

doi: 10.7541/2013.82

## 大叶藻居群微卫星遗传多样性研究

孙典荣<sup>1</sup> 李 渊<sup>2</sup> 李文涛<sup>2</sup> 高天翔<sup>2</sup>

(1. 中国水产科学研究院南海水产研究所, 广州 510300; 2. 中国海洋大学  
海洋生物多样性与进化研究所, 青岛 266003)

**摘要:** 采用 4 对微卫星引物对大叶藻的 7 个地理居群进行了遗传多样性与遗传结构分析。扩增 148 株大叶藻得到 57 个等位基因, 每个位点平均等位基因数为 6, 大叶藻居群的平均期望杂合度( $H_e$ )为 0.687, 平均观测杂合度( $H_o$ )为 0.417。青岛湾居群的遗传多样性最高( $A=7.750$ ,  $AR=7.043$ ), 俚岛居群最低( $A=4.750$ ,  $AR=4.543$ )。从  $F_{st}$  值来看, 7 个大叶藻居群间属于中度分化。UPGMA 系统发育树显示, 中国 4 个大叶藻居群聚类到一起, 其遗传分化可能是由于历史大海草场的遗留小片段居群产生, 而中国、韩国、日本和爱尔兰居群间的遗传分化则主要是由于地理隔离造成的。自由交配估计结果支持海草的东亚起源说。青岛湾居群遗传多样性较高, 可优先作为大叶藻移植修复的材料和基因库, 并进行重点保护。

**关键词:** 大叶藻; 居群; 微卫星; 遗传多样性; 遗传结构

中图分类号: Q346 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2013)01-0082-08

大叶藻(*Zostera marina* L.)是北半球广泛分布的一种海草, 能生长在亚热带到冷温带, 甚至是亚寒带的沿岸浅水区<sup>[1]</sup>。大叶藻可为一些重要的经济鱼类、贝类、棘皮动物等提供直接的食物来源、栖息场所、隐蔽场所和育幼场, 还能缓冲洋流和潮汐对海底基质的扰动, 并且从洋流中过滤悬浊物和营养物质, 其根和根状茎生长在沉淀物中, 具有稳定海底沉积物的作用, 从而改善海水的透明度<sup>[2,3]</sup>。由于大叶藻对水质的敏感性, 因此可以作为沿海水域环境的指示剂。1930 年, 世界范围的大叶藻海草场经历了“枯萎病”, 导致大叶藻几近灭绝, 而如今世界范围内的大叶藻海草床严重退化<sup>[4,5]</sup>, 许多地方的大叶藻居群正承受着环境和基因的双重压力, 出现了一些顶梢枯死的现象<sup>[5]</sup>, 我国的大叶藻海草床亦未能幸免<sup>[6]</sup>。

随着分子生物学技术的应用, 关于大叶藻的遗传学分析有了更为深入的研究<sup>[7]</sup>。同工酶研究结果显示, 大叶藻居群等位酶变异较少, 并不能提供足

够的信息量, 不能清楚地反映大叶藻居群遗传分化、遗传结构与其生殖策略和空间分布的关系<sup>[5,8,9]</sup>。因此, 大叶藻居群的遗传结构有待于应用多态性和灵敏度更高的分子标记进行探讨。微卫星(SSR)标记具有多态性高、突变快、杂合度高、共显性等特点, 已被广泛应用于海洋生物遗传多样性研究<sup>[10]</sup>。迄今, 国外学者利用 SSR 标记开展了一些大叶藻居群遗传学研究。Reusch<sup>[11]</sup>利用 SSR 技术对瓦伦登海和波罗的海两个海域的大叶藻进行相关性研究, 发现瓦伦登海海域大叶藻的有效种群较大, 且居群间基因交流较频繁; Olsen, *et al.*<sup>[3]</sup>对北半球 49 个大叶藻居群进行了 SSR 研究, 探讨了大叶藻的历史传播途径, 并发现北欧海域的大叶藻遗传多样性较高; Campanella, *et al.*<sup>[5]</sup>利用 SSR 标记技术对新泽西巴尼加特湾 8 个大叶藻居群进行了遗传学研究, 并以此判断适合作为移植修复的居群; Oetjen, *et al.*<sup>[12]</sup>开发了 15 对大叶藻 SSR 引物, 并结合 SNP 分子标记对瓦伦登海海域大叶藻居群的特定生境选择进行了研究。目

收稿日期: 2011-10-24; 修订日期: 2012-10-09

基金项目: 海洋公益性行业科研专项(201105005); 国家自然科学基金(30700615)资助

作者简介: 孙典荣(1973—), 男, 广东揭阳市人; 副研究员; 研究方向为海洋渔业与海洋生态研究。Tel: 020-89108341; E-mail: drsun73@163.com

