

# 蜈蚣藻和管形藻的 RAPD 分析\*

王茜 安利佳 杨君 苏乔 王宏伟 康晓慧<sup>†</sup>

(大连理工大学生物工程系 大连 116012)

(大连医科大学丹东分院 丹东 118002)

**提要** 于 1997 年 9 月在大连石庙海区分株采集蜈蚣藻、管形藻和舌状蜈蚣藻,采用 RAPD 技术在分子水平上对属于红藻门的两种藻类——蜈蚣藻和管形藻进行了分析。所试 60 个引物中,有 21 个经扩增得到了 120 个多态片段。应用 PHYLIP 软件,按照 UPGMA 和 Neighbor-Joining(N-J)法分别构建聚类图。分析结果表明,RAPD 多态性提示蜈蚣藻和管形藻差异较大,应为两个不同的属。

**关键词** 蜈蚣藻 管形藻 分类 RAPD

**学科分类号** Q789

目前,海藻的分类仍主要借助于藻体的外部形态和内部结构的差异,如常以固着器形状、主要分枝数、藻体细胞的形态及层数等作为确定其种属关系的依据。李伟新等(1985, 1998)根据藻体形态构造的差异首次提出将蜈蚣藻节荚变型(*Grateloupia filicina* f. *lomentaria*)从蜈蚣藻属中分离出来,另建一新属——管形藻属,但这一说法并未得到普遍承认,至今仍有人延用蜈蚣藻节荚变型这一名称(徐祖洪等,1990)。为了确定管形藻的分类地位,本文报道采用 RAPD 技术将管形藻与蜈蚣藻在 DNA 分子水平上的比较结果。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品的采集与处理

所有样品均于 1997 年 9 月采自大连石庙海滨浴场,按 t1—t9 编号,其中 t1—t4 为管形藻(*Sinotubimorpha porracea*),各为 1 个样品;t5—t8 为蜈蚣藻(*Grateloupia filicina*),各为 1 个样品;t9 为舌状蜈蚣藻(*Grateloupia livida*),4 个样品。

所采样品按照 Tseng(1983)和栾日孝(1989)进行形态鉴定。然后将藻体表面的盐、砂、附生生物冲洗干净,再用蒸馏水冲洗两遍,于无菌风下或阴凉处风干。表面干燥后于 -70℃条件下保存待用。

### 1.2 基因组 DNA 的提取

参照 Doyle 等(1990)的 CTAB 法提取海藻模板 DNA。

### 1.3 DNA 扩增反应与电泳

**1.3.1 随机引物** 实验所用引物为 Operon 公司生产的 G 组、H 组、F 组引物,共计 60 个。

\* 辽宁省优秀青年科研人才培养基金资助项目,963005 号。王茜,女,出生于 1973 年 1 月,硕士,现工作单位:大连医科大学,邮编:116027, E-mail: pjjzln@yahoo.com

收稿日期:1999-01-20,收修改稿日期:1999-06-01

**1.3.2 RAPD 反应体系** 扩增反应总体积为 20 $\mu$ l, 其中无菌双蒸水 12 $\mu$ l, 10 $\times$  Buffer 2 $\mu$ l, 4 $\times$  dNTP (每种 2.0mmol/L) 1 $\mu$ l, 随机引物(5 pmol/ $\mu$ l) 1 $\mu$ l, 模板 DNA(12 ng/ $\mu$ l) 3 $\mu$ l, *Taq* 聚合酶 1 $\mu$ l [注: 10 $\times$  Buffer: Tris-HCl 10mmol/L (pH = 8.3), KCl 500mmol/L, MgCl<sub>2</sub> 20mmol/L, 0.1% 明胶 (W/V), Triton 100 1% (W/V)]。

**1.3.3 RAPD 反应程序** 反应混合物在加入 *Taq* DNA 聚合酶前置于沸水浴中预变性 5—10min, 待冷却后加入 *Taq* DNA 聚合酶, 然后将反应管置于 PCR-90AD 反应仪上, 94 $^{\circ}$ C 变性 1min, 35—36 $^{\circ}$ C 复性 1 分 40 秒, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 分 40 秒, 反应进行 45 个循环, 最后一次延伸反应为 72 $^{\circ}$ C 10min。

**1.3.4 电泳检测** 经含 0.5 $\mu$ g/ml 溴化乙锭 (EB) 1.4% 琼脂糖凝胶电泳分离扩增产物, 在 1 $\times$ TAE 缓冲液 (Tris-HAc, 0.001mol/L EDTA) 条件下电泳 (4V/cm) 3h 后, 取出凝胶在紫外灯下观察并照相。

