

SSR 荧光标记和银染技术的比较分析

郝晨阳 王兰芬* 贾继增 董玉琛 张学勇**

(中国农业科学院作物品种资源研究所,农业部作物品种资源与生物技术重点实验室,北京 100081)

摘要:应用多重 PCR 简单重复序列(SSR)荧光标记分析技术和常规的 SSR 银染技术,对北方冬麦区 451 份材料(中国小麦初选核心种质的一部分)进行分析,用相同材料和引物,对这两种方法的检测效果进行评价。用 24 对引物扩增,银染法共检测出 235 个等位变异,每个位点检测到的等位变异为 3~20,平均为 9.8 个,多态性信息指数 PIC 为 0.22~0.93,平均 0.74;而荧光标记可检测到 312 个等位变异,每个位点检测到的等位变异为 4~24,平均为 13.0 个, PIC 为 0.32~0.97,平均 0.75。荧光技术较银染方法在每个位点上多检测到 3 个等位变异,检测效果更为理想,更适于进行遗传多样性分析和研究;对两种方法的费用和工作效率做了初步分析,表明完成 5 000 ×78 个反应在费用基本持平的情况下,微卫星荧光标记技术的检测效率显著高于银染法(7.8 倍)。同时对微卫星荧光标记技术中低成本、高通量多重 PCR 体系的建立及 Genescan 3.7、Genotyper 3.7 软件数据分析中出现的一些具体问题进行了探讨。

关键词:小麦;微卫星;荧光 PCR;基因组扫描

中图分类号: S512. Q78

Comparison of Fluorescence and Silver-staining Detection Systems of Microsatellite Markers

HAO Chen Yang, WANG Lan Fen*, JIA Ji-Zeng, DONG Yu-Chen, ZHANG Xue-Yong**

(Key Laboratory of Crop Germplasm and Biotechnology, Ministry of Agriculture, Institute of Crop Germplasm Resources, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: Four-hundred and fifty-one wheat cultivars from Northern Winter Wheat Region were analyzed by fluorescence based genescan with multiple PCR microsatellite markers and SSR marker technology based on silver staining. In the same cultivars and the same set of SSR primers, the detection efficiency of the two systems was compared. At 24 loci among 451 accessions, total 235 alleles were obtained and average 9.8 alleles (from 3 to 20) were detected for every pairs of primers with silver staining system. However, average 13.0 alleles were detected by fluorescent system. Three more alleles were detected averagely by fluorescent system than silver staining at one locus. With almost equal cost, the efficiency of fluorescent system was 7.8 times of silver staining system without consideration of instrument investment. Some other strategies, such as building low-cost and high-throughout multiple PCR system and data analysis using Genescan and Genotyper procedure were also discussed.

Key words: Wheat; Microsatellite; Fluorescence-PCR; Genome scan

微卫星 (microsatellite), 亦称简单重复序列 (simple sequence repeats, 简称 SSRs), 是指一类由 1~6 个核苷酸组成的基序 (motif) 或基本重复单位串联构成的一段 DNA, 广泛分布于生物体基因组中。SSR 具有信息含量高、呈共显性遗传, 检测时 DNA 用量少、操作简便、多态性高、重复性好等特点, 是一

种极具实用价值的标记技术。20 世纪 90 年代以来, SSR 标记在资源的遗传多样性分析、基因组作图研究等领域展示出很好的应用潜力^[1-3], 已成为研究种质资源遗传多样性、基因组作图的首选标记。但在 SSR 标记被广泛应用的同时, 越来越多的科研工作者认识到, 尽管 SSR 这种标记技术操作简便,

基金项目: 国家重点基础研究项目 (G1998010202)。

作者简介: 郝晨阳 (1974-), 男, 山西太谷人, 博士, 主要从事小麦种质资源遗传多样性研究。* 王兰芬与郝晨阳对此文有同等贡献。

** 通讯作者: 张学勇。Tel: 010-62135294, E-mail: xueyongz@mail.caas.net.cn

Received (收稿日期): 2004-02-16, Accepted (接受日期): 2004-05-30.

