

基于转录组信息的坛紫菜EST-SSR标记的开发及新品系SW-81的种质鉴定

费勤娇, 丁洪昌, 张鹏, 王铁杆, 严兴洪

Development of EST-SSR marker based on transcriptome and the research of germplasm identification for the new strain (SW-81) of *Pyropia haitanensis*

FEI Qinjiao, DING Hongchang, ZHANG Peng, WANG Tiegang, YAN Xinghong

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.12024/jsou.20200503036>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

[栉江珧\(*Atrina pectinata*\)EST-SSR标记的开发与应用](#)

Development and Application of the EST-SSR Markers in *Atrina pectinata*

渔业科学进展. 2017, 38(2): 137 <https://doi.org/10.11758/yykxjz.20151116001>

[鲢EST-SSR标记的开发及其与生长性状关联性分析](#)

DEVELOPMENT OF EST-SSR MARKERS AND ANALYSIS OF GROWTH TRAIT IN SILVER CARP

水生生物学报. 2020, 44(3): 494 <https://doi.org/10.7541/2020.060>

[基于G-SSR和EST-SSR标记的鲫6个群体遗传结构分析](#)

GENETIC DIVERSITY AND STRUCTURE OF CRUCIAN CARP (*CARASSIUS AURATUS*) BASED ON G-SSR AND EST-SSR MARKERS

水生生物学报. 2018, 42(3): 451 <https://doi.org/10.7541/2018.057>

[从公共数据库中利用数据挖掘的方法开发15条黄金鲈EST-SSR标记](#)

DEVELOPMENT OF FIFTEEN EST-SSR MARKERS IN YELLOW PERCH *PERCA FLAVESCENS* BY DATA MINING FROM PUBLIC EST SEQUENCES

水生生物学报. 2018, 42(6): 1186 <https://doi.org/10.7541/2018.145>

[坛紫菜“申福2号”的SSR分子标记](#)

Research on SSR marker of the SF-2 strain of *Porphyra haitanensis* Chang et Zheng (Bangiales, Rhodophyta)

中国水产科学. 2013, 20(4): 859 <https://doi.org/10.3724/SP.J.1118.2013.00859>

[泥蚶34个EST-SSR标记的开发及在格粗饰蚶中的通用性检测](#)

Characterization of 34 polymorphic EST-SSR markers in *Tegillarca granosa* and their transferability in *Anadara craticulata*

水产学报. 2013, 37(1): 70 <https://doi.org/10.3724/SP.J.1231.2013.38307>

文章编号: 1674-5566(2021)03-0464-11

DOI:10.12024/jsou.20200503036

基于转录组信息的坛紫菜 EST-SSR 标记的开发及新品系 SW-81 的种质鉴定

费勤娇^{1,2}, 丁洪昌¹, 张鹏³, 王铁杆³, 严兴洪^{1,2}

(1. 上海海洋大学 水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306; 2. 上海海洋大学 上海水产养殖工程技术研究中心, 上海 201306; 3. 浙江省海洋水产养殖研究所, 浙江 温州 325005)

摘要: 基于坛紫菜 (*Pyropia haitanensis*) 转录组序列信息进行 EST-SSR 标记的开发, 并利用多态性 SSR 标记构建 DNA 指纹图谱用于坛紫菜新品系 SW-81 的种质鉴定。结果显示: 转录组数据中共检测出 9 033 个微卫星位点, 其中三核苷酸重复类型为绝对优势基元, 占比高达 95%; 经 Primer 5.0 软件对微卫星位点进行引物设计, 并从中随机合成 187 对微卫星引物进行有效性分析, 最终获得 92 对有效引物, 其中 42 对为多态性 EST-SSR 标记, 多态扩增率约为 22.46%; 利用开发的多态性 EST-SSR 标记构建了适用于 5 个坛紫菜品系的 DNA 指纹图谱, 为新品系 SW-81 的种质鉴定提供有效的分子检测手段。上述结果表明: 坛紫菜基因组中有着丰富的微卫星位点, 且同一位点的基因序列在不同品系间存在变异, 表现为扩增产物的多态性。基于 EST-SSR 标记的多态性分析可为坛紫菜种质资源的管理与鉴定提供有效的分子检测手段。

关键词: 坛紫菜; EST-SSR; 指纹图谱; 种质鉴定

中图分类号: S 917 **文献标志码:** A

紫菜 (*Pyropia*) 因味道鲜美、营养价值高, 被人们广泛食用, 在中日韩三国被大规模栽培^[1]。紫菜栽培不仅产生了较大的经济价值, 而且对栽培海区的生态修复也具有重要作用^[2]。目前, 在我国被大规模人工栽培的紫菜有温水性的坛紫菜 (*P. haitanensis*) 和偏冷水性的条斑紫菜 (*P. yezoensis*), 前者主要在福建、浙江和广东三省栽培, 后者栽培于江苏和山东二省。2016 年, 我国紫菜干品产量约 13.53 万 t, 产值达 100 亿元以上^[3]。为满足生产与社会多元化的需求, 在育种技术的不断进步与选育工作的逐步推进下, 已选育出多个优质高产的紫菜新品系(种)^[4-8]。其中, DING 等^[9]采用紫外线人工诱变技术, 选育出坛紫菜新品系 SW-81, 该品系具有产量高、品质好、耐高温且壳孢子放散量大等优点, 适于生产上大规模栽培, 有望被培育成可推广的新品种。

随着紫菜新品系(种)的日益丰富, 形态标记

越来越难以满足其种质资源的管理, 而分子标记技术为紫菜种质的快速鉴定提供了新的技术手段^[10]。DNA 指纹图谱技术是紫菜种质鉴定与遗传多样性分析的重要手段, RAPD、AFLP、SRAP 以及 SSR 等技术均可用于构建紫菜的 DNA 指纹图谱^[10]。其中, SSR 分子标记由于具有多态性高、结果可靠等优点, 成为构建指纹图谱最理想的分子标记^[11]。但由于 SSR 引物的开发成本较高, 目前已开发的 SSR 标记数量并不多, 且多用于条斑紫菜, 坛紫菜中 SSR 标记仍有着巨大的开发潜力。

本研究根据坛紫菜转录组序列信息进行 EST-SSR 标记的批量开发, 并利用所开发的多态性 SSR 标记构建坛紫菜品系的 DNA 指纹图谱, 一方面丰富紫菜的 SSR 标记库, 为紫菜的分子生物学研究提供更多的标记选择, 另一方面也为坛紫菜新品系 SW-81 的种质鉴定提供可靠的方法。

