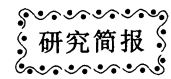


DOI: 10.3724/SP.J.1006.2011.01116



应用 ISSR 分子标记绘制红麻种质资源 DNA 指纹图谱

汪斌¹ 祁伟^{1,**} 兰涛¹ 陈惠端² 徐建堂¹ 粟建光³
李爱青⁴ 祁建民^{1,*}

¹ 福建农林大学 / 作物遗传育种与综合利用教育部重点实验室, 福建福州 350002; ² 福建农林大学机电工程学院, 福建福州 350002;
³ 中国农业科学院麻类研究所, 湖南长沙 410205; ⁴ 安徽省种子管理总站, 安徽合肥 230001

摘要: 以 6 份红麻种质资源为材料, 对 UBC807~UBC890 等 80 个 ISSR 引物进行筛选, 筛选出多态性好的 ISSR 引物 20 个。利用这 20 个 ISSR 引物扩增来自国内外 84 份红麻种质资源, 共获得 230 条谱带, 平均每个引物扩增出 11.5 条谱带, 其中多态性谱带 185 条, 多态性条带比率为 80.43%, 表明供试的红麻种质资源遗传多样性较丰富。以供试 84 份红麻种质资源的 ISSR 扩增谱带为基础, 建立了供试材料扩增条带指纹数据库的 Excel 文件。根据指纹图谱唯一性原则, 采用自行开发的 DNA 指纹数据分析软件, 再从 20 个多态性好的 ISSR 引物中遴选出 UBC 813、UBC 825、UBC 836、UBC 888 和 UBC 889 引物, 绘制出 82 个红麻种质资源的 DNA 指纹图谱, 为红麻种质资源分子身份证的构建奠定了基础。

关键词: 红麻, 种质资源; DNA; ISSR; 指纹图谱

Establishment of DNA Fingerprints of Kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) Germplasm Resources with ISSR Molecular Markers

WANG Bin¹, QI Wei^{1,**}, LAN Tao¹, CHEN Hui-Duan², XU Jian-Tang¹, SU Jian-Guang³, LI Ai-Qing⁴, and QI Jian-Ming^{1,*}

¹ Key Laboratory of Ministry of Education for Genetics, Breeding and Multiple Utilization of Crops, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China; ² College of Mechanical and Electrical Engineering, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China; ³ Institute of Bast Fiber Crops, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Changsha 410205, China; ⁴ Anhui Province Seeds Management Station, Hefei 230001, China

Abstract: Kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) is an important economic crop in China. To identify germplasm resources and establish the data base of DNA fingerprints, we adopted six kenaf germplasm resources to screen 80 ISSR primers, 20 of which were polymorphic. Then 20 ISSR primers were used to amplify 84 kenaf germplasm resources introduced and preserved from home and abroad. Totally 230 bands were produced, the average number of DNA bands amplified by each primer was 11.5, and the number of polymorphic DNA bands was 185. The polymorphic proportion of DNA bands was 80.43%, which indicated the abundant genetic diversity of kenaf germplasm resources preserved. Based on the DNA bands amplified from 84 kenaf germplasm resources, the Excel data base for PCR amplified bands of the kenaf germplasm resources was established. According to the principle of uniqueness of the fingerprints, the DNA fingerprints of 82 kenaf germplasm were constructed with five ISSR primers (UBC813, UBC825, UBC836, UBC888, and UBC889) selected from 20 polymorphic primers, using the analyzing software designed by our laboratory programmed and based on image manipulation. The fingerprints provide a basis of the molecular identification of kenaf germplasm resources. In this research, the DNA fingerprints system was proved to be feasible and reliable.

Keywords: Kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.); Germplasm resource; DNA; ISSR; Fingerprinting

红麻(*Hibiscus cannabinus* L.)是锦葵科(Malvaceae)木 抗逆性强、适应性广、丰产性高等生物学特性, 其纤维还
槿属(*Hibiscus*)一年生韧皮纤维作物, 具有生长速度快、 具有吸水、散水快和抑菌、抗菌等功效。红麻以其巨大的

本研究由福建省科技重点项目(2008N0005), 福建省科技重点项目(2007N0011), 国家麻类产业技术体系建设(nycytx-19-s12)和国家公益性行业(农业)科研专项(nyhyzx07-018-3)资助。

* 通讯作者(Corresponding author): 祁建民, E-mail: qijm863@163.com, Tel: 0591-83644898

第一作者联系方式: E-mail: wangbin_doc@163.com ** 共同第一作者

Received(收稿日期): 2010-09-16; Accepted(接受日期): 2011-03-06.

生物产量(为树木的 3~5 倍)、极强的二氧化碳吸收能力(为树木的 4~5 倍)以及品质可与针叶林木相媲美等突出优点而倍受关注^[1]。建国以来,我国十分重视麻类种质资源的搜集、鉴定与利用研究,并取得了系列成果^[2-4]。Howard 等^[5]曾根据叶型、茎色、叶柄色、株型和花瓣色等性状,将红麻划分为 5 个变种(Simplex、Viridis、Ruber、Purpureus 和 Vulgaris)和不同类型。虽然评价指标和性状有一定变动,但这一评价、鉴定及分类方法一直沿用至今^[6]。关于红麻与近缘种亲缘关系的研究, Menzel 等^[7]根据染色体同源性,将红麻所在的木槿属 *Furcaria* 组的种分成 3 类,第 3 类包含红麻 11 个二倍体和四倍体种,一般为 B 和 A 染色体组。1989 年黄培坤等^[3]对美国引进的 325 份红麻及其近缘种进行筛选鉴定,评价出综合性状优良的品种 BG52-135 和 J-1-113 等。1991 年邓丽卿等^[8]对来源于不同国家和地区的 450 份红麻栽培品种及野生资源材料进行了形态分类鉴定研究,把我国保存的红麻种质资源分为 29 个类别。2006 年李爱青等^[9]从形态学和细胞学角度,证明了红麻存在亚种的可能性。从总体来说,红麻种质资源的研究多为形态学水平的,其中一些也涉及到细胞学,但在红麻种质资源基因组 DNA 水平上的系统鉴定仍显不足。

