

基于 SCAR 标记的坛紫菜“闽丰 1 号” 多重 PCR 鉴定技术的建立

王 婷, 徐 燕, 谢潮添, 纪德华, 陈昌生*

(集美大学水产学院, 福建 厦门 361021)

摘要: 为建立坛紫菜“闽丰 1 号”(Z-26)品系的种质分子鉴定方法,采用 300 条 RAPD 引物对 6 个坛紫菜纯系进行标记扫描,从中筛选出“Z-26”品系的特异性随机扩增多态 DNA (RAPD) 标记 9 个,经克隆和测序,其中两个特异性标记成功转化为特异 SCAR 标记(Z26-600 和 Z26-360),标记片段大小分别为 530 bp 和 242 bp。并进一步通过 4 个不同实验验证,确定 Z26-600 和 Z26-360 两个标记是坛紫菜“Z-26”品系的特异和稳定性标记。最后为进一步简化种质鉴定程序,建立更为便捷和准确的种质鉴定方法,经过条件优化,以此两个标记为基础建立了坛紫菜“Z-26”品系的多重 PCR 鉴定方法,该方法可以在一次 PCR 反应中同时鉴定两个特异性标记。

关键词: 坛紫菜; 随机扩增多态 DNA(RAPD); 序列特异扩增区域(SCAR); 多重 PCR

中图分类号: S 917.3

文献标志码: A

坛紫菜(*Porphyra haitanensis*)是我国特有的暖温带性种类,其产量约占全国紫菜总产量的 80%,创造了可观的经济效益^[1]。近年来,基础研究的加强和生物技术的应用,带动了坛紫菜育种和栽培技术的快速发展,多个各具优良性状的坛紫菜新品系已在生产上进行了规模化中试^[2-8]。“闽丰 1 号”(Z-26)是集美大学坛紫菜种质改良及应用实验室选育出来的具有明显耐高温、高产等优良性状的坛紫菜新品系,已连续多年在生产上中试应用,生产性状经历了海区生产验证,深受养殖户的好评^[2]。

由于坛紫菜的形态性状易受环境因素影响,且可描述的特征有限,传统的依赖于形态特征的种质鉴定非常困难,品种经常混淆,一些栽培品系仍为未经选育的野生种,栽培上无法实现良种化,生产效益受到了极大影响,近年来多次发生由于种质退化原因造成的减产甚至绝收事件。这就要求在选育坛紫菜优良品系的同时,尽快发展新型的种质鉴定技术以避免种质混淆,保证坛紫菜栽

培的良种化。DNA 分子标记技术的出现为这一问题的解决带来了契机,它直接在 DNA 水平标记检测基因组的遗传变异,不受发育时期和环境因素的影响,数量丰富且多态性好,已经广泛应用于高等植物的种质鉴定中^[9]。

分子标记技术在紫菜种质鉴定中的应用也已经有了一些报导,贾建航等^[10]利用来自两个 RAPD 引物扩增的 8 条多态性条带构建了 15 个紫菜无性系的 DNA 指纹图谱;石金锋等^[11-12]报导了 8 个可以有效对紫菜无性系进行特异性鉴定的 RAPD 标记,并将其中 2 个标记把它们转换成生产上便于应用的序列特异扩增区域(sequence characterized amplified region, SCAR)标记;谢潮添等^[13]采用 SSR 标记构建了 44 个坛紫菜种质材料的 DNA 指纹图谱,并转化成了可用于种质自动化鉴定的数码指纹;也有研究分别采用 RAPD、AFLP 和 SRAP 标记技术构建紫菜品系的 DNA 指纹图谱,并将这些指纹图谱应用于紫菜的种质鉴定中^[14-16]。

收稿日期:2012-06-05 修回日期:2013-03-05

资助项目:国家自然科学基金项目(41176151,41276177);公益性行业(农业)科研专项(200903030);海洋公益性行业科研专项(201105008,201105023);福建省杰出青年基金项目(2010J06016);福建省教育厅新世纪优秀人才项目(JA10186)

通信作者:陈昌生, E-mail:cschen@jmu.edu.cn

SCAR 标记是在 RAPD 标记技术的基础上发展起来的一种基于 PCR 技术的单基因位点多态性遗传标记,具有快速、简便、重复性好和成本低廉等优点,适用于大量样品的快速鉴定和分析,已被广泛用于种质鉴定、标记辅助选择和遗传图谱构建中^[9]。而多重 PCR 技术则是指在同一个反应体系中进行多个目的片段扩增的 PCR 技术,具有高效性、系统性和经济简便性等优点^[17],自 1988 年由 Chamberlain 等^[18]首次提出以来,已经在动植物的分子标记扩增中得到了广泛的运用,但其在大型海藻中尚未见相关报导。

