

②效应期, 各种刺激信号在此阶段转化为一种中心信号; ③细胞死亡期 (JABS, 1999)。

## 马铃薯花粉四分体原生质体的分离

王 蒂, 司怀军, 王 清

(甘肃农业大学农学系, 兰州 730070)

花粉原生质体具有单倍体与原生质体的双重优点, 是植物性细胞工程中的重要实验体系。70年代初期, 有些学者就开始了花粉原生质体的研究, 但由于受到技术上的限制, 直到80年代中后期才有所突破。目前, 已从烟草、棉花、百合科、石蒜科、芸薹属等数十种植物的花粉分离得到了原生质体。马铃薯作为原生质体研究的模式作物, 至今尚未见花粉原生质体的研究报道。我们以四倍体马铃薯的花粉四分体为材料, 对影响原生质体分离的主要因素进行了研究, 现将研究结果简报如下。

采集正处于减数分裂四分体时期的花蕾, 用70%酒精消毒30s, 然后用0.1%升汞消毒3~5min, 无菌水冲洗5~6次。在无菌条件下取出花药并横切成2~3块, 加入少量无菌水, 轻轻挤压以释放出小孢子。用200目不锈钢网筛过滤, 滤液在500 r/min下离心5min, 用吸管吸去上清液, 留下沉淀物。加入过滤灭菌的酶液10mL, 酶液组成为RA培养基的大量及微量元素0.1% 2

-N-吗啉乙烷磺酸 (MES) 0.01% 酪蛋白水解物 (CH)、1% 蜗牛酶 (Snailase)、0.5% 崩溃酶 (Drisclase)、16% 蔗糖或18% 甘露醇。用手轻轻揉搓离心管, 然后转入60mm×15mm培养皿中, 用Parafilm封口, 置于可调温的旋转式摇床上, 在(25±1)℃, 20 r/min、黑暗条件下酶解3~5h, 酶解后吸取酶液至15mL离心管中, 在500 r/min下离心5min, 弃去上清液, 用洗涤液洗涤2次后, 再用RA培养基洗涤1次, 即可得到较为纯净的原生质体。原生质体的最高产量可达65.4%。用olympus AH-2型显微镜, 激发滤光片为420nm, 阻挡滤光片为530nm, 0.1% 荧光增白剂 (Calcoflower white) 鉴定脱壁效果表明已完全脱去了细胞壁。用0.01% 荧光素二醋酸酯 (FDA) 荧光检测表明分离得到的原生质体具有生活力。

马铃薯花粉原生质体的成功分离, 将会为单倍体培养、体细胞融合和遗传转化提供新的实验材料, 从而推动马铃薯生物技术研究的发展。

## 不同物种间共用 SSR 引物的研究

周以俊<sup>1</sup>, 郑文竹<sup>1</sup>, 许 莉<sup>1</sup>, 孟金陵<sup>2</sup>

(1. 厦门大学生物系, 厦门 361005; 2. 华中农业大学农学系, 武汉 430070)

SSR (Simple Sequence Repeat, 简单序列重复) 标记亦称微卫星, 是指由1~6个碱基组成的基本序列串联重复组成的短片段, 如(GT)<sub>n</sub>, (GATA)<sub>n</sub>等。人们可根据其两侧独特的序列设计引物, 进行PCR扩增。由于该技术简便、快

速、稳定性高, 在基因组学研究中, 已成为取代RFLP的第二代分子标记。开发SSR引物常用的方法是先建一个DNA文库, 用各种简单重复序列作为探针去筛库。得到阳性克隆子进行测序后, 根据所测的序列设计引物。这就需要较多的资金

投入,而且工作量大,目前只在少数模式植/动物中得到大量开发。近几年来,随着基因组计划的展开和大规模测序工作的进行,人们可以利用互联网,在GENEBANK中查到简单重复序列及其两端序列来设计引物。但这种方法只有在研究得比较彻底的拟南芥、水稻等植物中才可行。