通信作者: 高天翔, E-mail: gaotianxiang@ouc.edu.cn

前, 国内尚未见到对海草尤其是大叶藻居群遗传学研究的相关报道。本研究采用 4 对 SSR 引物, 对 7 个不同地理居群的大叶藻遗传多样性进行了研究, 研究结果不仅可为我国大叶藻资源现状的评价、管理和移植修复提供遗传背景资料和科学依据, 同时也将充实海草保护遗传学资料, 对于有类似分布和生物学特性的其他海草类群也具有重要的借鉴和参考价值。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

本研究所用大叶藻样品分别采自中国的威海俚岛、威海天鹅湖、青岛湾、大连近海以及日本东京湾、韩国内浦和爱尔兰克莱尔郡近海(图 1)。样品采集后用海水洗净, 取新鲜叶片放入装有硅胶的离心管中, 或将新鲜样品浸于海水直接带回实验室。采样时, 为确保所采样品为不同植株, 植株间隔至少在 2 m 以上。每个地点随机采取 24 株植株, 7 个居群共 168 株大叶藻样品。

### 1.2 实验方法

**基因组 DNA 提取** 取适量大叶藻新鲜叶片或干燥叶片, 参照 Ban<sup>[13]</sup>的 CTAB(Cetyltrimethylammonium bromide)法并加以改良来提取基因组 DNA, 将乙醇沉淀后的基因组 DNA 溶解于 100  $\mu$ L 蒸馏水中, 4 $^{\circ}$ C 保存备用。取提取的 DNA 3  $\mu$ L 用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 以备之后的 PCR 扩增。

**微卫星分析** 在前期实验的基础上, 本研究选用了 4 对多态性较高的微卫星引物<sup>[14, 15]</sup>, DNA 扩增按照各引物的 PCR 反应条件和程序进行。PCR 反应体积为 10  $\mu$ L, 各反应均设阴性对照以检查是否有 DNA 污染。取 1.5  $\mu$ L 扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测, 并以核酸分子量标准 Marker 作对照, 在

紫外透射分析仪上检测所需的条带, 8% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分型、银染和显影。

### 1.3 数据分析

使用 POPGENE 软件计算等位基因数( $A$ )、观测杂合度( $H_o$ )、期望杂合度( $H_e$ )。使用 GENEPOP 软件进行 Hardy-Weinberg 平衡检验与连锁不平衡检验。所有多重检验的显著性标准用连续 Bonferroni 法进行校正。根据 Bostein, *et al.*<sup>[16]</sup>方法和等位基因丰富度(Allelic richness,  $AR$ ), 应用 MS tools 工具计算获得多态信息含量  $PIC$ (Polymorphism Information Content)。用 MICRO-Checker 软件评估每个位点的无效等位基因。

利用软件 FSTAT 对两两群体间的遗传分化指数  $F_{st}$  进行量化分析, 并对其进行显著性多重检验。利用 MEGA 4.1 构建 UPGMA 系统树, 重复计算 10000 次获得各分支的支持率。运用 STRUCTURE 软件推导最可能自由交配群。

## 2 结果

### 2.1 居群遗传多样性

对大叶藻居群的微卫星分析结果表明, 148 株大叶藻个体检测到 57 个等位基因, 7 个居群的大叶藻在 4 个微卫星位点上等位基因数为 2—14, 每个位点平均等位基因数为 6, 多态性适中(表 1)。平均观测杂合度为 0.417, 平均期望杂合度 0.687。各位点观测杂合度( $H_o$ )在 0.330(CT-3)—0.517(CT-17H)变化, 各居群的  $H_o$  范围在 0.283(天鹅湖居群)—0.538(爱尔兰克莱尔郡居群); 各位点期望杂合度( $H_e$ )为 0.528 (CT-35)—0.8131(CT-17H), 各居群的  $H_e$  范围为 0.240(天鹅湖居群)—0.910(爱尔兰克莱尔郡居群)。  $F_{is}$  值范围在 -0.135(CT-35)—0.823(CT-17H)。等位基因丰富度( $AR$ )在各居群的范围为 4.543—7.043, 俚

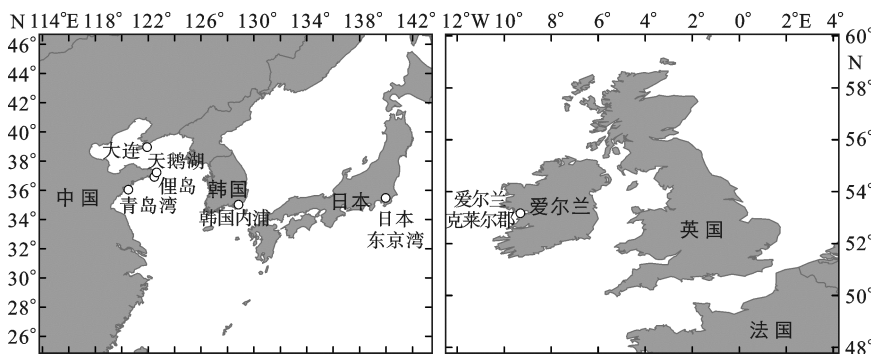


图 1 大叶藻采样地点

Fig. 1 Sampling sties of *Z. marina*

岛居群最低, 最高值出现在青岛湾居群, 平均  $AR$  值为 5.727。以青岛湾居群的遗传多样性最高 ( $A=7.750$ ,  $AR=7.043$ ), 俚岛居群最低 ( $A=4.750$ ,  $AR=4.543$ )。

