

SSR 标记在辣椒 DUS 测试中的应用研究

管俊娇¹, 余志慧², 杨晓洪¹, 王江民¹, 张鹏¹, 黄清梅¹, 张建华¹

(¹ 云南省农业科学院质量标准与检测技术研究所, 昆明 650205; ² 云南省农业科学院农业经济与信息研究所, 昆明 650205)

摘要: 为了评价 SSR 分子标记在辣椒 (*Capsicum annuum* L.) 品种特异性、一致性、稳定性 (DUS) 测试中的应用潜力, 采用聚丙烯酰胺凝胶电泳技术和毛细管电泳技术, 对辣椒 SSR 引物进行筛选, 采用入选的 30 对核心引物, 构建 130 份不同来源品种的指纹图谱。30 对引物共检测到等位基因 163 个, 每对引物等位基因变幅为 2~15, 平均等位基因数为 5.43, 多态信息量 (PIC) 的变异范围为 0.17~0.76, 平均为 0.43。聚类分析表明, 该套引物可以将所有参试品种区分开来, 遗传基础相近的品种优先聚在一起。130 个品种的遗传距离为 0.01~0.91。有 20 对品种遗传距离小于 0.10, 其中 3 对品种有 1 个位点的差异, 采用差异位点数判断品种特异性更适合目前辣椒品种现状。采用 10 对引物对品种 0313963-4 进行了一致性检测, 综合一致性比率 R 值为 96.5%, 低于 DUS 测试中对表型性状一致性的要求。因此 SSR 标记直接用于辣椒 DUS 判定还需进一步研究, 但是可用于近似品种筛选。

关键词: 辣椒; DUS 测试; SSR 标记; 近似品种

Study on the Application of SSR Markers in Pepper (*Capsicum annuum* L.) DUS Testing

GUAN Jun-jiao¹, YU Zhi-hui², YANG Xiao-hong¹, WANG Jiang-min¹, ZHANG Peng¹,
HUANG Qing-mei¹, ZHANG Jian-hua¹

(¹ Institute of Quality Standard and Testing Technology, Yunnan Academy of Agriculture Sciences, Kunming 650205;

² Institute of Agricultural Economy and Information, Yunnan Academy of Agriculture Sciences, Kunming 650205)

Abstract: To evaluate the application of SSR markers in pepper DUS testing, here we employed thirty pairs of SSR primers in fingerprinting analysis of 130 varieties. A total of 163 polymorphic alleles were detected by 30 primer pairs, which ranged from 2 to 15 with a mean value of 5.43. The polymorphism information content (PIC) ranged from 0.17 to 0.76, with the average of 0.43. These genotypes can be clarified using the polymorphic information. These pepper cultivars with close genetic background were clustered. The genetic distance of the 130 cultivars ranged from 0.01 to 0.91. There were 20 pairs of cultivars whose genetic distance was less than 0.10, among which 3 pairs had one locus difference. It was more suitable to judge the distinctness of pepper varieties by using the number of difference locus. Ten pairs of primers were used to detect the uniformity of the variety 0313963-4 and the comprehensive uniformity ratio R value was 96.5, which was lower than the requirement of phenotypic trait in DUS test. Therefore, SSR markers directly used in pepper DUS determination still need further study, but it can be used in the selection of similar varieties.

Key words: *Capsicum annuum* L.; DUS testing; SSR marker; similar varieties

收稿日期: 2018-08-08 修回日期: 2018-09-07 网络出版日期: 2018-11-13

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.4996.s.20181109.1647.006.html>

第一作者研究方向为植物新品种测试技术研究, E-mail: guanjunjiao@163.com

通信作者: 张建华, 研究方向为植物新品种测试技术研究, E-mail: zhjhua@163.com

基金项目: 云南省科技人才和平台计划 (2017HB087); 云南省农业基础研究联合专项 (YJQ201703); 植物品种 DUS 测试能力提升项目 (2017YB26405)

Fundation project: Yunnan Science and Technology Talents and Platform Plan (2017HB087), Project of Agricultural Basic Research in Yunnan Province (YJQ201703), DUS Testing of Plant Varieties Capacity Improvement Projects (2017YB26405)

辣椒 (*Capsicum annuum* L.) 作为一种重要的蔬菜,栽培历史悠久,在亚洲、欧洲和中美洲均有大面积栽培,在我国蔬菜生产中占有重要地位^[1]。随着辣椒需求的增加,辣椒品种数量也急剧增加,急需一种快速、准确的品种鉴定及管理系统。植物新品种须具备特异性 (distinctness)、一致性 (uniformity)、和稳定性 (stability), 才能获得品种权, 受到保护^[2]。目前,辣椒品种鉴定及特异性、一致性和稳定性 (DUS) 测试的常规方法是基于外观形态特征的田间观察检测方法,需要种植两个生长周期以上,易受时间、生长周期、气候等因素制约,难于做到及时、快速、准确等,而且由于骨干亲本的应用,品种间遗传背景狭窄,形态鉴定常遇到困难。DNA 指纹图谱是建立在 DNA 标记基础上的某一品种所具有区别于其他品种的特异 DNA 片段^[3]。国际植物新品种保护联盟 (UPOV) 认为,指纹图谱是鉴别品种、品系 (含杂交亲本、自交系) 的有力工具,将 SSR (simple sequence repeat) 和 SNP (single nucleotide polymorphism) 推荐为适合构建指纹图谱数据库的两种技术,认为 SSR 标记技术是目前最为成熟的

