

基于 RSAP 和 SSR 的辣椒优良自交系间遗传距离的估计与比较

杜晓华^{1,2}, 王得元¹, 巩振辉²

(1 广东省农业科学院 蔬菜研究所, 广东 广州 510640; 2 西北农林科技大学 园艺学院, 陕西 杨凌 712100)

[摘要] 作物 F_1 代的杂种优势表现与亲本间的遗传距离直接相关, 对自交系间遗传距离的估计可被用来预测杂种优势。针对我国鲜食尖椒的育种目标, 利用 RSAP 和 SSR 标记系统, 对来自国内外的 10 份尖椒优良自交系间的遗传距离进行估计, 并比较了 2 种标记的结果和效力。结果显示, RSAP 标记具有较高的位点和多态性检测能力, 平均每次可检测 51 个位点和 13 个多态性条带, 分别是 SSR 的 17 倍和 6.5 倍; 基于 RSAP 的遗传距离和基于 SSR 的遗传距离相关性较高 ($r = 0.5429$); 2 种标记系统的聚类结果基本一致, 均将 10 份尖椒分为 3 大类, 这种分类结果不但反映了果实形状在辣椒分类上的重要地位, 而且与辣椒杂种优势育种实践相一致。

[关键词] 辣椒; 遗传距离; RSAP; SSR

[中图分类号] S641.302

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2007)07-0097-06

Estimation and comparison of genetic distances among elite inbred lines in hot pepper (*Capsicum annuum* L.) by RSAP and SSR

DU Xiao-hua^{1,2}, WANG De-yuan¹, GONG Zhen-hui²

(1 Vegetable Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou, Guangdong 510640, China;

2 College of Horticulture, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: Levels of heterosis exhibited by the F_1 have a direct relationship with the divergence between their parents. Therefore, estimation of genetic distance can be useful for prediction of high performance crossings. Focusing on the breeding objectives of domestic long-fruit hot pepper variety type, two marker systems, i. e. restriction site amplified polymorphism (RSAP) and simple sequence repeat (SSR), were adopted to estimate the genetic distances among 10 elite inbred lines. The results showed that RSAP had the higher number of total loci (51) and polymorphic bands (13) per assay ratio, being 17-fold and 6.5-fold higher than SSR, respectively. The correlation between pairwise genetic distances generated by RSAP marker system and by SSR was high ($r = 0.5429$). The clusters of two marker systems were coincident and could classify ten long-fruit hot pepper varieties into three groups that were in accordance with the practice of pepper heterosis breeding and pepper fruit shapes.

Key words: hot pepper; genetic distance; RSAP; SSR

辣椒杂种优势明显, 杂交优势育种在辣椒育种中占据着非常重要的地位。采用有效方法预测杂种的优势表现, 对辣椒杂种优势利用具有重要意义。

由于作物 F_1 代的杂种优势表现与其亲本间的遗传距离直接相关^[1], 因此可借助对遗传距离的估计来预测优势杂交组合^[2]。与传统基于表现型的遗传距

* [收稿日期] 2006-06-01

[基金项目] 广东省自然科学基金项目(000162); 广东省农科院院长基金(04-基金-038)

[作者简介] 杜晓华(1972-), 男, 陕西岐山人, 博士, 主要从事蔬菜分子标记育种研究。

[通讯作者] 王得元(1968-), 男, 河南焦作人, 副研究员, 博士, 主要从事蔬菜育种与生物技术研究。

离估计方法相比,基于 DNA 标记的分析技术更具优势,因为 DNA 标记是基因组 DNA 水平的直接反映,不受环境影响和时空限制,数量几乎无限,且具有较高的多态性,目前已被广泛应用于玉米、水稻等多种作物遗传距离的估算^[2-3]。

简单序列重复 (Simple sequence repeats, SSR) 是一种揭示生物基因组高度重复区 DNA 多态性的 DNA 标记系统,其位点信息量高,共显性,稳定可靠,现已被广泛应用于辣椒遗传多样性分析、分子图谱构建等研究^[4-5]。限制性位点扩增多态性(restriction site amplification polymorphism, RSAP) 是一种检测基因组上广泛分布的限制性酶切位点多态性的新型 DNA 标记系统,该技术具有引物设计简便、操作简单、结果稳定、中等产率等特点,已在辣椒、苦瓜和水稻上得到了验证^[6]。

