

AFLP 分子标记技术及其在动物学 研究中的应用*

朱伟铨 王义权**

(南京师范大学生命科学学院遗传资源研究所 南京 210097)

摘要: 扩增片段长度多态性技术(AFLP)基于选择性扩增完全酶切消化后的基因组 DNA 片段,包括酶切与连接、选择性扩增、检测分析等 3 个步骤。该技术的运用不需要预知基因组的序列特征,具有较高的多态分辨力,产生的标记是显性标记,可适用于任何来源和各种复杂度的 DNA。自 AFLP 技术问世以来,在酶切、扩增体系、检测和分析方法等方面不断得到改进。本文将以线虫、昆虫、鱼类、鸟类、家畜、鼠、人等为例,介绍近年来 AFLP 技术在动物或人的遗传图谱构建和 QTL (quantitative trait loci) 定位、生物多样性、性别决定和繁殖行为研究、疾病及疾病诊断研究等上的应用。

关键词: AFLP; 分子标记; 动物分子生物学

中图分类号: Q81 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2003)02-101-07

AFLP and Its Application in Zoological Research

ZHU Wei-Quan WANG Yi-Quan

(Institute of Genetic Resources, College of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

Abstract: The AFLP (amplified fragment length polymorphism) technique is based on the selective PCR amplification of restriction fragments from a total digested genomic DNA. The technique involves three steps: restriction of the DNA and ligation of oligonucleotide adapters, selective amplification of sets of restricted fragments, and gel analysis of the amplified fragments. The fragments generated by AFLP are dominant and powerful DNA molecular markers for polymorphism detection. This method is applicable to any organism without prior knowledge of its genomic makeup. Some modifications of the method have been adopted since the appearance of AFLP. In this review, we will briefly introduce the application of AFLP to the study of generating linkage maps, QTL (quantitative trait loci) mapping, genetic variation, sex determination, breed behavior, disease and disease diagnoses with examples from nematodes, insects, fishes, birds, domestic animals, rats and humans.

Key words: AFLP; Molecular marker; Animal molecular biology

近 10 年来发展了许多 DNA 分子标记技术,它们或是基于 DNA-DNA 杂交,如 RFLP(restriction fragment length polymorphism);或是基于 DNA 片段特异性或随意性扩增,如 STS(sequence-tagged sites)、SCAR(sequence-characterized amplified region)、RAPD(random amplified polymorphic DNA)和 AFLP(amplified fragment length polymorphism)等^[1]。其中,扩增片段长度多态性(AFLP)技术结合了限制性酶切消化的可靠性和严格的 PCR 退火条件,有高度特异性,既克服了 RFLP 技术中 Southern 杂交的烦琐

和耗时的缺点,又解决了 RAPD 等技术中非特异 PCR 扩增而引起的可信度问题,使得该技术在现有的多元标

* 教育部骨干教师资助计划项目,江苏省“333 工程”人才培养基金;

** 通讯联系人, E-mail: wangyqj@jlonline.com;

第一作者介绍 朱伟铨,女,27 岁,硕士研究生;研究方向:动物分子生物学。

收稿日期:2002-07-20,修回日期:2002-11-08

记系统中具有较强的活力。

AFLP 技术由 Zabeau 等于 1992 年提出,并首先被运用到植物分子生物学的研究中^[2],因其快速、高效、简便且实验结果稳定可靠,易于标准化,随即被推广到生物学的各个研究领域,如遗传图谱的构建、基因或基因组区域特异性标记的筛选和定位、种及种下阶元的分类鉴定、遗传多样性和系统发生等的研究^[3-5]。

1 AFLP 分子标记技术

1.1 AFLP 的基本原理及一般过程 AFLP 技术基于选择性扩增完全酶切消化后的基因组 DNA 片段。该技术包括 3 个步骤(图 1):(i) DNA 的准备,即 DNA 的酶切以及与人工合成的寡聚核苷酸接头(artificial oligonucleotide adapter)连接。为了使酶切片段大小分布均匀,一般采用双酶酶切,在基因组上分别产生低频切口和高频切口。(ii) 选择性扩增酶切片段。AFLP 引物包括与人工接头互补的核心序列(CORE)、限制性内切酶识别

