

基因条码在条斑紫菜(*Pyropia yezoensis*) 不同品系间种质鉴定中的适用性*

曹殿嘉¹ 严兴洪^{1,2①}

(1. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306;

2. 上海海洋大学省部共建水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室 上海 201306)

摘要 为寻找适宜的条斑紫菜(*Pyropia yezoensis*)品系间种质分子标记鉴定法,利用 4 种基因条码(RUBISCO Spacer、UPA、Cox2-3 和 ITS-5.8S)对产自中国和日本的 6 个条斑紫菜品系的亲缘关系进行了分析研究。结果显示,在 6 个条斑紫菜品系中,上述 4 种基因条码的序列同源性较高,同源性为 97.8%–100%,其中,RUBISCO Spacer 序列的同源性为 100%。UPA 序列的同源性分析结果显示,在中国产的 LS、B4、HT 和 TM18 品系中,该序列完全相同,但与日本产的 GT 和 ROS-2 两个品系的序列有差异,该序列的同源性为 99.2%。在 6 个品系中,Cox2-3 和 ITS-5.8S 序列的同源性相对较低,分别为 97.8%–99.2%和 98.4%–99.8%。根据 UPA、Cox2-3 和 ITS-5.8S 基因条码通过邻接法构建的系统进化树显示,依据 ITS-5.8S 和 UPA 序列均能分别区分中国产的 4 个品系(LS、B4、HT 和 TM18)与日本产的两个品系(GT 和 ROS-2),分别形成两个大分支,其聚类结果与实际亲缘关系一致。但利用 ITS-5.8S 序列均能对中国产的 4 个品系和日本产的两个品系进行再区分,而利用 UPA 序列却无法对中国产的 4 个品系进行再区分,只能区分日本产的两个品系。使用 Cox2-3 序列则将 GT、ROS-2、LS 和 TM18 这 4 个品系聚成一个大分支,其聚类结果与实际亲缘关系不一致。上述结果说明,利用 ITS-5.8S 序列对本研究的 6 个条斑紫菜品系进行种质鉴定,效果最好。

关键词 条斑紫菜; 基因条码; 品系; 种质鉴定

中图分类号 Q949.29+2.1 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2016)03-0114-06

条斑紫菜(*Pyropia yezoensis*)为主要分布于我国北方及韩国和日本等地的重要紫菜栽培物种(张美如等, 2012)。近年来,全球海水温度不断上升,对人工栽培紫菜的品质和产量产生了较大影响。为此,研究者通过人工选育的方法获得了稳定高产且抗逆性好的条斑紫菜优良品系(王华芝等, 2012; Yan, 2000; Zhang *et al.*, 2011)。条斑紫菜品系间的准确种质鉴定,

不仅可以加快优良品种的选育速度,而且也是推广紫菜良种的重要基础工作。

目前,紫菜的种质鉴定主要有形态学、细胞学、生理生化和分子标记辅助等鉴定方法(张庆杰, 2012)¹⁾。在以往的条斑紫菜种质鉴定中,主要是依据传统的形态学和细胞学特征(Miura, 1984、1988; Niwa, 2005)。Hebert 等(2003a、b)首次提出了基因条形码(DNA

* 国家高科技研究发展计划(863 计划)项目(2012AA10A411)、国家自然科学基金项目(31072208)、国家海洋局公益专项(201105008; 201105023)、国家农业科技成果转化资金项目(2013GB2C220537)、农业部公益性专项(200903030)、上海市科委重点科技攻关项目(10391901100)、上海高校水产学一流学科建设项目、福建省科技重大专项(2011NZ0001-1)和福建省省长专项基金(2014S1477-10)共同资助。曹殿嘉, E-mail: cdjyoona@163.com