## 1.4 数据处理

**1.4.1 随机扩增 DNA 片段的观察及统计** 记录电泳后清晰有多态的扩增带, 有扩增带用“1”表示, 没有扩增带或扩增带弱用“0”表示, 得到原始数据。

**1.4.2 统计分析** 按照公式  $S = 2N_{xy} / (N_x + N_y)$  获得各样品间的遗传相似度 (Nei *et al.*, 1979), 其中  $S$  为片段共享度,  $N_{xy}$  为 X 和 Y 两个个体共享的片段数,  $N_x$  和  $N_y$  为 X 与 Y 个体分别拥有的 RAPD 标记数, 再由  $D = 1 - S$  获得相应的遗传距离。将得到的数据输入计算机, 应用 PHYLIP 软件, 按 UPGMA 法和 N-J 法分别构建聚类图。

## 2 结果与分析

### 2.1 引物的筛选

以各样品的 DNA 为模板, 对 Operon 公司的 G 组、H 组、F 组共 60 个引物进行筛选, 选出其中 21 个引物在所有样品中均扩增得到一定大小的片段, 且扩增带清晰可辨, 背景较浅, 扩增产物具多态。全部扩增产物共 120 个, 片段大小范围为 250—2500bp (图 1)。

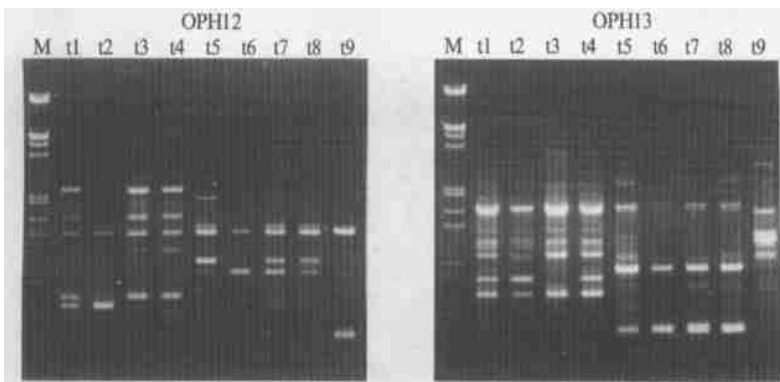


图 1 引物 OPH12/OPH13 扩增产物电泳

Fig. 1 The electrophoresis patterns of RAPD with primer OPH12/OPH13  
t1—t4: 管形藻, t5—t8: 蜈蚣藻, t9: 舌状蜈蚣藻, M: ADNA-Hind III/EcoR I  
分子量标记。表 1、图 2 同

### 2.2 各样品间的遗传距离

以上述确定的 21 个引物对表 1 中 9 个样品的模板 DNA 进行深入的 RAPD 分析。按

1. 4. 2 统计分析中所述的方法得到各样品间遗传距离矩阵(表 1)。从表 1 中可以看出, 蜈蚣藻和管形藻两居群内各个体间的平均遗传距离分别为 0.080 ( $D_{蜈蚣藻}$ ) 和 0.161 ( $D_{管形藻}$ ), 而蜈蚣藻和管形藻两个居群间的平均遗传距离( $D_1$ ) 为 0.746, 管形藻居群和舌状蜈蚣藻之间的平均遗传距离( $D_2$ ) 为 0.766, 蜈蚣藻居群和舌状蜈蚣藻(蜈蚣藻属中的另一种) 之间的平均遗传距离( $D_3$ ) 为 0.699, 其中  $D_1$ 、 $D_2$  和  $D_3$  均远大于  $D_{蜈蚣藻}$  和  $D_{管形藻}$ , 且  $D_1$  和  $D_2$  均大于  $D_3$ 。

表 1 管形藻、蜈蚣藻、舌状蜈蚣藻个体间遗传距离矩阵

Tab. 1 The matrix of genetic distance between *G. porracea*, *G. filiana* and *G. livida*

样品	t1	t2	t3	t4	t5	t6	t7	t8	t9
t1	0.000								
t2	0.125	0.000							
t3	0.117	0.248	0.000						
t4	0.143	0.263	0.073	0.000					
t5	0.782	0.780	0.717	0.760	0.000				
t6	0.768	0.765	0.720	0.766	0.111	0.000			
t7	0.755	0.742	0.685	0.765	0.061	0.087	0.000		
t8	0.745	0.739	0.682	0.762	0.052	0.121	0.051	0.000	
t9	0.765	0.760	0.778	0.762	0.700	0.688	0.704	0.702	0.000

