

## · 药材与资源 ·

## 中国不同地区绞股蓝 ITS 序列分析

蒋玲艳, 郭志刚, 王 翀, 赵桂仿\*

(西部资源生物与现代生物技术教育部重点实验室 西北大学生命科学学院, 陕西 西安 710069)

**摘要:**目的 比较中国不同地区绞股蓝的 nrDNA ITS 碱基序列的差异, 以期分析绞股蓝的地理分布与 ITS 基因型的相关性, 为我国不同地区绞股蓝的鉴别提供分子依据。方法 PCR 克隆测序, MegAlign (DNASTAR) 软件对序列进行对位排列, PAUP4. 0b10 软件进行系统发育分析, 构建最大简约树。结果 绞股蓝 ITS 区长度为 658 ~ 659 bp, 变异位点为 8. 48%, 信息位点为 2. 72%。不同地区的样品在碱基的量、信息位点的碱基位置和遗传距离等方面存在一些差异。系统发育分析表明 ITS 基因型与绞股蓝的地理分布具有一定的相关性, 但也有部分不一致, 可能主要是因为绞股蓝种内复杂的倍性。结论 ITS 序列可作为中国不同地区绞股蓝的一种良好的分子标记, 而要确定不同地区的绞股蓝合理的亲缘关系还需要结合其他方面的证据。

**关键词:** 绞股蓝; ITS 克隆测序; 分子鉴定

中图分类号: R282. 7

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2009)07-1123-05

ITS Sequence analysis of *Gynostemma pentaphyllum* from different habitats in China

JIANG Ling-yan, GUO Zhi-gang, WANG Chong, ZHAO Gui-fang

(Key Laboratory of Resource Biology and Biotechnology in Western China, Ministry of Education, College of Life Science, Northwest University, Xi an 710069, China)

**Abstract : Objective** By comparing the difference for ITS sequences of *Gynostemma pentaphyllum* from different habitats in China, to investigate the correlation between ITS genotype and geographic location and provide molecular evidence for identification of *G. pentaphyllum* from different habitats in China.

**Methods** PCR Clone sequencing, sequence alignments were performed using MegAlign (DNASTAR), phylogenetic analyses were conducted using PAUP4. 0b10 by maximum parsimony (MP) criteria. **Results** The length of ITS region varied from 658 to 659 bp. The proportion of variable sites is 8. 48% and the proportion of parsimony information (parsim-info) sites is 2. 72%. Some differences in the base contents, position of parsim-info sites, and genetic distance were detected from samples collected from different habitats. Phylogenetic analysis showed some correlation between ITS genotype and geographic location of *G. pentaphyllum*; but there were also some discrepancies between geographical location and affinity, which may mainly caused by the complex cytotypes in *G. pentaphyllum*. **Conclusion** The nrDNA ITS could be a good marker to distinguish *G. pentaphyllum* from different habitats in China, but the rational affinity could be determined through associating these ITS data with other evidence.

**Key words :** *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino; ITS clone sequencing; molecular identification

绞股蓝属 (*Gynostemma* Blume.) 为葫芦科 (Cucurbitaceae) 多年生草本植物, 全属共有 16 种 2 变种, 主要分布于中国秦岭、长江以南广大地区及朝鲜、日本等地<sup>[1,2]</sup>。绞股蓝 *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino, 又名五叶参、七叶参、七叶

胆、小苦草、遍地生根等, 是绞股蓝属内分布最广、资源最丰富的药用植物, 在我国 17 个省区均有分布, 种的分布区即属的分布区。作为我国常用中药, 绞股蓝具有悠久的历史, 最早记载于公元 1046 年朱棣所著的《救荒本草》中, 作为充饥的野菜食用, 其

\* 收稿日期: 2008-11-19

基金项目: 教育部“长江学者和创新团队发展计划”资助项目

作者简介: 蒋玲艳 (1984 →), 女, 河北省沧州市人, 在读硕士, 研究方向为植物分子系统与进化。E-mail: jianglingyan8406@163.com

