

文章编号:1000-0615(2007)01-0105-07

ISSR 标记在坛紫菜不同色泽丝状体 种质鉴定中的应用

谢潮添, 纪德华, 陈昌生, 徐燕, 张元
(集美大学水产学院, 福建 厦门 361021)

摘要:用 ISSR 分子标记技术对 4 个不同色泽坛紫菜(*Porphyra haitanensis*)丝状体品系(分别为桔黄色,褐绿色,棕红色和紫色)及 1 个野生型对照丝状体品系(褐红色)进行了遗传分析,共筛选出 11 条引物,PCR 反应得到了 129 个扩增位点,多态位点比率达 88.4%,有效等位基因数为 1.6369,期望杂合度为 0.3609,Shannon 多样性指数为 0.5265;根据 Nei 方法计算了这 5 个坛紫菜丝状体品系间的遗传相似性系数和遗传距离,结果发现 4 个不同色泽丝状体间的平均遗传距离为 0.5727,它们同野生型对照的平均遗传距离为 0.6564,同时应用 UPMGA 法对它们进行了聚类分析。最后应用引物 812 扩增的 4 个多态性位点构建了这 5 个不同坛紫菜丝状体的 DNA 指纹图谱,使每一品系都具有独特的 DNA 指纹,并将其转化成了计算机可以识别的数码指纹,可以方便地应用于坛紫菜丝状体的种质鉴定中。结果表明 ISSR 分子标记技术可以作为坛紫菜丝状体种质鉴定的有效技术手段,提供快捷、准确的鉴定结果。

关键词:坛紫菜; ISSR 标记; 遗传分析; 种质鉴定

中图分类号:S 917.3

文献标识码:A

Application of ISSR markers in germplasm identification of different color's *Porphyra haitanensis* filament strains

XIE Chao-tian, JI De-hua, CHEN Chang-sheng, XU Yan, ZHANG Yuan
(College of Fisheries, Jimei University, Xiamen 361021, China)

Abstract: *Parphyra haitanensis* is the most economically important seaweeds in south China. ISSR (inter-simple sequence repeat) markers were applied to analyze the genetic variation among 4 different color's *P. haitanensis* filament lines (saffron, green, brown and purple) and a wild-type line (maroon). 11 ISSR primers (selected from 35 primers) gave rise to 129 discernible DNA bands of which 114 (88.4%) were polymorphic; Effective number of alleles (N_e), expected heterozygosity (h) and Shannon's information index (I) were 1.6369, 0.3609 and 0.5265 respectively which were also calculated from the ISSR results by software popgene 1.32; Genetic similarity (GS) and genetic distances (GD) were calculated by using Nei's matching coefficient, the average GD among the 4 different color's filament lines is 0.5727, and the average GD between the 4 different color's filament lines and the wild-type filament line is 0.6564, all these results indicating a considerable genetic variation among the 5 filament lines. UPGMA cluster analysis

收稿日期:2006-06-02

资助项目:国家自然科学基金(40676077);福建省科技重大专项资助项目(2004NZ03)

作者简介:谢潮添(1977-),男,福建龙岩人,讲师,博士,主要从事海藻分子生物学研究。E-mail:ctxie@126.com

通讯作者:陈昌生,E-mail:cschen@jmu.edu.cn

based on Nei's genetic distances divided the 5 filament lines into three groups: the saffron and green in one group, the brown and purple in the other group and the wild-type line (maroon) in another group. Then we used the 4 polymorphic bands amplified from the primer 812 to construct the DNA fingerprints of the 5 *P. haitanensis* filament lines, in the constructed DNA fingerprints, each *P. haitanensis* filament line has its unique fingerprinting pattern and can be easily distinguished from each other. At last we transformed the DNA fingerprints into digital fingerprints which can be recognized by computer to predigest the variety identified process. All the results of this paper show that the ISSR marker is a useful technique in the variety identification of *P. haitanensis*, which can offer the correct results quicker than other molecular markers.

