

DNA 分子标记在雌雄异株植物 性别鉴定中的应用

董莉娜, 苏雪, 孙坤*, 张建清, 张辉, 陈纹

(西北师范大学植物研究所, 甘肃兰州 730070)

摘要: 雌雄异株植物中不同性别的植株所产生的经济效应和生态效应存在一定的差异, 在生产实践中, 选取适宜性别的植株进行栽培有助于提高效率, 避免不必要的浪费。然而, 性别鉴定的常用方法大多是根据表型、代谢产物含量及活性等方面的差异, 在成株阶段进行的, 鉴定结果的可靠性和准确性都有一定的局限。近几年, DNA 分子标记技术应用于雌雄异株植物的性别鉴定研究中, 获得了快速准确的鉴定结果。在比较常用性别鉴定方法的基础上, 主要就常用 DNA 分子标记在雌雄异株植物性别鉴定中的研究进展做一概述并对该领域的研究提出展望。

关键词: DNA 分子标记; 雌雄异株; 性别鉴定

中图分类号: Q943 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2006)01-0063-06

Applications of DNA molecular markers on sex identification of dioecious plants

DONG Li-na, SU Xue, SUN Kun*, ZHANG Jian-qing,
ZHANG Hui, CHEN Wen

(*Institute of Botany, Northwest Normal University, Lanzhou 730070, China*)

Abstract: There are many differences of the economic yield and ecological efficiency between different sexual individuals of dioecious plants. In practice, the unnecessary cultivation of unwanted males or females leads to wastage of resource, which can be avoided if the sex of the plant is determined at juvenile stage. The morphological and cytological studies conducted so far have failed to differentiate accurately between the various sex forms. Recently, the methods of seedling sex identification in dioecious plants have been improved by applying DNA molecular markers. Based on comparing the traditional methods with DNA molecular markers, the application of DNA molecular markers in sex identification of dioecious plants are summarized. The prospect and some problems in the field are also briefly presented.

Key words: DNA molecular markers; dioecious plants; sex identification

整个显花植物中雌雄异株植物约占 5% (Lionakis, 1985)。被子植物中有 959 个属存在雌雄异株现象, 雌雄异株植物约 14 620 种, 分布于 143 个科

(张大勇, 2004)。显花植物中常见雌雄异株的科有: 银杏科 (Ginkgoaceae)、大麻科 (Cannabaceae)、猕猴桃科 (Actinidiaceae)、杨柳科 (Salicaceae)、冬青科

收稿日期: 2004-12-13 **修回日期:** 2005-06-16

基金项目: 国家自然科学基金(30270091, 30570110); 西北师范大学知识与科技创新工程(02)资助项目[Supported by the National Natural Science Foundation of China(30270091, 30570110); Knowledge and Science Innovation Project of Northwest Normal University(No. 02)]。

作者简介: 董莉娜(1979-), 女, 陕西宝鸡人, 硕士研究生, 主要从事植物系统与进化研究。

* 通讯作者 (Author for correspondence), E-mail: <kunsun@nwnu.edu.cn>.

(Aquifoliaceae)、葡萄科(Vitaceae)、柿树科(Ebenaceae)、薯蓣科(Dioscoreaceae)等。在经济植物中,雌雄异株现象也十分普遍。不同性别的植株往往具有不同的经济价值(陈中海等,2000),如银杏等可作为行道树种,因其雄株长势旺盛,在栽培中应多以雄株为主;而猕猴桃等以产果实为主的植物,雌株经济价值显然要高于雄株。所以,在雌雄异株植物的栽培过程中,合理选择雌雄个体对提高效益、减少浪费都十分重要。然而,雌雄异株植物早期性别鉴定存在一定的困难,制约了不同性别植株的栽培育种。因此,植物早期性别鉴定的研究在理论与实践上都有重要的意义(邵宏波等,1994)。

