

福建省放线菌结瘤植物共生菌 *Frankia* 遗传多样性研究

李志真^{1,2}

(¹福建省林业科学研究院, 福州 350012)

(²福建师范大学地理学博士后流动站, 福州 350007)

摘要:【目的】了解福建省放线菌结瘤植物共生固氮菌 *Frankia* 的遗传多样性。【方法】利用 16S-23S rDNA 间隔区 (*rrn*) 和 *nifD*-K 基因间隔区的 PCR 扩增和 RFLP 技术, 分析了福建省木麻黄、杨梅、桫欏木、胡颓子等共生 *Frankia* 纯培养菌株的遗传差异。【结果】17 个菌株获得 *rrn* 扩增片段, 2 个杨梅菌株和 1 个胡颓子菌株扩增未成功, 酶切图谱经聚类分析表明 6 个地点的细枝木麻黄、短枝木麻黄、粗枝木麻黄 12 个共生 *Frankia* 菌株同源性高, 属于一个类群, 2 个地点的 4 个杨梅菌株和 1 个四川桫欏木菌株亲缘关系近, 为另一类群。25 个 *Frankia* 菌株的 *nifD*-K 基因间隔区 PCR-RFLP 分析结果显示, 7 个地点的 3 种木麻黄 14 个菌株聚类为一个类群, 4 个地点的 7 个杨梅菌株、2 个地点的 2 个四川桫欏木菌株以及 1 个台湾桫欏木菌株聚类为另一个类群, 胡颓子菌株则为独立的类群。【结论】研究结果表明福建省共生 *Frankia* 遗传多样性丰富。

关键词: *Frankia*; PCR; RFLP; IGS 16S-23S rDNA; IGS *nifD*-K; 遗传多样性

中图分类号: Q939 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 11-1432-07

福建省放线菌结瘤植物资源丰富, 自然分布与引进种植的约 4 科 4 属 29 种^[1], 如沿海防护林主要树种木麻黄, 果树杨梅, 造纸原料树种桫欏木等。这些固氮植物分布广泛, 适应性强, 在提高土壤肥力、促进植物生长、改善生态环境等方面发挥着重要作用。因此, 开展放线菌结瘤植物的共生固氮研究有着重要的理论意义和广阔的应用前景。

放线菌结瘤植物共生菌 *Frankia* 分类, 目前公认至“属”, 尚无法进行“种”的划分^[2,3]。许多学者从 *Frankia* 的形态特征^[3]、生理特性^[4]、可溶性蛋白^[5]、同功酶^[6]、免疫学^[7]、宿主特异性^[8]、DNA 同源性^[9]、基因组限制酶切图谱^[10]等诸多方面进行了分析, 由于研究菌株数量有限, 培养过程易发生变异, 迄今为止仍无有效的定种方法。近年来, 16S rDNA、16S-23S rDNA 间隔区序列以及 *nif* 基因作为一种分子标记,

广泛应用于各种微生物的分子遗传、分类鉴定、系统发育等研究^[2, 11, 12]。在我国, 利用 16S DNA 和 *nif* 基因等分子技术对北方生长的沙棘 (*Hippophae rhamnoides*)、黄果沙枣 (*Elaeagnus oxycarpa*)、色赤杨 (*Alnus tinctoria*)、毛赤杨 (*A. hirsuta*)、细枝木麻黄 (*Casuarina cunninghamiana*)、短枝木麻黄 (*C. equisetifolia*) 以及云南旱冬瓜 (*A. nepalensis*)、浙江杨梅 (*Myrica rubra*) 等少数共生 *Frankia* 的遗传多样性进行了研究^[13~16]。为了深入了解福建省放线菌结瘤植物共生 *Frankia* 的遗传差异, 本文利用 16S-23S rDNA 间隔区和固氮基因 *nifD*-K 间隔区为分子指标, 对福建省不同生境条件下生长的主要放线菌结瘤植物共生 *Frankia* 菌株进行了 PCR 扩增和 RFLP 分析, 以期明确福建省 *Frankia* 的种群多样性, 为 *Frankia* 的分类鉴定提供参考。

基金项目: 福建省科技厅自然基金项目(B993001); 国家林业局南方山地用材林培育重点实验室

作者简介: 李志真(1965-), 女, 福建长汀人, 高工, 博士, 主要从事林木共生微生物和林木遗传育种研究。Tel/Fax: +86-591-87911409;

E-mail: zhizhenlily@yahoo.com.cn

收稿日期: 2008-04-25; 修回日期: 2008-08-01

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株: 供试 *Frankia* 共生菌株 26 个, 其中短枝木麻黄 (*C. equisetifolia*) 菌株 6 个, 粗枝木麻黄 (*C. glauca*) 菌株 3 个, 细枝木麻黄 (*C. cunninghamiana*) 菌株 5 个, 杨梅 (*M. rubra*) 菌株 8 个, 四川桫木 (*A. cremastogyne*) 菌株 2 个, 台湾桫木 (*A.*

formosana) 菌株 1 个, 福建胡颓子 (*E. oldhami*) 菌株 1 个, 由福建南部东山、中部惠安、来舟和福州、东北部福安、北部武夷山等沿海及山地生长的上述植物根瘤分离获得。对照菌株为短枝木麻黄菌株 9550 和杨梅菌株 2215, 分别由中国林业科学研究院热带林业研究所康丽华研究员和中科院微生物研究所刘志恒研究员惠赠。各菌株来源见表 1。

