

烤烟种质资源形态学标记及 SSR 标记的多样性研究

陈杰^{1,2}, 杨静¹, 陈建军¹, 赵伟才³, 蔡一霞¹, 邓世媛¹, 王维¹
(1 华南农业大学农学院, 广东 广州 510642; 2 贵州省黔东南州烟草公司, 贵州 凯里 556000;
3 广东省烟草南雄科学研究所, 广东 南雄 512400)

摘要:田间调查了 69 份烤烟品种形态学性状, 并进行各品种间的遗传距离分析; 对 69 份烤烟种质资源进行 SSR 分析, 估算遗传相似系数; 结合这 2 种方法对 69 份烤烟资源进行遗传多样性研究. 结果表明, 69 份烤烟种质材料间的遗传距离在 0.32~7.83 之间, 平均为 2.80, 其遗传相似系数在 0.30~0.96 之间, 平均为 0.70. 聚类分析结果为, 供试品种大致分为国外优质种质及其衍生的后代、国内外地方品种、早花类型品种、晚花类型品种等几个类群. 结合形态学标记和分子标记对烤烟种质资源进行遗传多样性评价, 揭示了烤烟种间的遗传多样性与亲缘关系.

关键词:烤烟; 种质资源; 形态学标记; SSR 标记; 遗传多样性; 聚类分析
中图分类号:S502 **文献标志码:**A **文章编号:**1001-411X(2013)04-0450-08

The Genetic Diversity of Flue-Cured Tobacco Germplasm Resources Studied by Morphological Markers and SSR Markers

CHEN Jie^{1,2}, YANG Jing¹, CHEN Jianjun¹, ZHAO Weicai³, CAI Yixia¹, DENG Shiyuan¹, WANG Wei¹
(1 College of Agriculture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;
2 Qiangdongnan Tobacco Company in Guizhou Province, Kaili 556000, China;
3 Nanxiong Guangdong Institute of Tobacco Sciences, Nanxiong 512400, China)

Abstract: The genetic distance of sixty-nine flue-cured tobacco germplasm resources were analyzed by the field performance characters and SSR markers. The genetic distance was 0.32 – 7.83 among 69 flue-cured tobacco germplasm varieties, with an average of 2.80. The genetic similarity index was 0.30 – 0.96 among 69 flue-cured tobacco varieties, with an average of 0.70. Cluster analysis based on the matrix of genetic distance and genetic similarity index, respectively, was performed. Clustering results showed that the tested tobacco varieties could be divided into foreign varieties, domestic varieties, early-flowering type, late-flowering type etc.. The combination of morphological markers and molecular markers to evaluate the genetic diversity of flue-cured tobacco germplasm resources may reveal the interspecific genetic diversity and genetic relationship of tobacco, providing the theory basis for parental selection in cross breeding of tobacco genetic breeding.

Key words: flue-cured tobacco; germplasm resource; morphological marker; SSR markers; genetic diversity; cluster analysis

烟草 *Nicotiana tabacum* 属茄科 Solanaceae 烟草属 *Nicotiana*, 是我国乃至全世界最重要的经济作物之一. 烟草品种是烟叶生产的基础, 通过改良品种提高烟叶质量, 以满足卷烟工业的要求, 是一条投资少、收益高的最佳途径^[1]. 近年来, 在烟草育种中过度使用主体亲本, 尤其是我国烟草育种以 NC89、G28、K326 等优质品种作为中心品种进行烟草育种, 育种目标单一, 使得育成品种遗传背景相似、品种单

一化现象严重^[2-3]. 育种中心品种的选择范围较狭窄,育成的品种往往具有比较相同的优缺点,对病害的抗感性也基本一致,一旦病害大面积发生,对烟叶生产会造成不利影响. 大多数烟区品种单一化问题较为突出,急需新品种,但现在可供选择的品种较少,无法满足生产的要求^[4]. 因此,烟叶生产迫切要求育种工作者更多、更快、更好地推出新品种. 遗传多样性是生物多样性研究的核心,它反映出物种的遗传背景、育种潜力和利用价值,对烟草种质遗传多样性及不同烟草类型间的遗传关系进行研究,对充分发掘利用现有种质、合理选配亲本、拓宽育成品种遗传基础和保护优质种质具有十分的重要意义^[5]. 近年来,利用 DNA 分子标记技术对烟草种质资源遗传多样性开展了大量的研究^[6-16],并由单一的分子标记技术发展多种分子标记技术对同一供试材料进行亲缘关系的研究^[17-20],均得出烟草种间遗传多样性较丰富、普通烟草栽培种内亲缘关系较近的结论. 利用形态学标记和分子标记 2 种标记结合的方法对种质材料进行多态性分析并不多见^[21-22],在烟草种质遗传多样性的分析中鲜见相关报道.

烟草作为重要的经济作物,叶片是其收获器官,现蕾期的形态学性状作为衡量烟草产量和品质的一个重要参考依据,现蕾天数影响到着生叶片数,而叶片数直接控制着产量的高低. 田间杂交育种对亲本的选择不仅要看其亲缘关系的远近更要看其在当地气候条件下的表型特征及抗逆性,并于现蕾期选择生长健壮、性状优良的烟株进行留种,待开花进行杂交. 因此烟草现蕾期形态学性状的考察对杂交育种工作的顺利开展具有十分重要的意义. 本文以烤烟现蕾期的形态指标作为形态学标记,结合 SSR 分子标记技术对 69 份烤烟种质材料进行遗传多态性分析,试图为烤烟田间育种中优良品种、品系的选育,尤其是烤烟早花育种中对抗旱花育种材料的直观选择提供依据,最大限度地挖掘利用现有种质资源.

