

银杏分子技术的研究进展

莫昭展, 曹福亮, 汪贵斌

(南京林业大学森林资源与环境学院, 江苏南京 210037)

摘要: 综述了近几年来分子技术在银杏研究中的应用情况, 对银杏的遗传多样性、进化地位、品种鉴别、遗传连锁图谱、雌雄鉴别及其它相关研究进展进行了介绍, 并对当前研究中存在的问题和今后的发展方向作了进一步探讨。

关键词: 银杏; 分子技术; 研究进展

中图分类号: Q949.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2005)04-0356-06

Research advances in molecular biology on *Ginkgo biloba*

MO Zhao-zhan, CAO Fu-liang, WANG Gui-bin

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

Abstract: In this paper, the research status on *Ginkgo biloba* by molecular biology technology were reviewed, including genetic diversity, phylogeny, cultivar discrimination, genetic linkage map, gender discrimination, and other prospects of this species. The present issue and future development were also discussed.

Key words: *Ginkgo biloba*; molecular technology; research advances

银杏(*Ginkgo biloba* L.)是现存裸子植物中与恐龙同时代的最古老的孑遗植物,被公认为“活化石”,是中国特有的珍贵树种。银杏全身是宝,集食用、药用、材用、保健、观赏于一体,是一个重要的多用途特种经济生态型树种(曹福亮,2002)。近些年来,随着分子技术的进步,尤其是DNA分子标记的新技术不断涌现,有关银杏分子生物方面的研究报道也日渐增多。本文综述了近几年来分子技术在银杏研究中的应用情况,希望能为今后深入开展银杏的分子生物学研究提供参考。

1 银杏遗传多样性的研究

我国是世界上银杏资源最为丰富、分布广泛的国家,其它国家的银杏均引种自中国。然而,银杏的

最后避难所在哪儿?银杏的遗传基础如何?怎样更好地保护银杏资源?多年来,人们这些问题进行过各种深入研究,但却未得出令人信服的答案。由于银杏极少出现形态分化,因此必须借助于分子手段。

Tsumra(1997)等用银杏大配子体组织对编码12个酶系的同工酶进行遗传分析,用10个酶系的12个位点分析日本神庙和寺庙附近98株古树的等位酶变异。分析表明,日本不同区域银杏存在较大变异,银杏是在不同时期以种子形式引入并种于庙宇和神庙附近。

郑阿宝(2000)利用RAPD标记对浙江天目山及重庆金佛山银杏群体及部分栽培品种进行研究。两个群体分别为24%和23%,总的基因多样性为0.3325,其中95.5%存在于种群内。Ruhul等(2002)利用RAPD及RFLP技术对美国东部的银

收稿日期: 2004-07-06 修订日期: 2004-10-12

基金项目: 江苏省科技项目“银杏和何首乌资源遗传分析及药用新品种选育”(BG200413)

作者简介: 莫昭展(1974-),男,广西博白人,讲师,博士生,从事生物教学与研究。E-mail: zhaozhangm@hotmail.com

杏遗传多样性作了分析。采样点有三处:宾夕法尼亚 12 株,尼亚加拉瀑布和华盛顿特区各 2 株。结果表明,宾夕法尼亚银杏的多态位点百分率为 5%。三个采样点各取 2 株进行分析时,发现尼亚加拉瀑布的 2 株银杏与华盛顿群体有 45% 差异性条带。经 F 检验证实,宾夕法尼亚及华盛顿特区的银杏遗传结构极为相似($P > 0.9999$),而与尼亚加拉瀑布银杏不同($P < 0.05$)。葛永奇等(2003)利用 ISSR 对中国 3 个可能的野生群体(浙江天目山、贵州务川和湖北大洪山,各 15 个单株)及江苏泰兴(15 个单株)和美国纽约(6 个单株)的栽培银杏群体的遗传多样性进行了研究。结果表明,自然群体的多态位点百分率较高,为 57%(贵州务川)和 50%(浙江天目山、湖北大洪山),而栽培群体则较低,为 34%(江苏泰兴)和 24%(美国纽约)。在 3 个群体中,总变异的 15% 存在于群体间。

