

文章编号: 1004-7271(2005)01-0006-06

三种礁膜属藻类的分子遗传多样性和亲缘关系的 RAPD 分析

谢恩义^{1,2}, 孙彬¹, 马家海¹

(1. 上海水产大学生命科学与技术学院, 上海 200090;

2. 怀化学院生物工程系, 湖南怀化 418008)

摘要: 用 RAPD 技术对礁膜、袋礁膜和宽礁膜进行了 DNA 多样性分析, 这 3 种礁膜的基因组 DNA 分子量均约 23Kb。在使用的 88 个随机引物中, 有 43 个引物在所有样品中都能重复性较好地扩增出条带清晰的多态性片段, 多态引物比例为 48.86%。袋礁膜、宽礁膜和礁膜多态位点比例分别为 55.93%、65.28% 和 53.14%。礁膜与宽礁膜、宽礁膜与袋礁膜以及礁膜与袋礁膜种间遗传距离分别为 0.411 8, 0.414 8 和 0.437 5。通过对遗传距离分析, 结果表明采自 3 个不同海区的样本为同一礁膜属的 3 个种, 与传统分类鉴定结果相吻合。UPGMA 和 NJ 法构建的种间分子系统树一致, 结果是宽礁膜和礁膜之间的亲缘关系最近, 宽礁膜与袋礁膜之间的亲缘关系较远, 礁膜与袋礁膜之间的亲缘关系最远, 这与宽礁膜与礁膜共有形态特征较多, 袋礁膜与宽礁膜、礁膜共有形态特征少相验证。

关键词: 礁膜属; RAPD; 遗传多样性; 亲缘关系

中图分类号: S 917 文献标识码: A

Application of RAPD in analysing genetic variation and genetic relationship of three species of *Monostroma* (Chlorophyta)

XIE En-yi^{1,2}, SUN Bin¹, MA Jia-hai¹

(1. College of Aqua-life Science and Technology, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China;

2. Department of Bioengineering, Huaihua College, Huaihua 418008, China)

Abstract: Random amplified polymorphic DNA markers were used to analyse the DNA diversity of *Monostroma nitidum*, *M. latissimum* and *M. angicava*. The size of genomic DNA of each species was about 23 kb. 43 primers screened from 88 random primers generated repeatedly clear polyotripic bands in all samples, and the proportion was 48.86%. The polymorphic sites proportion of *M. nitidum*, *M. latissimum* and *M. angicava* were 53.14%, 65.28% and 55.93% respectively. The inter-species genetic distances among those species (*M. nitidum*, *M. latissimum* and *M. angicava*) were 0.411 8, 0.414 8 and 0.437 5 respectively. The result showed that these samples coming from three different marine area were the same genus but different species. Those were consistent with the conventional systemic identification. The molecular phylogenetic tree constructed by UPGMA method coincided with that constructed by NJ method. The result also indicated that the genetic relationship between *M.*

收稿日期: 2004-09-04

基金项目: 浙江省科学技术厅科技兴海专项基金(2002C23014)

作者简介: 谢恩义(1966-), 男, 湖南邵阳人, 副教授, 博士, 从事水产增殖及生物技术研究, E-mail: xicenyi@sohu.com

通讯作者: 马家海(1940-), 男, 教授, Tel: 021-65710020, E-mail: mjh25@sh163.net

latissimum and *M. nitidum* was the nearest, that between *M. latissimum* and *M. angicava* was farther, and that between *M. nitidum* and *M. angicava* was the farthest. The result also testified the fact that *M. nitidum* and *M. latissimum* shared more common characteristics in morphology, while *M. angicava* shared less common characteristics in morphology with *M. nitidum* and *M. latissimum*.