① 通讯作者: 严兴洪, 教授, E-mail: xhyan@shou.edu.cn

收稿日期: 2015-04-30, 收修改稿日期: 2015-05-25

1) 张庆杰. 坛紫菜“申福 2 号”SSR 分子标记的研究和性别相关 AFLP 反应体系的建立. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2012, 1–38

barcoding)的概念;随后,基因条码在紫菜种质鉴定中也得到了较广泛的应用(赵玲敏等, 2009; Niwa, 2003、2008、2009; Saunders, 2005)。Wang 等(2009)采用直接 PCR 技术对 8 个紫菜种的 RUBISCO Spacer 序列进行比较分析,表明该序列的同源性与紫菜种的来源呈相关关系,说明 RUBISCO Spacer 序列适用于紫菜种的分类。Milstein 等(2012)对巴西 3 个紫菜种的 25 个品系的 UPA、Cox1 和 Cox2-3 基因条码进行了分析,并依据这 3 种序列的同源性成功命名了 1 个新的紫菜种(*Pyropia* sp. 77),同时确认了 *Pyropia drewiana* 和 *Pyropia spiralis* 是同一紫菜种。谢小雪等(2013)测定了坛紫菜 11 个品系的 UPA、Cox2-3、Cox1 和 ITS-5.8S 共 4 种基因条码序列,发现只有 ITS-5.8S 序列可以完全区分各个坛紫菜品系。

本研究利用 4 种基因条码(RUBISCO Spacer、UPA、Cox2-3 和 ITS-5.8S)对条斑紫菜 6 个品系的亲缘关系进行了比较分析,旨在找到一种适合于条斑紫

菜品系间种质鉴定的方法。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本研究所用条斑紫菜 6 个品系(LS、B4、HT、TM18、GT 和 ROS-2)均以自由丝状体的形式被保存于实验室内,其保存和培养方法同 Kato 等(1984),其来源、代码及特性见表 1。

1.2 实验方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 条斑紫菜各品系的自由丝状体用灭菌 ddH₂O 清洗 3 次,用灭菌吸水纸吸去水分,取 0.1 g 自由丝状体,经液氮快速充分研磨后,使用 DP320 新型植物基因组试剂盒(TIANGEN, 北京)提取基因组 DNA,再用 1%琼脂糖凝胶电泳检测基因组 DNA 的完整性,利用 NanoDrop2000 测定其基因组 DNA 的浓度和纯度, DNA 保存在-20℃备用。

表 1 本研究所用的 6 个条斑紫菜品系的代码、来源及特性

Tab.1 The codes, origins and characteristics of the six strains of *Pyropia yezoensis* in this study

序号 No.	代码 Code	来源与特性 Source and characteristics
1	LS	由产自江苏吕泗海区一株野生型的条斑紫菜叶状体放散的果孢子萌发而来
2	B4	条斑紫菜野生型品系(LS)的叶状体经 ⁶⁰ Co-γ 射线照射后,从其体细胞苗再生体中筛选出来的耐高温品系(Zhang <i>et al</i> , 2011)
3	HT	条斑紫菜品系(B4)的叶状体经 ⁶⁰ Co-γ 射线照射后,从其体细胞苗再生体中筛选出来的红色品系(Zhang <i>et al</i> , 2011)
4	TM18	条斑紫菜品系(B4)的叶状体经 ⁶⁰ Co-γ 射线照射后,从其体细胞苗再生体中筛选出来的耐高温品系(王华芝等, 2012)
5	GT	日本产条斑紫菜野生型品系(U-511)的叶状体经 MNNG 处理后,从单孢子萌发体中筛选出来的绿色突变品系(严兴洪等, 2000)
6	ROS-2	日本产条斑紫菜野生型品系(U-511)的叶状体经 MNNG 处理后,从单孢子萌发体中筛选出来的生长快的优良突变品系(严兴洪等, 2000)

1.2.2 基因条码的扩增和测序 用于 RUBISCO Spacer、UPA、Cox2-3 和 ITS-5.8S 基因条码扩增的特异性引物分别依据 Wang 等(2009)和谢小雪等(2013),由生工(上海)生物工程有限公司合成,具体的扩增位点及复性温度列入表 2。

