

• 研究报告 •

中国近海重要生态建群红藻真江蓠 的群体遗传多样性

刘若愚^{1,2} 孙忠民^{1,3} 姚建亭^{1,4} 胡自民^{1,4*} 段德麟^{1,4*}

1 (中国科学院海洋研究所实验海洋生物学重点实验室, 山东青岛 266071)

2 (中国科学院大学, 北京 100049)

3 (中国科学院海洋研究所海洋生物分类与系统演化实验室, 山东青岛 266071)

4 (青岛海洋科学与技术国家重点实验室, 山东青岛 266237)

摘要: 真江蓠(*Gracilaria vermiculophylla*)是中国近海潮间带生态系统结构组成和功能维持的重要支撑物种, 但有关其群体遗传结构和多样性分布模式的研究目前仍较缺乏。本研究利用线粒体 $cox1$ 序列对我国近海19个真江蓠地理群体进行了系统发育和群体遗传分析。461个长度为641 bp的 $cox1$ 序列片段共含有21个多态位点, 产生15个单倍型。基于 $cox1$ 序列的系统进化分析、单倍型分析和主成分分析显示, 19个真江蓠群体分化为南北两个类群, 其中浙江嵊泗以北的13个群体形成北方类群, 福建厦门以南的6个群体形成南方类群。遗传距离和分子方差分析显示真江蓠南北各类群内的遗传分化较小, 南北类群间的遗传分化达到亚种水平。南北类群间的差异是我国近海真江蓠群体遗传变异的主要来源。

关键词: *Gracilaria vermiculophylla*; 线粒体 $cox1$; 系统发育; 遗传多样性; 群体遗传分化

Genetic diversity of the habitat-forming red alga *Gracilaria vermiculophylla* along Chinese coasts

Ruoyu Liu^{1,2}, Zhongmin Sun^{1,3}, Jianting Yao^{1,4}, Zimin Hu^{1,4*}, Delin Duan^{1,4*}

1 Key Laboratory of Experimental Marine Biology, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao, Shandong 266071

2 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049

3 Department of Marine Organism Taxonomy and Phylogeny, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao, Shandong 266071

4 Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao, Shandong 266237

Abstract: As a habitat-forming species, the red alga *Gracilaria vermiculophylla* has been noted to play an essential role in shaping coastal marine communities and maintaining intertidal ecosystems along Chinese coasts. However, few studies have been conducted that analyze the genetic structure of the population and the distribution patterns of genetic variation. In this study, we compiled partial mitochondrial DNA cytochrome c oxidase subunit I gene ($cox1$) of 19 *G. vermiculophylla* populations (461 individuals) and performed phylogenetic analysis and population genetic surveys. A total of 461 mt-DNA $cox1$ sequences were obtained and edited into 641 bp, which contained 21 polymorphic sites and yielded 15 haplotypes. Phylogenetic inferences, haplotype networking, and principal coordinate analysis consistently indicated that *G. vermiculophylla* populations diverged into two groups: the northern group is comprised of specimens from the Yellow-Bohai Sea and the Shengsi Islands, while the southern group is comprised of specimens from six locations south to Xiamen, Fujian Province. Analysis of the molecular variance and Nei's genetic distances indicated low genetic differentiation between populations in each group while group-level genetic divergence is comparable to the degree of subspecies differentiation.

收稿日期: 2016-02-03; 接受日期: 2016-06-07

基金项目: 国家自然科学基金(31370264)

* 共同通讯作者 Co-authors for correspondence. E-mail: huzimin9712@163.com; dlduan@qdio.ac.cn

Key words: *Gracilaria vermiculophylla*; mitochondrial *cox1*; phylogenetics; genetic diversity; population genetic differentiation

真江蓠(*Gracilaria vermiculophylla*)隶属于红藻门真红藻纲江蓠目江蓠科,是一种可食用的大型经济海藻(Guiry & Guiry, 2016)。真江蓠藻体直立,线形圆柱状,常为紫褐色,亚软骨质,向上分枝,分枝基部不缢缩或略缢缩,半圆形的囊果、紫红色十字形分裂的四分孢子囊和V型的精子囊结构是其形态分类鉴定的重要依据(曾呈奎, 2008)。真江蓠是潮间带生态群落的初级生产者和重要建群物种。最新研究表明,在贫瘠海岸引入真江蓠可为小型底栖生物提供避难所和栖息地,无脊椎动物的丰度和生物量会随着真江蓠海藻床的扩展而增加,进而逐步形成复杂的生态群落(Thomsen et al, 2013)。此外,真江蓠还是一种良好的重金属吸附藻类,能明显改善水质环境(Riosmena et al, 2009)。

真江蓠是太平洋西岸的地方种(Terada & Yamamoto, 2002)。自Bellorin等(2004)首次在墨西哥的下加利福尼亚地区(Baja California)发现真江蓠后,在太平洋东岸(Saunders, 2009)、大西洋两岸(Rueness, 2005; Kim et al, 2010; Gulbransen et al, 2012)陆续报道了真江蓠的大范围入侵。近10年来,真江蓠在太平洋东岸和大西洋两岸的入侵范围呈现出快速扩大的趋势,改变了当地的生物多样性组成、潮间带群落结构和生态系统功能(Thomsen et al, 2013; Hu & Juan, 2014),引起学者们的广泛关注。在西北太平洋地区,现有的研究主要集中在真江蓠的分类鉴定、个体遗传多态性检测以及入侵起源地的探索等方面(Yang et al, 2008; Saunders, 2009; Kim et al, 2010),有关真江蓠群体遗传结构和多态性地理分布的研究则鲜有报道。

真江蓠在中国近海分布广泛,早期的文献记录显示其最北端分布位于辽宁省的大连市,最南端分布位于广西省的防城港市(夏邦美和张峻甫, 1999)。目前,国内只有少量关于真江蓠分子标记研究的报道(Zhao et al, 2013; 钟晨辉等, 2014),且主要集中于DNA条形码开发和系统进化分析,所用材料仅限于少量采样地点的个别样品。Gulbransen等(2012)通过扩大样本(包括采样范围和每个地点的样品数量)发现美国弗吉尼亚湾的真江蓠群体具有较高的遗传多

