

天目山银杏群体遗传变异的同工酶分析*

吴俊元 陈品良 汤诗杰

(江苏省植物研究所,南京210014)

摘要 本文利用同工酶电泳方法,研究了天目山银杏群体的遗传变异性,计算了4种同工酶(GDH, G-6PDH, PRX, SDH)8个位点上的等位基因频率和每个位点的平均杂合率。结果表明:天目山银杏群体的遗传变异性较小,各位点的平均杂合率仅为 0.150 ± 0.004 ,呈现较大程度的遗传同一性,因此认为天目山银杏很可能是僧人在寺庙旁栽植的银杏留下的后代。

关键词 银杏群体;同工酶;遗传变异

Isozyme analysis of the genetic variation of *Ginkgo biloba* L. population in Tian-Mu Mountain Wu Jun-Yuan, Cheng Pin-Liang and Tang Shi-Jie (Jiangsu Institute of Botany, Nanjing 210014), *J. Plant Resour. & Environ.* 1992,1(2):20~23

The genetic variation of *Ginkgo biloba* L. population in Tian-Mu Mountain was studied by means of isozyme analysis. Forty trees were sampled from the population as representatives. Allele frequency at eight loci of four isozymes (GDH, G-6PDH, PRX, SDH) and average heterozygosity per locus were calculated. The average heterozygosity of 0.150 ± 0.004 per locus indicated that there were less genetic variation and greater genetic identity in *Ginkgo biloba* L. population of Tian-Mu Mountain. It is considered that the trees are very likely the offspring of plants that were cultivated in the vicinity of the old temple by resident monks.

Key words *Ginkgo biloba* L.; population; isozyme; genetic variation

引 言

我国有无野生状态的银杏存在已被国内外的植物学家争论了100多年,争论的焦点在于天目山的银杏群体。西方一些植物学家,如 Sargent^[17]和 Wilson^[21,22]等人基于19世纪末和20世纪初在亚洲的一些有限野外工作认为:野生状态的银杏可能已经绝迹,现存的银杏是佛教徒在寺庙旁的栽植才得以保存下来的。我国的陈嵘^[6]认为“野生者绝无,浙江西天目山颇似天然生者”。贾祖璋^[6]、李惠林^[12]和林协^[4,5]等则认为银杏有野生种,郑勉^[3]、李正理^[2]、裴鉴^[6]等则觉得难以证实。近来,王伏雄和陈祖铿^[1]及陈心启^[8]等也怀疑天目山银杏的野生性,认为它们是僧人栽植于寺庙附近的银杏留下的后代。但上述一些观点多缺乏令人置信的证据,因而本文通过对天目山银杏几种同工酶的分析,研究其群体的遗传变异性,同时对其野生性问题作一探讨。当然,群体遗传变异性的研究,也可为今后银杏的选种和育种提供遗传学依据。

收稿日期 1991-12-25

* 本文承蒙顾姻、贺善安研究员审阅,在此深表感谢。

材料和方法

1. **植物材料** 1990年秋在浙江西天目山22个点随机采集40株单株的银杏种子(DBH一般都在50 cm 以上),1991年春在苗圃地直播,取大约生长6个月后的幼苗叶片为实验材料。

2. **样品的提取、电泳和酶的检测** 样品提取缓冲液的方法基本参照 Wendel Parks^[19]的配方。聚丙烯酰胺凝胶垂直平板电泳参考杨太兴*的方法。电泳完毕后,过氧化物酶(PRX)、谷氨酸脱氢酶(GDH)、莽草酸脱氢酶(SDH)和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G-6PDH)的染色分别参考杨太兴,Siciliano and Shaw^[7]和 Vallejos^[18]的方法。染色后的胶板用玻璃纸制成干板保存。

实验结果

4种同工酶的电泳结果见图1。根据 Wendel and Parks^[19]的方法,当1种酶由多于1个基因编码时,具有最大的阳极迁移率的位点用阿拉伯数字1表示,依次为2,3,……。同样,在同一位点上,编码具有最大阳极迁移率的蛋白质的等位基因用下标 a 表示,依次为 b, c,……。例如:SDH-1a 表示它是编码第1位点上迁移最快的蛋白质的等位基因,而第1位点则又是指控制向阳极迁移最快,具有SDH酶活性的一系列产物的位点。各种酶的表现如下:

葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G-6PDH) 此酶仅检测到1条同工酶带,不同单株表现一致,无变异产生,表明此酶为单态酶(monomorphic enzyme)。Wijsman^[20]等在 *Petunia* Juss. 的研究中,也仅探测到1个活性区域,区域较宽。而 Levin and Creper^[19]在 *Lycopodium lucidulum* 的研究中,检测到两个G-6PDH位点,但变异也较小。