\* 通讯作者 赵桂仿 Tel: (029) 88305207 E-mail: zhaogf@nwwu.edu.cn

后,明代徐光启在《农政全书》中收录了《救荒本草》的有关绞股蓝的全部文字。绞股蓝含有多种药用成分,如绞股蓝皂苷、黄酮、维生素、氨基酸、多糖、微量元素等,现代医学临床研究表明其具有调血脂、抗肿瘤等重要的药理作用,并且具有无毒、廉价、资源丰富等优点,市场现已开发出多种绞股蓝产品,如绞股蓝茶、绞股蓝可乐、绞股蓝含片等<sup>[2-5]</sup>。由于生态环境和人为因素的影响,不同地区的绞股蓝遗传成分产生分化,从而影响其化学成分和临床药效,因而从其遗传本质对不同产地的绞股蓝进行分子鉴定显得非常重要。

近年来,随着分子生物学的发展,各种分子标记技术和 DNA 序列分析技术等,在植物种源鉴定、药材真伪鉴别等方面发挥了重要作用。ITS(internal transcribed spacer)是介于 18S 和 26S 之间的非编码内转录间隔区,包含一个 5.8S 编码区。其具有进化速率快,片段长度小(在大多数被子植物中都小于 700 bp),由于协同进化(concerted evolution)使得这个片段在不同的重复单元之间十分一致<sup>[6]</sup>等优点,近年来被广泛地应用于解决较低分类单元层次上的植物系统发育问题<sup>[6-9]</sup>,包括近缘属间关系、属下种间的关系<sup>[10,11]</sup>,甚至种下居群间的关系<sup>[12]</sup>。本实验采用 PCR 克隆测序技术,测定了 13 个来自中国不同地区的绞股蓝的 ITS 序列,并对序列进行了分析,以期分析绞股蓝的地理分布与 ITS 基因型的相关性,为我国不同地区绞股蓝的鉴别提供分子依据。

## 1 材料与方法

1.1 实验材料:本实验研究材料绞股蓝于 2005 年 7~10 月分别采自湖南、湖北、贵州、云南、四川、浙江、安徽、江苏等 8 个省区共 13 个地区。野外采集新鲜、完整的植物幼嫩叶片,置于盛有硅胶的塑胶袋中干燥保存,每个地区随机采集 10~15 个不同个体,个体间距离尽量保持在 5 m 以上。同时,在每个采样点制作标本,记录样品的采样地位置及采样时间等信息,标本由中国科学院昆明植物研究所陈书坤研究员与西北农林科技大学陈彦生研究员鉴定。所有用于分析的材料来源及编号见表 1。

1.2 DNA 提取:以硅胶快速干燥的植物叶片为材料,参照改进的 CTAB 法<sup>[13]</sup>提取总 DNA,并作适当修改。

1.3 PCR 扩增及回收纯化:实验中使用 ITS 通用引物 ITS4(5'-3') TCCTCCGCTTATTGATATGC 和 ITS5(5'-3') GGAA GTAAA GTCGTAA - CAA GG<sup>[14]</sup>对目的片段进行扩增和测序。PCR 扩

表 1 绞股蓝材料来源

Table 1 Resources of *G. pentaphyllum*

来源	编号	纬度/°N	经度/°E	海拔/m	序列号
云南省大理市苍山	DL	25.41	109.07	2560	EU910158
云南省昆明市黑龙潭	KM	25.08	102.44	1943	EU910164
贵州省梵净山	FJS	27.50	108.46	538	EU910160
四川省峨眉山	EM	29.35	103.17	882	EU910159
四川省成都市青城山	CD	30.54	103.34	924	EU910157
湖南省吉首市高光界	JS	28.39	110.04	840	EU910163
湖南省株洲市桃源洞	ZZ	26.29	114.01	651	EU910169
湖北省房县	FX	31.54	110.30	700	EU910161
湖北省十堰市武当山	SY	32.26	110.45	936	EU910167
河南省灵宝市灵湖	LB	34.52	110.85	469	EU910165
河南省西峡县伏牛山	XX	32.48	112.12	800	EU910168
浙江省杭州市灵隐	HZ	30.14	120.05	132	EU910162
江苏省南京市紫金山	NJ	32.03	118.49	133	EU910166

