

簇生椒杂交种及亲本的指纹图谱构建和亲缘关系分析

王莉月¹, 王 辉¹, 刘艳芝², 姜 童¹, 林 多¹

(1. 青岛农业大学园艺学院, 青岛市园艺植物遗传改良与育种重点实验室, 山东青岛 266109; 2. 济宁市农业科学研究院, 山东济宁 272031)

摘 要: 为完善辣椒知识产权保护体系, 补充辣椒指纹图谱库, 本文通过表型差异大的 8 份辣椒材料筛选出的 25 对扩增稳定、条带清晰、有多态性的引物, 建立 3 个簇生朝天椒杂种一代和亲本的数字化指纹图谱并进行亲缘关系分析。结果表明, 对杂交种及其亲本进行扩增, 共扩增出 123 个位点, 多态性的位点 51 个, 无多态性位点 72 个, 多态性比率为 41.5%, 并构建了数字化 DNA 指纹图谱。分别对 3 个辣椒品种及其亲本进行 UPGMA 聚类分析结果表明, 亲本间的遗传相似系数在 0.36~0.59 之间, 母本 16002-1 和父本 16026、16027 在 0.47 处归为一类, 父本 16030 单独一类。杂交种遗传相似系数在 0.49~0.6 之间, 杂交种 F16007 和 F16008 在 0.49 处归为一类, 杂交种 F16011 单独一类, 与亲本的亲缘关系远近趋势一致。

关键词: 簇生朝天椒; 指纹图谱; InDel 标记; 进化树

中图分类号: S641.03

文献标识码: A

DOI: 10.3969/J. ISSN. 1674-148X. 2018. 03. 007

Digital Fingerprint and Genetic Relationship of Clustered Peppers' Hybrids and Parents

WANG Liyue¹, WANG Hui¹, LIU Yanzhi², JIANG Tong¹, LIN Duo¹

(1. Horticultural College of Qingdao Agricultural University,

Key Laboratory of Horticultural Plant Genetic Improvement and Breeding of Qingdao, Qingdao 266109, China;

2. Jining Academy of Agricultural Sciences, Jining 272031, China)

Abstract: In order to improve variety intellectual property protection system and supplement the fingerprint database of pepper, 25 pairs of primers with stable, clear bands and polymorphic properties were obtained successfully by screening in 8 pepper varieties which showed obviously different phenotypic characteristics. Digital fingerprints were established with the 25 pairs of primers by amplifying in clustered pepper's 3 hybrids and its corresponding parents. The results showed that there were 123 loci, including 51 polymorphic loci and 72 nonpolymorphic loci, with 41.5% polymorphism rate. The digital DNA fingerprinting of three hybrids and its parents were established by using 25 pairs of InDel primers. The UPGMA cluster analysis showed that genetic similarity of 4 parents was from 0.36 to 0.59. 16002-1, 16026 and 16027 were clustered into one group, and 16030 belonged to the other group. The genetic similarity among hybrids was from 0.49 to 0.6. Hybrid F16007 and F16008 were clustered into one group in 0.49, and F16008 belonged to the other group. The results showed the clustered result between hybrids and parents had a relatively consistent trend.

Key words: clustered pepper; digital fingerprint; InDel marker; genetic relationship

收稿日期: 2018-03-03

基金项目: 山东省农业良种工程资助项目(2016LZGC011); 山东省蔬菜创新团队资助项目(SDAIT-02-022-06); 青岛市民生科技计划项目(16-6-2-43-nsh); 青岛农业大学高层次人才科研基金项目(6631115041)

作者简介: 王莉月(1995-), 女, 山东荣成人, 在读硕士研究生, 主要研究方向为蔬菜遗传育种与分子生物学。E-mail: 596145404@qq.com

林 多(1973-), 女, 博士, 教授, 主要研究方向为蔬菜遗传育种与分子生物学。E-mail: linduo73@163.com

当前我国生产上所应用的簇生朝天椒^[1]良种依靠明显的杂种优势带来了巨大收益,但是种质资源保护机制并不健全,市场上的辣椒品种更是鱼目混珠,良莠不齐,假种子、繁种间遗传漂变的现象非常严重,严重损害了原始育种者的利益。传统的田间性状鉴定方法^[2]测试周期长,形态鉴定^[3]的数量多,准确性不高。

