

doi:10.11937/bfyy.20165158

# 干制辣椒雄性不育系与保持系间多态性 InDel 标记的筛选

姜 童, 王 辉, 杨延杰, 林 多

(青岛农业大学 园艺学院, 青岛市遗传改良与育种重点实验室, 山东 青岛 266109)

**摘 要:**以 3 对干制辣椒雄性不育系以及相应保持系(15005A, 15006B; 16011A, 16012B; 16063A, 16064B)为试材, 采用 InDel 标记的方法对干制辣椒雄性不育系与保持系间进行检测, 以期筛选出干制辣椒雄性不育与保持系间存在多态性的标记。结果表明: 在 44 个 InDel 标记中, 仅有一个标记 CIDH776 在 3 对不育系和保持系间存在一致的多态性, 该标记在不育系中分别扩增出约为 600 bp 和 650 bp 左右的 DNA 片段, 而在相应保持系中均未扩增出相应条带。初步认为, 分子标记 CIDH776 可用于干制辣椒雄性不育系与保持系间的分子标记辅助鉴定。

**关键词:**干制辣椒; 雄性不育; InDel 标记

**中图分类号:** S 641.303.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2017)15-0024-05

辣椒(*Capsicum annuum* L.)属茄科辣椒属一年生或有限多年生植物, 因其维生素 C 含量高

**第一作者简介:**姜童(1995-), 男, 硕士研究生, 研究方向为蔬菜遗传育种。E-mail: 583944745@qq.com.

**责任作者:**林多(1973-), 女, 博士, 教授, 研究方向为蔬菜营养生理与品质育种。E-mail: linduo73@163.com.

**基金项目:**山东省农业重大应用技术创新资助项目(682214007); 山东省农业良种工程资助项目(6622315070); 青岛农业大学应用型人才培养特色名校建设工程教学研究资助项目(XJG2013006, XJG2013127); 青岛农业大学高层次人才科研基金资助项目(6631115041); 山东省自然科学基金资助项目(ZR2014CQ034)。

**收稿日期:**2017-04-01

而深受消费者欢迎。辣椒雄性不育是指植物花药不能产生正常有功能的花粉的现象, 通常包括花药无法产生花粉, 花粉败育以及花药无法开裂这几种现象。由于辣椒杂交优势明显, 目前市场上所用的大部分种子是杂交一代, 但是随着国内农资以及劳动力等价格的提高, 杂种一代的生产成本也逐渐增高, 而雄性不育是迄今为止能够降低这一成本的有效途径之一<sup>[1]</sup>。

InDel 即插入缺失, 是针对基因组中插入缺失位点而设计的 PCR 标记, 广泛分布于基因组, 数目众多, 经 PCR 扩增、电泳分离以及相应的染色技术检测, 得到的多态性 DNA 片段即为 InDel 标记, 具有分布广、重复性好、检测方便、呈共显性

except ClaCBL1 in extracellular matrix. In addition, there are several *cis*-elements existed in upstream sequences of watermelon *CBL* genes, which could response to different environmental stimuli and phytohormones. And the *cis*-element types and number of different watermelon *CBL* genes were not identical. These results indicated that watermelon *CBL* genes might involve in multiple biological processes and they had different functions.

**Keywords:** watermelon (*Citrullus lanatus*); *CBL* gene; sequence characterization; protein structure; phylogeny; *cis*-elements

遗传等优点,被广泛用于植物遗传多样性分析、高密度遗传图谱构建、基因定位、种子纯度鉴定和分子标记辅助育种等研究领域<sup>[2]</sup>。近年来,应用 InDel 标记进行基因定位受到许多学者关注,在种质资源遗传多样性和亲缘关系等<sup>[3-6]</sup>领域已有大量研究,但对于干制辣椒 InDel 标记的研究尚鲜见报道。该研究以 3 对干制辣椒雄性不育系以及相应保持系为试料,采用 InDel 标记的方法对干制辣椒不育系与保持系相关标记进行筛选,以期筛选出 InDel 标记,为干制辣椒不育系与保持系相关分子标记辅助选择方面提供一定参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

