

ISSR 分子标记及其在植物遗传学研究中的应用

王建波

(武汉大学植物发育生物学教育部重点实验室, 武汉 430072)

摘要: ISSR 分子标记是在 SSR 标记基础上发展起来的一种新技术, 其基本原理是在 SSR 的 5' 或 3' 端加锚 1~4 个嘌呤或嘧啶碱基, 然后以此为引物, 对两侧具有反向排列 SSR 的一段基因组 DNA 序列进行扩增。重复序列和锚定碱基是随机选择的, 扩增产物经聚丙烯酰胺或琼脂糖凝胶电泳分离后, 每个引物可以产生比 RAPD 方法更多的扩增片段, 因此, ISSR 标记是一种快速、可靠、可以提供有关基因组丰富信息的 DNA 指纹技术。ISSR 标记呈孟德尔式遗传, 在多数物种中是显性的, 目前已广泛用于植物品种鉴定、遗传作图、基因定位、遗传多样性、进化及分子生态学研究。

关键词: 分子标记; ISSR; 植物; 应用

中图分类号: Q953

文献标识码: A

文章编号: 0253-9772(2002)05-0613-04

ISSR Markers and Their Applications in Plant Genetics

WANG Jian-bo

(Key Laboratory of MOE for Plant Developmental Biology, Wuhan University, Wuhan 430072, China)

Abstract: Recently, inter-simple sequence repeat (ISSR) markers have emerged as an alternative system with reliability and advantages of microsatellites (SSR). The technique involves amplification of genomic segments flanked by inversely oriented and closely spaced microsatellite sequences by a single primer or a pair of primers based on SSRs anchored 5' or 3' with 1-4 purine or pyrimidine residues. The sequences of repeats and anchor nucleotides are arbitrarily selected. Coupled with the separation of amplification products on a polyacrylamide or agarose gels, ISSR amplification can reveal a much larger number of fragments per primer than RAPD. It is concluded that ISSR technique provides a quick, reliable and highly informative system for DNA fingerprinting. ISSR markers are inherited in Mendelian mode and segregated as dominant markers. This technique has been widely used in the studies of cultivar identification, genetic mapping, gene tagging, genetic diversity, evolution and molecular ecology.

Key words: molecular markers; ISSR; plant; applications

20 世纪 60~70 年代以来, 同工酶(等位酶)作为一种基因的直接产物而被广泛用作遗传标记^[1]。80 年代以来, 随着分子遗传学技术的发展, 人们将目光投向直接基于 DNA 的分子标记, 特别是随着大量限制性核酸内切酶的成功分离和提纯, 基于 DNA 杂交的限制性片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism, RFLP)技术受到密切关注, 并被广泛用于遗传作图、基因标记、系统与进化等研究领域^[2]。

90 年代以来, 由于 PCR 技术的出现, 基于 PCR 技术的

分子标记, 如随机扩增多态性 DNA(random amplified polymorphic DNA, RAPD)、微卫星(microsatellite)或称简单序列重复(simple sequence repeat, SSR)、扩增片段长度多态性(amplified fragment length polymorphism, AFLP)等受到广泛重视和应用。SSR 技术根据微卫星序列两侧的保守序列设计引物, 对串联重复的微卫星序列进行 PCR 扩增, 结果可以显示出微卫星序列拷贝数的差异, 该技术重复性和稳定性都较好, 被广泛用于遗传作图、种质鉴定等研究中^[3], 但由于 SSR 两侧引物具有物种特异性, 具体实验中引物设计费时耗

收稿日期: 2001-11-23; 修回日期: 2002-01-14

基金项目: 国家自然科学基金(30170063, 30170177)资助

作者简介: 王建波(1964-), 男, 河南新郑人, 博士, 教授, 专业方向: 植物进化发育遗传学。Tel: 027-87682213, E-mail: jbwang@whu.edu.cn

