

条斑紫菜 5 个栽培品系的 ISSR 分析

袁昭岚¹, 黄鹤忠¹, 沈颂东¹, 陈大鹏², 朱建一², 许 璞²

(1.苏州大学 生命科学学院, 江苏 苏州 215123; 2.江苏省海洋水产研究所, 江苏 南通 226003)

摘要: 利用 ISSR-PCR 方法对条斑紫菜(*Porphyra yezoensis*) 5 个栽培品系进行遗传多态性分析, 优化了 PCR 反应体系和反应参数。从 100 个 ISSR 引物中筛选 23 个引物扩增了 217 个 DNA 片段, 其中 201 个片段呈现多态性, 占总扩增片段的 92.6%。依据扩增结果进行遗传相似性和遗传距离分析, 构建分子树状图。结果表明, 在条斑紫菜 5 个品系中, 采自南通海区的 2 个品系首先聚在一起, 其遗传距离为 0.389 7; 接着依次和来自青岛的 2 个野生品系聚类, 两个野生品系间的距离为 0.429 9; 原种来自日本的样品与其他 4 个样品相距最远, 平均遗传距离为 0.446 9。同时, 5 个紫菜品系的 ISSR 分析中产生了一些特有的指纹图谱, 可进一步应用于种质分析的研究。

关键词: 条斑紫菜(*Porphyra yezoensis*); ISSR; 遗传多样性

中图分类号: Q31 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3096 (2006) 07-0009-06

条斑紫菜 (*Porphyra yezoensis* Ueda) 为红毛菜科 (Bangiaceae) 紫菜属 (*Porphyra*) 植物, 是世界上最重要的人工栽培海藻之一, 营养丰富, 味道鲜美, 具有很高的经济价值。条斑紫菜优良品种的选育对提高中国紫菜的产量和质量有着非常重要的意义。但条斑紫菜叶状体形态特征简单, 各栽培品系的鉴别存在一定困难, 而其二倍体的丝状体在外观形态上差异更小。因此探索新的遗传标记方法对条斑紫菜的育种学发展有重要意义。

20 世纪 90 年代以后, DNA 标记技术的出现为在分子水平上进行遗传多样性分析、品系鉴定、遗传作图等提供了有力的工具。RAPD 和 AFLP 分析技术应用于紫菜属植物研究已有报道^[1~2]。ISSR (inter-simple sequence repeat) 分析方法是 Zietkiewicz^[3]等在 SSR 即微卫星标记基础上发展起来的一种新技术。SSR 是一种高度串联重复序列, 重复单位仅 2~6 个 bp, 均匀分布于基因组中。ISSR 的原理是在 SSR 的 5' 或 3' 端加锚 1~4 个碱基, 然后以此为引物, 对两侧具有反向排列 SSR 的一段基因组 DNA 进行扩增。ISSR 技术是一种快速、可靠、可提供相关基因组更多信息的

DNA 指纹技术, 每个 ISSR 引物可以产生比 RAPD 更多的扩增片段, 且操作较 AFLP 更为简单, 因此目前在植物方面已广泛用于重要农作物如水稻, 小麦和玉米等的品系鉴定、遗传作图、基因定位和遗传多样性分析^[4~6]。作者首次将 ISSR 分析技术应用于紫菜属海藻的遗传多样性研究中。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用的 5 个条斑紫菜丝状体样本由江苏省海洋水产研究所国家级紫菜种质库提供 (表 1)。

1.2 研究方法

1.2.1 DNA 提取

取 0.1 g 左右丝状体, 蒸馏水冲洗干净, 滤纸吸

收稿日期: 2004-10-20; 修回日期: 2004-12-30

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (40206019); 江苏省高技术研究项目 (BG2002312)

