

坛紫菜种质材料 DNA 指纹图谱的构建

谢潮添, 陈昌生*, 纪德华, 赵国瑞, 徐燕, 史修周
(集美大学水产学院, 福建 厦门 361021)

摘要: 采用 20 对简单重复序列 (SSR) 引物对福建省坛紫菜种质资源库中保存的 44 个坛紫菜种质材料进行了遗传分析, 共检测到了 81 个多态性位点, 每对引物检测到的等位基因介于 2~6 个之间, 平均为 4.05 个, 引物的 PIC 值介于 0.15~0.79 之间, 平均为 0.57。然后根据 3 对引物 (Phes08, Phes03 和 PC13) 扩增出的 16 个多态性位点构建了 44 个坛紫菜种质材料的指纹图谱库, 使得每一种质材料均具有其特异的 DNA 指纹图谱。并根据指纹图谱中各扩增位点条带的有无, 将指纹图谱转化成了计算机可以识别的数码指纹, 开发了相应的数码指纹识别软件, 为坛紫菜种质的自动化鉴定及坛紫菜种质资源库的信息化管理奠定了基础。

关键词: 坛紫菜; 种质材料; 简单重复序列; 指纹图谱库

中图分类号: S 917

文献标识码: A

坛紫菜是我国紫菜人工养殖的两个主要种类之一, 原产于福建, 20 世纪 70 年代后推广到浙江沿海, 目前已成为闽浙沿海的支柱性产业, 其产量占全国紫菜总产量的 75% 左右, 是我国特有的暖温带性种类^[1]。

近年来, 基础研究的加强和生物技术的采用, 带动了坛紫菜育种和栽培技术的快速发展, 新的栽培品系不断出现。科学准确地鉴别新品系及种质材料的遗传特异性, 对于坛紫菜种质的质量鉴定、遗传资源评价和品种权益保护均具有重要意义。传统的依赖于形态学的种质鉴定, 由于坛紫菜大多数形态性状易受环境因素影响, 且可描述的特征有限, 准确的鉴定工作非常困难。随着 DNA 分子标记的不断发展和检测技术的渐趋完善, 从分子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。DNA 指纹图谱技术已经在农作物品种的种质鉴定中发挥了重要作用^[2], 国际植物品种权保护联盟 (UPOV) 已将 DNA 指纹图谱鉴定纳入农作物品种 DUS 测试内容, 并将 DNA 指纹图谱构建的标记方法确定为简单重复序列 (simple sequence

repeat, SSR) 和单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP)^[3], 我国也已将 DNA 指纹图谱鉴定作为品种质量监控的重要措施之一, 为品种保护提供理论基础和法律依据^[4]。

DNA 指纹图谱在紫菜种质鉴定中的应用已有报导, 贾建航等^[5]利用来自两个 RAPD 引物扩增的 8 条多态性条带构建了 15 个紫菜无性系的 DNA 指纹图谱。石金锋等^[6-7]报道了 8 个可以有效对 8 个紫菜无性系进行特异性鉴定的 RAPD 分子标记, 并把它们转换成生产上便于应用的 SCAR 标记。刘必谦等^[8]采用 3 对 EST-SSR 引物扩增出的 5 个条带构建了 8 个坛紫菜丝状体品系的 DNA 指纹, 使得每个丝状体品系都有独一无二的指纹模式。谢潮添等^[9]利用 ISSR 标记构建了 4 个坛紫菜色素突变体的 DNA 指纹。Sun 等^[10]、Weng 等^[11]、Qiao 等^[12]分别构建了 27 个紫菜品系的 RAPD 和 AFLP 指纹图谱, 并应用 SRAP 标记构建了 16 个紫菜品系的 DNA 指纹图谱, 并将这些指纹图谱应用于紫菜的种质鉴定中。但这些研究大多是对一种紫菜的少数几个品系, 或者多种紫菜同时构建指纹图谱, 仍然存在着样品收集

收稿日期:2009-12-31 修回日期:2010-03-17

资助项目:国家自然科学基金项目(40676077, 40806065); 国家海洋“八六三”计划(2006AA10A413); 福建省科技平台建设项目(2007N2011); 福建省自然科学基金(2007J0064)

通讯作者:陈昌生, E-mail:cschen@jmu.edu.cn

不全,不同实验室的研究数据难以进行共享和比较,在生产上无法推广使用,且所采用的标记方法不符合 UPOV 的规定等诸多问题。

因此本研究拟按照标准 DNA 指纹库构建的原理^[3-4,13],对坛紫菜指纹图谱构建的各个环节进行优化,从而构建福建省坛紫菜种质资源库收集和保存的44个坛紫菜种质材料的SSR DNA 指纹图谱,并将指纹图谱转化为计算机可以识别的数码指纹,开发相应的数码指纹识别软件,应用于

