

用 AFLP 技术研究花生根瘤菌的遗传多样性*

张小平 陈强 李登煜

(四川农业大学农学院微生物系 雅安 625000)

Lindström K

(芬兰赫尔辛基大学应用化学与微生物系 00014)

摘 要 采用 AFLP 分子标记技术,对分离自中国、津巴布韦、以色列的 133 株慢生花生根瘤菌(*Bradyrhizobium* sp. *arachis*)和 13 个代表菌株(*Bradyrhizobium japonicum*、*Bradyrhizobium elkanii*)的 DNA 扩增长度多态性进行了分析,并根据各供试菌株的遗传相似性进行了数值聚类。结果表明慢生花生根瘤菌群体内存在很高的遗传多样性,每个菌株的 AFLP 带谱均与其它菌株完全不同。AFLP 技术简便、快速、重现性极高,能表现高信息量的 DNA 长度多态性,是目前研究生物群体内遗传多样性的最有效办法。

关键词 花生根瘤菌,多样性,AFLP

分类号 Q939.11 **文献标识码** A **文章编号** 0001-6209(1999)06-0483-88

AFLP(扩增长度多态性,Amplified Fragment Length Polymorphism,简称 AFLP)是一种新的分子标记技术,已广泛地用于某些植物^[1,2]、动物^[3]、线虫^[4]、真菌^[5]和细菌^[6]的遗传研究。采用 AFLP 方法能获得高信息量的 DNA 长度多态性^[7],因此,它不仅是揭示生物遗传多样性的最有效方法,而且有利于提高基因定位和标记辅助育种的效率。

在以前的研究中,对花生根瘤菌的保守基因 16S rRNA 序列和 16S rDNA 的 PCR-RFLP 谱进行了分析,发现花生根瘤菌在发育和进化方向上与大豆根瘤菌(*B. japonicum*)具有高度的相似性^[8],表明这两种方法在反映根瘤菌种间的遗传相关性方面是有效的。为了揭示花生根瘤菌种内存在的遗传差异性,采用了 DNA 重复序列指纹分析技术(rep-PCR)^[9],该法虽然获得了较高信息量的 DNA 长度多态性,但仅限于 DNA 的重复序列,而且结果的重现性较差。本试验以不同生态条件的慢生花生根瘤菌为材料,采用 AFLP 技术,揭示花生根瘤菌的遗传多样性,为花生根瘤菌的育种和系统发育研究提供依据。