可以看出,银杏确实存在遗传多样性,其中自然群体的遗传多样性高于栽培群体,但这种多样性主要存在于群体内部,群体之间的差异较小,说明银杏群体存在较强的奠基者效应,它们都起源于少数个体,在漫长的繁衍过程中逐渐产生变异。依据子遗植物避难所较其后裔具有更高的遗传多样性(Lewis, 1995; Comes, 1998),那么贵州务川极有可能为银杏的最后避难所。由于银杏具有极强的萌芽更新能力,极易进行无性繁殖,其分布区域可能存在人为活动干扰,加上采样策略和分析手段的不同,导致最后的结论数据有差异。显然,已有的研究结果并未能彻底解决问题,还需要在以下几个方面作出努力:扩大研究群体对象,重点是一些人迹罕至的银杏自然分布区;适当扩大样本数(每群体 30 株以上)(李昂等, 2000),注重其代表性;提高研究手段(Camacho 等, 2001);并结合野外生境、群落结构调查等。

2 银杏进化地位的研究

由于裸子植物之间的亲缘关系相对较远,由于同型现象及形态特征上的过度趋异导致很难区分祖征和衍征,给银杏进化地位的研究带来了不确定性。分子标记技术的发展给解决这一难题带来了希望,其研究的对象有叶绿体、线粒体和核基因组的核苷酸或氨基酸序列及叶绿体基因组的排列方式等。

Palmer 等(1982)研究了银杏叶绿体基因组(cpDNA)的限制图谱及包含核糖体和 17 种编码蛋

白的基因图谱。银杏 cpDNA 大小为 158kb,同大多植物一样,有两个反向重复序列(IR),IR 大小为 17kb,基因排列顺序也与大多种子植物一致(Raubeson, 1992)。在裸子植物中,针叶植物的 cpDNA 只有一个 IR,这与银杏不同,据此可将针叶植物划为一单系类群,其中不包括银杏,这一结果与传统分类相一致(Strauss, 1988)。cpDNA 中存在基因的缺失或插入,如研究发现在被子植物 cpDNA 中存在 chlL 基因(编码叶绿素酸酯还原酶,与黑暗条件下叶绿素合成有关)缺失。通过与包括银杏在内的众多植物的 cpDNA 比较发现,chlL 基因缺失特征为个体衍征(Suzuki, 1992)。cpDNA 的核苷酸顺序及其编码的氨基酸顺序也为系统学提供了大量信息,rbcL 基因(编码 RuBP 羧化酶大亚基)则是分子系统学中研究最为详尽的一个基因(Manhart, 1994)。rbcL 基因进化速率较慢,适于科以上分类研究。Hasebe(1992)等首次对包括银杏在内的裸子植物各纲的 rbcL 基因进行了研究,证明现存裸子植物为一单系类群。由于信息点较少,利用氨基酸序列信息所构建的裸子植物的系统发生树缺乏统计学支持。核苷酸序列信息表明,银杏与苏铁亲缘关系最近,而密码子第 1、2 位核苷酸信息则进一步验证了这一点,其 bootstrap 支持率达 80% 以上(Goremykin, 1996)。相对而言,针叶树的 cpDNA 研究较为深入,因此对银杏、苏铁、买麻藤等 cpDNA 的进一步研究将更有助于了解银杏的进化地位。

Hiesel 等(1994)对植物线粒体基因组(mtDNA)中 coxIII 基因(编码细胞色素 c 氧化酶第三大亚单位)序列进行了研究。由 coxIII 基因的 381 个核苷酸序列构建的系统发生树同样表明了银杏与苏铁亲缘关系最为相近。

