



向日葵品种鉴定和纯度分析的 AFLP 研究^①

刘杰 刘公社^② 齐冬梅 汪恩华 李芳芳

(中国科学院植物研究所 北京 100093)

摘要 从杂交油葵 A15 及其亲本的 1/2 粒干种子中提取基因组 DNA, 选用 17 对引物组合进行 AFLP 分析, 构建了它们的指纹图谱。17 对引物在 A 系与 R 系当中共扩增出 1125 条扩增产物, 其中 144 条带表现出多态性, 平均每对引物扩增 66 条带, 不同引物组合产生的 DNA 片段数目在 50 ~ 70 之间, 大小分布于 100bp ~ 500bp, 多态性比率为 12.8%。从中筛选出的 2 对引物 E-AAC/M-CTC 和 E-ACG/M-CTG 可将亲本和子代区分开。引物对 E-AAC/M-CTC 在 A 系中扩增出 440bp、190bp、160bp 3 条特征谱带, 在 R 系中扩增出 380bp、350bp、225bp、180bp 4 条特征谱带, E-ACG/M-CTG 在 A 系中扩增出了 2 条特征带 480bp 和 265bp, 在 R 系中扩增出 490bp、220bp、205bp、125bp 4 条特征谱带, 且上述谱带均在子代中出现。用引物组合 E-ACG/M-CTG 对 A15、双亲以及与 A15 外型十分相似的 10 个常用油葵杂交种进行 AFLP 分析, 不仅表现出良好的多态性, 并能够清楚地将它们加以区分。以其对 50 粒 A15 杂交种子进行纯度鉴定, 得到与大田纯度检测一致的结果, 说明使用 AFLP 标记检测油用向日葵的品种和纯度是可行的。对现行种子纯度和品种鉴定的方法进行了讨论。

关键词 杂交油葵 AFLP 种子纯度

Study on AFLP Markers Used in Identification and Genetic Purity Test of Sunflower (*Helianthus annuus* L.)

LIU Jie LIU Gong-She^② QI Dong-Mei WANG En-Hua LI Fang-Fang

(Institute of Botany, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093)

Abstract The genomic DNAs extracted from 1/2 mature seed of oilseed sunflower hybrid A15 and its parents were analyzed using AFLP (Amplified fragment length polymorphisms) to generate DNA fingerprints. A total of 1125 AFLP markers were produced with 17 primer combinations to screen A-line and R-line, ranging from 100 ~ 500 base pairs (bp), and the polymorphism rate was about 12.8%, the average bands amplified by each primer combination were 66. Primer combination E-AAC/M-CTC, could generate characteristic bands: 440 bp, 190 bp, 160 bp in A-line and 380 bp, 350 bp, 225 bp, 180 bp in R-line, whereas E-ACG/M-CTG could generate characteristic bands: 480 bp, 265 bp in A-line and 490 bp, 220 bp, 205 bp and 125 bp in R-line. All these characteristic bands screened were found in A15 hybrids. These bands can be used as AFLP markers to identify different varieties in oilseed sunflower and the purity of A15 hybrid seed. Several assess methods

① 中国科学院创新项目(KSCX1-08)。Supported by Key Project of the Chinese Academy of Science(KSCX1-08)。

② 通讯联系人。Author for correspondence.

作者简介: 刘杰, 男, 1963 年 7 月生于河北保定, 1986 年毕业于河北农大园艺系, 1997 年获中科院理学博士学位。现为中科院植物研究所副研究员。研究方向为生物工程及其在持续农业上的应用。至今已在国内外重要学术刊物上发表论文 10 余篇。

收稿日期 2001-07-06 接受日期 2001-08-08 责任编辑 刘 晖

of identification on varieties and purity of hybrid were discussed in this paper.

