



基于 SSR 标记对 33 份烟草材料的聚类分析

李 岩^{1,2}, 童治军², 焦芳婵², 吴兴富², 高玉龙², 姬广海¹, 肖炳光^{2*}

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

摘 要: 利用与烟草赤星病抗性连锁的 6 对 SSR 标记和随机选取的 21 对 SSR 标记, 对 33 份具有不同赤星病抗性的烟草种质资源的遗传关系进行了分析。结果表明: 基于 3 个烟草赤星病抗性 QTL 两侧的 6 个 SSR 标记可以较好地抗病品种和感病品种区分开来。在遗传相似系数(GS)为 0.44 的水平上, 可将 33 个烟草品种分为 4 个类群: 具有净叶黄(国内)和 Beinhart-1000(美国)赤星病抗源的烟草品种聚为一类(I 类); 抗赤星病的 CV 系列烟草品种聚为一类(II 类); 长脖黄、G140、NC82 等感病品种聚为一类(III 类); 香甜烟草(*N. suaveolens*)单独聚为一类(IV 类)。基于随机选取的 SSR 标记的聚类结果则不能看出与赤星病抗性的联系。

关键词: 烟草; SSR 标记; 赤星病; 聚类分析

中图分类号: Q789

文献标志码: A

Cluster Analysis of Thirty-three Tobacco Germplasms Based on SSR Markers

LI Yan^{1,2}, TONG Zhijun², JIAO Fangchan², WU Xingfu²,
GAO Yulong², JI Guanghai¹, XIAO Bingguang^{2*}

(1 Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China; 2 Yunnan Academy of Tobacco Agricultural Sciences, Kunming 653100, China)

Abstract: The phylogenesis of thirty-three tobacco germplasms belonging to different brown spot resistance analyzed by six SSR markers which linked to the tobacco brown spot resistant genes and twenty-one random SSR markers were reported in this study. The results of cluster analysis based on the six tobacco brown spot resistant linked SSR markers flanking the three tobacco brown spot resistant QTLs showed that thirty-three tobacco varieties could be clustered into four groups at a relative low level of GS (genetic similarity coefficient) 0.44. The tobacco varieties which had the resistant resource to tobacco brown spot from the Jingyehuang (China) and Beinhart-1000 (USA) were clustered into group I; the tobaccos which belong to CV series and are resistant to tobacco brown spot were clustered into group II; *N. suaveolens* belonging to wild tobacco was in an unique group IV; while the left which belong to susceptible varieties such as Changbohuang, G140, and NC82 were clustered into group III. The results of cluster analysis showed that the SSR markers linked to the tobacco brown spot resistant genes (flanking the resistant QTLs) could cluster the species into resistant and susceptible while the random SSR makers could not.

Key words: tobaccos; SSR markers; brown spot; cluster analysis

烟草赤星病的病原链格孢菌(*Alternaria alternata*)属半知菌亚门真菌, 其寄主范围较广, 烟草、棉

收稿日期: 2013-06-08; 修改稿收到日期: 2013-08-19

基金项目: 云南省科技厅项目(2012BB006); 中国烟草总公司项目(110201002001); 中国烟草总公司云南省公司项目(2010YN02, 2011YN06)

作者简介: 李 岩(1988—), 女, 硕士研究生, 主要从事烟草分子生物学研究。E-mail: zhibao1yan@163.com

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

花、花生、大豆等多种作物均可浸染并产生病斑。目前,赤星病病菌种群对不同品种的致病性因明显专化性差异而区分为不同的两类生理小种:柑桔致病性和柠檬致病性^[1]。烟草赤星病自 1892 年首次报道以来,给世界烟草产业带来重大经济损失。在中国,其呈间歇式爆发,尤其 20 世纪 80 年代至今,由于烟草赤星病生理小种多变、环境气候复杂、烟草品种抵抗力差等诸多影响因素,使其成为威胁中国烟草安全生产的主要真菌病害之一^[2]。虽然选育抗烟草赤星病的优良品种是预防该病最经济、有效的途径,但因在育种上面临着对种质资源的挖掘力度不够、优质、抗病资源匮乏及种质资源遗传背景狭窄等问题^[3]而很难通过常规育种手段实现。利用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。

在分子水平上对栽培烟草种质资源的研究中,国内外的报道绝大多数集中在利用非特异性标记 RAPD^[4-6]、SRAP^[7]、AFLP^[8-9]、ISSR^[10-12] 或 RAPD 和 AFLP 相结合^[13-14] 等对遗传多样性与亲缘关系进行分析上,而在利用与抗性连锁标记对烟草种质资源抗性遗传多样性分析方面的研究则较少。Julio 等^[9]利用已报道的分别与烟草 PVY、霜霉病和根黑腐病抗性基因连锁的 AFLP 标记对其收集到的 92 份烟草材料(38 份烤烟、26 份白肋烟、18 份晾晒烟、8 份香料烟和 2 份雪茄烟)的 PVY、霜霉病和根黑腐病抗性资源进行了遗传多样性分析。迄今为止,

利用基于赤星病抗性连锁的分子标记对烟草种质的遗传关系进行分析,在国内外尚未见报道。

本研究利用 Tong 等^[15]已报道的与烟草赤星病抗性基因连锁的 SSR 标记,首次对烟草材料进行遗传多样性及其亲缘关系研究,为利用烟草抗赤星病种质资源、合理选配亲本等提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 供试材料

参试的 33 份烟草材料(表 1),均由云南省烟草农业科学研究院提供。其中,抗烟草赤星病的材料(品种)有 25 份,分别属于 3 个抗源:即 Beinhart-1000(美国)、净叶黄(中国)和香甜烟草(*N. suaveolens*);烟草感赤星病材料有 8 份。

1.2 SSR 引物

参试的 27 对 SSR 引物分为两部分:一部分是 Tong 等^[15]公布的 6 对与 3 个烟草赤星病抗性 QTL(基因)连锁的 SSR 引物(表 2 的前 6 对引物);另一部分是在参照 Tong 等^[16]所公布的烟草 24 条连锁群中的 21 条(除去 3 个 QTL 所在的连锁群)上分别随机选取 1 对 SSR 引物。SSR 引物序列由宝生物(大连)有限公司合成。

Taq Polymerase、dNTPs、100 bp DNA ladder marker 均购自宝生物(大连)有限公司;丙烯酰胺和甲叉丙烯酰胺购自 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。

