

# 野生罗汉果遗传多样性的 ISSR 分析

彭云滔<sup>1</sup> 唐绍清<sup>1\*</sup> 李伯林<sup>1</sup> 刘燕华<sup>2</sup>

1 (广西师范大学生命科学学院, 桂林 541004)

2 (广西师范大学附属中学, 桂林 541001)

**摘要:** 应用 ISSR 分子标记方法对采自广西和广东的 7 个罗汉果(*Siraitia grosvenorii*)野生居群共 130 个个体进行了遗传多样性分析。15 个 ISSR 引物共扩增到了 111 个位点, 其中 91 个是多态性位点, 占 82.0%。Nei's 基因多样性指数( $H_e$ )为 0.248, Shannon 信息多样性指数( $I$ )为 0.354。罗汉果不同居群的遗传多样性水平差异较大, 居群多态位点百分率在 28.2%–55.6% 之间, Nei's 基因多样性指数为 0.080–0.209, Shannon 信息多样性指数为 0.123–0.310。永福居群(YF)和金秀居群(JX)的遗传多样性水平较高, 其周边居群的遗传多样性水平逐渐降低, 居群间产生了较大的遗传分化( $G_{st} = 0.569$ )。居群间的遗传距离与地理距离相关性不明显( $r = 0.369$ ,  $P = 0.115$ )。UP-GMA 聚类图中, 7 个居群的个体按居群各自聚在一起。

**关键词:** *Siraitia grosvenorii*, 遗传变异, 遗传结构, 种质资源

## Genetic diversity of *Siraitia grosvenorii* detected by ISSR markers

Yuntao Peng<sup>1</sup>, Shaoqing Tang<sup>1</sup>, Bolin Li<sup>1</sup>, Yanhua Liu<sup>2</sup>

1 College of Life Science, Guangxi Normal University, Guilin 541004

2 The High School Affiliated to Guangxi Normal University, Guilin 541001

**Abstract:** *Siraitia grosvenorii*, a liana species of the Cucurbitaceae endemic to southern China, is an important economic plant. The genetic diversity of 130 individuals from seven *Siraitia grosvenorii* populations from Guangxi and Guangdong provinces was estimated using inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. The fifteen primers employed produced a total of 111 scorable amplified fragments, of which 91 (82.0%) are polymorphic. Genetic diversity analysis showed that Nei's gene diversity ( $H_e$ ) was 0.248 and Shannon's genetic diversity index ( $I$ ) was 0.354. Genetic differentiation mainly occurred among populations ( $G_{st} = 0.569$ ). The correlation between genetic distance and geographic distance among the populations was not significant ( $r = 0.369$ ,  $P = 0.115$ ). UPGMA cluster analysis showed that the 130 individuals were clustered into seven clusters corresponding to the seven populations.

**Key words:** *Siraitia grosvenorii*, ISSR, genetic variation, genetic structure

罗汉果(*Siraitia grosvenorii*)是单性、雌雄异株的葫芦科(Cucurbitaceae)球根多年生藤本植物, 其果实是传统中药, 可用于治疗支气管炎、急慢性咽喉炎、哮喘和感冒等。果实中还含有一种热量低但甜度极高的物质, 是理想的天然甜味剂(李典鹏和张厚瑞, 2000), 可作为肥胖症和糖尿病患者理想的糖替代品。野生罗汉果主要分布于广西和广东, 贵州、湖南和江西的南部也有分布(路安民和张志耘, 1984; 李建强, 1993)。

罗汉果是重要的经济植物, 广西永福县和临桂

县是其栽培起源地(钟仕强, 1992), 近年来在广西融安、融水、龙胜和灵川等县的种植面积逐步扩大, 广东北部和贵州南部也有少量种植。但罗汉果的生产近年来遇到了一些困难: 一方面, 人工栽培一般都是通过压蔓方式繁殖种薯, 由于长期的无性繁殖, 罗汉果品种已经严重退化, 抗逆性越来越差; 另一方面, 现有栽培品种极易感染根线虫等病害, 原栽培地种植数年后就不能再利用, 需砍伐森林开垦新地, 造成森林面积逐年减少、水土流失严重、环境恶化(周昌远和蒋纪森, 2003)。因此, 利用遗传资源培育抗