技术^[4],可以使用该技术开展近似品种的辅助筛选工作^[5],已在水稻^[6]、玉米^[7-8]、棉花^[9]、油菜^[10-11]、葡萄^[12]、茶^[13]、小麦^[14-17]、多花黑麦草^[18]等作物品种鉴定和品种亲缘关系及近似品种筛选等方面得到应用。

本研究通过对大量 SSR 标记的筛选,确定一套带型清晰、等位变异间易于区别、多态性丰富、稳定性好的辣椒 SSR 核心引物,根据品种基于 SSR 标记的聚类结果和系谱分析,探讨采用 SSR 标记在辣椒 DUS 测试中的应用潜力,为我国辣椒新品种权保护提供理论依据和技术支撑。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试的 130 个辣椒品种如表 1 所示,其中第一组材料包括编号为 1~109 的 109 个材料,是来自中国不同地区的主要栽培品种,用于建立辣椒品种 DUS 测试的分子标记技术体系。第二组材料包括编号为 110~130 的 21 个品种,为近似品种或具有亲缘关系的品种,用于辣椒品种 DUS 测试分子标记技术体系实用性分析及验证。

表 1 供试材料的名称和来源

Table 1 The pepper varieties used in this study

编号 Code	名称 Name	类型 Type	来源 Origin	编号 Code	名称 Name	类型 Type	来源 Origin
1	湘辣 1 号	线椒	湖南湘研种业	13	海丰 1036 号 F ₁	牛角椒	北京海花生物科技有限公司
2	湘辣 4 号	线椒	湖南湘研种业	14	海丰 1022 号 F ₁	牛角椒	北京海花生物科技有限公司
3	湘辣 7 号	线椒	湖南湘研种业	15	海丰 23 号 F ₁	牛角椒,微辣	北京海花生物科技有限公司
4	湘研 13 号	牛角椒,微辣带甜	湖南湘研种业	16	海丰 1052 号 F ₁	线椒	北京海花生物科技有限公司
5	湘研 19 号	尖椒	湖南湘研种业	17	辛香 8 号 F ₁	线椒	江西农望高科技有 限公司
6	湘研 16 号	尖椒	湖南湘研种业	18	苏椒 5 号 F ₁	长灯笼形辣椒	江苏省农业科学院 蔬菜研究所
7	湘妃 F ₁	线椒	湖南湘研种业	19	苏椒 11 号 F ₁	长灯笼形辣椒,微辣	江苏省农业科学院 蔬菜研究所
8	湘研 806	牛角椒	湖南湘研种业	20	苏椒 12 号 F ₁	羊角椒	江苏省农业科学院 蔬菜研究所
9	海丰 15 号 F ₁	正方灯笼形甜椒	北京海花生物科技 有限公司	21	苏椒 13 号 F ₁	灯笼形甜椒	江苏省农业科学院 蔬菜研究所
10	海丰 25 号 F ₁	长方灯笼形甜椒, 微辣	北京海花生物科技 有限公司	22	苏椒 14 号 F ₁	牛角椒,微辣	江苏省农业科学院 蔬菜研究所
11	海丰 10 号 F ₁	正方灯笼形甜椒	北京海花生物科技 有限公司	23	苏椒 15 号 F ₁	牛角椒,微辣	江苏省农业科学院 蔬菜研究所
12	海丰 16 号 F ₁	正方灯笼形甜椒	北京海花生物科技 有限公司	24	苏椒 16 号 F ₁	长灯笼形辣椒,微辣	江苏省农业科学院 蔬菜研究所

表 1(续)

