

# 古银杏雄株的 ISSR 遗传多样性分析

王国霞 曹福亮 方炎明

(南京林业大学森林资源与环境学院)

**摘要:**应用 ISSR 分析技术对 19 个省市的 97 株古银杏雄株进行遗传多样性分析,并对它们的亲缘关系进行分析鉴定。结果表明:银杏雄株具有丰富的基因多样性和遗传多样性,选用的 13 个引物共扩增出 114 条 DNA 条带,其中多态性 DNA 条带 83 条,占 72.8%;有效等位基因数为 1.811 7,基因多样性为 0.437 4,Shannon 信息指数为 0.625 3;利用 UPGMA 法对扩增结果进行聚类分析,把 97 株古银杏雄株分为 2 大类,一类表现出较强的地理相关性,另一大类结果表明遗传距离与地理位置远近不完全相关。

**关键词:** 银杏;雄株;ISSR;遗传多样性

中图分类号: S792.95;S718.46 文献标志码: A 文章编号: 1000-1522(2010)02-0039-07

WANG Guo-xia; CAO Fu-liang; FANG Yan-ming. **Genetic diversity of ancient male ginkgo trees by ISSR analysis.** *Journal of Beijing Forestry University* (2010) 32(2) 39-45 [Ch, 26 ref.] College of Forest Resources and Environment, Nanjing Forestry University, 210037, P. R. China.

The genetic diversity of 97 ancient male ginkgo trees from 19 provinces was estimated by using ISSR markers to analyze the genetic relation of these individual trees. The results show that male ginkgo trees have high genetic diversity. Thirteen ISSR (inter-simple sequence repeat) primers produced a total of 114 bands, of which 83 were polymorphic. The percentage of polymorphic bands was 72.8%, the effective number of alleles 1.811 7, Nei's genetic distance was 0.437 4 and Shannon index 0.625 3. UPGMA (unweighted pair-group method using arithmetic average) cluster analysis showed that the 97 individuals were divided into two groups. Group one was closely correlated with geographical locations, while for the other group, the genetic distance among the sampled male ginkgo trees was uncorrelated with geographical distance.

**Key words** *Ginkgo biloba*; male tree; ISSR; genetic diversity

ISSR(inter-simple sequence repeats)即简单重复序列区间,是一种基于 PCR 扩增的新型分子标记技术。具有稳定性好、多态性高、实验操作简单和快速等特点,而且 ISSR 标记可以揭示整个基因组的一些特征,不受季节、环境等外在因素的影响。与 RAPD 等技术相比,ISSR 标记的实验稳定性更好,检测到的多态性更高<sup>[1]</sup>。目前已被广泛用于作物遗传育种、植物品种鉴定、基因定位和遗传图谱构建等研究中<sup>[2-6]</sup>。也是目前在木本植物遗传多样性分析中的主要技术手段之一<sup>[7-10]</sup>。

银杏(*Ginkgo biloba*)是现存裸子植物中与恐龙

同时代的最古老的子遗植物。作为雌雄异株的树种,过去人们对银杏遗传多样性的研究多集中于果用栽培品种<sup>[11-14]</sup>。对银杏雄株尤其是古树的研究相对较少,由于银杏古树无性繁殖起源和个体间近亲繁殖的可能性小,可以提供较客观的种质遗传多样性基础信息,因而本文以来源于全国 19 个省市自治区的 97 株百年以上的古银杏雄株为研究对象,首次采用 ISSR 分子标记技术,从 DNA 水平上对银杏雄株进行遗传多样性分析,对其亲缘关系的相对远近进行鉴定,为促进银杏种质资源的有效保护、遗传改良和可持续利用提供理论依据。

收稿日期:2009-02-24

基金项目:“十一五”国家科技支撑计划项目(2006BAD18B0301)。

第一作者:王国霞,博士。主要研究方向:经济林栽培。电话:025-85427994 Email:wgxia191919@sina.com.cn 地址:210037 南京龙蟠路南京林业大学森林资源与环境学院。

责任作者:曹福亮,教授,博士生导师。主要研究方向:经济林栽培。电话:025-85420799 Email:samcao@njfu.edu.cn 地址:同上。

本刊网址: <http://www.bjfujournal.cn>; <http://journal.bjfu.edu.cn>

# 1 材料与方法

## 1.1 材 料

2006 年 4—5 月在全国 19 个省市 43 个市县共调查了 97 株百年以上的高龄银杏雄性单株(见表

1),采集刚展开的银杏嫩叶装入自封袋中,并装入硅胶干燥保存带回备用。

## 1.2 实验方法与数据处理方法

银杏 DNA 提取采用 Murray 等的 CTAB 法<sup>[15]</sup>,稍作改进。用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质