在分子标记技术发展的过程中, AFLP、RAPD、ISSR、SRAP 和 SNP 等多种新型标记技术在多种作物或动物上获得成功应用^[10-24]。唐利华等^[24]采用 ISSR 标记技术对来自全国的黑木耳 34 个主要栽培菌株进行 DNA 指纹分析,初步构建其标准化 DNA 指纹图谱。王心宇等^[25]对 ISSR 标记技术在构建多态水平很低的小麦种内指纹图谱方面做了初步研究。发现 $(AG)_n$ 、 $(AC)_n$ 、 $(TG)_n$ 等二核苷酸重复引物类型在小麦中多态水平最高,能将亲缘关系很近的品种或品系区分开。Prevost 等^[23]用 ISSR 指纹图谱鉴别马铃薯品种,仅用了 4 个 ISSR 引物就将 30 多个品种区分开来。

近年来,红麻的分子标记研究也取得了一些进展,利用分子标记进行了红麻的遗传多样性研究和不育基因的定位研究等。如郭平安等^[26]利用 RAPD 标记对红麻及其同属的近缘种进行了分析,将 27 份材料分成了 7 组,其中红麻分成 2 组,一组为栽培红麻,一组为野生材料。陶爱芬等^[10]和林荔辉等^[11]利用 ISSR 分子标记分析 30 份红麻栽培品种表明我国红麻栽培品种多数遗传基础较为狭窄。霍光等^[13]利用 ISSR 分子标记分析 44 份红麻种质资源得到了相似的结果。同时,李辉等^[12]利用 ISSR 分子标记对红麻的雄性不育基因进行分析,筛选到一条与红麻不育基因有关的引物 U859。本文以 ISSR 多态性谱带为基础,用编程的基于图像处理的 DNA 指纹图谱分析软件,绘制出 82 个红麻种质资源的 DNA 指纹图谱,为红麻种质资源的分子身份证构建奠定了基础。

1 材料与方 法

1.1 供试材料

从我国保存的红麻种质资源和现代育成的品种中选

取 84 份,其中包括从美国、古巴、澳大利亚、非洲等 22 个国家和地区引进的栽培品种 23 份,野生及半野生类型 21 份,我国“八五”至“十五”期间由中国农业科学院麻类研究所、福建农林大学、广东省农业科学院等单位选育的红麻新品种 40 份。全部供试材料(表 1)于 2005 年种植于福建农林大学试验大田。

1.2 红麻基因组 DNA 的提取和纯化

在幼苗期,采用本研究室改良的 CTAB 法提取红麻幼嫩叶片的基因组 DNA,用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。然后对所提取的红麻 DNA 进行纯化^[10,27]。

1.3 多态性 ISSR 引物筛选及参试材料的 ISSR 分析

以福红 2 号、福红 952、福引 0-16-1、福红 7 号、福红 992 和闽红 964 的基因组 DNA 为模板,对 UBC087~UBC890 等 80 个 ISSR 引物进行多态性筛选,ISSR 引物购自上海生工生物技术有限公司。在冰上建立 25 μ L 的 ISSR-PCR 反应体系(表 2)。ISSR-PCR 扩增程序为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 45 s, 50 $^{\circ}$ C 1.5 min, 72 $^{\circ}$ C 1.5 min, 36 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min; 10 $^{\circ}$ C 保存。退火温度因扩增产物的效果而调整。PCR 产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳分离,EB 染色检测。然后利用上面 6 个红麻材料筛选出的多态性 ISSR 引物,对 84 份红麻材料进行标记分析,获得扩增谱带。

1.4 红麻 DNA 指纹图谱的绘制

对于 84 个红麻材料的 ISSR 扩增谱带,只分析清晰可辨的电泳条带。对于每条 ISSR 引物的扩增产物,按照扩增条带的分子量从大到小编号和读取。以扩增条带出现为“1”,不出现为“0”,把图形资料转换成数字资料。将每个 ISSR 引物对 84 份红麻种质资源的扩增结果记录为一张 Excel 表格。将每个 Excel 表格中的 0、1 序列数据阵导入计算机程序,进行运算分析,找出其中唯一的特征值,每个特征值所对应的物种号即为此引物所能扩增出的具有特异性谱带的品种。分别对多个 ISSR 引物的扩增结果进行运算,直到将所有材料分开为止,从而构建出供试 84 个红麻种质资源的 DNA 指纹图谱。

2 结果与分析

2.1 供试材料 DNA 提取与多态性 ISSR 引物筛选

采用本实验室已建立的红麻总 DNA 提取的改良 CTAB 法与 ISSR 扩增技术优化体系^[27],以福红 2 号、福红 952、福引 0-16-1、福红 7 号、福红 992 和闽红 964 的基因组 DNA 为模板,对 UBC087~UBC890 等 80 个 ISSR 引物进行多态性筛选,采用 1% 的琼脂糖凝胶电泳分离 ISSR 的 PCR 扩增产物,共选出 20 个多态性较理想的 ISSR 引物(表 3)。

2.2 多态性引物对供试材料的 ISSR 分析

利用筛选出的 20 条多态性引物对 84 份红麻种质资源进行 ISSR 分析,图 1 为引物 UBC825 对 84 个红麻材料的扩增结果。由图中可以看出,84 个红麻材料的 ISSR-PCR

表 1 供试 84 份红麻种质资源名称、来源及类型
Table 1 Varieties, origins, and types of 84 kenaf germplasm resources in the experiment

