

SCAR 分子标记和叶形分析对 银杏性别鉴定的研究^①

黄茜^{1,2}, 陈珂¹, 刘霁瑶¹, 杨晓红¹, 雷波²

1. 南方山地园艺学教育部重点实验室/西南大学园艺园林学院, 重庆 400715;

2. 重庆市环境科学研究院, 重庆 401147

摘要: 选取 12 株已知性别成年银杏和 27 株未知性别银杏幼苗为材料, 将成年植株与幼苗的叶形特征及 SCAR 标记特异带进行协同分析, 探索成、幼年银杏间性别特征在形态和分子水平上的偶联关系。结果表明: 银杏雌雄株长枝叶片叶形间的稳定差异规律表现为雌株的叶形指数(叶宽/叶长)和叶裂指数(叶裂/叶长)均大于雄株; 在成、幼年植株叶形分析基础上, 假设了幼苗中的扇形、多裂扇形和蒲扇形叶植株为 F 类, 可能为雌株, 假设幼苗叶不规则形、楔形和翅为 M 类, 推测其为雄株; 用 SCAR-GBA 组引物对 27 株银杏一年生实生苗 DNA 组进行扩增, 经 3 次重复, 其中 M 组 12 株幼苗中有 11 株获得了与成年雄株一致的特异带, F 组 15 株中 14 株没有雄性特征带。分子技术研究结果与幼苗叶形判断假设之间的吻合率达 92.6%, 二者之间的偶联关系密切。研究结果证明: 采用叶形特征对银杏幼苗进行早期性别鉴定在生产上是可行的。

关键词: *Ginkgo biloba*; 性别鉴定; 叶形; SCAR 标记; 协同分析

中图分类号: Q949.64

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2016)03-0062-08

银杏 *Ginkgo biloba* L. 是原产我国的单属单种植物, 被称为“活化石”。作为现存裸子植物中的孑遗植物, 具有丰富而重要的经济、生态、社会、文化及科研价值, 在国内外得到广泛栽培应用, 倍受学术界重视^[1-2]。银杏树姿、叶形优美, 加之抗性极强, 常被作为行道树。但银杏外种皮腐烂时散发恶臭, 且落果污染环境, 故雄株在园林绿化中颇受青睐。因雌雄株价值分化大, 银杏园林绿化苗圃和银杏果用林等经济林都要求将其雌雄株区分开来, 根据各自需要进行种植。银杏作为一种典型的雌雄异株裸子植物, 与其他雌雄异株植物一样, 性别的早期鉴定往往受制于童期长、性别形态分化晚和性别表现较迟的影响。目前, 国内外很多学者已从雌雄株外部形态、生理生化差异^[3]、化学药剂处理^[4]、同工酶图谱^[5]、染色体组型^[6-7]、遗传标记^[8]等方面进行了不同角度和水平的探索。但上述方法大都针对已成熟个体性别差异的研究, 对于苗期性别的鉴定体系不成熟, 更缺乏将性成熟成年植株与幼苗进行性别决定因子及性别特征表现的偶联性比较分析研究。DNA 分子标记是以生物大分子的多态性和个体间遗传物质内核苷酸序列变异为基础的遗传标记, 是 DNA 水平遗传多态性的直接反映, 具有较高的准确性和科学性, 被广泛应用于动植物种群多态性分析^[9]、性别鉴定、亲缘关系^[10]研究等方面, 因此基于 DNA 分子标记的银杏表观农艺性状的研究具有十分重要的生产实际意义。

① 收稿日期: 2015-06-24

基金项目: 国家现代农业产业技术体系专项(CARS-22-ZJ0503); 重庆市研究生教育教学改革研究项目(yjg143028); 西南大学中央高校基本业务费专项资金项目(XDJK2014D024); 西南大学国家级大学生创新创业训练计划(201310635021)。

作者简介: 黄茜(1989-), 女, 湖北恩施人, 硕士研究生, 主要从事经济植物生物学与生物技术研究。

通信作者: 杨晓红, 教授, 博士研究生导师。

SCAR 标记是由 Paran 提出的一种分子标记技术, 该技术将其它分子标记技术扩增的特异片段进行克隆和测序, 然后根据所得测序序列两端的序列, 合成特异引物对, 进行特异 PCR 扩增^[11]. 由于 SCAR 标记是用特异引物进行扩增, 排除了随机引物结合的可能, 因此特异性和重复性较高^[12]. SCAR 标记自开发以来, 被广泛应用. 在性别鉴定方面, Deputy 等通过 RAPD 标记转化了 3 个 SCAR 引物对, 对番木瓜幼苗进行性别鉴定, 成功率高达 99.2%^[13], 十分可靠.

