

辣椒 *C. frutescens* × *C. chinense* 种间杂种的获得与鉴定

陈学军, 周坤华, 方 荣, 缪南生, 王长林

(江西省农业科学院蔬菜花卉研究所, 南昌 330200)

摘要: 运用有性杂交方法, 以强辣灌木辣椒 *Capsicum frutescens* H₁₀₁ 为母本(P₁)、强辣 *C. chinense* PI439487 为父本(P₂) 进行种间杂交, 获得了 *C. frutescens* × *C. chinense* 种间杂种。对种间杂种 F₁ 25 个表型性状进行了观察比较, 结果表明: F₁ 在生长势方面具有明显的杂种优势, 其他表型性状则多介于 P₁ 与 P₂ 之间。SRAP 分析显示, F₁ 与 P₁、P₂ 共有带 220 条, 占总位点数的 53.92%, 与 P₁ 或 P₂ 共有带 143 条, 占 35.05%, F₁ 特异带和特异缺失带 12 条, 点 2.95%。F₁ 与 P₁ 遗传相似系数为 0.749, 大于其与 P₂ 的遗传相似系数(0.740), 说明杂种在 DNA 水平上更趋向于母本。*C. frutescens* × *C. chinense* 种间杂种的获得, 为 *C. chinense* 香味和多花基因的转移及新材料创制奠定了基础。

关键词: 灌木辣椒; *C. chinense*; 种间杂种; 表型性状; SRAP

Production and Identification of Interspecific Hybrids Between *C. frutescens* and *C. chinense*

CHEN Xue-jun, ZHOU Kun-hua, FANG Rong, MIAO Nan-sheng, WANG Chang-lin

(Vegetable and Flower Institute, Jiangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanchang 330200)

Abstract: With manual pollination, an interspecific hybrid was obtained from the cross between a pungent *Capsicum frutescens* accession H₁₀₁ (P₁) and the pungent *C. chinense* accession PI439487 (P₂). 25 phenotypic characters were observed and compared among P₁, F₁ and P₂. The results indicated the growth vigor of F₁ had heterosis significantly, and the majority of the other phenotypic characters were intermediate to that of either parent. SRAP analysis showed that the F₁ hybrid contained 220 bands of two parents, accounting for 53.92% of the total loci, and the percentage of 143 bands holding by F₁ and either parent reached to 35.05%. The number and the percentage of the specific loci in F₁ were 12 and 2.95% respectively. The genetic similarity coefficient between F₁ and P₁ was 0.749, greater than that between F₁ and P₂ (0.740), suggesting the hybrid was more similar to the female parent at DNA level. The obtainment of the interspecific hybrid of *C. frutescens* × *C. chinense* afford a basis for the transfer of the fruit flavor gene and the multiple-flower gene in *C. chinense* and the formulation of new materials in pepper.

Key words: *C. frutescens*; *C. chinense*; Interspecific hybridization; Phenotypic character; SRAP

在辣椒属 5 个栽培种中, *Capsicum frutescens* 和 *C. chinense* 是两个重要的加工型栽培种, *C. frutescens* 主要分布于美洲、亚洲和非洲的低纬度地区, 作为调味品种种植, 果实多用于制干、腌渍和提炼辣椒油^[1], 我国海南和云南热带地区有 *C. frutescens* 种质分布, 当地俗称“小米椒”^[2-4]。*C. chinense* 则主要分布于美洲, 在我国仅海南有栽培的报道, 俗称“黄

灯笼”或“黄帝椒”^[5], *C. chinense* 具有多花特性(图 1), 果肉有特殊芳香, 果实主要用于制酱, 品质优良。

种间杂交是实现基因转移的有效途径, 通过种间杂交, 可望将 *C. chinense* 的香味和多花基因转移至 *C. frutescens* 中, 从而提升 *C. frutescens* 加工品质和产量。关于辣椒属种间杂交, 国内外研究报道较多

有 *C. annuum* × *C. frutescens*^[6-8] 和 *C. annuum* × *C. chinense*^[9-11], 而 *C. frutescens* × *C. chinense* 则少有涉及^[12], 特别是以我国原产 *C. frutescens* 种质资源开展与美洲 *C. chinense* 的种间杂交研究, 在国内外尚未见报道。为此, 本研究以云南强辣 *C. frutescens* H₁₀₁ 为母本、美洲强辣 *C. chinense* PI439487 为父本进行有性杂交, 探讨其种间杂交的可行性, 对获得的种间杂种进行表型性状与分子鉴定, 以期对辣椒种间优异基因的利用与新材料创制提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料

