

• 实验技术与方法 •

## RAPD 分析 —— 鉴定柑桔体细胞杂种的快速方法

肖 顺 元

(华中农业大学园艺系, 武汉 430070)

Frederick G. Gmitter, Jr., Jude W. Grosser, 黄 舒

(美国佛罗里达大学柑桔研究与教育中心)

**摘 要** 本文利用改进的 DNA 提取方法, 从 Volkamer 柠檬(*Citrus volkameriana* Ten. and Pasq.)和酸橙(*C. aurantium* L.)及其原生质体杂种植株的叶片中抽提总 DNA, 进行 RAPD(Random Amplified Polymorphic DNA)分析。结果表明: 在随机选取的 15 种引物中, 有 10 种可单独或与其它引物一道鉴定这一组合的体细胞杂种。与形态学性状观察、同工酶及 DNA 杂交分析等方法比较, RAPD 分析是一种可在试管苗期即可直接、准确、快速鉴定柑桔体细胞杂种的方法。

**关键词** 柑桔, RAPD, 体细胞杂种

## RAPD Analysis: A Rapid Method to Identify Citrus Somatic Hybrids

Xiao Shunyuan

(Horticulture Department, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070)

Frederick G. Gmitter, Jr., Jude W. Grosser, Huang Shu

(Citrus Research and Education Center, University of Florida, 700Exp. Stn. Rd., Lake Alfred, FL 33850, USA)

通过原生质体融合创造种、属间体细胞杂种, 在柑桔砧木品种的改良上具有很大的应用潜力<sup>(3,4)</sup>。鉴定体细胞杂种的常用方法有形态学比较和同工酶分析, 这两种方法简便、易行, 但在亲缘关系较近的种间融合杂种的鉴定上有些困难, 在再生植株的早期, 也不易通过形态学特征进行鉴别。要获得体细胞杂种最直接的遗传证据必须进行 DNA 遗传分析。在柑桔上, 不少体细胞杂种是通过 Southern 杂交分析得以鉴定的<sup>(5,6)</sup>。但 DNA 分子杂交分析需要用较多的组织或器官提取 DNA, 难以制备适宜的探针, 分析过程比较繁琐。在原生质体融合技术日益成熟的今天, 不同柑桔种间属间的体细胞杂种不断增多。因此, 需要一种从 DNA 水平上迅速、有效地鉴定体细胞杂种的简便方法。自 90 年代以来, RAPD 分析方法已在动物、植物、人类遗传作图和基因分析等诸多领域广泛应用。本文就其在柑桔体细胞杂种的鉴定上的应用进行了探讨。

### 1 材 料 与 方 法

#### 1.1 试验材料

试验所用的 Volkamer 柠檬(*Citrus volkameriana* Ten and Pasq.)、酸橙(*C. aurantium* L.) 两种原生质体融合亲本植株及其两株体细胞杂种植株均取自美国佛罗里达大学柑桔研究与教育中心 Dr. Grosser 的温室<sup>(7)</sup>。

#### 1.2 分析方法

1.2.1 DNA 抽提 本试验对 DNA 的提取方法作了较大的改进。取 1—2 个嫩梢尖(100mg 左右或更少), 置于灭

过菌的 1.5ml 离心管中,用自制的玻璃棒将组织捣碎,加入 700 $\mu$ l 提取缓冲液(100mmol/L Tris-HCl, pH8.0, 50mmol/L Na<sub>2</sub>EDTA, pH8.0, 500mmol/L NaCl, 10mmol/L  $\beta$ -巯基乙醇, 3% SDS), 搅匀后,在 65 $^{\circ}$ C 水浴中保温 10 分钟,离心(12 000rpm, 2 分钟),将上清液转入干净离心管中,加入等体积(约 600 $\mu$ l)苯酚-氯仿(苯酚:氯仿 = 1:1)溶液,上下摇动混匀几次,离心(12 000rpm, 5 分钟),将上清液转入干净离心管中,加入 10 $\mu$ l 5mol/L 醋酸钠和 0.6 倍体积的异丙醇,搅匀后,在 -20 $^{\circ}$ C 下静置 10 分钟,离心(12 000rpm, 2 分钟),倾掉上清液,用 75% 酒精洗一次,在室温或真空下干燥 DNA,最后加入 50 $\mu$ l TE 缓冲液(10mmol/L Tris-HCl, 0.1mmol EDTA, pH8.0) 溶解 DNA,加 5 $\mu$ l RNase (Boehringer, Mannheim 公司产),在 37 $^{\circ}$ C 下保温 1 小时,用紫外分光光度计(Pharmacia LKB, Ultrospec Plus Spectrophotometer)测定浓度,取原液稀释成 50ng/ $\mu$ l DNA 溶液,用于 PCR 扩增。

