

# ISSR 分子标记及其在动物遗传结构研究中的应用\*

林杰君 鲍毅新\*\* 刘 军 张 旭

(浙江师范大学生态研究所, 浙江金华 321004)

**摘 要** 简单重复序列间区(inter-simple sequence repeat, ISSR)标记技术近年来已成为 DNA 分子标记技术中的一个热点,并在遗传学研究中发挥着重要的作用。然而,相比较其在植物研究中的应用,在动物研究中还处于起步阶段。本文就 ISSR 分子标记技术的原理和方法要点进行简述,归纳了其在动物遗传多样性、资源鉴定、亲缘关系等遗传结构相关领域中的应用情况,并对其应用前景进行了展望,旨在为 ISSR 分子标记技术在动物相关研究领域中的推广应用提供参考。

**关键词** ISSR; 遗传多样性; 资源鉴定; 亲缘关系

**中图分类号** Q75 **文献标识码** A **文章编号** 1000-4890(2012)5-1319-08

**ISSR marker and its applications in analyzing animal genetic structure: A review.** LIN Jie-jun, BAO Yi-xin\*\*, LIU Jun, ZHANG Xu (*Institute of Ecology, Zhejiang Normal University, Jinhua 321004, Zhejiang, China*). *Chinese Journal of Ecology*, 2012, **31**(5): 1319–1326.

**Abstract:** Inter-simple sequence repeat (ISSR) marker technology has become a hotspot in DNA molecular technology in recent years, and plays an important role in genetic research. However, this technology is still at an initial stage in animal research, compared with its applications in plant research. This paper introduced the principles and main methods of ISSR marker technology, and summarized its applications in analyzing the genetic structure of animals, such as genetic diversity, resources identification, and genetic relationship, etc. The application prospects of this technology were also discussed, aimed to provide reference for the further applications of this technology in animal research.

**Key words:** ISSR; genetic diversity; resources identification; genetic relationship.

遗传结构指遗传变异的分布式样或格局,是生物的基因和基因型在时间和空间上的分布形式(Loveless & Hamrick, 1984; 李忠超和王小兰, 2005)。作为遗传学研究的基本内容之一,往往通过计算基因频率、遗传距离及遗传分化系数等参数,来揭示种群内及种群间的遗传变异情况,从而反映出一定的种内及种间关系。遗传结构的研究方法大致经历了形态标记、细胞标记、生化标记和 DNA 分子标记这 4 个阶段(戴伟等, 2005)。由于 DNA 分子标记可以直接反应物种基因水平上的差异,并且克服了前 3 种标记数量少且易受环境影响等缺点(邱芳等, 1998),自创立以来,便得到广泛地重视,成为遗传学研究的重要手段。目前,常用于动物遗传结构研究的分子标记主要有限制性片段长度多态性

(restriction fragment length polymorphism, RFLP)(Mickett *et al.*, 2003)、扩增片段长度多态性(amplified fragment length polymorphism, AFLP)(Zhao *et al.*, 2008)、随机扩增多态性 DNA(random amplified polymorphic DNA, RAPD)(Sharma *et al.*, 1998)和简单重复序列(simple sequence repeat, SSR)(Campos *et al.*, 2002)等标记技术。

简单重复序列间区(inter-simple sequence repeat, ISSR)是在 SSR 基础上直接发展起来的一种分子标记技术,由 Zietkiewicz 等(1994)创建。因其具有操作简易、多态性丰富、成本低廉、适合大样本量研究等优点,自 1994 年创建以来,便在种群遗传多样性、亲缘关系、种质资源鉴定、系统发育等研究领域得到广泛地应用,并被认为是一种简便且有效的分子标记技术,但多局限于植物研究中(Bornet *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2009; Christopoulos *et al.*, 2010)。

\* 浙江省研究生创新科研项目(YK2009038)资助。

\*\* 通讯作者 E-mail: sky90@zjnu.cn

收稿日期: 2011-10-30 接受日期: 2012-02-23

随着分子标记技术的不断完善和发展,ISSR 技术的应用在动物遗传结构研究的相关领域也逐渐被采纳 (Glazko, 2003; Guicking *et al.*, 2009; Fahmi & Al-Otaibi, 2011), 并呈现一定的增长趋势。本文对 ISSR 分子标记技术的基本原理和方法要点及其在动物遗传结构相关领域中的研究进行综述, 希望能对动物的遗传多样性、资源鉴定、亲缘关系等领域的研究提供有益参考, 并对其应用前景进行了展望, 为推广 ISSR 分子标记技术的应用范围提供理论支持。

## 1 ISSR 的基本原理

DNA 分子标记虽种类繁多, 但基本原理都是相似的, 即通过一定的手段 (主要有分子杂交、PCR 和电泳等技术) 来揭示不同样本间 DNA 序列本身的差异。真核生物基因组中广泛存在着一种高度串联重复序列 SSR, 一般是由 1~6 个碱基作为核心序列的多次重复组成。基于这一现象, 便开发出了 SSR 标记技术和 ISSR 标记技术 (王建波, 2002)。SSR 标记是根据微卫星序列两侧的保守序列来设计引物, 具有较好的重复性和稳定性, 然而在大多数情况下并不清楚重复序列侧翼的保守区域, 而且 SSR 两侧引物具有物种间特异性, 在具体实验中使得引物设计过程费时费力, 这在一定程度上限制了该技术的广泛应用 (Kojima *et al.*, 1998; 杨玉玲等, 2006)。相比之下, ISSR 标记则弥补了这个不足, 其利用真核生物基因组中广泛存在 SSR 序列来设计引物, 无需预先克隆和测序等繁琐工作, 大大节约了实验的前期准备工作。

