

Optimization of *Chaenomeles* SRAP-PCR Reaction System through the Quadratic Orthogonal Rotatable Combinatorial Design*

Dekui Zang, Changhong Yin, Yanling Wang, Yan Ma

Forestry College, Shandong Agricultural University, Tai'an
Email: zangdk@sdau.edu.cn

Received: Aug. 31st, 2012; revised: Sep. 14th, 2012; accepted: Sep. 15th, 2012

Abstract: Using *Chaenomeles* genome DNA as template, the relationship between the five PCR factors (Mg^{2+} , dNTP, primer, *Taq* DNA polymerase, template DNA) and the PCR results was studied through the quadratic orthogonal rotatable combinatorial design. The mathematical model of the PCR result on the PCR factors was firstly established by software SAS9.0. Based on the model, the optimized amplification system for SRAP-PCR of *Chaenomeles* was set up and verified. The successful establishment of the optimization system showed that the quadratic orthogonal rotatable combinatorial design are stable and reliable to optimize the SRAP-PCR system, and it could be applied to the other optimization of PCR systems.

Keywords: *Chaenomeles*; Quadratic Orthogonal Rotatable Combinatorial Design; Optimization of PCR System; Mathematical Model

利用二次正交旋转组合设计优化木瓜 SRAP-PCR 反应体系*

臧德奎, 尹长虹, 王延玲, 马 燕

山东农业大学林学院, 泰安
Email: zangdk@sdau.edu.cn

收稿日期: 2012 年 8 月 31 日; 修回日期: 2012 年 9 月 14 日; 录用日期: 2012 年 9 月 15 日

摘 要: 以木瓜属(*Chaenomeles*)植物基因组 DNA 为模板, 采用五因素二次正交旋转组合设计(1/2 实施), 对 PCR 反应的 5 个因素(Mg^{2+} 、dNTP、引物、*Taq* DNA 聚合酶、模板 DNA)进行研究, 首次建立了 PCR 反应各因素编码值与 PCR 结果评分值之间的数学模型。利用该模型, 建立了 PCR 反应的最优体系, 并进行了验证。最优体系的成功建立表明, 该优化方法是稳定可靠的, 可以为其他物种的 PCR 体系优化提供借鉴。

关键词: 木瓜属; 二次正交旋转组合设计; PCR 体系优化; 数学模型

1. 引言

相关序列扩增多态性(Sequence-related amplified polymorphism, SRAP)是由加州大学的 Li 和 Quiros 在

芸薹属(*Brassica*)植物上开发出来的、基于 PCR 的新型分子标记系统^[1]。该标记针对基因外显子中 GC 含量丰富、启动子和内含子中 TC 含量丰富的特点, 设计独特的引物对开放阅读框 ORFs 进行特异扩增, 具有简单、快速、稳定性强、无需预知序列信息、在基

*基金项目: 国家自然科学基金(30972406)。

基因组中分布均匀等特点, 现已广泛应用于甜瓜、桃、柿子、牡丹、番茄、葱属等多种植物的遗传多样性评价、品种鉴定、比较基因组学等诸多领域^[2-14], 均取得了很好的结果。

SRAP 是基于 PCR 反应的分子标记, 其反应条件受到 PCR 各因子的浓度、模板质量、退火温度等多种因素影响, SRAP-PCR 反应体系的建立和优化是试验成功与否的关键。目前, 优化 PCR 反应体系的方法主要有正交试验法和单因素试验法。正交试验法只是选择了设计组合中较好的一个, 最优组合不一定出现在正交设计表中; 单因素试验法则依次选择了各组分的最佳浓度, 但不能反映 PCR 体系中各组分的交互作用, 因此也无法确保该组合为最佳反应体系。此外, 均匀设计法^[15]、趋势面设计法^[16]也偶尔用于 PCR 体系优化, 但均不能明确反映 PCR 各因素间及其与 PCR 结果间的函数关系。

