

辣椒过氧化物酶同工酶研究 及模糊聚类分析

马德华

王 鸣

(天津市黄瓜研究所, 天津) (西北农业大学园艺系, 杨陵)

摘 要

以辣椒属 (*Capsicum*) 的 7 个种 (包括 4 个变种、3 个类型) 计 172 个品种为试材, 于成株期取功能叶片进行制样分析, 得出过氧化物酶 (POD) 同工酶的基本酶谱为 12 条酶带, 并将 172 份材料中各个种、类型出现的过氧化物酶同工酶表型频率用模糊聚类分析 (fuzzy cluster analysis) 方法进行动态聚类。结果表明, *C. annuum* 的两个变种关系极近; *C. baccatum* 的两个变种关系也很近; *C. chinense* 与 *C. frutescens* 关系较近, 这两个种及 *C. praetermissum* 与 *C. annuum* 关系亦较近, 而 *C. annuum* 与 *C. baccatum*、*C. eximium*、*C. chacoense* 关系则较远。从而得出, 普通栽培辣椒, 首先应该利用其野生种 *C. annuum* var. *annuum* 的有用基因, 其次是 *C. frutescens*、*C. chinense* 及 *C. praetermissum*, 最后才应当考虑利用 *C. eximium*、*C. baccatum* 及 *C. chacoense* 的有用基因。据此对辣椒属的起源、分类及上述种质材料在育种上的应用问题进行了讨论。

关键词 辣椒属 种质资源 同工酶 模糊聚类分析

引 言

随着辣椒育种的发展, 其种质资源在育种中的地位愈来愈显得重要。由于病害日益严重, 而普通栽培辣椒 (*Capsicum annuum* var. *annuum*) 中又不存在抗病毒 (尤其是 CMV) 病的抗原, 因此, 许多国家的育种工作者致力于弄清普通栽培辣椒与其野生种及近缘种的关系, 以期把抗性基因导入普通栽培辣椒。Pickersgill B. (1971, 1980), Egawa Yoshinobi (1985), Pickersgill B. (1979) 分别从形态学、细胞学及数值分类学等方面做了大量有助于理解辣椒属种间关系的研究, 但均未指明普通栽培辣椒利用其他基因的顺序。同工酶技术

注: 巩振辉同志协助工作, 谨致谢意。

自1959年被提出以来,迅速得到极其广泛的应用,但在辣椒上的研究起步较晚。McLeod (1977)研究不同花色种群的辣椒酯酶同工酶,发现白花种紫花种群的同工酶谱不尽相同,同时认为*C. cardenasii*和*C. eximium*应属于同一个种。李佩华(1985),McLeod (1983a, 1983b)也曾研究了辣椒同工酶与种间关系,但亦未指明各种间关系的远近程度。针对前人研究的不足,本试验将生化研究与数理分析结合起来,试图利用模糊聚类分析方法对同工酶研究结果进行整理分析,以确定普通栽培辣椒利用辣椒属其它物种基因的顺序,澄清我国对辣椒属分类的一些模糊认识,填补国内这一领域的某些空白,从更深入的层次上探讨这些材料对改良我国栽培辣椒的利用价值,为我国丰富的辣椒种质资源的整理、分类、研究、利用提供资料。

材料与方法

本试验是西北农业大学园艺系“辣(甜)椒种质资源及育种研究”课题的一部分,试材为近年由国内外搜集的172份辣椒属材料,均经三代以上自交选纯,于1986年1月至10月在西北农业大学蔬菜试验站进行,育苗移栽及田间管理同一般生产田。

一、样品采集与制备

于成株期取生长正常、无病虫害的功能叶片,经蒸馏水洗净后用滤纸吸干,然后取1克左右,称至0.001克,加入等量的PH8.0 TrisHCl样品提取液及40%蔗糖,在冰冻研钵中研至匀浆,5000转/分离心15分钟,取上清液为粗酶液。

二、同工酶分离及显现

采用聚丙烯酰胺不连续垂直板凝胶电泳,参照黄永芬(1983)提供的方法进行,过氧化物酶同工酶染色方法采用联苯胺—过氧化氢系统,同工酶区带的相对迁移率(R_f)计算参照Kuhns(1978)介绍的方法,相关系数计算按刘福(1985)的方法进行。