ISSR 技术的基本原理是在 SSR 的 3' 端或 5' 端锚定 1~4 个随机碱基 (如: 3' 端锚定: (CA)<sub>n</sub>YG; 5' 端锚定: BDB (CA)<sub>n</sub>), 以此为引物进行 PCR 扩增, 在 PCR 反应中, 锚定引物可引起特定位点退火, 特异地扩增出具有反向排序的微卫星区域间的 DNA 序列。由于具有反向排序的微卫星序列在基因组中的分布不止一种情况, 所以一条 ISSR 引物能扩增出多条 DNA 片段, 扩增产物经聚丙烯酰胺凝胶或琼脂糖凝胶电泳分离, 扩增出的片段大小集中在 200~2000 bp。

## 2 ISSR 技术操作流程

### 2.1 引物设计及反应体系优化

ISSR 引物设计是进行扩增的必要程序, 通常在 SSR 的 3' 端或 5' 端锚定 1~4 个随机碱基。由于

SSR 串联重复的核心序列以双核苷酸重复最为常见, 因而在设计 ISSR 引物时, 在二核苷酸重复序列的 3' 端或 5' 端进行锚定较为常见, 但也有三核苷酸锚定和四核苷酸锚定, 锚定后使引物总长度为 20 bp 左右。而在具体研究工作中, 一般直接采用加拿大哥伦比亚大学 (UBC) 公布的第 9 套 ISSR 引物序列, 共计 100 条, 可用于不同物种遗传结构的分析 (Chatterjee & Mohandas, 2003; 金则新等, 2007)。表 1 总结了一些已在动物遗传结构研究中扩增成功的引物, 利用这些引物通过 PCR 反应可以扩增出需要的片段。

ISSR-PCR 扩增是整个实验的关键步骤, 一般对所有样本进行 ISSR 扩增前, 需对模板浓度、Mg<sup>2+</sup> 浓度、Taq 酶浓度等实验条件进行摸索, 以确定 ISSR-PCR 在该物种中的最优反应条件, 接着筛选出适合该物种扩增的 ISSR 引物, 并对反应体系进行优化, 一般以条带清晰、多态性高、重复性好的引物为宜 (姜静等, 2003; He *et al.*, 2007), 再利用筛选出的引物对所有样本进行扩增检测。

### 2.2 产物检测与统计分析

ISSR 扩增产物经琼脂糖凝胶 (浓度为 1.5%~2%) 或聚丙烯酰胺凝胶 (浓度为 6%) 电泳分离和染色, 观察电泳结果并进行拍照保留图像。清晰可见的条带全部用于统计分析。按条带的有无进行计数, 在指定迁移位置出现条带时, 被认为是相同的 DNA 片段产物, 计数为“1”, 不存在则为“0”, 构建“01”矩阵二元数据。根据实验目的, 采用不同的软件如 Popgene、Arlequin、Ntsys 等对数据进行统计分析 (Rohlf, 1998; Francis *et al.*, 2000; Excoffier *et al.*, 2005)。

## 3 ISSR 技术在动物遗传结构研究中的应用

### 3.1 遗传多样性研究

遗传多样性是生物多样性的一个重要方面, 是种群繁殖和更新的遗传基础, 可反映一个物种适应环境的能力和对环境变迁持续进化的潜力 (孙始威等, 2008)。由于 ISSR 标记能提供数量较多的大的 DNA 片段, 可以揭示出基因组内的多态性位点, 所以是一种研究种群内及种群间遗传多样性的理想方法 (Zietkiewicz *et al.*, 1994; Verma & Rana, 2011)。Yao 等 (2007) 用 10 条 ISSR 引物分析了 27 只来自蓬莱和 30 只来自青岛的海参 (*Apostichopus japonicus*), 发现这两个种群的遗传多样性都处于较高的水平,

表 1 成功应用于动物遗传结构研究的 ISSR 引物序列

Table 1 Sequences of ISSR primers successfully used to analyze the genetic structure of animals

