

坛紫菜不同品系亲缘关系的 SSR 标记分析

张鹏^{1,2}, 张源¹, 王铁杆^{2,3}, 严兴洪¹

(1. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306; 2. 浙江省海洋水产养殖研究所, 浙江 温州 325000; 3. 浙江省近岸水域生物资源开发与保护重点实验室, 浙江 温州 325000)

摘要: 利用 SSR 标记对 9 个坛紫菜 (*Porphyra haitanensis*) 品系 (2 个野生品系, 2 个优良品系, 2 个杂交品系, 3 个色素突变品系) 的丝状体进行了亲缘关系分析。结果表明: 从 52 对微卫星引物中筛选出 7 对引物, 它们的反应稳定并且其 PCR 产物具有多态性。9 个品系的平均有效等位基因数 (N_e) 为 1.716 6, 平均期望杂合度 (H_e) 为 0.407 4, 平均多态信息含量 (PIC) 为 0.330 8, Shannon 多样性指数 (I) 为 0.623 9。用 Nei 氏法计算出这 9 个品系的遗传距离和遗传相似性系数, 再用 UPMGA 和 Neighbor-joining 2 种方法所获得的系统学关系图, 其结果均基本上反映了各品系间的亲缘关系。在引物 PC-40 界定的遗传座位上, 2 个优良品系申福 1 号和优质 6 号 (以申福 1 号为母本选育出来的品系) 的丝状体和叶状体均出现了区别于其他品系的等位基因, 显示对这 2 个优良品系进行 SSR 特异性标记是可能的。[中国水产科学, 2009, 16 (6): 842-849]

关键词: 坛紫菜; 品系; 亲缘关系; SSR 标记; 种质鉴定

中图分类号: Q94

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2009)06-0842-08

紫菜 (*Porphyra*) 属有 130 多个种^[1], 其中的数种紫菜已被大规模人工栽培, 成为海水养殖的重要对象之一。紫菜的经济价值很高, 仅中、日、韩 3 国的紫菜年产值就超过了 20 亿美元^[2]。在中国大陆被大规模栽培的紫菜有南方的坛紫菜 (*Porphyra haitanensis*) 和北方的条斑紫菜 (*P. yezoensis*)。坛紫菜是中国特有的种, 主要栽培在福建、浙江和广东 3 省。近 5 年来, 坛紫菜的年产量约占全国紫菜产量的 75%, 所以, 它在中国的紫菜产业中占有十分重要的位置。

近年来, 坛紫菜的遗传育种研究取得了长足的进步, 相继建立了人工诱变育种^[3-5]、单性育种^[6]和杂交育种等技术^[7], 大大缩短了优良品系的筛选周期, 数个坛紫菜优良品系已在生产中得到了一定规模的应用, 取得了显著的经济效益^[8]。不同的坛紫菜品系, 尽管在体形和颜色上表现出一些差异, 但这些差异易受栽培密度和栽培水域生态因子的影响, 所以单靠形态学

特征很难将它们准确地区分开来^[9]。SSR 标记因具有共显性好、重复性高、多态性丰富等优点, 在高等植物中已成为遗传连锁图谱构建、群体遗传学研究、分子标记辅助育种、系谱分析、指纹图谱绘制和品种纯度鉴定等的理想工具^[10]。尽管 RFLP^[11]、RAPD^[12]、AFLP^[13]和 ISSR^[14-15]等分子标记技术已在紫菜不同种或品系的种质鉴定中得到了初步尝试, 但有关紫菜的 SSR 标记研究并不多^[16-17]。本研究利用 SSR 标记, 对已培育出来的数个坛紫菜品系进行遗传差异和亲缘关系分析, 期望获得部分优良品系的特异性分子标记。

1 材料与方法

1.1 实验材料

所用的 9 个坛紫菜品系名称和代码如表 1 所示, 它们的来源与特性如下: FD 品系为野生型品系, 是从采自福建省福鼎海区的野生叶状体的体细胞再生

收稿日期: 2009-03-24; 修订日期: 2009-06-25.

基金项目: 国家 863 计划资助项目 (2006AA10A413); 国家自然科学基金资助项目 (30571443); 上海市优秀学科带头人项目 (07XD14028); 上海市教委重点学科建设项目 (J50701); 宁波市重大科技攻关委托项目 (200702C1011026); 温州市科技局科技兴海项目 (S20070046)。

作者简介: 张鹏 (1982-), 男, 硕士, 主要从事海洋生物生理生态学研究。

通讯作者: 严兴洪 (1958-), 男, 教授, 博士生导师, 主要从事海洋生物生理生态、海藻生物技术和遗传育种研究。E-mail: xhyan@shou.edu.cn

体中分离而得; XC、SF-1、Q-1 和 SPY 等 4 个品系是从经诱变处理后的野生型品系(Wt, PT-001)的叶状体的体细胞再生体中分离得到^[4]; SPY-1 品系是从 SPY 品系里再次分离得到, Y-6 品系是从 SF-1 品系后代中选育而得。这 7 个品系均是利用叶状体的单性生殖获得的遗传纯合品系。Z4 品系和 Z7 品系分别是通过野生型(Wt, PT-001)与红色色素突变体杂交后获得的杂合品系^[7]。

