

# 甜瓜种质资源耐贮性状的 RAPD 分子标记筛选

户金鸽<sup>1</sup>, 廖新福<sup>1</sup>, 罗淑萍<sup>2</sup>, 张瑞<sup>1</sup>

(1. 新疆维吾尔自治区葡萄瓜果开发研究中心, 新疆 鄯善 838200; 2. 新疆农业大学 农学院, 新疆 乌鲁木齐 830052)

**摘 要:**以 64 份不同耐贮性状的甜瓜种质资源为试材, 采用 RAPD 分子标记技术对其进行遗传多样性分析。结果表明:19 条引物共扩增出 118 条 DNA 条带, 其中 103 条表现出多态性, 占总条带的 87.29%。聚类分析结果表明, 64 份甜瓜种质资源可被分为耐贮藏、不耐贮藏和中间类型三大类。

**关键词:**甜瓜; RAPD; 种质资源

**中图分类号:**S 652 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)16-0120-05

RAPD(Random Amplified Polymorphic DNA)是一种利用任意序列的寡核苷酸片段为单引物, 以未知序列的基因组 DNA 为模板, 通过 PCR(Poly-merase Chain Reaction, 聚合酶链式反应)扩增, 寻找多态性 DNA 片段作为分子标记的 DNA 多态性检测技术。自 1990 年 Williams 等<sup>[1]</sup>创立以来, 凭借其技术简单、分析所需 DNA 样品量少、成本低等优点, 已被广泛应用于基因定位、遗传图谱构建和遗传多样性分析等领域, 成为当今最重要的分子生物学技术之一。

甜瓜(*Cucumis melo* L.)属于葫芦科(Cucurbitaceae)甜瓜属(*Cucumis*)1 a 生蔓生草本植物, 在世界各地均有栽培, 是全球十大水果之一, 其种质资源十分丰富<sup>[2]</sup>。近年来, 我国利用 DNA 分子标记对甜瓜种质资源亲缘关系的分析时有报道。乐锦华等<sup>[3]</sup>、刘万勃等<sup>[4]</sup>、张建农等<sup>[5]</sup>、王掌军等<sup>[6]</sup>先后均利用 RAPD 标记对甜瓜种质资源进行了分析, 并且认为 DNA 分子标记具有快速、准确、多态性强等优点, 在甜瓜种质资源研究方面具有较好的应用前景。但是, 甜瓜生产地域性和季节性极强<sup>[7]</sup>, 成熟时大量涌入市场, 形成市场短期积压, 加上甜瓜糖度高, 水分含量大, 易受病原菌感染而腐烂变质, 给甜瓜产业带来了巨大的经济损失。目前, 除了哈斯阿古拉<sup>[8]</sup>报道了甜瓜耐贮藏基因工程的研究外, 对甜瓜耐贮性状的研究报道还比较少, 该试验通过 RAPD 分子标记

技术, 对新疆维吾尔自治区葡萄瓜果开发研究中心现有的部分甜瓜种质资源的耐贮性状进行了分子标记筛选, 以期对甜瓜耐贮藏性状育种提供辅助手段。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试 64 份甜瓜种质资源均由新疆维吾尔自治区葡萄瓜果开发研究中心提供。2009 年 4 月底种植, 6 月初采集嫩叶, 将样品贮于超低温冰箱中备用, 其名称或代号见表 1。材料的选取以《新疆甜瓜西瓜志》为依据, 分别选取耐贮藏和不耐贮藏的品种。

81 条随机引物购自上海生工(Sangon)公司, DNTPs、DL 2 000 DNA Marker 购自沃尔森生物公司; Taq DNA 聚合酶、10 × buffer (不含 MgCl<sub>2</sub>)、25 mM MgCl<sub>2</sub> 购自华美公司。

### 1.2 试验方法

试验于 2009 年 11 月至 2010 年 1 月在西北农林科技大学园艺学院, 农业部西北园艺种质资源利用重点开放实验室、陕西省农业分子生物学重点实验室进行。

