

烟草种质资源遗传多样性与群体结构分析

张铭真, 邢雪霞, 李晓辉, 杨铁钊, 徐世晓*

(河南农业大学烟草学院, 郑州 450002)

摘要: 发掘优良基因, 为改良烟草品种提供理论依据。采用 ABI-3500xl 遗传分析仪对 87 份烟草种质材料进行多态性检测。在 87 份烟草种质中, 41 对 SSR 引物共检测出 241 条多态性位点, 平均为 5.88 个位点。遗传相似系数为 0.47~0.91, PIC 值为 0.23~0.91, 平均为 0.63。群体结构分析表明, 当 $K=2$ 时, K 值最大, 即 87 份烟草材料可划分为 2 个类群 P1 和 P2, P1 类群又可划分为 5 个亚类, P2 类群可划分为 2 个亚类。烟草种质资源遗传多样性丰富, 群体结构划分与种质类型不完全相关。

关键词: 烟草; SSR 荧光标记; 遗传多样性; 群体结构

中图分类号: S572.03

文章编号: 1007-5119 (2016) 04-0042-06

DOI: 10.13496/j.issn.1007-5119.2016.04.008

Analysis of Genetic Diversity and Population Structure of Germplasm Resources in *Nicotiana tabacum*

ZHANG Mingzhen, XING Xuexia, LI Xiaohui, YANG Tiezhao, XU Shixiao*

(College of Tobacco Science, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, Henan, China)

Abstract: The population structure and genetic diversity of tobacco provide a theoretical basis for identifying elite genes and improving varieties by breeders. Genetic diversity and population structure of 87 tobacco materials were evaluated using 41 polymorphic SSR markers screened from a total of 80 SSR primer pairs. The amplified fragment length polymorphism was detected by The Applied Biosystems 3500 xl Genetic Analyzer. The results revealed that a sum of 241 polymorphism sites were found using the 41 SSR primer pairs, with an average of 5.88 sites per primer pair. The genetic similarity coefficient ranged from 0.47-0.91, and the PIC averaged 0.63, ranging from 0.23-0.91. Results from the clustering analysis based on a model-based method indicated that when $K=2$, the largest delta K value, namely 87 tobacco materials can be divided into two groups (P1 and P2, with the P1 group further divided into five classes and the P2 group further divided into two classes. The genetic diversity of tobacco germplasm was abundant and the division of population structure was not completely related to germplasm type.

Keywords: tobacco; SSR fluorescent markers; genetic diversity; population structure

烟草是我国重要经济作物之一, 目前烟草育种面临亲本匮乏, 品种遗传背景狭窄等问题^[1], 亟需加强对种质资源的遗传基础的了解。对现有烟草种质材料进行遗传多样性研究, 可以选择遗传差异较大的亲本配制杂交组合, 减少育种工作量, 提高育种效率。同时, 寻找与目标性状相关的分子标记, 可以为分子标记辅助育种奠定基础。当前, 分子标记已开始应用于作物遗传资源及育种研究, 分别被

称为分子资源鉴定和分子标记育种^[2]。随着分子生物学技术的迅猛发展, 分子标记技术日趋成熟, 目前常用的分子标记有 RFLP、SRAP、AFLP、ISSR、SSR 等。微卫星(亦称简单序列重复 simple sequence repeats, SSR) 技术具有多态性高、数量丰富、重复性好、呈共显性、广泛分布于基因组等优点^[3]。Bindle 等^[4]从 Tobacco Genome Initiative 公布的烟草基因组序列信息中搜索到 282 对 SSR 引物, 并利用

基金项目: 中国烟草总公司重大项目“高抗根结线虫病优质烤烟新品种选育”(110201402004)