表 1 供试 *Frankia* 菌株及来源

Table 1 *Frankia* strains for study

Strain	Host plant	Geographical origin	Soil and Site	pH
FCe19	<i>C. equisetifolia</i>	东山(Dongshan, Fujian, China)	Coastal sand	-
FCe23	<i>C. equisetifolia</i>	东山(Dongshan, Fujian, China)	Coastal sand	-
FCe42	<i>C. equisetifolia</i>	来舟(Laizhou, Fujian, China)	Mountain red soil	-
FCe37	<i>C. equisetifolia</i>	惠安(Huian, Fujian, China)	Coastal sand	7.41
FCe72	<i>C. equisetifolia</i>	惠安(Huian, Fujian, China)	Coastal sand	7.41
FCe75	<i>C. equisetifolia</i>	惠安(Huian, Fujian, China)	Coastal sand	7.41
FCc02 ^{Ac}	<i>C. cunninghamiana</i>	福州(Fuzhou, Fujian, China)	Perlite in the pot	7.20
FCc04 ^{Ac}	<i>C. cunninghamiana</i>	福州(Fuzhou, Fujian, China)	Perlite in the pot	7.20
FCc64	<i>C. cunninghamiana</i>	福鼎(Fuding, Fujian, China)	Coastal tidal flat	6.85
FCc91	<i>C. cunninghamiana</i>	惠安(Huian, Fujian, China)	Coastal sand	7.45
FCc93	<i>C. cunninghamiana</i>	惠安(Huian, Fujian, China)	Coastal sand	7.45
FCg07	<i>C. glauca</i>	东山(Dongshan, Fujian, China)	Coastal sand	-
FCg08	<i>C. glauca</i>	东山(Dongshan, Fujian, China)	Coastal sand	-
FCg77	<i>C. glauca</i>	福清(Fuqing, Fujian, China)	Coastal sand	-
FEo01	<i>E. oldhami</i>	惠安(Huian, Fujian, China)	Coastal sand	6.90
FAf07	<i>A. formosana</i>	来舟(Laizhou, Fujian, China)	Wet land	-
FAc01	<i>A. cremastogyne</i>	来舟(Laizhou, Fujian, China)	Wet land	-
FAc03	<i>A. cremastogyne</i>	福州(Fuzhou, Fujian, China)	Perlite in the pot	7.20
FMr13	<i>M. rubra</i>	来舟(Laizhou, Fujian, China)	Mountain red soil	-
FMr16	<i>M. rubra</i>	来舟(Laizhou, Fujian, China)	Mountain red soil	-
FMr24	<i>M. rubra</i>	来舟(Laizhou, Fujian, China)	Mountain red soil	-
FMr43	<i>M. rubra</i>	武夷山(Wuyi Mountains, Fujian, China)	Mountain red soil	-
FMr58	<i>M. rubra</i>	福鼎(Fuding, Fujian, China)	Red soil in the orchard	4.40
FMr59	<i>M. rubra</i>	福鼎(Fuding, Fujian, China)	Red soil in the orchard	4.40
FMr61	<i>M. rubra</i>	福鼎(Fuding, Fujian, China)	Red soil in the orchard	4.40
FMr70	<i>M. rubra</i>	福鼎(Fuding, Fujian, China)	Red soil in the orchard	4.40
9550	<i>C. equisetifolia</i>	广州(Guangzhou, Guangdong, China)	Red soil in the nursery	-
2215	<i>M. rubra</i>	云南(Yunnan, China)	Mountain red soil	-

1.1.2 引物、试剂和仪器: 本实验扩增 2 个 DNA 区域:(1) 16S-23S rDNA 的核糖体操纵子区域, 即 16S rDNA 的 3 端、间隔区 IGS 和 23S rDNA 5 端的 *rrn* 区域;(2) 固氮基因区域, 即 *nifD* 基因 3 端、间隔区 IGS 以及 *nifK* 基因 5 端的 *nifD-K* 区域。扩增 rDNA 引物为: FGPS989ac 和 FGPL132, 核苷酸序列: 5'-GGGGTCCGTAAGGGTC-3 和 5'-CCGGGTTTCCCC-ATTCGG-3^[17,18] 扩增 *nifD-K* 基因的引物为: FGPD807 和 FGPK700, 序列: 5'-CACTGCTACCGG TCGATGA-

A-3 和 5'-CGAGGTAGGTCTCGAAACCGG-3^[17,18]。限制性内切酶为 *Nci* I、*Rsa* I、*Msp* I、*Nde* I、*Alu* I、*Cfo* I 等 6 种, *Taq* 聚合酶, 均系 Promega 公司产品, 由上海生物工程公司合成。PCR 扩增仪为 PTC-100 (MC 公司), 凝胶成像系统是 Bio-Rad Gel Doc 2000 (MJ 公司)。