编号 No.	材料名称 Name	来源 Origin	类型 Type	编号 No.	材料名称 Name	来源 Origin	类型 Type
1	福红 2-1 Fuhong 2-1	FAFU, China	Cultivar	43	H305	IBFC, CAAS, China	Cultivar
2	福红 2 号 Fuhong 2	FAFU, China	Cultivar	44	Bg52-1	Mali	Cultivar
3	福红 3 号 Fuhong 3	FAFU, China	Cultivar	45	743	GAAS, China	Cultivar
4	福红 4 号 Fuhong 4	FAFU, China	Cultivar	46	粤引 1 号 Yueyin 1	GAAS, China	Cultivar
5	福红 5 号 Fuhong 5	FAFU, China	Cultivar	47	粤引 4 号 Yueyin 4	GAAS, China	Cultivar
6	福红 6 号 Fuhong 6	FAFU, China	Cultivar	48	非洲裂叶 Africa cleft leaf	Africa	Cultivar
7	福红 7 号 Fuhong 7	FAFU, China	Cultivar	49	金山无刺(早) Jinshanwuci (early)	FAFU, China	Cultivar
8	福红 8 号 Fuhong 8	FAFU, China	Cultivar	50	金山无刺(晚) Jinshanwuci (late)	FAFU, China	Cultivar
9	福红 9 号 Fuhong 9	FAFU, China	Cultivar	51	泰红 763 Taihong 763	Thailand	Cultivar
10	福红 951(红) Fuhong 951(red)	FAFU, China	Cultivar	52	古巴 8 号 Cuba 8	Cuba	Cultivar
11	福红 952(绿) Fuhong 952(green)	FAFU, China	Cultivar	53	83-20	America	Cultivar
12	福红 991(红) Fuhong 991(red)	FAFU, China	Cultivar	54	85-15	Poland	Cultivar
13	福红 992(绿) Fuhong 992(green)	FAFU, China	Cultivar	55	F65	France	Cultivar
14	福红 02/9 Fuhong 02/9	FAFU, China	Cultivar	56	AS-277	Australia	Cultivar
15	福引 0-16-1 Fuyin 0-16-1	FAFU, China	Cultivar	57	AS233	Australia	Cultivar
16	闽红 88/31 Minhong 88/31	FAAS, China	Cultivar	58	阿联红麻 Alianhongma	Egypt	Cultivar
17	闽红 321 Minhong 321	FAAS, China	Cultivar	59	ZF78	South Africa	Cultivar
18	闽红 964 Minhong 964	FAAS, China	Cultivar	60	85-135	Philippines	Cultivar
19	H318	IBFC, CAAS, China	Cultivar	61	PA264	Pakistan	Cultivar
20	H316	IBFC, CAAS, China	Cultivar	62	85-13	Sudan	Cultivar
21	LC0301	IBFC, CAAS, China	Cultivar	63	H029	Kenya	Wildspecies
22	福红 992 Fuhong 992	FAFU, China	Cultivar	64	H038	Kenya	Wildspecies
23	福红 9913 Fuhong 9913	FAFU, China	Cultivar	65	H060	Tanzania	Wildspecies
24	ZH-01	ZAAS, China	Cultivar	66	H070	Tanzania	Wildspecies
25	K03-2	GXU, China	Cultivar	67	H076	Tanzania	Wildspecies
26	中红麻 4 号 Zhonghongma 4	IBFC, CAAS, China	Cultivar	68	H094	Tanzania	Wildspecies
27	青皮 3 号 Qingpi 3	Viet Nam	Cultivar	69	H098	Tanzania	Wildspecies
28	02/11(绿) 02/11(green)	FAFU, China	Cultivar	70	H102	Tanzania	Wildspecies
29	02/12(无刺) 02/12(no thorn)	FAFU, China	Cultivar	71	塔什干 Tashigan	Soviet	Cultivar
30	02/29(绿) 02/29(green)	FAFU, China	Cultivar	72	GA42	Ghana	Half wildspecies
31	02/31(红) 02/31(red)	FAFU, China	Cultivar	73	ZB90	Zambia	Half wildspecies
32	02/51(绿) 02/51(green)	FAFU, China	Cultivar	74	IDN147	Indonesia	Half wildspecies
33	KB11	IBFC, CAAS, China	Cultivar	75	85-244	Kenya	Half wildspecies
34	KB2	IBFC, CAAS, China	Cultivar	76	SL-254	Salvador	Half wildspecies
35	SCS11-04	Germany	Cultivar	77	ZM412	Zimbabwe	Half wildspecies
36	SCS11-06-1	Germany	Cultivar	78	NA414	Nigeria	Half wildspecies
37	SCS11-09	Germany	Cultivar	79	85-132	Sudan	Half wildspecies
38	C2032	Cuba	Cultivar	80	MX247	Mexico	Half wildspecies
39	EV-41	America	Cultivar	81	ZB324	Zambia	Half wildspecies
40	红引 135 Hongyin 135	IBFC, CAAS, China	Cultivar	82	SD124	Sudan	Half wildspecies
41	83-6	Pakistan	Cultivar	83	UG93	Uganda	Half wildspecies
42	83-7	Pakistan	Cultivar	84	H118	Tanzania	Wildspecies

FAFU: 福建农林大学; FAAS: 福建省农业科学院; IBFC, CAAS: 中国农业科学院麻类研究所; ZAAS: 浙江省农业科学院; GXU: 广西大学; GAAS: 广东省农业科学院。

FAFU: Fujian Agriculture and Forestry University; FAAS: Fujian Academy of Agricultural Sciences; IBFC, CAAS: Institute of Bast Fiber Crops, Chinese Academy of Agricultural Sciences; ZAAS: Zhejiang Academy of Agricultural Sciences; GXU: Guangxi University; GAAS: Guangdong Academy of Agricultural Sciences.