作者简介: 张铭真(1992-), 女, 硕士研究生, 研究方向为烟草遗传育种与生理。E-mail: yczhangmingzhen@163.com

*通信作者, E-mail: xushixiao@126.com

收稿日期: 2016-01-25

修回日期: 2016-03-05

这些引物构建了烟草遗传连锁图。聂琼等^[5]利用 SSR 和 ISSR 技术分析了 23 份烟草种质遗传多样性。文轲等^[6]利用 SSR 技术,以抗 CMV 的烤烟品种台烟 8 号、感病品种 NC82 为亲本,构建 BC1 代分离群体,筛选到一个与抗性基因相关的 SSR 标记,并认为台烟 8 号对 CMV 的抗性是由多基因控制。祁建民等^[7]应用 ISSR 技术,对烟草属 4 个种 30 份材料进行遗传多样性分析,发现栽培种内的遗传基础相对狭窄。陈雅琼等^[8]用 36 对 SSR 引物,分析了 63 份烤烟和 8 份白肋烟种质的遗传多样性,也表明我国烟草栽培种间的遗传基础狭窄、遗传多样性不丰富。陈杰等^[9]结合形态学标记和 SSR 分子标记对 69 份烤烟种质资源进行遗传多样性评价,它们之间的遗传距离在 0.32~7.83,遗传相似系数在 0.30~0.96。以往的研究存在研究材料的类型、数量不足、代表面较窄的问题,因此本研究征集不同类型不同来源的烟草种质材料,并基于全自动 DNA 遗传分析系统的 SSR 荧光标记检测技术,利用 Genographer 软件精确定量扩增产物的片段长度,对 87 份烟草种质进行遗传多样性和群体结构研究。确定烟草种质材料间的遗传背景差异与群体结构,为烟草优异基因的发掘、复杂性状关联分析以及拓展烟草育种的遗传基础提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

87 份烟草种质资源名称列于表 1,种质资源来源于河南农业大学烟草育种实验室和青州烟草研究所。2015 年 5 月取苗期刚长出来的新鲜叶片至于 2 mL 离心管中液氮冷冻带回河南农业大学烟草育种实验室,从液氮中取出放置于 -70 °C 超低温冰箱中保存待用。

1.2 烟草总 DNA 提取和 SSR-PCR 扩增

样品离心管置于磨样机上,待叶片磨碎后于液氮中迅速冷冻,用 TaKaRa 新型植物基因组 DNA 提取试剂盒(宝生物工程(大连)有限公司)提取 DNA。用 2%琼脂糖凝胶电泳检测质量后保存于

-20 °C 冰箱待用。

利用三引物法 PCR (在 5'端加有 M13 尾巴序列的特异正向引物、特异反向引物及带有荧光标记的通用型 M13 引物,利用毛细管电泳技术可以同时检测不同荧光染料标记的多个 SSR 位点)扩增 SSR 位点。所用的荧光标记引物是 M13-Cy5,序列为 5'-CACGACGTTGTAAAACGAC-3',在合成 SSR 引物时,在每个正向引物的 5'端加上 M13 尾巴序列,SSR 引物由金唯智(苏州)生物科技有限公司合成。正、反向引物的浓度均稀释为 10 μmol/L, -20 °C 保存备用。

SSR-PCR 反应体系为 10 μL,包括:2 μL 基因组 DNA,0.6 μL Mg²⁺,1 μL 10×Buffer,0.15 μL dNTP,0.1 μL rTaq 酶,带荧光标记的 M13 正向引物 0.1 μL,正向引物和反向引物各 0.05 μL,0.15 μL。PCR 程序如下:94 °C 5 min 预变性;94 °C 30 s,55 °C 30 s,72 °C 30 s,30 个循环;94 °C 30 s;退火温度各引物不同。

1.3 毛细管电泳检测

PCR 产物吸取 2 μL 于加有 6 μL 变性剂的 384 孔板中,95 °C 变性 5 min。PCR 产物用 AB 公司 Genetic Analyzer 3500 xl 仪器进行检测。试验结果用 Genographer 软件进行数据读取。