PCR 反应体系均为 25 μl,其中, ddH₂O 13.5 μl, 10×Loading buffer 2.5 μl, MgCl₂ 2 μl, dNTP 2.5 μl, 正反向引物各 0.5 μl, 1 U Taq 酶 0.5 μl, 基因组 DNA 3.0 μl。

RUBISCO Spacer、UPA、Cox2-3 和 ITS-5.8S 序列的 PCR 反应程序: 94℃ 5 min; 35 个循环: 94℃ 45 s, 退火依据各引物的复性温度, 72℃延伸 45 s; 最后 72℃延伸 10 min, 4℃下保存。PCR 产物经纯化

后由生工(上海)生物工程有限公司进行克隆测序。

1.2.3 序列分析及系统树的构建 用 Blast 软件进行同源性检测,利用 DNAMAN 软件进行序列比对及同源性分析,使用 MEGA 5.0 软件通过邻接法(NJ)构建 4 种基因条码的系统发育树。

2 结果与分析

2.1 条斑紫菜 6 个品系丝状体基因组 DNA 的提取

条斑紫菜 6 个品系丝状体基因组 DNA 的分子量约为 23 kb (图 1), OD_{260 nm}/OD_{280 nm} 在 1.8–2.0 之间,可满足后续的实验需要。

表 2 4 种基因条码的扩增引物序列
Tab.2 Primers used for the amplification of the four DNA barcodings

基因条码 DNA barcoding	引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'-3')	复性温度 Annealing temperature (°C)
RUBISCO Spacer	RuF	CGCTGCTAAAACCTGTGGGC	56
	RuR	GGCGTTGTAATAAGAATCCTGG	56
UPA	UPAF	GGACAGAAAGACCCTATGAA	50
	UPAR	TCAGCCTGTTATCCCTAGAG	50
Cox2-3	Cox23F	GATGCTGTACCCGGTAGAT	55
	Cox23R	GTTGTAATTGTTTAGCTGTTTTT	55
ITS-5.8S	ITSF	GGGATCCGTTTCCGTAGGTGAACCTGC	60
	ITSR	GGGATCCATATGCTTAAGTTCAGCGGGT	60

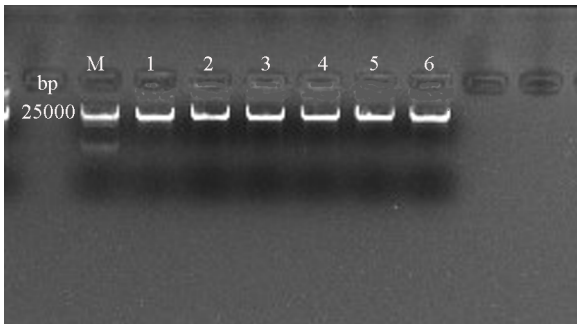


图 1 条斑紫菜 6 个品系的基因组 DNA 的琼脂糖凝胶电泳
Fig.1 Agarose electrophoresis of the total DNA extracted from the six strains of *P. yezoensis*
M: λ DNA/*Hind*III digest DNA marker; 1-6: LS, B4, HT, TM18, GT, and ROS-2 respectively

2.2 条斑紫菜 6 个品系的 4 种基因条码扩增结果

经 PCR 反应,从条斑紫菜 6 个品系的基因组 DNA 中分别扩增出 4 种基因条码的特异性产物,分子量分别约为 500 bp、365 bp、365 bp 和 1100 bp (图 2)。PCR 反应产物条带单一,经克隆测序后,4 种基因条码的 NCBI 收录号列入表 3。

2.3 条斑紫菜 6 个品系 4 种基因条码的序列同源性

条斑紫菜 6 个品系的 RUBISCO Spacer 序列产物包括大亚基 *rbcL*、小亚基 *rbcS* 以及基因间隔区 RUBISCO Spacer。根据基因间隔区 RUBISCO Spacer 序列计算的同源性如表 4 所示,条斑紫菜 6 个品系具有

