

引用格式:

陈莹, 王瑾, 崔清志, 杨慧萍, 李秀敏, 刘峰. 辣椒花药颜色突变体 *Caya* 表型特征分析及遗传定位[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2023, 49(6): 661–666.

CHEN Y, WANG J, CUI Q Z, YANG H P, LI X M, LIU F. Phenotypic analysis and genetic mapping of anther color mutant *Caya* in *Capsicum annuum*[J]. Journal of Hunan Agricultural University(Natural Sciences), 2023, 49(6): 661–666.

投稿网址: <http://xb.hunau.edu.cn>



辣椒花药颜色突变体 *Caya* 表型特征分析及遗传定位

陈莹¹, 王瑾⁵, 崔清志², 杨慧萍⁵, 李秀敏¹, 刘峰^{1,2,3,4*}

(1.湖南大学隆平分院, 湖南 长沙 410125; 2.湖南农业大学园艺学院, 湖南 长沙 410128; 3.园艺作物种质创新与新品种选育教育部工程研究中心, 湖南 长沙 410128; 4.蔬菜生物学湖南省重点实验室, 湖南 长沙 410128; 5.南京农业大学园艺学院, 江苏 南京 210095)

摘要: 以通过 EMS 诱变筛选得到的黄色花药辣椒突变体 *Caya* 为材料, 以野生型樟树港辣椒 ST-8 为对照, 测定花药中花青素及类黄酮的含量, 进行花粉活力鉴定, 发现突变体 *Caya* 花药中花青素含量显著降低, 类黄酮含量和花粉活力与 ST-8 的无显著变化。以 ST-8 和 *Caya* 进行正反交, 得到 F₁ 群体, F₁ 自交构建 F₂ 群体, F₁ 和 *Caya* 回交构建 BC₁ 群体, 调查各群体的紫色花药和黄色花药植株数量, 分析花药颜色的遗传规律, 发现黄色花药受 1 对隐性核基因控制; 采用 BSA-Seq 技术对控制花药颜色的基因进行定位, 将候选区域锁定在 2 号染色体 142 Mbp 至 157 Mbp; 设计 9 对 SNP 标记对 F₂ 分离群体进行基因分型, 进一步缩小候选区间, 最终将目的基因定位于 147 461 604 bp 至 150 376 942 bp, 在候选区间内筛选到 2 个与花青素合成密切相关的基因, 登录号为 Capana02g002586、Capana02g002763。

关键词: 辣椒; 突变体; 花药颜色; 花青素; BSA-Seq

中图分类号: S641.3; Q786

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2023)06-0661-06

Phenotypic analysis and genetic mapping of anther color mutant *Caya* in *Capsicum annuum*

CHEN Ying¹, WANG Jin⁵, CUI Qingzhi², YANG Huiping⁵, LI Xiumin¹, LIU Feng^{1,2,3,4*}

(1.Longping Branch, Hunan University, Changsha, Hunan 410125, China; 2.College of Horticulture, Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan 410128, China; 3.ERC for Germplasm Innovation and New Variety Breeding of Horticultural Crops, Changsha, Hunan 410128, China; 4.Key Laboratory for Vegetable Biology of Hunan Province, Changsha, Hunan 410128, China; 5.College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu 210095, China)

Abstract: In order to determine the changes in anthocyanin and flavonoid content in anthers and to identify pollen viability, yellow anther pepper *Caya* obtained through EMS mutagenesis screening was used as the experimental material with the wild-type Zhangshugang pepper ST-8 as the control. The results showed that the anthocyanin content of the anthers of the mutant *Caya* was significantly reduced, with no significant change in the flavonoid content and pollen viability. We collected the number of purple anther and yellow anther plants in each population, analyzed the genetic pattern of anther color on the F₁ populations obtained between ST-8 and *Caya*, F₂ populations constructed by F₁ self-crossing, BC₁ population from F₁ and *Caya* backcrossing. The results showed that yellow anthers were controlled by one pair of recessive nuclear genes. Using BSA-Seq method, the genes for color determination located on chromosome 2, between 142 Mbp to 157 Mbp. 9 pairs of SNP markers were designed to genotype the F₂ segregating population to further

收稿日期: 2023-02-07

修回日期: 2023-11-21

基金项目: 岳麓山种业创新项目(2021NK1006); 特色蔬菜产业技术体系(CARS-24-A-15)

作者简介: 陈莹(1998—), 女, 湖南衡阳人, 硕士研究生, 主要从事辣椒分子遗传育种研究, 3473266173@qq.com; *通信作者, 刘峰, 博士, 研究员, 主要从事辣椒种质资源重要性状功能基因挖掘及新种质创制研究, liufengrich@126.com

narrow down the candidate region, and the target genes were finally located between 147 461 604 bp and 150 376 942 bp, and two genes closely related to anthocyanin synthesis were screened within the candidate region, namely, Capana02g002586 and Capana02g002763.