二次正交旋转组合设计是正交回归试验设计的一种, 它克服了普通正交设计无法寻找最优区域的缺点, 同时又保留了正交设计试验次数少、计算简便、消除回归系数间相关性的优点。而且, 利用该设计还可以建立定量数学模型, 并从多角度对模型进行模拟分析。二次正交旋转组合设计目前主要应用于机械工艺研究、培养基组份优化以及田间施肥量试验^[17-24], 尚无用于筛选 PCR 反应体系的报道。本研究首次尝试采用二次正交旋转组合设计优化 SRAP-PCR 反应体系, 并对其进行建模分析, 以期得到最佳反应组合。

2. 材料与方法

2.1. 材料

研究材料为木瓜属(*Chaenomeles*)植物的叶片, 采

自山东农业大学校园, 包括“豆青”(C. *sinensis* “Douqing”)、“长俊”(C. *cathayensis* “Changjun”)和“多彩”(C. *speciosa* “Toyo-Nishiki”)3 个品种。

SRAP 引物参照王明明等^[25]的引物组合, 正向序列为: 5'-TGAGTCCAAACCGGATA-3', 反向序列为: 5'-GACTGCGTACGAATTTAG-3'。

Mg²⁺、dNTP、*Taq* DNA 聚合酶均购自北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司, DNA marker 购自 Biomiga 公司, PCR 引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

2.2. 研究方法

2.2.1. 木瓜基因组 DNA 的提取和检测

以木瓜幼叶为材料, 利用改良 CTAB 法^[26,27]提取基因组 DNA, 用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳法和紫外分光光度计法检测 DNA 质量和纯度, 稀释至 50 ng·μL⁻¹, -20℃ 保存。

2.2.2. PCR 反应体系的二次正交旋转组合设计

采用 5 因子二次正交旋转组合设计(1/2 实施)。以 PCR 反应体系中的 5 个因子 Mg²⁺(X₁)、dNTP(X₂)、引物(X₃)、*Taq* DNA 聚合酶(X₄)、模板 DNA(X₅)为自变量, 编制 PCR 反应的因子水平编码表(表 1)。反应体系总体积为 25 μL, 不足体积用 ddH₂O 补充。试验设计方案见表 2, 共 36 个处理, 每个处理 4 次重复。

PCR 扩增程序参照文献^[1]: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 1 min, 35℃ 复性 1 min, 72℃ 延伸 1 min, 5 个循环; 94℃ 变性 1 min, 50℃ 复性 1 min, 72℃ 延伸 1 min, 30 个循环; 72℃ 延伸 7 min。

扩增产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳分离, 经溴化乙锭(EB)染色, 在凝胶成像系统上采集图像。

Table 1. Factor levels and their coded values
表 1. PCR 反应的因子水平编码表

编码值 Coded values	因子浓度 Factor levels				
	X ₁ (mmol·L ⁻¹)	X ₂ (mmol·L ⁻¹)	X ₃ (μmol·L ⁻¹)	X ₄ /U	X ₅ /ng
2	3.0	0.4	0.4	2	70
1	2.625	0.325	0.325	1.625	55
0	2.25	0.25	0.25	1.25	40
-1	1.875	0.175	0.175	0.875	25
-2	1.5	0.1	0.1	0.5	10

