

AFLP módszer alkalmazása növényi minták azonosításához

Zubor Ákos¹ – Surányi Gyula² – Prokisch József¹ – Győri Zoltán¹ – Borbély György²

¹Debreceni Egyetem Agrártudományi Centrum,
Mezőgazdaságtudományi Kar,
Mezőgazdasági Terméfeldolgozás és Minősítés Tanszék,
Debrecen

²Debreceni Egyetem, Természettudományi Kar,
Növénytani Tanszék, Debrecen

ÖSSZEFOGLALÁS

A DNS-polimorfizmus meghatározásának egyik lehetséges módja a PCR-technikával kombinált AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)-módszer alkalmazása. A Debreceni Egyetem Természettudományi Karának Növénytani Tanszékén 2000-2001-ben sikeresen bevezetett módszert a jőféle sáfrány (*Crocus sativus* L.) rokonsági körének vizsgálatához használtuk. A jőféle sáfrány évezredek óta termesztett növény, amely a világon a legdrágább fűszert adja. A növény steril, triploid, csak vegetatív úton szaporodik, magokat nem terem. Eredete ismeretlen, csak termesztési kultúrákban létezik, feltételezhetően egy másik faj mutációjára, amelyet az ember szelektált, vagy több fajból létrehozott, létrejött hibrid. Rokonsági vizsgálatára a hagyományos módszerek csak korlátozott mértékben alkalmasak, ésszerűnek tűnt a molekuláris biológia nyújtotta lehetőségeket alkalmazni esetében. Munkánk eredménye volt a módszer bevezetése és sokrétű alkalmazásának megismerése mellett, hogy az irodalmi adatoknak megfelelően a *C. sativus*-hoz leginkább hasonló genetikai mintázatot a *C. cartwrightianus* esetében tapasztaltunk.

SUMMARY

One possible method for the determination of DNA-polymorphism is the PCR-based AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism). This method had been successfully introduced to the Department of Botany at University of Debrecen in 2000-2001 with the examination of hay saffron (*Crocus sativus* L.) and its allies. Hay saffron is grown as a spice for some thousand years producing the most expensive spice in the world. This plant is sterile, triploid reproduces only vegetatively with no fertile seeds. However its origin is unknown it exists only in cultivation and it is a mutated variety of another species or an artificial or natural hybrid. Usual methods for the systematic examination are restricted hence it seemed to be reasonable to apply molecular biological methods in its case. Results of this work include the introduction and many fold application of the method beside ensuring the consequences of science literature with determining the *C. cartwrightianus* to give the most similar genetical pattern to *C. sativus*.

BEVEZETÉS

Napjainkban a növény- és állatrendszertan, a populációbiológia, és az ökológia egyre részletesebben tárja fel az élőlények, társulások, életközösségek közötti hasonlóságot, vagy azokat a tulajdonságokat, amelyek mérhető, jól meghatározható különbséget jeleznek közöttük.

Ennek a kutatási iránynak a fejlődéséhez az utóbbi időben a molekuláris biológia is egyre növekvő mértékben hozzájárul. Ez a tudományterület a fenotípusosan megjelenő, egyszerűbb eszközökkel meghatározható tulajdonságokhoz hozzáteszi a genotípus, a genetikai variabilitás vizsgálatát.

A DNS a földi élőlények túlnyomó szálalékánál, mint általános információhordozó szerepel, amely az adott fajra, egyedre nézve jellemző, egyedi. Ezen a makromolekulán bizonyos mintázatok szabályosan ismétlődnek. Ezeket a mintázatokat egyes, baktériumokból izolált, enzimek képesek felismerni, sőt adott ponton szét is hasítják. Az így kapott DNS szakaszok, fragmentumok száma és hossza jellemző az adott fajra, egyedre (1-2. ábra).

1. ábra: DNS- lánc kettős (EcoRI és MseI) restrikciós helyel

```
5'-----GAATTC-----TTAA-----3'  
3'-----CTTAAG-----AATT-----5'
```

Figure 1: DNA chain with two (EcoRI and MseI) restriction sites

2. ábra: Kettősen emésztett DNS fragmentum

```
5'AATTC-----T  
G-----AAT5'
```

Figure 2: Double digested DNA fragment

Ha ezeket a nagyon kis koncentrációban, de annál nagyobb számban lévő fragmentumokat rendszerezni tudjuk és ennek értékelhető megjelenítését is megoldjuk, nagyon hasznos eszközt nyerünk az egyes élőlények faji, egyedi különbségeinek vagy hasonlóságainak kimutatására.

