

高通量提取桃树叶组织基因组 DNA 的研究

刘 航 空, 王 安 柱, 赵 彩 平, 韩 明 玉, 李 金 金, 李 芳

(西北农林科技大学 园艺学院, 陕西 杨凌 712100)

摘 要:以 1 个桃树杂交后代群体中不同成熟度的桃叶片组织为试材,以商品试剂盒为对照,采用高通量提取 DNA 的方法,研究了提取试剂、研磨仪使用钢珠大小和震动频率、时间等参数对提取 DNA 产物产率、质量的影响。结果表明:在常用的 CTAB 中添加 0.3% 的抗坏血酸,并提高 PVP 浓度至 4%,NaCl 浓度至 12%,能有效解决试剂盒提取过程中出现色素及蛋白质、多糖等杂质问题。提取方法和研磨方法优化组合,筛选获得高通量提取不同成熟度桃叶片 DNA 的方法,表明改良的提取方法采用 5 mm 研磨珠、60s、30 次/s 或 5 mm 研磨珠、60s、25 次/s 的研磨预处理,不仅省时省工,适用不同成熟度的桃叶片组织,而且提取效果最好,产率最高,质量符合基因组测序要求。该研究为高效提取 DNA 提供了技术依据。

关键词:桃树;叶片;高通量;基因组 DNA

中图分类号:S 662.103.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)13-0120-06

桃起源于我国西北,我国具有丰富的桃资源优势。其基因组很小(约 265 Mb),染色体数量少($2n=16$),单基因控制的性状较多。全基因组测序工作的完成及高通量测序技术的发展,为全基因组 QTL 和候选基因发掘定位奠定了基础,极大推动了资源评价及辅助育种研究进程^[1]。关于基因组测序及基因定位、遗传图谱制作等需要大量个体 DNA,这些技术都需要高质量的基因组 DNA。桃为多年生植物,受物候期制约,与蔬菜等一年生作物相比,叶片具有一定的角质层,酚类、糖类、色素、蛋白质等物质含量丰富,同时由于品种间的差异,样品组织成熟度差异,导致了提取的 DNA 质量存在明显差异^[2]。传统的手工液氮研磨法,因为过程耗力耗时,已经不能适应科研快速发展的需求^[3]。随着高通量组织研磨仪器的引进,DNA 提取效率大幅度提高,但是也出现了许多新的问题。表现在进口研磨钢珠太贵,在震荡研磨过程中易发生离心管爆裂,组织样品粉碎不彻底,提取 DNA 浓度较低,提取 DNA 质量不纯等问题。

现以 1 个桃树杂交后代群体为研究对象,以不同成熟度的桃叶片为试材,以商品试剂盒为对照,通过对提取方法、研磨仪使用钢珠大小和使用震动频率等参数进

行筛选,以期获得一种产率高、稳定性好、适用性广、适用于高通量操作的桃基因组 DNA 提取体系,为开展桃分子生物学研究提供可靠的技术基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料:来自“沙红桃”×“红芙蓉桃”的 F_1 杂交后代。

试验仪器:德国 RESTCH MM-400 球磨仪, Eppendorf 5417 离心机,水浴锅, Thermo nanodrop 2000c 微量分光光计,电泳凝胶检测系统等。

试验试剂:天根植物 DNA 提取试剂盒, QIAGEN 植物 DNA 提取试剂盒, Tris(北京索莱宝), HCl(天津市化学试剂), NaCl(西陇化工), PVP(上海蓝季), CTAB(北京索莱宝), 抗坏血酸(西陇化工), 氯仿(天津市化学试剂), 异戊醇(天津市化学试剂), 巯基乙醇(北京索莱宝), 无水乙醇(西陇化工), 异丙醇(西陇化工), Tris 饱和酚(北京索莱宝)等。

1.2 试验方法

1.2.1 DNA 提取方法改良 通过查阅资料,综合文献报道的 CTAB 桃叶片提取 DNA 方法^[4],在常用的含有 100 mM Tris-HCl(pH 8.0)、20 mM EDTA(pH 8.0)、1.4 mM NaCl、2%PVP、2%CTAB、2%(v:v)巯基乙醇的 CTAB 提取缓冲液中,增加了抗坏血酸物质及 PVP、NaCl 的含量,以降低色素及多酚、多糖等杂质污染(表 1)。以天根植物 DNA 提取试剂盒和 QIAGEN 植物 DNA 提取试剂盒为对照,筛选出产率高、稳定性好、适用性广的 DNA 提取方法。