Keywords: pepper(*Capsicum annuum* L.); mutant type; anther color; anthocyanins; BSA-Seq

花药是植物雄性生殖器官的重要组成部分。花药颜色是植物的重要性状之一,目前对花药的育性研究较多,对花药颜色研究较少。前人研究发现花药颜色与植物抗性^[1]、育性^[2]等性状有着密切关系。在 43 种淫羊藿属植物生境调查中发现,黄色花药类淫羊藿属植物往往分布在光线较强或海拔较高的地区,在免受紫外线伤害方面比绿色花药类淫羊藿属植物更有优势^[3]。GAVRUTENKO 等^[4]发现,花药颜色与背景产生强对比更能吸引传粉者,特别在短距离信号传递过程中,花药颜色比花瓣颜色更重要、更可靠。

NI 等^[5]研究发现,谷子 6 号染色体的 1 个单显性基因 *Z3ac* 控制褐色花药性状。韩康妮等^[6]和 XIE 等^[7]研究发现,控制谷子黄色花药的基因定位在 6 号染色体上,定位区间分别为 34 068 360 bp 至 34 163 067 bp 和 34 130 000 bp 至 34 190 000 bp,二者定位区域有部分重叠。在矮牵牛中,将查尔酮合成酶基因(*CHS*)导入 *wha* 突变体可以使白色花药产生类黄酮,变成原本的黄色,并能恢复花粉活力^[8]。CHEN 等^[9]研究发现,沉默 *PHCHS*、*PhACC1*、*PhACC2* 和 *PhAAE13* 均造成矮牵牛花药白化。ZHANG 等^[10]研究发现,控制辣椒花药颜色的基因为位于 1 号染色体前端的 *CabHLH1*,*CabHLH1* 沉默后 *DFR* 基因表达量显著下降,花药表现为黄色。

本试验以黄色花药辣椒突变体 *Caya* 为研究材料,构建 F_1 、 F_2 、 BC_1 群体,通过表型分析、遗传规律分析,确定控制突变体 *Caya* 花药颜色基因的候选区间,筛选候选基因,旨在了解辣椒花药花青素的合成路径,为辣椒品质性状改良提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 植物材料与遗传群体的构建

黄色花药辣椒突变体 *Caya* 是由野生型樟树港辣椒 ST-8 经 EMS 诱变筛选得到,经连续多年自交,确定其突变性状能稳定遗传。

以 ST-8 和 *Caya* 进行正反交,得到 F_1 群体,

F_1 自交构建 F_2 群体, F_1 和 *Caya* 回交构建 BC_1 群体。3 个群体均用于遗传分析和基因定位。

1.2 生理指标的测定

分别采集野生型和突变体成熟期花药,采用花青素试剂盒 ZC-S0634(上海茁彩生物科技有限公司产品)和类黄酮试剂盒 A142-1-1(南京建成生物工程研究所产品)测定花青素和类黄酮的含量。

1.3 花粉活力观察

在载玻片中央滴加 I_2 -KI 溶液,选取成熟期花药置于载玻片上,用镊子碾碎花药,去除破碎的花药壁,在显微镜下观察花粉染色情况并拍照。每个样品随机选取 5 个视野进行观察,统计花粉染色率,计算花粉活力。

1.4 性状调查和遗传规律分析

于盛花期对 F_1 、 F_2 和 BC_1 群体花药颜色进行统计,共调查 3 次。计算 F_1 、 F_2 和 BC_1 群体各性状分离比并进行卡方检验。

1.5 全基因组测序

从 F_2 分离群体中分别取 25 株黄色花药辣椒的叶片和 25 株紫色花药辣椒的叶片,使用打孔器获得大小一致的叶片,构建突变体混池和野生型混池,分别命名为 *Caya*-MTP 和 *Caya*-WTP,CTAB 法^[11]提取总 DNA 后,进行纯化质检,合格后通过 Illumina NovaSeq6000 对其进行测序。

