

海南龙血树 RAPD-PCR 反应体系的优化

郑道君, 谢良商, 张 文, 张治礼*

(海南省农业科学院 农作物遗传育种重点实验室, 海口 571100)

摘要: 采用单因子试验和正交试验设计, 对影响海南龙血树 RAPD-PCR 反应的模板 DNA 量、 Mg^{2+} 、dNTP 和引物浓度, Taq 聚合酶用量等因子进行研究, 分析各因子对 RAPD-PCR 扩增结果的影响, 确立了海南龙血树 RAPD-PCR 反应的最佳条件, 即在 25 μ L 反应体系中, 包含 10 \times buffer 2.5 μ L, 2.0 mmol/L $MgCl_2$, 300 μ mol/L dNTPs, Taq 酶 1.5U, 引物 0.8 μ mol/L 和 DNA 模板 20 ng。以此条件为基础, 筛选出适用于海南龙血树 RAPD-PCR 分析的 18 条有效引物, 为采用 RAPD 技术分析海南龙血树种群遗传变异水平和遗传结构打下了基础。

关键词: 海南龙血树; RAPD; 反应条件优化; 有效引物筛选

中图分类号: Q943 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2011)01-0031-05

Optimization of RAPD-PCR reaction system for *Dracaena cambodiana*

ZHENG Dao-Jun, XIE Liang-Shang, ZHANG Wen, ZHANG Zhi-Li*

(Key Laboratory of Crop Genetics and Breeding, Hainan Academy of Agricultural Sciences, Haikou 571100, China)

Abstract: Both single factor test and orthogonal design were applied to study the effects of main factors on the RAPD-PCR system for *Dracaena cambodiana*, in which the main factors included the content of template DNA, the concentration of Mg^{2+} , dNTPs and primers and the content of Taq DNA polymerase, and an optimal 25 μ L RAPD-PCR reaction system for *D. cambodiana* was established, including 2.5 μ L 10 \times PCR buffer, 2.0 mmol/L $MgCl_2$, 300 μ mol/L dNTPs, 1.5 U Taq polymerase, 0.8 μ mol/L primers, and 20 ng DNA template. 18 primers were selected for RAPD-PCR analysis for *D. cambodiana* using the optimized amplification system above, which can be employed for the analysis of genetic variation and structure of *D. cambodiana* population.

Key words: *Dracaena cambodiana*; RAPD; optimization of reaction condition; screening of effective primers

海南龙血树 (*Dracaena cambodiana*) 又名小花龙血树, 俗称“山海带”、“不老松”和“平安树”, 属百合科 (Liliaceae) 龙血树属植物, 在中国仅产于海南 (中国科学院中国植物志编辑委员会, 1992)。海南龙血树是国产血竭的两种基源植物之一 [另一基源植物为剑叶龙血树 (*D. cochinchinensis*)], 可提取传统名贵中药材“血竭” (广东省植物研究所, 1977; 谢宗万, 1989)。此外, 海南龙血树还是园林绿化和家庭盆栽的名贵树种, 具有很高的观赏价值。作者在

野外资源调查时发现, 近年来海南龙血树野生资源遭受掠夺性采挖, 加之人类活动致使其生境的破碎化, 其数量目前已十分有限, 现存的原生种群仅有 10 个, 而各种群的个体数量在 20~5 000 棵不等 (调查结果将另文报道)。调查还发现, 海南龙血树种群更新能力极差, 属自然更新失败。野生海南龙血树资源亟待保护。目前, 该物种已被列入二级国家重点保护野生植物 (中国数字植物标本馆: <http://www.cvh.org.cn/>) 和三级中国稀有濒危保护植物

收稿日期: 2010-05-24 修回日期: 2010-11-08

基金项目: 国家自然科学基金 (30760015); 海南省自然科学基金 (30831) [Supported by National Natural Science Foundation of China (30760015); Natural Science Foundation of Hainan (30831)]

作者简介: 郑道君 (1979-), 男, 海南人, 硕士, 主要从事植物种质资源和植物保护遗传学研究, (E-mail) daojunzh@yahoo.com.cn.

* 通讯作者: 张治礼 (1970-), 男, 博士, 研究员, 研究领域为橡胶树产胶、植物抗逆分子生物学, (E-mail) zzl_catas@hotmail.com.

