

山东丹参 (*Salvia miltiorrhiza*) 不同地理 居群的遗传多样性

宋振巧, 王建华*, 王洪刚, 王明明, 解玉丽

(山东农业大学农学院, 泰安 271018)

摘要:以山东泰安、临沂、莱芜、菏泽和潍坊 5 个居群的 72 份丹参株系为材料, 利用 ISSR 引物进行群体遗传结构的研究。结果表明: 8 个 ISSR 引物在 5 个居群中共扩增出 219 个位点, 平均可扩增出 27 条带, 在种级水平及泰安、临沂、莱芜、菏泽和潍坊 5 个居群水平多态性位点百分比分别为 98.63%、81.28%、66.67%、66.21%、51.14% 和 50.68%, 种级水平的 Nei 基因多样性和 Shannon 信息指数大于各居群; 5 个居群 Nei 基因多样性和 Shannon 信息指数相比较, 泰安 > 临沂 > 莱芜 > 菏泽 > 潍坊; 根据基因分化系数, 测得的基因流值 N_m 为 4.2352; UPGMA 聚类分析结果表明, 莱芜居群和临沂居群遗传一致度最大, 遗传关系最近, 泰安居群与其它 4 个居群遗传关系最远; 分析发现菏泽居群、泰安居群是相对独立的群体, 但 5 个居群间存在部分基因交流。所有参数分析表明, 泰安居群遗传多样性最丰富, 故在制定原位种质保护计划时应优先考虑泰山周边地区的丹参。

关键词:丹参; ISSR 标记; 遗传多样性

文章编号: 1000-0933(2008)11-5370-07 中图分类号: Q346 文献标识码: A

Genetic diversity of different eco-geographical populations in *Salvia miltiorrhiza* revealed by ISSR Markers in Shandong, China

SONG Zhen-Qiao, WANG Jian-Hua*, WANG Hong-Gang, WANG Ming-Ming, XIE Yu-Li

Agronomy College, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China

Acta Ecologica Sinica, 2008, 28(11): 5370 ~ 5376.

Abstract: 72 *Salvia miltiorrhiza* lines from five different geographical populations located at Tai'an, Linyi, Laiwu, Heze and Weifang in Shandong province of China were studied by ISSR markers. The results indicated that 219 polymorphic bands were detected with 8 primers, average twenty-seven bands every primer. The percentage of polymorphic loci (P) was 98.63%, 81.28%, 66.67%, 66.21%, 51.14% and 50.68%, respectively at species level and Tai'an, Linyi, Laiwu, Heze and Weifang population level. The Nei's gene diversity index and Shannon's information index of species level were higher than population level. The Nei's gene diversity index and Shannon's information index of five populations were Tai'an > Linyi > Laiwu > Heze > Weifang. Gene flow between the populations was 4.2352 based on genetic differentiation coefficient. UPGMA cluster analysis indicated that Laiwu population and Linyi population were the highest in Genetic identity which was the nearest in genetic relationships, and the genetic distance between Tai'an population and other four populations were the farthest. The results showed that Heze population and Tai'an population were relative independent

基金项目: 山东省农业良种工程资助项目 ([2007]217-12)

收稿日期: 2008-05-08; 修订日期: 2008-06-27

作者简介: 宋振巧 (1976 ~), 女, 山东济南人, 博士生, 主要从事药用植物种质资源及栽培生理研究. E-mail: szq@sda. edu. cn

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: jhwangjh@163. com

Foundation item: The project was financially supported by the agricultural good breed engineering of Shandong Province (No. [2007]217-12)

Received date: 2008-05-08; **Accepted date:** 2008-06-27

Biography: SONG Zhen-Qiao, Ph. D. candidate, mainly engaged in germplasm resources of Chinese herb and physiological research. E-mail: szq@sda. edu. cn

populations, but there were still some gene exchange between five populations. Based on the study of population genetic structure, Tai'an population should be given a high priority consideration in *Salvia miltiorrhiza* populations in situ germplasm conservation strategies owing to its highest genetic diversity.

