

6个野生鼠尾藻种群遗传多样性的AFLP分析

伊新华^{1,2}, 李世国^{1,2}, 何平³, 侯和胜^{1,2}, 王丽梅³

(1. 辽宁师范大学 生命科学学院, 辽宁 大连 116029; 2. 辽宁省植物生物技术重点实验室, 辽宁 大连 116029; 3. 辽宁省海洋水产科学研究院, 辽宁 大连 116023)

摘要: 运用AFLP分子标记技术对大连庄河石城岛(SCD)、瓦房店将军石(JJS)、长海县大长山(DCS)、旅顺董砣子(DTZ)和旅顺盐场(YC)5个野生鼠尾藻(*Sargassum thunbergii*)种群与山东蓬莱(PL)1个野生群体的共60个个体进行遗传多样性分析。采用10对引物组合共扩增出条带530条, 其中多态性带417条, 平均多态性检出比例为78.68%。AMOVA分析显示, 大部分的遗传变异(76.58%)存在于种群内, 少部分(23.42%)存在于种群之间。遗传分化系数(G_{st})为0.241 8, 与遗传固定化系数(F_{st})的值(0.234 2)接近, 表明鼠尾藻种群内部具有较高的遗传分化, 同时种群间的基因流 $N_m=0.817 5$, 表明基因流动较低。UPGMA聚类分析表明, 大连5个野生鼠尾藻种群与山东蓬莱鼠尾藻种群遗传距离较远, 明显聚为2支; 大连种群中将军石和大长山2个种群聚为1支, 遗传相似系数为0.769 8, 再与董砣子种群聚类到一起; 盐场种群单独聚为1支, 且与其他种群的遗传相似系数均在0.583 0以下。分析结果表明, 各鼠尾藻种群内部存在着较高的遗传多样性, 而种群间的遗传多样性水平较低, 其遗传距离的远近不仅与地理隔离因素有关, 高盐等外界环境胁迫也可能起到了一定的作用。鼠尾藻的生殖方式、种群间基因流动的大小以及生长环境的差别可能是其种群分化的主要原因。[中国水产科学, 2010, 17(5): 922-929]

关键词: 鼠尾藻; AFLP; 遗传多样性; 遗传距离

中图分类号: S917

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2010)05-0922-08

鼠尾藻(*Sargassum thunbergii*)是暖温带海藻, 为中国沿海常见野生种, 具有较高的经济价值和营养价值。随着海参及鲍养殖业的迅猛发展, 作为其饵料, 鼠尾藻的需求量也不断增加。目前鼠尾藻在中国还没有形成规模化养殖, 年产量较低, 同时其养殖对种菜的选择和依赖性较大, 导致人们对野生种群的大量采集, 很多沿海地区的鼠尾藻种质资源由此遭到严重破坏^[1]。因此开展鼠尾藻的人工养殖和优良品种培育的研究势在必行, 同时其种质资源保护和遗传多样性鉴定也变得尤为重要。

近年来曲良等^[2]、Yoshida等^[3]、Pang等^[4-5]和Hwang等^[6]对马尾藻属海藻的种质资源保存和养殖技术进行了探讨, 一些科研工作者也对鼠尾藻养殖方

式、有性繁殖与人工育苗技术、发育过程和生长影响因素等开展了研究^[7-11]。关于鼠尾藻野生种群遗传多样性及亲缘关系的研究国内外鲜有报道。赵凤娟等^[12-13]运用RAPD和ISSR 2种分子标记技术对山东半岛4个不同地理隔离鼠尾藻种群的遗传多样性和遗传结构进行了检测和评估, 指出山东半岛鼠尾藻种群内部的遗传多样性呈较低水平。王丽梅等^[14]通过AFLP技术对辽宁、山东、浙江沿海4个野生鼠尾藻种群的遗传多样性进行分析, 结果表明4个群体的遗传多样性水平均出现了一定程度的降低。本研究采用比较成熟可靠的AFLP分子标记技术, 对大连沿海和山东蓬莱鼠尾藻野生种群进行遗传多样性分析, 可以为这些地区野生鼠尾藻种质资源鉴定、人工育苗以及

收稿日期: 2009-10-25; 修订日期: 2010-01-17.

基金项目: 辽宁省科学技术计划重大、重点项目子课题(2008203002); 大连市科技兴海示范工程(2007BNC065).