1 材料和方法

1.1 供试菌株

供试菌株列表 1。

1.2 全量 DNA 提取

将供试菌株接种于 TY 液体培养基中,28℃ 振荡培养 5d 后,用 TE 缓冲液洗涤菌体,全量 DNA 按参考文献^[10]的方法提取。

* 国家自然科学基金(No. 39570024)和欧盟国际合作项目(IC18-CT96-0103)资助

收稿日期:1998-03-23,修回日期:1998-06-08

表 1 供试菌株

Table 1 Bacterial strains used

菌株代号 Strain code	来源 Source	寄主 Host plant	菌株代号 Strain code	来源 Source	寄主 Host plant
Spr1-2	四川眉山	天府 3 [#]	Spr20-6	云南元谋	黑叶果
Spr2-8	四川洪雅	天府 3 [#]	Spr21-1	云南元谋	黑叶果
Spr2-9	四川洪雅	天府 3 [#]	Spr21-5	云南元谋	黑叶果
Spr3-1	四川雅安	天府 3 [#]	Spr22-1	四川米易	地方种
Spr3-2	四川雅安	天府 3 [#]	Spr22-2	四川米易	地方种
Spr3-4	四川雅安	天府 3 [#]	Spr22-3	四川米易	地方种
Spr4-1	四川雅安	地方种	Spr22-6	四川米易	地方种
Spr4-5	四川雅安	地方种	Spr22-7	四川米易	地方种
Spr5-2	四川夹江	地方种	Spr22-8	四川米易	地方种
Spr6-3	四川宜宾	天府 3 [#]	Spr23-1	四川米易	地方种
Spr7-1	四川南充	天府 3 [#]	Spr23-2	四川米易	地方种
Spr7-6	四川南充	天府 3 [#]	Spr23-4	四川米易	地方种
Spr7-8	四川南充	天府 3 [#]	Spr24-1	四川米易	地方种
Spr7-9	四川南充	天府 3 [#]	Spr24-2	四川米易	地方种
Spr7-10	四川南充	天府 3 [#]	Spr24-3	四川米易	地方种
Spr8-3	四川平昌	地方种	Spr24-4	四川米易	地方种
Spr10-2	四川旺苍	地方种	Spr24-5	四川米易	地方种
Spr11-2	四川眉山	天府 3 [#]	Spr25-1	云南华坪	鹰勾鼻
Spr12-2	四川洪雅	天府 3 [#]	Spr25-2	四川米易	地方种
Spr15-2	四川金堂	地方种	Spr25-3	四川米易	地方种
Spr16-2	四川攀枝花	天府品系	Spr26-1	四川西昌	百天早
Spr16-3	四川攀枝花	天府品系	Spr27-1	四川西昌	百天早
Spr16-5	四川攀枝花	天府品系	Spr27-2	四川西昌	百天早
Spr16-8	四川攀枝花	天府品系	Spr27-3	四川西昌	百天早
Spr17-1	四川攀枝花	红花生	Spr27-4	四川西昌	百天早
Spr17-2	四川攀枝花	红花生	Spr27-5	四川西昌	百天早
Spr17-3	四川攀枝花	红花生	Spr27-6	四川西昌	百天早
Spr18-3	四川攀枝花	俩米	Spr28-1	四川攀枝花	地方种
Spr18-4	四川攀枝花	俩米	Spr28-2	四川西昌	百天早
Spr18-6	四川攀枝花	俩米	283A	Iseral	花生
Spr19-1	四川攀枝花	三米	297A	Iseral	花生
Spr19-2	四川攀枝花	三米	MAR253	津巴布韦	花生
Spr19-4	四川攀枝花	三米	MAR411	津巴布韦	花生
Spr20-1	云南元谋	黑叶果	MAR1445	澳大利亚	花生
Spr20-2	云南元谋	黑叶果	LMG14306	津巴布韦	花生
Spr20-3	云南元谋	黑叶果	LMG14309	津巴布韦	花生

续表 1

菌株代号 Strain code	来源 Source	寄主 Host plant	菌株代号 Strain code	来源 Source	寄主 Host plant
LMG6138	M. Gillis	大豆	2686	江西上饶	地方种
ATCC10324	ATCC	大豆	2687	江西南昌	粤优 5
USDA110	USDA	大豆	2688	江西南昌	粤优 5
USDA76	M. Gillis	大豆	2689	江西南昌	粤优 5
LMG6123	M. Gillis	大豆	2692	江西南昌	地方种
LMG6153	M. Gillis	大豆	2693	江西南昌	地方种
USDA4087	USDA	大豆	2695	江西南昌	地方种
USDA83217	USDA	大豆	2697	河北芦龙	翼优 2
B15	辽宁	大豆	2699	湖南长沙	95-5029
2502	邵阳湖	花生(87-97)	2700	湖南长沙	95-5029
2519	湖北邵阳	中花 4 [#]	2705	湖南长沙	湘花 4 [#]
2539	湖北武昌	花生 4 [#]	2710	湖南长沙	湘花 4 [#] 3
2550	湖北武昌	花生 4 [#]	2716	山东泰安	海花 1
2560	山西林宜	鲁花 9 [#]	2719	山东泰安	海花 1
2567	山西林宜	鲁花 9 [#]	2721	山东泰安	海花 1
2576	山西太原	海花 2 [#]	2724	山东泰安	大白沙
2584	山西汾阳	晋花 1	2728	山东泰安	小白沙
2642	吉林松源	鲁花 1	2730	山东泰安	小白沙
2644	吉林松源	鲁花 1	2735	山东泰安	小白沙
2652	广东广州	粤优 79	2737	北京平谷	翼优 2
2654	广东广州	粤优 169	2739	北京平谷	翼优 2
2656	广东广州	粤优 169	2742	陕西南镇	海花 1
2658	广东东莞	粤优 59	2746	陕西南镇	海花 1
2659	广东东莞	粤优 59	2751	山东云城	海花 1
2660	广东东莞	粤优 59	2752	山东云城	海花 1
2661	广东东莞	粤优 169	2753	山东吉莫	8130
2662	广东东莞	粤优 169	2757	山东吉莫	鲁花 10 [#]
2663	广东东莞	粤优 169	2764	山东吉莫	8130
2664	广东东莞	粤优 59	2769	山东吉莫	8130
2666	广东东莞	粤优 59	2773	河北万乡	翼优 3
2667	广东东莞	粤优 59	2774	河北万乡	翼优 3
2669	广东东莞	粤优 59	009	中国农科院	花生
2672	广东东莞	企石 1	147-3	中国农科院	花生
2676	广东东莞	企石 1	2260	中国农科院	大豆
2679	广东东莞	企石 2	2281	中国农科院	大豆
2682	广东东莞	企石 2	2282	中国农科院	大豆
2684	江西上饶	粤优 5	DE454	中国农科院	大豆

