

银杏雄株种质资源遗传多样性研究

莫昭展¹, 曹福亮², 符韵林³

(1. 玉林师范学院, 广西玉林 537000; 2. 南京林业大学森林资源与环境学院, 江苏南京 210037; 3. 广西大学林学院, 广西南宁 530004)

摘要 [目的] 分析银杏雄株种质资源的遗传多样性, 为其保存和育种创新奠定基础。[方法] 采用改进的 CTAB 法提取来自 11 个省的银杏雄株叶片的基因组 DNA, 随机引物经初筛和复筛后用于 RAPD 扩增, 并运用 POPGENE 软件分析银杏雄株种质资源的遗传多样性。[结果] 从 100 多对随机引物中筛选出 12 对扩增带清晰、重复性和多态性好的引物, 将其用于 RAPD 扩增和遗传多样性分析。利用筛选出的 12 对 RAPD 引物对 40 个样品进行 PCR 扩增, 得到 96 条清晰条带, 其中 41 条有多态性。银杏雄株种质资源的平均有效等位基因数为 1.644 0, 平均基因多样性为 0.375 2, 平均 Shannon 信息指数为 0.556 2。[结论] 银杏雄株种质资源具有丰富的遗传多样性, 对其有效保存和合理利用具有重要意义。

关键词 银杏; 雄株; 遗传多样性; RAPD

中图分类号 Q949 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2007)26-08130-02

Study on Genetic Diversity of Male Ginkgo biloba L.

MO Zhao-zhan et al (Yulin Normal College, Yulin, Guangxi 537000)

Abstract [Objective] The research aimed to analyze the genetic diversity of germplasm resources of male Ginkgo biloba L so as to lay foundation for its conservation and breeding innovation. [Method] The improved CATB method was adopted to extracted genomic DNA in the blades of male ginkgo from 11 provinces, the random primers were used for RAPD amplification after primary and second screening, and genetic diversity of germplasm resources of male ginkgo was analyzed by POPGENE software. [Result] 12 pairs of primers with clear amplified bands, good repeatability and polymorphism were screened out from more than 100 pairs of random primers for RAPD amplification and analysis of genetic diversity. 12 pairs of RAPD primers that were screened out were used for PCR amplification on 40 samples, and 96 clear bands were obtained, 41 bands of which had polymorphism. The mean number of effective alleles of germplasm resources of male ginkgo was 1.644 0, the average gene diversity was 0.375 2 and average Shannon information index was 0.556 2. [Conclusion] Germplasm resources of ginkgo had abundant genetic diversity, which had important significance for its effective preservation and reasonable utilization.

Key words Ginkgo biloba L.; Male plants; Genetic diversity; RAPD

银杏适应性强, 长期受到自然条件的影响和人工选择的作用, 在我国出现众多的地方性品种和品系, 形成了众多的地理型和生态型。据不完全统计, 全国银杏品种(品系)有 100 个左右。多年来, 科学考察队在四川贡嘎山、福建武夷山、浙江瑞安、湖北神农架、湖南张家界、广西大瑶山等地的原始森林中, 相继发现银杏的存在, 而且江苏、山东、浙江、安徽、广西等重点银杏产区的种质资源尚未全面挖掘, 因此, 我国具有巨大的银杏物种基因库^[1]。但是, 由于银杏分布大多呈分隔状态且较少集中连片, 绝大部分还处于无保护状态, 缺乏有效地收集、保存和利用, 故极易造成银杏种质资源的破坏和流失。银杏是雌雄异株的植物, 对银杏的利用主要侧重于果实的采收、叶子的采收, 人们对银杏雄株的重要性缺少认识, 肆意砍伐、毁坏, 使得银杏雄株种质资源日益减少。目前, 学术界尚未对雄株进行系统分类, 使得银杏雄株的保护和利用困难, 仅有少量专家学者对雄株种质资源进行了收集研究^[2-4]。为此, 笔者采用 RAPD 分子标记技术对雄株种质资源进行了初步分析, 旨在为雄株种质资源的鉴别、搜集、保存和育种创新奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料 银杏雄株样品采集于江苏江都的银杏雄株种质资源收集圃, 具体来源见表 1。所用的随机引物由上海生物工程公司合成, DNA 聚合酶 Taq 购自大连宝生生物有限公司, dNTP 购自上海生物工程公司。

