

回归分析在辣椒品种 RAPD 反应体系优化中的应用*

张子学^{1,2}, 侯喜林^{1**}

(1 南京农业大学作物遗传与种质创新国家重点实验室, 江苏 南京 210095;

2 安徽科技学院, 安徽 凤阳 233100)

摘要:以辣椒 (*Capsicum annuum* L.) 为材料, 采用回归分析的方法对 RAPD 体系进行优化研究。结果表明在体积为 20 μ l 反应体系中, 主要因子的优化组合是: Mg^{2+} 、dNTP、Taq 酶、引物、模板 DNA 等的浓度分别为 3 mmol/L、0.3 mmol/L、1.3 U、0.4 μ mol/L 和 64 ng; 热循环程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 40 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 90 s, 47 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。通过对 24 个辣椒品种进行遗传多样性分析, 证明该优化体系是稳定可靠的。

关键词:辣椒; RAPD 体系; 回归分析

中图分类号: Q 946

文献标识码: A

文章编号: 0253-2700(2005)04-0425-08

Optimization of Applying Regressive Analysis to RAPD Reaction System in Studying Cultivars of *Capsicum annuum*

ZHANG Zi-Xue^{1,2}, HOU Xi-Lin^{1**}

(1 National Key Laboratory of Crop Genetics and Germplasm Enhancement, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2 Anhui Science and Technology University, Fengyang 233100, China)

Abstract: Optimized RAPD system with the aid of regressive was used in studying cultivars of *Capsicum annuum* L. The results indicated that concentrations of Mg^{2+} , dNTP, Taq polymerase, primer, template DNA were 3 mmol/L, 0.3 mmol/L, 1.3 U, 0.4 μ mol/L, 64 ng respectively in 20 μ l reaction system and thermal cycle program was 1 cycle of denaturing for 2 min at 94 $^{\circ}$ C, 47 cycles of denaturing for 30 s at 94 $^{\circ}$ C, annealing for 1 min at 40 $^{\circ}$ C, primer extension for 90 s at 72 $^{\circ}$ C and the last cycle of extension for 10 min at 72 $^{\circ}$ C. The RAPD reaction system identified by genetic diversity analysis of 24 *Capsicum* cultivars was stable and dependable.

Key words: *Capsicum annuum*; RAPD system; Regressive analysis

随机扩增多态 DNA 技术, 简称“RAPD”(Random Amplified Polymorphic DNA) 自 Wil-

* 基金项目: 安徽省教育厅项目(2002JK074, 2004JK086) 安徽省科技厅项目(04023069) 和南京农业大学国家重点实验室开放基金项目(ZW2002006)

** 通讯作者: Author of correspondence. E-mail: hxl@njau.edu.cn

收稿日期: 2004-12-06, 2005-05-28 接受发表

作者简介: 张子学(1956-)男, 教授, 主要从事蔬菜遗传育种工作。

liams 等 (1990) 创立以来, 由于其与 RFLP、AFLP 等其他技术相比, 具有操作简便快速、自动化程度高、通用性好、不受研究对象已有分子研究基础的限制、对模板 DNA 需求量小、量要求低、不接触放射性等多种优点。该技术被广泛应用于动植物和微生物的遗传多样性分析、亲缘关系鉴定 (韩春艳, 2004; 张凤琴等, 2004), 遗传多样性分析 (苏志龙等, 2005; 周利杰等, 2005) 品种 (品系) 鉴定 (陈吉岳等, 2004) 等方面, 但其稳定性较差。影响 RAPD 反应体系稳定的因素很多, 主要有 Mg^{2+} 、dNTP、Taq 酶、引物和模板浓度以及热循环体系中的退火温度和循环次数等。有关 RAPD 体系优化研究, 虽已有一些报道 (王得元等, 2001; 李先平等, 2000; 安德荣等, 2001; Benter 等, 1995) 但都停留在宏观的经验方面, 尚未见有进行诸因子的作用大小、因子间的相互作用以及各因子与目标函数之间的稳定性和数量优化研究的报道。本研究中采用逐步回归分析的方法对 RAPD 反应体系进行优化, 并应用于辣椒遗传多样性分析的实践中, 为提高 RAPD 稳定性和可重复性开辟了新途径。