力,要检测多个基因座是不现实的,这在一定程度上阻碍了该技术的广泛应用^[4]。AFLP 技术是一种选择性扩增限制性片段的方法,它结合了 RFLP 和 PCR 的优点,又不需要使用同位素,具有比 RFLP 和 RAPD 更大的优越性,已广泛用于基因鉴定、基因作图、基因表达、遗传多样性等方面,是一种比较好的分子标记^[5]。

近几年人们又发展了一种新的分子标记,即简单重复间序列(inter-simple sequence repeat, ISSR)标记^[6]。该技术以加锚 SSR 寡聚核苷酸作引物,对位于反向排列的 SSR 之间的 DNA 序列进行 PCR 扩增,而不是扩增 SSR 本身,它在引物设计上比 SSR 技术简单得多,不需知道 DNA 序列即可用引物进行扩增,又可以揭示比 RFLP、RAPD、SSR 更多的多态性,现已在遗传作图、基因定位、遗传多样性、进化、系统发育等研究方面被广泛应用^[7~27],下面对 ISSR 技术的原理、操作及其在植物遗传、进化等领域的应用进行简要介绍。

1 ISSR 技术的原理

基因组中分布有大量的重复序列,根据其在基因组中的含量可将其分为轻度、中度和高度重复序列,根据其分布特征可分为散在重复序列和串联重复序列,微卫星(即 SSR)是一种高度串联重复序列,重复基序仅 2~6bp,分布于常染色体区,是真核生物基因组重复序列的主要组成部分,均匀分布于基因组中^[3]。正是基于基因组的这种特点,才出现了 SSR 和 ISSR 技术。ISSR 技术的基本原理就是在 SSR 的 3' 或 5' 端加锚 1~4 个嘌呤或嘧啶碱基,然后以此为引物,对两侧具有反向排列 SSR 的一段 DNA 序列进行扩增,然后进行电泳、染色,根据谱带的有无及相对位置,来分析不同样品间 ISSR 标记的多态性。ISSR 技术的原理和操作与 SSR、RAPD 非常相似,只是引物设计要求不同,但其产物多态性远比 RFLP、SSR、RAPD 更加丰富,可以提供更多的关于基因组的信息,而且比 RAPD 技术更加稳定可靠,实验重复性更好^[8~11]。

2 ISSR 技术实验操作

与其他基于 PCR 技术的分子标记方法一样,ISSR 技术也主要包括 DNA 提取、PCR 扩增、电泳检测、观察结果及统计分析等步骤。

2.1 DNA 提取

可采用常规方法提取用于 ISSR 分析的 DNA 样品,如 SDS 法或 CTAB 法。虽然不需要用试剂盒对所提取的 DNA 进行纯化,但仍需对 DNA 样品进行电泳,检测其质量,并用分光光度计检测 DNA 与蛋白质之比值。用无菌水将 DNA 稀释到 10 ng/ μ l 的浓度,贮存在 -20℃ 或 -70℃ 冰箱中备用。

2.2 引物设计

引物设计是 ISSR 技术中最关键、最重要的一步。基因

组中 SSR 一般为 2~6 寡聚核苷酸,用于 ISSR 的引物常为 5' 或 3' 端加锚的二核苷酸、三核苷酸、四核苷酸重复序列,重复次数(n)一般为 4~8 次,使引物的总长度达到 20bp 左右。5' 或 3' 端用于锚定的碱基数目一般为 1~4 个,锚定的目的是引起特定位点退火,使引物与相匹配 SSR 的一端结合,而不是中间,从而对基因组中特定片段进行扩增、检测。

