

满江红鱼腥藻与其宿主的遗传多样性和协同性的 RAPD 分析

陈 坚¹, 郑伟文², 徐国忠¹, 宋铁英², 唐龙飞¹

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

摘要: 从 16 个代表不同种属或地域来源的满江红样本中分离出共生藻并通过处理获得无藻的满江红宿主, 对二者同步进行了 RAPD 扩增, 分别得到了大量 DNA 多态片段。通过建立满江红鱼腥藻及其宿主的 UPGMA 聚类关系图, 看出二者在遗传分支上存在着一定程度的协同对应关系。但在种内的不同品系间, 这种协同性有所减少, 发现有的品系的共生藻发生了明显的变异。

关键词: 满江红鱼腥藻; 满江红; 共生; 遗传多样性; RAPD 分析

中图分类号: Q173

文献标识码: A

文章编号: 0253-9772(2002)01-0045-05

The Genetic Diversity and Homology of *Anabaena azollae* and its Host Plant (*Azolla*) Based on Rapd Analysis

CHEN Jian¹, ZHENG Wei-weng², XU Guo-zhong¹, SONG Tie-Ying², TANG Long-fei¹

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

2. Biotechnology Research Center, FAAS, Fuzhou 350003, China)

Abstract: Symbiotic *Anabaena azollae* and its host plant *Anabaena*-free *Azolla* were isolated from 16 *Azolla* accessions representing different *Azolla* species or geographic origins. DNA polymorphic fragments were obtained by simultaneous RAPD amplification of both symbiont and host. The UPGMA clusters of *Anabaena azollae* and its host *Azolla* were established separately based on Dice coefficient calculation and a coordinated relationship was shown between *Anabaena azollae* and its *Azolla* host along both individual genetic divergence, but this genetic homology was reduced among different strains within *Azolla* species while the obvious mutants of *Anabaena azollae* were detected in some *Azolla* tested strains collected from different geographic area in the same host species.

Key words: *Anabaena azollae*; *Azolla*, symbiosis; genetic diversity; RAPD analysis.

水生植物满江红(又称“红萍”)是由蕨类满江红属(*Azolla*)植物体和共生在其叶腔中的固氮蓝细菌——满江红鱼腥藻(*Anabaena azollae*)组成, 这种共生关系是紧密的且具有遗传性。由于现存在世界上不同地域来源的满江红在有性器官形态上存在着明显的多样性, 分类学上有 2 个亚属, 7 个大种^[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。20 世纪 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, PCR 技术被引入到对满江红的研究之中。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], 但后者发现由于共生体中藻的 DNA 对整个 PCR 产物有干扰作用, 认为从共生体中提取的 DNA 不适合于满江红属本身的系统分类研究。近年来对鱼腥藻的分子系

收稿日期: 2001-02-13; 修回日期: 2001-06-11

基金项目: 福建省自然科学基金(编号 B9910024)和福建省科学技术厅中-瑞国际合作研究计划资助。

作者简介: 陈 坚(1965-), 男, 福建福州人, 副研究员, 专业方向: 植物生理生化与分子生物学。

Tel: 0591-7836147/7903264. E-mail: Chenjian3@hotmail.com

统学分析,建立了 *nif* 基因 RFLP 和 STRR 序列 PCR 产物指纹的系统分支图^[6,7],但两者之间有所不同。通过对满江红共生体的处理,我们得到了无藻的满江红,对 16 种不同种属和地域来源的满江红的无藻萍样本及其叶腔中分离出来的鱼腥藻同步进行了 RAPD 分析,探讨了满江红鱼腥藻与其宿主的遗传多样性及其间的协同对应关系。

