

辣椒种质资源 ITS 与系统进化分析

徐小万, 李颖*, 王恒明*, 徐晓美, 李涛, 罗少波

(广东省农业科学院蔬菜研究所, 广州 510640)

摘要: 以核糖体 DNA 内转录间隔区 (Internal Transcribed Spacer, rDNA ITS 区) 作为 DNA 条形码对辣椒进行系统进化分析。利用收集的 17 份辣椒资源, 提取总 DNA, 进行 PCR 扩增和测序, 并从 GenBank 下载辣椒属的主要栽培种浆果状椒 (*Capsicum baccatum*)、茸毛椒 (*C. pubescens*)、灌木状辣椒 (*C. frutescens*) 和野生种 (*C. eximium*)、野生种 (*C. lycianthoides*) 的 ITS 序列, 进行系统进化与亲缘关系分析。结果表明, 以野生种 (*C. eximium*) 的 ITS 序列为参考序列, 利用 Clustalx 2.1 软件进行比对, 发现 3 个中华辣椒、茸毛椒和灌木状辣椒在 ITS1 区有 15 个碱基缺失。以茄科番茄属 (*lycopersicon*) 栽培种 ‘上海 906’ 作为外类群, 在进化树标尺约 0.11 处, 22 个辣椒属 ITS 序列可分为 6 个分支。全部一年生辣椒 (14 个) 聚在一支。中华辣椒 (3 个) 和灌木状辣椒聚在一支, 表明中华辣椒与灌木状辣椒亲缘关系相对较近。野生种 (*C. eximium*)、浆果状椒、茸毛椒和野生种 (*C. lycianthoides*) 分别单独为一支。

关键词: 辣椒; ITS 序列; 系统进化

中图分类号: S 641.3

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2014) 05-0881-08

Analysis on the Internal Transcribed Spacers (ITS) Sequences and Phylogenetic of Pepper

XU Xiao-wan, LI Ying*, WANG Heng-ming*, XU Xiao-mei, LI Tao, and LUO Shao-bo

(Vegetable Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China)

Abstract: Based on the emerging field of molecular systematics as a powerful classification tool, a phylogenetic analysis was conducted using sequences of the Internal Transcribed Spacer of nuclear ribosomal DNA (rDNA ITS) as DNA bar-codes for phylogenetic analysis of *Capsicum* plants. Seventeen pepper (*Capsicum*) resources were collected from different localities and sequenced ITS for all samples by sanger dideoxy method. Furthermore, other ITS sequences of *Solanum lycopersicum* (Shanghai906), *C. baccatum*, *C. pubescens*, *C. frutescens*, *C. eximium* and *C. lycianthoides* were downloaded from GenBank and aligned with the sequences obtained in this study by Clustalx 2 software. Then, the (G + C) content, divergence and similarity among sequences were analyzed by DNASTAR software. Finally, based on the ITS sequences, phylogenetic tree was reconstructed by MEGA5.1 software using *Solanum lycopersicum* (Shanghai 906) as an outgroup to root the tree. The alignment result indicated a 15-base deletion in the ITS1 region for *C. chinense* (No. 6, 7, 8), *C. pubescens* (No. 20) and *C. frutescens* (No. 22) but not in

收稿日期: 2013-11-29; 修回日期: 2014-04-10

基金项目: 广东省科技计划项目 (2010B020304001, 2011B020303001, 2012B040400007, 2012B020303002); 广东省农业科学院院长项目 (201108); 国家现代农业产业技术体系建设专项资金项目 (CARS-25-G-36)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: ly38469@163.com; whming2006@21cn.com)

C. annuum, *C. baccatum*, *C. eximium* and *C. lycianthoides*. According to the analysis of phylogeny, the 22 *Capsicum* samples were divided into 6 clustered, all of *C. annuum* samples were clustered together. *C. chinense* and *C. frutescens* were clustered together. The result indicated that the genetic relationships of *C. chinense* and *C. frutescens* were close. *C. eximium*, *C. baccatum*, *C. pubescens* and *C. lycianthoides* represent entirely different branches.

Key words: *Capsicum*; ITS sequence; phylogenetic analysis

辣椒属 (*Capsicum*) 主要有 5 个栽培种 (邹学校, 2009), 即一年生辣椒 (*C. annuum*)、中华辣椒 (*C. chinense*)、浆果状椒 (*C. baccatum*)、灌木状椒 (*C. frutescens*) 和茸毛椒 (*C. pubescens*), 其中一年生辣椒是分化最多、栽培最广的 1 个种, 而中华辣椒是亚马逊地区栽培最为广泛的 1 个种。另外, 辣椒属还有许多近缘野生种, 其中有部分已被利用, 如茸毛椒。