Table 2. Experimental matrix and results
表 2. 试验设计矩阵及试验结果

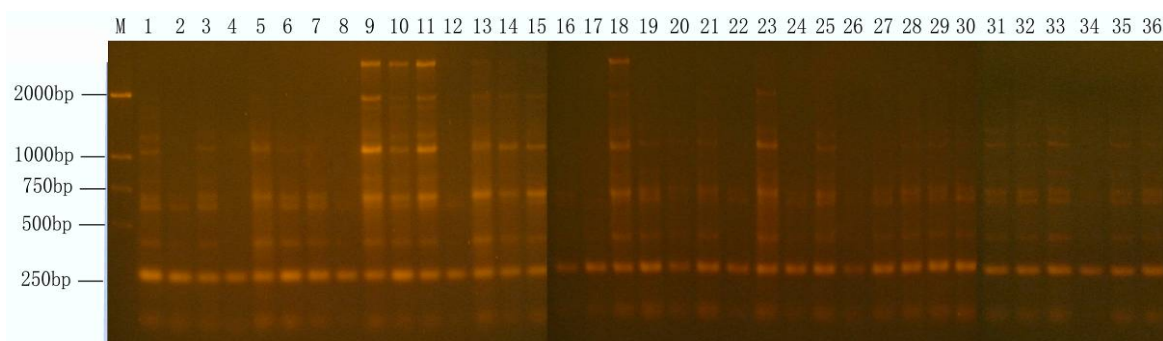
试验号 No.	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	试验结果 Results						
						4 次试验条带数 Number of bands				条带之和 Sum of bands	条带方差 Variance of bands	得分 Y Score
1	1	1	1	1	1	8	7	6	9	30	1.25	28
2	1	1	1	-1	-1	4	4	3	4	15	0.1875	8
3	1	1	-1	1	-1	7	6	3	5	21	2.1875	15
4	1	1	-1	-1	1	2	2	1	2	7	0.1875	2
5	1	-1	1	1	-1	6	7	4	5	22	1.25	16
6	1	-1	1	-1	1	6	4	2	2	14	2.75	7
7	1	-1	-1	1	1	5	6	2	5	18	2.25	12
8	1	-1	-1	-1	-1	1	1	2	1	5	0.1875	1
9	-1	1	1	1	-1	10	11	9	6	36	3.5	34
10	-1	1	1	-1	1	11	13	8	5	37	9.1875	35
11	-1	1	-1	1	1	11	13	11	7	42	4.75	36
12	-1	1	-1	-1	-1	1	4	11	2	18	15.25	11
13	-1	-1	1	1	1	7	8	8	6	29	0.6875	27
14	-1	-1	1	-1	-1	7	3	1	3	14	4.75	5
15	-1	-1	-1	1	-1	8	5	7	5	25	1.6875	21
16	-1	-1	-1	-1	1	1	5	6	2	14	4.25	6
17	2	0	0	0	0	2	1	8	3	14	7.25	4
18	-2	0	0	0	0	8	6	9	10	33	2.1825	31
19	0	2	0	0	0	7	4	10	11	32	7.5	30
20	0	-2	0	0	0	5	1	7	3	16	5.0	9
21	0	0	2	0	0	5	3	7	8	23	3.6875	17
22	0	0	-2	0	0	3	3	7	7	20	4	13
23	0	0	0	2	0	8	9	7	11	35	2.1875	33
24	0	0	0	-2	0	4	1	2	2	9	1.1875	3
25	0	0	0	0	2	8	5	3	4	20	3.5	14
26	0	0	0	0	-2	2	6	4	5	17	2.1875	10
27	0	0	0	0	0	5	9	7	5	26	2.75	23
28	0	0	0	0	0	6	7	7	7	27	0.1875	25
29	0	0	0	0	0	6	4	8	5	23	2.1875	19
30	0	0	0	0	0	5	5	8	9	27	3.1875	24
31	0	0	0	0	0	7	6	10	11	34	4.25	32
32	0	0	0	0	0	7	5	10	9	31	3.6875	29
33	0	0	0	0	0	8	6	7	8	29	0.6875	26
34	0	0	0	0	0	1	7	8	8	24	8.5	20
35	0	0	0	0	0	6	5	8	4	23	2.1875	18
36	0	0	0	0	0	6	5	6	8	25	1.1875	22

3. 结果与分析

3.1. 回归模型的建立

木瓜 SRAP-PCR 反应体系的 36 个处理的扩增结

果(图 1)显示,不同处理间存在显著差异。目前对电泳图的评价主要采用评分法^[28],本研究加以改进。对凝胶成像图中 36 个处理,除了统计亮度高且清晰的条带数量外,还根据 4 次重复实验计算同一处理的方差



注: M 为 DNA marker, 1~36 为二次正交旋转组合试验设计不同的处理。

Note: M means DNA marker, 1 - 36 means different treatments of the experiment. This figure is one of the four repeated experimental pictures.