收稿日期: 2020-05-08 修回日期: 2020-06-26

基金项目: 浙江省农业(水产)新品种选育重大科技专项(2016C02055-6); 国家重点研发计划“蓝色粮仓科技创新”重点专项(2018YFD0900606); 国家自然科学基金(31072208); 江苏省科技计划(现代农业)重点项目(BE2018335)

作者简介: 费勤娇(1994—), 女, 硕士研究生, 研究方向为海藻遗传育种。E-mail: 2365300366@qq.com

通信作者: 严兴洪, E-mail: xhyan@shou.edu.cn

1 材料与amp;方法

1.1 实验材料

实验所使用的 5 个坛紫菜品系,其名称、代码如表 1 所示。上述品系均以自由丝状体的形式被保存于本实验室内,保存条件:温度(20 ± 1) $^{\circ}\text{C}$,光照密度 $2 \mu\text{mol photons}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$,光照周期 10L:14D,每半年更换添加 MES^[12]培养基的灭菌

海水。各品系叶状体的培养方法同文献[13],取体长为 10 ~ 15 cm 的叶状体用于提取 DNA。

1.2 DNA 提取

取健康生长的丝状体和叶状体,经灭菌的 ddH₂O 清洗后,采用改进后的 LiCl 法提取它们的基因组 DNA,并用 CTAB 法加以纯化^[14],通过测定 OD 值和 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量。

表 1 EST-SSR 标记的开发实验所用的坛紫菜品系

Tab.1 Strains used in the development experiments of EST-SSR marker in *P. haitanensis*

序号 No.	代码 Codes	品系 Strains	来源与特征 Sources and characters
1	SW-81	野生型突变体	人工选育,遗传纯合,采苗容易
2	HR-5	红色杂交品系	人工选育,遗传纯合,采苗容易
3	WD-7	暗红色杂交品系	人工选育,遗传纯合,采苗容易
4	SF-2	申福 2 号	人工选育,遗传纯合,丝状体发育速度较慢
5	WT-10	福鼎野生型	从采自福鼎的栽培紫菜种分离遗传杂合,采苗容易

1.3 转录组数据来源

坛紫菜转录组数据来源于本课题组对坛紫菜野生型品系(WT, PT-001)进行 Illumina 高通量深度测序的结果^[15]。测序样本为低盐处理不同时间段(3、6 和 9 h)的坛紫菜叶状体,提取 RNA 后委托北京诺禾致源生物信息科技有限公司进行 RNA-Seq 转录组测序,并通过 de novo 法组装得到 33 872 条 Unigene 作为分析背景数据。

1.4 转录组 SSR 位点的鉴别与 SSR 引物设计

采用 MISA 软件([http://: www. pgrc. ipk-gatersleben. de](http://www.pgrc.ipk-gatersleben.de))对聚类后的 EST 搜索 SSR,搜索单核苷酸、二核苷酸、三核苷酸、四核苷酸、五核苷酸和六核苷酸最少重复次数分别为 10、6、5、5、5 和 5 次,包括中间被少数碱基打断的(interrupted)不完全重复的 SSR。

用 Primer 5.0 引物批量设计程序对含有 SSR 位点的 Unigene 序列设计引物,并且 SSR 位点侧翼序列长度 ≥ 50 bp。引物设计的主要参数:退火温度(T_m)为 50 ~ 65 $^{\circ}\text{C}$,上、下游引物的 T_m 相差 ≤ 2 $^{\circ}\text{C}$;PCR 产物大小为 100 ~ 500 bp;引物长度为 18 ~ 28 bp;GC 含量为 40% ~ 60%,尽量避免引物二级结构如发卡结构、二聚体、错配和引物二聚体的出现。

对批量设计的 SSRs 引物对在 Unigene 库中进行 SSR 引物的 Blast 验证。

1.5 EST-SSR 引物筛选

随机选取 187 对 EST-SSR 引物交由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。纯化后的丝状体 DNA 被稀释至 20 ng/ μL 作为模板,进行 PCR 扩增。15 μL 反应体系包括:20 ng/ μL 的 DNA 模板 2 μL ,Taq Mix 7.5 μL ,10 $\mu\text{mol/L}$ 的 Primer-F 及 Primer-R 各 0.4 μL ,加 ddH₂O 至 15 μL 。

PCR 反应在 Eppendorf AG 22331 Hamburg 型热循环仪上进行。反应程序:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min;接 40 个循环:94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,退火(温度视引物而定)30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s;最后延伸 10 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 保温。PCR 扩增后的产物先在 1% 琼脂糖凝胶中检测,随后利用 6% 非变性聚丙烯酰胺凝胶于垂直电泳槽中电泳分离,电泳条件:电压为 150 V,时间为 4 h。最后利用银染色法对电泳产物进行检测。电泳后采用银染的方式进行显色,并用 BIO-RAD 凝胶成像系统拍照记录。

1.6 数据统计分析

根据聚丙烯酰胺凝胶电泳检测结果,选择清晰稳定、再现性强的条带进行统计,不同扩增产物的迁移位置标记为不同的位点。按照位点的单一与否可以将试验引物分为 3 类。(1)无效引物:100 ~ 500 bp 未出现扩增条带,或条带杂乱;(2)有效引物:100 ~ 500 bp 可扩增出预期条带,

条带规律,各品系带型或多态或单一;(3)多态引物^[16]:预期范围内扩增出规律性条带,扩增产物在各品系之间存在着微小的差异,表现为多态性。

1.7 构建 DNA 指纹图谱

根据电泳检测图像统计并分析扩增位点处条带的有无,分别赋值 1 和 0,有带记为 1,无带记为 0,形成 1/0 矩阵。遵循最少引物、位点且能区分所有品系的原则^[17],挑选核心引物,建立 5 个坛紫菜品系的丝状体 DNA 指纹图谱,每个品系 3 个重复,使得每个品系均有独特的指纹模式可区别于其他品系。

