

DOI: 10.3969/j.issn.1000-3142.2013.01.004

汪琼,姚青菊,徐增莱,等. 基于 ISSR 和 RAPD 标记的 4 个夏蜡梅种群的遗传多样性研究[J]. 广西植物, 2013, 33(1): 30-34

Wang Q, Yao QJ, Xu ZL, et al. Genetic diversity of four populations of *Calycanthus chinensis* based on ISSR and RAPD markers[J]. Guihaia, 2013, 33(1): 30-34

基于 ISSR 和 RAPD 标记的四个夏蜡梅种群的遗传多样性研究

汪 琼¹, 姚青菊¹, 徐增莱^{1*}, 胡建国², 杨传书²

(1. 江苏省中国科学院植物研究所(南京中山植物园), 南京 210014; 2. 连云港市新浦区国营南云台林场, 连云港 222062)

摘 要: 利用 ISSR 和 RAPD 技术对 4 个夏蜡梅种群 25 个单株的遗传多样性进行研究。从 60 条简单重复序列引物中筛选出了 10 条引物在 25 个个体中共检测到 62 个可重复的位点, 其中多态位点为 41 个, 总的多态位点百分率为 65.60%; 从 60 条寡核苷酸引物中筛选出了 10 条引物共扩增出 52 个位点, 其中多态性位点 31 个, 多态性位点的百分率为 57.50%。Shannon 指数估算的夏蜡梅群体总遗传多样性为 0.3737, 各群体平均遗传多样性为 0.1645。Nei's 指数估算的夏蜡梅群体总遗传多样性为 0.2528, 各群体平均遗传多样性为 0.1117; 物种水平的有效等位基因数为 1.4473, 平均值为 1.1972。4 个自然群体的基因分化系数 $G_{st} = 0.5297$, 即总的变异中有 52.97% 的变异存在于群体间, 而群体内的遗传变异占总变异的 47.03%, 群体间遗传距离平均值 0.2187。也表明了夏蜡梅 4 个群体间出现了遗传分化。夏蜡梅群体间的基因流较低, $N_m = 0.4450$ 。聚类分析将 4 个种群聚为 2 支, 且聚类结果表现出明显的地域性特征。作为狭域分布种, 夏蜡梅各群体间存在遗传分化和多样性程度不高, 对夏蜡梅种群多样性的就地和迁地保护势在必行。

关键词: 夏蜡梅; ISSR; RAPD; 遗传多样性

中图分类号: Q949.67 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2013)01-0030-05

Genetic diversity of four populations of *Calycanthus chinensis* based on ISSR and RAPD markers

WANG Qiong¹, YAO Qing-Ju¹, XU Zeng-Lai^{1*},
HU Jian-Guo², YANG Chuang-Shu²

(1. Institute of Botany, Jiangsu Province & Chinese Academy of Sciences, Nanjing Botanical Garden Mem. Sun Yat-sen, Nanjing 210014, China; 2. State-owned South Yuntaishan Mountain Forestry Farm, Lianyungang 222062, China)

Abstract: Genetic diversities of 4 populations 25 individuals of *Calycanthus chinensis* were studied by ISSR and RAPD marker. 62 loci were identified with 10 simple sequence repeat primers screened from 60 primers, out of which 41 loci were polymorphic and the percentage of polymorphic bands was 65.60%; 52 loci were identified with 10 oligonucleotide primers screened from 60 primers, out of which 31 loci were polymorphic and the percentage of polymorphic bands was 57.50%. Shannon's indices of diversity (I) were 0.3737 among the species level with the average of 0.1645 among populations. Nei's gene diversity (h) was 0.2528 among the species with the average of 0.1117 among populations; and the effective number of alleles (ne) was 1.4473 among the species with the average of 1.1972 among populations. Genetic

* 收稿日期: 2012-05-28 修回日期: 2012-08-09

基金项目: 江苏省科技支撑计划项目(BE2008338); 连云港市科技计划项目(CN0712)

作者简介: 汪琼(1971-), 女, 安徽桐城人, 硕士, 研究方向为植物资源学, (E-mail) wqian2002@yahoo.com.cn。

* 通讯作者: 徐增莱, 博士, 研究员, 从事药用植物资源研究, (E-mail) xuzl5194@sohu.com。

variance analysis showed the coefficient of gene differentiation (G_{st}) was 0.5297 at species level, and the gene flow (N_m) was 0.4450. Cluster analysis indicated that 4 populations could be divided into 2 groups and consistent with their geographical distribution. As a highly restricted geographical distribution species, the genetic diversity level of *C. chinensis* was not high. It is necessary to take measures to protect in situ or ex situ endangered species.

