

Frankia 菌的遗传多样性的 RAPD 研究*

彭源东 张忠泽 (中国科学院沈阳应用生态研究所, 沈阳 110015)

【摘要】 选用 20 个随机引物, 对分自 2 个分类接种群的 8 株 *Frankia* 纯培养的总 DNA 进行随机扩增, 其中引物 OPW15 和 OPW16 能扩增得到较为稳定的 RAPD 图谱. 扩增产物分子量大都分布在 0.5~4Kb 之间. 从稳定的 RAPD 扩增图谱看, *Frankia* 菌间存在有丰富的遗传多样性; 在选定适当引物情况下, 能依据共同带将 *Frankia* 菌化归为同一分类接种群.

关键词 *Frankia* RAPD 多样性

RAPD study on genetic diversity of *Frankia*. Peng Yuandong and Zhang Zhongze (*Institute of Applied Ecology, Academia Sinica, Shenyang 110015*). -*Chin. J. Appl. Ecol.*, 1998, 9(1): 59~63.

Eight *Frankia* strains from 2 taxonomic inoculation groups were analysed for their genetic diversity with Random Amplified Polymorphic DNA(RAPD) technique. Twenty random primers were used, and the stable RAPD patterns could be detected with primer OPW15 and OPW16. The molecular weight of amplification products was between 0.5~4Kb, indicating a great genetic diversity within *Frankia* strains. Therefore, with proper primer in RAPD analysis, different *Frankia* strains could be allocated to the same inoculation group, based on common bands.

Key words *Frankia*, Random Amplified Polymorphic DNA(RAPD), Diversity.

1 引言

Frankia 是一类能和非豆科放线结瘤植物行共生固氮并结瘤的放线菌. 在 *Frankia* 的分类研究中, 发现 *Frankia* 菌群中有丰富的多样性^[6]. 为了检测与考察这种多样性, 已采用多种门类不同的分析方法, 如回接实验^[4]、血清学分析^[5]、同工酶图谱分析^[11]、全细胞可溶性蛋白分析^[7]、脂肪酸成分分析^[21]、全细胞糖型分析^[22]、16SrRNA 序列扩增^[16]、DNA 同源性分析^[10]、nifRFLP 类型分析^[8]等, 取得了大量研究结果. 但上述方法存在诸如引物设计困难、分析过程复杂耗时等诸多问题.

最近一种新的在分子水平上的遗传标记技术——随机放大多态性 DNA 技术

(Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD), 已经受到广泛的重视和应用^[12]. 这种技术的主要优点是操作程序简单迅速, 只需极少量的 DNA 作模板, 对 DNA 制备的质量要求不高, 且在对生物基因组情况不明时也可进行, 这些特点对于 *Frankia* 菌的遗传学研究尤为适用^[1,6]. 另外, 由于检测的位点分布相对随机, 且覆盖面广, 所以它比较能反映生物基因组的一般特征. 这种技术已在植物分子生物学领域得到成功应用, 在原核生物的分子生物学研究中已有涉足^[3,9]. 对于 *Frankia* 菌, 有人曾选用 6 种随机引物对分自两种木麻黄植物根部的 8 株 *Frankia* 菌进行过

* 国家自然科学基金(39470005)和中国科学院“九五”重大 B 项目.

1997-09-24 收稿, 1997-12-04 接受.

RAPD 分析, 结果表明单一随机引物即能检测到不同 *Frankia* 菌间的多态性差异^[20].

本文采用美国 Operon Technologic 公司出品的随机引物中的 OPW 系列, 共 20 个随机引物, 考察分自 2 个分类接种群的 8 株 *Frankia* 菌, 试图在分子水平上对 *Frankia* 菌群业已存在的遗传多样性有一个新的认识.

2 材料与方法

2.1 供试菌种

本试验选用了 8 株 *Frankia* 菌, 其中 7 株为本所分得, 1 株由美国哈佛大学提供(表 1). 供试菌株在 28℃ 下的有氮 BAP^[15] 培养基中培养并适时传代, 而后改用含适量甘氨酸的无镁无氮 BAP 培养基继续培养.