鲜食尖椒类 (*Capsicum annuum* var. *longum*) 品种是我国辣椒生产的主要品种类型之一,针对我

国鲜食尖椒的杂种优势育种目标,本研究随机选取了自国外引进的材料中选育出的尖椒优良自交系和国内各育种单位选育出的尖椒优良自交系共计 10 份,采用 RSAP 和 SSR 两种分子标记系统进行自交系间遗传距离的估计研究,旨在评价这 2 种标记系统在辣椒自交系间遗传差异分析中的适用性及其效力,以及这些辣椒优良自交系间的遗传距离,为辣椒杂种优势育种实践提供分子依据。

1 材料与方法

1.1 材 料

10 份辣椒 (*Capsicum annuum* var. *longum*) 优良自交系由广东省农业科学院蔬菜研究所提供,材料名称和来源见表 1。RSAP 和 SSR 引物由上海基康生物技术有限公司合成, *Taq* 酶购自华美生物工程公司。

表 1 供试辣椒自交系的名称和来源

Table 1 Names and origin of tested pepper inbred lines

编号 No.	名称与系谱 Name or pedigrees	属性 Type	来源 Origin
1	HN-1	羊角椒 Sheep-horn-shaped pepper	泰国 Thailand
2	5904	羊角椒 Sheep-horn-shaped pepper	湖南 Hu 'nan
3	甜牛角椒选系 Line derived from sweet cattle-horn-shaped pepper	粗牛角椒 Wide cattle-horn-shaped pepper	美国 America
4	388	长羊角椒 Long sheep-horn-shaped pepper	安徽 Anhui
5	伏地尖选系 Line derived from Fudjian pepper	羊角椒 Sheep-horn-shaped pepper	湖南 Hu 'nan
6	8216	羊角椒 Sheep-horn-shaped pepper	湖南 Hu 'nan
7	云阳椒选系 Line derived from Yunyang pepper	羊角椒 Sheep-horn-shaped pepper	河南 He 'nan
8	8802	羊角椒 Sheep-horn-shaped pepper	安徽 Anhui
9	赤峰牛角椒选系 Line derived from cattle-horn-shaped pepper from Chifeng	牛角椒 Sheep-horn-shaped pepper	内蒙古 Inner Mongolia
10	河南羊角椒选系 Line derived from sheep-horn-shaped pepper from Henan	羊角椒 Shape like slim horn	河南 He 'nan

1.2 方 法

1.2.1 辣椒 DNA 的提取 以 10 个辣椒自交系的幼嫩叶片为材料,参照王得元等^[7]的改良 SDS 法提取基因组 DNA。

1.2.2 RSAP 分析 依据 RSAP 原理^[6],本研究设计合成了 10 条 RSAP 引物(见表 2),组成 45 对引物组合,参照杜晓华等^[6]的方法对 10 个辣椒自交系

进行分析。PCR 反应体系具体为:25 μL 反应总体积中,模板 DNA 为 20 ng, Mg^{2+} 浓度 2.5 mmol/L, dNTPs 浓度 0.2 mmol/L, *Taq* DNA 聚合酶量为 1.5 U, 2 条引物均为 600 nmol/L。PCR 扩增在 GeneAmp PCR System 9700 扩增仪上进行,扩增产物采用 6% 的变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(70 W 恒功率),银染检测,程序参照许绍斌等^[8]的方法进行。

表 2 采用的 10 条 RSAP 引物

Table 2 10 primers of RSAP used in this study

引物名称 Primer name	引物序列(5'~3') Sequence of primers (5' to 3')	引物名称 Primer name	引物序列(5'~3') Sequence of primers (5' to 3')
R1	ATTACAACGAGTGGA TCC	R6	ATTTCA GCACCCACGA TC
R2	CACAGCACCCACTTTAAA	R7	ATAGTCCTGAGCGGTTAA
R3	GACTGCGTACATGAATTC	R8	ATAACTGTGTACCTGCA G
R4	TATCTGGTGA GGGATA TC	R9	GTACATGCATTACTGCGA
R5	TTGGGATA TCGGAAGCTT	R10	ATTGGA CTGGTCTCTA GA

