

辣椒种质遗传多样性的 RAPD 分析

李 晴, 张学时, 张广臣, 韩玉珠, 王 宇

(吉林农业大学 园艺学院, 吉林 长春 130118)

摘 要: 采用 11 个 RAPD 随机引物对 37 份辣椒材料进行 PCR 扩增。共扩增出 51 条谱带, 其中多态性条带 36 条, 多态性检测率占 70.6%, 不同引物扩增的条带在 3~7 条不等。结果表明: 通过聚类分析 37 份辣椒种质供分为 5 个类群, 每类群的种质亲缘关系较近, 但遗传关系与地域距离并无明显的相关性。

关键词: 辣椒; RAPD; 遗传多样性; 亲缘关系

中图分类号: S 641.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)22-0118-05

辣椒品种资源在全世界范围内分布广泛, 品种繁多, 在我国的栽培历史悠久, 不同的气候条件及栽培制度, 也逐渐形成了丰富的辣椒品种^[1]。1980 年召开的“辣椒遗传资源会议”, 已将辣椒属已驯化的栽培种分为 5 个种 *Capsicum annuum* L. 1 a 生辣椒、*Capsicum frutescens* L. 灌木状辣椒、*Capsicum baccatum* L. 浆果状辣椒、*Capsicum chinense* 中国辣椒、*Capsicum pubescens* 绒毛辣椒^[2,3]。我国的辣椒栽培种大部分都属于 *C. annuum*, 包括辣椒、甜椒、簇生椒等。我国大多数关于辣椒种质资源的遗传多样性研究都属于对 *Capsicum annuum* 种内不同变种的研究, 应用不同的分析鉴定方

法从多个水平上研究辣椒的遗传变异性^[4-7]。种质资源的遗传多样性是物种改良、生态适应性、新品种选育的基础。分子标记方法能够从分子水平上对辣椒种质的遗传多样性进行鉴定。RAPD 标记已广泛地应用于植物系统学、遗传变异分析、亲缘关系分析、品种鉴定、基因定位、绘制遗传连锁图谱等^[8]。该研究应用 RAPD 技术, 对 37 份辣椒种质资源的遗传多样性和亲缘关系进行分析, 加强辣椒种质资源遗传多样性的研究, 了解种质资源的遗传基础, 掌握种质资源的亲缘关系, 是辣椒新品种选育上新台阶的一个重要途径。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 植物材料 以 37 份辣椒种质资源为供试材料进行 RAPD 分析, 品种名称如表 1 所示。全部试材于 2008 年 3 月 21 日, 在吉林农业大学园艺学院蔬菜基地进行播种, 5 月 21 日定植大田。RAPD 试验于园艺学院分子实验室进行。

Construction of Genetic Linkage Map of Cucumber by SSR Technology

WANG Jun-hui¹, CUI Xing-hua², ZHANG Gui-hua², DU Sheng-li², ZHANG Xian¹

(1. College of Horticulture, Northwest Science and Technology University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100; 2. Tianjin Kemei Cucumber Research Institute, Tianjin 300192)

Abstract: With a CMV-resistant line (F-3) and a CMV-susceptible line (HZL04-1) as parents, an F₂ genetic mapping population containing 190 F₂ progenies was constructed. The results showed that 1 cucumber genetic linkage map containing 7 linkage groups was constructed using 170 SSR, 6 EST-SSR, and 3 SCAR markers, and the map covered 862.886 cM with an average marker interval of 4.79 cM. It was the basis of QTL locating of CMV resistant gene. The correspondence between the linkage groups and chromosomes was determined by comparing with the previous study.