Hori 等(1985)利用核基因 5S rRNA 序列构建了包括银杏在内的分子系统发生树,结果也是银杏与苏铁亲缘关系最为接近。但由于信息位点较少,基因序列较短(120bp),这一结果缺乏统计学支持。核基因 18S rRNA 序列结果支持银杏和苏铁作为一单系类群,bootstrap 支持率为 76%(Chaw, 1995)。Doyle 等(1994)利用 18S 和 26S rRNA 部分序列信息先将针叶类与苏铁聚为一类,然后再与银杏聚为一类,bootstrap 支持率为 88%。Troitsky(1991)报道了银杏 4.5S,核 5S 以及叶绿体 5S rRNA 基因序列,结果支持银杏与苏铁聚为一类。

3 银杏品种分子鉴别和遗传连锁图谱的构建

3.1 银杏品种分子鉴别

目前我国银杏栽培品种(系)已达百余个以上,从分子水平上去鉴定、比较、评价这些宝贵的资源,对更好地保护和利用银杏具有重要意义。

毕春侠(1998)分析了银杏10个品种的过氧化氢同工酶谱,发现不同品种在酶带及Rf值上存在差异,据此将这10个品种划分为4个类群。

谭晓风(1998)以15个银杏栽培品种的胚乳为材料,利用RAPD方法使用12个引物扩增出了20条多态性谱带,并确定了20个标记基因型。通过聚类分析将这些品种划分为4个类群,与较早期的3大类分类系统(佛手、马铃、梅核)基本吻合。冯晓黎(2002)应用同样方法,利用6个引物确定了49个标记基因型,对17个栽培品种进行了鉴别和分类。通过聚类分析将其分为两大类,结果与形态分类有所不同。刘叔倩等(2001)以银杏叶片为材料,用RAPD方法使用15个引物对28个银杏栽培品种(系)进行了遗传多样性检测和遗传分析,其多态位点百分率为30.5%。样品间的相似性较高,遗传变异较小,在取相似系数域值0.87的条件下,可将它们分为2个类群,但没有进一步地与传统分类相比较。桂仁意(2004)以41个银杏栽培种为材料利用筛选出的24对RAPD引物对所有41个样品进行PCR扩增出多态性条带43条,多态位点百分率为24.6%;利用筛选出的14对ISSR引物对所有41个样品进行PCR扩增出多态性条带31条,平均每条引物扩增清晰条带数为12.9条,多态位点百分率为17.2%;ISSR所揭示的银杏栽培群体的遗传多样性高于RAPD分析所得的结果,而且其所估算参数的标准差要低于RAPD所估算出的值,因此,在研究银杏品种亲缘关系上,ISSR分子标记技术比RAPD分子标记技术更为合适;聚类分析结果表明,运用分子标记所进行的分类结果与传统的分类结果不相吻合。

利用单倍体胚乳为材料进行分子鉴别时,由于能区分纯合和杂合位点,因此较二倍体材料更为高效。但因银杏童期长,取样会受到限制。银杏栽培群体的遗传多样性较自然群体低,要注重对自然群体资源的利用。

3.2 遗传连锁图谱

谭晓风等(1998)用RAPD分子标记构建了第1张银杏分子遗传图谱。该图谱共有62个RAPD标记,19个连锁群,总长度为829.1cM,覆盖了银杏基因组的1/3。桂仁意(2004)也进行了银杏遗传连锁图谱构建的研究,获得的连锁图谱的遗传跨度为1742.20cM,覆盖整个基因组大小的79.2%。连锁图标记间的平均距离为10.82cM。最大的连锁群图距为261.2cM,最小的连锁群图距为62.4cM。其中,相邻连锁位点间图距最大的为42cM,大于40cM的作图盲区也只有一个。在银杏遗传图谱构建中,受银杏自身的遗传变异限制,很难建立一个永久性的作图群体,只能用单体胚乳组织;目前建立的银杏遗传图谱密度偏低,远不能满足数量性状基因定位的要求。

4 银杏雌雄鉴别及相关研究

银杏童期长,实生树定植后需20~25a才能开花结果。因银杏种子在成熟时具有一种特殊的臭味,所以作为绿化树种只需雄株,而以生产白果为目的则需要大量的雌株。因此,有很多关于银杏雌雄株性别鉴别的形态学、生理生化指标、同工酶谱、化学药剂处理和染色体核型鉴定等方面的研究报道(程晓建等,2002),但这些研究结果都不理想。银杏雌雄差异源于内遗传物质差异,因此可直接从DNA水平出发,寻找性别差异。