1.4 数据分析

对 Genographer 软件获得的原始数据转化为 0,1 格式,建立原始矩阵后用 NTSYS-pc 2.10e^[10]软件进行后续分析。计算多态性位点百分率 $P(\%)=(k/n) \times 100$,其中 k 是多态位点数,n 为所测位点总数。SSR 位点的多态性信息量(PIC)按照如下公式进行计算: $PIC=1-\sum P_i^2$,公式中 P_i 表示第 i 个等位位点出现的频率。利用 NTSYS-pc Version 2.10e 中的 Qualitative date 模块计算任意两个品种间的相似系数(GS),以 Clustering 程序中 SHAN 进行 UPGMA (非加权组平均法)聚类分析,绘制聚类树状图;利用 Structure 2.3.4^[11]软件,采用混合模型进行群体遗传结构分析。

表 1 供试材料
Table 1 *Nicotiana tabacum* accession lines investigated in this study

编号	名称	类型	来源	编号	名称	类型	来源
1	豫烟 6 号	烤烟	中国	45	K399	烤烟	美国
2	豫烟 10 号	烤烟	中国	46	NC82	烤烟	美国
3	豫烟 11 号	烤烟	中国	47	龙江 851	烤烟	中国
4	豫烟 12 号	烤烟	中国	48	龙江 925	烤烟	中国
5	豫烟 12 号×K326	烤烟	中国	49	K149	烤烟	美国
6	豫烟 12 号×K346	烤烟	中国	50	T.I.245	烤烟	美国
7	豫烟 12 号×G-28	烤烟	中国	51	Ky151	烤烟	美国
8	农大 202	烤烟	中国	52	丸叶	烤烟	日本
9	K326	烤烟	美国	53	Va116	烤烟	美国
10	K346	烤烟	美国	54	白色种	烤烟	朝鲜
11	红花大金元	烤烟	中国	55	青梗	晒烟	中国
12	中烟 90	烤烟	中国	56	金英	晒烟	中国
13	中烟 100	烤烟	中国	57	Therkit	晒烟	澳大利亚
14	中烟 101	烤烟	中国	58	索马里五号	晒烟	索马里
15	云烟 85	烤烟	中国	59	齐市护脖香	晒烟	中国
16	云烟 87	烤烟	中国	60	密节多叶烟	晒烟	中国
17	宜中 90	烤烟	中国	61	红花小黑烟	晒烟	中国
18	89114	烤烟	中国	62	陈河金堂烟	晒烟	中国
19	毕纳 1 号	烤烟	中国	63	牡晒 82-38-7	晒烟	中国
20	韭菜坪 2 号	烤烟	中国	64	广杂 87 号	晒烟	中国
21	贵烟 11 号	烤烟	中国	65	Maryland Broad Leaf	晒烟	美国
22	遵烟 6 号	烤烟	中国	66	Burley	白肋烟	美国
23	瓮安 2 号	烤烟	中国	67	Burley 37	白肋烟	美国
24	黔西 1 号	烤烟	中国	68	牡晒 82-38-5	白肋烟	中国
25	玉水 3 号	烤烟	中国	69	8301	白肋烟	中国
26	粤烟 96	烤烟	中国	70	黄筋苑	白肋烟	中国
27	龙江 981	烤烟	中国	71	Burley 1	白肋烟	美国
28	南江 3 号	烤烟	中国	72	MS PB9	白肋烟	中国
29	洛宁 3 号	烤烟	中国	73	Burley 11A	白肋烟	中国
30	优选 1 号	烤烟	中国	74	Basma Llovina	香料烟	阿尔巴尼亚
31	金星 6007	烤烟	中国	75	Vranjska Jaka	香料烟	南斯拉夫
32	禹州 8504	烤烟	中国	76	赞比亚 1 号	香料烟	赞比亚
33	许金 5 号	烤烟	中国	77	杜普尼察 20-11	香料烟	保加利亚
34	长脖黄	烤烟	中国	78	特齐别勒 237	香料烟	保加利亚
35	NC27NF	烤烟	美国	79	督叶尖干种	雪茄烟	中国
36	NC89	烤烟	美国	80	Criollo Salteno 11	雪茄烟	南美
37	NC628	烤烟	美国	81	Havana 10	雪茄烟	波兰
38	Speight G-28	烤烟	美国	82	Havana 211	雪茄烟	中国
39	G70	烤烟	美国	83	夏湾那	雪茄烟	古巴
40	Coker176	烤烟	美国	84	大るま	晒烟	日本
41	12451	烤烟	中国	85	KY44	白肋烟	美国
42	Y8306	烤烟	中国	86	鄂烟 6 号	白肋烟	中国
43	Virgina Gold	烤烟	美国	87	B-1000	晒烟	中国
44	CF222	烤烟	美国				