1 材料和方法

1.1 材料及处理

满江红植物样本的来源见表。满江红无菌鱼腥藻分离结合文献 7 和 8 的方法进行。无菌无藻满江红培养结合文献 8 和 9 方法处理,经继代培养后镜检确认。

1.2 RAPD 分子标记

满江红样品按文献 4 法进行总 DNA 的提取。

满江红鱼腥藻按文献 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 10 \times PCR 反应缓冲液,200 μ M 的每种 dNTP,10pmol 的随机引物(引物号和顺列为:OPA13 CAGCACCCAC;OPB07 GGT-GACGCAG; OPB08 GTCCACACGG; OPC05 GATGACCGCC; OPC07 GTCCCGACGA; OPC08 TGGACCGGTG; OPD07 TTGGCACGGG),1 个单位 *Taq*DNA 聚合酶(均购自上海生工生物工程公司),并加入约 25ng 的模板 DNA 或 1 μ l 的藻细胞。反应在 PTC-100 热循环仪(MJ)中进行,并按文献 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)进行带的识别和比较,计算相似性系数(Dice 系数)矩阵,建立 UPGMA 系统聚类分析树状图。

表 1 16 种参试的满江红及其来源
Table 1 16 *Azolla* accessions and their origin

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		
2	1010	秘鲁	Peru		蕨状满江红 (<i>A. filiculoide</i>)
3	1043	巴西	Brazil		
4	2002	圭亚那	Guyana	三髻 (<i>Azolla</i>)	墨西哥满江红 (<i>A. mexicana</i>)
5	2003	圭亚那	Guyana		
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		
11	415	泰国	Tailand	九髻 (<i>Rhizosperma</i>)	覆瓦状满江红 (<i>A. imbricata</i> var.)
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 (<i>A. pinnata</i> var.)

* 为福建省农科院红萍研究中心资源圃编号

Accession code used in *Azolla* germplasm of *Azolla* research center, FAAS.

2 结果与分析

2.1 无藻满江红的获得

自然生长的满江红萍-藻共生体按文献 8 法,经

冲洗后用 0.1% 升汞和表面活性剂 Triton X-100 浸泡处理,取茎尖接种于 Nickell 培养基。为提高无藻萍的得率,再结合文献 9 法于培养基中加入一定浓度的抗生素,置 25 $^{\circ}$ C 光下培养 1~3 个月即可获得无藻

的满江红,其中三胞亚属所需时间较长。无藻萍在无氮的培养基上不能生长,需在含氮的 Hoagland 培养

基中经多次继代培养后镜检确认。如图 1 所示有藻与无藻的满江红叶片共生腔中藻丝存在的状况。

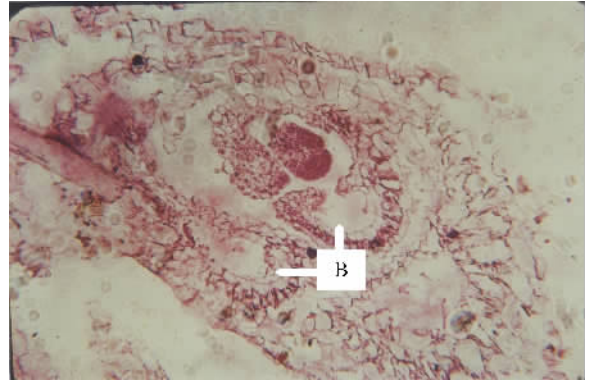
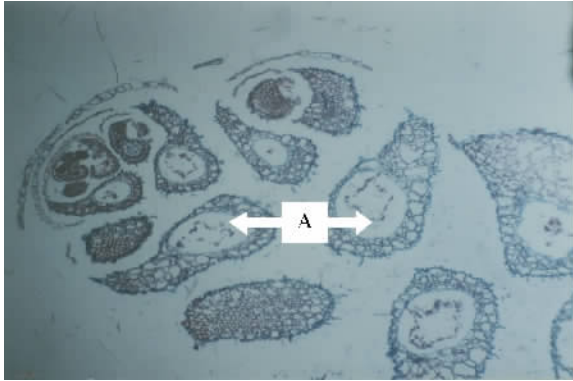


