子遗植物银杏群体遗传多样性的 ISSR 分析

葛永奇 邱英雄 丁炳扬 傅承新*

(浙江大学生命科学院植物系统进化与生物多样性实验室, 杭州 310029)

摘要: 采用 ISSR 分子标记技术, 对江苏泰兴、美国纽约的栽培银杏(*Ginkgo biloba*)群体和中国 3 个可能为野生的银杏自然群体(浙江天目山、贵州务川、湖北大洪山区)的遗传多样性水平和群体遗传结构进行了研究。用 13 个引物对 5 个群体共 66 个样品进行扩增, 共得到 88 个清晰的扩增位点, 其中多态性位点 62 个, 多态位点百分率(*PPB*)为 70.45%。POPGENE 分析结果表明: 与其他裸子植物相比, 银杏具有丰富的遗传变异($H_e = 0.2408$; $H_o = 0.3599$)。贵州务川群体的遗传多样性水平最高($PPB = 56.82\%$, $H_e = 0.2089$, $H_o = 0.3087$), 江苏泰兴栽培群体($PPB = 34.09\%$, $H_e = 0.1269$, $H_o = 0.1858$)和美国纽约的栽培群体($PPB = 23.86\%$, $H_e = 0.0884$, $H_o = 0.1312$)的遗传多样性水平较低。Nei's 遗传多样性分析和 AMOVA 分析表明, 3 个可能的自然群体间出现了一定程度的遗传分化($G_{st} = 0.1476$, $\Phi_{st} = 14.26\%$)。群体间一定程度的遗传分化可能是人为选择压力和基因流障碍引起的。根据 Nei's 遗传距离矩阵分别构建了群体间和个体间的遗传关系树状图。由 UPGMA 聚类分析可知, 贵州务川群体与浙江天目山群体优先聚类, 美国纽约群体与湖北大洪山群体具有较近的亲缘关系, 它们可能为同一野生群体的后裔。通过对银杏群体遗传结构的分析并结合群落学调查研究, 结果表明: 贵州务川银杏群体很可能为野生自然群体。基于银杏群体遗传学和生态学的研究结果, 建议在自然银杏群体最适生境和遗传多样性最高的贵州务川建立银杏保护区。由于银杏群体间出现了一定程度的分化, 建议 3 个自然群体间可进行植株和幼苗相互移栽, 以提高群体间的基因交流, 以最大限度地保护银杏的遗传多样性。

关键词: 银杏, ISSR, 遗传多样性, 遗传结构, 保护策略

中图分类号: Q16 文献标识码: A 文章编号: 1005-0094(2003)04-0276-12

An ISSR analysis on population genetic diversity of the relict plant *Ginkgo biloba*

GE Yong-Qi, QIU Ying-Xiong, DING Bing-Yang, FU Cheng-Xin*

Laboratory of Plant Systematic Evolution and Biodiversity, College of Life Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310029

Abstract: *Ginkgo biloba*, now unique in the *Ginkgo*sida, is referred as a "living fossil" plant. As a wild species, *Ginkgo biloba* is endemic to China. ISSR analysis was conducted on the possible natural populations (Tianmushan, Wuchuan, and Dahongshan) and the cultivated populations (Taixing and New York) in order to investigate the genetic diversity and the genetic structure of the populations. Out of 100 ISSR primers, 13 generated highly reproducible and stable DNA fragments. Using these primers, 88 discernible DNA fragments were produced. Of these, 62 ($PPB = 70.5\%$) were polymorphic loci, which indicated that high levels of genetic variation existed in the possible natural populations. The result of POPGENE analysis indicated that the level of genetic variation of *Ginkgo biloba* ($H_e = 0.2408$; $H_o = 0.3599$) was higher than other endangered or relict gymnosperms. The Wuchuan population possessed the highest level of genetic diversity ($PPB = 56.82\%$, $H_e = 0.2089$, $H_o = 0.3087$), while the cultivated populations, Taixing ($PPB = 34.09\%$, $H_e = 0.1269$, $H_o = 0.1858$) and New York ($PPB = 23.86\%$, $H_e = 0.0884$, $H_o = 0.1312$), exhibited lower levels of genetic diversity than the possible natural popula-

基金项目: 国家重点基础研究发展规划项目(G2000046806)
收稿日期: 2002-12-16; 接受日期: 2003-06-09
作者简介: 葛永奇, 男, 1977 年出生, 在读硕士生。研究方向为植物系统进化。
* 通讯作者 Author for correspondence E-mail: fucxsmi@mail.hz.zj.cn

tions (Tianmushan , Wuchuan and Dahongshan). Nei's genetic diversity analysis and analysis of molecular variance (AMOVA) showed that there was a certain level of genetic differentiation ($G_{st} = 0.1476$, $\Phi_{st} = 14.26\%$) among the three possible natural populations. Some differentiation may be caused by human selective pressures and barriers to gene flow. The dendrograms of genetic relationships among populations and among individuals were constructed based on Nei's genetic distance. The Wuchuan and Tianmushan populations clustered in a clade. Close relationship was revealed between the New York and Dahongshan populations , which means that they are likely the offspring of the same natural population. The combined results of the analysis of population genetic structure and community investigation suggest that Wuchuan may be a natural population. Based on ecological and genetic information available for *Ginkgo biloba* , two management strategies are proposed. The first would consist of an in situ conservation plan that defines conservation areas free from significant disruption for the genetically most diverse population and the optimal habitat (namely Wuchuan). The second would be to cross-transplant adult plants or seedlings mutually among populations in order to enhance the gene flow. By this means , the genetic diversity resources of the species can be preserved to the greatest extent.

