

应用于作物体细胞杂种鉴定的遗传标记方法

张 瑜 ， 赵 云 云
(首都师范大学 生命科学院, 北京 100037)

摘 要: 着重介绍了 4 类遗传标记方法的原理及特点, 简要概述了其在作物体细胞杂种鉴定方面的应用进展。
关键词: 体细胞杂种; 遗传标记
中图分类号: Q 943 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001—0009(2007)12—0055—05

作物体细胞杂种的鉴定研究离不开遗传标记, 遗传标记是遗传物质的特殊的易于识别的表现形式, 可以用于研究基因遗传和变异的规律。随着分子生物学和生物技术的迅速发展, 遗传标记技术也得到了迅猛的发展。目前, 遗传标记主要分为四大类: 形态学标记、细胞学标记、生化标记和分子标记。形态学标记指可以观察到的一些表型性状; 细胞学标记主要包括核型、染色体带型等; 生化标记主要是指同工酶和贮藏蛋白质等生化物质; 分子标记是以生物大分子, 尤其是生物体的遗传物质——核酸的多态性为基础的遗传标记。

1 形态学标记

第一作者简介: 张瑜(1982-), 女, 硕士, 主要从事植物细胞工程研究。E-mail: zhangyu19821031@163.com。
通讯作者: 赵云云。E-mail: kjc-zhaoyy@mail.cnu.edu.cn。
收稿日期: 2007—06—25

植株形态、叶片形态、花器官形态、果实特征等形态学特征是判断及筛选体细胞杂种的基本而又重要的标准。形态学标记可以直接的体现杂种与双亲的形态区别, 方法非常简单。但是它易受环境和其它遗传效应影响, 且标记的数量较少。

2 细胞学标记

核型、染色体带型和原位杂交及染色体的非整倍性和结构变异等细胞学标记是鉴定体细胞杂种的一种有效的方法。

2.1 制片分析

通常以根尖、茎尖、幼叶、叶片愈伤组织等为材料, 采用压片法进行染色体标本制备, 需用卡宝品红、醋酸洋红等染色液进行染色、镜检和计数。制片分析作为最基本的细胞学分析手段, 方法比较简单, 但是易受材料和时间的限制。

2.2 原位杂交

[26] Kawasaki T, Henmi K, Ono E, et al. The small GTP-binding protein Rac is a regulator of cell death in Plants [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96: 10922-10926.
[27] Heo W D, Lee S H, Kim M C, et al. Involvement of specific calmodulin isoforms in salicylic acid-independent activation of plant disease resistance response [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1999 96: 766-771.
[28] Rate D N, Cuenca J V, Bowman G R, et al. Again-of-function Arabidopsis acd6 mutant reveals novel regulation and function of the salicylic acid

signaling pathway in controlling cell death, defenses and cell growth [J]. Plant Cell, 1999, 11: 191-206.
[29] Delledonne M, Xia Y, Dixon R A, et al. Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance [J]. Nature, 1998, 394: 585-588.
[30] Pedroso M C, Magalhaes J R, Durzan D. Nitric oxide induces cell death in taxus cells [J]. Plant Sci, 2000, 157: 173-180.
[31] 崔克明. 植物细胞程序性死亡的机理及其与发育的关系 [J]. 植物学报, 2000, 17(2): 97-107.

Programmed Cell Death of Plant Induced by Stress

CAO Hui, LIU He, FU Xun-cheng, LI Chun-xia
(Horticulture Department of Shanxi Agriculture University, Taigu, Shanxi 261061, China)

Abstract: Programmed cell death(PCD) is an active and gene-regulated process which plays an important role in normal growth and development of plants. In this review, we summarized recent studies on the features of PCD in plants including the possible pathways of signal transduction in PCD, the important enzyme related to PCD and so on.
Key words: Plant; Stress; Programmed cell death

1969 年 Gall、Pardue 和 John 等(2002)首次建立该技术,并应用于组织切片和细胞标本上。原位杂交技术(*in situ hybridization*, ISH)是根据核酸分子碱基互补配对原则,利用标记探针与组织、细胞或染色体的 DNA 进行杂交,对细胞中的待测核酸进行定性、定位或相对定量分析(张明,曹家树,2000)。

