

# 辣椒种质遗传多样性的 EST-SSR 分析

陈文超,张竹青,邹学校  
(湖南省蔬菜研究所,长沙 410125)

**摘要:**辣椒(*Capsicum annuum* L.)是一种重要的蔬菜作物,分析辣椒种质的遗传多样性对于辣椒种质的收集、鉴定和利用都有重要的意义。EST-SSR 标记是一种位于转录区的 SSR 标记,能够检测出转录区的多态性,进而能够反映出种质之间真实的遗传多样性。本研究利用 33 个 EST-SSR 标记分析了 31 份辣椒种质的遗传多样性。EST-SSR 标记在测试的辣椒种质上共检测出 91 个等位基因,平均每个位点扩增出 2.76 个等位基因,最多扩增出 6 个等位基因,多态性信息含量(PIC)最小为 0.03,最大为 0.74,平均为 0.38。系统聚类分析将 31 份种质分为 2 大类,聚类结果表现出了一定程度的与果实性状的相关性。主坐标分析的结果基本上与聚类分析的结果一致,但更加详细地表现了辣椒种质之间的遗传变异。

**关键词:**辣椒;遗传多样性;EST-SSR;聚类分析;主坐标分析

## Genetic Diversity of Pepper Germplasm Investigated by EST-SSR Markers

CHEN Wen-chao,ZHANG Zhu-qing,ZOU Xue-xiao  
(Hunan Province Vegetable Research Institute,Changsha 410125)

**Abstract:**Pepper (*Capsicum annuum* L.) is one of the staple vegetable crops with significant economic value. Investigation of pepper genetic diversity is crucial for the collection,identification,and application of pepper germplasm resources. EST-SSR markers,derived from the transcript regions,can detect the polymorphism in the transcript regions on the genome and thus exhibit the true genetic diversity. In the study,a total of 33 EST-SSR markers were employed to investigate the genetic diversity of 31 pepper varieties. A total of 91 alleles were detected among the tested pepper varieties by the EST-SSR markers. The maximum number of alleles and the average alleles per locus were 6 and 2.76,respectively. The polymorphic information content (PIC) per locus ranged from 0.03 to 0.74 with the average of 0.38. Systemic cluster analysis separated the tested pepper varieties into two major groups which showed certain correlation with the morphologic traits of the fruit. The result of principal coordinate analysis was similar to that of the systemic cluster analysis,exhibiting more thoroughly genetic variations among the tested pepper varieties.

**Key words:** Pepper;genetic diversity;EST-SSR;systemic cluster analysis;principal coordinate analysis

辣椒(*Capsicum annuum* L.)是主要的蔬菜作物之一,具有重要的经济价值<sup>[1-2]</sup>。辣椒种质资源是发展辣椒生产和开展辣椒育种的物质基础。我国辣椒资源相对丰富,但遗传背景较狭窄<sup>[3]</sup>。进行辣椒

种质遗传多样性研究,对于鉴别特异种质、确定核心亲本、提高育种效率等都具有重要意义。

分子标记已经成为种质资源研究的重要工具,RAPD<sup>[4]</sup>、AFLP<sup>[5]</sup>、SRAP<sup>[6-7]</sup>、SSR<sup>[8]</sup>等标记都曾被

收稿日期:2013-03-15 修回日期:2013-03-26 网络出版日期:2013-10-22

URL:<http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20131022.1547.027.html>

基金项目:现代农业产业技术体系建设专项(nycytx-35)

第一作者研究方向为辣椒遗传育种。E-mail:wence1974@126.com

通信作者:邹学校,研究方向为辣椒遗传育种。E-mail:zou\_xuexiao@163.com

用于辣椒种质遗传多样性的评价。在众多的分子标记中,SSR 标记因重复性好、多态性高,呈共显性遗传、数量丰富和遍布整个基因组等优点,已成为广泛使用的分子标记之一。

目前在辣椒上总共开发了 500 多个 SSR 标记,这些标记已经被广泛地应用于连锁图谱构建、分子标记辅助选择等研究<sup>[9-13]</sup>。EST-SSR 标记是基于 EST 序列开发的 SSR 标记,除具有基因组 SSR 标记的优良特征外,还能够反映出转录区的差异,这使得 EST-SSR 在种质遗传多样性分析等研究中具有更高的使用价值<sup>[14]</sup>。因此,本研究拟以

