

## 条斑紫菜 6 个品系的 SRAP 分析

贾 威<sup>1</sup>, 黄林彬<sup>1,2</sup>, 严兴洪<sup>1,2\*</sup>

(1. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306;

2. 上海海洋大学省部共建水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306)

**摘要:** 为鉴别条斑紫菜不同品系的种质, 使用相关序列扩增多态性 (sequence-related amplified polymorphism, SRAP) 标记对条斑紫菜的 5 个选育品系和 1 个野生品系进行遗传分析, 结果从 35 对引物组合中筛选出可扩增出稳定清晰条带的组合 11 对, 共获得 131 个扩增位点, 其中多态性位点 125 个, 多态性比例高达 95.42%。6 个品系间的遗传距离为 0.364 3~0.867 9, 平均为 0.593 0。用 UPGMA 法进行聚类分析, 结果将 6 个品系分为 2 个群, 所反映的亲缘关系与各品系的来源基本一致, 说明 SRAP 标记技术可以成为条斑紫菜品系间遗传分析的有效工具。在 131 个多态性位点中, 选择扩增出的 4 个位点构建了 6 个品系的指纹图谱。另外, 通过 ME1/EM6 引物组合扩增得到耐高温品系 TM-18 的特异性条带, 经回收测序和重新设计引物, 该条带在其丝状体和叶状体 DNA 中均能稳定地被扩增出来, 可用于该品系的种质鉴别。

**关键词:** 条斑紫菜; 相关序列扩增多态性; 分子标记; 遗传距离; 指纹图谱

**中图分类号:** Q 785; S 968.4

**文献标志码:** A

条斑紫菜 (*Pyropia yezoensis* (Ueda) M. S. Hwang et H. G. Choi) 隶属于红藻门 (Rhodophyta)、原红藻纲 (Rhodophyceae)、红毛菜目 (Bangiales)、红毛菜科 (Bangiaceae)、紫菜属 (*Pyropia*)<sup>[1]</sup>, 是我国长江以北紫菜的主要栽培品种, 在经济海藻产业中占有重要地位, 行业总产值 30 亿元左右<sup>[2]</sup>。近年来, 随着栽培规模的扩大和海洋环境的变化, 条斑紫菜出现了种质退化、产量降低及病害频发等问题<sup>[2-3]</sup>, 造成了巨大的经济损失, 生产上亟需具有耐高温、抗病害等特性的优良品种。近年来, 随着条斑紫菜细胞工程育种研究的深入开展, 数个优良品系已进行小规模的生产性试验<sup>[4-5]</sup>, 但良种的选育速度跟不上产业的快速发展需求。为此, 研究者希望引入分子标记辅助育种技术, 弥补常规育种的不足, 加快条斑紫菜育种的进程。

**相关序列扩增多态性 (sequence-related**

**amplified polymorphism, SRAP) 分子标记**是一种新型的、基于 PCR 的标记系统, 目前已成功地应用于作物遗传多样性分析、遗传图谱的构建以及重要性状的标记等方面<sup>[6-7]</sup>, 但在紫菜中的研究还不多<sup>[8-9]</sup>。本研究利用 SRAP 分子标记对实验室选育的 5 个条斑紫菜新品系和 1 个野生品系进行遗传分析和种质鉴定, 旨在为建立条斑紫菜分子标记辅助育种技术奠定基础。

### 1 材料与方 法

#### 1.1 实验材料

本研究所用 6 个条斑紫菜品系均以自由丝状体的形式保存于实验室内, 保存方法同张秉磊<sup>[4]</sup>, 它们的来源与部分特性如表 1 所示。

提取基因组 DNA 前, 先取部分保种的丝状体进行扩繁, 条件为温度 (18 ± 1) °C, 光照密度 15 ~ 30 μmol photons/(m<sup>2</sup> · s), 光周期 10L:14D。

收稿日期:2013-04-17 修回日期:2013-06-09

资助项目:国家“八六三”高技术研究发展计划(2012AA10A411);国家自然科学基金项目(31072208);农业部公益性专项(200903030);国家海洋局公益专项(201105008,201105023);国家农业科技成果转化资金项目(2011GB2C000005);上海市科委重点科技攻关项目(10391901100);上海高校水产学一流学科建设

通信作者:严兴洪,E-mail:xhyan@shou.edu.cn

培养液由盐卤海水加 MES 培养基配成<sup>[10]</sup>,每 2 周更换三分之一培养液。各品系叶状体的培养方法同 Yan 等<sup>[11]</sup>。

