

苜蓿红豆草属间体细胞杂种的分子生物学鉴定

徐子勤 贾敬芬

(西北大学生物系生物技术省重点实验室 西安 710069)

摘要 通过原生质体融合和培养获得苜蓿红豆草属间体细胞杂种植株。采用一种简便方法从杂种组织再生植株叶片、红豆草羟脯氨酸抗性系再生植株叶片和苜蓿根瘤农杆菌 702 转化系愈伤组织提取 DNA 用于 RAPD 和 Southern 杂交分析。随机引物扩增结果显示两种亲本的 RAPD 多态具有明显差异。在所用 20 种随机引物中,6 种产生较多的 DNA 片段。杂种组织具有两种亲本特有的 DNA 片段,但倾向于排除红豆草亲本的染色体,表明该杂种为非对称杂种,两种亲本染色体之间可能发生了重组。由于红豆草 DNA 的介入,杂种组织表现出较强的分化能力。分别利用 RAPD 扩增得到的 OPA14 1000bp 红豆草羟脯氨酸抗性系特异产物和 OPA14 1600bp 苜蓿根瘤农杆菌 702 转化系特异产物为探针进行 Southern 分子杂交,证明杂种组织同时具有这两种 DNA 片段的同源序列。

关键词 苜蓿,红豆草,体细胞杂种,随机扩增多态 DNA(RAPD),Southern 分子杂交

中图分类号 Q813.4 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2000)01-0173-06

聚合酶链式反应(PCR)是 90 年代分子生物学领域的突出进展之一。通过它不仅分离基因,也可以快速检测特异 DNA 片段。但 PCR 反应通常需要对目的 DNA 片段的序列十分清楚,这极大地限制了它的应用范围。Williams 等采用只有 10 个碱基的单个引物进行 PCR 反应,建立起 RAPD 体系,来实现小片段 DNA 的差异酶促扩增,使 PCR 技术的应用更为广泛^[1,2]。RAPD 多态片段可以直接用作遗传标记,来分析植物材料在不同离体培养和生长时期的变异程度。

苜蓿是最重要的牧草之一,也是品质改良研究中最受关注的豆科植物之一,一些抗病和抗旱特征可以通过原生质体融合从野生品系或其它植物转入其栽培品系。尽管现在苜蓿可以比较容易地从愈伤组织或原生质体得到再生植株,但有关其种间体细胞杂种植株再生的报道仅有几例^[3-8]。Pupilli 等通过细胞融合得到紫花苜蓿和蓝花苜蓿六倍体杂种,分子生物学检测表明杂种组织中蓝花苜蓿基因组被部分排除^[9,10]。Li 等通过电融合法得到了红豆草和苜蓿属间体细胞杂种,但杂种并没有获得红豆草亲本的富含单宁物质特征^[11]。我们采用紫花苜蓿根瘤农杆菌 702 转化系与红豆草抗羟脯氨酸变异体为亲本,通过 PEG 诱导原生质体融合,选择得到属

间体细胞杂种植株^[12]。本工作采用 RAPD 和 Southern 杂交技术对该杂种作了分子生物学鉴定。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

用本室筛选的普通红豆草(*Onobrychis viciaefolia*)($2n = 4x = 28$)羟脯氨酸抗性系(Hyp^r)为一亲本;Hyp^r对 10mmol/L Hyp,20% PEG-4000 和 1% NaCl 有很强的抵抗能力,并且可以再生^[13,14]。用本室得到的紫花苜蓿(*Medicago sativa*)($2n = 4x = 32$)根瘤农杆菌 702 转化系(M₇)为另一亲本;M₇没有分化能力,在不含植物激素的培养基上生长良好。将 Hyp^r和 M₇原生质体融合,经选择培养得到 R1 杂种愈伤组织并再生出完整植株^[12]。

1.2 方法

1.2.1 植物总 DNA 的分离与纯化:从 Hyp^r和杂种 R1 再生植株叶片,及 M₇愈伤组织提取总 DNA。总 DNA 提取主要采用以下两种方法:

a)取 2g 材料于 -20℃ 冷冻,然后加 30mL 提取缓冲液(100mmol/L Tris,0.35mol/L 山梨醇,5mmol/L EDTA,1.0% β-巯基乙醇,pH 8.0)匀浆,用两层纱布过滤后于 700 × g 离心 10~15min。沉淀悬浮于 5mL 附加 1.0% CTAB、1mmol/L NaCl、

