

## 珍稀药用植物红根草野生及离体快繁群体的遗传多样性

黄宁珍\*, 付传明, 赵志国, 唐凤鸾, 覃艳, 石云平

广西壮族自治区/中国科学院广西植物研究所, 广西桂林541006

**摘要:** 红根草是一个有重要药用价值的珍稀濒危药材植物。为了更好地了解红根草野生和组培快繁种质的遗传多样性信息, 本文用RAPD和ISSR分子标记技术, 对红根草4个野生种群及一个离体快繁群体进行遗传多样性分析, 为物种保护和繁育提供理论依据。结果显示, 在物种水平上, 该物种的遗传多样性水平中等, Nei基因多样性指数(H)、Shannon信息多样性指数(I)和多态性位点百分率(PPL)分别为0.237/0.248 (RAPD/ISSR, 下同)、0.365/0.380和78.4%/81.1%; 遗传变异大多数(70.5%/81.5%)发生在种群内、少部分(29.5%/18.5%)发生在种群间; 野生种群的基因流为1.21/2.20, 但UPGMA聚类分析结果表明, 距离35 km以上的种群遗传分化明显, 因此推测基因流动主要存在于种群内, 地理距离是种群分化的主要原因。在居群水平上, H、I和PPL三项遗传多样性参数分别为0.167/0.202、0.253/0.303和51.7%/58.0%; 离体快繁群体的RAPD分析结果显示, 其遗传多样性高于其原野生种群, 这一结果暗示, 离体快繁过程中可能发生了体细胞变异, 这些变异与RAPD-PCR区域有关。

**关键词:** 红根草; 遗传多样性; 离体快繁; 体细胞变异; RAPD; ISSR

## Genetic Diversity of Wild and *in vitro* Proliferation Plants of *Salvia prionitis* Hance, a Rare Chinese Herb

HUANG Ning-Zhen\*, FU Chuan-Ming, ZHAO Zhi-Guo, TANG Feng-Luan, QIN Yan, SHI Yun-Ping

Guangxi Institute of Botany, Guangxi Zhuangzu Autonomous Region and Chinese Academy of Sciences, Guilin, Guangxi 541006, China

**Abstract:** *Salvia prionitis* Hance is an endangered and valuable Chinese herb in south of China. In this study, the genetic diversity of four wild and one *in vitro* proliferation populations of *S. prionitis* was tested by using RAPD (random amplified polymorphic DNA) and ISSR (inter simple sequence repeat) markers for finding out genetic diversity information of wild and tissue culture source material and providing theory foundation for species protection and proliferation. RAPDs/ISSRs results indicated that the genetic diversity at species level was moderate. The Nei's gene diversity index (H), Shannon's information index (I), and percentage of polymorphic loci (PPL) were 0.237/0.248, 0.365/0.380, and 78.4%/81.1% respectively. The large proportion of genetic variation (70.5%/81.5%) resided within populations and only a small proportion (29.5%/18.5%) resided among populations. A high gene flow (1.21/2.20) was found in wild populations. But results of UPGMA cluster analysis showed that clear differentiation resided between populations of which the distance was over 35 km. It suggested that the most of gene flow was within population. Geographic obstructing might be the major reason of population's differentiation. In population level, the values of H, I, and PPL were 0.167/0.202, 0.253/0.303, and 51.7%/58.0% respectively. However, for the plants *in vitro* proliferation, the value of H, I, and PPL were abnormal higher than its wild source population when tested by RAPDs. It suggested that somatic mutations probably occurred during tissue culture. And these mutations were likely to relate to RAPD-PCR regions.

**Key words:** *Salvia prionitis* Hance; genetic diversity; *in vitro* proliferation; somatic mutations; RAPD; ISSR

红根草(*Salvia prionitis* Hance)为唇形科(Labiatae)鼠尾草属多年生草本植物, 又名红地胆、红根子、小丹参、黄埔鼠尾, 主要分布于我国广西、江西等南方各省, 生于山坡、路旁阳处草丛中或疏林下, 其味微苦、性凉, 有清热解毒、抗菌消炎的功能。民间常用于治疗急性扁桃腺炎、咽喉炎、支气管炎、肠炎、细菌性痢疾等炎症。广西

区内先后出现多家加工企业, 其中“桂林三金药业集团”生产的“复方红根草片”是国家重点保护的中

收稿 2011-06-27 修定 2011-08-17  
资助 广西科技攻关项目(桂科攻0322024-3B和桂科攻0992003B-31)。

\* 通讯作者(E-mail: hnzhen68@yahoo.com.cn; Tel: 0773-2900645)。

药品种。自杨保津等(1988)首次从红根草中分离到红根草邻醌, 证实它对P388白血病细胞有很强的抑制作用后, 张金生和黄勇(1995)从红根草中分离出红根草酮内酯(prioketolactone)等多个新成分, 并且以红根草邻醌为先导化合物, 通过化学结构修饰后得到一个名为沙尔威辛(salvicine)的二萜醌(diterpenequinone)类化合物, 具有较强的体内抗肿瘤活性, 对肺癌、胃癌、卵巢癌、肝癌、结肠癌和宫颈癌等实体瘤细胞的增殖生长具有显著的抑制作用, 对胃癌和肺癌有一定选择性(Zhang等1999)。药理实验证实, 沙尔威辛具有抑制癌细胞生长和阻断其修复再生通路双重作用, 在治疗癌症的同时, 可阻止其复发, 毒副作用低于现有的同类药物, 是一类具有抗耐药、抗转移、毒性轻微的DNA拓扑异构酶II新型抑制剂, 有望成为我国具有自主知识产权的抗肿瘤新药, 并已进行I、II期临床研究(卿晨1999; 罗志国2005; Lang等2005; Zhou等2008)。

