

# 红锥基因组 RAPD 反应体系的建立和优化

徐斌, 张方秋, 潘文, 朱报著

(广东省林业科学研究院, 广州 510520)

**摘要:** 以红锥 (*Castanopsis hystrix* A. DC.) 嫩叶为材料, 应用改良的 CTAB 方法成功提取了红锥基因组 DNA, 并对影响随机扩增多态 DNA (RAPD) 反应的各因素进行了优化, 建立了红锥 RAPD 的优化反应体系及程序。在 25  $\mu$ l 反应体系中, 模板 DNA 0.8 ng  $\mu$ l<sup>-1</sup>, 10 $\times$ Buffer 2.5  $\mu$ l, Mg<sup>2+</sup> 2.0 mmol/L, Taq DNA 聚合酶 0.8 U, dNTPs 0.35 mmol/L, 随机引物 S42 0.28  $\mu$ mol/L。PCR 循环程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 然后 94 $^{\circ}$ C 30 s, 39 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 35 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。

**关键词:** 红锥; DNA 提取; RAPD; 体系优化

中图分类号: Q523

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2008)01-0089-06

## The Optimization of RAPD Reaction System for *Castanopsis hystrix*

XU Bin, ZHANG Fang-qiu, PAN Wen, ZHU Bao-zhu

(Guangdong Forest Research Institute, Guangzhou 510520, China)

**Abstract:** The genomic DNA was extracted from *Castanopsis hystrix* A. DC. using the modified method of CTAB, and the optimization of its RAPD reaction system was also studied. Results showed that the high-quality genomic DNA can be obtained with the modified method of CTAB, and it could be directly used for RAPD analyses. The optimal PCR system for RAPD analysis was as follows: 0.8 ng  $\mu$ l<sup>-1</sup> DNA template, 2.0 mmol/L Mg<sup>2+</sup>, 0.8 U Taq polymerase, 0.35 mmol/L dNTPs, 0.28  $\mu$ mol/L random primer S42, in 25  $\mu$ l reaction system. RAPD program was 3 minutes at 94 $^{\circ}$ C for pre-denaturation, then followed by 35 cycles, each with 30 seconds at 94 $^{\circ}$ C for denaturation, 1 minute at 39 $^{\circ}$ C for annealing, 2 minutes at 72 $^{\circ}$ C for extension, finally extension at 72 $^{\circ}$ C for 10 minutes.

**Key words:** *Castanopsis hystrix*; DNA extraction; RAPD; System optimization

红锥 (*Castanopsis hystrix* A. DC.) 又名刺栲, 具有生长快、材质优、适应广、效益高等优良特性, 是南亚热带地区重要的优良阔叶用材树种<sup>[1-2]</sup>。在红锥的进化过程中, 红锥分布较广, 分布区内由于气候、土壤等诸多环境条件的多样性, 加上长期的人工干扰, 造成了不同种源间的差异, 使红锥遗传变异十分丰富<sup>[3]</sup>。近几年来, 随着广东省实施林业分类经营, 大力提倡发展优良乡土阔叶树种, 红锥的研究和开发得到重视, 红锥工程造林需要大量优质的种子, 其良种繁育工作更加迫切。因此, 为了更

好地了解红锥的进化关系、保护该树种的基因资源多样性及制定合理的选种、育种策略, 非常有必要对红锥野生或人工林种质资源的遗传多样性进行分析、分类、鉴定和良种选择。RAPD 技术能灵敏地揭示两个亲缘关系十分相近的个体之间的遗传变异, 非常适合检测种下水平的多样性, 广泛应用于居群的遗传结构分析、种质资源分析、栽培品种的鉴定等, 自从 1990 年 RAPD 技术问世以来, 在这个领域开展了大量工作<sup>[4]</sup>。然而由于 RAPD 是以 PCR 反应为基础, 引物较短, 对反应条件很敏感, 因此应

收稿日期: 2007-04-23 接受日期: 2007-08-23

基金项目: 广东省林业局 2006 年优良乡土树种选育和繁育专项基金资助

用 RAPD 标记时,对其反应条件进行优化是十分必要<sup>[9]</sup>。鉴于目前仍未有对红锥的 RAPD 反应体系进行优化的报道,本研究以红锥的基因组 DNA 为模板,对 RAPD 反应的各种因素进行全面比较分析,建立并优化了红锥稳定的 RAPD 反应体系。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