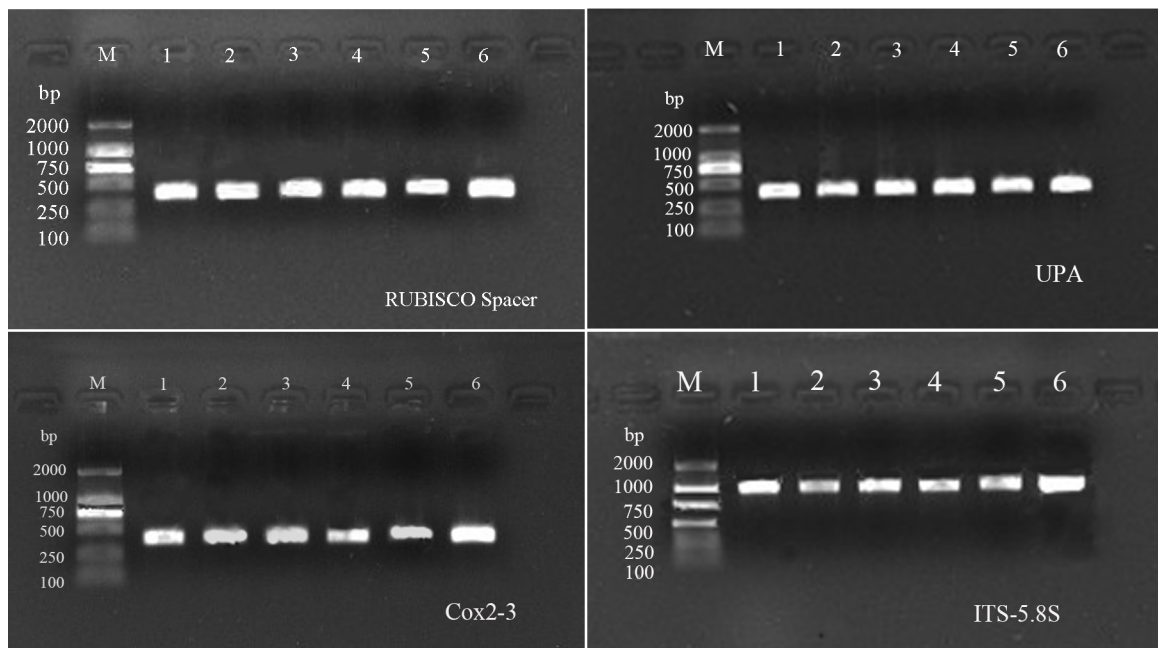


图 2 条斑紫菜 6 个品系的 4 种基因条码的琼脂糖凝胶电泳
Fig.2 Agarose electrophoresis of the four DNA barcodings of the six strains of *P. yezoensis*
M: DL2000 DNA Marker; 1-6: LS, B4, HT, TM18, GT, and ROS-2 respectively

表 3 条斑紫菜 6 个品系 4 种基因条码的 NCBI 收录号

Tab.3 Accession numbers of the four DNA barcodings of the six strains of *P. yezoensis*

代码 Code	NCBI 的收录号 GenBank accession No.			
	RUBISCO Spacer	UPA	Cox2-3	ITS-5.8S
LS	KR260245	KR260251	KR349291	KR260257
B4	KR260246	KR260253	KR349293	KR260259
HT	KR260248	KR260252	KR349292	KR260258
TM18	KR260247	KR260254	KR349294	KR260260
GT	KR260249	KR260255	KR349295	KR260261
ROS-2	KR260250	KR260256	KR349296	KR260262

表 4 基于 RUBISCO Spacer 和 UPA 序列的条斑紫菜 6 个品系同源性分析

Tab.4 Sequence homology analysis of the six strains of *P. yezoensis* based on RUBISCO Spacer and UPA

代码 Code	序列同源性 Sequence homology (%)					
	LS	B4	HT	TM18	GT	ROS-2
LS		100	100	100	99.2	99.2
B4	100		100	100	99.2	99.2
HT	100	100		100	99.2	99.2
TM18	100	100	100		99.2	99.2
GT	100	100	100	100		99.4
ROS-2	100	100	100	100	100	

