

大花蕙兰基因组 DNA 提取及 RAPD 反应条件探索

李冬梅^{1,2}, 朱根发^{2*}, 叶庆生¹

(1. 华南师范大学生命科学学院, 广东省植物发育生物工程重点实验室, 广州 510631; 2. 广东省农业科学院花卉研究所, 广州 510640)

摘要: 用 SDS、CTAB 和改良 CTAB 法分别提取大花蕙兰叶片基因组 DNA, 发现以改良 CTAB 法提取的 DNA 纯度高, 产率也较高。以 5'-GGTGCTCCGT-3' (BA440) 为随机引物, 并以大花蕙兰品种 '金杯' (*Cymbidium hybridum* cv. Hiroshima Golden Cup "Sunny Moon") 的 DNA 为模板, 对 RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) 反应体系进行了优化研究, 结果表明, 25 μ l 反应体系中, Mg^{2+} 、Taq DNA 聚合酶、引物、模板 DNA 和 dNTP 5 种主要成分的适宜浓度或用量分别是: 2.0 mmol/L、1.0 U、0.20 μ mol/L、25 ng 和 0.20 mmol/L。扩增程序优化为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 0.5 min, 37 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 40 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。

关键词: 大花蕙兰; 基因组 DNA 提取; CTAB; RAPD

中图分类号: Q523

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2006)01-0025-06

Genomic DNA Extraction and RAPD Protocols for *Cymbidium hybridum*

LI Dong-mei^{1,2}, ZHU Gen-fa^{2*}, YE Qing-sheng¹

(1. College of Life Science, South Normal University, Guangdong Key Lab of Biotechnology for Plant Development, Guangzhou 510631, China; 2. Floricultural Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Science, Guangzhou 510640, China)

Abstract: SDS, CTAB and modified CTAB methods were used to extract DNA from the leaves of *Cymbidium hybridum* cv. Hiroshima Golden Cup "Sunny Moon" and cv. Fortissimo "Pianist". The results showed that modified CTAB method was best for DNA quality and production. The optimal reaction of RAPD in *C. hybridum* was studied with primer 5'-GGTGCTCCGT-3' for cv. Hiroshima Golden Cup "Sunny Moon". The optimum concentration of five important components such as Mg^{2+} , Taq DNA polymerase, primer, template DNA, and dNTP in 25 μ l RAPD reaction system were 2.0 mmol/L, 1.0 U, 0.20 μ mol/L, 25 ng, and 0.20 mmol/L, respectively. Modified thermal profile consisted of an initial denaturation step at 94 $^{\circ}$ C for 4 min, followed by 40 cycles of 94 $^{\circ}$ C for 30 s, 37 $^{\circ}$ C for 1 min and 72 $^{\circ}$ C for 1 min and a final exposure to 72 $^{\circ}$ C for 7 min.

Key words: *Cymbidium hybridum*; Genomic DNA extraction; CTAB; RAPD

随着 RAPD 技术的迅速发展^[1], 其在花卉的种质资源遗传多样性和育种研究中被广泛应用^[2-17]。大花蕙兰(*Cymbidium hybridum*)又称虎头兰、蝉兰, 为兰科 (Orchidaceae) 兰属多年生常绿草本植物。其品种众多, 花瓣大, 色彩艳丽且花色多, 花期较长, 可盆栽或用作鲜切花, 具有很高的观赏价值和经济

开发前景。目前我国的大花蕙兰品种主要靠进口, 而系统的育种研究刚开展不久, 因而大花蕙兰产业的发展较慢。大花蕙兰 RAPD 标记技术研究的开展, 将对我国大花蕙兰种质资源的保存与利用及其良种的选育与推广提供理论与技术支持, 对大花蕙兰产业的长期发展也有重要的作用。

