

# 烟草种质不同群体量遗传完整性的 SSR 研究

潘应花<sup>1,2</sup>, 刘艳华<sup>1</sup>, 任 民<sup>1</sup>, 张兴伟<sup>1</sup>, 牟建英<sup>1,2</sup>, 陈夏晔<sup>1,2</sup>, 丛 鑫<sup>1,2</sup>, 王志德<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>中国农业科学院烟草研究所, 青岛 266101; <sup>2</sup>中国农业科学院研究生院, 北京 100081)

**摘要:** 以普通烟草种质红花大金元、皖口红土烟、白花黑烟、云烟 87 以及野生种 *Nicotiana glauca* 为试验材料, 利用 SSR 分子标记技术结合构建 DNA 混合基因池的方法对种质不同群体量的遗传完整性进行研究。结果表明, 960 对引物对红花大金元、皖口红土烟、白花黑烟以及云烟 87 进行全基因组扫描, 在前 3 份种质中未筛选到多态性引物, 而在云烟 87 中筛选出 3 对多态性引物。3 对多态性引物在云烟 87 的 80 个单株中扩增出 6 条特异性条带, 将群体量降为 10 株时仍能检测到 6 条特异性条带, 因此普通烟草种质繁殖更新群体等于或大于 10 株便能代表群体的遗传完整性。野生种 *N. glauca* 从 608 对引物中筛选出 11 对多态性引物, 扩增出 44 条 DNA 条带, 其中多态性 DNA 片段有 19 条, 并对不同的群体量进行遗传多样性参数的比较, 得出大于 20 株的群体能代表野生种的遗传完整性。

**关键词:** 烟草; SSR; 群体大小; 遗传完整性

## Analysis on Tobacco Genetic Integrity of Different Populations by SSR Markers

PAN Ying-hua<sup>1,2</sup>, LIU Yan-hua<sup>1</sup>, REN Min<sup>1</sup>, ZHANG Xing-wei<sup>1</sup>, MU Jian-ying<sup>1,2</sup>,  
CHEN Xia-ye<sup>1,2</sup>, CONG Xin<sup>1,2</sup>, WANG Zhi-de<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> Tobacco Research Institute of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Qingdao 266101;

<sup>2</sup> Graduate School of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081)

**Abstract:** *Nicotiana tabacum* germplasm Honghuadajinyuan, Wankouhongtuyan, Baihuaheiyuan, Yunyan 87 and wild tobacco germplasm *Nicotiana glauca* were used as materials in this study. The genetic integrity of different populations was investigated by SSR with constructing mixed DNA pool. The results showed that none of polymorphic SSR primers were screened from 960 SSR primer pairs of Honghuadajinyuan, Wankouhongtuyan and Baihuaheiyuan, but 3 polymorphic SSR primers of Yunyan 87 were detected. 6 polymorphic alleles were amplified from 80 plants, and they could still be achieved when the population was reduced to 10 plants. So the population greater than or equal to 10 plants can represent the genetic integrity of *N. tabacum* germplasm. 11 pairs of primers were selected from the 608 pairs to analyze *N. glauca*, and 44 alleles were amplified from the 80 plants, and the polymorphic alleles were 19. According to the comparison of genetic diversity parameters, a sample of no less than 20 plants should be represent the genetic integrity of the population.