Figure 1. Electrophoresis photograph of SRAP-PCR reaction with the quadratic orthogonal rotatable combinatorial design

图 1. SRAP-PCR 二次正交旋转组合试验设计电泳图

以反映其稳定性。依不同处理的条带总数与方差进行排序, 条带最多且方差较小的处理得 36 分, 条带最少且方差较大的处理得 1 分, 以此类推, 以不同处理所得分值为目标函数(表 2)。

将表 2 中的试验设计矩阵及评分结果在 SAS 9.0 软件中运行, 由响应面的参数估计得回归方程:

$$Y = 23.6875 - 5.791667X_1 + 4.875X_2 + 2.625X_3 + 7.208333X_4 + 2.041667X_5 - 1.28125X_1^2 - 2.5625X_1X_2 - 0.78125X_2^2 + 0.1875X_1X_3 + 1.6875X_2X_3 - 1.90625X_3^2 - 0.4375X_1X_4 + 0.0625X_2X_4 - 0.9375X_3X_4 - 1.15625X_4^2 - 1.4375X_1X_5 + 1.5625X_2X_5 + 1.5625X_3X_5 - 0.5625X_4X_5 - 2.65625X_5^2$$

该方程反映了 PCR 处理的评分值 Y 与 PCR 各因素编码值之间的函数关系。

回归模型的方差分析(表 3)显示, 除交叉项外, 方程的线性项、平方项及总回归全部显著, 复决定系数 $R^2 = 0.9342$, 证明回归方程与实际拟合较好; 失拟检验不显著($P = 0.7118$), 说明未知因素对试验结果的干扰较小, 因此回归模型有意义。

3.2. 木瓜 SRAP-PCR 反应最优体系的建立与验证

3.2.1. 最优体系的建立

将回归方程代入 SAS9.0, 在各因素编码范围 (-2~2) 内的 0.1 水平上进行模拟寻优, 求得 Y 的极大值点。此时 $X_1 = -2$, $X_2 = 2$, $X_3 = 1.72$, $X_4 = 2$, $X_5 = 1.81$, $Y = 68.3045$ 。

将各因子编码值换算为相应的浓度值即得到反应的最优体系: $Mg^{2+} 1.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $dNTP 0.4$

$\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、引物 $0.379 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、*Taq* DNA 聚合酶 2 U、模板 DNA 67.15 ng, 总体积为 25 μL 。

3.2.2. 利用最优体系筛选多态性引物组合

以木瓜属 3 个品种的基因组 DNA 为模板, 利用上述最优体系对 157 对 SRAP 引物(表 4)进行扩增(图 2), 共筛选出条带清晰且多态性丰富的引物组合 32 对, 这 32 对引物共扩增出 544 条带, 其中多态性条带 495 条, 平均每对引物扩增出 15.47 个多态性条带。可以看出, 该最优体系对不同木瓜品种及引物组合的扩增均是稳定可靠的。

4. 讨论

PCR 技术在各个领域都有着广泛应用, PCR 反应体系因参试物种、分子标记方法及药品质量的不同而有所差异, 但 PCR 的优化方法是可以通用的, 因此, 选择一个好的试验设计方法对 PCR 体系的优化至关重要。

本文运用二次正交旋转组合设计优化木瓜的 SRAP-PCR 反应体系, 建立了 PCR 处理的评分值与 PCR 各因素编码值之间的数学模型, 该模型达到了 0.0001 的极显著水平且失拟检验不显著, 即所建模型有意义且与实际拟合较好, 因此该设计方法是合适的。

