

烤烟品种资源的 RAPD 分析

何川生^{1,2} 何兴金³ 葛 颂⁴ 李天飞² 许凌云¹ 许美玲² 许介眉¹

(1. 四川大学生命科学学院, 成都 610064; 2. 中国烟草育种研究南方中心, 玉溪 653100; 3. 四川师范学院生物系, 南充 637002; 4. 中国科学院植物研究所系统与进化植物学开放研究实验室, 北京 100093)

摘要: 从 156 个随机引物中筛选出 30 个引物, 对来自国内外的 31 个烤烟品种进行了遗传多样性和亲缘关系的 RAPD 分析。在检测的 246 个位点中, 127 个位点为多态位点 (52%)。聚类分析表明, 不同烤烟品种之间存在明显差异, 31 个品种基本上可分为 4 大类, 品种最多的第一大类 (19 个) 主要由来自美国的 Orinoco 烤烟选育而成, 反映了我国现在推广的烤烟品种遗传基础比较狭窄。研究结果表明, RAPD 技术可用于烤烟品种的鉴别和纯度测定。研究为烤烟杂种育种中亲本的选配提供了一定的理论依据。

关键词: 烤烟; 品种资源; RAPD 分析

中图分类号: Q346+.5 文献标识码: A 文章编号: 0577-7496(2001)06-0610-05

Analysis of Germplasm of Flue-cured Tobacco by RAPD

HE Chuan-Sheng^{1,2}, HE Xing-Jin³, GE Song⁴, LI Tian-Fei¹, XU Ling-Yun¹, XU Mei-Ling², XU Jie-Mei¹

(1. College of Life Science, Sichuan University, Chengdu 610064, China;

2. China Tobacco Breeding Research Southern Center, Yuxi 653100, China;

3. Department of Biology, Sichuan Teachers College, Nanchong 637002, China;

4. Laboratory of Systematic and Evolutionary Botany, Institute of Botany, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China)

Abstract: Based on 30 primers selected from 156 random primers, RAPD polymorphism of 31 flue-cured tobacco cultivars from native and abroad, and their relationships were detected. Of 246 bands amplified, 127 were polymorphic (52%). The results showed that there were obvious differentiation between different cultivars. Cluster analysis indicated that all of the cultivars could be grouped into four clades, and the largest one (including 19 cultivars) was most likely to originate from Orinoco cultivar which was introduced from USA. This implied that the genetic basis of popularized flue-cured tobacco cultivars in China is rather narrow. In addition, it is feasible to identify the flue-cured tobacco cultivars and their purity with the RAPD technique. The study is also valuable in the choice of parents for the development of the flue-cured tobacco cultivars from hybrids.

Key words: flue-cured tobacco; germplasm; RAPD analysis

我国的烟草育种始于 30 年代中期, 育种目标经历了从优质到抗病、高产, 再到优质、抗病、适产的发展过程^[1]。60 年代通过 Mammoth Gold、DB101、Virginia Bright Leaf、Special400 及小黄金采用系统选育方式选育出“抵选 5 号”、“北流一号”、“金星 6007”等品种。70 年代开始注重抗病品种选育, 育成“广黄五十五号”、“辽烟十三号”、“红花大金元”、“春雷三号”、“庆胜二号”等 40 余个品种。自 80 年代初利用美国引进的优质多抗品种作亲本, 先后育成“中烟 14”、“辽烟十二号”、“中烟 86”、“中烟 90”、“云烟 85”等兼抗两种以上病害的品种。世界主产烟国家的烟草育种基本是在美国早期育成品种的基础上发展起来的, 各国的主栽品种或多或少地有美国品种的亲缘成分^[1]。近年来, 由于烤烟育种使用

的主体亲本日益集中, 导致烤烟育种所用种质的遗传基础日益狭窄, 阻碍了烟草产量和质量的进一步提高。RAPD 标记是建立在 DNA 水平上的分子标记, 由于其操作相对简单、获得结果快速且不受试验材料所处的发育时期、取样部位和环境条件的影响, 已被广泛用于遗传多样性检测、品种鉴定和亲缘关系的研究^[2]。目前已在苜蓿、豆类、番茄、水稻、玉米等多种植物中得到广泛应用^[3-8]。为了解我国烤烟品种的演化及变异程度, 从而为培育适合我国广大地区种植的优质、抗病烤烟新品种提供理论指导, 我们从多年来收集的 400 余份烤烟品种资源中, 应用计算机系统对其 14 个性状进行了聚类分析^[9]。在此基础上, 本研究从各品种群和亚群中筛选出 2~3 个代表品种, 共得到烤烟品种 31

个利用 RAPD 手段从分子水平上研究了我国烤烟品种的遗传变异和亲缘关系,为今后的烤烟品种的遗传育种、品种类型及纯度的鉴定提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料

供试的 31 个烤烟品种分别由中国烟草育种研究南方中心及原育种单位(中国农业科学院烟草研究所)提供,其品种名称、系谱、来源见表 1。供提取总 DNA 的试材均采自幼叶,每克鲜叶用 10 g 硅胶迅速干燥并置于低温处保存。