序列(ENZ)和 3' 端选择性碱基三部分。一般用不带或带 1 个选择性碱基的引物进行预扩增,然后用带 2~3 个选择性碱基的引物进行再扩增。所用引物可用放射性或荧光标记。(iii) AFLP 标记的统计。AFLP 产物通过聚丙烯酰胺变性凝胶电泳(SDS-PAGE)检测样品的多态性,可灵敏地分辨只有一个碱基差异的不同 DNA 片段^[6]。

1.2 AFLP 技术的特点

1.2.1 DNA 需要量少 AFLP 分析只需要少量的 DNA,且部分降解的样品也可用来分析,但样品必须很纯,没有扩增的抑制物存在。Rosendahl 和 Taylor^[7]曾成功地从一种真菌(Mycorrhizal fungi)的单个孢子中得到 AFLP 标记。另外,AFLP 反应对模板浓度的变化不敏感,DNA 浓度在 1 000 倍的范围内变化时对反应的影响都不太大,所产生的指纹图谱十分相似,但浓度低于一定的极限时,所扩增的条带不可靠。

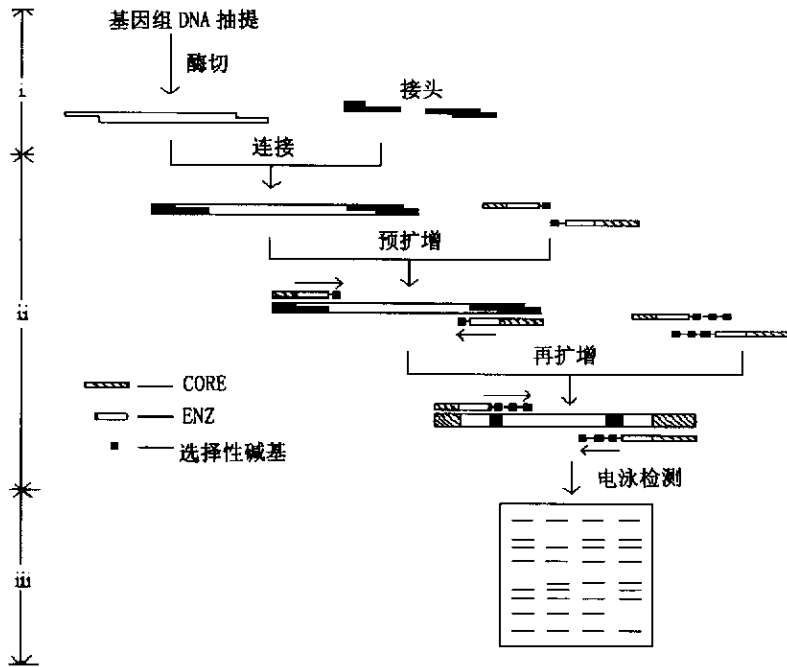


图 1 AFLP 的一般过程

(i) DNA 的准备;(ii) 选择性扩增酶切片段;(iii) AFLP 标记的统计

1.2.2 可重复性好 AFLP 分析基于电泳条带的有或无,高质量的 DNA 和过量的酶可以克服因 DNA 的酶切不完全而产生的失真,PCR 中较高的退火温度和较长的引物可将扩增中的错误减少到最低限度,因而 AFLP 分析具有很强的可重复性。Jones 等^[8]用 AFLP 探针在欧洲 8 个不同的实验室之间进行检测,发现其错误率小于 0.6%,与微卫星探针的水平相当。

1.2.3 多态性强 AFLP 分析可以通过改变限制性内切酶和选择性碱基的种类与数目,来调节扩增的条带数,具有较强的多态分辨能力。李传友等^[9]将 AFLP 标记与 RFLP 标记和 RAPD 标记进行了比较,认为它们鉴别多态的功效率顺序是 AFLP > RAPD > RFLP。

