

利用 ISSR 分子标记技术分析浙江沿海 4 株坛紫菜的遗传多样性

江灵芝, 孙 雪, 杨 锐, 骆其君

(宁波大学 海洋学院, 浙江 宁波 315211)

摘要: 利用 ISSR 分子标记技术对采自浙江省南麂岛和渔山列岛的 4 株不同形状野生坛紫菜(*Porphyra haitanensis*)进行了遗传多样性分析。从 33 条引物中筛选出 11 条可扩增出清晰条带的引物, 在 4 株坛紫菜中共扩增出 62 条 DNA 带, 其中多态性条带比例达 88.71%。遗传距离分析表明 4 株坛紫菜之间的遗传距离范围是 0.3226~0.6129, 聚类分析结果表明渔山列岛坛紫菜遗传距离最近, 而南麂岛的两株坛紫菜则距离相对较远。该研究说明浙江附近岛屿的野生坛紫菜遗传多样性丰富。

关键词: 坛紫菜(*Porphyra haitanensis*); ISSR; 遗传多样性

中图分类号: S917.3

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2012)06-0089-05

紫菜(*Porphyra*)是一种具有重要经济价值的海藻, 多分布于亚热带与温带的潮间带。紫菜营养丰富, 口味鲜美, 是广受中、日、韩等国家人们喜爱的食品。现今, 全世界已发现的紫菜约有 134 种, 仅中国就有 22 种, 南韭山、渔山、檀头山、南麂岛等岛屿都有野生紫菜分布^[1]。紫菜的生活史可以分成大型叶状体和丝状孢子体两种不等世代型。紫菜的分类一般是根据颜色和厚度等叶片形态、细胞特性、生殖细胞的分裂特点及其生活史特征等进行归类。但是, 形态特征具有局限性, 某些特征有可能是环境与基因型互作的结果, 这使得要把紫菜进行准确分类及研究产生一定的困难^[2-3]。

近些年来多种分子标记技术, 如扩增片段长度多态性(AFLP)、随机扩增多态性 DNA (RAPD)、微卫星(SSR)、简单重复序列间隔序列(ISSR)等被广泛用于紫菜种质鉴定、品系区分、遗传多样性分析等研究中。其中 ISSR 分子标记由于具有重复性强、操作简便、成本低等优点, 目前已经广泛应用于高等植物和海藻等研究领域^[4-8]。如陈昌生等^[9]利用 ISSR 分子标记对福建省的 3 个野生坛紫菜种群共 60 个个体进行了遗传多样性分析, 结果表明坛紫菜种群内个体间的遗传变异较大, 遗传多样性水平较高。谢潮添等^[10]用 ISSR 分子标记技术对 4 个不同颜色坛紫菜(*P. haitanensis*)丝状体品系及 1 个野生型对照品系进行

比较发现这 4 个不同丝状体间的平均遗传距离为 0.5727, 它们同野生型对照的平均遗传距离为 0.6564。以上研究证明 ISSR 技术在紫菜的遗传多样性研究中应用广泛, 并且紫菜的遗传多样性十分丰富。

本文以采自浙江省地理环境差异显著的两个岛南麂岛和渔山列岛的形态不同的 4 株坛紫菜作为实验材料, 利用 ISSR 分子标记技术来探讨其间的亲缘关系远近和遗传多样性, 为今后野生坛紫菜遗传图谱的构建、优良品系的选育以及浙江省坛紫菜种质资源的保护提供科学依据。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

本实验所用的 4 株坛紫菜, 其中 2 株采自浙江省温州市平阳县南麂岛, 另 2 株采自浙江省宁波市象山渔山列岛。这 4 株坛紫菜的外观特征不同, 其名

收稿日期: 2011-07-25; 2011-10-22

基金项目: 国家科技支撑计划项目(2011BAD13B08); 国家公益性行业(海洋)科研专项经费项目(201105009); 国家公益性行业(农业)科研专项经费项目(201003068)

