

## 基于 SSR 和 RSAP 的龙须菜作图群体多态性标记 开发与亲本间遗传距离的估计与比较

郭伟华, 隋正红\*, 胡依依, 李彬彬

(中国海洋大学海洋生物遗传学与育种教育部重点实验室, 山东 青岛 266003)

**摘要:** 遗传连锁图谱的构建是实现分子标记辅助育种与数量性状定位的必要手段, 为构建龙须菜 (*Gracilariopsis lemaneiformis*) 遗传连锁图谱提供多态性分子标记, 本实验共采用 400 对 SSR 引物和 91 对 RSAP 引物对组合, 对龙须菜两个  $F_1$  代配子体作图群体的亲本进行了多态性标记筛选, 并对 4 个亲本间的遗传距离进行了评估。得到的 SSR 多态性标记在 GL-F3/GL-M8 间为 15 个, GL-F6/GL-M9 间为 8 个; 多态性 RSAP 标记在 GL-F3/GL-M8 间为 88 个; GL-F6/GL-M9 间为 93 个。分析了基于 SSR、RSAP 技术的两对亲本间的遗传距离, SSR 结果显示 GL-F3/GL-M8 间遗传距离为 0.071 2, GL-F6/GL-M9 间的遗传距离为 0.043 6; RSAP 结果显示 GL-F3/GL-M8 间遗传距离为 0.228 4, GL-F6/GL-M9 间的遗传距离为 0.253 7。结果表明, 在引物组合平均覆盖的位点和引物组合平均产生的多态性方面, RSAP 均远高于 SSR, 在 GL-F3/GL-M8 间 RSAP 分别是 SSR 的 4.48 与 12.13 倍, 在 GL-F6/GL-M9 间 RSAP 分别是 SSR 的 5.81 与 25.5 倍, RSAP 标记更适合应用于龙须菜的遗传距离估计和资源的遗传多样性研究。本研究揭示出作图群体亲本间遗传多样性特征, SSR 与 RSAP 分子标记的开发为龙须菜遗传连锁图谱的构建奠定了基础。

**关键词:** 龙须菜; SSR; RSAP; 亲本; 多态性

**中图分类号:** Q 346; S 917.3

**文献标志码:** A

龙须菜 (*Gracilariopsis lemaneiformis*) 是一种重要的海洋大型红藻, 具有重要的经济价值及理论研究价值, 其栽培规模逐年扩大, 并实现了产业化<sup>[1]</sup>。龙须菜育种的主要方式是人工选择育种, 但这种育种耗时长且工作量大, 其分子育种体系相对落后。要实现分子辅助育种与数量性状定位, 高精度的遗传连锁图谱是至关重要的环节, 而多态性分子标记的筛选又是构建遗传连锁图谱至关重要的环节。关于龙须菜分子标记的相关研究已有较多报道, 如 AFLP, RAPD, SSR, SCAR, RSAP 等<sup>[2-5]</sup>, 以往研究表明龙须菜遗传多态性偏低。构建遗传连锁图谱需要大量的多态性标记, 依靠传统方法难以获得足够数量的可靠标记, 但是龙须菜基因组 survey 测序的完成使得大量 SSR 位点的开发成为可能。

简单序列重复 (simple sequence repeats, SSR) 在整个基因组中均匀分布, 为共显性标记, 同一位点存在多等位基因, 信息含量丰富, 稳定性好, 是构建遗传连锁图谱的理想标记之一<sup>[6-7]</sup>。限制性位点扩增多态性 (restriction site amplification polymorphism, RSAP) 是一种新型 DNA 标记技术<sup>[8]</sup>, 通过一个 PCR 反应便可检测基因组中酶切位点的变异, 并且其操作简便, 结果稳定, 已在辣椒 (*Capsicum annuum*)、紫菜 (*Porphyra*) 和龙须菜的相关研究之中得到验证<sup>[5,9-10]</sup>。

本研究选取了两个  $F_1$  代配子体分离群体龙须菜的 4 个亲本, 采用 SSR 和 RSAP 两种分子标记对其进行多态性标记的开发, 同时也对 4 个亲本间的遗传距离进行了估计研究, 旨在评估亲本

收稿日期: 2014-07-27 修回日期: 2014-11-03

资助项目: 十二五"农村领域国家科技计划 (2012AA10A411); 国家自然科学基金 (31372529); 山东省自主创新计划课题 (2013CX80202)

通信作者: 隋正红, E-mail: suizhengh@ouc.edu.cn

在这两种标记系统下的遗传差异,为龙须菜遗传连锁图谱构建奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