Key words: *Monostroma*; RAPD; genetic diversity; genetic relationship

礁膜属(*Monostroma*)最初划为石莼科(Ulvaceae),Kunieda把礁膜科(Monostromaceae)与石莼科分开^[1]。Cho等^[2]用RAPD技术进行了石莼目(Ulvales)藻类的遗传多样性标记和分析,发现礁膜属与石莼属(*Ulva*)在遗传上存在显著差异,两者有较远的亲缘关系,从而证明Kunieda的分类是正确的。杨君等对石莼属和浒苔属(*Enteromorpha*)进行了RAPD分析^[3]。在自然分类系统上,单凭形态特征是很难区分礁膜属种类的,必须结合生活史的观察,但礁膜属藻类的生活史周期长,为了快速鉴定礁膜属种质资源,以利育种育苗时选择适合栽培种类,在传统的形态分类的基础上,有必要对礁膜属种类进行分子遗传多样性分析。运用RAPD技术对大型海洋绿藻类研究较少,本文利用RAPD技术对我国常见的3种礁膜属藻类,即礁膜(*M. nitidum*)、袋礁膜(*M. angicava*)、宽礁膜(*M. latissimum*)进行了DNA多样性分析,以期对礁膜属种类的遗传育种提供理论和实践依据,为合理保护和利用礁膜属藻类的种质资源提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

试验材料:礁膜采自浙江省奉化市沿海,袋礁膜采自山东省青岛市沿海,宽礁膜采自浙江省玉环县人工栽培的网帘上。上述材料采集后,阴干至含水量为30%~40%左右,用内放冰冻冰袋的保温箱带回实验室,保存于-20℃的冰箱内待用。提取DNA前,用消毒过滤海水仔细清洗新鲜藻体,洗去泥砂和其它附着物,再用滤纸吸干表面水分,然后用于DNA制备。

1.2 总DNA的提取

参考杨君等^[3]的方法并加以改进。把研钵、杵和离心管等高压消毒。样品(约500mg鲜样品)加少量提取缓冲液(3%CTAB,100mmol/L Tris-HCl(pH 8.0),20mmol/L EDTA(pH 8.0),1.4mmol/L NaCl,0.2%(V/V)巯基乙醇,1%PVP)于研钵中,把研钵放冰块上充分研磨样品呈糊状,转移至1.5mL离心管中,再加入500 μ L提取缓冲液,混匀后,于60℃温浴20min后,再置于-20℃冰冻10min,后置于60℃温浴10min,加入1/3体积5mmol/L KAc,充分混匀,然后加入等体积氯仿:异戊醇(24:1),轻缓摇匀后,8000r/min离心10min。将上清液移至新管,并加入2/3体积异丙醇,轻缓混匀,于12000r/min离心5min,倒去异丙醇,用Trip头挑出白而粘的絮状沉淀物,70%乙醇洗涤1~2次,无菌真空抽干,溶于400 μ L 0.1 \times TE II中备用,使用时用TE II缓冲液稀释到适当浓度。

1.3 扩增前样品DNA完整性、浓度和纯度的测定

扩增前将总DNA抽提物进行1.2%琼脂胶电泳(电压5V/cm,电泳时间约1.5h),测定样品DNA的完整性,确定其分子量的大小。并将完整的DNA样品用752型紫外分光光度计测定OD₂₆₀值和OD₂₈₀值,以测定DNA浓度和纯度,然后根据原浓度,将其稀释到20ng/ μ L,保存于4℃冰箱中备用。

1.4 DNA扩增和电泳检测

1.4.1 随机引物

试验用的随机引物(10bp)有66个购自上海生工(Sngon)生物工程公司,另外20个由上海摩尔生化实验室合成,共计88个。

1.4.2 RAPD 反应体系

10 × Buffer, 4 × dNTP (10 mmol/L) MgCl₂ (25 mmol/L) 引物 (10 μmol/L) 和去离子水购自上海生工生物工程公司, TaqDNA 聚合酶 (5 U/μL) 购自 Canada Buistar Co. LTD。

RAPD 反应条件为:反应总体积为 25 μL, 内含 10 × Buffer (100mmol/L tris-HCl pH8.3, 500 mmol/L KCl) 2.5 μL, MgCl₂ (10 μmol/L) 2.2 μL, TaqDNA 聚合酶 (5 U/μL) 0.3 μL, 4 × dNTP (10 mmol/L) 1 μL, 引物 (5 μmol/L) 2 μL, 模板 DNA (10 ng/μL) 2 μL, 去离子水 15 μL。

