

## 长心卡帕藻养殖群体的遗传多样性分析

张婷<sup>1</sup>, 赵素芬<sup>1,2</sup>, 应成琦<sup>1</sup>, 沈和定<sup>1</sup>, 何培民<sup>1</sup>

(1. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306; 2. 广东海洋大学 水产学院, 广东 湛江 524025)

**摘要:** 应用RAPD技术对海南6个长心卡帕藻(*Kappaphycus alvarezii*)养殖群体(编号分别为L、S、LA、LD、NC、XC)遗传多样性进行了分析。从30个引物中筛选出了扩增多态性强、重复性好的6个引物,并从扩增产物S345、S352、S384、S1510、S2003、S2114中检测到了43个位点,条带大小在0.3~3 kb之间,其中多态位点为42个,平均多态位点百分率为98.72%。Popgen32软件分析表明,6个群体的多态位点百分率( $P$ )在62.79%~97.67%之间, Nei's 基因多样性指数 $H$ 在 $0.145\ 5 \pm 0.180\ 9$ 到 $0.246\ 3 \pm 0.179\ 7$ 之间, Shannon's 遗传多样性信息指数 $I$ 在 $0.229\ 1 \pm 0.256\ 6$ 到 $0.380\ 8 \pm 0.242\ 5$ 之间,6个群体之间的遗传距离在0.015 1~0.135 0之间,其中海南三亚内村群体(S)的遗传多样性高于其他群体遗传多样性。使用MEGA4软件对6个群体进行UPGMA聚类分析,结果表明,6个群体中S群体单独聚为一类,其他5个群体LA与XC先聚在一起,然后与LD、L和NC聚在一起。6个群体的藻体形态和颜色虽有差别,但RAPD标记显示皆属于同一个种,即长心卡帕藻。[中国水产科学, 2010, 17(3): 586-592]

**关键词:** 长心卡帕藻; 养殖群体; RAPD分析; 遗传多样性  
**中图分类号:** S917                      **文献标识码:** A

**文章编号:** 1005-8737-(2010)03-0586-07

麒麟菜类是一类重要热带性经济海藻,为卡拉胶工业的重要原料,每年的工业产值可达24亿美元,自从20世纪70年代以来,卡拉胶的市场需求量还在以每年5%的速度增加<sup>[1-2]</sup>。麒麟菜类在全世界的分布是以赤道为中心向南北延伸,主要分布于坦桑尼亚的桑给巴尔、菲律宾、印度尼西亚、日本的硫球群岛<sup>[3-4]</sup>。目前菲律宾、印度尼西亚、中国、坦桑尼亚等国家已开展了大规模人工养殖,其产量占国际产量的90%<sup>[5]</sup>。中国麒麟菜类分布于海南及台湾等<sup>[6]</sup>,年产约1万t干藻<sup>[7]</sup>。麒麟菜类原属于红藻门(Rhodopyta),真红藻纲(Floridae),杉藻目(Gigartinales),红翎菜科(Solieriaceae),麒麟菜属(*Eucheuma*)<sup>[8]</sup>。后来国内外藻类学家根据卡拉胶类型把麒麟菜类划分为3个属,即麒麟菜属(*Eucheuma*,  $\iota$ -卡拉胶)、卡帕藻属(*Kappaphycus*,  $\kappa$ -卡拉胶)和琼枝属(*Betaphycus*,  $\beta$ -卡拉胶)<sup>[8-11]</sup>。1985年中

国最早从菲律宾引进麒麟菜类养殖种类,当时称为异枝麒麟菜<sup>[3,12]</sup>,又叫长心麒麟菜<sup>[13]</sup>,现在称为长心卡帕藻<sup>[8,14]</sup>,为中国目前主要养殖种类。

随着麒麟菜类养殖生产的长期发展,海洋水质恶化以及单一营养繁殖方式等不利因素日渐突出,使中国麒麟菜类养殖产业面临产量逐年降低、病害越来越严重等问题,特别是2008年,降雨量过多造成栽培海区盐度降低,诱发中国海南麒麟菜类病害<sup>[5]</sup>,表明中国海南麒麟菜类养殖种类的种质退化十分严重,选育高产、抗病等优良品种已迫在眉睫。同样的情况也发生在菲律宾和印度尼西亚<sup>[5]</sup>。此外,在养殖过程中发现藻体分枝多、易断裂、产胶率低等现象,是否由遗传变异引起或者属于生理变化需待研究<sup>[7]</sup>。

RAPD是一种基于PCR的分子标记,其具有简便、快速、高效和灵敏的优点,已在藻类的遗传多样

收稿日期: 2009-08-09; 修订日期: 2009-10-29.