表 1 本研究所用条斑紫菜品系的代码、来源及特性  
Tab.1 Codes, origins and characters of *P. yezoensis* strains used in this paper

序号 no.	代码 codes	来源与特性 origins and characters
1	WT(LS-001)	从江苏吕泗海区紫菜栽培网帘上采回的一棵条斑紫菜叶状体放散的一个果孢子萌发而来的野生型品系 <sup>[12]</sup>
2	B4	WT 叶状体经 <sup>60</sup> Co- $\gamma$ 射线诱变处理后,从突变体细胞的再生苗后代中分离获得的耐高温型优良品系 <sup>[4]</sup>
3	TM-18	B4 叶状体经 <sup>60</sup> Co- $\gamma$ 射线诱变处理后,从突变体细胞的再生苗后代中分离获得的耐高温型优良品系 <sup>[5]</sup>
4	HT	B4 叶状体经 <sup>60</sup> Co- $\gamma$ 射线诱变处理后,从突变体细胞的再生苗后代中分离获得的耐高温型红色突变品系 <sup>[5]</sup>
5	Ros-2	日本的野生型条斑紫菜品系 U-511 的叶状体经诱变剂 MNNG 处理后,从其突变单孢子的萌发体中分离到的生长快型优良品系 <sup>[13]</sup>
6	LG	日本的野生型条斑紫菜品系 U-511 的叶状体经诱变剂 MNNG 处理后,从其突变单孢子的萌发体中分离到的绿色突变品系 <sup>[13]</sup>

## 1.2 基因组 DNA 的提取

材料经灭菌水洗净,用吸水纸吸干水分,称取 0.2 g 丝状体或叶状体,采用 DP320 新型植物基因组提取试剂盒(TIANGEN,北京)进行基因组 DNA 的提取。提取物在 1.0% 琼脂糖凝胶上电泳检测(100 V,30 min),并使用生物分光光度计(Eppendorf AG,Hamburg,Germany)测定 DNA 的

浓度和 OD 值。

## 1.3 SRAP 引物及 PCR 反应

PCR 扩增所用引物依据 Li 等<sup>[6]</sup>设计的成套 SRAP 引物,分别选取正向引物 5 条,反向引物 7 条(表 2),共 35 对引物组合,分别对 6 个品系的丝状体基因组 DNA 进行扩增。所用引物由生物工程(上海)股份有限公司合成。

表 2 本实验所用 SRAP 标记的正向引物和反向引物的序列(5'-3')  
Tab.2 Sequences(5'-3') of SRAP forward and reverse primers used in this paper

正向引物 forward primer	引物序列(5'-3') primer sequence	反向引物 reverse primer	引物序列(5'-3') primer sequence
ME1	TGAGTCCAAACCGGATA	EM1	GACTGCGTACGAATTAAT
ME4	TGAGTCCAAACCGGACC	EM6	GACTGCGTACGAATTGCA
ME6	TGAGTCCAAACCGGTAA	EM7	GACTGCGTACGAATTCAA
ME7	TGAGTCCAAACCGGTTCG	EM8	GACTGCGTACGAATTCTG
ME8	TGAGTCCAAACCGGTGC	EM9	GACTGCGTACGAATTTCGA
		EM10	GACTGCGTACGAATTTCAG
		EM11	GACTGCGTACGAATTCCA

PCR 反应体系 2.5  $\mu$ L 10  $\times$  PCR buffer, 2.0 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mmol/L dNTP, 1 U Taq DNA 聚合酶(TaKaRa,大连),20 ng 模板 DNA,正向和反向引物各 20 ng,反应体系共 25  $\mu$ L,不足部分由双蒸水(dd H<sub>2</sub>O)补足。

PCR 反应程序 94  $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94  $^{\circ}$ C 1 min,35  $^{\circ}$ C 1 min,72  $^{\circ}$ C 1 min,共 5 个循环;94  $^{\circ}$ C 1 min,48  $^{\circ}$ C 1 min,72  $^{\circ}$ C 2 min,共 35 个循环;72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min,4  $^{\circ}$ C 保存。

## 1.4 电泳检测

取 1.5  $\mu$ L 扩增产物,混合加样缓冲液,在 8% (W/V)的非变性聚丙烯酰胺凝胶上 130 V 恒压电泳约 4.5 h。电泳结束后,进行银染检测<sup>[14]</sup>,

