

野生银杏资源群体遗传多样性的 RAPD 分析

曹福亮, 花喆斌, 汪贵斌, 张往祥

(南京林业大学 森林资源与环境学院, 江苏 南京 210037)

摘要: 用随机扩增多态 DNA (RAPD) 技术对浙江西天目山、贵州务川、湖北大洪山区、重庆金佛山区和福建武夷山区等 5 个群体 150 个银杏 *Ginkgo biloba* 个体进行了遗传多样性分析。12 个寡核苷酸引物共检测到 194 个位点, 多态位点 130 个, 多态位点百分率 66.67%。用 PopGen 32 软件对数据进行了分析, 结果显示: Nei's 基因多样性指数 (h) 的群体水平是 0.431 7, Shannon 信息指数 (I) 的群体水平是 0.621 1, 基因分化系数 (G_{st}) 是 0.288 2。Shannon 信息指数 (I) 分析揭示的银杏群体遗传分化水平 $[(I_{sp} - I_{pop})/I_{sp}] = 0.190 3$, AMOVA 分析结果得出银杏群体间的分化占 36.7%。RAPD 数据显示, 5 个银杏群体遗传多样性较高, 其中浙江西天目山、贵州务川和湖北大洪山区有可能是野生银杏冰川期避难所。图 4 表 5 参 22

关键词: 林木遗传育种学; 银杏; 遗传多样性; 随机扩增多态 DNA (RAPD)

中图分类号: S718.46; Q813 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-5692(2008)01-0022-06

Genetic diversity in wild populations of *Ginkgo biloba* using random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis

CAO Fu-liang, HUA Zhe-bin, WANG Gui-bin, ZHANG Wang-xiang

(College of Forest Resources and Environment, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, Jiangsu, China)

Abstract: To determine the genetic variation among and within the populations of *Ginkgo biloba*, 150 individuals from 5 populations that were located in the Tianmu Mountain area (Zhejiang Province), Wuchuan (Guizhou Province), the Dahong Mountain area (Hubei Province), the Jingfu Mountain area (Chongqing City), and the Wuyi Mountain area (Fujian Province) were analyzed using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers with 12 random primers. Data were analyzed with the PopGen32 software and analysis of molecular variance (AMOVA), and compared using the Nei, Shannon, among-population genetic diversity (G_{st}) indices. RAPD detected 194 loci of which 130 exhibited polymorphism with an average percentage of polymorphic loci (PPB) of 66.7%. Also, the average for Nei's genetic diversity was 0.431 7, for Shannon's genetic diversity information index was 0.621 1, and G_{st} was 0.288 2. In addition, Shannon's genetic diversity information index revealed a differentiation among populations of 0.190 3, whereas the AMOVA showing differentiation among populations was 36.7%. Overall, RAPD results indicated that the five populations of *G. biloba* had high genetic diversity with the populations of Tianmu Mountain area, Wuchuan, and Dahong Mountain area possibly being survival habitats stemming from the glacial period. [Ch, 4 fig. 5 tab. 22 ref.]

Key words: forest breeding; *Ginkgo biloba*; genetic diversity; random amplified polymorphic DNA (RAPD)

在植物分类学上, 银杏 *Ginkgo biloba* 属银杏纲 Ginkgopsida 银杏目 Ginkgoales 银杏科 Ginkgoaceae 银杏属 *Ginkgo*, 且是银杏纲植物现代残存唯一一种。中国是世界上银杏资源最丰富, 分布最广泛的国家^[1]。遗传多样性的本质是生物体在遗传物质上的变异, 决定着物种或种群进化潜力和适应环境的

收稿日期: 2007-01-23; 修回日期: 2007-09-11

基金项目: 江苏省高技术研究项目 (BG2004314)