表 1 本实验所用坛紫菜品系、代码和特性
Tab. 1 Names, codes and characters of *Porphyra haitanensis* lines used in this experiment

品系序号 Line no.	品系代码 Line code	品系名称 Line name	品系特性 Characters of lines	
			丝状体 Conchocelis	叶状体 Gametophytic blade
1	Q-1	浅色突变体	纯合	颜色比野生色更浅,早成熟
2	SF-1	申福 1 号	纯合	颜色与野生色相似,晚成熟
3	Z4	杂交 4 号	杂合	亲本色块与重组色块嵌合体
4	Z7	杂交 7 号	杂合	亲本色块与重组色块嵌合体
5	FD	野生型 -FD	纯合	野生色,正常成熟
6	XC	野生型 -XC	纯合	野生色,细长型,正常成熟
7	SPY	红色突变体	纯合	颜色比野生色红,早成熟
8	SPY-1	红色突变体 -1	纯合	颜色比野生色红,早成熟
9	Y-6	优质 6 号	纯合	颜色与野生色相似,晚成熟,耐高温

上述品系的丝状体培养条件: 温度为(23±1)℃, 光照密度为 15~30 μmol·m⁻²·s⁻¹,光周期为 10L: 14D, 培养基为 MES^[18],每 2 周更换 1 次,各品系的叶状体培养方法同于文献[4]。

1.2 基因组DNA的提取

采用改进后的 LiCl 法^[19-20]提取坛紫菜丝状体和叶状体的基因组 DNA,用 BioPhotometer 生物分光光度计测定 DNA 的 OD 值和浓度,并在 1.0% 琼脂糖凝胶上电泳,用凝胶成像系统拍照。

1.3 微卫星引物筛选

用于 9 个坛紫菜品系丝状体遗传多样性分析的微卫星引物共 52 对(表 2): 12 对引自刘必谦等^[16,21]发布的微卫星引物,26 对引自 Sun 等^[17]发布的微卫星引物,3 对引自胡则辉等^[22]发布的微卫星引物,以及根据 GenBank 中的坛紫菜微卫星序列设计的引物 11 对(引物以 GenBank 注册号命名)。以上引物均由上海生物工程技术服务有限公司合成。先以 4 个不同品系的丝状体(Q-1、SF-1、Z4 和 Z7)DNA 样品为模板,对所有的微卫星引物进行 PCR 筛选(重复 2 次),从中选择扩增稳定且条带清晰的微卫星引物,然后对 9 个坛紫

菜品系的丝状体进行微卫星 DNA 的遗传多样性分析。

1.4 PCR扩增及电泳

PCR 反应在 PCR 仪(德国, Eppendorf Mastercycler ep)上进行。PCR 总反应体系为 15 μL,内含 10×PCR buffer (1.5 μL),2.0 mmol/L MgCl₂,0.15 mmol/L dNTP (每种),20 ng 的 DNA 模板,1U Taq DNA 聚合酶,微卫星正反向引物各 40 pmol。

PCR 反应程序为: 94℃变性 8 min; 接 35 个循环为 94℃30 s,退火 35 s(退火温度因引物而定),72℃45 s; 72℃最后延伸 8 min,4℃保存。在 PCR 扩增产物中加入 2 μL 加样缓冲液,混匀后吸取 5 μL,在 8%(W/V)非变性聚丙烯酰胺凝胶中电泳,电泳缓冲液为 1×TBE,250 V 恒电压下电泳约 2.5 h。电泳结束后,进行银染检测^[23],统计条带并拍照。

1.5 数据统计分析

根据电泳图谱,并参照引物设计时预期片段的大小统计条带,应用软件 POPGENE 1.32 进行分析,并统计以下参数: 遗传相似性系数(GS)、遗传距离(GD)、有效等位基因数(N_e)、期望杂合度(H_e)和 Shannon 多样性指数(I)。

1.6 聚类分析

根据计算得出的遗传距离,应用UPMGA和Neighbor-joining 2种方法对9个品系的坛紫菜进行亲缘关系聚类,使用的软件为MEGA 4.0。

2 结果与分析

2.1 坛紫菜丝状体和叶状体的DNA提取

如图1所示,由LiCl法提取的坛紫菜丝状体和叶状体基因组DNA,经1.0%的琼脂糖电泳检测,分

子量大约为23.1 kb, OD₂₆₀/OD₂₈₀在1.7~1.9之间,可满足SSR-PCR扩增的需要。

2.2 引物的选择和扩增结果

从52对微卫星引物中筛选出PC11、PC21、PC24、PC28、PC40、Ph148a和DQ831196等7对反应稳定、多态性较好且杂带较少的引物,其扩增结果如图2所示。7对引物在每一个品系中均可扩增出稳定的条带,扩增片段大小在100~350 bp之间。