编号 Code	名称 Name	类型 Type	来源 Origin	编号 Code	名称 Name	类型 Type	来源 Origin
25	中椒 4 号	灯笼形甜椒	中国农科院蔬菜花卉研究所	52	冀研 13 号	方灯笼形甜椒	河北省农科院
26	中椒 5 号	甜椒	中国农科院蔬菜花卉研究所	53	08-12	牛角椒,微辣	中国农科院蔬菜花卉研究所
27	中椒 6 号	牛角椒,微辣	中国农科院蔬菜花卉研究所	54	伏地尖	尖椒	中国农科院蔬菜花卉研究所
28	中椒 105 号	灯笼形甜椒	中国农科院蔬菜花卉研究所	55	茄门	方灯笼形甜椒	中国农科院蔬菜花卉研究所
29	中椒 106 号	牛角椒,微辣	中国农科院蔬菜花卉研究所	56	中椒 7 号	灯笼形甜椒	中国农科院蔬菜花卉研究所
30	中椒 107 号	灯笼形甜椒	中国农科院蔬菜花卉研究所	57	中椒 8 号	灯笼形甜椒	中国农科院蔬菜花卉研究所
31	中椒 08-08 号	灯笼形甜椒	中国农科院蔬菜花卉研究所	58	中椒 11 号	方灯笼形甜椒	中国农科院蔬菜花卉研究所
32	国福 308	黄皮长牛角椒	北京市农林科学院蔬菜研究中心	59	中椒 12 号	方灯笼形甜椒	中国农科院蔬菜花卉研究所
33	Sy07-184	黄皮羊角椒	北京市农林科学院蔬菜研究中心	60	中椒 26 号	方灯笼形甜椒	中国农科院蔬菜花卉研究所
34	国福 208	黄皮羊角椒	北京市农林科学院蔬菜研究中心	61	陇椒 3 号	羊角椒	甘肃农科院
35	京甜 1 号	圆锥形甜炮椒	北京市农林科学院蔬菜研究中心	62	陇椒 6 号	羊角椒	甘肃农科院
36	国禧 101	圆锥形甜椒	北京市农林科学院蔬菜研究中心	63	杭椒 1 号	羊角椒	浙江农科院
37	国禧 803	方灯笼形甜椒	北京市农林科学院蔬菜研究中心	64	沈椒四号 F ₁	长灯笼形辣椒,微辣	沈阳农科院
38	国禧 804	灯笼形甜椒	北京市农林科学院蔬菜研究中心	65	超级十六号 F ₁	长牛角椒	广州绿霸种业公司
39	奥金甜椒	灯笼形甜椒	北京市农林科学院蔬菜研究中心	66	二金条	长羊角椒	四川地方品种
40	国福 401	线椒	北京市农林科学院蔬菜研究中心	67	望都椒	长羊角形尖椒	河北望都地方品种
41	国福 403	线椒	北京市农林科学院蔬菜研究中心	68	鸡泽椒	长羊角形尖椒	河北望都地方品种
42	国塔 104	子弹头类型	北京市农林科学院蔬菜研究中心	69	益都红	长羊角形尖椒	山东益都地方品种
43	国塔 106	单生朝天椒	北京市农林科学院蔬菜研究中心	70	遵义椒	小羊角朝天椒	贵州地方品种
44	国塔 109	羊角椒	北京市农林科学院蔬菜研究中心	71	新丰 5 号 F ₁	羊角形尖椒	安徽萧新种业
45	国塔 112	单生朝天椒	北京市农林科学院蔬菜研究中心	72	威狮 1 号 F ₁	尖椒	东方正大公司
46	京甜 3 号	灯笼形甜椒	北京市农林科学院蔬菜研究中心	73	龙禧 2 号 F ₁	尖椒	东方正大种子有限公司
47	翠龙 126 F ₁	灯笼形甜椒	市场购买	74	红罗丹 F ₁	长方灯笼形甜椒	先正达种子子公司
48	冀研 4 号	甜椒	河北省农科院	75	塔兰多 F ₁	方灯笼形甜椒	瑞克斯旺公司
49	冀研 5 号	甜椒	河北省农科院	76	格兰特 F ₁	长方灯笼形甜椒	瑞克斯旺公司
50	冀研 6 号	甜椒	河北省农科院	77	JUMILLA F ₁	长方灯笼形甜椒	德瑞特种业
51	冀研 12 号	方灯笼形甜椒	河北省农科院	78	MENTOR F ₁	长方灯笼形甜椒	德瑞特种业

表 1(续)

编号 Code	名称 Name	类型 Type	来源 Origin	编号 Code	名称 Name	类型 Type	来源 Origin
79	热辣 2 号	灯笼形中国辣椒	中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所	105	博辣 1 号	羊角椒	湖南省蔬菜研究所
80	热辣 3 号	黄皮羊角尖椒,微辣	中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所	106	博辣 2 号	线椒,羊角形	湖南省蔬菜研究所
81	热辣 8 号	线椒	中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所	107	博辣 4 号	线椒,羊角形	湖南省蔬菜研究所
82	热甜 14 号	长方灯笼形甜椒	中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所	108	福湘 5 号	尖椒	湖南省蔬菜研究所
83	热甜 1 号	长方灯笼形甜椒	中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所	109	兴蔬 215	尖椒	湖南省蔬菜研究所
84	热甜 6 号	长方灯笼形甜椒	中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所	110	15-1	子弹头类型	云南省农科院
85	热甜 7 号	长方灯笼形甜椒	中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所	111	15-2	子弹头类型	云南省农科院
86	精选丘北辣椒	指形线椒	云南地方品种	112	15-3	朝天椒	云南省农科院
87	正光皱皮辣	灯笼形辣椒	云南地方品种	113	15-4	朝天椒	云南省农科院
88	海丰 3 号	线椒	市场购买	114	15-19	羊角椒	云南省农科院
89	猪大肠	长羊角椒	新疆省农科院	115	15-20	羊角椒	云南省农科院
90	都椒一号	长羊角椒	北京市农林科学院蔬菜研究中心	116	15-24	羊角椒	云南省农科院
91	海青 8 号尖椒	羊角椒	市场购买	117	15-25	羊角椒	云南省农科院
92	川辣 4 号	长羊角形线椒	四川省农科院	118	CT106	朝天椒	云南省农科院
93	川腾 1 号	长羊角椒	四川省农科院	119	CT117	朝天椒	云南省农科院
94	川腾 6 号	长羊角椒	四川省农业科学院园艺研究所	120	0307487G5-1	子弹头类型	云南省农科院
95	黄太子	云南小米辣	市场购买	121	0307487G5-2	子弹头类型	云南省农科院
96	先锋 303	线椒	市场购买	122	0399243-1	羊角椒	云南省农科院
97	红贵 404	尖椒	市场购买	123	0399243-2	羊角椒	云南省农科院
98	博辣娇红	线椒	湖南省蔬菜研究所	124	0399243-3	羊角椒	云南省农科院
99	博辣红艳	线椒	湖南省蔬菜研究所	125	0313963-3	长牛角椒	云南省农科院
100	博辣红帅	线椒	湖南省蔬菜研究所	126	0313963-4	长牛角椒	云南省农科院
101	兴蔬 201	尖椒	湖南省蔬菜研究所	127	0313958-4	长牛角椒	云南省农科院
102	兴蔬嫩辣	尖椒	湖南省蔬菜研究所	128	0313958-2	长牛角椒	云南省农科院
103	兴蔬羽燕	牛角椒	湖南省蔬菜研究所	129	0313965-4	长牛角椒	云南省农科院
104	福湘秀丽	牛角椒	湖南省蔬菜研究所	130	0313965-5	长牛角椒	云南省农科院

