

# 38 份晾晒烟种质资源遗传关系的 SSR 分析

张雪廷<sup>1,2</sup>, 童治军<sup>2</sup>, 焦芳婵<sup>2</sup>, 肖炳光<sup>2</sup>, 曾千春<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>云南农业大学, 昆明 650201; <sup>2</sup>云南省烟草农业科学研究院, 玉溪 653100)

**摘要:** 从自主开发的近 3000 对烟草 SSR 引物中随机选出 30 对 SSR 引物, 对 38 份晾晒烟种质资源的遗传关系进行了分析。在 38 份供试材料中共检测出 173 个等位基因, 每对 SSR 引物可检测到的等位基因数为 2~11 个, 平均为 5.77 个; 遗传相似系数 ( $GS$ ) 的变化范围为 0.140~0.928, 平均为 0.534。表明 38 份晾晒烟的遗传多样性丰富, 遗传差异较大, 亲缘关系较远。聚类分析表明, 在  $L1 (GS=0.165)$  处可将 38 个品种分为 2 个类群, 即晾晒烟类群和美国从烟草起源地收集的烟草 (TI, tobacco instruction) 类群; 晾晒烟类群又可进一步分为 4 个亚类, 其聚类结果与所期望的结果基本一致。表明 SSR 是一种有效、稳定和可靠的分子标记, 能较好地地从分子水平上揭示晾晒烟种质资源的遗传背景和亲缘关系。

**关键词:** 晾晒烟; SSR 标记; 遗传多样性; 亲缘关系

## Genetic Relationship Analysis of Thirty-eight Sun/Air-Cured Tobacco Germplasms Based on Simple Sequence Repeat (SSR) Markers

ZHANG Xue-ting<sup>1,2</sup>, TONG Zhi-jun<sup>2</sup>, JIAO Fang-chan<sup>2</sup>, XIAO Bing-guang<sup>2</sup>, ZENG Qian-chun<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Yunnan Agricultural University, Kunming 650201; <sup>2</sup>Yunnan Academy of Tobacco Agricultural Sciences, Yuxi 653100)

**Abstract:** The first phylogenesis of 38 sun/air-cured tobacco germplasms analyzed by simple sequence repeat (SSR) markers were reported in this study. 30 primer pairs were randomly selected from a nearly total of 3000 self-developed tobacco SSR primers. A total of 173 polymorphic alleles were amplified in 38 varieties, and the number of alleles detected by each SSR primer ranged from 2 to 11, with an average of 5.77 alleles per markers. Genetic similarity coefficient ( $GS$ ) among the 38 varieties ranged from 0.140 to 0.928, with an average of 0.534, which indicated the genetic variation of the 38 varieties was quite large and the genetic diversity was much abundant in sun/air-cured tobacco varieties. The result of cluster analysis based on SSR markers showed that 38 varieties could be clustered into 2 groups including sun/air-cured and TI tobacco groups at a relative low level of  $GS=0.165$ . And the sun/air-cured group was further classified into 4 subgroups, which was basically according with expected case. The results showed that SSR was a stable, reliable, and valuable molecular marker system which was more efficient in generating accurate information on genetic background and relationship of tobacco, especially in sun/air-cured germplasms.

**Key words:** sun/air-cured tobaccos; simple sequence repeat (SSR) markers; genetic diversity; genetic relationship

晾晒烟是指以自然条件为主的晾晒结合或晾制方法调制的烟叶, 包括除烤烟外的栽培烟草类型。为了便于研究和利用, 又可将其进一步划分为白肋烟、雪茄烟、香料烟、地方性晾烟和地方性晒烟等不

同的栽培类型<sup>[1]</sup>。在 400 多年的种植过程中, 我国虽然拥有丰富的烟草种质资源, 但在育种上却面临着对种质资源的挖掘、创新力度不够, 过度依赖骨干系, 种质资源遗传背景狭窄等问题<sup>[2]</sup>。因此, 应用

