

• 药材与资源 •

中日当归属药用植物 ITS 序列分析

赵国平¹, 新关稔³, 石川隆二³, 钱三旗², 章 群², 敖杰男¹

(1. 暨南大学医学院, 广东 广州 510632; 2. 暨南大学生命科学技术学院, 广东 广州 510632;

3. 日本弘前大学农学生命科学部, 日本青森 036-8561)

摘要:目的 建立当归属药用植物功效的分子系统学基础, 为当归属药用植物功效的差异性提供分子依据。方法 采用 PCR 技术与克隆技术相结合, 获得 ITS 基因, 进行测序, 经 Phylip 软件统计分析和分支分析, 建立系统发育树, 计算各类群间的遗传距离。结果 当归属药用植物中 ITS1-5.8 S-ITS2 序列长度为 600~629 bp, 去除序列长度为 165 bp 的 5.8 S, ITS1+ITS2 排序后的长度为 468 个位点。系统树将当归属药用植物分为两组, 以独活、白芷为代表分别聚类, 甘肃产岷当归 *Angelica sinensis* 不与上述任何一组聚类, 却与欧当归 *Levisticum officinale* 遗传距离相对较小。结论 上述结果与当归属药用植物功效差异基本吻合, 启示药用植物亲缘演化关系可能是研究药用植物功效规律的一条重要途径。

关键词: 当归属; 基因转录间隔区; 遗传距离; 功效**中图分类号:** R282.7**文献标识码:** A**文章编号:** 0253-2670(2006)07-1072-05ITS Sequence analysis of Chinese and Japanese medicinal plants of *Angelica* L.ZHAO Guo-ping¹, NIIZEKI Minoru³, ISHIGAWA Liuni³, QIAN San-qi²,ZHANG Qun², AO Jie-nan¹

(1. Medical College, Jinan University, Guangzhou 510632, China; 2. College of Life Science and Technology,

Jinan University, Guangzhou 510632, China; 3. Faculty of Agricultural and Life Science,

Hirosaki University, Hirosaki 036-8561, Japan)

Abstract: Objective To establish the base of molecular system-theory on medicinal plants of *Angelica* L. and to offer molecular gists for finding the efficacy difference of them. **Methods** The PCR technique was utilized together with the clone technique to get the ITS gene and measure its genic sequence. Statistical analyzing and branch analyzing were carried out by Phylip software and genetic distance difference in every kinds can be calculated with MEGA3. **Results** ITS1-5.8 S-ITS2, belongs to one of medicinal plants of *Angelica* L., its sequence length extents 600 to 629 bp. Subtracting 5.8 S, its length is 165 bp, the length of ITS is 468 bp. The medicinal plants of *Angelica* L. are divided into two groups by dendrogram. The genetic distance of *A. sinensis* from Gansu Province is obviously different from the other medicinal plants of *Angelica* L., but the distance difference compared with *Levisicum officinale* is smaller. **Conclusion** It suggests that the above result be identical to the efficacy of medicinal plants of *Angelica* L. It may be an important reason of explaining why the efficacy between *A. sinensis* and other medicinal plants of *Angelica* L. is so different.

Key words: *Angelica* L.; internal transcribed spacer; genetic distance; efficacy

当归属植物在我国有 26 种 5 变种 1 变型, 分布于南北各地, 主产东北、西北和西南地区。我国分布的品种大部分可作药用, 而诸如当归、白芷、独活等则属于常用中药。当归能养血活血、调经止痛, 治疗

血虚、月经不调等病证; 独活祛风除湿, 应用于风湿痹痛等; 白芷除与独活具有类似功效外, 又能解表、通窍、消肿排脓, 用于风寒表证、鼻渊、痈疽疮疡等。笔者推测, 上述药物药性、功效的差异性应与植物间

收稿日期: 2005-10-10**基金项目:** 国家自然科学基金项目资助(30271618)**作者简介:** 赵国平(1958—), 男, 暨南大学医学院教授, 博士, 2002 年赴日本弘前大学农学生命科学部作高级访问学者, 主要从事药用植物分子生物学、中药药性理论研究。 Tel: (020)85225969 (020)85228016 E-mail: tguo428@jnu.edu.cn

