

正交设计优化辣椒 SRAP - PCR反应体系及引物筛选

周坤华^{1,2}, 方荣¹, 陈学军^{1*}, 繆南生¹, 王悟亮³

(1. 江西省农业科学院 蔬菜花卉研究所, 江西 南昌 330200; 2. 江西省农业科学院 油料作物重点实验室, 江西 南昌 330200; 3. 江西省农业科学院, 江西 南昌 330200)

摘要:以辣椒基因组 DNA 为模板, 采用 $L_{16}(4^5)$ 正交试验设计, 对 SRAP 反应体系中的 5 种关键因素 (*Taq* DNA 聚合酶、 Mg^{2+} 、dNTPs、引物、模板 DNA) 进行优化, 结果表明, 辣椒 SRAP - PCR 最佳反应体系为: *Taq* DNA 聚合酶 0.75 U、 Mg^{2+} 0.6 mmol/L、dNTPs 0.2 mmol/L、引物 0.8 μ mol/L、模板 DNA 50 ng, 总体积为 10 μ L。运用该体系对辣椒 3 份种质材料进行验证, 证明该体系稳定可靠, 并从 198 个 SRAP 引物组合中筛选出扩增条带清晰、多态性丰富的 35 个引物组合。该体系的建立与多态性引物组合的筛选为 SRAP 标记技术在辣椒分子遗传学中的应用提供科学依据。

关键词:辣椒; SRAP; 正交设计; 体系优化; 引物筛选

中图分类号: S641.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000 - 2286(2010)03 - 0595 - 06

Optimization of SRAP - PCR System in Pepper Using Orthogonal Design and Selection of Primers

ZHOU Kun-hua^{1,2}, FANG Rong¹, CHEN Xue-jun^{1*},
MIAO Nan-sheng¹, WANG Wu-liang³

(1. Vegetable and Flower Institute, Jiangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanchang 330200, China; 2. The Key Laboratory of Oil Crop, Jiangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanchang 330200, China; 3. Jiangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanchang 330200, China)

Abstract: The $L_{16}(4^5)$ orthogonal design was used to optimize SRAP - PCR system in pepper (*Capsicum* spp.) with five key factors (*Taq* DNA polymerase, Mg^{2+} , dNTPs, primer and template DNA, respectively). The results showed that the optimized SRAP - PCR system for pepper was 0.75 U *Taq* DNA polymerase, 0.6 mmol/L Mg^{2+} , 0.2 mmol/L dNTPs, 0.8 μ mol/L primer, 50 ng template DNA in a total of 10 μ L reaction solution. The optimized SRAP - PCR system was tested on three pepper germplasm and was steady and reliable. 35 primer combinations were selected with abundant polymorphism from 198 primer combinations. The optimized SRAP - PCR system and polymorphism primer combinations could be applied to research on molecular genetics in pepper.

Key words: pepper; SRAP; orthogonal design; system optimization; selection of primers

收稿日期: 2010 - 03 - 03 修回日期: 2010 - 05 - 09

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30860173) 和江西省农科院创新基金项目

作者简介: 周坤华 (1984 -), 男, 硕士, 助理研究员, 主要从事蔬菜遗传育种与分子生物技术研究; E-mail: zhoukunchua6080@163.com; * 通讯作者: 陈学军, 博士, 研究员, E-mail: 19889766@163.com.

SRAP标记(sequence-related amplified polymorphism, 序列相关扩增多态性)是 Li和 Quiros^[11]开发的一种基于 PCR (polymerase chain reaction, 聚合酶链式反应)的新型分子标记技术。该标记针对基因外显子 GC(鸟嘌呤、胞嘧啶)含量丰富及启动子、内含子 AT(腺嘌呤、胸腺嘧啶)含量丰富的特点设计引物,进行 PCR 扩增,因不同个体内含子、启动子与间隔区长度不等而产生多态性,具有操作简便、快速、多态性丰富、重复性好以及不需预知物种序列信息等优点,目前已应用于遗传图谱构建、基因定位和遗传多样性分析等领域^[12-7]。