国内外科技人员在辣椒种质资源分子鉴定方面进行了全面的研究, 取得了一些阶段性成果。Lefebvre 等 (2001) 采用 AFLP 和 RAPD 标记以及结合表型数据对辣椒自交系开展遗传多样性研究。陈学军等 (2007) 通过 RAPD 和 ISSR 对辣椒属的 5 个栽培种 13 份资源进行了研究, 能将一年生辣椒与其他 4 个栽培种区分开来。Sanatombi 等 (2010) 采用 RAPD 的标记对印度曼尼普尔邦 7 个当地品种开展了种质资源鉴别工作, 结果表明 7 个品种分别属于一年生辣椒、中华辣椒和灌木状椒。李永平等 (2011) 利用 RAPD 分子标记技术对辣椒种质资源遗传多样性进行分析, 结果将供试的 90 份种质分为 5 大类群。陈学军等 (2012) 采用 SRAP 和 SSR 标记对中国灌木辣椒开展了遗传多样性研究。孟金贵等 (2012) 应用 ISSR 标记开展了涮辣与辣椒属 5 个栽培种亲缘关系的研究。上述研究为辣椒遗传育种及产业化发展奠定了基础。

在核基因组研究中, 利用核糖体 DNA 内转录间隔区 (Internal Transcribed Spacer, rDNA ITS 区) 序列对药用植物菲兰 (Lee et al., 2006)、红山茶 (田敏 等, 2008)、石斛 (栗丹 等, 2012)、桑 (陈仁芳 等, 2010)、扁桃 (邱蓉 等, 2012) 等进行鉴定和系统进化分析。ITS 区在进化过程中受到的选择压力非常小, 且进化速率较快, 另外 ITS 区序列具有保守性, 不仅适合于低分类群的系统发育分析, 而且可以反映种间与种内水平的变化, 亦被用于种内各居群内的差异性研究 (丁小余 等, 2002; 德英 等, 2012)。近年来, ITS 作为常用分子标记已被用于辣椒属植物的系统分类 (蒋向辉 等, 2010; Purkayastha et al., 2012), 同时也发现了部分种类的 ITS 存在多态性。Ryzhova 等 (2002) 对 1 个浆果状椒、2 个中华辣椒和 1 个一年生辣椒, 蒋向辉等 (2010) 对 1 个湖南当地农家品种 ‘浏阳朝天椒’, Purkayastha 等 (2012) 对 6 份辣椒素极高的辣椒材料 ‘Bhut Jolokia’ 进行了 rDNA-ITS 序列分析, 由于研究材料类型与数量不足, 代表面较窄, 研究结论具有一定局限性。

本研究中通过多年的调查, 收集了国内外不同来源的一年生辣椒和中华辣椒共 17 份, 并从 GenBank 下载辣椒属的主要栽培种浆果状椒 (Bohs & Olmstead, 2001)、茸毛椒、灌木状椒 (Purkayastha et al., 2012) 和野生种 *C. eximium* (Whitson & Manos, 2005)、野生种 *C. lycianthoides* (Smith & Baum, 2006) 的 ITS 序列, 结合本研究材料的 ITS 序列, 分析 ITS 长度、(G + C) 含量及其变异、遗传分歧和同源性, 探讨辣椒资源的系统位置与进化关系。

1 材料与amp;方法

1.1 材料及 DNA 提取

试验于 2012 年在广东省蔬菜新技术重点实验室完成。试验材料由广东省农业科学院蔬菜研究

所辣椒育种与生物技术团队提供(表 1), 8 份材料由国外引进, 其中一年生辣椒 14 份, 中华辣椒 3 份。采摘苗期鲜叶片, 用第 7 或 8 片真叶提取基因组 DNA, 提取方法参照 CTAB 法(王关林和方宏筠, 2002), 然后将提取的 DNA 放入 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 备用。

