

银杏类黄酮 *O*-甲基转移酶基因的克隆与表达分析

张传丽¹, 陈 鹏^{2,*}, 仲月明², 周长远², 梁国华³, 沈丹红², 吴秋月²

(¹扬州大学生物科学与技术学院, 江苏扬州 225009; ²扬州大学园艺与植物保护学院, 江苏扬州 225009; ³扬州大学教育部植物功能基因组学重点实验室, 江苏扬州 225009)

摘 要: 采集扬州大学银杏种质资源圃不同发育时期的银杏叶片提取 RNA, 经简并引物 PCR 和 5' RACE 扩增, 得到了 5'端包含起始密码子在内的长为 876 bp 的银杏类黄酮 *O*-甲基转移酶 (flavonoid *O*-methyl-transferase, FOMT) 基因 cDNA 片段, 命名为 *GbFOMT-13*, 其在 GenBank 数据库注册号为 JN711433。对所得核苷酸序列及推导的氨基酸序列进行 BLAST 比对分析和进化树分析, 结果证实了 *GbFOMT-13* 为银杏的 FOMT 部分序列。半定量 RT-PCR 结果表明, *GbFOMT-13* 表达水平在银杏叶片的不同发育时期差异很大, 其表达模式表现为春季幼叶>秋季老叶>夏季成熟叶, 与类黄酮总量增长速率变化趋势相似。

关键词: 银杏; 叶片; *GbFOMT-13*; 基因; 克隆; 表达模式

中图分类号: S 664.3

文献标识码: A

文章编号: 0513-353X (2012) 02-0355-08

Cloning and Expression of Flavonoid *O*-methyltransferase Gene in *Ginkgo biloba*

ZHANG Chuan-li¹, CHEN Peng^{2,*}, ZHONG Yue-ming², ZHOU Chang-yuan², LIANG Guo-hua³, SHEN Dan-hong², and WU Qiu-yue²

(¹ College of Bioscience and Biotechnology, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu 225009, China; ² School of Horticulture and Plant Protection, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu 225009, China; ³ Key Laboratory of Plant Functional Genomics, Ministry of Education, Yangzhou University, Jiangsu Yangzhou 225009, China)

Abstract: *Ginkgo biloba* leaves were collected from Ginkgo Germplasm Resources Garden of Yangzhou University during different developmental periods, and were used to extract total RNA. After degenerate primer PCR and 5' RACE amplifying, a 876 bp cDNA sequence containing 5' end and start codon, named *GbFOMT-13* was obtained, which had been embodied in GenBank database, and accession No. is JN711433. Alignment with BLAST of the nucleotide and deduced amino acid sequence and phylogenetic tree analysis showed that *GbFOMT-13* was partial of FOMT gene from *Ginkgo biloba*. Semi-quantitative RT-PCR analysis revealed that *GbFOMT-13* was developmental stage-specific and its expression level was the highest in the spring and the lowest in the summer, which is similar with the change of total flavonoid increase rate in *Ginkgo biloba* leaf.

收稿日期: 2011-09-27; **修回日期:** 2011-12-27

基金项目: 国家农业综合开发项目 (GH32311002); 江苏省林业三项工程项目 (lxsx[2008]02)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: chenpeng@yzu.edu.cn; Tel: 0514-87972072)

Key words: *Ginkgo biloba*; leaf; *GbFOMT-13*; gene; cloning; expression pattern

银杏类黄酮是银杏次生代谢形成的最主要功能性成分之一。甲基化是类黄酮基本结构形成后由类黄酮 *O*-甲基转移酶 (flavonoid *O*-methyltransferase, FOMT) (EC 2.1.1-) 催化的最主要的修饰反应之一, 它可降低类黄酮活性基团的化学反应活性, 还可增加其脂亲和性, 扩大其在细胞内的分布范围 (Yang et al., 2004), 同时提高其抗菌性 (Ibrahim & Muzac, 2000)。甲基化与酰基化、糖基化等基本修饰反应导致了类黄酮种类及功能的多样性 (Ibrahim & Anzellotti, 2003; 李际红 等, 2011)。