Key Words: *Salvia miltiorrhiza*; ISSR marker; genetic diversity

丹参(*Salvia miltiorrhiza*)为唇形科鼠尾草属多年生植物丹参的干燥根及根茎,是我国传统名贵常用大宗中药材。其有效成分主要为丹参酮 I A、丹参酮 II A 和隐丹参酮等二萜醌类化合物。丹参以根入药,具有镇静安神、消肿止痛、祛瘀生新、活血调经等功效^[1],主要用于治疗冠心病、心绞痛、月经不调、痛经、失眠、心悸等症,特别是在治疗心脑血管疾病方面疗效显著。近年来新的研究表明,丹参可以有效地抑制癌细胞增生^[2]。随着需求量的增加,栽培丹参逐渐替代野生丹参成为中药丹参的主要来源,目前我国丹参的主要产地有山东、河南、陕西和四川等省,安徽、甘肃等省也有少量种植。

药材最重要的性状是品质,一般来源于道地产区的药材品质好、产量大。在历史上湖北、河南、山东、陕西、四川和山西等省都曾经是丹参的主要产地或道地产区。其中山东省是我国丹参的种植大省,也是现代栽培丹参的道地产区,在全国占有重要地位,主要分布于泰安、临沂、日照、菏泽、淄博、潍坊等县市。山东栽培丹参主根细、须根多,丹参酮 II A 的含量高^[4],而且品质好、产量大。另外,山东的栽培丹参多是通过种子繁殖,因而可能保留了更广泛的种质资源。如郭宝林等^[3]研究发现山东的栽培居群与相应的野生居群的遗传多样性基本一致,表明这些地区的栽培过程中少有人工选择。因此,加强山东产地丹参群体遗传结构和遗传变异的研究,评价其遗传多样性对于丹参的科学保护和有效利用等都具有重要意义。

通过对山东主要产地收集的材料进行形态学观察,发现山东丹参在形态上表现出较丰富的遗传多样性;同时根据形态差异进行材料的分类,以及有效成分含量的测定,发现丹参酮 II A、丹酚酸 B 含量存在显著差异,表现出丰富的遗传多样性。

我国对来自全国主产区的丹参和丹参种间资源进行了一些研究。郭宝林等^[3]采用 RAPD 对来自全国不同主产区及山东沂水的丹参遗传关系进行了研究,发现丹参居群内存在丰富的遗传变异;张兴国等^[5]对不同类型的川产丹参进行了 RAPD 分析;汪红等^[6]利用 ITS 片段对丹参的种间材料进行了遗传多样性分析。而针对山东省内不同地区丹参的遗传结构研究还未见报道,利用 ISSR 分子标记技术对丹参遗传多样性进行的研究也未见报道。ISSR 标记以其多态性高、重复性较好和显性遗传而被认为是较理想的遗传标记^[7]。本研究在前期研究工作的基础上,进一步利用分子系统学及 ISSR 标记技术对来自山东不同居群的 72 个株系的群体遗传结构进行了研究,旨在探讨山东道地产区的遗传多样性并为其保护和利用提供分子依据。

1 材料和方法

1.1 材料

本实验于 2006~2007 年在山东农业大学中药研究实验室进行,以生长在山东省潍坊(WF₁₋₉)、临沂(LY₁₋₁₂)、莱芜(LW₁₋₁₂)、菏泽(HZ₁₋₁₁)和泰安(TA₁₋₂₈)5 个居群共 72 个实生株系为试料。材料采集的地理位置见图 1。每个材料取适量幼嫩叶片,低温下带回实验室,冷冻于 -20℃ 冰箱中备用。

1.2 方法

采用改良 CTAB 法提取基因组 DNA,扩增反应在 BIO-RAD 型基因扩增仪上进行。丹参的 ISSR-PCR 反应优化体系为:在总体积 25 μl 的反应体系中,含 1 ×