目前已发现扩增结果与引物序列有密切关系。植物基因组中最多的 SSR 是 (AT) n 、(TA) n 、(GA) n 、(CT) n 等二核苷酸重复序列^[12],因此,ISSR 技术中所用的引物以与上面序列互补的加锚二核苷酸重复序列为主,寡聚三核苷酸、四核苷酸引物用得较少。另一方面,虽然 ISSR 引物为通用引物,不像 SSR 引物那样需根据物种基因组特征合成引物,但研究中仍发现不同植物类群中,能够扩增出带纹的引物存在较大差异,如 Ammiraju 等使用 100 个引物对小麦基因组进行扩增,55 个引物能扩增出带纹,产生多态带纹最多的是二核苷酸引物 (CT) n 、(GA) n 、(CA) n 和一个三核苷酸引物 (GTT) n ,而且大多数引物是在 3' 端加锚,只有 (AT) n 引物是在 5' 端加锚,3' 加锚的 (AT) n 引物没有扩增产物,表明加锚的位置直接影响到扩增结果^[13]。Moreno 等在葡萄、Blair 等在水稻的实验中则发现,5' 端加 3 个碱基锚定的引物产生较多的带纹,而 3' 端加锚的引物产生较少的带纹^[8,12]。Ratnaparkhe 等的研究也表明改变锚定碱基的位置和序列可以提供基因组的重要有用信息^[14]。在柑橘^[15]、水稻^[8]、欧洲栗^[16]中发现 (AT) n 引物均无扩增产物,而 (CA) n 、(GA) n 引物可以产生较多的多态带纹。另一方面,在玉米中发现三核苷酸引物,如 (GCT) n 、(AGG) n ,比二核苷酸引物产生更多的多态位点^[17]。也有研究者应用一对不同引物,如 (CA) n + (AC) n 、(TG) n + (GT) n 等,这些引物不仅能扩增出单引物所产生的全部带纹,而且常有新的 DNA 片段被扩增出来^[12]。

2.3 扩增反应

在确定了引物之后,就可以在 PCR 仪上对基因组中的 SSR 间序列进行扩增了。扩增步骤与 RAPD 技术相似,但不同引物、不同植物材料的扩增条件存在差异,需通过预备实验对 25 μ l 反应液中的引物 (0.2~0.8 μ mol/L)、DNA 模板 (5~50 ng) 浓度、Tag 酶 (0.4~1.0 U)、pH (8.3~9.0)、变性温度、复性温度、热循环程序等进行优化,以获得清晰、可重复、宜统计的带纹。

2.4 电泳及染色

PCR 产物需经电泳分离、染色显示后才能进行谱带观察、统计。目前 DNA 分离中所用的电泳介质都可用于 ISSR 扩增产物的分离,琼脂糖浓度常用 1.5%~2.0%,聚丙烯酰胺常用浓度为 6%,后者的分离效果通常更好。用硝酸银或溴化乙啶 (EB) 染色后,在可见光 (银染) 或紫外光 (EB 染色) 下进行观察,统计带纹的有 (计为 1) 或无 (计为 0) 及相对位置,然后即可根据研究目的,应用相关软件进行分析。

3 ISSR 技术的应用

ISSR 技术由于引物较长,退火温度较高,这就增强了实验的可重复性,同时实验操作简单、快速、高效,不需要繁琐的构建文库、设计引物、杂交、同位素显示等步骤,而且 ISSR 标记可以揭示整个基因组的一些特征,并呈孟德尔式遗传,因此该技术一问世就在植物遗传分析中得到了广泛应用。ISSR 标记一般是显性遗传的^[18,19],这在谱带统计和遗传分析中须引起注意。

3.1 遗传作图与基因定位

遗传作图研究的目的是寻求足够的多态分子标记,从而将所有基因座定位到特定染色体的特定区域,最好是在染色体步查(walking)距离内。由于 ISSR 标记可以揭示高度多态性,又遍布于染色体上,因此它是绘制遗传连锁图的理想标记,从 Kojima 等首先将 ISSR 标记用于一粒小麦遗传作图以来^[4],目前已用于桃^[9]、大麦^[20]、欧洲和日本落叶松^[21]、欧洲栗^[16]、欧洲草莓^[22]、柑橘^[23]等的遗传作图。

