

赫卫,张慧,王莹.辣椒种质资源的形态学和SRAP分析[J].黑龙江农业科学,2019(5):7-11,12.

辣椒种质资源的形态学和 SRAP 分析

赫 卫,张 慧,王 莹

(黑龙江省农业科学院 园艺分院,黑龙江 哈尔滨 150069)

摘要:为探索辣椒种质的遗传多样性和亲缘关系,对43份辣椒种质进行形态学和SRAP分子标记分析。结果表明:根据辣椒的28个形态学性状进行聚类分析,在遗传距离系数6处可以聚为6个组群。94对SRAP引物组合中,每对引物平均扩增的清晰条带数为8.34条,其中多态性比率为13.90%,从中筛选出28对多态性丰富的引物用于SRAP分析。绘制亲缘关系聚类图,43份辣椒种质间的相似系数分布为0.59~0.96,在0.72的相似系数处分为6个组群。SRAP聚类与形态学聚类相似度高,二者都可为辣椒的遗传分析及育种亲本的选择提供一定的借鉴作用。

关键词:辣椒;形态学;SRAP;聚类分析

黑龙江省是远东地区、韩国、朝鲜蔬菜出口的主要省份之一,市场广阔。黑龙江省由于地处高纬度地区,冬季漫长、气候严寒,原产于热带、亚热带地区的辣椒生长受限,辣椒优良新品种研发相对滞后,急需研发适于本地的优势品种。通过整合自身已有资源,加强辣椒种质资源亲缘关系的研究,可以最大限度地、合理地运用杂种优势来培育优良品系,具有很大的实际意义和应用价值。

序列扩增多态性(Sequence-based Amplified Polymorphism,SRAP)分子标记引物组合类型多样,多态性高,目前已成功地应用于辣椒种质资源的研究。例如在种质资源鉴定评价方面,张素勤等^[1]对61份贵州主栽辣椒品种(系)进行SRAP分析,发现辣椒多样性分布和种质来源地具有一致性。张兴桃等^[2]和李宁等^[3]分别对安徽省内的58份辣椒品种和72份新疆干辣椒进行了SRAP标记分析。SRAP标记技术已经应用于遗传图谱的构建,如周坤华等^[4]以一年生辣椒B9431为母本,中国野生灌木辣椒H108为父本种间杂交得F₂群体,利用264个SRAP标记、32个SSR标记和2个ISSR标记构建包含14个连锁群的辣椒遗传图谱。SRAP标记技术还可以对重要性状进行标记。Ji等^[5]基于不育系和保持系的线粒体基因组SRAP分析,细胞质不育系中SRAP引物结

合位点(130 bp)与在保持系(140 bp)中10 bp缺失产生形成的SCAR标记可以从品系中明确选择出细胞质不育系。SRAP标记技术在种子纯度鉴定方面也有应用。李亚利等^[6]用互补型引物DC1-EM9和ME5-EM20对航椒4号和航椒5号进行了各100粒种子的SRAP鉴定,所测纯度分别为100.0%和97.3%,与田间纯度100.0%和99.5%非常接近。本研究分析了43份辣椒种质的形态学性状和SRAP分子标记,旨在从形态学结合分子水平揭示辣椒种质资源的亲缘关系,为实际育种工作中合理的选择杂交亲本提供依据,提高育种工作精确度和效率。

1 材料与方法

1.1 材料

本试验43份辣椒材料由黑龙江省农业科学院园艺分院提供。从全国各地收集辣椒种质43份种植在黑龙江省农业科学院园艺分院试验基地,在3月25日进行穴盘育苗,5月25日定植于大棚中,每个品种种植30株,常规栽培管理。

1.2 辣椒性状调查

1.2.1 调查项目及方法 以《辣椒种质资源描述规范和数据标准》^[7]为依据对28个性状进行数字编码。28个性状包括株幅、株高、株型、熟性、首花节位、分枝性、主茎色、叶节色、茎绒毛、叶面茸毛、叶色、叶形、叶面特征、单节腋花数、花梗着状、花冠色、花药色、花柱色、花柱长、果形、果肩形、果顶形、果棱沟、果特征、果基存花萼、青熟果色、老熟果色、单株果数。与《标准》比较,新增紫叶脉的绿色叶,黄色的老熟果,这两种类型。

