

贵州省加工型辣椒资源 RSAP 分析

左泽彦, 吴拥军*, 罗 熹, 吴玉俊, 卢 彪

(贵州大学 生命科学学院, 贵州 贵阳 550025)

摘要: 利用 RSAP 标记技术对贵州省的 20 份加工型辣椒种质资源进行评价, 以期为辣椒品种选育提供依据。结果表明, 3 对引物共扩增出 72 条带, 其中 47 条为多态性条带, 多态性比例为 65.3%, 平均每对引物产生 24 条多态性条带, 片段大小为 100~2 000 bp。聚类分析结果表明, 20 份材料的遗传相似系数变化范围为 0.625~0.931, 果形性状在聚类图中呈随机分布, 表明贵州省加工型辣椒种质间存在着丰富的遗传多样性。

关键词: 加工型辣椒; 种质资源; 限制性位点扩增多态性; 聚类分析

中图分类号: S641.3 文献标志码: A 文章编号: 1004-3268(2012)07-0116-04

The RSAP Analysis on Processing Pepper Resources in Guizhou Province

ZUO Ze-yan, WU Yong-jun*, LUO Xi, WU Yu-jun, LU Biao

(College of Life Sciences, Guizhou University, Guiyang 550025, China)

Abstract: Twenty varieties of processing pepper in Guizhou province were identified by RSAP markers, which provided evidence for breeding of processing pepper and increased stability of product quality in production enterprises. Three pairs of RSAP primers were screened and they produced 72 amplified fragments, 47 of which (65.3%) were polymorphic, with an average of 24 polymorphic fragments for each primer-pair and size ranging from 100 bp to 2 000 bp. The value of genetic similarity among 20 pepper accessions based on UPGMA varied from 0.625 to 0.931. The characters with different fruit shapes randomly distributed in the dendrogram, indicating that the genetic diversity of processing pepper cultivars from Guizhou province were abundant.

Key words: processing pepper; germplasm resources; RSAP; cluster analysis

加工型辣椒是指采收红椒、酱红椒或者老熟青椒, 口感辛辣或半辛辣并用于加工的辣椒品种类型。除可直接鲜食外, 还可干制、酱制、泡制加工成各种辣椒制品, 也可以作为农产品加工的调料, 或经过深加工从中提取辣椒红色素、辣味素, 作为化妆品生产和食品生产的天然原料^[1-2]。贵州现有辣椒加工企业 130 余家, 具有一定规模的有 20 多家, 其辣椒的种植规模、加工业规模、产品集散规模等均居全国第一, 辣椒产业已成为贵州省最重要的特色农业产业之一。目前, 围绕着加工型辣椒及其制品, 贵州已形成了以

贵阳南明老干妈风味食品有限责任公司为龙头, 百余家辣椒食品加工企业为主体的贵州辣椒食品加工企业群, 其中, 油辣椒产品已占全国市场份额的 70% 以上, 2005 年贵州干辣椒及辣椒制品总产值超过 30 亿元, 预计到 2015 年, 总产值将达到 50 亿元。

由于加工型辣椒对辣味、色泽、油分、香气等品质指标和商品指标有特殊的要求, 因此需要专用品种。贵州省生产企业使用的辣椒原料多由不同品种按照一定比例混合而成, 因此, 炒制出的辣椒制品风味就会出现差异。同时, 生产企业对使用的辣椒品

收稿日期: 2012-03-01

基金项目: 贵州省农业公关项目(黔科合 NY 字[2010]3021 号)

作者简介: 左泽彦(1985-), 男, 山东栖霞人, 在读硕士研究生, 研究方向: 生物化学与分子生物学。E-mail: zuozeyan2008@163.com

* 通讯作者: 吴拥军(1971-), 男, 河南濮阳人, 教授, 博士, 主要从事食品生物技术研究。E-mail: wujbio@163.com

种多以感官进行判断,也会影响加工成品品质的稳定性。种质资源是育种的基础,只有充分了解种质间的遗传差异,才能选配出较强的优势组合,而利用分子标记技术已成为研究作物种质资源的有效方法^[2]。RSAP (restriction site amplification polymorphism)即限制性位点扩增多态性,是通过简单的梯度 PCR 反应,针对基因组内普遍存在的酶切位点来产生多态性标记。RSAP 的引物是依据序列相关扩增多态性 (SRAP, sequence related amplified polymorphism)的引物设计原理建立的,使用 1 对由 17~18 个碱基组成的引物序列,5'端前 12~14 个碱基为没有特殊组成的填充序列,3'端的选择性碱基为 4~6 个碱基组成的限制性内切酶的酶切位点序列。依据引物内 3'端选择性碱基,即因基因组

