

4种紫菜叶状体的 ISSR 分子标记分析

崔灵英¹, 许璞², 朱建一², 许广平², 骆其君³, 马家海¹

(1. 上海水产大学 生命科学与技术学院, 上海 200090; 2. 江苏省海洋水产研究所, 江苏 南通 226007; 3. 宁波大学 生命科学学院, 浙江 宁波 315211)

摘要: 4种紫菜样品分别为采自青岛海区的野生条斑紫菜(*Porphyra yezoensis*)、华北半叶紫菜(*P. kataadai* var. *hemiphylla*)、少精紫菜(*P. oligospermatangia*)和浙江象山海区人工栽培的坛紫菜(*P. haitanensis*)。取其10—15 cm叶状体为材料, 采用 ISSR(Inter-simple sequence repeats)分子标记进行分析。从100个 ISSR引物中筛选出22个引物, 扩增出清晰、可重复的条带共计247条, 其中多态性条带比例达95.5%。根据扩增结果进行的聚类分析显示, 条斑紫菜和少精紫菜的亲缘关系最为接近, 在聚类图中二者首先聚在一起, 接着与坛紫菜相聚, 最后与华北半叶紫菜汇聚。本研究还讨论了紫菜属海藻的遗传多样性以及种间的特异性 ISSR 分子标记。本研究目的在于紫菜遗传变异、亲缘关系以及分类研究, 探索新的分析手段。[中国水产科学, 2006, 13(3): 371—377]

关键词: 紫菜; ISSR-PCR; 聚类分析

中图分类号: Q943 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-8737-(2006)03-0371-07

紫菜(*Porphyra*)是重要经济海藻, 广泛分布于从寒带到亚热带之间的潮间带海域。已报道的紫菜种类约有134种之多, 中国记载有22个物种或变种^[1]。紫菜生活史属不等世代型, 分为大型配子体(叶状体)世代和微型孢子体(丝状体)世代。紫菜分类学研究主要以叶状体形态特征为依据, 如根据叶片的颜色、形态、厚度、边缘细胞特征、藻株性别特征、生殖细胞分裂式、染色体数目以及生活史类型等进行分类与谱系分析^[2-5]。然而紫菜的表型特征有一定的局限性, 有些表型特征是基因型与环境相互作用的产物, 基因型相同的个体在不同环境条件下可能表现出显著的表型差异, 这给紫菜分类和系统学研究带来一定的困难或不确定性^[6-9]。

核酸DNA是最原始的遗传物质。随着现代分子生物学技术的发展, 直接以DNA为分析对象进行PCR扩增的各种分子标记技术不断涌现出来, 可从核酸水平检测个体、群体和种间的遗传差异。分子标记具有信息量大和不受环境影响等诸多优点, 可以弥补传统分类学方法的不足, 为系统分类学提供了新的研究方法。各种分子标记技术在紫菜研究中也得到了广泛应用。Stiller等^[10]根据SSU rDNA

的限制性酶切位点, 对15种紫菜进行了种质鉴定和系统学研究; Mizukami等^[11]利用RAPD技术对条斑紫菜(*P. yezoensis*)的4个品种和甘紫菜(*P. tenera*)的2个品种进行了种质差异分析。Dutcher等^[12]用RAPD标记研究北大西洋西部海区和临近墨西哥湾海区的3种紫菜的遗传多样性。Stiller等^[13]对紫菜(*P. rediviva*)的rDNA进行RFLP研究, 揭示了东北太平洋沼泽地带这一新种可能源于北大西洋的紫菜(*P. purpurea*)。Osamu等^[14]对条斑紫菜(*P. yezoensis*)的3个品系进行了AFLP分析, 表明这些品系的遗传背景的多样性程度很高。郭宝太等^[15]对条斑紫菜和坛紫菜(*P. haitanensis*)的总DNA酶切后进行直观RFLP分析, 发现2种紫菜的谱带表现出明显的种间差异。

