

RSAP 标记技术新引物设计及其反应体系的优化

张明科,张鲁刚,巩振辉,惠麦侠

(西北农林科技大学 园艺学院, 国家小麦改良中心杨陵分中心, 陕西省农业分子生物学重点实验室, 陕西 杨凌 712100)

【摘要】【目的】对限制性位点扩增多态性(Restriction site amplified polymorphism, RSAP)标记技术进行改进,并优化了其反应体系。【方法】遵循引物设计原则,使限制性位点序列位于中间,在其 3'端增加 3 个选择性碱基,5'端设计为 10~12 个碱基的随机序列,设计了 14 条长为 19 bp 的限制性位点扩增多态性(RSAP)新引物。以大白菜、紫菜薹自交系及其 F₁、F₂ 的 DNA 为模板,对新引物的反应体系进行了优化,并对其重复性和适用性进行了检验。【结果】新设计引物 PCR 扩增的前 5 个循环退火温度为 35 ℃,后 35 个循环为 52 ℃;在 25 μL 优化反应体系中,模板 DNA 用量为 2.0 μL(20.0 ng/μL)、Mg²⁺ 3.0 μL(25 mmol/L)、Taq 酶(5 U/μL)1.5 U、dNTPs 2.0 μL(2.5 mmol/L)、引物各 0.6 μL(10 μmol/L);新引物扩增出的谱带较原引物更多,多态性更好;只改变选择性碱基,新设计引物就能扩增出新的谱带;新设计引物的重复性、稳定性好,在荞麦和小麦品系,以及紫菜薹、大白菜及其 F₁、F₂ 中,新引物均能扩增出清晰谱带。【结论】新引物适用性和重复性好,可广泛应用于其他作物的基因组 DNA 分析。

【关键词】 限制性位点扩增多态性;引物设计;反应体系;体系优化

【中图分类号】 S188

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2009)02-0148-07

New primers design and reaction system optimization of restriction site amplified polymorphism (RSAP) marker technique

ZHANG Ming-ke, ZHANG Lu-gang, GONG Zhen-hui, HUI Mai-xia

(College of Horticulture, Northwest A&F University, Yangling Branch of National Wheat Improvement Centre, Shaanxi Key Laboratory of Molecular Biology for Agriculture, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: 【Objective】RSAP marker technique was improved and its reaction system was optimized.

【Method】The sequence of restriction site (4-6 bases) located in the middle, three selective nucleotides were added to its 3' end and 10 to 12 bases long of random sequence lied in its 5' end. Fourteen new primers of restriction site amplified polymorphism (RSAP) were redesigned 19 nucleotides long. Then, using DNA from inbred lines' young leaves of Chinese cabbage (*Brassica campestris* L. ssp. *Pekinensis*), Purple-caitai (*Brassica campestris* L. var. *purpurea* Bailey) and their F₁, F₂ as trial materials, its reaction system was optimized and reproducibility and applicability were tested. 【Result】PCR amplification of new primers was run for the first 5 cycles with an annealing temperature of 35 ℃, followed by 35 cycles with an annealing temperature of 52 ℃; the optimum PCR reaction system of 25 μL included 2.0 μL DNA templates (20.0 ng/μL), 3.0 μL of Mg²⁺ (25 mmol/L), 1.5 U of Taq DNA polymerase, 2.0 μL of dNTPs (2.5 mmol/L) and 0.6 μL of each primers (10 μmol/L). New primers could amplify more strips and polymorphism was better than former primers. In the varieties of buckwheat and wheat, new primer could amplify vivid strips too. 【Conclusion】The applicability and reproductivity of new primers were very good, and application

* [收稿日期] 2008-04-03

[基金项目] 西北农林科技大学科研专项(05ZR065); 国家“863”高技术研究与发展计划项目(2006AA100108-4-7)

[作者简介] 张明科(1970—), 男, 陕西扶风人, 讲师, 在读博士, 主要从事蔬菜育种与生物技术研究。

E-mail: zhangmk0904@sina.com

[通信作者] 张鲁刚(1963—), 男, 陕西岐山人, 教授, 博士生导师, 主要从事蔬菜生物技术与育种研究。

E-mail: lugangzh@163.com

would be broad.