收稿日期:1999-03-23,修回日期:1999-09-28。

基金项目:国家自然科学基金资助(39770365),陕西省教委重点科研项目(99JK13),西北大学科学研究基金(98NW25H)资助。

25mmol/L EDTA 的提取缓冲液中,60℃保温 1~24h。加入等体积氯仿-异戊醇(24:1)抽提 2 次,于 12 000r/min、4℃离心 10min。上层水相转入一个干净的离心管,加入 2 倍体积冷乙醇于室温放置 10min 沉淀 DNA。12 000r/min 离心后,弃上清液,沉淀吹干后用少量 TE 缓冲液溶解,在 260nm 和 280nm 波长测定 DNA 浓度。

b)取 2g 材料,在液氮中研磨成粉末,每克材料加入 10mL 65℃预热的提取液(2% (W/V)CTAB, 1.4mol/L NaCl, 20mmol/L EDTA, 100mmol/L Tris-HCl, 2% β -巯基乙醇, pH 8.0), 65℃保温 1h。冷却至室温后,加入等体积氯仿-异戊醇抽提 2 次,于 10 000r/min、4℃离心 10min 沉淀 DNA。沉淀用 75%乙醇洗涤 2 次,干燥后溶于 0.5mL TE 缓冲液。加入 RNase,使终浓度为 50 μ g/mL, 37℃保温 30min。接着加入蛋白酶 K,使终浓度为 0.1mg/mL, 37℃保温 2h。再次用氯仿-异戊醇(24:1)抽提两遍,加入等体积 4mol/L NaCl,混匀后加 2 倍体积冷乙醇沉淀 DNA, 4℃、10 000r/min 离心 10min 后弃上清。沉淀干燥后用少量 TE 缓冲液溶解,测定 260nm 和 280nm 紫外吸收值确定 DNA 浓度。

1.2.2 RAPD 反应条件:采用 Operon Technologies Ltd. 公司生产的 A 组引物(共 20 个)进行 RAPD 反应,每种引物 10 bp, G + C 含量为 60%。为了减少交叉污染和提高扩增反应的重复性,同时进行一些对照试验:①其它反应成分齐全,但不加模板 DNA。②其它反应成分齐全,但不加 Taq 酶。模板 DNA 稀释至 1 μ g/ μ L 浓度后保存, Taq DNA 聚合酶采用华美生物工程公司产品。

RAPD 反应体系为 25 μ L, 含 20ng 模板 DNA, 1.0 μ mol/L 随机引物, dATP、dTTP、dCTP 和 dGTP 各 100 μ mol/L, 40mmol/L KCl, 2mmol/L MgCl₂, 0.025 μ g 牛血清白蛋白(或明胶), 10mmol/L Tris-HCl, pH 8.3。每个反应 1 个单位的 Taq DNA 聚合酶。在加入 Taq 酶之前,混合后的其它成分先在 94℃加热 10min,使 DNA 充分变性。Taq 酶加入后,混匀离心,并用 25 μ L 石蜡油覆盖。在华美公司 Thinker series II DNA Thermal cycler 基因体外扩增仪上扩增。先在 72℃保温 3min 后进入循环,循环次数 45。每次循环为:94℃ 1min, 36℃ 2min, 72℃ 3min。最后在 72℃延伸 10min,置于 4℃冰浴冷却。点样于 1.5%琼脂糖凝胶, 80V 电泳 2h。

1.2.3 限制酶切和 Southern 分子杂交:10 μ g 总 DNA 用限制酶进行切割。根据内切酶产品来源设

计反应体系, 37℃反应过夜。将酶切产物点样于 0.8%琼脂糖凝胶, 80V 电泳 2~4h, 电泳缓冲液为 1 \times TAE。琼脂糖凝胶上的 DNA 片段经碱变性后, 转移到硝酸纤维素薄膜上, 80℃烘烤 2h 使 DNA 与薄膜交联。然后于 42℃预杂交 4h, 接着加入³²P 标记 RAPD 扩增特异 DNA 片段作为探针进行杂交。预杂交液成分为: 5 \times SSPE, 5 \times denhardt 试剂, 0.1%SDS, 50%甲酰胺, 0.1mg/mL 鲑精 DNA^[15]。