内限制性内切酶位点的不同而产生多态性^[3]。本研究采用 RSAP 分子标记技术对贵州省的 20 份辣椒种质资源进行分析,旨在为辣椒优良资源的发掘、利用及加工型辣椒的选育提供科学依据,进而促进生产企业对加工型辣椒品种的鉴定,保证成品品质的稳定性。

1 材料和方法

1.1 材料

贵州省加工型辣椒种质资源较为丰富,根据其产地、长度、辣度等特征差异,搜集了来自贵州省不同辣椒市场及辣椒加工公司的 20 份加工型干辣椒(表 1)作为试验材料。主要试剂购自大连宝生物工程(大连)有限公司。

表 1 供试加工型辣椒性状

编号	品种	果实长度/cm	果实宽度/cm	果实厚度/cm	籽粒个数/个	产地
1	遵义条子-1	6.06	1.20	0.72	83	遵义虾子市场
2	遵义条子-2	6.03	1.23	0.83	90	遵义虾子市场
3	遵义条子-3	6.11	1.17	0.50	10	遵义虾子市场
4	遵义韩国条	5.59	0.89	0.52	69	遵义虾子市场
5	遵义条子-4	4.83	1.16	0.56	50	遵义虾子市场
6	遵义条子-5	2.81	1.89	1.82	13	遵义虾子市场
7	遵义满天星	3.96	0.93	0.55	37	遵义虾子市场
8	遵义七星椒	4.36	0.93	0.49	66	遵义虾子市场
9	七星椒	4.36	1.04	0.76	82	遵义虾子市场
10	满天星	4.31	0.93	0.61	61	贵阳
11	花溪党武辣椒	9.96	1.50	0.86	110	花溪
12	河南三樱椒	4.79	1.21	0.67	50	贵阳
13	遵义灯笼椒-1	4.89	1.07	0.75	78	遵义虾子市场
14	小圆椒	3.62	1.68	1.58	151	遵义虾子市场
15	遵义灯笼椒-2	3.68	2.70	1.93	209	遵义虾子市场
16	河南子弹头	3.85	1.36	0.82	34	遵义虾子市场
17	遵义子弹头	2.94	1.34	1.15	57	遵义虾子市场
18	灯笼椒	3.64	2.68	2.11	125	贵阳
19	兴仁辣椒	10.4	1.70	0.90	114	杏仁
20	贞丰辣椒	7.08	1.32	0.73	87	贞丰

1.2 方法

1.2.1 加工型辣椒种子基因组 DNA 的提取 称取加工型辣椒种子 0.1 g,于液氮中充分研磨成粉末后迅速转移到 1.5 mL 的离心管中,按照植物基因组 DNA 提取试剂盒(目录号:DP 305-03,北京 TIAGEN 生化科技有限公司)的操作手册提取辣椒种子基因组 DNA,用 0.7%琼脂糖在 1×TAE buffer 中,以 5 V/cm 电泳 0.5 h 后,在凝胶成像系统中拍照检测 DNA 的纯度及完整度。用紫外分光光度计检测其质量和浓度后,用 TE 缓冲液稀释 DNA 至同一浓度,放入-20℃冰箱储存备用。

1.2.2 引物设计及 PCR 扩增 设计的 RSAP 引物序列见表 2。RSAP-PCR 扩增反应体系(15 μL)为:模板 DNA 50 ng,10×buffer 1.5 μL,dNTPs 1.2 μL,引物 A 0.5 μL,引物 B 0.5 μL,Taq 酶 1 U,加三蒸水补足 15 μL;RSAP 反应程序为 95℃5 min,1 个循环;95℃1 min,35℃1 min,72℃1 min,5 个循环;95℃1 min,47℃1 min(退火温度随引物而定),72℃1 min,30 个循环;72℃10 min,4℃下保存。扩增产物通过 6%的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测,并按许绍斌等^[4]报道的银染法进行染色。

表 2 RSAP 引物编号与引物序列

引物编号	引物序列(5'-3')	限制酶切位点
CS1	ATTACAACGAGTGGATCC	GGATCC
CS2	CACAGCACCCACTTTAAA	TTTAAA
CS3	TATCTGGTGAGGGATATC	GATATC
CS4	ATTGGAAGTGGTCTCTAGA	TCTAGA