1.8 DNA 指纹图谱的稳定性验证

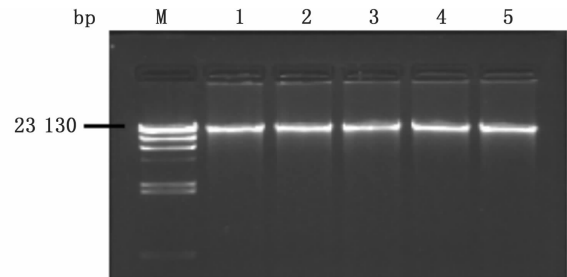
从室内培养的叶状体中,每个品系随机选择 3 颗进行基因组 DNA 的提取,利用上述核心引物对各品系叶状体 DNA 进行 PCR 扩增,检验该引物用于紫菜叶状体鉴定时的稳定性。

2 结果

2.1 坛紫菜各品系的丝状体和叶状体 DNA 的电泳检测

从 5 个品系的丝状体(图 1)和叶状体(图 2)

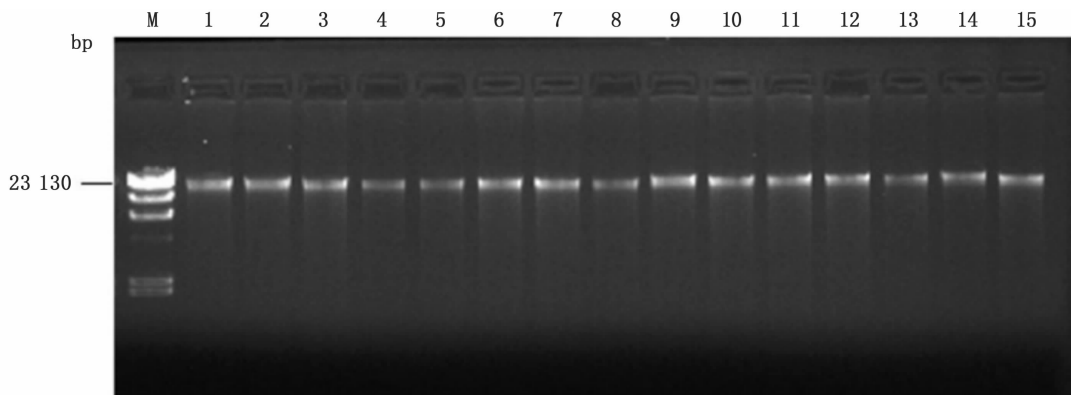
中提取的 DNA 条带清晰,经 1% 琼脂糖凝胶电泳检查后,确定 DNA 的分子量为 23 kb, NanoDrop 2 000 测定结果表明,各品系 DNA 的 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 均在 1.8 左右,可满足 SSR-PCR 扩增的要求。



M. λ DNA/*Hind* III marker; 1. SW-81; 2. HR-5; 3. WD-7; 4. SF-2; 5. WT-10。

图 1 5 个坛紫菜品系的丝状体 DNA 在 1% 琼脂糖凝胶电泳上的电泳结果

Fig.1 Agarose gel photograph of genomic DNA extracted from the conchocelis of five strains in *Pyropia haitanensis*



M. λ DNA/*Hind* III marker; 1~3. SW-81; 4~6. HR-5; 7~9. WD-7; 10~12. SF-2; 13~15. WT-10。

图 2 5 个坛紫菜品系的叶状体 DNA 在 1% 琼脂糖凝胶电泳上的电泳结果

Fig.2 Agarose gel photograph of genomic DNA extracted from blades of five strains in *Pyropia haitanensis*

2.2 坛紫菜转录组中 SSR 的分布与结构特点

通过对坛紫菜转录组中的 33 872 条 Unigenes(序列总长约 36 571.80 kb)序列进行搜索,找到 9 033 个符合条件的 SSR,出现频率(检出 SSR 个数与总 Unigene 数之比)为 26.67%。坛紫菜转录组的 SSR 种类较为丰富,二核苷酸至六核苷酸重复类型均存在,但各种类型的出现频率有较大差异(表 2)。其中:三核苷酸重复出现

的频率最高,占总 SSR 的 95.00%;其次是二核苷酸、四核苷酸和六核苷酸重复类型,分别占总数的 4.21%、0.58% 和 0.14%。

坛紫菜转录组中 SSR 位点重复次数以 5 次(5 695)最多,占总 SSR 的 63.05%;紧接着重复次数为 6、7、8 和 9 次的 SSR 位点个数分别为 2 723、525、48 和 13 个,分别占到总数的 30.15%、5.81%、0.53% 和 0.14%;而统计的 ≥ 10

次重复的 SSR 位点共有 29 个,占总数的 0.32%。

表 2 坛紫菜 EST-SSRs 的类型、数量及分布频率

Tab. 2 Type, number and frequency of EST-SSRs in *Pyropia haitanensis*

SSR 类型 SSR type	重复次数 Repeat number							总计 Total	比例 Ratio/%
	5	6	7	8	9	10~20	>20		
二核苷酸 Dinucleotide	0	241	73	31	11	24	0	380	4.21
三核苷酸 Trinucleotide	5 643	2 472	447	17	1	0	1	8 581	95.00
四核苷酸 Tetranucleotides	44	6	1	0	0	1	0	52	0.58
五核苷酸 Pentanucleotides	6	0	1	0	0	0	0	7	0.07
六核苷酸 Hexanucleotides	2	4	3	0	1	3	0	13	0.14
总计 Total	5 695	2 723	525	48	13	28	1	9 033	
比例 Ratio/%	63.05	30.15	5.81	0.53	0.14	0.31	0.01		

2.3 坛紫菜转录组 SSR 基序重复类型和频率特征

坛紫菜 SSR 核苷酸基序类型(表 3),二、三、四、五、六核苷酸的重复次数分别为 380、8 581、52、7 和 13。SSR 以三核苷酸重复基序为主要类型,占总 SSR 的 95.00%,在三核苷酸重复基序中又以 CCG、CGC、GCC、GGC、GCG 和 CGG 亚型最

多,为 7 772 条,占该类型总数的 90.57%;其次是二核苷酸重复基序,以 CG/CG 类型最多,为 259 条,占该类型总数的 68.16%,而 AC/GT 最少,仅出现 2 次。四、五和六核苷酸重复基元类型较多,但数量较少,出现频率均较低。

表 3 坛紫菜转录组中 SSR 序列数量、类型及分布

Tab. 3 Summary of quantity, type and distribution of SSR in transcriptome of *Pyropia haitanensis*

