

利用 ISSR 标记分析烟草种质的遗传多样性

肖炳光¹, 杨本超^{1,2}

(¹ 中国烟草育种研究(南方)中心, 云南省烟草科学研究所, 玉溪 653100; ² 宁波农业科学院, 宁波 315054)

摘要: 【目的】分析烟草种质的遗传多样性水平, 揭示不同烟草类型间的遗传关系, 为充分发掘、利用种质提供依据。【方法】对包括不同烟草类型的 119 份种质进行了 ISSR 分析, 估算其遗传相似系数, 利用 UPGMA 法作聚类图。【结果】利用 21 个 ISSR 引物共扩增出 672 条带, 全部为多态性带, 其中 116 条为普通烟草特有带。普通烟草种质间的遗传相似系数变化范围为 0.779~0.945, 其中烤烟种质间遗传相似系数变化范围在 0.812~0.933 之间; 不同烟草类型基本可聚为相应的亚类或小类, 引进烤烟品种与国内品种并未聚为各自类别。普通烟草与其它烟草种间遗传相似系数较小; 普通烟草与其假定祖先种 *N. sylvestris* 聚为一类, 同为碧冬烟草亚属花烟草组的 *N. longiflora* 和 *N. plumbaginifolia* 聚为一类, 聚类结果与种间遗传分化吻合。【结论】中国现有烤烟种质遗传多样性水平较低; 为拓宽烤烟育成品种的遗传基础, 应充分发掘野生烟草的遗传潜力。

关键词: 烟草; ISSR; 遗传多样性; 聚类分析

Assessment of Genetic Diversity Among Tobacco Germplasm by ISSR Markers

XIAO Bing-guang¹, YANG Ben-chao^{1,2}

(¹ China Tobacco Breeding Research (Southern) Center, Yunnan Institute of Tobacco Science, Yuxi 653100;

² Ningbo Academy of Agricultural Sciences, Ningbo 315054)

Abstract: 【Objective】Assessing the genetic diversity among tobacco accessions and analyzing the genetic relationships among various types of tobacco in order to provide essential information for the exploration and utilization of tobacco germplasm. 【Method】One hundred and nineteen tobacco accessions including various types of tobacco were used for ISSR analysis. The genetic similarity coefficients were estimated and cluster analysis was carried out using UPGMA method. 【Result】672 bands, all of which were polymorphic, were amplified using 21 ISSR primers. Out of them, 116 bands were specific for *N. tabacum*. Pairwise genetic similarity coefficients among accessions in *N. tabacum* ranged from 0.779 to 0.945. Among the flue-cured tobacco varieties, genetic similarity coefficients ranged from 0.812 to 0.933. The tobacco accessions could be clustered into different subgroups or classes according to the types of tobacco. The flue-cured tobacco accessions introduced from abroad were obviously not separated from the domestic accessions including landraces and varieties developed in China. There are low genetic similarity coefficients between the accessions in *N. tabacum* and other tobacco species. The species *N. tabacum* and its progenitor *N. sylvestris* were clustered into the same class, and *N. longiflora* and *N. plumbaginifolia*, both of them belong to the group Alatae of the subgenera *Petunioides*, were clustered into the same class. The results obtained in the ISSR dendrogram agreed with the presumed genetic differentiation. 【Conclusion】There was a low genetic diversity among the flue-cured tobacco germplasm in China. In order to widen the genetic base of the flue-cured tobacco varieties, the genetic potentials in the wild tobacco should be explored.

Key words: Tobacco; ISSR; Genetic diversity; Cluster analysis

0 引言

【研究意义】烟草在植物学分类上属于茄科

(Solanaceae) 烟草属 (*Nicotiana*), 目前已发现 66 个种。中国栽培的烟草按生物学性状、烟叶品质特点和栽培调制方法一般分为烤烟、晒烟、晾烟、白

收稿日期: 2006-08-29; 接受日期: 2006-12-20

基金项目: 国家烟草专卖局项目 (110199901003) 和云南省烟草专卖局项目 (02A01, 05-03)

作者简介: 肖炳光 (1971-), 男, 湖北仙桃人, 博士, 研究方向为烟草遗传育种。Tel: 0877-2075023; Fax: 0877-2075001; E-mail: xiaobg@263.net

肋烟、香料烟、黄花烟 6 种类型,除黄花烟属于黄花烟草种 (*N. rustica* L.) 外,其余 5 种类型属于普通烟草种 (*N. tabacum* L.),其中烤烟是中国也是世界上栽培面积最大的烟草类型。由于烟草育种中过度使用主体亲本^[1],加之定向选择,使得育成品种遗传基础狭窄、品种单一化现象严重。研究烟草种质的遗传多样性及不同烟草类型间的遗传关系,对于充分发掘、利用现有种质、合理选配亲本、拓宽育成品种遗传基础等具有十分重要的意义。【前人研究进展】表型数据^[2]和同工酶标记^[3,4]曾被用于烟草种质的聚类分析,分子标记技术的发展则为种质研究提供了更有效的手段。RAPD^[5-10]、ISSR^[10-12]、IRAP^[13]和 AFLP^[9,14,15]等分子标记分析表明烤烟等普通烟草种内遗传多样性水平较低、遗传基础狭窄,而不同烟草种间遗传差异较大。【本研究切入点】以往的研究由于使用的材料较少或涵盖的烟草类型不全,无法对不同栽培烟草类型的遗传多样性及其相互之间的遗传关系进行分析,从而难以对亲本选配、尤其是烤烟育种中如何充分利用不同烟草类型种质和烟草野生种提供有效指导。由 Zierkiewicz 等^[16]发展起来的 ISSR (inter-simple sequence repeats) 技术是根据基因组内广泛存在的微卫星序列设计单一引物,对两侧具有反向排列 SSR 的一段 DNA 序列进行扩增,无需事先了解基因组序列信息,具有操作简便、快速、仅需微量 DNA 等特点,在许多作物亲缘关系分析、遗传多样性研究、遗传图谱构建和性状基因定位等方面得到了广泛应用^[17,18]。【拟解决的关键问题】利用 ISSR 标记分析 119 份烟草种质的遗传多样性,揭示不同烟草类型间的遗传关系,以期为烤烟育种中合理选配亲本、充分发掘利用现有种质提供依据。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