基金项目: 上海浦江人才计划项目(05PJ14086); 上海市优秀学科带头人计划项目(08XD14037).

作者简介: 张婷(1985-),女,在读硕士研究生,研究方向为海洋生物学.

通讯作者: 何培民. Tel: 021-61900457; E-mail: pmhe@shou.edu.cn

性分析<sup>[15-17]</sup>、种质鉴定、遗传育种<sup>[18-19]</sup>以及遗传图谱构建<sup>[15]</sup>中被广泛应用。本研究主要应用RAPD技术对中国麒麟菜类主要养殖种类——长心卡帕藻养殖群体进行遗传多样性分析,旨在研究其遗传背景,为今后的麒麟菜类养殖良种选育奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

长心卡帕藻样本于2007年4月和2008年2月采集于海南省陵水县新村和黎安养殖海区、三亚市内村和六道养殖海区。根据采集地点和藻体颜色不同,将群体分为6个养殖群体(表1),每一群体以5 m间距随机取样,低温运回实验室并预培养1周后,置于-70℃低温冰箱冷冻保存。

表1 长心卡帕藻养殖群体样品信息  
Tab. 1 Sample data of *Kappaphycus alvarezii* in the study

群体 Population	藻体特征 Algae characteristic	采集地点 Collecting site	采集时间 Collecting time	样品数 Sample size
L	黄绿色,分枝细、多而短	海南陵水新村	2007-04	30
S	红褐色,分枝细、少而长	海南三亚内村	2007-04	30
LA	红褐色,分枝细、少而长	海南陵水黎安	2008-02	30
LD	红褐色,分枝细、少而长	海南三亚六道	2008-02	30
NC	黄绿色,分枝粗、多而短	海南三亚内村	2008-02	30
XC	红褐色,分枝细、少而长	海南陵水新村	2008-02	30

### 1.4 PCR扩增

PCR反应体系及反应参数采用赵素芬等<sup>[22]</sup>的方法。扩增完毕,在1.2%琼脂糖凝胶上(含EB 0.5 μg/mL)电泳分离,以GeneRuler™ 100 bp Ladder Plus (#SM0321, MBI)指示DNA片段的大小,电泳条件120 V, 200 mA, 50 min,然后在Panasonic wv-Bp330紫外拍照仪下拍照。

### 1.5 遗传多样性分析

RAPD是显性标记,同一引物扩增产物中电泳迁移率一致的条带被认为具有同源性。统计电泳后凝胶上清晰可见的扩增条带,将每一条清晰带的迁移位置记为1个位点。对于不同个体所扩增出的条带,迁移位置相同的出现时记为“1”,缺失记为“0”,将电泳结果转换成0、1二元数据矩阵,输入计算机。

### 1.2 基因组DNA提取与纯度测定

DNA提取方法采用CTAB法,具体操作步骤参考赵素芬等<sup>[20]</sup>的报道。

将提取的DNA取5 μL,用10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)稀释到60 μL,用Eppendorf Biophotometer (德国)测定,记录模板的浓度和OD值。同时用0.8%琼脂糖凝胶电泳(含EB 0.5 μg/mL),结果在Panasonic wv-Bp330紫外拍照仪(中国)下拍照,检查DNA模板的完整性。

### 1.3 RAPD引物筛选

根据文献[21]选用30个引物。从每个群体中随机选取2个样本作为模板,在25 μL反应体系中进行引物筛选及可重复性试验,从中选出扩增条带清晰、反应稳定且多态性好的引物用于全部180个样品的RAPD分析。

用Popgen32软件计算多态位点百分率 $[P(\%) = \text{多态位点数} / \text{位点总数} \times 100\%]$ 、Shannon信息多样性指数 $I$ 和遗传距离;将遗传标记作为2个等位基因(1和0)和复等位基因位点,基于Hardy-Weinberg平衡,计算Nei's基因多样性指数 $H$ 。

用MEGA4软件对6个养殖群体进行UPGMA聚类分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 基因组DNA提取与纯度测定

采用CTAB法从长心卡帕藻新鲜藻体的顶端部位提取DNA,用0.8%的琼脂糖电泳检测(图1),均呈现1条带。DNA样品经过分光光度计检测,其 $OD_{260}/OD_{280}$ 值均在1.7~1.9之间,表明其纯度高、质量好。