增反应在 PTC DNA Engine PCR 仪上进行。反应总体积为 20  $\mu$ L,其中 2  $\mu$ L 10  $\times$ PCR Buffer(含 20 mmol/L  $Mg^{2+}$ ),0.4  $\mu$ L dNTP(10 mmol/L),0.8  $\mu$ L *Taq* DNA 聚合酶(2 U/ $\mu$ L),ITS4 和 ITS5 引物各 0.5  $\mu$ L(10  $\mu$ mol/L),DNA 模板约 50 ng,扩增程序为:94 预变性 5 min,94 变性 45 s,56 退火 45 s,72 延伸 1 min,35 个循环;最后 72 延伸 7 min。

扩增产物在含有 EB 的 1.8%琼脂糖凝胶中电泳分析,80 V 电泳 3 h,目的条带从琼脂糖凝胶中切下,用 Gel Extraction Mini Kit 试剂盒回收,操作步骤见说明书。

将回收纯化后的扩增产物在 1.8%琼脂糖凝胶中电泳,分析其浓度,确定连接反应中外源插入片段的量。

1.4 扩增产物的克隆与测序:回收后的 PCR 产物,用宝生物工程有限公司的 pMD18-T Vector 连接试剂盒进行连接,热激法转化大肠杆菌感受态细胞 Top 10,用含有 50  $\mu$ L/mL 的氨苄青霉素的 LB 平板(预先涂 x-gal 和 IPTG)筛选阳性克隆。重组质粒的提取采用碱裂解法进行,提取的重组质粒进行 PCR 鉴定<sup>[15]</sup>。每个地区的材料选取 5~10 个含有目的片段的克隆进行双向测序。测序反应由上海生工生物工程有限公司完成,测序引物为 T7+/M13-。

1.5 序列分析和系统发育树的构建:用 MegAlign(DNASTAR)软件对序列进行对位排列,然后手工适当校正。ITS-1 及 ITS-2 的范围根据 GenBank 中已发表的苦瓜属(*Momordica* L.) nrDNA ITS 序列确定(GenBank 检索号为 AY606266)。用 PAUP4.0b10 软件<sup>[16]</sup>进行系统发育分析。空位(gap)被处理为缺失(missing)。最大简约性分析采用如下选项完成,即树二组重新连接(TBR)、启发

式搜索 (Heuristic search)、多重性选择 (Muhrees option)、ACCTAN 优化和 100 次随机附加的重复。利用自展法 (Bootstrap, 1 000 次重复) 检验各分支的置信度。

## 2 结果与分析

2.1 不同地区绞股蓝 ITS 序列比较: 本实验测得中国 13 个地区的绞股蓝的 ITS 区 (包括 5.8S rDNA) 序列的长度范围 658 ~ 659 bp, 仅 1 bp 差异, 长度变异很小。同一地区的不同克隆间序列高度一致, 单一的碱基置换可能由于 *Taq* 酶的错误, 因而忽略不计。这样, 每个地区的绞股蓝仅有一种主要的克隆类型。当空位 (Gap) 作缺失处理时, ITS 区全序列排序后的长度为 660 位点, 其中有 56 个变异位点, 18 个为系统发育的信息位点, 分别占 8.48% 和 2.72%。ITS1 的长度均为 226 bp, 排序后长度也为 226 bp, 含 7 个信息位点 (表 2)。ITS2 的长度范围为 269 ~ 270 bp, 排序后长度为 271 bp, 含 11 个信息位点 (表 2)。不同地区样品的 G+C 的量基本相同, ITS1 为 66.8% ~ 68.2%, ITS2 为 55.0% ~ 57.0%。5.8S rDNA 高度保守, 长度均为 163 bp, 在 13 个地区的样品中没有变异位点。(各地区 ITS1、ITS2 长度和序列中的 G+C 质量分数见表 3)。本