在野外调查中我们发现, 红根草在野生自然条件下多数以10~100株的小群出现, 小群中个体数量的多少和植株大小与分布地的人畜活动和土地肥沃程度有关。伐木、放牧、垦荒等农事活动, 极大破坏了红根草的生存环境; 加上企业收购和产区群众大量采挖, 红根草资源正在迅速减少, 分布地域变得小而破碎, 目前红根草在许多产区已经绝迹, 种质资源处于濒危状态。另外, 在多年的引种栽培中我们发现, 引种的红根草年产籽数量高达每株500~2 000粒, 但种子发芽率极低, 栽培地及其周围未发现新增个体, 室内播种实验也未见其萌发, 可见, 该物种必须通过人工手段进行繁育和保护。我们的相关研究也显示, 组培快繁是大量繁育红根草种苗的有效方法(唐凤鸾等2006)。为了更好地了解红根草野生种群的遗传多样性以及组培繁育对红根草后代群体遗传多样性的影响, 本研究采用RAPD和ISSR两种分子标记, 对红根草野生和组培快繁材料进行遗传多样性分析, 为正确保护和繁育其种质提供理论指导。

## 材料与方法

### 1 材料

#### 1.1 植物材料

(1)红根草(*Salvia prionitis* Hance)野生种群。

在本研究中, 共采集4个红根草野生种群, 分别来自广西桂林地区的永福县寿城(SC)和苏桥(SQ)、阳朔县葡萄(PT)和临桂县四塘(ST) 4个地方, 4个居群分别命名为SC、SQ、PT和ST。每个居群选取3~5个小群共22~24个植株为采样株, 每株采集鲜叶2~5 g为一份样品; 4个居群共采集鲜叶样品94份, 贮存于-72 °C的冰箱中, 用于DNA提取。居群分布和每个居群的采样数量见图1和表1。

(2)红根草组培快繁材料。红根草组培快繁材料来自SC居群, 组培快繁参照唐凤鸾等(2006)的方法, 将来自不同植株的50个无菌外植体, 通过5次继代后生根并移栽, 移栽苗在温室大棚中培养70 d左右, 小苗长出7~10片真叶, 每株采集2~5 g叶片, 共采集20个样品, 为组培快繁种群, 命名为ZP(表1)。

#### 1.2 引物

RAPD引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成, 共100条, 编号和序列与该公司公布

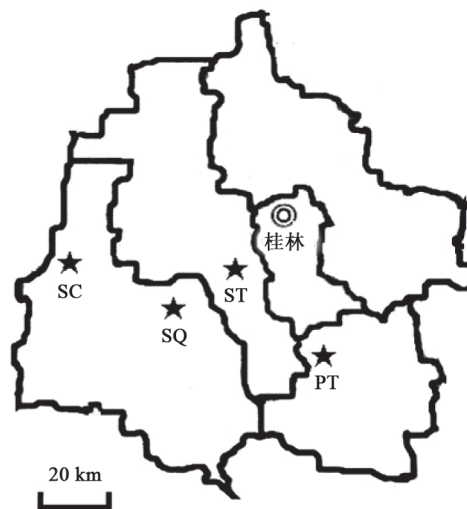


图1 红根草4个居群在桂林地区的分布

Fig.1 Localities of four populations of *S. prionitis* in Guilin

表1 居群名称、分布地和每个居群的采样数量

Table 1 Population appellation, distributing loci, and samples collected in this study

居群名称	居群分布地(经/纬度)	采集的个体数量
SC	广西永福县寿城(109.78/25.16)	24
SQ	广西永福县苏桥(110.05/25.11)	22
PT	广西阳朔县葡萄(110.43/24.91)	24
ST	广西临桂县四塘(110.05/25.22)	24
ZP	来自SC居群的离体快繁群体	20

的《Sangon产品目录》内的引物序号和序列相同。ISSR引物序列采用加拿大British Columbia大学公布的序列,由上海生工生物工程技术有限公司合成,共65条。

## 2 方法

### 2.1 DNA分离提取

植株总DNA提取参照李合生(2000)的方法,并用北京鼎国生物技术有限责任公司生产的DNA片段快速纯化/回收试剂盒纯化总DNA,用1.0%琼脂糖电泳检测DNA质量。

### 2.2 RAPD-PCR反应条件及程序

RAPD-PCR反应条件为: 25  $\mu$ L的反应液内含模板20~50 ng, 4种dNTP各0.2 mmol·L<sup>-1</sup>, 引物0.3  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup>, 2.0 mmol·L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>, 10 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl pH 8.3, 5 mmol·L<sup>-1</sup> KCl, 1 U· $\mu$ L<sup>-1</sup> Taq酶。RAPD-PCR扩增程序: 94 °C预变性5 min; 94 °C变性1 min, 36 °C复性45 s, 72 °C延伸2 min, 40个循环; 循环结束后72 °C延伸5 min。PCR产物在1.5%琼脂糖上电泳, 溴化乙锭染色, 凝胶成像仪上观察、照像和记录。

