

李辉玲, 张国儒, 曾卫东, 等. 基于 InDel 标记的新疆色素辣椒遗传多样性及聚类分析[J]. 江苏农业科学, 2021, 49(17): 67–71.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2021.17.010

基于 InDel 标记的新疆色素辣椒遗传多样性及聚类分析

李辉玲¹, 张国儒², 曾卫东¹, 赛买提江·艾依提¹, 王国洪¹, 张建文¹

(1. 巴音郭楞蒙古自治州农业科学研究院, 新疆库尔勒 841000; 2. 新疆农业科学院园艺作物研究所, 新疆乌鲁木齐 830091)

摘要:利用杂种优势的方式有效提高作物产量和品质的先决条件是全面系统地掌握色素辣椒亲本的遗传背景, 包括遗传差异、遗传距离等, 从而可预见性地选育高产高抗杂交种。利用 240 对 InDel 引物对 30 份新疆色素辣椒地方材料的基因组 DNA 进行 PCR 扩增, 利用软件 NtSys 2.10 对电泳后的多态性条带进行聚类分析。本研究最终检测出 23 对特异性引物, 将参试材料分为 3 类, 有效区分出不同品种资源间基因的内部差异。InDel 分子标记技术系统地评价了各资源间的遗传距离和亲缘关系情况, 为杂交育种工作中选配亲本提供了一定的理论参考和指导。

关键词:色素辣椒; 遗传多样性; InDel 分子标记; 聚类分析; 杂交组合

中图分类号:S641.303 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2021)17-0067-04

辣椒属于茄科 (Solanaceae), 是全球第三大作物, 随着栽培面积的不断扩大, 辣椒产业发展速度迅猛, 逐渐成为我国最大的蔬菜产业^[1-2]。用于工业萃取辣椒红色素的辣椒即色素辣椒, 20 世纪 90 年代初, 新疆开始大范围、规模化种植色素辣椒, 因其红色素含量和产量高且病虫害少而被国际市场青睐, 成为新疆“红色产业”重要组成之一^[3]。色素辣椒新品种选育的过程包括自交系选择、杂交试配和品种比较试验等, 其中, 杂种优势利用是色素辣椒新品种选育的重要途径^[4], 而试配亲本的亲缘关系是重要指标。传统育种通常依据田间作物的直观表型性状来分析亲缘关系的远近, 譬如生产中关键的经济指标——产量, 是育种中判断新品种杂种优势的重要标准^[5], 属于数量性状遗传, 受环境影响大, 通过表型性状选择的效率低。分子标记技术可以使育种者在作物幼苗期、DNA 层面上了解各个材料的遗传距离和亲缘关系, 快速准确地鉴定出遗传差异。

分子标记技术常用于育种工作中对作物资源的遗传多样性及遗传背景、遗传距离的研究。基于全基因组的分子标记在辣椒中已有应用, 但利用

InDel 标记对新疆色素辣椒种质资源遗传分析和聚类研究的报道较少。插入缺失长度多态性 (insertion-deletion length polymorphism, InDel) 是近缘种或同一物种不同个体间基因组 DNA 插入或缺失部分核苷酸的现象, 即同源的序列相比, 某一个位点有插入或缺失部分碱基的情况^[6]。InDel 标记作为新一代分子标记^[7], 在基因组中分布广泛、数量众多, 多应用于分子辅助育种、动植物群体遗传分析等相关研究^[8-10]。借助 InDel 分子标记技术分析种质资源的遗传多样性, 有助于优异品质性状的改良^[11]。本研究采用 240 对 InDel 引物对 30 份地方色素辣椒资源进行遗传多样性分析评价, 快速准确地判断材料间的遗传距离, 为后续色素辣椒育种中杂交亲本选配及品种遗传改良提供理论依据和指导。

1 材料与方法

1.1 试验材料

参试的 30 份试验材料 (表 1) 均由巴音郭楞蒙古自治州农业科学研究院特色作物研究室辣椒课题组提供, 其中有本课题组培育的品种 (新椒 29 号)、保存的部分高代自交系材料和其他地区收集的材料 (共 7 份), 于 2020 年 10 月在人工气候室播种育苗, 每份材料育苗 40 株。

