

DOI:CNKI:61-1390/S.20111025.1731.017

网络出版时间:2011-10-25 17:31

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20111025.1731.017.html>

秦岭野生蕙兰 RAPD 反应体系的优化

王宝宁^a, 张显^b, 陈君梅^a, 宋军阳^a

(西北农林科技大学 a 林学院, b 园艺学院, 陕西 杨凌 712100)

[摘要] **【目的】**建立适宜于秦岭野生蕙兰 RAPD 分析的 PCR 反应条件,为利用 RAPD 技术研究秦岭野生蕙兰的遗传多样性提供技术依据。**【方法】**以秦岭野生蕙兰叶片为材料,采用改良 CTAB 法,提取野生蕙兰基因组 DNA 进行 RAPD 扩增反应。以 5'-CCTTGACGCA-3'(S12)为随机引物,通过 $L_{16}(4^5)$ 正交试验与单因素试验 2 种方法,对 RAPD 反应体系的主要参数(Mg^{2+} 浓度、dNTPs 浓度、模板 DNA 用量、引物浓度、*Taq* DNA 聚合酶用量)进行摸索和优化,并经过验证试验,建立适合秦岭野生蕙兰的 RAPD 遗传多样性分析体系。**【结果】**研究得到的适于秦岭野生蕙兰的 RAPD 遗传多样性分析体系为:25 μ L 反应体系中, Mg^{2+} 浓度为 2.5 μ mol/L,dNTPs 浓度为 0.16 mmol/L,模板 DNA 用量为 100 ng,引物浓度 0.6 μ mol/L,*Taq* DNA 聚合酶用量为 1.5 U。各因素对 RAPD 反应的影响程度依次为:模板 DNA 用量>引物浓度>*Taq* DNA 聚合酶用量>dNTPs 浓度> Mg^{2+} 浓度。**【结论】**优化的秦岭野生蕙兰 RAPD 反应体系扩增效果比较理想,扩增条带的多态性明显、清晰度高、重复性好,可用于进一步的遗传多样性分析。

[关键词] 秦岭;野生蕙兰;RAPD-PCR;体系优化

[中图分类号] S682.310.1

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2011)12-0087-08

Optimization of RAPD reaction system on wild *Cymbidium faberi* in Qinling Mountain

WANG Bao-ning^a, ZHANG Xian^b, CHEN Jun-mei^a, SONG Jun-yang^a

(a College of Forestry, b College of Horticulture, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: **【Objective】**The reaction system RAPD of wild *Cymbidium faberi* in Qinling was established to provide technical basis of technology research for the genetic diversity wild Qinling orchids. **【Method】**In this research, modified CTAB method was used to extract DNA from the leaves of *C. faberi* Rolfe for RAPD reaction. Primer 5'-CCTTGACGCA-3'(S12) was used as random primer, $L_{16}(4^5)$ orthogonal design and single factor design were used to screen and to establish optimal reaction system of RAPD that were used in wild *C. faberi* in Qinling. Mg^{2+} , dNTPs, primer, *Taq* DNA polymerase, and template DNA were used as important parameters for exploration and optimization experiment. **【Result】**The optimum concentration of five important components such as Mg^{2+} , *Taq* DNA polymerase, dNTPs, primer, and template DNA in 25 μ L reaction system was 2.5 μ mol/L, 1.5 U, 0.16 mmol/L, 0.6 μ mol/L and 100 ng. The effective degree of the factors on the RAPD reaction was in the order: template DNA>primer>*Taq* DNA polymerase>dNTPs> Mg^{2+} . **【Conclusion】**The amplification effect of the optimization RAPD reaction system of wild *C. faberi* in Qinling is ideal. Amplified polymorphism of strip is obvious, reproducible and with high definition, which can be used for further analysis of genetic diversity.

Key words: Qinling Mountain; wild *Cymbidium faberi*; RAPD-PCR; optimization

* [收稿日期] 2011-05-16

[基金项目] 国家林业局社会公益项目(200704009);陕西省农业攻关项目(2009K01-11);西安市科技局攻关项目(NC09045-1)