1.5 RAPD 反应程序

RAPD 反应在 M J Research Inc-PTC100™ 公司生产的 PCR 仪器上扩增, RAPD 反应条件与 Williams 等 (1990) 基本相似。基因组 DNA 在 PCR 扩增仪上经 94℃ 预变性 4 min 后进行 42 个扩增循环, 每个循环包括 94℃ 变性 45 s, 37℃ 复性 1 min, 72℃ 延伸 1.5 min, 最后在 72℃ 延伸 10 min。

1.6 电泳检测

扩增产物经含 0.5 μg/mL 溴化乙锭 (EB) 的 1.2% 琼脂糖凝胶电泳, 以 DL-2 000 作为分子量标记物, 电泳缓冲液为 TBE, 在 4 v/cm 电场强度下电泳 2.5 h 左右, 然后置于 Gene-Genius 凝胶成像仪下观察、拍照。

1.7 统计分析

为避免因 RAPD 技术的重复性较差而影响实验结果, 作者进行了多次重复实验, 只将重复性较好的引物用于最终的结果分析。并且在所有获得的片段中, 只分析了稳定性较好的、大小为 500 ~ 2 000 bp 的片段, 未分析过大和过小的片段。按照 Nei 等计算种间带纹相似系数 (S_{xy}) 的公式: $S_{xy} = 2 N_{xy} / (N_x + N_y)$, 再由 $D = 1 - S_{xy}$ 算出 2 个种间的遗传距离。

2 结果

2.1 基因组 DNA 的提取

琼脂糖凝胶电泳检测所提 DNA 分子量大小约 23 kb, 紫外检测 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值为 1.7 ~ 1.9, 且重复性较好。

2.2 RAPD 扩增结果

在所试用的 88 个引物中有 43 个引物在所有样品中都能成功且重复较好地扩增, 得到一定大小的片段 (图 1 为部分引物扩增产物电泳图), 其中以清晰、可辨扩增条带作为原始数据统计。88 个引物中有 43 个引物扩增出了较明显的多态性片段, 多态引物比例为 48.86%。3 个种共检测到 342 个可以统计的位点, 其中多态性位点 251 个, 占总位点数的 73.4%。单引物最多可以产生 15 个位点, 最少产生 3 个位点, 平均每条引物能扩增出 7.95 个位点, 其中平均多态位点为 5.84 个, 所扩增片段长度范围在 300 ~ 2 500 bp 之间。袋礁膜总位点数为 177 个, 多态位点数为 99 个, 多态位点比例为 55.93%; 宽礁膜总位点数为 216 个, 多态位点数为 141 个, 多态位点比例为 65.28%; 礁膜总位点数为 175 个, 多态位点数为 93 个, 多态位点比例为 53.14%。

2.3 种间的遗传相似系数及遗传距离

统计各种间共有的 RAPDs, 计算得到种间的遗传相似系数和遗传距离 (表 1)。袋礁膜与宽礁膜之间的遗传相似系数为 0.585 2, 遗传距离为 0.414 8; 袋礁膜与礁膜之间的遗传相似系数为 0.562 5, 遗传距离为 0.437 5; 宽礁膜与礁膜之间的遗传相似系数为 0.588 2, 遗传距离为 0.411 8。

2.4 聚类分析

根据 43 个引物综合计算所得的礁膜属各种间遗传距离, 应用 Phylip 软件包, 按照 UPGMA 法和 N-J 法分别构建聚类图 (图 2-a, b)。从图中可以看出 2 种聚类分析结果一致, 宽礁膜和礁膜先聚在一起, 然

后再共同与袋礁膜聚在一起。

表 1 袋礁膜、宽礁膜和礁膜种间的遗传相似系数(对角线以上)/遗传距离(对角线以下)

Tab.1 Genetic similarity(above diagonal)/genetic distances(below diagonal) matrix of *M. angicava*, *M. latissimum* and *M. nitidum*

	袋礁膜 (<i>M. angicava</i>)	宽礁膜 (<i>M. latissimum</i>)	礁膜 (<i>M. nitidum</i>)
袋礁膜 (<i>M. angicava</i>)	-	0.585 2	0.562 5
宽礁膜 (<i>M. latissimum</i>)	0.414 8	-	0.588 2
礁膜 (<i>M. nitidum</i>)	0.437 5	0.411 8	-