目前已从欧洲云杉 (Kim et al., 2010)、美洲黑杨 (Kim et al., 2006a; Joe et al., 2010)、水稻 (Kim et al., 2006c; Lee et al., 2008)、小麦 (Zhou et al., 2006) 及拟南芥 (Muzac et al., 2000) 等多种植物中克隆到了与类黄酮甲基化相关的 *FOMT* 基因。银杏叶片类黄酮含量丰富, 银杏叶提取物 (Extract of *Ginkgo biloba* leaves, EGB) EGB761 中类黄酮含量高达 24% (Jacobs & Browner, 2000; Smith & Luo, 2004)。异鼠李素是银杏主要的黄酮苷元之一 (Beek et al., 1991; Hasler et al., 1992; 李卫星 等, 2010), 属 3'-甲基槲皮素衍生物, 这说明在银杏中存在着编码可催化槲皮素 3'-OH 甲基化的类黄酮 *O*-甲基转移酶基因 3'-*FOMT* (Kim et al., 2006b; Schmidt et al., 2010)。迄今为止尚未见有关于银杏 FOMT 的研究报道。研究银杏 *FOMT* 基因克隆与表达对揭示银杏黄酮苷元的衍变及该基因的结构与进化具有重要理论意义, 同时亦为其基因表达调控, 进行遗传改良以提高银杏叶片中类黄酮含量提供了基因资源与技术依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试银杏叶片均采自扬州大学文汇路校区银杏种质资源圃银杏雄株。于 2010 年 4 月采集幼嫩期叶片, 7 月采集成熟期叶片, 10 月采集衰老期叶片液氮冷冻, 置 -70 °C 保存备用。

大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 菌株 DH5 α 购买自南京百斯凯科技有限公司。引物由上海英骏生物技术有限公司 (Invitrogen) 合成, 其名称及序列见表 1。

表 1 使用的引物信息
Table 1 Sequence of primers

引物名称 Primer	引物序列 Sequence (5' - 3')	用途 Description
GAPDHF	AGACTGGCGTAGAGTATGTGG	内参基因引物 Reference gene primers
GAPDHR	TCAGATTCCTCCTTGATGGCG	内参基因引物 Reference gene primers
OMTP	GTIGAYGTIGGIGGIGIAMHGG	简并引物 Degenerate primer
OMTB1	TCRTRKWCCARTCRTGMARAAT	简并引物 Degenerate primer
5' RACE outer primer	CATGGCTACATGCTGACAGCCTA	5'端克隆 5' end amplification
5' RACE inner primer	CGCGGATCCACAGCCTACTGATGATCAGTCGATG	5'端克隆 5' end amplification
M13W5	CCGGATGGTACACTGTCAA	5'端克隆; 半定量 RT-PCR 5' end amplification; Semi-quantitative PCR
M13N5	TGAGATTGAGTGTGGATCCG	5'端克隆 5' end amplification
GbOMTCF1	TAAAGGGAATTGGAATGGG	半定量 RT-PCR Semi-quantitative PCR

注: 引物序列中 R 代表 A/G; Y 代表 C/T; M 代表 A/C; W 代表 A/T; K 代表 G/T; H 代表 A/T/C; I 为次黄嘌呤, 代表 A/T/G/C。
Note: In degenerate primers sequence, R represents A/G; Y represents C/T; M represents A/C; W represents A/T; K represents G/T; H represents A/T/C; I is hypoxanthine, representing A/T/G/C.

1.2 银杏叶片总 RNA 提取和总 RNA 反转录

参照 CTAB 法 (Wang et al., 2005) 提取银杏叶片总 RNA。用分光光度计测其浓度, $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 琼脂糖凝胶电泳检测后备用。

以 $2 \mu\text{g}$ 银杏叶片总 RNA 为模板, 参照 TaKaRa 公司 PrimeScript[®] 1st Strand cDNA Synthesis Kit 反转录试剂盒说明书进行 cDNA 第一链的合成。选用银杏甘油醛 3-磷酸脱氢酶基因 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH, GenBank accession number: L26924) 为内参基因 (Jansson et al., 1994; Xu et al., 2008), 以 GAPDHF/GAPDHR 为上、下游引物, 反转录产物为模板进行 cDNA 模板检测。

PCR 反应体系为: cDNA 模板 $1 \mu\text{L}$, GAPDHF/GAPDHR ($5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 上、下游引物各 $2 \mu\text{L}$, $10 \times \text{Buffer}$ $2.5 \mu\text{L}$, MgCl_2 ($25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) $2 \mu\text{L}$, dNTPs ($10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ each) $2 \mu\text{L}$, TaKaRa *Taq* 酶 $0.2 \mu\text{L}$, 用灭菌双蒸水补足到 $25 \mu\text{L}$, 混匀。PCR 反应扩增运行程序: 94°C 3 min; 94°C 30 s, 53°C 30 s, 72°C 30 s, 30 个循环; 4°C 停止反应。 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.3 *GbFOMT-13* 基因中间片段扩增和 PCR 产物回收、克隆及测序