Key words Sunflower, AFLP, Purity of seed

油用向日葵 (*Helianthus annuus* L.) 是植物油脂和蛋白质的重要来源, 葵花油中富含亚油酸等人体必需脂肪酸, 是营养价值很高的食用油(刘公社等, 1995)。杂交油葵具有耐干旱、耐盐碱、耐瘠薄等特点, 特别适合于我国西部干旱少雨地区栽培, 栽培面积逐年扩大, 在目前改善我国西部生态建设、增加农民收益以及产业结构调整当中, 发挥着重要作用(刘公社和王志远, 1999)。向日葵属于异花授粉作物, 制种条件要求严格。对向日葵品种及种子纯度的鉴定研究一直受到育种家的高度重视。20 世纪 80 年代以来, 研究者利用同工酶、种子蛋白等生化标记和 RAPD 等分子标记技术对向日葵的研究作了许多有益的探索(张太平等, 1996; 谢宗铭等, 1999; 莫结胜等, 2001), 但由于这些方法本身的限制, 目前生产上还不得不依赖于耗时、费力的田间鉴定。随着对油用向日葵需求日益加大的同时, 假、劣杂交种的问题越来越明显, 种子纠纷日趋增多。快速、准确、可靠的新技术成为当前对育种研究者提出的紧迫要求。

20 世纪 90 年代初发展起来的 AFLP (amplified fragment length polymorphisms) 分子标记技术(Zabeau and Vos, 1993; Vos *et al*, 1995), 以其自动化程度高、多态性好、稳定性强等特点, 已被广泛应用于作物种质资源分析、遗传连锁图的构建以及重要基因的定位和克隆(Hongtrakul *et al*, 1997; Becker *et al*, 1995; Mohan *et al*, 1997)。本文从半粒向日葵种子中提取基因组 DNA, 采用 AFLP 方法对我国目前向日葵主要杂交种 A15 进行杂种鉴定和纯度分析, 并与其它品种鉴定方法相比较, 探讨了一种简捷、快速、可行的新方法。

1 材料和方法

1.1 植物材料

供试 11 个油用向日葵杂交种为我国目前推广的主栽品种。杂交种 A15 及父、母本由法国 Limagrain 集团提供(表 1)。

1.2 AFLP 接头和引物

接头序列: EcoR I adaptor: 5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3', 5'-CTGACGCATGGTTAA-3'; MseI adaptor: 5'-GACGATGAGTCCTGAG-3', 5'-TACTCAGGACTCAT-3'。AFLP 所用的引物参见表 2。由上海 Sangon 生物工程公司合成。

1.3 DNA 提取与 AFLP 扩增

选择成熟、饱满的向日葵种子, 取半粒(不含胚部分)约 30mg, 提取基因组 DNA 作为模板。DNA 提取方法参照改良的 CTAB 法(刘杰等, 2001)。AFLP 扩增参照 Vos 等(1995)的方法进行。AFLP 反应试剂盒(AFLPTM Analysis System I 包括: AFLP Core Reagent Kit 和 AFLP Starter Primer Kit)选自 GIBCO BRL 产品。扩增反应完成后, 在含有 7.5 mol/L 尿素的 5% 聚丙烯酰胺凝胶上走电泳(高压电泳仪: Electrophoresis Constant Power Supply EC600-90, Parmarcia Company; 测序电泳槽: Sequi-Gen GT Nucleic Acid Electrophoresis Cell, Bio-Rad Company) 2300V, 60mA, 90W, 恒功率 1.5h。电泳完成后, 参照 Chalhoub 等(1997)的方法对电泳胶进行硝酸银染色。然后用 Molecular Imager FX 凝胶成像系统(Bio-Rid Company)扫

描照相。按每个样品扩增产物,有带记为“1”,无带记为“0”,记录并统计数据。

表 1 实验材料与来源
Table 1 Experimental materials and its origin

编号 Number	基因型 Genotype	来源 Origin	提供者 Provider
1	DK-1	美国 American	内蒙古自治区农业技术推广站 Nei Mogol Agricultural Technical Extending Station
2	DK-118	美国 American	内蒙古自治区农业技术推广站 Nei Mogol Agricultural Technical Extending Station
3	G101	美国 American	内蒙古自治区农业技术推广站 Nei Mogol Agricultural Technical Extending Station
4	F-51	法国 France	内蒙古自治区农业技术推广站 Nei Mogol Agricultural Technical Extending Station
5	F128	法国 France	内蒙古自治区农业技术推广站 Nei Mogol Agricultural Technical Extending Station
6	YK-9803	法国 France	内蒙古自治区农业技术推广站 Nei Mogol Agricultural Technical Extending Station
7	内葵杂 2 号 NKH2	内蒙古 Nei Mongol	内蒙古自治区农业技术推广站 Nei Mogol Agricultural Technical Extending Station
8	新葵杂 4 号 XKH4	新疆 Xinjiang	新疆石河子农垦科学院 Shihezi Agriculture Reclamation Science Academy of Xinjiang
9	新葵杂 6 号 XKH6	新疆 Xinjiang	新疆石河子农垦科学院 Shihezi Agriculture Reclamation Science Academy of Xinjiang
10	新葵杂 8 号 XKH8	新疆 Xinjiang	新疆石河子农垦科学院 Shihezi Agriculture Reclamation Science Academy of Xinjiang
11	A15	法国 France	内蒙古多伦县种子站 Duolun Seed Service Station
12	A15 父本(Restoring line)	法国 France	法国 Limagrain 集团 Limagrain Seed Group , France
13	A15 母本(Male sterile line)	法国 France	法国 Limagrain 集团 Limagrain Seed Group , France