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 提取 将种子置于培养皿中催芽,取幼嫩组织,每份样品中随机抽取 10 个个体,采用周春阳等^[19]改良 CTAB 法提取样品基因组 DNA。DNA 样品稀释为 25 ng/ μ L 保存,供 PCR 使用。

1.2.2 引物筛选及 PCR 扩增 选用 10 个系谱差异较大的品种对 316 对引物^[20-24]进行初筛,选出带

型清晰、具有多态性的引物。入选引物用 109 个品种决选,要求入选引物在染色体上分布均匀、带型清晰、不同等位变异的带型易于区分、PCR 产物稳定,最终确定一套核心引物。对筛选出的 SSR 标记的正向引物 5' 末端利用 6-FAM、HEX、ROX 和 TAMRA 等 4 种荧光染料中的一种进行标记。引物的合成和标记均由上海生工生物工程技术服务有限

公司完成。

PCR反应液体积为20 μL , 含dNTP混合液0.25 mmol/L, 正反向引物各0.3 mmol/L, Taq DNA聚合酶0.8 U, 1 \times PCR缓冲液(含 Mg^{2+}), 样品DNA 50 ng, 所用试剂均购自北京天根生化公司。

反应程序为94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性4 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性45 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸45 s, 共35个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.2.3 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测 引物筛选扩增产物在8%非变性聚丙烯酰胺凝胶上进行电泳检测。200 V电压预电泳30 min, 而后400 V电压电泳2 h, 银染, 拍照保存。

1.2.4 荧光标记毛细管电泳 将筛选出的30对引物(表2), 在每对引物5'端添加荧光标记, PCR产物变性后在ABI 3130测序仪上分离, 每个反应重复2次。使用GeneMapper 3.2软件分析扩增片段峰型, 读取片段数据。

1.2.5 数据分析 采用PowerMarker计算基因型数(Genotype)、多态信息量(PIC, Poly-morphism information content), 并根据Nei's遗传距离, 进行UPGMA聚类分析。

一致性分析参考王风格等^[25]的方法, 采用CAMS-378、HpmsE015、CAMS-236、HpmsE119、

hpms1-5、Hpms2-21、HpmsE149、HpmsE128、es330、hpms1-214等10对引物, 20个单株进行分析。单个位点的一致性比率用 r 表示, $r=1-\text{杂株数}/\text{总株数}$; 每个品种的所有位点的平均一致性比率用 R 表示, $R=\sum r_i/10$, 式中 r_i 表示第 i 个位点的一致性比率。

2 结果与分析

2.1 引物筛选

采用聚丙烯酰胺凝胶电泳结合银染方法, 筛选出42对具有多态性、条带清晰、等位变异间易于区分、重复性好的引物。将上述42对引物的正向引物5'末端利用6-FAM、HEX、ROX和TAMRA等4种荧光染料进行标记, 对130个品种进行PCR扩增, 分别采用聚丙烯酰胺凝胶电泳方法及DNA分析仪检测, 最后确定30对兼容聚丙烯酰胺凝胶电泳和毛细管电泳检测平台的核心引物(表2)。入选的30对引物既适用于普通测序胶电泳技术检测, 也适用于荧光SSR标记-全自动分析技术检测, 图1为引物HpmsE119在一组辣椒品种中检测到的等位变异峰图, 该组辣椒品种是湘研16号、国塔104、伏地尖、黄太子、热辣2号, 扩增片段大小分别为234 bp、238 bp、242 bp、260 bp、264 bp。

表2 辣椒30对SSR引物信息

Table 2 Polymorphic information of 30 SSR primers

位点 Locus	染色体 Chromosome	等位基因数 Allele number	基因多样性指数 Gene diversity	多态信息量 PIC
CAMS-378	1	6	0.59	0.52
CAMS-236	2	8	0.69	0.65
HpmsE119	3	5	0.66	0.59
HpmsAT2-14	4	4	0.27	0.24
HpmsE015	5	4	0.41	0.35
hpms1-5	6	15	0.79	0.76
HpmsE095	7	4	0.18	0.17
CAMS-090	8	6	0.44	0.39
Hpms2-21	10	9	0.71	0.66
HpmsE149	11	8	0.33	0.32
HpmsE128	12	3	0.40	0.33
HpmsE067	c	3	0.33	0.28
HpmsE019	1	4	0.50	0.43
HpmsE016	3	9	0.74	0.71
HpmsE072	6	9	0.72	0.69
HpmsE063	1	6	0.55	0.46
HpmsE060	3	6	0.25	0.23
HpmsE014	6	7	0.24	0.23
es330	—	4	0.57	0.50
Epms-923	—	4	0.58	0.49
hpms1-214	—	5	0.59	0.53
epms697	—	5	0.53	0.41
es120	—	5	0.71	0.67
es285	—	3	0.44	0.34
hpms1-106	—	3	0.50	0.38