Key words : *Ginkgo biloba* , ISSR , Genetic diversity , Genetic structure , Conservation strategy

银杏(*Ginkgo biloba*)是裸子植物银杏纲中唯一现存的中生代子遗植物。雌雄异株 ,染色体数目为 $2n = 24$ (陈学森等 ,1996)。银杏对气候的适应性较强 ,分布于 $21^{\circ}30' \sim 41^{\circ}46' N$, $97^{\circ} \sim 125^{\circ} E$ 间的温带、暖温带和亚热带地区。由于银杏叶和种子具有重要的药用价值以及其种子的可食性 ,银杏在中国被广泛栽培 ,至今已有近 1000 年的栽培史 (Del Tredici *et al.* , 1992)。现栽培银杏分布于我国的 24 个省区 ,国外现栽培的银杏都源自中国 (林协 ,1965)。我国银杏资源非常丰富 ,数百年来 ,人们选育的优良品种(系)已达百余个 ,银杏已经成为重要的经济植物(章继华 ,1992)。大量的栽培群体和栽培品种是否能够替代对自然银杏群体的保护 ? 能否从分子水平推测出银杏在中国的避难所 ? 要解决这些问题 ,有必要对原产地(中国)的银杏自然群体和栽培群体的遗传结构和多样性水平进行研究。

近两个世纪以来 ,人们在银杏的形态学、细胞学、生态学、繁育生物学和植物化学等方面作了大量的研究(陈学森等 ,1996 ;向应海等 ,1997 ;Holt & Rothwell ,1997 ; Del Tredici ,1997 ;周亚林等 ,1998 ; Jacobs & Browner , 2000 ; 林睦就等 ,2002 ;曹帮华等 2002)。而且 ,目前国内外已有一些关于银杏等位酶和 DNA 分子水平的遗传多样性的研究报道。吴俊元等(1992)分析了西天目山银杏古树的等位酶变异 ,Tsumura & Ohba (1997) 分析了日本 98 株古银杏树的等位酶变异 ,刘叔倩等(2001)利用 RAPD 分子标记对银杏的不同变异类型进行了研

究 ,Kuddus *et al.* (2002)利用 RAPD 技术分析了美国 3 个群体的 18 株银杏的遗传变异。上述研究多数是以栽培群体或单个可能的自然群体为研究材料 ,因而未能揭示银杏在物种水平的遗传多样性水平。

ISSR(inter-simple sequence repeats)是由 Zietkiewicz *et al.* (1994)提出的一种新型分子标记技术 ,用于检测 SSR(simple sequence repeat)间 DNA 序列差异。ISSR 引物比 RAPD(随机扩增多态性 DNA)的引物长 ,退火温度更高($50^{\circ}C$ 左右) ,因此 ISSR 具有比 RAPD 更高的可重复性和稳定性(Esselman *et al.* , 1999 ;邹喻苹等 2001 ; Camacho & Liston , 2001)。近年来 ,应用 ISSR 分析技术对植物进行遗传多样性研究已有较多报道(Gilbert *et al.* , 1999 ;Prevost & Wilkinson ,1999 ;钱韦等 2000 ;Camacho & Liston , 2001)。本研究利用 ISSR 分析技术对中国 3 个可能野生的银杏自然群体和 1 个栽培群体以及 1 个美国栽培群体的遗传结构进行了研究 ,旨在揭示 1)银杏自然群体的遗传结构和遗传多样性水平 2)从分子水平结合群落学调查推测银杏在中国可能的避难所 3)为有效保护银杏遗传资源提供科学的保护策略。

1 材料与方法

1.1 植物材料

材料来源包括可能为银杏野生地的浙江西天目山(TM)、贵州务川(WC)、湖北大洪山(DH)、中国

的栽培群体江苏泰兴(TX),美国纽约中央公园及纽约植物园的栽培群体(NY)共计 5 个群体。除美国纽约仅采集 6 株银杏的叶片外 ,其他每个地区根据银杏分布范围随机选取 15 个样株(间隔至少 100 m 以上 ,植株胸径大于 50 cm) ,每株采集的叶片迅速装入封口袋用硅胶干燥保存。为保证重复取样的准确性 ,对每株样树的树高、胸径进行测量和照相并记录生境和钉铁牌编号登记。所选群体(除 NY 群体外)在中国的分布见图 1 ,各群体所在地及其生境状况见表 1。

1.2 基因组 DNA 提取与 PCR 扩增

采用改良 CTAB 法(Doyle , 1991)提取银杏叶片基因组 DNA。ISSR 扩增反应条件经过比较和优化确定为 25 μ L 的 PCR 反应液 ,内含 :模板约 60 ng ,1U Taq 酶 ,1.5 mmol/L MgCl₂ , 4 种 dNTPs 各 0.25 mmol/L ,0.3 μ mol/L 引物 ,0.5mmol/L 亚精胺 ,2% 甲酰胺。PCR 扩增条件 :94℃ 预变性 5 min , 然后进行 45 个循环 :94℃ 变性 1 min ,52 ~ 55℃ 复性 45s ,72℃ 延伸 2 min ,循环结束后 72℃ 5 min。PCR 产物在含有 EB 的 2.0% 琼脂糖凝胶中电泳 ,以 100

图 1 银杏群体(中国)采样点示意图
注 :TM :浙江西天目山群体 ,WC :贵州务川群体 ,DH :湖北大洪山群体 ,TX :江苏泰兴群体
Fig. 1 Map showing populations of *Ginkgo biloba* sampled from China
Note : TM , population of West Tianmu Mountain , Zhejiang Province ; WC , population of Wuchuan County , Guizhou Province ; DH , population of Dahong Mountain , Hubei Province ; TX , population of Taixing County , Jiangsu Province

表 1 5 个银杏群体的产地、生境及采样数
Table 1 Location , habitat and sample size (number of individuals) of five *Ginkgo biloba* populations

群体 Population	产地 Location	生境 Habitat	采样数 Sample size
TM	浙江西天目山 West Tianmu Mountain , Zhejiang Province	落叶与常绿混交林 Mixed evergreen and deciduous forest	15
WC	贵州务川 Wuchuan County , Guizhou Province	落叶与常绿混交林 Mixed evergreen and deciduous forest	15
DH	湖北大洪山 Dahong Mountain , Hubei Province	落叶阔叶林和针阔混交林 Deciduous broad-leaved forest and mixed coniferous-broad-leaved forest	15
TX	江苏泰兴 Taixing County , Jiangsu Province	栽培林 Cultivated forest	15
NY	美国纽约 New York Botanical Garden and Central Park , USA	栽培林 Cultivated forest	6

