

文章编号:1000-0615(2009)06-0940-09

5.8S rDNA-ITS 区片段的序列分析 在坛紫菜种质鉴定中的应用

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

摘要:为探讨 DNA 序列标记技术在坛紫菜种质鉴定中的应用,对 10 个野生坛紫菜种质材料的 5.8S rDNA-ITS 区进行 PCR 扩增和序列分析,结果发现扩增的片段长度在 1 208 ~ 1 219 bp 之间,可以分为 ITS1 区,5.8S 区和 ITS2 区 3 个部分,其中 5.8S 区片段的长度完全一致,均为 160 bp;ITS1 区和 ITS2 区片段的长度也非常接近,只有几个碱基的差异。多重序列比对发现 10 个种质材料的 ITS 区(包括 ITS1 和 ITS2)序列都存在一定差异,序列同源性在 95.82% ~ 99.73% 之间,而 5.8S 区序列则完全一致,但与其它种紫菜的 5.8S 区序列有很大差异,序列同源性在 79.7% ~ 95.0% 之间。由此认为 5.8S rDNA-ITS 区这种高度保守区和高变区交替排列的形式可以成为坛紫菜种质鉴定及系统进化分析的强有力工具。

关键词:坛紫菜;5.8S rDNA;转录单元内间隔区;序列分析

中图分类号:S 963

文献标识码:A

紫菜(*Porphyra*)是重要的经济红藻,在海藻养殖业中占有重要的地位^[1]。坛紫菜(*P. haitanensis*)是我国紫菜栽培品种之一,原产于福建,20 世纪 70 年代后推广到浙江沿海,随后在福建、浙江等沿海地区被广泛养殖,其产量约占全国紫菜总产量的 75% 左右。坛紫菜养殖发展较快,但品种的提纯、复壮、种质改良等研究工作相对滞后,缺乏经过人工选育的、具有优良性状的新品种,阻碍了坛紫菜养殖业的健康持续发展^[2]。

杂交育种和选择育种是坛紫菜种质复壮和新品种培育的重要手段^[2],这两项技术的应用要求不断地从野生坛紫菜种群中选育性状优良的种质作为亲本,但由于福建沿海潮间带的岩石上交错分布有坛紫菜、长紫菜(*P. dentata*)等多种紫菜种群,并且由于这些紫菜的外形极为相似,很难从形态结构上进行区分,极易混淆,经常造成误采。随着基础研究的加强和生物技术的应用,紫菜育种和栽培技术得到了快速发展,新的栽培品系不断出现,新品种选育和产权保护的也需要也给紫菜的

种质鉴定提出了更高的要求,这就要求开发出一种简单快捷和准确的种质鉴定技术。尽管 DNA 指纹标记技术已经在紫菜和其它植物的种质鉴定中得到了广泛应用^[3-7],但是这类标记技术仍然存在着实验结果重复性较差,主观性高,不同实验室的研究数据难以共享等诸多问题^[8]。而以不同保守基因位点序列测定为基础的 DNA 序列标记则为这些问题的解决提供了很好的途径。

真核生物的 rRNA 基因(rDNA)是高度重复的串联序列单位,由 18S、5.8S 和 26S rDNA 联结组成一个转录单位,彼此被转录单元内间隔区(internal transcribed spacer, ITS)分开^[8]。由于该基因功能上的高度保守性和进化的时钟性,已经被越来越多地用于物种分类和遗传进化的研究,特别是介于 18S 和 26S 之间的 ITS 区序列由于具有进化速度快、长度不大、测序方便、在基因组不同单元间一致性好等特点,已被广泛用于探讨属内种间甚至种下个体间的遗传关系,在动物、高等植物、真菌以及藻类等中均已获得理想的结果。

收稿日期:2009-05-14 修回日期:2009-07-09

资助项目:国家自然科学基金(40676077,40806065);国家“八六三”高技术研究发展计划(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

目前 GenBank 数据库中已收录了数万种 rDNA 的全部或部分序列,积累了丰富的序列资料,可以为物种的系统进化及种质鉴定研究提供丰富而详实的资料^[9]。在国外,rDNA 序列也已经在紫菜的种质鉴定及系统进化研究中发挥了重要作用^[10-23],但目前国内利用该技术对大型海藻进行系统进化分析和种质鉴定的报导却很少,汪文俊等^[24]利用该技术对 6 个海带栽培品系进行了系统发生分析,谢潮添等^[25]比较了坛紫菜野生和栽培品系 5.8S rDNA-ITS 区的序列差异,并依此构建了 7 种 9 个品系紫菜的系统发育树。