Key words: restriction site amplified polymorphism; primer design; reaction system; optimization

早在 1980 年,人类遗传学家 Botstein 等^[1]首先提出, DNA 限制性片段长度多态性 (Restriction fragment length polymorphism, RFLP) 可以作为遗传标记,开创了直接利用 DNA 多态性发展遗传标记的新阶段。以 DNA 多态性为基础的分子标记,具有数量多、多态性高、可直接反映基因组 DNA 等优点,已被广泛应用于作物遗传图谱构建、重要性状的标记定位、种质资源遗传多样性分析、品种指纹图谱和纯度鉴定等方面。然而, DNA 标记的广泛应用和深入推广,有赖于 DNA 标记技术的不断发展与改进。操作简便、多态性丰富、产率中等、结果稳定可靠、成本低廉,已成为新型分子标记技术的发展方向。基于生物基因组上广泛分布的限制性内切酶识别位点(简称限制性位点),杜晓华等^[2]创建了限制性位点扩增多态性 (Restriction site amplified polymorphism, RSAP),并以辣椒为试材,对该项技术进行了优化,且在苦瓜和水稻作物上对其适用性进行了检验。但该技术在进行引物设计时,将限制性位点序列放在 3' 末端,由于限制性位点本身序列的影响,将不可避免地导致引物 3' 末端出现 3 个连续性碱基以及末位碱基为 A 的情况,从而使错误引发几率和错配效率明显增加。基于以上考虑,本研究重新设计了 RSAP 标记引物,以紫菜薹、大白菜及其 F₁、F₂ 为材料,进行了 RSAP 反应体系优化,并在荞麦、小麦上对其适用性进行了检验。现将研究结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 紫菜薹 (*Brassica campestris* L. var. *purpurea* Bailey) 自交系 95T2-5 (P₁)、大白菜 (*Brassica campestris* L. ssp. *Pekinensis*) 自交系 94S17-1 (P₂) 及其 F₁、F₂, 均由西北农林科技大学园艺学院白菜课题组提供; 荞麦品系 1 号和 2 号 DNA, 由西北农林科技大学农学院李瑞国硕士提供; 小麦品系 1 号和 2 号 DNA, 由西北农林科技大学农学院王仕强硕士提供。

1.1.2 主要生化试剂与仪器 引物由上海生物工程有限公司合成; *Taq* 聚合酶购自华美生物工程公司; Marker 购自大连宝生物公司; PCR 仪为 PTC-200。

1.2 方法

1.2.1 DNA 的提取 采用 CTAB 法^[3], 并参考王绮等^[4]、孟祥栋等^[5]的方法进行。

1.2.2 引物设计 引物设计原则^[6]: ①引物长度一般为 15~30 bp, 常用 18~27 bp; ②应避免引物 3' 端出现 3 个以上的连续碱基, 如 GGG 或 CCC, 以避免错误引发机率增加; ③末位碱基为 A 的错配效率明显高于其他 3 个碱基, 因此应当避免在引物的 3' 端使用碱基 A; ④引物序列的 GC 含量一般为 40%~60%, 所设计的引物尽可能一致; ⑤引物的熔解温度 (*T_m*) 值在 58 °C 左右; ⑥选用 3' 端 DNA 双链形成所需的自由能 (ΔG) 值较低 (绝对值不超过 9), 而 5' 端和中间 ΔG 值相对较高的引物。

遵循以上原则, 在限制性酶切位点序列的 3' 端增加 3 个选择性碱基, 新设计引物 14 条 (表 1), 长度均为 19 bp, 其结构组成为: 5' 端 10~12 bp 的随机序列, 中间 4~6 bp 的某限制性内切酶识别位点, 3' 端 3 bp 的选择性碱基。新引物在设计时 GC 含量设定为 52.6%, *T_m* 值为 58 °C, 选用具有粘性末端的限制性位点序列, 同时避免在引物的 3' 端使用碱基 A, 并注意选用 3' 端 ΔG 值较低 (绝对值不超过 9) 而 5' 端和中间 ΔG 值相对较高的引物。

1.2.3 退火温度的确定 借鉴相关序列扩增多态性^[7] (Sequence related amplified polymorphism, SRAP) 和杜晓华等^[2] 的 PCR 程序, 反应条件: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 1 min, 35 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1 min, 5 个循环; 94 °C 变性 1 min, 46~54 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1 min, 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min, 4 °C 保存。