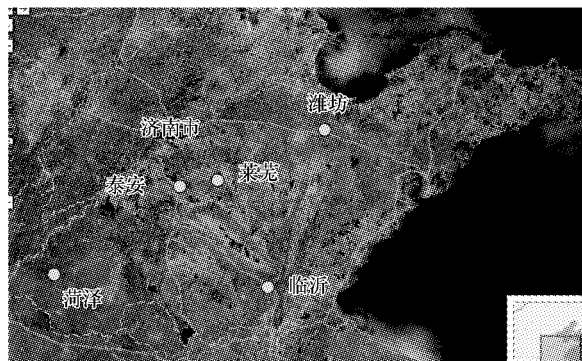


图 1 采样地点在山东的地理位置

Fig. 1 Geographic locations of the 5 *Salvia miltiorrhiza* populations in the Shandong Province, China

PCR buffer, 0.75U TaqDNA 聚合酶, $2.5\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{Mg}^{2+}$, $0.8\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 引物, $0.3\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ dNTP, 120 ~ 150ng 模板 DNA, 退火温度为 53°C 。PCR 扩增程序为: 94°C 预变性 7min, 1 个循环; 94°C 变性 45s, 53°C 退火 90s, 72°C 延伸 120s, 45 个循环; 72°C 延伸 7 min, 1 个循环。 4°C 保存备用。PCR 扩增产物中加入适量 5:1 的溴酚兰, 混匀, 用 DL2000 DNA Marker 作对照, 用 6% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳。电泳条件: $5\times\text{TBE}$ 缓冲液和 120V 的电压电泳分离。至溴酚兰迁移到适当位置时停止电泳, 结束后固定、银染、显影, Tanon 3500 型凝胶成像系统观察、照相并保存。

1.3 数据分析

在特定的 ISSR 位点上, 测定每一供试样品的等位位点组成。电泳资料采用 0、1 二维数据矩阵的方法录入电脑, 有带记录为 1, 无带记为 0。数据分析采用 NTSYSpc-2.10e (Exeter Software, Setauket, N. Y.)、POPGENE version 1.32 软件。

ISSR 引物多态性信息用多态性带数和多态性带数百分数估计。居群的遗传多样性信息用 Shannon 信息指数 $I^{[8]}$ 和 Nei 基因多样性 H 估计^[9]。居群间的遗传分化采用遗传分化系数 G_{st} 和基因流 $Nm^{[10]}$ 来估算。居群间的聚类根据 Nei 的遗传距离 D 和遗传一致度 I_N , 采用非加权算术平均聚类法 (UPGMA) 进行聚类分析^[11]。居群内的聚类根据 SM 相似系数矩阵采用 UPGMA 聚类法进行聚类分析^[12]。

2 结果与分析

2.1 不同 ISSR 引物在山东丹参各群体中的扩增多态性

从 96 个 ISSR 引物中选出 8 个扩增产物多态性好、谱带清晰的引物, 利用选出的 8 个引物对 72 个丹参样本的基因组 DNA 进行扩增 (图 2)。

不同 ISSR 引物在山东丹参各群体扩增结果进行的多态性及遗传分化分析结果列于表 1。由表中可以看出, 不同的引物扩增的总带数明显不同, 8 个引物扩增的总带数范围从 22 到 35 条不等, 其中引物 UBC808 扩增的多态性带最多为 35 条, 引物 UBC856 扩增的多态性带数最少为 22 条, 平均扩增带数为 27 条。同一引物在不同群体扩增多态性也存在明显差异, 引物 UBC846 在泰安居群多态性百分比 ($P=92.59\%$) 最高, 在潍坊居群最低 ($P=37.04\%$)。5 个居群中泰安居群平均多态性带数 (22.25) 和多态性百分数 ($P=82.62\%$) 最高。

对各位点的基因多样性进行统计发现, 各位点 Nei 基因多样性 (H) 为 $0.129\sim0.212$, 平均 0.159 。方差分析显示 H 在多数位点具有显著性差异, 个别位点之间具有极显著差异。根据群体遗传分化系数 $G_{st}=0.082$, 计算得 G_{st} 基因流 $Nm=4.2352$, 说明群体间存在部分基因交流。

