

青藏高原放牧家畜小肠结肠炎耶尔森氏菌 LAMP 检测方法的建立及应用

蔡其刚¹, 唐一波², 高小龙², 仝丽娜², 赵静², 张红见^{2*}

(1. 青海大学畜牧兽医科学院, 青海西宁 810016; 2. 青海大学农牧学院, 青海西宁 810016)

摘要 为了建立特异性、敏感性和适用性强的 LAMP 检测方法, 采用分子生物学方法, 根据 GenBank 数据库中该细菌的 *outL* 基因, 进行了多序列比对和保守区域确定。根据其保守序列, 在线设计和筛选了一套 LAMP 引物。温度优化及特异性和敏感性验证后建立了检测该病菌的 LAMP 检测方法, 并对青藏高原放牧牛、羊临床粪便样品进行了检测。结果表明, LAMP 检测方法的最适温度为 63 ℃; 检测其与大肠杆菌、沙门氏菌、阪崎肠杆菌、金黄色葡萄球菌、多杀性巴氏杆菌及蜡样芽胞杆菌无交叉反应; 检测下限为 100 fg 目的基因; 利用建立的方法检测了 208 份放牧牦牛、藏羊粪便 DNA 样品, 共检测到 26 份阳性样品, 阳性率为 12.5%。这表明成功建立了一种检测该病的特异性、敏感性和适用性强的 LAMP 检测方法。

关键词 放牧家畜; 小肠结肠炎耶尔森氏菌; LAMP; *outL* 基因; 敏感性; 特异性

中图分类号 S852.6 **文献标识码** A

文章编号 0517-6611(2019)24-0107-04

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2019.24.032



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Establishment and Application of LAMP Detection Method for *Yersinia enterocolitica* in Grazing Livestock in Qinghai-Tibet Plateau
CAI Qi-gang¹, TANG Yi-bo², GAO Xiao-long² et al (1. Academy of Animal Science and Veterinary Medicine, Qinghai University, Xining, Qinghai 810016; 2. College of Agriculture and Animal Husbandry, Qinghai University, Xining, Qinghai 810016)

Abstract In order to establish a LAMP detection method with high sensitivity, specificity and applicability for *Yersinia enterocolitica*, *outL* gene sequences of *Y. enterocolitica* were downloaded from GenBank database to make multiple sequences blast by using molecular biology method. The conserved regions of the gene were determined. Based on the sequences of conserved gene, a set of LAMP primers were designed and screened out online. The LAMP method was established after temperature optimization, sensitivity and specificity verification. The clinical stool samples of grazing cattle and sheep were detected by the LAMP detection method. The results showed that the optimal temperature for LAMP detection method was 63 ℃. There was no cross-reactivity with *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Enterobacter sakazakii*, *Staphylococcus aureus*, *Pasteurella multocida* and *Bacillus cereus*. The detection limit was 100 fg of the target gene. 26 positive samples were detected among 208 fecal DNA samples of yak and Tibet sheep, the positive rate was 12.5%. These results demonstrated that a LAMP method for the detection of *Y. enterocolitica* with high sensitivity, specificity and applicability was established.

Key words Grazing livestock; *Yersinia enterocolitica*; LAMP; *outL* gene; Sensitivity; Specificity

小肠结肠炎耶尔森氏菌(*Yersinia enterocolitica*)简称耶氏菌, 是一种革兰氏阴性菌, 能引起人和多种动物的耶氏菌病。在欧洲, 该病是常见的第三大食源性细菌性疾病, 排在前 2 位的分别是肠沙门氏菌和空肠弯曲杆菌^[1]。大多数情况下, 该病都是由耶氏菌感染所致, 可导致患病动物产生各种临床症状, 如发烧、腹痛和腹泻等^[2], 在世界范围内造成了极大的经济损失。其流行病学尚不清楚, 通常认为人感染该病主要是通过食用未煮熟的动物产品或饮用污染了耶氏菌的水而感染^[3-5]。环介导等温扩增反应(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)是近年来发展较快的一种检测方法, 该方法最大的优点是通常在 1 h 内即可将目的基因扩增到 1×10⁹倍, 且操作简单、快速、敏感性高和特异性强, 无需特殊仪器。因此, LAMP 方法已被广泛应用于包括多种细菌、病毒以及寄生虫等病原的快速检测研究^[6-9]。