1.2 方法

1.2.1 材料处理。每个不同样品采集新鲜叶片, 用变色硅胶

干燥的方法固定 DNA。具体操作如下: 采集 5~10 g 新鲜叶片置于一带拉锁的小塑料袋中, 再加入 50~100 g 变色硅胶, 摇动使叶片与硅胶充分地、均匀地接触, 一般来说, 硅胶与叶片的比例至少要 10:1 (w/w), 以保证叶片在 12 h 之内干燥。在野外一旦发现硅胶从深蓝色变成粉红色要即时更换, 干燥的材料带回实验室, 室温下保存。

1.2.2 基因组 DNA 的提取。提取高质量的 DNA 样品是后续分析的基本前提。DNA 提取参考 Murray (1980) 的 CTAB 法^[5]并稍加改进。

1.2.3 DNA 的质量检测。用 1% 琼脂糖凝胶电泳进行 DNA 质量检测。

1.2.4 RAPD 扩增体系。PCR 扩增在 PTC-200PCR 仪上进行。扩增体系的建立参考谭晓风等 (1998)、刘叔倩等 (2001)、桂仁意 (2004)^[6-8]。扩增程序为: 94℃ 预变性 2 min; 94℃ 变性 30 s, 40℃ 退火 30 s 和 72℃ 延伸 2 min, 38 个循环; 72℃ 延伸 7 min。反应体系为 20 μl: 10 倍反应缓冲液 Mg²⁺ 浓度为 22.5 mmol/L) 2 μl, Taq 酶 1 单位, dNTP 各为 100 μmol/L, 引物 0.5 μmol/L, DNA 模板 20 ng 左右。扩增产物经含有溴化乙锭的 1.2% 琼脂糖凝胶在 1×TBE 缓冲液中电泳分离, 最后在紫外灯下用凝胶成像系统拍照记录结果。

1.2.5 引物筛选。在确定的 RAPD 扩增方案下, 首先利用 1 个 DNA 样品对 100 多对 10-碱基的随机引物进行初筛, 只要有扩增谱带且谱带清晰即可用于复筛; 抽取 6 个不同种源的银杏基因组 DNA 样品参加复筛, 其中有分离的引物即可用于最后的全部样品分析。