为确定最佳退火温度, 试验将后 35 个循环的退火温度分别设为 46, 48, 50, 52 和 54 °C, 以大白菜自交系和紫菜薹自交系的 DNA 为模板, 采用引物组合 Rs1-Rs2 进行 PCR 扩增。

1.2.4 反应体系中其他物质含量的确定 在 25 μ L 的反应体系中, 采用 L₁₆ (4⁵) 正交试验设计, 对 RSAP 反应体系中的 Mg²⁺、dNTPs、*Taq* 酶、引物和模板 DNA 用量进行 5 因素 4 水平的筛选试验, 试验因素和水平见表 2。引物为 Rs7-Rs8, 模板为紫菜薹自交系的 DNA。

表 1 新设计的 RSAP 引物
Table 1 New primers of RSAP

引物编号 Primer No.	引物序列 Primer sequence	限制性位点 Restriction site	限制性内切酶 Restriction enzyme
Rs1	5'-TGCCAGCCACGAATTCAGC-3'	GAATTC	<i>EcoR</i> I
Rs1a	5'-TGCCAGCCACGAATTCATG-3'	GAATTC	<i>EcoR</i> I
Rs2	5'-TGCCAGCCACAAGCTTAGC-3'	AAGCTT	<i>Hind</i> III
Rs2a	5'-TGCCAGCCACAAGCTTATG-3'	AAGCTT	<i>Hind</i> III
Rs3	5'-TACgACgCACGGATCCATT-3'	GGATCC	<i>BamH</i> I
Rs4	5'-GGCCAGCCGCTTTAAAAATC-3'	TTTAAA	<i>Dra</i> I
Rs5	5'-TgCCA _g CCACGATATCATG-3'	GATATC	<i>EcoR</i> V
Rs6	5'-TgCCA _g CCACAGATCTATG-3'	AGATCT	<i>Bgl</i> II
Rs7	5'-TGCCAGCCA _g ACTGCAGATT-3'	CTGCAG	<i>Pst</i> I
Rs8	5'-TGCCAGCCACTCTAGAATG-3'	TCTAGA	<i>Xba</i> I
Rs9	5'-TgCCA _g CCACATGCATATG-3'	ATGCAT	<i>Nsi</i> I
Rs10	5'-gTTgCCA _g CCACTCGAATT-3'	TCGA	<i>Taq</i> I
Rs11	5'-gTTgCCA _g CCACGATCATT-3'	GATC	<i>Mbo</i> I
Rs12	5'-gTTgCCA _g CCACTTAACTG-3'	TTAA	<i>Mse</i> I

表 2 PCR 反应的因素及其用量
Table 2 Factors and amount of PCR reaction

水平 Level	因素 Factors					
	模板 DNA (20.0 ng/ μ L)/ μ L DNA template	Mg ²⁺ (25 mmol/L)/ μ L	Taq 酶(5 U/ μ L)/U Taq polymerase	dNTPs (2.5 mmol/L)/ μ L	引物(10 μ mol/L)/ μ L Primer	
1	1.0	2.0	0.5	1.5	0.4	
2	1.5	2.5	1.0	2.0	0.6	
3	2.0	3.0	1.5	2.5	0.8	
4	2.5	3.5	2.0	3.0	1.0	

1.2.5 新设计引物与原引物扩增结果的比较 对具有相同限制性位点的新引物与原引物进行扩增结果比较,新引物在优化条件下进行,原引物的扩增体系和条件参考杜晓华等^[2]建立的 RSAP 技术。新引物选用引物组合 Rs1-Rs2,原引物选用 R3-R5,R3 的引物序列为 5'-GACTGCGTACATGAATTC-3',限制性位点为 GAATTC;R5 的引物序列为 5'-TTGGGATATCGGAAGCTT-3',限制性位点为 AAGCTT。模板为紫菜藁自交系和大白菜自交系的 DNA。

此外,在保持新引物 5'端序列不变的前提下,通过改变 3'端的 3 个选择性碱基,观察扩增谱带的变化。

1.2.6 新引物扩增的重复性检测 为验证新引物的重复性,确保其稳定性,本研究以大白菜、紫菜藁及其 F₁ 的 DNA 为模板,采用 Rs4-Rs1a 引物组合,分 2 次进行扩增。