3 对辣椒材料雄性不育系和相应保持系材料(15005A, 15006B; 16011A, 16012B; 16063A, 16064B;其中 A 和 B 分别表示雄性不育系和保持系)由青岛农业大学园艺学院干制辣椒育种课题组提供;分布于辣椒 12 条染色体上的 44 对 InDel 引物为 LI 等<sup>[7]</sup>开发的辣椒 InDel 标记(表 1),引物由上海生物工程公司合成。

1.2 试验方法

1.2.1 干制辣椒基因组 DNA 的提取

采用改良 CTAB 法<sup>[8]</sup>和植物基因组 DNA 提取试剂盒 2 种方法,分别提取干制辣椒材料 DNA。改良 CTAB 法具体步骤如下,①取样:新鲜叶片取直径 2 cm 的小片,加入 2 mL 离心管

中。②研磨:向离心管中加入液氮用玻璃棒充分研磨至粉末状。植物基因组 DNA 提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司,按试剂盒说明书步骤,提取干制辣椒叶片基因组 DNA。

1.2.2 琼脂凝胶电泳检测

取 DNA 样品 5  $\mu$ L 与 1  $\mu$ L 6 $\times$ loading buffer 混匀后上样,1% 琼脂糖凝胶(含荧光染料 GoldView<sup>TM</sup>)电泳检测 DNA 质量。电泳条件:120 V 电泳 45 min,Bio-Rad 凝胶成像系统下观察照相。

1.2.3 InDel-PCR 扩增

利用干制辣椒 InDel 引物对 6 份 DNA 样品进行 PCR 扩增。PCR 反应体系为:DNA 模板 2  $\mu$ L(约 40 ng),正反引物各 1  $\mu$ L,2 $\times$ Go Taq R Colorless Master Mix 8  $\mu$ L,加 ddH<sub>2</sub>O 至终体积 15  $\mu$ L;循环体系为:94  $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94  $^{\circ}$ C 变性 30 s,59.5  $^{\circ}$ C 退火 30 s,72  $^{\circ}$ C 延伸 45 s,共 35 个循环;72  $^{\circ}$ C 总延伸 5 min;4  $^{\circ}$ C 保存扩增产物,退火温度不是固定不变的,不同引物有不同的退火温度,将这 44 对引物按照相近温度分为 3 类:58.0、59.0、60.0  $^{\circ}$ C。

1.2.4 聚丙烯酰胺凝胶电泳

取 2  $\mu$ L 扩增产物于 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶进行电泳检测,分子量大小为 1 000 bp 的 Marker 2  $\mu$ L,250 V 电压下电泳 50 min。电泳结束后,清水冲洗玻璃板两面,使凝胶冷却,然后进行银染和显色,置于灯箱上照相。

表 1 试验所用的 InDel 引物

Table 1 InDel primer sequence used in the study

编号	标记名称	编号	标记名称	编号	标记名称	编号	标记名称
No.	Marker name	No.	Marker name	No.	Marker name	No.	Marker name
1	CIDH373	12	CIDH872	23	CIDH279	34	CIDH859
2	CIDH440	13	CIDH437	24	CIDH304	35	CIDH807
3	CIDH200	14	CIDH858	25	CIDH351	36	CIDH614
4	CIDH552	15	CIDH49	26	CIDH307	37	CIDH29
5	CIDH325	16	CIDH634	27	CIDH404	38	CIDH360
6	CIDH776	17	CIDH270	28	CIDH764	39	CIDH426
7	CIDH202	18	CIDH494	29	CIDH667	40	CIDH237
8	CIDH28	19	CIDH580	30	CIDH825	41	CIDH800
9	CIDH69	20	CIDH293	31	CIDH377	42	CIDH848
10	CIDH8	21	CIDH218	32	CIDH124	43	CIDH131
11	CIDH81	22	CIDH696	33	CIDH509	44	CIDH908

## 2 结果与分析

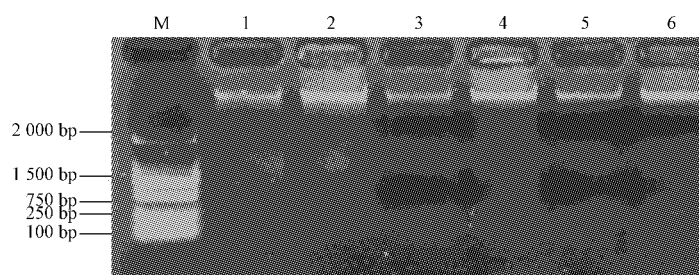
### 2.1 基因组 DNA 质量检测

将提取的干制辣椒材料基因组 DNA 进行了琼脂糖电泳检测,采用 2 种方法提取的 DNA 完整性好,而且点样孔干净。但采用改良 CTAB 法(图 1)提取的 DNA 纯度、质量浓度均没有植物基因组 DNA 提取试剂盒(图 2)的高,该研究采用植物基因组 DNA 提取试剂盒提取的 DNA 进行了后续试验。