本研究对银杏 SCAR 标记体系进行了优化改善, 并结合形态学特征, 对已知性别的银杏成年植株和未知性别的幼苗进行性别特征差异比较及协同分析, 以期对银杏的早期性别鉴定提供理论基础和生产实践中的技术支撑.

1 材料与方法

试验在西南大学园艺园林学院教育部南方山地园艺学重点实验室进行. 试验材料为银杏(*Ginkgo biloba* L.)核用主栽品种佛指‘Fozhi’. 共选择长势良好、栽培管理和立地条件一致的 12 株已知性别成年银杏(通过花芽解剖和花粉电镜扫描确定其性别)和 864 株一年生银杏幼苗为材料, 均来自西南大学银杏种植基地. 成年植株按生长地分为 2 组, 其中 F1 和 M1 组生长环境一致, F2 和 M2 组生长环境一致; 实生苗按种子千粒重分为 3 组: G1(2.6 kg)、G2(2.4 kg)、G3(1.8 kg), 实生苗统一催芽播种、栽培管理, 发育阶段和发育环境完全一致.

1.1 叶片取样及处理

2013 年 10 月, 选成年银杏东南西北 4 个方位的长枝取样, 同一方位的叶片装袋保存, 成年植株每株采 80 片叶; 银杏种植基地的幼苗实验株全株叶片装袋保存, 叶片数为 15~20 片.

叶片清洁后用 Canon 扫描仪依次扫描叶片, 用 Photoshop 对扫描好的叶片按照大小顺序进行排列, 用 CAD 对已扫描并排序叶片进行叶长、叶宽、叶裂、叶基角、叶柄长的测量, 运用 Excel 对所得到的叶片形态特征数据进行比对分析, 算出叶形指数(叶宽/叶片长)、叶裂指数(叶裂/叶片长)和叶基夹角. 由于成年植株的长枝为营养枝, 短枝为生殖枝, 而幼苗均为营养生长, 因此在与一年生银杏实生幼苗进行比较和规律探寻的时候选择成年植株长枝叶片作供试叶片.

1.2 SCAR 分子标记验证

1.2.1 银杏 DNA 提取

2014 年 5 月, 采取上述成年植株和幼苗的 1 g 新鲜叶片用改良的 CTAB 法^[14]进行 DNA 提取. 用 1.0%(w/v)琼脂糖电泳和超微量分光光度计(美国 ThermoScientific 的 Nanodrop 仪器)检测 DNA 质量和浓度, 并稀释至 40 ng/ μ L.

1.2.2 SCAR-PCR 扩增

SCAR-PCR 扩增体系(25 μ L): 银杏 DNA(40 ng/ μ L)为 1.0 μ L, primer(100 ng/ μ L)各 1.0 μ L, r-Taq 酶 0.2 μ L, dNTP(10 Mm)为 0.5 μ L, 10 $\times$ Buffer(含 Mg^{2+})2.5 μ L, 其余用 ddH₂O 补足. 引物序列见表 1.

PCR 扩增条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 退火 30 s, 35 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min; 循环结束后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min; 扩增产物置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存.

1.2.3 PCR 扩增产物的检测

电泳: 扩增产物均在 1.0%(w/v)琼脂糖凝胶(含 EB)中进行电泳, 以标准分子量(Marker)DL2000 作为对照, 电泳时间 40 min.

1.2.4 SCAR 引物和退火温度筛选

根据 Liqin Liao 等^[15]筛选出的 2 对 SCAR 引物作为本次试验的引物, 其序列及退火温度见表 1.

引物和模板结合时候的温度参数即为退火温度, 对 PCR 特异性影响较大. 按照 Liao 的退火温度, 实验结果并不理想, 因此本研究对 SCAR 引物组进行了退火温度的筛选, 在筛选时设计了 5 个梯度温度, 分别是 42 $^{\circ}$ C, 46 $^{\circ}$ C, 50 $^{\circ}$ C, 54 $^{\circ}$ C, 58 $^{\circ}$ C.

表 1 SCAR 引物序列及退火温度

SCAR 标记	引物序列	退火温度/℃
GBA	CTGCTGGGACACAGTACAGAGTTTG	64
	GGGTTGTGCGCCAAGGTTAT	
GBB	CTGCTGGGACTTATAGGTCTTACTG	62
	AGATCCTATCACTGATCCGAAACAA	

2 结果与分析

2.1 叶形特征分析

2.1.1 成年植株叶形分析

成年银杏雌株(F)组和雄株(M组)的长枝部分叶片形态扫描如图 1 所示. 从图中可得知: F 组叶片叶面积均大于 M 组; F 组叶片具多数浅裂, M 组叶片多为全缘. F1 叶片多为蒲扇形和多裂扇形, M1 叶片多为楔形和不规则形; F2 叶片多为扇形和蒲扇形, M2 叶片多为翅形和蒲扇形.