**Key words:** tobacco; SSR; population size; genetic integrity

烟草种质资源是烟草育种、生物技术以及烟草科学发展的物质基础, 是人类赖以生存和发展的宝贵财富。到目前为止, 我国收集保存烟草种质资源

5267 份, 居世界首位, 包括选育、地方以及国外引进种质和野生种。我国烟草种质是以种子的形式保存在低温种质库中, 而烟草种质资源的繁殖更新是保

收稿日期: 2012-11-09    修回日期: 2013-01-22    网络出版日期: 2013-08-09

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20130809.1445.017.html>

**基金项目:** 烟草种质资源收集、编目与利用 (NB2011-2130135-32); 国家烟草种质资源平台 (2012-018)

第一作者主要从事烟草种质遗传完整性研究。E-mail: panyinghua2010@sina.com

通信作者: 王志德, 主要从事烟草种质资源研究。E-mail: wzdyes@tom.com

种的重要任务之一,在繁殖更新过程中尽可能的维持遗传完整性对烟草种质资源的研究具有极其重要的作用。为了最大程度的保证种质繁殖更新前后亲代和子代之间的遗传相似性,必须对不同类型的作物适宜的繁殖群体量进行研究,国内外许多作物在这一方面已经有了深入的探讨<sup>[1-5]</sup>。然而,烟草不同群体量的遗传完整性研究尚未见报道。SSR 分子标记与其他标记相比,结果可靠,多态性强,呈共显性等特点<sup>[6]</sup>,已成为研究种质遗传多样性较为理想的方法。

本研究以普通烟草种质和野生种质为供试材料,利用 SSR 分子标记的方法,分析评价了不同繁殖更新群体量的遗传完整性,为制定适宜的繁殖更新群体量提供重要的理论与现实依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

以烟草普通种质红花大金元、碗口红土烟、白花黑烟、云烟 87 以及野生种 *Nicotiana glauca* 为材料,来源于中国烟草种质资源中期库(青岛),2011 年 10 月将供试材料播种在中国农业科学院烟草所温室内。

### 1.2 DNA 的提取

待幼苗长至 3 叶期时,采用单株提取 DNA 的方法。用 DNA 试剂盒(天根植物 DNA 提取试剂盒)快速提取植物基因组 DNA,并用 1% 的琼脂糖凝胶检测 DNA 的质量。红花大金元和云烟 87 分别随机提取 80 个单株 DNA,碗口红土烟和白花黑烟分别随机提取 60 个单株 DNA,野生种 *N. glauca* 随机提取 96 个单株 DNA。

### 1.3 SSR 引物

SSR 引物有两个来源,用于普通烟草研究的 960 对引物来源于 2011 年 G. Bindler 等<sup>[7]</sup>发表的引物序列,960 对引物均匀分布在 24 条连锁群上。用于野生种研究的 608 对引物,其中 504 对引物来源同上,另外 104 对引物来源于农业部转基因烟草环境安全监督检验测试中心(青岛)针对野生烟草序列设计的 SSR 引物序列。引物由上海生物工程技术服务有限公司合成。

### 1.4 DNA 基因池

由于引物数量较大,如果每对引物单株 DNA 都进行扩增,工作量将太大。为了解决这个问题,采用构建 DNA 混合基因池的方法,将同一种质材料随机选取 10 份混和为 1 个基因池,则烟草种质红花大金元、云烟 87 和 *N. glauca* 分别构建

8 个基因池,碗口红土烟和白花黑烟分别构建 6 个基因池。

### 1.5 PCR 扩增体系

总体积 10  $\mu$ L,随机引物 1  $\mu$ L,模板 DNA 1  $\mu$ L, Dream Taq Green PCR Master MIX (2X) 5  $\mu$ L, H<sub>2</sub>O 3  $\mu$ L。扩增程序:94  $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94  $^{\circ}$ C 变性 15 s,退火 55  $^{\circ}$ C 15s,延伸 72  $^{\circ}$ C 30 s,35 个循环,72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min。取 PCR 产物放置于 4  $^{\circ}$ C 进行储存,在 180 V 的恒电压下用 8% 的聚丙烯酰胺凝胶进行电泳,分离扩增产物,银染显色后进行检测。

### 1.6 数据统计分析

统计扩增条带,在同一迁移率上有带记为 1,无带记为 0,缺失记为 9,参照 DNA Ladder Marker 估计片段大小。用 POPGENE Ver. 1.31 软件进行不同群体的等位基因数( $N_a$ )、有效等位基因数( $N_e$ )、遗传多样性指数( $H$ )及香农指数( $I$ )等遗传多样性参数的计算;利用 SAS V8.2 对不同的繁殖群体量的各遗传多样性参数进行  $t$  检验;利用 NTSYS-PC 2.1 对各个群体的遗传一致度进行非加权类平均法(UPGMA)聚类分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 遗传多样性分析