作为紫菜属海藻的二倍体世代, 其丝状体具有易于长期保存的特点^[16], 常被用作于种质保存的材料。近年来, 一些以丝状体为材料开展的研究, 如利用RAPD技术对多种紫菜丝状体进行遗传多样性和种质鉴定研究^[16-18], 通过RAPD标记测序转换得到SCAR的标记^[19], 利用AFLP对坛紫菜的遗传变异进行的研究等^[20], 丰富了紫菜分子标记研究的

收稿日期: 2005-07-19; 修订日期: 2005-11-15。

基金项目: 农业部“渔业资源保护”项目资助(农财发[2004]50)。

作者简介: 崔灵英(1979-), 女, 硕士研究生, 从事海洋生物学研究。E-mail: lycui@stmail.shfu.edu.cn

通讯作者: 许璞。Tel: 0513-85228263; E-mail: xup66@sina.com

内容与方法。但从紫菜两个世代的细胞性质来看,叶状体的单倍体性质使结果更为直观。

ISSR 分子标记是用 SSR(Simple sequence repeats)引物来扩增重复序列之间的区域,称为简单重复序列区间,又称为 Inter-SSR,简称 ISSR,为显性标记,具孟德尔遗传特征,因此被广泛地应用于人类以及各种动植物的遗传多样性的分析、品种和种质鉴定以及物种和种群亲缘关系的研究^[21-22]。本研究首次将 ISSR 分子标记应用于紫菜叶状体的研究,通过对中国产 4 种常见紫菜的 ISSR 分析,并以分子遗传学以及系统

学方面的数据资料,为紫菜遗传变异、亲缘关系以及分类研究提供新的方法。

1 材料与方法

1.1 实验材料

条斑紫菜(*P. yezoensis*)、华北半叶紫菜(*P. katadai* var. *hemiphylla*)和少精紫菜(*P. oligospermatangia*)为青岛海区的野生型藻体,坛紫菜(*P. haitanensis*)是浙江象山海区的人工栽培藻体。采集地点、时间见表 1。

表 1 实验所用材料名称、地点及时间

Tab. 1 Serial number, origins and time of materials in this study

名称 Serial number	采集地点 Location	采集时间 Collecting time
PY	青岛海区 Qingdao sea area	May 2005
PH	浙江象山海区 Xiangshan sea area in Zhejiang	Dec. 2005
PK	青岛海区 Qingdao sea area	Apr. 2005
PO	青岛海区 Qingdao sea area	May 2005

注:PY、PH、PK 和 PO 分别为条斑紫菜(*P. yezoensis*)、坛紫菜(*P. haitanensis*)、华北半叶紫菜(*P. katadai* var. *hemiphylla*)和少精紫菜(*P. oligospermatangia*)的简称。

Note: PY, PH, PK and PO represent *P. yezoensis*, *P. haitanensis*, *P. katadai* var. *hemiphylla* and *P. oligospermatangia*, respectively.

1.2 基因组 DNA 的提取

野外采集的紫菜叶状体材料,每种紫菜取 10~15 cm 藻体多株,经冷贮、暗培养和多次洗刷后,挑选健康藻体切取中间部位的营养组织区域,用灭菌蒸馏水洗净。基因组 DNA 提取过程为:将准备好的材料吸干水分并切碎,随机称取 4 种紫菜叶状体切碎小片材料约 200 mg,在液氮中研磨成粉末状,解冻后加入 3 倍体积预热的 CTAB 提取液,并加入 Protein K 至终质量浓度为 300 mg/mL,立即置于 eppendorf 管中,55 ℃ 水浴 1 h,加入 0.25 体积的 -20 ℃ 的 5 mol/L 的 KAc,冰浴 15 min,解冻后用等体积的酚、氯仿、异戊醇混合液(体积比 25:24:1)抽提 1~2 次,接着用酚抽提 2~3 次,然后用酚、氯仿、异戊醇混合液(体积比 25:24:1)和氯仿、异戊醇混合液(体积比 24:1)分别抽提 1~2 次,最后得到的无色透明水相用 2 倍体积的 -20 ℃ 预冷的无水乙醇充分沉淀,10 000 r/min 离心 10 min,沉淀物用 4 ℃ 的 70% 乙醇洗涤 2~3 次,干燥后溶于 TE buffer (10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 1 mmol/L EDTA),-20 ℃ 保存备用。