收稿日期: 2012-09-11 修回日期: 2012-11-29 网络出版日期: 2013-06-07

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20130607.1742.027.html>

基金项目: 中国烟草总公司云南省公司项目 (2010YN02, 2011YN04)

第一作者主要从事烟草生物技术研究。E-mail: 442988139@163.com

通信作者: 肖炳光, 博士, 主要从事烟草育种与生物技术研究。E-mail: xiaobg@263.net

分子标记技术对烟草种质资源进行遗传多样性与亲缘关系分析,已成为烟草遗传资源研究的重要内容,其研究结果可为种质资源在烟草育种中的科学利用提供重要的理论依据。

在分子水平上对烟草(尤其是异源四倍体的栽培种)种质资源的研究中,国内外的报道绝大多数集中在 RAPD<sup>[3-5]</sup>、SRAP<sup>[6]</sup>、AFLP<sup>[7-8]</sup>、ISSR<sup>[9-11]</sup> 或 RAPD 和 AFLP 相结合<sup>[12-13]</sup> 等非特异性的标记上。而利用特异性 SSR 标记来揭示烟草种质资源遗传多样性方面的研究较少,这主要受制于烟草基因组数据的匮乏以及烟草 SSR 标记大量开发的成本过高等因素。受益于美国烟草基因组计划(TGI, tobacco genome initiative; <http://www.tobaccogenomic.org/>), G. Bindler 等<sup>[14]</sup> 在 2007 年公布了第 1 张基于 SSR 标记的烟草遗传连锁图谱,并释放了 278 对烟草 SSR 引物。此后,才使得利用 SSR 标记研究烟草种质资源的遗传多样性变成现实。H. Moon 等<sup>[15-17]</sup>

利用 278 对烟草 SSR 引物中部分引物分别对 51 份烟草材料(14 份野生材料,3 份人工合成的多倍体材料和 34 份普通烟草栽培种)、117 份美国主栽的烤烟品种和 702 份美国从烟草起源地收集的材料(TI)进行了遗传多样性分析。然而,到目前为止,利用 SSR 标记对晾晒烟种质遗传关系的分析,在国内外尚未见报道。

本研究利用自主开发的 SSR 标记,首次针对晾晒烟品种进行遗传多样性及其亲缘关系研究,以便为充分发掘、利用晾晒烟种质资源,合理选配亲本等提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

参试的晾晒烟种质共 38 份(表 1),其中国内 19 份、国外 19 份,均由云南省烟草农业科学研究院提供。

表 1 供试材料的编号、名称、来源及类型

Table 1 The accession, variety name, origin, and type of materials

编号	品种名称	来源	类型	编号	品种名称	来源	类型
Accession	Variety name	Origin	Type	Accession	Variety name	Origin	Type
NT01	Burley21	美国	白肋烟	NT20	细石头草烟	中国 云南	晒烟
NT02	L-8	美国	白肋烟	NT21	祥云土烟-1	中国 云南	晒烟
NT03	Banket A-1	美国	白肋烟	NT22	小华青	中国 湖南	晒烟
NT04	Kentucky15	美国	白肋烟	NT23	老板烟	中国 河南	晒烟
NT05	Kentucky17	美国	白肋烟	NT24	沂水香烟	中国 山东	晾烟
NT06	Tennessee86	美国	白肋烟	NT25	Ambalema	美国	雪茄烟
NT07	Tennessee90	美国	白肋烟	NT26	Florida301	美国	雪茄烟
NT08	Virginia509	美国	白肋烟	NT27	新昌香料烟	中国 浙江	香料烟
NT09	Ti245	美国	晒烟	NT28	波贝达 2 号	南斯拉夫	香料烟
NT10	安麻山晒烟-3	中国 云南	晒烟	NT29	克撒锡巴斯玛	希腊	香料烟
NT11	安丘笨烟-1	中国 山东	晾烟	NT30	柯玛蒂尼巴斯玛	希腊	香料烟
NT12	莲塘晒烟	中国 广西	晒烟	NT31	沙姆逊	阿尔巴尼亚	香料烟
NT13	勐掌晾烟	中国 云南	晒烟	NT32	土耳其巴斯玛	土耳其	香料烟
NT14	千层塔	中国 辽宁	晾烟	NT33	丸叶	日本	香料烟
NT15	青梗	中国 广东	晒烟	NT34	希腊巴斯玛	希腊	香料烟
NT16	树凹咬	中国 云南	晒烟	NT35	云香巴斯玛 1 号	中国 云南	香料烟
NT17	宿松杀猪刀	中国 安徽	晾烟	NT36	乐业大瓣烟	中国 云南	晒烟
NT18	腾冲大柳叶	中国 云南	晾烟	NT37	白花铁杆子	中国 四川	晒烟
NT19	铁把子烟	中国 山东	晾烟	NT38	Ti112	美国	晒烟