Key words: *Porphyra haitanensis*; ISSR marker; genetic analysis; germplasm identification

紫菜是目前世界上人工养殖经济价值最高的一类海藻,2003年我国的紫菜产量已位居世界首位^[1]。坛紫菜(*Porphyra haitanensis*)和条斑紫菜(*Porphyra yezoensis*)是我国紫菜人工养殖的两个主要种类,其中坛紫菜原产于福建,上世纪70年代后推广到浙江沿海,目前已成为闽浙沿海的支柱产业,其产量占全国紫菜产量的80%左右,是我国特有的暖温带性种类。

坛紫菜种质资源的收集、鉴定、评价和保存是坛紫菜常规育种和基因工程育种的重要基础,近年来,随着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。然而由于紫菜大多数形态性状非常容易受到环境因素的影响,可描述的特征也有限,以往主要依靠形态学特征的紫菜分类方法已经很难满足现代紫菜分类、种质鉴定、新品种选育和产权保护的要求。分子标记技术的出现为这一问题的解决带来了契机,在国外,分子标记技术已经在紫菜遗传多样性分析^[2-3]、杂种优势性状跟踪^[4]、种质鉴定^[5-6]、基因定位以及遗传图谱构建^[7]等中得到了广泛应用。国内也在这方面进行了一定程度的尝试,采用RAPD、AFLP、ISSR等分子标记技术分析各种紫菜的遗传多样性^[8-13],并对RAPD技术在紫菜种质鉴定中的应用进行了初步探索^[14-16],但迄今为止,将ISSR标记应用于海藻研究的报道还很少,国内仅见用ISSR标记对几个江蓠属海藻的遗传变异进行分析的报导^[17]。

紫菜自由丝状体是紫菜生活史中的二倍体阶段,是进行遗传和育种研究的主要材料,也是紫菜种苗生产中的关键一环,但是自由丝状体无法从外观、形态进行鉴定,专门研究紫菜丝状体种质鉴定的文章也很少,因此本研究的目的是采用ISSR

分子标记技术对本实验室分离出来的不同色泽坛紫菜自由丝状体进行遗传变异分析,建立各品系丝状体的DNA指纹图谱,旨在建立一套适合于坛紫菜自由丝状体种质鉴定的分子标记技术,为进一步的分子标记辅助坛紫菜育种奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

坛紫菜材料4个不同色泽坛紫菜自由丝状体样本均为本实验室通过诱变育种技术选育、纯化并保存于福建省坛紫菜种质资源库中的品系(表1),它们同野生型对照品系一起置于20℃,光照强度1000~1500 lx,光周期为12 h(光):12 h(暗)的条件下培养。

表1 实验所用坛紫菜丝状体品系及其颜色

Tab.1 The colors of *P. haitanensis* filament lines in this study

丝状体品系 filament lines	色泽 color
1	桔黄色 saffron
2	褐绿色 green
3	棕红色 brown
4	紫色 purple
野生型 wild-type	褐红色 maroon

试剂与引物 DNA提取所用生化试剂均购置于上海生工生物工程有限公司,而PCR扩增所需试剂均由大连宝生物工程有限公司提供。所采用的引物依据加拿大哥伦比亚大学设计的ISSR引物选取35条由大连宝生物工程有限公司合成。

1.2 方法

DNA提取及检测 收集培养液中培养的各品系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^[18]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。

ISSR 分析 按照本实验室建立的坛紫菜 ISSR 标准反应体系进行,25 μL 的反应体系中含 2.5 μL 10 \times PCR Buffer,5 ng 模板 DNA,2.5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Mg^{2+} ,1.5 U *Taq* 酶,200 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 引物,200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ dNTP。PCR 扩增在美国 MJ Research PTC-200 型 PCR 仪上进行,具体程序为:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 7 min;每个循环 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min,48 $^{\circ}\text{C}$ 复性 45 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min,共进行 35 个循环;循环结束后 72 $^{\circ}\text{C}$ 再延伸 7 min。扩增结束后,取 6 μL 扩增产物在 1.5% 琼脂糖胶中电泳,经 EB 染色后观察结果并拍照。

数据分析 以电泳后扩增条带的清晰度,可重复性为标准用于 ISSR 的标记分析。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,相同迁移位置扩增条带的有无分别记为 1 和 0,输入计算机形成 1、0 矩阵,然后应用软件 POPGENE 1.32,假定这些 ISSR 标记位点处于 Hardy-Weinberg 平衡状态,分别统计以下参数:

- (1) 多态位点百分数(P);
- (2) 遗传相似性系数(GS)和遗传距离(GD);
- (3) 平均每个位点的观察等位基因数(N_a);
- (4) 平均每个位点的有效等位基因数(N_e);
- (5) 期望杂合度(h);

(6) Shannon 多样性指数(I)