作者简介: 袁昭岚(1980-), 女, 硕士研究生, 研究方向是藻类分子生物学; 沈颂东, 通讯作者, shensongdong@suda.edu.cn

干水分, 采用改良的 CTAB 方法提取基因组 DNA。 DNA 经 0.7%的琼脂糖凝胶电泳染色测定浓度。

表 1 实验所用紫菜丝状体名称及其来源

Tab.1 Name and their origins of *Porphyra yezoensis* conchocelis

丝状体品系	来源
Y-0008 <i>Porphyra yezoensis</i>	2001 年选自南通海区人工栽培群体 (原种引自日本)
Y-9965 <i>P. yezoensis</i>	1999 年选自南通海区人工栽培群体
Y-9509 <i>P. yezoensis</i>	1995 年选自南通海区人工栽培群体
Y-9308 <i>P. yezoensis</i>	1993 年选自青岛海区野生藻落
Y-2035 <i>P. yezoensis</i>	1999 年选自青岛海区野生藻落

1.2.2 ISSR-PCR 反应条件及程序

实验所用的 ISSR 引物是由 British Columbia 大学设计的成套引物。从 100 条引物中筛选扩增条带较多、信号强、背景清晰的引物用于 ISSR-PCR 反应。

DNA 扩增在 Biometra 的 TgradientPCR 仪上进行, 25 μ L 的 PCR 反应液内含: 模板约 30 ng, 1U 的 Taq 酶, 1.5 mmol/L MgCl₂, 0.2 mmol/L dNTP, 0.3 μ mol/L 引物。PCR 扩增条件经优化确定为, 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 然后进行 45 个循环: 94 $^{\circ}$ C 变性 45 s, 52 $^{\circ}$ C 复性 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 循环结束后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

扩增产物在 EC minicell 350 电泳仪上进行, 所用琼脂糖购自 BBI 公司。琼脂糖凝胶电泳质量分数为 2% (含终质量浓度为 0.5 mg/L 溴化乙锭), 最大电压不超过 5 V/cm, 电泳 3 h 后取出, 在紫外分析系统 (上海复日生物技术研究 所 FU-200 UV/WHITE ANALYSIS) 上观察结果并拍照。

1.2.3 数据分析

电泳图谱的每条带 (DNA 片段) 均为一个分子标记, 代表一个引物的结合位点。统计条带的有无, 强带和可重复出现的弱带均视为有, 记作 1; 否则为无, 记作 0。采用 Nei 等的计算方法 $S=2N_{ij}/(N_i+N_j)$ 来计算两两样品间的相似性系数, 其中 N_{ij} 为材料 i 和 j 共有的条带数, N_i 和 N_j 分别为材料 i 和 j 各自的条带数。遗传距离 $D=1-S$, 根据遗传距离利用 Phylip 软件进行聚类分析。

2 结果和分析

2.1 ISSR 反应体系的优化

2.1.1 DNA 模板浓度

在其他反应条件不变的情况下, 本实验在 25 μ L 的反应体系中设置了 5, 10, 20, 30, 50 ng 5 个梯度的 DNA 模板含量, 各个梯度均能扩增出 PCR 条带 (图

1)。余艳等^[7]认为 ISSR-PCR 反应对模板浓度并不敏感, 3~60 ng 的模板含量均可以扩增出基本相同的带型。经比较, 本实验确定模板含量为 20 ng。

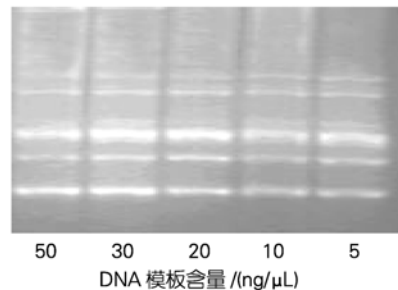


图 1 不同 DNA 模板含量 PCR 扩增结果电泳图

Fig.1 Electrophoresis result of different template concentrations

2.1.2 Mg²⁺ 浓度

在 PCR 反应中, Taq DNA 聚合酶是 Mg²⁺ 的依赖性酶, 对 Mg²⁺ 浓度非常敏感, 一般 PCR 反应中, 1.5~2.0 mmol/L Mg²⁺ 是比较合适的。本实验在此基础上设置了 0.5~3.5 mmol/L 的 5 个 Mg²⁺ 梯度。从实验结果来看, 除了 Mg²⁺ 为 0.5 mmol/L 以外, 其余的均能扩增出结果, 但 Mg²⁺ 浓度过高或过低时, 扩增条带少且不清晰。当 Mg²⁺ 浓度为 1.5~2.0 mmol/L 时, 效果最佳 (图 2)。

