

石莼属(*Ulva*)和浒苔属(*Enteromorpha*) 绿藻的 RAPD 分析*

杨 君 安利佳 王 茜 王宏伟 苏 乔 康晓慧[†]

(大连理工大学生物工程系 大连 116012)

[†](大连医科大学丹东分校 丹东 118002)

提要 于 1997 年下半年在大连石庙海区采集石莼、孔石莼、砺菜、缘管浒苔、肠浒苔、管浒苔、刚毛藻等 7 种海藻样品,采用 RAPD 技术对大连地区绿藻门石莼属和浒苔属进行了初步的分子系统学研究。所试 60 个引物中有 32 个经扩增得到了 237 个多态片段。应用 PHYLIP 软件包,按照 UPGMA 法和 N-J 法聚类分析的结果均表明,缘管浒苔(*Enteromorpha linza*)与石莼属有较近的亲缘关系,应深入探究其分类地位。

关键词 石莼属 浒苔属 RAPD

学科分类号 Q789

分子生物学技术的不断发展和完善,为分类学和系统学研究提供了许多新方法。90 年代初,建立在 PCR(聚合酶链式反应)技术基础上的 RAPD(随机扩增多态性 DNA)技术一经兴起,就因其简便、灵敏、快捷等特点而被迅速应用于基因组 DNA 的多态性分析,尤其是系统学和种间亲缘关系的研究中,成为一种有效的分子标记。近年来,RAPD 技术已经被广泛应用于高等植物和海藻分子系统学研究中(李宽钰等,1997;石福臣等,1998; Patwary *et al.*, 1993; Ho *et al.*, 1995a, b; Haring *et al.*, 1996; Park *et al.*, 1998),本文利用 RAPD 技术对绿藻门石莼属和浒苔属基因组 DNA 进行了初步的分析,以期确立一种能够有效补充传统分类方法的新手段。

1 材料与方法

1.1 样品的采集与处理

实验所用的石莼目(Ulvales)、石莼科(Ulvaceae)、石莼属(*Ulva*)中的石莼(*Ulva lactuca*)、孔石莼(*U. pertusa*)、砺菜(*U. conglobata*),浒苔属(*Enteromorpha*)中的缘管浒苔(*Enteromorpha linza*)、肠浒苔(*E. intestindis*)、管浒苔(*E. tubulosa*)以及作为对照的刚毛藻(*Cladophora* sp.)共计 7 种材料(每种 10 株),均于 1997 年下半年采自大连石庙海区。用蒸馏水仔细清洗新鲜藻体,洗去泥砂和其它附着物,然后用滤纸吸干表面水分,用于 DNA 制备。

1.2 总 DNA 的提取和纯化

* 辽宁省优秀青年科研人才培养基金资助项目,963005 号。杨 君,女,出生于 1972 年 8 月,硕士,现工作单位:大连医科大学,邮编:116027, E-mail: wyangjun@263.net

收稿日期:1999-01-20,收修改稿日期:1999-06-01

参照 Doyle 等(1990)的方法并加以改进。样品经液氮研磨成粉末后,加入提取缓冲液[3% CTAB, 100mmol/L Tris-HCl (pH=8.0), 100mmol/L EDTA (pH=8.0), 1.4mol/L NaCl, 0.2%(V/V) 巯基乙醇, 1% PVP]于 60℃温育 30min, 再加入 1/3 体积 5mol/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, 将 DNA 沉降下来, 用 70% 乙醇洗涤 1—2 次后, 在无菌风下吹干, 溶于 400 μ l 1 \times TE 中(10mmol/L Tris-HCl, 1mmol/L EDTA)。当沉淀完全溶解后, 加入 RNase 于 37℃温育 30min, 然后重复氯仿-异戊醇(24:1)的抽提步骤, 在上清液中加入二倍体积无水乙醇, 将纯化后的 DNA 沉降下来。沉淀吹干后溶于 0.1 \times TE 中备用。