统计条带并拍照。

## 1.5 数据统计分析

根据电泳图谱,选择清晰、稳定的条带进行统计,每一条带的迁移位置标记为一个位点,相同位置条带的有和无分别标记为 1 和 0,形成 1/0 矩阵。应用 POPGENE 1.32 软件计算多态位点百分数、遗传相似性系数和遗传距离。根据计算结果,使用 NTSYSpc 2.10e 软件,采用 UPGMA 法对 6 个品系进行聚类分析。

## 1.6 DNA 指纹图谱的构建

根据扩增结果,依据使用“最少条带、最少引物”的原则,选择清晰稳定的条带构建条斑紫菜 6 个品系的 DNA 指纹图谱。

### 1.7 特异性标记开发

根据电泳结果,挑选扩增清晰、稳定的特异性条带,由生工生物工程(上海)股份有限公司进行回收和测序,根据测序结果使用 Primer Premier 5.0 软件设计特异性引物,再对丝状体和叶状体的基因组 DNA 分别扩增,检验标记的稳定性。

## 2 结果与分析

### 2.1 条斑紫菜丝状体基因组 DNA 的提取

使用 DP320 新型植物基因组试剂盒 (TIANGEN,北京) 提取条斑紫菜各品系丝状体和叶状体基因组 DNA,经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测(图 1),分子量大约为 23 kb,OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 比值 1.7~1.9,可用于 PCR 扩增。

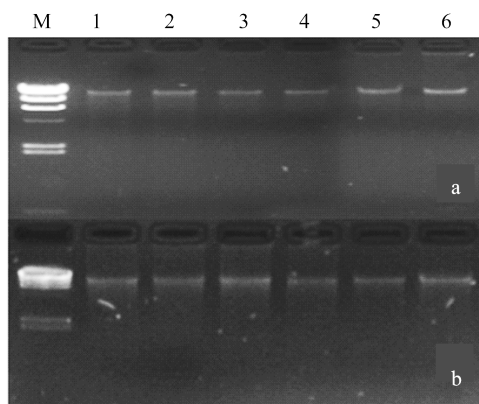


图 1 条斑紫菜 6 个品系的丝状体和叶状体基因组 DNA 在 1% 琼脂糖凝胶上的电泳结果  
a. 丝状体 DNA; b. 叶状体 DNA; 泳道 M.  $\lambda$  DNA/*Hind* III digest; 泳道 1~6. WT, B4, TM-18, HT, Ros-2, LG

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of genome DNA extracted from conchocelis and gametophytic blades of 6 strains of *P. yezoensis*

a. DNA from conchocelis; b. DNA from gametophytic blades; Lane M.  $\lambda$  DNA/*Hind* III digest; Lanes 1-6. WT, B4, TM-18, HT, Ros-2, LG

### 2.2 SRAP-PCR 扩增结果

使用 35 对引物组合对条斑紫菜 6 个品系的丝状体基因组 DNA 进行扩增,经 3 次重复,筛选到 11 对可以扩增出清晰、稳定条带的引物组合(表 3)。电泳图谱显示大于 800 bp 的扩增条带多而浓密,小于 100 bp 的条带较弱且不易辨识。在 100~800 bp 范围之间,11 对引物组合共扩增出 131 个位点,其中多态性位点 125 个,多态性位点的比例为 95.42% (图 2)。

表 3 不同 SRAP 引物组合对条斑紫菜 6 个品系的扩增位点数及多态性位点数

Tab. 3 Total and polymorphic loci numbers per SRAP primer combinations amplified in 6 strains of *P. yezoensis*

序号 no.	引物组合 primer combinations	扩增总位点数 total loci no.	多态性位点数 polymorphic loci no.
1	ME1/EM6	8	7
2	ME1/EM8	10	10
3	ME6/EM8	11	10
4	ME6/EM11	10	9
5	ME7/EM1	10	9
6	ME7/EM6	13	13
7	ME7/EM7	16	14
8	ME8/EM1	14	14
9	ME8/EM8	15	15
10	ME8/EM10	10	10
11	ME8/EM11	14	14
合计 total no.		131	125
平均 average no.		11.9	11.4