植物的性别决定机制复杂,不同植物其决定机制也不相同。总体来说有以下3种:(1)性染色体决定;(2)性染色体与常染色体的比率决定;(3)激素调控(Irish等,1989)。其中只有很少一部分雌雄异株植物具有完整的性染色体(Shibata等,1999)。尽管雌雄异株植物的性别决定机制各不相同,但雌雄个体总会在形态、生理生化、细胞、核酸等方面体现出不同程度的差异。目前,植物性别鉴定的方法大多也是以雌雄株外部形态、生理代谢产物、所含化学物质、同工酶、特异蛋白质、氨基酸含量及核苷酸的差异为依据,这些方法在植物的性别鉴定研究中发挥了一定的作用(尹立辉,2003)。但上述方法大都是对已成熟的个体进行性别差异研究,在植物性别的早期鉴定方面所做的工作还不够;另外,由于植株个体的性别分化受多种因素的影响,采用形态、生理代谢产物、所含化学物质、同工酶等方法进行植物早期性别鉴定的准确性不够。DNA分子标记因其不受发育阶段、外界环境及组织特异性的影响,能够提供准确可靠的性别鉴定信息,近年来被广泛应用于雌雄异株植物的早期性别鉴定中。本文在比较常用鉴定方法的基础上,主要就DNA分子标记在植物性别鉴定中的应用做一概述。

1 植物性别鉴定方法的比较

1.1 以外部形态差异为依据

外部形态的差异是基因与环境共同作用的结果,在一定程度上能够反映基因水平的差异。因此,可以为植物的性别鉴定提供依据。例如,龚文楼(1995)对毛白杨苗木幼树和成熟期雌雄株夏态和冬态的叶型、冠形、树皮及皮孔进行了比较,提出了毛

白杨雌雄株鉴别的形态学依据。廉永善等(2000)通过对中国沙棘雌雄株叶片的长、宽及长宽比的测量,发现在大多数情况下,雌株的叶片较狭窄,雄株的叶片相对较宽;雌株叶片的长宽比值均大于雄株,据此可以进行沙棘雌雄性别鉴定。

根据外部形态进行雌雄异株植物的性别鉴定具有简便、易行、可操作性强等优点。然而,大多数雌雄异株植物在性器官分化和发育成熟之前,雌雄株的形态差异并不明显,而且植物的外部形态易受环境以及发育阶段的影响,鉴定结果的准确性也不高。

1.2 以生理生化差异为依据

雌雄株间生理生化的差异指植株在生理指标、新陈代谢、生化特性、同工酶、特异蛋白质以及氨基酸含量等方面所体现出的差异。以此为依据的鉴定方法大多是对雌雄株个体间生理生化指标和活性进行比较,得到雌雄株的鉴别信息。例如,卢崇恩等(1995)通过对中国沙棘雌雄株叶片的持水力和叶绿素含量的测定,发现雄株不仅持水力强,而且叶绿素含量、光合速率和呼吸速率均比雌株高。廉永善等(2000)比较了不同产区的中国沙棘雌雄株叶片的氨基酸含量,发现雄性叶片中氨基酸含量(除天冬氨酸)都高于雌性叶片,特别是精氨酸、亮氨酸和谷氨酸的含量更为明显。

其中,由于同工酶是分子水平的指标,是基因差异在表达水平的体现,在一定程度上可以反映出雌雄株间的本质差异,是植物性别鉴定的有效途径之一。例如,袁仕禄等(1999)通过对华中五味子雌雄株的休眠芽、萌动芽、功能叶和茎的韧皮部的过氧化物酶同工酶电泳分析,发现尽管不同器官、不同时期的过氧化物同工酶具有时间特异性,但是不同时期的功能叶的过氧化物同工酶谱却趋于稳定,且雌株功能叶与雄株功能叶之间存在明显的差异。艾辛等(2000)对黄瓜雌性系和雌雄株系子叶和真叶进行了过氧化物酶同工酶、多酚氧化酶同工酶、超氧化物歧化酶同工酶分析,结果表明雌性植株有较强的酶活性和较多数目的同工酶,而且真叶中酶谱的稳定性较子叶的好。

