

研究简报

# 多叶重楼遗传多样性的 RAPD 分析

张金渝<sup>1,3</sup> 虞泓<sup>1,2\*</sup> 张时刚<sup>2</sup> 丁长春<sup>1</sup>

1 (云南大学生命科学院生态遗传学实验室, 昆明 650091)

2 (云南英茂生物技术实验室, 昆明 650212)

3 (云南省农业科学院质量标准与检测技术研究所, 昆明 650205)

**摘要:** 应用 RAPD 技术检测了多叶重楼 (*Paris polyphylla*) 2 个变种 4 个居群的遗传多样性, 并与 1 个凌云重楼 (*P. cronquistii*) 居群进行了比较。选择的 16 个随机引物在 5 个居群中共检测到 246 个多态位点。在居群水平上, 滇重楼 2 个居群的多态位点百分比 (PPB) 分别为 57.43% 和 54.67%, Shannon 指数分别为 0.3080 和 0.2830; 七叶一枝花 2 个居群的 PPB 分别为 56.33% 和 57.75%, Shannon 指数分别为 0.3080 和 0.3293。在变种水平上, 滇重楼的 PPB 为 75.14%, Shannon 指数为 0.3922, 遗传分化系数 (*Gst*) 为 0.3085; 七叶一枝花的 PPB 为 80.31%, Shannon 指数为 0.3992, 遗传分化系数 (*Gst*) 为 0.3726; 在种的水平 PPB 达 92.05%, 遗传分化系数 *Gst* 达 0.5151。聚类分析显示滇重楼和七叶一枝花有较近的亲缘关系, 而与凌云重楼遗传距离较远。此结果从分子水平上支持了过去将滇重楼和七叶一枝花划分为 1 个种下 2 个变种的形态分类观点。

**关键词:** *Paris polyphylla*, RAPD, 遗传多样性, 居群遗传分化

中图分类号: Q347

文献标识码: A

文章编号: 1005 - 0094(2004)05 - 0517 - 06

## RAPD variation within and among four populations of *Paris polyphylla*

ZHANG Jin-Yu<sup>1,3</sup>, YU Hong<sup>1,2\*</sup>, ZHANG Shi-Gang<sup>2</sup>, DING Chang-Chun<sup>1</sup>

1 Laboratory of Ecological Genetics, College of Life Science, Yunnan University, Kunming 650091

2 Innmol Laboratory of Biotechnology of Yunnan, Kunming 650212

3 Agricultural Quality, Standard and Testing for Technology Institute, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming 650205

**Abstract:** The randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) technique was applied to assess the genetic diversity and structure of four populations of two varieties of *Paris polyphylla*. As a control, a population of *P. cronquistii* was compared with the four *P. polyphylla* populations to determine their phylogenetic relationships. Using 16 random primers, a total of 246 RAPD polymorphic loci were detected. At the population level, the percentage of polymorphic loci (PPB) of two populations of *P. polyphylla* var. *yunnanensis* was 57.4% and 54.67%, while Shannon information index (*I*) was 0.3080 and 0.2830, respectively. The PPB of two *P. polyphylla* var. *chinensis* populations was 56.33% and 57.75%, while Shannon information index (*I*) were 0.3080 and 0.3293, respectively. At the variety level, the PPB, *I* and *Gst* values of *P. polyphylla* var. *yunnanensis* were 75.14%, 0.3922, and 0.3085, respectively, while those of *P. polyphylla* var. *chinensis* was 80.31%, 0.3992, and 0.3726, respectively. At the species level, the PPB was 92.05%, and *Gst* was 0.5151. The UPGMA dendrogram showed that the two varieties of *P. polyphylla* are more related to each other than to *P. cronquistii*, which supports the previous treatment of *P. polyphylla* var. *yunnanensis* and *P. polyphylla* var. *chinensis* as two varieties within *P. polyphylla* based on gross morphology.