1.2.7 新引物的适用性检测 以禾本科的小麦和荞麦各 2 个品系为材料,采用 Rs1-Rs2a 引物进行 RSAP 扩增,以检验新引物的适用性。

1.2.8 产物的检测 扩增产物采用质量浓度为 8%的非变性聚丙烯酰胺进行电泳,银染检测。银染程序参照李严等^[8]的方法并加以改进,即固定(体积分数为 10%乙醇、体积分数 0.5%冰乙酸)10~12 min 1 次;渗透(质量浓度为 0.2%的硝酸银水溶液)10~12 min;蒸馏水漂洗 30 s 1 次;0.002 g/L 硫代硫酸钠的水溶液漂洗 30 s;显色(质量浓度 1.5%氢氧化钠、体积分数 0.4%甲醛)至谱带清晰,于自来水下冲洗后照相。

2 结果与分析

2.1 新引物 PCR 退火温度的确定

由图 1 可以看出,在 46~54 °C 时均能扩增出条带,但以 52 °C 时扩增条带多且清晰,效果最好,故确定改进的 RSAP 标记技术的退火温度为 52 °C。

2.2 新引物最佳反应体系的优化

由图 2 可见,针对反应体系中各因素的不同组合,扩增结果存在明显差异。处理 3,4,6,7,9,10,15 和 16 的扩增条带较多,主带清晰,其中以处理 4 和 7 最优。

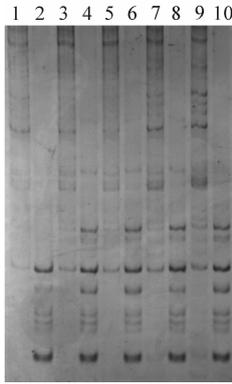


图 1 新引物 PCR 退火温度的优化

1~2,3~4,5~6,7~8,9~10. 退火温度分别为 46,48,50,52 和 54 °C;引物为 Rs1-Rs2;单号泳道模板为 P₁;双号泳道模板为 P₂

Fig. 1 Optimization of RSAP annealing temperature with new primers

1—2,3—4,5—6,7—8,9—10. Annealing temperature were 46, 48,50,52 and 54 °C respectively;Primer combination was Rs1-Rs2;Odd lanes P₁;Even lanes P₂

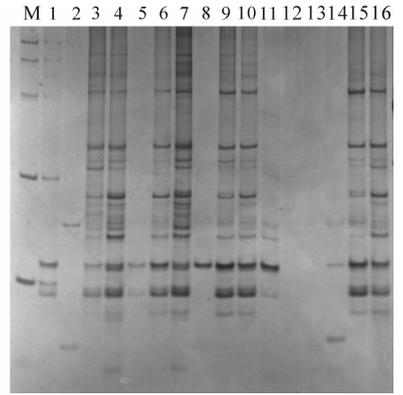


图 2 新引物最佳反应体系的优化

M. DNA Marker;1~16. 正交试验的不同处理;引物为 Rs7-Rs8;模板为 P₁

Fig. 2 Optimization of RSAP reaction system with new primers

M. DNA Marker;1—16. Different treatments of orthogonal experiment;Primer combination was Rs7-Rs8;DNA template was P₁

对图 2 各泳道的条带数和清晰度进行统计和评价,各处理得到的相应分值见表 3。

表 3 新引物 PCR 反应体系的正交试验结果

Table 3 Results of orthogonal experiment for PCR reaction system with new primers