### 1.2 SSR 引物

所用的 30 对 SSR 引物是从云南省烟草农业科学研究院(即中国烟草育种研究(南方)中心)开发的近 3000 对 SSR 引物<sup>[18-19]</sup>中随机挑选的。开发烟草 SSR 引物的数据来源主要有 2 个:一是美国烟草基因组计划(TGI)释放出的一批烟草基因组序列(TGI, <http://www.tobaccogenomic.org/>);二是在公共数据库下载的所有烟草 EST 序列(TIGR, <http://www.tigr.org/tdb/e2k1/plant.repeats/>)。SSR 引物

全部由宝生物(大连)有限公司合成。

### 1.3 试剂

Taq Polymerase、dNTPs、100 bp DNA ladder marker 均购自宝生物(大连)有限公司;丙烯酸胺和甲叉丙烯酸胺购自 USB Corporation(美国);Tris-Base、Boric Acid、EDTA-2Na 和 CTAB 购自 Amersham Biosciences(美国);其他均为国产试剂。

### 1.4 烟草 DNA 的提取

烟草基因组 DNA 的提取采用 CTAB 大量法,提

取、纯化及检测方法参照 J. E. De Riek 等<sup>[20]</sup>并作适当修改。

### 1.5 SSR 反应条件

PCR 反应体系为 20  $\mu\text{L}$ , 其中 20 ~ 50 ng/ $\mu\text{L}$  DNA 样品 1.5  $\mu\text{L}$ 、10  $\times$  PCR reaction buffer ( $\text{Mg}^{2+}$  plus) 2  $\mu\text{L}$ 、25 mmol/L dNTPs 1.5  $\mu\text{L}$ 、10  $\mu\text{mol/L}$  正反向引物各 1.5  $\mu\text{L}$ 、*rTaq* 0.75 U, 最后用 ddH<sub>2</sub>O 补齐至 20  $\mu\text{L}$ 。PCR 扩增在 Bio-RAD Master Cycler C1000 上进行, 反应程序为 94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min; 94  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s, 退火(退火温度随引物的不同而改变)30 s, 30 个循环, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 30 s, 最后 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 5 ~ 7 min, 4  $^{\circ}\text{C}$  保存。

### 1.6 扩增产物检测

PCR 扩增产物中加 1/6 体积的 6  $\times$  Loading buffer, 然后取 2.5  $\mu\text{L}$  上样, 利用 6% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶在 DYY-12 型电泳仪(北京六一厂)上进行电泳分离(220V, 3h), 最后参照许绍斌等<sup>[21]</sup>的方法进行银染检测。

### 1.7 数据分析

扩增产物按同一迁移位置上条带在各个材料中

的有(记为 1)、无(记为 0)和缺失(记为 2)进行统计。参试的每两份材料间的遗传相似系数(GS, genetic similarity coefficient)用 M. Nei 等<sup>[22]</sup>的公式计算。利用 NTSYSpc Version 2.11 软件<sup>[23]</sup>按照类平均法(UPGMA, unweighted pair-group method with arithmetic means)进行聚类分析, 构建分子进化系统树。