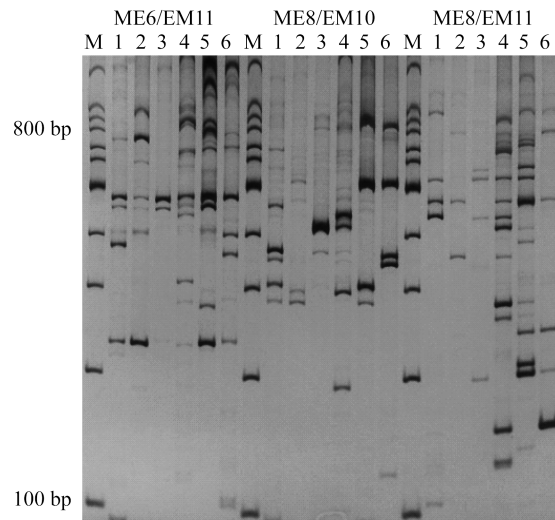


图 2 SRAP 引物组合 ME6/EM11、ME8/EM10、ME8/EM11 对条斑紫菜 6 个品系的扩增结果  
泳道 M. 100 bp DNA ladder; 泳道 1~6. WT, B4, TM-18, HT, Ros-2, LG

Fig. 2 SRAP patterns of 6 strains of *P. yezoensis* amplified by primer combinations ME6/EM11, ME8/EM10 and ME8/EM11

Lane M. 100 bp DNA ladder; Lanes 1-6. WT, B4, TM-18, HT, Ros-2, LG

### 2.3 遗传多样性分析

根据电泳图谱的统计结果,将扩增的条带记录在 1/0 矩阵中,分别计算条斑紫菜 6 个品系间

的 Nei 氏遗传相似性系数 (GS) 和遗传距离 (GD) (表 4)。由表 4 可以看出, 6 个品系间的遗传相似性系数为 0.496 2 ~ 0.694 7, 平均为 0.558 8; 遗传距离为 0.364 3 ~ 0.867 9, 平均为 0.593 0。

根据条斑紫菜 6 个品系间的遗传相似性系数

进行 UPGMA 聚类分析, 结果见图 3。6 个品系可聚成 2 个群, 其中 WT 和 B4 聚合后与 TM-18 和 HT 聚为一群, Ros-2 和 LG 聚为一群, 这与 6 个品系的来源基本一致。

表 4 条斑紫菜 6 个品系间的遗传相似性系数 (GS) 和遗传距离 (GD)  
Tab. 4 Genetic distances (GD) and genetic similarities (GS) among 6 strains of *P. yezoensis*

品系 strains	WT	B4	TM-18	HT	Ros-2	LG
WT		0.687 0	0.633 6	0.496 2	0.542 0	0.557 3
B4	0.375 4		0.626 0	0.519 1	0.519 1	0.580 2
TM-18	0.456 4	0.468 5		0.648 9	0.480 9	0.542 0
HT	0.700 8	0.655 7	0.432 5		0.419 8	0.435 1
Ros-2	0.612 5	0.655 7	0.732 1	0.867 9		0.694 7
LG	0.584 7	0.544 5	0.612 5	0.832 1	0.364 3	

注: 右上角的数字表示遗传相似性系数, 左下角的数字表示遗传距离

Notes: The data in top right corner were genetic similarities and in low left corner were genetic distances

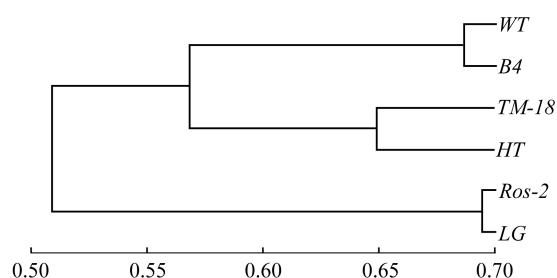


图 3 条斑紫菜 6 个品系 UPGMA 的聚类结果

Fig. 3 A UPGMA dendrogram of genetic relationships among 6 strains of *P. yezoensis*

## 2.4 DNA 指纹图谱的构建

依据使用“最少条带、最少引物”的原则, 在 11 个引物组合中筛选出 1 个组合 (ME8/EM11), 共 4 个位点来构建条斑紫菜 6 个品系的 SRAP-DNA 指纹图谱 (图 4)。按条带的有无, 记录每个位点。在 DNA 指纹图谱中, 每个品系都有独特的指纹模式可以区别于其它品系 (表 5)。

