

食用海带(*Saccharina japonica*)新品系 遗传多样性研究*

姚海芹^{1,2} 刘福利^{2,3} 王飞久^{2①} 梁洲瑞²

汪文俊² 孙修涛² 李晓蕾^{1,2}

(1. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306;

2. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071;

3. 青岛海洋科学与技术国家实验室 海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 青岛 266071)

摘要 为获取 3 个食用海带(*Saccharina japonica*)新品系(“海天 1 号”、“海天 2 号”、“海天 3 号”)和“黄官 1 号”海带的遗传多样性和遗传结构信息,为海带种质保存及新品系培育提供理论依据,本研究采用 SSR 分子标记技术,从 20 对 SSR 引物中筛选出 8 对扩增效果好的引物,对 4 个海带品系的 120 个样本进行了种群遗传分析。结果显示,8 对引物共检测到 28 个具有多态性的等位基因,9 个特异性等位基因,平均每对引物检测到等位基因数为 4.6250 个。4 个海带品系的 Nei's 基因多样性(H)和香农指数(I)平均值分别为 0.3809 和 0.6702,遗传多样性水平偏低,且亲缘关系较近。其中,“海天 1 号”海带的 H 、 I 值最高,多态性位点最多,遗传多样性优于其他 3 个海带品系。“海天 2 号”、“海天 3 号”和“黄官 1 号”海带遗传多样性水平依次降低。聚类分析结果显示,“海天 1 号”与“海天 3 号”海带亲缘关系最近,而与“黄官 1 号”海带亲缘关系最远。AMOVA 分析显示,4 个海带品系 92.06% 的变异来源于品系内部,7.94% 的变异来源于品系间。“黄官 1 号”海带的遗传多样性在 4 个海带品系中最低,以其作为亲本培育新品种时,应注意提高子代的遗传多样性。遗传多样性最高的是“海天 1 号”,可充分利用其优点培育优良的新品系。

关键词 海带;遗传多样性;SSR;聚类分析;AMOVA

中图分类号 Q943;S917 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2017)03-0155-08

海带(*Saccharina japonica*)是重要的经济褐藻,富含碘、褐藻胶和甘露醇等(刘福利等,2012),在食品加工、化工、医药等领域都有广泛的应用(李林等,2001)。自 20 世纪 50 年代起,我国就开展了海带遗传育种研究与应用的工作,先后培育出许多新品种(Liu *et al.*, 2012a),在海带养殖的增产、增效中发挥了

重要作用。目前,海带仍存在种质退化、混杂、抗性差等问题(方宗熙,1963),影响着海带产业的可持续发展。因此,加强对海带品系间的遗传关系和群体遗传多样性研究意义重大。

分析海带遗传多样性的分子标记方法很多,如 RAPD(Random-amplified polymorphic DNA)标记,检

* 国家“863”子课题(2012AA10A406)、山东省科技发展计划(2013GHY11505)、山东省农业良种工程项目(抗逆功能性海带种质的基因开发与利用)和国家青年自然科学基金项目(41306176)共同资助[This work was supported by National High Technology Research and Development Program (2012AA10A406), the Development Program of Science and Technology of Shandong Province (2013GHY11505), Agricultural Seed Project of Shandong Province (The development and utilization of resistance gene functional of *Laminaria* germplasm), and National Natural Science Foundation of China (41306176)]. 姚海芹, E-mail: yaohaiqin19@163.com

① 通讯作者:王飞久,研究员, E-mail: wangfj@ysfri.ac.cn

收稿日期:2016-03-02, 收修改稿日期:2016-03-26

测速度快、DNA用量少,但稳定性和重复性不高(夏鹏等, 2003; 周志刚等, 2003); AFLP(Amplified fragment length polymorphism)标记具有较高的稳定性、可用少量的引物短时间内检测大量的位点,但对基因组纯度和反应条件要求较高(Shan *et al.*, 2009; 张全胜等, 2008; 李世国等, 2009); ISSR(Inter-simple sequence repeat)标记实验操作简单、快速、高效,但需要时间摸索最适条件,且不能区分显性纯合和杂合基因型(Wang *et al.*, 2005)以及 SSR(Simple sequence repeat)等方法(罗兵等, 2013; 张荣良等, 2016)。RAPD、ISSR和 AFLP的标记引物属于通用引物,是非特异性标记。SSR分子标记技术具有以下特点:共显性、特异性高(刘岩等, 2006; 石媛嫒等, 2008; 丛义周等, 2009¹⁾),能大大降低非目标生物的干扰;涵盖范围广、揭示多态性高。Gerber等(2000)发现, AFLP标记的多态性远远小于 SSR标记的多态性;样本 DNA的质量要求低、成本低。Chamberlain等(1998)首次引入多重 PCR技术,将 SSR的稳定性与多重 PCR的高通量特点相结合,大大提高了 SSR分型效率,从而降低了遗传分析的时间与成本,另外,新一代测序技术的发展,也降低了微卫星位点的开发成本,开发出大量的微卫星标记(刘福利等, 2013; Song *et al.*, 2013)。据此,本研究采用 SSR标记技术对食用海带新品系的遗传多样性进行分析。

