分子标记概述及其在藻类中的应用^{*}

王秀良 赵凤娟 吕 慧 姚建亭 刘吉东 段德麟

(中国科学院海洋研究所, 青岛 266071)

遗传标记经历了形态标记、细胞学标记、蛋白质标记及 DNA 标记的四个重要发展历程。纵观遗传学的发展历史, 遗传学的发展推动了新型遗传标记的发展, 每一种新型遗传标记的发现, 均推进了遗传理论与技术的发展。19 世纪后期, 孟德尔以豌豆为材料, 利用 7 对形态学标记对杂种后代的不同个体依据性状表现进行归类分析, 发现了著名的遗传分离规律和独立分配规律。细胞学标记是指能明确显示遗传多态性的细胞学特征, 如染色体形态、数目和结构在不同物种中的差异等, 可以作为一种遗传标记来进行基因定位。20 世纪 50 年代, 人们发现同工酶是一种可用于物种起源与进化研究、种质鉴定、分类等诸多领域的分子标记技术 (Marker et al., 1959)。20 世纪后期以来, DNA 分子标记技术不断涌现, 相继建立了 RFLP (restriction fragment length polymorphism)、DNA 指纹 (DNA fingerprint)、RAPD (random amplified polymorphism DNA)、AFLP (amplified fragment length polymorphism)、微卫星 DNA (microsatellite DNA)、SNP (single nucleotide polymorphism) 等专门的技术, 在生物研究中得以广泛应用。分子标记技术应用于藻类学研究较晚, 主要用于藻类的系统发生、地理分布、种群遗传、分类、亲本鉴定、杂种优势的鉴别及种质鉴定等领域。

一、同工酶标记及其在藻类中的应用

同工酶作为遗传标记是 Marker 等 (1959) 最早提出的。同工酶是指一个以上基因位点编码的酶的不同分子形式, 其具有相同的催化功能但理化性质又不同的一类酶, 其结构的差异来源于基因类型的差异, 因此并不一定是同一基因的产物。与此相对, 由一个基因位点的不同等位基因编码的酶的不同形式称为等位酶。同工酶通常利用非变性淀粉凝胶或聚丙烯酰胺凝胶电泳及特异性染色来检测, 即酶的多种形式形成肉眼可辨的带型——酶谱, 根据酶谱的不同来显示酶蛋白在遗传上的多态性。这种多态性可能是由于基因编码的氨基酸序列的不同引起的, 或者是由于蛋白质后加工的糖基化等引起的。与形态标记、细胞学标记相比, 同工酶标记可以通过直接采集组织、器官等少量样品进行

^{*} 国家自然科学基金项目 (编号: 30500383) 资助。

通信作者: 王秀良, 男, 助理研究员; E-mail: xliang@yq.icas.ac.cn; 段德麟, 男, 研究员, 从事海藻研究; E-mail: dkluar@ms.qdio.ac.cn

收稿日期: 2006 年 12 月 18 日。

分析,首次突破了把整株样品作为研究材料进行分析的方式,并可以直接反映基因产物的差异,因此同工酶标记在过去的二三十年中受到相当的重视与发展,已被广泛应用于种群分析、种质鉴定和分类等研究领域。但同工酶分析也有其内在的局限性,如每一种同工酶标记都需特殊的显色方法和技术;同工酶是基因表达的产物而非基因本身,因此其状况常受环境及发育状态的影响;并且同工酶检测到的多态性位点的数量有限,它只能分析那些编码可溶性酶的基因,而且还要求其产物易于提取并能通过凝胶电泳进行检测等。

尽管如此,同工酶技术已应用于研究多种海藻,如蕨藻(*Caulerpa taxifolia*) (Benzie et al, 1997; 2000),江篱(*Gracilaria chilensis*) (Inasuwari 1993),石花菜(*Gelidium*) (Sosa et al, 1992-1993),紫菜(*Porphyra*) (Lindstrom et al, 1991)以及海带(*Laminaria*) (Neeffus et al, 1992)等。虽然该技术在海藻的应用中不是很普遍,主要是因为藻类多糖对蛋白提取的干扰,特别是在选择红藻与褐藻作为研究对象时。同工酶标记的研究表明藻类群体相对于维管植物在遗传与变异方面有其自身独有的特点。到目前为止,在高等植物中,29%的同工酶由一个基因位点编码,大多数由两个甚至更多的位点编码(Weeden et al, 1989);而在所研究的藻类同工酶中,约50%是由单一的基因位点编码,只有3种同工酶是由4个以上的基因位点编码的,它们是酸性磷酸酶(Cheney et al, 1978)、超氧化物歧化酶(Sosa et al, 1992-1993)和黄素酶(Sosa et al, 1992-1993),表明在藻类中同工酶编码基因的位点相比高等植物要低。海藻的生活史具有多样性,有的只有一个世代,有的具有两个世代(单倍和2倍),有的则存在3个世代(寄生在红藻的雌配子体的果孢子体)(Dawreede et al, 1988)。在不同的世代藻体的倍性不同,有的海藻,即使在同一生长时期,也同时存在着自由生活的同型的单倍与2倍的藻体。一种假设认为单倍体藻体的酶谱应该简单,在单倍体中每个位点只有一个等位基因,因此每一条带代表着一个位点。在蕨藻(*Caulerpa peltata*)中,几种同工酶的复杂带式表明这种蕨藻可能是多倍体(Benzie et al, 1997)。Abo等(1996)对两种紫菜(*Porphyra tenera*和*P. yezoensis*)的生活史中两个不同阶段的单倍与2倍的异型藻体的同工酶进行了研究。检测海藻群体的遗传变异的程度与分析样本群体的大小及分析的同工酶位点的多少紧密相关。在报道的高等植物的研究中,一般要在几百个2倍体个体中考察10多个位点,而在藻类种群的研究中,分析的同工酶位点介于3~22个位点之间,分析的样本数为30~60。整体而言,与高等植物相比,藻类中同工酶的多态性要低,在所有位点中,只有25%的位点呈多态性(P),每个位点的平均等位基因为1.39(A),表观杂合度为0.074(H);而高等植物中,P为54.4%,A为2.00,H为0.152(Sosa et al, 1999; Frankel et al, 1995)。多数海藻存在无性繁殖生活史,这种繁殖方式将降低藻类种群的遗传多样性。无性繁殖会使得在一个种群内许多个体保持遗传的同一性(Van Oppen et al, 1995)。Sosa等(1996)认为加那利群岛内江篱(*Gracilaria cervicornis*)3个种群遗传变异非常低是由无性繁殖引起的,在两个种群内已经几年没有采集到具有繁殖能力的产四分孢子的藻体了。另外,无性繁殖使得藻类群体间的遗传分化变高。Pearson等(1997)对加州北部与南部的红藻*Lithothrix asperillum*群体进行了同工酶分析,发现群体间的遗传分化非常高;同时还发现南部种群是有性繁殖,表现为较高的种群内部遗传

传多样性, 而北部种群为无性繁殖, 种群内遗传多样性较低。

同工酶标记多用于海藻种群的遗传多样性分析及种群在不同地理分布中的遗传分化的研究。Sosa等(1993)对分布在西班牙 Canary 岛的 3 个不同区域中的石花菜 (*Gelidium canariensis*) 的孢子体种群及配子体种群进行了分析, 发现在 3 个区域中的单倍体亚群的遗传变异 (包括多态位点数, 同一位点的平均等位基因数及遗传多样性) 低于 2 倍体亚群, 并且发现种群遗传分化与这 3 个区域的地理间隔无相关性。Johansson等(2003)利用 13 种同工酶标记, 研究了波罗的海和北海的刚毛藻 (*Cladophora rupestris*) 种群的遗传分化, 从 11 个不同的海区中采集 328 个样本进行分析, 检测的超氧化物歧化酶位点存在多态性, 聚类分析将所有样本划分成波罗的海和北海类群。同工酶标记也适用于藻类的分类及种属鉴定。Lindström等(1991)利用同工酶标记结合藻体的形态特征及染色体的数目对北太平洋和北大西洋的 5 对紫菜的类属关系进行了研究。Brostoff等(1997)对新西兰岛 27 个地点的紫菜 (*Porphyra*) 进行了等位酶分析, 发现该地区的紫菜种类远比先前报道过的要多, 但不能清楚地辨别这些新的紫菜种类。

