

5个紫菜属物种丝状体的微卫星初步遗传分析

吴文婷¹, 张磊², 宋志民¹, 赵翠², 汤晓荣², 刘涛², 陈伟洲¹

(1. 汕头大学海洋生物研究所, 广东 汕头 515063; 2. 中国海洋大学海洋生命学院, 山东 青岛 266003)

摘要: 文章利用 68 对微卫星引物对坛紫菜 (*Porphyra haitanensis*)、半叶紫菜 (*P. katadai*)、条斑紫菜 (*P. yezoensis*)、少精紫菜 (*P. oligospermatangia*) 和皱紫菜 (*P. crispata*) 5 个紫菜属物种的丝状体进行初步的遗传分析, 共筛选出 20 对高多态性适用引物, 在 10 份紫菜丝状体样品扩增位点的多态性比例为 95.24%, 每对引物可扩增的等位基因位点数为 1.22~4.05, 平均为 2.37; 各样品之间的遗传多样性指数为 0.2546~0.8994; 不同物种的遗传距离为 0.1060~1.4066, 同一物种的丝状体材料优先聚类为一支, 表明筛选出的微卫星引物具有良好的遗传分辨能力。

关键词: 紫菜; 微卫星; 等位基因位点; 遗传分化

中图分类号: S 917.3

文献标志码: A

文章编号: 2095-0780-(2012)04-0029-08

Preliminary genetic analysis of conchocelis from 5 *Porphyra* species using microsatellite

WU Wenting¹, ZHANG Lei², SONG Zhimin¹, ZHAO Cui², TANG Xiaorong²,
LIU Tao², CHEN Weizhou¹

(1. Marine Biology Institute, Shantou University, Shantou 515063, China;

2. College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: We conducted a preliminary genetic analysis of conchocelis from 5 *Porphyra* species (*P. haitanensis*, *P. katadai*, *P. yezoensis*, *P. oligospermatangia* and *P. crispata*) by 68 microsatellite primer-pairs, and selected 20 microsatellite primer-pairs with high polymorphism. The polymorphism proportion among 10 *Porphyra* conchocelis reaches 95.24%, and the effective number of alleles for each primer is 1.22~4.05 (average 2.37). The genetic diversity index is 0.2546~0.8994 and the genetic distance between different species is 0.1060~1.4066. Conchocelis from the same species group into one cluster first, which reveals that the selected microsatellite primer-pairs have good genetic resolution power.

Key words: *Porphyra*; microsatellites; allele loci; genetic variation

紫菜(*Porphyra*)属于红藻门、红毛菜科, 已经报道有 134 个物种, 广泛分布于从寒带到亚热带的潮间带海域。紫菜是一类重要的经济红藻, 作为目前世界上人工养殖海藻中经济价值最高的种类, 仅中、日、韩三国紫菜的初级加工品年产值就超过

20×10^9 美元^[1]。中国是世界紫菜的主要生产国和出口国, 主要栽培种类包括条斑紫菜(*P. yezoensis*)和坛紫菜(*P. haitanensis*)。长期以来紫菜的遗传育种研究以诱变育种、单性生殖、选择育种等经典育种技术为主, 相对于蓬勃发展的动植物分子育种研

收稿日期: 2012-04-30; 修回日期: 2012-05-11

资助项目: 国家自然科学基金项目(40776072); 国家公益性行业(农业)科研专项(200903030); 广东省科技计划项目(2010B060200010, 2010B020201015); 汕头市科技计划项目(2010-126)

作者简介: 吴文婷(1986-), 女, 硕士研究生, 从事海藻生物学与实验生态学研究。E-mail: 09wtwu@stu.edu.cn

通讯作者: 陈伟洲, E-mail: wzchen@stu.edu.cn

究而言,分子标记技术尤其是共显性分子标记数量少、应用种类有限,制约了紫菜遗传改良工作的快速发展。微卫星又称为简单序列重复(simple sequence repeat, SSR),作为一种共显性遗传标记,具有多态性高、重复性好等优点^[2],已被广泛应用到海带属(*Laminaria*; *Saccharina*)^[3-4]、江蓠属(*Gracilaria*)^[5]、龙须菜属(*Gracilariopsis*)^[6]、紫菜属(*Porphyra*)^[7-8]等重要大型海藻的遗传多样性、遗传图谱构建和 QTL 定位研究中。

