

# 辣椒杂交种 SSR 分子标记鉴定及表型比较分析

刘子记<sup>1</sup>, 李静婷<sup>2</sup>, 杨 衍<sup>1</sup>, 曹振木<sup>1</sup>

(1. 中国热带农业科学院 热带作物品种资源研究所, 农业部华南作物基因资源与种质创制  
重点开放实验室, 海南 儋州 571737; 2. 平顶山学院 资源与环境科学学院, 河南 平顶山 467000)

**摘要:**利用 SSR 分子标记技术对热辣 3 号辣椒杂交种进行纯度鉴定。从 85 对 SSR 引物中筛选出 10 对引物在热辣 3 号亲本间表现明显的多态性, 均为共显性标记。为了提高鉴定结果的准确性, 选用位于辣椒不同染色体上的 3 对共显性标记对热辣 3 号辣椒进行纯度检测, 种子纯度为 99.49%。分子标记鉴定与表型鉴定比较分析表明, 2 种鉴定结果高度一致。研究结果表明, SSR 分子标记可以用于热辣 3 号辣椒杂交种纯度的快速、准确检测。

**关键词:**辣椒; 杂交种; SSR 标记; 纯度检测

**中图分类号:** Q78 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7091(2014)01-0069-04

## SSR Molecular Markers Identification of Pepper Hybrid and Comparative Analysis with Phenotypes

LIU Zi-ji<sup>1</sup>, LI Jing-ting<sup>2</sup>, YANG Yan<sup>1</sup>, CAO Zhen-mu<sup>1</sup>

(1. Tropical Crops Genetic Resources Institute, Chinese Academy of Tropical Agriculture Sciences, Key Laboratory of Crop Gene Resources and Germplasm Enhancement in Southern China, Ministry of Agriculture, Danzhou 571737, China; 2. College of Resource and Environment Science, Pingdingshan University, Pingdingshan 467000, China)

**Abstract:** Establishing a rapid and stable seed purity identification technology system is the effective measure for controlling the pepper hybrid quality. The development of molecular marker techniques could provide an accurate and fast way for identifying the crops hybrid purity. In this study, SSR markers were applied to testing the purity of Rela No. 3. 10 pairs among 85 pairs of SSR primers showed significant polymorphisms between the parents of Rela No. 3. All of them were co-dominant markers. In order to improve the accuracy of identification results, three co-dominant SSR markers located on different chromosomes were selected for purity test of Rela No. 3. The seed purity was 99.49%. Comparative analysis showed that the identification results of molecular markers and phenotypes were highly consistent. The study results indicated that SSR markers could be used for hybrid purity test of Rela No. 3, quickly and accurately.

**Key words:** Pepper; Hybrid; SSR markers; Purity identification

种子是实现农业科技进步的载体。蔬菜生产中广泛使用杂交种, 种子纯度降低会明显影响作物的产量和品质。目前, 我国作物杂交种纯度鉴定仍以田间种植形态鉴定为主, 辅以同工酶电泳技术鉴定等<sup>[1]</sup>。田间种植形态鉴定周期较长, 耗费大量的人力和物力资源, 表型易受环境条件的影响, 完全不能满足快速检测杂交种纯度的需要; 同工酶电泳鉴定技术虽然较为准确、可靠, 但同工酶标记多态性信息

不够丰富并且具有组织和器官特异性<sup>[2]</sup>。随着作物新品种数量的不断增加和育种种质遗传基础日趋狭窄, 田间种植形态鉴定和同工酶电泳技术不能有效区分遗传关系较近的杂交种<sup>[3]</sup>。实践中迫切需要开发快速、准确的检测技术。

分子标记技术的快速发展使得从基因组水平上鉴定作物杂交种纯度成为可能。李智军等<sup>[4]</sup>、李成伟等<sup>[5]</sup>和王得元等<sup>[6]</sup>利用 RAPD 标记检测辣椒杂

收稿日期: 2013-11-02

基金项目: 海南省自然科学基金项目(312025); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金资助项目(1630032012050; 1630032013008)

