

文章编号: 1674-5566(2009)04-0409-06

利用微卫星遗传标记评价坛紫菜的种质

吴亚亚, 胡则辉, 严兴洪, 周志刚

(上海海洋大学农业部水产种质资源与养殖生态重点开放实验室, 上海 201306)

摘要:从坛紫菜叶状体中提取基因组 DNA, 并用 CTAB/NaCl 纯化, 得到质量较高的 DNA, 它无 RNA 污染, 且 OD_{260}/OD_{280} 比值为 1.89~1.95, 适用于微卫星分子标记研究。根据坛紫菜微卫星 DNA 序列设计特异引物, 进行坛紫菜微卫星的 PCR 扩增反应。用 PopGen 软件分析坛紫菜 2 个优良品系和 1 个野生种群间的 Nei 氏遗传相似系数和遗传距离分别在 0.576 0~0.691 5 和 0.425 1~0.641 2, 然后根据 Nei 氏遗传距离用 MEGA 软件构建了 UPGMA 聚类图, 结果表明高蛋白和生长快这两个优良品系群体虽来自野生种群, 尽管表型差异不大, 但从基因型来说它们已不同于野生种群。同时还得到了 3 条可区分坛紫菜野生种群及 2 个优良群体(生长快型、高蛋白型)的差异性条带: $4^{\#}-117$ 、 $25^{\#}-231$ 、 $14^{\#}-302$ 。

关键词:坛紫菜; 简单序列重复; 微卫星 DNA

中图分类号: S 917 **文献标识码:** A

Evaluation of *Porphyra haitanensis* germplasm by use of microsatellite genetic markers

WU Ya-ya HU Ze-hui YAN Xing-hong ZHOU Zhi-gang

(Key Laboratory of Genetic Resource and Aquaculture Ecology, Ministry of Agriculture
Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: Genomic DNA was extracted from *Porphyra haitanensis* thallus according to the method described by Wattier et al. After purification with CTAB and NaCl, high quality DNA could be obtained. The average size of genomic DNA was about 23 kb estimated by agarose gel electrophoresis which showed no RNA occurring on it and the ratio of OD_{260}/OD_{280} was around 1.89-1.95 determined spectrophotometrically, illustrating that the extracted DNA was good enough to meet the needs for analysis of microsatellite markers. The SSR-PCR amplification was performed using the special primers designed according to the microsatellite DNA sequences reported by Hu et al. in detail and the PCR products were detected by polyacrylamide gel electrophoresis and stained by silver method. A Nei's genetic distance matrix could be constructed among three populations by using the PopGen³² software, demonstrating that Nei's genetic similarity was ranging between 0.576 0-0.691 5 and Nei's genetic distance was 0.425 1-0.641 2. An UPGMA molecular dendrogram was constructed according to the Nei's genetic distance matrix by using the MEGA 4.0 software. It revealed that the two populations of fast-growing and high protein content first clustered, then clustered with wild

收稿日期: 2008-08-05

基金项目: 国家“八六三”高技术研究发展计划(2002AA603032, 2006AA10A413); 上海市水产养殖重点学科建设项目资助(Y1101); 上海市高校 E 研究院资助项目

作者简介: 吴亚亚(1982-), 男, 江苏徐州人, 硕士, 主要从事坛紫菜遗传方面的研究。E-mail: wupanda@163.com

通讯作者: 周志刚, E-mail: zgzhou@shou.edu.cn

population. Three special DNA bands named 25[#]-231, 14[#]-302 and 4[#]-117 were also found among the wild type and the other two bred strains namely fast-growing and high content of protein of this red seaweed.

