

曼地亚红豆杉 RAPD 反应体系与程序的优化

黄夕洋, 蒋水元, 李虹, 李锋

(广西壮族自治区广西植物研究所, 广西桂林 541006)
中国科学院

摘要: 以曼地亚红豆杉为研究对象, 采用 L16(4⁵) 正交组合实验和单因素梯度实验对 MgCl₂、dNTP、随机引物、Taq 酶、模板 DNA 浓度和退火温度、循环次数等影响 RAPD 扩增的重要因素进行优化, 以期建立最优的 RAPD 反应体系与程序。实验结果表明, 各因素最适条件为: 25 μL PCR 反应体系中 10× Buffer 2.5 μL, MgCl₂ 1.5 mmol/L, dNTP 0.2 mmol/L, 随机引物 0.6 μmol/L, Taq 酶 1.0 U, 模板 DNA 80 ng; 退火温度为 37 °C, 循环次数为 45 次。

关键词: 曼地亚红豆杉; RAPD 优化; 反应体系和程序; 正交组合; 单因素

中图分类号: Q943 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2008)04-0451-04

Optimization of the RAPD reaction system and procedure of *Taxus media*

HUANG Xi-Yang, JIANG Shui-Yuan, LI Hong, LI Feng

(Guangxi Institute of Botany, Guangxi Zhuang Autonomous Region and the Chinese Academy of Sciences, Guilin 541006, China)

Abstract: Regarded *Taxus media* as the research object, several important factors included MgCl₂, dNTP, random primer, Taq polymerase, template DNA and annealing temperature, amplification were optimized by L16(4⁵) orthogonal design experiment and single factor experiment in order to establish optimal RAPD system and procedure. The results showed that a total volume of 25 μL PCR reaction system conditioned 10× Buffer 2.5 μL, MgCl₂ 1.5 mmol/L, dNTP 0.2 mmol/L, random primer 0.6 μmol/L, Taq polymerase 1.0 U, template DNA 80ng, and annealing temperature was 37 °C, amplification for 45 cycles.

Key words: *Taxus media*; RAPD optimization; reaction system and procedure; orthogonal design; single factor

随着分子生物学技术的迅速发展, 特别是其在药用植物研究中发挥的重要作用, 为实现中药现代化提供了很好的基础。目前, 现代分子生物学技术在药用植物上应用主要是分子标记技术和生物技术二大技术(傅荣昭等, 1998)。随机扩增多态性 DNA 分子标记(Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD)由于其操作简便快速、省时省力、DNA 用量少, 已在药用植物研究中得到了广泛的应用。由于 RAPD 分子标记一般表现为显性遗传, 其 PCR 易受到实验条件的影响, 对反应条件要求严格。并且 RAPD 的稳定性与重复性较差, 不太令人满意, 反应

中的诸多因素都对扩增结果有一定的影响, 因此优化并统一反应体系是 RAPD 成功的基础(普晓兰等, 2003; 盛丽等, 2005), 可获得理想的 RAPD 图谱。目前, 关于专门对影响 RAPD 反应结果的因素进行优化的研究已有了报道(王金刚等, 2002; 徐莉等, 2005; 张辉等, 2005; 沈一岚等, 2006)。

曼地亚红豆杉(*Taxus media*)是从北美加拿大引种的一种杂交红豆杉, 多为常绿灌木, 从其枝、叶、茎、根中提取的具有较高抗癌活性的紫杉醇, 是新型的天然植物抗癌药物, 正由于红豆杉属药用价值很高, 已日益受到世人瞩目, 开发和利用其资源已成为

收稿日期: 2007-11-19 修回日期: 2008-02-27

基金项目: 广西科技攻关项目(0537017-11)[Supported by Key Technologies Research and Development Program of Guangxi(0537017-11)]

