

# 基于不同 DNA 序列对四数獐牙菜系统位置分析

杨路存<sup>1,2</sup>, 陈桂琛<sup>1\*</sup>, 周国英<sup>1,2</sup>

(1 中国科学院西北高原生物研究所, 西宁 810001; 2 中国科学院研究生院, 北京 100039)

**摘要:**以扁蕾属植物为外类群, 基于 trnL2trnF 序列、rpl16 序列以及 ITS 序列, 采用最大简约法对四数獐牙菜的系统位置进行了分析。结果显示: 尽管在 ITS 系统发育树、trnL2trnF 系统发育树和 rpl16 系统发育树中所用的种和数量有所不同, 所得到的 3 种系统发育树的拓扑结构也不一致, 但四数獐牙菜的系统位置在 3 种系统发育树中的结果基本一致。在 trnL2trnF 系统发育树中, 四数獐牙菜与花锚属的 *H. elliptica*、*H. brevicornis* 和 *H. weddelliana* 形成了一个单系群; 而在 ITS 和 rpl16 系统发育树中, 四数獐牙菜与歧散獐牙菜先聚在一起, 再与花锚属的植物聚为一支支持率较高的单系支。研究表明, 四数獐牙菜与 *Anagalidium* 属的歧散獐牙菜的亲缘关系最近, 其次是与花锚属的植物, 而与獐牙菜属植物的亲缘关系较远。本实验系统发育的结果支持将四数獐牙菜从獐牙菜属中分出而归入 *Anagalidium* 属的观点。

**关键词:** 四数獐牙菜; trnL2trnF 序列; ITS 序列; rpl16 序列; 异花组; *Anagalidium*

中图分类号: Q789 文献标识码: A

## Systematic Position of *Swertia tetraptera* Maxim. Inferred from ITS, rpl16 and trnL2trnF DNA Sequences

YANG Lu<sup>1,2</sup>, CHEN Gui<sup>1\*</sup>, ZHOU Guo<sup>1,2</sup>

(1 Northwest Plateau Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810001, China; 2 Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

**Abstract:** The systematic position of *Swertia tetraptera* was analysed using Maximum Parsimony Method, with the *Gentianopsis grandis* being selected as outgroup, based on trnL2trnF sequences, rpl16 sequences and ITS sequences data sets. The results showed that although the numbers and the species are different in ITS phylogenetic tree, rpl16 phylogenetic tree and trnL2trnF phylogenetic tree, and the topology of three phylogenetic tree is also inconsistent. As far as the systematic position of *S. tetraptera*, the results are in agreement. In trnL2trnF phylogenetic tree, *S. tetraptera* forms a monophyletic lineage with *H. elliptica*, *H. brevicornis* and *H. weddelliana*, while in ITS and rpl16 phylogenetic tree, *S. tetraptera* form a sister group relationship with *Anagalidium dichotoma*, and this group is strongly associated with *H. elliptica* and other species of *Halenia*. These results indicated that *S. tetraptera* is closely related to *A. dichotoma*, followed by the species of *Halenia*. Therefore, the results support that *S. tetraptera* should be excluded from the genus *Swertia* and be put into the genus *Anagalidium*.

**Key words:** *Swertia tetraptera*; trnL2trnF sequence; ITS sequence; rpl16 sequence; Sect. *Heteranthos*; *Anagalidium*

<sup>1</sup> 收稿日期: 2010-04-07; 修改稿收到日期: 2010-07-16

基金项目: 国家中西部专项(2001BA901A47)