样性特征和单倍型丰度,表明样品采集数量对研究真江蓠群体遗传结构的分布模式可能会产生重要的影响。本研究共收集19个地理群体的461株真江蓠样品的线粒体 $cox1$ 序列,在分子水平进行物种鉴定的基础上对不同群体的遗传多样性组成、分布特征和群体遗传分化模式进行了深入分析,探讨形成这种遗传结构和地理分布格局的可能因子,以期当真江蓠野生资源的保护监管和开发利用提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 样品采集和地理分布

在2013–2016年间,研究团队沿中国近海由北向南在18个地点采集到456株真江蓠样品,每株个体用硅胶干燥保存。为扩大样本的覆盖区域,后续分析中整合了钟晨辉等(2014)采自厦门杏林湾的5株野生真江蓠个体的线粒体 $cox1$ 序列(KF789526–KF789530)。扩大后的样本地点达19个,共计461株个体。采样详细信息见表1。

1.2 DNA提取、PCR扩增和测序

取30 mg干燥样品在双蒸水中浸泡,用毛刷洗净藻体表面的附着物。样品晾干后加入液氮碾磨成藻粉,利用植物基因组提取试剂盒DP305 (Tiangen, Beijing)提取真江蓠的基因组DNA, -20°C 保存备用(李晶晶等, 2013)。采用Saunders (2005)设计的红藻通用引物对 GazF1: TCAACAAATCATAAAGATATTGG 和 GazR1: ACTTCTGGATGTCCAAAAAAYCA扩增真江蓠的线粒体 $cox1$ 序列。扩增反应在TakaRa TP600型PCR仪上进行。采用50 μL 反应体系:模板DNA 0.5 μL , $10\times\text{Taq Buffer}$ 5 μL , dNTPs 4 μL , 5 U/ μL 的Taq DNA聚合酶(TransGen) 0.5 μL , 引物2 μL 和超纯水38 μL 。PCR反应程序为: 94°C 预变性2 min, 94°C 变性30 s, 50°C 退火30 s, 72°C 延伸1 min, 30个循环; 72°C 延伸8 min。扩增产物经1%的琼脂糖凝胶电泳检测后进行纯化,在ABI 3730XL测序平台上进行正向测序。

1.3 数据处理和系统发育树构建

用BioEdit 5.0.6软件(Hall, 1999)对测序获得的线粒体 $cox1$ 序列进行比对和手工校正。将编辑好的

表1 真江蓠19个群体的代号、地理位置、样本量(N)、多态位点数(Np)、单倍型数(Nh)、单倍型类型(数量)(Hn(n))、单倍型多态性(Hd)、核苷酸多态性(π)、采集时间和采样人
Table 1 Sampling information of 19 *Gracilaria vermiculophylla* populations, including abbreviation codes, geographic location, sample size (N), number of polymorphic sites (Np), number of haplotypes (Nh), types of haplotype (Hn(n)), haplotype diversity (Hd), nucleotide diversity (π), collecting date and collectors

代号 Code	地理位置 Location	经纬度 Longitude/Latitude	N	Np	Nh	Hn(n)	Hd	π ($\times 10^{-2}$)	采样人 Collectors
南方群体 Region South									
YT	北海银滩 Yingtang beach, Beihai	109.34 °E, 21.45 °N	24	7	4	H0(21), H2, H3, H4	0.239	0.143	刘若愚, 胡自民 Ruoyu Liu, Zimin Hu
JH	北海金海岸 Jinhaian, Beihai	109.11 °E, 21.49 °N	33	1	2	H0(32), H2	0.061	0.009	刘若愚, 胡自民 Ruoyu Liu, Zimin Hu
TC	湛江特呈岛 Techeng island, Zhanshan,	110.44 °E, 21.15 °N	30	0	1	H0(30)	0.000	0.000	孙忠民, 姚建亭 Zhongmin Sun, Jianting Yao
NA	汕头南澳岛 Nanao island, Shantou	117.04 °E, 23.45 °N	23	1	2	H0(19), H1(4)	0.300	0.047	孙忠民, 姚建亭 Zhongmin Sun, Jianting Yao
ZP	漳州漳浦六鳌 Zhangpu liuao, Zhanzhou,	117.77 °E, 23.92 °N	35	0	1	H0(35)	0.000	0.000	孙忠民, 黄超华 Zhongmin Sun, Chaohua Huang
XL	厦门杏林湾 Xingling bay, Xiamen	118.08 °E, 24.60 °N	5	1	2	H0(4), H1(1)	0.400	0.062	钟晨辉等 Chenhui Zhong et al
小计 Subtotal			150	8	5	H0(141), H1(5), H2(2), H3, H4	0.116	0.027	
北方群体 Region North									
SS	舟山嵎泗岛 Shengsi island, Zhoushan	122.44 °E, 30.68 °N	19	0	1	H6(19)	0.000	0.000	胡自民 Zimin Hu
YY	青岛一浴 No. 1 beach, Qingdao	120.34 °E, 36.05 °N	21	2	3	H5(19), H7, H10	0.186	0.030	刘若愚 Ruoyu Liu
EY	青岛二浴 No. 2 beach, Qingdao	120.34 °E, 36.05 °N	21	0	1	H5(21)	0.000	0.000	刘若愚 Ruoyu Liu
SY	青岛三浴 No. 3 beach	120.36 °E, 36.05 °N	39	0	1	H5(39)	0.000	0.000	刘若愚 Ruoyu Liu
YH	青岛银海国际 Yinhai, Qingdao	120.42 °E, 36.06 °N	36	2	3	H5(26), H8(9), H13	0.427	0.069	刘若愚 Ruoyu Liu
LR	青岛石老人 Shilaoren sea, Qingdao	120.49 °E, 36.09 °N	36	2	3	H5(32), H9(3), H12	0.208	0.033	刘若愚 Ruoyu Liu
SD	威海石岛 Stone island, Weihai	122.41 °E, 36.91 °N	13	0	1	H5(13)	0.000	0.000	李晶晶, 张杰 Jingjing Li, Jie Zhang
DC	威海东楮岛 Dongchu island, Weihai	122.56 °E, 37.04 °N	32	1	2	H5(16), H14(16)	0.516	0.081	刘若愚, 胡自民 Ruoyu Liu, Zimin Hu
JM	威海鸡鸣岛 Jiming island, Weihai	122.48 °E, 37.45 °N	7	0	1	H5(7)	0.000	0.000	李晶晶, 张杰 Jingjing Li, Jie Zhang
CD	烟台长岛 Long island, Yantai	120.72 °E, 37.94 °N	16	0	1	H5(16)	0.000	0.000	胡自民 Zimin Hu
HN	大连黄泥川 Huangnichuan, Dalian	121.56 °E, 38.82 °N	35	1	2	H5(34), H11	0.057	0.009	刘若愚, 胡自民 Ruoyu Liu, Zimin Hu
HS	大连黑石礁 Heshijiao, Dalian	121.56 °E, 38.87 °N	8	0	1	H5(8)	0.000	0.000	刘若愚, 胡自民 Ruoyu Liu, Zimin Hu
ZZ	大连獐子岛 Zhangzi island, Dalian	122.74 °E, 39.04 °N	28	0	1	H5(28)	0.000	0.000	姚建亭, 孙忠民 Ruoyu Liu, Zimin Hu
小计 Subtotal			311	9	10	H5(259), H6(19), H7, H8(9), H9(3), H10, H11, H12, H13, H14(16)	0.300	0.050	