与以外部形态的差异进行性别鉴定的方法相比,生理生化水平的差异,尤其是同工酶水平的差异在其鉴定结果的准确性上有明显提高。但这些方法的应用大多集中在雌雄株成熟个体的比较,缺乏纵向的比较和分析,而且生理生化的差异受发育阶段和植株所处环境的影响,对于不同发育阶段以及不

同生境中植株间差异的研究也有不足。因此,生理生化水平的差异虽然可以为雌雄异株植物的性别鉴定提供一定的依据,但其鉴定结果的可靠性尚需进一步的分析。

1.3 以细胞水平的差异为依据

雌雄植株在细胞水平上的差异主要反应在染色体组型上。根据染色体组型来进行植物性别鉴定的方法只适用于由性染色体决定的雌雄异株植物,如银杏、女娄菜、罗汉松等。与前两种鉴定方法相比,应用染色体组型分析进行植物的性别鉴定受多种因素的限制,如有些染色体太小,不便于观察与测量;有些植物的性别决定机制不清楚;只能用于鉴定由性染色体决定性别的植物等。

1.4 以核酸差异为依据

应用核酸差异进行性别鉴定主要有两个方面:(1)根据核酸含量的差异进行鉴别;(2)应用 DNA 分子标记的方法进行鉴别。

由性染色体决定的雌雄异株植物在理论上存在核酸含量的差异。但是核酸含量的测定在实际操作过程中受多种因素制约,如提取核酸的技术水平的限制、对鉴定结果的分析处理等。此外,应用核酸含量进行的性别鉴定仍然是以雌雄株个体间量上的差异为依据,并不能反映雌雄株间的本质差异,而且操作繁琐,鉴定结果不稳定。因此,对雌雄异株植物性别鉴定的准确性并不高,以此作为性别鉴定的依据在实际应用中并不多。

近年来,DNA 分子标记技术被应用于植物的性别鉴定中,提高了植物性别鉴定的准确性。与前几种常用方法相比,DNA 分子标记的方法有如下优点:(1)不受组织特异性及环境的影响;(2)对采样的要求不高;(3)在理论上,适用于各种性别决定机制形成的雌雄异株植物;(4)可以从海量信息中筛选所需信息,而不是只根据几个信息位点进行判断;(5)测定结果容易标准化;(6)鉴定结果准确性高。鉴于此,DNA 分子标记被广泛应用于植物早期性别鉴定的研究中,为雌雄异株植物的栽培育种提供了可靠的性别鉴定信息。

2 DNA 分子标记在植物早期性别鉴定中的应用

由于 DNA 分子标记具有上述优点,因而开始在雌雄异株植物,如银杏(王晓梅等,2001a,2002;姜

凌等,2003)、大麻(Mandolino 等,1999;陈其军等,2001)、猕猴桃(Harvey 等,1997;Gill 等,1998)、番木瓜(Urasaki 等,2002;Deputy 等,2002;Parasnis 等,1999)等经济植物的性别鉴定中得到了应用,为雌雄异株植物的早期性别鉴定提供了新的途径。目前,常用于植物性别鉴定研究的 DNA 分子标记有 RAPD、SCAR、AFLP 以及基于 SSLP 的方法,这些方法大多是在 PCR 的基础上,结合混合分组分析方法(bulk segregant analysis,BSA),对雌雄异株植物进行快速、可靠、准确的早期性别鉴定。

2.1 RAPD 标记

随机扩增的多态性 DNA(random amplified polymorphic DNA,RAPD)是以一个 10 碱基的任意序列的寡核苷酸片段为引物在未知序列的基因组 DNA 上进行随机的 PCR 扩增,扩增产物通过凝胶电泳分离,溴化乙锭染色,显示扩增产物 DNA 的多态性。