聚类分析 根据遗传距离计算结果,采用算数平均数的非加权成组配对法(UPGMA 法)进行聚类分析。使用软件为 NTSYSpc 2.10e。

指纹图谱构建 构建图谱时依据用最少引物、最少条带、又要把所有供试样品逐个区分开来的原则,从扩增的大量条带中选取稳定性和重复性良好、多态性又高的条带,用于构建这 5 个坛紫菜自由丝状体品系的 DNA 指纹图谱,使得在该 DNA 指纹图谱中,每个材料都具有其特有的 DNA 指纹。最后根据带的有/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数码指纹。

2 结果与分析

2.1 ISSR 分析结果

在 ISSR 扩增实验中,以提取的 5 个自由丝状体品系基因组 DNA 为模板进行引物筛选,结果从 35 条 ISSR 引物中筛选出 11 条引物,可以扩增出清晰稳定,重复性好,多态性高的条带(部分引物的扩增结果见图 1)。这 11 条引物共扩增出 129 个位点,其中 114 个位点具有多态性,多态位点百分率(P)为 88.4%。每个引物扩增的位点数为 6~15 个,平均每个引物扩增的位点数为 11.7 个,扩增的条带大小在 400~3 500 bp 之间。引物序列及其扩增结果见表 2。

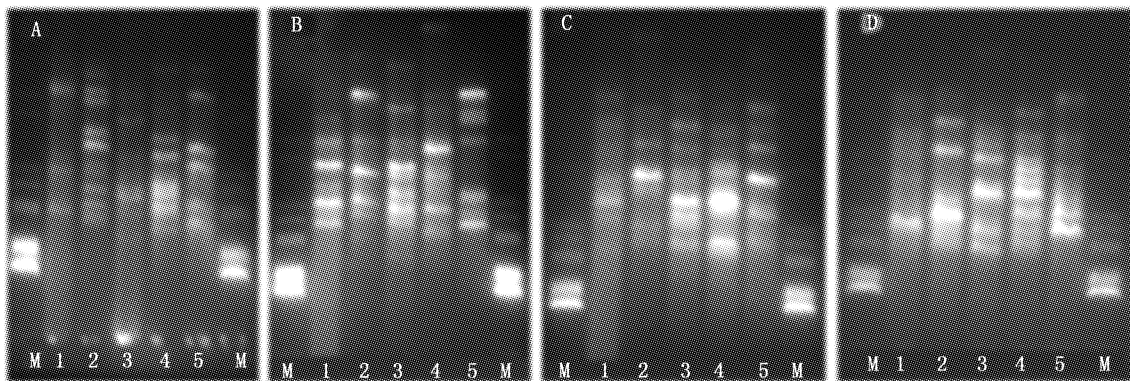


图 1 部分引物(A:807;B:812;C:825;D:826)的 ISSR 扩增结果

Fig. 1 The ISSR amplification products of partial primers (A: 807;B:812;C:825;D:826) obtained from the 5 *P. haitanensis* filaments

- 1-4: 不同色泽丝状体品系 1、2、3、4;5: 野生型对照;M: 分子量标记
1-4: The *P. haitanensis* filaments of 4 different color lines 1,2,3,4;
5: The *P. haitanensis* filaments of wild-type strains; M: Marker

表 2 ISSR 引物、序列及扩增后产生的不同带型数
Tab.2 Name of ISSR primers, sequence and bands after amplification

引物名称 primers	引物序列(5'-3') sequence	总位点数 total bands	多态位点数 polymorphic bands	ISSR 扩增位点 bands of ISSR amplification				野生型 wild type
				1	2	3	4	
807	(AG)8T	12	11	3	10	5	7	6
808	(AG)8C	9	9	3	5	3	2	4
810	(GA)8T	12	12	5	8	9	9	4
812	(GA)8A	15	13	6	7	11	7	8
816	(GA)8T	10	9	4	4	7	9	2
817	(CA)8A	15	14	7	7	6	6	8
820	(GT)8C	6	5	2	2	3	5	3
821	(CA)8T	14	10	6	9	13	11	8
825	(AC)8T	15	12	8	10	9	7	7
826	(GT)8C	13	13	2	4	8	10	5
830	(TG)8G	8	6	4	4	5	4	5
合计 total		129	114	50	70	79	77	60

