

# 辣椒恢复基因连锁标记的适用性评价与应用

米志波 张建盈 王平勇 刘辰 沈火林\*

(中国农业大学农学与生物技术学院, 设施蔬菜生长发育调控北京市重点实验室, 北京 100193)

**摘要:** 为了更准确、高效地利用分子标记辅助选择技术进行辣椒细胞质雄性不育育性基因的选择, 本试验利用 36 份已知基因型 (*RfRf* 或 *rfrf*) 的辣椒自交系对 11 对已报道的辣椒恢复基因连锁标记进行适用性检验。结果表明, 显性标记 CRF3S1S 和 CRF-SCAR 的适用性最广, 其准确率分别为 91.67%、88.89%; 在 6 对共显性标记中 CaRf-FL-M2 的适用性最广, 其准确率为 80.56%。育种实际应用中可以利用标记 CRF3S1S 或 CRF-SCAR 对辣椒材料进行初次鉴定, 对其中含有 *Rf* 基因的辣椒材料利用标记 CaRf-FL-M2 进行再次鉴定。

**关键词:** 辣椒; 恢复基因; 分子标记辅助选择

辣椒利用 CMS (Cytoplasmic male sterility) 三系配套制种可以省去人工去雄, 提高种子纯度, 同时有利于知识产权的保护。但是, 如果父本的育性恢复力不强, 则会严重影响  $F_1$  的果形和产量 (王立浩, 2007)。因此选育恢复性强、配合力高、农艺性状优良的恢复系 (父本) 成为辣椒 CMS 在杂种优势利用中急需解决的主要问题之一 (沈火林和石正强, 2002)。传统的辣椒 CMS 育性基因选择是根据测交组合的育性表现进行筛选。分子标记辅助选择可直接反映不同材料 DNA 的多态性差异, 并且选择不受时间和环境的影响 (华明艳等, 2008)。通过育性紧密连锁的分子标记直接进行育性基因的选择, 可以有效加快恢复系的筛选进程。

目前普遍认为辣椒育性恢复由一个主效恢复基因 *Rf* 控制, 除主效基因外, 育性恢复还受到修饰基因和环境因素 (特别是温度) 的影响 (Zhang et al., 2000; Gulyas et al., 2006)。Zhang 等 (2000)

报道了两个与主效 *Rf* 基因连锁的 RAPD 标记 OP13<sub>1400</sub> (0.37 cM) 和 OW19<sub>800</sub> (8.12 cM)。Lee 等 (2008a) 利用与 *Rf* 基因连锁的 RAPD 标记 OPT-02/570 (5 cM) 开发出一个 STS 标记 CRF-SCAR。Gulyas 等 (2006) 检验了恢复标记 CRF3S1S 的适用性, 并分析得到 CRF3S1S 在  $F_3$  中的遗传距离为 5.3 cM, 在  $F_4$  中的遗传距离为 4.8 cM。Kim 等 (2006) 成功地将 AFLP 标记 AFRF8 转化成一个共显性 CAPS 标记 AFRF8CAPS (1.8 cM)。Min 等 (2009) 利用 AFLP 技术开发了 3 个与 *Rf* 基因连锁的标记 AFRF1、AFRF3 和 AFRF4, 并转化为可用于 PCR 的标记类型。Lee 等 (2008a) 利用 AFLP-BSA 方法开发出用于去除部分育性材料的 CAPS 标记 PR-CAPS (1.8 cM)。Jo 等 (2010) 利用矮牵牛 *Rf* 基因筛选辣椒 BAC 文库开发出连锁标记 BAC13T7SCAR (1.4 cM)。常彩涛等 (2005) 利用 BSA 分析法筛选得到 PCR 标记 S418<sub>1515</sub>, 并证明其能用于候选育性材料的初筛。吴国平等 (2012) 以甜椒为试材, 利用 SRAP 分子标记技术筛选得到一个与甜椒恢复基因相关的分子标记, 并成功地将此 SRAP 标记转化为简单、稳定的 SCAR 标记。