作者简介: 伊新华(1983-), 女, 硕士, 从事海藻分子生物学研究. E-mail: yixinhua527@163.com

通讯作者: 王丽梅(1964-), 女, 研究员, 研究方向为水产生物繁育. E-mail: meizi4678@sina.com

杂交育种技术中的亲本选择提供可靠的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

实验所选用的6个野生鼠尾藻种群共60个个体,分别采自庄河石城岛(SCD),瓦房店将军石(JJS),长海县大长山岛(DCS),旅顺董砣子(DTZ),旅顺盐场(YC)以及山东蓬莱刘家旺(PL)海区,样品基本信息见表1。采集海域为海岸线长500~1 000 m,宽100~500 m的潮间带,采用常规定点法随机选取10个非假根繁殖的个体,置于冰盒中运回实验室,-80℃保存备用。

表1 鼠尾藻样品种群基本信息
Tab. 1 Information of the sampled wild populations of *Sargassum thunbergii*

序号 No.	群体简称 Abbreviation	采集地点 Collection location	采集时间 Collection time	样品数目 Sample no.	海区分布 Distribution	地理位置 Geographic location
1	SCD	大连庄河石城岛 Shicheng Island, Zhuanghe, Dalian	2009	10	黄海 Yellow Sea	122.97° E 39.54° N
2	JJS	大连瓦房店将军石 Jiangjunshi, Wafangdian, Dalian	2008	10	渤海 Bohai Sea	121.1° E 39.94° N
3	DCS	大连长海县大长山岛 Dachangshan Island, Changhai, Dalian	2008	10	黄海 Yellow Sea	122.63° E 39.26° N
4	DTZ	大连旅顺董砣子 Dongtuozi, Lvshun, Dalian	2008	10	渤海 Bohai Sea	121.10° E 38.82° N
5	YC	大连旅顺盐场 Yanchang, Lvshun, Dalian	2008	10	黄海 Yellow Sea	121.33° E 38.82° N
6	PL	山东蓬莱刘家旺 Liujiawang, Penglai, Shanddong Province	2009	10	黄海 Yellow Sea	120.93° E 37.79° N

1.2 基因组DNA的提取

称取保存备用的样品叶状体0.15 g,蒸馏水冲洗干净,吸干水分,液氮研磨成粉末,转移到1.5 mL 灭菌离心管中。基因组DNA的提取方法参照李世国等^[15]的CTAB法,稍加改动。加入1 mL CTAB裂解缓冲液(20 mmol/L EDTA, pH 8.0; 100 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0; 3% CTAB; 1.4 mol/L NaCl; 1% PVP) 和10 μL β-巯基乙醇,5 μL RNase A (10 mg/mL),振荡摇匀,65℃水浴1 h,且每隔10 min轻轻颠倒混匀。加入1/3体积的5 mol/L KAc(pH 5.0),混匀,静置15 min。室温,12 000 r/min离心10 min。转移上清液于新离心管中,加入1/5体积氯仿抽提10 min。室温,12 000 r/min离心15 min。按上面步骤重新抽提1次。小心吸取上清液于新离心管中,加3/5体积预冷的异丙醇沉淀DNA,-20℃放置30 min。室温,12 000 r/min离心10 min。弃上清,75%乙醇洗涤沉淀2次,晾干。30 μL 无菌水溶解,用1.5%琼脂糖凝胶电泳检测提取质量。

1.3 AFLP扩增

AFLP实验参照Vos等^[16]的方法进行,并稍加改

动。200 ng基因组DNA用EcoR I和Mse I 2种内切酶双酶切,酶切和接头连接反应同时进行,体系如下:10×T4 DNA连接酶缓冲液,1.25 μL; ddH₂O,8.4 μL; 100×BSA (10 mg/mL),0.1 μL; EcoR I接头(5 μmol/L),0.5 μL; Mse I接头(50 μmol/L),0.5 μL; Eco RI内切酶(15 U/μL),0.3 μL; Mse I内切酶(10 U/μL),0.25 μL; T4 DNA连接酶(350 U/μL),0.2 μL; DNA模板(50 ng/μL),1 μL。PCR仪中37℃反应8 h。连接产物稀释10倍作为预扩增体系的模板,预扩产物稀释1 000倍作为模板进行选择扩增。10对选择性扩增引物序列组合见表2。DNA扩增片段经聚丙烯酰胺凝胶电泳后按Bassam等^[17]的方法银染显色。