Key words: SSR; EST-SSR; SCAR; genetic linkage map; cucumber

表 1 供试品种名称

序号	品种名称
1	金帝 2 号
2	金富早椒
3	先正达辣椒 鲜 1
4	吉利 165
5	辣家家
6	湘辣二号辣椒
7	美玉
8	辛香王子朝天椒
9	先正达辣椒 鲜 3
10	虎皮小尖辣椒
11	大为
12	金福
13	湘辣四号
14	大椒王
15	金椒红
16	韩丰
17	红世界
18	致富椒王 008
19	寿光羊角黄辣椒
20	红宝辣椒
21	富祥
22	吉利 161
23	天复辣椒(簇生椒)
24	韩 3
25	彦福一号(杭椒)
26	九龙塔辣椒
27	22 号尖椒
28	9794
29	红福
30	红塔
31	圣剑尖椒
32	百美千椒
33	九龙长虹辣椒
34	古月红
35	福康五号尖椒
36	景红
37	火童

1.1.2 RAPD 分子标记试剂 DNA 提取试剂: 辣椒总 DNA 提取采用动植物基因组 DNA 小量试剂盒(购自长春维特洁生化产品经销公司); PBS 缓冲液(配方); 液氮(购自长春繁政中心)。PBS 缓冲液(0.01 M)配制方法: 准确称量 KCl 0.2 g, KH₂PO₄ 0.2 g, NaCl 8.0 g, Na₂HPO₄ · 12H₂O 3.14 g; 在容量瓶中将各成分依次溶解于 1 000 mL 的三蒸水中, 充分混匀; 分装备消毒; 消毒: 高压锅中 120℃, 消毒 20 min。RAPD 试验试剂: 10 nmol 引物、2.5 mM dNTPs(dATP、dCTP、dGTP、dTTP 的混合物)、5 U/μL *rTaq*、10×Buffer、6×Buffer、核酸碱染色剂均购自宝生物工程(大连)有限公司。λDNA、琼脂糖(购自长春鼎国生物技术有限公司)、TAE 缓冲液(Tris、EDTA、冰乙酸配制)。

1.2 试验方法

1.2.1 DNA 提取方法 采用动植物基因组 DNA 小量

试剂盒提取 37 种辣椒试材基因组 DNA。利用 500 ng/μL λDNA 检测试材 DNA 母液浓度和纯度。进行 RAPD 试验时再根据试验需要将 DNA 浓度稀释到 30~40 ng/μL。1.2.2 RAPD 反应体系优化 对影响 RAPD 反应的主要因素模板 DNA 浓度、dNTPs 浓度、*rTaq* 酶用量、引物浓度等因素进行试验筛选。试验设置如表 2 所示。RAPD 反应程序参照 williams^[9] 等方法。反应程序为: 94℃预变性 4 min; 94℃变性 1 min, 37℃下退火 1.5 min, 72℃下延伸 1.5 min, 45 个循环后; 再 72℃下延伸 7 min; 最后在 4℃保存至取出。试材 DNA 在 TC-512 型 PCR 仪内进行扩增反应。制备浓度为 1%的琼脂糖凝胶进行电泳, 100 mL 凝胶中加入 10μL 核酸碱染色剂, 电泳后置于紫外凝胶成像仪下观察照相。

表 2 RAPD 反应体系各成分浓度梯度

成分	浓度					
模板 DNA/ ng	30~40 ng					
dNTPs/ mmol · L ⁻¹	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3
<i>rTaq</i> / U	0.4	0.6	0.8	1	1.2	1.4
引物/ μmol · L ⁻¹	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7

1.2.3 引物筛选 根据供试辣椒果实大小、颜色、形状等性状差异, 挑选韩 3 和天复 2 份辣椒材料为模板进行引物筛选, 从 115 条随机引物中筛选出条带清晰、重复性好、多态性高的引物作为扩增反应的引物。

1.3 数据处理方法

选择清晰、稳定且重复性好的条带应用于统计分析, 按扩增带的有无记数, 有带的记为 1, 无带的记为 0 形成 0/1 矩阵, 把图形资料转换成数据。利用 DPS 软件^[10] 中 Nei、Li 的方法, 根据类平均分类方法 UPGMA (Unweighted Pair Grouped Method with Arithmetic Average)构建聚类树状图。

2 结果与分析

2.1 DNA 浓度检测

将所提取 DNA 母液进行琼脂糖凝胶电泳, 后在凝胶成像仪下拍照。根据所设定的 λDNA 的 5 个梯度, 估测各试材 DNA 浓度, 其结果见图 1。从 DNA 母液浓度检测电泳结果可知, 母液浓度范围在 50~500 ng/μL。采用试剂盒提取辣椒试材 DNA, 提取纯度较高, 所含杂质较少, 结果较为稳定, 方法简便, 节省了一定的时间。