Az értékelhető megjelenítés egyik legáltalánosabb módja, ha a DNS szakaszokat megsokszorozzuk, és az így nyert, nagyobb mennyiségű fragmentum keveréket gélelektroforézissel „rendezzük”.

A DNS molekula megsokszorozását a 80-as évek közepén végezték el először mesterségesen. Az eljárást Polymerase Chain Reaction-nak (PCR), azaz polimeráz láncreakciónak nevezték el. Lényege, hogy a *Thermophilus aquaticus* nevű baktériumból izolált, hőstabil DNS-polimeráz enzim, a Taq megfelelő körülmények között egymás után többször is képes az adott DNS lánc szintézisére és az újonnan másolt DNS láncokat is tovább másolja, tehát minden

másolási ciklusban az adott DNS mennyiség láncreakció szerűen megkétszereződik. Ezzel a módszerrel másfél, két óra alatt a DNS mennyiség több milliószorosára is növekedhet. Az így kapott nagy koncentrációjú nukleinsavat agaróz gélen elválasztva az azonos hosszúságú fragmentumok egy helyre rendeződnek, így akár meg is számolhatjuk, hogy hányféle és milyen nagyságú szakasz keletkezett.

1993-ban Zabeau és Vos (Key Gene, Hollandia) szabadalmaztatott, majd 1995-ben publikált egy olyan eljárást, amely megoldja azt a problémát, mely a PCR-rel történő DNS polimerizálás esetében fellép, azaz ahhoz, hogy egy adott DNS szakaszt megtöbbszörözzünk, legalább egy, kezdeti részének a bázissorrendjét ismernünk kell. Ez a szekvenciaismeret azért nagyon fontos, mert a DNS-polimeráz enzim csak akkor tudja elkezdni a működését, ha rendelkezésre áll egy olyan, kevés bázisból álló, egyszálú DNS szakasz, oligonukleotid, amely már előzőleg hozzákötődött a másolni kívánt DNS-hez. Ezt az oligonukleotidot primernek nevezzük, mely a nevében is hordozza, hogy a folyamat beindítására szolgál. Ezt a természetben egy

másik enzim szintetizálja rá a szétnyílt DNS lánc azon pontjára, ahonnan az adott szakasz szintézise kezdődni fog. A PCR esetében ezt az enzimet nem használjuk, hanem az előre elkészített (szintetizált) primert adjuk a DNS fragmentumokhoz. Ahhoz azonban, hogy tudjuk, milyen bázissorrendű primert vigyünk be a rendszerbe, feltétlenül ismernünk kell az adott eredeti DNS szakasz kezdeti sorrendjét, aminek komplemetereként a primer bekötődhet. Ha belegondolunk, hogy egy élőlény DNS állományának szétszabdalásakor akár több százezer fragmentum is keletkezhet, láthatjuk, hogy ennek kiderítése bármelyik kutatólabor teljes kapacitásának is több mint megterhelő lenne. Erre kínál megoldást az Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) azaz felerősített fragmenthossz polimorfizmus módszer (Vos et al., 1995). Ennek lényege, hogy mivel ismerjük a DNS-t felszabdáló, ún. restrikciós enzimek hasítási pontjainak bázissorrendjét, azt is tudjuk, hogy a fragmentumok végein milyen bázisok vannak. Ez csak néhány, 1-2, bázis ismeretét jelenti, de már elég ahhoz, hogy olyan adaptereket szintetizáljunk, amelyek a végekhez hozzá tudnak kötődni (3-4. ábra).

3. ábra: AFLP adapterek

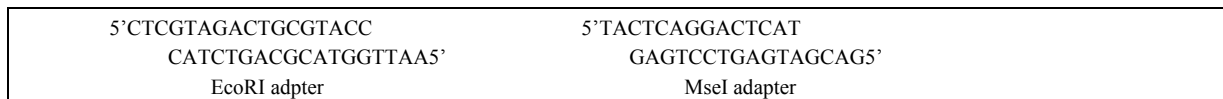


Figure 3: AFLP adapters

4. ábra: DNS fragmentum adapterekkel

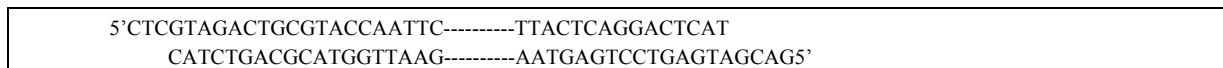


Figure 4: DNA fragment with adapters

Mivel a fragmentek végén lévő néhány tíz bázispárból álló adapterek teljes bázissorrendjét ismerjük, már csak olyan primereket kell

hozzáadnunk, amelyek ezekhez az adapterekhez bekötődnek, és amelyeket már a Taq polimeráz is felismer (5. ábra).

