

泛和公认的一种检测方法之一,随着荧光素 SYBR Green I 的逐渐应用, TaqMan 法与之相比的优势正在逐渐减弱,可以根据实验需要选择不同的检测方法。

3.3 两种方法对转基因大豆深加工产品检测效果分析

本实验应用的 FQ-PCR 方法采用染料和荧光探针来检测 PCR 产物的积累,可非常精确、重复地定量目的基因的含量,并且比传统的定量方法劳动强度小。封闭式检测系统运行,无需进行扩增后电泳分析等操作,避免交叉污染问题,短时间内便可获得数据进行分析^[9,10]。

随着 FQ-PCR 技术方法的不断改进与完善,其应用越来越普及,将涉及到各学科和领域,也会成为目前转基因定量检测应用最热门的技术。

参考文献:

- [1] Holck A, Va tilingom M, Didierjean L, et al. 50 - Nuclease PCR for quantitative event specific detection of the genetically modified Mon810 Mais-Carde maize[J]. *European Food Research and Technology*, 2002, 214: 449 - 454.
- [2] Hernandez M, Pla M, Esteve T, et al. A specific real - time quantitative PCR detection system for event MON810 in maize YieldGardw based on the 30 - transgene integration sequence[J]. *Transgenic Research*, 2003, 12: 179 - 189.
- [3] Rønning S B, Vatilingom M, Berald K G, et al. Event specific real - time quantitative PCR for genetically modified Bt11 maize (*Zea mays*)[J]. *European Food Research Technology*, 2003, 216: 347 - 354.
- [4] Kint G Berald, Ame Holst - Jensen. Roundup Readyw soybean eventspecific

ic real - time quantitative PCR assay and estimation of the practical detection and quantification limits in GMO analysis[J]. *European Food Research and Technology*, 2001, 213: 432 - 438.

[5] Isabel Tavemiers, Pieter Windels, Marc Vaitilingom, et al. Event - specific plasmid standards and real - time PCR methods for transgenic Bt11, Bt176, and GA21 maize and transgenic GT73 canola[J]. *J Agric Food Chem.*, 2005, 53(8): 3041 - 3052.

[6] Marra Hernandez, Teresa Esteve, Salomé Prat, et al. Development of real - time PCR systems based on SYBR Green I, Amplifluor and TaqMan technologies for specific quantitative detection of the transgenic maize event GA21[J]. *Journal of Cereal Science*, 2004, 39: 99 - 107.

[7] 张驰宇, 张高红, 杨敏, 等. 四步法消除 SYBR Green I 实时定量 RT - PCR 中引物二聚体的影响[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2004, 20(3): 387 - 392.

[8] Litao Yang, Aihu Pan, Junwei Jia, et al. Validation of a tomato - specific gene, LAT52, used as an endogenous reference gene in qualitative and real - time quantitative PCR detection of transgenic tomatoes[J]. *J Agric Food Chem.*, 2005, 53(2): 183 - 190.

[9] S Lerat, L S England, M L Vincent, et al. Real - time polymerase chain reaction quantification of the transgenes for Roundup Ready corn and Roundup Ready soybean in soil samples[J]. *J Agric Food Chem.*, 2005, 53, 1337 - 1342.

[10] Michael E Rott, Tracy S Lawrence, Erika M Wall, et al. Detection and quantification of Roundup Ready soy in foods by conventional and real - tie polymerase chain reaction[J]. *J Agric Food Chem.*, 2004, 52: 5223 - 5232.

甜瓜组织培养过程中的染色体数目变异

谢丽琼, 王咏星, 刘晓颖, 马相汝, 张洪涛, 李冠*

(新疆大学生命科学与技术学院, 新疆乌鲁木齐 830046)

摘要: 以甜瓜组织培养过程中产生的不定芽为材料, 观察了不同阶段不定芽中染色体数目发生变异的频率, 同时比较了在无外加诱变剂的情况下, 甜瓜根尖与组培不定芽之间最大分裂相时间的变化。

关键词: 甜瓜; 组织培养; 染色体数目

中图分类号: Q343.2*44 文献标识码: A 文章编号: 1004-311X(2006)02-0059-02

Variability of the Amount of Chromosome in Callus State of *Cucumis melo* L

XIE Li - qiong, WANG Yong - xing, LIU Xiao - ying, MA Xiang - ru, ZHANG Hong - tao, LI Guan*

(College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Urumqi 830046, China)

Abstract: The amount of chromosome changed in the plant callus culture. Observed the changing ratio of *Cucumis melo* L's chromosome in different callus state, it was obviously that the variation used to happen. The ratio was not the same in the developing callus buds, and after 4 times continuously culture, the variation is no less than 30 percent. It showed that without the inducer the time of metaphase was different from the root of melon to the callus buds.