部分辣椒种质为材料,利用 EST-SSR 标记分析这些种质的遗传多样性,评价 EST-SSR 标记检测多样性的效率,为辣椒种质资源的鉴定和利用提供相关的理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 植物材料

根据主要性状的差异,选取了 31 份不同类型的辣椒材料用于遗传多样性分析。31 份辣椒材料都来自于湖南省蔬菜研究所辣椒课题组,辣椒材料的编号及主要性状特征见表 1。

表 1 植物材料编号、名称和主要性状

Table 1 The code,name,and major traits of the plant materials

编号	名称	来源	主要性状	编号	名称	来源	主要性状
Code	Name	Origin	Major traits	Code	Name	Origin	Major traits
1	鸡爪椒	浙江杭州	早熟羊角	17	湘潭晚	湖南湘潭	晚熟长牛角
2	伏地尖	湖南衡阳	早熟羊角	18	博辣红帅	自选品种	中熟线椒
3	SJ06-28	自选品系	晚熟深绿色羊角	19	博辣红牛	自选品种	早熟线椒
4	SJ07-1	自选品系	中熟羊角	20	兴蔬 301	自选品种	早熟线椒
5	SJ05-48	自选品系	晚熟粗牛角	21	博椒一号	自选品种	早熟线椒
6	SJ09-52	自选品系	晚熟粗牛角	22	红秀	自选品种	晚熟线辣椒
7	SJ05-47	自选品系	晚熟粗牛角	23	08HN1	自选品系	晚熟线椒
8	SJ05-49	自选品系	晚熟粗牛角	24	泸溪椒	湖南湘西	中熟线椒
9	福湘四号	自选品种	早熟粗牛角	25	茄门甜椒	上海	早熟灯笼
10	福湘二号	自选品种	早熟粗牛角	26	四川海椒	四川成都	朝天单生圆形
11	兴蔬 16	自选品种	中熟长角椒	27	紫色辣椒	云南保山	晚熟朝天单生指形
12	湘研 16	自选品种	晚熟长牛角	28	J04-46-1	自选品系	簇生朝天椒
13	D70-2	自选品系	早熟牛角	29	罗甸辣椒	贵州罗甸	晚熟朝天圆形椒
14	特大牛角椒	内蒙古赤峰	早熟长牛角	30	广西白皮辣椒	广西桂林	晚熟白皮椒
15	早帅	自选品种	极早熟粗牛角	31	ICPN18-7	亚蔬中心	晚熟白皮椒
16	福湘一号	自选品种	极早熟粗牛角				

### 1.2 SSR 分析

辣椒材料采用基质育苗,按照常规方法进行管理。在 4 叶 1 心期,每份材料随机选取 5 株采集新鲜叶片,混合取样,然后用 2% CTAB 法提取 DNA<sup>[15]</sup>,用 NanoDrop 2000 检测 DNA 的浓度和质量。将 A260 与 A280 比值大于 1.8 的 DNA 样本稀释成 20 ng/μL 工作液,用于 EST-SSR 分析。从本课题组开发的 65 个辣椒 EST-SSR 标记中,筛选出 33 个多态性标记进行遗传多样性分析,33 个多态性 EST-SSR 引物名称及序列信息见表 2。

PCR 反应的总体积为 10 μL,含有 1 × Buffer, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 μM dNTPs, 0.2 μM primer, 0.5 U *Taq* 酶, 20 ng DNA。PCR 扩增程序为:94 ℃ 预变性

5 min;94 ℃ 变性 30 s,55 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 45 s,35 个循环;72 ℃ 延伸 5 min;12 ℃ for ever。扩增产物用 8% 非变性 PAGE 在 120 V 恒压下电泳 2 h,然后银染染色。