根据各位点等位基因在 7 个大叶藻居群中的分布频率(数据未显示), 发现 CT-35 位点等位基因 CT-35-3 和 CT-35-7—13 与群体具有显著的相关性(列联表检验

表 1 大叶藻 7 个居群 4 个微卫星位点的遗传多样性指标  
Tab. 1 Genetic diversity indices for four microsatellite loci in seven populations of *Z. marina*

位点 Loci		俚岛 LD	天鹅湖 TEH	青岛湾 QB	大连 DL	内浦 KN	东京湾 TB	克莱尔郡 IF
CT-3	A	6	10	10	8	8	7	2
	$He$	0.770	0.822	0.860	0.839	0.803	0.817	0.514
	$Ho$	0.500	0.375	0.167	0.333	0.250	0.500	0.188
	$PIC$	0.713	0.780	0.826	0.801	0.762	0.768	0.374
	$F_{is}$	0.355	0.549	0.810	0.608*	0.693	0.394	0.643
	AR	5.560	8.745	9.377	7.839	7.516	6.451	2.000
CT-35	A	3	3	3	3	8	2	10
	$He$	0.377	0.240	0.520	0.638	0.770	0.241	0.910
	$Ho$	0.208	0.174	0.292	0.571	0.458	0.273	0.895
	$PIC$	0.325	0.220	0.447	0.551	0.719	0.208	0.875
	$F_{is}$	0.452	0.279	0.445*	0.106	0.410*	-0.135	0.018
	AR	2.894	2.906	2.997	3.000	7.250	2.000	9.950
CT-20	A	5	6	4	3	6	5	5
	$He$	0.701	0.621	0.299	0.520	0.772	0.748	0.757
	$Ho$	0.458	0.333	0.208	0.375	0.542	0.435	0.524
	$PIC$	0.630	0.571	0.274	0.447	0.716	0.687	0.701
	$F_{is}$	0.351	0.468	0.307	0.284	0.303	0.424*	0.314
	AR	4.787	5.525	3.558	2.997	5.560	4.974	4.990
CT-17H	A	5	7	14	9	6	5	7
	$He$	0.754	0.803	0.887	0.838	0.827	0.776	0.807
	$Ho$	0.136	0.250	0.833	0.833	0.350	0.667	0.546
	$PIC$	0.692	0.754	0.858	0.798	0.778	0.718	0.758
	$F_{is}$	0.823	0.693	0.062	0.005	0.583*	0.144	0.329
	AR	4.930	6.328	12.238	8.336	5.998	4.998	6.654
Mean	A	4.750	6.500	7.750	5.750	7.000	4.750	6.000
	$He$	0.650	0.621	0.642	0.709	0.793	0.646	0.747
	$Ho$	0.326	0.283	0.375	0.528	0.400	0.469	0.538
	$F_{is}$	0.505	0.550	0.421	0.259	0.501	0.279	0.286
	AR	4.543	5.876	7.043	5.543	6.581	4.606	5.899

注: A: 等位基因数;  $He$ : 期望杂合度;  $Ho$ : 观测杂合度;  $PIC$ : 多态信息含量; AR: 等位基因丰富度;  $F_{is}$ : Fisher 指数,  $P < 0.05$ ; \*Bonferroni 校正后仍显著

$P < 0.01$ )。CT-35-3 在北太平洋区域的 6 个居群(中国、韩国和日本居群)相对其他等位基因具有较高频率(31.251%—86.362%), 而 CT-35-9—13 只在北大西洋区域的爱尔兰居群中存在, CT-35-7—8 同样在爱尔兰居群中具有较高频率(图 2)。

## 2.2 遗传结构分析

结果显示, 大叶藻 7 个地理居群间存在明显的遗传分化(表 2)。从  $F_{st}$  数值来看, 青岛与大连居群间最小, 为 0.051; 最大值为 0.261, 出现在天鹅湖与爱尔兰克莱尔郡居群之间; 国内居群  $F_{st}$  最大值出现在天鹅湖和大连居群间, 为 0.189; 国内居群与国

