

文章编号: 1000-0615(2008)05-717-08

野生坛紫菜种群遗传多样性的 ISSR 分析

陈昌生, 谢潮添, 纪德华, 徐 燕, 郭留超

(集美大学水产学院, 福建 厦门 361021)

摘要: 采用简单序列重复区间 (ISSR) 分子标记技术对福建省的 3 个野生坛紫菜 (*Porphyra haitanensis*) 种群共 60 个个体进行了遗传多样性分析。15 条引物共扩增出 222 个位点, 其中 186 个位点具有多态性, 多态位点百分率为 83.78%, 在种群水平上, 多态位点百分率为 80.18%~81.53%, 平均为 80.93%。期望杂合度、Shannon 信息指数在物种水平上分别为 0.3304 和 0.4834; 在种群水平上分别为 0.3089 和 0.4551, 表明坛紫菜种群内存在着较高的遗传多样性水平, 且在三个种群间没有明显差异。依据 G_{st} 值, 坛紫菜的遗传变异主要发生在种群内的个体间 (占 93.5%), 只有 6.5% 的遗传变异发生在种群间, 由此说明坛紫菜种群间的遗传分化水平很低, 这与坛紫菜种群间充分的基因交流 ($N_m = 7.1930$) 是相关的。基于遗传距离的 UPGMA 聚类结果表明坛紫菜 60 个个体并不按照其地理分布进行分群, 而是随机分群的。文章最后还对坛紫菜种质资源保护的必要性进行了讨论。

关键词: 坛紫菜; ISSR; 遗传多样性; 遗传分化

中图分类号: S 917 **文献标识码:** A

坛紫菜 (*Porphyra haitanensis*) 是我国特有暖温带性种类, 其产量约占全国紫菜总产量的 75%。经过 40 多年人工养殖的坛紫菜, 由于种质提纯复壮和育种研究工作严重滞后, 所使用的栽培品系已出现严重的种质退化, 生产效益受到了极大影响。因此迫切要求对原产地的野生坛紫菜种群进行遗传多样性分析, 以摸清坛紫菜的遗传背景, 从而为坛紫菜的遗传育种及种质资源保护提供理论基础。分子标记技术为种质资源遗传分析提供了强有力的工具, 它直接在 DNA 水平检测基因组的遗传变异, 不受发育时期和环境因素的影响, 数量丰富且多态性好, 已广泛应用于紫菜的遗传多样性分析中, 如: 梅俊学等^[1]对 4 个条斑紫菜栽培品系, 徐涤等^[2]对 2 种紫菜的 5 个品系, 陈骁等^[3]对 11 个紫菜样品等都采用 RAPD 标记进行了遗传多样性分析。杨锐等^[4-5]则采用 AFLP 标记对坛紫菜的野生种及两个栽培品系,

11 个条斑紫菜品系进行了遗传变异研究。但这些研究都只是对少数几个品系进行遗传多样性分析, 目前尚未见到对野生坛紫菜种群进行遗传多样性分析的报导。

ISSR (inter-simple sequence repeat) ——简单序列重复区间扩增多态性是由在 SSR 标记基础上发展起来的一种分子标记技术^[6], 具有 DNA 样品用量少, 操作简单, 无需预先知道受试基因组 DNA 序列, 结果记录方便, 实验成本低, 能提供丰富的关于基因组的信息, 且比 RAPD 技术更加稳定可靠, 重复性好等优点, 已经在植物的遗传多样性分析、指纹图谱绘制、品种鉴定、进化及分子生态学等研究中得到广泛应用^[7]。但迄今为止, ISSR 标记应用于海藻研究的报道还很少, 国内仅见李文红等^[8]、孙雪等^[9]利用 ISSR 标记对几个江蓠属海藻进行遗传变异分析, 以及谢潮添等^[10]探讨了 ISSR 标记在坛紫菜种质鉴定上的应用等

收稿日期: 2007-10-24

资助项目: 国家自然科学基金(40676077); 国家海洋 863 计划(2006AA10A413); 福建省科技重大专项(2004NZ03); 福建省自然科学基金(2007J0064)