实验材料在含 Pro 培养基<sup>[11]</sup>的灭菌海水中培养,光照 45  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 、光周期 12L:12D、温度 25  $^{\circ}\text{C}$ ,每周更换海水。提取 DNA 前,在灭菌海水中用消毒毛刷刷除表面杂藻,用蒸馏水冲洗一次。龙须菜优良品系 GL 四分孢子体放散得到 4 株雌雄配子体(表 1)。

表 1 实验材料具体信息  
Tab.1 The information of material

材料名称 materials name	性别 sexuality	材料特征 features
GL-F3	雌配子体	藻体鲜红,主支长,分支少,生长快速
GL-M8	雄配子体	藻体深红,主支短且细,分支多,生长快速
GL-F6	雌配子体	藻体鲜红细长,分支少,生长快速
GL-M9	雄配子体	藻体深红,主支较短,分支多,生长缓慢

### 1.2 龙须菜基因组 DNA 的提取

采用天根植物基因组 DNA 提取试剂盒

(TIANGEN BIOTECH,北京)提取龙须菜基因组 DNA;用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 分子的完整性;利用核酸蛋白仪(TGem Spectrophotometer, TIANGEN)对所提取的基因组 DNA 进行定量测定,同时检测 DNA 的纯度。

### 1.3 SSR 分析

根据龙须菜基因组 survey 测序数据<sup>[12]</sup>,共合成 400 对 SSR 引物,分别由上海生工(采用 HAP 纯化,300 对,编号为 S1-S300)和深圳华大(采用 PAGE 纯化,100 对,编号为 H1-H100)两家公司合成。利用 400 对引物对 4 个龙须菜样品 DNA 进行 PCR 扩增。20  $\mu\text{L}$  PCR 反应体系中各反应物含量:2.0  $\mu\text{L}$  10  $\times$  PCR Buffer,20 ng 基因组 DNA,1.5 mmol/L  $\text{MgCl}_2$ ,0.2 mmol/L dNTPs,0.5  $\mu\text{mol}/\text{L}$  primer,1 U *Taq* DNA 聚合酶(*Taq* DNA Polymerase,Thermo Fisher Scientific)。PCR 程序进行扩增反应:94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min;94  $^{\circ}\text{C}$  30 s,65  $^{\circ}\text{C}$  60 s,72  $^{\circ}\text{C}$  30 s,30 个循环;72  $^{\circ}\text{C}$  5 min;反应结束后将产物置于 4  $^{\circ}\text{C}$  保存。扩增产物通过 6% 聚丙烯酰胺凝胶电泳,银染,进行分析。

### 1.4 RSAP 分析

根据 RSAP 引物设计原则<sup>[8]</sup>,借鉴紫菜及龙须菜中已用的 RSAP 引物<sup>[5,10]</sup>,共设计 14 条 RSAP 引物(表 2)。

表 2 本实验采用的 RSAP 引物  
Tab.2 Primers of RSAP used in this study

引物名称 primer name	引物序列(5'-3') sequence of primers	引物名称 primer name	引物序列(5'-3') sequence of primers
S1	GACTGCGTACATGAATTC	E2	CGTAAAGAAGTAGGATCC
S2	TATCTGGTGAGGGATATC	E3	GAGGTCTGGTTATCTAGA
S3	TTGGGATATCGGAAGCTT	E4	TCTTGTCGGAGATCTAGA
S4	GACTCCATTAGGAAGCTT	E5	CTGCTGACTACGGATTAA
S5	AGCTACCATGCAGAATTC	E6	CCTTTAGCCTGTGATATC
S6	GTGCATCGATCTGGTTAA	E7	GAGTCCATGCTGAAGCTT
E1	ATATGATCACACGGATCC	E8	CTAGGTCATCAGTCTTAA

根据杜晓华等<sup>[8]</sup>的 RSAP-PCR 反应体系以及王津果等<sup>[5]</sup>对龙须菜 RSAP 扩增条件的优化,本实验扩增的 20  $\mu\text{L}$  PCR 反应体系中各反应物含量:2.0  $\mu\text{L}$  10  $\times$  PCR Buffer,30 ng 基因组 DNA,2.5 mmol/L  $\text{MgCl}_2$ ,0.15 mmol/L dNTPs,0.4  $\mu\text{mol}/\text{L}$  primer,2 U *Taq* DNA 聚合酶(*Taq* DNA Polymerase,Thermo Fisher Scientific)。PCR 反应程序为 94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min;前 5 个循环为 94  $^{\circ}\text{C}$  1 min,35  $^{\circ}\text{C}$  1 min,72  $^{\circ}\text{C}$  1 min;后 30 个循环为