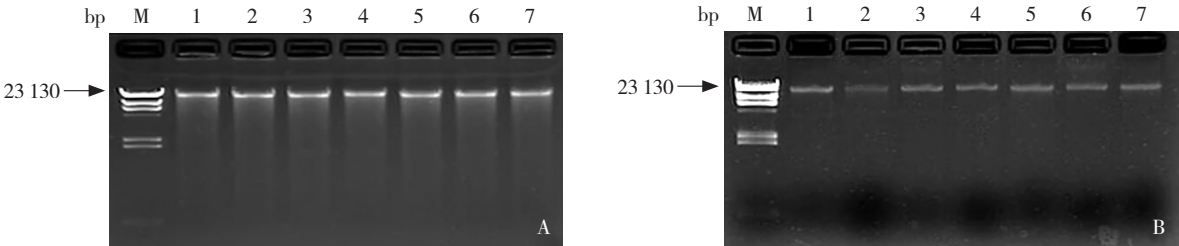


图1 用LiCl法提取的坛紫菜丝状体和叶状体基因组DNA在1.0%的琼脂糖电泳检测结果
M: DNA/*Hind* III 分子量标准; A: 丝状体基因组DNA; B: 叶状体基因组DNA

Fig. 1 Agarose gel photograph of total DNA extracted from conchocelis and blades of *Porphyra haitanensis* with LiCl
M: DNA/*Hind* III Ladders; A: Genomic DNA extracted from conchocelis; B: Genomic DNA extracted from blades

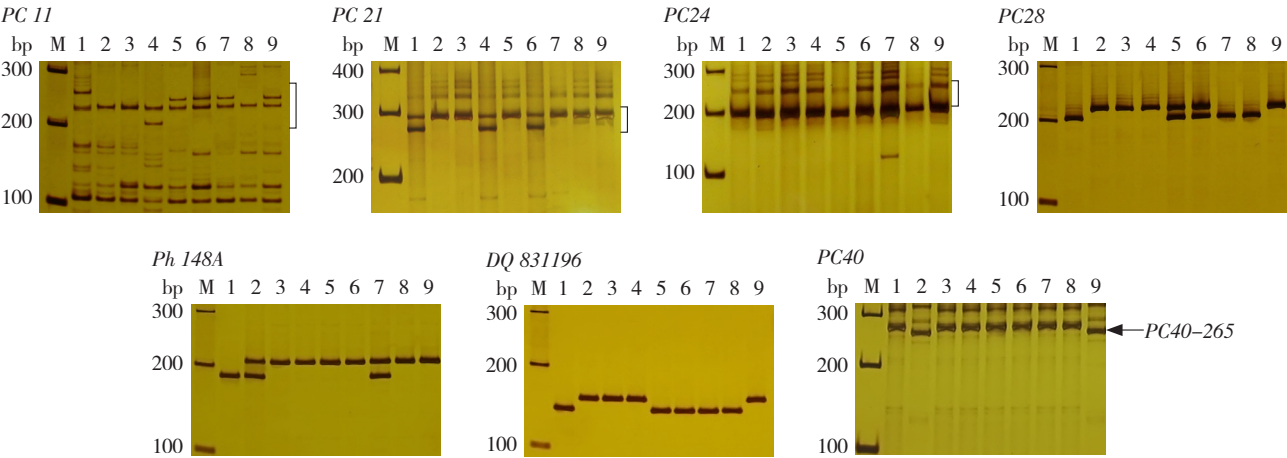


图2 7对SSR引物在9个坛紫菜品系丝状体中的扩增结果

M: DL100 分子量标准; 1-9泳道: Q-1, SF-1, Z4, Z7, FD, XC, SPY, SPY-1, Y-6; 图中以“[]”标注统计条带的范围

Fig. 2 Electrophoresis results by 7 microsatellite primer-pairs in 9 lines of *Porphyra haitanensis* conchocelis

M: DNA maker DL100; Lanes 1-9: Q-1, SF-1, Z4, Z7, FD, XC, SPY, SPY-1, Y-6. The range of statistic bands is marked by “[]”

表 2 52 对 SSR 引物序列和特异退火温度

Tab. 2 Sequence of 52 pairs of microsatellite marker primers used in this study and specific annealing temperature of PCR amplification