收稿日期: 2005-08-08 接受日期: 2005-11-21

基金项目: 广东省科技攻关重大专项 (2003A201040); 广州市农业局招标项目 (GK0302105) 资助

* 通讯作者 Corresponding author

成功提取基因组 DNA 是 RAPD 扩增的关键, 据报道花卉植物 RAPD-PCR 常用的 DNA 提取方法有 CTAB 法、酚/氯仿法和 SDS 法等^[3, 8, 10, 14], 但有关兰属大花蕙兰的研究报道很少^[2, 5, 8, 12, 15]。本文探讨适宜的大花蕙兰基因组 DNA 提取方法和大花蕙兰 RAPD 优化体系, 为大花蕙兰种质资源评价及育种的研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料和试剂

材料 在广东省农业科学院花卉研究所兰圃中采集大花蕙兰‘金杯’(*Cymbidium hybridum* cv. Hiroshima Golden Cup “Sunny Moon”)和‘钢琴家’(cv. Fortissimo “Pianist”)的幼嫩叶片, 用塑料袋封装, 然后装入冰盒保鲜, 带回实验室后用灭菌双蒸水洗涤除去尘渣等杂物, 室温晾干后保存于 -80°C 冰箱备用。

试剂 Tris 碱、HCl (盐酸)、CTAB (十六烷基三甲基溴化胺)、EDTA (乙二胺四乙酸二钠)、NaCl (氯化钠)、Boric Acid (硼酸)、 β - 巯基乙醇、PVP (聚乙烯吡咯烷酮)、Tris 饱和酚、氯仿、异丙醇、无水乙醇、SDS (十二烷基硫酸钠)、NaAc (醋酸钠)、KAc (醋酸钾) 等试剂为国产分析纯; dNTPs、琼脂糖、 λ DNA/*EcoR* I + *Hind* III Marker、RNaseA 购自北京鼎国生物技术有限公司; *Taq* DNA 聚合酶、 $10\times$ Reaction Buffer 和 MgCl_2 购自 TaKaRa 生物公司; 引物购自上海博亚公司。

1.2 基因组 DNA 提取和检测

SDS 法 参照戴思兰等^[18]的方法。

CTAB 法 参照《精编分子生物学实验指南》^[19]的方法。

改良 CTAB 法 从 -80°C 冰箱中取出冰冻的 0.5 g 叶片加液氮研磨成粉末, 迅速转入 10 ml 离心管, 加入 3 ml 65°C 预热的 CTAB 提取缓冲液 (100 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0; 1.4 mol/L NaCl; 20 mmol/L EDTA, pH 8.0; 2% CTAB; 2% β - 巯基乙醇, 现用现加) 和 0.1 g PVP, 充分混匀后, 65°C 水浴保温 30 min。冷却至室温, 加入 1/8 体积的 Tris 饱和酚, 65°C 水浴 15 min, 4°C $14\ 500\times g$ 离心 15 min, 取上清液加入等体积的氯仿, 缓慢颠倒混匀, 65°C 水浴 15 min 后在 4°C 下 $14\ 500\times g$ 离心 15 min。取

上清液加入 0.7 倍体积的 -20°C 预冷的异丙醇, 混匀后, 于 -20°C 静置 30 min 以上。取出于 4°C $12\ 000\times g$ 离心 10 min, 所得沉淀用 70% 乙醇和无水乙醇各洗两次, 转移至 1.5 ml 离心管, 室温风干。风干后溶于 600 μl 高盐 TE 溶液 (10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0; 1.0 mol/L NaCl; 0.1 mmol/L EDTA, pH 8.0), 用等体积的酚/氯仿、氯仿各抽提 1 次, 离心, 取上清液, 加入 1/10 体积的 3 mol/L NaAc (pH 5.2) 混匀, 再加入 0.7 倍体积的 -20°C 异丙醇沉淀 1 h 以上, 离心, 弃上清液, 收集沉淀。所得沉淀用 70% 乙醇和无水乙醇各洗两次, 自然风干后溶于 100 μl TE 缓冲液 (10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0; 1 mmol/L EDTA, pH 8.0) 中, 充分溶解后, 加入 1 μl RNaseA, 37°C 水浴 1 h。分装成小体积, 4°C 或 -20°C 保存备用。