用 ISSR 标记作图一般分为 4 个主要步骤:(1)孟德尔分离比检测,确定 ISSR 标记遗传规律;(2)分子标记聚类;(3)在每一连锁群中,对分子标记进行排序;(4)亲本图之间同源搜索。(3)、(4)步可使用 MAPMARKER、JOINMAP 等软件完成^[16]。ISSR 遗传图还可以与同工酶、RFLP、RAPD 遗传图相互参照、相互补充,如在一粒小麦和柑橘中,ISSR 标记分布于整个染色体组,其在图上所处的位置与 RFLP 相似,并可在 RFLP 图上标记稀少的区域增加标记,使饱和度增加,分子标记间距离缩小^[4,23]。

小麦籽粒大小是一个复杂的性状,任何关于其遗传调控机制的信息都会使育种效率得以提高。若能鉴别与控制籽粒大小 QTL 连锁的分子标记,将有利于育种工作中进行早期选择,并最终积累这些提高小麦产量的标记。最近,Amiraju 等通过 ISSR 技术已找到了与小麦籽粒 QTL 连锁的分子标记,3 个标记与小种子性状连锁,4 个标记与大种子性状连锁,他们认为 ISSR 技术在寻找与控制农艺性状连锁的分子标记中将非常有用^[13]。目前还找到并定位了与抗枯萎病基因连锁的 ISSR 标记^[14,19]。

3.2 种质资源鉴定

ISSR 技术可以比 RFLP、SSR、RAPD 等技术更多地揭示基因组中的多态性,是一种很好的 DNA 指纹标记,因此,该技术在种质资源鉴定方面显示出比其他方法更高的优越性,目前涉及到的植物包括玉米^[17]、小麦^[24]、马铃薯^[25]、柑橘^[15]、羽扇豆^[11]、水稻^[8]、葡萄^[12]等,在马铃薯中,甚至 4 个引物即可对 34 个品种进行鉴别,其中有 2 个引物单独使用即可区分出所有品种,4 个引物中任何 2 个引物组合,扩增结果也呈现出品种特异性,并且全部检测工作可以在 9 h 内完成^[25],因此,ISSR 技术是一种快速、准确、可以产生足够多态位点的方法,可用于大规模 DNA 指纹分析,在植物种

质资源鉴别中将发挥越来越大的作用。

3.3 植物分类、进化及遗传多样性

Joshi 等用 ISSR 标记分析了稻属(*Oryza*)物种的遗传多样性和系统发育关系,研究材料包括稻属的 17 个野生种(基因组类型分别为 AA、BB、CC、EE、FF、GG、BBCC、CCDD 和 HHJJ)和 2 个栽培种(即亚洲栽培稻 *O. sativa* 和非洲栽培稻 *O. glaberrima*,基因组均为 AA),基于 ISSR 带纹数据的严格一致树显示稻属是多途径进化的,*O. brachyantha* (FF) 是分化程度最高的种,*O. australiensis* (EE) 没有归到 *Officinalis* 复合体中。ISSR 标记在研究稻属植物进化关系中非常有用^[26]。Huang 和 Sun 根据 ISSR 标记和 cpDNA 限制酶图谱分析,对番薯属(*Ipomoea*)进行了研究,发现 ISSR 标记可以产生丰富的多态位点,从而揭示种间、种内遗传变异情况,分别用这两种标记构建的番薯属系统树具有相似的拓扑结构,但 ISSR 标记的高多态性可以更好地区分种下分类群间的关系,他们认为最好是将这两种数据结合起来评价该属种间、种下亲缘关系^[27]。

杂交和基因渐渗在被子植物进化中起着非常重要的作用,特别是与多倍化过程相结合的时候。目前已有一些分子标记用于揭示异源多倍体物种的形成和进化^[28~30],但对二倍体或同倍性杂种的认识还不足 10 种植物^[31],主要困难是多倍体中亲本的遗传分化程度较高,容易通过分子生物学方法认识,而二倍体或同倍性杂种的亲本间亲缘关系较近,难以用同工酶、核及叶绿体基因组限制酶图谱、RAPD 等标记确定,而多态性丰富的 ISSR 标记则为这一问题的解决提供了契机,这在玄参科的钓钟柳属(*Penstemon*)和列当科的 *Hyobanche* 属中已有出色的研究工作^[31~33]。