1.6 基于 KASP 的 SNP 基因分型

运用 BWA(<http://bio-bwa.sourceforge.net/>)将数据比对到辣椒 *zunla* 基因组数据库(<http://peppersequencing.genomics.cn>)上,查找全基因组的 SNP 位点。将比对得到的变异结果通过 GTAK 软件过滤,筛选条件:样品的 SNP 位点测序深度 ≥ 5 ;碱基比对质量值 ≥ 20 ;变异检测质量值 ≥ 30 。根据 2 个混池的 SNP-index 作分布图,将隐性池的 SNP-index 减去显性池的 SNP-index,绘制 Δ SNP-index 与基因组关系位置图。

利用 F_2 群体进行 KASP 基因分型。截取每个 SNP 位点上、下游各 100 bp DNA 序列, 运用引物在线设计网站 SNP Primer(www.snpway.com)设计 KASP 引物, 由生工生物工程(上海)有限公司进行合成。选用武汉景肽公司的 PARMS SNP 检测试剂配制体系, 采用罗氏 LightCycler® 96 实时荧光定量 PCR 仪进行分析。

1.7 数据处理

采用 Excel 2019 进行数据分析; 采用 Adobe Illustrator CC 进行绘图。

2 结果与分析

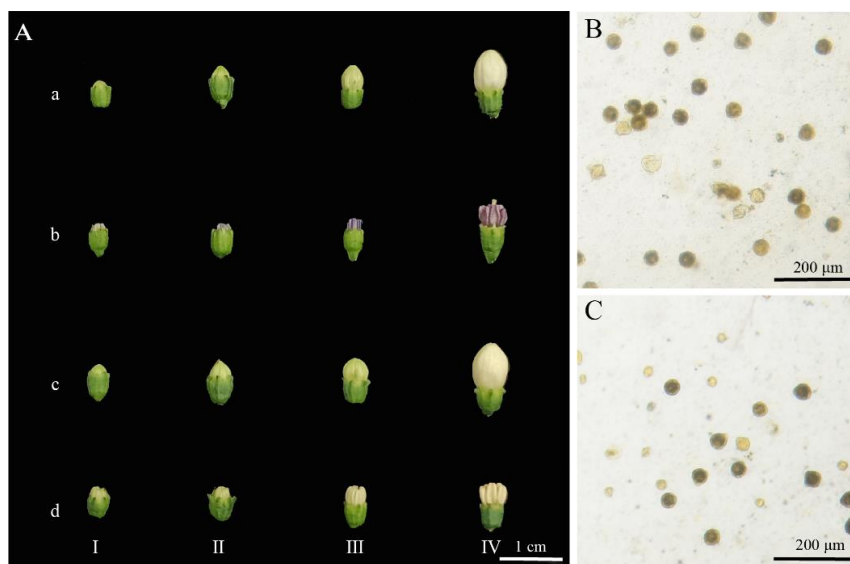
2.1 表型特征分析

分别对 ST-8 和 *Caya* 花药不同发育时期进行观察, 根据花药颜色变化将花药发育划分为 4 个时期(图 1-A), 在原色期(现蕾后第 3 天)二者花药颜色都为青绿色, 无明显差异; 在破色期(现蕾后第 6 天)之后, 二者开始出现差异, ST-8 花药呈淡蓝紫色; 至累色期(现蕾后第 10 天), ST-8 花药颜色逐渐加深直至变为深紫色, 之后颜色不再变

化, 而 *Caya* 在破色期(现蕾后第 6 天)花药表现为黄色, 直至成熟裂开都没有出现颜色变化。推断破色期(现蕾后第 6 天)为花药颜色差异开始的时期。

观察花药发育过程, ST-8 和 *Caya* 成熟期(现蕾后第 15 天)的花药均饱满且体积较大, 除花药颜色外, 不存在其他显著差异。对成熟花药进行 I₂-KI 染色试验, 在显微镜下观察(图 1-B, 图 1-C)发现, 二者花药内均有大量花粉粒, 花粉粒饱满, 体积较大, 染色深, 少数花粉粒发育不良, 体积较小, 染色浅, 呈干瘪状态。随机挑选 5 个视野进行花粉活力统计, 结果显示, ST-8 可育花粉率为 94.26%, *Caya* 可育花粉率为 90.80%, 差异不显著。