表 1 *Frankia* 菌株

Table 1 *Frankia* strains

菌株 Strains	宿主植物 Host plants	来源 ^[1] Sources
Cc01	细枝木麻黄	中国
	<i>Casuarina cunninghamiana</i>	China
Cc13	细枝木麻黄	中国
	<i>Casuarina cunninghamiana</i>	China
Ce24	木麻黄	广东
	<i>Casuarina equisetifolia</i>	Guangdong
R43	细枝木麻黄	美国
	<i>Casuarina cunninghamiana</i>	USA
Hr16	沙棘	辽宁
	<i>Hippophae rhamnoides</i>	Liaoning
Hr18	沙棘	辽宁
	<i>Hippophae rhamnoides</i>	Liaoning
Hr30	沙棘	辽宁
	<i>Hippophae rhamnoides</i>	Liaoning
Hr34	沙棘	辽宁
	<i>Hippophae rhamnoides</i>	Liaoning

2.2 研究方法

2.2.1 *Frankia* 总 DNA 的提取^[2] 针对生长状况不一的 *Frankia* 菌, 采用 4 种方法进行了 *Frankia* 总 DNA 的提取, 它们是溶菌酶法、CTAB 法、微波法及 CTAB+微波法.

2.2.2 RAPD-PCR 扩增 RAPD-PCR 扩增中所用引物选用美国 Operon Technologic 公司出品的引物 Kits 中的 OPW 系列(表 2). PCR 扩增反

表 2 随机引物名称及其核酸序列

Table 2 Random primers and their sequences

引物 Primers	核酸序列 Nucleotide sequences
OPW01	CTCAGTGTCC
OPW02	ACCCCGCCAA
OPW03	GTCCGGAGTG
OPW04	CAGAAGCGGA
OPW05	GGCGGATAAG
OPW06	AGGCCCGATG
OPW07	CTGGACGTCA
OPW08	GAATGCCTCT
OPW09	GTGACCGAGT
OPW10	TCGCATCCCT
OPW11	CTGATGCGTG
OPW12	TGGGCAGAAG
OPW13	CACAGCGACA
OPW14	CTGCTGAGCA
OPW15	ACACCGGAAC
OPW16	CAGCCTACCA
OPW17	GTCTGGGTT
OPW18	TTCAGGGCAC
OPW19	CAAAGCGCTC
OPW20	TGTGGCAGCA

应总体积为 20μl, 反应体系中以 *Frankia* 基因组 DNA 为模板(约 10ng), 其中引物 OPW 为 15ng/管, 4 种 dNTP 各 0.25mmol·L⁻¹, 10×PCR 缓冲液 2μl, Taq DNA 聚合酶 0.5u(华美公司产品).

扩增反应在美国 Perkin Elmer 公司的 9600 型 PCR 扩增仪上进行: 先 94℃ 变性 2min, 35℃ 复性 1min, 72℃ 延伸 2min 循环 5 圈; 再按 94℃ 30s, 36℃ 30s, 72℃ 1min 程序循环扩增 35 次, 最后在 72℃ 延伸 5min, 以使延伸反应充分进行. 每种引物的扩增反应均重复 2 次.

20μl PCR 产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测分析.

3 结 果

3.1 菌间公共带的分布

本研究采用 20 个随机引物在相同条件下分别对分自 2 个接种分类群的 8 株 *Frankia* 菌的总 DNA 进行随机扩增. 结果表明, OPW 系列中 20 个随机引物只有 OPW15 和 OPW16 能扩增得到较为稳定的 RAPD 带. 从 OPW15 的 RAPD 扩增结果来看(图 1), Cc01, Cc13, Ce24 有 1 条共同带, Ce24 与 R43 间有 1 条共同带. R43

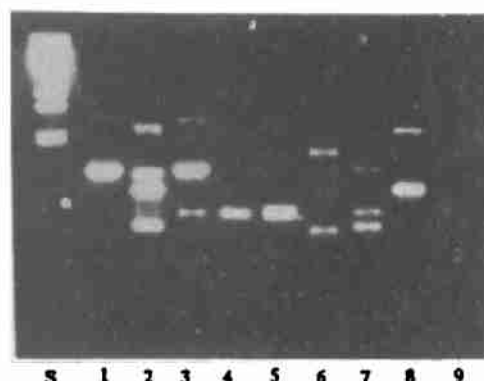


图 1 随机引物 OPW15 对 8 株 *Frankia* 菌 DNA 扩增的 RAPD 图谱

Fig.1 RAPD - PCR patterns of 8 *Frankia* strains with OPW15 as random primer.

