

晒黄烟种质资源遗传多样性分析与评价

刘艳华¹, 向德虎¹, 闫宁¹, 黄谨², 首安发², 杜咏梅¹, 董建新¹

(¹中国农业科学院烟草研究所, 青岛 266101; ²广西烟草公司贺州市公司, 贺州 542899)

摘要:为加强晒黄烟资源的收集保存与利用,本研究对来源于国家烟草中期库的6份晒黄烟和新收集的26份晒黄烟进行了SSR分子标记研究,根据来源不同将32份种质分成Z(资源库)、G(广西贺州)以及M(广西百色)3个群体。结果表明,(1)106对SSR引物共检测到110个位点,其中85个为多态性位点,多态性比率为77.27%,种质间的遗传相似系数变异范围为0.49~0.95,表明种质间遗传基础比较狭窄。(2)3个群体内遗传差异由大到小分别为:Z>M>G。Z与M的遗传相似系数为0.7762,遗传距离相对较远,G与M遗传相似系数为0.8963,遗传距离较近。(3)在相似系数0.49处可将32份种质分成2类,第1类包括寸三皮和大宁早烟籽,第2类包括3个亚类,其中来源于Z群体的公会晒烟与新收集晒黄烟品种(系)归为一类,Z群体的其他种质与新收集种质遗传距离较远。(4)来自不同地点的同名种质大宁烟遗传距离相对较远,相似系数为0.788。不同名称的公会包盖烟和凤凰黄烟遗传相似性最高,相似系数为0.939。

关键词:晒黄烟;SSR;遗传多样性

Analysis on Genetic Diversity of Yellow Sun-cured Tobacco Germplasm Resources

LIU Yan-hua¹, XIANG De-hu¹, YAN Ning¹, HUANG Jin², SHOU An-fa², DU Yong-mei¹, DONG Jian-xin¹

(¹Tobacco Research Institute of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Qingdao 266101;

²Hezhou Filiale of Guangxi Tobacco Corporation, Hezhou 542899)

Abstract: In order to promote collection, conservation and utilization of yellow sun-cured tobacco resource, 32 yellow sun-cured tobacco germplasm materials were analyzed using 106 pairs of microsatellite (SSR) markers. Based on origins, the tobacco germplasm resources were divided into three groups, including Z from Tobacco Mid-term Germplasm Repository, G from Hezhou of Guangxi Province and M from Baise of Guangxi Province. The results were as follows: (1) Totally 110 loci were detected using the 106 pairs of SSR selected from 740 primer combinations, 85 of these were polymorphic loci (77.27%). The range of variant coefficient was 0.49-0.95 based on molecular clustering, suggesting the genetic basis of the yellow sun-cured tobacco germplasm resources was narrow. (2) The order of genetic diversity of the three groups was Z > M > G. The genetic coefficient was 0.7762 between Z and M, and 0.8963 between G and M. (3) The 32 tobacco germplasm materials were clustered into 2 groups at the position of coefficient of 0.49. The first group included Cunsanpi and Daninghanyanzi germplasm resources. The second group included 3 sub-groups. Gonghuishaiyan from group Z was clustered together with the new collections while other tobacco germplasm resources weren't clustered with the new collections. (4) The genetic distance of the homonymic germplasm resource Daningyan from different origins was far, with a coefficient of 0.788. The genetic distance between Gonghuibaogaiyan and Fenghuanghuangyan was the closest with the coefficient of 0.939.

Key words: yellow sun-cured tobacco; SSR; genetic diversity

收稿日期: 2015-01-28 修回日期: 2015-03-17 网络出版日期: 2016-01-28

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20160128.1533.024.html>

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项(201203091); 贺州特色优质晒黄烟叶开发研究(2012-08)