表 1 研究材料及相关 ITS 序列

Table 1 Plant species and source of ITS sequences included in this study

编号 Code	名称 Name	栽培种类型 Species	来源 Source	编号 Code	名称 Name	栽培种类型 Species	来源 Source
1	D597	一年生辣椒 <i>C. annuum</i>	中国 广东 Guangdong, China	13	M5	一年生辣椒 <i>C. annuum</i>	马来西亚 Malaysia
2	D590	一年生辣椒 <i>C. annuum</i>	中国 广东 Guangdong, China	14	M6	一年生辣椒 <i>C. annuum</i>	马来西亚 Malaysia
3	红辣椒 Hong Lajiao	一年生辣椒 <i>C. annuum</i>	中国 广东 Guangdong, China	15	CM334	一年生辣椒 <i>C. annuum</i>	美国 USA
4	观赏椒 Guanshang Jiao	一年生辣椒 <i>C. annuum</i>	中国 重庆 Chongqing, China	16	Anhui 1	一年生辣椒 <i>C. annuum</i>	中国 安徽 Anhui, China
5	D600	一年生辣椒 <i>C. annuum</i>	中国 广东 Guangdong, China	17	Hunan 1	一年生辣椒 <i>C. annuum</i>	中国 湖南 Hunan, China
6	Trinidad 1	中华辣椒 <i>C. chinense</i>	特立尼达拉岛 Trinidad	18		野生种 <i>C. eximium</i>	Frome GenBank [AY665841]
7	Jamaica 1	中华辣椒 <i>C. chinense</i>	牙买加 Jamaica	19		浆果状椒 <i>C. baccatum</i>	Frome GenBank [AF244708]
8	HABANERO- LIMON	中华辣椒 <i>C. chinense</i>	秘鲁 Peru	20		茸毛椒 <i>C. pubescens</i>	Frome GenBank [AY875749]
9	M1	一年生辣椒 <i>C. annuum</i>	马来西亚 Malaysia	21		野生种 <i>C. lycianthoides</i>	Frome GenBank [DQ314158]
10	M2	一年生辣椒 <i>C. annuum</i>	马来西亚 Malaysia	22		灌木状辣椒 <i>C. frutescens</i>	Frome GenBank [HQ705989]
11	M3	一年生辣椒 <i>C. annuum</i>	马来西亚 Malaysia	23	上海 906 Shanghai 906	普通番茄 <i>L. esculentum</i>	Frome GenBank [EU760391]
12	M4	一年生辣椒 <i>C. annuum</i>	马来西亚 Malaysia				

1.2 PCR 扩增及测序

聚合酶链式反应(PCR)体系为 $20\text{ }\mu\text{L}$, 包括 $10\times$ PCR buffer $2.5\text{ }\mu\text{L}$, $25\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ MgCl_2 $1.2\text{ }\mu\text{L}$, 模板 DNA ($40\text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) $1.0\text{ }\mu\text{L}$, $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 上下游引物各 $1.0\text{ }\mu\text{L}$, *Taq* 酶 ($5\text{ U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) $0.2\text{ }\mu\text{L}$, $2.0\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ dNTP $2.0\text{ }\mu\text{L}$, 加 ddH_2O 补足 $20\text{ }\mu\text{L}$ 。参照 White 等(1990)的方法设计 ITS 区扩增所用通用引物, ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') 和 ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACA AGG-3')。ITS-PCR 反应程序为: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min , $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s , $52\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s , $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 复性 40 s , 共 35 个循环后, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min , $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

PCR 产物纯化回收: 北京鼎国 NEP013-1 DNA 片段快速纯化/回收试剂盒; 连接: pEASY-T1 Simple Cloning Kit CT111-01 试剂盒。回收纯化后的产物连接于 pEASY-T1 Simple Cloning Vector 上, 随后加连接产物于 Trans 1-T1 感受态细胞中, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 静置培养过夜。挑取单克隆 PCR 方法鉴定阳性克隆。Invitrogen 公司测序。为确保所测序列的准确性, 测序过程中使用扩增引物进行双向测序。

1.3 数据分析

测序原始峰图使用 Contig Express 软件拼接, 而后用 BioEdit 手工校对, 用 Clustal X 对所得序列进行排列。DNASar 软件计算 ITS 序列的遗传分歧及同源性百分比差异(Kimura, 1980; Tamura

et al., 2011)。ITS 序列分析采用 MEGA 5.05 软件, 以茄科番茄属 (*Lycopersicon*) 栽培种 ‘上海 906’ 作为外类群植物, 采用邻位相接法 (Neighbor-Joining, NJ) 构建系统树。系统树的每个分支的统计学显著性分析以自展法 (bootstrap) 进行检验, 重复次数为 1 000 次。

2 结果与分析

2.1 ITS 序列长度、(G + C) 含量及变异

根据 GenBank 中已报道的辣椒 ITS 序列 (Accession No. AY665841), 确定 17 个辣椒样品的 rDNA ITS 序列中 ITS1 和 ITS2 与 3 个编码区 18S、5.8S 和 26S 的界限。

17 个辣椒样品的 ITS 序列 (只包含 ITS1, 5.8S rDNA 和 ITS2) 长度变化范围在 632 ~ 651 bp (表 2), 14 个一年生辣椒中, 编号 1 的辣椒材料 ITS 序列最短, 为 632 bp, 编号为 5、12 和 13 的 3 个一年生辣椒材料 ITS 序列全长为 650 bp, 其余 10 个一年生辣椒材料 ITS 序列全长为 651 bp。编号为 6、7 和 8 的 3 个中华辣椒 ITS 序列全长为 644 bp, 比一年生辣椒 ITS 序列全长短。(G + C) 含量为 49.38% ~ 63.51%, 转换颠换比 3.37。当空位 (gap) 作缺失处理时, ITS 区全序列排序后的长度为 660 个位点, 其中有 237 个变异位点, 173 个简约信息位点, 分别占 35.91% 和 26.21%。在 17 个 ITS 序列中, A 占碱基总数的 25.5%, T 占 24.0%, C 占 28.8%, G 占 23.7%。

表 2 辣椒种质资源 ITS 长度及 (G + C) 含量
Table 2 Lengths of ITS sequences and its contents of (G + C) in *Capsicum* spp.