1.4 统计与分析方法

将具有相同分子量大小的DNA片段作为1个座位,条带不分强弱根据有无计为“1”和“0”,输入EXCEL文档形成数据矩阵,多人多次重复读取数据以减小误差。采用软件POPGENE1.32^[18]对6个野生鼠尾藻种群分别计算多态位点比率、Shannon's 信息指数(I)、平均杂合度(H)、种群水平的Nei's遗传距离以及遗传相似系数、种群间总的遗传分化系

数(G_{st}),确定种群间的遗传关系,用Mega 4.0软件^[19]根据计算所得的遗传距离按UPGMA(Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean)法生成聚类分析图。采用Arlequin ver.3.0^[20]软件对6个群体进行分子方差分析(AMOVA, Analysis of Molecular Variance),计算遗传变异来源及遗传分化系数(F_{st})。

2 结果与分析

2.1 AFLP扩增结果

筛选出的10对选择性扩增引物组合形式为E+2/M+3,引物组合和扩增效果见表2。共扩增出清

晰可辨的条带530条,大小分布在100~1500 bp,其中多态性条带417条,平均多态性比例为78.68%。多态性比率总体分布在60.00%~92.86%,平均每对引物组合产生53条扩增带,41.7条多态性带。产生多态性条带比例最高的引物组合为E+AG/M+CTG,共扩增产生42条带,其中多态性带39条,多态性检出比率为92.86%;产生多态性比例最低的引物组合为E+AA/M+CAC,扩增条带总数为60条,多态性带为36条,多态性比率为60%。E+AA/M+CTG引物组合扩增的AFLP聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱见图1,各野生鼠尾藻种群内部以及种群之间条带差异性较高。

表2 10对引物组合在6个鼠尾藻种群中的扩增多态性
Tab. 2 Genetic polymorphism detected in 6 populations of *Sargassum thunbergii* using 10 pairs of primers

引物组合 Primer combination	扩增条带总数 No. of total bands	多态性带数 No. of polymorphic bands	共有带数 No. of shared bands	多态性比率/% Polymorphic rate
E+AA/M+CAC	60	36	24	60.00
E+AA/M+CAG	34	25	9	73.53
E+AA/M+CAT	60	49	11	81.67
E+AA/M+CCA	60	52	8	86.67
E+AA/M+CTG	66	54	12	81.82
E+AG/M+CAA	60	46	14	76.67
E+AG/M+CAG	55	41	14	74.55
E+AG/M+CAT	43	35	8	81.40
E+AG/M+CCA	50	40	10	80.00
E+AG/M+CTG	42	39	3	92.86
总数 Total	530	417	113	78.68
平均 Average	53	41.7	11.3	78.68

注:引物组合中E和M分别代表2个共同序列,其中E=GACTGCGTACCAATTC;M=GATGAGTCCTGACTAA。
Note: In the primer combinations, E and M represent two shared sequences which are E=GACTGCGTACCAATTC and M=GATGAGTCCTGAG-TAA, respectively.

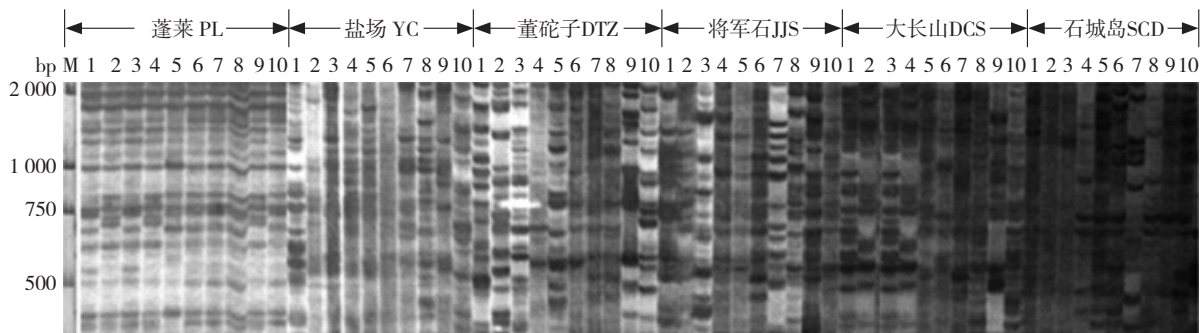


图1 E+AA/M+CTG引物组合对6个群体鼠尾藻样品的AFLP扩增带型
M: DL2000 marker; 1-10代表来自各群体的10个个体。

Fig. 1 AFLP band patterns generated by primer combination of E+AA/M+CTG in six *Sargassum thunbergii* populations
M: DL2000 marker; 1-10: individuals from each population.