实验步骤也不繁琐,但在大规模、多批次的数据收集和分析时仍存在相当大的难度,如不同等位变异的准确识别及不同批次反应数据的统一。笔者在建立中国小麦核心种质的工作中,采用了荧光标记技术,利用 ABI3700 DNA 分析仪,实现了数据收集和处理的自动化,克服了银染法的不足。

微卫星荧光标记-全自动基因分析(3700 DNA Analyzer)技术采用 FAM、VIC 和 NED 3 种不同颜色的荧光染料标记微卫星引物,将不同荧光标记、扩增片段长度差异较大的 PCR 产物和标准分子量样品(内标)在同一泳道中电泳,通过毛细管电泳,Genescan 3.7、Genotyper 3.7 软件进行图像收集和分析,精确计算出微卫星等位变异扩增片段的大小,实现了 SSR 标记与高效、自动化技术的结合。Huang 等应用类似的技术,用 24 对微卫星荧光引物对 998 份小麦材料进行了遗传多样性研究与评价^[4],在国内尚未见其他相关的报道。

本研究应用多重 PCR 简单重复序列(SSR)荧光

标记分析技术和银染技术,选用 24 对微卫星引物对 451 份普通小麦材料进行了遗传多样性分析,对这两种方法的检测效果作了比较;另外对人们普遍关注的费用和工作效率做了初步评价;同时对微卫星荧光标记技术中低成本、高通量多重 PCR 体系建立及 Genescan 3.7、Genotyper 3.7 软件数据分析中出现的一些技术问题进行了探讨。

1 材料与方法

1.1 材料

北方冬麦区的 451 份初选核心种质^[5,6],2001 年秋种植于河南省洛阳地区农业科学研究所,统一观察记载。

1.2 实验方法及数据处理

本实验选用的 24 对微卫星引物及序列详见表 1,引物的所有资料来源于 Röder 等^[2]。银染方法参照 Bassam *et al.*^[7]。下面重点介绍基于银染和荧光微卫星标记的实验流程及数据分析方法。

表 1 SSR 引物的编号及序列

Table 1 Catalog No., repeat motif of SSR primers

引物 Primer	所在染色体 Chr. location	退火温度 T_m (°C)	重复单元 Repeat motif	引物序列(左) Primer sequence (left)	引物序列(右) Primer sequence (right)
Xgwm130	7A	60	(GT) ₂₂	AGC TCT GCT TCA CGA GGA AG	CTC CTC TTT ATA TCG CGT CCC
Xgwm149	4B	55	(GA) ₂₃	CAT TGT TTT CTG CCT CTA GCC	CTA GCA TCG AAC CTG AAC AAG
Xgwm155	3A	60	(CT) ₁₉	CAA TCA TTT CCC CCT CCC	AAT CAT TGG AAA TCC ATA TCC C
Xgwm161	3D	60	(CT) ₁₅	GAT CGA GTG ATG GCA GAT GG	TGT GAA TTA CTT GGA CGT GG
Xgwm182	5D	60	(CT) ₁₈	TGA TGT AGT GAG CCC ATA GGC	TTG CAC ACA GCC AAA TAA GG
Xgwm186	5A	60	(GA) ₂₆	GCA GAG CCT GGT TCA AAA AG	CCC CTC TAG CGA GAG CTA TG
Xgwm194	4D	50	(CT) ₃₂	GAT CTG CTC TAC TCT CCT CC	CGA CGC AGA ACT TAA ACA AG
Xgwm261	2D	55	(CT) ₂₁	CTC CCT GTA CCG CTA AGG C	CTC CCG CTA CTA GCC ATT G
Xgwm292	5D	60	(CT) ₃₈	TCA CCG TGG TCA CCG AC	CCA CCG AGC CGA TAA TGT AC
Xgwm294	2A	55	(GA) ₉ TA(GA) ₁₅	GGA TTG GAG TTA AGA GAG AAC CG	GCA GAG TGA TCA ATG CCA GA
Xgwm3	3D	55	(CA) ₁₈	GCA GCG GCA CTG GTA CAT TT	AAT ATC GCA TCA CTA TCC CA
Xgwm304	5A	55	(CT) ₂₂	AGG AAA CAG AAA TAT CCG GG	AGG ACT GTG GGG AAT GAA TG
Xgwm333	7B	55	(GA) ₁₉	GCC CGG TCA TGT AAA ACG	TTT CAG TTT CCG TTA ACC TTT G
Xgwm413	1B	60	(GA) ₁₈	TGC TTG TCT AGA TTG CTT GGG	GAT CGT CTC GTC CTT GCC A
Xgwm415	5A	55	(GA) ₂₅	GAT CTC CCA TGT CCG CC	CGA CAG TCG TCA CTT GCC TA
Xgwm428	7D	60	(GA) ₂₂	CGA GGC AGC GAG GAT TT	TTC TCC ACT AGC CCC GC
Xgwm429	2B	50	(CT) ₂₅	TTG TAC ATT AAG TTC CCA TTA	TTT AAG GAC CTA CAT GAC AC
Xgwm46	7B	60	(GA) ₂ GC(GA) ₃₃	GCA CGT GAA TGG ATT GGA C	TGA CCC AAT AGT GGT GGT CA
Xgwm513	4B	60	(CA) ₁₂	ATC CGT AGC ACC TAC TGG TCA	GGT CTG TTC ATG CCA CAT TG
Xgwm570	6A	60	(CT) ₁₄ (GT) ₁₈	TCG CCT TTT ACA GTC GGC	ATG GGT AGC TGA GAG CCA AA
Xgwm583	5D	60	(CA) ₂₇	TTC ACA CCC AAC CAA TAG CA	TCT AGG CAG ACA CAT GCC TG
Xgwm645	3D	55	(CT) ₂₃	TGA CCG GAA AAG GGC AGA	GCC CCT GCA GGA GTT TAA GT
Xgwm82	6A	60	unknown	ACGTTAGAAAGGTGCAATGGG	AGTGGATGCACCGACTTTTG
Xgwm95	2A	60	(AC) ₁₆	GAT CAA ACA CAC ACC CCT CC	AAT GCA AAG TGA AAA ACC CG