二、限制性片段长度多态性 (RFLP) 及其在藻类中的应用

RFLP (restriction fragment length polymorphisms) 在 20 世纪 70 年代首次报道 (Grodzicki et al., 1974), 但从人类遗传学家 Botstein 等 (1980) 首次提出 DNA 限制性片段长度多态性可作为遗传标记的观点之后, 该技术才得到了不断的发展和运用, 并广泛用于植物遗传连锁图的构建、分子标记辅助选择、遗传关系分析及数量遗传研究等方面。RFLP 的产生主要是由于 DNA 序列上的变化, 如碱基的替换、缺失以及重排等, 导致某种限制性内切酶 (restriction enzymes, 简称 RE) 酶切位点的增加或丧失, 从而造成基因型间限制性片段长度的差异。对每一个 DNA/RE 而言, 所产生的片段是特异性的, 它可作为某一 DNA 所特有的“指纹”。RFLP 分析是一项综合技术, 涉及 DNA 的提取、限制性酶消化、琼脂糖凝胶电泳、Southern 杂交等多项分子生物学技术。它的获得是将特定生物类型的基因组 DNA 经限制酶消化后, 通过琼脂糖电泳将消化后的 DNA 片段按大小顺序分离开, 并按原来的顺序与位置转移至易于操作的尼龙膜或硝酸纤维素膜上, 用放射性 (如 ^{32}P) 或非放射性物质 (如生物素、地高辛等) 标记的 DNA 探针, 与膜上的 DNA 进行 Southern 杂交, 依据 DNA 酶切片段与探针序列的同源性程度的高低, 即可显示出不同来源的 DNA 的限制性酶切片段的长度多态性。

RFLP 分析有两种不同的方法: 对酶切带型进行直接比较 (直观 RFLP 分析) 或对分子杂交带型进行比较 (杂交 RFLP 或 RFLP)。直观 RFLP 分析是对基因组 DNA 的酶切产物直接进行电泳比较 (如 cpDNA 和 mtDNA 的直观 RFLP 分析)。经杂交后的 RFLP 可形成少数条带, 或多条带, 同时考察多个位点的差异的 DNA 指纹分析。

与形态学标记及同工酶标记相比, RFLP 没有表型效应, 不受环境条件、发育阶段和组织特异性的影响, 可以检测出编码区的变异, 也可以检测出非编码区的变异, 因此其标记的数目几乎是无限的。大部分 RFLP 标记符合孟德尔遗传规律的共显性标记, 双亲的两个以上的分子量不同的多态性片段均在杂种 F_1 中表现, 很容易将杂合子与纯合

子分开, 基于 RFLP的共显性特点已被广泛应用于多种生物的分析中, 特别是成功地构建植物遗传图谱。但 RFLP标记也存在所用的 DNA量较大, 一般为 $5 \sim 15 \mu\text{g}$ 检测步骤繁琐, 周期长, 需要的仪器、设备较多, 探针的制备成本较高等不足。尽管 RFLP标记遍布全基因组, 与其他 DNA分子标记相比, 其检测的 DNA变异仍然是有限的, 同样用一个具有 6 碱基识别位点的限制性内切酶检测 10^9 碱基对的基因组时, 尽管有多达 250 000 个位点被检测到, 但也只有 1.5×10^6 个碱基对, 只相当于扫描了整个基因组的 0.15%, 而其他大部分基因组的 DNA变异位点并没有被检测到。

PCR-RFLP技术的出现很快得到了人们的认可。这种技术摒弃了 RFLP分析过程中繁琐的 Southern杂交步骤, 只需纳克水平的 DNA作为扩增模板, 然后对 PCR扩增的 DNA片段进行限制性酶切, 电泳分析后就可以清晰地检测出 DNA片段的差异, 而不需要 Southern杂交过程, 就如同对相对较小的 DNA分子 (如线粒体 DNA和叶绿体 DNA) 进行直接酶切后电泳分析一样。

RFLP分析在藻类中应用的报道不是很多。在藻类中, RFLP分析的主要对象是叶绿体 DNA (cpDNA), 主要是由于藻类的叶绿体基因组中基因的排列顺序变化很大, 酶切后 DNA片段的大小与多少也不同, 因此容易发现酶切片段的多样性 (Saunders et al., 1993)。但分离藻类的质体 DNA 步骤比较繁琐, 时间较长 (Goff et al., 1988), 因此限制了 RFLP标记在藻类中的应用。

藻类 cpDNA的 RFLP分析常被用来进行种属分类及同种不同居群的分析。Fair等 (1988) 以海带目分属于 3 个科的几个种 *Lessoniopsis littoralis*, *Nereocystis luetkeana*, *Alaria marginata*, *Laminaria saccharina*, *Macrocystis integrifolia* cpDNA基因文库分离到的多拷贝 DNA片段 IMR23S和单拷贝片段 IMi432, IMH7作为印迹探针, 进行了 cpDNA的 RFLP分析, 探讨了 3 个科的分类关系, 结果将 *Lessoniopsis*、*Macrocystis*、*Alaria* 归为翅藻科, *Laminaria*、*Nereocystis* 则归为海带科。这与以形态特征为依据的分类结果不同。

Go等 (1988) 通过质体 DNA的 RFLP分析, 便可将 3 种江篱 (*Gracilaria lemaneiformis*, *G. pacifica* 和 *G. robusta* Setchell) 完全区分开。对于 *G. lemaneiformis* 的位于北美太平洋沿岸 3200 km 范围之内的不同种群进行的质体 DNA的 RFLP分析, 无论是对酶切片段电泳后直接的 RFLP分析, 还是用特异的探针进行 Southern杂交的 RFLP分析, 结果均表明不同种群的 RFLP图谱是完全一致的。而 Rice等 (1990) 对欧洲及世界其他地区的红藻 *G. verrucosa* (Hudson) Papenfuss 和一个相似种, 及一个作为外群的不同种 *G. sordida* W. Nelson 的总共 11 个种群进行了质体 DNA的 RFLP分析, 发现没有两个种群的 RFLP的图谱是完全一致的 (即使是属于同一个种)。这表明地理间隔使得同一种的不同种群发生了遗传分化。

也有人以藻类基因组 DNA作为 RFLP的研究对象。Bhattacharya等 (1987) 对处于北太平洋两种生长环境差异很大的多肋藻 *Costaria costata* (Turner) Saunders (常年处于浪溅处的种群和常年处于没有浪溅的种群), 以线虫 18~28 S DNA间隔区作为印迹探针, 对基因组 DNA进行了 RFLP分析, 尝试了多种限制性内切酶 (EcoRI, HpaI, XbaI, MboI), 但没发现两种种群的 RFLP有多态性。Coyer等 (1997) 对 California 沿岸相隔距离为小于 1 m, 10 m, 25 m, 16 km 和 250 km 的 *Postelsia palmaeformis* (Phaeophyceae) 5 个种群进行

了以 M13 为印迹探针的基因组 DNA 的 RFLP 分析, 发现居群内的遗传相关性非常高。相隔小于 1 m 的居群间的相似度高于相隔 25 m 以上的居群间的相似度, 而 RFLP 的分析结果却显示相隔 25 m 居群间的相似度与相隔 250 km 的居群间的相似度一致。这表明 RFLP 分析只适合分析相隔 25 m 以内的居群的遗传变异。

