

陶丽婷, 杨世鹏, 王丽慧, 等. 辣椒疫霉菌 SSR - PCR 反应体系的建立及优化[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(7): 80 - 83.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.07.020

辣椒疫霉菌 SSR - PCR 反应体系的建立及优化

陶丽婷, 杨世鹏, 王丽慧, 李 屹, 李 莉

(青海大学农林科学院/青海省蔬菜遗传与生理重点实验室, 青海西宁 810016)

摘要:为快速有效地确定辣椒疫霉菌 SSR - PCR 反应体系, 采用正交优化设计方法, 对影响辣椒疫霉菌 SSR - PCR 反应体系的 4 个主要因素(模板 DNA、引物、dNTPs、*Taq* 酶)在 4 个水平上进行优化。结果表明, 不同因素下各水平浓度对 SSR - PCR 的反应结果均有显著性影响, 最佳反应体系(20 μ L)为: 1.0 ng 模板 DNA, 0.8 μ mol/L 引物, 0.5 μ mol/L dNTPs, 1.0 U *Taq* 酶。PCR 扩增程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 15 s, 58.4 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 36 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 最佳循环数为 36。利用该体系对 12 份辣椒疫霉菌进行验证, 证明该体系稳定可靠, 本试验为辣椒疫霉菌遗传多样性分析研究及分子育种奠定了理论基础。

关键词:辣椒疫霉菌; SSR - PCR; 正交设计; 体系优化

中图分类号: S436.418 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)07-0080-04

辣椒疫霉菌(*Phytophthora capsici* Leonian)是引起辣椒疫病的霜霉属真菌, 危害作物根、茎、叶, 卵孢子可在土壤中越冬。由于疫病是土传病害, 传播速度快、途径广, 给辣椒生产带来巨大的经济损失^[1]。目前, 种植抗病品种是防治辣椒疫病的有效方法之一, 然而, 辣椒疫霉菌具有很高的变异性^[2], 基于 SSR 标记具有位点多态性高的特点, 可以揭示这些变异并发现不同种间的多态性^[3]。因此, 对辣椒疫霉菌遗传多样性的深入研究对辣椒抗病育种及群体结构分析具有重要

意义。

简单重复序列(simple sequence repeats, SSR)又称微卫星 DNA(microsatellite DNA)是以 1~6 个核苷酸多次串联重复的 DNA 序列^[4], 具有数量丰富、多态性高、对 DNA 质量要求不高且重复性好、可靠性高等特点^[5]。SSR 位点的多态性对基因及基因组的遗传变异具有重要作用, 可用于研究真菌种群的遗传结构多样性^[6], 但相关疫霉菌的报道较少^[7]。陶宇等通过对大豆疫霉菌 EST 开发新的 SSR 标记, 来研究大豆疫霉菌的遗传变异^[8]。孙文秀等对 7 个不同区域的辣椒疫霉菌进行 RAPD 分析, 探索了不同区域辣椒疫霉菌的遗传分化关系^[9]。姚国胜等用 SSR 对马铃薯致病疫霉群体结构进行分析并完善了其分子标记体系^[10]。

本研究对 *Taq* 酶、模板 DNA、dNTP、引物等 4 个因素, 在 4 个不同浓度水平下进行正交试验设计, 进行扩增体系的优化, 并对退火温度进行优化, 以期确定辣椒疫霉菌 SSR - PCR 反

收稿日期: 2016-06-24

基金项目: 青海省科技厅基础研究项目(编号: 2014-ZJ-735)。

作者简介: 陶丽婷(1992—), 女, 青海海东人, 硕士研究生, 研究方向为作物遗传育种。E-mail: 547145694@qq.com。

通信作者: 李 莉, 研究员, 硕士生导师, 现主要从事蔬菜遗传育种及栽培生理等研究工作。Tel: (0971) 5311182; E-mail: yyslili@163.com。

[17] Prieto P, Navarro - Raya C, Valverde - Corredor A, et al. Colonization process of olive tissues by *Verticillium dahliae* and its in planta interaction with the biocontrol root endophytes *Pseudomonas fluorescens* PICF7[J]. Microbial Biotechnology, 2009, 2(4): 499 - 511.

[18] 农 倩, 陈雪凤, 黎起秦, 等. 水稻内生细菌 B196 的鉴定及其对水稻纹枯病的防治作用[J]. 中国生物防治学报, 2011, 27(1): 99 - 103.

[19] Compant S, Duffy B, Nowak J, et al. Use of plant growth - promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(9): 4951 - 4959.