DNA 检测 在核酸蛋白测定仪 (Eppendorf Biophotometer) 上测定 A_{260} 、 A_{280} 、 A_{260}/A_{280} 和 DNA 溶液的浓度 (每个样品取 3 次的平均值)。然后取 DNA 样品液在 0.8% 琼脂糖凝胶 (含 $0.5\ \mu\text{g}\ \text{ml}^{-1}$ 溴化乙锭) 上用 $0.5\times$ TBE 缓冲液 (45 mmol/L Tris; 45 mmol/L Boric Acid; 1 mmol/L EDTA, pH 8.0) 以 $5\ \text{V}\ \text{cm}^{-1}$ 的恒压电泳 30 min, 在 SYNGENE 凝胶成像系统中拍照并记录。

1.3 RAPD 反应体系的初步优化

RAPD 主要成分用量的优化 参照文献 [20] 的方法, RAPD-PCR 反应体系的 5 种主要成分 Mg^{2+} 、*Taq* DNA 聚合酶、引物、模板 DNA 和 dNTP 的用量设置 7 个浓度梯度 (见表 1)。以 BA440 为随机引物 (5'-GGTGCTCCGT-3'), 以大花蕙兰‘金杯’基因组 DNA 为模板进行 RAPD 反应体系的单因素优化实验。当进行某一因素水平实验时, 其他因素均固定在第 3 个浓度梯度。所有反应体系均为 25 μl , 均加 $1\times$ Reaction Buffer。DNA 扩增在 PTC-100 型热循环仪 (MJ Research 公司生产) 上进行, 基本扩增程序为: 94°C 预变性 4 min; 94°C 变性 1 min, 35°C 退火 1 min, 72°C 延伸 2 min, 40 个循环; 最后 72°C 延伸 7 min。取 20 μl PCR 产物和 4 μl $6\times$ 溴酚蓝, 在 1.5% 琼脂糖凝胶 (含 $0.5\ \mu\text{g}\ \text{ml}^{-1}$ 溴化乙锭) 上电泳 ($0.5\times$ TBE、 $5\ \text{V}\ \text{cm}^{-1}$) 1.5 h, SYNGENE 凝胶成像系统拍照记录。

扩增程序的优化 筛选出各因素的最佳水平组合后, 在基本扩增程序的基础上, 主要针对主

表 1 RAPD 反应体系中 5 种成分用量

Table 1 Different amount of five important components used in RAPD reaction

浓度梯度 Concentration gradient	MgCl ₂ (mmol/L)	Taq DNA polymerase (U)	Primer (μ mol/L)	Template DNA (ng)	dNTP (mmol/L)
1	1.0	0.50	0.10	10	0.10
2	1.5	1.00	0.15	15	0.15
3	2.0	1.50	0.20	20	0.20
4	2.5	1.75	0.25	25	0.25
5	3.0	2.00	0.30	30	0.30
6	3.5	2.50	0.35	40	0.35
7	4.0	3.00	0.40	50	0.40

循环的变性时间、复性温度、延伸时间设置 6 种程序(表 2),其它扩增程序参数不变。

表 2 6 种不同的扩增程序

Table 2 Six different thermal programmes used in amplification

编号 No.	变性时间 Denaturation time (min)	复性温度(°C) Renaturation temperature	延伸时间 Extension time (min)
1	1.0	35	2
2	1.0	35	1
3	0.5	35	1
4	1.0	37	2
5	1.0	37	1
6	0.5	37	1

1.4 优化的 RAPD 体系的初步应用

利用优化的 RAPD 体系,分别以大花蕙兰‘金杯’和‘钢琴家’的基因组 DNA 为模板,对 100 个 10 碱基随机引物进行筛选。重复三次。

2 结果和分析

2.1 基因组 DNA 提取

用 3 种方法提取了大花蕙兰的基因组 DNA,从

图 1 和表 3 可以看出,3 种方法均能提取基因组 DNA,但用 SDS 法提取的 DNA,在电泳检测时胶状物富集点样孔附近,形成亮带,OD_{260/280} 高于 2.10; CTAB 法提取的 DNA 呈棕褐色或粘稠状,OD_{260/280} 低于 1.70; 改良 CTAB 法提取的 DNA 的 OD_{260/280} 在 1.80-1.90 之间,电泳点样孔附近无杂质污染,条带清晰。利用改良 CTAB 法,从 0.5 g ‘金杯’、‘钢琴