2.2 山东丹参不同居群的遗传多样性

利用 POPGENE version 1.32 软件对实验数据进行各项参数的统计分析, 结果列于表 2。表 2 显示, 山东丹参种级水平的多态性位点数目为 216, 多态性位点百分比为 98.63% , 高于各居群的多态性位点和百分比。5 个居群的多态性条带数量和多态性比率, 范围分别为 $111\sim178$ 和 $50.68\%\sim81.28\%$; 其中泰安居群的多态性位点数目、多态性位点百分比、观测的等位位点数 (N_a) 和有效等位位点数 (N_e) 这 4 个参数值均高于其他 4 个居群。

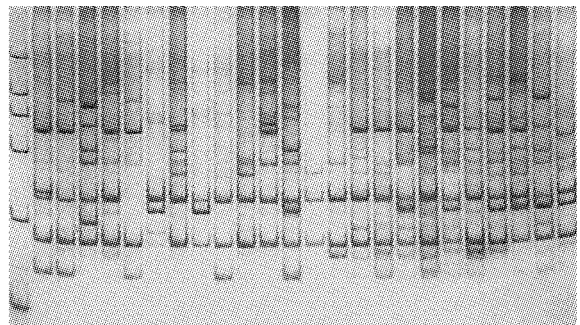


图 2 ISSR 引物 UBC840 对丹参的扩增图谱

Fig. 2 ISSR Amplified result of *Salvia miltiorrhiza* by primer UBC840

泳道从左到右依次为 DL2000 DNA Marker、WF1-9、LY1-11、LW1-4
The lanes from left to right were DL2000 DNA Marker, WF1-9, LY1-11, LW1-4

表 1 不同 ISSR 引物在山东丹参各群体扩增多态性及遗传分化

Table 1 Polymorphism of different ISSR primers in the *Salvia miltiorrhiza* populations and gene differentiation in ShanDong

引物名称 Primer name	总带数 Total amplified bands	潍坊 Weifang		临沂 Linyi		莱芜 Laiwu		菏泽 Heze		泰安 Tai'an		Nei 基因 多样性 H Nei's gene diversity	遗传分化 系数 G_{st} The coefficient of gene differentiation
		A	P(%)	A	P(%)	A	P(%)	A	P(%)	A	P(%)		
UBC808	35	23	65.71	23	65.71	28	80	17	48.57	28	80	0.147bAB	0.068abAB
UBC816	26	11	42.30	19	73.07	18	36.23	10	38.46	21	80.77	0.150bAB	0.093aAB
UBC840	29	8	27.58	16	55.17	16	55.17	11	42.30	18	62.06	0.129bB	0.102aA
UBC841	27	17	62.96	17	62.96	21	77.78	12	44.44	19	77.37	0.148 bAB	0.081abAB
UBC846	27	10	37.04	19	77.37	11	40.74	16	59.26	25	92.59	0.143bAB	0.080abAB
UBC850	25	14	56	16	64	16	64	13	52	22	88	0.167aAB	0.086abAB
UBC856	22	14	63.63	19	86.36	16	72.72	18	81.81	20	90.90	0.212aA	0.050 bB
UBC864	28	14	50	17	60.71	19	67.85	14	50	25	89.28	0.179abAB	0.094 aAB
平均 Average	27.38	13.88	50.65	18.25	68.17	18.13	61.81	13.88	52.11	22.25	82.62	0.159	0.082

A: 多态性带数 The number polymorphic bands; P: 多态性带百分数 The percentage of polymorphic bands

表 2 山东丹参居群的遗传多样性

Table 2 Genetic diversity of *Salvia miltiorrhiza* populations

居群 Population	多态性位点数目 The number of polymorphic loci	多态性位点 百分比(%) The percentage of polymorphic loci	观测的等位 位点数 N_a Observed number of alleles	有效等位 位点数 N_e Effective number of alleles	Nei 基因 多样性 H Nei's gene diversity	Shannon 信息指数 I Shannon's Information index
种级水平 Species Level	216	98.63	1.9863	1.2155	0.1575	0.2764
潍坊 Weifang	111	50.68	1.5068	1.1657	0.1129	0.1870
临沂 Linyi	146	66.67	1.6667	1.2044	0.1427	0.2383
莱芜 laiwu	145	66.21	1.6621	1.1962	0.1364	0.2292
菏泽 Heze	112	51.14	1.5114	1.1907	0.1268	0.2051
泰安 Tai'an	178	81.28	1.8128	1.2309	0.1559	0.2611