作者简介: 杨路存(1981-), 女(汉族), 在读博士研究生, 主要从事分子生态学方面的研究。E-mail: qhyle2000@yahoo.com.cn

\* 通讯作者: 陈桂琛, 研究员, 主要从事生态学方面的研究。E-mail: gcchen@nwipb.ac.cn

四数獐牙菜(*Swertia tetraptera* Maxim.)隶属于龙胆科(Gentianaceae)獐牙菜亚族(Subtribe Swertiinae)獐牙菜属异花组,是分布于青藏高原的一个特有种<sup>[1]</sup>。从目前所见的分类系统可知,其系统位置是个长期悬而未决的问题。自Grisebach<sup>[2]</sup>将歧散獐牙菜(*Swertia dichotoma*)从獐牙菜属中分出,发表了单种属Anagallidium Griseb.以来,许多学者也将四数獐牙菜归入此属<sup>[35]</sup>,然而,Ana2gallidium属未被其他学者采纳。何廷农<sup>[1]</sup>根据*S. tetraptera*主茎上的花较侧枝上的花大,呈明显的异型而建立异花组放入獐牙菜属中。随后,一些学者如薛春迎等<sup>[6,7]</sup>对花蜜腺的数目、位置、形态、附属物等特征以及花蜜腺解剖结构的研究也支持何廷农的观点。尽管如此,薛春迎等<sup>[8]</sup>,史刚荣<sup>[9]</sup>,Chassot等<sup>[10]</sup>分别通过对胚胎学和花粉形态学的研究发现,四数獐牙菜与花锚属椭圆叶花锚的亲缘关系较近,与本属其它种较远。由此可见,四数獐牙菜的系统位置仍存在一定争议,还需要进一步研究。

近年来,利用分子生物学方法获得的大量植物DNA序列资料应用于系统学的研究。在龙胆科(Gentianaceae)中,nrDNA的ITS序列以及一些进化比较快的cpDNA基因间隔区已被用来研究一些属间的分子系统学。Yuan等<sup>[11]</sup>,Chassot等<sup>[12]</sup>分别采用ITS、ITS和trnL2trnF对龙胆亚族和獐牙菜亚族的分子系统学进行了研究,结果显示,四数獐牙菜与椭圆叶花锚的亲缘关系较近,而与本属的其它种亲缘关系较远,四数獐牙菜应从獐牙菜属中分出。但是由于Yuan等<sup>[11]</sup>的研究仅包括獐牙菜属的3个种,而Chassot等<sup>[12]</sup>的研究仅包括獐牙菜属的23种,且无肉根组、大花组和歧散獐牙菜等形态类型,很难对四数獐牙菜的系统问题做出全面、深入和系统的研究。因此,本研究在已有的工作基础上,新测定獐牙菜属5种及相关类群1种,共6种植物的trnL2trnF序列,并从GenBank中调取相关种的trnL2trnF、rp116及ITS序列,一并进行分支分析,以探讨四数獐牙菜与獐牙菜属以及花锚属的亲缘关系,进一步分析四数獐牙菜的归属问题。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

根据薛春迎<sup>[13]</sup>的分支分析,獐牙菜属划分为4个亚属、9个组,本研究收集了分亚属各个组的代表植物以及其它植物共39种,其中四数獐牙菜(*Swertia tetraptera*)、祁连獐牙菜(*Swertia przew*

*alskii*)、华北獐牙菜(*Swertia wolfgangiana*)、川西獐牙菜(*Swertia mussotii*)、抱茎獐牙菜(*Swertia franchetiana*)、椭圆叶花锚(*Halenia elliptica*)这6种植物材料为野外采集的新鲜叶片。采集后迅速用硅胶干燥,回到实验室后进行总DNA提取及trnL2trnF序列测定。其余种的trnL2trnF以及全部的ITS序列和rp116序列均来自GenBank。同时,由于Chassot等<sup>[12]</sup>的研究中已经确认了Anagallidium的属级地位,因此本研究中将歧散獐牙菜作为Anagallidium的种。样品产地以及其它由基因库中下载以用于本实验系统发育分析的相关序列见表1。

