

桔梗 RAPD-PCR 体系的正交优化及引物筛选

夏晓娟^{1,2}, 王 丽¹, 魏建和², 杨成民², 褚庆龙², 于 婧²

(1 四川大学 生命科学学院, 四川 成都 610064;
2 中国医学科学院 中国协和医科大学 药用植物研究所, 北京 100094)

【摘 要】 【目的】建立桔梗 RAPD-PCR 反应的最佳体系并应用于桔梗遗传图谱的构建。【方法】以 2 个桔梗亲本 GS16 和 GS106 的叶片 DNA 为模板,对桔梗 DNA 的提取及对影响桔梗 RAPD-PCR 扩增的重要参数进行优化试验,并从 530 个随机引物中筛选出在 2 个亲本间具多态性的引物。【结果】叶片研磨后用蒸馏水预洗及 2 次沉淀时加入 3 mol/L NaCl(pH 5.2)溶液,提取的基因组 DNA 纯度较高。优化的最佳反应体系总体积为 25 μ L,内含 ddH₂O 12.4 μ L、10 $\times$ buffer 2.5 μ L、引物 0.3 μ mol/L、dNTPs 200 μ mol/L、Mg²⁺ 2.5 mmol/L、Taq DNA 聚合酶 0.5 U、DNA 模板 40 ng;反应程序为:94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min;94 $^{\circ}$ C 30 s,35.3 $^{\circ}$ C 1 min,72 $^{\circ}$ C 2 min,40 次循环;72 $^{\circ}$ C 10 min。按此优化 RAPD 条件成功地从 530 个随机引物中筛选出了 115 个在两亲本间具多态性的引物。【结论】改良的 CTAB 法能成功用于桔梗基因组 DNA 提取,建立的最佳反应体系可用于桔梗遗传图谱的构建。

【关键词】 桔梗;RAPD;体系优化;正交设计;引物筛选

【中图分类号】 S567.23⁺9.035.3 【文献标识码】 A 【文章编号】 1671-9387(2008)10-0193-06

The optimization of RAPD-PCR system with orthogonal design and primers screening in *Platycodon grandiflorum*

XIA Xiao-juan^{1,2}, WANG Li¹, WEI Jian-he², YANG Cheng-min²,
CHU Qing-long², YU Jing²

(1 College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610064, China;
2 Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union
Medical College, Beijing 100094, China)

Abstract: 【Objective】The study was done to find the optimized reaction system for the construction of genetic link map in *Platycodon grandiflorum*. 【Method】The method of isolating genomic DNA from the leaves of *P. grandiflorum* and important factors influencing RAPD-PCR was studied. 【Result】The genomic DNA was successfully extracted from the leaves of *P. grandiflorum* with distilled water washing after rubbing the leaves, and deposited twice with 3 mol/L NaCl (pH 5.2) solution. The optimal PCR system for RAPD analysis was as follows: ddH₂O 12.4 μ L, 10 $\times$ buffer 2.5 μ L, primer 0.3 μ mol/L, dNTPs 200 μ mol/L, Mg²⁺ 2.5 mmol/L, Taq DNA polymerase 0.5 U, DNA template 40 ng in 25 μ L reaction volume. The reaction program was devised for 94 $^{\circ}$ C 4 minutes, 94 $^{\circ}$ C 30 s, 35.3 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 2 min, followed by 40 cycles, and a final extension at 72 $^{\circ}$ C for 10 minutes. 115 primers were screened from 530 10 bp random primers, which could produce stable and polymorphic bands. 【Conclusion】The reformed CTAB method

* [收稿日期] 2007-11-05
[基金项目] 国家“十五”科技攻关项目(2004BA721A24);国家中药材扶持项目(2005);北京市科技新星培养计划(2004A60)
[作者简介] 夏晓娟(1984—),女,湖北大冶人,在读硕士,主要从事药用植物分子育种研究。
[通讯作者] 魏建和(1970—),男,福建建阳人,教授,博士,主要从事药用植物基因资源与分子育种规范化栽培研究。
E-mail: wjianh@263.net

could extract the genomic DNA of *P. grandiflorum* successfully, and the optimum RAPD reaction system could be used for the genetic link map construction in *P. grandiflorum*.