谷氨酸脱氢酶(GDH) 此酶共有两条同工酶带,由同一位点上的两个等位基因编码。酶谱表现为两种纯合子类型,基因型分别为 aa 和 bb,无杂合子出现,许多植物如 *Camellia* L.^[19]和 *Campsis* Lour.^[11],表现为单态酶,仅1条酶带。但有的植物如 *Eucalyptus* L'Hér^[14], *Pinus* L.^[13]和 *Zea* L.^[16],除表现两条纯合子酶带外,还出现杂合子酶带,是1条宽的中间带。

过氧化物酶(PRX) PRX 呈现的酶带较多,共有8条,分别由4个基因位点编码。在 PRX-1和 PRX-4位点上,仅有1条酶带出现,为单态位点。在 PRX-2位点上,产生1种纯合子和1种杂合

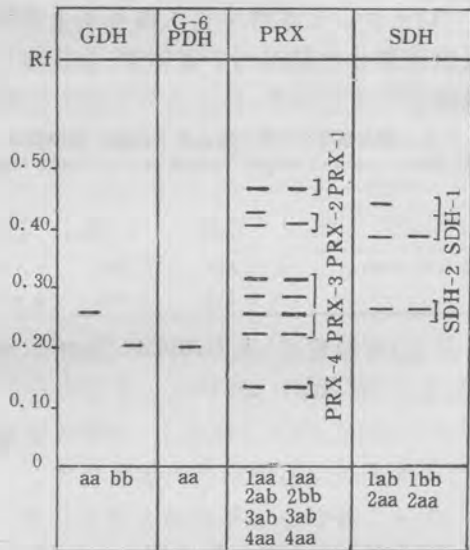


图1 银杏4种同工酶的基因型图解
Fig 1 Schematic illustrations of representative phenotypes for four enzyme systems

* 杨太兴, 1980; 垂直平板聚丙烯酰胺凝胶电泳(资料)

子,基因型分别为 bb 和 ab,没有出现纯合子 aa 类型。杂合子显示两条酶带,无中间酶带,表明此位点是编码单聚体(monomer)蛋白质。在 PRX-3 位点上,则表现 4 条酶带,和 Dane^[10]对 *Cucumis melo* L. 的研究结果相似。认为这 4 条酶带由两个等位基因控制,杂合子 ab 则呈现 4 条酶带,同时也说明此位点是编码单聚体蛋白质的位点,和 PRX-2 位点相符。

莽草酸脱氢酶(SDH) SDH 表现两个酶活性区域,分别有 1 条和 2 条酶带,各由 1 个基因编码。SDH-1 为多态位点,出现 1 种纯合子 bb 和杂合子 ab。杂合子显示 2 条酶带,表明 SDH-1 为编码单聚体蛋白质。SDH-2 为单态位点,仅显示 1 条酶带。Moran^[14]等在 *Eucalyptus* L'Hér 上对 SDH 的研究则检测到 1 个单聚体位点,由几个等位基因编码。

讨 论

1. 天目山银杏群体的遗传变异性

(1) 天目山银杏群体同工酶位点上的等位基因频率 一个群体内各等位基因的频率通常可反映该群体内基因的丰富程度,为此我们对天目山银杏群体 4 种同工酶 8 个位点上的 12 个等位基因进行统计分析,得出各等位基因的频率如表 1。

表 1 天目山银杏群体 8 个同工酶位点上的等位基因频率
Tab 1 Allelic frequency at eight isozyme loci of *Ginkgo biloba* L. population

等位基因 Allele	等位基因频率 Allele frequency							
	GDH	G-6PDH	SDH-1	SDH-2	PRX-1	PRX-2	PRX-3	PRX-4
a	0.890	1.000	0.144	1.000	1.000	0.152	0.500	1.000
b	0.110	0.000	0.856	0.000	0.000	0.848	0.500	0.000

从表 1 可以看出,在 G-6PDH, SDH-2, PRX-1 和 PRX-4 4 个纯合子位点上,均出现 1 个等位基因;在 GDH, SDH-1 和 PRX-2 多态位点上,出现的纯合子多,杂合子少,仍以 1 个等位基因的表现为主;而在 PRX-3 位点上,尽管各单株间无变异发生,但所有个体均以杂合子的形式表现,因而两个等位基因出现的频率相等。

(2) 同工酶位点上平均杂合率的计算分析 一个群体的遗传变异性通常用多态位点在整个位点中所占的比例和每个位点的平均杂合程度来表示,而且后者比前者有较大的理论上的优越性。因而我们用每个位点的平均杂合率分析群体的遗传变异程度。

一个位点上基因的纯合性(j)和杂合性(h)可根据 Nei^[15]的公式计算:

$$j = \sum X_i^2 \quad h = 1 - \sum X_i^2 \quad X_i: \text{群体中第 } i \text{ 个等位基因的频率。}$$

很显然,天目山银杏群体 4 个单态位点的 $j=1, h=0$; 而 GDH, SDH-1, PRX-2 和 PRX-3 位点的 h 分别为 0.196, 0.247, 0.258 和 0.500。

