

绞股蓝种质资源遗传多样性及亲缘关系的 ISSR 分析

李 华, 史美荣, 肖娅萍*

陕西师范大学生命科学学院, 药用资源与天然药物化学教育部重点实验室, 西北濒危药材资源开发国家工程实验室, 陕西 西安 710062

摘要: 目的 研究绞股蓝 *Gynostemma pentaphyllum* 种质资源的遗传多样性及亲缘关系。方法 采用 ISSR 分子标记技术对来自全国 12 个省市不同生态环境的 48 份绞股蓝种质材料进行遗传多样性及亲缘关系分析。结果 100 条 ISSR 引物中共筛选出 15 条扩增条带清晰、稳定性好且多态性明显的引物, 48 份材料 DNA 扩增共获得 214 个位点, 其中多态位点 206 个, 多态性比率 (PPL) 96.26%, 平均每条引物扩增位点为 14.27 个; 平均观察等位基因数 (N_a)、有效等位基因数 (N_e)、Shannon 多样性信息指数 (I) 和 Nei's 基因多样性指数 (H) 分别为 1.962 6、1.335 8、0.221 1 和 0.359 8; 种质材料间的遗传相似系数变幅为 0.57~0.96, 平均为 0.72。利用 UPGMA 聚类分析, 以遗传相似系数 0.71 为界, 48 份材料聚为 4 大类。结论 绞股蓝种质材料间的遗传多样性较高, 种质间的亲缘关系与其地理分布和生态环境并不完全一致。

关键词: 绞股蓝; 种质资源; 遗传多样性; 亲缘关系; ISSR 标记

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2015)11-1666-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.11.020

ISSR analysis on genetic diversities and phylogenetic relationships of *Gynostemma pentaphyllum* germplasm reseedources

LI Hua, SHI Mei-rong, XIAO Ya-ping

Key Laboratory of Medicinal Resources and Natural Pharmaceutical Chemistry, Ministry of Education; National Engineering Laboratory for Resource Developing of Endangered Chinese Crude Drugs in Northwest of China; College of Life Sciences, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China

Abstract: **Objective** To analyze the genetic diversities and phylogenetic relationships of *Gynostemma pentaphyllum* germplasm. **Methods** Genetic diversities and phylogenetic relationships of 48 *G. pentaphyllum* germplasm from 12 provinces in different ecological environments were analyzed by inter simple sequence repeat (ISSR) molecular makers. **Results** (1) Fifteen primers were selected from 100 primers which had clear and stable polymorphic bands. A total of 214 loci were obtained, including 206 loci, on average, amplification site of each primer 14.27 and polymorphic loci (PPL) was 96.26%. The averagely observed number of alleles (N_a), effective number of alleles (N_e), Shannon information index (I) and Nei's genetic index (H) were 1.962 6, 1.335 8, 0.221 1, and 0.359 8, respectively. The enetic similarity coefficient (GS) ranged from 0.57 to 0.96. Cluster annlysis with UPGMA method showed that the 48 testing materials were divided into four groups at the level GS 0.72. **Conclusion** The results of ISSR analysis reveal that *G. pentaphyllum* germplasm has a higher genetic diversity level and the genetic relationship is not entirely consistent with geographical distribution and ecological environment.

Key words: *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino; germplasm reseedources; genetic diversity; phylogenetic relationship; ISSR markers

绞股蓝 *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino 隶属于葫芦科 (Cucurbitaceae) 绞股蓝属 *Gynostemma* Bl. 多年生草质攀援藤本植物, 在印

度、缅甸、越南、老挝、马来西亚、印度尼西亚、朝鲜、日本等国家均有分布, 呈典型的亚热带分布类型^[1]。我国绞股蓝植物资源非常丰富, 主要分布于

收稿日期: 2014-10-17

基金项目: 国家“十二五”科技支撑计划 (660588)

作者简介: 李 华 (1988—), 女, 在读硕士, 研究方向为药用植物资源及生物技术。Tel: 18392393554 E-mail: 573024805@qq.com