表 2 AFLP 分析中应用的引物
Table 2 Primers of EcoRI and MseI used in AFLP analysis

EcoRI 预扩增引物 EcoRI preselective primer		5'-GACTGCGTACCAATTC A-3'			
MseI 预扩增引物 MseI preselective primer		5'-GATGAGTCTGAGTAAC-3'			
EcoRI 选择性扩增引物 EcoRI Selective primers	EcoRI-ACC EcoRI-AGC	EcoRI-ACT EcoRI-ACG	EcoRI-ACA EcoRI-AAG	EcoRI-AGG EcoRI-AAC	
MseI 选择性扩增引物 MseI Selective primers	MseI-CAA MseI-CTA	MseI-CAC MseI-CTC	MseI-CAG MseI-CTG	MseI-CAT MseI-CTT	

2 结果与分析

2.1 AFLP 引物的筛选

向日葵的基因组较大(约 1.8×10^9 base pairs),故采用二步法扩增。第一步扩增时为一个选择性碱基,第二步扩增时为三个选择性碱基(即 1+3 扩增)。首先用 17 对 E 端与 M 端引物组合对杂交种的亲本 A 系(A15 的母本)和 R 系(A15 的父本)的基因组 DNA 进

行筛选。结果显示:17 对引物组合在 A 系与 R 系当中共扩增出 1125 条扩增产物,144 条带表现出多态性,平均每对引物扩增 66 条带,不同引物组合产物的 DNA 片段数目在 50~70 不等,大小在 100 bp~500 bp 之间,平均多态性频率为 12.8%(表 3)。说明使用 AFLP 能够产生较为丰富的多态性,用来检测向日葵基因组是可行的,可以检测到基因组大部分区域。选择在双亲中多态性及谱带质量表现良好的引物对,再对 A 系、R 系和 A15 杂种进行重复筛选,发现 E-AAC/M-CTC 在 A 系中扩增出 440 bp、190 bp、160 bp 3 条特征谱带,在 R 系中扩增出 380 bp、350 bp、225 bp、180 bp 4 条特征谱带,而在 F1 中则同时扩增出了上述 7 条互补特征谱带(图 1);E-ACG/M-CTG 在 A 系中扩增出了 2 条特征带 480 bp 和 265 bp,在 R 系中扩增出 490 bp、220 bp、205 bp、125 bp 4 条特征谱带,在 F1 中也同时扩增出了上述 6 条互补特征谱带(图 2),见表 4(有带记为“1”,无带记为“0”,公共带与弱带未列入)。

2.2 引物 E-AAC/M-CTC 及 E-ACG/M-CTG 对不同向日葵杂交种 AFLP 的扩增多态性

使用引物组合 E-AAC/M-CTC 及 E-ACG/M-CTG 对 A15、双亲及 10 个生产上主要推广的向日葵杂交种进行 AFLP 分析,引物 E-AAC/M-CTC 在这 13 个基因型中表现出良好的多态性,并将 A15 与其它外形相似的大部分杂交种区别开来,但在 DK-118、F128 和内葵杂 2 号三个基因型存在相同带型,新葵杂 4 号与新葵杂 6 号具有相同带型(表 5,图 1),以之用于鉴定 A15 纯度不是特别理想。采用引物 E-ACG/M-CTG 能够得到更满意的结果(表 6,图 2)。尽管新葵杂 8 号品种与 A15 之间在带型上没有差异,但它与亲本 A 系、R 系的差异却非常显著。因此,使用引物 E-ACG/M-CTG 不仅可利用在 A15、A 系、R 系中产生的特征谱带将 A15 与其它向日葵杂交种区别开来,还可用于 A15 杂交种的纯度鉴定。

