

文章编号: 1003-8701(2007)05-0028-03

ISSR 标记的研究与应用

朴红梅, 李万良, 穆楠, 尹航

(吉林省农业科学院经信中心, 长春 130124)

摘要: 简单序列重复区间扩增多态性(Inter-simple sequence repeat, 简称 ISSR)是一种新型的分子标记。它直接对基因组 DNA 进行分析, 不受任何环境条件影响, 在遗传上多为共显性。在不同的发育阶段, 同一个体的任何体细胞所得的带型或指纹都是一样的, 并且符合孟德尔遗传规律。本文对 ISSR 在品种鉴定、遗传关系及遗传多样性分析、基因标签、植物基因组作图、指纹图谱的建立等方面作了简要概述。

关键词: ISSR; 分子标记; 品种鉴定

中图分类号: Q75

文献标识码: A

分子标记是以生物大分子的多态性为基础的遗传标记, 它能够反映植物在遗传物质 DNA 水平下的差异, 是植物遗传育种领域内一项新兴的技术。近年来, 人们发现了一种新型的分子标记- ISSR, 它是简单重复序列区间扩增(Inter-simple sequence repeats)。它直接对基因组 DNA 进行分析, 不受任何环境条件影响。在不同的发育阶段, 同一个体的任何体细胞所得的带型或指纹都是一样的, 并且符合孟德尔遗传规律。因此, ISSR 技术一经出现就引起了人们的高度重视。

1 ISSR 技术的原理与特点

简单序列重复区间扩增多态性(Inter-simple sequence repeat, 简称 ISSR)是一种新型的分子标记, 是由 Zietkiwicz(1994)等创建的一种简单序列重复区间扩增多态性分子标记。它的分子生物学基础是基因组中存在的简单序列(simple sequence repeat, 简称 SSR), 且具有同 SSR 一样丰富的多态性。ISSR 标记根据植物中广泛存在 SSR 的特点, 利用植物基因组中常出现的 SSR 本身设计引物, 无需克隆和测序。用于 ISSR-PCR 扩增的引物通常为 16~18 个碱基序列, 由 1~4 个碱基组成的串联重复和几个非重复的锚定碱基组成, 从而保证了引物与基因组 DNA 中 SSR 的 5' 或 3' 末端结合, 通过 PCR 反映扩增 SSR 之间的 DNA 片段。ISSR 技术是在 SSR 序列的 5' 或 3' 末端加上 2~4 个随机选择的核苷酸作为引物, 以引起特定序列位点的退火, 降低其他可能靶标退火的数目。因而避免了引物在基因组上的滑动, 可提高 PCR 扩增反映的专一性。测定过程中以锚定 SSR 寡聚核苷酸为引物, 以位于反向排列于 SSR 之间的 DNA 序列为基础进行 PCR 扩增, 用 17~22 个碱基的重复锚定引物扩增重复序列之间的片段, 而不是扩增 SSR 本身, 其在引物设计上比 SSR 技术简单得多, 不需知道 DNA 序列即可进行扩增, 又可以提示比 RAPD、SSR 更丰富的多态性。ISSR 典型的反映每个泳道可产生 20 多条带, 条带的多少取决于不同的物种和引物。例如: Nagoka 和 Ogihara 在小麦的 ISSR 标记研究中发现 ISSR 标记可获得几倍于 RAPD 标记的信息量。SSR 在真核生物中的分布非常普遍, 并且进化变异速度非常快, 因而锚定引物的 ISSR-PCR 可以检测基因组许多位点的差异。

ISSR 标记具有如下特点: ①ISSR 标记相对于其他标记方法更简便、快捷; ②ISSR 标记符合孟德尔遗传规律, 具有良好的遗传稳定性和多态性; ③遗传多态性高; ④无需知道任何靶标序列的 SSR 背景信息。

收稿日期: 2007-03-28

作者简介: 朴红梅(1978-), 女, 硕士, 主要从事农业信息研究。

在实验中, ISSR 引物可直接在基因组 DNA 中进行 PCR 扩增, 用琼脂糖或聚丙烯酰胺凝胶电泳检测, 无需预先知道基因组 DNA 中的任何序列信息即可检测, 扩增谱带丰富。ISSR 技术可以快速、高效、灵敏地检测出基因组 DNA 的多态性, 且具有良好的重复性, 操作简便、成本低, 更适合大样本的检测。ISSR 标记技术利用了基因组丰富的 SSR 序列信息, 与 SSR 相比, ISSR 不需要预先获知序列信息, 程序简化、成本降低; 同时与 RAPD 相比, ISSR 更具可靠性, 重复性高, 每个引物都能产生较高的多态性, 同时具备 RAPD 的简便、易操作等特点; 与 RFLP、AFLP 相比, ISSR 更快捷、稳定、成本较低、DNA 用量小、安全性较高。由于上述优点, ISSR 标记技术在种群遗传学、种质资源分类学与种系发生学等方面得到了迅速而广泛的应用。

