

· 研究简报 ·

## 华南沿海4个地理群体江蓠的遗传变异分析

苏天凤, 张汉华, 吴进锋

(中国水产科学研究院南海水产研究所, 广东广州 510300)

**摘要:** 利用 ISSR 标记技术对江蓠属的 2 个种细基江蓠繁枝变种 (*Gracilaria tenuistipitata*) 和龙须菜 (*Gracilaria lemaneiformis*) 的遗传变异进行了研究。所用的细基江蓠繁枝变种材料分别来自粤东 (6 株)、粤西 (3 株)、北部湾 (3 株) 及海南岛 (5 株), 龙须菜来自汕头南澳岛。用 6 条 ISSR 引物进行筛选, 有 5 条可扩增出清晰可辨条带。这 5 条引物共扩增 72 条带, 其中 53 条 (73.61%) 表现出多态性。根据 Nei 等的遗传相似性系数进行分析, 结果表明: 除海南种群外, 同一种群中株间相似性达 1.000, 无任何变异; 海南种群各株间相似性在 0.899 ~ 1.000 之间。4 个地理群体的细基江蓠繁枝变种的相似系数在 0.7955 ~ 0.8764 之间, 北部湾与粤东的江蓠细基繁枝变种的相似性最高 ( $S$  为 0.8764), 北部湾与粤西的细基江蓠繁枝变种相似性最低 ( $S$  为 0.7955)。龙须菜与细基江蓠繁枝变种 2 种间的遗传距离为 0.4630。

**关键词:** 细基江蓠繁枝变种; 龙须菜; ISSR; 遗传变异

**中图分类号:** S968.43\*4; Q755      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1673-2227-(2005)05-0056-04

## Analysis on genetic diversity of four geographical populations of sea moss *Gracilaria* in the coast of waters south China

SU Tian-feng, ZHANG Han-hua, WU Jing-feng

(South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences,  
Guangzhou 510300, China)

**Abstract:** ISSR technique was used to investigate the genetic diversity of the 2 *Gracilaria* algae, including 1 strain *G. lemaneiformis* from Nanao Island and 17 strains *G. tenuistipitata* var. *liui*, which came from west Guangdong waters (3 strains), east Guangdong water (6 strains), Beibu Gulf (3 strains) and Hainai Island (5 strains). Of the 6 ISSR primers screened, 5 primers could produce clear bands. A total of 72 bands were amplified and 57 (79.17%) revealed polymorphism. The data were used to generate Nei's similarity coefficient ( $S$ ). The results showed: besides the population of Hainan, there wasn't any genetic diversity in individuals inter-population because their genetic similarity were all 1.000, the genetic similarity of population of Hainan was among 0.899 ~ 1.000. The genetic similarity were 0.7955 ~ 0.8764 among the four geographical populations of *G. tenuistipitata*. The maximum similarity occurred between Beibu Gulf and East Guangdong waters ( $S = 0.8764$ ). The genetic distance between *G. lemaneiformis* and *G. tenuistipitata* was 0.4630.

**Key words:** *Gracilaria tenuistipitata* var. *liui*; *G. lemaneiformis*; ISSR; genetic diversity

收稿日期: 2005-06-24; 修回日期: 2005-07-01

资助项目: 国家“863”高技术研究发展计划项目 (2003AA627030)

作者简介: 苏天凤 (1969-), 女, 副研究员, 从事渔业生物多样性保护与种质资源保存研究。E-mail: lu5555@sohu.com

通讯作者: 张汉华, E-mail: zhh502@163.net

江蓠属暖水性红藻类, 大多数为一年生, 分布于温带、亚热带和热带海域。细基江蓠繁枝变种为多年生, 一年四季均能生长, 分布在低潮线以下的水域中, 是我国华南沿海大面积栽培的对象, 其鲜品可鲍养殖的饲料, 干品用于提取藻胶。龙须菜多生长在潮间带下部沙沼中到潮下带, 是提取琼脂的优良原料。