随着组织化学和分子生物学的进一步的发展,染色体原位杂交技术不断改进。在植物体细胞杂种研究方面,原位杂交技术日益显示出其优势,可用于倍性变异的来源检测、融合双亲的基因组互作、染色体行为分析等。例如, Itoh 等(1991)应用原位杂交技术对油菜非对称杂种进行了研究,发现所检测的 5 个杂种都丢失了供体 1~3 条染色体。

2.2.1 特异片断的荧光原位杂交 20 世纪 80 年代末,出现了利用荧光素进行标记或检测的荧光原位杂交(*fluorescence in situ hybridization*, FISH)技术,使信号检出率提高。Wang 等(2005)通过 FISH 技术分析 wheat 和 *Agropyron elongatum* 的体细胞杂种,发现杂种中有 *A. elongatum* 的小染色体片断,从而证明了杂种的性质。FISH 比 ISH 有两个优点:不同的探针可以同时测定几个不同序列在染色体上的物理顺序;通过数字成像显微技术就可以获得更为准确的图谱。

2.2.2 基因组原位杂交 采用整个基因组的 DNA 可作为 FISH 探针来识别植物杂种、异源多倍体和重组的育种品系中不同来源的染色体和染色体片段,这一重要的 FISH 技术变型称为基因组原位杂交(*genomic in situ hybridization*, GISH)。Wolters 等(1994)应用 GISH 技术研究了番茄与马铃薯属间体细胞杂种的有丝分裂、减数分裂行为,发现存在很多异常现象。GISH 技术更直接简便,可与整条染色体杂交,而且杂交位点可以在细胞分裂任何时期观察到。通过 GISH 不仅能了解配对同源染色体的来源,还能观察到异源染色体易位互换重组现象。

2.3 流式细胞仪分析

通过流式细胞分析仪(*flow cytometer*, FCM)对大量处于分裂期间染色体的细胞 DNA 含量进行检测,经仪器的附设计算机自动进行统计分析,绘制出 DNA 含量(倍性)的分布曲线图。以已知倍性的同类试材为对照,确定待测植株的倍性。相对常规染色体制片法来说,采用流式细胞仪进行倍性分析操作简便,不受材料和时间的限制。但该方法的单独使用,尚不能鉴别出是否为异源四倍体、二倍体胞质杂种,而且流式细胞仪价格昂贵、使用成本较高。

3 生化标记

生化标记(*biochemical marker*)主要是同工酶(*isozyme*)和种子贮藏蛋白(如醇溶蛋白)等生化物质的遗传标记。

3.1 同工酶分析

由于酶的结构主要是由遗传物质 DNA 分子上碱基排列顺序决定的,因此对酶的分析可以间接反映不同生物的不同基因结构。同工酶结构上的差异,可在电流中表现出来,因而易于识别。

国内外近年来用同工酶分析法鉴定杂种,已取得了一些结果。Trabelsi 等(2005)通过 PEG 处理 *potato Solanum L. tuberosum* 和 *Solanum vernei* 的原生质体融合得到了 5 棵再生植株,采用酯酶和过氧化酶分析来初步鉴定再生株的杂种特性。

3.2 蛋白质分析

各种蛋白质都有其特有的等电点,在高于其等电点 pH 的缓冲液中,将形成带负电荷的质点,在电场中向正极泳动,在同一条件下,不同蛋白质带电荷有差异,分子量大小也不同,所以泳动速度不同,蛋白质可分成多条区带。向凤宁等(2001)采用双向电泳技术分析杂种蛋白质组分可见,杂种不仅含有双亲的蛋白质组,而且还产生了特异的新蛋白。

在电泳和等电聚焦时,蛋白质迁移率的差异、共显性等蛋白质多态性在数量上是有限的。很多蛋白质的多态性不能通过电泳检测,因为氨基酸改变了,蛋白质的物化性质没变。而且,基因编码的多态性蛋白质本身可能不被作图。由于这些因素,蛋白质标记具有一定局限性。