[作者简介] 王宝宁(1985—),女,陕西宝鸡人,在读硕士,主要从事园林植物遗传育种研究。E-mail: wangbaoni001@163.com

[通信作者] 张显(1961—),男,陕西宝鸡人,教授,主要从事园艺植物种质资源与利用研究。E-mail: zhangxian098@126.com

秦岭是我国南北方气候的分界线,无论是从自然地理的角度还是从人文地理的角度看,秦岭在我国地理上都具有重要的分界意义^[1]。相对丰富的水资源加上特殊的地理位置,为众多植物的生长发育提供了有利条件^[2],孕育了丰富的植物资源,堪称中国植物的天然宝库^[3]。秦岭山地是东亚地区暖温带-北亚热带物种最丰富的地区之一,其生态系统的多样性及生物物种的多样性和遗传的多样性,均具有重要的典型性和代表性^[4]。传统所说的兰花,一般指兰科中的兰属(*Cymbidium*)植物,主要指春兰(*Cymbidium goeringii* (Rchb. f.) Rchb. f.)、惠兰(*Cymbidium faberi* Rolfe)、建兰(*Cymbidium ensifolium* (L.) Sw.)、墨兰(*Cymbidium sinense* (Jackson ex Andr.) Willd.)和寒兰(*Cymbidium kanran* Makino)等 5 大类,国人称此类兰花为“国兰”^[5]。国兰不仅具有植物学方面的科学研究价值和观赏价值,而且包含有深厚的文化意蕴。RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) 是基于 PCR(Polymerase Chain Reaction)技术的一种 DNA 分子标记方法,由 Williams 等和 Welsh 领导的 2 个研究小组所创立^[6]。该技术操作简便、高效安全且成本较低,因此在园艺植物种质资源遗传多样性分析和育种研究中得到了广泛应用^[7-12],现主要应用于基因定位、亲缘关系分析、生物多样性检测、品种分类等诸多领域。鉴于目前关于秦岭野生惠兰 RAPD 分析的研究尚未见报道,本研究参考大花惠兰^[9]、蝴蝶兰^[12]、铁皮石斛等^[13] 兰花植物 RAPD 方面的研究文献,以秦岭野生惠兰的基因组 DNA 为模板,对反应的各要素进行比较分析,以期建立适用于秦岭野生惠兰的稳定的 RAPD 反应体系,为秦岭野生惠兰分子水平上的遗传多样性研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

供试植物材料秦岭野生惠兰(*C. faberi* Rolfe),

表 1 秦岭野生惠兰 RAPD 反应体系(25 μL)中的 5 种组成成分及其水平

Table 1 Five components and levels in RAPD reaction (25 μL)of wild *Cymbidium faberi* in Qinling Mountain

水平 Level	dNTPs/ (mmol · L ⁻¹)	Mg ²⁺ / (μmol · L ⁻¹)	引物/(μmol · L ⁻¹) Primer	DNA 模板/ng Template DNA	Taq 酶/U Taq polymerase
1	0.12	1.5	0.2	60	1.0
2	0.16	2.0	0.4	80	1.5
3	0.20	2.5	0.6	100	2.0
4	0.24	3.0	0.8	120	2.5

来自陕南境内秦岭山脉的不同自然分布区(商洛柞水、镇安、商南、丹凤、山阳等地),现种植于西北农林科技大学兰花种质资源圃。所用随机引物购自上海生工生物工程有限公司;dNTPs、琼脂糖、*Taq* DNA 聚合酶、10×Reaction Buffer 和 MgCl₂ 等试剂,均购自沃尔森公司;250 bp DNA Maker,购自 TaKa-Ra 生物公司。

1.2 方法

1.2.1 DNA 的提取和检测 (1)DNA 提取。采用改良 CTAB 法提取兰花基因组 DNA,并参考相关文献 DNA 的提取方法做部分修改^[7-9,12]。

(2)DNA 检测。①在紫外分光仪中检测 DNA 的 OD 值,根据 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值判断 DNA 大致纯度。一般情况下,OD₂₆₀/OD₂₈₀ 为 1.8~1.9 时,即表明为高纯度的 DNA^[13]。②用琼脂糖凝胶电泳,EB 染色,在凝胶成像分析系统下拍照并记录结果。

1.2.2 RAPD-PCR 扩增反应体系的初步优化 RAPD-PCR 反应体系的 5 种主要成分 dNTPs、Mg²⁺、*Taq* 酶、随机引物和 DNA 模板用量各设置 4 个水平,详见表 1。以秦岭野生惠兰(来自镇安)DNA 为模板进行试验。RAPD 随机引物经过筛选后用 S12 引物进行扩增。各处理的反应体系均为 25 μL,每处理均加入 2.5 μL 无 Mg²⁺ 10×Buffer,然后计算用量,不足体积用双蒸水补足。基本扩增程序为:94℃预变性 3 min,94℃变性 1 min,37℃退火 40 min,72℃延伸 1.5 min,40 个循环;72℃延伸 7 min。12 g/L 琼脂糖凝胶电泳,EB 染色,凝胶成像系统观察并照相,统计扩增得到的 DNA 片段数、亮度等因素,进行相关分析。

1.2.3 RAPD-PCR 反应体系优化的正交试验设计

选用 L₁₆ (4⁵) 正交表对野生惠兰(来自镇安)的 RAPD 反应体系进行优化。研究 dNTPs、Mg²⁺、*Taq* 酶、随机引物和 DNA 模板 5 种反应物用量变化对 RAPD 反应扩增结果的影响。参照表 1 中的因素及其水平,共设计了 16 组处理如表 2 所示。

表 2 秦岭野生蕙兰 RAPD-PCR 反应体系中各组分不同用量的 $L_{16}(4^5)$ 正交设计

Table 2 $L_{16}(4^5)$ orthogonal design for the component of RAPD- PCR system of wild *Cymbidium faberi* in Qinling Mountain