1.2.2 数据分析 采用Excel 2003对数据进行

收稿日期:2018-11-26

基金项目:现代农业产业技术体系建设专项资金资助(CARS-24-G-04);黑龙江省农业科学院园艺分院青年人才项目。

第一作者简介:赫卫(1981-),女,博士,助理研究员,从事辣椒遗传育种研究。E-mail:la_jiao800@163.com。

通讯作者:张慧(1971-),女,硕士,副研究员,从事辣椒育种研究。E-mail:la_jiao8000@163.com。

整理和标准化处理,采用 SPSS 18.0 和非加权组平均法(UPGMA)对材料系统聚类。

1.3 SRAP 标记分析

1.3.1 DNA 提取 称取 0.1 g 辣椒幼嫩叶片,液氮研磨成粉末,把粉末转入事先加入 700 μL CTAB 和 20 μL β -巯基乙醇并于 65 $^{\circ}\text{C}$ 预热的 2 mL 离心管中,混匀后置于 65 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中恒温 60 min,加入等体积的氯仿:异戊醇(24:1)溶液,混匀后室温下于 10 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min,取上清 600 μL ,加入 1/100 体积的 RNaseA 溶液,于

37 $^{\circ}\text{C}$ 放置 30 min。加入 600 μL –20 $^{\circ}\text{C}$ 预冷的异丙醇,混匀后在 –20 $^{\circ}\text{C}$ 放置 30 min,于 10 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min 回收 DNA 沉淀,用保存在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下的无水乙醇洗涤沉淀 2 次,晾干后加入超纯水溶解 DNA。

1.3.2 PCR 反应体系正交试验 针对 PCR 反应体系的 *Taq* DNA 聚合酶、引物、 Mg^{2+} 和 dNTP 4 个因素,设计 3 水平 L9(3^4)正交方案(表 1)。对琼脂糖电泳检测的结果进行直观分析,获得辣椒 SRAP 标记 PCR 反应各影响因素的最佳水平。

表 1 PCR 反应体系正交试验设计

Table 1 Orthogonal test design of the PCR reaction system

编号 Number	Mg^{2+} 浓度 Mg^{2+} concentration/(mmol· L^{-1})	引物 Primer/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	<i>Taq</i> DNA 聚合酶 <i>Taq</i> DNA polymerase/(U·20 μL^{-1})	dNTP 浓度 dNTP concentration/(mmol· L^{-1})
1	2.00	0.10	0.25	0.20
2	2.00	0.20	0.50	0.25
3	2.00	0.30	0.75	0.30
4	2.50	0.10	0.50	0.30
5	2.50	0.20	0.75	0.20
6	2.50	0.30	0.25	0.25
7	3.00	0.10	0.75	0.25
8	3.00	0.20	0.25	0.30
9	3.00	0.30	0.50	0.20

SRAP 引物序列参考已报道文献^[8-9],共组成 144 对引物(表 2)。采用最佳反应体系,50 ng 模板 DNA,PCR 反应总体积为 20 μL 进行 PCR 反应。反应程序:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min,35 $^{\circ}\text{C}$ 复性 1 min,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min,5 个循环;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min,50 $^{\circ}\text{C}$ 复性 1 min,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min,35 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。采用 6% 变

性聚丙烯酰胺凝胶电泳(80 W 稳功率,1 h)分离 PCR 产物,银染法染色。

1.3.3 数据分析 对于每一引物的扩增产物,按扩增条带的有无进行记录,电泳图谱上清晰且可重复出现的条带记为“1”,同一位置没有条带记为“0”。采用 UPGMA 法,应用 Ntys 2.01 软件进行聚类分析。