2.1.3 dNTP 浓度对 ISSR 扩增的影响

分别试验 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25, 0.35 mmol/L 的 dNTP 对扩增结果的影响表明: 在各 dNTP 浓度下, 都能扩增出条带, 但浓度过高 (0.25, 0.35 mmol/L) 或过低 (0.05 mmol/L) 时, 条带较少。由图 3 可知, dNTP 浓度以 0.2 mmol/L 较为适宜, 条带稳定且清晰。

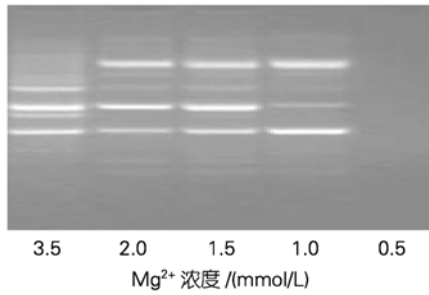


图2 不同 Mg^{2+} 浓度 PCR 扩增结果电泳图
Fig.2 Electrophoresis result of different Mg^{2+} concentrations

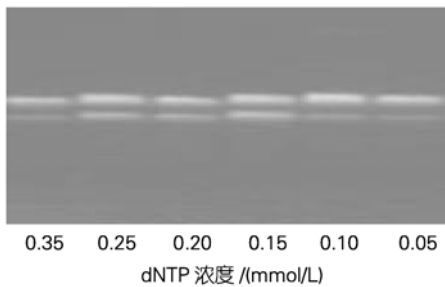


图3 不同 dNTP 浓度 PCR 扩增结果电泳图
Fig.3 Electrophoresis result of different dNTP concentrations

2.1.4 引物浓度

引物浓度是 PCR 反应体系的重要影响因素。实验设计了 5 个浓度梯度：0.2, 0.25, 0.3, 0.4, 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 。从扩增结果看，引物浓度增加，电泳条带的亮度和数目增加。浓度为 0.2~0.25 $\mu\text{mol/L}$ 时，条带较弱；

当浓度增加至 0.3 $\mu\text{mol/L}$ 时，扩增稳定，条带清晰。因此，在紫菜 ISSR-PCR 反应体系采用 0.3 $\mu\text{mol/L}$ 的引物浓度较为合适（图 4）。

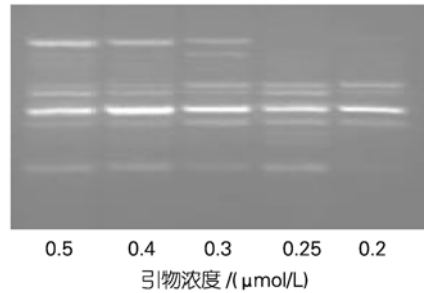


图4 不同引物浓度 PCR 扩增电泳图
Fig.4 Electrophoresis result of different primer concentrations

2.1.5 退火温度

实验采用的由 University of British Columbia 提供的 100 条 ISSR 引物。根据公式计算的退火温度大多为 55~60°C，本实验中大多数引物采用了以 52°C 为退火温度。根据具体引物稍做调整，对 GC 含量高的引物，可将退火温度适当提高，而对 AT 含量高的引物，其退火温度则较低。

2.2 引物筛选结果和紫菜基因组多样性程度分析

根据以上实验结果，最终确定了条斑紫菜的 PCR 反应体系。从 100 个引物中筛选 23 个引物对所有样品进行 PCR 扩增（图 5），共计扩增了 217 个 DNA 条带。其中，多态性 DNA 条带有 201 条，占总带数的 92.6%，每个引物可扩增的 DNA 带的数目在 5~13 之间，平均为 9.34 条（表 2），扩增的 DNA 带的大小

