

坛紫菜品系间杂交子代杂种优势的 ISSR 分析

纪德华¹, 谢潮添¹, 徐燕¹, 陈昌生^{1*}

(1 集美大学 水产学院, 福建 厦门 361021)

摘要:以野生型坛紫菜(♀)和经过人工诱变选育获得的红色型(♂)坛紫菜进行杂交获得丝状体和叶状体,从中挑选5株具有一定生长优势和其它经济性状的藻体分别进行体细胞克隆和丝状体培育,获得5个性状稳定的子代品系(品系A, B, C, D, E)。然后应用ISSR标记技术对杂交亲本及这5个子代品系的杂种优势进行研究,从67个引物中筛选出了21条能扩增出清晰、稳定条带的引物,共得到366个扩增位点,其中347个位点具有多态性,多态位点百分率达94.8%,扩增的条带大小在400~4000 bp之间。通过对扩增带谱的统计分析,发现5个坛紫菜杂种子代品系同父本和母本的遗传相似性平均值分别为0.5191和0.5551,都明显低于两亲本间的遗传相似性0.6120;并且5个杂种子代的有效等位基因数1.5501,期望杂合度0.3200, Shannon多样性指数0.4720都要明显高于两亲本的有效等位基因数1.3907,期望杂合度0.1954和Shannon多样性指数0.2708。由此表明杂交使得坛紫菜的遗传多样性水平明显提高,产生了显著的杂种优势。从扩增带谱的统计结果,还可看出5个杂种子代同两亲本的遗传距离不是对等的,全部都稍偏向母本,聚类分析结果也同样证明了这一点,说明细胞质基因在坛紫菜遗传性状的表达中也发挥了重要作用。文章最后对ISSR技术在杂种优势预测中的应用也进行了讨论。

关键词:坛紫菜;杂交;杂种优势;ISSR

中图分类号:S 917.3

文献标识号:A

文章编号:0253-4193(2008)06-0147-07

1 引言

紫菜是目前世界上人工养殖经济价值最高的一类海藻^[1],其中坛紫菜(*Porphyra haitanensis*)是我国紫菜人工养殖的两个主要种类之一。福建是坛紫菜的主要发祥地和产区,其产量约占全国紫菜总产量的75%左右。20世纪70年代以来,坛紫菜养殖发展较快,但品种的提纯、复壮、种质改良等研究工作相对滞后,缺乏经过人工选育的、具有优良性状的新品种,无法保证苗种的质量,且多年自养、自留、自用,导致种质退化,生产效益降低,影响沿海渔民的经济收入和坛紫菜养殖业的健康发展^[2]。传统的杂

交育种和选择育种技术相结合是种质复壮和新品种培育的重要手段,是保证坛紫菜养殖业持续、健康发展的有效途径之一^[2]。

现代生物技术的发展为种质改良及新品种的检测提供了许多新手段,分子标记技术就是其中最为重要的手段之一。在国外,分子标记技术已经在紫菜遗传多样性分析^[3-4],杂种优势性状跟踪^[5],种质鉴定^[6-7],基因定位以及遗传图谱构建^[8]等中得到了广泛应用;国内也在这方面进行了一定程度的尝试,采用RAPD, AFLP, SSR等分子标记技术分析各种紫菜的遗传多样性^[9-14],并对分子标记技术在紫菜种质鉴定中的应用进行了初步探索^[15-16],但

收稿日期:2008-03-06; 修订日期:2008-08-04。

资助项目:国家海洋863计划(2006A10A413);国家自然科学基金(40676077);国家科技支撑项目(2007BAD07B03);福建省重大科技平台建设项目(2007N2011);福建省高校水产重点实验室资助项目。

作者简介:纪德华(1976—),男,助理研究员,主要从事海藻生物技术及水产增养殖研究。E-mail: dhjj@jmu.edu.cn

* 通讯作者:陈昌生(1957—),男,教授,主要从事水产增养殖和育种技术的研究。E-mail: cschen@jmu.edu.cn

迄今为止,尚未见到将分子标记技术应用于探讨海藻杂种优势的报道。本研究通过对坛紫菜品系间杂交后代及亲本的 ISSR 扩增带谱进行分析,以期能准确地对杂交后代进行分析鉴定,在分子水平上为坛紫菜杂交育种及杂种优势的研究提供理论依据。