作者简介: 江灵芝(1987-), 女, 硕士研究生, 主要从事分子生物学与遗传育种研究, 电话: 0574-87600170, E-mail: zihan19870101@163.com; 孙雪, 通信作者, 硕士生导师, 电话: 0574-87600170, E-mail: sunxue@nbu.edu.cn

称代码、产地及形态特征如表 1 所示。将上述紫菜采回后自然晾干处理后, 放置于冰箱中保存。

表 1 所用坛紫菜的代码、产地和特征

Tab. 1 The codes, origins and characteristics of *Porphyra haitanensis*

序号	代码	产地	特征
1	NJ-1	南麂岛	叶片细长
2	NJ-2	南麂岛	叶片粗宽
3	YS-1	渔山列岛	叶片细长
4	YS-2	渔山列岛	叶片粗宽

1.2 DNA 的提取

实验前将存于 -20℃ 冰箱的坛紫菜取出, 在灭菌海水中复苏过夜。用毛刷反复轻刷叶片表面后置于 0.7% 碘化钾溶液中浸泡 5~10 min, 最后再置于灭菌海水中冲洗数次。各取 5~6 片健康紫菜的叶片幼嫩部分进行基因组 DNA 提取。

采用 CTAB 法结合基因组 DNA 提取试剂盒的 GenClean 小柱子(上海捷瑞生物工程有限公司)进行紫菜基因组 DNA 的提取。

1.3 ISSR 引物的选择

本次实验共用了 33 条 ISSR 引物, 从这 33 条引物中筛选出能够出现清晰可见的可重复的扩增片段的 02、04、05、07、26、61、63、G2、G3、G5、G6 11 条引物。这些 ISSR 引物的名称、序列与退火温度见表 2。

表 2 引物序列、退火温度及其多态性比例

Tab. 2 Sequences, annealing temperatures and the polymorphic ratios of ISSR primers

引物名称	引物序列	退火温度 ()	条带数	多态性比例 (%)
02	(GA) ₈ C	48	7	100
04	(AC) ₈ TG	50	5	100
05	(AC) ₈ TG	52	5	100
07	(ATG) ₆	48	4	75.0
26	(AC) ₈ CC	52	3	66.6
61	(AG) ₈ GT	48	8	87.5
63	(AG) ₈ CT	50	6	66.6
G2	(AC) ₈ CC	50	4	75.0
G3	(AC) ₈ GA	49	7	100
G5	(AG) ₈ GT	49	5	80.0
G6	(AG) ₈ CT	49	8	100

1.4 PCR 反应及电泳

PCR 反应(Biometra PCR 仪)体系如下: 1.5 mmol/L MgCl₂, 0.2 mmol/L dNTP, 0.2 μmol/L 引物, 15 ng DNA 模板和 1 个单位 DNA 聚合酶。PCR 反应程序为: 首先 94 °C 下预变性 5 min; 接着, 设置 35 个循环, 94 °C 下变性 45 s, 退火 1 min(退火温度见表 2), 然后再 72 °C 下延伸 2 min; 最后, 72 °C 下延伸 10 min; 取扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳, 电泳结束后, 拍照记录电泳结果。

1.5 数据的统计处理

电泳图谱的每一条带为一个标记, 代表一个引物的结合位点。根据各个分子标记的迁移率及其有无来统计数据, 若有条带出现记做 1, 若无条带出现记做 0。运用 Nei 和 Li 等的公式 $S=2N_{ij}/(N_i+N_j)$ 计算样品间的相似性系数, 其中 N_i 为样品 i 有的条带数, N_j 为样品 j 有的条带数; N_{ij} 为样品 i 和样品 j 都有的条带数^[11]。遗传距离 $D=1-S$, 用 Popgen32 软件进行分析与作图。

2 结果

2.1 扩增结果图谱

4 株坛紫菜的 11 条引物扩增结果见图 1(图中的 1, 2, 3, 4 分别代表表 1 所列的 4 株坛紫菜)。扩增结果表明, 本研究所用的 11 条引物在不同坛紫菜中扩增出数目与位置均不同的可重复性的条带, 扩增片段大小都在 100bp 至 2000bp 的范围内。通过统计 11 条引物在 4 种样品中共扩增出 62 条 DNA 带, 其中多态性 DNA 条带 55 条, 占 88.71%。