2.2 RAPD 反应体系优化结果

经条件筛选得出, 反应体系总体积为 25μL, 最适反应体系包含 30~40 ng 模板 DNA、0.1 mmol/L dNTPs、1U *rTaq* 酶、0.6μmol/L 随机引物, 10×Buffer 25 mmol/L, 最后用灭菌重蒸水补充反应液至 25 μL。

2.3 RAPD 筛选引物结果

从 115 条随机引物中初选出 28 条(表 3)可用于辣

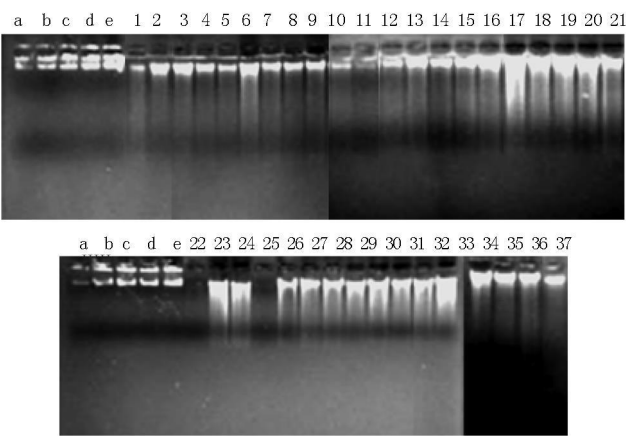


图1 DNA 浓度母液检测电泳图谱

注:泳道 a~e:λDNA 含量分别为 500、1 000、1 500、2 000、2 500 ng 泳道 1~37:供试种质 DNA。

椒样品 RAPD 扩增反应的引物,然后从扩增结果中选出扩增效果好的,且在 2 个辣椒品种中有明显差异的 11 条引物作为 RAPD 扩增反应的引物,对供试的 37 份辣椒进行遗传多样性分析。

表 3 RAPD 扩增引物序列	
引物编号	引物序列
R-4-OPB-05	TGCGCCCTTC
R-5-OPB-07	GGTGACGCAG
R-6-OPB-10	CTGCTGGGAC
R-9-OPA-02	TGCCGAGCTG
R-13-OPA-08	GTGACGTAGG
R-31-OPT-18	GATGCCAGAC
R-33-OPG-08	TGGACCGGTG
R-43-OPG-08	TCACGTCCAC
R-45-OPG-13	CTCTCGGCCA
R-46-OPG-14	GGATGAGACC
R-56-OPH-12	ACCGCATGCT

2.4 随机扩增产物多态性分析

由表 4 可知,11 个引物共扩增出 51 条带,其中多态性条带 36 条,多态性检测率为 70.6%。不同引物扩增的条带数 3~7 条不等,平均每个引物产生 4.64 条带,产生 3.27 条多态性条带,RAPD 标出的片段分子量变化范围在 100~1 500 bp。引物 OPG-14 扩增出的条带最多,为 7 条,引物 OPA-02 扩增出的条带最少为 3 条。不同引物对不同辣椒材料进行扩增反应,各试材在图片上的扩增带范围不同,充分表现了辣椒种质资源 DNA 的多态性。该试验从 115 条引物中筛选出的 11 条 RAPD 引物都可用于 DNA 条带扩增,且得到较为稳定的 RAPD 扩增图谱,部分扩增结果见图 2。

表 4 11 个 RAPD 引物对 37 个辣椒品种的扩增结果

引物	扩增条带数	多态性条带数	多态性条带比例 %
R4-OPB-05	5	4	80
R5-OPB-07	5	5	100
R6-OPB-10	5	5	100
R9-OPA-02	3	2	66.67
R13-OPA-08	5	4	80
R31-OPT-18	4	3	75
R33-OPC-08	4	2	50
R43-OPG-08	3	1	33.33
R45-OPG-13	5	3	60
R46-OPG-14	7	4	57.14
R56-OPH-12	5	3	60
总计	51	36	
平均	4.64	3.27	69.29