**Key words:** *Paris polyphylla*, RAPD, genetic diversity, population genetic differentiation

多叶重楼 (*Paris polyphylla*) 是延龄草科 (Trilliacae) 重楼属 (*Paris*) 侧膜亚属 (subgenus *Daiswa*) 的

植物, 主要分布于长江以南地区, 下分 8 个变种和 2 个变型 (李恒, 1998)。其分布于云南、贵州、四川及

收稿日期: 2004 - 03 - 30; 接受日期: 2004 - 06 - 24

基金项目: 云南大学省级生物技术人才培养基地资助项目和云南大学植物学博士点基金

\*通讯作者 Author for correspondence. E-mail: fisher@yninmol.com

缅甸北部的变种滇重楼 (*P. polyphylla* var. *yunnanensis*) 和分布于长江以南及越南北部的变种七叶一枝花 (又称华重楼) (*P. polyphylla* var. *chinensis*) 是重要的药用植物,具有清热解毒、消肿止痛之功效,长期以来被作为多种中成药和中药的主要原材料 (图 1)。凌云重楼主要分布于云南东南部、广西南部及四川峨眉山等地,其核型多态,被认为是现有各种重楼的共同种源,在重楼系统发育研究方面是一个承前启后的关键类群 (李恒,1998)。以往对重楼属植物的研究工作多数集中于形态分类 (李恒,1986)、系统发育 (李恒,1984)、核型分析 (顾志建,1982,1986)、化学成分分析 (陈昌祥和周俊,1992;徐学民和钟焯昌,1988)、孢粉学 (Takahashi,1984;韦仲新,1988) 及引种驯化 (李运昌,1982) 等方面,而关于重楼遗传多样性及其遗传结构研究的报道则十分少见。

RAPD 是研究居群遗传多样性,揭示其遗传结构的快速、简便、有效的方法。本文试图利用此种分子标记技术进行重楼居群遗传多样性和遗传结构的分析,为药用重楼植物的保护、引种驯化、遗传育种、繁育栽培和标准化种植提供理论依据和方法措施。同时,对重楼药材标准化种植优良品种进行 DNA 分子标记,为建立重楼属药用植物的 DNA 指纹图谱打下基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

实验材料为多年生野生植株移栽至英茂实验室保育基地 (海拔 2100 m) 的再生苗,每个居群随机取 20 个个体的新鲜叶片放入 - 80 超低温冰箱备用,样品来源见表 1。

### 1.2 CTAB 法提取 DNA

本实验采用 CTAB 法 (邹喻苹,2001) 加以改进后,提取重楼总 DNA。取冷冻新鲜叶片 0.5 g 放入灭菌研钵中,加入少许 PVP、石英砂及 120  $\mu$ L  $\beta$ -巯基乙醇,充分研磨后加入 4 mL 提取缓冲液 (100 mmol/L Tris-HCl, 50 mmol/L EDTA, 750 mmol/L NaCl, pH8.0),洗去多糖和次生代谢物。离心后加入 4 mL 2  $\times$ CTAB,65  $^{\circ}$ C 水中保温 1 h;冷却后加入 1/3 体积 5 mol/L KAc 冰中保温 1 - 2 h;离心后,在上清液中加入等体积的氯仿:异戊醇溶液 (24:1 (V/V)) 抽提 2 次,取上清液,加 2/3 体积异丙醇, - 20  $^{\circ}$ C 静置 1 h;离心后沉淀用 70%乙醇洗两次。沉淀晾干后,用适量 1  $\times$ TE 缓冲液溶解。电泳检测并标定 DNA 浓度至 10 ng/ $\mu$ L,备用。

