

## 琼枝野生群体与养殖群体的 EST-SSR 分析

胡吟胜<sup>1</sup>, 段泽林<sup>2</sup>, 黄 勃<sup>1\*</sup>, 于淑楠<sup>1</sup>, 王 婷<sup>3</sup>

(1. 海南大学海洋学院, 海南 海口 570228;

2. 华东师范大学生命科学学院, 上海 200241;

3. 中国科学院海洋研究所, 山东 青岛 266071)

**摘要:** 为研究野生琼枝与养殖琼枝的遗传差异, 利用 EST-SSR 技术分析了海南东北部地区 9 株野生和 9 株养殖琼枝的遗传差异性。结果显示, 用 5 对 EST-SSR 引物对 18 个个体的基因组进行扩增, 扩增出的片段大小为 250~2 500 bp, 琼枝野生群体和养殖群体的多态性比例分别为 74.29% 和 70.00%; 野生群体之间的平均遗传距离为 0.46, 养殖琼枝群体之间的平均遗传距离为 0.22。聚类分析图显示, 在相似系数 0.49 处, 18 株群体按野生与养殖分为 2 大类, 在相似系数 0.66 附近, 野生群体分成 3 类, 养殖琼枝群体分为 2 类, 在相似系数 0.73 附近, 野生琼枝群体分成 5 类, 而养殖群体为 3 类, 相似系数越高, 野生群体比养殖群体分类单元越多。研究表明, 野生琼枝群体的遗传多样性比养殖琼枝群体高。

**关键词:** 琼枝; EST-SSR; 野生; 养殖

**中图分类号:** S 968.4

**文献标志码:** A

琼枝 (*Betaphycus gelatinae*) 属于红藻门 (Rhodophyta), 杉藻目 (Gigartinales), 红翎菜科 (Solieriaceae), 琼枝藻属 (*Betaphycus*)。琼枝具不规则的羽枝, 分枝可对生, 互生, 向四面伸展<sup>[1]</sup>。藻体表面多现紫红色或黄绿色, 腹面大部分为紫红色。琼枝具有食用及药用价值, 是生产卡拉胶的重要热带养殖经济红藻<sup>[2]</sup>。近年来, 由于环境污染及琼枝连续多代养殖, 使琼枝的种质资源多样性降低, 与野生群体相比, 养殖群体的种质下降明显, 主要表现为琼枝生长速度降低, 白化病多发, 养殖成本增加。

EST-SSR 是在 SSR 上发展起来的一种分子标记技术<sup>[3]</sup>, 具有很好的稳定性和多态性<sup>[4]</sup>。目前 EST-SSR 技术在海洋动物的野生群体与养殖群体的遗传差异的研究中被广泛运用, 如企鹅珍珠贝<sup>[5]</sup>、凡纳滨对虾<sup>[6]</sup>, 在海洋大型藻类方面, 也广泛应用于野生群体与养殖群体的遗传差异的研

究, 如海带的野生与养殖遗传分析<sup>[7]</sup>、坛紫菜野生种群的遗传多样性<sup>[8]</sup>, 江蓠属的 SSR 标记<sup>[9]</sup>, 龙须菜野生与选育品种间 SSR 差异<sup>[10]</sup>的研究。本实验利用 EST-SSR 技术, 对琼枝的野生与养殖群体进行分析, 以期为我国琼枝的遗传改良及养殖技术的改进提供遗传数据。

### 1 材料与方 法

#### 1.1 实验材料

18 株琼枝采自海南东北部的翁田, 其中 9 株取自翁田养殖区, 编号为 1~9, 9 株野生琼枝采自翁田自然海区, 编号为 10~18。

#### 1.2 基因组的提取

取琼枝藻株幼嫩部位, 每种材料分别在无菌蒸馏水中清洗, 去掉藻株上含带的海水及杂物, 吸干水后用于 DNA 的提取。DNA 的提取分别采用 Omega 公司生产的 D2485-01 植物提取试剂盒以