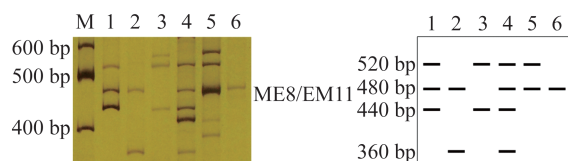


图 4 条斑紫菜 6 个品系的 DNA 指纹图谱

泳道 M. 100 bp DNA ladder; 泳道 1 ~ 6. WT, B4, TM-18, HT, Ros-2, LG

Fig. 4 DNA fingerprints of 6 strains of *P. yezoensis*

Lane M. 100 bp DNA ladder; Lanes 1 - 6. WT, B4, TM-18, HT, Ros-2, LG

表 5 条斑紫菜 6 个品系的指纹二进制码

Tab. 5 DNA fingerprints binary codes of 6 strains of *P. yezoensis*

品系 strain	二进制码 binary code	品系 strain	二进制码 binary code
WT	1110	HT	1111
B4	0101	Ros-2	1100
TM-18	1010	LG	0100

## 2.5 特异性标记

在引物组合 ME1/EM6 所扩增的条带中, TM-18 品系中找到一条约 800 bp 的特异性条带 (图 5)。经回收测序, 序列通过 NCBI 网站进行 BLAST 比对, 没有发现同源序列。根据所得序列信息, 使用 Primer Premier 5.0 软件设计 1 对特异性引物, 正向引物序列 TM1-F: 5'-TATCTTTGTATTGGGTTTGC-3', 反向引物序列 TM1-R: 5'-TTCCAGTAGGCGGTATCA-3', 目的条带大小为 341 bp。

用重新设计的特异性引物 TM1-F/R 对 6 个品系的丝状体和叶状体分别进行扩增, 结果发现, 在条斑紫菜 6 个品系中只有 TM-18 可以扩增出约 340 bp 大小的特异性条带, 而其它品系中没有出现 (图 6)。

为检验该标记的重复性和稳定性, 分别以不同时期提取的 TM-18 丝状体 DNA 和随机抽取的 5 棵 TM-18 叶状体提取的 DNA 为模板进行扩增, 新引物 TM1-F/R 扩增出的特异性条带在 TM-18 的丝状体和叶状体中均可稳定地出现 (图 7)。

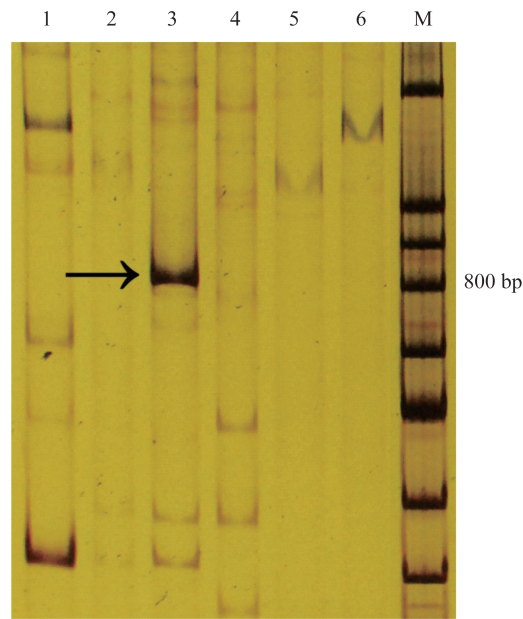


图 5 引物组合 ME1/EM6 在条斑紫菜 6 个品系中的扩增结果

泳道 M. 100 bp DNA ladder; 泳道 1 ~ 6. WT, B4, TM-18, HT, Ros-2, LG, 箭头所示为 TM-18 品系的特异性条带

Fig. 5 The electrophoresis by primer ME1/EM6 in 6 strains of *P. yezoensis*

Lane M. 100 bp DNA ladder; lanes 1 - 6. WT, B4, TM-18, HT, Ros-2, LG. Arrow indicated the specific band of TM-18 strain

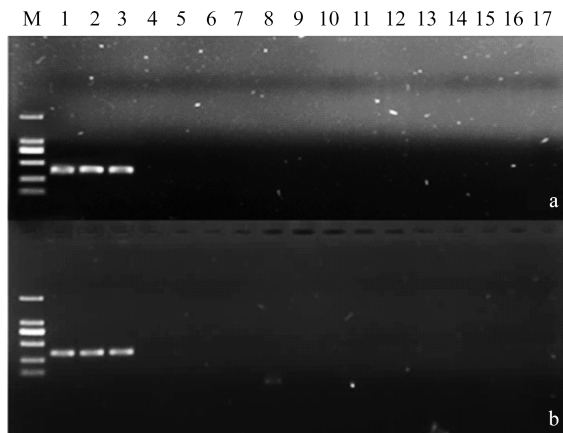


图 6 TM1-F/R 在 6 个条斑紫菜品系中的扩增结果

a. 丝状体 DNA 的扩增结果; b. 叶状体 DNA 的扩增结果; 泳道 M. DL 2000 DNA Marker; 泳道 1 ~ 3. TM-18; 4 ~ 6. WT, 7 ~ 9. B4, 10 ~ 12. HT, 13 ~ 15. Ros-2, 16 ~ 17. LG