(国家环境保护局等,1987)。全面开展保护生物学研究,包括保护遗传学研究是解决生物多样性危机、挽救成千上万物种的根本出路,也是合理的资源开发和利用的前提(李昂等,2002)。但关于海南龙血树的研究目前主要集中在组织快繁、栽培技术以及以血竭为基础的开发利用等方面(郑道君等,2009),关于该物种保护生物学方面的研究目前国内外尚未见报道。为此,我们采用 RAPD 技术研究海南龙血树种群遗传变异水平和遗传结构,以期从分子水平揭示海南龙血树种群的濒危现状和致危原因,并为制定合理的保护策略提供科学依据。

RAPD 技术所需 DNA 用量少,检测快速简便、费用低廉,引物通用性强,具有很好的稳定性和多态性,近年来已在濒危植物保护遗传学研究领域得到广泛应用(李昂等,2002;董贞荣等,2006;Xia 等,2007;Gaiotto 等,1997)。但是由于 RAPD 技术是一种基于 PCR 的分子标记,且其引物序列短以致退火温度较低,对反应条件变化非常灵敏,影响因子较多。针对不同的物种,系统地研究 RAPD 分析中的各种影响因子,摸索其最佳反应条件,是获得准确、可重复研究结果的关键。为此,我们对海南龙血树 RAPD 分析中的模板浓度、dNTPs 浓度、 Mg^{2+} 浓度、Taq 酶用量、引物浓度等影响因子进行了比较系统的研究。在单因子试验结果的基础上,采用正交试验研究海南龙血树 RAPD 分析最佳反应条件,首次建立了一套稳定的海南龙血树 RAPD-PCR 反应体系,在此基础上筛选出了一批有效引物,其研究结果将为 RAPD 技术应用于海南龙血树种群保护遗传学方面的研究奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材料

用于反应体系优化的海南龙血树供试材料取自海南省东方市俄贤岭居群(18°59'58" N,109°04'30" E);选取与俄贤岭居群生境差异较大的三亚市南山居群(18°18'04" N,109°09'06" E)和东方市黑岭居群(18°46'30.0" N,108°48'45.8" E)各 1 份材料用于有效引物的筛选。所有供试材料均为采自健康树的嫩芽或叶,常温下带回实验室后保存于-20 °C 备用。

1.2 试剂与仪器

主要试剂:60 条 S 系列随机引物由上海生物工程有限公司合成;100 bp plus Marker 购自北京中

科瑞泰公司;Taq DNA polymerase 和 4 × dNTP mix 购自上海申能博彩生物科技有限公司。主要仪器:离心机,电热恒温水浴锅,电冰箱,移液枪,紫外分光光度计,梯度 PCR 仪(Biometra),水平电泳仪,Gel Doc XR 型凝胶成像系统等。

1.3 方法

1.3.1 基因组 DNA 提取及检测 采用梁远发等(2008)改良后的 CTAB 法提取基因组 DNA。利用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的完整性、紫外分光光度计检测 DNA 的浓度和纯度。提取的 DNA 浓度稀释至 20ng/μL 保存在-20 °C 冰箱中备用。

1.3.2 随机引物初选 RAPD-PCR 原始反应条件组成:10 × 反应 buffer 2.5 μL,2.0 mmol/L $MgCl_2$,200 μmol/L dNTPs,Taq 酶 1.5 U,引物 0.4 μmol/L,DNA 模板 30 ng,最后用无菌超纯水补足至 25 μL。RAPD-PCR 扩增程序:94 °C 预变性 4 min;然后按 94 °C 变性 40 s,38 °C 退火 45 s,72 °C 延伸 120 s,进行 40 个循环;最后 72 °C 延伸 8 min。按此原始反应体系及扩增程序,对引物进行初选。

表 1 单因子试验中各因子的梯度水平

Table 1 Gradient levels of each factor in single factor test

水平 Levels	影响因素 Factors				
	Template DNA (ng/25μL)	Taq DNA polymerase (U/25μL)	Mg^{2+} (mmol/L)	dNTP (μmol/L)	Primer (μmol/L)
1	2.5	0.025	0.25	25	0.25
2	5.0	0.5	0.5	50	0.05
3	10.0	1.0	1.0	100	0.1
4	20.0	1.5	1.5	150	0.15
5	40.0	2.0	2.0	200	0.2
6	60.0	2.5	2.5	250	0.25
7	80.0	3.0	3.0	300	0.3
8	120.0	4.0	3.5	400	0.6
9	160.0	5.0	4.0	550	0.8
10	240.0	6.0	5.0	650	1.0
11	320.0	10.0	7.0		