Key words: *Platycodon grandiflorum*; RAPD; optimization; orthogonal design; primer screening

桔梗 (*Platycodon grandiflorum* (Jacq.) A. DC.) 为桔梗科桔梗属多年生草本植物, 是我国销量最大的 40 种传统中药材之一。桔梗通常以根入药, 性平, 味苦、辛, 有开宣肺气、祛痰排脓的功能。在我国东北地区及日、韩、朝等东亚国家, 桔梗被作为一种常用蔬菜, 其根可制成美味的菜肴。欧美、日韩还将其作为切花等园艺观赏植物^[1-4]。

目前已经有一些应用 RAPD 技术, 从 DNA 水平上对桔梗种质资源的遗传多样性及不同栽培品种、生态类型的亲缘关系进行研究的报道^[5-8], 但对桔梗的分子育种, 特别是遗传图谱的构建及数量性状位点 (QTL) 的定位研究较少。

随机扩增多态性 DNA 作为一种分子标记技术, 被广泛地应用于个体和品系鉴定、基因定位、遗传图谱构建^[9]、遗传多样性检测^[10-11]、标记辅助选择和种间遗传分析等多个领域。国内外有关 RAPD-PCR 反应条件的优化研究, 大多采用单因子试验^[12-15], 难免会忽视各因子之间的相互作用效应。为此, 本研究对植物 DNA 提取中广泛使用的 CTAB 法, 加以改进并应用于桔梗。在此基础上, 采用正交设计对 RAPD-PCR 反应中几个主要影响因素进行了优化, 并在最佳反应体系及反应条件下, 对 2 个桔梗亲本间的多态性随机引物进行了筛选, 以期用 RAPD 标记构建桔梗遗传图谱奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 植物样品 模板 DNA 制备材料为桔梗遗传图谱构建用的亲本 P₁ (GS16) 和 P₂ (GS106), 种植于中国医学科学院药用植物研究所 (北京海淀区马连洼) 药用植物栽培育种基地。采样时取桔梗干净的嫩叶及老叶, 迅速放入装有硅胶的封口袋密封, 置于一 20 ℃ 低温冰箱中保存备用。

1.1.2 试剂与仪器 10×PCR buffer、*Taq* DNA 酶、MgCl₂ 等购自大连宝生物公司 (TaKaRa), dNTP 购自上海生工, DNA Ladder 购自北京全式金公司。PCR 扩增仪为美国 IBA 公司生产的 Gene Amp PCR STSTEM 9700, GeneQuant Pro 微型分光光度计为美国安玛西亚公司产品。

1.1.3 引 物 研究用的 RAPD primers 全部由

上海生工合成, 为 10 个碱基的随机引物。

1.2 桔梗 RAPD 扩增条件的优化

1.2.1 DNA 的提取 基因组 DNA 的提取采用 CTAB 法^[16] 并加以改良, 即研磨时加入少量 PVP (聚乙烯吡咯烷酮), 叶片研磨至粉末状后, 置于 2 mL 离心管, 加入 1 mL 蒸馏水进行预洗, 摇动 5~6 s, 6 000 r/min 离心 4 min, 弃上清液。然后再加入预热的 CTAB 溶液在 65 ℃ 水浴中裂解 45 min。在两次沉淀 DNA 时均加入 1/10 体积的 3 mol/L NaCl (pH 5.2), 并置于一 20 ℃ 冰箱中 30 min 至沉淀出现。紫外分光光度计检验 DNA 的浓度及纯度。将 DNA 浓度稀释为 10 ng/μL, 于一 20 ℃ 冰箱中保存、备用。

1.2.2 PCR 扩增及电泳检测 随机引物采用上海生工的 B2 系列 RAPD 引物, 选择扩增产物稳定、重复性好的引物 S86 (碱基序列为 GTGCCTAACC) 进行 PCR 扩增。基本反应体系总体积为 25 μL, 其中含 10×PCR buffer 2.5 μL, 25 mmol/L MgCl₂ 2.0 μL, 2.5 mmol/L dNTP 2.0 μL, 2.5 U/μL *Taq* DNA 酶 0.5 μL, 5 μmol/L primer 4.0 μL, 模板 DNA 10 ng, 无菌超纯水补至 25 μL。PCR 反应程序为: 94 ℃ 预变性 4 min; 94 ℃ 30 s, 35 ℃ 1 min, 72 ℃ 2 min, 45 次循环; 72 ℃ 10 min。扩增结束后, 用 12 g/L 琼脂糖凝胶 (含 EB 0.5 μg/mL) 对扩增产物进行电泳分离, 以 2 000 bp DNA Ladder 作 Marker。在凝胶成像系统上观察并保存图像。

