



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109628636 B

(45) 授权公告日 2021. 11. 30

(21) 申请号 201910146189.8

(22) 申请日 2019.02.27

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 109628636 A

(43) 申请公布日 2019.04.16

(73) 专利权人 新疆维吾尔自治区葡萄瓜果研究所

地址 838200 新疆维吾尔自治区吐鲁番市鄯善县苗园路

(72) 发明人 王勇 李玉玲 苏来曼·艾则孜
孙锋 伍国红 骆强伟 郭平峰
李超 张翠环

(74) 专利代理机构 西安汇恩知识产权代理事务所(普通合伙) 61244

代理人 张伟花

(51) Int.Cl.

G12Q 1/6895 (2018.01)

G12N 15/11 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 102277444 A, 2011.12.14

纪薇等. 葡萄品种新郁在新疆吐鲁番地区的光合效应研究.《西北林学院学报》.2015,第30卷(第5期),

Hong Huang等.Mining and validating grape (Vitis L.) ESTs to develop EST-SSR markers for genotyping and mapping.《Mol Breed》.2011,第28卷(第2期),

王勇等.19个自育葡萄品种(系)指纹图谱构建.《新疆农业科学》.2020,第57卷(第12期),

审查员 谢培

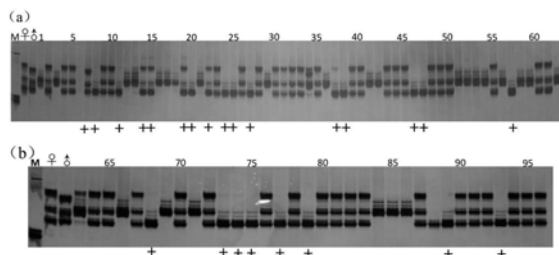
权利要求书2页 说明书7页 附图2页

(54) 发明名称

鉴定新郁葡萄和巨峰葡萄杂交种的SSR分子标记及其应用

(57) 摘要

本发明提供了一种鉴定新郁葡萄和巨峰葡萄杂交种的SSR分子标记,SSR分子标记为5对SSR标记引物VMC7h3、Scu15vv、Vchr13a、UDV-088和VrZAG67,还提供了其应用,父本巨峰、母本新郁和新郁葡萄和巨峰葡萄杂交种的DNA提取,建立PCR反应体系及扩增反应程序,进行PCR产物的电泳分离后,对依次用5对SSR标记引物对杂交种真实性进行鉴定。本发明通过前期筛选的5对SSR标记引物用于鉴定新郁葡萄和巨峰葡萄杂交种,能鉴定出真杂交种,能快速检验新郁葡萄和巨峰葡萄杂交工作成效,并提前剔除假杂交种后代,有利用提高育种效率,节约成本。



1. 一种鉴定新郁葡萄和巨峰葡萄杂交种的SSR分子标记,其特征在于,所述SSR分子标记的SSR标记引物为5对SSR标记引物,分别命名为VMC7h3、Scu15vv、Vchr13a、UDV-088和VrZAG67;

VMC7h3的核苷酸序列为TCAGATATTGAAGAACCACA和ACTAGAAAATGCACAATCTCCC;

Scu15vv的核苷酸序列为GCCTATGTGCCAGACCAAAAAC和TTGGAAGTAGCCAGCCCAACCTTC;

Vchr13a的核苷酸序列为TGGCAGAGCAAATGAATCAA和TTGGATGGATTGGAATGACC;

UDV-088的核苷酸序列为CCATGCACACACGCACAT和CCACCAAACAAGTGGAGGTT;

V r Z A G 6 7 的 核 苷 酸 序 列 为 A C C T G G C C C G A C T C C T C T T G T A T G C 和 TCCTGCCGGCGATAACCAAGCTATG。

2. 一种如权利要求1所述的鉴定新郁葡萄和巨峰葡萄杂交种的SSR分子标记的应用,其特征在于,利用SSR分子标记鉴定新郁葡萄和巨峰葡萄杂交种,包括以下步骤:

S1、父本巨峰、母本新郁和新郁葡萄和巨峰葡萄杂交种的DNA提取;

S2、建立PCR反应体系及扩增反应程序;

S3、PCR产物的电泳分离;