坛紫菜种质鉴定,实现坛紫菜种质资源库的信息化管理。

1 材料与方法

1.1 供试材料

44个坛紫菜种质材料均来自于福建省坛紫菜种质资源库中保存的丝状体纯系(表1)。培养条件为20℃,光照强度1000~1500 lx,光周期为12 h(光):12 h(暗)。

表1 供试坛紫菜的种质编号及来源
Tab.1 Germplasm No. and origin of the samples of *P. haitanensis*

序号 no.	种质编号* germplasm no.	特征 characters	来源 origin	序号 no.	种质编号 germplasm no.	特征 characters	来源 origin
1	YS I	生长速度快 grew fast	野生选育(平潭苏澳) wild breeding (Suao of Pintan)	17	YSⅦ-1	生长速度快,藻体宽 grew fast, width of blade	野生选育(平潭东甲岛) wild breeding (Dongjia island of Pintan)
2	YS II	生长速度快 grew fast	野生选育(平潭东澳) wild breeding (Dongao of Pintan)	18	YSⅦ-2	生长速度快,藻体宽 grew fast, width of blade	野生选育(平潭东甲岛) wild breeding (Dongjia island of Pintan)
3	YS III	生长速度快,藻体宽 grew fast, width of blade	野生选育(平潭东甲岛) wild breeding (Dongjia island of Pintan)	19	PX II	生长速度快,藻体厚 grew fast, thickness of blade	大田选育 breeding by field selection
4	YS IV	生长速度快 grew fast	野生选育(平潭将军山) wild breeding (Jiangjunshan of Pintan)	20	PX III	生长速度快 grew fast	大田选育 breeding by field selection
5	YS V-1	生长速度快,藻体宽 grew fast, width of blade	野生选育(平潭将军山) wild breeding (Jiangjunshan of Pintan)	21	PX V	藻体薄,不易成熟 thin of blade, hard to mature	大田选育 breeding by field selection
6	YS V-2	生长速度快,藻体窄 grew fast, narrow of blade	野生选育(平潭将军山) wild breeding (Jiangjunshan of Pintan)	22	PX V-1	生长速度快,耐高温 grew fast, high temperature resistant	大田选育 breeding by field selection
7	YS V-3	生长速度快,藻体宽, 不易成熟 grew fast, width of blade hard to mature	野生选育(平潭将军山) wild breeding (Jiangjunshan of Pintan)	23	PX V-2	生长速度快 grew Fast	大田选育 breeding by field selection
8	YS V-4	生长速度快,不易成熟 grew fast, hard to mature	野生选育(平潭将军山) wild breeding (Jiangjunshan of Pintan)	24	PX IV-1	生长速度快,藻体厚 grew fast, thickness of blade	大田选育 breeding by field selection
9	YS VI	生长速度慢,藻体较宽、厚 grew slowly, width and thickness of blade	野生选育(平潭草屿) wild breeding (Caoyu of Pintan)	25	PX IV-2	生长速度快,藻体厚 grew fast, thickness of blade	大田选育 breeding by field selection
10	YS VII-1	生长速度慢,易成熟 grew fast, easy to mature	野生选育(厦门大嶼) wild breeding (Dadeng of Xiamen)	26	PX IV-3	藻体厚,耐高温 thickness of blade, high temperature resistant	大田选育 breeding by field selection
11	YS VII-2	生长速度慢,易成熟 grew fast, easy to mature	野生选育(厦门大嶼) wild breeding (Dadeng of Xiamen)	27	Z-17	红色,生长速度快 red, grew fast	杂交选育 hybrid breeding
12	YS VIII	生长速度慢,藻体宽, 易成熟 grew fast, width of blade, easy to mature	野生选育(漳浦古雷) wild breeding (Gulei of Zhangpu)	28	Z-19	生长速度较快 grew fast	杂交选育 hybrid breeding
13	YS IX	生长慢,易成熟 grew slowly, easy to mature	野生选育(东山) wild breeding (Dongshan islang of Zhangzhou)	29	Z-26	红色,耐高温 red, high temperature resistant	杂交选育 hybrid breeding
14	YS X-1	生长速度慢,藻体宽, 易成熟 grew slowly, width of blade, easy to mature	野生选育(平潭南海) wild breeding (Nanhai of Pintan)	30	Z-60	生长速度快 grew fast	杂交选育 hybrid breeding
15	YS X-2	生长慢,窄叶,易成熟 grew slowly, narrow of blade, easy to mature	野生选育(平潭南海) wild breeding (Nanhai of Pintan)	31	Z-61	生长速度快 grew fast	杂交选育 hybrid breeding
16	YS XI	生长速度慢,易成熟 grew slowly, easy to mature	野生(平潭南赖岛) wild breeding (Nanlai of Pintan)	32	Z-66	生长速度快,耐高温 grew Fast, high temperature resistant	杂交选育 hybrid breeding