2.2 群体遗传多样性

由表3可以看出,6个野生鼠尾藻种群的多态位点比率(PPB)分布在17.92%~92.83%之间,其中蓬莱种群(PL)的多态位点比率最低,为17.92%,将军石(JJS)和董砣子(DTZ)种群多态位点比率最高,均为92.83%。6个种群的平均杂合度(H)分布

在0.058 1~0.357 3之间,蓬莱种群(PL)最低,其他5个种群差别较小,均在0.309 0~0.357 3之间。蓬莱(PL)种群的Shannon's多样性指数(I)最低,为0.089 1,其他种群均分布在0.459 8~0.526 8之间,且以将军石种群(JJS)最高。6个种群的遗传分化系数(G_{st})为0.241 8。

表3 6个鼠尾藻野生种群的遗传多态性
Tab. 3 Genetic polymorphism in six wild populations of *Sargassum thunbergii*

群体 Population	多态位点比率/% Percentage of polymorphic loci, PPB	平均杂合度 Average heterozygosity, H	Shannon's 多样性指数 Shannon's information index, I
石城岛 SCD	86.04	0.3276	0.4833
大长山 DCS	91.51	0.3405	0.5061
将军石 JJS	92.83	0.3573	0.5268
董砣子 DTZ	92.83	0.3485	0.5188
盐场 YC	83.77	0.3090	0.4598
蓬莱 PL	17.92	0.0581	0.0891
平均 Average	78.68	0.2902	0.4307

根据Nei^[21]的方法计算的群体间遗传相似性系数和遗传距离显示,将军石(JJS)和大长山(DCS)种群间的遗传距离较近,为0.261 6,盐场(YC)和蓬莱(PL)种群之间的遗传距离较远,为0.678 2;与之对

应的将军石(JJS)和大长山(DCS)的种群之间遗传相似系数最高,为0.769 8,盐场(YC)和蓬莱(PL)种群之间的遗传相似系数最小,为0.507 5(表4)。

表4 6个鼠尾藻野生种群的遗传相似性系数(对角线上方)和遗传距离(对角线下方)
Tab. 4 Genetic identity (above diagonal) and genetic distance (below diagonal) of six wild populations of *Sargassum thunbergii*

种群 Population	石城岛 SCD	大长山 DCS	将军石 JJS	董砣子 DTZ	盐场 YC	蓬莱 PL
石城岛 SCD	—	0.6245	0.6547	0.6396	0.5925	0.5830
大长山 DCS	0.4708	—	0.7698	0.7283	0.6623	0.5660
将军石 JJS	0.4236	0.2616	—	0.7660	0.6019	0.5623
董砣子 DTZ	0.4469	0.3170	0.2665	—	0.5792	0.5208
盐场 YC	0.5235	0.4121	0.5077	0.5460	—	0.5075
蓬莱 PL	0.6702	0.5691	0.5395	0.6525	0.6782	—

根据Nei's遗传距离用UPGMA法构建的6个野生鼠尾藻种群的聚类图见图2。6个种群可以分成两大类群,山东蓬莱(PL)鼠尾藻种群聚为一个类群,其他大连沿海的种群聚为另一类群。在大连沿海各种群中,将军石(JJS)、大长山(DCS)和董砣子(DTZ)种群遗传距离较近,聚为一支;盐场(YC)种群与上述3个种群遗传距离较远,单独聚为一支。

运用Arlequin ver.3.0软件对鼠尾藻6个种群进行AMOVA分析(表5),结果显示大部分的遗传变异(76.58%)存在于种群内,少部分(23.42%)存在于种群间。遗传固定化系数 F_{st} 为0.234 2,与遗传分化系数 G_{st} 的值(0.241 8)接近,且基因流 N_m [$N_m=0.25(1-F_{st})/F_{st}$] 为0.817 5。