1.2 菌株 DNA 的提取

参照彭源东等方法^[19], 以 CTAB 方法提取菌株 DNA, 并作改进。离心收集菌体 (约 60 mg), 充分

研磨,先以 TE 8 (Tris 50 mmol/L , EDTA 20 mmol/L , pH 8.0) 洗涤,再用 TNE 溶液 (Tri-HCl 10 mmol/L , NaCl 100 mmol/L , EDTA 1 mmol/L , pH 8.0) 洗涤 2 次,收集菌体悬浮液,加入 300 μ L CTAB 提取缓冲液 (CTAB 2% , Tri-HCl 100 mmol/L , EDTA 20 mmol/L , NaCl 1.4 mol/L , pH 8.0),充分混匀,70 $^{\circ}$ C 水浴 3 h。加入等体积的氯仿:异戊醇 (24:1) 溶液,混匀,离心 3 min,移取上清液,加 2/10 体积的 CTAB 沉淀缓冲液 (CTAB 5% , NaCl 0.35 mmol/L),混匀,65 $^{\circ}$ C 水浴 10 min。加入酚:氯仿:异戊醇 (24:23:1) 溶液,高速离心 10 min,重复抽提 2 次,加入 1/10 体积 3 mol/L KAc,以预冷无水乙醇沉淀 DNA,再以 70% 乙醇洗涤,自然风干,以 TE (Tris 10 mmol/L , EDTA 1 mmol/L) 溶液保存于 -20 $^{\circ}$ C,同时取 2 μ L 于 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.3 PCR 扩增

PCR 扩增反应总体积为 25 ~ 50 μ L,其中:2 μ L 模板 DNA (*Frankia* 基因组 DNA),0.2 mmol/L 引物、0.2 mmol/L dNTP,1~1.5 U *Taq* 酶。16S-23S rDNA 的扩增反应程序为:95 $^{\circ}$ C 3 min,94 $^{\circ}$ C 1 min、50 $^{\circ}$ C 1 min、72 $^{\circ}$ C 2 min,循环 35 次,72 $^{\circ}$ C 5 min。*nifD*-K DNA 扩增反应程序是:95 $^{\circ}$ C 3 min,95 $^{\circ}$ C 1 min、55

1 min、72 $^{\circ}$ C 2 min,循环 35 次,72 $^{\circ}$ C 6 min。PCR 产物在 1.5% 琼脂糖凝胶上电泳,EB 染色,于凝胶成像系统中检查扩增效果。

1.4 RFLP 分析

根据内切酶作用位点及有关研究结果^[17],选用上述 6 种内切酶对 PCR 产物进行酶切。反应体系均为 5 μ L,反应温度 37 $^{\circ}$ C,酶切 2 h。酶切产物在 1.5% 琼脂糖凝胶上电泳,染色,拍照,检测。

1.5 聚类分析

对应每一条酶切谱带,不同菌株间迁移率相同的带视为同一性状。酶切片段以 Bio-Rad Quantity one 软件进行谱带分析,用 UPMGA 方法构建聚类分析图。

2 结果和分析

2.1 *rrn* 基因片段扩增

20 个供试 *Frankia* 菌株 DNA 经引物 FGPS809ac 和 FGPL132 扩增 16S-23S rDNA 的 *rrn* 区域,11 个木麻黄菌株、4 个杨梅菌株、1 个四川桫木菌株和对照木麻黄菌株 9550 均获得一条稳定、清晰的特异条带,片段约 1067 bp 左右,见图 1。杨梅 FMr59、胡颓子 FEO01 和对照杨梅 2215 等 3 个菌株的 DNA 经多次扩增,仍未能获得 *rrn* 区域的扩增带。

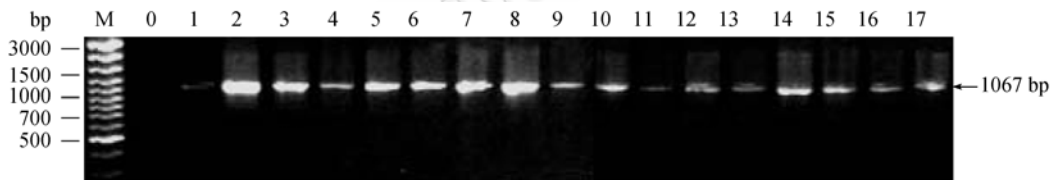


图 1 木麻黄、杨梅、桫木共生 *Frankia* 的 16S-23S rDNA 间隔区 *rrn* 序列扩增

Fig. 1 Amplified *rrn* region of IGS 16S-23S rDNA of *Frankia* strains nodulating *Casuarina*, *Myrica* and *Alnus*. 1-9550, 2-FAc01, 3-FMr43, 4-FCe75, 5-FCe91, 6-FMr24, 7-FMr13, 8-FMr16, 9-FCe72, 10-FCe64, 11-FCg08, 12-FCc04^{Ac}, 13-FCe19, 14-FCe37, 15-FCe23, 16-FCe42, 17-FCc02^{Ac}.