**1.2.1 总 DNA 的提取与测定** 取 0.5~1.0 g 甜瓜花期幼嫩叶片, 于液氮中研磨成粉末, 转入 2.0 mL 离心管中, DNA 提取采用稍作改良的 CTAB 法<sup>[9]</sup>。将上述提取的 DNA 样品 1 μL 在核酸蛋白仪进行检测, 取 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 在 1.7~2.0 之间的 DNA 样品做 RAPD 分子标记, 后用 1.5% 的琼脂糖电泳检测 DNA 浓度, 并将每个样品的浓度稀释到 20 ng/μL 左右。

**1.2.2 引物筛选** 试验所用的 81 条随机 RAPD 引物是从乐锦华等<sup>[3]</sup>、陈金体等<sup>[10]</sup>、张建农等<sup>[5]</sup>、姚国新等<sup>[11]</sup>、刘富中等<sup>[12]</sup>、王掌军等<sup>[6]</sup>开发的甜瓜 RAPD 系列引物中选出的被证明条带清晰、多态性好、分辨率高的引物。选取 2 个耐贮性状差异较大的甜瓜种质资源进行 RAPD 引物筛选, 进一步从 81 条引物中筛选出能在

**第一作者简介:**户金鸽(1982-), 女, 硕士, 助理研究员, 现主要从事西甜瓜育种等研究工作。E-mail: hujinge2007@sina.com.

**责任作者:**廖新福(1960-), 男, 硕士, 研究员, 硕士生导师, 国家西甜瓜产业技术体系岗位专家, 现主要从事西甜瓜育种和贮藏与运输等研究工作。E-mail: lxf3838@163.com.

**基金项目:**国家西甜瓜产业技术体系专项资金资助项目(nycytx-36); 新疆自治区科技支撑资助项目(201131104)。

**收稿日期:**2013-04-10

表 1 供试材料

Table 1 List of experimental accessions

编号 No.	名称 Name	编号 No.	名称 Name
1	“黄麻皮”	33	“皮山亏瑞克”
2	“皮极甘”	34	“卡拉克赛”
3	“青皮红肉秋瓜”	35	“秋黄皮青肉”
4	“郁金”	36	“花皮金棒子”
5	“哈密加格达”	37	“其干吐木休克阿含其”
6	“含笑”	38	“奎孜克焦孜”
7	“塔城冬甜瓜”	39	“牙孜力克焦孜”
8	“绿皮子”	40	“大青皮”
9	“赛热克麦盖”	41	“卡拉孜西”
10	“香梨黄”	42	“米籽瓜”
11	“小青皮”	43	“绿皮酥”
12	“红肉可口奇”	44	“恰尔库洪”
13	“阿拉尔甜瓜”	45	“青皮脆”
14	“且介可口奇”	46	“铁千里”
15	“伯些克辛”	47	“小青皮红肉”
16	“芙蓉”	48	“跃进黄皮”
17	“黄皮红肉夏瓜”	49	“胜金白瓜”
18	“加格达”	50	“且未加格达”
19	“卡拉麦盖”	51	“恰尔密及甘”
20	“于田冬瓜”	52	“阿克那瓦提”
21	“铁皮”	53	“洋海白瓜”
22	“皇后”	54	“本地黄皮子”
23	“其力格”	55	“黑眉毛密及甘”
24	“黄皮可口奇”	56	“波斯皮牙孜”
25	“赛热克西力克可洪”	57	“且末太热”
26	“大黄盖”	58	“安江可口奇”
27	“卡热卡来克可口奇”	59	“光皮胜金白皮”
28	“伽师黑皮”	60	“拜克扎德”
29	“大黄旦子”	61	“黄旦子”
30	“秋黄皮白肉”	62	“红心脆”
31	“一包糖”	63	“玛纳斯瓜旦”
32	“奎把密及甘”	64	“太热”