1.2.3 SSR 分析 根据以 *Capsicum annuum* 和 *C. chinense* 为材料构建的辣椒遗传连锁图谱,选用 28 个已定位在辣椒染色体上 (<http://www.sgn.cornell.edu/oldhighlights.pl>,2006)、且序列已公布的 SSR 标记^[5]进行 SSR 分析。28 个 SSR 标记具体为: *Hpms* 1-139、*Hpms* 1-148、*Hpms* 1-214 和 AF039662(均定位在 1 号染色体), *Hpms* 1-106 和 *Hpms* 1-143(均定位在 2 号染色体), *Hpms* 1-173、*Hpms* 1-230、AA840689 和 AA840692(均定位在 3 号染色体), *Hpms* 1-165、CAN130829 和 *Hpms* 1-69(均定位在 4 号染色体), *Hpms* 2-18(定位在 4a 号染色体), *Hpms* 2-45(定位在 5 号染色体), *Hpms* 1-172(定位在 7 号染色体), *Hpms* 1-216(均定位在 7a 号染色体), *Hpms* 1-41、*Hpms* 1-43、*Hpms* 1-62、*Hpms* 1-155、*Hpms* 1-281、*Hpms*h-*pMADS* 和 AA840739(均定位在 8 号染色体), *Hpms* 1-3、*Hpms* 1-117 和 *Hpms* 2-41(均定位在 9 号染色体), *Hpms* 2-21(定位在 10 号染色体)。

在 SSR 分析中,PCR 扩增条件按照 Lee 等^[5]的方法进行。扩增反应体系总体积为 25 μL:模板 DNA 为 20 ng,Mg²⁺ 浓度 2.5 mmol/L,dNTPs 浓度 0.2 mmol/L,Taq DNA 聚合酶量为 1 U,2 条引物均为 400 nmol/L。扩增产物分离和银染检测的方法同 1.2.2。

1.2.4 数据统计与聚类分析 对 RSAP 和 SSR 分

析产生的多态性条带,按二元数据进行统计。各样品中有带赋值为 1,无带赋值为 0。按 Jaccard 相似系数(Jaccard's coefficient)法计算遗传相似系数(J_{Cij}), $J_{Cij} = a / (a + b + c)$ 。式中: a 为两样品共有的条带数, b 、 c 为第 i 和第 j 样品各自的条带数。按照 $GD(J) = 1 - J_{Cij}$ 计算遗传距离(GD)。基于 Jaccard 相似系数,采用算术平均数非加权成组法(Unweighted pair group method using arithmetic averages,UPGMA)进行聚类分析,聚类分析在 MVSP 3.1 软件上进行。

2 结果与分析

2.1 辣椒优良自交系间分子标记的多态性检测

2.1.1 RSAP 标记 在 10 个辣椒自交系中,41 对引物组合共扩增出 2 121 个条带,其中多态性条带为 538 个(占 25.4%)。平均每对引物组合产生 51 个条带,各引物组合产生的多态性条带数目为 4~35 个不等,平均多态性条带数为 13 个。图 1 为引物组合 R6R9 在 10 个辣椒自交系上的扩增图。引物组合 R1R2 产生的多态性条带最多,达 35 个,占其扩增总条带数(46 个)的 76%;虽引物组合 R2R4 产生的条带数最多(78 个),但多态性条带并不多,为 15 个(占 19%)。说明产生的条带总数与多态性条带并不成正比关系。