1 材料与方法

1.1 材料

RAPD 体系优化试验选用的凤椒 1 号辣椒品种为安徽技术师范学院育成, 2002 年通过鉴定的质核互作雄性不育系 \times 恢复系的 F_1 为模板 DNA, 在初步掌握辣椒 PCR 反应体系构成和引物筛选条件的基础上, 采用扩增条带较多的 OP AH02 引物, 进行体系各方面条件优化。选用 24 个辣椒品种 (表 1), 对筛选出的 28 条引物具有多态性的扩增结果, 进行遗传多样性分析, 对优化体系进行验证。

表 1 辣椒参试品种类型及其来源

Table 1 Types and origin of trial varieties in *Capsicum*

编号	品种名称	类型	来源	编号	品种名称	类型	来源
1	8819	长椒	西安市种子公司	13	黄牛角椒	长椒	湖南农业大学
2	上海茄门	甜椒	上海农科院	14	96-4C	甜椒	安徽技术师范学院
3	碭引 1 号	甜椒	碭山县种子公司	15	98-6C	甜椒	安徽技术师范学院
4	紫甜椒	甜椒	蚌埠市科技园	16	黑壳早	长椒	徐州市种子公司
5	紫簇生椒	簇生椒	安徽技术师范学院	17	苏引 5 号	长椒	江苏农科院
6	萧引 1 号	甜椒	萧县辣椒制种基地	18	奶油甜椒	甜椒	蚌埠市科技园
7	萧引 2 号	甜椒	萧县辣椒制种基地	19	丰县羊角椒	长椒	丰县种子公司
8	萧引 3 号	甜椒	萧县辣椒制种基地	20	农大 40	甜椒	中国农科院
9	四叶椒	长椒	寿县种子公司	21	光叶簇生椒	簇生椒	凤阳县种子公司
10	黄甜椒	甜椒	蚌埠市科技园	22	毛叶簇生椒	簇生椒	安徽技术师范学
11	黄壳早	长椒	徐州市种子公司	23	碭引 2 号	长椒	碭山县种子公司
12	黄簇生椒	簇生椒	四川重庆	24	紫叶线椒	长椒	安徽技术师范学院

在 RAPD 体系中采用的 Mg^{2+} 、PCR 缓冲液、Taq 酶均购自 Takara 公司, 引物、dNTP 分别购自 Operon 公司和上海生物工程有限公司。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取 采用 Pich 等 (1993) 的 N2-SDS 法, 并略加改动, 利用辣椒新鲜幼嫩果皮, 提取过程中省去 PVP 脱色素, DNA 溶解于 TE 中, -20°C 保存备用。

1.2.2 试验设计 PCR 体系优化采用二因子全实施和单个因子的试验, 包括: Mg^{2+} 与 dNTP 浓度、Taq 酶与引物浓度、DNA 浓度、循环次数和退火温度等研究内容, 其因子水平见表 2, 以上各因子在不参与优化时, 25 μl 的反应中分别控制在 2.5 mmol/L、0.3 mmol/L、1 U、0.3 $\mu\text{mol/L}$ 、60 ng、40 次和 40°C 。采取分步研究, 每个处理 2 次重复。电泳无带的处理, 其扩增产物为零, 扩增产物为零的处理因无法参与回归运算而舍去。

表 2 辣椒 RAPD 体系的因子及其水平

Table 2 Factors and their levels of RAPD system in *Capsicum*

	因 子 水 平				
	2.0	2.5	3.0	3.5	
MgCl ₂ (mmol/L)	2.0	2.5	3.0	3.5	
dNTP (mmol/L)	0.15	0.225	0.3	0.375	
Taq 酶 (U)	0.25*	0.5	1.0	1.5	
引物 (μmol/L)	0.1	0.2	0.4	0.6	
DNA (ng)	15	30	60	120	240
循环量 (次)	30	35	40	45	50
退火温度 (°C)	34.0	35.1	37.8	40.7	43.5 45.7
	34.3	36.4	39.3	42.1	44.8 46.0