试验材料红锥采自广东省林业科学研究院苗圃,取枝条上端嫩叶,用蒸馏水清洗干净,当日提取 DNA,或置于 -30℃ 冰箱中备用。

### 1.2 DNA 的提取

参考改良的 CTAB 法<sup>[6]</sup>,并稍加改动,即在提取缓冲液中加入 2.5 mol/L NaCl 和 5% PVP,提取红锥新鲜嫩叶的总 DNA。其中 2×CTAB 提取液包括:100 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 20 mmol/L EDTA, 2.5 mol/L NaCl, 2%(质量浓度) CTAB, 5% PVP, 2% β-巯基乙醇(体积分数)。

### 1.3 DNA 浓度及纯度检测

提取的 DNA 分别进行 0.8% 琼脂糖凝胶电泳、紫外分光光度计 (Eppendorf) 检测其浓度和纯度。

### 1.4 试剂

试验所用的 MgCl<sub>2</sub>、dNTPs、Taq DNA 聚合酶均购自上海生工公司,随机引物由 Invitrogen 合成。

## 1.5 RAPD 反应

① RAPD 反应体系各因子梯度:以提取的红锥 DNA 为模板,用已筛选的 S42 随机引物进行扩增,在 MJ Research PTC-200 型 PCR 仪上进行 PCR 扩增。反应体系 25 μl,其中含有 10×PCR buffer 2.5 μl, 25 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 2.5 μl, 10 mmol/L dNTPs 0.75 μl, 5 U μl<sup>-1</sup> Taq DNA 聚合酶 0.2 μl, 50 ng μl<sup>-1</sup> 模板 DNA 0.5 μl, 10 μmol/L 引物 1 μl, ddH<sub>2</sub>O 17.55 μl。本实验参考张今今等<sup>[7]</sup>及尹佟明等<sup>[8]</sup>的方法,对影响扩增结果的模板浓度、镁离子浓度、Taq 酶、引物浓度、dNTPs 浓度、退火温度和循环次数等主要因子进行研究,设置梯度见表 1,在保持其他因子不变的情况下,按一定梯度改变单一因子进行扩增,筛选最优条件,以获得最优化、最稳定的反应体系,以等体积的无菌双蒸水代替模板 DNA 作为对照。② RAPD-PCR 扩增程序:94℃ 3 min; 94℃ 30 s, 36℃ 1 min, 72℃ 2 min, 40 个循环; 72℃ 10 min; 最后 4℃ 保存。PCR 扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶在 1×TAE 缓冲液中电泳,电压 3 V cm<sup>-1</sup>,稳压 1.5 h,溴化乙锭染色检测。

## 2 结果和分析

### 2.1 红锥 DNA 提取

提取的红锥总 DNA 沉淀呈白色、半透明, OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 比值在 1.7-2.0 之间, DNA 纯度较高,经过凝胶电泳检测 (图 1), 条带清晰,主带完整,主要集中在较大区域,点样孔没有发亮现象,说明用这

表 1 红锥 RAPD 反应体系优化设计

Table 1 Optimization of RAPD reaction system for DNA of *C. hystrix*

序号 No.	Mg <sup>2+</sup> (mmol/L)	Primer (μmol/L)	dNTPs (mmol/L)	Template DNA (ng μl <sup>-1</sup> )	Taq DNA polymerase (U)	Anneal temperature (°C)	Cycles
1	0	0	0	0	0	33	30
2	0.4	0.08	0.10	0.8	0.2	34	35
3	0.8	0.12	0.15	1.6	0.4	35	40
4	1.2	0.16	0.20	2.4	0.6	36	
5	1.6	0.20	0.25	3.2	0.8	37	
6	2.0	0.24	0.30	4.0	1.0	38	
7	2.4	0.28	0.35	4.8	1.2	39	
8	2.8	0.32	0.40	5.6	1.4	40	
9	3.2	0.36	0.45	6.4	1.6	41	
10	3.4	0.40	0.50	7.2	1.8		
11		0.44					
12		0.48					