作者简介: 刘子记(1982-), 男, 山东菏泽人, 助理研究员, 博士, 主要从事蔬菜分子生物学及遗传育种研究。

通讯作者: 曹振木(1972-), 男, 广西南宁人, 副研究员, 主要从事蔬菜遗传育种研究。

交种纯度,标记鉴定结果与田间种植形态鉴定结果完全一致,该研究结果表明,RAPD 标记在辣椒种子纯度鉴定中的应用是可行的。尽管 RAPD 标记技术具有操作简单、实验周期短、成本低等优点,但稳定性和重复性较差<sup>[7]</sup>。SSR 标记因具有操作简单、数量丰富、在染色体上均匀分布、共显性遗传、稳定性和重复性好等优点,已在多种作物品种纯度鉴定中得到应用。SSR 标记被成功用于大白菜<sup>[8]</sup>、黄瓜<sup>[9]</sup>、瓠瓜<sup>[10]</sup>、茄子<sup>[11]</sup>、花椰菜<sup>[12]</sup>等蔬菜作物品种纯度鉴定<sup>[18-20]</sup>。但 SSR 标记在辣椒杂交种纯度鉴定方面的研究鲜有报道。本研究以热辣 3 号辣椒为研究对象,旨在利用 SSR 标记建立辣椒杂交种纯度鉴定技术体系,以期在辣椒育种、制种和良种的及时销售提供科学依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

供试材料为辣椒杂交种一代热辣 3 号,是中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所经多年研究选育出的微辣丰产黄皮粗牛角椒,生长势和分枝能力较强,枝叶茂盛,鲜椒产量 67 500 ~ 75 000 kg/hm<sup>2</sup>,商品椒黄绿色,单果质量 85 ~ 92 g,果长 27 ~ 29 cm,果宽 3.5 ~ 3.7 cm,抗黄瓜花叶病毒病,中度耐热,抗青枯病和枯萎病,耐疫病、炭疽病。母本材料 L202 和父本材料 L211 均由中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所提供。将供试材料播种于营养钵中,待植株长至 6 片真叶时,利用改良的 CTAB 法<sup>[13]</sup>提取 L202、L211 和热辣 3 号单株叶片的基因组 DNA。

### 1.2 多态性引物分析

本试验按照 <http://solgenomics.net/search/markers> 网站上公布的序列合成了 85 对辣椒 SSR 引物,由北京赛百盛基因技术有限公司合成。以母本材料 L202 和父本材料 L211 基因组 DNA 为模板,进行 PCR 扩增,筛选在亲本间表现多态性的 SSR 标记。

PCR 反应体系为 10  $\mu$ L,其中包括 50 mmol/L KCl,10 mmol/L Tris-HCl (pH 值 7.5),1.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>,0.20 mmol/L dNTPs,40 ng 引物,0.5 U *Taq* DNA 聚合酶,30 ~ 50 ng 模板 DNA。扩增程序为 94  $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94  $^{\circ}$ C 变性 45 s,55  $^{\circ}$ C 退火 45 s,72  $^{\circ}$ C 延伸 1 min,40 个循环;72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min,PCR 产物保存于 10  $^{\circ}$ C。3  $\mu$ L 扩增产物与 2  $\mu$ L 上样缓冲液混合经 12% 非变性聚丙烯酰胺凝胶(丙烯酰胺:甲叉双丙烯酰胺=29:1)电泳,银染显色进行带

型分析。

### 1.3 分子标记纯度鉴定

以热辣 3 号单株 DNA 为模板,选取位于辣椒不同染色体在亲本材料间表现为共显性的 SSR 标记进行 PCR 扩增,根据特异谱带的扩增结果检测杂交种纯度。热辣 3 号品种纯度(%) =  $(1 - n/N) \times 100\%$ ,其中  $N$  为待测热辣 3 号种子数目, $n$  为单独具有父本或母本谱带特征、或既不同于热辣 3 号谱带特征也不同于父母本谱带特征的植株数目。

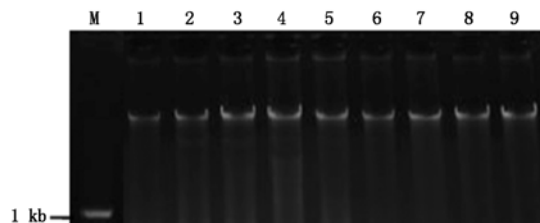
### 1.4 田间表型纯度鉴定

将取材后的热辣 3 号幼苗及亲本材料按照顺序移栽到土质肥沃的地块,采用常规栽培措施进行田间管理,在成株期依据品种的特征特性逐株进行鉴定。比较分析标记鉴定结果与田间鉴定结果。