所有材料中扩增出清晰、稳定、重复性强的 DNA 条带。

1.2.3 PCR 扩增及产物的鉴定 采用 PTC-100 型的 PCR 仪进行扩增。扩增体系为:反应总体积 25  $\mu$ L,其中 10 $\times$  buffer 2.5  $\mu$ L,25 mM MgCl<sub>2</sub> 2  $\mu$ L,10 mM dNTPs 0.5  $\mu$ L,2.5 U Taq DNA 聚合酶,引物 1  $\mu$ L,模板 DNA 2.5  $\mu$ L,ddH<sub>2</sub>O 16.2  $\mu$ L。扩增反应程序为:94℃预变性 2 min;94℃变性 1 min,36℃退火 1 min,72℃延伸 2 min,39 个循环;最后再 72℃延伸 10 min。反应结束后取 25  $\mu$ L PCR 扩增产物在含有 EB 的 1.5% 琼脂糖与 1 $\times$  TAE 缓冲液中电泳检测,电压为 90 V,时间 1.0~1.5 h,并以 100~2 000 bp 标准分子质量进行对照。电泳结果在 GENE GENI VS 型凝胶成像系统下观察,经电脑成像扫描仪记载结果。

### 1.3 数据分析

RAPD 电泳结果采取 0/1 赋值记带,在相同迁移位置,有带的(Present)记为 1,无带的(Absent)记为 0,将

这些数据输入 NTSYS 2.10 聚类软件中计算相似系数,按照 UPGMA 进行聚类分析,绘制树状聚类图。

## 2 结果与分析

### 2.1 64 份甜瓜资源 PCR 扩增结果

从 81 条随机引物中筛选出 19 条引物对 64 份甜瓜种质资源的 DNA 样本进行 PCR 扩增,由表 2 可知,19 条引物共扩增出 103 条有多态性的带,其中 ALW359608 和 ALW359570 最多,均为 9 条;ALW359569 和 ALW359597 随机扩增的带数最少,均为 4 条;19 条引物共扩增出 118 条,其中 103 条扩增出多态性,占总条带的 87.29%,平均扩增出 5.42 条多态性的带。引物 ALW359574 对 64 个甜瓜种质资源的 PCR 扩增结果见图 1。

表 2 19 条引物对 64 份甜瓜种质资源扩增的多态性片段统计

Table 2 Statistics of numbers of DNA fragments amplified with 19 primers in 64 cultivars or strains

引物 Primer	序列 5'-3' Sequences 5'-3'	扩增总带数 Total number of bands/条	多态性数 Polymorphic bands/条	多态位点频率 Percentage of polymorphic bands/%
ALW359558	GTGAGGCGCAG	8	8	100.00
ALW359566	GTCAGAGTCC	5	4	80.00
ALW359569	CCGCGTCTTG	4	4	100.00
ALW359570	GGCTAACCGA	9	8	88.89
ALW359571	GGAGTGGACA	7	7	100.00
ALW359574	TTCCCCCGCT	5	5	100.00
ALW359576	GGACGGCGTT	5	4	80.00
ALW359588	TCACTCCCTC	5	5	100.00
ALW359593	TGGTCCGAGA	5	3	60.00
ALW359597	GAGCTACCGA	4	3	75.00
ALW359598	GACCCCGACA	6	4	66.67
ALW359601	CACGCAGATG	6	6	100.00
ALW359608	CTCACCGTCC	9	8	88.89
ALW359613	AAGACCCCTC	7	7	100.00
ALW359619	GGAGTACTGG	8	7	87.50
ALW359623	TGCGGCTGAG	5	2	40.00
ALW359625	ACGGCGTATG	8	8	100.00
ALW359627	ACCTCAGCTC	6	5	83.33
ALW359629	CCGCGTCTTG	6	5	83.33
总计 Total	19	118	103	87.29

### 2.2 64 份甜瓜资源聚类结果

从图 2 可以看出,64 份甜瓜种质资源被大体分为 3 类:不耐贮藏(29、64、61、60、63、62)、中间类型(15、30)、耐贮藏(其余种质资源)。根据 DNA 扩增结果计算各试验材料之间的相似系数,其分布范围从 56.67%~92.22%。试验材料中,“卡拉克赛”和“奎孜克焦孜”、“卡拉克赛”和“花皮金棒子”、“黄皮红肉夏瓜”和“卡拉麦盖”、“黄皮红肉夏瓜”和“铁皮”之间的相似系数最高,为 92.22%。红心脆和大黄旦子之间的相似系数最小,为 56.67%。