材料编号 Code	ITS1		5.8S		ITS2		ITS	
	长度/bp Length	含量/% Content	长度/bp Length	含量/% Content	长度/bp Length	含量/% Content	长度/bp Length	含量/% Content
1	238	53.19	160	41.25	234	53.85	632	50.16
2	238	52.52	160	41.25	253	53.75	651	50.23
3	238	52.10	160	41.88	253	55.73	651	51.00
4	238	52.52	160	42.50	253	54.55	651	50.84
5	237	51.48	160	42.50	253	54.94	650	50.62
6	227	65.20	160	53.75	257	66.93	644	63.04
7	227	66.52	160	52.50	257	67.32	644	63.35
8	227	66.08	160	53.13	257	67.70	644	63.51
9	238	50.00	160	43.75	253	55.34	651	50.54
10	238	52.94	160	42.50	253	54.55	651	51.00
11	238	52.10	160	41.88	253	55.73	651	51.00
12	237	51.05	160	41.25	253	52.96	650	49.38
13	237	52.32	160	42.50	253	54.15	650	50.62
14	238	52.10	160	42.50	253	55.73	651	51.15
15	238	50.42	160	42.50	253	54.55	651	50.08
16	238	52.52	160	41.88	253	54.94	651	50.84
17	238	52.94	160	43.13	253	53.75	651	50.84

分析表明, ITS1 序列长度范围 227 ~ 238 bp, 相差 11 个碱基。编号为 5、12 和 13 的 3 个一年生辣椒 ITS1 序列长为 237 bp, 其它 11 个一年生辣椒 ITS1 序列长为 238 bp。编号为 6、7 和 8 的 3 个中华辣椒 ITS1 序列长为 227 bp, 比一年生辣椒 ITS1 序列短。A 占碱基总数的 24.4%, T 占 20.5%, C 占 31.2%, G 占 23.8%, (G + C) 含量变幅为 50.0% ~ 66.52%。当空位 (gap) 作缺失处理时, ITS1 区全序列排序后的长度为 240 个位点, 其中有 89 个变异位点, 占总位点的 37.08%, 70 个简约信息位点, 占总位点 29.17%。以野生种 *C. eximium* 的 ITS 序列为参考序列, 利用 Clustalx 2.1 软件进行比对, 发现编号 6、7、8、20 和 22 在 ITS1 区有 15 个碱基缺失。

ITS2 序列长度在 234 ~ 257 bp, 相差 23 个碱基, 相对 ITS1 区来说变化较大。编号为 1 的一年生辣椒 ITS2 序列长为 234 bp, 其它 13 个一年生辣椒 ITS2 序列长为 253 bp。编号为 6、7 和 8 的 3 个中华辣椒 ITS2 序列长为 257 bp, 中华辣椒 ITS2 序列长度较一年生辣椒的要长。A 占碱基总数的 18.5%, T 占 23.9%, C 占 32.1%, G 占 25.5%, (G+C) 含量变幅为 52.96% ~ 68.09%。当空位 (gap) 作缺失处理时, ITS2 区全序列排序后的长度为 257 个位点, 其中有 96 个变异位点, 占总位点的 37.35%, 65 个简约信息位点, 占总位点 25.29%。

5.8S rDNA 序列长度为 160 bp, 长度高度保守。A 占碱基总数的 29.3%, T 占 26.5%, C 占 21.5%, G 占 22.7%, (G+C) 含量变幅为 41.25% ~ 53.75%。5.8S rDNA 区全序列有 52 个变异位点, 占总位点的 32.5%, 40 个简约信息位点, 占总位点 25%。

2.2 ITS 序列遗传分歧及同源性分析

用 DNASTar 软件计算 17 个 ITS 序列的遗传分歧及同源性百分比差异, 结果表明, 这 17 个 ITS 序列的同源性 (percent identity) 约 25.2% ~ 100%, 遗传分歧在 (divergence) 约 0 ~ 3.39 (表 3)。材料 13 与材料 5、7、8 的遗传分歧较大, 分别为 3.06、3.32、3.28, 材料 4 与材料 7 遗传分歧最大为 3.39。

