

- [5] Crosasse P, Ceruti M, Brusa P, et al. Preparation, characterization and properties of sterically stabilized paclitaxel-containing liposomes [J]. *J Contr Rel*, 2000, 63(1): 19-30.
- [6] Yan J Q, Wang Y, Wang J Y. Preparation of paclitaxel stealth liposomes and its tissue distribution in mice [J]. *Acta Pharm Sin* (药科学报), 2000, 35(9): 706-709.
- [7] Fang J, Wang Y Q, Song J D. Antibody-mediated targeting of taxol-containing immunoliposome against human colorectal carcinoma [J]. *Chin J Immunol* (中国免疫学杂志), 1998, 14(3): 198-200.
- [8] Zhang J Q, Zhang Z R, Qing R, et al. Study on long circulating magnetoliposome entrapped paclitaxel [J]. *Chin Pharm J* (中国药科学报), 2003, 38(7): 520-522.
- [9] He W, Yang J X, Yang J, et al. The research on liver targeting delivery system of cantharidin polyphase liposome modified by strengthened targeting materia [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 1998, 29(6): 413-417.
- [10] Huang Y, Hou S X, Lin J Y. Study on preparation of liver-targeted Caowu albumin microspheres [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 1999, 24(12): 731-733.
- [11] Cheng D Y, Chen W B, Lu B, et al. The acute effect of tetrandrine pulmonary targeting microspheres on hypoxic pulmonary hypertension in rats [J]. *Chin J Tuberc Respir Dis* (中华结核和呼吸杂志), 2000, 23(5): 289-291.
- [12] Li F Q, Lu B, Chen W B. Tetrandrine loaded sustained release microcapsules for lung targeting [J]. *Acta Pharm Sin* (药科学报), 2001, 36(3): 220-223.
- [13] Deng R, Chen J M, Yao C U. Zedoary turmeric oil genlatin microspheres for hepatic arterial embolization [J]. *Acta Pharm Sin* (药科学报), 2000, 35(7): 539-543.
- [14] Xu A X, Wang X X, Yu M, et al. Clinical study on super-selective camptothecin microsphere's embolization of internal iliac artery for bladder carcinoma [J]. *Natl Med J China* (中华医学杂志), 2000, 80(5): 358-359.
- [15] Yuan H L, Zhao Y L, Yang X C. Studies on the process of liver-targeted oxymatrine nanoparticle [J]. *Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol* (中药新药与临床药理), 2004, 15(1): 54-56.
- [16] Yuan H L, Xiao X H, Cai G M, et al. Studies on the process of liver-targeted Jumasu nanoparticle [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2004, 29(6): 589-590.
- [17] Yi Y M, Yang T Y, Pan W M. Studies on distribution of <sup>125</sup>I-bovine serum albumin in *Astragalus polysaccharide nanoparticle in vivo* [J]. *Acta Univ Med Tongji* (同济医科大学学报), 1999, 28(3): 244-246.
- [18] Yang K, Wen Y M, Li L J, et al. Preparation of cucurbitacin BE poly(lactic acid) nanoparticles for targeting cervical lymph nodes [J]. *West China J Stomatol* (华西口腔医学杂志), 2001, 19(6): 347-350.
- [19] Yang K, Wen Y M, Wang C M, et al. The study of cucurbitacin BE poly(lactic acid) nanoparticles delivering cucurbitacin BE to metastasized cervical lymph nodes in mice with oral cancer [J]. *West China J Stomatol* (华西口腔医学杂志), 2003, 21(6): 77-88.
- [20] Yang K, Wen Y M, Wang C M, et al. Clinical application of anticancer nanoparticles targeting metastasis foci of cervical lymph nodes in patients with oral carcinoma [J]. *West China J Stomatol* (华西口腔医学杂志), 2003, 21(6): 447-450.
- [21] Liu M X, Dong J, Yang Y J, et al. Research on system of triptolide-loaded poly(D, L-lactic acid) nanoparticles [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2004, 35(2): 117-121.
- [22] Yang S C, Zhu J B, Liang B W, et al. Studies on camptothecin solid lipid nanoparticles [J]. *Acta Pharm Sin* (药科学报), 1999, 34(2): 146-150.
- [23] Yu J N, Tong S S, Xu X M, et al. HPLC Determination of silybin in mouse liver after dosing SLB lipid nanospheres [J]. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2003, 23(6): 461-463.
- [24] Gong Z N, Xu L Y, Song J Z, et al. Study on rat nasal administration with emulsion of Chinese herb *Angelica dahurica* [J]. *Chin J Clin Pharm* (中国临床药科学报), 2001, 10(6): 370-373.
- [25] Liu X H, Zhang J S, Li C Q, et al. Study on traditional Chinese drug colon targeting system [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2001, 23(12): 859-862.
- [26] Yan H J, Ling Z X, Wang Y R, et al. Verification of colon-targeted release of Changankang pellets [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2003, 25(7): 523-526.
- [27] Yang M, Qiu X L, Li Z, et al. The prospect on oral colon targeting drug delivery system of traditional Chinese drug [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2004, 26(10): 851-854.
- [28] Li C Y. The research and exploitation on targeting system of traditional Chinese drug [J]. *China J Tradit Chin Med Info* (中国中医药信息杂志), 2001, 12(8): 30-31.