本试验利用 36 份已知基因型 (*RfRf* 或 *rfrf*) 的辣椒自交系对 11 对已开发的遗传距离较近的 *Rf* 基因连锁标记进行适用性检验。根据所得准确率、实

米志波, 男, 硕士研究生, 专业方向: 蔬菜遗传育种与生物技术, E-mail: 383010356@qq.com

\* 通讯作者 (Corresponding author): 沈火林, 教授, 博士生导师, 专业方向: 蔬菜遗传育种与生物技术, E-mail: SHL1606@cau.edu.cn

收稿日期: 2014-03-06; 接受日期: 2014-05-21

基金项目: “十二五” 国家科技支撑计划项目 (2012BAD02B02), 现代农业产业技术体系北京市果类蔬菜创新团队项目

验成本以及实验操作情况来衡量 *Rf* 基因连锁标记的适用性, 从而为更准确、高效地利用分子标记选择辣椒恢复基因提供一定的试验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试的 36 份辣椒 (*Capsicum annuum* L.) 自交系均由中国农业大学辣椒课题组提供。这些自交系均已通过测交证明了育性的基因型, 其中 13 份育性基因型为 *RfRf*, 23 份育性基因型为 *rfif*。2013 年春以伏地尖 A 雄性不育系为母本, 与 36 份自交系进行配组, 2013 年春将测配的 36 个杂交组合种植在中国农业大学上庄实验站大棚内, 再次观察测交组合的育性, 验证 36 份自交系的育性基因型。

### 1.2 试验方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 DNA 提取采用 CTAB 法。以 36 份父本自交系植株幼嫩真叶为材料, 每份自交系混合取样。提取完毕后利用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA, 并将每个样品 DNA 质量浓度稀释到  $10 \sim 25 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 。

1.2.2 连锁标记 试验检验的 11 对标记信息见表

1。引物由北京三博远志生物技术有限责任公司合成。利用 1.8% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物, 在 ChampGel 5000 凝胶成像仪上观察并拍照分析。

1.2.3 PCR 体系及反应程序 试验采用两种 PCR 反应体系。第 1 种 PCR 反应体系使用购自北京奥赛博科技发展有限公司的  $2 \times \text{Taq} 10 \text{ MasterMix}$ , 体系为:  $10 \mu\text{L}$  模板 DNA ( $20 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ )、 $10 \mu\text{L}$   $2 \times \text{Taq} 10 \text{ MasterMix}$ 、正向和反向引物各  $0.6 \mu\text{L}$ 、 $6.8 \mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O; 第 2 种 PCR 反应体系使用购自北京天根生物技术公司的 *Taq* 酶和 dNTP, 体系为:  $10 \mu\text{L}$  模板 DNA ( $20 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ )、 $0.4 \mu\text{L}$  dNTP ( $2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )、 $0.5 \text{ U}$  *Taq* DNA 聚合酶、 $2 \mu\text{L}$   $10 \times \text{buffer}$  (含  $\text{Mg}^{2+}$ )、正向和反向引物各  $0.6 \mu\text{L}$ 、 $14 \mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O。试验首先选用第 1 种反应体系, 对于扩增 PCR 失败的标记再选用第 2 种反应体系。

OPP13-CAPS、AFRF8CAPS、PR-CAPS、CRF-SCAR 标记反应程序为:  $95 \text{ }^\circ\text{C}$  预变性 5 min;  $95 \text{ }^\circ\text{C}$  45 s, 退火 45 s,  $72 \text{ }^\circ\text{C}$  90 s, 40 个循环;  $72 \text{ }^\circ\text{C}$  延伸 10 min (Lee et al., 2008b)。AFRF1CAPS、CaRf-FL-M2、CRFCAPS 标记反应程序为:  $95 \text{ }^\circ\text{C}$  预变性 5 min;  $95 \text{ }^\circ\text{C}$  30 s, 退火 30 s,  $72 \text{ }^\circ\text{C}$  2 min,