1 材料与方法

1.1 材料

参试烤烟种质 69 份,由广东省烟草南雄科学研究所提供. 材料名称及来源见表 1.

SSR 引物信息来自 Bindler 等^[23]公开发表的烟草 SSR 连续图谱及其引物序列,在各条染色体上均匀选取 2~3 对(共 42 对)SSR 引物用于遗传多样性检测. 序列由生工生物工程(上海)有限公司合成;Taq DNA Polymerase 和 dNTPs 均购自新标科信生物科技(北京)有限公司.

1.2 方法

1.2.1 形态学性状调查 烟草成苗移栽,各个材料种植 3 个小区,每小区 10 株,株距为 0.6 m,行距为 1.2 m. 记录移栽至现蕾天数,调查农艺性状包括着生叶片数、株高、最大叶长和最大叶宽,按《烟草种质资源描述规范和数据标准》^[24]调查数据.

1.2.2 DNA 提取 按上海植物生理研究所的 TPS 抽提法稍加修改进行. 具体过程如下:剪取新鲜叶片 1 g 左右,放入 2 mL 离心管中,加入液氮,迅速捣碎,加入 800 μL 预热的 TPS 抽提液[100 mmol/L Tris-Cl (pH 8.0), 10 mmol/L EDTA (pH 8.0), 1.0 mol/L KCl], 75 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 30 min, 12 000 r/min 离心 15 min, 取上清液,加入 2/3 体积的苯酚/三氯甲烷/异戊醇(体积比 25:24:1)溶液,摇动数分钟, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液,加入 2 倍体积的无水乙醇, -20 $^{\circ}\text{C}$ 放置 30 min, 12 000 r/min 离心 10 min, 倒掉上清液,用 φ (乙醇)为 70% 的溶液洗 2 次,风干,溶于 200 μL 0.5 $\times$ TE 溶液中, -4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用.

1.2.3 SSR-PCR 反应条件 PCR 反应总体积为 20 μL , 反应体系中含 1 $\times$ PCR Buffer, dNTPs 0.2 mmol $\cdot$ L⁻¹, 1.5 U Taq 酶, 0.2 $\mu\text{mol} \cdot$ L⁻¹ 引物, 20 ng 模板 DNA. PCR 扩增在 Eppendorf mastercycler gradient 22331 hamburg 上进行,先在 94 $^{\circ}\text{C}$ 下预变性 3 min;再进行 35 个循环的变性(94 $^{\circ}\text{C}$ 50 s)、退火(55 $^{\circ}\text{C}$ 45 s)、延伸(72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min)步骤;然后在 72 $^{\circ}\text{C}$ 下继续延伸 5 min;最后慢慢冷却至 10 $^{\circ}\text{C}$ 保持.

1.2.4 电泳及检测 PCR 扩增产物加 1/6 体积的上样缓冲液,取 3 μL 利用质量分数为 6% 聚丙烯酰胺(PAGE)凝胶电泳分离, 5 V/cm 恒压进行电泳,电泳后,拆下胶板,蒸馏水中漂洗 2 次,显影,待条带出现,拍照记录.

1.2.5 表型数据分析 利用 DPS 6.55 (Data processing system) 软件对形态学数据进行基本分析,计算广义遗传率,进行主成分分析. 对农艺性状进行 Q 型聚类分析,采用效果较好的类平均法(Unweighted pair-group method using arithmetic averages, UPGMA)进行聚类,绘出聚类树形图. 根据聚类结果,以类群结合的水平为纵坐标,结合次数为横坐标,将全部聚合过程画成一条阶梯式的折线图(聚合结合线),用于确定一条分类等级的划分界限.

1.2.6 基因型数据分析 扩增产物按同一迁移位置的条带在各材料中有(记为 1)或无(记为 0)进行统计. 利用 NTSYS-pc Version 2.10e 软件包计算遗传相似系数,并按照 UPGMA 法进行聚类分析,构建聚类图^[25].

表 1 69 份供试烤烟品种编号及来源

Tab.1 The number and origin of 69 flue-cured tobacco varieties studied in the experiment