2 材料与方法

2.1 材料

坛紫菜材料母本是采自福建平潭自然岩礁的野生坛紫菜经过几代大田选育出的野生型品系;父本是经⁶⁰Co- γ 射线辐照坛紫菜自由丝状体选育的具有明显生长优势的红色型藻体。将父本和母本单株杂交产生的杂合自由丝状体促熟,使之释放壳孢子并发育为子代叶状体,从中挑选 5 株具有生长优势和其它经济性状的个体^[2],酶解获得单细胞,然后通过体细胞克隆途径^[17]和丝状体培育,获得 5 个性状稳定的子代品系(暂时命名为:品系 A, B, C, D, E),用于后续研究。各品系的性状特点如表 1 所示。

表 1 5 个杂交子代品系的性状特点

| 品系 | 性状特点 |
|----|-------------------|
| A | 叶片宽且薄,生长速度快,耐高温 |
| B | 叶片薄,但叶型较窄,生长速度快 |
| C | 耐高温,四种色素含量较高,品质较好 |
| D | 耐低氮磷,四种色素含量最高,品质好 |
| E | 耐低氮磷 |

试剂与引物 DNA 提取所用生化试剂均购置于上海生工生物工程有限公司,而 PCR 扩增所需试剂均由大连宝生物工程有限公司提供。所采用的引物依据加拿大哥伦比亚大学设计的 ISSR 引物选取 67 条由大连宝生物工程有限公司合成。

2.2 方法

DNA 提取及检测收集培养液中培养的各品系自由丝状体用滤纸吸干后,取 0.5g 置于微型匀浆机中进行高速匀浆,然后采用传统的 CTAB 法^[18]稍作改良后进行 DNA 的提取和纯化,在 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳中检查所提取 DNA 的完整性,并在 Beckman DU-600 核酸蛋白紫外分析仪上测定 DNA 浓度。

ISSR 分析按照本实验室建立的坛紫菜 ISSR 标准反应体系^[16]进行,25 μ L 的反应体系中含 2.5 μ L 10 \times PCR Buffer, 5 ng 模板 DNA, 2.5 mmol/dm³ Mg²⁺, 1.5U Taq 酶, 200 nmol/dm³ 引物,

200 μ mol/dm³ dNTP。PCR 扩增在美国 MJ Research PT C-200 型 PCR 仪上进行,具体程序为:94 $^{\circ}$ C 预变性 7 min; 每个循环 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 48 $^{\circ}$ C 复性 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 共进行 35 个循环;循环结束后 72 $^{\circ}$ C 再延伸 7 min。扩增结束后,取 6 μ L 扩增产物在 1.5% 琼脂糖胶中电泳,经 EB 染色后观察结果并拍照。

数据分析以电泳后扩增条带的清晰度,可重复性为标准用于 ISSR 的标记分析。将每一样品电泳图谱中每一条带的迁移位置记为一个位点,相同迁移位置扩增条带的有无分别记为 1 和 0,输入计算机形成 1,0 矩阵,然后应用软件 POPGENE 1.32,假定这些 ISSR 标记位点处于 Hardy-Weinberg 平衡状态,分别统计以下参数:多态位点百分数(P)、遗传相似性系数(GS)和遗传距离(GD)、平均每个位点的观察等位基因数(N_a)、平均每个位点的有效等位基因数(N_e)、期望杂合度(h)、Shannon 多样性指数(I)。