· 续表 1 ·

33	Z-68	生长速度快 grew fast	杂交选育 hybrid breeding	39	Z-91	褐绿色,叶片宽而薄 breen, wirth and thin of blade	杂交选育 hybrid breeding
34	Z-71	红色,藻体宽 red, width of blade	杂交选育 hybrid breeding	40	Z-92	褐绿色 breen	杂交选育 hybrid breeding
35	Z-72	生长速度快 grew fast	杂交选育 hybrid breeding	41	Z-94	褐绿色,抗逆性强 breen, stress tolerant	杂交选育 hybrid breeding
36	Z-80	褐色,生长速度快,叶片宽 brown, grew fast, width of blade	杂交选育 hybrid breeding	42	YB I	桔红色,容易成熟 nacarar, easy to mature	诱变选育 mutagenesis breeding
37	Z-81	生长速度快,藻体宽 grew fast, width of blade	杂交选育 hybrid breeding	43	YB II	褐绿色 breen	诱变选育 mutagenesis breeding
38	Z-82	桔红色,生长速度快 nacarar, grew fast	杂交选育 hybrid breeding	44	YB III	紫色,生长速度快 purple, grew fast	诱变选育 mutagenesis breeding

注: * 为福建省坛紫菜种质资源库对各种质的编号。

Notes: The germplasm No. of *P. haitanensis* germplasm repository of Fujian.

1.2 方法

DNA 提取 收集培养液中培养的各种质材料的自由丝状体用滤纸吸干后,取 0.5 g 置于微型匀浆机中进行高速匀浆,然后采用传统的 CTAB 法^[14]稍作改良后进行 DNA 的提取和纯化,在 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳中检查所提取 DNA 的完整性,并在 Beckman DU-600 核酸蛋白紫外分析仪上测定 DNA 浓度。

引物 共筛选了 80 对引物,其中 28 对引物来自于 Xie 等^[15]从坛紫菜 EST 序列中开发的 EST-SSR 引物,11 对引物来自于 Zuo 等^[16]根据坛紫菜基因组数据开发的 SSR 引物,其余 41 对引物来自于 Sun 等^[17]的报导。引物由大连宝生物(TaKaRa)公司合成。

SSR 分析 通过正交实验(数据未发表)确定坛紫菜 SSR 扩增的最佳反应体系为:25 μL 的反应体系中含 2.5 μL 10 \times PCR Buffer,5 ng 模板 DNA,1.0 U *Taq* 酶(TaKaRa),200 nmol/L 上

游引物,200 nmol/L 下游引物和 200 $\mu\text{mol/L}$ dNTP。最佳扩增程序为:94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, Tm(依引物不同,表 2)45 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,35 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。扩增反应在 MJ reseach PTC-200 型扩增仪上进行,扩增产物在 10% 的聚丙烯酰胺胶上于 60 W 恒功率电泳 2 h,经银染显色,扫描仪记录结果。

数据统计分析 根据扩增片断对应的分子量从大到小(图 1),将每一样品电泳图谱中每一条带的迁移位置记为一个位点,相同迁移位置条带的有无分别记为 1 和 0,数据缺失记为“-”,输入电脑形成 1,0 矩阵,计算等位基因数。然后利用软件 Picalc 0.6 根据计算公式(1)^[18]计算各引物的多态性指标 PIC(polymorphism information content)值:

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n P_i^2 - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2P_i P_j \quad (1)$$