将 960 对引物对普通烟草构建的基因池进行扩增,608 对引物对野生种 *N. glauca* 构建的基因池扩增,并筛选多态性的引物,结果见表 1。由表 1 可知,4 份普通烟草种质中红花大金元、碗口红土烟、白花黑烟的个体之间遗传差异较小,在 960 对引物中未筛选出多态性引物;云烟 87 相比前 3 个品种,遗传多样性稍高,筛选出 3 对多态性引物。野生种 *N. glauca* 筛选出 11 对多态性引物。图 1A 为部分引物(61148、50762、51912、52049)对红花大金元构建的 8 个混合 DNA 基因池的扩增结果,4 对引物都扩增出清晰的条带,8 个基因池之间没有差异;图 1B 为部分引物(51063、51071、52821、54810、54972)对碗口红土烟构建的 6 个 DNA 基因池的扩增结果,引物 51063、52821、54810、54972 均扩增出清晰条带,引物 51071 没有扩出条带,6 个基因池之间没有差异;图 1C 为部分引物(52957、52992、51113、53230、53332)对白花黑烟构建的 6 个 DNA 基因池的扩增结果,除引物 52957 没有扩增出清晰条带,其他引物均扩增出清晰条带,6 个基因池之间没有差异。图 2 为部分引物(52415、52856、53555、60038、55240、55279)对云烟 87 构建的 8 个 DNA 基因池的扩增结

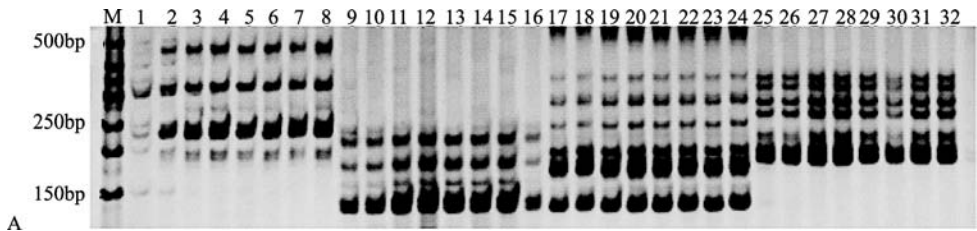
果,其中引物 52415、55279 没有扩增出条带;引物 52856、53555、60038、55240 均扩增出清晰条带,而引物 60038 在 8 个混合的 DNA 池之间扩增出 5 个条带,特异性条带为 3 个,即引物 60038 为有多态性的引物。图 3 为针对野生烟草序列设计的部

分 SSR 引物 ( Y7、Y25、Y60、Y35 ) 对 *N. alata* 构建的 8 个 DNA 基因池的扩增结果,4 对引物均扩增出清晰条带,其中引物 Y35 在 8 个混合的 DNA 池之间扩增出 2 条特异性条带,即引物 Y35 为有多态性的引物。