处理 Treatment	模板 DNA DNA template	Mg ²⁺	Taq 酶 Taq polymerase	dNTPs	引物 Primer	条带数 Strip number	清晰度 Definition	得分 Score
1	1(1.0)	1(2.0)	1(0.5)	1(1.5)	1(0.4)	8	5	8.42
2	2(1.5)	1(2.0)	2(1.0)	2(2.0)	2(0.6)	2	3	4.05
3	3(2.0)	1(2.0)	3(1.5)	3(2.5)	3(0.8)	16	5	11.27
4	4(2.5)	1(2.0)	4(2.0)	4(3.0)	4(1.0)	22	9	17.86
5	1(1.0)	2(2.5)	1(0.5)	3(2.5)	4(1.0)	3	1	2.18
6	2(1.5)	2(2.5)	2(1.0)	4(3.0)	3(0.8)	16	7	13.49
7	3(2.0)	2(2.5)	3(1.5)	1(1.5)	2(0.6)	28	9	20.0
8	4(2.5)	2(2.5)	4(2.0)	2(2.0)	1(0.4)	1	7	8.13
9	1(1.0)	3(3.0)	1(0.5)	4(3.0)	2(0.6)	16	7	13.49
10	2(1.5)	3(3.0)	2(1.0)	3(2.5)	1(0.4)	19	7	14.56
11	3(2.0)	3(3.0)	3(1.5)	2(2.0)	4(1.0)	11	3	7.26
12	4(2.5)	3(3.0)	4(2.0)	1(1.5)	3(0.8)	0	0	0.00
13	1(1.0)	4(3.5)	1(0.5)	2(2.0)	3(0.8)	0	0	0.00
14	2(1.5)	4(3.5)	2(1.0)	1(1.5)	4(1.0)	3	1	2.18
15	3(2.0)	4(3.5)	3(1.5)	4(3.0)	1(0.4)	16	5	11.27
16	4(2.5)	4(3.5)	4(2.0)	3(2.5)	2(0.6)	17	7	13.85
K1	41.60	24.09	43.02	30.60	42.38			
K2	43.80	34.28	17.50	19.44	51.39			
K3	35.31	49.80	35.07	41.86	24.76			
K4	27.30	39.84	52.42	56.11	29.48			
k1	10.40	6.02	10.76	7.65	10.60			
k2	10.95	8.57	4.38	4.86	12.85			
k3	8.83	12.45	8.77	10.47	6.19			
k4	6.83	9.96	13.11	14.03	7.37			
R	4.13	6.43	8.73	9.17	6.66			

对表 3 进行正交试验分析,由极差值的大小可以初步推断出反应体系中各因素的影响大小依次

为:dNTPs>Taq 酶>引物>Mg²⁺>模板 DNA。对反映各因素影响大小的 k 值进行比较分析可知,

25 μL 反应体系中各因素的最优组合为:模板 DNA 1.5 μL 、 Mg^{2+} 3.0 μL 、*Taq* 酶 2 U、dNTPs 3.0 μL 、引物各 0.6 μL 。经过与实际试验扩增结果比较及基于尽量减少试验费用的考虑,最后确定 25 μL 反应体系中各因素的最优组合为:模板 DNA 2.0 μL 、 Mg^{2+} 3.0 μL 、*Taq* 酶 1.5 U、dNTPs 2.0 μL 、引物

各 0.6 μL 。

2.3 新设计引物与原引物扩增结果的比较

由图 3 可以看出,新设计引物扩增出的谱带更多,多态性更好。在保持新引物 5'端序列不变的前提下,改变 3'端的 3 个选择性碱基,其扩增结果见图 4。

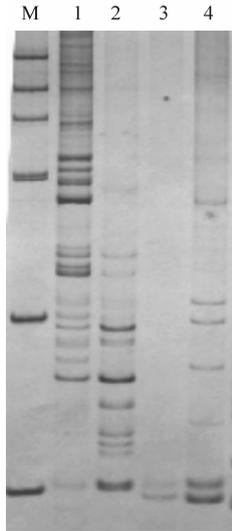


图 3 新设计引物与原引物扩增结果的比较

M. DNA Marker; 1~2. 引物为 Rs1-Rs2;
3~4. 引物为 R3-R5; 1, 3. P_1 ; 2, 4. P_2

Fig. 3 Comparison of amplification profile with new primer and former primer

M. DNA Marker; 1~2. Primer combination was Rs1-Rs2;
3~4. Primer combination was R3-R5; 1, 3. P_1 ; 2, 4. P_2

由图 4 可以看出,只改变选择性碱基,新设计引物就能扩增出新的谱带,不仅使引物设计简单化,而且可以设计出更多的新引物。

2.4 新引物扩增结果的重复性

由图 5 可见,随机选用的新引物组合 Rs4-Rs1a 的 2 次扩增结果清晰一致,说明新设计引物的扩增结果重复性、稳定性好,能够提供基因组信息。

2.5 新引物的适用性

应用引物组合 Rs1-Rs2a,以小麦和荞麦各 2 个品系进行扩增,结果见图 6。从图 6 可以看出,在优化后的反应体系中,新引物均能很好地在小麦和荞麦品系中扩增出清晰谱带。