### 1.3 PCR 扩增与引物筛选

从上海生工合成的 94 条随机引物中筛选出 16 条条带清晰、稳定性和重复性好的引物用于 RAPD

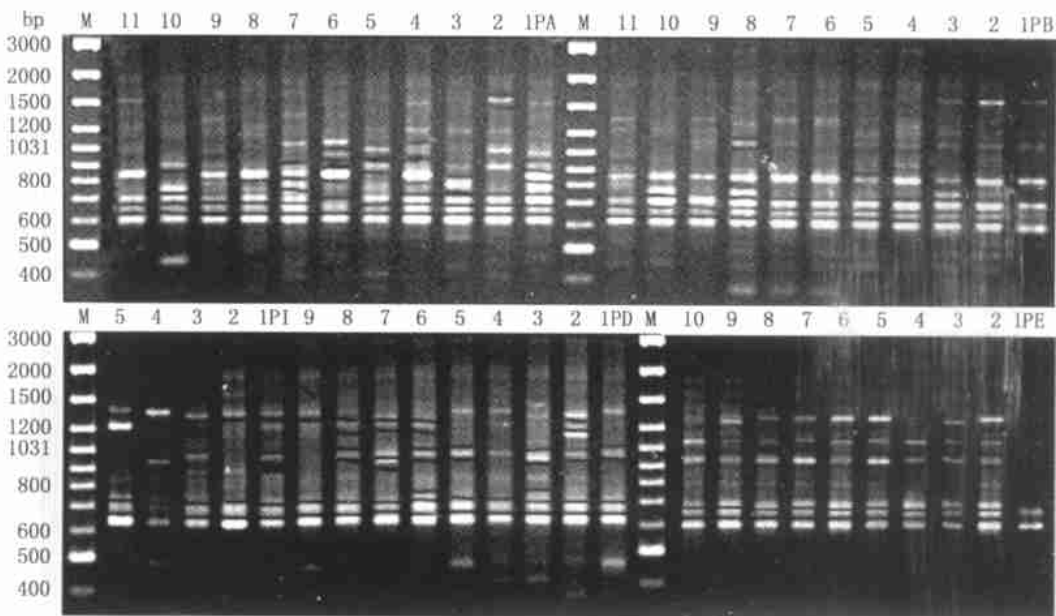


图 1 引物 S329 对各个居群 (PA, PB, PD, PI 和 PE) 扩增的 DNA 指纹图谱  
Fig. 1 DNA fingerprints of five populations (PA, PB, PD, PI and PE) using primer S329

表 1 5 个重楼居群的产地、采样量及海拔

Table 1 Locality, sample size, and altitude of five populations of the genus *Paris*

物种 Species	居群 Population	采样数 Sample size	来源地 Locality	海拔 Altitude (m)
滇重楼 <i>P. polyphylla</i> var. <i>yunnanensis</i>	高明 (PA) Songming	20	云南昆明高明 Songming, Kunming, Yunnan	2100
	澄江 (PB) Chengjiang	20	云南玉溪 Mt. Liangwang, Yuxi, Yunnan	2500
七叶一枝花 <i>P. polyphylla</i> var. <i>chinensis</i>	那坡 (PD) Napo	20	广西百色那坡 Napo, Baise, Guangxi	1200
	越南 (PI) Vietnam	9	越南高平 Gaobang, Vietnam	800 - 1000
凌云重楼 <i>P. cronquistii</i>	越南 (PE) Vietnam	20	越南高平 Gaobang, Vietnam	800 - 1000

表 2 16 个有效随机引物序列及其扩增结果

Table 2 Sequences and amplifications of 16 effective random primers

引物 Primer	序列 Sequence (5'-3')	DNA 条带数 No. of bands	多态性条带 No. of polymorphic bands
S1	GTTCGCTCC	16	15
S12	CCTTGACGCA	16	15
S121	ACGGATCCTG	14	13
S134	TGCTGCAAGT	16	15
S139	CCTCTAGACC	13	10
S217	CCAACGTCGT	14	13
S366	CACCTTTCCC	11	10
S235	CAGTGCCGGT	17	16
S28	GTGACGTAGG	15	15
S442	ACGTAGCGTC	21	21
S465	CCCCGGTAAAC	22	22
S46	ACCTGAACGG	16	15
S55	CATCCGTGCT	14	13
S463	CTGATACGCC	15	14
S383	CCAGCACTT	23	23
S329	CACCCCA GTC	17	16

分析,引物序列见表 2。PCR 反应在 PE 公司生产的 PE9700PCR 扩增仪上进行,每个反应重复 1 次。反应体系 (25  $\mu$ L): Taq 酶 (0.5 U/ $\mu$ L) (Promega 公司) 2  $\mu$ L, 10  $\times$ PCR Buffer 2.5  $\mu$ L, 25 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 2  $\mu$ L, 2.5 mmol/L dNTP (Promega 公司) 1.5  $\mu$ L, 引物 (33 ng/ $\mu$ L) (上海生工合成) 2  $\mu$ L, 模板 DNA (10 ng/ $\mu$ L) 2  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 13  $\mu$ L, 最后加一滴石蜡油防止蒸发。反应条件: 94 预变性 5 min; 94 变性 30 s, 37 复性 30 s, 72 延伸 1 min, 共 40 个循环; 72 延伸 7 min。反应产物用 2.0% 琼脂糖凝胶电泳分离, EB 染色 0.5 h, 用水洗净后, 用 Kodak Image Station 440CF 保存图像。