1.1.1 植物材料 参试烟草种质 119 份(表 1),其中包括 59 份烤烟、32 份晒晾烟(含晒烟及除白肋烟以外的晾烟)、11 份白肋烟、9 份香料烟、1 份黄花烟和 7 份野生烟种质,由中国烟草育种研究(南方)中心提供。

1.1.2 试剂 ISSR 引物序列信息来自 UBC,共 91 条,由宝生物(大连)有限公司合成;Taq DNA Polymerase、dNTPs 购自宝生物(大连)有限公司;100 bp DNA ladder marker 购自 Invitrogen 公司(美国)。

1.2 试验方 法

1.2.1 DNA 提取 参照杨本超等^[11]的方法。

1.2.2 ISSR 反应条件 PCR 反应总体积为 25 μ l,反应体系中含 1 \times PCR Buffer, 1.5 mmol·L⁻¹ MgCl₂, 4 种 dNTP 各 0.2 mmol·L⁻¹, 1U Taq 酶, 0.5 μ mol·L⁻¹ 引物, 20 ng 模板 DNA。PCR 扩增在 GeneAmp PCR System 9600(Perkin Elmer)上进行,先在 94 $^{\circ}$ C 下预变性 4 min;再进行 45 个循环的变性(94 $^{\circ}$ C 30 s)、退火(51 $^{\circ}$ C 30 s)、延伸(72 $^{\circ}$ C 66 s)步骤;然后在 72 $^{\circ}$ C 下继续延伸 5 min;最后慢慢冷却至 4 $^{\circ}$ C。

1.2.3 产物检测 扩增产物加 1/6 体积的上样缓冲液(40%蔗糖, 0.025%溴酚蓝),取 3.5 μ l 利用 3%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离^[11],银染检测^[19]。

1.2.4 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。每两份材料间的遗传相似系数(genetic similarity coefficient, GS)用 Nei 等^[20]的公式计算:

$$GS_{ij} = 2N_{ij} / (N_i + N_j)$$

式中, N_{ij} 指两份材料共有的带数, $N_i + N_j$ 指两份材料所有带数之和。利用 NTSYSpc Version2.0 软件^[21]按照 UPGMA 法进行聚类分析,构建聚类图。

2 结果与分 析

2.1 ISSR 标记分 析

首先用 6 份烟草种质(编号分别为 1、3、38、53、76 和 92)对 91 条 ISSR 引物进行筛选,初步筛选出 29 条引物用于 119 份烟草种质的 ISSR 分析,结果有 21 条引物在所有材料中能扩增出清晰且稳定的多态性带,其余 8 条引物因扩增带模糊或多态性带较弱而无法统计,图 1 为引物 UBC857 的扩增结果。普通烟草(1~111)的扩增产物有一些共有主带、带型相似,而黄花烟品种树麻克(112)和野生烟(113~119)的扩增带型差异很大。

利用上述 21 条引物共扩增出 672 条带,且全部为多态性带,平均每条引物扩增出 32 条带(表 2)。在这 672 条带中,116 条为普通烟草特有带,即在所有 111 份普通烟草种质中均出现,而在黄花烟和野生烟中均未出现;另有 288 条带则在所有普通烟草种质中均未扩增到,而只出现于黄花烟和(或)部分野生烟中(表 2)。

