

石蒜属植物遗传多样性的 ISSR 和 RAPD 标记比较研究

袁菊红^{1,2}, 孙 视², 彭 峰², 冯 煦², 夏 冰^{1,2*}

(1. 南京农业大学园艺学院, 江苏 南京 210095; 2. 江苏省中国科学院植物研究所 南京中山植物园, 江苏 南京 210014)

摘 要:目的 研究石蒜属 4 种植物的种间亲缘关系和同一种内不同采集地材料的遗传多样性, 为其种质资源评价和合理开发利用提供分子佐证。方法 用 ISSR 和 RAPD 标记分别对不同采集地的 37 份石蒜属植物(石蒜 18 份、中国石蒜 10 份、换锦花 5 份、忽地笑 4 份)的基因组 DNA 的遗传多样性进行检测。结果 (1)16 条 ISSR 和 17 条 RAPD 引物分别扩增出 229 和 215 条带, 多态比率分别为 85.59% 和 69.77%, 显然, ISSR 检测出的多态性条带的能力优于 RAPD; (2)ISSR 和 RAPD 标记检测同组供试材料种间或种内的 Nei's 遗传相似系数范围分别为 0.545 9~0.934 5, 0.641 9~1.000 0, 平均为 0.683 6, 0.742 8。两者相关系数 $r=0.858\ 2$, 达极显著水平。 (3)ISSR 和 RAPD 标记的分子聚类结果相近, 两种标记均能准确地把不同来源的材料先按种聚类, 种间的分子分类结果与传统经典分类相符; 种内不同采集地材料间存在一定的遗传差异, 其遗传多样性较为丰富。 (4)用 POPGENE 3.2 分析的种间基因分化系数(Gst)与用 AMOVA 进行的遗传变异巢式方差分析所得结果基本一致。结论 两种标记均可用于石蒜属植物种间亲缘关系与种内的遗传多样性研究, 虽然 ISSR 标记在种间遗传多样性检测上分辨率较 RAPD 标记低, 但 ISSR 标记能检测到更高的种内遗传差异性, 更适合种下水平的遗传多样性研究。

关键词:石蒜属; RAPD; ISSR; 种间差异; 遗传多样性

中图分类号:R282.710

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2007)10-1555-07

Comparison between ISSR and RAPD markers in genetic diversity of plants in *Lycoris* Herb.YUAN Ju-hong^{1,2}, SUN Shi², PENG Feng², XIA Bing^{1,2}, FENG Xu²

(1. College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. Institute of Botany, Jiangsu Province and Chinese Academy of Science, Nanjing Botanical Garden, Mem. Sun Yat-Sen Nanjing 210014, China)

Abstract: **Objective** To investigate the inter- and intra-specific relationships among four species of *Lycoris* Herb. from different habitats and provide the evidence for the evaluation and exploitation of the germplasm of *Lycoris* Herb. **Methods** The genetic diversities of 37 accessions of *Lycoris* Herb. from different habitats were investigated with the technique of inter-simple sequence repeat (ISSR) and random amplified polymorphic DNA (RAPD), which were 18 of *L. radiata*, 10 of *L. chinensis*, 5 of *L. sprengeri* and 4 of *L. aurea*. **Results** (1) The 229 and 215 DNA bands were amplified with 16 ISSR and 17 RAPD primers respectively, the percentage of polymorphic bands (PPB) in ISSR detection (85.59%) was higher than that in RAPD (69.77%). (2) The coefficient ranges of interspecific and intraspecific genetic similarity (GS) in ISSR and RAPD analyses for the same materials were 0.545 9~0.934 5 and 0.641 9~1.000 0, respectively, the average were 0.683 6 and 0.742 8. There was significant difference of correlation coefficient at 0.01 level between ISSR and RAPD ($r=0.858\ 2$). (3) The similar molecular cluster results were obtained from RAPD and ISSR analyses, and showed that the genetic diversity of intraspecific was high, the interspecific relationship also matched well with the results of typical classification. (4) The coefficient of gene differentiation (Gst) among interspecific analyzed by POPGENE 3.2 consistent with the result of molecular variance analysis by AMOVA. **Conclusion** ISSR and RAPD markers were both efficient methods in revealing interspecific or intraspecific genetic differences and diversity in plants of *Lycoris* Herb. The acuity with ISSR detecting for interspecific genetic diversity is lower than that with RAPD. The more intraspecific genetic differences are detected by ISSR marker. However, ISSR is more suitable for the study

收稿日期: 2007-01-26

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30370292); 江苏省自然科学基金资助项目(BK2004062); 江苏省道地药材种质资源库建设项目(BM2006104)

作者简介: 袁菊红(1975-), 女, 南京农业大学博士研究生, 研究方向为药用植物遗传多样性研究、种质资源评价等。

E-mail: yuanjuhong@sina.com

* 通讯作者 夏 冰 E-mail: bingxia@mail.cnbg.net

on intraspecific genetic diversity.