2.5 辣椒种质 RAPD 聚类分析

通过 DPS 数据处理软件,对 0/1 矩阵进行分析,聚类距离采用欧式距离,根据类平均方法进行聚类分析,构建树状图(图 3)。聚类结果表明,在遗传距离为 3.03 cm 处,37 份辣椒种质资源共分为 5 个类群。类群 I 包括 11 个辣椒品种,为 1、5、8、11、14、18、22、23、29、32、35 号品种,这些品种虽然在部分性状上有一定差异,但某些品种间存在着其共同的特性。这 11 个品种的产地不同,其中 1、11、14、29 号品种产自韩国,其它品种来源不一,8、23 号同为簇生类朝天椒,其果形、株型、果实营养物质含量都相似,且都属于晚熟种,而 8、11、23 号其辣椒素含量都是最高的,说明它们亲缘关系较近,1、5、8、11、14、22、23、29、32 号品种包括羊角椒和朝天椒,它们都适合作为干椒使用,18、29、35 号品种其果皮又都呈浅绿或黄绿色,各品种间存在着一定的联系,某些基因表达的性状相似,故其分为一类。类群 II 包括 2、4、6、13、15、16、17、20、21、26、28、30、33、34、36、37 号共 16 个品种,这些种质也来源于不同地域,除 2 号金富早椒外,其它品种都属于羊角椒,适合做干椒使用。类群 II 又分为 2 个亚群,亚群 I 包括 2、13、15、16、17、30、33 号品种,其果实辣椒素含量都在中等偏上,果味较辣,亚群 II 包括 4、6、20、21、26、28、34、36、37 号品种,这些品种都为羊角椒,果径较细,果型指数较为接近,适合脱水加工之用。类群 III 只有 12 号和 25 号 2 个品种,这 2 个品种均产自韩国,属于羊角椒,适合制成干辣椒,其果味辣度适中,辣椒红素含量中等,其叶型指数、红果鲜重、单株结果数均较为相似。类群 IV 包括 3、7、9、10、19 号 5 个品种,这些品种也都为羊角椒,果食适合鲜两用,3 号和 9 号分别为先正达辣椒鲜 1 和鲜 3,但其辣椒素含量都较低,10 号与 19 号都属于早熟种。类群 V 包括 24、31、27 号 3 个品种,其各品种辣椒素含量都较低,都属于微辣类型,且它们都主要适合鲜食,24 号品种也适合脱水加工。