试验材料为 *C. frutescens* H₁₀₁ 和 *C. chinense* PI439487, H₁₀₁ 是原产于云南麻栗坡县、经多代人工自交获得的纯系材料, PI439487 为自交纯系, 引自美国国家种质资源试验室。上述材料均由江西省农业科学院蔬菜花卉研究所提供。

1.2 研究方法

1.2.1 种间杂交方法 杂交试验在海南三亚进行, 2009 年 10 月 8 日播种, 露地定植。在开花盛期, 以 H₁₀₁ 为母本 (P₁)、PI439487 为父本 (P₂), 采用徒手旋花去雄法杂交、挂牌, 授粉后 60d 左右收获红熟果实, 剥取种子晒干贮藏。为保证父本花粉的纯度, 在杂交前 1d 下午将父本次日要开放的花蕾用 2cm × 1cm 医用胶布粘住, 杂交时再取下这些花收集新鲜花粉。

1.2.2 表型性状观察 2010 年 3 月 2 日将 P₁、F₁ 和 P₂ 种植于江西南昌试验基地, 随机选取 F₁ 及双亲各 10 株进行表型性状观察鉴定, 包括株高、叶纵径、叶横径、叶形指数、叶柄长、叶色、始花节位、花色、每节花数、花梗着生状态、果顶朝向、果纵径、果横径、果形指数、果肉厚度、单果质量、果实辣味、果肉香味、青熟果色泽、老熟果色泽、软肉及落果性状、果柄长度、种子千粒重、种子发芽率、播种至开花天数等, 其中, 叶形指数 = 叶纵径/叶横径, 果形指数 = 果纵径/果横径, 具体参照陈学军等^[13] 的方法进行。

1.2.3 SRAP 分析方法 用改良 CTAB 法^[14] 提取辣椒基因组 DNA。选用多态性好、条带清晰稳定的 16 对 SRAP 引物对 P₁、F₁ 和 P₂ 进行 SRAP 分析。PCR 反应体系参照本试验室优化的 10μl 体系^[15], 其中 Taq DNA 聚合酶 0.75U、Mg²⁺ 0.6mmol/L、dNTPs 0.2mmol/L、引物 0.8μmol/L、模板 DNA 50ng。Taq DNA 聚合酶、Mg²⁺、dNTPs 和 buffer 均购自 Fermentas 公司, DNA ladder 购自 Takara 公司。

PCR 反应在 Eppendorf 公司生产的 PCR 仪中进行, 扩增程序为: 94℃ 5min; 94℃ 1min, 35℃ 1min, 72℃ 1min, 5 个循环; 94℃ 1min, 50℃ 1min, 72℃ 1min, 35 个循环; 72℃ 10min, 4℃ 保存。PCR 产物采用 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶 (7mol/L 尿素) 电泳, 电泳缓冲液为 1 × TBE, 70w 恒功率电泳 1.5h。银染法染色显影^[16], 在荧光灯上观察分析条带。

1.3 遗传相似系数计算

将电泳图谱上清晰条带记为 1, 同一位置没有条带记为 0, 获得数据矩阵, 用 Jaccard 系数表示遗传相似系数, 利用 SPSS12.0 软件计算 P₁、F₁ 与 P₂ 间遗传相似系数大小。

2 结果与分析

2.1 种间杂种的获得

在海南三亚生态条件下, *C. frutescens* H₁₀₁ 和 *C. chinense* PI439487 开花结果正常, 通过在人工杂交授粉期间采用摘除母本自交果等方法, 使种间杂交坐果率达到 46.2%, 成功获得 *C. frutescens* × *C. chinense* 种间杂交果实和杂种种子。

2.2 种间杂种育性表现

种间杂种 (F₁) 部分种子种胚发育不良, 表现为种子不饱满、种壳发黑 (图 1), 种子千粒重仅为 1.364g, 明显小于母本种子千粒重 (3.167g), 发芽率也仅为 29.20%。但发芽成苗后的 F₁ 植株生长发育正常, 其自交果所产种子 (F₂) 发芽率为 88.70%, 与常规辣椒种子差异不大。

