



吴小倩,曹孟霞,代晓雨,等.改良CTAB法对台湾独蒜兰叶片DNA提取效果的影响[J].黑龙江农业科学,2020(4):26-31.

# 改良CTAB法对台湾独蒜兰叶片DNA提取效果的影响

吴小倩,曹孟霞,代晓雨,吴沙沙,翟俊文

(福建农林大学 园林学院/兰科植物保护与利用国家林业与草原局重点实验室,福建 福州 350002)

**摘要:**为探究兰科植物DNA的提取条件,以兰科独蒜兰属台湾独蒜兰(*Pleione formosana*)幼嫩叶片作为试验材料,在传统的CTAB法上进行改良,设计 $L_9(3^4)$ 正交试验,探究不同因素、不同处理对DNA产率、纯度的影响。结果表明:4个因素对DNA产率的影响顺序为样品质量>水浴温度>清洗时间>水浴时间,最佳提取条件为样品重量30 mg、清洗20 min、55℃水浴2.0 h,该处理下DNA主条带清晰,得率为148.98 ng· $\mu\text{L}^{-1}$ ,  $A_{260}/A_{280}$ 均值为1.89。

**关键词:**兰科;独蒜兰属;DNA提取;CTAB法;正交试验

目前,用于高通量测序或者构建基因组文库的细胞核DNA一般采用SDS法(Sodium Dodecyl Sulfate)<sup>[1]</sup>和CTAB法(Hexadecyl trimethyl ammonium Bromide)<sup>[2]</sup>。王景雪等<sup>[3]</sup>和孙璐宏等<sup>[4]</sup>采用SDS法对植物基因组DNA进行提取,所提取的DNA质量较低,原因是多酚、多糖类物质不能得到有效地去除,而兰科植物生长过程中会产生大量多酚、多糖等次生代谢产物<sup>[5]</sup>,且植物材料在化学成分、组织结构等方面有差异<sup>[6]</sup>,采用传统的CTAB法无法获得质量优的DNA。

台湾独蒜兰为兰科(Ochidaceae)独蒜兰属(*Pleione*)多年生草本植物,主要分布于福建西部至北部(连成、上杭、武夷山)、江西东南部、浙江南部和台湾<sup>[7]</sup>。其株形奇特、花色明丽,花期或花后只长出一枚叶片,因而又被称为“一叶兰”<sup>[8]</sup>;台湾独蒜兰还被用作传统药材“冰球子”的替代品<sup>[9]</sup>。台湾独蒜兰因其具有较高的观赏价值和药用价值,人为采挖严重,野生资源遭到严重破坏<sup>[10]</sup>,已成为易危物种(VU)<sup>[11]</sup>。因此在保证植株能够存活的前提下,提高叶片DNA提取率对台湾独蒜兰后续进行更深入的分子生物学研究,如通过分子标记手段研究独蒜兰属野生资源的遗

传多样性,对了解独蒜兰属的遗传背景、濒危机制以及如何进行科学有效的保育具有重要意义。DNA是进行分子研究的基础,DNA的浓度和纯度严重影响后续基因组酶切等结果<sup>[12]</sup>。但是截至目前,还未见有关于独蒜兰属叶片DNA提取方法的相关研究,因此亟需摸索一套高质量、高效率的DNA提取方法。因此本研究在传统CTAB法基础上进行改良,设置4因素3水平梯度的 $L_9(3^4)$ 正交试验,旨在探究高质量、高效率的提取台湾独蒜兰(*Pleione formosana*)叶片DNA的试验条件,并为富含酚类、多糖类的植物DNA的提取提供借鉴。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 植物材料 样品采集自福建省德化戴云山。选取植株的幼嫩叶片作为试验材料,叶片在采集后立即用茶包装好并做好记录和标记,将装有叶片的茶包放入自封袋中用变色硅胶进行干燥处理,封口前挤尽自封袋中的空气。