为了检测放牧牦牛、藏羊群中耶氏菌病的感染情况, 进而对环境中的该病菌的污染情况和人感染风险进行评估, 笔者针对该病菌的 *outL* 基因保守序列, 综合利用分子生物学相关技术, 建立了 LAMP 快速检测方法, 并利用建立的 LAMP 检测方法, 对来自青海省和西藏自治区的 208 份放牧牦牛、藏

羊粪便样品进行了检测。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 标准菌株与对照菌株。耶氏菌标准菌株(ATCC23715), 购自北京中科质检生物技术有限公司; 对照菌株大肠杆菌(*E. coli*)、沙门氏菌(*Salmonella*)、阪崎肠杆菌(*Enterobacter sakazakii*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、多杀性巴氏杆菌(*Pasteurella multocida*)及蜡样芽胞杆菌(*Bacillus cereus*), 均由青海大学农学院动物医学系兽医传染病学实验室提供。

1.1.2 主要试剂及仪器。

1.1.2.1 试剂。改良磷酸缓盐冲液(PSB)培养基, 购自杭州微生物试剂有限公司; 细菌基因组快速抽提试剂盒, 购自北京艾比根生物技术有限公司; 粪便基因组 DNA 提取试剂盒(离心柱型)、核酸替代染料、6×Loading Buffer、DL-2 000 Marker、2×Taq PCR Master Mix, 购自天根生化科技(北京)有限公司; Loopamp[®] DNA 扩增试剂盒(环介导等温扩增法)及 Loopamp[®] 荧光目视检测试剂盒, 均购自荣研生物科技(中国)有限公司。

1.1.2.2 仪器。实时浊度仪(型号为 LA-320C), 购自日本荣研化学株式会社; 核酸蛋白测定仪(型号为 Bio photometer plus), 购自德国 Eppendorf 公司; 核酸电泳仪(型号为 DYY-12)购自于北京六一生物科技有限公司; 凝胶成像分析系统

基金项目 国家自然科学基金项目(31560695, 31560701); 青海省农牧厅项目(NMSY-2016-07, NMSY-2018-03)。

作者简介 蔡其刚(1981—), 男, 河南商丘人, 副研究员, 博士, 从事动物疫病诊断防治研究。* 通信作者, 教授, 硕士, 硕士生导师, 从事青藏高原畜禽传染病的诊断与防治研究。

收稿日期 2019-06-08

(型号为 6300),购自上海天能科技有限公司。

1.1.3 引物。根据 NCBI 网站中 GenBank 数据库登录的耶氏菌的 *outL* 基因(登录号为 CP009846.1),使用生物学软件 MEGA7.0 比对 *outL* 基因的保守序列,按照 LAMP 方法的引物设计原则,在线(<http://primerexplorer.jp/elamp> 4.0.0/index.html)设计并筛选针对 *outL* 基因的引物序列(表 1)。HPLC 级引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

表 1 *outL* 基因 LAMP 所用引物序列

Table 1 Primer sequences of *outL* gene for LAMP

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence	引物大小 Primer size//bp
F3	5'-AGGAATTCAAACACATCAGC-3'	240
B3	5'-CAACTCTAATCTTTTGTCTGAA-3'	240
FIP	5'-AGGTCGATATTATCGCCATAGGAAA-TTTAGTAAACAGACCTAAAAAAGAAG-C-3'	—
BIP	5'-ATTTGCCATAATGCGTAATACATCGTTTCGTGTTTATAACCAAACCTTCG-G-3'	—