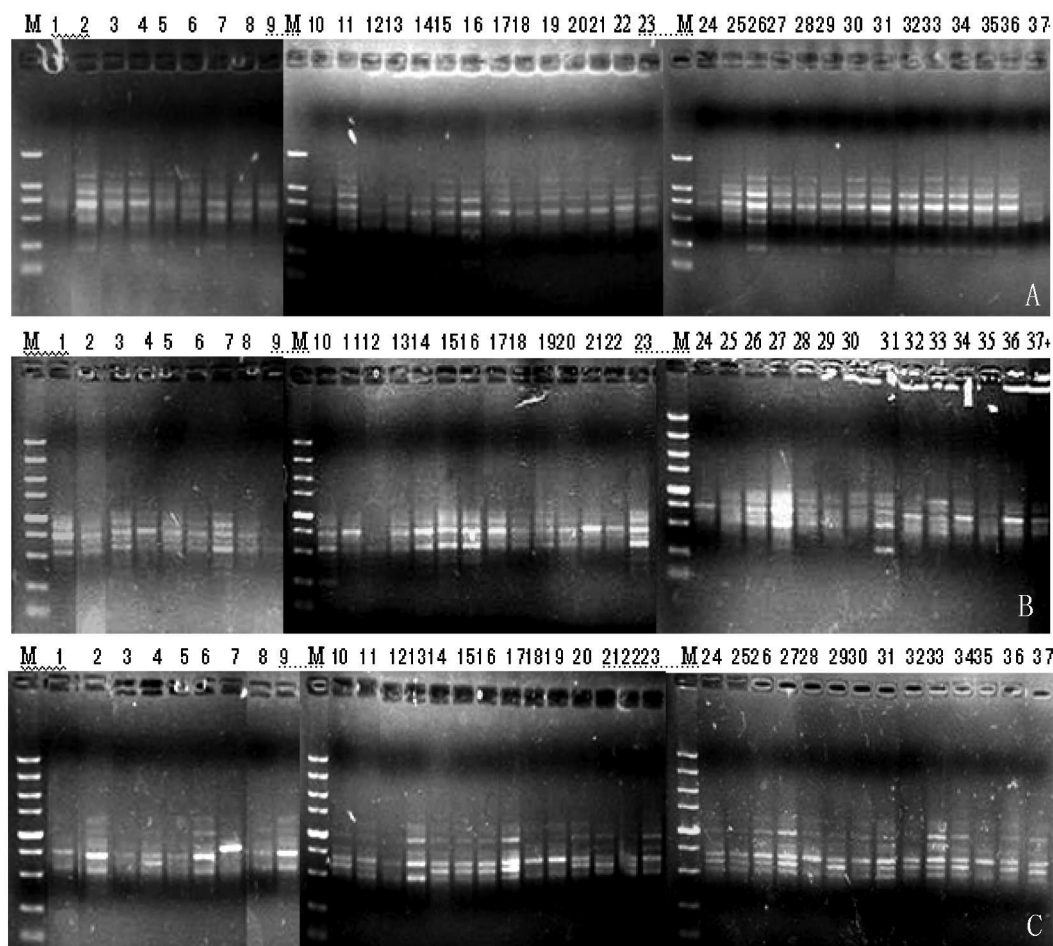


图 2 部分 RAPD 引物扩增电泳图谱

注: 图中泳道编号为供试 37 份材料; M- DNA marker; 图 2A 引物为 R- OPB- 05; 图 2B 引物为 R- OPB- 07; 图 2C 引物为 R- OPB- 10。

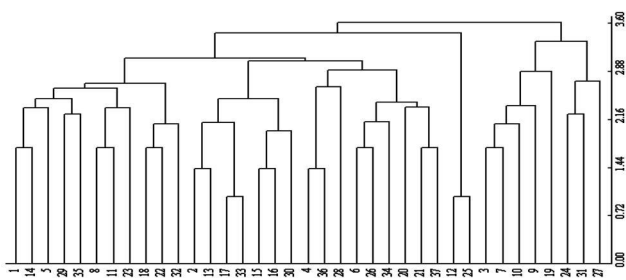


图 3 37 份辣椒材料的 RAPD 聚类树状图

3 结论与讨论

供试辣椒品种 DNA 提取的质量是决定 RAPD 反应是否成功的关键, 研究中为尽量避免杂质对试验结果的影响, 提高试材 DNA 提取的纯度, 采用动植物基因组 DNA 小量试剂盒提取, 从浓度检测结果可看出, 所提取的多数辣椒 DNA 母液浓度都较高, 少量试材的 DNA 母液浓度低, 可通过在试验过程中适当调节其浓度来避免

对试验结果造成影响, 由此获得的基因组 DNA 可较好的用于 RAPD 反应, 得到清晰条带。该试验从 115 条随机引物中最终筛选出 11 条引物用于 RAPD 扩增反应, 这 11 条引物在 PCR 扩增后可检测出稳定且清晰的条带, 且条带在不同品种间有明显差异。RAPD 反应不同引物扩增后, DNA 片段在图谱上的扩增位置也各不相同, 说明这 11 条引物扩增出的 DNA 产物多态性较高, 可明显的反映出 37 个辣椒品种间的遗传多样性。供试品种来自韩国和中国地方种质, 但有些品种间的遗传距离较远, 且分属于不同类群。从聚类结果上看, 各类群的种质都较为复杂, 产地也不尽相同, 在果实的品种特性上也存在一定差异, 但部分种质与种质间存在共同点, 则其亲缘关系较近。类群 I、类群 II 内的种质并不都来源于同一产地, 但其却划分为同一类群, 说明种质来源虽对种间关系有一定的影响, 但其却并不能充分体现种质间的亲缘关系, 只凭借种质产地来确定其所属类群是不科学的。已有研究报道, 种内的遗传距离与地理距离