表 2 SRAP 引物信息

Table 2 Information of the SRAP primers

标记名 Label	序列 Sequence	标记名 Label	序列 Sequence	标记名 Label	序列 Sequence
Forward sequence(5'-3')					
me1	TGAGTCCAAACCGGATA	me2	TGAGTCCAAACCGGAGC	me3	TGAGTCCAAACCGGAAT
me4	TGAGTCCAAACCGGACC	me5	TGAGTCCAAACCGGAAG	me6	TGAGTCCTTCCGGTAAC
me7	TGAGTCCAAACCGGTAG	me8	TGAGTCCAAACCGAAC	me9	TGAGTCCAAACCGGAGT
me10	TGAGTCCTTCCGGTCC	me11	TGAGTCCTTCCGGTGC	me12	TGAGTCCAAACCGGCAT
Reverse sequence(5'-3')					
em1	GACTGCGTACGAATTAAAT	em2	GACTGCGTACGAATTGTC	em3	GACTGCGTACGAATTGAC
em4	GACTGCGTACGAATTGTA	em5	GACTGCGTACGAATTAAAC	em6	GACTGCGTACGAATTGCA
em7	GACTGCGTACGAATTCAA	em8	GACTGCGTACGAATTCTG	em9	GACTGCGTACGAATTGCA
em10	GACTGCGTACGAATTTCAG	em11	GACTGCGTACGAATTCCA	em12	GACTGCGTACGAATTATG

2 结果与分析

2.1 辣椒种质形态学性状聚类分析

根据辣椒的 28 个形态学性状进行聚类分析(图 1),在遗传距离系数 6 处将 43 份材料聚为 6 个组群。第 1 组群包括材料 9、30、6、33、35、34、43、12、28、31、4、24、23、25 和 26,分枝少,主茎绿色,雌蕊长于雄蕊,羊角型椒。第 2 组群包括材料 3 和 22,分枝少,叶节色为紫色,茎和叶面没有绒毛,指型果实表面光滑,果面没有棱沟,叶脉、花冠、花柱、青熟果都是紫色。第 3 组群包括材料 18、20 和 19,植株直立,茎和叶面没有绒毛,卵圆形叶片,果实向上,果面没有棱沟,每个腋节有多个花,其牛角型的果实表面有棱沟,果实朝下生长。第 4 组群包括材料 1、2、17、39、41、7、42 和 15,早熟,叶节是紫色的,绿色叶的表面平滑,雌蕊长于雄蕊。第 5 组群包括材料 10、16、11、29、32、14、5、36、和 21,熟期晚,植株直立,分枝少,茎上没有绒毛,第 6 组群包括材料 27、38、8、13 和 37,分枝少,主茎绿色,果实表面光滑,第 7 组群包括材料只有 1 份,40,青熟果黄白色,短指型,植株矮小,仅 30 cm 高度。

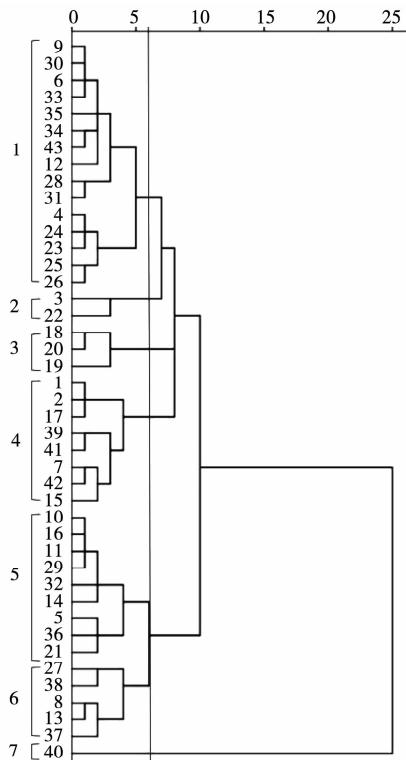


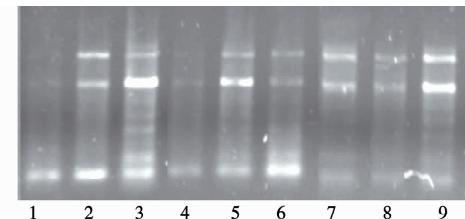
图 1 43 份辣椒种质表型的聚类图

Fig. 1 Phylogenetic tree of 43 pepper accessions based on morphologies

2.2 SRAP 扩增体系的优化

以辣椒 11 号叶片为材料,利用正交设计直观分析法对辣椒 SRAP 反应体系中各组分(Mg^{2+} 、引物、*Taq* DNA 聚合酶和 dNTP)的浓度进行优化。对 PCR 扩增结果(图 2)由高到低依次打分,条带清晰度最高的记为 9 分,最低的记为 1 分,9 个组合的分数(从 1 到 9)依次为 1、5、9、3、8、6、4、2、7。