### 1.2 方法

依据改良的CTAB法<sup>[14]</sup>从硅胶干燥的叶片中提取总DNA。对四数獐牙菜、祁连獐牙菜、华北獐牙菜、川西獐牙菜、抱茎獐牙菜、椭圆叶花锚这6种植物cpDNA的trnL(UAA)2trnF(GAA)区段进行PCR扩增,使用通用引物e(5'GGTTCAAGTC2CCTCTATCCC23c)和f(5'ATTTGAACTGGT2GACACGAG23c)<sup>[15]</sup>;扩增反应在Biometra thermal cycler PCR扩增仪上进行,反应体系为25 LL,内含10 @buffer缓冲液2.5 LL,10 mmol/L dNTPs 0.5 LL,总模板DNA 1 LL(10~20 ng),25 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 1.5 LL,正反引物各1 LL(10 pmol/L),Taq DNA聚合酶0.2 LL(5 U),以及ddH<sub>2</sub>O 17.3 LL。扩增反应程序为94e预变性3 min,94e变性1 min,52e退火45 s,72e延伸1 min,35个循环,最后72e保温7 min。

扩增反应结束后1.2%琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物产量和纯度。电泳条带单一整齐,且亮度较高时,扩增产物即可以使用试剂盒进行纯化。选用离心柱型DNA产物纯化试剂盒(Tiangen, Beijing, China)进行纯化。纯化后的PCR产物用1.2%琼脂糖凝胶电泳检测,并用微量核酸蛋白检测仪ND21000(NANODROP, America)进行定量,之后即可进行测序反应。

测序反应在ABI3730XL DNA测序仪上进行,使用ABI公司提供的Bigdye Terminator(Applied Biosystems, America)试剂。测序反应总体体系为10 LL,包含2.5 LL Bigdye Terminator;引物5 pmol;模板25~50 ng,测序反应的条件为95e 8 s,95e 15 s,50e 15 s,60e 90 s,25个循环;60e 90 s,4e 5 min。