作者简介: 黄夕洋(1981-), 女, 广西南宁人, 硕士, 研究实习员, 主要从事分子生物学与保护生物学等研究。

当今研究的热点(毛锁云等,2002)。RAPD 标记关于曼地亚红豆杉方面的研究较少,而对于红豆杉科中其它物种的研究则较多(陈毓亨等,1999;王艇等,2000;张宏意等,2003;王贵荣等,2005;Karin Hilfiker 等,2004;Li 等,2006),因此本研究首先对其反应条件进行筛选,应用正交组合实验,并结合单因素梯度筛选实验,对影响 RAPD 结果的 Mg^{2+} 、dNTP、随机引物、Taq DNA 聚合酶、模板 DNA 的浓度和退火温度、循环次数等因素进行优化,旨在建立一套适用于曼地亚红豆杉稳定的 RAPD 反应技术体系。为今后运用 RAPD 分子标记技术对曼地亚红豆杉种内以及品种间进行遗传多样性等分析研究,并提高实验的准确性奠定理论与实践基础。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

曼地亚红豆杉新鲜枝条叶片采自位于广西桂林资源县越城岭林场的广西植物研究所与晖昂生化药业有限责任公司共建的曼地亚红豆杉种植基地。带回实验室后,用清水洗涤除去灰尘等杂物,室温晾干后保存于 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。

1.2 试剂药品

dNTP 和随机引物购于上海生工生物工程技术服务有限公司;Taq DNA 聚合酶购于上海中科开瑞生物芯片科技股份有限公司;Lambda DNA/Hind III + EcoR I Markers 购于华美生物工程公司。

1.3 实验方法

1.3.1 正交组合优化 RAPD 反应体系 采用 CTAB 法提取植物 DNA,经初步实验筛选后选择 S92(5' CAGCTCACGA3') 为优化实验用的随机引物。RAPD 反应采用 $25\text{ }\mu\text{L}$ PCR 反应体系,设计 Mg^{2+} 、dNTP、随机引物、Taq 酶和模板 DNA 五因素四梯度水平(表 1),查正交表 $L_{16}(4^5)$ (杜荣寿,1999)进行正交组合设计(表 2)。

在 Biometra UNO II PCR 仪上进行扩增,基本反应程序为: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 3 min; $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1 min, $36\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1 min, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 2 min,40 个循环;最后 $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳后在生物电泳图像分析系统(复日科技 FR-200)上观察并照相。

1.3.2 单因素优化反应程序 进一步对 RAPD 反应程序中的退火温度和循环次数进行单因素梯度优化筛选,并比较两者对扩增条带数和清晰度的影响。

退火温度、循环次数分别设计 4 个梯度, $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $36\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $38\text{ }^{\circ}\text{C}$ 和 35 次、38 次、40 次、45 次。

表 1 反应体系正交组合各因素水平表

Table 1 Orthogonal design factorial levels of RAPD reaction system

| 因素 Factor | $MgCl_2$ 浓度 (mmol/L) | dNTP 浓度 (mmol/L) | 引物 浓度 ($\mu\text{mol/L}$) | Taq 酶 单位 (U) | DNA 浓度 (ng) |
|-------------------|----------------------------|------------------------|-----------------------------------|--------------------|-------------------|
| 梯度水平 | 1.0 | 0.10 | 0.1 | 1.0 | 50 |
| Gradient level | 1.5 | 0.15 | 0.2 | 1.5 | 80 |
| | 2.0 | 0.20 | 0.4 | 1.75 | 100 |
| | 2.5 | 0.25 | 0.6 | 2.0 | 200 |