同一因素在同一水平下的分数之和越大,该反应水平越好,在选定的 3 水平范围内,4 个因素的主次顺序为引物、*Taq* DNA 聚合酶、 Mg^{2+} 浓度、dNTP 浓度(表 3)。极差越大,该因素对反应体系的影响越显著,SRAP-PCR 反应中 4 个组分的最佳反应水平为引物为 $0.30 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, *Taq* 酶为 $0.75 \text{ U} \cdot 20 \mu\text{L}^{-1}$, dNTP 为 $0.20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, Mg^{2+} 为 $2.50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。



编号同表 1;引物组合为 me4/em2。

The same number in Table 1; The primer combination is me4/em2.

图 2 PCR 扩增体系优化

Fig. 2 PCR amplification system optimization

表 3 PCR 反应体系的正交直观分析

Table 3 Orthogonal intuitionistic analysis of the PCR reaction system

结果 Result	Mg^{2+} 浓度 Mg^{2+} concentration	引物 Primer	<i>Taq</i> DNA 聚合酶 <i>Taq</i> DNA polymerase	dNTP 浓度 dNTP concentration
T1	15	8	9	16
T2	17	15	15	15
T3	13	22	21	14
k1	5.00	2.67	3.00	5.33
k2	5.67	5.00	5.00	5.00
k3	4.33	7.33	7.00	4.67
R	1.34	4.66	4.00	0.66

2.3 引物筛选

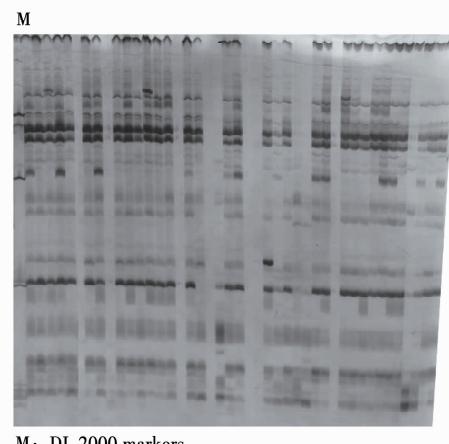
采用优化的 PCR 反应体系筛选出 28 个引物组合条带多且具有多态性的引物。随机选择 6 份

材料(2、7、11、17、26、38)为试验材料,对144对引物组合进行筛选。144对引物组合中,94对可以扩增出清晰的条带,每对引物平均扩增的清晰条带数为8.34条,其中多态性比率为13.90%。从中筛选出28对(me1-em2、me1-em3、me1-em4、me1-em5、me1-em6、me1-em7、me1-em11、me1-em12、me2-em2、me2-em4、me2-em7、me2-em9、me2-em10、me3-em1、me3-em7、me4-em4、me5-em2、me5-em4、me5-em6、me5-em7、me6-em3、me7-em4、me7-em6、me8-em1、me8-em3、me8-em5、me9-em1和me12-em5)带型清晰且多态性丰富的引物用于种质资源的SRAP分析。

2.4 基于SRAP标记的辣椒种质的聚类分析

部分辣椒材料的SRAP扩增产物的电泳结果见图3。经聚类分析,43份辣椒种质间的相似系数分布在0.59~0.96。在0.72的相似系数处,

供试材料被分为6个组群(图4)。



M: DL 2000 markers.