由 Bosco 等人设计的引物 FGPS989ac 和 FGPL132 用于扩增木麻黄、桫木 *Frankia* 类群的 *rrn* 区域,但不能扩增一些木麻黄根瘤无效菌株 (Fix⁻) 和非典型性菌株 (Nod⁻)^[17,18]。本实验结果也说明了该引物能有效地扩增木麻黄 *Frankia* 类群,并能扩增部分杨梅 *Frankia*,但对另一些杨梅菌株 (如 FMr59、2215) 和胡颓子菌株无效,因此利用 16S-23S rDNA 间隔区了解杨梅和胡颓子 *Frankia* 类群的遗传多样性,尚需要进一步设计和筛选引物。

2.2 PCR-RFLP 分析

扩增产物经 *Nci*、*Msp*、*Nde* 和 *Rsa* 酶切,

结果见图 2。17 个 *Frankia* 菌株扩增带以 *Nci* 酶切,获得 4 条酶切片断,分为 2 种酶谱类型,其中 3 条小分子片断大小一致,第 4 条片断存在差异。桫木 FAc01 和杨梅 FMr43、FMr24、FMr13、FMr16 有一条约 510 bp 的共同带,12 株木麻黄菌株共有另一条片段,约 287 bp。用 *MspI* 和 *NdeII* 酶切,参试菌株的扩增产物同样分成 2 种酶谱类型,木麻黄菌株有相同的酶切谱带,杨梅和桫木菌株为另一种酶切图谱,各个酶切片断较小。以 *RsaI* 酶切,16 株菌株获得大小一致的 3 条片断,菌株 FMr13 则另有 3 条差异性片段。从这些酶切结果看,内切酶 *NciI* 和 *MspI* 能较好地地区分菌株的差异性。

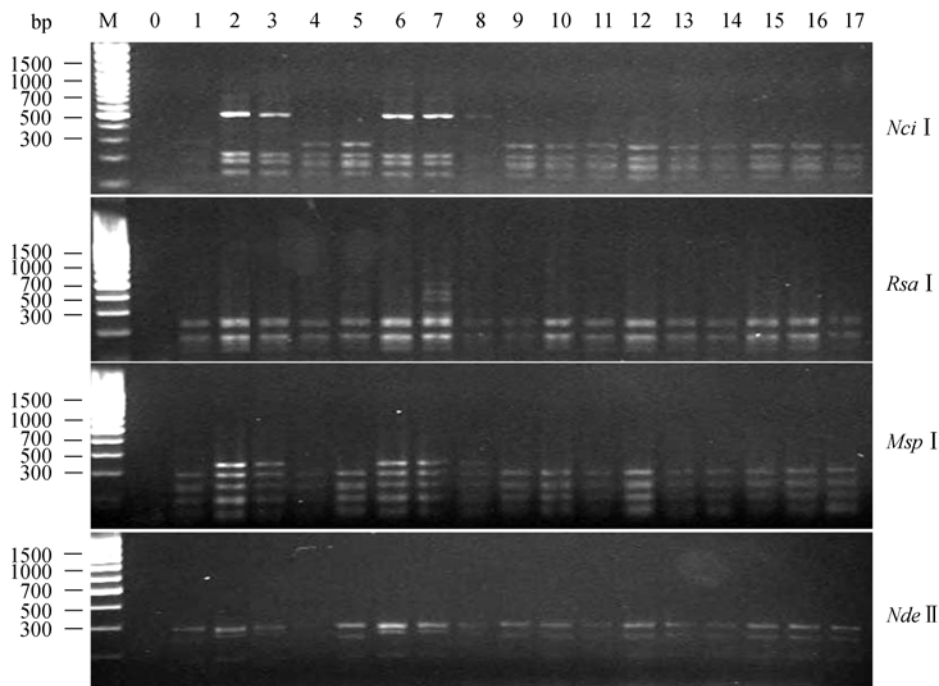


图2 *Frankia* 16S-23S rDNA 间隔区扩增片段的酶切图谱

Fig. 2 Fingerprints of amplified *Frankia* IGS 16S-23S rDNA after digestion with *Nci* I, *Rsa* I, *Msp* I, *Nde* II. 1-9550, 2-FAc01, 3-FMr43, 4-FCe75, 5-FCe91, 6-FMr24, 7-FMr13, 8-FMr16, 9-FCe72, 10-FCe64, 11-FCg08, 12-FCe04^{Ac}, 13-FCe19, 14-FCe37, 15-FCe23, 16-FCe42, 17-FCe02^{Ac}.

2.3 聚类分析

为了直观反映菌株间 16S-23S rDNA 基因的遗传关系,将参试菌株 4 种酶切图谱以 UPMGA 方法进行聚类分析,构建了相似性聚类图,结果见图 3。

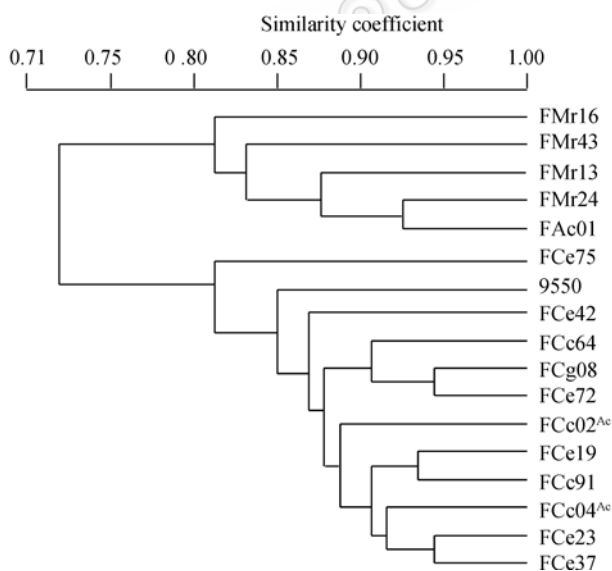


图3 *Frankia* 16S-23S rDNA 间隔区 PCR 扩增产物酶切图谱聚类分析

Fig. 3 Cluster analysis on PCR-RFLP products amplified IGS 16S-23S rDNA of *Frankia* strains.