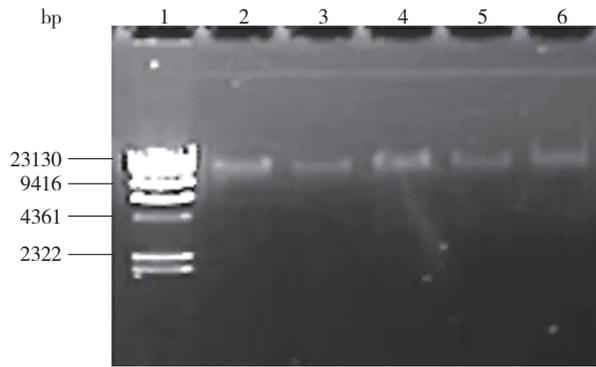


图1 长心卡帕藻基因组DNA电泳图谱

1: Marker; 2~6: 长心卡帕藻L3基因组DNA

Fig. 1 Electrophoresis map of genomic DNA of *Kappaphycus alvarezii*

1: Marker; 2-6: Genomic DNA of *K. alvarezii* L3

## 2.2 引物筛选

每个群体中随机选取2个样本作为模板,在反应体系中进行引物筛选及可重复性试验,从30个

RAPD引物中获得6个扩增条带清晰、反应稳定且多态性好的引物(表2),每条引物扩增的条带在4~13之间,共检测到43条可统计的DNA扩增片段。条带大小在0.3~3 kb之间,其中多态位点为42个,平均多态位点比例率为98.72%。

## 2.3 长心卡帕藻养殖群体的遗传多样性分析

**2.3.1 RAPD分析** 在筛选出的6个引物中,引物S352扩增的条带多态性最好。引物S2003扩增的0.8 kb条带在S群体多见,而在L、LA群体仅在个别个体中出现,在LD、NC和XC群体中不出现;引物S2003扩增的1.35 kb条带在LA、LD、NC和XC群体的部分个体出现,而在L和S群体不出现(图2、3)。6个群体中,S群体的遗传多样性最高( $P=76.74\%$ ;  $H=0.2460 \pm 0.1905$ ;  $I=0.3733 \pm 0.2629$ )(表3)。LA与XC群体之间的遗传距离最小,为0.0151;L与NC群体之间的遗传距离最大,为0.1350(表4)。

表2 筛选所得RAPD引物的序列及其扩增结果

Tab. 2 Sequences and amplification results of six RAPD primers selected out in the study

引物 Primer	序列(5'-3') Sequence(5'-3')	扩增条带数 No. of amplified bands	多态性条带数 No. of polymorphic bands	多态性位点比例/% Percentage of polymorphic loci
S345	CTCCATGGGG	5	5	100
S352	GTCCCGTGGT	8	8	100
S384	GACTGCACAC	7	7	100
S1510	ACTGCCCGAC	4	4	100
S2003	GTGCGAGAAC	13	12	92.3
S2114	CCGCGTTGAG	6	6	100

表3 6个长心卡帕藻群体遗传多样性的RAPD分析

Tab. 3 Genetic diversity of six populations of *Kappaphycus alvarezii* by RAPD markers

$n=30$ ;  $\bar{x} \pm SD$

群体 Population	多样性指数 Diversity index		
	$P/\%$	$H$	$I$
L	26 (60.47)	$0.1455 \pm 0.1809$	$0.2291 \pm 0.2566$
S	33 (76.74)	$0.2460 \pm 0.1905$	$0.3733 \pm 0.2629$
LA	32 (74.42)	$0.2396 \pm 0.1816$	$0.3656 \pm 0.2580$
LD	27 (62.79)	$0.1930 \pm 0.2084$	$0.2900 \pm 0.2901$
NC	28 (65.12)	$0.2090 \pm 0.2023$	$0.3142 \pm 0.2860$
XC	29 (67.44)	$0.2344 \pm 0.2126$	$0.3468 \pm 0.2955$
合计 Total	42 (97.67)	$0.2463 \pm 0.1797$	$0.3808 \pm 0.2425$

注:  $P$ 为多态位点个数(百分率);  $H$ 为Nei's基因多样性指数;  $I$ 为Shannon's遗传多样性信息指数。

Note:  $P$  represents number (percentage) of polymorphic loci.  $H$  represents Nei's (1973) gene diversity index.  $I$  represents Shannon's information index.