聚类分析根据遗传距离计算结果,采用算数平均数的非加权成组配对法(UPGMA 法)进行聚类分析。使用软件为 NTSYSpc 2.10e。

3 结果与分析

3.1 ISSR 扩增结果

用 67 条 ISSR 引物对坛紫菜两亲本及 5 个子代品系进行 ISSR 的扩增分析,结果有 21 条 ISSR 引物,可以扩增出清晰稳定,重复性好,多态性高的条带(部分引物的扩增结果见图 1)。这 21 条引物共扩增出 366 个位点,其中 347 个位点具有多态性,多态位点百分率(P)为 94.8%。每个引物扩增的位点数为 5~29 个,平均每个引物扩增的位点数为 17.4 个,扩增的条带大小在 400~4000 bp 之间。各引物对两亲本和杂交子代的扩增带谱存在明显差异,同一引物对两亲本和杂交子代的扩增位点也存在多样性。引物序列及其扩增结果见表 2。

3.2 各坛紫菜品系间的遗传相似性

根据 21 条引物的扩增带谱进行统计分析,将扩增出的 DNA 条带记录在 1/0 矩阵中,通过 Nei 的方法,分别计算得到遗传相似性系数(GS)和遗传距离(GD)见表 3。从表 3 可以看出两坛紫菜亲本的遗传相似性较大,为 0.612 0;5 个子代品系同父本的遗传相似性在 0.478 1~0.568 3 之间,平均为 0.519 1;同母本的遗传相似性在 0.510 9~0.590 2