表 3 17 对引物组合在杂交种 A15 双亲间的 AFLP 多态性

Table 3 AFLP of 17 primer combinations on parents of sunflower hybrid A15

代号 Code	引物组合 Primer combinations	扩增带数(条) No. of detectable bands	多态性带数(条) No. of polymorphic bands	多态比例(%) Polymorphic percentage
1	E-AGC/M-CAC	70	17	24
2	E-AGC/M-CAG	65	11	17
3	E-AGC/M-CAT	64	12	19
4	E-AGC/M-CTA	68	5	7
5	E-AGC/M-CTG	72	7	10
6	E-AGC/M-CIT	75	3	4
7	E-ACC/M-CAC	67	14	21
8	E-ACC/M-CAT	69	1	1
9	E-ACC/M-CTA	68	10	15
10	E-ACC/M-CTG	58	2	3
11	E-ACC/M-CIT	64	13	20
12	E-AAC/M-CTC	71	7	10
13	E-AAC/M-CTG	68	5	7
14	E-AAC/M-CIT	63	8	13
15	E-AAC/M-CAC	75	13	17
16	E-AAC/M-CAG	58	6	10
17	E-ACG/M-CTG	50	10	20
Total		1125	144	
Average		66.18	8.47	12.8

表 4 A、R、A15 三种基因型 E-AAC/M-CTC、E-ACG/M-CTG AFLP 扩增结果

Table 4 Amplified bands of A lines, R lines and A15 with E-AAC/M-CTC and E-ACG/M-CTG

AFLP 谱带 AFLP band	A 系 A line	A15	R 系 R line
E-AAC/M-CTC-440 bp	1	1	0
E-AAC/M-CTC-380 bp	0	1	1
E-AAC/M-CTC-350 bp	0	1	1
E-AAC/M-CTC-225 bp	0	1	1
E-AAC/M-CTC-190 bp	1	1	0
E-AAC/M-CTC-180 bp	0	1	1
E-AAC/M-CTC-160 bp	1	1	0
E-ACG/M-CTG-490 bp	0	1	1
E-ACG/M-CTG-480 bp	1	1	0
E-ACG/M-CTG-265 bp	1	1	0
E-ACG/M-CTG-220 bp	0	1	1
E-ACG/M-CTG-205 bp	0	1	1
E-ACG/M-CTG-125 bp	0	1	1

表 5 引物 E-AAC/M-CTC 在 A15 及其它 10 个杂交种中的 AFLP 扩增情况

Table 5 AFLP results in 11 sunflower hybrids with primer E-AAC/M-CTC

差异带 Differential band	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	A15	R	A
E-AAC/M-CTC-440 bp	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1
E-AAC/M-CTC-380 bp	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
E-AAC/M-CTC-350 bp	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
E-AAC/M-CTC-225 bp	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
E-AAC/M-CTC-190 bp	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1
E-AAC/M-CTC-180 bp	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0
E-AAC/M-CTC-160 bp	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1

表 6 引物 E-ACG/M-CTG 在 A15 及其它 10 个杂交种中的 AFLP 扩增情况

Table 6 AFLP results in 11 sunflower hybrids with primer E-ACG/M-CTG

差异带 Differential band	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	A15	R	A
E-ACG/M-CTG-490 bp	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1
E-ACG/M-CTG-480 bp	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0
E-ACG/M-CTG-265 bp	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0
E-ACG/M-CTG-220 bp	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0
E-ACG/M-CTG-205 bp	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1
E-ACG/M-CTG-125 bp	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0

2.3 用引物 E-ACG/M-CTG 对杂交种 A15 进行纯度鉴定

随机选取 50 粒 A15 种子,用 E-ACG/M-CTG 引物按前述方法进行 AFLP 分析,所有单株都扩增出了 6 条特征谱带(图 3 部分结果未展示),可以认为被检测的 50 粒种子均为杂交种 A15。在这 50 粒被检种子中,没有出现杂株,与本实验室 1999 年在内蒙多伦配制的 A15 纯度(田间鉴定结果为 99%,样本 600 株)基本相符。国际《农作物种子检验规程》GB/T3543-1995 规定种子纯度为 98% 以上时,则至少应检测 100 粒种子以上。我们所测的纯