序列导入NCBI进行BLASTn搜索,寻找相似度最高的已知序列。从GenBank中下载在藻类学专业期刊上公开发表的真江蓠和江蓠属其他物种及龙须菜(*Gracilariopsis lemaneiformis*)的*cox1*序列用作参考。这些序列包括:真江蓠(EF434927、EF434936、EF434937、EF434938、EF434939、FJ499550、FJ499581、GU907103、GU907104、GU907105、GU907106、GU907108、GU907110、GU907111、GQ292864、GQ292865、GQ292866、GQ292867、GQ292868、KF789526、KF789527、KF789528、KF789529、KF789530),缢江蓠(*G. salicornia*)(FJ499537),壶果江蓠(*G. tikvahiae*)(FJ499538、FJ499539、FJ499548、FJ499549、FJ499542),*G. parvispora*(EF434921、EF434922、KC113593、KC113594),太平洋江蓠(*G. pacifica*)(FJ499517、FJ499531、FJ499533、FJ499534、FJ499536)和龙须菜(KF789531)。采用邻接法(neighbor-joining, NJ)和最大似然法(maximum likelihood, ML)构建系统发育树。首先采用Model-test 3.7 (Posada & Crandall, 1998)的AIC标准(Akaike information criterion)确定最佳的核苷酸替代模型(HKY+I+G, I = 0.6193, G = 1.5714)。然后使用MEGA 6.0.6 (Tamura et al, 2013)的Kimura 2-parameter遗传距离模型构建NJ树,在Hasegawa-Kishino-Yano模型下构建ML树。为方便ML树与NJ树的比较,ML Heuristic Method选择Nearest-Neighbor-Interchange。系统发育树分支节点的置信度均采用自展检验方法(bootstrap method)进行估算,自展检验重复1,000次。

1.4 群体遗传学分析

采用DnaSP 5.1 (Librado & Rozas, 2009)计算各群体的多态位点数(N_p)、单倍型数(N_h)、单倍型多态性(H_d)和核苷酸多样性(π)。使用GenAlEx 6.5 (Peakall & Smouse, 2012)计算群体间的Nei's遗传距离、基因流(N_m),进行单倍型分析、主成分分析(principal component analysis, PCA)和分子方差分析(analysis of molecular variance, AMOVA)。利用Network 4.6.1.3 (Bandelt et al, 1999)的Median-joining算法构建真江蓠线粒体*cox1*序列的单倍型网状图。

2 结果

2.1 线粒体*cox1*鉴定和系统进化分析

扩增获得的461个线粒体*cox1*序列长度为641

bp,序列中无碱基缺失和插入。BLASTn搜索显示每条*cox1*序列与GenBank中公开发表的真江蓠序列的相似度在99–100%之间。NJ和ML系统树显示,本研究新获得的*cox1*序列与从GenBank下载的全部真江蓠序列聚集为一个大分支,自展支持率为100%,同时该分支同江蓠属其他种类和龙须菜明显分开(图1)。

NJ和ML系统树同时还显示浙江嵊泗(SS)以北的13个群体的真江蓠*cox1*序列同采自朝鲜半岛西海岸及中国威海和青岛的真江蓠样品(GU907106、GU907108、GU907110、EF434936、GU907103)聚为一个北部分支,而中国厦门以南6个群体的150个真江蓠*cox1*序列(YT、JH、TC、NA、ZP和XL)聚为一个南部分支(图1)。这一结果表明中国近海的真江蓠群体存在南北地理分化。

2.2 遗传多态性和单倍型分布

461个线粒体*cox1*序列含有21个多态位点(核苷酸变异率3.27%),共产生15个单倍型(表1,表2),GenBank注册号为KU136374–KU136387和KF789527(表2)。其中北方群体共计9个多态位点(占1.40%),南方群体8个多态位点(占1.25%)。北方群体的核苷酸和单倍型多态性分别在0.00000–0.00081和0.000–0.516之间;南方群体的核苷酸和单倍型多态性分别在0.00000–0.00143和0.000–0.400之间。真江蓠北方类群的核苷酸和单倍型多态性(0.00050, 0.300)要高于南方类群(0.00027, 0.116)(表1)。中国近海19个真江蓠群体的核苷酸和单倍型多态性分别为0.00318和0.589,其中南方群体的TC、ZP和北方群体SS、EY、SY、SD、JM、CD、HS、ZZ均只检测到1个单倍型。

线粒体*cox1*单倍型中介网状图(图2)显示,单倍型H5–H14以H5为中心呈星状散射,各单倍型之间仅有1个碱基差异(表2)。单倍型H0–H4以H0为中心呈星状散射,各单倍型之间存在1–4个碱基差异。H0–H4和H5–H14的*cox1*序列在位点346、517、562和604处存在明显的特征变异(表2)。另外,单倍型H5–H14仅分布在浙江嵊泗(SS)以北的13个群体里,其中H5是北方群体的主要共享单倍型(占比83.28%)。H0–H4仅分布在福建厦门杏林湾(XL)以南的6个群体里,其中H0是南方群体的主要共享单倍型(占比94.00%)(表1,图2)。