1.1.2 试剂 清洗液(其中含有50 mmol·L<sup>-1</sup> EDTA(pH 8.0),200 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl(pH 8.0),250 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl;2×CTAB提取液(其中含有20 mmol·L<sup>-1</sup> EDTA(pH 8.0),100 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl(pH 8.0),1.4 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl,2% CTAB(w/v));氯仿/异戊醇(24:1)(v/v);异丙醇;3 mol·L<sup>-1</sup> 醋酸钠、75%乙醇;液态氮、2 000 bp

收稿日期:2020-01-15

第一作者:吴小倩(1993-),女,在读硕士,从事园林植物观赏与应用等研究。E-mail:wu\_xiaoqian@126.com。

通信作者:翟俊文(1985-),男,博士,副教授,从事兰科植物系统分类方面等研究。Email:zhai-jw@163.com。

Marker (D2000 plus; Star Maker plus); 6 × loading buffer; 琼脂糖; 1 × TAE 缓冲液; 冰醋酸; 0.5 mmol·L<sup>-1</sup> EDTA; Tris-base; 去离子水; 核酸染料 (SuperRed GelRed), 其中 EDTA、Tris-HCl、CTAB 试剂购于 Sigma 公司, 6 × loading buffer 购于北京酷来搏科技有限公司, 其余试剂均为国产分析纯。

1.1.3 仪器 研磨仪 (Biospec Product, Inc); 移液枪 (Eppendorf); 台式高速冷冻离心机 (Neofuge 23R, HealForce); 恒温水槽与水浴锅 (HH-S2, 江苏省金坛市医疗仪器厂); 琼脂糖电泳仪 (DYCP-31DN, 北京六一); 凝胶成像仪 (WFH-101.102, 上海精科实业有限公司); Qubit 2.0 (Thermo Fisher Scientific, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 DNA 的提取 设置样品质量 (A)、清洗时间 (B)、水浴温度 (C)、水浴时间 (D) 的 L<sub>9</sub> (3<sup>4</sup>) 正交试验进行台湾独蒜兰叶片 DNA 的提取。具体步骤如下:

①依据表 1 称取相应质量的样品于已灭菌的 2 mL 离心管中, 加入一颗 5 mm 的钢珠, 于液氮中冷冻后研磨 1 min, 8 000 r·min<sup>-1</sup>, 离心 1 min, 倒掉钢珠;

②加入清洗液 1 mL, 依据表 1 于 60 ℃ 水浴锅中清洗相应时间; 8 000 r·min<sup>-1</sup>, 离心 10 min, 弃上部液体;

③加入 1 mL 的 2 × CTAB 缓冲液, 依据表 1 于水浴锅不同水浴温度中水浴相应时间, 期间每 10 min 小心上下颠倒混匀;

④8 000 r·min<sup>-1</sup>, 离心 10 min, 用移液枪将上清液吸至新的 2 mL 已灭菌离心管中;

⑤加入 1 mL 氯仿/异戊醇 (24:1), 翻转混匀 10 min;

⑥重复步骤⑤, 将上清液吸至新的 1.5 mL 的离心管中;

⑦加入等体积的异丙醇 (-20 ℃ 预冷) 和 100 μL 醋酸钠溶液, 混匀, -20 ℃ 冰箱静置 12 h; 8 000 r·min<sup>-1</sup>, 离心 8 min, 弃上清液, 保留管底 DNA;

⑧加入 1 mL 75% 乙醇 (-20 ℃ 预冷) 且轻弹管壁, 漂洗 DNA; 8 000 r·min<sup>-1</sup>, 离心 8 min, 弃上

清液; 用移液枪吸取废液, 通风橱中风干;

⑨加入 60 μL 去离子水溶解 DNA。

1.2.2 DNA 含量和纯度的测定 采用 Qubit 2.0 检测 DNA 含量和纯度。取稀释过的 DNA 样品 1 μL, 测定其在波长 260 和 280 nm 处的吸收度值 (OD), 根据 OD<sub>260/280</sub> 值判断 DNA 的纯度。