表 2 反应体系正交组合设计实验方案

Table 2 Experiment scheme of orthogonal design of RAPD reaction system

| 实验号 No. | $MgCl_2$ (mmol/L) | dNTP (mmol/L) | 引物 ($\mu\text{mol/L}$) | Taq 酶 (U) | DNA (ng) |
|------------|----------------------|------------------|-----------------------------|--------------|-------------|
| 1 | 1.0 | 0.10 | 0.1 | 1.0 | 50 |
| 2 | 1.0 | 0.15 | 0.2 | 1.5 | 80 |
| 3 | 1.0 | 0.20 | 0.4 | 1.75 | 100 |
| 4 | 1.0 | 0.25 | 0.6 | 2.0 | 200 |
| 5 | 1.5 | 0.10 | 0.2 | 1.75 | 200 |
| 6 | 1.5 | 0.15 | 0.1 | 2.0 | 100 |
| 7 | 1.5 | 0.20 | 0.6 | 1.0 | 80 |
| 8 | 1.5 | 0.25 | 0.4 | 1.5 | 50 |
| 9 | 2.0 | 0.10 | 0.4 | 2.0 | 80 |
| 10 | 2.0 | 0.15 | 0.6 | 1.75 | 50 |
| 11 | 2.0 | 0.20 | 0.1 | 1.5 | 200 |
| 12 | 2.0 | 0.25 | 0.2 | 1.0 | 100 |
| 13 | 2.5 | 0.10 | 0.6 | 1.0 | 100 |
| 14 | 2.5 | 0.15 | 0.4 | 1.5 | 200 |
| 15 | 2.5 | 0.20 | 0.2 | 2.0 | 50 |
| 16 | 2.5 | 0.25 | 0.1 | 1.75 | 80 |

1.3.3 最优反应体系与程序的稳定性检测 根据反应体系与反应程序的优化结果,更换随机引物进行 PCR 反应,实验重复 3 次,从扩增条带的清晰度、重复性来检测 RAPD 的稳定性。

2 结果分析

2.1 正交组合对 RAPD 反应体系的影响

RAPD 反应扩增所得到的结果之中,每一因素的改变均对扩增条带有影响,并且各因素之间存在一个动态的适合浓度比例,可以说 RAPD 标记得到的结果是各因素相互之间优化的综合。

根据正交组合设计的实验方案,一共有 16 个组合实验,不同组合的 PCR 扩增结果存在一定的差异,结果依次如图 1 中 1~16 泳道所示。这 16 个正

交组合中,按照 $MgCl_2$ 的浓度可以分为四个组,其中第二组(组合 5~8)是扩增效果较好较稳定的一组,相对应的 $MgCl_2$ 浓度为 1.5 mmol/L。组合 3、4、9 扩增条带最少或无;组合 2、5、11、15、16 都未完全扩增出所有条带,条带数不多,其中组合 2、5、15 所扩增的谱带有模糊拖尾现象;组合 10、13、14 扩增条带多,但条带亮度过大而使条带挤在一起,不利于条带的确认、数带与分析,而且也存在拖尾现象;组合 1、6、12 扩增条带虽多但扩增效果不如组合 7、8,谱带相对较弱,稳定性较差;组合 7、8 表现为扩增带多而亮、清晰、明显,实验效果是最好的,考虑到稳定性和经济效益,组合 7 则是最优组合。因此,正交组合实验表明,曼地亚红豆杉 RAPD 最优反应体系是:25 μ LPCR 反应体系中 10 \times Buffer 2.5 μ L, $MgCl_2$ 1.5 mmol/L, dNTP 0.2 mmol/L, 随机引物 0.6 μ mol/L, Taq 酶 1.0 U, 模板 DNA 80 ng。

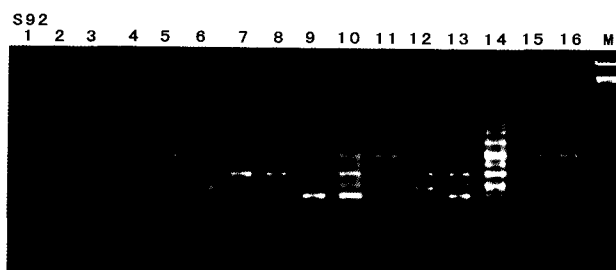


图 1 随机引物 S92 的正交组合设计优化 RAPD 结果

Fig. 1 The RAPD results of experiment scheme of orthogonal design by random primer S92