## 2 结果与分析

### 2.1 SSR 标记的多态性分析

利用随机挑选出的 30 对 SSR 引物, 对参试的 38 份晾晒烟种质资源进行 PCR 扩增, 扩增产物均达到了对烟草 SSR 引物的设计要求, 即 SSR 引物扩增产物的分子量均在 150 bp 左右(100 ~ 300 bp)(图 1)。30 对 SSR 引物在 38 份烟草材料中共扩增出 173 个多态性条带(即在 30 个 SSR 位点上共检测到 173 个等位基因), 每对 SSR 引物可检测的等位基因数为 2 ~ 11 个, 平均为 5.77 个。表明 SSR 标记在检测晾晒烟基因组遗传多态性上有十分显著的检出效率。

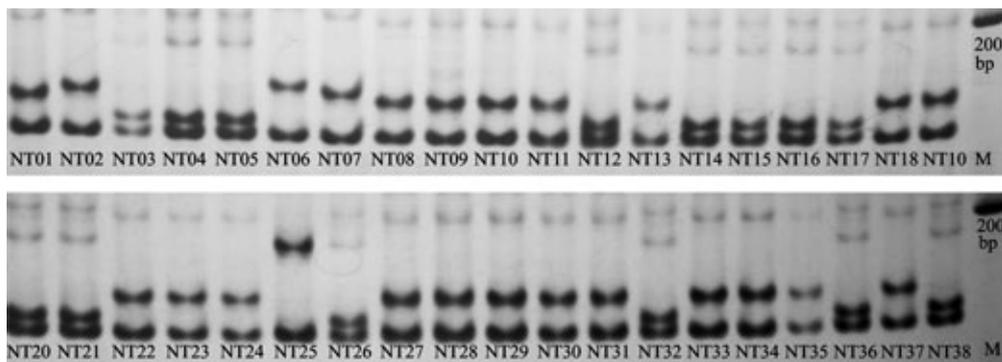


图 1 引物 Tp718 的扩增结果

Fig. 1 Result of PCR amplification using primer Tp718

38 份烟草材料均属于由共同祖先种(林烟草(*Nicotiana sylvestris*)和绒毛状烟草(*Nicotiana tomentosiformis*))自然杂交进化而成的普通烟草。从扩增带型上看, 每对引物均有 1 ~ 2 条共同的主带扩增, 表明 38 份烟草材料具有相似的遗传基础或由共同的祖先演化而来, 与现在公认的烟草起源与进化的观点相吻合。

### 2.2 晾晒烟种质的遗传相似性

根据 SSR 标记分析结果, 计算 38 份晾晒烟种质材料间的遗传相似系数(表 2), 供试材料间的遗传相似系数在 0.140 ~ 0.928 之间, 平均为 0.534。其中宿松杀猪刀(NT17)与柯玛蒂尼巴斯玛(NT30) 2 份材料间的遗传相似系数最低, 达到 0.140; 而

Tennessee86(NT06)和 Tennessee90(NT07)之间的遗传相似系数最高, 达到 0.928。说明此 38 份晾晒烟的遗传相似性相对较低, 变异范围较大, 亲缘关系较远。即使是属于相同的栽培烟草类型, 其遗传相似性也很低, 如白肋烟品种间的遗传相似系数为 0.402 ~ 0.928, 平均为 0.665; 香料烟品种间的遗传相似系数为 0.210 ~ 0.600, 平均为 0.405; 地方性晒烟品种间的遗传相似系数为 0.161 ~ 0.463, 平均为 0.312; 雪茄烟 Florida301(NT26)和 Ambalema(NT25)间的遗传相似系数为 0.228。上述结果表明, 供试的晾晒烟品种间存在着丰富的变异, 遗传基础相对比较宽, 遗传差异性较显著。