根据其他植物 *O*-甲基转移酶 (*O*-methyltransferase, OMT) 蛋白的氨基酸序列保守区, 设计了一对简并引物 OMTP/OMTB1, 进行中间片段克隆。PCR 反应体系: cDNA 模板 $2 \mu\text{L}$, OMTP/OMTB1 ($5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 上、下游引物各 $4 \mu\text{L}$, $10 \times \text{Buffer}$ $2.5 \mu\text{L}$, MgCl_2 ($25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) $2 \mu\text{L}$, dNTPs ($10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ each) $2 \mu\text{L}$, TaKaRa *Taq* 酶 $0.2 \mu\text{L}$, 用灭菌双蒸水补足到 $25 \mu\text{L}$, 混匀。PCR 反应程序为: 94°C 3 min; 94°C 40 s, 45°C 40 s, 72°C 90 s, 30 个循环; 72°C 10 min; 4°C 停止反应。

PCR 反应产物经 $12 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 琼脂糖凝胶电泳检测后回收, 与 pMD18-T 载体连接, 转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 菌落 PCR 以及质粒酶切鉴定后由上海生工生物技术有限公司测序。

1.4 *GbFOMT-13* 基因 5' RACE PCR 和 PCR 产物回收、克隆及测序

根据测序得到的 *GbFOMT-13* 基因中间片段序列设计 5' RACE 基因特异性引物 M13W5 和 M13N5, 按照 5' Full RACE Kit (TaKaRa) 试剂盒使用说明、以 5' RACE Outer Primer/M13W5 为上、下游引物进行 *GbFOMT-13* 基因 5' RACE Outer PCR。5' RACE Outer PCR 反应体系为: 5' RACE 反转录反应液 $2 \mu\text{L}$, $1 \times \text{cDNA Dilution Buffer}$ $8 \mu\text{L}$, $10 \times \text{LA PCR buffer II}$ (Mg^{2+} Free) $4 \mu\text{L}$, MgCl_2 ($25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) $3 \mu\text{L}$, TaKaRa LA *Taq* 酶 $0.25 \mu\text{L}$, 5' RACE Outer Primer ($10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 和 M13W5 ($10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 各 $2 \mu\text{L}$, 用灭菌双蒸水补足到 $50 \mu\text{L}$ 。PCR 反应程序为: 94°C 预变性 3 min; 94°C 30 s, 52°C 30 s, 72°C 90 s, 25 个循环; 72°C 延伸 10 min。

以 5' RACE Outer PCR 反应液为模板、利用 5' RACE Inner Primer/M13N5 和 5' RACE Inner Primer/M13W5 两对引物分别进行 5' RACE Inner PCR。5' RACE Inner PCR 反应体系: Outer PCR 反应液 $1 \mu\text{L}$, $10 \times \text{LA PCR buffer II}$ (Mg^{2+} Free) $5 \mu\text{L}$, MgCl_2 ($25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) $5 \mu\text{L}$, dNTPs Mixture ($2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ each) $8 \mu\text{L}$, TaKaRa LA *Taq* 酶 $0.5 \mu\text{L}$, 5' RACE Inner Primer ($10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 和 M13W5/ M13N5 ($10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 各 $2 \mu\text{L}$, 用灭菌双蒸水补足到 $50 \mu\text{L}$ 。PCR 反应程序为: 94°C 预变性 3 min; 94°C 30 s, 52°C 30 s, 72°C 90 s, 30 个循环; 72°C 延伸 10 min。

PCR 反应产物经 $12 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 琼脂糖凝胶电泳检测后回收, 与 pMD18-T 载体连接, 转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 菌落 PCR 以及质粒酶切鉴定后由上海生工生物工程有限公司测序。

1.5 序列分析

利用 Primer Primer 5 软件进行编码区分析及其相应的氨基酸序列推导; 核苷酸和氨基酸序列分

别利用 NCBI 网站上的 BLASTn、RPS-BLAST 以及 Specialized BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 进行相似性分析及保守区域预测; 用 DNAMAN 6.0.40 软件通过氨基酸序列分析银杏 FOMT 多肽片段与其他植物 FOMT 的关系。

