

# 紫菜(*Porphyra*)遗传差异的 ISSR 分析\*

孙 雪 骆其君 杨 锐 裴鲁青

(宁波大学海洋生物工程重点实验室 宁波 315211)

**提要** 采用 ISSR 标记技术对来自不同产地的 6 个坛紫菜(*Porphyra haitanensis*)无性系和两个条斑紫菜(*P. yezoensis*)无性系进行了遗传差异的分析。结果表明, 7 条 ISSR 引物在 8 个紫菜系中共扩增出 59 条片段, 全部表现出多态性。根据 Nei 等的相似性系数得出 8 个紫菜系间的遗传距离在 0.274—0.746 之间。用 UPGMA 方法作出的系统树中各紫菜基本上是按照产地进行聚类, 从而推测紫菜的遗传差异可能与地域分布相关。本文结果也证明了 ISSR 与 RAPD、AFLP 等标记技术一样适用于紫菜的遗传多样性分析。

**关键词** 坛紫菜, 条斑紫菜, ISSR, 遗传距离

**中图分类号** Q789

紫菜(*Porphyra*)中含有丰富的蛋白质、维生素和钙, 是深受人们喜爱的海洋食品, 也是海水养殖中经济价值最大的海藻。同时, 紫菜与虾、贝等海洋动物的混养实验表明, 紫菜养殖对于环境的调节和改善也具有重要的生态意义。目前, 我国养殖紫菜主要有两种, 一是以江苏为代表的条斑紫菜(*P. yezoensis*), 另一种是浙闽两省为主的坛紫菜(*P. haitanensis*)。紫菜间的种系区分多依据形态学和细胞学结果进行, 但不同的生活环境等外界因素会使藻体发生某些形态上的改变。尤其是用做实验室保种和生产育苗的紫菜丝状体, 有时相互之间只能依据其发育成的叶状体来进行分辨。为了检验不同紫菜丝状体的遗传多样性, 以便为今后的紫菜分子标记辅助育种提供基因水平的资料, 作者对 6 个坛紫菜无性系和两个条斑紫菜无性系进行了简单序列重复区间扩增多态性(inter-simple sequence repeat, ISSR)的标记分析。

ISSR 是 Zietkiewicz 等(1994)在微卫星(SSR)基础上建立的一种分子标记技术。该技术以加有锚定碱基的 SSR 序列作为引物, 特异地扩增位于反向排列的 SSR 位点之间的 DNA 序列, 根据其差异来分析材料的多样性。ISSR 通常为显性标记(Tsumura *et al.*, 1996), 呈孟德尔式遗传, 具有很

好的稳定性和多态性(Fang *et al.*, 1997; 李文红等, 2005)。目前 ISSR(或与 RAPD、SSR 等技术一起)已经广泛用于高等植物的种质资源评价、进化和系统发育关系分析、遗传多样性以及遗传作图与基因定位等多个研究领域。但在低等植物——藻类中 ISSR 应用的报道并不多, 仅见于串珠藻(*Batrachospermum boryanum*)(Vis, 1999)和江蓠(*Gracilaria*)(孙雪等, 2003)两类海藻中。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

本文中选用了 6 个坛紫菜无性系和两个条斑紫菜无性系作为实验材料, 这些材料均由本实验室定名与保藏。6 个坛紫菜系分别为 Hza、Hzc、Hzf、Hpt、Hmy、Hzz, 其中 Hza、Hzc、Hzf 为福建平潭的养殖紫菜, 而 Hpt 为来自浙江普陀山的野生紫菜, Hmy 和 Hzz 为浙江养殖紫菜。Yn51 和 Yn55 是来自江苏南通的两个养殖条斑紫菜无性系。培养条件: MAV3 号培养基, 温度为 13—15℃, 光照周期为 12h/12h。