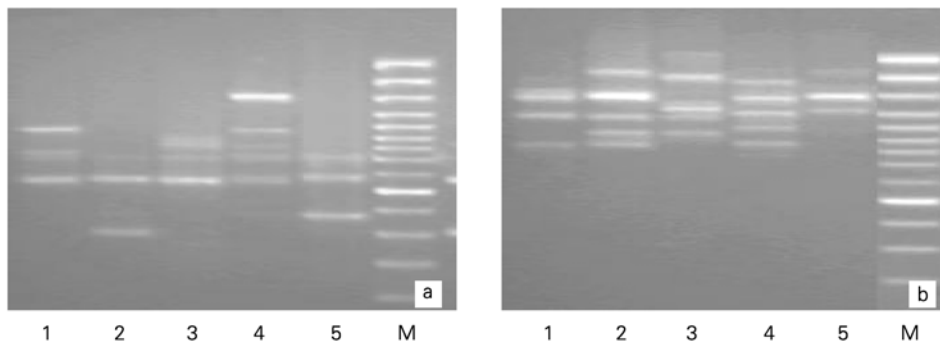


图5 引物 810(a), 866(b)对条斑紫菜 5 个品系扩增后的电泳图
Fig.5 Electrophoresis results of ISSR on *Porphyra yezoensis* with primer 810(a) and primer 866(b)

表 2 23 个引物在条斑紫菜 5 个品系中的扩增结果

Tab.2 Amplification of 23 ISSR primers on 5 cultivars in *Porphyra yezoensis*.

引物	序列	扩增条带数	多态性条带数	多态性位点比例 (%)
807	(AG) ₈ T	10	10	100.0
809	(AG) ₈ G	11	9	81.8
810	(GA) ₈ T	8	7	87.5
812	(GA) ₈ A	10	8	80.0
816	(CA) ₈ T	10	10	100.0
818	(CA) ₈ G	9	8	88.9
826	(AC) ₈ C	12	11	91.7
830	(TG) ₈ G	7	6	85.7
834	(AG) ₈ YT	6	5	83.3
835	(AG) ₈ YC	5	5	100.0
850	(GT) ₈ YC	9	9	100.0
855	(AC) ₈ YT	9	8	88.9
856	(AC) ₈ YA	12	11	91.7
857	(AC) ₈ YG	11	10	90.1
859	(TG) ₈ RC	9	8	88.9
864	(AT) ₈ G	10	10	100.0
866	(CTC) ₆	9	8	88.9
873	(GACA) ₄	11	11	100.0
878	(GGAT) ₄	8	8	100.0
881	(GGGTG) ₃	9	8	88.9
890	HVH (TG) ₇	9	8	88.9
891	VHV (GT) ₇	10	10	100.0
895	AGAGTTGGTAGCTCTTGATC	13	13	100.0

注：R=(A, G)；Y=(CT)；H=(A, T, C)；V=(A, C, G)

在 150~2 500bp 之间。23 个引物中，二核苷酸重复序列的有 16 个，3 个三核苷酸重复序列，2 个四核苷酸重复序列，五核苷酸和其他引物各有一个，这表明紫菜染色体基因组中以二核苷酸重复居多。从每个引物

扩增的条带数来看, (AC) n 重复序列引物扩增条带较多, 平均为 10.5 条。在二核苷酸重复序列引物中, 以 (AC) 和 (AG) 为多, 占 50%, 这也说明在紫菜基因组中 (AC)、(AG) 重复序列较多。

2.3 遗传距离和聚类分析

为确定条斑紫菜 5 个栽培品系之间的遗传差异, 计算了它们之间的遗传距离和相似性系数, 如表 3 所示, 并根据遗传距离用 PHYLIP 软件进行聚类分析, 分析结果见图 6。