表 2 对银杏 5 个群体 66 个个体进行扩增的 ISSR 引物的特点
Table 2 Attributes of ISSR primers used for generating ISSR markers from 66 individuals of *Ginkgo biloba* sampled from five populations

引物编号及序列 Code and sequence of primer	统计条带数 No. of bands scored	多态性条带数 No. of polymorphic bands
UBC815 (CT) ₈ G	7	4
UBC824 (TC) ₈ G	10	10
UBC828 (TG) ₈ A	3	2
UBC835 (AC) ₈ CG	9	8
UBC844 (CT) ₈ GC	8	5
UBC845 (CT) ₈ GG	5	3
UBC848 (CA) ₈ AG	6	3
UBC853 (TC) ₈ RT	8	8
UBC857 (AC) ₈ YG	8	8
UBC858 (TG) ₈ AG	4	2
UBC859 (TG) ₈ GC	5	1
UBC874 (CCCT) ₄	7	4
UBC881 (GGGGT) ₃	8	4

注 :R = A/T , Y = C/G

bp Marker (GeneRuler 100 ladder ,Fermentas UAB , Inc.)作为标准分子量对照 ,EPSON 紫外自动成像仪照相。位点的命名由所用引物和条带大小来确定。

1.3 引物筛选

用加拿大哥伦比亚大学(UBC)提供序列 ,上海生工公司合成的 ISSR 引物 ,5 个群体中各选取 2 个模板 ,在 25 μL 反应体系中进行扩增筛选。从 100 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全部 5 个群体 DNA 样品的扩增(表 2)。变性温度根据引物的 *Tm* 值变化 1 ~ 3℃。

1.4 统计分析

电泳图谱中的每一条带均视为一个分子标记 (marker) ,并代表一个引物的结合位点。按凝胶同一位置上 DNA 带的有无进行统计 ,有带(包括弱带)的记为“ 1 ” ,无带的记为“ 0 ”。对群体遗传参数的统计基于以下两个假设 :1)银杏群体处于 Hardy-Weinberg 平衡 2)统计条带时认为电泳迁移率相同的条带是扩增基因组上的相同 DNA 片段的产物。采用 POPGENE 软件(Yeh *et al* ,1997)对全部群体和各个群体分别进行遗传参数分析。分别计算了多

态位点百分率(*PPB* , percentage of polymorphic bands)、观测等位基因数(*A_o* , number of alleles per locus)、有效等位基因数(*A_e* , effective number of alleles per locus)、群体总基因多样性(*H_t* , total gene diversity)、群体内基因多样性(*H_s* , gene diversity within populations)、各群体间的遗传分化指数(*G_{st}* , coefficient of population differentiation)(*G_{st}* = 1 - *H_s* / *H_t*)、Nei's 基因多样性(*H_e*)、Nei's 遗传距离(*D* , genetic distance)和遗传一致度(*I* , genetic identity)。Shannon's 信息指数(*H_o* , Shannon's information index)也被用来检测群体遗传多样性水平(Lewontin , 1972)。*H_o* = - ∑ *P_i* log₂ *P_i* , *P_i* 为第 *i* 条带的表型频率。根据 Nei's 遗传距离 ,利用 NTSYS PC-2. 10 (Rohlf ,1994)软件对银杏群体和单株进行 UPGMA 聚类分析。

Excoffier *et al.* (1992)发展出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(Huff *et al.* , 1993 ; Ge *et al.* , 1999) ,计算群体表型变异时 ,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)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。

2 结果与分析

2.1 群体和物种水平的遗传多样性水平

从 100 个左右的引物中筛选出的 13 个 ISSR 引物(表 2) ,对 5 个群体的 66 个 DNA 样品进行 PCR 扩增。其中 ,引物 UBC845 对浙江西天目山(TM)群体的 15 棵植株 DNA 样品扩增结果见图 2。13 条引物扩增出的条带数目从 3 至 10 不等 ,条带片段大小分布在 250 ~ 2500 bp 之间。共扩增产生了 88 个可统计的条带 ,其中具有多态性的条带 62 个 ,占 70. 45%(表 2)。贵州务川(WC)、浙江西天目山(TM)、湖北大洪山区(DH)、江苏泰兴(TX)、美国纽约(NY)5 个群体的多态性位点百分率分别为 56. 82%、50%、50%、34. 09% 和 23. 86%(表 3)。

从表 3 可知 ,美国纽约(NY)群体的多态位点百分率(*PPB*)最低 ,贵州务川(WC)群体的多态位点百分率最高。3 个可能的野生自然群体的 *PPB* 平均为 52. 27% ,比栽培群体(TX ,NY ,PZ)要高得多。3 个可能的野生自然群体的 Nei's 基因多样性(*H_e*)

图 2 引物 UBC845 扩增浙江天目山银杏群体(TM)15 棵植株基因组 DNA 的 ISSR 电泳图
Fig.2 ISSR profiles of 15 individuals from the TM population of *Ginkgo biloba* with primer UBC845

在 0.1844 ~ 0.2089 之间 ,平均值为 0.1986 ; Shannon’s信息指数(H_o)在 0.2724 ~0.3087 之间 ,平均值为0.2920 ;各群体的 Shannon’s 信息指数大小变化趋势与多态位点百分率一致。典型栽培群体江苏泰兴(TX)的基因多样性为 0.1269 ,Shannon’s 信息指数为 0.1858。美国纽约栽培群体(NY)的基因多样性和 Shannon’s 信息指数最低(H_e =0.0884 , H_o = 0.1312)。选择 3 个可能的自然群体计算银杏物种水平的遗传多样性 ,结果表明银杏自然群体在物种水平的遗传多样性(PPB =70.45% , A_o = 1.7045 , A_e = 1.4155 , H_e = 0.2408 , H_o = 0.3599)比栽培群体要高得多(表 3)。

