

# 我国沿海鼠尾藻(*Sargassum thunbergii*) 遗传资源 RAPD 分析\*

刘 玮 李美真 吴海一 詹冬梅 丁 刚

(山东省海水养殖研究所藻类中心实验室 青岛 266002)

**提要** 采用 RAPD 分子标记技术分析了我 国沿海五个海区(大连、威海、青岛、温州、福州)鼠尾藻种群的遗传多样性。从 60 条随机引物中筛选出 21 条引物,对五个鼠尾藻种群共 150 份 DNA 样本进行了扩增,共检测到 207 个有效位点,多态位点达 89.5%, Nei 基因多样性指数( $H$ )为 0.2966, Shannon 信息指数( $I$ )为 0.4508; 种群间的遗传分化系数( $G_{st}$ )为 0.6131, 基因流( $N_m$ )为 0.3155。AMOVA 分析表明  $F_{st}$  为 0.6185。我国沿海鼠尾藻种群遗传多样性较低,遗传分化水平较高。

**关键词** 鼠尾藻, RAPD, 遗传多样性, 遗传分化  
**中图分类号** Q789

鼠尾藻(*Sargassum thunbergii*)俗称老鼠尾、谷穗子,为北太平洋西部特有的暖温带海藻,在我国沿海均有分布。目前,有关鼠尾藻的研究已有许多报道(王增福等, 2007; Umezaki, 1974),但在遗传结构等方面研究很少(Zhao *et al.*, 2007)。

随机扩增多态性 DNA(RAPD)是种群遗传多样性研究的常用技术,具有安全、简便、高效、快捷等特点,在海洋生物研究方面已经得到广泛应用(宋林生等, 2002; Matoso *et al.*, 2004)。本研究利用 RAPD 分子标记从种群水平上揭示不同海区鼠尾藻种群的遗传多样性和分化水平,以期为我国鼠尾藻遗传资源保护、鼠尾藻新品种培育提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

鼠尾藻样品为 2008 年 5—8 月分别采自辽宁大连,山东威海、青岛,浙江温州,福建福州,见表 1。采集时选取样本间隔距离至少为 1m,每处随机采集 30 份藻体样本。用灭菌海水洗净、晾干后,置于-80℃保存。

表 1 实验采集墨角藻目种群样品

Tab.1 Details of Fucales populations in the study

群体编号	种名	采集地点	采集时间	样品份数
DL	鼠尾藻	辽宁大连	2008 年 8 月	30
WH	鼠尾藻	山东威海	2008 年 5 月	30
QD	鼠尾藻	山东青岛	2008 年 5 月	30
WZ	鼠尾藻	浙江温州	2008 年 6 月	30
FZ	鼠尾藻	福建福州	2008 年 6 月	30
LJC	鹿角菜	山东威海	2008 年 5 月	30

### 1.2 实验方法

**1.2.1 DNA 的提取** DNA 制备方法采用 Hoarau 等(2007)改进的 CTAB 法,1%琼脂糖电泳检测提取 DNA,紫外分光光度计定量后,4℃保存备用。

**1.2.2 RAPD 分析** PCR 反应总体系为 20μl,其中模版 DNA 约 50ng, 10×PCR 缓冲液 2.0μl, MgCl<sub>2</sub> 2.0mmol/L, dNTP 0.1mmol/L, 引物 0.2μmol/L, Taq DNA 聚合酶 1.0U。反应条件为: 94℃预变性 5min, 然后 45 个循环(94℃变性 1min, 37℃复性 1min, 72℃延伸 1min), 最后 72℃延伸 5min。

电泳采用 1%琼脂糖, 1×TAE 缓冲液, 6V/cm 电泳

\* 国家高技术研究发展计划(863)项目, 2006AA10A416 号; 海洋公益性行业科研专项经费项目, 200905019 号、200905020 号、201105008-2 号; 山东省科技攻关计划, 2009GG10005012 号。刘 玮, E-mail: fengchuiyan@yahoo.com.cn