本文对分离自福建沿海各地区的 10 个具优良性状的野生坛紫菜种质材料进行了 5.8S rDNA-ITS 区的序列测定,并通过和 GenBank 数

据库中公布的其它紫菜 rDNA 相应序列进行比较和分析,以探索坛紫菜种质鉴定的新方法。

1 材料与方法

1.1 材料

10 个具优良性状的野生坛紫菜种质材料是从福建沿海各地采集的野生坛紫菜样品中经提纯复壮和单个体细胞克隆的丝状体途径制备成纯系而得到(表 1)。实验所用生化试剂巯基乙醇、十六烷基三甲基溴化胺、氯仿、异戊醇、无水乙醇,氯化钙购置于上海生工生物工程技术有限公司,DNA 回收纯化试剂盒及 PMD18-T 载体购置于大连宝生物工程有限公司。

表 1 野生紫菜种质材料编号及采集地点

Tab.1 Number and collection site of germplasm materials of *P. haitanensis* analyzed in this study

编号 no.	采集地点 collection site	采集时间 collection time	编号 no.	采集地点 collection site	采集时间 collection time
DJ	平潭东甲岛 Dongjia island of Pintan	2005-12	CY	平潭草屿 Caoyu of Pintan	2005-12
JJS1	平潭将军山 Jiangjunshan of Pintan	2005-12	DD1	厦门大嶼 Dadeng island of Xiamen	2005-12
JJS2	平潭将军山 Jiangjunshan of Pintan	2005-12	DD2	厦门大嶼 Dadeng island of Xiamen	2005-11
JJS3	平潭将军山 Jiangjunshan of Pintan	2005-12	DS	漳州东山岛 Dongshan islang of Zhangzhou	2005-12
JJS4	平潭将军山 Jiangjunshan of Pintan	2005-12	NH1	平潭南海 Nanhai of Pintan	2005-12

1.2 DNA 制备

采用改良的 CTAB(十六烷基三甲基溴化胺)法进行坛紫菜纯系丝状体 DNA 的提取和纯化^[26],电泳检测所提取 DNA 的完整性,并在核酸蛋白紫外分析仪上测定 DNA 浓度。

1.3 5.8S rDNA 和 ITS 的 PCR 扩增和测序

特异性引物根据文献^[27]设计的引物对(a 和 b),由大连宝生物工程有限公司合成,具体序列及扩增位点如图 1 所示。25 μ L 的 PCR 反应体系中含 10 \times PCR buffer 2.5 μ L,DNA 模板 100 ng,0.2 mmol/L dNTPs,0.5 μ mol/L 引物,0.3 U *Taq* DNA 聚合酶。PCR 扩增程序为 95 $^{\circ}$ C 变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 变性 45 s,63 $^{\circ}$ C 退火 60 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 90 s,共进行 13 个循环,每个循环退火温度降低 1 $^{\circ}$ C,直至 50 $^{\circ}$ C;94 $^{\circ}$ C 变性 45 s,50 $^{\circ}$ C 退火 60 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 90 s,30 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 再延伸 10

min。扩增产物由大连宝生物工程有限公司测序。

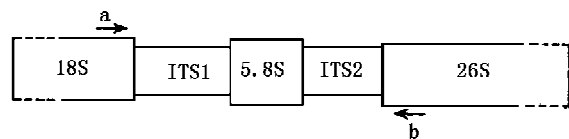


图 1 rDNA 的基本结构图及引物的靶区

Fig.1 The structure of rDNA and sites of primers

a = 5'-GGGATCCGTTTCCGTAGGTGAACCTGC-3'; b = 5'-GGGATCCATATGCTTAAGTTCAGCGGGT-3'

1.4 序列分析及系统树构建

利用 NCBI 服务器(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)上的 Blast 软件对测序结果进行同源性检测,确定所克隆序列中各段 rDNA 和 ITS 序列的边界及长度,最后将所克隆的序列输送到