### 2.3 ISSR-PCR反应条件及程序

ISSR-PCR反应体系组成与RAPD-PCR相同。ISSR-PCR扩增程序: 94 °C预变性5 min; 94 °C变性1 min, 52 °C复性45 s, 72 °C延伸2 min, 40个循环; 循环结束后72 °C延伸5 min。PCR产物在1.5%琼脂糖上电泳, 溴化乙锭染色, 凝胶成像仪上观察、照像和记录。

### 2.4 引物筛选

为了获得RAPD-PCR和ISSR-PCR反应引物,在差异较大的2个居群中各选2份DNA样本进行引物筛选,在100个RAPD和65个ISSR引物中,分别选出重复性好、可产生清晰条带的RAPD引物14条、ISSR引物9条,用于进行下一步的PCR分析(表2)。

### 2.5 扩增产物和差异带的分析方法

根据两种分子标记PCR条带的迁移率及其有无统计所有的二元数据,有带记作1,无带记为0,强带和弱带均赋值为1,仅在重复实验中能稳定出现的差异条带才被记录,得到原始数据矩阵。首先,用POPGENE软件(Yeh等1997)分别计算如下参数: (1)多态性位点百分率(percentage of polymorphic loci, PPL); (2) Shannon信息多样性指数(Shan-

表2 本研究所用的RAPD和ISSR引物序列

Table 2 Primers sequence of RAPD and ISSR used in this study

RAPD		ISSR	
引物编号	引物序列(5'→3')	引物编号	引物序列(5'→3')
A-01	CAGGCCCTTC	856	(AC) <sub>8</sub> (GC)A
S1	GTTTCGCTCC	855	(AC) <sub>8</sub> YT
S10	CTGCTGGGAC	811	(GA) <sub>8</sub> C
S66	GAACGGACTC	835	(AG) <sub>8</sub> YC
S69	CTCACCGTCC	815	(CT) <sub>8</sub> G
S29	GGGTAACGCC	881	(GGGGT) <sub>3</sub>
S95	ACTGGGACTC	812	(GA) <sub>8</sub> A
S86	GTGCCTAACC	841	(CA) <sub>8</sub> RG
S93	CTCTCCGCCA	866	(CTC) <sub>5</sub>
S91	TGCCCGTCGT		
S90	AGGGCCGTCT		
S123	CCTGATCACC		
S369	CCCTACCGAC		
S17	AGGGAACGAG		

Y=C或G; R=A或T。

non's information index, I); (3) Nei基因多样性指数(Nei's gene diversity index, H) (Nei 1973); (4)群体总基因多样性(total gene diversity, Ht)和居群内基因多样性(gene diversity within populations, Hs); (5)居群间基因分化系数(variation among populations, Gst)和基因流(gene flow, Nm); (6) Nei遗传一致度(genetic similarity, GS) (Nei 1972)。其次,用NT-SYS-PC2.11软件(Rohlf 1997)计算个体间的Nei相似性系数,对所有个体进行UPGMA聚类分析。

## 实验结果

### 1 红根草野生种群的遗传多样性

RAPD-PCR扩增结果表明,14个随机引物共扩增出102条重复性好、轮廓清晰的多态性条带,平均每个引物的扩增带数为7.3条。在“居群/物种”水平上,红根草的Nei基因多样性指数 $H_{RAPD}=0.167/0.237$ , Shannon信息多样性指数 $I_{RAPD}=0.253/0.365$ , 多态性位点百分率 $PPL_{RAPD}=51.7\%/78.4\%$ (表3)。

ISSR-PCR扩增结果显示,9个引物共扩增出53条重复性好、轮廓清晰的多态性条带,平均每个引物的扩增带数为5.9条。在“居群/物种”水平上,红根草的Nei基因多样性指数 $H_{ISSR}=0.202/0.248$ , Shannon信息多样性指数 $I_{ISSR}=0.303/0.380$ , 多态性

表3 红根草野生种群和组培材料的遗传多样性

Table 3 Genetic diversity of wild populations and tissue culture materials of *S. prionitis*

分析方法	居群名称	Na	Ne	H	I	PPL/%
RAPD	SC	1.59	1.32	0.194	0.291	57.8
	SQ	1.48	1.26	0.155	0.235	48.0
	PT	1.51	1.31	0.178	0.266	51.0
	ST	1.50	1.23	0.143	0.221	50.0
	居群水平	1.52	1.28	0.167	0.253	51.7
	物种水平	1.78	1.39	0.237	0.365	78.4
ISSR	SC	1.64	1.37	0.217	0.328	64.2
	SQ	1.49	1.24	0.149	0.229	49.1
	PT	1.57	1.38	0.216	0.318	56.6
	ST	1.62	1.39	0.227	0.338	62.3
	居群水平	1.58	1.34	0.202	0.303	58.0
	物种水平	1.81	1.41	0.248	0.380	81.1
RAPD	ZP(SC)	1.68	1.39	0.231	0.347	68.6
ISSR	ZP(SC)	1.49	1.27	0.155	0.235	49.1

Na: observed number of alleles, 观测的等位基因数; Ne: effective number of alleles, 有效等位基因数; H: Nei基因多样性指数; I: Shannon信息多样性指数; PPL: 多态性位点百分率。表4同。

位点百分率 $PPL_{ISSR}=58.0\%/81.1\%$  (表3)。

RAPD和ISSR两种标记系统都能产生各自有效的多态性条带, 从H、I和PPL三种遗传多样性参数看, ISSR标记略高于RAPD标记。两种分子标记的分析结果表明, 红根草野生材料在居群水平的遗传多样性中等, 在物种水平的遗传多样性较高(表3)。因此, 该物种濒危的原因应与物种遗传多样性之外的其他原因有关。