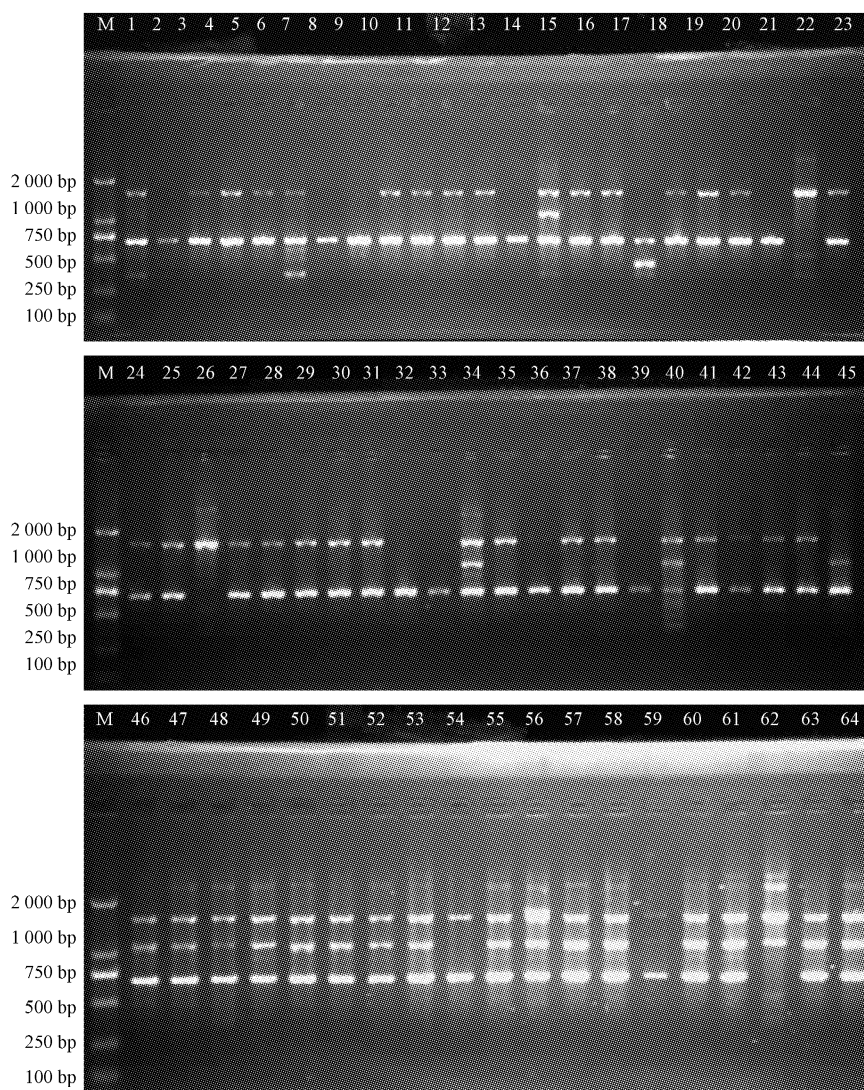


图1 引物 ALW359623 对哈密瓜种质资源的 RAPD 扩增图谱

注:1~64 对应种质资源同表1。M 为 Marker DL 2 000。下同。

Fig. 1 Amplification patterns of primer ALW359623 in the 64 hawthorn cultivars by RAPD

Note: The numbers are consistent with Table 1. M Marker DL 2 000. The same below.

### 3 讨论

在甜瓜分类史上,第1次对甜瓜进行系统分类的是法国瓜类专家罗典。虽然罗典的分类方法存在着不足,但对以后甜瓜的分类有着十分重大的影响。1962年,美国学者威特克依据罗典分类,将甜瓜种分为7个变种,这一分类法简明、方便,是迄今欧美各国普遍使用的甜瓜分类系统,但也存在一些不足。在2000年以前,还未见有关 RAPD 技术用于甜瓜分类的报道,此后乐锦华等<sup>[3]</sup>、刘万勃等<sup>[4]</sup>、张建农等<sup>[5]</sup>、王掌军等<sup>[6]</sup>先后利用 RAPD 标记对甜瓜种质资源进行了分类,进一步排除了甜瓜分类学上的同名异物、同物异名现象。

RAPD 随机引物标记的方法自 John 等 1990 年创立以来已有 20 多年了,由于其操作简单、成本较低,已广泛用于植物重要农艺性状的分子标记、品种鉴定与遗传多