4 分子标记

分子标记(*molecular marker*)是以生物的某些大分子物质(主要指核酸)的多态性为基础的遗传标记。依其多态性检出所用的分子生物学技术,大致可分为以 Southern 杂交技术为核心的分子标记和以 PCR 技术为核心的分子标记。

4.1 基于 Southern 杂交技术的分子标记

该技术利用限制性内切酶酶解不同生物体的 DNA 分子后,用特异探针进行 southern 杂交,通过放射自显影或非同位素来检测 DNA 的多态性,其中最具有代表性的是发现最早的限制性片段长度多态性(RFLP, *restriction fragment length polymorphisms*)。其基本原理是用限制性内切酶把 DNA 分子降解成大量的长短不等的小片段,这些小片段的数目及长度反映了限制性内切酶酶切位点在 DNA 分子上的分布。不同来源的 DNA 具有不同的限制酶酶切位点的分布,每一种 DNA/限制酶组合所产生的片段是特异的,从而产生多态性。其可靠性高,是共显性标记。但 DNA 用量大,操作繁琐,技术复杂,工作量大,有放射性危害。

Cheng 等(2004)曾运用 RFLP 标记技术对 *Triticum aestivum* 和 *Agropyron elongatum* 体细胞杂种的线粒体基因进行分析,发现杂种细胞是供体和受体基因自由组合和分离的结果。

4.2 以 PCR 技术为基础的分子标记

PCR 技术即聚合酶链式反应,就是利用 DNA 聚合酶进行体外扩增 DNA 的技术,方法简便、快速。根据使用引物的特点可概括为两种类型。

4.2.1 单引物 PCR 技术 以一寡聚核苷酸序列(4~20bp)为引物,对基因组 DNA 进行随机 PCR 扩增,产生扩增片段长度多态。包括 RAPD (randomly amplified polymorphic DNA), DAF (DNA amplification fingerprinting), SPAR (single primer amplification reaction), SSR—Anchored—PCR (simple sequence repeat—anchored—PCR) 等。这些标记与 RFLP 相比,操作简便,自动化程度高,但稳定性稍差(吴俊 2002)。RAPD、DAF、AP—PCR 标记其技术流程大同小异,即用单引物扩增基因组 DNA,PCR 结束后电泳分析,在紫外光下观察或照像,不同之处在于所应用的引物类型不同。RAPD 标记技术: RAPD 即随机扩增多态 DNA 标记,由 Williams 等(1990)研究小组建立,是一种以 PCR 技术即多聚酶链式反应为基础的分子标记,其基本原理是以一个通常为 10bp 的寡聚核苷酸为引物,通过 PCR 扩增反应,产生不连续的 DNA 产物,用以检测 DNA 序列的多态性。Sigareva 等(1999)利用 RAPD 技术对 *Camelina sativa* 和 rapid-cycling *Brassica oleracea* 原生质体融合获得的体细胞杂种进行了分析,其中 7 个杂种的谱带中具有双亲的谱带。RAPD 技术优点: ①引物无种属特异性;②模板用量极少,灵敏度高;③标记计数量多;④分析自动化,技术方便快捷,实验成本低,使用范围广。但 RAPD 技术的稳定性较差,PCR 反应对反应条件极为敏感,反应条件的细微变化可能影响扩增结果的重复性;RAPD 技术通用性差,物种对 PCR 的反应条件不同。DAF 标记技术: DNA 扩增指纹由 Caetano—Anolles 等(1991)建立。DAF 所用引物长度比 RAPDs 短,甚至可短至 5bp,因此它所提供的谱带信息比 RAPDs 大得多。DNA 指纹图谱是指某一品种具有的区别于其他品种的特异 DNA 片段,其表现方式为一系列电泳图谱的差异。Wu 等(2005)运用 DAF 标记技术对初步鉴定为多倍体的杂种进行了分析,证实了杂种细胞中确实存在双亲的 DNA。各品种的 DNA 指纹差异可直接提供与目标性状有关的 DNA 水平的信息,避免了环境干扰;不受生长发育时间的制约;成本低且准确可靠。AP—PCR 标记技术: 任意引物 PCR,由 Welsh 和 McClelland(1990)建立。AP—PCR 使用的引物较长(10~15 bp),但 PCR 反应前 2 个循环的严谨条件较低,最终的反应结果与 RAPD 类似。SSR—Anchored—PCR; SSR 锚定 PCR 标记系统由 Zietkiewicz 等(1994)建立,其技术要点是引物设计时,在引物的 3' 端或 5' 端锚定上简单序列重复(尤其是(CA)_n),另一端再设计 2~4 个碱基;用这种引物扩增 DNA,

