

文章编号: 1674-7054(2012)04-0379-05

巢蕨基因组 DNA 提取与 RAPD 反应体系优化

王雪兵^{1,4}, 于旭东^{1,3}, 朱会军^{1,2}, 吴繁花¹, 黄小凤⁴, 胡新文¹

(1. 海南大学 农学院, 海南 海口 570228; 2. 贵州大学 精细化工研究

开发中心/绿色农药与农业生物工程国家重点实验室培育基地/教育部重点实验室, 贵州 贵阳 550000;

3. 海南大学 热带作物种质资源保护与开发利用教育部重点实验室, 海南 海口 570228; 4. 东莞植物园, 广东 东莞 523086)

摘 要: 以新鲜幼嫩的巢蕨叶片为材料, 优化了巢蕨叶片基因组 DNA 的提取方法与 RAPD 反应体系。结果表明, 利用改进的 CTAB 方法, 能够提取出高质量的巢蕨基因组 DNA; 优化的巢蕨 RAPD 的最终反应体系(25 μL) 为: 模板 DNA($50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 1.5 μL , 引物($1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 1.5 μL , $2 \times \text{EasyTaq PCR SuperMix}$ 12.5 μL 。

关键词: 巢蕨 *Neottopteris nidus*; DNA 提取; RAPD; 分子标记

中图分类号: Q 949.36

文献标志码: A

巢蕨(*Neottopteris nidus* (L.) J. Sm.) 是分布于旧世界热带地区^[1-3] 的大型附生蕨类植物。它附生于雨林或季雨林的树干或林下石头上, 成一大丛而中空, 能承接枯枝落叶和雨水等成分。这些成分经过一系列物理、化学过程及生物相互作用形成巢蕨基质。转化而来的巢蕨基质提供巢蕨本身所需的营养物质, 这种营养方式能使巢蕨生长发育成巨大植株, 湿重达 200 kg^[4], 且对巢蕨基质的形成及雨林生态产生重要影响^[5]。巢蕨奇特的营养方式, 独特的生活环境引发了研究者对这类附生蕨类植物的遗传多样性与遗传结构的兴趣。RAPD 分子标记能极其灵敏地揭示 2 个亲缘关系十分接近的个体之间的遗传变异, 因此, 它适合于检测种以下水平的多样性。近年来, 运用 RAPD 标记开展濒危植物居群的保育遗传学研究受到重视。人们已经对猪血木(*Euryodendron excelsum*) 个体^[6], 长叶榧(*Torreya jackii*) 居群^[7]、崖柏(*Thuja sutchuenensis*) 居群^[8]、白豆杉(*Pseudotaxus chienii*) 居群^[9]、长叶红砂(*Reaumuria trigyna*) 居群^[10] 等一大批珍稀濒危植物的遗传多样性进行了分析并提出了相应的保育策略。因此, 应用分子标记技术来研究这类大型附生蕨类植物的遗传多样性非常有意义。笔者优化了巢蕨的基因组 DNA 提取方法和 RAPD 反应体系, 以期建立一个稳定的 RAPD 反应体系, 为今后开展巢蕨居群的遗传多样性分析提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料 实验材料取自海南大学儋州校区农学院教学科研基地迁地保育的巢蕨的嫩叶。

1.1.2 试剂与引物 溴酚蓝、氯化钠、 $\varphi = 2\%$ 的 β -巯基乙醇、Tris-平衡酚、无水乙醇、异戊醇等均为国产分析纯; CTAB, SDS, PVP, EDTA, RNase 均购于上海生工; $2 \times \text{EasyTaq PCR SuperMix}$ (包含 *EasyTaq* DNA 聚合酶、dNTPs 和优化的反应缓冲液, 浓度 $2 \times$) 购于北京 Trangen company; 琼脂糖购于 Gene Tech (Shanghai) company; CTAB 抽提缓冲液($10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Tris-HCl pH8.0, $1.4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaCl, $w = 2\%$ 的 CTAB, $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 EDTA, $w = 2\%$ 的可溶性 PVP); 氯仿-异戊醇混合液($V_{\text{氯仿}}:V_{\text{异戊醇}} = 24:1$);

收稿日期: 2012-11-10

基金项目: 国家自然科学基金项目(31060123, 30760025); 海南省自然科学基金项目(311021, 312056); 海南大学教育教学研究课题立项项目(hdjy0920); 东莞市高等院校、科研机构科技计划项目(2011108102039, 2012108102054)