对山东丹参 5 个居群的 Nei 基因多样性进行比较,泰安居群最高($H=0.1559$),其次临沂($H=0.1427$),莱芜($H=0.1364$),菏泽($H=0.1268$),潍坊($H=0.1129$)最低;Shannon 信息指数比较结果为泰安($I=0.2611$)>临沂($I=0.2383$)>莱芜($I=0.2292$)>菏泽($I=0.2051$)>潍坊($I=0.1870$)。但方差分析显示 Nei 基因多样性($F=0.335, p>0.05$)和 Shannon 信息指数($F=0.517, p>0.05$)在各群体间差异不显著(表 2)。从各参数的统计分析可以看出,泰安居群各遗传多样性参数值高于其他 4 个居群,建议优先在泰安居群建立原位保护区。

2.3 山东不同产地丹参群体间的遗传一致度和遗传距离

为了进一步分析各居群间的遗传分化程度,计算了 Nei 的遗传一致度 I_N 和遗传距离 D (表 3),群体的遗传一致度 0.9686~0.9966,遗传距离 0.0034~0.0319,说明居群间的相似程度较高,遗传距离较小。

表 3 山东丹参居群的 Nei 遗传一致度和遗传距离的无偏估计

Table 3 Nei's unbiased measures of genetic identity and genetic distance of *Salvia miltiorrhiza* populations

群体 Pop D	群体 Pop I_N				
	潍坊 Weifang	临沂 Linyi	莱芜 Laiwu	菏泽 Heze	泰安 Tai'an
潍坊 Weifang	* * * *	0.9936	0.9904	0.9792	0.9712
临沂 Linyi	0.0064	* * * *	0.9966	0.989	0.9762
莱芜 Laiwu	0.0097	0.0034	* * * *	0.9902	0.9783
菏泽 Heze	0.021	0.0111	0.0098	* * * *	0.9686
泰安 Tai'an	0.0292	0.0241	0.022	0.0319	* * * *

对角线上方为 Nei 遗传一致度,对角线下方为 Nei 遗传距离 Nei's genetic identity (above diagonal) and genetic distance (below diagonal)

采用 Nei 遗传距离无偏估计法进一步阐明居群之间的遗传关系,对得到的距离矩阵采用 UPGMA 法进行聚类分析,得到 5 个居群间的聚类分析图(图 3)。可以看出,莱芜居群和临沂居群遗传一致度最大,遗传距离最近;其次潍坊居群与临沂、莱芜两个居群较近,菏泽与上述 3 个居群遗传关系较远、而泰安居群与上述 4 个居群遗传关系最远(表 3)。

2.4 山东不同产地丹参 72 个株系聚类分析

使用 NTSYSpc-2.10e 软件,利用 UPGMA 聚类法对山东不同产地丹参 5 个居群的 72 个株系进行聚类分析,结果见图 4。

从图 4 可以看出,在相似性为 72.3% 处展开,所有

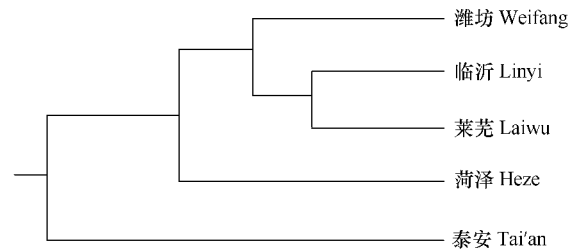


图 3 利用 UPGMA 距离法根据 Nei 遗传距离对 5 个山东丹参居群聚类分析

Fig. 3 Dendrogram obtained by UPGMA cluster analysis based on Nei's genetic distances among the five eco-geographical groups of *Salvia miltiorrhiza* in Shandong