最后在DNA测序仪上收集数据。trnL2trnF

范围根据 GenBank 下载的植物序列确定, 新测序列注册于 GenBank 中(正在注册)。所有种类的序列号见表 1。

### 1.3 数据分析

序列排列用 Clustal X 软件完成<sup>[16]</sup>, 排好的序列利用 PAUP4.0 软件进行系统发育分析。在以大

表 1 试验材料来源及其序列号

Table 1 Source of material and GenBank accession number used in the experiment

分类群 Taxa	采样地 Locality	凭证标本 Voucher	序列号 GenBank accession No.			
			ITS	trnL2trnF	rp116	
獐牙菜亚属 Subgen. Swertia	膜边獐牙菜(组模式种) <i>S. marginata</i>	GenBank	DQ317505	AF102486	DQ317470	
	祁连獐牙菜 <i>S. przewalაკii</i>	青海门源 Menyuan, Qinghai	(S. L. Chen) 0524	AF255913	DQ317460	
	折皱组 Sect. Rugosa	华北獐牙菜 <i>S. wolfgangiana</i>	青海门源 Menyuan, Qinghai	(S. L. Chen) 0523	AF255914	
	二叶獐牙菜 <i>S. bifolia</i>	GenBank	DQ317490		DQ317472	
	康定獐牙菜 <i>S. souliei</i>	GenBank			DQ317455	
	獐牙菜组 Sect. Swertia	宿根獐牙菜(组模式种) <i>S. perennis</i>	GenBank	AJ580550	AY251774	
	红直獐牙菜 <i>S. erythroicta</i>	GenBank	AF251122		DQ317458	
热带山地组 Sect. Montana	(组模式种) <i>S. volkensis</i>	GenBank	AJ318571	AJ315269	AJ294566	
	<i>S. kilimandscharica</i>	GenBank	AJ318564	AJ315262		
獐牙菜属 Swertia	狭叶獐牙菜(组模式种) <i>S. angustifolia</i>	GenBank	FJ010793	AJ315249	DQ317463	
	川西獐牙菜 <i>S. mussoii</i>	青海玉树 Yushu, Qinghai	(S. L. Chen) 0520	AF255915	DQ317473	
	抱茎獐牙菜 <i>S. franchetiana</i>	青海湟源 Huangyuan, Qinghai	(S. L. Chen) 0525	AF255916	DQ317462	
	丽江獐牙菜 <i>S. delavayi</i>	GenBank			DQ317461	
	观赏獐牙菜 <i>S. decora</i>	GenBank			DQ317467	
	多枝组 Sect. Ophelia	劝禄獐牙菜 <i>S. luquanensis</i>	GenBank			DQ317454
	紫红獐牙菜 <i>S. punicea</i>	GenBank			AJ294567	
	云南獐牙菜 <i>S. yunnanensis</i>	GenBank			DQ317468	
	细瘦獐牙菜 <i>S. tenuis</i>	GenBank			DQ317464	
	大籽獐牙菜 <i>S. macrosperma</i>	GenBank			DQ317469	
	獐牙菜 <i>S. bimaculata</i>	GenBank			AJ411000	
	异花组 Sect. Heteranthos	四数獐牙菜(组模式种) <i>S. tetraptera</i>	青海化隆 Hualong, Qinghai	(S. L. Chen) 0506	AF346013	DQ317459
	宽丝组 Sect. Platynema	普兰獐牙菜 <i>S. ciliata</i> (组模式种)	GenBankF	J010798	FJ010814	
		西南獐牙菜 <i>S. cincta</i>	GenBank	AY551185		DQ317465
	毛獐牙菜 <i>S. pubescens</i>	GenBank		AJ315266	DQ317466	
藏獐牙菜组 Sect. Kingdon2 Wardia	藏獐牙菜(组模式种) <i>S. racemosa</i>	GenBank	FJ010807	FJ010823		
肉根亚属 Subgen. Poeiphila	多茎獐牙菜(组模式种) <i>S. multicaulis</i>	GenBank	FJ010799	FJ010815		
	大花组 Sect. Macranthos	<i>S. pseudohookeri</i>	GenBank	AJ318567	AJ315265	
密花亚属 Subgen. Fraseria	<i>S. albomarginata</i>	GenBank	AJ318535	AJ315233		
	<i>S. speciosa</i>	GenBank	Z48146	AJ315276		

续表 1 Continued Table 1

	椭圆叶花锚 <i>H. elliptica</i>	青海囊谦 Nangqian, Qinghai	(S. L. Chen) 0522	AF346012	AJ410979
	<i>H. weddelliana</i>	GenBank		AJ315240	AJ410999
	<i>H. brevicornis</i>	GenBank		AJ315238	AJ410969
花锚属 <i>Halenia</i>	<i>H. rusbyi</i>	GenBank			AJ410993
	<i>H. serpyllifolia</i>	GenBank			AJ410995
	<i>H. pulchella</i>	GenBank			AJ410990
	<i>H. viridis</i>	GenBank			AJ410998
	<i>H. rhyacophila</i>	GenBank			AJ410992
Anagallidium	歧散獐牙菜 <i>A. dichotoma</i>	GenBank		DQ317488	DQ317457
扁蕾属 <i>Gentianopsis</i>	大花扁蕾 <i>G. grandis</i>	GenBank		AF346007	AJ315273
					DQ317483

花扁蕾(*Gentianopsis grandis*)为外类群,用 PAUP4.0 软件<sup>[17]</sup>做最大简约法分析时,空位(gap)始终作为缺失状态,采用启发式搜索(Heuristic search),1 000 次随机加入,TBR 枝长交换。利用 bootstrap(1 000 次重复)检验各分支的置信度。

## 2 结果与分析

### 2.1 基于 trnL2trnF 序列的分类

本实验测得的 6 种獐牙菜属植物的 trnL2trnF 区序列和从 Genebank 获得的 13 种獐牙菜属和花锚属植物的 trnL2trnF 区序列的长度范围为 342~377 bp。空位作为缺失处理时, trnL2trnF 序列排序后的长度为 421 bp,对 421 个位点进行了分析,变异位点 99 个(包括 41 个信息位点)。以大花扁蕾为外