SSR 类型 SSR type	基序 Sequence motif	重复次数 Repeat number	频率 Frequency/%
二核苷酸 Dinucleotide	AC/GT	90	1.00
	AG/CT	29	0.32
	AT/TA	2	0.02
	CG/CG	259	2.87
三核苷酸 Trinucleotide	AAG, AGA, GAA, TTC, TCT, CTT	27	0.30
	AAC, ACA, CAA, TTG, TGT, GTT	22	0.24
	CCA, CAC, ACC, GGT, GTG, TGG	246	2.72
	GAG, AGG, GGA, CTC, TCC, CCT	105	1.16
	ATG, TGA, GAT, ATC, TCA, CAT	4	0.05
	ACG, CGA, GAC, GTC, TCG, CGT	172	1.91
	CCG, CGC, GCC, GGC, GCG, CGG	7 772	86.04
	CAG, AGC, GCA, TGC, GCT, CTG	233	2.58
四核苷酸 Tetranucleotides	CCGC, CGCC, GGCG, GCGG	14	0.15
	CCCG, GCCC, GGGC, CGGG	16	0.18
	CCGG, GGCC, CGGC, GCCG	9	0.10
	GCAC, GTGC, CCGA, GCAG, CAGC	7	0.08
	TGCC, CGGT, CTTC, CCAC, GGTC	6	0.07
五核苷酸 Pentanucleotides	GGGAG, CCAGC, CCGCA, CCGTC, GGGGC, CGGCG, CCGAC	7	0.07
六核苷酸 Hexanucleotides	CACCGC, GGCGAC, GTGCCG, CGCTGC, CGCGGG, TCTTTT, GCCGTG, ACGGGC, CCGCAA, CCGCAC, CAGCAA, GGAGCG, TCCCGG	13	0.14

2.4 EST-SSR 引物的有效性与通用性检测

对 9 033 个含 SSR 位点的 EST 序列进行引物设计,共设计了 1 758 对 SSR 位点特异引物。为了验证这些引物的有效性,随机挑选合成了 187 对 EST-SSR 引物,包括二核苷酸、三核苷酸、四核苷酸、五核苷酸及六核苷酸重复类型的 SSR 位点。以 5 个坛紫菜品系的基因组 DNA 为模板,对

这批引物进行 PCR 扩增与筛选。通过多次筛选,共得到 92 对引物可产生理想的 PCR 产物,有效扩增率达到 49.20%,表明其通用性较高(表 4, 5)。其中,42 对引物在不同的品系间呈现出不同的带型,为多态性引物,多态扩增率约为 22.46%(表 5)。

表 4 有效 EST-SSRs 引物信息

Tab. 4 Valid EST-SSRs primer information

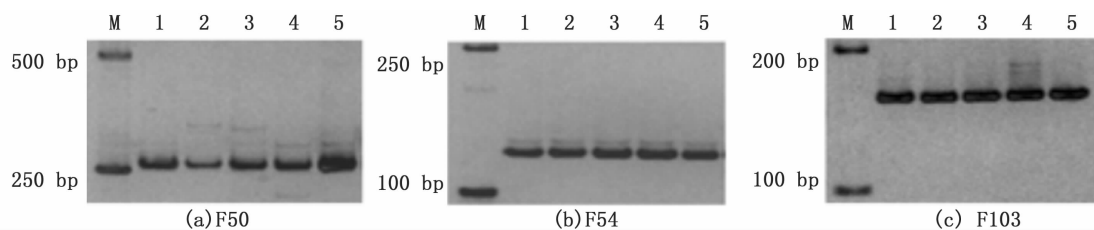
编号 Code	引物序列 Primer sequence	退火温度 T _m /°C	重复基序 Repeated motif	预期产物 Expected size/bp
F2	F:TCTCTGTCAACGACGACGG R:TCGATAGGAGGACCAAGCCA	60	(A)11	233
F6	F:ACTATGACGTCACCAAGCCG R:CCAGGTACGCGTTCCTATGG	60	(CCG)5	213
F8	F:GAAATTGCATGCGCGACTCC R:TCGCGCAAATAACGGTGTG	60	(C)10	170
F12	F:AACCACTGCTAATGTCCGGA R:GTGCCTGGATGAGCTACTGG	63	(A)11	234
F20	F:GTCGAAGGGGATGACTGCAA R:CCCCTGCCACAGTCCTTG	60	(G)10	226
F24	F:CATTTCAGCTGCCATGCCAAG R:CAAGAGTGCAACGTGTCCTG	60	(GT)8	262
F28	F:GGGTCTGGAGCAGAGGAGG R:GTAGGAGCTCCACTTCCGTC	62	(GCG)5	154
F29	F:GACAGGTTTGGCCTCTGACA R:ATTGTAGCCGACGTAGCTCG	62.5	(CGA)5	223
F31	F:CTCGCAGCAGCTCTGTAGG R:TCCTAGTGAGACATTGCCGG	64	(T)10	240
F33	F:CCGTCGTACAAGAAGGGGAA R:ATGACTTGGATGGCCGTCAG	60	(C)11	270
F34	F:GGCCACTATACCACGACAGG R:AGCCTGTCGTTATGTGGTGG	60	(CAC)5	243
F50	F:AATACCACACCCGTCGTCAC R:GCAAACAACAACGACCGA	65	(C)11	258
F54	F:ACGGCTGTGTTTGACCAGAA R:CGAACTGCCGTTGTCAAGTG	58	(C)10	134
F55	F:CCCACTGTCCCTTCTTCC R:GACATGATGCAAGCGTCGAC	58	(C)11	116
F64	F:CGTTCTCAGAGACGACACGG R:CTATCTGGACCACTGCAGGC	61	(A)14	232
			

