

ICS 65.150  
B 51

**SC**

# 中华人民共和国水产行业标准

SC/T 2082—2018

---

## 坛 紫 菜

*Pyropia haitanensis*

2018-12-19 发布

2019-06-01 实施

---

中华人民共和国农业农村部 发布

## 前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本标准由农业农村部渔业渔政管理局提出。

本标准由全国水产标准化技术委员会海水养殖分技术委员会(SAC/TC 156/SC 2)归口。

本标准起草单位:福建省水产技术推广总站、集美大学。

本标准主要起草人:黄健、刘燕飞、谢潮添、陈燕婷、宋武林、纪德华、徐燕、翁祖桐、陈曦飞、陈昌生。

# 坛 紫 菜

## 1 范围

本标准给出了坛紫菜[*Pyropia haitanensis* (Chang et Zhang) 1960]的学名与分类、主要形态特征、繁殖特性、细胞遗传学特性、分子遗传学特性、检测方法及判定规则。

本标准适用于坛紫菜的种质检测与鉴定。

## 2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

SC/T 2064 坛紫菜种藻和苗种

## 3 学名与分类

### 3.1 学名

坛紫菜[*Pyropia haitanensis* (Chang et Zhang) 1960]

### 3.2 分类

红藻门(Rhodophyta)、红藻纲(Rhodophyceae)、红毛菜目(Bangiales)、红毛菜科(Bangiaceae)、紫菜属(*Pyropia*)。

## 4 主要形态特征

### 4.1 叶状体

叶状体呈薄膜状,其形态为披针形、亚披针形或针形、亚卵型或长亚卵形,边缘无皱褶或稍有皱褶,边缘细胞具有锯齿,基部圆形、楔形、脐形或心脏形(见图1)。自基部细胞向下延伸的假根丝固着在生长基质上。暗绿色带褐色或红褐色。自然生长的一般体高为12 cm~18 cm,室内培养和人工栽培的可达2 m以上。叶状体多为单层细胞结构,仅局部为两层细胞,细胞内含一个星状色素体,位居中。叶状体厚度一般为18  $\mu\text{m}$ ~70  $\mu\text{m}$ ,人工栽培的经多次剪收可达100  $\mu\text{m}$ 以上。

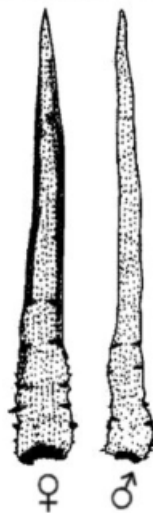


图1 坛紫菜叶状体

4.2 丝状体

从叶片上放散出来的果孢子遇到含碳酸钙的基质如贝壳等就钻入萌发,形成藻落。丝状体在无附着基质的人工培养条件下,可悬浮生长于海水中,形成藻落或藻球,成为游离丝状体(自由丝状体)。丝状体的生长从果孢子萌发开始,经历营养藻丝生长、孢子囊枝生长、壳孢子形成和放散 3 个时期(见图 2),每一个时期随着生长发育形态也有相应的变化。

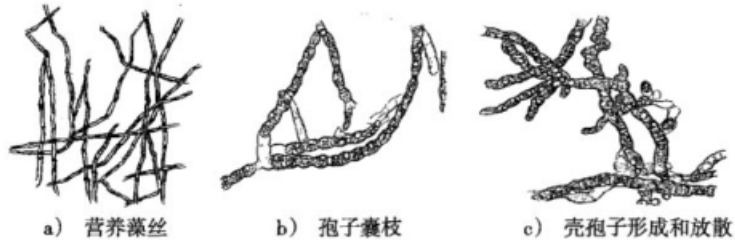
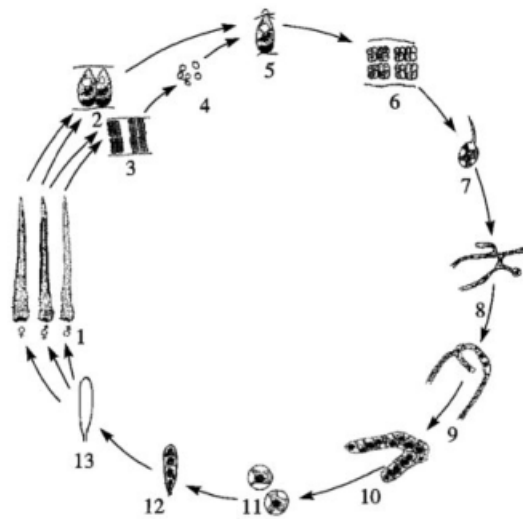