之间, 平均为 0.555 1。从中可以看出杂种子代同两亲本间的遗传差异不是均等的, 稍偏向母本。5 个

子代品系间的遗传相似性在 0.491 8~ 0.694 0 之间, 平均为 0.598 4。

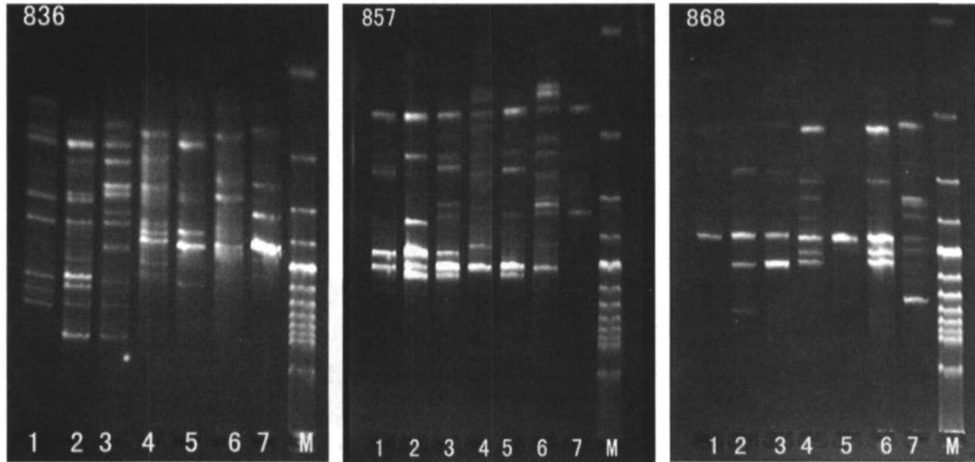


图 1 部分引物(836,857,868)的 ISSR 扩增结果

1 品系 A, 2 品系 B, 3 品系 C, 4 品系 D, 5 品系 E, 6 母本, 7 父本, M. 分子量标记

表 2 ISSR 引物、序列及扩增后产生的不同带型数

| 引物 | 引物序列 | 位点总数 | 多态位点数 | ISSR 扩增位点数 | | | | | | |
|-----|---------|------|-------|------------|------|------|------|------|-----|-----|
| | | | | 品系 A | 品系 B | 品系 C | 品系 D | 品系 E | 母本 | 父本 |
| 807 | (AG)8T | 25 | 23 | 12 | 11 | 12 | 3 | 12 | 7 | 8 |
| 808 | (AG)8C | 12 | 12 | 5 | 4 | 8 | 1 | 3 | 5 | 4 |
| 810 | (GA)8T | 23 | 23 | 8 | 16 | 9 | 7 | 3 | 7 | 3 |
| 812 | (GA)8A | 16 | 16 | 5 | 5 | 9 | 9 | 9 | 8 | 4 |
| 817 | (CA)8A | 10 | 10 | 3 | 5 | 2 | 6 | 2 | 6 | 3 |
| 835 | (AG)8YC | 21 | 18 | 13 | 6 | 8 | 10 | 8 | 8 | 8 |
| 836 | (AG)8YA | 18 | 18 | 8 | 10 | 11 | 7 | 4 | 3 | 5 |
| 840 | (GA)8YT | 22 | 21 | 6 | 8 | 11 | 7 | 8 | 11 | 9 |
| 841 | (GA)8YC | 16 | 14 | 8 | 3 | 6 | 7 | 8 | 6 | 7 |
| 847 | (CA)8RC | 18 | 17 | 9 | 6 | 7 | 10 | 8 | 4 | 8 |
| 848 | (CA)8RG | 15 | 14 | 4 | 4 | 4 | 4 | 2 | 7 | 5 |
| 850 | (GT)8YC | 22 | 22 | 15 | 9 | 4 | 5 | 6 | 7 | 7 |
| 851 | (GT)8YG | 17 | 16 | 9 | 7 | 1 | 10 | 8 | 9 | 3 |
| 855 | (AC)8YT | 23 | 22 | 11 | 10 | 8 | 9 | 11 | 11 | 1 |
| 856 | (AC)8YA | 5 | 4 | 2 | 2 | 1 | 2 | 3 | 1 | 1 |
| 857 | (AC)8YG | 16 | 15 | 5 | 6 | 8 | 3 | 7 | 9 | 2 |
| 858 | (TG)8RT | 13 | 12 | 4 | 5 | 5 | 2 | 2 | 4 | 4 |
| 859 | (TG)8RC | 15 | 14 | 7 | 7 | 5 | 5 | 1 | 9 | 5 |
| 860 | (TG)8RA | 17 | 17 | 2 | 4 | 3 | 5 | 6 | 9 | 4 |
| 862 | (AGC)6 | 29 | 27 | 16 | 13 | 8 | 15 | 12 | 11 | 12 |
| 868 | (GAA)6 | 13 | 12 | 1 | 4 | 4 | 7 | 2 | 5 | 7 |
| 合计 | | 366 | 347 | 153 | 145 | 134 | 134 | 125 | 147 | 110 |

表 3 7 个坛紫菜品系的遗传相似性系数 GS (对角线上方)和遗传距离 GD (对角线下方)

| | 品系 A | 品系 B | 品系 C | 品系 D | 品系 E | 母本 | 父本 |
|----|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| 品系 | | 0.694 0 | 0.631 1 | 0.549 2 | 0.592 9 | 0.510 9 | 0.500 0 |
| 品系 | 0.365 3 | | 0.663 9 | 0.538 3 | 0.625 7 | 0.543 7 | 0.478 1 |
| 品系 | 0.460 2 | 0.409 6 | | 0.491 8 | 0.639 3 | 0.568 3 | 0.519 1 |
| 品系 | 0.599 3 | 0.619 4 | 0.709 7 | | 0.568 3 | 0.562 8 | 0.530 1 |
| 品系 | 0.522 7 | 0.468 9 | 0.447 3 | 0.565 1 | | 0.590 2 | 0.568 3 |
| 母本 | 0.673 5 | 0.609 3 | 0.565 1 | 0.574 8 | 0.527 4 | | 0.612 0 |
| 父本 | 0.693 1 | 0.737 8 | 0.655 6 | 0.634 8 | 0.565 1 | 0.491 0 | |

7 个坛紫菜品系间的遗传变异分析结果见表 4, 从表中可以看出, 两坛紫菜亲本间的有效等位基因数为 1.390 7, 期望杂合度为 0.195 4, Shannon 多样性指数为 0.270 8。而 5 个杂种子代间的效等

位基因数为 1.550 1, 期望杂合度为 0.320 0, Shannon 多样性指数为 0.472 0。由此可见, 杂交使得坛紫菜的遗传多样性得到了明显提高。