1.3.3 RAPD-PCR 反应条件优化试验设计 采用单因子试验方法(表 1),以上述原始反应条件为基础,筛选各因子的适宜浓度范围(每个因子筛选 4 个水平)。以筛选出的适宜水平按 $L_{16}(4^5)$ 方案设计正交试验,筛选海南龙血树最佳 RAPD-PCR 反应条件。选择扩增条带多且清晰的引物 S28 用于模板浓度优化,引物 S5 用除模板浓度以外的影响因子优化和正交试验。参照何正文等(1998)和穆立蕾等(2006)所用的直观分析法,依据谱带的强弱和杂带

的多少对正交试验的 PCR 扩增结果依次打分。条带数量丰富、清晰的最佳产物记 16 分;相反,最差的计 1 分。分别进行两次独立计分,取两次的平均数。根据上述打分结果求出每个因子同一水平下的试验值之和 K_i 以及每一因子水平下的数据平均值 k_i ,并求出同一因子不同水平间平均值的极差 R 。

1.3.4 有效多态性引物筛选 以生境差异显著的 3 份供试材料的 DNA 为模板,在优化后的最佳反应条件下,筛选扩增结果清晰、重复性好且具有良好多态性的引物。

1.3.5 扩增产物的检测 扩增产物在含 Goldview 核酸染料的 1.5% (W/V) 琼脂糖凝胶电泳中分离,电压为 5 V/cm,电泳缓冲液为 $0.5 \times$ TBE。电泳结束后在 Gel Doc XR 型凝胶成像分析系统观察并拍照记录。

2 结果与分析

2.1 模板 DNA 用量的适宜范围

试验结果表明,模板浓度对海南龙血树 RAPD-PCR 扩增产物的带型影响不显著(图 1)。只是在 $2.5 \text{ ng}/25 \mu\text{L}$ 时扩增条带较弱,随着浓度增大,即当模板浓度 $\geq 2.5 \text{ ng}/25 \mu\text{L}$ 时,扩增产物的带型一致、清晰。本研究选择 $10 \sim 60 \text{ ng}/25 \mu\text{L}$ 的模板浓度用于后续正交试验。

2.2 Taq 酶用量对 RAPD-PCR 的影响

Taq 酶是影响 RAPD-PCR 扩增结果的重要因子。试验结果表明: Taq 酶用量少于 0.5 U,扩增量明显不足,条带少且弱(图 2 中 1 泳道);当用量为 $0.5 \sim 1.0 \text{ U}$ 时,带型不稳定,部分条带扩增量不足(图 2 中 2,3 泳道);而 Taq 酶用量为 $1.5 \sim 3.0 \text{ U}$ 时,条带清晰,带型一致(图 2 中 4~7 泳道);但是当 Taq 酶 $\geq 4.0 \text{ U}$,部分扩增条带减弱或消失,同时出现新的条带。可见,过高的 Taq 酶用量会抑制海南龙血树 RAPD-PCR 反应,同时会引起非特异性产物的产生。上述结果表明,用于后续正交试验的适宜 Taq 酶用量为 $1.5 \sim 3.0 \text{ U}$ 。

2.3 Mg^{2+} 浓度对 RAPD-PCR 结果的影响

扩增结果表明:当 $\text{Mg}^{2+} \leq 0.25 \text{ mmol/L}$ 时,不能扩增出条带(图 2 中 12 泳道)。这可能是由于模板、引物、dNTPs 竞争与 Mg^{2+} 结合,导致激活 Taq 酶所需的自由 Mg^{2+} 不足,造成酶活力显著降低,扩增反应失败。当浓度为 0.5 mmol/L 时,有扩增产