M: Lambda DNA/Hind III + EcoR I Markers. 下同。

2.2 退火温度和循环次数单因素优化对 RAPD 反应程序的影响

退火温度、循环次数是影响 RAPD 反应最重要的因素之一,具有相对的灵活性,因此筛选两者最适的条件是进一步优化 RAPD 反应的重要控制措施(盛丽等,2005)。退火温度降低会增加扩增条带数而降低特异性,温度升高会减少扩增条带而增加特异性,温度过高则会抑制扩增;循环次数则影响扩增产量,循环次数增加,扩增产物量增加,扩增条带的亮度也增加(侯大斌,2006)。

图 2、3 中 1~4 泳道依次分别代表优化 RAPD 反应程序实验中设计的退火温度:35 $^{\circ}C$ 、36 $^{\circ}C$ 、37 $^{\circ}C$ 、38 $^{\circ}C$,以及循环次数:35 次、38 次、40 次、45 次。从实验结果可知:35~38 $^{\circ}C$ 均可扩增出条带,但随着退火温度的升高,38 $^{\circ}C$ 时扩增特异性增强,扩增

条带减弱,不能很好地表达其引物的多态性;35 $^{\circ}C$ 扩增不如 36 $^{\circ}C$ 、37 $^{\circ}C$ 的效果好,所以 36 $^{\circ}C$ 和 37 $^{\circ}C$ 较为适宜,但既要考虑到保证引物与模板的稳定配对,又要增强结果的特异性,因此选择 37 $^{\circ}C$ 最好。循环次数筛选的结果从图中也可看出,随着循环次数的增加,扩增产物的量和亮度也随着增加;在 35 个循环时,由于循环数过少,扩增产量不足,条带暗,甚至有些条带未能扩增显示出来;随着循环数的增加,到 45 个循环时的扩增效果则达到最佳的。因此,优化反应程序的实验表明,曼地亚红豆杉 RAPD 最优反应程序是:95 $^{\circ}C$ 3 min;94 $^{\circ}C$ 1 min,37 $^{\circ}C$ 1 min,72 $^{\circ}C$ 2 min,45 个循环;72 $^{\circ}C$ 10 min。

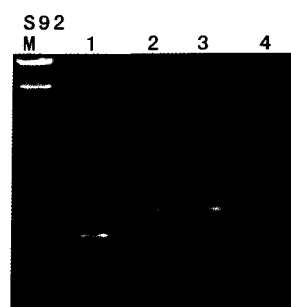


图 2 随机引物 S92 的退火温度优化结果

Fig. 2 The optimization results of different annealing temperature by random primer S92

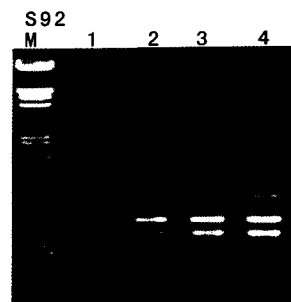


图 3 随机引物 S92 的循环次数优化结果

Fig. 3 The optimization results of different cycles by random primer S92

2.3 最优反应体系与程序的稳定性检测结果

根据 RAPD 优化实验的研究结果,我们再选用其它 4 个随机引物 S111 (5' CTTCCGCAGT3'), S128 (5' GGGATATCGG3'), S139 (5' CCTCTAGACC3'), S106 (5' ACGCATCGCA3') 进行 RAPD-PCR 扩增,重复实验 3 次,各引物的扩增结果在图 4 中分别相对应 1~3 泳道、4~6 泳道、7~9 泳道、10~12 泳道。从图中可看出,4 个随机引物重复的 3

次实验得到的结果是一致的,扩增的 DNA 条带清晰明显,无拖尾模糊现象,重复性强。因此该优化建立的曼地亚红豆杉 RAPD 反应体系与程序是最适的,并且稳定性和重复性好。

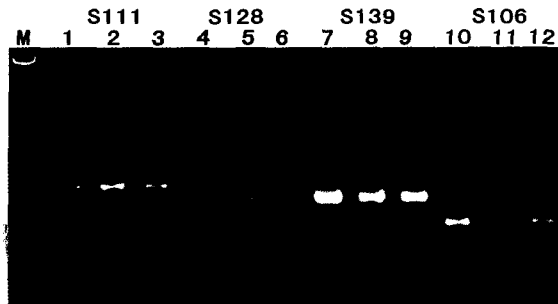


图 4 随机引物 S111、S128、S139、S106 扩增 RAPD 的稳定性检测结果

Fig. 4 The experiment results of the stability of RAPD by random primer S111, S128, S139, S106