表 1 供试的 97 株银杏雄株的概况  
Tab. 1 Basic information of 97 male ginkgo trees

编号	名称	树龄/a	采集地	地理位置	编号	名称	树龄/a	采集地	地理位置
1	日照 02	1 500	山东日照东港区	35°40'N ,119°52'E	50	广德 02	100	安徽广德天寿寺	30°89'N ,119°41'E
2	日照 20	500	山东日照	35°40'N ,119°52'E	51	广德 03	150	安徽广德芦村乡	30°89'N ,119°41'E
3	日照 01	120	山东日照五莲县	35°73'N ,119°22'E	52	宁国 01	150	安徽宁国山门乡	30°62'N ,118°96'E
4	蒙阴 22	450	山东蒙阴	35°70'N ,117°90'E	53	宁国 02	100	安徽宁国山门乡	30°62'N ,118°96'E
5	海阳 31	400	山东海阳	36°77'N ,121°16'E	54	宁国 03	200	安徽宁国山门乡	30°62'N ,118°96'E
6	泰安 02	420	山东泰安泰山王母池	36°18'N ,117°13'E	55	宁国 04	100	安徽宁国山门乡	30°62'N ,118°96'E
7	泰安 01	100	山东泰安泰山	36°18'N ,117°13'E	56	宁国 05	100	安徽宁国度村	30°62'N ,118°96'E
8	泰安 03	1 000	山东泰安斗母宫	36°18'N ,117°13'E	57	泰兴 03	100	江苏泰兴黄桥	32°16'N ,120°02'E
9	泰安 04	>2 000	山东泰安	36°18'N ,117°13'E	58	泰兴 04	>200	江苏泰兴黄桥	32°16'N ,120°02'E
10	泰安 05	450	山东泰安	36°18'N ,117°13'E	59	泰兴 02	100	江苏泰兴根思村	32°16'N ,120°02'E
11	郯城 01	100	山东郯城王桥	34°61'N ,118°35'E	60	泰兴 01	150	江苏泰兴老叶乡	32°16'N ,120°02'E
12	郯城 02	100	山东郯城新村	34°61'N ,118°35'E	61	南京 01	100	江苏南京	32°03'N ,118°47'E
13	郯城 03	3 000	山东郯城	34°61'N ,118°35'E	62	南京 02	100	江苏南京	32°03'N ,118°47'E
14	郯城 04	100	山东郯城	34°61'N ,118°35'E	63	奉化 01	>1 000	浙江奉化雪窦寺	29°66'N ,121°41'E
15	邳州 02	100	江苏邳州农场	34°03'N ,117°97'E	64	新县 01	300	河南新县陈店乡	31°65'N ,114°85'E
16	邳州 03	100	江苏邳州铁富镇	34°03'N ,117°97'E	65	新县 03	>500	河南新县郭家河乡	31°65'N ,114°85'E
17	宿迁 01	200	江苏宿迁	33°95'N ,118°25'E	66	新县 02	100	河南新县郭家河乡	31°65'N ,114°85'E
18	寿县 04	1 500	安徽寿县清真古寺	32°58'N ,116°78'E	67	西峡 03	>1 000	河南西峡二郎坪乡	33°33'N ,111°50'E
19	寿县 03	1 000	安徽寿县孔庙	32°58'N ,116°78'E	68	西峡 04	>150	河南西峡二郎坪乡	33°33'N ,111°50'E
20	寿县 02	100	安徽寿县报恩寺	32°58'N ,116°78'E	69	西峡 01	100	河南西峡二郎坪乡	33°33'N ,111°50'E
21	寿县 01	100	安徽寿县报恩寺	32°58'N ,116°78'E	70	西峡 02	2 000	河南西峡二郎坪乡	33°33'N ,111°50'E
22	金寨 03	200	安徽金寨楼房村	31°67'N ,115°87'E	71	安陆 01	>1 000	湖北安陆王义贞镇	31°30'N ,113°69'E
23	金寨 04	100	安徽金寨楼房村	31°67'N ,115°87'E	72	安陆 02	500	湖北安陆王义贞镇	31°30'N ,113°69'E
24	金寨 02	150	安徽金寨横河村	31°67'N ,115°87'E	73	随州 01	1 000	湖北随州胡家河	31°69'N ,113°38'E
25	金寨 01	>500	安徽金寨横河村	31°67'N ,115°87'E	74	神农架 01	1 000	湖北神农架	31°73'N ,110°67'E
26	北京 01	100	北京	39°92'N ,116°46'E	75	婺源 01	2 000	江西婺源	29°26'N ,117°79'E
27	翼城 01	>300	山西翼城	35°74'N ,117°76'E	76	武夷山 01	100	福建武夷山	27°75'N ,117°94'E
28	晋祠 01	>1 000	山西太原晋祠	37°87'N ,112°54'E	77	顺昌 02	1 500	福建顺昌大干镇	26°93'N ,117°72'E
29	晋城 01	500	山西晋城	35°48'N ,112°85'E	78	顺昌 01	2 000	福建顺昌大干镇	26°93'N ,117°72'E
30	周至 01	2 000	陕西周至楼观台	34°20'N ,108°15'E	79	南雄 01	2 000	广东南雄	25°14'N ,114°33'E
31	长安 01	300	陕西长安内苑村	34°16'N ,108°99'E	80	南雄 02	200	广东南雄坪田镇	25°14'N ,114°33'E
32	嵩县 04	1 000	河南嵩县车村镇	33°34'N ,111°47'E	81	桂林 06	100	广西桂林灵川	25°29'N ,110°33'E
33	嵩县 05	100	河南嵩县车村镇下庙	33°34'N ,111°47'E	82	桂林 09	100	广西桂林灵川	25°29'N ,110°33'E
34	嵩县 02	100	河南嵩县车村镇宝石村	33°34'N ,111°47'E	83	桂林 60	200	广西桂林灵川	25°29'N ,110°33'E
35	康县 01	>1 000	甘肃康县	33°33'N ,105°58'E	84	石门 01	500	湖南常德石门洛浦寺	29°58'N ,111°27'E
36	天目 01	100	浙江西天目山	30°23'N ,119°72'E	85	石门 02	>1 000	湖南常德石门林场	29°58'N ,111°27'E
37	天目 02	>1 000	浙江天目山祥祿寺	30°23'N ,119°72'E	86	安化 01	>500	湖南安化木孔乡	28°38'N ,111°20'E
38	天目 04	500	浙江天目山	30°23'N ,119°72'E	87	通江 02	100	四川通江胜利乡	31°95'N ,108°24'E
39	天目 21	100	浙江天目山西华亭	30°23'N ,119°72'E	88	通江 01	100	四川通江诺江镇	31°95'N ,108°24'E
40	天目 05	150	浙江天目山	30°23'N ,119°72'E	89	重庆 01	1 500	重庆南川	25°35'N ,106°24'E
41	天目 08	300	浙江天目山门内	30°23'N ,119°72'E	90	都江堰 01	>1 000	四川都江堰青城山	30°23'N ,103°28'E
42	湖州 02	100	浙江湖州菱湖区	30°75'N ,119°84'E	91	盘县 01	>2 000	贵州盘县	25°71'N ,104°42'E
43	湖州 03	100	浙江湖州菱湖区	30°75'N ,119°84'E	92	印江 61	400	贵州印江	27°98'N ,108°44'E
44	湖州 01	150	浙江湖州东林镇	30°75'N ,119°84'E	93	东安 26	100	湖南东安	26°37'N ,111°27'E
45	长兴 02	>400	浙江长兴小浦镇	30°01'N ,119°91'E	94	腾冲 51	200	云南腾冲	25°02'N ,98°39'E
46	长兴 03	100	浙江长兴小浦镇	30°01'N ,119°91'E	95	腾冲 02	>2 000	云南腾冲	25°02'N ,98°39'E
47	长兴 04	100	浙江长兴小浦镇	30°01'N ,119°91'E	96	腾冲 03	>1 000	云南腾冲	25°02'N ,98°39'E
48	长兴 05	150	浙江长兴小浦镇	30°01'N ,119°91'E	97	腾冲 04	200	云南腾冲	25°02'N ,98°39'E
49	广德 01	800	安徽广德新杭镇	30°89'N ,119°41'E					