94  $^{\circ}\text{C}$  1 min,46  $^{\circ}\text{C}$  1 min,72  $^{\circ}\text{C}$  1 min;最后 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 5 min,产物于 4  $^{\circ}\text{C}$  保存。扩增产物通过 6% 聚丙烯酰胺凝胶电泳,银染,进行分析。

### 1.5 数据统计与分析

扫描凝胶图像,人工观察电泳条带,将 PAGE 胶板上同一位点上清晰稳定的可见条带记为 1,模糊不清或空带记为 0,构建 0 ~ 1 矩阵,利用 POPGENE 软件计算遗传距离<sup>[13-14]</sup>,比较 4 个亲本之间的遗传多样性。

## 2 结果

### 2.1 亲本间分子标记的多态性检测

SSR 分析 在检测的 400 对 SSR 引物中,

GL-F3 与 GL-M8 间共得到 15 对多态性引物,在 GL-F6 和 GL-M9 内共得到 8 对多态性引物(表 3)共获得 20 种多态性 SSR 碱基基序(表 4)。

表 3 多态性 SSR 引物比例分布  
Tab. 3 Frequency of polymorphic SSR primers

基序碱基数 number of base sequence	合成引物 数/对 number of primers	GL-F3、GL-M8 间多态性引物 polymorphic primers between GL-F3 and GL-M8			GL-F6、GL-M9 间多态性引物 polymorphic primers between GL-F6 and GL-M9		
		多态性引物 数/对 number of polymorphic primers	在多态性引物 总数中的比例/% proportion in polymorphic primers	在自身引物 总数中的比例/% proportion in number of primers	多态性引物 数/对 number of polymorphic primers	在多态性引物 总数中的比例/% proportion in polymorphic primers	在自身引物 总数中的比例/% proportion in number of primers
3	170	10	66.67	5.88	6	75.00	3.53
4	49	0	0.00	0.00	0	0.00	0.00
5	55	3	20.00	5.45	0	0.00	0.00
6	126	2	13.33	1.59	2	25.00	1.59
总计 total	400	15	100.00	3.75	8	100.00	2.00

表 4 多态性 SSR 碱基基序类型  
Tab. 4 Types of base sequence of polymorphic SSR

基序碱基数 number of base sequence	基序类型 types of base sequence				
3	CAG(3*4)	CAG(3*5)	CAG(3*6)	GCA(3*7)	GCC(3*4)
	GCG(3*4)	GCG(3*5)	GCT(3*4)	GTT(3*9)	TCT(3*4)
	TCT(3*6)	TGT(3*4)	TTC(3*4)	TTC(3*5)	
5	CTTCC(5*4)	GCGGC(5*4)	TTTTG(5*12)		
6	GCCTCC(6*7)	GCGGGA(6*8)	TTTCGG(6*8)		

注: \* 表示基序碱基重复

Notes: \* is number of base sequence repeat

GL-F3 与 GL-M8 间的 15 对多态性引物为 H035、H056、H062、S017、S019、S024、S033、S061、S062、S068、S083、H084、H086、H099 和 H100。多态性引物占引物总数的 3.75%,其中 3、4、5 和 6 碱基基序类型分别占到了 66.67%、0.00%、20.00% 和 13.33%;而这四种基序类型在其自身合成数量中的比例分别为 5.88%、0.00%、5.45% 和 1.59%。由此可见在 GL-F3 与 GL-M8 间的多态性引物中,3 碱基基序类型的 SSR 所占比例最多。通过实验获得 GL-F3 与 GL-M8 间部分样品 SSR 聚丙烯酰胺凝胶电泳图(图 1)。

GL-F6 与 GL-M9 间的 8 对多态性引物为 H064、S021、S027、S280、S282、S296、H099 和 S199。多态性引物占引物总数的 2%,其中 3、4、5 与 6 碱基基序类型分别占 75.00%、0.00%、0.00% 和 25.00%;而这四种基序类型在其自身合成数量中

的比例分别为 3.53%、0.00%、0.00% 和 1.59%。由此可见在 GL-F6 与 GL-M9 间的多态性引物中,3 碱基基序类型的 SSR 所占比例最多。