1.1.4 标准菌株及对照菌株 DNA。纯培养的标准菌株(ATCC23715)和各对照菌株按照细菌基因组快速抽提试剂盒操作说明书提取细菌基因组 DNA。

1.1.5 临床粪便样品 DNA。208 份放牧牦牛、藏羊临床粪便样品分别采自青海省河南县、共和县、格尔木市、杂多县、久治县与及西藏那曲地区和日喀则市等地区。取 1 g 左右收集的粪便,置于 5 mL 灭菌 PSB 中,25 °C 下恒温摇床增菌培养 24 h。然后,4 °C、12 000 r/min 下离心 10 min,收集沉淀,用于粪便基因组总 DNA 提取,粪便 DNA 提取按照粪便基因组 DNA 提取试剂盒(离心柱型)操作说明书进行操作。

1.2 方法

1.2.1 LAMP 检测的建立及条件优化。按照 Loopamp® DNA 扩增试剂盒推荐的体系建立耶氏菌 LAMP 检测方法。反应体系(总体积为 25 μL)如下:DNA 模板 2 μL,2 × 反应缓冲液(RM)12.5 μL,5 pmol/μL 的 F3、B3 引物各 1 μL,40 pmol/μL 的 FIP、BIP 引物各 1 μL,20 pmol/μL 的 LAMP 荧光检测试剂(FD)1 μL,BstDNA 聚合酶 1 μL,去离子水 4.5 μL。反应程序如下:60 °C 反应 60 min,80 °C 灭活 5 min。

试剂盒推荐反应时间为 30~60 min。为了保证充分地扩增,首先扩增 60 min 进行 LAMP 扩增。为了摸索扩增反应的最适温度,以标准菌株(ATCC23715)DNA 为模板,分别在 60、61、62、63、64 和 65 °C 条件下,按照试剂盒推荐的体系使用实时浊度仪进行 LAMP 扩增,80 °C 灭活 5 min 后,将 LAMP 产物按 1:4 稀释后,取 2 μL 加上样缓冲液进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.2.2 LAMP 特异性。利用建立的 LAMP 检测方法,在最适温度下,以提取的标准菌株(ATCC23715)及对照菌株的基因组 DNA 为模板,进行 LAMP 扩增,80 °C 灭活 5 min。将 LAMP 产物按 1:4 稀释后取 2 μL 加上样缓冲液进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。同时,以 ATCC23715 为模板,利用

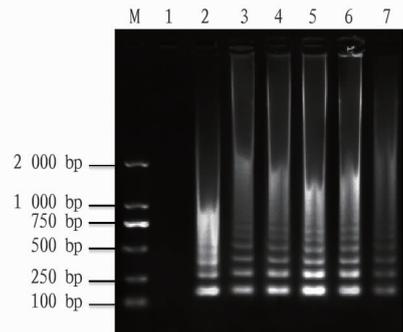
LAMP 外引物 F3、B3 进行普通 PCR 扩增,扩增产物切胶回收后送交生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。测得序列在 NCBI 网站上进行在线比对,以验证引物的特异性。

1.2.3 LAMP 敏感性。将提取的标准菌株(ATCC23715)的 DNA 使用核酸蛋白浓度测定仪进行浓度测定,并进行连续 10 倍倍比稀释,即 $1 \times 10^{-1} \sim 1 \times 10^{-8}$ 稀释,对原液和稀释后的 DNA 按照建立的 LAMP 方法,在最适温度下进行 LAMP 扩增,80 °C 灭活 5 min。取 2 μL LAMP 产物加上样缓冲液进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.2.4 LAMP 临床样品的检测。利用建立的 LAMP 方法对临床上采集并提取的 208 份粪便样品的 DNA 进行检测。