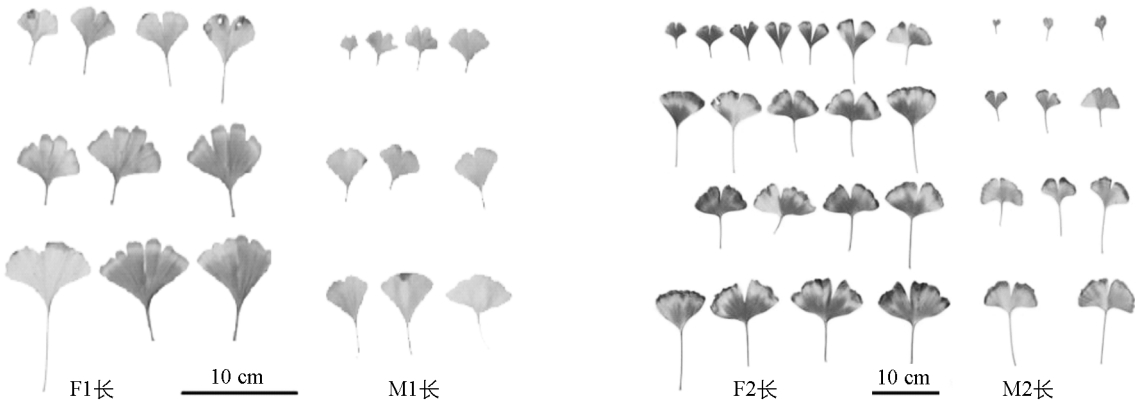


图 1 成年银杏雌雄株长枝叶片形态对比

将成年银杏长枝上叶片的长、宽以及叶裂深度进行测量, 数值特征见图 2a. 可见雌性(F)株叶的长与宽均大于雄性(M)株, 同时 F 株的叶裂深度也普遍大于 M 株, 计算其叶形指数和叶裂指数, 也是雌性(F)株大于雄性(M)株(图 2b). 表明叶形指数和叶裂指数是区别成年银杏雌雄株的重要参考指标.

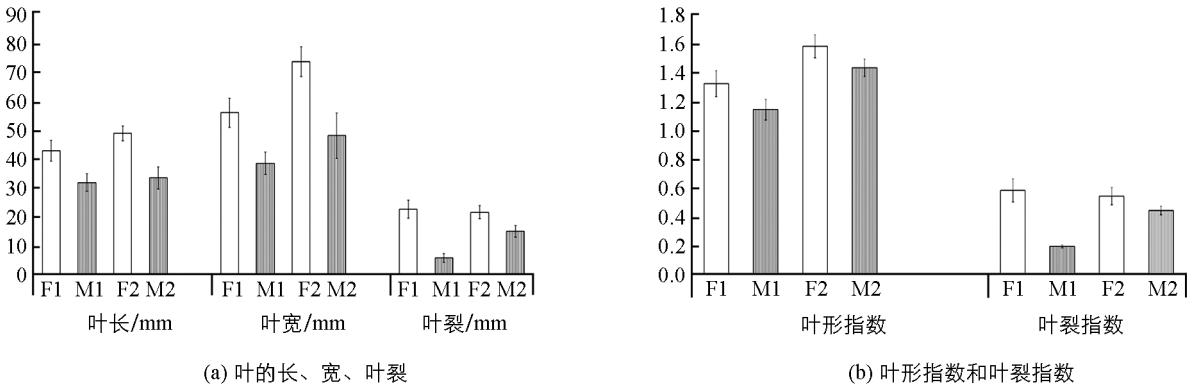


图 2 成年银杏雌(F)雄株(M)株长枝叶片形态数值特征

2.1.2 一年生幼苗叶形分析

银杏一年生幼苗叶片形态富有多多样性特征, 本研究参考盛宝龙等^[16]对银杏标准叶的判定标准, 根据每株幼苗形态变异系数最小的叶片形态和全株叶片主要叶形, 在杨天秀、李士美等^[17-18]的叶形分类基础上将所有幼苗叶片主要分成楔形、翅型、蒲扇形、扇形和多裂扇形以及不规则形 6 大类(图 3).