2.3 种间杂种 F₁ 表型性状的观察鉴定

种间杂种 F₁ 植株高大, 生长势强, 其株高、叶纵径、叶横径和叶柄长等表型值要明显超过双亲。F₁ 每节花数 1~6 朵, 平均 3.5 朵, 大大超过 P₁ 的 1~2 朵 (平均 1.5 朵) (图 2), 其他性状则多介于双亲之间 (图 2 和表 1)。依据 F₁ 不同性状的表现特点, 可将 25 个 F₁ 表型性状 (软肉及落果性状除外) 分为 4 种类型, (1) 偏母型: F₁ 叶形指数、果横径、果形指数、果肉厚度、单果质量和老熟果色泽等性状均偏向母本 H₁₀₁; (2) 偏父型: F₁ 始花节位、叶色、每节花数、果纵径和果柄长度等性状偏向父本; (3) 中间型: F₁ 的花色、花梗及果实生长状态、果实辣味、果实香味和青熟果色泽等介于双亲之间; (4) 超亲型: F₁ 株高、叶纵径、叶横径和叶柄长均大于双亲, 种子千粒重、种子发芽率以及播种至开花天数则小于双亲。此外, F₁ 与母本 H₁₀₁ 一样, 存在软肉及落果现象。

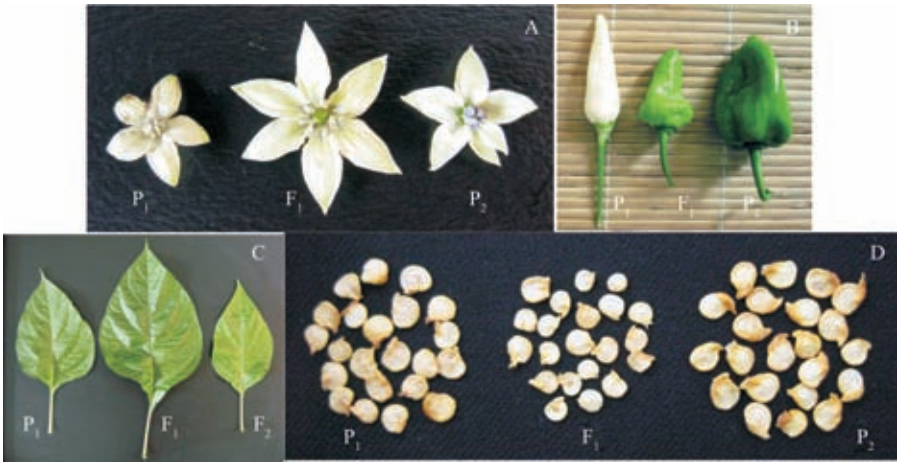


图 1 *C. frutescens* H₁₀₁ (P₁)、*C. chinense* PI439487 (P₂) 及其杂种 F₁ 的形态特征

Fig.1 Morphological characters of *C. frutescens* H₁₀₁ (P₁) ,*C. chinense* PI439487 (P₂) and their interspecific hybrid F₁

A:花;B:果实;C:叶;D:种子

A: Flowers; B: Fruits; C: Leaves; D: Seeds



图 2 *C. frutescens* H₁₀₁ (P₁)、*C. chinense* PI439487 (P₂) 和 F₁ 花的着生状态

Fig.2 Growth state of flowers of *C. frutescens* H₁₀₁ (P₁) ,*C. chinense* PI439487 (P₂) and their F₁

表 1 亲本及 F₁表型性状

Table 1 Phenotypic characters of parents and their F ₁			
性状 Characters	P ₁	F ₁	P ₂
株高 (cm)	99. 5	110. 8	50. 6
叶纵径 (cm)	16. 25	21. 80	14. 50
叶横径 (cm)	10. 10	12. 67	7. 70
叶形指数	1. 62	1. 72	1. 88
叶柄长 (cm)	4. 25	5. 50	3. 57
叶色	浅绿	绿	绿
始花节位	20 ~ 22	19 ~ 21	16 ~ 18
花色	白绿	白绿	白绿
每节花数	1 ~ 2	1 ~ 6	2 ~ 7
花梗直立否	是	混合型	否
果顶是否向上生长	是	混合型	否
果纵径 (cm)	5. 10	4. 50	4. 27
果横径 (cm)	1. 615	1. 975	3. 230
果形指数	3. 158	2. 28	1. 32
果肉厚度 (cm)	0. 12	0. 16	0. 21
单果质量 (g)	2. 15	2. 91	8. 07
果实辣味	强辣	强辣	强辣