表 4 坛紫菜亲本及杂种子代的遗传变异统计结果

| 参数 | 等位基因数 (N_a) | 有效等位基因数 (N_e) | 期望杂合度 (h) | Shannon 多样性指数 (I) |
|-------|-------------------|-------------------|-------------------|-----------------------|
| 两亲本间 | 1.390 7 ± 0.488 6 | 1.390 7 ± 0.488 6 | 0.195 4 ± 0.244 3 | 0.270 8 ± 0.338 7 |
| 5 个子代 | 1.816 9 ± 0.387 2 | 1.550 1 ± 0.330 9 | 0.320 0 ± 0.167 9 | 0.472 0 ± 0.236 8 |

根据坛紫菜之间的 Nei 遗传距离进行 UPGMA 聚类分析, 获得了坛紫菜亲本及子代间的亲缘关系树状图 (图 2)。从图上可以看出坛紫菜 5 个子代品系同母本的亲缘关系要明显近于父本, 表明有细胞质基因在杂交子代遗传性状的表达中发挥了作用。

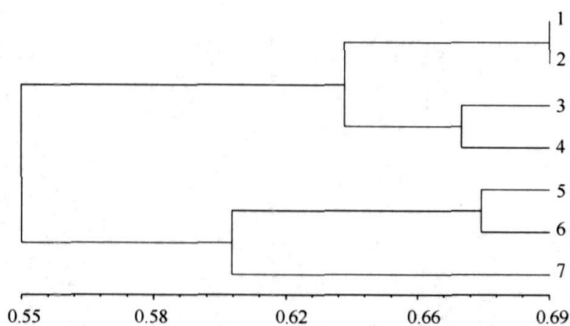


图 2 坛紫菜亲本及子代间的亲缘关系树状图

1. 品系 A, 2. 品系 B, 3. 品系 C, 4. 品系 D, 5. 品系 E, 6. 母本, 7. 父本

4 讨论

4.1 坛紫菜品系间杂交后代的杂种优势分析

杂种优势是指两种或几种不同遗传类型(不

同基因型)的亲本杂交所产生的子代在长势、生活力、抗逆性、产量、品质等方面要优于其亲本的现象^[19]。经济有效地预测杂种优势一直是育种工作者关心的重要研究内容, 他们很早就注意到亲本遗传距离与子代杂种优势表现存在一定的相关性。因此, 亲缘关系、地理来源、形态标记和同工酶等方法相继用于亲本遗传距离的测算并预测杂种优势, 但鉴于方法的局限性, 预测能力不尽理想^[19]。DNA 分子标记的发展, 为杂种优势预测提供了新的手段, 尽管利用分子标记检测遗传距离同杂种优势的相关性目前仍然存在较大争议, 但大量的研究结果仍然表明亚种内分子标记间遗传距离能够较好的预测杂种优势^[20-21]。Meleghinger et al.^[21]认为, 在一定范围内, 亲本间的遗传距离越大, 杂种优势越明显, 张培江等^[22]利用 RAPD 分析也得到同样的结果, 认为随着遗传距离增大, 获得较强杂种优势的组合的机会可能也会增多。本实验利用 ISSR 标记技术测得坛紫菜两亲本的遗传距离为 0.491 0, 小于 0.54 的范围值, 理论上二者杂交是可以产生杂种优势的。

根据杂种优势的显性学说, 杂交改变了杂交后代的基因组合, 增加了基因的杂合性, 改变了不同位

点上基因的互作,在绝大多数基因型和环境之间获得一种相互协调的平衡,因而提高了杂种的生活力、繁殖力和生长速度等重要遗传性状^[19]。从本研究的实验数据来看,5个坛紫菜杂种子代品系同父本和母本的遗传相似性平均值分别为0.519 1和0.555 1,都明显低于两亲本间的遗传相似性0.612 0。从有效等位基因数,期望杂合度,Shannon多样性指数等的统计结果来看,杂交使得坛紫菜两亲本有效等位基因数从1.390 7提到到了子代的1.550 1,期望杂