表 3 自然与栽培群体内的遗传多样性比较分析
Table 3 Statistical analysis of genetic variation in natural and cultivated populations

群体 Population	个体数 Sample size	多态位 点百分率 PPB (%)	观测等位 基因数 A_o	有效等位 基因数 A_e	Nei’s 基因多样性 H_e	Shannon’s 信息指数 H_o
自然群体 Natural population						
TM	15	50.0	1.5000 (0.5029)	1.3218 (0.3834)	0.1844 (0.2076)	0.2724 (0.2968)
WC	15	56.82	1.5682 (0.4982)	1.3635 (0.3863)	0.2089 (0.2083)	0.3087 (0.2969)
DH	15	50.0	1.5000 (0.5029)	1.3614 (0.4036)	0.2026 (0.2162)	0.2948 (0.3085)
群体水平 Population level	15	52.27 (3.937)	1.523 (0.0394)	1.349 (0.0235)	0.1986 (0.0127)	0.2920 (0.0183)
物种水平 Species level	45	70.45	1.7045	1.4155	0.2408	0.3599
栽培群体 Cultivated population						
TX	15	34.09	1.3409 (0.4767)	1.2285 (0.3733)	0.1269 (0.1980)	0.1858 (0.2814)
NY	6	23.86	1.2386 (0.4287)	1.1532 (0.3100)	0.0884 (0.1690)	0.1312 (0.2449)
PZ(邳州)*	28	30.47	—	—	—	—

* 根据刘叔倩(2001)资料所作的统计分析 ,括号内的数值为标准差 ; “ — ”表示作者未作统计
* Statistical analysis based on Liu *et al.* (2001). Numbers in parentheses are standard deviations. “ — ”, data not available.
 PPB , Percentage of polymorphic bands ; A_o , number of alleles per locus ; A_e , effective number of alleles per locus ; H_e , Nei’s (1973) gene diversity ; H_o , Shannon’s information index (Lewontin , 1972)

2.2 群体间遗传分化程度的比较分析

根据总的基因多样性(H_t)和群体内基因多样性(H_s)计算不同群体间的分化水平(G_{st}) (表 4)。所分析的 5 个银杏群体间 $G_{st}=0.3248$, 即表明总的遗传变异中有 32.48% 的变异存在于群体间, 群体内的遗传变异为 67.52%。银杏 3 个可能的野生自然群体间 $G_{st}=0.1476$, 在总的遗传变异中有 14.76% 的变异存在于群体间, 群体内的遗传变异为 85.24% (表 4)。

AMOVA 对 3 个可能的野生自然群体的分析结果与 Nei's 遗传多样性分析所得到的遗传分化系数基本一致, 在总的遗传变异中有 14.26% (Φ_{st}) 的变异发生在群体间, 有 85.74% 的变异发生在群体内, 群体间和群体内变异均极显著 ($P<0.001$) (表 5)。群体遗传分化分析表明, 银杏群体间已经出现了一

定程度的遗传分化。

2.3 银杏群体和个体间的聚类分析

为了进一步分析群体之间的遗传分化程度, 计算了 Nei's 遗传一致度(I)和遗传距离(D) (Nei, 1978)。银杏各群体间遗传一致度(I)和遗传距离(D)列于表 6。从表中可以看出, I 值的变化范围为 0.8244~0.9411, D 值变化范围为 0.0607~0.1931, WC 与 TM 的 I 值最高, TX 与 NY 的 I 值最低。

根据 Nei's 遗传距离利用 UPGMA 法所构建的群体遗传关系聚类图见图 3。

单株遗传关系聚类图见图 4。单株 UPGMA 聚类结果表明, 江苏泰兴(TX)群体个体间具有相似的基因型, 因此群体中 15 个个体明显聚为一支, 这是人为选择品种和营养繁殖的结果。美国纽约(NY)群体的 6 个个体也聚在一起, 且与湖北大洪山(DH)

表 4 不同群体间的遗传分化分析

Table 4 Analysis of genetic differentiation among populations

群体 Population	Nei's 总基因多样性 H_t	Nei's 群体内基因多样性 H_s	Nei's 遗传分化系数 G_{st}
所有群体(平均值) All populations(Mean)	0.2403(0.0409)	0.1622(0.0208)	0.3248
WC/TM/DH 平均值 Mean	0.2330(0.0399)	0.1986(0.0311)	0.1476

Notes : H_t , total gene diversity ; H_s , gene diversity within populations ; G_{st} , the coefficient of population differentiation

表 5 银杏群体间和群体内分子变异的 AMOVA 分析结果

Table 5 Analysis of molecular variance (AMOVA) within/among *Ginkgo biloba* populations

变异来源 Source of variation	自由度 <i>d. f.</i>	总方差 <i>SSD</i>	平均方差 <i>MSD</i>	变异组分 Variance component	总变异百分率 Total variance (%)	P^*
群体间 Among populations	2	57.51	28.76	1.37	14.26	<0.001
群体内 Within populations	42	345.6	8.23	8.23	85.74	<0.001

* P values are the probabilities of having a more extreme variance component than the observed values by chance alone. Probabilities calculated by 1000 random permutations of individuals across populations.