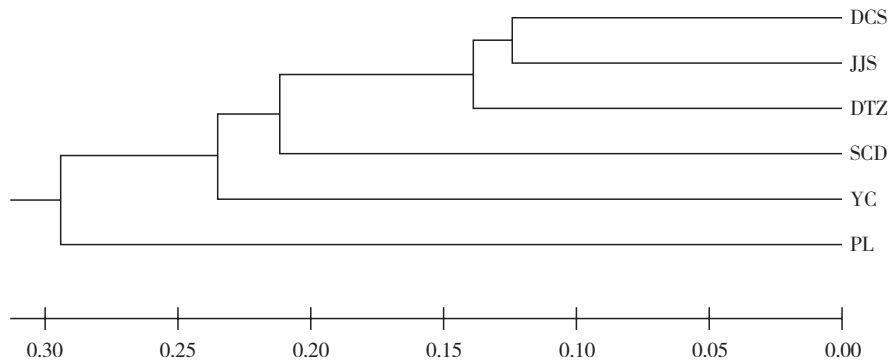


图2 根据Nei's遗传距离用UPGMA法构建的6个种群的系统树
DCS为大长山种群, JJS为将军石种群, DTZ为董舵子种群, SCD为石城岛种群, YC为盐场种群, PL为蓬莱种群。
Fig. 2 UPGMA dendrogram of six wild populations of *Sargassum thunbergii* based on Nei's genetic distance
DCS represents Dachangshan population, JJS represents Jiangjunshi population, DTZ represents Dongtuozi population, SCD represents Shichengdao population, YC represents Yanchang populatin and PL represents Penglai population.

表5 鼠尾藻6个群体间遗传差异的分子方差分析(AMOVA)
Tab. 5 Analysis of molecular variance(AMOVA) of six populations of *Sargassum thunbergii*

变异来源 Source of variation	自由度 df	平方和 Sum of square	方差组分 Variance component	方差比例/% Percentage of variance
群体间 Among populations	5	1 729.433	26.065	23.42
群体内 Within population	54	4 683.000	85.241	76.58
总变异 Total variation	59	6 332.433	111.306	100.00

3 讨论

取样策略直接影响到群体遗传多样性分析的可靠性。克隆生长常常导致空间遗传变异的斑块化,可能会对植物群体遗传变异的评价造成影响^[22]。鼠尾藻具有无性繁殖的特性,因此在取样时每2个取样位点的距离都控制在100 m以上,以保证不对遗传变异完全相同的个体重复取样。通常认为,一个群体内最佳的取样数要求包括95%以上基因频率以及大于0.05的等位基因^[23],因此在不了解某一物种生物学特性和遗传背景的情况下,对一个群体进行资源保护的随机取样数目可以确定在30个左右^[24]。但是由于目前鼠尾藻野生资源受到较大的人为影响(人工采集作为经济水产养殖动物的饵料),辽宁大连沿海资源量已经相当贫乏。在进行遗传背景分析的同时,还对野生鼠尾藻各个群体年度

生长变化情况进行跟踪调查,期望能够对野生鼠尾藻资源的保护提供理论和技术上的支持。从本研究中10对引物的扩增图谱来看,每个群体都表现出一定的特征条带和共有带,每个群体内部个体能够很好地聚类,可以反映该群体的基本遗传关系和规律。因此,在个体样品数量受到限制的情况下,10个个体也能够显示出该群体的基本的遗传特征,可以用于遗传关系分析,这在其他研究报道中也有类似的应用^[15,25-27]。

从聚类分析图(图2)可以看出,6个野生鼠尾藻种群明显聚为两大类群,山东蓬莱(PL)种群单独聚为一支,其他大连地区的种群聚为另一支;大连沿海各种群中将军石(JJS)和大长山(DCS)聚为一支,遗传距离较近,而盐场(YC)种群单独聚为另一支。高水平的群体遗传分化可由物种的繁育系统、基因漂变或群体间的遗传隔离等因素造成^[28]。AMOVA