说明：“*”：该因子水平的所有处理组合均无扩增产物（舍弃）。

1.2.4 扩增产物的定量分析 采用 λDNA 建立标准曲线，每次扩增产物的电泳以 150 ng λDNA 进行标定，确定各处理扩增产物的产量。

1.2.5 回归优化分析 采用曾成秋（1988）逐步回归分析的方法建立模型，因子入选标准 $F = 0.5$ ，分别建立方程，最后对入选因子进行优化分析。

1.2.6 遗传多样性的随机引物筛选 从 112 条能够扩增产物的随机引物中筛选出 28 条多态性和重复性强的引物。

1.2.7 遗传多样性的分析方法 每个品种根据扩增条带的有无分别记为 1 和 0，品种间的遗传相似系数： $GS = 2N_{ij} / (N_i + N_j)$ ，其中 N_{ij} 为 2 个品种共有的带数， N_i 、 N_j 分别代表成对比较的 2 个品种的总带数。采用卢崇飞等（1988）相似系数 1 次成型法构建聚类图。

2 结果与分析

2.1 RAPD 体系优化分析

2.1.1 Mg²⁺ 和 dNTP 浓度的优化 首先通过对 Mg²⁺ 和 dNTP 浓度进行逐步回归分析，结果表明二者之间符合 $y = -1085.1 + 886.27x_1 + 846.98x_2 - 178.08x_1^2 - 4635.2x_2^2 + 656.43x_1x_2$ ($F = 27.17$) 回归达极显著水平，可以用于预测和控制，通过对偏回归系数的标准化分析表明，二者及互作对目标函数的作用大小的比较关系为：Mg²⁺ > dNTP > 二者的互作效应。分别对 x_1 和 x_2 求一阶导数得方程组：

$$\begin{cases} -356.16x_1 + 656.43x_2 + 886.27 = 0 & (1) \\ -9270.4x_2 + 656.43x_1 + 846.98 = 0 & (2) \end{cases}$$

解之得：当在 20 μl 的反应体系中添加 3.05 mmol/L Mg²⁺ 和 0.3076 mmol/L dNTP 时，扩增产物的产量达到或接近极大值（399.03 ng）。

从图 1 中也可以看出：在 Mg²⁺ 2.5 ~ 3.5 mmol/L 和 dNTP 0.225 ~ 0.375 mmol/L 范围内均能扩增出较为一致的条带，但也有一定的差异，在此范围内，随着 dNTP 浓度的增加，扩增条带数呈下降的趋势。同时，在同一 dNTP 浓度下，随着 Mg²⁺ 浓度的增加，扩增条带数呈增加的趋势。

2.1.2 Taq 酶与引物浓度的优化 从 Taq 酶与引物（Primer）2 因子逐步回归分析表明，符合 $y = -931.20 + 1231.8x_1 + 2874.5x_2 - 415.16x_1^2 - 2880.8x_2^2 - 353.02x_1x_2$ ，($F = 19.43$) 回归极显著，通过求一阶偏导，得极大值点的坐标（1.306, 0.4189）。说明在 20 μl 的反应

1.2.3 PCR 扩增反应 扩增反应除温度梯度 PCR 在 PCR Biometra Tgradient 96 型上进行之外，其余的均在 M J Research 公司生产的 PTC-100™ 型热循环仪上进行。基本的热循环程序为：94℃ 预变性 2 min，94℃ 变性 30 s，40℃ 退火 1 min，72℃ 延伸 90 s，40 个循环，最后 72℃ 延伸 10 min。20 μl 反应体系，扩增产物用 1 倍 TAE 电泳缓冲液在 14 g/L 琼脂糖凝胶板上电泳，加样量 14 μl，电泳结束后，经溴化乙锭染色 30 min，而后采用 UPV imaging of laboratory 凝胶成像分析系统进行分析。

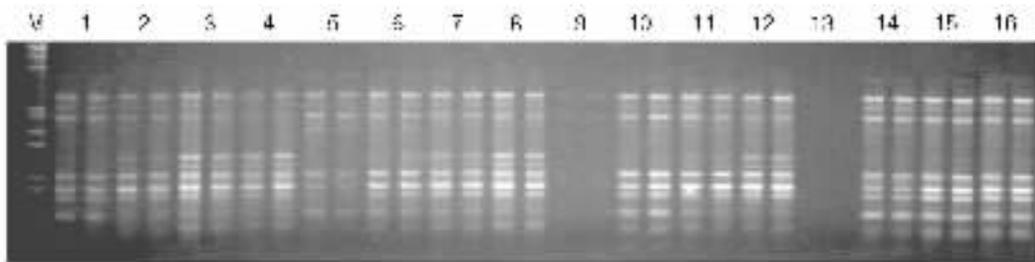


图1 不同 Mg²⁺ 和 dNTP 浓度对 RAPD 带型的影响

Fig. 1 Effect on RAPD profiles in different concentration of Mg²⁺ and dNTP in *Capsicum*