表 1 供试材料的名称、抗性及来源

Table 1 The cultivar name, resistance and origin of materials

编号 Code	品种名称 Cultivar	抗性 Resistance	来源 Origin
1	净叶黄 Jingyehuang	抗赤星病,中感黑胫病和根结线虫病,感青枯病 Resistance; Tobacco Brown Spot; Middle Susceptible; Tobacco Black Shank and Root Knot Nematode; Susceptible; Tobacco Bacterial wilt	由长脖黄选育出的抗赤星病品种 The brown spot resistant cultivar from Changbohuang by systemic breeding
2	庆胜 2 号 Qingsheng No. 2	抗赤星病,中抗黑胫病和根结线虫病,感青枯病 Resistance; Tobacco Brown Spot; Middle Resistance; Tobacco Black Shank and Root Knot Nematode; Susceptible; Tobacco Bacterial wilt	由净叶黄中系统选育而成 The brown spot resistant cultivar from Jingyehuang by systemic breeding
3	千斤黄 Qianjinhuang	中抗赤星病和 TMV Middle Resistance; Tobacco Brown Spot and TMV	由净叶黄中选变异株培育而成 The mutant resistant brown spot cultivar from Jingyehuang by systemic breeding
4	襄颖 1 号 Xiangying No. 1	中抗赤星病和 TMV Middle Resistance; Tobacco Brown Spot and TMV	净叶黄×中卫 1 号 Jingyehuang×Zhongwei No. 1
5	单育 2 号 Danyu No. 2	抗赤星病,中抗 TMV,中感黑胫病,感青枯病 Resistance; Tobacco Brown spot; Middle Resistance; TMV; Middle Susceptible; Tobacco Black Shank; Susceptible; Tobacco Bacterial wilt	净叶黄×金星 6007 Jingyehuang×Jinxing 6007
6	中烟 15 Zhongyan 15	中抗赤星病和黑胫病,感青枯病和根结线虫病 Middle Resistance; Tobacco Brown Spot and Tobacco Black Shank; Susceptible; Tobacco Bacterial wilt and Root Knot Nematode	(净叶黄×金星 6007)×G28 (Jingyehuang×Jinxing 6007)×G28
7	中烟 86 Zhongyan 86	抗赤星病和黑胫病,中抗气候型斑点病,感青枯病 Resistance; Tobacco Brown Spot and Tobacco Black Shank; Middle Resistance; Climate Type Spot; Susceptible; Root Knot Nematode	G28×净叶黄 G28×Jingyehuang

续表 1 Continued Table 1

8	中烟 90 Zhongyan 90	耐赤星病和花叶病, 中抗黑胫病, 感根结线虫病和 PVYHigh Resistance; Tobacco Black Spot and TMV; Middle Resistance; Tobacco Black Shank; Susceptible; Root Knot Nematode and PVY	(单育 2 号×G28)×(G28×净叶黄) (Danyu No. 2×G28)×(G28×Jingyehuang)
9	许金 4 号 Xujin No. 4	中抗赤星病, 中感根结线虫病和 TMV, 感黑胫病 Middle Resistance; Tobacco Brown Spot; Middle Susceptible; Root Knot Nematode and TMV; Susceptible; Tobacco Black Shank	净叶黄×中卫 1 号 Jingyehuang×Zhongwei No. 1
10	许金 5 号 Xujin No. 5	中抗赤星病和根结线虫病, 中感黑胫病, 感青枯病 Middle Resistance; Tobacco Brown Spot and Root Knot Nematode; Middle Susceptible; Tobacco Black Shank; Susceptible; Tobacco Bacterial wilt	净叶黄×贝拉烟 Jingyehuang×Beilayan
11	许金 7 号 Xujin No. 7	抗赤星病和黑胫病, 中抗 TMV, 感青枯病 Resistance; Tobacco Brown Spot and Tobacco Black Shank; Middle Resistance; TMV; Susceptible; Tobacco Bacterial Wilt	净叶黄×中卫 1 号 Jingyehuang×Zhongwei No. 1
12	许金 8 号 Xujin No. 8	中抗赤星病和 TMVMiddle Resistance; Tobacco Brown Spot and TMV	(净叶黄×中卫 1 号)×净叶黄 (Jingyehuang×Zhongwei No. 1)×Jingyehuang
13	龙江 911 Longjiang 911	抗赤星病, 中抗黑胫病, 根结线虫病和 PVYMiddle Resistance; Tobacco Brown Spot; Middle Resistance; Tobacco Black Shank, Root Knot Nematode and PVY	龙江 851×CV91 Longjiang 851×CV91
14	潘圆黄 Panyuanhuang	中抗赤星病, 抗黑胫病, 中感南方根结线虫病和 TMVMiddle Resistance; Tobacco Brown Spot; Resistance; Tobacco Black Shank; Middle Susceptible; Southern Root Knot Nematode and TMV	由许金 2 号系统选育而成 The tobacco brown spot middle resistant cultivar from Xujin No. 2 by systemic breeding
15	金星 6007 Jinxing 6007	中抗赤星病、黑胫病、根结线虫病和气候型斑点病 Middle Resistance; Tobacco Brown Spot, Tobacco Black Shank, Root Knot Nematode and Climate Type Spot	从金星烟中系统选育而成 The tobacco brown spot middle resistant cultivar from Jinxing by systemic breeding
16	山东多叶 Shandongduoye	中抗赤星病, 中感黑胫病和 TMVMiddle Resistance; Tobacco Brown Spot; Middle Susceptible; Tobacco Black Shank and TMV	由特字 402 系统选育而成 The tobacco brown spot middle resistant cultivar from Special 402 by systemic breeding
17	塘蓬 Tangpeng	中抗赤星病和 TMV, 感黑胫病和青枯病, 高感从顶病 Middle Resistance; Tobacco Brown Spot and TMV; Susceptible; Tobacco Black Shank and Tobacco Bacterial Wilt; High Susceptible; Tobacco Bushy Top	地方品种 Native variety
18	9147	中抗赤星病 Middle Resistance; Tobacco Brown Spot	从 K326 的变异株中选育 The mutant resistant cultivar from K326
19	CV73	抗赤星病, 感黑胫病 Resistance; Tobacco Brown Spot; Susceptible; Tobacco Black Shank	CV58×(G-28×NC82)
20	CV78-4	中抗赤星病、TMV, 中感黑胫病 Middle Resistance; Tobacco Brown Spot and TMV; Middle Susceptible; Tobacco Black Shank	CV58×(G-28×NC82)F ₁
21	CV85	抗赤星病, 感黑胫病 Middle Resistance; Tobacco Brown Spot; Susceptible; Tobacco Black Shank	CV58×(G-28×NC82)
22	CV87	抗赤星病, 感黑胫病和 PVYResistance; Tobacco Brown Spot; Susceptible; Tobacco Black Shank and PVY	CV58×(G-28×NC82)
23	CV89	抗赤星病, 感黑胫病 Resistance; Tobacco Brown Spot; Susceptible; Tobacco Black Shank	CV58×(G-28×NC82)
24	Beinhart-1000	抗赤星病和黑胫病 Resistance; Tobacco Brown Spot and Tobacco Black Shank	源于美国 Originated from USA
25	<i>N. suaveolens</i>	抗赤星病、野火病、PVY、霜霉病、白粉病和 TMV Resistance; Tobacco Brown Spot, Tobacco Wild Fire, PVY, Downy Mildew, Powdery Mildew and TMV	源于澳大利亚东南部沿海地区 Originated from the coastal area of southeast Austrilia
26	长脖黄 Changbohuang	感赤星病、黑胫病、青枯病和根结线虫病 Susceptible; Tobacco Brown Spot, Tobacco Black Shank, Tobacco Bacterial Wilt and Root Knot Nematode	地方品种 Native variety
27	凤城黄金 Fengchenghuangjin	感赤星病、黑胫病, 中抗 TMV Susceptible; Tobacco Brown Spot and Tobacco Black Shank; Middle Resistance; TMV	地方品种 Native variety
28	G28	感赤星病和 PVY, 抗黑胫病、根结线虫病和青枯病 Susceptible; Tobacco Brown Spot and PVY; Resistance; Tobacco Black Shank, Root Knot Nematode and Tobacco Bacterial Wilt	(Corker139×Oxford1-181)×NC95
29	G140	感赤星病和根结线虫病, 中抗黑胫病和青枯病, Susceptible; Tobacco Brown Spot and Root Knot Nematode; Middle Resistance; Tobacco Black Shank and Tobacco Bacterial Wilt	Speight G-7×Speight G-3
30	NC82	感赤星病、青枯病、根结线虫病和病毒病, 抗黑胫病 Susceptible; Tobacco Brown Spot, Tobacco Bacterial Wilt, Root Knot Nematode and Virus disease; Resistance; Tobacco Black Shank	6129×Coker319
31	CV16-2	中感赤星病、黑胫病, 抗 TMV Middle Susceptible; Tobacco Brown Spot and Tobacco Black Shank; Resistance; TMV	不详 Unknown
32	Mary land609	感赤星病、青枯病、根结线虫病、TMV, 抗黑胫病 Susceptible; Tobacco Brown Spot, Tobacco Bacterial Wilt, Root Knot Nematode and TMV; Resistance; Tobacco Black Shank	MD Robinson×Florida301
33	Mary land872	感赤星病、青枯病和根结线虫病, 抗黑胫病和 TMV Susceptible; Tobacco Brown Spot, Tobacco Bacterial Wilt and Root Knot Nematode; Resistance; Tobacco Black Shank and TMV	MD609×Wilson