Key words: *Lycoris* Herb.; random amplified polymorphic DNA (RAPD); inter-simple sequence repeat (ISSR); interspecific genetic differences; genetic diversity

石蒜属(*Lycoris* Herb.)植物是一类具有很高的观赏价值和药用价值的植物,本属中12种为我国特有,分布15个省区,而以江苏、浙江、安徽种类最多。石蒜 *L. radiata* (L'Herit.) Herb. 自古即做药用,主要用于治疗咽喉肿痛、痈肿疮毒、水肿、小便不利、咳嗽痰喘、食物中毒等症。本属其他种类与石蒜类似,鳞茎中富含多种生物碱,是提取加兰他敏、力可拉敏、石蒜碱等的重要原料,而加兰他敏、石蒜碱等具有多种药理活性作用。石蒜碱是治疗阿米巴痢疾药吐根代用品的原料,也有一定的镇痛和抗癌、抗肿瘤作用;加兰他敏、力可拉敏具有显著抑制胆碱酯酶活性,已被用于治疗轻中度老年痴呆症和小儿麻痹后遗症恢复神经功能的要药。

在石蒜属植物经典分类及系统演化研究的基础上,如何利用分子标记的方法研究石蒜属种间亲缘关系及种内遗传多样性,对探讨本属植物物种的起源演化和遗传资源的合理利用,发掘野生种中有利基因和繁育新品种具有十分重要的意义。在众多的DNA分子标记中,随机扩增多态性DNA(RAPD)和简单序列重复间(ISSR)分子标记因具有操作简单、模板需要量少、引物容易得到和不需要知道被检基因组序列等优点,被广泛地应用于物种亲缘关系和遗传多样性研究中。近年来,石蒜属植物的种间亲缘关系和杂交起源的分子标记研究较多^[1,2]。而种内遗传多样性研究除长筒石蒜 *L. longituba* Y. Hsu & G. J. Fan 不同地理居群的RAPD分析及其花色变异类型的ISSR分子标记研究外^[3],本属中其他种类的遗传多样性研究还未见报道。因此,本实验利用ISSR和RAPD技术比较研究秋出叶类型的石蒜 *L. radiata*、忽地笑 *L. aurea* (L'Herit.) Herb. 和春出叶类型的中国石蒜 *L. chinensis* Traub、换锦花 *L. sprengeri* Comes et Baker 4个种共37份材料的遗传多样性,为有效地评价石蒜属植物遗传资源、合理开发利用、新品种选育及遗传多样性保护等提供分子依据。

1 材料与方法

1.1 植物材料及其来源:试验材料于2004年7~9月间从野外采集鳞茎,并种植于南京中山植物园苗圃中,其编号、种名、采集地见表1,材料经南京中山植物园姚淦和笔者共同鉴定。

表1 供试材料的种名和采集地

Table 1 Species and habitats of investigated plants in *Lycoris* Herb.

种名	编号	采集地	种名	编号	采集地
石蒜	1	安徽宏村	20	广西桂林	
	2	湖南郴州苏仙桥	21	贵州黄果树	
	3	贵州关岭县	22	广西南宁	
	4	贵州遵义	中国石蒜	23	安徽琅琊山
	5	安徽九华山	24	安徽琅琊山南天门(深黄色)	
	6	安徽休宁	25	安徽琅琊山南天门(淡黄色)	
	7	广西全州	26	安徽琅琊山北坡	
	8	贵州安顺	27	安徽休宁	
	9	湖南衡山	28	江苏宝华山1	
	10	广西桂林雁山	29	江苏宝华山2	
	11	广东乐昌白石镇	30	江苏宝华山3	
	12	湖南宜章	31	江苏宝华山隆昌寺	
	13	江苏汤山	32	贵州凤岗县	
	14	广东乐昌王边村	换锦花	33	浙江舟山小郭巨岛坡北
	15	安徽黄山	34	浙江舟山小郭巨岛坡南	
	16	安徽齐云山	35	浙江普陀山观音洞	
	17	福建明溪	36	浙江普陀山观音洞西	
	18	江苏宝华山	37	浙江普陀山菩提南	
忽地笑	19	湖南郴州桂阳			

1.2 方法

1.2.1 DNA提取与检测:石蒜、忽地笑每个采集地选取8个单株(22为1个单株),换锦花、中国石蒜每个采集地取3个单株,每一单株采摘1个幼嫩叶片混合后采用改良的CTAB法与PCR产物纯化试剂盒结合法提取DNA。用1.0%的琼脂糖电泳检测DNA的浓度和纯度。

1.2.2 引物筛选:扩增反应在PE 9700 PCR仪上进行,体系为20 μL,用一个DNA样品分别对90条ISSR引物和75条PAPD引物进行筛选,选择扩增稳定、清晰条带的引物作为正式扩增。