GenBank 数据库中。

利用 Dnaman 软件进行多重序列比对,并根据最大简约法(maximum parsimony, MP),利用 Mega 4 软件构建这些紫菜品系的系统发育树,分析时所用参数均为各软件默认值,并采用

Bootstrapping 法对所构建的系统发育树进行评估。

由 Genbank 数据库下载的 4 种紫菜的 5.8S 序列(表 2)也参与了 5.8S 区的多重序列比对及系统发育树的构建。

表 2 下载的紫菜 5.8 S 区片段信息

Tab. 2 The detail of the downloaded 5.8 S region of *Porphyra*

品种 species	收录号 Gi.	片段长度 sequence length	参考文献 references
<i>P. dreviana</i>	AY766365	160	Milstein, et al. [17]
<i>P. umbilicalis</i>	AY322146	163	Unpublished
<i>P. suborbiculata</i>	AF378665	158	Broom, et al. [10]
<i>P. yezoensis</i>	AY368576	153	Hu, et al. [12]

2 结果与分析

2.1 5.8S rDNA-ITS 区片段的 PCR 扩增

通过 PCR 扩增,从各个野生坛紫菜种质材料中扩增出了一条大小均一的 DNA 片段,约为 1 200 bp(图 2)。

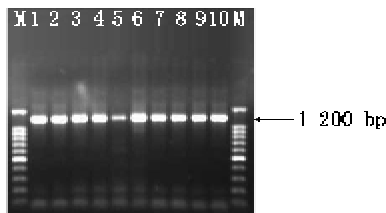


图 2 PCR 扩增产物 DNA 片段电泳图

Fig. 2 PCR profile of the ITS1-5.8S-ITS2 regions for 10 germplasm materials of *P. haitanensis*

1: DJ; 2: JJS1; 3: JJS2; 4: JJS3; 5: JJS4; 6: CY; 7: DD1; 8: DD2; 9: DS; 10: NH1; M: Marker

2.2 5.8S rDNA-ITS 区片段的序列分析

Blast 同源性分析结果表明所克隆 rDNA 片段可以分为 ITS1 区, 5.8S 区和 ITS2 区 3 个部分, 而且 10 个坛紫菜种质材料 rDNA 的各区段边界是一致的(图 3), 5.8S 区两端分别有一段 polyA 和 polyT 序列。各材料 rDNA 序列各区段的长度见表 3, 从表中可以看出各种质材料 rDNA 片段序列全长都在 1 208 ~ 1 219 bp 之间, 5.8S 区片段的长度完全一致, 均为 160 bp; ITS1 区和 ITS2 区片段的长度也非常接近, 均在 368 bp 和 688 bp 左右, 只有几个碱基的差异。进一步从整

个 rDNA 片段的碱基组成上来看, 10 个坛紫菜样品的碱基组成也基本一致。所克隆的 10 个序列片段已提交到 GenBank 数据库中, 收录号如表 3 所示。

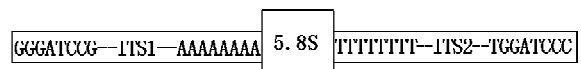


图 3 坛紫菜 ITS1-5.8S-ITS2 区的序列结构

Fig. 3 Structure and boundary of each park of ITS1-5.8S-ITS2 region of *P. haitanensis*

2.3 5.8S rDNA-ITS 区片段的多序列比对

通过 DNAMAN 软件对 10 个坛紫菜种质材料 ITS1 区(371 bp)进行多重序列比对, 结果(表 4)发现 ITS1 区序列完全不同, 即使是来源于同一采集地点的两个材料间序列也各不相同, 序列同源性在 97.28% ~ 99.73% 之间(表 5)。其中 JJS2 和 DS, JJS1 和 JJS2, JJS2 和 NH1 之间的序列同源性最高, 分别只有一个碱基的差异, 而 DD1 和 JJS4 两个材料间的序列同源性最低, 在 10 个碱基位置上存在差异。

同样的, 通过 DNAMAN 软件对 10 个坛紫菜种质材料 ITS2 区(694 bp)进行的多重序列比对结果(表 6)也表明 ITS2 区序列完全不同, 序列同源性在 95.82% ~ 99.13% 之间(表 5)。其中 JJS1 和 NH1 之间的序列同源性最高, 只在 6 个碱基位置上存在差异, 而 DS 和 DJ 两个材料间的序列同源性最低, 在 29 个碱基位置上存在差异。