S4、杂交种真实性的鉴定;先用SSR标记引物Vmc7h3在新郁葡萄和巨峰葡萄杂交种的杂交群体中筛选出携带父本特异性基因的条带的杂交种,然后用SSR标记引物Scu15vv在通过SSR标记引物Vmc7h3筛选后剩余的新郁葡萄和巨峰葡萄杂交种的杂交群体中继续筛选出携带父本特异性基因的条带的杂交种,再用SSR标记引物Vchr13a在通过SSR标记引物Scu15vv筛选后剩余的新郁葡萄和巨峰葡萄杂交种的杂交群体中继续筛选出携带父本特异性基因的条带的杂交种,然后用SSR标记引物UDV-088在通过SSR标记引物Vchr13a筛选后剩余的新郁葡萄和巨峰葡萄杂交种的杂交群体中继续筛选出携带父本特异性基因的条带的杂交种,最后用SSR标记引物VrZAG67在通过SSR标记引物UDV-088筛选后剩余的新郁葡萄和巨峰葡萄杂交种的杂交群体中继续筛选出携带父本特异性基因的条带的杂交种,依次经过5对SSR标记引物筛选,携带父本特异性基因的条带的杂交种为真杂交种,经过5对SSR标记引物筛选后仍不具有携带父本特异性基因的条带的杂交种基本可以视为假杂交种。

3. 根据权利要求2所述的一种鉴定新郁葡萄和巨峰葡萄杂交种的SSR分子标记的应用,其特征在于,S1中所述DNA提取的方法为采用改良的CTAB法,分别提取父本巨峰、母本新郁和新郁葡萄和巨峰葡萄杂交种的叶片的DNA,通过琼脂糖凝胶电泳,检测DNA的片段长度、浓度和纯度,用于PCR扩增。

4. 根据权利要求3所述的一种鉴定新郁葡萄和巨峰葡萄杂交种的SSR分子标记的应用,其特征在于,所述父本巨峰、母本新郁和新郁葡萄和巨峰葡萄杂交种的叶片的DNA置于-20℃保存。

5. 根据权利要求2所述的一种鉴定新郁葡萄和巨峰葡萄杂交种的SSR分子标记的应用,其特征在于,S2中所述PCR反应体系为:PCR MiX混合液10μL、100μL/mL的SSR标记引物0.8μL、浓度为20ng/μL的DNA模板2.0μL、ddH₂O7.2μL。

6. 根据权利要求2所述的一种鉴定新郁葡萄和巨峰葡萄杂交种的SSR分子标记的应用,其特征在于,S2中所述扩增反应程序为:94℃预变性4min;94℃变性40s,45℃~65℃退火1min,72℃延伸1min,进行35个循环;最后一个循环72℃延伸10min,停止于4℃。

7. 根据权利要求2所述的一种鉴定新郁葡萄和巨峰葡萄杂交种的SSR分子标记的应用,

其特征在于,S3中所述PCR产物的电泳分离的方法采用非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳;所述非变性聚丙烯酰胺凝胶中聚丙烯酰胺凝胶的质量分数为8%。

8.根据权利要求7所述的一种鉴定新郁葡萄和巨峰葡萄杂交种的SSR分子标记的应用,其特征在于,采用非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳的方法为:

S301、量取ddH₂O 40mL,10×TBE 4mL,40%Acr-Bis 8mL,TENMED40μL,10%APS 400μL,混合搅拌均匀2min~3min后得到非变性聚丙烯酰胺凝胶,将非变性聚丙烯酰胺凝胶迅速倒入凝胶槽中,若有气泡,将气泡赶到凝胶槽的边上,然后迅速将梳子装入凝胶槽中;

S302、待S301中所述非变性聚丙烯酰胺凝胶凝固25min~35min后,将凝胶槽放入电泳槽中,向电泳槽中加入0.5×TBE缓冲液,轻轻拔出凝胶槽中的梳子,使电泳槽中的0.5×TBE缓冲液覆盖凝固后的非变性聚丙烯酰胺凝胶;

S303、分别将5μL用同一SSR标记引物扩增的父本巨峰、母本新郁和新郁葡萄和巨峰葡萄杂交种的杂交群体中各新郁葡萄和巨峰葡萄杂交种的DNA在点样板的各点样孔中点样,第一个点样孔点为PCR Marker作为分子量标记,然后进行2h~3h电泳,电泳结束后,将电泳后的非变性聚丙烯酰胺凝胶置于LED发光箱中,观察分离的DNA条带并拍照分析。

9.根据权利要求8所述的一种鉴定新郁葡萄和巨峰葡萄杂交种的SSR分子标记的应用,其特征在于,S301中所述Acr-Bis中丙烯酰胺和双丙烯酰胺的质量比为39:1。

鉴定新郁葡萄和巨峰葡萄杂交种的SSR分子标记及其应用

[0001] 本发明属于杂交种鉴定技术领域,具体涉及一种鉴定新郁葡萄和巨峰葡萄杂交种的SSR分子标记及其应用。

背景技术

[0002] 葡萄育种主要有杂交、实生选种、芽变、诱变等方法。杂交育种是葡萄育种的重要途径。这种方式是在人工控制下,通过两个不同基因型品种的配子结合而获得新品种。通过这种方式可以将多个目标性状结合在一起,满足现代育种目标的综合性,比如,抗逆(病、旱、寒)无核、香味无核、丰产香味大粒等。葡萄品种大多为两性花,既可以自交结实,也可以异花授粉。开展杂交工作,要先将母本花的雄蕊去除干净,并排除其它外来花粉干扰,才能保证杂交的有效性、真实性。同时,也要保证父本花粉的活力。