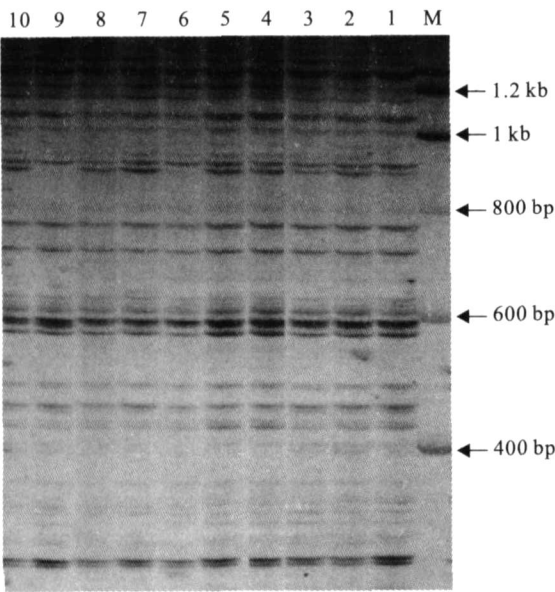


图 1 RSAP 引物组合 R6R9 在 10 个辣椒自交系上的扩增结果

Fig. 1 Amplified profile by R6R9 primer set of RSAP in 10 pepper inbred lines

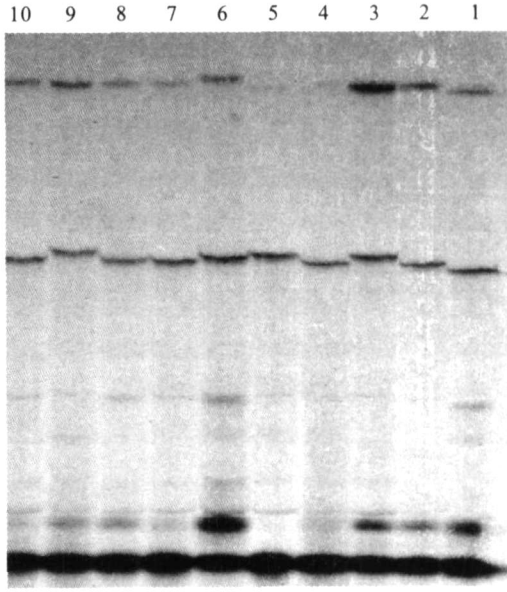


图 2 SSR 引物对 *hpms* 1-143 在 10 个辣椒自交系上的扩增结果

Fig. 2 Amplified profile by *hpms* 1-143 primer set of SSR in 10 pepper inbred lines

2.1.2 SSR 标记 28 对 SSR 引物中,共有 16 对产生多态性条带。这 16 对 SSR 引物共扩增出 46 个条带,其中多态性条带为 34 个(占 74%)。平均每对引物产生 3 个条带,各引物产生的多态性条带数为 1~3 个不等,平均为 2 个。图 2 为引物对 *Hpms* 1-143 在 10 个辣椒自交系上的扩增图。引物对 *hpms*1-114、*hpms*1-173、*hpms*1-155、*hpms*1-143、*hpms*1-62、*HpmshpMADS* 和 *CAN130829* 产生的多态性带数目最多,均为 3 个。

表 3 RSAP 与 SSR 标记系统产生信息情况的比较

Table 3 Comparison of information obtained by the RSAP and SSR marker systems

标记类型 Marker types	引物组合数 Number of primer sets	引物组合平均 覆盖的位点数 Number of loci per primer set	引物组合平均 产生的多态性 Number of polymorphic loci per primer set	平均遗传距离 Mean genetic distance	最大遗传距离 Maximum genetic distance	最小遗传距离 Minimum genetic distance
RSAP	41	51	13	0.575	0.687	0.477
SSR	16	3	2	0.495	0.737	0.133

2.2 10 个辣椒优良自交系间的遗传距离

2.2.1 基于 RSAP 标记的遗传距离 基于 RSAP 标记,10 个辣椒自交系之间的平均遗传距离为 0.575,最小为 0.477,最大为 0.687,10 个辣椒自交系的遗传距离范围为 0.477~0.687(表 3)。分析基于 Jaccard 相似系数的 10 个辣椒自交系的 RSAP 标记遗传距离(表 4)发现,来自同一地区(河南)的 7 号自交系与 10 号自交系遗传距离最小,来自美国的 3 号自交系与来自湖南的 6 号自交系的遗传距离最大。进一步分析发现,来自国内的 8 个自交系间的平均遗传距离为 0.568,来自泰国的 1 号自交系与来自国内的 8 个自交系间的平均遗传距离为 0.573,来自美国的 3 号自交系与来自国内的 8 个自交系间的平均遗传距离为 0.603。从图 3 可以发现,在相似系数为 0.4 处,10 个辣椒自交系被分为 3 类:6 号单