1.2.3 反应体系和扩增程序:通过对模板DNA浓度、Mg²⁺、dNTPs、Taq酶及退火温度等试验,得到了两种标记最适反应体系和扩增程序,ISSR反应体系:10×PCR buffer 2 μL, 2.5 mmol/L dNTPs 1 μL, 2 μmol/L引物 4 μL, DNA(10~50 ng)1 μL, 25 mmol/L MgCl₂ 1.6 μL, 1 U Taq DNA聚合酶,用ddWater补足到所需体积;RAPD反应体系与ISSR基本一致,dNTPs为1.2 μL。ISSR扩增程序:94℃预变性3 min,进入40个PCR循环(94℃变性45 s, 58℃或60℃复性30 s, 72℃延伸90 s),最后于72℃延伸5 min, 4℃保存。RAPD扩增程序:94℃

预变性 3 min, 进入 38 个 PCR 循环(94 ℃变性 30 s, 38 ℃复性 30 s, 72 ℃延伸 90 s), 最后于 72 ℃延伸 7 min, 4 ℃保存。

吸取扩增反应产物 12 μL 加适量的 Loading buffer 于 1.5% 琼脂糖电泳, 电场强度为 3~5 V/cm, 电泳 1.5 h, FR-200A 凝胶成像仪上拍照。

1.2.4 数据统计与分析: 对供试 37 份材料扩增的电泳带总数和多态性带的数目进行统计。每个样品按谱带有强带和弱带记为 1, 无带记为 0, 得到原始数据表征矩阵。用 POPGENE3.2 软件计算等位基因数(na)、有效等位基因数(ne)、基因多样性指数(h)、Shannon 多样性指数(I)、总的基因多样性度(Ht)、种内基因多样性度(Hs)、基因分化系数(Gst)、基因流(Nm), 并得出遗传距离矩阵等。用 WINAMOVA 软件和 DCA2^[4,5]分析种间、种内的遗传变异水平。同时用 TFPGA 软件包中的非加权配对算术平均法(UPGMA)构建聚类图。

2 结果分析

2.1 两种分子标记的遗传多态性比较: 通过引物筛选, 得出了符合要求的 ISSR 引物 16 条, RAPD 引物 17 条, 引物名称、序列和多态位点百分比见表 2。从中可以看出 ISSR 引物扩增的多态位点百分比普遍高于 RAPD 引物。两种标记扩增结果见表 3。16 条 ISSR 引物对石蒜属 4 个种 37 份材料的 DNA 扩增, 共获得 229 条带, 194 条为多态性带, 多态性百分比达 85.59%。扩增条带数在 9~23, 平均每个引物扩增出 14.3 条, DNA 片段集中分布在 200~2 000 bp。17 条 RAPD 引物对上述同一组材料扩增后, 共得 215 条带, 其中 150 条为多态性带, 多态性百分比达 69.77%。平均每个引物扩增出 12.8 条带, DNA 片段集中分布范围为 250~1 800 bp。因此, 与 RAPD 分析比较, ISSR 对基因组 DNA 所检测到遗传多态性能力更高。但两种标记均能反映出供试的 4 个物种间、种内存在较高的 DNA 多态性(图 1)。

表 2 正式扩增的引物名称、序列和多态位点百分比

Table 2 Primer name, sequences, and their PPB

ISSR 引物	序列 5'→3'	多态性百分比/%	RAPD 引物	序列 5'→3'	多态性百分比/%
ISSR-3	(AC) 8 TT	100.00	OPA16	AGCCAGCGAA	90.91
ISSR-4	(AC) 8 AG	100.00	OPAD16	AACGGGCGTC	54.55
ISSR-5	(AC) 8 TG	93.33	OPB02	TGATCCCTGG	25.00
ISSR-8	(ATG) 6	55.56	OPB08	GTCCACACGG	93.33
ISSR-17	(GACA) 4	89.47	OPC13	GGGGGTCTTT	60.00
ISSR-32	(AG) 8 AC	100.00	OPD03	GTGCGCGTCA	53.33
ISSR-35	(AG) 8 TA	73.33	OPF05	CCGAAATCCC	75.00
ISSR-36	(AG) 8 TC	66.67	OPF13	GGCTGCAGAA	71.43
ISSR-43	(AC) 8 CT	92.31	OPG08	TCACGTCCAC	70.00
ISSR-44	(AC) 8 GA	87.50	OPG09	CTGACGTCAC	71.43
ISSR-56	(AG) 8 TT	71.43	OPG17	ACGACCGACA	54.55
ISSR-59	(AG) 8 GC	71.43	OPJ18	TGGTCCGAGA	88.89
ISSR-74	(ACTG) 4	93.33	OPN01	CTCACGTTGG	73.33
UBC807	(AG) 8 T	100.00	OPV03	CTCCCTGCAA	63.64
UBC848	(CA) 8 RG	66.67	OPW15	ACACCGGAAC	66.67
3ASSR37	(CA) 7 TGA	83.33	OPX06	ACGCCAGAGG	64.29
			OPZ09	CACCCAGTC	87.50

