

条斑紫菜不同栽培品系的遗传多样性分析*

Genetic Diversity of Different Cultivars of *Pyropia yezoensis*

杨立恩¹, 韩晓磊², 周伟¹, 邓银银¹, 许广平¹, 胡传明¹, 朱建一², 陆勤勤^{1**},
徐建国³

YANG Li'en¹, HAN Xiaolei², ZHOU Wei¹, DENG Yinyin¹, XU Guangping¹, HU Chuanming¹, ZHU Jianyi², LU Qinqin¹, XU Jianguo³

(1. 江苏省海洋水产研究所, 江苏南通 226007; 2. 常熟理工学院, 江苏常熟 215500; 3. 江苏省海洋渔业指挥部, 江苏南通 226000)

(1. Jiangsu Institute of Oceanology & Marine Fisheries, Nantong, Jiangsu, 226007, China; 2. Changshu Institute of Technology, Changshu, Jiangsu, 215500, China; 3. Marine Fisheries Dispatching Department of Jiangsu, Nantong, Jiangsu, 226000, China)

摘要:【目的】确定通过杂交和突变选育出的条斑紫菜 (*Pyropia yezoensis*) 栽培品系的遗传多样性。【方法】采用简单重复序列区间 (Inter simple sequence repeat, ISSR)、扩增片段长度多态性 (Amplified fragment length polymorphism, AFLP) 和随机扩增多态性 DNA (Random amplified polymorphism DNA, RAPD) 等 3 种分子标记对条斑紫菜不同栽培品系进行遗传多样性分析。【结果】3 种分子标记的多态性比率分别为 38.10%、38.95% 和 61.75%; 所表现出来的不同栽培品系间遗传距离分别为 0.1785、0.1029 和 0.2845; 3 种分子标记聚类结果并不完全一致, 但可以看出 Y-0602、Y-HA01 和 Y-H001 总是聚类在一起, 而 Y-DL02 倾向于单独聚为一支。【结论】通过诱变和杂交所选育的品系, 在遗传角度上仍然属于条斑紫菜, 但已形成不同栽培品系, 具有一定的遗传多样性。

关键词: 条斑紫菜 遗传距离 分子标记 栽培品系

中图分类号: S326, S968.43⁺¹ **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-9164(2016)03-0241-07

Abstract:【Objective】Different cultivars were screened and bred by mutation or hybridization, and their genetic diversity was determined. 【Methods】Molecular markers ISSR, AFLP and RAPD were employed to analyze the genetic diversity of screened cultivars. 【Results】The polymorphism ratio shown by ISSR, AFLP and RAPD was 38.10%, 38.95% and 61.75%, respectively. The genetic distance shown by ISSR, AFLP and RAPD between different cultivars of

Pyropia yezoensis was 0.1785, 0.1029 and 0.2845, respectively. Although the clustering results were not consistent, the cultivars Y-0602, Y-HA01 and Y-H001 always clustered together, whereas Y-DL02 tended to cluster as outgroup. 【Conclusion】After being screened and bred by mutation or hybridization, the cultivars studied in the present paper are genetically the same species as *P. yezoensis* but essentially different cultivars with certain genetic diversity.

Key words: *Pyropia yezoensis*, genetic distance, molecular markers, cultivars

收稿日期: 2016-05-10

修回日期: 2016-06-15

作者简介: 杨立恩(1983—), 男, 助理研究员, 主要从事紫菜分子生物与生理学研究。

* 国家自然科学基金面上项目(31272664), 国家海洋局海洋公益性行业科研专项项目(201105023), 南通市科技计划项目(MS22015026)和江苏省水产三新工程重大项目(D2015-18)资助。