Key words: *Porphyra haitanensis*; simple sequence repeat; microsatellite DNA

紫菜属红藻门 (Rhodophyta)、原红藻纲 (Protofloridae)、红毛菜科 (Bangiaceae)、紫菜属 (*Porphyra*), 是世界上产值最高的栽培海藻之一。长期以来紫菜的遗传育种基本上是以形态学为基础, 从而造成紫菜的选育技术落后, 然而 DNA 分子标记技术的出现为紫菜种质鉴定与遗传多样性分析提供了一个重要方法, 可以有效地辅助种质的遗传改良。微卫星 DNA 又称简单序列重复 (simple sequence repeat SSR), 该分子标记技术具有多态性高、共显性遗传、孟德尔遗传、重复性好等优点^[1], 并已应用于海带 (*Laminaria digitata*)^[2-3]、江蓠 (*Gracilaria gracilis*)^[4-5]、坛紫菜 (*Porphyra haitanensis*)^[6-7] 等海藻的遗传研究中。本研究根据胡则辉等^[8]报道的坛紫菜微卫星 DNA 序列, 设计特异性引物, 运用微卫星 DNA 分子标记技术分析并鉴定坛紫菜的种质及其来源, 以便更有效地推动坛紫菜种质资源评价并辅助紫菜遗传改良。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本实验选用的材料为坛紫菜高蛋白、生长快 2 个优良品系群体和野生种群体 (图 1), 其中野生种来自福建连江海区, 2 个优良品系群体是对该野生种经⁶⁰Co 诱变后从中筛选出来的。将这两个优良品系和野生种坛紫菜都养殖在福建连江海区, 样品采取后, 阴干带回实验室, -20℃ 保存。实验前对坛紫菜的叶状体进行复苏培养。



图 1 坛紫菜叶状体的形态

Fig 1 Morphology of various strains and wildtype of *Porphyra haitanensis* thallus

1.2 模板 DNA 的提取纯化

1.2.1 DNA 的提取

坛紫菜叶状体 DNA 的提取参考 Wattier 等^[9]的方法, 并加以改良。取复苏培养的个体 (约 100 mg), 液氮磨成粉末后放入 1.5 mL 提取缓冲液 (含 100 mmol/L Tris-HCl 50 mmol/L EDTA, 500 mmol/L NaCl 1.8% SDS 和 33 μg/L Proteinase K), 37℃ 温浴 40 min 期间每 5 min 上下颠倒摇匀 1 次; 室温离心 (13 000 r/min) 15 min 上清液转至另一离心管中, 冰浴 30 min; 4℃ 高速离心 (13 000 r/min) 15 min 上清液转移至另一离心管中, 用苯酚 氯仿 异戊醇 (25/24/1) 和氯仿 异戊醇 (24/1) 各抽提一次; 加入 2/3 体积的异丙醇混匀, -20℃ 放置过夜; 4℃ 高速离心 (13 000 r/min) 30 min 用 70% 乙醇洗涤沉淀, 干燥

后溶于 200 μ L 的 TE 缓冲液;加入 RNase A 至终浓度 10 μ g/mL, 37 $^{\circ}$ C 温浴 30 min 后, 4 $^{\circ}$ C 保存。

1.2.2 DNA 纯化

在 DNA 溶液中加入 NaCl 至终浓度 0.7 mol/L 后, 加入 1/10 体积 65 $^{\circ}$ C 预热的 CTAB/NaCl (10% CTAB/0.7 mol/L NaCl), 65 $^{\circ}$ C 温浴 10~20 min; 氯仿/异戊醇 (24/1) 抽提一次; 上清液加入 1/10 体积 3 mol/L NaAc (pH 5.4) 和 2 倍体积 -20 $^{\circ}$ C 预冷的无水乙醇, -20 $^{\circ}$ C 放置 30 min; 4 $^{\circ}$ C 高速离心 (13 000 r/min) 15 min 用 70% 乙醇洗涤沉淀, 干燥后溶于 40~80 μ L 的 TE 缓冲液; 4 $^{\circ}$ C 保存。

1.3 微卫星 DNA 引物的设计

根据胡则辉等^[8]所报道的坛紫菜微卫星 DNA 序列和引物设计原则, 使用引物设计软件 Primer Premier (Version 5.0) 和 Oligo (Version 6.22) 进行微卫星引物设计。设计好后的引物由上海生工生物工程技术有限公司进行合成。

1.4 PCR 扩增及电泳检测

每个群体各取 5 个坛紫菜个体的 DNA, 稀释到一定的浓度 (约为 30 ng/ μ L), 利用合成的引物进行 PCR 扩增。25 μ L 反应体系包括: 10 \times PCR 缓冲液 2.5 μ L, MgCl₂ (25 mmol/L) 1.5 μ L, dNTPs (2.5 mmol/L) 2 μ L 引物 (10 μ mol/ μ L) 1 μ L, Taq DNA 聚合酶 (5 U/ μ L) 0.2 μ L 模板 DNA 约 30 ng 加超纯水至 25 μ L。阴性对照中不加模板 DNA。