表 2 银杏幼苗叶形/叶裂指数分析

分类	长	宽	叶裂	叶形指数	叶裂指数
扇形	43.94±1.09a	40.22±1.03a	23.97±0.77a	0.96±0.06d	0.55±0.04c
多裂扇形	45.63±0.59b	43.57±0.68b	25.59±0.58b	0.94±0.07d	0.56±0.03c
蒲扇形	48.02±0.91b	43.50±0.93b	26.10±0.91c	0.91±0.07c	0.56±0.07c
不规则形	47.60±1.04b	42.56±0.92b	25.05±0.80b	0.88±0.01b	0.48±0.04a
楔形	47.02±0.85b	40.58±0.91a	23.95±0.88a	0.83±0.03a	0.49±0.04a
翅形	50.43±0.75c	43.91±0.75b	27.91±0.74c	0.85±0.03b	0.53±0.01b

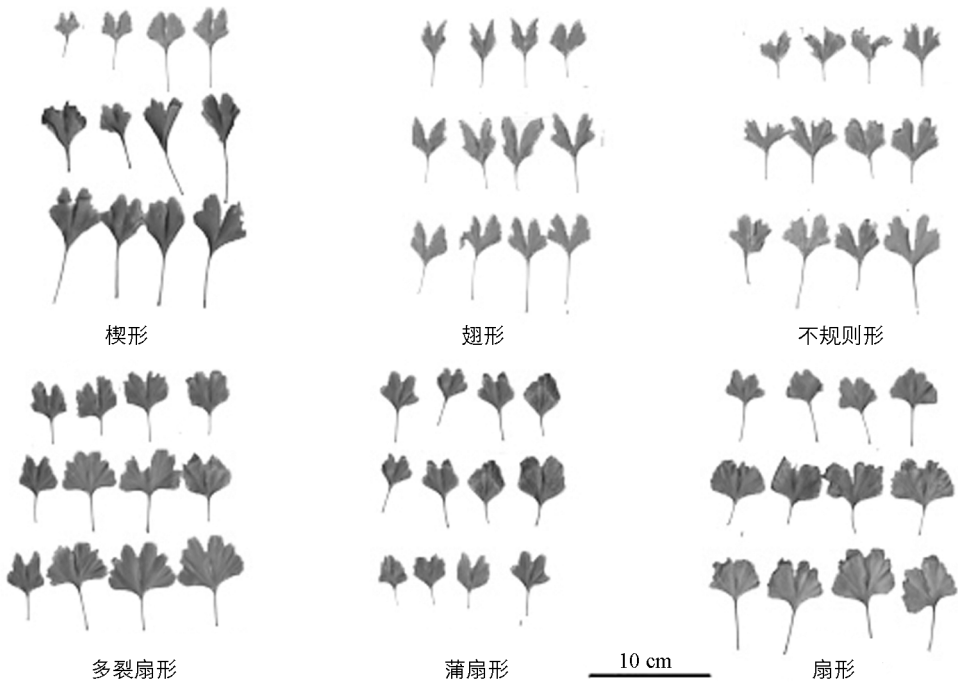


图 3 银杏一年生实生幼苗叶片多样性分析

测得幼苗叶片的数值特征见表 2。银杏幼苗中扇形、多裂扇形和蒲扇形叶的长与宽(或者面积)均普遍大于不规则形、楔形和翅形；叶形指数以 0.9 为分界线可明显将银杏幼苗叶片的分为两组，其中扇形、多裂扇形和蒲扇形植株的叶形指数均大于 0.9，不规则形、楔形和翅形的叶形指数均小于 0.9；以叶裂指数 0.54 为分界线也可将银杏幼苗叶片明显分为两组，其中扇形、多裂扇形和蒲扇形植株的叶裂指数均大于 0.54，不规则形、楔形和翅形均小于 0.54，这些叶形态学方面趋于一致性的分组分类变化规律如图 4。