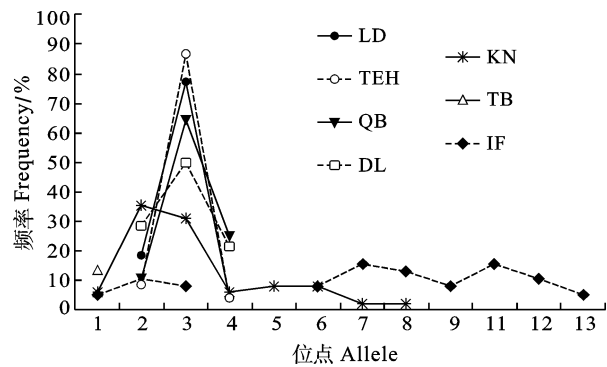


图 2 CT-35 等位基因在 7 个大叶藻居群中的频率分布图  
Fig. 2 Frequency distribution of allele CT-35 in seven populations of *Z. marina*

表 2 大叶藻两两群体间  $F_{st}$   
Tab. 2 Pairwise  $F_{st}$  among populations of *Z. marina*

	LD	TEH	QB	DL	KN	TB	IF
俚岛 LD							
天鹅湖 TEH	0.164**						
青岛湾 QB	0.121*	0.173**					
大连 DL	0.118*	0.189	0.051**				
内浦 KN	0.121**	0.180**	0.133*	0.110			
东京湾 TB	0.158**	0.132	0.197**	0.218**	0.161**		
克莱尔郡 IF	0.231**	0.261**	0.245**	0.216**	0.111	0.249*	

注: \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$

外居群  $F_{st}$  最小值出现在大连和韩国内浦居群间, 为 0.110。从  $F_{st}$  显著性来看, 极显著值 ( $P<0.01$ ) 出现在俚岛与天鹅湖、韩国内浦、日本东京湾、爱尔兰克莱尔郡居群间, 天鹅湖与青岛湾、日本东京湾、爱尔兰克莱尔郡居群间, 青岛湾与大连、韩国内浦、爱尔兰克莱尔郡居群间, 大连与韩国内浦、爱尔兰克莱尔郡居群间, 韩国内浦与日本东京湾居群间。俚岛与青岛湾、大连居群间, 青岛湾与日本东京湾居群间, 韩国内浦与爱尔兰克莱尔郡居群间差异显著 ( $P<0.05$ )。

利用 MEGA 4.1 构建的 UPGMA 系统树显示: 青岛和大连两居群先聚类, 然后与俚岛和天鹅湖居群聚类; 国内大叶藻居群与韩国内浦大叶藻聚类后, 再与日本东京湾居群聚到一起, 最后与北大西洋区的爱尔兰居群聚类(图 3)。

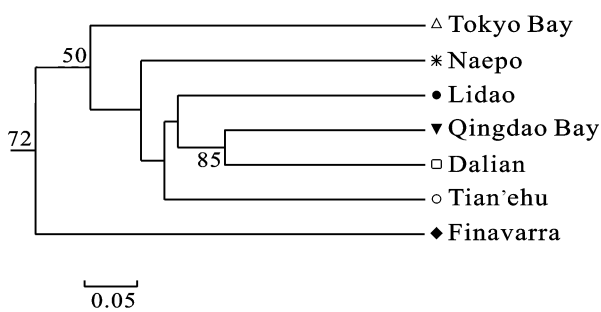


图 3 基于 7 居群大叶藻间遗传距离构建的 UPGMA 树

Fig. 3 UPGMA tree based on genetic distance of seven *Z. marina* populations

分支上的数字表示检验重复 1000 次所得的大于 50% 的支持率  
Only bootstrapping (1000 replicates) values over 50% are shown.

### 2.3 自由交配估计

运用 STRUCTURE 软件, 根据等位基因频率不相关假设 (Allele frequencies independent assumption)<sup>[17]</sup>, 总样本的预测自由交配组数为  $K=2$ (图 4)。

基于微卫星分子标记的个体分配模式显示, 国内 4 个大叶藻居群(俚岛、青岛湾、大连和天鹅湖)的绝大部分(87%以上)被分配在二号自由交配群(图 4, 灰色部分; 表 3), 尤其是俚岛居群, 96.8%被分配到二号自由交配群; 国外 3 个大叶藻居群(韩国内浦、日本东京湾和爱尔兰克莱尔郡)的绝大部分(76%以上)被分配在一号自由交配群(图 4, 黑色部分; 表 3), 尤其是爱尔兰克莱尔郡居群, 几乎全部(98.6%)被分配于一号自由交配群。

### 3 讨论

物种的遗传多样性是长期进化的产物, 是其生存适应和发展进化的前提<sup>[18]</sup>。物种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<sup>[19]</sup>; 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。因此, 通过遗传多样性研究, 除了可以了解物种的进化历史, 也可以为分析物种的进化潜力和预测物种发展方向提供重要依据。