Key words: *Calycanthus chinensis*; ISSR; RAPD; genetic diversity

夏蜡梅 (*Calycanthus chinensis*) 是蜡梅科 (Calycanthaceae) 夏蜡梅属 (*Calycanthus*) 多年生落叶直立灌木, 夏蜡梅属在我国为唯一分布种 (蒋英和李秉滔, 1979)。为第三纪孑遗物种, 我国二级保护的珍稀濒危植物, 仅分布于浙江省临安市和天台县的狭小范围内, 野生资源十分有限 (章绍尧等, 1995)。夏蜡梅 20 世纪 60 年代初在我国浙江省首次被发现, 由我国植物学家郑万钧等 (1963) 作为新种发表。当时将其置于美国蜡梅属下, 命名为 *Calycanthus chinensis* W. C. Cheng et S. Y. Chang。后来基于花部特征与美国蜡梅属存在显著差异, 郑万钧先生主张将成立夏蜡梅属 (*Sinocalycanthus* W. C. Cheng et S. Y. Chang), 并将其定名为 *Sinocalycanthus chinensis* (Cheng et S. Y. Chang) W. C. Cheng et S. Y. Chang。蒋英等 (1976) 则认为将夏蜡梅置于美国蜡梅属是合理, 应仍沿用最初的种名 *Calycanthus chinensis* Cheng et S. Y. Chang。2008 年出版的 *Flora of China* 对夏蜡梅的种名进行了修订, 正式命名为 *Calycanthus chinensis* (W. C. Cheng & S. Y. Chang) W. C. Cheng & S. Y. Chang ex P. T. Li (Li & Bartholomew, 2008)。

半个多世纪以来, 一些学者就夏蜡梅的细胞学和孢粉学 (李林初, 1986, 1989)、生态学 (徐耀良等, 1997; 张宏伟等, 1997)、遗传多样性 (Fang *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2006) 及保护生物学 (张文标等, 2007) 进行了研究。近年来, 由于人类对自然资源不合理利用日益加剧和环境变化, 夏蜡梅对逆境的抗性也引起了人们的关注 (刘文莉等, 2007, 2008; 柯世省等, 2007)。作为狭域分布种, 夏蜡梅种群数量小, 野生植株的天然蕴藏量十分有限, 其遗传多样性评价是就地保护和迁地保护的基础, 夏蜡梅种群的遗传多样性和遗传分化一直是其研究的核心内容。Li 等 (2006) 采用 RAPD 标记研究了夏蜡梅种群的遗传分化, 12 个引物共扩增出 165 个位点, 种水平和种群水平的多态位点百分率、Nei's 基因多样性指数、Shannon 信息指数分别为 68.84%、0.2421、0.3615 和 14.89%、0.0578、0.0843, 遗传分化系数和基因流分别 0.7613 和 0.1568。Fan *et al.* (2008)

也采用 RAPD 标记研究了夏蜡梅种群的遗传结构和保护策略。22 条引物共扩增出 257 个位点, 种水平和种群水平的多态位点百分率、Nei's 基因多样性和 Shannon 信息指数分别为 40.9%、0.1641、0.2386 和 59.1%、0.2097、0.3123, 基因流为 0.8944。以上结果表明夏蜡梅种群的遗传多样性较低。等位酶分析结果也表明夏蜡梅种群内的遗传多样性极低。本研究以大明山等 4 个夏蜡梅种群为材料, 采用 ISSR 标记和 RAPD 标记对夏蜡梅种群的遗传多样性进行研究, 为夏蜡梅资源的保护提供分子生物学证据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

在夏蜡梅分布区浙江天台、大明山、双石和西天目山采集 4 个夏蜡梅种群 (表 1), 采摘其健康幼嫩叶片, 用变色硅胶迅速干燥, 带回实验室, 常温保存备用。

表 1 用于 ISSR 和 RAPD 标记夏蜡梅种群概况
Table 1 Status of 4 populations of *Calycanthus chinensis* used in ISSR and RAPD maker