实验测得的序列已提交至 GenBank 数据库, 序列号见表 1。

2.2 系统发育分析: 中国 13 个地区的绞股蓝样品相互间的遗传距离见表 4。云南大理的样品 (DL) 和贵州梵净山的样品 (FJS) 之间遗传距离最大, 为 0.044; 遗传距离最小的是湖北房县 (FX) 的样品和湖南株洲 (ZZ) 的样品, 为 0.002。基于 ITS 序列中国 13 个地区的绞股蓝样品的系统发育树见图 1。在系统发育树中, 13 个地区样品以较高的支持率聚为两个主要的大支, 其中一支包含来自云南、河南、湖北、湖南、江苏等 7 个地区的样品, 云南两个地区的样品 (KM 和 DL) 和河南两个地区的样品 (LB 和 XX) 都分别以较高的支持率 (100%, 81%) 首先聚成一支, 显示其较近的亲缘关系。另一支包含来自四川、贵州、湖南、湖北等 5 个地区的样品, 支持率为 100%。浙江杭州的样品 (HZ) 独立于两个主要大支外, 单独成支。各地区样品间的亲缘关系基本与它们的地理分布相一致, 但是也有例外, 如系统发育树中吉首的样品 (JS) 位于第一大支, 与位于第二大支的与其地理位置较近的 ZZ 和 FJS 表现出较远的亲缘关系; 杭州的样品 (HZ) 也与其地理位置近的 NJ 样品表现出较远的亲缘关系。

表 2 13 个地区绞股蓝样品的 ITS 序列信息位点

Table 2 Comparison of parsimr info sites in ITS1 and ITS2 sequence from 13 samples of *G. pentaphyllum*

来源编号	ITS1							ITS2										
	18	80	89	95	97	160	189	402	412	448	561	570	585	588	628	638	642	646
DL	A	T	T	G	G	G	T	A	A	T	C	A	C	T	C	G	G	T
KM	G	*	*	*	*	*	*	G	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
FJS	*	C	G	T	*	T	*	G	G	C	*	G	T	C	*	A	A	C
EM	G	C	G	T	*	T	*	G	G	C	*	G	T	C	*	A	A	C
CD	G	C	G	T	*	*	*	G	G	C	*	G	T	C	*	A	A	C
JS	*	*	*	*	*	*	C	G	*	*	*	*	*	*	*	A	*	C
ZZ	A	C	G	*	*	T	*	G	G	C	*	G	T	C	*	A	A	C
FX	A	C	G	T	*	T	*	G	G	C	*	G	T	C	*	A	A	C
SY	*	*	*	T	*	*	C	G	*	*	*	*	*	*	T	A	*	C
LB	A	C	G	*	T	*	*	G	*	C	T	*	T	*	*	A	A	C
XX	A	C	G	*	T	*	*	*	*	*	T	*	T	*	T	A	A	C
HZ	A	C	G	T	*	T	*	G	G	*	*	G	T	C	*	A	A	C
NJ	*	*	*	*	*	*	*	G	*	*	*	*	*	*	*	A	*	C

上方的数字代表信息位点的位置 \*代表该位点碱基与 DL 相同

Upper numbers indicate nucleotide position from upstream of ITS sequence, asterisk (\*) indicates identity to base composition of DL sequence

## 3 讨论

ITS 序列是近年来用于探讨植物种间变异和种内变异以及近缘属间系统关系的重要分子标记。被子植物的 ITS 区长度比较稳定, 包括 5.8S rDNA 在内, 总长度为 600 ~ 700 bp, 特别易于扩增和测序。被子植物 ITS 区又有核苷酸序列的高度变异性, 屈

良鸽等<sup>[17]</sup>通过对不同生物类群的 ITS 序列 (自生物学数据库) 的比较得出: 被子植物大多数科属其 ITS 序列的种间差异值为 1.2% ~ 10.2%, 这对系统发育研究都是较合适的范围。本实验测得中国 13 个地区的绞股蓝样品在 ITS 区的碱基差异为 8.48%, 高于一般的种内差异值, 这表明不同分布区的绞股