基因座位 Locus	上游引物(5'-3') Forward primer sequence (5'-3')	下游引物(5'-3') Reverse primer sequence (5'-3')	退火温度 / °C Annealing temperature
AU188905	CGTCGTCAACTTCCTCTTCC	CCTCCCACTCAGTCTGCGTA	56
AU196122	TGCTCTTGTCCTAAACCCAT	CGTGTGATGCTCGTCGTGC	55
AU195385	TCCAGCAGACGGGAGAAAGA	CCGATACACCTGTTACGCCT	58
AU192492	GGCACAGGCTCAGCAAGTA	TATGCCACGGATGTAAGGAGG	56
AU192094	CGTCGCTTCCGTCGCTGTCT	TAGTTGGTGTGTCGCTTGA	57
AU187410	AGCCCCGTGGCGAAATCC	TACTGGGTGCTGTGCTCTGTT	61
AU191289	TTCCAGCAGACGGGAGAAAGAC	CCGATACACCTGTTACGCCTC	59
AU196400	TATCCGAAACACTATCGCTCCC	CCCAGACGCCGCAATGCT	59
AU193408	GGTGTACGCGGTGCTGTTGG	TAGAGGTTFFCTTAGTGCCAG	61
AU194267	GCCCACGCAAGTGTTTACCC	GGAAAGTATGTTGTCGGTCGGG	58
AV435669	TCTTGTTCCTTGACGACTGG	GATGGTGGCAGTGGCAGATG	57.9
AV432452	CCAACGATGGGTTTCTTCAA	ACTTCATGCCCTGCCGATG	57
PC01	TTGCTGCGTTTTCACCTTACATTT	ACAAGGCCAACCCGAACACA	61
PC02	GGCTGCGGTGAGTCACAGA	GTCGCTCCAACCTCCTGCT	63
PC03	GAAGATGCCGCTGCCAAGATT	GTCCATGTCCTCCTTGAGCG	60
PC04	TGGTGTGTCTTCCAACGAGT	CGGCTGTGCGACCTCGTTATA	60
PC05	CCCGTGGAGCTCCTTCATCA	TCTCCCATGACAGGTTGCCA	60
PC06	CCGTGGAGCTCCTTCATCAT	CTCCCATGACAGGTTGCCA	58
PC07	GCTGCCATGGATGCGGAA A	TACCCAGCATTGGCCTTGCT	60
PC08	GTGTGCTAATTGGACGAGGAC	AGCGACAACGAGGGCAGA	59
PC11	CGCTCAACCACTTCGTCAG	CATTGTTGGCGTTGTTGTCATA	57
PC13	CCGTCGTCAGCAGGAGCA	ATGTGAGAAGCCAGTAGGGAAAGT	60
PC15	GCCTCA AATGCTTCTCCACAG	CCTTGTTCGTGTTCTTGCTGC	60
PC16	GCCTCTGACAAGACCTTCAC	TCACGGTCACTGTCTTGGT	57
PC18	CGGATGGTGACTTTGGTGGCTA	GACGCAAACGCAGCCACTATTAT	61
PC19	CATTGGTTCCATCTACTCCTTT	TCTTTTGATCAGACAGCACCTT	55
PC21	TGACTTCCTCATCGACATTGT	GCCATAGTACATTTGTTGCTG	57
PC23	CGGACATGATGTTTAGTGACGA	GGCAAGCTGAGACGATGAC	58
PC24	GGAAATCCGTTTGACACCCTT	TTGGACGTGAAAGACTGAGCA	58
PC27	GCCAGCAACAAATGTACTATG	CCGTCAGGCAGAAGAGAAT	56
PC28	GTAGGGGGCGTCGATAGGTA	CATGGCAGGCAAGATGAA	58
PC34	ACGGGCTTCTACGACTACAAT	GACGACTTGTGCAGGTTGTT	58
PC36	GCTACGCGTTTGGCTACGAG	CGGTGGACGTTGTTCTGCTG	61
PC37	CGTGCTACTACGGCTACAAGG	GATGTTGCTCGCGTTCTCGTA	60
PC38	CGTGCTACTACGGCTACAAGGA	CTCGCGTTCTCGTAGCCAAAC	61
PC39	CGTGCTACTACGGCTACAAGGA	GACGACTTGTGCAGGTTGTTCT	60
PC40	CCGTGCTACTACGGCTACAA	GTCCGCTGCAGGTTGTTCT	60
PC41	GCTACGCGATGGGCTTCTA	GACCGGTGCAGGTTGTTCT	58
Ph026	ATCGCCGCGCAATGAG	GTCTGGACTATGGCGGCATCA	54
Ph148a	CCACTGGCTCAATGATGCGGTAA	TCCACCCCTGCCTTGACTGC	55
Ph148b	TGCGGACGGACCACGAGAA	GCCCACCGAGACACGCAAAC	50
DQ831196	CGAACGGTGCCACCATCA	CGCAGCCTTGAGGCACAT	58
DQ831197	TGTCCTCATCCGTGGCTGTT	CGAGCATCAGGCGGAGAT	59
DQ831194	CGTGCGAGTCATAGTCTGC	CAGCCAGTGCAAGAACCTCA	58.5
DQ831185	CTTGACCTGGGAAGTCAGA	TGCCCCGTGCTTCTGCTA	58
DQ831174	CATCAGGCGGAGATGGCTAG	CCGTCACGGAACCGATTGT	58
DQ831164	TTGGACGGACGCTGTCGT	GCGGTAAGGAGTCTGCTG	58
DQ831162	CAGTGAGAAATGCAGCAAGGC	CAGGACCACTGCTGACAGGACA	59
DQ831155	AGTGCGGACAGGACAAGGG	ACAGTGAGAAATGCAGCAAGG	58.5
DQ831191	CAGCTCGTTGCGGCAGAT	CGCACGCTTGAGGCACAT	59
DQ831163	AAACTTCTGGGTGTTCC	GTCTTGTCAAAGCCAAATACTG	58
DQ831165	CTCGTTGGACGGACGGTGTG	TGGCGGCGAAAGTGATGG	59