1.2 方法

1.2.1 辣椒 DNA 提取 每份材料随机采集约 100 mg 新鲜嫩叶, 置于 1.5 mL 试管中, 放入 2 粒钢珠, 经液氮处理后, 采用高通量组织研磨器进行破碎研磨。按照天根生化科技有限公司 DNA 提取试

收稿日期: 2021-01-07

基金项目: 巴音郭楞蒙古自治州财政支持基本科研业务经费 (编号: 202008, 202104)。

作者简介: 李辉玲 (1988—), 女, 甘肃兰州人, 硕士, 助理研究员, 主要从事特色作物的育种与栽培。E-mail: 12354399@qq.com。

通信作者: 张建文, 硕士, 副研究员, 主要从事加工番茄、色素辣椒等作物的育种与栽培。E-mail: 1220743143@qq.com。

表 1 供试材料

编号	DNA 编号	品系名称	备注	编号	DNA 编号	品系名称	备注
1	DNA1	B58	自交系	16	DNA17	685	自交系
2	DNA2	7 - UC	收集材料	17	DNA18	B31	自交系
3	DNA4	B53	自交系	18	DNA19	A61	自交系
4	DNA5	B28	自交系	19	DNA20	C36	自交系
5	DNA6	MY	收集材料	20	DNA21	A55	自交系
6	DNA7	A27	自交系	21	DNA22	B19	自交系
7	DNA8	FGH	收集材料	22	DNA28	C65	自交系
8	DNA9	C11	自交系	23	DNA32	C15	自交系
9	DNA10	B63	自交系	24	DNA33	B90	自交系
10	DNA11	A5	自交系	25	DNA34	7 - U	收集材料
11	DNA12	X29	新椒 29 号,培育品种	26	DNA35	D14	自交系
12	DNA13	A10	自交系	27	DNA36	HJ1	收集材料
13	DNA14	C94	自交系	28	DNA37	C18	自交系
14	DNA15	B44	自交系	29	DNA38	HJZ	收集材料
15	DNA16	A70	自交系	30	DNA41	HJ8	收集材料

剂盒(目录号:DP320)步骤提取各材料的基因组 DNA。采用核酸检测仪(NanoDrop-1000)及 1% 琼脂糖凝胶电泳对提取的 DNA 进行纯度、浓度检测,采用凝胶成像系统拍照记录,并将提取的 DNA 原液于 -20 ℃ 冰箱中保存。

1.2.2 PCR 扩增 PCR 反应体系(总体积 10 μL):模板 DNA 3.5 ng/μL、上下游引物 0.5 μmol/L 和 2 × Taq PCR Mix 5.0 μL。

扩增反应程序:94 ℃ 预变性 3 min;94 ℃ 变性 30 s,不同引物最佳退火温度下退火 30 s,72 ℃ 延伸 60 s,35 个循环;72 ℃ 延伸 5 min;所得产物 4 ℃ 冰箱保存。

1.2.3 聚丙烯酰胺凝胶电泳 采用 6.0% 非变性聚丙烯酰胺凝胶、北京六一电泳仪厂的 DYY-12 型电泳仪(200 V,400 mA,100 W,60 min),银染法显色后在医用胶片观察灯上,观察并用数码相机拍照。

1.2.4 数据处理 对扩增后的条带进行带型统计分析,根据带型构建(0,1)矩阵(0 代表无条带,1 代表有条带)存入 Excel 表格中^[12-13]。利用 Ntsys

2.10 软件计算 30 份地方资源的遗传相似系数,按照非加权配对算数平均法(UPGMA)进行聚类分析^[14],绘制聚类图。

2 结果与分析

2.1 DNA 模板的检测

由图 1 可知,图谱中条带整齐清晰未见拖尾,样品间浓度较为均匀,所提 DNA 质量测定值 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 的比值位于 1.8~2.0,浓度在 237~92 ng/μL。