3 讨论

RAPD 标记的重复性不是很好,其谱带对实验程序和条件的变化很敏感,因此利用 RAPD 分子标记时,为了保证结果的稳定性和可重复性,首先对其反应条件进行优化是必不可少(高燕会等,2006)。因此,本研究对曼地亚红豆杉 RAPD-PCR 反应中的 7 个因素进行了优化处理探索。

首先对 RAPD 反应体系中的重要因素(Mg^{2+} 、dNTP、随机引物、Taq DNA 聚合酶、模板 DNA)采用正交组合实验来优化。正交设计是用正交表来安排试验,用统计学原理来研究各因子试验的一种设计方法,它具有均衡分散、综合可比和效用明确的特性(张彦萍等,2005)。因此,正交设计用于 RAPD 反应体系的建立,具有工作量小,信息量大,数据分析简单,并可分析交互作用等优点(王家保等,2005);既可避免了传统的繁琐优化过程,也可考察出不同因素之间的相互作用,得出正交表中最佳的处理。同时为了保证 RAPD 反应结果的稳定性和重复性,仍需对反应程序的参数作进一步的研究实验,所以参照许多的研究报道(高燕会等,2006;张彦萍等,2005;王金刚等,2002)对退火温度、循环次数进行单因素优化实验,即可在短时间内快速得到一个最优反应程序。

根据优化研究结果与稳定性检测表明,所获得的曼地亚红豆杉最优 RAPD 反应体系与反应程序

的稳定性好、重复性强、扩增带型清晰,完全可以满足 RAPD 实验分析的需要;并可为以后研究曼地亚红豆杉及其近缘种的遗传多样性、分子育种等方面提供扎实的理论基础与技术保证,以及缩短实验进程和消耗。同时还须注意在应用该 RAPD 反应条件时,应保持其各因素条件的不变,并尽可能的使用同一厂家的药剂和同一 PCR 仪器设备等,以提高 RAPD 分析结果的重复性和可靠程度。

参考文献:

- 毛锁云,王海珍. 2002. 曼地亚红豆杉的栽培利用前景[J]. 江苏林业科技, 29(1): 50-51
- 杜荣骞. 1999. 生物统计学[M]. 北京: 高等教育出版社: 241-248
- 傅荣昭, 邵鹏柱, 高文远等. 1998. DNA 分子标记技术及其在药用植物研究上的应用前景[J]. 生物工程进展 18(4): 14-18
- Chen YH(陈毓亨), Bai SM(白守梅), Cheng KD(程克禄), et al. 1999. RAPD analysis on high-taxane-contained accessions of *Taxus chinensis* var. *mairiei*(南方红豆杉紫杉烷含量高量植株系 RAPD 初步研究)[J]. *Acta Bot Sin*(植物学报), 41(8): 829-832
- Gao YH(高燕会), Zhu YQ(朱玉球), Huang HH(黄华宏), et al. 2006. Study on optimization of RAPD-PCR reaction system of *Myrica rubra* using orthogonal design(杨梅 RAPD-PCR 体系的正交优化研究)[J]. *Biotechnology*(生物技术), 16(3): 55-58
- Hou DB(侯大斌). 2006. Extraction of genomic DNA and optimization of RAPD system with orthogonal design in *Coptis chinensis* (Ranunculaceae)(黄连基因组 DNA 提取与 RAPD-PCR 体系的正交优化研究)[J]. *J China West Normal Univ(Nat Sci)*(西华师范大学学报·自然科学版), 27(3): 249-252
- Karin Hilfiker, Felix Gugerli, Jean-Philippe Schütz, et al. 2004. Low RAPD variation and female-biased sex ratio indicate genetic drift in small populations of the dioecious conifer *Taxus baccata* in Switzerland[J]. *Conservation Genetics*, 5(3): 357-365
- Li X L, Yu X M, Guo W L, et al. 2006. Genomic diversity within *Taxus cuspidata* var. *nana* revealed by random amplified polymorphic DNA markers[J]. *Russian J Plant Physiol*, 53(5): 684-688
- Pu XL(普晓兰), Li P(李鹏), Du F(杜凡). 2003. Extraction of genomic DNA and optimization of RAPD condition for *Dendrocalamus sinicus*(巨龙竹基因组 DNA 的提取及 RAPD 反应条件的优化)[J]. *J Kunming Univ Sci Tech (Sci Tech)*(昆明理工大学学报·理工版), 28(1): 127-131
- Sheng L(盛丽), Wang D(王蒂), Si HJ(司怀军). 2005. Optimization of RAPD reaction conditions for *Angelica sinensis*(当归 RAPD 反应条件的优化)[J]. *J Gansu Agric Univ*(甘肃农业大学学报), 40(5): 591-595
- Shen YL(沈一岚), Xu JR(续九如), Li FR(李福荣), et al. 2006. RAPD experiment protocol and optimization in marigold(万寿菊 RAPD 分子标记优化体系的建立)[J]. *Jilin Fore Sci Tech*(吉林林业科技), 35(1): 10-14
- Wang GR(王贵荣), Li BL(李斌连), Gao SL(高山林). 2005. RAPD analysis and chromosome identification on several *Taxus* in China(我国境内几种红豆杉的 RAPD 分析和染色体鉴定)