表 2 SSR 引物序列信息
Table 2 The information of the SSR primer pairs

引物 Primer	上游(5'→3') Forward sequence	下游(5'→3') Reverse sequence	退火温度 T _m /℃	基序 Motifs	产物长度 Product size/bp
TM10737	CTGTCCAATTGGTTTAGCAACA	CGCCAAACAAGCCATTAGTT	60	AT	172
TME0534	TTTGCCTGTGTATCGGTGTG	ACACACACAGGGAGGGAGAC	57	TC	193
TM10589	ATCCGTCCATGCACACAGTA	CTGAGTGAGAGGCTTCGTGA	60	CT	206
TM10216	TCTCCATCTCGTTCAGGTACATT	CACATATCTCCTCTTCCTGACCA	60	AAT	200
TM10443	CACACAACCCACACCAACAT	AACGTGCAACACGCATAGAC	60	TAG	218
PT60669	AAGGAAACATTTGATCGTACACA	CCATCAAATTCATAGTCTGACCTT	57	AT	211
TM10003	AGGGTCGGGTACCTCTGTTT	TTGTGAATTCTCGAGCTCATGT	57	TA	198
TM10026	TGGAGGTGTTTGGAGATGGT	CCAAGATCAAATCTCACCCATT	60	ATA	220
TM10030	ATTGCGTCGCTACAACAACA	AAGCAGCCCATGACATTCTC	62	AAT	213
TM10107	TGGGACCAGTTCTCTCAGCTA	ACTAACATACCGCCTGCTG	62	AT	198
TM10130	TGGAATCATCCTTTAGCTTGC	CACGCACACTCTCCCAAGT	57	TAT	201
TM10254	GGGAAGGGGTGTTTGTGCATA	GCATATGCGCTATTTTGAAGG	60	AC	189
TM10379	GGCGGCGAAGATGTATTTAG	TTTGTAGGGGTTTGGTGAAG	60	CT	192
TM10562	CGGATGACCTTTCCACTCTC	CACGCAAACACACACACAAC	60	CA	194
TM10710	AAGGCCAGTGTATCTGGGAGT	TCGATTAGCAGTCACCTCCTC	60	AC	200
TM10901	TGAGATTTACAGCACACACC	GTGCAACATTCTTCACATTGC	60	AT	260
TM11091	GTCAGAGGAAATCGGCCATA	GCCCAACTCTCAATCCCTTT	60	ACT	260
TM11359	CGAACGCTACGGTCAGATTT	CATATTTCCCTCCCGAGACC	60	CTT	259
TME0024	TCTGCTCCATCTTTTGACGA	GCATTGCTTCACTCCATCAA	60	AT	188
TME0605	GCAGACTCCCAATTCCAAAA	CCCCCTTTAGCCTCTGTTC	60	GAA	203
TME2075	TCTCCCAATCCAGAAGAGGA	GTATGGTAGGAGCCCCGTTT	60	AT	192
TME5137	CAAATGGAGGCTGAGGTGAG	CCTCCCCTGAAATGTTCAAT	60	TC	191
PT50227	AGCTCCGCCACTGACTATGT	CCAAGAAGTCAATGGGTGTCA	55	TA	200
PT53955	CCAAGCATGCAAGACAAGAA	TTGCCATAATATCTTTCAACCAA	55	CA	209
PT60405	GCTGAACCTTAGCATGAACAAGG	GGGTCCCTACAGAAATGCAA	57	CA	210
PT61393	TTTCTGCAAGTGCTCCTTCTT	CCAACAAGTATTCAGCGGT	57	GA	192
PT61573	AACATGGGAGGAACAATCAAA	TTAGTGGGCCAGTTGCTTTC	55	TA	188

1.3 SSR 反应

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 De Riek 等^[17]并作适当修改。

PCR 反应体系为 20 μL,其中 20~50 ng/μL DNA 样品 1.5 μL、10×PCR reaction Buffer(Mg²⁺ plus)2 μL、25 mmol/L dNTPs 1.5 μL、10 μmol/L 正反向引物各 1.5 μL、*rTaq* 0.75 U,最后用 ddH₂O 补足至 20 μL。PCR 扩增在 Eppendorf Master cycler pro S 上进行,反应程序为 94 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 变性 30 s,退火(退火温度随引物的不同而改变,表 2)30 s,30 个循环,72 ℃ 延伸 30 s,最后 72 ℃ 延伸 5~7 min,4 ℃ 保存。