作者简介: 陈昌生(1957-), 男, 福建平潭人, 教授, 主要从事水产增殖和育种技术的研究。E-mail: cschen@jmu.edu.cn

报导。本研究的主要目的是要对福建省的野生坛紫菜种群进行遗传多样性分析,以期了解野生种群的遗传与分化特点,为坛紫菜的种质改良提供实验基础。

1 材料与amp;方法

1.1 样品的采集

根据野生坛紫菜的地理分布情况,2006年12月选取福建平潭岛(PT)、南日岛(NR)及东山岛(DS)三个种群(图1)作了取样分析,分别随机选取种群内的20个个体的叶状体作为样本,阴干后装入封口塑料袋中,带回实验室置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存备用。

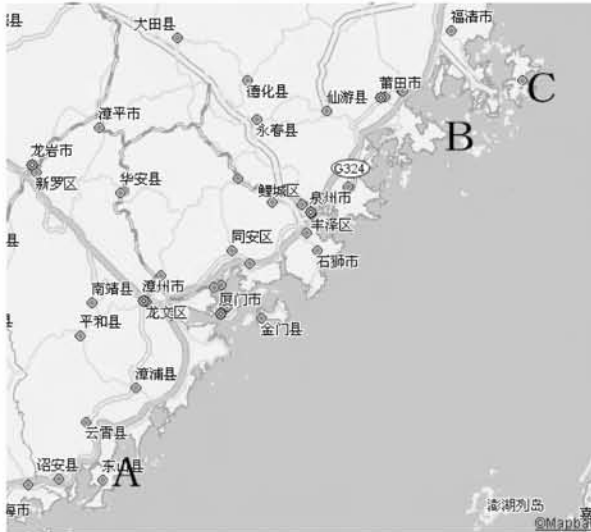


图1 坛紫菜样品的采集地点

A. 漳州东山岛(DS); B. 莆田南日岛(NR); C. 平潭(PT)

Fig. 1 The localities of *P. haitanensis* sampling populations

1.2 基因组DNA的提取及检测

取冷冻保存的坛紫菜叶状体1g,于海水中恢复至室温后剪成碎片,加入5mL酶液(2%海螺酶, $2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 葡萄糖), $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 振荡保温2h。酶解结束后用无菌海水稀释酶解物,筛绢过滤,滤液经 $5\text{ }000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ 离心5min,收集细胞。用无菌海水重悬浮洗涤、离心收集细胞,采用CTAB法^[11]提取基因组DNA,并经DNA片段快速纯化试剂盒(北京鼎国生物技术有限责任公司)纯化后,在1.0%的琼脂糖凝胶电泳中检查DNA的完整性及在Beckman DU-600核酸蛋白紫外分析仪

上测定DNA浓度。

1.3 坛紫菜ISSR标记分析的引物筛选

实验所用引物参照加拿大哥伦比亚大学(UBC)公布的第9套ISSR引物序列(http://www.michaelsmith.ubc.ca/services/NAPS/primer_sets/primers.pdf),由大连宝生物工程有限公司合成。按照扩增条带清晰稳定、重复性好为原则,在 $25\text{ }\mu\text{L}$ 的反应体系中对引物进行筛选。

1.4 PCR扩增及检测

按照本实验室建立的坛紫菜ISSR标准反应体系及扩增程序^[10]进行。PCR扩增在美国MJ Research PTC-200型PCR仪上进行,扩增结束后,以100bp DNA ladder (100~3 000 bp)作为相对分子质量标准,取 $5\text{ }\mu\text{L}$ 扩增产物在6%的聚丙烯酰胺胶上于60W恒功率电泳1.5h,经银染显色,并用扫描仪记录结果。

1.5 数据统计与分析

ISSR是显性标记,同一引物扩增产物中电泳迁移率一致的条带被认为具有同源性,按照相同迁移位置上有扩增条带的记为1,没有扩增条带的记为0的方法记录电泳谱带,输入计算机形成1,0矩阵。应用POPGENE 1.31程序,假定种群在这些ISSR标记位点处于Hardy-Weinberg平衡状态,分别统计各个种群及所有样本(总群体)的下列参数^[12]:

(1) 多态位点百分数(P):扩增的DNA片段出现频率小于或等于0.99的位点即为多态位点, $P = \text{具有多态的位点数}/\text{检测到的位点数} \times 100\%$;

(2) 平均每个位点的观察等位基因数(N_a);

(3) 平均每个位点的有效等位基因数(N_e);

(4) 期望杂合度(h),亦称Nei的平均基因多样性;

(5) Shannon信息指数(I);

(6) 总的基因多样性(H_t)和种群内的基因多样性(H_s);