“海天1号”、“海天2号”和“海天3号”海带是中国水产科学研究院黄海水产研究所与山东荣成寻山集团共同选育的3个食用海带新品系,具有产量高、耐高温、成熟较早等特点。其中,“海天1号”为北方高产海带与南方海带杂交获得,“海天2号”是“奔牛”紫外处理选育获得,“海天3号”是“黄官1号”紫外处理选育所得。为了解4个海带群体遗传多样性和遗传关系,本研究选用 SSR分子标记,从20对引物中(Zhang *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2012b; Shi *et al.*, 2007)筛选出8对扩增效果较好的引物,对每个品系的30个样本进行分析评价,为海带品系的遗传关系和群体遗传多样性研究提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本研究用的“海天1号”、“海天2号”、“海天3号”和“黄官1号”4个海带品系采自山东威海市荣成寻山集团青鱼滩养殖场,每个品系取30个个体(幼

孢子体长约10 cm),做好标记后放入自封袋,用冰盒带回实验室。

1.2 实验方法

1.2.1 DNA提取 采用天根植物基因组 DNA提取试剂盒提取4个海带品系共120个样品的基因组 DNA。使用琼脂糖凝胶电泳检测基因组 DNA的完整性和纯度,于-20℃冰箱保存备用。

1.2.2 微卫星引物筛选 随机取4个样品进行引物筛选,通过预实验筛选出多态性较高的引物进行正式的实验。PCR反应体系为10× Ex Taq Buffer 2.5 μl, dNTP(2.5 mmol/L)2 μl, Mix primer 1 μl, DNA 1 μl, Ex Taq 0.2 μl, H₂O 18.3 μl, 总体积25 μl。PCR反应程序为95℃ 2 min, 95℃ 30 s, 56℃ 20 s, 72℃ 30 s, 25个循环, 72℃ 5 min, 12℃保温。

1.2.3 数据统计和分析 用预实验筛选出的8对特异性、多态性较好的引物,对120个样本进行扩增、上机分型检测。将上机结果原始文件导入 Genemarker, 选用 LIZ500 内标准进行数据分析,按位点导出峰图、Excel 位点信息表。

根据 Excel 原始数据,去除非特异性条带,对特异性条带片段大小的相关信息进行整理。记录每对引物所有片段的大小,形成原始数据表征阵。并使用 Convert 软件将其转换成特定的格式。

用软件 Popgen 32 对4个海带品系的遗传多样性进行评估,选择的参数包括香农指数(I),多态位点比率(P),等位基因数(N_a)和有效等位基因(N_e), Nei's 基因多样性指数(H),表观杂合度(H_o)和期望杂合度(H_e)等。

品系间的遗传分化用 Popgen 32 计算遗传进化系数(G_{st})和基因流(N_m);用 Mega 4.1 根据遗传距离采用 UPGMA(Unweighted pair group method with arithmetic mean)方法构建品系间的聚类分析图。使用 Arlequin version 3.11 对4个海带品系进行 AMOVA (Analysis of molecular variance)分析,计算遗传变异来源及品系间的遗传分化系数。

2 结果与分析

2.1 引物筛选

随机抽取4个海带样品的基因组 DNA,按照 SSR-PCR 反应体系进行筛选引物,结果见表1。扩出2个条带的引物有 SSR261、DQ978345、DQ978340、

1) Cong YZ. Germplasm analysis of Dongfang No.3 hybrid *Laminaria*. Master's Thesis of Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2009 [丛义周. 东方3号杂交海带种质分析. 中国农业科学院硕士研究生学位论文, 2009]

Unigene8756、Unigene15777, 扩增出 3 个条带的引物有 CS55、Unigene95068、Unigene17168, 其他引物只扩增出 1 个条带或条带比较弥散。选用扩增出 2 个或 3 个条带的这 8 对引物, 对 4 个品系的 120 个样本进行毛细管电泳, 部分 SSR 引物筛选的琼脂糖凝胶电泳结果和毛细管电泳结果分别见图 1 和图 2, 引物信息见表 2。

由图 2 可以看出, 引物 DQ978340 在“海天 1 号”的 4 个个体中的扩增结果显示其具有较好的多态性, 扩增的基因型分别为(362、377), (377、377), (368、368), (350、362), 多态性等位基因的片段大小分别为 350、362、368 和 377。这些等位基因的峰值较高且无杂峰, 具有较高的可信度。该引物与其他 7 对引物分型效果相

似, 均能较好地对不同海带品系进行遗传分析。

2.2 引物多态性和扩增结果

8 对引物的扩增结果见表 3。由表 3 可知, 8 对引物共检测出 37 个等位基因, 观察等位基因数为 2–8 个, 平均为 4.6250 个; 有效等位基因数为 1.1353–3.3431 个。其中, SSR261 观察等位基因、有效等位基因数最多分别为 8、3.3431 个, CSS55 观察等位基因、有效等位基因数最少分别为 2、1.1353 个。8 对 SSR 引物均具有多态性, Unigene15777、Unigene17168 和 Unigene8756 的多态率最好, 达到 100%, 最低的是 DQ978340 引物(42.86%), 几对引物的平均多态位点百分率是 77.86%。