采集成熟期(现蕾后第 15 天)花药进行花青素含量和类黄酮含量的测定。结果表明, ST-8 花药中花青素含量约为 123.29 $\mu\text{g/g}$, 类黄酮含量约为 5.17 mg/g; 突变体 *Caya* 花药中花青素含量约为 4.41 $\mu\text{g/g}$, 类黄酮含量约为 5.95 mg/g。与 ST-8 相比, *Caya* 花药中花青素含量极显著减少, 类黄酮含量无显著差异。



A 辣椒花蕾不同发育时期的形态(a、b 分别是去除花瓣前后的 ST-8 花蕾, c、d 分别是去除花瓣前后的 *Caya* 花蕾; I 原色期, II 破色期, III 累色期, IV 成熟期); B ST-8 花药染色情况; C *Caya* 花药染色情况。

图 1 野生型 ST-8 和突变体 *Caya* 的表型

Fig.1 Phenotypic analysis result of wild type ST-8 and mutant type *Caya*

2.2 遗传规律分析

为分析突变体 *Caya* 的遗传规律, 将野生型辣椒 ST-8 与突变体 *Caya* 杂交, 构建 F_1 、 F_2 和 BC_1 群体, 调查表型情况。结果(表 1)表明, F_1 群体中

30 个单株表型均与野生型 ST-8 一致, 表明黄色花药为隐性性状; BC_1 回交群体黄色花药辣椒 28 株, 紫色花药辣椒 32 株, 分离比接近 1 : 1($\chi^2 = 0.27 < \chi^2_{0.05}$, $1 = 3.84$); F_2 群体共有 676 株, 黄色花药辣

椒有 522 株, 紫色花药辣椒有 154 株, 经卡方检验, 分离比接近于 3 : 1($\chi^2=1.76<\chi^2_{0.05}$, $I=3.84$), 符合孟德尔遗传定律, 确定 *Caya* 表型受 1 对隐性核基因控制。

表 1 突变体 *Caya* 遗传群体子代性状调查结果

Table 1 The statistical analysis result of the offspring traits in mutant <i>Caya</i>						
群体类型	群体总数	紫色花药株	黄色花药株数	理论比值	实际比值	χ^2
F ₁	30	0	30	0 : 1	0 : 1	—
F ₂ (ST-8× <i>Caya</i>)	676	522	154	3 : 1	3.39 : 1	1.76
BC ₁ (F ₁ × <i>Caya</i>)	60	32	28	1 : 1	1.14 : 1	0.27

$\chi^2>3.84(1)$, $P<0.05$, 差异显著; $\chi^2<3.84(1)$, $P>0.05$, 差异不显著。

2.3 *Caya* 基因定位

通过对突变体混池(*Caya*-MTP)和野生型混池(*Caya*-WTP)进行基因组重测序, 共得到 152 Gbp 原始序列数据, 样本的 GC 含量为 44% ~ 46%, Q30 指标为 93.5%~95.2%, 表明所有测序数据质量均合格, 达到分析要求。

通过 BWA 软件将 reads 比对到辣椒 *zunla* 参考基因组上, 共获得 53 617 个差异 SNP, 计算并绘制 Δ SNP-index 与基因组关系位置图。结果(图 2)显示, 2 号染色体末端有 1 个明显的峰值区域, Δ SNP-index 值在 0.5 以上, 初步确定候选基因位于 2 号染色体 142 Mbp 至 157 Mbp 之间。