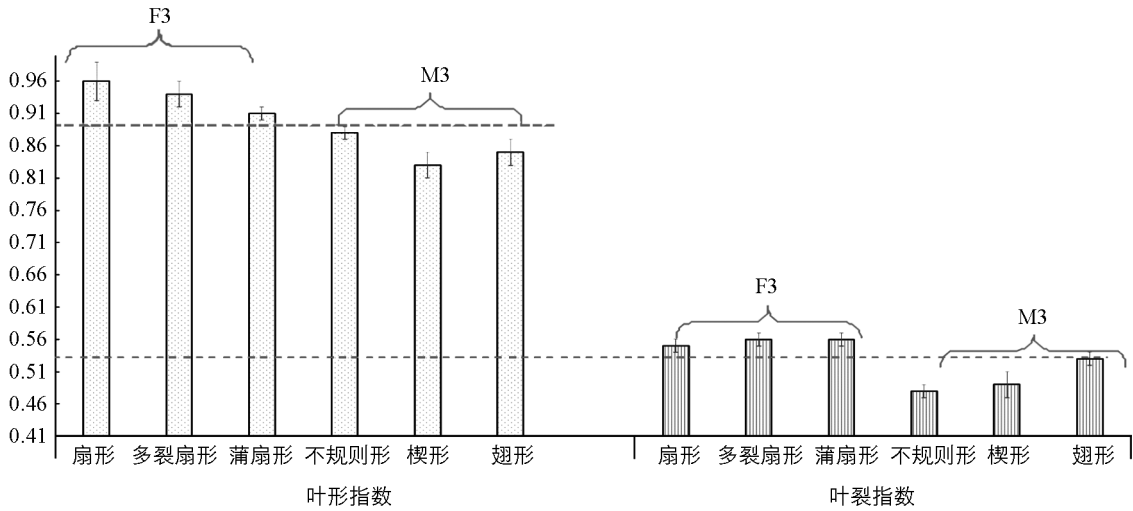


图 4 银杏幼苗叶片的叶形/叶裂指数分组分类

2.1.3 叶形/叶裂指数在银杏成株与幼苗间性别特征的偶联性假设

根据叶形指数和叶裂指数的不同, 可以将幼苗银杏分成大小不同的两组: 扇形、多裂扇形和蒲扇形植株为数值特征大组, 命名 F3 组, 不规则形、楔形和翅形叶的幼苗归为数值特征小组, 命名为 M3 组, 将这两组银杏叶面积、叶形指数、叶裂指数与成年银杏雌雄株的叶面积、叶形指数和叶裂指数对比分析, F3 组幼株与 F1、F2 组叶形特征相近, 叶面积、叶形指数和叶裂指数相对较大, 推测为雌株; M3 组幼苗与 M1、M2 组叶形特征规律一致, 叶面积、叶形指数和叶裂指数相对较小, 推测为雄株。

这两组幼苗叶形的分类是否与银杏性别相关联, 后面将采取 SCAR 分子标记技术对它们分别进行性别鉴别验证。

2.2 SCAR 分子标记检验

2.2.1 SCAR 引物组筛选结果

用 2 对 SCAR 引物分别对成年已知性别银杏 DNA 进行扩增, GBA 引物获得 1 条 400 bp 左右的雄株特异带, 稳定性好, 重复性高(图 5)。GBB 引物扩增后并未得到特异性条带。因此将 GBA 组引物作为后续试验的 SCAR 引物。

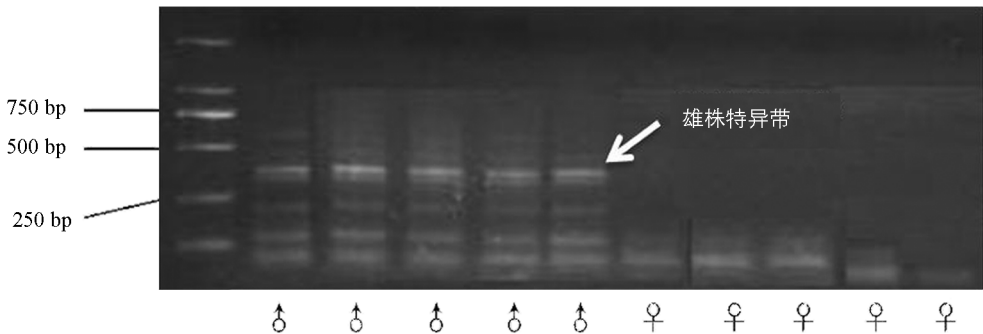
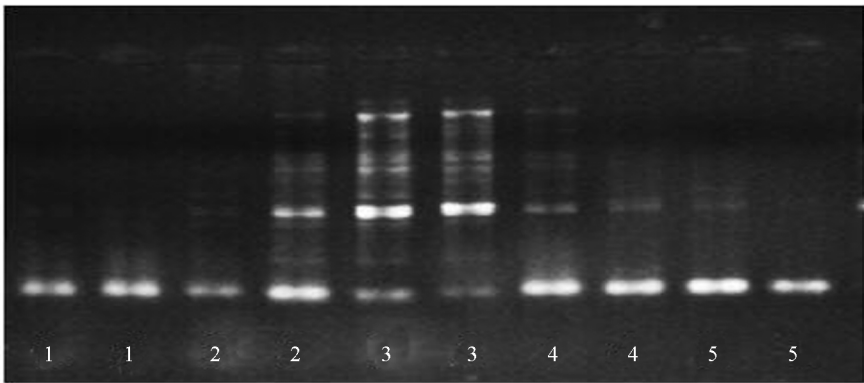