分子标记技术^[4]是继田间性状鉴定技术、形态学鉴定技术之后发展起来的一种较为理想的品种鉴定技术,并能直接反应基因组 DNA 的差异,省时省力。InDel 技术(insertion deletion length polymorphism)^[5]是基于基因组测序的第三代分子标记技术,属于共显性标记,分布广泛、数目众多,具有对技术要求低、操作快捷简单、针对性强和稳定性高等优点,能够较好适应市场和生产的需求,很有大规模开发和利用的价值。目前已在玉米^[6],水稻^[7],黄瓜^[8],莲藕^[9]等的研究中发挥了相当重要的作用。与我国辣椒品种鉴定技术规程所采用的 SSR 标记相比,SSR 为简单重复序列,InDel 标记为锚定标记,全面覆盖干制辣椒品种 12 对染色体,鉴定更为准确。InDel 标记在辣椒上仍处于重测序等初级阶段^[10],应用较少^[11],为完善干制辣椒种业知识产权环境,为干制辣椒品种真实性鉴定及纯度鉴定供参考依据,干制辣椒 DNA 指纹图谱库^[12]有待补充。利用 InDel 引物构建 4 个加工型簇生辣椒亲本和 3 个杂种一代辣椒品种的指纹图谱,并进行亲缘关系分析。以期对加工型辣椒品种保护提供分子生物学支持。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

用于数字化指纹图谱构建和亲缘关系分析的材料为簇生朝天椒 3 个杂交种及其亲本,见表 1;用于多态性引物筛选的 8 个表现性状差异较大的辣椒材料,见表 2;均由青岛农业大学茄果类育种团队提供。于 2016 年 3 月,播种于日光温室,在果实成熟期取其嫩叶置于-80℃超低温冰箱中保存。

1.2 试验方法

1.2.1 DNA 提取

DNA 提取采用由天根生化科技(北京)有限公司提供的植物基因组 DNA 提取试剂盒。取-80℃保存的干制辣椒品种幼嫩叶片 0.1g,放入液氮中磨碎,随后按照说明进行提取。利用琼脂糖电泳检测其浓度,将提取后的 DNA 置于 4℃保存,以防降解。

表 1 供试辣椒材料

Table 1 The information of tested pepper varieties

编号 Number	母本 Female parent	父本 Male parent	杂种一代 F ₁ Hybrid F ₁
1	16001-2	16027	F16008
2	16001-2	16026	F16007
3	16001-2	16030	F16011

表 2 用于 Indel 引物筛选的供试辣椒材料

Table 2 The pepper materials for screening InDel primers

品种名称 Variety name	品种类别 Variety category	来源 Source
精选簇生	簇生椒	中国山东
三樱椒	簇生椒	中国山东
长阳簇	簇生椒	中国湖北
秘鲁皇后	甜色素椒	秘鲁
鸡血红	甜色素椒	美国
铁皮椒 9 号	甜色素椒	美国
北京红 202	羊角椒	中国山东
Y20	羊角椒	韩国

1.2.2 引物筛选

供试引物参照由 Weipeng Li 等^[13]开发的辣椒 InDel 标记,从 12 条染色体上共 251 对 InDel 引物中筛选出 60 对 InDel 引物(表 3),由上海 Sangon 公司合成。

1.2.3 PCR 的扩增及电泳检测

PCR 反应程序及聚丙烯酰胺凝胶电泳检测参照姜童等^[11]方法。PCR 反应体系为模板 DNA 2μl,正反引物 1μl,2×Go Taq R Colorless Master Mix 7.5μl,用 ddH₂O 补充至 15μl。PCR 反应程序为 94℃预变性 5min;94℃变性 30s,退火 30s,72℃延伸 45s,35 个循环;最后 72℃总延伸 5min。聚丙烯酰胺凝胶 180V 130mA 电泳 2 小时检测其扩增条带,银染显色后于灯箱上拍照观察。

