

抗癌植物冬凌草种质资源遗传多样性分析

李国民^{1*}, 李忠超², 许凯扬¹, 文李¹

(1. 长沙理工大学生物与食品工程学院, 长沙 410076; 2. 中国科学院华南植物园, 广州 510650)

摘要:为了评价、管理和利用抗癌植物冬凌草(*Rabdosia rubescens*)的种质遗传资源,采用 ISSR 分子标记对其 7 个自然居群进行了遗传多样性分析。结果表明:冬凌草在物种水平具有中等的遗传多样性(Ppl:60.45%, H :0.2714, I :0.3365, H_B :0.3108),在居群水平具有较低的遗传多样性(Ppl:17.05%, H :0.0692, I :0.0989, H_B :0.0763),居群间存在较高的遗传分化(G_{ST} :0.6515, θ^B :0.6388, G_{ST-B} :0.6095)。基于遗传距离的 UPGMA 聚类中,位于华西的四川(SC)居群和中南的保靖(BJ)和石门(SM)居群组成核心分支,再分别与向南和向北的居群聚合。因此,ISSR 分子标记适合于冬凌草遗传多样性研究,对其核心种质库的构建具有指导作用。

关键词:冬凌草;遗传多样性;ISSR;核心种质

中图分类号:Q16

文献标识码:A

文章编号:1005-3395(2008)02-0116-07

Analysis on Genetic Diversity of Germplasm Resources of Anticancer Plant *Rabdosia rubescens* (Labiatae)

LI Guo-ming^{1*}, LI Zhong-chao², XU Kai-yang¹, WEN Li¹

(1. School of Biology and Food Engineering, Changsha University of Science & Technology, Changsha 410076, China;

2. South China Botanical Garden, the Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China)

Abstract: *Rabdosia rubescens* (Henmsl.) Hara is an anticancer plant distributed in the hills and mountains of mainland China. In order to evaluate, manage and develop the germplasm genetic resources of this species, 7 natural populations were sampled and analyzed using Inter-simple sequence repeats (ISSR) markers. There was a moderate level of diversity at species level (Ppl: 60.45%; H : 0.2714, I : 0.3365; H_B : 0.3108), and a low level of diversity at population level (Ppl: 17.05%; H : 0.0692; I : 0.0989; H_B : 0.0763), and a high level of genetic differentiation (G_{ST} : 0.6515; θ^B : 0.6388; G_{ST-B} : 0.6095). The Sichuan (SC), Baojing (BJ) and Shimen (SM) populations, composed core clade, and then gathered with the southern and northern populations, respectively, based on the UPGMA analysis. Therefore, ISSR markers were suitable for genetic diversity analysis and instructive for core collection construction of *R. rubescens*.

Key words: *Rabdosia rubescens* (Henmsl.) Hara; Genetic diversity; Inter-simple sequence repeat (ISSR); Core collection

药用植物种质资源是中药生产的源头,是中药材品种培育、改良的物质基础。近年来,由于对自然资源掠夺式的开发和生态环境恶化,不少药材如天麻、虫草、黄连、甘草等,野生资源处于濒临枯竭状态,而栽培资源又存在质量下降、品种退化等问

题^[1]。为了保证药材的质量稳定和增产增收,必须加强药材种质资源的收集、保存和研究工作,这就为药用植物核心种质(Core collection)的研究提出了新的要求。

核心种质的概念最早由 Frankel 和 Brown 于

1984年提出,认为核心种质是保存种质资源的一个核心子集,即以最少的个体数量最大限度地保存整个物种的遗传资源^[2]。核心种质的构建不但可以实现和加强对重点材料的重点保护和管理,有效地防止和避免遗传多样性(特别是优异种质和基因)的丢失;还提供了一套规模较小而遗传多样性丰富且具有代表性的样品,使得在现阶段即能够采用一系列先进手段和方法,有目的、有重点地进行优异种质、基因的筛选以及遗传工程的研究,避免工作的盲目性和降低工作量,从而提高种质资源的研究水平和利用效率^[3]。

