

ISSR 分子标记技术及其在蓖麻遗传育种中的应用

王超^{1,2}, 张智勇^{2,3}, 陈永胜^{2,4}, 栾世慧^{1,2}, 王文跃^{1,2}, 邵志敏^{1,2}, 尚雨丝^{1,2}

(1. 内蒙古民族大学农学院, 内蒙古 通辽 028042; 2. 内蒙古自治区高校蓖麻产业研究中心, 内蒙古 通辽 028042; 3. 内蒙古通辽市农业科学院, 内蒙古 通辽 028000; 4. 内蒙古民族大学生命科学学院, 内蒙古 通辽 028042)

摘要:介绍了内部简单重复序列多态性(Inter-simple sequence repeat, ISSR)分子标记技术的原理及特点, 综述了 ISSR 技术在研究遗传多样性、亲缘关系及系谱分析、鉴定优良种质资源及构建遗传连锁图谱等应用进展, 指出了目前 ISSR 分子标记在蓖麻种质改良和辅助育种等应用研究领域存在的问题, 并提出今后的研究趋向。

关键词:ISSR; 蓖麻; 分子标记; 遗传育种

中图分类号:S565.6

文献标识码:A

文章编号:1002-2767(2012)09-0014-04

分子标记是遗传标记的一种, 能够直接反映 DNA 分子水平的遗传变异。分子标记是以生物大分子的多态性为基础的一种遗传标记。DNA 分子标记是基于 DNA 分子多态性建立起来的一类标记方法, 是指能反映生物个体或种群间基因组中某种差异特征的 DNA 片段。DNA 分子标记较高的可靠性、高效性和较好的精确性, 奠定了它广泛应用的基础。

目前用于种质资源鉴定和遗传育种研究的分子水平标记技术主要包括: 以 Southern 杂交为基础的限制性片段长度多态性(Restriction fragment length polymorphism, RFLP)标记等; 以 PCR 为基础的随机扩增多态性 DNA(Randomly amplified polymorphic DNA, RAPD)标记、扩增片段长度多态性(Amplified fragment length polymorphism, AFLP)标记、序列特征化扩增区域(Sequence characterized amplified regions, SCAR)标记和随机引物 PCR(Random primer PCR, RP-PCR)标记等; 以重复序列为基础的简单重复序列(Simple sequence repeat, SSR)标记

和简单重复序列多态性(Inter-simple sequence repeat, ISSR)标记等; 以 mRNA 为基础的表达序列标签(Expressed sequence tag, EST)、基因表达序列分析(Serial analysis of gene expression, SAGE)和序列标签位点(Sequence tagged site, STS)等; 以单核苷酸多态性为基础的单核苷酸多态性(Single nucleotide polymorphism, SNP)标记等。

该文对 ISSR 分子标记技术的原理和特点做了简要介绍, 对其在植物, 特别是蓖麻遗传育种研究中的应用进行综述, 旨在指出目前研究中存在的问题, 并对 ISSR 标记技术在蓖麻研究中的应用前景进行展望。

1 ISSR 标记的原理和特点

ISSR(简单重复序列多态性)又称作锚定简单序列重复(Anchored simple sequence repeat, ASSR)或微卫星引物 PCR(microsatellite-primed PCR, MP-PCR), 该技术是 1994 年 Zietkiewicz 等^[1]提出的一种微卫星类分子标记技术。其来源于植物基因组中丰富的简单重复序列, 在微卫星序列的 3' 或 5' 端锚定 2~4 个随机核苷酸, 组成单引物进行重复序列间 DNA 的 PCR 扩增。在 PCR 反应中, 锚定引物可以引起特定位点退火, 导致与锚定引物互补的间隔不太大的重复序列间 DNA 片段进行 PCR 扩增。所扩增的 inter SSR 区域的多个条带通过聚丙烯酰胺凝胶电泳或者琼脂糖凝胶电泳得以分辨。

ISSR 标记技术操作简单、快速、高效, 不需要

收稿日期:2012-07-05

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30760123), (31160290); 教育部新世纪优秀人才支持计划资助项目(NCET-08-0870)