1.2.3 DNA 完整性测定 取 6 μL 的 DNA 加 2 μL 的 Loading Buffer 混合点在 1.5% 琼脂糖凝胶孔中, 电压设置 150 V, 电泳 35 min, 其余 -20 ℃ 保存。

表 1 试验因素及水平

Table 1 Experimental factors and levels

水平 Levels	因素 Factors			
	样品质量 Sample	清洗时间 Cleaning	水浴温度 Water bath	水浴时间 Water bath
	weight/mg	time/min	temperature/℃	time/h
1	10	20	25	0.5
2	20	40	65	2.0
3	30	60	55	1.0

注: 水浴温度 25 ℃ 为室温。  
Note: The bath temperature is 25 ℃ and the temperature is set by the air conditioner.

1.2.4 数据分析 试验所得数据用 Excel 2007 和 SPSS 23.0 进行统计, 采用单因素方差分析和 LSD 法对样品质量、清洗时间、水浴温度、水浴时间进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 DNA 最佳产率筛选

不同提取条件下 DNA 的浓度结果如表 2 所示: 处理 7 的产率最大, 平均值为 148.98 ng·μL<sup>-1</sup>。提取台湾独蒜兰叶片 DNA 的最佳条件为处理 7 (A<sub>3</sub>B<sub>1</sub>C<sub>3</sub>D<sub>2</sub>), 即样品质量 30 mg, 清洗时间 20 min, 水浴温度 55 ℃, 水浴时间 2.0 h, 在该条件下 DNA 的产率最高。处理 1 的产率最低, 说明清洗时间过短、水浴时间过短、水浴温度过低这 3 个外界因素对 DNA 的产率有明显的影响。

极差数据 R 显示, 4 个因素对 DNA 产率的影响顺序为: 样品质量 > 水浴温度 > 清洗时间 > 水浴时间。方差分析 (表 3) 表明, 4 个因素样品质量 (A)、清洗时间 (B)、水浴温度 (C) 和水浴时间 (D) 对 DNA 提取的浓度均具有显著性 (P <

0.05),其中样品质量(A)、清洗时间(B)和水浴温度(C)对试验影响极显著( $P<0.01$ )(表3)。处理4样品量较处理8少,但产率却高于处理8,对比二者的试验条件,说明是否进行水浴加热对DNA的产率有明显的影响。

进一步进行多重比较:(1)样品质量(A)3个水平间有极显著的差异( $P<0.01$ ),结合极差数据 $K_1<K_2<K_3$ 可知,样品质量对DNA产率的影响极显著,在一定程度上样品量越大,DNA的浓度越高;(2)清洗时间(B)3个水平之间对DNA

产率效果的影响也有显著的差异,结合极差数据 $K_2<K_3<K_1$ 可知,清洗时间在一定范围内效果最好,最佳清洗时间为20 min;(3)水浴温度的3个水平之间同样有显著的差异,并且结合极差数据 $K_1<K_2<K_3$ ,说明水浴温度只是在一定范围内有助于提高DNA的产率;(4)水浴时间仅0.5与2.0 h差异显著,其他均无显著差异,并且结合极差数据 $K_1<K_3<K_2$ ,说明水浴时间在一定范围内对DNA的产率影响更为显著,且2.0 h时效果最佳(表4)。

表 2 不同提取条件对台湾独蒜兰 DNA 产率的影响

Table 2 The effects of different extraction conditions on *P. formosana* DNA yield