2 结果与讨论

2.1 DNA 提取

植物材料(包括愈伤组织)均含有大量 RNA、多糖和可溶性蛋白质, 它们会严重妨碍 DNA 的纯化。第一种方法在研磨新鲜组织后, 通过较低的离心速度沉淀细胞核与细胞器, 大部分 RNA、多糖和可溶性蛋白存在于上清液中, 从而避免了 RNA 和蛋白质的酶解过程, 提取液中加入 0.35mol/L 山梨醇是为了防止核与细胞器过早破裂; 沉淀在含 CTAB 的提取缓冲液中于 60℃保温 1h 后, 细胞核就会破裂而释放出 DNA; 然后通过两次氯仿-异戊醇抽提, 便可得到足够内切酶反应的 DNA 量。第二种方法要经过液氮冰冻研磨, 并需要使用蛋白酶 K 和 RNA 酶等比较昂贵的试剂, 实验过程也比较繁琐。本实验结果表明, 采用第一种简易的 DNA 提取方法, 所获 DNA 完全能够达到 RAPD 反应的要求, 扩增产物与第二种方法相比重复性很高。本工作在大量扩增反应中均使用第一种方法提取的 DNA 作为模板。

2.2 影响 DNA 扩增反应的因素

RAPD 分析中存在的最大问题是重复性不太高, 因为 PCR 反应条件的变化会引起一些扩增产物的改变。本工作采用的扩增体系是经多次实验对各种因素进行比较后建立起来的, 在对杂种和亲本进行分析时, 严格保持条件一致, 主要带型均能重复产生。在实验过程中, 发现引物的退火温度是影响 RAPD 扩增反应真实性的重要因素, 退火温度过低会产生假的扩增产物。同时发现 RAPD 反应与一般的 PCR 体系一样, 也存在平台效应。20ng 模板 DNA 在 25 μ L 反应体积中经过 30~35 次循环, 可以产生 1~1.5 μ g 左右的 DNA 产物。此后反应产物只增加 0.5 μ g 左右。增大一些成分的量, 如增加酶、dNTP、Mg⁺⁺ 和引物量, 扩增产物的量并不增加。其原因可能是随着扩增产物的增多, 这些产物会与短序列引物竞争退火; 而扩增产物由于链较长, 往往

会在较高温度形成双链,从而减少了与引物的退火机会。

为了分析扩增结果是否为亲本与引物组合的真实反映,每一实验均重复多次,结果表明琼脂糖电泳显示的 DNA 多态之间具有较好的可比性。每一组反应中,对照试验如不加模板 DNA 或不加 Taq 酶等,均不能得到扩增产物。与明胶相比,牛血清白蛋白(BSA)更适宜于 RAPD 扩增反应,使用 0.025 μ g BSA,25 μ L 体积 45 次循环会产生 1~1.5 μ g DNA,而明胶在相同浓度只会产生 0.2~1 μ g DNA。

2.3 苜蓿红豆草体细胞杂种的 RAPD 分析

本工作采用 RAPD 技术比较了亲本和杂种在基因组 DNA 水平上的同源性变化。根据扩增带型分析,两个亲本的 RAPD 产物表现出明显的特异性。不同引物与同一亲本组合得到的扩增 DNA 多

态之间也存在很大差异,但杂种与两个亲本之间具有较大的同源性(图版 1)。

从 Operon Technologies Ltd. 公司 A 组 20 种随机引物中,筛选出 OPA09(AGTCAGCCGA)、OPA09 (GGGTAACGCC)、OPA13 (CAGCACCCAC)、OPA14 (TCTGTGCTGG)、OPA17 (GACCGCTTGT)和 OPA18(AGGTGACCGT)可以扩增产较多的 DNA 片段,具有较好的多态性。扩增产多集中在 0.5~2kb 之间。利用这 6 个引物,检测了苜蓿亲本的 28 个位点、红豆草亲本的 21 个位点和杂种的 35 个位点;其中杂种与苜蓿亲本的同源性位点为 20 个,杂种与红豆草亲本的同源性位点为 6 个(表 1)。因此,杂种 DNA RAPD 扩增产中,与 2 个亲本同源的 DNA 片段共计 26 个,其它 9 个 DNA 片段为新的扩增产。