式中, P_i 、 P_j 分别为群体中第 i 、 j 个等位基因频率, n 为等位基因数。

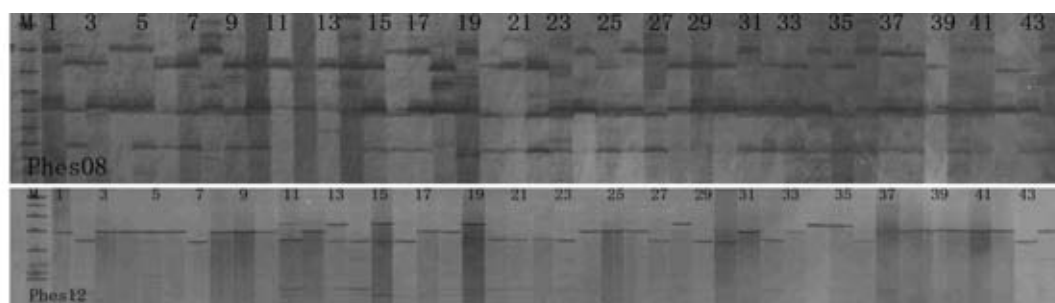


图 1 SSR 引物(Phes 08 和 Phes 12)对 44 个坛紫菜种质材料的扩增图谱

Fig.1 Electrophoretic pattern of 44 germplasm materials of *P. haitanensis* with SSR primers(Phes 08 and Phes 12)

标准 DNA 指纹图谱的构建 构建图谱时依据用最少引物、最少位点、又能把所有供试样品逐个区分开来的原则,根据 SSR 引物的凝胶电泳结果,从中挑选引物用于构建 44 个坛紫菜种质材料的 DNA 指纹图谱库,使得在该 DNA 指纹图谱库中,每个材料都具有其特异的 DNA 指纹。最后根据各位点条带的有/无分别记为 1/0 的方法,将 DNA 指纹图谱转化为计算机可以识别的代表各品系身份的特征指纹代码,配合使用相应的数码指纹识别软件,即可应用于坛紫菜的种质鉴定。

2 结果与分析

2.1 SSR 标记分析

在 SSR-PCR 扩增实验中,以提取的 44 个坛紫菜种质材料基因组 DNA 为模板进行引物筛选,结果从 80 对 SSR 引物中筛选出 20 对引物,可以扩增出清晰稳定,重复性好的位点。这 20 对 SSR 引物共检测到 81 个多态性位点,每对引物检

测到的等位基因分布在 2~6 个之间,平均为 4.05 个。引物的多态性指标 *PIC* 值介于 0.15~0.79 之间,平均为 0.57。图 1 为引物 Phes 08 和 Phes 12 扩增的电泳结果,分别扩增出了 4 个和 3 个等位基因,*PIC* 值分别为 0.67 和 0.52。引物扩增的等位基因数越多,该引物在种质鉴定中的作用就越大,在本实验中扩增的等位基因数大于平均数的引物有:Phes 03、Phes 06、Phes 15、PH 47、PH 49、PC 10、PC 11、PC 13 和 PC 23。而引物的多态性指标 *PIC* 值越大,表明该引物区分各种质材料的能力越强,在本实验中 *PIC* 值大于平均数的引物有:Phes 03、Phes 06、Phes 08、Phes 15、Phes 27、PH 47、PH 49、PC 10、PC 11、PC 13 和 PC 23。在这两类大于平均数的参数中,共同出现的引物有 9 对,凡是扩增的等位基因数大于平均数的引物,其 *PIC* 值就高于平均数,说明在坛紫菜中引物扩增的等位基因数和引物的多态性指标 *PIC* 值在总体上是保持一致的。

表 2 20 对 SSR 引物的序列、扩增的等位基因数、片段大小和 *PIC* 值

Tab. 2 Sequences, number of alleles, fragment size and polymorphic fragment information content (*PIC*) of 20 SSR primer pairs