2.3 遗传距离和PCA分析

Nei's遗传距离(表3)显示,厦门以南的6个真江

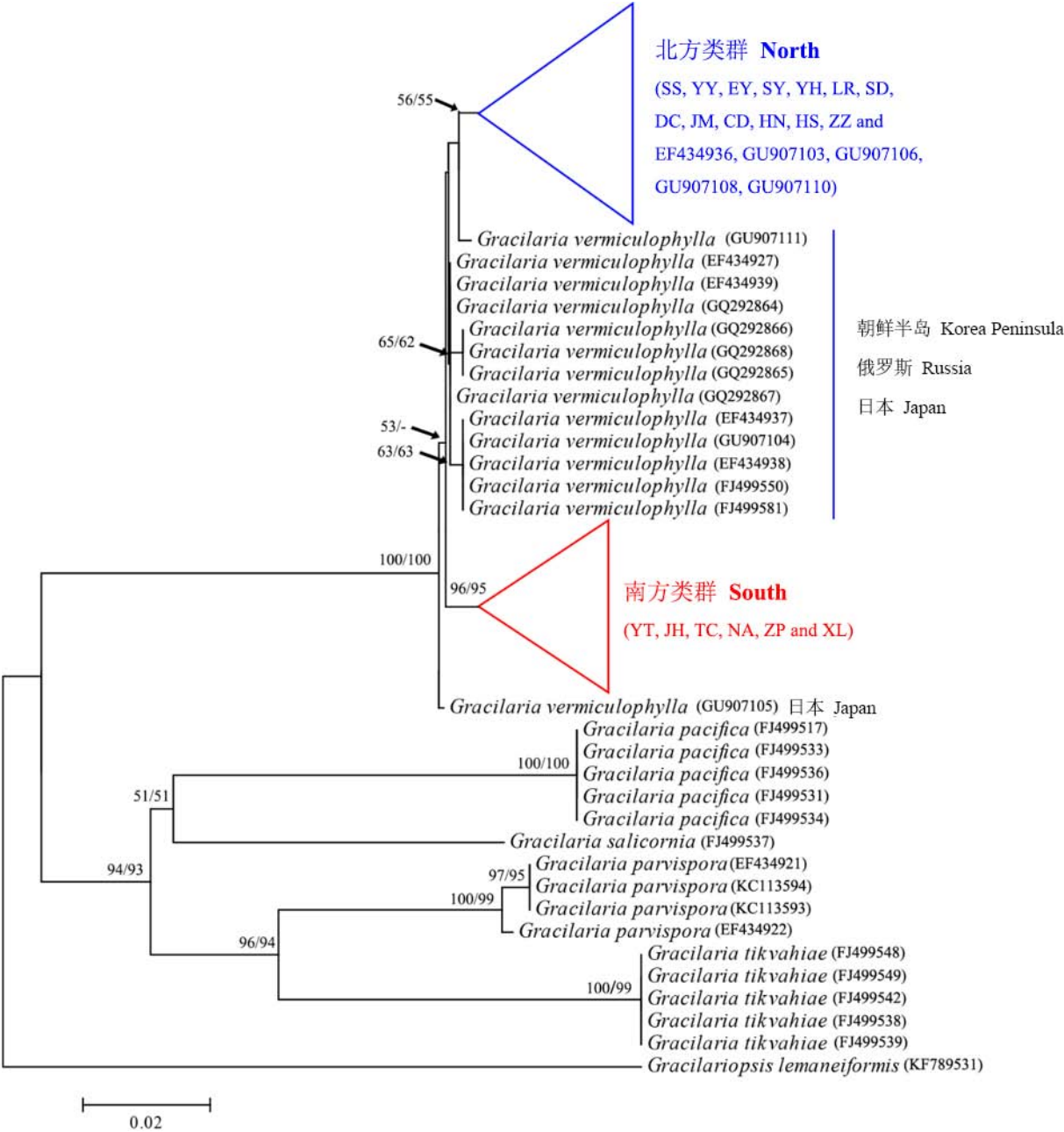


图1 基于真江蓠线粒体 $cox1$ 序列构建的NJ和ML树。数字表示各节点的自展支持率数值(> 50%, 斜线左为NJ树, 右为ML树)。群体代号同表1。
Fig. 1 Neighbor-joining (NJ) and maximum-likelihood (ML) phylogenetic trees based upon mt-DNA $cox1$ sequences of *Gracilaria vermiculophylla* and some congeneric species. Numbers indicate bootstrap values (> 50%) of NJ (left) and ML (right) inferences. Population codes are the same as in Table 1.

蓠群体间遗传距离均较小, 最大值0.003出现在YT与XL群体之间。北方13个真江蓠群体间遗传距离也很小, 最大值为0.062。南方群体与北方群体间的遗传距离相对较大, 最小为0.211, 最大为0.277。南北两个地理类群之间的Nei's遗传距离为0.215。

PCA分析结果显示中国南方的150株真江蓠个

体聚集为一个南方类群, 嵊泗以北的311株真江蓠个体聚集为一个北方类群(图3)。其中轴1 (Coord. 1) 和轴2 (Coord. 2)解释了90.54%的变异来源。北方类群的真江蓠个体主要沿轴2方向分布, 仅占总遗传变异量的3.88%, 而南北类群之间的遗传变异则占总量的80.66% (图3)。

表2 真江蓠15个线粒体cox1单倍型的核苷酸多态位点分布特征, 表中不同字体的字母表示各单倍型的多态位点。
Table 2 Polymorphic sites of 15 *cox1* haplotypes in *Gracilaria vermiculophylla*. The letters with different font denote polymorphic sites.