PCR 扩增产物中加 1/6 体积的 6×Loading Buffer,然后取 2.0~2.5 μL 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(220 V,3 h),最后参照许绍斌

等^[18]的方法进行银染检测。

1.4 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 2 份材料间的遗传相似系数(GS)用 Nei 等^[19]的公式计算。利用 NTSYSpc Version 2.11 软件^[20]按照类平均法(UPGMA)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

利用分布在 24 个连锁群上共计 27 对 SSR 引物,对 33 份具有不同赤星病抗性的烟草种质资源进行 PCR 扩增,扩增产物的分子量均符合预期目标(100~300 bp)(图 1~3)。27 对 SSR 引物在 33 份烟草材料中共扩增出 159 个多态性条带(即在 27 个 SSR 位点上共检测到 159 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 5.89 个。其中,分布在 3 个连锁群上且与烟草赤星病抗性连锁的 6 对 SSR 引物在 33 份烟草材料中共扩增出 53 个多态性条带,每对 SSR 引物可检测的等位基因数为 4~11 个,平均为 8.83 个;分布在另外 21 条连锁群上的 21 对 SSR 引物在 33 份烟草材料中共扩增出 106 个多态性条带,每对 SSR 引物可检测的等位基因数为 2~9 个,平均为 5.05 个。表明 SSR 标记在检测烟草基因组遗传多态性上有十分显著的检出效率。

2.2 33 份具有不同赤星病抗性烟草种质的遗传相似性

基于 6 对与烟草赤星病抗性连锁的 SSR 标记分析结果,计算 33 份参试烟草材料间的遗传相似系

数(表 3),供试材料间的遗传相似系数在 0.09~1.00 之间,平均为 0.55。其中属于野生烟草的香甜烟草(*N. suaveolens*)与其他 32 份材料间的遗传相似系数最低,平均为 0.09;而具有净叶黄赤星病抗性的‘庆胜 2 号’、‘襄颖 1 号’和‘许金 7 号’之间及同属于 CV 系列且具有赤星病抗性的‘CV73’、‘CV85’、‘CV87’和‘CV89’间的遗传相似系数,达到 1.00。说明此 33 份具体不同赤星病抗性烟草材料的遗传相似性相对较低,变异范围较大,亲缘关系较远。

基于剩余 21 个连锁群上随机选取的 21 个 SSR 标记分析结果,计算 33 份参试烟草材料间的遗传相似系数(表 3),供试材料间的遗传相似系数在 0.04~1.00 之间,平均为 0.52。其中属于野生烟草的香

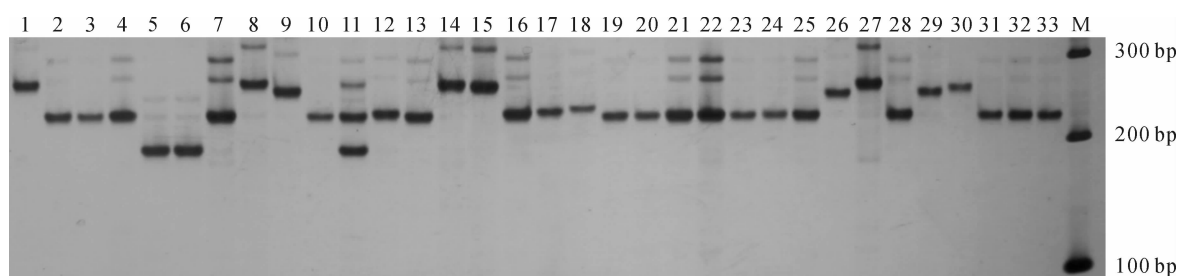


图 1 基于烟草赤星病抗性连锁标记 TM10589 的扩增结果

M. 100 bp DNA ladder; 1~33. 同表 1; 图 2、3 同

Fig. 1 Results of PCR amplification based on the tobacco brown spot resistant linked primer TM10589

M. 100 bp DNA ladder; 1~33. The same as Table 1; The same as below

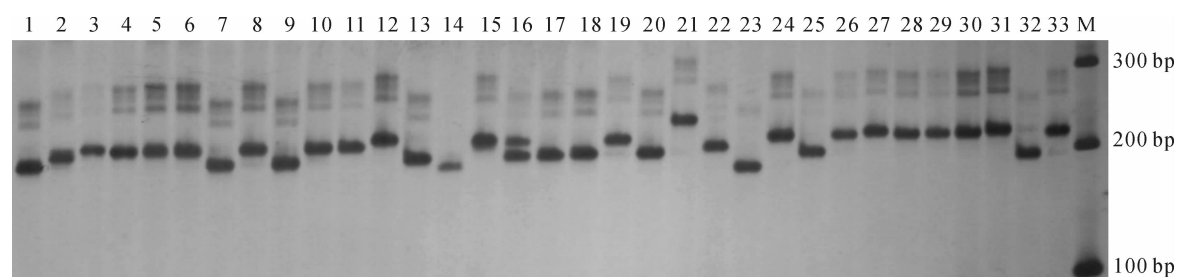


图 2 基于烟草赤星病抗性连锁标记 PT60669 的扩增结果

Fig. 2 Results of PCR amplification based on the tobacco brown spot resistant linked primer PT60669

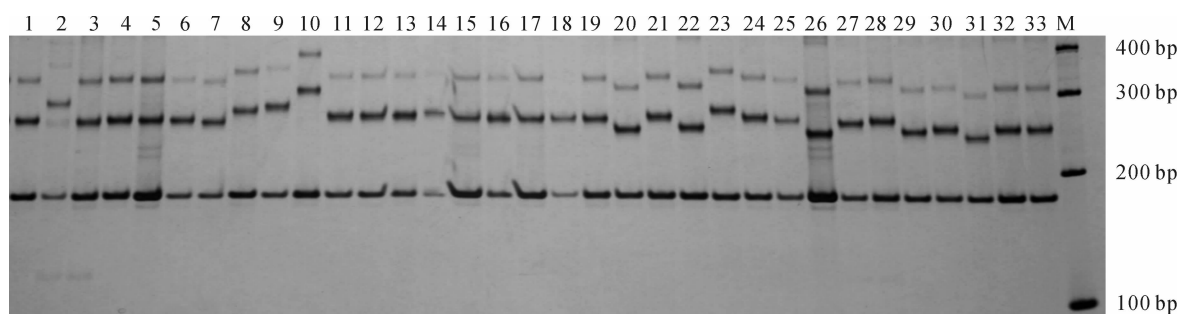


图 3 随机引物 TM11359 的扩增结果

Fig. 3 Results of PCR amplification by primer TM11359

表 3 33 份具有不同赤星病抗性的烟草材料间的遗传相似系数
Table 3 The genetic similarity coefficient in 33 tobacco cultivars with the different brown spot resistance