图 1 满江红叶片的石蜡切片

A: 自然生长的满江红叶腔中共生的满江红鱼腥藻丝 B: 继代培养 of 的无菌无藻满江红叶腔中没有藻丝

Fig. 1 The paraffin section of *Azolla* leaf

A: The *Anabaena azollae* filament in the leaf cavity of *Azolla* under natural growth

B: No appearance of *Azollae* filament in the leaf cavity of *Anabeana* and bacteria free *Azolla* after subculture

2.2 萍—藻间的 RAPD 扩增状况与遗传关系

经筛选有 7 个引物在萍和藻之间分别有很强的 PCR 扩增能力,萍藻间带型差异很大。在 16 个无

藻萍中共产生 129 条可区分的带,在藻中产生 106 条,多态带的比例均在 80% 以上。如图 2 所示其中引物 OPD07 在藻和萍间的扩增状况。

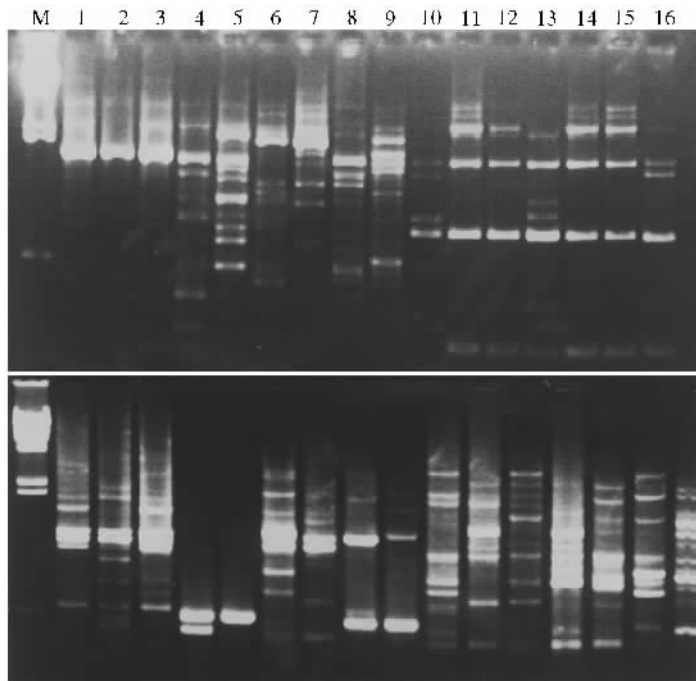


图 2 引物 OPD07 扩增的 16 个满江红鱼腥藻(上图)及其无藻萍宿主(下图)

样品的带型(M 为 λ DNA/*Hind* III 分子质量标记,1~16 样品号见表)

Fig. 2 RAPD banding pattern of 16 accessions for *Anabaena azollae* (upside photo) and its *Anabeana*-free *Azolla* host (downside photo) amplified by primer OPD07 (M as MW maker of λ DNA/*Hind* III, Sample No. 1~16 in table)

根据 16 个样本的 RAPD-PCR 产生的相似系数 (Dice 系数) 建立起来的鱼腥藻及其无藻萍宿主的 UPGMA 聚类树状图 (如图 3) 可以看出: 三胞亚属和九胞亚属的满江红鱼腥藻和相应的宿主之间都

存在明显的遗传差异, 其中藻体间差异为 84%, 萍体间为 70%; 在三胞亚属的 9 个样本中, 藻萍的遗传多样性对应关系基本一致, 均分为蕨状和卡洲萍及小叶与墨西哥萍 2 个类群组。但来自菲律宾的小