### 2.3 晾晒烟品种的聚类分析

根据遗传相似系数矩阵按 UPGMA 方法构建 38 份晾晒烟种质的聚类图(图 2)。在遗传相似系数  $GS = 0.165$  处(L1),可将供试材料划分为 2 大类:由美国从烟草的起源地收集而来的 2 份材料 Ti245 (NT09)和 Ti112(NT38)聚为第 II 类;剩余的 36 份材料则聚为第 I 类。在遗传相似系数  $GS = 0.216$  处 (L2),可将 I 类再分为 2 个亚类:同属雪茄烟的 Florida301(NT26)和 Ambalema(NT25)被归为 IB 亚类;剩余的 34 份材料则被聚为 IA 亚类。当采用适当的遗传相似系数来分隔,又可将 IA 亚类进一步分为 3 个亚亚类:IAa 包括 Burley21 (NT01)、Kentucky15 (NT04)、Kentucky17 (NT05)、Tennessee86 (NT06)、Tennessee90(NT07)、Virginia509(NT09)、L-8(NT02)、

BanketA-1 (NT03)、腾冲大柳叶 (NT18)、千层塔 (NT14)、铁把子烟(NT19)、沂水香烟 (NT24)、安丘笨烟-1(NT11)和宿松杀猪刀(NT17)共 14 份材料,其中前 8 份是从美国引进的白肋烟品种,后 6 份属于地方性晾烟品种;IAb 包括莲塘晒烟(NT12)、细石头草烟 (NT20)、祥云土烟-1 (NT21)、老板烟 (NT23)、小花青 (NT22)、安麻山晒烟-3(NT10)、树凹咬(NT16)、青梗 (NT15)、白花铁杆子 (NT37)和勐掌晾烟 (NT13)共 10 份材料,都是地方性晒烟品种;IAc 则包含新昌香料烟(NT27)、希腊巴斯玛(NT34)、沙姆逊(NT31)、土耳其巴斯玛 (NT32)、波贝达 2 号 (NT28)、丸叶 (NT33)、克撒锡巴斯玛 (NT29)、柯玛蒂尼巴斯玛 (NT30)、云香巴斯玛 1 号 (NT35)和乐业大瓣烟 (NT36)10 份材料,前 9 份均属于香料烟。