分析结果表明,种群内的遗传变异(76.58%)要远远大于种群间的遗传变异(23.42%),种群间遗传分化系数 G_{st} 为 0.241 8,与 F_{st} 的值(0.234 2)接近。依据 Wright^[29]的观点, F_{st} 值超过 0.15 就意味着群体间存在遗传结构上的高度分化,6个鼠尾藻种群之间存在高水平的遗传变异,同时也反映出各种群之间的基因流动水平较低^[30]。Zhao等^[12]通过 RAPD 和 ISSR 2种分子标记技术得出的山东沿海鼠尾藻种群的遗传分化更是达到了 57.57%和 59.52%。本研究中得出种群间的 $N_m=0.817\ 5$, Wright^[31]认为如果 $N_m<1$,则说明基因流动较小,遗传漂变可以导致群体间明显的遗传分化。山东蓬莱和大连海域的野生鼠尾藻种群之间具有较远的地理距离,同时生长海域环境的不同造成了基因交流的缺乏,致使两地的鼠尾藻种群遗传距离较远。任何的遗传趋异都不可能仅仅是由地理隔离造成的,其他因素也会影响种群的遗传多样性和遗传结构特征,例如生活史特征^[32],种群布局的性质,种群扩散的物理障碍^[33]以及影响其种群分布的一些环境因子(波浪、温度、盐分)等。Steen^[34]研究了盐分对海黍子(*Sargassum muticum*)的生长和繁殖的影响,找到了其在 Brackish 地区扩张受到限制的原因:海黍子生活史的早期阶段对于盐分的要求构成了一个生理障碍,在盐分较低的地区生长繁殖受到限制。鼠尾藻和海黍子都是隶属于马尾藻属的大型褐藻,2种藻类的生活史和生长繁殖对环境的要求很相似。因此,可以推论盐场海域周围海水的高盐环境影响到了鼠尾藻种群的生长和繁殖,进而使其遗传结构发生了较大的改变,与其他4个大连地区的群体相比遗传变异较大。将军石和董砣子处于渤海海域,而石城岛位于黄海海域,海域环境的不同可能造成群体之间遗传变异较大。因此,鼠尾藻的生殖方式、种群间基因流动过小以及生长环境的差别可能是其种群遗传分化较大的主要原因。

如表3所示,蓬莱种群(PL)的多态性位点比率(PPB),平均杂合度(H), Shannon's 多样性指数(I),分别为 17.92%、0.058 1、0.089 1,均属6个种群中最低。

结合图2的聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)扩增图谱也可以看出该种群个体间的扩增条带几乎一致,推测该种群具有较高的发生种质退化的风险。2007年赵凤娟^[13]通过 RAPD 和 ISSR 2种分子标记技术对山东半岛沿海4个不同地点(青岛,荣成,威海和烟台)采集的鼠尾藻样品,同样通过 PPB、 H 、 I 等参数进行了遗传多样性分析,发现山东沿海4个野生鼠尾藻种群内的遗传差异和遗传多样性较小。赵凤娟采样的4个地点中与本实验蓬莱种群距离最近的是烟台大秦种群,大秦种群的平均杂合度(H)为 0.135 7, Shannon's 多样性指数(I)为 0.196 8,与之相比较,本实验中蓬莱种群内个体的遗传多样性水平明显较低。Fletcher^[35]在研究海黍子时曾认为海黍子利用其固着器实现了营养再生使得种群内部遗传多样性水平降低,这种因素也可能是蓬莱鼠尾藻种群多样性较低的原因。因此,大连地区鼠尾藻养殖产业中种菜的选择应以本地种群为主要来源,这在今后鼠尾藻育苗及育种技术研究中均有较大的利用价值。

对鼠尾藻资源的研究与开发尚处于起步阶段,在养殖生产中还有许多需要解决的关键问题,种苗规模化生产是目前鼠尾藻养殖技术的瓶颈,如何从根本上突破这一屏障将成为科研工作者努力的方向。本研究选用 AFLP 分子标记技术探讨了大连沿海5个野生种群和山东蓬莱1个野生种群鼠尾藻的遗传多样性,通过在分子水平上分析各野生种群内部和种群之间的遗传分化相关指数,计算各群体间的遗传距离及遗传相似性,生成聚类关系图谱,揭示了6个野生鼠尾藻种群的遗传多样性,为优良品种的开发和培育奠定了理论基础。

参考文献:

- [1] 王增福,刘建国. 鼠尾藻(*Sargassum thunbergii*)有性生殖过程与育苗[J]. 海洋与湖沼,2007,38(5): 453-457.
- [2] 曲良,肖慧,王仁君,等. 鼠尾藻和小珊瑚藻对赤潮异弯藻克生效应的初步研究[J]. 中国海洋大学学报: 自然科学版,2007,37(4): 621-626.