亲缘关系和活性成分的差异性密切相关。在经典形态分类系统中,由于当归属内没有再分组,难以揭示药用植物亲缘演化与功效变化之间的相关性。

当归属药用植物的分子系统学研究,以往多在伞形科、芹亚科等高级分类阶元上进行。Gregory 等^[1]对伞形科、五加科、海桐花科等 80 个属的植物进行了 cpDNA 的 *rbcL* 基因序列分析,认为五加科和伞形科是两个姐妹群,与之较近的是海桐花科 (*Pittosporum*)。这一结果与伞形科来源于五加科的传统分类认识并不一致。*rbcL* 基因序列分析还显示,伞形科天胡荽亚科处于伞形科与五加科的中间位置,部分天胡荽亚科植物与五加科关系更近。此后采用 cpDNA 的 *matK* 基因研究结果得出了同样结论^[2]。Stephen 等运用 rDNA 的 ITS(internal transcribed spacer)序列,对芹亚科 40 种植物进行分子系统学研究,ITS 序列变化不支持依据芹亚科植物形态学和解剖学特征而进行的分类。在芹亚科植物系统发育过程中有一个大的遗传分隔区,所有墨西哥和美国中部特有的种系与其他地区的种系亲缘演化关系模糊^[3],上述植物 cpDNA 的 *rpoC1* 基因序列分析也得出了同样结论^[4]。此后,Stephen 等又在芹亚科选取 126 个代表种进行了 ITS 序列分析,并在伞形科范围内选取了 100 个代表种进行了 *rpoC1* 序列分析,得出的结论是:伞形科芹亚科为单系发生,与变豆菜亚科构成姐妹群;伞形科天胡荽亚科为多系发生,其中部分种系与五加科紧密结合在一起,而另一部分则与伞形科芹亚科、变豆菜亚科聚在一起。分子系统树中聚在一起的植物在经典分类系统中可能属于不同的类群^[5]。鉴于分子系统学研究资料已经突破了芹亚科的传统分类,Stephen 等将所研究的分子系统学证据综合起来,试图建立芹亚科新的分类系统,该实验将芹亚科分为七大世系: *Angelica* group(当归组)、*Aegopodium* group(羚角芹组)、*Apium* group(芹组)、*Daucus* group(胡萝卜组)、*Aciphylla* group(尖叶芹组)、*Oenanthe* group(水芹组),其中当归组最大^[6]。

上述系列成果说明,经典的植物分类系统与植物分子系统学研究结论之间存在着较大差异。在植物系统与进化研究中,核酸分子量是最基本的进化单位,能反映进化本质;核酸的基本序列是一元变化的,通常为点突破,趋同效应极小,以核酸分子为指标确定的系统化关系不受主观因素影响。据此笔者认为,经典的植物分类系统可能在客观反映植物亲缘演化关系方面存在着局限性。结合药用植物功效

的研究,大胆地推断:同一属药用植物,如果功效相似,可能分子系统学证据可以证明其亲缘关系较近;如果功效差异性大,分子系统学证据可以证明其亲缘关系较远。根据这种设想,选择了功效差异性较大的当归属药用植物作为研究对象。在基因片段选择方面,ITS 是目前分子系统学研究应用最多的一种,因 ITS 进化速率较编码区快,一般用于研究植物较低分类等级(如属、种、居群)的亲缘关系,并且已被证明这一区域的 DNA 特征可以作为被子植物系统学研究的一个非常有用的性状^[7]。因此,笔者选择 rDNA 的 ITS 序列作为研究中日当归属及其近缘属药用植物种间和种下类群亲缘关系的基因片段。

1 材料与方法

1.1 材料来源:见表 1,所有材料均来自野外,用硅胶快速干燥的新鲜叶片,国内品种分别经中国科学院江苏省植物研究所标本室刘启新研究员、本校药用植物教研室谈献和教授、洪恂教授鉴定;日本品种经日本弘前大学农学生命科学部原田幸雄教授鉴定。

表 1 材料来源

Table 1 Resources of medicinal plants of *Angelica* L.