编号 no.	引物序列 primer sequences		等位基因数 number of alleles	片段大小 (bp) fragment size	<i>PIC</i>
	反向引物 reverse primer (5'-3')	正向引物 forward primer (5'-3')			
Phes 03	TGCTGCTGCCTCGCTAT	CACCGTCTTGTGTGACCCCTC	6	369~396	0.76
Phes 05	TGTTGAGCAAGGGCAAGACC	CCATTGGCGGAAAGGGAC	3	102~117	0.52
Phes 06	TTGAGCAAGGGCAAGACCG	GGACCAGTAGCATTCCGACGAG	5	282~300	0.71
Phes 08	TGCTGACGGACGAGGAGAAGA	GCACCTGCAAAATGCCACAAA	4	351~382	0.67
Phes 11	CGGGTCGTCGAGTTGGTT	AGAGCGGGCGTAAGCGGAAG	3	160~169	0.42
Phes 12	CAGCATTACTACGCAAACCACC	AATAAAGCCACATCCGCACAA	3	347~353	0.52
Phes 15	GGCGTCTGATGGAGAA	CCGAGTGATGCCAAGGGA	5	338~359	0.63
Phes 17	GACGCAGCACGCACAAAC	CCGCACAAAGGCAAGAA	3	339~351	0.45
Phes 20	CGCCTGCCAATGACGAGA	GCAAGAACAAGGTGGAAGAGC	2	340~343	0.33
Phes 23	TCTCGCTGCCATTATCCTC	CGATGCGGTCATTGTGCTG	2	310~316	0.32
Phes 27	GTCAAGGAGACGTTGTGGGATA	AGCGGAAGGAGGACAGAGG	4	400~410	0.61
PH 47	GACCAGGGATGGAACCCGAGG	CGGTCTGGCAGGGCAGTTC	5	181~199	0.66
PH 49	CTAGACGGAGTGCGGCTGAC	GTCCTCCACGAGCATCAGG	5	176~196	0.72
PC 10	CACACGGAGACGAAGCACAA	CGTAGTCACCATCGTAGCAGT	5	223~244	0.70
PC 11	CGCTCAACCACTTCGTCAG	CATTGTTGGCGTTGTTGCATA	6	252~276	0.76
PC 13	CCGTCGTCAGCAGGAGCA	ATGTGAGAAGCCAGTAGGGAAAGT	6	192~213	0.76
PC 17	TCAACCATCAGCCATACCGAC	GACATGTCCGCCACCTTGTA	2	188~192	0.15
PC 22	TACCAGGTCGACCAGGAGCA	TCCAACCTCTGCAGTGTCCGTT	3	285~294	0.47
PC 23	CGGACATGATGTTTAGTGACGA	GGCAAGCTGAGACGATGAC	6	250~277	0.76
PC 36	GCTACGCGTTTGCTACGAG	CGGTGGACGTTGTTCTGCTG	3	271~283	0.53

2.2 指纹图谱的构建及向指纹代码的转换

根据 20 对引物对 44 个坛紫菜种质材料的 SSR 分析结果,及最少引物、最少位点、又能把所

有供试样品逐个区分开来的原则,挑选引物 Phes 08, Phes 03 和 PC 13 作为 44 个坛紫菜种质材料指纹图谱库构建的引物组合,根据这 3 个引物组

合扩增的 16 个多态性位点构建的 44 个坛紫菜种质材料的指纹图谱库(图 3)。在这指纹图谱库中,每个种质材料都具有其特异的 DNA 指纹图谱。

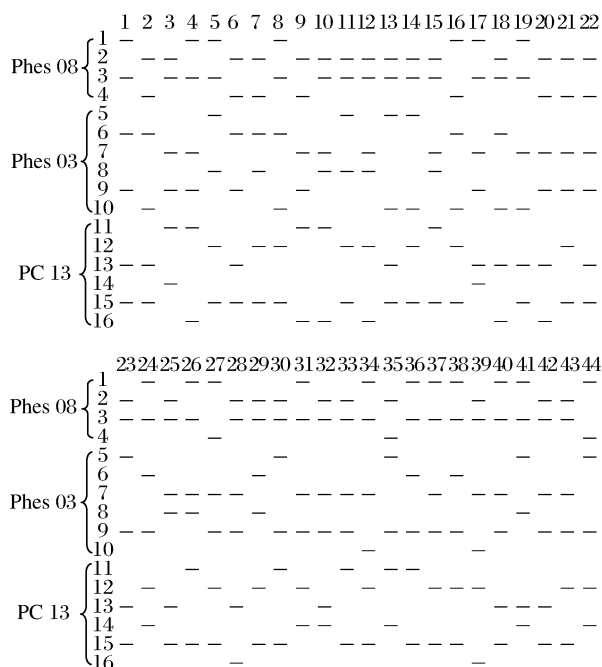


图 2 44 个坛紫菜种质材料的 DNA 指纹图谱
Fig. 2 DNA fingerprints of the 44 germplasm materials of *P. haitanensis*

同时,根据各引物 SSR 分析结果中各位点扩增条带的有无,将所构建的 44 个坛紫菜种质材料的 DNA 指纹图谱转化成了计算机可以识别的数

码指纹(表 3),使得每一种质材料与一特异的代码序列相对应。

2.3 数码指纹识别软件的开发及应用

为了便于坛紫菜种质库的信息化管理及后续坛紫菜种质鉴定的自动化,本研究还设计编写了坛紫菜数码指纹识别软件——Dfr 1.0。该软件分为两个模块:建库和数码识别。在建库模块,可以输入种质名称,种质相关信息,数码指纹(由引物编号及 0 和 1 组成的指纹代码两部分组成)。并将输入的所有信息组成一个种质相关的数据库,用于后续的种质比较(每个种质的数码指纹可以只有一个,也可以多个)。