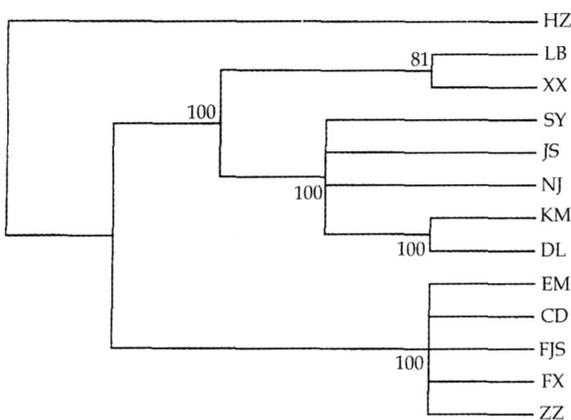
表 3 各地区绞股蓝 ITS 序列长度及 G+C 的量  
Table 3 Length and G+C contents of ITS1 and ITS2 of *G. pentaphyllum* from various habitats

地区编号	ITS/ bp	ITS1		ITS2	
		长度/ bp	G+C/ %	长度/ bp	G+C/ %
DL	658	226	66.8	269	55.8
KM	658	226	67.7	269	55.8
FJS	659	226	66.8	270	56.7
EM	659	226	68.1	270	57.0
CD	659	226	67.7	270	56.3
JS	658	226	67.7	269	55.7
ZZ	659	226	67.3	270	56.7
FX	659	226	67.3	270	56.7
SY	658	226	67.7	269	55.4
LB	658	226	67.3	269	55.0
XX	658	226	67.7	269	55.0
HZ	659	226	66.9	270	56.3
NJ	658	226	68.2	269	55.7

蓝各居群间已产生了较大的遗传分化。绞股蓝雌雄异株, 性比偏雄, 有有性繁殖和无性繁殖两种繁殖方式, 但在自然条件下以营养繁殖为主<sup>[3]</sup>, 居群内部占优势的克隆生长导致其不同居群间基因交流减少, 从而产生了较大的遗传分化。这在前人研究中已经得到证实, 研究者分别运用 ISSR 和 AFLP 分子标记对绞股蓝的遗传多样性进行研究, 结果均表明, 绞股蓝的遗传变异主要存在于居群间, 居群间遗传分化显著<sup>[18, 19]</sup>。本研究运用的 ITS 序列在绞股蓝种内显示出较高的变异, 这为不同地区的绞股蓝鉴别提供了新的手段。从 ITS 序列分析的结果来看, 不同地区样品在碱基的量、信息位点的碱基位置和遗传距离等方面存在一些差异。如: 云南地区的样品 (DL、KM) 在 638 和 646 bp 处有特异性的信息位

表 4 各样品间的遗传距离  
Table 4 Genetic distance among samples

	DL	KM	FJS	EM	CD	JS	ZZ	FX	SY	LB	XX	HZ	NJ
DL													
KM	0.005												
FJS	0.044	0.042											
EM	0.023	0.019	0.026										
CD	0.025	0.019	0.028	0.008									
JS	0.011	0.009	0.042	0.022	0.023								
ZZ	0.022	0.020	0.022	0.005	0.006	0.020							
FX	0.022	0.020	0.022	0.005	0.006	0.020	0.002						
SY	0.018	0.014	0.050	0.026	0.028	0.010	0.028	0.028					
LB	0.022	0.020	0.037	0.020	0.018	0.020	0.018	0.030	0.028				
XX	0.023	0.025	0.042	0.025	0.023	0.025	0.020	0.020	0.030	0.017			
HZ	0.026	0.025	0.030	0.012	0.014	0.025	0.003	0.008	0.033	0.023	0.025		
NJ	0.011	0.006	0.042	0.018	0.020	0.009	0.020	0.020	0.014	0.020	0.025	0.025	



分支上的数字是 1 000 次重复抽样检测的 bootstrap 值  
Numbers on branches are bootstrap values of 1 000 replications  
图 1 基于 ITS 序列分析得到的严格一致树 [步长为 65, 一致性指数 (CI) 0.861 和维持性指数 (RI) 0.842]  
Fig 1 Dendrogram of most-parsimonious (MP) resulted from ITS sequence (tree length = 65, CI = 0.861, RI = 0.842)