表 2 ISSR-PCR 反应体系
Table 2 ISSR-PCR reaction system

反应体系 Reaction system	所加的量 Amount added (μL)	终浓度 Final concentration
Primer pair (4 μmol L ⁻¹)	4.000	0.64 μmol L ⁻¹
10×buffer	2.500	1×buffer
Mg ²⁺ (25 mmol L ⁻¹)	2.500	2.5 mmol L ⁻¹
dNTPs (10 mmol L ⁻¹)	0.375	150 μmol L ⁻¹
Taq (5 U μL ⁻¹)	0.300	0.06 U μL ⁻¹
DNA (20 ng μL ⁻¹)	2.000	1.6 ng μL ⁻¹
Sterile water	13.325	

扩增条带比较清晰, 可将不同红麻材料相互区分。对于 ISSR 扩增谱带, 只分析清晰可辨的电泳条带。结果表明, 20 条多态性 ISSR 引物, 共扩增出 230 条谱带, 平均每个引物扩增出 11.5 条谱带, 其中多态性谱带 185 条, 多态性

条带比率为 80.43%, 表明供试的红麻种质资源遗传多样性较丰富。每个 ISSR 引物对 84 份红麻种质资源的扩增结果记录为一张 Excel 表格, 共建立了 20 张 Excel 表格。

2.3 特征谱带的筛选分析

用我校自行开发的 DNA 指纹数据分析器, 依次读入 20 条 ISSR 引物扩增结果对应的 Excel 表格数据, 对每个引物将 84 份红麻种质资源的 PCR 扩增谱带转换成的 0、1 数据进行分析, 找出其中对应引物 PCR 扩增唯一性的特异性谱带。如图 2 为对引物 UBC825 的扩增谱带数据进行特征值分析的结果截图。在筛选出的 20 个 ISSR 多态性引物中, 每个多态性引物分别能扩增出 7~23 条多态性条带, 不同引物能够区分的红麻种质资源数不同, 其范围在 3~66 之间。如引物 UBC825 能扩增出 17 条多态性条带, 并且可以区分出 66 个品种(图 2); 引物 UBC836 能扩增出 11 条多态性条带, 并且可以区分出 37 个品种。

表 3 20 个 ISSR 引物的编号及序列
Table 3 Serial numbers and sequences of 20 ISSR primers

引物编号 Primer number	引物序列 Primer sequence (5'-3')	引物编号 Primer number	引物序列 Primer sequence (5'-3')
UBC 813	CTCTCTCTCTCTCTT	UBC 850	GTGTGTGTGTGTGTGYC
UBC 814	CTCTCTCTCTCTCTA	UBC 856	ACACACACACACACACYA
UBC 815	CTCTCTCTCTCTCTG	UBC 864	ATGATGATGATGATGATG
UBC 816	CACACACACACACAT	UBC 868	GAAGAAGAAGAAGAAGAA
UBC 825	ACACACACACACACT	UBC 873	CACAGACAGACAGACA
UBC 827	ACACACACACACACG	UBC 881	GGGTGGGGTGGGGTG
UBC 828	TGTGTGTGTGTGTGA	UBC 885	BHBGAGAGAGAGAGAGA
UBC 829	TGTGTGTGTGTGTGC	UBC 888	BDBCACACACACACACA
UBC 835	AGAGAGAGAGAGAGAYC	UBC 889	DBDACACACACACACAC
UBC 836	AGAGAGAGAGAGAGAYA	UBC 890	VHVTGTGTGTGTGTGT

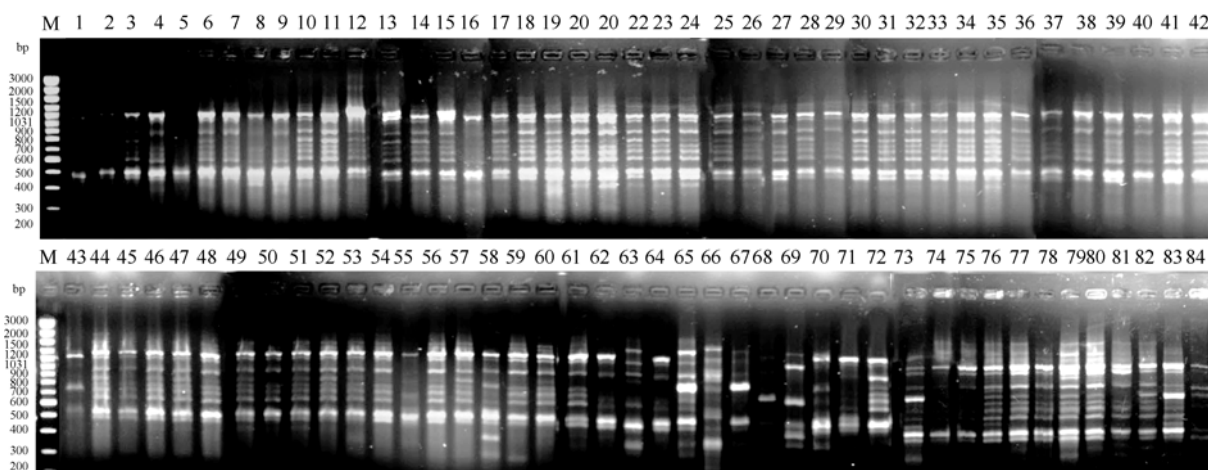


图 1 84 个红麻材料用 UBC825 引物扩增结果
Fig. 1 Amplification results of primer UBC825 in 84 kenaf germplasm resources

M: 标准 DNA 分子量 marker, 图片上边数字为 84 个红麻种质资源编号。
M: DNA molecular weight ladder. The number above is serial number of 84 kenaf germplasm resources.