第一作者简介:刘航空(1980-),男,陕西咸阳人,博士研究生,实验师,现主要从事果树栽培及遗传育种等研究工作。E-mail:lhk2205@163.com

责任作者:韩明玉(1962-),男,陕西扶风人,博士,教授,研究方向为果树栽培及遗传育种。

基金项目:国家“863”资助项目(2011AA1002060001);国家园艺实验教学示范中心建设资助项目(I105021301)。

收稿日期:2015-03-15

表1 正交组合筛选 DNA 提取缓冲液处理

序号	添加或增加的物质		
	抗坏血酸浓度/%	PVP 浓度/%	NaCl 浓度/%
1	0.1	2	8
2	0.1	4	10
3	0.1	6	12
4	0.3	2	10
5	0.3	4	12
6	0.3	6	8
7	0.5	2	12
8	0.5	4	8
9	0.5	6	10

1.2.2 高通量提取 DNA 提取条件筛选 取 2 mL 圆底离心管,高压灭菌烘干备用。购置直径分别为 4、5、6 mm 自行车轴常用钢珠,分别放置无水乙醇 2 h,过滤晾干表面酒精,放置到已灭菌的 2 mL 离心管中。每个离心管放 1 个钢珠,按照 3 种类型的钢珠,设置 3 个处理,每处理 3 次重复。

1.2.3 高通量提取桃 DNA 方法筛选 在 4 月初采摘未展开的桃嫩叶,5 月初采摘已展开的桃嫩叶,9 月初采摘成熟的老叶片,分别装在预处理的含有钢珠的试管中。设置研磨仪震动时间(30s、60s)和振动频率(25 次/s、30 次/s)4 种组合的研磨处理,对样品进行粉碎,使用优化的桃 DNA 提取方法,筛选出高质量、高产率、高通量的桃 DNA 提取方法体系。

1.2.4 提取方法验证 以“沙红桃”×“红芙蓉桃”的 F₁ 杂交后代为研究对象,按照优化的试验步骤,在 9 月初随机选取 23 株杂交个体的成熟老叶,提取桃基因组 DNA,进行适用性评价。

1.2.5 试验步骤 采摘大小一致的桃叶片 1~2 片(重量约 0.1 g),放置到预先处理好的含有钢珠的离心管中,每个处理重复 3 次,按照试验设计的组合方式进行标记,冰盒采样,带回液氮速冻 5min,迅速放入-80℃超低温冰箱中保存待用。样品研磨:从-80℃超低温冰箱取出样品,放置液氮预冷 5min,迅速转入研磨仪适配盒中,按照试验设计的研磨处理方法进行操作,研磨结束后迅速回置液氮预冷 30s,取出后迅速打开样品管盖,添加 DNA 提取液。分别按照天根植物 DNA 提取试剂盒和 QIAGEN 植物 DNA 提取试剂盒的参照说明书操作,具体方法略。常用的改良 CTAB 法提取植物组织 DNA 提

取步骤:加入 900 μ L(含有 100 mM Tris-HCl(pH 8.0), 20 mM EDTA(pH 8.0),1.4 mM NaCl,2%(M:V)PVP, 2%(M:V)CTAB,2%(V:V)巯基乙醇,1%(M:V)RNaseA)的 65℃预热 DNA 提取缓冲液,混匀,65℃水浴 30~60min。加 900 μ L 氯仿:异戊醇(24:1),12 000 r/min 离心 10min。取 700~900 μ L 上清液,加 900 μ L Tris 饱和酚:氯仿:异戊醇(25:24:1),12 000 r/min 离心 10min。取 400~500 μ L 上清,加等体积氯仿:异戊醇(24:1),12 000 r/min 离心 10min。取上清 300~450 μ L,加 2 倍体积(-20℃)冰异丙醇,-20℃静置 30min,12 000r/min 离心 5min,弃上清。75%酒精润洗 3 次,如出现沉淀漂浮,12 000 r/min 离心 2~3min,弃上清液。通风橱晾干 DNA,加入 100 μ L 的 TE 溶解,4℃保存待检测。电泳检测条件:琼脂糖 1%,电压 70 V,电泳时间 40min,上样量 1 μ L。