S 为分子量标记 λ /Hind III; 1~8 分别为 8 株 *Frankia* 菌的 RAPD - PCR 扩增图谱, 依次是: 1) Cc01; 2) Cc13; 3) Ce24; 4) R43; 5) Hr16; 6) Hr18; 7) Hr30; 8) Hr34; 9 为对照 (不加模板, 有多聚酶, 有引物). S. lambda digested with Hind III (molecular weight standard); 1) Cc01; 2) Cc13; 3) Ce24; 4) R43; 5) Hr16; 6) Hr18; 7) Hr30; 8) Hr34; 9) Control experiment with primer and polymerase using no template DNA. 下同. The same below.

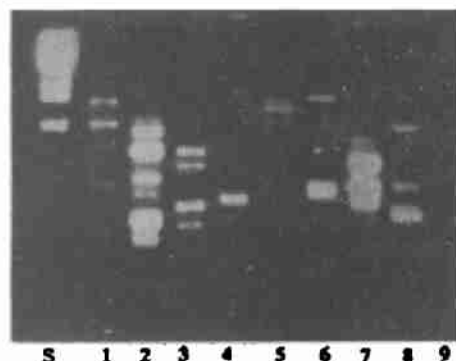


图 2 随机引物 OPW16 对 8 株 *Frankia* 菌 DNA 扩增的 RAPD 图谱

Fig.2 RAPD - PCR patterns of 8 *Frankia* strains with OPW16 as random primer.

与 Hr16 带型一致, 且与 Hr30 有 1 条公共带. Hr16 与 Hr30 有 1 条共同带. OPW16 的 RAPD 扩增结果表明 (图 2), Cc01、Cc13、Ce24 间有 1 条共同带, 且 Ce24 与 Cc13 间有 2 条共同带, 而 R43 则与前三者无任何共同带. 而 Hr18、Hr30、Hr34 间有 1

条共同带, 且 Hr18、Hr34 有 2 条共同带.

从带型总体情况看, 带的大小在 8 株菌中的分布较为均匀, 且带型较为简单^[12]. 群内各菌株间共同带不多, 群间共同带更是稀少, 显示 *Frankia* 菌的差异非常显著.

3.2 菌间相似性比较

参照 Nei^[18]提出的相似性公式计算菌株间在分子水平上的相似性. 设 N_x 为菌株 X 中某一引物扩增出的条带数, N_y 为菌株 Y 中同一引物扩增出的条带数, N_{xy} 为 X 和 Y 中扩增出的片段长度相同的条带数, 则这两个菌株之间的遗传相似性可以表示为 $S_{xy} = 2N_{xy} / (N_x + N_y)$. 由表 3 可看出, 木麻黄类群中部分菌株间的相似程度比较高, 相似值大于 50%; 而沙棘类群的 *Frankia* 菌间仅 Hr16 和 Hr30 间相似值为 50%, 其余菌间无任何相似性. 由表 4 可知, 木麻黄类群及沙棘类群的相似值集中在 28% 左右, 相似程度比较低. 从相似值大小看, 相似程度普遍较低, 无论群内或群间各菌株的差异十分显著, 显示出 *Frankia* 菌群中存在丰富的遗传多样性.

表 3 *Frankia* 菌间相似性分析 (以 OPW15 为引物)
Table 3 Similarity of 8 *Frankia* strains with OPW15 as random primer in RAPD - PCR

菌株 Strains	相似值 Similarity value(%)							
	Cc01	Cc13	Ce24	R43	Hr16	Hr18	Hr30	Hr34
Cc01	100							
Cc13	33	100						
Ce24	80	0	100					
R43	0	0	50	100				
Hr16	0	0	50	100	100			
Hr18	0	0	0	0	0	100		
Hr30	0	28	33	50	0	0	100	
Hr34	0	0	0	0	0	0	0	100

注: 相似值 (%) = $2N_{xy} / (N_x + N_y) \times 100\%$, 其中 N_x 表示菌株 X 扩增出的条带数, N_y 表示菌株 Y 扩增出的条带数, N_{xy} 表示菌株 X 和 Y 中扩增出的长度相同的条带数. 下同.

Notes: Similarity value(%) = $2N_{xy} / (N_x + N_y) \times 100\%$, N_x and N_y are the numbers of fragments detected in strains X and Y respectively. N_{xy} is the number of fragments shared by both strains. The same below.