表 1 苜蓿红豆草体细胞杂种与亲本的 RAPDs 多态比较

Table 1 Comparison of RAPD polymorphisms between alfalfa(+) sainfoin somatic hybrid and the parents*

Material	Number of the amplified DNA						Total
	OPA03	OPA09	OPA13	OPA14	OPA17	OPA18	
M ₇	5	5	6	6	1	5	28
Hyp ^r	2	4	5	6	1	3	21
R1	7	5	9	8	3	3	35
Number of homologous locus between R1 and M ₇	2	4	6	6	1	1	20
Number of homologous locus between R1 and Hyp ^r	1	1	1	1	1	1	6

* R1: Somatic hybrid plants of alfalfa and sainfoin; M₇: Alfalfa calluses transformed with *Agrobacterium tumefaciens* 702; Hyp^r: Hydroxyproline-resistant sainfoin plants.

OPA03(图版 I-B)、OPA09(图版 I-F)、OPA13(图版 I-E)和 OPA14(图版 I-A)扩增结果表明,杂种(r)RAPD 多态接近于苜蓿亲本(m),但也存在红豆草亲本(h)的特异片段。OPA18(图版 I-C)的扩增产显示杂种与红豆草亲本相似。OPA17(图版 I-D)扩增产中,杂种除具有两个亲本的 DNA 片段外,还出现一条新带。本工作前期曾对杂种组织进行过细胞学、同工酶和冠瘿碱分析,发现杂种再生芽存在染色体排除现象。RAPD 结果反映出,杂种组织除综合了两个亲本的核物质外,其染色体还可能发生了重组,并且倾向于排除红豆草亲本的 DNA。为了分析 RAPD 反应的灵敏程度和稳定性,在每次试验中同时进行几个重复,结果显示虽然存在一些变异,但 RAPD 多态基本稳定,具有一定的可比性。

2.4 苜蓿红豆草体细胞杂种的 Southern 鉴定

由于存在共迁移问题,亲本 DNA 和杂种 DNA 扩增出现相同分子量的带后,并不能保证亲本和杂

种拥有同一段的 DNA 序列。也即亲本 DNA 和杂种 DNA 扩增产虽然在电泳中处于同一位置,但这些产物有可能是不同的 DNA 片段。同时,琼脂糖凝胶电泳后得到的每一条带也有可能包含了不同的扩增产,因为琼脂糖凝胶电泳只能分开不同大小的片段,而不能分开有不同碱基序列但大小相同的片段。为了进一步分析杂种组织是否真正含有两个亲本的 DNA 序列和 RAPD 实验得到的一些 DNA 片段的亲本特异性,本工作选用 RAPD 扩增产得到的 OPA14 1000bp 红豆草羟脯氨酸抗性系特异产物和 OPA14 1600 bp 苜蓿根癌农杆菌 702 转化系特异产物为探针,对亲本和杂种 DNA 进行杂交分析,结果显示这两段序列确实分别为两个亲本所具有的特异性片段,并且都能与杂种 DNA 产生杂交信号。

以 OPA14 扩增产中 1000bp Hyp^r 特异产物为探针,通过 Southern 分子杂交检测杂种组织,发现 Hyp^r 和杂种 DNA 中包含红豆草亲本的该特异

片段(图 1A),而 M_7 没有。以 OPA14 扩增产物中 1600bp M_7 特异片段为探针,结果表明杂种 DNA 和 M_7 DNA 包含苜蓿亲本的该特异片段,而 Hyp^r 没有(图 1B)。在图 1B 中,杂种 DNA 与苜蓿亲本 DNA 相比,其 Southern 带型已发生了改变,靠上部的两条带与苜蓿亲本相似,但出现一条 4.5kb 的新杂交带。这说明两种亲本原生质体融合后,融合细胞在培养和再生过程中发生了基因组重排与重组。