2.2 各品系坛紫菜丝状体间的遗传相似性

将扩增出的 DNA 条带记录在 1/0 矩阵中, 通过 Nei 的方法, 分别计算得到的遗传相似性系数(GS)和遗传距离(GD)见表 3。4 个不同色泽自由丝状体的遗传距离在 0.4410 至 0.7655 之间, 平均为 0.5727, 而这 4 个不同色泽丝状体与野生型对照的遗传距离在 0.5031 至 0.7655 之间, 平均为 0.6564。

5 个坛紫菜丝状体品系的遗传变异分析结果见表 4, 从表中可以看出, 4 个不同色泽丝状体之间的有效等位基因数为 1.5736, 期望杂合度为

0.3246, Shannon 多样性指数指数为 0.4714。而它们同野生型对照之间进行比较, 则有效等位基因数为 1.6369, 期望杂合度为 0.3609, Shannon 多样性指数为 0.5265。

2.3 各品系坛紫菜丝状体的聚类分析

根据坛紫菜之间的 Nei 遗传距离进行 UPGMA 聚类分析, 结果见图 2。从图 2 可以看出, 这 5 个坛紫菜丝状体可以分为 3 群, 品系 1 和 2 聚合, 3 和 4 聚合, 1, 2 聚合之后先与野生型对照聚合, 然后才同 3、4 聚合。

表 3 5 个坛紫菜丝状体品系的遗传相似性系数 GS(对角线上方)和遗传距离 GD(对角线下方)

Tab.3 Genetic similarity (above diagonal) and genetic distances (below diagonal) matrix between the 5 *P. haitanensis* filament strains

	1	2	3	4	野生型 wild type
1		0.6434	0.5814	0.4651	0.6047
2	0.4410		0.5659	0.5271	0.5271
3	0.5423	0.5694		0.6202	0.4651
4	0.7655	0.6403	0.4778		0.4884
野生型 wild type	0.5031	0.6403	0.7655	0.7167	

表 4 5 个坛紫菜丝状体品系的遗传变异统计结果

Tab.4 The genetic variation statistics among the 5 *P. haitanensis* filament strains

参数 parameter	等位基因数(N_a) number of alleles	有效等位基因数(N_e) effective number of alleles	期望杂合度(H) expected heterozygosity	Shannon 多样性指数(I) Shannon's information index
4 个不同色泽丝状体间 among 4 filament strains	1.7752 ± 0.4191	1.5736 ± 0.3530	0.3246 ± 0.1832	0.4714 ± 0.2608
5 个间丝状体 (包括野生型对照) among 5 filament strains (include the wild-type)	1.8837 ± 0.3218	1.6369 ± 0.3144	0.3609 ± 0.1514	0.5265 ± 0.2081

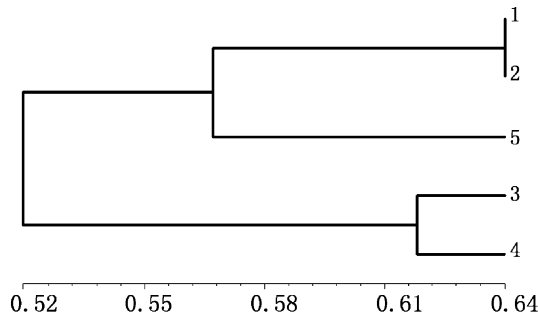


图2 5个坛紫菜丝状体品系基于 Nei 的遗传距离的 UPGMA 聚类结果

Fig.2 Dendrogram of UPGMA cluster analysis based on Nei's genetic distances among the 5 *P. haitanensis* filament strains

2.4 指纹图谱构建

由于样本数比较少,而且坛紫菜丝状体 ISSR 扩增的多态性又比较高,11 条引物中,除引物 808、820 和 830 外,其余引物都只用 1 条引物就能将供试的 5 个坛紫菜品系完全分开。但是根据使用最少引物,最少条带,能将所有供试样品完全分开的原则,以及选取的条带要求具有稳定性和重复性良好、多态性高的特点,从 812 引物扩增出来的 15 条条带中选取了 4 个条带用于构建这 5 个坛紫菜自由丝状体品系的 DNA 指纹图谱(图 3),并将其转化成计算机可以识别的数码指纹(表 5),便于计算机的识别处理。

片段大小 size of bands	1	2	3	4	野生型 wild-type
590	■				■
1020	■	■			
1320				■	
1670		■			■