表 3 17 个辣椒 ITS 序列遗传分歧 (左下角) 及同源性 (右上角) 比较

材料编号 Code	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1		50.0	51.1	50.8	65.2	26.3	25.8	25.9	49.1	51.1	44.1	54.7	50.9	49.8	49.8	51.3	49.1
2	0.79		94.2	93.6	45.5	26.6	26.6	26.6	93.7	94.2	27.4	36.0	94.0	93.9	97.9	96.2	93.7
3	0.75	0.06		95.0	47.0	27.4	27.2	27.4	96.5	100	27.0	36.4	99.8	96.3	94.0	96.5	96.5
4	0.76	0.07	5.50		46.6	26.6	26.4	26.4	94.2	95.0	27.0	36.3	94.8	95.0	93.9	94.6	94.2
5	0.44	0.96	0.91	0.92		26.7	25.7	26.1	46.1	47.0	74.1	87.9	46.9	46.7	45.9	47.3	46.1
6	2.86	2.71	2.47	2.77	2.68		97.2	95.5	26.9	27.4	26.6	25.8	27.4	27.0	26.4	27.4	26.9
7	3.19	2.69	2.55	2.94	3.39	0.03		97.1	26.7	27.2	26.4	25.5	27.2	26.9	26.4	27.2	26.7
8	2.97	2.70	2.49	2.86	2.96	0.05	0.03		26.7	27.4	26.7	25.5	27.4	26.9	26.4	27.2	26.7
9	0.81	0.07	0.04	0.06	0.94	2.59	2.64	2.64		96.5	26.5	36.0	96.3	95.6	93.6	95.7	100.0
10	0.75	0.06	0	0.06	0.91	2.47	2.55	2.49	0.04		27.0	36.4	99.8	96.3	94.0	96.5	96.5
11	0.98	2.77	2.97	2.90	0.33	2.78	2.84	2.77	3.24	2.97		83.9	26.8	26.8	27.9	27.1	26.5
12	0.66	1.44	1.41	1.42	0.14	3.06	3.32	3.28	1.44	1.41	0.19		36.3	36.3	36.4	36.6	36.0
13	0.76	0.07	0.002	0.06	0.91	2.47	2.55	2.49	0.04	0.002	3.03	1.42		96.2	93.9	96.3	96.3
14	0.79	0.07	0.04	0.06	0.92	2.56	2.65	2.62	0.05	0.04	2.99	0.14	0.04		94.0	95.9	95.6
15	0.79	0.02	0.07	0.07	0.94	2.75	2.77	2.76	0.07	0.07	2.56	1.41	0.07	0.07		94.3	93.6
16	0.75	0.04	0.04	0.06	0.89	2.49	2.57	2.55	0.05	0.04	2.99	1.40	0.04	0.05	0.06		95.7
17	0.81	0.07	0.04	0.06	0.94	2.59	2.64	2.64	0	0.04	3.24	1.44	0.04	0.05	0.07	0.05	

2.3 系统进化和聚类分析

以茄科番茄属栽培种 ‘上海 906’ 作为外类群, 根据试验获得的 17 个 ITS 序列以及从 NCBI 获得的 5 个不同辣椒种的 ITS 序列, 用 MEGA4 进行系统进化聚类分析, 结果表明, 茄科番茄属与辣椒属的植物分化十分明显, 分别为一单支系 (图 1)。进化树中 23 个 ITS 的平均遗传距离为 0.238, 22 个辣椒 ITS 之间的平均遗传距离为 0.159, 外类群茄科番茄属 ITS 与 22 个辣椒属 ITS 之间的平均遗传距离为 1.120。在进化树标尺约 0.11 处, 22 个辣椒属 ITS 序列可分为 6 个分支。

分支 A 共 14 个辣椒样品全为一年生辣椒, 包括 7 个国内收集的资源, 还包括 6 个引自马来西亚的辣椒资源, 以及从美国收集的材料, 这 14 个辣椒样品平均遗传距离为 0.041。分支 B 包括 3 个中华辣椒和灌木状辣椒, 该支平均遗传距离为 0.039, 表明中华辣椒与灌木状辣椒亲缘关系相对较

近。分支 C、D、E、F 等分别只有 1 个辣椒样品，分别为野生种 (*C. eximium*)、茸毛椒、浆果状椒、野生种 (*C. lycianthoides*)。

由图 1 可知，14 个一年生辣椒分别与灌木状辣椒和中华辣椒有较近的亲缘关系。分支 D 与分支 A、分支 B、分支 E、分支 F 的遗传距离平均分别为 0.077、0.055、0.086、0.089，由此表明浆果状椒与野生种 (*C. eximium*) 和茸毛椒亲缘关系相对较近。而野生种 (*C. lycianthoides*) 与茸毛椒亲缘关系相对较近。