3 讨论

作者应用 ISSR 分子标记方法对紫菜遗传多样性进行初步研究。通过对模板浓度、 Mg^{2+} 浓度、dNTP 浓度、引物浓度等条件进行优化, 确定了紫菜的 ISSR-PCR 反应体系, 这个反应体系与本实验室优化的文蛤 (*Meretrix meretrix*) ISSR 反应体系相比较, 基本一致^[8]。当样品、引物、扩增条件一致时, 其结果基本一致, 显示了 ISSR 技术的稳定性, 可能与 ISSR 引物较长, 退火温度较高, 非特异性扩增因素减少等有关。ISSR 因其实验操作简便、稳定可靠、且不需要知道基因组序列的特点, 目前在水生生物上, 如文蛤、江蓠属 (*Gracilaria*) 几种海藻、马氏珠母贝 (*Pinctada martensii*)^[8~11] 等方面的研究已有报道。

由聚类分析可知, 2 号样品与 3 号首先聚在一起, 这两者都是采自南通海区的条斑紫菜栽培品系, 地理位置和生长环境都比较相似, 只是采集时间有所差异。接着依次和来自青岛的 2 个野生品系相聚, Y-9308 和 Y-2035 2 个品系间的距离为 0.429 9; 1 号样品虽也采自南通海区的栽培群体, 但与其他几个条斑紫菜的遗传距离都较大, 平均遗传距离为 0.446 9, 可能是由于 1 号样品原种来自日本, 地理阻隔可能是导致差异的重要原因。徐涤等^[12]在对 5 个紫菜品系间遗传差异的 RAPD 分析时, 也发现来自青岛的条斑紫菜与来自日本的条斑紫菜之间的遗传距离, 大于其与坛紫菜 (*Porphyra haitanensis*) 之间的遗传距离。目前, 多数研究报道认为地理环境对紫菜的遗传变异影响较大。

与其它物种相比, 紫菜的多态性位点比例极高。王勇^[13]等对坛紫菜的 6 个丝状体品系进行的 RAPD 分析中得到多态位点占总位点的 94.6%; 贾建航等^[14]在对 5 个坛紫菜和 7 个条斑紫菜、一个半叶紫菜 (*P. katadai*) 及一个少精紫菜 (*P. oligospermatangia*) 进行的 RAPD 分析中, 也获得 97.1% 的多态性位点; 杨锐等^[1]对坛紫菜进行 AFLP 研究时, 获得了 96.97% 的

多态性位点。本实验结果显示, 5 个条斑紫菜品系的多态性位点达 92.6%。这说明紫菜种内的遗传变异相当丰富。

表 3 5 个条斑紫菜栽培品系遗传距离 (右上方) 和相似性系数 (左下方) 矩阵

Tab.3 Genetic distances (upper-triangular data matrix) and genetic similarity (lower-triangular data matrix) of 5 cultivars of *Porphyra yezoensis*

	Y-0008	Y-9965	Y-9509	Y-9308	Y-2035
Y-0008	-	0.4520	0.4811	0.4766	0.3778
Y-9965	0.5480	-	0.3897	0.3953	0.3805
Y-9509	0.5189	0.6103	-	0.4615	0.4794
Y-9308	0.5234	0.6047	0.5385	-	0.4299
Y-2035	0.6222	0.6195	0.5206	0.5701	-

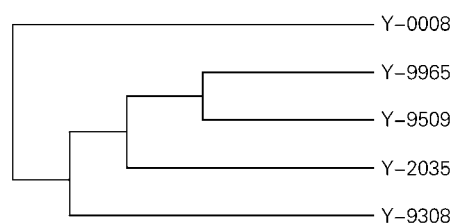


图 6 条斑紫菜 5 个栽培品系的 UPGMA 聚类图

Fig.6 Dendrogram of 5 cultivars of *Porphyra yezoensis*

通过本实验发现, ISSR 分子标记适用于紫菜丝状体的遗传多样性分析研究, 它能够简单地将这 5 个品系区分开, 如引物 810, 866 等 (图 5)。ISSR-PCR 有一套通用引物, 其实验操作简单, 快捷, 在种质资源鉴定分析中有较大的应用前景。进一步选取扩增稳定、特异性强的条带进行克隆、测序, 从而获得更为稳定的 SSR 微卫星标记, 可用于紫菜种群遗传学和多样性的深入研究。如果能开发更多的微卫星标记, 这对于构建紫菜连锁群和遗传图谱、种质资源分析与保护、及优良品种的选育都具有重要意义。

参考文献:

- [1] 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.
- [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 (自然科学版), 2000, 35 (2): 230-234.