M: marker (λDNA/E coR1 + HindIII), 下同。1~4、5~8、9~12 和 13~16 分别用 0.15、0.225、0.30 和 0.375 mmol/L dNTP 处理；每种 dNTP 处理浓度内随编号从小到大 Mg²⁺ 处理浓度逐渐提高(表 2)。每个处理皆为 2 次重复。

体系中有 1.3 U Taq 酶活性和 0.4189 μmol/L 引物时，扩增产量最高。同时，通过对偏回归系数的标准化分析表明，二者及互作对目标函数的作用大小的比较关系为：引物 > Taq 酶 > 二者的互作效应。从图 2 也可以看出，在试验区间范围内，低浓度的 Taq 酶，需要有较高浓度的引物下，才能扩增出产物；在适宜的 Taq 酶浓度下，引物浓度低时，仅有少量大片段的扩增产物，且扩增产量较低；随着引物浓度的逐渐增加，扩增带数及扩增产量趋于稳定，当引物浓度超过一定量时，扩增大片段的产量相对下降，小片段的产量相对提高。这是由于引物浓度过高，在变性至复性的初始阶段，引物之间相互竞争，结合在同一模板片段不同位点引物数的概率增加，导致扩增大片段的延伸受阻、产率下降，小片段的产率相对提高。这也是 Bruno 等(1993)和顾红雅等(1995)所论述的造成 PCR 非特异性扩增的主要原因之一。

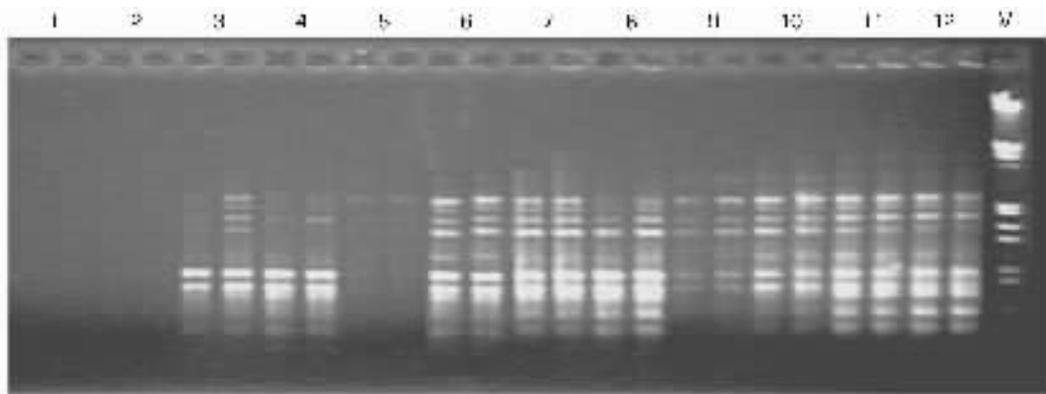


图2 不同 Taq 和 Primer 浓度对 RAPD 带型的影响

Fig. 2 Effect on RAPD profiles at different concentration of Taq enzyme and primer

1~4、5~8、9~12 为从低到高 3 种 Taq 酶处理浓度；每种 Taq 酶处理浓度内从小到大分为 4 种 Primer 处理浓度(表 2)。每个处理皆为 2 次重复。

2.1.3 循环量和模板 DNA 浓度的优化 对循环量和模板 DNA 浓度逐步回归分析表明：符合 $y = -455.73 + 223.90x_1 + 3.1283x_2 - 2.3388x_1^2 - 0.010136x_2^2 - 0.038825x_1x_2$, (F = 146.39)