病性强、适于平地生产的罗汉果新品种是当务之急。

遗传多样性研究能为植物育种和遗传改良提供理论指导。ISSR (inter-simple sequence repeats) 是一种新型的分子标记 (Zietkiewicz *et al.*, 1994), 具有比 RAPD 更高的可重复性和稳定性 (Tsumura *et al.*, 1996; Fang & Roose, 1997)。近年来, ISSR 分子标记已被广泛应用于植物的遗传多样性研究 (钱韦等, 2000; 葛永奇等, 2003; 马朝芝等, 2003; Martins *et al.*, 2003; Panda *et al.*, 2003)。以往对罗汉果的研究集中在化学成分、甜味素提取、栽培技术和病虫害防治等方面 (斯建勇等, 1996; 李典鹏和张厚瑞, 2000; 蔡健和等, 2001; 余丽娟等, 2003; 杭玲等, 2003), 但缺乏在遗传多样性方面的研究报道。本研究运用 ISSR 分子标记对罗汉果的 7 个野生居群的遗传多样性进行了分析, 目的在于揭示其遗传结构和遗传多样性水平, 为保护和合理利用野生罗汉果遗传资源提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

根据野生罗汉果的地理分布情况, 选取其栽培起源地广西永福和临桂 (YF); 罗汉果资源丰富的金秀县 (JX); 野生罗汉果的分布的近北界的兴安县

(XA) 和南界的浦北县 (PB); 广西、广东交界处的贺州市 (HZ) 以及广东乳源县 (RY) 和肇庆县 (ZQ) 共 7 个居群。随机选取居群内的个体作为样本, 其中肇庆居群只有 10 个个体, 全部取样, 其他居群各取 20 个个体。居群内个体间的取样间隔在 10 m 以上 (如永福、兴安、金秀和浦北居群), 但对于个体数较少的居群 (如乳源、肇庆和贺州居群), 有的个体间的距离达不到 10 m。采集罗汉果的枝叶, 插入清水中迅速带回实验室。将新鲜叶片洗净后装入封口塑料袋中于 -70℃ 保存。各居群的产地及生境特点等见表 1。

1.2 基因组 DNA 提取与引物筛选

采用 CTAB 法 (Doyle & Doyle, 1987) 提取总 DNA。实验所用 ISSR 引物均由上海生物工程技术服务有限公司合成, 引物序列参照加拿大哥伦比亚大学 (UBC) 公布的第 9 套 ISSR 引物序列 ([http://www.michaelsmith.ubc.ca/services/NAPS/Primer\\_Sets/Primers.pdf](http://www.michaelsmith.ubc.ca/services/NAPS/Primer_Sets/Primers.pdf))。每个居群选取 2 个模板, 在 25 μL 反应体系中进行引约筛选及可重复性试验。从 69 个引物中选出 15 个扩增条带清晰、反应稳定的引物用于全部 130 份 DNA 样品的扩增 (表 2)。

1.3 PCR 扩增

ISSR 扩增反应条件经过比较和优化确定为 25

表 1 罗汉果样品的产地和生境  
Table 1 The localities and habitats of the samples of *Siraitia grosvenorii*

居群 Population	产地 Locality	采样数 Sampling size	经纬度 Location	生境 Habitat
永福 (YF)	广西永福龙江乡 Longjiang, Yongfu County, Guangxi	20	25°21' N, 109°49' E	林下、山沟旁, 海拔 500 – 600 m Under the forests and near small valleys, Alt. 500 – 600 m
兴安 (XA)	广西兴安县金石乡 Jinshi, Xing'an County, Guangxi	20	25°50' N, 110°19' E	林下、山沟旁, 海拔 500 – 600 m Under the forests and near small valleys, Alt. 500 – 600 m
贺州 (HZ)	广西贺州市姑婆山 Mt. Gupo, Hezhou City, Guangxi	20	24°37' N, 111°33' E	林缘、山沟旁, 海拔 600 – 650 m At the forest edges and near small valleys, Alt. 600 – 650 m
金秀 (JX)	广西金秀县金秀镇 Jinxu, Jinxiu County, Guangxi	20	24°06' N, 110°15' E	林下、山沟旁, 海拔 800 – 900 m Under the forests and near small valleys, Alt. 800 – 900 m
浦北 (PB)	广西浦北县六甲镇 Liuyin, Pubei County, Guangxi	20	22°27' N, 109°49' E	林下、山沟旁, 海拔 800 – 900 m Under the forests and near small valleys, Alt. 800 – 900 m
肇庆 (ZQ)	广东肇庆市凤凰镇 Fenghuang, Zhaoqing City, Guangdong	10	23°16' N, 112°30' E	灌丛中, 海拔 347 m In shrubs, Alt. 347 m
乳源 (RY)	广东乳源县八宝山 Mt. Babao, Ruyuan County, Guangdong	20	24°52' N, 113°05' E	林缘、山沟旁, 海拔 800 – 1000 m At forest edges and near small valleys, Alt. 800 – 1000 m