结果与讨论

关于辣椒过氧化物酶同工酶虽有研究报道,但不系统。韩发(1985)、李佩华(1985)、Eshbaugh(1975, 1979)、McLeod(1979, 1983)等从不同方面对辣椒过氧化物酶同工酶进行了研究,但均未阐明其基本酶谱。本试验对辣椒属7个种计172份材料叶的过氧化物酶同工酶进行了检测,共出现了12条酶带。根据各酶带的迁移率及染色深浅,参考Rick(1983)在番茄上对过氧化物酶同工酶带分区的方法,我们将辣椒属过氧化物酶同工酶带划分为四个区,即 POD_1 、 POD_2 、 POD_3 及 POD_4 区。其基本酶谱及迁移率如图1所示。

为了更清楚地了解辣椒属各种间的相互关系,我们对过氧化物酶同工酶酶带在各个种所出现的频率作了统计,结果列于表1。可以看出,各酶带在辣椒属各种中出现的频率是很不一致的,以 POD_3 酶带表型频率最高(1.00),其次是 POD_1 、 POD_{4b} 、 POD_{4a} 、 POD_{4c} 和 POD_{2d} ,其表型频率均在0.80以上。可见, POD_3 、 POD_1 、 POD_{4b} 、 POD_{4a} 、 POD_{4c} 和 POD_{2d} 这六条带可以视为辣椒属稳定的主要酶带,构成了该属的特征酶谱。

各酶带表型频率的差异,形成了种间酶谱的差异。有些酶带在某些种内有较高的表型频

表 1 辣椒过氧化物酶同工酶带频率 (1987)

酶 带	POD ₁	POD ₂	POD ₃	POD ₄	POD ₅	POD ₆	POD ₇	POD ₈	POD ₉	POD ₁₀	POD ₁₁	POD ₁₂	POD ₁₃	POD ₁₄	POD ₁₅	POD ₁₆
1. <i>C. annuum</i> var. <i>annuum</i> (铃形椒)	1.00	0.27	0.57	0.67	0.88	0.88	0.17	0.78	1.00	0.96	1.00	0.96	1.00	0.96	1.00	0.18
2. <i>C. annuum</i> var. <i>annuum</i> (牛角椒)	1.00	0.42	0.58	0.67	0.83	0.83	0.25	0.92	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.92	1.00	0.25
3. <i>C. annuum</i> var. <i>annuum</i> (红辣椒)	1.00	0.33	0.67	0.83	0.83	0.83	0.33	0.67	1.00	0.83	1.00	0.83	1.00	0.83	1.00	0.17
4. <i>C. annuum</i> var. <i>minimum</i>	1.00	0.25	0.50	0.75	0.75	0.75	0.25	0.75	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.75	1.00	0.25
5. <i>C. chinense</i>	1.00	0.71	0.57	0.71	0.57	0.57	0.29	0.14	1.00	0.43	1.00	0.43	1.00	0.29	1.00	0.14
6. <i>C. frutescens</i>	1.00	0.67	0.33	0.17	0.83	0.83	0.33	0.33	1.00	0.33	1.00	0.33	1.00	0.33	1.00	0.16
7. <i>C. baccatum</i> var. <i>pendulum</i>	0.75	1.00	0.25	0.25	0.75	0.75	0.25	0.50	1.00	1.00	0.50	1.00	1.00	0.25	0.50	0.00
8. <i>C. baccatum</i> var. <i>baccatum</i>	0.75	1.00	0.25	0.50	0.75	0.75	0.25	0.50	1.00	1.00	0.35	1.00	1.00	0.50	0.50	0.00
9. <i>C. chacoense</i>	1.00	0.75	0.25	0.25	0.25	0.25	0.00	0.00	1.00	0.75	0.00	0.75	1.00	0.00	0.00	0.00
10. <i>C. praetermissum</i>	1.00	1.00	0.50	0.25	0.75	0.75	0.00	0.25	1.00	0.75	1.00	0.75	1.00	1.00	1.00	0.25
11. <i>C. eximium</i>	1.00	0.75	0.75	0.50	0.50	0.50	0.25	0.50	1.00	1.00	0.50	1.00	1.00	0.00	0.00	0.00

