

王 鑫,王珊瑛,王苗苗,等. 紫菜不同品系的 AFLP 遗传差异性分析[J]. 江苏农业科学,2013,41(5):38-41.

紫菜不同品系的 AFLP 遗传差异性分析

王 鑫¹, 王珊瑛¹, 王苗苗^{1,2}, 王亚东¹, 朱辰娴¹, 陆勤勤³, 姜 波¹, 张 涛¹, 朱建一¹

(1. 常熟理工学院生物与食品工程学院,江苏常熟 215500; 2. 江苏省水产技术推广站,江苏南京 210036;
3. 江苏省海洋水产研究所,江苏南通 226007)

摘要:采用扩增片段长度多态性技术(AFLP)对6个紫菜品系进行遗传差异性分析。结果表明,在42对引物中,有6对能得到重复性较好的多态性条带,共扩增出141条谱带,其中133条为多态性谱带,多态位点的比例达94.33%。基于引物扩增结果计算遗传相似性,结果显示不同紫菜品系间存在差异。UPGMA、NJ法聚类分析结果表明,条斑紫菜品系Y001和Y-L0602遗传相似系数高,聚为一类;条斑紫菜和坛紫菜遗传重组品系Y-H034和H-Y035聚为一类,之后与Y-H017品系聚集;坛紫菜H017品系与其他供试品系遗传距离较远,聚类在最外侧。各品系间遗传距离与其选育方法有关,筛选获得的遗传重组后代表现出与条斑紫菜更近的亲缘关系。

关键词:紫菜;AFLP;分子标记;遗传重组

中图分类号:S917 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2013)05-0038-04

紫菜是一种原始大型红藻,据不完全统计,世界现存紫菜约130多种,我国共记载了22个紫菜物种或变种^[1]。紫菜具有很高的经济价值,我国的紫菜人工栽培已有几百年的历史,目前我国紫菜产量约占世界总产量的1/4^[2]。我国长江以北的江苏等沿海地区是条斑紫菜的主要栽培区,福建、浙江、广东等省沿海主要栽培坛紫菜。在紫菜产业的发展过程中,优良种质选育是关键。近年来,藻类工作者通过传统选育、诱变育种及定向选育等技术,开展了条斑紫菜和坛紫菜栽培品系的改良工作,并取得了一定的进展^[3-7]。随着科学技术的进步,尤其是分子生物学技术在育种领域的推广应用,利用分子标记技术研究紫菜种质遗传多样性已成为紫菜辅助育种的一个重要方面。

AFLP(amplified fragment length polymorphism)技术是由 Vos 等在 1993 年开发并发展起来的一种选择性扩增限制性片段的方法^[8]。该方法较好地结合了 RFLP 技术的可靠性以及 RAPD 技术的简易性等优点,同时 AFLP 技术是一种共显性标记,具有很好的多态性及重复性,能够提供更为丰富的遗

传信息^[9],适用于遗传多样性、种质鉴定、标记辅助育种、基因定位和快速构建遗传图谱等研究^[10-13]。目前,紫菜主要栽培品系多由自然种群选育而来,随着栽培海区环境的不断变化,产业对紫菜种质的环境适应能力及品质有越来越多的需求,藻类研究人员通过选育、诱变等育种技术对紫菜种质进行了一系列的改良研究,获得了适合栽培的紫菜优良品系^[3-7];同时,在育种过程中,分子生物学技术作为辅助育种手段也逐步得到应用,江苏省紫菜栽培品种——条斑紫菜的分子标记辅助育种研究迫在眉睫。本试验采用 AFLP 分子标记技术,对选用的6个紫菜品系叶状体的遗传多样性进行了研究,为优良种质的筛选提供了必要的分子生物学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

由常熟理工学院海藻遗传与种质创新实验室及江苏省海洋水产研究所国家级紫菜种质库提供种质,并在其所属的紫菜栽培试验基地海区(江苏省南通市)采集各品系叶状体,详见表1。