作者简介: 王雪兵(1985-), 男, 四川广安人, 东莞植物园研究实习员, 硕士。

通信作者: 胡新文, 男, 教授。E-mail: hqx888999@163.com

酚-氯仿-异戊醇混合液($V_{\text{酚}}:V_{\text{氯仿}}:V_{\text{异戊醇}}=25:24:1$)。100 条长度为 10 bp 的随机引物由上海生物工程有

限公司合成。

1.1.3 主要仪器 德国 EPPENDORF 冷冻离心机、德国 Biotra PCR 仪、德国 TGRADIENT 梯度 PCR 仪、上海 Unico 分光光度计(UV-2000)、北京佰亿新凝胶成像系统(Tanon4100)等。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取 CTAB 用量与不同 NaCl 浓度的处理组合为:① $w=1\%$ 的 CTAB, $1.4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaCl; ② $w=1\%$ 的 CTAB, $2.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaCl; ③ $w=2\%$ 的 CTAB, $1.4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaCl; ④ $w=2\%$ 的 CTAB, $2.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaCl; ⑤ $w=3\%$ 的 CTAB, $1.4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaCl; ⑥ $w=3\%$ 的 CTAB, $2.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaCl; ⑦ $w=4\%$ 的 CTAB, $1.4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaCl; ⑧ $w=4\%$ 的 CTAB, $2.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaCl。采用改良的 CTAB 法(在文献 [1] 的基础上,进行改进)提取巢蕨基因组 DNA,具体操作步骤如下:(1) 在 65°C 水浴中预热 CTAB 抽提缓冲液;(2) 称取幼嫩叶片约 300 mg 置于研钵中,用液氮研磨至粉状,然后迅速装入 2 mL 的离心管中;(3) 依序加入 1.5 mL 的 $w=2\%$ CTAB 抽提缓冲液和 20 μL 的 β -巯基乙醇,摇匀;(4) 将离心管置于 65°C 的水浴锅中,每 5 min 摇动 1 次,混匀,30 min 后取出;(5) 冷却 2 min 后,于 25°C $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min;(6) 取上清,加入相同体积的 Tris-平衡酚,摇匀成乳浊状,于 4°C $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min;(7) 取上清,加入相同体积的酚-氯仿-异戊醇混合液($V_{\text{酚}}:V_{\text{氯仿}}:V_{\text{异戊醇}}=25:24:1$),于 4°C $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min;(8) 重复步骤(7);(9) 取上清,加入相同体积的氯仿-异戊醇混合液($V_{\text{氯仿}}:V_{\text{异戊醇}}=24:1$),于 4°C $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min;(10) 用移液枪吸取 200 μL 上清转入 2 mL 的离心管中,依序加 1/10 体积的醋酸钠溶液(pH5.2)和 -20°C 的无水乙醇 400 μL ,慢慢上下摇动离心管 30 s, -20°C 沉淀 30 min;(11) 4°C $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,倒掉液体;(12) 加入 $\varphi=70\%$ 的乙醇进行漂洗,重复 1 次,注意勿将白色 DNA 沉淀倒出;(13) 吸出乙醇后,置于超净工作台里风干 DNA 1.5~2 h;(14) 加入 50 μL 的 TE 缓冲液溶解 DNA,再加入 0.5 μL 的 RNase,于 37°C 水浴 30 min,冷却后检测,保存于 -20°C 冰箱中。

1.2.2 DNA 纯化 按文献 [2] 的方法进行 DNA 的纯化。

1.2.3 DNA 纯度检测 分光光度计检测:取 DNA 原液 5 μL ,用 TE 稀释 100 倍,用 UV-2000 型紫外分光光度计测定 260,280 nm 处的吸光值。根据 260 nm 处的吸光值计算 DNA 浓度;根据 OD_{260}/OD_{280} 比值判断有无多糖、蛋白质、RNA 等杂质,从而确定 DNA 的纯度。琼脂糖凝胶电泳检测:取 5 μL DNA 原液,加入 1 μL 的 $6\times$ 溴酚蓝,混匀,点入 $w=0.8\%$ 琼脂糖凝胶中,用 $1\times$ TAE 缓冲液,2.5 V $\cdot \text{cm}^{-2}$ 电泳 1.5 h,凝胶成像系统(Tanon4100)观察拍照记录。检测 DNA 的完整性,并根据分子质量标准判断 DNA 分子大小。