** 通讯作者: 陆勤勤(1964—), 男, 研究员, 主要从事条斑紫菜育种与栽培学研究, E-mail: jsntlqq@163.com.

0 引言

【研究意义】条斑紫菜 (*Pyropia yezoensis*) 是我国长江以北地区的主要紫菜栽培物种^[1]。江苏是我国条斑紫菜主产区,其产业规模和产量均占全国条斑紫菜的 97% 以上,行业年产值超过 50 亿元。江苏省海洋水产研究所国家级紫菜种质库长期从事条斑紫菜遗传育种工作,不仅保存有大量的条斑紫菜基础种质,而且还以此为基础进行诱变、筛选、纯化、扩增与保存等有关条斑紫菜优良品系选育方面的工作,所选育的优良品系长期应用于江苏省紫菜产业,良种覆盖率达到 30% 以上,对产业的稳定起到不可忽视的作用。因此,鉴定这些基础种质和选用品系之间在分子遗传学水平上的关系至关重要。**【前人研究进展】**分子标记被广泛用于遗传多样性分析、品种和种质鉴定以及种群亲缘关系等方面的研究。常用的分子标记有简单重复序列区间 (Inter simple sequence repeat, ISSR)、扩增片段长度多态性 (Amplified fragment length polymorphism, AFLP) 和随机扩增多态性 DNA (Random amplified polymorphism DNA, RAPD)。这 3 种分子标记所需 DNA 样品量少,无需预先知道受试基因组 DNA 信息,结果记录方便,并可通过 0/1 矩阵计算遗传距离、遗传相似性指数、聚类分析等参数,因而被广泛应用于紫菜栽培品系鉴定和遗传多样性的研究工作中^[2-18]。**【本研究切入点】**不同的分子标记各有优劣,所表现出来的多态性也会在具体数据上有所差异,但得出的一致结论可能更加可靠,因此本研究同时应用 ISSR、AFLP 和 RAPD 3

表 1 实验所用的紫菜栽培品系

Table 1 Cultivars used in the present study

品系 Cultivar	来源 Source
Y-QD	1993 年采自于青岛的野生条斑紫菜品系 Wild cultivar collected from Qingdao in 1993
Y-DL01	大连条斑紫菜野生种群选用品系 (2013 年) Breeding cultivar with growth advantage from population collected from Dalian in 2013
Y-DL02	大连条斑紫菜野生种群选用品系 (2014 年) Breeding cultivar with growth advantage from population collected from Dalian in 2014
Y-0601	种藻经 ⁶⁰ Co-γ 诱变、高光胁迫筛选后于适温栽培海区选育 (2003 年) Cultivar screened by high light stress in moderate temperature coast after being mutated by ⁶⁰ Co-γ since 2003
Y-0602	种藻经 ⁶⁰ Co-γ 诱变、高光胁迫筛选后于低温栽培海区选育 (2003 年) Cultivar screened by high light stress in low temperature coast after being mutated by ⁶⁰ Co-γ since 2003
Y-06D0	具生长优势的栽培群体经 ⁶⁰ Co-γ 诱变选育 (南通, 2003 年) Breeding cultivar of mutated populations with growth advantage by ⁶⁰ Co-γ in Nantong in 2003
Y-HA01	海安条斑紫菜栽培海区选用品系 (2011 年) Breeding cultivar of growth advantage population collected from cultivation coast in Hai'an in 2011
Y-H001	条斑紫菜与坛紫菜杂交重组的黑色丝状体选用品系 Breeding cultivar from black conchocelis after hybridization of <i>P. yezoensis</i> and <i>P. haitanensis</i>
Y-H002	条斑紫菜与坛紫菜杂交重组的红色丝状体选用品系 Breeding cultivar from red conchocelis after hybridization of <i>P. yezoensis</i> and <i>P. haitanensis</i>

种分子标记检测不同选育品系间的遗传多样性。**【拟解决的关键问题】**通过品系间遗传距离的比较和聚类分析,确定诱变和杂交所选育出的品系在遗传角度上是否仍然属于条斑紫菜。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究所采用的条斑紫菜为江苏省海洋水产研究所国家级紫菜种质库所保存的野生条斑紫菜种质和长期选育的栽培品系 (表 1), 材料取自研究所与紫菜栽培企业合作建设的新品系栽培示范基地。按照 Yang 等^[19]所述方法提取叶状体基因组 DNA, 所提取 DNA 用 1% (W/V) 琼脂糖凝胶电泳检测后, -20℃ 保存备用。

1.2 方法

1.2.1 ISSR 扩增

ISSR 引物为 British Columbia 大学公布的第 9 套引物, 由上海生工生物工程有限公司合成。MgCl₂、dNTP、rTaq DNA 聚合酶等试剂购自 Takara 公司。PCR 反应在 Biometra PCR 仪上进行。针对多态性较高的引物, 则先对 MgCl₂、dNTP 浓度, 引物的退火温度等因子进行优化, 选用优化后的参数进行扩增反应。用混合 DNA 模板对 100 条引物进行扩增筛选, 反应体系为 25 μL, 内含 2 mmol/L MgCl₂、0.2 mmol/L dNTP、0.2 μmol/L 引物, 约 20 ng 的 DNA 模板和 1 U rTaq 酶。PCR 扩增反应程序: 94℃ 预变性 3 min; 94℃ 变性 30 s, 54℃ 退火 45 s, 72℃ 延伸 90 s, 35 个循环; 最后 72℃ 延伸 5 min。选