1.3 AFLP

1.3.1 酶切连接:在 200ng 全量 DNA 中,加入 $10\times$ 酶切连接缓冲液 $2\mu\text{L}$, *EcoR* I ($12\text{U}/\mu\text{L}$) $2\mu\text{L}$, *Mse* I ($4\text{U}/\mu\text{L}$) $1\mu\text{L}$, *EcoR* I 连接子^[7] ($5\mu\text{mol/L}$) $0.5\mu\text{L}$, *Mse* I 连接子^[7] ($10\mu\text{mol/L}$) $1\mu\text{L}$, T_4 DNA 连接酶 ($4\text{U}/\mu\text{L}$) $1\mu\text{L}$, 用重蒸馏水补充至总体积 $20\mu\text{L}$, 再加入 $20\mu\text{L}$ 矿物油。置 PCR 仪中进行酶切连接反应。反应条件是 37°C 恒温 $2\sim 3\text{h}$, 然后以每分钟 0.5°C 的速度降至 15°C , 再经 70°C 高温处理 15min 使酶变性失活。将反应液置 -20°C 保存, 作为扩增的模板。

1.3.2 PCR 扩增:AFLP 的 PCR 扩增反应液组成为: *Dynazyme* ($10\times$) 缓冲液 $2\mu\text{L}$, dNTP ($2\times$) $2\mu\text{L}$, 具有 2 个选择性碱基的 *EcoR* I 引物 ($5\mu\text{mol/L}$) 和 *Mse* I 引物 ($10\mu\text{mol/L}$) 各 $1\mu\text{L}$, *Dynazyme* 聚合酶 ($2\text{U}/\mu\text{L}$) $1\mu\text{L}$, 经酶切连接的模板 DNA $1\mu\text{L}$, 用重蒸馏水补充至总体积 $20\mu\text{L}$, 再加矿物油 $20\mu\text{L}$, 置 PCR 仪中扩增。实验中选择性碱基引物的设计参照 Vos^[7] 的文献, 其序列分别为:

EcoR I 5' GACTGCGTACCAATTTCGC 3' (选择性碱基为 GC)

Mse I 5' GATGAGTCCTGAGTAACG 3' (选择性碱基为 CG)

PCR 扩增反应的程序为: 94°C 变性 30s , 59°C 退火 1min , 72°C 延伸 1min , 重复 30 个循环, 最后 72°C 延伸 3min 。

1.3.3 聚丙烯酰胺凝胶电泳及结果处理:PCR 扩增产物用 Vos^[7] 的方法进行聚丙烯酰胺凝胶电泳分离和银染。各菌株的 AFLP 谱用惠普扫描仪扫描, 并用 Gelcompar 软件按 UPGMA 平均连接程序进行聚类分析。

