

文章编号: 1674-5566(2013)03-0334-07

山东半岛大叶藻不同地理种群遗传多样性和遗传结构分析

刘坤^{1,2}, 刘福利², 王飞久², 孙修涛², 汪文俊², 丁昌玲², 梁洲瑞²,
马兴宇^{1,2}

(1. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306; 2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室, 山东 青岛 266071)

摘要: 应用 RAPD 技术, 对自然分布于山东半岛莱州湾、小石岛、俚岛、楮岛和汇泉湾的 5 个大叶藻种群的遗传多样性和遗传结构进行了分析, 并基于研究结果对山东半岛大叶藻种群保护和移植修复提出了建议。实验用 10 条 RAPD 引物共扩增多 42 条条带, 多态条带 39 条, 多态性位点比率为 92.86%。研究结果表明山东半岛大叶藻种群具有较高的遗传多样性和较高的遗传分化; AMOVA 分析显示 5 个种群 99.68% 的变异来源于种群内部, 而 0.32% 的变异来源于种群间; Mantel 测试表明 5 种群遗传距离与地理距离之间没有相关性; 遗传多样性最低的是莱州湾种群, 应该得到优先保护; 遗传多样性较高的是俚岛种群和汇泉湾种群, 可以作为山东半岛海草场移植修复的首选种群。

研究亮点: 国内学者对自然分布于我国的大叶藻群体遗传学研究较少, 遗传多样性是海草床修复中需要考虑的重要因素。本研究利用 RAPD 技术对山东半岛大叶藻种群遗传多样性和遗传结构进行了分析, 并基于保护遗传学观点, 提出了优先保护种群以及海草床移植修复优选种群, 为我国大叶藻保护和海草床修复提供了基础资料。

关键词: 大叶藻; 海草; 遗传多样性; 随机扩增多态性 DNA 标记; 分子方差分析; Mantel 测试

中图分类号: Q 943; S 917

文献标志码: A

大叶藻隶属于沼生目 (Helobiae)、大叶藻科 (Zosteraceae)、大叶藻属 (*Zostera*), 广泛分布于我国山东、河北和辽宁沿海。作为海草的一种, 大叶藻所形成的群落是近海生态系统中关键的组成部分, 具有重要的生态和经济价值^[1-6]。国内大叶藻资源的研究起步较晚, 研究领域主要集中在生物学、生态生理学等方面^[1,6-10]。

目前, 我国大叶藻种群正面临着环境恶化与遗传多样性衰退的双重压力^[7,11-12], 而国内学者对大叶藻不同地理种群遗传多样性和遗传结构的研究却鲜见报道^[13-14]; 遗传多样性是移植中需要考虑的一个重要因素^[15], 然而结合种群遗传多样性的移植修复实验也未见报道。本实验采用 RAPD 技术对山东半岛大叶藻 5 个不同地理种群的遗传多样性以及遗传结构进行了研究, 以期

掌握山东半岛大叶藻不同地理种群的遗传多样性和遗传结构现状, 为我国沿海进行的大叶藻种群保护、移植修复提供遗传学依据, 同时也将充实大叶藻保护遗传学资料, 对其他海草种类也有借鉴和参考价值。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究所用大叶藻样品分别采自山东半岛的 5 个地区, 包括: 莱州湾、小石岛、俚岛、楮岛和汇泉湾 (图 1), 采样时植株间至少间隔 2 m, 每个群落随机采集 20 株植株。采集好的样品用海水初步清洗, 装入封口袋, 做好标记带回实验室。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取

取大叶藻适量的新鲜幼嫩茎叶, 对 5 个种群

收稿日期: 2012-07-11 修回日期: 2013-03-14

基金项目: 国家公益性行业 (农业) 科研专项 (201003068); 科技部对欧盟科技合作专项经费项目 (0914)