#### 1.4 数据分析

电泳图谱的每 1 条带记为 1 个位点, 只记录那

些可辨认的、两次扩增结果一致的条带。同一位点有带记为“1”, 无带记为“0”, 缺失记为“.”。形成 0/1 矩阵图输入计算机, 采用 POPGENE 1.32 计算出多叶重楼各居群的 Nei's 基因多样性指数 ( $H$ )、Shannon 信息指数 ( $I$ )、多态位点百分比 ( $PPB$ )、基因分化系数 ( $Gst$ )、居群内基因多样性 ( $Hs$ )、总的基因多样性 ( $Ht$ )、Nei's 遗传距离 ( $D$ ) 和遗传一致度 ( $I$ )。用 MEGA 软件对各居群进行 UPGMA 聚类分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 多叶重楼的遗传多样性分析

从 94 条 10 bp 随机引物中筛选出 16 条随机引物, 对 4 个多叶重楼居群 (2 个滇重楼居群和 2 个七叶一枝花居群) 和 1 个凌云重楼 (*P. cronquistii*) 居群

共 89 个样品进行 RAPD 分析,共扩增出 260 个条带。其中多态性条带 246 个,占总数的 94.62% (图 1)。从表 3 可以看出,在多叶重楼中,越南七叶一枝花 (PI) 居群的多态位点百分比 (PPB) (57.75)、Shannon 指数 (0.3293) 和 Nei s 基因多样性指数 (0.2241) 均为最高;而云南澄江滇重楼居群 (PB) 的 PPB 值 (54.67)、Shannon 指数 (0.2830) 和 Nei s 基因多样性指数 (0.1891) 较低。多叶重楼各居群的 PPB 值相差不大,最高值与最低值相差仅为 3.08 个百分点;而且多叶重楼各居群的 PPB 值、Shannon 指数和 Nei s 基因多样性指数均比凌云重楼高,因此有更多的遗传多样性。

## 2.2 多叶重楼的遗传变异分析

根据遗传多样性水平在居群内 ( $H_s$ ) 和居群间的分化 ( $H_t-H_s$ ) 以及居群间遗传差异在总的遗传差异中所占的比例 ( $G_{st}$ ) (表 4), 种间的基因分化系数 ( $G_{st}$ ) 达 0.5151。这说明在种的水平上仅有 48.49% 的分子变异存在于变种内,而有 51.51% 的分子变异存在于变种间,也就是说变种间分化较大。而在

变种水平上,滇重楼变种只有 30.85% 的分子变异存在于居群间,而有 69.15% 的变异存在于居群内。在变种七叶一枝花中有 37.26% 的分子变异存在于居群间,62.74% 的变异存在于居群内。两个变种内各居群间均存在一定的分化。无论是在滇重楼还是七叶一枝花,居群内的基因多样性程度要小于总的基因多样性程度,这表明遗传变异主要存在于居群间。

## 2.3 遗传距离和聚类分析

遗传距离分析结果 (表 5) 显示,各居群间的遗传距离在 0.1354 - 0.3900 之间。滇重楼和七叶一枝花的遗传距离平均为 0.2620,2 个滇重楼居群间遗传距离最近 (0.1354),2 个七叶一枝花居群间遗传距离为 0.1960。多叶重楼与凌云重楼居群间的遗传距离较远,在 0.3500 到 0.3900 之间,平均为 0.3677。在 UPGMA 聚类中,多叶重楼聚在一起而与凌云重楼分开;而在多叶重楼中,滇重楼和七叶一枝花之间有较大分化,分开聚成两支 (图 2)。

表 3 多叶重楼各居群、变种及凌云重楼的遗传变异

Table 3 Genetic variation within populations and varieties of *Paris polyphylla* and *P. cronquistii*