1.2.6 统计分析 研磨效果计算标准:研磨后有残存叶片或管壁破裂现象计算为 0 分;研磨后出现叶片组织融化,呈鲜绿色计算为 5 分;研磨后叶片组织没有残留但没有形成细沙状颗粒计算 7 分;研磨后叶片组织呈黄绿色粉状计算 10 分;每个处理总平均值计算为研磨效果分值。符合测序要求 DNA 应具备:OD 值在 1.8~2.2 范围内,浓度 \geq 50 ng/ μ L,电泳条带主带清晰,无严重拖尾,在点样孔附近除 DNA 条带外无其它条带。该试验判断依据以测序公司检测报告为准。

1.3 数据分析

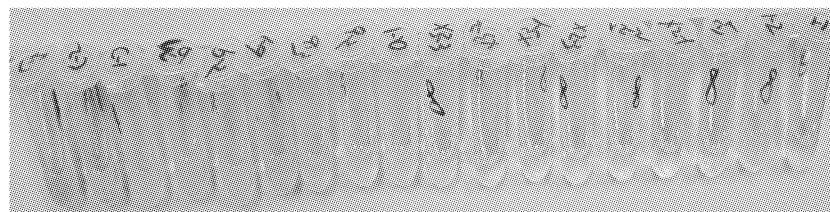
数据处理使用 DPS 7.05 软件进行方差分析。

2 结果与分析

2.1 试剂盒获取 DNA 产率及质量对比分析

取不同成熟度的叶片 0.1 g,采用市场流通的常用植物组织 DNA 提取试剂盒,进行桃叶片组织 DNA 提取,每个试验处理设 3 个重复。

图 1~2 为试剂盒提取过程中不同处理提取分离时呈现的颜色变化。结果表明,成熟组织在使用试剂盒提取 DNA 过程中,分离液含有大量色素。图 3 为提取 DNA 的凝胶电泳图,结果表明,点样孔附近发亮,可能存在大分子蛋白质或多糖类物质污染。



注:试管编号从右到左依次为幼嫩组织至成熟组织的提取编号。右起第 1~6 支试管为 4 月份采摘的未展叶嫩叶,第 7~12 支为 5 月份采摘的完全展开的叶嫩叶,第 13~18 支为 9 月份采样成熟叶片。下同。

图1 不同成熟度桃叶片提取 DNA 的第 1 次抽提效果对比图

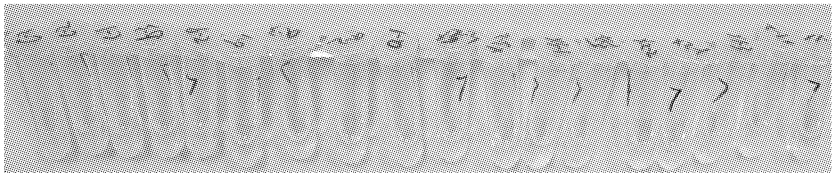


图2 不同成熟度桃叶片提取 DNA 的最后一次抽提效果对比图

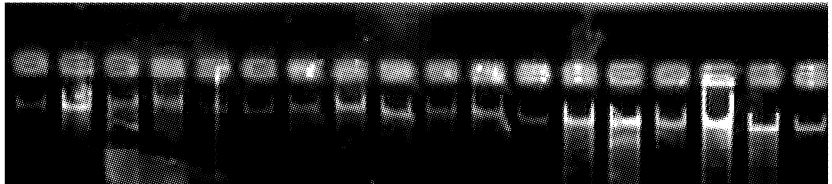


图3 不同成熟度桃叶片提取 DNA 的凝胶电泳图

由表 2 可知,试验使用的试剂盒获得的 DNA 均存在糖类或蛋白质类污染。提取效率方面,使用未展叶的嫩叶组织,DNA 产率最高,而采用成熟的叶片,其产率最低且 OD 值不符合测序要求。除 QIAGEN 试剂盒提取

未展叶的试验处理外,在所有处理中,采用天根试剂盒提取桃未展叶的处理效果,获得 DNA 产率为 375.96 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$,较其它处理存在显著性差异,OD 值也符合基因组测序要求。