王晓梅等(2001)应用150个10bp的随机单引物及110对双引物组合,对雌雄2个DNA池(各有10株)进行RAPD分析,获得了1个与雄性相关的RAPD标记,该引物序列为TGATCCCTGG。同时还利用AFLP技术,应用48个引物组合,筛选与银杏性别相关的分子标记。其中3个引物组合各提供了1个与雌性相关的分子标记。经Southern点杂交证实有两个标记(E2/M5和E5/M3)为银杏雌性基因组所特有。

为进一步了解银杏的雌雄差别,张建业等(2002)克隆了银杏雄株全长LEAFY基因,该基因序列与genebank中银杏雌株LEAFY基因核苷酸和蛋白质序列同源性都高达99%。该基因含2个内含子,3个外显子。与雌株LEAFY基因相比较,雄株LEAFY基因少3个碱基,突变均在植物该基因的非保守区内。

MADS-box 基因是广泛存在于动植物体中的调节基因家族,也是目前植物界了解最多的调节基因家族,在植物的花分生组织、花器官及各种营养器官中有不同形式的时空表达模式(蔡小钊,2000)。Muriel Jager 等对银杏的 MADS-box 基因进行了研究。在银杏基因组中存在大量 MADS-box 基因,推测这与基因重复有关。将 MADS-box 基因之一 GBM5 克隆并测序,发现它与拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)的 AGAMOUS 基因同源,在花器官及营养器官中均有表达。目前 genebank 上已有大量银杏 MADS-box 基因序列数据。

5 其它研究进展

孙天恩等(2000)用细胞光度术(Cytophotometry)定量分析了银杏细胞核 DNA 的含量,认为其二倍体细胞核 DNA 有质量为 $(19.40 \pm 0.78) \times 10^{-12}$ g,其 C 值为 $(9.70 \pm 0.62) \times 10^{-12}$ g。知道了银杏细胞核 DNA 的质量可以大致估计其基因组的大小。平均 1.0×10^{-12} g 相当于 0.965×10^9 个碱基对,因此,银杏细胞核 DNA 大约有 18.721×10^9 个碱基对(bp)。这对于银杏基因工程的操作有重要参考价值。

植物细胞器中存在 mRNA 编辑现象。在高等植物叶绿体中,C→U 的转变发生于特定位点,它们位于蛋白质编码区,并能改变 mRNA 的编码产物。Jorg Kudla 等(1999)等报道了 *psbE* 操纵子的 RNA 编辑模式,发现了 4 个 C→U 编辑位点,有 2 个是银杏所特有的,其中 1 个位于顺反子间隔区。这点非常令人惊奇,因为这是在植物叶绿体中第 1 次发现存在于非编码区的 RNA 编辑位点。Jorg Kudla 等对此进行了分析,认为它没有生理功能,可能是进化的遗留产物,或者因与其它编辑位点类似而被编辑因子识别。Hiesel 等(1994)将银杏 *cox III* 基因的 cDNA 与 mtDNA 序列比较发现,在 mRNA 编辑过程中,共有 21 个 C 转换成了 U。虽然这种转换在维管植物中较为普遍,但就转换的核苷酸相对数量而言,银杏是最多的。

银杏自身具较强的抗病、抗虫能力。黄虎等(2001)从银杏的叶片中纯化获得了 1 个抗真菌蛋白,把它命名为 GAFP1。它能够抑制水稻纹枯病菌和棉花炭疽病菌菌丝的生长,与蛋白质数据库中已知的蛋白质没有同源性,可能是 1 个新的抗真菌蛋白。