从而每个位点的平均杂合性(H)和取样方差[V(H)]又可通过下述公式计算^[15]:

$$H = \sum_{l=1}^r h_l / r \quad V(H) = \sum_{l=1}^r (h_l - H)^2 / \{r(r-1)\} \quad r: \text{所研究的位点数目}; l: \text{表示第 } l \text{ 个位点}$$

计算得 H 为 0.150, V(H) 为 0.004。因而天目山银杏群体每个位点的平均杂合率 H 可表示为 0.150 ± 0.004 。

当然,一个群体的遗传变异性也可用任意选择的基因对之间不同密码子的平均数目(Dx)来表示, $Dx = -\log_e J^{[15]}$, 计算得天目山银杏群体的 Dx 为 0.163。Dx 与 H 接近,表明两个等位基

同间的不同是因一个密码子的不同引起的。

上述结果表明:天目山银杏群体的遗传变异性较小,显示出较大程度的遗传同一性,即使象 PRX-3位点,尽管其 h 达到 0.500,但其基因型在群体中未发生变异。因而虽然此位点上基因的杂合性较高,但基因型的杂合性是零。

2. 天目山银杏群体的遗传变异性与其野生性的关系 Tredici(待发表)等认为天目山上的人类活动已有1500多年,因而使得解决有关天目山银杏野生性问题的长期争论变得非常困难,但从我们对其进行遗传变异的分析来看,认为该群体很可能是僧人在寺庙旁栽植的银杏留下的后代,支持王伏雄和陈心启等的观点。因为银杏是现存种子植物中最古老的孑遗植物,是世界著名的“活化石”,其进化世系可追溯到侏罗纪(Jurassic),大约1亿9千万年之前,假如天目山的银杏属野生起源,那么在其漫长的进化过程中,应该产生许多基因突变,丰富群体的遗传变异;加之,银杏为雌雄异株植物,其交配系属远交类型(outcrossing system),群体应该表现出较大程度的遗传变异性,而事实与之相反,因而其野生性值得怀疑。

当然,影响一个群体遗传变异的因素很多,群体大小和繁殖方式可能也会影响天目山银杏群体的遗传变异。

参 考 文 献

- 1 王伏雄,陈祖铨. 1983, 植物学报 85(3):199~206.
- 2 李正理. 1957, 植物学报 6(3):189~193.
- 3 郑勉. 1954; 中国种子植物分类学(上册), 上海新亚书店, 上海. 76~78页.
- 4 林协. 1965, 生物学通报 3, 32~33.
- 5 林协. 1984, 生物学教学 3, 17~18.
- 6 梁立兴, 侯九襄. 1987; 武汉植物学研究 5(4):411~418.
- 7 Siciliano M J, C R Shaw. 1980, 植物生理学通讯 (4):59~70.
- 8 Chen S C. 1989; *Cathaya* 1:161~178.
- 9 Cheng W C. 1993; *Cont. of the Biol. Lab. the Sci. Soc. China* 8(3):298~307.
- 10 Dane F. 1983; Cucurbits. In: S D Tanksley, T J Orton (eds). *Isozyme in plant genetics and breeding*. Elsevier Scientific Publishing Co. Amsterdam. pp. 369~390.
- 11 He S A, J Y Wu, Y Gu. 1990; *Cathaya* 2:21~28.
- 12 Li H L. 1956; *Bull. Morris Arb.* 7:3~12.
- 13 Milton J B. 1979; *The Jour. of Hered.* 70:86~89.
- 14 Moran G F, J C Bell. 1983; *Eucalyptus*. In: S D Tanksley, T J Orton (eds). *Isozyme in plant genetics and breeding*. Elsevier Scientific Publishing Co. Amsterdam. pp. 423~441.
- 15 Nei M. 1975; *Molecul Population Genetics and Evolution*. North Holland. Amsterdam.
- 16 Pyror A J. 1974; *Heredity* 32:397~419.
- 17 Sargent C S. 1897; *Garden and Forest* 10:390~391.
- 18 Vallejos C E. 1983; Enzyme activity staining. In: S D Tanksley, T J Orton (eds). *Isozyme in plant genetics and breeding*. Elsevier Scientific Publishing Co. Amsterdam. pp. 469~515.
- 19 Wendel J F, C R Parks. 1982; *The Jour. of Hered.* 73:197~204.
- 20 Wijsman H J W. 1983; *Petunia*. In: S D Tanksley, T J Orton (eds). *Isozyme in plant genetics and breeding*. Elsevier Scientific Publishing Co. Amsterdam. pp. 229~252.
- 21 Wilson E H. 1914; *Plantae Wilsonianae*. Harvard Univ. Press, Cambridge.
- 22 Wilson E H. 1919; *Gard. Mag.* 30(4):144~148.