第一作者研究方向为烟草种质资源研究与利用。E-mail: liuyanhua@caas.cn

通信作者: 董建新, 研究方向为烟草营养与栽培生理。E-mail: dongjianxin@caas.cn

晒黄烟是我国一种特有的烟叶类型,种植历史悠久,是我国“中式卷烟”的特色原料之一^[1]。有研究表明,在烤烟型卷烟和混合型卷烟中加入晒黄烟,能丰富卷烟香吃味、提高卷烟劲头以及降低卷烟焦油含量,在中式卷烟降焦减害方面具有不可替代的作用。长期以来晒黄烟品种(系)都是由农户自留自种^[2],品种数量不断增加,种植分散,进而形成了诸多各具地区特色的品种群。在长期引种和选育过程中,不同地域间品种交流频繁,导致同名异物或同物异名现象十分普遍,因此,开展晒黄烟种质资源遗传多样性评价,对晒黄烟种质资源的收集、保护和高效利用具有重要意义。

目前,用于遗传多样性研究的方法很多,主要包括形态标记、染色体标记、生化标记和分子标记等。其中分子标记是 DNA 水平遗传变异的直接反映,具有不受生育期、环境和基因表达与否的影响,且有多态性高、遗传稳定等特点。近年来,国内外已有很多有关利用 RAPD、RFLP、SSR、SRAP、TRAP、SNP 等分子标记进行植物遗传多样性的研究报道^[3-10]。简单序列重复(SSR, simple sequence repeat)由于具有多态性高、稳定性好和操作简单等优点,广泛应用于植物品种的鉴定、系谱分析以及遗传图谱的构建等研究^[11-12]。G. Y. Song 等^[13]利用小麦的 SSR 引物构

建了六倍体裸燕麦 22 个连锁群,总长 2070.50 cM 的遗传图谱。K. F. M. Salem 等^[14]利用 SSR 分子标记研究评价了埃及六倍体小麦的遗传多样性。王惠梅等^[15]利用筛选出的 19 对 SSR 多态性引物,分析了 30 个野生菽居群的遗传多样性与遗传结构。盖树鹏等^[16]运用 SSR 和 SRAP 两种分子标记在玉米品种鉴定中进行了比较,结果表明,SSR 检测的遗传距离变幅更大,更适于品种在亲缘关系方面的分析。以往对晒黄烟的研究主要集中在品种提纯复壮、栽培与管理^[17]、外观质量^[18]以及调制过程中化学物质变化等方面^[19],而对晒黄烟种质遗传多样性研究较少。本研究利用 SSR 分子标记对地方名优晒黄烟种质资源进行遗传多样性研究,可为生产上晒黄烟品种(系)的鉴定、杂交亲本选配以及晒黄烟资源的高效利用提供理论基础和物质支持。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为 32 份晒黄烟种质资源,包括来源于国家烟草中期库的 6 份晒黄烟资源,编号为 Z,来源于广西贺州的 13 份地方品种(系),编号为 G,来源于广西百色的 13 份地方品种(系),编号为 M,见表 1。

表 1 32 份晒黄烟种质资源的名称

Table 1 The name and number of the 32 sun-cured tobacco germplasm resources

编号 Code	名称 Variety	编号 Code	名称 Variety	编号 Code	名称 Variety	编号 Code	名称 Variety	编号 Code	名称 Variety
Z1	大宁旱烟籽	G1	黄姚南雄烟	G8	莲塘小叶烟	M1	大宁烟	M8	南雄烟
Z2	塘蓬	G2	樟木林高产烟	G9	公会包盖烟	M2	包盖烟	M9	南雄烟
Z3	武鸣牛利	G3	黄姚黄烟	G10	凤凰南雄烟	M3	包盖烟	M10	南雄烟
Z4	小花青	G4	沙田黄烟	G11	公会高产烟	M4	黄烟	M11	高产烟
Z5	公会晒烟	G5	公会南雄烟	G12	大宁烟	M5	黄烟	M12	高产烟
Z6	寸三皮	G6	樟村小烟	G13	凤凰黄烟	M6	黄烟	M13	高产烟
		G7	公会黄烟			M7	南雄烟		

1.2 试验方法

1.2.1 DNA 提取与 PCR 扩增 以烟草嫩叶为试验材料,采用改进的 CTAB 法,多株混合法提取总 DNA,并利用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 完整性。试验所用 SSR 引物来自 2011 年 G. Bindler 等^[20]发表于 Theoretical and Applied Genetics 上的引物序列,筛选出均匀分布在 24 条连锁群上的 740 对引物,由上海生物工程有限公司合成。