本研究基于微卫星分子标记对中国、韩国、日本和爱尔兰 7 个居群的大叶藻遗传多样性进行了分析, 由于所承受的环境压力不同(如: 海流、温度、底质、光照、其他藻类的繁殖竞争等), 各居群表现出不同的遗传多样性及不同的遗传结构。研究结果显示, 7 个大叶藻居群观测杂合度(0.283—0.538)明显低于期望杂合度(0.621—0.793), 表明 7 个大叶藻居群间交流很少, 自交或者无性生殖过多。对于大叶藻而言, 这种现象较为常见。Campanella, *et al.*<sup>[5, 20]</sup>在对新西兰巴尼加特湾和西大西洋沿海的大叶藻居群研究中也得到相同的结果; 而 Reusch, *et al.*<sup>[15]</sup>则得到观测杂合度与期望杂合度相差不大的结果。等位基因丰富度高意味着适应能力更强, 与其他居群交流频繁<sup>[20]</sup>。7 个大叶藻居群的平均等位基因丰

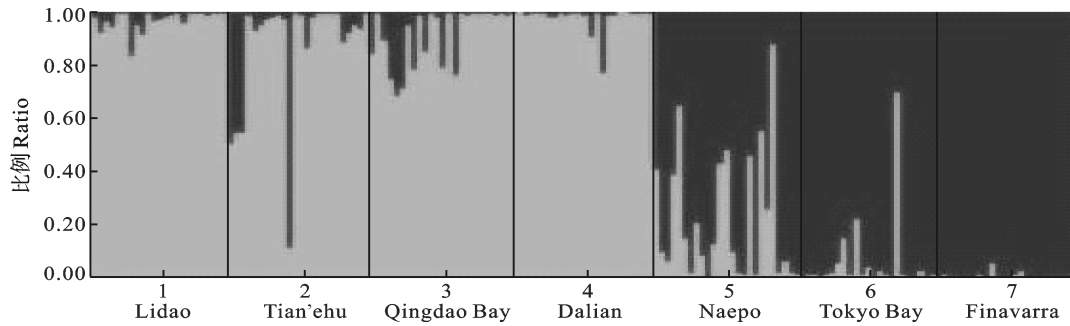


图 4 基于 4 个微卫星位点运算得到的 7 个大叶藻居群的 STRUCTURE 条形图( $K=2$ )

Fig. 4 Structure bar plots ( $K=2$ ) from four microsatellite loci for seven populations of *Z. marina*.

表 3 分配模式检验得到的 7 个大叶藻居群在 2 个自由交配群中的分布比例

Tab. 3 Proportion of seven populations of *Z. marina* in each two inferred clusters

地理居群 Populations	推断遗传群 Inferred cluster		株数 Sample number
	1	2	
俚岛 LD	0.034	0.968	24
天鹅湖 TEH	0.130	0.870	24
青岛湾 QB	0.092	0.908	24
大连 DL	0.025	0.975	24
内浦 KN	0.768	0.232	24
东京湾 TB	0.937	0.063	24
克莱尔郡 IF	0.986	0.014	24

富度为 5.727, 低于西大西洋沿海(6.3)<sup>[20]</sup>, 而高于加拿大海域(4)<sup>[3]</sup>居群。多态信息含量(PIC)最初用于连锁分析主要是对基因多态性的估计, 现常用于表示微卫星 DNA 的变异程度, 反映微卫星位点多态性的高低。Botstein, *et al.*<sup>[21]</sup>首先提出了衡量基因变异程度的多态信息含量指标: 当  $PIC > 0.500$  时, 表明该位点具有高度多态性; 当  $0.250 < PIC < 0.500$  时, 该位点为中度多态性位点; 而  $PIC < 0.250$  位点则可认为是低度多态性位点。在本研究中, 除 CT-35 和 CT-20 在个别居群为中度多态位点外, 其余位点均为高度多态位点, 这与遗传多样性信息一致。研究结果表明, 基于微卫星分子标记得到的大叶藻遗传变异程度总体上处于一个较高的水平, 选择潜力较大。

大叶藻同时具有有性生殖和无性生殖两种生殖策略, 但是大量研究证明大叶藻只进行有限的有性生殖, 这样就限制了花粉的杂交, 基因的流动<sup>[22]</sup>。在有关大叶藻的研究调查中, 自交现象几乎出现在每一个地点的居群中, 杂交的机率很小<sup>[3, 5, 15, 20]</sup>。Campanella, *et al.*<sup>[5]</sup>提出大叶藻杂合度较低, 居群内自交高于杂交的特征似乎已经适应了它的生活环境,