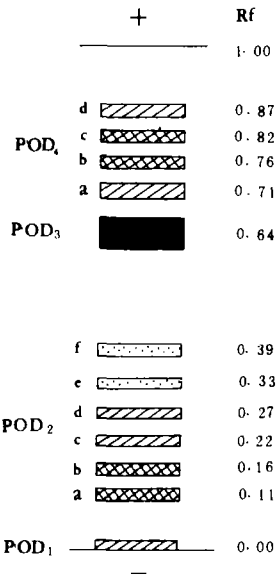


图1 辣椒属过氧化物酶同工酶基本酶谱

了种内品种的分离和种间的关联。所以目前形态分类学上的种，实际上其内部组成是十分复杂的，虽然外部形态上表现一致，而其内在基因组成上可能存在着较大差异，已蕴藏着它种的基因。这在某种程度上说明了为什么辣椒不同种间杂交容易成功（Pickersgill, 1980）的原因。另一方面也为辣椒属普通栽培辣椒种的种内杂交同样可以丰富基因组成的理论提供了依据。所以种内杂交（品种间杂交）依然是一个颇有价值的育种途径，不过种内品种间杂交的局限性也是显而易见的。

在直观分析了过氧化物酶同工酶在辣椒属各个种的表现之后，如何进一步揭示它们之间的亲缘关系很值得进一步深入研究。目前尚未见到这方面的报道。我们就过氧化物酶同工酶带在各个种的表型频率，参考刘福（1985）相关系数法作如下探讨。

根据同工酶带的表型频率，计算两种之间的相关系数：

$$r_{ij} = \frac{\sum_{k=1}^m X_{ik} X_{jk}}{\sqrt{\left[\sum_{k=1}^m X_{ik}^2 \right] \left[\sum_{k=1}^m X_{jk}^2 \right]}}$$

式中 r_{ij} 为第 i 个材料与第 j 个材料间的相关系数， m 为出现的酶带数，本试验中共出现12条酶带，故 $m=12$ 。 r_{ij} 为种间的相关系数，它表示种间关系的远近。种间相关系数越大，表示亲缘关系越近；反之，相关系数越小，则表示亲缘关系越远。各种间的相关系数详列于表2。由表2可知，*C. annuum*的两个变种*C. annuum* var. *annuum*与*C. annuum* var. *minimum*相关系数极高（ $r_{ij}=0.99$ 以上），说明它们之间亲缘关系极近。值得强调的是，这一结果与形态分类学及前述根据过氧化物酶同工酶的分组以及我们所做的杂交试验十分吻合。*C. baccatum*的两个变种相关系数亦很高（ $r_{ij}=0.9813$ ），这也与前人的

率，而在另一些种则表现频率较低，甚至不表现。如 POD_1 在各材料表型频率都很高，唯在*C. baccatum*中却相对较低（0.75），与其种形成了较大的差异。其它酶带也有类似的情况。根据酶谱在种间的异同，有可能帮助我们寻找种间的亲缘关系，并弥补形态分类的不足。

在我们所检测的172个代表品种中，过氧化物酶同工酶带数有极大的差异，出现了8—11条酶带不等，而且在酶带的组合形式上也有很大的不同。这种酶谱差异性在一定程度上说明了辣椒属各种间的差异，即使在同一种内，品种间的差异也客观存在。另一方面，有些属于不同种的品种，而它们的酶谱却又较为相似，由此可见种间种内的酶谱关系是极其复杂的。这表明

表 2 辣椒属各种间相关系数矩阵 R (1987)

编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	1										
2	0.9962	1									
3	0.9920	0.9900	1								
4	0.9942	0.9940	0.9925	1							
5	0.8944	0.8972	0.9299	0.9089	1						
6	0.8926	0.8970	0.9055	0.8937	0.9526	1					
7	0.8686	0.8878	0.8676	0.8756	0.8771	0.9005	1				
8	0.8575	0.8952	0.8793	0.8808	0.8607	0.8581	0.9813	1			
9	0.7102	0.7207	0.7221	0.7303	0.8110	0.7781	0.8865	0.8852	1		
10	0.9211	0.9231	0.9150	0.9057	0.9175	0.9326	0.9060	0.8999	0.7908	1	
11	0.3708	0.8872	0.8940	0.8913	0.9128	0.8730	0.9445	0.9268	0.9046	0.8569	1