皱紫菜(*P. crispata*)是中国南方沿海野生紫菜的主要种类之一,具有重要的经济价值和药用价值。研究表明,皱紫菜的高温耐受性较坛紫菜和条斑紫菜要强,对环境具有更强的适应能力^[9]。目前中国已经进行皱紫菜人工栽培试验,增加紫菜栽培新种类对于解决坛紫菜栽培生产中因高温而出现“烂菜”等问题具有重要的意义。半叶紫菜(*P. katadai*)和少精紫菜(*P. oligospermatangia*)均为野生种类,主要分布于北方沿海地区,和条斑紫菜都属于雌雄同体的紫菜种类,也是紫菜属遗传学研究的良好试验材料。微卫星标记在紫菜属不同物种中的研究应用较少,关于皱紫菜、半叶紫菜和少精紫菜等紫菜属物种的微卫星标记尚未见报道。笔者利用微卫星 DNA 分子标记技术分析皱紫菜等 5 个紫菜属物种的遗传结构及种质,以便更有效地推动紫菜种质资源评价并辅助紫菜遗传改良,同时对微卫星标记在紫菜属物种遗传分析中的通用性进行探讨,以期紫菜属的分子遗传学研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验所用的紫菜属 5 个物种 10 个品系自由丝状体(表 1)由中国海洋大学汤晓荣老师惠赠,培养于中国海洋大学海洋生物遗传育种研究室。

1.2 基因组 DNA 的提取

紫菜丝状体基因组 DNA 的提取均采用植物基因组 DNA 提取试剂盒(北京天根)法提取,用 Nanodrop 1000 分光光度计测定 DNA 的光密度(OD)和浓度,并在 1.0% 琼脂糖凝胶上电泳(100 V 30 min)检测,用 JS-380A 自动凝胶图像分析仪拍照并进一步检验 DNA 的质量和浓度。

1.3 微卫星引物合成及筛选

现有的文献报道紫菜微卫星引物共 68 对:25 对引自 SUN 等^[10]发布的微卫星引物,10 对引自刘

表 1 此试验所用的 10 个品系紫菜丝状体信息表

Tab. 1 Information of 10 lines of *Porphyra* conchocelis in this study

序号 No.	品系代码 line code	物种名称 species name
1	PH1	坛紫菜 <i>P. haitanensis</i>
2	PH2	坛紫菜 <i>P. haitanensis</i>
3	PH3	坛紫菜 <i>P. haitanensis</i>
4	PH4	坛紫菜 <i>P. haitanensis</i>
5	PK1	半叶紫菜 <i>P. katadai</i>
6	PK2	半叶紫菜 <i>P. katadai</i>
7	PY1	条斑紫菜 <i>P. yezoensis</i>
8	PY2	条斑紫菜 <i>P. yezoensis</i>
9	PO	少精紫菜 <i>P. oligospermatangia</i>
10	PC	皱紫菜 <i>P. crispata</i>

必谦等^[11]发布的微卫星引物,11 对引自 ZUO^[12]发布的微卫星引物,8 对引自 XIE 等^[13]发布的微卫星引物,14 对引自 KONG 等^[14]发布的微卫星引物,引物由华大基因公司合成。以 5 个不同物种的丝状体(PH2, PK2, PY2, PO 和 PC)DNA 样品为模板,对所有引物进行 PCR 筛选,从中选择扩增稳定且条带清晰的微卫星引物(引物信息见表 2)。

1.4 PCR 扩增及电泳

利用筛选出的微卫星引物对 5 个物种的 10 个丝状体品系进行 PCR 扩增。

PCR 反应在 PCR 仪(BIOER)上进行。反应体系为 20 μ L,试剂终浓度分别为 1.5 mmol·L⁻¹, 10 $\times$ PCR buffer[含氯化镁(MgCl₂)], 0.125 mmol·L⁻¹ dNTP, 20 ng 模板 DNA, 0.05 U *Taq* DNA 聚合酶,微卫星引物 1.0 μ L。

PCR 反应程序为 94 $^{\circ}$ C 变性 5 min;接 35 个循环为 94 $^{\circ}$ C 50 s,退火 45 s(退火温度因引物而定),72 $^{\circ}$ C 1 min;72 $^{\circ}$ C 最后延伸 10 min,4 $^{\circ}$ C 保存,1.0% 琼脂糖电泳,100 V 50 min,检测 PCR 产物。取部分选扩产物(3 μ L)与等体积的上样缓冲液(3 μ L)充分混匀,95 $^{\circ}$ C 变性 5 min。点样 6 μ L,在 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶上电泳,仪器为 DYY-12C 电泳仪(北京市六一仪器厂出品),电泳前进行 30 min 预电泳,最大功率恒功率电泳 2 h。银染程序参照 SANGUINETTI 等^[15]报道的方法。室温下自然

干燥, 用扫描仪扫描并保存图像。

1.5 数据统计分析

微卫星标记按共显性标记进行数据统计及分析。根据分子量大小对扩增结果读带, 以二倍体形式记录, 从大到小依次记为 A, B, C……。利用 POP-GENE32 (V 1.31) (<ftp://ftp.microsoft.com/Softlib/MSLFILES/HPGL.EXE>) 软件计算各群体的观测有效等位基因数(N_e)、多态位点百分率(P)、基因多样性指数($Nei's$)、Shannon 信息指数(I)、表观杂合度(H_o)和预期杂合度(H_e)、 $Nei's$ 标准遗传距离(D)、遗传相似度和遗传分化指数(F_{st})。根据 $Nei's$ 标准遗传距离, 利用 MEGA 4.0 (<http://www.megasoftware.net/>) 中的非加权平均算法(UPGMA)对各种群进行聚类分析, 自展检验 1 000 次。