### 1.3 数据分析

将电泳图谱上清晰且可重复出现的条带记为 1,同一位置没有出现的带记为 0,从而生成由 1 和 0 组成的原始矩阵。按照使用手册,用 NTSYS-pc 2.10e 软件进行聚类分析和主坐标分析。

根据公式  $PIC = 1 - \sum_{i=1}^k P_i^2$  计算多态性信息含量(*PIC*, polymorphic information content)值,其中 *k* 是一个 SSR 所检测到的等位基因的数量,*P<sub>i</sub>* 是第 *i* 个等位基因的频率。

2 结果与分析

2.1 EST-SSR 标记多态性分析

用伏地尖、早帅、红秀、茄门甜椒和罗甸辣椒共 5 个品种为材料,进行引物筛选试验。从 65 个 EST-SSR 标记中,筛选出 33 个具有多态性、扩增质量好的标记用于遗传多样性分析。33 个 EST-SSR 标记的多态性信息见表 2。由表 2 可知,33 个 EST-SSR

标记在 31 份辣椒种质材料中共扩增出 91 个等位基因,平均每个位点扩增出 2.76 个等位基因。检测到等位基因最多的是 CAK33,共检测出 6 个等位基因。EST-SSR 位点的平均多态性信息含量 (*PIC*) 为 0.38,其中 CAK13 位点的多态性信息含量最低,为 0.03;CAK30 的多态性信息含量最高,为 0.74。CAK61 在 31 份辣椒种质中的扩增结果见图 1。