1.6 *GbFOMT-13* 表达分析

分别提取 2010 年 4 月幼嫩期、7 月成熟期和 10 月衰老期的银杏雄株叶片总 RNA 并进行反转录。以反转录的 cDNA 为模板, 以 GbOMTCF1/M13W5 为上下游引物, 研究 *GbFOMT-13* 在叶片不同发育期的表达情况。内参基因利用银杏 *GAPDH* 的特异引物 GAPDHF/GAPDHR 进行测定。

2 结果与分析

2.1 中间片段扩增

以银杏雄株叶片总 RNA 反转录产物为模板, 利用简并引物扩增中间片段, 经 $12 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 琼脂糖凝胶电泳检测, 得到 3 条特异性 DNA 条带, M11、M12 和 M13, 分别回收、连接、转化、测序后, 进行 BLAST 分析, 发现仅长度为 190 bp 的 M13 为目的片段 (图 1)。

2.2 5' RACE 扩增

利用 5' RACE Inner Primer/M13N5 和 5' RACE Inner Primer/M13W5 两对引物分别进行 5' RACE Inner PCR。经检测, 仅以 5' RACE Inner Primer/M13W5 为引物的 PCR 得到了长度为 964 bp 的 5' 末端序列 (图 1)。将上述的中间片段和 5' 末端序列进行序列拼接, 得到了长度为 876 bp 的基因序列, 命名为 *GbFOMT-13*, 在 GenBank 中注册号为 JN711433。

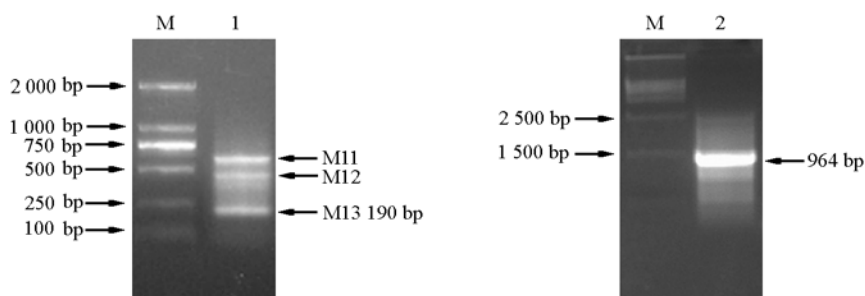


图 1 银杏 *GbFOMT-13* 基因片段电泳图

M: DNA marker; 1: 简并引物扩增产物; 2: 5' RACE 扩增产物。

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of degenerate primer PCR and 5' RACE PCR amplified products of *GbFOMT-13*

M: DNA marker; 1: The product of degenerate primer PCR; 2: The product of 5' RACE PCR amplifying.

2.3 序列分析

序列分析表明, *GbFOMT-13* 序列 5'非编码区 (5' Untranslated Region, 5' UTR) 长度为 67 bp, 编码区长度为 809 bp, 可编码 269 个氨基酸残基多肽片段。对其氨基酸序列进行 BLASTp 分析, 发现 *GbFOMT-13* 具有植物 OMT 蛋白二聚体结构域 (dimerization domain, GenBank accession number: cl06920) (Met31-Ala81) 和 OMT 超家族 (*O*-methyltransferase superfamily, GenBank accession number: cl14604) 序列 (Gly96-Thr269) (图 2)。



图 2 *GbFOMT-13* 基因核苷酸序列及推测到的氨基酸序列

灰色部分为二聚体结构域；方框部分为植物 *O*-甲基转移酶超家族结构域。

Fig. 2 Nucleotide sequence of *GbFOMT-13* cDNA and deduced amino acid sequence

Dimerization domain is highlighted in gray; Boxes stand for plant *O*-methyltransferase superfamily domain.