RSAP 分析 在 GL-F3 与 GL-M8 间,91 对引物组合一共扩增出了清晰条带 424 个,其中多态性条带为 88 个(占 20.8%)。每对引物组合平均产生 4.66 个条带,各个引物对组合产生的多态性条带数目为 0~8 个不等,多态性条带数平均为 0.97 个。引物组合 E5-E6 产生的多态性条带最多,达 8 个,占其扩增总条带数(9 个)的 88.9%;虽然引物组合 S1-S6、S2-S5 和 S4-E5 产生的条带数最多(均为 11 个),但多态性条带并不多,分别为 5、5、4 个,表明条带产生的总数与多态性数目并不成正比关系。通过凝胶成像获得 GL-F3 与 GL-M8 在 5 对引物对组合下扩增产生的部分条带结果(图 2)。

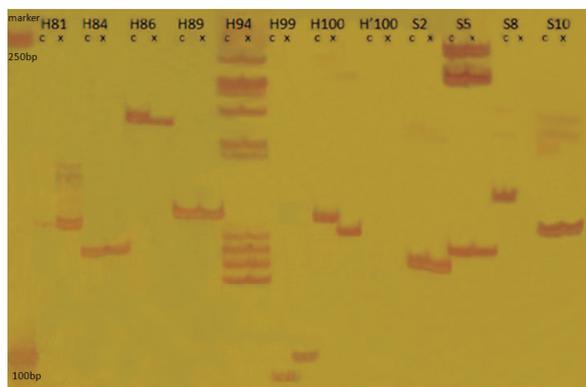


图1 GL-F3与GL-M8间部分样品SSR  
聚丙烯酰胺凝胶电泳结果

H81-S10为引物名称,每对引物下的两个泳道分别为母本和父本,C为母本,X为父本。最左侧泳道为Marker DS2000,250 bp和100 bp

Fig.1 Partial silver stained SSR amplification  
profile between GL-F3 and GL-M8

H81-S10 are primers name, two lanes under each pair of primer are parent, C is female parent and X is male parent. The left lane shows Marker DS2000, 250 bp and 100 bp

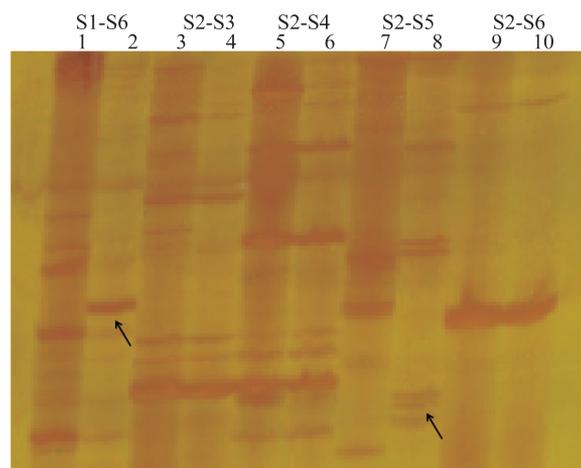


图2 部分样品RSAP聚丙烯酰胺凝胶电泳结果  
相邻泳道为一对RSAP引物组合,奇数泳道为母本,偶数泳道为父本,如1为母本,2为父本,1和2为同一对RSAP引物组合扩增产生;其中黑箭头所示为多态性条带

Fig.2 Partial silver stained RSAP amplification profile

A RSAP primer combinations in a pair of adjacent lanes, odd lanes as female parent and even as male parent. 1, 2 produced by the same pair of primer combinations; black arrow shows polymorphic bands.

在GL-F6与GL-M9间,91对引物组合共扩增出清晰条带540个,其中多态性条带为93个(占17.2%)。每对引物组合平均产生5.93个条带,各个引物对组合产生的多态性条带数目为

0~6个不等,多态性条带数平均为1.02个。引物组合S2-E2通过PCR产生的多态性条带最多,达6个,占其扩增总条带数(8个)的75%;虽引物组合S5-E7,产生的条带数最多(11个),但多态性条带仅为3个,占其扩增总条带数的23%。多态性条带占其扩增总条带数最多的引物对组合S6-E5,其多态性条带(4个)占其扩增总条带数(5个)的80%。

## 2.2 龙须菜亲本间的遗传距离

基于SSR标记的遗传距离 4个亲本间的SSR遗传距离为0.0216~0.0944(表5),GL-F3与GL-F6 SSR遗传距离最小,为0.0216;GL-M8与GL-M9 SSR遗传距离最大,为0.0944;GL-F3与GL-M8 SSR遗传距离为0.0712,高于GL-F6与GL-M9间的0.0436。结果表明,在SSR标记中,GL-F3与GL-M8遗传距离差异较GL-F6与GL-M9大,但GL-F3与GL-M8之间的差异仍然较小。