2 结果与分析

2.1 紫菜丝状体基因组 DNA 的提取

所提取的紫菜丝状体基因组 DNA, OD_{260}/OD_{280} 为 1.7 ~ 1.9, 质量浓度为 20 ~ 40 $ng \cdot \mu L^{-1}$, 没有 DNA 降解、RNA 残留及蛋白质污染, 可以满足微卫星遗传分析的需要(图 1)。

2.2 引物筛选结果

从 68 对微卫星引物中筛选出 20 对扩增稳定、

多态性高的引物(表 2), 其部分扩增结果见图 2。其中有 14 对引物在 5 个物种中均可扩增出稳定的条带, 扩增片段大小为 192 ~ 420 bp, 且这 14 对引物中有 10 对可在 10 个丝状体中扩增出稳定的条带。

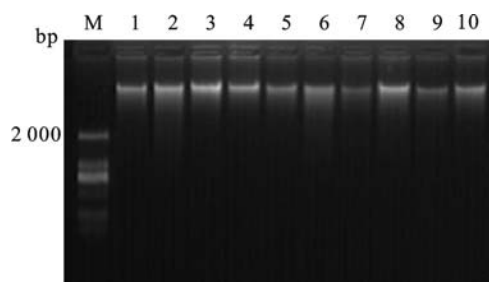


图 1 紫菜丝状体基因组 DNA 在 1.0% 的琼脂糖电泳检测结果

M. DL 2 000 分子量标准; 1~4. PH1、PH2、PH3、PH4, 坛紫菜; 5~6. PK1、PK2, 半叶紫菜; 7~8. PY1、PY2, 条斑紫菜; 9. PO, 少精紫菜; 10. PC, 皱紫菜

Fig. 1 Electrophoresis in 1% agarose gel of genomic DNA

obtained from conchocelis of *Porphyra*

M. DL 2 000 DNA marker; 1~4. PH1, PH2, PH3, PH4, *P. haitanensis*; 5~6. PK1, PK2, *P. katadai*; 7~8. PY1, PY2, *P. yezoensis*; 9. PO, *P. oligospermatangia*; 10. PC, *P. crispata*

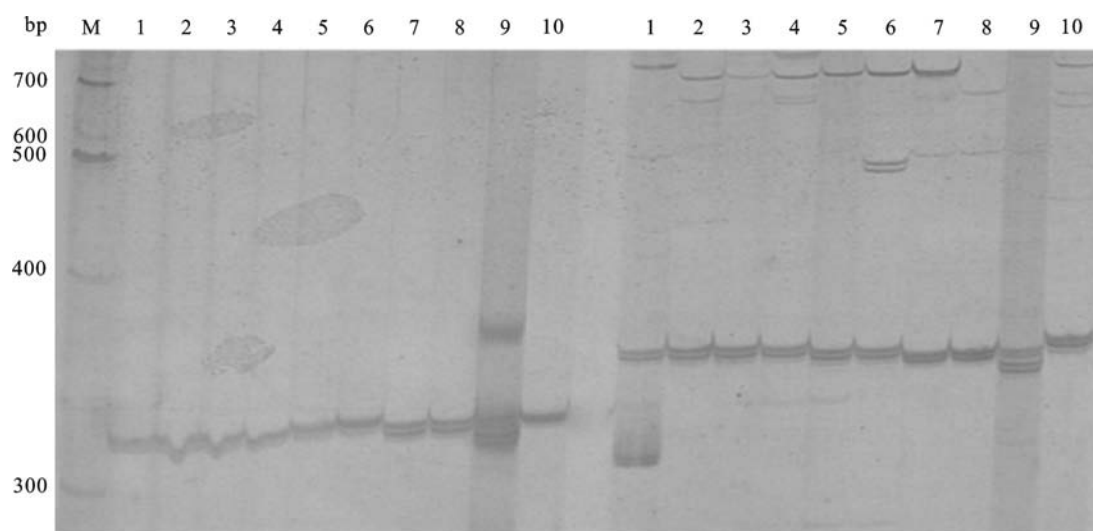


图 2 部分微卫星引物(左: SSR-ZC15; 右: SSR-ZC20)在 10 个紫菜丝状体中的扩增结果

M. DL100 分子量标准; 1~10. PH1, PH2, PH3, PH4, PK1, PK2, PY1, PY2, PO, PC

Fig. 2 Electrophoresis of part of microsatellite primer-pairs (L: SSR-ZC15; R: SSR-ZC20) in

10 lines of *Porphyra* conchocelis

M. DNA maker DL100; 1~10. PH1, PH2, PH3, PH4, PK1, PK2, PY1, PY2, PO, PC

表 2 20 对微卫星引物序列和特异退火温度

Tab. 2 Sequence of 20 pairs of microsatellite marker primers and specific annealing temperature for PCR amplification