2.1.3 RSAP 标记与 SSR 标记的比较 2 种标记系统在 10 个辣椒自交系中平均产生的多态性比例(多态性带/总条带)差异明显,SSR(74%)明显高于 RSAP(25.4%),表明 SSR 提供的位点信息量较高。但从每对引物组合检测的位点数目看,RSAP 要远高于 SSR,是其 17 倍(表 3);RSAP 平均每对引物产生的多态性条带也高于 SSR,是其 6.5 倍(表 3)。可见,RSAP 每次检测(每对引物组合扩增)获得的信息量较高。

独一类,3 号和 9 号为一类,其余为一类。

2.2.2 基于 SSR 标记的遗传距离 10 个辣椒自交系基于 SSR 标记的平均遗传距离为 0.495(表 3)。由表 4 可知,来自湖南的 2 号自交系和来自河南的 10 号自交系遗传距离最小,为 0.133,来自美国的 3 号自交系分别与来自湖南的 6 号和来自安徽的 8 号自交系遗传距离最大,为 0.737。来自国内的 8 个自交系间的平均遗传距离为 0.443,来自泰国的 1 号自交系与来自国内的 8 个自交系间的平均遗传距离为 0.484,来自美国的 3 号自交系与来自国内的 8 个自交系间的平均遗传距离为 0.669。由 SSR 聚类图(图 4)可以看出,在相似系数为 0.5 处,10 个辣椒自交系被分为 3 类:其中 6 号为一类,3 号和 9 号为一类,其余聚为一类。

表 4 基于 RSAP(对角线以下)和 SSR(对角线以上)的 10 个辣椒基因型的遗传距离矩阵

Table 4 Genetic distance matrix based on RSAP (below diagonal) and SSR (above diagonal) among the ten pepper genotypes

编号 No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1		0.474	0.632	0.421	0.500	0.526	0.421	0.444	0.611	0.474
2	0.562		0.684	0.294	0.375	0.500	0.187	0.312	0.667	0.133
3	0.563	0.571		0.556	0.722	0.737	0.632	0.737	0.600	0.684
4	0.597	0.579	0.671		0.579	0.526	0.235	0.353	0.611	0.187
5	0.519	0.486	0.618	0.582		0.529	0.500	0.437	0.706	0.471
6	0.634	0.652	0.687	0.637	0.618		0.526	0.471	0.647	0.500
7	0.552	0.524	0.593	0.526	0.499	0.609		0.250	0.684	0.187
8	0.551	0.541	0.627	0.523	0.522	0.584	0.511		0.647	0.312
9	0.577	0.577	0.487	0.656	0.587	0.683	0.545	0.593		0.588
10	0.591	0.555	0.633	0.575	0.555	0.631	0.477	0.531	0.562	

2.2.3 基于 RSAP 标记的遗传距离与基于 SSR 标记的遗传距离比较 基于 RSAP 的遗传距离矩阵

与基于 SSR 的遗传距离矩阵的回归分析结果(图 5)表明,二者之间的相关程度较高($r = 0.5429$, $P <$

0.001)。2 种标记计算的遗传距离均显示,来自泰国的自交系与国内自交系间的平均遗传距离同国内自交系之间的平均遗传距离无明显差别,而来自美国的自交系与国内自交系间的遗传差异较大。基于 2