图3 引物组合me1-em6对部分材料的扩增结果

Fig. 3 Amplification result of primer pair me1-em6 in portion accessions

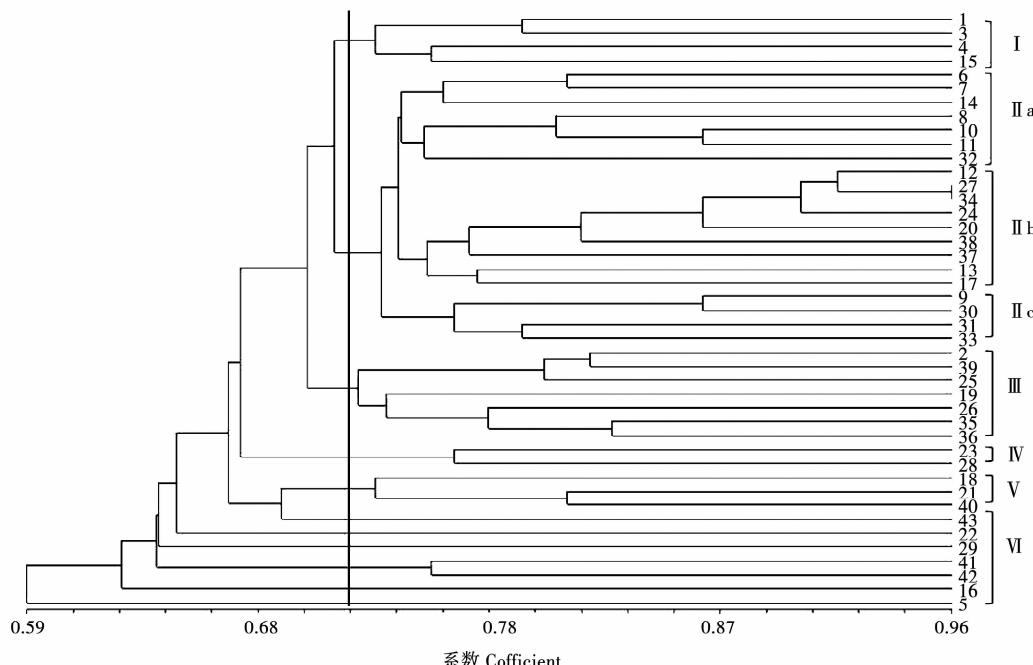


图4 辣椒种质资源的聚类图

Fig. 4 The clustering figure of hot pepper germplasm resources

第Ⅱ组群的材料数目最多(20份),包括供试材料的近一半,是最大的组群。在0.74的相似系数处,可以将其进一步分为3个亚组,a亚组包括7份材料(6、7、14、8、10、11、32),主茎为绿色,上面只有少量分枝、果实垂直朝下生长;b亚组包括9份材料(12、27、34、24、20、38、37、13、17),主茎上只有少量分枝,叶片为深绿色,果实表面光滑;c亚组包括4份材料(9、30、31、33),主茎上只

有少量分枝,短羊角型果实的表面光滑。第Ⅰ组群包括4份材料(1、3、4、15),主茎上只有少量分枝,茎节为紫色,果实向侧下生长。第Ⅲ组群包括7份材料(2、39、25、19、26、35、36),叶片是长卵圆形,叶面平滑,雌蕊长于雄蕊。第Ⅳ组群包括2份材料,23和28,植株直立生长、主茎上只有少量分枝,茎节为紫色,叶片是深绿色、卵圆形,叶片微皱无绒毛,成熟果实是鲜红色。第Ⅴ组群包括3份

材料(18、21、40),茎节是浅紫色,茎上没有绒毛,叶片平滑也没有绒毛,果实向上直立生长,果实表面光滑,成熟果实是鲜红色。其余7份材料都归为第Ⅵ组(43、22、29、41、42、16、5),茎上没有绒毛,叶片平滑,花柱是紫色的。

3 结论与讨论

3.1 性状数目对形态学分类的影响

在前人研究中,形态学聚类分析多依据少数几个性状,分类以果形为主要依据^[1]。本研究的辣椒形态学聚类分析由28个形态学性状共同决定,在单一性状中的性状描述也更为详尽。参与聚类的性状越多,单一组群中的单一性状的表现型越多,多组群的多个性状使得聚类分组更为复杂。形态学聚类分析与SRAP分类比较后发现,两种分类结果相似性很高,说明性状数目影响形态学分类,性状数目越多,形态学分类的准确性越高。