2 结果和讨论

花生根瘤菌的 AFLP 谱如图 1 所示, 由图 1 可以看出, 花生根瘤菌的 AFLP 有很高的多态性, 每个菌株的带谱均与其它菌株完全不同, 这充分反映了花生根瘤菌群体内存在的遗传多样性。在花生根瘤菌的遗传多样性研究中, 以前采用过 RFLP 和 rep-PCR 方法^[8,9], 但这两种方法提供的信息量相对少得多, 而且 RFLP 技术复杂, rep-PCR 结果重现性差。AFLP 结果的重现性, 经过多次试验得到证实, 在其它文献中也有类似报道^[5,6]。

既然每个菌株的 AFLP 谱均与其它菌株不一致, 同时结果的重现性很好, 我们认为: AFLP 在根瘤菌的原位研究中, 是一种极为有用的标记技术。目前使用的抗菌素基因和发光基因标记法, 必须将抗性基因和发光基因重组到研究菌株中, 必然导致遗传性状的改变, 而 AFLP 是一种自然的标记。为了更直观的反映花生根瘤菌群体内存在的遗传多样性, 使用 UPGMA 平均连接程序进行了相似性聚类分析, 结果如图 2 所示。聚类分析的结果表明: 所有供试菌株的 AFLP 谱相似性水平仅有 10%。按照根瘤菌系统分类标准, 种内 DNA 的同源性应该达到 85%, 依据这个标准, 花生根瘤菌可以划分为许多个遗传型。这种遗传上的巨大差异, 导致了花生根瘤菌分类地位的复杂性, 前人将花生根瘤菌笼统地归为豇豆族杂群 (Cowpea type), 显然是不合适的。花生根瘤菌不仅在遗传上具有多样性, 而且在表型上也是如此, 我们已对这群菌株的 120 多个表型性状进行了测定和聚类分析, 发现各菌株在碳源和氮源利用、抗药性、耐盐性、生长的最适温度和酸碱度等方面均存在很大差异。

