

4株形态不同的长心卡帕藻 (*Kappaphycus alvarezii*) 的初步 ISSR 分析

刘晨临¹, 黄晓航¹, 刘建国²

(1. 国家海洋局第一海洋研究所, 山东 青岛 266061; 2. 中国科学院海洋研究所, 山东 青岛 266071)

摘要:为了研究高产胶量品系的遗传学特征,建立了长心卡帕藻(*Kappaphycus alvarezii*)物种的 ISSR 分析方法。用 ISSR 技术对 4 株同一起来源,形态各异的长心卡帕藻进行了遗传学分析,与 11 条 ISSR 引物共扩增得到 60 条带,其中 1 条带具有多态性并推测与稳定的经济性状连锁。说明 ISSR 技术可应用于长心卡帕藻品系筛选,结合其他手段,为分子标记辅助育种提供了可能。

关键词:长心卡帕藻(*Kappaphycus alvarezii*); ISSR; 种质鉴定

中图分类号:S968; Q755

文献标识码:A

文章编号:1000-3096(2009)04-0050-04

长心卡帕藻(*Kappaphycus alvarezii*)曾用名异枝麒麟菜,俗称麒麟菜,属红藻门,真红藻纲,杉藻目,红翎菜科,卡帕藻属,是热带、亚热带多年生海藻^[1]。长心卡帕藻生长速度快,生物量大,是改善富营养化水质的海洋藻类。该藻经济价值较高,是栽培生产卡帕型卡拉胶的主要原料。卡拉胶在食品和轻化工业如生产奶制品、果胶、火腿肠和牙膏等领域有广泛应用。研究发现,卡拉胶还有一定的药学功效,能降低人体血清胆固醇,其膳食纤维有治疗便秘的作用^[2]。

长心卡帕藻原产菲律宾和印度尼西亚等热带地区,我国长心卡帕藻是 1984 年由中国科学院海洋研究所从菲律宾引进的^[3],经过 20 多年的营养繁殖和驯化栽培,目前已经在海南省、广西和福建等地形成约上万亩的栽培规模,年产约 1 万 t 干藻。目前国产长心卡帕藻的含胶量和凝胶强度与国外产品相比还有一定差距,原因尚不十分清楚。长心卡帕藻的藻体形状常发生扭转、膨大等变化,形态上具有很大的不确定性,时常出现不规则芽和分枝,并且存在枝芽多少稀疏的差异。上述差异究竟属于生理性变化还是遗传性差异目前尚不清楚,同时上述性状变化与生长速率、含胶量以及凝胶强度等经济性状之间的关系亦十分模糊,限制了该藻的品系改良,也在一定程度上制约着我国长心卡帕藻养殖和卡拉胶产业的发展。采用传统育种技术和分子标记手段相结合,筛选性状好、产胶量高的品系,是今后卡帕藻研究的重要方向。

ISSR 是基于 SSR 发展起来的一种新型分子标记技术,SSR(简单序列重复)是指由 2~6 个碱基组成的基本序列,串联重复而组成的短片段。ISSR 技

术以基因组内广泛存在的 SSR 序列为主体设计单一引物,扩增反向排列 SSR 之间的一段 DNA 序列,然后对扩增产物进行电泳、染色,根据谱带的有无及相对位置来分析不同样品间 ISSR 标记的多态性。由于 SSR 序列在基因组中广泛分布,且等位变异特别丰富,可以检测到很高的多态性,因此 ISSR 法更适合于种间和种下关系的分析^[4]。被广泛应用于物种亲缘关系和遗传多样性研究、DNA 指纹图谱的建立、遗传图谱的构建和基因定位及分子标记辅助育种等研究中。

迄今为止 ISSR 技术在红藻研究中的应用很少,主要集中在江篱属物种的研究。孙雪等^[5]用 ISSR 标记对 7 种江篱属海藻进行了遗传多样性研究,发现 ISSR 标记的多态性达到 77.48%。李文红等^[6]还采用 ISSR 标记对龙须菜的 1 个野生群体和选育品系进行了亲缘关系分析,并根据特异扩增片段构建了龙须菜选育品系的指纹图谱,可用于区分龙须菜选育种群和野生种群。苏天凤等^[7]利用 ISSR 标记技术对华南沿海 4 个地理群体江篱属的 2 个种细基江篱繁枝变种和龙须菜的遗传变异进行了研究。本文将分子标记技术率先应用于长心卡帕藻的研究,通过 11 条引物扩增序列分析,将引物 P4 扩增的一条差异条带与在生产中有高含胶量稳定性状的卡巴藻品系联系起来,为利用分子标记技术辅助筛选与培育卡帕藻新品种,进行了有益的尝试。