处理 Treatments	A	B	C	D	I	Ⅱ	Ⅲ	平均浓度 Mean concentration/ (ng·μL <sup>-1</sup> )
1	1	1	1	1	16.07	17.68	19.20	17.65
2	1	2	2	2	22.00	26.10	27.20	25.10
3	1	3	3	3	31.10	36.80	35.30	34.30
4	2	1	2	3	78.90	99.60	76.28	84.93
5	2	2	3	1	47.80	50.60	43.20	47.20
6	2	3	1	2	29.80	41.00	36.10	35.63
7	3	1	3	2	157.93	142.50	146.50	148.98
8	3	2	1	3	92.20	74.88	71.20	79.43
9	3	3	2	1	114.40	124.3	106.20	118.30
K <sub>1</sub>	77.05	251.56	132.71	183.15				
K <sub>2</sub>	167.76	151.73	228.33	209.71				
K <sub>3</sub>	346.71	188.23	230.48	198.66				
R	269.66	63.33	97.77	26.56				
R 值排序	A>C>B>D							
最优水平	A <sub>3</sub> 、B <sub>1</sub> 、C <sub>3</sub> 、D <sub>2</sub>							

表 3 各因素方差分析

Table 3 Analysis of variance of each factor

方差来源 Source of variance	离差平方和 Sum of squares of deviations	自由度 Freedom	均方 Mean square	F	P
样品质量	36640.711	2	18320.355	330.170	0.000
清洗时间	5167.275	2	2583.637	46.562	0.000
水浴温度	6041.757	2	3020.879	54.442	0.000
水浴时间	457.419	2	228.710	4.122	0.034

2.2 DNA 最佳纯度筛选

纯度高的DNA的A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub>比值在1.8~2.0,小于1.8说明有酚类和蛋白质的污染,大于

2.0说明有RNA的污染<sup>[13]</sup>。图1所示,处理1的A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub>比值大于2.0之外,猜测原因可能是清洗时间水浴时间过短,未充分去除样品中的杂质。

表 4 不同因素的多重比较

Table 4 Multiple comparison of different factors

试验因素	处理(I)	处理(J)	均值差值(I-J)	标准误差	P 值
Experimental factor	Treatment(I)	Treatment(J)	Mean difference(I-J)	Standard error	P value
样品质量	1	2	−30.2033 *	3.51149	0.000
	2	3	−58.5367 *	3.51149	0.000
	3	1	88.7400 *	3.51149	0.000
清洗时间	1	2	33.2756 *	3.51149	0.000
	2	3	−11.0911 *	3.51149	0.005
	3	1	−22.1844 *	3.51149	0.000
水浴温度	1	2	−30.7611 *	3.51149	0.000
	2	3	−1.8611	3.51149	0.603
	3	1	32.6222 *	3.51149	0.000
水浴时间	1	2	−9.9644 *	3.51149	0.011
	2	3	3.6522	3.51149	0.312
	3	1	6.3122	3.51149	0.089

注：\* 代表显著性相关。

Note: \* represents significant correlation.

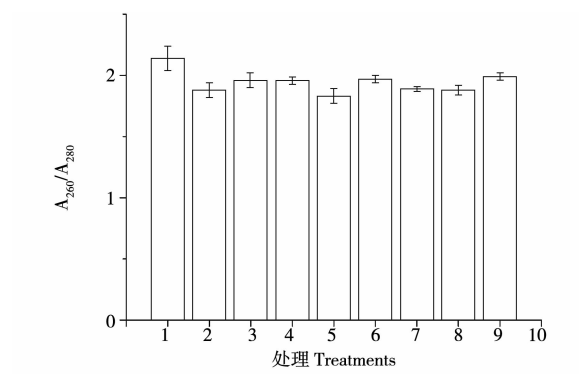


图 1 不同处理下  $A_{260}/A_{280}$  的值

Fig.1 The value of  $A_{260}/A_{280}$  by different treatments

其余处理比值均在 1.8~2.0,说明所得到的 DNA 纯度均较优。处理 7 $A_{260}/A_{280}$  为 1.89,纯度最高;处理 9 $A_{260}/A_{280}$  为 1.99,说明已有少量 RNA 污染,推测可能是水浴时间过短导致的。