## 药用植物生物工程研究进展 II. 分子标记、遗传转化及功能基因研究

黄璐琳, 胡尚钦, 杨 晓

(四川省农业科学院 中药材研究中心, 四川 简阳 641400)

**摘要:** 随着生物技术和天然产物开发的不断深入, 现代分子生物学研究的先进技术应用于药用植物研究领域, 对传统中药的现代化发展起着越来越重要的作用。利用分子标记技术, 对于药用植物种属间的亲缘关系多态性和系统树的建立发挥了重要作用; 利用农杆菌介导遗传转化技术, 可将有重要功能的基因通过基因重组转移到目的植株获得表达; 对药用植物重要功能基因的研究将有助于明确这些功能的重要遗传和生理调控功能, 为其进一步开发利用奠定基础。就药用植物的分子标记、遗传转化和功能基因研究进行综述。

**关键词:** 药用植物; 分子标记; 功能基因

中图分类号: R282.1

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2006)05-0647-05

收稿日期: 2005-09-16

作者简介: 黄璐琳(1978-), 女, 硕士研究生, 研究方向为生物化学与分子生物。 Tel: (0832)7013346 E-mail: huanglulin@163.com

## Advances in bioengineering studies on medicinal plants II. Molecular markers, heredity conversions and functional genes

HUANG Lu-lin, HU Shang-qin, YANG Xiao

(Research Center of Chinese Medicinal Materials, Sichuan Academy of Agricultural Science, Jianyang 641400, China)

**Key words:** medicinal plants; molecular markers; functional genes

20 世纪 70 年代以来,分子生物学技术迅猛发展,人类对生物工程有了全新的认识,新的研究技术和方法不断被发明和使用,每年均有大量的研究成果公布于众。药用植物分子标记、农杆菌介导遗传转化和功能基因研究是药用植物较新的研究领域,目前这方面的研究也发展很快,本文对其研究状况进行了综述,以期对相关研究提供参考。

### 1 分子标记

分子标记技术在药用植物的群体遗传结构、生态与进化、分类、质量评价等多方面应用广泛。

1.1 RFLP 标记:20 世纪 70 年代中期,遗传学家发现了限制性片段多态性(restriction fragment length polymorphic, RFLP)现象,1980 年 Botstein 首先提出利用 RFLP 作遗传标记构建遗传图谱。RFLP 基本原理是基因组 DNA 在限制性内切酶作用下,产生大小不等的 DNA 片段;它所代表的是基因组 DNA 酶切后产生的片段在长度上的差异,这种差异是由于突变增加或减少了某些内切酶位点造成的。王艇等对红豆杉科及相关类群 14 种植物进行了叶绿体基因 *rbcL* 的 PCR-RFLP 分析,表明红豆杉科和三尖杉科属单系群,为药用植物分类提供了证据<sup>[1]</sup>。