2.2 普通烟草种质的遗传相似程度

普通烟草种质间的遗传相似系数变化范围为 0.779~0.945,平均值为 0.868,遗传相似程度较高。

表 1 烟草种质及其来源

Table 1 Tobacco accessions and their origins

序号 No.	名称 Accession	类型 Type	来源 Origin	序号 No.	名称 Accession	类型 Type	来源 Origin
1	红花大金元 Honghuadajinyuan	烤烟 Flue-cured	中国 China	61	岔河草烟 Chahecaoyan	晒晾烟 Sun/air-cured	中国 China
2	K326	烤烟 Flue-cured	美国 USA	62	细石头草烟 Xishitoucaoyan	晒晾烟 Sun/air-cured	中国 China
3	G-28	烤烟 Flue-cured	美国 USA	63	江城芭蕉烟 Jiangchengbajiaoyan	晒晾烟 Sun/air-cured	中国 China
4	V ₂	烤烟 Flue-cured	美国 USA	64	树凹咬 Shuao Yao	晒晾烟 Sun/air-cured	中国 China
5	云烟 85 Yunyan No.85	烤烟 Flue-cured	中国 China	65	鸭莫黄 Yamohuang	晒晾烟 Sun/air-cured	中国 China
6	云烟 317 Yunyan 317	烤烟 Flue-cured	中国 China	66	乐业大瓣烟 Leyedabianyan	晒晾烟 Sun/air-cured	中国 China
7	NC82	烤烟 Flue-cured	美国 USA	67	八大河土烟 Badahetuyan	晒晾烟 Sun/air-cured	中国 China
8	K346	烤烟 Flue-cured	美国 USA	68	坝林土烟 Balintuyan	晒晾烟 Sun/air-cured	中国 China
9	RG11	烤烟 Flue-cured	美国 USA	69	波卡大柳叶 Bokadaliuye	晒晾烟 Sun/air-cured	中国 China
10	长脖黄 Changbohuang	烤烟 Flue-cured	中国 China	70	腾冲大柳叶 Tengchongdaliuye	晒晾烟 Sun/air-cured	中国 China
11	翠碧 1 号 CuiBi No.1	烤烟 Flue-cured	中国 China	71	裸利烟 Luoliyan	晒晾烟 Sun/air-cured	中国 China
12	NC89	烤烟 Flue-cured	美国 USA	72	歪尾巴 Waiweiba	晒晾烟 Sun/air-cured	中国 China
13	G-80	烤烟 Flue-cured	美国 USA	73	平坝辣烟 Pingbalayan	晒晾烟 Sun/air-cured	中国 China
14	G-140	烤烟 Flue-cured	美国 USA	74	密节烟 Mijieyan	晒晾烟 Sun/air-cured	中国 China
15	中烟 14 Zhongyan No.14	烤烟 Flue-cured	中国 China	75	洋房烟 Yangfangyan	晒晾烟 Sun/air-cured	中国 China
16	中烟 90 Zhongyan No.90	烤烟 Flue-cured	中国 China	76	青梗 Qinggeng	晒晾烟 Sun/air-cured	中国 China
17	寸茎烟 Cunjingyan	烤烟 Flue-cured	中国 China	77	塘逢烟 Tangpengyan	晒晾烟 Sun/air-cured	中国 China
18	金星 6007 Jinxing 6007	烤烟 Flue-cured	中国 China	78	千层塔 Qiancengta	晒晾烟 Sun/air-cured	中国 China
19	金元 Gold dollar	烤烟 Flue-cured	美国 USA	79	沂水香烟 Yishuixiangyan	晒晾烟 Sun/air-cured	中国 China
20	Special 400	烤烟 Flue-cured	美国 USA	80	小花青 Xiaohuaqing	晒晾烟 Sun/air-cured	中国 China
21	云烟 2 号 Yunyan No.2	烤烟 Flue-cured	中国 China	81	白花铁杆 Baihuatiegan	晒晾烟 Sun/air-cured	中国 China
22	581	烤烟 Flue-cured	中国 China	82	黔江乌烟 Qianjiangwuyan	晒晾烟 Sun/air-cured	中国 China
23	77089-12	烤烟 Flue-cured	中国 China	83	小牛舌 Xiaoniushe	晒晾烟 Sun/air-cured	中国 China
24	黄苗榆 Huangmiaoyu	烤烟 Flue-cured	中国 China	84	Ti1112	晒晾烟 Sun/air-cured	美国 USA
25	净叶黄 Jingyehuang	烤烟 Flue-cured	中国 China	85	Ti245	晒晾烟 Sun/air-cured	美国 USA
26	歪把子 Waibazi	烤烟 Flue-cured	中国 China	86	Va934	晒晾烟 Sun/air-cured	美国 USA
27	小黄金 1025 Xiaohuangjin 1025	烤烟 Flue-cured	中国 China	87	Kenek	晒晾烟 Sun/air-cured	美国 USA
28	许金 1 号 XuJin No.1	烤烟 Flue-cured	中国 China	88	Raja	晒晾烟 Sun/air-cured	美国 USA
29	CV87	烤烟 Flue-cured	中国 China	89	Florida301	晒晾烟 Sun/air-cured	美国 USA
30	大白筋 599 Dabaijin 599	烤烟 Flue-cured	中国 China	90	Maryland 609	晒晾烟 Sun/air-cured	美国 USA
31	丰字 6 号 Fengzi No.6	烤烟 Flue-cured	中国 China	91	Maryland 872	晒晾烟 Sun/air-cured	美国 USA
32	革新 3 号 Gexin No.3	烤烟 Flue-cured	中国 China	92	Burley 21	白肋烟 Burley	美国 USA
33	广黄 55 Guanghuang 55	烤烟 Flue-cured	中国 China	93	Virginia509	白肋烟 Burley	美国 USA
34	晋太 66 Jintai 66	烤烟 Flue-cured	中国 China	94	Kentucky10	白肋烟 Burley	美国 USA
35	临胸 1 号 Linxu No.1	烤烟 Flue-cured	中国 China	95	Kentucky15	白肋烟 Burley	美国 USA
36	辽烟 8 号 Liaoyan No.8	烤烟 Flue-cured	中国 China	96	Kentucky17	白肋烟 Burley	美国 USA
37	辽烟 12 号 Liaoyan No.12	烤烟 Flue-cured	中国 China	97	Banket A-1	白肋烟 Burley	津巴布韦 Zimbabwe
38	满屋香 Manwuxiang	烤烟 Flue-cured	中国 China	98	Tennessee86	白肋烟 Burley	美国 USA
39	台烟 8 号 Taiyan No.8	烤烟 Flue-cured	中国 China	99	Tennessee90	白肋烟 Burley	美国 USA
40	云烟 87 Yunyan No.87	烤烟 Flue-cured	中国 China	100	L-8	白肋烟 Burley	美国 USA
41	86-3002	烤烟 Flue-cured	中国 China	101	Kentucky907	白肋烟 Burley	美国 USA
42	Coker139	烤烟 Flue-cured	美国 USA	102	Kentucky8959	白肋烟 Burley	美国 USA
43	Coker176	烤烟 Flue-cured	美国 USA	103	土耳其巴斯玛 Turkey Basma	香料烟 Oriental	土耳其 Turkey
44	Coker371-Gold	烤烟 Flue-cured	美国 USA	104	希腊巴斯玛 Greece Basma	香料烟 Oriental	希腊 Greece
45	CU236	烤烟 Flue-cured	美国 USA	105	Pobeda 2	香料烟 Oriental	保加利亚 Bulgaria
46	Delgold	烤烟 Flue-cured	加拿大 Canada	106	丸叶 Wanye	香料烟 Oriental	日本 Japan
47	Dixie Bright101	烤烟 Flue-cured	美国 USA	107	Xanthi NC	香料烟 Oriental	土耳其 Turkey

续表 1

Continue table 1

序号 名称 No. Accession	类型 Type	来源 Origin	序号 名称 No. Accession	类型 Type	来源 Origin
48 Hicks	烤烟 Flue-cured	美国 USA	108 新昌香料烟 Xinchangxiangliao	香料烟 Oriental	中国 China
49 Kutsaga 51E	烤烟 Flue-cured	美国 USA	109 Komotini Basma	香料烟 Oriental	土耳其 Turkey
50 MC Nair944	烤烟 Flue-cured	津巴布韦 Zimbabwe	110 Samsun	香料烟 Oriental	土耳其 Turkey
51 NC95	烤烟 Flue-cured	美国 USA	111 Xanthi Basma	香料烟 Oriental	土耳其 Turkey
52 NC567	烤烟 Flue-cured	美国 USA	112 树麻克 Shumake	黄花烟 Rustica	中国 China
53 NC2326	烤烟 Flue-cured	美国 USA	113 N.debneyi	野生烟 Wild	澳大利亚 Australia
54 NC TG55	烤烟 Flue-cured	美国 USA	114 N.Glauca	野生烟 Wild	阿根廷 Argentina
55 Oxford 2	烤烟 Flue-cured	美国 USA	115 N.Longiflora	野生烟 Wild	巴西 Brazil
56 Oxford 26	烤烟 Flue-cured	美国 USA	116 N.plumbaginifolia	野生烟 Wild	巴西 Brazil
57 Reams c73	烤烟 Flue-cured	美国 USA	117 N.repanda	野生烟 Wild	古巴 Cuba
58 SC71	烤烟 Flue-cured	美国 USA	118 N.suaveolens	野生烟 Wild	澳大利亚 Australia
59 SC72	烤烟 Flue-cured	美国 USA	119 N. sylvestris	野生烟 Wild	阿根廷 Argentina
60 勐掌晾烟 Mengzhangliangyan	晒晾烟 Sun/air-cured	中国 China			