### 1.2 试剂与引物

植物基因组 DNA 提取试剂盒购自北京鼎国, PCR 试剂购自上海生工。所用 ISSR 引物(表 1)由上海生工合成。

\* 浙江省自然科学基金项目, M403015 号、Y304094 号。孙 雪, 博士, 副研究员, E-mail: sunxue@nbu.edu.cn

收稿日期: 2005-11-22, 收修改稿日期: 2006-04-25

### 1.3 DNA 的提取

称取约 10mg 吸干水分的紫菜丝状体, 真空冷冻干燥后按植物基因组 DNA 提取试剂盒的操作说明进行紫菜基因组 DNA 的提取。DNA 的浓度确定使用 Kodak 软件(标准浓度 DNA 样品做参照)。

### 1.4 PCR 扩增与电泳检测

PCR 反应在 GeneAmp PCR system 2400 (Perkin Elmer)中进行。反应体系(总体积为 20 $\mu$ l)中包括 15ng 模板 DNA、1.5mmol/L MgCl<sub>2</sub>、0.2 mmol/L dNTP、0.2 $\mu$ mol/L 引物和 1 单位的 *Taq* 酶。PCR 扩增程序为 94 预变性 5min, 然后按照 94 变性 50s, 复性(不同引物其复性温度见表 1)90s, 72 延伸 2min 的程序进行 32 个循环, 最后 72 延伸 8min。扩增产物在 1.2%的琼脂糖凝胶中电泳, 紫外透射分析仪上观察、拍照。

### 1.5 数据处理与统计分析

用 Kodak 软件结合人工观察统计电泳条带, 将有效条带转化成 0、1 型数据。按照公式  $S = 2N_{xy} / (N_x + N_y)$  计算各样品间的两两遗传相似性(Nei *et al.*, 1979), 其中  $S$  为相似性系数,  $N_{xy}$  为  $X$  和  $Y$  两个个体共有的条带数,  $N_x$  和  $N_y$  分别为个体  $X$  和  $Y$  各自拥有的条带数。遗传距离  $D = 1 - S$ 。用 popGen32 对所得数据进行统计学分析, 按 UPGMA 方法构建聚类图。

表 1 ISSR 引物序列、退火温度及扩增条带

Tab.1 The sequences, annealing temperatures and amplified bands of ISSR primers

引物	引物序列 (5'—3')	退火温度( )	扩增条带数
P02	(AG) <sub>7</sub> CA	50	8
P16	(GCT) <sub>5</sub> CC	55	8
P20	(GA) <sub>7</sub> AC	50	10
P22	(CAG) <sub>5</sub> CG	55	8
P47	(TGG) <sub>5</sub> CG	50	6
P60	(AAG) <sub>6</sub>	50	7
P86	(ACG) <sub>6</sub> CC	60	12

## 2 结果与分析

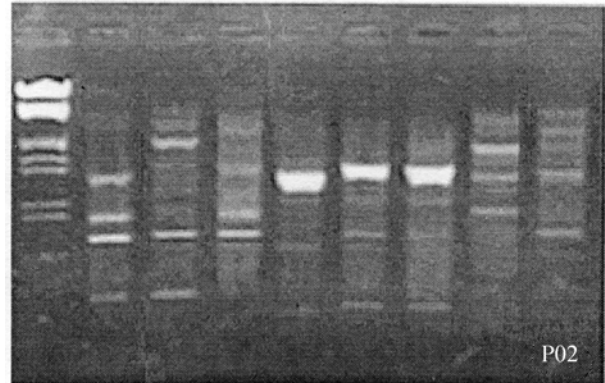
### 2.1 ISSR 扩增图谱

本实验中共试验了 15 条 ISSR 引物, 其中 7 条可扩增出清晰条带, 将其用于 8 个紫菜系间的遗传差异分析(图 1 给出了引物 P02 和 P20 的扩增图谱)。所有引物的退火温度在 50—60 之间, 保证了 PCR 反应较高的特异性; 扩增条带在 6—12 条之间, 并且所有引物的扩增片段全部表现为多