RAPD 标记可以为雌雄株间差异序列的分析提供丰富的多态位点,具有易操作、费用较低等优点而被广泛应用于雌雄异株植物的性别鉴定中。Harvey 等(1997)在形态学及生理生化水平的差异对猕猴桃性别鉴定不理想的情况下,对人工育种的猕猴桃杂交后代应用 RAPD 标记的方法进行性别标记物的筛选。结合 BSA 的方法,Harvey 等(1997)从 500 个随机引物中筛选出 2 个特异性标记物:雄性特有的 800bp 和雌性特有的 850bp 的扩增条带。张立平等(1998)应用 RAPD 标记技术从 10 个引物中筛选出了四个引物(P601、P610、P681、P688),这四个引物的 PCR 扩增产物在刺葡萄、桑叶葡萄、复叶葡萄雌雄株间存在多态性,尽管雌雄株间相同带数明显多于相异带数,但仍能看到雌雄间的差异。王晓梅等(2001b)应用 150 个随机单引物和 110 对随机双引物组合对银杏进行 RAPD 分析,共得到了 1800 个标记物,其中仅有一个单引物(TGATC-CCTGG)可以在雄性池和雄性个体间产生一条 1kb 左右的雄性特异标记物。姜凌等(2003)结合 BSA 法从 1200 个引物中得到了 8372 个 RAPD 扩增条带,从中筛选出了与银杏雄株相关的引物 S1478-682 和与雌性相关的引物 OPC4,通过对北京和沈阳两地银杏雌雄株个体的 RAPD 扩增发现引物 S1478 鉴定结果的稳定性较高,可以应用于银杏的早期性别鉴定。蔡亮等(2002)在筛选了 340 种随机引物,发现其中有 23 种引物的 PCR 扩增产物具有良好的

多态性,最终筛选得到了引物 P20,该引物可以在罗汉松雌株上产生特有的长约 750bp 的扩增条带,可用于罗汉松的早期性别鉴定。

大多数雌雄异株植物虽然性器官及生理行为等方面存在差异,但遗传信息的绝大部分是一致的(王晓梅等,2001b)。因此,应用 RAPD 标记的方法进行植物性别早期鉴定时不可避免的要经历繁琐的引物筛选过程。此外,RAPD 标记对实验条件较敏感,试验结果的重复性低等标记本身的不足影响了鉴定结果的准确性。尽管如此,RAPD 分子标记技术仍不失为快速进行植物性别早期鉴定的好方法,尤其适用于对未知基因序列的雌雄异株植物进行性别鉴定的初步研究。

2.2 SCAR 标记

特征序列扩增区域(sequence characterized amplified regions, SCAR),是从 RAPD 技术衍生而来的,通过对感兴趣的 RAPD 片段的克隆与测序,进行序列分析后设计出一对互补到原来 RAPD 两端的 24 碱基的引物,用这对引物与原来的模板 DNA 进行 PCR 扩增时,特征序列扩增区域被特异性扩增。由于 SCARs 标记对反应条件不敏感,重复性好,可以提供较 RAPDs 更多的信息位点。因此,将 RAPDs 转化成 SCARs 标记进行植物早期的性别鉴定可以获得更加稳定可靠的鉴定结果。

Gill 等(1998)在 Harvey 等(1997)研究的基础上,将两个 RAPD 标记物:雄性特有带(SmY)和雌性特有带(SmX)克隆到载体 pGEM-T 上进行序列分析,随后在形成 RAPD 标记物的引物后添加 12~13 个寡核苷酸,合成了 SCARs 引物:SmXf,SmXr,SmYf,SmYr,其中 SmY 可用于猕猴桃个体的早期性别鉴定。Mandolino 等(1999)应用引物 OPA 进行 PCR 扩增,在大麻雄株上形成长约 400bp 的特异带(OPA₈₀₀),对 OPA₈₀₀ 进行序列分析后,在引物 OPA 后添加了 9~10 个寡核苷酸,对这两个引物进行 PCR 扩增,得到雄性特有的 390 bp 左右的 SCAR 标记,该 SCAR 标记可用于精确、早期、快速地鉴别大麻雄性植株。陈其军等(2001)应用 RAPD 技术筛选了 30 个随机引物,其中引物 S401(5'-GT-TGGTGGCT-3')扩增得到了约 2.5 kb 的一条雄性特异带,通过对该 RAPD 标记物进行克隆与序列分析,在引物 S401 的基础上合成了 20 和 22 个碱基的 SCAR 引物,对这两个引物进行 PCR 扩增,发现雄性大麻能够扩增出一条与 RAPD 标记相应的特异