## 2 红根草组培材料的遗传多样性

组培居群ZP源自野生居群SC, 根据预期设想, 正常情况下, 不论是采用RAPD还是ISSR标记, ZP的遗传多样性参数应低于SC。

ISSR分析结果表明, 组培材料的Nei基因多样性指数、Shannon信息多样性指数和多态性位点百分率等3种遗传多样性参数均小于原野生居群( $H_{ZP}=0.155 < H_{SC}=0.217$ ,  $I_{ZP}=0.235 < I_{SC}=0.328$ ,  $PPL_{ZP}=49.1\% < PPL_{SC}=64.2\%$ ) (表3), H、I和PPL降低的幅度分别为28.6%、28.4%和23.5%, 与预期相符合。

而RAPD分析结果则显示, 组培居群的遗传多样性参数高于原野生居群( $H_{ZP}=0.231 > H_{SC}=0.194$ ,  $I_{ZP}=0.347 > I_{SC}=0.291$ ,  $PPL_{ZP}=68.6\% > PPL_{SC}=57.8\%$ ) (表3), H、I和PPL升高的幅度分别为19.1%、

19.2%和18.7%, 与预期相反。产生这种结果的可能原因有两方面, 一是由于RAPD-PCR复性温度(36 °C)较低, 在引物与模板配对过程中可能出现错配现象, 导致多态性条带增加; 二是在组培快繁过程中, RAPD-PCR区域发生了体细胞变异, 导致RAPD标记检测的遗传多样性偏高。为此, 我们反复对居群ZP及SC的DNA样品进行多次RAPD-PCR反应, 取平均数进行统计分析和比较, 结果表明, 居群ZP的遗传多样性参数H、I和PPL均明显高于居群SC (表4)。因此, 推测红根草组培快繁居群遗传多样性偏高, 可能与组培过程中发生的体细胞变异有关, 而且变异位点可能在RAPD-PCR区域。

表4 基于RAPD标记的红根草组培材料和其原野生种群的遗传多样性

Table 4 Genetic diversity of tissue culture materials and their source wild populations of *S. prionitis* based on RAPD

居群名称	分析次数	Na	Ne	H	I	PPL/%
SC	1	1.59	1.32	0.194	0.291	57.8
	2	1.51	1.31	0.178	0.266	51.0
	3	1.60	1.33	0.195	0.292	57.8
	平均	1.57 <sup>a</sup>	1.32 <sup>a</sup>	0.189 <sup>a</sup>	0.283 <sup>a</sup>	55.5 <sup>a</sup>
	ZP	1	1.68	1.39	0.231	0.347
ZP	2	1.60	1.35	0.228	0.342	63.7
	3	1.62	1.36	0.230	0.345	66.7
	平均	1.63 <sup>a</sup>	1.37 <sup>b</sup>	0.230 <sup>b</sup>	0.345 <sup>b</sup>	66.3 <sup>b</sup>

同一列中平均数后相同或不同的小写字母表示差异不显著( $P>0.05$ )或显著( $P<0.05$ )。

## 3 红根草野生材料的遗传结构

野生红根草遗传多样性和遗传变异分布见表5, RAPD/ISSR分析结果显示, 红根草野生群体总基因多样性(Ht)为0.237/0.248, 居群内基因多样性(Hs)为0.167/0.202, 后者为前者的70.5%/81.5%; 居群间基因分化系数为29.5%/18.5%, 居群内基因分化系数为71.5%/81.5%; 基因流(Nm)为1.212/2.203。这些结果说明, 红根草基因多样性和基因分化主要发生在居群内; 对于一年生宿根性植物而言, 其基因流相对较高。

而红根草野生居群的遗传一致度(GS)的RAPD/ISSR分析结果(表6)显示, 4个居群间的GS值在0.8598~0.9392/0.9021~0.9509, 其中最高值出现在PT和ST两个居群间, 说明它们之间的遗传一

表5 基于RAPD和ISSR标记的野生红根草的基因多样性及变异分布

Table 5 Gene diversity and variation distribution of wild *S. prionitis* populations based on RAPD and ISSR marker

分析方法	Ht	Hs	Hs/Ht	Gst	1-Gst	Nm
RAPD	0.237±0.032	0.167±0.016	70.5%	29.5%	71.5%	1.212
ISSR	0.248±0.030	0.202±0.022	81.5%	18.5%	81.5%	2.203

Ht: 群体总基因多样性; Hs: 居群内基因多样性; Gst: 居群间基因分化系数; 1-Gst: 居群内基因分化系数; Nm: 基因流, Nm=0.5 (1-Gst)/Gst。

表6 红根草野生种群间的遗传一致度

Table 6 Genetic similarity (GS) values between wild populations of *S. prionitis*

居群名称	SC	SQ	ST	PT
SC		0.8940	0.8931	0.8693
SQ	0.9257		0.8740	0.8598
ST	0.9106	0.9387		0.9392
PT	0.9134	0.9021	0.9509	