注:树龄来自各地古树名木志记载及调查时获得的古树相关信息。 Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

量 ,DNA 的纯度和浓度通过紫外吸收法测定。ISSR 引物由上海生工公司合成。

ISSR 反应条件经过筛选和优化确定为 20 μL 反应体系 模板 DNA20 ng 0.5 U *Taq* 酶(大连宝生物工程有限公司) ,1.5 mmol/L Mg<sup>2+</sup> ,dNTP 0.25 mmol/L 引物 0.5 μmol/L。PCR 扩增条件:94℃ 预变性 3 min ;94℃ 变性 30 s 50 ~52℃ 复性 45 s 72℃ 延伸 2 min 35 个循环;72℃ 延伸 7 min<sup>[16]</sup>。PCR 产物在 1.0% 琼脂糖上电泳 ,凝胶成像系统拍照。为保证实验的稳定性 ,每个样品每个引物均重复 3 ~4 次。

根据各分子标记的电泳谱带有无统计所有的二元数据:有带的记为“1” ,无带的记为“0” 。所得结果为一二元数据矩阵。根据这个二元数据计算多态位点百分数 ,采用软件 POPGENE32 ( Version 1.31)<sup>[17]</sup> ,分别计算有效等位基因数 ( $N_e$ )、基因多样性( $H$ )、Shannon 多样性信息指数 ( $I$ ) ,根据 Nei's 遗传距离用类平均聚类法 (UPGMA) 对供试单株进行聚类分析 绘制遗传关系聚类图。

## 2 结果与分析

### 2.1 引物筛选和 ISSR 多态性分析

从 70 个引物中选出 13 个扩增条带较多、信号强、背景清晰的引物用于 ISSR-PCR 反应(表 2) 。13 个引物对 97 个银杏雄株进行扩增共扩增出 114 条 DNA 条带 ,其中多态性 DNA 条带 83 条 ,平均多态性频率达 72.8%。扩增出的条带大小在 300 ~2 000 bp 之间。每个引物扩增的条带数 6 ~13 条不等 ,平均每个引物扩增 8.77 个条带和 6.38 条多态带 ,多态性最高达 100% ,最低为 66.7%。引物 ISSR-1 扩增出的条带数最多为 13 条 ,而引物 ISSR-25、ISSR-65 和 ISSR-848 都只扩增出 6 条。由于 ISSR 揭示的是基因组 DNA 在酶切位点和其后的选择性碱基的变异 ,同一单株在不同引物产生了不同的 ISSR 产物图谱 ,同一引物在不同单株间产生的扩增谱带也不相同 ,充分表现了供试银杏雄树单株间在 DNA 水平上具有广泛的差异。引物 ISSR-1 和 ISSR-857 扩增的部分 ISSR 产物图谱见图 1。