编号 No.	采集地 Locality	样株数 No. of individuals
TT	浙江天台 Tiantai, Zhejiang	12
DM	浙江大明山 Mountain Daming, Zhejiang	8
SS	浙江双石 Shuangshi, Zhejiang	3
XTM	浙江西天目山 Mountain Xitianmu, Zhejiang	2

1.2 实验方法

1.2.1 总 DNA 的提取 采用北京百泰克生物技术有限公司出品的新型快速植物基因组 DNA 提取试剂盒 (离心柱型) 提取 DNA, 并溶解于灭菌双蒸水中, 低温 (-20 °C) 贮藏, 备用。

1.2.2 PCR 扩增与检测

1.2.2.1 ISSR 的 PCR 扩增与检测 PE-9700 PCR 仪上进行 PCR, 反应条件参照金则新等 (2007) 的方法加以改进, 20 μ L 的反应体系包括 1 \times Tag DNA 酶缓冲液 (10 mmol/L Tris-HCl, 50 mmol/L KCl,

0.1% Trion x-100, pH 8.4), 2.5 mmol/L MgCl₂, 1 U Tag 酶, 50 ng 模板, 0.4 μmol/L 引物, 各 0.4 mmol/L 的 dATP, dGTP, dCTP 和 dTTP。PCR 程序: 首先 95 °C 预变性 3 min, 95 °C 变性 30 s, 然后 58 °C 退火 40 s, 72 °C 延伸 1 min, 35 个循环, 最后 72 °C 保温 7 min, 4 °C 保存。PCR 产物在 1.2% 的琼脂糖胶中电泳 1 h, 溴化乙锭(EB)染色, 凝胶成像系统拍照。

1.2.2.2 RAPD 的 PCR 扩增与检测 PE-9700 PCR 仪上进行 PCR, 反应条件参照改进的张文标等(2007)方法, 20 μL 的反应体系包括 1×Tag DNA 酶缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl, 50 mmol/L KCl, 0.1% Trion x-100, pH8.4), 2.5 mmol/L MgCl₂, 1 U Tag 酶, 50 ng 模板, 0.4 μmol/L 引物, 各 0.4 mmol/L 的 dATP, dGTP, dCTP 和 dTTP。PCR 程序: 95 °C 预变性 3 min, 95 °C 变性 30 s, 38 °C 退火 40 s, 72 °C 延伸 1 min, 35 个循环, 72 °C 保温 7 min, 4 °C 保存。PCR 产物在 0.8% 的琼脂糖胶中电泳 1 h, 溴化乙锭(EB)染色, 凝胶成像系统拍照。

1.2.3 引物筛选 筛选上海生物工程技术有限公司设计生产的 ISSR 引物和 RAPD 引物各 60 个, 选取其中扩增条带丰富、信号强的 10 个引物简单重复序列引物和 10 个寡聚核苷酸引物进行 RAPD 扩增。

1.3 数据分析

根据电泳图谱中 DNA 条带的有无, 将 ISSR 和 RAPD 扩增结果转化为二元数据(有带的量化为 1, 无带的量化为 0), 计算多态性。应用 POPGENE 软件采用 UPGMA 法计算品种的遗传相似系数, 并对种群间的亲缘关系进行聚类分析。

2 结果与分析

2.1 ISSR-PCR 扩增结果

10 条 ISSR 引物共扩增出 62 个位点, 平均每条引物扩增出 6.2 个位点, 其中多态性位点 41 个, 多态位点百分率(Percentage of polymorphic sites, PPS)为 65.60%(表 2)。扩增条带大小集中在 1500~500 bp 之间, 其中引物 ISSR-35 扩增出的位点和多态性位点均最多, 分别为 8 个和 6 个; ISSR-35 扩增出的多态性位点百分率最高, 达 80.00%。ISSR62 和 UBC-815 扩增出多态性位点的百分率最低, 仅 50.00%。图 1 显示了引物 ISSR-62 的扩增结果。