表 5 多态性 EST-SSRs 引物信息
Tab. 5 Polymorphic EST-SSRs primer information

编号 Code	引物序列 Primer sequence	退火温度 T _m /°C	重复基序 Repeated motif	预期产物 Expected size/bp
F3	F:ACTCGCTGTTGCCTATGC R:AGACCAATCCGCCCTTT	55	(GCG)6	270
F9	F:CACCTTCCAGTTGACCTTTCC R:TTGCCTGTCTCTCCCTGCTAC	60	(GGC)5	190
F14	F:TTGGATGGTGGGGAACAGATCGA R:GGACTCGTTTCACGGGTAGGACA	61	(GCG)8	185
F18	F:GTAGTTCGTGCCCTTTTCCG R:CGCCCTCATCTCTGCTTCC	60	(A)13(CG)7	277
F19	F:CGTCTGCCACACTTTTCC R:CCTGCCGTCGTTCTCA	62	(GGC)5	424
F22	F:GAGGAGGAGGGGAGTAGGC R:GTGGTGGCGGAGTACA	65	(CCG)5	196
F31-2	F:CCCTGATGGGCTTGAT R:TTGCCGTTGTTAGTGTGA	52	(AG)3	101
F32	F:GAACGATGTGATTGTCGGCG R:ACCGAAGTGCGCCATAAA	59	(GGC)5	205
F36-2	F:CACGGGTTTGAATGGAAGG R:TCCGGCACGAAAGATGG	58	(G)10	173
F44	F:TCCCGCAGCACTGTTTTT R:AAAAAGCAAGCAAGCCCGAG	61	(C)11	179
F46-2	F:GCTTTGTTTTTCTGCCTTTGC R:TCTAGGTCGGGTTGCTGGTG	62	(G)11	248
F65	F:AAAATCCCGTTGCCGTTTGG R:CAAGTCCAGCACCTCAAGT	60	(GGC)5	248
F67	F:CGGTTGCAAAAAACACACA R:GCAAGAATTGCTCGAGTGG	62.5	(GGC)5	248
F71	F:CTGTGCTCTGACCGTTCACC R:TCGAGGATTTGACTTGCC	61	(C)12	175
F76	F:CCTCCCTCCCTCTACCCTTG R:CAGCAGTGTCTCCCGTACG	61	(GAG)5	192
.....				

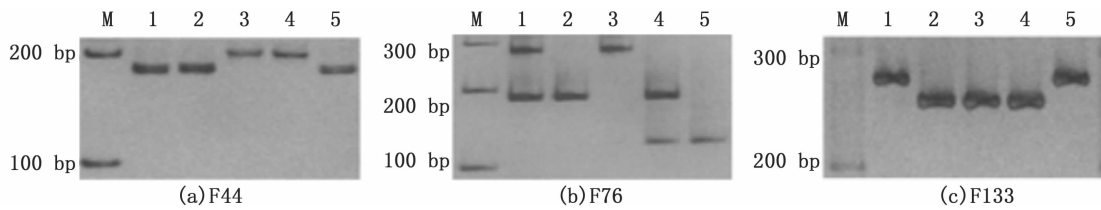
图 3 为有效引物(F50、F54 和 F103)在坛紫菜各品系中的扩增,在所选用的品系间并没有表现出扩增产物的差异,具有高度的普遍性和一致性;图 4 为多态性引物(F44、F76 和 F133)在坛紫

菜各品系中的扩增,可清楚地观察到不同品系间带型的差异,表明所开发的 EST-SSR 引物可用于坛紫菜生物多样性分析。



M. 100 bp DNA ladder; 1. SW-81; 2. HR-5; 3. WD-7; 4. SF-2; 5. WT-10。

图 3 有效引物 F50, F54, F103 在坛紫菜不同品系间的扩增条带
Fig. 3 Amplified band of effective primers F50, F54, F103 among different strains of *Pyropia haitanensis*



M. 100 bp DNA ladder; 1. *SW-81*; 2. *HR-5*; 3. *WD-7*; 4. *SF-2*; 5. *WT-10*。

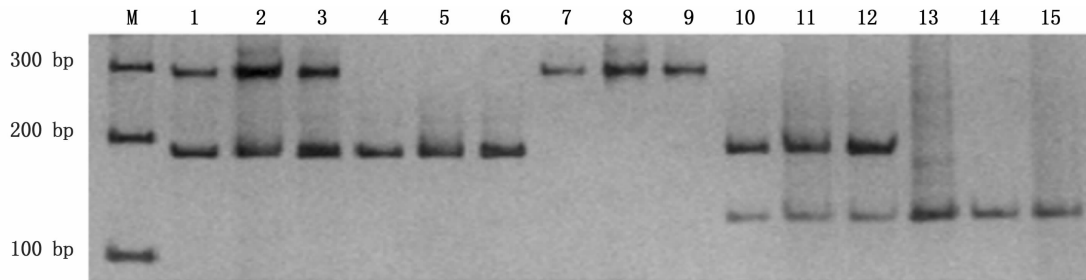
图 4 多态性引物 F44, F76, F133 在坛紫菜不同品系间的扩增条带

Fig. 4 Amplified band of polymorphic primer F44, F76, F133 among different strains of *Pyropia haitanensis*

2.5 DNA 指纹图谱的构建

依据使用最少位点、最少引物的原则,从 42 对多态性 EST-SSR 引物中筛选出 1 对引物 (F76), 序列 F: CCTCCCTCCCTCTACCCTTG; R: CAGCAGTGTCTCCCGTACG。以 5 个坛紫菜品系的丝状体 DNA 为模板,在该引物的 PCR 扩增下出现了 3 种不同的扩增位点,大小分别约为 290、

192 和 127 bp。如图 5 所示,*HR-5*、*WD-7* 和 *WT-10* 品系均仅出现 1 个条带,而 *SW-81* 和 *SF-2* 则均呈现出两个条带,其中 *SW-81* 品系为 290 和 192 bp 扩增组合,*SF-2* 为 192 和 127 bp 的扩增组合。每个品系具有不同的位点组合,构成了其独特的指纹模式,由此构建出了适用于该 5 个坛紫菜品系的 SSR-DNA 指纹图谱。



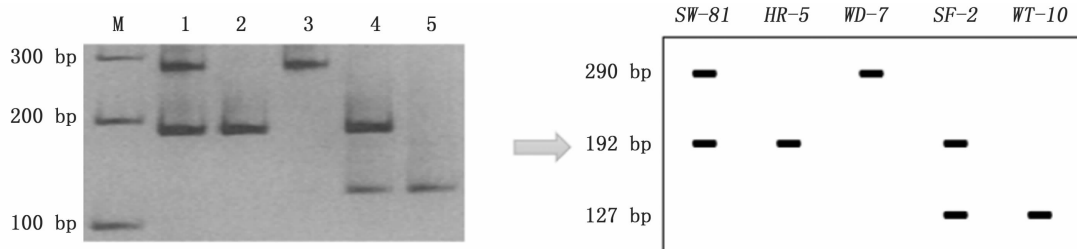
M. 100 bp DNA ladder; 1~3. *SW-81*; 4~6. *HR-5*; 7~9. *WD-7*; 10~12. *SF-2*; 13~15. *WT-10*。