1.2.3 反应体系的正交试验设计方案 选择引物、dNTPs、Mg²⁺、DNA 模板浓度和 *Taq* 酶量 5 个因子, 每个因子设 4 个水平 (表 1), 进行正交组合试验设计。根据正交设计试验表 L₁₆ (4⁵)^[17] 确定桔梗 RAPD-PCR 反应体系的试验方案 (表 2)。

1.2.4 退火温度对 RAPD-PCR 扩增结果的影响 利用正交试验筛选出的优化反应体系进行退火温度梯度试验, 退火温度分别为 30.1, 31.2, 33.0, 35.3, 37.9, 40.7 和 43.4 ℃, 循环 40 次。其他 PCR 反应程序同 1.2.2。反应结束后, 扩增产物在 12 g/L 琼脂糖凝胶上电泳, 电压不超过 5~6 V/cm, 电泳结束后在紫外凝胶成像系统上观测并照相。

1.3 桔梗多态性引物和标记位点的筛选

用桔梗亲本 P₁ (GS16)、P₂ (GS106) 的基因组

DNA 进行 RAPD 扩增,筛选出具有清晰多态性扩 增产物的 RAPD 引物。

表 1 桔梗 RAPD-PCR 反应体系正交组合试验设计的因素与水平

Table 1 Factors and levels of RAPD-PCR system with orthogonal combination design in *P. grandiflorum*

水平 Level	因素 Factor				
	引物/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) Primer	DNA/ng	$\text{Mg}^{2+}/(\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})$	dNTP/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	<i>Taq</i> 酶/U <i>Taq</i> enzyme
1	0.2	5	1	150	0.5
2	0.3	10	2	200	1
3	0.4	20	2.5	250	1.25
4	0.5	40	3	300	1.5

表 2 桔梗 RAPD-PCR 反应体系正交组合的 $L_{16}(4^5)$ 试验方案

Table 2 Orthogonal combination $L_{16}(4^5)$ of RAPD-PCR system in *P. grandiflorum*

试验号 No.	因素 Factor				
	引物/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) Primer	DNA/ng	$\text{Mg}^{2+}/(\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})$	dNTP/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	<i>Taq</i> 酶/U <i>Taq</i> enzyme
1	0.2	5	1	150	0.5
2	0.2	10	2	200	1
3	0.2	20	2.5	250	1.25
4	0.2	40	3	300	1.5
5	0.3	5	2	250	1.5
6	0.3	10	1	300	1.25
7	0.3	20	3	150	1
8	0.3	40	2.5	200	0.5
9	0.4	5	2.5	300	1
10	0.4	10	3	250	0.5
11	0.4	20	1	200	1.5
12	0.4	40	2	150	1.25
13	0.5	5	3	200	1.25
14	0.5	10	2.5	150	1.5
15	0.5	20	2	300	0.5
16	0.5	40	1	250	1

2 结果与分析

2.1 桔梗基因组 DNA 的完整性和纯度检测

用改良 CTAB 法提取的桔梗基因组 DNA 的完整性较好,在 DNA 条带附近及点样孔周围没有发亮现象,表明提取的 DNA 中蛋白质、多糖类物质已经被较好地去除(图 1)。用紫外分光光度计测定稀释 100 倍的 DNA 纯度, A_{260}/A_{280} 比值为 1.7~1.9,说明所获得的 DNA 纯度较高,以此模板进行 RAPD 扩增,能产生丰富、清晰和重复性较好的条带。

2.2 多因素组合对桔梗 RAPD-PCR 扩增结果的影响

图 2 表明,16 个处理中,除处理 5,6,13 外,其他处理均可以扩增出清晰的条带。4,7,8,9,10,11 和 14 这 7 个处理扩增出的 RAPD 图谱一致,但各片段的亮度在各处理中不一样,即不同处理的优势扩增片段不同。考虑减少 *Taq* 酶的用量,则在 16 个处理中以处理 8 最优,扩增条带数最多,而且各条