取 5 μL DNA 样品,在 1.0% 琼脂糖凝胶进行电泳检测其浓度。经 EB 染色后,在 FR-200 生物电泳图像分析仪上作定量记录。

1.3 PCR 反应体系

实验所用 MgCl₂、dNTP 及 Tag DNA 聚合酶等试剂由上海生工提供,引物是 University of British Columbia 设计的成套引物。PCR 反应在德国 Biotron 公司的 T-Gradient Thermoblock 型 Biometra PCR 仪上进行。

PCR 反应总体积为 25 μL,内含 Mg²⁺ 1.5 mmol/L, dNTP 0.2 mmol/L, 引物 0.25 μmol/L, 约 30 ng 的 DNA 模板和 1.5 u Taq 酶。

反应程序经过 94 ℃ 预变性 5 min,然后进入循环:94 ℃ 45 s, 52 ℃ 45 s, 72 ℃ 2 min,共 46 个循环,最后一个循环结束后再在 72 ℃ 继续延伸 10 min。扩增产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳分离,EB 染色后由 FR-200 生物电泳图像分析仪记录图像。

1.4 数据分析

PCR 扩增条带的有/无(强带和可重复出现的弱带均视为有),按 1/0 记录在矩阵中,数据由 PHILIP(v3.5)软件进行统计分析。按照 Nei 和 Li^[23]的相似性指数 $S_{AB} = 2N_{AB} / (N_A + N_B)$ 定义, N_{AB} 是共有的片段数, N_A 、 N_B 分别是样品 A、B 所有的片段数,相似性指数矩阵由公式 $d = 1 - S$ 转化为遗传距离(d),再根据遗传距离由 PHILIP(v3.5)软件中的 Neighbor-joining 程序进行聚类分析。

2 结果

2.1 紫菜叶状体 DNA 图谱

由改良的 CTAB 法提取获得的紫菜叶状体基因组 DNA, 经 1.0% 琼脂糖电泳 (含 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 溴化乙锭) 检测, 分子量约为 23 kb, 可以满足 ISSR-

PCR 扩增的需要 (图 1)。

2.2 引物的选择和扩增结果

从 100 个 ISSR 引物中筛选出 22 个能够产生清晰可重复性扩增片段的引物, 引物序列及扩增情况见表 2, 其中 10 个引物对 4 种紫菜叶状体 DNA 的扩增结果如图 2。