表 2(续)

位点	染色体	等位基因数	基因多样性指数	多态信息量
Locus	Chromosome	Allele number	Gene diversity	PIC
epms712	—	2	0.50	0.37
es167	—	5	0.43	0.40
es297	—	3	0.33	0.28
es321	—	6	0.32	0.30
es105	—	2	0.25	0.22
平均 Mean		5.43	0.47	0.43

— : 不详
 — : Unknown

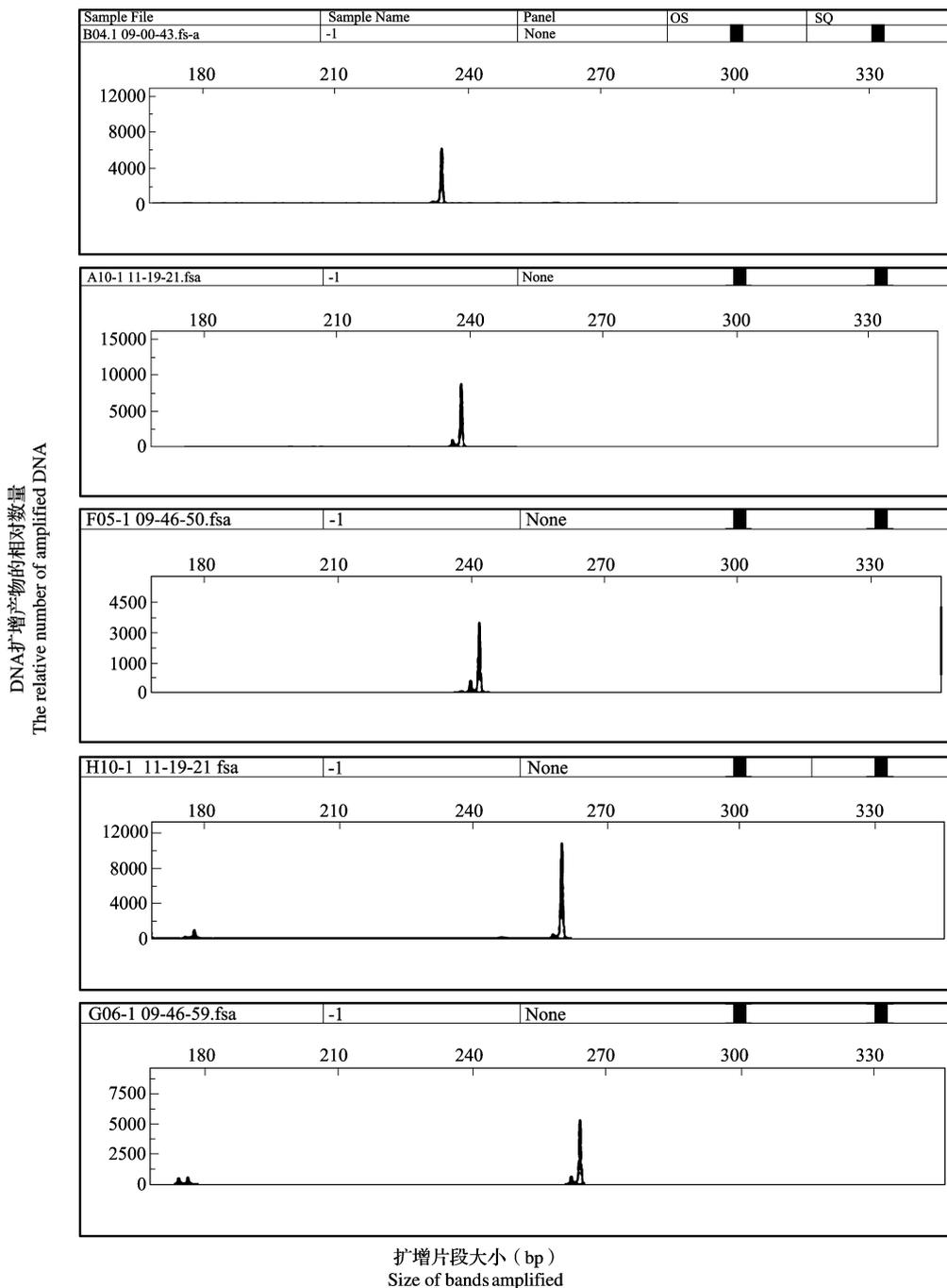


图 1 HpmsE119 引物的 5 个等位变异
 Fig.1 Five allelic variations for SSR marker HpmsE119

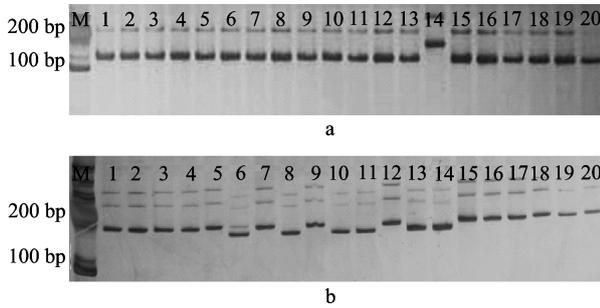


图3 有异带的扩增图谱

Fig.3 PCR amplification in uniformity analysis

3 讨论

3.1 特异性判定

在前人的研究^[26-27]中根据不同的作物、不同的分子标记类型,提出了划分品种特异性的遗传距离指标 0.25、0.20 和 0.10 等,而我国国家行业标准中采用了差异位点数来判断品种特异性,如水稻、玉米中,品种间差异位点数 ≥ 2 ,判定为不同品种;品种间差异位点数=1,判定为近似品种;当品种间差异位点数=0,判定为极近似品种或相同品种。辣椒品种间差异位点数 ≥ 2 时,判定为不同品种。在本研究中有 20 对品种遗传距离小于 0.10,其中 3 对品种有 1 个位点的差异,其他品种的位点差异数均在 2 个以上。这些品种都为目前已经大面积推广种植的已知品种,导致这种结果有以下几个原因,首先是少数骨干亲本的应用,使得品种间的遗传差异越来越小,品种难以区分;其次,由于所选标记与表型之间无必然联系,决定表型差异的基因/位点未被检测到;第三,遗传距离结果受计算方法、品种、分子标记、引物数量等因素的影响。因此,在辣椒中,采用差异位点数判断品种特异性更适合目前辣椒品种现状,且对于检测到差异位点数小于 2 的品种,还需要增加田间种植进行鉴定。

3.2 一致性、稳定性判定

一致性在品种权保护中非常重要,根据 UPOV 公约精神及我国《种子法》的规定,一个品种相关性状包括用于 DUS 测试的所有性状及品种描述采用的全部性状都必须具有足够的一致性。一般认为如果一个品种具备一致性,则可认为该品种具备稳定性。