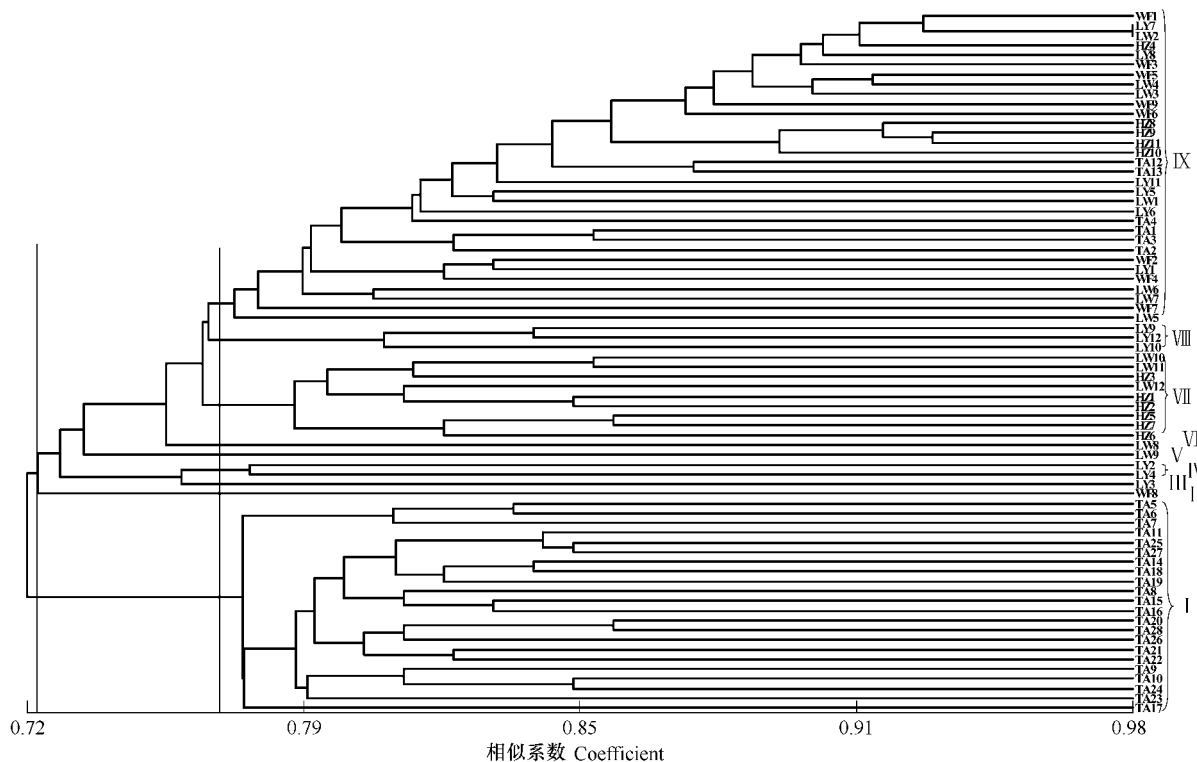


图 4 72 株山东丹参基于 SM 相似系数的 UPGMA 聚类

Fig. 4 Dendrogram of 72 *Salvia miltiorrhiza* based on UPGMA analysis using SM similarity coefficient

株系可以分成两大类,第 I 类包括泰安居群的大部分个体共 22 个,其余材料聚为一大类,说明泰安居群与其他材料的差异较大。对第 I 类以外的材料在相似性为 76.9% 处展开,这些材料可以分成八类,其中潍坊 8 号、临沂 3 号、临沂 2 号和 4 号、莱芜 9 号、莱芜 8 号分别分到 II、III、IV、V、VI 类中,第 VII 类包括菏泽 6 个材料以及莱芜 3 个材料,其中菏泽 6 个材料来自同一取材地点。另有 3 个临沂材料聚为第 VIII 类,剩余的材料聚为第 IX 类,包括潍坊大部分材料共 8 个材料(WF1-7, WF9)、莱芜 7 个(LW1-7)、泰安 6 个(TA1-4, TA12-13)、菏泽 5 个(HZ4, HZ8-11)、以及临沂 3 个(LY1, LY7-8)。