2.3 有效等位基因数、遗传杂合度和多态信息含量

9个坛紫菜品系间的平均有效等位基因数为1.716 6,平均期望杂合度为0.407 4,Shannon多样性指数指数为0.623 9。从位点来看,多态信息含量最高的微卫星座位为*DQ831196* (0.371 9),最低为*PC21* (0.239 2)。7个微卫星座位的PIC平均为0.330 8,中度多态性座位($0.5>PIC>0.25$)占总遗传座位的85.7%,低度多态性座位($PIC<0.25$)占总遗传座位的14.3%。上述结果表明,所选微卫星座位基本处于中度多态性,遗传变异较小。

2.4 遗传距离、遗传相似指数和聚类分析

9个坛紫菜品系的遗传相似指数在0.206 7至

0.958 5之间,平均为0.700 5;遗传距离在0.042 4至0.898 3之间,平均为0.391 1(表3)。

根据各品系间的遗传距离进行UPGMA聚类分析(图3A),这9个品系可聚成3个大群,SF-1和Y-6聚合为一群,Z4和Z7聚合为一群,在剩下的一群中SPY和SPY-1以及XC和FD分别聚为一群,然后与剩余的Q1聚为一群。对该遗传距离进行Neighbor-joining聚类分析(图3B),除Q-1、FD、XC、SPY和SPY-1之间的关系发生了变化外,其余的结果与前面相似。Z4和Z7聚为一群,SF-1和Y-6聚为一群,剩余的Q-1和SPY首先聚为一群,然后再与SPY-1、FD和XC聚为一群。

表3 9个坛紫菜品系的遗传距离(GD)
Tab. 3 Genetic distances (GD) among nine lines of *Porphyra haitanensis*

品系 Line	Q-1	SF-1	Z4	Z7	FD	XC	SPY	SPY-1	Y-6
Q-1									
SF-1	0.7985								
Z4	0.6920	0.2400							
Z7	0.8923	0.4581	0.1003						
FD	0.2863	0.3404	0.2827	0.6131					
XC	0.2719	0.6202	0.2624	0.2192	0.0567				
SPY	0.0645	0.6444	0.4407	0.8328	0.0527	0.1293			
SPY-1	0.1965	0.6020	0.3312	0.6828	0.0638	0.1252	0.0424		
Y-6	0.8983	0.0527	0.1873	0.2336	0.2877	0.4133	0.7458	0.6828	

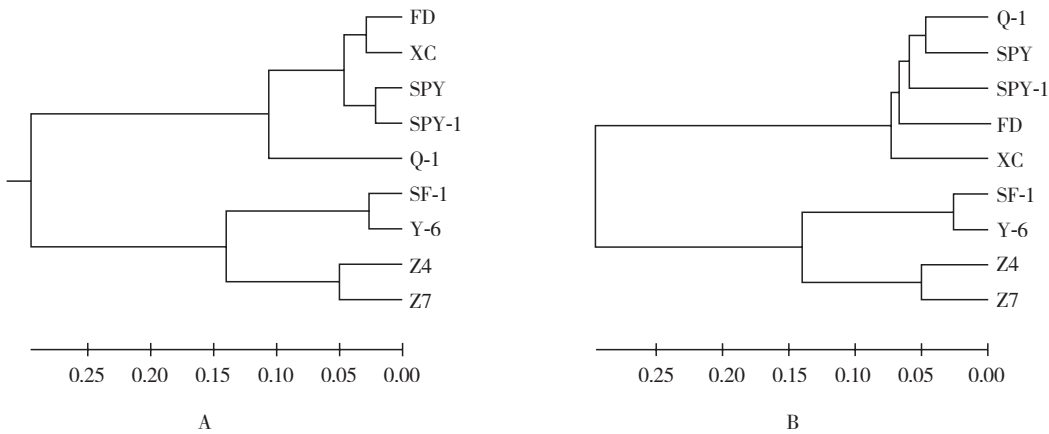


图3 9个坛紫菜品系的聚类分析图

A: UPGMA; B: NJ

Fig. 3 Cluster dendrogram of 9 lines of *Porphyra haitanensis* based on genetic distances

A: UPGMA; B: NJ

2.5 特异性标记

如图 2 所示,在 *PC40* 引物界定的遗传座位上,申福 1 号(SF-1)以及优质 6 号(Y-6)均出现了区别于其他品系的等位基因(*PC40-265*)。为了证明这一条带的稳定性和可靠性,重新用 *PC40* 引物对 2 个品系的丝状体和叶状体进行了分析(图 4A),结果显示,

这一特异等位基因分别在这 2 个品系的丝状体和 16 个不同的叶状体个体中出现且较稳定。另外,为了进一步验证该标记的应用价值,用 *PC40* 引物分别对野生品系(Wt, PT-001)的丝状体和不同的叶状体个体也进行了分析(图 4B),结果显示在 Wt 品系中没有出现与 *PC40-265* 相同的等位基因。