表 2 试剂盒获取 DNA 产率及质量分析

DNA 提取方法	不同成熟度的桃叶片	DNA 浓度/ $(\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1})$	OD(260/280)	是否存在降解	蛋白质、糖污染情况	是否符合测序要求
天根试剂盒	未展叶嫩叶	375.96a	1.91a	无降解	糖类或蛋白质类污染	符合
	完全展开的叶嫩叶	153.06c	1.81ab	轻度降解	糖类或蛋白质类污染	符合
	成熟叶片	152.06c	1.52c	轻度降解	糖类或蛋白质类污染	不符合
QIAGEN 试剂盒	未展叶嫩叶	324.05ab	1.87a	无降解	糖类或蛋白质类污染	符合
	完全展开的叶嫩叶	216.21bc	1.85ab	轻度降解	糖类或蛋白质类污染	符合
	成熟叶片	139.38c	1.64bc	轻度降解	糖类或蛋白质类污染	不符合

2.2 筛选适用于成熟桃叶片组织提取的 DNA 提取缓冲液

选取与试剂盒提取 DNA 试验对应的 3 棵树,9 月初采摘成熟的桃叶片组织,每个处理 3 个重复,筛选出最佳的 DNA 提取缓冲液。

从表 3 可以看出,处理 3 和处理 5 获得的 DNA 产率最高,分别为 725.51、768.78 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$,与处理 1、2、4、6、8 存在显著性差异,高于表 2 所有试剂盒提取幼嫩组织的产率。在所有处理中,仅有处理 1 和处理 8 的 OD 值不符合测序要求,与其它处理存在显著性差异。

2.3 高通量提取桃 DNA 方法筛选

采摘不同成熟度的桃叶片组织,设置研磨仪震动时间(30s、60s)和振动频率(25 次/s、30 次/s)的 4 种组合的研磨处理,对样品进行粉碎,以 2.2 试验处理 5 的提取缓

冲液作为提取液,筛选优化研磨仪器设置参数。使用小直径研磨球,进行短时间低频研磨,将导致样品粉碎不彻底。使用大直径研磨球,进行长时间高频研磨,可导致样品管被击穿。图 4 为不同研磨处理的研磨效果,

表 3 提取成熟叶片 DNA 的方法筛选

改良 DNA 提取方法处理	DNA 浓度/ $(\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1})$	OD (260/280)	蛋白质、糖污染情况	是否符合测序要求
1	347.05c	1.69b	糖类或蛋白质类污染	是
2	502.35bc	1.88a	无明显杂质污染	是
3	725.51a	1.93a	无明显杂质污染	是
4	378.60c	1.94a	无明显杂质污染	是
5	768.78a	1.94a	无明显杂质污染	是
6	446.10c	1.94a	无明显杂质污染	是
7	628.03ab	1.92a	无明显杂质污染	是
8	479.82bc	1.64b	糖类或蛋白质类污染	是
9	614.00ab	1.92a	无明显杂质污染	是