带均较亮。进一步重复性试验表明,处理 8 的试验体系具有较好的重复性。该处理的引物、模板、 Mg^{2+} 、dNTP 和 *Taq* 酶用量分别是 $0.3 \mu\text{mol/L}$ 、40 ng、2.5 mmol/L、200 $\mu\text{mol/L}$ 和 0.5 U。

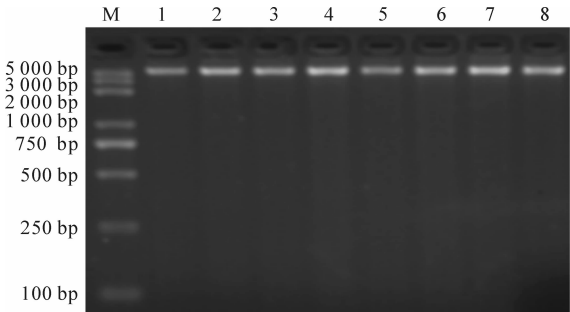


图 1 桔梗基因组 DNA 的凝胶电泳图

M, Marker; 1~8, 桔梗基因组 DNA

Fig. 1 Electrophoretic products of the genomic

DNA from *P. grandiflorus*

M, Marker; 1-8, DNA samples

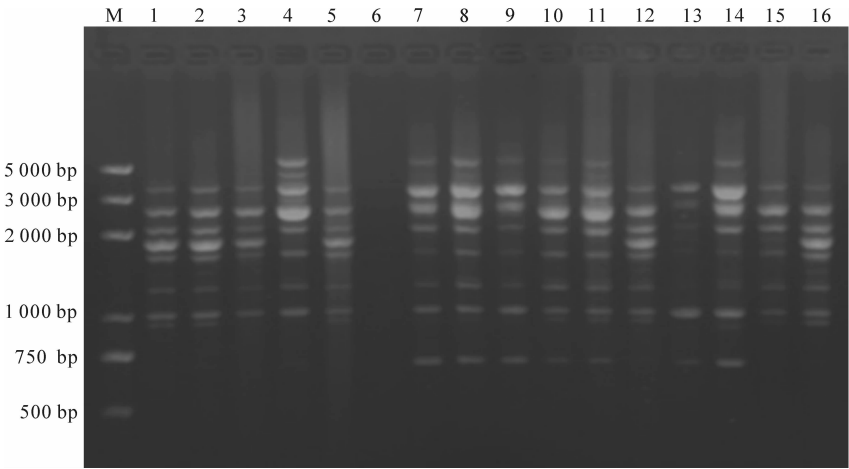


图 2 引物、模板 DNA、 Mg^{2+} 、dNTP 和 *Taq* 酶用量组合处理对桔梗 RAPD-PCR 扩增结果的影响
M. Marker(2000 bp Ladder);1~16. 不同因子的组合处理,与表 2 试验号对应

Fig. 2 The combining influence of primer,DNA, Mg^{2+} ,dNTP and *Taq* polymerase on
RAPD-PCR in *P. grandiflorum*

M. Marker(2 000 bp Ladder);1—16. Treatments of combination with different factors,
each treatment number is corresponding to Table 2

2.3 退火温度对桔梗 RAPD-PCR 扩增结果的影响

从图 3 可以看出,随着退火温度升高,扩增条带逐渐减少。退火温度为 35.3 ℃ 的扩增结果最为理想。

2.4 桔梗多态性引物的筛选

对 530 个 RAPD 引物在桔梗亲本 GS16 和 GS106 间进行筛选,结果发现,453 个引物可扩增出清晰可辨带型,占有引物的 85.5%,每个引物可扩增出 1~17 条带;其中 115 个引物在两亲本间检测出多态性,共产生 912 条扩增谱带,平均每个引物扩增 7.9 条带,其中多态性谱带 293 条,占有扩增谱带的 32.1%。

多态性引物的名称及其序列详见表 3。

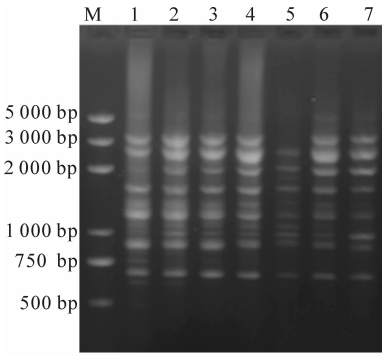


图 3 退火温度对桔梗 RAPD-PCR 扩增结果的影响
M. Marker;1-7. 退火温度分别为 30.1, 31.2, 33.0, 35.3,37.9,40.7 和 43.4 ℃ 时的扩增产物