续表			
性状 Characters	P ₁	F ₁	P ₂
果实香味	淡	中	浓
青熟果色泽	乳白	浅绿	深绿
老熟果色泽	红	红	黄
软肉及落果	有	有	无
果柄长度 (cm)	4. 00	3. 60	3. 33
种子千粒重 (g)	3. 167	1. 364	3. 786
种子发芽率 (%)	98. 60	29. 20	97. 80
播种至开花天数 (d)	95	90	98

2.4 SRAP 分析

2.4.1 SRAP 引物组合的多态性 16 对 SRAP 引物组合共扩增出清晰、稳定性好的条带 408 条 (图 3), 平均每对引物组合扩增的 DNA 带数为 25. 5 条, 大小为 50 ~ 3000bp, 多态性位点数为 188, 多态性位点比率为 46. 08%, 平均每对引物组合有 11. 75 个多态性位点, 每对 SRAP 引物组合都可以将 P₁、F₁、P₂三者有效分开。

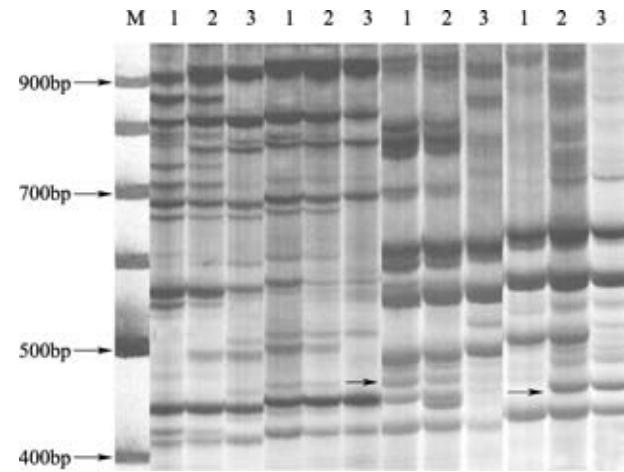


图3 不同SRAP引物组合扩增结果

Fig.3 Amplification profile using different primers combination in P₁, F₁ and P₂

1~3 分别为 P₁、F₁ 和 P₂, 箭头所指为特异片段, M 为 DNA Marker
1-3 are P₁, F₁ and P₂, respectively. The arrow marked specific bands.
M is DNA marker

表2 *C. frutescens* H₁₀₁ (P₁)、*C. chinense* PI439487 (P₂) 及其杂种 (F₁) SRAP 标记的表现

Table 2 Expression of SRAPs in *C. frutescens* H₁₀₁ (P₁), *C. chinense* PI439487 (P₂) and their F₁

材料 Material	双亲及 F ₁ 带型组合							总位 点数 Total
	Combination of SRAP bands in parents and F ₁ hybrid							
P ₁	+	+	-	-	+	+	-	408
F ₁	+	+	+	+	-	-	-	
P ₂	+	-	+	-	+	-	+	
位点数	220	78	65	7	5	24	9	408
百分比(%)	53. 92	19. 12	15. 93	1. 72	1. 23	5. 88	2. 20	-

“+”表示有带,“-”表示无带
“+” means having PCR products,“-” means no PCR products

3 讨论

种间杂交是实现基因转移的有效途径之一,本研究以云南 *C. frutescens* H₁₀₁ 为母本、美洲 *C. chinense* PI439487 为父本,开展了 *C. frutescens* 与 *C. chinense* 种间杂交,成功获得其种间杂种,这是国内首次获得 *C. frutescens* × *C. chinense* 种间杂种的报道。*C. frutescens* 是我国唯一有野生种分布的栽培种,而 *C. chinense* 具有一节多花和抗炭疽病^[17] 等多种有利性状,因此, *C. frutescens* × *C. chinense* 种间杂种的获得,为深入开展 *C. frutescens*、*C. chinense* 种间优异基因的转移、新材料创制和聚合育种奠定了基础。表型分析和分子试验表明,种间 F₁ 在生长势方面具有明显的杂种优势,其他表型性状则多介于 P₁ 和 P₂ 之间;既有双亲共有位点,也有分别来自 P₁ 或 P₂ 的特异位点,因而在形态学和 DNA 分子水平上验证了种