在玉米^[25,28]、小麦^[29]的研究中采用多个位点的一致性来评价品种的一致性。本研究中,采用 10 对引物对新品种 0313963-4 进行了一致性检测,共检测了 20 个个体,综合一致性比率 R 值为 96.5%。

在辣椒 DUS 测试指南中对于杂交种一致性,采用 1% 的群体标准和至少 95% 的接受概率,当样本大小为 20~35 株时,最多可以允许有 1 个异型株。相比之下,DUS 测试中一致性判定对表型性状一致性要求较高。这与前人在玉米、小麦上的研究结果一致,由于育种家在选育品种的过程中,主要基于表型性状进行选择,没有在 SSR 位点进行有目的的选择,致使该品种有可能在一些位点上保留着剩余变异,这些位点的不一致性在表型上不一定表现出来,但在该引物扩增结果就出现了异型带。

因此,选用的引物位点及数量、需要检测的样本数均会影响品种的一致性比率进而影响一致性判定。利用分子标记判定一致性时,至少需要检测多少个单株以及一致性和稳定性的评估标准,还需要大量的试验数据才能明确。

3.3 近似品种筛选

特异性是指一个植物品种有一个以上性状明显区别于已知品种。特异性测试的参比对象是所有其他“已知品种”,但是要申请品种与所有已知品种进行比对往往是不可能的,也没有必要^[11,30],因此提出了筛选近似的品种用于种植比较,即测试机构从已知品种中筛选出近似品种,与待测品种田间相邻种植比较。近似品种的选择可以通过亲缘系谱分析、DUS 测试中的分组性状比较和 DNA 分子指纹辅助选择等方式^[29],其中 DNA 分子指纹辅助选择的方法由于其不受时间限制、快速、节能的优点而受到关注。

赖运平等^[11]、王立新等^[14]、张晗等^[15]已经对油菜、小麦品种审定及 DUS 测试中采用分子标记方法筛选近似品种进行了深入研究,结果表明,SSR 标记分析结果与系谱基本吻合,可以用于近似品种的筛选。在何建文等^[31]、罗玉娣等^[32]的研究中,同种果形的辣椒优先聚在一起,同种果实类型的材料之间有较近的亲缘关系。在本研究中,同一栽培种相聚,遗传背景相近或具有共同亲本品种优先聚在一起,甜椒和辣椒分开,同种果形的品种聚在一起,与前人研究结果一致,综上所述说明,该组 SSR 标记用于辣椒近似品种辅助选择是可行的。

致谢: 本研究中所用材料主要由中国农业科学院蔬菜花卉研究所及云南省农业科学院园艺研究所提供,试验得到了张宝玺研究员、龙洪进研究员的帮助,在此一并致谢!