第一作者简介:王超(1987-), 男, 山东省龙口市人, 在读硕士, 从事作物分子生物学研究。E-mail: 15048514255@163.com。

通讯作者:陈永胜(1971-), 男, 内蒙古自治区通辽市人, 博士, 教授, 硕士研究生导师, 从事作物生物技术方面的研究。E-mail: 13754059963@163.com。

繁琐地构建基因文库、杂交和同位素显示的步骤;遗传多态性高,可同时提供多位点信息和揭示不同微卫星座位个体间变异的信息;采用的引物较长(17~24 bp),退火温度较高,因此引物具有更高的专一性,降低了条带的干扰,随之提高试验结果的可重复性;ISSR 标记为显性标记,符合孟德尔遗传规律;ISSR 标记技术结合了 RAPD 和 SSR 的优点,耗资少,模板 DNA 用量少。

2 ISSR 技术在植物研究中的应用

2.1 构建遗传连锁图谱与基因定位

遗传图谱研究目的是寻找足够的多态分子标记,从而将所有基因定位到特定染色体的特定区域。ISSR 技术因具有较高的准确性、重复性和高度多态性,并遍布在整个染色体上,可将特定 PCR 标记锚定在染色体的已知位置,而被广泛应用于绘制遗传连锁图谱和基因定位。Lu Jiangjie 等^[2]用细茎石斛和铁皮石斛的杂交 F_1 ,通过拟测交理论,包括 74 个 ISSR 引物在内的共 422 个引物构建基因图谱,细茎石斛图谱总长 1127.9 cM,共 17 个连锁群,165 条标记位点;铁皮石斛图谱总长 1 210.9 cM,19 个遗传连锁群,169 条标记位点。Zhang Fei 等^[3]利用 ISSR 技术与其它分子标记技术相结合,绘制了菊科植物‘雨落英’和‘奥运含笑’的连锁图谱。Chen Danwei 等^[4]利用 ISSR 和 AFLP 标记腊梅花 F_2 ,共标记了 84 个父本特异性条带 51 母本特异性条带绘制亲本基因连锁图谱,母本遗传图总长 2 417.8 cM,平均相邻间距 25.61 cM,最大相邻遗传间距 48.2 cM;父本连锁遗传距离 1 184.2 cM,平均相邻连锁间距 25.7 cM,最大相邻间距 49.0 cM。曹娴等^[5]用 ISSR 标记技术鉴定出草莓的一个与抗灰霉病基因连锁的标记 UFFa01H05,该标记与抗性基因间的遗传距离为 15.9 cM。

2.2 种质资源鉴定

种质资源是选育新品种的基础材料,包括各种植物的栽培种、野生种的繁殖材料以及利用这些繁殖材料人工创造的各种植物的遗传材料。种质资源鉴定评价的传统方法主要是通过植株观察和试验,这种方法会因外界环境因子的影响而出现偏差。而分子标记鉴定能较好地克服外界的影响。近年来,ISSR 标记技术已经广泛应用在小

麦、玉米、甘蓝、马铃薯和柑橘等植物的种质资源鉴定,并取得了较好的结果。例如,徐菲等^[6]应用 ISSR 标记将 33 个秋海棠属植物品种划分为 3 大聚类。He F 等^[7]应用 ISSR 技术和 RAPD 技术相结合,对 560 种拟南芥进行种群间多样性和遗传距离分析。LIU Benying 等^[8]以 8 个种群 134 份云南茶树资源为材料,应用 ISSR 标记方法,应用 Nei-Li 相似系数法估算了 134 个材料间的相似系数为 0.445~0.819,平均为 0.512,说明茶树资源间的遗传基础较宽。Prevost 等^[9]用 4 个 ISSR 引物,就区分开 30 多个马铃薯品种。