图 5 GBA 组引物对成年银杏 DNA 扩增结果

2.2.2 退火温度筛选结果

对 SCAR 引物组从 42 ℃ 开始直到 58 ℃, 每间隔 4 ℃ 设为 1 个退火温度, 结果表明, 随着温度的升高, 扩增条带呈现弱—强—弱的变化, 在温度升至 50 ℃ 时, PCR 扩增特征条带最清晰, 温度再升高, 条带又逐渐暗淡(图 6)。因此, GBA 组引物的最适退火温度为 50 ℃。



1: 42 ℃; 2: 46 ℃; 3: 50 ℃; 4: 54 ℃; 5: 58 ℃. 每个梯度重复 2 次。

图 6 引物 GBA 退火温度筛选

2.2.3 幼苗扩增结果

用 GBA 组引物对 3 组种子来源幼苗中长势基本一致的 27 株(G1 组 7 株, G2 组 7 组, G3 组 13 株)银杏幼苗 DNA 进行扩增, 每组种子萌发幼苗叶的 SCAR 条带基本上都分成了两大类, 一类条带多一条明亮带, 一类少一条明亮带。前面设为 M 组的幼苗几乎都有明亮清晰的特征条带, F 组几乎都缺少 M 组的特征带。将 M 组特征带与成年银杏雄株的特征带比较, 为同一个位置, 都在 400 bp 左右, 证明幼苗 M 组的植株

的确为雄株，F 组的植株为雌株(图 7)。银杏幼苗叶形/叶裂指数性别判别与分子标记判别的吻合度分析见表 3。经 SCAR 标记检验得出利用叶形分析初步判别银杏幼苗的性别方法准确率达 92.6%。

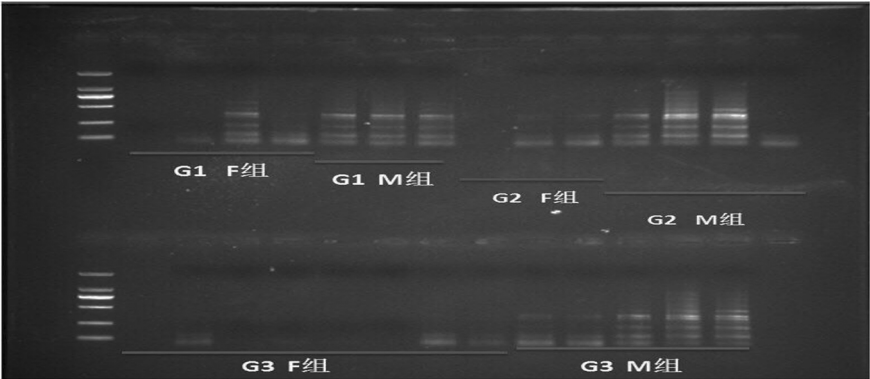


图 7 GBA 组引物对银杏幼苗 DNA 扩增结果

表 3 银杏幼苗叶形/叶裂指数性别判别与分子标记判别的吻合度分析

组别	F 组 (假设)	雌株(检验)	M(假设)	雄株(检验)	准确率/ %
G1	4	3	3	3	85.7
G2	3	3	4	3	85.7
G3	8	8	5	5	100
吻合度计算	15	14	12	11	92.6

3 讨 论

3.1 SCAR 分子标记的可靠性和稳定性

形态特征鉴别法最为直观简易，但目前并没有可靠的定论，且无对幼苗进行早期性别鉴定的相关的研究报道；化学药剂处理鉴别法^[19-20]和生理生化指标法^[21]简单易行，但仍处在定性阶段，缺乏准确的量性标准；同工酶法^[5]及染色体核型分析法^[7, 22]均可靠，但难以应用于大规模生产实践；种类多样的分子标记法^[8]及特异蛋白方面^[23]的研究更为准确，但尚需较高的科技支撑，实验步骤繁杂、条件要求高，难以普及。雌雄植物间的差异归根到底是 DNA 分子间的差异，且分子标记不受发育时间、组织特异性等的影响，比其他常用方法如生理生化指标测定法、化学药剂处理法、同工酶谱分析法等准确可靠，因此从分子水平研究雌雄株的差异，能够对植物进行准确的性别鉴定。目前有 RAPD^[24]、AFLP^[25-26]、ISSR^[27-28]、SSR^[29-30]和 SCAR 等种类的分子标记应用于银杏的遗传指纹图谱构建、品种鉴定和遗传育种研究，有 RAPD^[31-32]、AFLP^[8]和 SCAR^[15]标记应用于银杏的早期性别鉴定中。其中 RAPD 标记对实验中的影响因素如模板浓度、Mg²⁺ 浓度等条件十分敏感，因此缺乏较高的稳定性和重复性；AFLP 具有较高的稳定性和准确性，但流程复杂，步骤繁多，耗时较长。SCAR 标记即为特征性片段扩增区域，从其他分子标记技术基础上衍生而来，通过对目的特异片段的克隆与测序，根据所测得的两端的序列，合成特意引物对，进行 PCR 扩增。SCAR 标记只扩增了特定 DNA 区域，因此具有较高的特异性和重复性。