样品号	名 称	来 源	鉴定人
1	重齿当归 <i>Angelica biserrata</i>	四川江油	洪 恂
2	北白芷 <i>A. ursina</i>	日本新潟	原田幸雄
3	可食当归 <i>A. edulis</i>	日本新潟	原田幸雄
4	骨缘当归 <i>A. cartilaginata</i>	吉林长春	洪 恂
5	白花前胡 <i>Peucedanum praeruptorum</i>	江苏宜兴	谈献和
6	紫花前胡 <i>A. decursiva</i>	江苏南京	刘启新
7	圆当归 <i>A. archangelica</i>	江苏南京	刘启新
8	仙台当归 <i>A. acutiloba</i> subsp. <i>iwatenis</i>	日本青森	原田幸雄
9	毛当归 <i>A. pubescens</i>	江苏南京	刘启新
10	拐芹 <i>A. polymorpha</i>	江苏南京	刘启新
11	黑水当归 <i>A. amurensis</i>	江苏南京	刘启新
12	峨嵋当归 <i>A. omeiensis</i>	四川重庆	洪 恂
13	杭白芷 <i>A. dahurica</i> Sav. cv. <i>hangbaizhi</i>	浙江杭州	刘启新
14	白芷 <i>A. dahurica</i>	四川绵阳	洪 恂
15	兴安白芷 <i>A. dahurica</i> Sav. var. <i>dahurica</i>	河南洛阳	刘启新
16	川白芷 <i>A. dahurica</i> var. <i>nepetoides</i>	四川重庆	洪 恂
17	管鞘当归 <i>A. pseudosinensis</i>	江苏南京	刘启新
18	祁白芷 <i>A. dahurica</i> Sav. cv. <i>qibaizhi</i>	河南洛阳	洪 恂
19	狭叶当归 <i>A. anomala</i>	日本青森	原田幸雄
20	岷当归 <i>A. sinensis</i>	甘肃兰州	洪 恂
21	欧当归 <i>Levisticum officinale</i>	江苏南京	刘启新

1.2 总 DNA 的提取、ITS 区的扩增:分别取各个种的新鲜叶片 0.2 g 左右,采用改良的 CTAB 法^[8]提取总 DNA,并以 0.8% 的琼脂糖,1×TBE 缓冲液电泳检测。

用 White 等^[9]描述的引物进行 ITS 区的扩增。上游引物为 ITS-5F: 5'-GGAAGGAGAAGTCG-TAA-CAAGG-3';下游引物为 ITS-4R: 5'-TC-CTTCCGC-TTATTGATATGC-3'。聚合酶链式反

应(PCR)在 PERKIN ELMER 9600 型 PCR 仪上进行。反应体系为 60 μ L,其中 ITS-5F 和 ITS-4R 各 3 μ L(2 μ mol/L),0.3 μ L Taq 酶(5 U/ μ L),6 μ L 10 $\times$ buffer,3.6 μ L MgCl₂(25 mmol/L),6 μ L dNTP(25 mmol/L),模板 DNA 25 ng,加水至 60 μ L。PCR 程序为:94 $^{\circ}$ C 预变性 30 s,94 $^{\circ}$ C 变性 1 min,53 $^{\circ}$ C 退火 1 min,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min。35 个循环后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。4 $^{\circ}$ C 保存。

1.3 ITS 区的克隆、纯化、测序:上述 PCR 产物直接测序效果不好,而经过大肠杆菌克隆以后测序效果良好。在 DNA 连接酶的作用下,将药用植物 ITS 区 PCR 产物与载体基因 PBluescript I SK(+/-)溶液相混合,在 16 $^{\circ}$ C 恒温箱中水浴 12 h 以上,与经前培养的大肠杆菌相混合,在掺有氨苄青霉素的培养皿中 37 $^{\circ}$ C 培养 18 h 以上,白色菌落再在掺有氨苄青霉素的液体培养液中 37 $^{\circ}$ C 振荡培养 18 h 以上。采用 QIA kit 分离、纯化质粒 DNA。

测序反应依据双脱氧终止法原理^[10],在上述 PCR 仪上进行。反应体系 10 μ L,测序引物为 M13IRD 800 forward 和 reverse。反应程序为 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,95 $^{\circ}$ C 变性 30 s,50 $^{\circ}$ C 退火 30 s,70 $^{\circ}$ C 延伸 1 min。30 个循环后 4 $^{\circ}$ C 保存。测序采用手动测序法,在 LIC-4000 测序仪上进行。每个样品正向、反向测序各两次,将 4 次所测结果进行认真校对。