8 对引物共扩增出 9 个特异性基因, 片段大小为 156–368 bp (表 4)。“海天 1 号”海带具有 6 个特异等位基因, 数目最多; “海天 2 号”和“黄官 1 号”分别具有 2 个和 1 个特异等位基因。由于本研究只选用了 8 对引物及每个品系的 30 个样本, 不能确切的说这些特异性基因专属于某个品系, 可通过选用更多的样品进行验证。

2.3 品系间的遗传分析

各品系的遗传参数见表 5, 4 个海带品系的等位基因(N_a)为 2.6250–3.6250, Nei's 基因多样性(H)为 0.2943–0.4705, 香农指数(I)为 0.5072–0.8583, 说明这 4 个海带品系的遗传多样性呈中等程度。其中, “海天 1 号”和“海天 2 号”海带的观察杂合度和期望杂合度较高; “黄官 1 号”海带的最低。“海天 1 号”海带的 Nei's 基因多样性(H)、香农指数(I)和多态性位点均最高, “黄官 1 号”对应的这 3 个参数最低。

由表 6 知, “海天 2 号”和“海天 3 号”海带的遗传距离最大为 0.9707, “海天 1 号”和“海天 3 号”海带的遗传相似系数最低, 为 0.0297。4 个海带品系间的遗传相似系数和遗传距离分别位于 0.8732–

表 1 20 对引物筛选结果
Tab.1 Screening of twenty pair of published primers

引物名称 Primer name	片段 1 Fragment 1	片段 2 Fragment 2	片段 3 Fragment 3
CN468232	杂带 Nonspecific banding		
AW401303	杂带 Nonspecific banding		
SSR261	212	214	
DQ978345	238	240	
CN467174	杂带 Nonspecific banding		
CS55	266	287	289
CN467886	杂带 Nonspecific banding		
DQ978342	282		
SSR278	394		
DQ978340	361	377	
Unigene3299	119		
Unigene1084	156		
Unigene83950	119		
Unigene93270	141		
Unigene95068	154	157	160
Unigene8756	152	158	
Unigene15777	125	128	
Unigene17168	151	156	159

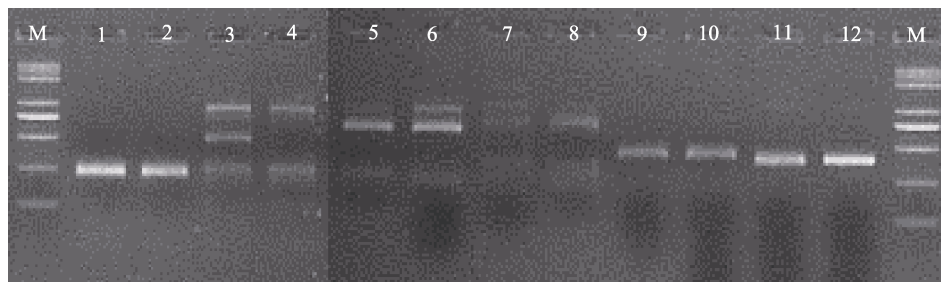


图 1 部分 SSR 引物预实验扩增结果

Fig.1 The results of pre-experiment amplification using partial SSR primers

M: DNA Marker; 1, 2: DQ978345; 3, 4: CS55; 5, 6: AW401303; 7, 8: CN468232; 9, 10: DQ98342; 11, 12: DQ978340