(7) 基因分化系数(G_{st})和基因流(N_m);

(8) 遗传距离(D)和遗传相似性(I)。

最后根据种群间Nei的遗传距离,采用算数平均数的非加权成组配对法(UPGMA法)进行

聚类分析。使用软件为 NTSYSpc 2.02。

2 结果与分析

2.1 ISSR 标记分析结果

对 3 个坛紫菜种群共 60 个个体进行 ISSR 扩增,结果从 65 条 ISSR 引物中筛选出 15 条引物,可以扩增出清晰稳定,重复性好,多态性高的

条带(部分引物的扩增结果见图 2)。这 15 条引物共扩增出 222 个位点,其中 186 个位点具有多态性,多态位点百分率(P)为 83.78%。每个扩增引物的位点数为 12~19 个(表 1),平均为 14.8 个,扩增条带大小在 120~2 800 bp。ISSR-PCR 扩增结果共检测出 60 个基因型,即每个样品均有独立的基因型。

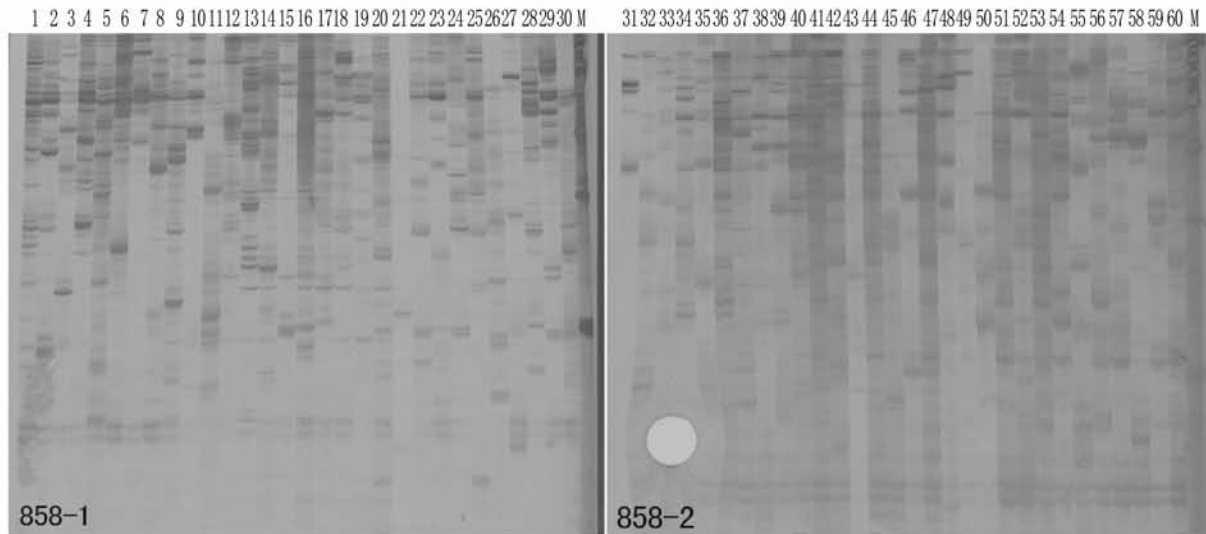


图 2 3 个坛紫菜种群的 ISSR-PCR 扩增结果

1~20:平潭种群;21~40:莆田南日岛种群;41~60:漳州东山岛种群

Fig. 2 The ISSR amplification products of 3 populations of *P. haitanensis*

1-20:PT population;21-40:NR population;41-60:DS population

表 1 各引物序列、扩增位点与多态位点数

Tab. 1 Primer sequences, number of loci and number of polymorphic loci

引物 primer	引物序列(5'-3') sequence	位点总数 no. of loci	多态位点数 no. of polymorphic loci	多态位点百分率(%) percent of polymorphic loci
807	(AG)8T	14	12	85.71
808	(AG)8C	14	11	78.57
812	(GA)8A	14	12	85.71
816	(CA)8T	13	11	84.61
825	(AC)8T	12	10	83.33
826	(AC)8C	16	13	81.25
830	(TG)8G	15	13	86.67
835	(AG)8YC	15	12	80.00
836	(AG)8YA	16	13	81.25
840	(GA)8YT	15	13	86.67
841	(GA)8YC	19	16	84.21
847	(CA)8RC	15	13	86.67
848	(CA)8RG	10	8	80.00
856	(AC)8YA	18	15	83.33
858	(TG)8RT	16	14	87.50
合计 total		222	186	83.78