物种的遗传多样性是其长期生存和保持进化潜力的物质基础,且核心种质的材料必须具有最大的遗传代表性,因此准确评测物种遗传多样性是合理构建其核心种质的前提^[2]。研究遗传多样性的方法包括形态宏观水平的性状统计和分子微观水平的同工酶、等位酶以及 RFLP、RAPD、SSR、ISSR、ALFP 和 DNA 测序等,DNA 分子标记方法的研究对象是遗传物质本身,不受物种所处环境条件和发育阶段的影响,又能反映环境条件对物种遗传选择的影响,成为研究物种遗传多样性和品种鉴定(包括道地药材)的主要方法,其中 ISSR 标记因其重复性好和简便快速,得到大量应用^[4-5]。

冬凌草 *Rabdosia rubescens* (Henmsl.) Hara 为唇形科香茶菜属小灌木植物,广布于我国陕西、甘肃、山西、河北、河南、安徽、湖北、江西、湖南、四川、贵州及浙江等地,生于海拔 100~1 000 m 的山坡、谷地、灌丛、林地等处^[6]。冬凌草最早在河南省济源市太行、王屋山区民间用于食道癌、贲门癌的治疗,且对化脓性扁桃体炎,急、慢性咽喉炎及慢性气管炎等也有较高疗效,同时还可以作为水土保持植物和蜜源植物,因此引起了国内外医药界学者和植物科研工作者的广泛关注和高度重视。近 30 年来,对冬凌草的化学成分、药理作用、构效关系、临床应用和开发利用开展了多方面的研究^[7]。

冬凌草一直处于野生状态,生长环境较差,因此产量很不稳定,随着冬凌草系列产品生产量的扩大,冬凌草野生资源破坏越来越严重,药材来源越来越混乱^[8]。为了解决药材资源和生态保护问题,2006年4月,国家质量监督检验检疫总局对济源冬凌草实施地理标志产品保护,随后,河南省发布《济源冬凌草生产质量技术规范》地方标准^[9]。虽然国家和地方对冬凌草种质资源的保护制定了上

述政策,济源市当地有关企业和农户也发展了药材生产基地,但对于冬凌草种质资源的基础性工作,如遗传基础、优良种质的稳定鉴定等,还未开展。

2004年以来,我们对冬凌草自然居群的分布和资源量及生境因素进行了调查,对不同产区药材的有效成分进行了检测,对居群消长动态进行了分析,并收集了代表性种质资源,在此基础上建立了异地人工居群,以期通过对自然居群和人工居群的生长、发育和繁殖状况及遗传动态进行定期观测和有效化学成份分析,建立冬凌草核心种质库,同时筛选出优良的种质资源以便大面积人工种植。本文主要报道冬凌草 7 个代表性自然居群遗传多样性初步分析结果,为了解冬凌草现有种质资源遗传多样性组成特点和今后种质资源的引种、收集工作提供依据;为冬凌草核心种质库的建立、道地药材分子鉴定、资源保护和深层次开发利用提供参考。

1 材料和方法

1.1 居群采样

冬凌草 *Rabdosia rubescens* (Henmsl.) Hara 材料采集自河南济源王屋山、郑州凤凰山;湖南石门壶瓶山、保靖;重庆市秀山和酉阳;四川成都金牛山和贵州松桃,共 7 个自然居群,居群的详细地理位置见表 1。其中济源王屋山和重庆居群各包括两个亚居群。各居群随机选取间距 5 m 以上 10 个样品,新鲜叶片放入装有变性硅胶的封口袋中进行快速干燥,之后转移至超低温冰箱保存备用;种子和活体植株带回长沙理工大学植物学实验地播种、栽培。