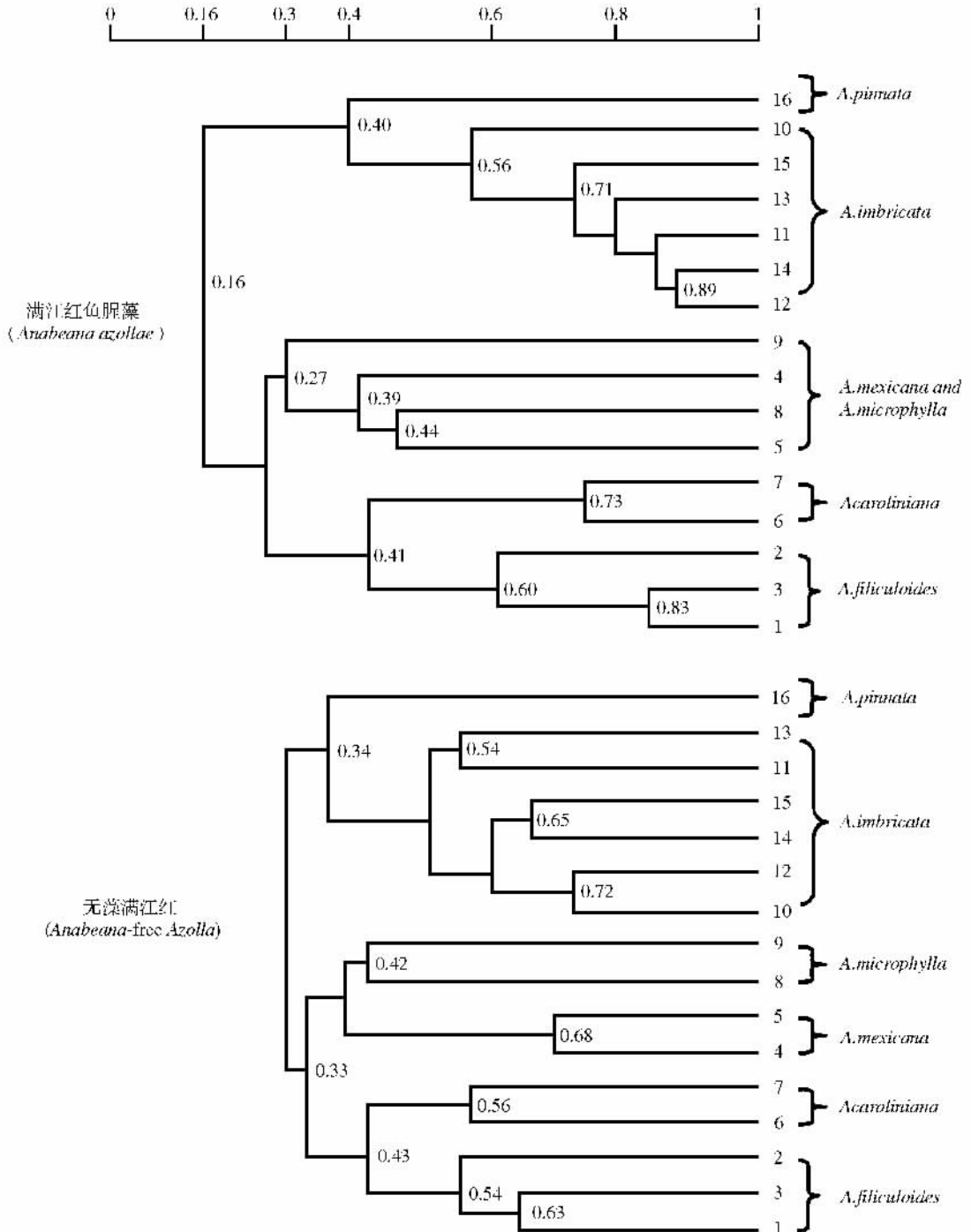


图 3 基于 RAPD 分析的 16 个样本满江红鱼腥藻及其对应宿主的 UPGMA 树状关系图

Fig. 3 Dendrogram (UPGMA) based on RAPD for *Anabeana azollae* and their correspondent symbiotic host from 16 *Azolla* accessions

叶满江红(9号样品)的鱼腥藻变异较大(差异达73%),而它的宿主萍同来自南美洲的小叶满江红(8号样品)相比,差异也达58%,但两种宿主萍间的形态差异难以用肉眼明显辨别。此外,2个墨西哥萍品系(4、5号样品)中的鱼腥藻也有差异(达61%);九髯亚属7个样品的鱼腥藻对应宿主的2个变种,即覆瓦状满江红(10~15号样品)和羽叶满江红(16号样品)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,除来自菲律宾(10号样品)的藻发生了明显的变异外,其余5个藻之间相似程度(0.71~0.89)高于其宿主萍(0.49~0.72)。