Fig. 3 The influence of annealing temperature on
RAPD-PCR in *P. grandiflorum*

M. Marker;1—7. Annealing temperature in
order;30.1,31.2,33.0,35.3,37.9,40.7,43.4 ℃

表 3 桔梗多态性引物的名称及其序列

Table 3 Names and sequences of polymorphic primers in *P. grandiflorum*

引物 Primer	序列 5'-3' Sequence 5'-3'	引物 Primer	序列 5'-3' Sequence 5'-3'	引物 Primer	序列 5'-3' Sequence 5'-3'
S10	CTGCTGGGAC	S277	GTCCTGGGTT	S484	AGTGCCTGA
S11	GTAGACCCGT	S281	GTGGCATCTC	S490	TGTGCCCGAA
S12	CCTTGACGCA	S284	GGCTGCAATG	S499	CCCCCTATCA
S14	TCCGCTCTGG	S294	GGTCGATCTG	S505	GACCTAGTGG
S32	TCGGCGATAG	S296	GGGCCAATGT	S506	GTCTACGGCA
S39	CAAACGTCGG	S301	CTGGGCACGA	S519	CCTCCTCATC
S51	AGCGCCATTG	S305	CCTTTCCCTC	S520	ACGGCAAGGA
S52	CACCGTATCC	S316	CTCTGTTCGG	S1005	TTGCAGGCAG
S56	AGGGCGTAAG	S318	GACTAGGTGG	S1012	TCCAACGGCT
S64	CCGCATCTAC	S324	AGGCTGTGCT	S1013	TGAGTCCGCA

续表 3 Continued table 3

引物 Primer	序列 5'-3' Sequence 5'-3'	引物 Primer	序列 5'-3' Sequence 5'-3'	引物 Primer	序列 5'-3' Sequence 5'-3'
S72	TGTCATCCCC	S327	CCAGGAGGAC	S1015	CTACAGCGAG
S82	GGCACTGAGG	S328	GGGTGGGTAA	S1019	GGCAGTTCTC
S86	GTGCCTAACC	S338	AGGGTCTGTG	S1021	GGCATCGGCT
S88	TCACGTCCAC	S341	CCCGGCATAA	S1040	CCTGTTCCCT
S91	TGCCCCGTCGT	S347	CCTCTCGACA	S1061	TCTGCTACGG
S95	ACTGGGACTC	S349	TGAGCCTCAC	S1062	CCATCGGAGG
S100	TCTCCCTCAG	S357	ACGCCAGTTC	S1070	CAAGCGTCAC
S101	GGTCGGAGAA	S358	TGGTCGCAGA	S1071	CAGTGTGCTC
S104	GGAAGTCGCC	S360	AAGCGGCCTC	S1073	TCCCACGAGT
S119	CTGACCAGCC	S364	CCGCCCAAAC	S1076	CGTCGTGCTC
S137	AACCCGGGAA	S378	CCTAGTCGAG	S1079	TCGCAGCGAG
S145	TCAGGGAGGT	S381	GGCATGACCT	S1126	GGGAACCCGT
S168	TTTGCCCGGT	S391	ACGATGAGCC	S1127	TCGCTGCGGA
S181	CTACTGCGCT	S398	ACCACCCACC	S1231	ACCGTGCCGT
S189	TCCTGGTCCC	S402	ACAACGCCTC	S1233	CACGGACCGA
S202	GGAGAGACTC	S407	CCGTGACTCA	S1238	GTTGCGCAGT
S222	AGTCACTCCC	S411	GTCCACTGTG	S1240	TCTGCCTGGA
S223	CTCCCTGCAA	S412	GGGACGTTGG	S1249	CCGTTAGCGT
S225	TCCGAGAGGG	S415	GACCTACCAC	S1252	CTGGCTAGCC
S228	GGACGGCGTT	S431	TCGCCGCAAA	S1254	GTGCCGCACT
S234	AGATCCCGCC	S439	GTCCGTACTG	S1271	CTTCTCGGTC
S236	ACACCCCACA	S440	GGTGCTCCGT	S1274	CACCTCGACC
S242	CTGAGGTCTC	S443	CTGTTGCTAC	S1279	AGCCTGGGGA
S248	GGCGAAGGTT	S446	CCACGGGAAG	S1284	TCTGCCATCC
S250	ACCTCGGCAC	S451	GACAGGAGGT	S1286	CCCGAGATCC
S254	TGGGTCCCTC	S455	TGGCGTCCTT	S1288	TGAGAAGCGG
S259	GTCAGTGCGG	S474	CCAGCCGAAC	S1291	GACCCCGACA
S263	GTCCGGAGTC	S482	TCTGTGCGTC	S1294	CTCCGATCA