作者简介: 刘坤 (1987—), 男, 硕士研究生, 研究方向为海藻生物学。E-mail: liukun198@126.com

通信作者: 王飞久, E-mail: wangfj@ysfri.ac.cn

的每株样品进行基因组 DNA 的提取, DNA 提取的试剂盒选用天根植物基因组 DNA 提取试剂盒(天根,北京)。提取的样品 DNA 用琼脂糖凝胶电泳检测其完整性和纯度, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。

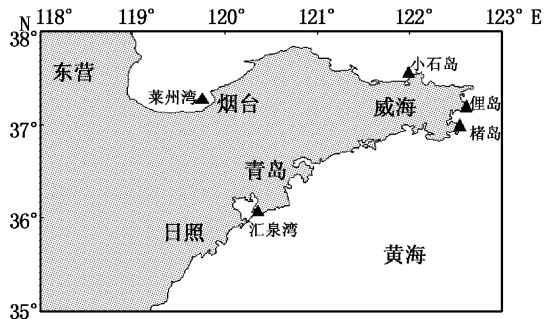


图 1 采样地点

Fig. 1 Sampling sites

1.2.2 PCR 扩增

PCR 反应体系: $2 \times \text{ES Taq MasterMix}$ (康为世纪,北京) $10\text{ }\mu\text{L}$, ddH_2O $8.2\text{ }\mu\text{L}$, Primer $0.8\text{ }\mu\text{L}$, Template DNA $1\text{ }\mu\text{L}$, 总体积 $20\text{ }\mu\text{L}$ 。反应条件: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 min , $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s , $36\text{ }^{\circ}\text{C}$ 40 s , $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 90 s , 40 个循环, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 min 。PCR 扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 在培清 JS-680C 凝胶成像系统(培清,上海)下成像保存。

1.2.3 数据处理与统计分析

将电泳图谱清晰且可重复的条带赋值为 1, 同一位置上的弱带且不重复或者未出现带的赋值为 0, 形成 1、0 数据矩阵。利用 POPGENE Version 1.32 计算种群内的遗传多样性指标以及种群间的遗传差异指标, 包括多态位点百分数 (percentage of polymorphic loci)、平均杂合度 (Nei's gene diversity)、Shannon 多样性指数 (Shannon's information index) 以及遗传相似系数 (genetic identity)、遗传距离 (genetic distance)、遗传分化指数 (G_{st})、基因流 (gene flow); 运用 DCFA 1.1^[16] 以及 AMOVA Version 1.55 进行种群间遗传结构分析; 利用 NTSYS 2.10e 基于遗传相似系数矩阵构建 5 种群 100 个体的 UPGMA 聚类图; 利用 TFGA Version 1.3 对 5 种群进行 Mantel 测试。

2 结果与分析

2.1 引物筛选

利用 3 份不同地理位置的大叶藻材料进行引物筛选, 从 50 条 RAPD 引物中筛选到多态性高且重复性好的 10 条引物。RAPD 扩增条带在 $250 \sim 2000\text{ bp}$ 之间, 图 2 为引物 S12 对小石岛种群 20 个体的扩增结果; 10 条引物共扩增出 42 条条带, 多态条带 39 条, 多态性位点比率为 92.86%。

表 1 RAPD 引物及其扩增结果
Tab. 1 RAPD primers and amplification results

引物	碱基序列	总条带数	多态性条带数	多态率/%
S7	GGTGACGCAG	5	4	80.00
S8	GTCCACACGG	4	4	100.00
S11	GTAGACCCGT	4	4	100.00
S12	CCTTGACGCA	6	6	100.00
S17	AGGGAACGAG	3	3	100.00
S79	GTTGCCAGCC	4	4	100.00
S82	GGCACTGAGG	3	2	66.67
S94	GGATGAGACC	4	2	50.00
S97	ACGACCGACA	5	5	100.00
S98	GGCTCATGTG	4	4	100.00