表 3 野生坛紫菜种质材料 rDNA 片段的序列分析结果

Tab.3 Detail of ITS1-5.8S-ITS2 region of 10 germplasm materials of *P. haitanensis*

编号 no.	收录号 Gi.	序列全长(bp) sequence length	序列中各碱基数 based components				ITS1 片段长度 sequence length of ITS1	5.8S 片段长度 sequence length of 5.8S	ITS2 片段长度 sequence length of ITS2
			A	C	G	T			
DJ	FJ217794	1219	303	295	313	308	371	160	688
JJS1	FJ217795	1214	305	290	310	309	369	160	685
JJS2	FJ217796	1217	303	292	310	312	368	160	689
JJS3	FJ217797	1221	304	289	313	315	368	160	693
JJS4	FJ217798	1214	304	290	307	313	365	160	689
CY	FJ217789	1208	302	289	306	311	364	160	684
DD1	FJ217790	1212	301	291	311	309	367	160	685
DD2	FJ217791	1216	303	291	311	311	368	160	688
DS	FJ217792	1215	302	291	312	310	368	160	687
NH1	FJ217793	1216	303	290	311	312	370	160	686

表 4 10 个坛紫菜种质材料 ITS1 区(371 bp)序列变异位点

Tab.4 Variable nucleotide positions of ITS1 region (371 bp) of 10 germplasm materials of *P. haitanensis* by compressing alignments

变异位置 variance position	27	49	83	127	128	164	200	204	224	231	233	245	289	307	353	368	369	370	371
碱基类型 base type	G	T	A	T	-	C	G	G	G	A	A	A	C	-	A	A	A	-	-
CY			-	-		T				-	C		T					-	
DD1						T				-	C	G							
DD2			C													T			
DJ	T				T					-								A	A
DS														G					
JJS1																			A
JJS2																			
JJS3			-		T														
JJS4			-				A	A	A						-	-			
NH1					T														A

注:“-”表示碱基缺失

Notes:“-”shows base deletion

表 5 10 个坛紫菜种质材料 ITS1 区(对角线下方)和 ITS2 区(对角线上方)的序列同源性

Tab.5 Sequence homology of ITS1 (below diagonal) and ITS2 (above diagonal) of 10 germplasm materials of *P. haitanensis*

	CY	DD1	DD2	DJ	DS	JJS1	JJS2	JJS3	JJS4	NH1
CY		98.40	98.11	97.25	96.96	97.67	97.97	97.11	97.97	97.96
DD1	98.64		98.26	97.54	97.24	98.40	97.83	96.69	97.39	98.40
DD2	97.55	98.37		97.54	97.54	98.69	98.70	97.84	98.55	98.98
DJ	97.04	97.84	98.38		95.82	97.40	97.69	97.40	96.40	97.68
DS	98.10	98.91	98.92	98.39		97.39	97.97	96.83	97.25	97.53
JJS1	97.83	98.64	99.19	99.19	99.19		98.55	97.12	97.54	99.13
JJS2	98.10	98.91	99.46	98.92	99.46	99.73		98.27	98.41	98.84
JJS3	98.10	98.37	98.92	98.92	98.92	99.19	99.46		98.13	97.41
JJS4	97.54	97.28	97.83	97.30	97.83	98.10	98.37	98.37		97.83
NH1	97.30	98.11	98.65	99.73	98.65	99.46	99.19	99.19	97.57	

表6 10个坛紫菜种质材料ITS2区(694 bp)序列变异位点
 Tab.6 Variable nucleotide positions of ITS2 region (694 bp) of 10 germplasm materials of *P. haitanensis* by compressing alignments

