

几种紫菜种质资源遗传多样性的 RAPD 分析

陈 骁, 左正宏, 姚继承, 陈奕欣

(厦门大学 生命科学学院, 福建 厦门 361005)

摘要: 用随机多态 DNA (RAPD) 标记方法对 11 个紫菜(*Porphyra*)样品进行遗传多样性检测, 从 46 个随机引物中筛选出 27 个有效引物, 共扩增出 282 条 DNA 带, 其中多态位点 224 个, 占 79.4%。用类间平均链锁法对各样品间的遗传距离进行聚类分析。结果显示, 2 个条斑紫菜之间的亲缘关系很近, 遗传相似系数达 98.1%, 和坛紫菜的亲缘关系较远; 坛紫菜不同样品间的遗传相似系数在 75.8%~90.6%之间, 表明坛紫菜种质资源具有丰富的遗传多样性, 是良种选育的遗传基础。

关键词: 随机多态 DNA (RAPD); 紫菜(*Porphyra*); 遗传多样性

中图分类号: Q953

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2005)04-0076-05

紫菜(*Porphyra*)是中国三大经济型海藻之一, 其产值居于海藻之首^[1]。目前, 中国紫菜养殖品种主要有条斑紫菜和坛紫菜。长期以来, 坛紫菜栽培者主要用混杂的野生种作为苗源, 使紫菜的产量和质量稳定性差, 影响了这一产业的发展。目前对紫菜种质鉴定的方法还主要是采用传统的形态学方法, 而形态特征总是会受生长环境的影响, 如温度、盐度、营养盐水平、潮汐和海流等。所以仅靠叶状体的形态特征很难准确判断种质的优劣。当前, 种质问题是开发和利用紫菜资源的主要限制因素之一, 因此加强紫菜种质资源的研究就显得非常重要。

近年来发展起来的随机多态 DNA (RAPD) 分子标记技术, 是以 PCR 为基础的有效的种质鉴定手段, 由于它具有多态性高, 相对快速、简便和经济, 已广泛用于动植物种内品系区分、种间或种内的亲缘关系和遗传变异水平的检验、杂种优势的鉴定等。也已开始在紫菜种质鉴定研究中应用^[1~4]。本研究选取 2 个较有代表性的坛紫菜栽培品种和 2 个条斑紫菜栽培品种, 以及 7 个野生坛紫菜样品, 拟通过 RAPD 技术对其种质资源的遗传多样性进行筛查, 为进一步筛选优良品种及分子标记辅助育种提供分子生物学依据。

1 材料和方法

1.1 材料

实验用的 11 个紫菜样品名称及来源见表 1。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取与纯化

采用郭宝太等^[5]的方法经本实验室改进后, 用于基因组 DNA 的提取与纯化。在 BECKMAN-DU640 核酸蛋白分析仪上测定 DNA 的纯度和浓度, 通过琼脂糖电泳检测 DNA 的完整性, -20℃ 保存备用。

1.2.2 基因组 DNA 的 RAPD 扩增

反应总体积 20 μL, 其中无菌双蒸水 9 μL, 2.5 mmol/L dNTP 2 μL, 引物 100 pmol/L 1 μL, 10 ng/μL 的 DNA 模板 4 μL, 10×buffer 2 μL, 1.5 mmol/L MgCl₂ 2 μL, Taq 酶 1.0U。扩增反应程序: 94℃ 3 min 预变性; 94℃ 1 min, 36℃ 2 min, 72℃ 2 min, 35 个循环; 最后 72℃ 延伸 5 min。PCR 仪型号为美国产 ThermoHybaid, PCR 产物用 1.2% 琼脂糖电泳检测, 用 BIO-RAD 公司生产的 Fluor-STM Multilmager 凝胶成像系统扫描。

收稿日期: 2003-07-21; 修回日期: 2003-11-18

基金项目: 国家 863 计划项目 (2002A603023); 福建省重大农业科技项目 (2001Z017)

作者简介: 陈骁 (1979-), 男, 江西上饶人, 硕士研究生; 陈奕欣, 通讯作者, 教授, 从事遗传育种及分子生物学研究,

E-mail: chenxiyix@yanan.xmu.edu.cn

表1 紫菜样品名称及来源

Tab. 1 The localities of *Porphyra* samples

样品名称	采集地点	生长条件
GL1	福建平潭县	人工养殖
NH	福建平潭县	野生
JJS	福建平潭县	野生
BBD	福建平潭县	野生
LSD	福建平潭县	野生
LPZ	福建平潭县	人工养殖
XSD	福建福清市	野生种养殖
DXY	福建平潭县	野生种养殖
LH	福建龙海市	人工养殖
LYG	江苏连云港	人工养殖
RD	江苏如东	人工养殖