2 结果与分析

2.1 LAMP 反应最适温度的确定 以提取的标准菌株(ATCC23715)DNA 为模板,按照试剂盒推荐的 25 μL 反应体系配制 LAMP 反应液,并设置阴性对照反应。分别在 60、61、62、63、64 和 65 °C 条件下进行 LAMP 扩增反应。将 LAMP 反应产物进行 1:4 稀释后进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳。结果表明,阴性对照的 LAMP 反应产物没有可见的 DNA 条带,而加入 DNA 模板的 6 支 PCR 管中的 LAMP 反应产物均扩增出“阶梯状”的 DNA 条带,且反应温度为 63 °C 的 LAMP 扩增产物条带最亮,DNA 浓度最大,表明在 63 °C 时 LAMP 反应扩增效率最高,63 °C 是最适反应温度(图 1)。



注:M.DL 2 000 Marker;1.阴性对照;2~7 分别为 LAMP 反应在 60、61、62、63、64 和 65 °C 的扩增产物

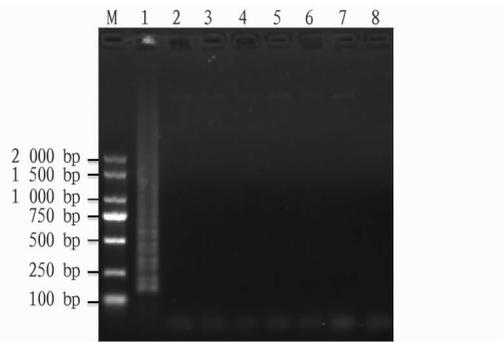
Note:M.DL2 000 Marker;1.Negative control;2~7. Amplification products of LAMP reaction at 60 ,61,62 ,63,64 and 65 °C respectively

图 1 LAMP 反应检测耶尔森氏菌最适温度的筛选

Fig.1 Screening of the optimum temperature for the detection of *Y. enterocolitica* by LAMP reaction

2.2 LAMP 反应特异性检测 利用建立的 LAMP 检测方法,在最适温度 63 °C 下以提取的标准菌株(ATCC23715)和其他 6 种对照菌株的基因组 DNA 为模板进行 LAMP 扩增。电泳结果显示,只有标准菌株(ATCC23715)扩增出明显的“阶梯状”的 DNA 条带,而其他 6 株对照菌株和阴性对照均无可见 DNA 条带,表明建立的 LAMP 方法具有良好的特异性(图 2)。同时,因为反应体系中加入了 1 μL 的 FD,在紫外线下可见阳性样品呈现绿色荧光,而阴性对照没有荧光(图 3)。用 LAMP 外引物对标准菌株 ATCC23715 的 DNA 进行普通 PCR 扩增,电泳结果显示获得约 240 bp 大小的 DNA 条带

(图 4),与预期大小一致。PCR 产物测序后返回的序列与目的基因进行 Blast 比对,同源性达 100%,因此 LAMP 和 PCR 扩增的条带均为目的基因。

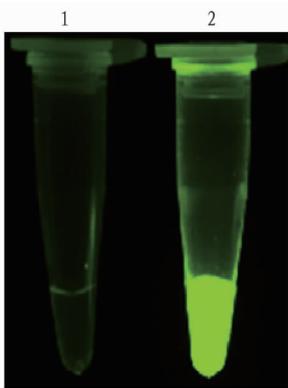


注:M.DL 2 000 Marker;1.ATCC23715;2.大肠埃希菌;3.沙门氏菌;4.阪崎肠杆菌;5.金黄色葡萄球菌;6.多杀性巴氏杆菌;7.蜡样芽胞杆菌;8.阴性对照

Note:M.DL2 000 Marker;1.ATCC23715;2.*Escherichia coli*;3.*Salmonella*;4.*Enterobacter sakazakii*;5.*Staphylococcus aureus*;6.*Pasteurella multocida*;7.*Bacillus cereus*;8.Negative control