注:  $D_1=0.746$ ,  $D_2=0.766$ ,  $D_3=0.699$

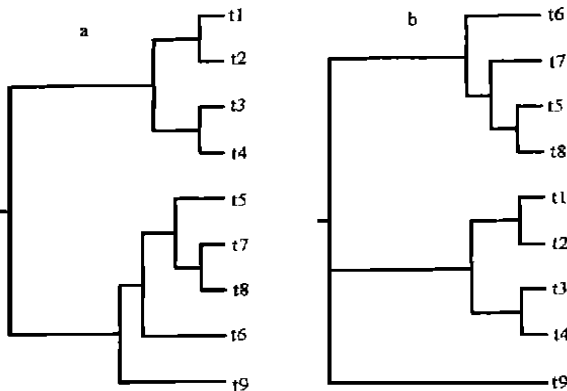


图 2 利用 UPGMA 法(a) 和 N-J 法(b)分析得到的聚类图

Fig. 2 The dendrogram based on random amplified Polymorphic DNA by UPGMA (a) and N-J (b) analysis of genetic distance data

## 2.3 聚类分析结果

根据遗传距离矩阵, 应用 PHYLIP 软件, 按照 UPGMA 法(图 2a) 和 N-J 法(图 2b) 分别构建聚类图, 其中 N-J 法以舌状蜈蚣藻为外群。

## 3 讨论

### 3.1 海藻模板 DNA 的制备

海藻细胞富含多糖, 采用常规的植物总 DNA 提取方法很难将其去除, 从而影响 PCR 扩增反应(Hong *et al.*, 1995)。在本实验中, 作者曾采用多种方法制备模板 DNA, 其中以 CTAB 法获得的 DNA 为模板进行 PCR 扩增时的效果最为理想。

实验表明, 要获得纯度较高的 DNA, 首先应保证材料前处理过程中藻体干燥程度的适宜, 一般以表面干燥为佳。作者曾做过吹干时间的梯度试验, 将试材在同等条件下分别吹干 1h、2h、3h 和 4h, 结果表明以 2h 为最佳吹干时间。此后, 随着吹干时间的延长即藻体干燥程度的增加, 得到的提取液

越粘稠, 其中的多糖也更难去除, 这一结果与 Hong 等(1995)的实验结果基本一致。

此外, 在提取过程中还应注意试材量与提取缓冲液量的适当比例, 通常在 2.5ml 的提取缓冲液中加入 0.1g 试材较好, 只有这样才能保证多糖等物质在提取缓冲液中彻底溶解。如果材料比例过大, 同样会造成提取液粘度过大, 给 DNA 的提取带来困难。

### 3.2 RAPD 分析结果与传统分类的比较

李伟新等(1985, 1998)根据藻体的形态构造如外皮层细胞排列方式, 内皮层细胞形状等方面的特征差异, 首次提出蜈蚣藻节荚变型并非蜈蚣藻的变型, 而是另一种物种。同时建议将蜈蚣藻节荚型从蜈蚣藻属中移出来, 另建立一新属——管形藻属(*Sinotubimorpha porracea*)。RAPD 多态片段聚类分析的结果表明(图 2b), 蜈蚣藻和舌状蜈蚣藻首先聚为一类, 然后再与管形藻聚在一起。由于 N-J 法中是以舌状蜈蚣藻为外群进行聚类, 所以 UPGMA 法和 N-J 法得到的聚类结果略有差异, 但在两种方式的聚类结果中蜈蚣藻和管形藻均首先各自聚为一类。另外, 据表 1 还可知, 蜈蚣藻和管形藻居群间的平均遗传距离( $D_1$ )为 0.746, 远远大于蜈蚣藻和管形藻居群内各个体间的平均遗传距离( $D_{蜈蚣藻} = 0.161$ ,  $D_{管形藻} = 0.080$ ); 蜈蚣藻和管形藻居群间的平均遗传距离( $D_1$ )与管形藻居群和舌状蜈蚣藻之间的平均遗传距离( $D_2 = 0.766$ )又大体相近, 同时  $D_1$  和  $D_2$  又大于蜈蚣藻与舌状蜈蚣藻之间的平均遗传距离( $D_3 = 0.669$ ), 由此提示管形藻与蜈蚣藻之间具有种以上的遗传距离。综合上述得到的遗传距离和聚类分析结果, 作者认为管形藻并不是蜈蚣藻的节荚变型, 而应建立一个新的属——管形藻属。