1.3 引物

为 Operon 公司 F 组、K 组及部分 A 组和 B 组引物, 共计 60 个。

1.4 RAPD 反应条件

反应总体积为 20 μ l, 其中包括 10 倍缓冲液[Tris-Cl 10mmol/L (pH=8.3), KCl 50mmol/L, MgCl₂ 2mmol/L], 4 种 dNTP(每种各 100 μ mol/L), 0.2 μ mol/L 引物, 20ng 基因组 DNA, 1 单位 TaqDNA 聚合酶。

1.5 RAPD 反应程序

反应混合物在加入 Taq DNA 聚合酶前, 于 96℃预变性 10min。待冷却后加入 Taq DNA 聚合酶, 在 PCR90-AD 扩增仪上扩增 45 个循环(94℃变性 60s, 36℃复性 80s, 72℃延伸 140s), 完成最后一个循环后于 72℃继续延伸 10min。

为避免因 RAPD 技术的重复性较差而影响实验结果, 作者做了多次重复实验, 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 450—2000bp 的片段, 未分析过大和过小的片段。

1.6 电泳检测

扩增产物经含 0.5 μ g/ml 溴化乙锭(EB)的 1.4% 琼脂糖凝胶电泳, 在 4V/cm 电场强度下电泳 3h 左右, 然后在紫外灯观察结果并照相。

1.7 数据处理

根据随机扩增 DNA 片段在电场中的迁移率与碱基对数目以 10 为底的对数成反比, 按照标准片段(DNA-Hind III[ANI]/EcoRI)的迁移速率绘制标准曲线, 并依此计算各扩增片段的大小。按照 Nei 等(1979)计算相似度(S)的公式: $S = 2N_{xy} / (N_x + N_y)$, 计算出多态 DNA 片段的相似度。所得数据用 Phylip 软件包分析, 利用 UPGMA 法和 N-J 法分别构建聚类图。

2 结果

2.1 所用 60 个引物中的 32 个在所有样品中都扩增得到一定大小的片段, 其中清晰可辨、片段大小在 450—2500bp 之间的扩增带作为原始数据统计, 共 237 个(图 1), 有扩增带的用“1”表示, 无扩增带或扩增带极弱的用“0”表示。实验重复两次, 扩增结果的重现性较好。

2.2 据 Nei 等(1979)公式计算出样品之间随机多态 DNA 片段的相似度(S), 见表 1。

2.3 根据公式 $D = 1 - S$ 将相似度(S)换算成遗传距离(D), 应用 Phylip 软件包, 按照 UPGMA 法(图 2a)和 N-J 法(图 2b)分别构建聚类图, 其中 N-J 法以刚毛藻为外群。

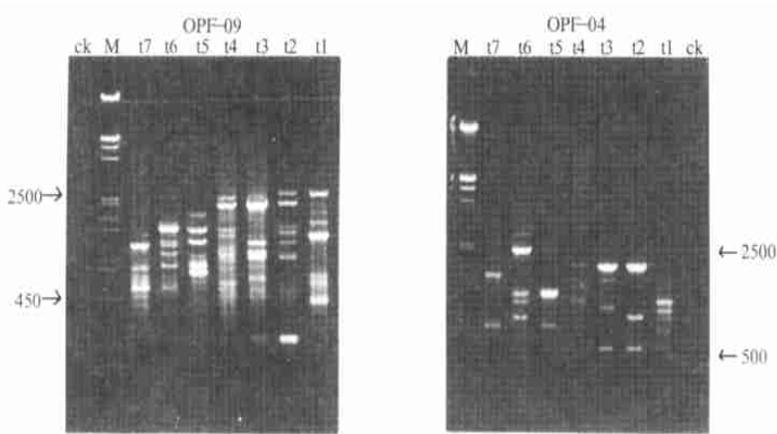


图 1 引物 OPF-09、OPF-04 扩增产物电泳图

Fig. 1 The electrophoresis patterns of RAPD by using primers OPF-04 and OPF-09
t1. 石莼; t2. 孔石莼; t3. 砾菜; t4. 缘管浒苔; t5. 肠浒苔; t6. 管浒苔; t7. 刚毛藻;
ck. 未加模板 DNA 的对照; M. λ DNA- Hind III/ EcoR I 分子量标记