PCR 总反应体系为 15 μ L,其中含模板 DNA

1.5 μ L, 2 \times Dream Taq Green PCR Master Mix (购自 Fermentas 公司) 7.5 μ L, 引物浓度为 0.6 μ mol/L。扩增反应在 ABI · PCR 扩增仪上进行,扩增程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 54 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s, 共 38 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。PCR 反应结束后,取 3 μ L PCR 产物在 10% 非变性聚丙烯酰胺凝胶上恒电压 150 V 电泳 1.5 h。用改进的 NaOH 银染方法对电泳后的聚丙烯酰胺凝胶进行染色显影。

1.2.2 数据统计 将电泳图谱清晰且可重复的条带赋值为1,同一位置上弱带且不重复或未出现带的赋值为0,形成1、0数据矩阵。根据 C. Shannon 等^[21]的方法,以 PopGene32^[22]软件在假定哈丁温伯格平衡条件下计算遗传多样性和 Shannon 指数的估计值,同时计算群体内遗传差异和群体间相似系数。用 NTSYS2.10 软件以 UPGMA 法进行聚类分析。

2 结果与分析

2.1 SSR 多态性引物的筛选

从 740 对引物中筛选出 106 对条带清晰、多态性较好的引物。利用这 106 对 SSR 引物对 32 份晒黄烟资源进行多态性扩增,共检测到 110 个位点,其中 85 个为多态性位点,多态性比率为 77.27%,多态性比例较高(图 1)。

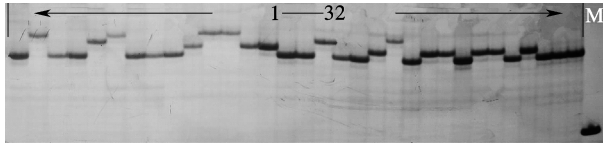


图 1 引物 PT50457 对 32 份晒黄烟扩增结果

Fig. 1 The amplified result of 32 yellow sun-cured tobacco resources by primer PT50457

2.2 聚类分析

聚类分析结果(图 2)表明,种质间遗传相似系

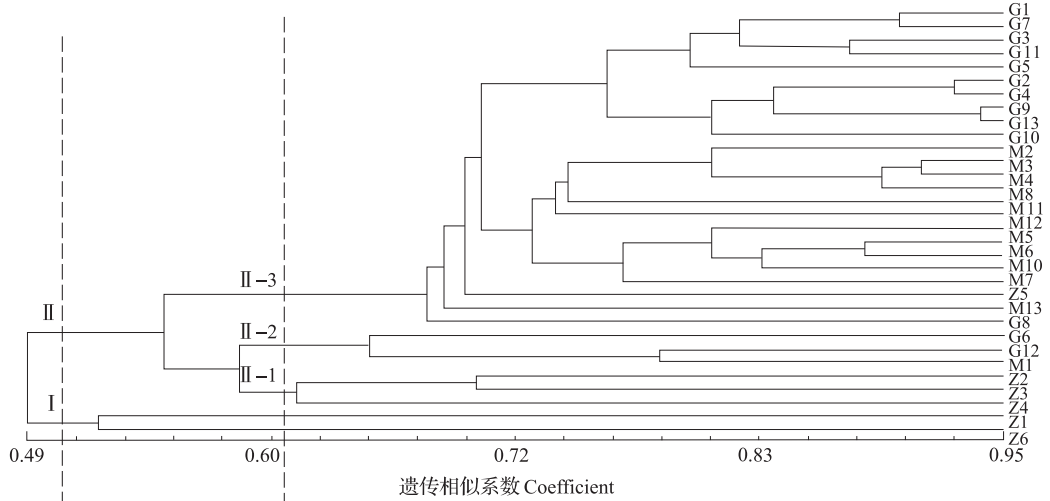


图 2 32 份晒黄烟基于 SSR 标记的 UPGMA 聚类图

Fig. 2 UPGMA cluster analysis of 32 yellow sun-cured tobacco germplasm resources based SSR marker