2.4.2 双亲和 F₁ 带型分析 对 *C. frutescens* H₁₀₁ (P₁)、*C. chinense* PI439487 (P₂) 及其 F₁ SRAP 扩增产物进行分析,发现共有 7 种组合(表 2),归为 5 种类型:(1) P₁、P₂ 和 F₁ 共有带 220 条,占 53.92%,反映了双亲 DNA 的同源性部分。(2) F₁ 与亲本之一共有带 143 条,占 35.05%,其中 F₁ 与 P₁ 共有带多于 F₁ 与 P₂ 共有带。(3) 仅一个亲本有带、另一亲本和 F₁ 无带的情况占 8.08%, P₁ 独有带多于 P₂ 独有带。(4) 双亲无带、F₁ 有带的情况占 1.72%。(5) 双亲有带、F₁ 无带的情况占 1.23%。

2.4.3 F₁ 与双亲遗传相似性评价 以 P₁、F₁ 和 P₂ 分子谱带数据为原始矩阵,获得两两不同种质间的遗传相似系数,结果显示, F₁ 与 P₁ 遗传相似系数为 0.749,大于 F₁ 与 P₂ 间的遗传相似系数 0.740, P₁ 与 P₂ 遗传相似系数较小为 0.557。

间杂种的真实性。

细胞遗传学和分子生物学研究结果表明,在辣椒属的 5 个栽培种中, *C. frutescens* 与 *C. annuum*、*C. chinense* 三者亲缘关系较近,而与 *C. baccatum*、*C. pubescens* 亲缘关系较远^[18-19]。但目前国内只有获得 *C. annuum* × *C. frutescens*^[8] 和 *C. annuum* × *C. chinense* 的报道^[9-10],程志芳等^[10] 开展了辣椒种间杂交研究,但未能获得 *C. frutescens* × *C. chinense* 杂种果实。Bahadur^[12] 研究表明, *C. frutescens* 与 *C. chinense* 的杂交,其杂交后代花粉仅 28% 具有育性,远低于种内杂种花粉 75%~97% 的可育率。本研究结果显示, *C. frutescens* 与 *C. chinense* 种间杂交,虽然存在一定困难,主要表现为杂种 F₁ 部分种子种胚发育不良,种子发芽率只有 29.20%,但仍能获得具有正常生育能力的 F₁ 植株。

一节多花是 *C. chinense* 最显著特点之一,有别

于其他 4 个栽培种。Tanksley 等^[20]研究发现,多花性状至少受 5 个数量性状位点控制,且存在较强的上位互作效应,通过转育,能使 *C. annuum* 每节着花数提高 50%。在本试验中, F_1 每节花数 1~6 朵,平均 3.5 朵,比母本 *C. frutescens* H_{101} 平均着花数(1.5 朵)提高 133.33%。通过回交和自交等人工选择手段,可望获得具有多花性状、稳定的 *C. frutescens* 遗传材料,提高 *C. frutescens* 增产潜力。*C. chinense* 另一个特点是果肉具有特殊香味,具特殊加工品质。在本试验中, F_1 香味较 P_1 有所增强,但其香型与 P_2 还是有一定差异。关于 *C. chinense* 果实香味的遗传规律,目前尚未见有报道,有待今后进一步研究。

SRAP 是一种新型 DNA 分子标记技术,具有简便、稳定及不需预知物种序列信息等优点,是评价作物遗传多样性、品种鉴定和系统发生的有效工具^[21]。Ferriol 等^[22-23] 研究认为,SRAP 技术在生态型变异性和生态型进化史上比 AFLP 更具有一致性,在对育种目标性状的评价方面明显优于 RAPD 标记,检测杂交种纯度准确度比 SSR 更高^[24]。在本试验中,SRAP 多态性位点比率达 46.08%,每对 SRAP 引物组合都可以将 P_1 、 F_1 、 P_2 三者有效分开,说明 SRAP 具有较高的多态性标记比例,利用 SRAP 标记鉴别、评价辣椒属不同栽培种及其杂种效率高、效果好。

参考文献

[1] Pickersgill B. Genetic resources and breeding of *Capsicum* spp. [J]. Euphytica, 1997, 96: 129-133