### 3.3 RAPD 技术在海藻分类学上的应用

目前, 海藻的分类仍主要在形态水平上进行。由于海洋环境的开放性, 不同的生活环境、气候、潮汐等各种各样的外界因素均会使藻体形态特征发生较大变化, 从而给海藻的传统分类带来困难。而 RAPD 技术可以在 DNA 水平上对物种进行分子鉴定, 因此进入 90 年代以来该技术被用于海藻分类学的研究。Patway 等(1993)首先应用该技术比较了宽叶石花菜与异形石花菜的种间差异及后者 13 个个体间的种内差异; Doucher(1994)用该技术研究了三种紫菜的亲缘关系; Ho 等(1995a, b)报道了 RAPD-PCR 技术在马尾藻属种间分子鉴定中的应用。本实验表明, 采用 RAPD 技术对蜈蚣藻和管形藻进行 DNA 分子水平上的研究, 可以提出比较明确的分类学上的证据, 而且作者将 RAPD 实验重复两次, 得到的实验结果较稳定, 因此这一实验方法无疑是对传统分类的一个极好补充, 并将更加广泛地应用于海藻分子系统学研究中。

致谢 承蒙中国科学院海洋研究所曾呈奎院士、陆保仁研究员的帮助和指导, 谨致谢忱。

## 参 考 文 献

李伟新, 徐法礼, 符鹏飞, 1985. 隐丝藻科一新属, 管形藻属. 见: 中国海洋湖沼学会藻类学会编辑, 第二届全国藻类学会会员大会暨学术年会论文摘要集, 134

李伟新, 丁镇芬, 1998. 隐丝藻科一新属——管形藻属. 湛江海洋大学学报, 18(3): 1-5

徐祖洪, 史升耀, 李智恩, 1996. 蜈蚣藻、蜈蚣藻节荚变型和拟厚膜藻卡拉胶的研究. 海洋与湖沼, 27(5): 499-503

栾日孝, 1989. 大连沿海实习指导. 大连: 大连海运学院出版社, 44-45

- Doutcher J A, 1994. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) identification of genetic variation in three species of *Porphyra* (Bangiales, Rhodophyta). *J Appl Phycol*, 6: 267—273
- Doyle J J, Doyle J L, 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12: 13—5
- Ho Chai- Ling, Pang Siew- Moi, Pang Tikki, 1995a. Application of polymerase chain reaction (PCR) using random polymorphic DNA (RAPD) primers in the molecular identification of selected *Sargassum* species (Phaeophyta Fucales). *Eur J Phycol*, 30: 273—280
- Ho Chai- Ling, Pang Siew- Moi, Pang Tikki, 1995b. Molecular characterization of *Sargassum polystum* and *S. siliquosum* (Phaeophyta) by polymerase chain reaction (PCR) using random polymorphic DNA (RAPD) primers. *J Appl Phycol*, 7: 33—41
- Hong Yong- Ki, Kim Sang- Dal, Miniam Polne- Fuller, 1995. DNA extraction conditions from *Porphyra perforata* using LiCl. *J Appl Phycol*, 7: 101—107
- Nei M, Li W H, 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 74: 5 267—5 273
- Patway M U, Mackay R M, van der Meer J P, 1993. Revealing genetic markers in *Gelidium vagum* (Rhodophyta) through the random polymorphic DNA primers (RAPD) technique. *J Phycol*, 29: 216—222
- Tseng C K, 1983. *Common Seaweeds of China*. Beijing: Science Press, 50

## RAPD ANALYSIS OF *GRATELOUPIA FILICINA* AND *SINOYUBIMORPHA PORRACEA*

WANG Qian, AN Li- jia, YANG Jun, SU Qiao, WANG Hong- wei, KANG Xiao- hui

(Department of Biological Engineering, Dalian University of Technology, Dalian, 116012)

(Dalian Medical University Dandong Branch, Dandong, 118002)

**Abstract** Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) was used to study *Grateloupiafilicina* and *Sinoyubimorphaporracea* (Rhodophyta), in terms of the molecular systematics. Amplification with 60 random primers was made under predetermined optimal reaction (samples were first heated at 95 °C for 10 min., and followed by 45 cycles of 60 sec. at 94 °C, 100 sec. at 36 °C, and 160 sec. at 72 °C, then held at 72 °C for 10min. after 45 cycles). 21 of the 60 random primers tested were positive, generating a total of 120 prominent amplification products. The amplified fragments were scored as present (1) or absent (0) for each DNA sample and an index of degree of band sharing (*S*) was calculated by using Nei and Li's matching coefficient method. The value of (1- *S*) was used to evaluate genetic distances between species. The dendrograms were built based on UPGMA and Neighbor- Joining analysis of genetic distance matrix data. The result suggests that RAPD is useful in distinguishing *G. filicina* from *S. porracea* and that *G. filicina* and *S. porracea* may belong to different genera.

**Key words** *G. filicina* *S. porracea* Classification RAPD

**Subject classification number** Q789