表 2 各个引物序列、扩增位点数与多态位点数  
Table 2 Primer sequences, number of loci and number of polymorphic loci

引物号 Primer	序列(5'-3') Sequence (5'-3')	统计位点数 No. of loci	多态位点数 No. of polymorphic loci
UBC808	(TA) <sub>8</sub> C	7	4
UBC811	(GA) <sub>8</sub> C	11	10
UBC817	(CA) <sub>8</sub> A	2	0
UBC821	(GT) <sub>8</sub> T	2	0
UBC822	(TC) <sub>8</sub> A	3	2
UBC826	(AC) <sub>8</sub> C	6	3
UBC836	(AG) <sub>8</sub> YA	10	9
UBC840	(GA) <sub>8</sub> YT	11	11
UBC855	(AC) <sub>8</sub> YT	8	7
UBC857	(AC) <sub>8</sub> YG	8	7
UBC866	(CTC) <sub>5</sub>	11	10
UBC874	(CCCT) <sub>4</sub>	8	7
UBC881	(GGGT) <sub>3</sub>	8	8
UBC890	VHV(GT) <sub>7</sub>	7	5
UBC891	HVH(TG) <sub>7</sub>	9	8

Y = C or G, V = A, C or G

μL 的 PCR 反应液: 20 – 50 ng 模板 DNA, 1U Taq 酶, 1 × PCR Buffer, 2.0 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, dNTPs 0.2 mmol/L, 0.5 μmol/L ISSR 引物。PCR 扩增程序为: 94℃ 预变性 3 min, 接着进行 40 个循环: 94℃ 变性 1 min, 52℃ 退火 50 s, 72℃ 延伸 2 min, 循环结束后, 72℃ 延伸 7 min。扩增产物在 1.5% 的琼脂糖凝胶中电泳, 用 Lambda DNA/EcoR I + Hind III Marker 作为标准分子量对照, 溴化乙锭染色, 用上海复日 FR-980 型紫外与可见光分析系统进行图像扫描与分析。所有的扩增反应都重复一次。

1.4 数据统计与分析

ISSR 是显性标记, 同一引物扩增产物中电泳迁

移率一致的条带被认为具有同源性, 按照相同迁移位置上有扩增带记为 1、无带为 0 的方法记录电泳谱带, 仅记录清晰、可重复的并且长度在 250 – 2000 bp 范围内的扩增带。

得到的 ISSR 数据矩阵用于下列分析: (1) 将 ISSR 标记视为表征性状, 采用 POPGENE 1.31 软件 (Yeh *et al.*, 1999) 计算多态位点百分率 (*PPL*) 和 Shannon 信息多样性指数 (*I*) (Lewontin, 1972); (2) 将 ISSR 标记作为 2 个等位基因 (1 和 0) 的复等位基因位点, 基于 Hardy-Weinberg 平衡, 剔除基因频率小于 3/*N* (*N* 为样本数, 130) 的条带后 (Lynch & Milligan, 1994), 计算 Nei's 基因多样性指数 (*H<sub>e</sub>*) (Nei, 1973)、总居群基因多样性 (*H<sub>t</sub>*)、各居群基因多样性 (*H<sub>s</sub>*) 和基因分化系数 (*G<sub>st</sub>*); (3) 用 ARLEQUIN 2.000 软件 (Schneider *et al.*, 2000) 进行 AMOVA 分析, 基于样品间的欧氏平方距离 (Stewart & Excoffier, 1996) 计算遗传变异在居群间和居群内的分布、居群间的遗传分化、居群间的遗传距离与地理距离之间的相关性和居群间的基因流 (*N<sub>m</sub>*); (4) 用 NT-SYSPc 2.10 (Rohlf, 1997) 计算个体间的 Nei 相似性系数 (Nei & Li, 1979), 并对个体进行 UPGMA 聚类分析。