1.2.4 样品适用性广 AFLP 技术适用于任何来源和各种复杂度的 DNA,如基因组 DNA、cDNA、mRNA、质粒、

某一个基因或基因片段,且不需要预知这些 DNA 的序列特征^[10],用同样一套限制酶、接头和引物,可对各种生物的 DNA 进行分子遗传标记研究。

1.2.5 稳定的遗传性 AFLP 标记在后代中的遗传和分离中遵守孟德尔定律;种群中的 AFLP 标记位点遵循 Hardy-Weinberg 平衡^[11]。

1.2.6 等位基因共显性 在可分辨的长度范围内,不同长度的等位基因可共显于同一胶上,然而由于 AFLP 标记是显性标记,其多态的统计是基于酶切片段的有或无,因而没有足够的信息能将纯合显性个体与杂合个体相分离^[12]。由于它的显性性质,使其对等位基因的频数信息分析难以得到准确的估计,这就妨碍了该方法对某些种群的遗传分析^[13]。

1.3 AFLP 技术的改进和发展 AFLP 技术产生后,许多研究者对其进行了改进,使它得到了很大的发展,得以在更广的领域内被运用。

1.3.1 扩增片段的显示与记录 由于放射性标记引物制备繁琐、对实验室要求高、易污染、电泳结果检测耗时,许多研究者对 AFLP 的结果检测进行了改进。Cho 等^[14]用银染变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)代替放射自显影,认为前者的结果同样可靠,并能检测到更多的扩增产物。Lindstedt 等^[15]将 AFLP 产生的片段进行荧光标记的毛细管电泳,并用 GeneScan 和 GelCompar II 软件包统计 AFLP 数据,研究不同基因型间的多态关系。

1.3.2 限制性内切酶的选择使用 一些研究者对 AFLP 技术进行了简化和优化,使其既简便易行,又有较高的多态检出率。Habu 等^[16]仅用了—个识别 4 碱基位

点的限制性内切酶来筛选 mRNA 样品的基因表达差异。Suazo 等^[17]在使用 AFLP 标记技术时,用单酶消化基因组 DNA,并只进行一次 PCR 扩增,所得结果稳定可靠。而 Waugh 等^[18]利用三种限制性内切酶消化 DNAs,产生的限制性片段只与两种选择性接头连接。他们将此命名为 (TE)-AFLP。正因为第三种酶的加入,使得 (TE)-AFLP 的结果更具分辨力,减少扩增产生的条带数,适用于较为复杂的基因组的分析。

1.3.3 AFLP 接头与预扩增 Ivashuta 等^[19]将双链 cDNA 用限制性内切酶 *Mse*I 进行消化,并与相应 AFLP 接头连接。改变后的模板用 oligo-dT 引物进行预扩增(不均匀扩增)以增加 3' 末端序列的模板;预扩增的产物用一个有选择作用的 AFLP 引物和一个锚定 oligo-dT 引物扩增(传统 PCR)。这样的改进可促进 3' 末端片段的优先扩增,同时可重复扩增包含上下游引物序列的分离片段。

1.3.4 特异位点筛选与鉴别 针对 AFLP 技术不适用于大规模的特异位点筛选的缺点,Bradeen 等^[20]设计了 AFLP 的转换程序。该程序对从 BSA 获得的与 Y2Y2 表型连锁的 AFLP 标记进行克隆、测序;并以此设计反向引物(I1 和 I2)。基因组单酶酶切,再连接环化,最后反向扩增(iPCR)与标记连锁的片段。再根据此片段的序列设计标准引物(P1 和 P2),并用于 Y2Y2 和 y2y2 DNA 的扩增,电泳结果显示 y2y2 个体的 PCR 产物长于 Y2Y2。此后的测序结果表明在该区域 y2 有一个 138 bp 的插入(图 2)。最后他们将 P1 和 P2 引物的 PCR 产物用于 Y2Y2、y2y2 和 Y2y2 个体的鉴别,使之成为一个快速、简便、非放射性和共显性的标记。