2 结果

2.1 SSR 引物多态性分析

从 80 对引物中筛选出 41 对多态性较好、扩增带清晰的引物对 87 份烟草种质进行分析。41 对引

物在 87 份烟草种质中扩增出 241 条多态性条带。各引物多态性条带数为 2~24, 平均每对引物能扩增到 5.88 个多态性片段。各引物的 PIC 值变幅为 0.23~0.91, 平均为 0.63 (表 2)。

表 2 41 对 SSR 引物的多态检测

Table 2 Polymorphism detection of 41 pairs of SSR primers					
引物名称	多态位点数	PIC 值	引物名称	多态位点数	PIC 值
TM10004	3	0.51	TM10255	9	0.83
TM10051	4	0.57	TM10247	8	0.77
TM10053	8	0.81	PT1085	3	0.48
TM10081	3	0.46	PT30186	9	0.74
TM10175	6	0.70	PT20459	7	0.69
TM10102	5	0.70	PT30272	5	0.61
TM10140	8	0.77	PT20234	3	0.46
TM10268	7	0.73	PT10466	3	0.44
TM10285	3	0.36	PT40005	5	0.63
TM10279	4	0.63	PT20286	14	0.85
TM10320	2	0.23	PT20211	24	0.91
PT54150	3	0.55	PT1399	6	0.75
PT20382	3	0.45	PT30188	3	0.55
TM10179	3	0.52	PT30248	6	0.65
TM10211	6	0.73	PT30235	4	0.60
TM10145	5	0.68	PT20291	10	0.82
PT30380	6	0.70	TM10519	3	0.47
PT51926	5	0.64	TM10530	3	0.55
PT30473	9	0.81	TM10401	2	0.24
PT30138	7	0.71	PT20376	4	0.49
TM10142	10	0.83	总计	241	
			平均	5.88	0.63

