

研究简报

## 满江红鱼腥藻遗传多样性的 RAPD 分析

陈 坚<sup>1</sup> 郑伟文<sup>2</sup> 宋铁英<sup>2</sup> 徐国忠<sup>1</sup> 唐龙飞<sup>1</sup>

(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 AZOLLA* BASED ON RAPD ANALYSIS

CHEN Jian<sup>1</sup>, ZHENG WeiWeng<sup>2</sup>, SONG Tie Ying<sup>2</sup>, XU Guo-zhong<sup>1</sup> and  
TANG Long-fei<sup>1</sup>

(1. *Azolla Research Center, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350013;*  
2. *Biotechnology 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: Q949.2 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*)叶腔中的固氮兰细菌曾被认为是一个种满江红鱼腥藻(*Anabaena azollae* Strab.)。但由于现存的满江红在分类学上有 2 个亚属, 7 个种<sup>[1]</sup>, 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<sup>[2,3]</sup>。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<sup>[4,5]</sup>, 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<sup>[6-8]</sup>, 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<sup>[9]</sup>方法, 剥离及处理按文献<sup>[7]</sup>的方法进行。

1.2 RAPD 分子标记 满江红鱼腥藻按<sup>[7]</sup>法, 取适量藻细胞直接进行 PCR 反应。PCR 扩增反应在 25 $\mu$ L 反应体系中进行: 体系中包括 2.5 $\mu$ L 的 10X PCR 反应缓冲液, 200 $\mu$ 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		墨西哥满江红 ( <i>A. mexicana</i> )
3	1043	巴西 Brazil		卡洲满江红 ( <i>A. caroliniana</i> )
4	2002	圭亚那 Guyana		小叶满江红 ( <i>A. microphylla</i> )
5	2003			
6	3001	美国 USA		
7	3501	哥伦比亚 Colombia		
8	4018	巴拉圭 Paraguay		
9	4060	菲律宾 Philippines		
10	409	菲律宾 Philippines	九膘 ( <i>Rhizosperma</i> )	
11	415	泰国 Thailand		
12	418	越南 Vietnam		覆瓦状满江红 ( <i>A. imbricata</i> var.)
13	505	福建莆田 Fujian Putian		
14	511	福建宁德 Fujian Nide		
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。其引物号和顺序为: OPA13 CAGCACCCAC; OPB07 GGT GACG CAG; OPB08 GTCCA CACGG; OPC05 GATGACCGCC; OPC07 GTCCCGACGA; OPC08 TG GACCGGTG; OPD07 TTGGCACGGG, 1 个单位 TaqDNA 聚合酶(均购自上海 Sangon), 并加入 1 μL 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

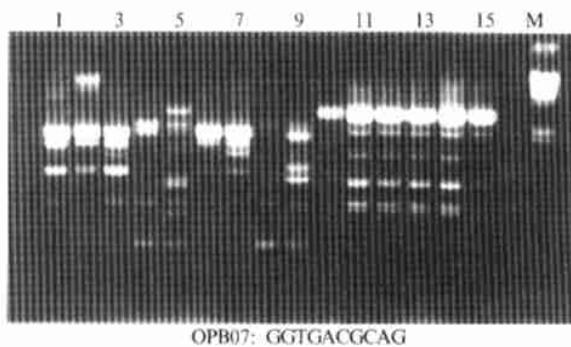


图 1 引物 OPB07 扩增的 16 个满江红鱼腥藻的带型

(M 为 *lambda* DNA/*Hind* III 分子量标记, 1—16 样品)

Fig. 1 RAPD banding pattern of 16 accessions for *A. nabaenae* 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)。

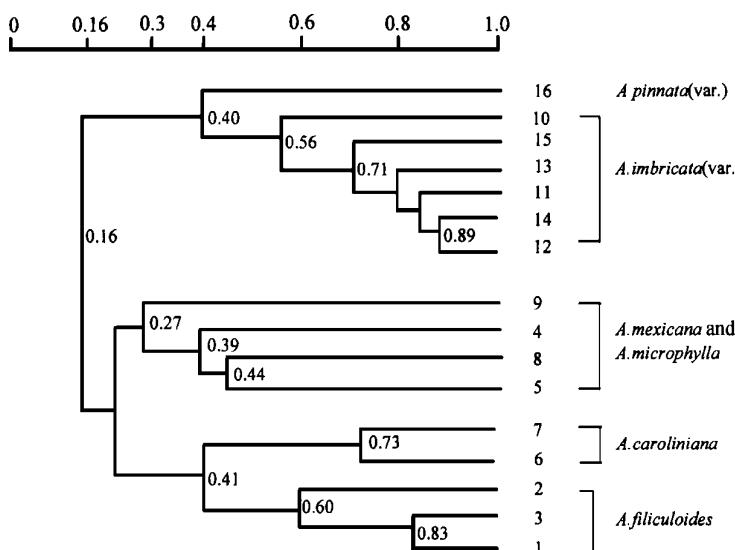


图 2 基于 RAPD 分析的满江红鱼腥藻 16 个样本的 UPGMA 树状关系图

Fig. 2 Dendrogram (UPGMA) based on RAPD for *A. nabaenae* *A. zollae* from 16 *A. zolla* 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<sup>[8]</sup>。但迄今只有用 RFLP 和 STRR-PCR 指纹法能将共生藻区分为三膘和九膘 2 个明显不同的类群。早期 Franche 用 *nif* HDK 的 RFLP 可进一步将三膘分为 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<sup>[3]</sup>。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<sup>[6]</sup>。直到近

来, Zheng 用 STRR RCR 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<sup>[7]</sup>。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程度的遗传多样性。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, Coheur Bazire G. Evolutionary divergence in the *nif* H. D. K gene region among nine symbiotic *A nabeana azollae* and between heterocystous 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*—*A nabeana* 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*—*A nabeana 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 finger printing[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(*A nabeana azollae*) 的分离与培养[J]. 科学通报, 1979, (14): 664—666