

核桃种质资源遗传多样性研究中的 AFLP 技术优化及引物筛选

王红霞¹, 张志华¹, 赵书岗², 赵悦平³, 玄立春⁴

(1. 河北农业大学 山区研究所, 河北 保定 071001; 2. 河北农业大学 生命科学院, 河北 保定 071001;
3. 河北农业大学 现代科技学院, 河北 保定 071001; 4. 迁安林业局, 河北 迁安 064400)

摘要:以亲缘关系较近的辽宁 1 号、辽宁 2 号、辽宁 3 号、辽宁 6 号、辽宁 8 号为试材, 将 AFLP 技术体系在核桃研究上进行优化, 并筛选出 20 对多态性高的 AFLP 引物组合, 用于核桃种质遗传多样性分析。

关键词:核桃; 种质资源; AFLP; 引物; 遗传多样性

中图分类号:S664.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-7091(2008)01-0050-05

Optimization of AFLP Fingerprinting and Screening of Primer Pairs in Genetic Diversity Analysis of Walnut Germplasm

WANG Hong-xia¹, ZHANG Zhi-hua¹, ZHAO Shu-gang², ZHAO Yue-ping³, XUAN Li-chun⁴

(1. Mountainous Areas Research Institute, Hebei Agricultural University, Baoding 071001, China;

2. College of Life Science, Hebei Agricultural University, Baoding 071001, China;

3. The Department of Modern Science and Technology, Hebei Agricultural University,

Baoding 071001, China; 4. Forestry Bureau of Qian an, Qian an 064400, China)

Abstract: AFLP fingerprinting system was optimized by employing of five cultivars of walnut (*Juglans regia* L.) for genetic diversity analysis of walnut germplasm. Twenty pairs of informative primers were identified and recommended for AFLP analysis of genetic diversity of walnut.

Key words: Walnut; Germplasm; AFLP; Primers; Genetic diversity

AFLP (Amplified fragment length polymorphism, 扩增片段长度多态性) 被称为“下一代分子标记”, 是检测 DNA 多样性的一种新技术^[1]。由于该技术重复性好、检测的多态性高、无需预先知道被分析基因组 DNA 序列信息等优点, 已广泛用于农作物、蔬菜、林木、果树等植物种质资源的品种鉴定、遗传多样性分析、遗传图谱构建、基因定位和标记辅助育种等方面^[2-5]。有关 AFLP 技术在核桃上应用的报道很少^[6], 本试验将 AFLP 技术体系应用到核桃种质资源遗传多样性研究中并加以优化, 旨在为核桃种质资源遗传多样性研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 试验材料

本试验采用亲缘关系较近的普通核桃 (*J. regia*)

品种辽宁 1 号、辽宁 2 号、辽宁 3 号、辽宁 6 号、辽宁 8 号为试材, 5 个品种于 2004 年 4 月 20 日采自河北省赞皇县林业局苗圃场。

1.2 试验方法

1.2.1 技术优化 核桃基因组 DNA 提取改良 CTAB 法是在 CTAB 中添加不同浓度的抗酚类、抗氧化、抗褐变的物质, 以筛选出适宜 AFLP 分析的核桃基因组 DNA 提取的有效方法^[7]。即在 CTAB 基本提取液 (提取液成分 1 100 mmol/L Tris 碱 1.4 mmol/L NaCl 20 mmol/L EDTA 2%CTAB; 提取液成分 2 100 mmol/L Tris 碱 1.4 mmol/L NaCl 50 mmol/L EDTA 3%CTAB) 中, 分别加入浓度为 50, 100 mmol/L 的 β -巯基乙醇; 1%, 2%, 3% 的 PVP₄₀; 10, 15, 20 mmol/L 的 Na₂S₂O₅ (偏重亚硫酸钠), 共 24 个处理。具体设计见表 1。

收稿日期: 2007-12-20

基金项目: “十一五” 国家科技支撑计划项目 (2006BAD18B02)