1.2.3 数据处理与分析

根据电泳图谱，将图谱上某一位置出现条带的记

为 1，缺乏的记为 0。强带和弱带都记为 1，仅那些重复性好的带才被记录。按 Nei^[6]的方法计算样品间的遗传相似系数 (S)， $S = 2N_{ij}/(N_i + N_j)$ ，其中 N_{ij} 为两品种共有的条带数， N_i 和 N_j 分别表示两品种各自扩增出的条带数。同时计算遗传距离(D)， $D = 1 - S$ 。利用得到的 D 矩阵进行类间平均链锁法 (Between groups linkage) 聚类分析^[7]，建立样品间的亲缘关系树状图。

2 结果

2.1 RAPD扩增结果

从46个引物中筛选出扩增条带清晰，重复性好的引物2共7个，用这27个引物对所有样品进行正式扩增。得到282条带，其中多态性带224条，占总数的79.4%(表2)。图1为部分引物的RAPD电泳图谱。

表2 引物序列及 PCR 扩增结果

Tab. 2 The sequences of the primers and the results of PCR

引物名称	碱基序列	扩增的位点数	非多态性带数	多态性带数	多态性带百分比(%)
S121	ACGGATCCTG	6	3	3	50.0
S122	GAGGATCCCT	5	2	3	60.0
S124	GGTGATCAGG	9	1	8	88.9
S125	CCGAATTCCC	7	3	4	57.0
S127	CCGATATCCC	10	0	10	100.0
S128	GGGATATCGG	10	0	10	100.0
S130	GGAAGCTTGG	10	2	8	80.0
S131	TTGGTACCCC	5	2	3	60.0
S132	ACGGTACCAG	14	1	13	92.9
S133	GGCTGCAGAA	7	1	6	85.7
S134	TGCTGCAGGT	6	3	3	50.0
S136	GGAGTACTGG	12	1	11	91.7
S138	TTCCCGGGTT	2	0	2	100.0
S139	CCTCTAGACC	4	1	3	75.0
S140	GGTCTAGAGG	7	2	5	71.4
S141	CCCAAGGTCC	7	1	6	85.7
S142	GGTGCGGGAA	15	6	9	60.0
S147	AGATGCAGCC	16	4	12	75.0
S148	TCACCACGGT	12	3	9	75.0
S150	CACCAGGTGA	6	2	4	66.7
S152	TTATCGCCCC	24	4	20	83.3
S155	ACGCACAACC	20	3	17	85.0
S156	GGTGACTGTG	9	0	9	100.0
S157	CTACTGCCGT	9	3	6	66.7
S158	GGACTGCAGA	22	5	17	77.3
S159	ACGGCGTATG	19	3	16	84.2
S160	AACGGTGACC	9	1	8	88.9
总计		282	58	224	79.4

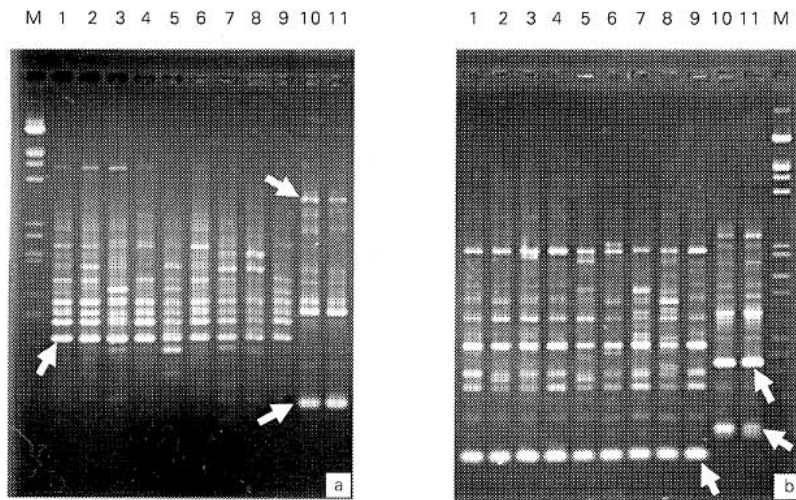


图1 引物 S158 (a)、S147 (b) 的 RAPD 电泳图谱

Fig.1 The RAPD electrophoresis patterns of primer of S158 (a) and S147(b)