回归极显著, 当 y 极大时, 循环量为 47 次, 模板 DNA 的浓度为 63.89 ng。根据标准化的偏回归系数可知, 其因子的作用大小比较关系为: 循环量 > 模板浓度 > 交互效应。从图 3 也可以看出这一点, 在整个区间范围内, 随着循环量的增加, 扩增产物的产量和扩增条带数有逐渐增加的趋势。当模板浓度在 15 ~ 120 ng, 循环量在 40 ~ 50 次时, 扩增带数基本相等, 但在模板浓度 240 ng 时, 循环量低于 40 次, 无可见的扩增产物带, 随着循环量的增加, 虽能扩增出产物, 但扩增产物的产量低, 且带数少。其原因是反应体系中模板、引物和 dNTP 都可与 Mg^{2+} 结合, Mg^{2+} 为 Taq 酶活性不可缺少的辅助因子, 由于模板浓度的过量提高, 使自由 Mg^{2+} 的浓度下降, 因而阻碍了 RAPD 反应。在其他条件不变时, 将 Mg^{2+} 浓度提高到 4 mmol/L, 其扩增产物及其条带数明显增加。但 Mg^{2+} 浓度过高也会增加引物的错配频率 (安德荣等, 2001, 张凤琴等, 2003)。

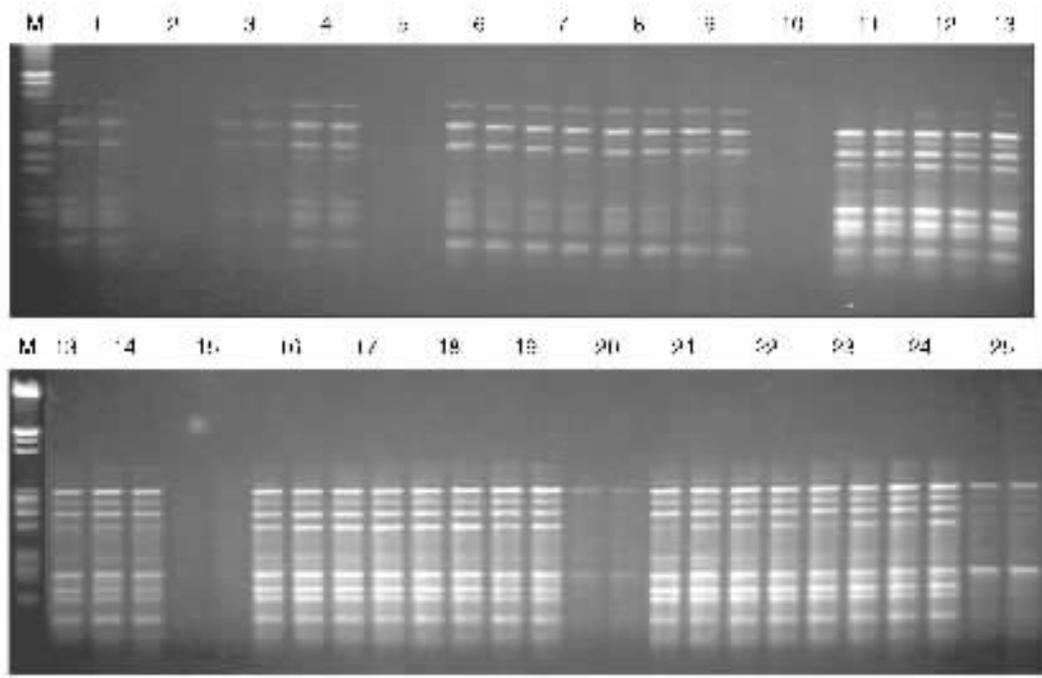


图 3 不同循环量和模板 DNA 浓度对 RAPD 带型的影响

Fig. 3 Effect on RAPD profiles at different cycle numbers and template DNA concentrations

1 ~ 5、6 ~ 10、11 ~ 15、16 ~ 20 和 21 ~ 25 分别为 30、35、40、45 和 50 次循环; 每种循环处理内从小到大分别为 5 种不同模板 DNA 浓度 (15、30、60、120 和 240 ng) 的处理组合。皆为 2 次重复。

2.1.4 退火温度的优化 从退火温度优化拟合分析表明, 在试验区间范围内, 符合 $y = -4.924x^2 + 393.63x - 7415.0$ 的二次曲线, 其最佳退火温度为 39.97℃。从图 4 可以看出, 在试验区间内, 退火温度低的情况下, 主要扩增产物是一些大片段, 而随着退火温度的逐渐提高, 扩增产物中大片段的比例逐渐减少, 而小片段的比例逐渐增多。同时, 在试验区间范围内, 随着退火温度的提高, 扩增条带数有逐渐增加的趋势。这是由于在退火温度较低的情况下, 虽然循环体系除退火温度不同外, 其余条件完全相同, 然而就是因为退火温度