类群,用最大简约法(启发式搜索)获得 3 个最简约树,简约树长度为 123 步,一致性指数(CI)和维持性指数(RI)分别为 0.894 3 和 0.105 7,利用 3 个最简约树获取严格一致树,如图 1 所示。在 trnL2trnF 系统发育树中,所研究的獐牙菜属和花锚属类群分为 4 支:多枝亚属和肉根亚属所选类群聚为一支,自展支持率为 70%;獐牙菜亚属的代表种聚为一支,自展支持率为 57%;密花亚属的种单独聚为一支;第 4 支则由花锚属的 3 个种和四数獐牙菜组成,自展支持率为 70%。

### 2.2 基于 ITS 序列的分类

ITS 序列的长度范围为 604~625 bp,对位排列后长度为 642 bp,对 642 个位点进行了分析,其中稳定位点 436 个,变异位点 206 个(包括 126 个信息位

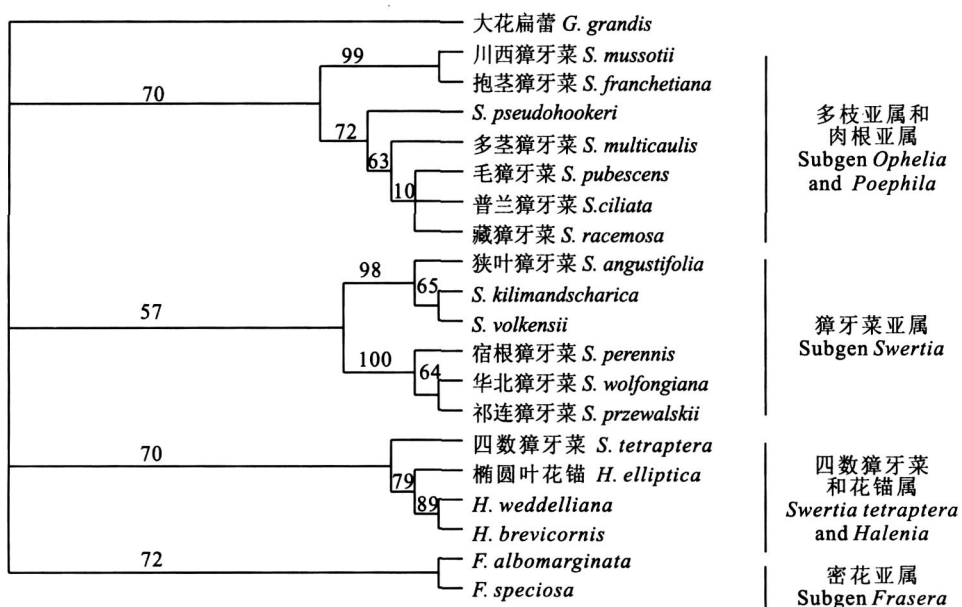


图 1 基于 trnL2trnF 区序列分析得到的最大简约树

图中的数字表示分支自展支持率;下同

Fig. 1 The strict consensus tree of three most parsimonious trees generated from trnL2trnF sequences

Numerals on the branches indicate percentage support in 1 000 bootstrap replicates; The same as below