处理编号 No.	dNTPs/ (mmol · L ⁻¹)	Mg ²⁺ / (μmol · L ⁻¹)	引物/(μmol · L ⁻¹) Primer	DNA 模板/ng Template DNA	Taq 酶/U Taq polymerase
1	1(0.12)	1(1.5)	1(0.2)	1(60)	1(1.0)
2	1	2(2.0)	2(0.4)	2(80)	2(1.5)
3	1	3(2.5)	3(0.6)	3(100)	3(2.0)
4	1	4(3.0)	4(0.8)	4(120)	4(2.5)
5	2(0.16)	1	2	3	4
6	2	2	1	4	3
7	2	3	4	1	2
8	2	4	3	2	1
9	3(0.20)	1	3	4	2
10	3	2	4	3	1
11	3	3	1	2	4
12	3	4	2	1	3
13	4(0.24)	1	4	2	3
14	4	2	3	1	4
15	4	3	2	4	1
16	4	4	1	3	2

1.2.4 RAPD-PCR 反应体系优化的单因素试验设计 对以上 5 种因素进行单因素设计,即每次只改变 1 种组分用量,保持其他因素在第 3 水平不变。各因素及其水平设置见表 1。

1.2.5 RAPD 反应体系的验证 以来自秦岭不同自然分布区的野生蕙兰 DNA 为模板,运用不同的随机引物(S12、S43、S67、S199、S293 和 S445 等 6 个),对以上试验所优化出的 RAPD 反应体系进行验证。

2 结果与分析

2.1 秦岭野生蕙兰基因组 DNA 的提取

通过 CTAB 法,采摘兰花幼叶提取基因组 DNA。在提取中对纯度不高的基因组 DNA 进行纯化。结果表明,所提取的基因组 DNA 为白色絮状沉淀,大多数 DNA 质量浓度集中在 100~1 000 ng /μL(表 3)。电泳结果(图 1)表明,提取的 DNA 比较完整,无明显降解,无 RNA 污染。

表 3 部分秦岭野生蕙兰基因组 DNA 的检测结果

Table 3 Results of DNA extraction from wild *Cymbidium faberi* in Qinling Mountain

野生蕙兰编号 No. of <i>C. faberi</i>	OD ₂₆₀	OD ₂₈₀	OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀	DNA 质量浓度/(ng · μL ⁻¹) DNA concentration
1	5.659	3.862	1.47	282.9
2	6.140	3.019	2.03	307.0
3	20.465	10.279	1.99	1 023.3
4	19.255	10.216	1.88	962.8
5	5.738	2.995	1.92	286.9
6	7.814	4.062	1.92	390.7
7	7.555	3.843	3.84	377.8
8	14.363	8.070	1.78	718.2



图 1 部分秦岭野生蕙兰基因组 DNA 的电泳图谱

Fig. 1 Electrophoretogram of genomic DNA from wild *Cymbidium faberi* in Qinling Mountain

电泳结果(图 2)显示,1~16 号试验中,除 13 号外其余 15 个试验均可得到扩增条带;其中 4 和 14 号试验的条带为 2 条,重复性较差;其余试验均产生了 3~5 条条带,但有的试验扩增条带模糊,重复性不好。

参考电泳条带、清晰度和重复性 3 个评价指标的分析结果(表 4),由极差大小可以看出,模板用量对扩增结果影响最大,其次为引物浓度,再次为 *Taq*

DNA 酶用量和 dNTPs 浓度, Mg^{2+} 浓度对扩增结果的影响最小。从反应体系看,当模板用量较少时,扩增效果不好;当用量较多时,扩增效果较好,且与引物、*Taq* DNA 聚合酶、dNTPs 和 Mg^{2+} 4 个成分相比,在 $\alpha=0.05$ 水平下达到了极显著差异。因此 RAPD 反应的 5 个因子中,模板 DNA 用量为主效因子。

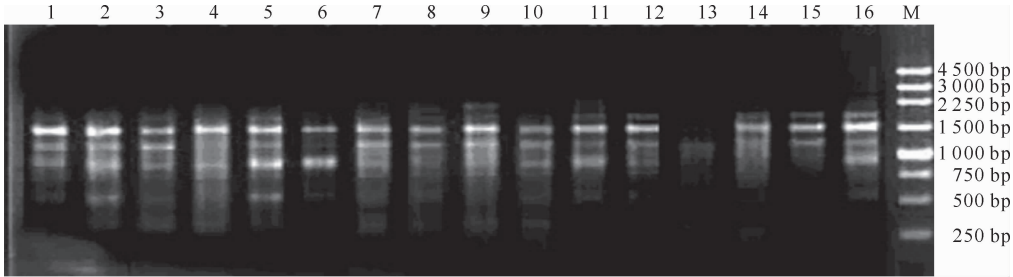


图 2 16 个正交试验组合下秦岭野生蕙兰的 RAPD-PCR 扩增结果(引物 S12)
1~16. 对应表 2 中 16 个试验处理;M. Marker

Fig. 2 RAPD-PCR amplification results of wild *Cymbidium faberi* in Qinling Mountain
of 16 experimental combinations (Primer S12)

1—16. Correspond to 16 experimental treatments of table 2;M. Marker

表 4 秦岭野生蕙兰 RAPD-PCR 扩增体系的正交试验结果

Table 4 Orthogonal test results of RAPD-PCR amplifications system from wild *Cymbidium faberi* in Qinling Mountain