条带,应用于大麻的早期性别鉴定。Urasaki 等(2002)应用引物 IBRC-RP07 进行 PCR 扩增后,在番木瓜雄性和两性植株中得到约 450 bp 的扩增条带 PSDM(Papaya Sex Determination Marker),经克隆测序后合成 SCAR 引物 SDP-1 和 SDP-2,PCR 扩增可以在雄性及两性植株上形成 225bp 的 SCARs 标记物,可用于精确快速的番木瓜的早期性别鉴定中。Deputy 等(2002)依据番木瓜中性别决定基因 sex1 所提供的信息,将 3 个 RAPD 标记物克隆、部分测序后,合成了 3 个 SCAR 引物:W11、T12 和 T1;其中,SCAR W11 和 SCAR T12 可以在两性及雄性植株中产生特异带,SCAR T1 在被测植株中则形成相似的条带,因此,应用 SCAR T12 和 SCAR T1 的扩增条带作阳性对照,从番木瓜的幼苗中鉴别出两性番木瓜植株的成功率可达 99.2%。

与 RAPD 标记相比,SCAR 标记鉴定结果的稳定性得到了显著提高。但要成功得到 SCAR 标记,需对 RAPD 标记进行克隆、测序等过程,固而较 RAPD 标记操作繁琐、花费高。此外,SCAR 标记同样存在对 PCR 反应条件较为敏感等不足之处。然而,鉴于 SCAR 标记可以提供准确可靠的鉴定结果,目前还是广泛应用于植物性别早期鉴定的研究中。

2.3 AFLP 标记

扩增片段长度多态性(amplified fragment length polymorphism, AFLP)是将基因组 DNA 经限制性内切酶完全消化后,在限制性片段两端连接上人工接头作为扩增的模板,扩增后检测其多态性的一种 DNA 分子标记。由于 AFLP 引物设计的巧妙与搭配的灵活使其成为当今获得多态性效率最高的分子标记。

Spada 等(1998)应用两个酶组合:EcoR I 和 Mse I, Pst I 和 Mse I,对石刁柏基因组进行完全酶切,用 46 个引物(35 个 EcoR I + 3 和 Mes I, 11 个 Pst I + 2 和 Mes I + 3)组合进行 PCR 扩增,得到一条雄性特异标记物 SV,可以更有效的应用于石刁柏的性别鉴定。王晓梅等(2001a)利用 48 个引物组合对雌雄银杏两个 DNA 池进行 AFLP 分析,共得到 1 896 条扩增带,其中有 3 个引物组合(E₂/M₅, E₄/M₁, E₅/M₃)的 3 个标记只存在于雌性基因池中,将雌性特有的这三个 AFLP 片段回收,再扩增并克隆后,制备成探针,分别与雌雄银杏基因组 DNA 进行 Southern 点杂交,其中以 E₄/M₁ 引物组合得到的 AFLP 片段为探针进行 Southern 点杂交

在雌雄银杏基因组 DNA 中均出现杂交信号, E_2/M_2 和 E_5/M_3 只在雌性植株中产生杂交信号, 初步证明这两个差异片段为雌性基因所特有。

应用 AFLP 技术进行性别鉴定研究, 可以得到与 SCAR 标记相当的准确性, 但 AFLP 分析存在试验步骤多, 流程长的问题, 包括模板 DNA 的纯化、内切酶的选择与完全消化、接头的连接效率、预扩增的条件与产物的稀释、选择性扩增时引物组合的筛选、引物对浓度的比例以及在现实可能的条件下检测手段的确定等一系列过程都需要反复摸索。所以, 应用 AFLP 标记进行植物的性别鉴定研究, 对实验室和操作人员的要求较高。