Fig. 6 The electrophoresis by primer TM1-F/R in 6 strains of *P. yezoensis*

a. Amplification of conchocelis DNA; b. Amplification of gametophytic blades DNA;

Lane M. DL 2000 DNA Marker; Lane 1 - 3. TM-18; 4 - 6. WT, 7 - 9. B4, 10 - 12. HT, 13 - 15. Ros-2, 16 - 17. LG

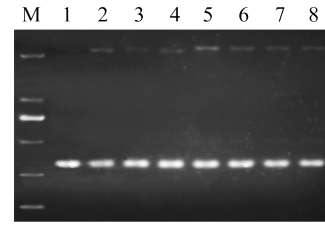


图 7 TM1-F/R 引物在条斑紫菜 TM-18 丝状体 DNA 和叶状体 DNA 中的扩增结果

泳道 M. DL 2000 DNA Marker; 泳道 1 ~ 3. TM-18 丝状体 DNA; 泳道 4 ~ 8. TM-18 叶状体 DNA

Fig. 7 The electrophoresis by primer TM1 - F/R in DNA conchocelis and gametophytic blades of TM-18 strain of *P. yezoensis*

Lane M. DL 2000 DNA Marker; Lane 1 - 3. conchocelis DNA of TM-18; Lane 4 - 8. gametophytic blades DNA of TM-18

### 3 讨论

相关序列扩增多态性标记针对外显子中富含 GC, 而内含子和启动子中富含 AT 的特点设计引物, 对开放阅读框 (open reading frame, ORF) 进行扩增。由于内含子、启动子及其间隔序列的种间差异很大, 有可能获得高多态性的标记<sup>[15]</sup>。相较于 RFLP、SSR、RAPD 和 ALFP 等常用的分子标记技术, SRAP 标记技术具有多种优点<sup>[16]</sup>: ①引物设计简单, 在不同物种中有很高的通用性; ②17 ~ 18 bp 的引物设计和 2 种不同的退火温度保证了扩增结果的稳定; ③主要是对 ORF 进行扩增, 扩增结果与表现型更为相关; ④操作简单, 无需酶切等操作。目前, SRAP 标记在拟南芥、甘蓝、棉花和油菜等高等植物中已经成功的运用<sup>[16-18]</sup>。在紫菜中, SRAP 标记的研究不多, 其中 Qiao 等<sup>[9]</sup>使用 SRAP 标记技术对 3 个种共 16 个紫菜品系进行了分析, 在 30 对引物组合中共筛选到 14 对反应稳定且重复性好的引物, 在扩增的 533 条片段中有 522 条具多态性, 多态性位点比率高达 97.9%。谢潮添等<sup>[8]</sup>用 SRAP 对 15 个坛紫菜品系进行遗传多样性分析, 并应用于坛紫菜遗传连锁图谱的构建<sup>[19]</sup>。

本研究筛选出 11 对可清晰稳定扩增的引物组合, 在 100 ~ 800 bp 之间共扩增出 131 个位点, 其中多态性位点为 125 个, 多态率为 95.42%。这表明 SRAP 标记可以用来检测条斑紫菜的遗传变异, 且具有较高的分辨率。使用 SRAP 标记可