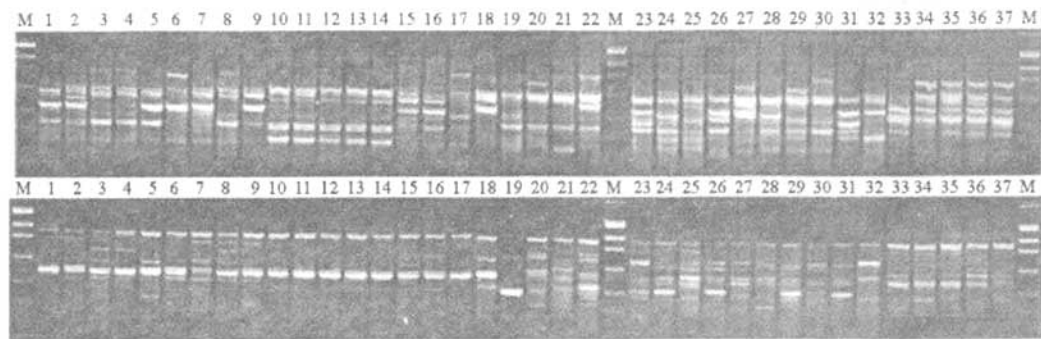
表 3 ISSR 和 RAPD 扩增结果

Table 3 Results of ISSR and RAPD amplification

	多态性引物数	多态性引物数扩增出的条带总数	平均每条引物扩增出的条带数	扩增产物大小范围/bp	扩增产物集中分布范围	检测出的多态性条带总数	多态性条带占总数的百分数/%
ISSR 数据	16	229	14.3	100~3 000	200~2 000	196	85.59
RAPD 数据	17	215	12.8	200~3 500	250~1 800	150	69.77

2.2 供试材料的遗传分析: 用 POPGENE3.2 软件计算出种间多态谱带比率(PPB, %)值, ISSR 种间 PPB(%)值高低顺序为: 石蒜(66.81%)>中国石蒜(55.90%)>忽地笑(40.17%)>换锦花(27.95%), RAPD 标记多态性结果也符合这一趋势(具体数据

略)。此外, na 、 ne 、 h 、 I 、 Ht 、 Hs 、 Gst 、 Nm 等见表 4、5。从 h 值来看, 两种标记有所差异, ISSR 的高低顺序与 PPB 值相同, 但 RAPD 却为石蒜>忽地笑>中国石蒜>换锦花。 I 值 ISSR 和 RAPD 标记变化范围分别为 0.161 0~0.354 7、0.092 7~0.221 4,



1~37-同表 1 M-Marker

1-37-are same as Table 1 M-Marker

图 1 ISSR3(上)和 RAPDZ09(下)对供试的 37 份材料的扩增图谱

Fig. 1 Amplified results of ISSR Primer 3 (upper) and RAPD Primer Z09 (lower) of 37 samples

表 4 石蒜属 4 种植物的遗传结构指数

Table 4 Genetic indices in four species of *Lycoris* Herb.

种 名	ISSR				RAPD			
	等位基因数	有效等位基因数	基因多样性指数	香农多样性指数	等位基因数	有效等位基因数	基因多样性指数	香农多样性指数
石蒜	1.668 1	1.408 1	0.237 5	0.354 7	1.414 0	1.255 7	0.148 7	0.221 4
忽地笑	1.401 7	1.302 2	0.169 8	0.245 9	1.339 5	1.248 4	0.141 3	0.205 5
中国石蒜	1.559 0	1.324 6	0.193 7	0.292 4	1.400 0	1.241 5	0.141 2	0.211 6
换锦花	1.279 5	1.186 8	0.109 0	0.161 0	1.162 8	1.106 1	0.062 5	0.092 7
石蒜属水平	1.855 9	1.531 9	0.307 8	0.457 9	1.697 7	1.434 0	0.250 3	0.371 8
St. Dev.	(0.352 0)	(0.352 2)	(0.175 0)	(0.237 8)	(0.460 3)	(0.382 9)	(0.199 9)	(0.281 0)

表 5 石蒜属 4 种植物种间和种内遗传变异的分子方差分析

Table 5 Molecular variance analysis of inter- and intra-specific inheritance for four plants of *Lycoris* Herb.