表 2 ISSR 引物及其扩增带数

Table 2 ISSR primers and the number of amplified bands

引物 Primer	碱基序列 ^a Sequence	扩增总带数 Total number of amplified bands	普通烟草特有带数 Number of specific bands for N. tabacum	普通烟草缺乏带数 Number of bands not amplified in N. tabacum
UBC811	(GA) ₈ C	28	6	17
UBC812	(GA) ₈ A	23	11	7
UBC813	(CT) ₈ T	13	5	3
UBC814	(CT) ₈ A	27	3	5
UBC815	(CT) ₈ G	18	2	3
UBC817	(CA) ₈ A	18	6	10
UBC823	(TC) ₈ C	30	1	17
UBC824	(TC) ₈ G	22	4	11
UBC825	(AC) ₈ T	38	10	15
UBC826	(AC) ₈ C	43	11	22
UBC834	(AG) ₈ YT	49	8	21
UBC835	(AG) ₈ YC	41	10	23
UBC840	(GA) ₈ YT	38	8	20
UBC843	(CT) ₈ RA	41	1	13
UBC844	(CT) ₈ RC	32	6	16
UBC853	(TC) ₈ RT	37	4	8
UBC857	(AC) ₈ YG	43	5	24
UBC873	(GACA) ₄	39	7	17
UBC878	(GGAT) ₄	25	0	10
UBC879	(CTTCA) ₃	31	1	4
UBC887	DVD(TC) ₇	36	7	22
合计 Sum		672	116	288
平均 Average		32.00	5.52	13.71

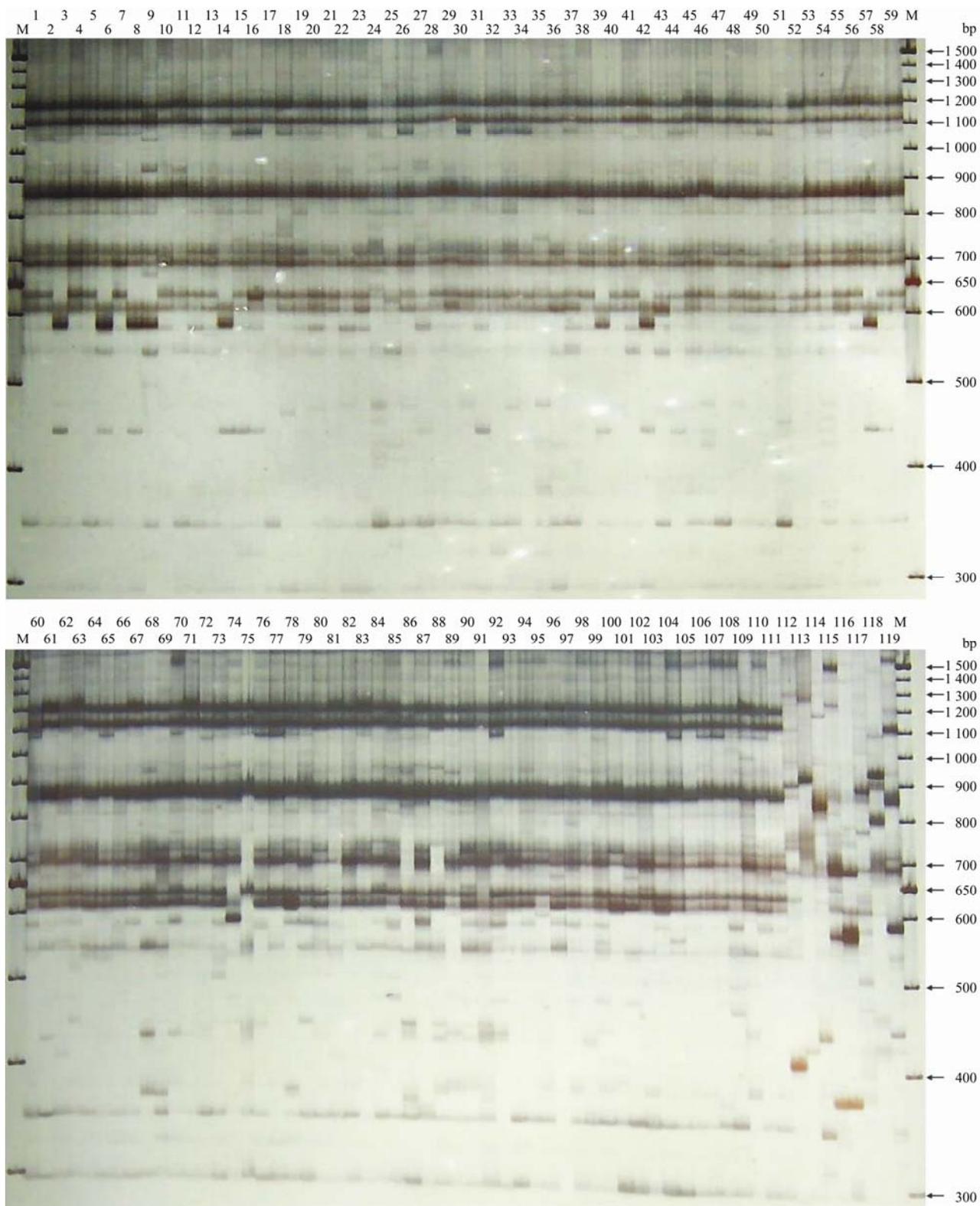
* 下标表示重复次数: R = A/G, Y = C/T, V = A/C/G, H = A/C/T, D = A/G/T