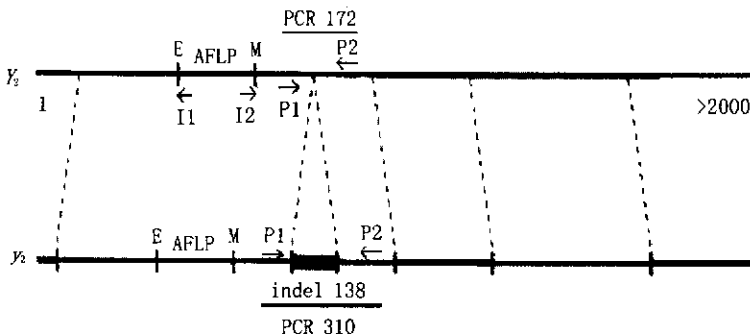


图 2 Y2 等位基因相邻区域基因序列示意图(引自 Bradeen *et al.* 1998)

E 和 M 是 AFLP 分析得到的分子标记两侧的 *Eco*R I 和 *Mse* I 酶切位点,I1 和 I2 是反向 PCR 引物,

P1 和 P2 是根据反向 PCR 序列设计的标准引物,黑框部分是 y2 上的长达 138 个 bp 的插入序列

1.3.5 其它 鉴于显性标记的 AFLP 技术在分析中的一些不足。Ulrich 等^[21]认为详细的家系资料有助于 AFLP 标记的共显性分析,用于评估等位基因频率和重建种群的遗传结构。此外,一种改进的 AFLP 技术称为

microsatellite AFLP 或 SAMPL(selective amplification of microsatellite polymorphic DNA),它用一个 AFLP 引物和一个 SSR 锚定引物选择性扩增,从而结合了 AFLP 技术的方便快捷和 microsatellite 标记的共显性优势,成为一个具

有很大发展前途的分子标记工具^[12, 22]。AFLP 的显性标记特点,在许多研究中所得到的数据仅记为扩增片段的有或无(1 或 0),结果对显性杂合子与纯合子无法区分,丢失了许多有用的信息。Piepho 等^[23]通过对 AFLP 的特定电泳片段定量,用标准混合分配法(normal mixture)分析数据,从而确定每一个体的基因型(genotypes)和估算群体中各基因型的频率。

2 AFLP 技术在动物分子生物学中的应用

近年来,一些研究者将 AFLP 技术用于动物学有关问题的探讨,极大地推动了动物分子生物学的发展。

2.1 在遗传图谱构建和 QTL 定位中的应用

AFLP 技术可以在对基因组没有事先了解的情况下产生大量的全基因组范围的多态标记,因而是遗传连锁作图的有力工具,被广泛运用于 QTL 的定位分析中,其大大地延伸现有的遗传连锁图谱,并缩短了标记间的平均距离。对于仅有少数标记的系统或需要别的标记来增大原有的 RFLP 或 RAPD 标记的系统,可以选择 AFLP 技术来制作遗传连锁图谱^[21]。

Otsen 等^[4]在小鼠的连锁图谱上定位了 18 个 AFLP 标记,并研究了 RI 家系中的一些血压显型与 AFLP 标记基因型的关系,将两个相关的 AFLP 标记定位在 20 号染色体上。而 Knorr 等^[24]利用 204 个 AFLP 分子标记增加了东方兰辛鸡遗传连锁图谱的密度,使连锁群总长增加了 25%,AFLP 标记位点在该图中均匀分布。而在家畜研究方面,Lumsden 等^[25]利用序列标签位点(sequence tagged sites, STS)ADH2 和 MTP 从绵羊的 YAC 文库中筛选到 9 个含 ADH2、MTP 或微卫星标记 BM1329 的 YACs,以这 9 个 YACs 为模板进行 AFLP 分析,研究它们间的重叠程度,有 14 个条带在不止一个 YACs 中出现。

此外 Roos 等^[26]在尝试治疗一种绵羊寄生性线虫时,用 AFLP 技术并结合其它分子标记技术构建了线虫的连锁图谱。利用该图谱可以鉴别不同选择压力下其等位基因频率发生改变的功能基因,以及识别抵抗寄生控制的机制。Roupe 等^[27]用拟 F2 代构图策略做成一幅土豆胞囊线虫(*Globodera rostochiensis*)的 AFLP 遗传图谱。