编号	Code	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	
1		0.88	0.75	0.88	0.88	0.60	0.75	0.30	0.75	0.65	0.88	0.88	0.48	0.61	0.48	0.61	0.30	0.31	0.30	0.61	0.30	0.30	0.30	0.30	0.48	0.13	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30	0.31	0.30	0.30	
2	0.83		0.75	1.00	0.88	0.61	0.75	0.31	0.75	0.61	1.00	0.88	0.47	0.61	0.47	0.63	0.28	0.32	0.29	0.61	0.29	0.29	0.29	0.29	0.45	0.09	0.38	0.39	0.52	0.51	0.51	0.50	0.43	0.43	
3	0.94	0.83		0.80	0.78	0.59	0.82	0.36	0.81	0.66	0.78	0.73	0.55	0.62	0.43	0.58	0.28	0.31	0.30	0.61	0.30	0.61	0.30	0.30	0.43	0.12	0.37	0.35	0.36	0.50	0.50	0.41	0.41	0.41	
4	0.81	0.79	0.51		0.88	0.61	0.75	0.31	0.75	0.61	1.00	0.88	0.47	0.61	0.47	0.63	0.28	0.32	0.29	0.61	0.29	0.61	0.29	0.29	0.45	0.09	0.38	0.39	0.52	0.51	0.51	0.50	0.43	0.43	
5	0.79	0.81	0.38	0.51		0.60	0.75	0.30	0.75	0.65	0.88	0.88	0.48	0.61	0.48	0.61	0.30	0.31	0.30	0.61	0.30	0.61	0.30	0.30	0.48	0.13	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30	0.31	0.30	0.30	
6	0.56	0.49	0.55	0.53	0.57		0.36	0.36	0.58	0.58	0.60	0.60	0.42	0.61	0.42	0.61	0.37	0.40	0.35	0.75	0.35	0.75	0.35	0.35	0.55	0.11	0.36	0.38	0.40	0.39	0.39	0.40	0.38	0.38	
7	0.82	0.82	0.51	0.72	0.50	0.55		0.38	0.88	0.63	0.75	0.81	0.58	0.62	0.55	0.59	0.41	0.38	0.50	0.58	0.50	0.58	0.50	0.50	0.57	0.17	0.40	0.41	0.43	0.43	0.30	0.43	0.41	0.41	
8	0.57	0.59	0.31	0.31	0.34	0.32	0.35		0.38	0.38	0.38	0.38	0.38	0.38	0.38	0.38	0.38	0.37	0.44	0.53	0.36	0.53	0.53	0.53	0.35	0.09	0.41	0.41	0.52	0.53	0.52	0.52	0.45	0.43	
9	0.84	0.81	0.75	0.78	0.50	0.50	0.33	0.63		0.75	0.81	0.58	0.62	0.55	0.59	0.41	0.38	0.50	0.58	0.50	0.58	0.50	0.50	0.50	0.57	0.17	0.40	0.41	0.43	0.43	0.30	0.43	0.41	0.41	
10	0.96	0.83	0.56	0.63	0.53	0.55	0.82	0.52	0.51		0.61	0.61	0.61	0.44	0.63	0.58	0.62	0.28	0.30	0.45	0.59	0.45	0.45	0.45	0.51	0.18	0.31	0.30	0.31	0.32	0.32	0.31	0.29	0.29	
11	0.83	0.81	0.75	0.65	0.48	0.51	0.51	0.33	0.83	0.51		0.88	0.47	0.61	0.47	0.63	0.28	0.32	0.29	0.61	0.29	0.29	0.29	0.45	0.09	0.38	0.39	0.52	0.51	0.51	0.50	0.43	0.43		
12	0.97	0.83	1.00	0.53	0.38	0.45	0.48	0.34	0.57	0.43	0.56		0.48	0.61	0.48	0.61	0.30	0.31	0.30	0.61	0.30	0.61	0.30	0.30	0.48	0.13	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30	0.31	0.30	0.30	
13	0.78	0.79	0.82	0.82	0.41	0.49	0.48	0.31	0.59	0.48	0.57	0.82		0.41	0.62	0.53	0.33	0.36	0.46	0.56	0.46	0.46	0.46	0.46	0.55	0.21	0.38	0.39	0.41	0.41	0.42	0.40	0.32	0.32	
14	0.64	0.69	0.57	0.61	0.38	0.43	0.47	0.31	0.66	0.48	0.68	0.57	0.61		0.60	0.75	0.35	0.35	0.40	0.62	0.40	0.62	0.40	0.40	0.40	0.59	0.27	0.34	0.30	0.35	0.28	0.29	0.38	0.33	0.33
15	0.39	0.81	0.49	0.49	0.82	0.60	0.55	0.31	0.45	0.48	0.43	0.49	0.49	0.39		0.75	0.35	0.35	0.40	0.62	0.40	0.62	0.40	0.40	0.40	0.72	0.27	0.34	0.30	0.35	0.28	0.29	0.38	0.33	0.33
16	0.33	0.31	0.30	0.32	0.33	0.45	0.31	0.33	0.32	0.32	0.31	0.30	0.30	0.32	0.29	0.33		0.35	0.35	0.40	0.62	0.40	0.40	0.40	0.40	0.72	0.27	0.34	0.30	0.35	0.28	0.29	0.38	0.33	0.33
17	0.27	0.30	0.28	0.32	0.28	0.45	0.29	0.28	0.29	0.31	0.27	0.28	0.32	0.28	0.28	0.28	0.28		0.40	0.50	0.36	0.50	0.50	0.50	0.50	0.36	0.30	0.41	0.41	0.43	0.43	0.43	0.43	0.41	0.41
18	0.96	0.83	0.56	0.38	0.58	0.55	0.82	0.29	0.48	1.00	0.45	0.56	0.56	0.38	0.39	0.58	0.29	0.28		0.61	0.36	0.61	0.61	0.61	0.61	0.39	0.15	0.40	0.42	0.44	0.43	0.43	0.44	0.36	0.36
19	0.31	0.83	0.83	0.56	0.52	0.51	0.56	0.32	0.53	0.42	0.55	0.83	0.56	0.40	0.52	0.28	0.28	0.42		0.36	1.00	1.00	1.00	1.00	0.52	0.09	0.41	0.41	0.42	0.42	0.41	0.41	0.40	0.40	
20	0.83	0.83	0.68	0.49	0.68	0.67	0.55	0.32	0.52	0.52	0.52	0.68	0.49	0.41	0.68	0.29	0.28	0.38	0.56	0.42		0.35	0.35	0.35	0.55	0.11	0.36	0.38	0.40	0.39	0.39	0.40	0.38	0.38	
21	0.31	0.55	0.55	0.57	0.45	0.49	0.39	0.28	0.55	0.38	0.55	0.55	0.57	0.50	0.45	0.28	0.28	0.38	0.56	0.42		1.00	1.00	1.00	0.52	0.09	0.41	0.41	0.42	0.42	0.41	0.41	0.40	0.40	
22	0.36	0.51	0.76	0.57	0.45	0.50	0.42	0.30	0.53	0.39	0.53	0.76	0.57	0.52	0.45	0.29	0.28	0.39	0.56	0.42	0.57		1.00	1.00	0.52	0.09	0.41	0.41	0.42	0.42	0.41	0.41	0.40	0.40	
23	0.32	0.83	0.83	0.56	0.52	0.51	0.56	0.32	0.53	0.42	0.53	0.83	0.56	0.40	0.52	0.29	0.29	0.42	1.00	0.45	0.57	0.83	0.52	0.53	0.53	0.22	0.38	0.39	0.42	0.41	0.41	0.42	0.38	0.38	
24	0.32	0.72	0.51	0.59	0.46	0.42	0.39	0.28	0.61	0.46	0.61	0.51	0.59	0.39	0.46	0.29	0.29	0.46	0.53	0.43	0.52	0.53	0.53	0.53	0.22	0.38	0.39	0.42	0.41	0.41	0.42	0.38	0.38		
25	0.04	0.09	0.04	0.17	0.13	0.14	0.18	0.13	0.20	0.11	0.20	0.04	0.17	0.19	0.13	0.04	0.06	0.11	0.18	0.19	0.21	0.17	0.17	0.18	0.08	0.25	0.21	0.16	0.13	0.13	0.16	0.10	0.09		
26	0.68	0.83	0.68	0.49	0.68	0.67	0.55	0.32	0.52	0.52	0.52	0.68	0.49	0.41	0.68	0.29	0.28	0.52	0.40	1.00	0.38	0.36	0.36	0.40	0.42	0.04	0.59	0.69	0.60	0.61	0.72	0.58	0.58		
27	0.51	0.74	0.36	0.36	0.79	0.53	0.53	0.31	0.47	0.53	0.47	0.36	0.36	0.38	0.38	0.79	0.28	0.28	0.53	0.39	0.70	0.37	0.35	0.39	0.42	0.10	0.70	0.60	0.81	0.81	0.82	0.69	0.69		
28	0.56	0.80	0.38	0.41	0.71	0.58	0.54	0.30	0.48	0.49	0.48	0.38	0.41	0.27	0.71	0.27	0.28	0.49	0.41	0.82	0.38	0.33	0.33	0.41	0.43	0.08	0.82	0.70	0.82	0.82	0.86	0.71	0.73		
29	1.00	0.83	0.31	0.30	0.30	0.34	0.35	0.60	0.31	0.33	0.31	0.31	0.30	0.31	0.30	0.33	0.28	0.33	0.30	0.30	0.32	0.30	0.30	0.30	0.29	0.08	0.30	0.29	0.32	0.32	0.32	0.59	0.63	0.63	
30	0.65	0.83	0.68	0.49	0.68	0.67	0.55	0.32	0.52	0.52	0.52	0.68	0.49	0.41	0.68	0.30	0.28	0.52	0.41	1.00	0.38	0.41	0.41	0.41	0.43	0.14	1.00	0.71	0.83	0.65	0.58	0.62	0.62		
31	0.19	0.21	0.21	0.28	0.25	0.21	0.21	0.20	0.21	0.20	0.21	0.21	0.28	0.21	0.28	0.21	0.25	0.20	0.27	0.20	0.21	0.20	0.21	0.23	0.21	0.20	0.04	0.20	0.21	0.19	0.20	0.58	0.58		
32	0.28	0.26	0.28	0.35	0.21	0.36	0.33	0.27	0.28	0.27	0.28	0.28	0.35	0.19	0.21	0.28	0.33	0.27	0.29	0.28	0.22	0.30	0.29	0.29	0.29	0.05	0.28	0.28	0.28	0.28	0.28	0.21	0.88		
33	0.28	0.27	0.28	0.33	0.23	0.36	0.34	0.24	0.26	0.26	0.26	0.28	0.33	0.21	0.23	0.28	0.33	0.26	0.29	0.28	0.22	0.30	0.29	0.29	0.29	0.04	0.28	0.28	0.28	0.28	0.21	0.83			