1.2.1 SSR 标记银染分析

1.2.1.1 DNA 提取 采用酚-氯仿法^[8,9]。

1.2.1.2 PCR 扩增

PCR 反应采用 25 μ L 反应体系,在 PTC-225 (MJ. Research, Inc) 上进行。模板

DNA (20 ng/ μL) 4 μL , 10 \times PCR buffer 2.5 μL , Mg^{2+} (25 mmol/L) 2.0 μL , *Taq* 酶 (5 U/ μL) 0.2 μL , dNTP (25 mmol/L) 0.2 μL , SSR 引物 (2 $\mu\text{mol/L}$) 3 μL , ddH₂O 13.1 μL 。反应试剂购自 Promega 上海分公司和北京鼎国公司。

PCR 反应程序 (以退火温度 55 $^{\circ}\text{C}$ 为例) 为 94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 55 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, Go to step 2 35 个循环, 72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存待用。

1.2.1.3 扩增产物的检测 PCR 扩增产物中加入 6~10 μL Loading buffer (98% 甲酰胺, pH 8.0, 10 mmol/L EDTA, 0.25% 溴酚蓝, 0.25% 二甲苯青), 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min, 冰上冷却, 在 6% 的聚丙烯酰胺凝胶上电泳 50 min 左右 (80W 恒功率, 不含预电泳 30 min)。银染检测扩增产物^[7]。

1.2.1.4 数据分析方法 每个样品 SSR 的扩增谱带按有/无分别赋值 1、0。不同引物对的扩增效果用多态性信息指数 (PIC) 表示, $\text{PIC} = 1 - \sum p_i^2$, 其中, " p_i " 为任一引物对第 i 个等位变异在所有供试材料中出现的频率。

1.2.2 基于荧光标记的 SSR 技术

1.2.2.1 多重 PCR 扩增 根据荧光标记引物的颜色、扩增产物分子量大小及退火温度, 对引物选择组合, 每组引物的数量一般为 4~6 对, 相同颜色的引物选择 1~2 个且兼顾具有相同退火温度的原则, 组成不同的引物组合, 对所有材料进行扩增。

PCR 反应体系总体积为 15 μL , 其中 DNA 模板 (20 ng/ μL) 2 μL , 10 \times PCR buffer (含 20 mmol/L Mg^{2+}) 1.5 μL , dNTP (25 mmol/L) 0.12 μL , *Taq* 酶 (2 U/ μL) 0.3 μL , 单个荧光引物 (2 $\mu\text{mol/L}$) 1 μL , ddH₂O 10.08 μL 。在实际操作中, 应根据电泳结果 (峰图的高低), 调整 DNA 模板和荧光引物的用量, 摸索出最佳扩增反应体系。