PCR-RFLP 在藻类的研究中多应用于种属鉴定。Bolet 等 (1996) 用 cpdBA-IGS 片段的 PCR-RFLP 对分属于蓝藻的 3 个形态种 *Anabaena circinalis*, *Microcystis aeruginosa*, *Nodularia spumigena* 的 19 株蓝藻进行了分析, 发现每个种内均存在较高的多态性, *M. aeruginosa* 和 *N. spumigena* 其在北半球株系和澳洲株系的 RFLP 也存在多样性。这表明该方法适用于属及属以下分类水平的系统发生学研究。Teasdale 等 (2002) 采用 *rbcL* 基因的 PCR-RFLP 分析, 对紫菜的不同种进行了区分和鉴定。Stiller 等 (1996) 利用 18S rDNA 基因的 PCR-RFLP 分析表明, 15 种紫菜均有各自独有的 RFLP 图谱, 并且利用这些图谱, 鉴定出一个新种 *P. rediviva*。ITS 的 PCR-RFLP 曾被研究者用来鉴定区分江篱属 (*Gracilaria*) 的不同种 (Goff et al., 1988)。Candice 等 (1999) 利用 ITS-RFLP 对来自智利不同地域及新西兰不同地域的 6 个种群进行了分析, 结果表明来自智利的 4 个种群属于一个种 *G. chilensis*; 位于新西兰惠灵顿的 Scorching 湾的居群也属于该种, 而另一处的种群则属于另外一个种类。

三、随机扩增多态性 DNA (RAPD) 及其在藻类中的应用

RAPD (random amplified polymorphism DNA) 技术是 1990 年由 Williams 和 Welsh 两个研究小组同时发展起来的一种 DNA 水平上的多态性检测技术 (Williams et al., 1990; Welsh et al., 1990), 是第一种以 PCR 技术为基础的 DNA 分子标记技术。RAPD 技术所用的引物短, 复性温度低, 用一个随机序列的寡核苷酸作为引物 (通常为 8~10 bp), 以基因组 DNA 作为模板, 在较低的退火温度下 (36~40°C) 进行 PCR 扩增。如果不同个体在结合位点上的序列因突变存在差异, 或者两个结合位点间由于 DNA 序列的插入、缺失造成距离变化, 就会形成扩增产物的出现或者消失或者长度变异等多态现象, 从而成为基因组 DNA 多态的分子标记。

RAPD 技术的特点是无需预知研究对象的基因组序列, 可免去 RFLP 中的探针的克隆制备、同位素标记、杂交等步骤; RAPD 引物现已商品化, 而且无生物种属特异性, 同样一套引物可用于不同生物基因组的分析, 并且可以检测整个基因组; RAPD 所需模板 DNA 量少, 每个反应仅需要几十纳克的模板 DNA, 能在短时间内分析大量样本; 操作简便易行, PCR 扩增产物, 经琼脂糖凝胶电泳 EB 荧光染色后就能检测到 DNA 序列的多态性, 当然有的研究者为了增加 RAPD 带型的分辨率, 而采用聚丙烯酰胺凝胶电泳银染的方法。不过这样操作要复杂一些。RAPD 标记一般表现为显性遗传, 扩增产物只能记为“有或无”, 因此不能鉴别出杂合子与纯合子, 在杂交研究中, 如果在每一位点父母本皆为纯合, 则在父母本中显现的条带均应出现在杂交 F₁ 代中, 而在 F₂ 代中, 多态性条带应该以 3:1 的比例分离。

Paras 等 (1993) 提出了一种将 RAPD 标记转化为特异序列扩增区域标记 SCAR (se-

quence characterized amplified region)的新方法, 将目标材料作 RAPD分析之后呈多态性的片段克隆之后, 根据测序结果设计长为 18~24 bp的引物, 重新进行 PCR扩增检测是否还能扩增出原来的多态性, 这样转化成功的标记就称为 SCAR标记。由于 SCAR标记所用的引物长, 因此它具有更高的重复性, 且 SCAR标记有时呈现出共显性遗传的特点, 它比 RAPD和其他利用随机引物的标记方法在基因定位和遗传作图中有更好的应用前景。

RAPD标记局限性主要是再现性差。由于采用的引物短, T_m 值低, 扩增结果易受外界因素的影响, 造成实验的重复性较差。但研究者普遍认为, 只要对 RAPD标记的试验条件进行摸索后, 将其标准化, 就可以提高 RAPD标记的再现性。此外, 由于存在共迁移的问题, RAPD的扩增产物在不同个体中出现的相同分子量带, 并不能保证这些个体拥有同一条(同源)片段; 同时, 在胶上看见的一条带也有可能包含了不同的扩增产物, 因为所用的凝胶电泳类型只能分开不同分子量大小的片段, 而不能分开有不同碱基序列, 但有相同分子量大小的片段。尽管如此, 由于该技术操作简单、快速, 因此一经诞生即受到重视, 现已被广泛用于基因定位、连锁标记、物种识别及遗传多样性检测、种质资源鉴定和系统学研究等许多方面。

RAPD标记技术在藻类学研究中应用最为广泛, 常被用来进行藻类种群的遗传变异分析 (Bouza et al., 2006; Coyer et al., 1997; Engelen et al., 2001; Faugeron et al., 2001; Faugeron et al., 2004; Wright 2000)。Vahk等(2000)用 RAPD标记, 对 *Furcellaria lumbicalis* (Gelatinales, Rhodophyta) 分属于波罗的海的 12个居群的 12个样本进行了遗传多样性分析。UPGMA聚类分析将其分为 4个簇群, 12个样本中存在着很高的遗传多样性, 每个样本均能和其他的样本彼此分开, 这可能是由于藻体的漂浮扩散以及基因组的重排或是该藻的有性繁殖方式引起的。Meneses等(1996)利用 RAPD标记对位于智利 3个不同地点的 *Gracilaria chilensis* 的自然群体和养殖群体进行了研究, 在种群内或种群间存在较高的多态性, 聚类分析表明有两个地点的 *G. chilensis* 个体混杂聚在一起, 另一个地点的个体单独成为 1个类群。这表明由于移植的作用, 使得前两个地点的种群的遗传相似性比较接近; 与智利本土和来源于瑞典的 *G. tenuitipitata* 的样本之间的遗传相似性 (0.45~0.53) 相比, 本土种群之间的遗传相似性要高 (0.74~0.88), 这表明智利本土的江蓠均属于一个种为 *Gracilaria chilensis*。Dutche等(1994)利用 RAPD标记对紫菜属 (Porphyra) 的 3个种做了个体间、居群间和种间关系分析, 发现北大西洋和墨西哥湾不同区域的 3种紫菜的 6个不同株系, 既有在遗传上同型的居群, 又有异型的居群, 种间的相似性为 40%~66%。Albert等(1997)利用 RAPD标记对葡萄牙南部的 3个石花菜 *Gelidium sesquipedale* 自然种群进行了遗传分析, 分析表明 3个种群之间的遗传相似性非常高, 距离远的相似性较低。Yeh等(2000)对台湾 *Caulerpa* 的种群用 RAPD标记进行了分析, 研究表明种间及种内的遗传变异的差异不明显, 且遗传变异和地理距离没有相关性。

进化的基本单位不是个体而是居群, 进化就是居群间基因库的改变。居群遗传结构就是遗传变异或者说基因和基因型在时间和空间上的分布样式。对群体遗传结构及其影响因子的研究是群体遗传学中的重要部分。在藻类中, Faugeron等(2004)利用 RAPD标