2.2 烟草种质资源聚类分析

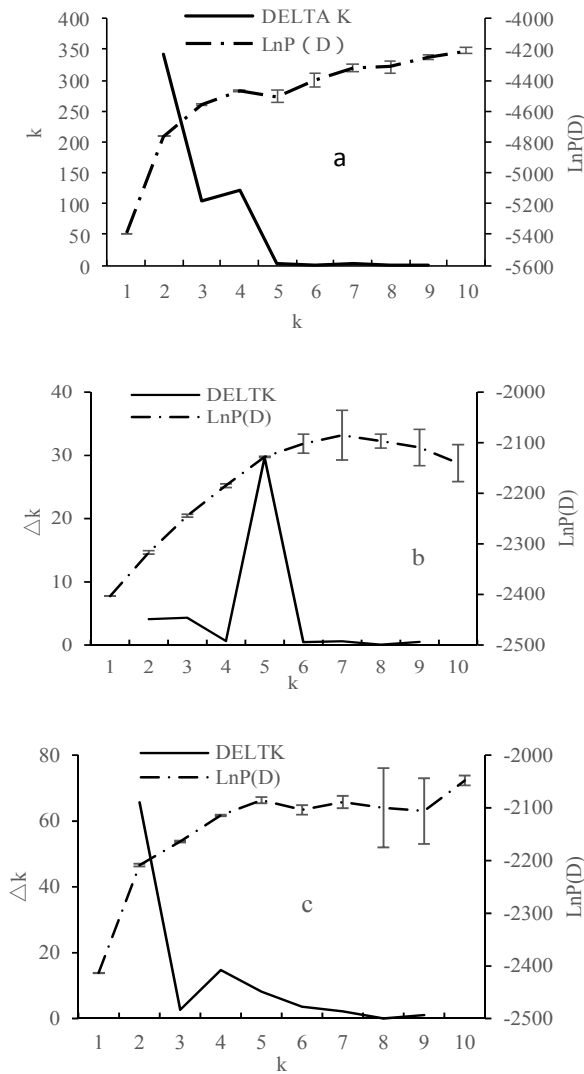
以 41 对 SSR 引物的扩增带型为基础,以 0,1 格式表示,其中数据缺失标记为 2,用 NTSYS-pc2.10e 软件进行 UPGMA 法聚类分析,得出 87 份种质的聚类图。各种质间遗传相似系数范围为 0.47~0.91,其中玉水 3 号(25)与 G70(39)相似系数最大,为 0.91,说明亲缘关系很近;密节多叶烟(60)与 K326(9)之间的相似系数为 0.47,说明这两品种间的亲缘关系较远。在相似系数 0.66 处,可将 87 份烟草种质分成 5 大类。赞比亚 1 号(香料烟)和 T.I.245 各成一大类,第 3 类仅包括 Criollo Salteno 11 和 B-1000,两者间相似系数为 0.69。第 4 大类由 Virginia Gold、Ky151、丸叶、青梗、金英、密节多叶烟、红花小黑烟、陈河金堂烟、广杂 87 号、Basma Llovina、Vranjska Jaka、督叶尖干种、夏湾那 13 个品种组成。其他品种构成第 5 大类。在相似系数 0.64 处可将 87 份烟草种质分为两大类;Virginia Gold、Ky151、丸叶、青梗、金英、密节多叶烟、陈河金堂烟、广杂 87 号、Basma Llovina、Vranjska Jaka、督叶尖干种、夏湾那等 13 个品种为一类,剩余品种为第 2 类。在不同相似系数处划分会得到不同类型,但是这两种划分都将烤烟类种质聚集为一大类,其中亦会参杂其他类型烟草种质。

2.3 供试烟草种质群体结构分析

本研究利用全基因组 41 个 SSR 标记对 87 份烟草品种进行群体结构分析;假定亚群数目 K 为 1~10,每个 K 值运行 5 次模拟运算。随着 K 值的逐渐增加,软件输出的后验概率 $\ln P(D)$ 值呈连续上升趋势,但 $\ln P(D)$ 值最明显的变化发生在 K 由 1 到 2 的过程中。 K 综合考虑了 $\ln P(D)$ 的变化速率和方差,当 $K=2$ 时, K 出现峰值(图 1a)。从上述方法判断,本群体中 87 份烟草品种被分成两个类群, P_1 和 P_2 (图 1)。 P_1 类群包含 50 个烟草品系,在 P_1 类群中,群体结构分析发现,随着 K 值的逐渐增加,后验概率 $\ln P(D)$ 值呈上升趋势,当 K 由 4 到 5 时, $\ln P(D)$ 值变化最为明显。当 $K=5$ 时, K 出现了峰值(图 1b)。因此 P_1 类群中检测到 5 个亚类群。在 P_2 类群中,群体结构分析发现,随着 K 值的逐渐增加,后验概率 $\ln P(D)$ 值逐渐上升,当 K 由 1 到 2 时, $\ln P(D)$ 值变化最明显,当 $K=2$ 时, K 出现了峰值(图 1c)。因此 P_2 类群中检测到两个亚类群。烟草 87 个品种的群体结构示意图如图 2。