择多态性高的引物对每个样品基因组 DNA 进行扩增,扩增产物用 1.5% (W/V) 琼脂糖凝胶电泳检测,用凝胶成像仪(Biorad)观察结果并拍照记录。

1.2.2 AFLP 扩增

取各品系基因组 DNA 100 ng,用 *EcoR* I 和 *Mse* I (20 μ L 体系)在 37°C 水浴条件下酶切 3 h,酶切片段与 *EcoR* I 和 *Mse* I 接头在 T4 连接酶的作用下 (25 μ L 体系) 18°C 水浴条件下连接过夜。*EcoR* I 接头序列: 5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3' 和 5'-CTGACGCATGGTTAA-3'; *Mse* I 接头序列: 5'-GACGATGAGTCCTGAG-3' 和 5'-TACTCAG-GACTCAT-3'。取酶切连接产物 5 μ L 用于预扩增,预扩增引物 3' 端带有 1 个选择性碱基,引物序列为 E01: 5'-GACTGCGTACCAATTCA-3' 和 M02: 5'-GATGAGTCCTGAGTAAC-3', 50 μ L PCR 反应体系含有 1.5 mmol/L $MgCl_2$, 0.2 mmol/L dNTP, 1 U rTaq 酶, 0.2 μ mol/L 引物, 20 ng DNA 模板。PCR 反应程序: 95°C 预变性 3 min; 95°C 30 s, 56°C 30 s, 72°C 60 s, 20 个循环; 72°C 60 s 延伸。PCR 产物 4°C 保存。预扩增产物 1:15 (V/V) 稀释后,用于选择性扩增,选择性扩增引物 3' 端带有 3 个选择性碱基,选取 6 对引物进行扩增。PCR 反应程序: 95°C 预变性 3 min, 95°C 30 s, 65°C 30 s, 降落 PCR, 每个循环退火温度降低 0.7°C, 12 个循环后, 95°C 30 s, 56°C 30 s, 72°C 60 s, 8 个循环, 72°C 60 s 延伸。取选择性扩增产物 10 μ L 于 PCR 仪上 95°C 变性 2 min, 迅速取出置于冰上使其保持变性状态,在 4.5% (V/V) 的变性聚丙烯酰胺凝胶上电泳检测;电泳缓冲液为 1 \times TBE,保持 60 W 恒定功率;在不加样品的情况下先预电泳 30 min,然后将尿素吹净,在点样孔加入样品,电泳至第一条 loading buffer 指示剂到玻璃板底部时结束电泳。银染参考韩晓磊等^[20]方法进行。

1.2.3 RAPD 扩增

用混合 DNA 模板从 300 条 RAPD 引物中筛选出多态性较高的引物,设计正交试验优化 rTaq 酶、dNTP、引物和 Mg^{2+} 的浓度,确定 PCR 反应体系为 25 μ L,含有 1.5 U rTaq 酶,5% (V/V) DMSO, 0.25 mmol/L dNTP, 2 mmol/L $MgCl_2$, 0.2 μ mol/L 引物, 20 ng DNA 模板;梯度 PCR (33~43°C) 优化每条引物的退火温度。PCR 扩增程序: 94°C 预变性 5 min; 94°C 45 s, 最佳退火温度 45 s, 72°C 90 s, 40 个循环;然后 72°C 延伸 10 min。选择多态性高的引物对每个样品基因组 DNA 进行扩增,产物用 1.5% (W/V) 琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像仪观察结果并拍照记录。

1.2.4 图谱分析

根据琼脂糖凝胶或者聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱,将图谱上某一位置出现的条带记为 1,缺失的条带记为 0,强带和弱带均记为 1,只记录重复性好的条带,得出 0/1 原始数据矩阵。研究使用的遗传学参数主要有:

多态位点比率 $P = \text{多态位点数} / \text{位点总数} \times 100\%$,

遗传相似性系数 $S_{xy} = 2N_{xy} / (N_x + N_y)$,

遗传距离 $D = 1 - S$,

其中: n_i 为 i 位点上有带的品系数, n 为总品系数; N_{xy} 为品系 x 和品系 y 共有的位点数, N_x 和 N_y 分别为 x 和品系 y 的总位点数; S 为相似系数。

利用 PopGen32 计算遗传相似度、遗传距离和遗传多样性;利用 Arlequin 进行 AMOVA 分析;利用 MEGA5.0 构建 UPGMA 系统树。

2 结果与分析

2.1 ISSR 分子标记结果

2.1.1 ISSR 扩增结果

本试验筛选出 7 个 ISSR 引物,对不同栽培品系 DNA 样品进行 PCR 扩增,7 个 ISSR 引物扩增出位点数目为 3~12,共扩增产生 52 个可统计的位点,其中 31 个位点为 9 个品系所共有的 ISSR 标记位点,共有位点百分率为 59.62% (表 2)。

