

用于紫菜无性系种质鉴定的计算机 化 DNA 指纹的建立

贾建航¹, 陈一华¹, 石金锋¹, 金德敏¹, 许 璞²,
梅俊学³, 翁曼丽¹, 王 斌¹

(1. 中国科学院 遗传研究所, 北京 100101; 2. 江苏海洋水产研究所, 江苏 南通 226007; 3. 中国科学院 海洋研究所, 山东 青岛 266071)

摘要: 研究用 RAPD 技术对条斑紫菜(*Porphyra yezoensis*)、坛紫菜(*P. Haitanensis*)、半叶紫菜(*P. Katadai* var. *Hemiphylla*)和少精紫菜(*P. Oligospermatangia*)的 15 个无性系丝状体进行了遗传多样分析, 用 120 个 Operon 引物进行了筛选, 从中选用来自 OPJ-18 和 OPN-02 扩增出的 8 条多态性条带构建了这 15 个紫菜无性系的 DNA 指纹图谱, 在该图谱中每个紫菜无性系均有各自特异的 DNA 指纹. 用 1 和 0 分别表示 DNA 带的出现和缺失, 将各个无性系的 DNA 指纹用计算机语言表示, 建立了 15 个紫菜无性系的计算机化 DNA 指纹; 在此基础上设计了紫菜无性系种质鉴定的计算机软件 PhGI.

关键词: 计算机化的 DNA 指纹; 种质鉴定; RAPD; 紫菜

中图分类号: Q789

文献标识码: A

文章编号: 0253-4193(2001)01-0079-06

1 引言

紫菜是世界性分布的大型红藻, 具有重要的经济价值, 我国紫菜的产量居世界首位, 与海带相比, 我国紫菜的产量低于海带, 但其产值却高于海带. 传统的分类方法主要是依据紫菜的形态特征, 包括形状、大小、边缘细胞的数目等. 由于大多数形态性状受环境因素的影响较大, 可描述的特征有限, 因此紫菜种质的准确鉴定较为困难. 种质鉴定是品种选育的基础. 近年来分子标记技术和 DNA 指纹分析技术已广泛应用于农作物的种质鉴定^[1~4], 并已开始在海藻研究中应用, 如红藻的种质鉴定及分子系统发育研究^[5~7]、藻类的亲缘关系的比较^[8]、藻类的遗传多样性检测^[6]和藻类的杂种优势研究^[9].

收稿日期: 2000-06-02; 修订日期: 2000-08-14.

基金项目: 国家“863”计划海洋领域资助项目(819-03-02).

作者简介: 贾建航(1966—), 男, 河北省保定市人, 讲师, 博士, 从事植物分子遗传学研究.

紫菜丝状体是保存紫菜种质的主要方式,也是育种所必需的材料.本研究目的在于建立一个基于紫菜丝状体 RAPD 指纹的计算机分析方法,为紫菜无性系的快速、准确鉴定及分类提供一种新的方法.

2 材料和方法

2.1 紫菜无性系

紫菜丝状体无性系由江苏省海洋水产研究所和中国科学院海洋研究所提供,有 7 个条斑紫菜、6 个坛紫菜、1 个半叶紫菜和 1 个少精紫菜,共计 15 个无性系,其来源与特点见文献[5].

2.2 紫菜丝状体 DNA 的提取

在 18℃ 培养紫菜的丝状体,收集、吸干后,在液氮中研磨成粉状,按本实验室报道的方法提取其 DNA^[5].

2.3 RAPD 分析

按本实验室的方法^[5]进行紫菜的 RAPD 分析,反应总体积 25 mm³,成分为 Tris - Cl pH8.3 10 mmol/dm³, MgCl₂ 2.0 mmol/dm³, KCl 50 mmol/dm³, 4 种核苷酸各为 0.15 mmol/dm³, 引物 15 ng, 模板 20 ng, Taq DNA 聚合酶 1.0 U, 覆盖一滴石蜡油. 反应程序如下:反应混合物在 95℃ 变性 4 min, 然后进入循环:94℃ 变性 45 s, 37℃ 复性 1 min, 72℃ 延伸 2 min, 共 42 个循环,最后 72℃ 保温 5 min. 扩增产物在 1.2% 琼脂糖凝胶中电泳, EB 染色后用 Bio - Rad DOC - 1000 扫描仪扫描记录或照相.

2.4 紫菜丝状体 DNA 指纹图谱的构建

参照本实验室建立水稻 DNA 指纹图谱的方法^[10], 挑取具有代表性的 RAPD 多态性条带构建紫菜丝状体的 DNA 指纹图谱.