*通信作者 肖娅萍, 女, 教授, 硕士生导师, 主要从事药用资源和天然药物化学研究。E-mail: yapingxiao@snnu.edu.cn

秦岭南坡、长江流域和淮河流域及其南部广大地区。因其含有与人参皂苷相似的达玛烷型皂苷, 又被誉为“南方人参”, 引起人们的广泛兴趣和重视。此外, 绞股蓝还含有氨基酸、蛋白质、小分子多糖、脂肪、黄酮类、微量元素和维生素等生物活性物质。现代药理研究表明, 绞股蓝具有降血糖、调血脂、抗肿瘤、抗氧化、抗衰老、增强免疫力等多种功效^[2-6]。

迄今为止, 在绞股蓝种质资源的收集、保存、分类鉴定及栽培育种等方面取得了一定的进展^[7-10], 但仍然存在不少问题, 其中种质分类鉴定困难及品系混乱问题尤为突出。长期以来, 对绞股蓝种质分类鉴定多是根据其表型性状的差别, 而遗传多样性的差异更重要的是表现在蛋白质、染色体和 DNA 水平上。分子标记的发展为从 DNA 水平检测种质资源的遗传多样性, 区别鉴定不同种质提供了有利的工具。目前 DNA 标记技术已有几十种^[10], 其中 ISSR (inter-simple sequence repeats) 是由加拿大蒙特利尔大学 Zietkiewice 等^[11]于 1994 年提出的一种建立在 PCR 反应基础上的新型微卫星类分子标记, 即简单序列重复区间扩增多态性的分子标记。该技术是基于 SSR 标记基础上发展而来, 其基本原理是利用若干串联重复碱基和几个非重复的锚定碱基所组成的序列作为引物, 对两侧具有反向排列 SSR 的一段基因组 DNA 序列进行扩增, 扩增产物会获得较多大小不一的片段, 经电泳后, 片段在凝胶上的位置能显示不同样品间的 ISSR 标记差异^[12]。该技术无需预知基因组背景信息, 具有 DNA 样品用量少、操作简单快捷、实验成本低等优点, 且稳定性较高, 实验重复性好, 更适合大批量样品的检测^[13]。近年来已广泛应用于各种种质资源的鉴定、遗传关系和遗传多样性分析以及种质资源指纹图谱的建立^[14-17]。

绞股蓝作为我国重要的药用植物资源, 已被列为《中国重点保护植物名录》II 级保护, 说明其自然植物资源已经受到了外在环境和人类活动的严重威胁^[18]。近年来由于大量的人为采挖和利用, 致使其野生资源变得更为稀少。因此, 广泛而深入地开展绞股蓝种质资源的调查、收集并对其遗传多样性进行研究已变得十分必要和迫切。庞敏等^[19]利用 RAPD 分子标记技术, 从 66 个随机引物中筛选出 5 个多态性好的引物, 构建了 19 份绞股蓝种质的指纹图谱, 并对其进行聚类分析, 初步探讨了绞股蓝种

质的遗传多态性。Wang 等^[20]利用 ISSR 分子标记研究了绞股蓝 14 个居群的遗传多态性和地理结构。结果表明, ISSR 标记能有效揭示绞股蓝居群间的遗传分化和分子变异水平, 但取材范围相对较狭窄。本研究采用 ISSR 分子标记对本实验室收集的来自全国 12 个省市区不同生态环境的野生绞股蓝种质资源的遗传多样性和亲缘关系进行分析, 取材范围更为广泛, 生境条件更为复杂, 目的在于从分子水平上揭示整个基因组的遗传变异及遗传多样性, 从而为全面掌握绞股蓝种质资源, 加强资源的有效保护和合理利用提供科学参考依据。

1 材料和方法

1.1 材料

绞股蓝种质材料是本实验室于 2012—2013 年 5~8 月采自云南、贵州、四川、重庆、陕西、河南、湖北、湖南、安徽、浙江、广西、福建省市区共 48 份, 经陕西师范大学植物教研室田先华教授鉴定为葫芦科绞股蓝属植物绞股蓝 *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino。野外采集时, 详细记录其生境和生物学特性等信息后, 采挖植株根茎移栽成活至陕西省平利县绞股蓝种植基地的种质资源圃内, 并进行编号及相关信息整理及记录, 具体来源见表 1。