变异来源	ISSR						RAPD				
	自由度	平方和	均方	方差组成	百分比/%	P 值*	平方和	均方	方差组成	百分比/%	P 值*
种间	3	452.60	150.87	15.36	37.31	<0.001	461.64	153.88	16.91	51.11	<0.001
种内	33	851.45	25.80	25.80	62.69	<0.001	533.82	16.18	16.18	48.89	<0.001

* 1 000 次变换显著性检测

* significance tests after 1 000 permutations

属水平分别为 0.457 9 和 0.371 8。换锦花的 PPB 值和 *I* 均最低。POPGENE3.2 得出的两种分子标记的 *Gst* 在 34.71%~46.37%，与以 AMOVA 进行的遗传变异巢式方差分析结果 37.31%~51.11% 基本一致，前者稍小于 AMOVA 计算的结果。RAPD 检测种间差异大于 ISSR，而 ISSR 却能检测到更高的种内遗传差异。

ISSR 标记检测石蒜属 4 种植物种间或种内的 Nei's 遗传相似系数范围为 0.545 9~0.934 5，最大值为 0.934 5(样本号 35 与 36 间)，最小值为 0.545 9(样本号 24 与 18 之间)平均为 0.683 6。RAPD 扩增结果的遗传相似性系数处于 0.641 9~1.000 0，最大值 1.000(样本号 12 与 13 之间)，最大值为 0.641 9(样本号 5 与 32)，平均为 0.742 8。该指标也表明 ISSR 标记比 RAPD 标记能检测到更大的遗传变异。

2.3 供试材料的聚类分析：两种标记均将供试的

37 份材料按种聚成了 4 大类，忽地笑和中国石蒜，石蒜与换锦花先聚在一起，表明两两亲缘关系较近。显然，两个聚类图都表明供试的 4 种植物的种间差异大于种内差异。见图 2。

种内不同来源的材料聚类分析：从 ISSR 聚类图中可以看出，在遗传距离约 0.31 处，石蒜明显的分为 3 支：第 1 支由 1、5、15、12、13、10、11、14、16 组成，包括了广东、广西、湖南、江苏和安徽 5 省 9 份材料；第 2 支由 2、9(湖南)、7(广西)、3、8、4(贵州)、6(安徽)组成，来自福建明溪 17 和安徽宝华山 18 构成了第 3 支。换锦花 5 份材料是按来源进行聚类的，即来自浙江舟山小郭巨岛与普陀山的分别聚在不同亚支。而中国石蒜和忽地笑种内聚类却不明显按来源进行，如中国石蒜，来自安徽琅琊山的 4 份材料 23、24、25、26 与来自江苏宝华山的 4 份材料 28、29、30、31 交叉聚在一起，然后再与安徽休宁材料 27 聚类，最后与来自贵

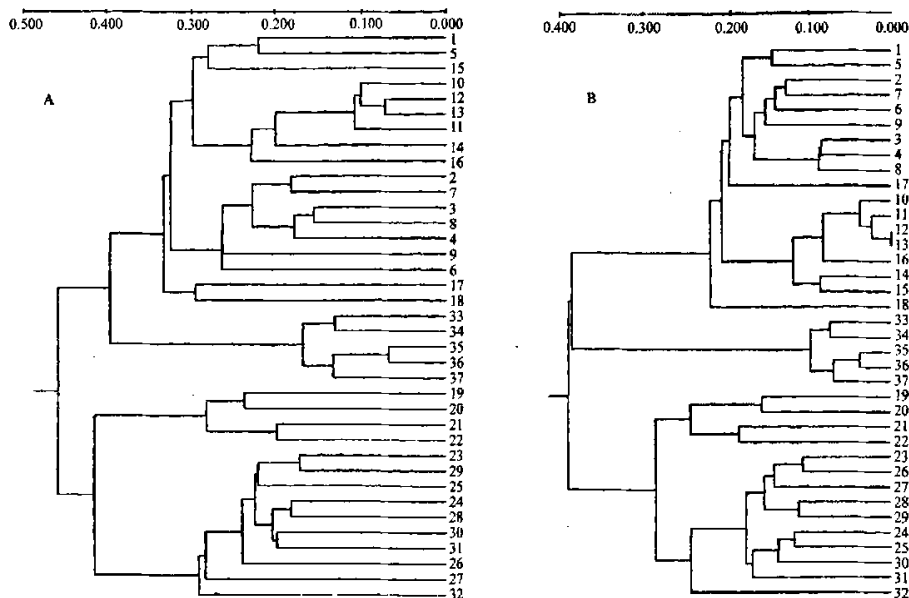


图 2 基于 ISSR(A)和 RAPD(B)数据绘制的 37 份供试材料的聚类图

Fig. 2 Dendrograms of cluster for 37 accessions of *Lycoris* Herb. based on ISSR (A) and RAPD (B) markers