种方法提取的 DNA 完整性较好, 没有 RNA、蛋白质、酚和糖类等杂质, 适合下一步的 PCR 扩增反应。

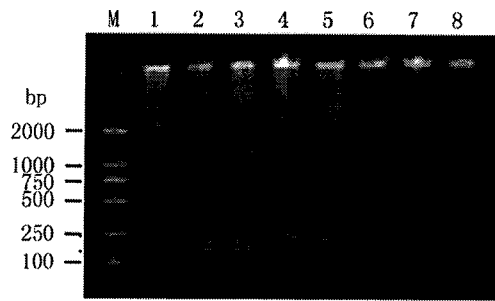


图 1 红锥总 DNA 凝胶电泳图谱

Fig. 1 Electrophoresis photograph of DNA extracted from *C. hystrix*  
M: DL2000 DNA marker; 1-8: 从云南省不同无性系提取的基因组 DNA Genomic DNA in different clonal trees from Yunnan Province

## 2.2 RAPD-PCR 反应体系的优化

### 2.2.1 Mg<sup>2+</sup> 浓度

Mg<sup>2+</sup> 为 *Taq* DNA 聚合酶的激活剂, RAPD 扩增体系中不同 Mg<sup>2+</sup> 浓度对红锥 RAPD 的影响见图 2。从图 2 中可以看出, 当 Mg<sup>2+</sup> 浓度为 0-0.4 mmol/L 时, 由于浓度太低不能得到有效的扩增; 当 Mg<sup>2+</sup> 浓度增加到 0.8 mmol/L 时, 所有条带基本可见, 但不清晰; 当 Mg<sup>2+</sup> 浓度达到 1.2-2.0 mmol/L 时, 条带的明亮度明显增加, 且条带清晰。随着 Mg<sup>2+</sup> 浓度的进一步提高, 条带数明显增加, 但亮度减弱, 当浓度达到 3.4 mmol/L 时, 各条带亮度都较弱。所以, 2.0 mmol/L 的 Mg<sup>2+</sup> 浓度是进行红锥 RAPD 扩增的最适浓度。

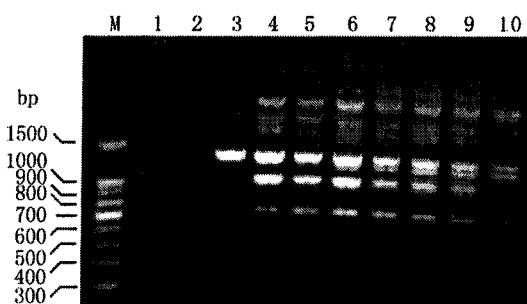


图 2 Mg<sup>2+</sup> 浓度对扩增结果的影响

Fig. 2 Effect of Mg<sup>2+</sup> concentration on RAPD results  
M: 100 bp DNA Ladder; 1: 0 mmol/L; 2: 0.4 mmol/L; 3: 0.8 mmol/L; 4: 1.2 mmol/L; 5: 1.6 mmol/L; 6: 2.0 mmol/L; 7: 2.4 mmol/L; 8: 2.8 mmol/L; 9: 3.2 mmol/L; 10: 3.4 mmol/L.

### 2.2.2 引物浓度

由图 3 可知, 引物浓度从 0.08 μmol/L 递增至

0.12 μmol/L, 基本能扩增出所需的条带, 但亮度太弱, 不能完全被扩增。随着浓度的升高, 达到 0.48 μmol/L 时, 条带仍清晰可辨, 均匀明亮, 效果较好。因此在本研究中, 确定 0.28 μmol/L 的引物浓度较为适宜。



图 3 引物浓度对扩增结果的影响

Fig. 3 Effect of random primer concentration on RAPD results

M: 100 bp DNA Ladder; 1: 0 μmol/L; 2: 0.08 μmol/L; 3: 0.12 μmol/L; 4: 0.16 μmol/L; 5: 0.20 μmol/L; 6: 0.24 μmol/L; 7: 0.28 μmol/L; 8: 0.32 μmol/L; 9: 0.36 μmol/L; 10: 0.40 μmol/L; 11: 0.44 μmol/L; 12: 0.48 μmol/L.