表 1 已开发的辣椒 CMS 恢复基因连锁标记

标记名称	标记序列 (5' -3')	标记及类型	遗传距离/cM	退火温度/ $^\circ\text{C}$	标记来源
OPP13-CAPS	TACAGCTTCAAAGTAAACACAACC ATTCCGGGTCCAAGAAGGTTCTAT	CAPS ( <i>Hinf</i> I); 共显性	1.1	58	Lee et al., 2008b
CRF3S1S	ATTTTCAGATTGTGGCGACG CGACCATCAGCAGGAGG	SCAR; 显性	4.8	60	Gulyas et al., 2006
CRF-SCAR	GTACACACCACTCG-TCGCTCCT TTCTTGGGTCCCTTT-CTTCCAA	STS; 显性	2.7	55	Lee et al., 2008b
AFRF8CAPS	GTTGATGCTCTATGGTTGGAGAAC GCACTATTCTATTGGCTTTCTG	CAPS ( <i>Rsa</i> I); 共显性	1.8	56	Kim et al., 2006
PR-CAPS	ATGTCACCCCCACAGACTCCTTCACCT TCCCATCTAGCCTCTGCCTTCTCAAATG	CAPS ( <i>Mse</i> I); 共显性	1.6	56	Lee et al., 2008a
AFRF1CAPS	CTGCGTACCAATTCACTAAAGCACT TGAGTCTGAGTAACCAGGTCATTG	CAPS ( <i>Kpn</i> I); 共显性	1.1	60	Min et al., 2009
CaRf-FL-M2	ATGGATCCAAAGGACCACAAGCTAACC GCATTGGGACTGAAATCCCCAAATAAG	STS; 共显性	0.5	60	Min et al., 2009
CRFCAPS	GATTCATCCTCGAGCAAAGAGGATTAC TCAAGGAAATCCCCAAATAAGTGTGAACC	CAPS ( <i>Hha</i> I); 共显性	1.5	60	Min et al., 2009
BAC13T7 SCAR	GAAGTAGCCCAAACTTATCAGG CACTAAGCCCGATGTATGAATC	SCAR; 显性	1.4	53	Jo et al., 2010
S418 <sub>1515</sub>	CACCATCCGTCAGGAGAAAGAGG ACTCTTCTCACAGGAATCCGACCA	显性	—	55	常彩涛等, 2005
SRAP	CCAAACCGTAATCTAAAC ATTCATTTTCATCACGCAGCC	SCAR; 显性	—	58	吴国平等, 2012

40个循环; 72 °C延伸 10 min (Min et al., 2009)。BAC13T7SCAR 标记反应程序为: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 30 s, 退火 30 s, 72 °C 60 s, 40 个循环; 72 °C 延伸 10 min (Jo et al., 2010)。CRF3S1S 标记反应程序为: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 30 s, 退火 30 s, 72 °C 60 s, 25 个循环; 72 °C 延伸 10 min (Gulyas et al., 2006)。S418<sub>1515</sub> 标记反应程序为: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 30 s, 退火 60 s, 72 °C 70 s, 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min (常彩涛等, 2005)。SRAP 标记反应程序为: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 30 s, 退火 45 s, 72 °C 80 s, 40 个循环; 72 °C 延伸 7 min (吴国平等, 2012)。每对引物的退火温度见表 1。

## 2 结果与分析

### 2.1 PCR 扩增结果

已有的研究报道 (Lee et al., 2008b; Min et al., 2009; Jo et al., 2010) 认为标记 OPP13-CAPS、AFRF8CAPS、PR-CAPS、AFRF1CAPS、CaRf-FL-M2、CRFCAPS 为共显性标记, 在恢复材料中能分别扩增出 700、200、600、360、550、1 534 bp 的特异条带, 在不育材料中能分别扩增出 450、300、700、474、600、1 200 bp 的特异条带; CRF3S1S、CRF-SCAR、BAC13T7SCAR、S418<sub>1515</sub>、SRAP 标记为显性标记, 在恢复材料中能分别扩增出 870、500、556、1 515、250 bp 的特异条带。