注: RUBISCO Spacer: 对角线下方; UPA: 对角线上方

Note: RUBISCO Spacer: below diagonal; UPA: above diagonal

完全相同的 RUBISCO Spacer 序列, 同源性为 100%。

条斑紫菜 6 个品系的 UPA 序列的同源性在 99.2%–100% 之间, 其中 LS、B4、HT 和 TM18 这 4 个品系的 UPA 序列完全相同, 序列同源性为 100%。ROS-2 和 GT 品系在 4 个位点发生了突变, 与 LS、B4、HT 和 TM18 这 4 个品系的序列同源性均为 99.2%。

Cox2-3 序列由 COX2 和 COX3 的部分编码序列以及基因间隔区 3 个部分组成。条斑紫菜 6 个品系的 Cox2-3 序列同源性在 97.8%–99.2% 之间(表 5)。GT 与

表 5 基于 Cox2-3 和 ITS-5.8S 序列的条斑紫菜 6 个品系同源性分析

Tab.5 Sequence homology analysis of the six strains of *P. yezoensis* based on Cox2-3 and ITS-5.8S

代码 Code	序列同源性 Sequence homology (%)					
	LS	B4	HT	TM18	GT	ROS-2
LS		98.9	99.6	99.6	98.4	98.6
B4	98.1		99.1	99.8	98.6	98.8
HT	98.4	99.2		99.1	99.5	99.6
TM18	98.9	98.3	98.1		98.7	98.8
GT	98.6	98.4	98.6	98.9		99.8
ROS-2	98.0	98.1	97.8	98.6	99.2	

注: Cox2-3: 对角线下方; ITS-5.8S: 对角线上方

Note: Cox2-3: below diagonal; ITS-5.8S: above diagonal

ROS-2 品系和 HT 与 B4 品系的序列同源性最高, 均达到 99.2%, HT 与 ROS-2 品系序列同源性最低, 只有 97.8%。

ITS-5.8S 序列包括核糖体 18S、28S 部分序列以及 ITS-5.8S 完整序列。条斑紫菜 6 个品系 ITS-5.8S 序列同源性较高, 同源性在 98.4%–99.8% 之间。其中, GT 与 ROS-2 品系、B4 与 TM18 品系的 ITS-5.8S 序列同源性最高, 均为 99.8%。B4 与 ROS-2 品系的序列同源性最低, 为 98.6%。

2.4 条斑紫菜 6 个品系 4 种基因条码的系统发育树

基于 UPA、Cox2-3 和 ITS-5.8S 基因条码, 通过邻接法(NJ)构建的系统发育树如图 3–图 5 所示。UPA 和 ITS-5.8S 两种序列均将中国产的 4 个品系与日本产

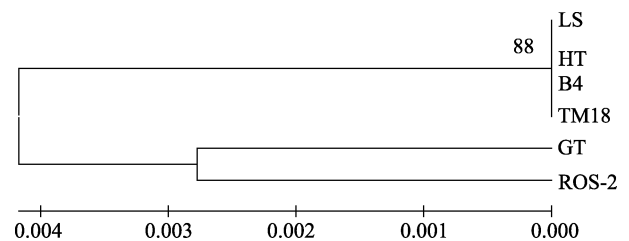


图 3 基于 UPA 序列通过邻接法构建的条斑紫菜 6 个品系的系统发育树

Fig.3 Phylogenetic tree of UPA of the six strains of *P. yezoensis* constructed with the neighbor-joining analysis

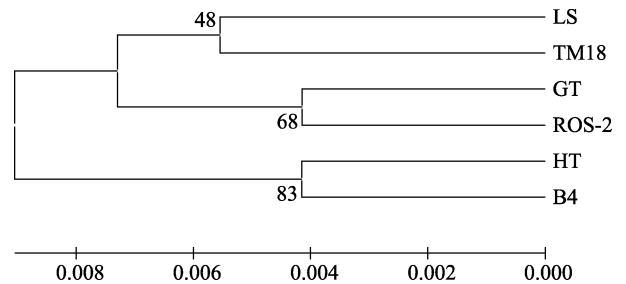


图 4 基于 Cox2-3 序列通过邻接法构建的条斑紫菜 6 个品系的系统发育树

Fig.4 Phylogenetic tree of Cox2-3 of the six strains of *P. yezoensis* constructed with the neighbor-joining analysis