表1 试验品系概况

试验品系	品系背景概况	种质保存
H017	坛紫菜栽培品系	江苏省海洋水产研究所国家级紫菜种质库
Y-H017	遗传重组 F ₂ 代品系,显示条斑紫菜性状	常熟理工学院海藻遗传与种质创新实验室
Y-H034	遗传重组 F ₁ 代品系,主要显示条斑紫菜性状	常熟理工学院海藻遗传与种质创新实验室
H-Y035	遗传重组 F ₁ 代品系,主要显示条斑紫菜性状	常熟理工学院海藻遗传与种质创新实验室
Y-L0602	高光胁迫诱导品系	常熟理工学院海藻遗传与种质创新实验室
Y001	条斑紫菜主产区栽培品系	江苏省海洋水产研究所国家级紫菜种质库

收稿日期:2012-11-06

基金项目:农业部公益性行业科研专项(编号:200903030);国家海洋局海洋公益性行业科研专项(编号:201105023);国家“863”计划(编号:2012AA10A406-6);江苏省农业科技支撑计划(编号:BE2011376、BE2011375)。

作者简介:王 鑫(1991—),男,江苏无锡人,生物工程专业。E-mail:184665444@qq.com。

通信作者:朱建一,男,教授,主要从事海藻栽培学研究。E-mail:zhujianyint@sina.com。

1.2 AFLP 分析方法

采用改良 CTAB 法提取样品基因组 DNA,并用紫外分光光度计(Amersham Biosciences Ultrospec 2100)测定样品浓度和纯度,以1.0%琼脂糖凝胶电泳检测,之后将样品DNA稀释为约50 ng/μL,-20℃保存备用。

参照 Vos 等的方法^[8,14]构建 AFLP 反应体系,引物及接头序列参照 Qi 等的方法^[15],引物、接头均由华大基因合成。预扩增引物为 E01(GACTGCGTACCAATTC-A)和 M02(GAT-

GAGTCCTGAGTAA - C)。从 42 对选择性扩增引物中筛选出扩增带数目适中、背景清晰、多态性高的引物组合(E32,M59;E37,M51;E37,M55;E32,M58;E32,M48;E38,M60)作为选择性扩增的引物。选择性扩增产物经 4.5% 聚丙烯酰胺凝胶电泳,60 W 恒功率电泳约 1 h 后银染,自然晾干,电泳结果经 ScanMaker 9600 扫描仪进行扫描并记录。

表 2 AFLP 预扩增和选择性扩增引物及序列

引物类别	引物名称	序列(5'→3')
预扩增引物	E01	GACTGCGTACCAATI' C - A
	M02	GATGAGTCCTGAGTAA - C
选择性扩增引物	E32	GACTGCGTACCAATTC - AAC
	E37	GACTGCGTACCAATTC - ACG
	E38	GACTGCGTACCAATTC - ACT
	M48	GATGAGTCCTGAGTAA - CAC
	M51	GATGAGTCCTGAGTAA - CCA
	M55	GATGAGTCCTGAGTAA - CGA
	M59	GATGAGTCCTGAGTAA - CTA
	M60	GATGAGTCCTGAGTAA - CTC

1.3 数据统计与分析

根据分子量标准,对照反应产物在凝胶上的相应位置,每一条扩增条带作为一个分子标记,有清晰条带的记为“1”,无带的记为“0”,只统计条带清晰的扩增带,最后将整个分子标记图谱转化为“0”、“1”的信息矩阵。统计每个位点出现条带

的个体数,得出该位点在每组中出现的频率,将带型结果转化成更易进行后续分析的数值结果。

采用 POPGENE VERSION 1.31 软件计算各品系间的遗传相似度和遗传距离,并从凝胶上找出差异性条带。利用 MEGA 5.1 软件构建系统发育树,利用 SPSS 13.0 对各个品系间的位点频率进行完全随机设计单因素方差分析。

2 结果与分析

2.1 AFLP 扩增条带结果

从 42 对引物中筛选出能够获得清晰扩增条带的选择性引物 6 对,共得到 141 条谱带,平均每对引物扩增 15 条,对不同样品进行扩增得到的谱带均有差异。在 6 对引物扩增出的谱带中,仅 8 条为单态条带,多态位点占 94.33%。图 1 是 E32 M59 引物对扩增后得到的 AFLP 指纹图谱,表明不同紫菜品系扩增谱带存在差异。