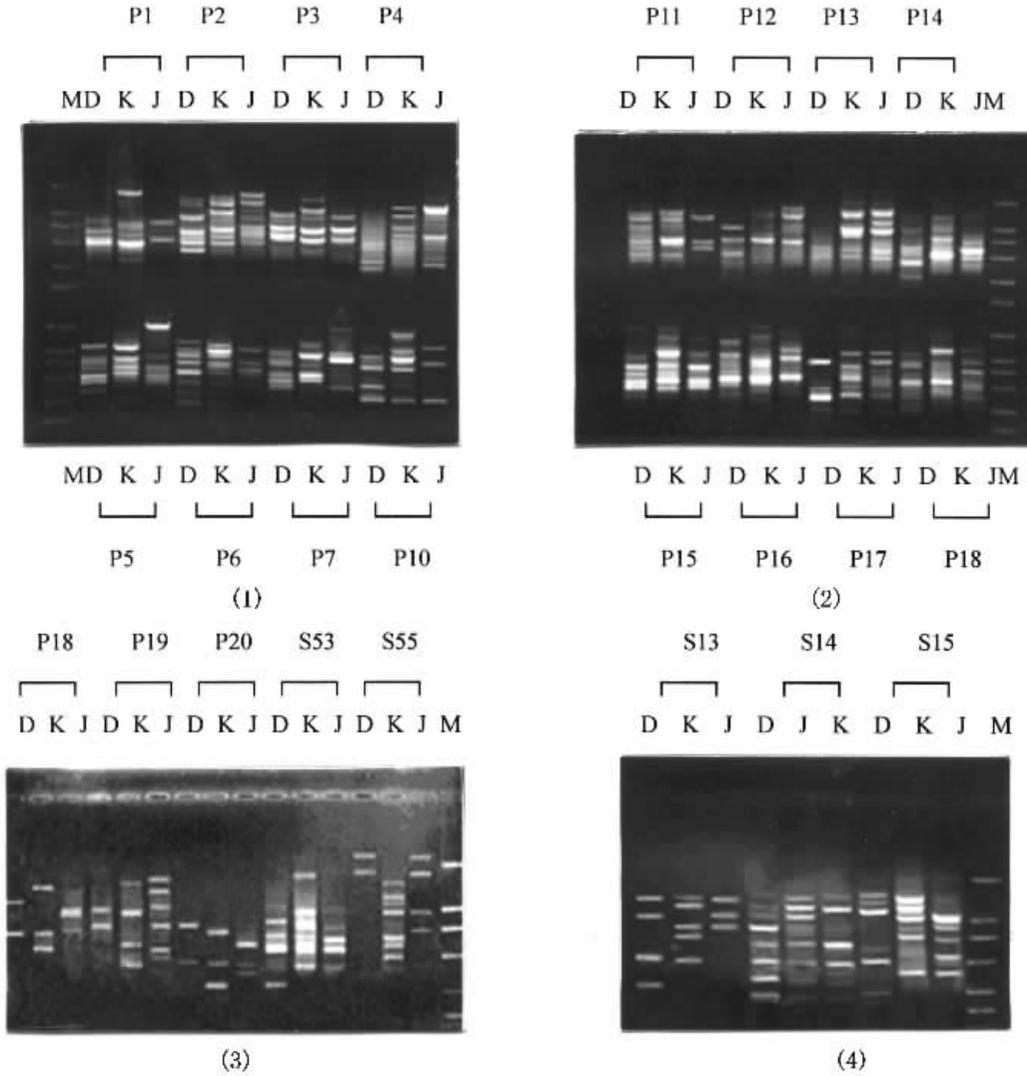


图 1 引物 P1-P20、S13-S15、S53、S55 扩增产物电泳图谱

Fig.1 RAPD patterns of *M. nitidum*(J), *M. latissimum*(K) and *M. angicava*(D) using different primers

(P and S are code names of different random primers)

注 (1)为引物 P1-P10 扩增产物电泳图谱 (2)为引物 P11-P18 扩增产物电泳图谱 ;