以种质资源圃内生长 1 年的植株为植物材料, 采集其幼嫩叶片装入塑封袋内, 每袋 8~10 片小叶, 加入硅胶, 使硅胶充满到袋子的 2/3, 保持少量气封袋, 确保叶片与硅胶混匀, 以便快速干燥。第 1 次加入的硅胶量一定要充足, 确保叶片完全干燥, 待叶片彻底干燥后存放于 -80 °C 的冰箱中备用。每个材料选取 5 株, 等量嫩叶混合提取总 DNA。

1.2 方法

1.2.1 总 DNA 的提取及检测 采用改良 CTAB 法提取植物基因组 DNA, 用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 浓度及完整度, 经核酸蛋白分析仪测定质量浓度和相对纯度后, 将其稀释至 20 ng/μL 终质量浓度, -20 °C 保存备用。

1.2.2 引物的筛选 本实验根据加拿大哥伦比亚大学 (University of British Columbia, UBC) 核算蛋白工作室公布的 100 条 ISSR 引物序列设计, 由北京华大基因科技服务公司合成。随机挑选 3 个样本对 100 条引物进行筛选, 最终筛选出结果稳定、背景清晰且多态性好的引物用于绞股蓝种质材料样本的分析。

表1 材料及来源

Table 1 Experimental materials and sources

编号	采集地点	海拔/m	经纬度
1	陕西西安	573	103°50.103'E, 29°51.199'N
2	贵州施秉 1	775	108°06.873'E, 27°06.929'N
3	贵州施秉 2	802	108°06.461'E, 27°07.119'N
4	贵州安顺	917	108°03.843'E, 26°58.573'N
5	贵州铜仁	1 566	108°42.393'E, 27°53.958'N
6	云南景洪	542	100°56.636'E, 21°51.076'N
7	云南勐腊	584	101°35.241'E, 21°37.621'N
8	云南景洪药用植物园	596	100°47.667'E, 22°01.102'N
9	云南普洱	1 638	101°02.668'E, 22°51.491'N
10	湖南张家界 1	739	110°26.393'E, 29°18.765'N
11	湖南张家界 2	1 087	110°29.425'E, 29°23.004'N
12	重庆缙云山	851	106°23.485'E, 29°50.455'N
13	四川青城山 1	872	103°23.485'E, 29°50.455'N
14	四川青城山 2	905	103°28.554'E, 30°55.163'N
15	陕西宁陕	1 523	103°29.715'E, 33°33.664'N
16	河南灵宝	1 563	110°25.973'E, 34°29.344'N
17	河南西峡	1 026	111°27.880'E, 33°16.982'N
18	浙江杭州	51	120°21.997'E, 30°26.793'N
19	广西桂林 1	479	110°16.205'E, 25°15.375'N
20	广西桂林 2	480	110°16.478'E, 25°15.305'N
21	广西阳朔 1	141	110°28.294'E, 24°43.483'N
22	广西阳朔 2	141	110°28.285'E, 24°43.475'N
23	广西金秀 1	1 495	110°06.569'E, 23°58.063'E
24	广西金秀 2	1 215	110°06.770'E, 23°58.368'N
25	广西大新 1	372	106°43.492'E, 22°51.329'N
26	广西大新 2	401	106°43.244'E, 22°51.484'N
27	广西扶绥	83	107°48.176'E, 22°33.871'N
28	湖北竹溪	456	109°43.098'E, 32°18.655'N
29	湖北房县 1	805	110°44.003'E, 31°54.829'N
30	湖北房县 2	848	110°42.675'E, 31°53.656'N
31	湖北神农架	2 705	110°14.305'E, 31°26.901'N
32	湖北建始	1 500	110°02.305'E, 30°14.433'N
33	湖北恩施	904	109°11.112'E, 31°25.070'N
34	湖北宣恩	537	109°29.054'E, 30°00.271'N
35	湖北鹤峰	524	110°00.567'E, 29°53.197'N
36	福建南平	249	118°08.706'E, 26°25.297'N
37	福建大田	539	117°76.391'E, 26°08.127'N
38	福建漳平	278	117°27.611'E, 25°31.494'N
39	福建龙岩	546	117°00.905'E, 24°58.442'N
40	福建南靖	243	117°13.279'E, 24°53.888'N
41	陕西平利 1	1 084	109°16.871'E, 31°89.390'N
42	陕西平利 2	963	109°16.140'E, 31°88.034'N
43	陕西平利 3	775	109°25.505'E, 32°20.580'N
44	陕西平利 4	759	109°24.318'E, 32°21.537'N
45	陕西平利 5	675	109°25.061'E, 32°20.771'N
46	安徽合肥 1	94	117°10.269'E, 31°50.089'N
47	安徽合肥 2	111	117°10.214'E, 31°50.483'N
48	陕西师范大学绞股蓝种质资源圃内种植的绞股蓝		