辣椒(*Capsicum* spp.)是一种世界性的蔬菜作物,其果实具特有的辣味和丰富的维生素 C,既可鲜食、调味,也可入药,是提炼辣椒油、辣椒红素和辣椒素的原料,具有重要的经济价值和食疗保健作用^[8]。近年来, AFLP、RAPD、ISSR 等分子标记技术在辣椒上应用较普遍^[9-12],但 SRAP 标记在辣椒上的应用报道较少^[13-14],且有关采用正交试验设计方法优化辣椒 SRAP 反应体系的研究尚未见报道。本文首次运用正交试验设计方法,开展了辣椒 SRAP 反应 10 μ L 体系的优化研究,并对部分 SRAP 引物组合进行了多态性筛选,以期获得辣椒最佳 SRAP 反应体系和多态性丰富的 SRAP 引物组合,降低实验成本,为辣椒分子遗传学研究提供技术支撑。

1 材料和方法

1.1 材料和试剂

1.1.1 材料 试验材料为 B₉₄₃₁ (*C. annuum*. var *longum*)、海南小米椒 H108 (*C. frutescens*)及其组合 B₉₄₃₁ \times H108,上述均由江西省农业科学院蔬菜花卉研究所提供。

1.1.2 试剂 用于 SRAP-PCR 反应的 *Taq* DNA 聚合酶、Mg²⁺、dNTPs 和 Buffer 均购自 Femantas 公司,用于凝胶检测的标准分子量(marker) 100 bp DNA ladder 购自 Takara 公司。SRAP 引物北京奥科公司合成,以上游引物 Me8 (5' - TGAGTCCAAACCGGCAC - 3')和下游引物 Em21 (5' - GACTGCGTACGAATTC - 3')为引物组合,作为体系优化的固定引物。

1.2 基因组 DNA 的提取和检测

参照改良 CTAB 法^[15]提取辣椒基因组 DNA。用岛津公司 Uvmini-1240 型紫外分光光度计检测 DNA 溶液浓度与纯度,并将其稀释为 50 ng/ μ L, -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.3 SRAP-PCR 反应体系优化的正交设计

根据统计学原理,采用 L₁₆ (4⁵) 正交表^[16]设计试验,对 SRAP 反应体系的 *Taq* 聚合酶、Mg²⁺、dNTPs、引物和模板 DNA 等 5 种影响因素设置四水平 16 个组合,2 次重复(表 1 和表 2),总反应体积为 10 μ L。

表 1 PCR 反应体系的因素水平设定

Tab 1 The designation of factors and their levels in PCR reaction

因素 Factors	水平 (10 μ L 体系终浓度) Levels (final concentration of 10 μ L reaction system)			
	1	2	3	4
<i>Taq</i> 酶 / U <i>Taq</i> polymerase	0.25	0.5	0.75	1.0
Mg ²⁺ / (mmol \cdot L ⁻¹)	1	1.5	2.0	2.5
dNTPs / (mmol \cdot L ⁻¹)	0.1	0.2	0.3	0.4
引物 / (μ mol \cdot L ⁻¹) Primer	0.2	0.4	0.6	0.8
模板 DNA / ng Template DNA	25	50	75	100

1.4 PCR 反应

PCR 反应在 Eppendorf 公司生产的 PCR 仪中进行,扩增程序为: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 1 min, 35 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 5 个循环; 94 $^{\circ}$ C 1 min, 50 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。PCR 产物采用 60 g/L 变性聚丙烯酰胺凝胶 (7 mol/L 尿素) 电泳,电泳缓冲液为 1 \times TBE, 70 w 恒功率电泳 1.5 h。参照许绍斌等^[17]的方法进行快速银染法染色显影,在荧光灯上观察分析条带。

表 2 PCR 反应正交试验设计表 [L₁₆(4⁵)]

Tab 2 The table of orthogonal design of PCR[L₁₆(4⁵)]