作者简介: 曹福亮, 教授, 博士生导师, 从事经济林培育等的研究。E-mail: samcao2007@yahoo.com.cn

能力, 对它们进行研究, 有助于为物种的保护和利用制订正确的策略。目前, 虽然对于银杏遗传多样性已开展了一些研究, 但对于银杏野生群体的研究不多^[1]。对银杏的群体遗传多样性进行研究, 可获得银杏群体遗传变异和遗传分化的分子数据, 揭示不同地区银杏群体的亲缘关系和生态、地理等环境因素与遗传分化的相关性, 揭示银杏对生长环境适应所导致的基因分化机制, 从而初步探讨野生银杏可能的聚集地, 也可为银杏野生遗传资源的有效保护和合理利用提供理论依据。本文根据文献资料记载, 选取中国可能的5个野生银杏群体, 利用随机扩增多态 DNA (RAPD) 技术对它们进行遗传多样性分析, 以初步了解我国银杏野生群体的遗传多样性, 更好地开发和利用银杏这一珍贵资源。

1 材料和方法

1.1 实验材料

2006年4月中旬, 对浙江西天目山(TM)、贵州务川(WC)、湖北大洪山区(DH)、重庆金佛山区(JF)和福建武夷山区(WY)等5个群体, 根据银杏分布状况进行叶片随机采集, 每个种群选取30样株(间隔至少30m, 株高大于15m, 胸径大于50cm), 迅速将采集的叶片装入封口袋, 并用硅胶干燥保存。各群体所在地及其生境状况见表1。

1.2 实验方法

1.2.1 DNA的提取及检测

DNA提取借鉴桂仁意^[2]的方法。考虑到银杏叶内富含多种复杂次生代谢物, 尤其是多糖、酚类、萜类等化合物, 在利用CTAB(十六烷基三甲基溴化铵)提取时, 适当提高 β -巯基乙醇的体积分数(从2%提高到3%), 使它与多酚物质竞争氧, 防止酚氧化成醌, 以达到防止褐变的目的。另外, 增加氯仿: 异戊醇(24:1)溶液的抽提次数, 避免操作过程中的剧烈剪切力的作用, 最终获得质量较好、可用于下游操作的基因组DNA。提取的DNA在紫外分光光度计中测定光密度值, 从而进行定量。

1.2.2 随机扩增与产物检测

所用引物购自上海生工生物有限公司。在已有文献报道的百余对RAPD多态引物中进行RAPD引物筛选^[3-5], 最后选取信号强、背景清晰的12条多态引物(表2)用于样品的扩增。PCR扩增在ABI 2400(applied biosystems, USA)扩增仪上完成。经比较与优化, 确定RAPD-PCR反应体系为: 反应总体积为20 μ L, 内含: 20 ng 基因组DNA, 2 mmol \cdot L⁻¹ 氯化镁, 200 μ mmol \cdot L⁻¹ dNTP, 0.5 μ mmol \cdot L⁻¹ 引物, 16.67 nkat *Taq* 酶及10 \times PCR Buffer 2 μ L, 其余的用ddH₂O补齐。PCR扩增程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性2 min; 94 $^{\circ}$ C 变性30 s, 38 $^{\circ}$ C 复性30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸1.5 min, 共38个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸7 min; 最后保存温度为10 $^{\circ}$ C。

采用15 g \cdot L⁻¹ 琼脂糖凝胶电泳, 0.5 mg \cdot L⁻¹ EB (ethidium bromide) 染色。电泳缓冲液为1 \times TBE, 电泳电压为3.5 V \cdot cm⁻¹, 电泳时间为2 h。电泳结束后在凝胶成像仪内照像保存或直接在紫外灯仪上判读记录。

1.2.3 数据记录与统计 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”。在收集过程中, 只记录易于辨认的带, 排除模糊不清的带。

利用PopGen 32 (population genetic simulator) 软件包分析多态位点比率(PPB), Shannon 多样性指数(*I*), Nei's 基因多样性指数(*h*), 群体内遗传多样性(*H_s*), 群体间的遗传分化水平(*G_{st}*)和基因流