编号 ¹⁾	名称	系谱	编号 ¹⁾	名称	系谱
1	K399	(Coker139 × Coker319) × NC95	35	Coker371	[(G28 × 354) × (CB139 × F-105) × (G28 × 354)] × NC82
2	NC82	6129 × Coker319	36	CV088	不详
3	Coker319	Coker139 × Hicks	37	NC628	20038 × 20048
4	McNair944	SpeightG-10 × McNair30	38	Speight G-33	不详
5	Coker206	(Coker139 × 59-84-2F) × 74-472	39	NC72	不详
6	NC89	6855-2 × 672	40	Coker347	Coker319 × Coker258
7	Coker316	Coker139 × Hicks	41	Bell93	Bell15 × Coker187
8	大白筋 599	大白筋系选	42	NC60	McNair × Speight G-28
9	湖口烟	地方	43	TI245	南美地方品种
10	云烟 85	云烟 2 号 × K326	44	NC2514	不详
11	McNair133	Coker316 × McNiar12	45	Coker48	(Coker258 × Coker319) × Coker319
12	Coker176	(Coker139 × Coker 256) × Coker319	46	RG22	McNair373 × Coker51
13	NC729	K326 × K399	47	Coker86	Coker258 × 175L
14	K358	McNair926 × 80241	48	Coker258	NC95 × Coker319
15	Speight G-70	(Coker258 × Va115) × Speight G-10	49	SC58	Yellow Special × (Flord301 × Warne) × (400 × TI448A)
16	Speight G-140	Speight G-7 × Speight G-3	50	S1640	地方
17	云烟 97	Speight G-7 × NC89	51	RG8	K326 × K399
18	丰字 6 号	K326 × Speial1401	52	Virginia115	Hicks × Coker139
19	红花大金元	大金元系选	53	NC2326	9102 × Hicks
20	Coker411	[(Coker139 × (Hicks × Coker 139))] × Coker213	54	Coker187	Coker187 × Coker156
21	Speight G-28	(Coker139 × Oxford1-181) F ₄ × NC95	55	Speight G-23	不详
22	单育 3 号	(Speight G-28 × 革新 5 号) F ₁ 花粉离体培养	56	Coker213	(Coker319 × Coker139) × Coker319
23	CF20	Speight G-28 × 净叶黄	57	Kutsaga E1	Kuo-fan × Hicks
24	许金 1 号	十里庙 × (黄苗榆 97、牛津 2 号、抵字 101、富字 30、富字 47 混合花粉)	58	Speight G-52	Speight G-28 × Speight G-141
25	K394	Speight G-28 × McNair	59	RG12	不详
26	Virginia116	NC82 × Coker139	60	索马里 5 号	不详
27	RG11	NC50 × K399	61	春雷 3 号	金星 6007 × 抵字 101
28	K326	McNair30 × NC95	62	曼光	地方
29	岩烟 97	401-2 × G28	63	日本 4 号	不详
30	NC27NF	(Coker319 × NCTG21) × Coker319	64	RG17	K326 × K399
31	中烟 90	(单育 2 号 × G28) F ₆ × (G28 × 净叶黄)	65	云 87	云烟 2 号 × K326
32	K346	K326 × 80641	66	云烟 100	云烟 87 × KX14
33	Coker26	Coker139 × Hicks	67	云烟 202	MSKX13 × KX14
34	雄革 1 号	3038 × (青梗、螺丝头、许金 1 号混合花粉)	68	NC95	(Coker139 × Bell4-30) × (Coker139 × Hicks)
			69	G80	G-28 × G-45

1) 8 ~ 10、19、22 ~ 24、29、31、34、36、61、62、65 ~ 67 来自中国,43 来自南美,57 来自津巴布韦,60 来自索马里,其他均来自美国.

2 结果与分析

2.1 形态学性状分析

对烤烟农艺性状指标分析(表 2)可知,参试品种的各个指标都具有广泛的变异,各个指标的变异系数都达到了 13% 以上,其中以现蕾天数的变异系数最小,为 13.1%,变异范围为 65.31 ~ 87.20 d.株高的变异系数最大,达到了 36.1%,变异范围为 60.22 ~ 115.30 cm. 各个指标的广义遗传率较高,

都达到了 70% 以上,其中以现蕾天数最高,为 87.59%,说明对各个指标早期进行选择效果较好.对现蕾期各个指标进行主成分分析,分别计算出各个指标的贡献率,其中以现蕾天数的贡献率最高,为 75.48%,其对应的变异系数为各指标中最低,在各个指标中最为稳定,是反映品种特性、影响现蕾期的最主要指标.着生叶片数的贡献率在所有指标中居第 2 位,为 13.40%,是影响现蕾期的次要指标.

表 2 烤烟种质形态性状分析

Tab.2 The morphological characters analysis of flue-cured tobacco germplasm

形态学性状	平均值±标准差	变异范围	变异系数/%	广义遗传率/%	贡献率/%
现蕾天数/d	65.31±8.56	65.31~87.2	13.1	87.59	75.48
着生叶片数/片	21.80±4.38	21.80~34.33	20.1	85.29	13.40
株高/cm	60.22±21.76	60.22~115.3	36.1	80.70	5.07
最大叶长/cm	52.30±7.32	52.30~-73.0	14.0	77.04	3.53
最大叶宽/cm	24.15±4.64	24.15~37.2	19.2	72.86	2.52

2.2 SSR 标记的遗传多态性分析

选择遗传差异大的 6 份烟草种质(编号分别为 4、24、31、43、57 和 62)对 42 对 SSR 引物进行筛选,初步筛选出 15 对多态性好、重复性好的引物用于

烟草种质的 SSR 分析,结果有 6 对引物在所有材料中能扩增出清晰且稳定的多态性带,其余 9 对引物因扩增带模糊或多态性带较弱而无法统计. 6 对 SSR 引物共扩增出 76 条稳定的条带,其中多态性条带 66 条,平均每个引物扩增 11 条多态性条带,引物的平均多态性比率为 86.8%(表 3). 在所用的 SSR 引物中,以引物 PT20485 区分 69 个品种的效果最为明显,每个品种都有其各自独特的指纹图谱(图 1). 即使是亲缘关系很近的品种,也可根据指纹将其分开,如 1 号 K399、28 号 K326 和 51 号 RG8(RG8 由 K326 和 K399 杂交选育而成). 这说明 SSR 标记在烤烟遗传资源中具有丰富的遗传多态性,可以很好地揭示供试材料间的遗传差异和亲缘关系.