表 2 ISSR 引物在栽培品系间的扩增情况

Table 2 Amplification pattern of ISSR between different cultivars

引物编号 Primer No.	引物序列 Primer sequence (5'-3')	位点数 No. of loci	多态位点数 No. of polymorphic loci	多态位点 比率 (%) Percent of polymorphic loci
809	(AG) ₈ G	12	7	58.33
826	(AC) ₈ C	8	3	37.50
827	(AC) ₈ G	8	3	37.50
830	(TG) ₈ G	3	1	33.33
856	(AC) ₈ YA	7	1	14.29
890	VHV(GT) ₇	7	3	42.86
891	HVH(TG) ₇	7	3	42.86
平均值 Mean		7.43	3	38.10

2.1.2 品系间的遗传多样性

在 52 个扩增位点中,多态位点为 21 条,多态位点比率为 40.38%。不同品系间的平均遗传距离为 0.1785,平均 Shannon's 指数为 0.1143,平均杂合度不大 (0.2164)。条斑紫菜不同栽培品系两两间的遗传距离为 0.0594~0.3403 (表 3)。

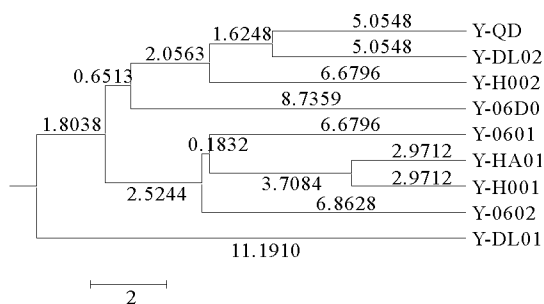
表 3 不同栽培品系两两间的遗传距离

Table 3 Pairwise genetic distance between different screened cultivars

	Y-QD	Y-DL01	Y-DL02	Y-0601	Y-0602	Y-06D0	Y-HA01	Y-H001	Y-H002
Y-QD	—								
Y-DL01	0.3403	—							
Y-DL02	0.1011	0.2136	—						
Y-0601	0.2377	0.1671	0.2136	—					
Y-0602	0.1671	0.1900	0.1446	0.1446	—				
Y-06D0	0.1900	0.2136	0.1671	0.2136	0.2377	—			
Y-HA01	0.2136	0.1900	0.1446	0.1446	0.1226	0.1900	—		
Y-H001	0.2377	0.2136	0.2136	0.1226	0.1446	0.1671	0.0594	—	
Y-H002	0.1446	0.2624	0.1226	0.1671	0.1446	0.1671	0.1446	0.1671	—

2.1.3 聚类分析

基于 ISSR 遗传距离,采用 MEGA5.0 软件构建 9 个栽培品系的 UPGMA 系统树(图 1)。从聚类结果可以看出,Y-QD、Y-DL02、Y-H002 和 Y-06D0 聚在一个分支内,Y-0601、Y-HA01、Y-H001 和 Y-0602 聚为另一个分支,Y-DL01 单独聚为一支。



为 16.67%~53.57%。另外,从表 4 可见各引物组合的总位点数差异不显著($P > 0.05$)。

表 4 不同 AFLP 引物对的扩增结果

Table 4 Number of bands generated by AFLP primer combinations

引物组合 Primer combination	扩增位点数 No. of total amplified loci	多态位点数 No. of total polymorphic loci	多态位点比率 Percent of all polymorphic loci (%)
E11/M47	32	14	43.75
E11/M48	32	15	46.88
E11/M49	28	15	53.57
E11/M55	42	17	40.48
E23/M49	24	4	16.67
E23/M55	32	9	28.12
总计 Total	190	74	38.95

图 1 基于 ISSR 遗传距离构建的栽培品系 UPGMA 系统树

Fig. 1 UPGMA dendrogram of 9 screened cultivars reconstructed by ISSR genetic distance

Note: E11; 5'-GACTGCGTACCAATTCAA-3'; E23; 5'-GACTGCGTACCAATTCTA-3'; M47; 5'-GATGAGTCCTGAGTAACAA-3'; M48; 5'-GATGAGTCCTGAGTAACAC-3'; M49; 5'-GATGAGTCCTGAGTAACAG-3'; M55; 5'-GATGAGTCCTGAGTAACGA-3'