显然 17 个 *Frankia* 菌株可以分为两种类群:木麻黄类群和杨梅-桉木类群。福建东北部福鼎、中部惠安、来舟、福州、南部东山以及广州等不同地点、不同土壤基质的细枝木麻黄、短枝木麻黄、粗枝木麻黄共生的 12 个 *Frankia* 菌株同源性高,亲缘关系近,同属于一个类群。武夷山和来舟的 4 个杨梅菌株和 1 个四川桉木菌株在 81%相似性水平上聚类为另一类群。各类群菌株之间一定差异,如在木麻黄类群中,惠安的短枝木麻黄菌株 FCe37 与 FCe75、FCe72 差异较大,而与东山的 FCe23 相似性极高,东山的粗枝木麻黄菌株 FCg08 与惠安的短枝木麻黄 FCe72 相似性高。在杨梅-桉木类群中,同一地点的杨梅菌株 FMr24 与 FMr16 差异较大,与四川桉木菌株 FAc01 相似性却高达 92.6%,说明生存于相同地点的 *Frankia* 菌株可以差异较大,分布于不同地域的 *Frankia* 也可能极为相似。

2.4 *nifD-K* 基因 IGS PCR-RFLP 分析

以引物 FGPD807 和 FGPK700'扩增 *nifD* 和 *nifK* 基因间隔区,25 个菌株均获得扩增片段,约 1400 bp。PCR 产物经 5 种内切酶作用,获得结果图 4。经 *Msp* I、*Rsa* I、*Cfo* I 和 *Nci* I 酶切,25 个菌株表现出 8 种酶切图谱:胡颓子菌株 FEo01 为一个独特的酶