合度从0.1954提高到了0.320 0,Shannon多样性指数也从0.270 8提高到了0.472 0。这些数据表明杂交使得坛紫菜的遗传多样性水平明显提高,由此也预示着这5个坛紫菜杂种子代将表现出明显的杂种优势。这一点从笔者后续对这5个杂种子代品系经济性状检测的结果(表5)中得到了证实,从表5中可以看出5个坛紫菜杂种子代在形态性状、生长性状、抗逆性状及品质性状上均表现出了明显优于亲本的现象,表现出了明显的杂种优势。

表5 杂交亲本及其子代的经济性状^[2]

| 品系 | 父本 | 母本 | A | B | C | D | E | |
|------|--|------------|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| 形态性状 | 长度/cm | 110~220 | 20~90 | 78~141 | 73~132 | 90~102 | 82~110 | 60~87 |
| | 宽度/cm | 1.8~3.0 | 0.7~1.6 | 4.0~5.0 | 1.2~1.8 | 3.5~4.8 | 1.6~2.0 | 1.6~2.1 |
| | 厚度/ μm | 28~35 | 45~67 | 26~32 | 29~34 | 30~35 | 46~55 | 39~42 |
| 生长性状 | 平均日增长量/ $\text{cm} \cdot \text{d}^{-1}$ ^① | 3.06±1.04 | 2.01±0.42 | 3.47±0.72 | 4.32±0.80 | 3.21±0.92 | 3.05±0.71 | 2.98±0.37 |
| | 平均日增重率(%) ^① | 32.97±3.86 | 33.11±4.52 | 40.66±2.72 | 36.79±2.48 | 37.28±2.63 | 33.63±3.37 | 29.93±2.93 |
| 抗逆性状 | 耐高温天数/d ^② | 4 | 3 | 5 | 4 | 6 | 2 | 4 |
| | 耐低氮磷天数/d ^③ | 7 | 5 | 9 | 9 | 9 | 12 | 12 |
| 品质性状 | 藻红蛋白含量 ($\times 10^{-3}$) | 42.69±5.89 | 32.14±0.78 | 38.17±0.091 | 44.64±0.025 | 52.01±0.119 | 61.71±0.098 | 46.64±0.009 |
| | 藻蓝蛋白含量 ($\times 10^{-3}$) | 15.01±1.03 | 12.75±0.66 | 11.82±0.020 | 22.75±0.031 | 15.47±0.606 | 24.51±0.080 | 24.36±0.022 |
| | 别藻蓝蛋白含量 ($\times 10^{-3}$) | 11.16±0.47 | 10.10±0.43 | 9.28±0.067 | 13.59±0.082 | 11.21±0.017 | 16.47±0.047 | 14.24±0.041 |
| | 叶绿素含量 ($\times 10^{-3}$) | 5.43±0.27 | 4.70±0.18 | 5.30±0.030 | 7.10±0.043 | 6.43±0.065 | 5.93±0.022 | 6.44±0.073 |

注:①指在适宜培养条件下培养20d内的平均日增长量和日增重率;②指在30℃高温下,各品系藻体开始出现针尖般烂点的时间;③指在人工制作的低氮、磷海水[含氮量为(2.0±0.12) $\mu\text{g}/\text{dm}^3$;含磷量为(2.5±0.26) $\mu\text{g}/\text{dm}^3$]中培养,藻体开始变黄的时间。

从本研究的ISSR分析结果还发现,5个杂种子代品系同母本的遗传距离都低于它们同父本的遗传距离,也就是说杂种子代同两亲本的遗传距离不是对等的,而是稍偏向母本。聚类分析的结果也同样证明了这一点。万俊芬等^[23]对日本盘鲍×皱纹盘鲍子代杂种优势的RAPD分析结果,滕丽莉等^[24]对栉孔扇贝×虾夷扇贝子一代杂种优势的RAPD分析结果都发现杂种子代同两亲本的遗传距离存在明显差异。这可能是细胞质遗传在其中所起作用的结果,也就是说在坛紫菜杂交子代遗传性状的表达中,细胞质基因也发挥了重要作用。

