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 Jian[1], ZHENG Wei-Weng[2], SONG Tie-Ying[2], XU Guo-zhong[1] and TANG Long-fei[1]
(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* Strasb.)。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 25μL 反应体系中进行: 体系中包括 2.5μL 的 10×PCR 反应缓冲液, 200μmol/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	三膜 (*Azolla*)	蕨状满江红 (*A. filiculoide*)
2	1010	秘鲁 Peru		
3	1043	巴西 Brazil		
4	2002	圭亚那 Guyana		墨西哥满江红 (*A. mexicana*)
5	2003			
6	3001	美国 USA		卡洲满江红 (*A. caroliniana*)
7	3501	哥伦比亚 Colombia		
8	4018	巴拉圭 Paraguay		小叶满江红 (*A. microphylla*)
9	4060	菲律宾 Philippines		
10	409	菲律宾 Philippines	九膜 (*Rhizosperma*)	覆瓦状满江红 (*A. imbricata* var.)
11	415	泰国 Tailand		
12	418	越南 Vietnam		
13	505	福建莆田 Fujian Putian		
14	511	福建宁德 Fujian Ninde		
15	575	山东 Shang dong		
16	7004	澳大利亚 Australia		羽叶满江红 (*A. pinnata* 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: ①三膜亚属和九膜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%。②三膜亚属 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%)。③九膜亚属 7 个样本的鱼腥藻对应宿主的 2 个变种,即覆瓦状满

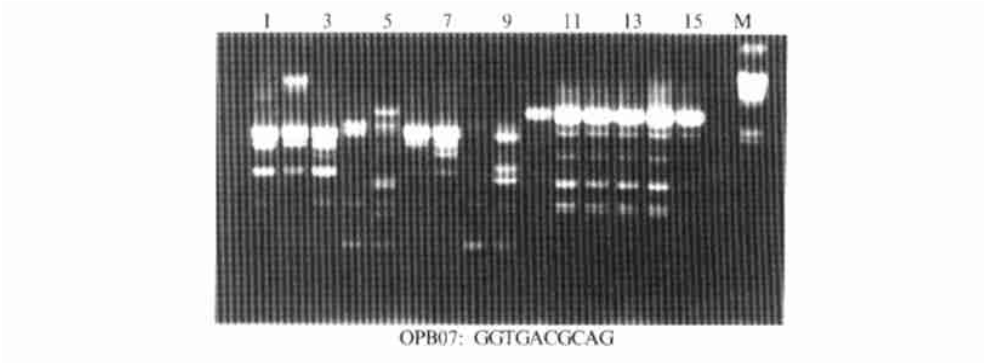


图 1　引物 OPB07 扩增的 16 个满江红鱼腥藻的带型
(M 为 *lamda* DNA/*Hind* Ⅲ分子量标记, 1—16 样品)

Fig. 1　RAPD banding pattern of 16 accessions for *Anabaena-azollae* amplifed by primer OPB07 (M as M W marker of *lamda* 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) 。

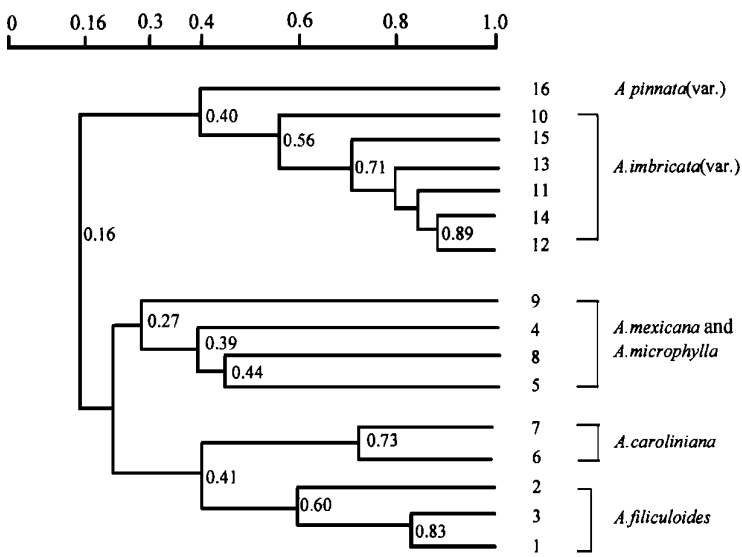


图2　基于 RAPD 分析的满江红鱼腥藻 16 个样本的 UPGMA 树状关系图

Fig. 2　Dendrogram (UPGMA) based on RAPD for *Anabeana-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[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 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[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, Coherr-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