1.2 DNA 提取和 ISSR 扩增

采用改良的 CTAB 法^[10]提取叶片总 DNA。通过 0.8% 的琼脂电泳检测 DNA 质量, -20℃ 保存备用。对加拿大哥伦比亚大学(University of British Columbia)公布序列的 100 个 ISSR 引物(Set No. 9, No. 801~900,由上海生物工程有限公司合成)进行筛选,其中引物 807、810、811、836、842、857、864、878、881、890 的重复性较好,多态性较高,用于 7 个居群的 PCR 扩增(引物序列参见邹喻莘等^[4])。每个反应体系为 20 μl,其中包括 20 ng 的模板 DNA、10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)、50 mmol/L KCl、0.1% Triton X-100、2.7 mmol/L MgCl₂、0.1 mmol/L dNTPs、200 nmol/L primer 及 1.5 U *Taq* 酶(Takara 宝生生物工程大连有限公司)。每个引物均设一个空白对照反应以排除系统误差。反应在 PTC-100 型

表 1 冬凌草取样居群的地理位置

Table 1 Localities of sampling populations of *Rabdosia rubescens*

居群代码 Population code	地点 Location	纬度 Latitude (N)	经度 Longitude (E)	海拔 Altitude (m)
JY	河南济源王屋山 Wangwu mountain, Jiyuan, Henan	35°10' ~ 35°29'	112°16' ~ 112°59'	360 ~ 750
ZZ	河南郑州凤凰山 Fenghuang mountain, Zhengzhou, Henan	34°27' ~ 34°53'	103°27' ~ 104°19'	350 ~ 560
SM	湖南石门壶瓶山 Huping mountain, Shimen, Hunan	29°58' ~ 30°09'	110°29' ~ 110°59'	510 ~ 780
BJ	湖南保靖 Baojing, Hunan	28°40' ~ 28°48'	108°10' ~ 109°23'	480 ~ 500
SC	四川成都金牛山 Jinniu mountain, Chendu, Sichuan	27°32' ~ 27°54'	109°40' ~ 109°43'	325 ~ 342
CQ	重庆市秀山、酉阳 Xiushan and Youyang, Chongqing	26°17' ~ 27°29'	101°40' ~ 103°05'	300 ~ 311
GZ	贵州松桃 Songtao, Guizhou	27°14' ~ 27°41'	101°27' ~ 101°48'	325 ~ 3462

PCR 反应仪 (MJ Research) 上进行, 反应程序为: 94℃ 预变性 4 min, 接着 94℃ 15 s, 52℃ 45 s, 72℃ 75 s, 45 个循环, 最后 72℃ 延伸 10 min。反应产物在含溴化乙锭 (ethidium bromide, 0.1 $\mu\text{g ml}^{-1}$) 的 2.0% 琼脂糖凝胶中, 以 1.0 \times TBE 电泳缓冲液在 3 ~ 5 V cm^{-1} 场强下电泳 3 ~ 4 h 分离, 最后用紫外成像系统 LabWorks Software Version 3.0 (UVP, Upland, CA 91786, USA) 成像, 用 100 bp 的 DNA ladder 作为分子量标记。

1.3 数据分析

对清晰且重复性好的条带按扩增阳性(1), 模糊带、弱带及空白按扩增阴性(0), 记录电泳谱带, 形成表型数据矩阵。

假定居群处于 Hardy-Weinberg 平衡, 用 PopGene32^[11] 软件计算以下各遗传多样性指数^[12]: (1) 多态位点数 Ppn (Number of polymorphic band) 和多态位点百分率 Ppl (Percentage of polymorphic loci); (2) Nei's 基因多样性指数 H (Nei's gene diversity), Shannon 多态性信息指数 I (Shannon's information index); (3) 遗传一致度 I_N (Genetic identity) 和遗传距离 D (Genetic distance)。

无须假定居群处于 Hardy-Weinberg 平衡, 用 HICKORY, version 1.0 软件^[13] 计算 Bayesian 基因多样性指数 (H_B); 在默认取样参数 (burn-in = 50 000, sample = 250 000, thin = 50) 和自主自由度模式 (the f

free model) 下, 计算 θ^B 和 G_{st-B} 。

采用 AMOVApre1.0^[14] 和 AMOVA1.55^[15] 软件得到居群间的遗传分化系数 G_{st} (The coefficient of gene differentiation), 根据 $N_m = (1 - G_{st})/4G_{st}$ 计算基因流 N_m (Gene flow)。

在遗传距离 D 的基础上, 用 NTSYS2.1^[16] 软件对 7 个居群进行非加权算术平均聚类 (Unweighted pair group with arithmetic average, UPGMA)。