基于RSAP标记的遗传距离 GL-F3与GL-M8 RSAP遗传距离为0.2284(表5),GL-F6与GL-M9 RSAP遗传距离为0.2537,RSAP结果分析表明,GL-F6与GL-M9之间的遗传距离差异要大于GL-F3与GL-M8。

表5 基于RSAP(对角线以下)和SSR(对角线以上)的4个亲本基因型的遗传距离矩阵

Tab.5 Genetic distance matrix based on RSAP  
(below diagonal) and SSR (above diagonal)  
among the 4 genotypes

亲本 parents	GL-F3	GL-M8	GL-F6	GL-M9
GL-F3	****	0.071 2	0.021 6	0.056 0
GL-M8	0.228 4	****	0.048 6	0.094 4
GL-F6	****	****	****	0.043 6
GL-M9	****	****	0.253 7	****

注:\*\*\*\*表示空缺

Notes: \*\*\*\* means empty

## 2.3 RSAP标记与SSR标记的比较

在两对杂交亲本组合中,RSAP在引物组合平均覆盖的位点和引物组合平均产生的多态性方面均远高于SSR标记,在GL-F3与GL-M8间RSAP引物组合平均覆盖的位点和引物组合平均产生的多态性分别是SSR的4.48倍与12.13倍(表6);在GL-F6与GL-M9间RSAP分别是SSR的5.81倍与25.50倍(表7)。由此可见,RSAP每次检测(每对引物组合扩增)获得的信息量更高。

表6 GL-F3与GL-M8间SSR与RSAP标记系统产生信息情况的比较

Tab.6 Comparison of information obtained by the SSR and RSAP marker systems between GL-F3 and GL-M8

标记类型 marker types	引物组合数 number of primer sets	引物组合平均覆盖的位点数 number of loci per primer set	引物组合平均产生的多态性 number of polymorphic loci per primer set	遗传距离 genetic distance
SSR	400	1.04	0.08	0.071 2
RSAP	91	4.66	0.97	0.228 4

表7 GL-F6与GL-M9间SSR与RSAP标记系统产生信息情况的比较

Tab.7 Comparison of information obtained by the SSR and RSAP marker systems between GL-F6 and GL-M9

标记类型 marker types	引物组合数 number of primer sets	引物组合平均覆盖的位点数 number of loci per primer set	引物组合平均产生的多态性 number of polymorphic loci per primer set	遗传距离 genetic distance
SSR	400	1.02	0.04	0.043 6
RSAP	91	5.93	1.02	0.253 7

### 3 讨论

龙须菜野生群体基因组遗传多样性较低<sup>[2-5,15]</sup>,本研究中选用的4个亲本样品均由一株四分孢子体放散,遗传背景相对较为相似,因此,选用合适的分子标记对其基因组差异开展研究十分重要。从分子标记分析的稳定性和操作简便性考虑,本研究选用了SSR和RSAP这两种分子标记系统。龙须菜基因组survey测序的完成,提供了大量的SSR位点信息<sup>[12]</sup>;而RSAP标记简便易行,分析成本较低。在两对杂交亲本组合中,RSAP平均每次检测(每个引物组合对扩增)的条带数和多态性带数均远高于SSR标记,显示了较高的分析效力。RSAP为随机引物,只要基因组中出现了对应酶切位点的变异,便会出现结果的差异,而基因组中往往存在丰富的酶切位点。SSR所采用的为特异引物,每次只检测一个位点,但结果稳定,可检测大量的等位基因。从本实验结果看出RSAP标记更适用于龙须菜的遗传距离

估算和资源遗传多样性的研究。

SSR为共显性标记,本文的研究对象为单倍的配子体,理论上本研究SSR标记扩增出的条带应均为单一条带,但结果显示部分引物对的产物却出现了多个条带,如H81、H94及S5等,可能为非特异性扩增,但是根据Survey结果,可以明确获知目的片段大小,从而找到目的片段,非特异性扩增并不对结果造成影响。