PCR 反应程序: 基本与银染体系相同, 退火温度略有提高, 增加延伸时间。

1.2.2.2 扩增产物的纯化 毛细管电泳对 DNA 的纯度要求非常严格, 应尽量去净残留的盐分、蛋白质, 残留的去污剂 (SDS 等) 及残留的 RNA。

1.2.2.3 扩增产物的检测 在 96 孔板的每个孔中分别加 1 μL 纯化的 PCR 产物, 9 μL 甲酰胺和 0.18 μL 内标, 3 000 r/min 离心 1 min; 然后 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min, 置冰上 10 min, 离心后用 ABI3700 进行毛细管电泳。

1.2.2.4 数据分析 待电泳完毕, 对样品的原始数据用 Genescan 3.7 和 Genotyper 3.7 两套软件共同完成分析任务。用基因扫描程序 Genescan 进行 SSR 原始数据扫描与分析, 统计 96 个泳道的空道数, 并计算每板样品的通过率 (成功率), 作为检验与校正仪器电泳效果的依据。一般应将无峰样品的比例控制在 5% 以内。在峰图扫描过程中, 将 Genescan 3.7 程序的两大参数 Size Standard 和 Parameters 分别设置为 GS500-250.szs 与 GS500Analysis.gsp。然后用 Genotyper 3.7 软件对数据进一步分析, 从而确定不同样品扩增片段的长度 (单位: bp)。对分析的全部样品而言, 一些品种扩增产物的变异会超出设定的预计范围, 需要对 Genotyper 程序得到的部分数据加以校正。数据的获得及处理流程如图 1 所示。

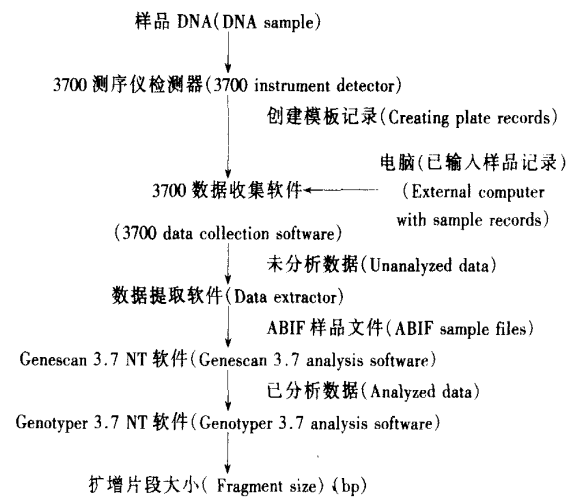


图 1 数据获得及处理流程

Fig. 1 Working chart for data obtaining and processing

2 结果与分析

2.1 SSR 荧光法与银染法检测效果的比较

在利用银染法分析时, 不同样品 DNA 的片段大小, 要用银染后的带谱与已知分子量的 Marker 作比较才能获得 (图 2)。因而, 同一胶板上所有样品带谱间相对位置的识别, 以及不同胶板得到的 SSR 数据的统一给数据收集和分析带来很大的困难, 在分析的材料和位点较多时, 成为制约数据准确性的主要因素。因此, 小麦核心种质的构建工作采用了多重 PCR 微卫星荧光标记技术 (图 3), 这种方法通过 Genescan 和 Genotyper 程序的分析, 可以自动读出目标 DNA 片段的大小, 克服了银染法的不足。