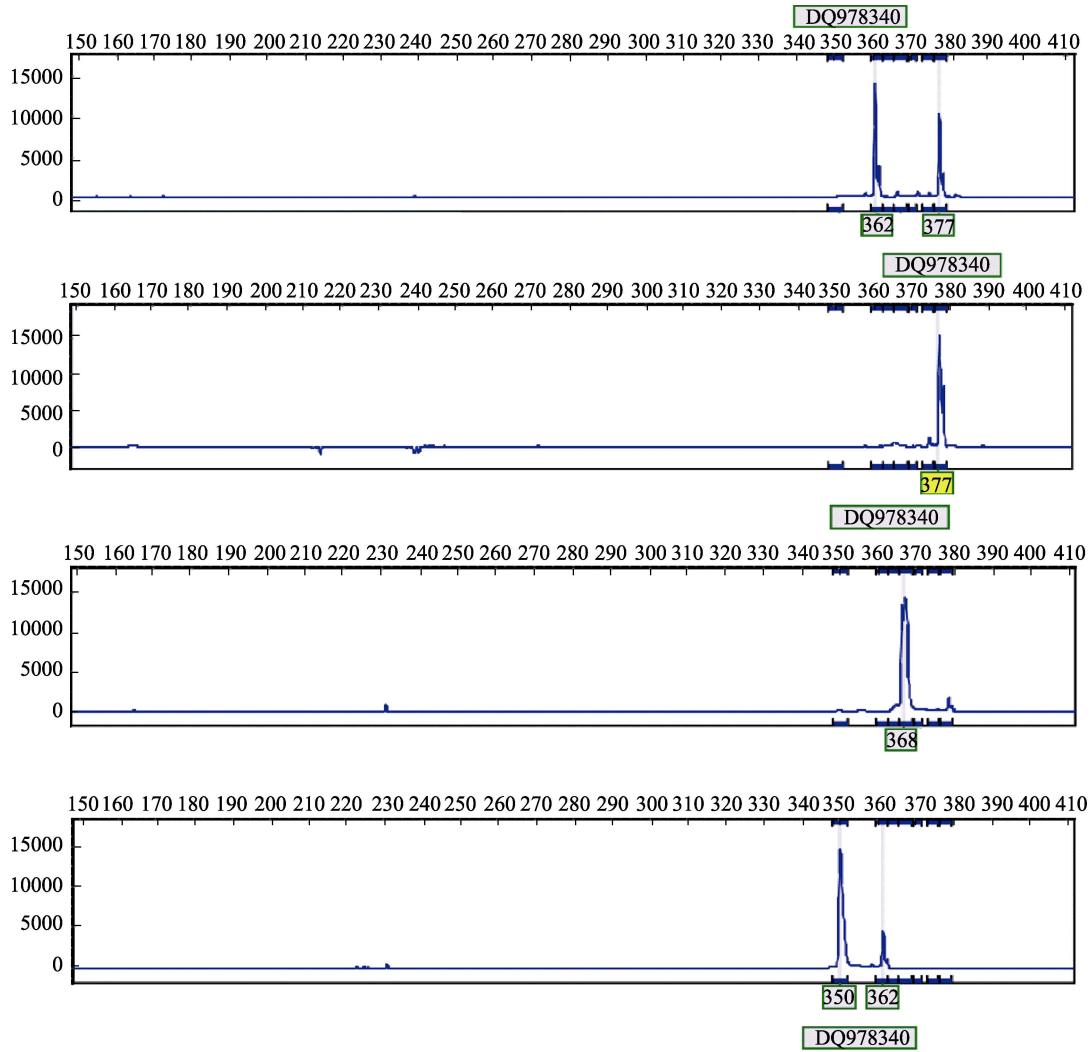


图 2 引物 DQ978340 在“海天 1 号”海带的 4 个个体中的扩增结果

Fig.2 Results of four individual *S.japonica* “Haitian No.1” amplified by primer DQ978340

表 2 8 对海带 SSR 引物特征

Tab.2 Characteristics of eight pairs of SSR primers of *S. japonica*

引物编号 Primer code	引物序列 Primer sequence (5'-3')	重复序列 Repetitive sequence	退火温度 Annealing temperature (°C)	片段大小 Fragment size (bp)
CS55	F: CTCTAAGGAGGACGTGACCAC R: CCGAACATGTCCAATGCC	(GAG) 7	56	280
DQ978340	F: TATCCCGTTCGTTCCACTC R: CGACCCTAATAAGCTCTACCT	(CAA)9	56	380
DQ978345	F: AAAAGGTGAAGGGATTTCGTCG R: CTGAGCAGATTTATGTGGAGCG	(AC)9	56	240
SSR261	F: AGATGGAAGAAGACCTCG R: ACATGAACCAAACCTACAGT	(GA)23	56	226
Unigene15777	F: TTGGGAACAGGTAGCCAAC R: AGGGGTACCAGGAGAAGTAGGAG	(CCT)11	56	129
Unigene17168	F: GAGATGACCTTTTACCCTTACGC R: GTGGTGCTGATCATAAACCAAG	(CCT)10	56	160
Unigene8756	F: CAAATCTCCTTTTCCATTGACAT R: CGGGGGTTAAATGAATAAAAATG	(GAG)7	56	156
Unigene95068	F: ATGTAAGTGTGACGCTCCTAGC R: CTTCAACGCTACCTCCTCCTCT	(AGG)5	56	155

表 3 不同 SSR 位点的遗传参数
Tab.3 Genetic parameters of different SSR loci

引物 Primer	观察等位基因数 N_a Number of observed alleles	多态位点百分比 Percentage of polymorphic loci (%)	有效等位基因数 N_e Number of effective alleles	观察杂合度 H_o Observe heterozygosity	期望杂合度 H_e Expected heterozygosity	Nei's 基因多样性 指数 H Nei's gene diversity
CS55	2	50.00	1.1353	0.0000	0.1197	0.1192
DQ978340	5	80.00	2.2592	0.5598	0.5598	0.5574
DQ978345	7	42.86	1.9446	0.4174	0.4879	0.4857
SSR261	8	75.00	3.3431	0.9224	0.7039	0.7009
Unigene15777	4	100.00	2.5878	0.4583	0.6161	0.6136
Unigene17168	4	100.00	1.3485	0.2917	0.2590	0.2579
Unigene8756	3	100.00	1.4263	0.2069	0.3002	0.2989
Unigene95068	4	75.00	1.6708	0.4500	0.4032	0.4015