表4 长心卡帕藻6个养殖群体间的遗传距离  
Tab. 4 Genetic distances between six cultivated populations of *Kappaphycus alvarezii*

群体 Population	L	S	LA	LD	NC	XC
L	****					
S	0.1290	****				
LA	0.0360	0.0827	****			
LD	0.0565	0.0738	0.0216	****		
NC	0.1350	0.0742	0.0514	0.0380	****	
XC	0.0310	0.1074	0.0151	0.0294	0.0539	****

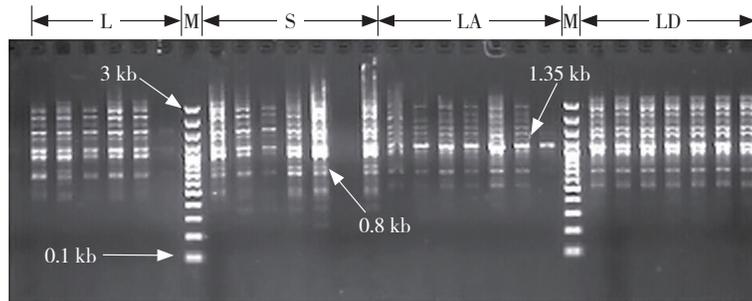


图2 引物S2003在长心卡帕藻养殖群体中的扩增电泳图谱  
M: 分子量标准. L、S、LA、LD表示不同的养殖群体.

Fig. 2 Electrophoresis map of primer S2003 in cultivated populations of *Kappaphycus alvarezii*  
M: Marker. L, S, LA, LD represent different cultivated *K. alvarezii* populations.

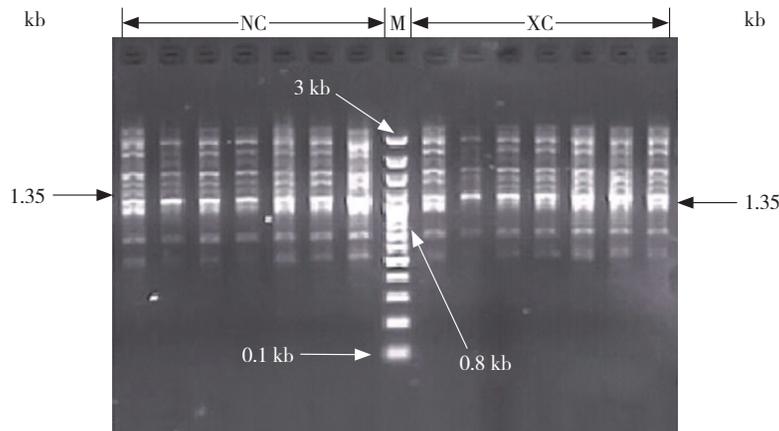


图3 引物S2003在长心卡帕藻养殖群体中的扩增电泳图谱  
M: 分子量标准. NC、XC表示不同的养殖群体.

Fig. 3 Electrophoresis map of primer S2003 in cultivated populations of *Kappaphycus alvarezii*  
M: Marker. NC and XC represent different cultivated *K. alvarezii* populations.

2.3.3 聚类分析 根据遗传距离数值(表4),利用MEGA4软件对6个长心卡帕藻群体进行UPGMA聚

类分析,结果见图4。6个群体中S群体单独聚为一类,其他5个群体LA与XC先聚在一起,然后与LD、

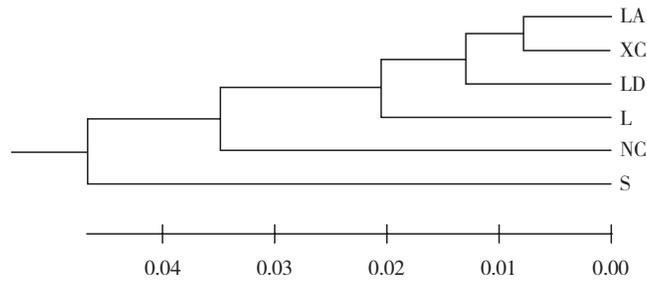


图4 长心卡帕藻6个养殖群体间的UPGMA聚类图

Fig. 4 UPGMA dendrogram of six cultivated populations of *Kappaphycus alvarezii*

L和NC聚在一起,说明L、S和NC群体与LA和LD群体的亲缘关系较远,LA和LD或XC的亲缘关系较近。

### 3 讨论

#### 3.1 长心卡帕藻养殖群体遗传多态性

中国长心卡帕藻是1985年由菲律宾引进,原引进的藻种仅十余kg,物种相对单一,经过多年的简单营养增殖,与原产地该藻种相比,存在分枝多、枝条嫩、易断裂、出胶率低、凝胶强度低、抗逆性变弱等问题<sup>[23]</sup>,种质明显退化。