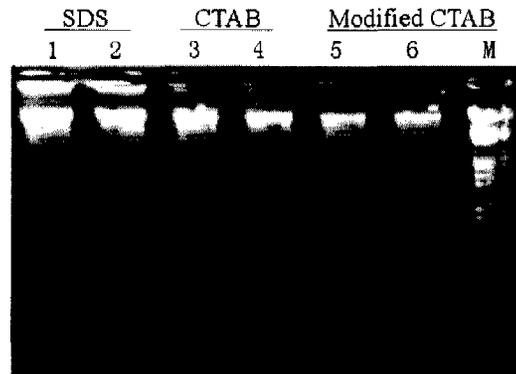


图 1 大花蕙兰的基因组 DNA 不同提取方法的电泳图谱

Fig.1 Electrophoretogram of genomic DNA from leaves of *Cymbidium hybridum*

1, 3, 5 为 ‘金杯’ cv. Hiroshima Golden Cup “Sunny Moon”;
2, 4, 6 为 ‘钢琴家’ cv. Fortissimo “Pianist”;
M=λDNA/EcoR I +Hind III Marker.

表 3 3 种方法提取的大花蕙兰叶片基因组 DNA 检测

Table 3 Results of DNA extraction from the leaves of *Cymbidium hybridum* cultivars by various methods

	SDS		CTAB		改良CTAB Modified CTAB	
	金杯 Golden Cup	钢琴家 Pianist	金杯 Golden Cup	钢琴家 Pianist	金杯 Golden Cup	钢琴家 Pianist
OD ₂₆₀	0.238	0.294	0.327	0.272	0.443	0.264
OD ₂₈₀	0.106	0.133	0.197	0.171	0.239	0.146
OD _{260/280}	2.12	2.22	1.66	1.59	1.85	1.81
浓度 Concentration (ng μl ⁻¹)	1635	1524	1189	1470	1103	1322

家' 叶片中提取的 DNA 量分别为 110.3 μg 和 132.2 μg , 按每次 PCR 的 DNA 用量为 25 ng 计算, 可以分别满足 4 412 和 5 288 次 PCR 反应所需。其它两种方法虽数量上能满足, 但在质量上达不到要求。而改良 CTAB 法提取的基因组 DNA, 在质量和数量上均能满足大量 PCR 扩增的需要, 故可作为优选的方法。

2.2 RAPD 体系的优化

2.2.1 RAPD 反应体系主要成分的优化

从图 2A 可看出, Mg^{2+} 浓度在 1.0 mmol/L 时扩

增产物很少, 在 1.5–2.5 mmol/L 之间时扩增产物条带亮且清晰, 在 3.0–4.0 mmol/L 之间扩增产物条带多但较模糊, 故 Mg^{2+} 浓度以 2.0 mmol/L 左右为宜。*Taq* DNA 聚合酶(图 2B)对 RAPD 体系有较大的影响, 25 μl 反应体系中酶用量越多, 扩增产物条带越亮, *Taq* DNA 聚合酶在 0.5 U 到 1.5 U 之间时扩增产物条带清晰, 从经济角度和实验效果综合考虑, *Taq* DNA 聚合酶用量以 1.0 U 为宜。引物的用量(图 2C)对 RAPD 反应也有一定的影响, 在 0.20 $\mu\text{mol/L}$ 时, 扩增的条带最清晰。在实验设置的用量范围内, 模板 DNA 的用量(图 2D)和 dNTP 的