尽管至今尚无实验完全证明这一观点, 但是 Palstra 和 Ruzzante<sup>[23]</sup>的确观察到大叶藻居群大小大于最小理论有效居群大小。Wright<sup>[24]</sup>提出了  $F_{st}$  值分化程度范围:  $0.050 < F_{st} < 0.150$  时为中度分化;  $F_{st}$  值  $< 0.050$  时为低度分化, 也就意味着居群间基因交流较频繁。由表 2 可以看出, 本研究中的 7 个大叶藻居群间属于中度分化, 居群间基因交流较低。

由自由交配估计(图 4)可以看出, 国内 4 个大叶藻居群几乎全部被分配在二号自由交配群中, 与中国居群地理距离越远的居群被分配到二号自由交配群的比例越少, 以致爱尔兰居群几乎全被分配到一号自由交配群中。由 UPGMA 树也可以看出, 中国大叶藻居群首先聚类, 与韩国内浦居群聚类后, 再与日本东京湾居群聚类, 最后与爱尔兰克莱尔郡居群聚类, 这与自由交配估计结果相吻合。西北太平洋海域的海草物种多样性非常高, 在之前的大叶藻起源的探讨中, 就曾有学者提出海草的东亚起源说<sup>[1, 25, 26]</sup>。由自由交配估计可以看出亚洲居群几乎全部属于二号自由交配群, 随着地理距离的增加, 二号自由交配群的比例大幅下降, 这一结果间接支持了海草东亚起源说。

目前, 尽管大叶藻的扩散途径并不十分明确, 但中国大叶藻与其他居群分属不同的进化支, 遗传距离较大, 基因流水平很低, 海运活动并不能促使中国、韩国、日本和爱尔兰大叶藻居群间的基因交流, 据此推测地理隔离造成了大叶藻居群间的遗传差异, 长时间的独立进化和相互间缺乏基因流进而导致其分化。目前, 已有很多研究证实了地理隔离造成遗传分化<sup>[13, 27-31]</sup>。国内 4 个大叶藻居群并未表现出地理距离与遗传的相关性, 可能是由于山东半岛和辽东半岛以前是一大片连续的海草场, 而青岛湾和大连居群则是大海草场退化后的小片段居群,

保留了更多的原始遗传结构信息<sup>[3, 32, 33]</sup>, 在小片段居群恢复期间, 受各自周边复杂的水文栖息环境影响, 导致其发生不同的奠基者效应、瓶颈效应和遗传漂变<sup>[5]</sup>。

微卫星标记的高变异率赋予其很强的检测细微居群空间分化的能力<sup>[34]</sup>。在资源管理保护时, 微小的居群阳性分化对资源的安全具有重大意义。分辨率强而且可靠性高的微卫星标记研究适合于大叶藻资源管理, 但目前关于大叶藻的微卫星引物很少, 而且并不一定都适用, 需开发新的微卫星标记。此外, 本研究所用的 7 个大叶藻居群地理跨度较大, 虽然能反映一定的遗传信息, 但由于没有在大叶藻的分布范围内连续采样, 并不清楚大叶藻的扩散路径及整体的遗传结构特征。因此, 今后有必要增加样品数量, 开发新的微卫星引物。

McKay, *et al.*<sup>[35]</sup>认为, 由于海草移植引进新的基因型或者单倍型, 可能造成两方面的遗传污染 (Genetic pollution)。首先, 引入新的基因型或者单倍型可能产生较大的遗传压力, 导致海草移植修复的失败。其次, 新引入的基因型植株可能在短时期内大量繁殖, 使早已适应本地环境的土著植株锐减, 同样没有达到移植修复提高遗传多样性的目的; 而且不同的基因型植株都有不同的生活史, 其适应环境不同, 新引进的基因型植株可能并不适应新的生长环境, 致使成活率低下, 甚至全部死亡<sup>[36]</sup>。从本地环境中引入移植修复植株是至关重要的, 但是不能在不同地点间进行简单的移植, 这样可维持自然居群的遗传结构。遗传多样性是移植中需要考虑的一个重要因素, 多样性较低则可能不足以应对外间环境和繁殖策略的变化; 相反, 较高的遗传多样性可以应对外界环境的变化, 并且减少自交的几率。大叶藻移植修复时, 应该采用遗传多样性高的本地居群, 并对遗传多样性低的居群进行重点保护。

#### 致谢:

感谢江鑫博士、胡自民博士、郭栋、吴忠鑫以及日本东京大学小松辉久教授在样品的采集过程中给予的极大帮助。

#### 参考文献:

[1] den Hartog C. The Seagrasses of the World [M]. Amsterdam: North Holland Publication Co. 1970, 1—275