RAPD分析6个养殖群体,发现长心卡帕藻栽培群体间的遗传多样性丰富(多态位点比例 $P=97.67%$ ) (表3),遗传变异水平较高。与其他相近物种的遗传多样性相比,明显高于细基江蓠(*Gracilaria tenuistipitata*) ( $P=40.47%$ ) 及其繁枝变种(*G. tenuistipitata var liui*) ( $P=31.35%$ )<sup>[21]</sup>,高于紫菜(*Porphyra*) ( $P$ 为70%~97%)<sup>[15]</sup>和裙带菜(*Undaria pinnatifida*) ( $P=87.15%$ )<sup>[24]</sup>。这说明中国长心卡帕藻种质虽退化,但还有很大的遗传选育空间。此外,最初引进的长心卡帕藻属于野生种,具有一定的选育优势。6个长心卡帕藻养殖群体中,S群体的多态位点百分率 $P$ 为76.74%,Nei's基因多样性指数 $H$ 为 $0.2460 \pm 0.1905$ ,Shannon's遗传多样性信息指数 $I$ 为 $0.3733 \pm 0.2629$ (表3),均高于其他群体,说明在同等选育条件下,S群体的遗传多样性高,更具选育优势。

在筛选出的6个引物中,S2003可在6个群体中扩增出差异性的条带,说明这些DNA片段可用于某

一群体的特殊识别标记,这是否与藻体的形态表型或生殖等特征有关,有待进一步研究证实。RAPD是一种简便、快速,对模板信息需求量少的分子标记。为保证RAPD结果的可靠性,需考虑它的可重复性。在长心卡帕藻RAPD条件优化的实验中,笔者发现在保证反应体系中各成分、反应程序和所用仪器等相同条件的情况下,RAPD的可重复性好,结果可靠<sup>[22]</sup>。

#### 3.2 长心卡帕藻养殖群体聚类分析

根据遗传距离聚类分析(图4)时,S群体单独聚为一类,其他群体则聚为另一类。黎安是所有栽培长心卡帕藻的最终苗源地,由此向其他养殖区扩散。在中国长心卡帕藻的养殖主要是养殖户分海区养殖,而不同海区的水质、光照、营养、盐度等条件的不同,都有可能造成藻体颜色、形态变化<sup>[8]</sup>,甚至是遗传结构的变化。由此说明,6个群体在养殖过程中缺少一定的基因交流,而最初引种的规模较小,所以在养殖的过程中各群体间存在了一定的遗传结构的差异。刘晨临等<sup>[7]</sup>用ISSR分子标记,从4株形态不同的长心卡帕藻中筛选出与经济性状相关的带型,提出来源同一亲本的这些藻体之间已经存在了稳定的遗传差异。本研究证明RAPD技术可用于长心卡帕藻的遗传多样性分析,而实验有待进一步用原引自菲律宾的长心卡帕藻与中国长心卡帕藻进行亲缘关系的分析,或选用多态性高、可提供更多遗传信息的标记对中国长心卡帕藻进行深入的遗传多样性分析。