本研究获得的多态性SSR引物较少,原因主要有以下两点:一方面实验材料本身遗传相似度高,且个体较少,只有两对亲本,这可能是检测到多态性较少最为重要的原因;另一方面,所选择的SSR位点自身相对保守,极少发生变异,鲜见多态性。本实验在合成SSR引物时,对各SSR基序类型及重复次数所占比例进行了筛选,引物基序重复次数主要集中于4~8次,最多重复12次。有研究表明,人类基因组中SSR多态性与其长度存在正比关系,重复次数较少可能是这些位点未检测到多态性的另一个原因<sup>[16]</sup>。SSR多态性筛选结果显示,两个作图群体亲本之间多态性引物中3碱基基序类型的SSR所占比例最多,并且其出现的概率也最大。而胡依依<sup>[17]</sup>采用SSR对龙须菜三个野生群体进行多态性分析,结果表明4碱基基序类型的SSR产生多态性的概率最大。由此可见龙须菜SSR多态性具有其独特特征,碱基基序数较少反而多态性较高。

本实验通过两种不同的标记分别计算两对亲本间的遗传距离,得到的结果却不尽相同。SSR分析结果显示,GL-F3与GL-M8之间的遗传差异大于GL-F6与GL-M9,而RSAP分析结果却恰恰相反,这可能与选择两种标记之间的数量比例有关。标记的取样误差和数目是遗传距离误差的主要来源,尽量选用已定位在染色体上且均匀分布的共显性标记可以减少取样误差,提高分析的准确性<sup>[18]</sup>。本实验利用400对SSR标记和91对RSAP引物组合进行遗传分析,分子标记数目较多,使分析的准确性得到了一定程度的提高。不同分子标记技术产生遗传多样性的不一致性,其原因还有待进一步阐明。

本实验对同一四分孢子体所放散的配子体RSAP分析所得遗传距离高于王津果等<sup>[5]</sup>采用RSAP对湛山野生、981和07-2三种龙须菜群体进行多样性分析所得遗传距离,究其原因如下:本

实验所用引物组合数为 91 对远高于王津果等<sup>[5]</sup>的 15 对组合,检测位点较多,多态性位点增多;所用四分孢子体源于龙须菜优良品系 GL,自身具有许多优良性状,其自身杂合度较高,所产生的配子体之间差异较大;王津果等<sup>[5]</sup>采用的实验材料为二倍体,而本实验采用的为单倍体。丁弘叶等<sup>[2]</sup>采用 AFLP 技术的研究表明二倍体群体内的总基因多样性 Ht(0.179 9)要明显高于单倍体群体内的总基因多样性 Ht(0.058 1),二倍体群体间的遗传变异要高于单倍体群体。

龙须菜是重要的大型经济红藻,筛选培育具有优良性状的新品种是育种工作者的主要任务。由于龙须菜自身遗传多样性较低,难以像农业作物那样通过杂交,改善性状,实验室内杂交所需周期长,延长了育种进程。因此在龙须菜育种时可考虑运用物理或化学手段诱变使其基因发生突变,采用细胞工程手段与近缘物种实现细胞融合或运用基因工程手段导入外源基因<sup>[19-21]</sup>,从根本上增加龙须菜的遗传多态性,推动其育种研究发展。