图3 5个坛紫菜自由丝状体品系的 DNA 指纹图谱

Fig.3 The ISSR fingerprints of 5 *P. haitanensis* filament strains

3 讨论

3.1 ISSR 分子标记技术在坛紫菜种质鉴定中的应用

紫菜自由丝状体是紫菜生活史中的二倍体阶段,是紫菜种质保存的重要形式。由于坛紫菜叶状体阶段大部分为雌雄异体,成熟后放散的雌雄配子体很容易就发生杂交,这样就导致坛紫菜不像条斑紫菜容易获得性状稳定的纯系丝状体,因此对于坛紫菜自由丝状体种质鉴定的研究

表5 5个坛紫菜自由丝状体品系的计算机化 DNA 指纹图谱

Tab.5 The computerized fingerprints of 5 *P. haitanensis* filament strains

坛紫菜丝状体品系 <i>P. haitanensis</i> filament strains	计算机化 DNA 指纹 computerized DNA fingerprints
1	1100
2	0101
3	0100
4	0010
野生型 wild-type	1001

长期滞后^[19],造成选育出来的良种经常同其它品种混淆,无法得到确实有效的保存和延续。分子标记的出现就为这一问题的解决带来契机,由 DNA 标记技术所产生的 DNA 指纹图谱分析,可从 DNA 水平上反映植物个体间的差异,最大程度减少其他因素的干扰,使植物的分类和鉴定更加准确和真实,因此在品种鉴定,新品种注册,种质真实性和纯度检验等方面很有效^[20]。近年来,本实验室通过现代细胞工程育种、单克隆育种以及人工诱变育种等现代生物技术和传统育种技术的结合,分离和培养出了多个不同色泽的坛紫菜纯系丝状体,各个纯系丝状体间很容易从色泽上加以区分,因此这些不同色泽的丝状体就为探讨分子标记在坛紫菜种质鉴定中的作用提供了条件。

从实验结果中可以看出,坛紫菜不同品系丝状体 ISSR 扩增结果存在着较为丰富的多态位点,129 个位点中只有 15 个单态位点,其余 114 个为多态性位点,多态性比率达 88.4%,这一点同 Jia 等^[14]、王勇等^[21]及陈骁等^[10]采用 RAPD 技术在坛紫菜中的研究结果是一致的,说明 ISSR 技术同 RAPD 技术一样,可以对坛紫菜的遗传背景进行高效的分析,找出它们之间的差异。同时在指纹图谱构建中,发现很多引物都可以在只使用一条引物的情况下就将 5 个供试品系完全分开,每一品系都具有独特的 DNA 指纹,由此表明 ISSR 分子标记技术可以作为坛紫菜种质鉴定的有效的技术手段。而且基于 ISSR 技术本身具有的稳定性和重复性好,操作简单等优点^[22],其在坛紫菜丝状体种质鉴定中的应用,可以提供了比 RAPD、AFLP 等更为快捷、稳定、准确的鉴定结果。此外作者还根据贾建航等^[23]的方法,将坛紫菜不同丝状体的 DNA 指纹图谱转化成了计算机

可以识别的数码指纹,这就使得在实际进行种质鉴定时,只需对每个待鉴定样品进行指定引物的 ISSR 扩增,获得其 DNA 数码指纹,然后将每个样品的数码指纹输入电脑,电脑通过计算并可自动给出该样品属于已建库品系中的哪一个,如果该样品不属于已建库品系中的任何一个,则电脑会显示这是一个新材料,并给出该样品与每个建库品系的相似系数,这样就大大方便了坛紫菜的种质鉴定工作,实现种质资源库的计算机化管理。

3.2 坛紫菜不同色泽丝状体间的遗传变异

4 个不同色泽丝状体间的平均遗传距离 0.5727,它们同野生型对照的平均遗传距离 0.6564,都要高于徐涤等^[9]、陈骁等^[10]及杨锐等^[11]在坛紫菜栽培品系间以及栽培品系同野生品系间的遗传分析结果。此外,4 个不同色泽丝状体间之间的有效等位基因数为 1.5736,期望杂合度为 0.3246,Shannon 多样性指数指数为 0.4714。这些结果均表明 4 个不同色泽丝状体之间存在着较高的遗传多样性水平,可为后续的坛紫菜遗传育种提供丰富的遗传变异位点。对 4 个不同色泽丝状体同野生型对照的比较分析,则有效等位基因数为 1.6369,期望杂合度为 0.3609,Shannon 多样性指数为 0.5265,表明 4 个不同色泽丝状体同野生型对照相比,发生了明显的遗传变异。在自然条件下,一个物种的遗传变异取决于物种的进化历史、群体所经历的进化事件、物种的生殖模式以及环境的特点等,据 Soulé^[24]估计,杂合度增加百分之一需要一百万年的时间。而笔者采用诱变育种的方法,很容易就使坛紫菜发生了较高的遗传变异,由此说明人工诱变育种技术是坛紫菜育种的一个高效的技术手段,该技术可以在短时间内带给坛紫菜带来丰富的遗传变异位点,从而为坛紫菜良种的选育提供更为广泛的选择范围。