通讯作者: 李美真, 研究员, E-mail: li-meizhen@163.com

收稿日期: 2009-06-12, 收修改稿日期: 2009-08-26

45min, 0.5 $\mu$ g/ml 溴化乙锭染色后, 凝胶成像系统统计结果。

**1.2.3 数据处理** 选取清晰的电泳条带进行统计。相同迁移位置上, 按各样本扩增片段有无, 出现扩增条带的记录为 1, 没有扩增条带的记录为 0, 得到 RAPD 表型矩阵。采用软件 POPGENE 1.31 分析鼠尾藻群体遗传多样性(Yeh *et al.*, 1997), 包括多态位点比例  $P$ 、平均杂合度  $H$  和 Shannon 多样性指数  $I$  等。使用 TFPGA 1.3 软件(Miller, 1997)<sup>1)</sup>计算两两群体间遗传距离, 选取 Nei 氏无偏斜距离矩阵(Nei, 1978)并以鹿角菜群体(30 份 DNA 样本)为外群, 采用 UPGMA 法构建不同群体的系统树, 靴带值设为 1000。用 Arlequin 3.01(Excoffier *et al.*, 2005)进行分子方差分析(analysis of molecular variance, AMOVA), 分析遗传变异在种群内和种群间的分布, 并计算群体间遗传分化系数。

## 2 结果

### 2.1 RAPD 分析

从每个群体中各选一份 DNA 样本进行引物筛选, 从上海生工合成的 60 条随机引物中选出扩增条带清晰、重复性和稳定性好的引物, 共 21 条(表 2)。用这些引物对所有群体 DNA 样本和一份空白对照, 进行 PCR 扩增和统计分析。各个引物的检测到的位点数为 3—15 个, 平均每条扩增 8.7 个位点, 统计选取的电泳条带大小在 250—2000bp 之间。

表 2 RAPD 扩增使用引物  
Tab.2 Primers for RAPD analysis

引物	引物序列 5' 3'	引物	引物序列 5' 3'
S7	GGTGACGCAG	S201	GGGCCACTCA
S17	AGGGAACGAG	S205	GGGTTTGCA
S22	TGCCGAGCTG	S208	AACGGCGACA
S24	AATCGGGCTG	S1010	GGGATGACCA
S33	CAGCACCCAC	S1027	ACGAGCATGG
S45	TGAGCGGACA	S1028	AAGCCCCCA
S53	GGGGTGACGA	S1213	GGGTCGGCTT
S58	GAGAGCCAAC	S1518	GTGGGCATAC
S105	AGTCGTCCCC	S1520	TGCGCTCCTC
S115	AATGGCGCAG	S2025	GGGCCGAACA
S118	GAATCGGCCA		

### 2.2 遗传多样性

结果见表 3。共检测到 207 个清晰、可重复的有效位点, 其中 182 个为多态性位点。在物种水平上, 鼠尾藻多态性位点百分率为 87.92%, Nei 基因多样性指数  $H$  为 0.2966, Shannon 信息指数  $I$  为 0.4508; 在群体水平上, 各个群体多态性位点百分率为 23.19%—56.04%, 平均值为 33.72%, Nei 基因多样性指数  $H$  为 0.0937—0.2216, 平均值为 0.1350, Shannon 信息指数  $I$  为 0.1371—0.3257, 平均值为 0.1981。多态性位点百分率、Nei 基因多样性指数和 Shannon 信息指数均具有相似的趋势。种群遗传多样性由高到低依次为: 大连群体(DL) >温州群体(WZ) >青岛群体(QD) >威海群体(WH) >福州群体(FZ)。其中大连种群(DL)的遗传多样性明显高于其它种群, 而其余种群的多样性相差不大。

表 3 鼠尾藻种群遗传多样性参数  
Tab.3 Genetic diversity within different *S. thunbergii* populations

群体编号	$P(\%)$	$H$	$I$
DL	116(56.04)	0.2216	0.3257
WH	50(24.15)	0.0991	0.1447
QD	58(28.02)	0.1102	0.1625
WZ	77(37.20)	0.1505	0.2203
FZ	48(23.19)	0.0937	0.1371
总体	182(87.92)	0.3013	0.4549