物种	引物序列	文献来源
驯鹿 <i>Rangifer tarandus</i>	(CA) <sub>8</sub> AT, (CA) <sub>8</sub> AG, (CA) <sub>8</sub> GG, (AG) <sub>8</sub> C, (GA) <sub>8</sub> C	Kostia <i>et al.</i> ,2000; Kol & Lazebny,2007
家蚕 <i>Bombyx mori</i>	(GA) <sub>8</sub> T, (TC) <sub>8</sub> A, (TC) <sub>8</sub> C, (TG) <sub>8</sub> G, (AG) <sub>8</sub> YC, (CT) <sub>8</sub> RC, (CA) <sub>8</sub> RG, (GT) <sub>8</sub> YG, (AC) <sub>8</sub> YG, (ACC) <sub>6</sub> , (AGC) <sub>6</sub> , GGG(TGGGG) <sub>2</sub> TG, (AG) <sub>8</sub> T, (CT) <sub>8</sub> T, (CT) <sub>8</sub> A, (AC) <sub>8</sub> C, (AC) <sub>8</sub> G, (AG) <sub>8</sub> YA, (GA) <sub>8</sub> YC, (GA) <sub>8</sub> YG, (CT) <sub>8</sub> RA, (CT) <sub>8</sub> RG, (ATG) <sub>6</sub> , (GAC) <sub>6</sub> , HBH(GA) <sub>7</sub> , BHB(GA) <sub>7</sub> , VDV(CT) <sub>8</sub>	Chatterjee & Mohandas, 2003; Awasthi <i>et al.</i> ,2008
黑斑侧褶蛙 <i>Pelophylax nigromaculata</i>	(AG) <sub>8</sub> T, (AG) <sub>8</sub> C, (AG) <sub>8</sub> G, (GA) <sub>8</sub> C, (CA) <sub>8</sub> A, (CA) <sub>8</sub> G, (AC) <sub>8</sub> T, (AC) <sub>8</sub> C, (AC) <sub>8</sub> G, (AG) <sub>8</sub> YC	张国强,2005;Zhang <i>et al.</i> ,2008
铁锈笠螺 <i>Patella ferruginea</i>	(CA) <sub>8</sub> GT, (CA) <sub>8</sub> AC, (CA) <sub>8</sub> AG, (GTG) <sub>8</sub> GC, (GAG) <sub>8</sub> GC,	Casu <i>et al.</i> ,2006
牙鲆 <i>Paralichthys olivaceus</i>	(AG) <sub>8</sub> G, (GA) <sub>8</sub> C, (AC) <sub>8</sub> G, (GT) <sub>8</sub> C, (GA) <sub>8</sub> G (AG) <sub>8</sub> G, (CA) <sub>8</sub> A, (AC) <sub>8</sub> T, (GA) <sub>8</sub> YG, (CA) <sub>8</sub> RG, (GT) <sub>8</sub> YC, (AC) <sub>8</sub> YT, (AC) <sub>8</sub> YA, (TG) <sub>8</sub> RT, (TG) <sub>8</sub> RC, (TG) <sub>8</sub> RA, BDB(CA) <sub>7</sub> , (TC) <sub>8</sub> C, (GA) <sub>8</sub> T, (GA) <sub>8</sub> YC, (GA) <sub>8</sub> YG, (CT) <sub>8</sub> RC	Liu <i>et al.</i> ,2006; 徐建鹏等,2009
角倍蚜 <i>Schlechtendalia chinensis</i>	(AG) <sub>8</sub> T, (AG) <sub>8</sub> C, (AG) <sub>8</sub> G, (GA) <sub>8</sub> C, (CA) <sub>8</sub> G, (AC) <sub>8</sub> C, (AC) <sub>8</sub> G, (AC) <sub>8</sub> YG, (CTC) <sub>6</sub> , (GAA) <sub>8</sub> , (GACA) <sub>4</sub> , BDB(CA) <sub>7</sub>	Ren <i>et al.</i> ,2008;王定江等,2008
南灰伯劳鸟 <i>Lanius meridionlis</i>	(GACA) <sub>4</sub> , (CCTA) <sub>4</sub>	Gonzalez <i>et al.</i> ,2008
虾夷扇贝 <i>Patinopecten yessoensi</i>	(AG) <sub>8</sub> T, (GA) <sub>8</sub> T, (AG) <sub>8</sub> YT, (GGAGA) <sub>3</sub> , (AG) <sub>8</sub> TG, GTCAGT-GTC(TCC) <sub>5</sub> , GACAGTGAC(GT) <sub>8</sub> , (AG) <sub>8</sub> C, (AG) <sub>8</sub> YC, (GA) <sub>8</sub> YC, (CT) <sub>8</sub> RC, (GGAGA) <sub>3</sub>	何斌等,2007;王婷等,2009
丝光绿蝇 <i>Lucilia sericata</i>	(CA) <sub>6</sub> AC, (CA) <sub>6</sub> AG, (CA) <sub>6</sub> GT, (CA) <sub>6</sub> GG, (AG) <sub>8</sub> TA, (AG) <sub>8</sub> TC, (GA) <sub>6</sub> GG, (GACA) <sub>4</sub> , (TG) <sub>8</sub> GT, (AC) <sub>7</sub> , (CAC) <sub>4</sub> GC, (GAG) <sub>6</sub> GC, (CA) <sub>6</sub> GG, (CTC) <sub>4</sub> GC, (AG) <sub>8</sub> AT, (CT) <sub>8</sub> AC	He <i>et al.</i> , 2007; Zheng <i>et al.</i> , 2010
貉 <i>Nyctereutes procyonoides</i>	(AG) <sub>8</sub> T, (AG) <sub>8</sub> C, (AG) <sub>8</sub> G, (GA) <sub>8</sub> T, (GA) <sub>8</sub> C, (GA) <sub>8</sub> A, (AC) <sub>8</sub> T, (AC) <sub>8</sub> C, (AC) <sub>8</sub> G, (CA) <sub>8</sub> T, (CA) <sub>8</sub> A, (CA) <sub>8</sub> G, (GT) <sub>8</sub> C, (TG) <sub>8</sub> C, (TG) <sub>8</sub> G	Korpelainen <i>et al.</i> ,2007;Yang & Bai,2008
松材线虫 <i>Bursaphelenchus xylophilus</i>	(GA) <sub>9</sub> CCA, (AC) <sub>9</sub> TG, (AC) <sub>9</sub> GA, (TC) <sub>9</sub> CG, CGT(CA) <sub>8</sub> , CAG(GT) <sub>9</sub> , (GA) <sub>8</sub> YC, (CA) <sub>8</sub> RG, (AC) <sub>8</sub> YG, BDB(CA) <sub>7</sub> , VHV(GT) <sub>7</sub> , HVH(TGT) <sub>5</sub> ,BDB(CAC) <sub>5</sub> , BDV(CAG) <sub>5</sub>	Metge & Burgermeister,2008
赤眼鳟 <i>Squalibarbus curriculus</i>	(AG) <sub>8</sub> AC, (AG) <sub>8</sub> AT, (AG) <sub>8</sub> AA, (AG) <sub>8</sub> TG, (AG) <sub>8</sub> GA, (AG) <sub>8</sub> GC, (AG) <sub>8</sub> CA, (AG) <sub>8</sub> CT, (AG) <sub>8</sub> CC, (AGTG) <sub>4</sub> , (ATG) <sub>6</sub> , (GA-TA) <sub>2</sub> ,(GACA) <sub>2</sub>	杨太等有,2008;韩晓磊等,2010