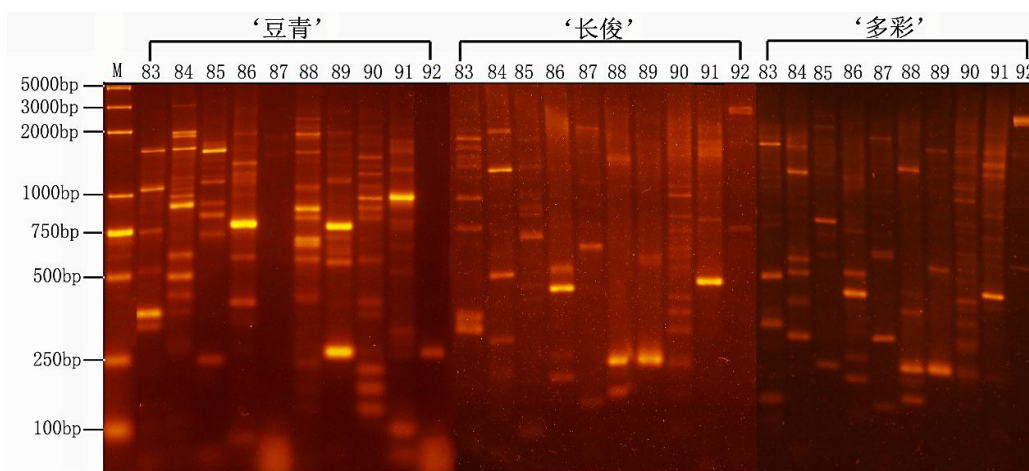
目前对电泳图的评价主要采用直观法, 对其进行评分分析的较少且均未体现出条带的稳定性^[16, 29, 30]。本实验采用条带数之和与方差相结合的方法, 既体现了条带的特异性和敏感性, 又兼顾其稳定性。模型的成功建立证明该评价方法是可行的。

Table 3. Variance analysis of the regression model
表 3. 回归模型的方差分析

变异来源 Source of variance	自由度 DF	平方和 Sum of Squares	F 值 F Value	P 值 Pr > F
线性项 Linear	5	2887.875000	33.90	<0.0001
二次项 Quadratic	5	456.906250	5.36	0.0050
交叉项 Cross product	10	284.625000	1.67	0.1788
总回归 Total Model	20	3629.406250	10.65	<0.0001
失拟项 Lack of Fit	6	74.693750	0.62	0.7118
误差 Pure Error	9	180.900000		
总剩余 Total Error	15	255.593750		

Table 4. SRAP primer sequences used in amplification
表 4. 用于扩增的 SRAP 引物序列

正向引物 Forward primer	碱基序列 Sequences	反向引物 Reverse primer	碱基序列 Sequences
ME1	5'-TGAGTCCAAACCGGATA-3'	EM1	5'-GACTGCGTACGAATTTGC-3'
ME2	5'-TGAGTCCAAACCGGAGC-3'	EM2	5'-GACTGCGTACGAATTTGG-3'
ME3	5'-TGAGTCCAAACCGGACC-3'	EM3	5'-GACTGCGTACGAATTAGC-3'
ME4	5'-TGAGTCCAAACCGGTAG-3'	EM4	5'-GACTGCGTACGAATTCGA-3'
ME5	5'-TGAGTCCAAACCGGTGT-3'	EM5	5'-GACTGCGTACGAATTCGA-3'
ME6	5'-TGAGTCCAAACCGGCGT-3'	EM6	5'-GACTGCGTACGAATTGGC-3'
ME7	5'-TGAGTCCAAACCGGACG-3'	EM7	5'-GACTGCGTACGAATTAAT-3'
ME8	5'-TGAGTCCAAACCGGAAT-3'	EM8	5'-GACTGCGTACGAATTTAG-3'
ME9	5'-TGAGTCCAAACCGGTAA-3'	EM9	5'-GACTGCGTACGAATTCAG-3'
ME10	5'-TGAGTCCAAACCGGTCA-3'	EM10	5'-GACTGCGTACGAATTACG-3'
ME11	5'-TGAGTCCAAACCGGAAG-3'	EM11	5'-GACTGCGTACGAATTATG-3'
ME12	5'-TGAGTCCAAACCGGACA-3'	EM12	5'-GACTGCGTACGAATTCAG-3'
ME13	5'-TGAGTCCAAACCGGAGA-3'	EM13	5'-GACTGCGTACGAATTGCA-3'
ME14	5'-TGAGTCCAAACCGGTA-3'	EM14	5'-GACTGCGTACGAATTTGA-3'
		EM15	5'-GACTGCGTACGAATTATT-3'