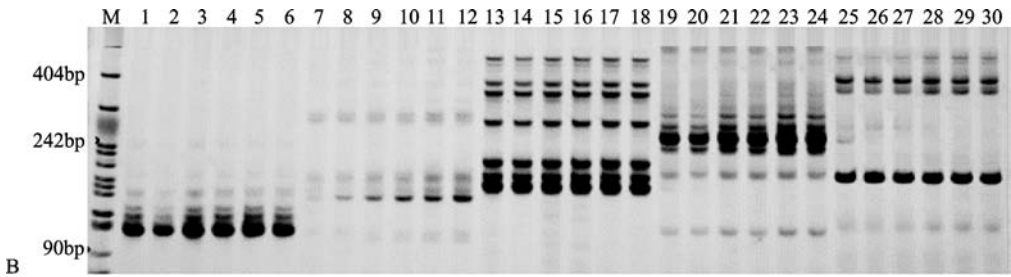
表 1 960 对引物对试验材料的扩增结果

Table 1 The amplified result of materials by 960 primers

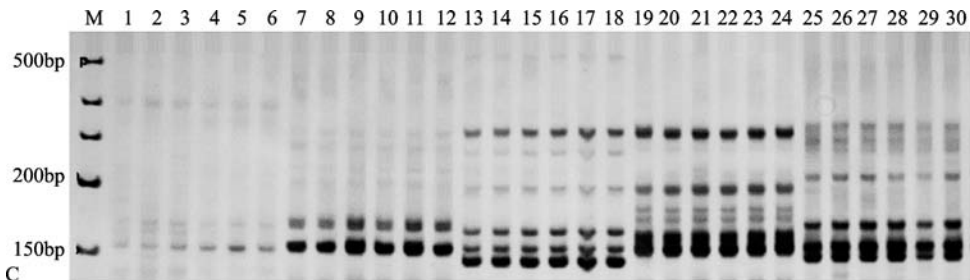
|               | 红花大金元<br>Honghuadajinyuan | 云烟 87<br>Yunyan 87 | 碗口红土烟<br>Wankouhongtuyan | 白花黑烟<br>Baihuaheiyan | <i>N. alata</i> |
|---------------|---------------------------|--------------------|--------------------------|----------------------|-----------------|
| 扩出清晰条带的引物数(对) | 601                       | 603                | 553                      | 639                  | 207             |
| 有多态性的引物数(对)   | 0                         | 3                  | 0                        | 0                    | 11              |



M: Mark; 1-8、9-16、17-24、25-32 分别为引物 61148、50762、51912、52049 对红花大金元 8 个基因池的扩增结果  
1-8、9-16、17-24、25-32 are the amplified results of Honghuadajinyuan constructing  
8 mixed DNA pools by primers 61148、50762、51912、52049



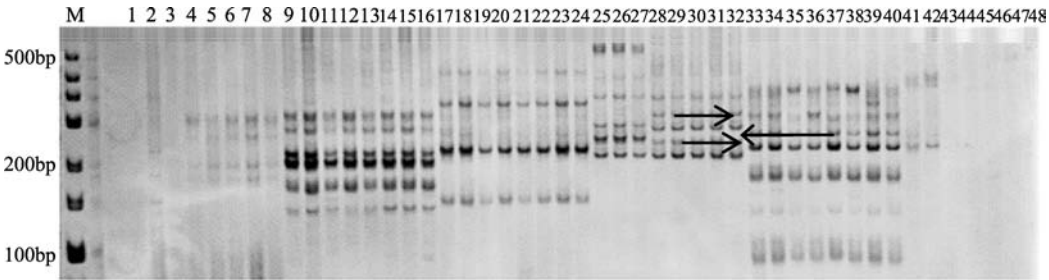
M: Mark; 1-6、7-12、13-18、19-24、25-30 分别为引物 51063、51071、52821、54810、54972 对碗口红土烟 6 个基因池的扩增结果  
1-6、7-12、13-18、19-24、25-30 are the amplified results of Wankouhongtuyan constructing  
6 mixed DNA pools by primers 51063、51071、52821、54810、54972



M: Mark; 1-6、7-12、13-18、19-24、25-30 分别为引物 52957、52992、51113、53230、53332 对白花黑烟 6 个基因池的扩增结果  
1-6、7-12、13-18、19-24、25-30 are the amplified results of Baihuaheiyan constructing  
6 mixed DNA pools by primers 52957、52992、51113、53230、53332