态性分析和遗传图谱构建等众多研究领域。但由于 RAPD 随机引物 10 个碱基太短,而且退火温度较低(36~40℃),很容易造成错误配对,再加上各种试剂的质量和浓度差异、人为误差等易造成扩增出现假阳性带型和结果的不稳定。试验过程中采用同一 RAPD-PCR 反应体系,同时在数据统计时只统计有明显多态性的主带,忽略弱带,可以提高结果的准确性。该试验对甜瓜耐贮藏性状进行了初步筛选,从而为甜瓜的耐贮藏性状育种提供理论依据。

迄今为止,有关甜瓜耐贮藏性状的分子标记还很少,而该试验所用的引物是从前人开发的甜瓜 RAPD 系列引物中选出的被证明多态性好、分辨率高的引物,虽然被用于 RAPD 标记扩增,但所得的结果与事实之间还存在一定的差异。引起这一差异的原因可能与甜瓜的

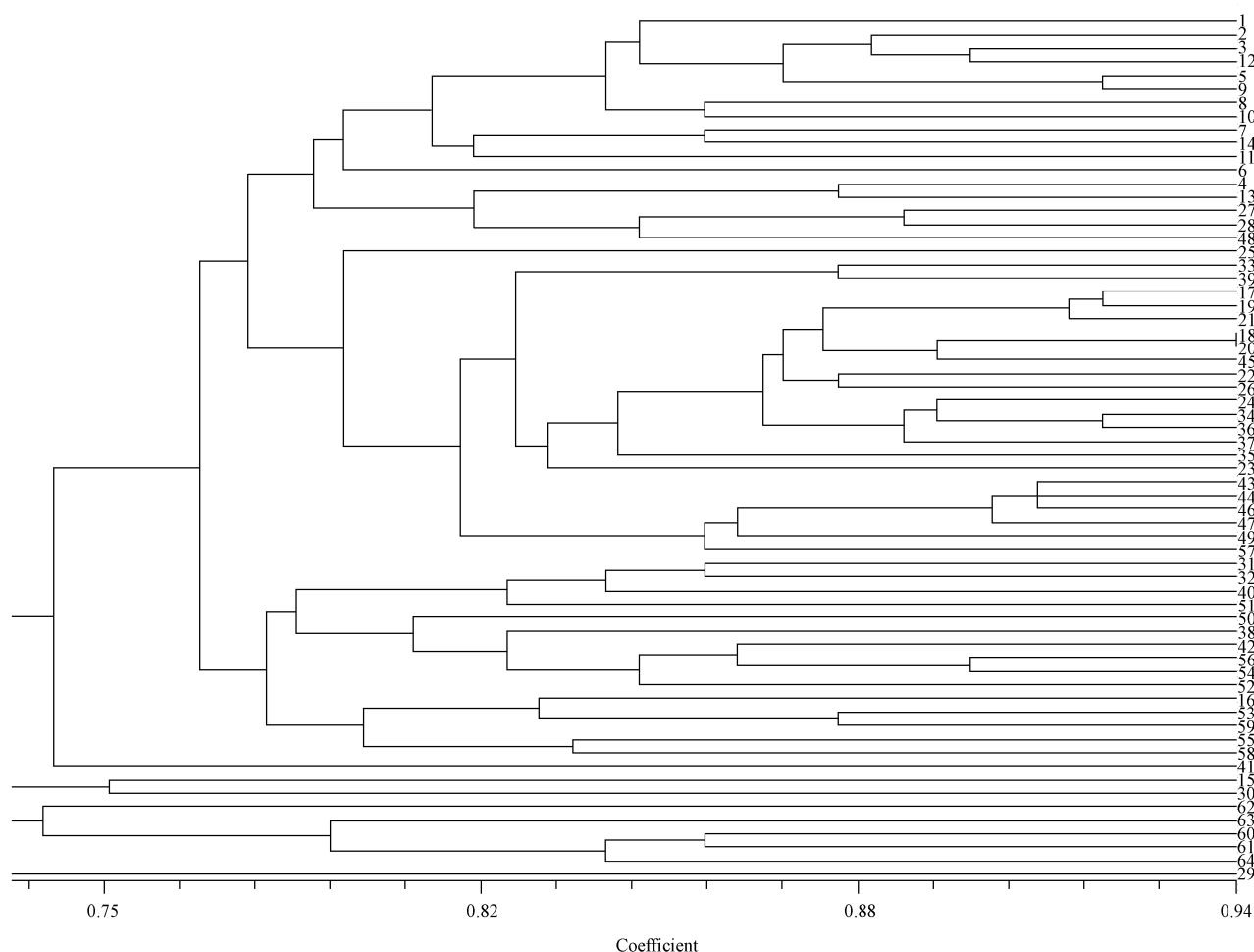


图 2 64 份甜瓜种质资源的 RAPD 数据聚类分析树状图

Fig. 2 Cluster analysis dendrogram of 64 melon germplasm resources genotypes constructed from RAPDs

潜伏病害有关。林德佩等<sup>[13]</sup>对新疆的甜瓜种质资源进行了耐贮藏性状的调查,该试验是以这次调查为基础进行的。田间是甜瓜的第一生产车间,不当的田间操作使得甜瓜在田间已感染病害,但由于缺乏发病条件,果实表现出的耐贮藏性与试验结果存在一定的差异。在贮藏期间,一旦有适宜的发病条件,致病病原菌就会大量繁殖,从而引起甜瓜迅速腐烂变质,表现出不耐贮藏性状。

该试验只是对新疆维吾尔自治区现存的部分甜瓜种植资源的耐贮藏性状进行了初步筛选,试验虽使用 19 条引物能够比较完全地揭示甜瓜种质资源的耐贮藏性状,但至于找到 RAPD 分子标记特征谱带与植物学性状的对应关系以及特征谱带间的相关性、同源性等问题,则有待于进一步研究。