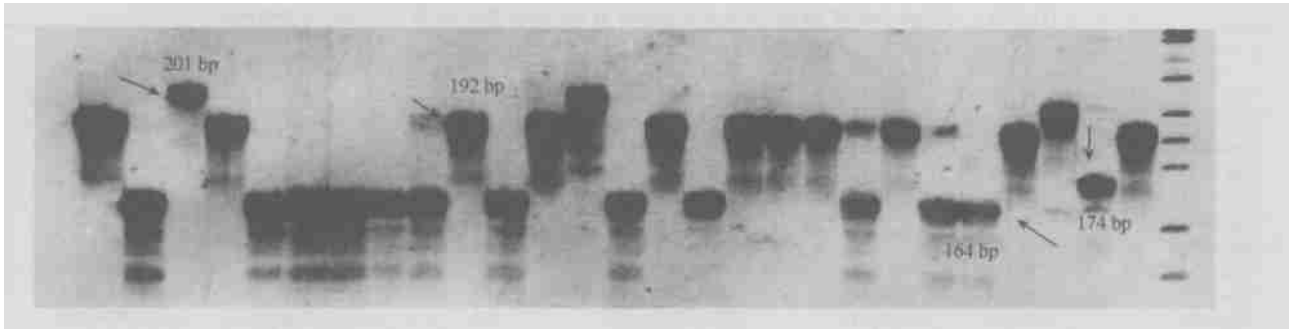


图 2 银染后的 SSR 图谱
Fig. 2 SSR profile after silver staining

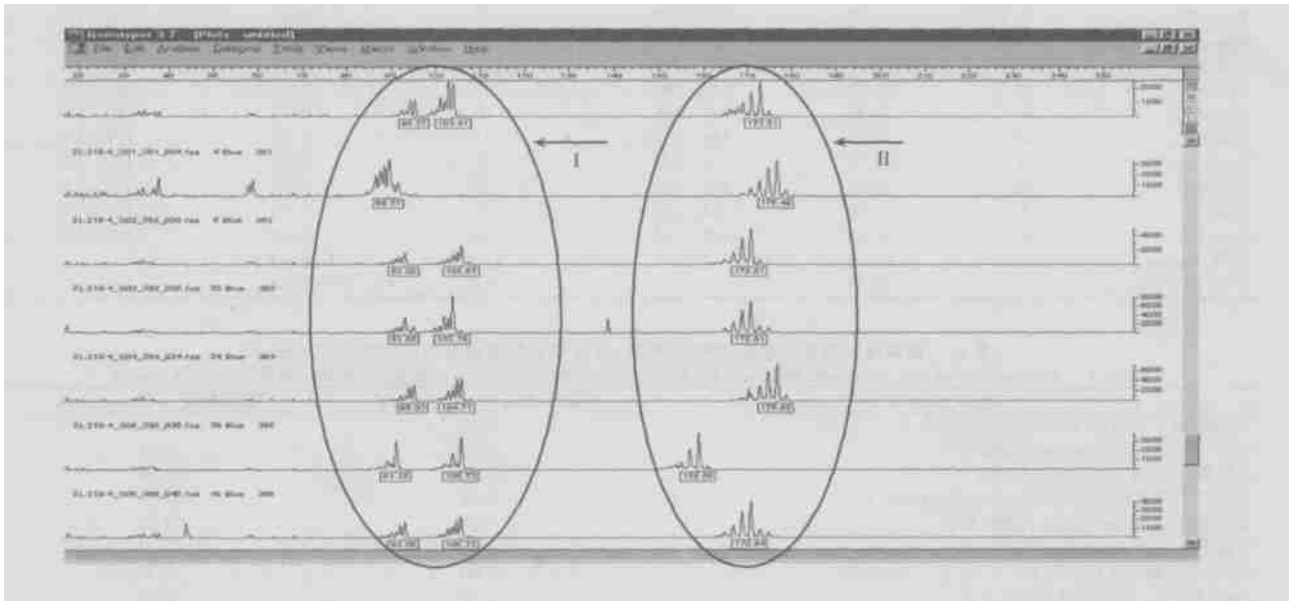


图 3 Genetyper 3.7 软件分析的部分数据
Fig. 3 SSR profile in ABI3700 processed by Genetyper 3.7 software
Xgwm635 () 和 Xgwm219 () 两位点上扩增的不同等位变异, Xgwm635 为双位点引物。
and show different alleles in the loci Xgwm635 () and Xgwm219 (). Xgwm635 is a two-loci primer.