(下转第 472 页 Continue on page 472)

植物区系成分的组合特征、演化的历史和近代趋势、区系的多样性和独特性。由此也说明群落学取样方法在区系分析中能得到可靠的结果。

综上所述,九连山自然保护区是泛热带及热带亚洲植物区系与北温带植物区系过渡的交汇地带,是泛热带植物区系成分的分布最北缘地区之一,以及东亚——北美区系成分的分布最南端地区之一。

致谢 本文得到了九连山国家级自然保护区管理局的大力帮助和支持;成军锋、周华、罗淑琴、杨盛锋、王琴、占青等参与了野外调查与数据整理,在此一并表示感谢!

参考文献:

- 王伯荪. 1987. 植物群落学[M]. 北京:高等教育出版社
- 王荷生. 1987. 植物区系地理[M]. 北京:科学出版社
- 刘信中,肖忠优,马建华. 2002. 江西九连山自然保护区科学考察与森林生态系统研究[A]. 北京:中国林业出版社
- 赵志模,郭依泉. 1990. 群落生态学原理与方法[M]. 北京:科学技术文献出版社
- Chen YJ(陈拥军), Zhang XC(张宪春), Ji MC(季梦成), et al. 2002. Studies on the Pterido flora of Jiulienshan Nature Reserve (九连山自然保护区蕨类植物区系研究)[J]. *Acta Agric Univ Jiangxi*(江西农业大学学报), 24(1): 78-81
- Dong Q(董琼), Li XW(李乡旺), Fan GS(樊国盛). 2006. Study on floristic phytogeography of seed plants from Dazhongshan Natural Reserve in Yunnan Province(大中山自然保护区种子植物区系研究)[J]. *Guihaia*(广西植物), 26(5): 541-545
- Ji MC(季梦成), Xie QH(谢庆红), Qu XY(曲雪艳), et al. A study on the medicinal pteridophytes in Jiulienshan Nature Reserve of Jiangxi Province, China. (江西九连山自然保护区药用蕨类植物研究)[J]. *Acta Agric Univ Jiangxi*(江西农业大学学报), 21(3): 376-380
- Lin Y(林英). 1981. Vegetation of Jiangxi Jiulienshan Nature Reserve(江西省九连山自然保护区的植被)[J]. *Acta Phytocool Geobot Sin*(植物生态学与地植物学丛刊), 5(2)
- Su ZY(苏志尧), Zhang HD(张宏达). 1994. Genera of Guangxi's flora; an areal type analysis(广西植物区系属的地理成分分析)[J]. *Guihaia*(广西植物), 14(1): 3-10
- Wu ZY(吴征镒). 1991. The areal-types of Chinese genera of seed plants (中国种子植物属的分布)[J]. *Acta Bot Yunnan*(云南植物研究), Suppl. IV: 1-139
- Yao ZS(姚振生), Lai XW(赖学文), Cao L(曹岚). 2002. Medicinal plant resources of Jiulienshan Nature Reserve in Jiangxi Province(九连山自然保护区药用植物资源)[J]. *Jiangxi Sci*(江西科学), 20(2): 98-103
- Ye JX(叶居新). 1986. Plants and forest in Jiulienshan Nature Reserve(九连山自然保护区的植物与森林)[J]. *Jiangxi Fore Sci Tech*(江西林业科技), (4): 23-27