- [2] Hemminga M, Duarte C. Seagrass Ecology [M]. Cambridge: Cambridge University Press. 2000, 1—32
- [3] Olsen J L, Stam W T, Coyer J A, *et al.* North Atlantic phylogeography and large-scale population differentiation of the seagrass *Zostera marina* L. [J]. *Molecular Ecology*, 2004, **13**(7): 1923—1941
- [4] Orth R J, Luckenbach M, Marion S R, *et al.* Seagrass recovery in the Delmarva coastal bays, USA [J]. *Aquatic Botany*, 2006, **84**(1): 26—36
- [5] Campanella J J, Bologna P A X, Smith S M, *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
- [6] Li W T, Zhang X M. The ecological functions of seagrass meadows [J]. *Periodical of Ocean University of China*, 2009, **39**(5): 933—939 [李文涛, 张秀梅. 海草场的生态功能. 中国海洋大学学报, 2009, **39**(5): 933—939]
- [7] Li Y, Li W T, Sun D R, *et al.* Phylogenetic relationships in zosteraceae based on *matK* and *ITS* nucleotide sequences [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2011, **35**(6): 900—907 [李渊, 李文涛, 孙典荣, 等. 基于 *matK* 基因和 *ITS* 序列探讨大叶藻科的系统发育关系. 水生生物学报, 2011, **35**(6): 900—907]
- [8] De Heij H, Nienhuis P H. Intraspecific variation in isozyme patterns of phenotypically separated populations of *Zostera marina* L. in the south-western Netherlands [J]. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 1992, **161**(1): 1—14
- [9] Williams S, Orth R J. Genetic diversity and structure of natural and transplanted eelgrass populations in the Chesapeake and Chincoteague Bays [J]. *Estuaries*, 1998, **21**(1): 118—128
- [10] Liu B Q, Zeng Q G, Wang Y J, *et al.* The cross-species amplification and validation of EST-SSR loci in *Porphyra haitanensis* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2007, **31**(2): 149—154
- [11] Reusch T B H. Microsatellites reveal high population connectivity in eelgrass (*Zostera marina*) in two contrasting coastal areas [J]. *American Society of Limnology and Oceanography*, 2002, **47**(1): 78—85
- [12] Oetjen K, Ferber S, Dankert I, *et al.* New evidence for habitat-specific selection in Wadden Sea *Zostera marina* populations revealed by genome scanning using SNP and microsatellite markers [J]. *Marine Biology*, 2010, **157**(1): 81—89
- [13] Ban Y. Methods of DNA and RNA isolation of *Oryza sativa* [A]. In: Shimamoto K, Sasaki T (Eds.), PCR Experiments Protocol of Plants [C]. Tokyo: Shujunsha. 1997, 34—40
- [14] Reusch T B H, Stam W T, Olsen J L. Microsatellite loci in