5. ábra: AFLP primerek

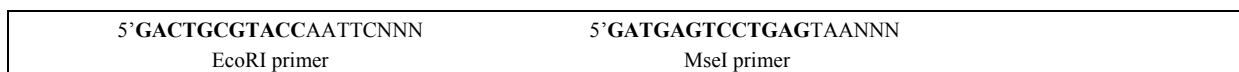


Figure 5: AFLP primers

Így szinte maradéktalanul fel tudjuk szaporítani az összes fragmentumot anélkül, hogy akár csak a

kezdeti szekvenciájukat is ismernénk, a hasítási helyeket leszámítva (6. ábra).

6. ábra: Szintetizáló DNS fragmentum primerekkel



Figure 6: Synthesizing DNA fragment with primers

Ezzel azonban még nem kapunk jól értékelhető mintázatokat, ugyanis a fragmentumok száma olyan nagy, hogy a gélelektroforézises képük még teljesen egybemosódik és értékelhetetlen. Az AFLP erre a problémára is megoldást kínál azzal, hogy a fragmentumok számát specifikusan, szelektíven lecsökkenti. Ezt több lépésben érhetjük el.

Első lépésben a genomiális DNS-t kétféle restriktív enzimrel, egy ritkán hasító és egy gyakori hasítási hellyel rendelkező enzimrel kezeljük. A ritkán hasító enzim (esetünkben az EcoRI) eleve csökkenti a szakaszok számát, míg a gyakran hasító enzim (MseI) biztosítja a megfelelő számú, ezáltal diverz és eléggé rövid fragmentum mennyiséget, amelyben előfordulnak az egyénre, fajra nézve egyedi DNS-szakaszok is. Az ily módon kezelt DNS tartalmazni fog olyan szakaszokat, amelyeknek mind a két végét ugyanaz az enzim alakította ki és olyat is, amelyek az egyik végét az egyik, a másikat a másik enzim.

Második lépésben a primerek módosításával csökkentjük a felerősített szakaszok számát. A primerek úgy épülnek fel, hogy van egy központi, komplementer részük, amellyel az adott adapterhez be tudnak kötődni (az ábrákon vastaggal jelölve) és van egy olyan enzimspecifikus részük, amely a Taq polimeráz számára, mint felismerési szignál szerepel. Ezekon felül még van három olyan bázisuk, amely nem állandó, hanem bizonyos elképzeléseknek megfelelően módosítható (az ábrákon NNN-nel jelölve). Ennek a három, szelektív bázisnak a változtatásával egymástól némileg eltérő primereket hozhatunk létre.

Az AFLP első PCR alkalmazásánál egy úgynevezett preszelektív amplifikációt végzünk, amikor csak az első ilyen bázis kiterjesztést határozzuk meg. Ekkor csak azok a fragmentumok fognak felerősödni, amelyeknél az adott enzim hasítási helye után közvetlenül a primeren lévő szelektív bázis komplementere található.

A PCR további alkalmazásakor már olyan primereket alkalmazunk, amelyeknél mind a három szelektív bázist megadjuk, így már csak azok a fragmentumok erősödnek fel, amelyeknél a hasítási hely után közvetlenül a primer kiterjesztésének megfelelő bázisok következnek. Ez a módszer olyan hatékonyan tud szelektálni a fragmentumok közül, hogy néhány darab primer-pár használatával szinte biztosan találunk olyan fragmentumokat, amelyek csak az adott fajra vagy egyedre jellemzőek.

Ezen a módon egy olyan adatrendszer kapunk, ahol az egyes mintáknál szerepel, hogy az adott primer-párral hány egyedi, illetve egy másik mintával hány közös fragmentje volt. Ez alapján kiszámolható a minták relatív távolsága, amely aztán clusterként ábrázolva jól szemlélteti az egyes taxonok közti genetikai távolságot.

A módszer nagy érzékenysége és általános működési elve miatt alkalmazható növények, állatok, prokarióták stb. fajok közötti és fajon belüli távolságainak felmérésére egyaránt.

2000-2001-ben a DE TTK Növénytan Tanszékén több növénycsoport vizsgálatával sikeresen

bevezettük a módszert. Itt néhány mondatban ismertetjük az egyik ilyen vizsgálatunkat.

ANYAG ÉS MÓDSZER

Vizsgálatunkhoz sajnos nem tudtuk a *Crocus sativus* rokonsági körének teljes fajkészletét felsorakoztatni (MATHEW, 1982), de az összes vizsgált faj őszi virágzású és valamilyen szempontból (pl. mert egyes vidékeken szintén termesztették, mint szerényebb értékű fűszernövényt) kapcsolódik a jőféle sáfrányhoz.