2.2 AFLP 结果

2.2.1 AFLP 扩增结果

使用 6 对不同引物对,从 9 个栽培品系的 DNA 样品中共检出 190 个不同长度的位点(表 4)。对 190 个位点进行统计发现,9 个栽培品系共有的 AFLP 标记位点有 116 个(共有位点百分比为 61.05%)。不同引物的扩增结果存在差异,产生的位点从 24 到 42 不等,扩增出的多态位点为 4~17 条,多态位点比率

2.2.2 品系间的遗传多样性

为 16.67%~53.57%。另外,从表 4 可见各引物组合的总位点数差异不显著($P > 0.05$)。不同栽培品系间遗传相似度和遗传距离分别为 0.8971 和 0.1029,品系间的 Shannon's 指数为 0.2101,平均杂合度为 0.1406。条斑紫菜不同栽培品系两两间遗传距离为 0.0402~0.1571(表 5)。

表 5 不同栽培品系两两间的遗传距离

Table 5 Pairwise genetic distance between different screened cultivars

	Y-QD	Y-DL01	Y-DL02	Y-0601	Y-0602	Y-06D0	Y-HA01	Y-H001	Y-H002
Y-QD	—								
Y-DL01	0.1418	—							
Y-DL02	0.1363	0.1418	—						
Y-0601	0.0725	0.1147	0.1545	—					
Y-0602	0.1224	0.0638	0.1545	0.0891	—				
Y-06D0	0.0903	0.1080	0.1571	0.0844	0.1087	—			
Y-HA01	0.1358	0.0836	0.1219	0.1081	0.0402	0.0935	—		
Y-H001	0.1126	0.0889	0.1331	0.1059	0.0537	0.1267	0.0882	—	
Y-H002	0.1103	0.0791	0.1310	0.0969	0.0507	0.0960	0.0408	0.0763	—

2.2.3 聚类分析

基于 AFLP 遗传距离,利用 MEGA5.0 软件构建栽培品系的 UPGMA 系统树(图 2)。从聚类结果可以看出,Y-DL02 单独聚类,Y-QD、Y-0601、Y-06D0 聚为一个分支,Y-DL01、Y-0602、Y-HA01、Y-H001 和 Y-H002 聚类在一起。

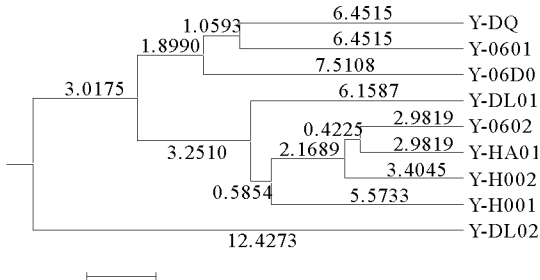


图 2 基于 AFLP 遗传距离构建的栽培品系 UPGMA 系统树

Fig. 2 UPGMA dendrogram of screened cultivars reconstructed by AFLP genetic distance

2.3 RAPD 结果

2.3.1 RAPD 扩增结果

本试验筛选出 27 个 RAPD 引物,对 9 个栽培品系的 DNA 样品进行 PCR 扩增,27 个 RAPD 引物扩增出 5~18 位点,共扩增产生 274 个可统计的位点,其中不同栽培品系共有的 RAPD 标记位点有 102 条(共有位点百分比为 37.23%)(表 6)。

2.3.2 品系间遗传多样性

在 274 个扩增位点中,多态位点为 172 条,多态位点比率为 62.77%;栽培品系间的平均遗传距离、Shannon's 指数和平均杂合度分别为 0.2845、0.3281 和 0.2174。条斑紫菜不同栽培品系两两间的遗传距离为 0.1535~0.5072(表 7)。

2.3.3 聚类分析

基于 RAPD 遗传距离,采用 MEGA5.0 软件构建条斑紫菜 9 个栽培品系的 UPGMA 系统树(图 3)。从图中可以看出,Y-DL02 与其他品系分开聚类,Y-0601、Y-0602、Y-06D0、Y-HA01、Y-H001 和 Y-H002 聚类在一起。

表 7 不同栽培品系两两间的遗传距离

Table 7 Pairwise genetic distance between different screened cultivars

	Y-QD	Y-DL01	Y-DL02	Y-0601	Y-0602	Y-06D0	Y-HA01	Y-H001	Y-H002
Y-QD	—								
Y-DL01	0.3928	—							
Y-DL02	0.4656	0.5072	—						
Y-0601	0.2804	0.2950	0.4257	—					
Y-0602	0.2660	0.2332	0.4426	0.1535	—				
Y-06D0	0.2425	0.2950	0.4036	0.1926	0.1794	—			
Y-HA01	0.2804	0.2565	0.4483	0.2015	0.2060	0.2015	—		
Y-H001	0.2332	0.2950	0.5072	0.1926	0.1882	0.2015	0.2472	—	
Y-H002	0.2332	0.2472	0.4598	0.2015	0.2060	0.2472	0.2105	0.2015	—