1.2.4 RAPD 反应体系 RAPD-PCR 的扩增程序为: 94°C 预变性 5 min, 94°C 变性 30 s, 30°C 退火 30 s, 72°C 延伸 45 s,进行 5 个循环; 94°C 变性 30 s, 48°C 变性 30 s, 72°C 延伸 45 s,进行 35 个循环; 72°C 终延伸 7 min, 4°C 保存。PCR 扩增产物采用 $w=1.0\%$ 的琼脂糖凝胶电泳检测。

为增加结果的可靠性和提高反应体系的稳定性,在 RAPD-PCR 扩增反应体系中,进行了不同模板 DNA 用量(DNA 质量浓度为 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 和不同引物(浓度为 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 上样体积的试验。模板 DNA 体积梯度:0.5,1.0,1.5,2.0,2.5 μL ; 引物体积梯度:1.0,1.5,2.0,2.5,3.0 μL 。用 2 号和 28 号引物进行扩增,重复 1 次。为了筛选每条引物的最适退火温度,本实验设 12 个梯度进行筛选。用筛选出的引物和优化后的 RAPD-PCR 反应体系对材料进行 PCR 扩增。

2 结果与分析

2.1 巢蕨基因组 DNA 提取 实验结果表明:处理③($w=2\%$ 的 CTAB, $1.4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaCl) 提取 DNA 的效果较好,提取的 DNA 条带清晰可见,无 RNA,无降解现象(图 1); DNA 质量浓度为 $80 \sim 100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, OD_{260}/OD_{280} 比值为 1.78~1.96,说明 DNA 纯度高,蛋白质、酚类及多糖等杂质去除完全。

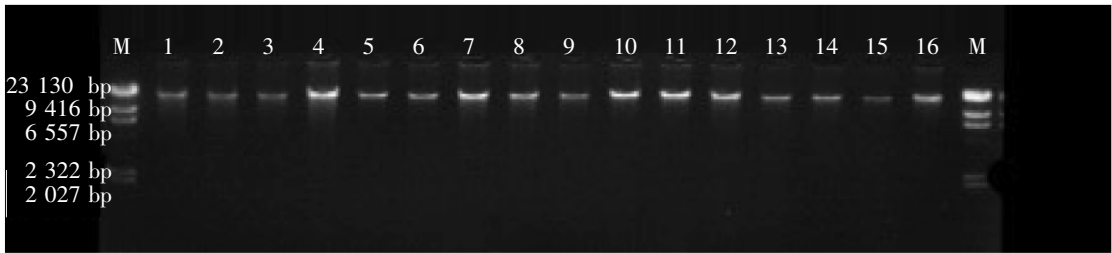


图 1 巢蕨基因组 DNA 琼脂糖凝胶电泳结果

2.2 巢蕨基因组 DNA 的 RAPD 反应体系的优化 实验结果表明: 模板用量为 1.5 μL 时,可扩出全部产物,且条带清晰,0.5 μL 时,重复差,1 μL 时,带型不整齐(图 2); 引物体积在 1.5 μL 时,能扩出全部产物,带型均匀(图 3)。

