

中国海区不同养殖品系海带与 长海带之间的遗传关系

周志刚, 史西志, 胡远皆, 孙育平

(上海水产大学 渔业学院 农业部水产种质资源与养殖生态重点开放实验室, 上海 200090)

摘要:对中国海区海带(*Laminaria japonica*)不同栽培品系(种)及长海带(*L. longissima*)的配子体无性繁殖系进行12个酶系统的同工酶检测,获得了31个基因位点,酶谱分析结果说明,来自同一株海带的雌、雄配子体无性繁殖系具有较高的遗传相似性,但“860”品系可能因杂合度大,导致该品系雌、雄配子体无性繁殖之间的遗传距离较远。对它们相应的亲本孢子体进行RAPD分析,30个随机引物共得到185个扩增位点,其中多态性位点76个,占41%。利用UPGMA对同工酶及RAPD所得到的遗传距离进行聚类分析,表明中国海区养殖海带的不同品系或品种之间的遗传相似性较大,而“烟杂1号”与长海带之间具有较近的亲缘关系。基于同工酶和RAPD图谱的结果推测,“烟杂1号”是一个新的杂交种,其母本可能是“荣杂1号”,而父本可能是长海带。

关键词:配子体;同工酶;海带;长海带;RAPD;孢子体

中图分类号:Q949.288.4

文献标识码:A

文章编号:1005-8737-(2003)06-0474-07

随着养殖规模的扩大和使用价值的提高,我国在海带(*Laminaria japonica*)遗传育种和育苗方面开展了较深入的研究。所选育的品系或品种,相对农作物虽较少,但在国内外大型经济海藻中,还是比较多的^[1-3]。例如,高产高碘海带“860”品系^[4]、“海杂1号”^[5]、“单海1号”^[6]、“单海10号”^[7]、“高产早熟1号”^[1]、“荣杂1号”^[2]及2000年得到国家原良种审定委员会审定的“烟杂1号”^[2]等多个品系(种)。目前,象“860”品系、“高产早熟1号”、“荣杂1号”等品系或品种仍继续扮演着养殖角色。

海带等大型经济海藻遗传育种中所采用的主要经济性状指标是依据它们的形态特征(如叶片长、宽、厚,柄及固着器外形及内部结构等),这些形态

特征呈数量性状遗传^[1],它们或多或少受到多基因的控制,并能随生境条件发生较大的变化^[8]。因此,在海带的遗传育种研究中,仅根据其形态特征对种质进行鉴定是不够的,有必要通过生化及DNA标记等技术,进行种质鉴定和遗传关系分析。

Neefus等^[9]利用同工酶技术对海带属一些种及其他大型褐藻进行了群体遗传学的初步分析。Yotsukura等^[10]运用随机扩增多态性DNA(RAPD)技术对海带、皱海带(*L. religiosa*)和利尻海带(*L. ochotensis*)进行种的鉴定,认为皱海带可与海带分开,但与利尻海带没有太大的差别。综观海带的所有研究背景,利用同工酶及RAPD技术对海带品系(种)进行鉴定,至今还未曾报道。

近来,Hu等^[11]发展了一种自海带孢子体中提取高质量DNA的方法,并对其PCR随机扩增的条件等进行了优化^[12]。在此基础上,我们试图同时运用RAPD及同工酶技术,对中国海区养殖的不同品系(种)海带进行种质鉴定,探讨“烟杂1号”的亲本来源以及这些品系(种)与长海带等的遗传关系,为遗传标记在海带育种中的应用研究奠定理论基础。

收稿日期:2003-02-25; 修订日期:2003-07-29.

基金项目:国家自然科学基金(39800105);上海市教育发展基金会“曙光计划”项目(98-SG-32).

作者简介:周志刚(1964-),男,教授,博士,从事藻类生物技术教学和研究. E-mail: zgzhou@shfu.edu.cn

1)荣成市海带育苗场,青岛海洋大学生物系. 高产早熟海带新品种——“早1”的培育鉴定材料. 1991.

2)烟台市水产技术推广中心. “烟杂一号”海带新品种培育鉴定材料. 1996.