2.2 野生坛紫菜的遗传多样性

由表2可知,坛紫菜在物种水平上的多态位点百分率为83.78%,种群内的位点百分数在80.18%~81.53%,平均为80.93%,差异很小。物种水平上每位点的有效等位基因数为1.5810,种群水平上为1.5390;期望杂合度在物种水平上

为0.3304,在种群水平上为0.3089;Shannon信息指数在物种水平上为0.4834,在种群水平上为0.4551。三个种群内的多态位点百分数、有效等位基因数、期望杂合度及Shannon信息指数均差异均为不显著($P>0.05$),说明三个坛紫菜种群的遗传多样性水平没有明显差异。

表2 坛紫菜种群间遗传变异统计

Tab. 2 The genetic variation statistics among populations of *P. haitanensis*

种群 population	观察等位基因数 N_a	有效等位基因数 N_e	期望杂合度 h	Shannon 信息指数 I	多态位点百分数 P
PT	1.8018 ± 0.3995	1.4984 ± 0.3484	0.2917 ± 0.1799	0.4344 ± 0.2503	80.18%
NR	1.8108 ± 0.3925	1.5673 ± 0.3608	0.3205 ± 0.1873	0.4685 ± 0.2546	81.08%
DS	1.8153 ± 0.3889	1.5514 ± 0.3578	0.3145 ± 0.1813	0.4623 ± 0.2511	81.53%
平均 average	1.8093 ± 0.1454	1.5390 ± 0.1211	0.3089 ± 0.0943	0.4551 ± 0.1047	80.93%
总群体 total population	1.8378 ± 0.3694	1.5810 ± 0.3423	0.3304 ± 0.1750	0.4834 ± 0.2426	83.78%

2.3 坛紫菜种群的遗传结构

由表3可知,坛紫菜所有群体总的基因多样性为0.3304,种群内的基因多样性为0.3089,基因分化系数为0.0650(表3),表明坛紫菜种群间的遗传变异只占遗传总变异的6.5%,而93.5%

的遗传变异都分布在种群内的个体间,由此说明坛紫菜种群间的遗传分化水平较低。这一点也得到了种群间遗传距离(D)和遗传一致度(I)(表4)计算结果的证实,三个坛紫菜种群间的遗传相似性为0.9480~0.9586。

表3 坛紫菜种群间的遗传分化统计

Tab. 3 The genetic differentiation statistics among populations of *P. haitanensis*

种群 population	总的基因多样性 H_t	种群内的基因多样性 H_s	基因分化系数 G_{st}	基因流 N_m
总群体 total population	0.3304 ± 0.0306	0.3089 ± 0.0277	0.0650	7.1930

从表3还可看出,三个坛紫菜种群间基因流(N_m)的估测值为7.1930,说明坛紫菜种群间有充分的基因交流。

表4 坛紫菜种群间 Nei 的遗传一致度
(对角线上方)和遗传距离(对角线下方)

Tab. 4 Nei's genetic identity (above diagonal) and genetic distances (below diagonal) matrix of *P. haitanensis*

种群 population	PT	NR	DS
PT		0.9480	0.9586
NR	0.0534		0.9538
DS	0.0422	0.0473	

2.4 聚类分析

根据个体间 Nei 的遗传距离,将三个种群的60个个体进行UPGMA聚类,聚类结果如图4。从中可以看出三个种群的60个个体并不按照它们的地理分布进行聚类,而是随机聚类的,由此进一步说明坛紫菜种群间的遗传分化水平较低,遗传变异主要存在于种群内的个体间。

3 讨论

3.1 野生坛紫菜的遗传多样性

Jia 等^[13]、王勇等^[14]、杨锐等^[5]以及陈骁等^[3]采用RAPD或AFLP标记技术在对部分坛紫菜野生或栽培品系进行的遗传多样性分析结果中都表明坛紫菜的栽培品系间及野生品系间都存在着