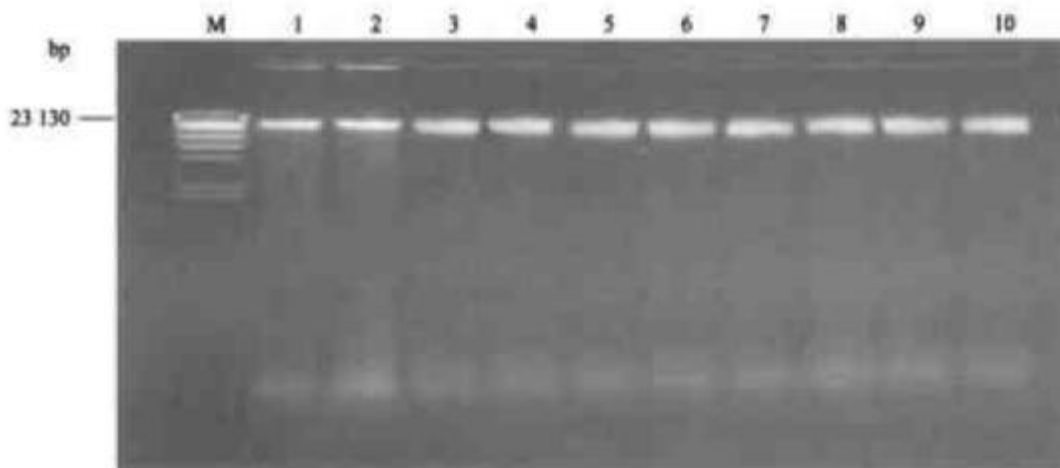


图 1 经 CTAB 提取的紫菜叶状体基因组 DNA 在 1.0% 琼脂糖凝胶中的电泳结果

M: *Hind* III 酶切的 λ DNA 分子量标记; 1~10: 紫菜叶状体基因组 DNA

Fig.1 Photograph of genomic DNA obtained from leafy thalli of *Porphyra* with CTAB and M: λ DNA digested with *Hind* III; Lanes 1~10: Genomic DNA obtained from leafy thalli of *Porphyra*

表 2 22 个引物对 4 种紫菜叶状体 DNA 的扩增情况

Tab.2 Amplification of 22 ISSR primers in four species of *Porphyra*

编号 No.	引物序列 Primer sequence	总扩增条带数 Total bands	多态性条带数 Polymorphic bands	多态位点比例/% Polymorphic loci rate
807	AGAGAGAGAGAGAGAGT	11	10	90.9
809	AGAGAGAGAGAGAGAGG	15	14	93.9
810	GAGAGAGAGAGAGAGAT	12	12	100.0
812	GAGAGAGAGAGAGAGAA	11	10	90.9
816	CACACACACACACAT	2	2	100.0
817	CACACACACACACAA	3	3	100.0
826	ACACACACACACACC	12	12	100.0
830	TGTGTGTGTGTGTGTGG	3	3	100.0
834	AGAGAGAGAGAGAGAGYT	27	25	92.6
850	GTGTGTGTGTGTGTGYC	15	14	93.9
855	ACACACACACACACAYT	18	18	100.0
856	ACACACACACACACAYA	11	11	100.0
857	ACACACACACACACAYG	13	13	100.0
859	TGTGTGTGTGTGTGTGRC	4	4	100.0
864	ATGATGATGATGATGATG	10	9	90.0
866	CTCTCTCTCTCTCTCTC	9	8	88.9
873	GACAGACAGACAGACA	14	13	92.9
878	GGATGGATGGATGGAT	11	11	100.0
881	GGGTGGGGTGGGGTG	14	13	92.9
890	VHCGTGTGTGTGTGTGT	12	12	100.0
891	HVHTGTGTGTGTGTGTG	11	11	100.0
895	AGAGTTGGTAGCTCTTGATC	9	8	88.9