表 4 特异等位基因统计
Tab.4 Unique alleles in four cultivars of *S. japonica*

引物 Primer	片段大小 Fragment size (bp)	特异性标记所在品系 Cultivar with unique alleles
CS55	256	海天 1 号 Haitian No.1
DQ978340	368	海天 1 号 Haitian No.1
DQ978345	230	海天 1 号 Haitian No.1
DQ978345	232	海天 1 号 Haitian No.1
DQ978345	241	海天 2 号 Haitian No.2
DQ978345	242	黄官 1 号 Huangguan No.1
SSR261	210	海天 1 号 Haitian No.1
SSR261	218	海天 1 号 Haituqn No.1
Unigene95068	156	黄官 1 号 Huangguan No.1

0.9707 和 0.0297–0.1356 范围内, 说明 4 个海带品系亲缘关系较近。根据品系间的遗传距离, 利用 UPGMA 法构建了 4 个海带品系的系统进化树(图 3)。4 个海带品系被分为 2 个大枝, “黄官 1 号”海带单独构成了 1 个分枝。另外 3 个海带品系又被分成了 2 枝, 其中, “海天 1 号”和“海天 3 号”为 1 个分枝, “海天 2 号”为另一分枝。

4 个海带品系间的基因分化系数(G_{st})值为 0.082, 基因流(N_m)为 2.797。表明 4 个海带品系的遗传分化程度较低, 但有一定的基因交流。AMOVA 分析表明, 7.13%的遗传变异存在于不同的品系间, 而 98.94%存在于品系内部(表 7), 品系间和品系内的遗传变异存在显著差异($P < 0.05$, 1000 次重复)。

表 5 4 个海带品系的遗传参数
Tab.5 Genetic parameters in four cultivars of *S. japonica*

遗传参数 Genetic parameters	海天 1 号 Haitian No.1	海天 2 号 Haitian No.2	海天 3 号 Haitian No.3	黄官 1 号 Huangguan No.1
观察等位基因数 N_a Number of observed alleles	3.6250	3.1250	2.6250	2.7500
有效等位基因数 N_e Number of effective alleles	2.1358	1.7959	1.8339	1.6351
观察杂合度 H_o Observe heterozygosity	0.4245	0.4780	0.4307	0.3720
期望杂合度 H_e Expected heterozygosity	0.4785	0.4044	0.3855	0.2998
Nei's 基因多样性 H Nei's gene diversity	0.4705	0.3976	0.3791	0.2943
多态性位点数 N Number of polymorphic	8.0000	7.0000	7.0000	6.0000
多态性位点比率 P Percentage of polymorphic loci (%)	100.0000	87.5000	87.5000	75.0000
香农指数 I Shannon Index	0.8583	0.6781	0.6372	0.5072

表 6 4 个海带品系的遗传相似系数(右上角)和遗传距离(左下角)

种源 Cultivar code	海天 1 号 Haitian No.1	海天 2 号 Haitian No.2	海天 3 号 Haitian No.3	黄官 1 号 Huangguan No.1
海天 1 号 Haitian No.1	****	0.9415	0.9707	0.9005
海天 2 号 Haitian No.2	0.0603	****	0.9654	0.8732
海天 3 号 Haitian No.3	0.0297	0.0352	****	0.9458
黄官 1 号 Huangguan No.1	0.1048	0.1356	0.0557	****

3 讨论

3.1 引物筛选

开发海带微卫星引物的研究已有较多报道, Billot 等(1998)用掌状海带(*Laminaria digitata*)基因组 DNA 开发出 10 个具有多态性的微卫星位点, 芮凤平(2013)¹⁾从海带转录组(EST-SSR)和基因组 DNA 中开发出 143 对具有多态性的引物。本研究从已开发的 SSR 引物中挑选了 20 对, 其中, 只有 8 对能够进行稳定的 PCR 扩增并具有清晰的条带。毛细管电泳结果显示, 8 对引物均具有较高的多态性, 其余的 12 对引物 PCR 扩增条带弥散, 无法进行等位基因的判读或多态性较低。主要原因可能包括海带 DNA 存在干扰 PCR 扩增反应的物质(Patwary *et al.*, 1994; Varela-Álvarez *et al.*, 2006)和海带微卫星引物区域变异较大, 产生基因逃逸(Buchan *et al.*, 2005; Hoffman *et al.*, 2005)。其次, 与物种个体间的差异和 PCR 扩增程序以及毛细管电泳等有关。如毛细管电泳检测结果较灵敏, 碱基的插入或缺失都会影响其结果的判定。

3.2 不同海带品系间的遗传多样性和遗传关系

与陆生作物相比, 海带育种经过长期的人工干预, 连续多代自交或近交, 某些重要的经济性状产生分离或丢失, 使其呈现较低的遗传多样性。通过分析发现, “海天 1 号”海带具有较高的遗传多样性, 而“黄官 1 号”海带的遗传多样性相对较低。另外, “黄官 1 号”海带的杂合度、Nei's 基因多样性和香