PCR 反应是在 Eppendorf AG 22331 型 PCR 循环仪上进行。PCR 反应程序为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min 后进入循环体系, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s 退火 (表 1) 30 s 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 进行 40 个循环; 然后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min, 4 $^{\circ}$ C 保温。

表 1 坛紫菜微卫星 DNA 标记引物及其核心重复序列

Tab. 1 Sequences of designed primers and microsatellite repeat motifs in *Porphyra haitanensis*

引物	引物序列 5' to 3'	大小 (bp)	核心序列	退火温度 ($^{\circ}$ C)
4 $^{\#}$	F: ttactgttgggcaatgt R: ggatlgaaagctgctt	117	(CTT) ₃	50
7 $^{\#}$	F gaccattatccagaccccaacc R cagggtcaggcgcttlat	323	(GA) ₄	50
14 $^{\#}$	F: atcgcgcgcaatgag R: gtcggactatggcgcatca	302	(GA) ₄	54
15 $^{\#}$	R tgcggctgccatcgac F ggaaaggccaccaacgaaa	120	(GTCTG) ₂	54
16 $^{\#}$	F tatggtcgaagcctgcctg R ctctggcaacggctctca	232	(GATTG) ₃	54
25 $^{\#}$	F: cgaccggctgcgatgc R: tatgtgtcaaacccgatga	247	(GC) ₃	52
27 $^{\#}$	R tccaccccgccttgacgc F ccaatggctcaatgagcggtaa	226	(GC) ₃	50

注: F 为正向引物; R 为反向引物

使用 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 (polyacrylamide gel electrophoresis PAGE) 进行 PCR 产物分析, 电泳缓冲液为 1 \times TBE 电压为 8 V/cm, 电泳 4 h 银染法^[10]染色并拍照记录。

1.5 数据分析

SSR-PCR 扩增条带的有/无 (强带和可重复出现的弱带均视为有), 按 1/0 记录在矩阵中, 数据由 PopGen32 软件进行统计分析。计算群体间的 Nei 氏遗传相似系数 (Nei's unbiased measures of genetic identity) 和 Nei 氏遗传距离 (Nei's Unbiased Measures of genetic distance), 然后根据 Nei 氏遗传距离用 MEGA 4.0 软件中的 UPGMA 程序进行聚类分析。

2 结果

2.1 坛紫菜基因组 DNA 的提取

所提取的坛紫菜叶状体基因组 DNA 经 1% 琼脂糖凝胶电泳观察 (图 2)。结果表明, DNA 的分子量约为 23 kb 没有 RNA 污染。

2.2 坛紫菜优良品系与野生型的遗传关系

本实验共设计了 25 对引物, 其中有 7 对引物 (表 1) 可以得到较好的扩增产物。扩增出的 DNA 条带记录在 0/1 矩阵中, 将整个分子标记图谱转化成“0”、“1”信息矩阵。用 PopGen32 软件分析 3 个坛紫菜群体间的 Nei 氏遗传相似系数和 Nei 氏遗传距离 (表 2)。分析表明, 3 个坛紫菜群体的 Nei 氏遗传相似系数在 0.576 0~0.691 5, Nei 氏遗传距离在 0.425 1~0.641 2。然后根据 Nei 氏遗传距离用 MEGA4.0 软件构建它们的 UPGMA 聚类图 (图 3), 结果显示高蛋白和生长快 2 个优良品系的群体先聚在了一起, 然后再和野生种群体聚在一起。说明这 2 个优良品系虽然来自野生种, 而且形态差异不大 (图 1), 但在基因型上与野生种群体有了一定的分化。

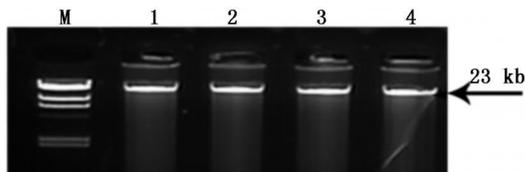


图 2 坛紫菜基因组 DNA 在 1% 琼脂糖凝胶上的电泳图
Fig 2 Total DNA extracted from the individual thallus of *Porphyra haitanensis* and separated in 1% agarose gel
M: DNA/Hind III 标准分子量标准; 1~4 泳道: 提取的 DNA 样品