## 2 结果与分析

### 2.1 辣椒叶片基因组 DNA 提取与检测

利用改良的 CTAB 法提取辣椒叶片基因组 DNA,采用 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测提取 DNA 的纯度和浓度,电泳结果呈现一条清晰整齐的主带,无明显拖尾现象(图 1),能够满足 SSR 标记扩增的要求。



M. DL1000 DNA Marker;1 ~ 10. 辣椒样品叶片基因组 DNA。  
M. DL1000 DNA Marker;1 ~ 10. The genomic DNA of pepper samples.

图 1 部分辣椒样品基因组 DNA 的检测结果  
Fig.1 The genomic DNA detection result of partial pepper samples

### 2.2 多态性标记筛选

以热辣 3 号母本材料 L202 和父本材料 L211 基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增,筛选 85 对辣椒 SSR 引物,其中 10 对引物在亲本间能扩增出互补的特异谱带(表 1、图 2),分别位于辣椒 1、2、3、10、11 和 12 号染色体上,多态性比率为 11.76%,均为共显性标记类型,多态性片段大小为 100 ~ 400 bp,标记 SSR21、SSR27、SSR70 和 SSR76 扩增条带清晰,多态性片段差异明显,可用于热辣 3 号品种纯度鉴定。

### 2.3 热辣 3 号种子纯度的 SSR 标记鉴定

为了确保鉴定结果的准确性,选用位于辣椒不同染色体上的多态性标记 SSR27、SSR70 和 SSR76 对 196 株热辣 3 号单株及其亲本材料进行 PCR 扩

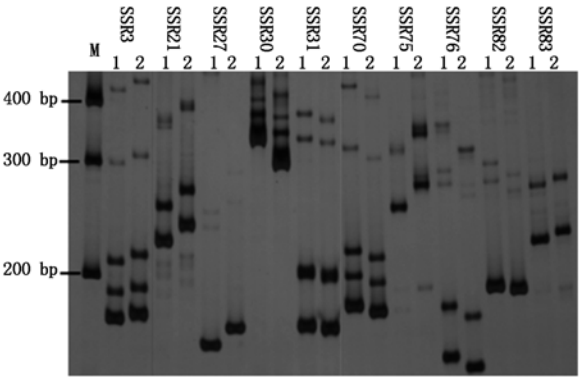
增,部分扩增结果见图 3。从 SSR 标记扩增结果分析,195 个热辣 3 号单株既具有母本特异谱带也具有父本特异谱带,属于真实的杂交种,23 号单株缺

少父本特异谱带,与母本扩增谱带一致,说明 23 号单株为母本自交株,3 对 SSR 标记的检测结果一致,热辣 3 号辣椒杂交种的纯度为 99.49%。

表 1 热辣 3 号亲本间表现多态性的 SSR 标记

Tab. 1 The polymorphic SSR markers between parents of Rela No. 3

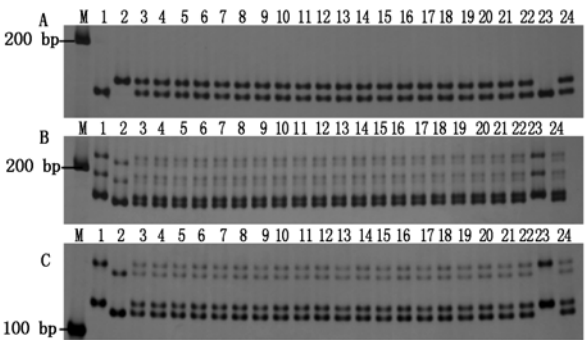
引物编号 Primer code	正向引物序列(5' - 3') Forward primer sequence	反向引物序列(5' - 3') Reverse primer sequence	染色体 Chromosomes
SSR3	ATCCCAAAAGGCAAAATC	CCCTTCCACATTTCAGTCA	1
SSR21	TGATCAGCGGACAAATCT	GGTGACACTGACCCCATATA	2
SSR27	TCTGGGAATTTTGGAACTGC	TCCAGTTTTGATCATCTCCAAC	2
SSR30	ATTGTGATAGCAACCCCTGG	CACAGATGAGGGCACAAATG	3
SSR31	ACGCCAAGAAAATCATCTCC	CCATTGCTGAAGAAAATGGG	3
SSR70	GACAGTCTTTCAAGAACTAGAGAGAG	TGGAGCAAACACAGCAGAAC	10
SSR75	TGACAGCTACCGAAAATGA	CCTCTAATGCTGACGTGAA	11
SSR76	TTTGGACCCCTTCCCTAC	GGATCAAGTAGGCCGTTGA	11
SSR82	CACCATGTAGCATCTGGG	GATGGATGGATCGACAGA	12
SSR83	TTTTGATCCCTCGATAAGTCTTT	TCACACCAGACTCAGCCAATTTA	12