变异位置 variance position	0	6	40	66	85	114	143	166	173	225	245	260	264	265	281	301	316	335
碱基类型 base type	T	T	A	T	G	C	A	A	A	T	T	T	C	G	T	G	A	A
CY	-				-								G	C		A		
DD1	-	C					G					C	G	C				
DD2								G										
DJ									G	-		C	G	C	C			
DS			G			T					G							
JJS1				C														
JJS2																		
JJS3																		
JJS4	-																	
NH1																	G	G
变异位置 variance position	356	359	378	381	401	405	406	422	423	427	432	433	476	499	503	504	516	569
碱基类型 base type	C	G	C	G	C	T	T	A	C	C	-	-	-	G	G	G	T	G
CY		A				A		G		T								A
DD1						A												
DD2					G													
DJ							G											
DS						A					T	T	G			A		
JJS1			-				G											
JJS2							G				T	T	G					
JJS3			A	G				G	T		T	T	G		A		A	
JJS4	T			G				G	T		T	T	G	C				
NH1																		
变异位置 variance position	579	580	598	599	600	601	605	606	671	673	676	677	678	684	687	691	694	
碱基类型 base type	A	-	-	-	-	-	A	C	G	T	A	C	T	A	T	T	C	
CY	-																	
DD1								T									-	
DD2		A																
DJ	-		C	G	G	G									-	A		
DS						C					-	-	C		C	-		
JJS1									T								-	
JJS2	-									C								
JJS3	-		C	G	G	G												
JJS4		A																
NH1								T		-								

注：“-”表示碱基缺失
 Notes:“-”shows base deletion

但是,10个坛紫菜种质材料5.8S区(160 bp)的多重序列比对结果却发现5.8S区序列完全相同,没有发现碱基变异位点。但与其它紫菜材料的5.8S区进行的多序列比对结果却发现,尽管不同紫菜品种间5.8S区在长度上差异不大

(表2),但序列组成上却存在较大差异(表2,表7),序列同源性最高为95%(*P. haitanensis*和*P. yezoensis*),最低只有79.7%(*P. suborbiculata*和*P. yezoensis*)。

表 7 紫菜 5.8S 区序列的同源性
Tab.7 Sequence homology of 5.8S of *Porphyra*

	<i>P. haitanensis</i>	<i>P. drewiana</i>	<i>P. suborbiculata</i>	<i>P. umbilicalis</i>	<i>P. yezoensis</i>
<i>P. haitanensis</i>					
<i>P. drewiana</i>	91.3				
<i>P. suborbiculata</i>	89.9	87.3			
<i>P. umbilicalis</i>	86.8	86.8	85.4		
<i>P. yezoensis</i>	95.0	92.4	79.7	90.7	

2.4 紫菜系统发育树的构建

基于 MP 法构建的 10 个坛紫菜种质材料 ITS 区(包括 ITS1 区和 ITS2 区)的系统发育树如图 4 所示。由图中可以看出,通过对 ITS 区进行系统发育树分析,可以将 10 个坛紫菜种质材料明显地分为 5 个分枝,CY,DD1,DS 和 DJ 4 个材料为一枝,DD2,JJS3 和 JJS4 3 个材料为一枝,剩下的 JJS2,JJS1 和 NH1 则个为一枝。而基于 MP 法构建的 5 种紫菜 5.8S 区的系统发育树(图 5)也能很好地将这 5 种紫菜分为 5 枝,各为一枝。图中 Bootstrap 值大部分都大于 70,说明所构建的系统发育树是比较可靠的。