作者简介: 王红霞 (1976-), 女, 河北藁城人, 博士, 主要从事核桃种质资源遗传多样性研究。

通讯作者: 张志华 (1957-), 男, 河北玉田人, 研究员, 主要从事核桃育种及种质资源研究。

表 1 核桃基因组 DNA 提取方法

Tab.1 Treatment of DNA extraction in walnut

序号 Code	处理 Treatment									
基本提取液 1	100 mmol/L Tris 碱	1.4 mmol/L NaCl	20 mmol/L EDTA	2 % CTAB						
1	基本提取液	+	1 % PVP40	+	50 mmol/L	-巯基乙醇	+	10 mmol/L	Na ₂ S ₂ O ₅	
2	基本提取液	+	1 % PVP40	+	50 mmol/L	-巯基乙醇	+	15 mmol/L	Na ₂ S ₂ O ₅	
3	基本提取液	+	1 % PVP40	+	50 mmol/L	-巯基乙醇	+	20 mmol/L	Na ₂ S ₂ O ₅	
4	基本提取液	+	1 % PVP40	+	100 mmol/L	-巯基乙醇	+	10 mmol/L	Na ₂ S ₂ O ₅	
5	基本提取液	+	1 % PVP40	+	100 mmol/L	-巯基乙醇	+	15 mmol/L	Na ₂ S ₂ O ₅	
6	基本提取液	+	1 % PVP40	+	100 mmol/L	-巯基乙醇	+	20 mmol/L	Na ₂ S ₂ O ₅	
7	基本提取液	+	2 % PVP40	+	50 mmol/L	-巯基乙醇	+	10 mmol/L	Na ₂ S ₂ O ₅	
8	基本提取液	+	2 % PVP40	+	50 mmol/L	-巯基乙醇	+	15 mmol/L	Na ₂ S ₂ O ₅	
9	基本提取液	+	2 % PVP40	+	50 mmol/L	-巯基乙醇	+	20 mmol/L	Na ₂ S ₂ O ₅	
10	基本提取液	+	2 % PVP40	+	100 mmol/L	-巯基乙醇	+	10 mmol/L	Na ₂ S ₂ O ₅	
11	基本提取液	+	2 % PVP40	+	100 mmol/L	-巯基乙醇	+	15 mmol/L	Na ₂ S ₂ O ₅	
12	基本提取液	+	2 % PVP40	+	100 mmol/L	-巯基乙醇	+	20 mmol/L	Na ₂ S ₂ O ₅	
13	基本提取液	+	3 % PVP40	+	50 mmol/L	-巯基乙醇	+	10 mmol/L	Na ₂ S ₂ O ₅	
14	基本提取液	+	3 % PVP40	+	50 mmol/L	-巯基乙醇	+	15 mmol/L	Na ₂ S ₂ O ₅	
15	基本提取液	+	3 % PVP40	+	50 mmol/L	-巯基乙醇	+	20 mmol/L	Na ₂ S ₂ O ₅	
16	基本提取液	+	3 % PVP40	+	100 mmol/L	-巯基乙醇	+	10 mmol/L	Na ₂ S ₂ O ₅	
17	基本提取液	+	3 % PVP40	+	100 mmol/L	-巯基乙醇	+	15 mmol/L	Na ₂ S ₂ O ₅	
18	基本提取液	+	3 % PVP40	+	100 mmol/L	-巯基乙醇	+	20 mmol/L	Na ₂ S ₂ O ₅	
19	基本提取液	+	1 % PVP40	+	25 mmol/L	-巯基乙醇	+	50 mmol/L	Na ₂ S ₂ O ₅	
20	基本提取液	+	1 % PVP40	+	50 mmol/L	-巯基乙醇	+	50 mmol/L	Na ₂ S ₂ O ₅	
21	基本提取液	+	1 % PVP40	+	100 mmol/L	-巯基乙醇	+	50 mmol/L	Na ₂ S ₂ O ₅	
基本提取液 2	100 mmol/L Tris 碱	1.4 mmol/L NaCl	50 mmol/L EDTA	3 % CTAB						
22	基本提取液	+	2 % PVP40	+	50 mmol/L	-巯基乙醇	+	10 mmol/L	Na ₂ S ₂ O ₅	
23	基本提取液	+	2 % PVP40	+	50 mmol/L	-巯基乙醇	+	15 mmol/L	Na ₂ S ₂ O ₅	
24	基本提取液	+	2 % PVP40	+	50 mmol/L	-巯基乙醇	+	20 mmol/L	Na ₂ S ₂ O ₅	