本研究采用 RAPD 分子标记技术筛选坛紫菜“闽丰 1 号”的特异扩增片段,并将其转化为特异 SCAR 标记,同时应用多重 PCR 技术构建基于 SCAR 标记的坛紫菜“闽丰 1 号”快速鉴定技术,以为坛紫菜栽培种质的鉴定提供快速、便捷和准确的技术方法。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

供试的坛紫菜 6 个纯系(Z-26、Z-17、Q-1、9-IV、Z-61、8-I)和 28 个坛紫菜种质品系均来自于福建省坛紫菜种质资源库。培养条件为(21 ± 1)℃,光照强度为 50 ~ 60 μmol/(m² · s),光周期为 12 h(光):12 h(暗)。

1.2 实验方法

DNA 提取 收集培养液中培养的各品系叶状体或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^[19]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。

RAPD 特异扩增片段筛选 以坛紫菜 6 个纯系(Z-26、Z-17、Q-1、9-IV、Z-61、8-I)叶状体 DNA 为模板,分别采用 300 条(S1 ~ S300)10 碱基的 RAPD 随机引物[生工生物工程技术(上海)有限公司]进行特异性扩增片段筛选。RAPD 扩增反应体系为 10 × PCR buffer 2.0 μL, 2.5 mmol/L dNTP 1.0 μL, 10 μmol/L RAPD 引物 1.0 μL, 25 mmol/L MgCl₂ 1.0 μL, 5 U/μL Taq DNA 聚合酶 0.3 μL, 5 ng/μL 模板 DNA 2.0 μL,最后加无菌 ddH₂O 至反应体系总体积为 20

μL。RAPD 扩增的反应程序为 95 °C 预变性 5 min;95 °C 变性 30 s,37 °C 复性 50 s,72 °C 延伸 1 min,以上 3 步重复 40 个循环;72 °C 延伸 10 min。

RAPD 扩增结束后,取 7 μL 扩增产物,加 3 μL 溴酚蓝后于 1.2% 的琼脂糖凝胶中电泳 1.5 h 后,在紫外灯下观察电泳结果,并拍照。

特异扩增片段的回收、克隆和测序 将 RAPD 特异性扩增片段用琼脂糖凝胶回收试剂盒(Tiagen)切胶回收后,与 pGEM-T Easy 载体(Promega)连接,并转化至 *E. coli* DH5α 感受态细胞,培养细菌并提取质粒后用 M13 通用引物进行阳性克隆检测,然后将含有目的片段的重组质粒 DNA 送往大连宝生物工程有限公司测序。

SCAR 标记引物设计 将测序获得的 DNA 序列去除载体序列后,应用 Primer Premier 5.0 软件进行 SCAR 标记引物的设计,并用 Oligo 6.0 软件进行引物评价,同时在 NCBI 数据库上用 Primer BLAST 验证引物的特异性,最后选定的引物由生工生物工程技术服务(上海)有限公司合成。

SCAR 标记的验证 为验证所设计 SCAR 标记引物的特异性和稳定性,进行了 4 个不同的验证实验:(1)验证 SCAR 标记在 6 个坛紫菜纯系中的特异性;(2)验证 SCAR 标记引物在 28 个坛紫菜种质品系(含 Z-26 的父本和母本)中的特异性;(3)验证 SCAR 标记在 Z-26 F₂ ~ F₄ 叶状体和 F₂ ~ F₅ 丝状体中的稳定性;(4)验证 SCAR 标记在随机选取的 Z-26 34 个叶状体个体中的稳定性。

SCAR 标记验证的 PCR 反应体系为 10 × PCR buffer 2.0 μL, 2.5 mmol/L dNTP 1.0 μL, 10 μmol/L SCAR 正反向引物各 0.5 μL, 5 U/μL Taq DNA 聚合酶 0.3 μL, 5 ng/μL 模板 DNA 2.0 μL,最后加无菌 ddH₂O 至反应体系总体积为 20 μL。PCR 反应程序为 95 °C 预变性 5 min;95 °C 变性 30 s,复性(温度依 SCAR 引物不同而不同)50 s,72 °C 延伸 1 min,以上 3 步重复 30 个循环;72 °C 延伸 10 min。扩增结束后于 1.2% 的琼脂糖凝胶中进行电泳检测。