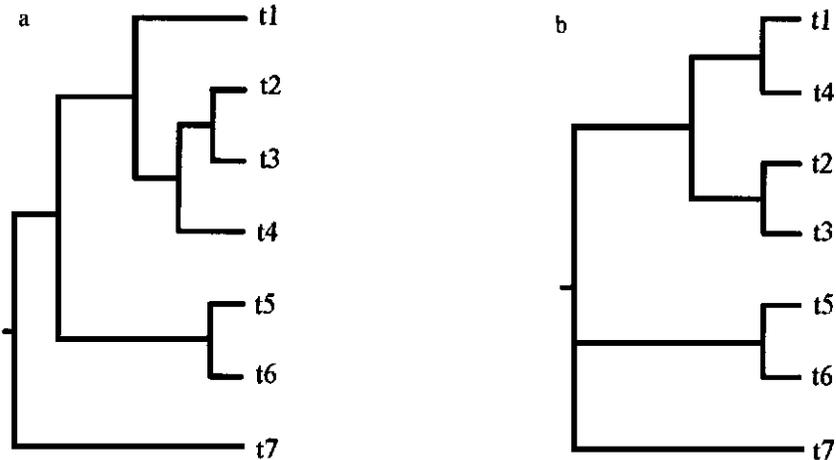


图 2 利用 UPGMA (a) 和 N-J 法 (b) 分析得到的聚类图

Fig. 2 The dendrogram based on the genetic distance matrices with UPGMA (a) and N-J (b)
注: t1. 石莼; t2. 孔石莼; t3. 砾菜; t4. 缘管浒苔; t5. 肠浒苔; t6. 管浒苔; t7. 刚毛藻

表 1 随机引物扩增多态 DNA 片段的相似度

Tab. 1 The similarity matrix of random amplified polymorphic DNA shared among seven samples

样品	t1	t2	t3	t4	t5	t6	t7
t1	1.000						
t2	0.466	1.000					
t3	0.463	0.743	1.000				
t4	0.459	0.484	0.520	1.000			
t5	0.390	0.436	0.415	0.417	1.000		
t6	0.332	0.408	0.444	0.388	0.756	1.000	
t7	0.223	0.260	0.267	0.144	0.313	0.306	1.000

注: t1. 石莼; t2. 孔石莼; t3. 砾菜; t4. 缘管浒苔; t5. 肠浒苔; t6. 管浒苔; t7. 刚毛藻

3 讨论

3.1 RAPD 与海藻分类学研究

多年以来,海藻的分类学研究一直停留在形态解剖学水平上,通常以藻体的形态、结构特征及其生殖和生活史的特点等作为划分标准。其中,由于外部形态特征比较直观、容易操作,是实践中主要应用的分类依据。但是,由于海洋的开放环境和人为因素的影响,海藻的分类标准难于统一,给分类工作带来了很大困难,不利于海藻资源的调查和利用,因此探求一种能够有效补充传统分类方法的新手段具有十分重要的意义(Ho *et al.*, 1995a, b)。