表 6 RAPD 引物在栽培品系间的扩增情况

Table 6 Amplification pattern of RAPD primers between different cultivars

引物编号 Primer No.	引物序列 Primer sequence	位点数 No. of loci	多态位点数 No. of Polymorphic loci	多态位点比率 Percent of polymorphic loci(%)
22	TGATCCCTGG	15	10	66.67
56	CACACTCCAG	10	7	70.00
62	GGACCCAACC	12	8	66.67
65	TGAGCGGACA	12	7	58.33
67	TTGGCACGGG	7	3	42.86
82	GGTGCGGGAA	8	2	25.00
114	TGCTGCAGGT	14	12	85.71
118	TTCCCGGGTT	9	5	55.56
119	CCTCTAGACC	6	3	60.00
155	AGTCGTCCCC	11	8	72.73
160	GGGAGACATC	7	3	42.86
170	ACAACGCGAG	7	4	57.14
201	CATTTCGAGCC	11	9	81.82
215	CTCCTGCCAA	18	11	61.11
226	GAGGGAAGAG	15	10	66.67
236	AGGTTGCAGG	5	1	20.00
239	GAGTGGTGAC	10	7	70.00
241	GTTGGTGGCT	14	7	50.00
266	GAGACGCACA	10	7	70.00
269	TGCCGGCTTG	10	8	80.00
272	CACAGACACC	8	4	50.00
278	GGTGAGGTCA	10	5	50.00
280	GGTGCTCCGT	11	10	90.91
282	ACGTAGCGTC	12	5	41.67
296	TCGGCGGTTC	8	5	62.50
299	GGTGCACGTT	9	7	77.78
300	ACACACGCTG	10	9	90.00
平均值 Mean	—	10.33	6.56	61.70

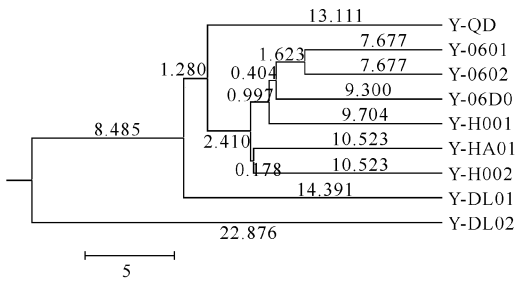


图3 基于RAPD遗传距离构建的栽培品系UPGMA系统树

Fig. 3 UPGMA dendrogram of cultivars reconstructed by RAPD genetic distance

3 讨论

ISSR、AFLP 和 RAPD 都是在 PCR 的基础上发展出来的分子标记技术,之前的研究证明这 3 种不同的分子标记均可用于紫菜品系鉴定、遗传多样性分析等^[7,15]。其中 ISSR 标记因其随机引物末端带有锚定碱基,既有高多态性又有较高稳定性; AFLP 虽然实验成本高、实验步骤繁琐复杂、技术要求高等,然而实验结果稳定可靠、重复性好; RAPD 技术是发展较早的分子标记,因其多态性高、简单快捷等特点,被认为适用于种质库鉴定、管理工作。陈淑吟等^[21]认为通过多个分子标记组合使用即能得到可靠的结论。本研究用 ISSR、AFLP 和 RAPD 3 种分子标记研究紫菜不同栽培品系遗传多样性,结果显示不同品系之间平均遗传距离分别为 0.1785, 0.1029 和 0.2845。造成这一结果的原因可能与不同的分子标记所表现出来的多态性不同有关,另一个可能原因是引物组合的多寡也会引起一定的遗传距离变化。因此,使用不同的分子标记虽然会在具体数据上表现出一定差异,但得出的一致结论可能更加可靠。

本研究 ISSR 分子标记得出的不同条斑紫菜栽培品系之间遗传距离为 0.0594~0.3403(表 3),这一结果比陈昌生等^[8]所得出的野生坛紫菜种群间遗传距离(0.0414~0.052)和陈淑吟等^[21]所得出的条斑紫菜不同丝状体种质间遗传距离(0.0392~0.0981)大,但比谢潮添等^[15]所得出的坛紫菜不同色泽丝状体栽培品系间的遗传距离(0.4410~0.7655)和袁昭岚等^[18]所得出的条斑紫菜不同栽培品系之间遗传距离(0.3897~0.4469)小。这一结果可能说明本实验所研究的不同条斑紫菜栽培品系,包括条斑紫菜和坛紫菜“杂交”选育的 Y-H001、Y-H002 和诱变选育的 Y-0601、Y-0602、Y-06D0 等品系,在基因水平上仍然属于条斑紫菜,经过诱变选育,提高种质遗传多样性,形成不同品系,但仍然需要进一步选育以阻止栽培种质退化。本实验 AFLP 结果得出条斑紫菜不同栽培