Munkánkhoz a következő fajokat reprezentáló mintákat használtuk fel:

Crocus sativus L. 1 - a madridi Királyi Botanikus Kertből 1998

Crocus sativus L. 2 - Priszter Szaniszló gyűjteményéből

Crocus cartwrightianus Herbert - Priszter Szaniszló gyűjteményéből

Crocus longiflorus Rafin. - Priszter Szaniszló gyűjteményéből

Crocus goulimyi Turill - Priszter Szaniszló gyűjteményéből

Crocus goulimyi var. *albus* - Priszter Szaniszló gyűjteményéből

Crocus serotinus ssp. *Salzmannii* Mathew - Priszter Szaniszló gyűjteményéből

Crocus pulchellus Herbert - Priszter Szaniszló gyűjteményéből

A minták 96%-os alkoholban, -20 °C-on tárolt levéldarabok voltak.

DNS kivonás

Az AFLP módszer alkalmazásához megfelelő tisztaságú DNS mintákra van szükség. A begyűjtött növények leveléből a Benner és mtsai (1995) által közölt kivonási módszerrel végeztük a DNS extrakciót.

A restriktív enzimekkel történő hasítás

Az egyes *Crocus* fajokból származó DNS mintákat EcoRI, TruI, EcoRI+TruI, AluI illetve HindIII enzimekkel hasítottunk (Vos és mtsai, 1995; Reineke és Karlowsky, 2000). Itt kell megjegyezni, hogy az MseI és a TruI enzimek szekvencia felismerési és hasítási helyei megegyeznek, azaz izoschizomerek, egymást helyettesíthetik. Az enzimek és az emésztés során használt pufferek, reagensek a Fermentas cég készítményei voltak.

Az adapterek ligálása

A TruI, EcoRI, illetve EcoRI+TruI restriktív enzimekkel emésztett DNS fragmentekhez kapcsoltuk a megfelelő adapter oligonukleotidokat (Reineke és Karlowsky, 2000; Briand és mtsai, 2000). A ligálás reagensai Fermentas készítmények.

A PCR reakcióelegy összeállítása

A *TruI* és *EcoRI* adapterekkel ligált DNS-fragmentek mennyiségének növelését a PCR alkalmazásával érték el (Briand és mtsai, 2000). A PCR reakcióban használt enzimek és pufferek Fermentas termékek.

Az alkalmazott primerek nukleotid szekvenciái:

EcoRI: 5'-GACTGCGTACCAATTCACG

TruI: 5'-GATGAGTCCTGAGTAACAA

A DNS minták elektroforézise és festése

A restriktív enzimekkel történő módosítások és a PCR-t követően kapott DNS fragmenteket akrilamid gélelektroforézissel választottuk el (Vos és mtsai, 1995; Briand és mtsai, 2000). A DNS mintázat meghatározásakor minden esetben 5% koncentrációjú poliakrilamid gélt használtunk, futtató pufferünk 1xTBE volt.

A DNS fragmentek méretének meghatározásához a Fermentas cég HindIII emésztett lambda-DNS molekulatömeg standardját használtuk (23,1; 9,4; 4,4; 2,3; 2,0 és 0,56 kbp). A molekulatömeg standard és különböző DNS minták gélre vitelekor is a Fermentas 6x töménységű mintapufferét alkalmaztuk (végkoncentráció: 2x). Az általunk használt AFLP technika nem tartalmazott radioaktív jelölési lépéseket (pl. primerek), ezért a DNS fragmentek elválasztás utáni kimutatására minden esetben az ezüstoffestés módszerét alkalmaztuk (Sammons et al., 1981; Schumacher et al., 1983), a kapott DNS mintázatokat szkennelés után „jpeg” formátumú képfájlokként rögzítettük.

A PCR-technikán alapuló AFLP-módszerrel kapott eredmények statisztikai kiértékelése

A különböző, összehasonlító populációkból származó DNS-minták az AFLP-PCR technika alkalmazása és a gélelektroforétikus elválasztás után az ezüsttel festett géleken egy-egy „géloszlopként” (lane) jelennek meg. Ezekben az oszlopokban a DNS fragmentek (band) számbavehetőek. Ha egy adott csík jelen van, akkor 1-es értéket, ha nincs, akkor 0 értéket kap (Loh et al., 1999; Nybom és Kraft, 1995). Ha minden vizsgált objektumra (adott populáció DNS-mintázata) elvégezzük a fenti transzponációt, akkor egyértelműen képezhetjük az ún. Jaccard-indexet (J):

$$J = a/a+b+c, \text{ ahol}$$

a = két összehasonlítandó mintában, az azonos pozícióban lévő csíkok száma,

b = csak az egyik összehasonlítandó mintára jellemző csíkok száma,

c = csak a másik összehasonlítandó mintára jellemző csíkok száma.