1.2.3 PCR 扩增及检测 ISSR-PCR 扩增反应体系采用本实验室优化后的体系: 总体积 20 μL , 包含 2 μL 10 $\times$ PCR 缓冲液、模板 DNA 40 ng、 Mg^{2+} 2.0 mmol/L、dNTPs 0.25 mmol/L、引物 0.8 $\mu\text{mol/L}$ 、TaqDNA 聚合酶 1.0 U。扩增反应程序为 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, 之后 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 45 s, 40~60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min, 进行 35 个循环, 最后延伸 8 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。反应产物在含有 EB (ethidium bromide, 溴化乙锭) 的 2% 琼脂糖凝胶中电泳分离, 在凝胶成像系统中检测并照相。

1.2.4 数据处理与分析 ISSR 通常被认为是显性标记, 视每条多态性为一个等位基因。凝胶上相同迁移率位置上有 DNA 条带的记为 1, 没有 DNA 的记为 0, 将结果输入 Excel 表格, 得到 ISSR 表型数据矩阵。利用 POPGENE 32 (Version 1.32) 软件计算 ISSR-PCR 扩增产物的多态位点数、多态性位点比率 (PPL)、观测等位基因数 (N_a)、有效等位基因数 (N_e)、Nei's 基因多样性指数 (H)、Shannon 多样性信息指数 (I)。运用 NTSYS-PC (Version 2.10e) 软件的 Similarity 程序下 Qualitative data 对原始矩阵进行 Nei 遗传相似系数 (genetic similarity, GS) 计算, 选用 Clustering 中 ANAN 程序的非加权成组配对算术平均法 (UPGMA) 对绞股蓝种质材料进行相似系数聚类分析, 最后在 Graphic 中的 Tree plot 程序下建立树状图^[21]。