表 2 坛紫菜 3 个群体基于 SSR-PCR 图谱的 Nei 氏遗传距离和遗传相似性

Tab 2 Nei's genetic identity and genetic distance of polymorphism in *Porphyra haitanensis*

	野生	生长快	高蛋白
野生		0.691 5	0.576 0
生长快	0.425 1		0.577 0
高蛋白	0.641 2	0.640 2	

注: 对角线以上的数字表示遗传相似性指数, 对角线以下的数字表示遗传距离

2.3 坛紫菜特异性标记

本实验同时还得到了 3 条 DNA 特异性标记条带 (图 4、图 5、图 6): 4[#]引物在野生种群体中扩增出 1 条 DNA 特异性标记条带 (4[#]-117); 25[#]引物在生长快群体中扩增出 1 条 DNA 特异性标记条带 (25[#]-231); 14[#]引物在野生型群体中扩增出 1 条 DNA 特异性标记条带 (14[#]-302)。利用这些特异的标记可以辨别这 2 个优良品系群体及野生种群体。

3 讨论

尽管对紫菜丝状体基因组 DNA 提取方法有大量报告^[11-12], 且提取 DNA 的纯度、完整性均较好, 但运用提取这些方法提取紫菜叶状体基因组 DNA, 效果却不是理想。主要原因有以下 3 点: (1) 紫菜中含有的染色体较少 ($n=2\sim 5$), 总 DNA 含量不高^[13]; (2) 紫菜叶状体细胞中含有大量多糖, 在 DNA 提取过程中, 它们可以和 DNA 产生共沉淀; (3) 紫菜细胞中含有大量的 DNA 酶。本研究先后尝试了 LCI 法^[14]、尿素^[11]、CTAB 法^[15]、试剂盒法 (由天根生物科技有限公司提供), 结果发现用修正的 LCI 法可以得到高纯度 DNA, 但得率较低, CTAB 法和试剂盒法所得 DNA 也不多。Wattier 等^[9]用 SDS 和高盐溶液成功地提取了 *Porphyra sp* 的基因组 DNA, 本研究采用此方法, 并用 CTAB/NaCl 纯化提取的

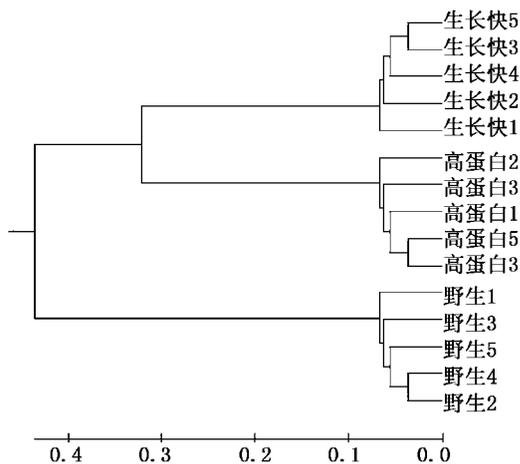


图 3 基于 SSR-PCR 产生的坛紫菜 3 个群体 15 个样品 Nei 氏遗传距离所构建的 UPGMA 聚类图

Fig 3 Dendrogram of the three *Porphyra haitanensis* populations constructed using UPGMA methods based on matrices of pairwise Nei's genetic distances

本研究先后尝试了 LCI 法^[14]、尿素^[11]、CTAB 法^[15]、试剂盒法 (由天根生物科技有限公司提供), 结果发现用修正的 LCI 法可以得到高纯度 DNA, 但得率较低, CTAB 法和试剂盒法所得 DNA 也不多。Wattier 等^[9]用 SDS 和高盐溶液成功地提取了 *Porphyra sp* 的基因组 DNA, 本研究采用此方法, 并用 CTAB/NaCl 纯化提取的