扩增出的产物为简单序列重复之间的 DNA 序列。SPAR 标记技术: SPAR, 单引物扩增反应。该标记系统由 Gupta 等(1994)提出,其技术流程同 RAPD。该系统所用引物为微卫星序列或简单序列重复,扩增产物为各简单序列重复间的 DNA 片段。

4.2.2 双引物 PCR 技术 通过特异的双引物选择扩增基因组 DNA 或基因组 DNA 限制性酶切片段,产生扩增片段长度多态。包括 STS (sequence—tagged sites), SCAR (sequence characterized amplified regions), AFLP (amplified fragment length polymorphism), SRAP (sequence related amplified polymorphism), TRAP (target region amplified polymorphism)。这类标记为共显性,多态性高,分辨率高,稳定性强,重复性好,速度快,自动化程度高。STS 标记技术: 序列标志位点是基于 RFLP 发展起来的一类 PCR 标记技术。STS 技术的基本原理是: 对 RFLP 标记使用的克隆进行测序,根据序列信息设计一对引物,用于对基因组 DNA 进行特意扩增,对扩增产物进行常规的 DNA 电泳检测扩增产物的多态性。甘蓝型油菜与花椰菜原生质体通过 PEG 法诱导融合,采用 STS 标记引物鉴定 32 株再生植株为杂种。(惠志明等 2006)。STS 作为一种基于 PCR 的标记技术,显然具有 RFLP 无法比拟的实用性。SCAR 标记技术: SCAR 标记技术由 Paran 和 Michemore(1993)建立,其原理是将一个理想的 RAPD 标记克隆后,对其末端进行测序,而后设计出较长的引物(如 24 个碱基),对不同材料中该标记的有无进行特异扩增。这样,不同材料中 DNA 序列的差异可通过这个单一带的出现与否加以判断。李映等(2005)利用两个 SCAR 双侧翼标记对马铃薯四倍体栽培种的双单倍体系与二倍体野生种的原生质体融合体细胞杂种进行分子标记辅助鉴定。SCAR 的稳定性比 RAPD 增强了许多,而且待检 DNA 间的差异可直接通过有无扩增产物来显示,这甚至可省去电泳的步骤。AFLP 标记技术: AFLP 扩增片段长度多态性。该标记系统由 Zabeau 和 Vos(1995)发明,其原理是选择性扩增基因组 DNA 的酶切片断。由于不同材料的 DNA 的酶切片断存在差异,因而便产生了扩增产物的多态性。利用 AFLP 技术对 *Thlaspi caerulescens* 和 *Brassica napus* 原生质体融合获得的体细胞杂种进行了分析,发现 17 个植株都具有 10 个以上的双亲的特征谱带,属于双亲融合的体细胞杂种(Brewer, 1999)。AFLP 技术与 RAPD 技术相比有以下优点: ①显性标记,多态性强;②稳定性好,分辨率高,重复性强,可靠性好。但是其实验程序比 RAPD 技术复杂;需使用同位素等标记引物,成本高,对人体有害。SRAP 标记技术: 相关序列扩增多态性是一种新型的基于 PCR 的标记系统,由美国加州大学蔬菜作物系 Li 与 Quiros(2001)提出,也称基于