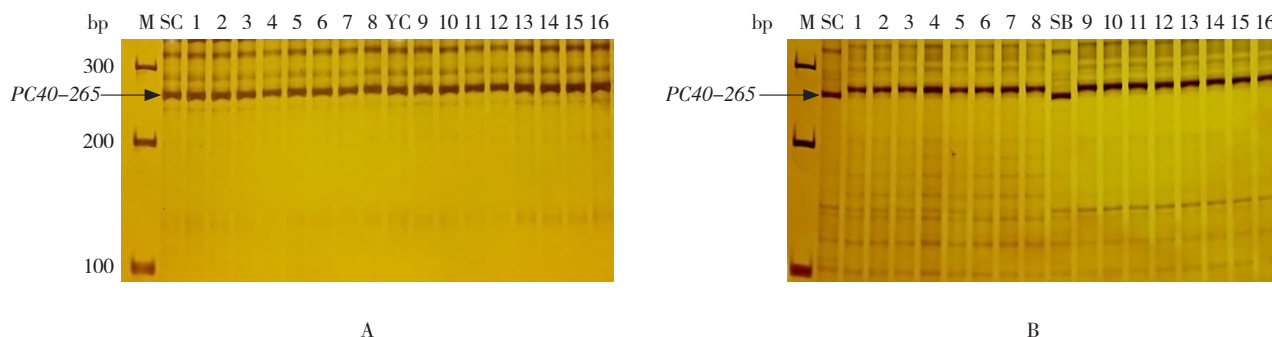


图 4 引物 *PC40* 对坛紫菜 SF-1、Y-6 和 Wt 品系的丝状体和叶状体的扩增结果

A: 引物 *PC40* 对 SF-1 和 Y-6 品系的扩增结果. M: DL100 分子量标准; SC 和 YC 泳道分别为 SF-1 和 Y-6 品系的丝状体 DNA 扩增结果;

1-8 泳道: SF-1 品系的不同叶状体个体的扩增结果; 9-16 泳道: Y-6 品系的不同叶状体个体的扩增结果.

B: 引物 *PC40* 对 SF-1 和 Wt 品系的扩增结果. M: DL100 分子量标准; SC 和 SB 泳道分别为 SF-1 品系的丝状体和叶状体个体 DNA 扩增结果;

1-8 泳道: Wt 品系的丝状体扩增结果; 9-16 泳道: Wt 品系的不同叶状体个体扩增结果.

Fig. 4 The electrophoresis results by primer *PC40* in lines of *SF-1*, *Y-6* and Wt in *Porphyra haitanensis*

A: The electrophoresis results by primer *PC40* in *SF-1* and *Y-6* lines. M: DNA maker DL100; Lanes SC and YC: the electrophoresis results of conchocelis of *SF-1* and *Y-6* lines, respectively; Lanes 1-8: the results of different blades of *SF-1* line; Lanes 9-16: the results of different blades of *Y-6* line.

B: The electrophoresis results by primer *PC40* in *SF-1* and Wt lines. M: DNA maker DL100; SC and SB Lanes: the results of *SF-1* line of conchocelis and different blades, respectively; Lanes 1-8: the results of conchocelis of Wt line; Lanes 9-16: the results of different blades of Wt line.

3 讨论

SSR 标记因具有共显性好、重复性高、多态性丰富等优点,已被广泛应用到拟南芥、烟草、水稻、玉米、小麦、白杨、松树、苹果、桃等模式生物和主要农作物的研究中,并取得了很多研究成果。但是,在紫菜的相关研究中还未得到广泛的应用,其主要原因在于紫菜 SSR 引物的开发还处在一个较为初级的阶段。刘必谦等^[16,21]最先从条斑紫菜 EST 数据库中筛选出微卫星位点,并对 8 个坛紫菜品系的丝状体进行了微卫星 DNA 指纹扩增。SUN 等^[17]用类似的方法,用 SSRIT 软件分析了总共 20 799 个紫菜 EST 序列,发现了 391 条 SSR 序列,并设计了 48 对 SSR

引物,根据得到的 SSR 数据建立了 22 个紫菜品系的进化系统树和 DNA 指纹。胡则辉等^[22]先用 *Sau3AI* 限制性内切酶消化坛紫菜基因组 DNA,然后用构建坛紫菜小片段基因组文库的方法,进行了微卫星序列的初步筛选。

本研究利用 SSR 标记,对 9 个不同坛紫菜品系的遗传变异和亲缘关系进行了分析。9 个品系的遗传相似指数平均为 0.700 5,说明品系间的亲缘关系较为接近,而个别品系之间的遗传相似指数达到了 0.9 以上,说明它们之间总体的变异程度不是很明显。