2 结果与分析

2.1 ISSR 扩增产物及多态性分析

利用筛选出的最优反应体系及反应程序, 从

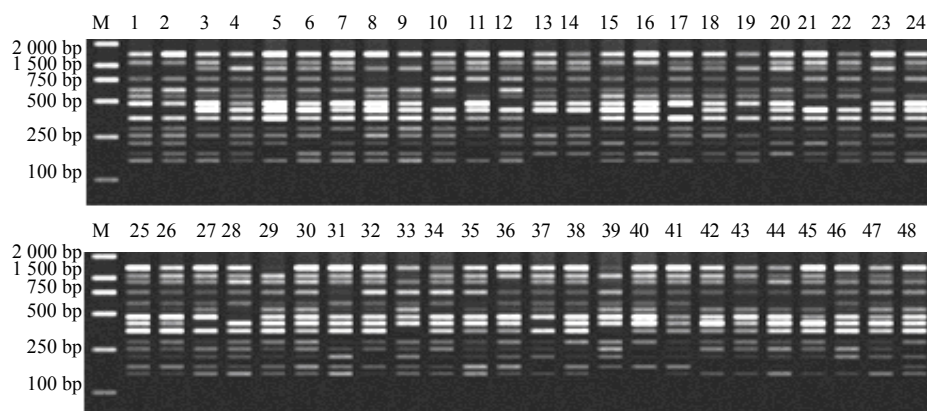
100 条 ISSR 引物里最终筛选出特异性好、多态性高且重现性好的 15 条引物, 用于 48 份绞股蓝种质材料基因组 DNA 的 PCR 扩增, 其中引物 UBC-807 对 48 份种质的扩增图谱见图 1。据表 2 的统计结果显示, 15 条引物共扩增出 214 个位点, 其中多态性位点 206 个, 平均 PPL 达 96.26%; 每个引物扩增位点 10~18 个, 平均 14.27 个, 其中多态性位点 9~18 个, 平均 13.73 个; 引物 UBC-807、UBC-862、UBC-866、UBC-887、UBC-888、UBC-889、UBC-891、UBC-895 引物多态性比率都高达 100%, 引物 UBC-834 的多态性最低也达 88.24%, 其中 UBC-888 扩增位点最多, 为 18 个, 引物 UBC-864 扩增位点最少。这说明供试绞股蓝种质资源间存在较高的遗传变异, 且 ISSR 分子标记能有效地从分子水平上揭示材料间的多态性。

2.2 遗传多样性分析

将 48 份绞股蓝种质材料的 ISSR 扩增谱带输入 POPGENE32 软件中进行分析, 结果表明, 绞股蓝种质材料的平均 N_a 、 N_e 、 I 和 H 分别为 1.962 6、1.335 8、0.221 1 和 0.359 8。

2.3 遗传相似性分析

GS 是用来比较群体或个体间相似程度的度量参数, 平均相似系数越高, 说明相似程度越大, 遗传背景一致性越强^[22]。48 份绞股蓝种质材料间的 GS 变化范围为 0.57~0.96, 平均为 0.72。由 GS 获得的次数分布图 (图 2) 可知, 遗传相似性系数主要集中在 0.60~0.75 内, 所占比例高达 88.21%, 说



1~48 为绞股蓝, 编号同表 1 M-Marker

1—48—Accession of *G. pentaphyllum* germplasm resources, numbers were showed in Table 1 M-Marker

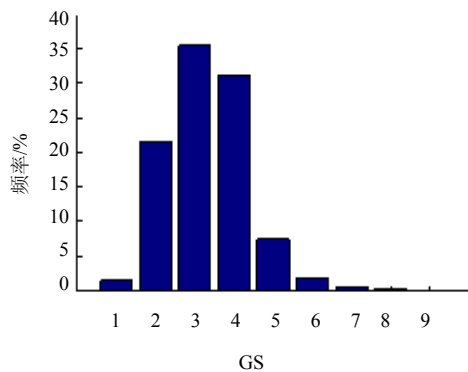
图 1 引物 UBC-807 对 48 份绞股蓝种质资源扩增图谱

Fig. 1 ISSR amplification result of *G. pentaphyllum* with Primer UBC-807

表 2 引物序列及位点多态性

Table 2 Sequence and amplified loci polymorphism of 15 primers

引物编号	序列 (5'-3')	退火温度/℃	位点数	多态位点数	PPL/%
UBC-807	(AG) ₈ T	50	14	14	100.00
UBC-831	(AC) ₈ YA	53	14	13	92.86
UBC-834	(AG) ₈ YT	53	17	15	88.24
UBC-840	(GA) ₈ YT	53	17	16	94.12
UBC-841	(GA) ₈ YC	55	14	13	92.86
UBC-861	(ACC) ₆	60	14	13	92.86
UBC-862	(AGC) ₆	60	14	14	100.00
UBC-864	(ATG) ₆	48	10	9	90.00
UBC-866	(CTC) ₆	50	13	13	100.00
UBC-879	(CTTCA) ₃	40	14	13	92.86
UBC-887	DVD(TC) ₇	52	14	14	100.00
UBC-888	BDB(CA) ₇	52	18	18	100.00
UBC-889	DBD(AC) ₇	51	14	14	100.00
UBC-891	HVHTGTGTGTGTGTGTG	51	13	13	100.00
UBC-895	AGAGTTGGTAGCTCTTGATC	55	14	14	100.00
平均	—	—	14.27	13.73	96.26
总计	—	—	214	206	—