2.4 群体间遗传多样性

利用 PopGene32 软件对 3 个群体的遗传相似性进行计算。群体 G 和群体 M 的遗传相似系数最高,为 0.8963,群体 G 与群体 Z 遗传相似系数次之,为 0.8176,群体 M 与群体 Z 遗传相似系数最小,为

数变异范围为 0.49 ~ 0.95,遗传基础比较狭窄。在相似系数为 0.49 时,可以将 32 份晒黄烟种质分成 2 大类群,第 I 大类包括寸三皮和大宁旱烟籽,说明来自于烟草资源库的 6 份资源,寸三皮和大宁旱烟籽遗传距离最近。第 II 大类包括 3 个亚类,第 1 亚类中包括 Z2、Z3、Z4 等 3 份种质;第 2 亚类包括 G6、G12、M1, M1 与 G12 遗传距离小于 G6 与 G12 的遗传距离;第 3 亚类包括来自于烟草种质资源中期库的公会晒烟以及其他新收集种质,来自不同产区的品种(系)分别聚为不同的类群,表明各产区经过多年的自然和人工选择均形成了具有地方特色的种质群体,且大部分种质与公会晒烟的遗传距离都较近。

2.3 群体内遗传多样性

来源于烟草中期库的 Z 群体包括 Z1 ~ Z6 等 6 份种质,来源于广西贺州的 G 群体包括 G1 ~ G13 等 13 份种质,来源于广西百色的 M 群体包括 M1 ~ M13 等 13 份种质。群体内遗传多样性分析(表 2)表明,来源于烟草种质资源库的 Z 群体遗传多样性指数是 0.7295,其遗传多样性最高,其次是来源于广西贺州 G 群体遗传多样性指数为 0.6031,来源于广西百色的 M 群体遗传多样性最小为 0.5909。说明目前生产上利用的晒黄烟种质资源的遗传基础比较狭窄。

0.7762,表明来源于广西不同产区的晒黄烟资源遗传一致度非常高,在相近的环境条件下,形成了具有地方特色的品种(系)群,今后要拓宽生产上晒黄烟品种(系)的遗传基础,需充分利用烟草种质资源中期库的名优晒黄烟资源。

表 2 群体内遗传多样性

Table 2 Genetic diversity within 3 groups

类型 Type	份数 Copies	等位基因数 N_a	有效等位基因数 N_e	香农指数 I	多态性位点数 Polymorphic loci	比例(%) Rate
Z	6	2.44	2.00	0.7295	77	90.59
M	13	2.31	1.71	0.5909	68	80.00
G	13	2.38	1.71	0.6031	66	77.65

2.5 种质间遗传相似性

由 32 份晒黄烟资源间的遗传相似系数可知,来源于 M 群体的同名(包盖烟)种质 M2 和 M3 的遗传相似系数为 0.83。黄烟种质 M4、M5 遗传相似系数为 0.8, M4、M6 遗传相似系数为 0.69, M5、M6 遗传相似系数为 0.81。南雄烟 M7、M8 遗传相似系数为 0.66, M7、M9 遗传相似系数为 0.78, M7、M10 遗传相似系数为 0.72, M8、M9 遗传相似系数为 0.75, M8、M10 遗传相似系数为 0.78, M9、M10 遗传相似系数为 0.87。高产烟 M11、M12 遗传相似系数为

0.73, M11、M13 遗传相似系数为 0.70, M12、M13 遗传相似系数为 0.64, 因此来源于 M 群体的同名种质间遗传差异比较显著, 可视为不同的种质。另外, 来源于 M 群体的 M1(大宁烟)与 G12(大宁烟)遗传相似系数为 0.79, 也属于同名异种。而来源于 G 群体的不同名种质 G9(公会包盖烟)和 G13(凤凰黄烟)的遗传距离最近, 遗传相似系数为 0.939, 在遗传上的差异甚小, 但可利用从 740 对 SSR 引物中筛选的 PT53770、PT50434、PT54444、PT55030、PT51976 以及 PT60404 等 6 对特异引物将它们分开(表 3)。