2 结果和分析

10 条 ISSR 引物共扩增出分子量大小在 150 bp 到 1 680 bp 的位点 134 个, 其中 81 个为多态位点 (Ppn), 多态位点百分率 (Ppl) 为 60.45% (图 1)。

Popgene 分析软件得出的 Nei's 遗传多样性 (H) 和 Shannon 信息指数 (I) 及 HICKORY 软件计算的 Bayesian 基因多样性指数 (H_B) 如表 2。

冬凌草 7 个自然居群中, 单个居群的多态位点百分率 (Ppl) 在 13.83% 到 20.00% 之间, 平均 17.05%; Nei's 基因多样性指数 (H) 和 Shannon 多样性指数 (I) 分别在 0.0575 到 0.0932 和 0.0846 到 0.1176 之间, 平均为 0.0692 和 0.0989; Bayesian 基因多样性指数 (H_B) 在 0.0621 到 0.1124 之间, 平均 0.0763。各指数的趋势一致, JY 居群具有最高的遗传变异, SC 居群的遗传变异最低, 但居群间的差异并不明显, 也与地理分布无关。JY 和 CQ 居群具有

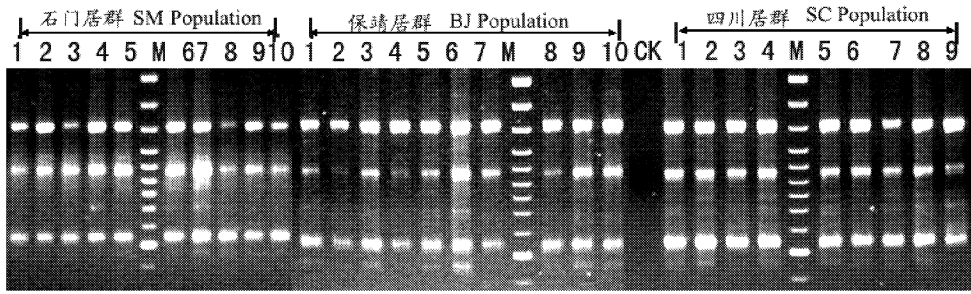


图 1 ISSR 引物 878 在代表性居群的扩增结果

Fig. 1 ISSR patterns produced with primer 878 for representative population

M: 200 ~ 1500 bp DNA ladder, CK: 对照 Control.

表 2 冬凌草不同自然居群的遗传多样性参数

Table 2 Parameters of genetic variability within populations of *Rabdosia rubescens*

居群 Population	Ppl (%)	<i>I</i>	<i>H</i>	<i>H_B</i>
JY	20.00	0.1176	0.0932	0.1124
ZZ	16.84	0.0918	0.0640	0.0687
SM	18.04	0.1064	0.0737	0.0791
BJ	16.51	0.0965	0.0677	0.0728
SC	13.83	0.0846	0.0575	0.0621
CQ	19.22	0.1057	0.0716	0.0756
GZ	14.90	0.0897	0.0570	0.0640
平均 Mean	17.05	0.0989	0.0692	0.0763
物种水平 At species level	60.45	0.3365	0.2714	0.3108

Ppl: 多态位点百分率 Percentage of polymorphic loci; *I*: Shannon 多态性信息指数 Shannon's information index; *H*: Nei's 基因多样性指数 Nei's gene diversity index; *H_B*: Bayesian 基因多样性指数 Bayesian gene diversity index.