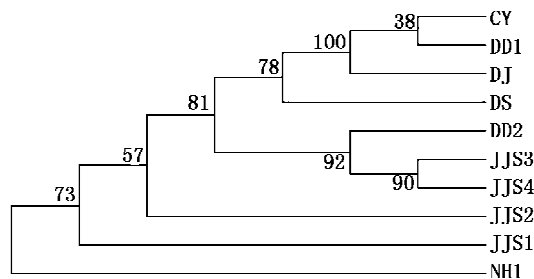


图 4 基于 MP 法构建的 10 个坛紫菜种质材料 ITS 区的系统发育树

Fig.4 Cladogram based on ITS sequences by MP methods

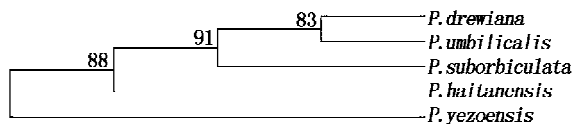


图 5 基于 MP 法构建的 5 种紫菜 5.8S 区的系统发育树

Fig.5 Cladogram based on 5.8S sequences by MP methods

3 讨论

紫菜广泛分布于从寒带到亚热带的潮间带水域,据不完全统计世界上约有 130 种,大约有 19

种分布在我国^[1]。由于紫菜的形态特征比较简单,可用于种质鉴定的特征有限,而且大多数形态性状易受环境因素影响,因此紫菜种质鉴定尚处于低级阶段,准确的鉴定工作非常困难。而且近年来,随着生物技术在紫菜育种中的广泛应用,新的栽培品系不断出现,良种化栽培及产权保护的也需要也给紫菜的种质鉴定提出了更高的要求。DNA 序列标记是通过从构成遗传信息的碱基水平的差异来揭示属内种间甚至种内不同个体间的分类关系,测序数据客观可靠,且上传到公共数据库后,可以方便地实现不同实验室间的数据共享,因此 DNA 序列标记越来越受到各国学者的重视,已经被广泛应用于植物的种质鉴定及系统进化分析中^[8]。众多紫菜研究结果^[10-23]也已经证实紫菜 *rRNA* 基因是由序列保守区和序列高变区交替构成的,而这种序列保守区和高变区交替的组合形式就为紫菜的种质鉴定及系统进化分析提供了极大便利,可以通过序列保守区的序列测定来进行紫菜种以上水平的系统分类及进化分析,而高变区的序列特征又可以用来进行种下水平个体间的系统分类。

但以往大部分的研究都是通过对 rDNA 中的小亚基(SSU rRNA)和 ITS1 区进行序列测定来进行紫菜的种质鉴定和系统进化分析的,由于核糖体小亚基基因中包含有外显子及数目不等的内含子^[15],序列较长(大多超过 2 000 bp),PCR 扩增及序列分析较为繁琐,不太适合进行一般栽培品系间的系统分类。由此,本文依据 rDNA 的结构特征,对 10 个坛紫菜种质材料 rDNA 中的 ITS1-5.8S-ITS2 区进行了 PCR 扩增和序列测定,并通过多重序列比对发现坛紫菜 rDNA 中的 ITS 区序列都存在一定差异(表 4,表 6),序列同源性在 95.82%~99.73% 之间(表 5),即使是采集自同一地点的不同材料(DD1 和 DD2;JJS1, JJS2, JJS3 和 JJS4),其序列组成也不一致,这与前人的

研究结果是一致的^[13,20-21],由此认为可以通过对 ITS 区的序列差异来对不同的坛紫菜材料进行种质分类,并且根据系统进化分析可以很容易判断出不同坛紫菜材料的亲缘关系。而对坛紫菜不同种质材料 5.8S 区进行的多重序列比对结果却发现序列完全一致,但与其他紫菜的 5.8S 区序列却存在着较大差异,序列同源性在 79.7%~95% 之间。由此可见紫菜的 5.8S 区序列表现为种以下水平的保守性,不同品种之间却存在着较大差异,因此可以利用紫菜的 5.8S 区序列来进行种以上水平的系统分类和遗传进化分析。而且由于 5.8S rDNA-ITS 区序列长度通常较短(1 200 bp 左右),在 PCR 扩增及序列分析上都较 SSU rDNA-ITS1 区方便,因此 5.8S rDNA-ITS 区的序列分析可以作为紫菜种质鉴定及系统进化分析的强有力工具。

参考文献:

- [1] 张学成,秦松,马家海,等. 海藻遗传学[M]. 北京:中国农业出版社,2005:184-185.
- [2] 陈昌生,徐燕,纪德华,等. 坛紫菜品系间杂交藻体选育及经济性状的初步研究[J]. 水产学报,2007,31(1):97-104.
- [3] 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,合肥:中国作物学会,2003:416-422.
- [4] 徐涂,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.
- [5] 杨锐,刘必谦,骆其君,等. 利用 AFLP 技术研究条纹紫菜的遗传变异[J]. 海洋学报,2005,27(3):159-162.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] 王建波,张文驹,陈家宽. 核 rDNA 的 ITS 序列在被子植物系统与进化研究中的应用[J]. 植物分类学报,1999,37(4):407-416.
- [9] 李玉泉,何平,邓洪平,等. rDNA 片段序列分析技术及其在植物系统与进化研究中的应用[J]. 西南师范大学学报(自然科学版),2005,30(1):145-149.
- [10] Broom J E, Nelson W A, Yarish C, et al. A reassessment of the taxonomic status of *Porphyra suborbiculata* Kjellm, *Porphyra carolinensis* Coll et J. Cox and *Porphyra lilliputiana* W. A. Nelson, G. A. Knight et M. W. Hawkes (Bangiales, Rhodophyta) based on molecular and morphological data[J]. Eur J Phycol, 2002, 37: 227-236.
- [11] Bloom J E, Jones W A, Hill D F, et al. Species recognition in few Zealand *Porphyra* using 18 S rDNA sequencing [J]. Journal of Applied Phycology, 1999, 11: 421-428.
- [12] Hu Z M, He Y J, Duan D L. Molecular identification of Chinese cultivated *Porphyra* (Bangiaceae, Rhodophyta) based on the rDNA internal transcribed spacer-1 sequence and random amplified polymorphic DNA markers [J]. Marine Biology Research, 2007, 3(1): 20-28.
- [13] Kunimoto M, Kito H, Mizukumi Y, et al. Molecular features of a defined genetic marker for the determination of the *Porphyra tenera* lineage [J]. Journal of Applied Phycology, 2003, 15: 337-343.
- [14] Kunimoto M, Kito H, Cheney D P, et al. Discrimination of *Porphyra* species based on small subunit ribosomal RNA gene sequence [J]. J Appl Phycol, 1999, 11: 203-209.
- [15] Kunimoto M, Kito H, Kaminishi Y, et al. Molecular divergence of the ssu rRNA gene and internal transcribed spacer-1 in *Porphyra yezoensis* (Rhodophyta) [J]. J Appl Phycol, 1999, 11: 211-216.
- [16] Lindstrom S C, Fredericq S. *rbcL* gene sequences reveal relationships among north-east Pacific species of *Porphyra* (Bangiales, Rhodophyta) and a new species, *P. aestivalis* [J]. Phycol Res, 2003, 51: 211-224.
- [17] Milstein D, Oliveira M C. Molecular phylogeny of Bangiales (Rhodophyta) based on small subunit rDNA sequencing: emphasis on Brazilian *Porphyra* species [J]. Phycologia, 2005, 44 (2), 212-221.
- [18] Niwa K, Aruga Y. Rapid DNA extraction from conchocelis and ITS-1 rDNA sequences of seven strains of cultivated *Porphyra yezoensis* (Bangiales, Rhodophyta) [J]. J Appl Phycol, 2003, 15:29-35.
- [19] Niwa K, Kikuchi N, Lwabuchi M, et al. Morphological and AFLP variation of *Porphyra yezoensis*

- Ueda form, *narawaensis* Miura (Bangiales, Rhodophyta) [J]. *Phycol Res*, 2004, 52, 180 – 190.
- [20] Niwa K, Kobiyama A, Aruga Y. Confirmation of cultivated *Porphyra tenera* (Bangiales, Rhodophyta) by polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism analyses of the plastid and nuclear DNA [J]. *Phycol Res*, 2005, 53: 296 – 302.
- [21] Niwa K, Kikuchi N, Aruga Y. Morphological and molecular analysis of the endangered species *Porphyra tenera* (Bangiales, Rhodophyta) [J]. *J Phycol*, 2005, 41: 294 – 304.
- [22] Niwa K, Kato A, Kobiyama A, *et al.* Comparative study of wild and cultivated *Porphyra yezoensis* (Bangiales, Rhodophyta) based on molecular and morphological data [J]. *J Appl Phycol*, 2008, 20: 261 – 270.
- [23] Niwa K, Furuita H, Yamamoto T, *et al.* Identification and characterization of a green-type mutant of *Porphyra tenera* Kjellman var. *tamatsuensis* Miura (Bangiales, Rhodophyta) [J]. *Aquaculture*, 2008, 274: 126 – 131.
- [24] 汪文俊,王广策,张宝玉,等. 海带栽培品系和长海带 ITS 区的 PCR 扩增及序列分析 [J]. *高技术通讯*, 2005, 15(4): 95 – 101.
- [25] 谢潮添,陈昌生,纪德华,等. 坛紫菜 5.8S rDNA 和 ITS 区片段的序列分析及应用 [J]. *高技术通讯*, 2007, 17(5): 540 – 545.
- [26] 克拉拉克. 植物分子生物学实验手册 [M]. 顾红雅,译. 北京: 高等教育出版社, 1997: 153 – 162.
- [27] Oliveira M C, Ragan M A. Variant forms of a group I intron in nuclear small-subunit rRNA genes of the marine red alga *Porphyra spiralis* var. *amplifolia* [J]. *Mol Biol Evol*, 1994, 11: 195 – 207.