称取辽宁 1 号、辽宁 2 号、辽宁 3 号、辽宁 6 号、辽宁 8 号的新鲜叶片 3 g,放入研钵中,加入液氮,迅速研磨成细粉状;用酚-氯仿法提取基因组 DNA,经纯化后溶于 100 μL TE(pH 8.0)溶液中。在 0.8 % 的琼脂糖凝胶上检测 DNA 有无降解,以已知含量的 DNA(华美生物工程公司)为对照,将 DNA 的浓度调整到 150 ng/μL 左右。

酶切 吸取纯化好的参试资源 DNA 样品每份 450 ng,各含 *Mse* I 3.00 U, *Eco*R I 3.00 U, NEB Buffer2 2 μL, BSA(10 mg/ mL) 0.2 μL,用 ddH₂O 补齐至 20 μL,混合均匀后,在 PCR 仪上 37 ℃ 酶切 4 h。

连接 酶切完成的 DNA 样品中,加入 50 pmol/μL *Mse* 接头 1.0 μL, 5 pmol/μL *Eco*R 接头 1.0 μL, T4 Buffer 0.5 μL, ATP(10 mM) 1.8 μL, T4 Ligase(3 U/μL) 0.5 μL,混合均匀后,在 PCR 仪上 37 ℃ 连接 10 h 以上(或过夜)。连接完成后, 65 ℃ 变性 10 min。结束后,样品用 1 ×TE 溶液稀释 5 倍用于预扩增。

预扩增 预扩增 PCR 反应液每份 20 μL,各含限制性酶切、连接后稀释 5 倍的 DNA 产物 5.0 μL, 10 ×PCR Buffer(含 Mg²⁺) 2.0 μL, dNTP(2.5 mmol/L) 1.6 μL, *Eco*R primer(E₀₀, 50 ng/μL) 0.6 μL, *Mse*

primer(M₀₀, 50 ng/μL) 0.6 μL, Taq 酶(5 U/μL) 0.1 μL, ddH₂O 10.1 μL。混合均匀后,在 PCR 仪上进行预扩增。参数为 95 ℃ 2 min, 95 ℃ 30 s, 56 ℃ 30 s, 72 ℃ 60 s, 共 30 个循环。预扩增结束后,PCR 预扩增产物用 1 ×TE 溶液稀释 5 倍用于选择性扩增。

选择性扩增 选择性扩增 PCR 反应液每份 20 μL,各含 PCR 预扩增并稀释 5 倍后的 DNA 产物 5.0 μL, 10 ×PCR Buffer(含 Mg²⁺) 2.0 μL, dNTP(2.5 mmol/L) 1.8 μL, Taq 酶(5 U/μL) 0.15 μL, *Eco*R primer(含 3 个选择性碱基 50 ng/μL) 0.8 μL、*Mse* primer(含 3 个选择性碱基 50 ng/μL) 0.8 μL、ddH₂O 9.45 μL。混合均匀后,在 PCR 仪上进行选择性扩增。参数为 95 ℃ 2 min, 95 ℃ 50 s, 65 ℃ 40 s, 72 ℃ 60 s, 每循环退火温度降低 0.7 ℃, 共 13 个循环, 95 ℃ 50 s, 56 ℃ 40 s, 72 ℃ 60 s, 共 31 个循环, 72 ℃ 10 min。选择性扩增完成后,置于 -20 ℃ 下备用。

聚丙烯酰胺凝胶电泳 向选择性扩增产物中加入 10 μL 上样缓冲液(98 % 甲酰胺, 10 mmol/L EDTA, 0.25 % 二甲苯氰, 0.25 % 溴酚蓝), 95 ℃ 变性 10 min,立即冰浴,然后取 8 μL 在 6 % 聚丙烯酰胺凝胶(60 g Acrilamide, 3.157 5 g Bis-acrilamide, 100 mL 10 ×TBE buffer 和 420.42 g 尿素,用重蒸馏水将其溶

解,并定容至 1 000 mL)上进行电泳分析。电泳条件:恒功率 80 W,2 h,电泳仪上槽使用 10 ×TBE 缓冲液,下槽使用 5 ×TBE 缓冲液(含 2.5 mmol/L 的 NaAC)。上槽的液面应没过样品点样孔。