A Jaccard index, tehát annak „a becsült valószínűsége, hogy két objektum megegyezik egy, legalább az egyiküket jellemző változóban” (Podani, 1997).

A „J” értéke 0 és 1 között mozoghat, tükrözve a két minta genetikai közelségét.

A Jaccard-index értékeit hasonlósági mátrixokba rendeztük, amelyeket dendrogramokon is megjelenítettünk (1-6. táblázat).

AZ EREDMÉNYEK ISMERTETÉSE ÉS ÉRTÉKELÉSE

Eredményeink alapján megállapítható, hogy a két, különböző helyről származó *C. sativus* hasonlósági indexe volt a legnagyobb: $J=0,9$ (2. és 5. táblázat). A *C. sativus*hoz a többi faj közül minden esetben a *C. cartwrightianus* állt a legközelebb. A 2. táblázatban két, eltérő helyről származó *C. sativus* szerepel. Ha ezek bármelyikét kiemeltük az adatsorunkból (3. és 4. táblázat), az előző eredmény akkor sem változott. Az 5. táblázat a két *C. sativus* és a *C. cartwrightianus* becsült hasonlóságát mutatja, melyből megállapítható, hogy a *C. sativusok* és az utóbbi közt lévő távolságok eltérése csekély, azaz majdnem ugyanolyan mértékben hasonlít a két eltérő élőhelyű *C. sativus* a *C. cartwrightianus*ra. A 6. táblázat szintén azt a feltételezést erősíti, hogy a *C. sativus* legközelebbi rokona az itt szereplő öt faj közül a *C. cartwrightianus*. Eredményeinkből az is kitűnik, hogy a két eltérő helyről származó *C. sativus* hasonlósági értéke magasabb, mint az egy faj, két változatát adó *C. goulimyi* és *C. goulimyi* var. *albus* esetében, ám ez utóbbiak hasonlósága a restriktív enzimtől függően magasabb, megegyezik vagy kisebb, mint a *C. sativus* – *C. cartwrightianus* közötti hasonlóság (1., 3., 4. és 6. táblázat).

Természetesen hangsúlyozni kell, hogy a fenti állításokat ugyan független, ismételt kísérletek alapján tesszük, de eddig csak egyetlen *EcoRI/TruI* primer párt próbáltunk ki PCR-os programjainkban; és itt kell megemlítenünk azt is, hogy a *C. cartwrightianus* csoport hiányzó taxonjaiból eddig nem sikerült mintát beszerezniük, ezért még ezen taxonok vizsgálatával is ki kívánjuk bővíteni kísérleti munkánkat.

EcoRI+TruII (kettős) emésztett *Crocus* DNS-mintázatok Jaccard-index alapján hasonlósági mátrixba rendezett és dendrogramon ábrázolt formája

	C.sativus1	C.cartwr.	C.longifl.	C.goulimyi	C.gou.v.alb	C.serotinus	C.pulchell.
C.sativus1							
C.cartwr.	,556						
C.longifl.	,364	,433					
C.goulimyi	,375	,235	,324				
C.gou.v.al	,452	,303	,353	,607			
C.serotinu	,406	,303	,353	,324	,353		
C.pulchell	,382	,364	,371	,382	,371	,455	

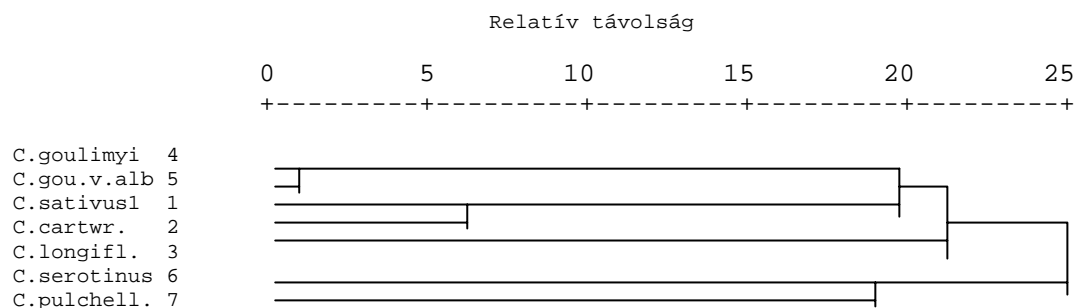


Table 1: Double (*EcoRI*+*TruII*) digested *Crocus* DNA patterns arranged in similarity matrix with Jaccard index and displayed on dendrogram