### 2.3 遗传分化

由 Shannon 信息指数计算的遗传分化系数  $G_{st}$  为 0.6131, 由  $G_{st}$  估算的种群间基因流  $N_m$  为 0.3155。AMOVA 分析表明, 总的遗传分化指数  $F_{st}$  值为 0.6185, 群体间  $F_{st}$  值在 0.4200—0.7522 ( $P < 0.001$ )。群体中的遗传变异有 61.85%来自群体间, 而只有 38.15%来自群体内, 种群内变异小于种群间变异。结果表明鼠尾藻群体内、群体间均产生一定遗传变异, 但主要遗传变异存在于种群间。见表 4。

### 2.4 遗传距离

鼠尾藻种群间遗传距离范围为 0.1727—0.2587, 根据相应的遗传距离两两聚类(图 1, 表 5)。从聚类结果可以看出, 整个鼠尾藻群体可以分为两大支。大连种群、威海种群、青岛种群聚类为一大支, 其中大连种群与威海种群遗传距离最近(0.1727), 它们首先聚

1) Miller M P, 1997. Tools for population genetic analyses (TGPFA) 1.3: a Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. Computer software distributed by author

表4 鼠尾藻种群分子方差分析  
Tab.4 Analysis of molecular variance (AMOVA) within and among populations of *S. thunbergii*

变异来源	自由度 (df)	总方差	变异组分	变异百分比 (%)	P
群体间	5	2928.47	28.41	61.85	<0.001
群体内	114	1997.20	17.52	38.15	<0.001

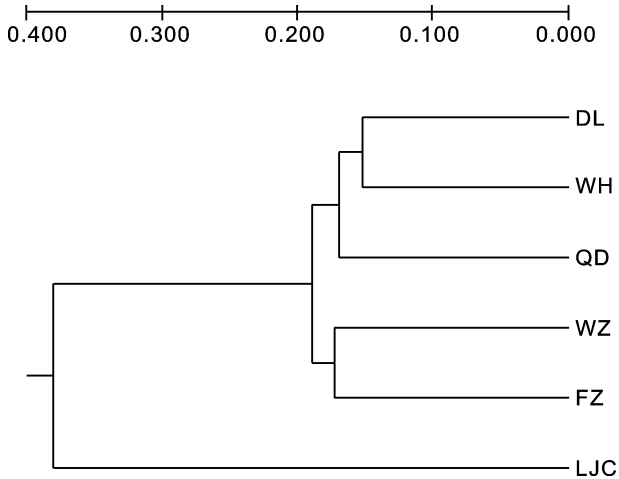


图1 基于 Nei 氏遗传距离的鼠尾藻种群 UPGMA 聚类表征图

Fig.1 UPGMA dendrograms using Nei's unbiased genetic distance of *S. thunbergii* populations

表5 群体间遗传距离矩阵和遗传分化指数矩阵  
Tab.5 Nei's unbiased genetic distance and  $F_{st}$  estimates between pairs of populations

种群	DL	WH	QD	WZ	FZ	LJC
DL	—	0.4590	0.4745	0.4200	0.4813	0.6257
WH	0.1727	—	0.5990	0.6043	0.6645	0.7282
QD	0.2040	0.2183	—	0.5604	0.6453	0.7461
WZ	0.1955	0.2587	0.2376	—	0.5608	0.6878
FZ	0.1996	0.2351	0.2433	0.2132	—	0.7522
LJC	0.3684	0.4241	0.5309	0.4299	0.4992	—

