

# 新疆 8 个棉花品种(系)的指纹图谱分析

姜 伟<sup>1</sup>, 李雪源<sup>2</sup>, 何觉民<sup>1</sup>, 陆建农<sup>1</sup>

(1. 广东海洋大学 农业生物技术研究所, 广东 湛江 524088; 2. 新疆农业科学院粮食作物研究所, 新疆 乌鲁木齐 830091)

**摘要:** 利用 ISSR 对 8 个新疆品种(系)进行指纹图谱构建。通过基因组多态性分析, 从 60 条引物中筛选到 11 条扩增效果好的引物, 用其中 2 条引物 UBC809, UBC841 建立 8 个品种的指纹图谱, 统计品种鉴定的置信概率达到 1/8388608。结果显示, ISSR 分子标记技术对棉花品种的指纹图谱构建具有高效性和准确性。

**关键词:** ISSR 标记; 品种鉴定; 指纹图谱

中图分类号: S562.01 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2007)增刊-0089-04

## Fingerprinting Analysis for 8 Cultivars(Lines) of Xinjiang

JIANG Wei<sup>1</sup>, LI Xue-yuan<sup>2</sup>, HE Jue-min<sup>1</sup>, LU Jian-nong<sup>1</sup>

(Institute of Agricultural Biotechnology, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China;

2. Grain Crops Institute, Xinjiang Academy of Agricultural Science, Urumqi 830091, China)

**Abstract:** ISSR (Inter simple sequence repeat) markers were used to find reliable fingerprint to identify 8 cotton cultivars in this paper. A total of 60 primers being polymorphic and informative selected out of 11 ISSR markers localized in cotton genetic linkages. By genome screening and data analysis, an acceptable DNA fingerprint was constructed with 2 primers UBC809, UBC841 that could be used to identify these cotton cultivars with 1/8388608 of probability. The results indicated ISSR marker was effective highly and accuracy for identifying varieties of cotton.

**Key words:** ISSR marker; Identification; Fingerprint

种子鉴定传统上主要采用形态学、同工酶电泳和种子贮藏蛋白电泳等方法。形态学鉴定往往只能利用品种的外部性状特征, 且受环境条件的影响较大, 容易发生错误; 同工酶电泳和种子贮藏蛋白电泳由于同工酶的位点和种子贮藏蛋白的类型都很有限, 难以区分亲缘关系较近的材料<sup>[1]</sup>; 利用分子标记技术建立指纹图谱具有高度的基因型特异性, 结果易分析且稳定可靠, 可以准确地鉴定生物个体之间的差别, 是鉴别品种的有力工具<sup>[2,3]</sup>。王学德等<sup>[4]</sup>应用 AFLP 技术, 在 18 对引物的扩增片段中发现 52 处多态性, 获得了棕色棉“三系”及杂种 F<sub>1</sub> 的 DNA 指纹图谱。朱美霞等<sup>[5]</sup>通过 15 对 SSR 引物对 5 个棉花品种的检测和引物组合法检测, 发现 SSR 标记具有高效性、可靠性, 完全可以用于品种纯度的检测。

ISSR(Inter Simple sequence repeat) 是一种新型的分子标记, 该技术检测的是两个 SSR(Simple sequence

repeats) 之间一段短 DNA 序列上的多态性, 其技术原理和操作与 RAPD 相似, 不同之处在于其引物序列较长, 退火所需温度高, 因此具有重复性高、可靠性强且品种间多态性丰富等优点, 已广泛用于玉米<sup>[6]</sup>、水稻<sup>[7]</sup>、大豆<sup>[8]</sup>、小麦<sup>[9]</sup>、马铃薯<sup>[10]</sup>等作物的遗传图谱构建, 但有关棉花品种 ISSR 指纹图谱的构建尚未见报道。本研究旨在探讨利用 ISSR 技术对引自新疆的 8 个棉花品种(系)建立指纹图谱的可能性, 进而为今后利用该技术进行棉花品种鉴定、多样性评价、亲缘关系分析等提供分子水平上的可靠依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