表 2 EST-SSR 标记信息及多态性检测结果

Table 2 The information and polymorphic results of EST-SSR markers

编号		引物序列		基序	片段大小	等位	多态性	
Code		Primer sequence		Motif	(bp)	基因数量	信息含量	
					Product size	No. of allele	<i>PIC</i>	
CAK6	F	GCATTCAAAGCCACACAAAA	R	GACGGATAAGGAGGTGCTGA	(GCC)6	141	2	0.46
CAK7	F	TGTTGAGTGGCCATACTGATG	R	AAACCACGTCGAGATTGGTC	(ACATTCA)2	149	2	0.06
CAK10	F	GCTGGAGTGCCTTGCAAAAAT	R	GTGGGTTTCCAATGAATGCT	(CCAAAC) 2	183	3	0.33
CAK12	F	CACGCTTGAACGTGCCACTC	R	TGCTGTACCCAATGGTTGTG	(TG)7	165	3	0.51
CAK13	F	CCGGCATAAGGATCAAAACAT	R	AGCACTGAAGCTTGTGACGA	(TCT)9	178	2	0.03
CAK14	F	TGATGGAGCTGTTCTTGCAG	R	GTTCCGTTTCAGGTGCAGTT	(ACA)3	175	2	0.09
CAK15	F	GGCTTGTTTACAAGGGGAAA	R	ACAGCCTCGCTCAAGTAACC	(TGCTCC)3	206	2	0.43
CAK18	F	ACGGCAGGTTGTTGAGAAGT	R	ATGCGACAATCGACAAACAA	(GAG)10	172	3	0.58
CAK19	F	CAAAGCACAAATGACGAATGTT	R	TATGCCGGTAATTCGAGGTC	(AT)13	173	3	0.62
CAK20	F	GGTGGCCAGAAAAGTAATCC	R	AGCCCTAACATGGCTGCTAA	(TCGTCA)3	166	2	0.27
CAK21	F	TTGTTGGCCTGACTTTTGAA	R	AAAATCGATCGTGGAGTTG	(ACA)5	163	2	0.09
CAK22	F	TGGGGATCTAAACATGAAGG	R	CATGTGGGATGATGAATGGA	(ATC)4	235	2	0.43
CAK24	F	AAACGTCATCACGCCATCA	R	CGTAACGCACCCTCTAGGAA	(CACCAT)5	159	5	0.43
CAK28	F	TGGATTCTCATGCTTCAAG	R	CGCGAATCTCATCTGATCCT	(AGA)9	215	2	0.47
CAK30	F	ATTCTCTTCCACCGCCTTTT	R	TCCGTTAAAGCACCATTTCC	(CA)14	143	5	0.74
CAK31	F	TAAGAGCAAGGAGGCTCTGC	R	GACATGATCCAACCCAATCC	(GAG)7	196	3	0.60
CAK33	F	CCTTCCTAGCCACACACCTC	R	GAAGGAATAACCGGCAGCTA	(TC)10	147	6	0.69
CAK35	F	TCCCACGAGTCTTTTTGAGG	R	TCTGGTCTTCTTGGGAATCAA	(AAACA)6	229	3	0.32
CAK36	F	CGAGGCTTCCCTTTTCTCTC	R	TCGCCAAGGACGATAACTTT	(TTAA)4	175	2	0.06
CAK40	F	AACCTCGGAGGAGCATTTTT	R	TTCAACCTCAACAGCAGCAG	(CTG)10	155	3	0.40
CAK41	F	CAGCAGCTACTTGCTCACCTT	R	CCGAGAGGAGATATGGTGGA	(ATTTG)3	157	2	0.27
CAK43	F	TCCTGAAGCGCTTTTAAACG	R	AGCCTCCATTGTTAGCTTCTTG	(GTAT)3	217	3	0.57
CAK45	F	CAC TTGCCAGACCCAATACA	R	CTCTCAACTCTCGGCACACA	(AG)9	161	2	0.27
CAK46	F	GGGCGATTTTACATACTAGGA	R	GGGTTTCAACCTTGAAGGAA	(GGAATT)2	222	3	0.58
CAK47	F	TGGAGGCTATGGAAC TCACC	R	AAGCTGCTGTTGTCCCTCAT	(TGGGTA)3	199	2	0.17
CAK52	F	AAGCAAAC TTGCCCTTGCTA	R	TACACGCCACTTGAACCAGA	(AT)8	150	3	0.26
CAK54	F	CGAAAAGAGAACGACGGAGT	R	CTTCACCATCTCACCGAACC	(CTCC)3	164	3	0.42
CAK55	F	TTGCTCGTGAAGCATGTAGC	R	TTTCAAACCCGTGACACAGA	(ATTTGG)2	208	3	0.42
CAK56	F	GCACGGCTCTATATCTCTCTATCTT	R	TCAACATCTCACCGAAGCTG	(CT)14	164	3	0.54
CAK58	F	GTGAACCACGAGCGGATTAT	R	CGGAGTCAAAAGGACCTTCA	(TTGGCA)2	224	3	0.48
CAK59	F	AATTGTTGACCATCCCCAAA	R	AATGTGCATGAATAGCAAAGAA	(CAAA)7	226	2	0.35
CAK61	F	GAAGTGGCAGATGAGGGAAA	R	AGGTGGTGGAGGACATGGT	(ACGACC)4	177	3	0.49
CAK64	F	GAGAGGCGATTGCGTTGTAT	R	TCCAGAAATGGGAAAACAGC	(TCT)3	208	2	0.20

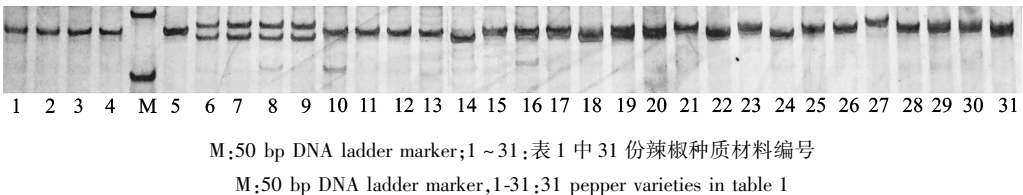


图 1 CAK61 标记在 31 份辣椒品种扩增带型

Fig.1 The PCR amplification pattern of CAK61 marker on the 31 pepper varieties

2.2 基于 EST-SSR 标记的聚类分析

33 个 EST-SSR 标记检测到 91 个多态性位点,按照带的有无,分别记为 1 或者 0,生成二向矩阵。根据原始矩阵计算 31 份辣椒种质两两之间的 Jaccard 相似系数,其分布范围为 0.28 ~ 0.96,平均为 0.55。广西白皮辣椒和 SJ09-52 之间的相似系数最小为 0.28,表明这 2 份种质之间的遗传差异最大。福湘一号和早帅之间的相似系数最大为 0.96,表明二者之间遗传差异最小,与这 2 份辣椒品种有着相似的亲本有关。