种标记的聚类结果基本一致,即均将 6 号单独分开,并将牛角椒 3 号和 9 号聚为一类,其他羊角椒聚在一起。

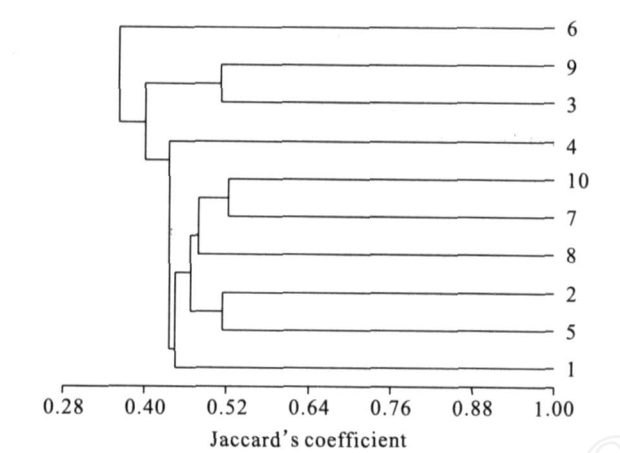


图 3 基于 RSAP 标记的 10 个辣椒自交系的聚类结果

Fig. 3 UPGMA dendrogram of 10 inbred lines based on RSAP data

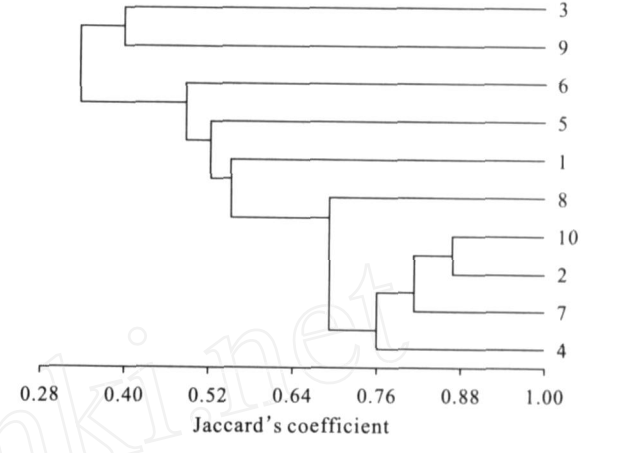


图 4 基于 SSR 标记的 10 个辣椒自交系的聚类结果

Fig. 4 UPGMA dendrogram of 10 inbred lines based on SSR data

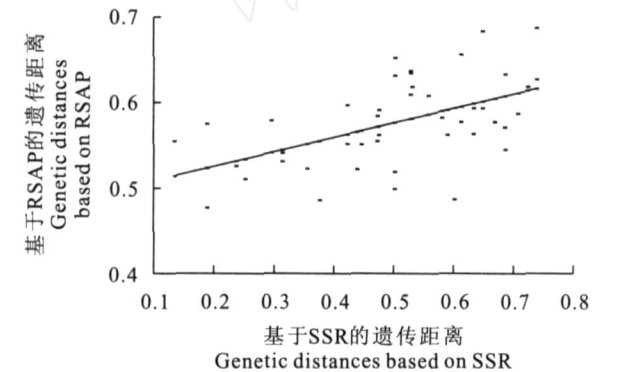


图 5 基于 RSAP 与基于 SSR 的遗传距离矩阵的回归分析

Fig. 5 Regression analysis to compare the genetic pairwise distances obtained from RSAP and SSR

3 讨 论

3.1 RSAP 与 SSR 遗传分析效力的比较

辣椒(*C. annuum*)遗传基础较窄^[9-16],本研究中选用的 10 个辣椒自交系均属于 *Capsicum annuum* var. *longum*,遗传基础更为狭窄,因此,选用合适的分子标记系统开展研究十分重要。从分子标记分析的稳定性和操作简便方面考虑,本研究选用了 RSAP 和 SSR 这 2 种分子标记系统。在 10 个辣椒自交系间的遗传距离评价中,RSAP 平均每次检测(每个引物组合扩增)的条带数和多态性带数均很高,分别是 SSR 标记的 17 倍和 6.5 倍,显示了很高

的分析效力。鉴于 SSR 标记的开发费工费时,且目前可供公开利用的辣椒 SSR 标记不足 100 个^[5],多数 SSR 标记由 Syngenta、DNA Landmarks 等公司开发,属商业机密(<http://www.sgn.cornell.edu/oldhighlights.pl>, 2006),而 RSAP 标记的引物设计简便易行,分析成本较低,因此,RSAP 标记较适合在辣椒自交系的遗传距离估计和资源的遗传多样性研究中应用。

3.2 辣椒优良自交系间遗传距离的分子标记估计

本试验基于 RSAP 和 SSR 对 10 个辣椒自交系的聚类结果,均将 3 号和 9 号牛角椒聚在一起,与其他羊角椒分开,反映了辣椒果实形状在辣椒分类上的重要地位,这与以往的辣椒分类结论一致^[4,11,13,15]。基于 RSAP 标记估计的遗传距离还与辣椒杂种优势育种实践相一致,湖南省农业科学院邹学校等^[17]利用不同类内的、遗传距离较大的 2 号和 6 号自交系(遗传距离为 0.652),选育出了优势明显的杂种一代辣椒——湘研 16 号。