RAPD 技术自 1990 年建立以来,已经被广泛应用于高等动、植物的种属鉴定,在海藻方面也有不少研究报道。Patway 等(1993)、Madeleine 等(1995)、Ho 等(1995a, b)和 Park 等(1998)等工作表明, RAPD 技术可以作为红藻门(Rhodophyta)的石花菜属(*Gelidium*)、橡叶藻属(*Phycodrys*)以及褐藻门(Phaeophyta)的马尾藻属(*Sargassum*)的分子遗传标记,也表明 RAPD 技术可以为藻类分类工作者提供一个 DNA 分子水平的分类证据,有力地佐证传统分类结果或为解决一些分类学上多年悬而未决的问题提供一条新的途径。1996 年, Haring 等(1996)利用 RAPD 技术对绿藻 *Chlamydomonas eugametos* 进行了研究,揭示出不同品系间存在着遗传差异,其中 80% 的 RAPD 扩增片段是单拷贝的 DNA 序列,可以作为染色体步行(chromosome walking)的起始点(starting points),表明 RAPD 是一种较好的研究绿藻 DNA 多态性的标记方法。在本实验中,通过对随机扩增 DNA 多态片段的分析表明, RAPD 分析结果与传统分类结果基本一致,石莼目与刚毛藻目之间遗传距离最远,为 0.747;而在石莼目中,石莼属内的种间遗传距离为 0.443,这一数值也明显低于石莼属与浒苔属的属间遗传距离(0.596)。因此提示,通过遗传距离的分析可以基本判断出所试材料之间亲缘关系的远近。从 UPGMA 聚类分析的结果来看,除缘管浒苔先与石莼属聚为一类外,都是同属的首先聚到一起,然后是同为石莼目、石莼科的石莼属与浒苔属再聚到一起,最后才与刚毛藻目的刚毛藻聚类(图 2a)。N-J 法聚类分析的结果与 UPGMA 基本相同(图 2b),但缘管浒苔与石莼、孔石莼、砺菜聚类的先后略有不同,在 UPGMA 法中缘管浒苔先与孔石莼、砺菜聚类后,再和石莼聚在一起;而在 N-J 法中,缘管浒苔则先与石莼聚类,再和孔石莼、砺菜聚在一起。从树图的形状来看,两种方法聚类的趋势是一致的,石莼属内聚类先后的差异可能与 N-J 法选择了外群有关。因此,本文的结果表明将 RAPD 技术应用于海藻种类间的分子鉴定是可行的,可以用于进一步深入研究。

虽然 RAPD 技术在实际操作中存在着重复性较差的弊病,但是通过增大样本分析数目或细致操作,还是可以获得基本准确的实验结果,前人的工作也证实了这一点(Patway *et al.*, 1993; Ho *et al.*, 1995a, b)。

由于样本数目的局限,本实验未提供作为分子分类依据的标准片段和程序,这一结果尚需进一步的更为可靠的分子操作,如 DNA 指纹图谱、DNA 序列分析等方能获得。

3.2 缘管浒苔的分类地位

按海藻的传统分类标准,石莼属与浒苔属的主要分类特征是:石莼属藻体叶状,两层细胞;浒苔属藻体管状,单层细胞。而缘管浒苔的结构比较特殊,其基部和边缘藻体呈中空管状,单层细胞,类似浒苔属;其余部分藻体叶状,两层细胞,类似石莼属,因此对其分类

地位学者们的意见并不统一。该种是由 Linnaeus (1753) 发现, 列入石莼属, 定名为长石莼 (*Uva linza* Linnaeus), 其后瑞典分类学家 Agardh 根据特征将其转隶 (transfer) 到浒苔属内, 组合为缘管浒苔 [*Enteromorpha linza* (Linnaeus) J. Agardh] (1883)。这两种观点在很长一段时间同时存在, 如 Levring (1937)、曾呈奎等 (1962) 等许多学者同意 Linnaeus 列入石莼属的意见, 但也有不少学者同意 Agardh 转隶到浒苔属内的观点。看来, 采用传统分类方法来确定缘管浒苔的分类地位有一定的难度。本文应用 RAPD 技术从 DNA 分子水平的研究表明, 石莼属三种植物材料与浒苔属的肠浒苔、管浒苔之间的平均遗传距离为 0.596, 缘管浒苔与浒苔属肠浒苔、管浒苔之间的平均遗传距离为 0.597, 可见缘管浒苔与浒苔属这两种植物之间的差异已达到属间差异水平。聚类分析结果也表明, 不论是采用 UPGMA 还是 N-J 法都是将缘管浒苔首先与石莼属聚为一类, 表现出与石莼属有更近的亲缘关系 (图 2), 这一结果与 Linnaeus 等学者的意见一致。