并且它们之间的遗传距离较近,另外还发现蓬莱种群的遗传结构较为单一,而青岛种群较为复杂。Chen 等(2009)在比较中国本地草鱼( *Ctenopharyngodon idella* )及其被引入到美国、匈牙利和日本的种群的遗传多样性时,运用 22 条 ISSR 引物来进行研究,共扩增出 207 个位点,其中多态性位点为 82 个,发现位于中国长江的种群表现出最高的遗传多样性,而日本种群的遗传多样性是最低的,总体表现为,中国本地种的遗传多样性要高于国外的种群。Bi 等(2011)对养殖和野生的松江鲈鱼( *Trachidermus fasciatus* )进行 ISSR 分析,6 条引物在 85 个个体中,共扩增出 353 个位点,结果显示,养殖的鲈鱼种群具有较低的遗传多样性,但就整个物种水平而言,鲈鱼的遗传多样性还是处于相对较高的水平,并认为 ISSR 在研究种群遗传多样性时,是一种有效且快速的方法。在利用 ISSR 标记对种群遗传多样性进行分析时,由于 ISSR 引物可与整个基因组内多个位

点进行杂交,所以为数不多的引物即可得到大量的信息,Kol 和 Lazebny(2007)采用了 2 条 ISSR 引物对西伯利亚南部的驯鹿( *Rangifer tarandus* )进行研究,共扩增出 71 个不同的位点,并认为 ISSR-PCR 在对驯鹿的遗传多样性研究中是一种非常有效的手段。同样,Zamani 等(2011)也只是利用了(AG)<sub>9</sub>C 和(GA)<sub>9</sub>C 两条引物对伊朗西部哈马丹省 210 头 2~4 岁的绵羊( *Ovis aries* )进行了遗传多样性分析,各扩增出 28 和 36 条条带,Shannon 遗传多样性指数和 Nei’s 遗传多样性度分别为 0.2256,0.1258,具有较低的遗传多样性。另外,其还广泛应用于东北虎( *Panthera tigris altaica* ) (白秀娟,2004)、平胸龟( *Platysternon megacephlum* ) (马丽莎等,2007)、金钱豹( *Panthera pardus* ) (朱军等,2008)、墨西哥红尾蜘蛛( *Brachypelma vagans* ) (Machkour-M’Rabet *et al.* , 2009)、日本沼虾( *Macrobrachium nipponense* ) (Yang *et al.* , 2010)、致倦库蚊( *Culex quinquefasciatus* )



(Mendki *et al.*, 2011)、牛 (*Bos taurus*) (Askari *et al.*, 2011)、马 (*Equus caballus*) (Voronkova *et al.*, 2011)、福寿螺 (*Pomacea canaliculate*) (Dong *et al.*, 2011) 等物种的遗传多样性研究中, 并通过 ISSR 分子技术的检测取得了理想成果。

### 3.2 资源鉴定与分类

在对动物资源进行鉴定和分类时, 由于所要比较的动物个体外部特征比较相像, 差异不够明显, 或是在某些情况下所提供的样本材料有限 (比如一些走私的动物组织样本), 缺乏完整性, 此时基于传统的形态学方法已不能进行区分和鉴定, 但其所携带的遗传信息 DNA 仍然是存在的并且是完整的, 可根据不同样本所含基因信息的差异来达到分类和鉴定的目的, 并且保证了实验结果的科学性和可靠性。众多研究证实, ISSR 标记技术在动物资源鉴定与分类中是非常有效的。韩晓磊等 (2010) 用 3 条 ISSR 引物对同为雅罗鱼亚科鱼类的鳊鱼 (*Elopichthys bambusa*)、草鱼及赤眼鳟 (*Squaliobarus curriculus*) 进行遗传分析, 发现这 3 种鱼类的遗传信息差异显著, 分类地位至少在种的水平以上, 并找到 17 个种内特异性和中间共享位点, 可用于分子辅助分类和种质鉴定。He 等 (2007) 从 18 条 ISSR 引物中筛选出 9 条高多态性引物用于 5 种食尸蝇 (丝光绿蝇 *Lucilia sericata*, 巨尾阿丽蝇 *Aldrichina grahmi*, 大头金蝇 *Chrysomya megacephala*, 肥须亚麻蝇 *Parasarcophaga crassipalpis* 和家蝇 *Musca domestica*) 的扩增, 共扩增出 105 个位点, 其中多态性位点 95 个, 并发现其不同种类的嗜尸蝇中扩增的条带数目和大小是不同的, 并认为据此可以作为识别食尸蝇不同种类的依据。Maltagliati 等 (2006) 在对地中海的 3 种鱼 (*Valencia hispanica*, *V. letourneuxi* 和 *Aphanius fasciatus*) 进行 ISSR 分析, 9 条引物共扩增出 101 个多态位点, 并用 UPGMA 进行聚类, 发现这 3 种鱼各自聚为一支, 并成功鉴定出两份未知的样本都属于 *V. hispanica*, 由此认为 ISSR 在资源鉴定和分类上是一种方便且有效的方法。Dušinsky 等 (2006) 首次使用 ISSR 标记对蚋类昆虫的种内和种间关系进行了研究。

### 3.3 亲缘关系与系统发育

许多研究已表明, ISSR 技术在研究动物种间、种群间的亲缘关系以及动物系统发育方面也取得了很好的效果。张文静等 (2005) 用 13 条 ISSR 引物对褶累枝虫 (*Epistylis plicatilis*)、绿草履虫 (*Paramecium bursaria*)、多态喇叭虫 (*Stentor polymorphus*) 和嗜热