在真核生物基因组中均存在着由1~4个碱基对组成的简单重复序列 (simple sequence repeat, SSR)。简单序列重复区间扩增多态性 (inter-simple sequence repeat, ISSR) 是由 Zietkiewicz 等<sup>[1]</sup>于1994年创建的、在SSR基础上发展起来的一种分子标记。它的生物学基础仍然是基因组中存在的SSR。ISSR标记根据生物广泛存在SSR的特点, 利用基因组中常出现的SSR本身设计引物, 无需预先克隆和测序, DNA用量少, 技术要求低, 成本低廉。相对于随机引物扩增多态性 (RAPD) 技术, ISSR则具有更好的稳定性和可重复性, 可以提供更为可靠的遗传信息。其在植物领域中已经广泛用于重要的农作物如水稻、小麦和大豆等的品系鉴定、遗传作图、基因定位及遗传多样性分析等<sup>[2-4]</sup>。但在藻类分析研究中并不多见, 本文利用ISSR技术主要对华南沿海的常见细基江蓠繁枝变种和龙须菜遗传变异进行了初步研究。

## 1 材料和方法

### 1.1 研究材料

研究所用的材料分别来自粤东 (yd, 6株)、粤西 (yx, 3株)、北部湾 (bb, 3株) 及海南岛 (hn, 5株) 的大鱼港, 龙须菜来自汕头南澳岛 (st, 1株)。带回实验室后先在自来水下清洗, 后在蒸馏水中清洗, 稍干即在解剖镜下观察以确定没有其它微藻。

### 1.2 方法

1.2.1 基因组DNA的提取 采用杭州维特洁生物技术有限公司生产的动/植物组织细胞基因组DNA小量纯化试剂盒, 按照说明提取基因组DNA, 所获DNA稀释10倍后用于

1.2.2 ISSR的PCR扩增 ISSR引物由原上海博亚生物技术有限公司合成, 其序列见表1。用于PCR反应的试剂购自宝生物工程(大连)有限公司。PCR反应在德国BIO-Metra T1 Thermocycler PCR仪上进行。PCR反应总体积为50  $\mu\text{L}$ , 其中10  $\times$  Ex Taq Buffer 5  $\mu\text{L}$ , Ex Taq polymerase 0.3  $\mu\text{L}$  (1.5 U), dNTP (2.5 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ ) 4  $\mu\text{L}$ , 10 pmol $\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 引物2  $\mu\text{L}$ , 1  $\mu\text{L}$ 模板DNA, 其余为灭菌蒸馏水。扩增条件为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性5 min, 之后进行32个循环 (94 $^{\circ}\text{C}$  50 s, 48 $^{\circ}\text{C}$  2 min, 72 $^{\circ}\text{C}$  2 min), 引物P4和P6的复性温度为50 $^{\circ}\text{C}$ , 最后72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸7 min。

1.2.3 ISSR产物的检测 扩增产物经1.5% TAE琼脂糖凝胶电泳, 在英国Syngene公司的GenGenius全自动凝胶成像分析系统照像。

1.2.4 数据分析 统计ISSR扩增条带的有无, 强带和可重复出现的弱带记为1, 否则为0。采用Nei等的计算法  $S = 2N_{xy} / (N_x + N_y)$  计算两两材料间的相似性系数 (similarity coefficient), 其中  $N_{xy}$  为材料  $x$  和  $y$  共有的条带,  $N_x$  和  $N_y$  分别为材料  $x$  和  $y$  各自的条带数<sup>[5]</sup>。  $P$  为遗传距离, 按公式  $P = 1 - S$  计算。

## 2 结果与讨论

### 2.1 基因组DNA扩增结果

所用6条引物分别来自龙须菜<sup>[6]</sup>、串珠藻 *Batrachospermum boryanum* 的ISSR序列<sup>[7]</sup>以及江蓠 *G. gracilis* 的SSR序列<sup>[8]</sup>。除1条引物扩增带模糊未扩增出条带外, 其它引物扩增带清晰。由于5条引物在除海南岛外种群中扩增情况完全相同, 因此将各个种群的DNA混合后扩增, 扩增情况见表1。

从引物P1扩增电泳 (图1) 可知PCR扩增条带大小在0.30~3.0 kb之间。不同引物在所有材料中的扩增条带总数不同, 5条引物的扩增条带总数从3条到21条不等。引物P1扩增条数最多, 其次为P3, 最少为P4。