序列扩增多态性(FERRIOL 和 PICO 2003)。SRAP 的原理是利用独特的引物设计对 ORFs (open reading frames, 开放阅读框架)进行扩增,上游引物长 17bp, 5'端的前 10 bp 是一段填充序列,紧接着是 CCGG, 它们组成核心序列及 3'端 3 个选择碱基,对外显子进行特异扩增。下游引物长 18 bp, 5'端的前 10~11 bp 是一段填充序列,紧接着是 AATT, 它们组成核心序列及 3'端 3 个选择碱基,对内含子区域、启动子区域进行特异扩增,因个体不同以及物种的内含子、启动子与间隔长度不等而产生多态性。陆地棉品种 Coker 201 和克劳茨基棉通过对称融合获得体细胞杂种。采用 SRAP 标记检测再生植株中含有双亲的特征带,证明了杂种的真实性(张献龙等, 2004)。相关序列扩增多态性是近年来发展起来的一种新型分子标记系统,它具有简便、中等产量、高共显性、重复性、易于分离条带及测序等优点,最大的特点是它针对的是基因的阅读框区域。TRAP 标记技术:靶位区域扩增多态性是基于 PCR 的新型标记系统,由 Hu 与 Vick (2003)提出。与 SRAP、RAPD 和 AFLP 等标记技术无须任何序列信息即可直接 PCR 扩增不同,TRAP 技术是基于已知的 cDNA 或 EST 序列信息。其原理是利用生物信息学工具和表达序列标签(EST)数据库信息,产生目标候选基因区多态性标记。该技术采用 2 个 18 核苷酸引物,一个为固定引物,依据 EST 序列设计;另一个为随机引物,针对外显子或内含子的特点,设计分别富含 GC 或 AT 核心区的任意序列。通过对目标区域 PCR 扩增,产生围绕目标候选基因序列的多态性标记。SRAP 与 TRAP 是最近发展的新型分子标记系统,具有简便、高效、重复性好等优点,作为遗传标记在作物体细胞杂种的鉴定中有着广阔的前景。

4.3 以重复序列为基础的分子标记

以重复序列设计出的双引物对重复序列及其间的序列进行扩增,产生扩增片段长度多态。包括 SSR (simple sequence repeat), 5S rDNA 间隔序列分析,ISSR (inter-Simple sequence repeat)。这类标记为共显性,多态性很高,稳定。

4.3.1 SSR 标记技术 SSR 由 Rafalshi 和 Tingey (1993)提出。SSR 即简单重复序列,短串联重复或称简单序列长度多态性,它是由基因组中的二核苷酸、三核苷酸和四核苷酸的简单串联重复 DNA 序列。SSR 的标记属于共显性标记,符合孟德尔方式的分离和遗传规律,标记的数量是无限的;每个位点上有许多等位形式;带型简单,客观明了;既可用于探针,又能通过 PCR 快速扩增(马义勇和李殿申, 2005)。运用 SSR 标记技术对胡萝卜和川西獐牙菜体细胞杂种的叶绿体 DNA 分析表明,杂种细胞中双亲叶绿体基因组随机分离并发生重组(李子东等, 2005)。

4.3.2 5S rDNA 间隔序列分析 5S rDNA 在至今研究的所有真核生物中是以串联重复单位组成的,属简单多基因家族,120 bp 的编码区之间是随不同生物而长度不同的非转录间隔区。高等植物的间隔序列长度在 90~400 bp 之间,同一属的不同种植物之间以及同一种植物之间间隔序列的碱基序列和长度不同。以保守的 5S rDNA 编码区的一致序列为基础设计 PCR 引物,用来选择性扩增变异较大的非转录间隔区,以区别融合双方的核基因组,据此可进行体细胞杂种的鉴定。Cheng 等 (2004)曾运用 5S rDNA 间隔序列分析对 *Triticum aestivum* L 和 *Agropyron elongatum* 的体细胞再生植株和愈伤组织进行鉴定。5S rDNA 间隔序列分析操作方便,重复性好,在生长发育的各个时期均能检测,所需 DNA 量少,是一种分子水平上鉴定体细胞杂种的好方法。但由于此法检测的基因组位点数目较少,可与其它分子检测技术如 RAPD、RFLP 等相结合,对体细胞杂种中的异源基因作出更精确、更全面的定位与分析(周爱芬等, 1990)。