1.2.6 PCR 产物电泳检测。采用 1% 琼脂糖凝胶电泳, 0.5 μg/ml EB (ethidium bromide) 染色。电泳缓冲液为 1×TBE, 电泳电压为 3.5 V/cm, 电泳时间为 2 h。电泳结束后在凝胶成

基金项目 江苏省科技项目(编号: BG200413)。

作者简介 莫昭展 (1974-), 男, 广西玉林人, 博士, 副教授, 从事植物种质资源利用的教学与研究工作。

收稿日期 2007-04-30

表 1 银杏雄株种质资源来源及原株主要生长指标

序列号	来源	树高//m	胸径//m	树龄//a	备注
1	湖南东安	18.00	0.48	52	
2	陕西周至	15.80	0.38	40	
3	陕西长安	18.00	1.37	300	
4	浙江丽水	14.00	0.52	42	早花
5	福建福州芦山	14.00	0.40	60	
6	云南滕冲临河	20.00	0.58	35	
7	广西桂林林科所	15.70	0.56	50	
8	贵州印江	28.00	1.43	400	
9	湖北随县	22.70	0.83	600	
10	安徽宁国	13.00	0.31	80	
11	山东日照	29.00	2.10	1 000	
12	山东蒙阴	19.00	1.10	450	明朝
13	山东海阳	11.00	0.64	80	
14	山东荣城	17.00	0.60	54	
15	山东泰安	26.14	1.12	420	
16	山东泰安	29.00	0.94	450	早花
17	山东泰安	12.00	0.42	90	
18	山东泰安	21.20	0.65	100	
19	山东泰安	18.10	0.69	100	
20	山东泰安	21.20	0.51	100	
21	山东郯城	10.50	0.46	85	
22	山东郯城	16.10	0.49	70	
23	山东郯城	22.00	0.55	50	
24	山东郯城	11.70	0.42	71	
25	山东郯城	15.70	0.50	70	
26	山东郯城	37.00	2.30	2 200	
27	山东郯城	20.50	1.95	1 000	
28	山东郯城	15.70	0.62	80	
29	山东郯城	15.90	0.72	100	
30	山东泰安	26.00	0.97	500	晚花
31	江苏邳洲	26.00	0.46	80	
32	江苏邳洲	28.00	0.55	80	
33	江苏邳洲	23.00	0.43	300	
34	江苏邳洲	8.60	0.52	150	
35	江苏邳洲	4.60	0.56	500	
36	江苏邳洲	6.50	0.64	400	
37	江苏邳洲	3.00	0.66	250	
38	江苏邳洲	4.00	0.51	200	
39	江苏邳洲	3.00	0.68	150	
40	江苏邳洲	7.00	0.59	90	

注:性别均为♂。

像仪内照像保存。

1.3 数据统计 RAPD 扩增多态性谱带有用“1”表示,无谱带时记录为“0”。利用 POPGENE 软件计算各位点的观察等位基因数 N_a ,有效等位基因数 N_e ,基因多样性 H 以及 shannon 信息指数 I 。

2 结果与分析

2.1 DNA 质量检测结果 基因组 DNA 为一条清晰完整明亮的带,迁移率与 λ DNA 相当,没有拖散或弥散现象。

2.2 引物筛选 经过样品的初筛与复筛,从 100 多对随机引物中选出 12 对反应稳定、扩增带清晰、重复性好、存在多态性的引物,将其用于 PCR 扩增和遗传多样性分析。具体引物名称与序列见表 2。

表 2 多态性 RAPD 引物名称及其序列

序号	引物名称	引物序列
1	AL12	CCCAGGCTAG
2	AM06	CTCGGGATGT
3	AM08	ACCACGAGTG
4	AM14	TGGTTGCGGA
5	AN01	ACTCCACGTC
6	AY13	CCGCTCGTAA
7	B08	GTCACACGG
8	C09	CTCACCGTCC
9	E02	GGTGCGGGAA
10	F04	GGTGATCAGG
11	H01	GGTCGGAGAA
12	N07	CAGCCAGAG

2.3 RAPD 扩增结果 利用筛选出的 12 对 RAPD 引物对所有 40 个样品进行 PCR 扩增,共得到清晰条带 96 条,平均每条引物扩增清晰条带数为 8 条,多态性条带 41 条,多态位点百分率为 42%。图 1、2 是引物 AM14、AN01 的部分 RAPD 扩增谱带。