注: 右上角为遗传分化指数矩阵, 左下角为遗传距离矩阵

类后再与青岛种群聚类为一支; 而温州种群和福州种群聚类为另一支。鹿角菜群体与鼠尾藻群体遗传距离相差较大, 聚类图中, 鹿角菜群体明显与鼠尾藻群体分开。

### 3 讨论

#### 3.1 鼠尾藻种群的遗传多样性

遗传多样性的降低会导致群体对环境的适应能力减弱, 从而威胁自然环境中群体的生存安全

(Vrijenhoek, 1994)。Zhao 等(2007)通过 RAPD 研究表明, 山东半岛(烟台、威海、青岛)的鼠尾藻群体的多样性水平较低, 多态性位点比例为 80.5%。本研究结果也显示我国沿海几个主要鼠尾藻分布海区的鼠尾藻种群遗传多样性水平不高, 仅为 87.92%, 而且对比研究结果发现山东半岛部分海区鼠尾藻群体的遗传多样性有下降趋势。这可能因为近些年来海参养殖规模的迅速扩大, 鼠尾藻作为饲料的需求量也日益增长, 人为的无节制的采集藻种, 从而导致鼠尾藻自然资源的破坏, 种群遗传多样性的降低。因此有必要立即采取相关措施, 保护现有的鼠尾藻资源, 并修复其群体生态环境, 以避免鼠尾藻种群资源枯竭。

#### 3.2 鼠尾藻种群遗传结构

种群的遗传分化指数  $F_{st}$  表示两个种群间的遗传分化程度, 其范围在 0—1 之间,  $F_{st}$  越接近 1, 种群间的分化程度越高。根据 Wright(1978)的观点,  $F_{st} > 0.15$  就表明群体间存在较高的遗传分化(Wright, 1978)。本研究中, 鼠尾藻群体间  $F_{st}$  值为 0.4200—0.6645 ( $P < 0.001$ ), AMOVA 分析表明只有 38.15% 的变异来自群体内。这些结果表明鼠尾藻群体间遗传分化程度较高, 与 Zhao 等(2007)用 RAPD 技术研究得出的山东半岛鼠尾藻种群具有高度遗传分化的结果一致。

基因流值的大小和物种繁育方式是影响种群遗传结构的重要因素(Hamrick *et al*, 1990)。本研究中基因流值  $N_m$  为 0.3155, 基因流值较低。当  $N_m < 1$  时, 遗传漂变对种群遗传结构的分化作用可以忽略(Wright, 1931)。鼠尾藻种群的基因流值表明, 遗传漂变可能是鼠尾藻种群遗传分化的重要影响因素。鼠尾藻的繁殖方式有两种: 营养繁殖和有性生殖, 其中以固着器再生植株的营养繁殖方式为主, 有性生殖为辅(曾呈奎等, 2000)。而鼠尾藻有性生殖放散的配子体扩散能力有限, 因而可能导致种群内高度近交, 从而种群间产生较高遗传分化。而在海洋底栖动物中也有类似情况, 即扩散能力低的种群相对于扩散能力高的种群明显具有更高的遗传分化程度(Feral, 2002; Hellberg, 1994, 1995)。地理隔离作用对种群间的基因流有限制作用(林志华等, 2008; 李大宇等, 2009), 本研究选取的鼠尾藻种群间的地理距离均大于 200km, 作者认为这是鼠尾藻群体间高度遗传分化的原因之一。此外, 鼠尾藻种群间的遗传分化可能是环境自然选择的结果。不同基因型对不同的生态环境的适应能力不同, 而不同种群的生态环境(光照、温度、海浪冲击等)各不相同, 从而导致相同基因型个体聚集在较适应的生态环

境中,产生种群间的遗传分化。

鼠尾藻种群间存在较高遗传分化,但同时也存在一定的遗传相似度。从鼠尾藻种群的聚类结果看出地理距离较近的种群首先聚类为一支,例如大连种群和威海种群、温州种群和福州种群。若以长江为界,大连种群、威海种群和青岛种群这三个北方种群聚为一支,而南方的温州种群和福州种群则聚类为另外一支。鼠尾藻的南方种群和北方种群间存在一定遗传差异,AMOVA 分析表明有 5.94%的变异来自南方种群与北方种群间。而南方种群与北方种群间的遗传分化很可能来自自然选择压力,鼠尾藻作为一种典型的潮间带藻类,不仅受海水温度、陆地温度影响,而且温差的变化幅度、光照的强度和ación时间同样影响鼠尾藻的生长。因此,南方、北方不同的生态环境是导致鼠尾藻南方种群与北方种群间产生遗传分化的重要因素。