表1 5个银杏群体的采样地、采样数及生境

Table 1 Location, habitat and sample size of 5 populations of *Ginkgo biloba*

群体	采样地	生境	采样数/个
TM	浙江西天目山	落叶与常绿混交林	30
WC	贵州务川	落叶与常绿阔叶混交林	30
DH	湖北大洪山区	落叶阔叶林与针阔叶林	30
JF	重庆金佛山区	落叶阔叶与常绿混交林	30
WY	福建武夷山区	常绿阔叶林	30
总数			150

表2 研究所用随机引物

Table 2 The random primes used in this study

引物	序列(5'~3')	引物	序列(5'~3')
AL12	CCCAGGCTAG	AM06	CTCGGGATGT
AM08	ACCACGAGTG	AM14	TGTTGCGGA
AN01	ACTCCAGGTC	P10	TCCCGCTAC
B08	GTCCACACGG	C09	CTCACCGTCC
E02	GGTCCGGGAA	F04	GGTGATCAGG
H01	GGTCCGAGAA	N07	CAGCCCAGAG

(N_m)。用 AMOVA (analysis of molecular variance) 软件分析遗传变异在群体内群体间的分布, 最后由 TFPGA 软件包利用 UPGMA 法画出品种聚类树状图^[6-14]。

2 结果与分析

2.1 群体和物种水平的遗传多样性

RAPD 分析结果显示: 12 条引物对 5 个群体共 150 个 DNA 样品进行 PCR 扩增, 共扩增出的条带 97 条, 平均每条引物扩增清晰条带数为 8.1 条, 其中多态性条带 65 个, 占 66.67%。重庆金佛山区 (JF)、贵州务川 (WC)、浙江西天目山 (TM)、湖北大洪山区 (DH) 和福建武夷山区 (WY) 的多态性条带百分率 (PPB) 分别是 38.46%, 42.03%, 51.89%, 49.30% 和 34.49%, 遗传多样性高低的顺序是浙江西天目山 (TM) > 湖北大洪山区 (DH) > 贵州务川 (WC) > 重庆金佛山区 (JF) > 福建武夷山区 (WY)。图 1~3 为引物 B08 对 5 个群体 150 个 DNA 样品的扩增图片。群体遗传多样性分析见表 3。