3 讨论

拓宽烟草遗传基础,发掘优异基因,改良烟草品种是目前我国烟草育种的首要任务,而缺乏对种质资源遗传特点的了解是完成这一任务的最大障碍;目前许多研究者利用各种分子标记技术探讨了烟草资源的遗传多样性与亲缘关系。Moon 等^[12]利用 46 对 SSR 引物对 54 份烟草属材料进行聚类分析,得到的结果与基于形态细胞学的观察分类结果一致。王志德等^[13]用 43 个 RAPD 引物 PCR 扩增出 214 个 DNA 片段,将 24 个烟草种质分为 6 大类群,并表明其有高度的遗传多样性。梁景霞等^[14]用 18 个 ISSR 分子标记引物,对 96 份烟草种质进行 PCR 扩增,共获得 314 条稳定条带,并用 Nei-Li 相似系数法计算其遗传相似系数在 0.28~0.97,遗传多样性丰富。Patrizia Bogani 等^[15]利用 15 对 RAPD 引物对 42 个烟草品系进行遗传多态性研究,结果显示其遗传距离为 0.21 到 0.92。Ren 等^[16]用 AFLP 分子标记分析了 41 个烟草栽培种和 7 个野生烟草种的遗传多



注：a)总群体；b)P1类群；c)P2类群

图1 烟草总群体和不同类群中的后验概率和 K 值

Fig. 1 Posterior probability and delta k values of tobacco groups and different groups

态性，结果表明，烟草种间遗传距离在 0.28~0.58，种间遗传多样性丰富。本研究所用引物平均 PIC 值达到 0.63，这些引物能在某些烟草种质中扩增出特异带型，由此说明这些引物可用于烟草种质遗传多样性。本试验 41 对 SSR 引物对 87 份烟草种质的分析结果表明烤烟内的遗传相似性较高，种间的遗传差异较大，87 份烟草品种包含了烤烟、晾晒烟、白肋烟、雪茄烟和香料烟 5 个栽培类型，较好地表现出了遗传多样性特征，这与以往的研究^[17-21]结果相一致。聚类分析图显示，个别品种会偏离原有类型，说明在不同生态条件下，人为目的的长期选择逐渐形成了不同栽培类型；个别品种偏离原有类型，和其他类型聚在一起，主要与亲源关系有关；烟草种质间的遗传差异与品种调制类型、地理来源的差异没有较大的联系。

就中美主要烟草品种亲源关系进行研究，发现世界主产烟国家的烟草育种也基本在美国育成品种的基础上发展起来的，各国的主栽品种都有美国品种的亲源成分，我国的烟草育种更不例外^[1]；而本研究聚类分析和群体结构分析结果显示美国品种资源在不同亚群间出现一定程度的交叉现象。较高的遗传多样性是维持物种长期生存的基础，为提高烟草品种的产量、品质及抗性，可以利用生物工程的方法实现野生种优良基因向栽培品种转移的目的，从而创造更有利用价值或特殊作用的烟草新品种。