8 个品种(系)分别为新陆中 7 号、军棉 1 号、新海 17、新海 18、新海 21、新海 22、长绒棉 203、中绒棉 205。

收稿日期: 2007-07-02

基金项目: 自治区高新技术项目“新疆棉花特异种质基因分子标记及辅助育种”200311101

作者简介: 姜伟(1975-), 男, 湖北浠水人, 硕士, 主要从事棉花育种方面的研究

通讯作者: 李雪源(1964-), 男, 研究员, 主要从事作物遗传育种研究工作。

## 1.2 方法

1.2.1 DNA 的提取 本实验室通过改良常规的 SDS 提取法<sup>[11]</sup>, 快速提取棉花基因组总 DNA。

1.2.2 PCR 反应及电泳 反应体系总体积为 25  $\mu$ L, 包括 10 $\times$  PCR Buffer( 含 200 mmol/L Tris-HCl, 2. 5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 500 mmol/L KCl, pH 8. 3) 2. 5  $\mu$ L, 2. 5 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 2  $\mu$ L, Taq 酶 ( 0. 5 U/ $\mu$ ) 2  $\mu$ L, 2. 5 mmol/L dNTP 1. 5  $\mu$ L, 模板 DNA (20 ng/ $\mu$ L) 2  $\mu$ L, 引物

( 33 ng/ $\mu$ L) 2  $\mu$ L, 加 ddH<sub>2</sub>O 至 25  $\mu$ L。

扩增程序参数为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 95 $^{\circ}$ C 变性 45 s, 50~ 56 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1. 5 min, 共进行 35 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min, 4 $^{\circ}$ C 终止反应。

PCR 产物在 5% 非变性聚丙烯酰胺凝胶 (30% 丙烯酰胺 6 mL, 5 $\times$  TBE 7 mL, 10% 过硫酸铵 250  $\mu$ L, TEMED 20  $\mu$ L, 水 24 mL) 上电泳分离、银染、读带后照相, 获得各个品种 (系) 的电泳谱带。

表 1 引物序列及多态性比较

Tab. 1 The sequence of primers used and their polymorphism

编号 No.	引物序列 (5' $\rightarrow$ 3') Primer sequence (5' $\rightarrow$ 3')	退火温度/ $^{\circ}$ C Annealing temperature	总条带/条 Total of bands	多态性带 Polymorphic bands	多态性百分率/% Percentage of poly-morphic bands
UBC808	(AG)8C	52	5	4	80. 0
UBC809	(AG)8G	56	13	10	76. 9
UBC811	(GA)8C	55	10	8	80. 0
UBC815	(CA)8T	52	7	5	71. 4
UBC824	(AC)8T	54	8	7	87. 5
UBC826	(AC)8G	52	6	4	66. 7
UBC840	(GA)8YT	56	9	8	88. 9
UBC841	(GA)8YC	56	16	13	81. 3
UBC842	(GA)8AYG	52	5	3	60. 0
UBC873	(GACA)4	52	6	5	83. 3
UBC891	HVH(TG)7	52	5	3	60. 0

注: H. A, C 或 T; V. A, C 或 G; Y. C 或 G Note: H. A, C or T; V. A, C or G; Y. C or G

## 1.3 ISSR 分析

将聚丙烯酰氨凝胶电泳的谱带转换成数字指纹模式, 在相同的迁移位置上有带的计为 1, 无带的计为 0。根据指纹图谱出现的概率公式  $1/2^n$  (2 为等位基因的数目, n 为多态位点数,  $2^n$  则为检测 n 个位点涉及的所有可能的试材个数), 统计图谱的置信概率<sup>[12, 13]</sup>; 借鉴于常规植物分类方法, 根据各品种某一位点多态性片段的有或无, 编制 8 个棉花品种检索表<sup>[14]</sup>。