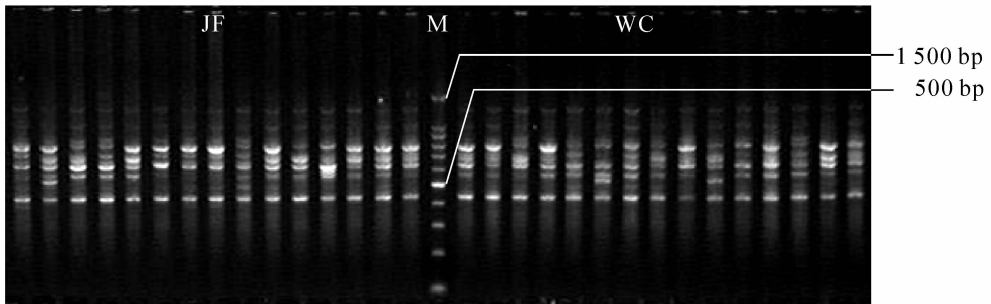


图 1 引物 B08 对 JF 和 WC 的 RAPD 扩增产物

Figure 1 Amplified RAPDs by primerB08 for samples from JF and WC

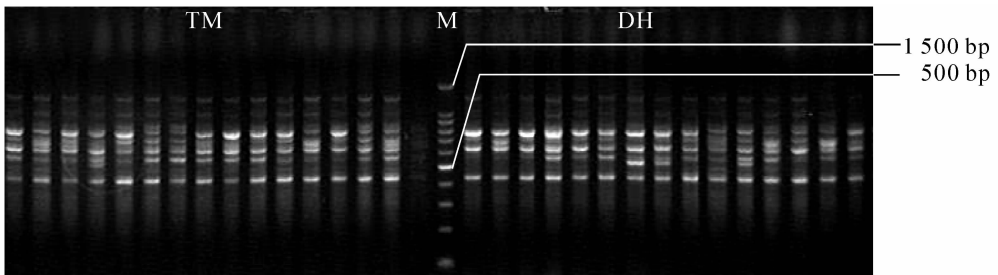


图 2 引物 B08 对 TM 和 DH 的 RAPD 扩增产物

Figure 2 Amplified RAPDs by primerB08 for samples from TM and DH

表 3 5 个银杏群体的遗传多样性分析 (平均值 ± 标准差)

Table 3 Analysis of genetic diversity of the five populations (mean ± SD)

群体	多态位点百分数 $P/\%$	Nei's 基因多样性 h	Shannon 信息指数 I
JF	38.46	0.184 1 ± 0.221 3	0.265 6 ± 0.314 9
WC	42.03	0.343 9 ± 0.209 5	0.486 8 ± 0.292 7
TM	51.89	0.436 2 ± 0.107 1	0.620 0 ± 0.140 4
DH	49.30	0.440 9 ± 0.115 9	0.623 9 ± 0.149 8
WY	34.49	0.131 4 ± 0.196 6	0.193 4 ± 0.283 3
群体水平	66.67	0.431 7 ± 0.071 4	0.621 1 ± 0.077 5

从表 3 可以看出, Nei's 基因多样性 (h) 群体平均水平是 0.431 7, Shannon 信息指数 (I) 的群体平均水平是 0.621 1。在群体水平上, Nei's 基因多样性指数 (h) 和 Shannon 信息指数 (I) 这 2 个指标的变化反映的趋势一致, 5 个群体的遗传多样性的顺序是 DH > TM > WC > JF > WY。Shannon 信息指数值均高于相应的 Nei's 基因多样性的数值。这可能是因为 Nei's 指数的计算必须有严格的显、隐性等位

基因频率, 而 Shannon 多样性指数则由于缺乏生物学意义, 在一定程度上避免了对 RAPD 扩增位点显隐性的讨论^[15]。

2.2 群体间遗传分化

假设 Hardy-Weinberg 平衡, 用 PopGen 32 软件对所有群体进行分析, 根据 Nei's 的总基因多样性(H_t)和种群内的基因多样性(H_s)估测种群间的分化系数(G_{st})为 0.288 2, 即在总的遗传变异中有 28.82% 存在于群体之间, 群体内变异占到了 71.18%。用 PopGen 32 估测的基因流为 1.234 8 (表 4), 表明群体之间有一定的基因交流, 但是还是低于一般风媒植物的平均值。根据 Shannon 信息指数, 银杏总的遗传多样性(I_{sp})为 0.621 1, 群体内遗传多样性(I_{pop})为 0.437 9, 由此得出银杏总的变异中有 29.49% 发生在种群间, 70.51% 发生在群体内, 反映的趋势总体上与 Nei's 遗传分化一致。

表 4 群体遗传分化分析

Table 4 Analysis of genetic differentiation among populations

项目	Nei's 总基因多样性 H_t	Nei's 群体内基因多样性 H_s	Nei's 基因分化系数 G_{st}	基因流 N_m	Shannon 信息指数 I		
					I_{sp}	I_{pop}	$(I_{sp} - I_{pop}) / I_{sp}$
平均	0.431 7	0.307 3	0.288 2	1.234 8	0.621 1	0.437 9	0.294 9
标准差	0.005 1	0.011 1			0.077 5	0.236 2	