2.3 遗传多样性和系统进化关系

遗传多样性是生命系统的基本特性,包括种内两个隔离地理种群间及单个种群内个体间的遗传变异,是物种适应自然和发生进化的遗传基础。ISSR 标记可以有效地揭示种群间及种群内的遗传多样性,分析其系统分化规律,并研究群体多样性程度及遗传结构,了解基因频率发生的变化,为种源划分提供 DNA 分子水平上的依据。LIU Benying 等^[8]对云南茶树资源分析检测,共获得 475 条稳定的谱带,其中多态性谱带 470 条(占 98.9%),有效地说明了遗传多样性丰富。大厂茶等 8 个种群间的遗传相似系数介于 0.850~0.987,平均相似距离 0.92,表明不同种群间的遗传差异较小。Li Zuo 等^[10]分析了莲属的 87 个品种,包括 70 个中国观赏莲种,7 个泰国野生莲种、2 种美洲黄莲、8 个中国莲和美洲黄莲的杂交品种,遗传多态性达 91.2%。Cai Yu^[11]等利用 ISSR 技术研究 224 个麻疯树属品种,在 219 个中国品种中,扩增多态性条带占 75.15%,Nei 基因多态性指数为 0.19,平均香农信息指数为 0.292。Li Huiying 等^[12]利用 29 个 ISSR 引物研究了 95 个中国野生狗牙根品种的遗传多态性,特异性条带(242 条)占 97.6%,遗传相似系数 0.51~0.97。Ali Shahi-Gharahlar 等^[13]对 39 种樱桃属植物用 12 条引物共扩增出 151 条特异多样性条带,扩增多态率达 81.8%~100.0%,并发现欧洲甜樱桃和小果樱桃的相似率最低(0.04)。孙小琴^[14]等采用 ISSR 标记分析寒兰的遗传多样性,结果表明不同开花季节寒兰的遗传多样性存在明显差异。

3 ISSR 技术在蓖麻遗传育种中的应用

ISSR 分子标记是蓖麻品种鉴定和遗传多样性研究的有效手段,对蓖麻种质资源、遗传多样性与亲缘关系鉴定,以及在遗传育种等方面的研究都能起到重要的指导作用,进一步为蓖麻分子育种积累一定的理论基础及实践依据。

通过 ISSR 标记技术,王亚^[15]对单雌蓖麻材料做了分子水平的分析,以单雌蓖麻和两性蓖麻以及杂交后的 F₂ 群体为材料,初步得到了与蓖麻雌性控制位点紧密连锁的分子标记 UBC844₇₅₀。郑鹭^[16]通过对 81 份蓖麻品种的 ISSR 分析,共筛选出 20 条多态性较好的 ISSR 引物,扩增多态条带 252 条,多态条带比率(PPB)为 53.17%,遗传相似系数范围为 0.45~0.94。吕二锁^[17]对 33 个蓖麻材料,利用 4 条 ISSR 适宜引物进行 PCR 扩增,得到多态性条带 25 条,多态性条带百分率为 75.7%,表明 33 个供试材料具有丰富的多态性。并在此基础上研究了蓖麻不同亲本及 F₁ 间的遗传相似度和遗传距离。黄文霞^[18]等应用 ISSR 标记,对国内外 17 份蓖麻材料的亲缘关系进行分析,筛选出 11 条能扩增出清晰条带并具有多态性的引物,且这些引物共计扩增出 90 条 DNA 条带,平均每条引物扩增的 DNA 条带数为 8.18 条,其中,多态性 DNA 条带 57 条,占 63.33%。17 份蓖麻材料的遗传相似系数在 0.52~0.97,且明显分为 2 个大类群,遗传相似性相对较高。Bhaves^[19]用 5 条 ISSR 引物在 22 个蓖麻品种中共扩增出 47 条带,其中 32 条多态性条带,平均每条引物扩增 6.4 条,扩增条带数从 8~13 不等,扩增条带长度从 240~2 700 bp 不等。多态性水平从 33.3~100 不等,平均多态性水平为 68.1%,展现出丰富的遗传多样性。