注:右上为与赤星病抗性连锁的 SSR 标记的遗传相似性系数;左下为随机选取的 SSR 标记的遗传相似性系数;编号 1~33 分别同表 1。
Note: Upper triangle: the results of brown spot resistant linked SSR markers; lower triangle: the results of random SSR markers; The accessions of 1~33 represents as Table 1.

甜烟草(*N. suaveolens*)与其他 32 份材料间的遗传相似系数最低,平均为 0.04,这与基于 6 对连锁标记分析的结果一致;而‘长脖黄’、‘NC82’和‘CV78-4’,‘许金 5 号’和‘9147’,‘许金 8 号’和‘千金黄’,‘CV73’和‘CV89’及‘净叶黄’和‘G140’之间的遗传相似系数达到 1.00。同样也说明此 33 份烟草材料的遗传相似性相对较低,变异范围较大,亲缘关系较远。

上述结果表明,供试的 33 份烟草品种间存在着较丰富的变异,遗传基础相对比较宽,遗传差异性较显著。

2.3 具有不同赤星病抗性的烟草品种的聚类分析

根据遗传相似性系数矩阵按 UPGMA 方法构建 33 份具有不同赤星病抗性烟草种质的聚类图(图 4)。基于赤星病抗性连锁的 SSR 标记聚类结果显示:在遗传相似系数为 0.44 的水平上,可以明显地将 33 份烟草材料划分为 4 个类群,即,属于野生烟草的香甜烟草(*N. suaveolens*)单独成一类(Ⅳ类),与香甜烟草具有独特的赤星病抗性一致;‘净叶黄’

的衍生品种大都与‘净叶黄’聚在一个类群(Ⅰ类),此类群中除‘龙江 911’和‘Beinhart-1000’外共有 15 份具有‘净叶黄’来源的赤星病抗性;CV 系列与 9147 及‘中烟 90’聚为一类(Ⅱ类);剩余的‘G140’、‘G28’和‘长脖黄’等聚为一类(Ⅲ类),此类群中除地方品种‘塘蓬’中抗烟草赤星病外,其余 8 份材料与‘长脖黄’一样属于高感烟草赤星病的材料(图 4, a)。该聚类结果说明,利用与烟草赤星病抗性连锁的 SSR 标记可以很好地将赤星病感病品种与抗性品种区分开,同时也能很好地将抗病品种中 3 个不同烟草赤星病抗源区分开,‘Beinhart-1000’和 CV 系列品种(美国),‘净叶黄’(中国)和香甜烟草。利用其余 21 条连锁群上随机选取的 21 对 SSR 标记对此 33 份烟草材料的聚类结果则显示:在遗传相似系数为 0.19 的水平上,可以明显将 33 个品种划分为两大类群,即,野生烟草类群(Ⅱ类)与栽培烟草类群(Ⅰ类)。因此,利用随机选取的 SSR 标记的聚类结果则看不出与烟草赤星病抗性的关系(图 4, b)。