收稿日期: 2013-03-24 修回日期: 2013-04-27

资助项目: 国家“八六三”高技术研究发展计划(2012AA10A412-8); 海南大学植物学国家重点学科(071001); 海南省重点科技项目(080137); 国家自然科学基金项目(41176084); 国家科技支撑计划项目(2009BADB2B0404-02); 海洋公益行业科研专项(201105008-7); 中医药行业科研专项(201207002-03)

通信作者: 黄 勃, E-mail: huangbohbl@163.com

及赵素芬等<sup>[11]</sup>的CTAB方法和Hu等<sup>[12]</sup>的SDS法。试剂盒法具体步骤如下:取100 mg研磨成粉末的样品于1.5 mL的离心管中,加入500  $\mu$ L Buffer CPL,65  $^{\circ}$ C水浴15 min后,加500  $\mu$ L 氯仿/异戊醇(24:1)快速混匀30 s,10 000  $\times$  g离心1 min后吸取300  $\mu$ L上清液到套有收集管的硅胶柱中,再加入150  $\mu$ L Buffer CXD和300  $\mu$ L无水乙醇,混匀后10 000  $\times$  g离心1 min,将硅胶柱换装到另一个收集管中,加入650  $\mu$ L SPW进行洗涤,10 000  $\times$  g离心1 min后将硅胶柱转移到一个新的1.5 mL离心管中,加入50~100  $\mu$ L的Elution Buffer,65  $^{\circ}$ C水浴3 min,10 000  $\times$  g离心1 min,离心管中所得的液体即为基因组DNA提取液。提取DNA后,用1%琼脂糖凝胶电泳并在凝胶成像系统拍照检测,查看DNA提取质量。

### 1.3 引物及PCR

通过麒麟菜EST序列为模板进行引物设计,然后从设计的引物中再筛选出其中5对引物,进行PCR扩增实验。5对引物信息见表1。PCR反应体系总体系为20  $\mu$ L,其中2  $\times$  PCR mix 10  $\mu$ L, DNA模板为1  $\mu$ L,引物Primer-F和Primer-R各1  $\mu$ L,加超纯水补足体积至20  $\mu$ L。扩增条件为94  $^{\circ}$ C预变性5 min,再进行25个循环(变性94  $^{\circ}$ C 30 s,复性49  $^{\circ}$ C 30 s,延伸72  $^{\circ}$ C 1 min),最后72  $^{\circ}$ C延伸10 min,4  $^{\circ}$ C保存,采用3%琼脂糖凝胶检测,并在凝胶成像系统拍照下拍照。

表1 引物信息  
Tab.1 Information of primer

引物编号 no. of primer	引物序列(5'-3') primer sequences	DNA 熔解温度/ $^{\circ}$ C $T_m$
1	-AATGTTTCGACCGATCTCA- -CTCTTATGCGCCAAGTA-	49.7
2	-ATGTCGCCAGGCAGTCAG- -CCAACACGCCCATCCATC-	54.5
3	-ATGTCGCCAGGCAGTCAG- -GCTTGGCTGAGCTACACG-	46.2
4	-TCGGAGTTGGGTTGTGAT- -GAAAGGCAGCCAGAGCAT-	52.2
5	-CTTTGCTGCTGGGCTGAC- -GGGAACAATGGACGAGGC-	53.1

### 1.4 数据处理

根据PCR产物的电泳图,统计扩增条带,条带不管强弱,只要出现即记为1,未出现的则记为0,将电泳结果转换成数据矩阵,用NTSYS 2.10e

软件计算出相似性系数,并做出聚类分析图。

## 2 结果

### 2.1 提取基因组方法选择

对于含糖较多的植物来说,提取高质量的DNA难度较大<sup>[13]</sup>。实验经过试剂盒法、CTAB法、SDS法3种不同的方法来提取琼枝的基因组DNA,经电泳后得到的电泳结果如图1。图中1号为试剂盒法,2号为CTAB法,3号为SDS法。图1表明3种实验方法都可以提取出DNA,但CTAB法及SDS法提取时间太长,而且蛋白质或杂糖多,不好去除干净等。用试剂盒法提取DNA,有操作时间短的优势,而且操作步骤少,可减少提取过程中的污染机会。综合考虑上述因素,实验采用试剂盒提取基因组DNA。