基于 Jaccard 相似系数,利用 UPGMA 法进行聚类分析,将聚类结果转换为协表征矩阵(cophenetic matrix),对协表征矩阵和相似系数矩阵的相关性进行 Mantel 检验,结果表明 2 种矩阵极显著相关( $P < 0.01$ ),相关系数为 0.85,表明聚类结果很好地体现了种质之间的遗传关系。辣椒种质的聚类结果见图 2。

由图 2 可知,在相似系数 0.48 处,31 份辣椒种质被分为 2 大类。

第 I 类包含 SJ05-48 和福湘四号在内的 5 份种质,这些都为粗牛角椒类型的种质,除福湘四号具有早熟性外,其他种质都为晚熟品种。

第 II 类包含鸡爪椒和广西白皮辣椒在内的共 26 份种质,这些种质又可以被细分为 6 个亚类。II-1 亚类包含了鸡爪椒和 ICPN18-7 等在内的 5 份种质,这些种质多为羊角椒或朝天椒类型。II-2 亚类包括福湘二号和 J04-46-1 在内的 4 份种质,这一亚类种质的果实类型比较复杂,不仅包括牛角椒,还包括线椒和灯笼型甜椒。II-3 亚类包括兴蔬 16 和红秀在内的 11 份种质,这些种质主要是湖南省蔬菜研究所选育的辣椒品种以及湖南的地方辣椒品种,这些种质聚为一类也反映出在遗传背景上具有一定的相似性。II-4 亚类仅包含泸溪椒 1 份种质。II-5 亚类包括 SJ06-28 和紫色辣椒在内的 4 份种质,这些种质多为线椒类型,但在果实上又具有一定的差异。II-6 亚类仅包含广西白皮辣椒 1 份种质。广西白皮辣椒和泸溪椒都被单独聚为一个亚类,也反映出与其他种质之间存在的遗传差异。

2.3 基于 EST-SSR 标记的主坐标分析

主坐标分析以分类单元间的相似系数为基础,因此,分类单元在主坐标排序图中的位置能反映出之间的遗传相似性。种质间位置越接近表明遗传组成越相似,越远则表明种质间的遗传差异越大。