2.2 种群内遗传多样性

各种群扩增出的多态位点数为 17~31 不等, 其中莱州湾种群的多态位点最少, 多态位点百分率为 40.48%, 俚岛种群与汇泉湾种群的多态位点相同, 且多态位点最多, 多态位点百分率为 73.81%。在种群水平上, 5 个种群的平均杂合度和 Shannon 多样性指数的范围分别为 $0.1500 \sim$

0.2909 和 $0.2220 \sim 0.4247$, 其中汇泉湾种群的平均杂合度最高, 而莱州湾种群的平均杂合度最低, 俚岛种群的 Shannon 多样性指数最高, 莱州湾种群的 Shannon 多样性指数最低。鉴于以上 3 个指标, 遗传多样性最低的是莱州湾种群, 遗传多样性最高的是俚岛种群和汇泉湾种群, 并且这两个种群的遗传多样性差异不大。对 5 种群的 100

个体进行分析,多态位点数为 39,多态位点百分率为 92.85%,平均杂合度为 0.359 3,Shannon 多样性指数为 0.529 0(表 2)。

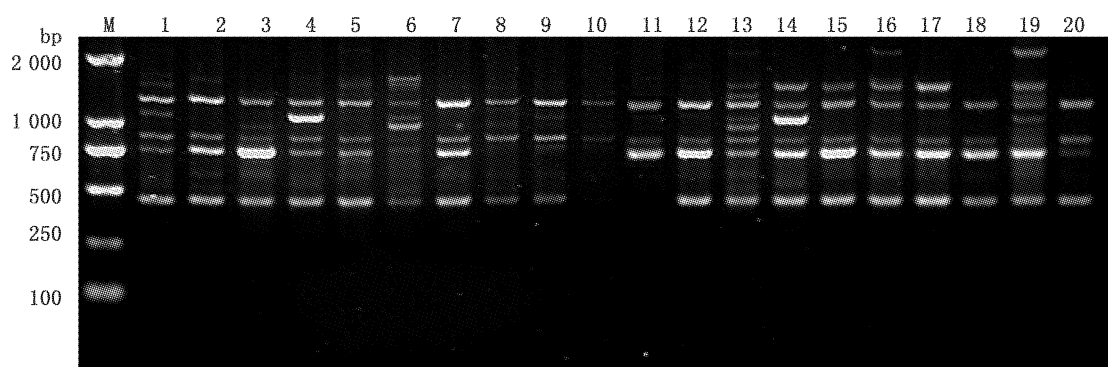


图 2 引物 S12 扩增的 RAPD 图谱

Fig. 2 The RAPD amplified pattern by primer S12

1~20. 20 个小石岛种群大叶藻样品; M. 分子量标准 DL 2 000。

表 2 不同大叶藻地理种群 RAPD 分析的遗传多样性

Tab. 2 RAPD polymorphisms of populations of *Z. marina* from different areas

	多态位点数	多态位点百分率/%	Shannon 多样性指数	平均杂合度
楮岛	24	57.14	0.314 3	0.212 2
莱州湾	17	40.48	0.222 0	0.150 0
俚岛	31	73.81	0.424 7	0.289 9
小石岛	28	66.67	0.344 7	0.230 0
汇泉湾	31	73.81	0.424 3	0.290 9
全部个体	39	92.85	0.529 0	0.359 3

2.3 种群间的遗传关系

种群间遗传相似性指数和遗传距离的范围分别为 0.739 9~0.856 4 和 0.155 1~0.301 3, 其中遗传相似指数最大值出现在俚岛种群和小石岛种群之间,最小值出现在莱州湾种群和小石岛种群之间;遗传距离最大值出现在小石岛种群和莱州湾种群之间,最小值出现在俚岛种群和小石岛种群之间。遗传分化指数(G_{st})和基因流的范围分别为 0.160 0~0.361 5 和 0.883 3~2.625 8,

遗传分化指数的最高值出现在小石岛种群和莱州湾种群之间,最低值出现在俚岛种群和汇泉湾种群;基因流最高值出现在俚岛种群和汇泉湾种群,最低值出现在莱州湾种群和小石岛种群之间。