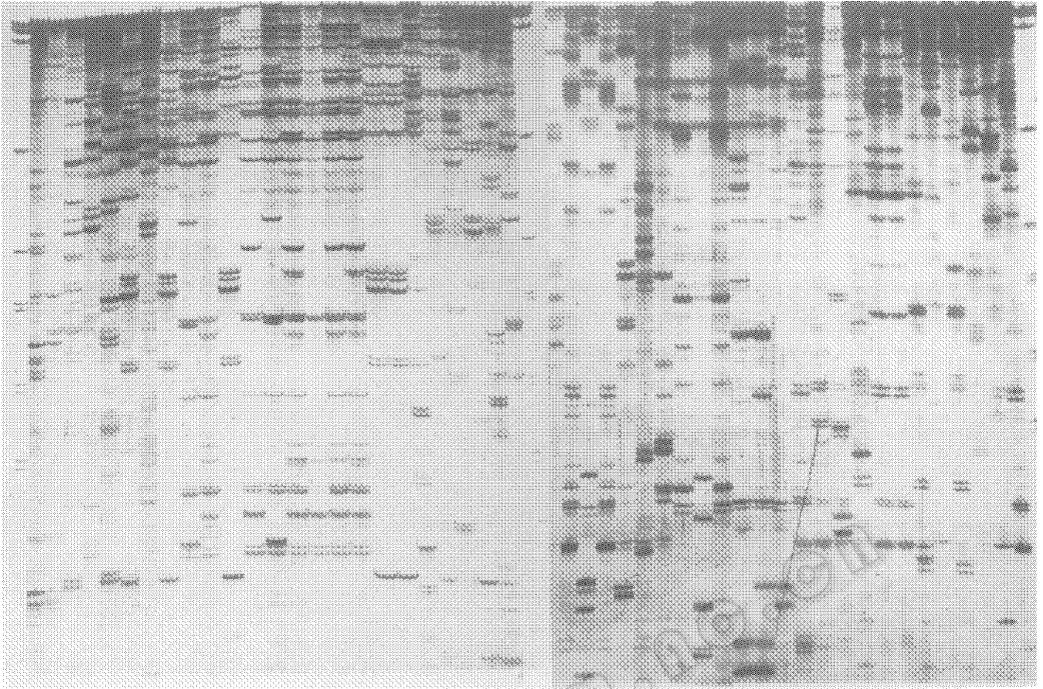


图 1 花生根瘤菌的 AFLP 谱(分子量标记 PGEM DNA)

Fig. 1 The AFLP patterns of peanut bradyrhizobia(molecular weight markers PGEM DNA)

从左到右的次序为 :PGEM DNA(分子量标准) 2642、2644、2652、2654、2656、2658、2659、2660、2661、2662、2663、2664、2666、2667、2669、2672、2676、2679、2682、2684、2686、2687、2688、2689、2692、PGEM DNA、Spr17-3、Spr18-3、Spr18-4、Spr18-6、Spr19-1、Spr19-2、Spr19-4、Spr20-1、Spr20-2、Spr20-3、Spr20-6、Spr21-1、Spr21-5、Spr22-1、Spr22-2、Spr22-3、Spr22-6、Spr22-7、Spr22-8、Spr23-1、Spr23-2、Spr23-4、Spr24-1、Spr24-2、Spr24-3 PGEM DNA