4 存在问题及应用前景展望

综上所述,ISSR 分子标记作为多位点标记,已在蓖麻遗传多样性研究、亲缘关系及系谱分析、蓖麻品种和种质鉴定及遗传图谱构建和标记辅助育种等方面已取得较大进展。但同样也存在着一些技术缺陷。如 ISSR 标记大多数为显性标记,多数情况下不能提供检测位点的纯合与杂合状态。ISSR 的多态性低,绘制的遗传图谱饱和度和低和标记间距离大等。

ISSR 技术对研究蓖麻资源所能提供的 DNA 水平上的信息是有限的,因此应针对蓖麻生产中的突出问题,加强交流与合作,将分子标记与传统育种有机结合起来,开展 RFLP、AFLP、EST 和 SNP 等多种分子标记,将多种标记技术统一综合研究,筛选出多态性更高、稳定性更好的引物和探针,降低试验成本,解决分子标记研究与育种实践联系不密切等问题,从而加速蓖麻遗传改良的进程。

但与其它标记相比,ISSR 标记因其引物容易设计,同时引物较长,PCR 条件较为严谨,试验重复性强,操作过程简单,不需使用同位素,可以揭示高程度的 DNA 多态性等优点,而被广泛用于遗传多态性分析、种群研究、种质评估、优良种质和品种鉴定、遗传图谱构建、基因定位及系统学研究等诸多领域。对具有狭窄背景种质的指纹图谱具有极大的研究潜力,因此有理由相信,ISSR 技术在蓖麻遗传育种研究中具有广阔的应用前景。

参考文献:

- [1] Zietkiewicz E, Rafalski A, Lubuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat(SSR) anchored Polymerase chain reaction amplified[J]. Genome, 1994, 20: 176-183.
- [2] Lu Jiangjie, Zhao Hongyan, Suo Nana, et al. Genetic linkage maps of *Dendrobium moniliforme* and *D. officinale* based on EST-SSR, SRAP, ISSR and RAPD markers[J]. Scientia Horticulturae, 2012, 137(1): 1-10.
- [3] Zhang Fei, Chen Sumei, Chen Fadi, et al. A preliminary genetic linkage map of chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium*) cultivars using RAPD, ISSR and AFLP markers[J]. Scientia Horticulturae, 2010, 125(3): 422-428.
- [4] Chen Danwei, Chen Longqing. The first intraspecific genetic linkage maps of wintersweet [*Chimonanthus praecox* (L.) Link] based on AFLP and ISSR markers[J]. Scientia Horticulturae, 2010, 124(1): 88-94.
- [5] 曹炯. 草莓抗灰霉病基因定位及桦树种质资源多样性的 ISSR 分析[D]. 上海: 上海交通大学, 2011: 26-41.
- [6] 徐菲, 宣继萍, 郑玉红, 等. 秋海棠属植物种质亲缘关系的 ISSR 分析[J]. 西北植物学报, 2012, 32(3): 471-476.
- [7] He F, Kang D, Ren Y, et al. Genetic diversity of the natural populations of *Arabidopsis thaliana* in China[J]. Heredity, 2007, 99: 423-431.
- [8] LIU Benying, LI Youyong, TANG Yichun, et al. Assessment of Genetic Diversity and Relationship of Tea Germplasm in Yunnan as Revealed by ISSR Markers[J]. Acta Agronomica Sinica, 2010, 36(3): 391-400.
- [9] Prevost A, Wilkinson M J. A new system of comparing