多重 PCR 扩增 将经过验证的两对特异 SCAR 标记引物加入同一反应体系中,对反应体系、引物浓度、退火温度、延伸时间和循环数等进行优化,以建立基于 SCAR 标记的坛紫菜 Z-26 多重 PCR 鉴定技术。

2 结果

2.1 Z-26 RAPD 特异扩增片段的筛选、克隆及测序

为筛选出坛紫菜“Z-26”品系的特异性标记,以6个遗传背景不同的坛紫菜纯系叶状体DNA为模板,300条RAPD引物进行筛选,结果从中筛选出在“Z-26”品系中特异性扩增的RAPD标记9

个,图1为引物S249和S250在“Z-26”中分别扩增出的特异性标记,标记长度分别为600 bp和360 bp左右(图1),分别命名为Z26-600和Z26-360。这两条特异性标记经过切胶回收、转化、克隆、测序和引物设计,最终成功转化为SCAR标记,DNA序列如图2和图3所示。而其余7个特异性标记由于各种原因未能转化为SCAR标记。

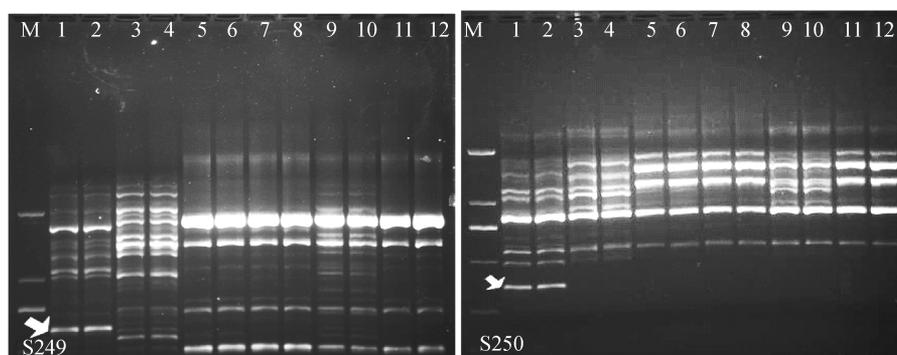


图1 S249和S250 RAPD引物在坛紫菜6个纯系中的扩增结果

Fig. 1 RAPD amplification of 6 pure lines of *P. haitanensis* by primer S249 and S250

M. D2000 marker; 1-2. Z-26; 3-4. z-17; 5-6. Q-1; 7-8. 9-IV; 9-10. z-61; 11-12. 8-I

```

1 CCACATCGGT TAATGTTCC TTCGGTTTAA TGGTATCATT ACTTACCGAG TCTACTTCTT
61 TTCAGGAAT AGTAAACACC TCGTTAGGTG AGATCTCAAT CACATCAACT TCAGTTTCAG
121 TAGGTGTAAT GGTCTTATTA ACAGGAGGTA ATTCTTGTA AAAACAAAA ATGTTAATAA
181 ACAATGTCAA AATTGTTATT AAAAGAATAT GTCTCTTGT GCTATACAAC CGCTTAAATT
241 CTATTTTGT AATACTTGG TCTAGTTTT GACGGTCAA ACATACATA TATTTTTGG
301 GGAGATTAA TTTTGCAAA AATTTAAATG ATAAAATGC GTTAAATAAT ATTACAATAT
361 GAAAGCTAAA GTTTTAGTTT TATTAGGATT TCTTTTCATC ACATTTTAT TGATGTCTT
421 TCAAAAAGAA GAGCGCAGCA ATAAGTTGT GGTGGTTTTA GATGCTGGTC ATGGTGAAAA
481 AGATCCTGGA AATCTTGGTA ATAATTTAA AGAAAAAGAC ATTGCACTTA AAATAGTATT
541 AGCAGTAGGT AAGGAGTTAG AGAAAAATCC GAACTTAAAG GTAATCTATA CTAGAAAAAC
601 CGATGTGG
  
```

图2 Z26-600的DNA序列

方框内为RAPD引物,下划线部分为SCAR标记引物。

Fig. 2 DNA sequence of Z26-600

Inside the box is the sequence of RAPD primers, the underlined is the sequence of SCAR primers.

```

1 ACCTCGGCAC TAAAAATATT TAATATCTCT CGTGCTACCT ACGAGAATTA TAGAGCAATC
61 GTTATCCATA AGTGCGAACA ATCGTATTTT AAATGGTGTA CCAAACGATT TCCCAATCAG
121 CTCCCTCTCT CTGAGGTGA AATCATTAAA CAGTACTTAA GTAATGAATG TTATCGTTTT
181 TGGTCTAAGT CTCAATATT TCTTATGGCT GTTAGAGATG GTAACTAGC TTGCTCCTTA
241 TCTACCTTTT ATAATTATGC TCGATTACTA GGCTTTGAAA ATAGAAAAAA CAAGCGAAAA
301 TCTGATAATT ACAATGCATT AAAAACATCT AAACCAATC AAATATGGTG TGCCGAGGT
  
```

图3 Z26-600的DNA序列

方框内为RAPD引物,下划线部分为SCAR标记引物。

Fig. 3 DNA sequence of Z26-600

Inside the box is the sequence of RAPD primers, the underlined is the sequence of SCAR primers.