2.2 在生物多样性研究中的应用

AFLP 技术被广泛地运用到揭示那些无法通过形态特征或别的分子标记技术解决的家系和近缘物种遗传变异与系统发生关系的研究工作中,是生物多样性调查的重要工具。同样,AFLP 技术在种下水平的遗传多样性研究中亦起着重要

的作用,例如:种群结构和差异的调查、无性繁殖个体的鉴定、保护遗传学研究以及基因流、异型杂交和基因渗入的评估等^[21]。

根节线虫(RKN)是一种土壤生活的、严重危害多种农作物的寄生虫。Semblat 等^[28]的研究小组于 1998 年利用 16 对 AFLP 引物的组合对 3 个具有特别重要价值的单性繁殖线虫(*Meloidogyne arenaria*, *M. incognita* 和 *M. javanica*)的种内多样性进行了研究,认为每种线虫种群的基因组相似性与其地理起源没有内在的联系。2000 年该研究小组研究了这 3 种线虫的 17 个种群抗西红柿 MI 基因的性状,以明确线虫的毒性是否与其分子标记相联系。AFLP 数据显示 17 个种群分布于截然不同的聚群,但综合表型特征和 DNA 分子标记数据表明种群聚类并不与其抗西红柿 MI 基因的毒性性状相一致。这表明大多数 DNA 多态性状与毒性性状无关,而可能与寄主选择有关,这说明有毒性种群并没有一个共同的起源,而可能作为一个独立的突变事件出现在这些单性繁殖世系形成以后^[29]。同样,Katlyar 等^[30]用 AFLP 技术分析了亚洲 5 个国家的 15 个地区的亚洲毒米蚊(*Orseolia oryzae*),得到的图谱清晰地反映了不同基因型间的进化关系。

AFLP 技术可运用于高度近亲繁殖的基因型和种群家系多样性的分析,亦可作为个体特异性标记。Ovilo 等^[31]用 12 种不同的引物分析了伊比里亚猪的两个黑色无毛家系。在扩增的条带中,有 26 个可作为家系特异性标记,这些标记仅出现在一个家系的所有个体中。

此外,非洲的马拉维湖里有 500 多种丽鱼科的鱼,它们都是近一百多万年来由同一个祖先进化而来,这个类群的快速变异被认为是形态适应和性别选择的结果。Albertson 等^[32]通过 AFLP 分析重建了这些分类单元的系统发生关系,并用以研究类群进化中的各种影响机制,特别是营养形态的适应性分歧。

2.3 在性别鉴定和繁殖行为研究中的应用

AFLP 技术在很多的物种中已成功地筛选到了与个体性别连锁的标记^[30, 31]。Behura 等^[33]得到了一个只在亚洲毒米蚊生物型 1、2、5 中出现而不在生物型 4 中出现的 AFLP 标记 Gm2 基因,基于这个 AFLP 标记的序列,设计了 SCAR(序列特异性扩增)引物,通过多元 PCR 实验可以有效地鉴别 5 种不同生物型。在生物型 1×4 和 2×4 杂交后代中进行遗传标记的研究显示:所有 F1 雌性均能 PCR 扩增出这个 AFLP 标记,而雌性后代中该标记只出现在那些母本是 Gm2 无毒生物型的个体中。AFLP 标记在无毒生物型中的特异性扩增和遗传方式表明 Gm2 基因是和毒米蚊性别连锁的。

在繁殖行为的研究方面, Questiau 等^[34]利用 AFLP 技术发现蓝喉颚 (*Luscinia svecica namnetum*) 种群存在非常普遍的婚外交配现象。因此, 对于很多尚无微卫星分析引物的分类单元交配系统的研究, 可用 AFLP 标记来实现。此外, 墨西哥哥蝶螈 (*Ambystoma mexicanum*) 变态发育失败 (滞育), 成为一种完全适应水栖的生活方式。Voss 等^[35]研究了非滞育的 *A. tigrinum tigrinum* 和滞育的 *A. mexicanum* 及其杂交 F1 代和回交后代的 AFLP 指纹, 得到三个与滞育连锁的 AFLP 标记。结果认为 *A. mexicanum* 物种来源于一个滞育隐性基因在种群中的纯合, 而完全水栖的生活使其与非滞育的陆栖的个体产生了生殖隔离。