表 3 筛选出的 6 对 SSR 引物名称、序列及其扩增结果

Tab.3 The six screened primer pairs applied to SSR analysis

引物名称	引物序列(5'—3')	多态性条带数	扩增条带数	多态性比例/%
PT20189	AAAGGTTTCGGTATCCACG ATTGGACGATGAGAACGA	11	12	91.7
PT20287	CGCCACAACAACCTCACCTTA TCATGCATGTTTCTCCTCCTT	10	13	76.9
PT20372	CCTTTACCTCCGACAATTTCA TAGGCTGGATAGGTGCCTCA	8	9	88.9
PT20485	TCCAGGTCAACAAAATCAAGC GATGTCATTGTGCTGTCACG	13	13	100.0
PT30164	GACGAGAGAGGGAGGGAAAG GAGAACTGTGGAAGTTGCCG	12	15	80.0
PT20242	TCCAAAGTTGGACCAGAA GTCCTACATGGGGCTCTT	12	14	85.7
平均		11	12.7	86.8
合计		66	76	

2.3 烤烟种质资源的遗传相似性与差异性分析

由形态学性状数据估算出烤烟种质材料间的遗传距离,69 份烤烟种质材料间的遗传距离在 0.32~7.83 之间,平均为 2.80. 其中,来自美国的烤烟品种 Coker316(Coker139×Hicks 回交多次)与美国品种 SpeightG-52(SpeightG-28×SpeightG-141)的遗传距离最小,为 0.32,相似度最高;品种 Coker316 与其他各个品种的遗传距离也较小,平均值最小,仅为 1.99;南美收集的地方品种 TI245 与品种 Coker86(Coker258×175L)的遗传距离最远,为 7.83,与其他各个品种的遗传距离的平均值较高,为 4.99;中国烤烟品种春雷 3 号(金星 6007×抵字 101)与其他各个品种的遗传距离的平均值最大,达到了 5.20.

由 SSR 标记数据估计烤烟种质材料间的遗传相似性系数,结果表明 69 份材料的遗传相似系数在 0.30~0.96 之间,平均为 0.70. 其中来自日本的烤烟品种日本 4 号与 K326 的遗传相似系数最低,为 0.30;同是来自美国的烤烟品种 Virginia115(Hicks×Coker139)与 NC2326(9102×Hicks 与 Hicks 回交 3 次)之间的遗传相似系数最高,达到了 0.96,2 个品种与其他品种的遗传相似系数也较大,平均值都较高;来自中国河南的地方品种曼光与其他各个品种的遗传相似系数的平均值最小,为 0.54;同样来自中国的烤烟品种 CV088(来源不详)与其他各个品种的遗传相似系数的平均值最大,为 0.76.

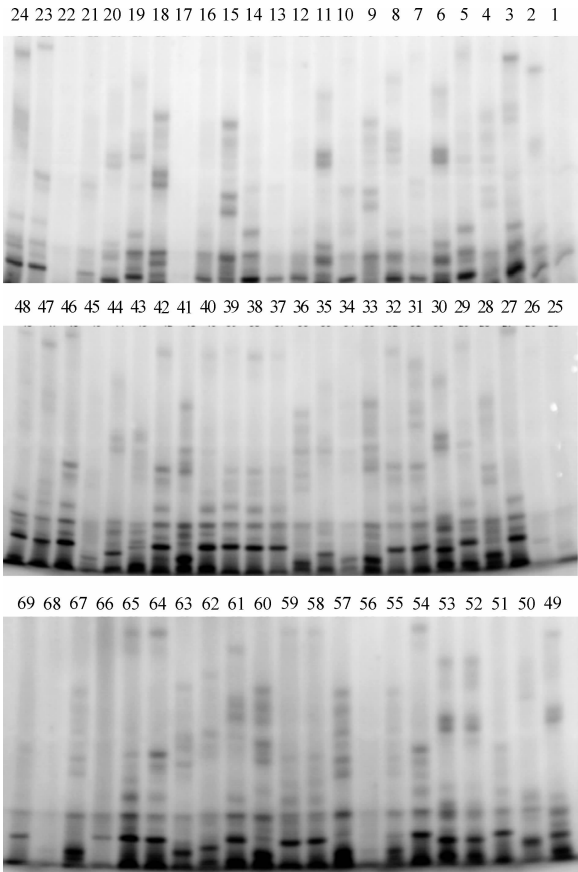


图 1 引物 PT20485 对 69 份烤烟品种扩增产物的聚丙烯酰胺电泳图

Fig. 1 Polyacrylamide gel electrophoresis profile of SSR fragments from 69 flue-cured tobacco varieties amplified with the primer PT20485

2.4 烤烟种质资源的聚类分析

反映聚合过程的 Q 型聚类结合线 (Cluster combined-line) 如图 2 所示. 从图 2 可以看出, 品种类群的聚合在纵轴上的分布是不均匀的, 类群结合水平先后出现过几次飞跃, 这些飞跃便将类群的结合区分为不同等级, 从而形成系统分类的等级性. 选择适当的飞跃, 取其跳跃位置的中点作结合线 L_1 和 L_2 :