态性。

在引物 P60、P02 的扩增图谱中两个浙江养殖坛紫菜系(Hmy 和 Hzz)的扩增图谱相似, 在引物 P16 的扩增图谱中 3 个浙江坛紫菜(Hpt、Hmy、Hzz)的扩增结果类似, 而在引物 P47、P16 的扩增图谱中条斑紫菜 Yn51 和 Yn55 的带型基本相同。因此, 依据以上 4 条引物的电泳图谱可以很容易地将两个江苏条斑紫菜、3 个浙江坛紫菜和两个浙江养殖坛紫菜与其他紫菜区分开。

M Hza Hzc Hzf Hpt Hmy Hzz Yn51 Yn55



M Hza Hzc Hzf Hpt Hmy Hzz Yn51 Yn55

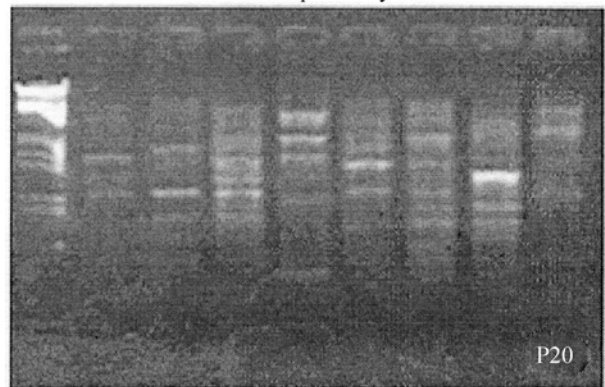


图 1 8 个紫菜无性系在引物 P02 和 P20 中的 ISSR 扩增图谱

Fig. 1 ISSR amplification pattern produced with primer P02 and P20 of 8 lines of *Porphyra*  
M 为  $\lambda$ DNA/*Hind* III + *Eco*R I marker

### 2.2 遗传距离与聚类分析

根据 Nei 等(1979)的公式得出各紫菜系间的遗传距离见表 2。从表 2 中可见, 各紫菜间的遗传距离在 0.274—0.746 之间。其中遗传距离最小的是条斑紫菜 Yn51 和 Yn55, 遗传距离最大的是福建坛紫菜 Hzf 和浙江野生坛紫菜 Hpt, 其次为 Hzf 与浙江养殖坛紫菜 Hmy 和 Hzz。在 UPGMA 方法构建的系统树图(图 2)中可见优先聚类的 3 个类群: 类群 由福建养殖坛紫菜系 Hza 和 Hzf

组成; 类群 由 3 个浙江坛紫菜系组成, 其中野生系 Hpt 先与养殖系 Hzz 相聚, 再与另一养殖系 Hmy 聚类; 类群 由江苏条斑紫菜 Yn51 和 Yn55 组成。在这 3 个类群外侧, 类群 (浙江坛紫菜) 与类群 (江苏条斑紫菜) 再聚类, 最后与 3 个福建坛紫菜依次聚在一起。

表 2 8 个紫菜无性系间的遗传距离

Tab.2 The genetic distances of 8 lines of *Porphyra*

	Hza	Hzc	Hzf	Hpt	Hmy	Hzz	Yn51	Yn55
Hza	—							
Hzc	0.535	—						
Hzf	0.420	0.535	—					
Hpt	0.584	0.511	0.746	—				
Hmy	0.584	0.420	0.690	0.420	—			
Hzz	0.584	0.609	0.690	0.335	0.335	—		
Yn51	0.559	0.487	0.559	0.398	0.635	0.487	—	
Yn55	0.585	0.465	0.585	0.294	0.465	0.420	0.274	—