EcoRI emésztett *Crocus* DNS-mintázatok Jaccard-index alapján hasonlósági mátrixba rendezett és dendrogramon ábrázolt formája

	C.sativus2	C.sativus1	C.cartwr.	C.longifl.	C.goulimyi	C.cou.v.al	C.serot.	C.pulchell
C.sativus2								
C.sativus1	,900							
C.cartwr.	,700	,636						
C.longifl.	,286	,267	,308					
C.goulimyi	,333	,417	,250	,231				
C.gou.v.al.	,250	,231	,400	,250	,625			
C.serot.	,353	,412	,294	,278	,500	,333		
C.pulchell	,273	,250	,300	,273	,333	,375	,188	

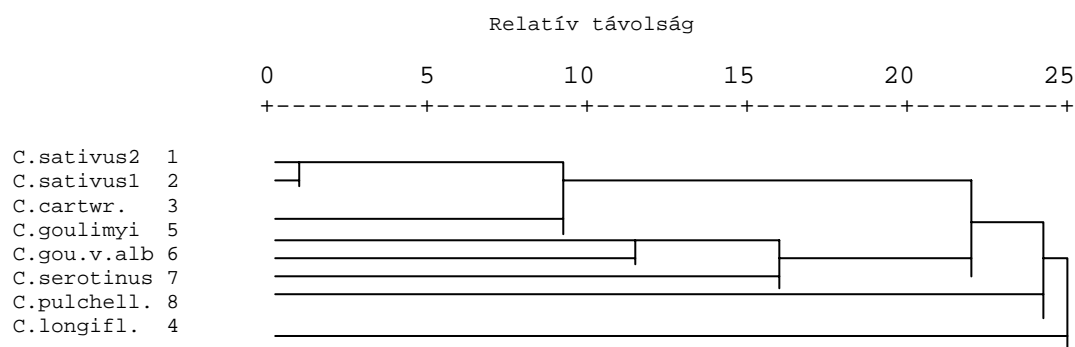


Table 2: *EcoRI* digested *Crocus* DNA patterns arranged in similarity matrix with Jaccard index and displayed on dendrogram

EcoRI emésztett DNS-mintázatok Jaccard-index alapján hasonlósági mátrixba rendezett és dendrogramon ábrázolt formája a *C. sativus 2* nélkül

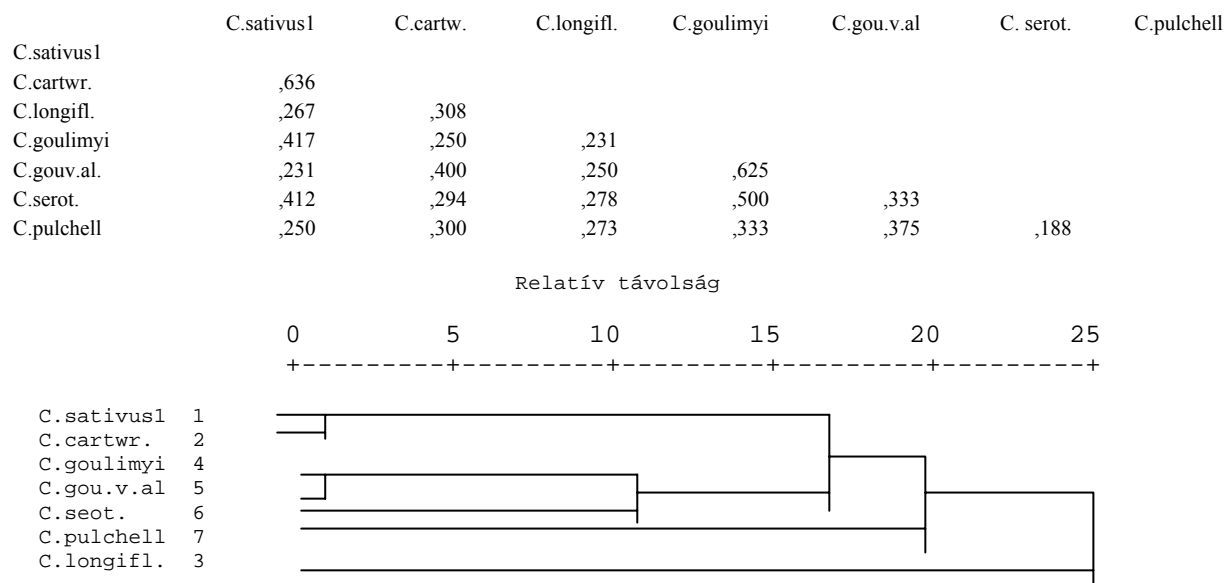


Table 3: EcoRI digested *Crocus* DNA patterns arranged in similarity matrix with Jaccard index and displayed on dendrogram without *C. sativus 2*