2 ISSR 技术的应用

近年来 ISSR 开始应用于植物遗传分析的各个方面, 如品种鉴定、遗传关系及遗传多样性、基因标签、植物基因作图、指纹图谱的建立等方面的研究。

2.1 品种鉴定及分类

作物的性状大多属数量性状, 由多基因控制, 易受环境条件影响。利用传统形态学鉴定方法区分品种时间长, 费用高, 难度较大。现有的鉴定方法中, 同工酶和蛋白质电泳可检测的位点少, 蛋白质类型不多, 多态性水平低, 对同一作物不同品种不能进行有效的区分。RFLP 技术繁琐, 对操作人员、设备要求高; RAPD 可靠性较差, 难以在品种鉴定中广泛应用。ISSR 多态性水平高, 易于分析, 不受环境影响, 在品种鉴定中显示出巨大的应用潜力。ISSR 引物为重复序列, 由于重复序列在基因组中是变异最快的成分, 不受或很少受到自然选择的影响, 故其变异保留下来, 所以重复序列区域的多态性远高于基因区域的多态性, 这是 ISSR 标记多态性较高的原因所在。利用 ISSR 绘制品种(系)的指纹图谱, 作为品种(系)的特征性状建立种质资源档案库, 可用于鉴别品种(系)。由于 ISSR 容易检测出 DNA 多态性, 所以 ISSR 分析已广泛应用于各类作物的品种(系)间的鉴别和分类。

余爱丽等(2002)利用 ISSR 标记技术对甘蔗及其近缘属进行了分类。Potter 等仅用 1 个 ISSR 引物即可区分 15 个核桃品种。用 2 个 ISSR 引物组合可鉴定 31 个品种, 只有 2 个品种需要 3 个引物才能区分。Arnau 等用 1 个 ISSR 引物即可区分 30 个草莓变异植株。Luisa 使用的 ISSR 引物的任何 1 个均可区分 24 个梨品种。因此, ISSR 技术是一种可靠、快捷的分子标记技术, 可用于大规模 DNA 指纹分析。Fang 等用 ISSR 标记区分亲缘关系很近的柑橘品种。Prevost 等仅用了 4 个 ISSR 引物就将 30 多个马铃薯品种区分开来。

2.2 亲缘关系

ISSR 技术也可用于种群内、种群间和物种间的研究。邱英雄等利用 ISSR-PCR 方法对杨梅的 7 个品种和 2 个无性系后代进行了基因组多态性分析, 选用 11 个引物扩增出 116 个 DNA 片段, 其中 48 个片段呈现多态性, 占总扩增片段的 41.4%, 并通过聚类分析将杨梅 7 个品种和 2 个无性系后代分为 3 类, 引物 ISSR16 和 ISSR20 相结合能够区分杨梅的全部品种和无性系后代, 依据扩增结果进行遗传距离分析, 构建了分子树状图。Gulsen 等的研究表明, 枸橼对于柠檬基因组形成有相当大的贡献。Fang 等用 10 个 ISSR 引物分析了柑橘 35 个种之间的亲缘关系, 将这 35 个种分为 5 个类群, 由 ISSR 标记所得到的分类结果和前人研究结果一致。何予卿等(2000)利用 ISSR 分子标记对 37 份栽培稻和野生稻的亲缘关系进行了分析, 结果栽培稻与野生稻的亲缘关系体现出栽培稻是由普通野生稻分化而来, 而普通野生稻是从南向北逐渐分化的。Luis 等通过对 28 个李品种的 AFLP 和 ISSR 分析表明, 这两种标记所得到的李品种亲缘关系的聚类图很相似。Huang 等用 ISSR 和 4 个叶绿体 DNA 非编码区的性位点变异来研究 40 个甘薯属样品的遗传多样性和种内关系, 测试的 15 个 ISSR 引物在所有的样品中共产生了 2 071 个片段, 平均每个样品扩增出了 52 条带。这些 ISSR 扩增片段在所研究的 40 个样品中具有较高的多态性(62.2%)。ISSR 技术可检测到甘薯属样本中较多的遗传变异, 同时对比 ISSR 技术与核基因 DNA 限制性分析对甘薯属样品的检测结果表明, ISSR 技术分析种间和种内的遗传关系。