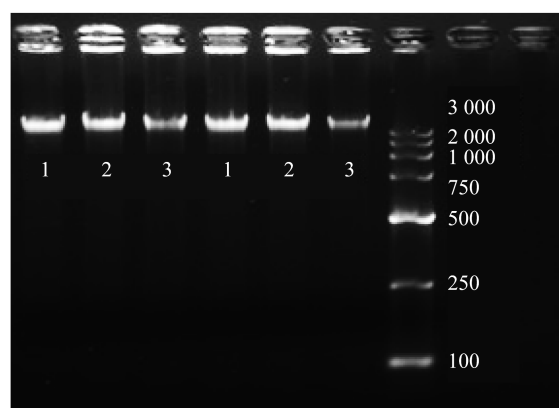


图1 DNA电泳结果图

Fig.1 DNA electrophoresis figure

### 2.2 条带多态性扩增结果

PCR产物电泳后,结果如图2所示,扩增的条带统计见表2。

用5个引物对18个个体进行了扩增,扩增条带片段大小为250~2 500 bp。每个引物对野生琼枝个体扩增的片段数为1~50个,平均扩增的条带为21条,共扩增出了105条片段,其中多态性条带为63条,平均多态位点比例为74.29%;每个引物对养殖琼枝个体扩增的片段为1~33个不等,平均扩增的片段为18条,一共扩增出了90条片段,其中多态性条带为78条,平均多态位点的比例为70.00%。野生琼枝群体扩增出的片段数及多态性比例均高于养殖琼枝群体。

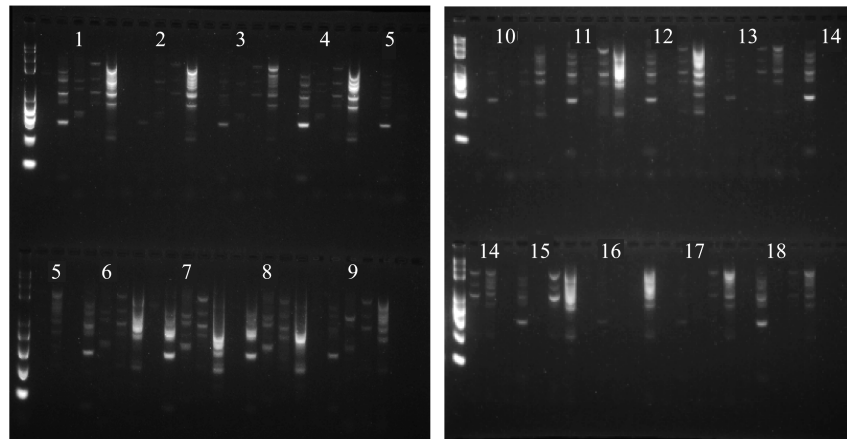


图 2 18 株琼枝的扩增电泳图

Fig. 2 18 strains of amplification electrophoresis map of *B. gelatinae*

表 2 野生与养殖琼枝扩增条带信息

Tab. 2 Wild and farmed *B. gelatinae* amplification bands information

群体 population	条带类型 kinds	引物 1 primer 1	引物 2 primer 2	引物 3 primer 3	引物 4 primer 4	引物 5 primer 5	条带总数 total	多态比例/% proportion
养殖 wild	扩增条带 amplification bands	1	21	14	21	33	90	70
	多态条带 polymorphic bands	1	12	14	12	24	63	
野生 farmed	扩增条带 amplification bands	1	34	1	19	50	105	74.29
	多态条带 polymorphic bands	1	25	1	19	32	78	