1.2 DNA 指纹图谱:1980 年, Wyman 和 White 发现了高变异的 DNA 序列。1985 年,Jeffreys 用碱基序列 GGGCAGGAA 的 16 bp 重复单位重复 29 次形成小卫星 33.15 作探针,与人基因组酶切片段进行 Southern 杂交,发现不同个体杂交图谱带上的位置千差万别,Jeffreys 将其称为 DNA 指纹图谱(DNA fingerprint),又名遗传图谱(genetic fingerprint)。其具有多位点性、高变异性、简单而稳定的遗传性,成为研究动植物群体遗传结构、生态与进化、分类等很有价值的遗传标记,在中药品质研究、产地分析等领域中发挥着重要作用。目前牛蒡、厚朴、红豆杉、金银花、红曲、西洋参、西红花、蒲公英、苦地胆等多种药用植物和药材进行了 DNA 指纹图谱研究。

1.3 RAPD 标记:随机扩增多态性 DNA (random

amplified polymorphic DNA, RAPD) 技术,由 Williams 和 Welsh 于 1990 年分别提出,又称任意引物 PCR,20 世纪 90 年代前期得到广泛应用。陈毓亨等对南方红豆杉的 12 个地区的 24 个样品进行了 RAPD 研究,表明四川峨嵋、云南和江西 3 地可能存在含紫杉烷高的植株系。陈京荔等对地黄的 19 个品种 RAPD 分析,为地黄的育种材料选择提供参考。彭锐等对 5 种石斛科植物进行 RAPD 分析,鉴定了 3 种不同方法提取的 DNA。崔光红等对荒漠肉苁蓉和管花肉苁蓉的遗传多样性进行 RAPD 分析,两者在居群间均有一定分化,荒漠肉苁蓉的遗传多样性较多,明显分化成 2 个生态型。刘叔倩等首次对银杏的 28 个变异类型进行 RAPD 分析,表明我国银杏的遗传多样性水平较低,遗传亲缘关系较近。

1.4 AFLP 标记:Zabeau 等将 PCR 与 RFLP 结合起来,创造了扩增片段长度多态性(amplified fragment length polymorphic, AFLP)分析技术。不同样品由于 DNA 序列不同,扩增出的片段数及长度各不相同,经变性的聚丙烯酰胺电泳就能区分出不同样品之间的差异,作为遗传标记构建连锁图,或鉴定与特定性状连锁的标记。马小军等对人参的 5 个农家类型进行了 AFLP 研究,说明农家类型之间的遗传差异很小,但长脖的 AFLP 有相对较高的多态性,更接近于野生人参<sup>[2]</sup>。

1.5 ISSR 标记:1994 年 Zietkiewicz 等发展的 ISSR(inter-simple sequence repeat)技术,是一种基于微卫星系列的新的分子标记技术,其随机分布于真核生物基因族内,显性标记,呈孟德尔遗传,具有简便,不需预先知道序列信息,重复性强等特点,广泛用于植物的分子标记和遗传育种。邱英雄等对 7 个不同野生群体的明党参和 1 个栽培群体的川明参进行 ISSR 分析,表明明党参的遗传多样性较高,川明参的遗传多样性低于明党参,聚类分析表明,川明参与明党参在 DNA 水平出现了较大的遗传分化,通过 ISSR 分析筛选出了川明参的一个特有分子标记<sup>[3]</sup>。

1.6 ITS 标记:内转录间隔区(internal transcribed

spacer, ITS) 特定序列, 主要集中在 18S~26S 的核 rDNA 基因的 ITS 区域, 可快速、准确的进行药材鉴别。马小军等用银染 DNA 测序法测定了 4 个山参的 ITS<sub>1</sub> 和 2 个山参的 ITS<sub>2</sub> 序列, 表明 ITS<sub>1</sub> 在人参种内稳定, ITS<sub>2</sub> 有部分变异, 可作为人参种质分析证据。姬可平等对小秦艽种籽中提取的 DNA rDNA 基因转录间隔区进行碱基序列测定, 得到小秦艽种籽 rDNA 基因转录间隔区的碱基序列, 表明 rDNA 基因内转录间隔区的碱基序列可作为分子水平鉴定药用植物的途径。丁小余等对束花石斛及其相似种玫瑰石斛、喇叭唇石斛、抱春石斛、兜唇石斛等进行 rDNA ITS 区序列研究, 选择了 15 个碱基位点作为鉴别束花石斛及其相似种的标记<sup>[4]</sup>。