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 海带及长海带亲本材料的收集 “860”品系^[4](用860来表示,以下同)是中国科学院海洋研究所海藻遗传实验室保留的种质。“高产早熟1号”品系(Zao1)采自于荣成海带育苗场。“荣杂1号”品系(Rong1)由烟台水产技术推广中心赠送。

上述三品系,都来自于海带(*Laminaria japonica* Aresch),是定向培育并经过自交筛选的办法培育出来的。

“烟杂1号”品系(901)由烟台水产技术推广中心赠送,根据鉴定材料,它是海带与长海带的杂交种。长海带(*Laminaria longissima* Miyabe)(Long)由烟台水产技术推广中心赠送。

1.1.2 配子体无性繁殖系的获得 将上述成熟的亲本孢子体按周志刚等^[13]方法分别形成雌、雄配子体无性繁殖系,并扩繁培养。

1.2 配子体无性繁殖系粗酶液的制备

分别称取0.8 g鲜重的海带雌、雄配子体无性繁殖系,冰浴研磨15 min,加1 mL提取缓冲液(0.1 mol/L Tris-HCl, pH 8.0, 5 mmol/L EDTA, 0.3 mol/L 蔗糖, 4 % PVP 和 0.1 % β -巯基乙醇),按 Zhou 等^[14]方法提取粗酶液,分装后存于-20 °C冰箱中备用。

1.3 同工酶电泳与染色

使用10 %或15 % (过氧化物酶)聚丙烯酰胺凝胶(PAGE)在4 °C冰箱中进行电泳^[15],电压300 V,待溴酚蓝指示剂到达阳极前沿或者2~3 h后染色。

共进行18种同工酶的染色,发现12种酶有活性。其中酯酶(EST, EC3.1.1.-)按 Schoenberg 等^[16]方法染色,苹果酸脱氢酶(MDH, EC1.1.1.37)与莽草酸脱氢酶(SkDH, EC1.1.1.25)按 Francke 等^[17]方法染色,超氧化物歧化酶(SOD, EC1.15.1.1)按 Beauchamp & Fridovich^[18]方法染色,过氧化物酶(PER, EC1.11.1.7)按徐如涓等^[19]方法染色,而酸性磷酸酶(ACP, EC3.1.3.2)、腺苷酸激酶(ADK, EC2.7.4.3)、谷氨酸脱氢酶(GDH, EC1.4.1.2)、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PDH, EC1.1.1.49)、己糖激酶(HK, EC2.7.1.1)、异柠檬酸脱氢酶(IDH, EC1.1.1.42)及苹果酸酶(ME, EC1.1.1.40)按 Murphy 等^[20]方法染色。观察结果并拍照记录。

1.4 孢子体 DNA 提取

按 Hu 等^[11]方法先将海带孢子体酶解获得游离单细胞或原生质体,然后利用 CTAB 按 Hu 等^[11]方法提取 DNA,最后将其溶解于50~100 μ L 的 TE 缓冲液[10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 1 mmol/L EDTA]备用。

1.5 随机引物

RAPD 分析实验中所使用的10 bp 随机引物均购自上海生工生物工程有限公司。在筛选的80个引物中,30个能稳定产生可重复的多态性条带。这些引物及序列参见表1。

表1 RAPD 分析中所使用的随机引物及序列

Table 1 Sequences of random oligonucleotide primers employed for RAPD analysis

引物 Primer	核苷酸序列(5'→3') Nucleotide sequence (5' to 3')	引物 Primer	核苷酸序列(5'→3') Nucleotide sequence (5' to 3')
OPS-22	TGCCGAGCTG	OPS-73	AAGCCTCGTC
OPS-23	AGTCAGCCAC	OPS-74	TGCGTGCTTG
OPS-24	AATCGGGCTG	OPS-76	CACACTCCAG
OPS-27	GAAACGGGTG	OPS-78	TGAGTGGGTG
OPS-29	CGGTAACGCC	OPS-79	GTTCCAGCC
OPS-31	CAATCGCCGT	OPS-121	ACGGATCCTG
OPS-33	CAGCACCCAC	OPS-124	GGTGATCAGG
OPS-34	TCTCTGCTGG	OPS-126	GGGAATTCGG
OPS-35	TTCCGAACCC	OPS-127	CCGATATCCC
OPS-38	AGGTGACCGT	OPS-128	GGGATATCGG
OPS-39	CAAACGTCGG	OPS-130	GCAAGCTTGG
OPS-40	GTTGCGATCC	OPS-132	ACCGTACCAG
OPS-65	GATGACCGCC	OPS-133	GCCTGCAGAA
OPS-66	GAACGGACTC	OPS-134	TGCTGCAGGT
OPS-68	TGCACCGGTG	OPS-136	GGAGTACTGC