#### 参考文献

[1] Williams J G, Kubelik A R, Livak K J, et al. DNA Polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers[J]. Nucleic Acids Research, 1990(18):6231-6535.  
[2] 马克奇,陈年来,王鸣.甜瓜优质栽培理论与实践[M].北京:中国农业出版社,2001.

[3] 乐锦华,施江,赵虎基,等.厚皮甜瓜亲缘关系及纯度的 RAPD 标记[J].果树科学,2000,17(4):295-299.  
[4] 刘万勃,宋明,刘富中,等. RAPD 和 ISSR 标记对甜瓜种质资源遗传多样性的研究[J].农业生物科学学报,2002,10(3):231-236.  
[5] 张建农,赵建华,李计红,等.甜瓜种质资源亲缘关系的 RAPD 标记分析[J].西北农林科技大学学报(自然科学版),2005,33(12):115-120.  
[6] 王掌军,王建设,刘生祥,等.甜瓜随机引物扩增多态性标记分析[J].农业科学研究,2006,27(1):1-5.  
[7] 蒲彬,刘雪山,许有成.哈密瓜贮藏保鲜及防腐技术[J].中国西瓜甜瓜,1990(3):48-51.  
[8] 哈斯阿古拉.甜瓜耐贮藏基因工程研究[D].呼和浩特:内蒙古大学,2004.  
[9] Murry M G, Thompson W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA[J]. Nucl Acid Res, 1980, 19(8):4321.  
[10] 陈金体,王晓峰. RAPD 分子标记鉴定甜瓜种子纯度试验[J].广东农业科学,2007(10):17-20.  
[11] 姚国新,刘玲,郭永强,等.利用 RAPD 标记分析甜瓜种质资源遗传多样性[J].首都师范大学学报(自然科学版),2006,27(5):56-67.  
[12] 刘富中,刘万勃,宋明.利用 RAPD 标记研究甜瓜种质的遗传多样性[C].全国蔬菜遗传育种讨论会,2002:273-277.  
[13] 林德佩.新疆甜瓜西瓜志[M].乌鲁木齐:新疆人民出版社,1985.