稍高的遗传多样性也许只是因为它们都包含了两个亚居群,取样范围更大。物种水平上,多态位点百分率(Ppl)为 60.45%,Nei's 基因多样性指数(*H*)、Shannon 多样性指数(*I*)和 Bayesian 基因多样性指数(*H_B*)分别为 0.2714、0.3365 和 0.3108(表 2)。

AMOVA 分析表明,居群间遗传分化系数(*G_{ST}*)为 0.6515;而自主自由度模式下得到的 θ^B 和 *G_{ST-B}* 平均值分别为 0.6388 和 0.6095(95% 置信区间)。即冬凌草的遗传变异主要存在于居群间,居群间基因流只有 0.1337。

从基于遗传距离的 UPGMA 聚类图可以看出,位于华西的 SC 居群和中南的 BJ 和 SM 居群组成核心分支,再分别与向南和向北的居群聚合(图 1); BJ 和 SC 居群、JY 和 ZZ 居群分别最先聚在一起,居群间分别具有最小和次小的遗传距离 0.2064 和 0.2144, CQ 居群位于聚类最外分支,与其它居群具有最大遗传距离(图 2、表 3)。

3 讨论

3.1 遗传多样性和遗传结构

居群的遗传多样性和遗传结构是物种最基本的特征之一,它受突变、迁移、选择和基因流的共同作用,同时还跟物种的进化历史和生物学特性有关;许多研究结果证明,植物类群的分类地位、生活型、分布范围、分布地区、繁育系统、种子扩散方式、生殖模式、演替阶段等因素都会影响到植物居群的分化^[4,17]。

卢小蕾等^[18]对河南产香茶菜属 6 种植物进行的 RAPD 分析表明,多态位点百分率为 68.81%,同种、同一种的栽培种和野生种之间存在明显的遗传分化。方芳等^[19]对浙江 3 种香茶菜的 8 个居群进行了 RAPD 分析,检测到 92.36% 的多态位点百分率;其中大萼香茶菜(*Rabdosia macrocalyx*) 两个居群的多态位点百分率为 47.31%;香茶菜(*R. amethystoides*) 5 个居群的多态位点百分率为 76.80%;香茶

表 3 冬凌草居群间遗传一致度(上)和遗传距离(下)

Table 3 Genetic identity (above diagonal) and genetic distance (below diagonal) among populations of *Rabdosia rubescens*

居群 Population	JY	ZZ	SM	BJ	SC	CQ	GZ
JY	****	0.8070	0.8051	0.7569	0.8104	0.7852	0.7848
ZZ	0.2144	****	0.7863	0.7673	0.8023	0.7384	0.7787
SM	0.2168	0.2404	****	0.8098	0.8115	0.7805	0.7786
BJ	0.2785	0.2649	0.2109	****	0.8135	0.7515	0.7710
SC	0.2102	0.2203	0.2089	0.2064	****	0.8078	0.8084
CQ	0.2419	0.3033	0.2478	0.2857	0.2134	****	0.7752
GZ	0.2424	0.2502	0.2503	0.2601	0.2127	0.2546	****