对 *GbFOMT-13* 的 cDNA 序列进行 BLASTn 分析,结果显示 *GbFOMT-13* 与欧洲云杉(AJ868575)、火炬松(AY764795)等裸子植物 *OMT* 基因同源性较高(表 2)。氨基酸序列 BLASTp 分析结果显示 *GbFOMT-13* 与拟南芥(NP_200227)、猫眼草(AAA80579, P59049, Q42653)、小麦(Q38J50)以及玉米(ACG37598)等植物 *FOMT* 的同源性很高(表 3)。

用 DNAMAN 6.0.40 软件对 *GbFOMT-13* 氨基酸序列与杂交薄荷(AAR09601)、拟南芥(NP_200227)、猫眼草(AAA80579, P59049, Q42653)、小麦(Q38J50, Q84N28)、玉米(ACG37598, NP_001106407)、大麦(CAA54616, ABQ58825)、日本晴水稻(ABB90678)、紫花苜蓿(AAC49928, O22309, P93324)、蒺藜苜蓿(Q29U27, ABD83924)、甘草(Q84KK5, Q84KK6)、大豆(AEI54338)以及多毛番茄(ADZ76433)和毛果杨(XP_002312934)等多种植物 *FOMT* 的氨基酸进行分析,得到了相似的结果:*GbFOMT-13* 与拟南芥(NP_200227)和猫眼草(AAA80579, P59049, Q42653)等植物 *FOMT* 蛋白的同源关系较近(图 3)。以上结果均表明 *GbFOMT-13* 确为银杏类黄酮 *O*-甲基转移酶基因的序列片段。

表 2 *GbFOMT-13* 基因核苷酸序列与其他裸子植物 *OMT* 基因的同源性

Table 2 The nucleotide sequence homoeology between *GbFOMT-13* and *OMTs* from other gymnospermaes

基因登录号 Accession number	物种 Species	碱基同源性/% Max identity	<i>E</i> -值 <i>E</i> -value
AJ868575	欧洲云杉 <i>Picea abies</i>	79	0.0
HE574557	海岸松 <i>Pinus pinaster</i>	79	0.0
AY764795	火炬松 <i>Pinus taeda</i>	79	2e-131
EU866228	花旗松 <i>Pseudotsuga menziesii</i>	85	6e-55
EU866229	大果黄杉 <i>Pseudotsuga macrocarpa</i>	83	6e-55

表 3 GbFOMT-13 氨基酸序列与其他植物 FOMT 蛋白的同源性
Table 3 The amino acid sequence homoeology between GbFOMT-13 and other plant FOMTs

基因登录号 Accession number	物种 Species	分值 Total score	序列覆盖度/% Query coverage	E-值 E-value
NP_200227	拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	301	94	2e-99
Q42653	猫眼草 <i>Chrysosplenium americanum</i>	291	91	9e-96
P59049	猫眼草 <i>Chrysosplenium americanum</i>	290	91	3e-95
AAA80579	猫眼草 <i>Chrysosplenium americanum</i>	268	91	2e-86
Q38J50	小麦 <i>Triticum aestivum</i>	263	98	2e-84
ACG37598	玉米 <i>Zea mays</i>	255	94	2e-81
ABQ58825	大麦 <i>Hordeum vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i>	245	98	2e-77
AAR09601	杂交薄荷 <i>Mentha</i> × <i>piperita</i>	238	90	1e-74
Q84N28	小麦 <i>Triticum aestivum</i>	237	94	3e-74
ADZ76433	多毛番茄 <i>Solanum habrochaites</i>	230	97	5e-71
AEI54338	大豆 <i>Glycine max</i>	189	87	8e-56
P93324	紫花苜蓿 <i>Medicago sativa</i>	187	87	1e-54