2.2 SCAR 标记的转化和验证

根据 DNA 序列,通过软件分别设计成功一对特异 SCAR 标记引物(表 1)。为验证 SCAR 标记引物的特异性和稳定性,进行了 4 个不同的验

证实验。首先,验证 SCAR 标记在 6 个坛紫菜纯系中的特异性,其中两对 SCAR 标记引物均只在 Z-26 处分别扩增出一条预期大小的特异性条带,其它品系均没有扩增条带出现(图 4)。

表 1 Z-26 的特异 SCAR 标记
Tab.1 Specific SCAR markers of Z-26

标记名称 marker name	引物序列(5'-3') primer sequence	扩增片段长度/bp amplification product size	退火温度/℃ annealing temperature
Z26-600	F:TTTTTCAGGAATAGTAAACACC R:TAGATTACCTTAAAGTTCGGAT	530	53.5
Z26-360	F:TAGAGCAATCGTTATCCATAAGTG R:TGTTTTTCTATTTTCAAAGCCTA	242	54.5

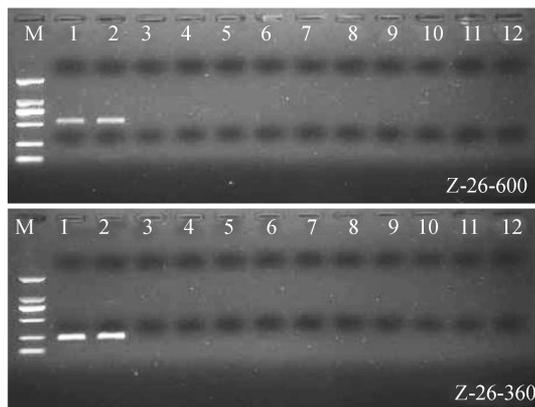


图 4 SCAR 标记在坛紫菜 6 个纯系中的验证结果

Fig.4 Verified result of SCAR markers in 6 pure lines of *P. haitanensis*

M. D2000 marker; 1-2. Z-26; 3-4. z-17; 5-6. Q-1; 7-8. 9-IV; 9-10. z-61; 11-12. 8-I.

其次,验证 SCAR 标记在 28 个坛紫菜种质品系(含 Z-26 的父本(7-I)和母本(PX II))中的特异性,结果如图 5 所示。由图中可以看出,两对 SCAR 引物仍然均只在 Z-26 处分别扩增出一条预期大小的特异性条带,其它品系均没有扩增条带出现,说明两个 SCAR 标记均为坛紫菜 Z-26 所特有的标记。两个 SCAR 标记在 Z-26 的父本和母本中也未出现扩增条带,说明扩增 SCAR 标记的两条引物分别来源于父本和母本的两个不同等位基因,只有在父本和母本杂交进行染色体片段重组产生新的纯和等位基因后,才在子代 Z-26 中出现特异 SCAR 标记。

再次验证 SCAR 标记在 Z-26 $F_2 \sim F_4$ 叶状体和 $F_2 \sim F_5$ 丝状体中的稳定性,结果如图 6 所示。由图中可以看出,两对 SCAR 引物在 Z-26 $F_2 \sim F_4$