基于 RAPD 数据的 5 种群大叶藻的 AMOVA 分析结果(表 4)显示:99.68% 的变异来源于种群内部,而 0.32% 的变异来源于种群间,且随机排列检验显示种群间差异极显著($P < 0.001$)。

表 3 不同地理种群大叶藻的遗传相似性指数(上三角)和遗传距离(下三角)

Tab. 3 Nei's genetic identity (above diagonal) and genetic distance (below diagonal) between five populations of *Z. marina* populations

	楮岛	莱州湾	俚岛	小石岛	汇泉湾
楮岛		0.842 3	0.754 5	0.794 9	0.763 1
莱州湾	0.165 8		0.752 4	0.739 9	0.826 1
俚岛	0.272 8	0.284 5		0.856 4	0.853 3
小石岛	0.229 5	0.301 3	0.155 1		0.833 9
汇泉湾	0.270 4	0.191 1	0.158 7	0.181 7	

表 4 大叶藻 100 个体的 AMOVA 分析

Tab. 4 Analysis of molecular variance (AMOVA) for 100 individuals of *Z. marina*

变异来源	自由度	方差总和	变异组分	变异比例	P 值
种群间	4	39.20	0.029	0.32%	<0.001
种群群内	95	875.55	9.216	99.68%	<0.001
总计	99	914.75	9.245	100%	

表 5 大叶藻 5 种群两两配对的遗传分化指数 (G_{st}) (上三角) 和基因流 (下三角)Tab. 5 Pair-wise estimate of G_{st} genetic distance (above diagonal) and gene flow (below diagonal) between the five populations of *Z. marina*

	楮岛	莱州湾	俚岛	小石岛	汇泉湾
楮岛		0.263 6	0.268 9	0.271 0	0.266 9
莱州湾	1.396 9		0.312 5	0.361 5	0.245 0
俚岛	1.359 5	1.099 8		0.178 1	0.160 0
小石岛	1.245 3	0.883 3	2.307 4		0.198 5
汇泉湾	1.373 4	1.540 6	2.625 8	2.018 7	

基于遗传距离矩阵构建 5 种群 100 个体的 UPGMA 系统树(图 3)。5 种群 UPGMA 系统树明显分为 2 分支,俚岛、小石岛种群首先聚到一起,之后与汇泉湾种群聚为一支,楮岛与莱州湾种群聚为一支。100 个体 UPGMA 系统树显示,100 个体明显分为 5 大分支,楮岛、小石岛、莱州湾种群的个体全部聚到其种群所在的分支中,俚岛种群的 19 个体聚到其它种群所在的分支中;而汇泉湾种群中 8 个体与莱州湾种群的全部个体聚为一支,其余个体与俚岛种群的 1 个体聚为一支。

对 5 种群遗传距离与地理距离数据矩阵进行相关性检测,相关系数 $r = -0.1063$ (图 4)。根据相关性原理,当 $0.7 < r < 0.8$,为弱相关性;当 $r < 0.7$,为极弱相关性或不相关。因此,5 种群遗传距离与地理距离之间没有相关性。

3 讨论

本研究利用 RAPD 技术对自然分布于山东半岛莱州湾、小石岛、俚岛、楮岛、汇泉湾 5 种群大叶藻的遗传多样性和遗传结构进行了分析。研究表明山东半岛大叶藻种群具有较高的遗传多样性和较高的遗传分化,这与刘志鸿等^[13]的研究结果类似。而以往的研究中发现大叶藻的遗传多样性比较低^[17-18],之所以造成这种差异可能是由于所研究的大叶藻种群分布以及取样范围不同。种群所承受的环境压力不同(如温度、光照、底质、生物竞争等),所表现出的遗传多样性和遗传结构也不同。大叶藻同时具有有性生殖和无性生殖两种生殖方式,但是大量研究表