结果表明,提取的 DNA 纯度高并且结构完整,可以稀释一定比例后用于后续 InDel-PCR 分析。

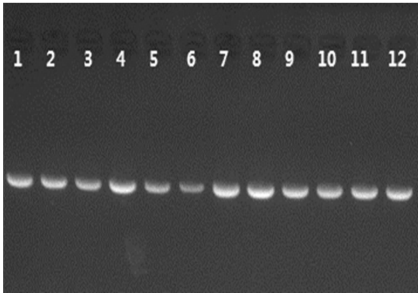


图1 12 份色素辣椒基因组 DNA 电泳结果

2.2 InDel 引物多态性分析

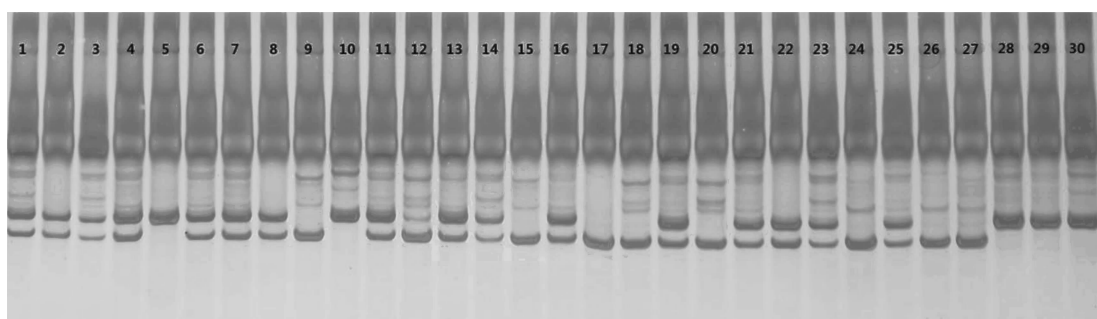
随机挑选 8 个色素辣椒基因组 DNA 组成小群体,对 240 对 InDel 引物进行扩增,淘汰效果欠佳、带型不好辨认的引物,筛选出 23 对引物(表 2)。由图 2 可知,30 份材料有特异性条带,特异性检出率为 9.58%。由表 3 可知,共扩增出 166 条带,多态性带 71 条,多态性比率为 42.8%。

2.3 聚类结果

采用 Ntsys 2.10 软件对扩增的结果进行分析,计算 30 份色素辣椒材料之间的遗传相似系数。结果表明,各材料之间的遗传相似系数在 0.24~1.00 间,供试 30 份色素辣椒种质资源总体表现遗传差异较小,遗传基础狭窄。对 30 份色素辣椒材料进行 UPGMA 聚类分析,由图 3 可知,在遗传相似系数 0.64 处将 30 份地方色素辣椒材料分为 3 个类群,其中,第一类群包含 13 份材料,分别为 1、10、2、15、16、17、5、6、11、18、41、12、37;第二类群包含 8 份材

表 2 23 对 InDel 标记的序列信息

编号	引物编号	引物名称	上游引物(5'→3')	下游引物(5'→3')
1	16	CIDH119	AGGAACATAAAAGTGGTTTGGGT	TCACACACGTCCAACCCAAT
2	33	CIDH136	ACAATCGAAGGGGAGCCTTG	TCCTCTGTTTCATGATTCGGACT
3	41	CIDH144	AGGAGAAAAAGAAAGAACAACCACA	CGAAGCCCTTCACATTAACGT
4	63	CIDH166	ACTCTTGGAAGATGGGTTCA	CCGAAGTAAATAGGAAAATTGCCA
5	88	CIDH191	AGCCCAATAGAAAAGATTGCTCA	CGCTGAATTTTGAAATATTTAGTCTGG
6	137	CIDH240	ACAAGGAGAAAAGGGGCCTT	CTGTATCTCGGCTTAAAGGGCT
7	146	CIDH249	GGAACCCGACCACCAGAAAA	TCGCGGGGACTATTTACCCCT
8	172	CIDH275	GGTGGGACCAAAGAGAGTTT	TGAACAAGCAAAAGCCAAGA
9	200	CIDH303	ACTCACAGTCCTTAAACTTACAAAAC	TGCCACTATAAATCCATCACCGA
10	201	CIDH304	AGGCACCAGTTAGCTCGAAA	AGCGCATCTCAATCTATGTCTGA
11	206	CIDH309	CCTGGAGGCTATGCACCATT	ATTTGCAGCCACCCAGCATA
12	209	CIDH312	CGCTACGAGTGGTACCTGAC	TGGGGATTGCTTCATTGGTGT
13	211	CIDH314	TCAGTTGTGTCTTGAACCT	ACATGCAGAACAAATAGCCCT
14	215	CIDH318	ACCGTTGACACTTCCATGCT	AATCCCCACGTGCAGTTCAT
15	219	CIDH322	CCGAGCATTGAGACCGAGTT	AAGCTTTCTGATCCACCCCC
16	228	CIDH331	TGACACGTGACATTCACCGT	TGACCTACAAACACACTGCTCA
17	234	CIDH337	AAAAAGGGCAGCTCGGTGTA	GAACCCCTGAAGAGAAGGC
18	1	InDel2 - 134	TGCTTCAGTTGAGTTGTCCA	TAAATCCCCCTGTGTGGCT
19	2	InDel2 - 140	GGTTGGTTAGCATGGGTGTG	CGAAACCGAACCGTTAAAGAC
20	3	InDel2 - 151	ACCCACGACTTAAACTCAAAAC	TCAAGAGAGAAATAGTGATGCCA
21	4	InDel11 - 31	AGTCCCTTCTGAGACATCCC	CACGGGTGCTGCAACATT
22	5	InDel11 - 66	GATGTGGGATTGTTTGCTTCC	CCTGAAAGTTAGAACCGCAAC
23	6	InDel11 - 73	ACGATACCTTGTATGGAATGCC	CTTCCGAGTCGACAAAACCC