3 讨 论

桔梗为多年生草本植物,细胞中含有很多次生干扰物质,易在 DNA 提取过程中与 DNA 共沉淀,形成胶状物难以溶解或产生褐变,严重影响了 DNA 的纯度。本研究采用以下 2 点解决上述问题:一是研磨要迅速,在解冻以前装入离心管加入 DNA 提取液,以减少样品与空气的接触时间;二是材料研磨中加入一定量的固体 PVP,在抽提缓冲液中也加入 PVP 和巯基乙醇以去除材料中富含的酚类物质,并添加高浓度的 NaCl,这样可以进一步排除多糖等杂质。另外,引物筛选时,采用相同材料、相同引物和同一扩增程序在不同时间重复 2 次试验,对于在 2 次试验中表现不一的,予以剔除,同时对扩增条带数虽多、但条带不太清晰的引物,也不予考虑。

本研究通过上述改良方法提取桔梗老叶和嫩叶的 DNA,对得到的 DNA 样品用紫外分光光度计进行检测,可知其 A_{260}/A_{280} 均为 1.7~1.9,琼脂糖凝胶电泳显示都只有 1 条主带,表明在试验材料不太充足的情况下,可以选择老叶进行 DNA 提取。此

外研究还建立了桔梗的最优 RAPD-PCR 反应条件:总反应体系体积为 25 μ L,内含 ddH₂O 12.4 μ L、10 $\times$ 缓冲液 2.5 μ L、引物 0.3 μ mol/L、dNTPs 200 μ mol/L、Mg²⁺ 2.5 mmol/L、*Taq* 酶 0.5 U、DNA 模板 40 ng,最佳退火温度 35.3 $^{\circ}$ C。利用该最佳反应条件从 DNA 水平上证实了桔梗亲本 P1 (GS16) 和 P2 (GS106) 在遗传物质上存在有真实差异,为后期构建桔梗的遗传图谱奠定了基础。

[参考文献]

[1] Halevy A H,Shlomo E,Ziv O. Improving cut flower production of ballon flower [J]. HortScience,2002,37(5):759-761.

[2] Park B H,Oliveira N,Pearson S. Temperature affects growth and flowering of the balloon flower (*Platycodon grandiflorum* (Jacq.) A. DC. cv. Astra Blue) [J]. HortScience,1998,33(2): 233-236.

[3] Goi M,Nagayama Y,Hasegawa A,et al. Year-round production of *Platycodon grandiflorum* A. DC. [J]. Technical Bulletin of the Faculty of Agriculture, Kagawa University, 1994, 46(2):87-92.

[4] Song C Y,Rob M S,Chung S K,et al. Effect of temperature and light on growth and flowering of potted plant production of