- [3] Yoshida T, Stiger V, Horiguchi T. *Sargassum boreale* sp. nov. (Fucales, Phaeophyceae) from Hokkaido, Japan [J]. *Phycol Res*, 2000, 48 (3): 125–131.
- [4] Pang S J, Zhang Z H, Zhao H J, et al. Cultivation of the brown alga *Hizikia fusiformis* (Harvey) Okamura: stress resistance of artificially raised young seedlings revealed by chlorophyll fluorescence measurement [J]. *J Appl Phycol*, 2007, 19 (5): 557–565.
- [5] Pang S J, Shan T F, Zhang Z H, et al. Cultivation of the intertidal brown alga *Hizikia fusiformis* (Harvey) Okamura: mass production of zygote-derived seedlings under commercial cultivation conditions, a case study experience [J]. *Aquac Res*, 2008, 39 (13): 1408–1415.
- [6] Hwang E K, Park C S, Baek J M. Artificial seed production and cultivation of the edible brown alga, *Sargassum fulvellum* (Turner) C. Agardh: developing a new species for seaweed cultivation in Korea [J]. *J Appl Phycol*, 2006, 18: 251–257.
- [7] 邹吉新, 李源强, 王义民, 等. 鼠尾藻的生物学特性及筏式养殖技术研究 [J]. *齐鲁渔业*, 2005, 22 (3): 1–133.
- [8] 原永党, 张少华, 刘海燕, 等. 鼠尾藻劈叉筏式养殖试验 [J]. *海洋湖沼通报*, 2006 (2): 126–128.
- [9] 张泽宇, 李晓丽, 由学策, 等. 鼠尾藻的繁殖生物学及人工育苗的初步研究 [J]. *大连水产学院学报*, 2007, 22 (4): 255–259.
- [10] 王飞久, 孙修涛, 李锋. 鼠尾藻的有性繁殖过程和幼苗培育技术研究 [J]. *海洋水产研究*, 2006, 27 (5): 1–6.
- [11] 姜宏波, 田相利, 包杰, 等. 温度和光照强度对鼠尾藻生长和生化组成的影响 [J]. *应用生态学报*, 2009, 20 (1): 185–189.
- [12] Zhao F J, Wang X L, Liu J D, et al. Population genetic structure of *Sargassum thunbergii* (Fucales, Phaeophyta) detected by RAPD and ISSR markers [J]. *J Appl Phycol*, 2007, 19 (5): 409–416.
- [13] 赵凤娟. 马尾藻种群遗传及早期发育的研究 [D]. 北京: 中国科学院研究生院, 2007.
- [14] 王丽梅, 戚贵成, 高祥刚, 等. 中国沿海鼠尾藻遗传多样性分析 [J]. *生物技术通报*, 2009 (S1): 277–279.
- [15] 李世国, 单体锋, 逢少军, 等. 九个海带栽培品种自交系后代遗传多样性和亲缘关系的 AFLP 分析 [J]. *中国水产科学*, 2009, 16 (2): 214–220.
- [16] Vos P, Hogers R, Bleeker M, et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting [J]. *Nucl Acids Res*, 1995, 23 (21): 4407–4414.
- [17] Bassam B J, Caetano-Anolles G, Gresshoff P M. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels [J]. *Anal Biochem*, 1991, 196 (1): 80–83.
- [18] Yeh F C, Yang R C, Mao J X. POPGENE, the user-friendly shareware for population genetic analysis [C]. Edmonton, Canada: Molecular Biology and Biotechnology Center, University of Alberta, 1997.
- [19] Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0 [J]. *Mol Biol Evol*, 2007, 24 (8): 1596–1599.
- [20] Excoffier L, Laval G, Schneider S. Arlequin ver.3.0: An integrated software package for population genetics data analysis [J]. *Evol Bioinform Online*, 2005, 1: 47–50.
- [21] Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals [J]. *Genetics*, 1978, 89: 583–590.
- [22] Barrett S C H, Eckert C G, Husband B C. Evolution processes in aquatic plant population [J]. *Aquat Bot*, 1993, 2–3 (44): 105–145.
- [23] Marshall D R, Brown A H D. Optimum sampling strategies in genetic conservation [M]. Cambridge University Press, 1975.
- [24] 金燕, 卢宝荣. 遗传多样性的取样策略 [J]. *生物多样性*, 2003, 11 (2): 155–161.
- [25] Shan T F, Pang S J. Assessing genetic identities of sporophytic offspring of the brown alga *Undaria pinnatifida* derived from mono-crossing of gametophyte clones by use of AFLP and microsatellite markers [J]. *Phycol Res*, 2009, 57 (1): 36–44.
- [26] 张全胜, 石媛媛, 杨官品. 我国引种海带和栽培品种 (系) 来源配子体克隆的 AFLP 分析 [J]. *中国海洋大学*