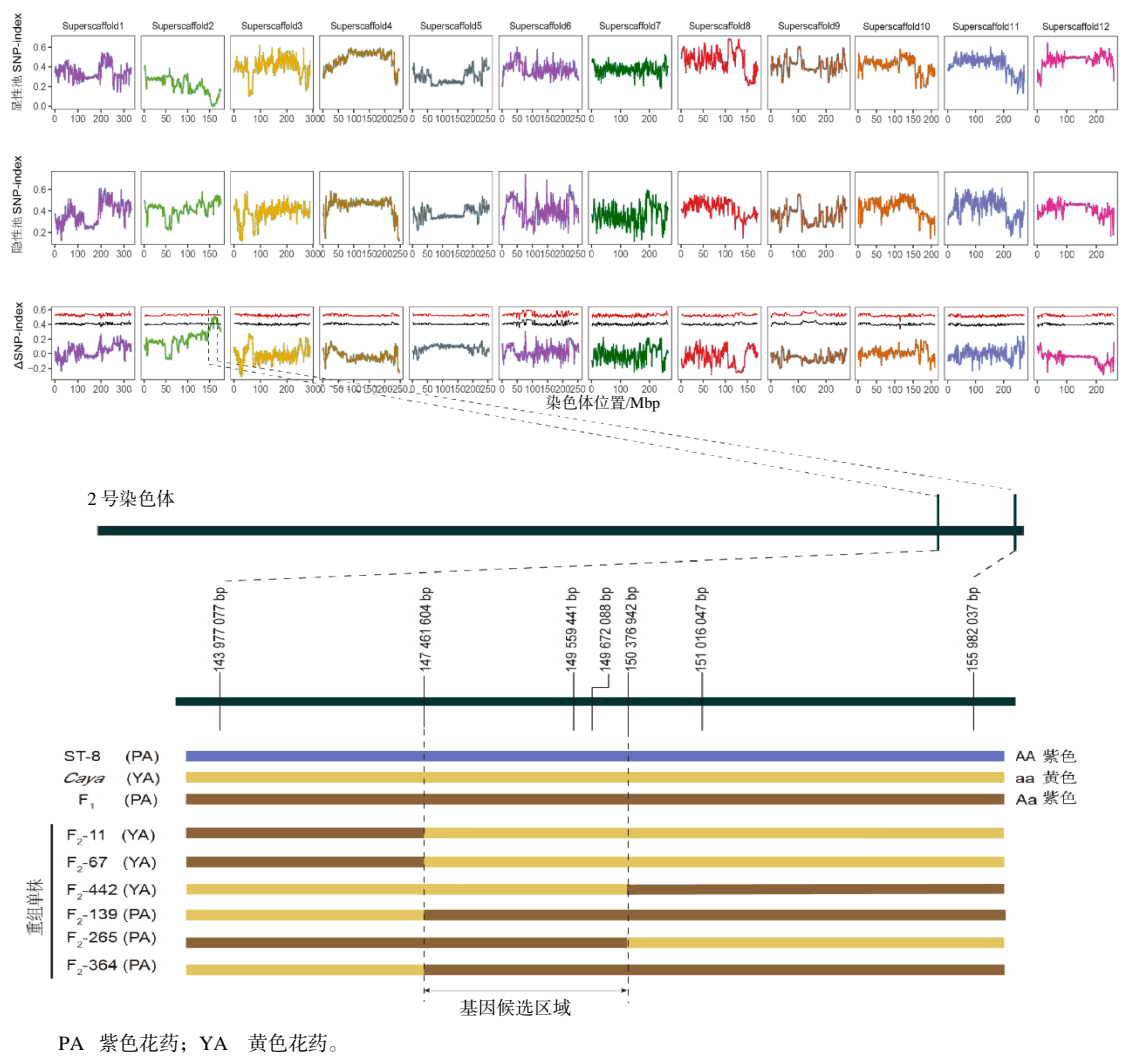


图 2 突变体 *Caya* 基因的精细定位
Fig.2 Fine mapping of the pepper *Caya* gene

根据 BSA-Seq 初定位结果,将目的基因锁定在 2 号染色体末端,候选区间约 15 Mbp,在此区域内进行精细定位。在候选区域两端设计分子标记,利用亲本筛选得到 2 对分子标记 143 977 077 bp 和 155 982 037 bp,在 676 株 F₂ 单株群体中进行基因分型,位点 143 977 077 bp 至 155 982 037 bp 内共检测到 72 个重组单株。设计引物在 72 个重组单株间进行检测,147 461 604 bp 处检测到 12 个重组单株,150 376 942 bp 处检测到 16 个重组单株。根据基因分型结果绘制 *Caya* 精细定位图(图 2),最终将精细定位范围缩小至 147 461 604 bp 至 150 376 942 bp,距离为 2.90 Mbp,位点 149 559 441 bp、149 672 088 bp 与目的基因共分离。

2.4 候选区间基因分析

结合辣椒 *zunla* 参考基因组数据以及 BSA-Seq 测序数据分析,候选区间内共有 12 个基因发生错义突变(表 2),其中 Capana02g002586、Capana02g002763 与花青素合成相关,推测这 2 个基因为候选基因, Capana02g002586 编码黄烷酮-3-羟化酶(F3H), Capana02g002763 编码二氢黄酮醇-4-还原酶(DFR)。