记对智利南部海岸 *Gigartina skottsbergi* 种群的遗传结构进行了研究。利用 17 个 RAPD 标记对周边 2 个种群及中部的 4 个原始种群总共 113 个单倍体个体进行了等位基因的多样性 (H_s) 及等位基因数目多少 (A) 的研究。表明过度的采集使得 *G. skottsbergi* 周边种群的遗传多样性与中部的原始种群相比明显较低, 且周边种群的遗传分化明显较高 ($F_{st} = 0.35 > F_{st} = 0 \sim 0.25$)。Martínez 等 (2003) 用 RAPD 标记对智利北部潮间带延伸 600 km 的昆布 *Lessonia nigrescens* 的遗传恢复进行了研究, 研究发现 20 年前遭受 El Niño 效应后大面积死亡的 *Lessonia nigrescens* 遗传多样性远低于其他地域的遗传多样性的 1/2。这说明藻类自然种群的遗传多样性一旦遭到毁灭性的破坏是很难恢复的。Engel 等 (2001) 用 RAPD 标记研究了风向、海湾等因素对 Curacao 岛 (Netherlands Antilles) 潮间带及潮下带的马尾藻 (*Sargassum polyceratum*) 的遗传多样性及遗传结构的影响, 结果表明, 不同海湾间的种群遗传多样性有差别, 但种群间并未完全隔离, Mante 检验表明在岛的两面因距离远近而引起的遗传分化均显著, 但处于上风向的一面, 这种遗传分化尤为显著。

不少研究者对 RAPD 技术局限性提出质疑。Van Oer 等 (1996) 详细研究并总结了 RAPD 标记在生物地理种群分析中的应用, 作者发现由于技术本身及 RAPD 重复性的原因, RAPD 标记比较适合于大距离范围内的生物种群分析, 如几百或几千公里, 当距离缩短时, RAPD 标记就会表现出较大的分析误差。Coyer 等 (1997) 对海带目的研究表明, RAPD 可以很好区分间隔 16 ~ 250 km 的群体的遗传变异, 但无法区分间隔 1 ~ 25 m 的群体的变异。另外, Faugeton 等 (2001) 利用 17 个 RAPD 标记对智利中部不同空间范围内 *Mazzaella laminaripides* 的 288 个配子体的遗传分化进行了研究。在 30 m 的距离内, 遗传距离与地理距离没有相关性; 而在 5 ~ 60 km 的空间范围内, 可以明显的观察到随着地理间隔的增大, 遗传距离也相应的增大, 这表明基因的流动只发生在临近的种群之间; 间隔 60 km 的居群之间的遗传分化 ($F_{st} > 0.25$) 明显高于间隔距离为 5 km 的居群之间的遗传分化 ($F_{st} = 0.07$), 而在更低的距离内遗传分化只有 $F_{st} = 0.025$ 。

RAPD 标记可用于藻类种间及种内的鉴定。Ho 等 (1995) 利用 RAPD 标记对不同种的马尾藻 (*Sargassum*) 进行了研究, 表明该技术可用于区分同属不同种的马尾藻, 也可作为同种下不同个体的指纹图谱。Baillie 等 (2000) 利用 RAPD 标记对寄生于巨蛤上的虫黄藻进行了遗传变异的分析, 分析表明不仅寄生于不同种巨蛤的, 而且寄生于同种巨蛤的不同个体的, 甚至寄生于同种巨蛤的同种个体的虫黄藻均存在着遗传变异。Murayama 等 (1998) 研究表明 RAPD 标记不仅适用于不同种赤潮藻 *Chattonella* 的区分鉴定, 而且也适用于同种的不同株。Park 等 (1998) 利用 31 个随机引物对采自韩国 6 个不同地域的 *Hizikia fusiformis* 的 6 个样本进行了遗传变异的研究, 结果表明这 6 个样本的遗传相似性介于 23% ~ 59% 之间。Ji 等 (2000) 利用多个 RAPD 位点来区分不同的紫菜品系 (Weng et al., 2005)。Wang 等 (2004) 建立了 15 种中国海带养殖品系配子体的 RAPD 种质鉴定指纹图谱, 并将其中 3 个 RAPD 位点转化为配子体特异的 SCAR 标记。

RAPD 标记也可用于藻类的杂种优势的研究中。Pawar 等 (1994) 首次将 RAPD 标记用于石花菜 *Gelidium vagum* 的杂种优势研究过程中, 用 RAPD 标记可以确认子一代的杂种性。Bilo 等 (1999) 将 RAPD 标记用于海带的亲本鉴定, 在一个包含 4 个母本的随

机杂交过程中, 利用 RAPD 标记可以辨认子代的亲本。

遗传图谱的构建是当前分子遗传学研究中的热点, RAPD 标记也在构建高密度的遗传图谱中起重要作用。每个 RAPD 片段可作为分子图谱的一个位点, 大量的 RAPD 位点既可以使原有的根据形态性状或 RFLP 构建的遗传图谱变得更饱和, 加大定位基因的密度, 也可以单独构建连锁图。在高等植物中用 RAPD 构建的遗传图谱已应用于各种重要的农作物材料中, 藻类方面少有报道, Harn 等 (1996) 首次尝试利用 RAPD 标记和一个 RFLP 标记构建了衣藻 *Chlamydomonas eugametos* 的连锁图谱。

除此之外, Santelices 等 (1996) 对江蓠 *G. chilensis* 孢子混合附生的异质性进行了研究, 异质性藻体表现为多态性, 而单一藻体则表现为单态性。Meneses 等 (1999) 利用 RAPD 技术对 *G. chilensis* 的营养生殖的遗传变异受培养环境条件的影响进行了研究, 结果表明, 遗传变异对培养环境的依赖具体表现为遗传相似度分布的变化, 当从野外移至实验室时, 低遗传相似度的频率降低, 而中等遗传相似度的频率则升高。

四、扩增片段长度多态性 (AFLP) 及其在藻类中的应用

AFLP (amplified fragment length polymorphism) 技术是由荷兰科学家 Zabeau 等 (1993) 发明的一种新型的 DNA 分子标记技术, 它结合了 RFLP 技术的可靠性及 RAPD 技术的高效性, 并克服了两者的弱点, 一次 PCR 反应可以检测大量的遗传位点, 被认为是分子标记技术中多态性最丰富的一种。其遗传多样性的分子机理与 RFLP 方法相似, 来源于限制性酶切位点的碱基的缺失与替换, 或像 RAPD 那样, 来源于 PCR 引物结合位点碱基的变化。

AFLP 分析的原理是, 基因组 DNA 经两种常用的限制性内切酶 (识别位点为 4 碱基的 *Mse*I 和识别位点为 6 碱基的 *Eco*RI) 消化后, 在限制性片段两端连接上人工接头, 根据接头序列和限制位点临近区域的碱基序列, 设计含有随机变化的选择性碱基的 PCR 引物来进行特异性 PCR 扩增, 只有那些跟限制性位点的侧翼序列与引物 3' 端选择性碱基相匹配的片段才能得到扩增, 扩增的片段主要是两个酶组合后产生的片段, 经变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后, 可通过同位素标记显影, 银染显示出多态谱带, 也可将荧光标记的 AFLP 产物在 ABI 377 自动测序仪上做荧光检测, 用软件 GeneScan 扫描分析后, 根据峰值来统计多态性。

AFLP 技术的特点在于其原理和 RAPD 相似, 不需要预先知道 DNA 序列的信息, 因而可用于研究没有任何分子生物学研究基础的物种; 还可用于 AFLP 分析的限制性内切酶与选择性碱基组合的数目和种类; 所产生的标记数目非常丰富; 其多态性远远超过其他分子标记, 在变性聚丙烯酰胺凝胶上电泳可检测到 50 ~ 100 条 AFLP 扩增产物; 模板用量少, 而且对模板浓度的变化不敏感, 由于利用特定引物扩增, 退火温度高, 因而假阳性低, 可靠性高; AFLP 标记多数为共显性表达, 表现为孟德尔遗传。但 AFLP 技术也受试验步骤多、流程长、需要优化每一步的试验条件等局限性。如模板 DNA 的纯化, 内切酶的选择与完全消化、接头的连接效率、预扩增的条件与产物的稀释、选择性扩增时引物组合的筛选 (选择碱基的数目与组成)、引物对浓度的比例以及在现实可能条件