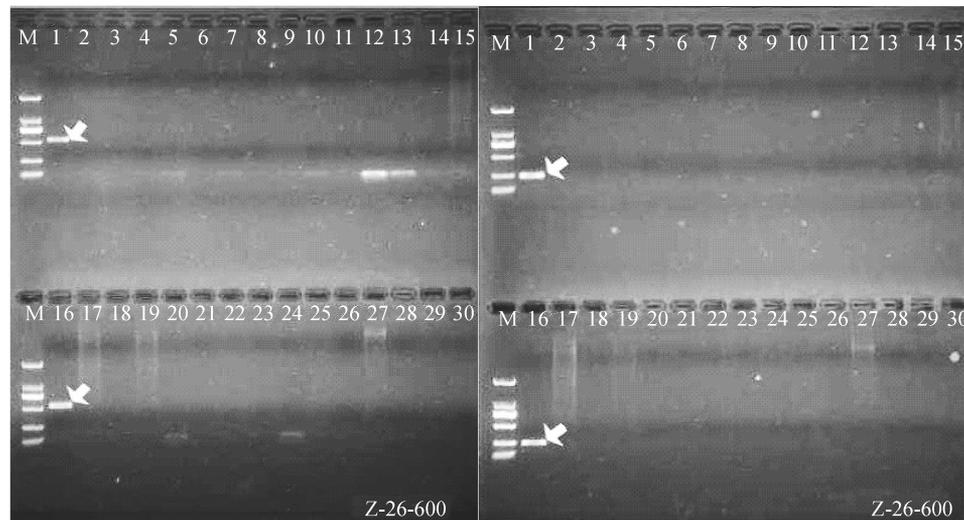


图 5 SCAR 标记在坛紫菜 28 个种质品系中的验证结果

Fig.5 Verified result of SCAR markers in 28 germplasm lines of *P. haitanensis*

M. D2000 marker; 1,16. Z-26; 2. YS I; 3. YS II; 4. YS III; 5. YS IV; 6. YS V; 7. YS VI; 8. YS VII; 9. YS VIII; 10. YS IX; 11. YS X; 12. YS XI; 13. YS XII; 14. PX II; 15. PX III; 17. PX V; 18. PX IV; 19. Z-19; 20. Z-60; 21. Z-66; 22. Z-68; 23. Z-71; 24. Z-80; 25. Z-82; 26. Z-91; 27. Z-94; 28. 7-I; 29. 7-II; 30. 7-III.

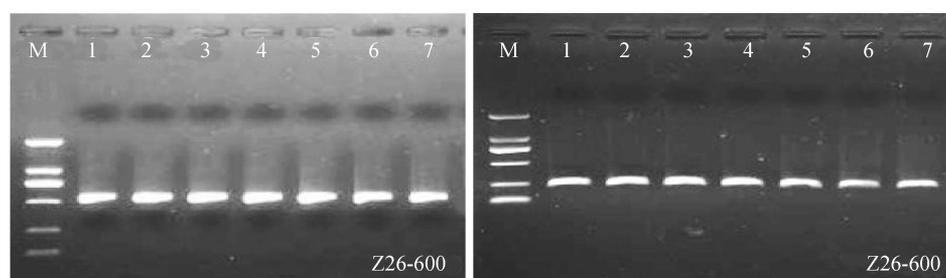


图6 SCAR 标记在 Z-26 品系 $F_2 \sim F_4$ 叶状体和 $F_2 \sim F_5$ 丝状体中的验证结果

M. D2000 marker; 1~3. $F_2 \sim F_4$ 叶状体; 4~7. $F_2 \sim F_5$ 丝状体。

Fig. 6 Verified result of SCAR markers in $F_2 - F_4$ thallus and $F_2 - F_5$ conchocelis of Z-26

M. D2000 marker; 1-3. $F_2 - F_4$ thallus; 4-7. $F_2 - F_5$ conchocelis.

叶状体和 $F_2 \sim F_5$ 丝状体均扩增出了一条预期大小的目的片段,说明两个 SCAR 标记在坛紫菜 Z-26 品系不同子代和不同世代间均具有很好的稳定性。

最后,从海区栽培的 Z-26 品系叶状体群体中随机挑选了 34 个个体,提取 DNA 后分别用两对

SCAR 引物进行 PCR 扩增,以验证 SCAR 标记 Z-26 品系不同叶状体个体中的稳定性,结果如图 7 所示。由图中可以看出,两对 SCAR 引物在 34 个 Z-26 叶状体个体中均扩增出了一条预期大小的特异性条带。由此说明,两个特异 SCAR 标记在 Z-26 品系不同叶状体个体中具有很好的稳定性。