2 结果

2.1 野生罗汉果的 ISSR 遗传多样性

通过 15 条 ISSR 引物对 7 个罗汉果野生居群共 130 个个体进行 ISSR 分析 (图 1), 共检测到 111 个位点 (每个引物产生 2 – 11 个位点), 其中 91 个位点是多态的, 占 82.0 %。Nei's 基因多样性指数 (*H<sub>e</sub>*) 为 0.248, Shannon 信息多样性指数 (*I*) 为 0.354 (表 3)。罗汉果居群多态位点百分率 (*PPL*) 在

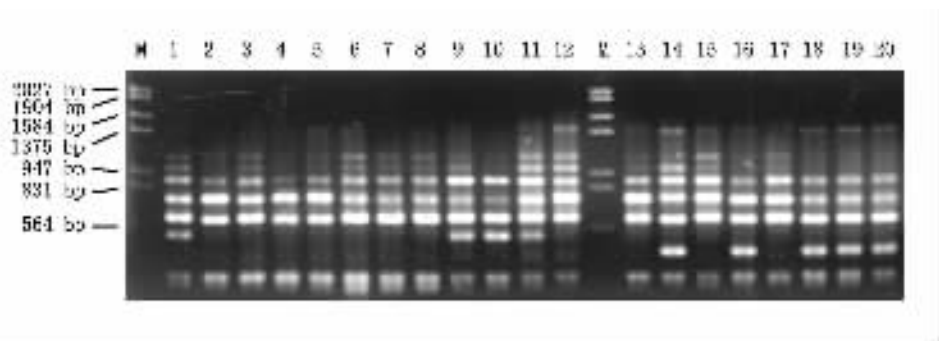


图 1 引物 UBC808 对永福居群 (YF) 样品扩增产生的谱带  
Fig. 1 ISSR bands of Yongfu (YF) population samples amplified with primer UBC808

表 3 罗汉果 7 个居群的遗传变异(括号中的数值为标准差)  
Table 3 Genetic variation of the seven natural populations of *Siraitia grosvenorii*. Standard deviations in parenthesis

居群 Population	总位点数 Total no. of loci	多态位点数 No. of polymorphic loci	多态位点百分率 PPL(%)	Nei's 基因多样性指数 $H_e$	Shannon's 信息多样性指数 $I$
永福(YF)	89	47	52.8	0.174(0.201)	0.262(0.285)
兴安(XA)	77	33	42.9	0.147(0.189)	0.220(0.275)
贺州(HZ)	78	29	37.2	0.149(0.205)	0.217(0.294)
金秀(JX)	81	45	55.6	0.209(0.203)	0.310(0.293)
浦北(PB)	86	36	41.9	0.110(0.167)	0.174(0.241)
乳源(RY)	85	24	28.2	0.080(0.157)	0.123(0.226)
肇庆(ZQ)	79	24	30.4	0.101(0.180)	0.144(0.251)
总体居群	111	91	82.0	0.248(0.184)	0.354(0.259)

表 4 罗汉果 7 个自然居群间的地理距离(km, 对角线上方)和遗传分化( $\Phi_{st}$ , 对角线下方)  
Table 4 Geographic distances (km) (above diagonal) and Nei's genetic differentiation ( $\Phi_{st}$ ) (below diagonal) between the seven natural populations of *Siraitia grosvenorii*

居群 Population	YF	XA	HZ	JX	PB	RY	ZQ
永福(YF)	—	84	198	144	307	330	350
兴安(XA)	0.483 ***	—	168	189	371	291	318
贺州(HZ)	0.447 ***	0.633 ***	—	147	304	157	190
金秀(JX)	0.419 ***	0.473 ***	0.461 ***	—	194	294	247
浦北(PB)	0.446 ***	0.583 ***	0.542 ***	0.419 ***	—	420	291
乳源(RY)	0.556 ***	0.681 ***	0.656 ***	0.621 ***	0.709 ***	—	198
肇庆(ZQ)	0.616 ***	0.728 ***	0.710 ***	0.577 ***	0.643 ***	0.769 ***	—

\*\*\*  $P < 0.001$

28.2% – 55.6% 之间,最低的是乳源居群(RY),为 28.2%,较高的有永福(YF)和金秀(JX)两个居群(分别为 52.8% 和 55.6%)。居群的 Nei's 基因多样性指数在 0.080 – 0.209 之间,Shannon 信息多样性指数在 0.123 – 0.310 之间,二者大小与居群多态位点百分率的大小趋势基本一致。