### 2.2 不育系和保持系基因组 DNA 多态性 InDel 引物筛选

针对每对不育系和保持系均进行了 44 对

InDel 引物的检测,其中 15005A,15006B 的检测结果如图 3 所示,在这 44 对 InDel 引物中有 3 对(CIDH776、CIDH28、CIDH81)在不育系和保持系间存在多态性。对其它 2 对材料也进行相同的筛选过程,其中 16011A 与 16012B 间有 2 对引物(CIDH776 和 CIDH279)存在多态性;16063A 与 16064B 间也有 2 对引物(CIDH776 和 CIDH29)存在多态性。所选 44 对 InDel 引物在 3 对不育系和保持系间的多态性比例分别为 6.8%、4.5%和 4.5%;而且有一对引物 CIDH776 在 3 对不育系和保持系间存在一致的多态性,多态性比例为 2.3%。



注:M 为 Marker;1~6 依次为编号 15005A、15006B、16011A、16012B、16063A、16064B。下同。

Note: M, Marker; 1-6, the order number are 15005A, 15006B, 16011A, 16012B, 16063A and 16064B, respectively. The same as follows.

图 1 改良 CTAB 法提取辣椒基因组 DNA 电泳检测

Fig. 1 Improved CTAB method for detection of genomic DNA in pepper

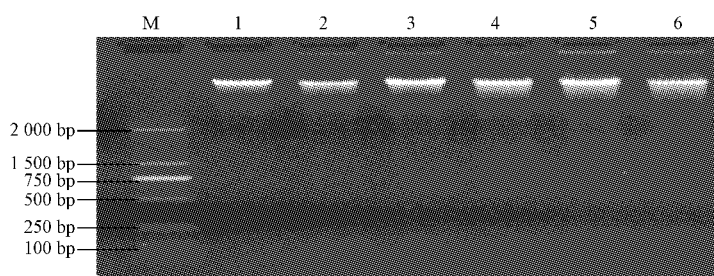


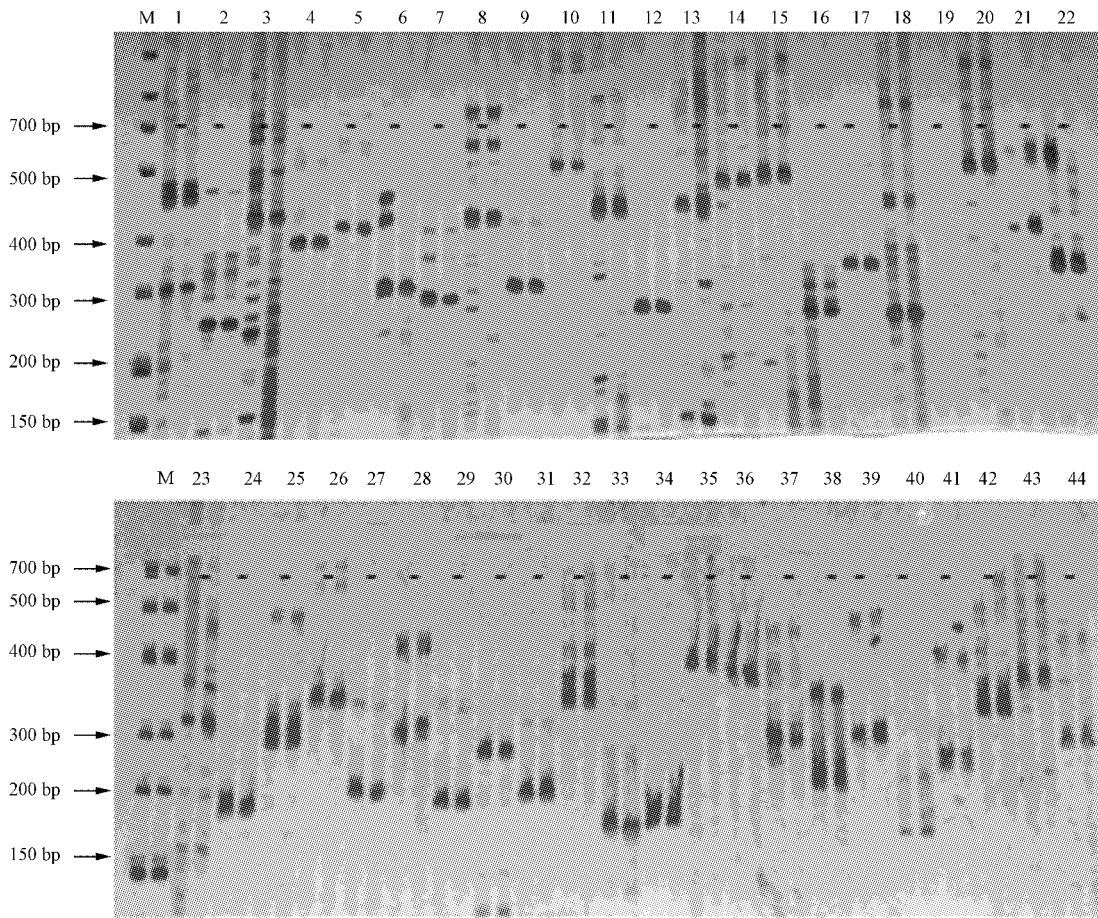
图 2 植物基因组 DNA 提取试剂盒提取辣椒基因组 DNA 电泳检测

Fig. 2 Genomic DNA extraction kit of genomic DNA in pepper

