

## 研究报告

### Research Report

# 基于 EST-SSR 不同地理的琼枝群体遗传差异研究

胡吟胜 杨文杰 黄勃\* 于淑楠

海南大学海洋学院, 海口, 570228

\* 通讯作者, huangbohb1@163.com

**摘要** 为研究不同海域的琼枝群体的遗传差异, 试验对海南麒麟菜保护区内 4 个地点的琼枝群体进行了遗传差异分析。结果表明: 所用的 5 对 EST-SSR 引物能扩增获得多态性条带, 检测出的观察等位基因数平均为 3.4 个, 有效等位基因数平均为 2.006 个, 琼枝群体的平均基因杂合度(Ave\_Het)为 0.489 1, 总体期望杂合度(Exp\_Het\*)为 0.532 0, 观察杂合度(Obs\_Het)平均值为 0.623 3, Shannon's 信息指数在 0.663 8~0.989 6 之间, 遗传分化显示有 20.39%的遗传变异存在于群体之间, 79.61%的遗传变异存在于群体之内。上述结果表明麒麟菜保护区内的琼枝群体存在差异。

**关键词** EST-SSR, 琼枝, 遗传多样性

## Research on the Genetic Character in Different Geographical *B. gelatinum* Using EST-SSR Marker

Hu Yinsheng Yang Wenjie Huang Bo\* Yu Shunan

The Ocean College of Hainan University, Haikou, 570228

\* Corresponding author, huangbohb1@163.com

DOI: 10.3969/gab.032.000367

**Abstract** For the study of genetic differences of *Betaphycus gelatinae* in different areas, we have comparatively analyzed the genetic diversity of *B. gelatinae* in Eucheuma reserve. The results showed that there were 5 SSR primers amplified with target bands. The numbers of observed and effective alleles were 3.4 and 2.006. Average gene heterozygosity was 0.489 1. The mean expected heterozygosity equaled 0.532 0. The observed heterozygosity was 0.623 3. Shannon information index is between 0.663 8~0.989 6. Genetic differentiation in 4 populations was 20.39%. About 79.61% of genetic variation was attributed within populations. The above results show that there are differences between *B. gelatinae* population.

**Keywords** EST-SSR, *Betaphycus gelatinae*, Genetic diversity

琼枝(*Betaphycus gelatinae*)属于红藻门, 杉藻目, 红翎菜科, 琼枝藻属(Doty and Norris, 1985)。琼枝具不规则的羽枝, 分枝可对生, 互生, 向四面伸展(匡梅等, 1999)。藻体表面多现紫红色或黄绿色, 腹面大部分为紫红色。琼枝具有食用及药用价值, 是生产卡拉胶的重要热带养殖经济红藻。在国外主要分布在菲律宾东部、日本琉球冲绳、印尼、澳大利亚, 在我国海南岛沿岸都有分布。

EST-SSR 是基于 SSR 发展起来的一种新型分子

标记技术, 反应了基因表达的转录部分。在藻类领域中, EST-SSR 技术已经被应用于浒苔属海藻(张磊, 2012)、坛紫菜(杨惠等, 2009)、大叶藻(孙典荣等, 2013)和条斑紫菜(刘必谦等, 2009)的遗传差异研究。琼枝的相关研究主要集中在养殖(方哲和鲍时翔, 2008)及生理方面(郑淑贞, 1991)的研究, 对琼枝的分子方面的研究报道比较少。文章利用 EST-SSR 技术对海南岛麒麟菜保护区 4 个不同地理上的琼枝群体遗传结构进行研究, 以期对保护区琼枝现状的评价、管理和保

基金项目: 本研究由海洋公益行业科研专项(201105008-7)、中医药行业科研专项(201207002-03)、国家 863(2012AA10A412-8)海南大学植物学国家重点学科(071001)、国家自然科学基金项目(41176084)和国家科技支撑计划项目(2009BADB2B0404-02)共同资助