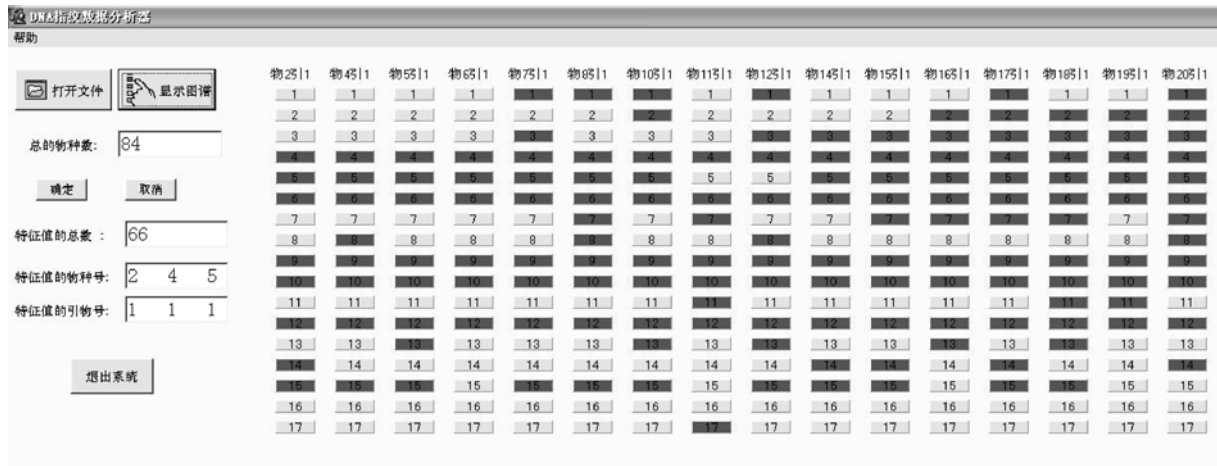


图 2 引物 UBC 825 扩增谱带筛选绘制的部分结果图

Fig. 2 Screening results of amplified bands of primer UBC 825

图中黑色长方形代表红麻材料在对应的 ISSR 引物有扩增条带, 上边物 n 代表第 n 个供试红麻种质材料(表 1 编号), 引 1 代表此次分析的引物。
The black rectangles in the figure indicate that there are amplified bands of the kenaf germplasm resources on the site. Material n on the top of the figure represents the No.n kenaf germplasm resources (Fig.1 numbers). Primer 1 represents the screening analysis primer in this experiment.

2.4 82 个红麻种质资源的 DNA 指纹图谱

综合考虑扩增产物多态性条带的数量和所能区分的品种数目, 最后我们选用 UBC825(以 P1 代表, 下同)、UBC836(P2)、UBC813(P3)、UBC888(P4)和 UBC889(P5) 5 个引物, 建立了 82 个红麻种质资源基因组的 DNA 指纹图谱。构建 DNA 指纹图谱的 5 个 ISSR 引物的有关信息见表 4。

表 4 红麻 DNA 指纹图谱构建所用 5 个 ISSR 引物的退火温度、多态性条带数和区分材料数

Table 4 Anneal temperature, polymorphic bands number and distinguished germplasms of five ISSR primers used for establishment of kenaf DNA fingerprinting

引物编号 Primer number	退火温度 Anneal temperature (°C)	多态性条带数 Polymorphic bands number	区分材料数 Distinguished germplasms
UBC825	51.5	17	66
UBC836	51.0	11	37
UBC813	50.0	9	10
UBC888	52.5	15	18
UBC889	53.0	7	3

图 3 所示为利用 UBC825 等 5 个引物构建的 82 个红麻种质资源的 DNA 指纹唯一性图谱。但是用此 5 个引物对于福红 3 号和福红 9 号还无法鉴别, 经查其系谱, 福红 9 号系从福红 3 号中单株选择的株选后代, 在遗传基础上没有明显差异。图中共包含 5 个引物的指纹图谱, 如果采用上对齐方式, 则会将不同引物的相同编号的条带误为一致。故本图采用下对齐的方式进行构图, 以示不同引物之区别。

3 讨论

自 1984 年开发出 DNA 指纹(DNA fingerprint)图谱技术后, 就显示出巨大的应用价值, 1985 年先后在移民身份

确定、罪犯身份确定中使用^[28]。在大田作物上, 科学准确地鉴别农作物品种及种质资源材料的遗传特异性, 对种子质量鉴定、遗传资源评价、品种权益保护等均具重要现实意义。近年来 DNA 分子标记的不断发掘和检测技术的渐趋完善, 使从 DNA 水平上对品种的遗传特异性进行快速、准确、不受环境条件影响的鉴定成为可能^[29]。目前所育成的一些红麻品种间在形态性状标记上的差异较难区别, 而 DNA 分子标记在 DNA 指纹鉴定、品种保护及亲缘关系分析科学性方面显得尤为重要。

DNA 指纹图谱很多是基于具有特异引物的微卫星标记(microsatellite 或 SSR)来构建, 如小麦^[29]、水稻^[30]、玉米^[31]等。这是因为特异引物拥有一些非特异引物所没有的优点, 如扩增产物的特异性, 重现性(稳定性)等, 尤其是微卫星标记的多态性比较高。红麻的分子标记起步较晚, 目前大多数分子标记都是非特异引物标记, 如 ISSR^[10-11]、RAPD^[26]、SRAP^[32]等。然而基于非特异引物的分子标记也是可以构建 DNA 指纹图谱的^[33-34]。若利用非特异引物(如 ISSR)构建红麻的 DNA 指纹图谱, 则要求所用的 ISSR 标记具备特异性、稳定性和多态性等。为了满足这些条件, 红麻的 ISSR 标记体系则需要摸索和完善, 诸如红麻基因组 DNA 的质量、PCR 反应体系和程序、电泳分离参数等都必须标准化^[27]。

利用分子标记进行 DNA 指纹鉴定或构建 DNA 指纹图谱, 遵循的原则之一是利用尽量少的标记分开尽量多的品种, 以降低成本和提高检测效率, 这就要求所用的标记多态性要好。本研究中所筛选出的多数的 ISSR 引物能产生高强带, 较少有重叠。ISSR 在不同品种间扩增效果存在较大差异, 不同引物和品种的组合中, 最高可扩增出 11 条带, 最低的只扩增出 4 条带。筛选出的 20 个 ISSR 引物对 84 份红麻材料进行 PCR 扩增, 共扩增出 230 条带, 平均每个引物扩增出 11.5 条, 其中多态性条带共 185 条,