图片中 1~30 为 30 份色素辣椒材料, 条带依次记载为 3、3、3、3、1、3、3、3、2、1、3、2、3、3、2、3、2、2、3、3、3、2、3、2、2、1、1、1

图2 标记筛选的部分结果

料,分别为 8、32、20、21、35、22、33、9;第三类群包含 9 份材料,分别为 4、28、36、13、14、34、7、38、19。

3 讨论与结论

中国辣椒萃取工业发展迅猛,在世界辣椒红产量和辣椒规模化生产市场中占据很大份额^[15-17]。色素辣椒国际贸易定价中,色价是决定性关键指标^[16],高色价是色素辣椒选育的重要目标,高色价品种会给农户和辣椒红色素萃取工业带来更加丰

厚的利润回报。近年来,辣椒种植规模不断扩大,引进品种和地方品种混杂无据、自留种连年退化等现状直接影响辣椒红色素产业的整体稳步、持续健康发展,用遗传多样性对辣椒种质资源进行分析评价并辅助杂交育种的亲本选配尤为重要。鉴于此,本研究搜集了 30 份色素辣椒材料,采用 InDel 分子标记技术进行遗传相似性与聚类分析,聚类分析是品种遗传背景差异度评价工作中广泛使用的技术手段^[18-21],本试验的目的是对现有的地方色素辣椒

表 3 扩增效果及多态性比率

编号	引物编号	引物名称	扩增总带数 (条)	多态性带 (条)	多态性比率 (%)
1	16	CIDH119	5	2	40.0
2	33	CIDH136	9	3	33.3
3	41	CIDH144	4	2	50.0
4	63	CIDH166	5	3	60.0
5	88	CIDH191	11	6	54.5
6	137	CIDH240	5	2	40.0
7	146	CIDH249	5	3	60.0
8	172	CIDH275	12	5	41.7
9	200	CIDH303	6	3	50.0
10	201	CIDH304	9	3	33.3
11	206	CIDH309	10	3	30.0
12	209	CIDH312	5	2	40.0
13	211	CIDH314	5	3	60.0
14	215	CIDH318	5	3	60.0
15	219	CIDH322	6	2	33.3
16	228	CIDH331	5	2	40.0
17	234	CIDH337	7	3	42.9
18	1	InDel-2-134	7	2	28.6
19	2	InDel-2-140	14	7	50.0
20	3	InDel-2-151	9	4	44.4
21	4	InDel-11-31	5	2	40.0
22	5	InDel-11-66	11	4	36.4
23	6	InDel-11-73	6	2	33.3
Σ			166	71	42.8

材料进行客观评估,为今后色素辣椒育种提供参考依据和指导。

本研究从 240 对引物中筛选出有特异性条带的引物 23 对,通过对 30 份色素辣椒材料进行扩增,最终将 30 份材料分为 3 个类群,通过表型性状比对发现,每个类群均有相似或相近的特点。试验中筛选得出的 23 对引物能够有效区分材料之间的差异,在 DNA 分子层面评价了地方色素辣椒品种间的遗传多样性和遗传背景差异,此结果为今后色素辣椒种质的搜集、利用和遗传改良提供一定的理论基础并对生产实践有一定的指导意义。

参考文献:

[1]郑井元,李雪峰,周书栋,等. 2017 年度辣椒科学研究进展[J]. 中国蔬菜,2018(5):9-15.