低，从变性温度 94℃ 降到退火温度，再上升到延伸温度，所经历的时间延长，其结果引物与模板 DNA 结合和扩增产物延伸时间相对延长，导致扩增大片段产物较多，小片段很少或没有。相反，退火温度提高，从变性到延伸所经历的时间缩短，其结果扩增产物中小片段的比例增多，同时，由于扩增片段较小，GC 或 AT 碱基对比例相对增大，不同位点的扩增产物的相对差异增大，不同片段的泳动距离差异拉大，扩增带数增多。这与刘红彦等（2001）的观点是基本一致的。

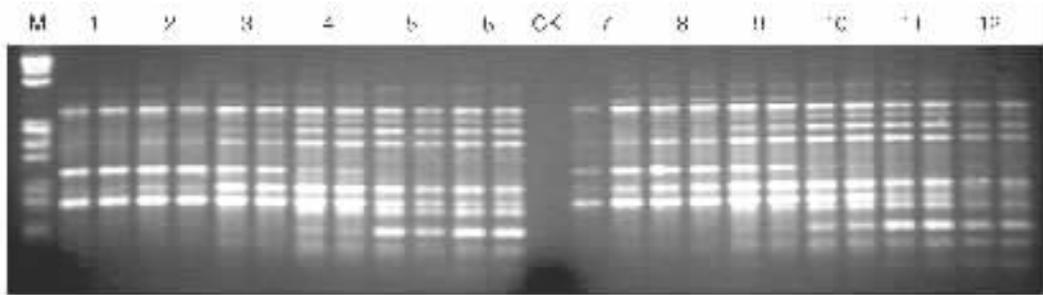


图 4 不同退火温度对 RAPD 带型的影响

Fig. 4 Effect on RAPD profiles in different annealing temperature

1~6、7~12 分别为从低到高 2 组不同的退火温度处理（表 2），每个处理皆为 2 次重复；CK：阴性对照。

2.2 供试品种的遗传多样性分析

2.2.1 RAPD 分析 通过 28 条随机引物对 24 个辣椒品种的 RAPD 分析，共扩增出 186 条 DNA 带，其中 165 条具有多态性，说明不同的辣椒品种之间的遗传多样性是很丰富的（图 5）。

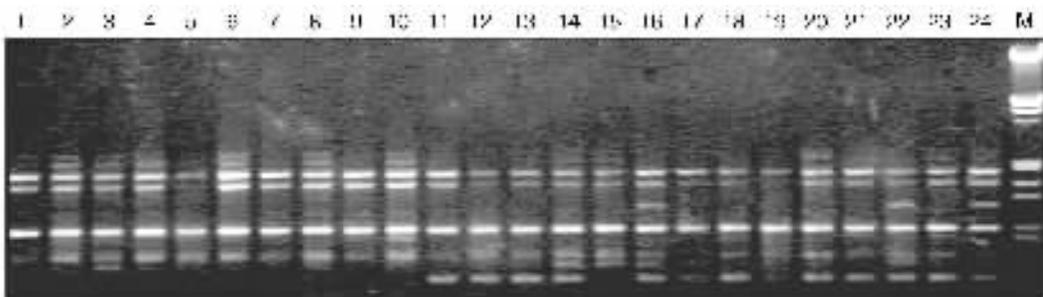


图 5 24 个辣椒品种的 DNA 采用随机引物 AW07 扩增的 RAPD 条带

Fig. 5 RAPD profiles amplified by random primer AW07 in 24 *Capsicum* varieties

2.2.2 聚类分析 24 个品种的聚类结果见图 6。在聚类域值 $\lambda = 0.630$ 时分为 3 大类群：簇生椒类型、甜椒类型和长椒类型，其中簇生椒与另外两类的遗传差异较为明显，说明簇生椒与其他两类在起源上分化较早，长椒和甜椒相对在起源上分化较晚，它们属于 *C. annuum* L. 的 3 个不同变种，这与栽培学上的分类是完全相符的。