居群 Population	总位点数 Total number of loci	多态位点数 No. of polymorphic loci	多态位点 百分比 PPB	等位基 因数 A	有效等位 基因数 Ae	Nei s 基因 多样性 H	Shannon s 指数 I
嵩明 (PA)	148	85	57.43	1.5743	1.3530	0.2066	0.3080
澄江 (PB)	150	82	54.67	1.5467	1.3246	0.1891	0.2830
变种滇重楼 <i>P. polyphylla</i> var. <i>yunnanensis</i>	177	133	75.14	1.7514	1.4477	0.2617	0.3922
那坡 (PD)	158	89	56.33	1.5633	1.3591	0.2053	0.3080
越南 (PI)	142	82	57.75	1.5775	1.3957	0.2241	0.3293
变种七叶一枝花 <i>P. polyphylla</i> var. <i>chinensis</i>	193	155	80.31	1.8031	1.4373	0.2630	0.3992
物种水平 Species level	239	220	92.05	1.9398	1.4705	0.2747	0.4239
凌云重楼 (PE) <i>P. cronquistii</i>	143	61	42.66	1.4266	1.2323	0.1377	0.2092

PPB, Percentage of polymorphic loci; A, Allele number; Ae, Effective allele number; H, Nei s gene diversity; I, Shannon s information index

表 4 滇重楼变种和七叶一枝花变种居群间的遗传分化分析 (括号内为标准差)

Table 4 Analysis of genetic differentiation among populations of *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* and *P. polyphylla* var. *chinensis*. Standard deviations in parentheses.

居群 Population	总基因多样性 $H_t$	居群内基因多样性 $H_s$	基因分化系数 $G_{st}$
滇重楼 <i>P. polyphylla</i> var. <i>yunnanensis</i>	0.2617 (0.0361)	0.1810 (0.0243)	0.3085
七叶一枝花 <i>P. polyphylla</i> var. <i>chinensis</i>	0.2762 (0.0338)	0.1733 (0.0230)	0.3726
多叶重楼 <i>P. polyphylla</i>	0.2825 (0.0255)	0.1370 (0.0116)	0.5151

$H_t$ , Total gene diversity;  $H_s$ , Gene diversity within population;  $G_{st}$ , The coefficient of gene differentiation

表 5 不同居群间的 Nei 遗传一致度 I(对对角线上方)和遗传距离 D(对对角线下方)

Table 5 Nei's genetic identity (above diagonal) and genetic distance (below diagonal) among populations

Population	PA	PB	PD	PI	PE
PA	*	0.8734	0.7670	0.7623	0.6770
PB	0.1354	*	0.7942	0.7556	0.7047
PD	0.2653	0.2304	*	0.8220	0.6958
PI	0.2714	0.2810	0.1960	*	0.6920
PE	0.3900	0.3500	0.3626	0.3682	*

居群代号见表 1 Population codes correspond to those in Table 1

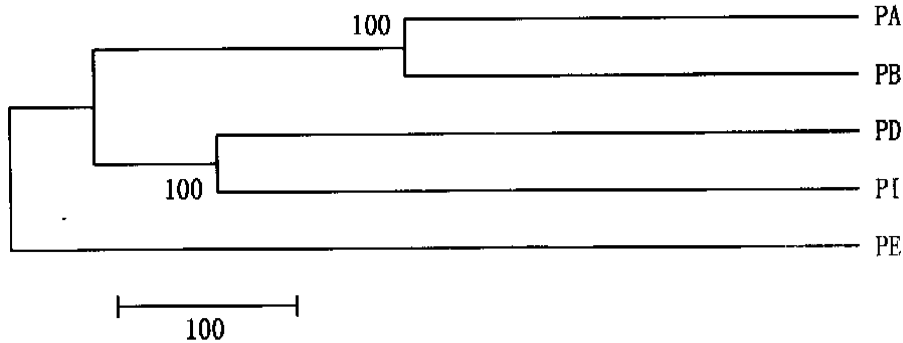


图 2 滇重楼、七叶一枝花与凌云重楼居群的 UPGMA 聚类图(居群代号见表 1)

Fig. 2 UPGMA dendrogram of populations of *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*, *P. polyphylla* var. *chinensis* and *P. cronquistii*. Population codes correspond to those in Table 1.