应用多重 PCR 简单重复序列 (SSR) 荧光标记片段分析技术和 SSR 银染检测技术, 选用 24 对引物对北方冬麦区 451 份材料 (中国小麦初选核心种质的一部分) 进行了扩增和对比分析 (表 2)。银染法共检测到 235 个等位变异, 每个位点的等位变异范围为 3~20, 每对引物的平均等位变异为 9.8 个, 多态性信息指数 PIC 范围为 0.22~0.93, 平均 0.74; 荧光标记检测到 312 个等位变异, 每个位点的等位变异范围为 4~24, 平均 13 个, PIC 范围为 0.32~0.97, 平均 0.75。说明荧光技术较银染方法在每个位点上多检测到 3 个等位变异, 具有更高的灵敏性, 更适

于进行遗传多样性分析和研究。

2.2 银染法和荧光法检测成本及效率比较

对银染法和荧光法的成本及其工作效率做了比较 (表 3)。在不考虑仪器成本的前提下, 银染法与荧光法完成一个 SSR 反应的试剂费用分别为 1.31 元、1.60 元。因此, 单纯从药品消耗估计经费预算, 荧光法高于银染法。但由于微卫星荧光标记技术高度自动化, 其检测效率显著高于银染法。在本文的实验规模和操作系统下, 它的工作效率是银染法的 7.8 倍。再考虑到工资成本, 实际上荧光标记技术较银染法更为经济。

表2 两种检测体系效果的比较(同一套材料、同一套引物)

Table 2 Comparison of the two detection systems at the same SSR loci in the same set cultivars

引物 Primer	荧光检测 Fluorescence			银染检测 Silver-staining		
	等位变异数 Allelic No.	多态性信息指数 PIC	片段范围 Size distribution (bp)	等位变异数 Allelic No.	多态性信息指数 PIC	片段范围 Size distribution (bp)
Xgwm130	17	0.46	100 - 136	6	0.67	110 - 140
Xgwm149	15	0.70	149 - 179	6	0.74	140 - 177
Xgwm155	15	0.77	116 - 152	11	0.80	122 - 149
Xgwm161	7	0.59	149 - 171	8	0.73	148 - 172
Xgwm182	11	0.88	148 - 172	7	0.73	156 - 187
Xgwm186	22	0.96	112 - 160	18	0.87	106 - 178
Xgwm194	6	0.69	129 - 143	5	0.79	129 - 136
Xgwm261	20	0.88	160 - 210	10	0.84	162 - 209
Xgwm292	12	0.87	200 - 222	12	0.86	197 - 223
Xgwm294	11	0.70	78 - 110	11	0.74	77 - 110
Xgwm3	6	0.62	76 - 86	6	0.60	76 - 87
Xgwm304	22	0.80	192 - 238	16	0.89	194 - 225
Xgwm333	10	0.72	140 - 164	8	0.77	138 - 166
Xgwm413	12	0.93	82 - 116	8	0.78	87 - 107
Xgwm415	4	0.46	130 - 136	3	0.48	129 - 138
Xgwm428	10	0.97	124 - 142	9	0.85	125 - 147
Xgwm429	16	0.84	195 - 225	14	0.83	189 - 221
Xgwm46	24	0.78	142 - 190	18	0.86	141 - 189
Xgwm513	7	0.88	141 - 155	4	0.73	140 - 152
Xgwm570	13	0.94	130 - 154	11	0.83	129 - 155
Xgwm583	11	0.71	148 - 174	9	0.83	155 - 182
Xgwm645	22	0.88	138 - 180	20	0.93	139 - 178
Xgwm82	7	0.32	144 - 158	5	0.22	147 - 160
Xgwm95	12	0.65	107 - 141	10	0.48	106 - 142
变异 Variance	4 - 24	0.32 - 0.97		3 - 20	0.22 - 0.93	
平均 Average	13	0.75		9.8	0.74	

表3 银染法和荧光法检测 5000 份样品、78 个位点所需成本与工作效率的比较

Table 3 Comparison of cost and work efficiency for 5000 \times 78 reactions by silver-staining system and fluorescence system