在银杏转基因研究方面,张伦等(1999)报道,发

根农杆菌(*Agrobacterium rhizogenes*)可侵染银杏幼叶、幼芽、幼茎,其中 A100,15834 菌株侵染率最高,可达 18.5%,形成毛状根。此毛状根能合成农杆菌碱。刘树楠等(1998)报道了同样的结果,并且证明银杏毛状根还具有合成银杏黄酮和银杏内酯的能力。Dupre-P 等(2000)建立了一个用农杆菌(*A. tumefaciens*)转化银杏的系统。将胚和携带有报道基因 *gus* 和选择基因 *nptII* 的质粒载体 pTHW136 的农杆菌共同培养,当用 1.5 个月大的胚在盐浓度低的培养基上培养时,可获得最高转化率 45%。

在银杏 DNA 文库构建方面,黄代青等(2002)首次采用染色体微分离微克隆技术,构建了银杏第 1 染色体 DNA 文库,约含有 75 000 个重组子,插入片段的平均大小为 800bp。

植物 rDNA 是由高度重复的序列组成的多基因家族,在 nDNA、cpDNA 及 mtDNA 中都存在,目前最常用的是核 rDNA。陈月琴等(1999)测定了银杏 1 雌株 rDNA ITS 区全序列共 1 172bp,其中 ITS1 为 788bp,ITS2 为 226bp,5.8S 基因为 158bp 对测验结果与从 Genbank 中获取的栽培于意大利的银杏 rDNA ITS 的序列进行比较,并采用计算机分析进行序列的排列与分析,结果表明,形态上很少变化的银杏,其个体之间有明显的分子差异,不同产地栽培株 rDNA ITS 区序列的核苷酸差异高达 25%。

6 问题和展望

由于分子标记技术具有快速、微量、特异性强、准确可靠等特点,且不受生育阶段、供试部位、环境条件、贮藏等因素的影响,获得的大量分子数据能直接反映遗传物质差异而且对数据的评价相对容易,因此广泛应用于银杏进化地位、遗传多样性、品种鉴别、银杏遗传图谱构建及雌雄鉴别等研究。不过现有的分子标记数据虽然支持将银杏与苏铁聚为一类,但分子标记数据还较少,且 bootstrap 支持率不高。另外应用形态特征对裸子植物进行分支分类研究的报道很多,研究结果存在争议(Rothwell, 1994),且与分子标记数据结果差异都比较大。当分子标记数据积累到一定程度时,可结合形态特征数据对银杏的进化地位作出正确评价。在银杏遗传多样性研究中,虽然得出了一些结论,但重点是要扩大研究范围,注重对银杏自然分布区的实地调查。在雌雄及品种分子鉴别上,则需要发展简单、可靠并能

进行早期检测的手段。

有关银杏雌雄性别决定和开花调控的分子机理现在所知甚少。在银杏遗传图谱构建中,受银杏自身的遗传变异限制,很难建立一个永久性的作图群体,只能用单体胚乳组织;目前建立的遗传图谱密度偏低,远不能满足银杏数量性状基因定位的要求,若要对银杏基因组进行深入研究,必须发展分子标记,构建高密度的遗传图谱。在银杏转基因研究中,目前还没有合适的植物再生体系。

毫无疑问,银杏的分子生物方面的研究已取得了一定的进展,为银杏的开发和应用奠定了良好的基础。随着分子技术的发展,当人们对银杏的资源有更全面的了解,对银杏的DNA序列有更多的认识,弄清银杏体内基因如何控制合成有用的特殊次生代谢产物之后,可将这些特殊基因转入合适受体进行表达,生产次生代谢产物。若能进一步完善银杏体细胞胚培养系统,也可对银杏进行遗传转化,培育出符合人们需要的银杏植株。随着体细胞胚克隆、各种组织器官培养和繁殖体系的日趋完善,以及酶工程、发酵工程在银杏上的应用,银杏将在医药、农业、园艺、林业上发挥出更大的作用。

参考文献:

- 冯晓黎. 2002. 银杏主要栽培品种的 RAPD 分子鉴别[D]. 株州:中南林学院.
- 刘叔倩,马小军,郑俊华. 2001. 银杏不同变异类型的 RAPD 指纹研究[J]. 中国中药杂志,26(12):822-825.
- 孙天恩,李根保,罗望生. 2000. 银杏细胞核 DNA 含量的分析[A]. 见:全国第八次银杏学术研讨会[C]. 武汉:湖北科学技术出版社.
- 郑阿宝. 2000. 银杏遗传多样性及生态保护的研究[D]. 南京:南京林业大学.
- 桂仁意. 2004. 银杏遗传连锁图谱的构建及进化地位的研究[D]. 南京:南京林业大学.
- 曹福亮. 2002. 中国银杏[M]. 南京:江苏科学技术出版社.
- 谭晓风,胡芳名,黄晓光. 1998. 银杏 RAPD 分子遗传图谱的构建[J]. 林业资源管理,(特刊):45-49.
- Bi CX(毕春侠),Guo JZ(郭军战). 1998. Analysis of HRP enzyme among ten breeds of *Ginkgo biloba* (银杏品种过氧化物同工酶谱分析)[J]. *Shuanxi Forest Science and Technology*(陕西林业科技),(4):1-3.
- Comes HP, Kadereit JW. 1998. The effect of quaternary climatic changes on plant distribution and evolution [J]. *Trends in Plant Science*, 3:432-438.
- Camacho FJ, Liston A. 2001. Population structure and genetic diversity of *Batrachium pumicola* (Ophioglossaceae) based on ISSR[J]. *American J Botany*, 88(6):1 065-1 071.
- Chaw SW, Sung HM, Long H, et al. 1995. The phylogenetic positions of the conifer genera *Amentotaxus*, *Phyllocladus* and *Nageia* inferred from 18S rRNA sequences[J]. *J Mol Evol*, 41:224-230.
- Cheng XJ(程晓建), Wang BP(王白坡), Zheng BS(郑炳松), et al. 2002. Progress on sex identification of dioecism in *Ginkgo biloba* (银杏雌雄株性别鉴别研究进展)[J]. *J Zhejiang Fore Coll*(浙江林学院学报), 19(2):217-221.
- Cai XD(蔡小翎), Wang JF(王金发). 2000. Function and mechanism of MADS-box gene in plant(植物 MADS 盒基因的功能和调节机理)[J]. *Plant Physiol Commun*(植物生理学通讯), 36(3):277-281.
- Chen YQ(陈月琴), et al. 1999. Relationship between the morphology and molecular evolution of "Living Fossil" *Ginkgo biloba*: evidences from the sequence analysis of rDNA ITS("活化石"植物银杏形态与分子进化(1))[J]. *Acta Sci Nat Univ Sunyatseni*(中山大学学报(自然科学版)), 38(1):16-19.
- Doyle JA, Donoghue MJ, Zimmer EA. 1994. Integration of morphological and ribosomal RNA data on the origin of angiosperms[J]. *Ann MO Bot Gard*, 81:419-450.
- Dupre P, Lacoux J, Neutelings G. 2000. Genetic transformation of *Ginkgo biloba* by *Agrobacterium tumefaciens* [J]. *Physiologia-Plantarum*, 108:413-419.
- Ge YQ(葛永奇), Qiu YX(邱英雄), Ding BY(丁炳扬), et al. 2003. An ISSR analysis on population genetic diversity of the relic plant *Ginkgo biloba* (孑遗植物银杏群体遗传多样性的 ISSR 分析)[J]. *Biodiversity Science*(生物多样性), 11(4):276-287.
- Goremykin V, Bobrova V, Pahnke J, et al. 1996. Noncoding sequences from the slowly evolving chloroplast inverted repeat in addition to rbcL do not support Gnetalean affinities of angiosperms[J]. *Mol Biol Evol*, 13:383-396.
- Hasebe M, Kofuji R, Ito M, et al. 1992. Phylogeny of gymnosperms inferred from rbcL gene sequences[J]. *Bot Mag Tokyo*, 105:673-679.
- Hiesel R, Von Haeseler A, Brennicke A. 1994. Plant mitochondrial nucleic acid sequences as a tool for phylogenetic analysis[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91:634-638.
- Hori H, Lim BL, Osawa S. 1985. Evolution of green plants as deduced from 5S rRNA sequences[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 82:820-823.
- Hiesel R, Combettes B, Brennicke A. 1994. Evidence for RNA editing in mitochondria of all major groups of land plants except the *Bryophyta* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91:629-633.
- Huang F(黄虎), Zhou Z(邹振), Xie WJ(谢伟军), et al. 2001. Isolation, purification and identification of an antifungal protein from leaves of *Ginkgo biloba* L. (源于银杏叶片中一个抗真菌蛋白(GAFP1)的分离、纯化和鉴定)[J]. *Jiangsu J of Agr Sci*(江苏农业学报), 17(2):77-81.
- Huang DQ(黄代青), Li LX(吕柳新), Wang P(王平). 2002. Construction of the first chromosome DNA library of *Ginkgo*(银杏第1染色体DNA文库的构建)[J]. *J Fujian Agric and Fore Univ(Nat Sci Edition)*(福建农林大学学报(自然科学版)), 31(4):490-494.
- Jorg Kudla, Ralph Bock. 1999. RNA editing in an untranslated region of the *Ginkgo* chloroplast genome[J]. *Gene*, 234:81-86.
- Lewis PO, Crawford DJ. 1995. Pleistocene refugium endemics exhibit greater allozymic diversity than widespread congeners in the genus *Polygonell* (Polygonaceae) [J]. *American J*