### 3 讨论

种内遗传多样性或变异越丰富,物种对环境变化的适应能力就越强,其进化的潜力就越大(葛颂, 2001)。因此,最大限度地维持种内遗传多样性水平,是持续利用遗传资源的前提和基础(李太武等, 2003)。本文对 4 个多叶重楼居群的 RAPD 分析得到多态位点百分比 (PPB 值) 在 54.67% 和 57.75% 之间,比唐荣华等(2003)对峨眉山 5 株七叶一枝花的 RAPD 分析结果 (PPB = 89.20%) 低。但是唐荣华等人的 RAPD 分析由于个体数少,难以得到整个居群甚至整个物种遗传多样性准确数值。在变种水平上,滇重楼的 PPB 值为 75.14,七叶一枝花的 PPB 值为 80.31。这说明滇重楼和七叶一枝花在长期的进化过程中形成了丰富的遗传多样性和进化潜力。虽然滇重楼和七叶一枝花长期被过度采集,但两个变种仍具有丰富的遗传多样性,具有较强的适应能力和进化潜力。

葛颂(1994)引用前人对 165 属 449 种植物等位酶数据进行统计分析得到多年生草本单子叶混交植

物的  $G_{st}$  值在 0.216 - 0.277 之间,而滇重楼和七叶一枝花 2 个变种内居群间遗传分化系数偏大,在 2 个变种内有一定的分化。葛颂(1994)认为在居群水平上繁育系统是影响植物遗传分化的重要因素; Avise(1994)则认为由弱飞行能力动物授粉和靠种子迁移的植物居群分化大。滇重楼和七叶一枝花变种内各居群间偏高的遗传分化很可能与其繁育系统有关。虽然多叶重楼被认为是虫媒花,但其花结构也利于自花授粉,其雄蕊高于雌蕊,柱头数枚,多向外卷,并且在花尚未展开之前,药室就已开放,这些特性为重楼自花授粉提供了可能性(李运昌, 1998),而且自交能结实。其具自交的特性增加了其居群间的遗传分化。此外,重楼能通过地下茎繁殖,也可能造成其遗传分化偏大。多叶重楼的种子球形,有鲜红多汁种皮,不易通过风传播,显然要靠动物和重力,可能也是造成其遗传分化大的原因。(顾志建等, 1982, 1994)通过对滇东 3 个七叶一枝花居群及凌云重楼等重楼核型多样性分析,得出在重楼属种内居群间染色体遗传变异较为活跃的结论,这可能也是滇重楼和七叶一枝花各变种内居群间遗传分化偏大

的原因。再者,由于此两个变种所处生态地理环境的差异以及地理隔离,在长期的自然选择条件下,致使地理距离较近的相邻居群间产生了较大的遗传分化。

滇重楼与七叶一枝花之间的遗传分化系数达 0.5151,表明大部分遗传变异存在于变种间,亦即两个变种间分化较大。但从 RAPD 所得的遗传距离(表 5)和聚类图(图 3)可知,这两个变种依旧有着很近的亲缘关系,有着较近的遗传距离和较高的遗传相似性,而与另一个种凌重楼遗传距离较远。这一结果支持李恒(1998)将其划分为 1 个种下的 2 个变种的观点。

长期以来,滇重楼与七叶一枝花作为云南白药等中成药的重要成分而被过度采集,在滇中、滇东等许多地区已濒临灭绝,因此对其种质资源及多样性的保护已迫在眉睫。考虑到滇重楼与七叶一枝花遗传多样性丰富而居群间遗传分化大、形态差异大等特点,在制定滇重楼与七叶一枝花的迁地保护策略和措施时,要尽量取不同地理分布区中不同生境的居群才能保护其物种的遗传多样性。

滇重楼与七叶一枝花丰富的遗传多样性和较大的遗传分化,为选育稳定高产的标准化种植品种提供了丰富的育种材料;同时可以将分子标记辅助育种技术应用于重楼的遗传育种,以缩短育种周期,促进重楼标准化、规范化的产业的稳固发展。

致谢:感谢文国松和何显静在实验和论文写作过程中给予的帮助,感谢云南英茂生物技术实验室的朱荣勋、李永谊、和锐、倪念春等工作人员在实验过程中给予的帮助!