2.3 DNA 完整性测定

不同提取条件下 DNA 条带亮度有一定差异:处理 1、2、3 由于样品量过少,浓度太低,条带亮度微弱;反之,处理 7、8、9 的样品量最大,条带也最亮,虽然处理 7 点样孔较亮,有蛋白质的污染,但基本获得了高浓度的 DNA;处理 4、8、9 存在拖尾现象,说明提取过程中存在 DNA 降解的现象(图 2)。

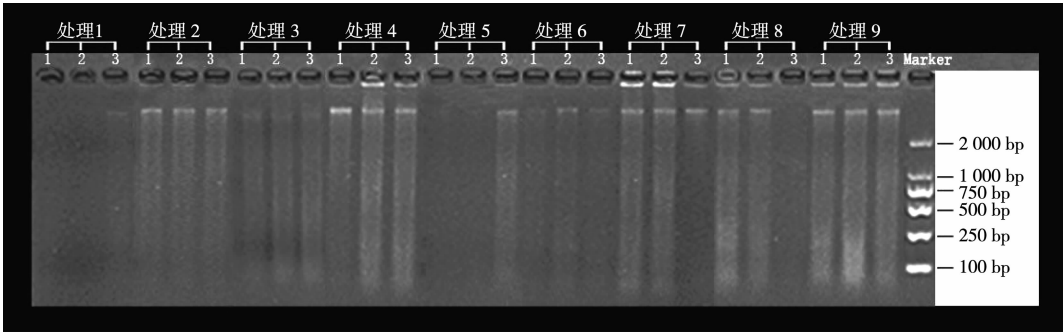


图 2 台湾独蒜兰 DNA 电泳

Fig.2 The DNA electrophoretogram of *P. formosana*

### 3 结论与讨论

在兰科植物 DNA 提取方法中,大多从 PVP、 $\beta$ -巯基乙醇和 CTAB 浓度,氯仿抽提次数、高盐 TE 溶液等角度对传统 CTAB 法进行改良<sup>[14-17]</sup>,本研究则是首次从样品质量、清洗时间、水浴温度等因素进行定量试验,通过设计正交试验对比不同因素不同水平对 DNA 提取质量影响程度的大小。

多酚、多糖和色素等物质的去除是兰科植物 DNA 提取的关键步骤<sup>[18]</sup>。前人研究表明,常规的 CTAB 提取法将多糖、酚类等这些杂质去除不够彻底<sup>[19]</sup>,而多酚等物质会氧化基因组 DNA 双链,破坏基因组的完整性,降低序列的长度,严重干扰 DNA 的提取;多糖类物质与 DNA 的理化性质相近,造成核酸的共沉淀而使 DNA 浓度降低<sup>[20]</sup>。且前期预试验采用传统的 CTAB 法提取台湾独蒜兰的 DNA,均未获得成功。因此本研究在利用传统 CTAB 法能够去除多糖、色素类物质的优点<sup>[21]</sup>上进行改良:① 叶片越老含有的多糖、多酚物质就越多<sup>[16]</sup>,尽量采取幼嫩的植物组织作为提取 DNA 的材料,及时进行硅胶干燥并放入 $-4^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存;② 缩短研磨及装管的时间可避免 DNA 褐变降解,否则样品中的酚类物质极易被氧化成醌类而与 DNA 进行不可逆的结合<sup>[17,22]</sup>,影响 DNA 的质量;③ 在研磨时加入钢珠并置于液氮中迅速冷却,使样品研磨更加充分;④ 在细胞核裂解前,用清洗液洗涤样品,通过质壁分离使细胞质中的大部分多糖、多酚类等次生代谢物质溶解,低温离心使之与细胞核分离<sup>[23]</sup>;⑤ 在提取 DNA 步骤 5 中减少吸取上清液的体积,可以降低蛋白质污染的程度;⑥ 增加抽提次数能有效去除小分子杂质,但过多也会造成 DNA 的损失<sup>[24]</sup>,因此两次加入氯仿/异戊醇(24:1)进行除杂。结合正交试验对比各因素影响程度的大小,有利于筛选出较优的提取台湾独蒜兰叶片 DNA 的条件,获得高质量的 DNA,以期为此方法在独蒜兰属的实际运用中提供参考和借鉴。