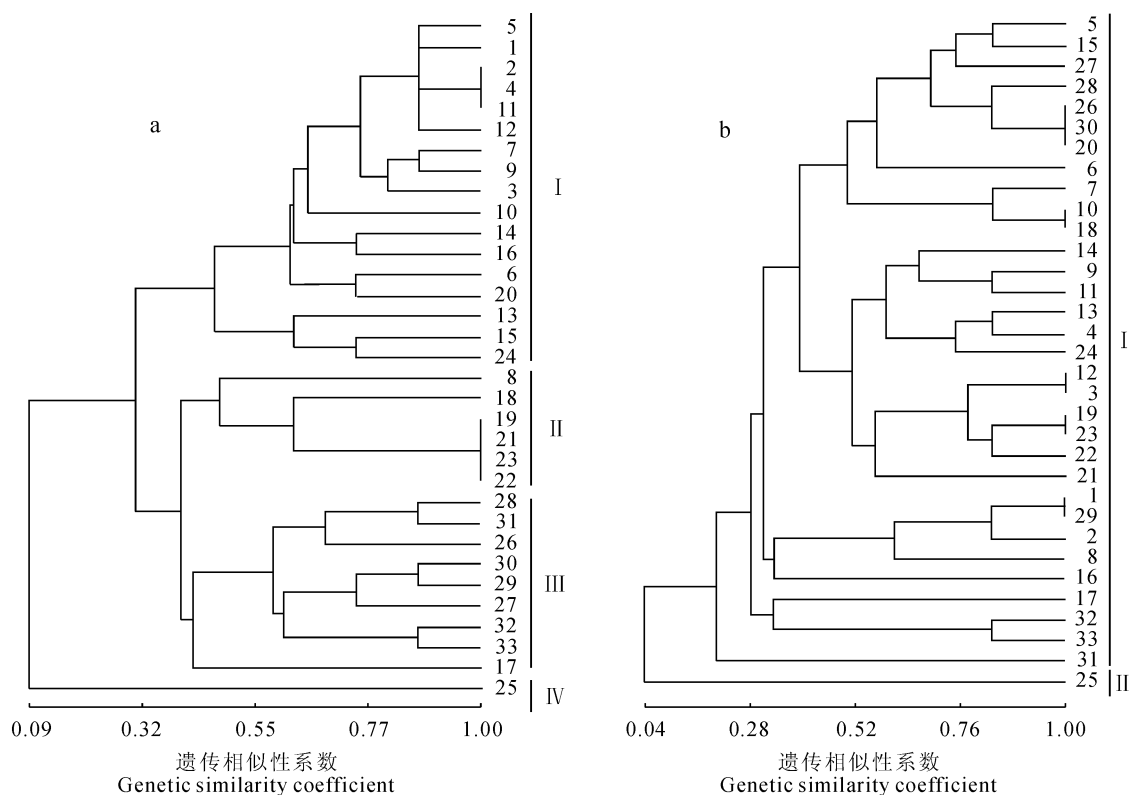


图 4 33 份烟草品种聚类图

a. 基于与赤星病抗性连锁的 SSR 标记的聚类图; b. 基于随机选取的 SSR 标记的聚类图; 33 份材料编号同表 1

Fig. 4 Dendrogram derived from UPGMA cluster analysis based on SSR analysis of 33 tobacco cultivars

a. The dendrogram derived from the brown spot resistant linked SSR markers; b. The dendrogram derived from the random SSR primers; The 33 varieties codes were as the same as the Table 1

3 讨 论

3.1 基于抗性连锁的 SSR 标记在烟草种质资源研究中的应用

利用 SSR 标记对烟草种质资源遗传多样性的研究报道较少。直到 2007 年, Bindler 等^[21]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。随后, Moon 等^[22-24]利用 Bindler 等^[21]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。而利用与抗性连锁的 SSR 标记对烟草种质资源进行聚类分析的研究, 迄今尚未见报道。Julio 等^[9]利用与烟草霜霉病、PVY 和根黑腐病抗性连锁的 AFLP 标记对 92 份烟草材料进行了聚类分析, 11 个 AFLP 组合共获得 524 个扩增片段, 其中 33 个片段(约 6.3%)为多态性片段。此 33 个多态性片段能较好地将分别具有烟草霜霉病、PVY 和根黑腐病抗源的烟草材料划分开, 并成功地将其中与抗烟草 PVY 连锁的 AFLP 扩增片段转化成 SCAR 标记。本研究中, 分别利用与烟草赤星病抗性连锁的 6 个 SSR 标记和随机选取的 21 个 SSR 标记, 在 33 份烟草材料中分别扩增出 53 和 106 个多态性条带, 每对 SSR 引物可检测的等位基因数分别为 4~11 和 2~9 个, 平均为 8.83 和 5.05 个。相较于随机挑选的 21 对 SSR 引物, 与烟草赤星病抗性连锁的 6 个标记在检测 33 份具有不同赤星病抗性的烟草种质资源遗传多态性上具有更高的效率。