图 1 部分引物对红花大金元 (A)、碗口红土烟 (B)、白花黑烟 (C) 的扩增结果

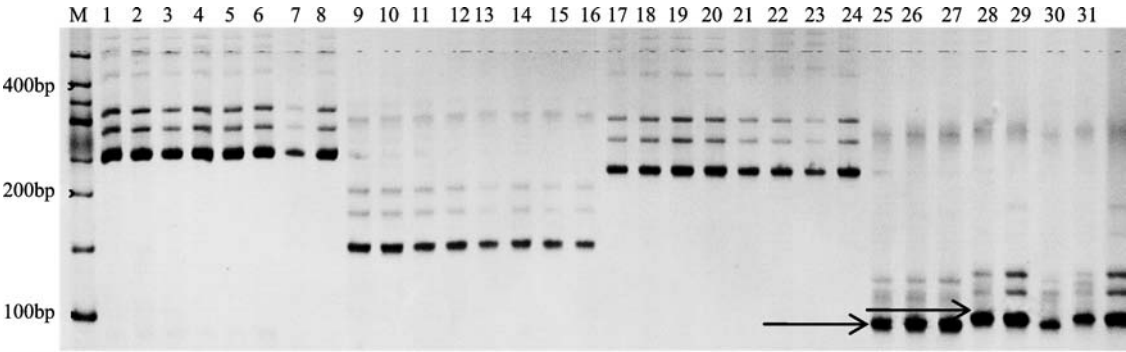
Fig. 1 The amplified results of Honghuadajinyuan, Wankouhongtuyan, Baihuaheiyan by part of primers



M;Mark;1-8、9-16、17-24、25-32、33-40、41-48 分别为引物 52415、52856、53555、60038、55240、55279 对云烟 87 8 个基因池的扩增结果  
1-8、9-16、17-24、25-32、33-40、41-48 are the amplified results of Yunyan87 constructing  
8 mixed DNA pools by primers 52415、52856、53555、60038、55240、55279

图 2 部分引物对云烟 87 的扩增结果

Fig. 2 The amplified result of Yunyan 87 by primers



M;Mark;1-8、9-16、17-24、25-32 分别为引物 Y7、Y25、Y60、Y35 对 *N. alata* 8 个基因池的扩增结果  
1-8、9-16、17-24、25-32 are the amplified results of *N. alata* constructing 8 mixed DNA pools by primers Y7、Y25、Y60、Y35

图 3 部分引物对 *N. alata* 的扩增结果

Fig. 3 The amplified result of *N. alata* by primers

2.2 群体遗传结构分析

2.2.1 云烟 87 群体遗传结构分析 利用筛选出来的 3 对多态性 SSR 引物 (PT52641、PT60080、PT60038)对云烟 87 品种的 80 个单株进行检测,共得到 16 个清晰可辨的条带,每个引物的条带数为 5~6,其中特异性条带数为 6 个。图 4 为引物 PT52641 对 36 个单株的扩增结果。

从云烟 87 的 80 份 DNA 中随机抽取 50 份

DNA,利用筛选出来的 3 对引物进行扩增并统计条带数,重复 3 次,16 个条带均可扩增出来。利用相同的方法,将群体量依次减少为 30、20、10,当群体量降低为 10 时仍可将 6 个特异性条带扩增出来。而将群体量缩小至 5,进行随机、多次的选取,发现在重复的过程中部分特异性条带会丢失,因此样本量为 10 株时能代表云烟 87 群体的遗传完整性。