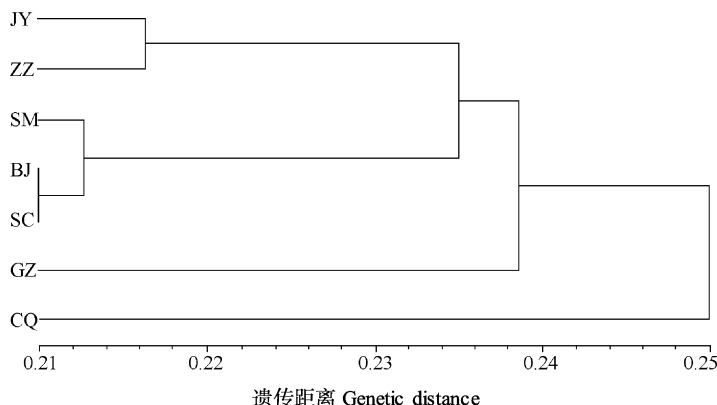


图 2 基于遗传距离的 UPGMA 聚类图

Fig. 2 UPGMA dendrogram based on genetic distance

菜不同种和同一种不同居群之间都存在较高的变异性和明显的遗传分化。

本研究表明冬凌草在物种水平具有中等的遗传多样性 (P_{pl} : 60.45%, H : 0.2714, I : 0.3365, H_B : 0.3108), 在居群水平具有较低的遗传多样性 (P_{pl} : 17.05%, H : 0.0692, I : 0.0989, H_B : 0.0763), 居群间存在较高的遗传分化 (G_{ST} : 0.6515, θ^B : 0.6388, G_{ST-B} : 0.6095)(表 2)。其物种水平中等的遗传多样性可归功于其广泛的地理分布、进化的异交繁育系统和多年生生活型等生物学和生态学特性, 但由于它一般适生于山坡林地, 因此居群间也存在一定的地理隔离, 加之近几十年来资源和生境遭到严重破坏, 已经造成和必将进一步加剧其遗传多样性丢失、小居群效应加剧等遗传不适后果, 体现在较低的居群水平遗传多样性。另外, 由于居群数和居群内个体数取样不是足够大, 也有可能造成目前这些遗传多样性参数与实际情况有一定误差, 但在居群具有相当数量多态位点数的时候, 采用自主自由度模式的 Bayesian 分析, 可以将这种误差降低^[20-21]。

3.2 遗传变异和道地药材

道地药材就是药用植物在特定环境下, 在长期生态适应过程中所形成的具有质量特征遗传稳定性的药材群体, 即地理宗(Geographical race)或地理生态型(Geocotype)或地理变种(Geographical variety); 优良的种质资源是道地药材品质形成的内因^[1]。总之, “道”包含的遗传变异越多, 会使居群间的分化进一步加深, 产生外部形态、组织结构及化学组成差异的基础越厚。

对异地栽培菘蓝(*Isatis indigotica* Fort.)药材的研究结果表明, 在相同生态环境中生长的不同居群菘蓝在化学成分、药理作用等方面依然存在显著差别; 同一个居群菘蓝的品质在移栽前后没有明显变化。等位酶分析结果又证实了菘蓝种内不同栽培居群在遗传结构上确实存在差异, 这表明物种遗传因素较生态环境因素在菘蓝药材品质形成中起更大作用, 菘蓝种内遗传变异是导致不同来源药材质量有差别的主要原因之一^[22]。

对河南省济源地区产的冬凌草进行化学成分分析, 发现其主要抗癌活性成分为冬凌草甲素(Ori-

donin)和冬凌草乙素(Ponicidin)等;但对河南省的鲁山、信阳、卢氏等地区和贵州省不同地区出产的冬凌草进行的化学成分研究表明,贵州产冬凌草与河南卢氏产冬凌草所含成分大致相同,虽然它们都含有二萜类化学成分如贵州冬凌草素(guidongnin),卢氏冬凌草甲素(ludongnin A),卢氏冬凌草乙素(ludongnin B),但要么不含冬凌草甲素和乙素,要么含量差异显著,其他次生代谢成分如熊果酸和齐墩果酸的含量也有差异,但含量变化与分布地纬度没有相关性^[23-25]。说明冬凌草随着产地生态环境(海拔、水、土和气候条件等)的不同,其次生代谢成分的结构类型会有较大的变化。

在遗传距离聚类分析时,位于华西的SC居群和中南的BJ和SM居群组成核心分支,再分别与向南和向北的居群聚合(图1);这与郭水良和曹同^[26]应用除趋势对应分析法,认为中国境内的川西、滇西北、藏东南的横断山脉地区是世界香茶菜属植物现代分布的分化中心的观点基本一致。说明冬凌草在其分化中心向外扩散过程中,为了适应区域生境,遗传基础发生了一定程度的变异,不但形态多态,生理代谢也改变,从而形成道地药材^[27]。

冬凌草居群间存在较大遗传分化,同时,居群水平 Nei's 基因多样性指数、Shannon 多样性指数和 Bayesian 基因多样性指数平均值分别为 0.0692、0.0989 和 0.0763,说明居群内拥有较多低频率特有位点(即居群特有多态位点),但这些位点是否与次生代谢产物合成基因相关,是否可以作为道地药材分子鉴定的依据,还有待进一步研究。

3.3 核心种质构建

根据核心种质的定义,从药用植物的特点出发,认为药用植物核心种质应具有如下特性^[1]:
①包含生产实践所需要的优异农艺性状或基因;
②包含临床疗效所需要的有效成分及其调控基因;
③组成应包括和体现当前药用植物的主要变异类型;
④彼此间要有异质性,最大限度地避免遗传上的重复;
⑤存在动态交流和调整。即药用植物核心种质除包括化学成分变化的多样性和稳定性外,还应准确度量不同遗传材料间的遗传相似度以及合理高效的抽样方法。