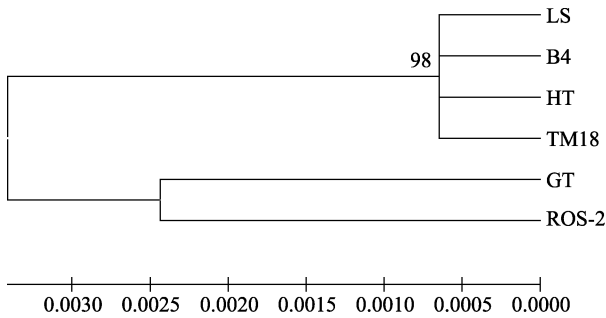


图 5 基于 ITS-5.8S 序列通过 NJ 法构建的条斑紫菜 6 个品系的系统发育树

Fig.5 Phylogenetic tree of ITS-5.8S of six strains of *P. yezoensis* constructed with the neighbor-joining analysis

的两个品系分别聚成两个分支,其聚类结果与 6 个品系的原有地域亲缘关系是一致的。利用 ITS-5.8S 序列均能对中国产的 4 个品系和日本产的两个品系进行再区分,而利用 UPA 序列却无法对中国产的 4 个品系进行再区分,只能区分日本产的两个品系。依据 Cox2-3 序列将中国产的两个品系(LS 和 TM18)和日本产的两个品系(GT 和 ROS-2)聚集成一个大分支,其聚类结果与实际亲缘关系不一致。以上结果表明,在本研究的 6 个条斑紫菜品系的种质鉴定中,ITS-5.8S 序列的区分效果最好。

3 讨论

目前, DNA 分子标记技术主要有两种:一是依据 PCR 反应扩增产物的有无和长短,对生物物种的遗传多样性进行研究,如 SSR、AFLP、SRAP 等。这类分子标记技术已经在紫菜的种质鉴定中得到了较广泛的应用(杨锐等, 2005; 袁昭岚等, 2006; 纪德华等, 2008; 张鹏等, 2009; 谢潮添等, 2010; 贾威等, 2013; 王婷等, 2013);二是以基因条码(DNA barcoding)即基因组中 DNA 片段的序列信息为基础,对生物物种的遗传多样性进行分析。作为基因组的一部分,在个体发育的不同时期和处于环境胁迫条件下,基因条码的序列不会发生改变,避免了传统形态学和细胞学鉴定中易受环境因子影响的弊端,使得鉴定的结果更加真实可靠(徐涤等, 2001; 袁昭岚等, 2006)。

本研究利用 4 种基因条码(RUBISCO Spacer、UPA、Cox2-3 和 ITS-5.8S)对中国产和日本产的 6 个条斑紫菜品系的亲缘关系进行了研究,其结果证实,6 个条斑紫菜品系具有完全相同的 RUBISCO Spacer 序列,序列同源性均为 100%,中国产的 4 个条斑紫菜品系(LS、B4、HT 和 TM18)的 UPA 序列完全相同,与日本产的两个品系(GT 和 ROS-2)相比,存在 4 个