单倍型 Haplotype	单倍型数量 Number	核苷酸多态位点 Polymorphic sites															GenBank access- sion number						
		4	25	52	64	65	112	151	250	346	352	370	406	433	460	517		558	562	593	604	605	634
H0	141	T	G	A	A	C	G	A	A	G	T	T	T	A	G	G	C	T	G	G	G	A	KUI136384
H1	5	T	A	A	A	C	G	A	A	G	T	T	T	A	G	G	C	T	G	G	G	A	KF789527
H2	2	T	G	A	A	C	G	A	A	G	T	T	T	A	G	G	C	T	G	G	G	G	KUI136385
H3	1	T	G	T	A	C	T	T	A	G	T	T	T	A	G	G	C	T	T	G	A	A	KUI136387
H4	1	A	G	A	A	C	G	A	A	G	T	T	T	A	G	G	C	T	G	G	G	A	KUI136386
H5	259	T	G	A	A	C	G	A	A	C	T	T	T	A	G	A	C	C	G	T	G	A	KUI136374
H6	19	T	G	A	A	C	G	A	A	C	G	T	T	A	G	A	C	C	G	T	G	A	KUI136375
H7	16	T	G	A	G	C	G	A	A	C	T	T	T	A	G	A	C	C	G	T	G	A	KUI136383
H8	9	T	G	A	A	T	G	A	A	C	T	T	T	A	G	A	C	C	G	T	G	A	KUI136377
H9	3	T	G	A	A	C	G	A	A	C	T	A	T	A	G	A	C	C	G	T	G	A	KUI136378
H10	1	T	G	A	A	C	G	A	A	C	T	T	C	A	G	A	C	C	G	T	G	A	KUI136379
H11	1	T	G	A	A	C	G	A	A	C	T	T	T	A	G	A	A	C	G	T	G	A	KUI136380
H12	1	T	G	A	A	C	G	A	A	C	T	T	T	A	A	A	C	C	G	T	G	A	KUI136381
H13	1	T	G	A	A	C	G	A	T	C	T	T	T	A	G	A	C	C	G	T	G	A	KUI136382
H14	1	T	G	A	A	C	G	A	A	C	T	T	T	T	G	A	C	C	G	T	G	A	KUI136376

表3 真江蓠群体间的Nei's遗传距离(群体代号同表1)

Table 3 Pairwise Nei's genetic distances among *Gracilaria vermiculophylla* populations. Population codes see Table 1.

YT	JH	TC	NA	ZP	XL	SS	YY	EY	SY	YH	LR	SD	DC	JM	CD	HN	HS	ZZ
YT	0.000																	
JH	0.000	0.000																
TC	0.000	0.000	0.000															
NA	0.002	0.001	0.001	0.000														
ZP	0.000	0.000	0.000	0.001	0.000													
XL	0.003	0.002	0.002	0.000	0.002	0.000												
SS	0.277	0.272	0.272	0.276	0.272	0.277	0.000											
YY	0.217	0.213	0.213	0.216	0.213	0.217	0.049	0.000										
EY	0.215	0.212	0.211	0.215	0.211	0.215	0.049	0.000	0.000									
SY	0.215	0.212	0.211	0.215	0.211	0.215	0.049	0.000	0.000	0.000								
YH	0.222	0.218	0.217	0.221	0.217	0.222	0.052	0.003	0.003	0.000	0.000							
LR	0.217	0.213	0.213	0.216	0.213	0.217	0.049	0.001	0.000	0.003	0.000	0.000						
SD	0.215	0.212	0.211	0.215	0.211	0.215	0.049	0.000	0.000	0.003	0.000	0.000	0.000					
DC	0.233	0.230	0.229	0.233	0.229	0.234	0.062	0.012	0.012	0.015	0.013	0.012	0.000	0.000				
JM	0.215	0.212	0.211	0.215	0.211	0.215	0.049	0.000	0.000	0.003	0.000	0.000	0.012	0.000	0.000			
CD	0.215	0.212	0.211	0.215	0.211	0.215	0.049	0.000	0.000	0.003	0.000	0.000	0.012	0.000	0.000	0.000		
HN	0.216	0.212	0.212	0.215	0.212	0.216	0.049	0.000	0.000	0.003	0.000	0.000	0.012	0.000	0.000	0.000	0.000	
HS	0.215	0.212	0.211	0.215	0.211	0.215	0.049	0.000	0.000	0.003	0.000	0.000	0.012	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
ZZ	0.215	0.212	0.211	0.215	0.211	0.215	0.049	0.000	0.000	0.003	0.000	0.000	0.012	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

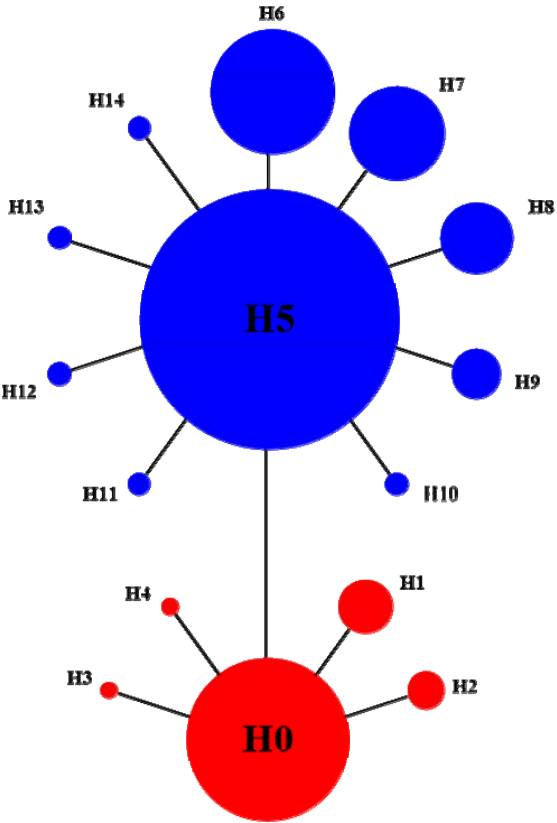


图2 真江蒿的线粒体 $cox1$ 单倍型中介网状图, 单倍型 H0–H4 仅在厦门杏林湾以南的南方群体中检测到, 单倍型 H5–H14 仅分布在浙江嵊泗到以北的北方群体中(群体代号同表1)。
Fig. 2 Median-joining network of mitochondrial $cox1$ haplotypes in *Gracilaria vermiculophylla* populations. We only detected haplotype H0–H4 in the populations south to Xiamen, while H5–H14 only in the populations north to Shengsi Island. Population codes are the same as in Table 1.