1-0.55~0.60 2-0.60~0.65 3-0.65~0.70 4-0.70~0.75 5-0.75~0.80
6-0.80~0.85 7-0.85~0.90 8-0.90~0.95 9-0.95~1.00

图 2 48 份绞股蓝种质资源遗传相似性系数的次数分布
Fig. 2 Genetic similarity coefficient of frequency distribution on 48 *G. pentaphyllum* germplasm resources

明不同生态环境绞股蓝的遗传性状差异较大, 多样性较高。其中亲缘关系最近的是来源于广西金秀的 2 份种质, GS 值为 0.96; GS 最低的来源于广西阳朔 1 和四川青城 1 2 份种质, GS 值为 0.57, 亲缘关系最远。由此可知 48 份绞股蓝种质资源遗传变异水平较高, 可作为育种材料来源。

2.4 聚类分析

利用 NTsys-pc1.2e 软件的 UPGMA 对 48 份绞股蓝种质材料进行聚类分析并建立聚类分支树状图 (图 3)。结果显示, 供试材料以遗传相似系数 0.71 为分界限, 聚为 4 大类: 第 I 类共计 14 份种质材料,

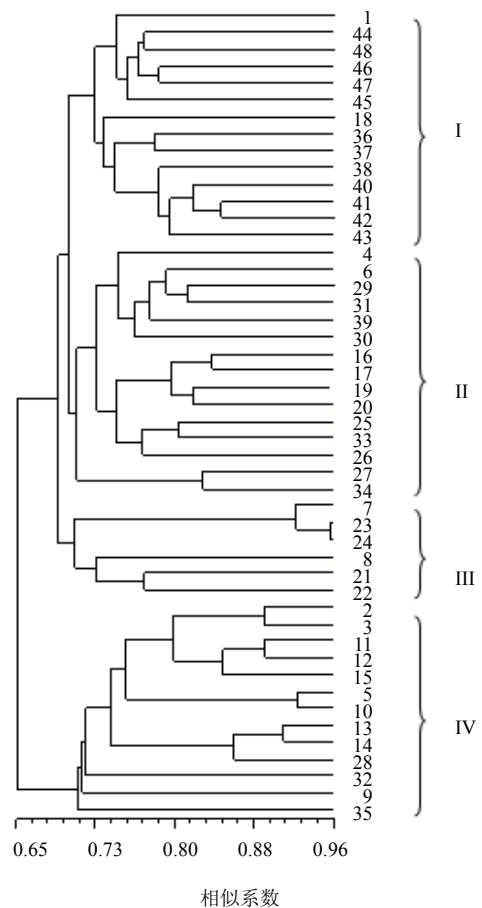


图 3 48 份绞股蓝种质资源 UPGMA 聚类图

Fig. 3 Dendrogram of cluster analysis based on ISSR of 48 *G. pentaphyllum* germplasm resources

分别为源自陕西 7 份、福建 4 份、安徽 2 份、浙江杭州 1 份；第 II 类共计 15 份种质材料，分别源自河南 2 份，广西 5 份，湖北 5 份，福建、贵州、云南各 1 份；第 III 类最少，共计 6 份，分别为云南勐腊、云南景洪药用植物园、广西阳朔 1 和 2 各 1 份及广西金秀 2 份；第 IV 类共计 13 份种质材料，分别源自贵州 3 份，湖南 2 份，四川 2 份，湖北 3 份，云南、陕西和重庆各 1 份。

3 讨论

育种实践表明，每个优良品种的产生均有赖于优良基因的发现和利用。鉴定、分析种质材料及其遗传多样性是发现新的基因资源、改良现有育种材料和选育新品种的基础性工作^[23]。植物分子生物学尤其是分子标记的发展使得植物资源的遗传背景更为清晰变为可能，从 DNA 水平上揭示样本材料间遗传多样性和亲缘关系不受环境条件、发育时期、器官种类等的限制。亲本间遗传差异大说明亲缘关系较远，杂交优势明显提高，这对种质资源的保护和有效利用具有重要意义。