## 2 农杆菌遗传转化

发根农杆菌和根癌农杆菌是根瘤菌科革兰氏阴性细菌, 可作为载体携带外源基因侵染植株引起根癌和不定根, 是近年来发展很快的一种转基因新方法, 具有操作简便、转化效率高和易得到稳定转化子等特点。目前, 在根癌农杆菌介导下已实现了多个属种真菌的遗传转化。农杆菌转化 Ti 质粒(根癌诱导质粒, tumor inducing plasmid)目前在药用植物上的应用较少, Ri 质粒(根诱导质粒, root inducing plasmid)转化研究较多。

Ri 质粒为发根农杆菌侵染后植物细胞产生不定根, 生长迅速, 不断分枝成毛状, 称为毛状根, 简称毛根或发根。Ri 质粒是单细胞克隆, 可直接作为基因工程的中间载体, 发根适宜于离体培养, 可表现原植株的次生代谢产物的合成能力<sup>[5]</sup>。

### 2.1 农杆菌诱导毛状根促进次生代谢

2.1.1 人参: 赵寿经等对人参毛状根进行了研究。根据 RiA4TL-DNA 序列分析结果, 设计一对引物, 以 Ri 质粒 DNA 为模板, 利用 PCR 方法对 rolC 基因进行了扩增; 利用 pGEM-T 载体对 rolC 基因进行了克隆和测序; 将 pGEM-T-rolC 用限制性内切酶 *Sac* I 酶切, 与经 *Sma* I 酶切 CIAP 去磷酸化的 pUC19 质粒重组, 经蓝白斑筛选得到正向重组的 pUC19-rolC; 再用 *Xba*I-*Sac* I 双酶切 pUC19-rolC 与 pBI121, 将 rolC 基因定向克隆到具有 CaMV35S 启动子的 pBI121 表达质粒上, 构建成植物表达载体 pBI-rolC, 用 pBI-rolC 转化农杆菌 LBA4404 构建成的 LBA4404 (pBI-rolC) 工程菌转化人参子叶, 获得发根的表达, PCR 扩增检测, 证明 rolC 基因确已整合到人参发根基因组中, 发根中检测出 7 种人参单体皂苷, 总皂苷质量分数达 18.55 mg/g<sup>[6]</sup>。刘峻等

通过 Ri 质粒将 colC 序列 T-DNA 整合到转化株的染色体中, 结果人参毛状根总皂苷质量分数 (2.486%) 高于原药材 (1.403%), 为工业化生产人参活性成分奠定了基础<sup>[7]</sup>。赵明强等利用人参毛状根将氢醌转化为熊果苷, 氢醌的转化率为 89.0%。

2.1.2 长春花: 通过毛状根培养可获得抗癌成分长春碱和长春新碱。孙敏军等利用发根农杆菌 A<sub>4</sub> 和 R<sub>1000</sub> 感染长春花愈伤组织, A<sub>4</sub> 毛状根的诱导率为 86.25%, 筛选的优良株系毛状根中的总生物碱高于原植物和愈伤组织, 长春花碱比根和叶高 27.4 和 23.5 倍, 长春花新碱高 23.5 和 0.5 倍。

2.1.3 其他研究: 王振华等用发根农杆菌 15834 菌株感染何首乌茎、叶外植体, 均可诱导出毛状根, 具有典型特征, 并能合成大黄酚 (0.0164%), 但量低于何首乌药材<sup>[8]</sup>。张汉明等首次利用发根农杆菌 A<sub>4</sub>、R1601、ATCC 15834 3 种菌株成功地从墨旱莲中诱导出毛状根, 其中含有甘露碱<sup>[9]</sup>。单俊杰等比较了栽培黄芪和黄芪毛状根总多糖的量分别为 2.61% 和 1.85%<sup>[10]</sup>。黄芪毛状根多糖与黄芪多糖都是由鼠李糖、阿拉伯糖、木糖、甘露糖、半乳糖和葡萄糖组成, 两者具有相同的免疫活性, 但强度略有差异<sup>[11]</sup>。

2.2 转移抗性基因: 通过农杆菌介导法转移抗性基因, 可获得高抗性的毛状根。刘传飞等利用发根农杆菌 R1601 直接诱导野葛、山葛、三裂叶野葛, 毛状根诱导率分别为 16.6%、16.2% 和 26.6%, 毛状根具有激素自主特性和抗卡那霉素特性, 并检测到转基因物质<sup>[12]</sup>。