4.3.3 ISSR 标记技术 ISSR 利用植物基因组中常出现的 SSR 序列本身设计引物,无需克隆和测序。ISSR 引物通常是一段长度在 15~20bp 左右的一段简单重复序列,扩增产物则为满足扩增子的 SSR 之间的 DNA 区域。Redblush 和 Duncan grapefruit 的原生质体对称融合得到了再生植株,采用不同的引物运用 ISSR 标记技术鉴定它的本质(Scarano 等, 2002)。

4.4 以单核苷酸为基础的分子标记

同一位点的不同等位基因之间常常只有一个或几个核苷酸的差异,因此在分子水平上对单个核苷酸的差异进行检测是很有意义的。目前 SNP 作为一种新的分子标记,已有 2000 多个标记定位于人类染色体上,在植物上也在进行开发研究。

5 讨论

理想的遗传标记应具备多态性高、重复性高、稳定遗传、能检测整个基因组、不受内外环境的影响、操作经济等特征。相比之下,形态学标记、细胞学标记和生化标记的多态性较低、信息量小,它们都是以基因表达的结果为基础,是对基因的间接反映,而基因表达过程本身包含着内外环境与基因之间的相互作用。DNA 分子标记是 DNA 水平上遗传变异的直接反映,它们是最能稳定遗传的,且可遍及整个基因组。因此, DNA 分子标记具有信息量大,多态性高,许多多态性标记在非编码区,不影响目标性状的表达,与不良性状无必然的连锁遗传现象,不受内外环境(组织类别、发育时期等)的干扰,与基因表达与否无关,检测迅速,操作简便等优点。DNA 分子标记是目前最为理想的分子标记,被广泛应用于作物杂种的研究中。

然而, DNA 分子标记技术本身也存在着缺点和不

足 如各类分子标记的应用很不平衡,以 RAPD 为最多, RFLP 其次 AFLP 最少。而 RAPD 技术本身不稳定,只有转化为 STS 或 SCAR 才能应用。随着分子生物学的发展, DNA 分子标记将在作物杂种研究上取得更加长足的进步,使种质资源的研究、分子遗传图谱的构建日趋成熟,使遗传群体、基因标记以及基因文库得到充分利用,使绝大多数性状基因得到准确定位,并利用图位克隆技术克隆重要性状基因,加快作物遗传学研究和遗传改良的进程。

参考文献

- [1] 陈春丽,郭文武,邓秀新.染色体原位杂交技术与植物体细胞杂种遗传鉴定[J].华中农业大学学报 2002 21(2): 189-194.
- [2] 张明,曹家树.染色体原位杂交技术[J].植物生理学通讯, 2000, 36(6): 544-549.
- [3] Itoh K, Iwabuchi M, Shimamoto K. In situ hybridization with species specific DNA probes gives evidence for asymmetric nature of Brassica hybrids obtained by X-ray fusion[J]. Theor Appl Genet, 1991, 81: 356-362.
- [4] Wang J, Xiang F N, Xia G M. Agropyron elongatum chromatin localization on the wheat chromosomes in an introgression line[J]. planta (Berlin), 2005, 221(2): 277-286.
- [5] Wolters A M A, Schoenmakers H C H, Kamstra S, et al. Mitotic and meiotic irregularities in somatic hybrids of *Lycopersicon esculentum* and *Solanum tuberosum*[J]. Genome 1994, 37: 726-735.
- [6] Trabelsi S, Gargoum Bouzid R, Vedel F, et al. Somatic hybrids between potato *Solanum tuberosum* and wild species *Solanum vemei* exhibit a recombination in the plastome[J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 2005, 83(1): 1-11.
- [7] 向凤宁,冯保民,夏光敏,等.小麦与高冰草体细胞杂种 F2 代的性状和蛋白质组分[J].植物学报, 2001, 43(3): 232-237.
- [8] Cheng A X, Xia G M, Zhi D Y, et al. Intermediate fertile *Triticum aestivum* (+) *Agropyron elongatum* somatic hybrids are generated by low doses of UV irradiation[J]. Cell Research, 2004, 14(1): 86-91.
- [9] 吴俊,魏钦平,束怀瑞,等.分子标记及其在果树种质资源研究中的应用[J].安徽农业大学学报 2002 29(2): 158-162.
- [10] Williams J G K, Kubelik A R, Livak K J et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers[J]. Nucleic Acids Research 1990 18(22): 6531-6535.
- [11] Sigareva M A, Earle E D. Camalexin induction in intertribal somatic hybrids between *Camelina sativa* and rapid-cycling *Brassica oleracea*[J]. Theor Appl Genet, 1999 98: 164-170.
- [12] Caetano-Anolles D, Bassam B J, Gresshoff P M. DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers[J]. Biotechnology, 1991, 9: 553-557.
- [13] Wu J H, Ferguson A R Mooney, Pauline A. Allotetraploid hybrids