四膜虫 (*Tetrahymena thermophila*) 的遗传进化关系进行了研究, 结果显示缘毛亚纲的褶累枝虫与膜口亚纲的嗜热四膜虫亲缘关系近于咽膜亚纲的绿草履虫, 绿草履虫在寡膜纲中处于原始地位。耿金虎等 (2009) 研究表明, ISSR 标记在研究小峰熊蜂 (*Bombus hypocrita*) 种群内亲缘关系和亚家系组成的时候, 也是非常有效的。对于种群间亲缘关系的研究目前还涉及到北海狮 (*Eumetopias jubatus*) (Koyama *et al.*, 2008)、三角帆蚌 (*Hyriopsis cumingii*) (陈婵娟等, 2009)、日本血吸虫 (*Schistosoma japonicum*) (Zhao *et al.*, 2009) 等物种。另外, Fritz 等 (2005) 对 5 种陆龟 (*Testudo graeca*, *T. hermanni*, *T. horsfieldii*, *T. kleinmanni* 和 *T. marginata*) 及一种新发现的比较矮小的陆龟 *T. weissingeri* 的系统进化关系进行研究, 线粒体细胞色素 b 和 ISSR 分析都显示, 前面的 5 种陆龟的遗传信息在系统进化上具有明显的不同, 但 *T. marginata* 和 *T. weissingeri* 在基因水平上并无明显差异, 其身体矮小和颜色上的差异主要是与其生长的外在环境有关, 并认为 *T. weissingeri* 并不能作为一个独立的进化单元。Nagornyuk 和 Glazko (2007) 对 9 种哺乳动物 (包括鲸目的海豚; 偶蹄目的牛、羊、猪; 奇蹄目的 2 种马、2 种驴和 1 种斑马) 进行 ISSR 分析, 最后提出鲸目的分化要早于偶蹄目和奇蹄目的观点。

### 3.4 动物标记辅助选择育种

动物的标记辅助选择 (marker assisted selection, MAS) 是利用了遗传标记与数量性状之间存在一定的联系, 即标记与控制这些数量性状的基因 (QTL) 处于连锁不平衡状态 (鲁绍雄和吴常信, 2002)。基于这个特点, 在实际选择育种过程中, 充分利用表型、谱系和遗传标记相结合的方式代替只利用表型和谱系的常规方法 (于忠伟, 2009), 可选育出具有优良性状的品种。近年来, 由于 QTL 研究越来越成为人们关注的热点, 且 MAS 具有不受环境、性别、发育的限制, 可进行早期育种, 能缩短物种世代间隔, 可提高选择强度、选择效率和准确性等特点 (鲁绍雄和吴常信, 2002), 使其已经成为动物优良品种选育过程中的重要途径和方法, 而通过 ISSR 分析也可筛选出与优良表型性状基因紧密连锁的 DNA 片段, 使其成为一种能够辅助育种的分子标记 (候娅丽和刘文忠, 2004)。孙永峰等 (2007) 通过计算特异性条带对性状的效应值, 发现在 3 条 ISSR 引物中共有 6 个标记位点即 AK89-A、AK89-I、AK91-B、

AK91-H、AK93-A、AK93-D 与吉林白鹅肉用品系的全净膛重性状呈现出显著相关( $P < 0.05$ ),并认为选择具有增效标记的个体留种可以大大提高选种的准确性。Srivatava 等(2007)发现,在 15 条 ISSR 引物中有 5 个标记位点与印度的家蚕(*Bombyx mori*)耐热性状有相关性,可为耐热家蚕的选育提供依据,从而适应印度炎热的气候。Stolpovsky 等(2010)用引物(AG)<sub>9</sub>C 对图瓦 18 个农场的绵羊进行 PCR 扩增并对其遗传特征和遗传关系进行了分析,以此可对这些种群进行遗传监测并为以后的繁殖选育提供依据。

#### 4 应用前景

20 世纪 80 年代以来,动物遗传结构的研究已经从形态、细胞和生化标记水平,进入到了 DNA 分子标记水平,ISSR 标记具有丰富的多态性,操作过程简易,实验成本低廉,适合大样本量研究等优点,使其已在动物遗传多样性、资源鉴定和亲缘关系等方面发挥了重要的作用,但在动物遗传作图方面的应用却鲜有报道。另外,任何一种分子标记都不是万能的,ISSR 标记也存在着一些缺点,例如,它在应用于具体实验过程中,需要对反应的最佳体系和适用的引物进行摸索,并且是一种显性标记,不能区分纯合和杂合个体,在解决交配系统、计算杂合度和父系分析等问题时效果不佳(Reddy *et al.*, 2002;李海生,2004)。对于上述出现的问题,在具体实验研究中,我们可以采用正交实验的方法来对反应体系进行优化,从已发表的文献中直接查找引物或从近缘物种中筛选得到适用的引物,从而简化实验过程。据相关报道,由于 ISSR 标记可以揭示出丰富的多态性,且又遍布于染色体上,所以在遗传图谱的绘制过程中,其实是一种理想的分子标记,并且已广泛应用于植物遗传连锁图地绘制(王建波,2002),相信其在动物遗传作图方面也必将发挥重要的作用。另外,我们可以根据不同的实验目的,将 ISSR 标记与 RAPD、线粒体等其他分子标记结合起来使用,而使实验结果更加具有科学性和说服力。

相信随着实验技术的不断革新、数据分析方法的不断改进、相关研究的不断深入,ISSR 分子标记的不足将会得到改善或被克服。在未来的时间里,其将会被更多的动物学家们所认识并得到更加广泛地应用,能进一步丰富遗传多样性、资源鉴定、亲缘关系等遗传结构相关领域的研究内容。在其他相关领域(SSR 位点筛选、遗传作图、基因定位等)研究