2.4 在疾病及疾病诊断研究中的应用 AFLP 差异筛选技术被广泛地应用在肿瘤研究方面。为了鉴别鼠的可转移骨肉瘤的基因表达差别, Fukuda 等^[36]利用 AFLP 技术分析了可转移的骨肉瘤 cDNA, 克隆得到 4 个与骨肉瘤高转移性状连锁系列的基因, 将它们与一些已知其功能的基因进行比较, 骨肉瘤的转移与 cytoskeletal 蛋白表达的改变、生物膜成分及增殖的改变相关。而 Majima 等^[37]将一种改进的 AFLP 技术运用到从 Tsc2 基因突变致发肾脏肿瘤的小鼠中分离不同表达的基因, 一种命名为“rising dbl quote, left (low) Niban”的基因被选作进一步的研究。该基因不仅在处于癌变过程中的细胞内表达, 还在小鼠 Eker 肾脏肿瘤初期和人的肾脏肿瘤细胞中表达, 但不在正常人或小鼠细胞中表达。Majima 等认为这种基因是肾脏肿瘤的候选标记, 特别是用于早期肾脏肿瘤诊断。

此外, AFLP 技术还是流行病学研究和诊断的良好工具。Rob 等^[38]从健康人群、疾患者群和一些动物的不同部位 (如粪便、血液、脓汁、尿和腹水) 分离的万古霉素抗性肠球菌 (vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*, VREF) 菌株进行 AFLP 分析, 结果显示万古霉素抗性肠球菌有着寄主特异性, 从健康人群和疾患者群中分离的菌株明显地属于不同的 AFLP 聚群, 而从健康人群中 and 从猪体内分离的菌株则形成了一个聚群, 同时在动物饲养员和屠夫的粪便中发现家禽和牛所特有而在人群中罕见的 VREF, Rob 等认为这充分证明了人群中的 VREF 主要起源于那些具有较高糖肽抗性的寄生于猪体内的 VREF, 且家畜和牛身上的 VREF 也可以向人群短暂地传播。

另外, Faux 等^[39]利用 AFLP 技术分析了蜂蜜和黄蜂毒液的生命威胁敏感性 (life-threatening sensitivity) 与白细胞抗原 (HLA) II DRB1 及 DRB1 等位基因间的相关性, 得出了患者的 IgE 应答部分由 HLA II 基因免疫应

答控制的结论。同样 AFLP 技术还被用于骨髓移植嵌合现象的监控^[40]。

3 结 论

象 AFLPs 这样的基于 PCR 扩增的标记技术, 因其可检测的多态性程度高, 易于提示种群的遗传差异, 是分子遗传多样性研究的主要工具之一。AFLP 标记的高度可信性和简洁方便使其成为遗传标记方法的首选。但 AFLP 技术受到其共显性性质的限制, 不能象 microsatellites 和等位酶技术那样清晰地进行种群遗传学分析, 但 AFLP 技术与 microsatellites 技术、序列信息的综合分析可作为遗传变异分析的主要工具。因此, 从事遗传多样性、种群结构、系统发生或 QTL 定位研究的研究者应考虑 AFLP 技术的优点和局限, 根据特定的研究内容加以选择。