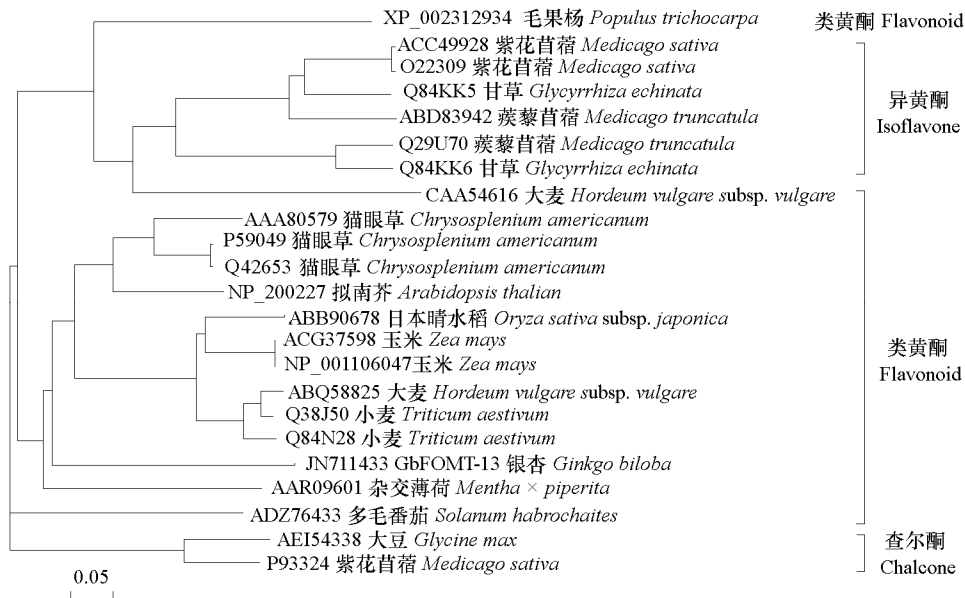


图 3 推导的 GbFOMT-13 氨基酸序列与多种植物氨基酸系统树

Fig. 3 Phylogenetic tree of the amino acid sequence of GbFOMT-13 and their homologues in other plants

2.4 GbFOMT-13 在银杏不同发育期的表达分析

半定量 RT-PCR 分析表明, *GbFOMT-13* 在银杏叶片幼叶期、成熟叶期以及老叶期均有表达,但不同发育时期表达水平存在较大差异,夏季成熟叶期表达量最低,春季幼嫩叶片期以及秋季老叶期表达水平较高,具有发育时期特异性(图 4)。

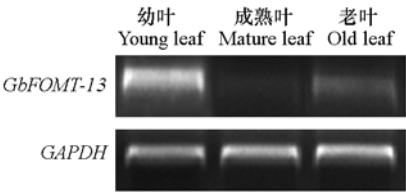


图 4 GbFOMT-13 表达模式分析

GAPDH 为内参基因。
Fig. 4 Expression profiles of *GbFOMT-13* in different developmental stage
GAPDH is reference gene.

3 讨论

类黄酮是植物次生代谢的结果,其合成是以光合产物为基础,以叶片衰老为前提的(程水源等, 2001)。春季银杏叶片分生组织活跃时,类黄酮合成较快,但叶片本身合成能力有限,故类黄酮含量不高;秋季叶片衰老时又有一个较大的类黄酮合成高峰,且此时叶片合成能力强,类黄酮含量最高(Thomas & Paul, 1994)。幼叶期、成熟叶期及老叶期银杏叶片类黄酮含量测定试验发现老叶期银杏叶片类黄酮含量最高,幼叶期最低(数据未列出)。陈鹏等(2000)研究发现,秋季老叶期银杏叶片类黄酮含量约为 $65 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,是整个生长季节类黄酮含量最高峰期,秋季类黄酮的合成约为 $13 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$;夏季成熟叶期类黄酮含量约为 $52 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,类黄酮的合成约为 0;春季嫩叶期类黄酮含量较低,其合成约为 $52 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,银杏叶片类黄酮的合成量为春季 > 秋季 > 夏季。本试验半定量 RT-PCR 结果证明 *GbFOMT-13* 在春季幼叶期 mRNA 表达量最高,夏季成熟叶片期最低,秋季居中。因此银杏叶片中 *GbFOMT-13* 表达量季节变化规律与叶片中类黄酮合成速率季节变化规律是相似的。

GbFOMT-13 这种表达模式与其同源基因葡萄 *AOMT* 的表达模式相似。研究发现葡萄开花后 60 d 花青素含量快速增长,此时 *AOMT* 基因表达水平也快速提高,之后花青素合成速率降低, *AOMT* 的表达量也降低; *AOMT* 属可诱导表达基因,其表达产物 *AOMT* 可能参与了花青素甲基化反应(Huguency et al., 2009)。以此类推, *GbFOMT* 基因表达产物 *GbFOMT* 可能参与了银杏叶片中类黄酮甲基化反应,且 *GbFOMT* (*GbFOMT-13*) 基因是受底物诱导表达的。