州的 32 号聚类,表明后者与其他中国石蒜的亲缘关系较远。RAPD 聚类图中,换锦花、忽地笑的聚类结果与 ISSR 完全一致,而石蒜和中国石蒜种内不同来源材料的聚类有一定的差异。石蒜 18 份材料中,除 1、5、17 外,其他材料的聚类与 ISSR 基本相同;中国石蒜中除 32 与其他材料的遗传距离大,表现出较远的亲缘关系外,来自宝华山和琅琊山的材料聚类较紧凑,9 份材料明显地分为两个亚支,第 1 亚支由 23、26、27、28、29 组成,第 2 亚支由 24、25、30、31 组成。来自琅琊山的 24、25 号样品花形一样,但花色上稍有差别,前者深黄色、后者淡黄色, RAPD 将其聚在一起,相比之下,ISSR 却能区分这两个花色不同的样本。两种标记中安徽琅琊山和江苏宝华山的中国石蒜聚类存在明显的交叉现象。

2.4 两种分子标记的相关性分析:为了检测同组样品内 ISSR 和 RAPD 分析的相关程度,对基于这两种标记的样品遗传相似性系数矩阵进行了相关分析。两种标记检测的遗传相似性在供试的 4 种植物 37 份材料中呈极显著的相关($r=0.858\ 2>r_{0.01}, n=666$),这进一步验证了两种标记聚类结果的相似性。

3 讨论

3.1 ISSR 和 RAPD 标记试验结果的可靠性与实验条件的稳定性:本研究的结果表明,ISSR 和 RAPD 对石蒜属 4 种植物进行遗传分析时,都能很好地区分种间关系。但对种下水平区分时, RAPD 区分能力稍弱(如聚类图中 12 和 13),对中国石蒜

(如 25、27)的区分,ISSR 也表现出比 RAPD 更强的区分能力。这与多位学者^[6,7]的研究结论一致。尽管如此,本研究认为 RAPD 标记技术仍可以有效地应用于石蒜属植物的遗传多样性评价研究中。ISSR 和 RAPD 标记的遗传相似系数之间存在极显著的相关性,也说明运用这两种标记技术分析石蒜属植物种质资源遗传多态性的可靠性。

对于要求检测大量样本的遗传多样性和居群遗传结构研究来说,检测手段的实验稳定性是至关重要的问题。本研究中 RAPD 对 PCR 反应的敏感,主要表现在 RAPD 对退火温度、模板的纯度的改变非常敏感,以致造成弱带的不稳定、带谱丰度的明显改变;而对 Mg^{2+} 、DNA 模板、dNTPs 及引物浓度在一定范围内改变却稳定得多。这一结果与 Schierwater 等^[8]和 Skroch 等^[9]得出的结论相符。因此要获得稳定可靠、重复性好的实验结果,必须在保证 DNA 模板质量的前提下,尽可能对反应条件的多项指标实行精确控制,并确保使用同一台 PCR 循环仪和同一批次的酶。相比之下,ISSR 对 PCR 的反应敏感性较低,这可能是本试验中用于扩增的 ISSR 引物长度都在 16~18 bp,反应退火温度偏高,引物与模板结合较稳定所致。Gilbert 等^[6]和 Yang 等^[7]的研究结论同样表明 ISSR 的反应稳定性优于 RAPD。

3.2 遗传相似性与遗传分化:遗传相似性的高低可以反映出样品间遗传差异的大小及其亲缘关系的远近,本研究中 37 份供试材料的遗传相似系数的平均

值 ISSR 和 RAPD 分别为 0.683 6、0.742 8, 遗传距离最小值分别为 0.067 7 和 0.000 0, 表明样品间有很高的遗传相似性。聚类图中石蒜与换锦花, 中国石蒜与忽地笑亲缘关系最近, 这与笔者进行的种间 ISSR 标记(待发表资料)和张露等^[2]的种间 RAPD 标记及聂刘旺^[10]同工酶谱分析的结果是一致的, 也与以往细胞学研究相符^[11,12], 因为石蒜和换锦花同时存在染色体数目为 $2n=22$ 或 33 的个体(核型 $22t$ 和 $33t$), 而忽地笑和中国石蒜的染色体数和核型都比较接近, 忽地笑 $2n=14$ 或 16 (核型 $8m+6T$ 或 $6m+10T$) 和中国石蒜 $2n=16$ (核型 $6m+10T$ 或 $8m+8T$)。

遗传分化系数(Gst)和 AMOVA 分析结果表明种间差异相当明显, 基因流 $Nm=0.578\ 2\sim0.940\ 6<1$, 说明种间产生了明显的遗传分化。其原因可能是: (1)植物的基因流是借助花粉、种子、孢子、营养体等遗传物质携带者的迁移或运动来实现的, 其中种子和花粉的传播是两种最主要的形式, 供试的 4 个种中, 中国石蒜的花期较早, 加上石蒜属植物的自然花期短, 因此它们之间通过花粉的扩散方式进行基因交流几率较小。(2)石蒜属植物的种子与花粉传播能力有限, 有性繁殖产生的个体只存在于 $2\sim6\ m$ ^[13], 且野生状态下石蒜种子萌发率偏低。(3)本属植物能以其鳞茎进行无性繁殖, 可归类为克隆植物, 这势必使其基因流传递受到进一步局限。(4)地理隔离或物理屏障在种群的分化和种群间的基因交流中起到重要作用。