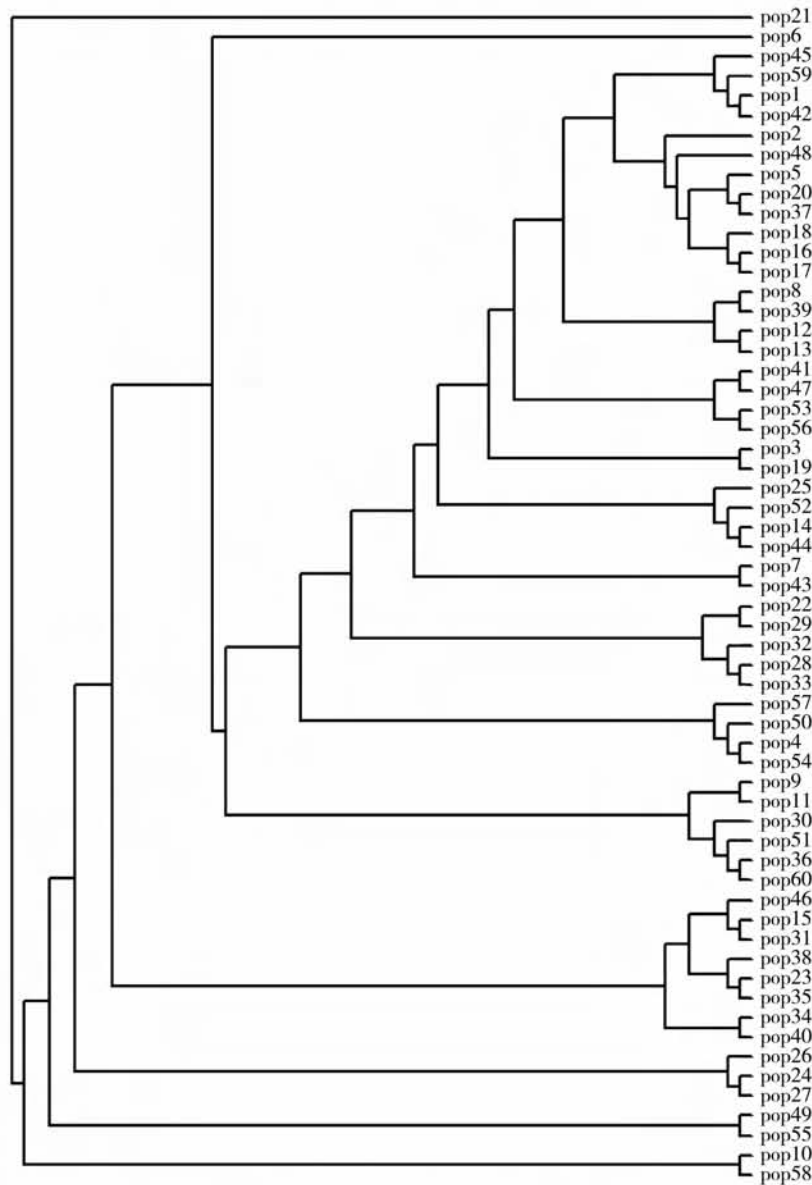


图 4 基于 Nei 遗传距离构建的坛紫菜个体 UPGMA 聚类图

Fig. 4 Dendrogram of UPGMA cluster analysis based on Nei's genetic distance of the 60 samples of *P. haitanensis*

较高的遗传多样性水平。而对于野生种群水平的坛紫菜遗传多样性分析,至今未见报导,这可能与野生坛紫菜仅分布于福建沿海且采样难度较高有关。本文通过对福建省三个野生坛紫菜种群的遗传多样性分析结果发现,坛紫菜在物种水平上,多态位点百分率为 83.78%,有效等位基因为 1.5810,期望杂合度为 0.3304,Shannon 信息指数为 0.4834,都要高于一般植物的遗传多样性分析结果^[15],由此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,种质资源保护较好,可以为后续坛紫菜遗传育种提供良好的种质

保证。物种遗传多样性的丰富程度在很大程度上受物种本身的生殖模式影响^[16],坛紫菜大部分为雌雄异体,少数为雌雄同体,且不具无性生殖^[17],长期异交的结果,会使得坛紫菜个体之间逐步分化,遗传变异加大,从而表现出较高的遗传多样性水平。此外,植物遗传多样性除了遗传因素外,还受外界生态环境因素,即选择因素的影响,但由于水生植物的水体生长环境基质相对稳定,生态因子的变化幅度相对较小,环境的异质性较小,所以环境因素对水生植物遗传多样性的影响相对较小^[18],本文分别对三个地理种群遗传变异