碱基的差别,序列同源性均为 99.2%,上述结果与孙雪等(2006)对坛紫菜的 RUBISCO Spacer 以及 Milstein 等(2012)对紫菜的 UPA 序列的研究结果类似,说明 RUBISCO Spacer 和 UPA 的序列在紫菜种间或品系间均是很保守的。另外,本研究也发现 ITS-5.8S 序列的同源性虽然为 98.4%–99.8%,但分子量为 160 bp 的 5.8S rDNA 的序列则完全相同。利用 UPA 和 ITS-5.8S 两种序列均能将中国产的 4 个品系与日本产的两个品系分别聚成两个分支,其聚类结果与 6 个品系的原有地域亲缘关系是一致的,表明生长环境的差异也许是导致以上两种序列聚类结果的原因。但是,利用 ITS-5.8S 序列均能对中国产的 4 个品系和日本产的两个品系进行再区分,而利用 UPA 序列却无法对中国产的 4 个品系进行再区分,只能区分日本产的两个品系。依据 Cox2-3 序列则将中国产的两个品系(LS 和 TM18)和日本产的两个品系(GT 和 ROS-2)聚集成一个大分支,其聚类结果与实际亲缘关系不一致,这与谢小雪等(2013)对坛紫菜 Cox2-3 序列的研究结果相似。依据本研究结果,在 6 个条斑紫菜品系间的种质鉴定中,ITS-5.8S 序列的区分效果最好,这个结果与坛紫菜品系间分子鉴定的相关研究结果类似(谢小雪等, 2013)。

参 考 文 献

- 王华芝, 严兴洪, 李琳. 条斑紫菜(*Porphyra yezoensis*)耐高温品系的筛选及特性分析. 海洋与湖沼, 2012, 43(3): 363–369
- 王婷, 徐燕, 谢潮添, 等. 基于 SCAR 标记的坛紫菜“闽丰 1 号”多重 PCR 鉴定技术的建立. 水产学报, 2013, 37(5): 688–695
- 孙雪, 杨锐, 刘必谦, 等. 坛紫菜 rbcS 及 rbcL-rbcS 基因间隔区的序列分析. 水产科学, 2006, 25(1): 23–26
- 纪德华, 谢潮添, 陈昌生, 等. 坛紫菜 ISSR 反应体系的建立与优化. 海洋科学, 2008, 32(6): 20–24
- 严兴洪, 田中次郎, 有贺佑胜. 条斑紫菜色彩突变体的诱导、分离和特性分析. 水产学报, 2000, 24(3): 221–228
- 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. 海洋学报, 2005, 27(3): 159–162
- 张美如, 陆勤勤, 许广平. 条斑紫菜产业现状及对其健康发展的思考. 中国水产, 2012(11): 15–19
- 张鹏, 张源, 王铁杆, 等. 坛紫菜不同品系亲缘关系的 SSR 标记分析. 中国水产科学, 2009, 16(6): 842–849
- 赵玲敏, 谢潮添, 陈昌生, 等. 5.8S rDNA-ITS 区片段的序列分析在坛紫菜种质鉴定中的应用. 水产学报, 2009, 33(6): 940–948
- 袁昭岚, 黄鹤忠, 沈颂东, 等. 条斑紫菜 5 个栽培品系的 ISSR 分析. 海洋科学, 2006, 30(7): 9–14
- 贾威, 黄林彬, 严兴洪. 条斑紫菜 6 个品系的 SRAP 分析. 水产学报, 2013, 37(10): 1495–1502
- 徐涤, 宋林生, 秦松, 等. 五个紫菜品系间遗传差异的 RAPD 分析. 高科技通讯, 2001, 11(12): 1–4