### 2.2 银杏雄株间遗传多样性分析

有效等位基因数 ( $N_e$ )、基因多样性 ( $H$ ) 与 Shannon 信息指数 ( $I$ ) 是度量遗传多样性水平的常用指标。将各银杏雄株的 ISSR 指纹数据用软件 POPGENE32 进行分析 ,分别计算  $N_e$ 、 $H$ 、 $I$  ,结果(见表 3)表明 ,同一引物所检测不同位点的遗传多样性程度存在较大的差异。银杏雄株的有效等位基因数 ( $N_e$ )、基因多样性 ( $H$ )、Shannon 信息指数 ( $I$ ) 平均

表 2 13 个 ISSR 引物扩增条带数与多态性比率  
Tab.2 Number and ratio of polymorphic bands amplified by 13 ISSR primers

引物编号	引物序列	扩增带数	多态性条带数	多态性比率/%
ISSR-1	ACACACACACACACT	13	10	76.9
ISSR-5	ACACACACACACACTG	8	5	62.5
ISSR-17	GACAGACAGACAGACA	11	8	72.7
ISSR-25	ACACACACACACACCA	6	4	66.7
ISSR-28	TGTGTGTGTGTGTGCC	12	8	66.7
ISSR-50	TGTGTGTGTGTGTGAG	10	8	80.0
ISSR-52	TGTGTGTGTGTGTGGA	7	7	100
ISSR-65	AGAGAGAGAGAGAGCC	6	4	66.7
ISSR-815	CTCTCTCTCTCTCTG	7	6	85.7
ISSR-835	ACACACACACACACCG	11	8	72.7
ISSR-844	CTCTCTCTCTCTCTGC	7	5	71.4
ISSR-848	CACACACACACACAAG	6	5	83.3
ISSR-857	ACACACACACACACYG	10	7	70.0
合计		114	83	72.8

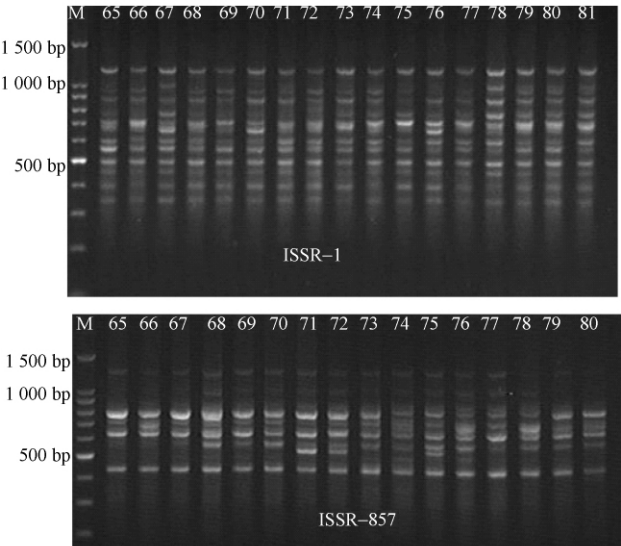


图 1 引物 ISSR-1 和 ISSR-857 对部分银杏雄株扩增产生的谱带  
Fig.1 ISSR bands of male ginkgo trees with primer-1 and primer-857

值分别为 1.811 7、0.437 4、0.625 6;有效等位基因数 ( $N_e$ ) 最大值为 1.999 9 ,最小值为 1.117 5;基因多样性 ( $H$ ) 最大值为 0.500 0 ,最小值为 0.105 1;Shannon 信息指数 ( $I$ ) 最大值为 0.693 1 ,最小值为 0.214 8。有效等位基因数、平均基因多样度和平均 Shannon 信息指数均方的标准误都较小 ,分别为 0.228 1、0.086 6、0.097 6 ,估计精度较高。

### 2.3 银杏雄株的聚类分析

根据 97 株古银杏雄株的 Nei's 遗传距离 ,利用 UPGMA 法进行聚类分析。从 Nei's 距离聚类图(图 2)可以看出 ,银杏雄株总体可以分为 2 大类群。位于下方的一大类群又可分为 2 个小类群:其中印江 61、盘县 01、桂林 06、桂林 09、桂林 60 和腾冲 51、腾冲 02、腾冲 03 等 8 株雄树聚为一类 ,这一小类群的

表 3 银杏雄株各多态位点的遗传多样性  
Tab.3 Genetic diversity of each polymorphic site of male ginkgo trees