# 桃园不同世代梨小食心虫性信息素诱捕器的比较

赵志国<sup>1</sup>, 高利华<sup>1</sup>, 杨慧娟<sup>1</sup>, 孔维娜<sup>2</sup>, 张金桐<sup>3</sup>, 马瑞燕<sup>1</sup>

(1. 山西农业大学 农学院, 山西 太谷 030801; 2. 山西省农业科学院 植保所, 山西 太原 030001;

3. 山西农业大学 文理学院, 山西 太谷 030801)

**摘 要:**梨小食心虫(*Grapholitha molesta* (Busck)) 1 a 发生多代, 测报防治较为困难。为明确不同类型诱捕器对梨小食心虫不同世代的诱杀效果, 现采用 6 种不同类型的诱捕器在桃园对 4 个世代的梨小食心虫进行了诱捕试验。结果表明: 不同世代的梨小食心虫对不同类型诱捕器表现有差异; 对梨小食心虫越冬, 以船型诱捕器最佳; 第 1 代以自动补水诱捕器为最佳; 第 2 代以水盆+粘板诱捕器最佳; 第 3 代以三角形诱捕器最佳。该研究对应用性信息素诱捕器大量诱杀梨小食心虫有一定的指导意义。

**关键词:**梨小食心虫; 世代; 性信息素; 诱捕器

**中图分类号:**S 436. 612. 2<sup>+</sup>9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001—0009(2013)16—0124—04

梨小食心虫[*Grapholitha molesta* (Busck)] 属鳞翅目卷叶蛾科(Lepidoptera Tortricidae), 又名东方果蛀蛾, 简称梨小, 是世界性的蛀果害虫之一<sup>[1-2]</sup>。梨小食心虫个体小, 主要对桃、苹果、梨、李、樱桃、枇杷、山楂等产生蛀梢蛀果的危害<sup>[3]</sup>。在我国东北地区梨小食心虫 1 a 发生 3 代, 华北、西北地区 1 a 发生 4~5 代<sup>[4]</sup>, 长江以南 1 a

发生达到 5~7 代<sup>[5-6]</sup>。其年发生代数多, 世代重叠严重, 测报防治困难<sup>[7]</sup>。

性信息素诱捕器具有灵敏度高, 准确性好, 使用简单, 费用低廉, 不伤害天敌等特点<sup>[8]</sup>。特别是害虫始发期, 虫口密度不高的情况下, 对害虫进行大量诱捕防治, 防效尤为显著<sup>[9]</sup>。有机桃产品生产过程中性信息素的使用是一种重要的绿色、环保、生态的害虫生态治理方法<sup>[10]</sup>。梨小食心虫各世代之间发生时寄主的小气候条件和大的环境因子不同, 防治方法多样, 在大量防治中需要筛选出适合诱杀的性信息素诱捕器。该试验拟通过 6 种有代表性的诱捕器对梨小食心虫进行诱捕试验, 筛选出不同世代诱捕效果最佳的梨小食心虫性信息素诱捕器, 以期应用性信息素防治梨小食心虫提供依据。

**第一作者简介:**赵志国(1975-), 男, 博士, 讲师, 现主要从事生物信息学及害虫综合治理等研究工作。E-mail: nice2me@126. com.

**责任作者:**马瑞燕(1968-), 女, 博士, 教授, 博士生导师, 现主要从事生物入侵防治及害虫综合治理等研究工作。E-mail: maruiyan2004@163. com.

**基金项目:**国家公益性行业(农业)科研专项资助项目(201103024); 山西农业大学创新基金资助项目(2010007)。

**收稿日期:**2013-04-15

## Genetic Diversity Analysis of Melon Germplasm Resources Resistant to Storage Properties by RAPD Molecular Markers

HU Jin-ge<sup>1</sup>, LIAO Xin-fu<sup>1</sup>, LUO Shu-ping<sup>2</sup>, ZHANG Rui<sup>1</sup>

(1. Development and Research Center of Grapes and Melons of Xinjiang Uighur Autonomous Region, Shanshan, Xinjiang 838200; 2. College of Agronomy, Xinjiang Agricultural University, Urumqi, Xinjiang 830052)

**Abstract:** 64 different melon varieties resistant to storage properties were used to analyze genetic diversity by RAPD marker. The results showed that 118 DNA bands were amplified with 19 random primers, of which 103 were polymorphic. An average proportion of polymorphic loci was 87.29%. 64 melon varieties could be classified into three groups, which were storable, intolerance to storage and medium storable type.

**Key words:** melon; RAPD; germplasm resources