收稿日期:2007-10-09;修回日期:2008-01-05

基金项目:国家海洋公益项目(200705010)

作者简介:刘晨临(1974-),女,山东滨州人,副教授,博士,主要从事海藻遗传学研究,电话:0532-88963155,E-mail: ch.lli@163.com

1 材料与amp;方法

1.1 实验材料及处理

实验长心卡帕藻取自海南省陵水黎安,从养殖

表 1 4 株试验材料的形态学特征

Tab.1 The morphological characteristics of four strains of materials

材料序号	藻体外部特征
NO. 1	藻体呈淡黄褐色,小分枝多,较细长,表面光滑,突起较少
NO. 2	藻体呈淡黄褐色,小分枝粗壮,分枝数量中等但较短,表面疣状突起多
NO. 3	藻体呈淡黄褐色,分枝粗壮,分枝少,表面光滑,疣状突起较少,产胶量较高
NO. 4	藻体呈淡红褐色,分枝和芽密集而细长,表面光滑,疣状突起较少

从上述实验材料的幼嫩尖部取 1~2 cm 长的藻体,用毛笔在无菌海水中充分刷洗,以确定无其他附生杂藻。然后在蒸馏水中清洗,滤纸吸干后即用于 DNA 的提取。

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植物基因组 DNA 小量制备试剂盒,按照说明并稍做改进提取基因组 DNA,所获 DNA 稀释 10 倍后用于扩增。

1.2.2 ISSR 的 PCR 扩增

ISSR 反应体系和反应条件参照 Wang 等^[8]的报道,进行适当的调整。ISSR 引物由上海生工生物技术有限公司合成,其序列见表 2。用于 PCR 反应的试剂购自宝生物工程(大连)有限公司。PCR 反应总体积为 25 μ L,ExTaq 聚合酶 1 U,Mg²⁺ 1.5 mmol/L,dNTP 0.2 mmol/L,引物 0.5 μ mol/L,模板 DNA 5 ng。扩增条件为:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,之后进行 40 个循环(94 $^{\circ}$ C 50 s,退火 45 s,72 $^{\circ}$ C 2 min),最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分离,溴化乙锭(EB)染色后紫外灯下观察拍照。

2 结果与amp;讨论

2.1 DNA 提取

一般而言,红藻由于含有较多的多糖类物质,其 DNA 提取比高等植物和其他藻类要困难得多。就长心卡帕藻而言,藻体中富含卡帕型卡拉胶,有时胶含量高时可以达到干质量的 50%,因此,改良 DNA 提取方法,从藻体中提取出高质量、高纯度的 DNA 用于 ISSR 分析,关系到整个实验的成败。为此,作者一方面选用在其他藻类 DNA 提取中取得较好结

藻中分别按照色泽、出芽多少和形状、分枝粗细等性状筛选,共选取了 4 株形态上有明显差异的藻株进行 ISSR 研究。实验材料序号及形态学特征见表 1。

表 2 选用的 ISSR 引物序列、扩增的条带数目及其退火温度

Tab.2 Primers, sequences, and numbers of polymorphic amplified loci and their annealing temperature

名称	序列 (5' to 3')	扩增条带 (条)	退火温度 ($^{\circ}$ C)	参考文献
P1	(gA) ₇ gT	8/8	48	[5]
P2	(gA) ₇ AC	6/6	48	[5]
P3	(CA) ₆ gg	3/3	48	[9]
P4	(gT) ₆ CC	5/6	48	[9]
P5	(gAA) ₆	6/6	48	[10]
P6	(AAg) ₇	4/4	52	[10]
P7	(Ag) ₈ C	5/5	52	[8]
P8	(Ag) ₈ YC	5/5	52	[8]
P9	(Tg) ₈ RT	4/4	52	[8]
P10	(AC) ₈ Yg	6/6	52	[8]
P11	(CA) ₈ Rg	7/7	52	[8]