参考文献

- [1] 刘军,张维,沈火林.辣椒遗传连锁图谱的构建及果实硬度的QTL分析.中国蔬菜,2011,1(8):17-21
Liu J, Zhang W, Shen H L. Construction of pepper genetic map and QTL analysis of fruit firmness. China Vegetables, 2011, 1(8): 17-21
- [2] 赖运平,张浙峰,王丽容,王莉花,余毅.薏苡新品种特异性、一致性和稳定性测试指南研制.植物遗传资源学报,2016,17(4):690-695
Lai Y P, Zhang Z F, Wang L R, Wang L H, Yu Y. Development of distinctness, uniformity and stability test guidelines for new varieties of job's tears. Journal of Plant Genetic Resources, 2016, 17(4): 690-695
- [3] 唐浩,余汉勇,张新明,魏兴华.水稻新品种测试的标准品种DNA指纹图谱多样性分析.植物遗传资源学报,2015,16(1):100-106
Tang H, Yu H Y, Zhang X M, Wei X H. Analysis on the diversity of DNA fingerprinting of the example varieties used for DUS test of rice new varieties. Journal of Plant Genetic Resources, 2015, 16(1): 100-106
- [4] UPOV. Guidelines for DNA-profiling: Molecular markers selection and database construction. Geneva: Office of the Union, 2010, 1-13
- [5] UPOV. Possible use of molecular markers in the examination of distinctness, uniformity and stability. Geneva: Office of the Union, 2011, 1-8
- [6] Singh R K, Sharma R K, Singh A K, Singh V P, Singh N K, Tiwari S P, Mohapatra T. Suitability of mapped sequence tagged microsatellite site markers for establishing distinctness, uniformity and stability in aromatic rice. Euphytica, 2004, 135(2): 135-143
- [7] 张金渝,张建华,杨晓洪,金航,米艳华,肖植文,孔令明,肖卿.玉米DUS测试标准品种的SSR分子指纹图谱的构建.玉米科学,2006,14(4):47-52
Zhang J Y, Zhang J H, Yang X H, Jing H, Mi Y H, Xiao Z W, Kong L M, Xiao Q. Building of SSR fingerprinting map of standard varieties on maize in DUS testing. Journal of Maize Sciences, 2006, 14(4): 47-52
- [8] 王风格,易红梅,赵久然,孙世贤,杨国航,任洁,王璐. DNA指纹技术在玉米区域试验品种真实性及一致性检测中的应用.分子植物育种,2016,14(2):456-461
Wang F G, Yi H M, Zhao J R, Sun S X, Yang G H, Ren J, Wang L. The application of DNA fingerprint technology in maize varieties' authenticity and consistency Identification in maize regional test. Molecular Plant Breeding, 2016, 14(2): 456-461
- [9] 匡猛,杨伟华,许红霞,王延琴,周大云,冯新爱.中国棉花主栽品种DNA指纹图谱构建及SSR标记遗传多样性分析.中国农业科学,2011,44(1):32-36
Kuang M, Yang W H, Xu H X, Wang Y Q, Zhou D Y, Feng X A. Construction of DNA fingerprinting and analysis of genetic diversity with SSR markers for cotton major cultivars in China. Scientia Agricultura Sinica, 2011, 44(1): 32-36
- [10] 陆光远,伍晓明,张冬晓,刘凤兰,陈碧云,高桂珍,许鲲. SSR标记分析国家油菜区试品种的特异性和一致性.中国农业科学,2008,41(1):32-42
Lu G Y, Wu X M, Zhang D X, Liu F L, Chen B Y, Gao G Z, Xu K. SSR-based evaluation of distinctness and uniformity of rapeseed (*Brassica napus* L.) varieties under Chinese national official field tests. Scientia Agricultura Sinica, 2008, 41(1): 32-42
- [11] 赖运平,张浙峰,王丽容,何巧林,黄维藻,张新明,堵苑苑,余毅.利用SSR标记筛选DUS测试中甘蓝型油菜近似品种.分子植物育种,2013,11(2):174-184
Lai Y P, Zhang Z F, Wang L R, He Q L, Huang W Z, Zhang X M, Du Y Y, Yu Y. Screening similar varieties of rapeseed (*Brassica napus* L.) in DUS testing using SSR markers. Molecular Plant Breeding, 2013, 11(2): 174-184
- [12] 李贝贝,姜建福,张颖,樊秀彩,孙海生,张国海,刘崇怀.葡萄品种DNA指纹数据库的构建及遗传多样性分析.植物遗传资源学报,2018,19(2):338-350
Li B B, Jiang J F, Zhang Y, Fan X C, Sun H S, Zhang G H, Liu C H. Construction of DNA fingerprinting and analysis of genetic diversity for grape cultivars. Journal of Plant Genetic Resources, 2018, 19(2): 338-350
- [13] 黄丹娟,马建强,陈亮.茶树PVP申请品种的SSR分子标记鉴定和系谱关系分析.茶叶科学,2016,36(1):68-76
Huang D J, Ma J Q, Chen L. SSR identification and pedigree analysis of PVP application cultivars in tea plant. Journal of Tea Science, 2016, 36(1): 68-76
- [14] 王立新,李宏博,廖琴,邱军,常利芳,刘丽华,任立平,高新欢,赵昌平.利用分子标记筛查小麦相似品种(系).作物学报,2010,36(9):1490-1497
Wang L X, Li H B, Liao Q, Qiu J, Chang L F, Liu L H, Ren L P, Gao X H, Zhao C P. Screening wheat varieties with genetic similarity using molecular markers. Acta Agronomica Sinica, 2010, 36(9): 1490-1497
- [15] 张晗,姚凤霞,刘永杰,宋卫华,许金芳,王东建,李汝玉. EST-SSR标记在冬小麦品种DUS测试中的应用.麦类作物学报,2010,30(5):801-806
Zhang H, Yao F X, Liu Y J, Song W H, Xu J F, Wang D J, Li R Y. Application of EST-SSRS to distinctness test of new varieties. Journal of Triticeae Crops, 2010, 30(5): 801-806
- [16] 郑永胜,张晗,王东建,孙加梅,王雪梅,段丽丽,李华,王玮,李汝玉.基于荧光检测技术的小麦品种SSR鉴定体系的建立.中国农业科学,2014,47(19):3725-3735
Zheng Y S, Zhang H, Wang D J, Sun J M, Wang X M, Duan L L, Li H, Wang W, Li R Y. Development of a wheat variety identification system based on fluorescently labeled SSR markers. Scientia Agricultura Sinica, 2014, 47(19): 3725-3735
- [17] 王立新,常利芳,李宏博,季伟,刘丽华,赵昌平.小麦区试品系DUS测试的分子标记.作物学报,2010,36(7):1114-1125
Wang L X, Chang L F, Li H B, Ji W, Liu L H, Zhao C P. Molecular markers for estimating distinctness, uniformity and stability of wheat cultivars of regional trials. Acta Agronomica Sinica, 2010, 36(7): 1114-1125
- [18] 黄婷,马啸,张新全,张新跃,张瑞珍,符开欣.多花黑麦草DUS测定中SSR标记品种鉴定比较分析.中国农业科学,2015,48(2):381-389
Huang T, Ma X, Zhang X Q, Zhang X Y, Zhang R Z, Fu K X. Comparison of SSR molecular markers analysis of Annual Ryegrass varieties in DUS testing. Scientia Agricultura Sinica, 2015, 48(2): 381-389
- [19] 周春阳,谢立波,李景富,周宇.辣椒叶片基因组DNA提取