3.2 SCAR 分子标记结合叶形分析对银杏进行性别鉴定的可行性

考虑到实验室方法对实验条件、操作人员科研素质要求较高，在实际农林生产中难以得到满足，本研究摒弃复杂的生理生化法、同工酶谱分析法、染色体分析法，将最可靠的分子标记法与最简单便捷的形态特征分析法结合。同时由于目前缺乏将成年植株与幼苗结合起来进行协同分析的研究，难以揭示银杏成年植株与幼苗植株之间性别表观特征的异同。本研究通过分析成年银杏的叶形，选取叶片时选取变异系数最小的可作为标准叶的叶片，找到了幼苗雌雄株叶形特征与成年银杏叶形特征基本一致的规律，依此假设幼苗性别，再通过 SCAR 标记验证幼苗性别，27 株幼苗性别鉴定准确率达 92.6%，基本满足田间生产实践的要求。本研究选择了同品种不同生境的成年银杏植株为材料，其遗传背景几乎完全相同，消除了假阳性。选

取同品种同生境的幼苗植株为材料,消除了环境因子对银杏雌雄性别特征早期表现的影响,可以保证 SCAR 分子标记和叶形分析对银杏性别鉴定的可靠性。

3.3 本研究的不足之处

本研究仅针对于当地一年生银杏实生苗,对于其他地区、其他品种和非一年生幼苗的银杏植株能否运用此方法进行性别鉴定尚需深入后续研究。此外,本研究最终使用了 1 对 SCAR 引物对幼苗进行性别鉴定,也需要对于更多性别相关标记引物的开发进行研究探索。

本研究将银杏性别鉴定方法化繁为简,为农业生产实践中大规模推广应用此法提供了研究基础,为银杏成株与幼苗性别鉴定进一步研究提供了分子水平与形态特征结合的理论基础和生产实践应用上的技术支撑。

参考文献:

- [1] BILIA A R. *Ginkgo biloba* L. [J]. Fitoterapia, 2002, 73(3): 276—279.
- [2] 郭善基. 中国果树志: 银杏卷 [M]. 北京: 中国林业出版社, 1993.
- [3] 温银元, 戾铁梅, 王玉国, 等. 银杏雌雄株间多种同工酶和磷酸腺苷含量的差异 [J]. 山西农业科学, 2008, 36(6): 84—85.
- [4] 张雪明. 杨梅和银杏雌雄性的早期鉴别 [J]. 经济林研究, 1989, 7(2): 79—80.
- [5] 钟文海, 杨中汉, 朱广廉. 根据过氧化物酶同工酶图谱鉴定银杏植株的性别 [J]. 林业科学, 1982, 18(1): 1—5.
- [6] 李正理. 最近十年(1949—1959)关于银杏的形态解剖学及细胞学上的研究 I [J]. 植物学报, 1959, 8(4): 262—270.
- [7] 陈学森, 邓秀新, 章文才, 等. 银杏雌雄株核型及性别早期鉴定 [J]. 果树科学, 1997, 14(2): 87—90.
- [8] 王晓梅, 宋文芹. 利用 AFLP 技术筛选与银杏性别相关的分析标记 [J]. 南开大学学报(自然科学版), 2001, 34(1): 5—9.
- [9] 刘浩强, 张云飞, 李鸿筠, 等. 基于 RAPD 和 SRAP 分子标记的柑桔大实蝇种群多态性及其亲缘关系研究 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2014, 36(11): 49—56.
- [10] 陈 业, 石建明, 沈文华, 等. 23 种中国兜兰属植物亲缘关系的 ISSR 分析 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2013, 35(6): 15—21.
- [11] PARAN I, MICHELMORE R. Development of Reliable PCR-Based Markers Linked to Downy Mildew Resistance Genes in Lettuce [J]. Theoretical and Applied Genetics, 1993, 85(8): 985—993.
- [12] DEBENER T, JANAKIRAM T, MATTIESCH L, et al. Sports and Seedlings of Rose Varieties Analysed with Molecular Markers [J]. Plant Breeding, 2000, 119(1): 71—74.
- [13] DEPUTY J, MING R, MA H, et al. Molecular Markers for Sex Determination in Papaya (*Carica papaya* L.) [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2002, 106(1): 107—111.
- [14] 汪卫星. 天然与人工合成三倍体枇杷基因组变异及其 DNA 甲基化分析 [D]. 重庆: 西南大学, 2008.
- [15] LIAO L, LIU J, DAI Y, et al. Development and Application of SCAR Markers for Sex Identification in the Dioecious Species *Ginkgo biloba* L. [J]. Euphytica, 2009, 169(1): 49—55.
- [16] 盛宝龙, 赵洪亮, 马连宝, 等. 银杏叶片形态研究 [J]. 植物遗传资源学报, 2004, 5(1): 65—68.
- [17] 杨天秀, 成明昊. 银杏叶生物学特性研究 [J]. 西南农业大学学报(自然科学版), 2003, 25(4): 313—315.
- [18] 李士美, 崔希峰, 王成生, 等. 银杏观赏品种的叶片形态特性 [J]. 林业科技开发, 2006, 20(2): 33—36.
- [19] YAMASAKI M. Identification of the Sexes in Dioecious Plants by Testing the Resistance to the Toxic Action of Chlorate [J]. Jap Jour Bot, 1933(6): 459—466.
- [20] 李鸿勋. 银杏雌雄株鉴别初报 [J]. 园艺学报, 1965(1): 12.
- [21] 李国梁, 林伯年, 沈德绪. 酚类物质在鉴别园艺雌雄性植物中的应用研究 [J]. 园艺学报, 1993, 20(4): 397—398.
- [22] POLLOCK E. The Sex Chromosomes of the Maidenhair Tree [J]. Journal of Heredity, 1957, 48(6): 290—294.
- [23] 杨金华, 付庆云. 雌雄异株植物银杏特异蛋白初步分析 [J]. 科技信息, 2012(31): 241—241.
- [24] 曹福亮, 花喆斌, 汪贵斌, 等. 野生银杏资源群体遗传多样性的 RAPD 分析 [J]. 浙江林学院学报, 2008, 25(1): 22—27.
- [25] 吴岐奎, 邢世岩, 王 萱, 等. 叶用银杏种质资源黄酮和萜内酯类含量及 AFLP 遗传多样性分析 [J]. 园艺学报, 2014,