以紫菜薹、大白菜及其 F_1 、 F_2 为试材,应用引物组合 Rs7-Rs8,扩增结果见图 7。图 7 中扩增条带清晰,差异谱带明显。说明改进的 RSAP 技术适用于多种作物的 DNA 标记技术。

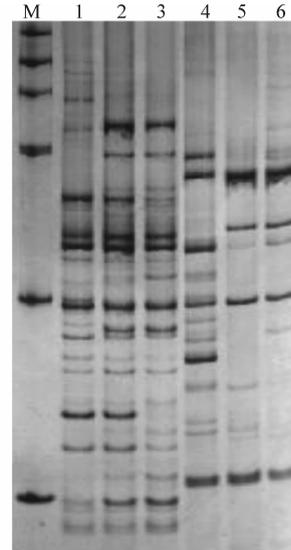


图 4 新引物选择性碱基改变后的扩增结果

M. DNA Marker; 1~3. 引物为 Rs1a-Rs2a; 4~6. 引物为 Rs1-Rs2;
1, 4. P_1 ; 2, 5. F_1 ; 3, 6. P_2

Fig. 4 Comparison of primers Rs1a-Rs2a and Rs1-Rs2 with changing one of three selective nucleotides

M. DNA Marker; 1~3. Primer combination was Rs1a-Rs2a;
4~6. Primer combination was Rs1-Rs2; 1, 4. P_1 ; 2, 5. F_1 ; 3, 6. P_2

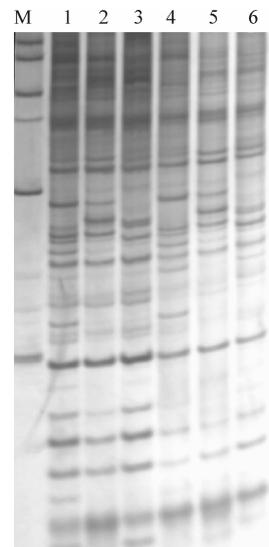


图 5 新引物组合 Rs4-Rs1a 的重复扩增结果

M. DNA Marker; 1, 4. P_1 ; 2, 5. F_1 ; 3, 6. P_2

Fig. 5 Comparison of RSAP profile amplified in two repeats with new primer Rs4-Rs1a

M. DNA Marker; 1, 4. P_1 ; 2, 5. F_1 ; 3, 6. P_2

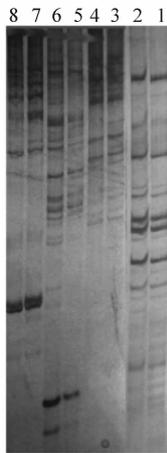


图 6 改进的 RSAP 技术在荞麦和小麦上的应用
1~2. 荞麦 1 号;3~4. 荞麦 2 号;5~6. 小麦 1 号;
7~8. 小麦 2 号;引物为 Rs1-Rs2a

Fig. 6 Application of improved RSAP technique
in buckwheat and wheat

1—2. Buckwheat variety No. 1;3—4. Buckwheat variety No. 2;
5—6. Wheat variety No. 1;7—8. Wheat variety No. 2;Primer
combination was Rs1-Rs2a

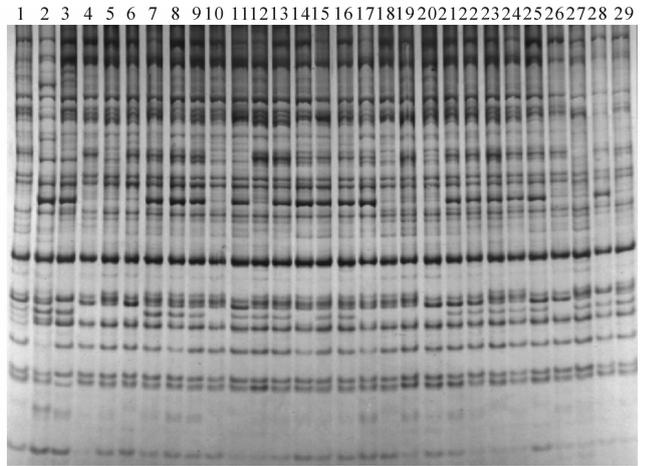


图 7 改进 RSAP 技术在紫菜薹和大白菜及其
F₁、F₂ 群体中的扩增结果

1. P₁;2. F₁;3. P₂;4~29. F₂ 群体中的不同植株;
引物组合 Rs7-Rs8

Fig. 7 Amplification profile in F₂ of Purple-caitai and
Chinese cabbage with improved RSAP technique