护利用提供有意义的遗传背景数据。

## 1 结果与分析

### 1.1 4 株琼枝基因组 DNA 扩增结果

试验用 5 个引物将琼枝基因组 DNA 进行 PCR 扩增后, 将 PCR 产物用 3% 的琼脂糖凝胶电泳并于凝胶成像系统下拍照 结果如图 1 所示。

### 1.2 聚类图分析

电泳图中, 出现电泳条带的记为 1, 否则记为 0, 将电泳结果转换成 0、1 矩阵后, 用 ntsys2.0 软件分析相似性系数并做树状聚类图 结果见图 2。

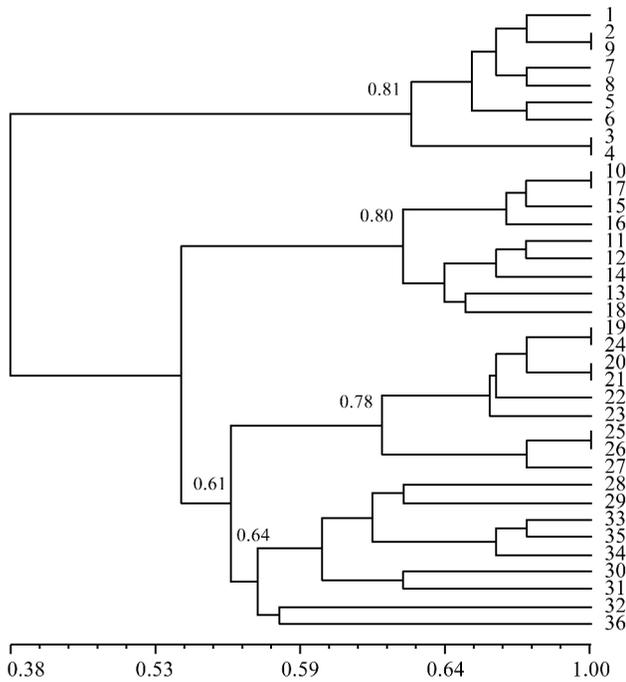


图 2 36 株琼枝聚类分析图

注: 琼枝编号: 1~9: 潮滩鼻; 10~18: 铜鼓岭; 19~27: 三更峙; 28~36: 欧村

Figure 2 The cluster analysis of *B. gelatinum*

Note: The number of *B. gelatinum*: 1~9: Chaotanbi; 10~18: Tongguling; 19~27: Sangengshi; 28~36: Ocun

从聚类图可以看出, 在阈值为 0.61 处, 所有琼枝以海域为单位聚为 4 类; 在阈值分别在 0.64、0.78、0.80 和 0.81 处, 潮滩鼻、铜鼓岭、三更峙和欧村的琼枝群体出现分类单元; 随着阈值的增大, 4 个海域的琼枝麒麟菜的分类单元越多, 但潮滩鼻海域的琼枝群体分类单元明显其它海域的琼枝群体要出现得更早, 遗传相似性系数比另外 3 个琼枝群体要低。