(3)为引物 P18-P20、S53、S55 扩增产物电泳图谱 (4)为引物 S13-S15 扩增产物电泳图谱。

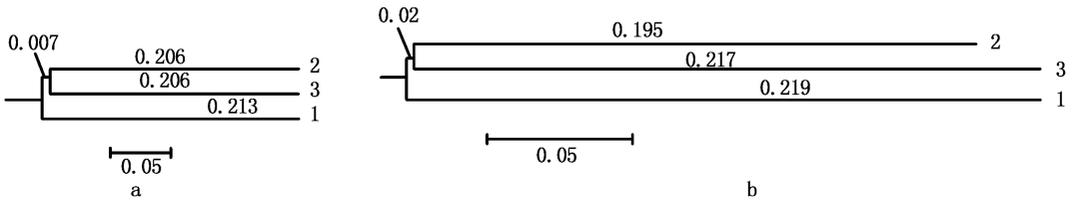


图 2 利用 UPGMA (a) 和 N-J (b) 法分析得到的聚类图

Fig. 2 Dendrograms constructed by UPGMA (a) and N-J (b) cluster analysis according to genetic distance (1. *M. angicava* 2. *M. latissimum* 3. *M. nitidum*)

3 讨论

3.1 DNA 的提取

大型海藻细胞内不仅具有较高的核酸酶活性^[4],而且细胞内含大量的多糖^[5],在绿藻中,细胞壁微纤维主要由木聚糖、甘露聚糖及纤维素组成,而是还有少量的葡聚糖存在于细胞质内,另外尚有大量的硫酸多糖组成细胞间物质,包括硫酸木聚糖、硫酸鼠李糖等^[6,7]。由于海藻多糖是水溶性的,使海藻细胞忍受渗透压变化的能力增强。海藻多糖将 DNA 缠绕包裹其中,在提取过程中使溶液十分粘稠,很难分离。海藻细胞较小(大约 $10 \mu\text{m}$)、细胞壁又厚,因此,多糖的去除是海藻 DNA 提取所面临的一大难题。DNA 样品中的酸性多糖、鞣酸、多酚等,这些物质不仅会干扰 RAPD 的进行^[8],而且会影响实验的结果,因此,在进行 DNA 提取的过程中必须尽量克服多糖的污染和干扰。十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)是一种阳离子型去污剂,它能跟核酸形成复合物,该复合物溶解于高盐溶液且稳定性好,同时它可选择性地结合肽聚糖和蛋白质,并能有效地降低蛋白质的含量。 60°C 左右的温浴可大大减少碳水化合物的含量。经过如此处理,可以成功地除去蛋白质、多糖的干扰。实验还发现,样品中加入少量提取缓冲液及少量石英砂,低温充分研磨,然后于 60°C 温浴,再冰冻 (-20°C) 1~2 次,经过温浴、冰冻再温浴处理,这样使组织细胞易于破裂,使 DNA 从细胞中游离出来,能获得较高产量的 DNA。

3.2 礁膜、宽礁膜和袋礁膜三者之间的亲缘关系

根据 Theoppe^[9]的研究结果,遗传相似系数 $I < 0.85$ (遗传距离 $D > 0.15$) 的 2 种群不可能为同一物种,同属间 I 为 $0.2 \sim 0.8$ ($D = 0.2 \sim 0.8$),同种间 I 是 $0.8 \sim 0.97$, D 为 $0.03 \sim 0.2$ 。本实验检测的样品 J (礁膜) 和 K (宽礁膜) 间遗传距离为 0.4118 , K (宽礁膜) 和 I (袋礁膜) 间遗传距离为 0.4148 , J (礁膜) 和 I (袋礁膜) 间遗传距离为 0.4375 ,据此,本实验采自 3 个不同地点的样本为同一礁膜属的 3 个种,即礁膜、宽礁膜和袋礁膜,与传统分类相吻合。石莼属与浒苔属的属间遗传距离为 0.596 ,石莼属内的种间遗传距离为 0.443 ^[3],这与本实验研究礁膜属内的种间遗传距离相近。