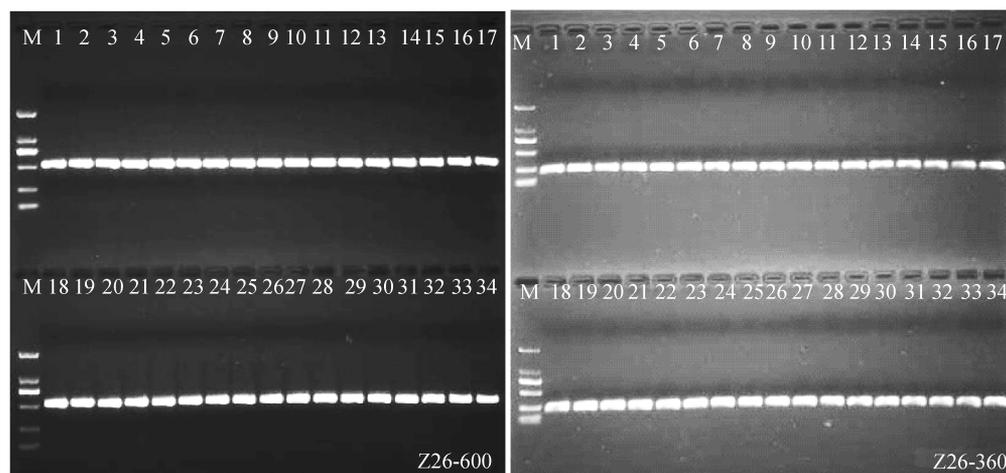


图7 SCAR 标记在 Z-26 品系 34 个叶状体个体中的验证结果

M. D2000 marker; 1~34. 34 个 Z-26 品系叶状体个体。

Fig. 7 Verified result of SCAR markers in 34 thalluses of Z-26

M. D2000 marker; 1-34. 34 thalluses of Z-26.

2.3 SCAR 标记多重 PCR 鉴定技术的建立

为简化应用 SCAR 标记进行坛紫菜种质鉴定的操作步骤,以建立快速、便捷和准确的鉴定技术,应用多重 PCR 技术将两对 SCAR 引物同时加入同一反应体系中,通过对反应体系、引物浓度、退火温度、延伸时间和循环数等进行优化后,建立了基于 SCAR 标记的坛紫菜 Z-26 多重 PCR 鉴定技术。PCR 扩增的反应体系为 $10 \times$ PCR buffer

$2.5 \mu\text{L}$, 2.5 mmol/L dNTP $2.0 \mu\text{L}$, $20 \mu\text{mol/L}$ Z26-360 正反向引物各 $0.25 \mu\text{L}$, $20 \mu\text{mol/L}$ Z26-600 正反向引物各 $0.5 \mu\text{L}$, $5 \text{ U}/\mu\text{L}$ *Taq* DNA 聚合酶 $0.3 \mu\text{L}$, $5 \text{ ng}/\mu\text{L}$ 模板 DNA $2.0 \mu\text{L}$,最后加无菌 ddH_2O 至反应体系总体积为 $25 \mu\text{L}$; PCR 扩增的反应程序为 95°C 预变性 5 min ; 95°C 变性 30 s , 54.6°C 复性 50 s , 72°C 延伸 1 min ,以上 3 步重复 30 个循环;最后 72°C 延伸 10 min ;扩增结束

后于 1.2% 的琼脂糖凝胶中进行电泳检测,如果在同一泳道中能同时检测到两个 SCAR 标记的片段,则表明所鉴定的对象为 Z-26 品系。

Z-26 品系的多重 PCR 扩增结果中出现了两条分别对应 Z26-600 和 Z26-360 SCAR 标记的扩增片段,而其它 5 个纯系的多重 PCR 扩增结果中没有扩增片段出现,说明基于 SCAR 标记的坛紫菜 Z-26 品系多重 PCR 鉴定具有很好的特异性(图 8)。



图 8 基于 SCAR 标记的坛紫菜 6 个纯系多重 PCR 扩增结果

M. D2000 marker; 1~2. Z-26 多重 PCR 扩增结果; 3~4. Z-26 Z26-600 标记单重 PCR 扩增结果; 5~6. Z-26 Z26-360 标记单重 PCR 扩增结果; 7~11. z-17、Q-1、9-IV、Z-61、8-I 多重 PCR 扩增结果。

Fig. 8 Multiplex PCR amplification of 6 pure lines of *P. haitanensis* based on SCAR markers

M. D2000 marker; 1~2. Multiplex PCR amplification of Z-26; 3~4. PCR amplification of Z-26 for Z26-600 marker; 5~6. PCR amplification of Z-26 for Z26-360 marker; 7~11. Multiplex PCR amplification of z-17, Q-1, 9-IV, Z-6 and 8-I.