为了在更多物种中以较少的投入应用SSR标记,进行基因组学研究,我们尝试在不同的物种间通用SSR引物。这样,从少数模式生物中获得的遗传信息可以迅速地应用到许多经济价值大,但基础理论研究比较薄弱的作物中去。

根据前人报道,合成了5对甘蓝型油菜SSR引物Bn92A, Bn6A2, Bn72A, Bn80/3, Bn38A, 对应简单重复序列分别为(A)<sub>28</sub>, (GATA)<sub>4</sub>, (TAA)<sub>5</sub> (GA)<sub>9</sub>, (GA)<sub>15</sub> (GGT)<sub>2</sub>, (TG)<sub>11</sub>。对分属不同物种的12份材料DNA进行PCR扩增。其中包括2个水稻品种、1个棉花品种、2个芥菜品种、1个白菜品种、2个玉米品种、2个甘蓝型油菜品种、1个柑橘品种以及1种十字花科野生植物 *Moricandia nitens*。采用的PCR循环为“Touchdown”PCR程序,复性温度为68℃到58℃。该程序反应特异性高,少有假阳性现象发生。扩增产物用琼脂糖凝胶电泳,结果显示,扩增产物量大,条带清晰,而且所有12份材料用5

对SSR引物均扩增出了大小一致的主带。主带大小分别为110~145 bp (Bn92A), 240~300 bp (Bn72A), 90~100 bp (Bn6A2), 100~150 bp (Bn80/3), 150~200 bp (Bn38A), 与文献报道中在甘蓝型油菜扩增出的SSR大小完全一致。另外,大部分材料还扩增出了一些大小不同的弱带。由于本研究所使用的引物长度都有20个碱基左右,复性温度控制得相当高,这就保证了反应的特异性,基本可以杜绝假阳性的发生。

本研究结果说明,各物种基因组间存在相当大的相似性,甘蓝型油菜的SSR引物可以在其他物种中进行扩增。1998年国外有报道用拟南芥SSR引物在同属十字花科、遗传距离较近的甘蓝型油菜中进行扩增,但在遗传差异较大、属于不同科的物种间共用SSR引物,本文还是首例报道。这样,只需直接从少数模式生物中利用现成的引物,没有必要对所有物种进行SSR引物开发,可以大大节省资金和人力。本研究所用材料包括主要粮食作物的玉米、水稻,油料作物甘蓝型油菜,蔬菜作物白菜、芥菜以及重要经济作物柑橘、棉花。在上述作物间能够互相利用SSR引物,无论对基础理论还是遗传育种研究都具有重要意义。

## 节节麦不同分裂时期和阶段的G-带核型及其变动性分析

余朝文<sup>1</sup>, 宋运淳<sup>2</sup>

(1. 怀化师范高等专科学校, 湖南怀化 418008; 2. 武汉大学生命科学院, 武昌 430072)

采用改良ASG法对节节麦(*Triticum tauschii* Tausch或*Aegilops squarrosa* L.)的G-带核型及其变动性进行了研究。建立了节节麦有丝分裂中期和3个染色体凝缩程度不同的早中期(按染色体凝缩程度从低到高分别称为早中期I, II, III)染色体的G-带核型。中期和3个早中期阶段的染色体全长都显示了清晰的、密切邻近的多重G-带带纹。每条染色体的着丝粒和随体

都很清晰,并在它们的两侧都有带纹分布。G-带带纹有粗细差别,深浅也有不同,但总的来看,带纹细窄、大小较相近,带间区小,分布较密集而均匀。不论哪个时期和阶段,同源染色体的带纹数目分布位置基本一致,可以较准确地配对。从早中期I, II, III至中期,染色体的带纹数目明显减少,带纹总数分别减少了41%, 36%, 28%。带纹的减少表现在各染色体的长、短臂上。