点, 分别为 G、T; 河南地区的样品 (LB、XX) 在 97 bp 处有特异性的信息位点 T (表 3)。ITS 序列可作为鉴别来自不同产地的绞股蓝的参考。

从系统发育树 (图 1) 中可以看出, 各地区样品间的亲缘关系基本与它们的地理分布相一致, 这表明 ITS 基因型与绞股蓝的地理分布具有一定的相关性。但是在系统树中吉首的样品 (JS) 和杭州的样品 (HZ) 都与其地理位置近的样品表现出较远的亲缘关系, 这又显示了其地理分布与亲缘关系的不一致。推测这种部分不一致性主要是由于绞股蓝种内复杂的倍性。细胞学资料表明, 绞股蓝有二倍体、四倍体、六倍体和八倍体 4 种细胞型, 不同倍性的植物在形态上难以区分<sup>[20, 21]</sup>, 但不同倍性的植物对生态环境的应对方式和居群间基因交流程度不同。目前还没有对该种植物进行多倍体起源的研究报道, 其多倍体的性质 (同源 vs 异源) 还不清楚。ITS 区序列以同步进化 (concerted evolution) 的特定方式进化, 这种进化方式受杂交和多倍化等多种因素的影

响<sup>[22]</sup>。目前的研究表明多倍体内 ITS 区序列的进化十分复杂(尤其在异源多倍体中),祖先的 ITS 区序列在多倍体内可能共存<sup>[23]</sup>,也可能朝着某一祖先的序列进化<sup>[24]</sup>。绞股蓝种内有 4 种倍性,其多倍体复杂的起源(种内还是种间起源)与扩散方式,以及不同于二倍体的基因交流方式和复杂的 ITS 同步进化方向可能导致其 ITS 基因型与地理分布的差异。应用分子生物学方法对绞股蓝多倍体的来源和性质进行研究是十分必要的。鉴于绞股蓝 ITS 基因型与地理分布的部分不一致性,要确定不同地区的绞股蓝合理的亲缘关系还需要结合其他方面的证据,从而达到准确的分子鉴定的目的。

参考文献:

[1] 吴征镒,陈书坤. 中国绞股蓝属(葫芦科)的研究[J]. 植物分类学报,1983,21(4):355-367.  
 [2] 陈书坤. 绞股蓝属植物的分类系统和分布[J]. 植物分类学报,1995,33(4):403-410.  
 [3] 刘世彪,胡正海. 绞股蓝结构和发育与其总皂甙积累相关性的研究[D]. 西安:西北大学,2005.  
 [4] 陈剑雄,廖瑞芳. 绞股蓝总皂甙对氧自由基所致脑血管痉挛的保护作用[J]. 中草药,1997,28(4):219-221.  
 [5] 王 翀,周天华,杨 雪,等. ISSR-PCR 鉴别绞股蓝属 7 种植物[J]. 中草药,2008,39(4):588-591.  
 [6] Tumer B J, Elder J R. Concerted evolution of repetitive DNA sequences in eukaryotes [J]. *Quart Rev Biol*, 1995, 70: 297-317.  
 [7] 王建波,张文驹,陈家宽. 核 rDNA 的 ITS 序列在被子植物系统与进化研究中的应用[J]. 植物分类学报,1999,37(4):407-416.  
 [8] Hsiao C, Chatterton N L, Asay K H. Phylogenetic relationship of 10 grass species: An assessment of phylogenetic utility of the internal transcribed spacer region in monocots [J]. *Genome*, 1994, 37: 112-120.  
 [9] Baldwin B G. Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA in plants: an example from