图 3 银杏群体间 Nei's 遗传距离的 UPGMA 聚类图

Fig. 3 UPGMA dendrogram for five populations of *Ginkgo biloba* based on Nei's genetic distance

表 6 Nei's 遗传一致度(*I*)(右上角)和遗传距离(*D*)(左下角)
Table 6 Nei's genetic identity (*I*) (above diagonal) and genetic distance (*D*) (below diagonal)

Population	TM	WC	DH	TX	NY
TM	****	0.9411	0.9302	0.8863	0.8539
WC	0.0607	****	0.9357	0.8587	0.8615
DH	0.0724	0.0664	****	0.8674	0.8962
TX	0.1207	0.1523	0.1422	****	0.8244
NY	0.1579	0.1491	0.1096	0.1931	****

群体中部分个体具有较近的亲缘关系 ,它们可能为同一自然群体的后裔。浙江西天目山(TM)群体和贵州务川(WC)群体的大部分个体以及湖北大洪山(DH)群体的部分个体根据遗传关系可分为 2 支。可以推测 ,浙江西天目山(TM)群体、湖北大洪山(DH)群体和贵州务川(WC)群体具有较近的亲缘关系。

3 讨论

3.1 银杏的遗传多样性

Kuddus *et al.* (2002)对美国宾夕法尼亚、华盛顿和尼加拉河的 18 株银杏间的遗传变异进行了 RAPD 分析 ,表明了华盛顿群体内 12 个个体间基因组相似性很高 ,RAPD 分析扩增的 72 个条带中仅 1 个条带为差异性条带(*PPB* = 1.4%) ,尼加拉河两个植株与华盛顿群体有 45% 差异性条带 ,由此推测银杏物种水平的遗传多样性可能比较高。

本实验从群体遗传学角度 ,在广泛取材的基础上对中国可能为野生的自然银杏群体的遗传变异进行了 ISSR-PCR 分析 ,3 个自然银杏群体在群体水平的 *PPB* 为 52.27% ,Nei's 基因多样性(*H_e*)为 0.1986 ,Shannon's 信息指数(*H_o*)为 0.2920 ,物种水平的 *PPB* 为 70.45% ,*H_e* 为 0.2408 ,*H_o* 为 0.3599。虽然没有用其他裸子植物的 ISSR 数据资料进行比较来判断银杏的遗传多样性程度的高低 ,但可以与一些裸子植物的 RAPD 数据资料进行间接比较(表 7)。结果表明 ,银杏的遗传多样性处于较高水平 ,证实了 Kuddus *et al.* (2002)对银杏遗传多样性水平的推测。银杏是一个古老树种 ,具有长寿命、风媒传粉、分布较广的特点。它对环境的依赖程度较小 ,具有很强的生命力和竞争力 ,除了以种子繁殖之外 ,

其营养繁殖的能力亦特别强(Del Tredici ,1992) ,因此银杏常成为阔叶林中的优势种群。经历了第四纪冰川气候变迁(Del Tredici ,2000) ,在中国残留的银杏群体并未像银杉(*Cathaya argyrophylla*)等子遗植物一样经历了非常严重的瓶颈效应和小群体的遗传漂变(汪小全等 ,1996) ,而是由于人为引种栽培和自然繁殖 ,扩展了其分布区 ,群体间也进行了一定程度的基因交流 ,从而导致了现存银杏群体具有较高遗传多样性水平。

大量的等位酶分析、叶绿体 DNA 和线粒体 DNA 研究的证据表明 ,子遗植物避难所的群体较其后裔群体具有更高的遗传多样性(Lewis & Crawford 1995 ; Comes & Kadereit ,1998)。ISSR-PCR 实验结果显示 ,贵州务川(WC)群体的遗传多样性水平最高(*PPB* = 56.82% ,*H_e* = 0.2089) ,湖北大洪山(DH)群体次之(*PPB* = 50% ,*H_e* = 0.2026) ,浙江西天目山(TM)群体(*PPB* = 50% ,*H_e* = 0.1844)稍低于湖北大洪山(DH)群体。植物化石研究表明 ,贵州大娄山脉一带的更新世地层中保存有许多第三纪残遗的植物化石 ,如桫欏(*Alsophila spinulosa*)、银杏、银杉、罗汉松(*Podocarpus macrophyllus*)、陆均松(*Dacrydium pierrei*)、水松(*Glyptostrobus pensilis*)等树种。这一区域古植物进化的历程说明 ,银杏在贵州和四川南部具有久远的发育、进化、繁衍和生存的历史(李建文等 ,1999)。根据作者对贵州务川银杏群落的实地考察发现 ,该地银杏群体内的种子实生苗较多 ,具有较强的种群自然更新能力。因此 ,贵州务川很可能为现代银杏在冰川期的避难所之一。

江苏泰兴(TX)栽培群体(*PPB* = 34.09%)比可能野生自然群体的遗传多样性要低得多 ,这是人为对品种选育的结果。刘叔倩等(2001)对江苏邳州 28 个不同银杏品种的遗传多样性进行了 RAPD 分析 ,结果表明品种间的 *PPB* 仅为 30.47%。银杏在我国广为栽培 ,栽培的数量和品种类型虽然很多 ,但它们在选育、引种栽培时所涵盖的遗传多样性却很低。美国纽约(NY)栽培银杏群体的遗传多样性更低(*PPB* = 23.86%) ,这 6 株可能来自相同的或亲缘关系十分相似的繁殖体。总体上银杏栽培群体的遗传多样性水平低于可能的自然群体。本实验证实了银杏有较高的遗传多样性 ,这也是中国的银杏品种多样性形成的遗传基础。

吴俊元等(1992)利用同工酶电泳方法 ,研究了

图 4 银杏 66 个单株间的 Nei's 遗传距离 UPGMA 聚类图
Fig. 4 UPGMA dendrogram for 63 trees of *Ginkgo biloba* based on Nei's genetic distance

浙江西天目山银杏群体的等位基因频率和每个位点的平均杂合率,结果表明西天目山银杏群体的等位酶基因位点的平均杂合率仅为 0.150。但本实验所检测的西天目山银杏群体内的基因多样性($H_e = 0.1844$)比同工酶高。理论上推测,同工酶基因位点是编码区,受环境的选择压较大,不易发生变异,而 ISSR-PCR 扩增的区域为整个基因组,其中基因

组非编码区的变异速度较快,因此 ISSR-PCR 检测的遗传多样性比同工酶高(Camacho & Liston, 2001)。

3.2 银杏群体的遗传结构与分化

由于裸子植物寿命长、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(El-Kassaby, 1991)。本实验的银杏自然群体间