处理编号 No	因素 Factor					条带数(B) Channel	清晰度(C) Definition	重复性(R) Repeatability	综合指数(I) Comprehensive index
	dNTPs	Mg^{2+}	引物 Primer	DNA 模板 Template DNA	<i>Taq</i> 酶 <i>Taq</i> polymerase				
1	1	1	1	1	1	4	0.8	0.8	2.56
2	1	2	2	2	2	4	1	1	4
3	1	3	3	3	3	4	0.8	0.8	2.56
4	1	4	4	4	4	2	0.5	0.5	0.5
5	2	1	2	3	4	5	1	1	5
6	2	2	1	4	3	4	0.8	0.5	1.6
7	2	3	4	1	2	3	0.5	0.5	0.75
8	2	4	3	2	1	3	0.5	0.5	0.75
9	3	1	3	4	2	3	0.5	0.5	0.75
10	3	2	4	3	1	4	0.8	0.8	2.56
11	3	3	1	2	4	5	0.8	0.8	3.2
12	3	4	2	1	3	4	0.5	0.5	1
13	4	1	4	2	3	0	0.5	0.5	0
14	4	2	3	1	4	2	0.5	0.5	0.5
15	4	3	2	4	1	3	0.8	0.8	1.92
16	4	4	1	3	2	5	1	0.8	4
均值 1 Mean 1	2.405	2.078	2.840	1.203	1.948				
均值 2 Mean 2	2.025	2.165	2.980	1.988	2.375				
均值 3 Mean 3	1.877	2.107	1.140	3.530	1.290				
均值 4 Mean 4	1.605	1.563	0.953	1.192	2.300				
极差 Range	0.800	0.602	2.027	2.338	1.085				

通过正交试验综合比较认为,秦岭野生蕙兰 RAPD-PCR 反应的优化体系为:反应体系 25 μ L,其中 dNTPs 浓度 0.16 mmol/L, Mg^{2+} 浓度 1.5~2.5

μ mol/L,模板 DNA 用量 100 ng,引物浓度 0.4 μ mol/L,*Taq* DNA 聚合酶用量 1.5~2.5 U,10 $\times$ Buffer 缓冲液 2.5 μ L,加入灭菌超纯水至 25 μ L。

2.3 秦岭野生蕙兰 RAPD-PCR 反应体系优化的单因素试验

2.3.1 dNTPs 浓度 dNTPs 浓度直接影响 PCR 扩增产物的合成。试验结果(图 3)表明,当 dNTPs 为 0.12 mmol/L 时,产生的条带较少且弱,条带长度集中在 1 500 bp 左右,未产生小片段的条带;dNTPs 浓度为 0.16~0.20 mmol/L 时,产生的条带多且清晰,均能得到理想的扩增产物且都有小片段产生;当 dNTPs 浓度为 0.24 mmol/L 时,扩增产物明显减少,条带不清晰且出现弥散状。因此,dNTPs 的浓度以 0.20 mmol/L 为最适值。

2.3.2 Mg²⁺ 浓度 Mg²⁺ 的浓度对 RAPD 反应的

特异性和扩增效率均有影响,其浓度过高会使非特异扩增产物增加或导致扩增失败,浓度过低会使扩增产物减少导致扩增反应失败。本试验共设置了 4 个 Mg²⁺ 浓度水平进行筛选,结果(图 4)表明,在所设浓度范围内均能产生扩增条带。当 Mg²⁺ 浓度为 1.5 μmol/L 时,扩增条带不清晰且出现弥散状,相对于其他浓度产生的条带较少;在浓度为 2.0~3.0 μmol/L 时,产生的条带数基本相同,但相对而言,浓度为 2.0 μmol/L 时条带出现弥散状,浓度为 3.0 μmol/L 时扩增产物清晰且稳定。从试验效果及成本考虑,2.5 μmol/L 的 Mg²⁺ 浓度即可达到理想的扩增效果。

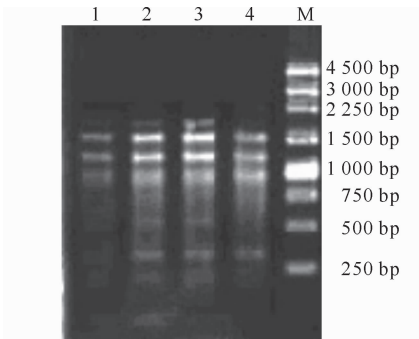


图3 dNTPs浓度对扩增结果的影响
1.0.12 mmol/L; 2.0.16 mmol/L; 3.0.20 mmol/L;
4.0.24 mmol/L; M.Marker
Fig.3 Effect of different dNTPs
concentration to amplification results
1.0.12 mmol/L; 2.0.16 mmol/L; 3.0.20 mmol/L;
4.0.24 mmol/L; M.Marker