2.2 四株坛紫菜的遗传距离和聚类分析

根据图 1, 记录条带情况, 再依据 Nei 等的计算方法, 求出 4 株不同坛紫菜间的遗传距离(表 3)。如表 3 所示, 表中数据表示 4 株坛紫菜的遗传距离。根据表 3 可知, 4 株坛紫菜之间的遗传距离范围是 0.3226~0.6129。其中, YS-1 和 YS-2 的遗传距离最小, 只有 0.3226; NJ-1 和 NJ-2 的遗传距离最大是 0.6129。根据表 3 中所示的 4 株坛紫菜的遗传距离, 用 Popgen32 软件进行分析, 得到聚类分析图(图 2)。如图 2 所示, YS-1 和 YS-2 的相似性最高, 所以首先相聚在一起, 再与 NJ-2 相聚类, 最后再与 NJ-1 相聚。

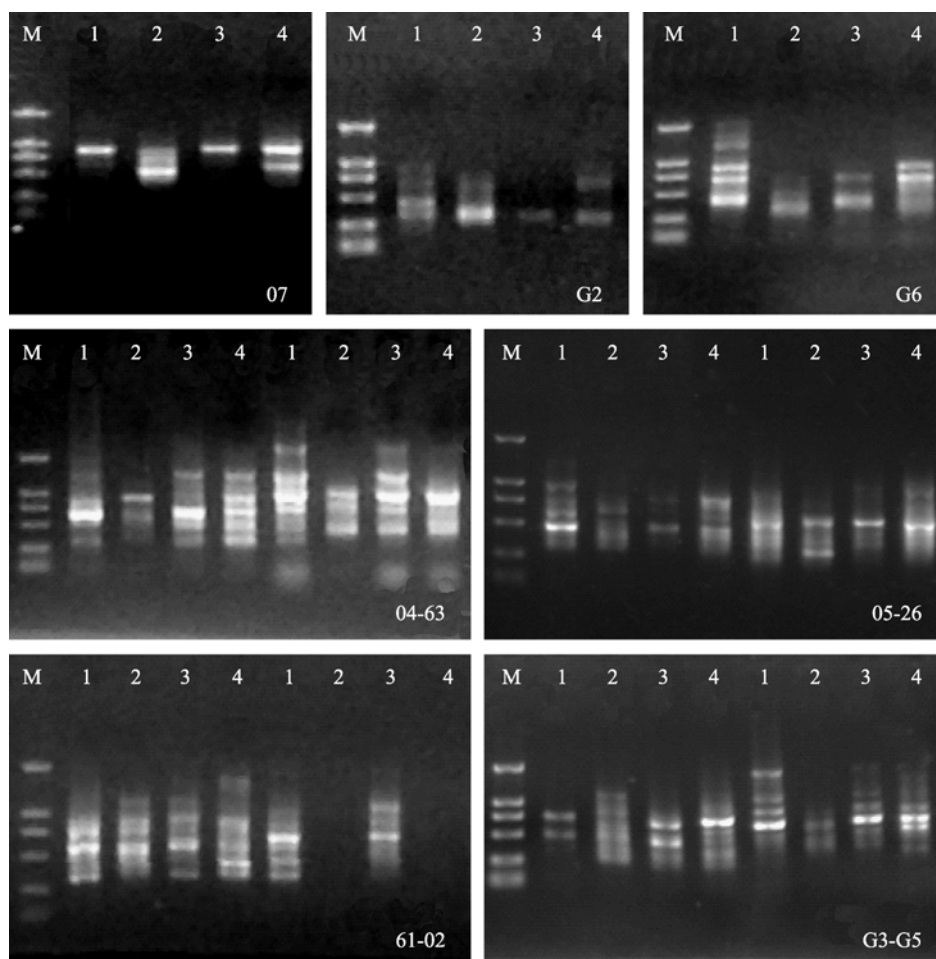


图 1 11 条引物在 4 株坛紫菜中的 ISSR 扩增结果

Fig. 1 The ISSR products of 11 primers amplified from the four strains of *Porphyra haitanensis*