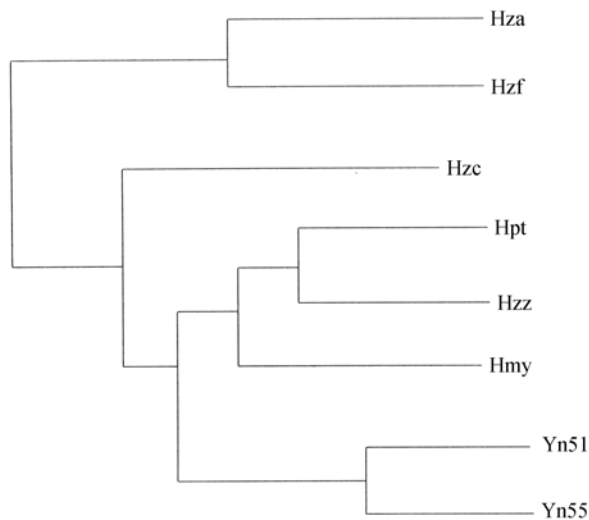


图 2 UPGMA 方法构建的 8 个紫菜无性系的系统树

Fig. 2 The dendrogram generated from 8 lines of *Porphyra* by UPGMA method

### 3 讨论

#### 3.1 紫菜的 DNA 提取与 ISSR 扩增

在提取紫菜丝状体 DNA 时发现用机械剪切方法来破碎藻体, 所得 DNA 产率低且有降解; 用液氮研磨少量藻体, 样品几乎全部附在研钵壁上。因此, 在本实验中作者采用冷冻干燥后再破碎藻体的方法, 所得 DNA 条带完整, 又减少了样品间交叉污染的机会, 比较适合大量紫菜样品的 DNA 提取操作。

本实验中 ISSR 扩增条件简单, 只要调整合适的  $Mg^{2+}$  浓度和退火温度, 其他如模板用量等对扩增谱带影响不大。但 ISSR 引物的选择是实验

的关键, 从 GenBank 数据库中收录的紫菜 EST 序列来分析, 紫菜中的 SSR 序列大多数为 3 碱基重复, 两碱基重复的很少。而在作者选用的 15 条引物中仅有约一半引物扩增出清晰可辨条带, 这可能与紫菜不同 SSR 位点之间的距离及其结构复杂程度等有关。

本实验中所用 7 条引物扩增片段全部表现出多态性, 可见紫菜中 ISSR 位点的多态性是极为丰富的。这一现象在紫菜中比较常见, 如杨锐等 (2002) 用 AFLP 分析浙闽两地坛紫菜的 528 个位点, 其中多态性位点占了 512 个 (多态性比例为 96.97%)。而用 RAPD 分析不同紫菜材料所得到的多态性片段比例分别为 94.6% (王勇等, 2000) 和 97.1% (Jia *et al*, 2000)。

#### 3.2 8 个紫菜无性系间的遗传差异

本文结果中各紫菜间基本上是按照江苏、浙江和福建 3 个不同产地进行聚类的, 即紫菜间的遗传变异程度可能与地域分布相关。这一结论与目前较多研究者认为的地理环境会造成紫菜间遗传差异的观点相一致 (van Oppen *et al*, 1996; 王勇等, 2000; 杨锐等, 2002)。如 Song 等 (1998) 发现, 不同采集地坛紫菜的遗传距离甚至大于种间距离。而徐涤等 (2001) 的 RAPD 分析结果表明, 青岛产野生条斑紫菜与日本产条斑紫菜间的遗传距离甚至大于其与两个坛紫菜品系间的距离, 并将该现象解释为地理阻隔。Jia 等 (2000) 用 RAPD 分析紫菜时将福建的坛紫菜 H9208 归到了条斑紫菜群中。可见, 坛紫菜与条斑紫菜的差异受地理距离等因素影响很大。本文结果中福建坛紫菜间的遗传多样性程度要大于浙江坛紫菜, 该结果与王勇等 (2000) 的结果相类似, 他们用 RAPD 对坛紫菜进行比较时发现 4 个福建坛紫菜间的相似性系数 (0.410—0.444) 要小于两个浙江坛紫菜 (0.636)。