#### 参考文献:

- [1] Zhang X C, Fei X G, Wang G C, *et al.* Genetic studies and large scale cultivation of *Gracilaria lemaneiformis* [J]. Periodical of Ocean University of China: Natural Science Edition, 2009, 39(5): 947 - 954. [张学成, 费修缙, 王广策, 等. 江蓠属海藻龙须菜基础研究与大规模栽培. 中国海洋大学学报: 自然科学版, 2009, 39(5): 947 - 954.]
- [2] Ding H Y, Sui Z H, Zhong J, *et al.* Compare and analyze the AFLP genetic diversity of *Gracilaria/Gracilariopsis lemaneiformis* different wild population of haploid and diploid [J]. Periodical of Ocean University of China: Natural Science, 2012, 42(1): 99 - 105. [丁弘叶, 隋正红, 仲杰, 等. 青岛不同野生群体的单倍体和二倍体龙须菜 AFLP 遗传多样性分析与比较. 中国海洋大学学报: 自然科学版, 2012, 42(1): 99 - 105.]
- [3] Li X F, Sui Z H, Zhang X C. Studies on application of RAPD to genetic diversity in *Gracilaria Lemaneiformis*-Extraction of DNA and optimization of RAPD [J]. Journal of Ocean University of Qingdao, 1998, 28(2): 293 - 298. [李向峰, 隋正红, 张学成. RAPD 技术在龙须菜遗传多样性中的应用-I. 总 DNA 提取及 RAPD 反应条件的优化. 青岛海洋大学学报, 1998, 28(2): 293 - 298.]
- [4] Pang Q Q, Sui Z H, Kang K H, *et al.* Application of SSR and AFLP to the analysis of genetic diversity in *Gracilariopsis lemaneiformis* (Rhodophyta) [J]. Journal of Applied Phycology, 2010, 22(5): 607 - 612.
- [5] Wang J G, Sui Z H, Zhou W, *et al.* RSAP Analysis on *Gracilariopsis lemaneiformis* and conversion of SCAR marker [J]. Periodical of Ocean University of China: Natural Science, 2014, 44(4): 47 - 53. [王津果, 隋正红, 周伟等. 龙须菜限制性位点扩增多态性标记分析及其 SCAR 标记的转化. 中国海洋大学学报: 自然科学版, 2014, 44(4): 47 - 53.]
- [6] Zhang Y S, Chen Q Q, Wu W, *et al.* Integration of centromeric regions on the rice molecular linkage map of SSR markers [J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2008, 27(2): 167 - 171. [张玉山, 陈庆全, 吴薇等. 水稻 SSR 标记遗传连锁图谱着丝粒的整合及其偏分离分析. 华中农业大学学报, 2008, 27(2): 167 - 171.]
- [7] Qian H, Wu Y, Fu H T. Construction of a genetic linkage map for oriental river prawn (*Macrobrachium nipponense*) using SSR and SRAP markers [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2012, 19(2): 202 - 210. [乔慧, 吴滢, 傅洪拓. 应用 SSR 和 SRAP 标记构建青虾遗传连锁图谱. 中国水产科学, 2012, 19(2): 202 - 210.]
- [8] Du X H, Wang D Y, Gong Z H. Development and refinement of a new marker technique-Restriction site amplified polymorphism (RSAP) [J]. Journal of Northwest A & F University: Natural Science Edition, 2006, 134(9): 45 - 49. [杜晓华, 王得元, 巩振辉. 一种新型 DNA 标记技术—限制性位点扩增多态性 (RSAP) 的建立与优化. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2006, 134(9): 45 - 49.]
- [9] Du X H, Wang D Y, Gong Z H. Estimation and comparison of genetic distances among elite inbred lines in hot pepper (*Capsicum annuum* L.) by RSAP and SSR [J]. Journal of Northwest A & F University: Natural Science Edition, 2007, 35(7): 97 - 102. [杜晓华, 王得元, 巩振辉. 基于 RSAP 和 SSR 的辣椒优良自交系间遗传距离的估计与比较. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2007, 35(7): 97 - 102.]
- [10] Qiao L X, Wen M L, Kong F N, *et al.* The application of RSAP marker technique in diversity detection and germplasm identification of *Porphyra* [J]. Periodical of Ocean University of China: Natural Science, 2007, 37(6): 951 - 956. [乔利仙, 翁曼丽,