项目 Items	银染方法 Silver-staining	荧光标记 * Fluorescence
Taq 酶(元) Taq DNA polymerase (RMB)	1.20	0.12
SSR 引物(元) SSR primer (RMB)	0.05	0.01
丙烯酰胺(元) Acrylamide (RMB)	0.03	0.00
甲叉双丙烯酰胺(元) Bis-acrylamide (RMB)	0.01	0.00
硝酸银(元) Silver nitrate (RMB)	0.03	0.00
甲酰胺(元) Formamide (RMB)	0.00	0.03
内标(元) Marker (RMB)	0.00	0.39
Pop-6 胶(元) Pop-6 gel (RMB)	0.00	0.68
Buffer(3700 DNA Sequencer)(元) Buffer (RMB)	0.00	0.29
进口 PCR 96 孔板(元) PCR plank (RMB)	0.00	0.08
单一反应试剂成本(元) Cost of single reaction (RMB)	1.31	1.60
5000 \times 78 反应试剂成本(元) Cost of total reactions (RMB)	51.09 $\times 10^4$	62.40 $\times 10^4$
6 人每天所能完成的反应数(个) No. of finished reaction	400	3072
所需天数 Time needed(d)	975(2.70 年)	126(0.35 年)
折合人年 Person-years needed	16.2	2.1
所需工资成本(元) Payment needed (RMB)	1.2 $\times 16.2(19.44) \times 10^4$	1.2 $\times 2.1(2.52) \times 10^4$
总成本(元) Total cost (RMB)	70.53 $\times 10^4$	64.92 $\times 10^4$

注:试剂成本为单一反应所需成本; *:4 对引物/反应。

Note: Reagent cost is the cost of single reaction; *: Four primers / reaction.

另外,常规的微卫星标记,数据收集完全依赖于人工,同一胶板不同等位变异的校对和胶板间数据的统一是一项大而复杂的工作。而微卫星荧光标记技术由于其高度智能化的特点,在数据收集、处理上采用 Genescan 和 Genotyper 软件分析,不仅使工作效率大大提高,数据也更加准确。

3 讨论

3.1 多重 PCR 体系的建立

建立一套理想的多重 PCR 反应体系,是保证微

卫星荧光标记实验成功及获得准确数据的关键。在实际操作中,首先应考虑荧光引物的分组与搭配问题,在同一组合里,相同颜色标记的引物之间扩增产物大小相差应在 50 bp 以上,以避免不同位点之间产生混淆,每组合引物的数量不得超过 6 对;其次是依据峰图的高低,不断优化 PCR 扩增体系,主要是通过调整模板 DNA 和荧光引物的用量,摸索出低成本、高通量、杂带少的反应体系。

3.2 精确实验数据的获得

实验数据的准确程度直接影响到研究结论的可

靠性。在应用多重 PCR 简单重复序列荧光标记片段分析技术对中国北方冬麦区 451 份材料完成扩增,得到完整数据后,笔者认为,该项技术在实验数据的精确程度方面,主要有两个制约因素。一方面要建立低成本、杂带少的有效的多重 PCR 体系,这个问题上面已经探讨。可以说,只有摸索出行之有效的多重 PCR 实验体系,才能得到理想的峰图,才能使 Genotyper 3.7 软件更加精确地分析出扩增片段

大小;另一方面就是实验人员对所选用引物扩增产物分子量变化范围的熟悉程度,如若对其估计偏大或偏小,就会出现软件对峰型好但非目标片段的图峰进行取值,或遗漏掉峰型好又属于本样品的峰值。当然,不可否认,对于不同类型图峰的识别与取值是一个比较复杂的工作(图 4,箭头所示为读取的峰型),面对如此丰富的峰型,读取峰值总的原则就是根据峰的高低,再考虑引物是否为多位点扩增。