Excoffier 等发展了一种分子方差分析 (analysis of molecular variance, AMOVA) 方法, 可直接对 RAPD, ISSR 等显性标记的表型数据进行分析, 剖析群体表型变异时, 不依赖于各种假设条件。因此, 本研究进一步利用 WINAMOVA 1.55 软件 (Excoffier, 1993)^[16] 对分布于中国的银杏群体内和群体间的分子变异进行了分析 (表 5)。从表中可以看出: 银杏群体间变异占 36.69%, 群体内变异占 63.31%, 群体间和群体内的变异均是极为显著 ($P < 0.001$)。

Nei's 基因多样性指数以及 Shannon 信息指数分析结果大致与 AMOVA 分析结果一致, 银杏的 5 个群体内的分化水平较高, 而群体间分化水平较低。

2.3 群体间遗传距离

基于 Nei's 遗传距离, 利用 UPGMA 法对 5 个银杏群体间的遗传关系进行了聚类分析。结果如图 4 所示。此聚类图显示: 5 个群体中, 福建武夷山 (WY) 群体显示了与其他群体之间较远的亲缘关系, 浙江西天目山 (TM) 与湖北大洪山区 (DH) 两群体之间有着很近的亲缘关系, 两者最先聚合, 然后分别与贵州务川 (WC)、重庆金佛山 (JF) 聚合。

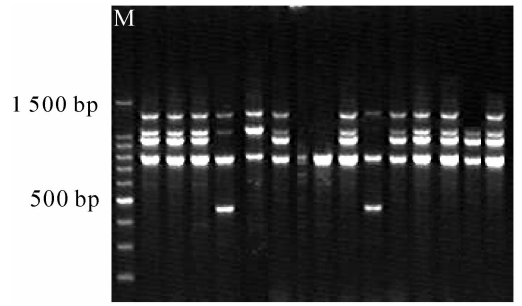


图 3 引物 B08 对 WY 的 RAPD 扩增产物

Figure 3 Amplified RAPDs by primer B-08 for samples from WY

表 5 AMOVA 分析结果

Table 5 Analysis of AMOVA

变异来源	自由度	均方差	变异组分	总百分比/%	P 值
群体间	4	35.013	2.093	36.69	<0.001
群体内	70	3.612	3.612	63.31	<0.001

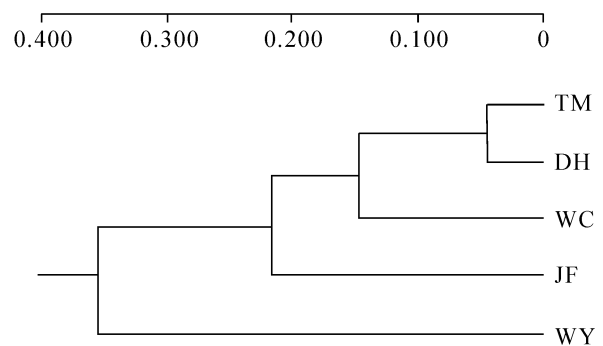


图 4 5 个银杏群体的 UPGMA 聚类

Figure 4 UPGMA clustering for 5 populations of *Ginkgo biloba*

3 讨论

作者用 RAPD 技术研究了 5 个可能的野生银杏群体: 多态位点比率群体水平是 66.67%, Nei's 基因多样性群体平均水平是 0.4317, Shannon 信息指数群体水平是 0.6211, 对比桂仁意^[4]利用 RAPD 技术对 44 个银杏栽培品种进行分析后得出其多态位点比率为 24.6%, 平均 Nei's 基因多样性为 0.3636, 平均 Shannon 信息指数为 0.5373。由此可见, 此次研究的 5 个可能野生银杏群体的遗传多样性较高。其中浙江西天目山、贵州务川、湖北大洪山区这 3 个群体的遗传多样性最高, 并且比一般裸子植物的平均值高了不少。