2.2 罗汉果居群遗传分化、基因流与分化组成

AMOVA 分析结果表明,两两居群间的遗传分化程度( $\Phi_{st}$ )较高,在 0.419 – 0.769 之间(表 4),平均为 0.580。金秀与永福居群间及金秀与浦北居群间的遗传分化程度最低( $\Phi_{st} = 0.419$ ,  $P < 0.001$ );肇庆与乳源居群间最高( $\Phi_{st} = 0.769$ ,  $P < 0.001$ )。对各罗汉果居群间的地理距离和遗传距离进行 Mantal 检验(Mantal, 1967),结果表明地理距离和遗传距离之间呈正相关,但相关性不显著( $r = 0.369$ ,  $P = 0.115$ )。

居群间的基因流( $N_m$ )较低,平均为 0.394,最高的仅为 0.693。

POPGENE 分析结果表明,遗传变异主要存在于居群间,7 个居群总的基因多样性( $H_t$ )为 0.254,其中居群内的基因多样性( $H_s$ )为 0.109;居群间基因分化系数( $G_{st}$ )为 0.569,居群间的遗传变异占总遗传变异的 56.9%。AMOVA 分析结果表明,居群间的遗传变异占 57.4% ( $P < 0.001$ ),居群内的遗传变异占 42.6%,此结果与用 POPGENE 软件进行分析的结果很接近。

2.3 聚类分析

根据个体间的遗传距离(Nei & Li, 1979)进行 UPGMA 聚类,分析结果(图 2)显示,130 个个体按居群各自聚在一起,这进一步表明居群间产生了一定的遗传分化。

3 讨论

地理分布范围是决定植物种遗传多样性的主要因素之一,宽分布区的种趋向于具有更高的遗传多样性水平(Karron, 1987; Hamrick & Godt, 1990)。