[2]FAO. FAOSTAT database[EB/OL]. [2021-05-19]. <http://faostat.fao.org>.

[3]李 艳,王 亮,刘志刚. 新疆绿洲干旱区制干辣椒生产技术现状与产业发展对策[J]. 北方园艺,2014(13):189-192.

[4]Pearson O H. Heterosis in vegetable crops[M]//Monographs on theoretical and applied genetics. Berlin:Springer:138-139

[5]张秀荣,李晓丹,张延安,等. 辣椒产量与相关农艺性状的灰色关联度分析[J]. 江西农业学报,2013,25(2):47-50.

[6]杨 洁,赫 佳,王丹碧,等. InDel 标记的研究和应用进展[J]. 生物多样性,2016,24(2):117-123.

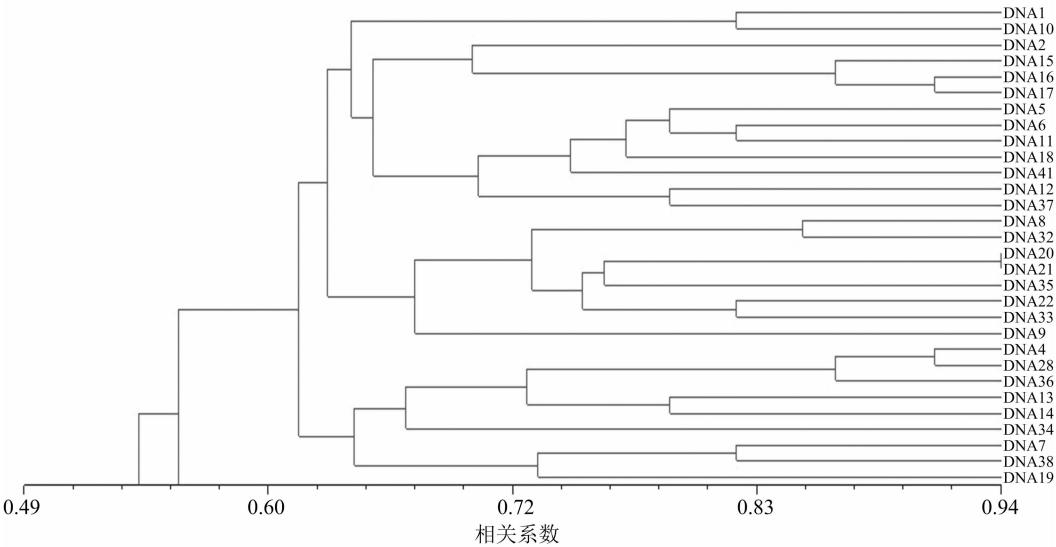


图3 聚类分析图谱

[7]Li W P,Cheng J W,Wu Z M,et al. An InDel-based linkage map of hot pepper(*Capsicumannuum*) [J]. Molecular Breeding,2015(1):1-10.

[8]Choi I Y,Hytén D L,Matukumalli L K,et al. A soybean transcript map gene distribution haplotype and single-nucleotide polymorphism analysis[J]. Genetics,2007,176(1):685-696.

[9]高 颖,罗双霞,王彦华,等. 大白菜抽薹开花时间与 SSR 和 InDel 标记的关联分析[J]. 园艺学报,2012,39(6):1081-1089.

[10]吉康娜,邵俊杰,林丹妮,等. 基于茄子基因组重测序的 InDel 标记开发及应用[J]. 植物遗传资源学报,20(5):1278-1288.