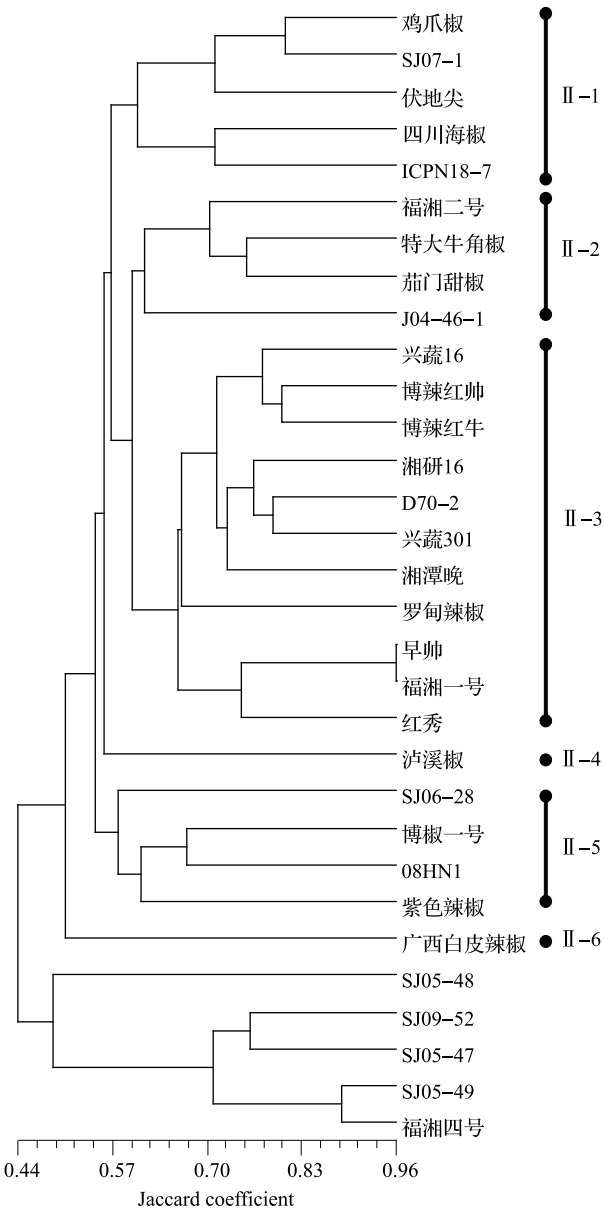


图 2 依据 EST-SSR 数据利用 UPGMA 算法获得的 31 份辣椒种质的聚类图

Fig. 2 UPGMA dendrogram of 31 pepper genotypes by EST-SSR marker

对辣椒 EST-SSR 标记所获得的结果进行主坐标分析,第 1 和第 2 主坐标分别解释了 15.44% 和 10.02% 的种质间变异。对 31 份种质做第 1、2 主坐标的二维图,结果见图 3。由图 3 可以看出,二维主坐标图的分析结果在第 I 类上与系统聚类分析结果完全一致,但是对于第 II 类种质而言,主坐标分析更加清楚地体现了这些种质的差异。在第 2 主坐标方向上,第 II 类种质散布在二维图的右侧,表明这些种质之间蕴藏着丰富的遗传多样性。



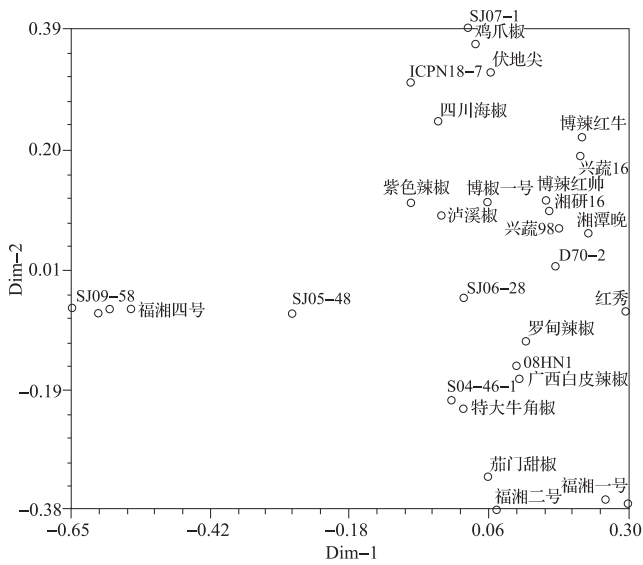


图3 二维主坐标图

Fig. 3 The 2-dimension scatter plot of principle coordinate analysis

3 讨论

EST-SSR 与基于基因组序列开发的 SSR 标记的区别在于 EST-SSR 在基因组上的位置是确定的,即来自于转录区。因此,EST-SSR 检测的是转录区的序列变异,能够反映出功能上的多样性,更适用于种质资源遗传多样性的评价。本研究利用 33 个 EST-SSR 标记分析了 31 份辣椒种质的遗传多样性,平均每个标记扩增出 2.76 个等位基因。罗玉娣等<sup>[16]</sup>利用 21 个 SSR 标记分析了 33 份辣椒材料,平均每对 SSR 引物检测到 2.6 个等位基因变异。周晶等<sup>[17]</sup>用 109 对 SSR 引物对 89 份辣椒材料进行分析,平均每对引物可扩增出 2.66 条带。何建文等<sup>[8]</sup>用 17 个 SSR 标记分析了 48 个贵州辣椒地方品种,平均每对引物可检测 3.8 个等位基因。本研究中 EST-SSR 位点检测到的平均等位基因数量与罗玉娣等<sup>[16]</sup>、周晶等<sup>[17]</sup>的结果相当,但低于何建文等<sup>[8]</sup>的结果。EST-SSR 来自于基因组上的转录区,而转录区的序列通常都比较保守,因此,一般来讲 EST-SSR 所检测到的多态性要低于基因组 SSR。但多态性检测能力的评价也与所测试的植物材料有关,如果所用的植物材料遗传背景差异较大,则标记检测到的多态性就高,反之,则标记的多态性检测能力就会大大降低。本研究中所用的 EST-SSR 检测到的 PIC 值平均为 0.38,反映出 EST-SSR 具有中度偏低的多态性检测能力,但考虑到 EST-SSR 能够检测出转录区的变异,并进而反