41(12): 2373—2382.

- [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(9): 1940—1945.
- [27] 葛永奇, 邱英雄, 丁炳扬, 等. 子遗植物银杏群体遗传多样性的 ISSR 分析 [J]. 生物多样性, 2003, 11(4): 276—287.
- [28] 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.
- [29] 闫小玲. 基于 cpDNA 单倍型和 SSR 分析的银杏群体遗传结构和谱系地理学研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2010.
- [30] 李广平, 曹福亮. 银杏 EST-SSR 引物开发 [J]. 西北农业学报, 2012, 21(12): 149—152.
- [31] LING J, RUI-LIN Y, MAO-XUE L, et al. Identification of a Sex-Associated RAPD Marker in *Ginkgo biloba* [J]. Acta Bot Sin, 2003, 45(6): 742—747.
- [32] 王晓梅, 宋文芹. 与银杏性别相关的 RAPD 标记 [J]. 南开大学学报(自然科学版), 2001, 34(3): 116—117.

Sex Identification of *Ginkgo biloba* L. by SCAR Markers and Leaf Morphology

HANG Qian^{1,2}, CHEN Ke¹, LIU Ji-yao¹,
YANG Xiao-hong¹, LEI Bo²

1. Key Laboratory of Horticulture Science for Southern Mountainous Regions, Ministry of Education /
School of Horticulture and Landscape Architecture, Southwest University, Chongqing 400715, China;
2. Chongqing Academy of Environmental Science, Chongqing 401147, China

Abstract: In the present study, 12 adult ginkgo (*Ginkgo biloba*) trees whose gender was known and 27 young seedlings with unknown gender were used as experimental materials. Their leaf morphological characteristics were compared and the DNA was amplified with SCAR-PCR so as to determine their coupling relationship. The results of leaf morphology index analysis of adult ginkgo plants and classification of ginkgo seedlings showed that the main differences between male and female adult plants were the leaf shape index and leaf lobe index. The leaf shape index and leaf lobe index of female plants were higher than those of male plants. Seedling plants with leaves of cattail leaf fan shape, fan shape and mul-lobe fan shape were named as F3 section which was speculated to be female plants; Plants with the other shapes were named as M3 section which was speculated to be male plants. With SCAR-PCR, male-specific bands similar to the male-specific bands of male adult plants were obtained in 11 of the 12 seedlings in M3 group, while no such male-specific bands were found in most plants of F3 group except one. The above results indicated that some sex-related gene(s) and leaf indexes are coupled and, therefore, morphological characteristics of leaves can be used in early gender identification for *G. biloba*.

Key words: *Ginkgo biloba*; gender identification; leaf morphology; SCAR marker; collaborative analysis

责任编辑 欧 宾