处理 Treat	Taq 酶 /U Taq polymerase/	Mg ²⁺ / (mmol · L ⁻¹)	dNTPs/ (mmol · L ⁻¹)	引物 / (μmol · L ⁻¹) Primer	模板 DNA /ng Template DNA
1	0.25	1.0	0.1	0.2	25
2	0.25	1.5	0.2	0.4	50
3	0.25	2.0	0.3	0.6	75
4	0.25	2.5	0.4	0.8	100
5	0.50	1.0	0.2	0.6	100
6	0.50	1.5	0.1	0.8	75
7	0.50	2.0	0.4	0.2	50
8	0.50	2.5	0.3	0.4	25
9	0.75	1.0	0.3	0.8	50
10	0.75	1.5	0.4	0.6	25
11	0.75	2.0	0.1	0.4	100
12	0.75	2.5	0.2	0.2	75
13	1.00	1.0	0.4	0.4	75
14	1.00	1.5	0.3	0.2	100
15	1.00	2.0	0.2	0.8	25
16	1.00	2.5	0.1	0.6	50

1.5 数据分析

参考何正文等^[18]的方法,按照条带数量、清晰度及背景对 16 个组合的电泳条带进行打分,取 2 次得分的平均值进行直观分析。采用穆立蕾等^[19]的方法求出每个因素同一水平下的得分总和 K_i 及平均值 k_i ,并求出同因素不同水平间的极差 R ,最后对各因素不同水平的结果均值 k_i 用 Excel 作图分析,确定各因素的最佳用量或浓度水平。

1.6 优化体系的稳定性检测及引物筛选

随机选择 8 对 SRAP 引物组合对优化体系进行验证,并用 198 对 SRAP 引物组合进行 PCR 扩增,筛选多态性引物。

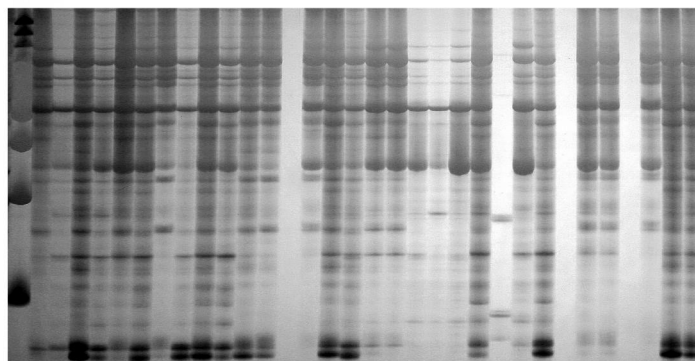
2 结果与分析

2.1 正交试验各因素对 PCR 反应影响的差异分析

在 16 个处理中,由于 Taq DNA 聚合酶、Mg²⁺、dNTPs、引物、模板 DNA 等 5 个因素浓度组合不同,扩增效果存在明显差异(图 1)。第 15 组合得 16 分,均值最高,扩增效果最好,其条带丰富,清晰度高,背景较低;第 13 组合得 1 分,均值最低,几乎没有扩增条带,扩增效果最差(表 3)。

由分析极差 R 可知(表 4),在 5 个因素中,dNTPs 的 R 值最

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16



从左至右分别为重复 I 和重复 II。其中,M: 100 bp DNA ladder; 1~16: 表 2 中的 1~16 处理。

From left to right were repeat I and II M: 100bp DNA ladder; 1~16: 1~16 treats in table 2

图 1 视上核细胞 (×400)

Fig 1 Nucleus supraopticus (×400)

高,为 7.0,说明 dNTPs 对反应体系结果影响最大;模板 DNA 的 R 值最低,为 1.9,说明模板 DNA 对反应体系结果影响最小。各因素对 PCR 反应的影响依次为: dNTPs > 引物 > Taq 酶 > Mg²⁺ > 模板 DNA。

表 3 PCR 产物电泳结果得分

Tab 3 The score result of PCR products

重复 Repeat	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
I	3	2	15	5	11	13	7	4	14	8	10	9	1	6	16	12
II	10	9	5	4	6	13	3	8	15	2	12	11	1	7	16	14
平均值 Average	6.5	5.5	10	4.5	8.5	13	5	6	14.5	5	11	10	1	6.5	16	13