M: λ DNA *Eco*RI + *Hind*III; 1-11 依次为: GL1, NH, JJS, BBD, LSD, LPZ, XSD, DXY, LH, LYG, RD

2.2 遗传相似系数与聚类图谱

用SPSS 11.0 for Windows 软件对记录下的数据进行处理, 得到各样品间的Nei氏遗传相似性系数矩阵(表3), 表中数据显示, 同为条斑紫菜的RD与LYG两个品种间的遗传相似系数最高, 达98.1%, 而坛紫菜不同样品间的遗传相似系数在75.8%~90.6%之间。作为不同种的条斑紫菜与坛紫菜的遗传相似系数

均在50%左右。根据遗传相似系数, 分别计算了各样品间的遗传距离, 依据不同样品间的遗传距离, 采用类间平均链锁法(Between groups linkage)对11个紫菜样品进行聚类分析, 得到亲缘关系树状图(图2)。从亲缘关系树状图中明显可以看出, 11个紫菜样品共聚成两大类, 同为条斑紫菜的RD与LYG先聚在一起, 同样, 其它9个坛紫菜样品先聚集后再与条斑紫菜相聚。

表3 各紫菜样品间的 Nei 相似系数矩阵

Tab.3 Nei's similarity of coefficient matrix among 11 *Porphyra* samples

样品	GL1	NH	JJS	BBD	LSD	LPZ	XSD	DXY	LH	LYG	RD
GL1	1.000										
NH	0.860	1.000									
JJS	0.804	0.834	1.000								
BBD	0.872	0.900	0.824	1.000							
LSD	0.758	0.829	0.906	0.818	1.000						
LPZ	0.857	0.852	0.831	0.829	0.808	1.000					
XSD	0.826	0.805	0.817	0.800	0.800	0.821	1.000				
DXY	0.768	0.769	0.799	0.781	0.777	0.778	0.875	1.000			
LH	0.880	0.848	0.814	0.865	0.803	0.832	0.847	0.840	1.000		
LYG	0.514	0.548	0.523	0.532	0.528	0.540	0.559	0.537	0.506	1.000	
RD	0.510	0.539	0.526	0.522	0.531	0.537	0.557	0.546	0.503	0.981	1.000