* Lower number denotes the number of repeats

其中来自日本的香料烟品种丸叶 (106) 和来自土耳其的香料烟品种 Xanthi NC (107) 之间的遗传相似系数最大 (0.945), 遗传距离最近; 引进的美国烤烟品种 RG11 (9) 和云南地方晒烟品种树凹咬 (64) 之间的

遗传相似系数最小 (0.779)。

为了比较普通烟草种内不同烟草类型的遗传多样性水平及相互之间的遗传关系, 分别计算出各类型内及不同类型间的平均遗传相似系数 (表 3)。香料烟



M 为 100 bp DNA ladder 分子量标准；1~119 分别为表 1 中的参试材料编号
M: 100 bp DNA ladder marker; 1-119: No. of the tobacco accessions in table 1

图 1 引物 UBC857 的扩增结果

Fig. 1 ISSR band profile amplified with primer UBC857

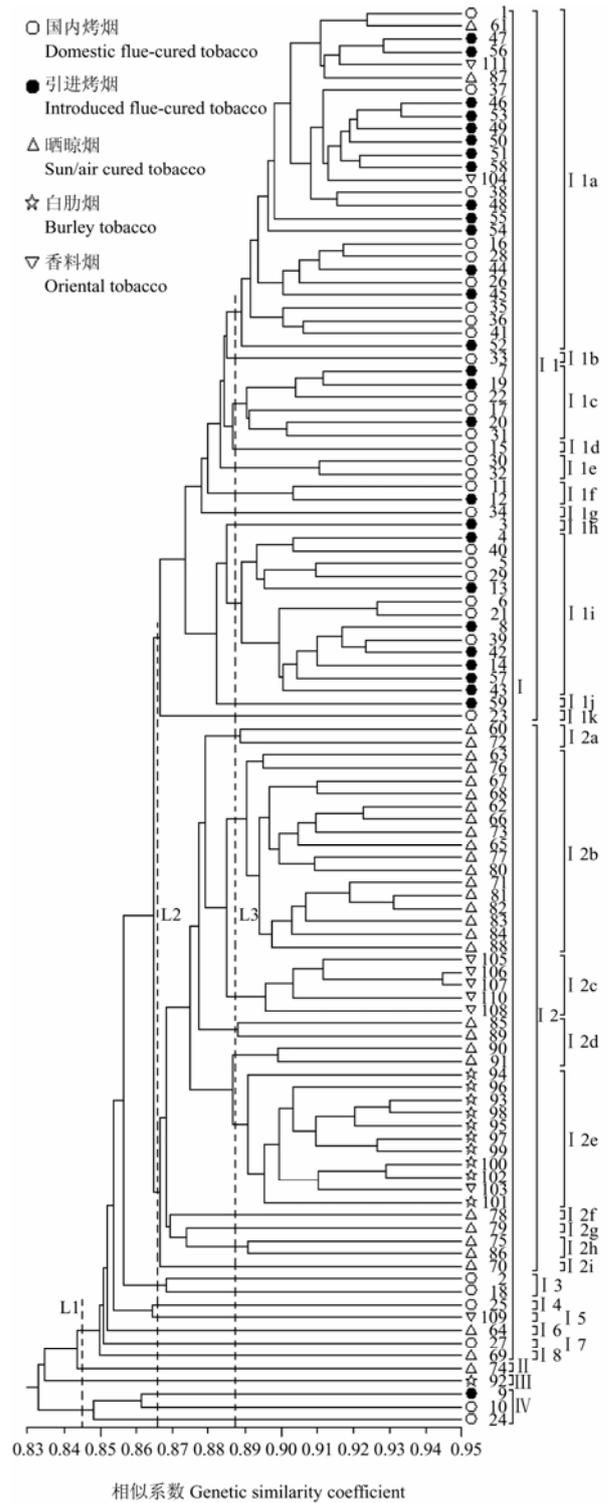
表 3 普通烟草类型内及类型间的平均遗传相似系数
Table 3 Average genetic similarity coefficients for intra- and inter-types in *N. tabacum*

烟草类型 Types of tobacco	烤烟 Flue-cured	晒晾烟 Sun/air-cured	白肋烟 Burley	香料烟 Oriental
烤烟 Flue-cured	0.876			
晒晾烟 Sun/air-cured	0.860	0.879		
白肋烟 Burley	0.855	0.868	0.891	
香料烟 Oriental	0.865	0.877	0.876	0.895

种质间遗传相似系数变化范围在 0.861~0.945 之间, 平均值最高 (0.895), 表明其遗传多样性水平最低。烤烟种质间遗传相似系数变化范围在 0.812~0.933 之间, 平均值在普通烟草内最低, 但仍达 0.876。从不同烟草类型间遗传关系来看, 烤烟与白肋烟的遗传相似程度最低, 其次是烤烟与晒晾烟; 而晒晾烟与香料烟的遗传关系最近, 其次是白肋烟与香料烟。但从总体上看, 普通烟草种内各类型烟草间平均遗传相似系数在 0.855~0.877 之间, 遗传相似程度均较高; 且各烟草类型内的遗传多样性水平也较低。