表7 银杏与松柏纲一些物种的遗传多样性比较
Table 7 Comparison of population genetic diversity in *Ginkgo biloba* and some species in the Coniferopsida

种类 Species	多态位点百分率 PPB (%)	有效等位基因数 A_e	Nei's 基因多样性 H_e	文献 Reference
银杏 <i>Ginkgo biloba</i>	70.5	1.42	0.24	This study
水杉 <i>Metasequoia glyptostroboides</i>	38.6		0.13	(李晓东等 2003)
窄果松 <i>Pinus attenuata</i>	48.2	1.48	0.15	(Wu <i>et al.</i> , 1999)
辐射松 <i>Pinus radiata</i>	49.8	1.50	0.17	(Wu <i>et al.</i> , 1999)
粗糙松 <i>Pinus muricata</i>	38.6	1.39	0.13	(Wu <i>et al.</i> , 1999)
赤松 <i>Pinus densiflora</i>	94.6	2.0	0.39	(Lee <i>et al.</i> , 1997)
黑云杉 <i>Picea mariana</i>	82.1	1.9	0.32	(Isabel <i>et al.</i> , 1995)
白云杉 <i>Picea glauca</i>	55			(Mosseler <i>et al.</i> , 1992)
花旗松 <i>Pseudotsuga menziesii</i>			0.19	(Aagaard <i>et al.</i> , 1998)
银杉 <i>Cathaya argyrophylla</i>	32			(汪小全等 , 1996)
陆均松 <i>Dacydium pierrei</i>	33.3			(苏应娟等 , 1999)

分化水平($G_{st} = 14.76\%$, $\Phi_{st} = 14.26\%$)与 Nybom & Bartish (2000) 对一些裸子植物的统计结果(对 6 种进行 Nei's 遗传多样性分析 : $G_{st} = 0.18$;对 8 种进行 AMOVA 分析 : $\Phi_{st} = 0.24$)进行比较发现 ,尽管银杏自然群体间地理距离很大 ,但群体间的分化值并不是很高。在群体及单株的 UPGMA 聚类分析中 ,贵州务川(WC)群体和浙江西天目山(TM)群体具有较高的遗传相似性 ,湖北大洪山(DH)群体中大部分个体与贵州务川(WC)和浙江西天目山群体(TM)聚为一支。一种可能的解释是 3 个群体间可能还存在一定程度的基因交流 ,另一种解释则是西天目山群体(TM)和湖北大洪山(DH)群体是贵州务川(WC)群体的后裔群体。如果考虑栽培群体则群体间的 G_{st} 为 0.3248 ,说明人为的选择作用对群体分化的影响很大。在单株的 UPGMA 聚类分析图中 ,栽培于美国纽约的 6 株银杏与湖北大洪山(DH)群体中的 6 株聚在一起 ,它们可能起源于相同的自然群体。

3.3 保护生物学意义

随着对银杏经济价值的日益开发 ,某些措施(如湖北大洪山区等地将银杏雌枝嫁接到雄枝上)不利于银杏群体的自然生长 ,会对银杏群体的野生状况和群体遗传结构造成相当大的影响。因此建议将银杏栽培园与银杏自然群体相隔离 ,防止个别基

因频率在自然群体内的进一步提高 ,导致某些基因型的纯合化 ,从而降低野生自然银杏群体的遗传多样性水平。银杏种子具有后熟现象 ,对温度和光照有一定的要求 ,在郁闭度高的林中难以萌发(李近雨 , 1987 ; Holt & Rothwell , 1997)。浙江西天目山群体中仅有少量的种子实生苗 ,与森林郁闭度太大有关。因此 ,对郁闭度过大的林子可进行适度砍伐(如 TM 群体)。贵州务川是银杏的集中分布区 ,而且有很多的银杏古树 ,银杏群体内的种子实生苗较多 ,具有较强的种群自然更新能力 ,是银杏遗传多样性就地和迁地保护的最佳地区。

总之 ,只要让群落保持自然的更新演替 ,自然银杏群体是能够在自然界继续生存下去的。所以建议对银杏自然群体的保护以就地保护为主。在就地保护时应选择银杏群体遗传多样性程度较高、适宜银杏生长和种群更新的集中分布区(如 WC 群体) ,建立自然保护区。由于银杏不同群体间出现了一定程度的遗传分化 ,建议对自然群体内的个体进行植株相互移栽和采种育苗移栽 ,以提高群体间的基因交流 ,最大限度地保护银杏的遗传多样性 ,为进一步选育银杏优良品种提供遗传基础。