本研究结果显示,冬凌草物种水平具有较高的遗传多样性,居群水平遗传多样性较低,大部分遗传变异存在于居群间。因此,构建冬凌草核心种质库时,在遗传代表性和异质性上,应在尽量多的居

群取样,而不能只取少数地区或少数居群,特别是分化中心周围的居群。同时,由于冬凌草居群间已具有较高的遗传距离,在栽培管理时既要防止近交衰退(Inbreeding depression),又要防止远交衰退(Outbreeding depression)^[28-29]。

当然,由于本研究居群内样本较少,分子标记技术的多态分辨率不及 AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) 和 SSR (Simple Sequence Repeat)^[4,17],为了更加准确地评价冬凌草种质资源的遗传多样性水平和遗传结构,还需进一步深入研究,特别是联合栽培学技术、有效成分测定技术和分子生物学技术,发现和鉴定其优良基因型的研究,更是亟待开展和深入。

致谢 审稿专家和《热带亚热带植物学报》编辑部对本文的修改给予大量中肯意见和宝贵建议,在此表示感谢!

参考文献

- [1] 黄璐琦,陈美兰,肖培根. 中药材道地性研究的现代生物学基础及模式假说 [J]. 中国中药杂志, 2004, 29: 494-496,610.
- [2] Frankel O H, Brown A H D. Current plant genetic resources — A critical appraisal [C]// Genetics: New Frontiers Vol. IV. New Delhi, India: Oxford and IBH Publishing, 1984: 1-11.
- [3] Huang L Q(黄璐琦), Lü D M(吕冬梅), Yang B(杨滨), et al. Development of the study on germplasm resources of medicinal plants: Construction of core collection [J]. Chin J Chin Mat Med(中国中药杂志), 2005, 30: 1565-1568, 1586.(in Chinese)
- [4] Zou Y P(邹喻苹), Ge S(葛颂), Wang X D(王晓东). Molecular Markers in Systematic and Evolutionary Botany [M]. Beijing: Science Press, 2001: 95-97. (in Chinese)
- [5] Luo X Y, Zhuang X Y, Yang Y S. Genetic diversity of *Camellia changii* Ye (Theaceae) using ISSR markers [J]. J Trop Subtrop Bot, 2007, 15(2): 93-100.
- [6] Li J Y(李静一). Investigation, exploitation and conservation of wild *Rabdosia rubescens* resources [J]. J Henan For Sci Techn(河南林业科技), 2004, 24: 48-50.(in Chinese)
- [7] Liu J(刘净), Liang J Y(梁敬钰), Xie T(谢韬). Development of *Rabdosia rubescens* (Hemsl.) Hara [J]. Strait Pharm J(海峡药学), 2004, 16: 1-7.(in Chinese)
- [8] Chen S Q(陈随清), Dong C M(董成明), Feng W S(冯卫生). The study on ecology and biological property of *Rabdosia rubescens* in Taihang Mountain Area [J]. Chin Wild Plant Res(中国野生植物资源), 2005, 24: 33-35.(in Chinese)
- [9] Wang X M(王新民), Li M(李明), Jie X L(介晓磊), et al. Technical regulation of standardization cultivation of *Rabdosia rubescens*-GAP [J]. Anhui Agri Sci Bull(安徽农学通报), 2006, 12: 142-144.
- [10] Doyle J. DNA protocols for plants — CTAB total DNA isolation [C]// Hewitt G M, Johnston A. Molecular Techniques in Taxonomy. Germany, Berlin: Springer, 1991: 283-293.