3 讨 论

3.1 满江红的遗传多样性

Van Coppenolle 曾用 22 个引物的 RAPD 建立起了 25 个满江红共生体样本的类群图,并发现实际仅选择 3~10 个引物就可实现同样的划分,其划分结果也同满江红的形态分类相近^[4]。我们的结果也说明:宿主满江红在 DNA 分子标记水平所具有的多态性与其个体形态标记基本一致,用 RAPD 评价满江红属植物的遗传多样性状况是可行的。但应用满江红共生体为材料进行系统发育分析(phylogeny analysis)是值得商榷的,因为在萍和藻的 DNA 同时对随机引物反应的共生体中,其结果所代表的意义不明确。

3.2 共生藻与宿主的遗传协同性

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^[10]。用 RFLP 和 STRR-PCR 指纹法首先就能将共生藻区分为三髯和九髯 2 个明显不同的类群。早期 Franche 用 *nif* HDK 的 RFLP 可进一步将三髯分为 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* 基因其他 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,但区别不出小叶、卡洲和墨西哥萍的藻^[6]。近来,Zheng 用 STRR-PCR 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,其结果支持共进化假说^[7]。我们对鱼腥藻及其宿主同步进行的 RAPD 分析,可以鉴别出参试的所有 16 个样本,具有更高分辨率,实验结果也证实了鱼腥藻与其

宿主间有着遗传上的协同对应关系,特别在种或种以上类元(taxa)的系统演化上存在着共进化的可能。但到了种内不同品系间,甚至在小叶和墨西哥满江红种间——已知道两者间的生殖隔离很小,通过人工有性杂交产生的是高度可育的杂种后代^[11],检测出鱼腥藻与宿主在遗传分支上并非完全协同,RAPD-PCR 揭示了在不同地域来源的品系间,个别鱼腥藻发生了明显的变异(如 4、5 号样品之间及 10 号样品)。但总体上看:品系间共生藻的遗传多样性程度要小于其宿主(如 1~3,6~7 号样品和 11~15 号样品)。

参 考 文 献 (References):

- [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, 第 1 期: 44~52.
- [3] Franche C, Cohen-Bazire G. Evolutionary divergence in the *nif* H. D. K gene region among nine symbiotic *Anabaena azollae* and between heterocystus cyanobacteria[J]. Symbiosis, 1987, 3: 159~178.
- [4] Van Coppenolle B, et al. Genetic diversity and phylogeny analysis of *Azolla* based on DNA amplification by arbitrary primers[J]. Genome, 1993, 36: 686~693.
- [5] Eskew D L, et al. DNA amplification fingerprinting of the *Azolla*-*Anabaena* symbiosis[J]. Plant Mol Biology, 1993, 21: 363~373.
- [6] Van Coppenolle B, et al. Genetic diversity and phylogeny analysis of *Anabaena azollae* based on RFLPs detected in *Azolla*-*Anabaena azollae* DNA complex using *nif* probes[J]. Theor Appl Genet, 1995, 91: 589~597.
- [7] Zheng W W, et al. 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] 白克智,等. 无藻满江红(*Azolla*)和满江红鱼腥藻(*Anabaena azollae*)的分离与培养[J]. 科学通报, 1979, 第 14 期: 664~666.
- [9] Forni C, et al. Effects of antibiotic treatments on *Azolla*-*Anabaena* and *Arthrobacter* [J]. Plant and soil, 1991, 137: 151~155.
- [10] Caudales R, et al. 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.
- [11] 唐龙飞,陈 坚,章 宁,等. 小叶满江红与墨西哥满江红杂交后代有性器官(孢子果)形态学分析[J]. 福建省农科院学报, 1996, 11(3): 54~59.