位点	样本数	$N_e$	$H$	$I$	位点	样本数	$N_e$	$H$	$I$
I1-1000	97	1.526 6	0.345 0	0.528 9	I857-500	97	1.117 5	0.105 1	0.214 8
I1-950	97	1.981 9	0.495 4	0.688 6	I844-1000	97	1.497 5	0.332 2	0.514 4
I1-880	97	1.590 1	0.371 1	0.558 0	I844-900	97	1.925 5	0.480 7	0.673 7
I1-780	97	1.965 3	0.491 2	0.684 3	I844-800	97	1.990 3	0.497 6	0.690 7
I1-650	97	1.975 6	0.493 8	0.687 0	I844-750	97	1.674 0	0.402 6	0.592 3
I1-600	97	1.342 4	0.255 1	0.422 8	I844-500	97	1.984 3	0.496 0	0.689 2
I1-560	97	1.950 4	0.487 3	0.680 4	I848-850	97	1.897 6	0.473 0	0.665 9
I1-450	97	1.999 6	0.499 9	0.693 0	I848-700	97	1.901 7	0.474 2	0.667 1
I1-400	97	1.989 1	0.497 3	0.690 4	I848-650	97	1.991 2	0.497 8	0.690 9
I1-350	97	1.970 1	0.492 4	0.685 5	I848-600	97	1.815 3	0.449 1	0.641 4
I835-1200	97	1.998 6	0.499 6	0.692 8	I848-350	97	1.993 4	0.498 3	0.691 5
I835-1100	97	1.748 4	0.428 0	0.619 4	I65-900	97	1.986 7	0.496 7	0.689 8
I835-1000	97	1.367 7	0.268 9	0.439 8	I65-800	97	1.988 5	0.497 1	0.690 3
I835-750	97	1.486 4	0.327 2	0.508 7	I65-600	97	1.645 5	0.392 3	0.581 2
I835-600	97	1.603 5	0.376 4	0.563 8	I65-500	97	1.923 6	0.480 1	0.673 1
I835-450	97	1.980 7	0.495 1	0.688 3	I52-1400	97	1.335 4	0.251 2	0.418 0
I835-400	97	1.277 3	0.217 1	0.374 6	I52-1200	97	1.313 9	0.238 9	0.402 6
I835-300	97	1.689 3	0.408 0	0.598 1	I52-850	97	1.934 1	0.483 0	0.676 0
I5-1500	97	1.881 6	0.468 5	0.661 3	I52-600	97	1.489 4	0.328 6	0.510 3
I5-1000	97	1.941 3	0.484 9	0.678 0	I52-550	97	1.993 2	0.498 3	0.691 4
I5-700	97	1.997 5	0.499 4	0.692 5	I50-1300	97	1.815 0	0.449 0	0.641 3
I5-500	97	1.968 2	0.491 9	0.685 1	I50-950	97	1.536 6	0.349 2	0.533 7
I5-450	97	1.890 9	0.471 2	0.664 0	I50-850	97	1.827 7	0.452 9	0.645 2
I815-1400	97	1.999 9	0.500 0	0.693 1	I50-800	97	1.918 3	0.478 7	0.671 7
I815-1300	97	1.999 9	0.500 0	0.693 1	I50-700	97	1.986 5	0.496 6	0.689 7
I815-1100	97	1.584 0	0.368 7	0.555 4	I50-650	97	1.986 5	0.496 6	0.689 7
I815-700	97	1.974 6	0.493 6	0.686 7	I50-400	97	1.869 1	0.465 0	0.657 7
I815-500	97	1.542 3	0.351 6	0.536 4	I50-300	97	1.906 0	0.475 3	0.668 3
I815-400	97	1.970 3	0.492 5	0.685 6	I25-1000	97	1.872 7	0.466 0	0.658 8
I17-1600	97	1.999 2	0.499 8	0.692 9	I25-900	97	1.976 3	0.494 0	0.687 1
I17-1300	97	1.943 8	0.485 6	0.678 6	I25-700	97	1.963 1	0.490 6	0.683 7
I17-1200	97	1.465 3	0.317 5	0.497 6	I25-550	97	1.765 5	0.433 6	0.625 2
I17-900	97	1.810 6	0.447 7	0.639 9	I28-1400	97	1.984 4	0.496 1	0.689 2
I17-800	97	1.944 8	0.485 8	0.678 9	I28-1200	97	1.965 4	0.491 2	0.684 3
I17-750	97	1.906 6	0.475 5	0.668 5	I28-1100	97	1.986 5	0.496 6	0.689 7
I17-700	97	1.530 2	0.346 5	0.530 6	I28-850	97	1.964 6	0.491 0	0.684 1
I17-600	97	1.220 8	0.180 9	0.326 3	I28-750	97	1.988 8	0.497 2	0.690 3
I857-1300	97	1.977 7	0.494 4	0.687 5	I28-550	97	1.889 6	0.470 8	0.663 6
I857-1000	97	1.578 0	0.366 3	0.552 7	I28-380	97	1.972 9	0.493 1	0.686 3
I857-850	97	1.638 4	0.389 7	0.578 3	I28-300	97	1.747 8	0.427 8	0.619 1
I857-700	97	1.962 0	0.490 3	0.683 4	平均	97	1.811 7	0.437 4	0.625 6
I857-650	97	1.888 0	0.470 3	0.663 2	标准差		0.228 1	0.086 6	0.097 6
I857-550	97	1.992 3	0.498 1	0.691 2					

雄株来源于云南、贵州、广西 均在我国西南部;另一小类群包括日照 20、日照 01、蒙阴 22、泰安 04、泰安 05、郯城 03、郯城 04、邳州 02、邳州 03 和晋祠 01 等 10 株雄树组成,主要以我国银杏主要分布区郯城及 周边地区为主,晋祠归于此类则说明此株银杏与上述单株亲缘关系较近,推测此株古代可能引种于山东地区或与上述单株属于同一起源。但总体上这一大类的 2 个小类群均表现出较强的地域相关性,即