本研究通过 ISSR 标记对来自云南、贵州、四川、重庆、陕西、河南、湖北、湖南、安徽、浙江、广西、福建 12 个省市区共 48 份野生绞股蓝种质材料进行遗传多样性分析。材料来源地囊括了绞股蓝在我国分布的大部分地区，具有明显的地域代表性。结果分析显示，15 条 ISSR 引物共检测到 214 个位点，平均 PPL 为 96.26%；48 份种质材料平均 I 和 H 分别为 0.221 1 和 0.359 8，遗传相似系数变幅为 0.57~0.96，平均为 0.72，这表明绞股蓝在长期的适应和进化过程中形成了广泛的遗传变异，不同种质材料间存在着丰富的遗传变异。

UPGMA 聚类分析显示，以遗传系数 0.71 为界，将 48 份种质划分为 4 大类，其中第 I 类中包括来自陕西和福建的绝大部分种质，表明陕西和福建的绞股蓝种质亲缘关系更为紧密，此外，安徽和浙江杭州的种质材料也聚在了第 I 类中；来自湖北宣恩、恩施、房县、神农架和广西大新、扶绥、桂林的种质则聚类在第 II 类中；而来自广西阳朔和金秀的 4 份种质则聚类在第 III 类中；第 IV 类则囊括了来自重庆、四川、湖南、湖北、陕西、云南及贵州的大部分种质。由此可见，聚类结果与其地理距离远近和生态环境并不完全一致，这与 Wang 等^[20]的研究结果一致。很多种质并未按种源聚类在一起，不同种源的种质存在明显的交叉聚类现象，这些地区的

种质表现出较大的地域分布差异性，即各种种质材料间的遗传分化程度较大，并且没有依据地理位置的渐变而呈现出遗传距离上的渐变规律，如来自云南的种质材料分散聚类在 II、III、IV 类中。推测绞股蓝野生自然居群的分化可能是因为其生活史特性、地理隔离与人类活动综合作用的结果。近年来由于大量的人为开发和利用，致使绞股蓝自然植物资源逐渐变的稀少，居群大量呈现片段化分布状态，加之绞股蓝适宜阴湿、温和的气候，其生活环境多在山涧、林下、小溪边等荫蔽处，导致了明显的居群遗传分化。生境片段化不仅影响生态系统的种类组成、数量结构、生态过程以及非生物因素，同时也会对物种的遗传结构产生较大的影响^[24]。因此，在后续的开发应用中，继续广泛而深入地收集更多地区的绞股蓝种质资源建立种质资源圃的同时，也该注重对野生绞股蓝种质资源的原生境保护工作，建立绞股蓝地方种质资源库，并加强当地农户和科普教育，防止人类活动对野生绞股蓝种质资源的破坏，保护其独特的基因资源，为绞股蓝的遗传生物学进化和物种形成等研究奠定必要分子基础。

本研究结果表明，ISSR 标记能有效区分绞股蓝种质材料，检测其遗传多样性水平，这为后续利用 ISSR 技术构建绞股蓝 DNA 指纹图谱奠定了基础。此外，本研究较为全面地揭示了所收集的绞股蓝种质材料遗传背景，为绞股蓝种质资源全面、有效利用提供了重要理论依据，并且可将 ISSR 聚类分析结果直接应用到选育工作中，选择亲缘关系较远的材料，增加后代的遗传变异，选育出杂交优势强、综合性状良好的优良品种，为绞股蓝品种的改良和优良新品种的培育提供了方便，减少育种工作中亲本选配的盲目性。