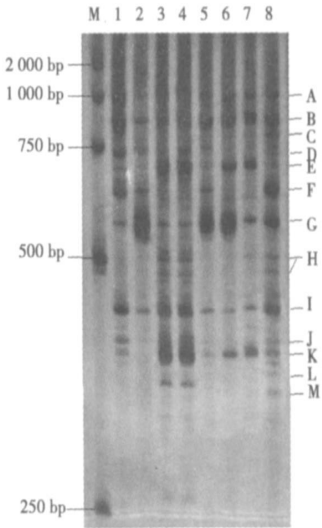
带方向, 将这些图谱转换为由 1 和 0 组成的字串, 即构成数字指纹, 可通过字串的排列顺序不同鉴定不同棉花品种 (表 2)。

## 2 结果与分析

### 2.1 品种 ISSR 标记多态性筛选

从 60 个引物中可筛选出扩增带型稳定、多态性较强、重复性较好的 11 个引物, 共检测到 90 个基因扩增片段, 每对引物可以检测到 5~ 16 个位点, 11 个引物均适合于对该批样品进行指纹标记, 如表 1。其中引物 UBC809 (AGAGAGAGAGAGAGG) 检出清晰的条带数目为 13 个, 多态性位点数为 10 个; 引物 UBC841 (GAGAGAGAGAGAGAYC) 检出的条带数为 16 个, 多态性位点数为 13 个, 大小介于 250~ 1 600 bp (图 1, 2)。

在图 1, 2 的指纹图谱中, 以 1 和 0 分别代表某个扩增出 DNA 带的出现和缺失, 按照从上到下的读



M. Marker; 1~ 8 依次为材料新陆中 7 号、军棉 1 号、新海 17、新海 18、新海 21、新海 22、长绒棉 203、中绒棉 205, A~ P 分别代表不同的扩增位点, 下同

M is makers ladder; 1~ 8 represent the cultivars Xinluzhong7, Junmian1, Xinhai17, Xinhai18, Xinhai21, Xinhai22, Changrongmian203, Zhongrongmian205; A~ P represent the amplified locis respectively

图 1 不同品种的 ISSR 指纹图谱 (引物 UBC809)

Fig. 1 ISSR fingerprint of cotton varieties (primer UBC809)

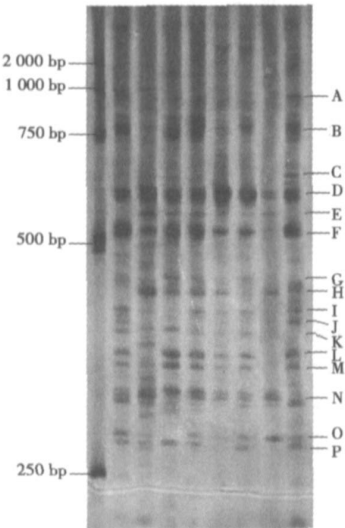


图2 不同品种的 ISSR 指纹图谱(引物 UBC841)  
Fig. 2 ISSR fingerprint of cotton varieties(primer UBC841 )  
表 2 不同品种的数字指纹

材料名称 Materials	图 1(引物 809) Fig. 1(Primer 809)			图 2(引物 841) Fig. 2(Primer 841)		
	A- E	F- J	K- M	A- E	F- J	K- P
新陆中 7 号 Xinluzhong 7	11111	11011	100	11010	10011	111111
军棉 1 号 Junmian 1	11010	11010	000	00011	10100	101111
新海 17 Xinhai 17	11011	01111	110	11111	11100	111101
新海 18 Xinhai 18	11011	01111	110	11111	11110	111111
新海 21 Xinhai 21	11010	11010	100	00011	10100	011100
新海 22 Xinhai 22	11001	01010	100	01010	10010	111111
长绒棉 203 Changrongmian 203	11011	01010	100	00011	10100	000110
中绒棉 205 Zhongrongmian 205	11110	11111	111	11101	01110	111111