[20] Hardoim P R, van Overbeek L S, van Elsland J D. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth[J]. Trends in Microbiology, 2008, 16(10): 463 - 471.

[21] Ahlholm J U, Helander M, Elamo P, et al. Micro - fungi and invertebrate herbivores on birch trees: fungal mediated plant - herbivore interactions or responses to host quality[J]. Ecology Letters, 2002, 5(5): 648 - 655.

[22] Ahlholm J U, Helander M, Henriksson J, et al. Environmental conditions and host genotype direct genetic diversity of *venturia ditricha*, a fungal endophyte of birch trees[J]. Evolution, 2002, 56(8): 1566 - 1573.

[23] 华永丽, 欧阳少林, 陈美兰, 等. 药用植物内生真菌研究进展[J]. 世界科学技术(中医药现代化), 2008, 10(4): 105 - 111.

[24] 江 曙, 钱大玮, 段金殿, 等. 植物内生菌与道地药材的相关性研究[J]. 中草药, 2008, 39(8): 1268 - 1272.

[25] 潘江禹, 汪 军, 毛 超, 等. 不同肥料对生防菌淡紫拟青霉 E7 定殖的影响[J]. 广东农业科学, 2012, (19): 61 - 63.

[26] Ledger T, Zúñiga A, Kraiser T, et al. Aromatic compounds degradation plays a role in colonization of *Arabidopsis thaliana* and *Acacia caven* by *Cupriavidus pinatubonensis* JMP134[J]. Antonie van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology, 2012, 101(4): 713 - 723.

[27] Liu B, Qiao H P, Huang L L, et al. Biological control of take - all in wheat by endophytic *Bacillus subtilis* E1R - j and potential mode of action[J]. Biological Control, 2009, 49(3): 277 - 285.

应的最优体系,为后续群体遗传多样性分析等奠定基础。

1 材料与与方法

1.1 材料与试剂

本试验所用材料为青海省农林科学院园艺研究所采集的来自青海省海东市乐都区、循化县、大通县、互助县、贵德县等 5 个地区的 12 株辣椒疫霉菌。菌株信息如表 1 所示。

表 1 12 株辣椒疫霉菌菌株采集地与寄主

序号	菌株编号	采集地点	寄主
1	LL04	青海省海东市乐都区柳湾村	猪大肠 6-1
2	LL05	青海省海东市乐都区柳湾村	航椒 8 号
3	LX02	青海省海东市乐都区高庙镇小河滩村	陇椒 5 号
4	LL06	青海省海东市乐都区柳湾村	猪大肠 6-1
5	LC04	青海省海东市乐都区长理村	乐都长辣椒
6	HX01	青海省海东市互助县下二村	猪大肠
7	HX02	青海省海东市互助县下二村	猪大肠
8	HW01	青海省海东市互助县威远镇兰家村	精品茄门
9	HW02	青海省海东市互助县威远镇兰家村	精品茄门
10	DT01	青海省海东市大通县示范基地	航椒 8 号
11	XX01	青海省海东市循化县新建村	循化线辣椒
12	GX05	青海省海东市贵德县杂让乡希望村	贵德辣椒

试验所用 *Taq* 酶、dNTPs、DNA Marker (D2000)、Mg²⁺、10×PCR buffer 均购自天根生化科技(北京)有限公司。SSR 引物根据 GeneBank 所公布的辣椒疫霉菌全序列基因,利用引物设计软件 Primer 5 设计而成,引物由北京华大基因有限公司合成。

核酸检测仪(2000C,购自 Thermo);PCR 仪(Eppendorf Mastercycler pro,购自上海研域仪器设备有限公司);电泳仪(DYY-6C 型,购自北京市六一仪器厂);凝胶成像仪(ImageQuant300/350/RTECL,购自 Bio-RAD)。

1.2 基因组 DNA 提取与检测

采用生工 UNIQ-10 柱式真菌基因组 DNA 抽提试剂盒提取辣椒疫霉菌基因组 DNA。用核酸检测仪确定 DNA 浓度与纯度,并将样品 DNA 稀释到所需浓度,用 1% 浓度的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 提取效果,并在凝胶成像仪上分析与拍照,最后于-80℃保存。