果的试剂盒,用于长心卡帕藻基因组 DNA 的提取;另一方面采用含胶量最少的幼嫩牙尖为实验材料;同时,对提取过程中需要注意的步骤进行了适当的改进,主要包括:1)液氮研磨要充分;2)在裂解液 bufferG-A 中,65 $^{\circ}$ C 温浴时间从常规的 15 min 延长至 1 h;3)温浴后离心,去除不溶于 bufferG-A 的残渣,这些残渣主要包括细胞壁成分和卡拉胶。通过方法改进获得的 DNA 用于 ISSR 分析,可以获得清晰且重复性好的条带。

2.2 ISSR 分析

本实验选择了孙雪等^[5]用于红藻江篱属物种

ISSR 分析的 6 条引物,以及 Wang 等^[9]用于褐藻海带 ISSR 分析的引物中的 5 条用于长心卡帕藻 ISSR 分析。在 4 个不同材料的扩增结果中(图 1),11 条引物扩增的清晰可见条带数从 3~8 条不等,与使用这些引物在江篱和海带中获得的条带数相近^[5,8]。在选用的 11 条引物中,除引物 P4 外,其他引物在 4 株不同形态的长心卡帕藻中扩增的条带都完全一致,只有引物 P4 扩增的样品 3 稳定地出现了一条差异条带。孙雪对龙须菜及其色素突变体的 ISSR 研究发现,不同种类间 ISSR 扩增的条带有差异,而同一种类间选用的 6 条引物扩增的条带几乎完全一致,不能有效地用于区分龙须菜野生型及其色素突变体^[11]。作者实验所选用的 4 株长心卡帕藻选自同一养殖场,都属于从菲律宾引进的长心卡巴藻亲本繁育而来,尽

管遗传基因同源性非常高,分子标记差异性较小,但是经过 20 多年的筛选与培育,都已表现出稳定的性状差异。这些个体性状之间的差异既有环境因素的作用造成的,比如在高氮水环境条件下,藻体色泽比较深,呈红褐色,而在氮营养比较缺乏的水环境中藻体色泽比较浅、呈黄褐色;也有发生在遗传水平的差异,如通过多年营养繁殖筛选和养育保持下来的稳定经济性状如有的品系生长较快,而有的品系卡拉胶品质较好等。因此,通过多个引物进行 ISSR 分析虽然不能有效地将这些各自具有典型形态学特征的品系完全加以区分,但是该结果证明 ISSR 技术可以在形态多变的长心卡巴藻将某些遗传上稳定表达的性状分离鉴定出来。将 ISSR 技术应用于长心卡帕藻属物种的种质鉴定和品系筛选,其结果是稳定可靠的。

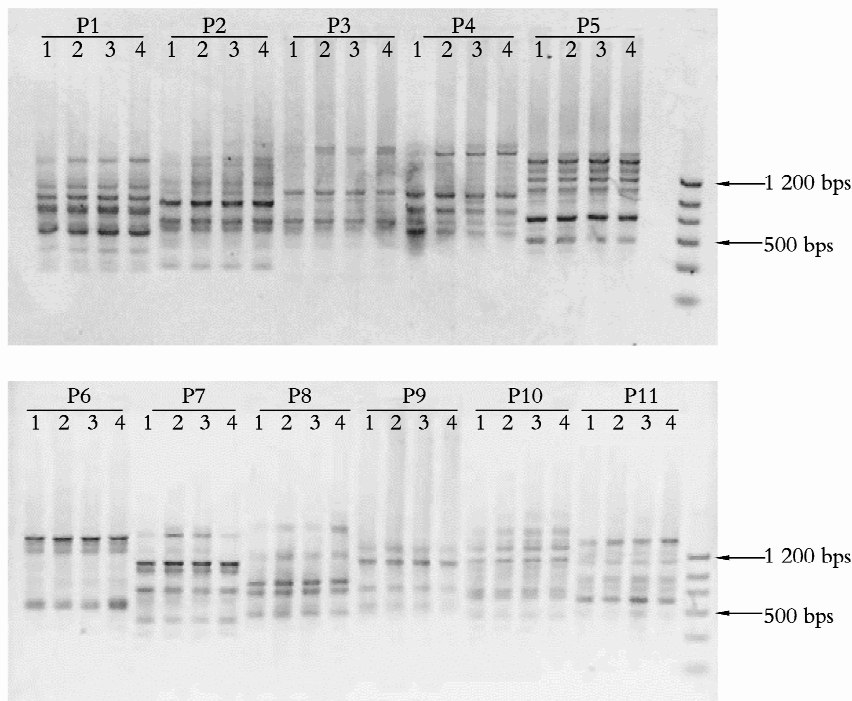


图 1 11 条 ISSR 引物在 4 株长心卡帕藻中的扩增图谱

Fig. 1 Amplified bands of 11 ISSR primers on 4 strains of *Kappaphycus alvarezii*