[2] 中国科学院云南植物研究所. 云南植物志第二卷[M]. 北京: 科学出版社, 1979: 561

[3] 陈学军, 方荣, 周坤华, 等. 辣椒种质亲缘关系的数量分子学研究[J]. 江西农业学报, 2009, 21(1): 31-34

[4] 邓明华, 文锦芬. 云南灌木辣椒资源[J]. 辣椒杂志, 2009(1): 36-37

[5] 王健华, 刘志昕, 王运勤, 等. 海南黄灯笼辣椒顶死病病原病毒的分离鉴定[J]. 热带作物学报, 2005, 26(3): 96-101

[6] Jae B Y, Jae W D, Dong C Y, et al. Interspecific cross compatibility among five domesticated species of *Capsicum* genus[J]. J Kor Soc Hort Sci, 2004, 45(6): 324-329

[7] Rao G U, Ben C A, Borovsky Y, et al. Mapping of yield-related QTLs in pepper in an interspecific cross of *Capsicum annuum* and *C. frutescens* [J]. Theore Appl Gene, 2003, 106(8): 1457-1466

[8] 陈学军, 方荣, 周坤华, 等. 辣椒种间杂种的表型鉴定及 SRAP 分析[J]. 西北植物学报, 2011, 31(2): 286-290

[9] 吴鹤鸣, 余建明, 丁犁平, 等. 辣椒属种间杂种 F_1 植株的细胞遗传学研究[J]. 遗传学报, 1997, 24(1): 59-65

[10] 程志芳, 钱春桃, 陈学军, 等. 辣椒属种间杂交及杂种鉴定研究[J]. 园艺学报, 2007, 34(4): 883-888

[11] Nowaczky P, Nowaczky L, Olszewska D, et al. Androgenic response of genotypes selected from *Capsicum annuum* L. × *C. chinense* Jacq hybrids[J]. Acta Physiol Plantarum, 2009, 31(4): 877-879

[12] Bahadur B J. Studies on interspecific and intraspecific genetic relationships in *Capsicum* using randomly amplified polymorphic DNA markers and chloroplast DNA sequences [D]. Las Cruces: New Mexico State University, 2003

[13] 陈学军, 程志芳, 陈劲枫, 等. 辣椒种质遗传多样性的 RAPD 和 ISSR 及其表型数据分析[J]. 西北植物学报, 2007, 27(4): 662-670

[14] Murry H G, Thompon W F. Rapid isolation of higher weight DNA [J]. Nucleic Acid Res, 1980(8): 4321

[15] 周坤华, 方荣, 陈学军, 等. 正交设计优化辣椒 SRAP-PCR 反应体系及引物筛选[J]. 江西农业大学学报, 2010, 32(3): 595-600

[16] 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

[17] Do J W, Kim S H, Park H G, et al. Inheritance of anthracnose (*Colletotrichum acutatum*) resistance in *Capsicum* using interspecific hybridization [J]. Korean J Hort Sci, 2009, 27(1): 140-144

[18] Egawa Y, Tanaka M. Cytogenetical relationships among three species of chilli peppers, *Capsicum chinense*, *C. frutescens* and *C. baccatum* [J]. Jpn Breed, 1984, 34: 50-56

[19] 陈学军, 陈劲枫, 耿红, 等. 辣椒属 5 个栽培种部分种质亲缘关系的 RAPD 分析[J]. 园艺学报, 2006, 33(4): 751-756

[20] Tanksley S D, Iglesias-Olivas J. Inheritance and transfer of multiple flower character from *Capsicum chinense* into *Capsicum annuum* [J]. Euphytica, 1984, 33: 769-777

[21] Budak H, Sheannan R C, Parmaksiz I. Molecular characterization of Buffalograss germplasm using sequence-related amplified polymorphism markers[J]. Theor Appl Genet, 2004, 108: 328-334

[22] Ferriol M, Pico B, Cordava P F. Molecular diversity of a germplasm collection of squash (*Cucurbita moschata*) determined by SRAP and AFLP makers[J]. Crop Sci, 2004, 44: 653-664

[23] Ferriol M, Pico B, Nuez F. Genetic diversity of a germplasm collection of *Cucurbita pepo* using SRAP and AFLP markers[J]. Theor Appl Genet, 2003, 107: 271-282

[24] 盖树鹏, 盖伟玲, 黄进勇. SSR 与 SRAP 标记在玉米品种鉴定中的比较研究[J]. 植物遗传资源学报, 2011, 12(3): 468-472