M. 为 DL2000 DNA Marker, 1-4. 分别代表表 1 所列的 4 株坛紫菜

M. DL2000 DNA Marker; 1-4. represented 4 strains of *P. haitanensis* shown in Tab. 1

表 3 4 株坛紫菜的遗传距离

Tab. 3 Genetic distances of four strains of *Porphyra haitanensis*

pop ID	NJ-1	NJ-2	YS-1	YS-2
NJ-1	—			
NJ-2	0.6129	—		
YS-1	0.4355	0.5000	—	
YS-2	0.5645	0.5000	0.3226	—

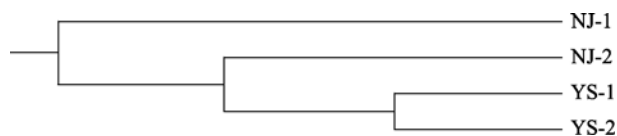


图 2 4 株紫菜的聚类图

Fig. 2 The cluster diagram of four strains of *Porphyra haitanensis*

3 讨论

分子标记实验中基因组 DNA 的质量是成功与否关键的一步^[12]。相对来说, 提取紫菜丝状体的基因组 DNA 较为容易。但是紫菜的叶状体细胞壁较丝状体不易破碎, 而且含有很多粘性多糖, 所以紫菜叶状体 DNA 提取的量都很低, 而且纯度不高^[13]。本次实验提取基因组 DNA 时所采用的是常用的提取植物 DNA 的 CTAB 试剂, 再结合离心柱法, 可以从少量的样品中提取出实验所需的 DNA 模板。结果表明 CTAB 结合试剂盒法提取所得的紫菜 DNA 的纯度和量可满足 ISSR 扩增要求。

很多研究都表明紫菜具有较高的遗传多态性。如 Dutcher 等^[14]用 RAPD 分子标记对采自北大西洋西部海域以及墨西哥海湾的 3 种不同品系紫菜进行

研究时,发现其多态性范围为 35%~100%。贾建航等^[15]用 RAPD 分子标记分析 15 株紫菜丝状体,其多态性高达 97.1%;杨锐等^[16]用 AFLP 分子标记对采自浙江渔山列岛、南麂列岛以及福建等地的坛紫菜进行分析,结果表明其多态位点比例高达 96.97%,并且其结果表明紫菜的遗传相似程度与地域分布相关。本实验中分布于渔山列岛的 2 株坛紫菜 YS-1 和 YS-2 虽然叶状体的形状有差别,但其遗传相似性较高,原因可能是受相同的生长环境以及地理位置的影响。采自南麂岛的 NJ-2 和采自渔山列岛的 YS-1 地理位置和生长环境明显不同,它们相似系数高的原因则有可能是 DNA 的关系。由以上可知,在本研究中,以地理环境为主影响坛紫菜品系和以基因组 DNA 为主影响坛紫菜品系的两种情况均出现了,说明不同体系坛紫菜的种内遗传距离并不是单一地受地理环境或 DNA 的影响。同时本次试验中的 4 株坛紫菜的多态位点百分率为 88.71%,和一般植物相比明显较高^[17],这显示坛紫菜的种间遗传差异很大。另外,由于坛紫菜多为雌雄异体,只有极少部分为雌性同体,而且坛紫菜不进行无性生殖^[18],长此以往,坛紫菜渐渐分化开来,变异越来越大,因此坛紫菜就具有比较高水平的遗传多样性。

海洋中的资源非常丰富,其中生物种质资源对于国家来说是极为重要的战略性资源,更是世界各国的关注点,它的重要性不言而喻。作为贝藻王国的南麂列岛,成为首批五个国家级海洋类自然保护区之一,又成为我国唯一纳入联合国教科文组织世界生物圈保护网络的海洋类生物保护区。去年,渔山列岛成为我国海洋特别保护区,藻类资源是二岛的重要特色。坛紫菜是我国的特色紫菜之一,浙江省在紫菜的生物多样性方面,具有独特的优势。但是由于海洋污染的日益严重和人们的过度开发破坏紫菜的生长地,野生坛紫菜面临着资源越来越匮乏的境地。因此,人们应该重视紫菜资源的保护,加强对野生紫菜种质资源的研究和合理开发利用。