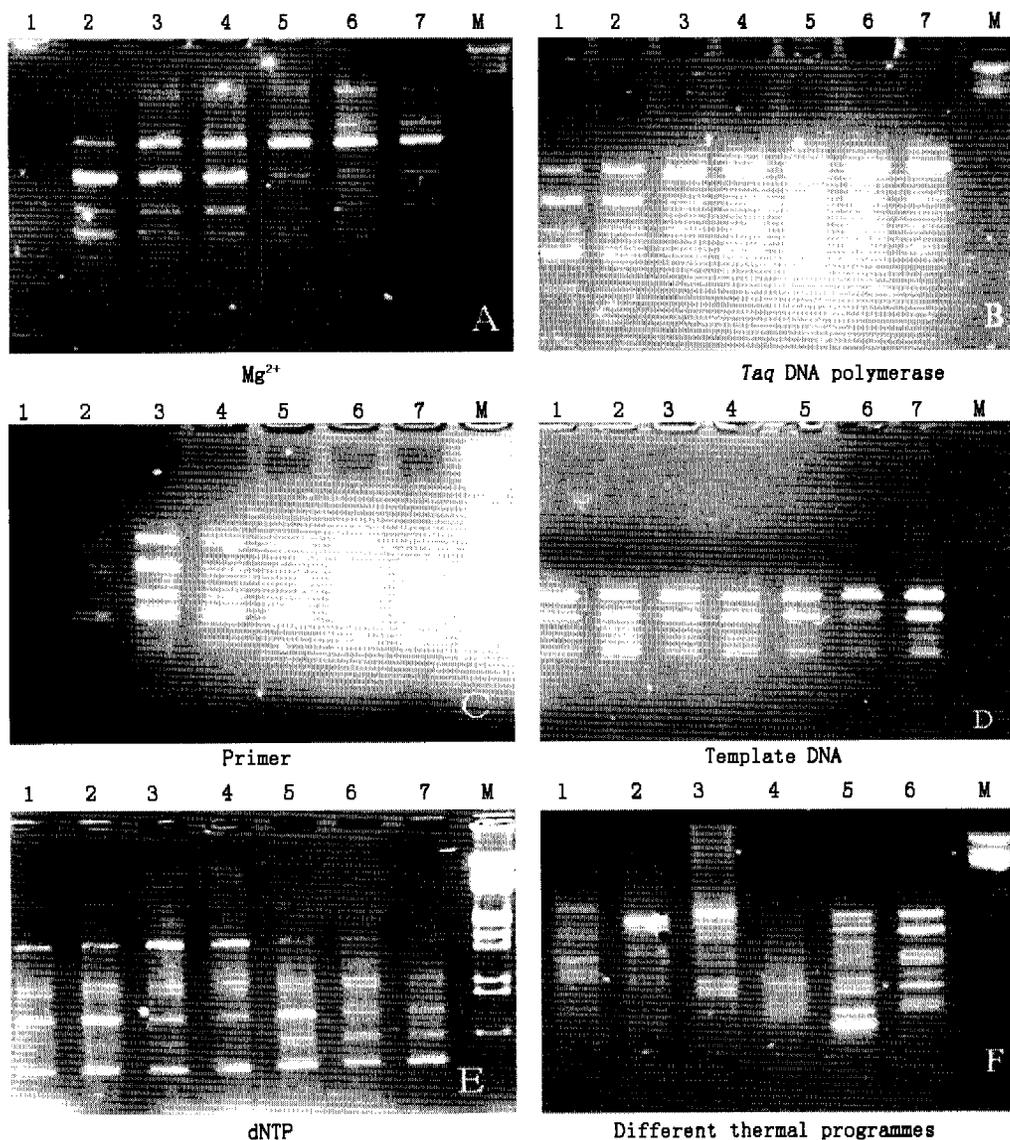


图 2 5 种主要成分和 6 种扩增程序对 RAPD 体系的影响

Fig. 2 Effects of five components and six thermal programmes on RAPD reaction

A、B、C、D、E 中的 1–7 见表 1; F 中的 1–6 见表 2。1–7 在 A、B、C、D 和 E 代表浓度梯度 as indicated in Table 1; 1–6 在 F 是相同的 as that in Table 2。M=λDNA/*Eco*R I + *Hind* III Marker