在生产应用上,表面光滑、枝体粗壮、芽少的长心卡帕藻藻体附带的杂质较少,出胶量高,凝胶强度大,比较受卡拉胶加工用户的欢迎。相反,分枝密集,新芽较多的个体生长比较快,藻体脆嫩,更适宜于用作水产养殖的鲍鱼活饵料。而出现引物 P4 扩增差异条带的 3 号样品,具有出胶量高,凝胶强度大的特征。ISSR 技术结合其他生物技术手段应用于

培育新品种,为验证该条带的表达与优良品系的连锁关系提供了可能。

综上所述,由于上述分子标记的手段,可以从形态多变的长心卡帕藻中分离鉴定出遗传上稳定表达的优良性状品系,因此通过该技术获得的重现性好的扩增条带,有可能作为今后分子标记辅助育种的标记。

参考文献:

- [1] 夏邦美, 张峻甫. 中国海藻志 [M]. 北京: 科学出版社, 1999.
- [2] 蔡玉婷. 麒麟菜的栽培技术及其经济价值 [J]. 福建水产, 2004, 1: 57-59.
- [3] 吴超元, 李家俊, 夏恩湛, 等. 异枝长心卡帕藻的移植和人工栽培 [J]. 海洋与湖沼, 1988, 19(5): 410-418.
- [4] Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) anchored polymerase chain reaction amplification [J]. *Genomics*, 1994, 20: 176-183.
- [5] 孙雪, 张学成, 茅云翔, 等. 几种江篱海藻的 ISSR 标记分析 [J]. 高技术通讯, 2003, 13(9): 89-93.
- [6] 李文红, 姚建亭, 王继成. 龙须菜 (*Gracilaria lemaneiformis*) 选育品系及其野生型的 ISSR 指纹分析 [J]. 海洋与湖沼, 2005, 36(3): 243-247.
- [7] 苏天凤, 张汉华, 吴进锋. 华南沿海 4 个地理群体江篱的遗传变异分析 [J]. 南方水产, 2005, 1(5): 56-59.
- [8] Wang X L, Liu C L, Li X, *et al.* Assessment of genetic diversities of selected *Laminaria* (Laminariales Phaeophyta) gametophytes by inter-simple sequence repeat analysis [J]. *J Integrative Plant Biology*, 2005, 47(6): 753-758.
- [9] Vis M L. Intersimple sequence repeats (ISSR) molecular markers to distinguish gametophytes of *Batrachospermum boryanum* (Batrachospermales, Rhodophyta) [J]. *Phycologia*, 1999, 38(1): 70-731.
- [10] 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.
- [11] 孙雪. 龙须菜 cDNA 文库构建及 EST 和 ISSR 分析 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2003. 77-85.

The primary application of ISSR analysis on strains identification of *Kappaphycus alvarezii*

LIU Chen-lin¹, HUANG Xiao-hang¹, LIU Jian-guo²

(1. First Institute of Oceanography, State Oceanology Administration, Qingdao 266061, China; 2. Institute of Oceanography, The Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China)

Received: Oct., 9, 2007

Key words: *Kappaphycus alvarezii*; inter-simple sequence repeat; strains of selection

Abstract: To investigate the genetic properties of high Carrangeenans production strains, the method of ISSR analysis of *Kappaphycus alvarezii* was established. The genetic diversities among 4 strains of *K. alvarezii* of the same origin which differs in configuration were analyzed. A total of 60 amplification loci were obtained from 11 ISSR primers, of which 1 locus revealed a polymorphism and possible linkage to the economic properties. It was indicated that the feasibility of ISSR could be combined with other measures on *K. alvarezii*.

(本文编辑: 张培新)