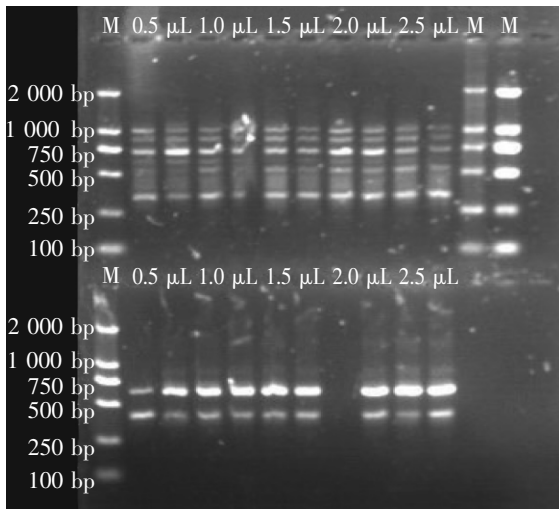


图 2 模板体积优化

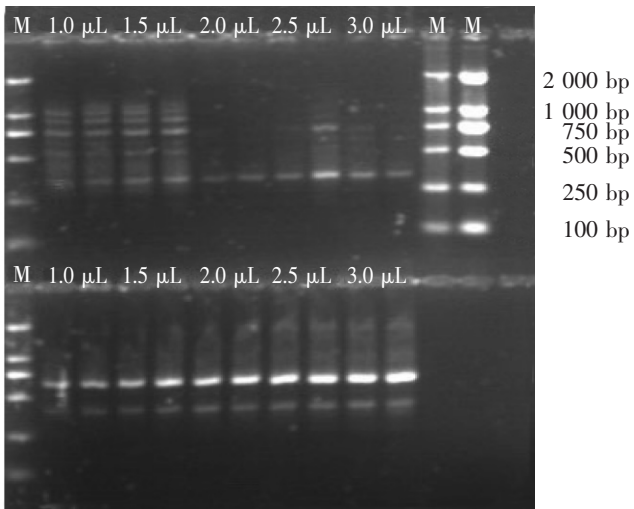


图 3 引物体积优化

经过优化后的巢蕨 RAPD-PCR 扩增反应体系为: 总反应体积 25 μL ,模板 DNA($50\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 1.5 μL ,引物($1\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 1.5 μL , $2 \times \text{EasyTaq PCR SuperMiX}$ 12.5 μL , ddH_2O 9.5 μL 。

根据所购引物的理论退火温度,设计了 12 个退火温度:46.5(A),46.6(B),46.8(C),47.1(D),47.5(E),47.8(F),48.2(G),48.9(H),49.2(I),49.3(J),49.4(K),49.5(L) $^{\circ}\text{C}$,运用上述优化后的反应体系对所购引物进行退火温度筛选,若上述温度范围不能筛选出最适合的退火温度,则调整扩大梯度 PCR 的梯度温度范围直到筛选出最适合的退火温度。从图 4 中可以看出,引物 WR02(退火温度为 49.5 $^{\circ}\text{C}$) 和 WR06(退火温度为 46.6 $^{\circ}\text{C}$) 能扩增出较多且清晰的条带。

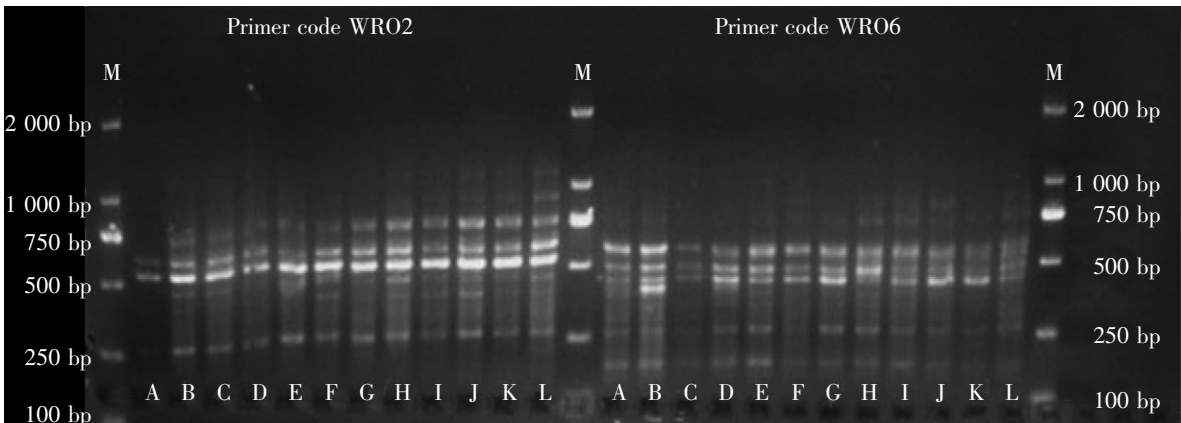


图 4 退火温度对 RAPD-PCR 的影响

对 100 条 RAPD 引物进行随机筛选,筛选出了能产生清晰的带型的 10 条引物,这些引物具有很好的多态性和良好的重复性。从表 1 可以看到每条引物对应的序列号、理论退火温度、最适退火温度。图 5 是引物 WR23 对 3 个巢蕨居群 60 个个体样品扩增的结果。从图 5 可以看出,扩增的带型既有相同的带型又有差异带型,带型均匀清晰,对照 CK 没有任何带型,说明建立的体系稳定有效。