由图 1 可知, 标记 AFRF1CAPS 和 S418<sub>1515</sub> 没能扩增到相应的特异条带; 标记 CRFCAPS 和 AFRF8CAPS 的扩增结果不稳定, 36 份辣椒自交系中分别只在 23 份、9 份材料中扩增到特异条带。其余 7 对标记扩增结果均与前人报道 (Lee et al., 2008b; Min et al., 2009; Jo et al., 2010) 相同。

### 2.2 分子标记的适用性比较

分子标记 CRF3S1S、CRF-SCAR、BAC13T7SCAR、SRAP、OPP13-CAPS、CaRf-FL-M2、CRFCAPS、PR-CAPS、AFRF8CAPS 的准确率分别为 91.67%、88.89%、44.44%、25.00%、80.56%、80.56%、61.11%、38.90%、25.00% (表 2)。显性标记 CRF3S1S 和 CRF-SCAR 具有较高的准确率, 并且这两个标记操作方便、重复性好、实验成本低, 因此具有广泛的适用性。在 6 对共显性标

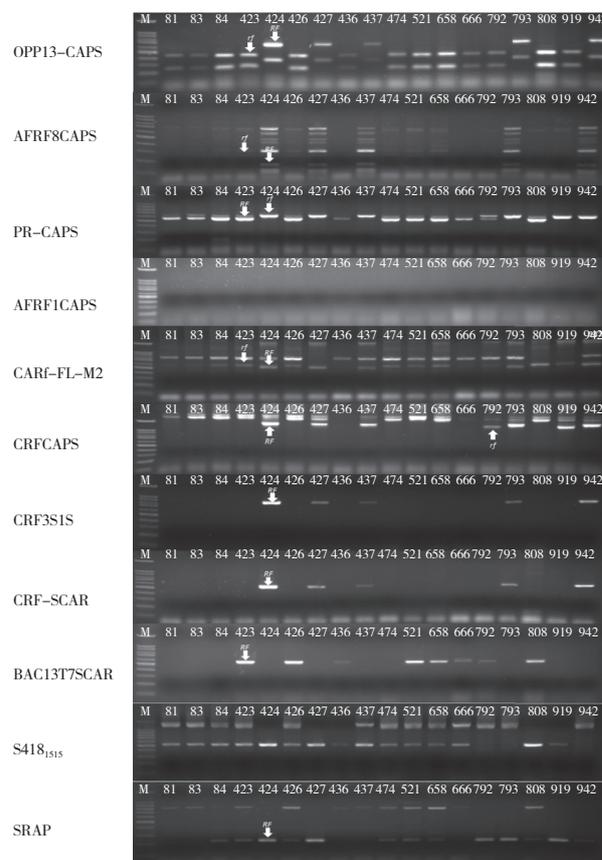


图 1 11 对分子标记的 PCR 扩增结果

箭头所指为特异带位置; M: 100 bp DNA ladder marker; 424、427、437、658、793、808、942 的基因型为 *R/Rf*, 其余基因型均为 *r/rf*。

记中, OPP13-CAPS 和 CaRf-FL-M2 的准确率均为 80.56%, 而标记 CaRf-FL-M2 在使用过程中不需要酶切, 相比于标记 OPP13-CAPS 降低了实验成本, 因此共显性标记中 CaRf-FL-M2 的适用性最广泛。