2.2 遗传距离与相似性分析

运用 POPGENE 计算出供试样品的遗传相似性和遗传距离(表 3),样品 H017 为坛紫菜品系,与其他供试品系的遗传相似度在 0.4 左右;除了与 H017 品系外,Y001 品系与其他材料的遗传相似度均高于 0.75,与 Y - L0602 相似度最高,达到 0.9183;Y - H017、Y - H034 和 H - Y035 品系间的遗传相似度较高,均达到 0.86 以上,与 H017 品系的相似度最低,遗传距离最远。

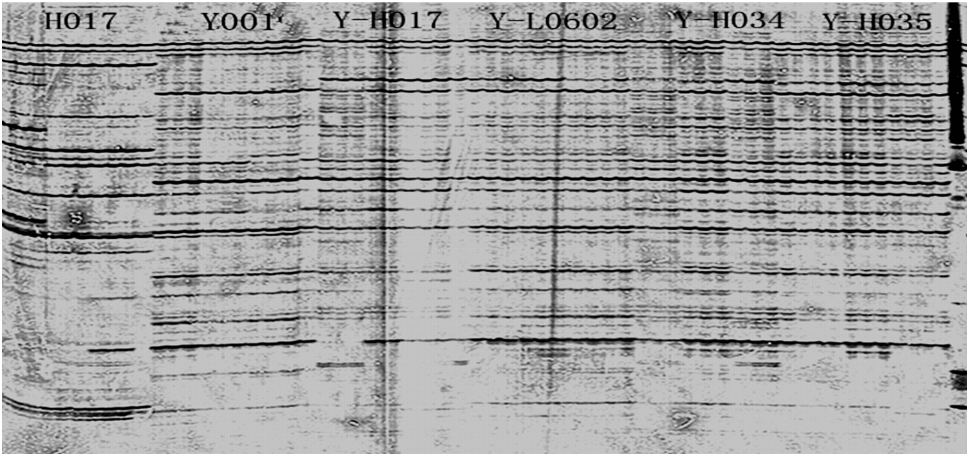


图1 E32 M59引物对扩增的AFLP指纹图谱

表 3 Nei's 遗传相似度(**** 上方)和遗传距离(**** 下方)

样品名称	H017	Y001	Y - H017	Y - L0602	Y - H034	H - Y035
H017	****	0.470 7	0.521 0	0.444 4	0.407 4	0.375 7
Y001	0.753 5	****	0.791 4	0.918 3	0.763 0	0.793 3
Y - H017	0.652 0	0.233 9	****	0.834 1	0.864 5	0.901 7
Y - L0602	0.811 1	0.085 3	0.181 4	****	0.772 8	0.817 5
Y - H034	0.898 0	0.270 5	0.145 6	0.257 7	****	0.907 9
H - Y035	0.978 9	0.231 5	0.103 5	0.201 5	0.096 6	****

2.3 紫菜样品聚类分析

利用 MEGA 3.1 软件的 UPGMA、NJ 法构建聚类图,UPGMA 分析结果显示 Y001 和 Y - L0602 品系首先聚为一类,然后与 Y - H017 聚为一类,H - Y035 与 Y - H034 聚类后再与其他条斑紫菜聚为一大类,H017 品系为最外枝。NJ 法

与 UPGMA 法构建的系统发育树具有相似的两枝,不同之处在于 Y - H017 的位置略有变化,Y - H034、Y - H035 和 Y - L0602、Y001 2 个分枝聚在一起后再与 Y - H017 聚类(图 2)。