致 谢 本实验在野外采样中得到浙江林科院林协研究员 ,贵州大学史继孔教授 ,务川县仡佬族苗族自

治县林业局李先龙局长等的大力支持。特致谢忱。

参考文献

- Aagaard J. E., Krutovskh K. V. and Strauss S. H. 1998. RAPD and allozymes exhibit similar levels of diversity and differentiation among populations and races of Douglas-fir. *Heredity*, **81**: 69 – 78.
- Camacho F. J. and Liston A. 2001. Population structure and genetic diversity of *Botrychium pumicola* (Ophioglossaceae) based on ISSR. *American Journal of Botany*, **88** (6): 1065 – 1070.
- Cao B-H (曹帮华), Cai C-J (蔡春菊) and Mou H-X (牟洪香). 2002. Post-maturity physiology of the ginkgo seed nuts. *Economic Forest Researches* (经济林研究), **20** (3): 22 – 23, 55. (in Chinese)
- Chen X-S (陈学森), Deng X-X (邓秀新) and Zhang W-C (章文才). 1996. Preliminary report on the chromosome number and karyotype of variety resources of *Ginkgo biloba* in China. *Journal of Huazhong Agricultural University* (华中农业大学学报), **15** (6): 590 – 593. (in Chinese)
- Comes H. P. and Kadereit J. W. 1998. The effect of Quaternary climatic changes on plant distribution and evolution. *Trends in Plant Science*, **3**: 432 – 438.
- Del Tredici P. 1992. Natural regeneration of *Ginkgo biloba* from downward growing cotyledonary buds (basal chichi). *American Journal of Botany*, **79**: 522 – 530.
- Del Tredici P., Lin H. and Yang G. 1992. The Ginkgos of Tian Mu Shan. *Conservation Biology*, **4**: 202 – 209.
- Del Tredici P. 1997. Lignotuber development in *Ginkgo biloba*. In: Hori T., Ridge R. W., Tulecke W., Del Tredici P., Tremouillaux-Guiller J. and Tobe H. (eds.), *Ginkgo biloba—a Global Treasure*. Springer-Verlag, Tokyo, 119 – 126.
- Del Tredici P. 2000. The evolution, ecology, and cultivation of *Ginkgo biloba*. In: Beek T. A. van (ed.), *Ginkgo biloba*. Harwood Academic Publishers, Amsterdam, Netherlands, 7 – 23.
- Doyle J. J. 1991. DNA protocols for plants—CTAB total DNA isolation. In: Hewitt G. M. and Johnston A. (eds.), *Molecular Techniques in Taxonomy*. Springer-Verlag, Berlin, Germany, 283 – 293.
- El-Kassaby Y. A. 1991. Genetic variation within and among conifer populations: review and evaluation of methods. In: Fineschi S., Malvolti M. E., Cannata F. and Hattemer H. H. (eds.), *Biochemical Markers in the Population Genetics of Forest Trees*. S. P. B. Academic Publishing bv, The Hague, The Netherlands, 61 – 76. (<http://www.kuglerpublications.com/SPB/default.asp>)
- Esselman E. J., Li J. Q., Crawford D. J., Windus J. L. and Wolfe A. D. 1999. Clonal diversity in the rare *Calamagrostis porteri* ssp. *insperata* (Poaceae): comparative results for allozymes and random amplified polymorphic DNA (RAPD) and intersimple sequence repeat (ISSR) markers. *Molecular Ecology*, **8**: 443 – 443.
- Excoffier L., Smouse P. E. and Quattro J. M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial-DNA restriction data. *Genetics*, **131**: 479 – 491.
- Excoffier L. 1993. *Analysis of Molecular Variance*. Version 1.55. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Geneva, Switzerland.
- Ge S., Oliveira G. C. X., Schaal B. A., Gao L. Z. and Hong D. Y. 1999. RAPD variation within and between natural populations of the wild rice *Oryza rufipogon* from China and Brazil. *Heredity*, **82**: 638 – 644.
- Gilbert J. E., Lewis R. B., Wilkinson M. J. and Caligari P. D. S. 1999. Developing an appropriate strategy to assess genetic variability in plant germplasm collections. *Theoretical and Applied Genetics*, **98**: 1125 – 1131.
- Holt B. F. and Rothwell G. W. 1997. Is *Ginkgo biloba* (Ginkgoaceae) really an oviparous plant? *American Journal of Botany*, **84**: 870 – 872.
- Huff D. R., Peakall R. and Smouse P. E. 1993. RAPD variation within and among natural populations of outcrossing buffalograss [*Buchloe dactyloides* (Nutt.) Engelm.]. *Theoretical and Applied Genetics*, **86**: 927 – 934.
- Isabel N., Beaulieu J. and Bousquet J. 1995. Complete congruence between gene diversity estimates derived from genotypic data at enzyme and random amplified polymorphic DNA loci in black spruce. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, **92**: 6369 – 6373.
- Jacobs P. M. and Browner W. S., 2000. *Ginkgo biloba*: a living fossil. *American Journal of Medicine*, **108** (4): 341 – 342.
- Kuddus R. H., Kuddus N. N. and Dvorchik I. 2002. DNA polymorphism in the living fossil *Ginkgo biloba* from the Eastern United States. *Genome*, **45**: 8 – 12.

Lee S. W., Kim Y. Y., Hyun J. O. and Kim Z. S. 1997. Comparison of genetic variation in *Pinus densiflora* natural populations by allozyme and RAPD analysis. *Korean Journal of Breeding*, **29**: 72 – 83. (in Korean with English summary)

Lewis P. O. and Crawford D. J. 1995. Pleistocene refugium endemics exhibit greater allozymic diversity than widespread congeners in the genus *Polygonell* (Polygonaceae). *American Journal of Botany*, **82**: 141 – 149.

Lewontin R. C. 1972. Apportionment of human diversity. *Evolutionary Biology*, **6**: 381 – 398.

Li J-W (李建文), Liu Z-Y (刘正宇), Tan Y-M (谭杨梅) and Ren M-B (任明波). 1999. Studies on the ginkgo at the Jinfoshan Mountain. *Forest Research* (林业科学研究), **12** (2): 197 – 201. (in Chinese)

Li J-Y (李近雨). 1987. Primary researches on post-maturity physiology and storage measures of the ginkgo seed nuts. *Hebei Forest Science and Technology* (河北林业科技), **3**: 8 ~ 9. (in Chinese)

Lin M-J (林睦就), Zhang Y-Y (张云跃) and Ma C-G (马常耕). 2002. Study on genetic variation of *Ginkgo biloba*. II. The variation of content of nutrient substance and mineral element in nut among and within population. *Scientia Silvae Sinicae* (林业科学), **38** (2): 157 – 161. (in Chinese)

Lin X (林协). 1965. The origin and distribution of *Ginkgo biloba*. *Bulletin of Biology* (生物学通报), **3**: 32 – 33. (in Chinese)

Liu S-Q (刘叔倩), Ma X-J (马小军) and Zheng J-H (郑俊华). 2001. A study on the RAPD fingerprinting of different varieties of *Ginkgo biloba* L. *China Journal of Chinese Materia Medica* (中国中药杂志), **26** (12): 822 – 825. (in Chinese)

Li X-D (李晓东), Huang H-W (黄宏文) and Li J-Q (李建强). 2003. Genetic diversity of the relict plant *Metasequoia glyptostroboides*. *Biodiversity Science* (生物多样性), **11** (2): 100 – 108. (in Chinese)

Mosseler A., Egger K. N. and Hughes G. A. 1992. Low levels of genetic diversity in red pine confirmed by random amplified polymorphic DNA markers. *Canadian Journal of Forest Research*, **22**: 1332 – 1337.