## 3 功能基因研究

3.1 功能基因研究常用技术及分类: 药用植物功能基因研究是从功能基因入手阐明药用植物有效成分的生物合成途径及其调控机制, 其中主要涉及到次生代谢产物生物调控的关键酶系的结构编码基因和其他功能基因。控制红花刺的基因、甘草种子的抗逆性基因和重要标识基因(信号基因/报告基因)等。研究中可能应用的分子生物技术有植物的表达序列标签 (EST) 和 cDNA 文库筛选; 药用植物功能蛋白质组研究; 特定代谢时期细胞功能簇 (CRC) 分析和功能蛋白质组表达图谱用于基因组功能提示的可行性; 基因表达指纹 (GEF); 基因表达系统分析 (SAGE); cDNA 3' 端限制酶切片显示; 分子指数的 RNA 指纹 (MI); 消减杂交 (SSH); 基因芯片等。这些分子生物技术可应用于药用植物次生代谢调控机制研究, 功能基因和次生代谢酶基因的克隆、表达和鉴定等<sup>[13]</sup>。

### 3.2 功能基因注册概况

3.2.1 世界功能基因研究情况:王伟等对 2 300 多种药用植物的基因组、蛋白质及表达序列标签(EST)的注册统计表明,66%的药用植物没有核酸序列报道,77%的药用植物没有蛋白质序列注册<sup>[14]</sup>。笔者近期在 NCBI 中输入关键词为 EST 和 medicinal plants,进行搜索,得到 50 615 条相关的 mRNA 信息。在药用植物中,功能基因克隆的植物主要是长春花、青蒿、甘草、红豆杉、天麻、银杏、雪莲、毛地黄、葛等 32 属 42 种药用植物的基因,黄酮类(酚类)合成基因、细胞色素 P450 基因克隆最多。药用植物功能基因研究日本最多,美国次之,德国第 3,中国第 4。美国对长春花、红豆杉有关的基因克隆走在世界前沿。德国在生物碱合成,包括长春花和萝芙木中的生物碱主要合成酶基因的克隆研究较多。日本药用植物基因克隆主要包括了黄连、杜仲、甘草、紫草、黄芪、人参以及天仙子等。西班牙进行了番红花基因研究,2001 年报道了 343 个 EST 片段的测序结果<sup>[14,15]</sup>。

3.2.2 我国功能基因研究情况:中国研究的基因主要是青蒿素、紫杉醇、黄芪多糖合成相关基因等,在 EST 注册了 15 个基因,其中 11 个与青蒿萜类成分合成有关,2 个与中国红豆杉有关,2 个与黄芪代谢有关<sup>[14]</sup>,尚未见到我国在黄酮类化合物与细胞色素 P450 相关基因克隆研究。中国分布的 8 种细辛属多种植物的 ITS 序列已经在 EMBL 中注册。

3.3 转基因育种:陈华等通过转移耐盐基因 SeN-HXI(逆向转运蛋白基因)获得蒲公英转基因耐盐品种<sup>[15]</sup>。李辛雷等利用转基因方法获得了性状特异或抗病虫的转基因菊花品种<sup>[16]</sup>。贺红等将衰退病毒外壳蛋白(CTV-cp)转移到枳壳植株,获得转基因抗病枳壳。黄贤荣等<sup>[17]</sup>进行柴胡与胡萝卜体细胞杂交,鉴别了 8 个杂种。贺经等将 GUS、NPT II 基因转移到巴戟天离体再生组织,获得抗病植株<sup>[18]</sup>。已获得的药用植物转基因植物,还有长春花、丹参、枸杞、广藿香、石防风等。

3.4 次生代谢产物相关基因研究:药用植物次生代谢产物总体可分为 3 大类,即生物碱、酚类(含黄酮类)和萜类(含挥发油类)。植物次生代谢基因的发现,同类蛋白功能的阐明,代谢物组及代谢途径的重新组合(pathway engineering)是后基因组时代天然产物化学的新研究方向,是药用植物基因研究中最活跃的领域,已取得较大进展。次生代谢生物合成途径的基础研究,特别是关键酶基因的研究和产物的分离、调控路径和体系的研究,为利用生物工程手段改良代谢途径,生产高产代谢产物打下重要基础。