多态信息含量(PIC)和杂合度(*H*)都是表示遗传变异程度的大小,当 PIC>0.5 时该座位为高度多态

座位,当 $0.5 > \text{PIC} > 0.25$ 时该座位为中度多态座位,当 $\text{PIC} < 0.25$ 时该座位为低度多态座位^[24]。在本研究中,7个微卫星座位的 PIC 平均为 0.330 8,属于中度多态性,期望杂合度平均为 0.407 4; PIC 较低、杂合度较小说明品系间遗传变异较小,9个品系在相应的微卫星座位上的杂合子比例较小,基因座位的纯度较高。造成这一结果的原因可能有两个方面:1)选用的9个品系中除野生型-FD品系外,其余的品系均是从同一个野生品系利用人工诱变的方法直接分离或再将获得的突变体与原来的野生型杂交后获得的,所以尽管它们是经诱变后被选育出来的,但基因的同源性可能还是很高的;另外,它们中的6个品系均是经过单性生殖获得的纯系,即使 Z4 和 Z7 两个杂交品系也是2个纯系间的杂交品系,这样就大大地减小了品系自身遗传基因的差异程度。2)由于实验中大部分的引物来自紫菜的 EST 序列,也可能造成了相应的微卫星位点的 PIC 较低^[20]。聚类分析的结果较真实地反映了这些品系间的亲缘关系,反过来也说明利用这些微卫星位点进行的亲缘关系分析结果,其真实性是较高的。

在引物的筛选过程中,发现很多引物的扩增结果并不能让人满意,一些引物扩增出了期望片段以外的条带,这些条带一般认为是由 PCR 反应中常见的非特异性扩增产生的,也有报道认为它们是与微卫星相关的非特异扩增假阳性带,即影子带(Shadow band)和异源核酸双链分子(Heteroduplex)^[25]。

影子带总是伴随特异带型一起出现,形成原因虽然有多种不同的解释,一般认为是由于在聚合酶延伸反应过程中发生与模板链脱离,形成滑动错位所致^[25]。Heteroduplex 条带的出现一般认为是由于等位基因之间的同源性,在退火过程中等位基因间彼此复性,形成异质核酸杂交分子,非精确配对的部位形成突环,导致电泳迁移率低于正常配对产物而产生的^[26-28]。一般采用降低 Mg^{2+} 浓度以及改变反应延伸的温度等技术手段来减少以上条带的出现。

除以上情况产生的多条带外,紫菜微卫星侧翼序列是否保守也是一个不容忽视的因素。例如,刘

必谦等^[29]用条斑紫菜 EST-SSR 引物在坛紫菜上进行种间扩增时,出现的假阳性带经回收测序确定为非微卫星片段。因此,可以认为部分紫菜微卫星侧翼序列存在不保守的可能性,进而造成了假阳性条带的出现,对于此类条带是应当排除在统计之外的。

Y-6 品系是从 SF-1 品系的无性克隆系里筛选出来的,所以这2个品系的丝状体和叶状体在 PC40 座位上都很稳定地出现了特异的等位基因;同时用野生品系进行验证试验发现,在野生品系的丝状体和叶状体中均没有出现此等位基因,这说明它是一个较为可靠的分子标记,有可能成为 SF-1 和 Y-6 品系的特异分子标记,这对它们的种质鉴定和产权保护均具有一定的价值。另外,由于这个 SSR 标记来源于 EST 序列,因此很有可能与特殊的功能基因相关,其分子序列等有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Yoshida T, Notoya M, Kikuchi N, et al. Catalogue of species of *Porphyra* in the world, with special reference to the type locality and bibliography. [J]. Nat Hist Res, Spec Issue, 1997, 3: 5-18.
- [2] 张学成,秦松,马家海,等. 海藻遗传学 [M]. 北京:中国农业出版社, 2005:184-186.
- [3] 王金峰,许璞,朱建一,等. 紫菜属海藻色素突变体的研究 [J]. 海洋水产研究, 2007, 28 (2): 28-35.
- [4] 梁志强. 坛紫菜遗传育种的初步研究 [D]. 上海:上海水产大学, 2004.
- [5] 严兴洪,马少玉. 坛紫菜抗高温品系的筛选 [J]. 水产学报, 2007, 31 (1): 112-119.
- [6] 严兴洪,李琳,陈俊华,等. 坛紫菜的单性生殖与遗传纯系分离 [J]. 高技术通讯, 2007, 17 (2): 205-210.
- [7] 严兴洪,李琳,贺佑胜. 坛紫菜减数分裂位置的杂交试验分析 [J]. 水产学报, 2006, 30 (1): 1-8.
- [8] 谢松平,宋武林,黄健,等. 坛紫菜“申福1号”人工育苗技术 [J]. 水产养殖, 2006, 27 (5): 39-44.
- [9] Mizukami Y, Kito H, Kunimoto M, et al. Effect of DNA preparation from laver (*Porphyra yezoensis*) thalli on reproducibility of RAPD (random amplified polymorphic DNA) patterns [J]. J Appl Phycol, 1998, 10: 23-29.
- [10] 周廷清. DNA 分子标记技术在植物研究中的应用 [M]. 北京:化学工业出版社, 2005: 131.