3 结果分析

3.1 RAPD 分析

本研究首先用 120 个 Operon 引物对 15 个紫菜无性系进行了 RAPD 分析,在 1% 的琼脂糖凝胶检测中,每个引物能够扩增出 2~11 条带.在此基础上选用重复性好的 6 个引物扩增出的 67 条多态性条带用于聚类分析,建立了 15 个无性系的聚类图^[5],根据上述结果选用有代表性的扩增条带构建 DNA 指纹图.

3.2 数据转换和计算机化的 RAPD - DNA 指纹的建立

由聚类研究所用的 67 个多态性条带中选取 8 个稳定性和重复性良好的多态性条带,用于构建紫菜无性系种质鉴定用的 DNA 指纹图谱,这 8 个多态性条带分别来自引物 OPJ - 18 和 OPN - 02 的扩增结果(见图 1, 2). 根据凝胶图谱中这 8 个条带的出现与否进行记录(见表 1), 然后根据记录结果绘制了 DNA 指纹模式图(见图 3). 图中 OPJ - 18₆₈₀ 表示用引物 OPJ - 18 扩增出的长度为 680 bp 的 DNA 片段. 在这一 DNA 指纹图谱中,每个无性系均有其特异的 DNA 指纹,可以把这 15 个紫菜无性系彼此区分开.

为了使 DNA 指纹便于计算机识别和分析,本研究将这种 DNA 指纹转换成由 1 和 0 组成的计算机可以识读的语言(见表 2), 1 和 0 分别代表某条 DNA 带的存在或缺失,每个无性系均有一个由代码构成的 DNA 指纹.

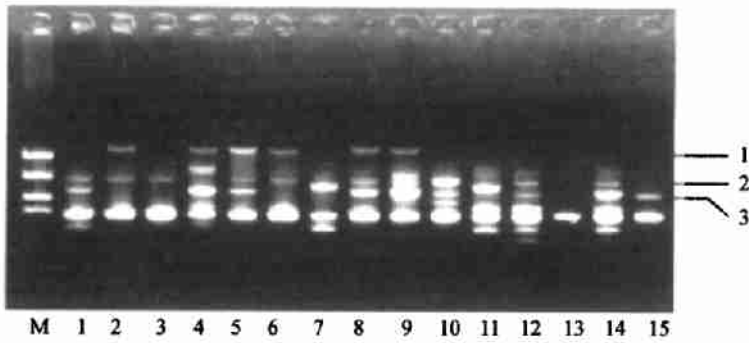


图1 随机引物 OPN-02 对紫菜的 RAPD 分析结果

各泳道样品: M 为 Marker λ , 1~15 依次为 Y9101, Y9001, Y9430, Y9502, Y9306, Y9252, 半叶, 少精, H9208, gr202, H9161, H181, H9163, H182, H180

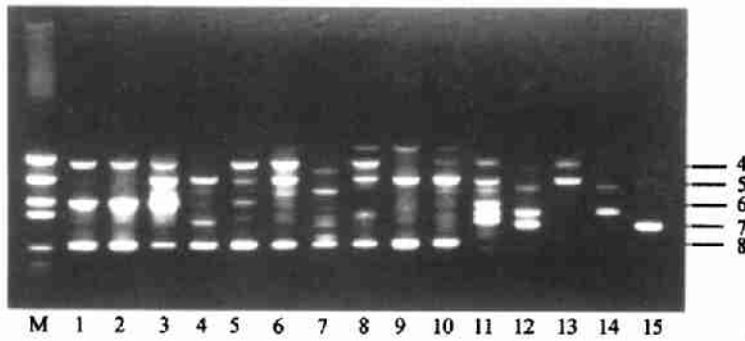


图2 随机引物 OPJ-18 对紫菜的 RAPD 分析结果

各泳道样品同图1

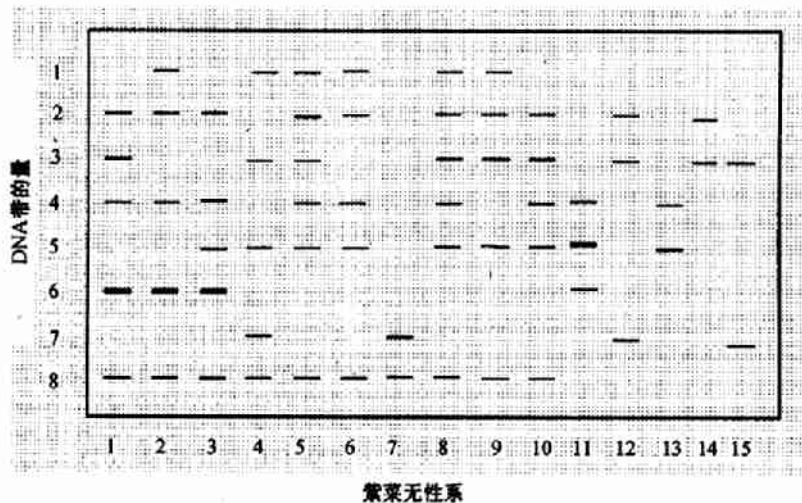


图3 15个紫菜无性系的DNA指纹模式图

条带命名依次为: 1. OPN-02₂₁₀₀, 2. OPN-02₁₈₀₀, 3. OPN-02₁₃₅₀, 4. OPJ-18₂₁₀₀, 5. OPJ-18₁₈₀₀, 6. OPJ-18₁₂₃₀, 7. OPJ-18₉₀₀, 8. OPJ-18₆₈₀.