### 2.3 遗传相似系数

用 NTSYS 2.10e 软件分析得到 18 种琼枝间

的相似性系数(表 3)。由表 3 可知,18 份琼枝群体之间的遗传相似系数 GS 为 0.20 ~ 0.93, 平均

表 3 18 种琼枝之间的相似系数

Tab. 3 Similarity coefficient between 18 kinds of *B. gelatinae*

	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12	C13	C14	C15	C16	C17	C18
C1	1.00																	
C2	0.80	1.00																
C3	0.73	0.80	1.00															
C4	0.80	0.60	0.80	1.00														
C5	0.73	0.93	0.86	0.67	1.00													
C6	0.67	0.60	0.53	0.53	0.67	1.00												
C7	0.67	0.73	0.53	0.60	0.67	0.86	1.00											
C8	0.67	0.73	0.67	0.73	0.80	0.87	0.87	1.00										
C9	0.73	0.80	0.73	0.67	0.86	0.67	0.67	0.80	1.00									
C10	0.66	0.60	0.67	0.60	0.67	0.46	0.33	0.46	0.53	1.00								
C11	0.67	0.46	0.40	0.60	0.40	0.60	0.60	0.60	0.40	0.46	1.00							
C12	0.73	0.53	0.46	0.53	0.46	0.53	0.53	0.53	0.46	0.53	0.93	1.00						
C13	0.73	0.53	0.46	0.67	0.47	0.53	0.53	0.53	0.46	0.67	0.80	0.73	1.00					
C14	0.60	0.40	0.33	0.53	0.33	0.40	0.40	0.40	0.33	0.67	0.67	0.60	0.87	1.00				
C15	0.53	0.46	0.40	0.60	0.53	0.60	0.46	0.60	0.67	0.73	0.46	0.40	0.67	0.67	1.00			
C16	0.40	0.46	0.40	0.33	0.40	0.20	0.33	0.33	0.40	0.60	0.46	0.40	0.67	0.80	0.60	1.00		
C17	0.67	0.46	0.40	0.60	0.40	0.47	0.47	0.46	0.53	0.73	0.60	0.53	0.80	0.80	0.86	0.73	1.00	
C18	0.60	0.53	0.46	0.40	0.46	0.26	0.40	0.40	0.60	0.67	0.53	0.60	0.73	0.73	0.67	0.80	0.80	1.00

为0.58;在养殖琼枝群体中,遗传相似性系数为0.53~0.93,6号、7号两个样与3号样的遗传相似性系数最低,都为0.53,5号和2号样遗传相似性最高,高达0.93,养殖群体的平均相似性系数为0.78,平均遗传距离为0.22;在野生琼枝群体中,遗传相似系数为0.4~0.93,15、16号两个样与12号样遗传相似性最低,都为0.40,遗传相似