下检测手段的确定等。此外, 由于 AFLP 技术受专利保护, 目前用于分析的试剂盒价格昂贵、分析成本高, 也是该技术的不足之处。

AFLP 技术已被广泛用于基因鉴定、基因作图、基因表达和遗传多样性等研究中, 是一种比较好的分子标记。而在藻类中的应用刚刚起步 (Kusumo et al., 2000; Donaldson et al., 2000)。Donaldson 等 (1998) 首次将该技术用于皱波角叉菜 (*Chondrus crispus* Stackh) 的分析, 从 25 对引物组合中筛选出了 6 对用来做进一步的研究, 每个引物对得到的条带数从 3~25 不等, 从居群间或居群内鉴定了一批保守或多变标记, 并且一些标记对某些个体来说是独特的, 证明了 AFLP 可作为一种遗传标记用于藻类的居群遗传研究, 并且发现 AFLP 标记在种群内及种群间的多态性太高, 以至于无法进行分析。这可能是由于角叉菜本身的遗传变异过高的缘故。此外, 对 AFLP 的重复性进行研究后发现, 对于同一批次的 DNA 虽然 AFLP 的带型一致, 但是带的强弱有所不同, 而对于不同批次的 DNA 得不到一致的带谱, 因此, DNA 模板的质量对于 AFLP 分析至关重要 (Donaldson et al., 2000)。Schaeffe 等 (2002) 曾成功地利用 AFLP 标记对同种 *Lithothamnium magaricae* (Rhodophyta) 的两种形态差异较大的种群进行了种群间及种群内的分析, 结果表明两种不同生长形态的种群虽属于同一种, 但其遗传分化较大, 个体的 AFLP 带谱式样与邻近不同生长形态的个体差异很大, 而与 250 km 之外的同一生长形态的个体却非常接近。两种不同种群内的遗传相似性分别为 0.75~0.85 和 0.55~0.67。这表明两种形态之间的基因流动非常有限, 这跟其营养体断裂生殖方式有关, 也有可能这两种不同形态的种群, 实为两个不同的种。Kusumo 等 (2000) 利用 AFLP 标记, 对加拿大及美国太平洋沿岸的 *Alaria marginata* Postels 和 Ruprecht 的种群遗传结构进行了研究, 在用 206 个 AFLP 标记, 对相隔几分米到 185 km 的 3 个不同区域的 71 个样本进行了遗传相似度的分析后, 发现遗传相似性明显地随着地理间隔距离的增大而降低, 当间隔距离为几个分米时, 相似性为 76%, 间隔距离增至 15 m 时为 71%, 而距离为 185 km 时则为 67%; 此外, 研究者还发现处于没有风浪处的几个区域的遗传相似性要高于位于浪溅处的区域的相似性值; 即使同一区域的遗传相似性在不同季节时也有变化。这可能是由于不同季节由不同世代的藻体占优势的缘故。Manschreck 等 (2002) 对 *Chara* (Chlorophyta) 属的 3 个种 *C. hispida*, *C. intermedia* 和 *C. tomentosa* 的 33 个样本的种间及种内的遗传变异进行了 AFLP 分析, 筛选出的 6 对引物组合共检测出了 1265 个多态性位点, 其中 99% 的位点是多态性位点, 种内的 AFLP 标记的多态性比率分别为 *C. hispida* (85.3%), *C. intermedia* (83.3%) 和 *C. tomentosa* (91.4%)。这表明种内的遗传变异非常高, 这也与种内表现出的形态的多样性相一致, 聚类分析的结果与以形态为基础的分类相一致。此外, Werne 等 (2001) 在衣藻 *Chlamydomonas reinhardtii* 中发现了一些与交配型 $m+$ 连锁的 AFLP 标记, 并将其中几个成功地转化为 SIS (sequence tagged site) 标记。

五、微卫星标记 (Microsatellite) 及其在藻类中的应用

在真核生物基因组内存在着大量的重复序列, 微卫星 DNA (microsatellite DNA) 是其中的一种, 又称为 SSR (simple sequence repeat), 其重复单位一般由 1~6 个碱基组

成, 重复次数在 10~60 之间, 长度一般为几十个碱基数。由于这些序列广泛存在于基因组中, 且串联重复的数目是可变的而呈现出高度多态性, 因而可作为比较理想的分子标记, 称为微卫星标记。

微卫星标记常用 PCR 方法检测。虽然微卫星 DNA 分布于整个基因组的不同位置上, 但其两端的序列多是相对保守的单拷贝序列。根据此序列设计一对特异性引物, 利用 PCR 技术, 扩增每个位点的微卫星 DNA 序列, 通过电泳分析, 即可显示不同基因型个体的微卫星的多态性。这种多态性来源于微卫星 DNA 在基因组的不同位置上的重复次数的不同及重复程度的不完全。

微卫星标记与其他标记技术相比, 重复性好, 稳定可靠, 具有许多优点, 如检测出多态性的频率极高, 而 RFLP 技术在某一位点处仅能发现 2~3 个等位变异, 但微卫星标记可找到多达 29 个等位变异; 微卫星标记为共显性标记, 可鉴别出杂合子和纯合子; 对模板 DNA 的质与量要求不苛刻等。其缺陷在于, 微卫星标记必须依赖测序设计引物, 开发成本高。但目前许多物种已有现成的、商品化的 SSR 引物, 对于一般实验室而言, 只需利用现成的 SSR 引物进行 PCR 扩增, 即可分析 DNA 的多态性。目前 SSR 标记已广泛应用于遗传作图和种质鉴定等。

Zietkiewicz 等 (1994) 在 SSR 标记的基础上又开发成功了一种新的分子标记 ISSR (Inter simple sequence repeat polymorphic DNA), 其具体做法是用结合于两个相邻 SSR 区域内的引物去扩增它们中间的单拷贝序列, 然后通过电泳检测其扩增产物的多态性。其引物由 1~4 个碱基组成的串联重复和几个非重复的锚定碱基组成随机引物, 从而保证了引物与基因组 DNA 中的 SSR 的 5' 和 3' 末端结合, 通过 PCR 反应扩增微卫星之间的 DNA 片段。同 SSR 标记相比, ISSR 不需要预先知道基因组的序列信息, 因而大大节约了实验的前期准备工作, 因而在其创立时间不久, 即得到广泛应用。

微卫星标记目前在藻类中的应用还比较少, 其应用的前提是必须开发重复序列两翼的特异性引物 (Billot et al., 2003; Coyer et al., 2003; Van et al., 2000-2003; Engel et al., 2004)。Billot 等 (1998) 从 *Laminaria digitata* (Phaeophyta) 孢子体基因组中分离和鉴定了 10 个微卫星标记。研究者从构建的两个部分基因文库中, 通过探针杂交, 从 216 个阳性克隆中筛选出 48 个含有序列长度超过 20 bp 的微卫星序列, 设计引物在 50 个孢子体中验证后, 发现只有 10 个标记有多态性, 最多的一个微卫星标记在一个位点处有 17 个等位基因。而 Luc 等 (1999) 对江蓠 *G. gracilis* 进行 SSR 分析得到了 9 个多态性微卫星位点。

尽管微卫星标记在藻类中的开发刚刚起步, Wattie 等 (1997) 用分离到的 4 个微卫星标记对世界范围内的江蓠 *G. gracilis* 进行了分析, 发现 G₁AAG 和 G₁AAC 位点没有等位基因变异, 而另两个微卫星探针 G₁CT 和 G₂CT 在种群内显示出高度的多样性, 93% 的种群个体有独特的基因型, 因此该探针为江蓠科中不同物种的识别提供了有用的遗传标记。