3.3 遗传多样性: RAPD 和 ISSR 标记均可显示出种间与种内的遗传差异(图 1), 并能将供试材料按种间差异或种内不同基因型差异的大小区分开来。两种分子标记多项指标揭示的遗传多态性均以石蒜最高, 中国石蒜次之, 忽地笑位居第三, 换锦花最低。一方面可能与其地理分布和来源有关, 石蒜和忽地笑均为广布种, 而换锦花主要来自浙江舟山群岛, 中国石蒜的分布介于二者之间。另一方面可能与试验中同种材料的样本数多少有关。

供试的 4 个种中, 虽然换锦花的聚类与地理来源呈一定的相关性, 但其他 3 个种的聚类与地理来源没有明显联系。中国石蒜和石蒜, 来自贵州的与华东地区的材料有较远的亲缘关系, 原因可能是地理隔离是植物种群间基因交流的一道天然屏障, 削弱了两地之间植物种群基因交流, 从而导致种内出现较明显的分化。可能与盾叶薯蓣南北居群产生了明显的遗传分化的原因相同^[14]。石蒜中 18 号样本(江

苏宝华山)与同种其他材料的亲缘关系最远, 也许是因为江浙一带是我国石蒜属植物的分布中心, 自然资源十分丰富、种类繁多, 种群之间发生了基因交流。安徽琅琊山和江苏宝华山的中国石蒜材料聚类存在明显的交叉现象, 原因也是如此。本研究中的忽地笑来自 3 个中西部省份, 换锦花为浙江省两个不同地方的材料, 因此, 对研究这两个种的遗传多样性有一定的局限性, 今后可收集更多分布区域的资源进行居群遗传结构等研究。

3.4 石蒜属植物资源的合理开发利用与遗传多样性保护: 了解植物遗传变异大小及物种在空间上的分布格局对于植物资源的合理开发利用和制定科学的保护策略起着极为重要的作用。通过野外调查采集实践和分子标记结果, 笔者认为, 供试的 4 种石蒜属植物除换锦花外, 野生资源及其遗传多样性都是相当丰富的。从遗传学的角度来看, 丰富的遗传多样性意味着比较高的适应能力和具有较大的育种和遗传改良能力。在天然状态下, 石蒜、中国石蒜、忽地笑具有很大的进化潜力, 且我国数量多, 难以自然灭绝, 但它们主要用鳞茎进行克隆繁殖, 种子繁殖系数较低, 其中的三倍体物种不能产生种子, 所以石蒜的自然更新能力赶不上人为对其无计划、无节制的采挖速度。因此, 随着对石蒜属植物药用成分研究的深入, 人们在对野生资源开发利用的同时, 更应加快繁育新品种特别是高含量加兰他敏的品种选育及其相应配套的栽培技术体系研究。以达到从根本上解决用于现代制药行业所需的植物原料缺乏问题, 从而有效地避免对我国特有的野生花卉和药用石蒜资源的过度采挖造成某些物种的濒危或灭绝。

References:

- [1] Zhang L, Cai Y M, Zhu G Q, et al. Analysis of the interspecific relationships on *Lycoris* (Amaryllidaceae) by use of RAPD [J]. *Acta Genet Sin* (遗传学报), 2002, 29(10): 915-921.
- [2] Shi S D. Studies on the interspecific relationships and hybrid origin of the genus *Lycoris* (Amaryllidaceae) [A]. *Dissertation of Doctor Degree of Zhejiang University* (浙江大学博士论文) [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2005.
- [3] Deng C L. Studies on the phylogenetics of *Lycoris* and germplasmic resources of *Lycoris longituba* [A]. *Dissertation of Doctor Degree of Nanjing Forestry University* (南京林业大学博士论文) [D]. Nanjiang: Nanjing Forestry University, 2005.
- [4] Exccffler L, Smouse P E, Vatiro Q J M. Analysis of molecular variance inferrel from metric distances amory DNA haplotypes: application fo human mitochondriol DNA restriction data [J]. *Genefics*, 1992, 13: 479-491.
- [5] Zhang F M, Ge S. Data analysis in population genetics. I. Analysis of RAPD data with AMOVA [J]. *Biodiv Sci* (生物多样性), 2002, 10: 438-444.
- [6] Gilbert J E, Lewis R V, Wilkinson M J, et al. Developing an