Key words: *Cucumis melo* L; callus culture; amount of chromosome

甜瓜(*Cucumis melo* L)俗称哈密瓜,属葫芦科黄瓜属。在新疆已经有两千多年的栽培历史,是我区特有的瓜果种类之一,具有很高的经济价值,但是在种植过程中种质退化现象严重。随着植物组织培养技术的日益成熟,人们正通过组织培养的方法来改良和保持优良甜瓜品种。

据报道,植物体细胞离体培养过程中会出现广泛的细胞遗传学上的变异,变异率的高低影响移栽后优良品质的保持。因此,在大量扩繁前,对培养材料进行细胞遗传学鉴定是非常必要的。现在大多采用再生植株的根尖、幼叶和花蕾等为材料观察变异,但这些材料的获得耗时、费工,而且不能保证再生植株的种质^[1]。而在组织培养中,组培芽的材料丰富,取材方便。因此,直接利用组培芽进行染色体数目鉴定是一种快捷、方便和有效的方法。

本实验采用 1 - 2cm 组培芽为材料,在培养早期进行鉴

定,及时切除变异高的不定芽,避免人力、物力资源的浪费,为优质甜瓜种质的快速繁殖提供保障。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 甜瓜品种:金皇后种子,购自新疆农业科学院。

1.1.2 试剂:所用试剂均为分析纯药品。

1.1.3 仪器:OLYMPUS 显微照相系统。

1.1.4 培养基:①无菌苗培养基:1/2MS + B5 有机元素;②芽诱导培养基:MS + 6 - BA 1.0mg/L;③继代培养基:MS + 6 - BA 0.5mg/L + IAA 0.05mg/L。

1.2 实验方法

1.2.1 培养条件:培养温度 25 ± 2℃,光照强度 1500lx, 16 h/d。

1.2.2 对照根尖的获得

甜瓜种子剥去种皮,以水培法发苗,3d 左右后根尖长至 1 ~ 2cm,切取根尖作为对照。

1.2.3 组培芽的获得

将甜瓜种子剥去种皮,在超净工作台上用 70% 的酒精灭菌 30s,再用 0.1% 的氯化汞灭菌 8min,无菌水冲洗 5 ~ 6 次,在无菌滤纸上沥干水分,接种于无菌苗培养基中。种子萌发 3d 后,在超净台中将种子切去胚,子叶纵切为三段,取中间子叶

收稿日期:2005 - 06 - 04;修回日期:2006 - 01 - 22

基金项目:新疆自治区自然科学基金资助项目(200121105)

作者简介:谢丽琼(1972 -),女,硕士,讲师,从事新疆特殊资源植物的生理与分子生物学研究, Tel: 8585071, E - mail: plantech@xju.edu.cn; * 通讯作者:李冠(1959),男,教授,博士生导师,从事甜瓜育种抗病研究, E - mail: guanli@xju.edu.cn。

切块作为外植体接种于芽诱导培养基中。子叶表面贴培养基培养。每20d继代一次,接种于继代培养基上。以长大于1cm的组培芽为材料。方法结合文献有所修改^[6]。

1.3 染色体的观察

1.3.1 对照根尖的染色体观察

根尖长至1~2cm时,于早晨9:30-10:10间隔2min取材,置于固定液(无水乙醇:冰乙酸=3:1)中固定24h,60℃下,1mol/L HCl解离8min,常规方法制片,100倍物镜观察、计数。

1.3.2 组培芽染色体的观察

选取长0.5~1cm的不定芽在早晨9:30-10:10间隔2min取材,置于固定液(无水乙醇:冰乙酸=3:1)中固定2h,60℃下,1mol/L HCl解离10min,常规方法制片。100倍物镜观察、随机选取中期细胞进行计数。

2 结果与分析

2.1 取材时间的确定

鉴于秋水仙素、低温等预处理都会引起染色体不同程度的变异^[2,3],无法确定变异是来自材料本身还是由预处理所引起,因此,本实验采用间隔时间取材来确定不同材料的分裂高峰期,并获得了数量较多中期细胞。结果表明:对照根尖在早晨10:08时刻取材效果最好,而组培芽在10:04时刻取材效果最好。

2.2 染色体数目变异分析

选取对照根尖中处于典型分裂中期的细胞50个进行染色体计数,结果显示,在50个细胞中染色体数均为24。在不同时期的组培芽中分别观察到了不同程度的变异(包括亚二倍体、超二倍体和四倍体)并且随着继代次数的增多(见图1),变异率也呈上升趋势两者呈明显的正相关,其中继代1次的

变异率为4.8%,继代4次的变异率为30.5%,如表1所示:

表1 不同继代时间变异率的变化

继代次数	观察总数	变异数	变异率	取材时间
对照	50	0	0.0	10:08
1次	634	30	4.8%	10:04
4次	595	181	30.5%	10:04