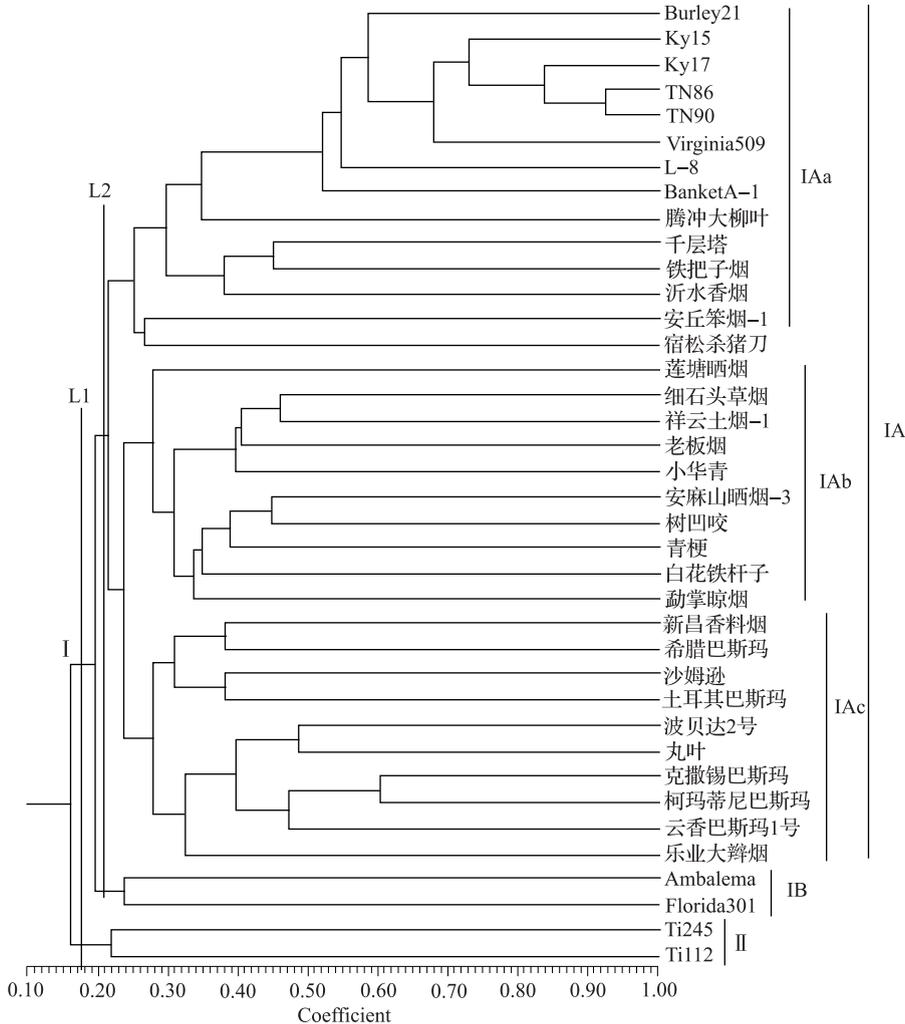


图 2 38 份晾晒烟品种基于 SSR 分析的 UPGMA 聚类图

Fig. 2 Dendrogram derived from UPGMA cluster analysis based on SSR analysis in the 38 sun/air-cured tobacco varieties

由图 2 的聚类结果可知,即使以一个相当低的遗传相似系数水平 ( $GS = 0.165$ , 即 L1 处), Ti245 (NT09) 和 Ti112 (NT38) 与余下的 36 份晾晒烟栽培品种仍能明显区分开。导致这一现象的原因可能是此 2 份材料未受到人为因素的干扰 (如严格的人工定向选择, 有目的的杂交组配等), 而较好保留了烟草进化起始阶段的基因型。与此相类似的情况也出现在绝大多数的地方性晒烟品种中, 如在 IA<sub>b</sub> 和 IA<sub>c</sub> 两小类中的所有晒烟 (地方性晒烟和香料烟) 品种由于需求量和种植面积均很小的缘故, 使得此类型品种所承受的选择压也很小, 从而使其保留了较丰富的遗传变异。但在 IA<sub>a</sub> 小类中的所有晾烟 (白肋烟和地方性晾烟) 品种中的遗传相似性相对较高, 尤其是白肋烟之间的亲缘关系很近, 遗传基础相对比较狭窄, 如 Tennessee86 (NT06) 和 Tennessee90 (NT07) 之间的遗传相似系数高达 0.928。这表明经历了人为的定向育种选择后, 使许多非育种目标的多样化性状丢失, 从而导致了遗传多样性降低。

### 3 讨论

#### 3.1 SSR 标记技术在烟草种质资源研究中的应用

如前文所述, 利用 SSR 标记技术对烟草种质资源遗传多样性的研究报道较少。直到 2007 年, G. Bindler 等<sup>[14]</sup> 才首次报道了利用 SSR 标记揭示 16 份普通烟草品种的亲缘关系。H. Moon 等<sup>[15]</sup> 利用 G. Bindler 等<sup>[14]</sup> 释放的烟草 SSR 引物对分别属于 15 个种的 51 份烟草材料进行了遗传多样性分析, 46 对 SSR 引物在 51 份材料中共检测到 529 个多态性位点, 平均每对引物可检测出 11.5 个等位位点。随后, H. Moon 等<sup>[16-17]</sup> 利用烟草 SSR 引物分别对美国主栽的烤烟品种和美国在烟草起源地收集的材料 (TI) 进行了分析, 其中, 70 对 SSR 引物在 702 份 TIs 材料中共检测到 1031 个多态性位点, 平均每对引物检测的等位位点数为 14.7 个。本研究中利用 30 对 SSR 引物对 38 份晾晒烟材料进行扩增, 共检测出 530 个多态性条带, 每对 SSR 引物可检测的等位基因数为 8~36 个, 平均为 17.67 个。上述结果表明, SSR 标记技术在烟草 (尤其在晾晒烟) 资源遗传关系分析中比较高效, 进而表明了 SSR 标记技术应用于烟草类型划分的可行性。