表 3 引物名称与序列

Table 3 The name and sequence of SSR primers

引物名称 Primer name	前引物序列 F-primer sequence	后引物序列 R-primer sequence	连锁群 Linkage group
PT53770	CAGAATTCCTCCACAGAA	CATCGTAAGCGTCAGTCTGC	19
PT50434	GCCGTCAGCAATAAGACTCC	GTTCGGATCCGTGACCTAAA	6
PT54444	GTGCCCATACCAGATTGTGA	ATCTTCCAACATTCCGACC	6
PT55030	GGTTCACAGTTCAGAAATTTACGC	GACAGAAAGAAAGACTCCGAAA	12
PT51976	CAGAGGGTAGTGAAGTATTCAATTT	GTTATCAATGCCCTGCCCT	22
PT60404	TGTGGATGTCATGGTTCTG	ATTAAGCTGGCATGTCTGGC	19

3 讨论

3.1 基于 SSR 分子标记的聚类评价

多样性评价和遗传背景的研究是种质资源利用的前提^[23], 而 SSR 标记由于其多态性高、稳定性好等特点, 已成为分子遗传和资源分类研究应用中最为广泛的分子标记^[24]。高亭亭等^[25]利用 SSR 分子标记对 Beihart1000-1 的抗赤星病基因进行了 QTL 定位研究。潘应花等^[26]利用 SSR 分子标记研究了烟草种质不同群体量的遗传完整性。陈夏晔等^[27]利用 SSR 分子标记研究了烟草抗黑胫病种质的遗传多样性。本文通过筛选来源于 G. Bindler 等^[20]发表的 106 对 SSR 引物, 共获得 110 个标记位点, 对 32 份晒黄烟种质资源进行遗传多样性评价, 来自烟草种质资源中期库的只有 6 份种质, 在数量上是新

收集种质的四分之一, 其遗传多样性显著高于新收集种质, 因此, 要拓宽生产晒黄烟品种(系)的遗传基础, 应加强对种质库晒黄烟资源优异基因的挖掘与利用。

3.2 群体间遗传多样性评价

采用 Popgene Version 1.32 对来源不同的 3 个群体间的遗传距离和相似系数进行分析, 结果表明, 来源地区相近的种质材料 G 和 M 群体遗传关系也较近, 与来源于烟草种质资源中期库的名优晒黄烟资源遗传差异较大。只有来源于烟草种质资源中期库的公会晒烟与新收集的大部分种质聚为一类, 说明从广西收集的 G 和 M 群体的种质可能最早来源于种质库的公会晒烟, 但在其进化传播过程中, 在某一生态环境条件下, 经过长期的人工选择和改良, 在遗传结构上发生变异, 形成各具地区特色的 G 和 M

群体,造成目前所利用的品种(系)的遗传基础狭窄。另外,尽管广西贺州和广西百色生态环境存在差异,但仍有部分种质 M1 和 G12、G8 和 M13 亲缘关系较近,这可能是由于不同地域间品种(系)的频繁引进或交流造成的。

3.3 新收集种质资源评价

同一来源地的同名种质包盖烟 M2、M3, 黄烟 M4、M5、M6, 南雄烟 M7、M8、M9、M10, 以及高产烟 M11、M12、M13 遗传差异显著,另外,不同来源地的同名种质 M1、G12 遗传差异也较大,因此,对新收集的同名种质可以作为不同的种质资源单独保存。来源于广西贺州的 G9(公会包盖烟)和 G13(凤凰黄烟)虽然其遗传差异甚小,但也可作为不同的种质分别保存,可利用本研究筛选的 6 对引物进行区分。