2.4 紫菜样品基因频率差异

由表4可知,H017与其余紫菜品系间条带差异明显,在

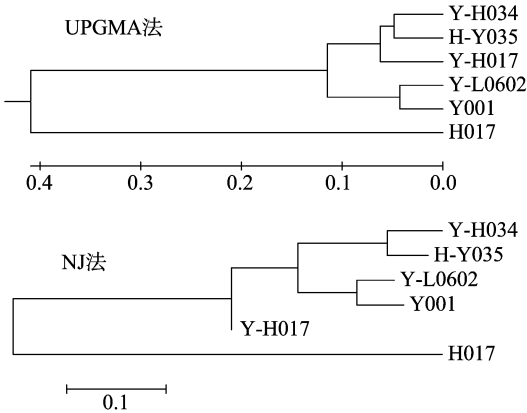


图2 不同紫菜加权类平均法(UPGMA)和邻接法(NJ)聚类

位点 A1480、A600、B1300、B740、B510、B160、C1000、C500、D1700、D500、D180、D175、D170、E1750、E550、E330 等处, H017 未出现谱带;而在位点 A1600、A760、A350、B1950、C1950、C875、C375、D2000、D1900、D214、E1900、E625 等处, H017 存在谱带。Y - L0602 与 Y001 在引物 E32 M59 扩增图谱中位点 A1625、A1500 处存在差异, Y - L0602 出现条带, 而 Y001 未出现。Y - H034 与 H - Y035 品系在位点 A1950、A1625、A1375、A1250、A1150、C2100、C2000、C700、C600、C475、C400、D2100、D144、D100、E830、E650、E630、E600、E325、E250 处概率存在差异。

3 讨论

紫菜育种工作是紫菜产业发展的重要推动力,是提高紫菜品质和产量的决定性因素。采用遗传重组的方法进行育种是一个值得关注的研究方向,通过条斑紫菜和坛紫菜的杂交选育获得具有 2 个紫菜物种特有生物学特征的后代^[16],对这些后代进一步筛选获得可在生产上利用的、具优良性状的栽培品系,然而亟待解决的重要问题是对其后代遗传性的分析研究^[17-18],借助分子标记技术在分子机制上提供更多遗传重组的证据。随着分子生物学研究技术的发展,AFLP 等分子标记辅助育种逐渐成为育种领域的重要技术手段^[19-22]。本研究以坛紫菜、条斑紫菜及其遗传重组获得的后代等 6 个品系作为材料进行 AFLP 分析,筛选出的 6 对引物扩增结果表现出较高的遗传多样性,这与之前杨锐等对不同地域条斑紫菜 AFLP 分析的研究结果^[23-24]相似。

研究结果中坛紫菜品系 H017 与 2 个条斑紫菜品系 Y001、Y - L0602 分属 2 个不同的紫菜物种,因此遗传距离相对较远,在不同引物扩增图谱中均存在多个特征谱带差异,这些差异是显著区分条斑紫菜和坛紫菜的分子标记。Y - L0602 与 Y001 同为条斑紫菜品系,从分子水平上看有很近的亲缘关系,遗传相似度很高。Y - L0602 是由条斑紫菜栽培品系经高光胁迫定向诱导而形成的品系,相对 Y001 栽培品系而言,可能其光照适应相关的基因发生了变化,因此在引物 E32 M59 的 A1625 和 A1500 位点具有可显著区分这 2 个品系的特征谱带。作为坛紫菜和条斑紫菜遗传重组后代的 Y - H017、Y - H034、H - Y035 是经育种筛选后获得的品系,既有条斑紫菜的藻体薄、生殖细胞混生形成条纹状等特征,又有坛紫菜藻体边缘具刺缘的特征^[16],且遗传重组后代的光合

表 4 各品系紫菜差异位点处的概率比较

引物 及位点	各品系紫菜差异位点处的概率					
	H017	Y - H017	Y - H034	H - Y035	Y - L0602	Y001
A1950	0	0.67	0.4	1	0.9	1
A1625	0	1	0.3	1	1	0
A1600	1	0	0	0	0	0
A1500	0	1	0.8	1	0.7	0
A1480	0	1	1	1	1	1
A1375	0	0.3	0.6	0	0.1	0
A1250	1	0.3	0.6	0.3	0	0
A1150	0	0.7	0.4	1	0.9	0.6
A760	1	0	0	0	0	0
A600	0	1	1	1	1	1
A350	1	0	0	0	0	0
B1950	1	0	0	0	0	0
B1300	0	1	1	1	1	1
B740	0	1	1	1	1	1
B510	0	1	1	1	1	1
B160	0	1	1	1	1	1
C2100	1	0.6	0.2	1	1	1
C2000	0	0.3	0.3	1	0.5	0.3
C1950	1	0	0	0	0	0
C1000	0	1	1	1	1	1
C875	1	0	0	0	0	0
C700	0.3	0.6	0.2	0.9	0.4	0.8
C600	0.9	0.3	0.2	0.5	1	0.3
C500	0	1	1	1	1	1
C475	1	0.6	0.2	0.8	1	0.3
C400	1	0.3	0.2	0.8	1	1
C375	1	0	0	0	0	0
D2100	0	1	0.3	0.7	0.6	1
D2000	1	0	0	0	0	0
D1900	1	0	0	0	0	0
D1700	0	1	1	1	1	1
D500	0	1	1	1	1	1
D214	1	0	0	0	0	0
D180	0	1	1	1	1	1
D175	0	1	1	1	1	1
D170	0	1	1	1	1	1
D144	0	0.6	0.9	0.1	0.8	1
D100	1	1	1	0.4	0.6	0.8
E1900	1	0	0	0	0	0
E1750	0	1	1	1	1	1
E830	0.4	0.9	0.5	0.2	0.9	1
E650	0.7	1	0.5	0.2	1	0.8
E630	0.9	0.9	0.6	0.2	0.7	0.5
E625	1	0	0	0	0	0
E600	0	0.8	0.8	0.4	0.5	0.7
E550	0	1	1	1	1	1
E330	0	1	1	1	1	1
E325	0	0.7	0.7	0.3	0.8	0.9
E250	0	0	0	0.3	0	0