- [11] Yeh F C, Yang R, Boyle T. POPGENE. Microsoft Windows-based freeware for population genetic analysis. Release 1.31 [M]. Edmonton: University of Alberta, 1999.
- [12] Nei M. Estimation of average heterozygosities and genetic distances from a small number of individuals [J]. *Genetics*, 1978, 89: 583–590.
- [13] Holsinger K E, Lewis P O. HICKORY: a package for analysis of population genetic data V1.0 [EB/OL]. Department of Ecology and Evolutionary Biology, University of Connecticut, USA. 2003. Available at website <http://www.eeb.uconn.edu>
- [14] Miller M P. AMOVA-PREP 1.01: A program for the preparation of AMOVA input files from dominant markers raw data [EB/OL]. Computer software distributed by author, 1998.
- [15] Excoffier L, Smouse P E, Quattro J M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondria DNA restriction sites [J]. *Genetics*, 1992, 131: 479–491.
- [16] Rohlf F J. NTSYSpc2.1 [CP/OL]. 2000. <http://www.exetersoftware.com/cat/ntsyspc/ntsyspc.html>.
- [17] Nybom H. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants [J]. *Mol Ecol*, 2004, 13: 1143–1155.
- [18] Lu X L(卢小蕾), Chen S Q(陈随清), Li X J(李雪菊), et al. RAPD analysis of six species in plant of *Rabdosia* (Bl.) Hassk. from Henan Province [J]. *Henan Sci(河南科学)*, 2006, 24: 841–843.(in Chinese)
- [19] Fang F(方芳), Guo S L(郭水良), Huang H(黄华), et al. RAPD analysis of eight populations in plants of *Isodon* (Schrud. ex Benth.) Kudo from Zhejiang Province [J]. *Chin Trad Herb Drugs(中草药)*, 2003, 34: 553–556.(in Chinese)
- [20] Holsinger K E, Lewis P O, Dipak K D. A Bayesian approach to inferring population structure from dominant markers [J]. *Mol Ecol*, 2002, 11: 1157–1164.
- [21] Renau-Morata B, Nebauer S G, Sales E, et al. Genetic diversity and structure of natural and managed populations of *Cedrus atlantica* (Pinaceae) assessed using random amplified polymorphic DNA [J]. *Amer J Bot*, 2005, 92: 875–884.
- [22] Wang Y(王寅), Qiao C Z(乔传卓), Wang Z R(王中仁), et al. Allozyme analysis in different cultivated populations of *Isatis indigotica* Fort [J]. *Acad J Second Military Med Univ(第二军医大学学报)*, 2000, 21: 209–212.(in Chinese)
- [23] Chen D Y(陈德媛), Pan L T(潘炉台), Yao P(姚婷). Comparative studies on the diterpenoid composition of *Rabdosia rubescens* from Guizhou different area [J]. *Chin J Ethnomed Ethnopharm(中国民族民间医药杂志)*, 1994, 5: 7–9.(in Chinese)
- [24] Yuan K(袁珂), Hu R H(胡润淮), Dong L M(董留民). Comparison of content of urolio acid and oleanolic acid in *Rabdosia rubescens* from different areas and different seasons [J]. *J Chin Med Mat(中药材)*, 1998, 21: 519–520.(in Chinese)
- [25] Han Q B(韩全斌), Zhao Q S(赵勤实), Li S H(黎胜红), et al. *ent*-Kaurane diterpenoids from *Isodon rubescens* collected in Guizhou Province [J]. *Acta Chim Sin(化学学报)*, 2003, 61: 1077–1082.(in Chinese)
- [26] Guo S L(郭水良), Cao T(曹同). Application of DCA to study distributive patterns of *Isodon* in China [J]. *J Zhejiang Univ (Agri Life Sci) (浙江大学学报: 农业与生命科学版)*, 2004, 30: 1–9.(in Chinese)
- [27] Bijlsma R, Loeschcke V. Environmental stress, adaptation and evolution: An overview [J]. *J Evolut Biol*, 2005, 18(4): 744–749.
- [28] Wang Z F(王峥嵘), Peng S L(彭少麟). Plant hybridization and its harmful genetic consequences [J]. *Biodiv Sci(生物多样性)*, 2003, 11: 333–339.(in Chinese)
- [29] Willi Y, Buskirk J V. Genomic compatibility occurs over a wide range parental genetic similarity in an outcrossing plant [J]. *Proc Royal Soc, Series B*, 2005, 272: 1333–1338.