### 2.2.3 dNTPs 浓度

从图 4 可以看出, 在 0.10-0.30 mmol/L 范围内, 由于 dNTPs 浓度较低, 扩增条带少, 不稳定, 当浓度增加至 0.35 mmol/L 时扩增效果最好, 此后, 随着浓度的增加, 扩增条带减少、变弱, 当浓度达到 0.5 mmol/L 时, RAPD 扩增被完全抑制。说明 dNTPs 浓度过高和过低都不利于红锥 RAPD 的扩增, 而 0.35 mmol/L 的 dNTPs 浓度对红锥 RAPD 扩增效果最佳。

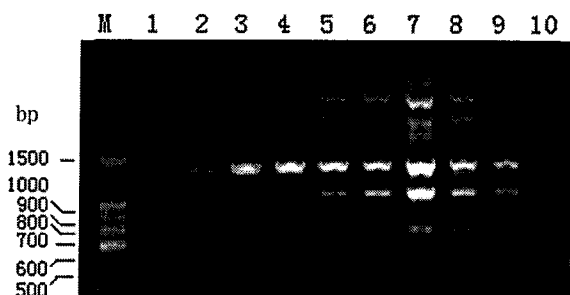


图 4 dNTPs 浓度对扩增结果的影响

Fig. 4 Effect of dNTPs concentration on RAPD results  
M: 100 bp DNA Ladder; 1: 0 mmol/L; 2: 0.10 mmol/L; 3: 0.15 mmol/L; 4: 0.20 mmol/L; 5: 0.25 mmol/L; 6: 0.30 mmol/L; 7: 0.35 mmol/L; 8: 0.40 mmol/L; 9: 0.45 mmol/L; 10: 0.50 mmol/L.

### 2.2.4 模板浓度

DNA 模板用量是 PCR 扩增的重要影响因素,

用量过高会出现非特异扩增甚至抑制扩增的进行,浓度过低则得不到扩增产物。从图 5 可以看出,模板 DNA 浓度为  $0.8\text{--}6.4\text{ ng }\mu\text{l}^{-1}$  时对 RAPD 带型影响不大,扩增产物清晰,稳定。当浓度达到  $7.2\text{ ng }\mu\text{l}^{-1}$  时,抑制条带的扩增,使条带变弱。所以本研究体系中模板 DNA 用量选用  $0.8\text{ ng }\mu\text{l}^{-1}$ 。

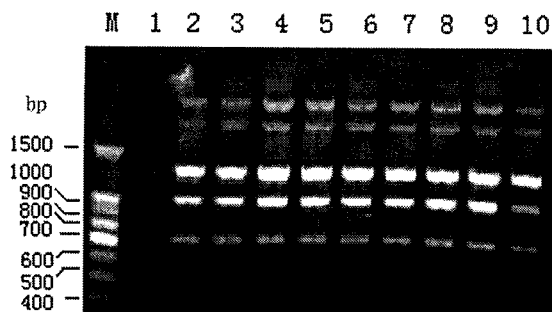


图 5 模板浓度对扩增结果的影响

Fig. 5 Effect of template DNA concentration on RAPD results

M: 100 bp DNA Ladder; 1:  $0\text{ ng }\mu\text{l}^{-1}$ ; 2:  $0.8\text{ ng }\mu\text{l}^{-1}$ ; 3:  $1.6\text{ ng }\mu\text{l}^{-1}$ ; 4:  $2.4\text{ ng }\mu\text{l}^{-1}$ ; 5:  $3.2\text{ ng }\mu\text{l}^{-1}$ ; 6:  $4.0\text{ ng }\mu\text{l}^{-1}$ ; 7:  $4.8\text{ ng }\mu\text{l}^{-1}$ ; 8:  $5.6\text{ ng }\mu\text{l}^{-1}$ ; 9:  $6.4\text{ ng }\mu\text{l}^{-1}$ ; 10:  $7.2\text{ ng }\mu\text{l}^{-1}$ .

### 2.2.5 *Taq* DNA 聚合酶

从图 6 可见, *Taq* DNA 聚合酶用量对红锥 RAPD 条带的数量和强弱均有较大的影响,在  $25\text{ }\mu\text{l}$  的体系中, *Taq* 酶浓度为  $0.2\text{--}0.6\text{ U}$  时,扩增的条带数少,带纹较浅, *Taq* 酶浓度为  $0.8\text{--}1.8\text{ U}$  时,扩增效果较好,带数较稳定,条带较清晰。从实际反应需要和成本考虑,本试验体系选择 *Taq* DNA 聚合酶用量为  $0.8\text{ U}$ 。