明大叶藻只进行有限的有性生殖^[19],这样就限制了花粉的杂交和基因的流动。山东半岛沿岸的海洋环流很容易造成一些独立的生境斑块,从而造成了种群间的隔离,长时间的独立进化和互相缺乏基因交流导致群体间较高的遗传分化。

AMOVA 分析显示山东半岛 5 种群的变异几乎全部来源于种群内部。地理距离较远的莱州湾种群和楮岛种群遗传距离反而较小。5 种群 100 个体 UPGMA 系统树显示并不是同一种群的所有个体都聚在一支,而是部分种群的少数个体与其他种群聚在一起。出现上述几种结果的原因可能是山东半岛以前是一大片连续的海草场,而本研究所选取的 5 种群是大海草场退化后的小片段种群。在小片段种群恢复期间,由于大叶藻以无性繁殖为主的生殖方式,导致其现有的遗传结构也是以前大海草场的一部分。

海洋环境的变化以及人类的过度开发,导致我国现存的大叶藻自然种群数量下降和生境片段化,这会明显地改变种群遗传结构,增加近亲繁殖和导致遗传多样性渐衰。物种的遗传多样性是长期进化的产物,是其适应、生存、发展和进化的前提,物种的遗传多样性越高或遗传变异越丰富,对环境变化的适应能力就越强^[20];反之,具有较低遗传多样性的物种则更容易受到环境变化的影响。保护遗传学主张濒危物种保护对策的制定必须同遗传因子和环境因子结合起来考虑^[21]。本研究中,遗传多样性最低的是莱州湾种群,应该得到优先保护。

海草移植修复中不宜引入新的基因型,否则

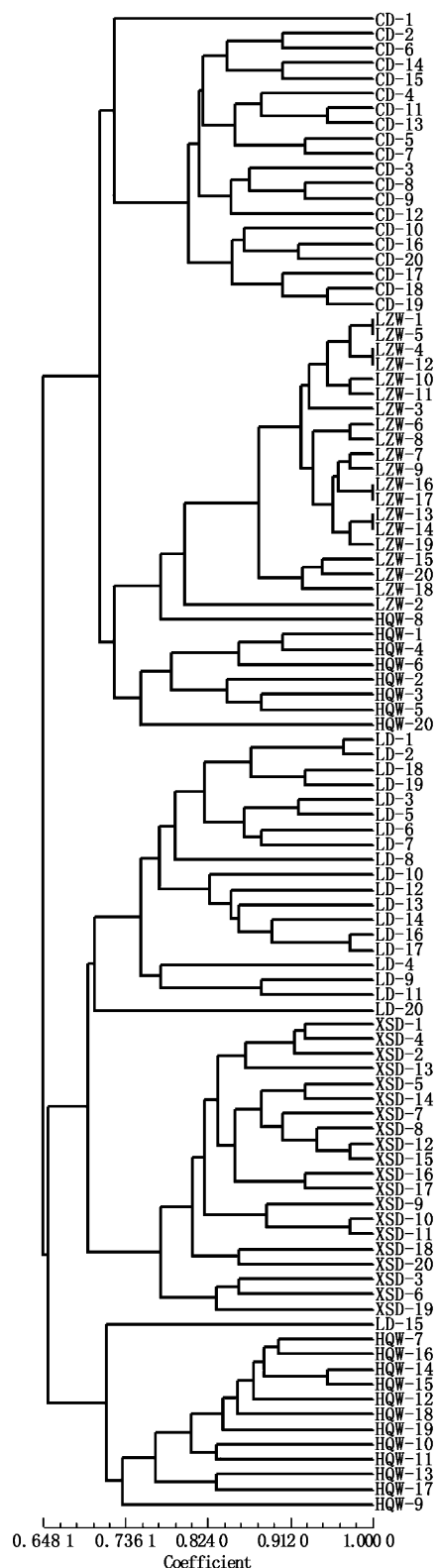


图3 基于遗传相似系数构建 100 个体的 UPGMA 系统树

Fig. 3 UPGMA tree of all individuals based on the Nei's genetic identity

CD-1 ~ CD-20. 楮岛种群 20 个体; LZW-1 ~ LZW-20. 莱州湾种群 20 个体; HQW-1 ~ HQW-20. 汇泉湾种群 20 个体; LD-1 ~ LD-20. 俚岛种群 20 个体; XSD-1 ~ XSD-20. 小石岛种群 20 个体。