聚类分析表明:泰安、菏泽居群属于相对独立的群体,但与其它居群同时存在部分基因交流。

3 讨论

3.1 山东不同产地丹参群体遗传多样性及其保护

丹参在我国分布广泛,基本上全国各地都有野生资源,其中种植面积较大的省份有山东、陕西、河南等。在历史上山东省曾是丹参的主要产地或道地产区,郭宝林等^[3]认为山东仍然是现代丹参栽培的道地产区。因此山东产区丹参不论在过去还是现在,对我国丹参的质量控制和产量稳定都起着重要作用,因此,进一步加强山东不同产地丹参资源遗传多样性研究,对于这一重要中药资源的科学保护和有效利用都具有重要意义。

郭保林研究指出丹参种内多态性条带比率为 100%,而居群内的多态性条带比率最高只有 55%,与本研究结果一致^[3]。本研究结果显示种级水平多态性位点百分比为 98.63%,5 个居群内的多态性比率范围为 50.68%~81.28%,表明丹参种级水平具有较高的遗传多样性,而居群内的遗传多样性较低,但不同居群的遗传多样性存在差异。从 Nei 基因多样性分析,泰安丹参($H=0.1559$)最高,其次为临沂($H=0.1427$),莱芜($H=0.1364$),菏泽($H=0.1268$),潍坊($H=0.1129$)最低。遗传多样性其它参数相比较,泰安居群的多态位点百分比、有效等位基因数、Nei 基因多样性以及 Shannon 信息指数均大于其他居群。这说明泰安居群可能具有相对较丰富的遗传种质。同时聚类分析表明,泰安、菏泽居群属于相对独立的群体,因此建议将泰安居群纳入优先保护体系。

3.2 山东不同产地丹参群体的遗传分化和基因流

遗传分化和基因流是评价群体遗传结构的重要指标。本试验以 ISSR 标记为基础,对山东省内 5 个居群进行研究,测得 G_{st} 值为 0.082,说明山东不同产地丹参遗传分化大部分存在于居群内,居群间较小,仅为 8.2%,与郭宝林等的研究结果一致^[3]。

基因流是基因在群体内或群体间的流动^[13],它与群体遗传分化成负相关。遗传分化如 G_{st} 值越大,群体内或群体间基因流就越小。而基因流对于植物群体移动和进化非常重要。对种子植物来说,群体间的基因流主要是由花粉或种子携带外来基因这两种形式产生的^[14]。当 $Nm > 1.0$ 时,表明基因流水平较高,当 $Nm > 5.0$ 时,表明具有较高的异交率^[15],本试验结果显示山东不同产地丹参具有较高的基因流($Nm = 4.2352$),说明丹参可能为常异花或异花授粉植物。

3.3 山东不同产地丹参聚类分析

本论文对山东不同产地丹参 72 个株系进行聚类分析,共聚成九类,泰安、菏泽同一居群的大多数株系都能聚在一起,分别居在第 I 类和第 VII 类,说明这两个居群是相对独立的群体。其中第 IX 类由 5 个居群共同组成,说明居群间存在不同程度的基因交流。

利用 UPGMA 距离法根据 Nei 遗传距离(表 3)对 5 个居群进行聚类分析(图 3),结果显示莱芜居群和临沂居群遗传距离最近;其次潍坊居群与临沂、莱芜两个居群较近,菏泽与上述 3 个居群遗传关系较远、而泰安居群与上述 4 个居群遗传关系最远。从地理位置上看,临沂和莱芜、潍坊相邻,而它们与菏泽距离相对较远,尤其潍坊与菏泽($D=0.021$)之间地理距离最远,这说明了遗传距离和地理距离之间具有相关性。此外比较泰安居群与其他 4 个居群间的遗传距离,由小到大分别是泰安居群与莱芜居群($D=0.022$)、临沂居群($D=0.0241$)、潍坊居群($D=0.0292$)、菏泽居群($D=0.0319$),这也表现出遗传距离与地理距离的远近成一定相关性,说明地理距离可能是影响基因交流的最大障碍。