图 5 用引物 F76 对不同坛紫菜品系的丝状体 DNA 扩增结果

Fig. 5 Amplification results by primers F76 in conchocelis DNA of different strains in *Pyropia haitanensis*

利用引物 F76 的 3 种扩增位点转化出各坛紫菜品系的 DNA 指纹图谱(图 6)。另外,按条带

的有无,将每个位点的条带转化为二进制码(表 6)。



M. 100 bp DNA ladder; 1. *SW-81*; 2. *HR-5*; 3. *WD-7*; 4. *SF-2*; 5. *WT-10*。

图 6 5 个坛紫菜品系的 DNA 指纹图谱

Fig. 6 DNA fingerprints of five strains of *Pyropia haitanensis*

表 6 5 个坛紫菜品系的指纹二进制码
Tab.6 DNA fingerprints binary codes of five strains of *Pyropia haitanensis*

品系 Strains	二进制码 Binary codes
SW-81	110
HR-5	010
WD-7	100
SF-2	011
WT-10	001

2.6 DNA 指纹图谱的稳定性验证

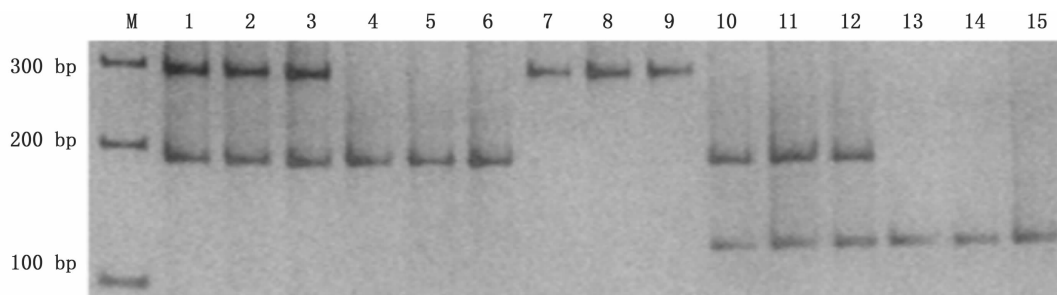
5 个坛紫菜品系的叶状体 DNA 在 F76 引物的扩增下出现了与丝状体相对应的扩增条带,表明该指纹图谱同样适用于紫菜叶状体的种质鉴定,不受细胞倍性变化的影响。

3 讨论

3.1 坛紫菜转录组中微卫星位点的分布特征

近年来,随着测序成本的降低以及各大数据共享平台的出现,不断完善的 EST 数据库成为

SSR 标记开发的又一重要来源。本研究利用坛紫菜转录组测序信息,从获得的 33 872 条 Unigenes 中共检测到 9 033 个微卫星位点。通过统计不同类型微卫星位点的出现频次,发现:三核苷酸重复类型的数量最多,占比高达 95.00%,为绝对优势基元类型,其中以 CCG, CGC, GCC, GGC, GCG, CGG 亚型最多;其次为二核苷酸重复类型(CG/CG 类型最多),而五、六核苷酸重复类型出现频次很少。关于 EST-SSR 类型的分布特点,三核苷酸重复类型在大多数物种中均占有绝对的优势,二核苷酸重复类型次之^[18]。对于同一紫菜属中的甘紫菜(*Pyropia tenera*)和列紫菜(*Pyropia seriata*)也具有类似的研究和报道:甘紫菜中三核苷酸重复类型占总微卫星位点的 90.20%^[19];而列紫菜中同样也是三核苷酸重复类型居多,占比 94.10%^[20]。由此可见,紫菜基因组中不同类型 SSRs 的分布并不是均匀的,在重复类型和碱基组合上具有明显的“偏好性”。



M. 100 bp DNA ladder; 1~3. SW-81; 4~6. HR-5; 7~9. WD-7; 10~12. SF-2; 13~15. WT-10.

图 7 用引物 F76 对 5 个坛紫菜品系叶状体 DNA 的扩增结果

Fig.7 Amplification results by primers F76 in blades DNA of different strains of *Pyropia haitanensis*

此外,对于二、三核苷酸重复类型在微卫星中占据绝对优势,有研究^[21]表明,核苷酸重复单元在生物的基因层面发挥着重要的作用,尤其在转录区,三核苷酸相对于其他类型的 SSR 单元,有利于减少移位突变的可能性,保持基因的稳定性。另一方面微卫星涉及到很多重要的功能基因,例如:三核苷酸 CCG 编码的脯氨酸可参与细胞代谢、基因表达的各个方面,包括能量转化、物质运输和信号传导等^[22];二核苷酸重复基元中的 AG/CT 亚型,在不同的阅读起点下可以被翻译为精氨酸(Arg)、谷氨酸(Glu)、丙氨酸(Ala)和亮氨酸(Leu),蛋白质中具有丰富的丙氨酸和亮

氨酸^[23]。目前,对于微卫星序列在基因组中功能的探索已积累了部分数据,但更为确切的作用机制仍有待于进一步的深入。

3.2 EST-SSR 标记的多态性分析

引物的多态性反映了所含信息量的多少,是衡量引物质量的重要指标,多态性高的引物能够揭示更多的基因信息。相关研究^[24-25]表明,微卫星标记的多态性与微卫星核心重复序列的长度成正比:当 SSR 核心基元长度大于 20 bp 时,呈现出较高的多态性;其次为核心基元长度在 12~20 bp 的 SSR,多态性较低;而当核心基元序列长度小于 12 bp 的 SSR,多态性最低。本研究用坛紫

菜的丝状体 DNA 对 187 对 SSR 引物进行了验证,筛选到有效引物 92 对,经统计,其中 42 对引物在不同坛紫菜品系间具有扩增差异,多态扩增率为 22.46%,平均每个多态性引物具有 1~2 条扩增条带。相对而言,本实验开发的 EST-SSR 标记的多态性程度并不高,可能与本实验选用的材料均为坛紫菜,种内差异性小有关^[26]。