注: 编号同表 1。

结论 (McLeod, 1983) 及形态学表现一致。

由 λ 水平可以得出, 因为我们采用相关系数建群, λ 取值都很高, 这一点是不难理解的, 由于试验样本间的相关本身很高, 在聚类过程中只是按相关程度的大小聚类的。正因为如此, 模糊聚类作为数值分类方法才有优越性。如果 λ 水平相距很大, 就说明样本间相似程度很小, 模糊聚类就失去了意义, 在此情况下事实上人们直观就可做出正确判断。

为更好地了解种间的分类和亲缘关系, 按最短距离法进行聚类, 即相关系数最大的两个种归为一组, 再逐个种 (组) 进行相关系数统计, 经过逐级分类归类后, 按种 (组) 间最大相关系数作图, 便得到了辣椒属各种的分类亲缘关系图, 如图 2。由图中可以看出, 除 *C.*

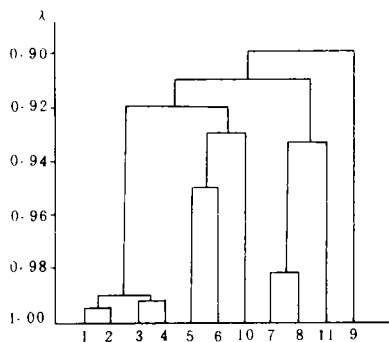


图 2 辣椒属各种亲缘关系聚类图 (编号同表 1)

baccatum 及 *C. annuum* 种内变异较小, 亲缘关系较近外, *C. chinense* 与 *C. frutescens* 亲缘关系亦较近。关于这两个种的关系, Egawa (1985) 通过细胞学研究, 发现 *C. frutescens* 与 *C. chinense* 关系极近, 它们之间杂种形成 12 对二价体。

Pickersgill (1979) 通过数值分类学研究提出它们应该归属于同一个种。McLeod (1983) 通过琼脂平板电泳研究, 也得出 *C. chinense* 与 *C. frutescens* 关系很近的结论。可见虽然采用不同的研究手段, 但各研究者所得结论却十分相似, 在今后育种工作中可以考虑充分利用它们之间的基因交流。

较特殊的一个种是 *C. chacoense*, 它与其它所有的种亲缘关系最远。Eshlaugh (1982) 曾指出, *C. chacoense* 是一个十分特殊的种, 它虽属于白花种, 但却与紫花种亲缘关系较近。由于本试验中未采用紫花材料, 所以它显得与所有试验材料的亲缘关系都很远。

关于辣椒起源与进化问题, 前人已有不少论述, Davenport (1970)、Jett (1973) 曾指出“单元进化说”, 认为现存的辣椒各种是由 *C. frutescens* 在同一时间、同一地点进化而成的。Heiser 等 (1971) 提出了“四元 (或五元) 进化假说”, 即现存的辣椒属各栽培种是由四个或五个野生祖先分别进化而来的。McLeod (1983) 提出了“三元进化假说”, 即三个野生种分别进化成了 *C. pubescens*、*C. baccatum* 及 *C. annuum* 与 *C. frutescens*、*C. chinense* 的复合体。本试验结果也把供试材料分成三个组 (取 $\lambda = 0.925$), 每一组都有一个栽培种及与之关系密切的野生种。由我们的试验结果可以得出辣椒的起源至少不是一元的结论, 本试验结果比较支持 Heiser 等及 McLeod 的多元起源假说。

利用同工酶谱表型频率进行模糊聚类的方法与直接按特征酶带分析所得结论基本相符。根据特征酶带划分, 主要依据的是同工酶酶带“质”的指标, 即主要考虑酶带的特征性差异; 而依据其表型频率则有“概率”的含义, 它是依据不同品种的酶带数量性差异来分组的。这两种方法配合使用可以充分体现出同工酶“质”与“量”的特征, 也可以相互印证所得结果, 使所得结论具有更高的价值和说服力。