2.2 RAPD-PCR 扩增结果

10 条 ISSR 引物共扩增出 52 个位点, 平均每条

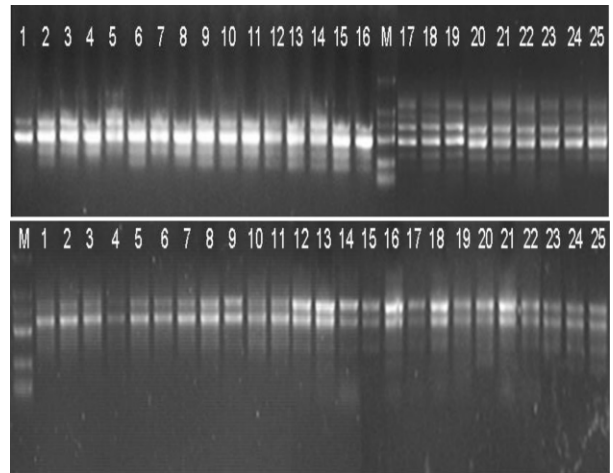


图 1 ISSR-62(上)和 RAPD-41(下)的夏蜡梅种群扩增结果 1-12. 天台种群; 13-20. 大明山种群; 21-23. 双石种群; 24-25. 西天目山种群。种群编号下同。

Fig. 1 Products generated by ISSR-62 (up) and RAPD-41 (down) 1-12. Individuals of population of Tian-tai; 13-20. Individuals of population of Mountain Daming; 21-23. Individuals of population of Shuangshi; 23-24. Individuals of population of Mountain Xitianmu. The same below.

表 2 ISSR 的引物序列及扩增结果

Table 2 ISSR primers and their amplification results

引物 Primer	序列 (5'-3') Sequence (5'-3')	总位点数 Total sites	多态性 位点数 Polymorphic sites	多态位点 百分率 Percentage of polymorphic sites (%)
ISSR-1	(AC)8T	7	5	71.43
ISSR-26	(AC)8 CC	8	6	75.00
ISSR-35	(AG)8 TA	5	4	80.00
ISSR-42	(AC)8CG	5	3	60.00
ISSR-45	(AC)8 GC	6	4	66.67
ISSR-47	(AC)8 GT	5	3	60.00
ISSR-62	(AG)8 CA	6	3	50.00
UBC-807	(AC)8 T	7	5	71.43
UBC-810	(GA)8T	7	5	71.43
UBC-815	(CT)8 G	6	3	50.00
平均 Average		6.2	4.1	65.60

引物扩增出 5.2 个位点, 其中多态性位点 31 个, 多态百分率为 57.50%(表 3)。扩增条带大小集中在 2000~500 bp 之间。其中引物 RAPD-39 扩增出的位点和多态性位点均最多, 分别为 8 个和 6 个; 多态性位点的百分率也最高, 达 75.00%。RAPD-41 扩增出多态性位点的百分率最低, 仅 40.00%。图 1 显示了引物 RAPD-41 的扩增结果。

2.3 夏蜡梅种群遗传多样性分析

基于 ISSR 和 RAPD 标记的夏蜡梅各种群的遗传多样性和分化指数见表 4。根据 PPB 值, 各种群遗传多样性高低排列为: 西天目山 < 双石 < 天台 <

大明山。而根据 Shannon 多样性指数(I)值各种群遗传多样性高低排列与按 PPB 值的排序相同。4 个夏蜡梅种群 Shannon 多样性指数变化范围为 0.0736~0.2989,物种水平多样性为 0.3737;Nei's

基因多样性为 0.0504~0.2012,物种水平为 0.1117;有效等位基因数的变异范围为 1.0861~1.3536,物种水平的有效等位基因数为 1.4473;观察等位基因数为 1.1217~1.5652,种水平为 1.7043。

表 3 RAPD 的引物序列及扩增结果

Table 3 RAPD primers and their amplification results

引物 Primer	序列 (5'-3') Sequence (5'-3')	总位点数 Total sites	多态性位点数 Polymorphic sites	多态位点百分率 (%) Percentage of polymorphic sites
RAPD-35	AGGTGACCGT	4	2	50.00
RAPD-36	CCACAGCAGT	4	2	50.00
RAPD-39	GTTGCGATCC	8	6	75.00
RAPD-41	ACCGCGAAGG	5	2	40.00
RAPD-42	ACCGCGAAGG	6	4	66.67
RAPD-43	GTGAGGCGTC	4	2	50.00
RAPD-46	GTCGCCGTCA	5	3	60.00
RAPD-48	TCTGGTGAGG	4	2	50.00
RAPD-49	GATGACCGCC	6	4	66.67
RAPD-50	TGAGCGGACA	6	4	66.67
平均 Average		5.2	3.1	57.50