2.2 棉花品种的鉴定、指纹图谱的构建及置信概率分析

本研究选用检测位点数较多的引物 UBC809、UBC841 作为组合来进行 8 个棉花品种的指纹图谱分析。根据 UBC809 的位点 C, D, E, F, G, H, J, K, L, M 谱带的有无分别可以将新陆中 7 号、军棉 1 号、新海 21、新海 22、长绒棉 203、中绒棉 205 6 个品种同其他 8 个供试样品区别开来,再利用 UBC841 的位点 I 或位点 O 则可以区分新海 17、新海 18 两个品种,若仅用引物 UBC841 指纹图谱也能够检测其中任何一个品种(系),而用单引物 UBC841 的多态性位点数 13,根据概率公式  $1/2^n$  其置信概率达到  $1/8192$  ( $1.22 \times 10^{-4}$ ),即 8192 份品种中就可能存在 2 个品种的电泳谱带完全相同,利用 UBC809 和 UBC841 这 2 对引物总的位点数为 23 个,其置信概率达到  $1/8\,388\,608$  ( $1.19 \times 10^{-8}$ ) 可知在 8 388 608 份品种中才可能存在 2 个品种的电泳谱带完全相同,较大程度提高了品种区分的置信区间,由此可知,我们选用的 UBC809 和 UBC841 这 2 个不同的引物组合,利用某一品种的特定谱带可以将所有材料一一区别开来,并可以保证在一定的置信度下获得简明的品种鉴别指纹图谱,同时说明 ISSR 在棉花基因组中的分布是十分广泛的,利用 ISSR 构建棉花品种(系)指纹图谱具有高效性和准确性。

2.3 棉花品种指纹检索表

现根据数字指纹代码以 UBC809、UBC841 为例,编制 8 个棉花品种指纹检索表:

1. 有 UBC809 ISSR-PCR C 位点片段 ..... 1, 8
2. 有 UBC809 ISSR-PCR E 位点片段 ..... 1 (新陆中 7 号 Xinluzhong7)
2. 无 UBC809 ISSR-PCR E 位点片段 ..... 8 (中绒棉 205 Zhongrongmian 205)
1. 无 UBC809 ISSR-PCR C 位点片段 ..... 2, 3, 4, 5, 6, 7
2. 无 UBC809 ISSR-PCR D 位点片段 ..... 6 (新海 22 Xinhai 22)
2. 有 UBC809 ISSR-PCR D 位点片段 ..... 2, 3, 4, 5, 7
3. 无 UBC809 ISSR-PCR H 位点片段 ..... 2, 5, 7
4. 无 UBC809 ISSR-PCR K 位点片段 ..... 2 (军棉 1 号 Junmian1)
4. 有 UBC809 ISSR-PCR K 位点片段 ..... 5, 7
5. 有 UBC841 ISSR-PCR B 位点片段 ..... 5 (新海 21 Xinhai 21)
5. 无 UBC841 ISSR-PCR B 位点片段 ..... 7(长绒 203 Zhongrongmian 205)
6. 有 UBC841 ISSR-PCR I 位点片段 ..... 4 (新海 18 Xinhai 18)
6. 无 UBC841 ISSR-PCR I 位点片段 ..... 3 (新海 17 Xinhai 17)

依据上述检索表,我们可以逐步鉴别所有品种。此方法对于少数品种鉴定尤为直观明了,简单易行。

3 讨论

利用分子标记技术获得品种的指纹图谱是目前品种鉴定技术的主要手段,虽然分子标记具有其独特的优点,但不同的分子标记又有各自的不足之处。

因此选择合适的分子标记是进行品种指纹图谱构建时应考虑的首要问题。本研究首次对利用 ISSR 标记构建 8 个新疆棉花品种指纹图谱进行了探索,试验从 60 条引物中可筛选出扩增带型稳定、多态性较强、重复性较好的 11 个引物进行棉花品种分析,在品种指纹图谱构建中,有限的引物只能适用于一定数量的样品群体,随鉴定的群体增大,存在不同品种