- [3] Zietkiewicz E, Rafalske A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) anchored polymerase chain reaction amplification[J]. *Genomics*, 1994, 20 : 176-183.
- [4] Blair M, Panaud W, McCouch O. Inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification for analysis of microsatellite motif frequency and fingerprinting in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *Theor Appl Genet*, 1999, 98: 780-792.
- [5] Kantety R V, Zeng X, Bennetzen J. Assessment of genetic diversity in popcorn inbred lines using inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification [J]. *Mol Breed*, 1995, 1:365-373.
- [6] Nagaoka T, Ogiwara Y. Applicability of inter-simple sequence repeat markers in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers [J]. *Theor Appl Genet*, 1997, 94: 597-602.
- [7] 余艳, 陈海山, 葛学军. 简单重复序列区间(ISSR)引物反应条件优化与筛选[J]. 热带亚热带植物学报, 2003, 11 (1): 15-19.
- [8] 陈大鹏, 沈怀舜, 丁亚平, 等. 文蛤 (*Meretrix meretrix*) 地理种群 ISSR 分子标记的初步研究[J]. 南京师大学报 (自然科学版), 2004, 27 (3): 74-77.
- [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] 王继伟, 孔杰. ISSR-PCR 技术在对虾中的应用初步研究[J]. 海洋水产研究, 2002, 23 (1): 1-4.
- [11] 吕林兰, 王爱民, 杜晓东, 等. 马氏珠母贝 DNA 快速一步法 (ROSE) 提取及 ISSR-PCR 应用[J]. 海洋科学, 2003, 27 (10): 42-45.
- [12] 徐涤, 宋林生, 秦松, 等. 5 个紫菜品系间遗传差异的 RAPD 分析[J]. 高技术通讯, 2001, 11(11): 1-3.
- [13] 王勇, 刘必谦, 骆其君, 等. 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) : 225-227.
- [14] 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.

Inter-simple sequence repeat (ISSR) analysis of five cultivars in *Porphyra yezoensis*

YUAN Zhao-lan¹, HUANG He-zhong¹, SHEN Song-dong¹, CHEN Da-peng², ZHU Jian-yi², XU Pu²

(1. College of Life Sciences Soochow University, Suzhou 215123, China ; 2. Marine Fisheries Institute of Jiangsu Province, Nantong 226007, China)

Received: Oct., 20, 2004

Key words: *Porphyra yezoensis*; ISSR; genetic diversity

Abstract: Inter-simple Sequence Repeat (ISSR)-PCR was used to determine the genomic DNA variations and genetic relationships of 5 cultivars of *Porphyra yezoensis*. The influence factors of ISSR were studied and the experiment parameters were optimized. The optimal experiment conditions were as follows: 25 μ L system containing 20ng/ μ L template, 1.5mmol/L $MgCl_2$, 0.2mmol/L dNTP, 0.3 μ mol/L primer. Optimal amplification program was 1 cycle of 5 min at 94°C; 45 cycles of 45s at 94°C, 45s at 52°C, and 2 min at 72°C; 1 cycle of 10 min at 72°C. One hundred ISSR primers were screened, of which 23 polymorphic and informative primers were selected. Total 217 DNA bands were amplified, 201 of which were polymorphic (92.6%). Cluster analysis based on the ISSR results was performed, which indicated that genetic distance between Y-9965 and Y-9505 was 0.3897; and the distance between the two samples from Qingdao (Y-9308, Y-2035) was 0.4299; further more, the cultivar come from Japan (Y-0008) had the average genetic distance 0.4469 compared with other four samples. At the same time, DNA profiles based on the ISSR markers had revealed potential fingerprints for various individual cultivars.

(本文编辑：张培新)