1.6 PCR 反应及电泳

按胡远皆等^[18]优化的程序和条件进行 PCR 反应。扩增产物在0.8 % 琼脂糖凝胶中电泳(含0.5 μ g/mL 溴化乙锭),电泳缓冲液为1 × TAE (20 mmol/L Tris-acetate, 1 mmol/L EDTA, pH 8.0),电压为5 V/cm,3 h后紫外灯下观察结果并拍照记录。

1.7 数据处理

把凝胶上出现的条带记为1,不出现的记为0,进行统计。根据 Jaccard 相似系数计算公式 $S_j = a/$

$(a+u)$ 计算相似系数 $S_j^{[21]}$, 其中 a 代表了每 2 个样品之间相同条带的个数, u 是不能成对的条带数。遗传距离按照公式 $D = -\ln S_j$ 计算, 利用 UPGMA (v2.0) 计算程序进行聚类分析, 利用 Mantel 程序计算 RAPD 与同工酶相似性系数的相关性。

2 结果与讨论

2.1 雌、雄配子体无性繁殖系同工酶酶谱分析

对 12 种同工酶的酶谱进行分析, 获得了 31 个基因位点, 其中 ACP、HK 和 SkDH 具有 2 个位点, PER 和 ADK 具有 3 个位点, MDH 和 SOD 具有 4 个位点, EST 具有 7 个位点, 而 G6PDH、GDH、IDH 和 ME 都只有 1 个位点。在研究的 10 个样品中, 共出

现 85 个等位基因, 平均每种酶可获得 7 个等位基因。其中“烟杂 1 号”雌、雄配子体无性繁殖系分别拥有 43 和 41 个等位基因, “高产早熟 1 号”分别为 41 和 39 个等位基因, 长海带分别为 35 和 30 个等位基因。

腺苷酸激酶的酶谱中“烟杂 1 号”雌、雄配子体无性繁殖系在位点 *Adk-2* 和 *Adk-3* 中都表现出多态性(图 1-a), 显示出它与其它品系存在不同。

过氧化物酶 *Per-1* 位点是分布于细胞质微体中, 只有长海带的雌、雄配子体无性繁殖系在该位点上存在多态性, 其它品系在这一位点及所有的品系在 *Per-2* 和 *Per-3* 位点上都表现了单态性(图 1-b)。

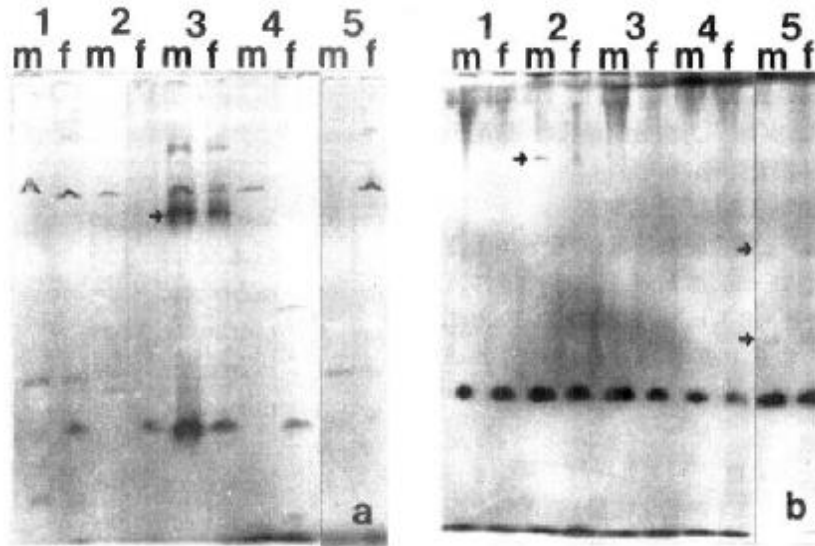


图 1 不同品系海带和长海带雌、雄配子体无性繁殖系的腺苷酸激酶(a)和过氧化物酶(b)同工酶电泳图谱

Fig. 1 Isozyme banding patterns of ADK and PER from various cultivars of *Laminaria japonica* and *L. longissima* gametophyte clones