图 2 LAMP 特异性检测结果

Fig.2 LAMP specific detection results



注:1.阴性对照;2.ATCC23715

Note:1.Negative control;2.ATCC23715

图 3 LAMP 荧光检视

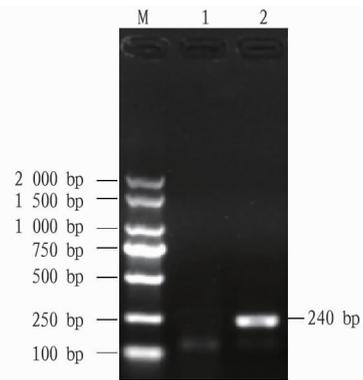
Fig.3 LAMP fluorescence view

2.3 LAMP 反应敏感性检测 经测定,标准菌株(ATCC23715)基因组 DNA 浓度为 $100 \text{ ng}/\mu\text{L}$,将 DNA 进行 10 倍连续倍比稀释,将 DNA 原液与稀释后的 DNA 为模板分别进行 LAMP 扩增反应,电泳结果显示 LAMP 的检测限值达到 100 fg (图 5),说明建立的 LAMP 方法具有较高的敏感性。

2.4 LAMP 反应临床样品的检测 利用建立的 LAMP 检测方法,对来自临床采集的 208 份放牧牦牛、藏羊粪便样品提取的 DNA 进行检测,结果共检测出阳性样品 26 份,阳性率为 12.5% ($26/208$)。

3 讨论与结论

耶氏菌是一种能引起人和动物严重的肠道疾病,主要症状有腹泻、胃肠炎、肠系膜淋巴结炎,严重的可引起败血症,在世界范围内造成了严重的经济损失^[10]。目前,针对耶氏菌的检测,已经建立了很多方法,主要有免疫学检测和病原

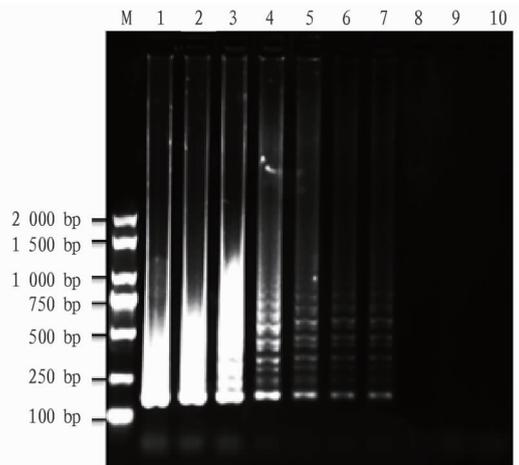


注:M.DL 2 000 Marker;1.阴性对照;2.ATCC23715

Note:M.DL2 000 Marker;1.Negative control;2.ATCC23715

图 4 LAMP 特异性验证

Fig.4 LAMP specific verification



注:M,DL 2 000 Marker;1,100 ng;2,10 ng;3,1.0 ng;4,100 pg;5,10 pg;6,1.0 pg;7,100 fg;8,10 fg;9,1.0 fg;10,阴性对照

Note:M,DL2 000 Marker;1,100 ng;2,10 ng;3,1.0 ng;4,100 pg;5,10 pg;6,1.0 pg;7,100 fg;8,10 fg;9,1.0 fg;10,negative control

图 5 LAMP 敏感性检测结果

Fig.5 LAMP sensitivity detection results

培养鉴定等^[11-14]。此外,也有将病原培养、免疫和 PCR 检测相结合,检测食品中耶氏菌的报道^[15]。然而,人们普遍认为 PCR 和 Real-time PCR 是鉴定耶氏菌的最有效、灵敏、且特有的检测方法^[16-17]。

该研究通过对该细菌 *outL* 基因的保守序列,在线设计和筛选了一套 LAMP 引物,并建立了一种用于检测耶氏菌的敏感性、特异性和适用性强的 LAMP 检测方法。该方法通过 LAMP 技术检测样本中的 DNA,与普通 PCR 技术相比 LAMP 方法对仪器和试验条件的要求更低,不需要专门的 PCR 仪。同时,LAMP 方法的扩增效率更高,在 1 h 内即可做出定性判断。结果判断方法很多,除了可以进行琼脂糖凝胶电泳判定外,也可以根据浊度进行肉眼判断,或者在反应液中加入荧光试剂,在紫外光下判定。后 2 种方法均不需要对扩增后的反应液进行开盖,避免了 DNA 对试验环境的污染。与传统的细菌分离、培养鉴定方法相比,LAMP 方法操作步骤简便,对操作人员的要求更低,也降低了对环境的污染和操作人员