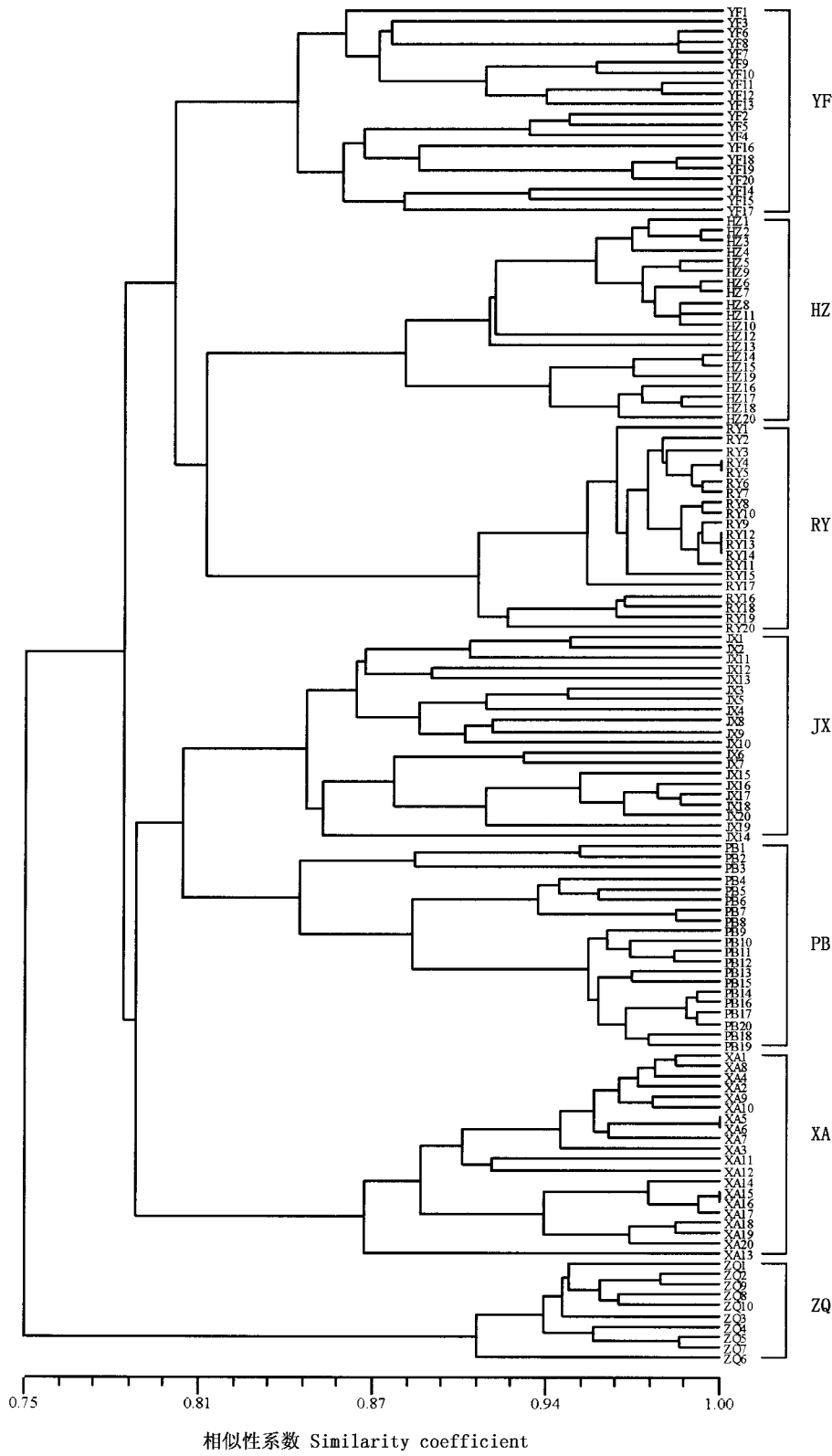


图 2 基于相似性系数构建的罗汉果个体 UPGMA 聚类图(居群代号同表 1)  
Fig. 2 UPGMA dendrogram of the 130 samples of *Siraitia grosvenorii* based on Nei & Li similarity coefficient. Numbers following the population codes indicate different individuals

野生罗汉果的分布区较广,加之罗汉果是单性、雌雄异株的植物,保证了其严格的异花授粉。在种的水平上,野生罗汉果与同科的一些植物如 *Schizopepon bryoniaefolius* (Akimoto *et al.*, 1999) 和 *Cucurbita maxima* (Decker-Walters *et al.* 1990) 或异交植物 (Hamrick & Godt, 1990) 的遗传多样性水平相当 ( $PPL = 82.0\%$ ;  $H_e = 0.248$ ;  $I = 0.354$ )。

7 个罗汉果居群间的遗传多样性水平存在较大的差异。永福居群(YF)和金秀居群(JX)的遗传多样性最高,兴安居群(XA)、浦北居群(PB)和贺州居群(HZ)的遗传多样性次之,而乳源居群(RY)和肇庆居群(ZQ)的遗传多样性最低。后两个居群反映遗传多样性的 3 个指标( $PPL$ ,  $H_e$ ,  $I$ )的值仅有永福居群(YF)和金秀居群(JX)的 1/2 左右。根据我们的调查,永福居群(YF)和金秀居群(JX)的个体数量较多,兴安居群(XA)、浦北居群(PB)和贺州居群(HZ)的个体数量较少,乳源居群(RY)和肇庆居群(ZQ)的个体数量最少。表明 ISSR 分子标记检测到的罗汉果居群遗传多样性水平与居群的大小相关,较大的居群趋向于具有更高的遗传多样性水平。在永福和金秀两地罗汉果的遗传多样性水平较高,并呈现出向周围地区逐渐降低的趋势。

野生罗汉果在居群间的遗传变异较大,居群间的遗传变异占总遗传变异的 56.9%。已有的研究表明,植物居群的遗传结构反映了种的长期进化史(分布区转移、生境片段化和居群特化)、突变、遗传漂变、交配系统、基因流和选择等不同过程的相互作用(Schaal *et al.*, 1998; Slatkin, 1987)。研究中发现,罗汉果居群间遗传变异的产生主要与居群间的基因交流受到限制有关。罗汉果对水、热及荫蔽条件的要求比较严格,一般沿山谷或溪边分布,多见于常绿阔叶林下。由于其种子较大(约 0.1 g)并能浮于水面,种子传播与水流的关系也比较密切。野生罗汉果居群的分布通常不连续,而且斑块之间的间隔距离较大(钟仕强, 1992)。所研究的 7 个野生罗汉果居群之间的地理距离较远(80–420 km),可能影响到了居群间的基因交流。李海生和陈桂珠(2004)研究发现,有些植物如海桑(*Sonneratia hainanensis*)和裸芸香(*Psilopogonum sinense*)居群间的遗传距离与地理距离呈显著的正相关关系。罗汉果居群间的遗传距离和地理距离之间也呈正相关关系,但相关性不显著,说明地理隔离影响其居群间的基