参 考 文 献

- [1] Han T H, van Eck H J, De Jeu M J, et al. Optimization of AFLP fingerprinting of organisms with a large-sized genome: a study on *Alstroemeria* spp. *Theor Appl Genet*, 1999, **98**: 465 ~ 471.
- [2] Zabeau M, Vos P. Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting. European patent application number: 92402629.7, 1993. Publication number EP 0534858.
- [3] Becker J, Vos P, Kuiper M, et al. Combined mapping of AFLP and RFLP markers in barley. *Mol Gen Genet*, 1995, **249**(1): 65 ~ 73.
- [4] Otsen M, den Bieman M, Kuiper M T, et al. Use of AFLP markers for gene mapping and QTL detection in the rat. *Genomics*, 1996, **37**(3): 289 ~ 294.
- [5] Rademaker J L, Hoste B, Louws F J, et al. Comparison of AFLP and rep-PCR genomic fingerprinting with DNA-DNA homology studies: *Xanthomonas* as a model system. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2000, **50**(Pt 2): 665 ~ 677.
- [6] Vos P, Hogers R, Bleeker M et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res*, 1995, **23**(21): 4 407 ~ 4 414.
- [7] Rosendahl S, Taylor J W. Development of multiple genetic markers for studies of genetic variation in arbuscular mycorrhizal fungi using AFLP. *Mol Ecol*, 1997, **6**: 821 ~ 829.
- [8] Jones C J. Reproducibility testing of RAPD, AFLP and 2 SSR markers in plants by a network of European laboratories. *Mol Breed*, 1997, **3**: 381 ~ 390.
- [9] 李传友, 郑洪刚, 翁曼丽等. 光敏核不育水稻等位突变的 AFLP 分析. *生物工程学报*, 2000, **16**(1): 91 ~ 95.

- [10] Vanechoute M. DNA fingerprinting techniques for microorganisms. A proposal for classification and nomenclature. *Mol Biotechnol*, 1996, **6** (2): 115 ~ 142.
- [11] Yan G, Romero-Severson J, Walton M, et al. Population genetics of the yellow fever mosquito in Trinidad: comparisons of amplified fragment length polymorphism (AFLP) and restriction fragment length polymorphism (RFLP) markers. *Mol Ecol*, 1999, **8**(6): 951 ~ 963.
- [12] Paglia G, Morgante M. PCR-based multiplex DNA fingerprinting techniques for the analysis of conifer genomes. *Mol Breed*, 1998, **4**: 173 ~ 177.
- [13] Waugh R, Bonar N, Baird E, et al. Homology of AFLP products in three mapping populations of barley. *Mol Gen Genet*, 1997, **255**(3): 311 ~ 321.
- [14] Cho Y G, Blair M W, Panaud O, et al. Cloning and mapping of variety-specific rice genomic DNA sequences: amplified fragment length polymorphisms (AFLP) from silver-stained polyacrylamide gels. *Genome*, 1996, **39**(2): 373 ~ 378.
- [15] Lindstedt B A, Heir E, Vardund T, et al. Comparative fingerprinting analysis of *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* strains by amplified-fragment length polymorphism genotyping. *J Clin Microbiol*, 2000, **38**(9): 3 379 ~ 3 387.
- [16] Habu Y, Fukada-Tanaka S, Hisatomi Y, et al. Amplified restriction fragment length polymorphism-based mRNA fingerprinting using a single restriction enzyme that recognizes a 4-bp sequence. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, **234**(2): 516 ~ 521.
- [17] Suazo A, Hall H G. Modification of the AFLP protocol applied to honey bee (*Apis mellifera* L.) DNA. *Biotechniques*, 1999, **26**(4): 704 ~ 705, 708 ~ 709.
- [18] Waugh R, Bonar N, Baird E, et al. Homology of AFLP products in three mapping populations of barley. *Mol Gen Genet*, 1997, **255** (3): 311 ~ 321.
- [19] Ivashuta S, Imai R, Uchiyama K, et al. The coupling of differential display and AFLP approaches for nonradioactive mRNA fingerprinting. *Mol Biotechnol*, 1999, **12**(2): 137 ~ 141.
- [20] Bradeen J M, Simon P W. Conversion of an AFLP fragment linked to the carrot Y₂ locus to a simple, codominant, PCR-based marker form. *Theor Appl Genet*, 1998, **97**: 960 ~ 967.
- [21] Mueller U G, Wolfenbarger L L. AFLP genotyping and fingerprinting. *TREE*, 1999, **14**(10): 389 ~ 394.