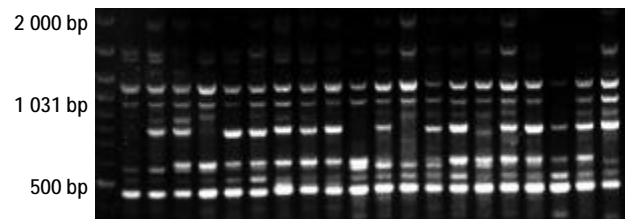


图 1 RAPD 引物 AM14 的部分扩增产物

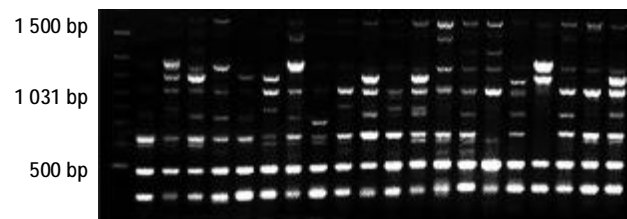


图 2 RAPD 引物 AN01 的部分扩增产物

2.4 遗传多样性估计 利用软件 POPGENE32 对众多态位点的有效等位基因数目 N_e 、基因多样性 H 、shannon 信息指数 I 以及平均有效等位基因数目、平均基因多样性、平均 shannon 信息指数进行计算,结果见表 3。由表 3 可知,雄株种质资源的平均有效等位基因数为 1.644 0,平均基因多样性为 0.375 2,平均 shannon 信息指数为 0.556 2;就各位点来讲,其各位点遗传多样性程度也存在较大差别,有效等位基因数最大值为 2.000,最小值为 1.219 5,基因多样性最大值为 0.500 0,最小值为 0.108 9,shannon 信息指数最大值为 0.693 1,最小值为 0.127 2;有效等位基因数目、平均基因多样性和平均 Shannon 信息指数的指数均方的标准误差都较小,分别为 0.258 5、0.108 9、0.127 2,估计精度较高。

3 结论与讨论

RAPD 分子标记具有简捷、高效、可靠等特点,在遗传多样性分析中应用广泛。但对于某一特定的物种而言,需建立其稳定的反应体系方可体现其高效可靠的优点,如果没有稳定的反应体系,RAPD 分子标记易出现重复性差等缺点,这一点对于进行 RAPD 分析很重要。对于要求检测大量样本的遗传多样性研究来说,首要步骤是获得数量足够、质量符合要求的 DNA 样品,因此样品的采集与 DNA 制备至关重要。一般来说,提取 DNA 的组织样品应尽量保持新鲜使其中的 DNA 维持结构完整与生理活性状态,冷冻是保持组织成分的最有效方式,但由于受采样地理位置及交通运输等因素的影响,要采集、冷冻和及时运输新鲜材料供 DNA 提取有一定困难。在该研究中,采取了用硅胶干燥植物叶片的方法采集样品。汪小全等对银杉的 RAPD 研究表明,从干样品中提取的 DNA 模板可获得与鲜样品同等的扩增效果,从同一个体的干叶和鲜叶片中提取的 DNA 模板可获得完全一致的扩增产物,这种方法现已广泛应用于 RAPD、PCR-RFLP、ISSR、RFLP 以及序列分析。

银杏是一个天然异交物种,其植物细胞储存了大量的、

(下转第 8133 页)

表 3 银杏雄株种质资源各多态位点的遗传多样性分析

位点	Na*	Ne*	h*	I*
AL12-1750	2.000 0	1.600 0	0.375 0	0.562 3
AL12-1520	2.000 0	1.663 2	0.398 7	0.588 2
AL12-1300	2.000 0	1.923 1	0.480 0	0.673 0
AL12-750	2.000 0	1.882 4	0.468 8	0.661 6
AL12-600	2.000 0	1.406 0	0.288 8	0.463 7
AM06-1700	2.000 0	1.834 9	0.455 0	0.647 4
AM06-950	2.000 0	1.219 5	0.180 0	0.325 1
AM06-600	2.000 0	1.406 0	0.288 8	0.463 7
AM08-1031	2.000 0	1.342 3	0.255 0	0.422 7
AM08-600	2.000 0	1.980 2	0.495 0	0.688 1
AM08-550	2.000 0	1.535 5	0.348 7	0.533 2
AM14-570	2.000 0	1.105 0	0.095 0	0.198 5
AM14-800	2.000 0	1.724 1	0.420 0	0.610 9
AM14-950	2.000 0	1.834 9	0.455 0	0.647 4
AN01-630	2.000 0	1.956 0	0.488 8	0.681 9
AN01-750	2.000 0	1.663 2	0.398 7	0.588 2
AN01-900	2.000 0	1.882 4	0.468 8	0.661 6
AN01-1031	2.000 0	1.980 2	0.495 0	0.688 1
AY13-1650	2.000 0	1.535 5	0.348 7	0.533 2
AY13-880	2.000 0	1.406 0	0.288 8	0.463 7
AY13-520	2.000 0	1.882 4	0.468 8	0.661 6
AY13-350	2.000 0	1.724 1	0.420 0	0.610 9
B08-700	2.000 0	1.834 9	0.455 0	0.647 4
B08-590	2.000 0	2.000 0	0.500 0	0.693 1
B08-450	2.000 0	1.956 0	0.488 8	0.681 9
C09-1100	2.000 0	1.406 0	0.288 8	0.463 7
C09-1050	2.000 0	1.470 6	0.320 0	0.500 4
C09-900	2.000 0	1.342 3	0.255 0	0.422 7
C09-600	2.000 0	1.219 5	0.180 0	0.325 1
E02-1250	2.000 0	1.834 9	0.455 0	0.647 4
E02-900	2.000 0	1.956 0	0.488 8	0.681 9
E02-520	2.000 0	1.600 0	0.375 0	0.562 3
F04-1200	2.000 0	1.781 7	0.438 8	0.630 6
F04-400	2.000 0	1.663 2	0.398 7	0.588 2
F04-350	2.000 0	1.161 1	0.138 7	0.266 4
H01-800	2.000 0	1.406 0	0.288 8	0.463 7
H01-700	2.000 0	1.663 2	0.398 7	0.588 2
H01-600	2.000 0	1.724 1	0.420 0	0.610 9
H01-550	2.000 0	1.834 9	0.455 0	0.647 4
N07-1400	2.000 0	1.781 7	0.438 8	0.630 6
N07-1150	2.000 0	1.280 0	0.218 8	0.376 8
平均值	2.000 0	1.644 0	0.375 2	0.556 2
St.Dev		0.258 5	0.108 9	0.127 2