DNA, 获得了可适用于 SSR-PCR 扩增反应的高质量基因组 DNA。

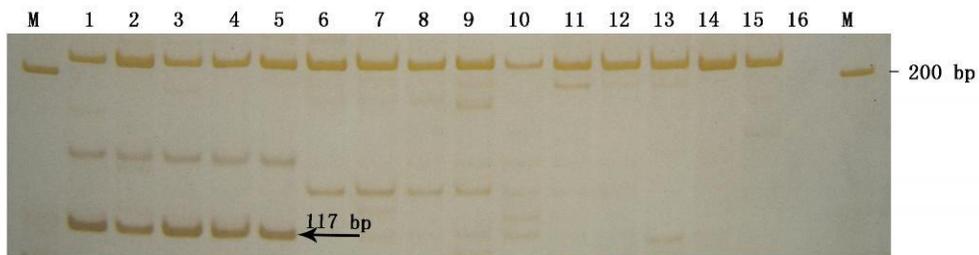


图 4 4[#]引物 PCR 扩增产物的电泳图谱

Fig 4 Electrophoresis pattern of amplified products of *Porphyra haitanensis* with 4[#] primer

M: GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus 标准分子量
1~5: 野生种群体; 6~10: 生长快群体; 11~15: 高蛋白群体; 16: 对照

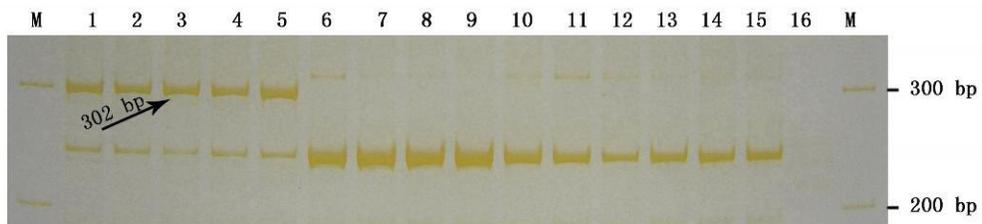


图 5 14[#]引物 PCR 扩增产物的电泳图谱

Fig 5 Electrophoresis pattern of amplified products of *Porphyra haitanensis* with 14[#] primer

M: GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus 标准分子量
1~5: 野生种群体; 6~10: 生长快群体; 11~15: 高蛋白群体; 16: 对照

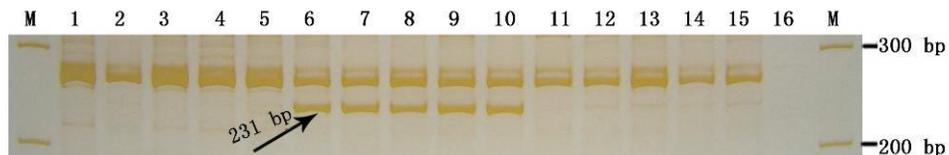


图 6 25[#]引物 PCR 扩增产物的电泳图谱

Fig 6 Electrophoresis pattern of amplified products of *Porphyra haitanensis* with 25[#] primer

M: GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus 标准分子量
1~5: 野生种群体; 6~10: 生长快群体; 11~15: 高蛋白群体; 16: 对照

在微卫星 DNA 分子标记的研制中, 微卫星的筛选非常重要和关键。微卫星的核心序列 (motif) 有各种各样类型, 关于何种类型核心序列的微卫星筛选出特征标记的可能性较大。Primmer^[16]在两种雀形目鸟中用四碱基的微卫星进行检测, 表现出极高的多态性 (150 个等位基因 /355 个体中), Wattier 等^[17]在江篱 (*Gracilaria gracilis*) 中筛选到四个微卫星标记, 其中两个为二碱基, 另外是三碱基为基本重复序列的微卫星, 结果发现 Gv1CT 和 Gv2CT 位均出现高的多态性 (在 75 个个体中, Gv1CT 位点扩增出 52 个等位基因, Gv2CT 位点扩增出 12 个等位基因), 而 Gv1AAC 与 Gv1AAG 在个体间未能表现出多态性, 而在种群间出现了多态性。Billot 等^[2]在掌状海带 (*Laminaria digitata* Lam x) 中对二碱基、三碱基和六碱基的微卫星进行了标记筛选, 结果发现, 三碱基和四碱基微卫星的多态性明显高于二碱基的。在本研究中, 主要选取了两碱基、三碱基和五碱基为基本重复单位的微卫星序列, 以两碱基、三碱基为基本重复单位的结果比较理想。