3 讨论

传统的基于形态特征的种质鉴定技术已不能适应当前紫菜产业发展的需要,利用分子标记技术开发新型的紫菜种质鉴定技术是科技进步和产业发展的必然,已有多篇文献综述了分子标记技术在紫菜种质鉴定中的应用^[20-22]。RAPD 标记具有操作简便,成本低廉等特点,但由于重复性差,稳定性不高等原因在很大程度上限制了该技术的应用; AFLP, SRAP 和 SSR 等标记尽管具有重复性好和稳定性高等优点,但却操作繁杂,对实验仪器要求较高;而 Paran 等^[23]在 RAPD 标记基础上开发的 SCAR 标记,尽管在标记开发时需要大量引物筛选、DNA 片段克隆、测序和引物设计等较为繁杂的步骤,但标记一旦开发成功,则

在实际应用中具有检测快速、操作简便、重复性好和成本低廉等优点,因此 SCAR 标记目前已在陆生高等植物中得到了广泛的应用^[9]。石金峰等^[12]也将 SCAR 标记技术引入到了紫菜的种质鉴定中,首先通过 RAPD 标记扫描筛选出了紫菜 15 个无性系的 8 个特异标记,并将其中无性系 Y9502 和 K9401 特有的 RAPD 标记成功转化成了 SCAR 标记。本研究通过 RAPD 标记技术扫描,从 300 条 RAPD 引物中筛选出了 9 个坛紫菜“Z-26”品系的特异标记,最终只有两个标记成功转化成了 SCAR 标记。由这些结果可以看出,并非所有的特异分子标记都能成功地转换成 SCAR 标记。可能原因有引物设计不合适、序列相似或多拷贝、DNA 甲基化和回收的多态性片段中存在相同大小片段或存在邻近 DNA 片段污染等^[24]。

在特异标记筛选的过程中,由于实验材料收集的局限性,筛选所得的特异性标记只能相对于所收集的材料而言是具有特异性的,在采用单一标记进行种质鉴定时就有可能把原有材料中未包括的,但却含有该特异标记的材料误判为是正确的材料,造成误判。因此,现在生产上往往都采用多个标记同时进行鉴定的方法来避免造成误判,只有多个特异性标记都为阳性的情况下,才能确定该材料为正确的材料。但每次样品鉴定,都要进行多次的标记验证,难免存在工作量大、检出时间长、成本高等诸多问题,而多重 PCR 技术则可以很好地解决这些问题。多重 PCR 与单一 PCR 相比,一次反应可以同时检测多个标记,时间短,所需试剂少,因而具有高效、快捷和经济的特点;同时在灵敏度上高度特异敏感,保证了扩增结果的准确性,极大地减少了工作量,在一定程度上加速了试验进程^[17]。因此,针对特定目标,开发简单、快速和有效的多重 PCR 鉴定技术对于紫菜的种质鉴定具有非常重要的意义。

由于多重 PCR 的试验条件要求较高,在对其试验条件进行优化时,除了需要对 dNTP 的浓度、Taq 酶活性和复性温度(T_m)值进行优化外,引物的兼容性和引物浓度的优化是其中的关键。引物的兼容性主要原则就是避免引物内部形成发卡结构、引物及引物之间在扩增过程中产生二聚体等,此外还需平衡每对引物的浓度使每个座位都能获得足够的扩增量。本实验经过多轮优化,最终建立了较为理想的坛紫菜“Z-26”品系的多重 PCR

鉴定技术,从鉴定结果看,具有很好的特异性,可方便地应用于该品系紫菜的种质鉴定中。

参考文献:

- [1] Blouin N A, Brodie J A, Grossman A C, *et al.* *Porphyra*: a marine crop shaped by stress[J]. *Trends in Plant Science*, 2010, 16(1): 29 - 37.
- [2] 陈昌生,纪德华,谢潮添,等.坛紫菜耐高温品系选育及经济性状的初步研究[J]. *海洋学报*, 2008, 30(5): 100 - 106.
- [3] 陈昌生,纪德华,谢潮添,等.坛紫菜耐低盐品系的选育及经济性状的比较[J]. *集美大学学报:自然科学版*, 2009, 14(1): 1 - 7.
- [4] 柳佩娟,纪德华,谢潮添,等.坛紫菜耐低氮磷品系选育的研究[J]. *集美大学学报:自然科学版*, 2009, 14(2): 109 - 114.
- [5] 陈昌生,梁艳,徐燕,等.坛紫菜薄叶新品系选育及经济性状的比较[J]. *渔业科学进展*, 2009, 30(2): 100 - 105.
- [6] 吕峰,严兴洪,刘长军,等.坛紫菜耐高温品系的选育与海区中试[J]. *上海海洋大学学报*, 2010, 19(4): 457 - 462.
- [7] 蒋悦,严兴洪,刘长军.坛紫菜优良品系的选育与特性分析[J]. *水产学报*, 2010, 34(9): 1363 - 1370.
- [8] Yan X H, Lv F, Liu C J, *et al.* Selection and characterization of a high-temperature tolerant strain of *Porphyra haitanensis* Chang et Zheng (Bangiales, Rhodophyta) [J]. *Journal of Applied Phycology*, 2010, 22(4): 511 - 516.
- [9] 周延清. DNA 分子标记技术在植物研究中的应用[M]. 北京:化学工业出版社, 2005.
- [10] 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(4): 403 - 407.
- [11] 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.
- [12] 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 - 131.
- [13] 谢潮添,陈昌生,纪德华,等.坛紫菜种质材料 DNA 指纹图谱构建[J]. *水产学报*, 2010, 34(6): 733 - 740.
- [14] Sun J W, Jin D M, Zhou C J, *et al.* Identification of *Porphyra lines* (Rhodophyta) by AFLP DNA fingerprinting and molecular markers [J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2005, 23(3): 251 - 262.
- [15] Weng M L, Liu B, Jin D M, *et al.* Identification of 27 *Porphyra lines* (Rhodophyta) by DNA fingerprinting and molecular markers [J]. *Journal of Applied Phycology*, 2005, 17(1): 91 - 97.
- [16] Qiao L X, Liu H Y, Guo B T, *et al.* Molecular identification of 16 *porphyra lines* using sequence-related amplified polymorphism markers [J]. *Aquatic Botany*, 2007, 87(3): 203 - 208.
- [17] 刘正斌,高庆荣,等.多重 PCR 技术在植物生物学研究中的应用[J]. *分子植物育种*, 2005, 3(2): 261 - 268.
- [18] Chamberlain J S, Gibbs R A, Ranier J E, *et al.* Deletion screening of the duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification [J]. *Nucleic Acids Research*, 1988, 16(23): 11141 - 11156.
- [19] 顾红雅,瞿礼嘉,译.植物分子生物学实验手册[M].北京:高等教育出版社, 1997.
- [20] 杨锐,戴继勋,刘必谦.现代生物技术在紫菜属中的应用[J]. *海洋湖沼通报*, 2001(2): 68 - 77.
- [21] 周志刚,孙育平.海藻分子生物学技术的应用与发展[J]. *上海水产大学学报*, 2002, 11(2): 160 - 166.
- [22] 于一.紫菜分子标记研究进展[J]. *现代农业科技*, 2010(12): 37 - 38.
- [23] Paran I, Michelmore R W. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1993, 85(8): 985 - 993.
- [24] 孙保娟. SCAR 标记转化失败的原因和对策[J]. *分子植物育种*, 2010, 8(3): 589 - 594.

Construction of multiplex PCR in variety identification of *Porphyra haitanensis* “Z-26” based on SCAR markers

WANG Ting, XU Yan, XIE Chaotian, JI Dehua, CHEN Changsheng*

(College of Fisheries, Jimei University, Xiamen 361021, China)

Abstract: *Porphyra haitanensis* is one of the most important economic marine crops of China. For any cultivar, the correct identification of species or forma of the cultivated strains is necessary to ensure a well-bred cultivation and good production quality. However, because the gametophytic blade of *Porphyra* is morphologically simple and marked variations can occur as environmental conditions change, it is very difficult to precisely identify the species or forma of cultivated strains based only on their morphological characteristics. With new advances in molecular biology, molecular markers and DNA fingerprinting techniques have become routine for the identification and classification of many crops, including seaweeds. The strain of “Z-26” of *P. haitanensis* was selected by the laboratory of germplasm improvement and the application of *P. haitanensis* in Jimei University which has the characters of high-temperature tolerance and high yield, and it has been widely cultivated in south China. In order to construct the technology of variety identification for “Z-26”, firstly, 300 primers of RAPD were used to scan the specific markers of 6 new strains of *P. haitanensis* and 9 specific RAPD markers of “Z-26” were selected. After cloning and sequencing, two specific RAPD markers of “Z-26” were transformed into the SCAR markers successfully, the length of the 2 SCAR markers was 540 and 242 bp, respectively. Secondly, after verification by 4 different experiments, we can affirm that the 2 SCAR markers were the specific and stable markers of “Z-26”. At last, based on the 2 SCAR markers, after optimization of experimental conditions, the technology of multiplex PCR which was used to identify the variety of “Z-26” was constructed. The result supplied a simple, fast and reliable technique for variety identification of “Z-26”.

Key words: *Porphyra haitanensis*; random amplified polymorphic DNA (RAPD); sequence characterized amplified region (SCAR); multiplex PCR

Corresponding author: CHEN Changsheng. E-mail: cschen@jmu.edu.cn