### 2.3 *Rf* 基因分子标记辅助选择

中国农业大学辣椒课题组已利用分子标记进行辣椒 *Rf* 基因的选择, 2012~2013 年两年间利用标记 CRF-SCAR 对田间 1 232 个辣椒品种和单株进行了 *Rf* 基因的鉴定 (图 2), 其中有 275 个品种和单株含有 *Rf* 基因, 含 *Rf* 基因材料所占的比例为 22.3%。结合本试验的结果, 育种实际应用中可以首先利用显性标记 CRF3S1S 或者 CRF-SCAR 对辣椒材料进行初次鉴定, 对其中含有 *Rf* 基因的辣椒材料利用共显性标记 CaRf-FL-M2 再次进行鉴定。此种方法不但操作方便、实验成本低, 而且还能得到辣椒单株准确的基因型, 进而有效地加快辣椒恢复系的筛选进程。

表 2 辣椒材料的育性基因型和分子标记检测结果

自交系/编号	材料类型	基因型	CRF3S1S	CRF-SCAR	BAC13T7SCAR	SRAP	OPP13-CAPS	CaRf-FL-M2	CRFCAPS	PR-CAPS	AFRF8CAPS
21077B/81	牛角椒	<i>rfif</i>	B	B	B	F	B	B	无	A	无
20154B/83	牛角椒	<i>rfif</i>	B	B	B	F	B	B	无	A	无
20155B/84	牛角椒	<i>rfif</i>	B	B	B	F	B	B	无	A	无
巨星 B/423	灯笼甜椒	<i>rfif</i>	B	B	F	F	B	B	无	A	无
巨星 C/424	灯笼甜椒	<i>RfRf</i>	F	F	B	F	A	A	A	B	A
上海园 B/426	灯笼甜椒	<i>rfif</i>	B	B	F	F	B	B	无	A	无
上海园 C/427	灯笼甜椒	<i>RfRf</i>	F	F	B	F	A	A	A	B	A
22033B/436	灯笼甜椒	<i>rfif</i>	B	B	F	B	B	无	无	A	无
22033C/437	灯笼甜椒	<i>RfRf</i>	F	F	B	B	A	A	A	B	A
Capino F10/474	灯笼甜椒	<i>rfif</i>	B	B	B	F	B	B	无	A	无
Mandy F11521	灯笼甜椒	<i>rfif</i>	B	B	F	F	B	B	无	A	无
20079C/658	羊角椒	<i>RfRf</i>	B	B	F	F	B	B	无	A	无
22045A/666	羊角椒	<i>rfif</i>	B	B	F	F	B	B	无	A	无
伏地尖 B/792	羊角椒	<i>rfif</i>	B	B	F	F	B	B	B	H	无
伏地尖 C/793	羊角椒	<i>RfRf</i>	F	F	B	F	A	A	A	B	A
26187C/808	羊角椒	<i>RfRf</i>	B	B	F	F	B	B	无	A	无
宁夏羊角 B/919	羊角椒	<i>rfif</i>	B	B	B	F	B	B	B	B	无
26088C/942	圆锥形	<i>RfRf</i>	F	F	B	F	A	A	A	B	A
25011B/1013	圆球形	<i>rfif</i>	B	B	F	F	B	B	无	A	无
20077B/1016	长线椒	<i>rfif</i>	B	B	B	F	B	B	B	B	无
二金条 C/1023	短线椒	<i>RfRf</i>	F	F	B	B	A	A	A	B	A
24122C/1029	长线椒	<i>RfRf</i>	F	F	B	F	B	B	A	B	A
23141B/1039	长线椒	<i>rfif</i>	B	B	B	F	B	B	B	B	无
益都红 B/1042	小羊角椒	<i>rfif</i>	B	B	B	F	B	B	B	B	无
益都红 C/1046	小羊角椒	<i>RfRf</i>	F	F	B	F	A	A	A	B	A
望都红 B/1047	小羊角椒	<i>rfif</i>	B	B	B	F	B	B	B	B	无
20199B/1057	短线椒	<i>rfif</i>	B	B	F	F	B	B	B	B	B
24011B/1066	小羊角椒	<i>rfif</i>	B	F	B	F	B	B	B	B	无
27022C/1070	粗线椒	<i>RfRf</i>	F	F	B	B	B	B	A	A	无
28337C/1145	粗线椒	<i>RfRf</i>	F	F	B	B	B	B	A	A	无
28337B/1149	粗线椒	<i>rfif</i>	B	B	B	F	B	B	B	B	无
29046B/1155	樱桃形	<i>rfif</i>	B	B	F	B	B	B	无	A	无
25667B/1160	圆锥形	<i>rfif</i>	F	F	F	F	H	B	A	A	无
正鸿 189 F8/1169	单生朝天椒	<i>RfRf</i>	F	F	F	F	B	B	A	B	无
天鹰椒/1182	朝天椒	<i>rfif</i>	B	B	B	F	B	B	B	B	无
27055C/1186	朝天椒	<i>rfif</i>	B	B	B	B	B	B	B	B	无
准确率/%			91.67	88.89	44.44	25.00	80.56	80.56	61.11	38.90	25.00