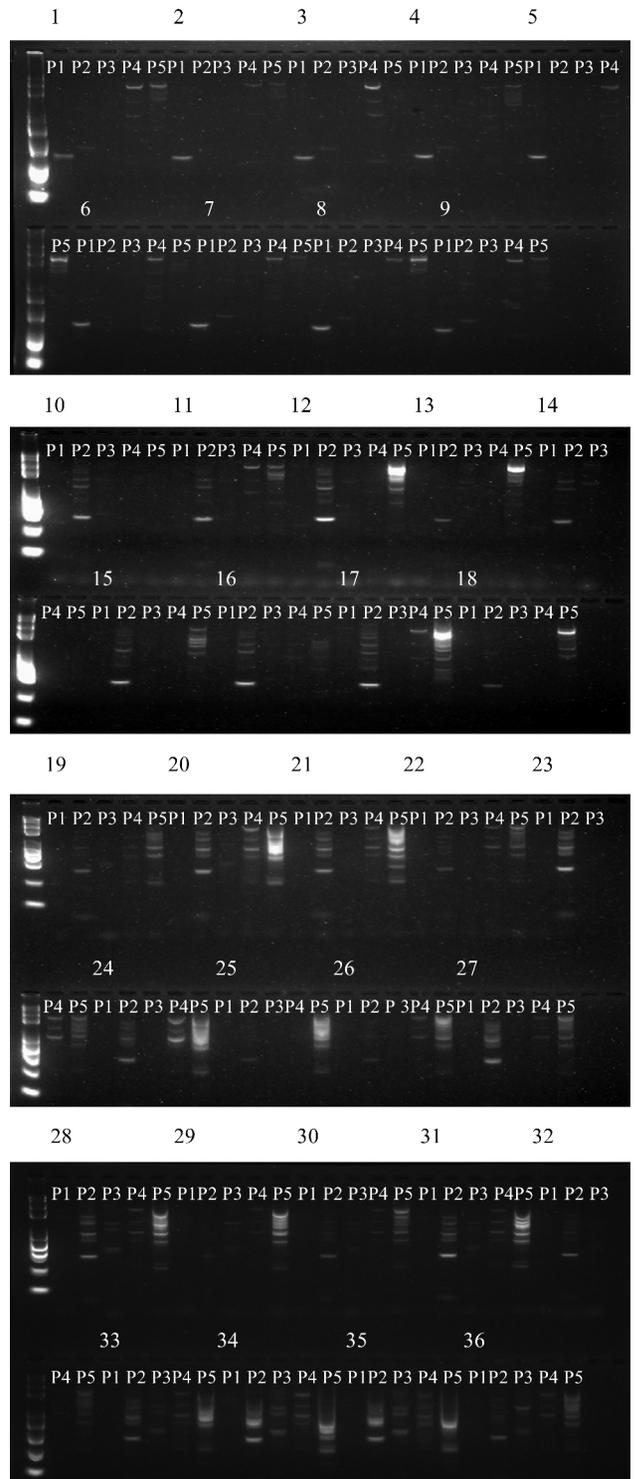


图 1 琼枝群体 PCR 产物电泳图

注: M: DL2000; P1, P2, P3, P4, P5: 引物; 琼枝编号: 1~9: 潮滩鼻; 10~18: 铜鼓岭; 19~27: 三更峙; 28~36: 欧村

Figure 1 Agarose gel image of PCR product of *B. gelatinum*

Note: M: DL2000; P1, P2, P3, P4, P5: Primer; The number of *B. gelatinum*: 1~9: Chaotanbi; 10~18: Tongguling; 19~27: Sangengshi; 28~36: Ocun

### 1.3 群体间的分化

总群体的近交系数( $F_{st}$ )、群体内近交系数( $F_{is}$ )、遗

传分化系数( $F_{st}$ )是反应各亚群间遗传分化的重要指标。 $F_{st}$ 值越大,各亚群间遗传分化越大(Cockerham and Weir, 1993)。由表1可以看出,遗传分化系数 $F_{st}$ 在0.030 7到1.000 0之间,平均值为0.203 9,即平均有20.39%的遗传变异存在于群体之间,有79.61%的遗传变异存在于群体之内。P4、P5座位的基因流较大, $N_m$ 值在1以上,平均 $N_m$ 值为0.976 3,小于1,说明群体间存在一定的基因流动。

从表2可以看到琼枝群体的平均基因杂合度(Ave\_Het)为0.489 1。总体期望杂合度(Exp\_Het\*)为0.532 0,不同琼枝群体的变化范围为0.423 4到0.660 0之间,其中欧村的期望杂合度最低,三更峙的期望杂合度最高。观察杂合度(Obs\_Het)平均值为0.623 3,4个琼枝群体的范围在0.396 4到0.744 4之间,铜鼓岭群体和潮滩鼻群体的观察杂合度接近,在4个群体中比较大,欧村的观察杂合度最低。