遗传距离的数值大小可以基本判断出所试材料之间亲缘关系的远近。从 UPGMA 法和 N-J 法聚类分析所得到的结果是一致的,都是宽礁膜和礁膜先聚在一起,然后再与袋礁膜聚到一起,这说明宽礁膜和礁膜之间的亲缘关系最近,宽礁膜与袋礁膜之间的亲缘关系较远,与遗传距离的数值大小一致。礁膜与袋礁膜之间的遗传距离最大,也说明礁膜与袋礁膜之间的亲缘关系最远。

宽礁膜与礁膜生活史相似,而它们的生活史与袋礁膜有许多不同之处。宽礁膜喜栖居于高潮带,礁膜喜栖居于中、高潮带,而袋礁膜常栖居于中、低潮带。宽礁膜和礁膜为冷温性藻类,分布纬度较袋礁膜为低,袋礁膜属亚寒性藻类,我国仅见于黄海和渤海。宽礁膜和礁膜在外形上均有光泽,配子体叶缘均有壁褶,细胞切面观,礁膜为圆形,宽礁膜为长卵圆形,袋礁膜在外形上无光泽,细胞切面观为纵长方形。传统分类上,从 3 种礁膜的栖息习性、生活史和形态特征等比较上看,宽礁膜与礁膜共有特征较多,亲缘关系相近。袋礁膜与宽礁膜、礁膜共有特征少,亲缘关系较远。这说明本研究以形态特征、生活史等为

依据的传统分类结果与以 DNA 分子水平上的 RAPD 标记结果一致。

参考文献：

- [1] Kunieda H. On the life-history of *Monostroma* [M]. Proc Imp Acad, Tokyo, 1934. 103 - 106.
- [2] Cho Y C, Park J W, Jin H J, et al. RAPD identification of genetic variation in *Ulva* seaweed [J]. J Korean Fish Soc, 1997, 30(3): 388 - 392.
- [3] 杨 君, 安利佳, 王 茜, 等. 石莼属 (*Ulva*) 和浒苔属 (*Enteromorpha*) 绿藻的 RAPD 分析 [J]. 海洋与湖沼, 2000, 31(4): 408 - 413.
- [4] Shivji M S, Rogers S O, Stanhope M J. Rapid isolation of high molecular weight DNA from marine macroalgae [J]. Mar Ecol Progr Ser, 1992, 84: 197 - 203.
- [5] Sosa P A, Oliveira M C. DNA extraction from macroalgae [R]. Appl Phycol Forum, 1992, 9: 7 - 9.
- [6] Hiraoka A, Harada N, Uehara T, et al. Capillary isotachopheric analyses of algal acidic polysaccharides and their application to a survey [J]. Chem Pharm Bull Tokyo, 1992, 40(3): 783 - 785.
- [7] 纪明侯. 海藻化学 [M]. 北京: 科学出版社, 1997. 358.
- [8] Hong Y k, Kim S, Miriam P F, et al. DNA extraction conditions from *Porphyra perforate* using Lic [J]. J Appl Phycol, 1995, 7: 101 - 107.
- [9] Theorpe J P. The molecular dock hypothesis: Biochemical evaluation, genetic differentiation, and systematics [J]. Am Rev Ecol Syst, 1982, 13: 139 - 168.

欢迎订阅 2005 年度《南方水产》

经科技部和新闻出版总署批准, 2005 年《水产文摘》改名为《南方水产》, 为综合类水产科技期刊, 双月刊, 大 16K, 页码扩增至 80 页, 印刷精美, 价格不变。

《南方水产》立足南方, 面向全国, 突出学术性、地域性、实用性、可读性, 开辟“研究论文”、“科学实验”、“专题综述”、“研究简报”、“新技术与新产品”、“市场动态”及“水产学科文摘”等专栏, 重点报道国内外渔业科研、生产的新技术、新成果及新动向。欢迎投稿, 欢迎订阅!

邮发代号 46 - 65, 每期定价 8.00 元, 全年 6 期 48.00 元 (含邮费)。由于接到上级的通知较迟, 为避免不必要的退款手续, 请读者直接向编辑部订购。

编辑部地址: 广州市新港西路 231 号

邮 编 510300

电 话 020 - 84458694

传 真 020 - 84451442

E-mail: nfsc@vip.163.com; scwz@163.net