EcoRI emésztett DNS-mintázatok Jaccard-index alapján hasonlósági mátrixba rendezett és dendrogramon ábrázolt formája a *C. sativus 1* nélkül

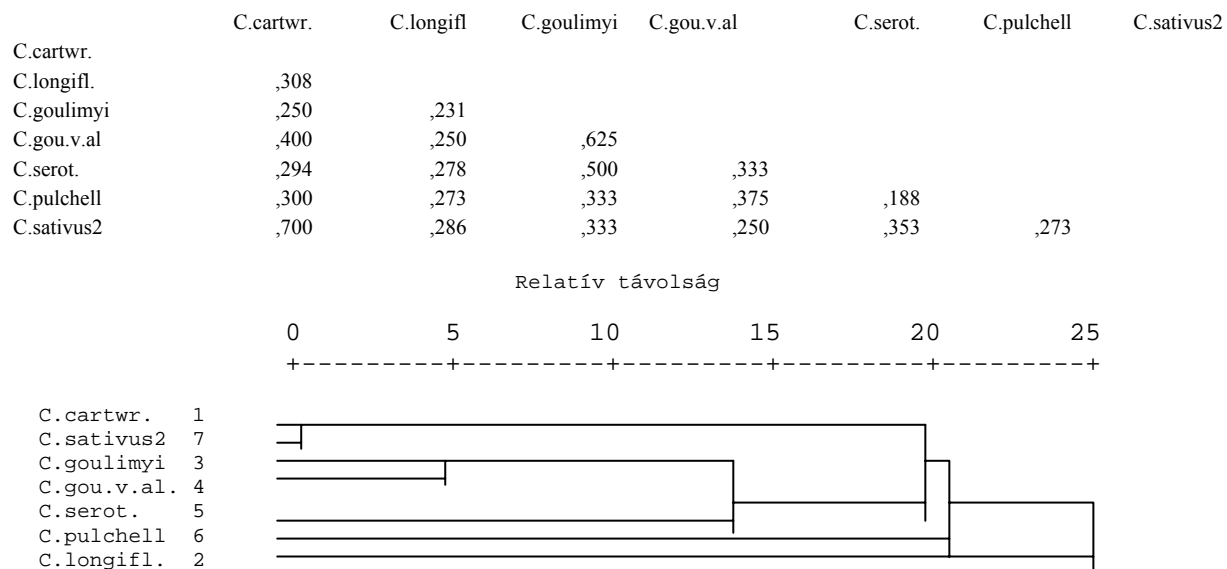
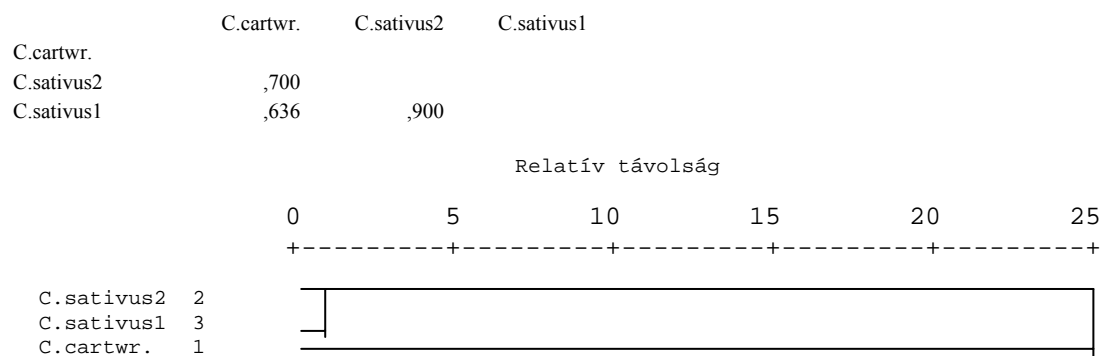
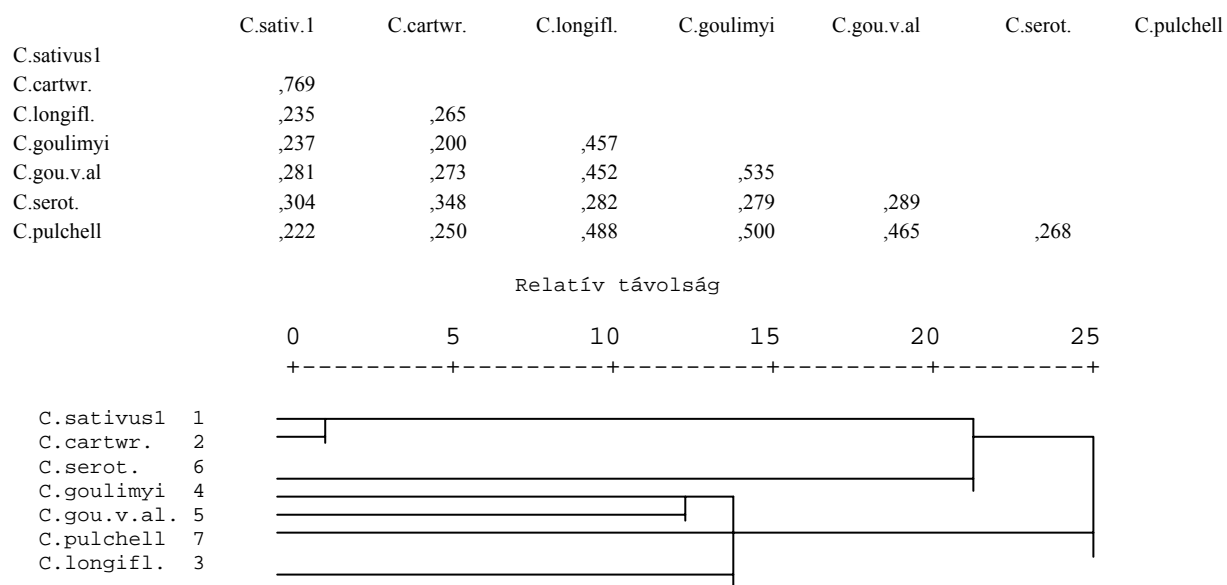