$$L_1 = (4.377\ 3 - 3.144\ 1) / 2 + 3.144\ 1 = 3.760\ 7,$$
$$L_2 = (3.144\ 1 - 2.891\ 1) / 2 + 2.891\ 1 = 3.017\ 6.$$

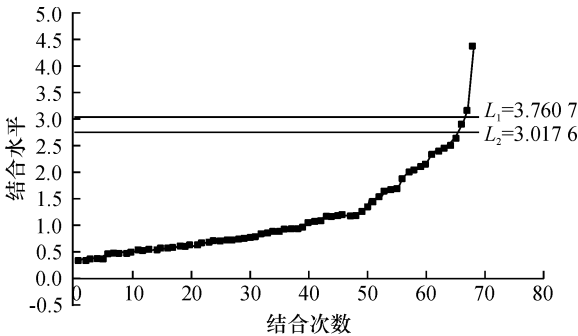


图 2 Q 型聚类结合线

Fig. 2 Q type cluster joint line

将 L_1 和 L_2 分别标在聚类结果图(图 3)上. 从图 3 可以看出, L_1 将各个品种明细地划分为 2 大类群: A 大类包括 1 号、16 号、26 号、41 号等 52 个品种; B 大类包括 3 号、12 号、31 号、47 号等 17 个品种. A 类群的各项性状指标均比 B 类群要小, A 类群各个品种的平均现蕾天数为 61.62 d, 着生叶片数 20.07 片, 植株高度 49.93 cm, 最大叶长 48.99 cm, 最大叶宽 22.37 cm; B 类群各个品种的平均现蕾天数为 76.60 d, 着生叶片数 27.10 片, 植株高度 91.73 cm, 最大叶长 62.41 cm, 最大叶宽 29.59 cm. B 大类各项农艺性状指标比 A 大类分别高 24.31%、35.02%、83.73%、27.38% 和 32.29%.

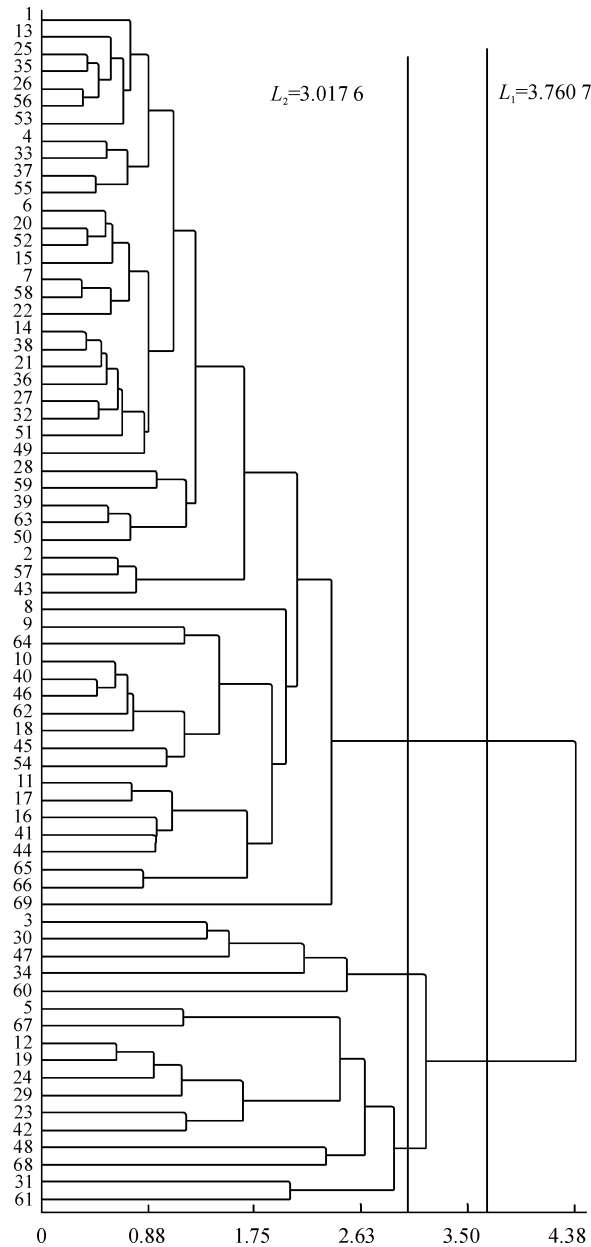


图 3 基于形态学性状确定的遗传距离的品种聚类图

Fig. 3 Dendrogram of flue-cured tobacco cultivars based on the morphological characters

L_2 将 69 个品种划分为 3 类:第 1 类为 A 大类,包括 52 个品种;第 2、3 大类同属于 B 大类,这 2 类的划分主要依据为着生叶片数,第 2 类包括 3 号、30 号、34 号、47 号、60 号 5 个品种,各个品种的着生叶片数都达到了 30 片以上;第 3 类包括 5 号、12 号、24 号、42 号、67 号等在内的 12 个品种,各个品种的着生叶片数都没有超过 30 片,平均值为 24.59 片.结合表 2 分析的各个农艺性状指标的贡献率来看,现蕾天数贡献率最高,为品种类群划分的主要依据,着生叶片数的贡献率第 2,为其划分类群的次要依据,根据着生叶片数的不同将 B 类群又划分为 2 大类群.

根据 SSR 分子标记估算的各品种的 Jaccard 相似系数(图 4)可知,第 1 等级按 Jaccard 相似系数(J_{s1})=0.63 可将 69 份材料分为 2 大类:第 1 大类包括 1 号、3 号、10 号、38 号等 66 个品种,这些品种大多具有 NC82、NC89、G28、G80、K326、K346 等品质优良且作为育种核心种质资源的品种的血缘关系;

第 2 大类包括 43 号、62 号、63 号 3 个品种,这 3 个品种分别为来自南美、中国、日本的地方烤烟品种,来源不详,与其他种资的遗传相似系数较小.