对角线右上方和左下方分别为RDPA和ISSR分析结果。

致度相对较高。根据居群间的相似性系数构建聚类图, 基于RAPD数据的聚类图(图2)显示, 距离最远(约35 km)的2个居群为SC和PT居群, 遗传分化明显, 为两个独立的居群; 距离较近的2个居群ST和SQ, 有少量个体混杂在一起。而基于ISSR数据的聚类图(图3)则显示, 4个居群共94个个体中, 仅PT居群的20个个体、SC居群的17个个体能聚类成群, 其他个体则混杂在一起。对两种标记的遗传相似系数矩阵进行相关分析, 结果表明, RAPD和ISSR分析结果的相关系数为0.369, 显示两种方法所得结果相关性并不高。上述结果表明, RAPD和ISSR两种标记在结果取向上虽然一致, 但其量化统计结果则表现出较大差异。

## 讨 论

### 1 红根草的种群状态与遗传多样性和遗传结构的关系

红根草曾是一种广泛分布于我国南方各省区的药用植物, 然而, 随着环境的变化和人为因素的影响, 其分布地生境破碎、种群萎缩、个体数量越来越少。Hamrick等(1991)认为, 与窄域分布种相比, 广布种趋于具有更高的遗传多样性水平。根据本文的研究结果, 红根草Nei基因多样性指数  $H_{RAPD}/H_{ISSR}=0.237/0.248$ , 多态性位点百分率  $PPL_{RAPD}/PPL_{ISSR}=78.4\%/81.1\%$ , 在物种水平上的遗传多样性

为中等以上, 是一个遗传多样性较为丰富的物种, 其目前的种群状态与人为破坏密切相关, 而与物种遗传多样性关联不大。

群体大小、生境片段化和种群萎缩等因素可能影响物种的再生能力(Fischer等2000)。Lamont等(1993)研究发现, 生境片段化使濒危植物古特贝克斯(*Banksia goodie*)繁殖力降低, 单独存在的个体繁殖力甚至降低为零。Nason和Hamrick (1997)也发现, 较小生境上的槟榔青属植物 *Spondias mombin* 种群的繁殖成功率低于大片断生境和连续生境上的种群, 同时小生境种群的种子萌发率也低于大片断生境和连续生境的种群。在引种栽培过程中, 我们发现, 红根草产籽量高达每株500~2 000粒, 但定植6年的栽培地及其周围一直没有发现新增的小植株; 室内种子萌发实验也发现, 这些种子的萌发率为0。而在十多年前, 红根草种子萌发率为7%左右(未发表的数据)。因此, 红根草和其他一些植物一样, 生境片段化和种群萎缩降低了该物种的繁殖能力, 加剧了物种的濒危风险(Boyce 1992; Pullin 2002; Van Dyke 2003)。

在遗传结构研究中, RAPD和ISSR分析结果都表明, 红根草种群间的遗传分化比较明显, 并且与种群间的地理距离相关, 如种群SC和PT地理距离最远, 两个种群间遗传分化程度最明显。作为宿根性一年生植物, 红根草的基因流也相对较高( $Nm_{RAPD}/Nm_{ISSR}=1.212/2.203$ )。根据Widen和Svensson (1992)的理论, 基因流超过1.0的一年生宿根性植物属混交或异型杂交植物。红根草花器官的形态与唇形科鼠尾草属其他物种一样, 是一类花柱异长和雌雄蕊异熟植物(中国科学院中国植物志编辑委员会1977), 雄、雌蕊伸出花冠, 且雌蕊比雄蕊长; 雌雄异熟以及柱头与花药彼此相反的位置, 使花的雌、雄器官在时间和空间上得以分开, 从而加大了异花授粉的可能性。尽管目前为止, 我们