2.4 AMOVA分析

将中国近海19个真江蒿群体视为1个类群进行 AMOVA 分析, 结果表明真江蒿的遗传变异主要来自于群体间(93%), 群体内仅为7%。同时, 真江蒿群体间存在显著的遗传分化($F_{ST} = 0.928, P < 0.001$), 群体间的 Nm 值仅为0.039 (表4)。将真江蒿群体划分为南北两个地理类群, AMOVA分析表明93%的遗传变异来自南北类群间, 且两大类群间的遗传分化非常显著($F_{CT} = 0.933, P < 0.001$); 只有3%的变异来自群体间($F_{SC} = 0.465, P < 0.001$), 而群体内的遗传变异不到4% ($F_{ST} = 0.964, P < 0.001$)。真江蒿南北类群间 Nm 值为0.019 (表4), 显示南北类群间的基因交流非常有限。

3 讨论

Saunders (2005)在开发红藻条形码进行物种鉴定时发现, 红藻种内 $cox1$ 序列核苷酸变异率在0–0.3%左右, 属内种间核苷酸变异率在4.5–13.6%左右。Yang等(2008)比较了韩国和日本部分地区的14个真江蒿线粒体 $cox1$ 序列, 检测到的变异率为1.2%。Kim等(2010)比较了全球312株真江蒿的线粒体 $cox1$ 序列, 检测到的变异率为1.98%。本研究中, 中国近海461株野生真江蒿的线粒体 $cox1$ 序列核苷酸变异率为3.27%, 其中南方类群的变异率为1.25%、北方类群的变异率为1.40%, 南、北类群的 $cox1$ 序列在346、517、562和604 bp碱基位点上存在明显的特征变异(表2)。以上研究中真江蒿线粒体



图3 基于线粒体 $cox1$ 序列遗传距离的主成分分析(群体代号同表1)
Fig. 3 Principal coordinate analysis of 461 mt-DNA $cox1$ sequences based on Nei's genetic distance. The amount of variation is explained by Coord. 1 and Coord. 2, respectively. Population codes are the same as in Table 1.

表4 真江蓠群体的分子变异分析(AMOVA)
Table 4 Analysis of molecular variance (AMOVA) of *Gracilaria vermiculopylla* populations

变异来源 Source of variation	自由度 df	平方和 Sums of squares	变异组分 Estimated variance	变异百分比 % of variation	分化系数 F-statistics	基因流 Nm
一个类群 One group						
群体间 Among populations	18	434.049	24.114	93		
群体内 Within populations	442	34.103	0.077	7	$F_{ST} = 0.928^*$	0.039
两个类群(南方群体, 北方群体) Two groups (Regions: South, North)						
类群间 Among regions	1	405.675	405.675	93	$F_{CT} = 0.933^*$	0.019
类群内群体间 Among populations	17	28.374	1.669	3	$F_{SC} = 0.465^*$	
群体内 Within populations	442	34.103	0.077	4	$F_{ST} = 0.964^*$	

F_{CT} 为类群间遗传分化系数, F_{SC} 为类群内群体间遗传分化系数, F_{ST} 为群体间遗传分化系数。* $P \leq 0.001$ 。
 F_{CT} was calculated as the proportion of variance among regions; F_{SC} was calculated as the proportion of variance among populations within regions; F_{ST} was calculated as the proportion of variance within populations. * $P \leq 0.001$.

*cox1*序列的核苷酸变异率都介于Saunders (2005)界定的红藻种内到种间变异率的区间内。类似的结果也出现在对细江蓠(*Gracilaria gracilis*) (2.04%)、沙菜(*Hypnea asiatica*) (2.06%)和*Mastcarpus stellatus* (2.60%)等红藻的研究中(Robba et al, 2006; Geraldino et al, 2009)。Robbat等(2006)采纳Saunders (2005)界定的属种变异率标准对*G. gracilis*和*M. stellatus*进行研究和讨论, 认为较高的核苷酸变异率是雏形种形成(incipient speciation)的例证。Hebert等(2003)在分析线粒体*cox1*序列的遗传距离时发现种内遗传距离往往小于0.200, 同属种间的遗传距离一般为该属种内遗传距离的10倍左右。Chu等(2009)认为当种内遗传距离大于0.200时可能存在亚种或隐存种(陈哲等, 2012)。本研究南北类群内各群体间的遗传距离最大为0.062, 远低于0.200, 而南北类群间的遗传距离为0.215。借鉴郑文娟等(2009)、Cheang等(2010)和Boo等(2014)对泥蚶(*Tegillarca granosa*)、半叶马尾藻(*Sargassum hemiphyllum*)和石花菜(*Gelidium crinale*)地理亚种的研究, 结合本文的PCA分析、AMOVA结果和基因流数值可知, 中国近海红藻真江蓠南北类群间的分化已达种内亚种水平。这种分化随着人类影响的加剧(如人为引种和养殖)和近岸环境的变化(如黑潮驱动的由南向北的遗传交流)可能会逐渐变得细微。因此, 现有真江蓠南北类群野生资源的收集和保存对于真江蓠物种的可持续保护和利用具有重要实践意义。

Kim等(2010)在美国弗吉尼亚湾仅检测到1种*cox1*单倍型。Gulbransen等(2012)增加了采样点和采样密度, 在同一地区检测到7种单倍型, 揭示了采样密度和样本量对真江蓠群体遗传结构分析的重

要影响。本研究在中国沿海检测到15个真江蓠*cox1*单倍型, 高于之前的研究报道(Kim et al, 2010), 这进一步凸显样本采集策略对红藻群体遗传结构和多样性分析的重要性。另外, 本文的结果并没有揭示出真江蓠南北类群分化的确切地理界限, 进而未能深入揭示真江蓠南北分化的潜在环境因素, 这有待于以后的持续采样加以探讨。