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.
- [2] Kornmann P. Life histories of monostromatic Porphyra species as a basis for taxonomy and classification [J]. Eur J Phycol, 1994, 29: 69-71.
- [3] Kurogi M. Contributions to the Systematics of Benthic Marine Algae of the North Pacific [C]// Systematics of *Porphyra* in Japan. Kobe: Japanese Society of Phycology, 1972: 167-192.
- [4] 李洪伟,沙伟. ISSR 技术及其在玉米研究中的应用[J]. 齐齐哈尔大学学报,2007, 23(4): 88-91.
- [5] 马朝芝,傅廷栋, Tuevesson S, 等. 用 ISSR 标记技术分析中国和瑞典甘蓝型油菜的遗传多样性[J]. 中国农业科学, 2003, 36(11): 1403-1408.
- [6] Sankar A A, Moore G A. Evaluation of inter-simple sequence repeat analysis for mapping in *Citrus* and extension of the genetic linkage map [J]. Theor Appl Genet, 2001, 102: 206-214.
- [7] 袁昭岚,黄鹤忠,沈颂东,等. 条斑紫菜 5 个栽培品系的 ISSR 分析[J]. 海洋科学, 2006, 30(7): 9-14.
- [8] 孙雪,张学成,茅云翔,等. 几种江蓠属海藻的 ISSR 标记分析[J]. 高技术通讯, 2003, 13(9): 89-93.
- [9] 陈昌生,纪德华,徐燕,等. 野生坛紫菜种群遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 水产学报, 2008, 32(5): 717-724.
- [10] 谢潮添,纪德华,陈昌生,等. ISSR 标记在坛紫菜不同色泽丝状体种质鉴定中的应用[J]. 水产学报, 2007, 31(1): 105-111.
- [11] Nei M, Li W H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1979, 76(10): 5269-5273.
- [12] 谢恩义,纪焕红,柳波,等. 红毛菜种间遗传差异的 RAPD 分析[J]. 中国水产学报, 2003, 10(4): 282-285.
- [13] 孙雪,骆其君,杨锐,等. 紫菜(*Porphyra*)遗传差异的 ISSR 分析[J]. 海洋与湖沼, 2007, 38(2): 141-145.
- [14] Dutcher J A, Kapraun D F. Random amplification polymorphic DNA (RAPD) identification of genetic variation in three species of *Porphyra* (Bangiales, Rhodophyta) [J]. J Appl Phycol, 1994, 6: 267-273.
- [15] 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.
- [16] 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.
- [17] Hamrick J L. Gene flow and distribution of genetic variation in plant population. In: Differentiation patterns in higher plants [M]. New York: Academic Press, 1987: 53-67.
- [18] 曾呈奎,王素娟. 海藻栽培学[M]. 青岛:山东科技出版社,1985.

Genetic diversity analysis of four Zhejiang coastal *Porphyra haitanensis* strains with ISSR marker

JIANG Ling-zhi, SUN Xue, YANG Rui, LUO Qi-jun

(School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Received: Jul., 25,2011

Key words: *Porphyra haitanensis*; ISSR; genetic diversity

Abstract: The genetic diversity of four morphologically different *Porphyra haitanensis* strains collected from Nanji Island and Yushan Island of Zhejiang Province was analyzed with ISSR markers. In total, 11 primers were selected out from 33 primers for diversity analysis. These primers amplified 62 bands, and 88.71% of the bands were polymorphic. The genetic distance of the four strains of *P. haitanensis* ranged from 0.3226 to 0.6129. Two strains from Nanji Island were clustered together first, with other two strains Yushan Island joined then, indicating that the wild *P. haitanensis* along Zhejiang Provincial coast is rich in diversity.

(本文编辑: 梁德海)