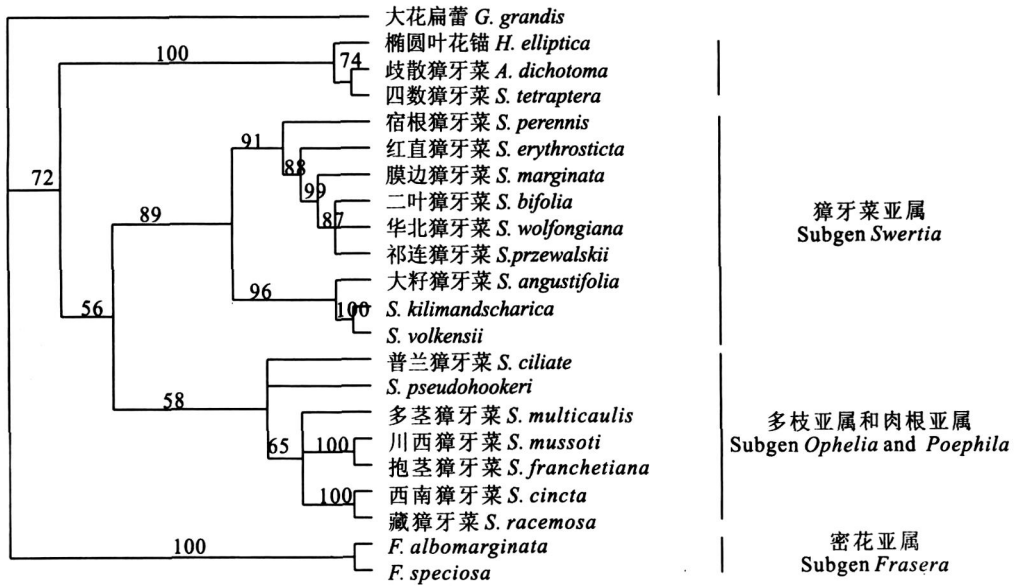


图 2 基于 ITS 区序列分析得到的最大简约树

Fig. 2 The strict consensus tree of 15 most parsimonious trees generated from nrDNA ITS sequences



图 3 基于 *rpl16* 区序列分析得到的最大简约树

Fig. 3 The strict consensus tree of three most parsimonious trees generated from *rpl16* sequences

点)。以大花扁蕾为外类群,当空位作缺失处理时,用最大简约法(启发式搜索)获得 15 个最简约树,简约树长度为 379 步,一致性指数(CI)和维持性指数(RI)分别为 0.717 7 和 0.708 4,利用 15 个最简约树获取严格一致树,如图 2 所示。在 ITS 系统发育树中,21 种獐牙菜属、花锚属和 *Anagallidium* 属植物分为 3 支,多枝亚属和肉根亚属的代表种先聚为一支,再与獐牙菜亚属的代表种构成一个支持率较高的分支。比较有趣的是,作为多枝亚属热带山地组的模式种 *S. volkensis* 和多枝组的模式种 *S. angustifolia* 聚为一支并聚于獐牙菜亚属支。四数獐牙菜与 *Anagallidium* 属的 *A. dichotoma* 以及 *H. elliptica* 则聚为另一个分支,自展支持率同样较高。而来自密花亚属的代表种则形成第 3 个支持率很高的分支。

### 2.3 基于 *rpl16* 序列的分类

*rpl16* 的序列长度范围为 693~713 bp,对位排列后长度为 748 bp,对 748 个位点进行了分析,变异位点 95 个(包括 41 个信息位点)。以大花扁蕾为外类群,当空位作缺失处理时,用最大简约法(启发式搜索)获得 12 个最简约树,简约树长度为 150 步,一致性指数(CI)和维持性指数(RI)分别为 0.800 0 和 0.200 0,利用 10 个最简约树获取严格一致树,如图 3 所示。*rpl16* 系统发育树的拓扑结构与 ITS 和 *trnL2trnF* 系统发育树的不大一样,系统发育树并没按照薛春迎的分类系统中的亚属进行分类,而是分为 5 支,自展支持率都较高,分别为 86%、90%、82%、69%、78%。所选的所有獐牙菜亚属的类群聚为第 1 支;第 2 支则由四数獐牙菜、歧散獐牙菜、獐牙菜以及花锚属的植物共同组成;作为多枝亚属热带山地组的模式种 *S. volkensis* 和多枝组的模式种 *S. angustifolia* 聚为第 3 支,勐禄獐牙菜(*S. luquanensis*),观赏獐牙菜(*S. decora*)和丽江獐牙菜(*S. delavayi*)聚为第 4 支,最后一支则由多枝亚属