1.4 数据分析及系统树构建:本实验将获得的碱基序列经 Clusta lx 排序,用 MEGA3 软件基于 Kimura 2-parameter 模型计算遗传距离,并采用近邻归群法(Neighbor-Joining,NJ)构建系统发育树,系统树各

分枝的置信度自举检测(bootstrap)1 000 次。

2 结果与讨论

2.1 ITS 长度与 G+C 的量:本实验测得 21 种样品的 ITS 区(包括 5.8 S rDNA)序列的长度范围为 600~629 bp。其中 ITS1 长度为 214~226 bp,ITS2 长度为 218~237 bp。所有种的 ITS2 长度均比 ITS1 长。而 5.8 S rDNA 则高度一致,均为 165 bp,无碱基差异。将 ITS 区中 5.8 S rDNA 去除,ITS1 与 ITS2 连接,Gap 做为缺失处理时,ITS1+ITS2 排序后的长度为 468 个位点,其中有 139 个变异位点,36 个为系统发育信息位点,分别占 29.7%和 7.7%。其各类群 ITS1+ITS2 长度和序列中的 G+C 质量分数见表 2。

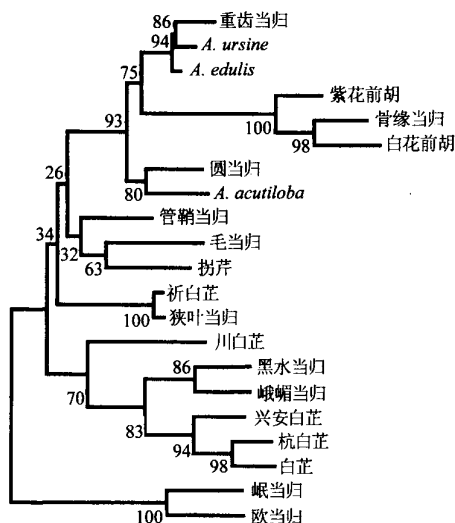
表 2 各类群 ITS 长度和 G+C 的量
Table 2 Length and G+C contents of ITS1 and ITS2 of taxa

片段 编号	片段长度 (ITS1+ ITS2)/bp	(G+C)/ %	片段 编号	片段长度 (ITS1+ ITS2)/bp	(G+C)/ %
1	445	52.6	12	435	50.3
2	441	53.7	13	436	53.5
3	441	53.5	14	436	53.3
4	438	51.1	15	435	53.1
5	437	49.0	16	437	53.5
6	440	50.9	17	433	50.7
7	435	50.1	18	434	52.9
8	434	49.8	19	434	52.6
9	436	50.3	20	438	52.2
10	434	50.4	21	438	50.1
11	435	49.8			