农指数均低于李涛等(2012)的研究结果。作者认为, 这主要是因为“黄官 1 号”海带是经过杂交后, 又经历多代自交选育而出, 在自交的过程中存在性状分离、基因丢失等现象。理论上, 随着时间的积累其杂合度呈下降趋势, 具有较低的遗传多样性。

通过对不同海带品系间的基因流、遗传距离以及相似系数的分析发现, 3 个海带新品系之间的遗传分化呈中等水平, 遗传相似系数最高达到 0.9707, 遗传距离最小为 0.0297。UPGMA 法构建的系统树结果显示, “海天 1 号”和“海天 3 号”海带亲缘性最近, 与“黄官 1 号”海带较远。“海天 3 号”是“黄官 1 号”紫外处理后自交获得, 理论上与“黄官 1 号”海带应具有较小的遗传距离和较高的遗传相似性。这说明, 紫外处理在一定程度上改变了“海天 3 号”海带的遗传物质, 使其表现出与“黄官 1 号”遗传物质上存在一定的变异。

AMOVA 分析表明, 4 个海带品系的变异主要来自品系内部, 来自品系间的变异仅占总变异的 7.94%, 说明这 4 个海带品系的亲缘关系较近。主要是因为选育过程中, 定向选择优良性状如高产、耐高温、高碘、高醇等, 使具有目标性状的个体在选育的过程中保留下来, 这也导致了遗传多样性降低(李涛等, 2012)。

物种遗传多样性是长期进化的产物, 是生物适应、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(刘坤等, 2013), 反之对环境的适应能力就会降低。

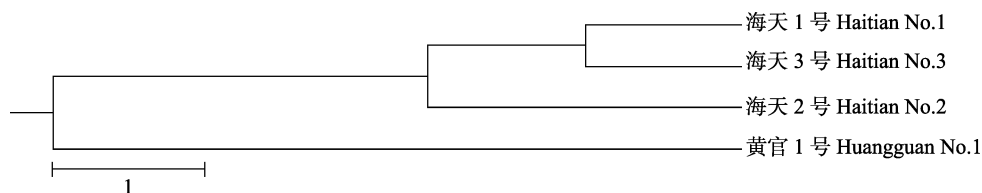


图 3 根据遗传距离采用 UPGMA 法构建的 4 个海带品系的系统进化树

Fig.3 Dendrogram of four cultivars of *S. japonica* by UPGMA clustering based on genetic distance

表 7 4 个海带品系的 AMOVA 分析
Tab.7 AMOVA analysis among and within four cultivars of *S. japonica*

变异的来源 Source of Variation	自由度 Degree of freedom	平方和 Sum of squares	变异组成成分 Variance components	变异率 Percentage of variation
品系间 Among populations	3	27.729	0.12911	7.94
品系内 Within individuals	236	353.167	1.49647	92.06
总变异 Total variation	239	380.896	1.62558	

1) Rui FP. Development of EST-SSR markers from *Saccharina japonica* and the study of the genetic diversity. Master's Thesis of Ocean University of China, 2013, 22-23 [芮凤平. 海带 EST-SSR 标记的开发及其遗传多样性研究. 中国海洋大学硕士学位论文, 2013, 22-23]

我国养殖的海带遗传多样性普遍较低, 种群基因多样性为 0.451, 香农指数在 0.18–0.55 之间(王莹等, 1999), 本研究中的 3 个海带的遗传多样性也在这一范围内。通过分析与评价, 对 4 个海带品系的遗传多样性有了一定的了解, 也为将来海带种质创新、杂交亲本选择、保护种群遗传多样性等提供可靠的依据。

