

研究简报

满江红鱼腥藻遗传多样性的 RAPD 分析

陈 坚¹ 郑伟文² 宋铁英² 徐国忠¹ 唐龙飞¹

(1. 福建省农业科学院红萍研究中心, 福州 350013; 2. 福建省农业科学院生物技术中心, 福州 350003)

THE GENETIC DIVERSITY OF *ANABAENA AZOLLAE* BASED ON RAPD ANALYSIS

CHEN Jian¹, ZHENG WeiWeng², SONG TieYing², XU Guo-zhong¹ and
TANG Long-fei¹

(1. *Azolla* Research Center, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350013;

2. *Biotchnology* Research Center, Fuzhou 350003)

关键词: 满江红鱼腥藻; 满江红; 遗传多样性; 随机扩增多态 DNA

Key words: *Anabaena azollae*; *Azolla*; Genetic diversity; RAPD analysis.

中图分类号: Q 949.2 文献标识码: A 文章编号: 1000- 3207(2001) 05- 0531- 04

共生在水生蕨类植物满江红(又称“红萍”: *Azolla*) 叶腔中的固氮蓝细菌曾被认为是一个种满江红鱼腥藻(*Anabaena azollae* Strash.). 但由于现存的满江红在分类学上有 2 个亚属, 7 个种^[1], 对不同满江红叶腔中鱼腥藻的鉴别, 多年来引起人们的重视。80 年代, 鱼腥藻的单克隆抗体和 RFLP 的研究, 发现了它与宿主分类上一定程度的对应关系^[2, 3]。90 年代以后, Van Coppenolle 和 Eskew 分别以 RAPD-PCR 和 DAF-PCR 对从满江红共生体中提取的 DNA 进行了分析^[4, 5], 但后者发现了共生体中藻的 DNA 对整个 PCR 产物的干扰作用会影响满江红属本身系统分类。近年来对满江红鱼腥藻的脂肪酸组分, *nif* 基因 RFLP 和 STRR 序列 PCR 产物指纹分析, 建立了各自的聚类分支图^[6-8], 其间的结果有所差异。为此作者对征集的 16 种不同种属和地域来源的满江红叶腔中分离出来的鱼腥藻进行了 RAPD 分析, 探讨了满江红鱼腥藻的遗传多样性。

1 材料和方法

1.1 材料 满江红植物样本的来源见表 1。 满江红无菌鱼腥藻的获得按文献^[9]方法, 剥离及处理按文献[7]的方法进行。

1.2 RAPD 分子标记 满江红鱼腥藻按[7]法, 取适量藻细胞直接进行 PCR 反应。PCR 扩增反应在 25 μ L 反应体系中进行: 体系中包括 2.5 μ L 的 10X PCR 反应缓冲液, 200 μ mol/L 的每种 dNTP, 10pmol 的

收稿日期: 2000- 12- 10; 修订日期: 2001- 03- 20

基金项目: 福建省自然科学基金(编号 B9910024); 福建省科技厅中- 瑞国际合作研究计划资助

作者简介: 陈 坚(1965-), 男, 福建省福州市人; 副研究员; 主要从事植物生理生化和分子生物学研究

表 1 16 种参试的满江红及其来源
Tab. 1 16 *Azolla* accessions and their origins

样品号 Sample No.	保存编号* Accession code	来源地 Collection origin	现有植物分类状况 Taxonomic status	
			亚属 Subgenus	种(变种) Species(Variety)
1	1001	前东德 Germany	三 膘 (<i>Azolla</i>)	蕨状满江红 (<i>A. filiculoides</i>)
2	1010	秘 鲁 Peru		
3	1043	巴 西 Brazil		
4	2002	圭亚那 Guyana		墨西哥满江红 (<i>A. mexicana</i>)
5	2003			
6	3001	美国 USA		卡洲满江红 (<i>A. caroliniana</i>)
7	3501	哥伦比亚 Colombia		
8	4018	巴拉圭 Paraguay		小叶满江红 (<i>A. microphylla</i>)
9	4060	菲律宾 Philippines		
10	409	菲律宾 Philippines	九 膘 (<i>Rhizosperma</i>)	覆瓦状满江红 (<i>A. imbricata</i> var.)
11	415	泰 国 Thailand		
12	418	越 南 Vietnam		
13	505	福建莆田 Fujian Putian		
14	511	福建宁德 Fujian Ningde		
15	575	山 东 Shandong		
16	7004	澳大利亚 Australia		羽叶满江红 (<i>A. pinnata</i> var.)