- 学报, 2008, 38(3): 429–435.
- [27] 逢巧巧. 采用SSR和AFLP标记技术对龙须菜的遗传多样性分析[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2009.
- [28] 张玲, 李庆军, 李德铎. 雅鲁藏布江河谷丝须蒯薯遗传多样性的初步研究[J]. 生物多样性, 2006, 14(11): 65–72.
- [29] Wright S. Evolution and genetics of populations[M]. Chicago: University of Chicago Press, 1978: 4.
- [30] Bohonak A J. Dispersal, gene flow and population structure [J]. Q Rev Biol, 1999, 74(1): 21–45.
- [31] Wright S. The genetical structure of populations [J]. Ann Eugen, 1951, 15: 323–334.
- [32] Hamrick J L, Godt M J W. Effects of life history traits on genetic diversity in plant species [J]. Philos T Roy Soc B, 1996, 351(1345): 1291–1298.
- [33] Engelen A H, Olsen J L, Breeman A M, et al. Genetic differentiation in *Sargassum polyceratum* (Fucales: Phaeophyceae) around the island of Curacao (Netherlands Antilles) [J]. Mar Biol, 2001, 139(2): 267–277.
- [34] Steen H. Effects of reduced salinity on reproduction and germling development in *Sargassum muticum* (Phaeophyceae, Fucales) [J]. Eur J Phycol, 2004, 39(3): 293–299.
- [35] Fletcher R L. Studies on recently introduced brown alga *Sargassum muticum* (Yendo) Flensholt. II Regenerative ability [J]. Bot Mar, 1975, 18(3): 157–162.

AFLP analysis of genetic diversity in six wild populations of *Sargassum thunbergii*

YI Xinhua^{1,2}, LI Shiguo^{1,2}, HE Ping³, HOU Hesheng^{1,2}, WANG Limei³

(1. College of Life Sciences, Liaoning Normal University, Dalian 116029, China; 2. Key Laboratory of Plant Biotechnology of Liaoning Province, Dalian 116029, China; 3. Liaoning Ocean and Fishery Science Research Institute, Dalian 116023, China)

Abstract: Amplified fragment length polymorphism (AFLP) was used to assess the genetic diversity of five wild populations of *Sargassum thunbergii* from Dalian which were Shichengdao (SCD), Jiangjunshi (JJS), Dachangshan (DCS), Dongtuozi (DTZ), Yanchang (YC) and a Shandong population which was Penglai (PL). Five hundred and thirty loci were obtained with ten combinations of selective primers. Of these loci, 417 were polymorphic, accounting for 78.98% of the total. Analysis of molecular variance (AMOVA) revealed that a higher portion (76.58%) of variations existed within populations, while lower portion (23.42%) existed among populations. The G_{st} value was 0.241 8, which was consistent with F_{st} (0.234 2), indicating great genetic differentiation within populations. UPGMA dendrogram of the six populations showed they could be clustered into two major groups. One group was from Shandong province, and the other was from Dalian. Among the populations from Dalian, JJS and DCS were clustered into one group, and the coefficient of similarity between them was 0.769 8; but YC was lonely clustered into one group, whose coefficients of similarity with other populations were below 0.583 0. The results showed that there was higher genetic diversity within the six populations, but lower diversity among them, and genetic distance of populations was decided not only by geographical distance but also by external environmental factors such as high salinity and so on. The great genetic differentiation among populations may result from different reproduction forms, little gene flow or different growth environments. [Journal of Fishery Sciences of China, 2010, 17(5): 922–929]

Key words: *Sargassum thunbergii*; AFLP; genetic diversity; genetic distance

Corresponding author: WANG Limei. E-mail: meizi4678@sina.com