参 考 文 献

- Billot C, Rousvoal S, Estoup A, *et al.* Isolation and characterization of microsatellite markers in the nuclear genome of the brown algae *Laminaria digitata* (Phaeophyceae). *Molecular Ecology*, 1998, 7(12): 1778–1780
- Buchan JC, Archie EA, van Horn RC, *et al.* Locus effects and sources of error in noninvasive genotyping. *Molecular Ecology Notes*, 2005, 5(3): 680–683
- Chamberlain JS, Gibbs RA, Rainer JE, *et al.* Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acids Research*, 1988, 16(23): 11141–11156
- Fang ZX. Piant breeding in *Laminaria* and the basic principles. *Journal of Shandong College of Oceanology*, 1963(2): 109–119 [方宗熙. 从海带的遗传育种工作谈育种的一般原理. 山东海洋学院学报, 1963(2): 109–119]
- Gerber S, Mariette S, Streiff R, *et al.* Comparison of microsatellites and amplified fragment length polymorphism markers for parentage analysis. *Molecular Ecology*, 2000, 9(8): 1037–1048
- Hoffman JI, Amos W. Microsatellite genotyping errors: Detection approaches, common sources and consequences for paternal exclusion. *Molecular Ecology*, 2005, 14(2): 599–612
- Li L, Luo Q, Zhang SH. Analysis on composition of fucoidin in *Laminaria japonica* Aresch. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2001, 1(1): 46–49 [李林, 罗琼, 张声华. 海带中褐藻糖胶的组成分析. 中国食品学报, 2001, 1(1): 46–49]
- Li SG, Shan TF, Hou HS, *et al.* Genetic analyses of principal farmed cultivars of *Laminaria japonica* in China: AFLP analyses of selfbreeding F₁ of nine cultivars. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2009, 16(2): 214–220 [李世国, 单体锋, 侯和胜, 等. 9 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. 中国水产科学, 2009, 16(2): 214–220]
- Li T, Liu FL, Wang FJ, *et al.* The genetic analysis and evaluate of *Saccharina Huanguan* No.1. *Journal of Qingdao Agricultural University (Natural Science)*, 2012, 29(3): 212–217 [李涛, 刘福利, 王飞久, 等. 黄官 1 号海带的遗传学分析与评价. 青岛农业大学学报(自然科学版), 2012, 29(3): 212–217]
- Li XJ, Liu JL, Cong YZ, *et al.* Breeding and trial cultivation of Dongfang No.3, a hybrid of *Laminaria* gametophyte clones with a more than intraspecific but less than interspecific relationship. *Aquaculture*, 2008, 280(1–4): 76–80
- Liu FL, Liu K, Wang FJ, *et al.* EST-SSR marker development and its application in population genetic diversity analysis of *Zostera marina*. *Progress in Fishery Sciences*, 2013, 34(4): 91–97 [刘福利, 刘坤, 王飞久, 等. 大叶藻 EST-SSR 标记开发及其在大叶藻群体遗传多样性研究中的应用. 渔业科学进展, 2013, 34(4): 91–97]
- Liu FL, Wang FJ, Duan DL. EST-SSR markers derived from *Laminaria digitata* and its transferable application in *Saccharina japonica*. *Journal of Applied Phycology*, 2012a, 24(3): 501–505
- Liu FL, Wang FJ, Sun XT, *et al.* Molecular breeding and its research advances and prospects in *Laminaria japonica* breeding. *Marine Sciences*, 2012, 36(9): 128–134 [刘福利, 王飞久, 孙修涛, 等. 分子育种及其在海带育种中的研究进展. 海洋科学, 2012, 36(9): 128–134]
- Liu FL, Yao JT, Wang XL, *et al.* Genetic diversity and structure within and between wild and cultivated *Saccharina japonica* (Laminariales, Phaeophyta) revealed by SSR markers. *Aquaculture*, 2012b, 358–359: 139–145
- Liu K, Liu FL, Wang FJ, *et al.* Analysis of genetic diversity and structure of *Zostera marina* populations in Shandong peninsula. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2013, 22(3): 334–340 [刘坤, 刘福利, 王飞久, 等. 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. 上海海洋大学学报, 2013, 22(3): 334–340]
- Liu Y, Cui JZ, Shen XY, *et al.* The application of DNA molecular marker technique to heritable breeding of *Laminaria*. *Transactions of Oceanology and Limnology*, 2006(1): 75–81 [刘岩, 崔建洲, 申雪艳, 等. DNA 分子标记技术在海带遗传育种研究中的应用. 海洋湖沼通报, 2006(1): 75–81]
- Luo B, Sun HY, Xu GM, *et al.* Research progress of SSR molecular marker. *Journal of Anhui Agriculture Science*, 2013, 41(12): 5210–5212, 5246 [罗兵, 孙海燕, 徐港明, 等. SSR 分子标记研究进展. 安徽农业科学, 2013, 41(12): 5210–5212, 5246]
- Patwary MU, van der Meer JP. Application of RAPD markers in an examination of heterosis in *Gelidium vagum* (Rhodophyta). *Journal of Phycology*, 1994, 30(1): 91–97
- Shan TF, Pang SJ. Assessing genetic identity of sporophytic offspring of the brown alga *Undaria pinnatifida* derived from mono-crossing of gametophyte clones by use of amplified fragment length polymorphism and microsatellite markers. *Phycological Research*, 2009, 57(1): 36–44
- Shi Y, Yang G, Liu Y, *et al.* Development of 18 polymorphic microsatellite DNA markers of *Laminaria japonica* (Phaeophyceae). *Molecular Ecology Notes*, 2007, 7(4): 620–622
- Shi YY, Yang GP, Liao MJ, *et al.* Comparative study on the microsatellite DNA polymorphism of the gametophytes of *L. japonica* and *L. longissima*. *Periodical of Ocean University of China*, 2008, 38(1): 303–308 [石媛媛, 杨官品, 廖梅杰, 等. 海带和长海带配子体无性繁殖系微卫星 DNA 多态性比较分析. 中国海洋大学学报, 2008, 38(1): 303–308]
- Song SL, Lim PE, Phang SM, *et al.* Microsatellite markers from expressed sequence tags (ESTs) of seaweeds in differentiating various *Gracilaria* species. *Journal of Applied Phycology*, 2013, 25(3): 839–846
- Varela-Álvarez E, Andreakis N, Lago-Lestón A, *et al.* Genomic DNA isolation from green and brown algae (*Caulerpa* and *Fucales*) for microsatellite library construction. *Journal of Phycology*, 2006, 42(3): 741–745
- Wang XL, Liu CL, Li XJ, *et al.* Assessment of genetic diversities of selected *Laminaria* (Laminariales, Phaeophyta) gametophytes by inter-simple sequence repeat analysis. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2005, 47(6): 753–758
- Wang Y, Dai JX. Comparison of genetic diversity in *Laminaria japonica* gametophytes. *Chinese Biodiversity*, 1999, 7(3): 197–201 [王莹, 戴继勋. 海带(*Laminaria japonica*)丝状体