注:经邓肯氏新复极差测验,小写字母表示 $P<0.05$ 显著水平。

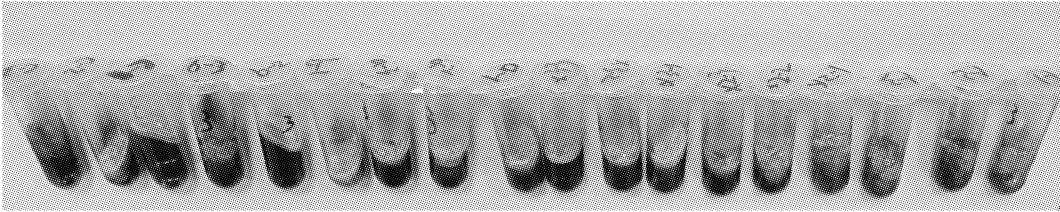
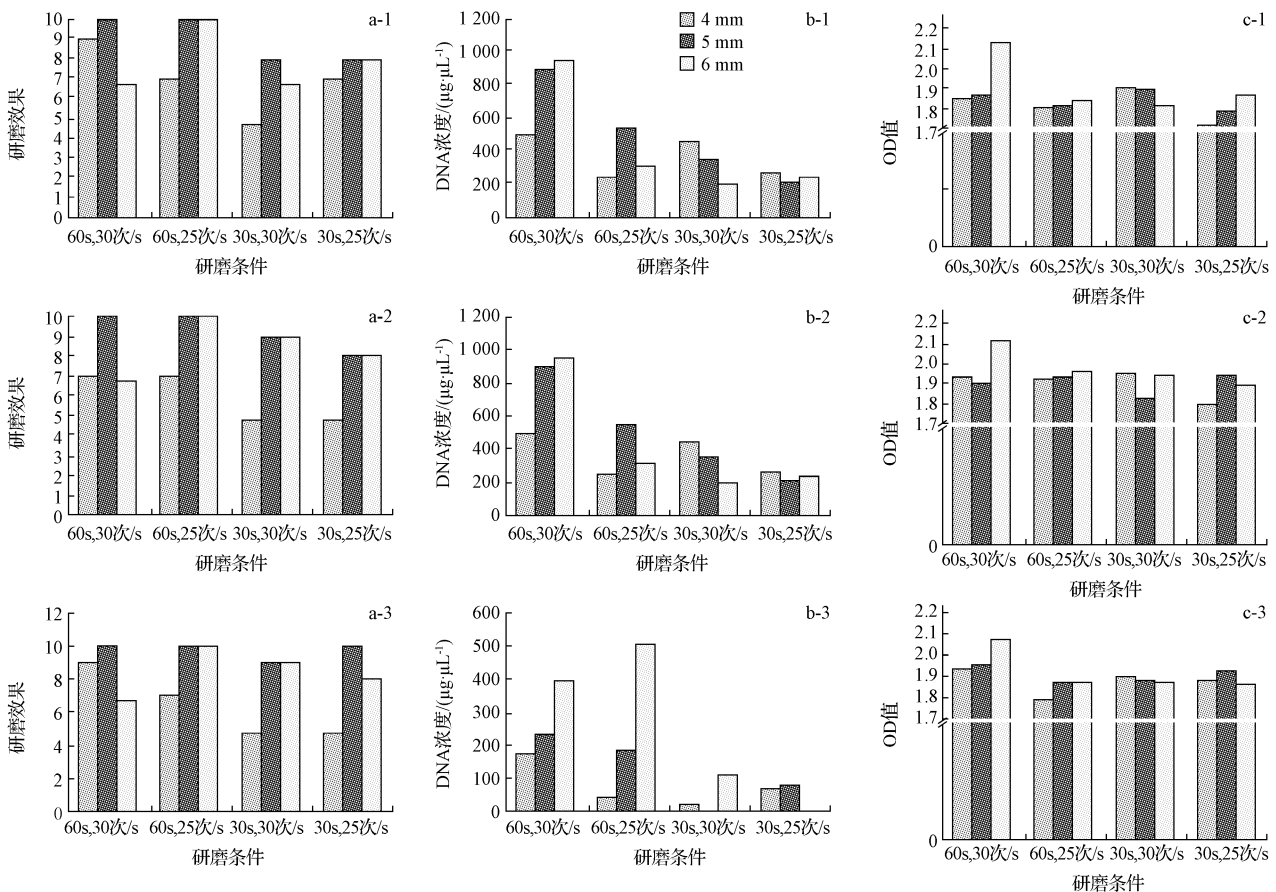


图4 研磨样品加提取液后的离心沉淀状态

右起第 4 支管显示样品研磨不彻底,左起第 6 支管显示样品管被击穿漏液。

由图 5 可知,对于所有类型桃叶组织进行高通量研磨,在 5 mm 研磨珠、60s、30 次/s 或 5 mm 研磨珠、60s、25 次/s 或 6 mm 研磨珠或 60s、25 次/s 条件下,研磨效果最好。其中,采用 5 mm 研磨珠、60s、30 次/s 和 6 mm 研磨珠、60s、30 次/s 研磨未展开的嫩叶和展开的嫩叶组织,提取的 DNA 产率均高于其它处理。但 6 mm 研磨珠、60s、30 次/s 研磨未展开的桃嫩叶组织提取的 DNA