用量(图 2E)对 RAPD 体系影响不大,10 到 50 ng 的模板 DNA 用量、0.10–0.40 mmol/L dNTP 均可扩增出稳定的条带,从扩增效果和经济角度综合考虑,选用的模板 DNA 用量为 25 ng、dNTP 浓度为 0.20 mmol/L。因此,优化的 RAPD 反应体系为:在 25 μ l 反应体系中, Mg^{2+} 、*Taq* DNA 聚合酶、引物、模板 DNA 和 dNTP 5 种主要成分的适宜浓度或用量分别是:2.0 mmol/L、1.0 U、0.20 μ mol/L、25 ng 和 0.20 mmol/L。

2.2.2 RAPD 扩增程序的优化

在优化的反应体系基础上,用 6 种程序(表 2)进行扩增,以程序 5 和 6 的效果最好,扩增的条带多且清晰,但程序 6 比 5 的特异性有所提高;程序 3 次之,扩增条带较多但模糊;程序 1 和 2 扩增的条带都很模糊;程序 4 最差,扩增效率较低,条带少且弱(图 2F)。可能是程序 5 与 6 扩增时间较短,对酶活性的保持相对会好些。由于程序 6 比 5 的特异性好,故确定程序 6 为优化的程序。

2.3 优化的 RAPD 体系的初步应用

利用筛选出多态性和重现性最好的 8 个随机引物(表 4)分别对‘金杯’和‘钢琴家’的基因组 DNA 进行 PCR 扩增。结果表明(图 3),多数条带清晰,扩增背景较干净,扩增片段的大小范围也较大,因此,进一步证实该 RAPD 反应体系和扩增程序适宜进行大花蕙兰的 RAPD 分析。

表 4 8 个随机引物的序列

Table 4 Sequences of selected arbitrary primers

引物编号 Code of primers	序列 Sequence 5'→3'
BA66	GAACGGACTC
BA67	GTCCCGACGA
BA187	TCCGATGCTG
BA198	CTGGCGAACT
BA199	GAGTCAGCAG
BA425	ACTGAACGCC
BA439	GTCCGTA CTG
BA440	GGTGCTCCGT

3 讨论

3.1 基因组 DNA 的提取

研究表明^[18,21],不同的取材时间、取材部位所获得的基因组 DNA 对 RAPD 有很大的影响。由于大花蕙兰叶片肉质,叶片越老,含有的多糖、多酚物质就越多,所以,采集幼嫩叶片是提取大花蕙兰基因组 DNA 的前提。DNA 的提取是 RAPD 扩增成功的基础,不同植物的基因组必须采取与之相适宜的提取方法,本试验采用改良 CTAB 法,在提取液中加入 β -巯基乙醇和 PVP 两种抗氧化剂,可防止 DNA 的褐化,这与戴思兰^[20]的研究结果一致;针对 SDS 和 CTAB 法提取的 DNA 中蛋白、多糖和多酚含量高的问题,我们采用的改良 CTAB 法用高盐 TE 溶液

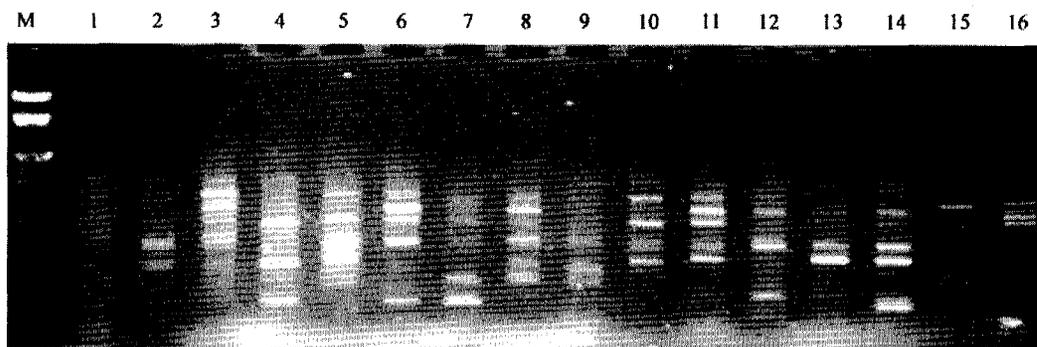


图 3 不同引物对‘金杯’和‘钢琴家’基因组 DNA 的 RAPD 扩增图谱

Fig. 3 RAPD patterns of cv. Hiroshima Golden Cup “Sunny Moon” and cv. Fortissimo “Pianist”