1. P₁;2. F₁;3. P₂;4—29. Individuals in F₂;Primer
combination was Rs7-Rs8

3 讨 论

PCR 技术广泛应用于基因组 DNA 分析,其主要用途之一是建立用于图谱构建的 DNA 标记,该标记在育种、分类、进化及基因克隆等方面已得到广泛应用。

目前,应用较多的几个基于 PCR 技术的标记系统,如 RAPD、SSR、AFLP 等,差异主要在于其复杂性、可靠性和信息容量,每一种标记系统都有其自身的优缺点。如 RAPD 标记操作简单,但重复性差、产率低;SSR 标记大部分呈共显性,而其开发相当昂贵且耗时;AFLP 标记产率高,目前应用广,但其主要缺点是复杂,必须进行包括 DNA 消化、连接、扩增等步骤,致使每一步条件优化困难。此外,在 AFLP 技术中,当限制酶作用于甲基化敏感位点时,会导致假多态性的产生;并且在某些物种中,如果使用识别 AATT 位点的限制酶 *Mse* I,会出现标记分布不均的情况。

引物设计是每一类 PCR 技术标记系统的关键。RSAP 技术中新引物长度设计为 19 bp,保证了扩增结果的稳定可靠性。此外,通过改变引物 3' 端 3 个选择性碱基,可以得到许多不同的引物,使引物设计工作简单化。新引物在设计上选用具有粘性末端的限制性位点序列,并将限制性位点置于随机序列和 3 个选择性碱基之间,避免了 3' 端出现 3 个连续性

碱基以及末位碱基为 A 的情况,从而使错误引发几率和错配效率明显降低。但对于具有平齐末端的限制性位点的引入,尚有待于进一步研究。

改进 RSAP 技术是一种操作简单、产率中等、稳定可靠的 DNA 标记技术,是 AFLP 的极大简化,是对 SRAP^[7] 和 TRAP^[9-10] 的有效补充。引物可两两随机配对,产生较多引物组合,一定程度上降低了引物的合成成本,加之操作步骤简单、检测位点较多,因此具有一定的成本优势。在许多作物全基因组的测序结果未获得以前,该技术在作物的遗传多样性分析、连锁图谱构建和基因定位等方面具有一定的推广应用价值。

本研究结果表明,新设计引物不仅在大白菜、紫菜薹等作物上适用,而且在小麦和荞麦上也能扩增出清晰的多态性条带,说明新设计引物的通用性很好。可以预测,改进的 RSAP 技术会与 SRAP 和 TRAP 技术一样,在其他作物的基因组 DNA 分析中发挥其巨大的标记系统优势。

[参考文献]

- [1] Botstein D, White R L, Skolnick M H, et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms [J]. *Am J Hum Genet*, 1980, 32(3): 314-333.
- [2] 杜晓华, 王得元, 巩振辉. 一种新型 DNA 标记技术——限制性位点扩增多态性(RSAP)的建立与优化 [J]. *西北农林科技大学学报: 自然科学版*, 2006, 34(9): 45-49.