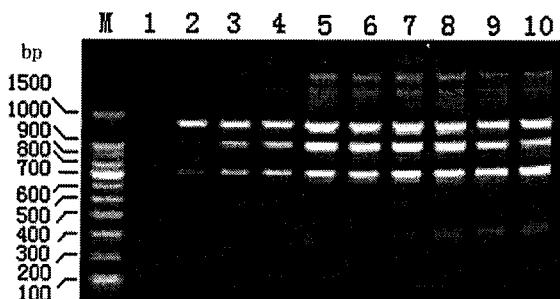


图 6 *Taq* DNA 聚合酶用量对扩增结果的影响

Fig. 6 Effect of *Taq* DNA polymerase concentration on RAPD results

M: 100 bp DNA Ladder; 1:  $0\text{ U}$ ; 2:  $0.2\text{ U}$ ; 3:  $0.4\text{ U}$ ; 4:  $0.6\text{ U}$ ; 5:  $0.8\text{ U}$ ; 6:  $1.0\text{ U}$ ; 7:  $1.2\text{ U}$ ; 8:  $1.4\text{ U}$ ; 9:  $1.6\text{ U}$ ; 10:  $1.8\text{ U}$ .

### 2.2.6 退火温度、循环次数

当退火温度过低时,非特异性条带扩增增多,而退火温度过高,特异性的扩增条带数明显减少。

RAPD 反应的退火温度一般在  $30\text{--}40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,要针对不同引物确定最佳的退火温度。图 7 所示,在较低的退火温度下(小于  $34\text{ }^{\circ}\text{C}$ ),PCR 会产生非特异扩增,退火温度为  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  时,部分条带被抑制,不能扩出,而退火温度为  $35\text{--}39\text{ }^{\circ}\text{C}$  时,扩增条带清晰、稳定。因此,选择  $39\text{ }^{\circ}\text{C}$  为红锥 RAPD 分析时的退火温度。

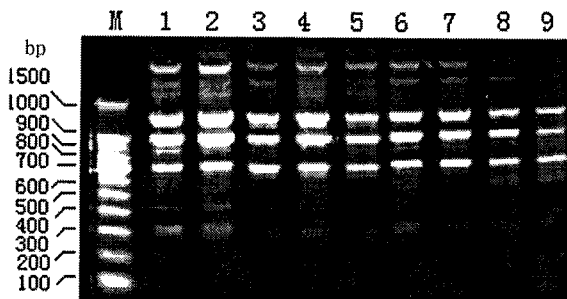


图 7 不同退火温度对扩增结果的影响

Fig. 7 RAPD results at different annealing temperatures

M: 100 bp DNA Ladder; 1:  $33\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; 2:  $34\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; 3:  $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; 4:  $36\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; 5:  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; 6:  $38\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; 7:  $39\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; 8:  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; 9:  $41\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

从图 8 可以看出,当循环次数分别为 30、35、40 次时, DNA 都能得到充分的扩增,带型清晰、稳定。在本体系中,选择 PCR 循环次数为 35 次。

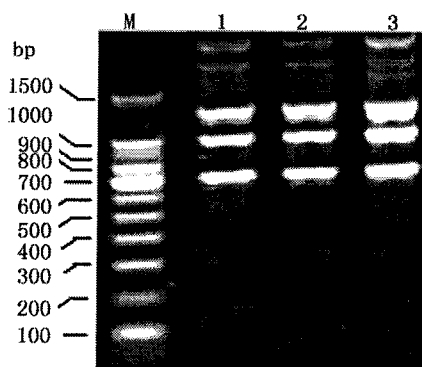


图 8 不同的循环次数对扩增结果的影响

Fig. 8 Effect of different PCR cycles on RAPD results

M: 100 bp DNA Ladder; 1: 30 cycles; 2: 35 cycles; 3: 40 cycles

### 2.3 红锥 DNA 的 RAPD 的扩增结果

采用优化后的 RAPD 扩增体系对不同产地的红锥无性系 DNA 进行扩增,图 9 的扩增结果表明,该体系在这 8 种材料中均能扩增出清晰的带型,扩增出的条带较亮,条带数量适宜,且主带清晰,其中 7 号为用于 RAPD 条件优化的实验样品。从条带数量,稳定性,清晰度的比较来看,我们这次 RAPD 的 PCR 实验体系较稳定,能用于红锥 RAPD 指纹图谱