性最高的是11号和12号样,为0.93,野生群体平均相似性系数为0.53,平均遗传距离为0.47。野生琼枝群体的平均相似性系数低于养殖琼枝群体。

#### 2.4 聚类分析

根据遗传相似性系数,利用NTSYS软件做出聚类分析见图3。

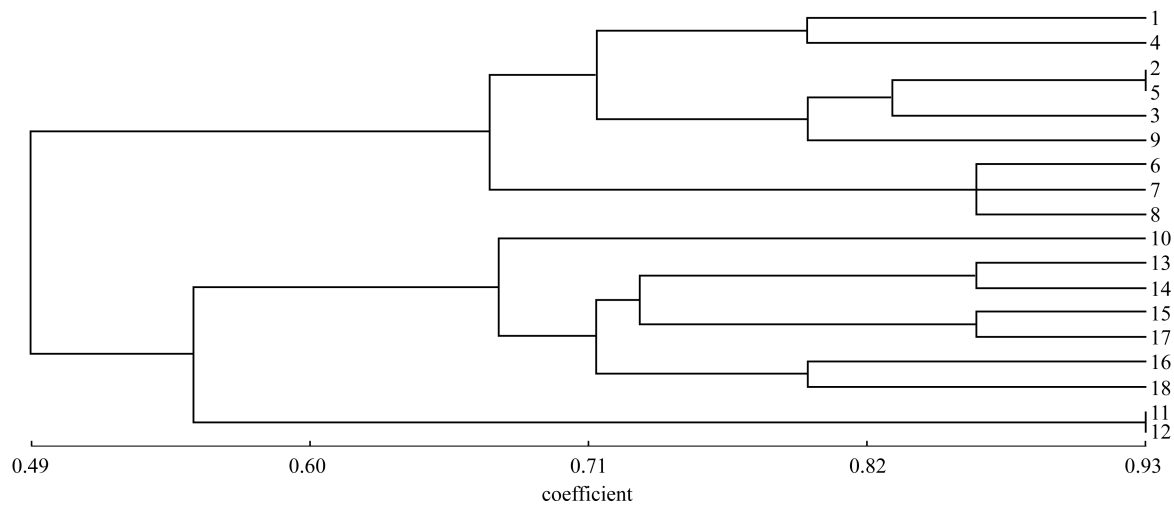


图3 18株琼枝的聚类分析树状图  
Fig.3 The cluster analysis of *B. gelatinae*

从聚类图可以看出,在相似系数为0.49时,18株琼枝分成野生琼枝群体与养殖琼枝群体2大类;相似系数为0.56时,野生琼枝群体分为2类,11和12号野生琼枝群体聚为一类,其余野生琼枝群体聚为一类;相似系数为0.66时,养殖琼枝群体分为2类,野生琼枝群体被分成3类;相似系数为0.71时,养殖群体分为3类,野生群体分为4类;相似系数为0.73时,野生琼枝群体被分成5类,养殖琼枝群体聚类程度不变,仍为3类。相似系数越高,野生琼枝群体的分类单元比养殖群体的分类单元越细。说明野生琼枝群体之间的遗传差异比养殖琼枝群体之间的差异要大。

### 3 讨论

在大型藻类研究中,关于养殖群体与野生群体遗传多样性比较研究的报道不多。张全胜等<sup>[14]</sup>用AFLP研究了海带的遗传多样性,发现野生群体出现明显的退化,李世国等<sup>[15]</sup>对海带的栽培品种和自交品种的遗传研究发现栽培种的遗传差异比自交种的遗传差异要低。主要是由于多代连续的人工养殖造成了群体遗传多样性的下

降<sup>[16-17]</sup>。琼枝营养价值丰富,是重要的食用药用藻类,也是生产卡拉胶的主要原料,其养殖业蓬勃发展。但由于连续的人工养殖,造成种质不断退化。实验利用EST-SSR技术对海南东北部海域的野生琼枝群体与养殖琼枝群体的遗传多样性进行比较,发现野生琼枝群体的遗传多样性比养殖琼枝群体遗传多样性高,其结果与国内外相关的研究结果一致。

本实验通过EST-SSR技术分析野生琼枝群体与养殖琼枝群体的遗传差异,发现养殖群体的遗传多样性比野生琼枝群体的多样性要低,EST-SSR分析表明,野生群体的多态性条带及多态性比例均高于养殖琼枝群体;相似性系数表及聚类的结果也表明野生琼枝群体之间的遗传差异比养殖琼枝群体之间的差异要大。造成这样的原因主要是养殖环境条件均匀,养殖琼枝繁殖方式是单一的无性营养繁殖,经过多代连续的养殖后,养殖琼枝群体的遗传多样性降低,种质资源退化。与此相反,生长在自然海区的野生琼枝,其海洋环境条件复杂,繁殖有无性繁殖和有性繁殖两种途径<sup>[18]</sup>,野生区的琼枝群体遗传差异大,其多样性

高。因此,经过多代繁殖后,形成了养殖群体遗传多样性降低,野生群体遗传多样性增加的格局。

本文得到杨文杰师兄前期的引物设计及实验的指导,以及后续于淑楠师妹的鼎力相助,在此一并感谢!