查尔酮异构酶(CHI)、花青素合成酶(ANS)与 FOMT 同属类黄酮生物合成酶,它们的编码基因 *CHI* 属 *FOMT* 上游基因,而 *ANS* 则属 *FOMT* 下游基因(Brenda, 2001; 李琳玲等, 2010)。银杏中 *GbFOMT-13* 与 *GbCHI* 和 *GbANS* 的表达模式既有相同点也有不同点,虽然这 3 个基因(或基因片段)在银杏幼叶期和老叶期(或成熟叶期)的叶片中均有一定的基本水平的表达,但 *GbCHI* 和 *GbANS* 在类黄酮含量较低的幼叶期的表达量要远低于类黄酮含量较高的老叶中的表达量(Xu et al., 2008; Cheng et al., 2011),与 *GbFOMT-13* 的表达模式完全不同的,表明 *GbFOMT-13* 基因转录水平上的调控模式与 *GbCHI* 和 *GbANS* 的是不同的。

有关 *GbFOMT* 基因全长 cDNA 与基因组 DNA 序列克隆及功能分析等仍需继续研究。

References

- Beek T A V, Scheeren H A, Melger W C. 1991. Determination of ginkgolides and bilobalide in *Ginkgo biloba* leaves and phytopharmaceuticals. *J Chromatogr*, 543: 375 - 387.
- Brenda W S. 2001. Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiol*, 126: 484 - 493.
- Chen Peng, Tao Jun, Zhou Hong-gen, Liu Ying-wu, Wu Rong-feng. 2000. Study on changes of the flavonoid content and some correlative factors of the leaves in male plant of *Ginkgo biloba*. *Journal of Yangzhou University: Natural Science Edition*, 3 (4): 40 - 43. (in Chinese)
- 陈 鹏, 陶 俊, 周宏根, 刘英武, 吴荣峰. 2000. 银杏雄株叶片类黄酮含量及其相关因子的变化研究. *扬州大学学报: 自然科学版*, 3 (4): 40 - 43.
- Cheng H, Li L L, Cheng S Y, Cao F L, Wang Y, Yuan H H. 2011. Molecular cloning and function assay of a chalcone isomerase gene (*GbCHI*) from *Ginkgo biloba*. *Plant Cell Rep*, 30: 49 - 62.
- Cheng Shui-yuan, Wang Yan, Li Jun-kai, Gu Man-ru, Shu Huai-rui. 2001. Studies on the change of flavone contents and its distribution in *Ginkgo biloba* leaves. *Acta Horticulturae Sinica*, 28 (4): 353 - 355. (in Chinese)
- 程水源, 王 燕, 李俊凯, 顾曼如, 束怀瑞. 2001. 银杏叶黄酮含量变化及分布规律的研究. *园艺学报*, 28 (4): 353 - 355.
- Hasler A, Stichler O, Meier B. 1992. Identification and determination of the flavonoids from *Ginkgo biloba* by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr*, 605 (1): 41 - 48.