注: A = E32 M59, B = E37 M51, C = E37 M55, D = E32 M58, E = E32 M48。

生理特征也与典型的条斑紫菜、坛紫菜不同^[25], *rbcl* 基因分析结果说明遗传重组后代在分子水平上发生了改变^[16]。本

研究结果再次证实,遗传重组后代在分子水平上与条斑紫菜和坛紫菜均存在不同之处,聚类分析结果说明这些品系与条斑紫菜品系亲缘关系明显更近,与坛紫菜品系 H017 的遗传距离较远,表明在以条斑紫菜生物学性状作为筛选指标获得的遗传重组后代在分子水平上与条斑紫菜更为接近。引物 E32 M48 的 E250 位点是遗传重组后代 H-Y035 品系的特征谱带。

品系间条带的差异和特征性条带的获得能够为进一步的分子标记(如 SCAR 分析)提供有效信息,采用 AFLP 筛选共显标记并转化为 SCAR 标记,可以作为种质鉴定的良好手段,AFLP 标记特异性位点的开发已成功运用到苹果品种^[26]、笛雕仔鱼^[27]、罗非鱼^[28]等的鉴定中,石金锋等通过分子手段获得了海藻的部分 SCAR 标记^[29]。本试验结果再次证实,AFLP 是紫菜辅助育种筛选的有效分子标记方法,以获取特征谱带的分子序列作为基本信息,可以进一步开发出能够区分不同品系的分子标记,进而为紫菜育种工作提供有力的分子证据。

参考文献:

- [1] Yoshida T, Notoya M, Kikuchi N, et al. Catalogue of species of *Porphyra* in the world, with special reference to the type locality and bibliography[J]. Nat Hist Res; special issue, 1997, 3; 5-18.
- [2] 张全斌, 赵婷婷, 蔡慧敏, 等. 紫菜的营养价值研究概况[J]. 海洋科学, 2005, 29(2): 69-72.
- [3] 陈昌生, 徐 燕, 纪德华, 等. 坛紫菜品系间杂交藻体选育及经济性性状的初步研究[J]. 水产学报, 2007, 31(1): 97-104.
- [4] 纪德华, 陈昌生, 郑伟刚, 等. ⁶⁰Co- γ 射线辐照坛紫菜叶状体及单克隆培养的研究[J]. 台湾海峡, 2005, 24(2): 171-177.
- [5] 陈昌生, 纪德华, 叶红莲, 等. 坛紫菜自由丝状体的 γ 射线辐照及培养的研究[J]. 台湾海峡, 2005, 24(2): 165-170.
- [6] 陈昌生, 纪德华, 姚 惠, 等. 不同品系坛紫菜自由丝状体在异常条件下生长发育的比较[J]. 台湾海峡, 2004, 23(4): 489-495.
- [7] 严兴洪, 梁志强, 宋武林, 等. 坛紫菜人工色素突变体的诱变与分离[J]. 水产学报, 2005, 29(2): 166-172.
- [8] Vos P, Hogers R, Bleeker M, et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting[J]. Nuc Acids Res, 1995, 23(21): 4407-4414.
- [9] 汤晓荣, 潘光华, 许东海. 紫菜分子遗传学研究进展[J]. 中国海洋大学学报, 2006, 36(5): 687-692.
- [10] Mueller U G, Wolfenbarger L L. AFLP genotyping and fingerprinting[J]. Trends Ecol Evol, 1999, 14(10): 389-394.
- [11] Gaiotto F A, Bramucci M, Grattapaglia D. Estimation of outcrossing rate in a breeding population of *Eucalyptus urophylla* with dominant RAPD and AFLP marker[J]. Theor Appl Genet, 1997, 95(5/6): 842-849.
- [12] Paglia G, Morgante M. PCR-based multiplex DNA fingerprinting techniques for the analysis of conifer genomes[J]. Molecular Breeding, 1998, 4(2): 173-177.
- [13] Donaldson S L, Chopin T, Saunders G W. Amplified fragment length polymorphism(AFLP) as a source of genetic markers for red algae[J]. J Appl Phycol, 1998, 10(3): 365-370.
- [14] Wang Z Y, Tsoi K H, Chu K H. Applications of AFLP technology in genetic and phylogenetic analysis of penaeid shrimp[J]. Biochem System Ecology, 2004, 32(4): 399-407.
- [15] Qi X, Lindhout P. Development of AFLP markers in barley[J]. Molecular General Genetics, 1997, 254(3): 330-336.
- [16] Xu P, Yang L E, Zhu J Y, et al. Analysis of hybridization strains of *Porphyra* based on *rbcL* gene sequences[J]. J Appl Phycol, 2011, 23: 235-241.
- [17] Miura A, Fu P F, Shin J A. Interspecific cross experiments between *Porphyra yezoensis* Ueda and *P. tenera* Kjellman (Bangiales, Rhodophyta) by using pigmentation variants[J]. J Tokyo Univ Fish, 1992, 79: 103-120.
- [18] Niwa K, Kobiyama A, Sakamoto T. Interspecific hybridization in the haploid blade-forming marine crop *Porphyra* (Bangiales, Rhodophyta): occurrence of allopolyploidy in surviving F1 gametophytic blades[J]. Journal of Phycology, 2010, 46: 693-702.
- [19] 袁力行, 傅骏骅, Warburton M, 等. 利用 RFLP、SSR、AFLP 和 RAPD 标记分析玉米自交系遗传多样性的比较研究[J]. 遗传学报, 2000, 27(8): 725-733.
- [20] 谢让金, 周至钦, 邓 烈. 真正柑橘果树类植物基于 AFLP 分子标记的分类与进化研究[J]. 植物分类学报, 2008, 46(5): 682-691.
- [21] Liu R H, Meng J L. RFLP and AFLP Analysis of inter- and intraspecific variation of *Brassica rapa* and *B. napus* shows that *B. rapa* is an important genetic resource for *B. napus* improvement[J]. Journal of Genetics and Genomics, 2006, 33(9): 814-823.
- [22] 周延清, 杨清香, 张改娜. 生物遗传标记与应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2008: 173-174.
- [23] 杨 锐, 刘必谦, 骆其君, 等. 利用 AFLP 技术研究条斑紫菜的遗传变异[J]. 海洋学报, 2005, 27(3): 159-162.
- [24] 贺剑云, 何林文, 张 辛, 等. 条斑紫菜(*Porphyra yezoensis*) 遗传多样性的 AFLP 分析[J]. 海洋与湖沼, 2010, 41(4): 489-494.
- [25] 姚春燕, 张 涛, 姜红霞, 等. 条斑紫菜不同品系藻体光合色素及叶绿素荧光参数比较[J]. 南京师大学报: 自然科学版, 2010, 33(2): 81-86.
- [26] 祝 军, 王 涛, 赵玉军, 等. 应用 AFLP 分子标记鉴定苹果品种[J]. 园艺学报, 2000, 27(2): 102-106.
- [27] 张俊彬, 黄良民, 陈真然. AFLP 技术在笛鲷的仔鱼鉴定及其分类学上的研究[J]. 海洋学报, 2005, 27(2): 165-171.
- [28] Li S F, Tang S J, Cai W Q. RAPD-SCAR markers for genetically improved new gift Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) and their application in strain identification[J]. Zoological Research, 2010, 31(2): 147-153.
- [29] 石金锋, 贾建航, 金德敏, 等. 紫菜无性系特异 SCAR 标记的获得[J]. 海洋学报, 2003, 25(1): 128-131.