表1 引物序列及扩增结果

Tab. 1 The sequences and amplified results of 5 primers

引物 primer	序列 sequence	扩增位点数 no. of bands	多态位点数 no. of polymorphic bands	多态位点比例/% proportion of polymorphic bands
P1	(GA) <sub>7</sub> GT	21	17	80.95
P2	(GA) <sub>7</sub> AC	15	13	86.67
P3	(CA) <sub>6</sub> GG	19	14	73.68
P4	(GT) <sub>6</sub> CC	3	3	100.00
P5	(GAA) <sub>6</sub>	14	6	42.86

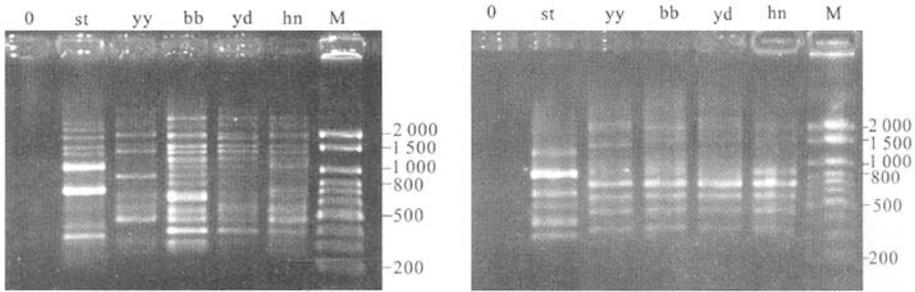


图1 引物 P1 (左) 和 P2 (右) 的扩增图谱

0. 空白对照; M. DNA 标记

Fig. 1 Amplified bands of primer P1 (left) and P2 (right)

0. blank contrast; M. DNA marker

2.2 数据分析结果

根据  $p = \text{多态性扩增片段数} / \text{扩增片段总数}$ , 计算出 5 份材料间的多态性位点比例为 73.61%, 其相似性系数及相对遗传距离见表 2。

数字矩阵对角线下的数据表示遗传距离, 数字矩阵对角线上的数据表示遗传相似性系数。将此结果用 NJ 方法进行处理, 得到图 2 所示的聚类结果。

表 2 5 种江蓠材料间的遗传相似性系数和相对遗传距离

Tab. 2 Genetic similarity indices and relative genetic among 5 *Gracilarias*

样品 samples	st	yy	bb	yd	hn
st	-	0.4938	0.4578	0.5366	0.6588
yy	0.5062	-	0.7955	0.8050	0.8046
bb	0.5422	0.2145	-	0.8664	0.8043
yd	0.4634	0.1950	0.1336	-	0.8132
hn	0.3412	0.1954	0.1957	0.1868	-

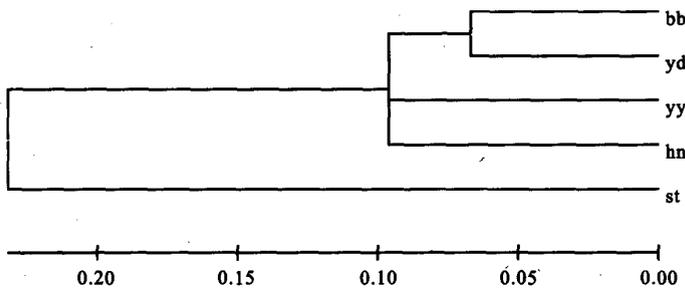


图 2 用 NJ 法构建的 5 种江蓠亲缘关系图

Fig. 2 Relationships among 5 *Gracilarias* based on NJ methods

3 讨论

本实验利用 ISSR 技术对细基江蓠繁枝变种种内及不同地理种群间与龙须菜的遗传变异进行了研究, 发现除海南

种群外, 其它群体种内各株间相似系数均为 1.000, 说明细基江蓠繁枝变种种内的遗传多样性极小。但是不同地理群体间的遗传变异较大, 遗传变异最大的发生在北部湾与粤西群体之间,  $P$  值达 0.2145。据葛颂等引用的文章, 认为