Vis (1999) 用 ISSR 技术对采自美国宾夕法尼亚州的 Powdermill 河流的一种红藻串珠藻 *Batrachospermum boyanum* 进行了种群内的遗传多样性分析, 5 条引物在 15 个配子体中产生了 57 条不同的带, 每一个配子体的综合带型都不完全相同, 个体之间的相似百

分比在 41% ~ 82%。因此 ISSR 标记似乎在区分居群间的单个配子体时是有用的。构建的邻接树 (NJ tree) 并没有表现出一种基于位置的从上游到下游的居群结构的分布, 而是采自最上游位点的个体与最下游个体的关系最近, 这些都说明了基因的高度流动或是分散。Hall 等 (2002) 也采用 ISSR 标记对美国东北部 9 个州的 9 条河流其中俄亥俄州一条河流的上、中、下游总共 11 个区段的 *B. hemithosum* (*Batrachosperma* sp. *Rhodophyta*) 进行了种群的遗传变异分析, 每个区段平均包含 15 个样本。对所有个体的比对分析表明在 9 条河流中有显著的遗传分化 ($P < 0.05$), 但是种群的遗传变异与地理间隔没有相关性。对俄亥俄州一条河流上、中、下游 *B. hemithosum* 的遗传分析表明, 三者之间的遗传变异 (21%) 远低于它们之内的遗传变异 (79%)。Wang 等 (2005, 2006) 利用 ISSR 检测技术检测了中国养殖海带和裙带菜配子体的遗传多样性, 表明养殖海带、裙带菜各品系经过长时间的人工选择之后其遗传组成发生了不同程度的变异。

六、单核苷酸多态性 (SNP) 及其在藻类中的应用

由单核苷酸差异引起的遗传多态性特征的 DNA 区域, 可以作为一种 DNA 标记, 即新发展起来的 SNP (Single nucleotide polymorphism) 标记。SNP 在大多数基因组中存在较高的频率, 在人类基因组中平均每 1300 碱基对就有一个 SNP 存在。理论上, 在每个 SNP 位点可以存在 4 个等位基因, 如 A G T C, 但实际上大多数 SNP 位点只有两个等位基因, 即 (A/T 或 G/C), 所以 SNP 的最大的杂合度为 50%。尽管单一的 SNP 所提供的信息量远小于现在常用的遗传标记, 但是由于 SNP 数量丰富, 可以进行自动化检测, 同时, SNP 标记是一种共显性标记, 因此, SNP 有广泛的应用前景。

鉴定 SNP 标记的主要途径有单链构象多态性分析 (SSCP)、同源双链分析和 DNA 测序。DNA 测序是鉴定 SNP 最常用、最精确的方法。其中随机鸟枪法测序、使用 PCR 方法的扩增子的测序以及 EST 的比较分析是最常用的方法。大规模的 SNP 鉴定则要借助于 DNA 芯片技术。尽管 SNP 标记已成为人类遗传研究的有力工具, 但迄今为止, SNP 在植物遗传与育种中应用的研究报道不多, 其主要原因是通过大规模测序去寻找基因组中 SNP 标记的成本太高所致。

SNP 在藻类中的应用迄今为止, 只见有两例相关的报道。Zuccarello 等 (1999) 运用 SSCP 方法对 *Bosmina montana* 质粒的变异和亲本遗传进行了分析。通过 SSCP 检测质粒编码的 *lbc* 酶大、小亚基的间隔区的 DNA 序列的变异, 发现 *B. montana* 质粒中的 3 种变异模式, 揭示了不同品系间杂交的物质基础, 这说明 SSCP 是一种快速检测红藻种群中质粒变异的方法。

Batley 等 (2003) 利用 ShuPE (Single nucleotide primer extension) 对 500 个 *Nodularia* (*Cyanobacteria*) 丝状体在 3 个基因 DNA 的 IIS 藻胆体蛋白的基因间隔区 (PC-IGS) 及编码气囊主要结构蛋白的基因 (*gluPA*) 处的 SNP 进行了检测, 研究表明 97% 的个体在 3 个基因区域的 SNP 表现为同一基因型, 2.4% 的个体在两个区域处表现为同一基因型, 剩余的 0.4% 没有产物。该研究表明, 该方法适用于含有大量个体的群体遗传学研究。

七、展 望

人类基因组测序的成功, 将生物学研究带入了“组”学时代(基因组学、蛋白组学、转录组学、代谢组学等)。基因组作为多态性最高的“标记”已被广泛用于生物学的各个领域。在藻类中, 除了几种单细胞蓝藻和一种硅藻(*Thalassiosira pseudonana*)的基因组全序列得到阐明以外, 大型海藻的基因组测序正处于酝酿当中。不过, 许多藻类的叶绿体和线粒体的基因组序列已经测序成功。我们相信新型的“标记”会在藻类的进化及遗传的研究中起重要作用。尽管如此, 各种 DNA分子标记仍将在藻类及遗传的各研究领域发挥重要的作用, 采用哪种分子标记进行研究, 这主要取决于研究的目的, 以及对各种分子标记方法的特点有清楚的认识, 尤其对于处于“组”学研究前夜的藻类, 更是如此。

参 考 文 献

- Abo K, Ecoshi K, Noda H. 1996. Isozyme from conchozooids and leaf thalli of *Porphyra* species. *Fish Sci* **62**: 367~371
- Alberto F, Santos R, Leite JM. 1997. DNA extraction and RAPD markers to assess the genetic similarity among *Gelidium* sessile (Rhodophyta) populations. *J Phycol* **33**: 706~710
- Baillie B K, Bekla-Baillie C A, Silvestre V et al. 2000. Genetic variation in *Symbiodinium* isolates from giant clams based on random amplified polymorphic DNA (RAPD) patterns. *Mar Biol* **136**: 829~836
- Batley J B, Hayes P K. 2003. Development of high throughput single nucleotide polymorphism genotyping for the analysis of *Nodularia* (Cyanobacteria) population genetics. *J Phycol* **39**: 248~252
- Benzie JA H, Ballment E, Chisholm J R M, Aubert J M. 2000. Genetic variation in the green alga *Caulerpa taxifolia*. *Aquatic Botany* **66**: 131~139
- Benzie JA H, Price IR, Ballment E. 1997. Population genetics and taxonomy of *Caulerpa* (Chlorophyta) from the Great Barrier Reef, Australia. *J Phycol* **33**: 491~504
- Bhattacharya D, Durell L D. 1987. Molecular genetic analysis of variation in *Costaria costata* (Turner). *Saunders Hydrobiologia* **151/152**: 63~67
- Bilbıtç, Boury S, Benet H, Kloareg B. 1999. Development of RAPD markers for parental analysis in *Laminaria digitata*. *Botanica Marina* **42**: 307~314
- Bilbıtç, Rousvoal S, Estoupa E, Pellen J T, Saumitou-Laprade P, Valero M, Kloareg B. 1998. Isolation and characterization of microsatellite markers in the nuclear genome of the brown alga *Laminaria digitata* (Phaeophyceae). *Mol Ecol* **7**: 1778~1790
- Bilbıtç, Engel C R, Rousvoal S, Kloareg B, Valero M. 2003. Current patterns, habitat discontinuities and population genetic structure: the case of the kelp *Laminaria digitata* in the English Channel. *Mar Ecol Prog Ser* **253**: 111~121
- Bolch C J, Blackbum S J, Neilan B A, Grøve P M. 1996. Genetic characterization of strains of *Cyanobacteria* using PCR-RFLP of the *cpbA* intergenic spacer and flanking regions. *J Phycol* **32**: 445~451
- Botstein B, White R L, Skolnick M et al. 1980. Construction of a genetic linkage map using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet* **32**: 314~331
- Bouza N, Caujale-Castells J, González-Perez M A, Sosa P A. 2006. Genetic structure of natural populations in the red alga *Gelidium canariense* (Gelidiales, Rhodophyta) investigated by random amplification polymorphic DNA (RAPD) markers. *J Phycol* **42**: 304~311
- Brosloff W N, Gordon M E. 1997. Allozyme variation in New Zealand *Porphyra* (Rhodophyta). *N Z J Bot* **35**: 203~220