表 4 基于 ISSR 标记和 RAPD 标记的夏蜡梅种群的遗传多样性

Table 4 Genetic diversity in *C. chinensis* populations based on ISSR and RAPD marker

种群编号 No.	多态位点数 PPL	多态位点百分数 PPS (%)	观察等位基因数 Na	有效等位基因数 Ne	Nei's 基因多样性 H	Shannon 信息指数 I
TT	38	33.04	1.3304	1.2069	0.1174	0.1735
DM	65	56.02	1.5652	1.3536	0.2012	0.2989
SS	21	18.26	1.1826	1.1421	0.0777	0.1119
XTM	14	12.17	1.1217	1.0861	0.0504	0.0736
平均值 Average value	34.5	29.87	1.3000	1.1972	0.1117	0.1645
物种水平 Species level	81	70.43	1.7043	1.4473	0.2528	0.3737

表 5 四个夏蜡梅种群的遗传相似系数和遗传距离

Table 5 Nei's genetic identity and genetic distance of 4 populations of *C. chinensis*

	TT	DM	SS	XTM
TT	****	0.8040	0.6792	0.6825
DM	0.2181	****	0.9229	0.8862
SS	0.3868	0.0802	****	0.9077
XTM	0.3820	0.1208	0.0968	****

****号上方为遗传相似系数,下方为遗传距离。

Populations 1-4 are the same as those in Table 1; Nei's genetic identity(above diagonal)and genetic distance(below diagonal).

2.4 夏蜡梅种群的聚类分析

基于 ISSR 和 RAPD 标记的 4 个夏蜡梅种群遗传距离和遗传相似系数见表 4。大明山种群和双石种群的遗传距离最近,仅为 0.0802;天台种群和双石种群的遗传距离最远,为 0.3868;遗传距离平均值为 0.2141。

基于遗传相似系数和遗传距离,UPGMA 法聚类分析,得到了 4 个夏蜡梅种群的聚类图(图 2)。

大明山种群和双石种群首先聚为一支,然后与西天目山种群聚到一起;天台种群与其他种群的亲缘关系较远,单独聚为一支。

2.5 夏蜡梅种群的基因分化

用 POPGENE 软件在假设遗传平衡条件下对 4 个夏蜡梅种群进行分析,计算出种水平基因多样性(H_t , gene diversity among populations)和种群内基因多样性(H_s , gene diversity within populations)分别为 0.2371 和 0.1117。种群间基因分化系数(G_{st})为 0.5291,即在总的遗传变异中有 52.91%存在于群体间,而 47.09%的变异都存在于种群的内部。基因流(N_m)为 0.4450,说明种群间的遗传交换较少。

3 讨论

3.1 夏蜡梅种群的遗传多样性

遗传多样性分析显示 4 个夏蜡梅种群 ISSR 和 RAPD 标记多态性条带百分率为 70.43%,但各种

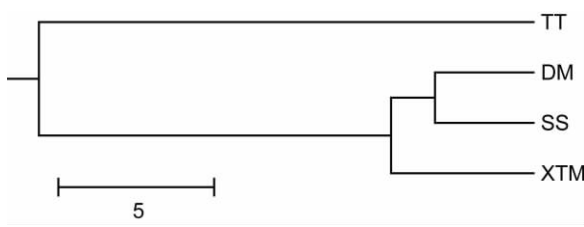


图 2 4 个夏蜡梅种群基于遗传相似系数的聚类图
Fig. 2 Dendrogram based on the genetic similarity coefficients of 4 populations of *C. chinensis*