水浴时间过短会造成 DNA 产率下降<sup>[25]</sup>,这与本试验的结果相一致: $\bar{K}_1 = 183.15$ ,  $\bar{K}_2 =$

209.71,  $\bar{K}_3 = 198.66$ 。对雷公藤进行 DNA 提取时,增加样品的用量反而会降低 DNA 的浓度<sup>[26]</sup>,在本研究中,根据样品重量的极差数据  $\bar{K}_1 = 77.05$ 、 $\bar{K}_2 = 167.76$ 、 $\bar{K}_3 = 346.71$  可知,样品质量与 DNA 浓度正相关。即当提取液用量不变时,增加叶片的重量,能够提高获取 DNA 的浓度。因此可以在本试验的基础上继续设计试验,找到最适的样品量,旨在提高 DNA 的浓度。并且分析试验结果发现,清洗时间、水浴温度均是在一定范围内就能达到较理想的效果。综上,提取台湾独蒜兰叶片较优提取条件为:样品重量 30 mg,清洗时间 20 min,水浴温度  $55^{\circ}\text{C}$ ,水浴时间 2.0 h,该处理下 DNA 产率最高且纯度较好。未来改进的方向:可尝试结合清洗次数、PVP 浓度、 $\beta$ -巯基乙醇的使用等角度继续设计试验,旨在提高 DNA 浓度和纯度的同时节省试验时间,提高效率。

### 参考文献:

- [1] Edwards K, Johnstone C, Thompson C. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis [J]. Nucleic Acids Research, 1991, 19 (6): 1349-1349.
- [2] Murray M G, Thompson W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA [J]. Nucleic Acids Research, 1980, 8(19): 4321-4326.
- [3] 王景雪,孙毅,高武军.一种简便实用的植物总 DNA 提取方法[J].山西大学学报(自然科学版),2000,23(3): 271-272.
- [4] 孙璐宏,鲁周民,张丽.植物基因组 DNA 提取与纯化研究进展[J].西北林学院学报,2010,25(6): 102-106.
- [5] Dirk H, Schneider B. Phenalenones from *Strelitzia reginae* [J]. Journal of Natural Products, 2000, 63(7): 1027-1028.
- [6] 罗立明,欧阳叶新,胡鸿钧.海洋单细胞四片藻基因组 DNA 的微量提取[J].植物科学学报,2003,21(4): 295-300.
- [7] 中国科学院中国植物志委员会.中国植物志,第十八卷[M].北京:科学出版社,1999.
- [8] 吴沙沙,周育真,兰思仁,等.福建省台湾独蒜兰分布及居群特征[J].福建农林大学学报(自然科学版),2014,43(4): 379-384.
- [9] Shiao Y J, Chen W P, Lin Y L. New polyphenols and triterpene from the pseudobulbs of *Pleione formosana* [J]. Journal of the Chinese Chemical Society, 2009: 828-833. DOI: 10.1002/jccs.200900122.
- [10] Lu M C. High frequency plant regeneration from callus

culture of *Pleione formosana*, Hayata[J]. Plant Cell Tissue & Organ Culture, 2004, 78(1): 93-96.

[11] 中国珍稀濒危植物名录[DB/OL]. [2020-01-15]. <http://rep.iplant.cn/prot/Pleione%20formosana>.

[12] 李小玲, 华智锐. 商洛野生蕙兰基因组 DNA 提取方法的比较[J]. 浙江农业科学, 2014, 1(1): 73-76.