引物编号 primer No.	引物序列(5'→3') primer sequence	重复序列 repetitive sequence	退火温 度/℃ annealing temperature	片段范围 fragment range	GenBank 登录号 GenBank accession No.	参考文献 reference
SSR-ZC1	TTCGCTGCGTTTCACCTTACATTT ACAAGGCCAACCCGAACACA	(TGCG) ₆	60	205	AV434771	[10]
SSR-ZC2	GGCTGCGGCTGAGTCACAGA GTCGCTCCAACCTCCTCTGCT	(AGC) ₈	60	235	AU194221	[10]
SSR-ZC3	TGGTGCTGTCTTCCAACGAGTA CGGCTGTGCGACCTCGTTATA	(AGC) ₁₃	60	245	AU196122	[10]
SSR-ZC7	CGCTCAACCACTTCGTCAG CATTGTGGCGTTGTTGTCATA	(AAC) ₁₀₊₁	58	261	AU191538	[10]
SSR-ZC9	CCGTCGTCAGCAGGAGCA ATGTGAGAAGCCAGTAGGGAAAGT	(GGC) ₇	60	200	AV434560	[10]
SSR-ZC10	ACTTCCATCGCTGTCTTCGCT CTGAGCTGCGTGTTGTGGTT	(AGC) ₈	60	196	AU192094	[10]
SSR-ZC12	TCAACCATCAGCCATACCGAC GACATGTCCGCCACCTTGTA	(ACC) ₁₁	58	192	AV435510	[10]
SSR-ZC15	TGACTTCCTCATCGACATTGT GCCATAGTACATTGTTGCTG	(AGC) ₈	55	319	AU187439	[10]
SSR-ZC16	TACCAGGTCGACCAGGAGCA TCCAACCTCTGCAGTGTCCGTT	(AGC) ₁₁	60	291	AU193458	[10]
SSR-ZC19	ACCTCCTCGGCTACTTCAGA GGATACAACGCCTGCTCCAT	(AGC) ₇	58	276	AV431181	[10]
SSR-ZC20	GGCAGCAGCCATGATGTA CCGTCAGGCAGAAGAGAAT	(AGC) ₈₊₈	55	339	AV433675	[10]
SSR-ZC23	CAAGGGCTACTGCTACTA CAA TACAAAAAGACTCTCGTG GCA	(AAC) ₁₇	55	249	AU195299	[10]
SSR-ZC25	CCGTGCTACTACGGCTA CAA GTCCGGTGCAGGTTG TTCT	(AAC) ₉₊₁₁	58	302	DN606134	[10]
SSR-ZC36	CCAACGATGGGTTTCTTCAA ACTTCATGCCCCTGCCGATG		55	300		[7]
SSR-ZC38	GGACAAGGGGTAATGGCT TGGAAAACTTCCTGGGTG	(CA) ₁₇	50	212 ~ 226	DQ831155	[12]
SSR-ZC43	GGAATGCCTTGCACCTGG CACTATTGACCGAATCCGCTAC	(GT) ₂₆	55	408 ~ 420	DQ831185	[12]
SSR-ZC44	CGTGCGAGTCATAGTCTGCT ACAGCCAGTGCAAGAACACC	(GTGA) ₂₆	55	191 ~ 200	DQ831194	[12]
SSR-ZC47	CTAGACGGAGTGCGGCTGAC GCTCCTCCACGAGCATCAGG	(CA) ₉	58	176 ~ 196	DQ831197	[12]
SSR-ZC54	GGTGGCAGTGAAGCCAAACA ACCCAGCAAAGTGCCTGAGC	(CG) ₇	60	229	DN607742	[13]
SSR-ZC61	AACAGAGATACGGAGAGC ATCAGATTGGAATTGCCT	(GT) ₈ ..(TG) ₁₁	50	276	EU670707	[14]