以扩增出大量多态性条带,而条带的强度也不相同。这可能是由于扩增片段在 DNA 中具有不同的拷贝数,或者是与引物的结合能力不同<sup>[20]</sup>,但目前并无条带强度和遗传关系的相关性的报道,故本研究只考虑条带的有无,并不考虑强度。6 个品系间的平均遗传距离为 0.593 0,表明条斑紫菜 6 个品系间存在着较高的遗传多样性。但是,与杨锐等<sup>[21]</sup>利用 AFLP 获得的 11 个条斑紫菜品系间的遗传距离(0.180~0.397)相比,本实验得到的平均遗传距离相对较高,这可能是由于<sup>60</sup>Co- $\gamma$ 射线和 MNNG 的诱变对条斑紫菜的效果较强,故筛选到的各品系间的差异也较大。另外,由于 6 个品系中有 4 个是中国的野生栽培品系及其诱变品系,另有 2 个是日本野生品系的诱变品系,由于地理位置相差很远,故相互之间的遗传距离较大,这与杨锐等<sup>[21]</sup>关于遗传距离与地理间距呈现正相关的结论相一致。部分品系的遗传差异较小,如 WT 与 B4 的遗传距离为 0.374 5,这可能是由于 B4 是由 WT 经过一次辐照诱变后筛选的,未造成太大的变异,故亲缘关系较近,但进一步诱变获得的 TM-18 和 HT 则与 WT 的遗传距离逐渐增大,特别是 HT,除了耐高温性进一步增大外,其藻体突变成红色,与 WT 呈浅棕色的藻体颜色完全不同,故相互间的遗传距离增大到 0.700 8。另外, TM-18 和 HT 聚为一群,符合二者选自 B4 的诱变过程,但是二者与 B4 聚成 2 个群,说明经过 2 次辐照诱变后,2 种耐高温品系的变异程度不断累积,亲缘关系增大。另外, Ros-2 和 LG 是由日本的野生型品系 U-511 诱变而来,与我国的条斑紫菜品系差异较大,故聚成 2 个群。本研究条斑紫菜 6 个品系的聚类分析结果与其品系来源基本一致,也说明使用 SRAP 标记技术可以较真实的反映出各品系间的亲缘关系。

在条斑紫菜的种质鉴定方法中,传统的形态学方法容易受栽培密度及海域环境的影响,很难准确区分不同的品种(系)。常用的特定序列测定方法多用于种间水平的鉴别,不能作为快速准确的种内品系鉴别工具<sup>[22-23]</sup>。在本研究中,使用 SRAP 标记技术对 6 个品系的丝状体 DNA 进行扩增,对特异性条带进行回收测序,并重新设计引物,获得特异性更强的标记。经过检验, TM-18 在丝状体 DNA 中的特异性标记可以在叶状体 DNA 中扩增出来,该特异性标记在 GenBank 库中未搜

索到同源序列,说明是一个新的序列,鉴于 SRAP 标记主要对 ORF 进行扩增的特点,该序列可能与耐高温品系 TM-18 的优良特性有关,有待于进一步研究。本研究结合 SRAP 标记的高多态性和重新设计引物的特异性,分析了条斑紫菜 6 个品系间的亲缘关系并获得了 TM-18 的特异性标记,只通过一步简单 PCR 和琼脂糖电泳,就实现了亲缘关系较近的种内品系的快速鉴定。SRAP 有望成为一种新的紫菜种内品系的鉴定方法,也为分子标记辅助育种技术在紫菜良种选育过程中的应用提供理论基础。