分析野生银杏群体得以维持较高水平遗传多样性的原因有以下几个方面。首先, 银杏曾北起东格陵兰、整个北半球, 南到澳大利亚、阿根廷和南非, 都有其踪迹, 分布几乎遍布全球。但是第四纪时, 冰期、间冰期多次交替出现, 造成动植物大规模的迁移, 银杏也难逃厄运, 现今仅在我国生存。第四纪时, 我国仅存在山岳冰川, 未受到冰盖影响, 冰川活动被限制在局部地区形成很多分散的动植物冰期避难所^[17]。因此, 可以推断, 现存的这些可能的野生银杏群体是从不同的“避难所”发展而来, 具有较为广泛的遗传基础; 其次, 银杏为孑遗植物, 有几百万年的历史, 个体生命周期长, 世代重叠, 繁育方式以风媒为主, 在不同的选择压力下保留了各自的适宜基因, 在漫长的进化过程中积累了较高水平的遗传变异。浙江天目山、贵州务川、湖北大洪山区有可能是野生银杏冰川期避难所。

Nei's 遗传多样性分析、Shannon 信息指数分析和 AMOVA 分析所揭示的银杏自然群体间分化水平分别是 28.82%, 29.49% 和 36.69%。银杏作为异花传粉的裸子植物, 由于具有较高的经济价值, 自古以来广为栽种, 而且裸子植物寿命长, 风媒异花授粉, 结实量大, 基因交流频繁, 群体间一般维持低水平的遗传分化。但是, 作者研究的野生银杏群体可能由于不同群体间地理距离大, 各地气候的差异, 加上群体间高大山脊的阻隔也使花粉的传播受到极大地阻碍, 所以基因交流比较微弱, 导致群体之间有明显的遗传分化。

从遗传聚类图来看, 5 个银杏群体可以分为 2 类, 其中福建武夷山群体显示了与其他群体之间较远的亲缘关系, 其他 4 个群体显示出比较相似的遗传多样性, 推测可能第四纪冰川前中国大陆是连成一体, 存在的银杏具有同源性, 不过后来过多的人类活动导致基因型的分化。

遗传多样性研究能为植物遗传改良提供理论指导^[18-22]。通过对野生银杏种群遗传结构分析可以获得群体遗传多样性、遗传变异分布式样等方面的重要数据, 对实现物种的有效管理和制定合理的保护策略有重要参考价值。本研究中取样的 5 个野生银杏群体采样地大都建立了自然保护区, 实行就地保护的措施, 除此之外还应尽量加大群体间交换, 为基因交流和重组创造条件, 以保存孑遗银杏遗传多样性。

参考文献:

- [1] 曹福亮. 中国银杏[M]. 南京: 江苏科学技术出版社, 2002.
- [2] 桂仁意. 银杏主要栽培品种指纹图谱构建及遗传图谱构建的研究[D]. 南京: 南京林业大学, 2004.
- [3] 郑阿宝. 银杏遗传多样性及生态保护的研究[D]. 南京: 南京林业大学, 2000.
- [4] 刘叔倩, 马小军, 郑俊华. 银杏不同变异类型的 RAPD 指纹研究[J]. 中国中药杂志, 2001, **26**(12): 822-825.
- [5] KUDDUS R H, KUDDUS N N, DVORCHIK I. DNA polymorphism in the living fossil *Ginkgo biloba* from the Eastern United States [J]. *Genome*, 2002, **45**: 8-12.
- [6] CHALMERS K J, WAUGH H R, SPRENT J I, et al. Detection of genetic variation between and within populations of *Gliricidia sepium* and *G. maculate* using RAPD markers [J]. *Heredity*, 1992, **69**: 465-472.
- [7] NEI M. Analysis of gene diversity in subdivided population [J]. *Procc Natl Acad Sci USA*, 1973, **70**: 3321-3323.
- [8] SLATKIN M, BARTON N H. A comparison of three indirect method for estimateing average levels of gene flow [J]. *Evolution*, 1989, **43**: 1349-1368.
- [9] YE H F C, YANG R C, BOYLE T. POPGENE: A joint project development by Francis C. Yeh and Rong-Cai Yang, University of Alberta and Tim Boyle [DB/CD]. Jakarta: Centre for International Forestry Research, 1999.