2.4 基于 SSLP 的方法

SSLP (simple sequence length polymorphism) 是一系列不同长度的重复序列, 不同的等位基因含有不同数目的重复单位。SSLP 主要有两种类型: (1) 小卫星 (minisatellite) 通常为 10~60bp, 重复程度较低; (2) 微卫星 (microsatellite) 通常为二、三或四核苷酸单位的重复。其中微卫星较小卫星更常用作 DNA 标记, 主要因为: 第一, 小卫星常分布于染色体的末端, 相比之下, 微卫星在基因组中的分布更便于用来基因定位。第二, 微卫星重复单位短, 更适用于应用 PCR 进行快速分型分析。

Siljak-Yakovlev 等 (1996) 应用色霉素 A3 对枣树根尖染色体进行染色, 发现在雌株上有一对 GC 含量丰富的同型染色体, 并应用于枣树的性别鉴定。Siljak-Yakovlev 等的实验表明, 雌雄株在重复序列上存在明显的差异, 这为应用 SSLP 进行植物性别鉴定的研究提供了实践依据。Parasnis 等 (1999) 提取已知性别的番木瓜个体幼嫩叶片中的 DNA, 应用限制性内切酶 Alu I, Hae III, Hinf I, Taq I, EcoR I, EcoRV, Msp I, Mbo I, Sau3A I 和 Dra I 对所提 DNA 进行充分的消化后, 与微卫星探针 $(TG)_{10}$, $(CAC)_5$, $(GAA)_6$, $(GGAT)_4$, $(GATA)_4$, $(GACA)_4$ 和小卫星探针 pV47 和 M13 进行 Southern 杂交, 发现探针 $(GATA)_4$ 与 Hinf I 消化产物杂交可以检测到雄性个体所特有的 5kb 的条带, 其鉴定结果稳定可靠。为了进一步检测在番木瓜幼苗中的鉴定效果, Parasnis 等对生长两个月左右的幼苗叶片进行 DNA 的提取, 对鉴定结果做一记录, 并与开花后个体的性别与实验所得鉴定结果进行比较, 发现应用微卫星标记进行早期性别鉴定的准确性可以达到 100%。

基于 SSLP 的方法在性别鉴定中操作较其他分子标记的方法更为繁琐, 对实验条件要求较高等不足, 目前应用微卫星进行性别鉴定的报道并不多。但其性别早期鉴定结果的稳定性和可靠性却是不容忽视的, 这一方法可以应用于雌雄异株植物的早期性别鉴定尤其适用于多年生经济物种的早期性别鉴定。

3 结束语

DNA 分子标记技术应用于雌雄异株植物的性别鉴定, 提高了鉴定结果的准确性和可靠性。尤其是 DNA 分子标记的方法不受发育时间及组织特异性的影响, 用于雌雄异株植物的早期性别鉴定可以得到常用方法无法获得的可靠的鉴定信息。尽管 DNA 分子标记方法在植物性别鉴定的研究中仍存在操作繁琐、雌雄株间特异性条带筛选困难、费用高等技术上的不足以及不便于在生产实践中推广等问题, 但是, 近年来随着 DNA 分子标记和基因芯片等分子技术的不断发展, 这些问题将会得到解决。如今后可以应用基因芯片技术对雌雄株间的差异序列进行快速的筛选与分离, 用以实现性别鉴定操作的自动化, 同时将筛选到的特异性引物制备成探针, 对雌雄异株植物的性别进行快速、高通量、准确的鉴定, 将可以满足生产实践的需求。另外, 应用重组基因原理寻找或构建与植物性别相关的表型基因, 以便于从稳定的表型差异上直接对雌雄异株植物进行快速准确的性别鉴别, 将降低性别鉴定的成本, 简化操作过程。相信随着雌雄异株植物性别决定机制的深入研究和分子生物学的飞速发展, 应用 DNA 分子标记进行雌雄异株植物的早期性别鉴定具有广阔的应用前景。

参考文献:

- 卢崇恩, 肖虹, 王文英, 等. 1995. 沙棘雌雄株部分生理生化指标的差异[J]. 沙棘, 8(2): 16-18.
- 张大勇. 2004. 植物生活史进化与繁殖生态学[M]. 北京: 科学出版社, 323.
- 邵宏波, 初立业. 1994. 高等植物的性别研究及其特点[J]. 生命科学, 6(1): 11-14.
- 龚文楼. 1995. 毛白杨雌雄株的直观鉴别[J]. 天津农林科技, (2): 40.
- 廉永善, 卢顺光, 薛顺康, 等. 2000. 沙棘属植物生物学和化学[M]. 兰州: 甘肃科学技术出版社, 176-184.
- Ai X (艾辛), Zhu LL (祝莉莉), Shu LH (舒理慧), et al. 2000. Correlation of sex expression and three oxidase isozyme in cucumber plant (*Cucumis sativus* L.) (黄瓜植株

- 性别表现与 3 种氧化酶同工酶的关系[J]. *J Wuhan Bot Res*(武汉植物学研究), **18**(3):184—188.
- Cai L(蔡亮), Tian XC(田晓晨), Li M(李明), et al. 2002. Application of RAPD in discrimination of *Podocarpus macrophyllus*'s sex(RAPD 技术在罗汉松性别辨别中的应用)[J]. *J Fudan Univ*(Nat Sci)(复旦学报(自然科学版)), **4**(6):635—640.
- Chen QJ(陈其军), Han YZ(韩玉珍), Fu YF(傅永福), et al. 2001. RAPD and SCAR molecular markers of sexuality in the dieocious speices *Cannabis sativa* L. (大麻性别的 RAPD 和 SCAR 分子标记)[J]. *Acta Phytophysiol Sin*(植物生理学报), **27**(2):173—178.
- Chen ZH(陈中海), Chen XJ(陈晓静). 2000. Progress of study on sex determination and sex identification in dioecious fruit tree(雌雄异株果树的性别决定及性别鉴定的研究进展)[J]. *J Fujian Agri Univ*(福建农业大学学报), **29**(4):429—434.
- Deputy JC, Ming R, Ma H, et al. 2002. Molecular markers for sex determination in papaya(*Carica papaya* L.)[J]. *Theor Appl Genet*, **106**:107—111.
- Gill GP, Harvey CF, Gardner RC, et al. 1998. Development of sex-linked PCR markers for gender identification in *Actinidia*[J]. *Theor Appl Genet*, **97**:439—445.
- Harvey CF, Gill GP, Fraser L, et al. 1997. Sex determination in *Actinidia*. 1. Sex-linked markers and progeny sex ratio in diploid *A. chinensis*[J]. *Sex Plant Report*, **10**:149—154.
- Irish Erin E, Timothy Nelson. 1989. Sex determination in monoecious and dioecious plants[J]. *The Plant Cell*, **1**:737—744.
- Jiang L(姜凌), You RL(尤瑞麟), Li MX(李懋学), et al. 2003. Identification of a sex-associated RAPD marker in *Ginkgo biloba*(银杏性别相关的分子标记)[J]. *Acta Bot Sin*(植物学报), **45**(6):742—747.
- Lionakis SM. 1985. Genetics and physiology of sex determination in dioecious plants[J]. *Fruits*, **40**(11):739—743.
- Mandolino G, Carboni A, Forapani S, et al. 1999. Identification of DNA markers linked to the male sex in dioecious hemp(*Cannabis sativa* L.)[J]. *Theor Appl Genet*, **98**:86—92.
- Parasnis AS, Ramakrishna W, Chowdari KV, et al. 1999. Microsatellite (GATA)_n reveals sex-specific differences in papaya[J]. *Theor Appl Genet*, **99**:1 047—1 052.
- Shibata F, Hizume M, Kuroki Y. 1999. Chromosome painting of Y chromosomes and isolation of a Y chromosome-specific repetitive sequence in the dioecious plant *Rumex acetosa*[J]. *Chromosoma*, **108**:266—270.
- Sijak-Yakovlev S, Benmalek S, Cerbah M, et al. 1996. Chromosomal sex determination and heterochromatin structure in date palm[J]. *Sex Plant Report*, **9**:127—132.
- Spada A, Caporali E, Marziani G, et al. 1998. A genetic map of *Asparagus officinalis* based on integrated RFLP, RAPD and AFLP molecular markers[J]. *Theor Appl Genet*, **97**:1 083—1 089.
- Urasaki N, Tokumoto M, Tarora K, et al. 2002. A male and hermaphrodite specific RAPD marker for papaya(*Carica papaya* L.)[J]. *Theor Appl Genet*, **104**:281—285.
- Wang XM(王晓梅), Song WQ(宋文芹), Liu S(刘松), et al. 2001a. AFLP markers related to sex in a dioecious plant, *Ginkgo biloba*(利用 AFLP 技术筛选与银杏性别相关的分子标记)[J]. *Acta Sci Nat Univ Nankaiensis*(南开大学学报(自然科学)), **34**(1):5—9.
- Wang XM(王晓梅), Song WQ(宋文芹), Li XL(李秀兰), et al. 2002. Analysis of genomic DNA between male and female in a dioecious plant, *Ginkgo biloba*(银杏雌雄基因组 DNA 间的差异性分析)[J]. *Chin J Cell Biol*(细胞生物学杂志), **24**(1):38—40.
- Wang XM(王晓梅), Song WQ(宋文芹), Liu S(刘松), et al. 2001b. RAPD markers related to sex locus in *Ginkgo biloba*(与银杏性别相关的 RAPD 标记)[J]. *Acta Sci Nat Univ Nankaiensis*(南开大学学报(自然科学)), **34**(3):116—117.
- Yin LH(尹立辉), Zhan YG(詹亚光), Li CH(李彩华), et al. 2003. Appraisal of researching ways in sex identification between female and male plants(植物雌雄株性别鉴定研究方法的评价)[J]. *Bull Bot Res*(植物研究), **23**(1):123—128.
- Yuan SL(袁仕禄), Jia WG(贾卫国), Zhan JR(占景仁), et al. 1999. Sexing of *Schisandra sphenanthera* Rehd. & Wils by isozyme peroxidase(华中五味子雌雄过氧化物酶同工酶性别鉴定研究)[J]. *J Northeast Agri Univ*(东北农业大学学报), **30**(2):195—198.
- Zhang LP(张立平), Lin BN(林伯年), Shen DX(沈德绪). 1998. The study on sexual distinction of dioecism in *Vitis*(雌雄异株葡萄的性别鉴定研究)[J]. *Chin Bull Bot*(植物学通报), **15**(4):63—67.