并不存在明显的相关性^[11]。种质资源由于栽培地区的不断扩大、栽培技术与育种研究的不断发展, 世界各地区范围内的引种也不断频繁, 从而导致各地区之间种质资源的遗传物质相互交流, 造成同一地域内的种质相似程度下降, 即使来源相同的种质也可以表现出丰富的遗传多样性。聚类结果中, 同一类群内的部分种质间尚具有较为相似的遗传多样性, 如 2 个朝天椒品种虽没有单独聚为一类, 但其也存在于同一类群内, 且遗传距离较近, 说明簇生椒与羊角椒亲缘关系较近, 与牛角椒亲缘关系远, 这与王玲等的研究结果一致^[12]; 营养物质: 辣椒素含量高的品种可聚为一类, 如 2、13、15、16、17、30、33 号品种; 果形相似, 同为羊角椒的品种或同适用于制作干椒的品种也可聚为一类。利用 RAPD 技术对种质资源进行分类, 得出结论它们之间的亲缘关系主要是由于遗传因子导致。供试辣椒品种基因资源的遗传多样性丰富, 聚类后每一类群内其品种亲缘关系较近, 但其种质间尚存在性状差别。

RAPD 技术通过不同引物反应基因组的遗传多样性, 从而表达种质间的遗传差异, 它从基因水平上区分作物种间关系, 明确鉴定其亲缘关系的远近, 与其它方法比较更具有真实可信度。该试验研究的分析结果可为辣椒种质亲缘关系的确立提供科学依据。

参考文献

- [1] 洪雨顺, 杨德. 辣椒种质资源遗传多样性保护和利用研究进展[J]. 中国农学通报, 2006, 22(2): 358-360.
- [2] 庄灿然, 吕金殿, 梁耀琦. 中国干制辣椒[M]. 北京: 中国农业科技出版社, 1995.
- [3] 谭亮萍, 周火强, 曾化伟, 等. 辣椒种质资源鉴定、评价及利用研究进展[J]. 辣椒杂志, 2008(2): 24-28.
- [4] 杨若林, 孔俊, 吴鑫, 等. ISSR 标记在辣椒资源遗传多态性分析中的初步应用[J]. 上海大学学报, 2005, 11(4): 423-426.
- [5] 陈学军. 辣椒早熟性状遗传分析、相关基因分子标记及辣椒属栽培种遗传多样性研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2006.
- [6] 罗玉娣, 李建国, 李明芳. 用 SSR 标记分析辣椒属种质资源的遗传多样性[J]. 生物技术通报, 2006(增刊): 337-341.
- [7] 何建文, 杨文鹏, 韩世玉, 等. 贵州辣椒地方品种分子遗传多样性分析[J]. 贵州农业科学, 2009, 37(8): 15-18.
- [8] 汪小全, 邹喻苹, 张大明, 等. RAPD 应用于遗传多样性和系统学研究中的问题[J]. 植物学报, 1996, 38(12): 954-962.
- [9] Williams J G K, Kubek A R, Livak J, et al. DNA poly morphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers[J]. Nucl Acid Res., 1990, 18: 6531-6535.
- [10] 唐启义, 冯明光. 实用统计分析及其 DPS 数据处理系统[M]. 北京: 科学出版社, 2002.
- [11] Stedje B, Bukeny a Zinaba R. RAPD variation in *Solanum anguivi* Lam. and *S. aethiopicum* L (Solanaceae) in Uganda [J]. Euphytica, 2003, 131: 293-297.
- [12] 王玲, 郑金贵, 赖钟雄. 辣椒遗传多样性的 RAPD 分析[J]. 福建农林大学学报, 2003(6): 213-216.

RAPD Analysis of Genetic Diversity on Hot Pepper Germplasm

LI Qing, ZHANG Xue-shi, ZHANG Guang-chen, HAN Yu-zhu, WANG Yu
(Horticultural College of Jilin Agricultural University, Changchun, Jilin 130118)

Abstract: Using 11 RAPD primers for 37 *Capsicum* were PCR amplified, total 51 amplified bands, 36 bands were polymorphic, polymorphism detection rate was 70.6%, different primer bands ranging from 3 to 7. The results showed that the 37 germplasm resources were divided into 5 groups. The genetic relationship of varieties in each group was near. But there was not apparent correlation between genetic relationship and region distance.

Key words: *Capsicum*; RAPD; genetic diversity; genetic relationship of varieties