品系间遗传距离为 0.0402~0.1571(表 5),比陈奕欣等^[7]得出的福建海区坛紫菜不同栽培种群之间遗传距离(0.264~0.398)和杨锐等^[17]得出的野生坛紫菜不同地理种群和表型种群之间遗传距离(0.2318~0.6023)小。这一结果不仅证明条斑紫菜不同栽培品系仍需进一步选育以继续增大种质遗传多样性,也反应出条斑紫菜和坛紫菜两个物种之间的区别^[6]。本实验 RAPD 结果得出条斑紫菜不同栽培品系之间的平均遗传距离为 0.2845,这一结果与徐涤等^[16]得出的条斑紫菜两个品系(0.32)和坛紫菜两个品系之间(0.31)的遗传距离相似,但比陈骁等^[6]得出的条斑紫菜两个品系(0.029)和坛紫菜不同品系之间的遗传距离(0.174)大。综合 3 种分子标记所得的遗传距离分析,本实验所研究的不同选育栽培品系,在遗传角度仍然属于条斑紫菜,但经过杂交或诱变选育后,遗传距离介于种内和品系间,已形成不同的栽培品系,在为生产提供良种确保栽培生产稳定的同时,提高条斑紫菜种质遗传多样性,确保条斑紫菜栽培种质不退化。同时通过比较发现,条斑紫菜不同品系(种群)间遗传距离与坛紫菜不同品系(种群)间遗传距离相比较小。

ISSR、AFLP 和 RAPD 对不同条斑紫菜栽培品系的聚类分析结果显示,3 个聚类树并不严格一致(图 1~3),一方面表明不同分子标记之间的差异,另一方面也为所研究的不同品系亲缘关系较近,仍属条斑紫菜提供证据。从聚类分析的结果中可以看出,品系 Y-0602、Y-HA01 和 Y-H001 总是聚在一起,而 Y-DL02 更倾向于聚类在独立分支,可能与各个栽培选用品系亲本来源有关系。

参考文献:

- [1] 胡传明,王丹青,王锡昌,等. 条斑紫菜与坛紫菜挥发性风味的电子鼻分析[J]. 广西科学, 2016, 23(2): 138-143. HU C M, WANG D Q, WANG X C, et al. Odors analysis of *Pyropia yezoensis* and *Pyropia haitanensis* by electronic nose[J]. Guangxi Sciences, 2016, 23(2): 138-143.
- [2] NIWA K, KIKUCHI N, HUWANG M S, et al. Cryptic species in the *Pyropia yezoensis* complex (Bangiales, Rhodophyta): Sympatric occurrence of two cryptic species even on same rocks[J]. Phycological Research, 2014, 62: 36-43.
- [3] SONG L S, DUAN D L, LI X H, et al. Use of RAPD for detecting and identifying *Porphyra* (Bangiales, Rhodophyta)[J]. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 1998, 16(3): 237-242.
- [4] SUN J W, JIN D M, ZHOU C J, et al. Identification of *Porphyra* lines (Rhodophyta) by AFLP DNA finger-