2.3 普通烟草种质的聚类分析

根据估算出的遗传相似系数矩阵, 按 UPGMA 法作普通烟草种质的聚类图 (图 2)。在遗传相似系数 0.845 处 (L1), 可将供试材料分为四类: I 类包括 106 份种质; 晒烟品种密节烟 (74) 和白肋烟品种 Burley 21 (92) 分别独自聚为 II 类和 III 类; IV 类包括 3 个烤烟品种, 其中 RG11 (9) 为引进的美国品种, 长脖黄 (10) 和黄苗榆 (24) 为地方品种。在遗传相似系数 0.866 处 (L2), 可将 I 类再分为 8 个亚类: I 1 亚类包括 56 份材料, 其中 52 份为烤烟种质; I 2 亚类包括 43 份材料, 但无烤烟种质; I 3 亚类包括 2 个烤烟品种, 其中 K326 (2) 为引进的美国品种, 金星 6007 (18) 系地方品种金星烟中系统选育而成; 净叶黄 (25) 和小黄金 1025 (27) 分别独自聚为 I 4 和 I 7 亚类, 其中前者是从地方品种长脖黄中选抗赤星病单株育成的, 后者从地方品种小黄金中系选而成; 香料烟品种 Komotini Basma (109)、晒烟品种树凹咬 (64) 和波卡大柳叶 (69) 则分别独自聚为 I 5、I 6 和 I 8 亚类。在遗传相似系数 0.887 处 (L3), 又可将 I 2 亚类进一步分为 9 个小类: I 2a、I 2b、I 2d 和 I 2h 小类分别包括 2、16、4 和 2 份晒晾烟种质; I 2c 小类包括 5 份香料烟种质; I 2e 小类包括 10 份白肋烟种质和 1 个香料烟品种。由上可见, 不同类型烟草基本可各自聚为相应的亚类或小类, 与传统分类相吻合。



图右边的数字和序号分别表示种质编号和类群
The number and the serial on the right of the dendrogram denote No. of accessions and groups, respectively

图 2 111 份普通烟草种质的聚类图
Fig. 2 Dendrogram of 111 *N. tabacum* accessions using UPGMA based on ISSR analysis

参试的 59 个烤烟品种中, 有 52 个被聚在 I 1 亚类, 该亚类在遗传相似系数 0.887 处 (L3) 可初步分为 11 个小类 (图 2): 广黄 55 (33)、中烟 14 (15)、晋太 66 (34)、G-28 (3)、SC72 (59) 和 77089-12 (23) 分别独自聚为 I 1b、I 1d、I 1g、I 1h、I 1j 和 I 1k 小类; 大白筋 599 (30) 和革新 3 号 (32) 聚为 I 1e 小类, 翠碧 1 号 (11) 和 NC89 (12) 聚为 I 1f 小类; I 1a 小类包括 27 个品种, 其中岔河草烟 (61) 和 Kenek (87) 为晒晾烟, Xanthi Basma (111) 和希腊巴斯玛 (104) 为香料烟, 其余为烤烟; I 1c 小类包括 6 个烤烟品种, 其中 NC82 (7)、金元 (19)、581 (17)、寸茎烟 (17) 和 Special 400 (20) 均曾有过的种植面积; I 1i 小类包括 13 个烤烟品种, 其中云烟 85 (5)、云烟 87 (40)、云烟 317 (6) 和云烟 2 号 (21) 为云南选育的品种, 云烟 85 和云烟 87 属于姊妹系, 是目前国内推广面积最大的两个自育品种、占全国烤烟种植面积的 50% 左右, 而云烟 2 号为其亲本之一。

国外引进品种在中国烤烟生产及育种上起着十分重要的作用。由图 2 的聚类结果可以看出, 国外品种与国内品种并未明显聚为各自类别, 表明烤烟品种的地理来源与遗传差异之间并没有必然的联系。

2.4 不同烟草类型及不同烟草种的聚类分析

普通烟草不同类型与其它烟草种间的遗传相似系数变化范围在 0.186~0.561 之间, 平均值为 0.304; 其中普通烟草各类型与 *N. sylvestris* 间的遗传相似系数变化范围在 0.468~0.561 之间, 平均值为 0.521; 普通烟草各类型与另 7 个烟草种间的遗传相似系数变化范围在 0.186~0.384 之间, 平均值为 0.274。

利用不同烟草类型 (或烟草种) 间的平均遗传相似系数, 按 UPGMA 法作聚类图 (图 3)。在相似系数 0.34 处 (L1), 普通烟草与其假定祖先种 *N. sylvestris* 聚为一类, *N. Longiflora* 和 *N. plumbaginifolia* 聚为一类。在遗传相似系数 0.60 处 (L2), 所有烟草种被单独聚为各自类别。

普通烟草种内, 各烟草类型在遗传相似系数 0.85 处 (L3) 仍聚为一类, 表明遗传相似性较高。相对而言, 烤烟与其它 3 种烟草类型间遗传距离较远, 而晒晾烟与香料烟间遗传关系最近, 与前面的遗传相似系数估算结果一致。

3 讨论

3.1 烤烟种质遗传多样性

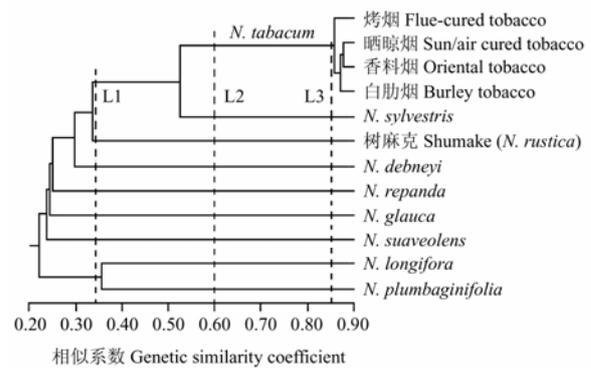


图 3 9 个烟草种的聚类图

Fig. 3 Dendrogram of 9 species in the genera *Nicotiana* using UPGMA based on ISSR analysis

品种间遗传关系研究和遗传多样性分析对于作物育种具有十分重要的意义^[22]。本研究中 59 份烤烟种质间的遗传相似系数变化范围在 0.812~0.933 之间, 平均值为 0.876, 遗传相似性较高, 与以往的研究结果一致^[6,7,11]。分析其原因, 首先, 由于育种中过度使用主体亲本^[1], 而忽视地方品种和特异种质的利用, 造成烤烟品种遗传基础狭窄。其次, 因为过去育种目标比较单一引起的定向选择, 使得许多非育种目标的多样性性状丢失, 导致遗传多样性降低^[11]。