物,但条带少且弱(图 2 中 13 泳道),这说明 Mg^{2+} 浓度仍较低。当 Mg^{2+} 浓度在 $1.0 \sim 3.5 \text{ mmol/L}$ 时,扩增条带一致且清晰;但随着浓度大于 3.5 mmol/L 部分条带开始变弱,且背景加深。这可能是由于增加镁离子的浓度使引物的错配频率增加。考虑到高浓度会引起扩增的严谨性下降,本试验选择 Mg^{2+} 浓度为 $1.0 \sim 3.0 \text{ mmol/L}$ 用于后续正交试验。

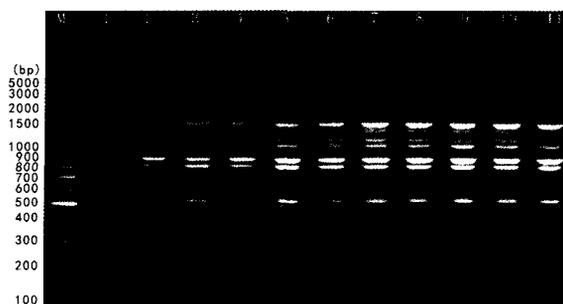


图 1 模板浓度梯度试验
Fig. 1 Testing of template concentration
M: 100 bp plus; 1~11: 2.5, 5, 10, 20, 40, 60, 80, 120, 160, 240 and 320 ng/25 μL .

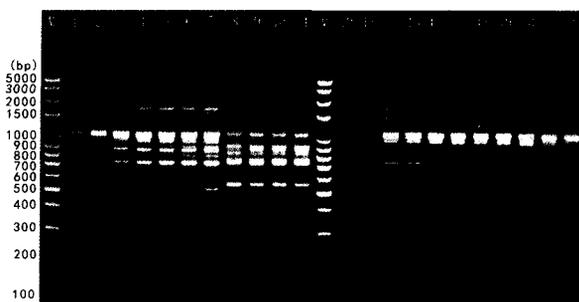


图 2 Taq 酶和 Mg^{2+} 浓度梯度试验
Fig. 2 Testing of Taq DNA polymerase and Mg^{2+} concentrations

M: 100 bp plus; 1~6: 0.25, 0.5, 1.0, 0.15, 2.0, 2.5, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 10.0 U (Taq DNA polymerase); 12~22: 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 5.0, 7.0 mmol/L (Mg^{2+}).

2.4 dNTPs 浓度对 RAPD-PCR 结果的影响

dNTPs 是反应中磷酸根的主要来源,其浓度取决于扩增片段的长度,另外其浓度的任何变化都会影响到 Mg^{2+} 的有效浓度。扩增结果表明,当 dNTPs 浓度在 $25 \sim 300 \mu\text{mol/L}$ 之间时,随着浓度的增加扩增的带数与强度也随之增加。当 dNTPs $\leq 100 \mu\text{mol/L}$ 时条带不清晰,扩增量不足(图 3 中 1~3 泳道),当浓度在 $150 \sim 300 \mu\text{mol/L}$ 时,扩增出的带型基本一致,条带多而清晰(图 3 中 4~7 泳道);而当 dNTPs $\geq 350 \mu\text{mol/L}$ 时,较大的扩增条

带表现出不能有效的扩增且有明显缺失的趋势。这说明,高浓度的 dNTPs 会抑制分子质量相对较大的条带扩增,其原因可能是过高浓度 dNTPs 与反应混合液中的 Taq 酶竞争 Mg²⁺,从而抑制聚合酶的活性,导致扩增谱带的改变甚至消失。根据以上分析结果,选择 150~300 μmol/L 的 dNTPs 浓度用于后续的正交试验为宜。

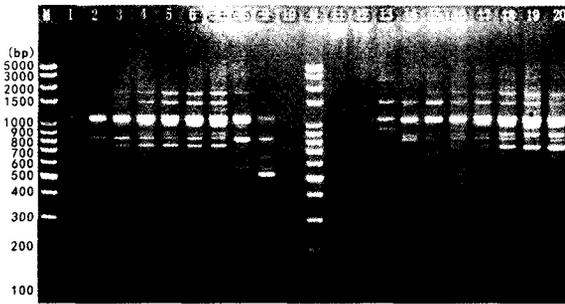


图 3 dNTPs 和引物浓度梯度试验

Fig. 3 Testing of dNTPs and primer concentrations

M: 100 bp plus; 1~10: 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 550, 650 μmol/L (dNTPs); 11~20: 0.025, 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25, 0.3, 0.6, 0.8, 1.0 μmol/L (primers).