分析。

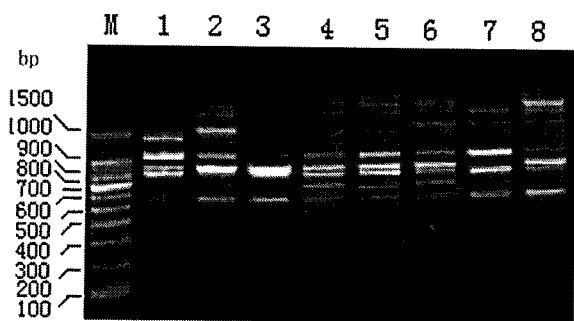


图 9 不同无性系红锥 DNA 的 RAPD 扩增结果

Fig. 9 The RAPD profiles of the genomic DNA from different clones of *C. hystrix*

M: 100 bp DNA Ladder; 1-8: 不同无性系 Different clonal trees.

### 3 结论和讨论

用改良的 CTAB 方法提取到了能用于 RAPD 分析的高质量红锥基因组 DNA, 并对影响 PCR 的各反应因子进行筛选, 获得了红锥 RAPD-PCR 较为理想的扩增体系, 即在 25  $\mu\text{l}$  反应体系中, 包含模板 DNA 0.8 ng  $\mu\text{l}^{-1}$ , 10 $\times$ Buffer 2.5  $\mu\text{l}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  2.0 mmol/L, *Taq* DNA 聚合酶 0.8 U, dNTPs 0.35 mmol/L, 随机引物 S42 0.28  $\mu\text{mol/L}$ 。其扩增程序为: 94 $^{\circ}\text{C}$  预变性 3 min, 然后 94 $^{\circ}\text{C}$  30 s, 39 $^{\circ}\text{C}$  1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$  2 min, 35 个循环, 最后 72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$  保存。本试验利用优化后的体系获得了红锥植物清晰的 RAPD 指纹图谱, 为红锥植物分子遗传多样性、种质资源鉴定、分类和良种选择等方面的研究奠定了基础。

为了提取高质量的 DNA, 以满足 RAPD 扩增的要求。在本次实验中, 我们采用了常规的 CTAB 法, 并稍加改进, 以新鲜萌发的红锥幼嫩叶片为材料, 在提取缓冲液中加入高盐 NaCl, 并将 CTAB 的浓度增加至 2%, 并加入体积分数为 2% 的  $\beta$ - 巯基乙醇和质量浓度为 5% 的水溶性 PVP, 以提高细胞的裂解程度, 减少多酚、糖和蛋白质等次生代谢物的干扰, 使 CTAB 充分与 DNA 结合, 从而达到高效纯化和分离目的<sup>[9]</sup>。这在红锥基因组 DNA 电泳结果和 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 的比值中都能较好的体现, 同时也说明改进的 CTAB 方法适合于红锥基因组 DNA 的高效提取, 这为进一步 RAPD 扩增提供了优良材料。

RAPD 标记的稳定性和可重复性, 一直是人们关注的问题, 这种随机扩增容易受到其反应体系中各成分的影响, 所以在进行 RAPD 分析之前, 一定

要对 RAPD 反应条件进行优化<sup>[10]</sup>。考虑到 RAPD-PCR 对各反应因子的敏感性, 及参考其它木本植物 RAPD-PCR 反应体系, 进行红锥 RAPD 优化设计, 将各反应因子浓度进行梯度设定。从实验结果来看, 红锥 RAPD-PCR 反应中各反应因子在一定浓度梯度范围内, PCR 扩增效果较好、条带清晰稳定、重复性较好, 这在利用优化后的 PCR 体系对红锥不同产地的无性系进行 PCR 扩增的结果中得到很好的证明。而从图 4 结果可以看出, 红锥 RAPD-PCR 的稳定性受 dNTPs 浓度影响较大, 在 0-0.5 mmol/L 浓度范围内, 只有浓度为 0.35 mmol/L 时的扩增效果较好, 扩增条带丰富、清晰、稳定, 这个浓度值与其它植物相比较<sup>[11-14]</sup>。Mg<sup>2+</sup> 作为 PCR 反应中的一个重要反应因子, 本实验中 Mg<sup>2+</sup> 在 1.2-2.0 mmol/L 相对较低的浓度范围内就能获得较好的 PCR 扩增结果, 这与孟现东<sup>[15]</sup>认为大部分木本植物的 PCR 扩增都需要较高的 Mg<sup>2+</sup> 浓度的结论稍有不同, 至于其它成分与一般的 RAPD-PCR 扩增方法中的相差不大。总之, 通过对实验条件 (如扩增程序和扩增体系) 进行严格的筛选, 获得了很好的重复性, 完全可用于后续红锥分子遗传多样性、种质资源鉴定、分类和良种选择等方面的研究。