虽然中国近海真江蓠的整体核苷酸变异率和单倍型多态性较高, 但在很多地理群体(如TC、ZP、SS、EY、SY、SD、JM、CD、HS和ZZ)中只检测到1个单倍型, 显示出高度的遗传均质性。对于藻类而言, 无性繁殖会促使群体内个体的基因型趋于纯合, 进而降低藻类群体遗传多样性。Peason和Murray (1997)发现红藻*Lithothrix aspergillum*在加利福利亚南部地区行有性繁殖的群体具有较高的遗传多样性, 而在北部行无性繁殖的群体其遗传多样性较低。这种现象在江蓠属海藻中亦有报道。例如, Guillemin等(2008)使用SSR标记研究智利江蓠(*Gracilaria chilensis*)发现, 主要依靠断枝增殖的人工养殖群体的遗传多样性水平明显低于野外行有性生殖的自然群体。真江蓠为多年生海藻, 有性世代和无性世代可以在同一时期存在, 四分孢子体和雌、雄配子体可在同一时期分别长成植株体。除行有性繁殖外, 在自然界中具有顶端细胞的真江蓠断枝能够不断分裂生长, 萌发出新枝长成新的藻体(曾呈奎和陈淑芬, 1959; Rueness, 2005)。真江蓠一般生长在生态因子变化幅度相对较小、环境基质相对稳定、异质性较小的平静内湾(Rueness, 2005), 这种稳定的环境条件使得真江蓠面临的自然选择压力偏小, 群体变异水平趋低。无性繁殖和环境选择

可能是中国近海某些真江蓠地理群体展现出高度遗传均质性的主要原因。

气候变化和近岸海洋环境变迁是影响近海生物群体遗传分化的关键因素, 中国近海真江蓠群体的南北分化可能与北半球古气候变动引起的近海环境剧烈波动有关。中国海是太平洋西部的边缘海, 在新生代晚期形成后经历了剧烈的气候和环境变迁。在更新世冰期, 东中国海和中国南海海平面比现在低约100–150 m, 黄东海和南海分别为两个独立的分隔着的边缘海(Wang, 1999)。这些边缘海的低洼处在冰期充当封闭的避难所, 保存残留的海洋生物类群, 促进种内遗传谱系的分化(Cheang et al, 2010; Hu et al, 2013)。中国近海真江蓠北方类群由单倍型H5–H14组成, 分布在黄东海; 南方类群由单倍型H0–H4组成, 分布在南海; 真江蓠南、北类群遗传分化显著, 基因交流有限(表1, 表4)。这种遗传分布模式在西北太平洋营底栖生活的潮间带海藻中亦有类似报道。例如, 沙菜日韩群体的单倍型为C1–C9, 中国台湾群体的单倍型为C10–C15(Geraldino et al, 2009)。羊栖菜的南海群体、东海群体和黄海群体表现出截然不同的线粒体*cox1*单倍型分布(Hu et al, 2013)。Cheang等(2010)的研究表明西北太平洋边缘海的隔离导致了半叶马尾藻福建以南群体与长江以北的日韩群体之间的遗传谱系分化。我们据此推测历史气候变化造成的黄东海和南海两大边缘海的分隔可能是导致真江蓠形成目前地理分布格局的重要原因。真江蓠南北两个类群可能来自不同的冰期避难所, 它们具有共同的祖先, 在冰期退却后沿不同的线路扩散到现在的黄渤海、东海和南海沿岸。这一假设希望能在后续的研究中得到进一步验证。

参考文献

- Bandelt HJ, Forster P, Röhl A (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16, 37–48.
- Bellorin AM, Olivera MC, Olivera EC (2004) *Gracilaria vermiculophylla*: a western Pacific species of Gracilariaceae (Rhodophyta) first recorded from the eastern Pacific. *Phycological Research*, 52, 69–79.
- Boo GH, Kim KM, Nelson WA, Rafael RR, Yoon KJ, Boo SM (2014) Taxonomy and distribution of selected species of the agarophyte genus *Gelidium* (Gelidiales, Rhodophyta). *Journal of Applied Phycology*, 26, 1243–1251.
- Cheang CC, Chu KH, Put AO (2010) Phylogeography of the marine macroalga *Sargassum hemiphyllum* (Phaeophyceae, Heterokontophyta) in northwestern Pacific. *Molecular Ecology*, 19, 2933–2948.
- Chen Z, Zhang J, Fu HF, Xu ZZ, Deng KZ, Zhang JY (2012) On the validity of the species *Phenacoccus solenopsis* based on morphological and mitochondrial *COI* data, with the description of a new body color variety. *Biodiversity Science*, 20, 443–450. (in Chinese with English abstract) [陈哲, 张姜, 傅杭飞, 许争争, 邓坤正, 张加勇 (2012) 基于形态特征和线粒体*COI*基因探讨扶桑绵粉蚧物种的有效性并记述一体色变异型扶桑绵粉蚧. 生物多样性, 20, 443–450.]
- Chu D, Liu GX, Fu HB, Xu W (2009) Phylogenetic analysis of mt-*COI* reveals the cryptic lineages in *Phenacoccus solenopsis* complex (Hemiptera: Pseudococcidae). *Acta Entomologica Sinica*, 52, 1261–1265.
- Geraldino PJL, Yang EC, Kim MS, Boo SM (2009) Systematics of *Hypnea asiatica* sp. nov. (Hypneaceae, Rhodophyta) based on morphology and nrDNA SSU, plastid *rbcL*, and mitochondrial *cox1*. *Taxon*, 58, 606–616.
- Guillemin ML, Faugeron S, Destombe C, Viard F, Correa JA, Valero M (2008) Genetic variation in wild and cultivated populations of the haploid-diploid red alga *Gracilaria chilensis*: how farming practices favor asexual reproduction and heterozygosity. *Evolution*, 62, 1500–1519.
- Guiry MD, Guiry GM (2016) AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>. (accessed on 2016-04-12).
- Gulbransen DJ, McGlathery KJ, Marklund M, Norris JN, Gurgel CFD (2012) *Gracilaria vermiculophylla* (Rhodophyta, Gracilariales) in the Virginia coastal bays, USA: *cox1* analysis reveals high genetic richness of an introduced macroalga. *Journal of Phycology*, 48, 1278–1283.
- Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95–98.
- Hebert PD, Cywinska A, Ball SL, deWaard JR (2003) Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 270, 313–321.
- Hu ZM, Zhang J, Lopez-Bautista J, Duan DL (2013) Asymmetric genetic exchange in the brown seaweed *Sargassum fusiforme* (Phaeophyceae) driven by oceanic currents. *Marine Biology*, 160, 1407–1414.
- Hu ZM, Juan LB (2014) Adaptation mechanisms and ecological consequences of seaweed invasions: a review case of agarophyte *Gracilaria vermiculophylla*. *Biological Invasions*, 16, 967–976.
- Kim SY, Weinberger F, Boo SM (2010) Genetic data hint at a common donor region for invasive Atlantic and Pacific populations of *Gracilaria vermiculophylla* (Gracilariales, Rhodophyta). *Journal of Phycology*, 46, 1346–1349.
- Librado P, Roas J (2009) DNAsp v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25, 1451–1452.
- Li JJ, Zhang J, Hu ZM, Duan DL (2013) Population genetics