EST-SSR 标记作为 DNA 编码区的一部分,因此多态性并不高,但其呈现的多态性较为稳定,重现性好,具有较强的实际应用价值^[27]。吴文婷等^[28]利用 68 对微卫星引物对坛紫菜、半叶紫菜 (*Pyropia katadai*)、条斑紫菜、少精紫菜 (*Pyropia oligospermatangia*) 和皱紫菜 (*Pyropia crispata*) 等 5 个紫菜属物种的丝状体进行遗传分析,其结果表明微卫星引物在同一属的不同的物种之间具有良好的通用性和遗传分辨力。因此,开发的多态性 EST-SSR 引物不仅可作为坛紫菜的种质鉴定,还可利用 SSR 标记的种间通用性为其他紫菜属物种提供可靠的标记资源。

3.3 SSR-DNA 指纹图谱的构建

DING 等^[9]利用紫外线人工诱变技术,筛选出坛紫菜新品系 SW-8I,后者具有高产、色素蛋白含量高、耐高温且壳孢子放散量大等优点,为了将该品系培育成为可推广的新品种,需要获得该品系可有效区别与其他品系的特征标记,用于种质鉴定和产权保护。DNA 指纹图谱构建的关键是选择合适的核心引物,核心引物的多态性直接决定了指纹图谱质量,多态性越高,图谱的分辨率越好,图谱构建所需的核心引物的数量就越少^[29]。本实验筛选到的引物 F76 多态性高,鉴别能力强,且带型易于分辨,利用它产生的 3 个不同的扩增位点,建立了 5 个坛紫菜品系的分子指纹图谱(图 6),而且达到仅用一对引物即可将 SW-8I 品系从试供坛紫菜品系中完全区分开目的。

目前利用 SSR 标记构建指纹图谱在紫菜种质资源的鉴定和分析方面的应用较为广泛:谢潮添等^[17]利用 3 对 SSR 引物 (Phe08, Phe03 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;SUN 等^[30]通过开发多态性 EST-SSR 标记,构建了 22 个紫菜品系的 DNA 指纹图谱及其系统进化树。但是多数研究仅以紫菜的丝状体为实验对象进行鉴定,缺乏在

叶状体中的稳定性和有效性评价。在本研究中,利用引物 F76 构建的多态性标记也可从试供的叶状体中稳定地鉴定出 SW-8I 品系,进一步证明了该指纹图谱的稳定性和可重复性。

综上所述,本研究不仅开发了一批高质量的紫菜 SSR 分子标记,也为坛紫菜新品系 SW-8I 的种质鉴定提供了有效的分子检测手段。

参考文献:

- [1] NODA H. Health benefits and nutritional properties of nori [J]. *Journal of Applied Phycology*, 1993, 5(2): 255-258.
- [2] 刘文礼, 阎希柱. 基于生态足迹的近海坛紫菜养殖可持续发展评估——以福建晋江为例 [J]. *应用海洋学学报*, 2017, 36(4): 580-585.
LIU W L, YAN X Z. Evaluation on the sustainable development of *Pyropia haitanensis* culture based on ecological footprint—a case study in Jinjiang of Fujian Province [J]. *Journal of Applied Oceanography*, 2017, 36(4): 580-585.
- [3] 农业农村部渔业渔政管理局. 2017 中国渔业统计年鉴 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2017.
Fisheries and Fisheries Administration Bureau of the Ministry of Agriculture and Rural Affairs. *China fishery statistical yearbook 2017* [M]. Beijing: China Agricultural Press, 2017.
- [4] 唐隆晨, 丁洪昌, 严兴洪. 条斑紫菜优良品系 (LC-14) 的筛选与特性分析 [J]. *中国水产科学*, 2017, 24(4): 738-745.
TANG L C, DING H C, YAN X H. Selection and characterization of the improved strain (LC-14) in *Pyropia yezoensis* (Bangiales, Rhodophyta) [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2017, 24(4): 738-745.
- [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.
YAN X H, MA S Y. Selection of a high-temperature resistant strain of *Porphyra haitanensis* (Rhodophyta) [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2007, 31(1): 112-119.
- [6] 王婷, 徐燕, 谢潮添, 等. 基于 SCAR 标记的坛紫菜“闽丰 1 号”多重 PCR 鉴定技术的建立 [J]. *水产学报*, 2013, 37(5): 688-695.
WANG T, XU Y, XIE C T, et al. Construction of multiplex PCR in variety identification of *Porphyra haitanensis* "Z-26" based on SCAR markers [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2013, 37(5): 688-695.
- [7] DING H C, LIU C J, YAN X H. Selection and characterization of an improved strain (ST-2) of *Pyropia haitanensis* by 60Co- γ ray irradiation [J]. *Aquaculture Research*, 2019, 50(9): 2388-2397.
- [8] DING H C, LV F, WU H X, et al. Selection and characterization of an improved strain produced by inter-species hybridization