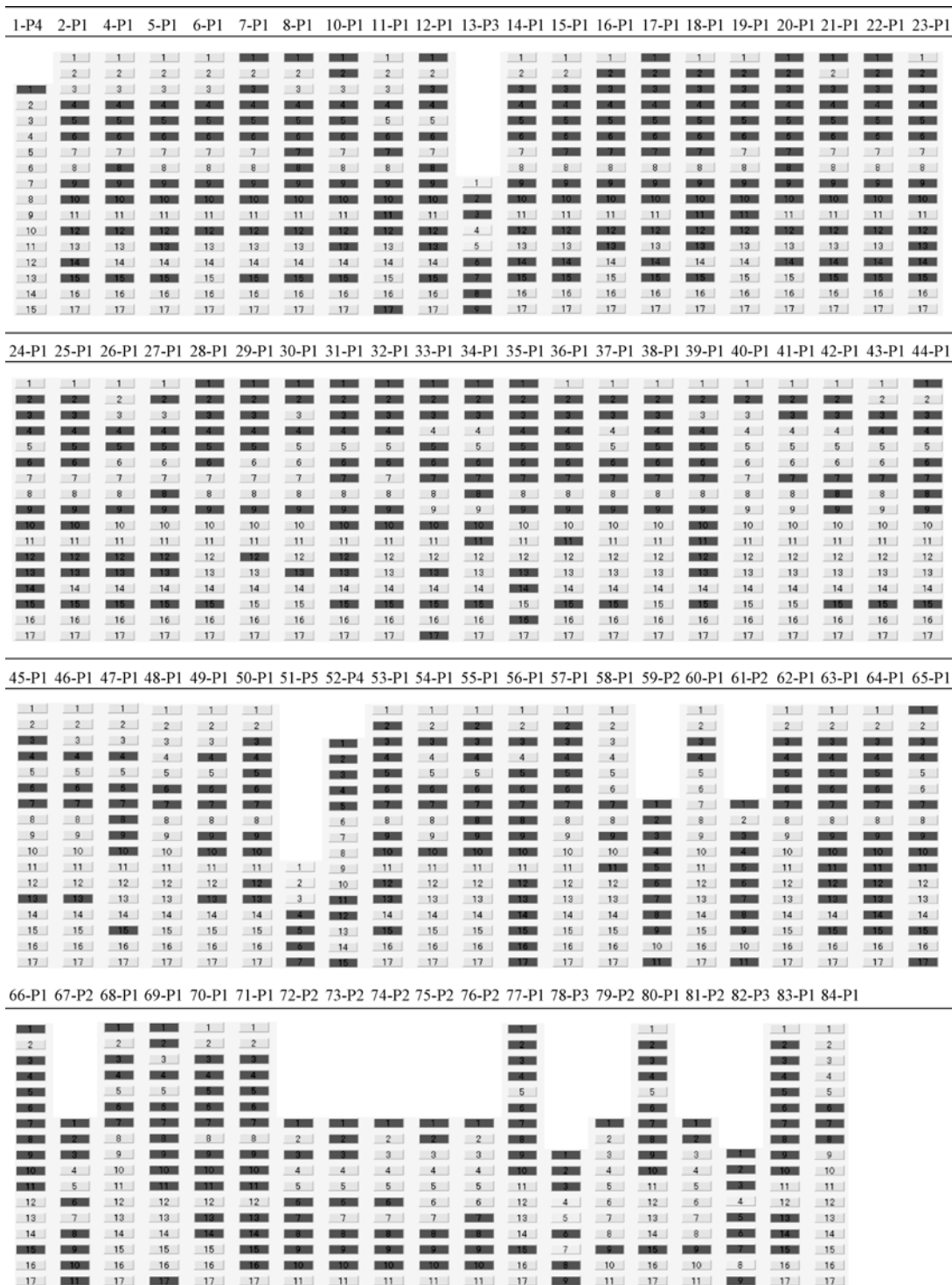


图 3 82 份红麻供试材料基因组 DNA 指纹图谱标准模式图

Fig. 3 Standard mode image of genome DNA fingerprintings of 82 kenaf germplasm resources for experiment

图中黑色长方形代表该红麻材料的该 ISSR 引物在这个位置有扩增条带, 上边标注的 x-Py 中, x 代表供试红麻种质材料(表 1 编号), Py 代表不同的引物, 其中 P1: UBC825, P2: UBC836, P3: UBC813, P4: UBC888, P5: UBC889。

The black rectangles in the figure indicate that there are amplified bands of the kenaf germplasm resources on the site. In the annotation x-Py on the upper part of the figure, x represents different kenaf germplasm resources (Fig.1 numbers), and Py represents the different primers in this experiment. P1: UBC825, P2: UBC836, P3: UBC813, P4: UBC888, P5: UBC889.

占总数的 80.43%。尤其是引物 UBC825 能扩增出 17 条多态性条带, 并且可以区分出 66 个品种。由此可见, ISSR 技术能够提供基因组 DNA 丰富的信息, 是红麻种质资源

研究中快速、可靠、有效的新技术。但是 ISSR 标记毕竟利用的是非特异引物, 其扩增条带的稳定性还是相对的。为了实现最终的准确、稳定的红麻 DNA 指纹图谱的构建,

在今后进一步研究上可考虑将 ISSR 标记中的多态性条带回收、克隆和测序, 然后转化成 SCAR 标记。若开发出一定数量的特异的 SCAR 标记, 则可满足较大容量的红麻种质资源指纹图谱绘制的需要。例如水稻的 DNA 指纹鉴定的部颁标准使用了 24 对微卫星引物, 其中 12 对首选引物, 12 对候选引物^[30]。