注:h 为 Nei's 遗传距离;试验的多态位点是 41;多态位点比例是 100.00;样本数量为 40。

种类繁多的次生物质,如糖类、酚类等,DNA 的提取与纯化比其他的植物困难,这些次生物质在提取 DNA 的过程中与

DNA 共沉淀,形成黏稠的胶状物难以溶解或产生褐变,且它们的存在会严重抑制 Taq DNA 聚合酶的活性,使得 PCR 扩增反应不能进行,所以在银杏 DNA 的提取过程中,去除多糖与多酚等次生物质是关键步骤。该研究采用 CTAB 法进行基因组 DNA 提取,其中有两处有所改动:①同时使用较高浓度的聚乙烯吡咯烷酮 PVP(5%,W/V)和巯基乙醇(3%),以消除银杏叶内复杂的次生物质的影响;②增加酚仿抽提次数,以充分去除各种杂质,取得了较好的扩增效果。

银杏作为中国独有的子遗树种,其种质资源遗传多样性研究对该物种进化、演化、变异及品种分类有重要意义。该研究仅在有限的时间里对有限的银杏雄株资源进行了遗传多样性初步分析,遗传多样性参数说明银杏雄株种质资源具有丰富的遗传多样性,开展银杏雄株种质资源选择和进行杂交育种,选育出优良品系的可能性是非常大的;同时也表明,进行雄株种质资源的收集、保存和有效利用是非常重要的。但是生物多样性和物种保护涉及许多因素,对一个物种进行保护,必须建立在对它有全面了解的基础之上,如果对生物进化的历史及它们赖以生存的生态系统和物质能量流动缺乏了解,仅仅研究遗传多样性本身其价值是很有限的。

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] 邢世岩,吴德军,有祥亮,等.叶用银杏种源、性别及无性系的因子和聚类分析[J].中南林学院学报,2000,20(2):26-30.
- [3] 陈学森.叶用银杏资源评价及选优的研究[J].园艺学报,1997,24(3):215-219.
- [4] 肖新华,张云跃.银杏种源、家系、无性系选择研究[J].经济林研究,2002,20(2):1-2.
- [5] MURRAY M G, THOMPSON W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA [J]. Nucl Acids Res, 1980, 8: 4321-4325.
- [6] 谭晓风,胡芳名,张启发.银杏主要栽培品种的分子鉴别[J].中南林学院学报,1998,18(3):3-9.
- [7] 刘叔倩.银杏不同变异类型的 RAPD 指纹研究[J].中国中药研究,2001,24(12):12-15.
- [8] 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.
- [9] 汪小全,邹喻苹,张大明.RAPD 应用于遗传多样性和系统学研究中的问题[J].植物学报,2000,38(12):954-962.