目前,酚类物质的主要生物合成途径已经弄清,苯丙氨酸(酪氨酸)脱氨酶是苯并烷类化合物代谢的中心酶。在黄酮类合成相关基因中,主要克隆的基因有查耳酮酶、催化黄酮母核羟基化的酶类及与糖苷转变有关酶类。目前至少已有 103 个黄酮合成相关基因被 12 个国家的科学家从这些植物中克隆,相关的生物合成途径申请了专利<sup>[14]</sup>。

生物碱代谢研究已经取得长足进展,研究主要集中在生物碱的储存和合成部位、转运途径、代谢调控因子、生物合成途径、关键酶及其编码基因等方面,生物碱代谢的精确途径和此过程中的关键酶及其编码基因的克隆是研究的焦点<sup>[19]</sup>。目前已经完成与生物碱合成相关的约 20 种 cDNA 克隆;已弄清了至少 8 种生物碱的酶促合成途径:阿吗灵、长春多灵、小檗碱、延胡索碱、macarpine、吗啡、小檗宁和东莨菪碱<sup>[20]</sup>。另外,长春花生物碱合成途径中的限速步骤得到鉴定,支路中 6 种酶中的 5 种已经得到鉴定,光、前体饲喂和诱导子诱导对代谢调控具有不同程度的效果<sup>[21]</sup>。贵州大学克隆了杜仲焦磷酸合酶(FPS)基因、肉桂醇脱氢酶(CAD)基因、喜树色氨酸脱羟酶(TDC)基因以及杜仲和天麻 3-羟基-3 甲基戊二酰辅酶 A 还原酶(HMGR)基因的部分片段。从紫草培养细胞中分离的一些与紫草宁形成相关的基因克隆和紫草宁代谢工程也进行了研究<sup>[22]</sup>。

#### 4 结语

分子标记技术在药用植物的正本清源、种属关系的多态性及进化途径研究等领域有重要的应用价值,随着生物信息学的发展,利用生物信息分析软件包对结果进行分析处理,将更加有利于药用植物资源关系的系统化和科学化发展。

利用农作物广泛使用的基因工程技术如农杆菌遗传转化技术对药用植物进行种质改良,易于操作,利用前景广大。随着新基因的不断发现和分离,新的基因不断被注册,众多基因的功能将进一步明确,转基因药用植物育种的研究条件将更加丰富,大大提高天然产物产量和抗性的新药用植物品种可得到培育。

利用反义-共抑制技术<sup>[20]</sup>或者过量表达技术,人们可以消除一些药用植物次生代谢途径的干扰步骤或引入所需要的代谢步骤,从而对药用植物进行改造,使其产生有重要医用价值的次生代谢产物。同时,随着人们不断分离到新的基因,可在细菌、酵母和昆虫细胞培养体中建立起异源表达系统,用单体酶甚至短的合成途径对生物碱进行仿生合成,将大大促进药效成分生产。