Note: M means DNA marker, 83 - 92 means different primer combinations.
注: M 为 DNA marker, 83-92 为不同引物组合的序号。

Figure 2. Amplification results of different primer combinations using the optimized system
图 2. 最优体系在部分 SRAP 引物组合中的扩增结果

所建立的最优体系为 Mg^{2+} $1.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、dNTP $0.4 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、引物 $0.379 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、*Taq* DNA 聚合酶 2 U、模板 DNA 67.15 ng，总体积为 25 μL 。利用该最优体系对木瓜属 3 个种的 157 对 SRAP 引物进行筛选，结果表明，该体系对不同木瓜品种及引物组合的扩增均是稳定可靠的，可以用于木瓜属分子研究的后续试验。

将相关文章中的 SRAP 体系各因素浓度进行编码后带入本实验所得模型，有的体系得分较高，如姜帆等对龙眼的优化体系^[31]得分 95.90；有的体系得分与本实验相近，如李艳香等对八仙花的优化体系^[32]得分 62.13；也有的体系得分较低，如楚爱香等对观赏海棠的优化体系^[33]得分 3.09。这可能是由于不同试验材料对 PCR 反应体系的要求不一样，因此，所得模型也不能完全通用，需要根据不同的试验材料建立相适应的数学模型进行优化。

二次正交旋转组合设计在 PCR 体系优化中的应用还没有报道，将该设计方法与 SRAP 标记技术结合并应用到木瓜属植物的研究中也尚属首例。本文对二次正交旋转组合设计在 PCR 反应体系优化中的应用进行了尝试，并与 SAS 软件结合，建立了完整的优化程序，希望能使这项技术在今后 PCR 体系优化中发挥作用。

参考文献 (References)