- [10] NEI M. Analysis of gene diversity in subdivided population [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1973, **70**: 3 321 – 3 323.
- [11] LEWONTIN R C, HUBBY J L. A molecular approach to the study of genetic heterozygosity in natural populations [J]. *Genetics*, 1992, **54**: 595 – 609.
- [12] WRIGHT S. The genetic calstructure of populations [J]. *Eugen*, 1931, **15**: 323 – 354.
- [13] NEI M. Estimation of average heterozygosity and genetics distance from a small number of individuals [J]. *Genetics*, 1978, **89**: 583 – 590.
- [14] 唐娟娟, 范义荣, 朱睦元. 黄山松群体遗传多样性分析[J]. 浙江林学院学报, 2003, **20** (1): 23 – 26.
- [15] 魏伟, 王洪新, 胡志昂, 等. 毛乌素沙地柠条群体分子生态学初步研究: RAPD 证据[J]. 生态学报, 1999, **19** (1): 16 – 22.
- [16] EXCOFFIER L. *Analysis of Molecular Variance (AMOVA) Version 1.5* [R]. Geneva: Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, 1993.
- [17] HU S Y. The metasequoia flora and its phylogeographic singnificance [J]. *J Arnold Arboretum*, 1980, **61**: 41 – 94.
- [18] ESSELMAN E J, LI J Q, CRAWFORD D J, *et al.* Clonal diversity in the rare *Calamagrostis porteri* ssp. *insperata* (Poaceae): comparative results for allozymes and random amplified polymorphic DNA (RAPD) and inter-simple sequence repeat (ISSR) markers [J]. *Mol Ecol*, 1999, **8**: 443 – 453.
- [19] TSUMURA Y, OHBA K, STRAUSS S H. Diversity and inheritance of inter-simple sequence repeat polymorphism in Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugi (*Cryptomeria japonica*) [J]. *Theor Appl Genet*, 1996, **92**: 40 – 45.
- [20] ZIETKIEWICZ E, RAFALSKI A, LABUDA D. Genome finger printing by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification [J]. *Genomics*, 1994, **20**: 176 – 183.
- [21] FANG D Q, ROOSE M L. Identification of closely related citrus cultivars with inter-simple sequence repeat markers [J]. *Theor Appl Genet*, 1997, **95**: 408 – 417.
- [22] 钱韦, 葛颂, 洪德元. 采用 RAPD 和 ISSR 标记探讨中国疣粒野生稻的遗传多样性[J]. 植物学报, 2000, **42** (7): 741 – 750.

浙江省省委、省政府领导高度关注浙江林学院科研成果

2007年11月8日, 中共浙江省委书记赵洪祝、浙江省省长吕祖善等专门来到2007中国浙江网上技术市场活动周暨杭州高新技术展示交易会浙江林学院展厅, 对浙江林学院参展的相关成果和产品产生了浓厚的兴趣, 并仔细询问了这些科技成果的相关技术和产生的效益等情况。副校长方伟分别向省领导介绍了各项成果的有关情况, 并汇报了浙江林学院近年来在科研工作上取得的成绩, 以及对服务“三农”、推动社会主义新农村建设和促进产业发展起到的积极作用。在此次交易会上, 浙江林学院选送“毛竹笋竹林高效经营关键技术集成与产业化”“竹碳生产关键技术”等2项浙江省科技进步一等奖的成果和刚刚获国家科技发明奖二等奖成果“刨切微薄竹生产技术与应用”等科研成果参加了展览。

据介绍, 2007中国浙江网上技术市场活动周由浙江省人民政府、科技部、国家知识产权局、中国科学院、中国工程院联合主办, 浙江省科技厅、杭州市人民政府等承办。中国浙江网上技术市场自2002年正式运行以来, 有效促进了科技与浙江经济的结合, 成为目前国内规模最大、影响最广的信息化、网络化技术市场。