#### 参考文献:

- [1] Sutherland J E, Lindstrom S C, Nelson W A, et al. A new look at an ancient order: generic revision of the Bangiales (Rhodophyta) [J]. *Journal of Phycology*, 2011, 47(5): 1131-1151.
- [2] 张美如, 陆勤勤, 许广平. 条斑紫菜产业现状及其健康发展的思考 [J]. *中国水产*, 2012(11): 15-19.
- [3] 王华芝, 严兴洪, 李琳. 条斑紫菜 (*Porphyra yezoensis*) 耐高温品系的筛选及特性分析 [J]. *海洋与湖沼*, 2012, 43(2): 363-369.
- [4] 张秉磊. 条斑紫菜 (*Porphyra yezoensis*) 耐高温品系的筛选 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2009: 1-64.
- [5] 王华芝. 条斑紫菜 (*Porphyra yezoensis*) 耐高温品系的筛选及特性分析 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2012: 1-81.
- [6] Li G, Quiros C F. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in *Brassica* [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2001, 103(2): 455-461.
- [7] Chen X, Xia Z, Fu Y, et al. Constructing a genetic linkage map using an F<sub>1</sub> population of non-inbred parents in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) [J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2010, 28(4): 676-683.
- [8] 谢潮添, 陈昌生, 纪德华, 等. 坛紫菜 (*Porphyra haitanensis*) SRAP 分子标记体系的构建及种质材料的遗传分析 [J]. *自然科学进展*, 2008, 18(3): 247-253.
- [9] Qiao L X, Liu H Y, Guo B T, et al. Molecular identification of 16 *Porphyra* lines using sequence-related amplified polymorphism markers [J]. *Aquatic Botany*, 2007, 87(3): 203-208.
- [10] 王素娟, 张小平, 徐志东, 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.
- [11] Yan X H, Aruga Y. Induction of pigmentation mutants by treatment of monospore germlings with MNNG in *Porphyra yezoensis* Ueda (Bangiales, Rhodophyta) [J]. *Algae*, 1997, 12: 39 - 54.
- [12] Zhang B L, Yan X H, Huang L B. Evaluation of an improved strain of *Porphyra yezoensis* Ueda (Bangiales, Rhodophyta) with high-temperature tolerance [J]. *Journal of Applied Phycology*, 2011, 23 (5): 841 - 847.
- [13] Yan X H. Induction, isolation and characterization of pigmentation mutants in *Porphyra yezoensis* Ueda (Bangiales, Rhodophyta) [D]. Tokyo: Tokyo University of Fisheries, 1997: 1 - 101.
- [14] 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.
- [15] 柳李旺, 龚义勤, 黄浩, 等. 新型分子标记——SRAP 与 TRAP 及其应用 [J]. *遗传*, 2004, 26 (5): 777 - 781.
- [16] 文雁成, 王汉中, 沈金雄, 等. 用 SRAP 标记分析中国甘蓝型油菜品种的遗传多样性和遗传基础 [J]. *中国农业科学*, 2006, 39 (2): 246 - 256.
- [17] Li G, Gao M, Yang B, *et al.* Gene for gene alignment between the *Brassica* and *Arabidopsis* genomes by direct transcriptome mapping [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2003, 107 (1): 168 - 180.
- [18] 林忠旭, 张献龙, 聂以春. 新型标记 SRAP 在棉花 F<sub>2</sub> 分离群体及遗传多样性评价中的适用性分析 [J]. *遗传学报*, 2004, 31 (6): 622 - 626.
- [19] 徐燕, 谢潮添, 陈昌生, 等. 坛紫菜遗传连锁图谱的构建 [J]. *水产学报*, 2010, 34 (9): 1354 - 1362.
- [20] Hu J G, Vick B A. Target Region Amplification Polymorphism: A novel marker technique for plant genotyping [J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2003, 21 (3): 289 - 294.
- [21] 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 [J]. *海洋学报*, 2005, 27 (3): 159 - 162.
- [22] 孙雪, 杨锐, 刘必谦, 等. 坛紫菜 *rbcS* 及 *rbcL-rbcS* 基因间隔区的序列分析 [J]. *水产科学*, 2006, 25 (1): 23 - 26.
- [23] 赵玲敏, 谢潮添, 陈昌生, 等. 5.8S rDNA-ITS 区片段的序列分析在坛紫菜种质鉴定中的应用 [J]. *水产学报*, 2009, 33 (6): 940 - 948.

## Analysis and identification of different strains of *Pyropia yezoensis* using sequence-related amplified polymorphism markers

JIA Wei<sup>1</sup>, HUANG Linbin<sup>1,2</sup>, YAN Xinghong<sup>1,2\*</sup>

(1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Resources, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

**Abstract:** 6 strains of *Pyropia yezoensis* (Ueda) M. S. Hwang et H. G. Choi were analyzed using SRAP (sequence-related amplified polymorphism) markers in order to identify the germplasm. DNAs from conchocelis of 6 strains were screened with 35 primer combinations, of which 11 primer combinations gave stable and reproducible amplification patterns. Among the total 131 fragments, 125 fragments (95.42%) were polymorphic. The genetic distances of 6 strains were between 0.364 3 and 0.867 9, and the average was 0.593 0. Cluster analysis of UPMGA showed a good and true relationships among the 6 strains. The results demonstrated that SRAP could be a useful tool in germplasm identification of *P. yezoensis* strains. From the total 131 fragments, 4 fragments amplified by 1 primer combination were used to develop the DNA fingerprints of 6 strains of *P. yezoensis*. One specific fragment of *TM*-18 was obtained in the fragments amplified by primer combination ME1/EM6. According to the DNA sequence of the fragments, a specific pair-primer was designed and it achieved stable amplification of a 340 bp specific band in both DNA of conchocelis and blades of *TM*-18. The specific marker could be used in fast identification of *TM*-18 strain.

**Key words:** *Pyropia yezoensis*; sequence-related amplified polymorphism (SRAP); molecular marker; genetic distance; fingerprints

**Corresponding author:** YAN Xinghong. E-mail: xhyan@shou.edu.cn