- Huguency P, Provenzano S, Verriès C, Ferrandino A, Meudec E, Batelli G, Merdinoglu D, Cheynier V, Schubert A, Ageorges A. 2009. A novel cation-dependent *O*-methyltransferase involved in anthocyanin methylation in grapevine. *Plant Physiol*, 150: 2057 – 2070.
- Ibrahim R K, Anzellotti D. 2003. The enzymatic basis of flavonoid biodiversity // Romeo J T. Integrative phytochemistry: From ethnobotany to molecular ecology pergamon. Amsterdam: Elsevier: 1 – 36.
- Ibrahim R K, Muzac I. 2000. The methyltransferase gene superfamily: A tree with multiple branches // Romeo J T, Ibrahim R K, Varin L, De Luca V. Evolution of metabolic pathways. Amsterdam: Pergamon Press: 349 – 384.
- Jacobs B P, Browner W S. 2000. *Ginkgo biloba*: A living fossil. *Am J Med*, 108: 341 – 342.
- Jansson S, Meyer-Gauen G, Cerff R, Martin W. 1994. Nucleotide distribution in gymnosperm nuclear sequence suggests a model for GC-content change in land-plant nuclear genomes. *J Mol Evol*, 39: 34 – 46.
- Joe E J, Kim B G, An B C, Chong Y, Ahn J H. 2010. Engineering of flavonoid *O*-methyltransferase for a novel regioselectivity. *Mol Cells*, 30: 137 – 141.
- Kim B G, Kim D H, Sung S H, Kim D E, Chong Y, Ahn J H. 2010. Two *O*-methyltransferases from *Picea abies*: Characterization and molecular basis of different reactivity. *Planta*, 232: 837 – 844.
- Kim B G, Kim H, Hur H G, Lim Y, Ahn J H. 2006a. Regioselectivity of 7-*O*-methyltransferase of poplar to flavones. *J Biotechnol*, 126: 241 – 247.
- Kim B G, Lee H J, Park Y, Lim Y, Ahn J H. 2006b. Characterization of an *O*-methyltransferase from soybean. *Plant Physiol Biochem*, 44: 236 – 241.
- Kim B G, Lee Y, Hur H G, Lim Y, Ahn J H. 2006c. Flavonoid 3'-*O*-methyltransferase from rice: cDNA cloning, characterization and functional expression. *Phytochemistry*, 67: 387 – 394.
- Lee Y J, Kim B G, Chong Y, Lim Y, Ahn J H. 2008. Cation dependent *O*-methyltransferases from rice. *Planta*, 227: 641 – 647.
- Li Lin-ling, Cheng Hua, Cheng Shui-yuan, Xu Feng, Wang Yan, Jiang De-zhi. 2010. Regulatory elements and functional analysis of chalcone synthase gene promoter from *Ginkgo biloba* L. *Acta Horticulturae Sinica*, 37 (12): 1919 – 1928 (in Chinese)
- 李琳玲, 程 华, 程水源, 许 锋, 王 燕, 姜德志. 2010. 银杏查尔酮合成酶基因启动子 (GbCHSP) 调控元件及功能分析. *园艺学报*, 37 (12): 1919 – 1928.
- Li Ji-hong, Xing Shi-yan, Wang Cong-cong, Zhang Qian, Fu Yin-yin. 2011. Analysis on genomic DNA methylation modification of *Ginkgo biloba* by methylation-sensitive amplification polymorphism. *Acta Horticulturae Sinica*, 38 (8): 1429 – 1436. (in Chinese)
- 李际红, 邢世岩, 王聪聪, 张 倩, 付茵茵. 2011. 银杏基因组 DNA 甲基化修饰位点的 MSAP 分析. *园艺学报*, 38 (8): 1429 – 1436.
- Li Wei-xing, Zhen Zhen, Zhou Chun-hua, Zhang Xiu-ping, Yu Jian-you, Chen Peng. 2010. Flavonoid content of the leaves and pollen of male *Ginkgo biloba* plants. *Scientia Agricultura Sinica*, 43(13): 2775 – 2783. (in Chinese)
- 李卫星, 甄 珍, 周春华, 张秀萍, 于建友, 陈 鹏. 2010. 银杏雄株叶片和花粉主要类黄酮成分含量分析. *中国农业科学*, 43 (13): 2775 – 2783.
- Muzac I, Wang J, Anzellotti D, Zhang H, Ibrahim R K. 2000. Functional expression of an *Arabidopsis* cDNA clone encoding a flavonol 3'-*O*-methyltransferase and characterization of the gene product. *Arch Biochem Biophys*, 375: 385 – 388.
- Schmidt S, Zietz M, Schreiner M, Rohn S, Kroh L W, Krumbein A. 2010. Genotypic and climatic influences on the concentration and composition of flavonoids in kale (*Brassica oleracea* var. *sabellica*). *Food Chem*, 119: 1293 – 1299.
- Smith J V, Luo Y. 2004. Studies on molecular mechanisms of *Ginkgo biloba* extract. *Appl Microbiol Biotechnol*, 64: 465 – 472.
- Thomas V, Paul G G. 1994. Accumulation of flavonoids during leaf development in *Cistus laurifolius*. *Phytochemistry*, 36 (3): 591 – 597.
- Wang T, Zhang N H, Du L F. 2005. Isolation of RNA of high quality and yield from *Ginkgo biloba* leaves. *Biotechnol Lett*, 27: 629 – 633.
- Xu F, Cheng H, Cai R, Li L L, Chang J, Zhu J, Zhang F X, Chen L J, Wang Y, Cheng S H. 2008. Molecular cloning and function analysis of an anthocyanidin synthase gene from *Ginkgo biloba*, and its expression in abiotic stress responses. *Mol Cells*, 26: 536 – 547.
- Yang H, Ahn J H, Ibrahim R K, Lee S, Lim Y. 2004. The three-dimensional structure of *Arabidopsis thaliana* *O*-methyltransferase predicted by homologybased modelling. *J Mol Graph Model*, 23: 77 – 87.
- Zhou J M, Gold N D, Martin V J J, Wollenweber E, Ibrahim R K. 2006. Sequential *O*-methylation of tricetin by a single gene product in wheat. *Biochim Biophys Acta*, 1760: 1115 – 1124.