感染的风险。这极大地缩短了检测的总体时间,传统的细菌培养、鉴定至少需要5~6 d,而该方法在30 h内即可做出结果判定,且可以对大量的临床样本进行批量操作。

因此,在该病的检测、预防和控制过程中,建立的该LAMP方法为该病大量样本的流行病学调查及其风险分析提供了一个行之有效的检测工具,应在临床上大量推广使用。

参考文献

- [1] HANIFIAN S, KHANI S. Prevalence of virulent *Yersinia enterocolitica* in bulk raw milk and retail cheese in northern-west of Iran[J]. *Int J Food Microbiol*, 2012, 155(1/2): 89-92.
- [2] AZIZ S N, AZIZ K M. Averting behavior framework for perceived risk of *Yersinia enterocolitica* infections[J]. *J Pathog*, 2012, 2012: 1-4.
- [3] THOERNER P, BIN KINGOMBE C I, BOGLI-STUBER K, et al. PCR detection of virulence genes in *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* and investigation of virulence gene distribution[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69(3): 1810-1816.
- [4] TRCEK J, FUCHS T M, TRUELZSCH K. Analysis of *Yersinia enterocolitica* invasion expression *in vitro* and *in vivo* using a novel luxCDABE reporter system[J]. *Microbiology*, 2010, 156(Pt 9): 2734-2745.
- [5] ONG K L, GOULD L H, CHEN D L, et al. Changing epidemiology of *Yersinia enterocolitica* infections: Markedly decreased rates in young black children, Foodborne Diseases Active Surveillance Network (FoodNet), 1996-2009[J]. *Clin Infect Dis*, 2012, 54: 385-390.
- [6] 陆冰洋, 刘华栋, 李婷婷, 等. 传染性法氏囊病病毒 RT-LAMP 检测方法的建立[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2018(15): 135-139, 243.
- [7] AHMED M E, ELDIGAIL M H, ELAMIN F M, et al. Development and evaluation of real-time loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of cystic echinococcosis[J]. *BMC Vet Res*, 2016, 12: 1-10.

(上接第24页)

3 结论

研究结果显示, 2008—2017年北京市高水肥小麦品种选育的趋势为抽穗期和成熟期呈提前趋势, 株高呈降低趋势, 穗粒数、千粒重和生育期天数呈减少趋势, 籽粒灌浆时间、单位面积有效穗数和产量呈增加趋势。

相关分析结果表明, 产量三要素中穗粒数与千粒重间呈正相关关系, 有效穗数与穗粒数、千粒重间呈负相关关系, 说明有效穗数和穗粒数之间、有效穗数和千粒重之间均为相互制约的关系。

产量与其构成三要素间均呈正相关, 相关系数由高到低依次为千粒重、穗粒数、有效穗数, 说明在产量构成三要素中, 千粒重对近年水地小麦产量提升的贡献最大, 其次是穗粒数, 而有效穗数的贡献最小。提高千粒重、增加穗粒数是小麦高产的关键。因此, 北京地区在选育高产品种时, 应当重点考虑千粒重对产量的影响, 适当增加穗粒数, 同时注意