- Candia A, Gonzalez W A, Montoya R, Gomez P, Nelson W. 1999. Comparison of ITS RFLP patterns of *Gracilaria* (Rhodophyceae: Gracilariaceae) populations from Chile and New Zealand and an examination of interfertility of Chilean morphotypes. *J Appl Phycol* **11**: 185~193
- Cheney D P, Babbel G R. 1978. Biosystematic studies of the red algal genus *Eucheuma*. 1. Electrophoretic variation among Florida populations. *Mar Biol* **47**: 251~264
- Cooper J A, Olsen J L, Stam W T. 1997. Genetic variability and separation in the sea palm kelp *Postelsia palmaeformis* (Phaeophyceae) as assessed with M13 fingerprints and RAPDs. *J Phycol* **33**: 561~568
- Cooper J A, Peters A F, Stam W T, Olsen J L. 2003. Post-ice age recolonization and differentiation of *Fucus serratus* L. (Phaeophyceae: Fucales) populations in Northern Europe. *Mol Ecol* **12**(7): 1817~1829
- De Wreede R E, Klinger T. 1988. Reproductive strategies in algae. In *Plant Reproductive Ecology* (Doust J L, & Doust L L, editors). 267~284. Oxford University Press, New York
- Donaldson S L, Chopin T, Saunders G W. 2000. An assessment of the AFLP method for investigating population structure in the red alga *Chondrus crispus* Stackhouse (Gelatinales: Florideophyceae). *J Appl Phycol* **12**: 25~35
- Donaldson S L, Chopin T, Saunders G W. 1998. Amplification fragment length polymorphism (AFLP) as a source of genetic markers for red algae. *J Appl Phycol* **10**: 363~370
- Dutcher J A, Kapraun D F. 1994. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) identification of genetic variation in three species of *Porphyra* (Bangiales: Rhodophyta). *J Appl Phycol* **6**: 267~273
- Engel C B, Desombere C, Valero M. 2004. Mating system and gene flow in the red seaweed *Gracilaria gracilis*: effect of haploid-diploid life history and intertidal rocky shore landscape on fine-scale genetic structure. *Heredity* **92**(4): 289~298
- Engelen A H, Olsen J L, Breman A M, Stam W T. 2001. Genetic differentiation in *Sargassum polyceratum* (Fucales: Phaeophyceae) around the island of Curaçao (Netherlands Antilles). *J Phycol* **139**: 267~277
- Fain S R, Druehl L D, Baillie D L. 1988. Repeat and single copy sequences are differentially conserved in the evolution of kelp chloroplast DNA. *J Phycol* **24**: 292~302
- Faugeron S, Martinez E A, Correa J A, Cardenas L, Desombere C, Valero M. 2004. Reduced genetic diversity and increased population differentiation in peripheral and overharvested populations of *Gelatina skottsbergii* (Rhodophyta: Gelatinales) in southern Chile. *J Phycol* **40**: 454~462
- Faugeron S, Valero M, Desombere C, Martinez E A, Correa J A. 2001. Hierarchical spatial structure and discriminant analysis of genetic diversity in the red alga *Mazzaella laminarioides* (Gelatinales: Rhodophyta). *J Phycol* **37**: 705~716
- Frankel O H, Brown A H D, Burdon J J. 1995. The Conservation of Plant Biodiversity. Cambridge University, Cambridge
- Goff L J, Coleman A W. 1988. The use of plastid DNA restriction endonuclease patterns in delineating red algal species and populations. *J Phycol* **24**: 357~368
- Grudzicker T, Williams J, Sharp P et al. 1974. Physical mapping of temperature sensitive mutations of adenoviruses. *Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology* **39**: 439~446
- Hall M M, Vis M L. 2002. Genetic variation in *Barraclospemum hemithosum* (Barraclospemales: Rhodophyta) among and within stream reaches using intersimple sequence repeat molecular markers. *Phycologia* **50**: 155~162
- Haring M A, Schuring F, Urbanus J, Musgrave A, Van der Ende H. 1996. Random Amplified Polymorphic DNA markers (RAPDs) as tools for gene mapping in *Chlamydomonas eugametos* (Chlorophyta). *J Phycol* **32**: 1043~1048
- Ho C L, Phang S M, Phang T. 1995. Application of polymerase chain reaction (PCR) using random amplified polymorphic DNA (RAPD) primers in the molecular identification of selected *Sargassum* species (Phaeophyta: Fucales). *Eur J Phycol* **30**: 273~280
- Inasawan S, Gordon M E, Daugherty C H, Lindsay G C. 1993. Assessment of allozyme variation among New Zealand populations of *Gracilaria chilensis* (Gracilariaceae: Rhodophyta) using starch-gel electrophoresis. *Hydrobiologia* **260/261**: 159~165
- Jia J H, Wang P, Jin D M et al. 2000. The application of RAPD markers in diversity detection and variety identification of *Porphyra*. *Acta Botanica Sinica* **42**(4): 403~407
- Johansson G, Sosa P A, Snoeijis P. 2003. Genetic variability and level of differentiation in North Sea and Baltic Sea popula-

- tions of the green alga *Cladophora rupestris* MarBiol **142**: 1019~1027
- Kusumoto H T, Druce L D. 2000. Variability over space and time in the genetic structure of the winged kelp *Alaria mairii* MarBiol **136**: 397~409
- Lindstrom S S, Cole K M. 1991. Relationships between some North Atlantic and North Pacific species of *Porphyr*a (Bangiales Rhodophyta): evidence from isozymes morphology and chromosomes Can J Bot **70**: 1355~1363
- Luo H, Morchen M, Engel C R, Destombe C, Epplein J T et al. 1999. Characterization of microsatellite markers in the red alga *Gracilaria gracilis* Mol Ecol **8**(4): 700~702
- Mannschreck B, Fink T, Melzer A. 2002. Biosystematics of selected Chara species (Charophyta) using amplified fragment length polymorphism Phycologia **41**(6): 657~666
- Markert C L, Miller F. 1959. Multiple forms of enzymes: tissue ontogenetic and species specific patterns Proc Natl Acad Sci USA **45**: 753~763
- Martínez E A, Cardenas L. 2003. Recovery and genetic diversity of the intertidal kelp *Lessonia nigrescens* (Phaeophyceae) 20 years after EL Niño 1982/1983. J Phycol **39**: 504~508
- Meneses J, Santelices B. 1999. Strain selection and genetic variation in *Gracilaria chilensis* (Gracilariales Rhodophyta). J Appl Phycol **11**: 241~246
- Meneses J. 1996. Assessment of populations of *Gracilaria chilensis* (Gracilariales Rhodophyta) utilizing RAPDs. J Appl Phycol **8**: 185~192
- Murayama-Kayano E, Yoshimatsu S, Kayano T, Nishio T, Ueda H, Nagamune T. 1998. Application of the random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique to distinguish species of the red tide phytoplankton *Chattonella* (Raphidophyceae). J Fermentation Bioengineering **85**(3): 343~345
- Neefus C D, Allen B P, Baldwin H P, Matheson A C, Ecker R T, Yarish C, Miller M A. 1992. An examination of the population genetics of *Laminaria* and other brown algae in the *Laminaria* les using starch gel electrophoresis Hydrobiologia **260/261**: 67~79
- Paan J, Michmore R W. 1993. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce Theor Appl Genet **85**: 985~993
- Pawar Y M U, Van der Meer J P. 1994. Application of RAPD markers in an examination of heterosis in *Gelidium vagum* (Rhodophyta). J Phycol **30**: 91~97
- Peason E A, Murray S N. 1997. Patterns of reproduction, genetic diversity and genetic differentiation in California populations of the geniculate coralline alga *Lithothrix aspergillum* (Rhodophyta). J Phycol **33**: 753~763
- Rice E L, Bird C J. 1990. Relationships among geographically distant populations of *Gracilaria verrucosa* (Gracilariales Rhodophyta) and related species Phycologia **29**(4): 501~510
- Santelices B, Correa J A, Meneses J, Aedo D, Varela D. 1996. Sporeling coalescence and intracolonial variation in *Gracilaria chilensis* (Gracilariales Rhodophyta). J Phycol **32**: 313~322
- Saunders G W, Kraft G T. 1993. Morphological and molecular investigation of the Gigartinales Sphaerococcaeae Phaeocarpaceae and Nitzoniaceae: evidence for a taxonomic reunion. J Phycol **39** (Suppl. 7)
- Schaeffer T N, Smith G J, Foster M S, De Tomaso A. 2002. Genetic differences between two growth forms of *Lithothylum marisrubri* (Rhodophyta) in Baja California sur Mexico. J Phycol **38**: 1090~1098
- Sosa P A, Cabrea-Perez M A, Garcia-Reina G. 1996. Genetic variation of *Gracilaria cervicornis* (Rhodophyta) gametophytes from the Canary islands. Eur J Phycol **10**: 279~284
- Sosa P A, Garcia-Reina G. 1992. Genetic variability and differentiation of sporophytes and gametophytes in populations of *Gelidium arbuscula* (Gelidiales Rhodophyta) determined by isozyme electrophoresis MarBiol **113**: 679~688
- Sosa P A, Garcia-Reina G. 1993. Genetic variability of *Gelidium canariensis* (Rhodophyta) determined by isozyme electrophoresis. J Phycol **29**: 118~124
- Sosa P A, Lindstrom S C. 1999. Isozymes in macroalgae (seaweeds): genetic differentiation, genetic variability and applications in systematics. Eur J Phycol **34**: 427~442