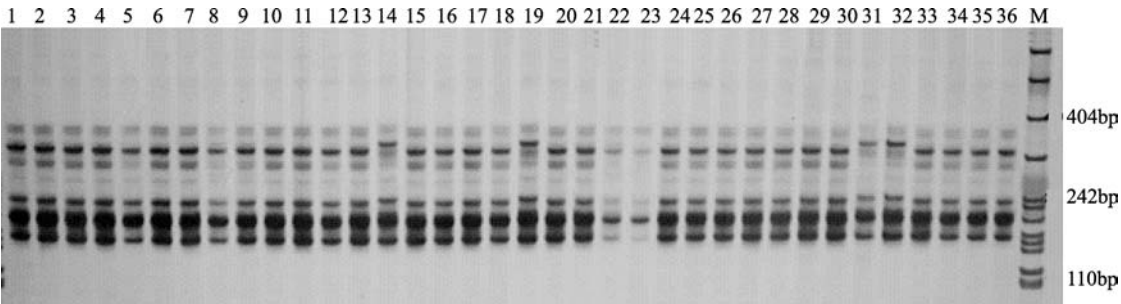


图 4 引物 PT52641 对云烟 87 部分材料的扩增结果

Fig. 4 The amplified result of Yunyan87 by primer 52641

**2.2.2 *N. alata* 群体遗传结构分析** 利用筛选出来的 11 对引物 (PT53226、PT54329、PT51609、PT50246、Y10、Y26、Y35、Y36、Y49、Y73、Tsp-124) 对 *N. alata* 的 96 个单株中进行分子标记检测,共扩增出 44 个 DNA 条带,其中多态性 DNA 片段有 19 个,占扩增总带数的 43%,每个引物产生的特异性带为 1~3 个。图 4 为引物 PT53226 对 *N. alata* 30 个单株的扩增结果图。

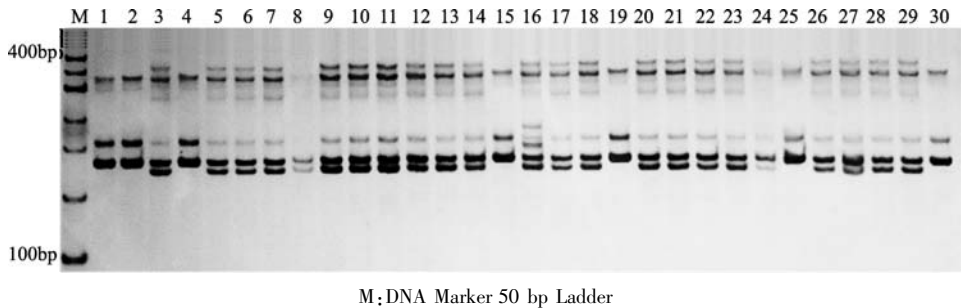


图 5 引物 PT53226 对 *N. alata* 部分材料的扩增结果

表 2 SSR 分析 *N. alata* 种质群体的遗传结构  
Table 2 Genetic composition of the population *N. alata* by SSR

| 群体         | 等位基因数                | 有效等位                     | 遗传多样性       | 香农指数     |
|------------|----------------------|--------------------------|-------------|----------|
| Population | <i>N<sub>a</sub></i> | 基因数 <i>N<sub>e</sub></i> | 指数 <i>H</i> | <i>I</i> |
| 5          | 2. 0000a             | 1. 5259b                 | 0. 2582a    | 0. 4319a |
| 10         | 2. 0909a             | 1. 5267b                 | 0. 2664a    | 0. 4515a |
| 20         | 2. 1818a             | 1. 5833a                 | 0. 2823a    | 0. 4776a |
| 30         | 2. 2727a             | 1. 5845a                 | 0. 2899a    | 0. 4900a |
| 60         | 3. 0000a             | 1. 5865a                 | 0. 2963a    | 0. 5126a |
| 96         | 3. 0000a             | 1. 5984a                 | 0. 3003a    | 0. 5162a |

同列不同小写字母分别表示 5% 差异显著水平。下同  
Values followed by different letters are significantly different at 5% (small) levels, the same as below

表 3 *N. alata* 种质群体遗传一致度分析  
Table 3 The analysis of genetic identity in the population of *N. alata*

| 群体 Population | 5       | 10      | 20      | 30      | 60      |
|---------------|---------|---------|---------|---------|---------|
| 10            | 0. 9969 |         |         |         |         |
| 20            | 0. 9950 | 0. 9928 |         |         |         |
| 30            | 0. 9950 | 0. 9905 | 0. 9971 |         |         |
| 60            | 0. 9880 | 0. 9803 | 0. 9931 | 0. 9943 |         |
| 96            | 0. 9915 | 0. 9855 | 0. 9960 | 0. 9973 | 0. 9992 |