[13] 一种改良的植物 DNA 提取方法[J]. 植物学报, 2013, 48(1): 72-78.

[14] 包英华, 白音, 谭庆辉, 等. 美花石斛基因组 DNA 提取方法的比较[J]. 热带亚热带植物学报, 2007, 15(2): 147-151.

[15] Miaobin Z. Study on DNA isolation from polysaccharides-rich transgenic *Dendrobium*[J]. Molecular Plant Breeding, 2009, 7(1): 209-214.

[16] 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.

[17] 司更花, 朱国鹏. 五唇兰基因组 DNA 提取方法的优化[J]. 热带林业, 2012, 40(2): 37-39.

[18] 赖瑞联, 徐洋, 赖恭梯, 等. 山枇杷基因组 DNA 的提取及自然群体内 ISSR 遗传多样性分析[J]. 福建林学院学报, 2015, 35(1): 53-59.

[19] 刘婵, 王博, 段青, 等. 滇山茶基因组 DNA 不同提取方法效果比较[J]. 江苏农业科学, 2010, 3(6): 49-50.

[20] 韩月彭, 王鲁, 谷超. 富含多糖多酚植物高质量细胞核 DNA 的提取方法[P]. 湖北: CN102533728A, 2012-07-04.

[21] 关萍, 康冀川, 邹容, 等. 兰科植物天麻基因组 DNA 提取方法的比较研究[J]. 山地农业生物学报, 2004, 23(5): 422-425.

[22] Li Y X, Chen L, Lin J, et al. Suppression subtractive hybridization cloning of cDNAs of differentially expressed genes in dovetree (*Davidia involucrata*) Bracts[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2002, 20(3): 231-238.

[23] 丁晓东, 吕柳新. 从顽拗植物荔枝中提取基因组 DNA 技术的研究[J]. 应用与环境生物学报, 2000, 6(2): 142-145.

[24] 郑云柯, 胡翔宇, 宋希强, 等. 石斛属植物基因组 DNA 提取方法的对比[J]. 热带生物学报, 2015, 6(2): 168-172.

[25] 李静, 尹俊梅, 任羽, 等. SDS 法提取石斛基因组 DNA 的研究[J]. 热带农业科学, 2009, 29(1): 22-26.

[26] 范文洁, 洪伟, 李键, 等. 雷公藤总 DNA 提取方法的研究[J]. 森林与环境学报, 2011, 31(1): 8-12.

# Effects of a Modified CTAB Method for DNA Extraction from Leaves of *Pleione formosana*

WU Xiao-qian, CAO Meng-xia, DAI Xiao-yu, WU Sha-sha, ZHAI Jun-wen

(College of Landscape Architecture, Fujian Agriculture and Forestry University, Key Laboratory of National Forestry and Grassland Administration for Orchid Conservation and Utilization at College of Landscape Architecture, Fuzhou 350002, China)

**Abstract:** In order to explore the effects of different factors and different treatments on DNA yield and purity, young leaves of *P. formosana* were used as experimental materials to improve the traditional CTAB method and design  $L_9(3^4)$  orthogonal test. The results showed that the order of the four factors on DNA yield was: sample weight > water bath temperature > cleaning time > water bath time. The optimal extraction conditions were: sample weight 30 mg, washing 20 min, water bath 55 °C for 2.0 h. The yield of DNA under treatment was 148.98 ng· $\mu\text{L}^{-1}$ , and the mean value of  $A_{260}/A_{280}$  was 1.89.

**Keywords:** Orchidaceae; *Pleione*; DNA extraction; CTAB method; orthogonal experiment

## 致 读 者

为适应我国信息化建设,扩大本刊及作者知识信息交流渠道,本刊现被《中国学术期刊网络出版总库》及 CNKI 等系列数据库收录,其作者文章著作权使用费与本刊稿酬一次性给付。如作者不同意文章被收录,请在来稿时声明,本刊将做适当处理。

《黑龙江农业科学》编辑部