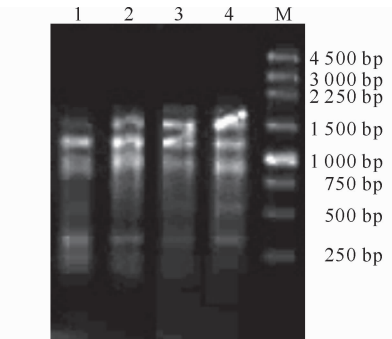


图4 Mg²⁺浓度对扩增结果的影响
1.1.5 μmol/L; 2.2.0 μmol/L; 3.2.5 μmol/L;
4.3.0 μmol/L; M.Marker
Fig.4 Effect of different Mg²⁺
concentration to amplification results
1.1.5 μmol/L; 2.2.0 μmol/L; 3.2.5 μmol/L;
4.3.0 μmol/L; M.Marker

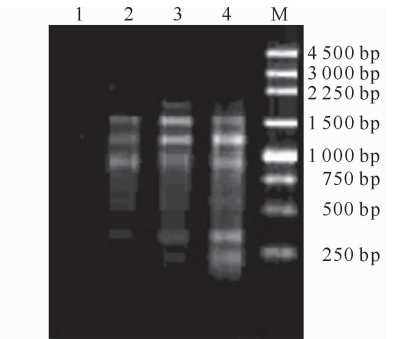


图5 引物浓度对扩增结果的影响
1.0.2 μmol/L; 2.0.4 μmol/L; 3.0.6 μmol/L;
4.0.8 μmol/L; M.Marker
Fig.5 Effect of different Primer
concentration to amplification results
1.0.2 μmol/L; 2.0.4 μmol/L; 3.0.6 μmol/L;
4.0.8 μmol/L; M.Marker

2.3.3 引物浓度 试验结果(图 5)表明,引物浓度为 0.2 μmol/L 时,无扩增产物出现;引物浓度为 0.4 μmol/L 时,扩增条带清晰但相对较弱,各条带扩增量明显少于其余浓度的扩增量;当浓度为 0.6 和 0.8 μmol/L 时均扩增出 5 条条带,但与浓度 0.8 μmol/L 时相比,引物浓度为 0.6 μmol/L 时扩增出了更多大片段产物,且带型清晰,重复性好。引物浓度为 0.8 μmol/L 时出现非特异性扩增,且伴有弥散状。因此,本研究认为 0.6 μmol/L 的引物浓度为最适值。

2.3.4 模板用量 由图 6 可见,模板 DNA 的 4 个用量水平均能产生扩增条带,在其用量为 60, 80 和 120 ng 时均扩增出了 4 条条带,带型重复性好但不清晰,且在用量为 120 ng 时带型出现弥散。而模板用量为 100 ng 时,可扩增出 5 条条带,重复性好且清晰。由此可以认为,模板用量为 100 ng 时获得的扩增效果最好。

2.3.5 Taq DNA 聚合酶用量 试验结果(图 7)表明,在 Taq DNA 聚合酶用量为 1.0 U 时缺失大部分扩增条带,而其用量为 1.5, 2.0 和 2.5 U 时均有清晰带型出现,但用量为 2.0 和 2.5 U 时扩增带型的清晰度、重复性、稳定性明显不如 1.5 U 时好。因此本研究选择的最佳 Taq DNA 聚合酶用量为 1.5 U。

2.4 正交试验与单因素试验 RAPD-PCR 体系优化结果的比较

从表 4 和图 2~7 可以看出,正交试验与单因素试验得到的结果基本一致,说明在 RAPD-PCR 反应体系的优化中,正交试验设计和单因素试验设计均能取得理想的试验结果,且能达到优化体系的目的。但就试验本身而言,单因素试验比较耗时耗力,且在反应过程中没有考虑到各个反应物的动态相互作用,而正交试验正好可以克服这一缺点^[16]。利用正交试验,不仅得到了理想的试验结果,且在一定程度上体现了各反应物对试验结果的影响程度。

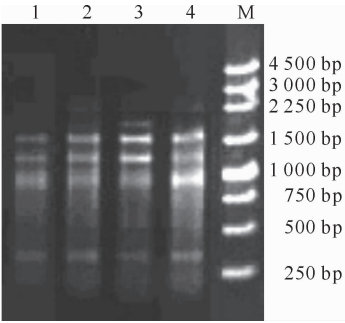


图 6 模板用量对扩增结果的影响

1. 60 ng;2. 80 ng;3. 100 ng;4. 120 ng;M. Maker

Fig. 6 Effect of different template DNA on amplification results

1. 60 ng;2. 80 ng;3. 100 ng;4. 120 ng;M. Maker

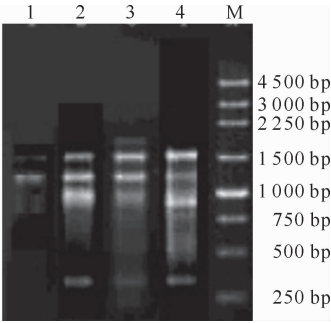


图 7 *Taq* 酶用量对扩增结果的影响

1. 1.0 U;2. 1.5 U;3. 2.0 U;4. 2.5 U;M. Maker

Fig. 7 Effect of different *Taq* DNA polymerase on amplification results

1. 1.0 U;2. 1.5 U;3. 2.0 U;4. 2.5 U;M. Maker

2.5 秦岭野生蕙兰 RAPD-PCR 反应体系的验证

从图 8~10 可以看出,优化的秦岭野生蕙兰 RAPD 反应体系的扩增结果均比较理想,扩增的多态性明显,条带清晰,重复性好。图 8~10 中所用的引物不同,所用材料也来自不同的自然分布区,表明