- 谢小雪, 陈昌生, 徐燕, 等. DNA 序列标记在坛紫菜种质鉴定中适用性的比较分析. 应用海洋学学报, 2013, 32(3): 404–410
- 谢潮添, 陈昌生, 纪德华, 等. 坛紫菜种质材料 DNA 指纹图谱的构建. 水产学报, 2010, 34(6): 913–920
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, *et al.* Biological identifications through DNA barcodes. Proc Biol Sci, 2003a, 270(1512): 313–322
- Hebert PDN, Ratnasingham S, deWaard JR. Barcoding animal life: cytochrome C oxidase I divergences among closely related species. Proc Roy Soc B Biol Sci, 2003b, 270 (1524): S96–S99
- Kato M, Aruga Y. Comparative studies on the growth and photosynthesis of the pigmentation mutants of *Porphyra yezoensis* in laboratory culture. J Phycol, 1984, 32: 333–347
- Milstein D, Medeiros AS, Oliveira EC, *et al.* Will a DNA barcoding approach be useful to identify *Porphyra* species (Bangiales, Rhodophyta). J Appl Phycol, 2012, 24(4): 837–845
- Miura A. A new variety and a new form of *Porphyra* (Bangiales, Rhodophyta) from Japan: *Porphyra tenera* Kjellman var. *tamatsuensis* Miura, var. nov. and *P. yezoensis* Ueda form. *narawaensis* Miura, form. nov. J Tykyo Univ Fish, 1984, 71: 1–37
- Miura A. Taxonomic studies of *Porphyra* species cultivated in Japan, referring to their transition to the cultivated variety. J Tokyo Univ Fish, 1988, 75: 311–325
- Niwa K, Aruga Y. Rapid DNA extraction from conchocelis and ITS-1 rDNA sequences of seven strains of cultivated *Porphyra yezoensis* (Bangiales Rhodophyta). J Appl Phycol, 2003, 15(1): 29–35
- Niwa K, Iida S, Kato A, *et al.* Genetic diversity and introgression in two cultivated species (*Porphyra yezoensis* and *Porphyra tenera*) and closely related wild species of *Porphyra* (Bangiales, Rhodophyta). J Phycol, 2009, 45(2): 493–502
- 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 Appl Phycol, 2008, 20(3): 261–270
- Niwa K, Kikuchi N, Aruga Y. Morphological and molecular analysis of the endangered species *Porphyra tenera* (Bangiales, Rhodophyta). J Phycol, 2005, 41(2): 294–304
- Saunders GW. Applying DNA barcoding to red macroalgae: a preliminary appraisal holds promise for future applications. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2005, 360(1462): 1879–1888
- Wang C, Dong D, Wang GC, *et al.* An improved PCR method for direct identification of *Porphyra* (Bangiales, Rhodophyta) using conchocelis based on a RUBISCO intergenic spacer. Chin J Oceanol Limnol, 2009, 27(3): 513–518
- Zhang BL, Yan XH, Huang LB. Evaluation of an improved strain of *Porphyra yezoensis* Ueda (Bangiales Rhodophyta) with high-temperature tolerance. J Appl Phycol, 2011, 23(5): 841–847

(编辑 冯小花)

Applicability of DNA Barcoding in the Identification of Different Strains in *Pyropia yezoensis*

CAO Dianjia¹, YAN Xinghong^{1,2}①

(1. College of Fisheries and Life Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 2. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Shanghai Ocean University, Ministry of Education, Shanghai 201306)

Abstract In order to find out an effective method to identify *Pyropia yezoensis* germplasm, we tested the efficacy of four common DNA barcodings—RUBISCO Spacer, UPA, Cox2-3, and ITS-5.8S—in determining the genetic relationships between six strains of *P. yezoensis* from China and Japan. The four DNA barcodings showed high sequence homologies varying from 97.8% to 100%, and the homology of RUBISCO Spacer was 100%. Four Chinese strains (LS, B4, HT, and TM18) shared the same UPA sequence. However, the barcoding was different from that of the Japanese strains GT and ROS-2 and the homology was 99.2%. The homologies of Cox2-3 and ITS-5.8S sequences were 97.8%–99.2% and 98.4%–99.8% respectively, which were lower than those of RUBISCO Spacer and UPA. Phylogenesis of UPA, Cox2-3 and ITS-5.8S sequences revealed that the four Chinese strains clustered into one branch according to their UPA and ITS-5.8S sequences, whereas the two Japanese strains belonged to another branch. These results were consistent with their actual relationships. Moreover, the four Chinese strains could be further distinguished according to their ITS-5.8S sequences, but were identified as in the same branch with the Cox2-3 barcoding. The results confirmed that ITS-5.8S was the most effective barcoding for identifying *P. yezoensis* strains in this study.

Key words *Pyropia yezoensis*; DNA barcodings; Strains; Germplasm identification

① Corresponding author: YAN Xinghong, E-mail: xhyan@shou.edu.cn