传统育种中, 常将不同地理来源作为亲本选配的根据之一。而本研究中的烤烟种质聚类分析表明, 国外引进品种与国内品种并未完全聚为各自类群, 意味着分子水平的遗传关系和地理来源间缺乏必然联系, 与许明辉等^[5]的报道类似。之所以出现这种现象, 主要是由于多数国内育成品种的亲本中有国外引进品种, 通过杂交重组而造成种质融合。提示我们在今后育种中进行亲本选择时, 不要局限于地理远缘, 应充分利用被聚在不同类或亚类的种质。如引进品种 RG11、地方品种长脖黄和黄苗榆与其它烤烟品种被聚为不同类群, 净叶黄、小黄金 1025、K326 和金星 6007 与其它烤烟品种被聚为不同亚类, 为了增加育种预见性、培育优良品种, 在亲本选配中应高度重视这几个种质。烤烟育种实践也证明了这点, 如以 K326 和国内育成品种云烟 2 号为亲本选育出的云烟 85 和云烟 87 目前已成为中国烤烟生产的主栽品种; 金星 6007 也曾作为主体亲本选育出了多个烤烟品种^[1]。

3.2 不同烟草类型及烟草种间的遗传关系

王志德等^[8]对 24 个不同类型烟草核心种质进行了 RAPD 分析, 结果表明种质间的遗传差异并不完全取

决于栽培类型间的差异,而与种质间演化有关,野生种与栽培种间存在较大的遗传差异。祁建民等^[12]应用 ISSR 标记对烟草属 4 个种 30 份材料的遗传多样性进行了分析,结果表明 3 个野生种间存在较大的遗传差异,栽培种内的遗传基础相对比较狭窄。本研究的聚类结果表明,普通烟草种内不同烟草类型种质大致可以聚为各自类别,如烤烟种质主要聚为 I 1 亚类,白肋烟种质主要聚为 I 2e 小类,香料烟种质主要聚为 I 2c 小类,与传统的类型划分比较吻合;但总体上看,普通烟草种质间的遗传相似程度较高,即使是不同烟草类型其亲缘关系也较近。Ren 等^[14]利用 AFLP 标记分析了烟草属种内和种间的遗传变异程度,结果也表明栽培烟草品种间 AFLP 图谱具有高度的相似性,遗传多样性水平较低,聚类分析时同一类群中往往包含不同类型烟草品种。杨友才等^[9,15]的研究中,烤烟与晒烟也没有被完全分为不同类群。

普通烟草与其它烟草种间遗传相似系数较小,遗传分化较大。相较而言,普通烟草与 *N. sylvestris* 的遗传关系最近,同 Ren 等^[14]和 Komarnitskii^[23]的研究结果相似,由于 *N. sylvestris* 是普通烟草的假定祖先种之一^[24,25],因而本研究从侧面也印证了普通烟草的起源问题;关于普通烟草的另外一个可能假定亲本 *N. tomentosiformis*^[24,26]则本文未能涉及。*N. longiflora* 和 *N. plumbaginifolia* 在相似系数 0.34 处 (L1) 可聚为一类 (图 3),由于两者同为碧冬烟草亚属 (*Petunioides*) 的花烟草组 (*Alatae*),因此遗传相似程度也相对较高。黄花烟品种树麻克虽然是栽培烟草,但由于在植物学分类上属于黄花烟草种 (*N. rustica*),因而与普通烟草的遗传关系也较远。可见,聚类结果与种间遗传分化吻合较好。

在烤烟育种实践中,为了融入不同烟草类型的风格特点,可以选择烤烟与普通烟草种内不同烟草类型进行杂交。但由于普通烟草种内不同烟草类型间遗传相似程度较高,选择不同类型烟草品种作为杂交亲本并不能从根本上改变当前品种遗传基础狭窄这一现状。而普通烟草与其它烟草种间遗传关系较远,若是为了丰富育成品种的遗传基础、培育突破性品种,还应充分发掘野生烟草种的遗传潜力,将野生烟草的优良或特异性状基因逐渐转入到烤烟品种中来。

4 结论

4.1 中国现有烤烟种质遗传相似性较高,遗传多样性水平较低,且基于 ISSR 分析的遗传关系和地理来源

间缺乏必然联系。因此在育种中选配亲本时,不要局限于地理远缘,应充分利用被聚在不同类或亚类的烤烟种质。

4.2 尽管普通烟草种内不同烟草类型种质大致可以聚为各自类别,但总体上看,普通烟草种质间的遗传相似程度较高,遗传基础相对比较狭窄;而普通烟草与其它烟草种间遗传差异较大。为拓宽烤烟育成品种的遗传基础,应充分发掘野生烟草的遗传潜力。

References

- [1] 王元英,周 健. 中美主要烟草品种亲源分析与烟草育种. 中国烟草学报, 1995, 2(3): 11-22.
Wang Y Y, Zhou J. Parentage analysis of major tobacco varieties and tobacco breeding in America and China. *Acta Tabaccaria Sinica*, 1995, 2(3): 11-22. (in Chinese)
- [2] 何川生,何兴金,李天飞,许美玲,许介眉. 烤烟品种资源的聚类分析. 中国农业科学, 2000, 33(3): 14-18.
He C S, He X J, Li T F, Xu M L, Xu J M. Cluster analysis of flue-cured tobacco germplasm. *Scientia Agricultura Sinica*, 2000, 33(3): 14-18. (in Chinese)
- [3] 许明辉,马继琼,刘广田. 烟草品种间同工酶遗传距离与杂种优势关系的研究. 农业生物技术学报, 1999, 7: 117-122.
Xu M H, Ma J Q, Liu G T. Relationship between genetic distance based on isoenzyme and heterosis in Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Journal of Agricultural Biotechnology*, 1999, 7: 117-122. (in Chinese)
- [4] 王志德,牟建民,王卫锋,戴培刚,蒋予恩. 部分烟草核心种质过氧化物同工酶标记分析. 中国烟草科学, 2003, (2): 9-11.
Wang Z D, Mu J M, Wang W F, Dai P G, Jiang Y E. An analysis on peroxide isoenzyme markers of tobacco partial core germplasms. *Chinese Tobacco Science*, 2003, (2): 9-11. (in Chinese)
- [5] 许明辉,郑民慧,刘广田. 烟草品种 RAPD 分子标记遗传差异研究. 农业生物技术学报, 1998, 6: 282-284.
Xu M H, Zheng M H, Liu G T. The genetic difference of tobacco varieties by RAPD. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 1998, 6: 282-284. (in Chinese)
- [6] 肖炳光,卢江平,卢秀萍,白永富,王绍坤,李天飞. 烤烟品种的 RAPD 分析. 中国烟草学报, 2000, 6(2): 10-15.
Xiao B G, Lu J P, Lu X P, Bai Y F, Wang S K, Li T F. The RAPD analysis in the flue-cured tobacco varieties. *Acta Tabaccaria Sinica*, 2000, 6(2): 10-15. (in Chinese)
- [7] 何川生,何兴金,葛 颂,李天飞,许凌云,许美玲,许介眉. 烤烟品种资源的 RAPD 分析. 植物学报, 2001, 43: 610-614.