群内多态性条带百分率的平均值仅为 29.87%，其中西天目山种群内 *PPB* 值仅 12.17%，大明山种群的 *PPB* 值最高，也仅为 56.02%；*Nei's* 基因多样性 (*H*) 和 Shannon 信息指数 (*I*) 仅 0.1117 和 0.1645，这表明夏蜡梅的遗传变异主要存在于种群间。其种群内部基因分化系数仅为 0.5291，也表明了这一点。4 个种群遗传距离的平均值仅为 0.2141；天台种群和双石种群的遗传距离最远，为 0.3868，大明山种群和双石种群的遗传距离最近，仅为 0.0802。与 Fan *et al.* (2008) 的 RAPD 研究结果 (种群水平 *PPB*、*H*、*I* 分别为 40.9%、0.1644 和 0.2386) 基本一致，但 Li *et al.* (2006) 的 RAPD 实验结果高 (种群水平 *PPB*、*H*、*I* 分别为 14.49%、0.0578 和 0.0843)；也比周世良等 (2002) 通过 14 个等位酶检测到的种群水平多态位点百分率为 0~13%。作为一种狭域分布的树种，夏蜡梅种群基因水平的遗传多样性不高已是公认的事实。但陈香波等 (2010) 通过对夏蜡梅自然分布区 8 个群体花部、叶部、果部和种子的 22 个性状系统调查与分析发现，夏蜡梅天然群体存在丰富的表型变异，20 个表型性状在群体间与群体内差异均达到极显著水平。可能是因为形态变异更多的是环境饰变而非遗传物质的改变。

4 个夏蜡梅种群的基因流为 0.4450。比 Fan (2008) 的研究结果 ($N_m = 0.8898$) 低。种群间基因分化系数 (G_{st}) 为 0.5291，表明种群间和种群内遗传变异相近。夏蜡梅是以异交为主、自交亲和、混合交配自然繁育系统。异交主要依赖昆虫传粉，这种传粉方式不利于花粉的长距离传播和远距离种群的基因交流，并有可能导致种群对局部生态环境的适应，进而促使种群间的遗传隔离 (李均敏等, 2004)，从而使分布地域狭窄、生境片段化的夏蜡梅种群的濒危程度加剧。

3.2 夏蜡梅种群的保护策略

本研究及众多研究结果均表明夏蜡梅种群的遗

传多样性不高。作为第三纪孑遗植物，狭域分布的珍稀濒危物种，对夏蜡梅种质资源的保护势在必行。张文标等 (2007) 的研究发现不同生境的夏蜡梅具有不同的遗传多样性，且在各生境间发生了明显的遗传分化。因此，选择种群密度大，生境丰富的地区建立保护区是夏蜡梅种群保护的有效方式。同时，迁地保护也不能忽视，对于一个基因流比较小， G_{st} 值为 0.60 的物种，至少要取样 6 个种群才能保存其 95% 的遗传多样性；而对 G_{st} 值为 0.20 的物种，要达到同样的效果只需要取样 2 个种群就足够 (Hamrik *et al.*, 1991)。根据夏蜡梅的 G_{st} 值，我们认为必须保存所有分布地的种群才可以保存其种质的多样性。此外，夏蜡梅叶大而色翠，晚春初夏开花，花大，花被片螺旋状着生于杯状或坛状的花托上，外花被片白色，倒卵形或倒卵状匙型，边缘紫红色，有脉纹；内层花被片中部以上淡黄色，中部以下白色。且其果很像一只精美的花瓶，春夏可赏花，秋天能观果，观赏价值高 (蒋英等, 1979)。因此，加快夏蜡梅作为园林观赏植物的推广引用和种质创新进程，对于夏蜡梅资源的保护同样具有重要而深远的意义。

参考文献:

- 张文标. 2007. 濒危植物夏蜡梅繁殖生态与遗传分化研究[D]. 重庆: 西南大学
- 章绍尧, 毛宗国. 1992. 夏蜡梅[M]//傅立国, 金鉴明. 中国保护植物红皮书. 北京: 科学出版社: 196-197
- 蒋英, 李秉滔. 1979. 中国植物志(第 30 卷第 2 分册)[M]. 北京: 科学出版社: 3-5
- Chen XB(陈香波), Ye WG(叶文国), Tian Q(田旗), *et al.* 2010. Phenotypic variation and distribution pattern of natural populations of *Sinocalycanthus chinensis* (夏蜡梅天然群体表型变异及分布特征)[J]. *J Beijing For Univer* (北京林业大学学报), 32(2): 133-140
- Fan CC, Pecchioni N, Chen LQ. 2008. Genetic structure and proposed conservation strategy for natural populations of *Calycanthus chinensis* (Calycanthaceae)[J]. *Can J Plant Sci*, 88: 179-186
- Hamrik JL, Godt MJW, Murawaki SA, *et al.* 1991. Correlations between species traits, allozyme diversity: implications for conservation biology[A]//Falk DA, Holsinger DE (eds). *Genetics, Conservation of Rare Plants*[VI]. New York: Oxford University Press: 75-86
- Jin ZX(金则新), Li JM(李均敏). 2007. ISSR analysis on genetic diversity of endangered relic shrub *Sinocalycanthus chinensis* (珍稀濒危植物夏蜡梅遗传多样性的 ISSR 分析)[J]. *Chin J Appl Ecol* (应用生态学报), 18(2): 247-253
- Ke SS(柯世省), Jin ZX(金则新). 2007. Effects of drought stress on lipid peroxidation and antioxidant system in leaves of *Calycanthus chinensis* (干旱胁迫对夏蜡梅叶片脂质过氧化及抗氧化系统的
- (下转第 142 页 Continue on page 142)