所优化的 RAPD 反应体系对不同引物、不同材料的扩增效果均良好,能够达到试验目的。因此认为,以上试验所优化的 RAPD 反应体系,可用于秦岭野生蕙兰的 RAPD 扩增分析。

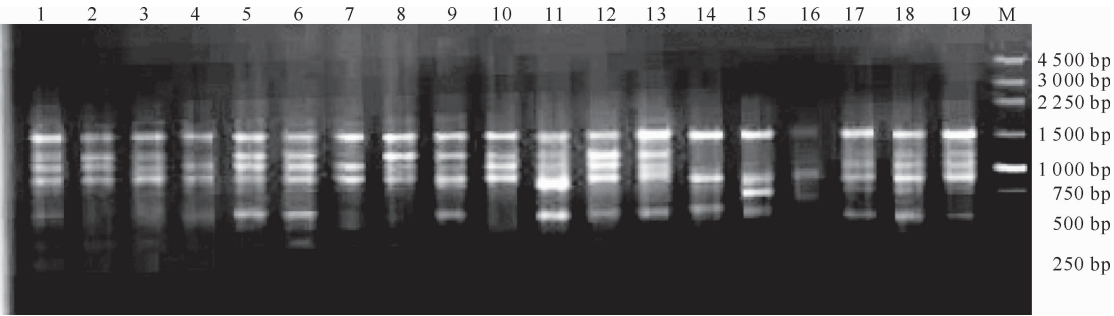


图 8 引物 S12 对秦岭野生蕙兰 RAPD-PCR 的扩增效果

1~16. 来自于镇安的野生蕙兰材料;17~19. 来自于柞水的野生蕙兰材料;M. Marker

Fig. 8 RAPD-PCR amplification results of wild *Cymbidium faberi* in Qinling Mountain from primer S12

1—16. Material comes from Zhenan;17—19. Material comes from Zhashui;M. Marker

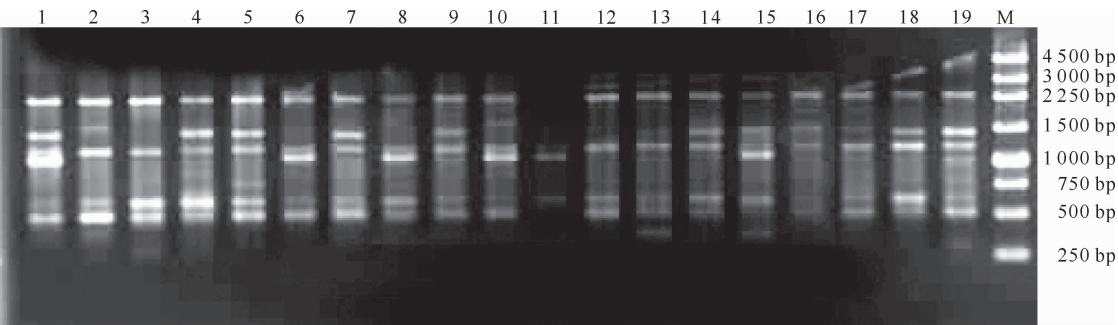


图 9 引物 S67 对秦岭野生蕙兰 RAPD-PCR 的扩增效果

1~14. 来自于丹凤的野生蕙兰材料;15~19. 来自于山阳的野生蕙兰材料;M. Marker

Fig. 9 RAPD-PCR amplification results of wild *Cymbidium faberi* in Qinling Mountain from primer S67

1—14. Material comes from Danfeng;15—19. Material comes from Shanyang;M. Marker

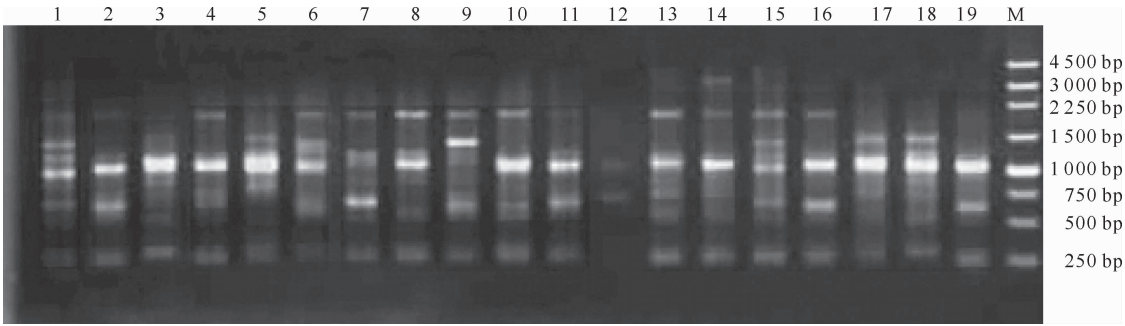


图 10 引物 S293 对秦岭野生蕙兰 RAPD-PCR 的扩增效果
1~19. 来自商南的野生蕙兰材料;M. Marker

Fig. 10 RAPD-PCR amplification results of wild *Cymbidium faberi* in Qinling Mountain from primer S293
1—19. Materials all come from Shangnan;M. Marker