1.3 PCR 反应体系正交试验

以采集自青海省海东市乐都区的辣椒疫霉菌(LL04)为试验材料,BJP05 号引物(5'-3':GACTCGGACTCGGACGAC,3'-5':CTCCTGCTCATCTTTCAGGC)为试验引物,SSR-PCR 反应体系的 4 个因素分别为模板 DNA、dNTPs、引物、*Taq* 酶的浓度,采用 L₁₆(4⁴)正交试验设计进行 4 因素 4 水平筛选分析,方案如表 2、表 3 所示。设试验总体系为 20 μL,按照表 2 中要求加入,另加 4 μL 10×PCR buffer、2 μL Mg²⁺,用 ddH₂O 补足 20 μL。SSR-PCR 扩增程序为:94℃预变性 2 min;94℃变性 15 s,58.4℃退火 30 s,36 个循环,72℃延伸 2 min,4℃保存。所得 PCR 扩增产物加 5 μL 6×Loading buffer,充分混匀后,取 10 μL 在 1% 琼脂糖凝胶上 120 V 恒压下电泳 30 min,电泳结束后在凝胶成像系统上观测拍照。

1.4 正交试验数据分析

本试验数据统计参照申洁等的方法^[11],统计可识别条

表 2 SSR-PCR 体系的因素水平

水平	因素			
	A:模板 DNA (ng)	B:引物 (μmol/L)	C:dNTPs (μmol/L)	D: <i>Taq</i> 酶 (U)
1	0.6	0.4	0.5	0.7
2	0.8	0.6	1.0	1.0
3	1.0	0.8	1.5	1.3
4	1.2	1.0	2.0	1.6

表 3 SSR-PCR 反应正交试验设计 L₁₆(4⁴)

编号	因素			
	A:模板 DNA (ng)	B:引物 (μmol/L)	C:dNTPs (μmol/L)	D: <i>Taq</i> 酶 (U)
1	0.6	0.4	0.5	0.7
2	0.6	0.6	1.0	1.0
3	0.6	0.8	1.5	1.3
4	0.6	1.0	2.0	1.6
5	0.8	0.4	1.0	1.3
6	0.8	0.6	0.5	1.6
7	0.8	0.8	2.0	0.7
8	0.8	1.0	1.5	1.0
9	1.0	0.4	1.5	1.6
10	1.0	0.6	2.0	1.3
11	1.0	0.8	0.5	1.0
12	1.0	1.0	1.0	0.7
13	1.2	0.4	2.0	1.0
14	1.2	0.6	1.5	0.7
15	1.2	0.8	1.0	1.6
16	1.2	1.0	0.5	1.3

带,同时参考条带明亮程度及背景清晰度,进行数据分析。数据采用极差、方差和多重比较方法分析各个处理结果,结果如表 4 所示。

表 4 SSR-PCR 正交试验结果

编号	模板 DNA	引物	dNTPs	<i>Taq</i> 酶	扩增片段数
1	1	1	1	1	3
2	1	2	2	2	5
3	1	3	3	3	7
4	1	4	4	4	4
5	2	1	2	3	6
6	2	2	1	4	8
7	2	3	4	1	8
8	2	4	3	2	5
9	3	1	3	4	7
10	3	2	4	3	6
11	3	3	1	2	7
12	3	4	2	1	8
13	4	1	4	2	5
14	4	2	3	1	6
15	4	3	2	4	6
16	4	4	1	3	5
k ₁	20	21	23	25	
k ₂	27	25	25	22	
k ₃	28	28	25	24	
k ₄	21	22	23	25	
R	8	7	2	3	

1.5 退火温度优化

PCR 反应体系中,每对引物都有其最适宜的退火温度。对同一模板、引物,设退火温度梯度进行 PCR 扩增反应,以引物的参考退火温度 $\pm 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 上下浮动^[12],以期获得该反应体系下最佳退火温度。依据上述试验的最优反应体系对退火温度进行优化。采用梯度 PCR 模式,自动设定温度为 54.4 ~ 61.4 $^{\circ}\text{C}$,生成温度梯度 54.4、55.6、56.4、57.2、58.4、59.0、60.5、61.2 $^{\circ}\text{C}$ 。其他反应程序与 PCR 正交试验设计的扩增程序相同。

1.6 扩增体系稳定性验证

利用优化的体系,以 BJP05 号引物随机选取 12 份辣椒疫霉菌 DNA 模板分别进行 SSR-PCR 扩增,进行辣椒疫霉菌 SSR-PCR 反应体系的稳定性检测。

2 结果与分析

2.1 基因组 DNA 提取与检测

本试验利用生工真菌基因组 DNA 抽提试剂盒提取 12 份辣椒疫霉菌模板 DNA,用核酸检测仪检测模板 DNA 浓度及纯度,其 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 值在 1.80 ~ 1.92 之间,DNA 浓度平均