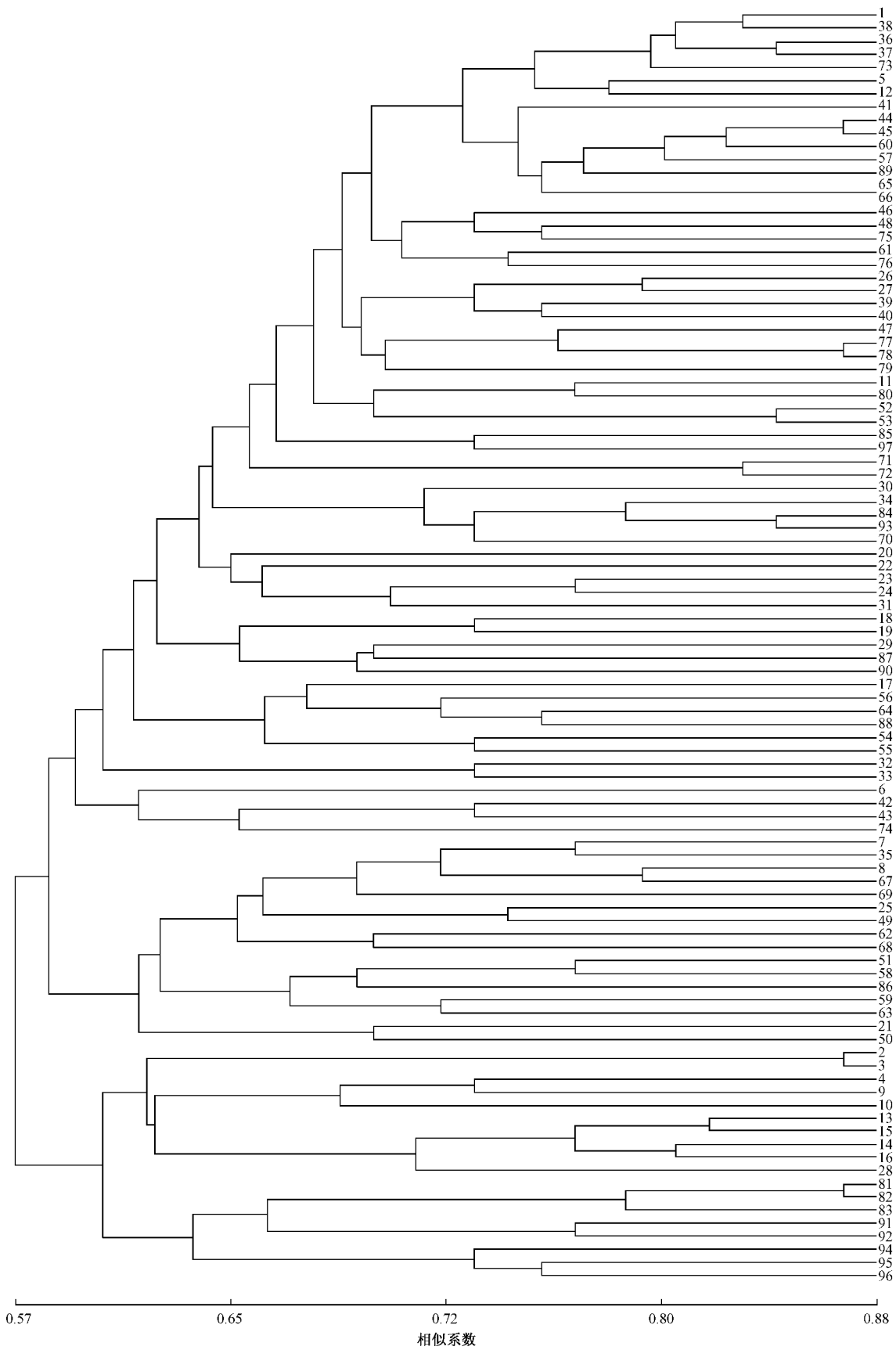


图 2 银杏雄株 Nei's 遗传距离的 UPGMA 聚类图

Fig. 2 Dendrogram of UPGMA based on Nei's genetic distance between male ginkgo trees

地理位置相近的,亲缘关系近。另一大类群也可分为 2 个小类群:一个小类群是由广德 01、广德 02、广德 03、西峡 01、西峡 03、西峡 04、泰安 01、泰安 03、泰兴 02、泰兴 04 及南京 02、安化 01、寿县 01、金寨

01、奉化 01、康县 01 等 16 个单株组成,尽管本类群的单株来源地理位置较分散,但总体上来自同一地区的单株也能聚在一起,如广德、西峡和泰安、泰兴的几个单株都集中于此类群;另一个小类群是聚集单株最多的一个类群,在这个类群里面,集中了其余的来自全国大部分地区的 63 个单株,其中包括来自天目山、湖州、长兴、宁国、新县、西峡、安陆、随州、南雄等银杏主要分布区及陕西周至、长安和来源于其他省份的一些著名的百年以上及多数千年古银杏雄株,结果表明遗传距离与其地理位置的远近不完全相关。