而在数码识别模块,输入一个数码指纹(包括引物编号及指纹代码),该软件即可自动与已建库各种质的数码指纹进行比较(只针对具有相同引物编号的指纹进行比较)。(1)若发现该输入的数码指纹与数据库中某一种质的数码指纹一致,则显示该检索的数码指纹与已建库种质中哪一种质的指纹相符,同时显示该种质的相关信息;(2)若在数据库找不到与该数码指纹相匹配的种质,则显示该种质为新种质,同时显示该种质与数据库中已建库各种质的遗传相似性(遗传相似性的算法为: $GS = N_i / N_i + N_j$ (N_i 为两个比较种质相同的扩增位点数, N_j 为两个比较种质不同的扩增位点数)),按相似性大小排列。最后并提示是否将该种质的相关信息加入数据库中,若选择加入,则会出现对话框,提示输入新种质的名称,种质相关信息等。若选择不加入,则终止。

表 3 44 个坛紫菜种质材料的数码指纹

Tab. 3 Computerized DNA fingerprints of the 44 germplasm materials of *P. haitanensis*

种质编号 germplasm no.	数码指纹 computerized fingerprints	种质编号 germplasm no.	数码指纹 computerized fingerprints	种质编号 germplasm no.	数码指纹 computerized fingerprints
YS I	1010010010001010	YSXI	1001010001010010	Z-61	1010001010010100
YS II	0101010001001010	YSXII-1	1010001010001100	Z-66	0110001010001100
YS III	0110001010100100	YSXII-2	0110010001001001	Z-68	0110001010100010
YSIV	1010001010100001	PX II	1010001001001010	Z-71	1010001001010010
YS V-1	1010100100010010	PX III	0101001010001001	Z-72	0101100010100100
YS V-2	0101010010001010	PX V	0101001010010010	Z-80	1010010010100010
YS V-3	0101010100010010	PX V-1	0101001010001010	Z-81	1010001010010010
YS V-4	1010010001010010	PX V-2	0110100010001010	Z-82	1010010010010010
YSVI	0101001010100001	PXIV-1	1010010010010100	Z-91	0110001001010001
YSVII-1	0110001100100001	PXIV-2	0110001100001010	Z-92	1010001010001010
YSVII-2	0110100100010010	PXIV-3	1010001100100010	Z-94	1010100100001100
YSVIII	0110001100010001	Z-17	1001001010010010	YB I	0110001010001010
YSIX	0110100001001010	Z-19	0110001010001001	YB II	0110001010010010
YSX-1	0110100001010010	Z-26	0110010100010010	YB III	1001100010010100
YSX-2	0110001100100010	Z-60	0110100010100010		

由此,在实际进行坛紫菜的种质鉴定时,只需对每个待鉴定样品进行指定引物的 SSR 扩增,获得其 DNA 数码指纹,然后将每个样品的数码指纹输入数码指纹识别软件中,软件通过计算即可自动给出该样品是否属于已建库种质中的一个,如果是就显示该样品的种质信息;如果不是,则显示该样品与各个已建库种质的相似系数。这样就大大方便了坛紫菜的种质鉴定工作,实现种质资源库的信息化管理。当然该数码指纹识别软件也可应用于其它物种的种质鉴定中。

3 讨论

3.1 SSR 标记技术在指纹图谱构建中的应用

传统的植物种质鉴定多以形态学标记作为依据,参考同工酶和种子贮藏蛋白标记。但形态学标记易受环境条件的影响,往往鉴定周期长,工作量大。同工酶和种子贮藏蛋白标记多态性不够丰富,同工酶还存在组织和器官特异性,对取材有严格的一致性要求,所以鉴定结果不够稳定。而与之相比,DNA 分子标记技术直接在 DNA 水平标记检测基因组的遗传变异,不受发育时期和环境因素的影响,数量丰富且多态性好,在农作物的种质鉴定、种子纯度和真实性鉴定中已经发挥了重要作用^[2]。但在众多的 DNA 分子标记中如何选择,是一个值得思考的问题。SSR 标记由于具有标记数量丰富,覆盖整个基因组,揭示的多态性高;具有复等位基因的特性,提供的信息量大;以孟德尔方式遗传,呈共显性;每个位点由引物序列决定,便于不同实验室相互交流合作开发引物,获得的资料能够在不同的实验室重复并共享等特点^[19],已经在植物的种质鉴定中得到了广泛应用,成为国际植物品种权保护联盟(UPOV)BMT 测试指南草案中指定的两种分子标记技术之一^[3](另一种分子标记技术为 SNP),而且由于 SSR 标记技术比较成熟,操作简单,成本相对较为低廉,目前已经成为各种农作物 DNA 指纹图谱库构建的首选标记^[4]。Bredemeijer 等^[20]采用 20 对 SSR 引物对超过 500 个西红柿品种进行了遗传分析,结果每个引物检测到的多态位点数为 2~8 个,平均为 4.7 个,并根据遗传分析结果构建了这 500 多个西红柿品种的指纹图谱;李根英等^[21]采用 134 对 SSR 引物构建了 2 457 个小麦基因型的指纹图谱,并依此开发了相应的小麦种