## 参考文献

- Avise, J. C. 1994. *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. Chapman & Hall, New York.
- Chen, C. X. (陈昌祥) and Zhou, J. (周俊). 1992. Two new steroid saponin of *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*. *Acta Botanica Yunnanica* (云南植物研究), **14**:111 - 113. (in Chinese with English abstract)
- Ge, S. (葛颂). 1994. Allozyme and plant evolutionary biology study. In: Chen, J. K. (陈家宽) and Yang, J. (杨继) (eds.), *Plant Evolutionary Biology* (植物进化生物学). Wuhan University Press, Wuhan, 153 - 208. (in Chinese)
- Ge, S. (葛颂). 2001. Application of DNA molecular marker in conservation biology. In: Zou, Y. P. (邹喻莘), Ge, S. (葛颂) and Wang, X. D. (王晓东) (eds.), *Molecular Marker in Evolutionary Botany* (系统与进化植物学中的分子标记). Science Press, Beijing, 140 - 149. (in Chinese)
- Gu, Z. J. (顾志建). 1982. An observation on karyotypes of three different populations of *Paris polyphylla*. *Acta Botanica Yunnanica* (云南植物研究), **4**:424 - 428. (in Chinese)
- Gu, Z. J. (顾志建) and Na, H. Y. (纳海燕). 1986. Karyotype studies in eight taxa of *Paris*. *Acta Botanica Yunnanica* (云南植物研究), **8**:315 - 318. (in Chinese)
- Li, H. (李恒). 1984. The phylogeny of the genus *Paris* L. *Acta Botanica Yunnanica* (云南植物研究), **6**:351 - 362. (in Chinese)
- Li, H. (李恒). 1986. A study on the taxonomy of the genus *Paris*. *Bulletin of Botanical Research* (植物研究), **6**:109 - 144. (in Chinese with English abstract)
- Li, H. (李恒). 1998. *The Genus Paris* (Trilliaceae) (重楼属植物). Science Press, Beijing, 33 - 41. (in Chinese)
- Li, T. W. (李太武), Li, C. H. (李成华), Song, L. S. (宋林生) and Su, X. R. (苏秀榕). 2003. RAPD variation within and among five populations of *Tegillarca granosa*. *Biodiversity Science* (生物多样性), **11**:118 - 124. (in Chinese with English abstract)
- Li, Y. C. (李运昌). 1982. Studies on the introduction cultivation of genus *Paris* L. I. A preliminary report on sexual propagation of *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*. *Acta Botanica Yunnanica* (云南植物研究), **4**:429 - 431. (in Chinese)
- Li, Y. C. (李运昌). 1998. The domestication of genus *Paris* (Trilliaceae). In: Li, H. (李恒) (ed.), *The Genus Paris* (Trilliaceae) (重楼属植物). Science Press, Beijing, 151 - 154. (in Chinese)
- Takahashi, M. 1984. Pollen morphology in *Paris* and its related genera. *Botany Magazine Tokyo*, **97**: 233 - 245
- Tang, R. H. (唐荣华), Wang, L. (王丽), Tang, X. W. (唐小为) and Li, Y. F. (李云飞). 2003. RAPD analysis of 11 species in *Paris*. *Journal of Sichuan University* (Natural Science Edition) (四川大学学报) (自然科学版), **40**:778 - 782. (in Chinese with English abstract)
- Wei, Z. X. (韦仲新). 1988. Studies on the pollen morphology of *Paris*. *Acta Botanica Yunnanica* (云南植物研究), **10**:147 - 153. (in Chinese)
- Xu, X. M. (徐学民) and Zhong, C. C. (钟焜昌). 1988. The chemical constituents of Chinese *Paris* (*Paris polyphylla* var. *chinensis*). I. Isolation and structural determination of sarpogenin — A, B, D. *Chinese Traditional and Herbal Drugs* (中草药), **19**(5): 2. (in Chinese)
- Zou, Y. P. (邹喻莘). 2001. Isolation, purification and identification of plant DNA. In: Zou, Y. P. (邹喻莘), Ge, S. (葛颂) and Wang, X. D. (王晓东) (eds.), *Molecular Marker in Evolutionary Botany* (系统与进化植物学中的分子标记). Science Press, Beijing, 16 - 25. (in Chinese)

(责任编辑:时意专)