表 4 正交试验结果的直观分析

Tab 4 Intuitive result of the orthogonal design

参素 Parameter	Taq 酶 Taq polymerase	Mg ²⁺	dNTPs	引物 Primer	模板 DNA Template DNA
K ₁	53	61	87	56	67
K ₂	65	60	80	47	76
K ₃	81	82	72	73	68
K ₄	73	32	31	96	61
k ₁	6.6	7.6	10.9	7.0	8.4
k ₂	8.1	7.5	10.0	5.9	9.5
k ₃	10.1	10.1	9.0	9.1	8.5
k ₄	9.1	8.5	3.9	12.0	7.6
R	3.5	2.6	7.0	6.1	1.9

2.2 因素内各水平对 PCR 结果的影响

2.2.1 Taq 酶用量 由图 2 可知, Taq 酶用量从 0.25 ~ 0.75 U, 结果均值逐步提高, 到 0.75 U 单位时达到扩增最佳效果。当用量为 1 U 单位时, 结果均值反而有所降低。这是因为 Taq 酶浓度过低, 合成产物量减少; Taq 酶浓度过高, 可引起非特异性扩增, 产生大量杂带, 且背景较深, 不利于遗传多态性的分析。从扩增效果和经济角度考虑, Taq 酶用量以 0.75 U 为佳。

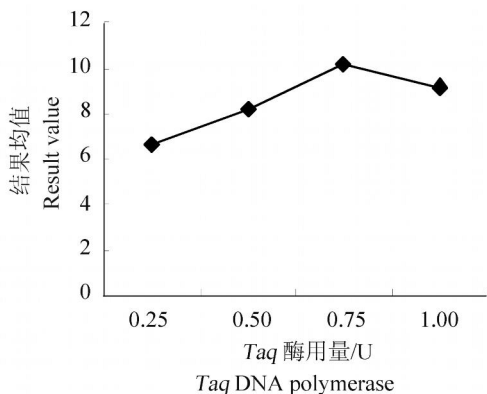


图 2 Taq 酶用量与结果均值的关系
Fig 2 Relationship between quantity of Taq DNA polymerase and mean of results

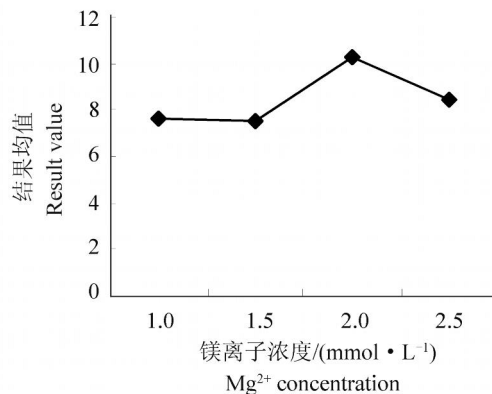


图 3 Mg²⁺ 浓度与结果均值的关系
Fig 3 Relationship between quantity of Mg²⁺ concentration and mean of results

2.2.2 Mg²⁺ 浓度 从图 3 看到, Mg²⁺ 浓度 1.0 mmol/L 和 1.5 mmol/L 2 个处理之间结果均值差异不大, 当 Mg²⁺ 浓度达到 2 mmol/L 时, 扩增效果最好, 当浓度为 2.5 mmol/L 时, 扩增效果降低。Mg²⁺ 是 Taq

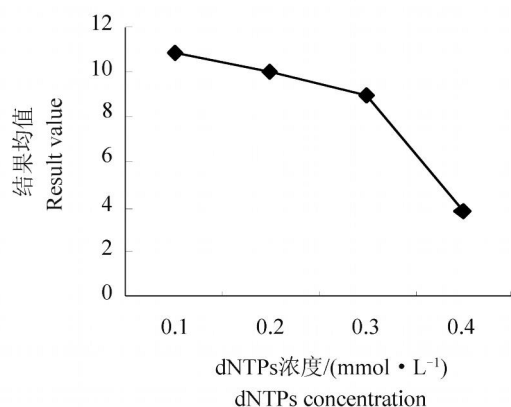


图 4 dNTPs浓度与结果均值的关系
Fig 4 Relationship between quantity of dNTPs concentration and mean of results