野生型坛紫菜经人工突变后筛选出了两个优良品种 (一个生长较快, 一个蛋白含量较高), 它们虽

然来自同一个野生群体而且在形态上也无明显差异,但在基因水平上相差很大(其 Nei氏遗传距离在 0.425 1~0.641 2),这说明突变后的坛紫菜在 DNA 水平上已发生了很大变化,同时从它们的 UPGMA 聚类图(图 3)可以看到两个突变群体首先聚在了一起,然后才和野生群体聚在了一起,表明两个突变群体尽管来自野生种群,但它们之间已呈现出明显的遗传分化。本研究中同时还有 3对引物扩增出了 3条 DNA 特异性标记条带,可以区分这三个不同的紫菜群体。微卫星 DNA 标记虽是特异性标记,但也会出现一些非特异性的扩增,如图 4中,在 165 bp和 148 bp处 4^{引物}分别从野生种群体和生长快群体扩增出了一条 DNA 特异性标记条带,图 6中,第 12~15个泳道等也扩增出了和特异性标记条带一样大小但比较弱的 DNA 条带,经检验发现该条带只是在 PCR 反应中产生的随机出现的非特异性扩增。与表现型标记(形态标记、细胞学标记和生化标记)和其他 DNA 标记(RAPD、AFLP等)相比,SSR具有多态性高,遗传稳定,共显性遗传等优点,因此在种质鉴定中有较大的潜力,可作为传统种质鉴定方法的有益补充。

参考文献:

- [1] 胡则辉,周志刚. 微卫星 DNA 标记技术及其在海洋生物遗传学中的应用[J]. 海洋湖沼通报, 2006, (1): 37-44.
- [2] Billot C, Rousvoal S, Estoup A, et al. Isolation and characterization of microsatellite markers in the nuclear genome of the brown alga *Laminaria digitata* (Phaeophyceae)[J]. Mol Ecol 1998, 7: 1778-1780.
- [3] Shi Y Y, Yang G P, Liu Y J, et al. Development of 18 polymorphic microsatellite DNA markers of *Laminaria japonica* (Phaeophyceae)[J]. Mol Ecol 2006, 7: 620-622.
- [4] Engel C R, Wattier R, Destombe C, et al. Performance of non motile male gametes in the sea: Analysis of paternity and fertilization success in a natural population of a red seaweed *Gracilaria gracilis*[J]. Proc R Soc Biol Sci Ser B, 1999, 266: 1879-1886.
- [5] Luo H, Moerchen M, Engel C R, et al. Characterization of microsatellite markers in the red alga *Gracilaria gracilis*[J]. Mol Ecol 1999, 8: 700-702.
- [6] 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.
- [7] 陈昌生,谢潮添,纪德华,等. 野生坛紫菜种群遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 水产学报, 2008, 32(5): 717-724.
- [8] 胡则辉,周志刚. 坛紫菜微卫星 DNA 序列的筛选[J]. 海洋科学, 2006, 30(1): 17-22.
- [9] Wattier R A, Prodohl P A, Maggs C A. DNA isolation protocol for red seaweed (Rhodophyta)[J]. Plant Mol Biol Rep 2000, 18: 275-281.
- [10] Brant J B, Gustavo C A, Peter M G. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels[J]. Anal Biochem, 1991, 196: 80.
- [11] 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: 403-407.
- [12] 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.
- [13] 张学成,秦松,马家海,等. 海藻遗传学[M]. 北京: 农业出版社, 2005: 184-185, 196-200.
- [14] Hong Y K, Coury D A, Polne-Fuller M, et al. Lithium chloride extraction of DNA from the seaweed *Porphyra perforata* (Rhodophyta)[J]. J Phycol 1992, 28: 717-720.
- [15] Hu Y J, Zhou Z G. Extraction of RAPD-friendly DNA from *Laminaria japonica* (Phaeophyta) after enzymatic dissociation of the frozen sporophyte tissues[J]. J Appl Phycol 2001, 13: 415-412.
- [16] Primmer C R, Möller A P, Ellegren H. New microsatellites from the pied flycatcher *Ficedula hypoleuca* and the swallow *Hirundo rustica* genomes[J]. Hereditas 1996, 124: 281-283.
- [17] Wattier R, Dallas J F, Destombe C, et al. Single locus microsatellites in Gracilariales (Rhodophyta): high level of genetic variability within *Gracilaria gracilis* and conservation in related species[J]. J Phycol 1997, 33: 868-880.