2.3 有效等位基因数和遗传杂合度

10个紫菜丝状体个体间的平均 N_e 为 2.37, 平均 H_e 为 0.550 9, I 为 0.899 9, F_{st} 为 0.400 0 ~

1.000 0, 平均为 0.733 3。10个品系的紫菜丝状体具有良好的遗传多样性, 且不同材料之间遗传分化较明显(表3)。

表3 20个微卫星的遗传多样性指数

Tab. 3 Genetic diversity index of 20 microsatellite loci

locus	表观杂合度 H_o	预期杂合度 H_e	有效等位基因数 N_e	Shannon 信息指数 I	遗传分化指数 F_{st}	基因流 N_m
SSR-ZC1	0.700 0	0.647 4	2.60	1.010 4	0.430 9	0.330 2
SSR-ZC2	1.000 0	0.733 3	2.57	1.011 4	0.844 6	0.046 0
SSR-ZC3	0.333 3	0.333 3	1.38	0.450 6	0.946 5	0.014 1
SSR-ZC7	0.000 0	0.484 8	1.80	0.636 5	1.000 0	0
SSR-ZC9	0.000 0	0.189 5	1.22	0.325 1	1.000 0	0
SSR-ZC10	0.100 0	0.721 1	3.17	1.565 4	0.927 0	0.019 7
SSR-ZC12	0.600 0	0.526 3	2.00	0.693 1	0.400 0	0.375 0
SSR-ZC15	0.100 0	0.415 8	1.65	0.687 4	0.873 4	0.036 2
SSR-ZC16	0.444 4	0.679 7	2.79	1.161 6	0.718 3	0.098 0
SSR-ZC19	0.666 7	0.797 4	4.05	1.565 4	0.625 0	0.150 0
SSR-ZC20	0.784 2	0.784 2	3.92	1.449 0	0.932 9	0.018 0
SSR-ZC23	0.500 0	0.575 0	2.17	0.921 5	0.716 3	0.099 0
SSR-ZC25	0.600 0	0.563 2	2.15	0.845 1	0.439 3	0.319 1
SSR-ZC36	0.111 1	0.385 6	1.57	0.654 7	0.896 9	0.028 7
SSR-ZC38	0.500 0	0.763 2	3.64	1.415 0	0.655 2	0.131 6
SSR-ZC43	0.666 7	0.732 0	3.24	1.239 5	0.600 0	0.166 7
SSR-ZC44	0.571 4	0.571 4	2.13	0.991 1	0.740 3	0.087 7
SSR-ZC47	0.285 7	0.439 6	1.69	0.598 3	0.859 2	0.041 0
SSR-ZC54	0.100 0	0.542 1	2.06	0.823 7	0.902 9	0.026 9
SSR-ZC61	0.500 0	0.684 2	2.86	1.161 1	0.615 4	0.156 3
平均 mean	0.375 2	0.550 9	2.37	0.899 9	0.733 0	0.091 1
标准差 standard deviation	0.288 5	0.205 5	0.872 7	0.392 6		

2.4 遗传距离、遗传相似指数和聚类分析

10个品系紫菜丝状体的遗传相似指数为 0.254 6 ~ 0.899 4, 平均为 0.474 9, 最小值出现在皱紫菜(PC)和半叶紫菜(PK1)中, 最大值出现在条斑紫菜的2个不同品系中; 遗传距离为 0.106 0 ~ 1.406 6, 平均为 0.792 3, 最大值出现在坛紫菜(PH1)和少精紫菜(PO)中, 最小值出现在条斑紫菜的2个不同品系中(表4)。

根据各个体间的遗传距离进行UPGMA聚类分析(图3), 这5个物种的10个品系的紫菜丝状体可以分成2个亚群, 坛紫菜单独聚为一支; 半叶紫菜、条斑紫菜、少精紫菜和皱紫菜聚为另一支, 其中条斑紫菜的2个品系首先聚在一块, 再与少精紫菜聚在一起, 接着与皱紫菜相聚, 最后与半叶紫菜汇聚。

表 4 10 个紫菜品系遗传距离(左下方)和相似性系数(右上方)矩阵
Tab. 4 Genetic distance (lower-triangular data matrix) and genetic similarity
(upper-triangular data matrix) of 10 *Porphyra* lines

POP ID	坛紫菜 1 PH1	坛紫菜 2 PH2	坛紫菜 3 PH3	坛紫菜 4 PH4	半叶紫菜 1 PK1	半叶紫菜 2 PK2	条斑紫菜 1 PY1	条斑紫菜 2 PY2	少精紫菜 PO	皱紫菜 PC
坛紫菜 1 PH1 <i>P. haitanensis</i> 1		0.445 4	0.471 9	0.506 0	0.307 7	0.302 2	0.296 9	0.373 1	0.245 0	0.423 1
坛紫菜 2 PH2 <i>P. haitanensis</i> 2	0.808 9		0.753 8	0.619 8	0.335 0	0.296 1	0.348 5	0.377 2	0.384 7	0.477 0
坛紫菜 3 PH3 <i>P. haitanensis</i> 3	0.751 1	0.282 7		0.860 8	0.555 6	0.527 4	0.485 8	0.465 1	0.391 2	0.436 4
坛紫菜 4 PH4 <i>P. haitanensis</i> 4	0.681 2	0.478 4	0.149 8		0.474 3	0.414 0	0.444 9	0.380 4	0.338 9	0.379 5
半叶紫菜 1 PK1 <i>P. katadai</i> 1	1.178 5	1.093 6	0.587 8	0.745 8		0.872 9	0.502 5	0.465 1	0.425 3	0.254 6
半叶紫菜 2 PK2 <i>P. katadai</i> 2	1.196 7	1.217 1	0.639 9	0.881 8	0.136 0		0.526 4	0.488 2	0.467 7	0.357 1
条斑紫菜 1 PY1 <i>P. yezoensis</i> 1	1.214 3	1.054 2	0.722 0	0.809 8	0.688 1	0.641 8		0.899 4	0.692 4	0.493 5
条斑紫菜 2 PY2 <i>P. yezoensis</i> 2	0.985 9	0.975 1	0.765 5	0.966 6	0.765 5	0.717 0	0.106 0		0.721 8	0.519 7
少精紫菜 PO <i>P. oligospermatangia</i>	1.406 6	0.955 4	0.938 4	1.082 1	0.855 1	0.759 9	0.367 6	0.326 0		0.567 9
皱紫菜 PC <i>P. crispata</i>	0.860 2	0.740 2	0.829 1	0.968 8	1.368 1	1.029 6	0.706 3	0.654 5	0.565 8	