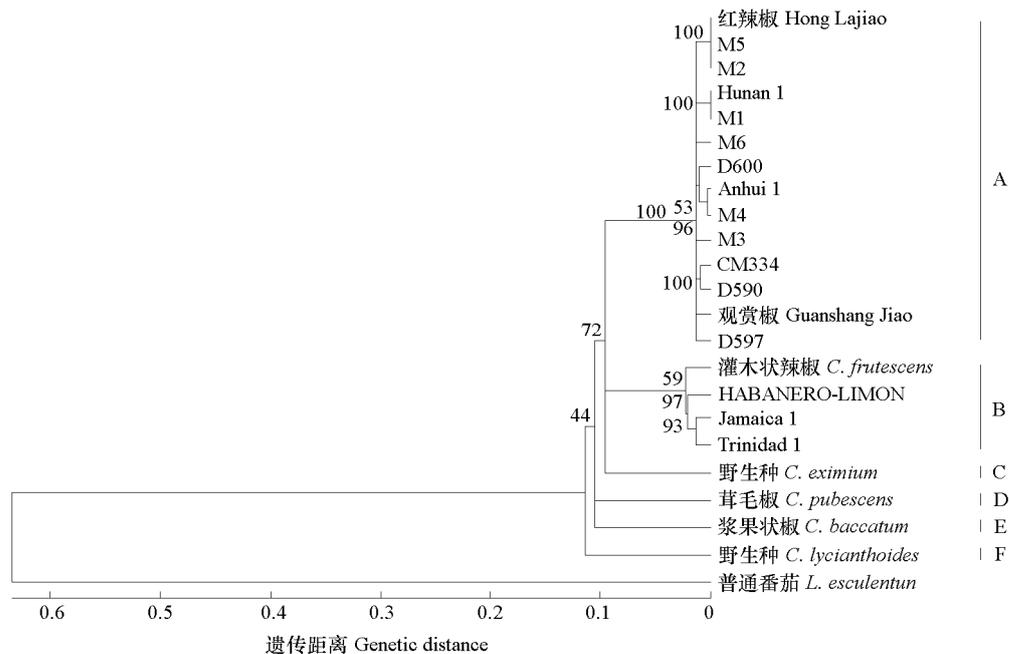


图 1 基于 ITS 区序列构建的系统发育树

Fig. 1 The phylogenetic tree based on the rDNA ITS sequence

3 讨论

本研究中 17 个辣椒样品通过 ITS 区域克隆所获得片段长度均在 750 bp 左右，这与前人研究辣椒 ITS 序列的结果 (Ryzhova et al., 2002; Purkayastha et al., 2012) 相吻合。有研究表明 (Bruce et al., 1995)，有花植物 (flowering plant) 的 ITS 序列一般比其它生物要短，在 187~298 bp 之间。本研究中的 17 个辣椒样品的 ITS (ITS1 和 ITS2) 序列变幅为 227~257 bp 之间，均在有花植物 ITS 序列长度变化范围之内，与前人研究的辣椒 ITS 序列长度 (Whitson & Manos, 2005; Hernández et al., 2010; 蒋向辉 等, 2010) 基本一致。分析表明辣椒 ITS1、ITS2 变异位点分别是 89 和 96 个，占总位点的 37.08% 和 37.35%，由此表明 ITS2 区变异稍大于 ITS1，这与 Purkayastha 等 (2012) 的观点相一致。而分析表明，5.8S 区均为 160 bp，在长度方面高度保守。

本研究中取材 17 份，对 ITS 序列进行分析，这 17 个 ITS 序列的同源性约 25.2%~100%，遗传分歧在 0~3.39 之间，说明辣椒 ITS 序列同源性变幅相对广泛，这可能与试材选取以及试验方法有关，尚需进一步研究。另外，引自马来西亚的一年生辣椒 (6 个) 与收集于中国内地的一年生辣椒 (8 个) 处于同一分支 A，未发现种内地理迁移的变化规律，这从另一角度说明一年生辣椒 ITS

序列具有一定的保守性, 种性比较稳定, 非近期分化类群。

ITS 为中度保守序列且长度不大, 在种内具有较高的保守性, 同时进化速率较快; 但在不同种间有不同的变异, 不仅广泛用于物种间的鉴定, 而且可以用来进行种内居群间的差异性分析。辣椒 ITS 序列比对结果发现中华辣椒 (编号 6、7、8、20) 和灌木状辣椒 (编号 22) 在 ITS1 区有 15 个碱基缺失, 为证实灌木状辣椒与中华辣椒被分在一起提供了分子证据。

本研究结果表明, 一年生辣椒与中华辣椒以及灌木状椒有较近的亲缘关系, 这与陈学军等 (2007) 采用表型数据以及 RAPD 和 ISSR 标记研究的结果一致, 也与前人基于形态学和细胞学的研究结果 (Pickersgill et al., 1979; Pickersgill, 1991) 一致。在辣椒的系统进化、聚类分析中, 基于 ITS 序列 (包括 ITS1、5.8S 和 ITS2) 分类结果表明, 不同地理种群的一年生辣椒处于同一分支 A。但在本研究的 NJ 系统树中, 灌木状辣椒与中华辣椒被分在一起, 未能将它们区分开来, 与 Purkayastha 等 (2012) 报道的研究结果相一致。同时也表明, 借助于 ITS 序列差异还不能够把辣椒属不同种完全鉴别, 需要借助其它的分子标记才能进行有效区分。