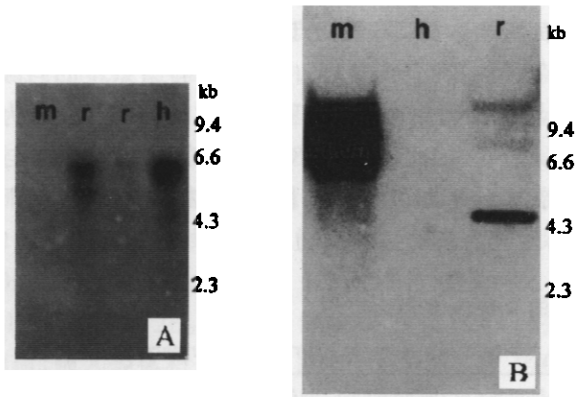


图 1 苜蓿红豆草体细胞杂种的 Southern 分析

Fig. 1 Southern analysis of somatic hybrid between alfalfa and sainfoin

A. Southern hybridization with OPA14 1000 bp Hyp^r DNA fragment as a probe, total DNA was digested with *Dde* I; B. Southern hybridization with OPA14 1600 bp M_7 DNA fragment as a probe, total DNA was digested with *Hind*III. m. M_7 calluses; r. r_1 hybrid; h. Hyp^r .

通过 RAPD 和 Southern 分子杂交实验,发现杂种组织主要倾向于排除红豆草亲本的 DNA,但杂种 DNA 也能扩增出红豆草亲本所具有的 DNA 片段,进一步证实了苜蓿(+)红豆草属间体细胞杂种的真实性,并且为非对称杂种。杂种 DNA 中红豆草亲本特异片段的存,反映出由于红豆草 DNA 的介入,才使得杂种组织具有一定的再生能力。

3 讨 论

本工作首先用 RAPD 方法对两个亲本和体细胞杂种进行了分析,获得较好的 DNA 多态性,杂种 DNA 扩增产物表现出很强的杂合性。杂种 DNA 在扩增出部分亲本片段的同时,还出现一些新带;表明两种亲本原生质体融合后,在选择条件下经历核融合、分裂、愈伤组织形成和植株再生等阶段,染色体发生了重排和缺失。

早期的遗传图谱构建工作大多采用 RFLP 分子标记,它们通常是共显性的,且被限制于那些低拷贝

或单拷贝序列区域。自 90 年代以来,随机扩增多态 DNA 技术(RAPD)及 RAPD 探针得到了迅速发展和普遍应用^[1]。这种多态性既可以反映染色体变异,也可以反映引物结合部位的碱基改变。RAPD 实验只需少量质量和纯度不高的 DNA 作为模板,利用 RAPD 标记可以检测亲本与杂种在基因组 DNA 水平上的差异。由于不受基因表达在时间和空间上的限制,RAPD 标记是一种比较准确的方法。但 RAPD 标记也有不尽完善的地方,即扩增产物在琼脂糖电泳中处于同一位置的片段,其序列可能并不具有同源性,还需进一步采用 Southern 分子杂交验证。通过 RAPD 有可能对以前无法分析的高度重复序列进行检测,与某种基因、特征连锁的目的 RAPD 分子标记可直接用来分析这些性状的存在与否。随着实验体系的不断完善,RAPD 技术已被用于体细胞杂种植株的鉴定^[16]和种质纯度鉴定^[17]等方面。

在植物育种研究中,遗传转化和体细胞杂交等生物技术的使用首先要求被转移的基因或性状能够稳定地整合和正确表达。另外还要求受体植物在遗传和形态上适合于这些性状的转移。Pupilli 等^[9,10]通过四倍体紫花苜蓿($2n = 4x = 32$)和二倍体蓝花苜蓿($2n = 2x = 16$)原生质体融合得到了六倍体杂种;RFLP 指纹分析发现尽管杂种包含了两个亲本的所有染色体,但蓝花苜蓿的基因组仍然被部分排除;多交后代中,两种亲本的一些性状表现出孟德尔遗传方式;细胞学观察表明还存在出现等价染色体和落后染色体等异常现象;杂种植株在田间虽具有一定优势,但稳定性很低。苜蓿和红豆草之间有性杂交不亲合,要将红豆草的富含单宁类物质和其它对病虫害的抗性特征转入苜蓿,体细胞杂交是一种可行的办法。Li 等^[11]通过电融合途径获得这两种植物的体细胞杂种,在他们的实验中,苜蓿叶肉细胞原生质体用致死剂量碘乙酰胺进行失活处理,红豆草悬浮培养细胞原生质体用致死剂量 γ -射线处理;电融合之后一般每次试验可产生 50 000 个异核体;融合产物用苜蓿原生质体进行饲喂培养,得到的再生植株全部类似于苜蓿,Southern 分析表明虽有红豆草基因组 DNA 的存在,但这些杂种植株均不能合成单宁类物质。本研究的目的是为了将红豆草的富含单宁物质和其它特性转入苜蓿基因组。RAPD 和 Southern 分析显示杂种组织倾向于排除红豆草的 DNA,但杂种 DNA 中也存在红豆草亲本的特异 DNA 序列。