- PCR Primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars[J]. Theor Appl Genet, 1999, 98(1): 107-112.
- [10] Li Zuo, Liu Xiuqun, Robert Wahiti Gituru, et al. Genetic diversity and classification of Nelumbo germplasm of different origins by RAPD and ISSR analysis[J]. Scientia Horticulturae, 2010, 125(4): 724-732.
- [11] Cai Yu, Sun Daokun, Wu Guojiang, et al. ISSR-based genetic diversity of *Jatropha curcas* germplasm in China[J]. Biomass and Bioenergy, 2010, 34(12): 1739-1750.
- [12] Li Huiying, Liu Li, Lou Yanhong, et al. Genetic diversity of Chinese natural bermudagrass (*Cynodon dactylon*) germplasm using ISSR markers[J]. Scientia Horticulturae, 2011, 127(4): 555-561.
- [13] Ali Shahi-Gharahlar, Zabihollah Zamani, Reza Fatahi, et al. Estimation of genetic diversity in some Iranian wild *Prunus* subgenus *Cerasus* accessions using inter-simple sequence repeat (ISSR) markers[J]. Biochemical Systematics and Ecology, 2011, 39(4-6): 826-833.
- [14] 孙小琴. 江西省野生寒兰的 ISSR 遗传多样性研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2011: 34-41.
- [15] 王亚. 蓖麻单雌性状的 ISSR 分析[D]. 太原: 山西大学, 2010: 22-34.
- [16] 郑鹭. 蓖麻种质资源鉴定评价及遗传多样性 ISSR 与 SRAP 分析[D]. 福建: 福建农林大学, 2007: 19-45.
- [17] 吕二锁. 蓖麻不同杂交组合的杂种优势和性状遗传表现的研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2011: 25-34.
- [18] 黄文霞. 蓖麻种质资源遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 西北农业学报, 2008, 17(1): 182-184.
- [19] Bhavesh B Gajeraa, Nitish Kumara, Amritpal S Singha, et al. Assessment of genetic diversity in castor (*Ricinus communis* L.) using RAPD and ISSR markers[J]. Industrial Crops and Products, 2010, 32(3): 491-498.

ISSR Molecular Marker Technique and Its Application in Genetic Breeding of Castor

WANG Chao^{1,2}, ZHANG Zhi-yong^{2,3}, CHEN Yong-sheng^{2,4}, LUAN shi-hui^{1,2}, WANG Wen-yue^{1,2}, SHAO Zhi-min^{1,2}, SHANG Yu-si^{1,2}

(1. Agriculture College of Inner Mongolia University For Nationalities, Tongliao, Inner Mongolia 028043; 2. Inner Mongolia Industrial Engineering Research Center of Universities for Castor, Tongliao, Inner Mongolia 028043; 3. Tongliao Academy of Agricultural Sciences, Tongliao 028015; 4. Life Science College of Inner Mongolia University for Nationalities, Tongliao, Inner Mongolia 028043)

Abstract: The principle and characteristics of the molecular marker techniques of inter-simple sequence repeat (ISSR) were described. The research of the ISSR molecule markers in the fields such as the research on genetic polymorphism, the analysis of genetic relationships and pedigrees, the identification of excellent germ plasms, the construction of genetic chain spectrums of a graph were summarized and the problems of the ISSR molecule markers that lied in the improvement of castor genes and auxiliary breeding at present were pointed out and the trend of future research was put forward.

Key words: ISSR; castor; molecular marker; genetic breeding

欢迎订阅 2013 年《中国稻米》杂志

《中国稻米》是由农业部主管, 中国水稻研究所主办, 全国农业技术推广服务中心等单位协办的全国性水稻科学技术期刊。设有“专论与研究”“品种与技术”“各地稻米”“综合信息”等栏目, 兼具学术性、技术性、知识性、信息性等特点。据《中国科技期刊引证报告》(核心版) 统计, 《中国稻米》2008 年的影响因子为 0.611, 2009 年为 0.422。2008 年度还有一篇文章被评为中国百篇最具影响的国内文章。适合水稻产区的各级技术人员及农业与粮食行政管理人员、科研教学人员和稻农阅读。本刊为双月刊, 标准大 16 开本, 单月 20 日出版。

每期定价 10.00 元, 全年 60.00 元, 公开发售, 邮发代码: 32-31, 国内刊号 CN33-1201/S, 国际统一刊号 ISSN 1006-8082, E-mail: zgdm@163.com, 网址: www.zgdm.net, 欢迎新老读者到当地邮局订阅, 也可直接到本刊编辑部订阅。

地址: 浙江省杭州市体育场路 359 号 邮政编码: 310006

电话(传真): (0571) 63370271, 63370368