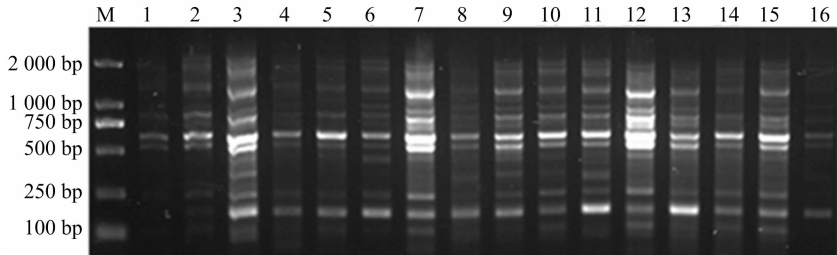
为 320 ng/ μL ,加 ddH₂O 稀释至所需浓度,-80 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

2.2 SSR-PCR 扩增结果

利用正交优化设计 $L_{16}(4^4)$,PCR 扩增产物电泳结果如图 1 所示,16 个处理结果均有条带出现。从图 1 可以看出,4 个因素在不同水平处理下其扩增结果存在明显差异。处理 2、6、9、10、11、13、15 的扩增条带数多且清晰,其中 9、10、11 处理主条带较明显,因此可认为这 3 个组合——9 ($A_3B_1C_3D_4$)、10 ($A_3B_2C_4D_3$)、11 ($A_3B_3C_1D_2$) 是 16 个正交试验处理中较适合辣椒疫霉菌 SSR-PCR 扩增的组合。

2.3 正交试验数据分析

组合 9、10、11 是 16 个正交试验处理中较优的组合,根据所得试验数据对各因素进行数据分析,以确定最佳组合。极差越大,离散程度越大,也说明该因素对试验结果影响最大^[13-14]。由表 4 可知,影响辣椒疫霉菌 SSR-PCR 反应体系的 4 个因子中,模板 DNA 浓度影响最大,其次是引物浓度,再次是 *Taq* 酶浓度,影响最小的是 dNTPs 浓度。由此判断出,SSR-PCR 扩增结果特异性条带多且亮的 3 个组合中最优的反应体系是组合 11 ($A_3B_3C_1D_2$)。



M—DNA Maker(D2000); 1~16—试验处理编号

图1 正交设计 SSR-PCR 反应体系扩增结果

为验证以上结果,对表 4 中各组合下扩增片段数据进行方差分析,结果如表 5 所示,4 因素 *F* 值的大小顺序为模板 DNA > 引物 > *Taq* 酶 > dNTPs,说明模板 DNA 浓度对辣椒疫霉菌 SSR-PCR 扩增结果影响最大,其次是引物浓度和 *Taq* 酶浓度,dNTPs 浓度对扩增反应结果影响最小。其中,模板 DNA、引物、*Taq* 酶各浓度水平对 PCR 扩增结果均有显著性差异,且模板 DNA 各水平对扩增结果具有极显著性差异。方差分析结果与极差分析结果一致,则证明正交优化设计表中第 11 组处理是辣椒疫霉菌 SSR-PCR 反应体系的最优处理,即影响辣椒疫霉菌 SSR-PCR 反应体系的 4 因素最佳浓度水平分别为 1.0 ng 模板 DNA、0.8 $\mu\text{mol/L}$ 引物、0.5 $\mu\text{mol/L}$ dNTPs、1.0 U *Taq* 酶。

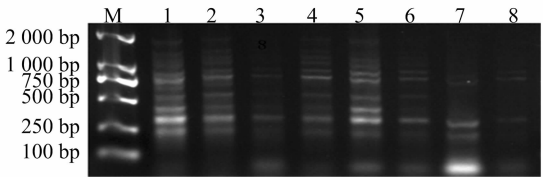
表 5 SSR-PCR 正交试验各因素间方差分析结果

变异来源	平方和	自由度	方差	<i>F</i> 值
模板 DNA	14.750	3	4.917	9.833 **
引物	7.500	3	2.500	5.000 *
dNTPs	4.000	3	1.333	2.667
<i>Taq</i> 酶	6.000	3	2.000	4.000 *
误差	14.897	3		
总计	47.147	15		

注: $F_{0.05}(3,15)=3.29$, $F_{0.01}(3,15)=5.42$;“*”表示在 0.05 水平上差异显著,“**”表示在 0.01 水平上差异显著。