- Bot, **82**: 141–149.
- Li Y(李 昂), Wang KQ(王可青), Ge S(葛 颂). 2000. Genetic diversity within and among populations of *Violatenuicornis* with reference to sampling strategies(不同采样策略对细距堇菜遗传多样性估算的影响)[J]. *Acta Bot Sin*(植物学报), **42**(10): 1 069–1 074.
- Liu SN(刘树楠), Sun TA(孙天恩), Li GB(李根保). 1998. Transformation of *Ginkgo* hairy root and establishment of its suspension culture clone(银杏发根的转化及其悬浮培养无性系的建立)[J]. *J Wuhan Univ(Nat Sci Edition)*(武汉大学学报(自然科学版)), **44**(2): 238–240.
- Manhart JR. 1994. Phylogenetic analysis of green plant rbcL sequences[J]. *Mol Phylogenet Evol*, **3**: 114–127.
- Palmer JD, Stein DB. 1982. Conservation of chloroplast genome structure among vascular plants[J]. *Curr Genet*, **10**: 823–834.
- Rudhul HK, Nayema NK, Igor D. 2002. DNA polymorphism in the living fossil *Ginkgo biloba* from the Eastern United States[J]. *Genome*, **45**: 8–12.
- Rothwell GW. 1994. Phylogenetic relationship among ferns and gymnosperms an overview[J]. *J Plant Res*, **107**: 411–416. Strauss SH, Palmer JD, Hower GT, et al. 1988. Chloroplast genomes of two conifers lack a large inverted repeat and are extensively rearranged[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, **85**: 3 898–3 902.
- RW, Tulecke W, et al. *Ginkgo biloba*—a Global Treasure [M]. Springer-Verlag, Tokyo, 159–172.
- Suzuki J, Bauer CE. 1992. Light-independent chlorophyll biosynthesis; involvement of the chloroplast gene, chlL[J]. *Plant Cell*, **4**: 929–940.
- Tan XF(谭晓风), Fu FM(胡芳名), Zhang QF(张启发). 1998. Identification of main cultivars in *Ginkgo biloba* by RAPD markers(银杏主要栽培品种的分子鉴别)[J]. *J Central South Fore Univ*(中南林学院学报), **18**(3): 1–8.
- Tsumura Y, Ohba K. 1997. The genetic diversity of isozymes and the possible dissemination of *Ginkgo biloba* in ancient times in Japan[A]. In: Hori T, Rideg Raubeson LA, Jansen RK. 1992. Chloroplast DNA evidence on the ancient evolutionary split in vascular land plants[J]. *Science*, **255**: 1 697–1 699.
- Troitsky AV, Melekhovets YF, Rakhimova GM, et al. 1991. Angiosperm origin and early stages of seed plant evolution deduced from rRNA sequence comparisons[J]. *J Mol Evol*, **32**: 253–261.
- Wang XM(王晓梅), Song WQ(宋文芹), Liu S(刘松), et al. 2001. Rapd makers related to sex locus in *Ginkgo biloba*(与银杏性别相关的 RAPD 标记)[J]. *Acta Sci Nat Univ Nankai*(南开大学学报(自然科学)), **34**(3): 116–117.
- Wang XM(王晓梅), Song WQ(宋文芹), Liu S(刘松), et al. 2001. AFLP markers related to sex in a dioecious plant, *Ginkgo biloba* L.(利用 AFLP 技术筛选与银杏性别相关的分子标记)[J]. *Acta Sci Nat Univ Nankai*(南开大学学报(自然科学))[J], **34**(1): 5–9.
- Zhang JY(张建业), Chen LG(陈力耕), Hu XQ(胡西琴), et al. 2002. Leafy homologous gene cloned in maidenhair tree (*Ginkgo biloba* L.)(银杏 LEAFY 同源基因的分离与克隆)[J]. *Sci Silv Sin*(林业科学), **38**(4): 167–170.
- Muriel Jager, Alexandre Hassanin, Michael Manuel, Hervé Le Guyader, Jean Deutsch. MADS-box genes.
- Zhang L(张 伦), Zhang X(张 熙), Wu JJ(吴建军), et al. 1999. Induction and culture of *Ginkgo* hairy root(银杏毛状根的诱导和培养)[J]. *Guizhou Sci*(贵州科学), **17**(6): 132–134.