第 2 等级按 Jaccard 相似系数(J_{s2})=0.67 将所有种质资源划分为 4 大类.第 1 等级划分中的第 1 大类被细分为 2 大类:1) a 小类,大多为利用品质优良的品种通过各种育种手段改良的后代,如 13 号品种 NC729 为 K326 与 K399 的杂交后代,17 号品种云烟 97 为 Speight G-7 × NC89 的后代;2) b 小类,大多是利用地方品种与品质优良品种杂交选育的后代,如 31 号品种中烟 90 是(单育 2 号 × G28) F_6 × (G28 × 净叶黄)的后代选育而成,49 号品种 SC58 由 Yellow Special × (Flord301 × Warne) × (400 × TI448A) 选育而成.第 1 级划分中的第 2 大类被细分为 2 大类,其中来自南美的地方品种 TI245 单独划分为一类,来自中国和日本的地方品种划分为一类,这可能与烟草传入我国路线之一是由日本传入我国东北有关^[26].

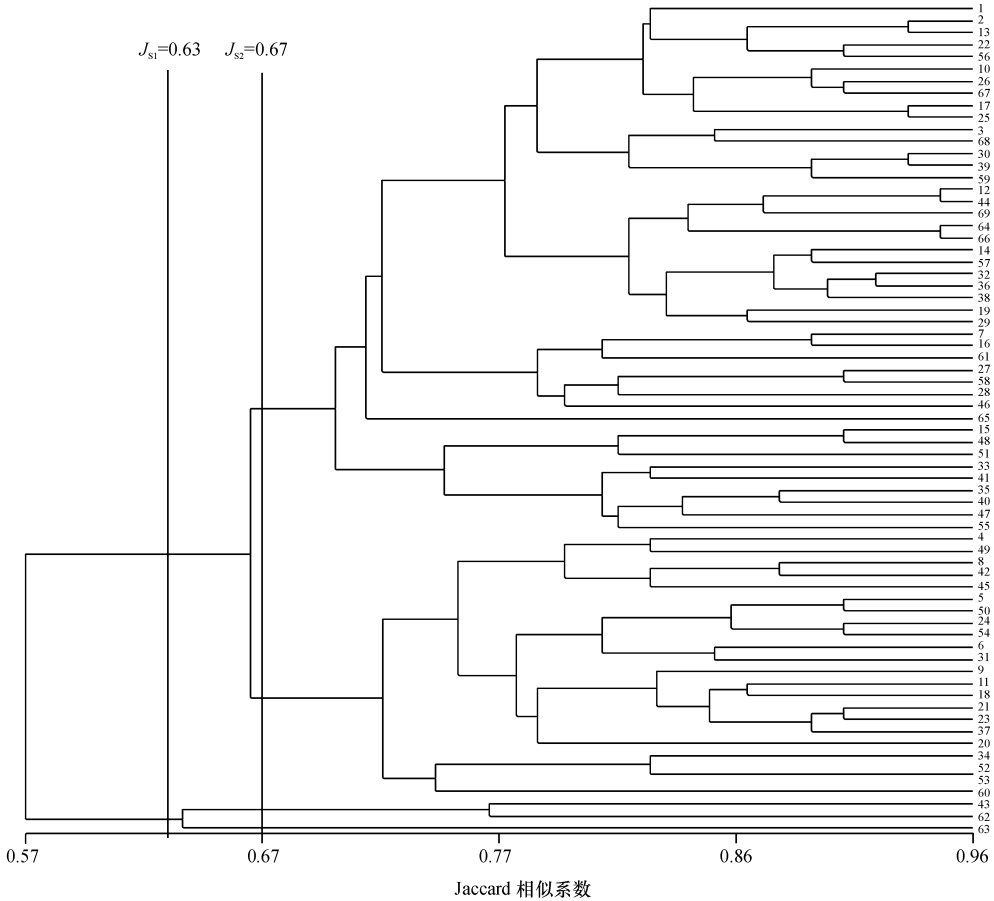


图 4 基于 SSR 分子标记确定的 69 份烤烟品种遗传相似系数的品种聚类图
Fig.4 Dendrogram of 69 flue-cured tobacco cultivars based on the SSR molecular markers

3 讨论与结论

3.1 烤烟 SSR 标记的遗传多态性

SSR 引物在烟草上的研究应用相对较晚,2007

年,Bindler 等^[23]报道了烟草的微卫星标记遗传图谱,2011 年 Bindler 等^[27]在前期工作的基础上筛选出 2 317 个多态性和重复性好、条带清晰的 SSR 标记,构建了包括 2 317 个 SSR 标记、2 363 个位点在内

的24个连锁群,遗传图谱总遗传长度为3 267 cM、标记间的平均距离小于1.5 cM.这是目前世界上包含标记位点最广、标记密度最大、平均图距最小的烟草分子连锁图谱.近年来SSR分子标记技术在烟草遗传育种上的应用越来越深入、广泛^[28-31]. Cossirat^[32]用160个RAPD引物对32个烟草品种进行遗传多样性分析,其中只有9个(占5.6%)引物能够扩增出29条稳定、清晰的多态性条带.郭金平等^[33]等利用150个RAPD随机引物对22份烤烟种质进行遗传多样性分析,筛选出的7个引物(占4.67%)共扩增出条带清晰、稳定的38个谱带,平均每个引物扩增出5.4条带,多态性条带比例为86.8%.聂琼等^[30]从22对SSR引物中筛选到多态性、重复性、稳定性都较好的8对引物,8对引物共检测到72条谱带,60条遗传多态性带,多态比例83.33%.徐军等^[31]利用Bandler等^[23]公布的286对SSR引物中筛选出的8对反应稳定、扩增条带清晰、多态性强的引物对80份普通烟草种质的指纹图谱进行分析,共扩增出85个多态性位点,平均每对引物10.6个.本研究通过对42个SSR引物的PCR分析,有6个引物(占14.3%)能够在69个烤烟品种中共扩增出清晰、重复性好的条带76条,平均每个引物扩增12.7条,多态性比率为86.8%.由此表明,SSR分子标记比RAPD更适于烟草种质遗传多态性研究;同时,SSR分子标记技术具有对DNA模版质量要求不高、电泳结果清晰、重复性好等优点,使得SSR分子标记技术容易掌握,对种质的多样性研究的结果准确度高,能很好的揭示其亲缘关系.