[0003] 新郁葡萄是一个红色、大粒的中晚熟制干鲜食兼用的品种,该品种抗旱性强,巨峰葡萄是一个黑紫色、大粒、草莓香味的早中熟四倍体欧美杂交种品种,该品种抗病性强,配制新郁×巨峰杂交组合,有望获得大粒、深色、有香味、高抗性的后代,但两个品种属于二倍体与四倍体间的杂交,加之葡萄杂合性高,容易自花授粉结实,后代的杂交真实性需要进行验证。

发明内容

[0004] 本发明所要解决的技术问题在于针对上述现有技术的不足,提供一种鉴定新郁葡萄和巨峰葡萄杂交种的SSR分子标记及其应用,本发明通过前期筛选的5对SSR标记引物VMC7h3、Scu15vv、Vchr13a、UDV-088和VrZAG67对用于鉴定新郁葡萄和巨峰葡萄杂交种,葡萄是具有高度杂合基因的多年生植物,杂交后代的性状差异较大,利用SSR分子标记鉴定杂交后代比作物、蔬菜、西甜瓜等具有纯合性亲本的植物要复杂的多,根据孟德尔遗传规律,1个分子标记能完成群体一半的鉴定,依次递减,葡萄的杂交群体纯度的鉴定至少需要5个特异的SSR分子标记才能完成,本发明通过5对SSR标记引物,对新郁葡萄和巨峰葡萄杂交种的杂交群体进行鉴定,鉴定出真杂交种,能快速检验新郁葡萄和巨峰葡萄杂交工作成效,并提前剔除假杂交种后代,有利用提高育种效率,节约成本。

[0005] 为解决上述技术问题,本发明采用的技术方案是:一种鉴定新郁葡萄和巨峰葡萄杂交种的SSR分子标记,所述SSR分子标记为5对SSR标记引物,分别命名为VMC7h3、Scu15vv、Vchr13a、UDV-088和VrZAG67;

[0006] VMC7h3的核苷酸序列为TCAGATATTGAAGAACCACA和ACTAGAAAATGCACAATCTCCC;

[0007] S c u 1 5 v v 的 核 苷 酸 序 列 为 G C C T A T G T G C C A G A C C A A A A A C 和 TTGGAAGTAGCCAGCCCAACCTTC;

[0008] Vchr13a的核苷酸序列为TGGCAGAGCAAATGAATCAA和TTGGATGGATTGGAATGACC;

[0009] UDV-088的核苷酸序列为CCATGCACACACGCACAT和CCACCAAACAAGTGGAGGTT;

[0010] V r Z A G 6 7 的 核 苷 酸 序 列 为 A C C T G G C C C G A C T C C T C T T G T A T G C 和 TCCTGCCGGCGATAACCAAGCTATG。

[0011] 本发明还提供了上述的鉴定新郁葡萄和巨峰葡萄杂交种的SSR分子标记的应用,利用SSR分子标记鉴定新郁葡萄和巨峰葡萄杂交种,包括以下步骤:

[0012] S1、父本巨峰、母本新郁和新郁葡萄和巨峰葡萄杂交种的DNA提取;

[0013] S2、建立PCR反应体系及扩增反应程序;

[0014] S3、PCR产物的电泳分离;

[0015] S4、杂交种真实性的鉴定;先用SSR标记引物Vmc7h3在新郁葡萄和巨峰葡萄杂交种的杂交群体中筛选出携带父本特异性基因的条带的杂交种,然后用SSR标记引物Scu15vv在通过SSR标记引物Vmc7h3筛选后剩余的新郁葡萄和巨峰葡萄杂交种的杂交群体中继续筛选出携带父本特异性基因的条带的杂交种,再用SSR标记引物Vchr13a在通过SSR标记引物Scu15vv筛选后剩余的新郁葡萄和巨峰葡萄杂交种的杂交群体中继续筛选出携带父本特异性基因的条带的杂交种,然后用SSR标记引物UDV-088在通过SSR标记引物Vchr13a筛选后剩余的新郁葡萄和巨峰葡萄杂交种的杂交群体中继续筛选出携带父本特异性基因的条带的杂交种,最后用SSR标记引物VrZAG67在通过SSR标记引物UDV-088筛选后剩余的新郁葡萄和巨峰葡萄杂交种的杂交群体中继续筛选出携带父本特异性基因的条带的杂交种,依次经过5对SSR标记引物筛选,携带父本特异性基因的条带的的杂交种为真杂交种,经过5对SSR标记引物筛选后仍不具有携带父本特异性基因的条带的的杂交种基本可以视为假杂交种。