2.2 各类群间的遗传距离:当归属 21 种植物相互间的遗传距离见表 3。基于 ITS 序列的当归属植物系统发育树见图 1。

表 3 当归属类群间的遗传距离
Table 3 Genetic distance among taxa of *Angelica L.*

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
1																				
2	0.011 6																			
3	0.009 2	0.006 9																		
4	0.057 6	0.055 3	0.050 2																	
5	0.057 5	0.057 8	0.052 7	0.023 5																
6	0.050 1	0.047 9	0.045 3	0.026 1	0.030 8															
7	0.030 4	0.028 2	0.025 7	0.057 7	0.065 1	0.055 2														
8	0.032 8	0.030 5	0.028 1	0.062 7	0.067 6	0.052 6	0.023 3													
9	0.052 4	0.047 9	0.045 3	0.083 6	0.089 1	0.076 2	0.052 7	0.055 1												
10	0.050 3	0.043 2	0.043 1	0.078 7	0.084 1	0.066 1	0.050 6	0.053 1	0.035 5											
11	0.120 4	0.116 0	0.112 9	0.152 5	0.149 7	0.138 7	0.118 3	0.118 2	0.115 0	0.112 2										
12	0.094 0	0.089 3	0.083 8	0.115 7	0.113 5	0.105 8	0.089 2	0.086 4	0.088 7	0.086 1	0.080 9									
13	0.080 3	0.075 8	0.073 0	0.115 7	0.115 8	0.099 8	0.080 8	0.083 3	0.072 8	0.065 1	0.083 0	0.065 6								
14	0.081 0	0.073 8	0.068 5	0.113 3	0.113 5	0.103 4	0.081 3	0.078 9	0.075 8	0.073 2	0.086 1	0.065 7	0.016 3							
15	0.075 5	0.068 5	0.063 2	0.107 6	0.105 1	0.097 7	0.075 8	0.078 5	0.062 8	0.067 8	0.080 6	0.060 5	0.025 8	0.025 8						
16	0.068 0	0.063 5	0.060 8	0.092 0	0.100 3	0.081 8	0.065 8	0.065 8	0.062 9	0.052 8	0.104 1	0.078 2	0.047 6	0.052 9	0.050 2					
17	0.047 5	0.043 0	0.040 4	0.075 7	0.075 8	0.068 3	0.045 3	0.045 3	0.032 9	0.040 2	0.087 7	0.062 5	0.057 2	0.060 1	0.047 5	0.052 5				
18	0.050 4	0.045 8	0.040 7	0.078 3	0.083 9	0.071 4	0.048 0	0.048 1	0.045 4	0.042 9	0.112 5	0.075 5	0.070 4	0.073 0	0.067 7	0.047 9	0.040 3			
19	0.053 0	0.045 9	0.040 8	0.078 7	0.081 6	0.074 2	0.050 6	0.048 2	0.048 0	0.045 5	0.115 4	0.075 7	0.073 1	0.070 6	0.065 3	0.052 9	0.042 8	0.002 3		
20	0.152 5	0.147 7	0.144 4	0.189 4	0.193 6	0.178 5	0.139 1	0.139 5	0.158 3	0.150 4	0.226 1	0.167 0	0.176 4	0.174 4	0.161 7	0.156 1	0.144 0	0.139 3	0.139 3	
21	0.182 7	0.184 8	0.181 1	0.218 9	0.222 6	0.200 6	0.172 6	0.175 9	0.182 8	0.174 6	0.215 5	0.191 9	0.191 7	0.189 8	0.189 0	0.171 1	0.164 7	0.168 6	0.171 4	0.09 6



图中数字表示各分枝自举检测的置信度,标尺表示遗传距离
Numbers above branches present confidence values from bootstrap test, a scale bar indicates genetic distance

图 1 基于 ITS 序列的当归属植物系统发育树
Fig. 1 Dendrogram of plants of *Angelica* L. based on ITS sequences

3 讨论

3.1 实验数据的分类学意义:DNA 是由 G 与 C、A 与 T 的氢键结合而形成的双螺旋结构,A 与 T、G 与 C 之间的摩尔数相等,利用 G 与 C 或 A 与 T 中的任意一对碱基组成即可反映该 DNA 序列的碱基特征^[11]。DNA 序列中经常会发生插入/缺失(indels)现象^[12],故 DNA 序列长度也能部分反映 DNA 序列特征。但 DNA 链是一个整体结构,即使 A 与 T、G 与 C 的量和长度相同的基因片段,由于碱基对之间的排列组合、先后顺序不同,各植物之间的遗传距离也会出现较大差异。在长期的系统演化过程中,更多地会发生单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism SNP)和点突变(mutation)、倒位与重排(inversion and rearrangement)等现象^[13],因此,选择适当的软件对获得的基因序列计算分析,计算遗传距离,建立系统树,是分子系统学研究的主要途径。从本次实验可以看出,G+C 的量和序列长度相似的 ITS 基因片段(如兴安白芷与岷当归)系统树中并未聚在一起,遗传距离也较远。

3.2 当归属分组与功效的关系分析:由图 1 可知,当归属植物分为两组。重齿当归、*A. ursina*、*A. edulis*、紫花前胡、白花前胡、骨缘当归、圆当归、*A. acutiloba* subsp. *iwatensis* 等 8 种植物为一组;杭白芷、白芷、兴安白芷、峨嵋当归、黑水当归、川白芷、管鞘当归、毛当归、拐芹、折白芷、狭叶当归等 11 种植

物为另一组。岷当归不与上述两组聚类,而与外类群欧当归相对较近。通过 Blasta 进行相同性检索,本实验所测相关品种如圆当归、拐芹、白芷、紫花前胡等与 Stephen 等^[3,4]所测相关品种的 ITS 序列基本一致。