4.2 ISSR标记技术在坛紫菜杂种优势分析中的应用

ISSR分子标记技术是由Zietkiewicz et al.^[25]在SSR标记基础上发展起来的一种新型分子标记技术,该技术具有DNA样品用量少,操作简单,灵敏度高,无需预先知道受试基因组DNA序列,结果记录方便,实验成本低,能提供丰富的关于基因组的信息,且比RAPD技术更加稳定可靠,实验重复性好等优点,已经广泛用于植物遗传多样性分析、DNA指纹图谱绘制、品种鉴定、进化及分子生态学研究^[26]。从本文的研究结果可以看出,ISSR标记技术同样可以应用于从分子水平上探讨坛紫菜杂种优势产生的遗传基础,是预测杂种优势的较好手

段,可以为坛紫菜的杂交育种提供分子水平上的理论依据。

然而杂种优势是一个非常复杂的生物学现象,不仅与双亲遗传差异有关,还与双亲遗传背景、所携带等位基因的类型、基因效应种类以及环境等一系列因素密切相关^[19],分子标记技术所提供的证据仅

限于提供了杂种优势产生的趋势和可能,杂交子代在生产上能否真正形成杂种优势,产生某些优良性状,还有待于生产实践的检验。因此,简单依靠遗传差异来精确预测杂种优势是不够的,杂种优势预测的最终解决将依赖于杂种优势遗传机理的彻底阐明。

参考文献:

- [1] 张学成,秦松,马家海,等. 海藻遗传学[M]. 北京:中国农业出版社,2005.
- [2] 陈昌生,徐燕,纪德华,等. 坛紫菜品系间杂交藻体选育及经济性状的初步研究[J]. 水产学报,2007,31(1):97-104.
- [3] MIZUKAMI Y, OKAUCHI M, KITO H, et al. Discrimination of laver cultivars with RAPD markers[J]. Fish Sci, 1996, 62(2): 173-177.
- [4] REMI A W, ALISTRIA L D, BARBARA A W, et al. cpDNA-RFLP in *Ceramium* (Rhodophyta): interspecific polymorphism and species-level phylogeny[J]. American Journal of Botany, 2001, 88(7): 1209-1213.
- [5] KITO H, KU MIMOTO M, KAMANISHI Y, et al. Protoplast fusion between *Monostroma nitidum* and *Porphyra yezoensis* and subsequent growth of hybrid plants[J]. J Appl Phycol, 1998, 10(1): 15-21.
- [6] KYOSUKE N, NORIO K, MITUSU MOBU I, et al. Morphological and AFLP variation of *Porphyra yezoensis* Ueda form. *Narawaensis* Miura (Bangiales, Rhodophyta) [J]. Phycological Research, 2004, 52: 180-190
- [7] KYOSUKE N, NORIO K, YUSHO A. Morphological and molecular analysis of the endangered species *Porphyra tenera* (Bangiales, Rhodophyta) [J]. J Phycol, 2005, 41: 294-304.
- [8] IITSUKA O, NAKAMURA K, OZAKI A, et al. Genetic information of three pure lines of *Porphyra yezoensis* (Bangiales, Rhodophyta) obtained by AFLP analysis[J]. Fisheries Science, 2002, 68: 1113-1117.
- [9] 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: 1-4.
- [10] 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): 6-80.
- [11] 杨锐,刘必谦,骆其君,等. 利用扩增片段长度多态性(AFLP)研究坛紫菜的遗传变异[J]. 高技术通讯,2002,12(1): 3-86.
- [12] 刘必谦,曾庆国,骆其君,等. 条斑紫菜 dbEST 中筛选微卫星位点及引物种间转移扩增[J]. 海洋与湖沼,2005,36(3): 48-254.
- [13] 胡则辉,周志刚,严兴洪. 坛紫菜微卫星 DNA 序列的筛选[J]. 海洋科学,2006,30(1): 7-22.
- [14] JIA J H, WANG P, JIN D M, et al. The application of RAPD Markers in diversity detection and variety identification of *Porphyra* [J]. Acta Botanica Sinica, 2000, 42(4): 403-407.
- [15] 石金锋,贾建航,金德敏,等. 紫菜无性系特异 SCAR 标记的获得[J]. 海洋学报,2003,25(1): 128-13.
- [16] 谢潮添,纪德华,陈昌生,等. ISSR 标记在坛紫菜不同色泽丝状体种质鉴定中的应用[J]. 水产学报,2007,31(1): 105-111.
- [17] 曾庆国,刘必谦,杨锐,等. 坛紫菜单个体细胞克隆的丝状体途径[J]. 中国水产科学,2004,11(6): 550-553.
- [18] 克拉尔克著(顾红雅译). 植物分子生物学实验手册[M]. 北京:高等教育出版社,1997.
- [19] COMINGS D E, MACMURRAY J P. Molecular Heterosis: A Review. Molecular genetics and metabolism [J]. 2000, 71(1): 19-31.
- [20] XIAO J, Li J, YUAN L, et al. Genetic diversity and its relationship to hybrid performance and heterosis in rice as revealed by PCR-based markers[J]. Theoretical and Applied Genetics, 1996, 92: 637-643.
- [21] MELCHINGERRA E, BOPPENMAIER J, DHILLON B S, et al. Genetic diversity for RFLPs in European maize inbred. relation to performance of hybrids with in versus between heterosis groups for forage trait[J]. Theoretical and Applied Genetics, 1992, 84: 672-681.
- [22] 张培江,才宏伟,李焕朝,等. RAPD 分子标记水稻遗传距离及其与杂种优势的关系[J]. 安徽农业科学,2000,28: 698-700.
- [23] 万俊芬,汪小龙,潘洁,等. 日本盘鲍×皱纹盘鲍子代杂种优势的 RAPD 分析[J]. 青岛海洋大学学报,2001,31(7): 506.
- [24] 滕丽莉,杨爱国,赵峰,等. 栉孔扇贝×虾夷扇贝子一代杂种优势的 RAPD 分析[J]. 高技术通讯,2005,15(6): 97-101.
- [25] ZIETKIEWICZ E, RAFALSKE A, LABUDA D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification[J]. Genome, 1994, 20: 178-183.
- [26] REDDY M P, SARLA N, SIDDIQ E A. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding[J]. Euphytica, 2002, 128: 9-17.