2.5 引物浓度对 RAPD-PCR 结果的影响

试验结果表明(图 3, 11~20 泳道),引物浓度对 RAPD-PCR 扩增的带型产生明显影响。引物浓度小于或等于 0.05 μmol/L 时无扩增产物;当引物浓度达到 0.1 μmol/L 时,随着浓度的增加,扩增条带的数量与强弱也随之明显增加;当达到 0.6 μmol/L 及其以上浓度时扩增条带丰富且清晰,带型趋于一致。根据扩增条带多少、强弱以及带型的稳定性,选择 0.3, 0.6, 0.8 和 1.0 μmol/L 的引物浓度用于后续的正交试验。

2.6 正交试验分析

正交试验设计结果见表 2,共包括 5 个因子各 4 个水平,其试验的扩增结果如图 4 所示。对试验结果进行打分,16 个试验组合的分数依次为:1, 8, 11, 12, 16, 15, 2, 3, 4, 2, 8, 5, 7, 4, 3, 7。由各组合的得分情况可知,分值最高的组合为 5 号组合,即为最佳组合,其扩增条带数最多,为 15 条,其中强带为 6 条(图 4 中 5 泳道);而最差组合为 1 号,能扩增出 8 条弱带,仅有 1 条强带(图 4 中 1 泳道)。极差 R 反映了影响因子对反应体系的影响情况,R 越大,影响越显著。由表 3 可知各因子不同水平的变化对海南龙血树 RAPD-PCR 反应的影响从大到小依次为: dNTP > 引物 > DNA 模板 > Mg²⁺ > Taq 酶。

表 2 RAPD-PCR 正交试验设计表
Table 2 Orthogonal design for RAPD-PCR [L₁₆(4⁵)]

编号 No.	影响因素 Factors				
	Template DNA (ng/25 μL)	Taq DNA polymerase (U/25 μL)	Mg ²⁺ (mmol/L)	dNTP (μmol/L)	Primer (μmol/L)
1	10	1.5	1.5	150	0.3
2	10	2.0	2.0	200	0.6
3	10	2.5	2.5	250	0.8
4	10	3.0	3.0	300	1.0
5	20	1.5	2.0	300	0.8
6	20	2.0	1.5	250	1.0
7	20	2.5	3.0	200	0.3
8	20	3.0	2.5	150	0.6
9	40	1.5	2.5	200	1.0
10	40	2.0	3.0	150	0.8
11	40	2.5	1.5	300	0.6
12	40	3.0	2.0	250	0.3
13	60	1.5	3.0	250	0.6
14	60	2.0	2.5	300	0.3
15	60	2.5	2.0	200	1.0
16	60	3.0	1.5	150	0.8

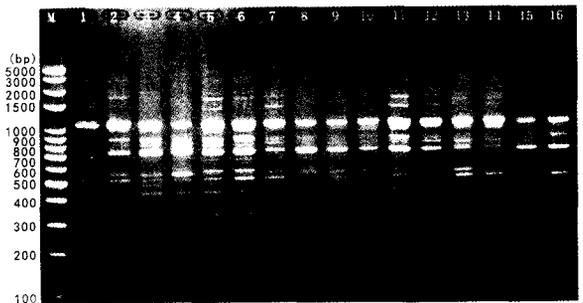


图 4 正交试验分析结果

Fig. 4 Analysis results of orthogonal design
(M: 100 bp plus; 1~16. 处理编号同表 2)

表 3 正交设计结果直观分析
Table 3 Intuitive analysis of orthogonal design

结果 Results	Template DNA	Taq DNA polymerase	Mg ²⁺	dNTPs	Primer
K1	32	28	31	13	12
K2	36	29	36	17	26
K3	19	24	22	38	36
K4	21	27	23	40	34
k1	8	7	7.75	3.25	3
k2	9	7.25	9	4.25	6.5
k3	4.75	6	5.5	9.5	9
k4	5.25	6.75	5.75	10	8.5
R	4.25	1.25	3.5	6.75	6