2.4 PCR 退火温度筛选

PCR 反应中,退火温度可能直接影响模板与引物的特异性结合。如图 2 所示,8 个退火温度下均可扩增出特异性条带,在退火温度低时,非特异性条带增多,且条带模糊不清晰,在退火温度高时,条带较暗。第 1、2、3 退火温度处理条带扩增弥散严重,背景较深,出现非特异性条带且主带亮度较弱;随着退火温度的升高,第 6、7、8 退火温度处理条带弥散减少,扩增不稳定且主带缺失;当退火温度为 57.2 ~ 58.4 $^{\circ}\text{C}$ 时,扩增条带清晰,重复性好且主条带亮,但以 58.4 $^{\circ}\text{C}$ 时扩增效果最佳。因此确定该引物的最佳退火温度为 58.4 $^{\circ}\text{C}$ 。



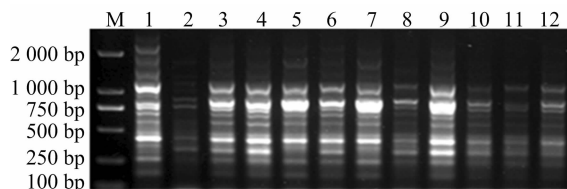
M—DNA Maker(D2000); 1—54.4 $^{\circ}\text{C}$; 2—55.6 $^{\circ}\text{C}$; 3—56.4 $^{\circ}\text{C}$; 4—57.2 $^{\circ}\text{C}$; 5—58.4 $^{\circ}\text{C}$; 6—59.0 $^{\circ}\text{C}$; 7—60.5 $^{\circ}\text{C}$; 8—61.2 $^{\circ}\text{C}$

图2 不同退火温度对 SSR-PCR 反应体系的影响

2.5 SSR-PCR 最佳反应体系稳定性检测结果

采用上述最佳反应体系结果,用 BJP05 号引物,对来自青海省海东市乐都区、互助县、大通县、循化县、贵德县的 12 份辣椒疫霉菌 DNA 进行 SSR 扩增。结果如图 3 所示,引物对每

份 DNA 样品均扩增出清晰的、多态性高且重复性好的目的条带,说明该体系稳定性较好,适用于辣椒疫霉菌的 SSR 反应。



M—DNA Maker(D2000); 1~5—乐都区菌株; 6~9—互助县菌株; 10—大通县菌株; 11—循化县菌株; 12—贵德县菌株

图3 应用最优反应体系对12份辣椒疫霉菌基因组 DNA 的 SSR-PCR 扩增结果

3 讨论

由于 SSR 标记易受到反应体系和扩增程序的影响,且各因素间又存在互作效应^[15],因此确定辣椒疫霉菌 SSR-PCR 最佳反应体系能够迅速获得试验结果,为辣椒疫霉菌遗传多样性研究的顺利进行节省时间与成本^[16]。本试验采用 $L_{16}(4^4)$ 正交试验设计,确立最佳组合,通过方差分析确定各个因素在 4 个浓度水平下对 SSR-PCR 反应影响的大小。

在 PCR 反应标准体系中,影响 PCR 结果的 5 个因素为 *Taq* 酶、 Mg^{2+} 、DNA、dNTPs、引物。 Mg^{2+} 是影响 PCR 结果的重要变量之一,高浓度的 Mg^{2+} ,使非特异性条带增多,浓度过低,影响酶活性。在前人研究中, Mg^{2+} 的用量浮动不大^[17],其浓度在 1.5~2.0 $\mu\text{mol/L}$ 之间浮动,本试验在 20 μL 体系中加 2 μL Mg^{2+} ,使其终浓度保持在分子克隆标准体系的较低水平,因此,本试验未对 Mg^{2+} 浓度作相关分析。dNTPs 是 PCR 反应的底物^[18],高浓度的 dNTPs 会与酶竞争游离的 Mg^{2+} ,降低其活性,引起错配,低浓度则会影响扩增效率。*Taq* 酶是对 Mg^{2+} 依赖的酶,浓度过高产生非特异性扩增,浓度过低会引起反应灵敏度差,使条带弥散。DNA 是 PCR 反应的基础,前人研究认为 DNA 的波动范围较广,其浓度在 1.0~6.0 $\text{ng}/\mu\text{L}$ 之间对反应影响不大^[19]。DNA 浓度过高使模板之间配对概率增加,相对减少了引物与模板的配对机会,降低引发效率,易产生非特异性扩增^[20]。本试验结果表明模板 DNA 对 PCR 反应影响最大,引物、*Taq* 酶次之,dNTP 浓度影响最小。退火温度决定 PCR 特异性和产量,温度过高引物不能与模板牢固结合,过低则容易使引物和模板错配,非特异性产物增加。可通过设置一系列梯度,以确定某些反应的特定退火温度,本试验设置 8 个梯度,筛选出最佳退火温度为 58.4 $^{\circ}\text{C}$ 。