1. 高产早熟 1 号; 2. 860; 3. 烟杂 1 号; 4. 荣杂 1 号; 5. 长海带; m. 雄配子体无性繁殖系; f. 雌配子体无性繁殖系。

1, Zao No. 1; 2, 860; 3, Yanza No. 1; 4, Rongza No. 1; 5, *L. longissima*; m, male gametophyte clone; f, female gametophyte clone

酯酶酶谱较复杂, *Est-1*, *Est-3* 和 *Est-4* 都是单态性, *Est-2* 位点上只有“高产早熟 1 号”雌配子体无性繁殖系表现了多态性, 相对而言 *Est-7* 位点上的多态性较高, 占 57%。

超氧化物歧化酶 *Sod-1* 可能是线粒体 DNA 编码的酶, *Sod-2* 和 *Sod-3* 位点可能是叶绿体 DNA 编码的酶, *Sod-3* 位点具有较高的多态性, 占 63%, *Sod-4* 可能是核基因组编码的酶, 都呈多态性。

酸性磷酸酶在 *Acp-1* 位点上呈现单态性, 在

Acp-2 位点上表现了 67% 的多态性。

莽草酸脱氢酶的 *Skdh-1* 是叶绿体 DNA 编码的酶, 它的多态位点百分率为 50%, 而 *Skdh-2* 是核基因组 DNA 编码的酶, 为单态性。

苹果酸脱氢酶在 4 个位点上都表现了高度的多态性, “烟杂 1 号”、“荣杂 1 号”和长海带在 *Mdh-3* 位点上所有的酶带都表现了高度的一致性。

“烟杂 1 号”在己糖激酶 *Hk-2* 位点和谷氨酸脱氢酶 *Gdh* 位点上分别出现了 $R_i = 0.291$ 和 $R_i =$

0.059的特有酶带,而其它的样品在该2位点上均呈单态性。

葡萄糖-6-磷酸脱氢酶和苹果酸酶的多态性都较高,均达到60%。而异柠檬酸脱氢酶为单态性。

2.2 孢子体 DNA 的 RAPD 图谱分析

在5个样品的海带孢子体进行了30个引物的RAPD分析,其中,单引物最多可产生11条带(OPS124),最少出现3条带(OPS132),平均每个引物产生6.2条带。所有引物共检测到185个扩增位点,其中多态性位点76个,占41%。扩增片段的大小分布为230~2000 bp。30个随机引物中,只有OPS65和OPS132 2个引物在5个样品中的扩增产物完全相同。

2.3 遗传标记分析

在过氧化物酶的同工酶谱中发现长海带在 *Per-1* 位点存在 $R_f=0.6$ 的这条酶带(图1-b中箭头所

示),但酶活性较 $R_f=0.705$ 的小得多,这条弱的酶带也可能是长海带与现中国海域养殖的海带不同的遗传标记之一;同样在该酶谱的 *Per-3* 位点上,“860”品系也表现了不同于其它样品的酶谱。另外,“烟杂1号”在 *Acp-1*、*Adk-2*、*Adk-3*、*Gdh*、*Hk-2*、*Mdh-4* 等位点上出现了特有的等位基因。

在RAPD图谱中,“烟杂1号”在OPS35和OPS27 2个引物中分别出现600 bp和550 bp不同于其它样品的遗传标记(图2a和2b中箭头所示),“860”品系在OPS76引物中出现1300 bp的遗传标记(图2c中箭头所示),长海带在OPS76引物中出现1900 bp的遗传标记(图2d中箭头所示)。