2.7 有效引物筛选

采用上述优化后的反应条件,以 3 份生境差异显著的材料之 DNA 为模板,对经初选后有 2 条以

上扩增产物的引物进行多态性引物筛选。结果表明,共 18 条引物表现出较好的多态性,其编号及序列见表 4。

3 结论与讨论

单因子试验即在保持其他因子一致不变的条件下,变化单一因子,分别研究各影响因子对 RAPD-PCR 反应的影响情况,已被广泛应用于 RAPD-PCR 反应体系的优化中(邵敏等,2009;孙丽娜等,2007;

周则刚等,2008;黄玉源等,2009;张志勇等,2009),但此方法忽视了各因子间的互作效应。正交设计试验可弥补上述的不足,它具有均衡分散、综合可比和效应明确等特性(李鹏等,2008),可了解各因子间的内在规律,较快找到最优的组合条件,并可明确影响扩增的主要因子和次要因子(明道绪,2007)。自倪星群等(1995)将正交试验应用于 PCR 反应体系优化中,何正文等(1998)对其统计方法进行简化后,该方法已在 PCR 反应体系优化研究中广泛应用(黄夕洋等,2008;张安世等,2009;沙伟等,2004)。但不同

表 4 所筛选出的 RAPD 引物及其序列
Table 4 Selected RAPD primers and corresponding sequences

引物编号 Primers	序列 Sequence (5'-3')	引物编号 Primers	序列 Sequence (5'-3')	引物编号 Primers	序列 Sequence (5'-3')
S5	TGCGCCCTTC	S6	TGCTCTGCC	S7	GGTGACGCAG
S11	GTAGACCCGT	S18	CCACAGCAGT	S21	CAGGCCCTTC
S22	TGCCGAGCTG	S28	GTGACGTAGG	S35	TTCCGAACCC
S38	AGGTGACCGT	S39	CAAACGTCGG	S97	ACGACCGACA
S121	ACGGATCCTG	S124	GGTGATCAGG	S126	GGGAATTCCGG
S402	ACAACGCCTC	S404	GCCGTTGTC	S405	GGGAACGTGT

的物种,其各 RAPD-PCR 反应影响因子的适宜水平有很大差异,而正交设计应是从各因子中挑选出适宜的水平进行试验。因此,为确保应用于正交试验设计的各因子水平的合理性,使其分析结果更加科学,本研究在单因子试验的基础上,找出各因子的适宜反应浓度水平用于正交试验优化以找出最佳反应条件。结果表明,在所研究的 5 个海南龙血树 RAPD-PCR 反应影响因子中,dNTP 浓度的影响最大,R 值为 6.75;引物与 dNTP 相当,R 值为 6;而 Taq 酶浓度的影响最小,R 值仅为 1.25。这与部分学者的研究结果不一致。张安世等(2009)在进行水稻 RAPD 反应条件优化时发现,各因子不同水平的变化对 RAPD-PCR 的影响依次为:dNTP 浓度 > Taq 酶 > Mg²⁺ 浓度 = 引物浓度。沙伟等(2004)研究表明,在藓类植物 RAPD 分析的影响因子中 dNTP 浓度影响最大,其余依次为 Taq 酶、模板 DNA 浓度和引物浓度。作者认为以上分析结果的差异主要是由于不同物种 DNA 所具有的特性所致,同时与不同厂家、批次 Taq 酶的质量等也有较大关系。

经过上述单因子试验与正交试验,确定海南龙血树最佳 RAPD-PCR 反应条件:在 25 μL 反应体系中包含 10 × buffer 2.5 μL,2.0 mmol/L MgCl₂,300 μmol/L dNTPs,Taq 酶 1.5 U,引物 0.8 μmol/L,

DNA 模板 20 ng;其 PCR 扩增程序为:94 °C 预变性 4 min,然后按 94 °C 变性 40 s,38 °C 退火 45 s,72 °C 延伸 120 s,进行 40 个循环,最后 72 °C 延伸 8 min。在此基础上,本研究筛选出 18 条适用于海南龙血树保护遗传学研究的有效多态性随机引物。

参考文献:

- 广东省植物研究所. 1977. 海南植物志(第 4 卷)[M]. 北京:科学出版社:155
- 中国科学院中国植物志编辑委员会. 1992. 中国植物志(第 14 卷)[M]. 北京:科学出版社:276-277
- 国家环境保护局,中国科学院植物研究所. 1987. 中国稀有濒危保护植物名录(I)[M]. 北京:科学出版社:38
- 明道绪. 2007. 生物统计附试验设计(第 3 版)[M]. 北京:中国农业出版社:286-287
- 倪量拜,郭景元,夏象辉,等. 1995. 利用正交试验设计确定 PCR 最适条件[J]. 中国卫生统计,4(12):53-55
- 谢宗万. 1989. 血竭基源的本草考证[J]. 中药材,12(7):4
- Dong ZR(董贞荣),Chen JM(陈进明),Wang QF(王青锋). 2006. RAPD analysis for mating system in *Caldesia parnassifolia*(泽苔草交配系统的 RAPD 分析)[J]. J Wuhan Bot Res (武汉植物学研究),24(2):167-170
- Gaiotto FA,Bramucci M,Grattapaglia D. 1997. Estimation of outcrossing rate in a breeding population of *Eucalyptus urophylla* with dominant RAPD and AFLP markers[J]. Theor Appl Genet,95:842-849
- He ZW(何正文),Liu YS(刘运生),Shen LH(陈立华),et al. 1998. Orthogonal design direct analysis for PCR optimization(正(下转第 86 页 Continue on page 86))

光照强度均增加,开花的数量增大,传粉者开始频繁地访花,且此时果实开始形成,因此这个时期花的生物量较高。至有性生殖末期,花蕾和花几乎都凋零,果实的生物量就增加。

如果分配给繁殖的资源量增加,分配给存活、生长的资源量就会减少,进而影响到植物未来的生长与发育。当环境条件较好时,植物营养体较大,光合产物较多,既可维持较高的生育率,又可在生长、存活等方面投入更大的资源,多年生的柔毛淫羊藿植株一般先只进行营养生长,达到一定个体大小之后才开花结实,此后大部分资源分配给繁殖,而一小部分分配给营养生长,以维持其基本的生长、存活需要。因此柔毛淫羊藿是营养生长和有性繁殖活动同时存在,存活、储藏和繁殖活动同时需求资源的投入。

参考文献:

- 江洪. 1992. 云杉种群生态学[M]. 北京:中国林业出版社
- 应俊生,陈德昭. 2001. 中国植物志[M]. 科学出版社,29:271
- Cao GX(操国兴),Xie DT(谢德体),Zhong ZC(钟章成),*et al.* 2003. Reproductive allocation of plant population(植物种群的生殖分配)[J]. *J Sichuan Fore Sci Tech*(四川林业科技),24(2):25-29
- Gleeson SK,Tilman D. 1990. Allocation and the transient dynamics of succession on poor soils[J]. *Ecology*,71:144-155
- Namrata Sharma AK,Kaul V. 1999. Patterns of resource allocation six *Plantago* species with different breeding system[J]. *J Plant Res*,112:1-5
- Song HX(宋会兴),Peng YY(彭远英). 2005. Comparison study on reproductive allocation of two grass(Gramineae)populations in Jinyun Mountain(缙云山2种禾草种群生殖配置的比较研究)[M]. *J Plant Res Environ*(植物资源与环境学报),14(3):12-15
- Su ZX(苏智先),Zhang SL(张素兰),Zhong ZC(钟章成). 1998. Advances in plant reproductive ecology(植物生殖生态学研究)[J]. *Chin J Ecol*(生态学杂志),17(1):39-46
- Xu X(胥晓),Su ZX(苏智先),Li YX(黎云祥). 1999. Analysis on fuzzy mathematics of forest in Nanchong region in Jialing River(嘉陵江流域南充金城山森林群落的模糊数学分析)[J]. *J Sichuan Teacher Coll;Nat Sci Edi*(四川师范学院学报·自然科学版),20(2):182-189
- 交设计直观分析法优化 PCR 条件[J]. *Bull Hunan Univ*(湖南医科大学学报),23(4):403-404
- Huang XY(黄夕洋),Jiang SY(蒋水元),Li H(李虹),*et al.* 2008. Optimization of the RAPD reaction system and procedure of *Taxus media*(曼地亚红豆杉 RAPD 反应体系与程序的优化)[J]. *Guihaia*(广西植物),28(4):451-454
- Huang YY(黄玉源),Nong BX(农保选),Liu C(刘驰),*et al.* 2009. Improving of RAPD reaction system in *Cycas* and studies on the genetic relationships of some species(苏铁属植物 RAPD 反应体系的优化及部分种类亲缘关系的探索)[J]. *Guihaia*(广西植物),29(5):569-575
- Li A(李昂),Ge S(葛颂). 2002. Advances in plant conservation genetics(植物保护遗传学研究进展)[J]. *Biodiversity Sci*(生物多样性),10(1):61-71
- Li A(李昂),Luo YB(罗毅波),Ge S(葛颂). 2002. Spatial autocorrelation study of population genetic structure of two orchid species(采用空间自相关分析研究两种兰科植物的群体遗传结构)[J]. *Biodiversity Sci*(生物多样性),10(3):249-257
- Li P(李鹏),Wang YD(汪阳东),Chen YC(陈益存),*et al.* 2008. Establishment of optimum ISSR-PCR reaction system in Tung oil tree(*Vernicia fordii*)(油桐 ISSR-PCR 最佳反应体系的建立)[J]. *Fore Res*(林业科学研究),21(2):194-199
- Liang YF(梁远发),Zheng DJ(郑道君),Liu GM(刘国民),*et al.* 2008. An effect DNA extraction method for the Kudingcha species in Oleaceae(一种适用于木犀科苦丁茶的高效 DNA 提取法)[J]. *Chin Agric Sci Bull*(中国农学通报),24(3):44-47
- Mu LQ(穆立蕃),Liu YN(刘赢男),Feng FJ(冯富娟),*et al.* 2006. Establishment and optimization of ISSR-PCR reaction system for *Tilia amurensis*(紫椴 ISSR-PCR 反应体系的建立与优化)[J]. *Sci Silv Sin*(林业科学),42(6):26-31
- Sha W(沙伟),Li J(李晶),Cao T(曹同),*et al.* 2004. Establishment of RAPD reaction system on the moss(藓类植物 RAPD 反应体系的建立)[J]. *Bull Bot Res*(植物研究),24(4):482-485
- Shao M(邵敏),Zhou HF(周鹤峰),Tang LB(唐历波),*et al.* 2009. Establishment of RAPD reaction system of *Aquilaria agallocha*(沉香随机扩增多态性 DNA 反应体系的建立)[J]. *Lishizhen Med Mat Med Res*(时珍国医国药),20(1):74-76
- Sun LN(孙丽娜),Yan YZ(严一字),Wu JR(吴基日),*et al.* 2007. Optimization of RAPD conditions of *Platycodon grandiflorus*(桔梗 RAPD 反应体系的优化)[J]. *Guihaia*(广西植物),27(3):410-413
- Xia J,Sun SG,Guo YH. 2007. Honeybees enhance reproduction without affecting the outcrossing rate in endemic *Pedicularis densispica*(Orobanchaceae)[J]. *Plant Biology*,9(6):713-719
- Zhang AS(张安世),Xing ZF(邢智峰),Xu JW(徐九文),*et al.* 2009. Orthogonal optimization of RAPD reaction system in rice(水稻 RAPD 反应体系的正交优化)[J]. *Bio Bull*(生物技术通报),12:92-95,101
- Zhang ZY(张志勇),He P(何平). 2009. Optimization of RAPD amplified conditions in medicinal plant *Sbarcandra glabra*(药用植物珊瑚 RAPD 扩增条件优化)[J]. *Guihaia*(广西植物),29(4):455-458
- Zheng DJ(郑道君),Xie LS(谢良商),Wang Y(王盈),*et al.* 2009. Research advances in Dragon's Blood plants in China(中国血竭基源植物的研究与利用)[J]. *Chin Wild Plant Res*(中国野生植物资源),28(6):15-20
- Zhou ZG(周则刚),Fang YM(方炎明),Wang B(王标). 2008. Genomic DNA extraction and optimization of RAPD analytic conditions of *Fagus engleriana*(米心水青冈基因组 DNA 提取及 RAPD 反应体系优化)[J]. *Bull Bot Res*(植物研究),28(6):684-688

(上接第 35 页 Continue from page 35)