映出种质之间真实的遗传多样性,EST-SSR 依然被认为是高效的评价遗传多样性的工具。

在种质聚类分析中,本研究将 31 份辣椒种质分为 2 个大类,其中第 II 类又可以被细分为 6 个亚类,分类结果表现出了与果实性状一定的相关性,但也并不完全一致,很多果实性状不同的品种也被分为了一个类或者一个亚类,这与周晶等<sup>[17]</sup>的结果类似。这可能是因为供试材料多为育成品种,材料之间已经经过了人工杂交和选择,因此,会造成部分品种具有相似遗传背景的现象,从而导致不同果实类型的种质不能被区分出来。另外,使用的引物数量少、在基因组上的覆盖率低,也容易导致分子标记的结果与表型性状分类的结果不一致的现象。

参考文献

[1] 邹学校,张竹青,陈文超,等. 辣椒植株性状 Hayman 双列杂交分析[J]. 植物遗传资源学报,2008,9(2):234-238

[2] 张宝玺,王立浩,毛胜利,等. 优质抗疫病甜椒种质资源的选育[J]. 植物遗传资源学报,2005,6(3):295-299

[3] 张宝玺,王立浩,毛胜利,等. “十一五”我国辣椒遗传育种研究进展[J]. 中国蔬菜,2010,12(24):1-9

[4] 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

[5] 贺洁,苏亚蕊,张大乐,等. 朝天椒遗传多样性的 AFLP 标记分析[J]. 河南大学学报:自然科学版,2010,40(3):278-282

[6] 许先松,刘志钦,林晓丹,等. 基于形态及 SRAP 标记的辣椒资源遗传多样性及亲缘关系比较[J]. 福建农林大学学报:自然科学版,2011,40(1):48-53

[7] 陈学军,周坤华,方荣,等. 辣椒 *C. frutescens* × *C. chinense* 种间杂种的获得与鉴定[J]. 植物遗传资源学报,2012,13(5):907-911

[8] 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

[9] Yi G B, Lee J M, Lee S, et al. Exploitation of pepper EST-SSRs and an SSR-based linkage map [J]. Theor Appl Genet, 2006, 114:113-130

[10] Nagy I, Stigel A, Sasvari Z, et al. Development, characterization, and transferability to other Solanaceae of microsatellite markers in pepper (*Capsicum annuum* L.) [J]. Genome, 2007, 50(7):668-688

[11] Portis E, Nagy I, Sasvari Z, et al. The design of *Capsicum* spp. SSR assays via analysis of *in silico* DNA sequence, and their potential utility for genetic mapping [J]. Plant Sci, 2007, 172(3):640-648

[12] 李晶晶,王述彬,刘金兵,等. 辣椒 EST-SSR 标记的开发[J]. 分子植物育种,2008,6(6):1219-1222

[13] Ince A G, Karaca M, Onus A N. Polymorphic microsatellite markers transferable across capsicum species [J]. Plant Mol Biol Rep, 2010,28(2):285-291

[14] Kong Q, Xiang C, Yu Z. Development of EST-SSRs in *Cucumis sativus* from sequence database [J]. Mol Ecol Notes, 2006, 6(4):1234-1236

[15] 孔秋生,李锡香,向长萍,等. 萝卜种质资源亲缘关系的 RAPD 分析[J]. 植物遗传资源学报,2004,5(2):156-160

[16] 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,(S1):337-341

[17] 周晶,沈火林,杨文才,等. 辣椒遗传多样性的 SSR 分析[J]. 华北农学报,2009,24(S1):62-67