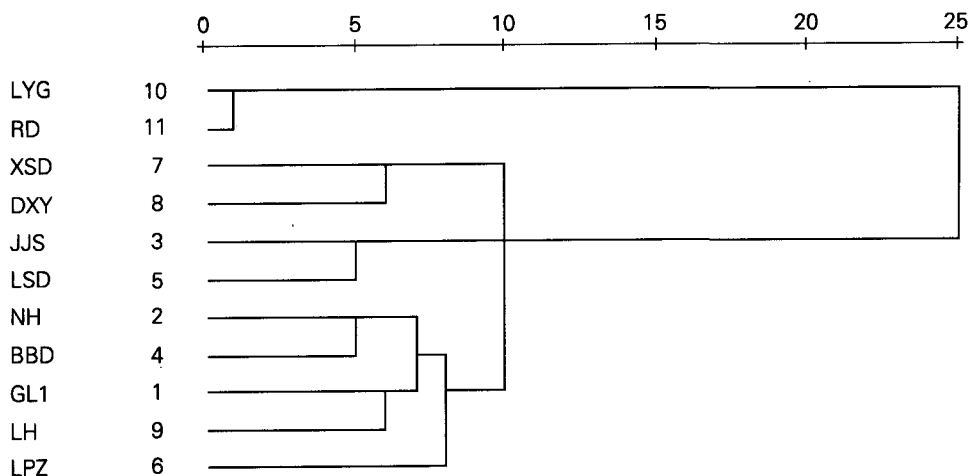


图 2 11个紫菜样品聚类树状图

Fig.2 Dendrogram of 11 *Porphyra* samples

3 讨论

对于紫菜种质资源的调查及鉴定,依据传统的形态学方法,如叶状体的边缘形态和果孢形成的部位以及丝状体颜色上的差别等都各有局限性。相对于其它分子标记技术,RAPD 分子标记技术具有多态性高,相对快速、简便和经济。而且已广泛用于动植物种内品系区分、种间或种内的亲源关系和遗传变异水平的检验、杂种优势的鉴定等。作者从 46 个随机引物中筛选出的 27 个引物所获得的数据,在 DNA 水平上显示出条斑紫菜与坛紫菜具有明显的差异。27 个引物对 11 个紫菜样品的扩增结果均显示出丰富的多态性,扩增的总位点数达 282 个,其中多态性位点为 224 个,占 79.4%,这些条带的差异反应了基因组 DNA 上的差别,充分显示了我国紫菜种质资源的丰富性,为进一步选育提供了可资鉴的分子生物学资料。另外,条斑紫菜与坛紫菜均能显示出自身特有的分子标记(图 1 中箭头所示),经过多次重复实验,表明引物 S147 与 S158 可以初步作为鉴定坛紫菜与条斑紫菜的 PCR 引物,同时,我们将对这些标记条带作进一步的研究,如转化为 SCAR 标记及标记条带作为探针进行杂交分析等,为作为分子标记辅助育种的基础。

从得到的 11 个紫菜样品的遗传相似系数来看(表 3),两个条斑紫菜品系间的相似系数最高,为 98.1%。而坛紫菜各样品间的相似系数略低,在 75.8%~90.6% 之间。作为不同种的坛紫菜与条斑紫菜之间,其遗传相似系数 50.3%~55.9% 之间,这与贾建航等^[3]的结果较吻合,但比徐涤等^[4]的结果要高。可能是条斑紫菜经过长期的系统选育,纯度提高,遗传背景趋于一致。坛紫菜的育种工作相对滞后,不同海区、不同生产模式如养殖与野生,坛紫菜之间还存在很大的遗传差异,显示坛紫菜还有很大的育种空间。

根据遗传距离,采用类间平均链锁法得到聚类树状图(图 2),从树状图中可以看出,11 个紫菜样品共聚成两大类,同为条斑紫菜的 RD 与 LYG 先聚在一起。同样,其它 9 个坛紫菜样品先聚集后再与条斑紫菜相聚。就坛紫菜而言,JJS 和 LSD 都是野生坛紫菜样品,而且地理位置较近。同样 XSD 和 DXY 也属地理位置接近的野生坛紫菜种人工养殖的紫菜。NH 和 BBD 均生长在外海野生菜坛上,而且地理位置相对较近,且海区风浪较大,可能物种间基因交流的机会很大,表现出亲缘关系较近。作为经过系统选育的常规养殖坛紫菜品种 LPZ,尽管目前品质已经严重退化,但长期的选育过程中,已使其与其它坛紫菜样品间产生一定的遗传分化。

参考文献:

- [1] 石金锋, 贾建航, 王萍, 等. 紫菜无性系特异分子标记的获得 [J]. 高技术通讯, 2000, 10: 1-3.
- [2] 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, 2000, 35 (2): 230-234.
- [3] 贾建航, 王萍, 金德敏, 等. RAPD 标记在紫菜遗传多样性检测和种质鉴定中的应用[J]. 植物学报, 2000, 42 (4): 403-407.
- [4] 徐涤, 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: 1-3.
- [5] 郭宝太, 毕玉平, 李广存, 等. 坛紫菜 DNA 的提取与快速纯化[J]. 农业生物技术学报, 1999, 4: 342-352.
- [6] Nei M, Li W A . Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979, 76:5269- 5273
- [7] Norusis M J. SPSS advanced statistics 6.1. Chicago, Ill: SPSS Inc; 1994.

Analysis of genetic diversity of *Porphyra* by random amplified polymorphic DNA

CHEN Xiao, ZUO Zheng-hong, YAO Ji-cheng, CHEN Yi-xin

(School of Life Science, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Received: Jul., 21, 2003

Key words: random amplified polymorphic DNA(RAPD); *Porphyra*; genetic diversity

Abstract: The genetic diversity of 11 *Porphyra*s samples were confirmed by random amplified polymorphic DNA(RAPD) markers. 27 primers were screened from 46 arbitrary primers, and a total of 282 DNA bands were amplified, among them 79.4% were polymorphic. The genetic data were analyzed by means of similarity, in a dendrogram was using between groups linkage method. The result showed that a close relationship existed between two cultivars of *Porphyra yezoensis* and the genetic coefficient comparability was 98.1%, while the genetic diversity level in *Porphyra haitanensis* was relatively high.

(本文编辑: 刘珊珊)