- Li L, He KX. 2006. The medical research status of sweet tea extracts[J]. *Mod Med Health*, **22**(2):199-201
- Liang J, Zhao P, Li B, et al. 2003. Acute and chronic toxicity of *Rubus suavisissimu*[J]. *Guangxi Med J*, **25**(12):2394-2397
- Liang XQ, Shi T, Xie P, et al. 2008. Effect of rubusoside on hyperglycemic rats induced by alloxan[J]. *Chin Foreign Med Treat*, **35**:7-8
- Liao MY, Qin GZ. 1981. Study the toxicity of the sweet tea[J]. *Guihaia*, **1**(4):20
- Liu D, Gao ZG, Zhang J, et al. 2005. Bioassay guided fractionation of *Rubus suavisissimus* leaf extracts possessing NK- inhibitory activities and a separable cytotoxicity[J]. *Pharm Biol*, **43**(8):713-717
- Liu HY, He KX, Li L. 2009. *Rubus suavisissimus* saponin effects on adhering of streptococcus mutans[J]. *J Clin Stomatol*, **25**(2):67-68
- Liu ZJ, Schwimer, Liu D, et al. 2006. Gallic acid is partially responsible for the anti-angiogenic activities of *Rubus* leaf extract[J]. *Phytother Res*, **20**:806-813
- Luo DW. 2010. Study on chemical constituents of *Rubusoside suavisissimus* fruit [D]. Guangxi Nor Univ
- Lü HC, Wang JX. 2007. Identification of the chemical constituents of *Rubus suavisissimus* (II)[J]. *J Guang Dong Coll Pharm*, **23**(5):489-491
- Nakahara K. 1998. Antiallegic activity of tencha and oolong tea polyphenols[J]. *Food Style*, **21**(2):45-49
- Ohtani K, ikawa Y, Kasai R, et al. 1992. Minor diterpene glycosides from sweet leaves of *Rubus suavisissimus*[J]. *Phytochemistry*, **31**(5):1553-1559
- Patel AV, Rojas-Vera J, Dacke CG. 2004. Therapeutic constituents and actions of *Rubus* species[J]. *Curr Med Chem*, **11**:1501-1512
- Sugimoto N, Kikuchi H, Yamazaki T, et al. 2001. Polyphenolic constituents from the leaves of *Rubus suavisissimus* [J]. *Nat Med*, **55**(4):219
- Tan DM. 2008. Studies on chemical constituents in leaves of *Rubusoside suavisissimus*[D]. Guilin: Guangxi Norm Univ
- Teng JW, Huang L, Yi XX, et al. 2008. Anti-allergic evaluation of Guangxi sweet tea polyphenols[J]. *Food Mach*, **24**(5):48-51
- Tian CP, Qu WJ, Zhang W, et al. 2001. Effect of rubusoside on mice gluconeogenesis and metabolism of blood lipid[J]. *Guangxi J Trad Chin Med*, **24**:59-61
- Tian CP, Qu WJ, Sun B, et al. 2003. Effect of rubusoside extracts on hyperglycemic rats induced by streptozotocin[J]. *Act Nutr Sin*, **25**(1):29-32
- Ukai K. 1997. Antiallegic action of *Rubus suavisissimus*[J]. *Shokuhin Kogyo*, **40**:52-59
- Wang C, Yin XP, Chen BT, et al. 2010. Anti-inflammatory effects of the extract of *Rubus suavisissimus* cultivated in Guangxi[J]. *Chin Pharm*, **21**(31):2891-2893
- Wang LB, Bi CH. 2007. Latest research advances in bioactive components of sweet tea [J]. *Cereals Oils*, **2**:47-49
- Wang JX, Lü HC. 2007. Studies on the chemical constituents of *Rubus suavisissimus*[J]. *J Chin Med Mat*, **30**(7):800-802
- Wang JX, Lü HC. 2008. Studies on the diterpenoids of *Rubus suavisissimus*[J]. *Li Shizhen Med Mat Res*, **19**(3):664-665
- Wei BY, Gao CH, Teng JW. 2006. Study on anti-allergic components of Guangxi sweet tea[J]. *Food Sci Technol*, **5**:139-142
- Wu YC, Wu D, Xie JX, et al. 2010. Anti-tumor effect in vitro of total flavone from *Rubus suavisissimus* [J]. *Chin J Exp Trad Med Form*, **16**(7):165-167
- Zhang QY. 2006. Studies on rubusoside and other chemical constituents in leaves of *Rubusoside suavisissimus*[D]. Guangxi Nor Univ
- Zhao LP, Lu XY, Chen QY, et al. 2010. To investigate the effects of sweet tea extract concentration on contraction of rabbit small intestine *in vitro*[J]. *Contemp Med*, **215**(24):1-2
- Zhong ZX, Zhou GF, Chen XF, et al. 2000. Pharmacological studies on the extract of *Rubus suavisissimus* from Guangxi[J]. *Li Shizhen Med Mat Res*, **11**(10):867-868