ISSR analysis on the heterosis in hybrids of *Porphyra haitanensis*

JI De-hua¹, XIE Chao-tian¹, XU Yan¹, CHEN Chang-sheng¹

(¹ College of Fisheries, Jimei University, Xiamen 361021, China)

Abstract: The wild strain (♀) of *Porphyra haitanensis* was crossbred with the red strain (♂) one which selected through induction of mutation to get the hybrid conchocelies and thallus. Of all the hybrids, 5 healthy thallus which have predominance of growth and other economic characteristics were selected to digest with snail enzymes, and through somacloning and conchocelies culturing, 5 strains (A、B、C、D、E) which have steady characters were obtained. And then, ISSR method was used to study the heterosis of the *P. haitanensis* parents and these 5 hybrid strains, 21 ISSR primers (were screened from 67 primers) gave rise to 366 discernible DNA bands of which 347 (94.8%) were polymorphic, the size of ISSR markers were highly reproducible ranged from 400 to 4000 bp. By statistic and analyzing these amplified bands, it can find that the average genetic similarity between the 5 hybrids and female parent and male parent are 0.519 1 and 0.555 1, which less the genetic similarity between the parents (0.612 0). The effective number of alleles, expected heterozygosity and shannon's information index among 5 hybrids were 1.550 1, 0.320 0 and 0.472 0 respectively, which also greater than the corresponding values (1.390 7, 0.195 4 and 0.270 8 respectively) between the parents evidently. From these datas, it can conclude that the hybrid can enhance the genetic diversity of *P. haitanensis* and produce distinct heterosis. From these datas, it also can find that the genetic distances between the 5 hybrids and female parent and male parent are no equality, all second to the female parent, the reason maybe is the cytoplasmic gene also participate in the expressing and regulation of *P. haitanensis* genetic characters. At last, the application of ISSR method in forecasting heterosis was discussed.

Key words: *Porphyra haitanensis*; hybrid; heterosis; ISSR