### 参 考 文 献

- 王增福,刘建国,2007.鼠尾藻(*Sargassum thunbergii*)有性生殖过程与育苗.海洋与湖沼,38(5):453—457
- 李大宇,殷倩茜,侯宁等,2009.黄颡鱼(*Pelteobagrus eupogon*)不同生态地理分布群体遗传多样性的微卫星分析.海洋与湖沼,40(4):460—469
- 宋林生,李俊强,李红蕾等,2002.用 RAPD 技术对我国栉孔扇贝野生种群与养殖群体的遗传结构及其遗传分化的研究.高技术通讯,7:83—86
- 林志华,董迎辉,李宁等,2008.基于形态参数和 AFLP 标记的文蛤(*Meretrix meretrix*)不同地理群体遗传变异分析.海洋与湖沼,39(3):245—251
- 曾呈奎,陆保仁,2000.中国海藻志.北京:科学出版社,32—35
- Excoffier L, Laval G, Schneider S, 2005. Arlequin ver.3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinform Online*, 1: 47—50
- Hamrick J L, Godt M J W, 1990. Allozyme diversity in plant species. In: Brown A H D, Clegg M T, Kahler A L *et al* ed. *Plant Population Genetics, Breeding and Genetic Resources*. Sinauer, Sunderland, Massachusetts, 43—63
- Hellberg M E, 1995. Stepping-stone gene flow in the solitary coral *Balanophyllia elegans*: equilibrium and nonequilibrium at different spatial scales. *Mar Biol (Berl)*, 123: 573—581
- Hoarau G, Coyer J, Stam W *et al*, 2007. A fast and inexpensive DNA extraction/purification protocol for brown macroalgae. *Molecular Ecology Notes*, 7: 191—193
- Matoso D A, Artoi R F, Galeti P M, 2004. Genetic diversity of the small characid fish *Astyanax* sp., and its significance for conservation. *Hydrobiologia*, 527(1): 223—225
- Nei M, 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89: 583—590
- Umezaki I, 1974. Ecological studies of *Sargassum thunbergii* (Merters) G. Kuntze in Maizuru Bay. *Japan Sea Bot Mag Tokyo*, 87: 285—292
- Vrijenhoek R C, 1994. Genetic diversity and fitness in small populations. In: Loeschcke V, Tomiuk J, Jian S K ed. *Conservation Genetics*. Basel: Birkhäuser, 37—53
- Wright S, 1931. Evolution in Mendelian population. *Genetics*, 16: 97—159
- Wright S, 1978. Evolution and genetics of populations. University of Chicago Press, Chicago, 179—182
- Yeh F C, Yang R C, Boyle T *et al*, 1997. POPGENE, the user-friendly shareware for population genetic analysis. *Molecular Biology and Biotechnology Center, University of Alberta, Edmonton, Alberta, Canada*, 20—25
- Zhao F J, Wang X L, Liu J D *et al*, 2007. Population genetic structure of *Sargassum thunbergii* (Fucales, Phaeophyta) detected by RAPD and ISSR markers. *J Appl Phycol*, 19: 409—416

## POPULATION GENETIC DIVERSITY OF *SARGASSUM THUNBERGII* IN THE COAST OF CHINA

LIU Wei, LI Mei-Zhen, WU Hai-Yi, ZHAN Dong-Mei, DING Gang

(Laboratory of Algal Biotechnology Center, Mariculture Institute of Shandong Province, Qingdao, 266002)

**Abstract** Five populations of *S. thunbergii* in Chinese coastal Dalian, Weihai, Qingdao, Wenzhou, and Fuzhou cities were analyzed to understand the genetic diversity of the species in Chinese coastal areas. Random amplified polymorphism of DNA (RAPD) analysis was conducted. Twenty one out of 60 polymorphic 10-base random primers were selected, from which 207 useful loci were detected. The polymorphic loci, Nei's gene diversity and Shannon diversity index were: 89.5%, 0.2966, 0.4508, respectively. The coefficient of genetic differentiation was 0.6131 and the gene flow ( $N_m$ ) was 0.3155. The results of AMOVA show significantly genetic differentiation among populations. Low level of genetic diversity within populations and high level of genetic differentiation among populations of *S. thunbergii* were revealed, which is important for the conservation of *S. thunbergii* germplasm and breeding.

**Key words** *Sargassum thunbergii*, RAPD, Genetic diversity, Genetic differentiation