关于泰安居群与其它 4 个居群的遗传距离较大的原因,推测其中一个原因可能是由于泰安居群的材料主要来自泰山野生资源或野生驯化资源,不同材料之间的遗传差异比较大。另一个原因可能是泰安居群的样本数大于其它居群,居群内多态性条带比率、Nei 基因多样性随着样本数量的减少有相应减少的趋势,这也说明最好使用相同数目的样本来研究居群间的遗传差异。

References:

- [1] Chinese pharmacopoeia committee. Pharmacopoeia of the People's Republic of China. volume 1. Beijing: Chemical Industry Press, 2005. 52
- [2] Chen J, Zhong L, Qian L P, et al. Apoptosis of SGC7901 gastric cancer cell induced by Tanshinone II A and the primary mechanisms. Fudan

University Journal of Medical Sciences, 2007, 34(1):57—65.

- [3] Huang X L, Wang C G. Quality research of wild and cultivated *Salvia miltiorrhiza*. Journal of Chinese Medicinal Materials, 1989, 12(9):31—34.
- [4] Guo B L, Lin S, Feng Y X, *et al.* Primary research on genetic relationship among main populations of *Salvia miltiorrhiza* and genuineness of herb. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2002, 33(12):1113—1116.
- [5] Zhang X G, Wang Y M, Luo G A, *et al.* Studies on resource characteristics of *Salvia miltiorrhiza* varieties. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2002, 33(8):742—747.
- [6] Wang H, Wang Q. Analysis of rDNA ITS sequences of Radix et Rhizoma *Salviae Miltiorrhizae* and plants of *Salvia* L. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2005, 36(9):1381—1385.
- [7] Zhou Y Q. Application of molecular marker technique in plant research. Beijing: Chemical Industry Press, 2005. 145—146.
- [8] Shannon C E, Weaver W. The mathematical theory of communication. Urbana: University of Illinois Press, 1949
- [9] Nei M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. Proc Natl Acad Sci USA, 1973, 70:3321—3323.
- [10] Slatkin M, Barton N H. A comparison of three indirect methods for estimating average levels of gene flow. Evolution, 1989, 43: 1349—1368
- [11] Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Genetics, 1978, 89:583—590.
- [12] Romesburg H C. Cluster analysis for researchers. Life time Learning Publication. Belmont, California, 1984. 334.
- [13] Grant V. The evolutionary process: a critical study of evolutionary theory. New York: Columbia University Press, 1991.
- [14] Hamrick J L. Gene flow distribution of genetic variation in plant populations. In: Urbanska K. Differentiation patterns in higher plants. New York: Academic Press, 1987. 53—57.
- [15] Gu W C. Statistical Genetics. Beijing: Science Press, 2004. 6: 99.

参考文献:

- [1] 卫生部药典委员会. 中国药典一部. 北京: 化学工业出版社, 2005. 52
- [2] 陈坚, 钟良. 丹参酮 II A 诱导 SGC7901 胃癌细胞凋亡及机制. 复旦大学学报(医学版), 2007, 34(1):57~65.
- [3] 郭宝林, 林生, 冯毓秀, 等. 丹参主要居群的遗传关系及药材道地性的初步研究. 中草药, 2002, 33(12):1113~1116.
- [4] 黄秀兰, 王长根. 野生与栽培丹参的质量研究. 中草药, 1989, 12(9):31~34.
- [5] 张兴国, 王义明, 罗国安, 等. 丹参品种资源特性的研究. 中草药, 2002, 33(8):742~747.
- [6] 汪红, 王强. 丹参及鼠尾草属植物的 rDNA-ITS 序列分析. 中草药, 2005, 36(9):1381~1385.
- [7] 周延清. DNA 分子标记技术在植物研究中的应用. 北京: 化学工业出版社, 2005. 145~146.
- [15] 顾万春著. 统计遗传学. 北京: 科学出版社, 2004. 6:99.