图 2 坛紫菜丝状体

5 繁殖特性

坛紫菜为异型世代交替生活史(见图 3),叶状体大型为单倍体,丝状体微型为二倍体。叶状体多数为雌雄异株,少数雌雄同株。雌雄同株时果孢子囊群和精子囊器常以直线或曲线分别集中区分于叶状体的一定区域上,有的精子囊器和果孢子囊分布在叶状体的上下对半等分。精子囊母细胞为雄性生殖细胞,经多次分裂形成精子囊器。每个精子囊器具有 128 个或 256 个精子囊,分裂式为♂ $A_4B_4C_8$ 或♂ $A_4B_4C_{16}$ ;果胞为雌性生殖细胞,果胞受精后分裂形成果孢子囊,成熟的果孢子囊内含 16 个或 32 个果孢子,分裂式为♀ $A_2B_2C_4$ 或♀ $A_2B_4C_4$ 。果孢子逸出萌发形成丝状体。丝状体经营养藻丝生长,发育成孢子囊枝,成熟分裂形成壳孢子囊,放散出壳孢子,壳孢子萌发时进行的第 1 次和第 2 次细胞分裂为减数分裂,进一步萌发成叶状体。



说明:

- |               |                   |
|---------------|-------------------|
| 1——叶状体;       | 8——丝状藻丝;          |
| 2——果孢(横切面);   | 9——孢子囊枝;          |
| 3——精子囊器(横切面); | 10——壳孢子囊形成与壳孢子放散; |
| 4——精子;        | 11——壳孢子;          |
| 5——受精卵;       | 12——四细胞叶状体;       |
| 6——果孢子囊;      | 13——叶状体幼苗。        |
| 7——果孢子;       |                   |

图 3 坛紫菜生活史

## 6 细胞遗传学特性

叶状体的细胞为单倍核相,染色体  $n=5$ ,丝状体的细胞为双倍核相,染色体  $2n=10$ (见图 4)。

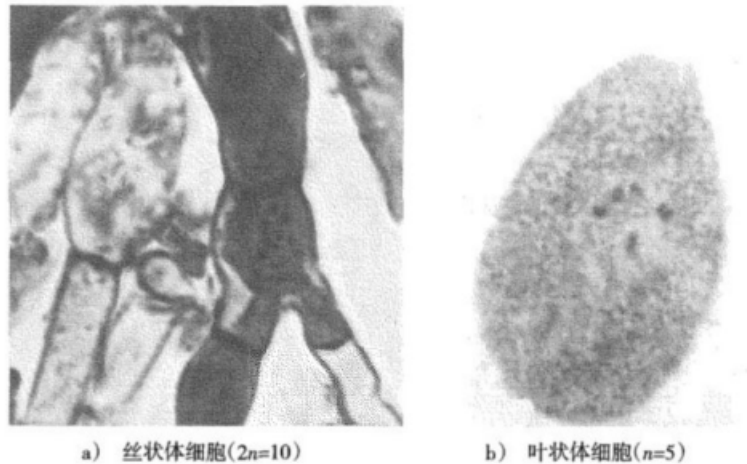


图 4 坛紫菜染色体

## 7 分子遗传学特性

### 7.1 5.8 S 核苷酸序列

坛紫菜 5.8 S 核苷酸序列总长度为 160 bp,序列如下:

```

1 GATACAAC TC TTAGCGGTGG ATATCTTGGC TCTCGCAACG ATGAAGAACG CAGCTAACTG
61 CGATAACTAA TGTGAATTGC AGGACTTCGT GAATCATTGA GTCTTTGAAC GCAAGTTGCG
121 CTCATGTCCG GGTGGATGTG AGCATGCCTG TTTGAGTGTC