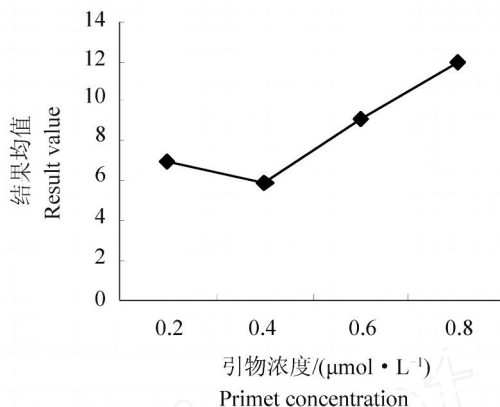


图 5 引物浓度与结果均值的关系
Fig 5 Relationship between quantity of primer concentration and mean of results

酶的激活剂,同时它与 dNTPs 模板结合,又可降低酶活性所需要的游离 Mg^{2+} 的量。因此, Mg^{2+} 浓度过低会降低 *Taq* 酶的活性,过高亦会造成非特异性扩增。因此, Mg^{2+} 浓度以 2 mmol/L 水平为宜。

2.2.3 dNTPs浓度 由图 4可知,随着 dNTPs浓度的不断升高,结果均值也随之下落。当 dNTPs浓度在 0.1 mmol/L, 0.2 mmol/L, 0.3 mmol/L 水平时,其结果均值差异不明显;当 dNTPs浓度为 0.4 mmol/L时,结果均值明显下降。这是因为高浓度的 dNTPs会对 PCR 扩增反应起抑制作用,而浓度过低又会影响到扩增产率。因此,综合考虑, dNTPs浓度以 0.2 mmol/L 水平为佳。

2.2.4 引物浓度 从图 5看到,引物浓度在 0.2 μmol/L和 0.4 μmol/L时,结果均值差异不显著,在 0.6 μmol/L和 0.8 μmol/L水平上,整体扩增效果则成明显的上升趋势。引物浓度会影响 PCR 扩增的特异性,较高的引物浓度会导致非特异性产物扩增,增加引物之间形成二聚体的机会;过低则影响到扩增效果。本实验结果表明,引物浓度以 0.8 μmol/L 为最适。

2.2.5 模板 DNA 用量 由图 6可知,当模板 DNA 用量为 25 ~ 50 ng时,结果均值有所增加,当模板 DNA 用量为 50 ng时,结果均值达到最高,此后,随着 DNA 用量的扩大,结果均值反而有所下降。这是因为 DNA 浓度过低,可导致扩增结果不稳定及扩增条带模糊;浓度过高,则可能使引物或 dNTPs过早耗尽,底物过量扩增,过早进入线性阶段,出现扩增结果不稳定的假象。因此,模板 DNA 量选用 50 ng 为最佳。

2.3 体系验证及多态性引物筛选

根据上述结果与分析,确定辣椒 SRAP - PCR 最优反应体系为: *Taq* 酶 0.75 U, Mg^{2+} 2 mmol/L, dNTPs 0.1 mmol/L, 引物 0.8 μmol/L,

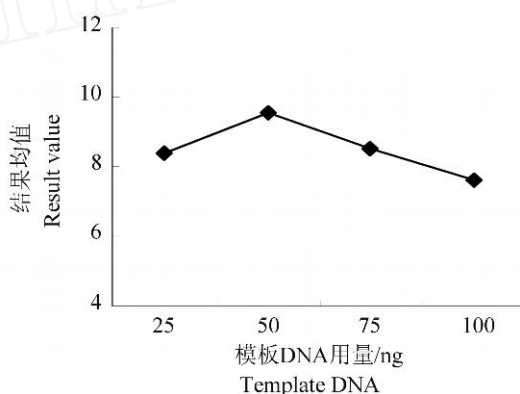
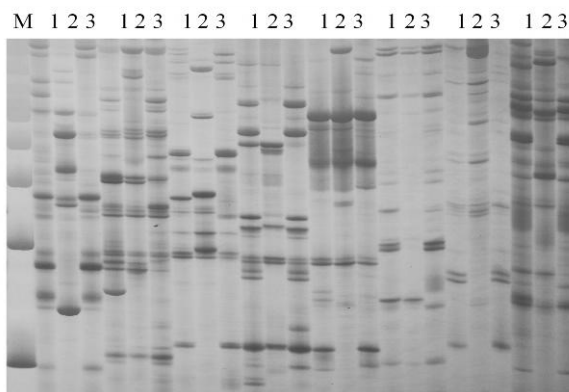