- 方法的研究. 辣椒杂志, 2011(3): 35-37
- Zhou C Y, Xie L B, Li J F, Zhou Y. The extraction of genomic DNA from hot pepper. *Journal of China Capsicum*, 2011(3): 35-37
- [20] Portis E, Nagy I, Sasvári Z, Sta'gel A, Barchi L, Lanteri S. The design of *Capsicum spp.* SSR assays via analysis of *in silico* DNA sequence, and their potential utility for genetic mapping. *Plant Science*, 2007, 172: 640-648
- [21] Minamiyama Y, Tsuru M, Hirai M. An SSR-based linkage map of *Capsicum annum*. *Molecular Breeding*, 2006, 18: 157-169
- [22] Lee J M, Nahm S H, Kim Y M, Kim B D. Characterization and molecular genetic mapping of microsatellite loci in pepper. *Theoretical and Applied Genetics*, 2004, 108: 619-627
- [23] Yi G, Lee J M, Lee S, Choi D, Kim B D. Exploitation of pepper EST-SSRs and an SSR-based linkage map. *Theoretical and Applied Genetics*, 2006, 114: 113-130
- [24] Kwon Y S, Lee J M, Yi G B, Yi S I, Kim K M, Soh E H, Bae K M, Park E K, Song I H, Kim B D. Use of SSR markers to complement tests of distinctiveness, uniformity, and stability (DUS) of pepper (*Capsicum annum* L.) varieties. *Molecules and Cells*, 2005, 19(3): 428-435
- [25] 王凤格, 赵久然, 戴景瑞, 王璐, 易红梅, 郭景伦, 孙世贤, 廖琴, 杨国航. 利用 SSR 标记进行玉米品种一致性检测研究. *分子植物育种*, 2007, 5(1): 95-104
- Wang F G, Zhao J R, Dai J R, Wang L, Yi H M, Guo J L, Sun S X, Liao Q, Yang G H. Uniformity analysis of maize varieties by a set of SSR markers. *Molecular Plant Breeding*, 2007, 5(1): 95-104
- [26] Troyer A F, Roehford T R. Germplasm ownership: related corn inbreds. *Crop Science*, 2002, 42: 3-11
- [27] 韩凤龙. 用于河南省小麦品种特异性和一致性鉴定的 SSR 分子标记研究. 南京: 南京农业大学, 2007
- Han F L. The research of SSR for distinctness and uniformity evaluation of henan wheat varieties. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2007
- [28] 王春梅, 任洪, 沈建华. 贵州 4 个延退玉米杂交种的真实性和一致性 DNA 指纹鉴定. *种子*, 2011, 30(12): 46-49
- Wang C M, Ren H, Shen J H. Identification the authenticity and consistency of 4 Maize hybrids applied in guizhou through DNA finger print. *Seed*, 2011, 30(12): 46-49
- [29] 王立新, 季伟, 李宏博, 葛玲玲, 信爱华, 王丽霞, 常利芳, 赵昌平. 以 DNA 位点纯合率评价小麦品种的一致性和稳定性. *作物学报*, 2009, 35(12): 2197-2204
- Wang L X, Ji W, Li H B, Ge L L, Xin A H, Wang L X, Chang L F, Zhao C P. Evaluating uniformity and stability of wheat cultivars based on ratio of homozygous DNA Locus. *Acta Agronomica Sinica*, 2009, 35(12): 2197-2204
- [30] 滕海涛, 吕波, 徐岩, 堵苑苑, 杨坤, 唐浩. 植物新品种 DUS 测试及近似品种的选择. *中国种业*, 2008(8): 14-16
- Teng H T, Lv B, Xu Y, Du Y Y, Yang K, Tang H. DUS test and approximate varieties selection of plant new varieties. *China Seed Industry*, 2008(8): 14-16
- [31] 何建文, 杨文鹏, 韩世玉, 杨红, 杨留启. 贵州辣椒地方品种分子遗传多样性分析. *贵州农业科学*, 2009, 37(8): 15-18
- He J W, Yang W P, Han S Y, Yang H, Yang L Q. Molecular genetic diversity of local pepper varieties in guizhou. *Guizhou Agricultural Sciences*, 2009, 37(8): 15-18
- [32] 罗玉娣, 李建国, 李明芳. 用 SSR 标记分析辣椒属种质资源的遗传多样性. *生物技术通报*, 2006(5): 337-341
- Luo Y D, Li J G, Li M F. Analysis of genetic diversity of *Capsicum* germplasm resources by using SSR markers. *Biotechnology Bulletin*, 2006(5): 337-341