的统计结果(表2)也说明了这一点。

3.2 坛紫菜种群的遗传结构

坛紫菜种群间的遗传变异只占遗传总变异的6.5%,93.5%的遗传变异都分布在种群内的个体间,种群之间分化程度较低,遗传相似度为0.9480~0.9586。已有的研究表明,植物种群的遗传结构是物种的长期进化史(分布区转移,生境片断化和居群特化)、突变、遗传漂变、交配系统、基因流(N_m)和选择等不同过程相互作用的结果^[19],而其中基因流与遗传漂变是相互拮抗的,基因的相互交流会引起种群内遗传变异量的增加,减少种群间的分化^[20],根据 Allendorf 等^[21]的观点,当 $N_m > 4$ 时,就表明种群间的基因交流比较充分,足以抵制遗传漂变的作用,发挥匀质化作用,防止种群间分化的发生。本研究中3个坛紫菜地理种群间的 N_m 值高达7.1930,表明三个种群间发生了充分的基因交流,从而阻止了种群间遗传分化的发生。影响种群间基因流大小的主要因素很多,如繁育系统、分布范围、种子传播机制、演替阶段等^[22],而在植物中,花粉和种子的扩散与传播是基因流最主要的方式,不同地点、不同生境的居群可通过花粉和种子的传播,实现基因交流^[20]。坛紫菜大部分为雌雄异体,繁育类型主要为异交,而且生活史中的果孢子及壳孢子都可以通过海流的运动进行长距离传播,这些因素足以引起坛紫菜种群间发生充分的基因交流,从而阻碍种群间遗传分化的发生。

3.3 野生坛紫菜种质资源的保护

海洋生物种质资源是“蓝色农业”的基础,是国家重大战略性基础资源,也是世界各海洋大国竞争的焦点之一,对于未来人类发展的重要性不可估量^[23]。坛紫菜是我国特有的暖温带性种类,福建是其原产地,野生坛紫菜资源非常丰富,为了对这一优质资源进行长期有效的保护,就必须进行种群分化和遗传结构方面的研究,以摸清遗传背景。从本文的研究结果可以看出,目前坛紫菜野生种群仍然保持着较高的遗传多样性,而且不同地理种群间进行着频繁的基因交流($N_m = 7.1930$)。但近年来,随着沿海经济的发展,向海中排放的污水量逐年增多,超过了海水自身的净化能力,环境污染日益严重,加上野生坛紫菜价格的不断上涨,人为的滥采乱采,很多天然岩石(菜坛)上生长的野生坛紫菜遭到严重破坏,资源数量

锐减,如果不进行抢救性的收集、保护和保存,有些生境的坛紫菜就会濒临绝种。而养殖群体在经过人工定向选择和有限亲体的多代繁殖后,往往会导致等位基因的丧失和遗传变异的减少,出现种质退化^[24],在最近10年的坛紫菜栽培中,已多次出现种质退化原因造成的减产或绝收事件,必须通过种质复壮和种质改良来保证坛紫菜养殖业的可持续健康发展。而野生种质资源的保护和保存正是种质复壮和种质改良的基础,因此必须加大对坛紫菜这一优质资源的种群分布、地理分化和遗传背景的研究,通过建立种质库和基因库来实现种质的长期有效保存。

参考文献

- [1] 梅俊学,金德敏,贾建航,等. 条斑紫菜不同栽培品系的 RAPD 研究[J]. 山东大学学报(自然科学版), 2000,35(2):230-234.
- [2] 徐 涛,宋林生,秦 松,等. 五个紫菜品系间遗传差异的 RAPD 分析[J]. 高技术通讯,2001,12:1-4.
- [3] 陈 骁,左正宏,姚继承,等. 几种紫菜种质资源遗传多样性的 RAPD 分析[J]. 海洋科学,2005,29(4):76-80.
- [4] 杨 锐,刘必谦,骆其君,等. 利用 AFLP 技术研究条斑紫菜的遗传变异[J]. 海洋学报,2005,27(3):159-162.
- [5] 杨 锐,刘必谦,骆其君,等. 利用扩增片段长度多态性(AFLP)研究坛紫菜的遗传变异[J]. 高技术通讯,2002,12(1):83-86.
- [6] Zietkiewicz E, Rafalske A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification [J]. Genome, 1994, 20: 178-183.
- [7] Reddy M P, Sarla N, Siddiq E A. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding[J]. Euphytica, 2002, 128: 9-17.
- [8] 李文红,姚建亭,王继成,等. 龙须菜(*Gracilaria lemaneiformis*)选用品系及其野生型的 ISSR 指纹分析[J]. 海洋与湖沼,2005,36(3):241-247.
- [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,2003,9:89-93.
- [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] 顾红雅. 植物分子生物学实验手册[M]. 北京:高等教育出版社,1997.