#### 3.3 ISSR 分子标记在海藻中的应用前景

由于传统的海藻分类和种质鉴定方法易受海藻生活环境等的影响, 因此需要更为稳定可靠的基因水平的标记来对海藻进行正确的分类和遗传多样性分析。目前, RAPD 技术由于其操作简便、快捷等优点而在这方面发挥了重要作用。AFLP 在海藻中的应用也有报道 (Donaldson *et al*, 1998; 杨锐等, 2002), 但可能是由于海藻多糖的存在而影响了该技术在海藻中的广泛应用。SSR 技术由于需要预先知道 SSR 位点两侧的 DNA 序列, 因而目前也很难大量应用。而 ISSR 技术只要

筛选出合适的 SSR 位点就可以设计引物进行 PCR 扩增, 其操作简单, 其结果具有更好的稳定性和更高的多态性, 因此在植物系统学研究方面已经显示出了其强大的优势。最近又出现了一种更为简单、灵敏的 FISSR, 它是用荧光标记的核苷酸掺入到 ISSR 反应中再在 DNA 测序仪上进行分析, 其信息量比常规 ISSR 高两倍, 而所需的模板 DNA 量却低于常规 ISSR 两倍之多(Nagaraju *et al.*, 2002b)。FISSR 技术已经在水稻、辣椒等作物中得到应用(Kumar *et al.*, 2001; Nagaraju *et al.*, 2002a)。目前 ISSR 技术在海藻中进行遗传标记分析的研究还很少, 相信随着更多海藻中 SSR 位点的发现, ISSR 技术在海藻的遗传变异和种质鉴定中将会发挥越来越大的作用。

### 参 考 文 献

- 王 勇, 刘必谦, 骆其君等, 2000. 坛紫菜品系间遗传差异的 RAPD 分析. 青岛海洋大学学报, 30(2)II: 225—229
- 孙 雪, 张学成, 茅云翔等, 2003. 几种江蓠属海藻的 ISSR 标记分析. 高技术通讯, 13(9): 89—93
- 李文红, 姚建亭, 王继成等, 2005. 龙须菜(*Gracilaria lemaneiformis*)选用品系及其野生型的 ISSR 指纹分析. 海洋与湖沼, 36(3): 241—247
- 杨 锐, 刘必谦, 骆其君等, 2002. 利用扩增片段长度多态性(AFLP)研究坛紫菜的遗传变异. 高技术通讯, 12(1): 83—86
- 徐 涂, 宋林生, 秦 松等, 2001. 五个紫菜品系间遗传差异的 RAPD 分析. 高技术通讯, 11(12): 1—3
- Donaldson S L, Chopin T, Saunders G W, 1998. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) as a source of genetic markers for red algae. *J Appl Phycol*, 10: 365—370
- Fang D Q, Roose M L, 1997. Identification of closely related citrus cultivars with inter-simple sequence repeat markers. *Theor Appl Genet*, 95: 408—471
- Jia J H, Wang P, Jin D M *et al.*, 2000. The application of RAPD markers in diversity detection and variety identification of *Porphyra*. *Acta Botanica Sinica*, 42(4): 403—407
- Kumar L D, Kathirvel M, Rao G V *et al.*, 2001. DNA profiling of disputed chili samples (*Capsicum annum*) using ISSR-PCR and FISSR-PCR marker assays. *Forensic Science International*, 116: 63—68
- Nagaraju J, Kathirvel M, Kumar R R *et al.*, 2002a. Genetic analysis of traditional and evolved Basmati and non-Basmati rice varieties by using fluorescence-based ISSR-PCR and SSR markers. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99(9): 5836—5841
- Nagaraju J, Kathirvel M, Subbaiah E V *et al.*, 2002b. FISSR-PCR: a simple and sensitive assay for high-throughput genotyping and genetic mapping. *Mol Cell Probes*, 16(1): 67—72
- Nei N, Li W H, 1979. Mathematical model for studying genetic variation in term of restriction endonucleases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 74: 5267—5273
- Song L S, Duan D L, Li X H *et al.*, 1998. Use of RAPD for detecting and identifying *Porphyra* (Bangiales, Rhodophyta). *Chin J Oceanol Limnol*, 16(3): 237—242
- Tsumura Y, Ohba K, Strauss S H, 1996. Diversity and inheritance of inter-simple sequence repeat polymorphisms in Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugi (*Cryptomeria japonica*). *Theor Appl Genet*, 92: 40—45
- van Oppen M J H, Klerk H, de Graaf M *et al.*, 1996. Assessing the limits of random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) in seaweed biogeography. *J Phycol*, 32: 433—444
- Vis M L, 1999. Intersimple sequence repeats (ISSR) molecular markers to distinguish gametophytes of *Batrachospermum boryanum* (Batrachospermales, Rhodophyta). *Phycologia*, 38(1): 70—73
- Zietkiewicz E, Rafalksi A, Labuda D, 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeats (SSR) anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 20: 176—183