银染 参照高志红和宋国立等^[8,9]的方法,略作修改。

A 脱色与固定 将玻璃板放入盛有 1.5 L 10 % 无水乙醇(固定/停止液)的塑料箱中,摇床上(70 r/min)摇动 20 ~ 30 min,直至二甲苯酞颜色褪去。

B 水洗 将脱色完全的玻璃板移至盛有 ddH₂O 的塑料箱中,摇床(70 r/min)摇动冲洗 2 次,每次 2 min。

C 银染 水洗后的玻璃板放入新配制的染色液(3 g AgNO₃,ddH₂O 1 500 mL)中,摇床上(70 r/min)轻轻摇动 20 min。

D 冲洗 用 ddH₂O 冲洗玻璃板 5 s 左右。

E 显影 将冲洗后的玻璃板迅速放入显影液

(30 g NaOH,6 mL HCHO,1 500 mL 的 dd H₂O)中,摇床(70 r/min)上轻摇至带纹出现。

F 定影 显影后的玻璃板迅速放入 10 %无水乙醇中(或将 1.5 L 10 %无水乙醇直接倒入)轻摇 3 ~ 5 min 进行定影,最后用自来水冲洗胶板 2 次,室温下自然干燥。

统计分析 对每一块胶板经认真观察后,记录每一对引物扩增出来的所有共有带和多态性带,对每一份材料有带记录为“1”,没有带记录为“0”,不清楚或模糊性带不予记录。

1.2.2 引物筛选 参考其他树种的分析结果,分别合成 *EcoR* 引物 14 个和 *Mse* 引物 9 个(表 1),每个 *EcoR* I 引物分别与每个 *Mse* I 引物进行组合,共有 126 个引物对,用 5 个材料(辽宁 1 号、辽宁 2 号、辽宁 3 号、辽宁 6 号、辽宁 8 号)的 DNA 样品分别对其进行扩增,从中选出多态性好、电泳谱带较为清晰的引物组合 20 对,用于核桃供试材料的 AFLP 分析。

表 2 AFLP 引物的核苷酸顺序

Tab.2 The sequences of primers

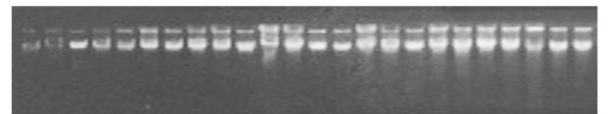
<i>EcoR</i> I 引物 Primes		<i>Mse</i> 引物 Primes	
E32	5 - GACTGCGIACCAATTC <u>AA</u> C-3	M48	5 - GATGA GICCTGA GTAAC <u>AC</u> -3
E33	5 - GACTGCGIACCAATTC <u>AG</u> -3	M49	5 - GATGA GICCTGA GTAAC <u>AG</u> -3
E35	5 - GACTGCGIACCAATTC <u>ACA</u> -3	M50	5 - GATGA GICCTGA GTAAC <u>AT</u> -3
E36	5 - GACTGCGIACCAATTC <u>ACC</u> -3	M59	5 - GATGA GICCTGA GTAAC <u>CTA</u> -3
E37	5 - GACTGCGIACCAATTC <u>ACG</u> -3	M60	5 - GATGA GICCTGA GTAAC <u>CTC</u> -3
E40	5 - GACTGCGIACCAATTC <u>AC</u> -3	M61	5 - GATGA GICCTGA GTAAC <u>CTG</u> -3
E41	5 - GACTGCGIACCAATTC <u>AGG</u> -3	M62	5 - GATGA GICCTGA GTAAC <u>CTT</u> -3
E57	5 - GACTGCGIACCAATTC <u>CCG</u> -3	M74	5 - GATGA GICCTGA GTAAC <u>CC</u> -3
E1	5 - GACTGCGIACCAATTC <u>AAA</u> -3	M3	5 - GATGA GICCTGA GTAAC <u>CA</u> -3
E2	5 - GACTGCGIACCAATTC <u>AA</u> T-3		
E3	5 - GACTGCGIACCAATTC <u>ATA</u> -3		
E4	5 - GACTGCGIACCAATTC <u>ATC</u> -3		
E5	5 - GACTGCGIACCAATTC <u>ATT</u> -3		
E6	5 - GACTGCGIACCAATTC <u>AG</u> T-3		