(上接第 55 页 Continue from page 55)

- Jin ZZ(金振洲), Ou XK(欧晓昆), Ou PD(区普定), et al. 1994. A preliminary study on the floristic characteristics of seed plants in dry-hot river valley of Jinshajiang(金沙江干热河谷种子植物区系特征的初探)[J]. *Acta Bot Yunnan*(云南植物研究), **16**(1):1—16.
- Li XW(李锡文). 1994. Two big biodiversity centres of Chinese endemic genera of seed plants and their characteristics in Yunnan Province(中国特有种子植物属在云南的两大生物多样性中心及其特征)[J]. *Acta Bot Yunnan*(云南植物研究), **16**(3):221—227.
- Li XW(李锡文), Li J(李捷). 1993. A preliminary floristic study on the seed plants from the region of Hengduan Mountain(横断山脉地区种子植物区系的初步研究)[J]. *Acta Bot Yunnan*(云南植物研究), **15**(3):217—231.
- Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG, et al. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities[J]. *Nature*, **403**(24):853—858.
- Richards J, 1993. *Primula*[M]. London: B. T. Batsford Ltd, 14—29.
- Ying JS(应俊生). 2001. Species diversity and distribution pattern of seed plants in China(中国种子植物物种多样性及其分布格局)[J]. *Biodiversity Science*(生物多样性), **9**(4):393—398.