度结果有 1% 的误差 ,可能与检测种子数目偏少有关。由于本实验的主要目的是验证 AFLP 方法鉴定种子纯度的可行性 ,因此没有做更多的单粒种子分析。

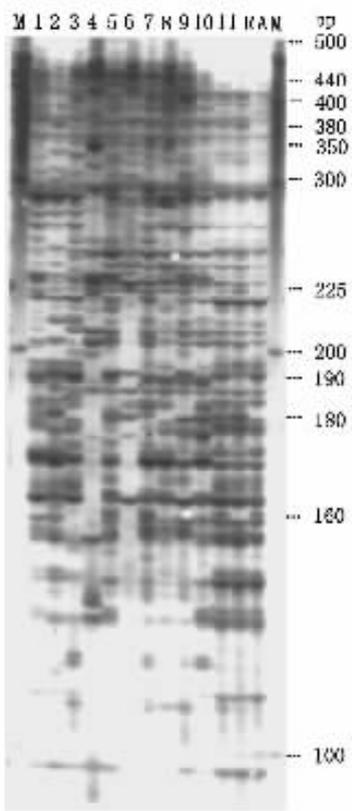


图 1 引物 E-AAC/M-CTC 在 13 个向日葵基因型的 AFLP 指纹图谱

Fig.1 AFLP fingerprint of 13 sunflower varieties using primer pair E-AAC/M-CTC

M : DNA Ladder ; 1 ~ 11 , R and A , sunflower sample number (see table 1)

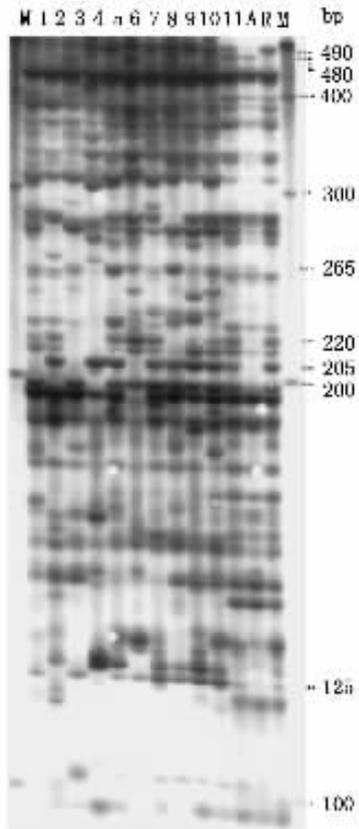


图 2 引物 E-ACG/M-CTG 在 13 个向日葵基因型的 AFLP 指纹图谱

Fig.2 AFLP fingerprint of 13 sunflower varieties using primer pair E-ACG/M-CTG

M : DNA Ladder ; 1 ~ 11 , R and A , sunflower sample number (see table 1)

3 讨论

油用向日葵杂种种子生产上一个令人棘手的问题是在 F1 代杂交种当中混有亲本种子和其它假杂种 ,这种情况会直接造成生产者的经济损失。因此 ,杂种种子纯度历来是种子生产部门特别重视的问题。由于缺乏行之有效的快速、准确、经济的品种和杂种纯度鉴定方法 ,种子生产者目前仍然不得不依赖于传统的田间形态学鉴定。这种方法不仅耗时、费力、受环境影响大 ,而且结果也不可靠 (Smith and Smith ,1992)。张太平等 (1996)、谢宗铭等 (1999)曾分别用同工酶和种子蛋白等生化标记的方法进行过有益的探索 ,并解决了一定的问题 ,但这些方法在基因型、取材部位、发育时期以及亲本之间的亲缘关系等方面仍存在着很大的局限性。从发育生物学的观点来看 ,高等植物多细胞生物的发育过程 ,乃是一系列基因在时间顺序上依次顺序表达的过程。对于调控某一生化反应的同工酶 ,也是某些基因表达的产物 ,由于其同工酶的种类、数量、活性、分子量大小与环境、发育阶段、植