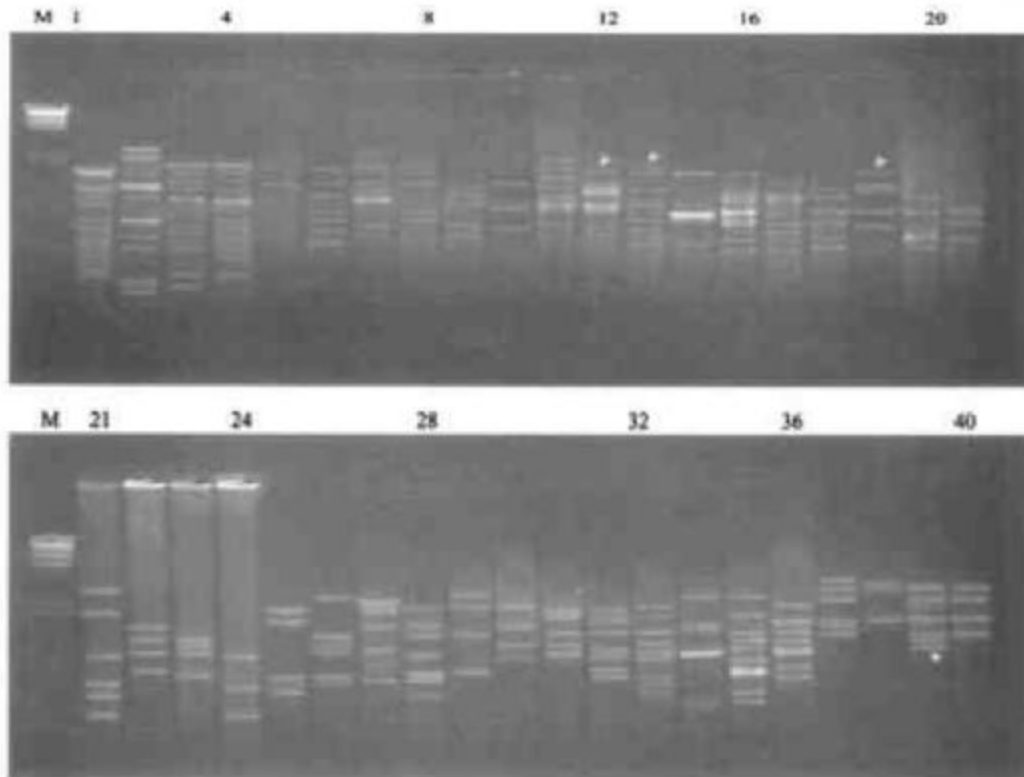


图2 4种紫菜叶状体DNA经不同ISSR引物扩增后的电泳图

M: *Hind* III酶切的λDNA分子量标记;1~4,5~8,9~12,13~16,17~20,21~24,25~28,29~32,33~36,37~40:分别为引物834,812,810,809,807,857,881,878,873,866对4种紫菜(顺序为少精紫菜、华北半叶紫菜、坛紫菜和条斑紫菜)叶状体DNA的扩增结果。

Fig.2 Amplification results of four species of *Porphyra* with different primers

Lane M: λDNA digested with *Hind* III; Lanes 1~4, Lanes 5~8, Lanes 9~12, Lanes 13~16, Lanes 17~20, Lanes 21~24, Lanes 25~28, Lanes 29~32, Lanes 33~36, Lanes 37~40: Amplification results of *P. oligospermatangia*, *P. hatadai* var. *hemiphylla*, *P. haitanensis* and *P. yessoensis* with primers 834, 812, 810, 809, 807, 857, 881, 878, 873 and 866, respectively.

这22个引物扩增出清晰可重复的条带共计247条。其中,多态性条带数为236条,占总条带数的95.5%。在这些DNA扩增片段中有4条分别出现在某一紫菜种内的条带:PY在引物810约1500 bp处,PH在引物866约500 bp处,PK在引物807约1500 bp处,PO在引物809的2027 bp处(图2中箭头所示)。

2.3 遗传距离和聚类分析

扩增出的DNA片段记录在1/0矩阵中,按照Nei和Li的分析方法,计算出4种紫菜之间的遗传距离和相似性系数,如表3所示。对角线下方为遗传距离,对角线上方为相似性系数。

根据Nei的遗传距离,用PHILIP(v3.5)软件构建聚类分析图(图3)。在图中,条斑紫菜和少精紫

菜首先聚在一起,接着和坛紫菜相聚,最后和华北半叶紫菜汇聚。

表3 遗传距离(左下方)和相似性系数(右上方)矩阵
Tab.3 Genetic distance (lower-triangular data matrix) and genetic similarity (upper-triangular data matrix) of four species of *Porphyra*

	PY	PH	PK	PO
PY	—	0.434	0.326	0.475
PH	0.565	—	0.349	0.359
PK	0.673	0.650	—	0.280
PO	0.524	0.640	0.719	—

注:PY,PH,PK和PO分别为条斑紫菜(*P. yessoensis*),坛紫菜(*P. haitanensis*),华北半叶紫菜(*P. hatadai* var. *hemiphylla*)和少精紫菜(*P. oligospermatangia*)的简称。

Note: PY, PH, PK and PO represent *P. yessoensis*, *P. haitanensis*, *P. hatadai* var. *hemiphylla* and *P. oligospermatangia*, respectively.