## References:

- [1] Wang T, Su Y J, Zhu J M, *et al.* PCR-RFLP analysis of *rbcl* genes in taxaceal and related taxa [J]. *Chin Bull Bot* (植物学通报), 2001, 18(6): 714-721.
- [2] Ma X J, Wang X Q, Xiao P G, *et al.* A study on AFLP fingerprinting of land races of *Panax ginseng* L. [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2000, 25(12): 707-709.
- [3] Qiu Y X, Fu C X, Wu F J. Analysis of population genetic structure and molecular identification of *Changium smyrnioides* and *Chuanminshen violaceum* with ISSR marker [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2003, 28(7): 598-602.
- [4] Ding X Y, Xu L S, Wang Z T, *et al.* Molecular authentication of *Dendrobium chrysanthum* from its allied species of *Dendrobium* [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2002, 27(6): 407-411.
- [5] Cao D M, Han Z H, Xu X F. Research progress of *Agrobacterium rhizogenes* [J]. *J Chin Biotechnol* (中国生物工程杂志), 2003, 23(2): 74-78.
- [6] Zhao S J, Li C Y, Luo X P, *et al.* Construction of plant expression vector of gene *rolC* and expression in *Panax ginseng* [J]. *Biotechnology* (生物技术), 2004, 24(9): 58-62.
- [7] Liu J, Ding J Y, Xu H, *et al.* Genetic transformation of *Panax ginseng* C. A. Meyer induced by root inducing plasmid (Ri) of *Agrobacterium rhizogenes* [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2001, 26(2): 95-98.
- [8] Wang Z H, Du Q, Liu H, *et al.* Culturing of hairy root of *Polygonum multiflorum* and determination of its chrysophanol content [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2001, 32(8): 695-696.
- [9] Zhang H M, Xu T F, Ding R X, *et al.* Genetic transformation of *Eclipta prostrata* by Ri T-DNA [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2001, 32(10): 924-926.
- [10] Chan J J, Wang S C, Liu D, *et al.* Comparison of polysaccharides between hairy root of *Astragalus membranaceus* and its cultivation [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2001, 32(5): 413-414.
- [11] Chan J J, Wang Y, Weng Y Q, *et al.* Comparing compositions and immunoactivities of polysaccharide in hair root of *Astragalus membranaceus* and cultivated *A. membranaceus* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2002, 33(12): 1096-1099.
- [12] Liu C F, Yu S H, Li L, *et al.* Hairy root induction and *in vitro* cultivation of *Pueraria lobata* Willd. Ohwi [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2002, 25(9): 525-527.
- [13] Chen K D, Ma X J, Wang W. Research on the gene resources protection and functional gene of medicinal plants [J]. *J Chin Biotechnol* (中国生物工程杂志), 2005, 25(4): 8-11.
- [14] Zhu P, Wang W, Chen K D. The currents status of the plant genome and EST research in medicinal plants [J]. *J Chin Biotechnol* (中国生物工程杂志), 2004, 24(2): 2-7.
- [15] Chen H, Li Y X. Biotechnological breeding for salt tolerance of dandelion [J]. *Chin Bull Bot* (植物学通报), 2004, 21(1): 19-25.
- [16] Li X L, Chen F D. Advances of genetic improvement and germplasm resources for chrysanthemum [J]. *Chin Bull Bot* (植物学通报), 2004, 21(4): 392-401.
- [17] Huang X R, Xiang F N, Xia G M, *et al.* Somatic hybridization between carrot and *Bupleurum scorzoneriifolium* and esterase isoenzyme analysis [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2002, 27(12): 887-890.
- [18] He H, Xu H H. *In vitro* culture and the agrobacterium-mediated genetic transformation of *Morinda officinalis* [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2002, 27(10): 733-735.
- [19] Tang Z H, Yu J H, Yang F J, *et al.* Metabolic biology of plant alkaloids [J]. *Chin Bull Bot* (植物学通报), 2003, 20(6): 696-702.
- [20] Buchanan B B, Gruissem W. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants* [M]. Beijing: Science Press, 2004.
- [21] Wang H, Sun M, Wu C L, *et al.* Progress on alkaloid biosynthesis path key steps and metabolism control studies of *Catharanthus roseus* [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2001, 26(10): 656-659.
- [22] Liu Z, Wu S J, Yang Y H. The advances of cDNA clones related shikonin formation and the metabolic engineering of shikonin [J]. *J Chin Biotechnol* (中国生物工程杂志), 2004, 24(4): 26-29.

## 敬告读者

《中草药》杂志编辑部尚存部分过刊合订本,包括:1974-1975年、1976年、1979年、1985-1994年(80元/年)、1995-1997年(110元/年)、1998年(120元/年)、1999年(135元/年)、2000年(180元/年)、2001-2003年(200元/年)、2004年(220元/年)、2005年(220元/年)。1996年增刊(50元)、1997年增刊(45元)、1998年增刊(55元)、1999年增刊(70元)、2000年增刊(70元)、2001年增刊(70元)、2002年增刊(65元)、2003年增刊(65元)、2004年增刊(65元)、2005年增刊(65元)。欢迎订购。订购者请直接与《中草药》杂志编辑部联系。

电话:(022) 27474913 23006821 传真:(022) 23006821 E-mail: zcyzbbj@tjipr.com