- printing and molecular markers[J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2005, 23(3): 251-262.
- [5] WENG M L, LIU B, JIN D M, et al. Identification of 27 *Porphyra* lines (Rhodophyta) by DNA fingerprinting and molecular markers[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2005, 17: 91-97.
- [6] 陈骁, 左正宏, 姚继承, 等. 几种紫菜种质资源遗传多样性的 RAPD 分析[J]. *海洋科学*, 2005, 29(4): 76-80.
CHEN X, ZUO Z H, YAO J C, et al. Analysis of genetic diversity of *Porphyra* by random amplified polymorphic DNA[J]. *Marine Science*, 2005, 29(4): 76-80.
- [7] 陈奕欣, 左正宏, 陈骁, 等. 坛紫菜种质资源遗传多样性的 AFLP 分析[J]. *厦门大学学报: 自然科学版*, 2007, 46(6): 831-835.
CHEN Y X, ZUO Z H, CHEN X, et al. Analysis of genetic diversity of *Porphyra haitanensis* using AFLP[J]. *Journal of Xiamen University: Nature Science*, 2007, 46(6): 831-835.
- [8] 陈昌生, 谢潮添, 纪德华, 等. 野生坛紫菜种群遗传多样性的 ISSR 分析[J]. *水产学报*, 2008, 32(5): 717-724.
CHEN C S, XIE C T, JI D H, et al. Genetic diversity of wild population of *Porphyra haitanensis* based on ISSR analysis[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2008, 32(5): 717-724.
- [9] JIA J H, WANG P, JIN D M, et al. The application of RAPD markers in diversity detection and variety identification of *Porphyra* [J]. *Acta Botanica Sinica*, 2000, 42(4): 403-407.
- [10] 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.
MEI J X, JIN D M, JIAN J H, et al. DNA polymorphism of *Porphyra yezoensis* and its application to cultivar discrimination[J]. *Journal of Shandong University*, 2000, 35(2): 230-234.
- [11] 乔利仙, 翁曼丽, 孔凡娜, 等. RSAP 标记技术在紫菜遗传多样性检测及种质鉴定中的应用[J]. *中国海洋大学学报*, 2007, 37(6): 951-956.
QIAO L X, WENG M L, KONG F N, et al. The application of RSAP markers technique in diversity detection and germplasms identification of *Porphyra* [J]. *Journal of Ocean University of China*, 2007, 37(6): 951-956.
- [12] 石金锋, 贾建航, 王萍, 等. 紫菜无性系特异分子标记的获得[J]. *高技术通讯*, 2000, 10: 1-3.
SHI J F, JIA J H, WANG P, et al. Development of specific molecular markers for *Porphyra* lines[J]. *High Technology Communication*, 2000, 10: 1-3.
- [13] 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.
SHI J F, JIA J H, JIN D M, et al. Conversion of RAPD marker to SCAR marker in *Porphyra* line[J]. *Acta Oceanologica Sinica*, 2003, 25(1): 128-131.
- [14] 孙雪, 骆其君, 杨锐, 等. 紫菜 (*Porphyra*) 遗传差异的 ISSR 分析[J]. *海洋与湖沼*, 2007, 38(2): 141-145.
SUN X, LUO Q J, YANG R, et al. ISSR analysis on genetic variation in *Porphyra* [J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2007, 38(2): 141-145.
- [15] 谢潮添, 纪德华, 陈昌生, 等. ISSR 标记在坛紫菜不同色泽丝状体种质鉴定中的应用[J]. *水产学报*, 2007, 31(1): 105-111.
XIE C T, JI D H, CHEN C S, et al. Application of ISSR markers in germplasm identification of different color's *Porphyra haitanensis* filament strains[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2007, 31(1): 105-111.
- [16] 徐涂, 宋林生, 秦松, 等. 五个紫菜品系间遗传差异的 RAPD 分析[J]. *高技术通讯*, 2001, 12: 1-4.
XU D, SONG L S, QIN S, et al. RAPD analysis of genetic variation among cultivated *Porphyra* [J]. *High Technology Communication*, 2001, 12: 1-4.
- [17] 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, 1: 83-86.
YANG R, LIU B Q, LUO Q J, et al. Genetic variation of *Porphyra haitanensis* by applying AFLP[J]. *High Technology Communication*, 2002, 1: 83-86.
- [18] 袁昭岚, 黄鹤忠, 沈颂东, 等. 条斑紫菜 5 个栽培品系的 ISSR 分析[J]. *海洋科学*, 2006, 30(7): 9-14.
YUAN Z L, HUANG H Z, SHEN S D, et al. Inter-simple sequence repeat (ISSR) analysis of five cultivars in *Porphyra yezoensis* [J]. *Marine Science*, 2006, 30(7): 9-14.
- [19] YANG L E, JIN Q P, XIAO Y, et al. Improved methods for basic molecular manipulation of the red alga *Porphyra umbilicalis* (Rhodophyta: Bangiales) [J]. *Journal of Applied Phycology*, 2013, 25: 245-252.
- [20] 徐建荣, 韩晓磊, 李宁, 等. 松江鲈群体遗传多样性的 AFLP 分析[J]. *大连水产学院学报*, 2008, 23(6): 437-441.
XU J R, HAN X L, LI N, et al. Analysis of genetic diversity in roughskin sculpin *Trachidermus fasciatus* by AFLP markers [J]. *Journal of Dalian Fisheries University*, 2008, 23(6): 437-441.
- [21] 陈淑吟, 陆勤勤, 张美如, 等. 紫菜丝状体种质特性的 ISSR 分析[J]. *江苏农业科学*, 2015, 43(7): 17-20.
CHEN S Y, LU Q Q, ZHANG M R, et al. ISSR analysis of characteristics of *Pyropia conchocelis* germplasms [J]. *Jiangsu Agriculture Science*, 2015, 43(7): 17-20.

(责任编辑: 米慧芝)