产物,OD 值偏离测序要求。采用 6 mm 研磨珠、60s、30 次/s 或 6 mm 研磨珠、60s、25 次/s 研磨成熟老叶,提取的 DNA 产率最高,其次为采用 5 mm 研磨珠、60s、30 次/s 或 5 mm 研磨珠、60s、25 次/s 的研磨处理。从 DNA 产物 OD 值分析,不同成熟度组织在采用 6 mm 研磨珠、60s、30 次/s 的研磨处理,DNA 产物 OD 值均大于 2.0。除采用 6 mm 研磨珠、60s、30 次/s 研磨未展开嫩叶的处理外,其它研磨处理获得的 DNA 均达到测序要求。



注:a-1,a-2,a-3 分别为未展开嫩叶、展开嫩叶及成熟老叶的研磨效果对比图;b-1,b-2,b-3 分别为未展开嫩叶、展开嫩叶及成熟老叶的 DNA 浓度对比图;c-1,c-2,c-3 分别为未展开嫩叶、展开嫩叶及成熟老叶的 DNA 质量 OD 值对比图。

图 5 高通量高质量提取桃叶片 DNA 研磨条件筛选

2.4 高通量提取 DNA 方法适用性验证

9 月初,随机采取 23 个“沙红桃”×“红芙蓉桃” F_1 杂交后代群体的成熟叶片,使用 5 mm 钢珠的预处理样品管采样,液氮预冷后,进行 60s、25 次/s 的研磨,以含有

100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 20 mM EDTA (pH 8.0), 0.3% 抗坏血酸, 12% NaCl, 4% PVP, 2% CTAB, 2% 巯基乙醇, 1% (M:V) RNaseA 的缓冲液为提取缓冲液,按照该方法步骤提取 DNA,并进行电泳检测。图 6 显示,

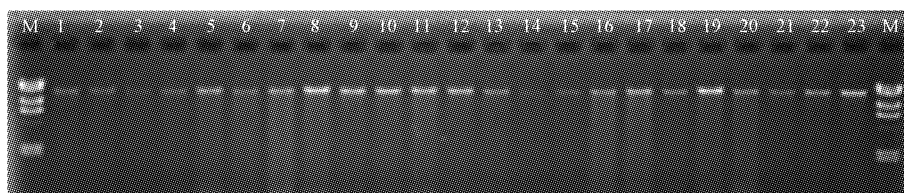


图 6 高通量 DNA 提取法提取成熟叶片 DNA 凝胶电泳图

23 个样品产生的条带主带清晰,无蛋白质或糖污染,部分出现微降解情况,测序公司报告确认所有样品均符合基因组测序的质量要求。

3 讨论与结论

市场上流通的植物 DNA 提取试剂盒,大部分采用异硫氰酸胍或其它碱裂解进行细胞裂解,再通过硅胶膜(或阴离子交换树脂),利用硅胶膜在高盐下结合核酸、在低盐下可以洗脱下来的特性(阴离子交换树脂则与之相反,在低盐高 pH 值条件下结合核酸,在高盐低 pH 值条件下洗脱),获得核酸分子。试剂盒高盐结合核酸的过程,使样品组织中的糖类、蛋白质得到稀释,基本上满足了对幼嫩桃叶片组织核酸提取的试验需求。由于农业受自然因素影响较大,幼嫩组织获取的局限性较大,通常使用的材料多为成熟的叶片组织。成熟的叶片组织,不仅含有大量的叶绿素、花青素、酚类物质,还是生产和运输光合产物(淀粉和糖)的重要场所,此外具有丰富的蛋白信号物质,行使着重要的养分调运功能。而这些叶绿素、花色苷、酚类、淀粉、糖、蛋白质是获取高质量的 DNA 最大干扰因素之一。在获取成熟桃叶片组织 DNA 时,从 2.1 的试验结果可以看出,使用市场上流通的试剂盒,获得的 DNA 均存在糖类或蛋白类污染。提取效率方面,使用未展叶的嫩叶组织, DNA 产率最高仅为 $375.96 \mu\text{g}/\mu\text{L}$,而采用成熟的叶片,其产率最低且 OD 值不符合测序要求。目前关于提取桃叶片组织 DNA 的方法研究较多^[4-10],且主要集中在对幼嫩桃叶片组织的研究。这些方法中过量地使用了 β -巯基乙醇,在高通量提取时,易对人身及环境产生影响。对桃成熟叶片及组织的改良提取方法的报道相对少,王富荣等^[2]报道的提取成熟桃叶片 DNA 的方法,程序相对繁杂,且多次过量使用了 β -巯基乙醇。抗坏血酸是一种强力抗氧化剂,对抑制多酚氧化酶具有很好的作用,起到与 β -巯基乙醇相同的作用^[11]。PVP 不仅具有抗氧化作用,还可较强的吸附色素功能。该研究中,在常用的 CTAB 提取方法基础上,添加了 0.3% 的抗坏血酸,并提高 PVP 浓度至 4%, NaCl 浓度至 12%,有效解决了在提取成熟叶片过程中出现的色素及蛋白、多糖等污染问题,降低了 β -巯基乙醇使用浓度及次数,操作步骤也相对简单。与试剂盒相比,通过在 2.2 成熟叶片中 DNA 提取试验测试, DNA 产率最高可达 $768.78 \mu\text{g}/\mu\text{L}$,质量也符合基因组测序要求。