- produced by protoplast fusion for seedless triploid Citrus breeding[J]. Euphytica 2005 141(3): 229-235.
- [14] Welsh J, McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers[J]. Nucleic Acids Res, 1990, 18: 7213-7218.
 - [15] Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) anchored polymerase chain reaction amplification[J]. Genomics 1994, 20: 176-183.
 - [16] Gupta M, Chyi Y S, Romero-Severson J, et al. Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genome using single primers of simple sequence repeats[J]. Theor. Appl. Genet, 1994, 89: 998-1006.
 - [17] 惠志明,刘凡,简元才,等.原生质体非对称融合获得花椰菜与 Oga CMS 甘蓝型油菜种间杂种[J].华北农学报, 2006, 21(3): 65-70.
 - [18] Paran I, Michelmore R W. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce[J]. Theor Appl Genet, 1993, 85: 985-993.
 - [19] 李映,蔡兴奎,李林章,等.马铃薯体细胞杂种的青枯病抗性鉴定[J].中国马铃薯 2005, 19(4): 198-200.
 - [20] Vos P, Hogers R, Bleeker M, et al. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Res[J]. Theor Appl Genet, 1995, 23: 4407-4414.
 - [21] Brewer E P, Saunders J A, Angle J, Scott, et al. Somatic hybridization between the zinc accumulator *Thlaspi caerulescens* and *Brassica napus*[J]. Theor Appl Genet, 1999 99: 761-771.
 - [22] LI G, QUIROS C F. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), A new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in *Brassica*[J]. Theor Appl Genet, 2001, 103: 455-461.
 - [23] FERRIOL M, PICO B, NUEZ F. Genetic diversity of some accessions of *Cucurbita maxima* from Spain using RAPD and SBAP markers[J]. Genetic Resources and Crop Evolution 2003, 50(3): 227-238.
 - [24] 张献龙,孙玉强,吴家和,等.棉花细胞工程及新种质创造[J].棉花学报, 2004, 16(6): 368-373.
 - [25] HU J, VICK B A. Target region amplification polymorphism: A novel marker technique for plant genotyping[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2003, 21: 289-294.
 - [26] Rafalski J A, Tingey S V. Genetic diagnostics in plant breeding: RAPDs, microsatellite and machines[J]. Trends Genet, 1993, 9: 275-279.
 - [27] 马义勇,李殿申.玉米分子标记的研究进展[J].杂粮作物 2005, 25(6): 353-355.
 - [28] 李子东,邵菲,蔡云飞,等.胡萝卜与川西獐牙菜不对称体细胞杂种的核质基因组特征[J].植物生理与分子生物学报 2005, 31(3): 254-260.
 - [29] 周爱芬,徐春晖,向凤宁,等.应用 5S rDNA 间隔序列分析鉴定体细胞杂种[J].生物工程学报, 1990, 15(14): 529-531.
 - [30] Scarano M T, Abbate L, Ferrante S, et al. ISSR-PCR technique: A useful method for characterizing new allotetraploid somatic hybrids of mandarin[J]. Plant Cell Reports, 2002, 20(12): 1162-1166.

Genetic Markers for Somatic Hybrid Identification in Crop

ZHANG Yu, ZHAO Yun-yun

(College of Life Science Capital Normal University, Beijing 100037, China)

Abstract: The principles and characters of four kinds of genetic markers were emphasized, and their applications in somatic hybrid identification were summarized in this paper.

Key words: Somatic hybrid; Genetic markers