综上所述,不同物种对 SSR-PCR 扩增体系影响各不相同,因此,采用 SSR-PCR 的方法研究遗传多样性之前对反应体系的优化是必不可少的,不但减少试验工作量节省成本,而且将增加对遗传多样性研究的多态性,提供试验的可重复性。

参考文献:

- [1] 郑小波. 疫霉菌及其研究技术[M]. 北京:中国农业出版社,1997.
- [2] Kirk P M, Cannon P F, Minter D W, et al. Ainsworth & bisby's dictionary of the fungi[M]. 10th ed. Wallingford: CAB International, 2008.
- [3] 梁玉琴,李芳东,傅建敏,等. 正交设计优化柿属植物 SSR-PCR 反应体系[J]. 经济林研究,2011,29(4):17-22.
- [4] 谢晶晶,姜 华,毛雪琴,等. 利用 SSR 技术研究浙江省稻瘟病菌群体的遗传多样性[J]. 浙江农业学报,2015,27(10):1781-1788.
- [5] 郑成木. 植物分子标记原理与方法[M]. 长沙:湖南科学技术出版社,2003.
- [6] Litt M, Luty J A. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene[J]. American Journal of Human Genetics, 1989, 44(3):397-401.
- [7] Wu K S, Tanksley S D. Abundance, polymorphism and genetic mapping of microsatellites in rice[J]. Molecular Genetics and Genomics, 1993, 241(1):225-235.
- [8] 蔺 宇,朱振东,王晓鸣,等. 大豆疫霉菌鉴定和检测的特异性 SSR 标记建立[C]//中国植物病理学会. 中国植物病理学会 2006 年学术年会论文集. 北京:中国农业科学技术出版社,2006.
- [9] 孙文秀,张修国,贾永健,等. 不同地区辣椒疫霉菌遗传多样性的 RAPD 分析[J]. 植物病理学报,2005,35(4):340-344.
- [10] 姚国胜,王俊山,杨英茹,等. 河北省和黑龙江省马铃薯晚疫病病菌 SSR 基因型分析[J]. 科技导报,2008,26(5):35-39.
- [11] 申 洁,侯思宇,孙朝霞,等. 正交优化枣树 ISSR-PCR 反应体系的研究[J]. 华北农学报,2010,25(2):116-120.
- [12] 李亚利,陈书霞,孟焕文,等. 利用正交设计优化黄瓜的 SSR-PCR 反应体系[J]. 西北农业学报,2008,17(3):280-284.
- [13] 郭海林,王志勇,薛丹丹,等. 结缕草属植物 SSR 反应体系的优化及其应用[J]. 植物遗传资源学报,2008,9(2):138-143.
- [14] 叶青雷,王玲玲,藏 楠,等. 榉树 DNA SSR-PCR 反应体系的正交优化[J]. 蚕业科学,2008,34(2):307-311.
- [15] 苏 辉,李志刚,宋书宏. 正交设计优化大豆 SSR-PCR 反应体系及引物筛选[J]. 华北农学报,2009,24(2):99-102.
- [16] 王欢欢,姜 晶,王 慧,等. 正交设计优化番茄基因组 DNA SSR-PCR 反应体系[J]. 江苏农业科学,2009(2):48-50.
- [17] 张崎峰,靳学慧,张亚玲,等. 正交设计优化稻瘟病菌 SSR-PCR 反应体系[J]. 安徽农业科学,2009,37(22):10426-10428.
- [18] 杨传平,王艳敏,魏志刚. 利用正交设计优化白桦的 SSR-PCR 反应体系[J]. 东北林业大学学报,2006,34(6):1-3.
- [19] 龙 菊,黄春琼,刘国道. 正交设计优化狗牙根 SSR-PCR 反应体系[J]. 基因组学与应用生物学,2016,35(1):198-205.
- [20] 张卿哲,孟金贵,张应华,等. 用正交设计法优化辣椒 ISSR-PCR 反应体系[J]. 西南农业学报,2011,24(3):1034-1038.