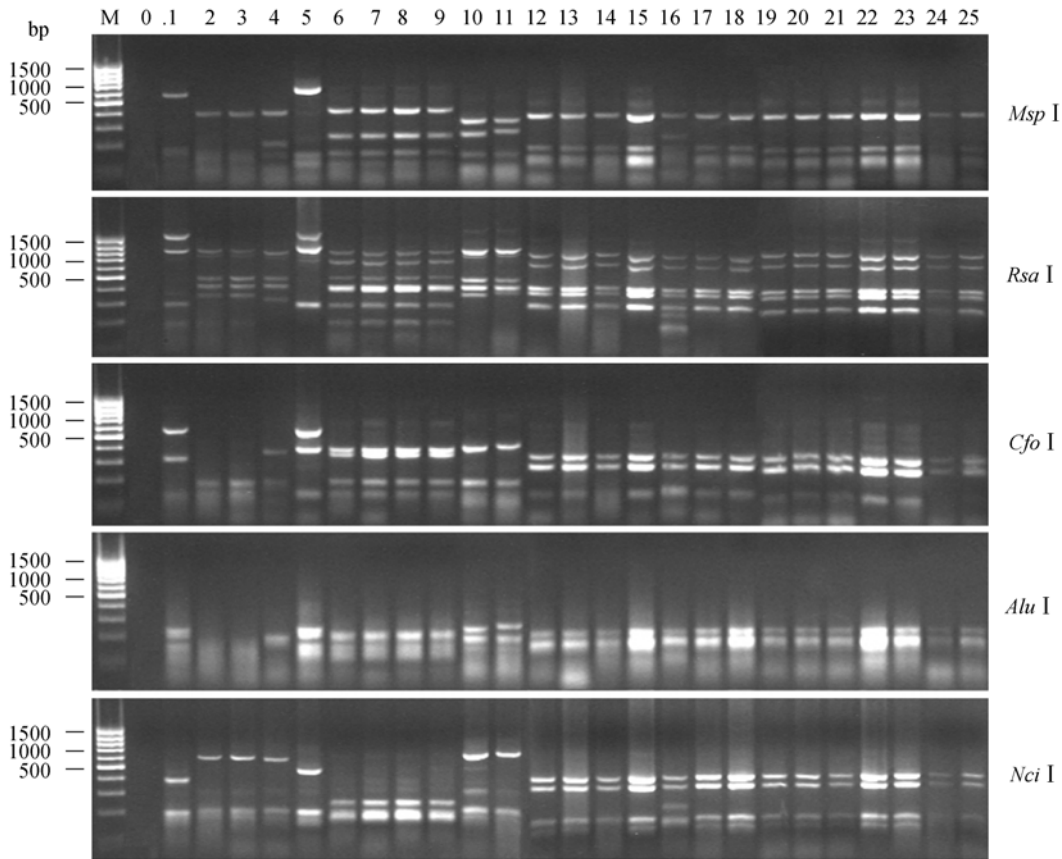


图 4 *Frankia nifD-K* 间隔区扩增片段的酶切图谱

Fig. 4 Fingerprints generated after *Msp* I, *Rsa* I, *Cfo* I, *Alu* I, *Nci* I digestion of amplified *Frankia* IGS *nifD-K* fragments. 1-FEo01, 2-FAf07, 3-FAc01, 4-FAc03, 5-2215, 6-FMr58, 7-FMr59, 8-FMr70, 9-FMr61, 10-FMr13, 11-FMr43, 12-9550, 13-FCg77, 14-FCc02^{Ac}, 15-FCc04^{Ac}, 16-FCg07, 17-FCg08, 18-FCe19, 19-FCe23, 20-FCe42, 21-FCc64, 22-FCe75, 23-FCe72, 24-FCc91, 25-FCc93.

切带型。桫欏木有 2 种谱带：四川桫欏木 FAc01 和台湾桫欏木 FAf07 的酶切片带相同，与四川桫欏木 FAc03 酶切片带略有差异。7 个菌株杨梅有 3 种酶切图谱，2215 为独特类型，FMr58、FMr59、FMr70 和 FMr61 等 4 个菌株酶切带型相同，异于 2215，菌株 FMr13 和 FMr43 则为另一种酶切带型。14 株木麻黄菌株扩增产物经 4 种内切酶作用，13 个菌株获得相似的酶切片带，粗枝木麻黄菌株 FCg07 呈现出差异性片段。*Alu*I 酶作用后 DNA 片段分离不清晰，无法区分这些菌株的多态性。

Msp I、*Cfo* I、*Nci* I 和 *Rsa* I 的酶切结果经聚类分析，参试菌株可分为 3 个类群：与福建和广州 7 个地点 3 种木麻黄共生的 14 个木麻黄菌株聚类为一个类群，相似性达 60%，其中菌株 FCg07 与其它木麻黄菌株差异较大（图 5）。福鼎、武夷山、来舟和云南等 4 个地点的 7 个杨梅菌株，以及福州和来舟的 2 个四川桫欏木菌株、1 个台湾桫欏木菌株在 47% 相似水平上聚类为一个类群，该类群菌株间明显差异，可划分为 4 个亚类群：四川桫欏木 FAc01 和台湾桫欏木 FAf07，

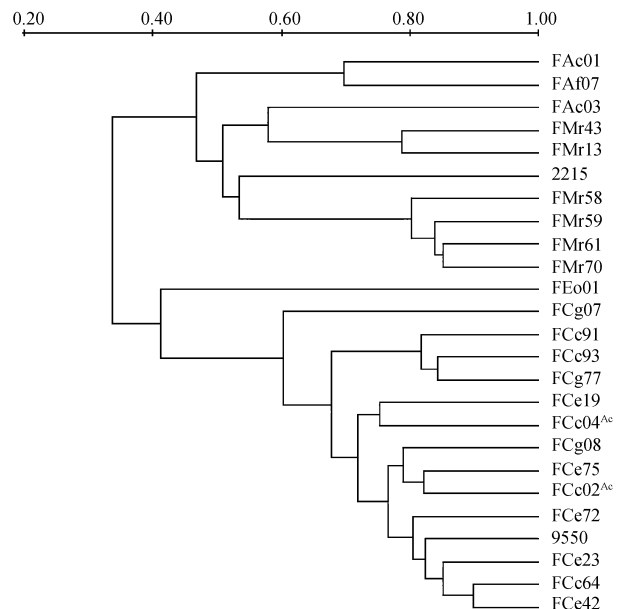


图 5 *Frankia* 菌株 *nifD-K* 间隔区 PCR-RFLP 分析聚类图
Fig. 5 Cluster analysis on PCR-RFLP products amplified IGS *nifD-K* of *Frankia* strains.

相似性接近 70%,可划归为一个亚类;福州的四川桫木 FAc03、武夷山的杨梅 FMr43、来舟的杨梅 FMr13 等亲缘关系较近,聚为一个亚类。福鼎的 4 个杨梅菌株 FMr58、Mr59、FMr70 和 FMr61 相似性程度高,归为另一个亚类。来自云南的对照菌株 2215 与福建 2 个杨梅亚类群的亲缘关系较远。胡颓子菌株 FEO01 与杨梅、桫木菌株相似程度低,与木麻黄菌株关系较近,但仍属于一个单独的分支,相似性为 41.3%。

3 讨论

综合上述 16S-23S rDNA 间隔区和 *nifD*-K 基因间隔区的 PCR-RFLP 分析结果可知,福建省放线菌结瘤植物共生 *Frankia* 菌株遗传多样性是丰富的,可以划分为三大类群:木麻黄类群、杨梅-桫木类群和胡颓子类群。细枝木麻黄、短枝木麻黄和粗枝木麻黄共生 *Frankia* 同源性程度高,属于一个类群,杨梅、四川桫木、台湾桫木等共生 *Frankia* 亲缘关系较近,为另一个类群。该类群菌株之间存在较大的差异,可以再划分亚类群,其遗传变异与宿主来源、地理分布没有明确的对应关系。胡颓子菌株另归为一个独立的类群。