- [8] 张艳艳, 叶倩, 王正荣, 等. 基于 *cox2* 基因的细粒棘球绦虫环介导等温扩增检测方法的初步建立[J]. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志*, 2017, 35(2): 169-172.
- [9] CAI T, LOU G Q, YANG J, et al. Development and evaluation of real-time loop-mediated isothermal amplification for hepatitis B virus DNA quantification: A new tool for HBV management[J]. *J Clin Virol*, 2008, 41(4): 270-276.
- [10] BOTTONI E J. *Yersinia enterocolitica*: Overview and epidemiologic correlates[J]. *Microbes Infect*, 1999, 1(4): 323-333.
- [11] RIBER U, JUNGENSEN G. Cell-mediated immune responses differentiate infections with *Brucella suis* from *Yersinia enterocolitica* serotype O:9 in pigs[J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 2007, 116(1/2): 13-25.
- [12] BALAKRISHNA K, MURALI H S, BATRA H V. Cloning, expression and characterization of attachment-invasion locus protein (Ail) of *Yersinia enterocolitica* and its utilization in rapid detection by immunoassays[J]. *Lett Appl Microbiol*, 2010, 50(2): 131-137.
- [13] LAUKKANEN R, HAKKINEN M, LUNDÉN J, et al. Evaluation of isolation methods for pathogenic *Yersinia enterocolitica* from pig intestinal content[J]. *J Appl Microbiol*, 2010, 108(3): 956-964.
- [14] SAVIN C, LECLERCQ A, CARNIEL E. Evaluation of a single procedure allowing the isolation of enteropathogenic *Yersinia* along with other bacterial enteropathogens from human stools[J]. *PLoS One*, 2012, 7(7): 1-8.
- [15] ESTRADA C S M, VELÁZQUEZ L D C, FAVIER G I, et al. Detection of *Yersinia* spp. in meat products by enrichment culture, immunomagnetic separation and nested PCR[J]. *Food Microbiol*, 2012, 30(1): 157-163.
- [16] LAMBERTZ S T, NILSSON C, HALLANVUO S, et al. Real-time PCR method for detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in food[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2008, 74(19): 6060-6067.
- [17] GÓMEZ-DUARTE O G, BAI J, NEWELL E. Detection of *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio cholerae*, and *Campylobacter* spp. enteropathogens by 3-reaction multiplex polymerase chain reaction[J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2009, 63(1): 1-9.

协调有效穗数和穗粒数的矛盾才能达到提高产量的目的。

参考文献

- [1] 周吉红, 毛思帅, 孟范玉, 等. 北京第八代小麦主推品种特点及其应用[J]. *作物杂志*, 2015(1): 20-24.
- [2] 周阳, 何中虎, 陈新民, 等. 30余年来北部冬麦区小麦品种产量改良遗传进展[J]. *作物学报*, 2007, 33(9): 1530-1535.
- [3] 谢华峰. 冀中南水地区域优质小麦品种22年性状演进报告[J]. *种子科技*, 2016, 34(8): 109-110, 112.
- [4] 仇松英, 许钢垣, 武计平, 等. 山西省冬小麦品种演变分析[J]. *华北农学报*, 1999, 14(2): 1-5.
- [5] 温辉芹, 程天灵, 裴自友, 等. 山西省近年审定小麦品种的综合性状分析[J]. *作物杂志*, 2018(4): 32-36.
- [6] 吴儒刚, 范业泉, 刘鹏, 等. 华北地区小麦品种农艺性状比较分析[J]. *安徽农业科学*, 2014, 42(7): 1959-1962, 2001.
- [7] 高辉明, 张正斌, 徐萍, 等. 2001—2009年中国北部冬小麦生育期和产量变化[J]. *中国农业科学*, 2013, 46(11): 2201-2210.
- [8] 曹廷杰, 赵虹, 王西成, 等. 河南省半冬性小麦品种主要农艺性状的演变规律[J]. *麦类作物学报*, 2010, 30(3): 439-442.
- [9] 佟汉文, 彭敏, 刘易科, 等. 2001—2016年湖北省小麦区域试验审定品种产量性状分析[J]. *湖北农业科学*, 2018, 57(24): 46-50.
- [10] 王玲燕, 朱红彩, 黄金华, 等. 2013—2018年河南省审定的半冬性小麦品种产量结构特点分析[J]. *安徽农业科学*, 2019, 47(13): 20-22, 25.