### 2.3 CIDH776 在 3 对干制辣椒雄性不育系与保持系间的扩增情况

通过对 3 对不育系和保持系进行的多态性 InDel 引物的筛选可知(图 3~4),CIDH776 标记在 3 对不育系和保持系间均存在一致的多态性,

在 3 份不育系中可同时扩增出 4 条 DNA 片段,其中 2 条大小约为 600 bp 和 650 bp 的 DNA 片段是在不育系中所特有的;而在 3 份保持系中均扩增出 2 条 DNA 条带。可见该标记在供试的不育系和保持系间表现为显性标记。



注:M为 Marker;1~44 为 44 对引物。

Note; M, Marker; 1—44. 44 pairs of primers.

图 3 亲本 15005A,15006B 的聚丙烯酰胺凝胶电泳

Fig. 3 SDS-PAGE electrophoresis analysis of 15005A,15006B

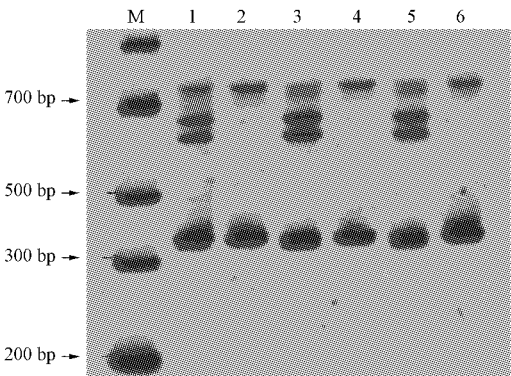


图 4 InDel 标记 CIDH776 在不育系和保持系中的 PCR 扩增结果

Fig. 4 Result of PCR amplification of CIDH776 in sterile and maintainer

3 结论与讨论

该研究以 3 对干制辣椒雄性不育系以及保持系为试验材料,利用均匀分布于辣椒 12 条染色体上的 44 对 InDel 引物进行了干制辣椒雄性不育系与保持系间的 PCR 检测,结果筛选到 1 对引物 CIDH776 在供试的干制辣椒雄性不育系和保持系间存在一致的多态性。

近年来,许多辣椒育种研究者在品种选育、辣椒不育机理探寻和不育基因定位上开展了大量工作。王得元等<sup>[9]</sup>以辣椒细胞质雄性不育系 93-A 及其保持系 93-B 为材料开展了 RAPD 标记研究,并获得了 2 个细胞质雄性不育基因相关的标记 OPK-17550 和 OPK-171500,同时认为标记 OPH-112000 可能与保持系中的保持基因相关。