欢迎订阅 2010 年《水产学报》

《水产学报》是由中国科协主管、中国水产学会主办、上海海洋大学承办、科学出版社出版的以反映我国水产科学技术成果为主的学术类核心期刊(中国科学引文数据库 CSCD 核心库和中信所核心库), 1964 年创刊,是中国水产界历史最为悠久的刊物之一。2002 – 2009 年连续荣获“百种中国杰出科技期刊”称号,2006 – 2008 年获得中国科协“精品期刊工程项目(C类)”资助,2009 年获得中国科协“精品科技期刊示范项目(B类)”资助。

本刊主要刊载水产基础研究、水产养殖和增殖、水产品病害防治、渔业水域环境保护、渔业资源与管理、水产品保鲜加工与综合利用等方面的研究论文、研究简报和综述。

为了不断扩增学报刊载信息量,提高论文时效性,《水产学报》将于 2010 年起由双月刊变更为月刊,每期 180 页,每期订价 49.00 元,全年订价 588.00 元。国内统一刊号:CN 31 – 1283/S,国际标准刊号:ISSN 1000 – 0615,国内邮发代号:4 – 297,国外发行代号:Q – 387。读者可在当地邮局办理订阅,破季、漏订或补订均可直接与编辑部联系。个人订户可享受 6 折优惠。

编辑部地址:上海市临港新城沪城环路 999 号 201 信箱

邮政编码:201306

联系人:张美琼

联系电话与传真:021 – 61900227

E-mail: mqzhang@shou.edu.cn; jfc@shou.edu.cn

Website: www.scxuebao.cn

Sequence analysis and application of 5.8S rDNA -ITS regions of *Porphyra haitanensis*

ZHAO Ling-min, XIE Chao-tian, CHEN Chang-sheng, JI De-hua
(College of Fisheries, Jimei University, Xiamen 361021, China)

Abstract: *Porphyra haitanensis* is an important economic marine crop, and has been widely cultivated along the coasts of South China. The correct identification of species or forma of *Porphyra* is necessary for ensuring the well-bred cultivation and the quality of production. However, as the gametophytic blade of *Porphyra* is morphologically simple and marked variations occur as environmental conditions change, it is very difficult to identify the species or forma of *Porphyra* based only on their morphological characteristics. In order to find a new way to discriminate the forma of *P. haitanensis*, the internal transcribed spacer (ITS) regions of nuclear ribosomal DNA (including 5.8S rDNA) of 10 germplasm materials of wild-type *P. haitanensis* were amplified and sequence analyzed by NCBI blast. The sequence length of the amplified fragments that ranged from 1 208 bp to 1 219 bp, can be divided into ITS1, 5.8S and ITS2 three regions. The 5.8S rDNA region of the 10 materials was of an identical size, 160 bp. The ITS1 and ITS2 regions varied slightly by two or three bps. By multiple sequences alignment, the result showed that the sequences of ITS region (including ITS1 and ITS2) of the 10 materials are different from each other and identical sequence pair was not found among these strains, sequence homology was 95.82% –99.73%, so it is easy to discriminate 10 germplasm materials of *P. haitanensis* by comparing the sequences of their ITS regions. And the sequences of 5.8S region of the 10 materials are identical, but difference with other *Porphyra* species, sequences homology was 79.7% –95.0%, so the sequences of 5.8S rDNA can be used to discriminate the species of *Porphyra*. In other words, the sequence of 5.8S rDNA -ITS region of *P. haitanensis* was alternate array by conservative region and high variational region, and the mode of sequence array of 5.8S rDNA-ITS regions can be a powerful tool in variety identification of *P. haitanensis*. The phylogenetic analyses based on these data also support the results.

Key words: *Porphyra haitanensis*; 5.8S rDNA; internal transcribed spacer; sequence analysis