3 讨论与结论

单因素试验法是传统的分子标记反应体系的筛选方法,其通过分析每一组分的最佳用量而组合成为最佳反应体系^[17]。这种方法的优点在于试验进展快速,在短时间内即可得到一个反应体系,但获得的信息量显然较少,也不能考察 PCR 体系中各组分的交互作用。而采用正交试验设计具有试验规模和工作量小、信息量大,且能快速获得试验结果的优点^[18],可弥补单因素设计的不足,从而提高 RAPD-PCR 反应体系的科学性和可靠性。本研究分别通过正交试验和单因素试验 2 种方法对秦岭野生蕙兰的 RAPD-PCR 反应体系进行了优化,二者所得结果基本一致。

经验证试验分析,优化的 RAPD 反应体系对于不同的引物及不同来源的秦岭野生蕙兰材料,均能获得比较理想的 RAPD 扩增效果,能够得到多态性好、清晰度高、重复性好的条带。综合考虑各种因素,最终确定的秦岭野生蕙兰 RAPD-PCR 反应的优化体系为:25 μ L 反应体系中,dNTPs 浓度为 0.16 mmol/L,Mg²⁺ 浓度为 2.5 μ mol/L,模板 DNA 用量为 100 ng,引物浓度为 0.6 μ mol/L,Taq DNA 聚合酶用量为 1.5 U,10 $\times$ Buffer 缓冲液为 2.5 μ L,最后加入灭菌超纯水至 25 μ L。PCR 反应程序为:94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min,94 $^{\circ}$ C 变性 1 min,37 $^{\circ}$ C 退火 40 min,72 $^{\circ}$ C 延伸 1.5 min,40 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。由正交试验结果分析还可发现,模板质量浓度对 RAPD-PCR 反应结果的影响最大且达到极显著差异,各因素的影响程度依次为:模板 DNA 用量>引物浓度>Taq DNA 聚合酶用量>dNTPs 浓度>Mg²⁺ 浓度。

[参考文献]

[1] 马诚超. 浅谈秦岭的地理分界意义 [J]. 宿州学院学报, 2007, 22(4):109-110.
Ma C C. A brief talk on Qinling's geographic significance [J]. Journal of Suzhou University, 2007, 22(4):109-110. (in Chinese)

[2] 王冬梅,李登武,胡春萍. 秦岭地区百合科药用植物资源多样性及其评价 [J]. 西北师范大学学报:自然科学版, 2007, 43(4):79-84.
Wang D M, Li D W, Hu C P. The diversity and evaluation of Liliaceae medicinal plants resources in Qinling Mountain [J]. Journal of Northwest Normal University: Natural Science Edition, 2007, 43(4):79-84. (in Chinese)

[3] 杨璐,侯必博,刘占林. 秦岭地区被子植物的特有现象研究 [J]. 湖南农业科学, 2009(6):15-19.
Yang L, Hou B B, Liu Z L. The endemic phenomenon of angiosperms in Qinling area [J]. Hunan Agricultural Sciences, 2009(6):15-19. (in Chinese)

[4] 杨新军,李同升. 秦岭国家级生态功能区生态旅游开发与保护 [J]. 水土保持通报, 2004, 24(3):64-67.
Yang X J, Li T S. Exploration and protection of eco-tourism resources in Qinling National Ecological Function Zone [J]. Bulletin of Soil and Water Conservation, 2004, 24(3):64-67. (in Chinese)

[5] 陈心启,吉占和. 中国兰花全书 [M]. 北京:中国林业出版社, 1998.
Chen X Q, Ji Z H. China encyclopedia of and orchid [M]. Beijing:China's Forestry Press, 1998. (in Chinese)

[6] Williams J G K. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers [J]. Nucleic Acid Res, 1990, 18(22):6531-6535.

[7] 梁红建,刘敏,钟志宇,等. 中国部分兰花品种 RAPD 分析 [J]. 园艺学报, 1996, 23(4):365-370.
Liang H J, Liu M, Zhong Z Y, et al. Identificaiton and classification of Chinese *Cymbidium* with RAPD [J]. Acta Horticulturae Sinica, 1996, 23(4):365-370. (in Chinese)

[8] 周辉,赵福宽,林成,等. 南瓜 RAPD 分析体系的优化 [J]. 云南农业大学学报, 2005, 20(2):172-177.