中,也将发挥重要作用。此外,该标记也已在动物行为研究方面有了些许进展,例如,Haig 等(2003)利用 ISSR 标记技术结合观察法对 1 种澳大利亚水雉(*Irediparra gallinacea*)的繁殖行为、配偶制度等进行了研究。在生理病理学研究方面亦有报道,Stoler 等(2006)对 18 位乳腺癌患者的肿瘤组织和周边正常组织进行 ISSR-PCR 扩增,发现在坏死组织中其扩增产物缺失的结果可能与其缺氧导致 DNA 的破损有关。随着科技的发展,ISSR 技术还可在其他更多的领域中显示出优越性,并为人类的发展做出贡献。综上所述,ISSR 分子标记技术由于其自身的特点和优势,在动物研究中将具有广阔的应用前景。

**致谢** 浙江师范大学王艳妮老师对本文的英文摘要进行了修改润色,特此致谢。

#### 参考文献

- 白秀娟. 2004. 圈养东北虎 ISSR 指纹分析初报. 兽类学报, **24**(1): 90-92.
- 陈婵娟, 窦红霞, 许志强, 等. 2009. 江苏地区 5 个三角帆蚌(*Hyriopsis cumingii*)种群的 ISSR 分析. 安徽农业科学, **37**(35): 17386-17389.
- 戴伟, 董文武, 苗郑, 等. 2005. DNA 分子标记在动物种群遗传结构研究中的应用. 天津农业科学, **11**(2): 4-7.
- 耿金虎, 黄强, 徐希莲, 等. 2009. ISSR-PCR 体系的建立与优化及其在亲缘关系分析中的应用. 昆虫学报, **52**(2): 223-227.
- 韩晓磊, 郁建峰, 陆秀乡, 等. 2010. 雅罗鱼亚科鱼类(鲢鱼、草鱼及赤眼鲮)的 ISSR 分子鉴定. 水产科学, **29**(9): 546-549.
- 何斌, 杨爱国, 王清印, 等. 2007. 栉孔扇贝♀×虾夷扇贝♂单对杂交子一代的 ISSR 分析. 大连水产学院学报, **22**(4): 273-277.
- 候娅丽, 刘文忠. 2004. ISSR 分子标记及其在动物遗传育种中的应用. 上海畜牧兽医通讯, (4): 8-9.
- 姜静, 杨传平, 刘桂丰, 等. 2003. 桦树 ISSR-PCR 反应体系的优化. 生态学杂志, **22**(3): 91-93.
- 金则新, 李均敏, 蔡琰琳. 2007. 不同海拔高度木荷种群遗传多样性的 ISSR 分析. 生态学杂志, **26**(8): 1143-1147.
- 李海生. 2004. ISSR 分子标记技术及其在植物遗传多样性分析中的应用. 生物学通报, **39**(2): 19-21.
- 李忠超, 王小兰. 2005. 保护生物学中若干术语的理解和辨析(1). 生物学通报, **40**(10): 13-14.
- 鲁绍雄, 吴常信. 2002. 动物遗传标记辅助选择研究及其应用. 遗传, **24**(3): 359-362.