唯一性是 DNA 指纹图谱的终极目标。由于研究对象的遗传背景、供试材料份数及其所选引物的多态性等因素的影响与限制, 在构建 DNA 指纹图谱过程中, 往往用 1 个引物达不到唯一性这个要求。本研究用了 5 个 ISSR 引物最终将 82 份红麻种质资源区分开来, 预计还可以区分更多的种质资源。本研究的一大特色是应用我校陈惠端老师自行开发的 DNA 指纹图谱分析软件, 能够快速准确在供试品种中找出特异性谱带, 并解决了供试品种太多时, 肉眼难以分析的问题, 提高了准确性, 具有一定的科学性和可靠性, 适合红麻指纹图谱分子数据库构建使用。本文构建出的红麻 DNA 指纹图谱可以在品种鉴定和知识产权保护等方面发挥作用, 也可以在挖掘重要功能基因方面提供分子标记基础, 而且也可揭示红麻种质资源的遗传多样性和亲缘关系, 为红麻杂交育种对亲本的利用提供科学依据, 为我国红麻种质资源分子数据库的建设奠定一定的工作基础。随着红麻基础研究的不断深入, 红麻的特异引物标记正在开发, 其中包括多态性较高的微卫星标记引物^[35]。预计, 随着红麻微卫星标记的不断开发, 在不久的将来用微卫星标记构建红麻的 DNA 指纹图谱则会变成现实。

致谢: 福建农林大学本科杨开琪与张世美的无私帮助, 中国农科院麻类研究所种质资源室戴志刚助研提供部分红麻种质资源, 特表示衷心感谢。

References

- [1] Cheng Z(程舟), Sameshima K(鲛岛一彦), Chen J-K(陈家宽). The study, processing and utilization of kenaf in Japan. *Plant Fiber Products* (中国麻业), 2001, 23(3): 16–24 (in Chinese)
- [2] Dempsey J M. *Fiber Crops*. Gainesville: University Presses of Florida, 1975. pp 300–325
- [3] Huang P-K(黄培坤), Deng L-Q(邓丽卿), Su J-G(粟建光), Li A-Q(李爱青). Identification and utilization study of kenaf germplasms from foreign countries. *China's Fiber Crops* (中国麻作), 1989, 11(4): 5–9 (in Chinese)
- [4] Li A-Q(李爱青). The visiting report of jute and kenaf germplasms in Kenya. *China's Fiber Crops* (中国麻作), 1990, 12(1): 16–21 (in Chinese)
- [5] Howard A, Howard G L C. Studies in Indian fibre plants 2 on some new varieties of *Hibiscus cannabinus* L. and *Hibiscus sabbdariffa* L. *Indian Dep Agric, Mem Bot Serv*, 1911, 4: 9–36
- [6] Bhardwaj H L, Rangappa, M, Webber III C L. Effects of row spacing, fertilizers, and varieties on kenaf yield in Virginia. In: *Proceedings of the International Kenaf Association Conference*, Albuquerque, NM 8, 1996. pp 21–26
- [7] Menzel M Y, Wiloson F D. Chromosomes and crossing behaviour of *Hibiscus cannabinus*. *Am J Bot*, 1961, 48: 651–657
- [8] Deng L-Q(邓丽卿), Su J-G(粟建光), Huang P-K(黄培坤), Li A-Q(李爱青). The study of morphology and tasonomy of kenaf germplasms. *China's Fiber Crops* (中国麻作), 1991, 13(4): 16–20 (in Chinese)
- [9] Li A-Q(李爱青), Dai Z-G(戴志刚), Chen J-Q(陈基权), Su J-G(粟建光). Studies on identification and classification of kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) germplasm. *J Plant Genet Resour* (植物遗传资源学报), 2006, 7(3): 352–355 (in Chinese with English abstract)
- [10] Tao A-F(陶爱芬), Qi J-M(祁建民), Li A-Q(李爱青), Fang P-P(方平平), Lin L-H(林荔辉), Wu J-M(吴建梅), Wu W-R(吴为人). The analysis of genetic diversity and relationship of elite kenaf germplasm based on inter-simple sequence repeats. *Acta Agron Sin* (作物学报), 2005, 31(12): 1668–1671 (in Chinese with English abstract)
- [11] Lin L-H(林荔辉), Wang B(汪斌), Tao A-F(陶爱芬), Wu J-M(吴建梅), Sun Z-Q(孙志强), Fang P-P(方平平), Qi J-M(祁建民). The analysis of genetic diversity of kenaf germplasm based on inter-simple sequence repeats. *J Wuhan Bot Res* (武汉植物学研究), 2008, 26(3): 240–244 (in Chinese with English abstract)
- [12] Li H(李辉), Li D-F(李德芳), Chen A-G(陈安国), Tang H-J(唐惠娟), Li J-J(李建军), Huo G(霍光). The breeding of kenaf male sterility and ISSR marker of male sterile gene. *Chin Agric Sci Bull* (农业生物技术科学), 2008, 24(8): 80–83 (in Chinese with English abstract)
- [13] Huo G(霍光), Li D-F(李德芳), Chen A-G(陈安国), Li J-J(李建军), Tang H-J(唐惠娟). Genetic diversity analysis of 44 shares of *Hibiscus cannabinus* L. germplasm resources using ISSR molecular marker. *J Anhui Agric Sci* (安徽农业科学), 2009, 37(21): 9890–9892 (in Chinese with English abstract)
- [14] Wang Z-H(王忠华). DNA fingerprinting technology and its application in crop germplasm resources. *Mol Plant Breed* (分子植物育种), 2006, 4(3): 425–430 (in Chinese with English abstract)
- [15] Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijmans M, van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucl Acids Res*, 1995, 23: 4407–4414
- [16] Yuan L-X(袁力行), Fu J-H(傅骏骅), Warburt M, Li X-H(李新海), Zhang S-H(张世煌), Khairallah M, Liu X-Z(刘新芝), Peng Z-B(彭泽斌), Li L-C(李连城). Comparison of genetic diversity among maize inbred lines based on RFLPs, SSRs, AFLPs and RAPDs. *Acta Genet Sin* (遗传学报), 2000, 27(8): 725–733 (in Chinese with English abstract)
- [17] Li L(李丽), Zheng X-Y(郑晓鹰). Utilization of AFLP molecular markers in identification of Chinese cabbage varieties. *Mol Plant Breed* (分子植物育种), 2006, 4(5): 685–689 (in Chinese with English abstract)
- [18] Li M(李鸣), Tan Y-M(谭裕模), Li Y-R(李杨瑞), Li R-B(李容柏), Gao G-Q(高国庆). AFLP molecular analysis of genetic difference