(上接第 34 页 Continue from page 34)

- 影响[J]. *Sci Silvae Sin*(林业科学), **43**(10):28-33
- Li BT, Bruce Bartholomew. 2008. *Calycanthus L.* Flora of China//Wu Z, Raven PH(eds). Beijing: Science Press; St. Louis: Missouri Botanical Garden Press, **7**:94-95
- Li JM, Jin ZX. 2006. High genetic differentiation revealed by RAPD analysis of narrowly endemic *Sinocalycanthus chinensis*, an endangered species of China[J]. *Biochem Syst Ecol*, **34**:725-735
- Li LC(李林初). 1986. Karyotype analysis of *Calycanthus chinensis* (Calycanthaceae)(夏蜡梅核型的研究)[J]. *Guihaia*(广西植物), **6**(3):221-224
- Li LC(李林初). 1989. Cyogeographical study of *Calycanthus Linneus*(夏蜡梅属的细胞地理学研究)[J]. *Guihaia*(广西植物), **9**(4):311-316
- Liu WL(刘文莉), Jin ZX(金则新), Ke SS(柯世省). 2007. The effects of copper on emerging metabolism of *Sinocalycanthus chinensis*(铜对夏蜡梅种子萌发代谢的影响)[J]. *J Yunnan Agric Univ*(云南农业大学学报), **22**(1):132-137
- Liu WL(刘文莉), Jin ZX(金则新), Ke SS(柯世省). 2008. Effects of copper on seed germination and antioxidant enzymes of *Sinocalycanthus chinensis*(铜对夏蜡梅种子萌发及抗氧化酶活性的影响)[J]. *Environ Chem*(环境化学), **37**(1):44-48
- Xu YL(徐耀良), Zhang RH(张若蕙), Zhou C(周骋). 1997. Study on Communities of *Calycanthus chinensis*(夏蜡梅的群落学研究)[J]. *J Zhejiang Fore Coll*(浙江林学院学报), **14**(4):355-362
- Yeh, FC, Yang RC. Poptgene v 1.31, download from <http://www.ualberta.ca/~fyeh/>
- Zhang HW(张宏伟), Weng DM(翁东明), Xu RZ(徐荣章). 1997. Study on ecological biological properties of *Sinocalycanthus chinensis*(夏蜡梅生态生物学特征的研究)[J]. *J Zhejiang For Sci & Tech*(浙江林业科技), **17**(1):15-17
- Zheng WJ(郑万钧), Zhang SR(章绍尧). 1963. A new genera of Calycantaceae—*Sinocalycanthus*(蜡梅科的新属——夏蜡梅属)[J]. *Acta Phytotax Sin*(植物分类学报), **9**(2):135-139