参考文献:

- [1] 尤抒忱. 国家级水产原良种场复查工作纪行: 国家级紫菜种质库工作与运行情况[J]. 中国水产, 2004, 9: 66 - 67.
- [2] Mizukami Y, Okauchi M, Kito, *et al.* Discrimination of laver cultivars with RAPD markers [J]. *Fish Sci*, 1996, 62(2): 173 - 177.
- [3] Remi A W, Alistria L D, Barbara A W, *et al.* cpDNA-RFLP in *Ceramium* (Rhodophyta): interspecific polymorphism and species-level phylogeny[J]. *American Journal of Botany*, 2001, 88(7): 1209 - 1213.
- [4] Kito H, Kunimoto M, Kamanishi Y, *et al.* Protoplast fusion between *Monostroma nitidum* and *Porphyra yezoensis* and subsequent growth of hybrid plants[J]. *J Appl Phycol*, 1998, 10(1): 15 - 21.
- [5] Kyosuke N, Norio K, Mitusunobu I, *et al.* Morphological and AFLP variation of *Porphyra yezoensis* Ueda form. *Narawaensis* Miura (Bangiales, Rhodophyta) [J]. *Phycological Research*, 2004, 52: 180 - 190.
- [6] Kyosuke N, Norio K, Yusho A. Morphological and molecular analysis of the endangered species *Porphyra tenera* (Bangiales, Rhodophyta) [J]. *J Phycol*, 2005, 41: 294 - 304.
- [7] Iitsuka O, Nakamura K, Ozaki A, *et al.* Genetic information of three pure lines of *Porphyra yezoensis* (Bangiales, Rhodophyta) obtained by AFLP analysis[J]. *Fish Sci*, 2002, 68: 1113 - 1117.
- [8] 梅俊学, 金德敏, 贾建航, 等. 条斑紫菜不同栽培品系的 RAPD 研究[J]. 山东大学学报(自然科学版), 2000, 35(2): 230 - 234.
- [9] 徐涤, 宋林生, 秦松, 等. 五个紫菜品系间遗传差异的 RAPD 分析[J]. 高技术通讯, 2001, 12: 1 - 4.
- [10] 陈骁, 左正宏, 姚继承, 等. 几种紫菜种质资源遗传多样性的 RAPD 分析[J]. 海洋科学, 2005, 29(4): 76 - 80.
- [11] 杨锐, 刘必谦, 骆其君, 等. 利用扩增片段长度多态性(AFLP)研究坛紫菜的遗传变异[J]. 高技术通讯, 2002, 12(1): 83 - 86.
- [12] 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.
- [13] 胡则辉, 周志刚, 严兴洪. 坛紫菜微卫星 DNA 序列的筛选[J]. 海洋科学, 2006, 30(1): 17 - 22.
- [14] Jia J H, Wang P, Jin D M, *et al.* The application of RAPD Markers in diversity detection and variety identification of *Porphyra* [J]. *Acta Botanica Sinica*, 2000, 42(4): 403 - 407.
- [15] 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, 10: 1 - 3.
- [16] 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 - 130.
- [17] 孙雪, 张学成, 茅云翔, 等. 几种江蓠属海藻的 ISSR 标记分析[J]. 高技术通讯, 2003, 9: 89 - 93.