2 结果与分析

2.1 核桃基因组 DNA 提取分析

24 个处理的 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值均在 1.8 ~ 2.0 之间,表明用这些处理方法提取的 DNA 纯度基本符合质量标准。从图 1 可看出 1,2,4,5 号处理谱带较暗,DNA 浓度较低;6,8,9,13,14,17 号处理的电泳谱带较强,DNA 基本无降解,并且 RNA 去除彻底,但是谱带与点样孔之间亮,说明该处理所提取的 DNA 中杂质较多;11,12,15,16,18 ~ 24DNA 处理降解严重且 RNA 去除不彻底;3,7 号处理电泳谱带明亮,但所提取的 DNA 呈黄褐色的碎块,故 3,7 号处理所提取的 DNA 亦不符合试验要求;10 号处理的电泳谱带较强,DNA 基本无降解,并且 RNA 去除彻底,DNA 呈透明丝状。综合两种检测结果,10 号处理所得

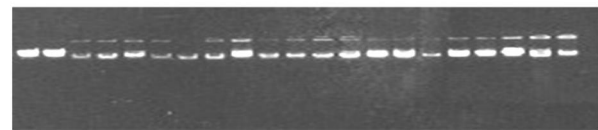
DNA 浓度大,蛋白质、RNA、多糖等去除彻底,无降解且 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值为 1.833。确定 10 号处理为最佳提取方法,其提取液成分为:100 mmol/L Tris-HCl,pH 8.0;20 mmol/L EDTA;1.4 mol/L NaCl;2 % CTAB;2 % PVP₄₀;100 mmol/L (- 巯基乙醇和 10 mmol/L Na₂S₂O₅。



从左向右为 1 ~ 24 号处理
The materials from the left to the right are 1 - 24 treatments
图 1 24 种处理所提核桃 DNA 的电泳效果
Fig.1 Results of electrophoresis of extracted DNA in walnut with 24 treatments

从图 2 可看出,采用 10 号处理所提取的不同核桃品种基因组 DNA 电泳谱带明亮清晰,无降解,无

RNA,且 DNA 纯度高。说明所提取的 DNA 符合 AFLP 银染技术体系的要求。



自左向右材料为 DNA450 ng、DNA600 ng、中林 1 号、中林 2 号、中林 3 号、中林 5 号、中林 6 号、丰辉、香玲、元丰、辽宁 1 号、辽宁 2 号、辽宁 3 号、辽宁 4 号、辽宁 5 号、辽宁 6 号、辽宁 7 号、辽宁 8 号、辽宁 10 号、辽宁 11 号、寒丰

The materials from the left to the right are Zhonglin1,Zhonglin2,Zhonglin3,Zhonglin5,Zhonglin6,Fenghui,Xiangling,Yuanfeng,Liaoning1,Liaoning2,Liaoning3,Liaoning4,Liaoning5,Liaoning6,Liaoning7,Liaoning8,Liaoning10,Liaoning11,Hanfeng

图 2 核桃基因组 DNA 电泳检测结果

Fig. 2 The result of walnut genomic DNA agarose electrophoresis

2.2 筛选到 20 对合适的 AFLP 引物组合

通过试验从 126 对引物组合中筛选出 20 对多态性较高、谱带分布均匀、带型质量较好的引物组合,可用于核桃种质资源遗传多样性分析。20 对引物组合如表 3。

表 3 用于核桃供试材料 AFLP 分析的引物

Tab. 3 The polymorphic primers that been used in AFLP analysis of walnut s materials