1.3 数据处理

试验数据分析采用 Excel 进行指纹图谱的结果统计,用“1”表示高位条带,“0”表示低位条带及无条带,用“0/1”杂合带;用 DPS 软件进行 UPGMA 聚类分析。

表 3 60 对引物名称及序列

Table 3 The name and sequence of 60 pairs of InDel primers

编号 Serial number	引物名称 Primer name	染色体编号 Chromosome number	编号 Serial number	引物名称 Primer name	染色体编号 Chromosome number	编号 Serial number	引物名称 Primer name	染色体编号 Chromosome number
1	CIDH28	Chr01	21	CIDH800	Chr04	41	CIDH669	Chr08
2	CIDH466	Chr01	22	CIDH776	Chr05	42	CIDH59	Chr08
3	CIDH914	Chr01	23	CIDH360	Chr05	43	CIDH267	Chr08
4	CIDH404	Chr01	24	CIDH580	Chr05	44	CIDH124	Chr08
5	CIDH304	Chr01	25	CIDH69	Chr05	45	CIDH437	Chr08
6	CIDH192	Chr01	26	CIDH494	Chr05	46	CIDH279	Chr09
7	CIDH614	Chr01	27	CIDH76	Chr05	47	CIDH307	Chr09
8	CIDH848	Chr02	28	CIDH5	Chr06	48	CIDH200	Chr09
9	CIDH8	Chr02	29	CIDH602	Chr06	49	CIDH634	Chr09
10	CIDH825	Chr02	30	CIDH131	Chr06	50	CIDH601	Chr09
11	CIDH872	Chr02	31	CIDH261	Chr07	51	CIDH247	Chr09
12	CIDH377	Chr02	32	CIDH509	Chr07	52	CIDH325	Chr10
13	CIDH293	Chr03	33	CIDH373	Chr07	53	CIDH764	Chr10
14	CIDH360	Chr04	34	CIDH302	Chr07	54	CIDH351	Chr11
15	CIDH440	Chr05	35	CIDH426	Chr07	55	CIDH807	Chr11
16	CIDH696	Chr06	36	CIDH858	Chr07	56	CIDH49	Chr11
17	CIDH328	Chr07	37	CIDH437	Chr07	57	CIDH859	Chr11
18	CIDH81	Chr08	38	CIDH667	Chr08	58	CIDH203	Chr11
19	CIDH552	Chr09	39	CIDH270	Chr08	59	CIDH908	Chr12
20	CIDH29	Chr10	40	CIDH179	Chr08	60	CIDH202	Chr12

2 结果与分析

2.1 InDel 标记的筛选

选取生物学性状差异较大、亲缘关系较远的 8 份簇生椒亲本材料,利用 60 对 InDel 引物对其 DNA 进行 PCR 扩增,并进行聚丙烯酰胺凝胶电泳检测。共筛选出 25 对覆盖干制辣椒品种的 12 条染

色体、片段大小介于 100bp—550bp 之间、条带清晰、多态性和稳定性都比较良好的 InDel 引物(表 4),筛选结果如图 1 所示。在多态性片段中,一类引物对材料的扩增片段无多态性差异如 CIDH49 和 CIDH552;一类引物对材料的扩增片段有多态性如 CIDH200 和 CIDH602。