表 1 10 条筛选出的 RAPD 引物序列与其对应的最适退火温度与理论退火温度

引物	序列(5'—3')	理论退火温度/℃	最适退火温度/℃
WR02	AACCGCGGCA	34	49.5
WR03	AACGGGCGTC	34	40.1
WR06	AAGCGACCTG	32	46.6
WR15	ACGAGCATGG	32	47.8
WR20	AGATGCGCGG	34	36.6
WR23	AGTCACTCCC	32	40.8
WR28	CAGTGCCGGT	34	49.4
WR39	CCTCACGTCC	34	39.0
WR65	GGAACCCGT	34	40.1
WR94	TTCCGCCACC	34	36.6

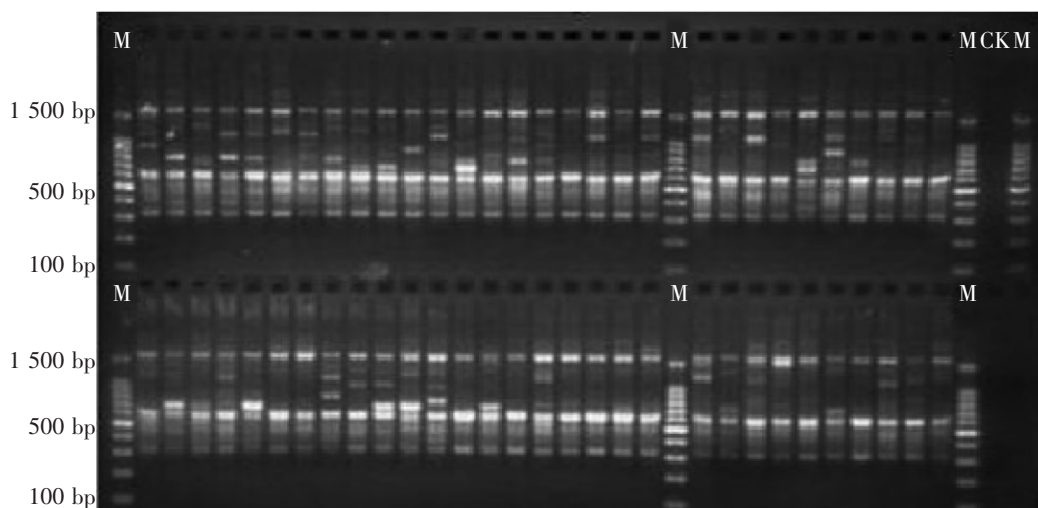


图 5 RAPD 引物 WR23 对 3 个巢蕨居群 60 个个体样品扩增的带型

3 讨论

巢蕨因富含多酚、多糖等次生代谢产物给 DNA 的提取带来了困难。目前常用的植物 DNA 的提取方法主要有 CTAB 法、SDS 法及高盐低 pH 法等^[3]。近年来,学者对蕨类植物 DNA 提取进行诸多尝试,已成功地提纯了一些蕨类植物的 DNA^[4-13]。李先进等^[9]认为,对药用蕨类植物大叶贯众(*Cyrtomium macrophyllum*)、掌叶铁线蕨(*Adiantum pedatum*)、凤尾蕨(*Pteris cretica*)、石韦(*Pyrrosia lingua*)而言,改进的 CTAB 优于 SDS 法;在多糖含量高的类群可增加 CTAB 的浓度^[20-21]。本实验结果表明,使用改进的 CTAB 法,能够快速提取出高纯度、高质量的巢蕨 DNA,能够满足进一步的研究需要。

对于要求检测大量样本的遗传多样性和居群遗传结构研究来说,检测手段的实验稳定性至关重要^[22]。所以有必要针对不同的实验材料进行 RAPD 反应体系的优化。主要影响反应体系的因素有模版 DNA、引物、Taq DNA 聚合酶、dNTPs、PCR 程序等。本实验中的 2 × EasyTaq PCR SuperMix 已经包含 EasyTaq DNA 聚合酶、dNTPs 和优化的反应缓冲液、浓度 2 ×,所以无需对 Taq DNA 聚合酶、dNTPs 及其缓冲液优化,只需对模版 DNA、引物进行优化。PCR 程序为:94 ℃ 预变性 5 min,94 ℃ 变性 30 s,30 ℃ 退火 30

s, 72 °C 延伸 45 s, 进行 5 个循环; 94 °C 变性 30 s, 48 °C 变性 30 s, 72 °C 延伸 45 s, 进行 35 个循环; 72 °C 延伸 7 min, 4 °C 保存。本实验优化出巢蕨 RAPD 的最终反应体系(25 μL)为: 模板 DNA($\rho = 50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 1.5 μL, 引物($1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 1.5 μL, 2 × EasyTaq PCR SuperMix 12.5 μL。实验证明, 该体系引物扩增出的条带清晰、多态性条带谱具有重复性。

致谢: 海南大学的姜艳、冯耀文、司更花、陈吉良、李江渝、周双清和中国热带农业科学院品种资源研究所的黄明忠在实验过程中给予了帮助, 特此致谢!