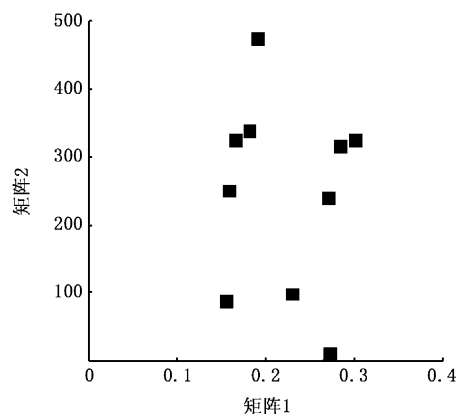


图4 5 种群遗传距离与地理距离数据矩阵 Mantel 测试结果

Fig. 4 Result of Mantel test between genetic distance data matrix and geographical distance data matrix of five populations

会造成遗传污染^[22]。新的基因型植株可能在短期内大量繁殖,对土著植株造成较大的生存竞争压力;而且不同的基因型植株有不同的生活习性,新引进的基因型植株可能不适应新的生长环境。从本地环境中引入移植修复植株是至关重要的,但是不能在不同的地点进行简单的移植,遗传多样性是移植中需要考虑的一个重要因素,较低的遗传多样性可能不足以应对外界环境的变化和繁殖策略的变化,相反较高的遗传多样性可以应对外界环境的变化,并且可以减少自交的几率。因此,移植修复是应该采用本地的遗传多样性高的居群。本研究中,遗传多样性较高的是俚岛种群和汇泉湾种群,可以作为山东半岛海草场移植修复的首选种群。

参考文献:

- [1] 叶春江,赵可夫. 高等植物大叶藻研究进展及其对海洋沉水生活的适应[J]. 植物学通报,2002,19(2):184-193.
- [2] DEN HARTOG C. The seagrasses of the world[M]. Amsterdam: North Holland Publication Co,1970,59:1-275.
- [3] FRANSSEN U S, CU J, BERGMANN N, et al. Transcriptomic resilience to global warming in the seagrass *Zostera marina*, a marine foundation species [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences,2011,108(48):19276-19281.
- [4] KWAK S N, BAECK W G, KLUMPP D W. Comparative feeding ecology of two sympatric greenling species, *Hexagrammos otakii* and *Hexagrammos agrammus* in eelgrass *Zostera marina* beds [J]. Environmental Biology of Fishes,2005,74(2):129-140.