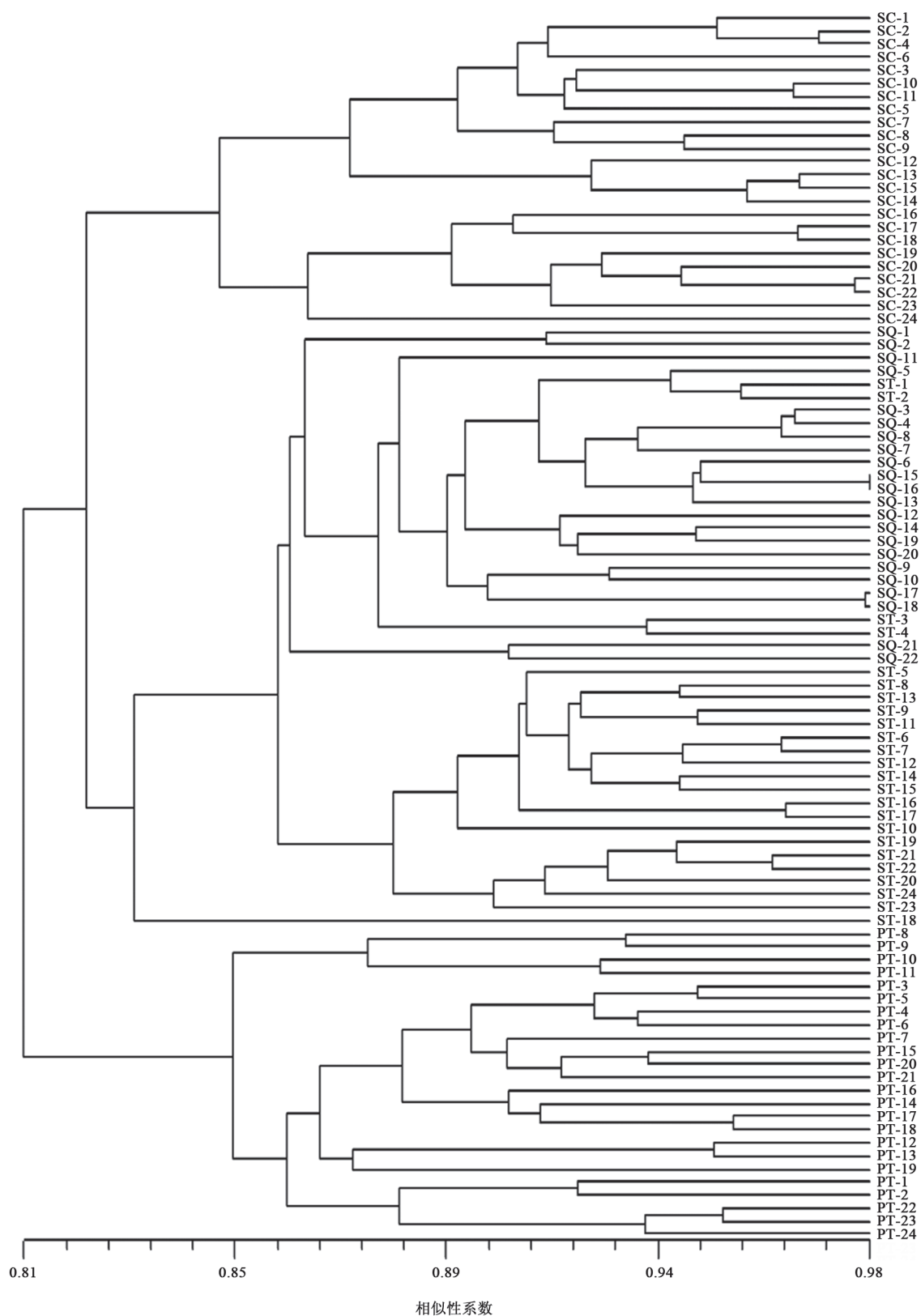


图2 基于RAPD相似性系数构建的红根草4个野生种群的UPGMA聚类图  
Fig.2 UPGMA dendrogram of four wild populations of *S. prionitis* based on RAPD data  
种群编号后的数字表示不同的个体。

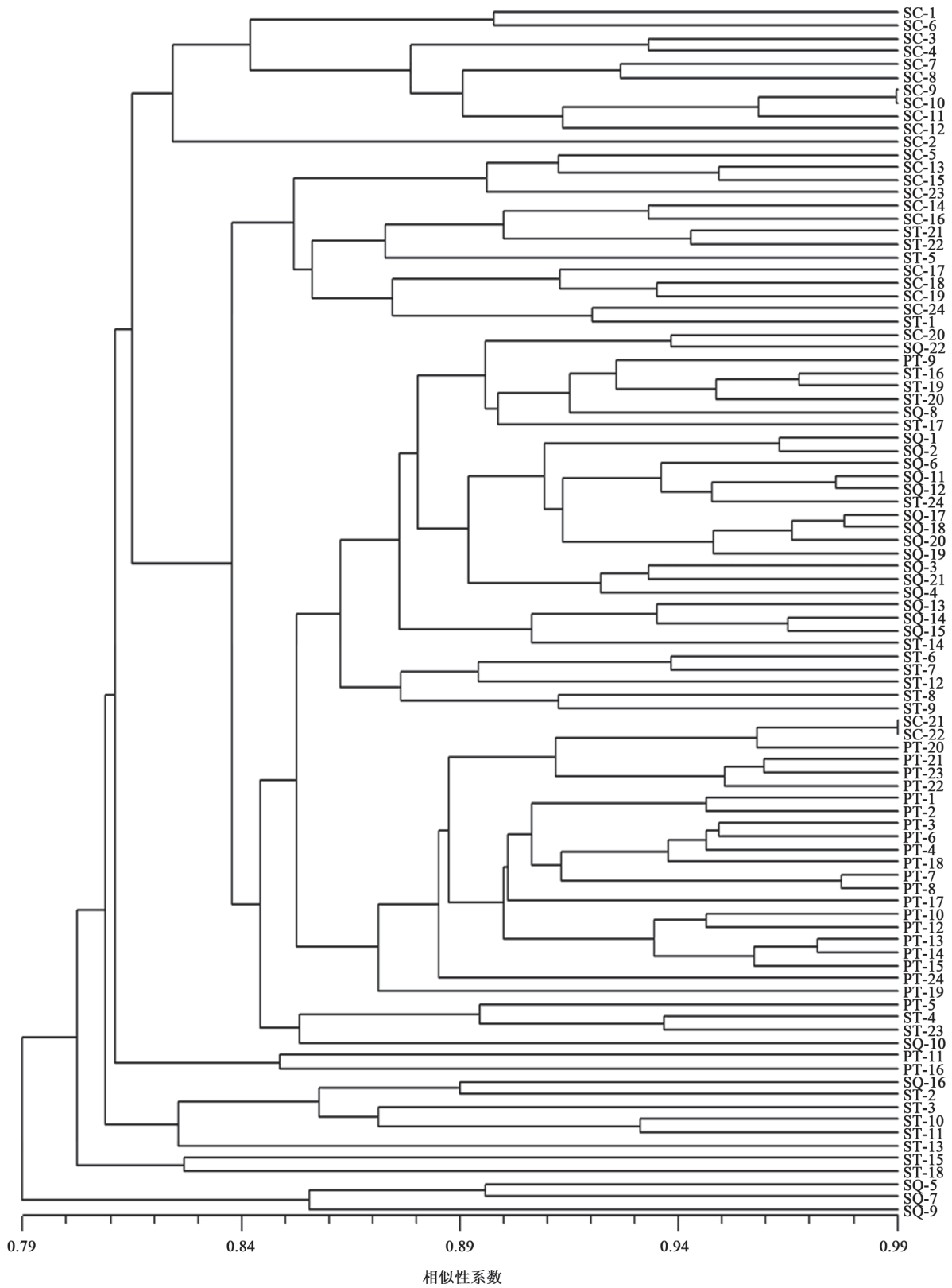


图3 基于ISSR相似性系数构建的红根草4个野生种群的UPGMA聚类图  
Fig.3 UPGMA dendrogram of four wild populations of *S. prionitis* based on ISSR data  
种群编号后的数字表示不同的个体。