所有这些遗传标记是否是特征可遗传的标记、能否稳定地遗传并且在杂交后代中表现出来,尚需进一步研究

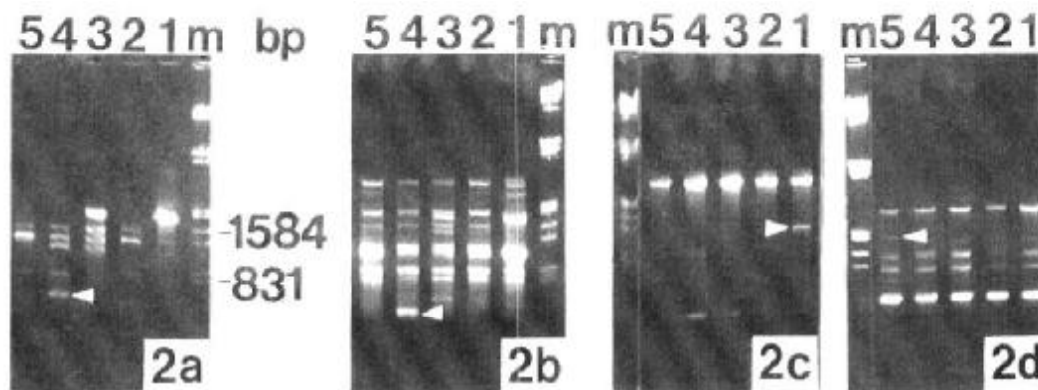


图2 不同品系海带和长海带在 OPS35(2a), OPS27(2b), OPS76(2c), OPS136(2d) 4种随机引物下的 RAPD 电泳图谱
Fig. 2 RAPD patterns of various cultivars of *Laminaria japonica* and *L. longissima* using OPS35 (2a), OPS27 (2b), OPS76 (2c), and OPS136 (2d) primers

1. 860; 2. 荣杂1号; 3. 高产早熟1号; 4. 烟杂1号; 5. 长海带; m. 分子量标准
1, 860; 2, Rongza No. 1; 3, Zao No. 1; 4, Yanza No. 1; 5, *L. longissima*; m, marker

2.4 遗传关系分析

自海带雌、雄配子体无性繁殖系的同工酶分析结果(表2)可知,“860”品系雌、雄配子体无性繁殖系之间的相似系数较小,只有0.388,甚至低于它与其他品系(如“高产早熟1号”和“荣杂1号”)之间的相似系数。说明该亲本孢子体的杂合度较大,以至在减数分裂产生游动孢子的时候,造成雌、雄配子体无性繁殖系遗传物质之间的相似系数较小。而其他海带所产生的雌、雄配子体无性繁殖系之间的相

似系数较大,甚至高达0.71(长海带)和0.75(“烟杂1号”),说明它们的杂合度较低,以至在配子体个体之间产生的分离度较小。

孢子体 DNA 的 RAPD 分析结果(表3)也说明,海带各品系及与长海带之间的遗传距离也比较大,平均为0.301,其中“烟杂1号”与“860”品系以及“高产早熟1号”与长海带之间的遗传距离分别高达0.381和0.365。

表2 根据同工酶谱计算的不同品系海带和长海带雌(F)、雄(M)配子体无性繁殖系之间的 Jaccard 相似系数(S_j) (右上角)和遗传距离(左下角)

Table 2 Pairwise comparisons of mean similarity coefficients (S_j) of Jaccard (upper-right) and genetic distances of various cultivars of *Laminaria japonica* and *L. longissima* male (M) and female (F) gametophyte clones based on isozyme banding patterns of 12 enzyme systems

样品 Sample	Zao1M	Zao1F	860M	860F	901M	901F	Rong1M	Rong1F	LongM	LongF
Zao1M	—	0.633	0.308	0.326	0.356	0.367	0.277	0.245	0.400	0.396
Zao1F	0.457	—	0.438	0.465	0.414	0.424	0.378	0.360	0.417	0.357
860M	1.178	0.826	—	0.388	0.346	0.333	0.324	0.400	0.311	0.306
860F	1.121	0.766	0.947	—	0.370	0.300	0.303	0.361	0.262	0.239
901M	1.033	0.882	1.061	0.994	—	0.750	0.292	0.388	0.291	0.288
901F	1.002	0.858	1.100	1.204	0.288	—	0.333	0.400	0.304	0.345
Rong1M	1.284	0.973	1.127	1.194	1.231	1.100	—	0.600	0.159	0.191
Rong1F	1.406	1.022	0.916	1.019	0.947	0.916	0.511	—	0.163	0.216
LongM	0.916	0.875	1.168	1.339	1.234	1.191	1.839	1.814	—	0.710
LongF	0.926	1.030	1.184	1.431	1.245	1.064	1.655	1.532	0.342	—

注:样品名参见“材料与方法”。

Note: Sample name refers to material and method.