参 考 文 献

- [1] Williams J G K, Kubelik A R, Huak K J *et al.* *Nucleic Acids Res*, 1991, **18**:6531~6535
- [2] Welsh J, McClelland M. *Nucleic Acids Res*, 1991, **18**:7213~7218
- [3] Teoule E. *Comptes Rendus Academic des Sciences, Paris, Serie III*, 1983, **292**:13~16
- [4] Deak M, Donn G, Feher A *et al.* *Plant Cell Rep*, 1988, **7**:158~161
- [5] Gilmour D M, Davey M R, Cocking E C. *Plant Cell Reports*, 1989, **8**:29~32
- [6] Thomas M R, Johnson L B, White F F. *Plant Science*, 1990, **69**:189~198
- [7] Mendis M H, Power J B, Davey M R. *J Exp Bot*, 1991, **42**:1565~1574
- [8] Mazin V V, Ostretsova I N, Agafodorova M N *et al.* *Sel' skokhozyaistvennaya Biologiya*, 1994, (4):101~106
- [9] Pupilli F, Scarpa G M, Damiani F *et al.* *Theor Appl Genet*, 1992, **84**:792~797
- [10] Pupilli F, Businelli S, Caceres M E *et al.* *Theor Appl Genet*, 1995, **90**:347~355
- [11] Li Y-G, Tanner G J, Delves A C *et al.* *Theor Appl Genet*, 1993, **87**:455~463
- [12] 徐子勤, 贾敬芬. *中国科学(C辑)*, 1996, **26**:449~454
- [13] 赵相山, 贾敬芬. *实验生物学报*, 1993, **26**:275~279
- [14] Xu Z-Q, Jia J-F. *Cell Research*, 1995, **5**:187~195
- [15] Maniatis T, Fritsch E F, Sambrook J. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbour, New York, 1982
- [16] 李昌功, 周 娟, 杨弘远等. *科学通报*, 1996, **41**:1327~1329
- [17] 陈 洪, 钱 前, 朱立煌等. *科学通报*, 1996, **41**:832~836

Molecular Identification of Intergeneric Somatic Hybrid Plants between Alfalfa and Sainfoin