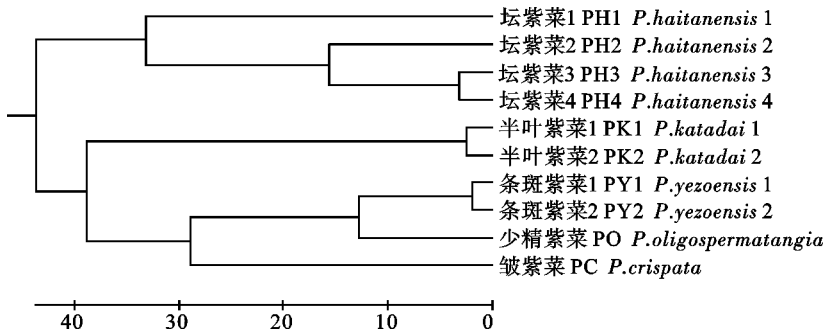


图 3 10 个紫菜品系的 UPGMA 聚类图

Fig. 3 Phylogenetic tree of 10 *Porphyra* lines using method of UPGMA

3 讨论

3.1 引物通用性

微卫星标记的缺点在于微卫星引物具有种属特异性, 在对一个物种首次进行微卫星分析时必须要进行微卫星引物的开发, 较费时耗力^[10]。有关研究认为微卫星引物可以在近缘物种间进行转移应用, 但能否转移以及转移的成功率在不同的物种间

表现较大的差异^[16-17]。SUN 等^[10]、刘必谦等^[11]、XIE 等^[13]和 KONG 等^[14]通过对一个紫菜属物种设计的微卫星引物进行了引物种间转移扩增研究, 证明微卫星引物在不同物种间具有高的通用性。笔者从 68 对微卫星引物中筛选出 20 对通用微卫星引物, 筛选比例为 29.4%, 其中 14 对引物均能在 5 个物种中进行有效扩增, 证实上述选扩的微卫星位点的侧翼序列在坛紫菜、条斑紫菜、少精紫菜、半

叶紫菜及皱紫菜具有比较高的保守性。

所研究的 68 对微卫星引物中 63.24% 来自紫菜 EST 序列, 36.76% 来自基因组文库, 而筛选出的 20 对引物中有 15 对来自 GenBank 中紫菜 EST 数据库, 占 34.88%, 5 对来自基因组, 占 20%。EST 序列来自于有表达意义的 mRNA 反转录的 cDNA, 相对于含有内含子的基因组文库, 在物种进化中更具保守性, 来自于 EST 序列的微卫星引物可以在更大范围的紫菜属内扩增出多态性位点。因此, EST-SSR 与基因组 SSR 相比更容易在不同物种中进行转移扩增。

3.2 紫菜属的遗传多样性

N_e 作为衡量 SSR 引物多态性高低的一个标准, 表明了物种或品系间的遗传多样性。 N_e 越高, 物种或品系间的遗传多样性越高, 在笔者的研究中每对引物可扩增的 N_e 平均为 2.37。张鹏等^[18]对坛紫菜 9 个品系的亲缘关系进行 SSR 标记分析, 平均 N_e 为 1.72。KONG 等^[14]用微卫星标记对条斑紫菜进行遗传分析, 平均 N_e 为 1.81。XIE 等^[13]用相同标记分析了坛紫菜 15 品系的遗传多样性, 平均 N_e 为 2.81, 此研究获得的 N_e 结果与前人研究相似, 同时显示种间的遗传多样性高于种内。

DAYANANDAN 等^[19]用 4 个微卫星引物对就可区分白杨(*Populus tremuloides*)的 34 个品系, 只有 2 个品系没有被区分开; BECHER 等^[20]用 3 对引物就可以很好区分 44 个天竺葵(*Pelargonium*)品系。此研究从 68 对微卫星引物中筛选出 20 对引物, 多态性比例高达 95.25%, 这可能与引物来源有关, 笔者所用的引物 63.24% 来自 EST 序列。然而, 刘必谦等^[7]认为从基因组 DNA 筛选出的微卫星, 其信息量要比来自 EST 的丰富, 而此研究结果并不支持这一观点。崔灵英等^[21]用 ISSR 标记对 4 种紫菜叶状体进行分析, 获得多态性条带比例达 95.5%。贾建航等^[22]在对 15 个紫菜种(系)的丝状体进行 RAPD 分析时得到多态性比例达 97.1%; 杨锐等^[23]用 AFLP 对坛紫菜 8 个品系的丝状体进行分析得到 96.97% 的多态性位点, 这些结果与笔者的研究结果相似, 进一步显示了紫菜物种的遗传变异相当丰富。