利用遗传距离进行聚类分析(图3),结果表明来自同一亲本的雌、雄配子体无性繁殖系能聚在一起,其中“烟杂1号”的遗传距离最小,而“860”品系的遗传距离最大,“烟杂1号”与“荣杂1号”的

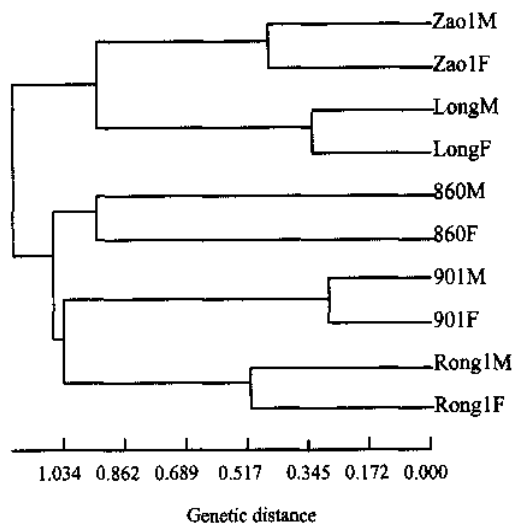


图3 基于同工酶谱构建的不同品系(种)海带及长海带雌(F)、雄(M)配子体无性繁殖系之间的聚类图(样品名参见“材料与方法”)

Fig. 3 Dendrogram of various male (M) and female (F) gametophyte clones of *Laminaria japonica* cultivars and *L. longissima* derived from UPGMA cluster analysis using the similarity coefficients based on isozyme patterns

亲缘关系较近,且它在遗传上还与“860”品系不是很远。图4结果很显然地说明,来自中国海区的三个海带品系(“860”、“高产早熟1号”与“荣杂1号”品系)具有较近的亲缘关系,它们与长海带有显著的区别,形态上后者因叶片狭窄而长区别于其他^[22],说明用遗传物质DNA对大型经济海藻进行种间鉴定是可以信赖的,但在单独利用同工酶谱时需谨慎,因环境对酶的表达量影响也较大。自“烟杂1号”的鉴定材料可知,它是海带与长海带的杂交种,图4也表明“烟杂1号”与长海带的亲缘关系较近。结合图3和图4,可以得到“烟杂1号”应是“荣杂1号”品系和长海带的杂交结果,其中雌配子体来自“荣杂1号”品系(图5);虽然“烟杂1号”与“860”品系的雄配子体之间的关系较近(图6),但通过 Mantel 检测,图4与图5之间相关系数($r = 0.549, p = 0.05$)远远大于图4与图6的相关系数($r = -0.201, p = 0.05$),因此“烟杂1号”的雄配子体应来自长海带。Lüning等^[23]通过杂交实验认为,海带属杂交后代的带片宽度与父本呈性连锁关系。“烟杂1号”形态上以窄而长的带片继承了长海带的性状,同工酶和 RAPD 的图谱也说明“烟杂1号”的雄配子体来自长海带,这就从遗传物质的角度证实了 Lüning等^[23]的结论。

表3 根据 RAPD 图谱计算的不同品系海带和长海带之间的 Jaccard 相似系数(S_j) (右上角)和遗传距离(左下角)

Table 3 Genetic similarity (upper-right) and distances of various cultivars of *Laminaria japonica* and *L. longissima* sporophytes estimated by RAPD markers

样品 Sample	Zao1	860	901	Rong1	Long
Zao1	-	0.769	0.750	0.799	0.694
860	0.263	-	0.683	0.776	0.697
901	0.288	0.381	-	0.785	0.726
Rong1	0.224	0.254	0.242	-	0.731
Long	0.365	0.361	0.320	0.313	-

注:样品名参见“材料与方法”。

Note: Sample name refers to material and method.