参考文献

- [1] 窦玉青,唐朝起,黄瑾,等.我国晒黄烟生产现状及其发展当议[J].中国烟草科学,2013,34(4):107-111
- [2] 韦廷荣,黎锋,洗伟洲,等.贺州晒黄烟品种筛选研究初报[C].广西烟草学会2013年学术年会论文集,2013
- [3] 丛鑫,刘艳华,戴培刚,等.抗PVY烟草种质资源遗传多样性分析[J].植物遗传资源学报,2014,15(3):679-684
- [4] 肖炳光.利用RAPD和ISSR标记分析烤烟品种间遗传关系[J].武汉植物学研究,2006,24(5):392-396
- [5] 陶爱芬,刘中华,祁建民.烟草种质资源遗传多样性的IRAP和ISSR标记比较分析[J].武汉植物学研究,2009,27(6):589-594
- [6] 刘建丰.烟草核心种质DNA遗传多样性研究[D].北京:中国农业科学院,2007
- [7] 祁建民,王涛,陈顺辉,等.部分烟草种质遗传多样性与亲缘关系的ISSR标记分析[J].作物学报,2006,32(3):373-378
- [8] 杨友才.烟草种质资源遗传多样性及青枯病抗性基因的分子标记研究[D].长沙:湖南农业大学,2005
- [9] 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
- [10] 林国平,蔡长春,王毅,等.白肋烟品种资源的聚类分析[J].中国烟草学报,2008,14(5):33-38
- [11] Esuma W, Rubaihayo P, Pariyo A, et al. Genetic diversity of pro-vitamin A Cassava in Uganda [J]. J Plant Studies, 2012, 1(1): 60-71
- [12] 徐军.烟草核心种质SSR指纹图谱的构建及遗传多样性分析[D].北京:中国农业科学院,2011
- [13] Song G Y, Huo P J, Wu B, et al. A Genetic linkage map of hexaploid naked oat constructed with SSR marker [J]. Crop J, 2015, 3(4): 353-357
- [14] Salem K F M, Röder M S, Börner A. Assessing genetic diversity of Egyptian hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) using microsatellite markers [J]. Genet Resour Crop Evol, 2015, 62: 377-385
- [15] 王惠梅, 吴国林, 江绍琳, 等. 基于 SSR 和 ISSR 的鄱阳湖流域野生菰资源的遗传多样性分析 [J]. 植物遗传资源学报, 2015, 16(1): 133-141
- [16] 盖树鹏, 盖伟玲, 黄进勇. SSR 与 SRAP 标记在玉米品种鉴定中的比较研究 [J]. 植物遗传资源学报, 2011, 12(3): 468-472
- [17] 王传义, 孙福山, 王卫国, 等. 连州晒黄烟 [J]. 中国烟草科学, 2004, 25(4): 16-18
- [18] 王军, 首安发, 黄瑾, 等. 不同棚内调制方法对晒黄烟等级及外观质量的影响 [J]. 西南农业学报, 2013, 26(6): 2527-2531
- [19] 于建军, 杨永锋, 李琳, 等. 不同温湿度发酵条件对晒黄烟中性致香物质的影响 [J]. 农业工程学报, 2008, 24(12): 279-282
- [20] Bindler G, Plieske J, Bakaheer N, et al. A high density genetic map of tobacco (*Nicotiana glauca* L.) obtained from large scale microsatellite marker development [J]. Theor Appl Genet, 2011, 123(2): 219-230
- [21] Shannon C, Weaver E. The mathematical theory of communication [M]. Urbana: University of Illinois Press, 1949
- [22] Yeh, F C, Yang R C, Boyle T. POPGENE: Microsoft window-based freeware for population genetic analysis release 1.31 [M]. Edmonton: University of Alberta, 1999
- [23] An C, Saha S, Jenkins J N, et al. Cotton (*Gossypium* spp.) R2R3-MYB transcription factors SNP identification, phylogenomic characterization, chromosome localization, and linkage mapping [J]. Theor Appl Genet, 2008, 116(7): 1015-1026
- [24] Amar M H, Biswas M K, Zhang Z, et al. Exploitation of SSR, SRAP and CAPS-SNP markers for genetic diversity of *Citrus* germplasm collection [J]. Sci Hortic, 2011, 128(3): 220-227
- [25] 高亭亭, 蒋彩虹, 罗成刚, 等. 烟草品种 Beinhart1000-1 抗黑胫病基因的 QTL 定位 [J]. 植物遗传资源学报, 2015, 16(2): 335-340
- [26] 潘应花, 刘艳华, 任民, 等. 烟草种质不同群体遗传完整性的 SSR 研究 [J]. 植物遗传资源学报, 2013, 14(5): 979-984
- [27] 陈夏晔, 刘艳华, 张兴伟, 等. 抗黑胫病烟草种质的遗传多样性分析 [J]. 中国农学通报, 2014, 30(7): 58-63