游思亮,王裔娜,田瑞平,等. 响应面法优化高压均质破碎重组大肠杆菌的条件[J]. 江苏农业科学,2021,49(17):71-74.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2021.17.011

响应面法优化高压均质破碎重组大肠杆菌的条件

游思亮,王裔娜,田瑞平,王 青

(南京农业大学作物遗传与种质创新国家重点实验室,江苏南京 210095)

摘要:通过单因素试验,分析了均质压力、均质次数和菌液浓度 3 个因素对大肠杆菌蛋白破碎率的影响。然后利用响应面试验拟合出大肠杆菌蛋白破碎率的回归方程,优化了高压均质法破碎大肠杆菌的试验条件。结果表明,各因素对大肠杆菌蛋白破碎率影响顺序为均质次数(B) > 均质压力(A) > 菌液浓度(C)。在均质压力 140 MPa、均质次数 4 次、菌液浓度 60 g/L 时,大肠杆菌蛋白破碎率达到最高,为 13.98%。

关键词:响应面;高压均质;蛋白破碎率;大肠杆菌

中图分类号: S182 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2021)17-0071-04

在生物学领域,经过改造过的细菌系统经常用来表达各种外源重组产物,如蛋白质、酶和抗体,大肠杆菌(*Escherichia coli*,简称 *E. coli*)是最常见的寄主材料。这主要是由其特点决定的,大肠杆菌表达系统具有遗传背景清楚、繁殖快、培养成本低、表达量高、表达产物容易纯化、稳定性好、抗污染能力强以及适用范围广等优势^[1]。

但是重组蛋白通常在大肠杆菌细胞内部表达,不能被大肠杆菌分泌到细胞外部,要提取纯化蛋白还需要将大肠杆菌细胞破碎^[2]。目前,用于提取大肠杆菌外源蛋白的常用细胞破碎方法主要有高压均质法、珠磨法、超声波破碎法、渗透压法、反复冻融法、酶解法和化学降解法^[3-8]。高压均质法破碎细胞的原理是在高压条件下使溶液通过均质阀,溶

液内细胞经过阀门的撞击力、通道内高速流体剪切力和瞬时压力差 3 个不同的作用力后被破碎,释放胞内物质达到细胞破碎的目的^[9]。高压均质法作为一种物理破碎方式,具有破碎效率高^[3-4]、无试剂消耗和污染^[5]、可用于工业化生产等诸多优点^[10],正在被越来越多的研究者采用。

有学者利用高压均质法研究破碎大肠杆菌的试验条件^[7],但主要是探讨单个因素对破碎结果的影响,没有考虑到因素之间的交互作用,也没有探讨最优化的试验条件。本研究在单因素试验的基础上,利用响应面法探讨因素之间的交互作用以及最优化的试验条件。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

材料:*E. coli* DH5 α 为南京农业大学小麦研究所保存,重组质粒 pCold-10477 为小麦研究所构建,按常规方法转化获得相应重组工程菌。

收稿日期:2021-01-10

基金项目:国家自然科学基金(编号:31801350)。

作者简介:游思亮(1984—),男,湖北武汉人,硕士,实验师,主要从事大型仪器设备管理和功能开发。E-mail:youisl@njau.edu.cn。

[11] 吴雪霞,查丁石,朱宗文,等. 茄子分子育种研究进展[J]. 江西农业学报,23(5):70-71.

[12] 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(6):62-67.

[13] 贾 豪,魏小春,姚秋菊,等. 辣椒 SSR 标记种质资源遗传多样性的分析[J]. 分子植物育种,2017,15(1):353-363.

[14] Sun M. Genetic diversity in three colonizing orchids with contrasting mating systems[J]. American Journal of Botany, 1997, 84(2): 224.

[15] 武占省,江 英,赵晓梅. 天然辣椒红色素的研究进展[J]. 中国食品添加剂,2004(6):22-25.

[16] 邱建生,张彦雄. 世界辣椒红色素的历史、现状及发展趋向

[J]. 中国食品添加剂,2003(6):3-10.

[17] 黄 巍,邹学校,马艳青. 辣椒红色素的研究进展[J]. 辣椒杂志,2008(2):32-36,44.

[18] 孔繁玲. 植物数量遗传学[M]. 北京:中国农业大学出版社,2006:403-419.

[19] 陈运起,高莉敏,刘洪星. 大葱部分种质资源数量性状聚类分析[J]. 中国蔬菜,2006(8):25-26.

[20] 臧贺藏,贺德先. 河南省主导小麦品种根系性状的聚类分析[J]. 河南农业科学,2009(5):24-28.

[21] 田新莉,赵宗胜,李国英. 聚类分析在棉花枯萎菌生理小种鉴定中的应用[J]. 石河子大学学报(自然科学版),2001(4):288-290,319.