间出现相同谱带的概率也会增加,此时,我们可以采用不同的引物组合将其区别开,或者挑选新的引物得到更为准确的指纹图谱<sup>[14]</sup>。本试验利用多态性位点数较多的 UBC809, UBC841 这 2 个引物将 8 个棉花品种相互区别,获得指纹图谱的置信概率为 1/8 388 608。即其他任何棉花品种出现与之相同指纹图谱的概率为 1/8 388 608,结果稳定可靠。

本研究挑选的 2 个引物扩增多态位点的数量和特异性不同,选择哪个引物扩增结果作为检索表的起始点,存在着随意性。可以说使用同样资料不同分析者,编制的检索表可能不同,但最终都以达到鉴别为目的。

与微卫星(SSR)相比,ISSR 不要求已知基因组序列信息且引物具有广泛的通用性,大大减少多态分析的前期工作。尽管 ISSR 是一种显性遗传标记,不能检测显性纯合基因型和杂合基因型<sup>[3,4]</sup>,但作为种或品种鉴定的分子标记,并不受其影响。本研究发现 ISSR 标记作为一种有效的鉴定品种与构建品种指纹图谱的技术,能较好地揭示品种间的差异,有望在棉花品种的鉴定和种质多样性分析方面得到更广泛的应用。

#### 参考文献:

- [1] 刘 华,王宇生,张 辉,等.小麦种质资源醇溶蛋白指纹图谱数据库的初步建立及应用[J].作物学报,1999,25(6):674-682.
- [2] 贾继增.分子标记种质资源鉴定和分子标记育种[J].中国农业科学,1996,29(4):1-10.
- [3] Gustavo. DNA Markers[M]. NewYork: Wiley-vch press,

1988.

- [4] 王学德,李 悦.彩色棉雄性不育系、保持系和恢复系的选育及 DNA 指纹图谱的构建[J].浙江大学学报(农业与生命科学版)2002,28(1):1-6.
- [5] 朱美霞,李英芝,王建书.利用 SSR 方法鉴定棉花品种纯度[J].安徽农业科学,2005,33(11):2010-2016.
- [6] Rajab Choukan, Abdolahi Hossainzadeh, Mohammad Reza Ghannadlha, *et al.* Use of SSR data to determine relationships and potential heterotic groupings within medium to late maturing Iranian maize inbred lines[J]. Field Crops Research, 2006, 95(2):212-222.
- [7] 杨 杰,仲维功,王才林,等.SSR 标记及其在水稻分子生物学研究中的应用[J].金陵科技学院学报,2004,20(4):34-39.
- [8] 宛煜嵩,王 珍,肖英华,等.一张含有 227 个标记的大豆遗传连锁图[J].分子植物育种,2005,3(1):15-20.
- [9] Nagoka T, Ogihara Y. Application of inter-simple sequence repeat polymorphism in wheat for use of DNAMarkers in comparison to RFLP and RAPD markers[J]. Theor Appl Genet, 1997, 94:597-602.
- [10] Prevost A. A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars [J]. Theor Appl Genet, 1999, 98:107-112.
- [11] 陈书霞,姚莲芳,房玉林. PCR 鉴定时的微量 DNA 快速制备[J].植物生理学通讯,2006,42(2):262-264.
- [12] 付瑜华,李 杰,王海燕,等.木薯商业品种的指纹图谱构建[J].植物遗传资源学报,2007,8(1):51-55.
- [13] 吴渝生,程在全,徐雨然,等.不同类型玉米 RAPD 指纹图谱的构建[J].种子,2002,125(5):11-13.
- [14] 沈永宝,施季森,赵洪亮.利用 ISSR DNA 标记鉴定主要银杏栽培品种[J].林业科学,2005,41(1):203-204.