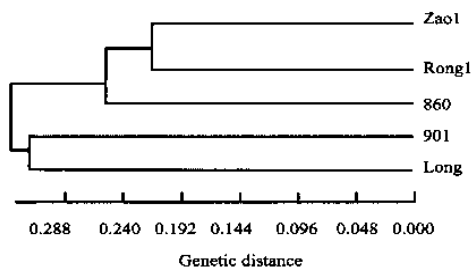


图4 基于 RAPD 图谱构建的不同品系(种)海带及长海带孢子体之间的聚类图(样品名参见“材料与方法”)

Fig. 4 Dendrogram of various cultivars of *Laminaria japonica* and *L. longissima* sporophytes derived from UPGMA cluster analysis using similarity coefficients based on RAPD patterns

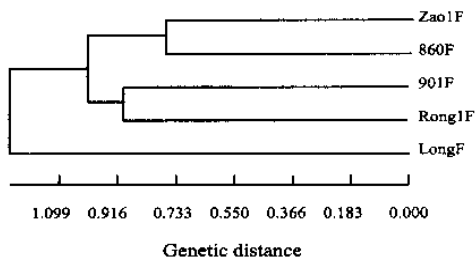


图5 基于同工酶谱建立的不同品系(种)海带及长海带雌(F)配子体无性繁殖系之间的聚类图(样品名参见“材料与方法”)

Fig. 5 Dendrogram of various female (F) gametophyte clones of *Laminaria japonica* cultivars and *L. longissima* derived from UPGMA cluster analysis using the similarity coefficients based on isozyme patterns

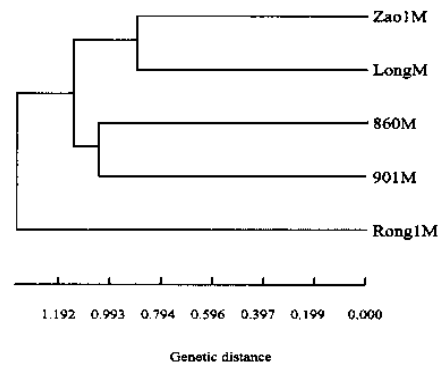


图6 基于同工酶谱建立的不同品系(种)海带及长海带雄(M)配子体无性繁殖系之间的聚类图(样品名参见“材料与方法”)

Fig. 6 Dendrogram of various male (M) gametophyte clones of *Laminaria japonica* cultivars and *L. longissima* derived from UPGMA cluster analysis using the similarity coefficients based on isozyme patterns

参考文献:

- [1] Fang Z X. A summary of the genetic studies of *Laminaria japonica* in China [A]. Tseng C K (ed.), Proceedings of the Joint China-U. S. Phycology Symposium [C]. Beijing: Science Press, 1983. 123-136.
- [2] Wu C Y, Lin G H. Progress in the genetics and breeding of economic seaweeds in China [J]. Hydrobiologia, 1987, 151/152: 57-61.
- [3] Patwary M U, van der Meer J P. Genetics and breeding of cultivated seaweeds [J]. Korean J Phycol, 1992, 7: 281-318.
- [4] 中国科学院海洋研究所海藻遗传育种组, 青岛海洋水产研究所藻类养殖组. 高产高碘海带新品种的培育 [J]. 中国科学, 1976, (5): 512-517.
- [5] 蒋本禹, 曲维扬, 唐志洁. 海带“海杂一号”的培育和应用 [J]. 海洋科学, 1983, (3): 39-41.
- [6] 方宗熙, 崔克进, 欧毓麟, 等. 海带“单海1号”新品种的选育: 用海带单倍体材料培育新品种 [J]. 山东海洋学院学报, 1983, 13(4): 63-70.
- [7] 方宗熙, 欧毓麟, 崔克进. 海带杂种优势的研究和利用: “单杂10号”的培育 [J]. 山东海洋学院学报, 1985, 15(1): 64-72.
- [8] Mathieson A C, Norton T A, Neushul M. The taxonomic implications of genetic and environmentally induced variations in seaweed morphology [J]. Bot Rev, 1981, 47: 313-347.
- [9] Neefus C D, Allen B P, Baldwin H P, et al. An examination of the population genetics of *Laminaria* and other brown algae in the Laminariales using starch gel electrophoresis [J]. Hydrobiologia, 1993, 260/261: 67-79.