没有详细的实验证据证明红根草以何种方式授粉结籽, 也没有相应的数据说明种子的育性与授粉方式的关系。但其较高的基因流说明, 群体中绝大多数个体应属杂交个体。

## 2 红根草组培材料的遗传多样性

组织培养与快速繁殖是珍稀濒危植物保护和繁育的重要手段之一, 但组培快繁的后代群体通常源自少量个体, 遗传多样性遗失和相关功能下降等难以避免。组培快繁群体若用于种质保育, 其遗传多样性变化则是人们关注的首要内容。因此, 在进行红根草组培快繁时, 我们的思路是尽可能多采集不同的植株为外植体材料, 并且继代的次数不宜过多, 以保证后代群体的遗传多样性水平。本文中的红根草无菌外植体分别来自50个不同的个体, 继代次数仅为5代。根据已有研究报道, 在自然界中以营养繁殖为主的水葫芦(*Eichhornia crassipes*)、沙鞭(*Psammochloa villosa*)和西伯利亚鸢尾(*Iris sibirica*)的无性克隆群体或亚群体的遗传多样性均较低(Li等2006; Li和Ge 2001; Kostrakiewicz和Wroblewska 2008)。在本研究中, ISSR分析获得的红根草组培群体的遗传多样性参数( $H=0.155$ ,  $I=0.235$ ,  $PPL=49.1\%$ )明显低于原野生种群( $H=0.217$ ,  $I=0.328$ ,  $PPL=64.2\%$ ) (表3), 这与理论预期的结果相符合。

也有人证实, 产于中国的李氏禾(*Leersia hexandra*)和产于印度的红球姜(*Zingiber zerumbet*)的无性繁殖群体仍维持相当高的遗传多样性(Song等2006; Kavitha和Thomas 2008)。我们在对红根草组培材料进行RAPD分析也发现, 组培群体的遗传多样性参数( $H=0.231$ ,  $I=0.347$ ,  $PPL=68.6\%$ )高于原野生种群( $H=0.194$ ,  $I=0.291$ ,  $PPL=57.8\%$ ) (表3)。

另外, 在通常情况下, 与RAPD引物相比, ISSR引物能产生更多的多态性条带(Fang和Roose 1997; Esselman等1999), 因此, 两种方法对同一材料进行遗传多样性分析时, ISSR所获得的结果通常高于RAPD (Adams等2003; Wu等2004, 2005)。然而在本实验中, 当研究红根草组培快繁群体的遗传多样性时, 我们发现, RAPD分析结果反而高于ISSR (表3)。这一结果与Chen等(2006)对以营养繁殖为主的濒危植物宽叶泽苔草(*Caldesia grandis*)的研究结果类似, Chen等(2006)同时指出, RAPD分析所

获得的这种反常结果可能与营养繁殖过程的体细胞变异有关。而且, Chen等(2005)研究发现, 源于植物组织培养过程的体细胞变异可通过cDNA-RAPD标记检出。

因此, 在本研究中, 当检测红根草组培快繁群体的遗传多样性时, 出现“RAPD检测结果高于ISSR、组培快繁居群遗传多样性高于原野生种群”两种反常现象, 其根本原因可能与组培过程中的体细胞变异有关, 而且这些变异位于RAPD-PCR区域, 仅被RAPD标记检出。

## 参考文献

- 李合生(2000). 植物生理生化实验原理和技术. 北京: 高等教育出版社, 214~217
- 罗志国(2005). 沙尔威辛临床前试验及I期临床研究[博士学位]. 北京: 中国协和医科大学
- 卿晨(1999). Salvicine体外抗肿瘤作用和诱导肿瘤细胞凋亡的研究[博士学位]. 上海: 中国科学院上海药物研究所
- 唐凤鸾, 李锋, 付传明, 黄宁珍(2006). 红根草的组织培养与快速繁殖研究. 广西植物, 26 (3): 282~285
- 杨保津, 黄秀兰, 黄勇, 王晓明, 林隆泽(1988). 红根草化学成分的研究. 植物学报, 30 (5): 524~527
- 张金生, 黄勇(1995). 红根草中的新二萜——红根草酮内酯和新红根草酮. 天然产物研究与开发, 7 (4): 1~4
- 中国科学院中国植物志编辑委员会(1997). 中国植物志(第六十六卷). 北京: 科学出版社, 70~196
- Adams RP, Schwarzbach AE, Pandey RN (2003). The concordance of terpenoid, ISSR and RAPD markers, and ITS sequence data sets among genotypes: an example from *Juniperus*. Biochem Syst Ecol, 31: 375~387
- Boyce MS (1992). Population viability analysis. Annu Rev Ecol Syst, 23: 481~506
- Chen JM, Gitura WR, Wang YH, Wang QF (2006). The extent of clonality and genetic diversity in the rare *Caldesia grandis* (Alismataceae): Comparative results for RAPD and ISSR markers. Aquat Bot, 84: 301~307
- Chen YH, Tsai YJ, Huang JZ, Chen FC (2005). Transcription analysis of peloric mutants of *Phalaenopsis* orchids derived from tissue culture. Cell Res, 15 (8): 639~657
- Esselman EJ, Li JQ, Crawford D, Winduss JL, Wolfe AD (1999). Clonal diversity in the rare *Calamagrostis porteri* ssp. *insperata* (Poaceae): comparative results for allozymes and random amplified polymorphic DNA (RAPD) and intersimple sequence repeat (ISSR) markers. Mol Ecol, 8: 443~451
- Fang DQ, Roose ML (1997). Identification of closely related citrus cultivars with inter-simple sequence repeat markers. Theor Appl Genet, 95: 408~417
- Fischer M, Husi R, Prati D, Peintinger M, Van Kleunen M, Schmid B (2000). RAPD variation among and within small and large populations of the rare clonal plant *Ranunculus reptans* (Ranunculaceae). Am J Bot, 87 (8): 1128~1137