- [12] 阮成江,何祯祥,周长芳. 植物分子生态学[M]. 北京:化学工业出版社,2005:70-78.
- [13] Jia J H, Wang P, Jin D M, *et al.* The application of RAPD Markers in diversity detection and variety identification of *Porphyra*[J]. *Acta Botanica Sinica*, 2000,42(4): 403-407.
- [14] 王 勇,刘必谦,骆其君. 坛紫菜品系间遗传差异的 RAPD 分析[J]. 青岛海洋大学学报,2000,30(2): 225-230.
- [15] 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.
- [16] Wansuk S, Anne R K, Uthairat N, *et al.* Genetic impacts of hybrid catfish farming (*Clarias macrocephalus* C. *gariepinus*) on native catfish populations in central Thailand[J]. *Aquaculture*, 2004, 235: 167-184.
- [17] 曾呈奎,王素娟. 海藻栽培学[M]. 青岛:山东科技出版社,1985.
- [18] 薛建华,卓丽环,周世良. 黑龙江野生莲遗传多样性及其地理式样[J]. 科学通报,2006,51(3): 299-308.
- [19] Schaal B, Hayworth D A, Olsen K M, *et al.* Phylogeographic studies in plants: problems and prospects[J]. *Molecular Ecology*, 1998, 7: 465-474.
- [20] Whitlock M C, Mc Cauley D E. Indirect measures of gene flow and migration: F_{ST} doesn't equal $1/(4N_m + 1)$ [J]. *Heredity*, 1999, 82: 117-125.
- [21] Allendorf F W. Gene flow and genetic differentiation among populations[J]. *Genetics and Conservation*, 1984,18(3): 51-65.
- [22] Hamrick J L, Godt H J W. *Plant population genetics, breeding, and genetic resources* [M]. Sunderland, Mass: Sinauer,1990:43-63.
- [23] FAO. Report on the state of the worlds plants genetic resources [M]// International Technical Conference on Plant genetic Resources. Leipzig, Germany, FAO, Rome, Italy,1996.
- [24] Li J, Gao T X, Liu G D, *et al.* Isozyme analysis in cultured populations of *Fenneropenaeus chinensis* [J]. *Marine Fisheries Research*, 2003,24(2): 1-8.

Genetic diversity of wild population of *Porphyra haitanensis* based on ISSR analysis

CHEN Chang-sheng, XIE Chao-tian, JI De-hua, XU Yan, GUO Liu-chao
(College of Fisheries, Jimei University, Xiamen 361021, China)

Abstract: *Porphyra haitanensis* is a unique seaweed species that grows in South China and has the highest production (by weight) in Chinese aquaculture. However it has been a great loss in nori farming due to the degeneration of the germplasm quality in the last years. In order to understand the genetic background of *P. haitanensis* and guide its genetic breeding and germplasm resource protection, Inter-simple sequence repeats (ISSR) markers were used to investigate the genetic variations within and among 3 populations (PT, NR and DS) of *P. haitanensis*. The thalli samples were collected from 60 individuals. 15 ISSR primers gave rise to 222 discernible DNA bands of which 186 (83.78%) were polymorphic, indicated a considerable genetic variation at specific level. At the population level, the percentage of polymorphic bands (P) was from 80.18% to 81.53%, 80.93% on average. Expected heterozygosity (h) and Shannon's information index (I) were 0.3304 and 0.4834 respectively at specific level, 0.3809 and 0.4551 at population level. According to the value of G_{st} , a large proportion of genetic variance (93.5%) of *P. haitanensis* was among individuals within population, only 6.5% genetic variance was among populations, the results indicated that the genetic differentiation level among the 3 populations of *P. haitanensis* was low. And according to the value of N_m , the reason of the low genetic differentiation level among populations of *P. haitanensis* was the sufficient gene flow. UPGMA cluster analysis based on Nei's genetic distance showed that the individuals from the same population were no grouped together, but randomly. At Last, the necessary of protecting the germplasm resource of *P. haitanensis* also was discussed.

Key words: *Porphyra haitanensis*; inter-simple sequence repeat; genetic diversity; genetic differentiation