- [5] VINCENT A C J, BERGLUND A, AHNESJO I. Reproductive ecology of five pipefish species in one eelgrass meadow[J]. *Oceanographic Literature Review*, 1996, 43(7):706.
- [6] 任国中,张起信,王继成,等. 移植大叶藻提高池养对虾产量的研究[J]. *海洋科学*, 1991(1):52-57.
- [7] 李文涛,张秀梅. 海草场的生态功能[J]. *中国海洋大学学报*, 2009, 39(5):933-939.
- [8] 刘元刚,王光辉. 大叶藻移植在海参养殖中的应用[J]. *齐鲁渔业*, 2006, 23(4):12.
- [9] 于函,马有会,张岩,等. 大叶藻的生态学特征及其与环境的关系[J]. *海洋湖沼通报*, 2007(s1):112-120.
- [10] 郭栋,张沛东,张秀梅,等. 山东近海海域海草种类的初步调查研究[J]. *海洋湖沼通报*, 2010(2):17-21.
- [11] ORTH R, LUCKENBACH M, MARION S, et al. Seagrass recovery in the Delmarva Coastal Bays USA [J]. *Aquatic Botany*, 2006, 84(1):26-36.
- [12] CAMPANELLA J, BOLOGNA P, SMITH S, et al. *Zostera marina* population genetics in Barnegat Bay, New Jersey, and implications for grass bed restoration[J]. *Population Ecology*, 2010, 52(1):181-190.
- [13] 刘志鸿,董树刚,牟海津,等. 青岛汇泉湾大叶藻种群遗传多样性的研究[J]. *海洋水产研究*, 1998, 19(2):27-32.
- [14] 李渊,孙典荣,李文涛,等. 基于 *matK*, *rbcL* 和 ITS 序列的 5 种大叶藻系统发育研究[J]. *水产学报*, 2011, 35(2):183-191.
- [15] CAMPANELLA J, BOLOGNA P, SMITH S, et al. Population structure of *Zostera marina* (eelgrass) on the western Atlantic coast is characterized by poor connectivity and inbreeding[J]. *Journal of Heredity*, 2010, 101(1):61-70.
- [16] 张富民,葛颂. 群体遗传学研究中的数据处理方法 I: RAPD 数据的 AMOVA 分析[J]. *生物多样性*, 2002, 10(4):438-444.
- [17] WAYCOTT M, BARNES P. AFLP diversity within and between populations of the Caribbean seagrass *Thalassia testudinum* (Hydrocharitaceae) [J]. *Marine Biology*, 2001, 139(6):1021-1028.
- [18] CHEN X, GAO Y, ZHAO N, et al. An AFLP analysis of genetic diversity and structure of *Caragana microphylla* populations in Inner Mongolia steppe, China[J]. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2009, 37(4):395-401.
- [19] LAUSHMAN R. Population genetics of hydrophilous angiosperms [J]. *Aquatic Botany*, 1993, 44(2):147-158.
- [20] 李渊. 大叶藻科的系统发育与大叶藻居群遗传学研究[D]. 青岛:中国海洋大学, 2011.
- [21] 王峥峰,葛学军. 不仅仅是遗传多样性:植物保护遗传学进展[J]. *生物多样性*, 2009, 17(4):330-339.
- [22] MCKAY J, CHRISTIAN C, HARRISON S, et al. How local is local-A review of practical and conceptual issues in the genetics of restoration [J]. *Restoration Ecology*, 2005, 13(3):432-440.

Analysis of genetic diversity and structure of *Zostera marina* populations in Shandong Peninsula

LIU Kun^{1,2}, LIU Fu-li², WANG Fei-jiu², SUN Xiu-tao², WANG Wen-jun², DING Chang-ling², LIANG Zhou-rui², MA Xing-yu^{1,2}

(1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, Shandong, China)

Abstract: In the present study, random amplified polymorphic DNA (RAPD) molecular marker was used to study the population genetic diversity and structure of five *Zostera marina* L. populations distributed in Shandong Peninsula: Laizhou bay, Xiaoshi Island, Li Island, Chu Island and Huiquan Bay. Based on the obtained results, suggestions for *Z. marina* population protection and for seaweed meadow restoration in Shandong peninsula were put forward. In the experiment, 42 bands were obtained by RAPD markers amplified through 10 selected primers. The percentage of polymorphic bands was 92.86%. The results showed that the populations in Shandong Peninsula had high genetic diversity and high genetic differentiation. The AMOVA demonstrated that the inter-population component accounted for 99.68% of the total variation, while the intra-population component accounted for 0.32%. Mantel tests showed that 5 populations of *Z. marina* L. had no correlation between genetic distance and geographic distance. The population in Laizhou Bay that showed the lowest genetic diversity should be given priority protection. The populations in Li Island and Huiquan Bay that showed highest genetic diversity can be used as the first choice for seaweed meadow transplanting restoration in Shandong Peninsula.

Key words: *Zostera marina* L. ; seagrass; genetic diversity; RAPD; AMOVA; Mantel test