References

- Bohs L, Olmstead G. 2001. A reassessment of *Normania* and *Triguera* (Solanaceae). *Plant Syst Evol*, 228: 33 - 48.
- Bruce G Baldwin, Michael J Sanderson, Mark J Porter, Martin F Wojciechowski, Christopher S Campbell, Michael J Donoghue. 1995. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: A valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 82 (2): 247 - 277.
- Chen Ren-fang, Yu Mao-de, Liu Xiu-qun, Chen Long-qing. 2010. Analysis on the internal transcribed spacers (ITS) sequences and phylogenetics of Mulberry (*Morus*). *Scientia Agricultura Sinica*, 43 (9): 1771 - 1781. (in Chinese)
- 陈仁芳, 余茂德, 刘秀群, 陈龙清. 2010. 桑种质资源 ITS 序列与系统进化分析. *中国农业科学*, 43 (9): 1771 - 1781.
- Chen Xue-jun, Cheng Zhi-fang, Chen Jin-feng, Lou Qun-feng, Geng Hong. 2007. Genetic diversity of pepper germplasm with RAPD, ISSR and phenotypic data. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 27 (4): 662 - 670. (in Chinese)
- 陈学军, 程志芳, 陈劲枫, 娄群峰, 耿红. 2007. 辣椒种质遗传多样性的 RAPD 和 ISSR 及其表型数据分析. *西北植物学报*, 27 (4): 662 - 670.
- Chen Xue-jun, Zhou Kun-hua, Zong Hong-xia, Fang Rong. 2012. Genetic diversity of *Capsicum frutescens* in China as revealed by SRAP and SSR markers. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 26 (12): 2445 - 2452. (in Chinese)
- 陈学军, 周坤华, 宗洪霞, 方荣. 2012. 中国灌木辣椒种质遗传多样性的 SRAP 和 SSR 分析. *西北植物学报*, 26 (12): 2445 - 2452.
- De Ying, Mu Huai-bin, Wang Zhao-lan, Zhao Lai-xi, Liu Xin-liang. 2012. rDNA-ITS sequence in *Elymus sibiricus* and *E. nutans*. *Journal of Plant Genetic Resources*, 13 (4): 609 - 613. (in Chinese)
- 德英, 穆怀彬, 王照兰, 赵来喜, 刘新亮. 2012. 老芒麦和垂穗披碱草 rDNA-ITS 序列分析. *植物遗传资源学报*, 13 (4): 609 - 613.
- Ding Xiao-yu, Wang Zheng-tao, Xu Luo-shan, Xu Hong, Zhou Kai-ya, Shi Guo-xin. 2002. Study on sequence difference and SNP phenomenon of rDNA ITS region in F type and H type population of *Dendrobium officinale*. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 27 (2): 85 - 89. (in Chinese)
- 丁小余, 王峥涛, 徐璐珊, 徐红, 周开亚, 施国新. 2002. F 型、H 型居群的铁皮石斛 rDNA ITS 区序列差异及 SNP 现象的研究. *中国中药杂志*, 27 (2): 85 - 89.
- Hernández A, Aranda E, Martín A, Benito M J, Bartolomé T, de Gúa Córdoba M. 2010. Efficiency of DNA typing methods for detection of smoked paprika "pimenton de la vera" adulteration used in the elaboration of dry-cured Iberian pork sausages. *J Agric Food Chem*. 58: 11688 - 11694.
- Jiang Xiang-hui, She Chao-wen, Xu Dong, Zhang Qing-hua, Zhu Chao. 2010. Study on ITS sequences clone and taxonomic status of *Capsicum frutescens* var. *liuyang*. *Jiangsu Agricultural Sciences*, (4): 36 - 37. (in Chinese)
- 蒋向辉, 佘朝文, 许栋, 张青桦, 朱超. 2010. 浏阳朝天椒的 ITS 序列分析及分类地位研究. *江苏农业科学*, (4): 36 - 37.
- Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16: 111 - 120.