图 6 模板 DNA 用量与结果均值的关系
Fig 6 Relationship between quantity of template DNA and mean of result



M 为 100 bp DNA ladder;泳道 1: B₉₄₃₁ × H108;泳道 2: H108;泳道 3: B₉₄₃₁。

M: 100 bp DNA ladder; lane 1: B₉₄₃₁ × H108; lane 2: H108; lane 3: B₉₄₃₁

图 7 优选反应体系 8 个引物组合的验证结果

Fig 7 The verification results of 8 primer combinations based on the optimized SRAP - PCR system

模板 DNA 50 ng,总反应体积 10 μ L。应用该体系随机抽取 8 对引物组合对 3 个辣椒基因组 DNA 进行分析,结果表明:不同引物组合扩增条带均清晰稳定,且多态性丰富(图 7),说明该体系稳定可靠,适用于辣椒基因组 DNA 的 SRAP 分析。

运用优化反应体系及供试辣椒基因组 DNA 对 198 对 SRAP 引物组合进行多态性筛选,结果显示,所有引物组合均能扩增出清晰可辨的条带,每个引物组合扩增条带数 28 ~ 70 条不等,其中 183 对引物组合扩增出多态性条带,占有引物组合的 92.42%;多态性条带清晰且丰富(5 条以上)的引物组合有 35 对,占有引物组合的 17.68%。

3 讨 论

SRAP 是在总结已有分子标记优缺点基础上开发出的一种新型的 DNA 分子标记技术,其扩增条带虽然较 RAPD、ISSR 分子标记稳定,但基于 PCR 反应的 SRAP 分子标记技术,同样受反应条件及物种差异的影响。刘立军等^[20]认为,不同植物 SRAP 最佳反应体系差别很大,需构建同一物种在相同仪器设备和一定操作规范下的最佳优化体系。本研究利用正交实验设计均匀分散、综合可比、可伸可缩及效用明确的特点,对影响辣椒 SRAP 反应体系的主要因素进行了优化筛选,较快找到了最优组合,避免了单一因素试验结果的不足。本研究采用了 SRAP 标记通用的扩增程序,研究了影响辣椒基因组 PCR 反应的 *Taq* 酶用量、 Mg^{2+} 浓度、dNTPs 浓度、引物浓度和模板 DNA 用量等 5 个主要因子。研究表明,dNTPs 浓度对辣椒扩增结果影响最大,模板 DNA 用量对扩增结果影响最小,这与张飞等^[21]和楚爱香等^[22]的研究结果是一致的。但与袁菊红等^[23]和姜维华等^[24]在石蒜、一品红植物上的研究结果有所差异,他们的研究结果显示 Mg^{2+} 浓度对扩增结果影响最大。这也说明在不同物种的 SRAP 反应体系中,既有相似的影响因子,也有各自特殊的反应条件,因此,应针对不同的研究对象设计不同的反应体系。

本研究筛选出的辣椒最优 SRAP-PCR 反应体系为:*Taq* 酶 0.75 U, Mg^{2+} 2.0 mmol/L,dNTPs 0.2 mmol/L,引物 0.8 μ mol/L,模板 DNA 50 ng,总体积 10 μ L。与黄瓜^[25]、丝瓜^[26]的 10 μ L SRAP 反应体系相比较,本体系引物浓度相对较高,但 *Taq* 酶的用量更低, Mg^{2+} 浓度、dNTPs 浓度和模板 DNA 用量则相对一致。与任羽等^[14]报道的 25 μ L 辣椒反应体系相比,本体系 *Taq* 酶用量和引物浓度等都有所减少,且 10 μ L 的小体系比 25 μ L 体系实验成本大大降低,因此,本研究优化的 10 μ L 反应体系更为经济高效,可广泛应用于辣椒基因组 DNA 的 SRAP 分析。

参考文献:

- [1] Li G, Quiros C F. Sequence - related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in Brassica[J]. Theor Appl Genet, 2001, 103: 455 - 461.
- [2] 王刚,潘俊松,李效尊,等. 黄瓜 SRAP 遗传连锁图的构建及侧枝基因定位[J]. 中国科学(C辑):生命科学, 2004, 36(16): 510 - 516.
- [3] Lin Z, Zhang X, Nie Y, et al Construction of a genetic linkage map for cotton based on SRAP[J]. Chinese Science Bulletin, 2003, 98(19): 2063 - 2067.
- [4] 潘俊松,王刚,李效尊,等. 黄瓜 SRAP 遗传连锁图的构建及始花节位的基因定位[J]. 自然科学进展, 2005, 15(2): 167 - 172.
- [5] 陈锋,张洁夫,陈松,等. 甘蓝型油菜隐性核不育基因的 SRAP 标记[J]. 江苏农业学报, 2007, 23(4): 283 - 288.
- [6] Ferriol M, Pico B, Nuez F. Genetic diversity of a germplasm collection of *Cucurbita pepo* using SRAP and AFLP markers[J]. Theor Appl Genet, 2003, 107: 271 - 282.
- [7] 林忠旭,张献龙,聂以春,等. 新型标记 SRAP 在棉花 F_2 分离群体及遗传多样性评价中的适用性分析[J]. 遗传学报, 2004, 31(6): 622 - 626.
- [8] 庠荣,陈学军,缪南生,等. 辣椒 (*Capsicum* spp.) 遗传资源与分子育种进展[J]. 江西农业学报, 2004, 16(3): 55 - 61.
- [9] Paran I, Aftergoot E, Shifris C. Variation in *Capsicum annuum* revealed by RAPD and AFLP markers[J]. Euphytica, 1998, 99: 167 - 174.
- [10] Sergio L, Alberto A, Luciana Q, et al RAPD and AFLP assessment of genetic variation in a landrace of pepper (*Capsicum annuum* L.) grown in North West Italy[J]. Genetic Resources and Crop Evolution, 2003, 50: 723 - 735.

(下转第 632 页)

- [2] 朱美英, 罗运阔, 赵小敏, 等. 南昌市近郊蔬菜基地土壤和蔬菜中重金属污染状况调查与评价 [J]. 江西农业大学学报, 2005, 27(5): 781 - 784.
- [3] 丁爱芳, 潘根兴. 南京城郊零散菜地土壤与蔬菜重金属含量及健康风险分析 [J]. 生态环境, 2003, 12(4): 409 - 411.
- [4] 黄益宗. 镉与磷、锌、铁、钙等元素的交互作用及其生态学效应 [J]. 生态学杂志, 2004, 23(2): 92 - 97.
- [5] Moreno D A, Villora G, Ruiz J M, et al. Growth conditions, elemental accumulation and induced physiological changes in Chinese [J]. Chemosphere, 2003, 52(6): 1031 - 1040.
- [6] 韩志萍, 王趁义. 不同生态型芦竹对 Cd, Hg, Pb, Cu 的富集与分布 [J]. 生态环境, 2007, 16(4): 1092 - 1097.
- [7] 冯文强, 涂仕华, 秦鱼生, 等. 水稻不同基因型对铅镉吸收能力差异的研究 [J]. 农业环境科学学报, 2008, 27(2): 447 - 451.
- [8] 庞安华, 刘建军, 倪才英, 等. 贵溪冶炼厂周边农田土壤重金属污染特性及评价 [J]. 土壤通报, 2006, 37(6): 1212 - 1217.
- [9] 胡宁静, 李泽琴, 黄朋, 等. 江西贵溪冶炼厂重金属环境污染特征及生态风险评价 [J]. 地球科学进展, 2004, 19(6): 467 - 471.
- [10] 黎佳佳, 付庆灵, 吕意, 等. 辣椒对灰潮土重金属 Cd Pb 污染的反应与矿质元素吸收 [J]. 农业环境科学学报, 2005, 24(2): 236 - 241.
- [11] 刘景春, 李裕红, 晋宏. 铜污染对辣椒产量、铜累积及叶片膜保护酶活性的影响 [J]. 福建农业学报, 2003, 18(4): 254 - 257.
- [12] Allan D L, Jarrell W M. Proton and copper absorption by maize and soybean root cell - walls [J]. Plant Physiology, 1989, 89(3): 823 - 832.
- [13] Choudhary M, Bailey L D, Grant C A, et al. Effect of Zn on the concentration of Cd and Zn in plant tissue of two durum - wheat lines [J]. Canadian Journal of Plant Science, 1995, 75(2): 445 - 448.
- [14] Branquinho C, Brown D H, Catarino F. The cellular location of Cu in lichens and its effects on membrane integrity and chlorophyll fluorescence [J]. Environmental and Experimental Botany, 1997, 38(2): 165 - 179.
- [15] 董力诚, 夏春镗, 沈昕妍. 芹菜叶对铅的吸收及其迁移规律初探 [J]. 同济大学学报: 医学版, 2005, 26(5): 79 - 81, 85.
- [16] 李非里, 刘从强, 杨元根, 等. 贵阳市郊菜园土—辣椒体系中重金属的迁移特征 [J]. 生态与农村环境学报, 2007, 23(4): 52 - 56.
- [17] 崔海丽, 夏春镗. 芹菜叶对铅的吸收和迁移规律 [J]. 同济大学学报: 医学版, 2006, 27(5): 17 - 20.