- between *Pyropia* sp. from India and *Pyropia haitanensis* from China[J]. *Aquaculture*, 2018, 491: 177-183.
- [9] DING H C, FEI Q J, ZHANG P, et al. Isolation and characterization of a heat-resistant strain with high yield of *Pyropia haitanensis* induced by ultraviolet ray[J]. *10.1016/j.aquaculture.2020.735050*.
- [10] 乔利仙,戴继勋,王晶珊,等. DNA 分子标记技术在紫菜属中的应用现状及展望[J]. *海洋科学*, 2008, 32(9): 82-87.
- QIAO L X, DAI J X, WANG J S, et al. The application status and prospect of DNA molecular markers in *Porphyra* [J]. *Marine Sciences*, 2008, 32(9): 82-87.
- [11] ROJAS G, MENDÉZ M A, MUÑOZ C, et al. Identification of a minimal microsatellite marker panel for the fingerprinting of peach and nectarine cultivars[J]. *Electronic Journal of Biotechnology*, 2008, 11(5): 4-5.
- [12] 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.
- WANG S J, ZHANG X P, XU Z D, et al. A study on the cultivation of the vegetative cells and protoplasts of *P. haitanensis* I [J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 1986, 17(3): 217-221.
- [13] 严兴洪,梁志强,宋武林,等. 坛紫菜人工色素突变体的诱变与分离[J]. *水产学报*, 2005, 29(2): 166-172.
- YAN X H, LIANG Z Q, SONG W L, et al. Induction and isolation of artificial pigmentation mutants in *Porphyra haitanensis* Chang et Zheng (Bangiales, Rhodophyta) [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2005, 29(2): 166-172.
- [14] HONG Y K, KIM S D, POLNE-FULLER M, et al. DNA extraction conditions from *Porphyra perforata* using LiCl [J]. *Journal of Applied Phycology*, 1995, 7(2): 101-107.
- [15] 冯畅,丁洪昌,严兴洪. 低盐胁迫下坛紫菜叶状体的转录组分析[J]. *水产学报*, 2016, 40(12): 1842-1849.
- FENG C, DING H C, YAN X H. Transcriptomic profiling of *Pyropia haitanensis* blade in responding to low-salinity stress [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2016, 40(12): 1842-1849.
- [16] BI Y H, WU Y Y, ZHOU Z G. Genetic diversity of wild population of *Pyropia haitanensis* based on SSR analysis [J]. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2014, 54: 307-312.
- [17] 谢潮添,陈昌生,纪德华,等. 坛紫菜种质材料 DNA 指纹图谱的构建[J]. *水产学报*, 2010, 34(6): 733-740.
- XIE C T, CHEN C S, JI D H, et al. Construction of DNA fingerprinting database of germplasm materials of *Porphyra haitanensis* [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2010, 34(6): 733-740.
- [18] LIANG X Q, CHEN X P, HONG Y B, et al. Utility of EST-derived SSR in cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.) and *Arachis* wild species [J]. *BMC Plant Biology*, 2009, 9(1): 35.
- [19] CHOI S, HWANG M S, IM S, et al. Transcriptome sequencing and comparative analysis of the gametophyte thalli of *Pyropia tenera* under normal and high temperature conditions [J]. *Journal of Applied Phycology*, 2013, 25(4): 1237-1246.
- [20] IM S, CHOI S, HWANG M S, et al. De novo assembly of transcriptome from the gametophyte of the marine red algae *Pyropia seriata* and identification of abiotic stress response genes [J]. *Journal of Applied Phycology*, 2015, 27(3): 1343-1353.
- [21] LI W, FENG Y X, SUN H Y, et al. Analysis of simple sequence repeats in the *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* genome and the development of microsatellite markers [J]. *Current Genetics*, 2014, 60(4): 237-245.
- [22] GAO L F, TANG J F, LI H W, et al. Analysis of microsatellites in major crops assessed by computational and experimental approaches [J]. *Molecular Breeding*, 2003, 12(3): 245-261.
- [23] 胡传明,陆勤勤,张美如,等. 不同品系条斑紫菜采收期游离氨基酸组成与含量变化特征 [J]. *江苏农业科学*, 2015, 43(7): 334-337.
- HU C M, LU Q Q, ZHANG M R, et al. Variation and content of free amino acids composition of *Pyropia yezoensis* cultivars at picking time [J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2015, 43(7): 334-337.
- [24] TEMNYKH S, DECLERCK G, LUKASHOVA A, et al. Computational and experimental analysis of microsatellites in rice (*Oryza sativa* L.): frequency, length variation, transposon association, and genetic marker potential [J]. *Genome Research*, 2001, 11(8): 1441-1452.
- [25] RICO C, IBRAHIM K M, RICO I, et al. Stock composition in North Atlantic populations of whiting using microsatellite markers [J]. *Journal of Fish Biology*, 1997, 51(3): 462-475.
- [26] 刘必谦,曾庆国,骆其君,等. 条斑紫菜 (*Pyropia 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.
- LIU B Q, ZENG Q G, LUO Q J, et al. Isolation of microsatellite loci from dbEST of algae *Porphyra yezoensis* and primer amplification of interspecies transfer [J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2005, 36(3): 248-254.
- [27] 谢皓,陈学珍,杨柳,等. EST-SSR 标记的发展和在植物遗传研究中的应用 [J]. *北京农学院学报*, 2005, 20(4): 73-76.
- XIE H, CHEN X Z, YANG L, et al. Development and application of EST-SSR marker in plant genetic [J]. *Journal of Beijing Agricultural College*, 2005, 20(4): 73-76.
- [28] 吴文婷,张磊,宋志民,等. 5 个紫菜属物种丝状体的微卫星初步遗传分析 [J]. *南方水产科学*, 2012, 8(4): 29-36.
- WU W T, ZHANG L, SONG Z M, et al. Preliminary genetic analysis of conchocelis from 5 *Porphyra* species using microsatellite [J]. *South China Fisheries Science*, 2012, 8

- (4): 29-36.
- [29] 葛亮. 基于转录组信息的百合 SSR 标记开发及种质分子鉴定研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2012.
- GE L. Development of SSR markers based on transcriptome and their application in germplasm identification of Lilium [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2012.
- [30] 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]. European Journal of Phycology, 2006, 41 (3): 329-336.

Development of EST-SSR marker based on transcriptome and the research of germplasm identification for the new strain (SW-81) of *Pyropia haitanensis*

FEI Qinjiao^{1,2}, DING Hongchang¹, ZHANG Peng³, WANG Tiegan³, YAN Xinghong^{1,2}

(1. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Shanghai Engineering Research Center of Aquaculture, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 3. Zhejiang Mariculture Research Institute, Wenzhou 325005, Zhejiang, China)

Abstract: EST-SSR markers were developed based on the transcriptome of *Pyropia haitanensis* and DNA fingerprinting was constructed using polymorphic SSR markers for the germplasm identification of the new strain SW-81 of *Pyropia haitanensis*. Experimental results: 9 033 microsatellite loci were detected in the transcriptome data, of which the trinucleotide repeat motif was the absolute dominant type, accounting for 95%; Designing primers for microsatellite loci by Primer 3.0 software, and 187 EST-SSR primers were synthesized randomly to analyze the effectiveness, and the 92 pairs of effective primers were finally obtained, of which 42 pairs were polymorphism EST-SSR markers, with the polymorphism amplification rate 22.46%; DNA fingerprints were constructed using the polymorphism EST-SSR marker, which was suitable for 5 strains of *P. haitanensis*, providing an effective molecular detection method for the germplasm identification of the new strain SW-81. The results above showed that there were abundant microsatellite loci in the genome of *P. haitanensis*, and the gene sequence of the same loci varied among different strains, showing the polymorphism of amplification products. The polymorphism analysis based on EST-SSR marker can provide an effective means of molecular detection for the management and identification of germplasm resources.

Key words: *Pyropia haitanensis*; EST-SSR marker; fingerprint; germplasm identification