### 3 结论与讨论

1) 本文应用 ISSR 分析技术对分布于我国 19 个省市的 97 株古银杏雄株进行遗传多样性分析,并对他们的亲缘关系进行分析鉴定。结果表明,银杏雄株具有丰富的基因多样性和遗传多样性,选用的 13 个引物共扩增出 114 条 DNA 条带,其中多态性 DNA 条带 83 条,占 72.8%。有效等位基因数平均为 1.811 7,基因多样性平均为 0.437 4,Shannon 信息指数平均为 0.625 6;对扩增结果进行聚类分析,把 97 株古银杏雄株分为 2 大类:一类表现出较强的地理相关性,这说明古银杏的引种栽培多以小范围、邻近区域引种为主,因而相邻或相近地区的亲缘关系较近;另一大类结果表明遗传距离与地理位置远近不完全相关,产生这种情况的原因一方面说明银杏古时跨地区引种的情况可能也较多,另一方面也证明了银杏雄株基因型较多,遗传资源比较丰富,这也是银杏长期适应和进化的结果。本文研究结果表明,我国银杏雄株资源丰富,具有丰富的遗传多样性和基因多样性,这为银杏杂交育种和新品种选育提供了丰富的资源和基础。

2) 物种的遗传多样性还与该种的进化历史有关。银杏是第四纪冰川残存的孑遗裸子植物,被公认为“活化石”,其祖先具有比较丰富的遗传基础,由于受第四纪冰川的影响,仅在我国长江流域一带的群山中得以保存,中国是世界银杏的最后天然产地和现代银杏的发源地,银杏在我国分布范围广,栽培历史长,古树资源比较丰富,可以提供较客观的种质遗传多样性基础信息,因而选用古树作为材料进行遗传多样性研究具有非常重要的意义。本文利用 ISSR 分析对 97 个古银杏雄株进行扩增,选用的 13 个引物共扩增出 114 条 DNA 条带,其中多态性 DNA 条带 83 条,多态位点百分率为 72.8%,结果表明银杏雄株的遗传多样性较高。与其他裸子植物的 ISSR 分析数据相比,银杏雄株的多态位点百分率比

穗花杉 (*Amentotaxus argotaenia*) 49%<sup>[18]</sup>、叉孢苏铁 (*Cycas segmentifida*) 70.49%<sup>[19]</sup>、长叶榧 (*Torreya jack*) 52.79%<sup>[20]</sup>和百山祖冷杉 (*Abies beshanzuensis*) 42.86%<sup>[21]</sup>都高,略低于资源冷杉 (*A. ziyuanensis*) 77.78%<sup>[22]</sup>、香榧 (*Torreya grandis*) 84.6%<sup>[23]</sup>和南方红豆杉 (*Taxus wallichiana* var. *mairei*) 88.52%<sup>[24]</sup>。

3) 银杏作为雌雄异株的树种,雄株在银杏杂交育种和栽培新品种选育过程中的重要地位都不可或缺,但此前针对雄株的研究则相对较少。在以往对银杏雄株的遗传多样性研究中,莫昭展等<sup>[25]</sup>对来自 10 个省份的 10 个银杏雄株无性系进行 RAPD 标记,利用 12 对引物共扩增出了 96 条带,多态性条带 41 条,占总带数的 42%,扩增片段长度为 300 ~ 2 000 bp,10 个银杏雄株无性系间表现出较丰富的多态性。王利等<sup>[26]</sup>利用 AFLP 标记研究了 29 个中国银杏雄株材料的亲缘关系,从 64 对 *Eco*R I 引物中筛选出 7 对清晰、多态性高的引物,共产生 1 173 条谱带,187 个特异位点和 1 145 条多态带,多态带的比例平均为 97.6%,所有材料之间相似系数在 0.38 ~ 0.82 之间,供试材料遗传变异大,供试材料的聚类与其地理位置的远近不完全相关,这与本文的研究结果基本一致。综合上述研究及本文结论,再次说明银杏雄株具有丰富的遗传性。由于物种对环境变化的适应能力以及进化潜力依赖于它的遗传多样性,从更好地保护和利用银杏遗传多样性角度出发,必须更广泛地收集、保护各种银杏种质资源。根据银杏遗传多样性较高的特点,在对银杏进行保护开发中,应该尽可能地对古树资源实施保护,以保护尽可能多的遗传多样性,也可对遗传差异较大的单株间或地区间进行引种和杂交育种,人为创造基因交流和重组的条件,更好地维持和提高银杏的遗传多样性水平。

### 参 考 文 献

[1] WOLF N G, LAGE J M. Genetic analysis of gestational trophoblastic disease: A review [J]. *Semin Oncol*, 1995, 22 (2): 113-120.

[2] DEBNATH S C. Inter-simple sequence repeat (ISSR)-PCR analysis to assess genetic diversity in a collection of wild cloudberry (*Rubus chamaemorus* L.) clones [J]. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 2007, 82(5): 727-732.

[3] ZHOU Y Q, ZHOU C N, YAO H L et al. Application of ISSR markers in detection of genetic variation among Chinese yam (*Dioscorea opposita* Thunb.) cultivars [J]. *Life Science Journal: Acta Zhengzhou University Overseas Edition* 2008 5(4): 6-12.