1.2.2 PCR 扩增及电泳分析 每 25 $\mu$ l PCR 反应液中含 50mmol/L Tris-HCl, pH8.3, 250 $\mu$ g/ml BSA, 2% Ficoll, 1mmol/L Tartrazine, 2mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 200 $\mu$ mol/L dNTP, 0.8 $\mu$ mol/L 10-mer Promer, 1 unit Taq Polymerase(Promega 公司产)及 25-50ng DNA。PCR 仪为 MJ Research Inc. 的 Programmable Thermal Controller PTC-100, Model 96U。PCR 扩增反应条件为:93 $^{\circ}$ C 2 分钟(使模板 DNA 变性),然后,93 $^{\circ}$ C 1 分钟,35 $^{\circ}$ C 1 分钟,72 $^{\circ}$ C 2 分钟,进行 42 个扩增循环。之后,用 1.8% 琼脂糖凝胶电泳分离扩增后的 PCR 产物,凝胶用溴化乙锭染色后照相。

## 2 结果 与 讨 论

本试验随机选取 15 种 Operon 公司产的 10-mer 引物进行 RAPD 分析,利用每种引物均能扩增出 3-8 条或更多的 DNA 片段,通过琼脂糖凝胶电泳可得以清楚地分离。其中,利用 5 种引物可单独、准确地鉴定 Volkamer 柠檬和酸橙的两株原生质体融合杂种,因为杂种的 RAPD 带中包含来自双亲的特殊带(见表 1,如图 1 中的 OPV4)。另有 5 种引物可在双亲之间扩增出 RAPD 差异,但杂种的带型要么与 Volkamer 柠檬一致,如引物 OPV6、OPW1,要么与酸橙相同,如引物 OPS19、OPU8、OPW19。从这两组引物中任意各选一种,便可相互补充,准确无误地鉴定杂种(如图 1 中的 OPV6、OPW19)。其余 5 种引物未能在双亲和杂种间扩增出 RAPD 差异。

表 1 15 种随机引物在鉴定 Volkamer 柠檬和酸橙的体细胞杂种上的有效性

引 物	碱 基 顺 序	RAPD 带型 <sup>1)</sup>
OPV1	5' TGACGCATGG 3'	1
OPV2	AGTCACTCCC	4
OPV3	CTCCCTGCAA	4
OPV4	CCCCTCACGA	1
OPV5	TCCGAGAGGG	1
OPV6	ACGCCAGGT	2
OPV7	GAAGCCAGCC	4
OPV8	GGACGGCGTT	4
OPV9	TGTACCCGTC	4
OPV14	AGATCCCGCC	1
OPS15	CAGTTCACGG	1
OPS19	GAGTCAGCAG	3
OPU8	GGCGAAGGTT	3
OPW1	CTCAGTGTCC	2
OPW19	CAAAGCGCTC	3

1) 1. 杂种的 RAPD 带型中含有来自双亲的特殊带; 2. 杂种的 RAPD 带型同 Volkamer 柠檬; 3. 杂种的 RAPD 带型同酸橙; 4. 双亲及杂种的 RAPD 带型相同。