剩余的种和肉根亚属的模式种共同组成。

## 3 讨论

何廷农<sup>[1]</sup>根据四数獐牙菜(*S. tetraptera*)主茎上的花较侧枝上的花大,呈明显的异型而建立异花组,并根据四数獐牙菜在一些形态、习性和花部特征上与獐牙菜属多枝亚属的其它种有较多相似的特征,如一年生草本,基生叶花期枯萎,花冠基部具 2 个腺窝将异花组归入獐牙菜属的多枝亚属中。而史刚荣<sup>[9]</sup>、薛春迎等<sup>[8]</sup>、Chassot 等<sup>[10]</sup>分别通过对胚胎学和花粉形态学的研究认为,四数獐牙菜的花粉形态和胚胎学特征与花锚属的椭圆叶花锚有更多的相似之处。基于 *trnL2trnF* 序列和 ITS 序列的分析表明,四数獐牙菜与椭圆叶花锚形成一单系支。在本研究中,对四数獐牙菜及其相关种的 *trnL2trnF*、ITS 和 *rpl16* 序列进行的分析显示,尽管在构建 3 种系统发育树时所用的种和数量有所不同,所得到的 3 种系统发育树的拓扑结构也不一致,但就四数獐牙菜的系统位置而言,3 种系统发育树中的结果基本一致。在 *trnL2trnF* 系统发育树中,四数獐牙菜与花锚属的 *H. elliptica*、*H. brevicornis* 和 *H. weddelliana* 形成了一个单系群;而在 ITS 和 *rpl16* 系统发育树中,四数獐牙菜与歧散獐牙菜先聚在一起,再与花锚属的植物聚为一支支持率较高的单系支。从这些结果可以看出,四数獐牙菜与 *Anagallidium* 属的歧散獐牙菜亲缘关系最近,其次是与花锚属的植物,而与獐牙菜属植物的亲缘关系较远。

综上所述,核糖体 DNAITS 区序列、*cpDNA trnL2trnF*、*rpl16* 区序列分析结果和胚胎学等方面特征均支持将四数獐牙菜从獐牙菜属分离出来。此外,ITS 和 *rpl16* 系统发育树的结果都支持 Griseb<sup>[3]</sup>、薛春迎<sup>[4]</sup>以及 He 等<sup>[5]</sup>将四数獐牙菜放入 *Anagallidium* 属的观点。

### 参考文献:

- [1] HE T N(何廷农), LIU SH W(刘尚武). New taxa of domestic *Sweretia*[J]. *Acta Phytotaxonomica Sinica* (植物分类学报), 1980, 18(1): 75- 85(in Chinese).
- [2] GRISEBACH A H R. Genera species *Gentianarum* adjectis observationibus quibusdam phytogeographicis[J]. *J. L. Cotta, Stuttgart, Tubingen*, 1839: 311- 315.
- [3] GRISEBACH A H R. *Gentianaceae*[A]. In: De Candolle, *Prodromus*, 1845, 9: 86- 119.
- [4] XUE CH Y(薛春迎), HE T N(何廷农), LIU J Q(刘建全). Embryology of a Tibetan medicine *Helenia elliptica*[J]. *Acta Botanica Yunnanica* (云南植物研究), 1999, 21(2): 212- 217(in Chinese).