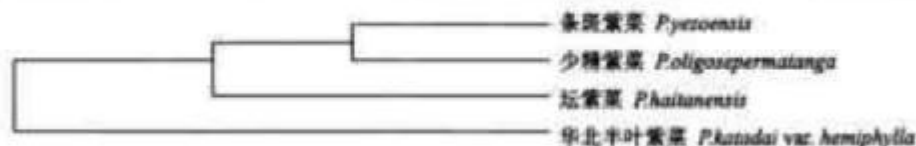


图3 4种紫菜的UPGMA聚类图

Fig. 3 Phylogenetic tree based on the genetic distance matrices with the method of UPGMA

3 讨论

3.1 紫菜叶状体基因组 DNA 的提取

紫菜叶状体基因组 DNA 的成功提取是本研究成败的关键。有关海藻基因组 DNA 的提取一直是困扰人们的问题之一^[24]。与紫菜丝状体不同,叶状体细胞壁较难破碎,且富含海藻黏性多糖,使得紫菜叶状体基因组 DNA 的提取量、纯度都很低,影响扩增结果。本研究所采用的 CTAB 法,是在 Doyle 等^[25]的基础上,通过不断摸索与总结,改良得到的一种基因组 DNA 的快速、简单的提取方法。提取得到的紫菜叶状体基因组 DNA 可以满足 ISSR-PCR 扩增的需要,为本研究的顺利开展奠定了基础。

3.2 4种紫菜的种间关系

从聚类分析结果来看,少精紫菜和条斑紫菜首先聚在一起,二者的遗传距离最为接近。两种紫菜都采自于青岛海区,地理位置和生长环境相似,有些研究认为^[17-18,20],地理环境相似可能是这一现象的解释。但是,在本研究中,华北半叶紫菜得到截然不同的结果,它与生长在同一地域的少精紫菜和条斑紫菜遗传差异最大,而较接近于生活在南方海域的坛紫菜。这说明紫菜物种之间的遗传距离并不总是与地理或生长环境相关。实验与分析结果表明,4种紫菜之间的重要生物学特征差异,例如少精紫菜和条斑紫菜染色体 $n=3$,并都具无性生殖特点,而半叶紫菜和坛紫菜染色体 $n=5$,且都不具无性生殖习性等^[1],与聚类分析结果有更为密切的关系。由 ISSR 分子标记得到的聚类结果,与贾建航等^[16]用 RAPD 标记对紫菜丝状体分析的结果一致,也符合经典分类学结果。

3.3 紫菜属的遗传多样性探讨

孙雪等^[26]用 ISSR 标记对几种江蓠属海藻进行了遗传多样性的研究,其中9个 ISSR 引物中有6个扩增出了多态性条带,多态性比例达 77.48%。本研究从 100 个 ISSR 引物中筛选出 22 个引物,扩增

出清晰条带 247 条,其多态性比例达 95.5%。紫菜与相近的真红藻纲江蓠相比,有较高的多态性。Kaprana 等^[12]用 RAPD 标记研究北大西洋西部海区和临近墨西哥湾海区的 3 种紫菜的遗传多样性时表明,这些物种的多态性程度较高;贾建航等^[16]在对 15 个紫菜种(系)的丝状体进行 RAPD 分析时得到多态性比例达 97.1%;杨锐等^[20]用 AFLP 对坛紫菜 8 个品系的丝状体进行分析得到 96.97% 的多态性位点,这些结果与本研究结果相似,进一步显示了紫菜物种的遗传变异是相当丰富的。实验结果同时也表明,由 ISSR 分子标记得到的紫菜遗传变异数据是可信的。

3.4 特异性条带

石金峰等^[17]曾筛选了 8 个代表不同紫菜种(系)的 RAPD 特异分子标记,徐藻等^[18]也筛选出 2 个随机引物用于区别条斑紫菜和坛紫菜。在本研究的扩增结果中,有 4 条只在某一紫菜种内出现的条带,可能为 4 种紫菜各自的特异分子标记。这些特异性条带经验证,回收、克隆后可用于设计分子探针或特异性引物等研究。