- Lee S K, Li P T, Lau D T, Yung P P, Kong R Y, Fong W F. 2006. Phylogeny of medicinal *Phyllanthus* species in China based on nuclear ITS and chloroplast *atpB-rbcL* sequences and multiplex PCR detection assay analysis. *Planta Med*, 72 (8): 721 - 726.
- Lefebvre V, Goffinet B, Chauvet J C, Caromel B, Signoret P. 2001. Evaluation of genetic distances between pepper inbred lines for cultivar protection purposes: Comparison of AFLP, RAPD and phenotypic data. *Theor Appl Genet*, 102 (5): 741 - 750.
- Li Dan, Li Zhen-jian, Mao Ping, Yan Xue-feng, Chun Ze, Ma Xin-rong. 2012. Phylogenetic analysis and identification of *Dendrobium* species based on ribosomal DNA internal transcribed spacer (ITS) sequence. *Acta Horticulturae Sinica*, 39 (8): 1539 - 1550. (in Chinese)
- 栗 丹, 李振坚, 毛 萍, 严雪峰, 淳 泽, 马欣荣. 2012. 基于 ITS 序列石斛材料的鉴定及系统进化分析. *园艺学报*, 39 (8): 1539 - 1550.
- Li Yong-ping, Lin Hui, Wen Qing-fang. 2011. RAPD analysis of genetic diversity for *Capsicum annuum* L. germplasms. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 26 (5): 747 - 752. (in Chinese)
- 李永平, 林 珩, 温庆放. 2011. 辣椒种质资源的遗传多样性分析. *福建农业学报*, 26 (5): 747 - 752.
- Meng Jin-gui, Zhang Qing-zhe, Wang Shuo, Zhang Ying-hua. 2012. Studies on genetic relationship between *Capsicum frutescens* var. *shuanlaense* and other five cultivated *Capsicum* species. *Acta Horticulturae Sinica*, 39 (8): 1589 - 1595. (in Chinese)
- 孟金贵, 张卿哲, 王 硕, 张应华. 2012. 涮辣与辣椒属 5 个栽培种亲缘关系的研究. *园艺学报*, 39 (8): 1589 - 1595.
- Pickersgill B. 1991. Cytogenetics and evolution of *Capsicum* L// Tsuchiya T, Gupta P K. Chromosome engineering in plants: Genetics, breeding, evolution. Part B. Amsterdam: Elsevier: 139 - 160.
- Pickersgill B, Heiser C B, McNeill J. 1979. Numerical taxonomic studies on variation and domestication in some species of *Capsicum* // Hawkes J G, Lester R N, Skelding A D. The biology and taxonomy of the Solanaceae. New York: Academic Press: 679 - 700.
- Purkayastha J, Alam S I, Gogoi H K, Singh L, Veer V. 2012. Molecular characterization of 'Bhut Jolokia' the hottest chilli. *Journal of Biosciences*, 37 (4): 757 - 768.
- Qiu Rong, Cheng Zhong-ping, Wang Zhang-li. 2012. Studies on genetic relationship and evolutionary path of subgenus *Amygdalus* in China. *Acta Horticulturae Sinica*, 39 (2): 205 - 214. (in Chinese)
- 邱 蓉, 程中平, 王章利. 2012. 中国扁桃亚属植物亲缘关系及其演化途径研究. *园艺学报*, 39 (2): 205 - 214.
- Ryzhova N N, Goryunova S V, Tomilo A A, Kochieva E Z. 2002. Two types of rDNA Internal Transcribed Spacers (ITSs) in the *Capsicum* genome. *Doklady Biol Sci*, 387: 539 - 541.
- Sanatombi K, Sen-Manidi S, Sharmc G J. 2010. DNA profiling of *Capsicum* landraces of Manipur. *Scientia Horticulturae*, 124 (3): 405 - 408.
- Smith S D, Baum D A. 2006. Phylogenetics of the florally diverse Andean clade Iochrominae (Solanaceae). *Am J Bot*, 93: 1140 - 1153.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28: 2731 - 2739.
- Tian Min, Li Ji-yuan, Ni Sui, Fan Zheng-qi, Li Xin-lei. 2008. Phylogenetic study on section *Camellia* based on ITS sequences data. *Acta Horticulturae Sinica*, 35 (11): 1685 - 1688. (in Chinese)
- 田 敏, 李纪元, 倪 穗, 范正琪, 李辛雷. 2008. 基于 ITS 序列的红山茶组植物系统发育关系的研究. *园艺学报*, 35 (11): 1685 - 1688.
- Wang Guan-lin, Fang Hong-jun. 2002. Plant genetic engineering. Beijing: Science Press. (in Chinese)
- 王关林, 方宏筠. 2002. 植物基因工程. 北京: 科学出版社.
- White T J, Bruns T, Lee S, Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics; in PCR protocols: A guide to methods and applications. CA, San Diego: Academic Press: 315 - 324.
- Whitson M, Manos P S. 2005. Untangling *Physalis* (Solanaceae) from the physaloids: A two-gene phylogeny of the Physalinae. *Syst Bot*, 30: 216 - 230.
- Zou Xue-xiao. 2009. Pepper genetics and breeding. Beijing: Science Press. (in Chinese)
- 邹学校. 2009. 辣椒遗传育种学. 北京: 科学出版社.