* 为福建省农业科学院红萍研究中心资源圃编号 Accession code used by *Azolla* germplasm of *Azolla* research center, FAAS.

随机引物,对文献[4]中所用的全部22种10 mer引物进行筛选,有7种能对藻细胞进行较稳定的扩增反应。其引物号和顺列为:OPA13 CAGCACCCAC; OPB07 GGTGACGCAG; OPB08 GTCCACACGG; OPC05 GATGACCGCC; OPC07 GTCCCGACGA; OPC08 TGGACCGGTG; OPD07 TTGGCACGGG,1个单位TaqDNA聚合酶(均购自上海Sangon),并加入1μL的藻细胞。反应在PTC-100热循环仪(MJ)中进行,并按[7]中程序进行PCR扩增和电泳,在Gel Doc 2000凝胶成像系统(Bio Rad)上观察并贮存图像,用系统所带有的软件(Quantity One)进行带的识别和带型的定义比较,计算相似性系数(Dice系数)矩阵 S_D ,建立UPGMA系统聚类分析树状图。

2 结果与分析

2.1 RAPD扩增状况 筛选出的7个引物对16种满江红鱼腥藻有很强的扩增能力,共产生106条可区分的带,其多态性位点的比例在80%以上。如图1所示其中引物OPB07的扩增状况。

2.2 遗传关系 根据7个引物对16个样本的RAPD-PCR产生的相似系数(Dice系数)建立起来的满江红鱼腥藻的UPGMA聚类树状图(图2)可以看出:①三膘亚属和九膘亚属的满江红鱼腥藻之间存在明显的遗传差异,差异率达84%。②三膘亚属9个样本的共生藻分为蕨状和卡洲萍及小叶与墨西哥萍2个类群组。来自菲律宾的小叶满江红(样品9)的鱼腥藻变异较大。此外,2个墨西哥萍品系(样品4,5)中的鱼腥藻也有较大差异(达61%)。③九膘亚属7个样本的鱼腥藻对应宿主的2个变种,即覆瓦状满

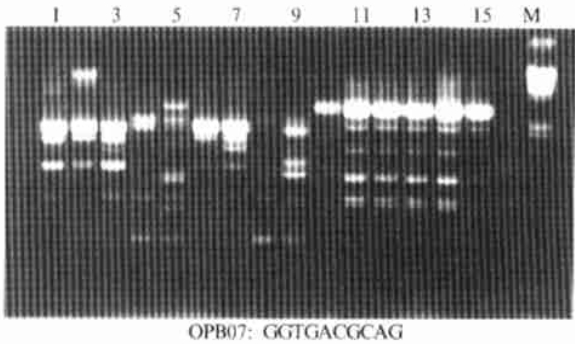


图 1 引物 OPB07 扩增的 16 个满江红鱼腥藻的带型
(M 为 *lambda* DNA/*Hind* III 分子量标记, 1—16 样品)

Fig. 1 RAPD banding pattern of 16 accessions for *Anabaena azollae* amplified by primer OPB07 (M as M W marker of *lambda* DNA/*Hind* III, Sample No. 1– 16 in Table)

江红(样品 10—15)和羽叶满江红(样品 16)明显分开。在 6 个来自不同地域的覆瓦状满江红鱼腥藻之间,来自菲律宾(样品 10)的藻发生了明显的变异外,其余 5 个藻之间相似程度较高(0.71—0.89)。