3.3 5 种紫菜的种间遗传关系

5 个紫菜属物种 10 个品系丝状体的遗传相似指数平均为 0.474 9, 说明个体间的亲缘关系比较远。曾呈奎等^[1]曾根据叶片边缘的细胞排列方

式将真紫菜亚属分为全缘紫菜组、刺缘紫菜组和边缘紫菜组, 并且认为该特征具有进化上的意义。根据这一分类系统皱紫菜、坛紫菜均属于刺缘紫菜组, 条斑紫菜、半叶紫菜和少精紫菜属于全缘紫菜组。此研究中 5 个物种中少精紫菜和条斑紫菜首先聚在一起, 两者的遗传距离最为接近, 这一结果与崔灵英等^[21]用 ISSR 分子标记对紫菜叶状体分析的结果一致, 也符合经典分类学结果; 根据笔者的研究结果, 皱紫菜聚类在条斑紫菜、半叶紫菜和少精紫菜的内部, 而不是与坛紫菜聚类为一支, 这与杨立恩等^[24]对紫菜叶状体进行 *rbcL* 基因分类分析结果相矛盾, 同时此研究结果与经典形态分类学认为皱紫菜和坛紫菜都属于刺缘紫菜组的结论也不一致。造成这些差异的原因可能是: 1) 试验材料不一样, 笔者采用的试验材料为丝状体, 而其他学者为叶状体; 2) 各种标记手段本身也存在着差异。

前人的研究表明, 坛紫菜、条斑紫菜、皱紫菜、半叶紫菜和少精紫菜这 5 种紫菜之间具有重要生物学特征的差异, 例如少精紫菜和条斑紫菜染色体 $n=3$, 皱紫菜、半叶紫菜和坛紫菜染色体 $n=5$ ^[1], 这一研究结果与笔者的聚类分析结果有一定的相关性。通过聚类分析结果可以较真实地反映这 10 个品系紫菜丝状体间的亲缘关系, 进一步显示微卫星分子标记在大型海藻分类学上具有一定的应用价值。

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: 184-186.
ZHANG Xuecheng, QIN Song, MA Jiahai, et al. Genetics of algae[M]. Beijing: Chinese Agriculture Press, 2005: 184-186. (in Chinese)
- [2] 周延清, 杨清香, 张改娜. 生物遗传标记与应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2008: 155-156.
ZHOU Yanqing, YANG Qingxiang, ZHANG Gaina. Biological genetic markers and application [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2008: 155-156. (in Chinese)
- [3] LIU Fuli, WANG Xueliang, YAO Jianting, et al. Development of expressed sequence tag-derived microsatellite markers for *Saccharina* (*Laminaria*) *japonica*[J]. J Appl Phycol, 2010, 22(2): 109-111.
- [4] ENRIQUE A M, LEYLA C, BILLOT C, et al. Microsatellites of *Laminaria digitata* tested in *Lessonia nigrescens*: evaluation and improvement of cross amplification between kelps of two different families[J]. J Appl Phycol, 2005, 17(3): 245-253.