3.2 烤烟品种间的遗传多样性和亲缘关系

种质遗传多样性及遗传关系的研究对作物的杂交育种亲本的合理选择、利用具有十分重要的意义^[5].本研究中69份烤烟种质资源间的遗传距离变化范围在0.32~7.83之间,平均值为2.80,遗传变化范围较大,总体遗传距离较近.遗传相似系数及聚类分析表明,遗传相似系数的范围较宽,品种间相似性较高,遗传相似系数在0.30~0.96之间,平均为0.70.可见,69份烤烟种质材料的遗传多样性较低,亲缘关系较近.这与前人^[32,34-38]对烤烟种质资源多态性研究的结果基本一致.长期以来,烟草育种的主体亲本主要集中在从古老的Orinoco衍生出来的Hicks、Coker139及其衍生的K326、K346、NC82、NC89、G28等少数优质种质^[39],加之定向选择,使得育成品种遗传基础狭窄、品种单一化现象极为严重.目前,我国大面积种植的烤烟品种K326、云烟87(云烟2号×K326)、云烟85(云烟2号×K326)等品种

亲缘关系十分相似.近年来,我国各个烟草产区,根据自身的气候生态条件及其对不同风格香型的烟草产品的要求,育成一批品种遗传性状稳定、品质优良、抗性较强的烤烟新品种,如粤烟97(MS207×粤烟96,粤烟96为K326优良变异系)、中烟100(9201×NC89多次回交)、豫烟6号(MSK326×自育的农大202)、湘烟3号(MSY2206-9×82-11-7,MSY2206-9具有MSK326的血缘,82-11-7由K349与云烟87杂交而成)等品种,这些品种在选育过程中所用的亲本范围比较狭窄,育种目标基本一致,造成了某些基因的定向选择,导致许多非育种目标的多样化性状丢失.这可能是导致烤烟种质遗传多样性较低的主要原因.

3.3 形态标记和分子标记

形态标记是遗传标记的一种,是人们最早利用的遗传标记.由于其操作简单、直观、便于观察,长期以来,物种的分类及鉴定都是以形态标记为主要或初步的指标.但形态学标记的缺点是遗传表达不太稳定,易受环境及基因影响.分子标记是继形态标记、细胞标记和生化标记之后发展起来的一种最为可靠的遗传标记技术.分子标记技术不受环境、季节的影响,与形态标记相比,更适用于植物分类和遗传多样性研究.本试验利用形态学标记,根据现蕾期农艺性状指标将69个品种划分为早花类型品种和晚花类型品种.利用SSR分子标记遗传相似系数的聚类结果,从系谱血缘关系及地理远缘关系2个方面较好地揭示了烤烟资源种内的遗传差异,将69份种质划分为从古老的Orinoco衍生出来的优质种质及具有其血缘的后代、国内外地方品种.本研究中2种方法在类群内划分表现出的差异性较大,亲缘关系较近的品种在利用形态学标记分析中并没有将其划分为一类.如品种Coker319(3号)和Coker316(7号)都是从Coker139与Hicks的杂交后代中选育出的品种,利用SSR标记分析将2个品种划分为一类,而形态学标记将2个品种划分为完全不同的2个类群,2个品种的遗传距离为4.14,远大于平均遗传距离2.80.烤烟品种农艺性状特征受环境影响较大,同时由于烤烟品种基本是通过常规杂交选育而成,受育种目标的影响,使育成品种之间类别的划分已不能完全依赖于品种系谱.本研究表明,分子标记技术为确定品种间的遗传差异提供了可靠的检测方法,但在烤烟育种中进行亲本选择时不能仅从亲缘关系上进行考虑,根据育种目标的不同也要把品种在当地气候条件下的农艺性状特征作为选择依据,全面挖掘烤烟材料的育种价值.

参考文献:

- [1] 卢秀萍. 中国烟草品种现状及育种对策[J]. 西南农业学报, 2006, 19(增刊): 400-404.
- [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] 艾树理. 我国烤烟育种进展与问题的探讨[J]. 中国烟草科学, 1999, 20(1): 44-46.
- [4] 李永平, 马文广. 美国烟草育种现状及对我国的启示[J]. 中国烟草科学, 2009, 30(4): 6-12.
- [5] 肖炳光, 杨本超. 利用 ISSR 标记分析烟草种质的遗传多样性[J]. 中国农业科学, 2007, 40(10): 2153-2161.
- [6] 常爱霞, 瞿永生, 贾兴华. 烟草 RAPD 反应体系优化及品种多态性标记研究[J]. 中国烟草科学, 2004, 25(2): 9-13.
- [7] 刘建丰, 王志德, 刘艳华, 等. 应用 SRAP 标记研究烟草种质资源的多样性[J]. 中国烟草科学, 2007, 28(5): 49-53.
- [8] 王日新, 任民, 贾兴, 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.
- [9] 龙腾, 刘雷, 黄玉碧. 四川部分晾晒烟种质遗传关系的 SRAP 分析[J]. 作物学报, 2009, 35(1): 173-178.
- [10] 刘艳华, 王志, 牟建民, 等. 不同烟草群体间遗传多样性分析[J]. 中国烟草科学, 2009, 30(增刊): 19-24.
- [11] 杨友才, 周清明, 尹晗琪. 烟草种质资源遗传多样性及亲缘关系的 AFLP 分析[J]. 中国农业科学, 2006, 39(11): 2194-2199.
- [12] 杜传印, 刘洪祥, 田纪春. 部分烟草种质亲缘关系的 AFLP 分析[J]. 作物学报, 2006, 32(10): 1592-1596.
- [13] 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.
- [14] 梁景霞, 祁建民, 方平平, 等. 烟草种质资源遗传多样性与亲缘关系的 ISSR 聚类分析[J]. 中国农业科学, 2008, 41(1): 286-294.
- [15] 叶兰钦, 幸明明, 杜金昆, 等. SSR 标记应用于烟草品种遗传多样性研究[J]. 中国农学通报, 2009, 25(1): 56-62.
- [16] 李凤霞, 王卫锋, 王鲁, 等. 烟草属植物遗传多样性和亲缘进化关系的荧光 AFLP 分析[J]. 中国农业科学, 2010, 43(12): 2418-2427.
- [17] 杨友才, 周清明, 尹晗琪, 等. 利用 RAPD 和 AFLP 标记分析烟草种质资源的遗传多样性[J]. 农业生物技术学报, 2006, 14(4): 585-593.
- [18] 陶爱芬, 刘中华, 祁建民, 等. 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.
- [19] 聂琼, 刘仁祥. 23 份烟草种质遗传多样性的 SSR 和 ISSR 标记分析[J]. 西南农业学报, 2011, 24(1): 15-19.
- [20] 祁建民, 梁景霞, 陈美霞, 等. 应用 ISSR 与 SRAP 分析烟草种质资源遗传多样性及遗传演化关系[J]. 作物学报, 2012, 38(8): 1425-1434.
- [21] 武耀廷, 张天真, 殷剑美. 利用分子标记和形态学性状检测的陆地棉栽培品种遗传多样性[J]. 遗传学报, 2001, 28(11): 1040-1050.
- [22] 彭瑜, 苏智先, 张素兰. 利用叶片形态学性状和 ISSR 标记检测柚类的遗传多样性[J]. 西北农林科技大学学报, 2008, 36(4): 105-110.
- [23] BINDLER G, HOEVEN R, GUNDUZ I, et al. A microsatellite marker based linkage map of tobacco[J]. Theor Appl Genet, 2007, 114(2): 341-349.
- [24] 王志德, 王元英, 牟健民, 等. 烟草种质资源描述规范和数据标准[M]. 北京: 中国农业出版社, 2006: 3-40.
- [25] ROHLF F J. NTSYS-pc: Numerical taxonomy and multivariate analysis system, Version 2.0[M]. New York: Exeter Software, Setauket, 1988: 34-48.
- [26] 佟道儒. 烟草育种学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1997: 15-45.
- [27] BINDLER G, PLIESKE J, BAKAHER 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(2): 219-230.
- [28] 吴海乔. 烟草青枯病抗性基因连锁分子标记的检测[D]. 福州: 福建农林大学, 2010.
- [29] 蒋彩虹, 罗成刚, 任民, 等. 一个与净叶黄抗赤星病基因紧密连锁的 SSR 标记[J]. 中国烟草科学, 2012, 33(1): 19-22.
- [30] 聂琼, 刘仁祥. 同科植物 SSR 引物在烟草遗传差异分析中的应用研究[J]. 中国烟草科学, 2011, 32(2): 52-56.
- [31] 徐军, 刘艳华, 任民, 等. 普通烟草种质资源的 SSR 标记与指纹图谱分析[J]. 中国烟草科学, 2011, 32(2): 62-65.
- [32] COSSIRAT J C. Genetic diversity and varietal identification in the species *Nicotiana tabacum* by RAPD markers[J]. Annaes d d l Tabac, 1994, 26: 1-7.
- [33] 郭金平, 朱惠丽, 周以飞, 等. 部分烤烟种质遗传多样性与亲缘关系的 RAPD 分析[J]. 中国烟草科学, 2009, 30(增刊): 15-18.
- [34] 何川生, 张汉尧, 卢江平, 等. RAPD 技术在烤烟品种资源鉴定及纯度分析中的应用[J]. 河南农业大学学报, 2000, 34(3): 240-243.
- [35] 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.
- [36] 杜传印, 王玉军, 李斯深, 等. 39 个烤烟种质亲缘关系的 AFLP 分析[J]. 中国农业科学, 2008, 41(9): 2741-2747.
- [37] 杨本超, 肖炳光, 陈学军, 等. 基于 ISSR 标记的烤烟种质遗传多样性研究[J]. 遗传, 2005, 27(5): 753-758.
- [38] 杨春元, 任学良, 王志红, 等. 贵州烤烟种质资源主要特征特性的遗传多样性分析[J]. 中国烟草科学, 2009, 30(增刊): 47-49.
- [39] 许美玲, 卢秀萍. 烤烟推广品种亲缘关系分析与育种亲本的选择[J]. 种子, 1999(1): 49-51.