Zhou H,Zhao F K,Lin C,et al. Optimization of RAPD analysis system in squash [J]. Journal of Yunnan Agricultural University,2005,20(2):172-177. (in Chinese)

[9] 李冬梅,朱根发,叶庆生. 大花蕙兰基因组 DNA 提取及 RAPD 反应条件探索 [J]. 热带亚热带植物学报,2006,14(1):25-30.
Li D M,Zhu G F,Ye Q S. Genomic DNA extraction and RAPD protocols for *Cymbidium hybridism* [J]. Journal of Tropical and Subtropical Botany,2006,14(1):25-30. (in Chinese)

[10] 金则新,李钧敏. 七子花种群遗传多样性的 RAPD 分析 [J]. 林业科学,2004,40(4):68-74.
Jin Z X,Li J M. RAPD analysis on genetic diversity of populations of *Heptacodium miconioides* [J]. Scientia Salvage Sinicae,2004,40(4):68-74. (in Chinese)

[11] 刘青林,陈俊愉. 梅花亲缘关系 RAPD 研究初报 [J]. 北京林业大学学报,1999,21(2):81-85.
Liu Q L,Chen J Y. A preliminary research on the relationship of *Prunus mume cultivars* and its close relatives by using RAPD assay [J]. Journal of Beijing Forestry University,1999,21(2):81-85. (in Chinese)

[12] 明 凤,董玉光,娄玉霞,等. 蝴蝶兰不同花色品种遗传多样性的 RAPD 分析 [J]. 上海农业学报,2003,19(2):44-47.
Ming F,Dong Y G,Lou Y X,et al. RAPD analysis on genetic diversities of *Phalaenopsis* varieties with different flower colors [J]. Acta Agriculturae Shanghai,2003,19(2):44-47. (in Chinese)

[13] 丁 鸽,丁小余,沈 洁,等. 铁皮石斛野生居群研究:Ⅳ. PAPD 反应体系的构建与优化 [J]. 南京师大学报:自然科学版,2006,29(1):84-88.
Ding G,Ding X Y,Shen J,et al. Studies of wild populations of *Dendrobium officinale*: Ⅳ. Establishment and optimization of PAPD reaction system [J]. Journal of Nanjing Normal University:Natural Science Edition,2006,29(1):84-88. (in Chinese)

[14] 普晓兰,李 鹏,杜 凡. 巨龙竹基因组 DNA 的提取及 RAPD 反应条件的优化 [J]. 昆明理工大学学报,2003,28(1):127-131.
Pu X L,Li P,Du F. Extraction of genomic DNA and optimization of RAPD condition for *Dendrocalamus sinicus* Chia et J L Su [J]. Journal of Kunming University of Science and Technology,2003,28(1):127-131. (in Chinese)

[15] 陈 阳,周先治,吴宇芬,等. 花椰菜 RAPD-PCR 反应体系的优化 [J]. 江西农业学报,2010,22(11):5-7.
Chen Y,Zhou X Z,Wu Y F,et al. Optimization of RAPD-PCR reaction system in cauliflower [J]. Acta Agriculturae Jiangxi,2010,22(11):5-7. (in Chinese)

[16] 俞渭江. 生物统计附试验设计 [M]. 北京:高等教育出版社,1993:97-99.
Yu W J. Biological statistics experimental design with [M]. Beijing:Higher Education Press,1993:97-99. (in Chinese)

[17] 郭大龙,罗正荣. 部分柿属植物 SRAP-PCR 反应体系的优化 [J]. 果树学报,2006,23(1):138-141.
Guo D L,Luo Z R. Optimization of SRAP-PCR in some *Diospyros* spp [J]. Journal of Fruit Science,2006,23(1):138-141. (in Chinese)

[18] 孙宪芝,王晓菡,马 燕,等. 应用正交设计建立芍药的 SRAP 反应体系 [J]. 华北农学报,2008,23(52):198-200.
Sun X Z,Wang X H,Ma Y,et al. Establishment of the SRAP reaction system of *Paeonia lactiflora* Pall by orthogonal design [J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica,2008,23(52):198-200. (in Chinese)

(上接第 86 页)

[20] 张晓霞,丁友芳,史玲玲,等. 京西葛组织培养及快速繁殖研究 [J]. 北京林业大学学报,2010,32(5):138-143.
Zhang X X,Ding Y F,Shi L L,et al. Tissue culture and rapid propagation of *Pueraria lobata* [J]. Journal of Beijing Forestry Univer sity,2010,32(5):138-143. (in Chinese)

[21] 曹孜义,刘国民. 实用植物组织培养技术教程 [M]. 甘肃兰州:甘肃科学技术出版社,1996:45-50.
Cao Z Y, Liu G M. The practical course of the plant tissue culture [M]. Lanzhou,Gansu:Gansu Science and Technology Press,1996:45-50. (in Chinese)

[22] Maza M P,Zamora R,Alaiz M,et al. Carob bean germ seed (*Ceratonia siliqua* L.): Study of the oil and protein [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture,1989,46(4):495-502.

[23] 陶延珍,李 枫,李 毅. 箭杆杨组织培养再生体系的建立 [J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版,2008,36(3):203-207.
Tao Y Z,Li F, Li Y. Establishment of tissue culture regeneration system of *Populus nigra* var *thevestina* [J]. Journal of Northwest A&F University: Nat Sci Ed,2008,36(3):203-207. (in Chinese)