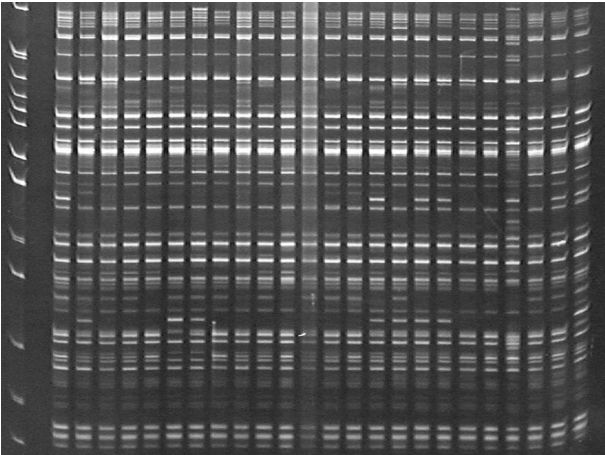
引物组合 Polymorphic primers	引物组合 Polymorphic primers	引物组合 Polymorphic primers
E-AAG/M-CAC	E-AGG/M-CAT	E-ATC/M-CCA
E-ACA/M-CTC	E-AAA/M-CCA	E-ATT/M-CTA
E-ACA/M-CTG	E-AAT/M-CTA	E-ATT/M-CTC
E-ACC/M-CAC	E-AAT/M-CTC	E-ATT/M-CTT
E-ACC/M-CTA	E-ATC/M-CAT	E-AGI/M-CTA
E-ACC/M-CCC	E-ATC/M-CTA	E-AGI/M-CTC
E-AGC/M-CAT	E-ATC/M-CTC	

2.3 部分核桃品种的指纹图谱

采用筛选的 20 对引物组合,对供试材料进行 AFLP 分析,结果表明所选取的引物应用于所有材料均有效。在采用的引物组合中,所有条带的分子量范围在 67 ~ 404 bp。采用引物组合 E-AAT/M-CTA 分析核桃供试材料的电泳图谱见图 3。优化后的 AFLP 技术可以较好地揭示核桃种质资源的遗传差异,成为核桃种质资源遗传多样性研究的有力工具。

3 讨论

提取和纯化 DNA 以获得足够数量质量好的 DNA 样品,是进行限制性酶切、分子杂交以及 PCR 扩增的首要步骤,与 RAPD 等相比,AFLP 分析所要求的 DNA 质量更高^[10]。由于 AFLP 分析要求 DNA 的 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值在 1.8 ~ 2.0 之间,并且分子量大、纯度高,所以在运用该技术进行种质资源鉴别和分析时,基因组 DNA 的提取是其成功的关键之一。果



自左向右材料为中林 1 号、中林 2 号、中林 3 号、中林 5 号、中林 6 号、丰辉、香玲、元丰、辽宁 1 号、辽宁 2 号、辽宁 3 号、辽宁 4 号、辽宁 5 号、辽宁 6 号、辽宁 7 号、辽宁 8 号、辽宁 10 号、辽宁 11 号、寒丰、新纸皮、汾早 2 号、晋丰、晋香、陕核 1 号

The materials from the left to the right are Zhongling1,Zhongling2,Zhongling3,Zhongling5,Zhongling6,Fenghui,Xiangling,Yuanfeng,Liaoning1,Liaoning2,Liaoning3,Liaoning4,Liaoning5,Liaoning6,Liaoning7,Liaoning8,Liaoning10,Liaoning11,Hanfeng,Xinzhipei,Fenzao2,Jinshu,Jinxiang,Shanhe1

图 3 部分核桃品种的 AFLP 电泳图谱
(引物组合为 E-AGG/M-CAT)

Fig. 3 Electrophoresis patterns of AFLP analysis for partly assayed materials of walnuts (Primer :E-AGG/M-CAT)

树上 DNA 提取的常用方法为 CTAB 法。近年来吴燕民^[11,12]、杨克强等^[13]应用 RAPD 技术对核桃属植物的亲缘关系进行了研究,其 DNA 提取的材料为一年生的休眠枝枝条,DNA 提取液为 CTAB 基本提取液中添加少量的 β -巯基乙醇。所提取 DNA 适用于 RAPD 分析,由于 RAPD 分析对 DNA 的要求不高,所以未必能满足 AFLP 分析的要求。针对核桃叶片中多糖、多酚、醌类及色素等物质含量较高的特点,本研究将材料改为叶片使研磨更方便快捷,在 CTAB 基本提取液中添加 PVP40、 β -巯基乙醇和 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ 较彻底地去除了多酚、多糖及醌类等物质,用该方法提取的核桃品种的 DNA 经紫外分光光度计和琼脂糖凝胶电泳检测,结果表明本试验得到了高分子量、高纯度、符合 AFLP 分析要求的核桃基因组 DNA。