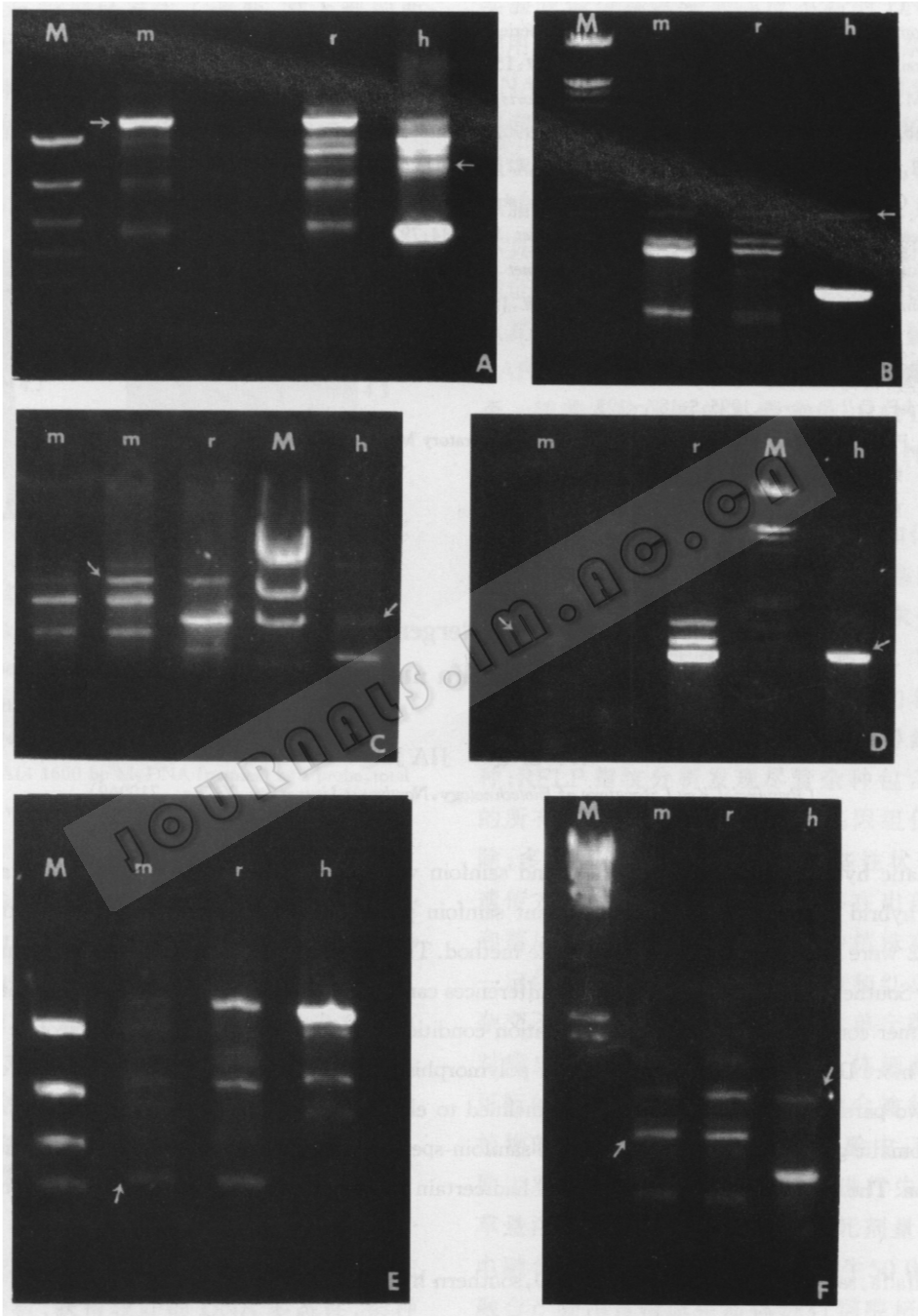
XU Zi-Qin JIA Jing-Fen

(Provincial Key Laboratory of Biotechnology, Northwest University, Xi'an 710069)

Abstract Somatic hybrid plants between alfalfa and sainfoin were regenerated by protoplast fusion and culture. DNA samples of the hybrid plants, hydroxyproline-resistant sainfoin plants, alfalfa cell line transformed with *Agrobacterium tumefaciens* 702 were isolated with a new and simple method. The hybridity was identified by random amplified polymorphic DNAs and Southern hybridization. Significant differences can be seen in the sequences amplified, which are specific for each parent/primer combination under the amplification conditions used. In 20 random oligonucleotide primers used, six could amplified more DNA fragments and had better polymorphisms. The results suggested that besides containing nuclear substances of two parents, the hybrid genome was inclined to eliminate sainfoin chromosome with DNA reconstruction. However, the somatic genome also could produce the sainfoin-specified DNA fragments which further confirmed by Southern hybridization. The hybrids were asymmetric and had certain regeneration ability just because the intervention of sainfoin DNA.

Key words Alfalfa, sainfoin, somatic hybrid, RAPD, southern hybridization

徐子勤等:苜蓿红豆草属间体细胞杂种的分子生物学鉴定
 XU Zi-Qin *et al*:Molecular identification of intergeneric somatic
 hybrid plants between alfalfa and sainfoin



A. Amplified products with OPA14; B. Amplified products with OPA03; C. Amplified products with OPA18; D. Amplified products with OPA17; E. Amplified products with OPA13; F. Amplified products with OPA09. m. Marker; M. M₇ calluses; r. R₁ hybrid; h. Hyp^r. The marker in A, C, E was PCR marker from Sino-American Biotechnology Company, while in Fig. B, D, F was λ -DNA/EcoRI + HindIII. (MG0781)