- [5] HE T N(何廷农), SHI W L(施文良). Qingxuedan and dauda Chinese medical herbs for treating hepatitis[J]. Acta Phytotaxonomica Sinica (植物分类学报), 1976, 14(2): 63- 65(in Chinese).
- [6] 薛春迎. 獐牙菜属的系统学研究[D]. 成都: 四川大学生命科学院, 2000: 35- 43.
- [7] XUE CH Y(薛春迎), LIU J Q(刘建全), LIAO ZH X(廖志新). Development and anatomy of floral nectary of three species in Swertia L. (Gentianaceae)[J]. Acta Bot. Boreo-Occident. Sin. (西北植物学报), 2001, 21(1): 112- 116(in Chinese).
- [8] XUE CH Y(薛春迎), HE T N(何廷农), LIU J Q(刘建全). Embryology of Swertia tetraptera Maxim. (Gentianaceae) and its systematic implication[J]. Acta Phytotaxonomica Sinica (植物分类学报), 1999, 37(3): 259- 263(in Chinese).
- [9] SHI G R(史刚荣). Cluster analysis for embryological characters of 12 species in Gentianaceae[J]. Journal of Huaibei Coal Industry Teachers College(淮北煤炭师范学院学报), 2004, 25(2): 51- 55(in Chinese).
- [10] P CHASSOT K, BERNHARD VON HAGEN. Pollen morphology of the Swertiinae (Gentianaceae): phylogenetic implications[J]. Botanical Journal of the Linnean Society, 2008, 157: 323- 341.
- [11] YUAN Y M, KUPFER P. Molecular phylogenetics of the subtribe Gentianinae (Gentianaceae) inferred from the sequences of internal transcribed spacers (ITS) of nuclear ribosomal DNA[J]. Pl. Syst. Evol., 1995, 196: 207- 226.
- [12] P CHASSOT, S. NEMOMISSA, YUAN Y M, et al. High paraphyly of Swertia L. (Gentianaceae) in the gentianella lineage as revealed by nuclear and chloroplast DNA sequence variation[J]. Plant Systematics and Evolution, 2001, 229: 1- 21.
- [13] XUE CH Y(薛春迎), LIU J Q(刘建全), LI D ZH(李德铎). Morphology and anatomy of flower nectary of Swertia L. (Gentianaceae)[J]. Acta Bot. Yunnan(云南植物研究), 2002, 24(3): 359- 369(in Chinese).
- [14] 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.
- [15] TABERLET P, GIELLY L, PAUTOU G, et al. Universal primers for the amplification of three noncoding regions of chloroplast DNA[J]. Plant Molecular Biology, 1991, 17: 1 105- 1 109.
- [16] THOMPSON J D, GIBSON T J, PLEWNIAC F, et al. The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools[J]. Nucleic Acids Research, 1997, 25: 4 876- 4 882.
- [17] SWOFFORD D L. PAUP 4. 0: Phylogenetic analysis using parsimony (and other methods). Beta version 4. 0 b 10. Sunderland: Sinauer Associates, 2002.

## 5 西北植物学报6参考文献著录体例

### 1. 外文期刊文献著录格式:

序号 y 全部作者 y 论文题目 y 期刊名称(斜体) y 发表年份 y 卷(期) y 页码。

例如:

- [19] HAMMONDE T, ANDEREWIS T J, MOTT K A. Regulation of Rubisco activation in antisense plants of tobacco containing reduced levels of Rubisco activase[J]. Plant J., 1998, 4(2): 101- 110.

### 2. 中文期刊文献著录格式:

序号 y 全部作者(括号中注明姓名的中文) y 论文题目 y 期刊名称(英文亦可用拉丁文,斜体并在括号中注明中文期刊名) y 发表年份 y 卷(期) y 页码(in Chinese).

例如:

- [47] YAO C P(姚彩萍), WANG Z Y(王宗阳), CAI X L(蔡秀玲), ZHANG D(张 栋), ZHANG J L(张景六), HONG M M(洪孟民). Effect of 5' upstream region on rice waxy gene expression[J]. Acta Phytophysiol. Sin. (植物生理学报), 1996, 22(4): 431- 436(in Chinese).

### 3. 教材、实验指导、论文集和专著按以下格式著录:

序号 y 全部作者 y 书名 y 出版地 y 出版社名称 y 出版年份 y 页码。

例如:

- [2] 李扬汉. 植物学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1993: 85- 107.

未注明事项请继续沿用5西北植物学报6参考文献的传统著录格式。