注：表中 F 代表基因型 *Rf*；A 代表基因型 *RfRf*；H 代表基因型 *Rfif*；B 代表基因型 *rfif*；无表示没有特异条带。

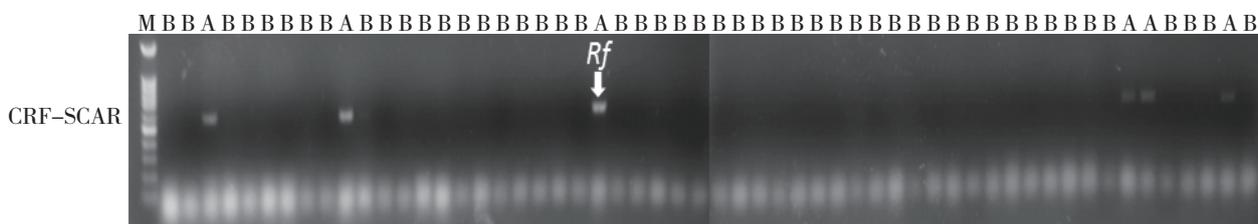


图 2 标记 CRF-SCAR 对辣椒品种和单株进行 *Rf* 基因鉴定的部分结果

箭头指出的是特异带位置；M：100 bp DNA ladder marker；A、B 分别表示基因型 *Rf* 和 *rfif*。

### 3 结论与讨论

标记开发过程中选用不同试材会影响标记的适用性。同一标记在不同材料  $F_2$  群体上的遗传距离也不相同,例如 Lee 等 (2008a) 与 Jo 等 (2010) 报道标记 CRF-SCAR 的遗传距离分别为 2.7、3.6 cM。开发的标记不能适用于所有育种材料和种质资源 *Rf* 基因鉴定,本试验中自交系 1160 只能被标记 CaRf-FL-M2 正确鉴定,自交系 658、808、1070、1145、1169 也只能被 3~4 个标记正确鉴定。另外,标记自身的稳定性也会影响标记的适用性。本试验检测的标记 AFRF1CAPS、S4181515、CRFCAPS、AFRF8CAPS 由于 PCR 扩增重复性差的原因而影响其判定。Jo 等 (2010) 利用 55 份育种材料对 4 个基于 PCR 和 2 个基于 HRM 的 *Rf* 基因连锁标记进行适应性比较,指出标记 OPP13-CAPS、PR-CAPS、CRF-SCAR、BAC13T7SCAR 的准确率分别为 27%、33%、89%、51%。除了标记 OPP13-CAPS 的准确率与本试验结果相差较大外,其余 3 个标记的准确率与本试验结果相近。试验依据标记准确鉴定基因型的比率评价标记的适用性,由于本试验材料仅有 36 份,因此所得的准确率也只能在一定程度上比较标记之间的适用性。