- Du X H, Wang D Y, Gong Z H. Development and refinement of a new marker technique——Restriction site amplified polymorphism (RSAP) [J]. Journal of Northwest A&F University: Nat Sci Ed, 2006, 34(9): 45-49. (in Chinese)
- [3] 李永明, 赵玉琪. 实用分子生物学方法手册 [M]. 北京: 科学出版社, 2001: 173-178.
Li Y M, Zhao Y Q. Manual for practical methods of molecular biology [M]. Beijing: Science Press, 2001: 173-178. (in Chinese)
- [4] 王 琦, 张鲁刚, 张战凤, 等. 大白菜杂交种“冠春”杂交率的 RAPD 分析 [J]. 西北植物学报, 2006, 26(4): 677-682.
Wang Q, Zhang L G, Zhang Z F, et al. RAPD analysis of the crossing rate of the spring Chinese Cabbage variety Guanchun (*Brassica campestris*) [J]. Acta Bot Boreal Occident Sin, 2006, 26(4): 677-682. (in Chinese)
- [5] 孟祥栋, 马 红, 盖树鹏. 快速提取用于 PCR 分析的几种蔬菜 DNA 的方法 [J]. 应用与环境生物学报, 1998, 4(3): 251-254.
Meng X D, Ma H, Gai S P. Rapid extraction methods of vegetable DNA suitable for PCR analysis [J]. Chin J Appl Environ Biol, 1998, 4(3): 251-254. (in Chinese)
- [6] 张新宇, 高燕宁. PCR 引物设计及软件使用技巧 [J]. 生物信息学, 2004, 2(4): 15-18.
Zhang X Y, Gao Y N. To design PCR primers with Oligo 6 and Primer Premier 5 [J]. China Journal of Bioinformatics, 2004, 2(4): 15-18. (in Chinese)
- [7] 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]. Theo Appl Genet, 2001, 103: 455-461.
- [8] 李 严, 张春庆. 新型分子标记——SRAP 技术体系优化及应用前景分析 [J]. 中国农学通报, 2005, 21(5): 108-112.
Li Y, Zhang C Q. A molecular marker——SRAP technique optimization and application analysis [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2005, 21(5): 108-112. (in Chinese)
- [9] 柳李旺, 龚义勤, 黄 浩, 等. 新型分子标记——SRAP 与 TRAP 及其应用 [J]. 遗传, 2004, 26(5): 777-781.
Liu L W, Gong Y Q, Huang H, et al. Novel molecular marker systems——SRAP and TRAP and their application [J]. Hereditas, 2004, 26(5): 777-781. (in Chinese)
- [10] Hu J G, Vick B A. Target region amplification polymorphism: A novel marker technique for plant genotyping [J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2003, 21: 289-294.
- (上接第 147 页)
- [24] 安贵阳. 苹果叶营养元素含量的标准值及其影响因素研究 [D]. 陕西杨凌: 西北农林科技大学, 2004.
An G Y. Apple leaf nutrient content of the standard and its impact factors [D]. Yangling Shaanxi: Northwest Agriculture and Forestry University, 2004. (in Chinese)
- [25] 李港丽, 苏润宇, 沈 隽. 几种落叶果树叶内矿质元素含量标准值的研究 [J]. 园艺学报, 1987, 14(2): 81-89.
Li G L, Su R Y, Shen Y. Research on some deciduous fruit trees in the standard value of mineral elements [J]. Acta Horticulturae Sinica, 1987, 14(2): 81-89. (in Chinese)
- [26] Grossman Y L, Ustin S L. Critique of stepwise multiple linear regression for the extraction of leaf biochemistry information from leaf reflectance data [J]. Remote Sensing of Environment, 1996(56): 182-193.
- [27] 鲍士旦. 土壤农化分析 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2000: 263-268.
Bao S D. Agricultural chemical analysis of soil [M]. Beijing: China Agriculture Publishing House, 2000: 263-268. (in Chinese)
- [28] 何 勇, 李晓丽. 基于主成分分析和神经网络的近红外光谱苹果品种鉴别方法研究 [J]. 光谱学与光谱分析, 2006, 26(5): 850-853.
He Y, Li X L. Discrimination of varieties of apple using near infrared spectra based on principal component analysis and artificial neural network model [J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2006, 26(5): 850-853. (in Chinese)
- [29] Malthus T J, Maderia A C. High resolution spectroradiometry: spectral reflectance of field bean leaves infected by *botrytis fabae* [J]. Remote Sensing of Environment, 1993(45): 107-116.
- [30] 李民赞. 光谱分析技术及其应用 [M]. 北京: 科学出版社, 2006: 123.
Li M Z. Spectroscopy and application [M]. Beijing: Science Press, 2006: 123. (in Chinese)
- [31] Dury S J, Wallis I R, Foley W J. Estimating foliage nitrogen concentration from HYMAP data using continuum removal analysis [J]. Remote Sensing of Environment, 2004, 3(1/2): 18-29.
- [32] Kokaly R F, Clark R N. Spectroscopic determination of leaf bio-chemistry using band-depth analysis of absorption features and stepwise multiple linear regression [J]. Remote Sensing of Environment, 1999(67): 267-287.