国际上有关木麻黄 *Frankia* 菌株多样性研究结果较为一致,认为与其共生的 *Frankia* 遗传多样性较低^[20,21]。但 Rouvier 等(1996)通过 16S-23S rDNA 的 *rrn* 基因和 *nif* 基因的 PCR-RFLP 分析指出,实际存在于澳大利亚本土的木麻黄 *Frankia* 多样性丰富,有 5 种 PCR-RFLP 类群^[17],且与宿主种类相对应,因而推测各地木麻黄 *Frankia* 多样性低与引种单一树种有关。福建省大量引种木麻黄始于 20 世纪 50 年代,经由越南引进短枝木麻黄和细枝木麻黄等 2 个树种进行推广应用。由于引种来源有限,树种单一,与之共生的 *Frankia* 类群也相应较少,可能导致木麻黄共生 *Frankia* 多样性低。从笔者进行的宿主侵染试验结果可知^[1],木麻黄对共生放线菌具有严格的选择性,杨梅、桫木共生 *Frankia* 不能侵染木麻黄结瘤,暗示木麻黄与 *Frankia* 之间的感染识别体系可能较为特异。

许多研究表明杨梅是最古老的一类放线菌结瘤植物,与其共生的 *Frankia* 有多个分支,较为混乱,一部分共生菌与木麻黄、桫木类群相似,一部分则具有胡颓子类群的遗传特性^[22,23]。本研究利用引物 FGPS989ac 和 FGPL132 对杨梅 FMr59、2215 和胡颓子 FEO01 的 *rrn* 区域多次扩增仍未能获得 PCR 产物。从 *nif* 基因的 PCR-RFLP 分析结果看,杨梅共生菌

存在较大差异,有多种亚类群,需要广泛地收集根瘤材料作深入分析以全面了解杨梅共生 *Frankia* 的多样性。

Nazaret 等(1991)通过 16S rDNA 序列分析认为侵染桫木的 *Frankia* 类群与侵染木麻黄的 *Frankia* 类群有很近的亲缘关系,而与胡颓子类群关系较远^[21],与本研究结果有较大差异,由此说明存在于福建境内四川桫木和台湾桫木根瘤内的 *Frankia* 类群可能有所不同。

国外研究表明胡颓子属植物共生 *Frankia* 较为独特,不同于杨梅、木麻黄和桫木的共生菌^[24]。本文虽仅就菌株 FEO01 进行了实验,但结果与其他研究一致,即胡颓子 *Frankia* 属于一个独立分支,不同于杨梅-桫木、木麻黄等 *Frankia* 类群。因参试胡颓子菌株少,深入了解福建省胡颓子属植物共生 *Frankia* 多样性有待后续进一步研究。

致谢 感谢福建省林业科学研究院杨宗武副院长的支持、谢一青同志的协助及福建省农科院生物技术中心陈坚研究员的指导。

参 考 文 献

- [1] 李志真. 福建弗兰克氏菌研究. 北京: 中国环境科学出版社, 2006, pp 7-78.
- [2] Normand P, Orso S, Cournoyer B, et al. Molecular phylogeny of the genus *Frankia* and related genera and emendation of the family *Frankiaceae*. *Int J Syst Bacteriol*, 1996, 46: 1-9.
- [3] Benson DR, Silvester WB. Biology of *Frankia* strains actinomy-cete symbionts of actinorhizal plants. *Microbiol Rev*, 1993, 57: 293-319.
- [4] Lechevalier MP, Ruan JS. Physiology, chemistry, serology, and infectivity of two *Frankia* isolates from *Alnus incana* subsp. *Can J Bot*, 1983, 61: 2826-2833.
- [5] Gardes M, Lalonde M. Identification and subgrouping of *Frankia* strains using sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Physiol Plant*, 1987b, 70: 237-244.
- [6] Gardes M, Borspuet J, Lalonde M. Isozyme variation among 40 *Frankia* strains. *Appl Environ Microbiol*, 1987, 53: 1596-1603.
- [7] Baker D, Newcomb W, Torrey JG. Immunochemical analysis of relationships among isolated frankiae (*Actinomycetales*). *Int J Syst Bacteriol*, 1981, 31: 148-151.
- [8] Baker D. Relationships among pure cultured strains of *Frankia* based on host specificity. *Physiol Plant*, 1987, 70: 245-248.
- [9] Akimov VN, Dobritsa SV. Grouping of *Frankia* strains on the basis of DNA relatedness. *System Appl Microbiol*, 1992, 15: 372-397.
- [10] Nittayajarn A, Mullin BC, Baker DD. Screening of symbiotic frankiae for host specificity by restriction fragment length poly-