- appropriate strategy to assess genetic variability in plant germplasm collections [J]. *Theor Appl Genet*, 1999, 98: 1125-1131.
- [7] Yang W P, Oliveira A C, Godwin I, *et al.* Comparison of DNA marker technologies in characterizing plant genome diversity: variability in Chinese sorghums [J]. *Crop Sci*, 1996, 36: 1669-1676.
- [8] Schierwater B, Ender A. Different thermostable DNA polymerase may amplify different RAPD products [J]. *Nucl Acids Res*, 1993, 21: 4647-4648.
- [9] Skroch P, Nienhuis J. Impact of scoring error and reproducibility of RAPD data on RAPD based estimates of genetic distances [J]. *Theor Appl Genet*, 1995, 91: 1086-1091.
- [10] Nie L W, Zhang D C, Zhang H J, *et al.* A study on three isozymes in plant of *Lycoris* Herb. [J]. *J Biol* (生物学报), 2003, 20(2): 27-29.
- [11] Kurita S. Variation and evolution in the karyotype of *Lycoris*, Amaryllidaceae W. Modes of karyotype alteration within species and probable trend of Karyotype evolution in the genus [J]. *Cytologia*, 1988, 53: 323-335.
- [12] Liu Y, Shu P S. A study on karyotypes of the genus *Lycoris* [J]. *Acta Phytotax Sin* (植物分类学报), 1989, 27(4): 257-264.
- [13] Chung M. Clonal and spatial genetic structure in a population of the endangered herb *Lycoris sanguinea* var. *Koreana* (Amaryllidaceae) [J]. *Genes Genet Syst*, 1999, 74(2): 61-66.
- [14] Huang C H, Hang Y Y, Zhou Y F, *et al.* Population genetic structure of *Dioscorea zingiberensis* in China [J]. *Acta Bot Yunnan* (云南植物研究), 2003, 25(6): 641-647.

白花蛇舌草氮、磷、钾吸收分配特性研究

李贺敏, 李潮海*

(河南农业大学农学院, 河南 郑州 450002)

摘要:目的 在大田条件下研究了白花蛇舌草对氮、磷、钾的吸收分配规律。方法 定期取样研究干物质积累规律, 采用常规测定方法测定植株氮、磷、钾的量。结果 白花蛇舌草苗期对氮、磷、钾吸收较少, 分枝开花期和结果期吸收量快速增加, 成熟期氮、磷吸收减少, 钾出现“负吸收”。白花蛇舌草植株对氮素吸收最多、钾次之、磷最少, 全生育期植株对氮、磷、钾的吸收比率为 1.00 : 0.16 : 0.54。苗期和分枝开花期氮、磷、钾主要积累在叶和茎中, 其中氮素以叶中分配最多, 磷和钾则主要分配在茎中; 结果期和成熟期氮、磷、钾多分配在花果和茎中, 氮和磷花果中最多, 钾则茎中最高。结论 白花蛇舌草在苗期对肥料要求不多, 可适当少施。分枝开花期和结果期吸收量骤增, 要加大施肥用量, 结果期对磷肥和钾肥要求较多, 应适当补施磷肥和钾肥以满足此期果实生长的需要。

关键词: 白花蛇舌草; 氮、磷、钾; 吸收; 分配

中图分类号: R282.2

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2007)10-1561-06

Absorption and distribution of nitrogen, phosphorus, and potassium of *Hedyotis diffusa*

LI He-min, LI Chao-hai

(College of Agronomy, Henan Agriculture University, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: Objective The absorption and distribution of nitrogen (N), phosphorus (P), and potassium (K) of *Hedyotis diffusa* was studied in field tests. **Methods** Through regular sampling, dry matter accumulation was studied, the contents of N, P, and K were analyzed by conventional methods. **Results** The uptake amount of N, P, and K by *H. diffusa* was lower at seedling stage, but increased rapidly at branching, blossoming, and fruiting stages, and the uptake amount of N and P decreased and K was negatively absorbed at mature stage. The uptake amount of N by *H. diffusa* was the highest, following was K_2O , while P_2O_5 was the lowest. In the growing season of *H. diffusa*, the ratio of N, P_2O_5 , and K_2O was 1.00 : 0.14 : 0.54. N Mainly distributed in leaf at seedling, branching, and blossoming stages, while P_2O_5 and K_2O mainly distributed in stem. The mineral nutrition mostly distributed in stem, flowers, and fruits at fruiting and mature stages, N and P_2O_5 mostly distributed in flowers and fruits, but K_2O mainly accumulated in stem. **Conclusion** A little fertilizer should be applied at seedling stage, oppositely the use

收稿日期: 2007-01-20

基金项目: 河南省科技攻关项目 (0524420022)

作者简介: 李贺敏 (1972-), 女, 河南上蔡人, 在职博士, 讲师, 主要从事药用植物栽培研究。

Tel: 13592667307 E-mail: lihemin2002@163.com

* 通讯作者 李潮海 Tel: (0371) 63558116

ISTIC	PKU
-------	-----