1.3 数据处理

RSAP 扩增产物按在相同迁移位置上(相同分子量片段)有带记为“1”,无带记为“0”,全部以 1、0 统计建立数据库,并转换为数值矩阵,用 NTSYSpc 2.10 e 分析软件中的 Qualitative data 进行矩阵分析,以 SAHN Clustering 进行相似性系数计算,UPGMA 法构建亲缘关系树状图。聚类结果等级界线的划分参照陈守良等^[5]的方法。

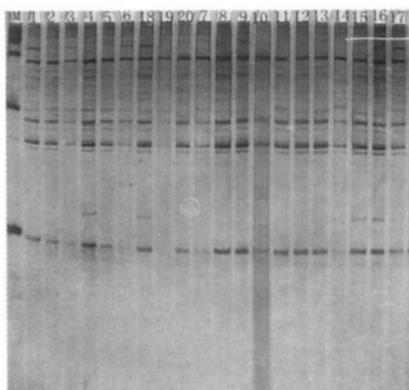
2 结果与分析

2.1 RSAP 引物扩增多态性分析

采用筛选出的多态性好、稳定性高的 3 对 RSAP 引物(表 3)对 20 份加工型辣椒种质资源进行 PCR 扩增分析。结果表明,这 3 对引物共扩增出 72 条带,其中 47 条具有多态性,多态性比率为 65.3%。不同引物扩增的条带数在 22~25 条,平均 24 条(表 3),其片段大小介于 100~2 000 bp(图 1)。其中 CS1、CS3 引物扩增的条带数为 25 条,CS2、CS3 引物扩增的条带数为 22 条。不同引物扩增出

表 3 3 对引物对 20 种辣椒的扩增结果

引物组合名称	产生条带数/条	多态性条带数/条	多态率/%
CS1、CS3	25	17	68
CS2、CS3	22	13	59.1
CS3、CS4	25	17	68
总计	72	47	—



1-20 为品种编号

图 1 CS3、CS4 引物的扩增结果

的条带数多态性有明显的差异,其中 CS2、CS3 引物扩增产生的条带多态率为 59.1%。通过对 20 份供试加工型辣椒资源的 RSAP 分析发现,不同引物产生的谱带数及多态性存在很大差异,其中 CS3、CS4 引物和 CS1、CS3 引物表现的多态性高于 CS2、CS3 组合,可以有效地鉴别供试辣椒材料。因此,RSAP 标记在检测辣椒种子基因组遗传多态性上有较显著的检出效率。

2.2 基于 RSAP 标记的辣椒遗传多样性评价

对扩增结果的遗传多样性分析表明,20 份加工型辣椒种质资源的遗传相似系数介于 0.625~0.931,其中遵义条子-2 与满天星之间的遗传相似性系数最低,为 0.625,而遵义灯笼椒-1 与小圆椒之间的相似性系数最高,为 0.931。

按照 Nei-Li 法计算参试材料之间的遗传距离,并构建了聚类图(图 2)。以相似系数 0.754 为阈值,20 份供试材料可聚为 3 个类群。自上而下,第 1 个类群包括 16 个样品,占总数的 80%;而第 2 个类群 2 个,占总数的 10%;第 3 个类群包括 2 个样品,占总数的 10%,说明第 2、3 类群的 4 个材料与其他的材料遗传差异较大。进一步对第 1 类群的 16 个样品进行聚类分析,以相似系数 0.799 为阈值,可将其分为 3 个亚类群:第 1 亚类群包括 13 个样品,占该类群的 81.25%;第 2 亚类群包括 2 个样品,占该类群的 12.5%;第 3 个亚类群包括 1 个样品,占该类群的 6.25%。从局部结果来看:从遵义市场采集的遵义灯笼椒-1 与小圆椒被优先聚为一类,其相似系数为 0.931;遵义满天星与遵义七星椒在相似系数为 0.804 时被聚为一类,与遵义韩国条、遵义条子-4 和遵义条子-3 却分属不同类群且遗传差异较大。其中,遵义条子-1 与遵义条子-2 在阈值 $L=0.799$ 处分属两大类,遵义七星椒、七星椒与