表 2 候选区间的基因注释信息

Table 2 Gene annotation information in candidate interval	
基因登录号	基因注释
Capana02g002586	黄烷酮 3-羟化酶
Capana02g002614	LRR 类受体丝氨酸
Capana02g002667	腺苷酸琥珀酸合成酶
Capana02g002672	Ovate-like 蛋白
Capana02g002687	SCR 类蛋白 4
Capana02g002717	类锌指同源结构域蛋白 2
Capana02g002720	Tubby-like F-box 蛋白
Capana02g002762	辅助蛋白样蛋白 1
Capana02g002763	二氢黄酮醇-4-还原酶
Capana02g002767	糖基转移酶
Capana02g002771	NADPH 依赖性二黄素氧化还原酶
Capana02g002774	α-糖基转移酶

3 结论与讨论

花青素广泛存在于植物的根、茎、叶、花、果实等器官中^[12],在信号传导、植物繁殖、抵抗非生物胁迫等方面有重要作用^[13-16]。花青素合成是植物类黄酮途径的一个重要的下游分支路径,

研究发现类黄酮含量与植物花粉育性密切相关^[10]。曹珂等^[2]对 637 份李属桃亚属种质进行调查发现,橘色、红色花药与花粉育性呈正相关,白色和浅褐色花药均表现为不育。ZHANG 等^[10]研究发现,花青素含量与花粉育性没有直接关系,类黄酮含量降低会造成 H₂O₂ 和 MDA 等活性氧类物质积累,从而导致花粉败育和雄性不育。本研究通过对野生型樟树港辣椒 ST-8 和突变体材料 *Caya* 的成熟花药进行 I₂-KI 染色,发现突变体辣椒 *Caya* 黄色花药花粉活力略有降低,但不存在显著差异。推测突变体 *Caya* 花药中仅仅只有花青素合成受阻,并未影响上游类黄酮类物质积累,未造成辣椒花粉育性的改变。

本研究利用野生樟树港辣椒 ST-8 和突变体 *Caya* 构建杂交群体,经性状调查和卡方检验后,明确黄色花药性状受 1 对隐性核基因控制。为了确定基因位置,构建 2 个极端混池,采用 Mutmap 结合 KASP 技术,利用 9 对引物将基因锁定在 2 号染色体 147 461 604 bp 至 150 376 942 bp 之间。结合 BSA-Seq 数据和 *zunla* 参考基因组信息,筛选到 2 个基因(Capana02g002586、Capana02g002763)与花青素合成密切相关。Capana02g002586 编码的 F3H 是花青素合成途径中从柚皮素到二氢山萘酚的关键催化酶。抑制 *F3H* 表达可以使香石竹橙色的花瓣颜色变淡,甚至褪去颜色表现为淡黄色^[17]。在红色、蓝色、黄色 3 种颜色的睡莲花瓣中, *F3H* 表达量依次递减^[18]。Capana02g002763 编码的 *DFR* 能将 3 种二氢黄酮醇还原为无色花青素。*DFR* 在亚洲百合的花药中高度表达,但只在花青素着色的器官和组织中表达^[19]。海棠叶色与其 *McDFR* 表达量正相关^[20],沉默 *GhDFR1* 导致棉花的花青素和原花青素含量明显降低^[21]。推测本研究中筛选到的 2 个基因是花青素合成途径中的关键基因,可能对辣椒抗逆境研究和作为形态标记的辣椒杂种培育具有重要意义。

为进一步确定突变体 *Caya* 花药花青素合成控制基因,下一步需进一步扩大群体,筛选更多群体单株,对 F₂ 群体重组单株进行自交收种,利用 F₃ 群体缩小定位区间;同时可通过基因沉默和过表达等技术进行功能验证,反向定位辣椒黄色花药花青素合成控制基因。

参考文献:

- [1] HOLTON T A , CORNISH E C . Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis[J]. The Plant Cell, 1995, 7(7): 1071–1083.
- [2] 曹珂, 王思倩, 朱更瑞, 等. 桃花粉育性与花药颜色的关系及其 SSR 分子标记[J]. 植物遗传资源学报, 2010, 11(6): 817–822.
- [3] WANG X Y, QUAN Q M, WANG B, et al. Discovery of androecium color polymorphism in *Epimedium pubescens* with habitat preference of anther/pollen color in the genus[J]. Journal of Plant Ecology, 2018, 11(4): 533–541.
- [4] GAVRUTENKO M, REGINATO M, KRIEBEL R, et al. Evolution of floral morphology and symmetry in the miconieae (Melastomataceae): multiple generalization trends within a specialized family[J]. International Journal of Plant Sciences, 2020, 181(7): 732–747.
- [5] NI X M, XIA Q J, ZHANG H B, et al. Updated foxtail millet genome assembly and gene mapping of nine key agronomic traits by resequencing a RIL population[J]. GigaScience, 2017, 6(2): giw005.
- [6] 韩康妮, 杜晓芬, 王智兰, 等. 谷子花药颜色基因 *Siac1* 的精细定位[J]. 中国农学通报, 2019, 35(12): 130–136.
- [7] XIE H F, HOU J L, FU N, et al. Identification of QTL related to anther color and hull color by RAD sequencing in a RIL population of *Setaria italica*[J]. BMC Genomics, 2021, 22(1): 556.
- [8] NAPOLI C A, FAHY D, WANG H Y, et al. White anther: a petunia mutant that abolishes pollen flavonol accumulation, induces male sterility, and is complemented by a chalcone synthase transgene[J]. Plant Physiology, 1999, 120(2): 615–622.
- [9] CHEN G J, LIU H P, WEI Q, et al. The acyl-activating enzyme PhAAE13 is an alternative enzymatic source of precursors for anthocyanin biosynthesis in petunia flowers[J]. Journal of Experimental Botany, 2017, 68(3): 457–467.
- [10] ZHANG Z S, LIU Y, YUAN Q L, et al. The bHLH1-DTX35/DFR module regulates pollen fertility by promoting flavonoid biosynthesis in *Capsicum annuum* L[J]. Horticulture Research, 2022, 9: uhac172.
- [11] ALLEN G C , FLORES-VERGARA M A , KRASYNANSKI S, et al. A modified protocol for rapid DNA isolation from plant tissues using cetyltrimethylammonium bromide[J]. Nature Protocols, 2006, 1(5): 2320–2325.
- [12] WINKEL-SHIRLEY B . Flavonoid biosynthesis : a colorful model for genetics , biochemistry , cell biology , and biotechnology[J]. Plant Physiology , 2001, 126(2): 485–493.
- [13] SILVA S , COSTA E M , CALHAU C , et al. Anthocyanin extraction from plant tissues: a review[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2017, 57(14): 3072–3083.
- [14] FALCONE FERREYRA M L , RIUS S P , CASATI P . Flavonoids : biosynthesis , biological functions , and biotechnological applications[J]. Frontiers in Plant Science, 2012, 3: 222.
- [15] AN J P, ZHANG X W, BI S Q, et al. The ERF transcription factor MdERF38 promotes drought stress-induced anthocyanin biosynthesis in apple[J]. The Plant Journal, 2020, 101(3): 573–589.
- [16] NOZZOLILLO C, ISABELLE P, DAS G. Seasonal changes in the phenolic constituents of jack pine seedlings(*Pinus banksiana*) in relation to the purpling phenomenon[J]. Canadian Journal of Botany, 1990, 68(9): 2010–2017.
- [17] ZUKER A , TZFIRA T , BEN-MEIR H , et al. Modification of flower color and fragrance by antisense suppression of the flavanone 3-hydroxylase gene[J]. Molecular Breeding, 2002, 9(1): 33–41.
- [18] CHAIPANYA C. Isolation and expression analysis of the flavanone 3-hydroxylase genes in lotus(*Nelumbo nucifera* Gaertn.), waterlily(*Nymphaea* sp.) and transient silencing in waterlily[J]. Chiang Mai Journal of Science, 2017, 44(2): 427–437.
- [19] NAKATSUKA A, IZUMI Y, YAMAGISHI M. Spatial and temporal expression of chalcone synthase and dihydroflavonol 4-reductase genes in the Asiatic hybrid lily[J]. Plant Science, 2003, 165(4): 759–767.
- [20] TIAN J, CHEN M C, ZHANG J, et al. Characteristics of dihydroflavonol 4-reductase gene promoters from different leaf colored *Malus* crabapple cultivars[J]. Horticulture Research, 2017, 4: 17070.
- [21] WANG L, ZHU Y, WANG P, et al. Functional characterization of a dihydroflavanol 4-reductase from the fiber of upland cotton(*Gossypium hirsutum*)[J]. Molecules, 2016, 21(2): 32.

责任编辑: 毛友纯
英文编辑: 柳 正