M. DL1000 DNA Marker; 1. L202; 2. L211。

图 2 多态性 SSR 标记在热辣 3 亲本间的扩增结果

Fig. 2 The amplification patterns of polymorphic SSR markers between parents of Rela No. 3



M. DL1000 DNA Marker; 1. L202; 2. L211; 3 ~ 24. 热辣 3 号单株。  
M. DL1000 DNA Marker; 1. L202; 2. L211; 3 ~ 24. Rela No. 3 plants.

图 3 SSR 标记 SSR27 (A)、SSR70 (B) 和 SSR76 (C)

在部分热辣 3 号单株及亲本材料中的扩增结果

Fig. 3 The amplification patterns of SSR markers SSR27 (A), SSR70 (B) and SSR76 (C) in Rela

No. 3 plants and parents

2.4 田间表型比较分析

成株期田间调查结果显示,母本材料 L202 叶柄较短,株高比热辣 3 号及父本材料矮,果表皱缩,果

实颜色为绿色,无辣味。父本材料 L211 果实和叶片比较光滑,果实颜色为浅黄绿色。热辣 3 号植株生长势和分枝能力较强,果皮颜色为深黄绿色,果表光滑。23 号植株与母本性状类似,叶柄较短,果表皱缩,果实颜色为绿色,无辣味。其余植株均具有热辣 3 号辣椒品种的典型特征,生长一致,果皮光滑,深黄绿色。分子标记鉴定结果与表型鉴定结果比较分析表明,2 种鉴定结果高度一致。该结果说明,SSR 标记可用于热辣 3 号杂交种纯度的快速鉴定。

3 结论与讨论

目前,导致辣椒杂交种混杂的主要原因为母本去雄不彻底,杂交种中混杂了母本自交种,其次为种子收获过程中的机械混杂。生产上多采用田间种植形态鉴定的方法进行品种纯度鉴定,但田间鉴定费时费力,成本较高,周期较长,影响良种的及时销售,严重影响经济效益。分子标记技术能够从基因组的水平上揭示杂交种与亲本材料间的遗传差异,不受环境条件的影响,鉴定结果的可靠性远远优于田间种植鉴定。Smith 等<sup>[14]</sup>利用 RFLP 分子标记成功鉴定了 78 个玉米杂交种品种;葛菊芬等<sup>[15]</sup>研究结果表明,RAPD 标记可以用于辣椒杂交种纯度的鉴定;王玲平等<sup>[16]</sup>成功建立了利用 AFLP 分子标记进行瓠瓜杂交种纯度鉴定的技术体系;但由于 RFLP 标记操作程序繁琐、成本较高,RAPD 标记稳定性和重复性较差,AFLP 标记对 DNA 的质量要求很高,因此 RFLP、RAPD 和 AFLP 标记不适于进行大批量杂交种纯度鉴定。SSR 标记技术操作简单、重复性和稳定性较好,对 DNA 质量要求不高,不仅可以识别母本自交种、父本自交种,而且可以识别机械混杂、异

源花粉导致的非杂交种<sup>[17]</sup>,SSR 标记以其独特的优势被广泛用于作物品种纯度鉴定<sup>[18-20]</sup>,但利用 SSR 标记鉴定辣椒杂交种纯度的研究报道较少。本研究采用 SSR 分子标记技术鉴定热辣 3 号杂交一代种纯度,能够准确地将母本自交种与杂交种区分开来,热辣 3 号杂交种纯度为 99.49%,与田间表型鉴定结果高度一致,该试验结果说明利用 SSR 标记可以准确地进行热辣 3 号辣椒杂交种纯度鉴定。