表 4 *Frankia* 菌间相似性分析(以 OPW16 为引物)
Table 4 Similarity of 8 *Frankia* strains with OPW16 as random primer in RAPD-PCR

菌株 Strains	相似值 Similarity value(%)							
	Cc01	CcI3	Ce24	R43	Hr16	Hr18	Hr30	Hr34
Cc01	100							
CcI3	22	100						
Ce24	25	22	100					
R43	0	0	0	100				
Hr16	33	0	0	0	100			
Hr18	28	25	0	0	0	100		
Hr30	25	22	0	40	50	28	100	
Hr34	28	25	28	0	0	33	28	100

4 讨 论

4.1 木麻黄类群 *Frankia* 菌遗传多样性

本研究选用的木麻黄类群的 *Frankia* 菌共 4 株, 其中 3 株分自细枝木麻黄(*C. cunninghamiana*), 1 株分自木麻黄(*C. equisetifolia*). 分自细枝木麻黄的 R43 菌株不能回接原宿主, 属非感染类型(non-infective). 有研究表明^[10, 16, 17], 已分纯的感染性木麻黄 *Frankia* 菌的遗传同源性程度非常高, 但 Rouvier^[19]的研究结果表明, 造成这种情况的原因是多方面的. 他以细枝木麻黄及木麻黄植物瘤内 *Frankia* 菌作为材料, 用 PCR-RFLP 方法证明了该族群 *Frankia* 菌的遗传多样性实际非常高, 而分纯的则比较同源, 可以化分为一个类群(Group 1). 本研究表明, 菌株 Cc01、CcI3、Ce24 可依据共同带划分为同一群(OPW15、OPW16 的结果均能说明这一点); 而且在选用合适的随机引物时, 同样可以很清晰地检测到分纯的木麻黄 *Frankia* 菌的差异性. 另外, RAPD 也可以检测到分自同种寄主植物但感染性不同的菌株间的差别, 如 R43 是非感染性的木麻黄类群的 *Frankia* 菌, 但与 Hr30 有 1 条共同带, 且和 Hr16 带型一致, 因而可以认为 R43 有可能并非木麻黄类群的弗氏菌; 我们曾用 REP-PCR 分析¹⁾ R43 与其它木麻黄类群 *Frankia* 菌的关系, 也得出了同样

的结论. 而 Lechevalier^[14]的研究结果证明, R43 能在沙棘植物根部形成根瘤.

4.2 沙棘类群 *Frankia* 菌的遗传多样性

据报道^[10, 16], 无论是 DNA 同源性或 16SrRNA 序列同源性比的结果均表明, 沙棘类群的 *Frankia* 菌间差异显著¹⁾. 本研究选用沙棘类群 *Frankia* 菌共 4 株, 均分自沙棘 *Hippophae rhamnoides* OPW16 的结果表明, Hr18、Hr30、Hr34 可依据共同带化分为同一群, 但从带的数量及大小分布看, 差异非常显著, 而 OPW15 的结果更说明了差异的存在.

4.3 引物选择对 RAPD 分析结果的影响

由表 3、4 中的相似比数据所反映出来的群内各菌株或群间各菌株间的相似性差别较大, 表明 RAPD 引物不同, 扩增结果不完全一致, 其展示的菌间差异程度也存在区别. 在 *Frankia* 菌遗传多样性的 RAPD 检测中, 用不同的 RAPD 引物进行 RAPD 多态性分析, 一方面能获得多样性(相关性和差异性)的认识; 另一方面, 不同引物的分析结果可能会不同. 对于后者, 可以认为, 这种差异是有理由的, 至少表明 *Frankia* 菌不同, 其基因组的 DNA 序列结构存在差异, 但同时也有共同点.

由此可以认为, 采用不同的分子分类方法, 反映的 *Frankia* 菌特性不同, 其结果可能存在差异, 甚至会导致相反的结论. 这是目前 *Frankia* 菌分类研究中所面临的难题. 对此, Lechevalier^[13]曾指出, 各种门类不同的方法所划分的 *Frankia* 菌的各类群间关系仍不明确. *Frankia* 菌的分类需要何种共同指标, 以作为分种的标准, 这一问题目前尚未解决, 还有待探索.

在分类学上, 某些分子类指标如 DNA 序列同源性、16SrRNA 序列同源比等能够

1) 彭源东等. 1998. 用 REP-PCR DNA 指纹鉴别 *Frankia* 菌(待发表).