质 SSR 分子标记鉴定试剂盒;高运来等^[22]采用 43 对 SSR 引物对 83 份大豆品种进行检测,共检测出等位变异 157 个,每个引物检测到的等位变异数为 2~7 个,平均为 3.65 个,并采用其自行编制的 ID Analysis 1.0 软件对数据进行了分析,结果表明只需 9 对引物就可以将 83 份材料完全区分开,并由此构建了黑龙江省大豆品种分子 ID;雷天刚等^[23]则采用 12 对 SSR 引物和 2 个 ISSR 特征引物构建了 70 个柑橘栽培品种(系)的 DNA 特征指纹图谱。在本研究中,平均每对 SSR 引物可以在 44 个坛紫菜种质材料中检测到 4.05 个多态性位点,引物的 PIC 值平均为 0.57,这些数据与 SSR 标记在陆地植物中的检测结果基本一致,而且在随后指纹图谱构建中,只用了 3 对 SSR 引物的扩增结果即可将 44 个坛紫菜种质材料完全区分开,使得每个种质材料均有其特异的 DNA 指纹,由此说明 SSR 标记也是坛紫菜指纹图谱构建的理想标记。当然在采用 SSR 标记作为指纹图谱构建的分子标记时,必须对遗传分析的技术体系进行优化和标准化,以保证实验数据在不同实验室的稳定性和重复性,由此构建的指纹图谱才具有广泛的适用性。为此,本研究在前期研究中通过正交实验对坛紫菜 SSR 标记分析技术体系进行了优化,建立了坛紫菜指纹图谱构建的最佳技术体系,保证了实验结果的可靠性。

3.2 坛紫菜 DNA 指纹图谱的构建

在本研究中,根据 3 对 SSR 引物对 44 个坛紫菜种质材料的分析结果,构建了坛紫菜的 DNA 指纹图谱库,并开发了相应的数码指纹识别软件,可以方便地实现坛紫菜种质材料的鉴定,提供相关种质信息,而且该指纹图谱库可以根据需要随时增加相关引物的扩增指纹及种质材料,大大方便了坛紫菜种质的管理和鉴定。如果再配合使用一些商业化的凝胶电泳图谱识别软件,则可以实现 SSR 分析、电泳图谱采集、数码指纹的转换及种质鉴定的自动化,完全避免人为操作的误差。通过 RAPD、AFLP 和 SRAP 3 种标记技术分别构建了各种紫菜品系的 DNA 指纹图谱^[10-12],但由于这些标记技术本身固有的缺陷,在构建指纹图谱时,需要人为地根据扩增条带的清晰度及重复性选择扩增位点,不可避免地存在人为选择的误差,而且也未提供相应的指纹图谱识别软件,故在实际应用中仍难以推广。坛紫菜 DNA 指纹图谱

库的成功构建在坛紫菜的分子标记辅助育种也具有重要的意义,通过对坛紫菜各种质材料 DNA 指纹多态性的分析,可以对国内坛紫菜种质资源的遗传背景作出总体评价,为后续坛紫菜育种中亲本的选配提供重要依据。

参考文献:

- [1] 王清印. 海水养殖生物的细胞工程育种[M]. 北京:海洋出版社,2007:314.
- [2] 周延清. 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.
- [3] UPOV(Union for the Protection of New Varieties of Plants). Guidelines for molecular marker selection and database construction, BMT Guidelines (proj. 3) [M]. Genrva, Switzerland, 2005:3-6.
- [4] 王风格,赵久然,郭景伦,等. 中国玉米新品种标准 DNA 指纹库构建研究的几点思考[J]. 植物学通报,2005,22(1):121-128.
- [5] 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):403-407.
- [6] 石金锋,贾建航,王萍,等. 紫菜无性系特异分子标记的获得[J]. 高技术通讯,2001,11(10):1-3.
- [7] 石金锋,贾建航,金德敏,等. 紫菜无性系特异 SCAR 标记的获得[J]. 海洋学报,2003,25(1):128-131.
- [8] 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):323-326.
- [9] 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.
- [10] Sun J W, Jin D M, Zhou C J, et al. Identification of *Porphyra* lines (Rhodophyta) by AFLP DNA fingerprinting and molecular markers [J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2005, 23:251-262.
- [11] Weng M L, Liu B, Jin D M, et al. Identification of 27 *Porphyra* lines (Rhodophyta) by DNA fingerprinting and molecular markers [J]. Journal of Applied Phycology, 2005, 17:91-97.
- [12] Qiao L X, Liu Y H, Guo B T, et al. Molecular identification of 16 *Porphyra* lines using sequence-related amplified polymorphism markers [J]. Aquatic Botany, 2007, 87:203-208.
- [13] 王风格,赵久然,戴景瑞,等. 玉米品种 DNA 指纹图谱数据库构建的标准化规范[J]. 分子植物育种,2007,5(1):128-132.
- [14] 克拉尔克. 顾红雅,译. 植物分子生物学实验手册[M]. 北京:高等教育出版社,1997:153-162.
- [15] Xie C T, Chen C S, Ji D H, et al. Characterization, development and exploitation of EST-derived microsatellites in *Porphyra haitanensis* Chang et Zheng (Bangiales, Rhodophyta) [J]. Journal of Applied Phycology, 2009, 21:367-374.
- [16] Zuo Z H, Wang C G, Cao X H, et al. Isolation and characterization of microsatellite loci from a commercial cultivar of *Porphyra haitanensis* [J]. Molecular Ecology Notes, 2006, 7:522-524.
- [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, 41:329-336.
- [18] Botstein D, White R L, Skolnick M, et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms [J]. Am J Human Genet, 1980, 32:314-331.
- [19] Zietkiewicz E, Rafalske A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification [J]. Genome, 1994, 20:178-183.
- [20] Bredemeijer G M M, Cook R J, Ganai M W, et al. Construction and testing of microsatellite database containing more than 500 tomato varieties [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2002, 105:1019-1026.
- [21] 李根英, Susanne D, Marilyn L W, 等. 小麦指纹图谱数据库的建立及 SSR 分子标记试剂盒的研发 [J]. 作物学报, 2006, 32(12):1771-1778.
- [22] 高运来,朱荣胜,刘春燕,等. 黑龙江部分大豆品种分子 ID 的构建 [J]. 作物学报, 2009, 35(2):211-218.
- [23] 雷天刚,何永睿,吴鑫,等. 柑橘栽培品种(系) DNA 指纹图谱库的构建 [J]. 中国农业科学, 2009, 42(8):2852-2861.

Construction of DNA fingerprinting database of germplasm materials of *Porphyra haitanensis*

XIE Chao-tian, CHEN Chang-sheng*, JI De-hua, ZHAO Guo-rui, XU Yan, SHI Xiu-zhou
(College of Fisheries, Jimei University, Xiamen 361021, China)

Abstract: 20 simple sequence repeat (SSR) primer-pairs were used to analyze the genetic diversity of 44 germplasm materials of *Porphyra haitanensis* stored in the germplasm repository. A total of 81 alleles were detected, with the number of alleles ranging from 2 to 6, and the average was 4.05, and the polymorphism information content (PIC) was between 0.15 and 0.79, with the average of 0.57. Then the 16 polymorphic alleles amplified from 3 primer-pairs of SSR (Phes08, Phes03 and PC13) were used to construct the DNA fingerprinting database of the 44 germplasm materials of *P. haitanensis*. In the constructed DNA fingerprinting database, each germplasm material has its unique fingerprinting pattern and can be easily distinguished from each other. At last the DNA fingerprints were transformed into digital fingerprints which can be recognized by computer based on appear and disappear of amplified band in each allele, and developed the corresponding software of digital fingerprints recognizer to predigest the germplasm identified process. In conclusion, the fingerprinting database will provide a basis for germplasm auto-identification and digital management of germplasm repository of *P. haitanensis*.

Key words: *Porphyra haitanensis*; germplasm materials; simple sequence repeat (SSR); fingerprint database

Corresponding author: CHEN Chang-sheng. E-mail: cschen@jmu.edu.cn