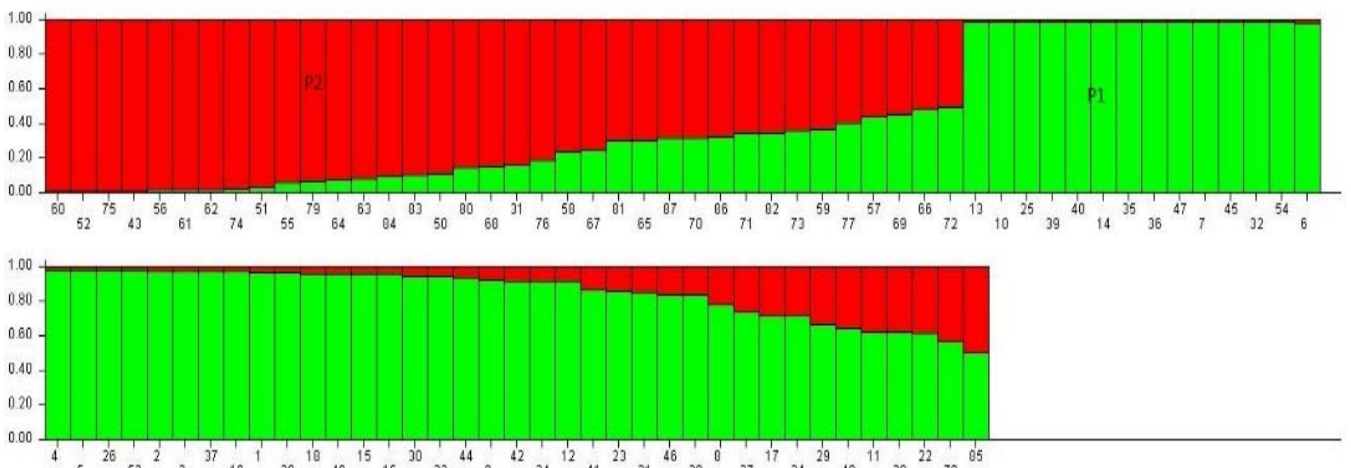


图2 87个烟草品种的群体结构示意图

Fig. 2 Group structure diagram of 87 tobacco varieties

4 结 论

供试烟草种质材料 SSR 分子标记揭示了烟草种间存在较丰富的遗传多样性, 烤烟品种内遗传基础相对狭窄。少数品种或类型聚类时出现交叉现象, 与其亲源关系有关, 与地理来源及调制类型关系不大。本研究可为进一步开展烟草种质资源指纹图谱研究及利用种内种间遗传差异较大的材料拓宽烟草遗传基础、发掘有利基因和改良烟草品种提供理论依据。

参考文献

- [1] 王云英, 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.
- [2] 贾继增. 分子标记种质资源鉴定和分子标记育种[J]. 中国农业科学, 1995, 29(4): 1-10.
- [3] Bhagwat A A, Cregan P B, Akkaya M S. Length polymorphisms of simple sequence repeat DNA in soybean[J]. Genetics, 1992, 132(4): 1131-1139.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] 文轲, 张志明, 任民, 等. 烤烟 CMV 抗性基因 QTL 定位[J]. 中国烟草科学, 2013, 34(3): 55-59.
- [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] 陈雅琼, 王卫峰, 丁安明, 等. 基于 SSR 荧光标记分析我国主要审(认)定烤烟及白肋烟品种遗传多样性[J]. 中国烟草学报, 2013, 19(2): 98-105.
- [9] 陈杰, 杨静, 陈建军, 等. 烤烟种质资源形态学标记及 SSR 标记的多样性研究[J]. 华南农业大学学报, 2013, 34(4): 450-457.
- [10] Rohlf F J. NTSYSpc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System Version 2.2 User Guide[M]. New York: Applied Bilstatistics Inc., 2009.
- [11] Pritchard J K, Stephens M, Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data[J]. Genetics, 2000, 7(4): 574-578.
- [12] Moon H S, Nicholson J S, Lewis R S. Use of transferable *Nicotiana tabacum* L. microsatellite markers for investigating genetic diversity in the genus *Nicotiana*[J]. Genome, 2008, 51(8): 547-559.
- [13] 王志德, 牟建民, 戴培刚, 等. 部分烟草核心种质 RAPD 分析[J]. 中国烟草学报, 2003, 9(4): 20-25.
- [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] Patrizia Bogani, Pietro Lio', Maria Carmela Intriери, et al. A Physiological and Molecular Analysis of the Genus *Nicotiana*[J]. Molecular Phylogenetics And Evolution, 1997, 7(1): 62-70.
- [16] Ren N, Timko M P. AFLP analysis of genetic polymorphism and evolutionary relationships among cultivated and wild *Nicotiana* species[J]. Genome, 2001, 44(4): 559-571.
- [17] 刘胜传, 刘仁祥, 雷红梅, 等. 利用 SSR 标记分析部分烟草种质的遗传多样性[J]. 贵州农业科学, 2009, 37(7): 1-3.
- [18] 李文平. 烟草种质遗传多样性的 SSR 标记分析及抗 TMV 鉴定[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2010: 20-23.
- [19] 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.
- [20] 何川生, 何兴金, 葛颂, 等. 烤烟品种资源的 RAPD 分析[J]. 植物学报, 2001, 43(6): 610-614.
- [21] 何其芳. 94 份烟草材料的遗传多样性和主要品质成分的分析[D]. 广州: 华南理工大学, 2012: 40-45.