表 1 用 OPJ-18 和 OPN-02 扩增出的
8 个多态性条带的记录结果

紫菜无性系	引物及其扩谱带							
	OPN-02				OPJ-18			
	1	2	3	4	5	6	7	8
1. Y9101	-	+	+	+	-	+	-	+
2. Y9001	+	+	-	+	-	+	-	+
3. Y9430	-	+	-	+	+	+	-	+
4. Y9502	+	-	+	-	+	-	+	+
5. Y9306	+	+	+	+	+	+	-	+
6. Y9252	+	+	-	+	+	-	-	+
7. 半叶	-	-	-	-	-	-	+	+
8. 少精	+	+	+	+	+	-	-	+
9. H9208	+	+	+	-	+	-	-	+
10. gr202	-	+	+	+	+	-	-	+
11. H9161	-	-	-	+	+	+	-	-
12. H181	-	+	+	-	-	-	+	-
13. H9163	-	-	-	+	+	-	-	-
14. H182	-	+	+	-	-	-	-	-
15. H180	-	-	+	-	-	-	+	-

表 2 15 个紫菜无性系计算机化的 DNA 指纹

紫菜无性系	计算机化的 DNA 指纹
1. Y9101	01110101
2. Y9001	11010101
3. Y9430	01011101
4. Y9502	10101011
5. Y9306	11111101
6. Y9252	11011001
7. 半叶	00000011
8. 少精	11111001
9. H9208	11101001
10. gr202	01111001
11. H9161	00011100
12. H181	01100010
13. H9163	00011000
14. H182	01100000
15. H180	00100010

我们开发了计算机应用软件 PhGI(*Porphyra* Germplasm Identification), 辅助进行紫菜无性系的鉴定. 在实际应用时, 通常先对一批材料进行 PCR 检测获得其 DNA 指纹, 然后将每个样品计算机化的 DNA 指纹输入计算机, 计算机就会立即显示这个样品属于上述 15 个已知无性系中的某一个. 如果这一样品不属于这 15 个无性系, 计算机则显示这是一个新材料, 并给出该样品与每个已知无性系的相似系数.

4 讨论

目前, 我国紫菜生产中所用的品种多数还是由自然界采集的, 各无性系之间存在着丰富的遗传多样性. 过去紫菜的分类较为粗放, 主要采用形态分类的方法. 近年来分子标记方法在紫菜分类和种质鉴定中得到应用. 本研究中的 4 类紫菜(条斑紫菜、坛紫菜、半叶紫菜、少精紫菜)之间的相互关系及分类地位一直是藻类学家们争论的焦点. 本研究的 RAPD 分析结果表明我国的紫菜无性系之间存在丰富的多样性, 彼此差异非常大, 多态性高达 70%~97%, 这可能由于它们的栽培历史很短, 而且主要来自野生种源, 这为建立它们的 DNA 指纹提供了方便, 使获得足够的多态性变得比较容易. RAPD 分子标记和 DNA 指纹图谱的应用将能由 DNA 水平上反映出各紫菜无性系的相互关系及其分类地位. 虽然紫菜的 DNA 多样性非常丰富, 容易获得多态性产物, 但在进行 RAPD 分析时如果采用较多的 RAPD 产物进行有关分析, 得出的结果会更加可靠.

DNA 指纹已在世界范围内被广泛接受, 做为具有法律效力的依据已经用于农作物品种鉴定的 DUS(distinctness, uniformity and stability)测定. 为了防止或减少使用不合格无性系带给紫菜生产造成的损失, 建立快速、可靠和简便的无性系鉴定方法已成为当务之急. 本研究开发的计算机化的 RAPD-DNA 指纹方法用于紫菜无性系鉴定, 对于合理、持久利用紫菜优良种