王述彬等<sup>[10]</sup>也利用 RAPD 技术对辣椒细胞质雄性不育系 21A 与其相应保持系 21B 的基因组 DNA 进行了比较分析,并获得了不育系 21A 基因组 DNA 特异的 RAPD 片段。魏兵强等<sup>[11]</sup>也利用类似的方法获得了与不育基因相关的 RAPD 标记 BH19-S900。这些标记对于分子辅助育种有实践意义和一定的利用价值。

该试验中,利用基因组锚定标记 InDel 对 3 对干制辣椒不育系和相应保持系开展了多态性引物筛选,并从中筛选到了 1 个稳定的多态性标记 CIDH776。LI 等<sup>[7]</sup>研究认为该 InDel 标记在第 6 号染色体上,且目的片段为 350 bp;该试验中 6 份材料在目的条带处均未表现多态性,但存在 650 bp 左右的多态性片段,可见该处的扩增片段为非特异性扩增。尽管该标记在 3 对不育系和保持系间存在一致的多态性,该多态性用于区分不育系和保持系。但对于该 InDel CIDH776 标记的应用范围及多态性片段的序列信息等尚需进一步研究。

#### 参考文献

[1] 傅鸿妃,柴伟国,吕晓茜,等. 雄性不育在我国辣椒品种选育中的应用及不育基因定位研究进展[J]. 现代农业科技,2016(3):

119-121.

[2] 张志刚,赵智中,李巧云,等. 大白菜 InDels 标记开发及其在剩余杂合体鉴定中的应用[J]. 农业生物技术学报,2016,24(4): 510-518.

[3] 姚国新,黄文超. 利用水稻籼粳分化 InDel 标记鉴定育种材料的籼粳属性[J]. 杂交水稻,2013,28(3):53-57.

[4] 葛敏,蒋璐,张晓林,等. 利用 Insertion/Deletion(InDel)分子标记检测玉米互交种混杂的原理及应用[J]. 分子植物育种,2013,11(1):37-47.

[5] 申璐,沈炎林,柴敏,等. 采用 InDel 和 SSR 标记分析番茄品种基因组 DNA 多态性[J]. 中国农业大学学报,2011,16(2): 34-42.

[6] 李斯更,沈镭,刘博,等. 基于黄瓜基因组重测序的 InDel 标记开发及其应用[J]. 植物遗传资源学报,2013,14(2):278-283.

[7] LI W, CHENG J, WU Z, et al. An InDel-based linkage map of hot pepper (*Capsicum annuum*) [J]. Molecular Breeding, 2015, 35(1):1-10.

[8] 谢立波,郭亚华,孟凡娟,等. 辣椒 RAPD 扩增体系的建立[J]. 安徽农业科学,2010,38(34):19272-19274.

[9] 王得元,王鸣,郑学勤,等. 用 RAPD 分析辣椒细胞质雄性不育基因[J]. 核农学报,2005,19(2):99-102.

[10] 王述彬,刘金兵,潘宝贵,等. 辣椒细胞质雄性不育系与其保持系基因组 DNA 的 RAPD 分析[J]. 上海农业学报,2008,24(1):8-10.

[11] 魏兵强,王兰兰,陈灵芝,等. 辣椒胞质雄性不育基因的分子标记[J]. 西北农业学报,2010,19(10):166,168-173.

## Selection of InDel Markers Associated With Male Sterile Gene in Dry Pepper

JIANG Tong, WANG Hui, YANG Yanjie, LIN Duo

(Horticultural College, Qingdao Agricultural University/Key Laboratory of Genetic Improvement and Breeding of Qingdao, Qingdao, Shandong 266109)

**Abstract:** Three pairs of dry pepper male sterile lines and maintain lines (15005A, 15006B; 16011A, 16012B; 16063A, 16064B) were used as materials, and polymorphism InDel markers was selected between sterile lines and corresponding maintainer lines. The results indicated that only one marker CIDH776 in the 44 InDel markers showed the same polymorphism between three pair of male sterile lines and corresponding maintainer lines. Two DNA fragments about 600 bp and 650 bp were amplified in three male sterile lines, but there was no amplification in corresponding maintainer lines. Therefore, InDel marker CIDH776 could be used for molecular marker assisted identification of male sterile line and maintainer line.

**Keywords:** dry pepper; male sterile; InDel marker