综上所述,ISSR 标记因其引物容易设计,实验重复性强,操作过程简单,不须使用同位素,可以揭示更高层次的 DNA 多态性,从而在植物遗传研究中具有广阔的应用前景,但任何一种分子标记都不能解决所有问题,在今后的研究工作中,我们应根据自己的研究目的,选择合适的分子标记,或将不同标记结合起来进行综合研究。

参考文献(References):

- [1] Tanksley S D, Orton T J. Isozyme in Plant Genetics and Breeding, Part B[M]. Amsterdam: Elsevier, 1983, 1~373.
- [2] 顾红雅. 限制性片段长度多态性(RFLPs)分子标记在植物系统与进化研究中的应用[A]. 见: 陈家宽, 杨继主编: 植物进化生物学[M]. 武汉: 武汉大学出版社, 1994, 207~231.
- [3] 何平. 真核生物中的微卫星及其应用[J]. 遗传, 1998, 20: 42~47.
- [4] Kojima T, Nagaoka T, Noda K. Genetic linkage map of ISSR and RAPD markers in Einkorn wheat in relation to that of RFLP markers[J]. Theor Appl Genet, 1998, 96: 37~45.
- [5] 吴敏生, 戴景瑞. 扩增片段长度多态性(AFLP)——一种新的分子标记技术[J]. 植物学通报, 1998, 12(4): 36~40.

