

利用RAPD标记鉴定新疆木纳格葡萄胚挽救苗的无核性状

伍新宇¹, 罗淑萍^{2,*}, 夏培蓓², 朱瑜²

(¹新疆农业科学院园艺作物研究所, 乌鲁木齐 830091; ²新疆农业大学农学院, 乌鲁木齐 830052)

将胚挽救技术与分子标记技术结合可以大大缩短育种年限, 加快育种进程。从最具新疆特色的鲜食、晚熟、大粒、耐贮运地方品种木纳格葡萄的果粒中取败育型胚珠进行离体培养, 得到胚挽救苗。再对胚挽救苗的无核性状进行鉴定, 以期为无核新品种的选育和缩短育种周期提供理论依据。

试材为新疆农业大学农业生物技术重点实验室培养的木纳格葡萄胚挽救苗 45 株(系)的嫩叶。主要试剂 CTAB、EDTA、SDS、PVP40 购自 Sigma 公司, *Taq* 酶、PCR buffer 购自天根公司, dNTPs 购自 TaKaRa 公司, 特异性引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

葡萄DNA基因组的提取采用改良CTAB法。RAPD反应在BIO-RAD My Cyclers的PCR仪上进行。采用 25 μ L 反应体系, 其中含 2.5 μ L 10 \times buffer, 0.5 μ L dNTPs, 0.5 μ L *Taq* 酶, 上下游引物各 0.5 μ L, 1.0 μ L 模板DNA, 用ddH₂O补足 25 μ L。反应条件为 94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 54 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 60 s, 35 个循环, 72 $^{\circ}$ C 再延伸 7 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。

无核性状相关分子标记的筛选: 以有核和无核葡萄混合 DNA 为模板进行 RAPD 扩增, 筛选引物, 将筛选出有特异性条带的引物进行二次筛选, 二次筛选分别以有核葡萄混合 DNA 和无核葡萄混合 DNA 为模板, 筛选出有核和无核葡萄存在明显差异带且重复性好的引物, 分别对无核葡萄单个 DNA 和有核葡萄单个 DNA 进行扩增, 将无核葡萄中都出现的特异性条带进行回收测序, 以测序序列为依据, 设计特异性引物。

胚挽救幼苗的无核性鉴定: 分别以 45 株胚挽救苗的 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶(琼脂糖加热溶于 1 \times TAE 缓冲液中), 在 1 \times TAE 缓冲液中进行电泳, Marker DL2000 作为分子量标记, 电泳结束后将胶放入 EB(溴化乙锭)液中进行染色, 并在 BIO-RAD 凝胶成像系统观察成像, 拍照记录结果。

利用无核基因相连锁的特异 RAPD 标记对 45 株木纳格葡萄胚挽救苗基因组 DNA 分别进行扩增, 结果 21 株在 750 和 500 bp 之间约 600 bp 处出现了特异带, 由此可以说明 21 株木纳格葡萄胚挽救苗含有相应的无核基因。含无核基因的木纳格葡萄胚挽救苗占全部木纳格葡萄胚挽救苗的 46.7%。利用本方法可以淘汰有核单株, 为木纳格葡萄无核新品种的选育提供技术支持, 缩短新品种育种周期, 节约人力、物力和财力。

关键词: 葡萄; RAPD; 胚挽救苗; 无核性状

中图分类号: S 663.1

文献标识码: A

文章编号: 0513-353X (2011) S-2487-01

收稿日期: 2011-08-29

基金项目: 新疆自治区高技术研究发展计划项目(200911110); 新疆自治区果树学重点学科基金项目

* 通信作者(E-mail: luoshuping2008@163.com)