参考文献

- [1] 陈书坤. 绞股蓝属植物的分类系统和分布 [J]. 植物分类学报, 1995, 33(4): 403-410.
- [2] 黄 萍, 陈竞龙, 张 雷, 等. 绞股蓝皂甙对 2 型糖尿病肾病的血脂、微量白蛋白尿的影响 [J]. 中国现代医学杂志, 2007, 17(2): 206-207.
- [3] Wang Z J, Luo D H. Antioxidant activities of different fractions of polysaccharide purified from *Gynostemma pentaphyllum* Makino [J]. *Carbohydr Polym*, 2007, 68(1): 54-58.
- [4] Lu H F, Chen Y S, Yang J S, et al. Gypenoside induced G₀/G₁ arrest via inhibition of cyclin E and induction of apoptosis via activation of caspase-3 and -9 in human

- lung cancer A-549 cells [J]. *In Vivo*, 2008, 22(2): 215-221.
- [5] Chen J C, Lu K W, Tsai M L, *et al*. Gypenosides induced G₀/G₁ arrest via CHk2 and apoptosis through endoplasmic reticulum stress and mitochondria-dependent pathways in human tongue cancer SCC-4 cells [J]. *Oral Oncol*, 2009, 45(3): 273-283.
- [6] 张涛, 袁弟顺. 中国绞股蓝种质资源研究进展 [J]. 云南农业大学学报, 2009, 24(3): 460-464.
- [7] 刘金龙. 药用植物绞股蓝新品种“恩七叶田”的选育及栽培技术与系列产品的研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2006.
- [8] 庞敏. 药用植物绞股蓝种质资源研究 [D]. 西安: 陕西师范大学, 2006.
- [9] 张涛. 绞股蓝种质资源库的建立及其主要活性成分的研究 [D]. 福州: 福建农林大学, 2009.
- [10] 周延清. DNA 分子标记技术在植物研究中的应用 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2005.
- [11] Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification [J]. *Genomics*, 1994, 20: 176-183.
- [12] 吴志祥, 潘俊松. 利用 ISSR 对矮牵牛品种遗传多样性的聚类分析 [J]. 上海交通大学学报: 农业科学版, 2012, 30(2): 36-44.
- [13] 孔祥彬, 张春庆, 许子锋. DNA 指纹图谱技术在作物品种 (系) 鉴定与纯度分析中的应用 [J]. 生物技术, 2005, 15(4): 74-77.
- [14] 黄颖桢, 陈菁瑛, 赵云青, 等. 金线莲遗传多样性的 ISSR 分析 [J]. 中草药, 2014, 45(15): 2230-2234.
- [15] 王薇, 刘超, 崔九成, 等. 珠子参种质资源遗传多样性的 ISSR 分析 [J]. 中草药, 2014, 45(17): 2525-2529.
- [16] 贾媛, 李忠海. ISSR 指纹图谱技术在种质资源研究上的应用 [J]. 河北农业科学, 2013, 17(5): 63-68.
- [17] 朱田田, 晋玲, 杜弢, 等. 基于 ISSR 的甘肃中麻黄遗传多样性研究 [J]. 中草药, 2014, 45(12): 1764-1768.
- [18] 李忠虎, 刘占林, 赵鹏, 等. 绞股蓝属植物系统进化研究进展述评 [J]. 西北植物学报, 2012, 32(10): 2133-2138.
- [19] 庞敏, 邹芳平, 肖娅萍. 应用 RAPD 技术构建绞股蓝 DNA 指纹图谱 [J]. 陕西师范大学学报: 自然科学版, 2006, 34(3): 87-91.
- [20] Wang C, Zhang H, Qian Z Q, *et al*. Genetic differentiation in endangered *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino based on ISSR polymorphism and its implications for conservation [J]. *Biochem Syst Ecol*, 2008, 36: 699-705.
- [21] Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals [J]. *Genetics*, 1978, 89(3): 583-590.
- [22] 刘欢, 慕平, 赵桂琴. 燕麦种质资源遗传多样性的 ISSR 研究 [J]. 草业学报, 2012, 21(4): 116-124.
- [23] 张怀山, 夏曾润, 栗孟飞, 等. 中型狼尾草种质资源遗传多样性的 ISSR 分析 [J]. 西北植物学报, 2014, 34(2): 256-264.
- [24] 陈小勇. 生境片段化对植物种群遗传结构的影响及植物遗传多样性保护 [J]. 生态学报, 2000, 20(5): 884-892.