本研究为确保鉴定结果的准确性和可靠性,选取了位于辣椒 2、10 和 11 号染色体上的 3 对 SSR 标记对热辣 3 号进行纯度鉴定,3 对标记的检测结果显示,热辣 3 号杂交种中仅混杂了母本自交种,这可能是由于母本去雄不彻底导致的母本自交种。

#### 参考文献:

- [1] 盖树鹏,盖伟玲,王日新. 6 个玉米杂交种种子纯度的 SSR 鉴定[J]. 种子,2010,29(7):44-47.
- [2] 兰刚,董军刚,孟倩,等. 油菜杂交种合油杂 2 号纯度鉴定的 SSR 引物筛选[J]. 西北农业学报,2012,21(9):74-78.
- [3] Salgado K C P C, Vieira M G G C, Von Pinho E V R. Genetic purity certificate in seeds of hybrid maize using molecular markers [J]. Revista Brasileira de Sementes, 2006,28(1):169-175.
- [4] 李智军,曾晶,龙卫平,等. 黄皮尖椒秀黄 F<sub>1</sub> 种子纯度的 RAPD 鉴定[J]. 广东农业科学,2012(23):136-138.
- [5] 李成伟,李卓杰,陈润政. 用 RAPD 方法鉴定杂交辣椒种子纯度[J]. 种子,1999(2):5-6.
- [6] 王得元,王永飞. 粤椒 1 号辣椒种子纯度的 RAPD 检测研究[J]. 中国辣椒,2002(1):19-22.
- [7] 刘子记,曹振木,杨衍. 应用分子标记技术检测作物杂交种纯度研究进展[J]. 种子,2013,32(6):48-51.
- [8] 管志坤,罗双霞,李艳霞,等. 利用 SSR 标记鉴定油绿 3 号大白菜品种纯度[J]. 种子,2011,30(9):34-39.
- [9] 杨瑞环,崔兴华,李鹏宇,等. SSR 技术检测‘津优 48’种子纯度试验[J]. 北方园艺,2012(16):108-109.
- [10] 鲁忠富,徐沛,吴晓花,等. SSR 分子标记技术在瓠瓜种子纯度快速鉴定中的应用[J]. 浙江农业学报,2012,24(4):578-581.
- [11] 王利英,乔军,石瑶,等. 茄子 SSR 多态性引物的筛选及品种纯度鉴定[J]. 华北农学报,2012,27(4):98-101.
- [12] 赵振卿,盛小光,虞慧芳,等. 花椰菜新品种浙 801 杂交种纯度的 SSR 鉴定[J]. 长江蔬菜,2011(18):18-20.
- [13] Liu Z J, Zhu J, Cui Y, et al. Identification and comparative mapping of a powdery mildew resistance gene derived from wild emmer (*Triticum turgidum* var. *dicoccoides*) on chromosome 2BS [J]. Theor Appl Genet, 2012,124(6):1041-1049.
- [14] Smith O S, Smith J S C, Bowen S L, et al. Similarities among a group of elite maize inbreds as measured by pedigree, F<sub>1</sub> grain yield, grain yield, heterosis, and RFLPs [J]. Theor Appl Genet, 1990,80(6):833-840.
- [15] 葛菊芬,张鲁刚,程智慧,等. 利用 RAPD 技术快速鉴定辣椒杂交种纯度的研究[J]. 辣椒杂志,2010(4):29-32.
- [16] 王玲平,戴丹丽,吴晓花,等. AFLP 分子标记技术在浙蒲 2 号种子纯度快速鉴定中的应用[J]. 浙江农业学报,2008,20(2):84-87.
- [17] 田筑萍,唐容,吴有祥,等. 利用 SSR 指纹图谱技术对杂交油菜种质鉴定的研究[J]. 种子,2008,27(6):69-71.
- [18] 武岩军,许晶,车星星. 应用 SSR 标记技术鉴定强盛 16 号玉米单交种纯度[J]. 山西农业科学,2012,40(6):599-602.
- [19] 张庶,周新成,李利斌,等. 利用 EST-SSR 标记鉴定大白菜杂交种纯度的研究[J]. 天津农业科学,2010,16(6):1-4.
- [20] 乔军,王利英,石瑶. 利用 SSR 进行品种纯度鉴定的研究进展[J]. 天津农业科学,2011,17(4):45-51.