#### 3.2 晾晒烟种质的遗传多样性与亲缘关系分析

由于本研究是首次利用 SSR 标记分析晾晒烟种质资源遗传多样性, 因此, 无任何与之相关的研究

报道可供参考与比较。本研究中供试材料间的遗传相似系数在 0.140~0.928 之间, 平均为 0.534, 说明晾晒烟品种间遗传多样性较丰富, 遗传基础相对较宽。究其原因, 首先, 由于市场需求量及种植面积均极其有限 (相较于烤烟而言), 在育种中未引起重视, 从而使地方品种和特异种质在一定程度上得到很好的保存。其次, 晾晒烟本身包含几种不同的栽培类型 (如雪茄烟、白肋烟、香料烟等), 而不同烟草栽培类型的形成是在各自的生态环境和人为长期选择下逐渐形成的。因此, 栽培类型间的差别更多保留了特定生态条件下不同的特征特性, 从而使类型间的多样化性状得到较大程度的保留<sup>[5]</sup>。与上述情况相反的是白肋烟, 供试的 8 份白肋烟品种间的遗传相似系数为 0.402~0.928, 平均为 0.665。尤其是由美国田纳西大学培育的 Tennessee86 (NT06) 和 Tennessee90 (NT07), 因其具有相同的亲本 (Burlley49 × PVY202) 而互为姊妹系, 导致之间的遗传相似系数高达 0.928。表明白肋烟品种间遗传相似性较高, 遗传基础相对狭窄。这一结果与前人在分子水平上对烤烟种质资源的研究相吻合<sup>[4,7-8,10-13]</sup>。其主要原因是, 过度依赖极少数的主体骨干亲本而使得许多非育种目标的多样化性状丢失, 导致其遗传多样性降低。总体上看, 本研究中除白肋烟外的晾晒烟材料无论是在不同的栽培类型间或是在同一栽培类型内, 均呈现出较丰富的遗传多样性和相对复杂的遗传背景。这说明我国晾晒烟资源的遗传变异比较丰富, 因此, 科学、合理利用晾晒烟种质资源, 开展不同栽培类型间杂交育种, 将是丰富我国烟草种质资源、拓宽育成品种遗传基础的有效途径之一。

#### 参考文献

- [1] 云南省烟草农业科学研究院. 云南晾晒烟栽培学 [M]. 北京: 科学出版社, 2009: 1-8
- [2] 王元英, 周健. 中美主要烟草品种亲源分析与烟草育种 [J]. 中国烟草学报, 1995, 2(3): 11-22
- [3] 肖炳光, 卢江平, 卢秀萍, 等. 烤烟品种的 RAPD 分析 [J]. 中国烟草学报, 2000, 6(2): 10-15
- [4] Del Piano L, Abet M, Sorrentino C, et al. Genetic variability in *Nicotiana tabacum* and *Nicotiana glauca* species as revealed by RAPD procedure [J]. Beiträge zur Tabakforschung In, 2000, 19: 1-15
- [5] Arslanl B, Okumus A. Genetic and geographic polymorphism of cultivated tobaccos (*Nicotiana tabacum* L.) in Turkey [J]. Russ J Genet, 2006, 42(6): 667-671
- [6] 王日新, 任民, 贾兴华, 等. 烟草主要栽培类型的 SRAP 标记研究 [J]. 生物技术通报, 2009(6): 100-104
- [7] Ren N, Timko M P. ALFP analysis of genetic polymorphism and evolutionary relationships among cultivated and wild *Nicotiana* species [J]. Genome, 2001, 44: 559-571