物种类、或同一植物的不同品种有着密切联系,从而表现出各种差异,正是这些差异限制了同工酶方法的广泛使用。种子蛋白也是基因表达的产物,亲缘关系很近的种,由于其相关的种子蛋白分子量非常接近,用现代电泳方法很难将其区分开来(胡志昂和王洪新,1991),在应用上也受到了一定的限制。

20 世纪 80 年代以来,相继出现了可在 DNA 水平上进行种质资源遗传变异分析、品种与纯度鉴定的 RFLP、RAPD、SSR、AFLP 等分子标记新技术(Vos *et al*, 1995; Weber and Helentjaris, 1989; Williams *et al*, 1990; Powell *et al*, 1995)。这些技术以其快速、准确、不受环境影响等特点,在玉米、小麦、番茄等许多作物上得到成功地应用(Smith and Register, 1998)。在品种与纯度鉴定上,这些方法各具特色:RFLP 分析能够区分亲缘关系非常接近的品种且稳定性很高,但需要一定数量的特异性探针,较多的植物材料,较大的工作量和实验室空间(Smith and Register, 1998);RAPD 技术以其快速、操作简便、产物易分析、对实验仪器要求不高等特点,成为大多数实验室易于采用的方法。由于假阳性扩增和重复性差始终是 RAPD 技术广泛应用的限制性因素,即使在同一实验室也难于将 RAPD 检测标准化(Smith and Register, 1998)。因此,将 RAPD 标记转换成 SCAR 标记则成为对 RAPD 技术的必要改进(Paran and Michelmore, 1993),而这样做却又降低了 RAPD 简便、快速等优势,提高了实验费用。SSR 最大的优点在于 SSR 产物进行测序胶电泳分离时具有单碱基的高分辨率,能检测到很高的多态性,遗传信息量较大。但前期 SSR 引物筛选所需工作量和费用很高,使这种方法只适合于具有高价格种子,比如番茄的纯度鉴定上(Smith and Register, 1998)。

用 AFLP 方法得到的指纹图谱具有稳定可靠且重复性好的优点,特别适合于品种鉴定、法医鉴别等方面的应用(陈洪等,1996)。Hongtrakul 等(1997)曾用 6 对 AFLP 引物对 24 个公共油用向日葵自交系进行了遗传相似性研究,得到平均每个引物对能产生 60 条扩增产物,多态性比率为 15.5% 的结果。本研究采用 17 对引物对向日葵进行 AFLP 分析:每对引物能产生 66 条带,多态性比率为 12.8%,与 Hongtrakul 等实验结果相似(15.5%);进一步的实验结果表明 AFLP 方法完全可以用来对油用向日葵的品种鉴定和杂交种子的纯度分析。本研究用 AFLP 检测油用向日葵的鉴定和 A15 的种子纯度,证实了该方法能够产生较为丰富的多态性以及稳定的 AFLP 标记。利用成熟种子直接提取 DNA,可简化 AFLP 的步骤且不受种子能否发芽的限制,特别是在种子数量很少的时候,只要取微量的部分种子,便能利用此方法提取 DNA 用于 PCR 分析,种子的其余部分仍可用于其它方面的研究。采用银染来

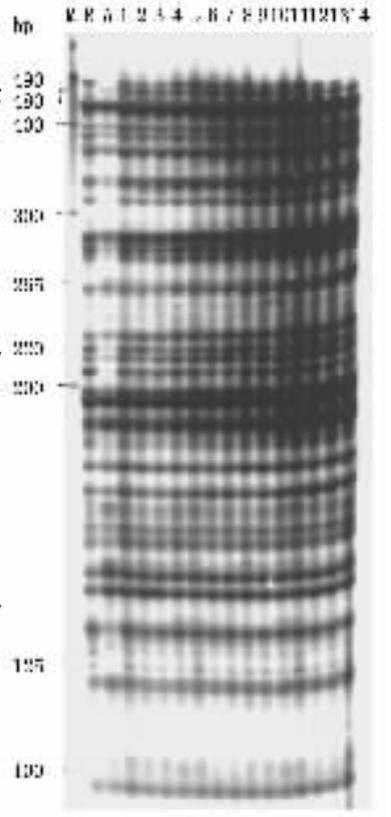


图 3 引物 E-ACG/M-CTG 在向日葵 A15 亲本和子代的 AFLP 指纹图谱

Fig. 3 AFLP profile of parents and A15 by primer pair E-ACG/M-CTG
M: DNA Ladder; 1~14: A15 hybrid, R: R-line, A: A-line