#### 参考文献:

- [1] 夏邦美,张峻甫. 中国海藻志[M]. 北京:科学出版社,1999:118-132.
- [2] 曾呈奎. 中国经济海藻类[M]. 北京:科学出版社,1962:144-148.
- [3] Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda G D. Genome finger printing by simple sequence repeats (SSR) anchored polymerase chain reaction amplification [J]. *Genomics*, 1994, 20(2):176-183.
- [4] Fang D Q, Roose M L. Identification of closely related citrus cultivars with inter simple sequence repeat markers [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1997, 95(3):408-471.
- [5] 王永丽,王梅芳,王爱民,等. 基于近缘 EST-SSR 引物的企鹅珍珠贝养殖和野生群体的遗传标记[J]. *广东海洋大学学报*, 2011, 31(3):7-11.
- [6] 张琼,李喜莲,薛淑雯,等. 凡纳滨对虾 EST-SSR 标记的筛选及遗传多态性检测[J]. *海洋学报*, 2011, 33(1):121-126.
- [7] 刘福利,段德麟. 海带群体遗传分析及叶片长、宽性状 QTL 研究[D]. 北京:中国科学院研究生院,2011.
- [8] 陈昌生,谢朝添,纪德华,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.
- [9] 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.
- [10] 李文红,姚建亭,王继成,等. 龙须菜选育品系及其野生型的 ISSR 指纹分析[J]. *海洋与湖沼*, 2005, 36(3):241-247.
- [11] 赵素芬,何培民. 长心卡帕藻 ISSR-PCR 反应体系的正交优化研究[J]. *中国生物工程杂志*, 2008, 28(6):163-167.
- [12] Hu Z M, Zeng X Q, Wang A H. An efficient method for DNA isolation from red algae [J]. *Journal of Applied Phycology*, 2004, 16(3):161-166.
- [13] 丁晓东,吕柳新. 从顽拗植物荔枝中提取基因组技术的研究[J]. *应用与环境生物学报*, 2006, 6(2):142-145.
- [14] 张全胜,石媛媛,丛义周,等. 我国引种海带和栽培海带源配子体克隆的 AFLP 分析[J]. *中国海洋大学学报:自然科学版*, 2008, 38(3):429-435.
- [15] 李世国,单体锋,侯和胜,等. 9 个海带栽培品种自交系后代遗传多样性和亲缘关系的 AFLP 分系[J]. *中国水产科学*, 2009, 16(2):214-220.
- [16] Sunden S L F, Davis S K. Evaluation of genetic variation in a domestic population of *Penaeus vannamei* (Boone): a comparison with three natural populations [J]. *Aquaculture*, 1991, 97(2-3):131-142.
- [17] Wolfus G M, Garcia D K, Warren A A. Application of the microsatellite technique for analyzing genetic diversity in shrimp breeding programs [J]. *Aquaculture*, 1997, 152(1-4):35-47.
- [18] 匡梅,曾呈奎,夏邦美. 中国麒麟菜族的分类研究[J]. *海洋科学集刊*, 1999, 41:168-236.

## EST-SSR analysis of wild and farmed *Betaphycus gelatinum*

HU Yinsheng<sup>1</sup>, DUAN Zelin<sup>2</sup>, HUANG Bo<sup>1\*</sup>, YU Shunan<sup>1</sup>, WANG Ting<sup>3</sup>

(1. Ocean College, Hainan University, Haikou 570228, China;

2. School of Life Sciences, East China Normal University, Shanghai 200241, China;

3. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China)

**Abstract:** EST-SSR was used to detect the hereditary difference in wild and cultured populations of the *Betaphycus gelatinae*, the result showed that nine individuals from each population were used of the 5 EST-SSR primers amplified, a total of 195 reproducible loci ranging from 250 to 2 500 bp were amplified from all the 18 individuals. The average percentages of polymorphic loci in wild and cultured populations were 74.29% and 70%. The intra-population genetic distance was 0.46 in wild population and 0.22 in cultured population. The cluster analysis showed that 18 individuals were clustered into two groups base on 0.49 of GS; wild populations were divided into 3 branches and cultured populations were divided into 2 branches base on 0.66; wild populations were divided into 5 branches and cultured populations were divided into 3 branches base on 0.73. The higher the value, the more branches the wild populations have. The research shows that genetic diversity of wild populations ampler than cultured

**Key words:** *Betaphycus gelatinae*; EST-SSR; wild; farmed

**Corresponding author:** HUANG Bo. E-mail: huangbohb1@163.com