3.2 基于赤星病抗性连锁标记的烟草品种聚类分析

基于分子标记进行烟草种质资源聚类的相关报道已有很多, 但已有研究仅仅是针对烟草材料进行选择, 如烟草核心种质资源聚类分析^[3,5-6,11]、栽培种

聚类分析^[7]、晾晒烟聚类分析^[14]、烤烟品种聚类分析^[4,10,12]等, 均未针对烟草特定性状进行。本研究利用 Tong 等^[15]已报道的烟草赤星病抗性 QTL 分析获得 3 个 QTL 两侧的 6 个 SSR 标记对长脖黄、净叶黄、净叶黄衍生系、感赤星病品种和不同赤星病抗源的 33 个烟草品种进行聚类分析, 得到了基于赤星病抗性连锁标记的聚类图, 其结果显示: 利用与烟草赤星病抗性 QTL 连锁的 SSR 标记不仅可将烟草赤星病抗、感品种区分开, 而且还能有效地将具有不同赤星病抗源的品种划分开。感赤星病的烟草品种虽然遗传背景有很大差异, 但基于赤星病抗性基因连锁标记的分析, 其差异度大大降低, 故将此类聚在一起(Ⅲ类); 具有净叶黄(国内)和 Beinhart-1000(美国)抗源的烟草品种聚为一类(Ⅰ类); 具有不明抗源的 CV 系列烟草品种(田间的赤星病表型通常为中抗)聚为一类(Ⅱ类); 明显不同于上述栽培烟草抗源的香甜烟草单独聚为一类(Ⅳ类)。而用随机选取的 SSR 标记的聚类结果则看不出与烟草赤星病抗性的关系。究其原因, 可能为: 当利用与抗性 QTL 连锁的标记进行聚类分析时, 针对的是特定的染色体区域, 聚类结果主要取决于参试材料是否抗病及抗病基因的来源, 故感病品种聚在一类, 而不同的抗源聚在不同的类别; 当利用随机的 SSR 标记进行聚类分析时, 并未针对特定的染色体区域, 聚类结果主要取决于参试材料全基因组水平上的遗传差异, 故 32 份普通烟草品种聚为一类, 香甜烟草属于不同烟草种、单独聚为一类。这一结果间接反映了已报道的烟草赤星病 QTL 定位的准确性, 也为下一步开展烟草抗赤星病的分子标记辅助育种工作奠定了基础。

基于赤星病抗性连锁的 SSR 标记不仅可将烟草赤星病抗、感品种区分开, 而且还能有效地将具有不同赤星病抗源的烟草品种划分开。

参考文献:

- [1] DEBORAH R, FRAVEL H W, *et al.* Biocontrol of tobacco brown-spot disease by *Bacillus cereus* subsp. *miscodes* in a controlled environment[J]. *Phytopathology*, 1977, **13**(5): 930—932.
- [2] 佟道儒, 卜锅章, 王元英, 等. 烟草育种学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1997: 6—8.
- [3] WANG Y Y(王元英), ZHOU J(周 健). Genetic analysis of the main tobacco cultivars and the tobacco breeding in USA and China[J]. *Acta Tabacaria Sinica* (中国烟草学报), 1995, **2**(3): 11—22 (in Chinese).
- [4] XIAO B G(肖炳光), LU J P(卢江平), LU X P(卢秀萍), *et al.* Genetic analysis of the fire-cured tobacco by RAPD marker[J]. *Acta Tabacaria Sinica* (中国烟草学报), 2000, **6**(2): 10—15 (in Chinese).
- [5] DEK P L, ABET M, SORRENTINO C, *et al.* Genetic variability in *Nicotiana tabacum* and *Nicotiana* species as revealed by RAPD proce-

- ture[J]. *Beiträge zur Tabakforschung International*, 2000, **19**(2): 1—15.
- [6] ARSLANL B, OKUMUS A. Genetic and heographic polymorphism of cultivated tobaccos (*Nicotiana tabacum* L.) in turkey[J]. *Russ J. Genet*, 2006, **42**(6): 667—671.
- [7] WANG R X(王日新), REN M(任 民), JIA X H(贾兴华), *et al.* Study on the main cultivated tobaccos by SRAP marker[J]. *Biotechnology Bulletin*(生物技术通报), 2009, **9**(6): 100—104(in Chinese).
- [8] 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.
- [9] JULIO E, VERRIER J L, DORLHAC DE B F. Development of SCAR markers linked to three disease resistances based on AFLP within *Nicotiana tabacum* L. [J]. *Theor. Appl. Genet.*, 2006, **112**: 335—346.
- [10] YANG B CH(杨本超), XIAO B G(肖炳光), CHEN X J(陈学军), *et al.* Study on the genetic diversity of flue-cured tobacco based on IS-SR marker[J]. *Hereditas*(遗传), 2005, **27**(5): 753—758(in Chinese).
- [11] XIAO B G(肖炳光), YANG B CH(杨本超), SHI CH H(石春海), *et al.* The genetic diversity analysis of tobacco germplasms by ISSR marker[J]. *Scientia Agricultura Sinica*(中国农业科学), 2007, **40**(10): 2 153—2 161(in Chinese).
- [12] QI J M(祁建民), WANG T(王 涛), CHEN SH H(陈顺辉), *et al.* Genetic diversity and relationship of partial tobacco by ISSR marker [J]. *Acta Agronomica Sinica*(作物学报), 2006, **32**(3): 373—378(in Chinese).
- [13] YANG Y C(杨友才), ZHOU Q M(周清明), YIN H Q(尹哈琪). Genetic analysis of the tobacco germplasms by RAPD and AFLP marker[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*(农业生物技术学报), 2006, **12**(14): 585—593(in Chinese).
- [14] ROSSI L, BINDLER G, PIJNENBURG H, *et al.* Potential of molecular marker analysis for variety identification in processed tobacco[J]. *Plant Var Seeds*, 2001, **14**: 89—101.
- [15] TONG Z J, JIAO T L, WANG F Q, *et al.* Mapping of quantitative trait loci conferring tesistance to brown spot in flue-cured tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) [J]. *Plant Breeding*, 2012, **131**: 335—339.
- [16] TONG Z J, YANG Z M, CHEN X J, *et al.* Large-scale development of microsatellite markers in *Nicotiana tabacum* and construction of a genetic map of flue-cured tobacco[J]. *Plant Breeding*, 2012, **131**: 674—680.
- [17] DE RIEK J E, CALSYN I, EVERAERT E, *et al.* AFLP based alternatives for the assessment of distinctness, uniformity and stability of sugar beet varieties[J]. *Theor. Appl. Genet*, 2001, **103**: 1 254—1 265.
- [18] XU SH B(许绍斌), TAO Y F(陶玉芬), YANG ZH Q(杨昭庆), *et al.* A simple and rapid method to silver staining[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*(农业生物技术学报), 2007, **16**(12): 183—187.
- [19] NEI M, LI W H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases[J]. *Pnas*, 1979, **76**: 5 269—5 273.
- [20] ROHLF F J. NTSYSpc numerical taxonomy and multivariate analysis system (Version2.0) [M]. New York: Applied Biostatistics Inc. , 1998.
- [21] BINDLER G, VAN DER HOEVEN R, GUNDUZ I, *et al.* A Microsatellite marker based linkage map of tobacco[J]. *Theor. Appl. Genet.*, 2007, **114**: 341—349.
- [22] 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**: 547—559.
- [23] MOON H S, NICHOLSON J S, HEINEMAN A, *et al.* Changes in genetics diversity of U. S. flue-cured tobacco germplasm over seven decades of cultivar development[J]. *Crop Sci.*, 2009, **49**: 498—506.
- [24] MOON H S, NIFONG J M, NICHOLSON J S, *et al.* Microsatellite-based analysis of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) genetic resources [J]. *Crop Sci.*, 2009b, **49**: 2 149—2 159.