检测扩增结果,可降低 AFLP 的费用,但与 RAPD 和生化标记方法相比较(莫结胜等,2001;谢宗铭等,1999),实验费用仍嫌偏高,但它比 RAPD 稳定可靠,比蛋白质电泳有更高的分辨率和多态性,在不把费用放在首位的前提下,严格的品种鉴定,如法院判决种子纠纷事件,采用 AFLP 技术是稳定可靠的。

参 考 文 献

- 陈洪,王振山,朱立煌,1996. 用 SRFA 法构建水稻指纹图谱. *生物工程学报*, **12**(3): 266 ~ 269
- 刘公社, Alain Bonjean, 彭克敬,1995. 向日葵研究与开发. 北京:中国科学技术出版社, 1 ~ 3
- 刘公社,王志远,1999. 北方农牧交错带可持续发展论文集. 北京:中国科学技术出版社,136 ~ 137
- 刘杰,熊艳文,刘公社,齐冬梅,李芳芳,汪恩华,2001. 向日葵种子不同部位微量提取 DNA 用于 PCR 的研究. *西北植物学报*, **21**(4): 615 ~ 619
- 胡志昂,王洪新,1991. 种子蛋白与品种鉴定. *植物学报*, **33**(7): 556 ~ 564
- 莫结胜,刘杰,刘公社,2001. 杂交油葵 A15 种子纯度的 RAPD 鉴定. *作物学报*, **27**(1):85 ~ 90
- 谢宗铭,陈福隆,孙宝启,1999. 种子蛋白乳酸尿素聚丙烯酰胺电泳技术及其对向日葵自交系和杂交种的鉴定. *中国油料作物学报*, **21**(3):30 ~ 33
- 张太平,赵殊英,高吉寅,关建平,1996. 贵洲南部山区向日葵地方品种的同工酶研究. 北京:中国农业科学技术出版社, 459 ~ 477
- Becker J, Vos P, Kuiper M, Salamini F, heun M, 1995. Combined mapping of AFLP and RFLP markers in barley. *Mol Gen Genet*, **249**:65 ~ 73
- Chalhoub B A, Thibault S, Laucou V, Rameau C, Hofte H, Cousin R, 1997. Silver staining and recovery of AFLP amplification products on large denaturing polyacrylamide gels. *Biotechniques*, **22**:216
- Hongtrakul V, Huestis G, Knapp S J, 1997. Amplified fragment length polymorphisms as a tool for DNA fingerprinting sunflower germplasm: genetic diversity among oilseed inbred lines. *Theor Appl Genet*, **95**:400 ~ 407
- Mohan M, Nair S, Bhagwat A, Sasaki T, 1997. Genome mapping, molecular markers and marker-assisted selection on crop plants. *Mol Breed*, **3**:87 ~ 103
- Paran I, Michelmore R W, 1993. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theor Appl Genet*, **85**:985 ~ 993
- Powell W, Machray G C, Provan J, 1995. Polymorphisms revealed by simple sequence repeats. *Trends in Plant Science*, **1**:215 ~ 222
- Smith J S C, Smith O S, 1992. Fingerprinting crop varieties. *Advances in Agronomy*, **47**: 85 ~ 140
- Smith J S C, Register III J C, 1998. Genetic purity and testing technologies for seed quality: a company perspective. *Seed Science Research*, **8**: 285 ~ 293
- Smith J S C, 1995. Identification of cultivated varieties by nucleotide analysis. In: Wrigley C W ed. Identification of Food-grain Varieties. St Paul, Minnesota: American Association of Cereal Chemists, 131 ~ 150
- Weber D, Helentjaris T,1989. Mapping RFLP loci in maize using B-A translocations. *Genetics*, **121**:583 ~ 590
- Williams J G K, Kubelik A R, Livak K J, Rafalski J A, Tingey S V, 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, **18**:6531 ~ 6535
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, Lee T V D, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M, 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res*, **23**:4407 ~ 4414
- Zabeau M, Vos P, 1993. Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting. European Patent Application No. 92402629. Publication No.0-534-858-A