- [11] Niwa K, Kikuchi N, Aruga Y. Morphological and molecular analysis of the endangered species *Porphyra tenera* (Bangiales, Rhodophyta) [J]. J Phycol, 2005, 41: 294–304.
- [12] 贾建航, 王萍, 金德敏, 等. RAPD 标记在紫菜遗传多样性检测和种质鉴定中的应用 [J]. 植物学报, 2000, 42 (4): 403–40.
- [13] 杨锐, 刘必谦, 骆其君, 等. 利用扩增片段长度多态性 (AFLP) 研究坛紫菜的遗传变异 [J]. 高技术通讯, 2002, 01: 83–86.
- [14] 崔灵英, 许璞, 朱建一, 等. 4 种紫菜叶状体的 ISSR 分子标记分析 [J]. 中国水产科学, 2006, 13 (3): 371–377.
- [15] 谢潮添, 纪德华, 陈昌生, 等. ISSR 标记在坛紫菜不同色泽丝状体种质鉴定中的应用 [J]. 水产学报, 2007, 31 (1): 105–111.
- [16] 刘必谦, 曾庆国, 骆其君, 等. 微卫星标记在坛紫菜丝状体品系 DNA 指纹构建中的应用 [J]. 水产学报, 2005, 29 (3): 324–328.
- [17] Sun J W, Liu T, Guo B T, et al. Development of SSR primers from EST sequences and their application in germplasm identification of *Porphyra* lines (Rhodophyta). [J]. Eur J Phycol, 2006, 41 (3): 329–336.
- [18] 王素娟, 张小平, 许云龙, 等. 坛紫菜营养细胞和原生质体培养的研究 I [J]. 海洋与湖沼, 1986, 17 (3): 217–221.
- [19] Hong Y K, Coury D A, Fuller M P, et al. Lithium chloride extraction of DNA from the seaweed *Porphyra perforata* (Rhodophyta). [J]. J Phycol, 1992, 28 (2): 717–720.
- [20] 王勇, 裴鲁青, 骆其君, 等. 紫菜丝状体 DNA 的提取 [J]. 海洋学报, 2002, 24 (2): 146–148.
- [21] 刘必谦, 曾庆国, 骆其君, 等. 条斑紫菜 (*Porphyra yezoensis*) dbEST 中筛选微卫星位点及引物种间转移扩增 [J]. 海洋与湖沼, 2005, 36 (3): 248–254.
- [22] 胡则辉. 坛紫菜 (*Porphyra haitanensis*) 微卫星序列的分离、特性及应用 [D]. 上海: 上海水产大学, 2005.
- [23] 王光利, 石培春, 张薇, 等. 微卫星 DNA 非变性 PAGE 银染法的分析探讨 [J]. 新疆农业科学, 2006, 43 (6): 455–458.
- [24] 包文斌, 陈国宏, 吴信生, 等. 中国红原鸡和泰国红原鸡遗传多样性分析 [J]. 遗传, 2007, 29 (5): 587–592.
- [25] 林凯东, 罗琛. 鲤的微卫星引物对草鱼基因组分析适用性的初步研究 [J]. 激光生物学报, 2003, 12 (2): 122–127.
- [26] 李琪. 海洋贝类微卫星 DNA 标记的开发及其在遗传学研究中的应用 [J]. 中国水产科学, 2006, 13 (3): 502–509.
- [27] May B, Krueger R C C, Kincaid H L. Genetic variation at microsatellite loci in sturgeon: primer sequence homology in *Acipenser* and *Scaphirhynchus* [J]. Can J Fish Aquat Sci, 1997, 54: 1 542–1 547.
- [28] 王吉振, 王爱国, 储明星, 等. 二核苷酸微卫星 PCR 扩增的影子带及其来源 [J]. 畜牧兽医学报, 2007, 38 (3): 241–246.
- [29] 刘必谦, 曾庆国, 王亚军, 等. 条斑紫菜 EST-SSR 引物种间转移扩增真实性研究 [J]. 水生生物学报, 2007, 31 (2): 149–154.

Phylogenetic relationship of the lines of *Porphyra haitanensis* (Rhodophyta, Bangiales) determined by microsatellite DNA markers

ZHANG Peng^{1,2}, ZHANG Yuan¹, WANG Tie-gan^{2,3}, YAN Xing-hong¹

(1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Zhenjiang Marineculture Research Institute, Wenzhou 325000, China; 3. Zhejiang Key Laboratory of Exploitation and oreservation of Coastat Bio-resource, Wenzhou 325000, China)

Abstract: Molecular analysis of nine different lines (2 wild-type, 2 improved varieties, 2 hybrid and 3 pigmentation mutants) of *Porphyra haitanensis* with microsatellite markers was performed. Results showed that 7 SSR primer-pairs selected from a total of 52 SSR primer-pairs gave good amplification patterns. Effective number of alleles, expected heterozygosity and Shannon's Information index was 1.617 4, 0.377 6 and 0.523 1, respectively. Genetic distances and genetic similarity were calculated using Nei's matching coefficient. Phylogenetic relationship analysis of UPMGA and Neighbor-joining based on Nei's genetic distance showed a good truly relationship among these lines. Samples of conchocelis and gametophytic baldes of both SF-1 and Y-6 (isolated from SF-1 line) lines had a unique allele on *PC40 locus*, indicating that it can be used as a marker to distinguish these two lines from the others. [Journal of Fishery Sciences of China, 2009, 16 (6): 842–849]

Key words: *Porphyra haitanensis*; SSR; genetic analysis; germplasm identification; line

Corresponding author: YAN Xing-hong. E-mail: xhyan@shou.edu.cn