Table 4: EcoRI digested *Crocus* DNA patterns arranged in similarity matrix with Jaccard index and displayed on dendrogram without *C. sativus 1*

EcoRI emésztett *C.sativus* 1, *C.sativus* 2 és *C. cartwrightianus* DNS-mintázatok Jaccard-index alapján hasonlósági mátrixba rendezett és dendrogramon ábrázolt formájaTable 5: EcoRI digested *Crocus sativus* 1, *C. sativus* 2 and *C. cartwrightianus* DNA patterns arranged in similarity matrix with Jaccard index and displayed on dendrogram

TruII emésztett DNS-mintázatok Jaccard-index alapján hasonlósági mátrixba rendezett és dendrogramon ábrázolt formája

Table 6: TruII digested *Crocus* DNA patterns arranged in similarity matrix with Jaccard index and displayed on dendrogram

IRODALOM

- Benner, M. S.-Braunstein, M. D.-Weisberg, M. U. (1995): Detection of DNA Polymorphisms Within the Genus *Catteya* (Orchidaceae). *Plant Molecular Reporter*, 13. 147-155.
- Briand, M.-Le Clers, V.-Grzebelus, D.-Senalik, D.-Simon, P. W. (2000): Modified Protocols for Rapid Carrot Genomic DNA Extraction and AFPL™ Analysis Using Silver Stain or Radioisotopes. *Plant Molecular Biology Reporter*, 18. 235-241.
- Loh, J. Ph.-Kiew, R.-Kee, A.-Gan, L. H.-Gan, Y. Y. (1999): Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) Provides Molecular Markers for the Identification of *Caladium bicolor* Cultivars. *Annals of Botany*, 84. 155-161.
- Mathew, B. (1982): The *Crocus*. A Revision of the Genus *Crocus* (Iridaceae). B. T. Batsford Ltd., London
- Nybm, H.-Kraft, T. (1995): Application of NA fingerprinting to the taxonomy of European blackberry species. *Electrophoresis*, 16. 1731-1735.
- Podani J. (1997): Bevezetés a többváltozós biológiai adatfeldtárás rejtelmeibe. Scientia Kiadó, Budapest
- Reineke, A.-Karlowsky, P. (2000): Simplified AFLP Protocol: Replacement of Primer Labeling by the Incorporation of α -Labeled Nucleotides during PCR. *Biotechniques*, 28. 622-623.
- Sammons, D. W.-Adams, L. P.-Nishazawa, E. E. (1981): *Electrophoresis*. 2. 135-141.
- Schumacher, J.-Randles, J. W.-Reisner, D. (1983): *Anal. Biochem.* 135. 288-295.
- Vos, P.-Hogers, R.-Bleeker, M.-Reijmans, M.-van de Lee, Th.-Hornes, M.-Frijters, A.-Pot, J.-Peleman, J.-Kuiper, M.-Zabeau, M. (1995): AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleid Acids Research*. 23. 21. 4407-4414.