在第一组,重齿当归首先与 *A. ursina*、*A. edulis* 两个日本品种聚在一起,然后再与紫花前胡、白花前胡、骨缘当归相聚,经两次聚合后与圆当归、*A. acutiloba* subsp. *iwatensis* 相聚。从有关文献记载来看,除紫花前胡、白花前胡和 3 个日本品种外,其余第 1 组品种都具有一定的祛风除湿、镇痛作用,用于治疗风湿痹痛^[14]。在第 2 组,首先聚在一起的是白芷、杭白芷、兴安白芷,然后与黑水当归、峨嵋当归聚合,经 2 次聚合后与川白芷聚合,经 3 次聚合后与管鞘当归、毛当归、拐芹聚合。经 4 次聚合后与折白芷、狭叶当归聚合。白芷及其种下类群都具有相似的功效,管鞘当归、拐芹、黑水当归、峨嵋当归祛风除湿,活血调经,与白芷及其种下群的功效同中有异。从表 3 可以看出,作为当归道地药材的岷当归与当归属中其他所有植物都有较大的遗传距离,而与欧当归遗传距离相对较近;从图 1 可以看出,岷当归不与当归属两组植物聚合,是当归属中一个特殊类群。当归是养血调经的常用药,与独活、白芷、拐芹等药物的功效差异性较大,而欧当归能活血调经,治疗月经不调、痛经等病,与岷当归功效有更多的相似性。

3.3 植物分子系统学研究的初步体会:首先是取样问题。在同一分类阶元上,所取样本越丰富,越能准确反映该类群的分类情况,如果一个属只选一个代表种,有的种并不能真实代表该属植物与他属植物之间的亲缘演化关系,得出的结论可能是不准确的,如本次研究中当归就是一个特殊类群。即使是同一品种,在居群之间也有一定差异。在进行中国药用植物的分子系统学研究时,应尽可能在同一分类阶元内多采一些品种,甚至采到种下类群。其次是基因片段选择问题。一般根据不同的研究目的选择不同的基因区域。rDNA 的 ITS 序列目前广泛用于研究被子植物科内,尤其是近缘属内及种间关系,均取得了预期的成果^[15~17]。到目前为止,当归属中国特有种的 ITS 序列资料并不多,本课题所选当归属 20 个样品,中国特有种 15 个,日本品种 5 个,可以补充当归属 ITS 研究资料的不足。适宜于较低分类阶元亲缘关系研究的还有 matK 基因等^[18],由于 matK 序列变异较为均一,在构建系统树时不必对不同类群的变异进行加权,增强了分子系统树的可靠性。本课题

题将结合 matK 基因作进一步研究。再次是测序与克隆技术问题,国内普遍采用的是 PCR 产物直接测序,由于 PCR 产物浓度低,易受污染,给测序反应和读序工作造成了一定困难。本课题将经 PCR 获得的目的基因用大肠杆菌克隆后分离、净化,得到的目的基因不仅浓度高,而且污染少,测序、读序效果好,成功率显著提高,为目前日本、欧美等国家普遍采用的方法^[19],值得推广。

References:

- [1] Grogory M P, Douglas E S, Pamela S S. Higher level relationships of *Apiales* (*Apiaceae* and *Araliaceae*) based on phylogenetic analysis of *rbcL* sequences [J]. *Am J Bot*, 1996, 83(4): 99-515.
- [2] Gregory M P, Douglas E S, Pamela S S. Clarification of the relationship between *Apiaceae* and *Araliaceae* based on matK and *rbcL* sequence data [J]. *Am J Bot*, 1997, 84(4): 565-580.
- [3] Stephen R D, Deborah K D. A molecular phylogeny of *Apiaceae* subfamily *Apioidae*: evidence from nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences [J]. *Am J Bot*, 1996, 83(2): 234-251.
- [4] Stephen R D, Seemanti R, Deborah S K D, *et al.* Molecular systematics of *Apiaceae* subfamily *Apioidae* phylogenetic analysis of nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer and plastid *rpoCl* intron sequences [J]. *Am J Bot*, 1998, 85(4): 563-591.
- [5] Gregory M P, Stephen R D. Major lineages within *Apiaceae* subfamily *Apioidae*: A comparison of chloroplast restriction site and DNA sequence data [J]. *Am J Bot*, 1999, 86(7): 1014-1026.
- [6] Stephen R D, Deborah S K D, Mark F W. A phylogeny of the flowering plant family *Apiaceae* based on chloroplast DNA *rp116* and *rpoCl* intron sequences: Towards a suprageneric classification of subfamily *Apioidae* [J]. *Am J Bot*, 2000, 87(2): 273-292.
- [7] Baldwin B G, Sanderson M J, Porter J M, *et al.* The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny [J]. *Ann Mo Bot Gard*, 1995, 82: 247-277.
- [8] Doyle J L, Doyle J A. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf material [J]. *Phytochem Bull*, 1987, 19: 11-15.
- [9] 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.
- [10] Sanger F, Nicklen S, Coulson S R. DNA Sequencing with chain-termination inhibitors [J]. *Proc Nat Acad Sci USA*, 1977, 74: 5463-5467.
- [11] The Japanese Biochemical Society (JBS); *Practical Biochemistry Experimentation* [M]. Taikyo: Chemical Commission of Taikyo, 1995.
- [12] Dowine S R, Olystead R G, Zurawaski G, *et al.* Six, independent losses of the cpDNA *rplz* intron in dicotyledons [J]. *Mol Phylog Impl Evol*, 1991, 45(5): 1245.
- [13] Hirasaka J, Shimada H, Minoru N, *et al.* The complete sequence of the rice (*Oryza sativa*) chloroplast genome; intermolecular recombination between distinct rRNA genes accounts for a major plasmid DNA inversion during the evolution of the cereals [J]. *Mol Gen Genet*, 1989, 217: 185-194.
- [14] Editorial Board of China Herbal, State Administration of Traditional Chinese Medicine. *China Herbal* (中华本草) [M]. Shanghai: Scientific and Technical Publishers, 1999.
- [15] Liu Y P, Cao H, Han G R, *et al.* MatK and ITS nucleotide sequencing of crude drug *Chuanxiong* and phylogenetic relationship between their species from China and Japan [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2002, 37(1): 63-68.
- [16] Zhu H F, Yang J B, Zhang C Q, *et al.* Systematic position of *Primula secundiflora* (*Primulaceae*) inferred from nuclear ribosomal DNA ITS sequence data [J]. *Acta Phytotaxon Sin* (植物分类学报), 2002, 40(2): 133-138.
- [17] Gao L M, Yang J B, Zhang C Q, *et al.* Phylogenetic relationship of subgenus *Tsutsusi* (*Rhododendron*) based on ITS sequences [J]. *Acta Bot Yunnan* (云南植物研究), 2002, 24(3): 313-320.
- [18] Johnson L A, Soltis D E. Phylogenetic inference in *Saxifragaceae sensu stricto* and *Gilia* (*Polemoniaceae*) using matK sequences [J]. *Ann Mo Bot Gard*, 1995, 82: 149-175.
- [19] Petersen G, Seberg O, Larsen S. The phylogenetic and taxonomic position of *Lilaeopsis* (*Aiaceae*), with notes on the applicability of ITS sequence data for phylogenetic reconstruction [J]. *Aust Syst Bot*, 2002, 15: 181-191.

基因枪介导灯盏花遗传转化及几个影响因素的研究

邱璐^{1,2}, 王波^{1*}, 罗春梅³, 曹光宇², 范战民², 龔礼嘉²

(1. 楚雄师范学院, 云南 楚雄 675000; 2. 北京大学生命科学院 蛋白质工程及基因工程国家重点实验室, 北京 100871; 3. 楚雄农业学校, 云南 楚雄 675000)

摘要:目的 获得具有较强抗虫抗真菌的转基因灯盏花植株。方法 通过 PCR 聚合酶链式反应得到目的基因 RBB12-3, 通过中间载体 PBS 及植物载体 YY46, 得到带有目的基因的质粒, 用基因枪轰击法进行遗传转化。对基因枪轰击受体、轰击压力、抗生素大霉素(Gent.)的敏感性进行对照实验。结果 用灯盏花的真叶作为基因枪轰击

收稿日期: 2005-09-25

作者简介: 邱璐(1965—), 女, 四川人, 硕士, 副教授, 主要从事植物转基因及植物组织培养研究。

* 通讯作者 王波(1961—), 男, 本科, 副教授, 主要从事分析化学及化工研究。