- Platycodon* [J]. Journal of the Korean Society for Horticultural Science, 1993, 34(6): 446-453.
- [5] 魏建和, 杨成民, 陈士林, 等. 桔梗栽培及野生种质遗传多样性的 RAPD 分析 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2006, 8(3): 37-41.
- Wei J H, Yang C M, Chen S L, et al. Analysis of genetic diversity of the cultivation and wild germplasms of *Platycodon grandiflorum* based RAPD markers [J]. World Science and Technology-Modernization of Traditional Chinese Medicine, 2006, 8(3): 37-41. (in Chinese)
- [6] 严一字, 吴基日, 孙丽娜. 桔梗种质资源的 RAPD 分析 [J]. 安徽农业科学, 2006, 34(16): 3908-3910.
- Yan Y Z, Wu J R, Sun L N. RAPD analysis of germplasm resources of *Platycodon grandiflorum* DC [J]. Journal of Anhui Agri Sci, 2006, 34(16): 3908-3910. (in Chinese)
- [7] 严一字, 吴基日. 利用 RAPD 标记分析东亚地区桔梗的亲缘关系 [J]. 植物研究, 2007, 27(3): 308-312.
- Yan Y Z, Wu J R. Genetic relationships of *Platycodon grandiflorum* cultivars from East-Asian area using RAPD markers [J]. Bulletin of Botanical Research, 2007, 27(3): 308-312. (in Chinese)
- [8] 王立平, 孙丽娜, 薛均诚. 紫花桔梗和白花桔梗的 RAPD 指纹图谱鉴定研究 [J]. 北方园艺, 2007(5): 40-41.
- Wang L P, Sun L N, Xue J C. Fingerprint research on identification of purple flower *Platycodon grandiflorus* and white flower *Platycodon grandiflorus* by RAPD [J]. Northern Horticulture, 2007(5): 40-41. (in Chinese)
- [9] 陈考科, 黄少伟. 桉树的分子标记技术及遗传图谱构建进展 [J]. 分子植物育种, 2005, 3(2): 255-260.
- Chen K K, Huang S W. Progress on molecular markers and the construction of the genetic linkage maps in *Eucalyptus* spp [J]. Molecular Plant Breeding, 2005, 3(2): 255-260. (in Chinese)
- [10] 赵 锦, 刘孟军, 吕增仁. RAPD 技术在植物遗传多样性研究中的应用 [J]. 河北农业大学学报, 2000, 23(1): 25-28.
- Zhao J, Liu M J, Lü Z R. The application of RAPD technique in studying genetic diversity of plant [J]. Journal of Agricultural University of Hebei, 2000, 23(1): 25-28. (in Chinese)
- [11] 李景欣, 乌仁图雅, 乌日娜. RAPD 分子标记技术在植物遗传多样性研究中的应用 [J]. 畜牧与饲料科学, 2004, 25(6): 57-59.
- Li J X, Wu R T Y, Wu R N. The application of RAPD molecular marker method in studying genetic diversity of plant [J]. Animal Husbandry and Feed Science, 2004, 25(6): 57-59. (in Chinese)
- [12] 刘万勃, 宋 明, 刘富中. 甜瓜种质 RAPD 的优化研究 [J]. 西南农业大学学报, 2000, 22(6): 513-515.
- Liu W B, Song M, Liu F Z. Optimization of RAPD technique system for melon (*Cucumis Melo* L.) germplasms [J]. Journal of Southwest Agricultural University, 2000, 22(6): 513-515. (in Chinese)
- [13] 赵 锦, 刘孟军. 枣树 RAPD 分析的优化研究 [J]. 果树学报, 2001, 18(6): 329-332.
- Zhao J, Liu M J. Optimization on RAPD analysis system of Chinese jujube (*Ziziphus jujuba* Mill.) [J]. Journal of Fruit Science, 2001, 18(6): 329-332. (in Chinese)
- [14] 王跃进, Lam I O. 葡萄 RAPD 分析影响因子的研究 [J]. 农业与生物技术学报, 1997, 5(4): 387-391.
- Wang Y J, Lam I O. Studies on affecting factors in the analysis of RAPD of grapes [J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 1997, 5(4): 387-391. (in Chinese)
- [15] 张彦萍, 刘海河. 西瓜 RAPD-PCR 体系的正交优化研究 [J]. 河北农业大学学报, 2005, 28(4): 51-53.
- Zhang Y P, Liu H H. Optimization of RAPD-PCR system with orthogonal design in watermelon [J]. Journal of Agricultural University of Hebei, 2005, 28(4): 51-53. (in Chinese)
- [16] 邹喻苹, 葛 颂, 王晓东. 系统进化植物学中的分子标记 [M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- Zou Y P, Ge S, Wang X D. Molecular markers on systematic and evolutionary botany [M]. Beijing: Science Press, 2001. (in Chinese)
- [17] 杜荣骞. 生物统计学 [M]. 北京: 高等教育出版社, 1999: 241-248.
- Du R Q. Biostatistics [M]. Beijing: High Education Press, 1999: 241-248. (in Chinese)