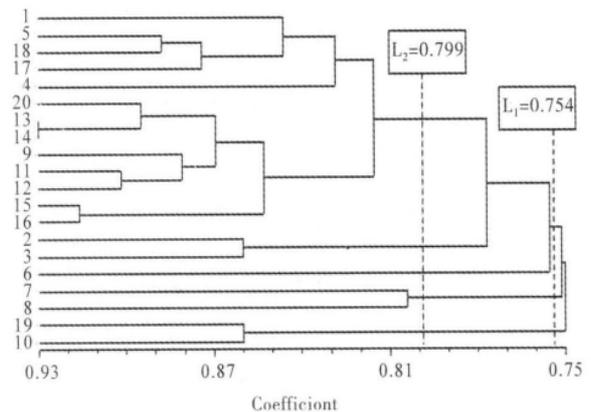


图 2 基于 RSAP 数据的 20 份加工型辣椒的聚类分析结果

满天星辣椒相似系数较低。由此可见,贵州遵义的加工型辣椒具有丰富的遗传资源可供利用。

3 讨论

物种的遗传多样性状况可反映出该物种的遗传背景、育种潜力和利用价值,是生物多样性研究的核心,对种质保护和发掘利用具有重要意义^[6]。加工型辣椒种质资源的多样性是培育新品种的重要物质基础,同时也是加工企业生产优质产品的保障。目前,贵州省主要加工型辣椒品种是灯笼椒、花溪辣椒、子弹头辣椒、条子辣椒等。辣椒资源的大面积推广,造成了地方性辣椒基因资源的大量流失。因此,加强对加工型辣椒种质资源的评价和利用,对当前加工型辣椒的遗传稳定性具有重要意义。

从聚类分析结果来看,果形相似的品种没有聚在一起,而是呈随机分布,似乎品种间的遗传距离与其果形性状没有相关性,与张璐等^[7]用 RAPD 聚类分析栽培辣椒品种得出了相似的结论,即辣椒品种的遗传相似性与果味或果形之间总体上无相关性。因此,在加工型辣椒遗传育种及种质资源鉴定与评价研究中,应该尽可能把分子生物学技术与其风味物质鉴定相结合,对各品种资源进行遗传分析,以提高加工型辣椒种质资源的利用效率。研究结果表明,在同类果形加工型辣椒资源中可以筛选到遗传距离相对较大的材料,这一点对加工型辣椒杂种优势利用有一定的指导作用,相关的验证工作正在进行中。

RSAP 分子标记技术前 5 个循环采用较低的退火温度(35 ℃),以保证引物通过部分匹配与模板结合,提高扩增效率;后 35 个循环采用较严谨的退火温度(43~46 ℃),对已扩增的片段进行特异性扩增,以保证扩增产物的稳定^[3]。在 RSAP 条带统计过程中,本研究只对条带的出现与否进行了统计,而未对条带的强弱进行分析。实际上扩增条带的强弱在一定程度上也能反映 DNA 水平的变化,如拷贝数的多少等^[8]。本试验采用了 3 对 RSAP 引物对

20 份加工型辣椒种子进行分析,共扩增出了 72 条带,多态性比率为 65.3%,遗传多样性表明,20 份辣椒种质资源的遗传相似系数介于 0.625~0.931。遵义条子-1 与遵义条子-2,遵义七星椒、七星椒与满天星辣椒从形态上不易区分,基于 RSAP 分析及其聚类图可以明显区分开来,其中,遵义条子-1 与遵义条子-2 在阈值 $L=0.799$ 处分属两大类,遵义七星椒、七星椒与满天星辣椒相似系数较低。本研究结果表明,RSAP 适用于加工型辣椒种质资源的遗传分析,可以此创新出多种类型的优异资源,以拓展、丰富辣椒基因库,更好地保护辣椒品种及鉴别加工品质。

参考文献:

- [1] 杜晓华,王得元,巩振辉.一种新型 DNA 标记技术——限制性位点扩增多态性(RSAP)的建立与优化[J].西北农林科技大学学报:自然科学版,2006,34(9):45-54.
- [2] 林清,雷开荣,吴红,等.加工型辣椒资源 RAPD 聚类分析[J].中国蔬菜,2006(增刊):70-72.
- [3] 乔利仙,翁曼丽,孔凡娜,等.RSAP 标记技术在紫菜遗传多样性检测及种质鉴定中的应用[J].中国海洋大学学报,2007,37(6):951-956.
- [4] 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.
- [5] 陈守良,徐克学,盛国英.中国散生竹类的数量分类和确定分类等级的探讨[J].植物分类学报,1983,21(2):113-120.
- [6] 姬广海,钱君,张世光,等.云南水稻抗白叶枯病品种的遗传多样性初报[J].中国水稻科学,2003,17(2):118-122.
- [7] 张璐,杨若林,刘文轩,等.辣椒部分栽培种遗传相似性的 RAPD 分析[J].上海大学学报:自然科学版,2003,9(5):433-437.
- [8] Wang X L, Yang Y X, Cong Y Z, et al. DNA fingerprinting of selected *Laminaria* (Phaeophyta) gametophytes by RAPD markers[J]. Aquaculture, 2004, 238: 143-153.