[4] AMMIRAJU J S S, DHOLAKIA B B, SANTRA D K, et al. Identification of inter simple sequence repeat (ISSR) markers associated with seed size in wheat [J]. *Theor Appl Genet*, 2001 102: 726-732.

[ 5 ] SUNDARAMOORTHY J , BABU C , RAM S G. Molecular diversity in the primary and secondary gene pools of genus *Oryza* [J]. *Plant Systematics and Evolution* ,2009 ,279 ( 1-4 ) :115-123.

[ 6 ] BHAGYAWANT S S , SRIVASTAVA N. Genetic fingerprinting of chickpea ( *Cicer arietinum* L. ) germplasm using ISSR markers and their relationships [J]. *African Journal of Biotechnology* , 2008 ,7 (24) : 4428-4431.

[ 7 ] OKUN D O , KENYA E U , OBALLA P O , *et al.* Analysis of genetic diversity in *Eucalyptus grandis* ( Hill ex Maiden ) seed sources using inter simple sequence repeats ( ISSR ) molecular markers [J]. *African Journal of Biotechnology* , 2008 , 7 (13) : 2119-2123.

[ 8 ] 胡绍庆 ,邱英雄 ,吴光洪 ,等. 桂花品种的 ISSR-PCR 分析 [J]. 南京林业大学学报 (自然科学版) , 2004 ,28 (增刊) :71-75.

[ 9 ] 周志强 ,郝雨 ,刘彤 ,等. 大兴安岭北段天然樟子松林遗传多样性与主要生态因子的相关性研究 [J]. 北京林业大学学报 , 2006 ,28 (6) :22-27.

[10] 陈伟. 光皮桦天然群体遗传多样性研究 [J]. 北京林业大学学报 , 2006 ,28 (6) :28-34.

[11] 沈永宝 ,施季森 ,赵洪亮. 利用 ISSR DNA 标记鉴定主要银杏栽培品种 [J]. 林业科学 , 2005 ,41 (1) :202-204.

[12] 曹福亮 ,黄敏仁 ,桂仁意 ,等. 银杏主要栽培品种遗传多样性分析 [J]. 南京林业大学学报 (自然科学版) ,2005 ,29 (6) : 1-6.

[13] 谭晓风 ,冯晓黎 ,胡芳名 ,等. 银杏 16 个主要栽培品种的分子鉴别 [J]. 中南林学院学报 , 2005 ,25 (4) :35-39.

[14] 王利 ,邢世岩 ,王芳. 银杏雌株种质遗传关系的 AFLP 分析 [J]. 林业科学 , 2008 ,44 (4) :48-53.

[15] NAGOKA T , OGIHARA Y. Application of inter-simple sequence repeat polymorphism in wheat for use of DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers [J]. *Theor Appl Genet* ,1997 ,94: 597-602.

[16] 曹福亮 ,王国霞 ,李广平 ,等. 银杏 ISSR-PCR 扩增反应体系的优化 [J]. 浙江林学院学报 ,2008 ,25 (2) : 186-190.

[17] YEH F C , YANG R C , BOYLE T. *POPGENE* , *Microsoft Windows-based freeware for population genetic analysis* [M]. Edmonton , Canada: Molecular Biology and Biotechnology Center , University of Alberta , 1999.

[18] 朱柏芳 ,朱筠 ,邓荣根 ,等. 穗花杉 ISSR 引物反应条件的优化与筛选 [J]. 植物研究 , 2006 ,26 (3) :318-322.

[19] 马永 ,李楠 ,钟业聪 ,等. 叉孢苏铁 ISSR 反应条件的优化及初步应用 [J]. 亚热带植物科学 , 2005 ,34 (1) :10-13.

[20] 金则新 ,李钧敏 ,李增鸿. 浙江仙居长叶榧自然居群遗传多样性的 ISSR 分析 [J]. 北京林业大学学报 ,2007 ,29 (1) :53-59.

[21] 袁建国 ,邱英雄 ,余久华 ,等. 百山祖冷杉的 ISSR 分析优化和遗传多样性初步研究 [J]. 浙江大学学报 (农业与生命科学版) ,2005 ,31 (3) : 277-282.

[22] 张玉荣 ,罗菊春 ,喻锦秀. 资源冷杉遗传多样性的 ISSR 分析 [J]. 北京林业大学学报 , 2007 ,29 (6) :41-46.

[23] 戴正 ,陈力耕 ,童品璋. 香榧品种遗传变异与品种鉴定的 ISSR 分析 [J]. 园艺学报 , 2008 ,35 (8) : 1125-1130.

[24] 张蕊 ,周志春 ,金国庆 ,等. 南方红豆杉种源遗传多样性和遗传分化 [J]. 林业科学 , 2009 ,45 (1) :50-56.

[25] 莫昭展 ,梁海清 ,曹福亮. 利用 RAPD 标记进行银杏雄株无性系的识别 [J]. 福建林业科技 , 2006 ,33 (3) :1-5.

[26] 王利 ,邢世岩 ,韩克杰 ,等. 银杏雄株亲缘关系的 AFLP 分析 [J]. 中国农业科学 , 2006 ,39 (3) :1940-1945.

(责任编辑 董晓燕)