参考文献:

- [1] HOLTUM R E. *Asplenium* Linn. sect. *Thamnopteris* Presl [J]. *Gardens' Bulletin*, Singapore, 1974, 27: 143 – 154.
- [2] BENZING D H. *Vascular Epiphytes: General Biology and Related Biota* [M]. Cambridge: University of Cambridge Press, 1990: 354.
- [3] HUANG T C. *Flora of Taiwan* [M]. Taipei: Editorial Committee of the Flora of Taiwan, 1994: 648.
- [4] ELLWOOD M D F, FOSTER W A. Doubling the estimate of invertebrate biomass in a rainforest canopy [J]. *Nature*, 2004, 429: 549 – 551.
- [5] 王雪兵, 黄勇, 杨琪, 等. 巢蕨基质的形成及其对雨林生态的影响 [J]. 仙湖, 2010, 9(3/4): 66 – 68.
- [6] 王艇, 苏应娟. 中国特有极度濒危植物猪血木的保护遗传学研究 [J]. 中山大学学报: 自然科学版, 2005, 44(1): 68 – 71.
- [7] 李建辉, 金则新, 李钧敏. 濒危植物长叶榧群体遗传多样性的 RAPD 分析应用 [J]. 应用生态学报, 2007, 18(12): 2661 – 2667.
- [8] 刘建锋, 肖文发. 濒危植物崖柏遗传多样性的 RAPD 分析 [J]. 江西农业大学学报, 2008, 30(1): 68 – 72.
- [9] 王艇, 苏应娟, 欧阳蒲月, 等. 利用 RAPD 标记分析濒危植物白豆杉种群的遗传结构 [J]. 生态学报, 2006, 26(7): 2313 – 2316.
- [10] 张颖娟, 王玉山. 濒危灌木长叶红砂遗传多样性 RAPD 的分析 [J]. 生物学杂志, 2008, 27(2): 157 – 161.
- [11] DOYLE J J, DOYLE J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue [J]. *Phytochem Bul*, 1987, 19: 11 – 15.
- [12] 邹喻苹, 葛颂, 王晓东. 系统与进化植物学中的分子标记 [M]. 北京: 科学出版社, 2001: 128.
- [13] 周延清, 杨清香, 张改娜. 生物遗传标记与应用 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2008: 28 – 93.
- [14] 付再萍. 狗脊蕨(*Woodwardia japonica* (L. f.) Sm) 基因组 DNA 提取与随机扩增多态性 DNA(RAPD) 的优化 [J]. 杭州师范学院学报: 自然科学版, 2007, 6(2): 129 – 132.
- [15] 沈洁, 罗安才. 提取蕨类植物 DNA 方法比较 [J]. 安徽农业科学, 2010, 38(4): 1738 – 1740.
- [16] 陈进明, 王青峰. 珍稀濒危蕨类植物东方水韭的遗传多样性 [J]. 武汉植物学研究, 2006, 24(6): 569 – 573.
- [17] 陈进明, 刘星, 王青峰. 中国珍稀濒危特有蕨类植物——云贵水韭的遗传多样性 [J]. 武汉大学学报: 理学版, 2005, 51(6): 767 – 770.
- [18] 陈进明, 王晶苑, 刘星. 中华水韭遗传多样性的 RAPD 分析 [J]. 生物多样性, 2004(12): 348 – 353.
- [19] 李先进, 彭正松, 张正英, 等. 四种药用蕨类 DNA 提取的比较研究 [J]. 绵阳师范学院学报, 2008, 27(8): 67 – 69.
- [20] AITCHITT M, AINSWORTH C C, THANGAVELU M. A rapid and efficient method for the extraction of total DNA from mature leaves of the date palm (*Phoenix dactylifera* L.) [J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1993, 11(4): 317 – 319.
- [21] MAGUIRE T L, COLLINS G G, SEDGLEY M. A modified CTAB DNA extraction procedure for plants belong to the family Proteaceae [J]. *Plant Molecular Biology Report*, 1994, 12(2): 106 – 109.
- [22] 钱韦, 葛颂, 洪德元. 采用 RAPD 和 ISSR 标记探讨中国疣粒野生稻的遗传多样性 [J]. 植物学报, 2000, 42(7): 741 – 750.