有效等位基因数、Shannon's 信息指数能反应遗传多样性。从表3可看到4个琼枝群体检测出的有效等位基因数为1.9499到2.5660之间,平均为2.2280个,观察等位基因数在2.4个到3个之间,平均为2.6875个;潮滩鼻琼枝群体Shannon's 信息指数最大,为0.989 6,

表1 F统计量和基因流

Table 1 Summary of F-statistics and gene flow for all loci

座位	群内近交系数	总群体近交系数	遗传分化系数	基因流
Locus	Fis	Fit	Fst	Nm
P1	****	1.000 0	1.000 0	0.000 0
P2	-0.342 1	0.219 4	0.418 3	0.347 6
P3	0.126 5	0.339 1	0.243 3	0.777 5
P4	-0.426 1	-0.3 823	0.030 7	7.885 7
P5	-0.460 0	-0.3 590	0.069 2	3.364 2
平均数	-0.281 6	-0.0 203	0.203 9	0.976 2
Mean				

表2 琼枝群体的遗传差异 EST-SSR 分析

Table 2 Genetic differentiation between *B. gelatinae* resources by EST-SSR analysis

种源	观察纯合度	观察杂合度	总体期望纯合度	总体期望杂合度	基因多样性	平均基因杂合度
Provenance	Obs_Hom	Obs_Het	Exp_Hom	Exp_Het	Nei	Ave_Het
潮滩鼻	0.380 6	0.619 4	0.340 0	0.660 0	0.601 6	0.543 4
CTB						
铜鼓岭	0.255 6	0.744 4	0.416 8	0.583 2	0.544 6	0.543 4
TGL						
三更峙	0.266 7	0.733 3	0.538 6	0.461 4	0.435 8	0.434 8
SGS						
欧村	0.603 6	0.396 4	0.576 6	0.423 4	0.386 3	0.434 8
OC						
平均数	0.376 6	0.623 3	0.468 0	0.532 0	0.492 1	0.489 1
Mean						

表3 平均等位基因与有效等位基因数

Table 3 Average number of alleles and effective number of alleles

群体	观察等位基因数	有效等位基因数	Shannon's 信息指数
Population	Na	Ne	I
欧村	2.600 0	1.949 9	0.663 8
OC			
潮滩鼻	3.000 0	2.566 0	0.989 6
CTB			
铜鼓岭	2.750 0	2.282 4	0.861 4
TGL			
三更峙	2.400 0	2.113 5	0.695 7
SGS			
平均数	2.687 5	2.228 0	0.802 6
Mean			

最小的为欧村琼枝群体,为0.663 8。说明潮滩鼻的遗传多样性最大,欧村的遗传多样性最小。

## 2 讨论

本实验对4个海域的琼枝群体进行了遗传结构分析,结果显示,4个琼枝群体的观察杂合度、期望杂合度、遗传分化系数、观察等位基因数目、有效等位基因数目、Shannon's 信息指数都有不同程度的差异,保护区内琼枝群体遗传多样性呈现一定的差异。杨文杰(2012)对野生与养殖琼枝的EST-SSR分析显示,同一海域的琼枝群体基本无差异,与本文研究结果不同,分析原因是杨文杰在每个海域所取的样本量只有2~4株,而且有部分是进行无性繁殖的养殖琼枝,造成群体内无差异结果的可能性较大。

Alpert等(1993)在研究*Frogaria chiloensis*种群间的遗传分化时发现,遗传距离与种群间的空间距离高度相关,本文对不同地理的琼枝群体分析表明,同一海

域的琼枝样品聚类到一起,且遗传差异由南向北逐渐增大的趋势。地理位置距离越大的点,在遗传差异性上也越大,与 Alpert 的研究相似。琼枝遗传差异可能与所处的海洋环境有关。张钰(2012)对保护区内生态环境调查显示,在保护区内,由南向北,人类活动逐渐减少,对琼枝的生境破坏程度减少。由于环境的破坏,导致琼枝种质资源下降,遗传差异减小。因而,保护区内琼枝的遗传差异呈现由南向北逐渐增加的趋势。