- morphism analysis. *Appl Environ Microbiol*, 1990, 56: 1172–1174.
- [11] Nazaret S, Gourmoyer B, Normand P, *et al.* Phylogenetic relationships among *Frankia* genomic species determined by use of amplified 16S rDNA sequences. *J Bacteriol*, 1991, 173: 4072–4078.
- [12] Normand P, M Gouy, B Cournoyer, *et al.* Nucleotide sequence of *nifD* from *Frankia alni* strain ArI3: phylogenetic inferences. *Mol Biol Evol*, 1992, 9: 495–506.
- [13] 刘忠, 吴少慧, 周斌, 等. 应用 ARDRA 技术研究 *Frankia* 菌多样性. 微生物杂志(*Journal of microbiology*), 2001, 21(1): 20–23.
- [14] 吴少慧, 张惠文, 熊智, 等. ARDRA 对植物根瘤内生放线菌 *Frankia* 多样性的研究. 应用生态学报(*Chinese journal of applied ecology*), 2001, 12 (6): 883–886.
- [15] 代玉梅, 曹军, 唐晓萌, 等. 高黎贡山旱冬瓜 *Frankia* 的 IGS PCR-RFLP 分析. 应用生态学报(*Chinese journal of applied ecology*), 2004, 15 (2): 186–190.
- [16] He XH, Chen LG, Hu XQ, *et al.* Natural diversity of nodular microsymbionts of *Myrica rubra*. *Plant and Soil*, 2004, 262: 229–239.
- [17] Rouvier C, Prin Y, Reddell P, *et al.* 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*, 1996, 62 (3): 979–985.
- [18] Hahn D, Nickel A, Dawson J. MiniReview, Assessing *Frankia* populations in plants and soil using molecular methods. *FEMS Microbiology Ecology*, 1999, 29: 215–227.
- [19] 彭源东, 柯丹兵, 张忠泽. *Frankia* 基因型 DNA 提取及其 PCR 带型. 微生物学杂志(*Journal of microbiology*), 1997, 17(3): 1–5.
- [20] Maggia L, Nazaret S, Simonet P. Molecular characterization of *Frankia* isolates from *Casuarina equisetifolia* root nodules harvested in West Africa (Senegal and Gambia). *Acta Fcol*, 1992, 13: 453–461.
- [21] Nazaret S, Gourmoyer B, Normand P, *et al.* Phylogenetic relationships among *Frankia* genomic species determined by use of amplified 16S rDNA sequences. *J Bacteriol*, 1991, 173: 4072–4078.
- [22] Huguet V, Batzli JM, Zimpfer JF, *et al.* Diversity and specificity of *Frankia* strains in nodules of sympatric *Myrica gale*, *Alnus incana*, and *Shepherdia canadensis* determined by *rrs* gene polymorphism. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67 (5): 2116–2122.
- [23] Clawson ML, Benson DR. Natural diversity of *Frankia* strains in actinorhizal root nodules from promiscuous hosts in the family *Myricaceae*. *Appl Environ Microbiol*, 1999, 65(10): 4521–4527.
- [24] Clawson ML, Margarita C, Benson DR. Diversity of *Frankia* Strains in root nodules of Plants from the Families *Elaeagnaceae* and *Rhamnaceae*. *Appl Environ Microbiol*, 1998, 64(9): 3539–3543.

Genetic Diversity of *Frankia* in Fujian

Zhizhen Li^{1,2*}

¹The Academy of Fujian Forestry, Fuzhou 350012, China)

²Postdoctoral Research Station, College of Geographical Sciences of Fujian Normal University, Fuzhou 350007, China)

Abstract: There are lots of actinorhizal plants distributed in coastal area and mountains in Fujian province, China. **[Objective]** The aim of this study is to describe the genetic diversity of *Frankia* strains symbiotically associated with several species of *Casuarina*, *Myrica*, *Alnus* and *Elaeagnus* in Fujian. **[Methods]** Genomic DNA was extracted from *Frankia* strains and used as template in PCR with the primers targeting two DNA regions, one in ribosomal operon, and the other in *nifD-K* gene. PCR products were then digested by using a set of restriction endonucleases to generate the restriction fragment length polymorphism patterns. **[Results]** Except 2 strains nodulating *M. rubra* and a strain infecting *E. oldhami*, 17 *Frankia* strains had an amplified fragment of *rrn* region in 16S-23S rDNA intergenetic spacer (IGS), 12 *Frankia* strains nodulating *C. equisetifolia*, *C. cunninghamiana* and *C. glauca* living in 6 geographical origins had high homogeneity and were assigned to one group by clustering analysis, 5 strains from *M. rubra* and *A. cremastogyne* were closely related and fell to the other group. All 25 *Frankia* strains showed a single copy of IGS *nifD-K* and generated 8 PCR-RFLP patterns while clustering into 3 different groups. *Frankia* strains nodulating three species of *Casuarina* in seven different sites had a high degree of genetic similarity to cluster one group. Isolates infecting *M. rubra*, *A. cremastogyne* and *A. formosana* were closely related and belonged to the other cluster, *Frankia* from *E. oldhami* owed a quite different cluster. **[Conclusion]** These results demonstrated that there is great genetic diversity among *Frankia* microsymbionts in Fujian.

Keywords: *Frankia*; PCR; RFLP; IGS 16S-23S rDNA; IGS *nifD-K*; Genetic Diversity

Supported by the Natural Science Foundation of Fujian Province (B993001) and the Key Laboratory of Timber Forest Breeding and Cultivation Ministry for Mountainous areas in Southern China

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-591-87911409; E-mail: zhizhenlily@yahoo.com.cn

Received: 25 April 2008/ Revised: 1 August 2008