簇生椒的遗传多样性 簇生椒共有 4 个品种，其中紫叶簇生椒与其他 3 种簇生椒的遗传差异较大，光叶簇生椒与毛叶簇生椒的遗传差异最小。

甜椒的遗传多样性 甜椒又可分为 2 个亚类，分别包含 5 个和 6 个品种。从图 6 可以

看出，亚类内不同品种间遗传相似性很高，而亚类间遗传差异则较为明显；这为甜椒不同品种间杂种优势利用提供了可能性。

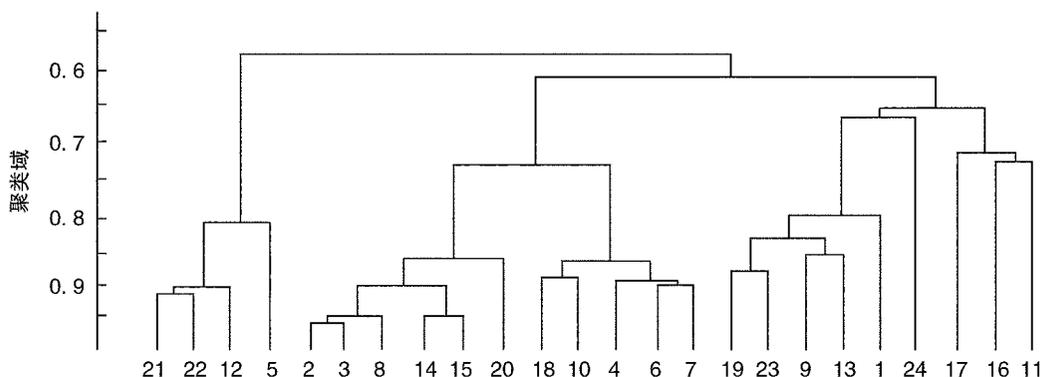


图 6 24 个辣椒品种的遗传关系聚类图

Fig. 6 Dendrogram of genetic relationships among 24 varieties of *Capsicum*

长椒的遗传多样性 长椒也可以分为两个亚类：长尖椒和棒形椒，分别包括 6 个和 3 个品种。由于长椒类的品种分别源于我国不同地区的地方品种，比甜椒具有更高的遗传多样性水平。这与 Lefebvre 等（1992）所报道结果是一致的，从一定程度上也反映出我国长椒资源的遗传多样性较为丰富。

3 讨论

RAPD 的反应程序是基于 PCR 反应体系的。因而该反应体系的优化便是获得理想的 RAPD 图谱的前提条件。本研究中从提高扩增产物的产量和稳定性出发，对辣椒 RAPD 体系中的 7 个因子进行了优化处理探索。该优化体系在 Mg^{2+} 浓度、退火温度和循环量方面略高于王得元等（2001），李先平等（2000），安德荣等（2001）的报道。在较高的 Taq 酶浓度时，扩增产物并不象安德荣等（2001）所报道的出现弥散现象，只是扩增产量下降，条带数减少。总之，在 RAPD 反应体系中， Mg^{2+} 、dNTP、Taq 酶、引物、模板 DNA 等的浓度、循环量和退火温度等方面都存在如何优化的问题。本文仅以扩增产物的产量作为目标函数进行优化，与最理想的体系尚有差距。我们认为以扩增产量、清晰度和稳定性为综合目标，编制应用程序分析软件，并引入凝胶成像分析系统，对人为可控因子水平进行合理量化，结合操作程序规范化，才能使 RAPD 技术更准确、更稳定，才能更好地应用于生物遗传育种研究。

4 结论

通过对辣椒 RAPD 反应体系的 7 个因子的优化分析表明，在 20 μ l 的反应体系中，优化组合是： Mg^{2+} 、dNTP、Taq 酶、引物、模板 DNA 等的浓度分别为 3 mmol/L、0.3 mmol/L、1.3 U、0.4 μ mol/L 和 64 ng；在热循环程序中其他参数相同的条件下，采用 40℃ 退火 1 min，47 个循环可以获得较为稳定、可靠的扩增产物。

在试验区间范围内，采用 2 因子或单因子的回归优化分析表明 Mg^{2+} 比 dNTP、引物比

Taq 酶、循环量比模板 DNA 浓度及其交互效应对扩增产量及稳定性影响更大, 交互效应的影响均最小; 退火温度的高低仅对扩增产量及条带数有一定影响。因此, 在 RAPD 反应体系优化过程中, 首先对 Mg^{2+} 、引物浓度和循环量进行优化, 可以取得事半功倍的效果。

应用本研究辣椒 RAPD 优化体系, 采用相似系数直接 1 次成型聚类法, 所得到的聚类结果与蔬菜栽培学各论(南方本)(浙江农业大学主编, 1993)的辣椒分类是一致的, 这说明采用该 RAPD 体系进行辣椒遗传多样性分析是可行的。