- [6] Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) — anchored polymerase chain reaction amplification[J]. *Genomica*, 1994, 20: 176~183.
- [7] Godwin I D, Aitken E A, Smith L W. Application of inter — simple sequence repeat (ISSR) markers to plant genetics[J]. *Electrophoresis*, 1997, 18: 1524~1528.
- [8] Blair M W, Panaud O, McCouch S R. Inter — simple sequence repeat (ISSR) amplification for analysis of microsatellite motif frequency and fingerprinting in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *Theor Appl Genet*, 1999, 98: 780~792.
- [9] Dirlwanger E, Pronier V, Parvery C, *et al.* Genetic linkage map of peach (*Prunus persica* L.) using morphological and molecular markers[J]. *Theor Appl Genet*, 1998, 97: 888~895.
- [10] Esselman E J, Li J Q, Crawford D J, *et al.* Clonal diversity in the rare *Calamagrostis porteri* ssp. *insperata* (Poaceae): comparative results for allozymes and RAPD and ISSR markers [J]. *Mol Ecol*, 1999, 8: 443~451.
- [11] Gilbert J E, Lewis R V, Wilkinson M J, *et al.* Developing an appropriate strategy to assess genetic variability in plant germplasm collections[J]. *Theor Appl Genet*, 1999, 98: 1125~1131.
- [12] Moreno S, Martin J P, Ortiz M. Inter — simple sequence repeats PCR for characterization of closely related grapevine germplasm[J]. *Euphytica*, 1998, 101: 117~125.
- [13] Ammiraju J S S, Dholakia B B, Santra D K, *et al.* Identification of inter simple sequence repeat (ISSR) markers associated with seed size in wheat[J]. *Theor Appl Genet*, 2001, 102: 726~732.
- [14] Ratnaparkhe M B, Santra D K, Tullu A, *et al.* Inheritance of inter — simpler — sequence — repeat polymorphisms and linkage with a fusarium wilt resistance gene in chickpea[J]. *Theor Appl Genet*, 1998, 96: 348~353.
- [15] Fang D Q, Krueger R R, Roose M L. Phylogenetic relationships among selected *Citrus* germplasm accessions revealed by inter — simple sequence repeat (ISSR) markers [J]. *J Amer Soc Horticult Sci*, 1998, 123: 612~617.
- [16] Casasoli M, Mattioni C, Cherubina, *et al.* A genetic linkage map of European chestnut (*Castanea sativa* Mill.) based on RAPD, ISSR and isozyme markers [J]. *Theor Appl Genet*, 2001, 102: 1190~1199.
- [17] Kantety R V, Zeng X, Bennetzen J. Assessment of genetic diversity in popcorn (*Zea mays* L.) inbred lines using inter — simple sequence repeat (ISSR) amplification[J]. *Mol Breed*, 1995, 1: 365~373.
- [18] Fang D Q, Roose M L. Inheritance of intersimple sequences repeat markers in *Citrus*[J]. *J Hered*, 1999, 90: 247~249.
- [19] Ratnaparkhe M B, Tekeoglu M, Muehlbauer F J. Inter — simpler — sequence — repeat (ISSR) polymorphisms are useful for finding markers associated with disease resistance gene clusters [J]. *Theor Appl Genet*, 1998, 97: 515~519.
- [20] Davila J A, Loarce Y, Ferrer E. Molecular characterization and genetic mapping of random amplified microsatellite polymorphism in barley[J]. *Theor Appl Genet*, 1999, 98: 265~273.
- [21] Arcade A, Anselin F, Faivre R P, *et al.* Application of AFLP, RAPD and ISSR markers to genetic mapping of European and Japanese larch[J]. *Theor Appl Genet*, 2000, 100: 299~307.
- [22] Cekic C, Battey N H, Wilkinson M J. The potential of ISSR — PCR primer — pair combinations for genetic linkage analysis using the seasonal flowering locus in *Fragaria* as a model[J]. *Theor Appl Genet*, 2001, 103: 540~546.
- [23] Sankar A A, Moore G A. Evaluation of inter — simple sequence repeat analysis for mapping in *Citrus* and extension of the genetic linkage map[J]. *Theor Appl Genet*, 2001, 102: 206~214.
- [24] Nagaoka T, Ogihara Y. Applicability of inter — simple sequence repeat markers in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers[J]. *Theor Appl Genet*, 1997, 94: 597~602.
- [25] Prevost A, Wilkinson M J. A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars[J]. *Theor Appl Genet*, 1998, 98: 107~112.
- [26] Joshi S P, Gupta V S, Aggarwal R K, *et al.* Genetic diversity and phylogenetic relationship as revealed by inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism in the genus *Oryza* [J]. *Theor Appl Genet*, 2000, 100: 1311~1320.
- [27] Huang J C, Sun M. Genetic diversity and relationships of sweetpotato and its wild relatives in *Ipomoea* series *Batatas* (Convolvulaceae) as revealed by inter — simple sequence repeat (ISSR) and restriction analysis of chloroplast DNA[J]. *Theor Appl Genet*, 2000, 100: 1050~1060.
- [28] Ainouche M L, Bayer R J. On the origins of the tetraploid *Bromus* species (section *Bromus*, Poaceae): insights from internal transcribed spacer sequences of nuclear ribosomal DNA [J]. *Genome*, 1997, 40: 730~743.
- [29] Doyle J J, Doyle J L, Brown A H D. Origin, colonization, and lineage recombination in a widespread perennial soybean polyploid complex[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 10741~10745.
- [30] 蔡从利, 王建波, 朱英国. 山羊草属异源多倍体基因组进化的 RAPD 分析[J]. *遗传学报*, 2001, 28: 158~165.
- [31] Wolfe A D, Xiang Q — Y, Kephart S R. Assessing hybridization in natural population of *Penstemon* (Scrophulariaceae) using hypervariable intersimple sequence repeat (ISSR) bands [J]. *Mol Ecol*, 1998, 7: 1107~1125.
- [32] Wolfe A D, Xiang Q — Y, Kephart S R. Diploid hybrid speciation in *Penstemon* (Scrophulariaceae) [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 5112~5115.
- [33] Wolfe A D, Randle C P. Relationships within and among species of the holoparasitic genus *Hyobanche* (Orobanchaceae) inferred from ISSR banding patterns and nucleotide sequences [J]. *Syst Bot*, 2001, 26: 120~130.