反映 *Frankia* 菌的系统发育关系,因而可以作为分类的一个指标^[10,16,23]。由于本身的特性,RAPD 技术能够反映种内及种间不同菌株间的细小差别。因此,人们常将之用作菌株鉴定及区分^[3,9,20]。基于此,RAPD 的分析结果和上述分子分类结果不完全相符也就不足为奇,但有理由相信,RAPD 技术将比其他方法更能够快速、灵敏地展示微生物世界丰富的遗传多样性。

5 结 论

5.1 RAPD 能反映种内及种间不同菌株间的细小差别,所以它能检测到 *Frankia* 菌群内存在的丰富多样性;同时它还能用于感染性不同的菌株间的鉴别。

5.2 不同引物的结果会存在差别。选用不同的 RAPD 引物,能将来自不同分类接种群的 *Frankia* 菌化归各自的分类群中。

参考文献

- 1 张宪武. 1993. 土壤微生物学研究. 沈阳: 沈阳出版社, 655~657.
- 2 彭源东等. 1997. *Frankia* 基因组的 DNA 提取及其 PCR 带型. 微生物学杂志, 17(3): 1~4.
- 3 Akopyanz, N. et al. 1992. DNA diversity among clinical isolated of *Helicobacter pylori* detected by PCR - based RAPD fingerprinting. *Nucleic Acids. Res.*, 20: 5137~5142.
- 4 Baker, D. D. 1987. Relationships among pure cultured strains of *Frankia* based on host specificity. *Physiol. Plant.*, 70: 245~248.
- 5 Baker, D. et al. 1981. Immunochemical analysis of relationships among isolated frankiae (Actinomycetales). *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 31: 148~151.
- 6 Benson, D. R. et al. 1993. Biology of *Frankia* strains, Actinomycete Symbionts of Actinorhizal Plants. *Microbiol. Rev.*, 57: 293~319.
- 7 Benson, D. R. et al. 1983. *Frankia* diversity in an alder stand as estimated by sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis of whole - cell proteins. *Can. J. Bot.*, 61: 2919~2923.
- 8 Dobritsa, S. V. 1985. Restriction analysis of the *Frankia* spp. genome. *FEMS Microbiol. Lett.*, 29: 123~128.
- 9 Fekete, A. et al. 1992. Amplification fragment length polymorphism in *Brucella* strains by use of polymerase chain reaction with arbitrary primers. *J. Bacteriol.*, 174: 7778~7783.
- 10 Fernandez, M. P. et al. 1989. Deoxyribonucleic acid relatedness among members of the genus *Frankia*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 39: 424~442.
- 11 Gardes, M. et al. 1987. Isozyme variation among 40 *Frankia* strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, 53: 1596~1603.
- 12 Gustavo Caetano - Anollés. 1993. Amplifying DNA with Arbitrary Oligonucleotide Primers. *PCR Methods and Applications*. 3: 85~94. By Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- 13 Lechevalier, M. P. 1994. Taxonomy of the genus *Frankia* (Actinomycetales). *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 44: 1~8.
- 14 Lechevalier, M. P. et al. 1987. Studies on *Frankia* sp. LLR02022 from *Casuarina cunninghamiana* and its mutant LLR02023. *Physiol. Plantarum.*, 70: 249~254.
- 15 Murry, M. A. et al. 1984. Growth kinetics and nitrogenase induction in *Frankia* sp. HFPAr13 grown in batch culture. *Plant and Soil*, 78: 61~78.
- 16 Nazaret, S. et al. 1991. Phylogenetic relationships among *Frankia* genomic species determined by use of amplified 16SrDNA sequences. *J. Bacteriol.*, 173: 4072~4078.
- 17 Nazaret, S. et al. 1989. Genetic diversity among *Frankia* strains isolated from *Casuarina* nodules. *Plant and Soil*, 118: 241~247.
- 18 Nei, M. et al. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 76: 5269~5273.
- 19 Rouvier, C. et al. 1996. Genetic diversity among *Frankia* strains nodulating members of the family *Casuarinaceae* in Australia revealed by PCR and restriction fragment length polymorphism analysis with crushed root nodules. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62: 979~985.
- 20 Sellstedt, A. 1991. Identification of *Casuarina-Frankia* strains by use of polymerase chain reaction (PCR) with arbitrary primers. *FEMS Microbiol. Lett.*, 93: 1~6.
- 21 Simon, L. et al. 1989. Confirmation of *Frankia* species using cellular fatty acids analysis. *Syst. Appl. Microbiol.*, 11: 229~235.
- 22 St.-Laurent, L. et al. 1987. Separation of various *Frankia* strains in the *Alnus* and *Elaeagnus* host specificity groups using sugar analysis. *Can. J. Microbiol.*, 33: 764~772.
- 23 Stackebrandt, E. et al. 1994. Taxonomic Note: A place for DNA - DNA reassociation and 16SrRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 44: 846~849.