Nei M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, **70**: 3321 – 3323.

Nei M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, **89**: 583 – 590.

Nybom H. and Bartish I. V. 2000. Effects of life history traits and sampling strategies on genetic diversity estimates obtained with RAPD markers in plants. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, **3**: 93 – 114.

Prevost A. and Wilkinson M. J. 1999. A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. *Theoretical and Applied Genetics*, **98**: 107 – 112.

Qian W (钱韦), Ge S (葛颂) and Hong D-Y (洪德元). 2000. Assessment of genetic variation of *Oryza granolata* detected by RAPD and ISSR. *Acta Botanica Sinica* (植物学报), **42** (7): 741 – 750. (in Chinese)

Rohlf F. J. 1994. *NTSYS-PC*. Version 2.10, Applied Biostatistics Inc, New York.

Su Y-J (苏应娟), Wang T (王艇), Huang C (黄超), Zhu J-M (朱建明) and Zhou Q (周勤). 1999. RAPD analysis of different population of *Dacydium pierrei*. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni* (Natural Science) [(中山大学学报(自然科学版)], **38** (1): 98 – 101. (in Chinese)

Tsumura Y. and Ohba K. 1997. The genetic diversity of isozymes and the possible dissemination of *Ginkgo biloba* in ancient times in Japan. In: Hori T., Ridge R. W., Tulecke W., Del Tredici P., Tremouillaux-Guiller J. and Tobe H. (eds.), *Ginkgo biloba—a Global Treasure*. Springer-Verlag, Tokyo, 159 – 172.

Wang X-Q (汪小全), Zou Y-P (邹喻苹), Zhang D-M (张大明), Hong D-Y (洪德元) and Liu Z-Y (刘正宇). 1996. Genetic diversity analysis by RAPD in *Cathaya argyrophylla*. *Science in China* (中国科学), **26** (5): 436 – 441. (in Chinese)

Wu J-Y (吴俊元), Chen P-L (陈品良) and Tang S-J (汤诗杰). 1992. Isozyme analysis of the genetic variation of *Ginkgo biloba* L. population in Tianmu Mountain. *Journal of Plant Resources and Environment* (植物资源与环境), **1** (2): 20 – 23. (in Chinese)

Wu J., Krutovskh K. V. and Strauss S. H. 1999. Nuclear DNA diversity, population differentiation, and phylogenetic relationships in the California closed-cone pines based on RAPD and allozyme markers. *Genome*, **42**: 893 – 908.

Xiang Y-H (向应海) and Xiang B-X (向碧霞). 1997. Primary report on an ancient *Ginkgo biloba* deleted community in

Wuchuan County, Guizhou Province. *Guizhou Science* (贵州科学), **15** (4): 239 – 244. (in Chinese)

Yeh F. C., Yang R. C., Boyle T., Ye Z. H. and Mao J. X. 1997. *POPGENE, the User Friendly Shareware for Population Genetic Analysis*. Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Edmonton, Canada.

Zhang J-H (章继华). 1992. Advance and prospect of resource-exploring of ginkgo in China. *Agriculture and Pasturage Information Researches* (农牧情报研究), **6**: 36 – 40. (in Chinese)

Zhou Y-L (周亚林), Bao J (包俊) and Huang H-Q (黄河清). 1998. A report on natural *Ginkgo biloba* community in Suizhou. *Hubei Forest Science and Technology* (湖北林业科技), **2**: 35 – 38. (in Chinese)

Zietkiewicz E., Rafalski A. and Labuda D. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, **20**: 176 – 183.

Zou Y-P (邹喻苹), Ge S (葛颂) and Wang X-D (王晓东). 2001. *Molecular Markers in Systemic and Evolutionary Botany* (系统与进化植物学中的分子标记). Science Press, Beijing. (in Chinese)

(责任编辑：孙大川)

图 书 信 息

中国高等植物图鉴(8 本)	549 元	中国竹材结构图谱	125 元
中国高等植物第 3 卷	260 元	中国野生花卉	580 元
中国高等植物第 4 卷	248 元	汉拉英中国木本植物名	88 元
中国高等植物第 5 卷	268 元	中国野鸟	220 元
中国高等植物第 7 卷	298 元	中国哺乳动物种和亚种分类名录与分布大全	65 元
中国高等植物第 8 卷	245 元	微生物学(影印)	92 元
中国高等植物第 9 卷	200 元	环境生物技术原理与应用(影印)	60 元
中国高等植物第 13 卷	298 元	自由基生物学的理论与应用	110 元
1 :100 万中国植被图集	980 元	遗传学——基因与基因组分析(影印)	88 元
中国木本植物种子	180 元	生物信息学手册	42 元
中国退化生态系统研究	49 元	生物信息学序列与基因组分析(影印)	73 元
中国鸟类种和亚种分类名录大全	38 元	转基因植物	68 元
自然保护野外研究技术	48 元	景观生态学原理及应用	45 元
中国珍稀植物	200 元	海洋微生物及其代谢产物	68 元
世界主要树种木材科学特性	158 元	生态学 :概念与应用(影印)	50 元

欲购以上图书 ,须增加书款的 10% 的邮挂费。请汇款至 :北京 9399 信箱 北京市海岸文化服务中心 ;邮编 :100093 ;开户银行 :建行北京西四支行金融街分理处 ;帐号 :6510003082610026498 ;电话 010 – 62591500 ;传真 010 – 62599659。欲知更多图书信息 ,请访问 www.sbook.com.cn 购书网或索要书目。