ISSR 是通过 PCR 反应扩增在真核生物中普遍存在的 SSR 之间的 DNA 片段,以检测基因组多个位点的差异。由于 ISSR 标记操作简便,只需微量的 DNA 模板就可进行分析,而且有很好的稳定性和多态性,也不涉及银染、同位素等复杂操作,因此在生物学中广泛的用于分析和评估种群的遗传多样性。在紫菜 DNA 指纹图谱的研究中,ISSR 分子标记方法可检测到相当丰富的多态位点,并可较方便地获得不同紫菜的特异性标记,因而具有重要应用价值。

参考文献:

- [1] 张学成, 蔡松, 马家海, 等. 海藻遗传学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2005.
- [2] Conway E, Mumford T F, Jr, et al. The genus *Porphyra* in British Columbia and Washington[J]. Syesis, 1975, 8: 185 - 244.

- [3] Garbary D J, Hansen G I, Scagle R F. The marine algae of British Columbia and northern Washington: division Rhodophyta (red algae), class Bangiophyceae[J]. Syesis, 1980, 13: 137-195.
- [4] Lindstrom S C, Cole K M. A revision of the species of *Porphyra* (Rhodophyta: Bangiales) occurring in British Columbia and adjacent waters[J]. Can J Bot, 1992C, 10: 2066-2075.
- [5] Kormann P. Life histories of monostromatic *Porphyra* species as a basis for taxonomy and classification[J]. Eur J Phycol, 1994, 29: 69-71.
- [6] Krishnamurthy V. A revision of the species of the algal genus *Porphyra* occurring on the Pacific coast of North America[J]. Pac Sci, 1972, 26: 24-49.
- [7] Kurogi M. Systematics of *Porphyra* in Japan[A]. Contributions to the Systematics of Benthic Marine Algae of the North Pacific [C]. Kobe: Japanese Society of Phycology, 1972. 167-192.
- [8] Lindstrom S C, Cole K M. An evaluation of species relationships in the *Porphyra perforata* complex (Bangiales, Rhodophyta) using starch gel electrophoresis[J]. Hydrobiologia, 1990a, 204/205: 179-183.
- [9] Mumford T F, Jr. Observations on the taxonomy of some species of *Porphyra* from Washington and Vancouver Island [D]. Seattle: University of Washington, 1973. 164.
- [10] Stiller J W, Walland J R. Molecular analysis reveals cryptic diversity in *Porphyra* (Rhodophyta)[J]. J Phycol, 1993(29): 506-517.
- [11] Mizukami Y, Okuchi M, Kito H, et al. Discrimination of laver cultivars with RAPD markers[J]. Fish Sci, 1996, 62(4): 547-551.
- [12] Dutcher J A, Kapran D E. Random amplification polymorphic DNA (RAPD) identification of genetic variation in three species of *Porphyra* (Bangiales, Rhodophyta)[J]. J Appl Phycol, 1994, 6: 267-273.
- [13] Stiller J W, Walland J R. *Porphyra radiosa* sp. Nov. (Rhodophyta): a new species from northeast Pacific salt marshes[J]. J Phycol, 1996, 33: 323-332.
- [14] Osamu Iitsuka, Kayo Nakamura, Akiyuki Oniki, et al. Genetic information of three pure lines of *Porphyra yezoensis* (Bangiales, Rhodophyta) obtained by AFLP analysis[J]. Fish Sci, 2002, 68: 1113-1117.
- [15] 郭宝太, 戴继勋, 毕玉平, 等. 紫菜总 DNA 酶切带型的发现与比较[J]. 海洋通报, 1999, 18(2): 88-92.
- [16] 贾建航, 王 萍, 金德敏, 等. RAPD 标记在紫菜遗传多样性检测和种质鉴定中的应用[J]. 植物学报, 2000, 42(4): 403-407.
- [17] 石金峰, 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(10): 1-3.
- [18] 徐 彦, 宋林生, 曲 松, 等. 五个紫菜品系间遗传差异的 RAPD 分析[J]. 高技术通讯, 2001, 11(12): 1-4.
- [19] 柳 波, 马家海, 金德敏, 等. 紫菜自由状态体 SCAR 标记的获得[J]. 高技术通讯, 2004, 14(12): 88-92.
- [20] 杨 锐, 刘必谦, 杨其君, 等. 利用片段长度多态性(AFLP)研究坛紫菜的遗传变异[J]. 高技术通讯, 2002, 12(1): 83-86.
- [21] Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome fingerprint by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification[J]. Genomics, 1994, 20: 176-183.
- [22] Fang D Q, Roose M L. Identification of closely related citrus cultivars with intersimple sequence repeat markers[J]. Theor Appl Genet, 1997, 95: 408-417.
- [23] Nei M, Li W M. Mathematical model for studying genetic distance in terms of restriction endonuclease[J]. Proceeding of the National Academy of Sciences, 1979, 76(5): 269-273.
- [24] 谢恩义, 纪焕红, 柳 波, 等. 红毛菜种间遗传差异的 RAPD 分析[J]. 中国水产科学, 2003, 10(4): 282-285.
- [25] Doyle J J, Doyle J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue[J]. Phytochem Bul, 1987, 19: 11-15.
- [26] 孙 雪, 张学成, 李云翔, 等. 几种江蓠属海藻的 ISSR 标记分析[J]. 高技术通讯, 2003, 13(9): 89-93.