(上接第 379 页 Continue from page 379)

- Terashima I, Funayama S, Sonoike K. 1994. The site of photoinhibition in leaves of *Cucumis sativus* L. at low temperatures is photosystem I, not system II [J]. *Planta*, **193**: 300–306.
- Terashima I, Noguchi K, Itoh-Nemoto T, et al. 1998. The cause of PSI photoinhibition at low temperatures in leaves of *cucumis sativus*, a chilling susceptible plant [J]. *Physiol Plant*, **103**: 295–303.
- Wei J(魏 捷), Yu H(余 辉), Li LB(李良璧), et al. 2000. Process on photodamage of pigments and proteins in PSI pellets of spinach(菠菜 PSI 颗粒中色素和蛋白的光破坏进程)[J]. *Chin Sci Bull*(科学通报), **45**(6): 612–617.
- Wiese C, Shi LB, Helber U. 1998. Oxygen reduction in the Mehler reaction is insufficient to protect photosystems I and II of leaves against photoinactivation [J]. *Physiol Plant*, **102**: 437–465.
- Xu CC, Jeon YA, Lee CH. 1999. Relative contribution of photochemical and non-photochemical routes to excitation energy dissipation in rice and barley illuminated at a chilling temperature [J]. *Physiol Plant*, **107**: 447–453.
- Xu CC, Lin RC, Li LB, et al. 2000a. Inc. rease in resistance to low temperature photoinhibition following ascorbate feeding is attributable to an enhanced xanthophyll cycle activity in rice (*Oryza sativa* L.) leaves [J]. *Photosynthetica*, **38**: 221–226.
- Xu CC, Li LB, Kuang TY. 2000b. The inhibited xanthophyll cycle is responsible for the increase in sensitivity to low temperature photoinhibition in rice leaves fed with glutathione [J]. *Photosynth Res*, **65**(2): 107–114.
- Xu CC, Li LB, Kuang TY. 2000c. Photoprotection in chilling-susceptible and -resistant plants illuminated at a chilling temperature; role of the xanthophyll cycle in the protection against lumen acidification [J]. *Australian Journal of Plant Physiol*, **27**(7): 669–675.
- Xu ZF(徐志防), Luo GH(罗广华), Ke DS(柯德森), et al. 2002. Chlorophyll fluorescence quenching induced by superoxide anion(超氧阴离子诱导的叶绿素荧光猝灭)[J]. *Prog Biochem Biophys*(生物化学与生物物理进展), **29**(1): 139–143.