〔参 考 文 献〕

- 王得元, 张长远, 殷秋妙, 2001. 辣椒 RAPD 反应体系研究 [J]. 广东农业科学, (1): 21—22
- 卢崇飞, 高惠璇, 叶文虎编著, 1988. 环境数理统计学应用及程序 [M]. 北京: 高等教育出版社, 163—179
- 顾红雅, 瞿礼嘉, 明小天等编著, 1995. 植物基因与分子操作 [M]. 北京: 北京大学出版社, 121—124
- 浙江农业大学主编, 1993. 蔬菜栽培学各论(南方本)(第 2 版)[M]. 北京: 农业出版社, 229—230
- 曾成秋著, 1988. 数理统计程序设计与使用 [M]. 合肥: 安徽教育出版社, 104—124, 246—251
- An DR (安德荣), Cheng JH (程继红), Cheng ZM (成卓敏), *et al*, 2001. Study on some problems about the repeat ability of RAPD [J]. *Journal of Triticeae Crops* (麦类作物学报), 21(1): 14—18
- Benter T, Papadopoulos S, Pape M, *et al*, 1995. Optimization and reproducibility of random amplified polymorphic DNA in Human [J]. *Analytical Biochemistry*, 230: 92—100
- Bruno WS, Sobral R, Honeycutt J, 1993. High output genetic mapping of polyploids using PCR-generated markers [J]. *Theor Appl Genet*, 86: 105—112
- Chen JY (陈吉岳), Liu PG (刘培贵), Fu JG (付建国), *et al*, 2004. Distinguishing isolates of *Morchella* (Ascomycota) from China by RAPD [J]. *Acta Bot Yunnan* (云南植物研究), 26(4): 434—438
- Han CY (韩春艳), Sun WB (孙卫邦), Gao LM (高连明), 2004. Analysis of genetic diversity of *Trigonobalanus doichangensis* (Fagaceae) by RAPD [J]. *Acta Bot Yunnan* (云南植物研究), 26(5): 513—518
- Lefebvre V, Palloix A, Rives M, *et al*, 1992. Nuclear RFLP between pepper cultivars (*Capsicum annum* L.) [J]. *Euphytica*, 71(3): 189—199
- Li XP (李先平), He YK (何云昆), Sun ML (孙茂林), *et al*, 2000. A preliminary study on RAPD analysis protocol in potato [J]. *Southwest Chin J Agric Sci* (西南农业学报), 13(1): 59—64
- Liu HY (刘红彦), Niu Y C (牛永春), Zhong M (钟鸣), 2001. Optimization of the temperature profile for wheat analysis [J]. *Journal of Triticeae Crops* (麦类作物学报), 21(4): 1—4
- Pich U, Schhubert I, 1993. Miniprep method isolation of DNA from plants with content of polyheolics [J]. *Nucleic Acids Research*, 21(14): 3328
- Su ZL (苏志龙), Yin SH (殷寿华), Wu CJ (吴成军), *et al*, 2005. Analysis of genetic structure of the endangered species *Pellacalyx yunnanensis* (Rhizophoraceae) by RAPD [J]. *Acta Bot Yunnan* (云南植物研究), 27(2): 181—186
- Williams GK, Kubelid AR, Livak KL, *et al*, 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers [J]. *Nucleic Acids Research*, 18: 6531—6535
- Zhang FQ (张凤琴), Xu LX (徐立新), Zhou P (周鹏), *et al*, 2003. The influential factors of RAPD in *Ilex kudingcha* and the optimization of the experimental conditions [J]. *Acta Bot Yunnan* (云南植物研究), 25(3): 347—353
- Zhang FQ (张凤琴), Liu GM (刘国民), Zhou P (周鹏), *et al*, 2004. A study on genetic variations, relationships and classification of several “KUDINGCHA” species in *Ilex* (Aquifoliaceae) based on RAPD analysis [J]. *Acta Bot Yunnan* (云南植物研究), 26(6): 637—644
- Zhou LJ (周利杰), Li NG (李南高), Yu H (虞泓), *et al*, 2005. RAPD analysis on the genetic variation of *Erigeron breviscapus* from Yunnan [J]. *Acta Bot Yunnan* (云南植物研究), 27(1): 59—65