- [5] LUO H, MÖRCHEN M, ENGEL C R, et al. Characterization of microsatellite markers in the red alga *Gracilaria gracilis* [J]. Mol Ecol, 1999, 8(4): 700–702.
- [6] 张学成, 贺扬, 徐涤. 龙须菜微卫星 DNA 标记筛选及系统分析[J]. 中国海洋大学学报: 自然科学版, 2009, 39(2): 259–264.
- ZHANG Xuecheng, HE Yang, XU Di. Screening microsatellite sequences from *Gracilaria lemaneiformis* and its phylogenetic analysis [J]. Periodic Ocean Univ China: Natural Science, 2009, 39(2): 259–264. (in Chinese)
- [7] 刘必谦, 曾庆国, 骆其君, 等. 微卫星标记在坛紫菜丝状体品系 DNA 指纹构建中的应用[J]. 水产学报, 2005, 29(3): 324–336.
- LIU Biquan, ZENG Qingguo, LUO Qijun, et al. Establishment of the DNA fingerprint of *Porphyra haitanensis* filament lines with microsatellite markers [J]. J Fish China, 2005, 29(3): 324–336. (in Chinese)
- [8] 胡则辉, 周志刚. 微卫星 DNA 标记技术及其在海洋生物遗传学中的应用[J]. 海洋湖沼通报, 2006(1): 37–44.
- HU Zehui, ZHOU Zhigang. Microsatellite DNA marker technique and its application to the genetic of marine organisms [J]. Trans Oceanol Limnol, 2006(1): 37–44. (in Chinese)
- [9] 姚春燕, 姜红霞, 朱建一, 等. 温度胁迫对紫菜丝状体叶绿素荧光特性的影响[J]. 江苏农业科学, 2011(1): 277–282.
- YAO Chunyan, JIANG Hongxia, ZHU Jianyi, et al. Temperature stress on chlorophyll fluorescence characteristics of *Porphyra conchocelis* [J]. Jiangsu Agric Sci, 2011(1): 277–282. (in Chinese)
- [10] SUN Jianwei, LIU Tao, GUO Baotai, et al. Development of SSR primers from EST sequences and their application in germplasm identification of *Porphyra* lines (Rhodophyta) [J]. Eur J Phycol, 2006, 41(3): 324–336.
- [11] 刘必谦, 曾庆国, 骆其君, 等. 条斑紫菜 (*Porphyra yezoensis*) dbEST 中筛选微卫星位点及引物种间转移扩增[J]. 海洋与湖沼, 2005, 36(3): 248–254.
- LIU Biquan, ZENG Qingguo, LUO Qijun, et al. Isolation of microsatellite loci from dbEST of algae *Porphyra yezoensis* and primer amplification of interspecies transfer [J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2005, 36(3): 248–254. (in Chinese)
- [12] ZUO Zhenghong, WANG Chonggang, CAO Xiaohua, et al. Isolation and characterization of microsatellite loci from a commercial cultivar of *Porphyra haitanensis* [J]. Mol Ecol Notes, 2007, 7(3): 522–524.
- [13] XIE Chaotian, CHEN Changsheng, JI Dehua, et al. Characterization, development and exploitation of EST-derived microsatellites in *Porphyra haitanensis* Chang et Zheng (Bangiales, Rhodophyta) [J]. J Appl Phycol, 2009, 21(3): 367–374.
- [14] KONG Fanna, MAO Yunxiang, YANG Hui, et al. Genetic analysis of *Porphyra yezoensis* using microsatellite markers [J]. Plant Mol Biol Rep, 2009, 27(4): 496–502.
- [15] SANGUINETTI C J, DIAS N E, SIMPSON G. Rapid silver straining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels [J]. Biotechniques, 1994, 17(5): 914–921.
- [16] PEAKALL R, GILMORE S, KEYS W, et al. Cross-species amplification of soybean (*Glycine max*) simple sequence repeats (SSRs) within the genus and other legume genera: implications for the transferability of SSRs in plants [J]. Mol Biol Evol, 1998, 15(10): 1275–1287.
- [17] VARSHNEYA R K, SIGMUNDA R, BORNERA A, et al. Inter-specific transferability and comparative mapping of barley EST-SSR markers in wheat, rye and rice [J]. Plant Sci, 2005, 168(1): 195–202.
- [18] 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[J]. 中国水产科学, 2009, 16(9): 842–849.
- ZHANG Peng, ZHANG Yuan, WANG Tiegan, et al. Phylogenetic relationship of the lines of *Porphyra haitanensis* (Rhodophyta, Bangiales) determined by microsatellite DNA markers [J]. J Fish Sci China, 2009, 16(9): 842–849. (in Chinese)
- [19] DAYANANDAN S, RAJORA O P, BAWA K S. Isolation and characterization of microsatellites in trembling aspen (*Populus tremuloides*) [J]. Theor Appl Genet, 1998, 96(6/7): 950–956.
- [20] BECHER S A, STEINMETZ K, WEISING K, et al. Microsatellites for cultivar identification in *Pelargonium* [J]. Theor Appl Genet, 2000, 101(4): 643–651.
- [21] 崔灵英, 许璞, 朱建一, 等. 4 种紫菜叶状体的 ISSR 分子标记分析[J]. 中国水产科学, 2006, 13(3): 371–377.
- CUI Lingyin, XU Pu, ZHU Jianyi, et al. Inter-simple sequence repeats (ISSR) applied in four species of *Porphyra* (Rhodophyta, Bangiales) [J]. J Fish Sci China, 2006, 13(3): 371–377. (in Chinese)
- [22] 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.
- JIA Jianhang, WANG Ping, JIN Demin, et al. The application of RAPD markers in diversity detection and variety identification of *Porphyra* [J]. Acta Botanica Sinica, 2000, 42(4): 403–407. (in Chinese)
- [23] 杨锐, 刘必谦, 骆其君, 等. 利用片段长度多态性 (AFLP) 研究坛紫菜的遗传变异[J]. 高技术通讯, 2002, 12(1): 83–86.
- YANG Rui, LIU Biquan, LUO Qijun, et al. Genetic variation of *Porphyra haitanensis* by applying AFLP [J]. High Technol Lett, 2002, 12(1): 83–86. (in Chinese)
- [24] 杨立恩, 金杰, 朱建一, 等. 紫菜 (*Porphyra*) 叶状体 *rbcL* 基因分类学分析[J]. 常熟理工学院学报: 自然科学, 2008, 23(8): 66–71.
- YANG Lien, JIN Jie, ZHU Jianyi, et al. Taxonomy of *Porphyra* (Rhodophyta, Bangiales) based on *rbcL* sequences from the thallus [J]. J Changshu Inst Technol: Natural Science, 2008, 23(8): 66–71. (in Chinese)