3.3 利用分子标记估计遗传距离的误差

Lefbvre 等^[15]认为,基于分子标记估计的遗传距离,其误差的主要来源在于标记的取样误差和标记的数目。为减少取样误差,Lefbvre 等建议应尽可能选用已定位在染色体上、均匀分布的共显性标记,以提高分析的准确性。为此,本试验利用 SSR 标记进行遗传分析时,选用了已定位、并分散于辣椒不同

染色体上的 SSR 标记;在 RSAP 分析中,10 条 RSAP 引物分别采用了 10 个不同的限制性位点,提高了检测多态性的范围,一定程度增加了标记分布的均匀性。本研究采用的 RSAP 标记的数目较多,达 538 个,使分析的准确性得到了一定程度地提高。

[参考文献]

- [1] Sekhon M S, Gupta V P. Genetic distance and heterosis in Indian mustard: developmental isozymes as indicators of genetic relationships[J]. Theor Appl Genet, 1995, 91:1148-1152.
- [2] Smith O S, Smith J S, Bowen S L, et al. Similarities among a group of elite maize inbreds as measured by pedigree, F₁ grain yield, grain yield, heterosis, and RFLPs[J]. Theor Appl Genet, 1990, 80:833-840.
- [3] 段发平, 梁承邳, 黎垣庆. 水稻杂种优势预测方法的现状、问题与对策[J]. 杂交水稻, 2000, 15(2):1-3.
- [4] Tam S M, Mhiri C, Vogelaar A, et al. Comparative analyses of genetic diversities within tomato and pepper collections detected by retrotransposon-based SSAP, AFLP and SSR[J]. Theor Appl Genet, 2005, 110:819-831.
- [5] Lee J M, Nahm S H, Kim Y M, et al. Characterization and molecular genetic mapping of microsatellite loci in pepper[J]. Theor Appl Genet, 2004, 108:619-627.
- [6] 杜晓华, 王得元, 巩振辉. 一种新型分子标记技术——限制性位点扩增多态性(RSAP)的建立和优化[J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版, 2006, 34(9):45-49.
- [7] 王得元, 彭世清, 刘志新, 等. 辣椒基因组 DNA 提取与 RAPD 分析[J]. 江西农业大学学报, 1998, 20(2):180-183.
- [8] 许绍斌, 陶玉芬, 杨昭庆, 等. 简单快速的 DNA 银染和胶保存方法[J]. 遗传, 2002, 24(3):335-336.
- [9] Livneh O, Nagler Y, Tal Y, et al. RFLP analysis of a hybrid cultivar of pepper (*Capsicum annuum*) and its use in distinguishing between parental lines and in hybrid identification[J]. Sci Technol, 1990, 18:209-214.
- [10] Prince J P, Loaiza-figueroa F, Tanksley S D. Restriction fragment length polymorphism and genetic distance among Mexican accessions of *Capsicum*[J]. Genome, 1992, 35:726-732.
- [11] Lefebvre V, Palloix A, Rives M. Nuclear RFLP between pepper cultivars[J]. Euphytica, 1993, 71:189-199.
- [12] Prince J P, Lackney V K, Angeles C, et al. A survey of DNA polymorphism within the genus *Capsicum* and the fingerprinting of pepper cultivars[J]. Genome, 1995, 38:224-231.
- [13] Paran I, Aftergoot E, Shifris C. Variation in *Capsicum annuum* revealed by RAPD and AFLP markers[J]. Euphytica, 1998, 99:167-173.
- [14] Rodriguez J M, Berke T, Engle L, et al. Variation among and within *Capsicum* species revealed by RAPD markers[J]. Theor Appl Genet, 1999, 99:147-156.
- [15] Lefebvre V, Goffinet B, Chauvet J C, et al. Evaluation of genetic distances between pepper inbred lines for cultivar protection purposes: comparison of AFLP, RAPD and phenotypic data[J]. Theor Appl Genet, 2001, 102:741-750.
- [16] 王玲, 郑金贵, 赖钟雄, 等. 辣椒遗传多样性的 RAPD 分析[J]. 福建农林大学学报:自然科学版, 2003, 32:213-216.
- [17] 邹学校, 周群初, 戴雄泽, 等. 湘研 16 号辣椒的选育[J]. 中国蔬菜, 2000(5):20-21.