## ISSR ANALYSIS ON GENETIC VARIATION IN *PORPHYRA*

SUN Xue, LUO Qi-Jun, YANG Rui, PEI Lu-Qing

(Marine Biotechnology Laboratory, Ningbo University, Ningbo, 315211)

**Abstract** ISSR (inter-simple sequence repeat) molecular marker technique, derived from SSR (simple sequence repeat or microsatellite), has been applied in various fields such as germplasm identification, evolution, and phylogenetic relationship and genetic diversity in higher plants. However, investigations with regard to algae were quite insufficient. In this paper, the genetic variation of marine red alga *Porphyra* was analyzed using ISSR.

Six lines of *P. haitanensis* and 2 lines of *P. yezoensis* were sampled, of which *P. haitanensis* included 3 cultivated lines (Hza, Hzc and Hzf) collected from Fujian Province, one wild line (Hpt) and 2 cultivated lines (Hmy and Hzz) from Zhejiang Province. And 2 lines of *P. yezoensis* from Jiangsu Province were named as Yn51 and Yn55. Among the screened 15 ISSR primers, 7 could generate clear bands. Total 59 fragments were generated with the 7 primers in the 8 lines of *Porphyra*, and all appeared to be polymorphic. From the amplification patterns, 2 lines of *P. yezoensis* could be distinguished from 6 lines of *P. haitanensis* in primer P16 or P47; 3 lines of *P. haitanensis* from Zhejiang Province were different from others in primer P16; and 2 cultivated *P. haitanensis* (Hmy and Hzz) were distinct from wild *P. haitanensis* (Hpt) in primer P60 or P02. The genetic distances of the 8 lines of *Porphyra* ranged from 0.274 to 0.746 based on Nei's similarity coefficient. The smallest genetic distance was between Yn51 and Yn55 (0.274), followed by the one between Yn55 and Hpt (0.294). The longest distance came between Hzf and Hpt (0.746); Hzf and Hmy, Hzf and Hzz, came to the next whose genetic distances were both 0.690.

In the dendrogram built by UPGMA method, the first 3 clustering groups could be recognized clearly. Group I was consisted of Hza and Hzf, Group II contained Hpt, Hmy and Hzz, and Group III covered Yn51 and Yn55. Then, Group II joined together with Group III. At last, the formed big group joined with Group I and another *P. haitanensis* from Fujian. *P. haitanensis* from Zhejiang stayed more closer to *P. yezoensis* from Jiangsu. Moreover, the 8 lines of *Porphyra* were clustered together mainly according to production area, instead of species classification.

From the above results, it was concluded that the genetic variation of *Porphyra* was relevant to their living localities, which was consistent with previous reports found in *Porphyra* by applying RAPD or AFLP technique. The study also showed that ISSR technique is a good tool to analyze the genetic diversity of *Porphyra*, just as other molecular markers do.

**Key words** *Porphyra haitanensis*, *P. yezoensis*, ISSR, Genetic distance