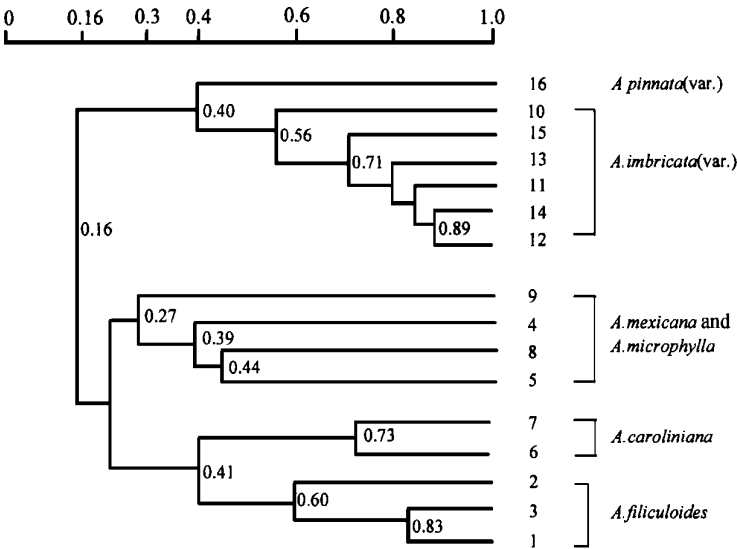


图 2 基于 RAPD 分析的满江红鱼腥藻 16 个样本的 UPGMA 树状关系图

Fig. 2 Dendrogram (UPGMA) based on RAPD for *Anabaena azollae* from 16 *Azolla* accessions

3 讨论

Caudales 根据不同种满江红叶腔内鱼腥藻的脂肪酸成分不同,提出了藻与宿主的共进化假说^[8]。但迄今只有用 RFLP 和 STRR-PCR 指纹法能将共生藻区分为三胞和九胞 2 个明显不同的类群。早期 Franche 用 *nif* HDK 的 RFLP 可进一步将三胞分为 2 个亚组,一组包括蕨状和卡洲萍的藻,另一组包括了小叶与墨西哥萍的藻^[3]。而后 Van Coppenolle 用 *nif* 基因其它 3 个片段的 RFLP 将 11 个满江红样本的鱼腥藻分为与宿主分类大致相对应的 5 个类群,但却区别不出小叶、卡洲和墨西哥萍的藻^[6]。直到近

来, Zheng 用 STR-RPCR 鉴别出了参试 18 个样本的全部 7 种满江红的鱼腥藻, 但同一个种内不同地域来源的品系间的带型没有区别^[7]。通过对满江红鱼腥藻进行的 RAPD 分析, 可以鉴别出参试的所有 16 个样本, 具有更高分辨率, 尽管从总体上看: 满江红品系间共生藻的遗传多样性程度要小于满江红种间及亚属间(如样品 1—3, 样品 6—7 和样品 11—15), 但也揭示出了在某些满江红品系间, 共生的鱼腥藻存在较高度度的遗传多样性。推测这种遗传上的分化有地理分隔的因素, 如征集于菲律宾群岛的小叶萍和覆瓦状萍中的共生藻(样品 9 和 10)在同类群中均表现出明显变异。但也不排除地域相近不同种满江红, 其共生藻间相互侵入的因素, 如源于南美圭亚那的墨西哥萍品系中可能渗入了小叶萍的共生藻。

参考文献:

- [1] Lumpkin T A, Plucknett D L. *Azolla*: botany, physiology and use as green manure[J]. *Econ Bot*, 1980, **34**: 111—153
- [2] 刘中柱等. 满江红鱼腥藻单克隆抗体的制备和研究应用[J]. 中国科学 B 辑, 1989, (1): 44—52
- [3] Franche C, Cohet Bazire G. Evolutionary divergence in the *nif* H. D. K gene region among nine symbiotic *Anabeana azollae* and between heterocystus cyanobacteria[J]. *Symbiosis*, 1987, **3**: 159—178
- [4] Van Coppenolle B. Genetic diversity and phylogeny analysis of *Azolla* based on DNA amplification by arbitrary primers[J]. *Genome*, 1993, **36**: 686—693
- [5] Eskew D L. DNA amplification fingerprinting of the *Azolla*-*Anabeana* symbiosis[J]. *Plant Mol Biology*, 1993, **21**: 363—373
- [6] Van Coppenolle B. Genetic diversity and phylogeny analysis of *Anabeana azollae* based on RFLPs detected in *Azolla*-*Anabeana azollae* DNA complex using *nif* probes[J]. *Theor Appl Genet*, 1995, **91**: 589—597
- [7] Zheng W W. Genetic diversity and classification of cyanobacteria in different *Azolla* species by the use of PCR fingerprinting[J]. *Theor Appl Genet*, 1999, **99**: 1187—1193
- [8] Caudales R. Fatty acid composition of symbiotic cyanobacteria from different host plant (*Azolla*) species: evidence for coevolution of host and symbiont[J]. *Int J Syst Bacteriology*, 1995, **45**(2): 364—370
- [9] 白克智. 无藻满江红(*Azolla*) 和满江红鱼腥藻(*Anabeana azollae*) 的分离与培养[J]. 科学通报, 1979, (14): 664—666