质资源, 加速对紫菜优良品系的选育, 并逐步实现紫菜生产的良种化和稳产、高产具有重要意义, 而且可以对我国优良紫菜种质资源的产权保护提供具有法律效力的证据。

RAPD, AFLP 和 SSR 都是以 PCR 为基础的 DNA 指纹分析技术, 它们可以作为 DUS 测试的法律依据, 用于法庭处理种子质量及产权纠纷。RAPD - DNA 指纹分析具有简单、方便、经济和快速的特点, 适合于实际的种质鉴定。RAPD 技术的缺点在于其检测多态性的效率低, 即使在装备良好的实验室通常也需要用很长时间来寻找合适的 DNA 指纹。但对于紫菜而言, 这个缺点相对不明显, 因为紫菜无性系的多态性非常丰富, 很容易找到它们的差异, 所以用 RAPD 方法基本上就可以满足目前紫菜研究的要求。只要建立了合适 RAPD - DNA 指纹, 在实际的种质鉴定中应用起来就很简便。

该图谱中无性系的数目可以根据需要和新无性系的不断出现而随时更新, 使之适合研究和生产的需求。

参考文献:

- [1] SELBACH A, CAAVALLI-MOLINA S. RAPD characterization of Brazilian barley (*Hordeum vulgare* ssp. *vulgare*) varieties [J]. Euphytica, 2000, 111: 127~135.
- [2] NOLI E, CONTI S, MACCAFERRI M, et al. Molecular characterization of tomato cultivars [J]. Seed Sci & Technol, 1999, 27: 1~10.
- [3] ARIFIN NS, OZAKI Y, OKUBO H. Genetic diversity in Indonesian shallot (*Allium cepa* var. *ascalonicum*) and *Allium* × *wakegi* revealed by RAPD markers and origin of *A.* × *wakegi* identified by RFLP analysis of amplified chloroplast genes [J]. Euphytica, 2000, 111: 23~31.
- [4] 王 斌, 张超良, 翁曼丽, 等. 玉米自交系 8112 特异 SCAR 标记的获得[J]. 高技术通讯, 1999, 9(3): 45~47.
- [5] JIA Jian-hang, WANG Ping, JIN De-min, et al. The application of RAPD markers in diversity detection and variety identification of *porphyra* [J]. Acta Botanica Sinica, 2000, 42(4): 403~407.
- [6] DUTCHER J A, KAPRAUN D F. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) identification of genetic variation in three species of *Porphyra* (Bangiales, Rhodophyta) [J]. Journal of Applied Phycology, 1994, 6: 267~273.
- [7] PATWARY M U, MACKAY R M, VAN DER MEER J P. Revealing genetic markers in *Gelidium vagum* (Rhodophyta) through the random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique [J]. Journal of Phycology, 1993, 29: 216~222.
- [8] HO C L, PHANG S M, PANG T. Molecular characterisation of *Sargassum polycystum* and *S. siliquosum* (Phaeophyta) by polymerase chain reaction (PCR) using random amplified polymorphic DNA (RAPD) primers [J]. J Appl Phycol, 1995, 7(1): 37~41.
- [9] PATWARY M U, VAN DER MEER J P. Application of RAPD markers in an examination of heterosis in *Gelidium vagum* (Rhodophyta) [J]. Journal of Phycology, 1994, 30: 91~97.
- [10] CHEN Yi-hua, JIA Jian-hang, LI Chuan-you, et al. Rice seed identification by computerized AFLP-DNA fingerprinting [J]. Chinese Rice Research Newsletter, 2000, 8(1): 4~5.

Construction of computerized DNA fingerprinting for identification of *Porphyra* lines

JIA Jian-hang¹, CHEN Yi-hua¹, SHI Jin-feng¹, JIN De-min¹, XU Pu²,
MEI Jun-xue³, WENG Man-li¹, WANG Bin¹

(1. Institute of Genetics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China; 2. Jiangsu Institute of Oceanology and Hydrobiology, Nantong 226007, China; 3. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China)

Abstract: RAPD (randomly amplified polymorphic DNA) analysis was performed with filaments of 15 *Porphyra* lines representing *P. Yezoensis*, *P. Haitanensis*, *P. Katadai* var. *hemiphylla* and *P. oligospermatangia*. Eight stable and repeatable RAPD bands amplified with two primers, OPN-02 and OPJ-18, were selected for the construction of DNA fingerprinting. The RAPD results are scored based on the presence or absence of each of the 8 bands and then converted to computer language expressed with two digitals, 1 and 0, which represent the presence (numbered as 1) or absence (numbered as 0) of each band, respectively. Based on these results, a model DNA fingerprint and a computerized DNA fingerprint are constructed. In the constructed DNA fingerprint, each *Porphyra* line has its unique fingerprinting pattern and can be easily distinguished from each other. Later, a software, named as PhGI, is designed based on this DNA fingerprinting for *Porphyra* line identification.

Key words: computerized DNA fingerprinting; germplasm identification; RAPD; *Porphyra*