- [10] Yotsukura N, Kawai T, Motomura T, et al. Random amplified polymorphic DNA markers for three Japanese laminarian species [J]. Fish Sci, 2001, 67: 857 - 862.
- [11] Hu Y J, Zhou Z G. Extraction of RAPD-friendly DNA from *Laminaria japonica* (Phaeophyta) after enzymatic dissociation of the frozen sporophyte tissues [J]. J Appl Phycol, 2001, 13: 415 - 422.
- [12] 胡远皆, 周志刚. 海带孢子体 DNA 随机扩增反应条件优化 [J]. 上海水产大学学报, 2001, 10: 193 - 198.
- [13] 周志刚, 吴超元. 海带无性繁殖系的形成及孢子体诱导 [J]. 生物工程学报, 1998, 14: 109 - 111.
- [14] Zhou Z G, Wu C Y, Wang S J. Application of isoenzyme in the crossbreeding of *Laminaria* [A]. Proceedings of the Fourth International Symposium on the Efficient Application and Preservation of Marine Biological Resources [C]. 22 - 24 Oct., Kangnung, Korea, 1998. 131 - 157.
- [15] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南 [M]. 第2版. 北京: 科学出版社, 1993. 1 062.
- [16] Schoenberg D A, Trench R K. Genetic variation in *Symbiodinium* (= *Gymnodinium*) *microdactylum* Freudenthal, and specificity in its symbiosis with marine invertebrates. I. Isoenzyme and soluble protein patterns of axenic cultures of *Symbiodinium microdactylum* [J]. Proc R Soc Lond B, 1980, 207: 405 - 427.
- [17] Francke J A, Coesel P F M. Isozyme variation within and between Dutch populations of *Closterium ehrenbergii* and *C. moniliferum* (Chlorophyta, Conjugatophyceae) [J]. Br Phycol J, 1985, 20: 201 - 209.
- [18] Beauchamp C, Fridovich I. Superoxide dismutase; improved assays and an assay applicable to acrylamide gels [J]. Anal Biochem, 1971, 44: 276 - 287.
- [19] 徐如涓, 赵毓楠. 表油菜素内酯对黄瓜幼苗下胚轴过氧化物酶和 IAA 氧化酶活性的影响 [J]. 植物生理学报, 1989, 15: 263 - 267.
- [20] Murphy R W, Sites Jr J W, Buth D G, et al. Proteins I: isozyme electrophoresis [A]. Molecular Systematics [M]. Massachusetts: Sinauer Associates, Inc. 1990. 45 - 126.
- [21] Sheath P H A, Sokal R R. Numerical Taxonomy [M]. San Francisco: W. H. Freeman and Co., 1973. 573.
- [22] 冈村金太郎. 日本海藻志 *Laminariales* [M]. 东京: 内田老鹤圃, 1936. 964.
- [23] Lfning K, Chapman A R O, Mann K H. Crossing experiments in the non-digitate complex of *Laminaria* from both sides of the Atlantic [J]. Phycologia, 1978, 17: 293 - 298.

Genetic relationship among brown seaweed *Laminaria longissima* and various cultivars of *L. japonica* in China revealed by isozyme and RAPD markers

ZHOU Zhi-gang, SHI Xi-zhi, HU Yuan-jie, SUN Yu-ping

(Key Laboratory of Genetic Resources and Ecology in Aquaculture, College of Fishery Science, Ministry of Agriculture, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

Abstract: Of 18 enzyme systems tested, there are 12 enzymes providing definite isozyme patterns with 31 loci occurring in various gametophyte clones of *Laminaria japonica* cultivars and *L. longissima*. In the light of similarity coefficients of Jaccard, the similarity is high between male and female gametophyte clones from the same parent. In comparison with other samples, the genetic distance between male and female gametophyte clones from the strain 860 of *L. japonica* is larger due to its possible higher heterozygosity. During the RAPD analysis of various cultivars of *L. japonica* and *L. longissima*, 30 random primers can amplify 185 loci with 76 polymorphic, accounted for 41 percent. By UPGMA cluster using the similarity coefficients based on isozyme and RAPD patterns, the result shows that the similarity is high between the various cultivars of *L. japonica* cultivated in China and Yanza No. 1 is close to *L. longissima* genetically. Yanza No. 1 is a hybrid, of which the female parent is from Rongza No. 1 strain of *L. japonica* and the male from *L. longissima*.

Key words: gametophyte; isozyme; *Laminaria japonica*; *L. longissima*; RAPD; sporophyte