- Yin AG(尹爱国), Su ZY(苏志尧), Chen BG(陈北光), et al. 2002. Floristic analysis of the evergreen broad-leaved forest community in Baiyunshan, Guangzhou(广州白云山常绿阔叶林区系成分分析)[J]. *J South Chin Agric Univ(Nat Sci Edit)*(华南农业大学学报·自然科学版), 23(4): 45-48
- [J]. *Pharm Biotechn*(药物生物技术), 12(2): 81-84
- Wang JB(王家保), Liu ZY(刘志媛), Xu BY(徐碧玉), et al. 2005. Optimization of the RAPD reaction system of *Litchi chinensis* by orthogonal design(用正交设计优化荔枝 RAPD 反应体系)[J]. *J Wuhau Bot Res*(武汉植物学研究), 23(4): 363-368
- Wang JG(王金刚), Che DD(车代弟), Lu LD(吕立涛). 2002. Optimization of RAPD technique system for *Gladiolus* germplasm(唐菖蒲 RAPD 分析体系的优化研究)[J]. *J Qiqihar Univ*(齐齐哈尔大学学报), 18(1): 38-41
- Wang T(王艇), Su YJ(苏应娟), Huang C(黄超), et al. 2000. Phylogenetic relations of taxaceae based on random amplified polymorphic DNA(红豆杉科植物 RAPD 分析及其系统学意义)[J]. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*(西北植物学报), 20(2): 243-249
- Wang T(王艇), Su YJ(苏应娟), Zhu JM(朱建明), et al. 2000. RAPD analyses of Taxaceae and its related taxa(红豆杉科及其相关类群的 RAPD 分析)[J]. *Acta Sci Nat Univ Sunyatseni*(中山大学学报(自然科学版)), 39(5): 129-130
- Xu L(徐莉), Zhang FC(张富春), Chen YQ(陈友强), et al. 2005. Isolation of safflower genomic DNA and optimization of RAPD system(红花基因组 DNA 的提取及 RAPD 体系的优化)[J]. *Xinjiang Agric Sci*(新疆农业科学), 42(2): 131-134
- Zhang H(张辉), Zhang JQ(张建清), Su X(苏雪), et al. 2005. Optimization of RAPD-PCR reaction conditions of the genus *Hippophae*(沙棘属植物 RAPD-PCR 反应条件的优化)[J]. *J Northwest Normal Univ(Nat Sci)*(西北师范大学学报·自然科学版), 41(3): 63-66
- Zhang HY(张宏意), Chen YQ(陈月琴), Liao WB(廖文波). 2003. RAPD analysis of population genetic diversity of *Taxus mairei*(南方红豆杉不同种群遗传多样性的 RAPD 研究)[J]. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*(西北植物学报), 23(11): 1994-1997
- Zhang YP(张彦萍), Liu HH(刘海河). 2005. Optimization of RAPD-PCR system with orthogonal design in watermelon(西瓜 RAPD-PCR 体系的正交优化研究)[J]. *J Agric Univ Hebei*(河北农业大学学报), 28(4): 51-53

(上接第 454 页 Continue from page 454)