(下转第 386 页)

植物学会, 2003: 488.

- [0] 文伟. 骨碎补愈伤组织的诱导及无性系建立的研究 [J]. 黑龙江农业科学, 2010(2): 3–6.
- [1] 檀龙云, 刘宝东, 张凌献. 骨碎补科两种植物配子体发育的研究 [J]. 武汉植物学研究, 2008, 26(3): 219–223.
- [2] 徐艳, 李扬, 李东, 等. 槲蕨配子体形态发育研究 [J]. 热带亚热带植物学报, 2009, 17(1): 12–16.
- [3] 吴艳芳, 尤敏, 王新胜, 等. 槲蕨配子体发育影响因素的初步研究 [J]. 武汉植物学研究, 2005, 23(5): 461–463.
- [4] 刘闻川, 俞慧娜, 戎华磊, 等. 不同光照条件对槲蕨组织培养外植体褐化的影响 [J]. 广东农业科学, 2008(8): 22–25.

Research Advances on Propagation of *Drynaria fortunei*

LI Cui, HUANG Xue-yan, LV Hui-zhen, HUANG Bao-you, ZHANG Zhan-jiang

(Guangxi Botanical Garden of Medicinal Plants, Guangxi Key Laboratory for Conservation and Genetic Improvement of Medicinal Plant Resources, Nanning 530023, China)

Abstract: *Drynaria fortunei*, a medicinal fern, is used as a kind of medicine to improve bone cell activities, prevent the toxic, reduce blood lipid and so on. The researches on *D. fortunei* were mainly focused on the herbals, pharmacological action, chemical constituents, physiology and artificial propagation. In recent years wild *D. fortunei* resources have sharply decreased as their living environment has been damaged due to their excessive collection driven by market demand. For conservation and sustainable utilization of the wild resources the methods for propagation of *D. fortunei* were reviewed based on available literature. Clearly, the tissue culture is the best way to propagate *D. fortunei* in the future and problems arising from *D. fortunei* propagation are pointed out.

Key words: *Drynaria fortunei*; sporogony; rhizome division; tissue culture

(上接第 383 页)

Extraction of Genomic DNA of *Neottopteris nidus* and Optimization of the RAPD Reaction System

WANG Xue-bing^{1,4}, YU Xu-dong^{1,3}, ZHU Hui-jun^{1,2}, WU Fan-hua¹, HUANG Xiao-feng⁴, HU Xin-wen¹

(1. College of Agronomy, Hainan University, Haikou 570228, China; 2. Research and Development Center for Fine Chemicals/ State Key Laboratory Breeding Base for Green Pesticide and Agricultural Bioengineering/ Ministry of Education Key Laboratory, Guiyang, Guizhou 550000, China; 3. Ministry of Education Key Laboratory for Conservation and Utilization of Tropical Crops Germplasm Resources, Haikou 570228, China; 4. Dongguan Botanic Garden, Dongguan, Guangdong 523086, China)

Abstract: In order to study the genitic diversity and genetic structure of Bird's nest fern (*Neottopteris nidus*) populations, fresh tender fronds of the Bird's nest fern were collected and resorted to genomic DNA extraction through optimized RAPD reaction system by using different concentrations of CTAB and NaCl, different volumes of template DNA and primer. The improved CTAB DNA extraction method was the best to extract the genomic DNA of the fronds of the Bird's nest fern. The optimum reaction system (25 μ L) for RAPD amplification of the Bird's nest fern DNA was listed as follows: The template DNA (50 mg $\cdot$ L⁻¹) 1.5 μ L; the primer (1 mmol $\cdot$ L⁻¹) 1.5 μ L; 2 $\times$ EasyTaq PCR SuperMiX 12.5 μ L.

Key words: Bird's nest fern; *Neottopteris nidus*; *Asplenium nidus*; extration of genomic DNA; RAPD; molecular marker