3 讨论

实验发现,在甜瓜的组织培养过程中确实发现了一定程度的变异,其变异率随培养时间的增长而增加,在继代4次的组培芽其变异率可高达30%。实验中还发现,甜瓜组培过程中出现的畸形苗、玻璃化苗和黄化苗,他们的染色体数目变化较正常苗大,但未达到显著差异,提示正常芽发生畸变主要是由于微环境(湿度、激素浓度等)的影响。栽培种白兰瓜^[7]、甜瓜的同科植物黄瓜^[8]、西瓜^[9]在组织培养过程中均发生染色体不稳定的变化。

在甜瓜组织培养过程中发生变异其原因可能是多方面的。杜捷^[4]等在研究兰州百合继代培养过程中的染色体变异中,得出脱分化在愈伤组织中遗传物质产生了许多变化,导致了其染色体水平的变化。何欢乐^[5]等认为细胞的不正常分裂是导致染色体变异的直接原因。在分裂过程中,纺锤体形成可能受阻而形成多倍体。二倍体和多倍体的多极分裂产生单倍体,而非整倍体可能起源于无丝分裂、后期染色体落后而造成的染色体丢失、染色体不分离。另外,在组织培养过程中,激素的使用、培养时间和继代次数的增加都会使染色体变异程度加大^[10]。

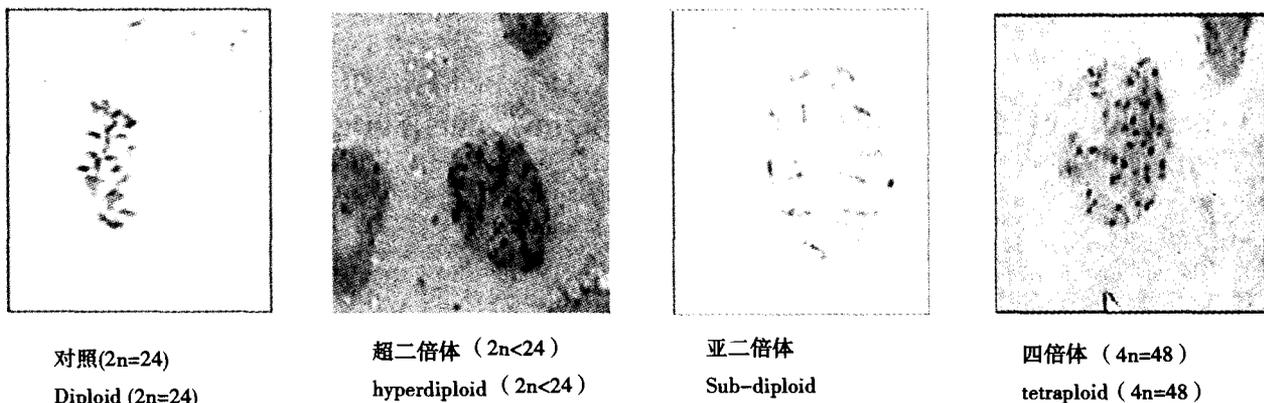


图1 染色体不同程度的变异显微照片($\times 1000$)

因此,在组织培养过程中,应及时转接,尽量缩短继代培养的间隔时间,并切除愈伤组织,防止愈伤组织再分化出苗,减少发生变异的可能性。另外要尽量减少继代的次数,以防发生较大的变异率,保持种质的稳定性。

在本实验中,仅对继代次数对变异率的影响进行了探讨,对激素浓度等原因未涉及,在以后的工作中要进行这方面的研究,以期获得较低的变异率,为甜瓜通过组织培养获得优质再生植株提供依据。

参考文献:

- [1]曹清河,陈劲枫,罗向东,等.用组培芽鉴定组培材料染色体数目的方法[J].植物生理学通讯,2003,39(6):655-657.
- [2]余朝文.四种预处理因素诱导畸变的效应比较[J].怀化师专学报,1995,14(2):49-52.
- [3]张海林,李三相.三种预处理对合欢根尖细胞有丝分裂的影响[J].

甜水师范学院学报,2002,22(5):36-37.

[4]杜捷,王刚,等.兰州百合继代培养过程中的染色体变异[J].西北师范大学学报:自然科学版,2003,39(2):14-65.

[5]何欢乐,蔡润,潘俊松.甜瓜不定胚再生植株的染色体数目变异[J].遗传,2002,24(2):166-170.

[6]蔡润,俞虹.甜瓜种苗克隆[J].上海交通大学学报,2000,34(11):1586-1590.

[7]王亚馥,高清祥.白兰瓜组织培养中染色体不稳定性的研究[J].兰州大学学报:自然科学版,1989,25(4):98-102.

[8]余阳俊,朱其杰.黄瓜成熟胚离体培养中的胚状体诱导和植株再生[J].植物生理学通讯,1992,28(1):37-39.

[9]郭启高,宋明,杨天秀,等.西瓜子叶组织培养中四倍体的产生及鉴定.西南农业大学学报,2000,22(4):298-300.

[10]潘俊松,蔡润,刘晓,等.甜瓜子叶节培养高效再生体系建立[J].上海交通大学学报:农业科学版,2003,21(4):295-303.