致谢 本文承蒙中国科学院海洋研究所曾呈奎院士、陆保仁研究员的帮助和指导, 谨致谢忱。

参 考 文 献

- 石福臣, 木佐贯博光, 铃木和夫, 1998. 中国东北落叶松属植物亲缘关系的研究. 植物研究, 18(1): 55—62
- 李宽钰, 黄敏仁, 王明麻, 1997. 用 RAPD 探讨毛白杨的起源. 植物分类学报, 35(1): 24—31
- 曾呈奎, 张德瑞, 张峻甫等, 1962. 中国经济海藻志. 北京: 科学出版社, 42
- Agardh J G, 1883. Till algemes Systematic VI Ulvaceae. Lunds Univ Årsskr, 19(2): 134
- Doyle J J, Doyle J L, 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus, 12: 13—15
- Haring M A, Schuring F, Urlanus J *et al.*, 1996. Random polymorphic DNA primers (RAPDs) as tools for gene mapping in *Chlamydomonas eugametos* (Chloophyta). J Phycol, 32: 1043—1048
- Ho Chai-ling, Phang Siew-moi, Pang Tikki, 1995a. Application of polymerase chain reaction (PCR) using random polymorphic DNA (RAPD) primers in the molecular identification of selected *Sargassum* species (Phaeophyta, Fucales). Eur J Phycol, 30: 273—280
- Ho Chai-ling, Phang Siew-moi, Pang Tikki, 1995b. Molecular characterization of *Sargassum polycystum* and *S. siliquosum* (Phaeophyta) by polymerase chain reaction (PCR) using random polymorphic DNA (RAPD) primers. J Appl Phycol, 7: 33—41
- Levring T, 1937. Zur Kenntnis der Algenflora der norwegischen Westküste, Ibid. 2, 33(8): 18
- Linnaeus C, 1753. Species Plantarum, exhibentes plantas rite cognitatas. ad genera Relatas, Vol. 2. Salvii, Stockholm, 1163
- Madelein J H, Van Oppen, Jeanine L *et al.*, 1995. Genetic variation within and among north Atlantic and Baltic populations of the benthic alga *Phycodrys rubens* (Rhodophyta). Eur J Phycol, 30: 251—260
- Nei M, Li W H, 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proc Natl Acad Sci USA, 74: 5267—5273
- Park J W, Cho Y C, Nam B H *et al.*, 1998. RAPD identification of genetic variation in seaweed *Hizikia fusiformis* (Fucales, Phaeophyta), J Mar Biotechnol, 6: 62—64
- Patway M U, Madkay R M, Van der Meer J P, 1993. Revealing genetic markers in *Gelidium vagum* (Rhodophyta) through the random polymorphic DNA primers (RAPD) technique, J Phycol, 29: 216—222

APPLICATION OF RAPD IN ULVA AND ENTEROMORPHA (CHLOROPHYTA)

YANG Jun, AN Li- jia, WANG Qian, WANG Hong- wei, SU Qiao, KANG Xiao- hui^{*}

(*Department of Bioengineering, Dalian University of Technology, Dalian, 116012*)

(*Dalian Medical College Dandong Branch, Dandong, 118002*)

Abstract To study the classification of *Ulva* and *Enteromorpha* at molecular level, genetic variation in *Ulva lactuca*, *U. pertusa*, *U. conglobata*, *Enteromorpha linza*, *E. intestinalis*, *E. tubulosa* and *Cladophora* sp. , (obtained from Shi Miao, Dalian in 1997), was detected by using Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) markers. Amplifications with 32 primers under predetermined optional conditions (samples were first at 96 °C for 10 minutes and followed by 45 cycles of 60 seconds at 94 °C, 80 seconds at 36 °C and 140 seconds at 72 °C, and then held at 72 °C for 10 minutes) generated a total of 237 prominent amplification products. The amplified fragments were scored as present (1) or absent (0) for each sample and the similarity value (S) was calculated by using Nei and Li's matching coefficient method. The value of D ($D = 1 - S$) was used to evaluate genetic distances between species. The dendrograms were built with methods of UPGMA and Neighbor- Joining on the basis of genetic distances by using PHYLIP software. The results from the two cluster analysis methods were similar in general. And *Enteromorpha linza* was first clustered with *Ulva*, not with *Enteromorpha*, which was shown by the two phylogenetic trees. It suggests that random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers is useful in discriminating *Ulva* and *Enteromorpha*, and that the relationship between *E. linza* and *Ulva* is much close.

Key words *Ulva* *Enteromorpha* RAPD

Subject classification number Q789