- [18] 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.
- [19] 王 斌,金德敏,柳 波,等. 紫菜 DNA 指纹图谱的特异分子标记[C]. 2003 年全国作物遗传育种学术研讨会论文集,2003:416-422.
- [20] 梁明山,曾 宇,周 翔,等. 遗传标记及其在作物品种鉴定中的应用[J]. 植物学通报,2001,18(8):257-265.
- [21] 王 勇,刘必谦,骆其君. 坛紫菜品系间遗传差异的 RAPD 分析[J]. 青岛海洋大学学报,2000,30(2):225.
- [22] Reddy M P, Sarla N, Siddiq E A. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding[J]. Euphytica, 2002, 128: 9-17.
- [23] 贾建航,陈一华,石金锋,等. 用于紫菜无性系种质鉴定的计算机化 DNA 指纹的建立[J]. 海洋学报,2001,23(1):79-84.
- [24] Soulé M. Molecular evolution [M]. Sunderland: Sinaur Assoc, 1976:60-77.

最常见的 100 个别字(括号中为正字)

- | | | | |
|-------------|-------------|--------------|---------------|
| 1. 按(安)装 | 27. 既(即)使 | 53. 名(明)信片 | 79. 渲(宣)泄 |
| 2. 甘败(拜)下风 | 28. 一如继(既)往 | 54. 默(墨)守成规 | 80. 寒暄(喧) |
| 3. 自抱(暴)自弃 | 29. 草菅(菅)人命 | 55. 大姆(拇)指 | 81. 弦(旋)律 |
| 4. 针贬(砭) | 30. 娇(矫)揉造作 | 56. 沓(呕)心沥血 | 82. 膺(贻)品 |
| 5. 泊(舶)来品 | 31. 挖墙角(脚) | 57. 凭(平)添 | 83. 不能自己(已) |
| 6. 脉搏(搏) | 32. 一诺千斤(金) | 58. 出奇(其)不意 | 84. 尤(犹)如猛虎下山 |
| 7. 松驰(弛) | 33. 峻(竣)工 | 59. 修茸(葺) | 85. 竭泽而鱼(渔) |
| 8. 一愁(筹)莫展 | 34. 不落巢(窠)臼 | 60. 亲(青)睐 | 86. 滥芋(筭)充数 |
| 9. 穿(川)流不息 | 35. 不径(脛)而走 | 61. 罄(罄)竹难书 | 87. 世外桃园(源) |
| 10. 精萃(粹) | 36. 烩(脍)炙人口 | 62. 声名雀(鹊)起 | 88. 脏(赃)款 |
| 11. 重迭(叠) | 37. 打腊(蜡) | 63. 发韧(韧) | 89. 醮(蘸)水 |
| 12. 渡(度)假村 | 38. 死皮癞(赖)脸 | 64. 搔(瘙)痒病 | 90. 蜚(蛰)伏 |
| 13. 防(妨)碍 | 39. 兰(蓝)天白云 | 65. 入场卷(券) | 91. 装祯(帧) |
| 14. 幅(辐)射 | 40. 鼎立(力)相助 | 66. 欣尝(赏) | 92. 饮鸩(鸩)止渴 |
| 15. 一幅(副)对联 | 41. 再接再厉(厉) | 67. 谈笑风声(生) | 93. 坐阵(镇) |
| 16. 天翻地复(覆) | 42. 老俩(两)口 | 68. 人情事(世)故 | 94. 旁证(征)博引 |
| 17. 言简意骇(赅) | 43. 黄梁(粱)美梦 | 69. 有持(恃)无恐 | 95. 灸(炙)手可热 |
| 18. 气慨(概) | 44. 了(瞭)望 | 70. 额首(手)称庆 | 96. 九州(州) |
| 19. 一股(鼓)作气 | 45. 水笼(龙)头 | 71. 追朔(溯) | 97. 床第(第)之私 |
| 20. 悬梁刺骨(股) | 46. 杀戳(戮) | 72. 鬼鬼崇崇(崇崇) | 98. 姿(恣)意妄为 |
| 21. 粗旷(犷) | 47. 痉孪(挛) | 73. 金榜提(题)名 | 99. 编篡(纂) |
| 22. 食不裹(果)腹 | 48. 美仑(轮)美奂 | 74. 走头(投)无路 | 100. 做(坐)月 |
| 23. 震撼(撼) | 49. 罗(啰)嗦 | 75. 趋之若鹜(鹭) | |
| 24. 凑和(合) | 50. 蛛丝蚂(马)迹 | 76. 迁徙(徙) | |
| 25. 侯(候)车室 | 51. 萎靡(靡)不振 | 77. 洁白无暇(瑕) | |
| 26. 迫不急(及)待 | 52. 沉缅(湮) | 78. 九霄(霄) | |

(摘自《咬文嚼字》2005 年第 6 期)