- 马丽莎, 郑光明, 朱新平, 等. 2007. 濒危平胸龟两个自然居群的 ISSR 分析. 动物学杂志, **42**(6): 13–20.
- 邱芳, 伏健民, 金德敏, 等. 1998. 遗传多样性的分子检测. 生物多样性, **6**(2): 143–150.
- 孙始威, 孙振兴, 葛宜和, 等. 2008. 基于 ISSR 标记的扁玉螺(*Neverite didyma*)自然居群遗传结构. 生态学报, **28**(11): 5499–5505.
- 孙永峰, 吴伟, 高光, 等. 2007. 吉林白鹅肉用品系主要产肉性状的 ISSR 分子标记研究. 吉林农业大学学报, **29**(6): 691–694, 714.
- 王婷, 丁君, 于佳平, 等. 2009. 利用 ISSR 技术研究虾夷扇贝不同地理种群的遗传多样性及其分化. 烟台大学学报(自然科学与工程版), **22**(1): 35–41.
- 王定江, 杨汉远, 钟扬, 等. 2008. 贵州省八个种群角倍蚜 ISSR 遗传多样性. 生态学杂志, **27**(10): 1729–1733.
- 王建波. 2002. ISSR 分子标记及其在植物遗传学研究中的应用. 遗传, **24**(5): 613–616.
- 徐建鹏, 张全启, 王志刚, 等. 2009. ISSR 标记在牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)与石蝶(*Kareius bicoloratus*)种间杂交一代的分离方式分析. 海洋与湖泊, **40**(5): 622–626.
- 杨太有, 关建义, 陈宏喜. 2008. 三个地理群体赤眼鳟遗传多样性的 ISSR 分析. 水生生物学报, **32**(4): 529–533.
- 杨玉玲, 马祥庆, 张木清. 2006. ISSR 分子标记及其在树木遗传育种研究中的应用. 亚热带农业研究, **2**(1): 18–24.
- 于忠伟. 2009. 标记辅助选择及其在动物育种中的应用. 家禽科学, (2): 44–47.
- 张国强. 2005. ISSR 分子标记揭示黑斑侧褶蛙中国种群的遗传结构和遗传多样性(硕士学位论文). 南京: 南京师范大学.
- 张文静, 余育和, 沈韞芬. 2005. 五株纤毛虫遗传关系的 ISSR 分析. 水生生物学报, **29**(6): 633–638.
- 朱军, 王立斌, 郭东龙, 等. 2008. 基于 ISSR 标记技术的金钱豹遗传多样性分析. 山西大学学报(自然科学版), **31**(2): 244–247.
- Askari N, Abadi MM, Baghizadeh A. 2011. ISSR markers for assessing DNA polymorphism and genetic characterization of cattle, goat and sheep populations. *Iranian Journal of Biotechnology*, **9**: 222–229.
- Awasthi AK, Kar PK, Srivastava PP, et al. 2008. Molecular evaluation of bivoltine, polyvoltine and mutant silkworm (*Bombyx mori* L.) with RAPD, ISSR and RFLP-STS marks. *Indian Journal of Biotechnology*, **7**: 188–194.
- Bi XX, Yang QL, Gao TX, et al. 2011. The loss of genetic diversity during captive breeding of the endangered sculpin, *Trachidermus fasciatus*, based on ISSR markers; implications for its conservation. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, **29**: 958–966.
- Bornet B, Antoine E, Bardouil M, et al. 2004. ISSR as new markers for genetic characterization and evaluation of relationships among phytoplankton. *Journal of Applied Phycology*, **16**: 285–290.
- Campos YR, Carvalho OS, Goveia CO, et al. 2002. Genetic variability of the main intermediate host of *Schistosoma mansoni* in Brazil *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda: Planorbidae) assessed by SSR-PCR. *Acta Tropica*, **83**: 19–27.
- Casu M, Casu D, Lai T, et al. 2006. Inter-simple sequence repeat markers reveal strong genetic differentiation among populations of the endangered mollusk *Patella ferruginea* (Gastropoda: Patellidae) from two Sardinian marine protected areas. *Marine Biology*, **149**: 1163–1174.
- Chatterjee SN, Mohandas TP. 2003. Identification of ISSR markers associated with productivity traits in silkworm, *Bombyx mori* L. *Genome*, **46**: 438–447.
- Chen Q, Wang CH, Lu GQ. 2009. Analysis of genetic variation in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) from native and colonized regions using ISSR markers. *Biochemical Systematics and Ecology*, **37**: 549–555.
- Christopoulos MV, Rouskas D, Tsantili E, et al. 2010. Germplasm diversity and genetic relationships among walnut (*Juglans regia* L.) cultivars and Greek local selections revealed by Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) markers. *Scientia Horticulturae*, **125**: 584–592.
- Dong SZ, Shentu XP, Pan YY, et al. 2011. Evaluation of genetic diversity in the golden apple snail, *Pomacea canaliculata* (Lamarck), from different geographical populations in China by inter simple sequence repeat (ISSR). *African Journal of Biotechnology*, **10**: 1777–1783.
- Dušinsky R, Kádela M, Stloukalová V, et al. 2006. Use of inter-simple sequence repeat (ISSR) markers for discrimination between and within species of blackflies (Diptera: Simuliidae). *Biologia*, **61**: 299–304.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S. 2005. Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, **1**: 47–50.
- Fahmi AI, Al-Otaibi SA. 2011. Genetic Variation in Captive Herd of Arabian Oryx Using RAPD and ISSR Markers. *African Journal of Biotechnology*, **10**: 5251–5262.
- Francis CY, Yang RC, Tim B. 2000. POPGENE (1.32) [EB/OL]. [2011-10-11]. <http://www.ualberta.ca/~fyeh/download.htm>.
- Fritza U, Široky P, Kamic H, et al. 2005. Environmentally caused dwarfism or a valid species: Is *Testudo weissingeri* Bour, 1996 a distinct evolutionary lineage? New evidence