1–8 为‘金杯’模板 DNA; 9–16 为‘钢琴家’模板 DNA. 1–8: Genomic DNA of cv. Hiroshima Golden Cup “Sunny Moon”; 9–16: Genomic DNA of cv. Fortissimo “Pianist”. 1 与 9、2 与 10、3 与 11、4 与 12、5 与 13、6 与 14、7 与 15、8 与 16 所用引物分别为 BA66, BA67, BA187, BA198, BA199, BA425, BA439 和 BA440. M: λ DNA/*EcoR* I + *Hind* III Marker. The primers of 1 and 9, 2 and 10, 3 and 11, 4 and 12, 5 and 13, 6 and 14, 7 and 15, 8 and 16 were BA66, BA67, BA187, BA198, BA199, BA425, BA439 and BA440, respectively.

(10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0; 1.0 mol/L NaCl; 0.1 mmol/L EDTA, pH 8.0) 溶解粗 DNA 样品液后, 再用酚/氯仿、氯仿抽提, 可有效除去蛋白、多糖和酚类等物质, 获得的 DNA 的质量和纯度都较好。

3.2 RAPD 体系的优化

RAPD 反应条件严格, Mg^{2+} 、*Taq* DNA 聚合酶、引物、模板 DNA 和 dNTP 及反应缓冲液等因素均能影响扩增结果, 已有的 RAPD 反应体系不能适合所有的物种。虽然 RAPD 反应涉及诸多因子, 但通过严格控制反应条件, 保证所有反应都在同一反应体系下完成, 如使用同一厂家相同批号的 *Taq* DNA 聚合酶, 采用相同的扩增程序, 就能获得重复性好、稳定可靠的结果^[20, 22]。本试验为了使 RAPD 体系具有较高的稳定性, 对影响 RAPD 的主要因素进行了试验, 结果得到与之相吻合的结论。而且 RAPD 操作流程快速、简便, 不需要同位素等优点, 根据实验需要也可以转化为可靠的 SCAR 标记, 故我们认为 RAPD 可作为大花蕙兰分子生物学研究的重要标记方法。