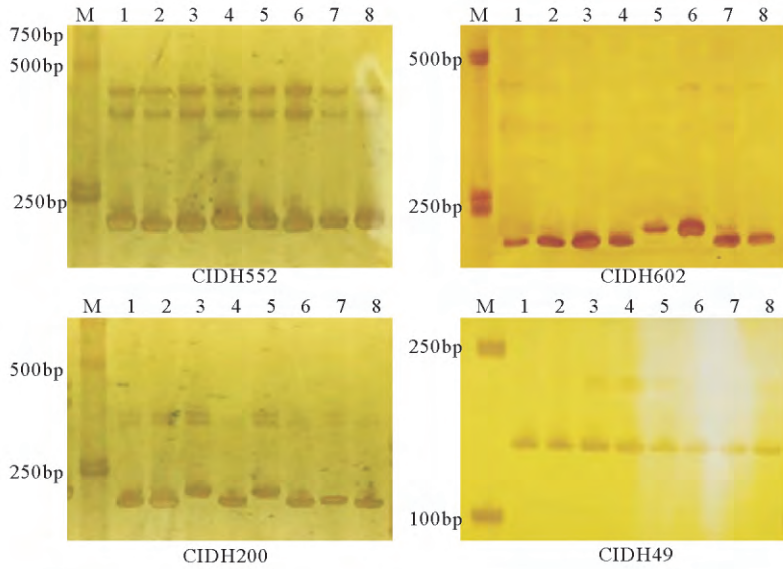
表 4 25 对 InDel 引物名称及序列

Table 4 The name and sequence of 25 pairs InDel primers

引物名称 Primer name	引物序列(5'~3') Primer sequence	扩增片段所在染色体 Chromosome containing mplified fragment	扩增片段长度 Length of amplified fragment
CIDH28	ACGCTGACATAACAAAGGCA TCGGCCAAAGTTCATATGGGA	1	170bp
CIDH825	GACACAACGATATCTTTGGGTCA GACAGGCCTCCTATGAAGCA	2	168bp

续表

引物名称 Primer name	引物序列(5'~3') Primer sequence	扩增片段所在染色体 Chromosome containing amplified fragment	扩增片段长度 Length of amplified fragment
CIDH848	ATCATCTGCACAGCTCCAC ACACTTACCTTTTTCGGACCTCA	2	136bp
CIDH8	AGGCACCAGTTAGCTCGAAA AGGCATCTCAATCTATGTCGA	2	228bp
CIDH293	GGCGCACTTCACTTTTGAGG AGCTTGTTATGCATTACATCGAGAA	3	370bp
CIDH440	AGGCACCCTTTTCTGTCCTT TGAGTTGGCCAGGATGTTGT	3	183bp
CIDH800	GGTTGTTGCCTGCATAGGGA TCTGCGGAAGAAAAGAGTGACA	4	113bp
CIDH776	CGGGAGAGAGAAAATCAATCAGG TCAAGTTTCGCTTCATTGGCT	4	156bp
CIDH360	CACTCTCTCCGCTTCGTCTT CATTTGTTGGTTCTCAGCGGT	5	213bp
CIDH580	TCATCACTCGAACCCATGATCT GGTCATTGTTGATTGTGAGTGGT	5	241bp
CIDH5	ACCCTCAACATTTGCTCAGGA CAAGGGTAGTATGGGGCGTG	6	135bp
CIDH602	GGAAACCGACCACCAGAAAA TCGCGGGGACTATTTACCCT	6	209bp
CIDH131	GTCTGTGGAATACCTCACTGCT AATTGTGGGTCCAACCGAT	6	238bp
CIDH373	ACAAGCCAGCAAATTGAAATGTC ATCAGGATCGACCCAAACCG	7	128bp
CIDH302	CCCTCGTCTGACAAGAGCTC ATGGGGACTCACCTTCCAGT	7	250bp
CIDH426	GAGTTGTCGTTGGCAATGGC ACGGCTTTCACGATAACTCCT	7	165bp
CIDH267	GCCCTGCTCATCCTTGAAGT CTGCAGCCACAGGAGATTCA	8	216bp
CIDH307	TTCGTCAGGCATCCAACCTCT CCCAATGTGAGATAACCAGGGT	9	255bp
CIDH200	TGCAAGGCAGAAGATGGACA TGCATTGCAAGCCATCAGAG	9	210bp
CIDH634	TGGCGCAAATGAGATTTTCGAC CGTGTGACATGGAGGTTTATGT	9	235bp
CIDH325	AAGGAGTATTCGCGCCAACA TGATGTGGCAGCGAGTGATT	10	500bp
CIDH351	ACGTGCAGTAATCAGCGTGA GTGAAACGACGGATCTGGAGA	11	175bp
CIDH859	TGAGGTTTCGCACTAGTCGTG TGCTTCAAAGTCTAGCCCGA	11	115bp
CIDH908	GCGGAGTCTTTTAATGAAGGGC TGCCTTGATGCATAAAGCTGTC	12	208bp
CIDH202	TGGGCTTTTGAGCGAGAGAA TGCAATGGGTTTCTAAGGCT	12	180bp