以无性繁殖为主的植物由于每个无性集群在大部分位点上都是纯合的, 形态变异也很小, 因此遗传多样性水平较低, 但不同的无性集群之间都有很大或明显的差异, 这是因为遗传变异分布在无性集群之间<sup>[9]</sup>, 本文的结论与之十分相符, 也与以下等人的研究结果相符。徐涤等<sup>[10]</sup>利用 RAPD 技术对条斑紫菜 (*Porphyra yezoensis*) 和坛紫菜 (*P. haitanensis*) 的遗传变异进行研究, 认为青岛海区的野生条斑紫菜品系与日本的养殖品系之间的遗传距离甚至大于与坛紫菜养殖品系之间的遗传距离, 据此认为地理环境会造成紫菜的遗传差异。杨锐等<sup>[11]</sup>也认为不同的环境因素是造成坛紫菜遗传变异的主要因素。据本实验的研究结果也可以得出造成细基江蓠繁枝变种遗传差异最主要的因素是地理环境。分析海南种群较其它种群具有较高的遗传多样性的原因, 极有可能是因为海南岛较其它地方高温的缘故。在热带, 高温使得生物的生殖力增高, 突变率亦增多, 因而生物种类和生物遗传多样性增加。苏天凤等<sup>[12]</sup>利用 RAPD 技术研究发现海南的合浦珠母贝种群高于其它地理种群的遗传多样性。刘必谦等<sup>[13]</sup>认为温度是造成牡蛎种群遗传多样性的主要原因, 但卫明<sup>[14]</sup>等在利用控制区序列分析环境因子对大石鸡种群遗传结构的影响时认为大石鸡种群遗传变异与年平均气温负相关, 说明随环境温度的升高大石鸡种群遗传多样性反而下降。认为这与大石鸡的起源有关, 大石鸡起源于柴达木盆地, 适于在年平均气温只有 2~4℃ 生活, 因此物种的遗传多样性与温度正相关否还与物种本身的起源环境有关。

#### 参考文献:

- [1] Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) -anchored polymerase chain reaction amplification [J]. *Genomics*, 1994, 20 (2): 176 - 183.
- [2] Nagaoka T, Ogihara Y. Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers [J]. *Theor Appl Genet*, 1997, 94 (5): 597 - 602.
- [3] Akagi H, Yokozeki Y, Inagaki A, et al. A co-dominant DNA marker closely linked to the rice nuclear restorer gene, Rf-1, identified with inter-SSR fingerprinting [J]. *Genome*, 1996, 39 (6): 1205 - 1209.
- [4] Akkaya M S, Bhagwat A A, Cregan P B. Length polymorphisms of simple-sequence repeat DNA in soybean [J]. *Genetics*, 1992, 132 (4): 1131 - 1139.
- [5] Nei M, Li W H. Mathematical model for studying genetical variation in terms of restriction endonucleases [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979, 74 (9): 5267 - 5273.
- [6] 孙雪, 张学成, 茅云翔, 等. 几种江蓠海藻的 ISSR 标记分析 [J]. *高技术通讯*, 2003, 13 (9): 89 - 93.
- [7] Vis M L. Intersimple sequence repeats (ISSR) molecular markers to distinguish gametophytes of *Batrachospermum boryanum* (Batrachospermales, Rhodophyta) [J]. *Phycologia*, 1999, 38 (1): 70 - 73.
- [8] Wattier R, Dallas J F, Destombe C, et al. Single locus microsatellites in Gracilariales (Rhodophyta): High level of genetic variability within *Gracilaria gracilis* and conservation in related species [J]. *J Phycology*, 1997, 33 (5), 868 - 880.
- [9] 葛颂, 洪德元. 遗传多样性及其检测方法 [A]. 见: 钱迎倩, 马克平主编. 生物多样性研究的原理与方法 [C]. 北京: 中国科学技术出版社, 1994. 122 - 140
- [10] 徐涤, 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, 11 (12): 1 - 3.
- [11] 杨锐, 刘必谦, 骆其君, 等. 利用扩增片段长度多态性 (AFLP) 研究坛紫菜的遗传变异 [J]. *高技术通讯*, 2002, 12 (1): 83 - 86.
- [12] 苏天凤, 蔡云川, 张殿昌, 等. 合浦珠母贝 3 个养殖群体的 RAPD 分析 [J]. *中国水产科学*, 2002, 9 (2): 106 - 109.
- [13] 刘必谦, 戴继勋, 喻子牛. RAPD 标记在大连湾牡蛎种群研究中的应用 [J]. *青岛海洋大学学报*, 1998, 28 (1): 82 - 88.
- [14] 卫明, 侯鹏, 黄族豪, 等. 环境因子对大石鸡种群遗传结构的影响 [J]. *生态学报*, 2002, 22 (4): 528 - 534.