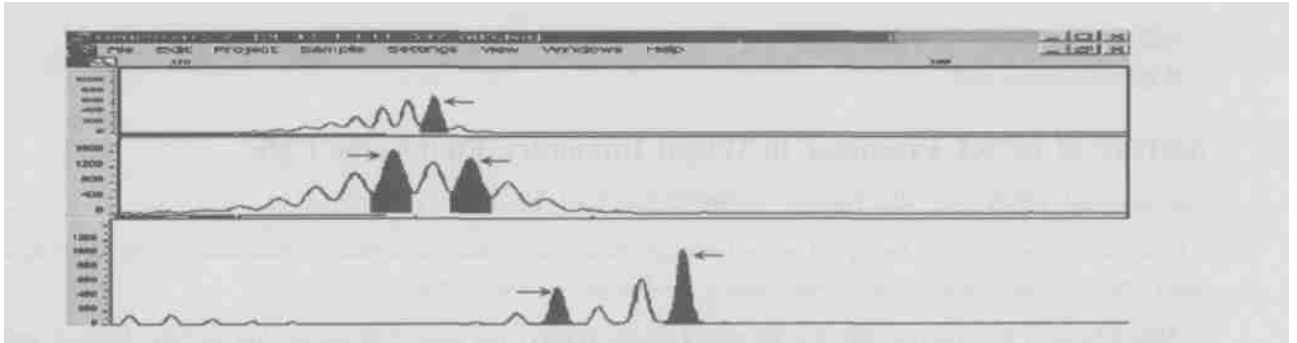


图 4 Genescan 程序扫描的部分样品
Fig. 4 Scanning for some samples using Genescan procedure

3.3 微卫星荧光标记技术的可行性分析

在北方冬麦区 451 份材料分析的基础上,结合中国小麦核心种质构建工作,大量实验说明微卫星荧光标记技术较银染法检测效果更为理想。在实验费用相差无几的情况下,工作效率却大大提高,这也说明分子标记技术正向着简便、快捷、实用、低成本、高通量、智能化的方向发展。需要强调的是,正因为微卫星荧光标记检测效率的空前提高,科研工作者在采用该项技术时就要重点考虑分析样品的数量问题,若要对数以千计的材料进行全基因组扫描或遗传多样性分析,该项技术是行之有效、比较理想的标记体系。在分析的材料和位点很少时,银染法不失为一套经济有效的检测体系,因为普通引物的合成比荧光标记引物的合成要便宜许多倍,而且适宜长期保存和利用,而后者只能保存半年至一年。

总而言之,多重 PCR 简单重复序列(SSR)荧光标记片段分析技术在作物核心种质构建中的应用,使机器自动收集、分析数据代替了银染方法的人工读取胶板的繁琐工作,在很大程度上降低了系统误差,同时提高了工作效率,为大规模开展基因组扫描或基因型分析提供了可能。

References

- [1] Chen X, Temnykh S, Xu Y, Cho Y G, McCouch S R. Develop of a microsatellite framework map providing genome-wide coverage in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor Appl Genet*, 1997, **95**: 552 - 562
- [2] Röder M S, Korzun V, Wendehake K, Plaschke J, Tixier M H, Leroy P, Ganal M W. A microsatellite map of wheat. *Genetics*, 1998, **149**: 2 007 - 2 023
- [3] Struss D, Plieske J. The use of microsatellite markers for detection of genetic diversity in barley populations. *Theor Appl Genet*, 1998, **97**: 308 - 315
- [4] Huang X Q, Börner A, Röder M S, Ganal M W. Assessing genetic diversity of wheat (*Triticum aestivum* L.) germplasm using microsatellite markers. *Theor Appl Genet*, 2002, **105**: 699 - 707
- [5] Zhang X Y(张学勇), Pang B-S(庞斌双), You G X(游光霞), Wang L-F(王兰芬), Jia J-Z(贾继增), Dong Y C(董玉琛). Allelic variation and genetic diversity at *Glu1* loci in Chinese wheat (*Triticum aestivum* L.) germplasm. *Scientia Agricultura Sinica* (中国农业科学), 2002, **35** (11): 1 302 - 1 310
- [6] Dong Y C(董玉琛), Cao Y S(曹永生), Zhang X Y(张学勇), Liu S-C(刘三才), Wang L-F(王兰芬), You G X(游光霞), Pang B-S(庞斌双), Li L-H(李立会), Jia J-Z(贾继增). Establishment of candidate core collections in Chinese common wheat germplasm. *Journal of Plant Genetic Resources* (植物遗传资源学报), 2003, **4** (1): 1 - 8
- [7] Bassam B J, Caetano-Anolles G, Gresshoff P M. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Anal Biochem*, 1991, **196**: 80 - 83
- [8] Sharp P J, Chao S, Desai S, Gale M D. The isolation, characterization and application in *Triticeae* of a set of wheat RFLP probes identifying each homeologous chromosome arm. *Theor Appl Genet*, 1989, **78**: 342 - 348
- [9] Dewos K M, Gale M D. The use of random amplified polymorphic DNA marker in wheat. *Theor Appl Genet*, 1992, **84**: 567 - 572