Inter-simple sequence repeats (ISSR) applied in four species of *Porphyra* (Rhodophyta, Bangiales)

CUI Ling-ying¹, XU Pu², ZHU Jian-yi², XU Guang-ping², LUO Qi-jun³, MA Jia-hai¹

(1. College of Aquatic Life Science and Technology, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China; 2. Jiangsu Institute of Marine Fisheries, Nantong 226007, China; 3. College of Life Science, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: The red algal genus *Porphyra*, with more than 134 described species, is a common and conspicuous component of rocky intertidal habitats in temperate marine waters worldwide. Members of the genus *Porphyra* have a life cycle that between two dissimilar phase: the foliose gametophyte usually referred to as the "conchocelis", and the filamentous sporophyte. Up to now little has been known about the systematics of *Porphyra* due to taxonomic difficulties inherent in a large but morphologically simple genus. In this study, four familiar species of leafy thalli of *Porphyra* in the sea areas in China, *P. yezoensis*, *P. katadai* var. *hemiphylla*, and *P. oligospermatangia* were collected from the beach of Qingdao, except *P. haitanensis* which was cultivated in the coast of Xiangshan in Zhejiang. Among 100 ISSR primers, 22 could produce 247 clear and repeatable bands, of which 236 bands appeared to be polymorphic (95.5%). Genetic distance was calculated and the cluster analysis was performed based on the ISSR amplified results. The nearest genetic distance was 0.524 between *P. yezoensis* and *P. oligospermatangia* from the beach of Qingdao and the farthest was 0.719 between *P. katadai* var. *hemiphylla* and *P. oligospermatangia* from different sea areas. The phylogenetic tree, according to the genetic distance matrices with the method of UPGMA, showed the relationship among the four species of *Porphyra*. An ISSR branch was formed between *P. yezoensis* and *P. oligospermatangia*, then *P. haitanensis* was clustered, and *P. katadai* var. *hemiphylla* got together with them finally. The phylogenetic relationship was consistent with that by traditional method. Of these polymorphic bands, four peculiar bands, which appeared in the four species of *Porphyra* respectively, could be the unique bands of them by further study. The results indicate the difference of the important biological characters among the four species of *Porphyra*, such as the number of chromosome and the types of reproduction, was correlated with the cluster results. The results also reflects that ISSR technique is valid on the relationship in *Porphyra*. [Journal of Fishery Sciences of China, 2006, 13 (3): 371 - 377]

Key words: *Porphyra*; ISSR-PCR; cluster analysis

Corresponding author: XU Pu. E-mail: xupu66@sina.com