群体间的分化水平高低与基因流密切相关,Wright (1931)认为基因流指数  $Nm > 1$ ,基因流能防止不同地区亚群体间发生遗传分化,当  $Nm < 1$ ,各亚群基因流受阻,群体可能出现遗传分化。本研究中, $Nm$  平均值为 0.976 2,说明保护区内琼枝群体出现遗传分化现象;遗传分化系数  $F_{st}$  能反应群体间遗传分化程度,当  $0 < F_{st} < 0.05$  时,不存在分化, $0.05 < F_{st} < 0.15$  时,中度分化, $0.15 < F_{st} < 0.25$  时,高度分化(Wright, 1978),实验结果显示  $F_{st}$  平均值为 0.203 9,即有 20.39%的变异来至于群体间,各群体的遗传分化程度较高,与本研究基因流显示群体出现遗传分化的结果一致。 $F_{is}$ 、 $F_{it}$  的值为正值时,群体近交程度严重, $F_{is}$ 、 $F_{it}$  的值为负值时,群体观察杂合度大于期望杂合度,则群体趋向远交,杂合比例增大(Weir and Cockerham, 1984),本文研究的  $F_{st}$ 、 $F_{it}$  的平均值都为负值,群体平均观察杂合度大于平均期望杂合度,说明琼枝群内杂合体较多,基因交流频繁,麒麟菜保护区内琼枝有性繁殖比无性繁殖普遍。

### 3 材料与方法

#### 3.1 实验材料

实验材料取自海南省麒麟菜保护区,由北向南分别是文昌潮滩鼻、文昌铜鼓岭、琼海三更寺及琼海欧村四个海域。每个海域采样后,用清水漂洗样品,去除附着的海水及杂质。然后在每个海域的样品中各随机选出 9 株藻体,共选取了 36 株藻株进行 EST-SSR 研究。所选的材料经液氮冷冻后,在  $-70^{\circ}\text{C}$  条件下保存,以备 DNA 提取。

#### 3.2 方法

##### 3.2.1 基因组的提取

采用上海泛柯生物科技有限公司生产的 DNA 基因组提取试剂盒(HP Plant DNA Kit D2485-01)按照说明书稍作修改后,进行琼枝基因组 DNA 的提取。步骤如下:取 100 mg 研磨成粉末的样品于 1.5 mL 的离心

管中,加入 500  $\mu\text{L}$  Buffer CPL,  $65^{\circ}\text{C}$  水浴 15 min 后,加 500  $\mu\text{L}$  氯仿/异戊醇(24:1)快速混匀 30 s,  $10\ 000\ \text{g}$  离心 1 min 后吸取 300  $\mu\text{L}$  上清液到套有收集管的硅胶柱中,再加入 150  $\mu\text{L}$  Buffer CXD 和 300  $\mu\text{L}$  无水乙醇,混匀后  $10\ 000\ \text{g}$  离心 1 min,将硅胶柱换装到另一个收集管中,加入 650  $\mu\text{L}$  SPW 进行洗涤,  $10\ 000\ \text{g}$  离心 1 min 后将硅胶柱转移到一个新的 1.5 mL 离心管中,加入 50~100  $\mu\text{L}$  的 Elution Buffer,  $65^{\circ}\text{C}$  水浴 3 min,  $10\ 000\ \text{g}$  离心 1 min,离心管中所得的液体即为基因组 DNA 提取液。

##### 3.2.2 PCR 扩增

本文所用 5 条引物序列为:

- 1 5'-AATGTTTCGACGATCTCA-3',  
5'-CTCTTATGCGGCCAAGTA-3';
- 2 5'-ATGTCGCCAGGCAGTCAG-3',  
5'-CCAACACGCCCATCCATC-3';
- 3 5'-ATGTCGCCAGGCAGTCAG-3',  
5'-GCTTGGCTGAGCTACACG-3';
- 4 5'-TCGGAGTTGGGTTGTGAT-3',  
5'-GAAAGGCAGCCAGAGCAT-3';
- 5 5'-CTTTGCTTGCTGGGCTGAC-3',  
5'-GGGAACAATGGACGAGGC-3'。

PCR 条件参考赵素芬等(2008)研究与琼枝同科的卡帕藻属的条件并做简单修改,反应总体积为 20  $\mu\text{L}$ ,其中 10  $\mu\text{L}$  2 $\times$ PCR Mix、1  $\mu\text{L}$  模板、Primer-F 和 Primer-R 引物各 1  $\mu\text{L}$ ,剩下加入超纯水补足体积至 20  $\mu\text{L}$ 。PCR 扩增条件为  $94^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min,之后进行 30 个循环,每个循环  $94^{\circ}\text{C}$  变性 45 s,  $46\sim 55^{\circ}\text{C}$  退火 45 s,  $72^{\circ}\text{C}$  延伸 1 min,最后  $72^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min,  $4^{\circ}\text{C}$  保存。取 5  $\mu\text{L}$  PCR 产物与 1  $\mu\text{L}$  上样缓冲液混匀后,在 100 V 电压下 3%琼脂糖凝胶电泳电泳 50 min 后,在凝胶成像系统下拍照保存。

##### 3.2.3 数据处理

用 POPGENE 软件(Yeh et al., 1999)计算观察杂合度、期望杂合度、遗传分化系数、观察等位基因数目、有效等位基因数目和 Shannon's 信息指数等参数,并用 ntsys2.0 软件作聚类分析。

#### 作者贡献

胡吟胜是试验主要完成人,参与前期引物的筛选、DNA 的提取、PCR 及数据分析,论文的撰写;杨文杰参与引物的设计及前期试验指导;于淑楠协助试验的顺利完成,黄勃为指导老师,参与实验过程中

的全程指导。

## 致谢

感谢海洋公益行业科研专项(201105008-7)、中医药行业科研专项(201207002-03)、国家 863(2012AA1-0A412-8)、海南大学植物学国家重点学科(071001)、国家自然科学基金项目(41176084)和国家科技支撑计划项目(2009BADB2B0404-02)对本研究的资助；感谢黄勃老师对本研究的指导及关心。