- [22] Witsenboer H, Vogel J, Michelmore R W. Identification, genetic localization, and allelic diversity of selectively amplified microsatellite polymorphic loci in lettuce and wild relatives (*Lactuca* spp.), *Genome*, 1997, **40**: 923 ~ 936.
- [23] Piepho H P, Koch G. Codominant analysis of banding data a dominant marker system by normal mixtures. *Genetics*, 2000, **155** (3): 1 459 ~ 1 468.
- [24] Knorr C, Cheng H H, Dodgson J B. Application of AFLP markers to genome mapping in poultry. *Anim Genet*, 1999, **30** (1): 28 ~ 35.
- [25] Lumsden J M, Lord E A, Cato S A, et al. The application of AFLP fingerprinting to construct a YAC contig containing ADH2 and MTP on sheep chromosome 6. *Cytogenet Cell Genet*, 1999, **84**(3 ~ 4): 225 ~ 229.
- [26] Roos M H, Hoekstra R, Plas M E, et al. Polymorphic DNA markers in the genome of parasitic nematodes. *J Helminthol*, 1998, **72**(4): 291 ~ 294.
- [27] Rouppe van der Voort J N, Van Eck H J, van Zandvoort P M, et al. Linkage analysis by genotyping of sibling populations: a genetic map for the potato cyst nematode constructed using a "pseudo-F₂" mapping strategy. *Mol Gen Genet*, 1999, **261** (6): 1 021 ~ 1 031.
- [28] Semblat J P, Wajnberg E, Dalmaso A, et al. High-resolution DNA fingerprinting of parthenogenetic root-knot nematodes using AFLP analysis. *Mol Eco*, 1998, **7**(1): 119 ~ 125.
- [29] Semblat J P, Bongiovanni M, Wajnberg E, et al. Virulence and molecular diversity of parthenogenetic root-knot nematodes, *Meloidogyne* spp. *Heredity*, 2000, **84** (Pt 1): 81 ~ 89.
- [30] Katiyar S K, Chandel G, Tan Y, et al. Biodiversity of Asian rice gall midge (*Orseolia oryzae* Wood Mason) from five countries examined by AFLP analysis. *Genome*, 2000, **43**(2): 322 ~ 332.
- [31] Ovilo C, Cervera M T, Castellanos C, et al. Characterization of Iberian pig genotypes using AFLP markers. *Anim Genet*, 2000, **31**(2): 117 ~ 122.
- [32] Albertson R C, Markert J A, Danley P D, et al. Phylogeny of a rapidly evolving clade: the cichlid fishes of Lake Malawi, East Africa. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96**: 5 107 ~ 5 110.
- [33] Behura S K, Nair S, Sahu S C, et al. An AFLP marker that differentiates biotypes of the Asian rice gall midge (*Orseolia oryzae*, Wood-Mason) is sex-linked and also linked to avirulence. *Gen Genet*, 2000, **263**(2): 328 ~ 334.
- [34] Questiau S, Eybert M C, Taberlet P. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers reveal extra-pair parentage in a bird species: the bluethroat (*Luscinia svecica*). *Mol Ecol*, 1999, **8**(8): 1 331 ~ 1 339.
- [35] Voss S R, Shaffer H B. Adaptive evolution via a major gene effect: paedomorphosis in the Mexican axolotl. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94**: 14 185 ~ 14 189.
- [36] Fukuda T, Kido A, Kajino K, et al. Cloning of differentially expressed genes in highly and low metastatic rat osteosarcomas

- by a modified cDNA-AFLP method. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, **261**(1): 35 ~ 40.
- [37] Majima S, Kajino K, Fukuda T, *et al*. A novel gene "Niban" upregulated in renal carcinogenesis: cloning by the cDNA-amplified fragment length polymorphism approach. *Jpn J Cancer Res*, 2000, **91**(9): 869 ~ 874.
- [38] Willems R J L, Top J, van den Braak N, *et al*. Host specificity of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *The Journal of Infectious Diseases*, 2000, **182**:816 ~ 823.
- [39] Faux M M F, Lalvani A, Dekker J, *et al*. Sensitivity to bee and wasp venoms: association with specific IgE responses to the bee and wasp venom and HLA DRB1 and DPB1. *Clin Exp Allergy*, 1997, **27**(5): 578 ~ 583.
- [40] Schreiner T, Prochnow-Calzia H, Maccari B, *et al*. Chimerism analysis after allogeneic bone marrow transplantation with non-radioactive RFLP and PCR-AFLP using the same DNA. *J Immunol Methods*, 1996, **196**(1): 93 ~ 96.