```

### 7.2 rbcS-ISR (ribulose - 1,5 - bisphosphate carboxylase/ oxygenase small subunit intergenic spacer region)核苷酸序列

坛紫菜 rbcS - ISR 核苷酸序列总长度 516 bp,序列如下:

```

1 GACTCCAACA GCAAACATCT AGTTTAATGA CTA CTGCTA ATGCTTAATT TGGCAAATTG
61 TAAGTAGAAT TGACTTATAA CAATAAGGAG CATAGAATAG TGAGAGTAAC ACAAGGGACC
121 TTTTCCTTCC TTCCAGACCT AACTGATGAA CAAATTAATA AGCAACTTGC TTATATCGTT
181 TCTAAAGGGT TTTCAGCAA TGTGAGTAT ACTGACGATC CTCATCCAAG AAACATATAT
241 TGGGAATTAT GGGGATTACC TTTATTGAT GTAAAAGATG CATCTGCTGT TATGTATGAG
301 ATTAGTTCAT GCAGAAAAGC AAAACCTAAT TATTATATTA AAGTTAATGC TTTTGATAAT
361 ACTCGAGGTA TTGAAAGTTG TGTACTATCT TTTATTGTAA ATAGACCTAT TAACGAGCCA
421 GGGTTCTTAT TACAACGCCA AGACTTTGAA GGTAGAACTA TGAAATATAG TTTACATAGT
481 TATGCTACTG AAAAGCCTGA AGGAGCTAGA TATTAA

```

## 8 检测方法

### 8.1 抽样方法

按 SC/T 2064 的规定执行。

### 8.2 主要形态特征检测

#### 8.2.1 叶状体

按 4.1 的规定采用目视法和显微镜检测。

#### 8.2.2 丝状体

按 4.2 的规定采用显微镜检测。

#### 8.3 染色体检测

见附录 A。

#### 8.4 DNA 片段序列检测

##### 8.4.1 坛紫菜 DNA 提取

参见附录 B。

##### 8.4.2 序列扩增引物

###### 8.4.2.1 5.8S 核苷酸序列扩增引物

正向引物:5'-GGGATCCGTTTCCGTAGGTGAACCTGC-3';

反向引物:5'-GGGATCCATATGCTTAAGTTCAGCGGGT-3'。

###### 8.4.2.2 rbcS-ISR 核苷酸序列扩增引物

正向引物:5'-GACTCCAACAGCAAACATCTAG-3';

反向引物:5'-TTAATA(T/C)CTAGCTCCTTCAGGC-3'。

##### 8.4.3 PCR 扩增

PCR 扩增反应体系为 25  $\mu$ L, 含 2.5  $\mu$ L 10 $\times$ PCR Buffer, 10 ng 模板 DNA, 2.5 mmol/L  $Mg^{2+}$ , 1.5 U *Taq* DNA 聚合酶, 200 nmol/L 引物, 200  $\mu$ mol/L dNTP, 最后添加无菌 ddH<sub>2</sub>O 至总体积为 25  $\mu$ L。

PCR 扩增具体程序:94 $^{\circ}$ C 预变性 7 min; 每个循环 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 55 $^{\circ}$ C 复性 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 共进行 35 个循环; 循环结束后 72 $^{\circ}$ C 再延伸 7 min。

##### 8.4.4 DNA 序列测定

参见附录 C。

#### 9 判定规则

以第 4 章、第 5 章为主, 参考第 6 章、第 7 章(5.8S 核苷酸序列 K2P 遗传距离 $<2\%$ 和 rbcS-ISR 核苷酸序列 K2P 遗传距离 $<5\%$ )判断检验样品结果。经检验, 符合上述质量要求的样品为合格样品。

**附录 A**  
**(规范性附录)**  
**染色体检测**

**A.1 染色液的配制**

**A.1.1 储存液**

4 g 苏沐精和 1 g 铁矾结晶,溶于 100 mL 的 45% 的醋酸溶液。

**A.1.2 染色液**

每 5 mL 的储存液中加入 2 g 水合三氯乙醛,充分溶解摇匀,存放一天后使用。染色液只能保存一个月,在两周内使用效果最好。

**A.2 染色体检测**

取分裂旺盛时的组织或细胞,遮光处理后 3 h 内,每间隔 30 min 用卡诺氏固定液(无水乙醇:冰乙酸=3:1)固定 1 次样品,24 h 后移至明亮处放置,直至固定的材料变成无色。将少量经过褪色处理的组织或细胞,在 4℃ 的蒸馏水中软化 5 s~10 s,吸干水分后置于载玻片上,滴加染色液,染色时间根据材料不同控制在 5 min~10 min。盖好盖玻片,于火焰上稍加热,使用橡皮进行轻微的压片。制好的片子不能及时进行观察可用石蜡封片。置于显微镜下观察和拍摄照片,先用低倍镜(10×10)调焦,找到具有分裂相的细胞后,再转换到高倍镜(10×40)下观察。