3.2 SRAP 分类与形态学分类比较

比较全面的辣椒形态学性状调查增加了形态学分类与SRAP标记分类比较的可信性。SRAP分类与形态学分类比较,亲缘关系相似性高。1、15(I组、2组),10、11、14、32(II组a、6组),9、30、31、33(II组c、1组),12、24、34(II组b、1组),13、27、37、38(II组b、5组),25、26、35(III组、1组),2、39(III组、2组),23、28(IV组、1组),41、42(VI组、2组),5、16、29(VI组、6组),共29份品种,占辣椒材料总数(43)的67.44%,两种分类法都体现了这29个品种的亲缘关系近,也暗示了两种方法的分类结果是可信的,对育种亲本的选择具有一定的借鉴作用。

根据形态特征的表现与SRAP标记的聚类不完全一致,可能是因为本试验所调查的形态学性状也只是辣椒表型性状的一部分,如抗病性、抗逆性等表型性状不在调查范围内,而SRAP标记是以整个辣椒基因组为分析目标的;或是因为形态性状的表现是某些功能基因表达在内外因素的共同作用下的结果,而SRAP标记是DNA结构上的差异,这种差异不一定都能表现在形态上^[10]。

3.3 引物筛选

引物组合144份,94份引物组合条带清晰,条带数目多。其它引物条带数目少、不清晰或没有条带,这种类型的引物组合集中于me3-me12与em8-em12组合。潘俊松等^[9]自行设计了5个引物,与其它引物共组成182个引物组合,从中筛

选出64个条带多且清晰的引物组合。说明SRAP引物需要鉴定筛选。SRAP标记通过独特的双引物设计对基因的开放阅读框的特定区域进行扩增,上游引物对外显子区域进行特异扩增,下游引物对内含子区域、启动子区域进行特异扩增,因不同个体以及物种的内含子、启动子与间隔区长度不同而产生多态性。SRAP上游引物间的区别在于3'端的3个选择碱基,下游引物间的区别也同样如此^[8]。只有部分引物组合条带多且清晰,说明3'端的3个选择碱基与生物的基因序列的结合有偏好性,不是所有的3个选择碱基都能与基因序列结合。

94对扩增出清晰条带的引物,可以用于遗传图谱的构建和亲缘关系分析等,28对带型清晰且多态性丰富的引物,可以用于种子纯度鉴定。

3.4 辣椒材料的选择

利用28对引物分析43份辣椒品种之间遗传相似系数在0.59~0.96,本研究采用的材料是常见的辣椒种质资源。说明常见的辣椒品种的遗传多样性相对较少,遗传基础相对较窄,为了提高育种效率,应扩大辣椒种质的来源范围,以拓展辣椒的遗传基础。

参考文献:

- [1] 张素勤,耿广东,周贤婷,等.贵州辣椒种质资源的表型和SRAP分析[J].山地农业生物学报,2008,27(3):228-232.
- [2] 张兴桃,王林,高贵珍,等.安徽省辣椒品种遗传多样性的SRAP分析[J].分子植物育种,2016,14(9):2519-2525.
- [3] 李宁,杨涛,帕提古丽,等.适于新疆制干类型辣椒种质资源遗传多样性的SRAP和SCoT分析[J].分子植物育种,2017,15(8):3331-3340.
- [4] 周坤华,陈学军,方荣,等.辣椒种间(*Capsicum annuum* × *C. frutescens*)遗传图谱的构建与分析[J].园艺学报,2013,40(11):2171-2179.
- [5] Ji J J, Huang W, Yin Y X, et al. Development of a SCAR marker for early identification of S-cytoplasm based on mitochondrial SRAP analysis in pepper (*Capsicum annuum* L.)[J]. Molecular Breeding,2014,33(3):679-690.
- [6] 李亚利,扈新民,赵丹,等.运用SRAP分子标记鉴定辣椒杂交种纯度[J].中国农学通报,2010,26(24):67-70.
- [7] 李锡香,张宝玺,沈镝,等.辣椒种质资源描述规范和数据标准[M].北京:中国农业出版社,2006.
- [8] Li G, Quiros C F. Sequence related amplified polymorphism(SRAP), A new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in *Brassica*[J]. Theoretical and Applied Genetics,2001,103(2):455-461.
- [9] 潘俊松,王刚,李效尊,等.黄瓜SRAP遗传连锁图的构建及始花节位的基因定位[J].自然科学进展,2005,15(2):167-172.
- [10] 李锡香,朱德蔚,杜永臣,等.黄瓜种质资源遗传多样性的RAPD鉴定与分类研究[J].植物遗传资源学报,2004,5(2):147-152.