因交流,由此造成居群间的基因流较低( $N_m = 0.394$ )。Wright (1951)指出,如果  $N_m < 1$ ,则遗传漂变可以导致居群间明显的遗传分化。因此,基因流受阻和遗传漂变可能是导致罗汉果居群间产生较大遗传分化的主要原因。

虽然没有被国家列为重点保护植物,但罗汉果是特产于我国的具有重要经济价值的物种,保护好野生罗汉果遗传资源,对于利用其遗传资源,培育抗病力强、适于平地栽培的新品种,解决罗汉果生产中的实际问题具有重要的意义。从本研究结果来看,广西永福和金秀的居群具有较高的遗传多样性水平,是保护和利用的重点;同时,罗汉果居群间产生了较大的遗传变异,遗传变异的分布有一定的地域性,因此也要注意其他地区野生罗汉果的保护与利用。

## 参考文献

- Akimoto J, Fukuhara T, Kikuzawa K (1999) Sex ratios and genetic variation in a functionally androdioecious species *Schizopepon bryoniaefolius* (Cucurbitaceae). *American Journal of Botany*, **86**, 880–886.
- Cai JH (蔡健和), Qin BX (秦碧霞), Yu YB (余玉冰), Liu ZM (刘志明) (2001) Virus identification of Luohanguo mosaic diseases. *Guangxi Sciences* (广西科学), **8**, 66–69. (in Chinese with English abstract)
- Decker-Walters DS, Walters TW, Posluszny U, Kevan PG (1990) Genealogy and gene flow among annual domesticated species of *Cucurbita*. *Canadian Journal of Botany*, **38**, 782–789.
- Doyle JJ, Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, **19**, 11–15.
- Fang DQ, Roose ML (1997) Identification of closely related citrus cultivars with inter-simple sequence repeat markers. *Theoretical and Applied Genetics*, **95**, 408–417.
- Fischer M, Husi R, Prati D, Peintinger M, van Kleunen M, Schmidt B (2000) RAPD variation among and within small and large populations of the rare clonal plant *Ranunculus reptans* (Ranunculaceae). *American Journal of Botany*, **87**, 1128–1137.
- Ge YQ (葛永奇), Qiu YX (邱英雄), Ding BY (丁炳扬), Fu CX (傅承新) (2003) An ISSR analysis on population genetic diversity of the relict plant *Ginkgo biloba*. *Biodiversity Science* (生物多样性), **11**, 276–287. (in Chinese with English abstract)
- Hamrick JL, Godt MJW. 1990. Allozyme diversity in plant species. In: *Plant Population Genetics, Breeding and Genetic Resources* (eds Brown AHD, Clegg MT, Kahler AL, Wier BS), pp. 43–63. Sinauer, Sunderland.
- Hang L (杭玲), Su GX (苏国秀), Xia YS (夏阳升), Liang XR (梁秀荣) (2003) Cultivation of tissue cultured seed-