- Stiller JW, Waaland JR 1996. *Porphyra rediviva* sp. nov. (Rhodophyta), a new species from northeast Pacific salt marshes. *J Phycol* **32** (2): 323~332
- Teasdale B, West A, Taylor H, Klein A 2002. A simple restriction fragment length polymorphism (RFLP) assay to discriminate common *Porphyra* (Bangiales, Rhodophyta) taxa from the Northwest Atlantic. *J Appl Phycol* **14**: 293~298
- Valjakka S, Makinen A, YLIMATTILA T 2000. Analysis of genetic diversity of *Furcellaria limbricalis* (Gelatinales, Rhodophyta) in the Baltic sea by RAPD-PCR technique. *Phycologia* **39** (2): 109~117
- Van der Straete H, J. Olsen J L, van der Zande L, Edwards K J, Sten W T 2000. Isolation and characterization of microsatellite loci in the benthic seaweed *Cladophoropsis membranacea* (Cladophorales, Chlorophyta). *Mol Ecol* **9**: 1442~1443
- Van der Straete H, J. van der Zande L, Sten W T, Haroun R J, Olsen J L 2003. Within-island differentiation and between-island homogeneity: non-equilibrium population structure in the seaweed *Cladophoropsis membranacea* (Chlorophyta) in the Canary Islands. *Eur J Phycol* **38**: 15~23
- Van oppen M, JH. Klerk H, De Graaf M, Sten W T, Olsen J L 1996. Assessing the limits of random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) in seaweed biogeography. *J Phycol* **32**: 433~444
- Van Oppen M, JH. Olsen J L, Sten W T 1995. Genetic variation within and among North Atlantic and Baltic populations of the benthic alga *Phycodrys rubens* (Rhodophyta). *Eur J Phycol* **30**: 251~260
- Vis M L 1999. Inter-simple sequence repeats (SSR) molecular markers to distinguish gametophytes of *Barraclospira* (Rhodophyta). *Phycologia* **38** (1): 70~73
- Wang X L, Yang Y X, Cong Y Z, Duan D L 2004. DNA fingerprinting of selected *Laminaria* (Phaeophyta) gametophytes by RAPD markers. *Aquaculture* **238**: 143~153
- Wang X L, Liu C L, Li X J, Cong Y Z, Duan D L 2005. Assessment of genetic diversities of selected *Laminaria* (*Laminariales*, Phaeophyta) gametophytes by inter-simple sequence repeat analysis. *J Integr Plant Biol*, **47** (6): 753~758
- Wang X L, Wang D, Li D P, Duan D L 2006. Genetic analysis of the gametophytes of *Undaria pinnatifida* (Phaeophyceae) with SSR method. *Aquaculture* **258**: 250~256
- Wattier R, Dallas J F, Destombe C et al 1997. Single locus microsatellites in *Gracilaria* (Rhodophyta): high level of genetic variability within *G. gracilis* and conservation in related species. *J Phycol* **33**: 868~880
- Weeden N, Wendel J 1989. Genetic of plant isozyms. In: *Isozymes in Plant Biology* (Soltis D & Soltis P, editors), 46~72. Dioscorides Press, Portland, OR
- Welsh J, McClelland M 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucl Acids Res* **18**: 7213~7218
- Weng M L, Liu B, Jin D M, Yang Q K, Zhao G, Ma J H et al 2005. Identification of 27 *Porphyra* lines (Rhodophyta) by DNA fingerprinting and molecular markers. *J Appl Phycol* **17**: 91~97
- Werner R, Olschewski J, Meegenhagen D 2001. Identification and cloning of amplified fragment length polymorphism markers linked to the mating type locus of *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyta). *J Phycol* **37**: 427~432
- Williams J G K, Kubelik A R, Livak K J, Rafalski J A, Tingey S V 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl Acids Res* **18**: 6531~6535
- Wright J T, Zuccarello G C, Steinhilber P D 2000. Genetic structure of the subtidal red alga *Delisa pulchra*. *Mar Biol* **136**: 439~448
- Yeh W J 2000. Genetic similarity of geographic *Caulerpa* (Chlorophyta) populations in Taiwan island revealed by random amplified polymorphic DNA. *J Fish Soc Taiwan* **27** (2): 115~127
- Zabeau M, Vos P 1993. Selective Restriction Fragment Amplification: A General Method for DNA Fingerprinting. International Publication Number WO93/06239. International Application Published under the Patent Cooperation Treaty (PCT), accessible through esf@cenet.databases www.espacenet.com
- Ziekiewicz E, Rafalski A, Labuda D 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* **20**: 176~183
- Zuccarello G C, Burger G, West J A, King R J 1999. A mitochondrial marker for red algal interspecific relationships. *Mol Ecol* **8**: 1443~1447

MOLECULAR MARKERS AND THEIR APPLICATIONS IN ALGAE RESEARCH

WANG X iulian^g ZHAO Fengjuan LÜ Hui LIU Jidong YAO Jianting DUAN Delin

(Institute of Oceanology Chinese Academy of Sciences Qingdao 266071)

ABSTRACT

The development of genetics has entered into new genetic markers application usage which developed one after the other from Mendelian morphological marker, cytogenetics marker, allozyme marker to DNA markers in algal research. Based on morphological features such as the colours and seed sizes of pea, Mendel discovered the famous genetic laws. The cytogenetics markers included chromosome morphology, number and structure, which can be used for gene localization. Allozymes are allelic variants of proteins produced by a single gene locus, and are of interest as markers because of the existing polymorphism. Since the 1970s, it has been used widespread for population genetics and other fields in biology. Since the last decade of the 20th century, various DNA marker techniques have been invented, such as RFLP, RAPD, AFLP, SSR and SNP. With DNA markers, it is conveniently and easily to observe and exploit genetic variation in the entire genome. However, the application of molecular markers is still in its primary level. Here the principles and characters of kinds of molecular markers were reviewed including their applications in algae research, respectively.