相对传统 DNA 提取方法,高通量组织研磨仪器,具有高效快捷、节省液氮、节省人工等特点。在采样制备时,可提前做好标记,有效节省了大田取样时间;研磨过程仅需 60s 即可完成 48~96 个样品研磨,保证了研磨样品始终保持冷冻状态,避免了研磨样品组织褐变和交叉污染,极大地提升了试验效率及效果。该试验对不同类型的桃叶片组织从提取方法和研磨方法进行了优化组合,认为 5 mm 研磨珠、60s、30 次/s 或 5 mm 研磨珠、60s、25 次/s 的研磨条件,具有广泛的适用性,不仅研磨效果好,而且获得的 DNA 产率高,质量也符合基因组测序要求。但是使用高速研磨也出现 OD 值偏高现象,尤其在使用 6 mm 研磨珠、60s、30 次/s 的研磨处理表现明显,分析可能是高速研磨冲击导致 DNA 分子断裂的缘故。因此,建议最好使用 5 mm 研磨珠、60s、25 次/s 的研磨条件下操作使用。

总之,这种高通量、省力化、适用性广的提取桃树叶片组织基因组 DNA 技术,极大节省了试验人员时间和精力,减少试验对自然生长条件的依赖性,还可节约经济成本,满足了科学发展需求。

参考文献

- [1] 李雄伟,贾惠娟,高中山. 桃基因组及全基因组关联分析研究进展[J]. 遗传,2013(10):1167-1178.
- [2] 王富荣,赵剑波,章镇,等. 适于 AFLP 分析用的桃成熟叶片 DNA 提取方法[J]. 果树学报,2006(4):638-641.
- [3] 王慧娜,初志战,马兴亮,等. 高通量 PCR 模板植物基因组 DNA 制备方法[J]. 作物学报,2013(7):1200-1205.
- [4] 魏姗姗,刘兴菊,杨敏生,等. 基于成熟期的桃品种遗传多样性 SSR 分析[J]. 北方园艺,2014(12):88-93.
- [5] 李雄伟,孟宪桥,贾惠娟,等. 桃品种特异性荧光 SSR 分子标记数据库构建[J]. 果树学报,2013(6):924-932.
- [6] 陈建军,王玉安,欧巧明,等. 甘肃地方桃种质资源的遗传多样性[J]. 西北农业学报,2013(7):149-155.
- [7] 曹珂,王力荣,朱更瑞,等. 桃遗传图谱的构建及两个花性状的分子标记[J]. 园艺学报,2009(2):179-186.
- [8] 逯昀,潘自舒,王倩,等. 桃果肉颜色和花粉育性的 SSR 分子标记初探[J]. 湖北农业科学,2009(9):2055-2058.
- [9] 彭建营,束怀瑞,孙仲序. 分子标记技术及其在果树种质资源研究上的应用[J]. 山东农业大学学报,2001,32(1):103-106.
- [10] Zhang S M, Xu C J, Gao Z S, et al. Development and characterization of microsatellite markers for Chinese bayberry (*Myrica Rubra* Sieb. & Zucc.) [J]. Conservation Genetics, 2009, 10(5):1605-1607.
- [11] 徐美隆,章雨,倪细炉. 一种高质量葡萄基因组 DNA 提取方法[J]. 北方园艺,2011(15):172-174.