[0016] 优选地,S1中所述DNA提取的方法为采用改良的CTAB法,分别提取父本巨峰、母本新郁和新郁葡萄和巨峰葡萄杂交种的叶片的DNA,通过琼脂糖凝胶电泳,检测DNA的片段长度、浓度和纯度,用于PCR扩增。

[0017] 改良的CTAB法为西北农业大学学报,1996,24(5):1-10中的方法,葡萄为多年生植物,组织中富含多酚和其他杂质,一般的植物组织DNA提取方法难以满足高质量的DNA的提取,用改良的CTAB法得到的DNA质量高、纯度好无降解,基本排除了组织中多酚物质、蛋白质和其他杂质的干扰,波长为260nm和280nm下吸光光度比值即 OD_{260}/OD_{280} 值为1.60~1.90或波长为260nm和230nm下吸光光度比值即 OD_{260}/OD_{230} 值 >2.0 ,用于PCR扩增效果良好。

[0018] 优选地,所述父本巨峰、母本新郁和新郁葡萄和巨峰葡萄杂交种的叶片的DNA置于-20℃保存。

[0019] 优选地,S2中所述PCR反应体系为:PCR MiX混合液10 μ L、100 μ L/mL的SSR标记引物0.8 μ L、浓度为20ng/ μ L的DNA模板2.0 μ L、ddH₂O 7.2 μ L;所述PCR MiX混合液为市购,所述PCR MiX混合液由以下组分组成:100mmol/L的KCl,20mmol/L的Tris-HCl(即摩尔浓度比为1:1的三羟甲基氨基甲烷和盐酸混合物),3mmol/L的MgCl₂,400mmol/L的dNTP混合物,0.1U/ μ l的Taq DNA聚合酶和指示剂溴酚蓝。

[0020] 优选地,S2中所述扩增反应程序为:94℃预变性4min;94℃变性40s,45℃~65℃退火1min,72℃延伸1min,进行35个循环;最后一个循环72℃延伸10min,停止于4℃。

[0021] 优选地,S3中所述PCR产物的电泳分离的方法采用非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳;所述非变性聚丙烯酰胺凝胶中聚丙烯酰胺凝胶的质量分数为8%。

[0022] 优选地,采用非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳的方法为:

[0023] S301、量取ddH₂O 40mL,10 \times TBE(三羟甲基氨基甲烷也即Tris、硼酸及EDTA的混合物)缓冲液4mL,40% Acr-Bis(丙烯酰胺和双丙烯酰胺的水溶液) 8mL,TENMED(四甲基乙二胺) 40 μ L,10%APS(过磷酸铵) 400 μ L,混合搅拌均匀2min~3min后得到非变性聚丙烯酰胺凝

胶,将非变性聚丙烯酰胺凝胶迅速倒入凝胶槽中,若有气泡,将气泡赶到凝胶槽的边上,然后迅速将梳子装入凝胶槽中;所述 $10\times$ TBE为市购;

[0024] S302、待S301中所述非变性聚丙烯酰胺凝胶凝固25min~35min后,将凝胶槽放入电泳槽中,向电泳槽中加入 $0.5\times$ TBE(三羟甲基氨基甲烷也即Tris、硼酸及EDTA的混合物)缓冲液,轻轻拔出凝胶槽中的梳子,使电泳槽中的 $0.5\times$ TBE缓冲液覆盖凝固后的非变性聚丙烯酰胺凝胶;

[0025] S303、分别将5 μ L用同一SSR标记引物扩增的父本巨峰、母本新郁和新郁葡萄和巨峰葡萄杂交种的杂交群体中各新郁葡萄和巨峰葡萄杂交种的DNA在点样板的各点样孔中点样,第一个点样孔点为PCR Marker (PCR标记)作为分子量标记(记为M),然后进行2h~3h电泳,电泳结束后,将电泳后的非变性聚丙烯酰胺凝胶置于LED发光箱中,观察分离的DNA条带并拍照分析。

[0026] 优选地,S301中所述Acr-Bis中丙烯酰胺和双丙烯酰胺的质量比为39:1。

[0027] 本发明与现有技术相比具有以下优点:

[0028] 本发明通过前期筛选的5对SSR标记引物VMC7h3、Scu15vv、Vchr13a、UDV-088和VrZAG67对用于鉴定新郁葡萄和巨峰葡萄杂交种,葡萄是具有高度杂合基因的多年生植物,杂交后代的性状差异较大,利用SSR分子标记鉴定杂交后代比作物、蔬菜、西甜瓜等具有纯合性亲本的植物要复杂的多,根据孟德尔遗传规律,1个分子标记能完成群体一半的鉴定,依次递减,葡萄的杂交群体纯度的鉴定至少需要5个特异的SSR分子标记才能完成,本发明通过5对SSR标记引物,对新郁葡萄和巨峰葡萄杂交种的杂交群体进行鉴定,鉴定出真杂交种,能快速检验新郁葡萄和巨峰葡萄杂交工作成效,并提前剔除假杂交种后代,有利用提高育种效率,节约成本。