附录 B  
(资料性附录)  
坛紫菜 DNA 提取

采用改良的 CTAB 法。具体步骤如下：

- a) 取 0.5 g 鲜重的丝状体或叶状体,用蒸馏水洗涤 3 遍,转入 5 mL 离心管中,加入 3 mL 65℃ 预热的 CTAB 缓冲液[含 2%(W/V)CTAB,1.4 mol/L NaCl,20 mmol EDTA,100 mmol Tris-HCL(pH 8.0),2%巯基乙醇],高速匀浆;
- b) 将离心管置于水浴锅中,65℃ 温浴 2 h,期间每 10 min 反转 2 次~3 次;
- c) 离心管放在台式高速离心机中离心,15 000 r/min,8 min,把上清液加入到另一离心管中;
- d) 冷却至室温后,轻柔加入等体积的氯仿:异戊醇(24:1),轻缓颠倒 60 min;
- e) 离心机中离心,15 000 r/min,10 min,取上清液至另一离心管中;
- f) 加入 2/3 体积的异丙醇,轻缓颠倒混匀后,于-20℃ 放置 1.5 h;
- g) 离心机中离心,15 000 r/min,10 min,弃上清液;
- h) 在离心管中加入 1 mL 的 70%乙醇,洗 2 次,再用无水乙醇洗一次;
- i) 倒去乙醇,将 DNA 沉淀于室温下放置 30 min~60 min;
- j) 加 1 mL 的 TE 缓冲液,完全溶解后,加 Rnase A 至 50 μg/mL,37℃ 温浴 1 h;
- k) 加等体积的酚:氯仿:异戊醇(25:24:1),颠倒混匀;
- l) 离心机中离心,15 000 r/min,10 min,取上清液至另一离心管中;
- m) 重复步骤 k) 和 l);
- n) 加蛋白酶 K 至 200 μg/mL,37℃ 温浴 1 h;
- o) 重复步骤 k) 和 l);
- p) 加 2 倍体积的无水乙醇、1/2 体积的 NaCl,混匀后在-20℃ 放置 1 h;
- q) 重复步骤 g)~i);
- r) 加 100 μL 的 TE 缓冲液,室温下放置 1 h~2 h,直至 DNA 完全溶解;
- s) 取 2 μL DNA 溶液,稀释 50 倍,用 BECKMAN - DU600 核酸蛋白分析仪检测其浓度与纯度;
- t) 用 0.8%的琼脂糖凝胶检测所提取的基因组 DNA 片段的完整性;
- u) 将 DNA 溶液用 TE 缓冲液稀释至 100 ng/μL 的浓度,置于-20℃ 的冰箱中保存备用。



**附 录 C**  
**(资料性附录)**  
**DNA 序 列 测 定**

### C.1 测序样品预处理

PCR 扩增完毕,取 7  $\mu$ L 扩增产物加 3  $\mu$ L 溴酚蓝后在 1%琼脂糖凝胶中电泳 1 h,经 EB 染色后在紫外灯下观察结果。使用 DNA 片段胶回收试剂盒回收并纯化目的片段。

### C.2 目的片段克隆

将回收的目的片段同 PMD 18-T 载体进行连接(目的片段和载体的摩尔比为 5:1,所用的连接酶为高活性的 T4 连接酶),然后通过热激转化法进行细菌转化。

### C.3 提取和纯化质粒 DNA

用质粒纯化试剂盒从细菌克隆中提取和纯化质粒 DNA。

### C.4 测序

纯化后的质粒 DNA 在 DNA 测序仪上采用 Sanger 双脱氧链终止法原理在两端同时进行。测序引物即为扩增引物;微量滴定板为 96 孔 U 型微量滴定板;链延伸-链终止反应混合液的配置。准备样品和列表,上样到微量滴定板中进行测序。测序电压 160 V/cm,温度 42 $^{\circ}$ C。

### C.5 结果读取

根据凝胶的放射自显影,运用计算机读取 DNA 编码,打印测试结果,然后进行数据处理。

---