## 参考文献

- Alpert P., Lumaret R., and Digiusto F., 1993, Population structure inferred from allozyme analysis in the clonal herb *Fragaria chiloensis* (Rosaceae), *American Journal of Botany*, 80(9): 1002-1006
- Cockerham C.C., and Weir B.S., 1993, Estimation of gene-flow from F-statistics, *Evolution*, 47(3): 855-863
- Doty M.S., and Norris J.N., 1985, *Eucheuma* species (Solanaceae, Rhodophyta) that are major sources of carrageenan, In: Abbott L.A., and Norris J.N. (eds.), *Taxonomy of Economic Seaweeds*, La. Jolla, California Sea Grant College Program, California, pp.47-61
- Fang Z., and Bao S.X., 2008, *Betaphycus gelatinae* biological characteristics and cultivation experiment, *Shuili Yuye* (Reservoir Fisheries), 28(2): 55-56 (方哲, 鲍时翔, 2008, 琼枝麒麟菜的生物学特性与养殖试验, *水利渔业*, 28(2): 55-56)
- Kuang M., Zeng C.K., and Xia B.M., 1999, Taxonomy of *Eucheumatoidae* in China, *Haiyang Kexue Jikan* (*Studia Marina Sinica*, 41: 168-236 (匡梅, 曾呈奎, 夏邦美, 1999, 中国麒麟菜族的分类研究, *海洋科学集刊*, 41: 168-236)
- Liu B.Q., Zeng Q.G., Wang Y.J. and Luo Q.J., 2007, The cross-species amplification and validation of EST-SSR loci in *Porphyra haitanensis*, *Acta Hydrobiologica Sinica*, 12(2): 1-154
- Sun D.R., Li Y., Li W.T., and Gao T.X., 2013, Genetic diversity in populations of *Zoster marina* L. inferred from nuclear SSR markers, *Shuisheng Shengwu Xuebao* (*Acta Hydrobiologica Sinica*), 37(1): 82-89 (孙典荣, 李渊, 李文涛, 高天翔, 2013, 大叶藻居群微卫星遗传多样性研究, *水生生物学报*, 37(1): 82-89)
- Weir B.S., and Cockerham C.C., 1984, Estimation F-statistics for the analysis of population structure, *Evolution*, 38 (6): 1358-1370
- Wright S., 1931, Evolution in mendelian population, *Genetics*, 16: 97-159
- Wright S., 1978, Evolution and the genetics of populations, volume 4: Variability within and among natural populations, University of Chicago Press, Chicago, pp.97-159
- Yang H., Mao Y.X., Kong F.N., Wang L., and Yan X.H., 2009, Development and practicability of EST-SSR markers in *Porphyra haitanensis*, *Zhongguo Haiyang Daxue Xuebao* (Periodical of Ocean University of China), 39(2): 265-270 (杨惠, 茅云翔, 孔凡娜, 王莉, 严兴洪, 2009, 坛紫菜 EST-SSR 筛选及其在遗传多样性分析中的实用性, *中国海洋大学学报(自然科学版)*, 39(2): 265-270)
- Yeh F.C., Yang R.C., and Boyley T., 1999, POPGENE (version 1.31): Software Microsoft Windows-based freeware for population genetic analysis, University of Alberta and Center for International Forestry Research, Alberta, Canada
- Yang W.J., 2012, Analysis on the diversity of genetic of *Betaphycus gelatinum* among farmed and wild population based on EST-SSR, Thesis for M.S., Hainan University, Supervisor: Huang B., pp.22 (杨文杰, 2012, 基于 EST-SSR 的琼枝麒麟菜养殖群体与野生群体的遗传差异性分析, 硕士学位论文, 海南大学, 导师: 黄勃, pp.22)
- Zhao S.F., Zhang T., Ying C.Q., and He P.M., 2008, Study on optimization of RAPD-PCR reaction system for *Kappaphycus alvarezii* by orthogonal design, *Shengwu Jishu Tongbao* (*Biotechnology Bulletin*), 4: 161-165 (赵素芬, 张婷, 应成琦, 何培民, 2008, 长心卡帕藻 RAPD-PCR 反应体系的正交优化研究, *生物技术通报*, 4: 161-165)
- Zheng S.Z., 1991, *Betaphycus* polysaccharide structure research, *Shengwu Huaxue Yu Shengwu Wuli Xuebao* (*Acta Biochimica et Biophysica Sinica*), 23(2): 112-116 (郑淑贞, 1991, 琼枝多糖结构的研究, *生物化学与生物物理学报(英文版)*, 23(2): 112-116)
- Zhang Y., 2012, Ecological investigation of *Eucheuma reserve* of Hainan, Thesis for M.S., Hainan University, Supervisor: Huang B., pp.61 (张钰, 2012, 海南岛麒麟菜保护区生态调查, 硕士学位论文, 海南大学, 导师: 黄勃, pp.61)
- Zhang L., 2012, Development of EST-SSR based microsatellite markers of green algae of ulva (Ulvaaceae, Chlorophyta) and complete sequencing of the mitochondrial DNA of *gracilaria*, Thesis for M.S., Ocean University of China, Supervisor: Liu T., pp.39 (张磊, 2012, 石莼科绿藻 EST-SSR 标记的开发应用及龙须菜线粒体全基因组研究, 硕士学位论文, 中国海洋大学, 导师: 刘涛, pp.39)