- eelgrass *Zostera marina* reveal marked polymorphism within and among populations [J]. *Molecular Ecology*, 1999, **8**(2): 317—321
- [15] Reusch T B H. Five microsatellite loci in eelgrass *Zostera marina* and a test of cross-species amplification in *Z. noltii* and *Z. japonica* [J]. *Molecular Ecology*, 2000, **9**(3): 365—378
- [16] Botstein D, White R L, Skolnick M, *et al.* Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms [J]. *American Journal of Human Genetics*, 1980, **32**(3): 314—331
- [17] Falush D, Stephens M, Pritchard J. Inference of population structure from multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies [J]. *Genetics*, 2003, **164**: 1567—1587
- [18] Soltis P S, Soltis D E. Genetic variation in endemic and widespread plant species examples from Saxifragaceae and Polystichum [J]. *Aliso*, 1991, **13**(1): 215—223
- [19] Huenneke L F. Ecological implications of genetic variation in plant populations [A]. In: Falk D A, Holsinger K E (Eds.), *Genetics and Conservation of Rare Plants* [C]. New York: Oxford University Press. 1991, 31—44
- [20] Campanella J J, Bologna P A X, Smith S M, *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
- [21] Botstein D, White R L, Skolnick M, *et al.* Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms [J]. *American Journal of Human Genetics*, 1980, **32**(3): 314—331
- [22] Laushman R H. Population genetics of hydrophilous angiosperms [J]. *Aquatic Botany*, 1993, **44**(2): 147—158
- [23] Palstra F P, Ruzzante D E. Genetic estimates of contemporary effective population size: what can they tell us about the importance of genetic stochasticity for wild population persistence [J]? *Molecular Ecology*, 2008, **17**(15): 3428—3447
- [24] Wright S. *Evolution and the genetics of populations* [A], Volume 4: Variability within and among Natural Populations [C]. Chicago: University of Chicago Press. 1978, 65—134
- [25] Aioi K. A daybreak in the studies on Japanese *Zostera* beds (in Japanese with English abstract) [J]. *Aquabiology*, 2000, **22**(6): 516—523
- [26] Tanaka N, Kuo J, Omori Y, *et al.* Phylogenetic relationships in the genera *Zostera* and *Heterozostera* (Zosteraceae) based on *marK* sequence data [J]. *Journal of Plant Research*, 2003, **116**(4): 273—279
- [27] Jones T C, Gemmill C E C, Pilditch C A. Genetic variability of New Zealand seagrass (*Zostera muelleri*) assessed at multiple spatial scales [J]. *Aquatic Botany*, 2008, **88**(1): 39—46
- [28] Rose C G, Paynter K T, Hare M P. Isolation by distance in the Eastern oyster, *Crassostrea virginica*, in Chesapeake Bay [J]. *Journal of Heredity*, 2006, **97**(2): 158—170
- [29] Liu J X, Gao T X, Yokogawa K, *et al.* Differential population structuring and demographic history of two closely related fish species, Japanese sea bass (*Lateolabrax japonicus*) and spotted sea bass (*Lateolabrax maculatus*) in Northwestern Pacific [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2006, **39**(3): 799—811
- [30] Liu J X, Gao T X, Wu S F, *et al.* Pleistocene isolation in the Northwestern Pacific marginal seas and limited dispersal in a marine fish, *Chelon haematocheilus* (Temminck & Schlegel, 1845) [J]. *Molecular Ecology*, 2007, **16**(2): 275—288
- [31] Palumbi S R, Grabowsky G, Duda T, *et al.* Speciation and population genetic structure in tropical Pacific sea urchins [J]. *Evolution*, 1997, **51**(5): 1506—1517
- [32] Hewitt G M. Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation [J]. *Biology Journal of the Linnean Society*, 1996, **58**(3): 247—276
- [33] Widmer A, Lexer C. Glacial refugia: sanctuaries for allelic richness, but not for gene diversity [J]. *Trends in Ecology and Evolution*, 2001, **16**(6): 267—269
- [34] Li C, Liu H, Huang R, *et al.* Identification of type I microsatellite markers and their polymorphism in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2011, **35**(4): 681—688 [李偲, 刘航, 黄容, 等. 草鱼型微卫星标记的发掘及其多态性检测. 水生生物学报, 2011, **35**(4): 681—688]
- [35] McKay J K, Christian C E, 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
- [36] Johannesson K, André C. Life on the margin: genetic isolation and diversity loss in a peripheral marine ecosystem, the Baltic Sea [J]. *Molecular Ecology*, 2006, **15**(8): 2013—2029

## GENETIC DIVERSITY IN POPULATIONS OF *ZOSTERA MARINA* L. INFERRED FROM NUCLEAR SSR MARKERS

SUN Dian-Rong<sup>1</sup>, LI Yuan<sup>2</sup>, LI Wen-Tao<sup>2</sup> and GAO Tian-Xiang<sup>2</sup>

(1. South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Science, Guangzhou 510300, China;

2. Institute of Evolution and Marine Biodiversity, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

**Abstract:** Seagrasses are angiosperms that are thought to have become adaptive to aquatic environment independently. The marine, monocotyledonous *Zostera marina* is a species of Zosteraceae using traditional classifications, which widely distributes from subtropical to subfrigid coastal oceans. Seven natural populations of *Z. marina* (Lidao, Tian'ehu, Qingdao Bay, Dalian, Naepo, Tokyo Bay and Finavarra) were used in this study. To study the mechanism of the genetic diversity and population structure of the seven populations, microsatellite marker (SSR) analysis was done. A total of 57 alleles were identified in 148 individuals across the four microsatellite primers analyzed, with a mean value of 6 alleles per locus. The mean expected heterozygosity ( $H_e$ ) and observed heterozygosity ( $H_o$ ) across all populations were 0.687 and 0.417, respectively, and a higher level of diversity was found in the population from the Qingdao Bay ( $A=7.750$ ,  $AR=7.043$ ) than other populations. The minimum  $F_{st}$  value was 0.051 between the populations from the Qingdao Bay and Dalian. The maximum  $F_{st}$  value was 0.261 between the populations from Tian'ehu and Finavarra. The  $F_{st}$  values suggested moderate genetic differentiation within most of the *Z. marina* populations. From the UPGMA tree, four populations in China (Lidao, Tian'ehu, Qingdao Bay and Dalian) clustered together, and the genetic relationships may be attributed to eelgrass meadow fragmentation. The geographic distance was responsible for the genetic differentiation from large-scale among populations in China (Lidao, Tian'ehu, Qingdao Bay and Dalian), Korea (Naepo), Japan (Tokyo Bay) and Ireland (Finavarra). Results of possible number of clusters supported that this seagrass species originated from East Asia. The population from the Qingdao Bay has higher genetic diversity, suggesting that populations in this region demand prioritized conservation and utilization for breeding programs.

**Key words:** *Zostera marina*; Population; Microsatellite; Genetic diversity; Genetic structure