### 参考文献

- [1] Huang Y Q(黄永权), Liang D C(梁东成), Zhang F Q(张方秋). On the breeding strategy of *Castanopsis hystrix* in Guangdong Province [J]. J Guangdong For Sci Techn(广东林业科技), 2004, 20(4):58-60.(in Chinese)
- [2] Qiu X J(丘小军), Zhu J Y(朱积余), Jiang Y(蒋贇), et al. Study on natural distribution and adaptability of *Castanopsis hystrix* [J]. J Guangxi Agri Biol Sci(广西农业生物科学), 2006, 25(2):175-179.(in Chinese)
- [3] Huang Q N(黄全能), Chen C J(陈存及). The community characteristics of natural forests of *Castanopsis hystrix* [J]. Subtrop Plant Res Commun(亚热带植物通讯), 1998, 27(2):7-11.(in Chinese)
- [4] Xiao F M(肖复明), Jiang X M(江香梅), Du T Z(杜天真). Application of RAPD molecular marker in tree genetics and breeding [J]. J Jiangxi Agri Univ(江西农业大学学报), 2003, 25(2):261-266.(in Chinese)
- [5] Williams J G, Kubelik A R. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic marker [J]. Nucl Acids Res, 1990, 18:6531-6535.
- [6] Chen K S(陈昆松), Li F(李方), Xu C J(徐昌杰), et al. An efficient macro-method of genomic DNA isolation from *Actinidia chinensis* leaves [J]. Heridity(遗传), 2004, 26(4):529-531.(in Chinese)

- [7] Zhang J J(张今今), Zhang Y(张莹), Li W Y(李文燕). Isolation genomic DNA and optimization of RAPD in *Ficus* [J]. J Northwest Agri For Univ(西北农林科技大学学报), 2006, 34(5):147-152.(in Chinese)
- [8] Yin T M(尹佟明), Han Z M(韩正敏), Huang M R(黄敏仁), et al. RAPD experiment protocol and optimization in forest trees [J]. J Nanjing For Univ(南京林业大学学报), 1999, 23(4):7-12.(in Chinese)
- [9] Huang J A(黄建安), Huang Y H(黄意欢), Luo J W(罗军武), et al. Efficient methods for genomic DNA extraction from tea plant [J]. J Hunan Agri Univ(湖南农业大学学报), 2003, 29(5):402-407.(in Chinese)
- [10] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程原理与技术[M]. 北京: 科学出版社, 1998:100-106.
- [11] Zhu X Z(朱秀志), Xiang C H(向成化), Peng Z S(彭正松), et al. Genomic DNA extraction and optimization of RAPD analytic conditions of *Michelia wilsonii* [J]. J Hebei Agri Univ(河北农业大学学报), 2006, 29(2):46-49.(in Chinese)
- [12] Hao R C(蒿若超), Qu C L(曲春礼), Zhang Y X(张月学), et al. Study on the methods of extraction and purification for Alfalfa DNA and the establishment and optimization for RAPD reaction system [J]. Heilongjiang Agri Sci(黑龙江农业科学), 2006(5):89-92.(in Chinese)
- [13] Wang L(王丽), Qiao A M(乔爱民), Sun Y M(孙一铭), et al. Extraction of genomic DNA from flowering Chinese cabbage and optimization of RAPD reaction system [J]. J Northwest China Norm Univ(西北师范大学学报), 2006, 31(2):124-128.(in Chinese)
- [14] Huang Y F(黄永芳), Yang M X(杨懋勋), Liu J(柳军), et al. DNA extraction and optimization of RAPD reaction system for *Lilium brownii* (Liliaceae) [J]. J Trop Subtrop Bot(热带亚热带植物学报), 2006, 14(3):251-255.(in Chinese)
- [15] Meng X D(孟现东), Chen Y T(陈益泰). The method for *Liquidambar formosana* DNA extracting and the optimization of PCR procedure [J]. For Res(林业科学研究), 2004, 17(1):42-46.(in Chinese)