Study on Extracting DNA From Peach Leaves Efficiently

LIU Hangkong, WANG Anzhu, ZHAO Caiping, HAN Mingyu, LI Jinjin, LI Fang

(College of Horticulture, Northwest Agriculture and Forestry University, Yangling, Shaanxi 712100)

小型西瓜离体器官再生的影响因素

王玉书¹, 高美玲¹, 王欢², 范震宇¹, 郭宇¹

(1. 齐齐哈尔大学 生命科学与农林学院, 黑龙江 齐齐哈尔 161006; 2. 齐齐哈尔大学 化学与化学工程学院, 黑龙江 齐齐哈尔 161006)

摘要:以3种基因型的小型西瓜无菌苗为试材,采用体外培养的方法,研究了外植体类型、激素组合、继代生根培养对离体器官再生的影响。结果表明:以子叶节为外植体的不定芽再生效果好于子叶;不同基因型最适的激素组合不同,W1的最适诱导培养基是MS+1.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA,再生频率为20.00%,W2的最适诱导培养基是MS+3.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA,再生频率为30.00%,W3的最适诱导培养基是MS+2.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA,再生频率为24.00%;最佳生根培养基为MS+NAA 0.5 mg/L。

关键词:小型西瓜;离体器官再生;不定芽分化

中图分类号:S 651 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)13-0125-03

小型西瓜又名迷你西瓜,因其果型小、品质优,十分迎合当前群众消费习惯,具广阔市场潜力,已成为一种高档礼品。小型西瓜作为一种新兴的西瓜优良新品种,现已经成为高效农业项目之一^[1]。目前,小西瓜品种依然大量进口,种子价格很高,采用离体培养诱导多倍体小型西瓜,受到越来越多人认同^[2]。20世纪70年代,Andrus等^[3]首次建立了无籽西瓜的无性繁殖体系。随后,研究者利用子叶等外植体,在一些基因型西瓜材料上诱导形成不定芽,获得了再生植株^[4-6]。然而,关于小

型西瓜离体培养技术的报道还很少。该试验以小型西瓜为试材,对取材部位、激素配比及继代生根进行探讨,以期完善西瓜组织培养再生体系、西瓜基因工程育种的进一步发展奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料为齐齐哈尔大学生命科学与农林学院园艺系培育的小型西瓜自交系,编号为W1、W2和W3。

1.2 试验方法

1.2.1 无菌苗培养 首先清水搓洗小型西瓜种子,然后用0.1%升汞(HgCl₂)消毒5min,无菌水漂洗3次,每次5min,之后置于无菌水中浸泡10h,将种子去壳(于超净工作台上操作),并将种子用滤纸吸干水后,5粒/瓶接种到MS(30%蔗糖,0.75%琼脂)发芽培养基上,置于25℃、

第一作者简介:王玉书(1985-),女,黑龙江富锦人,博士,讲师,现主要从事园艺植物遗传育种等研究工作。E-mail:wangys1019@126.com.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31401908);黑龙江省教育厅科学研究资助项目(12541881)。

收稿日期:2015-01-23

Abstract: Taking different maturities of leaves from peach progenies population as material, commercial kit was experimented as control group. The effect of the parameters of retsch about the grinding bead sizes, the frequency and time of vibration on yield and quality of DNA were investigated by the method of high-throughput extracting DNA. The results showed that adding 0.3% ascorbic acid, increasing the concentration of PVP to 4% and soaring the concentration of NaCl to 12% at the base of usual CTAB extraction buffer, the pigment and protein, polysaccharide were eliminated, and the problem appeared in the process of extracting DNA by the kits were effectively solved. Combining with the modified extraction method, the grinding pretreatment was screened. With the vibration frequency of 30 times/sec in 60 seconds by 5 mm grinding bead or the vibration frequency of 25 times/sec in 60 seconds by 5 mm grinding bead, a high throughput approach for DNA isolation from different maturity of leaves were acquired. It is not only considered to be a good ways to save time and dispense with much labor at extracting DNA, but also it was applied to extracting DNA from different maturity of peach leaves. More importantly, it could get high yield, reliable quality DNA for the genome sequencing. This study would provide guidance for technology of high performance DNA isolation.

Keywords: peach; leaf; high throughput; genome DNA