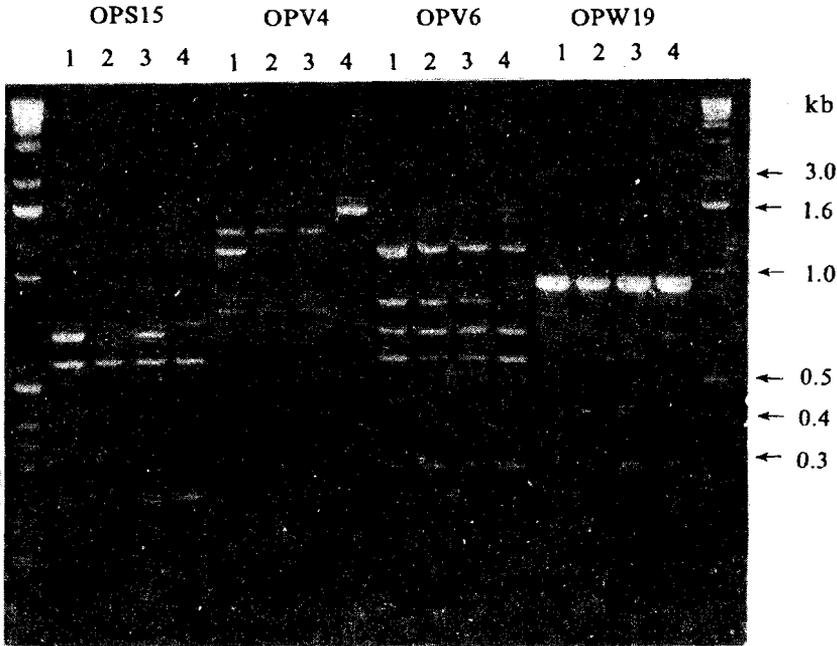


图 1 以 OPS15、OPV4、OPV6、OPW19 为引物时, Volkamer 柠檬、酸橙及其体细胞杂种的 RAPD 带型

1. Volkamer 柠檬; 2. 体细胞杂种(H<sub>1</sub>); 3. 体细胞杂种(H<sub>2</sub>); 4. 酸橙。

我们还发现, 利用个别引物可在两株杂种植株之间检测到 RAPD 带的差异(如图 1 中的 OPS15), H<sub>1</sub> 的 RAPD 带型与酸橙相同, 而 H<sub>2</sub> 的 RAPD 带型中多具一条来自 Volkamer 柠檬的强带。这一结果为两株杂种在叶片形态上存在差异的现象<sup>(7)</sup> 提供了遗传上的证据。来自同一融合组合的体细胞杂种植株之间, 在个别性状上表现出差异的原因有几方面, 有可能是在融合、再生等过程中亲本或杂种细胞产生染色体结构、数目变异所致<sup>(1)</sup>, 也有可能由杂种细胞之间核质基因重组分配不同造成的<sup>(6)</sup>。

本试验所用的 DNA 快速抽提方法十分有效, 利用该法提取的 DNA 产量高, 可达 100—500 μg/ 每克嫩梢组织, 纯度也较高, 完全适合 PCR 分析, 且 RAPD 结果稳定(两次重复分析结果一致)。与同工酶、分子杂交等方法比较, 本文试用的 RAPD 分析有以下两方面的优点: 1. 鉴定所需材料少, 一小片嫩叶(10—20mg) 即可得到足量 DNA 用于 PCR 扩增, 因此, 可在早期(试管小苗期) 即可鉴定, 对小苗影响不大。2. 鉴定所需时间短, 效率高。每人每天可抽提 40—50 个 DNA 样品, 比常规方法<sup>(2)</sup> 快 4—5 倍, 加上 RAPD 分析, 平均每人每天可完成 10 个样品、5 种引物的 RAPD 分析工作, 从而获得较多的遗传信息。由此可见, RAPD 分析是一种在试管苗期即可直接、准确、快速鉴定柑桔体细胞杂种的方法。

### 参 考 文 献

- (1) 叶新荣, 邓秀新, 肖顺元, 章文才, 1993. 实验生物学报, 26: 19—29.
- (2) Durham R E, *et al*, 1992. Theor. Appl. Genet., 84: 49—56.
- (3) Grosser J W, and F G Gmitter Jr., 1990. Plant Breeding Rev., 8: 339—374.
- (4) Grosser J W, and F G Gmitter Jr., *et al*, 1991. J. Amer. Soc. Hort. Sci., 117: 169—173.
- (5) Kobayashi S, and Ohgawara T, *et al*, 1988. Tissue and Organ Culture, 14: 63—69.
- (6) Kobayashi S, and Ohgawara T, *et al*, 1991. Theor. Appl. Genet., 82: 6—10.
- (7) Louzada E S, and Grosser J W, 1992. Hort. Sci., 27: 1033—1036.
- (8) Ohgawara T, and Kobayashi S, *et al*, 1995. Theor. Appl. Genet., 71: 1—4.

本文 1994 年 3 月 7 日收到。