- Hamrick JL, Godt MJW, Murawski DA, Loveless MD (1991). Correlations between species traits and allozyme diversity: implications for conservation biology. In: Falk DA, Holsinger KE (eds). Genetics and Conservation of Rare Plants. New York: Oxford University Press, 75~86
- Kavitha PG, Thomas G (2008). Population genetic structure of the clonal plant *Zingiber zerumbet* (L.) Smith (Zingiberaceae), a wild relative of cultivated ginger, and its response to *Pythium aphanidermatum*. *Euphytica*, 160: 89~100
- Kostrakiewicz K, Wroblewska A (2008). Low genetic variation in subpopulations of an endangered clonal plant *Iris sibirica* in southern Poland. *Ann Bot Fenn*, 45: 186~194
- Lamont BB, Klinkhamer P, Witkowski ET (1993). Population fragmentation may reduce fertility to zero in *Banksia goodii*—a demonstration of the Allee effect. *Oecologia*, 94: 446~450
- Lang JY, Chen H, Zhou J, Zhang YX, Zhang XW, Li MH, Lin LP, Zhang JS, Waalkes MP, Ding J (2005). Antimetastatic effect of salvicine on human breast cancer MDA-MB-435 orthotopic xenograft is closely related to Rho-dependent pathway. *Clin Cancer Res*, 11 (9): 3455~3464
- Li A, Ge S (2001). Genetic variation and clonal diversity of *Psammodochloa villosa* (Poaceae) detected by ISSR markers. *Ann Bot*, 87: 585~590
- Li WG, Wang BG, Wang JB (2006). Lack of genetic variation of an invasive clonal plant *Eichhornia crassipes* in China revealed by RAPD and ISSR markers. *Aquat Bot*, 84: 176~180
- Nason JD, Hamrick JL (1997). Reproductive and genetic consequences of forest fragmentation: two case studies of neotropical canopy trees. *J Heredity*, 88 (4): 264~276
- Nei M (1972). Genetic distance between populations. *Am Nat*, 106: 283~292
- Nei M (1973). Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc Natl Acad Sci USA*, 70 (12): 3321~3323
- Pullin AS (2002). Conservation Biology. Cambridge: Cambridge University Press
- Rohlf FJ (1997). NTSYSpc: Numerical taxonomy and multivariate analysis System, version 2.11S. New York: Exeter Software
- Song ZP, Guan Y, Rong J, Xu X, Lu BR (2006). Inter-simple sequence repeat (ISSR) variation in populations of the cutgrass *Leersia hexandra*. *Aquat Bot*, 84 (4): 359~362
- Van Dyke F (2003). Conservation Biology—Foundations, Concepts, Applications. Boston: McGraw-Hill
- Widen B, Svensson L (1992). Conservation of genetic variation in plants: the importance of population size and gene flow. In: Hansson L (ed). Ecological Principles of Nature Conservation: Application in Temperate and Boreal Environments. New York: Elsevier Science Publishers, 113~116
- Wu CJ, Cheng ZQ, Huang XQ, Yin SH, Cao KM, Sun CR (2004). Genetic diversity among and within populations of *Oryza granulata* from Yunnan of China revealed by RAPD and ISSR markers: implications for conservation of endangered species. *Plant Sci*, 167: 35~42
- Wu W, Zheng YL, Chen L, Wei YM, Yang RW, Yan ZH (2005). Evaluation of genetic relationships in the genus *Houttuynia* Thunb. in China based on RAPD and ISSR markers. *Biochem Syst Ecol*, 33: 1141~1157
- Yeh FC, Yang RC, Boyle TJB, Ye ZH, Mao JX (1997). POPGENE, the User-Friendly Shareware for Population Genetic Analysis. Edmonton: University of Alberta
- Zhang JS, Ding J, Tang QM, Li M, Zhao M, Lu LJ, Chen LJ, Yuan ST (1999). Synthesis and antitumor activity of novel diterpene-quinone salvicine and the analogs. *Bioorg Med Chem Lett*, 9: 2731~2736
- Zhou J, Chen Y, Lang JY, Lu JJ, Ding J (2008). Salvicine inactivates  $\beta_1$  integrin and inhibits adhesion of MDA-MB-435 cells to fibronectin via reactive oxygen species signaling. *Mol Cancer Res*, 6: 194~204