- He C S, He X J, Ge S, Li T F, Xu L Y, Xu M L, Xu J M. Analysis of germplasm of flue-cured tobacco by RAPD. *Acta Botanica Sinica*, 2001, 43: 610-614. (in Chinese)
- [8] 王志德, 牟建民, 戴培刚, 王伟峰, 蒋予恩. 部分烟草核心种质 RAPD 分析. *中国烟草学报*, 2003, 9(4): 20-25.
- Wang Z D, Mu J M, Dai P G, Wang W F, Jiang Y E. RAPD analysis of some core germplasm in tobacco. *Acta Tabaccaria Sinica*, 2003, 9(4): 20-25. (in Chinese)
- [9] 杨友才, 周清明, 尹晗琪. 利用 RAPD 和 AFLP 标记分析烟草种质资源的遗传多样性. *农业生物技术学报*, 2006, 14: 585-593.
- Yang Y C, Zhou Q M, Yin H Q. Analysis of genetic diversity in tobacco germplasm by RAPDs and AFLPs. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2006, 2006, 14: 585-593.
- [10] 肖炳光. 利用 RAPD 和 ISSR 标记分析烤烟品种间遗传关系. *武汉植物学研究*, 2006, 24: 392-396.
- Xiao B G. Assessment of genetic relationships between the flue-cured tobacco varieties by RAPD and ISSR Markers. *Journal of Wuhan Botanical Research*, 2006, 24: 392-396
- [11] 杨本超, 肖炳光, 陈学军, 石春海. 基于 ISSR 标记的烤烟种质遗传多样性研究. *遗传*, 2005, 27: 753-758.
- Yang B C, Xiao B G, Chen X J, Shi C H. Genetic diversity of flue-cured tobacco varieties based on ISSR marker. *Hereditas* (Beijing), 2005, 27: 753-758. (in Chinese)
- [12] 祁建民, 王涛, 陈顺辉, 周东新, 方平平, 陶爱芬, 梁景霞, 吴为人. 部分烟草种质遗传多样性与亲缘关系的 ISSR 标记分析. *作物学报*, 2006, 32: 373-378.
- Qi J M, Wang T, Chen S H, Zhou D X, Fang P P, Tao A F, Liang J X, Wu W R. Genetic diversity and genetic relatives analysis of tobacco germplasm based on inter-simple sequence repeat (ISSR). *Acta Agronomica Sinica*, 2006, 32: 373-378. (in Chinese)
- [13] 肖炳光, 杨本超. 利用 IRAP 标记分析烤烟品种间遗传差异. *西北植物学报*, 2006, 26: 1119-1124.
- Xiao B G, Yang B C. Assessing the genetic differences among the flue-cured tobacco varieties by IRAP markers. *Acta Botanica Boreal-Occident Sinica*, 2006, 26: 1119-1124.
- [14] Ren N, Timko MP. AFLP analysis of genetic polymorphism and evolutionary relationships among cultivated and wild *Nicotiana* species. *Genome*, 2001, 44: 559-571.
- [15] 杨友才, 周清明, 尹晗琪, 朱列书. 烟草种质资源遗传多样性及亲缘关系的 AFLP 分析. *中国农业科学*, 2006, 39: 2194-2199.
- Yang Y C, Zhou Q M, Yin H Q, Zhu L S. Studies on genetic diversity and relationship in tobacco germplasm by AFLP analysis. *Scientia Agricultura Sinica*, 2006, 39: 2194-2199
- [16] Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 1994, 20: 176-183.
- [17] Pradeep Reddy M, Sarla N, Siddiq E A. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica*, 2002, 128: 9-17.
- [18] 王建波. ISSR 分子标记及其在植物遗传学研究中的应用. *遗传*, 2002, 24: 613-616.
- Wang J B. ISSR markers and their application in plant genetics. *Hereditas* (Beijing), 2002, 24: 613-616. (in Chinese)
- [19] Bassam B J, Caetano-Anollés G, Gresshoff P M. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, 1991, 196: 80-83
- [20] Nei M, Li W. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1979, 76: 5269-5273.
- [21] Rohlf F J. NTSYSpc: numerical taxonomy and multivariate analysis system, Version 2.0. Exeter Software, Setauket, New York, USA. 1998.
- [22] Schut J W, Qi X, Stam P. Association between relationship measures based on AFLP markers, pedigree data and morphological traits in barley. *Theoretical and Applied Genetics*, 1997, 95: 1161-1168.
- [23] Komarnitskii S I. Molecular phylogeny of chloroplast DNA of species of the genus *Nicotiana*. *Cytology and Genetics*, 2005, 39 (4): 10-15.
- [24] Murad L, Lim K Y, Christopodoulou V, Matyasek R, Lichtenstein C P, Kovarik A, Leitch A R. The origin of tobacco's T genome is traced to a particular lineage within *Nicotiana tomentosiformis* (Solanaceae). *American Journal of Botany*, 2002, 89: 921-928.
- [25] Chase M W, Knapp S, Cox A V, Clarkson J J, Butsko Y, Joseph J, Savolainen V, Parokony A S. Molecular systematics, GISH and the origin of hybrid Taxa in *Nicotiana* (Solanaceae). *Annals of Botany*, 2003, 92: 107-127.
- [26] Lim K Y, Matyásek R, Lichtenstein C P, Leitch A R. Molecular cytogenetic analyses and phylogenetic studies in the *Nicotiana* section *Tomentosae*. *Chromosoma*, 2000, 109: 245-258.