- from mitochondrial and nuclear genomic markers. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **37**: 389–401.
- Glazko V. 2003. An attempt at understanding the genetic basis of domestication. *Animal Science Papers and Reports*, **21**: 109–120.
- Gonzalez J, Wink M, Garcia-del-Rey E, *et al.* 2008. Evidence from DNA nucleotide sequences and ISSR profiles indicates paraphyly in subspecies of the Southern Grey Shrike (*Lanius meridionalis*). *Journal of ornithology*, **149**: 495–506.
- Guicking D, Joger U, Wink M. 2009. Cryptic diversity in a Eurasian water snake (*Natrix tessellata*, Serpentes: Colubridae): Evidence from mitochondrial sequence data and nuclear ISSR-PCR fingerprinting. *Organisms Diversity and Evolution*, **9**: 201–214.
- Haig SM, Mace TR, Mullins TD. 2003. Parentage and relatedness in polyandrous comb-crested jacanas using ISSRs. *Journal of Heredity*, **94**: 302–309.
- He L, Wang SB, Miao XX, *et al.* 2007. Identification of necrophagous fly species using ISSR and SCAR markers. *Forensic Science International*, **168**: 148–153.
- Kojima T, Nagaoka T, Nada K, *et al.* 1998. Genetic linkage map of ISSR and RAPD markers in Einkorn wheat in relation to that of RFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics*, **96**: 37–45.
- Kol NV, Lazebny OE. 2007. Polymorphism of ISSR-PCR markers in Tuvian population of reindeer *Rangifer tarandus* L. *Russian Journal of Genetics*, **42**: 1464–1466.
- Korpelainen H, Kostamo K, Virtanen V. 2007. Microsatellite marker identification using genome screening and restriction-ligation. *BioTechniques*, **42**: 479–486.
- Kostia S, Ruohonen-Lehto M, Väinölä R, *et al.* 2000. Phylogenetic information in inter-SINE and inter-SSR fingerprints of the Artiodactyla and evolution of the Bov-tA SINE. *Heredity*, **84**: 37–45.
- Koyama S, Fujita S, Hirota T, *et al.* 2008. Genetic Structure of Steller Sea Lion (*Eumetopias jubatus*) Rookeries in the Sea of Okhotsk. *Zoological Studies*, **47**: 781–787.
- Li H, Ruan CJ, Silva JAT. 2009. Identification and genetic relationship based on ISSR analysis in a germplasm collection of sea buckthorn (*Hippophae* L.) from China and other countries. *Scientia Horticulturae*, **123**: 263–271.
- Liu YG, Chen SL, Li J, *et al.* 2006. Genetic diversity in three Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) populations revealed by ISSR markers. *Aquaculture*, **255**: 565–572.
- Loveless MP, Hamrick JL. 1984. Ecological determinant of genetic structure in plant populations. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **15**: 65–95.
- Machkour-M'Rabet S, Hénaut Y, Dor A, *et al.* 2009. ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) as molecular markers to study genetic diversity in tarantulas (Araneae, Mygalomorphae). *The Journal of Arachnology*, **37**: 10–14.
- Maltagliati F, Lai T, Casu M, *et al.* 2006. Identification of endangered Mediterranean cyprinodontiform fish by means of DNA inter-simple sequence repeats (ISSRs). *Biochemical Systematics and Ecology*, **34**: 626–634.
- Mendki MJ, Sharma AK, Veer V, *et al.* 2011. Population genetic structure of *Culex quinquefasciatus* in India by ISSR marker. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, **4**: 357–362.
- Metge K, Burgermeister W. 2008. Analysis of *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda: Parasitaphelenchidae) Provenances Using ISSR and RAPD Fingerprints// Mota MM, Vieira P, eds. Pine Wilt Disease: A Worldwide Threat to Forest Ecosystems. Berlin: Springer Press: 175–186.
- Mickett K, Morton C, Feng J, *et al.* 2003. Assessing genetic diversity of domestic populations of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) in Alabama using AFLP markers. *Aquaculture*, **228**: 91–105.
- Nagornyuk TV, Glazko VI. 2007. Polymorphism of molecular genetic markers (electrophoretic variants of proteins, ISSR-PCR) in representatives of Ungulata and Delphinidae. *Russian Agricultural Sciences*, **33**: 264–267.
- Reddy MP, Sarla N, Siddiq EA. 2002. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica*, **128**: 9–17.
- Ren ZM, Zhu B, Wang DJ, *et al.* 2008. Comparative population structure of Chinese sumac aphid *Schlechtendalia chinensis* and its primary host-plant *Rhus chinensis*. *Genetica*, **132**: 103–112.
- Rohlf FJ. 1998. NTSYS-PC: numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.02, New York: Exeter Software, Setauket Press.
- Sharma D, Rao KBCA, Singh HP, *et al.* 1998. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) for evaluating genetic relationships among varieties of guinea fowl. *Genetic Analysis: Biomolecular Engineering*, **14**: 125–128.
- Srivatava PP, Kar PK, Awasthi AK. 2007. Identification and association of ISSR marks for thermal stress in polyvoltine silkworm *Bombyx mori*. *Russian Journal of Genetics*, **43**: 858–864.
- Stoler DL, Bartos JD, Swede H, *et al.* 2006. Genomic instability in invasion breast carcinoma measured by inter-Simple Sequence Repeat PCR. *Breast Cancer Research and Treatment*, **97**: 107–110.
- Stolpovsky YA, Kol NV, Evsyukov AN. 2010. Analysis of the genetic structure of Tuvian short-fat-tailed sheep populations with the use of the ISSR-PCR method. *Russian Journal of Genetics*, **46**: 1462–1470.

- Verma S, Rana TS. 2011. Genetic diversity within and among the wild populations of *Murraya koenigii* (L.) Spreng., as revealed by ISSR analysis. *Biochemical Systematics and Ecology*, **39**: 139–144.
- Voronkova VN, Tsedev T, Sulimova GE. 2011. Comparative analysis of the informativeness of ISSR markers for estimating genetic diversity of horse breeds. *Russian Journal of Genetics*, **47**: 1004–1007.
- Yang CS, Bai XJ. 2008. The genetic diversity study of wild Wusuli raccoon dog from Neijiang district. *Journal of Northeast Agriculture University*, **15**: 20–24.
- Yang P, Chen LQ, Wang W, *et al.* 2010. Genetic diversity of oriental river prawn (*Macrobrachium nipponense* De Haan) revealed by ISSR markers. *Journal of Fishery Sciences of China*, **17**: 913–921.
- Yao B, Hu XL, Bao ZM, *et al.* 2007. Genetic variation in two sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) stocks revealed by ISSR markers. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, **25**: 91–96.
- Zamani P, Akhondi M, Mohammadabadi MR, *et al.* 2011. Genetic variation of Mehraban sheep using two inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. *African Journal of Biotechnology*, **10**: 1812–1817.
- Zhang H, Yan J, Zhang GQ, *et al.* 2008. Phylogeography and demographic history of Chinese black-spotted frog populations (*Pelophylax nigromaculata*): Evidence for independent refugia expansion and secondary contact. *BMC Evolutionary Biology*, **8**: 21.
- Zhao C, Li Q, Kong LF. 2008. Inheritance of AFLP markers and their use for genetic diversity analysis in wild and farmed scallop (*Chlamys farreri*). *Aquaculture*, **287**: 67–74.
- Zhao GH, Li J, Zou FC, *et al.* 2009. ISSR, an effective molecular approach for studying genetic variability among *Schistosoma japonicum* isolates from different provinces in mainland China. *Infection, Genetics and Evolution*, **9**: 903–907.
- Zheng X, Hu J, Kunnon SP, *et al.* 2010. Identification of necrophagous fly species from 12 different cities in China using ISSR and SCAR markers. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, **3**: 510–514.
- Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, **20**: 176–183.

---

**作者简介** 林杰君,女,1986年生,硕士研究生,主要从事分子生态学研究。E-mail: linjiejun1986@126.com

**责任编辑** 刘丽娟

---