- lings of *Momordica grosevenori*. *Guangxi Agriculture Sciences* (广西农业科学), (6), 70 – 72. (in Chinese)
- Karrin JD (1987) A comparison of levels of genetic polymorphism and self-compatibility in geographically restricted and widespread plant congeners. *Evolutionary Ecology*, **1**, 47 – 58.
- Lewontin RC (1972) The apportionment of human diversity. *Evolutionary Biology*, **6**, 381 – 398.
- Li DP (李典鹏), Zhang HR (张厚瑞) (2000) Studies and uses of Chinese medicine Luohanguo – a special local product of Guangxi. *Guihaia* (广西植物), **20**, 270 – 276. (in Chinese with English abstract)
- Li HS (李海生), Chen GZ (陈桂珠) (2004) Genetic diversity of mangrove plant *Sonneratia caseolaris* in Hainan Island based on ISSR analysis. *Acta Ecologica Sinica* (生态学报), **24**, 1657 – 1663. (in Chinese with English abstract)
- Li JQ (李建强) (1993) A revision of the genus *Siraitia* Merr. and two new genera of Cucurbitaceae. *Acta Phytotaxonomica Sinica* (植物分类学报), **31**, 45 – 55. (in Chinese with English abstract)
- Lu AM (路安民), Zhang ZY (张志耘) (1984) The genus *Siraitia* Merr. in China. *Guihaia* (广西植物), **4**, 27 – 33. (in Chinese with English abstract)
- Lynch M, Milligan BG (1994) Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Molecular Ecology*, **3**, 91 – 99.
- Ma CZ (马朝芝), Fu TD (傅廷栋), Tuevesson S, Gertsson B (2003) Genetic diversity of Chinese and Swedish rapeseed (*Brassica napus* L.) analysed by inter-simple sequence repeats (ISSRs). *Scientia Agricultura Sinica* (中国农业科学), **36**, 1403 – 1408. (in Chinese with English abstract)
- Mantal NA (1967) The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research*, **27**, 209 – 220.
- Martins M, Tenreiro R, Oliveira MM (2003) Genetic relatedness of Portuguese almond cultivars assessed by RAPD and ISSR markers. *Plant Cell Reports*, **22**, 71 – 78.
- Nei M (1973) Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, **70**, 3321 – 3323.
- Nei M, Li WH (1979) Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences, USA*, **76**, 5269 – 5273.
- Panda S, Martín J, Aguinalalde I (2003) Chloroplast and nuclear DNA studies in a few members of the *Brassica oleracea* L. group using PCR-RFLP and ISSR-PCR markers: a population genetic analysis. *Theoretical and Applied Genetics*, **106**, 1122 – 1128.
- Qian W (钱韦), Ge S (葛颂), Hong DY (洪德元) (2000) Assessment of genetic variation of *Oryza granolata* detected by RAPDs and ISSRs. *Acta Botanica Sinica* (植物学报), **42**, 741 – 750. (in Chinese with English abstract)
- Rohlf FJ (1997) *NTSYSpc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System*, Version 2.1. Exeter Software, Setauket, New York, USA.
- Schaal BA, Hayworth DA, Olsen KM, Rauscher JT, Smith WA (1998) Phylogeographic studies in plants: problems and prospects. *Molecular Ecology*, **7**, 465 – 474.
- Schneider S, Kuüffler JM, Rössli D (2000) *Arlequin, Version 2.0: A Software for Population Genetic Data Analysis*. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Geneva.
- Si JY (斯建勇), Chen DH (陈迪华), Chang Q (常琪), Shen LG (沈连钢) (1996) Isolation and determination of cucurbitane-glycosides from fresh fruits of *Siraitia grosvenorii*. *Acta Botanica Sinica* (植物学报), **38**, 489 – 494. (in Chinese with English abstract)
- Slatkin M (1987) Gene flow and the geographic structure of populations. *Science*, **236**, 147 – 164.
- Song WH (宋卫华), Li XD (李晓东), Li XW (李新伟), Huang HW (黄宏文), Li JQ (李建强) (2004) Genetic diversity and conservation strategy of *Psilopeganum sinense*, a rare species in the Three-Gorges Reservoir area. *Biodiversity Science* (生物多样性), **12**, 227 – 236. (in Chinese with English abstract)
- Stewart CN, Excoffier L (1996) Assessing population genetic structure and variability with RAPD data: application to *Vaccinium macrocarpon* (American cranberry). *Journal of Evolutionary Biology*, **9**, 153 – 171.
- Tsumura Y, Ohba K, Strauss SH (1996) Diversity and inheritance of inter-simple sequence repeat polymorphism in Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugi (*Cryptomeria japonica*). *Theoretical and Applied Genetics*, **92**, 40 – 45.
- Wright S (1951) The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics*, **15**, 323 – 354.
- Yeh FC, Yang RC, Boyle T, Ye ZH, Mao JX (1997) *POP-GENE, the User Friendly Shareware for Population Genetic Analysis*. Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Edmonton, Canada.
- Yu LJ (余丽娟), Chen QB (陈全斌), Yi XH (义祥辉), Yang RY (杨瑞云), Zhang YZ (张义正) (2003) Preparation of Mogroside V from fresh fruits of Luohanguo by high performance liquid chromatography. *Chinese Journal of Chromatography* (色谱), **21**, 397 – 399. (in Chinese with English abstract)
- Zhong SQ (钟仕强) (1992) Current situation of the research on Luohanguo. *Guangxi Agriculture Sciences* (广西农业科学), (4), 164 – 166. (in Chinese)
- Zhou CY (周昌远), Jiang JS (蒋纪森) (2003) Current situation and measures for development of Luohanguo production in Yongfu. *Guangxi Agriculture Sciences* (广西农业科学), (6), 3 – 4. (in Chinese)
- Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D (1994) Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, **20**, 176 – 183.