- between cultivars in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). *Acta Agron Sin* (作物学报), 2004, 30(10): 1008–1013 (in Chinese with English abstract)
- [19] Williams J G, Kubelik A R, Libak K J, Rafalski J A, Tingey S V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl Acids Res*, 1990, 18: 6531–6535
- [20] Welsh J, McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucl Acids Res*, 1990, 18: 7213–7218
- [21] Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 1994, 20: 176–183
- [22] 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.). *Theor Appl Genet*, 1999, 98: 780–792
- [23] Prevost A, Wilkinson M J. A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. *Theor Appl Genet*, 1999, 98: 107–112
- [24] Tang L-H(唐利华), Xiao Y(肖扬), Bian Y-B(边银丙). ISSR fingerprint analysis and SCAR marker of major cultivated strains of *Auricularia auricula* in China. *Mycosystema* (菌物学报), 2008, 27(2): 243–251 (in Chinese with English abstract)
- [25] Wang X-Y(王心宇), Chen P-D(陈佩度), Qi Z-J(齐增军), Zhang Z-Z(张政值), Ma Z-Q(马正强). Preliminary study of ISSR marker technique on wheat fingerprinting. *J Agric Biotechnol* (农业生物技术学报), 2001, 9(3): 261–263 (in Chinese with English abstract)
- [26] Guo A-P(郭安平), Zhou P(周鹏), Su J-G(粟建光). Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analyses among *Hibiscus cannabinus* and related species. *J Trop Subtrop Bot* (热带亚热带植物学报), 2002, 10(4): 306–312 (in Chinese with English abstract)
- [27] Xu J-T(徐建堂), Qi J-M(祁建民), Fang P-P(方平平), Li A-Q(李爱青), Lin L-H(林荔辉), Wu J-M(吴建梅), Tao A-F(陶爱芬). Optimized CTAB protocol for extracting genomic DNA from kenaf and improved PCR amplifications of ISSR and SRAP. *Plant Fiber Sci China* (中国麻业科学), 2007, 29(4): 179–183 (in Chinese with English abstract)
- [28] Guo X-Q(郭晓强), Feng Z-X(冯志霞). Jeffreys—the creator of DNA fingerprint map. *Bull Biol* (生物学通报), 2008, 43(1): 60–61 (in Chinese)
- [29] Wang L-X(王立新), Li Y-F(李云伏), Chang L-F(常利芳), Huang L(黄岚), Li H-B(李宏博), Ge L-L(葛玲玲), Liu L-H(刘丽华), Yao J(姚骥), Zhao C-P(赵昌平). Method of ID constitution for wheat cultivar. *Acta Agron Sin* (作物学报), 2007, 33(10): 1738–1740 (in Chinese with English abstract)
- [30] Zhuang J-Y(庄杰云), Shi Y-F(施勇烽), Zhuang J-Z(庄杰政), E Z-G(鄂志国), Zeng R-Z(曾瑞珍), Chen J(陈洁), Zhu Z-W(朱智伟). Construction and testing of primary microsatellite database of major rice varieties in China. *Chin J Rice Sci* (中国水稻科学), 2006, 20(5): 460–468 (in Chinese with English abstract)
- [31] Wang F-G(王凤格), Zhao J-R(赵久然), Wang L(王璐), Yi H-M(易红梅), Guo J-L(郭景伦), Dai J-R(戴景瑞), Yuan Y-P(原亚萍), Lu B-S(卢柏山), Yang G-H(杨国航). Determination of SSR core primers for maize hybrid purity identification. *J Agric Biotechnol* (农业生物技术学报), 2007, 15(6): 964–969 (in Chinese with English abstract)
- [32] Chen M-X(陈美霞), Zhang G-Q(张广庆), Qi J-M(祁建民), Zhang X-C(张晓琛), Lin L-H(林荔辉), Lan T(兰涛), Wu W-R(吴为人), Wu J-M(吴建梅), Tao A-F(陶爱芬), Fang P-P(方平平). Preliminary study on construction of a genetic linkage map of kenaf using SRAP and ISSR markers. *Plant Fiber Sci China* (中国麻业科学), 2008, 30(3): 121–127 (in Chinese with English abstract)
- [33] Han Y-C(韩延闯), Diao Y(刁英), Zhou L(周立), Liu J-Y(刘静宇), Zhou M-Q(周明全), Hu Z-L(胡中立), Song Y-C(宋运淳). Construction of the DNA fingerprinting in *Nelumbo*. *J Wuhan Bot Res* (武汉植物学研究), 2004, 22(3): 193–196 (in Chinese with English abstract)
- [34] Wei Z-W(魏臻武). DNA fingerprint of *Medicago sativa* variety genomes using SSR, ISSR and RAPD. *Acta Pratac Sin* (草业学报), 2004, 13(3): 62–67 (in Chinese with English abstract)
- [35] Zhou J-L(周建林), Jie Y-C(揭雨成). Isolation of microsatellite loci in kenaf (*Hibiscus cannabinus*). *J Nat Sci Hunan Norm Univ* (Nat Sci) (湖南师范大学自然科学学报), 2006, 29(1): 78–82 (in Chinese with English abstract)