2.3 遗传多样性分析

同一基因型在不同的环境条件下可发育出不同的形态或生理特征,而相同的形态又可能涉及不同的基因型。表型变异若没有经过遗传分析确证,严格地讲不能称为遗传多样性。ISSR 是对物种的基因组进行多态性分析,从而避免了环境和分析位点的限制。李海生等用 ISSR 标记技术对分布于海南岛的海南海桑的 4 个种群共 33 个个体进行了遗传变异分析,用 11 个引物共扩增出 166 条带,其中 142 条具多态性,多态位点百分率为 85.54%,在种群水平上多态位点百分率为 14.46%~80.12%,平均为 46.24%,海南海桑遗传变异发生在种群内个体间的占 75.89%,24.11%的遗传变异发生在种群间。葛永奇等用 13 个引物对银杏 5 个群体共 66 个样品进行扩增,其中多态位点百分率为 70.45%。分析结果表明:与其他裸子植物相比,银杏具有丰富的遗传变异。Lanham 等对醋栗的 ISSR 分析研究表明,醋栗次级基因库遗传变异丰富,可运用于早期育种计划。Moreno 等在葡萄中用 12 个 ISSR 引物,2 种电泳方法均不能在 Gar-nacha 的 12 个变异单株检测到多态性,说明这些单株尽管来源不同,表型发生变化,其基因本质并未发生很明显的分化。Eiadthong 等通过对 13 个泰国果品种 ISSR 分析表明,其中 2 个和其他品种关系较远,而另外 11 个品种可分为 3 个。Jian 等应用 ISSR 技术研究了来自华南地区的 6 个自然种群的红树植物银叶树(*Heritiera littoralis*)的遗传多样性,采用 11 个 ISSR 引物,共检测到 119 个位点,其中 95 个位点具有多态性,多态位点百分率达 83.19%,总的基因多样性为 0.232 7,基因分化系数为 0.239 3,种群间的遗传相似性平均为 0.918 9,表明银叶树在物种水平上有较高的遗传变异,其大部分遗传变异发生在种群内。Blair 等发现 ISSR 技术中每个 PCR 反应均产生足够多的多态性条带来区分 59 个水稻变种,所有的遗传多样性,同时能区分水稻栽培品系、亚种基因型及检测每亚种间的多态性水平。廖文芳等利用 ISSR 标记对华木莲的遗传多样性进行了研究,利用 10 个引物进行扩增,扩增结果显示,多态性 DNA 带只占总扩增带的 14.2%。与物种的遗传多样性平均水平、同科的其它种类以及其它物种植物相比,华木莲的遗传多样性极低。Nagaoka 等用 100 个引物对小麦进行 ISSR-PCR 分析,共有 33 个引物扩增出清晰可辨的 DNA 片段,其中(AC)_n引物扩增出最多的带型,并且进一步证明 ISSR 用于估测小麦的基因型是非常可靠的。

3 展望

ISSR 标记利用在植物基因组中经常出现的重复序列本身设计引物,无需预先克隆和测序,降低了开发费用,并且可以在不同物种间通用,不像 SSR 标记具有较强的种属特异性;与 RAPD 和 RFLP 相比,ISSR 揭示的多态性较高,可获得几倍于 RAPD 的信息量,精确度可与 RFLP 相媲美,因而是一种非常有发展前途的 DNA 指纹技术。指纹技术的发展是无止境的,目前正朝着多引物、长引物、通用引物方向发展,今后应一方面加强经典 DNA 指纹技术的改进,一方面加速新型 DNA 指纹技术的开发,在此基础上建立一套完善的 DNA 指纹鉴定体系,实现 DNA 指纹鉴定的简单化、自动化和商业化。

参考文献:

- [1] 宣继萍,等. 适合于苹果的 ISSR 反应体系的建立[J]. 植物生理学通讯, 2002, 38(6): 549-550.
- [2] 张立荣,等. SSR 和 ISSR 分子标记及其在植物遗传育种中的应用[J]. 河北农业大学学报, 2002(1): 90-94.
- [3] 张立荣,等. 小麦 ISSR 分析初探[J]. 河北农业大学学报, 2004, 27(1): 10-13.
- [4] 易克,等. 利用 SSR 和 ISSR 标记技术构建西瓜分子遗传图谱[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2003, 29, (4): 333-337.
- [5] 谢佳燕,等. ISSR 标记技术及其在遗传多样性研究中的应用[J]. 兽类学报, 2004, 24(1): 71-77.
- [6] 王心宇,等. ISSR 标记在小麦指纹图谱分析中的应用研究初探[J]. 农业生物技术学报, 2001, 9(3): 261-263.
- [7] 钱韦,等. 采用 RAPD 和 ISSR 比较标记探讨中国疣粒野生稻的遗传多样性[J]. 植物学报, 2002, 42(7): 741-750.
- [8] 李进波,等. 12 个水稻光温敏核不育系的 ISSR 标记鉴定及遗传分析[J]. 中国农学通报, 2002, 18(1): 6-9.
- [9] 邱英雄,等. 杨梅不同品种的 ISSR 分析[J]. 农业生物技术学报, 2002, 10(4): 343-346.
- [10] 何予卿,等. 利用 ISSR 分子标记研究栽培稻和野生稻的亲缘关系[J]. 农业技术生物学报, 2001, 9(2): 123-127.
- [11] 葛永奇,等. 子遗植物银杏群体遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 生物多样性, 2003, 11(4): 276-287.