- and demographic history of red seaweed, *Palmaria palmata*, from the Canada–northwest Atlantic. *Biodiversity Science*, 21, 306–314. (in Chinese with English abstract) [李晶晶, 张杰, 胡自民, 段德麟 (2013) 加拿大西北大西洋地区掌形藻的种群遗传结构与动态变化. 生物多样性, 21, 306–314.]
- Peakall R, Smouse PE (2012) GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update. *Bioinformatics*, 28, 2537–2539.
- Peason EA, Murray SN (1997) Patterns of reproduction, genetic diversity and genetic differentiation in California populations of the geniculate coralline alga *Lithothrix aspergillum* (Rhodophyta). *Journal of Phycology*, 33, 753–763.
- Posada D, Crandall KA (1998) Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, 14, 817–818.
- Riosmena RR, Talavera SA, Acosta VB, Gardner SC (2009) Heavy metals dynamics in seaweeds and seagrasses in Bahía Magdalena, BCS, México. *Journal of Applied Phycology*, 22, 283–291.
- Robba L, Russell SJ, Barker GL, Brodie J (2006) Assessing the use of the mitochondrial *Cox1* marker for use in DNA barcoding of red algae (Rhodophyta). *American Journal of Botany*, 93, 1101–1108.
- Rueness J (2005) Life history and molecular sequences of *Gracilaria vermiculophylla* (Gracilariales, Rhodophyta), a new introduction to European waters. *Phycologia*, 44, 120–128.
- Saunders GW (2005) Applying DNA barcoding to red macroalgae: a preliminary appraisal holds promise for future applications. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences*, 360, 1879–1888.
- Saunders GW (2009) Routine DNA barcoding of Canadian Gracilariales (Rhodophyta) reveals the invasive species *Gracilaria vermiculophylla* in British Columbia. *Molecular Ecology Resources*, 9 (Suppl. 1), 140–150.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30, 2725–2729.
- Terada R, Yamamoto H (2002) Review of *Gracilaria vermiculophylla* and other species in Japan and Asia. *Taxonomy of Economic Seaweeds*, 8, 215–224.
- Thomsen MS, Stæhr PA, Nejrup L, Schiel DR (2013) Effects of the invasive macroalgae *Gracilaria vermiculophylla* on two co-occurring foundation species and associated invertebrates. *Aquatic Invasions*, 8, 133–145.
- Tseng CK, Chen JF (1959) Reproductive of *Gracilaria vermiculophylla* and cultivation seedlings in laboratory. 90, 202–203. (in Chinese) [曾呈奎, 陈椒芬 (1959) 真江蓠的繁殖习性和幼苗的室内培育. 中国科学院海洋研究所调查研究报告, 90, 202–203.]
- Tseng CK (2008) Seaweeds in Yellow Sea and Bohai Sea of China. Science Press, Beijing. (in Chinese) [曾呈奎 (2008) 中国黄渤海海藻. 科学出版社, 北京.]
- Wang PX (1999) Response of western Pacific marginal seas to glacial cycles: paleoceanographic and sedimentological features. *Marine Geology*, 156, 5–39.
- Xia BM, Chang CF (1999) Flora Algarum Marinarum Sinicarum Tomus II, Rhodophyta no. V Ahnfeltiales, Gigartinales, Rhodymeniales. Science Press, Beijing. (in Chinese) [夏邦美, 张峻甫 (1999) 中国海藻志第二卷红藻门(第五分册): 伊谷藻目, 杉藻目, 红皮藻目. 科学出版社, 北京.]
- Yang EC, Kim MS, Geraldino PJL, Sahoo D, Shin JA, Boo SM (2008) Mitochondrial *cox1* and plastid *rbcl* genes of *Gracilaria vermiculophylla* (Gracilariaceae, Rhodophyta). *Journal of Applied Phycology*, 20, 161–168.
- Zhao XB, Pang SJ, Shan TF, Liu F (2013) Applications of three DNA barcodes in assorting intertidal red macroalgal flora in Qingdao, China. *Journal of Ocean University of China*, 12, 139–145.
- Zheng WJ, Zhu SH, Shen XQ, Liu BQ, Pan ZC, Ye YF (2009) Genetic differentiation of *Tegillarca granosa* based on mitochondrial *COI* gene sequences. *Zoological Research*, 30, 17–23. (in Chinese with English abstract) [郑文娟, 朱世华, 沈锡权, 刘必谦, 潘志崇, 叶央芳 (2009) 基于线粒体 *COI* 基因序列探讨泥蚶的遗传分化. 动物学研究, 30, 17–23.]
- Zhong CH, Huang RF, Lin Q, Zheng YY, Li LB, Liu B (2014) Molecular identification of a green type of *Gracilaria vermiculophylla*. *Journal of Applied Oceanography*, 33, 183–189. (in Chinese with English abstract) [钟晨辉, 黄瑞芳, 林琪, 郑雅友, 李雷斌, 刘波 (2014) 一种绿色真江蓠的分子鉴定. 应用海洋学报, 33, 183–189.]

(责任编辑: 孙军 责任编辑: 时意专)