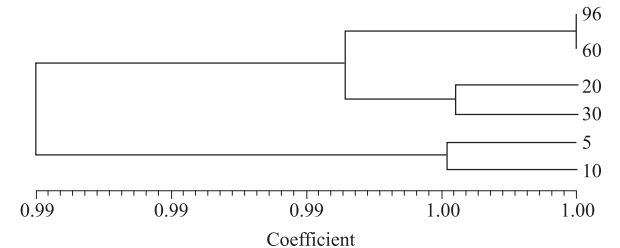


图 6 基于 SSR 标记的 *N. alata* 种质群体 UPGMA 聚类分析  
Fig. 6 The analysis of genetic identity of the population *N. alata*

从 *N. alata* 的 96 个单株中,随机抽取 5、10、20、30 和 60 株组成具有不同样本量的 5 个群体,利用 POP-GENE Ver. 1. 31 计算各个群体的遗传多样性指标,利用 SAS V8. 2 对其进行 *t* 检验(表 2)。结果表明,除有效等位基因数外,群体 5、群体 10 与群体 20、群体 30、群体 40 差异显著外,其他 3 个指标在 6 个供试群体间的差异不显著。

**2.2.3 *N. alata* 遗传一致度与聚类分析** *N. alata* 种质各群体之间的遗传一致度见表 3,遗传一致度介于 0. 9803~0. 9992 之间,群体 60 和群体 96 之间最大,群体 10 和群体 60 之间最小。根据遗传一致度进行聚类分析,结果表明(图 6),群体 60 和群体 96 遗传一致度最高,先聚为一类,然后和群体 30、群体 20 再聚为一类,群体 10 和群体 5 聚为一类。群体 20 与群体 96 遗传一致度高达 0. 9960,综合考虑不同群体之间的各遗传参数,对于烟草野生种质,当繁殖群体量大于 20 株时可以代表 *N. alata* 的遗传完整性。

### 3 讨论

遗传完整性是指群体的遗传结构得到完全的保持,维持种质遗传完整性是种质在贮藏和繁殖更新过程中最核心的工作<sup>[8]</sup>。影响种质遗传完整性的遗传因素主要包括基因突变、遗传漂变及遗传漂移等<sup>[9-11]</sup>,其中所有的遗传漂变都是由于取样误差而产生的,漂变在所有群体中都能出现,而且在很小的群体中效应更显著。

目前,国内外许多作物在此方面已做了不同深度的研究。M. J. Lawrence 等<sup>[12]</sup>认为为了保证群体中频率不低于 0.05 的稀有基因不会丢失,繁殖群体量至少为 172 株。N. R. Sackville Hamilton 等<sup>[13]</sup>推断,100 个单株的更新群体,频率为 0.05 的基因被丢失的概率仅为 0.000035,据此推荐 100 个单株作为更新群体。徐重益等<sup>[14]</sup>从 1 份菜薹地方品种的 200 单株中随机抽取 10、15、20、25、30、35 和 40 株组成不同的群体,利用 RAPD 技术得出大于 30 株的群体能代表该品种的遗传多样性。段兴恒等<sup>[15]</sup>对多花菜豆设 25、50、100、150、200 株 5 种不同的群体进行田间试验,得出多花菜豆基因库种子繁殖更新的群体大小一般以 50 株为宜。张晓宇<sup>[16]</sup>利用 SSR 分子标记研究 4 个不同的繁殖群体量(50、100、150、200 株)对玉米遗传完整性的影响,指出 200 株能较好的保持玉米的遗传完整性。

以上研究大都集中于异花授粉作物,而对自花授粉作物此方面的研究涉及较少。烟草属于自花授粉植物,但存在一定的异交率,一般在 5% 左右,部分烟草种质内存在较丰富的遗传多样性,因此,研究繁殖群体大小对烟草种质的遗传完整性意义重大。本研究表明,红花大金元、碗口红土烟、白花黑烟同一品种的个体之间遗传差异较小,因此,对于红花大金元、碗口红土烟、白花黑烟这类品种,在实际的生产过程中对于繁殖群体量的要求低一些,应该加强防止花粉污染及种子的混杂等方面的工作力度,例如,严格套袋,对多株进行混合收种等方式。对于云烟 87 这类品种,10 株以上便可代表该群体的遗传完整性。对于 *N. alata* 这类野生种,综合考虑不同抽样样本量的遗传多样性参数和聚类分析图,20 株以上可代表群体的遗传完整性。J. Crossa<sup>[17]</sup>指出,在实际的田间生产中,繁殖群体的量应该为理论值的 2 倍。因此,对于云烟 87 这类品种在田间繁殖更新过程中,一般要种植 20 棵植株以上;对于 *N. alata* 这类的野生种在田间进行繁种过程中种植 40 株。在研究不同的繁殖群体量对种质遗传完整性影响时,应充分考虑不同品种之

