强有力选择压力下形成了现有的多样性分布格局。

参考文献:

- [1] 梁国鲁,李晓林. 中国苹果属植物染色体研究[J]. 植物分类学报, 1993, 31(3): 236-251.
- [2] 余德浚,阎振龙,张鹏. 中国果树砧木资源[M]//中国农业科学院郑州果树所. 果树砧木论文集. 西安:陕西科学技术出版社, 1985: 3-10.
- [3] 王雷宏,汤庚国. 山荆子腊叶标本表型性状变异分析[J]. 西北植物学报, 2007, 27(8): 1690-1694.
- [4] 王雷宏,汤庚国,夏海武,等. 山荆子叶脉序的研究[J]. 南京林业大学学报:自然科学版, 2008, 32(2): 39-42.
- [5] 陈曦,汤庚国,郑玉红,等. 苹果属山荆子遗传多样性的 RAPD 分析[J]. 西北植物学报, 2008, 28(10): 1954-1959.
- [6] ROBINSON J P, HARRIS S A, JUNIPER B E. Taxonomy of the genus *Malus* Mill. (Rosaceae) with emphasis on the cultivated apple, *Malus domestica* Borkh. [J]. Plant Systematic and Evolution, 2001, 226(1/2): 35-58.
- [7] NEI M. The new mutation theory of phenotypic evolution[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2007, 104: 12235-12242.
- [8] ROUZINE I M, RODRIGO A, COFFIN J M. Transition between stochastic evolution and deterministic evolution in the presence of selection: general theory and application to virology [J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2001, 65(1): 151-185.
- [9] DOYLE J J, DICKSON E E. Preservation of plant samples for DNA restriction endonuclease analysis[J]. Taxon, 1987, 36(4): 715-722.
- [10] LIEBHARD R, GIANFRANCESCHI L, KOLLER B, et al. Development and characterisation of 140 new microsatellites in apple (*Malus x domestica* Borkh.) [J]. Molecular Breeding, 2002, 10(4): 217-241.
- [11] GOULÃO L, OLIVEIRA C M. Molecular characterisation of cultivars of apple (*Malus x domestica* Borkh.) using microsatellite (SSR and ISSR) markers[J]. Euphytica, 2001, 122(1): 81-89.
- [12] BENSON L L, LAMBOY W F, ZIMMERMAN R H. Molecular identification of *Malus hupehensis* (tea crabapple) accessions using simple sequence repeats [J]. HortScience, 2001, 36(5): 961-966.
- [13] YE H F C, YANG R C, BOYLE T. POPGENE version 1.31: Microsoft Window-based Freeware for Population Genetic Analysis [CP/CD]. Edmonton: University of Alberta, 1999.
- [14] GHARGHANI A, ZAMANI Z, TALAIE A, et al. Genetic identity and relationships of Iranian apple (*Malus x domestica* Borkh.) cultivars and landraces, wild *Malus* species and representative old apple cultivars based on simple sequence repeat (SSR) marker analysis[J]. Genetic Resources and Crop Evolution, 2009, 56(6): 829-842.
- [15] 康明,黄宏文. 湖北海棠的等位酶变异和遗传多样性研究[J]. 生物多样性, 2002, 10(4): 376-385.
- [16] 张元元,周志钦. 苹果属植物变叶海棠遗传多样性形成机理研究进展[J]. 果树学报, 2008, 25(6): 896-900.
- [17] 周志钦,成明昊,宋洪元,等. 苹果属小金海棠的遗传多样性初步研究[J]. 生物多样性, 2001, 9(2): 145-150.
- [18] 王雷宏,郑玉红,汤庚国. 8 个山荆子居群遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 西北植物学报, 2010, 30(7): 1337-1343.
- [19] WRIGHT S. Evolution and the Genetics of Populations (Vol. 4): Variability Within and Among Natural Populations[M]. Chicago: University of Chicago Press, 1978: 4.