M:marker;1: 精选簇生; 2:三樱椒;3:长阳簇;4: 秘鲁王后;5: 鸡血红; 6: 铁皮椒 9 号;7: 北京;红 202;8: Y20
 M:marker;1:Jingxuan clustered pepper;2: Capsicum annum; 3Changyang clustered pepper;4:Peru queen clustered pepper;
 5:Jixuehong clustered pepper;6:Tiepi clustered pepper No.9 ;7:Beijinghong clustered pepper 202; 8: Clustered pepperY20

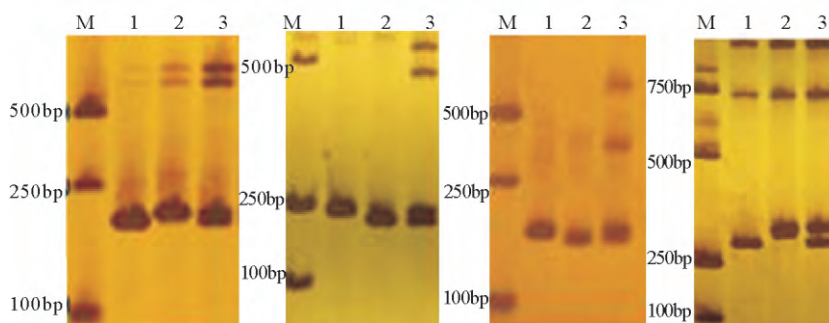
图 1 部分 InDel 引物的筛选结果

Fig. 1 Polymorphism screening result of some InDel primers

2.2 InDel 标记的多态性分析

利用筛选出来的 25 对特异性 InDel 引物分别对 3 个杂交品种及其亲本的基因组 DNA 进行多态性分析(图 2),其中 25 对 InDel 引物在扩增结果中

表现出多态性,共扩增出 123 个位点,具有多态性的位点 51 个,多态性比率为 41.5%。其中引物 CIDH825 在杂交种 F16008 中呈共显性(图 2)。



a. CIDH440;b. CIDH634;c. CIDH202;d. CIDH825

a-c. M:Marker;1:母本 16001-2;2:父本 16026;3:F16007

d. M: Marker;1:母本 16001-2;2:父本 16027;3:F16008

a-c. 1: female parent 16001-2; 2: male parent 16026; F₁: hybrid F₁6007

d. 1: female parent 16001-2; 2.: male parent 16027; F₁.: hybrid F₁6008

图 2 部分 InDel 引物在杂交亲本及杂交 F₁ 中的扩增结果

Fig. 2 Amplification result from parents and hybrids F₁ with a part of InDel primers

2.3 3 个杂种一代及其亲本的数字化指纹图谱构建

利用 25 对 InDel 引物构建指纹图谱,根据引物

扩增片段大小选择目的条带,4 个杂交亲本及 3 个杂交种的 DNA 指纹图谱如表 5。

表 5 簇生朝天椒杂种一代及亲本的数字化指纹图谱

Table 5 Digital fingerprints of hybrids and parents in clustered pepper

编号 Number	DNA 指纹图谱 DNA digital fingerprint
16001-2	1-0-0-0-0-1-1-0-0-0-1-0-1-0-1-0-0-0-0-1-0-0-0-0-1
16026	0-1-0-0-0-0-1-0-0-0-1-0-0-0-0-1-1-0-0-0-0-0-0-0-1
16027	0-1-1-0-1-1-1-0-0-0-1-0-1-0-1-1-1-0-0-0-0-0-0-0-0
16030	0-0-0-1-1-1-1-0-0-0-1-1-1-1-0-0-0-1-0-1-1-0-0-0-1
F16007	1-0-0-0-0-1-0-0-0-1-0-0-0-0-0-0-0-0-0-0-1-0-0-0-0-0
F16008	1-0/1-1-0-1-1-0-0-0-0-1-0-1-0-1-0-0-0-0-1-0-0-0-0-1
F16011	1-0-0-1-1-1-0-0-0-0-1-1-1-1-0-0-1-1-1-1-0-1-0-0-1