参考文献

- [1] Williams J K, Kubelik A R, Livak K L, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers [J]. Nucl Acids Res, 1990, 18(22):6531-6535.
- [2] Liang H J(梁红健), Liu M(刘敏), Zhong Z Y(钟志宇), et al. Identification and classification of Chinese *Cymbidium* with RAPD [J]. Acta Hort Sin(园艺学报), 1996, 23(4):365-370.(in Chinese)
- [3] Dubouzet J G, Murata N, Shinoda K. RAPD analysis of genetic relationships among *Alstroemeria* L. cultivars [J]. Sci Hort, 1997, 68:181-189.
- [4] Dubouzet J G, Murata N, Shinoda K. Relationships among some cultivated species and varieties of *Alstroemeria* L. based on RAPD analysis [J]. Sci Hort, 1998, 73:37-44.
- [5] Obara-Okeyo P, Kako S. Genetic diversity and identification of *Cymbidium* cultivars as measured by random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers [J]. Euphytica, 1998, 99:95-101.
- [6] Zhang C Y(张春英), Lin T X(林同香), Dai S L(戴思兰), et al. RAPD analysis on the genetic relationship of Peach-Blossom germplasm resources [J]. J Beijing For Univ(北京林业大学学报), 1999, 21(5):26-31.(in Chinese)
- [7] Chen X M(陈向明), Zheng G S(郑国生), Zhang S W(张圣旺). RAPD analysis of tree peony cultivars [J]. Acta Hort Sin(园艺学报), 2001, 28(4):370-372.(in Chinese)
- [8] Wen L(文李), Ye Q S(叶庆生), Wang X J(王小菁), et al. Analysis of relationship among *Cymbidium* cultivars using RAPD [J]. Chin J Appl Environ Biol(应用与环境生物学报), 2001, 7(1):29-32.(in Chinese)
- [9] Chen X M(陈向明), Zheng G S(郑国生), Meng L(孟丽). The RAPD analysis of the *Rosa* genus plant of *R. rugosa*, *R. chinensis* and *R. dawurica* [J]. Acta Hort Sin(园艺学报), 2002, 29(1):78-80.(in Chinese)
- [10] Chen L J(陈林姣), Miu Y(缪颖), Chen D H(陈德海), et al. Analysis of germplasm resources of *Narcissus tazetta* L. var. *chinensis* by RAPD [J]. J Xiamen Univ (Nat Sci) (厦门大学学报自然科学版), 2002, 41(6):810-814.(in Chinese)
- [11] Zhang L(张露), Cai Y M(蔡友铭), Zhuge Q(诸葛强), et al. Analysis of inter-species relationships on *Lycoris* (Amaryllidaceae) by use of RAPD [J]. Acta Genet Sin(遗传学报), 2002, 29(10):915-921.(in Chinese)
- [12] Ming F(明凤), Dong Y G(董玉光), Lou Y X(娄玉霞), et al. RAPD analysis on genetic diversities of *Phalaenopsis* varieties with different flower colors [J]. Acta Agri Shanghai(上海农业学报), 2003, 19(2):44-47.(in Chinese)
- [13] Wu W(武雯), Cai Y M(蔡友铭), Zou H Y(邹惠渝), et al. Genetic diversity of *Dianthus chinensis* L. and *D. caryophyllus* L. with RAPD [J]. J Nanjing For Univ (Nat Sci)(南京林业大学学报自然科学版), 2003, (4):72-74.(in Chinese)
- [14] Zhang J W(张俊卫), Chai Y R(柴玉荣), Bao M Z(包满珠). RAPD identification and discrimination of 42 ornamental pink double form cultivars of *Prunus mume* Sieb. et Zucc. [J]. Acta Hort Sin(园艺学报), 2004, 31(4):487-490.(in Chinese)
- [15] Sun C Y(孙彩云), Zhang M Y(张明永), Ye X L(叶秀麟), et al. The relationship of *Paphiopedilum* species in China by RAPD and isozyme [J]. Acta Hort Sin(园艺学报), 2005, 32(2):268-272.(in Chinese)
- [16] Huang G T(黄国涛), Ouyang D M(欧阳底梅), Xiang Q B(向其柏), et al. RAPD analysis of germplasm resources on *Canna* [J]. Acta Hort Sin(园艺学报), 2005, 32(2):273-277.(in Chinese)
- [17] Zhao Q F(赵庆芳), Ma S R(马世荣), Zeng X Y(曾小英), et al. RAPD analysis of *Lilium* cultivar resources [J]. J Lanzhou Univ (Nat Sci)(兰州大学学报自然科学版), 2005, 41(2):30-33.(in Chinese)
- [18] Dai S L(戴思兰), Chen J Y(陈俊愉), Gao R F(高荣孚), et al. DNA isolation procedure for RAPD amplification reaction of nine *Dendranthema* species [J]. Acta Hort Sin(园艺学报), 1996, 23(2):169-174.(in Chinese)
- [19] Osber F, Kingston R E, Moore D D, et al. Short Protocols in Molecular Biology [M]. Beijing: Science Press, 1998. 37-38.(in Chinese)
- [20] 邹喻萍, 葛颂, 王晓东. 系统与进化植物学中的分子标记 [M]. 北京: 科学出版社, 2001. 30-50.
- [21] Wen X P(文晓鹏), Deng X X(邓秀新). The extraction of genomic DNA from five species of *Rosa* [J]. Seed(种子), 2002, (6):18-21.(in Chinese)
- [22] Wang X Q(汪小全), Zou Y P(邹喻萍), Zhang D M(张大明), et al. Problems in the use of RAPD to the study of genetic diversity and systematics [J]. Acta Bot Sin(植物学报), 1996, 38(12):954-962 (in Chinese)