#### 参考文献

常彩涛,王春国,陈成彬,吴峰,吴锋,孙德岭. 2005. 细胞质雄性不育辣椒育性恢复基因特异分子标记的筛选. 实验生物学

- 报, 38 (3): 227-232.
- 华明艳,王立浩,毛胜利,张宝玺,云兴福. 2008. 辣椒中可用于辅助选择的分子标记及其研究进展. 长江蔬菜, (11): 14-17.
- 沈火林,石正强. 2002. 辣椒雄性不育恢复系选育研究 // 雷建军. 园艺学进展 (第五辑). 广州: 广州出版社: 448-451.
- 王立浩. 2007. 辣椒胞质雄性不育恢复性的遗传分析与定位及其应用的研究 [博士学位论文]. 北京: 中国农业科学院.
- 吴国平,袁稳,刘金兵,刁卫平,王述彬,潘宝贵,戈伟,侯喜林. 2012. 甜椒胞质雄性不育恢复系 SRAP 及 SCAR 标记. 分子植物育种, 10 (4): 446-451.
- Gulyas G, Pakozdi K, Lee J S, Hirata Y. 2006. Analysis of fertility restoration by using cytoplasmic male-sterile red pepper (*Capsicum annuum* L.) lines. Breed Sci, 56: 331-334.
- Jo Y D, Kim Y M, Park M N, Yoo J H, Park M K, Kim B D, Kang B C. 2010. Development and evaluation of broadly applicable markers for Restorer-of-fertility in pepper. Mol Breeding, 25: 187-201.
- Kim D S, Kim D H, Yoo J H, Kim B D. 2006. Cleaved amplified polymorphic sequence and amplified fragment length polymorphism markers linked to the fertility restorer gene in chili pepper (*Capsicum annuum* L.). Mol Cells, 21: 135-140.
- Lee J, Yoon J B, Park H G. 2008a. A CAPS marker associated with the partial restoration of cytoplasmic male sterility in chili pepper (*Capsicum annuum* L.). MolBreed, 21: 95-104.
- Lee J, Yoon J B, Park H G. 2008b. Linkage analysis between the partial restoration (*pr*) and the Restorer-of-fertility (*Rf*) loci in pepper cytoplasmic male sterility. Theoretical and Applied Genetics, 117: 383-389.
- Min W K, Kim S, Sung S K, Kim B D, Lee S. 2009. Allelic discrimination of the Restorer-of-fertility gene and its inheritance in peppers (*Capsicum annuum* L.). Theor Appl Genet, 119: 1289-1299.
- Zhang B X, Huang S W, Yang G M, Guo J Z. 2000. Two RAPD markers linked to a major fertility restorer gene in pepper. Euphytica, 113: 155-161.

## Applicability Evaluation and Application of Linked Markers for Restorer-of-fertility in Pepper

MI Zhi-bo, ZHANG Jian-ying, WANG Ping-yong, LIU Chen, SHEN Huo-lin\*

(College of Agronomy and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing Key Laboratory of Growth and Development Regulation for Protected Vegetable Crops, Beijing 100193, China)

**Abstract:** In order to accurately and efficiently use molecular marker assisted selection technique in selecting Restorer-of-fertility gene in pepper (*Capsicum annuum* L.) lines, this experiment carried out applicability test on the 11 pairs of reported Restorer-of-fertility gene linked markers with 36 pepper inbred line, whose genotype (*RfRf* or *rf rf*) has been known. The results indicated that dominant markers CRF3S1S and CRF-SCAR had the broadest applicability, and their accuracy rate were 91.67% and 88.89%, respectively. CaRf-FL-M2 had the broadest applicability among the 6 pairs of co-dominant markers, and its accuracy rate was 80.56%. In breeding practice, CRF3S1S or CRF-SCAR markers could be used to preliminarily identify pepper materials. Then one more identification could be conducted on pepper material containing *Rf* gene by CaRf-FL-M2 marker.

**Key words:** Pepper; Restorer-of-fertility; Molecular marker assisted selection