本试验结果不仅在理论上对辣椒属的分类和遗传学提供了新的资料, 而且对辣椒育种实

践也具有一定的指导意义。在供试材料中,有许多种是国内尚没有的。目前国内栽培的辣椒均为 *C. annuum* var. *annuum*, 该亚种虽然具有高产优质等特点,但在生产实践中抗病性差是育种工作者亟待解决的问题,尤其是迄今在 *C. annuum* var. *annuum* 亚种内尚未发现 CMV 抗原,因而抗 CMV 育种至今停滞不前。而其野生亚种 *C. annuum* var. *minimum* 及近缘种却拥有很好的抗病基因。如能把异种(或亚种)的抗病基因导入普通栽培辣椒中,对辣椒育种和生产将起重要的推动作用。本试验初步查明了各种间的亲缘关系,即指明了普通栽培辣椒利用其它种基因的顺序:它利用 *C. annuum* var. *minimum* 的基因十分方便,其间的相关系数在 0.99 以上。(这一结论在我们 1986 年所做的杂交试验中也得到了证实)。其次应当利用 *C. chinense*、*C. frutescens* 及 *C. praetermissum* 种的基因。关于 *C. chinense* 及 *C. frutescens* 与 *C. annuum* var. *annuum* 关系较近, Egawa (1984a, 1984b, 1986) 的细胞学研究已证实。最后才应利用 *C. baccatum*、*C. eximium* 及 *C. chacoense* 的基因。Pickersgill (1980) 曾指出,辣椒属的基因在各种间是可以相互交流的,但她未指出交流的顺序。当然这一结果还有待于育种实践的进一步验证和补充。

参 考 文 献

- [1] 李佩华: 辣椒干种籽酯酶同工酶的初步研究,《中国蔬菜》1985 (4), 28—29
- [2] 刘福: 电子计算机在农业上的应用,农村读物出版社, 1985
- [3] 韩发: 辣椒过氧化物酶和吲哚乙酸氧化酶与生长发育的关系,《高原生物集刊》1985 (4), 43—48
- [4] Egawa Yoshinobi et al.: Cytogenetical study of the interspecific hybrid between *Capsicum annuum* and *C. baccatum*, Japan. J. Breed. 31 (1) 1986, 16—21
- [5] Kuhns, L. J. et al.: Distinguishing rose cultivars by polyacrylamide gel electrophoresis I. Extraction and storage of protein and active enzymes from rose leaves, J. Amer. Soc. Hort. Sci., 103 (4) 1978, 503—508
- [6] McLeod M. J. et al.: An electrophoretic study of evolution in *Capsicum* (Solanaceae), Evolution, 37 (3) 1983, 562—574
- [7] Pickersgill, B.: Relationships between weedy and cultivated forms in some species of chilli peppers (genus *Capsicum*), Evolution, 25 (4) 1971, 683—691
- [8] Pickersgill, B. et al.: Numerical taxonomic studies on variation and domestication in some species of *Capsicum*. In: J. G. Hawkes, R. N. Lester and A. D. Skelding (eds.) Academic Press, New York, 1979

Peroxidase Isozyme Study and Fuzzy Cluster Analysis of Capsicum

Ma Dehua

(Tianjin Cucumber Research Institute , Tianjin)

Wang Ming

(Horticultural Department , Northwestern Agricultural University , Yangling)

Abstract

Polyacrylamide gel electrophoresis was employed in the present study . Functional leaves at adult stage of 172 *Capsicum* accessions were sampled for peroxidase (POD) analysis . The basic POD zymogram of *Capsicum* was first presented on their isozyme performances . 12 isoperoxidase bands were determined in its zymogram . Fuzzy cluster analysis was used in exploring the phenotypic POD isozyme bands frequencies of 7 species and 4 subspecies (172 accessions) . It is concluded that the relationship between two subspecies of *C. annuum* and that of the two subspecies of *C. baccatum* is very close , respectively . *C. chinense* was close to *C. frutescens* while these two species are fairly far from *C. praetermissum* . In addition , these three taxa are much farther away from *C. annuum* . The other three species *C. baccatum* , *C. chacoense* and *C. eximium* have a much greater distance to *C. annuum* . The present result provides an order of possibility to use the genes from its close relatives in pepper breeding programs . The genes of *C. annuum* var . *minimum* var . *annuum* then follow *C. frutescens* , *C. chinense* and *C. praetermissum* . It is difficult for *C. annuum* var . *annuum* to use the genes of *Capsicum* , such as *C. chacoense* , *C. eximium* and *C. baccatum* .

Key words: *Capsicum* ; Germplasm ; Isozyme ; Fuzzy cluster analysis