*Compositae* [J]. *Mol Phylogenet Evol*, 1992, 1: 3-16.  
 [10] Law S, Ronsted N, Thomton H, et al. Molecular phylogenetic evidence for the monophyly of *Fritillaria* and *Lilium* (Liliaeae; Liliales) and the infrageneric classification of *Fritillaria* [J]. *Mol Phylogenet Evol*, 2005, 35: 509-527.  
 [11] 葛 颂, Schaal B A, 洪德元. 用核糖体 DNA 的 ITS 序列探讨裂叶沙参的系统学位置—兼论 ITS 片段在沙参属系统学研究中的价值[J]. 植物分类学报,1997,35(5):385-395.  
 [12] 沈 洁,丁小余,贺 佳,等. 泽泻 rDNA ITS 区序列特征及其居群鉴别研究[J]. 南京师范大学学报,2005,28(3):86-88.  
 [13] Doyle J J, Doyle J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf material [J]. *Phytochem Bull*, 1987, 19: 11-15.  
 [14] White T J, Bruns T, Lee S, et al. *Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics* [M]. California: Academic Press, 1990.  
 [15] 黄培堂. 分子克隆实验指南(第三版) [M]. 北京:科学出版社,2002.  
 [16] Swofford D L. *Phylogenetic Analysis Using Parsimony* [M]. Massachusetts: Sinauer Associates, 2003.  
 [17] 屈良鹤,陈月琴. 生物分子分类检索表——原理与方法[J]. 中山大学学报:自然科学版,1999,38(1):1-6.  
 [18] Wang C, Zhang H, Qian Z Q, et al. Genetic differentiation in endangered *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino based on ISSR polymorphism and its implications for conservation [J]. *Biochem Systemat Ecol*, 2008, 36(9): 699-705.  
 [19] 江 波,孙 敏,邓洪平. 缙云山药用植物绞股蓝遗传多样性研究[D]. 重庆:西南师范大学,2005.  
 [20] 李汝娟,尚宗燕,张继祖. 三种绞股蓝植物染色体观察[J]. 植物学通报,1989,6(4):245-247.  
 [21] 高信芬,陈书坤,顾志建,等. 绞股蓝属的染色体研究[J]. 云南植物研究,1995,17(3):312-316.  
 [22] Dover G A. Concerted evolution, molecular drive and natural selection [J]. *Curr Biol*, 1994, 4: 1165.  
 [23] Sang T, Crawford DJ, Stuessy T F. Documentation of reticulate evolution in *Paeonia* using ITS sequences of nuclear rDNA: Implication for biogeography and concerted evolution [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995(92): 6813-6817.  
 [24] Wendel J F, Schnabel A, Seelanan T. Bidirectional interlocus concerted evolution following allopolyploid speciation in cotton (*Gossypium*) [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995(92): 280-284.

## 高山红景天叶肉原生质体分离培养与植株再生

刘剑锋,程云清,陈智文\*

(吉林师范大学,吉林 四平 136000)

摘要:目的 利用高山红景天组培苗叶片分离得到原生质体,经培养后获得再生植株。方法 研究了外植体前期预处理、外植体大小、酶液配比、酶液中甘露醇浓度等影响原生质分离的相关因素,确定最优分离条件。结果 用于原生质体分离的外植体无需黑暗预培养便可进行原生质体分离,外植体叶片长度大于 1.5 cm 为宜。获得原生质体的酶液组成为:1.0%纤维素酶 Onzuka R-10 + 0.5%果胶酶 Macerozyme R-10 + 10 mmol/L CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O + 0.1% MES + 0.7 mmol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + 0.5 mmol/L 甘露醇,在 25℃ 条件下酶解 4 h,原生质体最高产量为 39.43 × 10<sup>6</sup> 个/g 鲜质量,原生质体活力为 78.6%。原生质体培养基为 1/2MS + 1 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L ZT + 0.5 mmol/L 甘露醇 + 500 mg/L 水解酪蛋白。浅层培养 40 d 时形成小愈伤组织。愈伤组织在 MS + 1 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA

\* 收稿日期:2008-10-19

基金项目:国家自然科学基金项目“药用植物高山红景天优良种质筛选与倍性创新研究”(30801516);吉林省教育厅“十一五”科学技术研究项目“高山红景天四倍体的诱导与鉴定(吉教科合字 2007 第 367 号)”

作者简介:刘剑锋(1976—),男,湖北黄石人,吉林师范大学生命科学学院副教授,硕士生导师,从事细胞生物学的教学研究工作,已发表论文 30 余篇。Tel: (0434) 3292019 E-mail: jianfengliu1976@163.com