(上接第 600 页)

- [11] 陈学军, 陈劲枫, 耿红, 等. 辣椒属 5 个栽培种部分种质亲缘关系的 RAPD 分析 [J]. 园艺学报, 2006, 33(4): 751 - 756.
- [12] 陈学军, 程志芳, 陈劲枫, 等. 辣椒种质遗传多样性的 RAPD 和 ISSR 及其表型数据分析 [J]. 西北植物学报, 2007, 27(4): 662 - 670.
- [13] 杜晓华, 巩振辉, 王得元, 等. 辣椒优良自交系间遗传差异的分子分析 [J]. 西北植物学报, 2006, 26(12): 2445 - 2452.
- [14] 任羽, 王得元. 辣椒 SRAP - PCR 反应体系的建立与优化 [J]. 分子植物育种, 2004, 2(5): 689 - 693.
- [15] Murry H G, Thompon W F. Rapid isolation of higher weight DNA [J]. Nucleic Acid Res, 1980, 8: 4321.
- [16] 盖钧镒. 试验统计方法 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2000: 383.
- [17] 许绍斌, 陶玉芬, 杨昭庆, 等. 简单快速的 DNA 银染和胶保存方法 [J]. 遗传, 2002, 24(3): 335 - 336.
- [18] 何正文, 刘运生, 陈立华, 等. 正交设计直观分析法优化 PCR 条件 [J]. 湖南医科大学学报, 1998, 23(4): 403 - 404.
- [19] 穆立蕾, 刘赢男, 冯富娟, 等. 紫椴 ISSR - PCR 反应体系的建立与优化 [J]. 林业科学, 2006, 42(6): 26 - 31.
- [20] 刘立军, 蒙祖庆, 邢秀龙, 等. 苕麻基因组 SRAP 扩增体系的优化研究 [J]. 分子植物育种, 2006, 4(5): 726 - 730.
- [21] 张飞, 陈发棣, 房伟民, 等. 菊花 SRAP - PCR 反应体系的优化与确立 [J]. 植物资源与环境学报, 2009, 18(3): 44 - 49.
- [22] 楚爱香, 汤庚国. 观赏海棠 SRAP - PCR 反应体系优化及引物筛选 [J]. 湖北农业科学, 2008, 47(12): 1394 - 1397.
- [23] 袁菊红, 权俊萍, 胡绵好, 等. 石蒜 SRAP - PCR 扩增体系的建立与优化 [J]. 植物资源与环境学报, 2007, 16(4): 1 - 6.
- [24] 姜维华, 陶俊, 冯立国, 等. 利用正交设计优化一品红 SRAP 反应体系 [J]. 苏州科技学院学报: 自然科学版, 2009, 26(1): 48 - 52.
- [25] 庄振国, 张海英, 于广建, 等. 黄瓜 SRAP 反应体系的正交设计优化 [J]. 华北农学报, 2007, 22(4): 112.
- [26] 吴红, 林清, 雷开荣, 等. 丝瓜 SRAP - CR 体系建立与优化 [J]. 中国农学通报, 2009, 5(4): 30 - 34.