银染法是一种重要的 DNA 染色法。其原理是利用银离子可与核苷酸结合,在碱性环境下甲醛能使银离子还原从而使凝胶中的 DNA 得以显带^[14]。传统的 AFLP 银染过程中均采用弱碱碳酸钠显影,甲醛的浓度、显影液的温度和显影的时间都会影响银染的效果。甲醛浓度过高时,胶面颜色发黄,背景污浊;而浓度过低时,染色时间延长并且不易着色;显影液温度较高会使显影时间过短,胶面发黑,影响统计,夏天需提前 5 h 配置,放入 - 4℃ 冰箱中备用;显影时间过短,会导致显影不充分,谱带不清楚,甚至分子量较小的 DNA 片段显现不出来;若时间过

长,胶面发黑,背景过深,严重影响统计。本试验采用强碱氢氧化钠显影,显影液随用随配,不用提前预冷;不受显影时间的影响,完全显影后,随时间延长,显影效果不变;采用无水乙醇脱色和固定,减少了环境污染和对人体的伤害。

本试验通过对核桃基因组 DNA 提取方法、酶切、酶连、扩增体系、银染程序的优化,最终建立了核桃 AHP 银染反应体系;并从 126 对引物组合中筛选出 20 对多态性较高、谱带分布均匀、带型质量较好的引物组合,获得了清晰的指纹图谱。说明优化后的 AHP 技术可以较好地揭示核桃种质资源的遗传差异,成为核桃种质资源遗传多样性研究的有力工具。

参考文献:

- [1] Vos P, Hogers R, Bleeker M, *et al.* AHP: a new technique for DNA fingerprinting[J]. *Nucleic Acids Research*, 1995, 23 (21): 4407 - 4414
- [2] Degani C, Rowland L J, Saunders J A, *et al.* A comparison of genetic relationship measures in strawberry (*Fragaria ananassa* Duch.) based on AHPs, RAPDs, and pedigree data [J]. *Euphytica*, 2001, 117: 1 - 12.
- [3] Gbula L, Cabrita L, Oliveira C M, *et al.* Comparing RAPD and AHP analysis in discrimination and estimation of genetic similarities among apple cultivars[J]. *Euphytica*, 2001, 119: 259 - 270.
- [4] Incirli A, Akkaya M S. Assessment of genetic relationship in durum wheat cultivars using AHP markers[J]. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 2001, 48: 233 - 238.
- [5] 张汉尧, 郑成木. AHP 技术的发展及其应用[J]. *热带农业科学*, 2000, 85(3): 67 - 71.
- [6] Bayazit S, Kazan K, Guelbitti S, *et al.* A AHP analysis of genetic diversity in low chill requiring walnut (*Juglans regia* L.) genotypes from Hatay, Turkey[J]. *Scientia Horticulturae*, 2007, 111(4): 394 - 398.
- [7] 陈 静, 王文江. 适于 AHP 分析的核桃幼叶 DNA 提取方法[J]. *河北农业大学学报*, 2004, 27(6): 44 - 47.
- [8] 高志红, 章 镇, 韩振海, 等. 果梅 SSR 反应体系的优化[J]. *南京农业大学学报*, 2002, 25(4): 19 - 22.
- [9] 宋国立, 张春庆, 贾继曾, 等. 棉花 AHP 银染技术及品种指纹图谱应用初报[J]. *棉花学报*, 1999, 11(6): 281 - 283.
- [10] 缪 颖. AHP 分子标记及其应用[J]. *亚热带植物通讯*, 1999, 28(2): 55 - 60
- [11] 吴燕民, 裴 东, 奚声珂, 等. 运用 RAPD 对核桃属种间亲缘关系的研究[J]. *园艺学报*, 2000, 27(1): 17 - 22.
- [12] 吴燕民, 刘 英, 董凤祥, 等. 应用 RAPD 对我国栽培核桃不同地理生态型的研究[J]. *北京林业大学学报*, 2000, 22(5): 23 - 27.
- [13] 杨克强, 王跃进, 张银东, 等. 核桃早实性状的 RAPD 分析[J]. *园艺学报*, 2002, 29(6): 573 - 574.
- [14] 关海涛, 徐世昌, 郭玉华. 两种聚丙烯酰胺凝胶银染方法的比较[J]. *沈阳农业大学学报*, 2006, 37(1): 86 - 87.