2.4 3 个簇生朝天椒杂种一代及其亲本的亲缘关系分析

利用 UPGMA 聚类法对 4 个干制辣椒品种亲本进行进化树分析。结果表明:4 个亲本遗传相似系数在 0.36~0.59 之间(图 3),在 0.59 处父本 16030 单独为一类,母本同父本 16026 和父本 16027 为一类,在 0.40 处父本 16026 和父本 16027 归为一类。

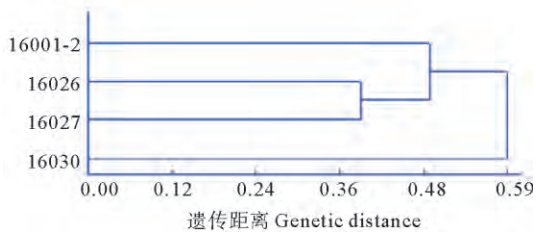


图 3 4 个簇生朝天椒亲本指纹图谱数据的 UPGMA 聚类分析

Fig. 3 UPGMA cluster analysis for 4 clustered pepper parents based on digital fingerprint data

对 3 个辣椒品种子一代进行 UPGMA 聚类图分析,结果表明:遗传相似系数在 0.49~0.61 之间,其中杂种一代 F16011 单独成一类;杂种一代 F16007 和 F16008 为一类。杂交种遗传相似系数在 0.49~0.61 之间而亲本遗传相似系数在 0.36~0.59 之间(图 4),亲缘分析结果基本一致。

3 讨 论

通过构建 DNA 指纹图谱,律文堂等^[14]筛选出可以区分不同莲藕品种的 InDel 标记,为莲藕的品种鉴定和育种提供分子遗传学依据。孙德岭等^[15]证明了 AFLP 技术用于白菜类蔬菜亲缘关系鉴定

的可行性,路盼等^[16]为番茄的品种区分、纯度鉴定及亲本的选配提供分子生物学依据。本研究建立 7 个干制辣椒品种的数字化 DNA 指纹图谱,为品种纯度鉴定和真实性鉴定提供快速准确的分子生物学途径,并在新品种的遗传多样性评价方面有重要价值。对于干制辣椒原原种,与标准图谱完全相同则视为同一品种,以保证品种的一致性;对于干制辣椒生产种,通过图谱检测可防止生产过程中的品种退化和品种遗传漂变。

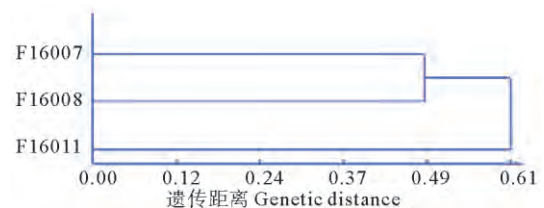


图 4 3 个簇生朝天椒杂种一代指纹图谱数据的 UPGMA 聚类图

Fig. 4 UPGMA cluster analysis for 3 clustered pepper hybrids based on digital fingerprint data

在 DNA 指纹图谱的基础上,从亲缘关系切入并结合农艺性状,可为制定育种中亲本选配方案提供依据。宋健等在番茄^[17]、魏艺聪等在草珊瑚^[18]、林宗铿等在芦笋^[19]方面分析其亲缘关系,从分子水平上为进一步进行亲本选配提供分子生物学依据。本文通过 UPGMA 聚类图分析材料间的遗传关系,其中母本 16002-1 同父本 16027 和 16026 的遗传背景相似,母本和父本 16030 的遗传相似系数最远,因此在亲本选择时,应优先选择亲缘关系较远的母本 16001-2 和父本 16030 进行杂交,防止种性退化。从亲缘关系分析来看,父本 16026 和父本