- 遗传多样性的比较研究. 生物多样性, 1999, 7(3): 197–201]
- Xia P, Yang YX, Liu SP, *et al.* Optimization of randomly amplified reaction conditions for gametophyte DNA of *Laminaria* “901” strain. *Marine Sciences*, 2003, 27(5): 22–26 [夏鹏, 杨迎霞, 刘升平, 等. 海带“901”配子体 DNA 随机扩增反应条件的优化. 海洋科学, 2003, 27(5): 22–26]
- Zhang J, Li W, Qu JQ, *et al.* Development and characterization of microsatellite markers from an enriched genomic library of *Saccharina japonica*. *Journal of Applied Phycology*, 2015, 27(1): 479–487
- Zhang QS, Shi YY, Cong YZ, *et al.* AFLP analysis of the gametophyte clones derived from introduced *Laminaria* (Phaeophyta) and cultured varieties of China. *Periodical of Ocean University of China*, 2008, 38(3): 429–435 [张全胜, 石媛媛, 丛义周, 等. 我国引种海带和栽培品种(系)来源配子体克隆的 AFLP 分析. 中国海洋大学学报, 2008, 38(3): 429–435]
- Zhang RL, Wang WJ, Feng YW, *et al.* Assessment of genetic variability and microsatellite analysis of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) after artificial selection of the shell width. *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(4): 90–96 [张荣良, 王卫军, 冯艳微, 等. 长牡蛎(*Crassostrea gigas*)壳宽快速生长选育群体遗传多样性及遗传结构的微卫星标记分析. 渔业科学进展, 2016, 37(4): 90–96]
- Zhou ZG, Shi XZ, Hu YJ, *et al.* Genetic relationship among brown seaweed *Laminaria longissima* and various cultivars of *L. japonica* in China revealed by isozyme and RAPD markers. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2003, 10(6): 474–480 [周志刚, 史西志, 胡远皆, 等. 中国不同养殖品系海带与长海带之间的遗传关系. 中国水产科学, 2003, 10(6): 474–480]

(编辑 马瑾艳)

Study on Genetic Diversity of Four New *Saccharina japonica* Cultivars

YAO Haiqin^{1,2}, LIU Fuli^{2,3}, WANG Feijiu^{2①}, LIANG Zhourui²,
WANG Wenjun², SUN Xiutao², LI Xiaolei^{1,2}

(1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306;

2. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 3. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266071)

Abstract In order to provide reliable theoretical basis for high-efficiency utilization of *Saccharina japonica* germplasm resources in its breeding practice, the information of genetic diversity and structure of three new edible *S. japonica* cultivars (including “Haitian No.1”, “Haitian No.2” and “Haitian No.3”) and “Huangguan No.1” were explored in this study. We selected eight pairs of primers for the simple sequence repeat (SSR) molecular marker technique to test the genetic diversity of 120 samples of the four *S. japonica* cultivars. From 20 pairs of SSR primers published online, eight pairs were identified because of their good amplification patterns on the majority of 120 DNA templates. The results showed that 28 polymorphic alleles and 9 specific alleles were detected by eight SSR markers, and the average alleles per primers detected were about 4.6250. The Nei’s gene diversity (H) and the Shannon index (I) of the four *S. japonica* cultivars were 0.3809 and 0.6702, respectively. It indicated that the genetic diversity of the four *S. japonica* was relatively low and four species were genetically related. Among them, the Nei’s gene diversity (H), Shannon’s information index (I) and the number of polymorphic alleles were the highest in “Haitian No.1”. This indicated that the genetic diversity of *S. japonica* of “Haitian No.1” was higher than other three *S. japonica* cultivars. The levels of genetic diversity of “Haitian No.2”, “Haitian No.3” and “Huangguan No.1” decreased successively. Cluster analysis demonstrated that the relationship between “Haitian No.1” and “Haitian No.3” was close, but the relationship between “Haitian No.1” and “Huangguan No.1” was not. AMOVA analysis showed that about 92.06% of the variation was derived from individuals of the four *S. japonica* cultivars, and 7.94% of the variation was derived among the four *S. japonica* cultivars. The genetic diversity of “Huangguan No.1” was the lowest, suggesting the need of strengthening the biodiversity protection; the highest genetic diversity was the “Haitian No.1”, and could be used for developing new cultivars.

Key words *Saccharina japonica*; Genetic diversity; SSR; Cluster analysis; AMOVA

① Corresponding author: WANG Feijiu, E-mail: wangfj@ysfri.ac.cn