间的差异。此外,这一结论在田间的有效性还需要进一步验证,在田间复植 1~2 代,按照这一标准,选取能代表群体遗传完整性的植株数,进行下一步的验证工作。

## 参考文献

- [1] Schoen D J, David J L, Bataillon T M. Deleterious mutation accumulation and the regeneration of genetic resources [J]. PNAS, 1998, 95: 394-399
- [2] Crossa J, Vencovsky R. Implications of the variance effective population size on the genetic conservation of monoecious species [J]. Theor Appl Genet, 1994, 89: 936-942
- [3] 马缘生, 谭富娟, 李灵芝, 等. 异花授粉作物大白菜和荞麦基因库种子繁殖技术研究 [J]. 中国农业科学, 2000, 33(2): 16-22
- [4] 许玉凤, 朱远英, 张志娥, 等. 高粱微卫星分析中遗传完整性样本量的确定 [J]. 华北农学报, 2012, 27(3): 108-114
- [5] 张艳欣, 王林海, 吕海霞, 等. 基于 EST-SSR 研究芝麻地方种质不同大小繁殖群体间多态性 [J]. 中国农学通报, 2011, 27(18): 90-93
- [6] 刘艳华, 牟建民, 王志德, 等. 分子标记技术在烟草遗传育种中的应用 [J]. 植物遗传资源学报, 2007, 8(1): 118-122
- [7] Bindler G, Plieske J, Bakahar N, et al. A high density genetic map of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) obtained from large scale microsatellite marker development [J]. Theor Appl Genet, 2011, 123: 219-230
- [8] 夏冰, 卢新雄, 林凤. 种质遗传完整性研究进展 [J]. 安徽农业科学, 2007, 35(15): 4415-4417
- [9] 王栋, 卢新雄, 张志娥, 等. SSR 标记分析种子老化及繁殖世代对大豆种质遗传完整性的影响 [J]. 植物遗传资源学报, 2010, 11(2): 192-199
- [10] 张晗, 卢新雄, 张志娥, 等. 种子老化对玉米种质资源遗传完整性变化的影响 [J]. 植物遗传资源学报, 2005, 6(3): 271-275
- [11] 王小丽, 李志勇, 李鸿雁, 等. 种子老化对扁蓿豆种质遗传完整性变化的影响 [J]. 中国草地学报, 2010, 32(6): 52-57
- [12] Lawrence M J, Marshall D F, Davies P. Genetics of genetic conservation. I. Sample size when collecting germplasm [J]. Euphytica, 1995, 84: 89-99
- [13] Sackville Hamilton N R, Chorlton K H. Regeneration of accessions in seed collections [M]. Rome: IPGRI, 1997
- [14] 徐重益, 李锡香, 王海平, 等. 菜薹种质内不同大小群体间遗传多样性的 RAPD 鉴定和比较 [J]. 植物遗传资源学报, 2004, 5(1): 43-46
- [15] 段兴恒, 孔庆全, 王述民, 等. 基因库中多花菜豆种子繁殖新方法 [J]. 华北农学报, 1998, 13(3): 81-87
- [16] 张晓宇. 玉米地方品种不同繁殖群体量遗传完整性的研究 [D]. 呼和浩特: 内蒙古大学, 2010
- [17] Crossa J. Methodologies for estimating the sample size required for genetic conservation of outbreeding crops [J]. Theor Appl Genet, 1989, 77: 153-161