## 参考文献:

- [1] Bixler H J. Recent developments in manufacturing and marketing carrageenan [J]. *Hydrobiologia*, 1996, 326/327: 35-57.
- [2] McHugh D J. A guide to the seaweed industry. Technical Report 441 [R]. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy. 2003.
- [3] 曾广兴. 异枝麒麟菜人工养殖技术[J]. *水产养殖*, 2001, 3: 5-7.
- [4] 刘思俭, 庄屏. 我国的麒麟菜栽培事业[J]. *湛江水产学院学报*, 1984, 1: 1-6.
- [5] 刘建国, 庞通, 王莉, 等. 导致热带产卡拉胶海藻大规模死亡原因分析与藻株抗病差异性比较[J]. *海洋与湖沼*, 2009, 40(2): 235-241.
- [6] 夏恩湛. 中国麒麟菜属植物地理学的初步研究[J]. *海洋与湖沼*, 1963, 5(1): 52-55.
- [7] 刘晨临, 黄晓航, 刘建国. 4株形态不同的长心卡帕藻(*Kappaphycus alvarezii*)的初步ISSR分析[J]. *海洋科学*, 2009, 33(4): 50-53.
- [8] 夏邦美, 张峻甫, 中国海藻志[M]. 北京: 科学出版社, 1999: 115-132.
- [9] Doty M S, Norris J N. *Euclidean species* (Solieriaceae, Rhodophyta) that are major sources of carrageenan [M]// Abbott I A. *Taxonomy of Economic Seaweeds*. La Jolla, California: California Sea Grant College Program, 1985: 47-61.
- [10] Doty M S. *Prodomus Ad systematica euclideanatioderum: A tribe of commercial seaweeds related to Euclidean (Solieriaceae, Gigartinales)* [M]// Abbott I A. *Taxonomy of economic seaweeds*. La Jolla, California: California Sea Grant Program, 1988, 159-207.
- [11] Doty M S. *Taxonomy of economic seaweeds; with reference to some Pacific and Caribbean species vol V* [R]. California Sea Grant College Program, University of California, La Jolla, Calif, Rep T-CSGCP, 1996: 237-245.
- [12] 吴超元, 李家俊, 夏恩湛, 等. 异枝麒麟菜的移植和人工栽培[J]. *海洋与湖沼*, 1988, 19(5): 410-418.
- [13] 郑国洪. 浅海浮筏式养殖长心麒麟菜技术[J]. *中国水产*, 2006, 11: 58-59, 80.
- [14] 王红勇, 姚雪梅, 王李. 长心卡帕藻生长适宜环境条件的研究[J]. *北京水产*, 2008, 3: 29-34.
- [15] 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.
- [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: 1-3.
- [17] 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.
- [18] 李文红, 毕蕾, 夏鹏, 等. 龙须菜(*Gracilaria lemaneiformis*)选用品系遗传背景的RAPD分析[J]. *高技术通讯*, 2004, 6: 85-88.
- [19] 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.
- [20] 赵素芬, 何培民. 长心卡帕藻ISSR-PCR反应体系的正交优化研究[J]. *中国生物工程杂志*, 2008, 28(6): 163-167.
- [21] 李文红, 胡自民, 覃志彪, 等. 细基江蓠及其繁枝变种的RAPD和ITS分析[J]. *海洋学报*, 2004, 26(6): 89-95.
- [22] 赵素芬, 张婷, 应成琦, 等. 长心卡帕藻RAPD-PCR反应体系的正交优化研究[J]. *生物技术通报*, 2008, 4: 161-165.
- [23] 廖洋, 刘洋. 高产卡拉胶海藻课题列入国家海洋公益项目[N]. *科学时报*, 2008-1-3(A01).
- [24] 岳志芹, 李大鹏, 戴继勋. 应用RAPD技术对裙带菜的遗传分析[J]. *海洋通报*, 2000, 19(6): 24-28.

## Population genetic diversity of *Kappaphycus alvarezii* cultivated in China

ZHANG Ting<sup>1</sup>, ZHAO Sufen<sup>1,2</sup>, YING Chengqi<sup>1</sup>, SHEN Hedong<sup>1</sup>, HE Peimin<sup>1</sup>

(1. Fisheries and Aqua-life College, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Fisheries College, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524025, China)

**Abstract:** Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) markers were used to estimate the population genetic diversity in six cultivated populations of *Kappaphycus alvarezii* in Hainan Province, China. Six primers (S345, S352, S384, S1510, S2003, S2114) were selected from 30 primers and 43 reproducible and discernible loci were amplified. The amplified fragment sizes ranged from 300 bp to 3 kb. The mean percentage of polymorphic loci was 98.27%. By using software POPGENE 32, the percentages of polymorphic loci of six populations of *K. alvarezii* were 62.79%–97.67%; Nei's (1973) gene diversity indices ( $H$ ) were from  $0.1455 \pm 0.1809$  to  $0.2463 \pm 0.1797$ ; Shannon's information indices ( $I$ ) were from  $0.2291 \pm 0.2566$  to  $0.3808 \pm 0.2425$ ; And genetic distances were 0.0151–0.1350. It indicated that the genetic variations among populations were high, and the genetic diversity index of population S (Neicun, Sanya, Hainan) was the highest. MEGA4 software was used for UPGMA dendrogram analysis. The result showed that population S clustered alone, and LA and XC first superficially clustered together, then ordinally clustered with LD, L and NC. The six populations really belong to the same species of *Kappaphycus alvarezii*, although differences in shape and color exist among them. [Journal of Fishery Sciences of China, 2010, 17(3): 586–592]

**Key words:** *Kappaphycus alvarezii*; cultivated population; RAPD analysis; genetic diversity

**Corresponding author:** HE Peimin. Tel: 021-61900457; E-mail: pmhe@shou.edu.cn