[0029] 下面结合附图和实施例对本发明作进一步详细说明。

附图说明

[0030] 图1是本发明SSR标记引物Vmc7h3对新郁葡萄和巨峰葡萄杂交种的杂交群体的鉴定的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳图。

[0031] 图2是本发明SSR标记引物Scu15vv对新郁葡萄和巨峰葡萄杂交种的杂交群体的鉴定的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳图。

[0032] 图3是本发明SSR标记引物Vchr13a对新郁葡萄和巨峰葡萄杂交种的杂交群体的鉴定的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳图。

[0033] 图4是本发明SSR标记引物UDV-088对新郁葡萄和巨峰葡萄杂交种的杂交群体的鉴定的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳图。

[0034] 图5是本发明SSR标记引物VrZAG67对新郁葡萄和巨峰葡萄杂交种的杂交群体的鉴定的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳图。

具体实施方式

[0035] 实施例1

[0036] 本实施例的鉴定新郁葡萄和巨峰葡萄杂交种的SSR分子标记,所述SSR分子标记为5对SSR标记引物,分别命名为VMC7h3、Scu15vv、Vchr13a、UDV-088和VrZAG67;

[0037] VMC7h3的核苷酸序列为TCAGATATTGAAGAACCACACA和ACTAGAAAATGCACAATCTCCC;

[0038] S c u 1 5 v v 的核苷酸序列为G C C T A T G T G C C A G A C C A A A A A C 和TTGGAAGTAGCCAGCCCAACCTTC;

[0039] Vchr13a的核苷酸序列为TGGCAGAGCAAATGAATCAA和TTGGATGGATTGGAATGACC;

[0040] UDV-088的核苷酸序列为CCATGCACACACGCACAT和CCACCAAACAAGTGGAGGTT;

[0041] V r Z A G 6 7 的核苷酸序列为A C C T G G C C C G A C T C C T C T T G T A T G C 和TCCTGCCGGCGATAACCAAGCTATG。

[0042] 本实施例还提供了上述的鉴定新郁葡萄和巨峰葡萄杂交种的SSR分子标记的应用,利用SSR分子标记鉴定新郁葡萄和巨峰葡萄杂交种,包括以下步骤:

[0043] S1、父本巨峰、母本新郁和新郁葡萄和巨峰葡萄杂交种的DNA提取;DNA提取的方法采用改良的CTAB法,分别提取父本巨峰、母本新郁和新郁葡萄和巨峰葡萄杂交种的叶片的DNA,通过琼脂糖凝胶电泳,检测DNA的片段长度、浓度和纯度,用于PCR扩增;所述父本巨峰、母本新郁和新郁葡萄和巨峰葡萄杂交种的叶片的DNA置于-20℃保存;

[0044] 改良的CTAB法为西北农业大学学报,1996,24(5):1-10中的方法,葡萄为多年生植物,组织中富含多酚和其他杂质,一般的植物组织DNA提取方法难以满足高质量的DNA的提取,用改良的CTAB法得到的DNA质量高、纯度好无降解,基本排除了组织中多酚物质、蛋白质和其他杂质的干扰,波长为260nm和280nm下吸光光度比值即 OD_{260}/OD_{280} 值为1.60~1.90或波长为260nm和230nm下吸光光度比值即 OD_{260}/OD_{230} 值 >2.0 ,用于PCR扩增效果良好;

[0045] S2、建立PCR反应体系及扩增反应程序;所述PCR反应体系为:PCR MiX混合液10 μ L、100 μ L/mL的SSR标记引物0.8 μ L、浓度为20ng/ μ L的DNA模板2.0 μ L、ddH₂O7.2 μ L;所述PCR MiX混合液为市购,所述PCR MiX混合液由以下组分组成:100mmol/L的KCl,20mmol/L的Tris-HCl(即摩尔浓度比为1:1的三羟甲基氨基甲烷和盐酸混合物),3mmol/L的MgCl₂,400mmol/L的dNTP混合物,0.1U/ μ L的Taq DNA聚合酶和指示剂溴酚蓝;所述扩增反应程序为:94℃预变性4min;94℃变性40s,45℃~65℃退火1min,72℃延伸1min,进行35个循环;最后一个循环72℃延伸10min,停止于4℃;

[0046] S3、PCR产物的电泳分离;PCR产物的电泳分离的方法采用非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳;所述非变性聚丙烯酰胺凝胶中聚丙烯酰胺凝胶的质量分数为8%;采用非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳的方法为:

[0047] S301、量取ddH₂O 40mL,10 \times TBE(三羟甲基氨基甲烷也即Tris、硼酸及EDTA的混合物)缓冲液4mL,40% Acr-Bis(丙烯酰胺和双丙烯酰胺的水溶液)8mL,TENMED(四甲基乙二胺)40 μ L,10%APS(过磷酸铵)400 μ L,混合搅拌均匀2min~3min后得到非变性聚丙烯酰胺凝胶,将非变性聚丙烯酰胺凝胶迅速倒入凝胶槽中,若有气泡,将气泡赶到凝胶槽的边上,然后迅速将梳子装入凝胶槽中;所述Acr-Bis中丙烯酰胺和双丙烯酰胺的质量比为39:1;所述10 \times TBE为市购;

[0048] S302、待S301中所述非变性聚丙烯酰胺凝胶凝固25min~35min后,将凝胶槽放入电泳槽中,向电泳槽中加入0.5 \times TBE(三羟甲基氨基甲烷也即Tris、硼酸及EDTA的混合物)缓冲液,轻轻拔出凝胶槽中的梳子,使电泳槽中的0.5 \times TBE缓冲液覆盖凝固后的非变性聚丙烯酰胺凝胶;

[0049] S303、分别将5 μ L用同一SSR标记引物扩增的父本巨峰、母本新郁和新郁葡萄和巨

峰葡萄杂交种的杂交群体中各新郁葡萄和巨峰葡萄杂交种的DNA在点样板的各点样孔中点样,第一个点样孔点为PCR Marker (PCR标记) 作为分子量标记 (记为M), 然后进行2h~3h电泳,电泳结束后,将电泳后的非变性聚丙烯酰胺凝胶置于LED发光箱中,观察分离的DNA条带并拍照分析。

[0050] S4、杂交种真实性的鉴定;先用SSR标记引物Vmc7h3在新郁葡萄和巨峰葡萄杂交种的杂交群体中筛选出携带父本特异性基因的条带的杂交种,然后用SSR标记引物Scu15vv在通过SSR标记引物Vmc7h3筛选后剩余的新郁葡萄和巨峰葡萄杂交种的杂交群体中继续筛选出携带父本特异性基因的条带的杂交种,再用SSR标记引物Vchr13a在通过SSR标记引物Scu15vv筛选后剩余的新郁葡萄和巨峰葡萄杂交种的杂交群体中继续筛选出携带父本特异性基因的条带的杂交种,然后用SSR标记引物UDV-088在通过SSR标记引物Vchr13a筛选后剩余的新郁葡萄和巨峰葡萄杂交种的杂交群体中继续筛选出携带父本特异性基因的条带的杂交种,最后用SSR标记引物VrZAG67在通过SSR标记引物UDV-088筛选后剩余的新郁葡萄和巨峰葡萄杂交种的杂交群体中继续筛选出携带父本特异性基因的条带的杂交种,依次经过5对SSR标记引物筛选,携带父本特异性基因的条带的的杂交种为真杂交种,经过5对SSR标记引物筛选后仍不具有携带父本特异性基因的条带的的杂交种基本可以视为假杂交种。

[0051] 本实施例的试验材料如表1所示,新疆维吾尔自治区葡萄瓜果研究所育种材料资源圃7年生的新郁和巨峰品种及新郁(母本♀)×巨峰(父本♂)杂交种的5年生杂交群体96株杂交单株:

[0052] 表1试验材料

	品种	种属	杂交组合	代号	株数
[0053]	新郁	欧亚种 [E42-6 (红地球自交) × 里扎马特]	新郁×巨峰	XJ	96
[0054]	巨峰	欧美杂交种 (石原早生×森田尼)			

[0055] 本实施例的5对SSR标记引物的信息如表2所示:

[0056] 表2 SSR标记引物序列

引物名称	氨基酸序列	熔解温度 (°C)
VMC7h3	TCAGATATTGAAGAACACCACA	54.48
	ACTAGAAAATGCACAATCTCCC	56.35
Scu15vv	GCCTATGTGCCAGACCAAAAAC	63.67
	TTGGAAGTAGCCAGCCCAACCTTC	60.07
Vchr13a	TGGCAGAGCAAATGAATCAA	53.70
	TTGGATGGATTGGAATGACC	55.75
UDV-088	CCATGCACACACGCACAT	57.30
	CCACCAAACAAGTGGAGGTT	57.80
VrZAG67	ACCTGGCCCGACTCCTCTTGTATGC	66.90
	TCCTGCCGGCGATAACCAAGCTATG	65.26

[0058] 利用5对SSR标记引物鉴定新郁葡萄和巨峰葡萄杂交种如下:

[0059] (1) SSR标记引物Vmc7h3对新郁葡萄和巨峰葡萄杂交种的杂交群体共96株单株的鉴定的结果如图1,图1(a)中从左至右依次为:Marker、新郁、巨峰、XJ1、XJ2、XJ3、XJ4、XJ5、XJ6、XJ7、XJ8、XJ9、XJ10、XJ11、XJ12、XJ13、XJ14、XJ15、XJ16、XJ17、XJ18、XJ19、XJ20、XJ21、XJ22、XJ23、XJ24、XJ25、XJ26、XJ27、XJ28、XJ29、XJ30、XJ31、XJ32、XJ33、XJ34、XJ35、XJ36、XJ37、XJ38、XJ39、XJ40、XJ41、XJ42、XJ43、XJ44、XJ45、XJ46、XJ47、XJ48、XJ49、XJ50、XJ51、XJ52、XJ53、XJ54、XJ55、XJ56、XJ57、XJ58、XJ59、XJ60、XJ61、XJ62;图1(b)中从左至右依次为:Marker、新郁、巨峰、XJ63、XJ64、XJ65、XJ66、XJ67、XJ68、XJ69、XJ70、XJ71、XJ72、XJ73、XJ74、XJ75、XJ76、XJ77、XJ78、XJ79、XJ80、XJ81、XJ82、XJ83、XJ84、XJ85、XJ86、XJ87、XJ88、XJ89、XJ90、XJ91、XJ92、XJ93、XJ94、XJ95、XJ96,由图1可得,SSR标记引物Vmc7h3从新郁葡萄和巨峰葡萄杂交种的杂交群体的96株单株中鉴定出XJ7、XJ8、XJ11、XJ14、XJ15、XJ19、XJ20、XJ22、XJ24、XJ25、XJ27、XJ34、XJ37、XJ38、XJ46、XJ47、XJ57、XJ68、XJ73、XJ74、XJ75、XJ77、XJ79、XJ88、XJ89、XJ93共26株单株携带父本巨峰特异性基因的条带,这说明这26株单株是真杂交种。

[0060] (2) 将用SSR标记引物Vmc7h3鉴定后,对剩余的未显示携带父本巨峰特异性基因的条带的70株单株用SSR标记引物Scu15vv的鉴定的结果如图2,图2从左至右依次为:Marker、新郁、巨峰、XJ1、XJ2、XJ3、XJ4、XJ5、XJ6、XJ9、XJ10、XJ12、XJ13、XJ16、XJ17、XJ18、XJ21、XJ23、XJ26、XJ28、XJ29、XJ30、XJ31、XJ32、XJ33、XJ35、XJ36、XJ39、XJ40、XJ41、XJ42、XJ43、XJ44、XJ45、XJ48、XJ49、XJ50、XJ51、XJ52、XJ53、XJ54、XJ55、XJ56、XJ58、XJ59、XJ60、XJ61、XJ62、XJ63、XJ64、XJ65、XJ66、XJ67、XJ69、XJ70、XJ71、XJ72、XJ76、XJ78、XJ80、XJ81、XJ82、XJ83、XJ84、XJ85、XJ86、XJ87、XJ90、XJ91、XJ92、XJ94、XJ95、XJ96,由图2可得,SSR标记引物Scu15vv从70株单株中鉴定出XJ1、XJ2、XJ3、XJ4、XJ5、XJ9、XJ13、XJ16、XJ17、XJ18、XJ23、XJ28、XJ35、XJ39、XJ41、XJ42、XJ43、XJ49、XJ50、XJ51、XJ59、XJ61、XJ62、XJ63、XJ64、XJ67、XJ78、XJ82、XJ84、XJ86、XJ90、XJ95、XJ96共33株单株携带父本巨峰特异性基因的条带,这说明这33株单株是真杂交种。

[0061] (3) 将用SSR标记引物Scu15vv鉴定后,对剩余的未显示携带父本巨峰特异性基因的条带的37株单株用SSR标记引物Vchr13a对新郁葡萄和巨峰葡萄杂交种的杂交群体的鉴定的结果如图3,图3从左至右依次为:Marker、新郁、巨峰、XJ1、XJ2、XJ3、XJ4、XJ5、XJ6、XJ9、XJ10、XJ12、XJ13、XJ16、XJ17、XJ18、XJ21、XJ23、XJ26、XJ28、XJ29、XJ30、XJ31、XJ32、XJ33、XJ35、XJ36、XJ39、XJ40、XJ41、XJ42、XJ43、XJ44、XJ45、XJ48、XJ49、XJ50、XJ51、XJ52、XJ53、XJ54、XJ55、XJ56、XJ58、XJ59、XJ60、XJ61、XJ62、XJ63、XJ64、XJ65、XJ66、XJ67、XJ69、XJ70、XJ71、XJ72、XJ76、XJ78、XJ80、XJ81、XJ82、XJ83、XJ84、XJ85、XJ86、XJ87、XJ90、XJ91、XJ92、XJ94、XJ95、XJ96,由图3可得,SSR标记引物Vchr13a从37株单株中鉴定出鉴定出XJ10、XJ21、XJ45、XJ48、XJ56、XJ65、XJ72、XJ81、XJ87共9株单株携带父本巨峰特异性基因的条带,这说明这9株单株是真杂交种。