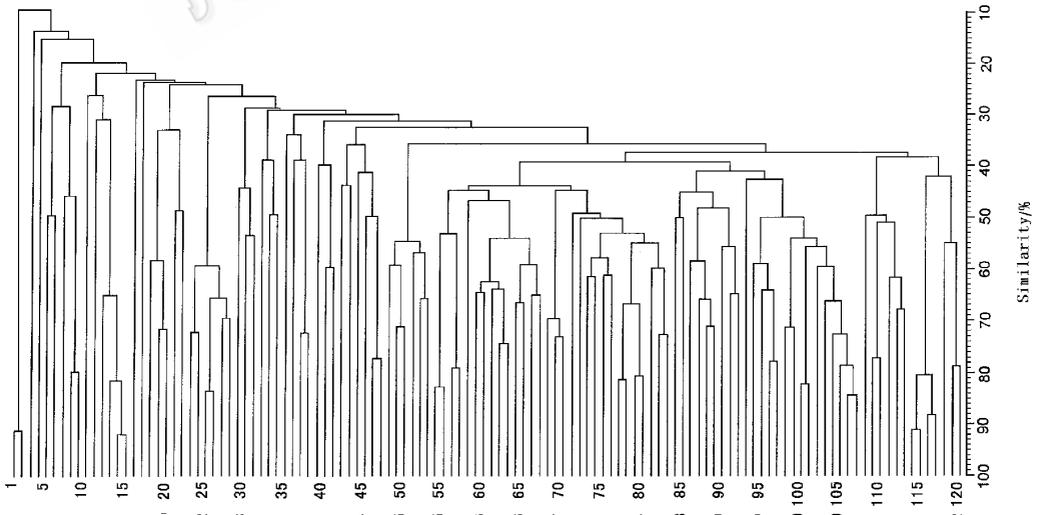


图 2 花生根瘤菌 AFLP 谱相似性聚类图

Fig. 2 UPGMA dendrogram based on the similarity of AFLP patterns

1-120 *Bradyrhizobium* sp. Spr 7-8, Spr7-6, Spr17-1, Spr22-3, LMG123, MAR253, *B. japonicum*. B15, LMG6138, *B. japonicum*. ATCC10324, *B. elkanii*. USDA76, Spr7-9, MAR411, LMG6135, LMG14309, LMG14306, Spr19-2, *B. japonicum*. USDA4087, 2663, 282(2), 2658(2), Spr16-3, Spr17-3, 2669, 2664, 2661, 2676(3), 2662, *B. japonicum*. USDA110, 2700, 2699(2), Spr17-2, Spr16-2, Spr16-3, Spr16-5, Spr10-2, 2735, 2724, *B. japonicum*. USDA8321, Spr11-2, Spr4-1, Spr5-2, MAR1445, 009, Spr1-2, Spr2-9, Spr2-8, Spr22-1, Spr18-6, Spr24-4, Spr22-8(2), Spr24-3, Spr22-2, 2692, 2693(2), Spr23-1, Spr22-6, 147-3, 2659(2), Spr4-5, 2739(2), 2742, 2710(2), 2644, 2642, Spr7-1, 2746, 2519(2), 2752, 2751, 2652, 2689, 2656, 2728, Spr3-2(2), Spr27-2(2), Spr27-4, Spr27-2(2), Spr27-6(2), Spr24-5, 2687, 2688, 2686, Spr16-8, Spr20-2(2), Spr19-4, Spr15-2, Spr28-2, Spr28-1, Spr19-1, Spr24-1, 2550, Spr12-2(2), 2684, 2753, 2769, 2567(3), 2737, 2774, 297A, 283A, Spr25-1, 2716, 2539, 2757(3), 2576, 27723, Spr18-4, Spr21-1, Spr20-6, Spr6-3, Spr21-5, Spr20-2, *B. Liaoningensis*. 2060, DE454, 2262, 2261, Spr26-1, Spr25-2(2), Spr3-4.

致 谢 本研究的部分菌种由中国农业科学院土壤肥料研究所葛诚研究员和李俊助理研究员提供,在此表示衷心感谢。

参 考 文 献

- [1] Meksem K, Leister D, Peleman J *et al.* *Mol Gen Genet*, 1995, **249**: 74-81.
- [2] Van Eck H J, van der Voort J R, Draaistra J *et al.* *Mol Breeding*, 1995, **1**: 397-410.
- [3] Otsen M, den Bieman M, Kuiper M T R *et al.* *Genomics*, 1996, **37**: 289-294.
- [4] Folkertsma R T, de Groot K E, Van zandvoort P M *et al.* *Molecular Plant Microbe Interactions*, 1996, **9**: 47.
- [5] Majer D, Mithen R, Lewis B G *et al.* *Mycological Research*, 1996, **100**: 1107-1111.
- [6] Keim P, Diers B W, Olson T C *et al.* *J Bact*, 1997, **179**: 818-824.
- [7] Vos P, Hogers M, Bleeker M *et al.* *Nuc Acid Res*, 1995, **23**: 4407-4414.
- [8] 张小平, 陈 强, 李登煜等. 微生物学报, 1996, **36**(3): 227-233.
- [9] 张小平, 李登煜, Nick G 等. 应用与环境生物学报, 1998, **4**(1): 70-73.
- [10] Ausubel F M, Brent R, Kingston R E *et al.* *Current protocols in Molecular biology*. Unit 2.4.1. New York: John Wiley and Sons, Inc. 1994.

THE USE OF AFLP TECHNIQUE FOR THE STUDY OF GENETIC DIVERSITY IN PEANUT BRADYRHIZOBIA

Zhang Xiaoping¹ Chen Qiang¹ Li Dengyu¹ Lindström K²

(¹Department of Microbiology, Sichuan Agriculture University, Yaan 625000)

(²Department of Applied Chemistry and Microbiology, University of Helsinki, SF-00014, Finland)

Abstract A total of 146 bradyrhizobial strains including 133 peanut bradyrhizobia isolated from different regions and 13 reference strains representing *B. japonicum* and *B. elkanii* were studied for their genetic diversity by use of AFLP marker technique. The genomic similarity was analysed by numerical Taxonomy based on the AFLP patterns. The results showed that the genetic diversity of peanut bradyrhizobia were very high. Each strain had a identical AFLP pattern. AFLP technique is simple, fast, highly reproducible, and is a useful tool for evaluating genetic diversity.

Key words Peanut bradyrhizobia, Diversity, AFLP