王伟,董绪友,曹平平,等.黑龙港流域不同浇水次数对小麦的影响[J].黑龙江农业科学,2019(5):12-15.

黑龙港流域不同浇水次数对小麦的影响

王 伟¹,董绪友²,曹平平¹,王伟伟¹,于 亮¹,王奉芝¹,钮力亚¹

(1. 沧州市农林科学院,河北 沧州 061000;2. 老湖镇农技站,山东 泰安 271511)

摘要:为探讨适合黑龙港流域种植的小麦品种以及配套的节水稳产技术,研究了不同浇水次数对小麦产量的影响。结果表明:为节约水资源,宜优选春季灌水1次,在拔节期浇水,结合浇水追施尿素225 kg·hm⁻²;在同等土壤肥力和栽培条件下,为提高产量,宜优选烟农172、尧麦16、邯115276、洛麦7号和济麦23;3种浇水处理条件下,株高均直接或间接地对产量产生显著影响,一定程度下株高越高产量相应越高。

关键词:小麦;限水;黑龙港流域

小麦是我国重要的粮食作物,在粮食生产中具有举足轻重的作用。黑龙港流域属暖温带半干旱半湿润季风气候,是河北省小麦生产主产区,也是河北省小麦低产区。黑龙港流域地下水超采极其严重,水资源严重匮乏,过量的地下水开采已引起很严重的生态问题^[1]。因此,国家限制华北区域地下水的开采。由于沧州小麦均属于井灌生产,限采必然会影响小麦生产,必须积极应对。小麦灌浆期没有充分的水分,育种家只有通过改良

品种,延长灌浆时间,让籽粒更加饱满^[2]。该地区种植的小麦品种必须具备良好的丰产性,对光、水、肥的利用率高^[3]。选育高产、优质、广适、抗逆性好的小麦品种,是目前小麦育种的重要方向^[4]。本研究为探讨适合黑龙港流域的种植的小麦品种以及节水稳产技术,研究不同浇水次数对小麦产量的影响,以期达到节水稳产的目的。

1 材料与方法

1.1 材料

选用19个小麦品种作为试验材料,其中18个是国家小麦产业技术体系提供的适合黄淮北片种植的小麦品种,包含烟农172、尧麦16、邯115276、洛麦7号、济麦23、临091、潍1917、衡S29、中麦4072、科源088、石10-4393、科农2011、泰科麦33、邢麦13、沧麦028、聊麦18、滨BY-34和安麦1号,并设当地推广品种农大399为对照。

Analysis of Morphology and SRAP of Pepper Germplasm Resources

HE Wei, ZHANG Hui, WANG Ying

(Institute of Horticulture, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150069, China)

Abstract: In order to explore the genetic diversity and genetic relationship of pepper germplasms, 43 pepper germplasms were analyzed by morphology and SRAP molecular markers. The results showed that cluster analysis based on 28 morphological characters of pepper could be clustered into 6 groups at 6 genetic distance coefficients. Among 94 pairs of SRAP primer combinations, the average number of clear bands amplified by each pair of primers was 8.34, and the polymorphism ratio was 13.90%. 28 pairs of primers with rich polymorphism were selected for SRAP analysis. The similarity coefficient of 43 pepper germplasms ranged from 0.59 to 0.96, and divided into 6 groups at 0.72 similarity coefficient. SRAP clustering and morphological clustering have high similarity, both of them can provide some reference for genetic analysis and selection of breeding parents of pepper.

Keywords: *Capsicum annuum* L.; morphology; SRAP; cluster analysis