16027 亲缘关系最近。杂交种间的遗传相似系数在 0.49—0.61 之间,其中杂交种 F16008 和 F16007 遗传相似系数较近,在 0.49 处聚为一类,F16011 单独为一类,和亲本分析结果基本一致。今后应对簇生朝天椒遗传相似系数较远的亲本材料进行选配。这与郭广军等^[10]在基于辣椒基因组重测序的 InDel 标记开发及应用中,InDel 标记可以有效地应用于辣椒种质鉴定,遗传图谱的构建,关联分析和基因定位等方面的结论是一致的。

综上,本文建立了 3 个簇生朝天椒杂交种及其亲本材料的数字化 DNA 指纹图谱,并分析了其亲缘关系,为 3 个自有品系的杂交种品种保护工作提供遗传分子标记保护策略的参考依据。亲本和杂交种的亲缘关系分析,也可为簇生朝天椒杂优育种中亲本选配提供理论依据。

参考文献:

- [1] 姚明华,尹延旭,王飞,等. 中国加工辣椒育种现状与发展对策[J]. 湖北农业科学,2015,6(11):2569—2573
- [2] 张德龙,张士荣,王军,等. 不同烤烟品种田间烟叶耐熟性强弱判定方法初探[J]. 青岛农业大学学报(自然科学版),2017,34(04):256—261
- [3] 王灵敏,孟小莽,许豫南,等. 浅议种子真实性与品种纯度鉴定方法的适用范围与优劣[J]. 种子科技,2016,34(08):33—34
- [4] 申璐,沈火林,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(02):34—42
- [5] 孟雅宁,严立斌,范妍芹. 分子标记技术在辣椒雄性不育中的研究进展[J]. 辣椒杂志,2017,15(02):1—5
- [6] 胡坤. 玉米与大乌草 InDel 标记的开发及遗传连锁图谱的构建[D]. 雅安:四川农业大学,2014
- [7] 刘丹,孙玉友,魏才强,等. Indel 分子标记及其在水稻研究中的应用[J]. 种子,2017(09):47—52+59
- [8] 戴剑. 基于 InDel 标记快速检测黄瓜津优 38 种子纯度[J]. 种子,2011(06):19—23
- [9] 律文堂,尹静静,刘蓬,等. 莲藕品种资源 InDel 指纹图谱的构建[J]. 长江蔬菜,2017(18):94—96
- [10] 郭广君,孙茜,刘金兵,等. 基于辣椒基因组重测序的 InDel 标记开发及应用[J]. 江苏农业学报,2015,31(06):1400—1406
- [11] 姜童,王辉,杨延杰,等. 干制辣椒雄性不育系与保持系间多态性 InDel 标记的筛选[J]. 北方园艺,2017(15):24—28
- [12] 王立浩,刘伟,张宝玺. 我国辣椒种业科技发展现状挑战及其思考[J]. 辣椒杂志 2016(03):1—6
- [13] 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
- [14] 律文堂,尹静静,刘蓬,等. 莲藕品种资源 InDel 指纹图谱的构建[J]. 长江蔬菜,2017(18):94—96
- [15] 孙德岭,赵前程,宋文芹,等. 自菜类蔬菜亲缘关系的 AFLP 分析[J]. 园艺学报,2001(28):331—335
- [16] 路盼,康立功,许向阳,等. 3 个番茄品种及其 6 份亲本材料指纹图谱的构建[J]. 中国瓜菜,2010,23(3):6—10
- [17] 宋健,陈杰,陈火英,等. 利用 SSR 分子标记分析番茄的遗传多样性[J]. 上海交通大学学报农业科学报,2006,6(24):524—528
- [18] 魏艺聪,陈莹,罗林泉,等. 18 份草珊瑚种质的 ISSR 标记遗传相关性与亲本选配分析[J]. 中国中药杂志,2014,39(23):4571—4575
- [19] 林宗铿,林艺华,蔡坤秀,等. 基于 ISSR 方法的芦笋育种亲本间亲缘关系分析[J]. 热带亚热带植物学报,2017,25(02):149—156