[0062] (4) 将用SSR标记引物Vchr13a鉴定后,对剩余的未显示携带父本巨峰特异性基因的条带的28株单株用SSR标记引物UDV-088对新郁葡萄和巨峰葡萄杂交种的杂交群体的鉴定的结果如图4,从左至右依次为:Marker、新郁、巨峰、XJ6、XJ12、XJ26、XJ29、XJ30、XJ31、XJ32、XJ33、XJ36、XJ40、XJ44、XJ52、XJ53、XJ54、XJ55、XJ58、XJ60、XJ66、XJ69、XJ70、XJ71、XJ76、XJ80、XJ83、XJ85、XJ91、XJ92、XJ94,由图4可得,28株单株中鉴定出XJ6、XJ12、XJ26、XJ29、XJ30、XJ31、XJ33、XJ36、XJ40、XJ44、XJ52、XJ53、XJ54、XJ55、XJ58、XJ60、XJ66、XJ69、XJ70、XJ71、XJ76、XJ83、XJ91、XJ92共24株单株携带父本巨峰特异性基因的条带,这说明这24株单株是真杂交种。

[0063] (5) 将用SSR标记引物UDV-088鉴定后,对剩余的未显示携带父本巨峰特异性基因的条带的4株单株用SSR标记引物VrZAG67对新郁葡萄和巨峰葡萄杂交种的杂交群体的鉴定的结果如图5,4株单株中未鉴定出携带父本特异性基因的条带,均表现为母本新郁的特异性基因的条带,应该为自交后代。

[0064] 本实施例对新郁葡萄和巨峰葡萄杂交种的杂交群体的96株单株进行鉴定,从中筛选出92株真杂交种,4株自交杂交种,新郁与巨峰杂交可以获得正常的杂交单株,群体的真杂交种率至少为95.8%。

[0065] 葡萄是具有高度杂合基因的多年生植物,杂交后代的性状差异较大,利用SSR标记鉴定杂交后代比作物、蔬菜、西甜瓜等具有纯合性亲本的植物要复杂的多,根据孟德尔遗传规律,1个分子标记能完成群体一半的鉴定,依次递减,葡萄的杂交群体纯度的鉴定至少需要5个特异的SSR分子标记才能完成,本实施例通过5对多态特异性的SSR标记,对新郁葡萄和巨峰葡萄杂交种的杂交群体进行验证,鉴定出真杂交种,能快速检验杂交工作成效,并提前剔除假杂交种后代,有利用提高育种效率,节约成本。

[0066] 以上所述,仅是本发明的较佳实施例,并非对本发明作任何限制。凡是根据发明技术实质对以上实施例所作的任何简单修改、变更以及等效变化,均仍属于本发明技术方案的保护范围内。

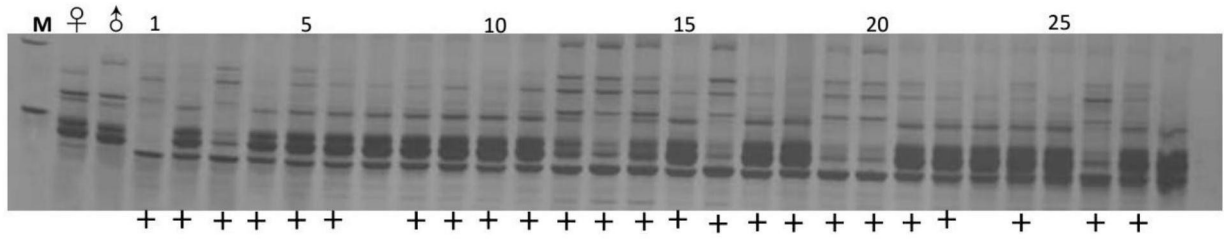


图4

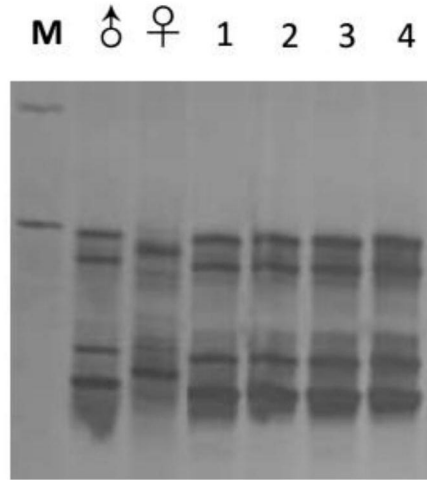


图5