- 孔凡娜,等. RSAP 标记技术在紫菜遗传多样性检测及种质鉴定中的应用. 中国海洋大学学报:自然科学版,2007,37(6):951-956. ]
- [11] Pflugmacher S, Steinberg, C E W, *et al.* Activity of phase I and phase II detoxication enzymes in aquatic macrophytes[J]. *Journal of Applied Botany-angewandte Botanik*,1997,71:144-146.
- [12] Zhou W, Hu Y Y, Sui Z H, *et al.* Genome survey sequencing and genetic background characterization of *Gracilariopsis lemaneiformis* (Rhodophyta) based on next-generation sequencing[J]. *PLOS One*,2013,8(7):e69909.
- [13] Yang R, Liu B Q, Luo Q J, *et al.* Genetic variation of *Porphyra yezoensis* by using AFLP [J]. *Acta Oceanologica Sinica*,2005,27(3):159-162. [杨锐,刘必谦,骆其君,等. 利用 AFLP 技术研究条斑紫菜的遗传变异. 海洋学报,2005,27(3):159-162. ]
- [14] Zhang D, Sui Z H, Ying H. The Genetic diversity analysis of the sporophytes of *Undaria pinnatifida* (Phaeophyceae) for Qingdao population by AFLP marker[J]. *Periodical of Ocean University of China: Natural Science*,2009,39(4):664-668. [张东,隋正红,易恒. 青岛裙带菜孢子体野生种群遗传多样性的 AFLP 分析. 中国海洋大学学报:自然科学版,2009,39(4):664-668. ]
- [15] Li W H, Yao J T, Wang J C. ISSR analysis of wild selected strains of *Gracilaria lemaneiformis* (Rhodophyta) [J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*,2005,36(3):241-247. [李文红,姚建亭,王继成. 龙须菜 (*Gracilaria lemaneiformis*) 选育品系及其野生型的 ISSR 指纹分析. 海洋与湖沼,2005,36(3):241-247. ]
- [16] Jarne P, Lagoda P. Microsatellites, from molecules to populations and back [J]. *Trends in Ecology and Evolution*. 1996,11(10):424-429.
- [17] Hu Y Y. The development of *Gracilaria/Gracilariopsis lemaneiformis* genome-wide SSR markers and genetic diversity research[D]. Qingdao: Ocean University of China,2014. [胡依依. 龙须菜全基因组 SSR 标记的开发及遗传多样性研究. 青岛:中国海洋大学,2014. ]
- [18] Lefebvre V, Goffinet B, Chauvet J C, *et al.* Evaluation of genetic distances between pepper inbred lines for cultivar protection purposes: comparison of AFLP, RAPD and phenotypic data[J]. *Theoretical and Applied Genetics*,2001,102:741-750.
- [19] Dai H J, Zhu Z B, Shen X L, *et al.* Essences and approaches of distant hybridization in crops breeding [J]. *Genomics and Applied Biology*,2010,29(1):144-149. [戴华军,朱正斌,沈雪林,等. 作物远缘杂交育种的途径及其实质. 基因组学与应用生物学,2010,29(1):144-149. ]
- [20] Wang A Y, Chen D L, Cai D T. Applications of wide hybridization and allopolyploidization in rice breeding[J]. *Journal of Wuhan Botanical Research*,2005,23(5):491-495. [王爱云,陈冬玲,蔡得田. 远缘杂交和异源多倍体化技术在水稻育种中的应用. 武汉植物学研究,2005,23(5):491-495. ]
- [21] Zhang Z X, Xiang Y W, Wang J Y. Design of progress in intergrated techniques for rice beeding [J]. *Journal of Southwest Agricultural University*,1993,15(5):465-469. [张志雄,向跃武,王家银,等. 水稻综合育种技术的设计与进展. 西南农业大学学报,1993,15(5):465-469. ]

**Development of polymorphic markers and estimation and comparison of genetic distances among parents of mapping population of *Gracilariopsis lemaneiformis* (Rhodophyta) based on SSR and RSAP analysis**

GUO Weihua, SUI Zhenghong\* , HU Yiyi, LI Binbin

(The Key Laboratory of Marine Genetics and Breeding, Ministry of Education,

Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

**Abstract:** *Gracilariopsis lemaneiformis* is an important agarophyte, which is economically important. The industrialization of *Gracilariopsis lemaneiformis* started 20 years ago and has become one of the most important aquaculture in China. At present, the breeding of this species depends heavily on selective and other traditional breeding approaches. The molecular breeding system which is more efficient has not yet been established. The construction of genetic linkage map is urgent for the molecular marker assistant breeding and mapping of quantitative traits. Totally 400 pairs of SSR primers and 91 pairs of RSAP primer combinations were screened for parents of two mapping populations to provide polymorphic molecular markers for the construction of genetic linkage map. The genetic distances among four parents were evaluated. 15 polymorphic markers between GL-F3 and GL-M8 and 8 polymorphic markers between GL-F6 and GL-M9 were obtained by SSR screening. 88 polymorphic markers between GL-F3 and GL-M8 and 93 polymorphic markers between GL-F6 and GL-M9 were obtained by RSAP screening. The development of these markers set the basis for construction of genetic linkage map. The genetic distance revealed by SSR between GL-F3 and GL-M8 was 0.071 2, while that between GL-F6 and GL-M9 was 0.043 6 and the genetic distance revealed by RSAP between GL-F3 and GL-M8 was 0.228 4, while that between GL-F6 and GL-M9 was 0.253 7. The average covering loci and producing polymorphic of per primer combinations were much higher from RSAP than from SSR analysis, the RSAP is 4.48 times and 12.13 times of SSR between GL-F3 and GL-M8, respectively while it showed 5.81 times and 25.5 times between GL-F6 and GL-M9, respectively. RSAP markers were better than SSR in evaluating the genetic distance and genetic diversity of resources of *G. lemaneiformis*. The genetic difference among parents of mapping population of *G. lemaneiformis* was proved. The development of SSR and RSAP markers set a foundation for the construction of genetic linkage map. The study revealed low genetic diversity in this species and other approaches, such as mutagenesis, cell engineering and transgenic were suggested to be exploited in further breeding attempts.

**Key words:** *Gracilariopsis lemaneiformis*; SSR; RSAP; parents; polymorphism

**Corresponding author:** SUI Zhenghong. E-mail: suizhengh@ouc.edu.cn