- [1] G. Li, C. F. Quiros. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: Its application to mapping and gene tagging in *Brassica*. *Theoretical and Applied Genetics*, 2001, 103: 455-461.
- [2] M. Ferriol, B. Pico and F. Nuez. Genetic diversity of a germplasm collection of *Cucurbita pepo* using SRAP and AFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 2003, 107(2): 271-282.
- [3] H. Budak, R. C. Sheaiman, J. Paimaksiz, et al. Comparative analysis of seeded and vegetative biotype buffalo grasses based on phylogenetic relationship in using ISSRs, SSRs, RAPDs and SRAPs. *Theoretical and Applied Genetics*, 2004, 109(2): 280-288.
- [4] A. Riaz, D. Potter and M. Stephen. Genotyping of peach and nectarine cultivars with SSR and SRAP molecular markers. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 2004, 129: 204-211.
- [5] J. J. Ruiz, M. S. Garcia, B. Pico, et al. Genetic variability and relationship of closely related Spanish traditional cultivars of tomato as detected by SRAP and SSR markers. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 2005, 130: 88-95.
- [6] D. L. Guo, Z. R. Luo. Genetic relationships of some PCNA Persimmons (*Diospyros kaki* Thunb.) from China and Japan revealed by SRAP analysis. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 2006, 53(8): 1597-1603.
- [7] O. Gulsen, K. S. aragul and K. Abak. Diversity and relationships among Turkish okra germplasm by SRAP and phenotypic marker polymorphism. *Biologia*, 2007, 62(1): 41-45.
- [8] M. A. Espósito, E. A. Martin, V. P. Cravero, et al. Characterization of pea accessions by SRAP's markers. *Scientia Horticulturae*, 2007, 113(4): 329-335.
- [9] R. Ahmad, P. Liow, D. F. Spencer, et al. Molecular evidence for a single genetic clone of invasive *Arundo donax* in the United States. *Aquatic Botany*, 2008, 88(2): 113-120.
- [10] X. Y. Han, W. L. S. ang, Z. A. Liu, et al. Characterization of sequence-related amplified polymorphism markers analysis of tree peony bud sports. *Scientia Horticulturae*, 2008, 115(3): 261-267.
- [11] Q. Hao, Z. A. Liu, Q. Y. Shu, et al. Studies on *Paeonia* cultivars and hybrids identification based on SRAP analysis. *Hereditas*, 2008, 145(1): 38-47.
- [12] H. Z. Li, Y. P. Yin, C. Q. Zhang, et al. Comparison of characteristics of SRAP and SSR markers in genetic diversity analysis of cultivars in *Allium fistulosum* L. *Seed Science and Technology*, 2008, 36(2): 423-434.
- [13] D. W. Xue, S. G. Feng, H. Y. Zhao, et al. The linkage maps of *Dendrobium* species based on RAPD and SRAP markers. *Journal of Genetics and Genomics*, 2010, 37: 197-204.
- [14] 李亚利, 扈新民, 赵丹等. 运用 SRAP 分子标记鉴定辣椒杂交种纯度[J]. *中国农学通报*, 2010, 26(24): 67-70.
- [15] 郭凌飞, 邹明宏, 杜丽清等. 均匀设计优化澳洲坚果 SRAP 反应体系[J]. *果树学报*, 2008, 25(2): 250-253.
- [16] 张晓蕾, 张凯旋, 杨传平等. 白桦 SRAP 反应体系的建立与优化[J]. *东北林业大学学报*, 2010, 28(9): 1-3.
- [17] 任广跃, 王红英, 于庆龙等. 翻转卸料双轴桨叶饲料混合机工作性能试验研究[J]. *农业工程学报*, 2004, 20(2): 132-135.
- [18] 王德福, 蒋亦元. 双轴卧式全混合日粮混合机的试验研究[J]. *农业工程学报*, 2006, 22(4): 85-88.
- [19] 刘淼, 王俊. 山核桃仁碱液浸泡法去皮工艺的研究[J]. *农业工程学报*, 2007, 23(10): 256-260.
- [20] 王金峰, 王金武, 葛宜元. 深施型液态施肥装置的设计与试验[J]. *农业机械学报*, 2009, 40(4): 58-62.
- [21] 王璐, 徐小琳, 韩军等. 响应面法优化棉籽油超声强化合成生物柴油工艺的研究[J]. *太阳能学报*, 2010, 31(6): 666-670.
- [22] 徐位力, 罗焕亮, 范恩友等. 二次正交旋转组合设计对马占相思组培增殖培养基的优化[J]. *广西植物*, 2002, 22(6): 517-520.
- [23] 于恒秀, 周美艳, 王淼等. 利用二次正交旋转组合设计优化芍药胚苗快繁的培养基[J]. *扬州大学学报*, 2008, 29(1): 84-89.
- [24] 谢必武, 张凤龙, 陈光蓉. 决明子优化栽培措施研究及模型建立[J]. *浙江大学学报*, 2007, 33(4): 425-428.
- [25] 王明明, 陈化榜, 王建华, 宋振巧, 李圣波. 木瓜属品种亲缘关系的 SRAP 分析[J]. *中国农业科学*, 2010, 43(3): 542-551.
- [26] G. S. H. Fang, R. Grumet. A quick and inexpensive method for removing polysaccharides from plant genomic DNA. *Biotechniques*, 1992, 13: 52-57.
- [27] 陈红, 张雷, 吕晓贞等. 适于木瓜属植物 AFLP 分析用 DNA 提取方法研究[J]. *北方园艺*, 2008, 12: 161-163.
- [28] 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.
- [29] 王志勇, 袁学军, 刘建秀等. 狗牙根 SRAP-PCR 反应体系优化及引物筛选[J]. *草业学报*, 2008, 17(3): 79-85.
- [30] 彭秉玉, 胡延萍, 巩爱岐等. 杂交油菜 ISSR-PCR 反应体系的建立和优化[J]. *植物研究*, 2010, 30(5): 576-581.
- [31] 姜帆, 高慧颖, 陈秀萍等. 龙眼 SRAP-PCR 反应体系的优化[J]. *福建林业科技*, 2007, 34(4): 20-23.
- [32] 李艳香, 李达, 李炎林等. 八仙花 SRAP 反应体系的建立与优化[J]. *湖南农业科学*, 2008, 6: 14-16.
- [33] 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.