PCR 扩增所用引物为加拿大 Sangon 公司生产的十聚体核苷酸;dNTP、*Taq* DNA 聚合酶购自美国 MBI 公司,琼脂糖西班牙进口。

1.2 方法

1.2.1 烤烟总 DNA 提取 供试总 DNA 提取采用 CTAB 法^[9]并作改进^[10]。对供试的 31 个烤烟品种每个品种取 5 个单株,每个单株取样 1 份,分别提取总 DNA。去 RNA 后用 24:1 的氯仿-异戊醇抽提一次,最后溶于 0.1×TE 中。经调整浓度后用于 PCR 扩增。

1.2.2 PCR 扩增 扩增反应在 GeneAmp PCR System 9600 (Perkin Elmer)上进行。20 μL 的 PCR 反应体系中包含 10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 50 mmol/L KCl, 0.1% Triton X-100, 40 mmol/L MgCl₂, 3 mmol/L dNTP, 1.0 μmol/L 引物,1 U *Taq* 酶,4 ng 模板 DNA;反应程序为先在 94 °C 下变性 6 min, 然后进行 40 个循环(每个循环包括 94 °C 下变性 1 min、36 °C 下退火 1 min、72 °C 下延伸 2 min), 循环结束后 72 °C 下延伸 6 min。扩增产物加 2 μL 的上样缓冲液(40%蔗糖,0.25%溴酚蓝),在 1.5%的琼脂糖凝胶(5 V/cm)中电泳,0.5 μg/mL 溴化乙锭中染色,在紫外灯下观测结果,并用 Polaroid 667 型数码相机照相,并记录电泳结果。

1.2.3 数据分析 对 31 个烤烟品种的 155 个 DNA 样品中扩增的电泳带总数与多态性带的数目进行统计。每个样品的扩增条带按有(1)或无(0)记录。每条扩增带以所用引物及片段大小命名,如 S1-500 表示引物 S1 扩增出的长度为 500 bp 的扩增带,其近似分子量用 PCR Marker 粗略推算出。每次实验均重复 2 次,对于多态位点,仅在重复试验中能稳定出现

表 1 用于 RAPD 分析的烤烟品种

Table 1 Flue-cured tobacco cultivars used in RAPD analysis

No.	Cultivar	Pedigree	Origin
1	Hicks	From White Stem Orinoco	USA
2	金星 6007Jingxing 6007	From Jingxing	Henan, China
3	NC95	(Coker 139 × Bell4-30) × (Coker 139 × Hicks)	USA
4	8813	Unknown	Sichuan, China
5	Coker 371 Gold	((G-28 × 354) × (CB139 × F-105)) × (G-28 × 354))	USA
6	保山团叶烟 Baoshantuanyeyan	Unknown	Yunnan, China
7	8602-123	Jingyehuang × Va115	Heilongjiang, China
8	Dawoshunye	Unknown	Yunnan, China
9	Nc2326	9120 × Hicks	USA
10	RG11	NC50 × K399	USA
11	NC82	6129 × Coker 319	USA
12	Special 400	From Orinoco	USA
13	寸茎烟 Cunjingyan	From Gold Dollar	Yunnan, China
14	辽烟 15 Liaoyan 15	MS G-28 × 8022-1	Liaoning, China
15	Coker139	(Golden × Golden Wilt) × (D101 Oxford1-181)	USA
16	净叶黄 Jinyehuang	From Changbohuang	Henan, China
17	V2	Unknown	USA
18	C151	Unknown	Guangdong, China
19	AK6	Unknown	Guangdong, China
20	临胸一号 LinqiYihao	From Xiaohuangjin	Shandong, China
21	云烟 85 Yunyan 85	Yunyan 2 × K326	Yunnan, China
22	永定 1 Yongding 1	From Tezhi 401	Fujian, China
23	云烟 2 Yunyan 2	Honghuadajingyuan × SpeightG-28	Yunnan, China
24	K326	McNair 225 (McNair 30 × Nc95)	USA
25	中烟 90 Zhongyan 90	(Danyu 2 × G-28) × (G-28 × Jinyehuang)	Shandong, China
26	Coker 319	Coker 139 × Hicks	USA
27	红花大金元 Honghuadajingyuan	Unknown	Yunnan, China
28	NCTG55	K326 × Coker 371-Gold	USA
29	云烟 317 Yunyan 317	Yunyan 4 × K326	Yunnan, China
30	K358	McN926 × 80241	USA
31	G-28	(Oxford1-181 × Coker 139) × Nc95	USA

的差异带用于数据分析。应用计算机软件 (PHYLIP3.5c 软件包中的 UPGMA)^[11],对原始数据极差标准化,通过类平均法,进行欧氏距离聚类。根据 Nei^[12]的方法计算样品间的简单遗传相似系数 $F = 2 \times m_{xy} / (m_x + m_y)$ 其中: m_x 、 m_y 为两个品种各自的总扩增条带数; m_{xy} 为两个品种共有的扩增条带数。

2 结果和讨论

2.1 31 个烤烟品种的多态性分析

首先用 156 个寡核苷酸引物分别扩增 2 个烤烟品种样品,得到 39 个具有多态性并且扩增效果较好的引物。再从中筛选出 30 个引物对供试的 31 个烤烟品种 155 份材料进行扩增。30 个引物扩增出了 246 条带(表 2)。每个引物扩增条带为 4~12 条,平均为 8 条,其中品种间具有多态性的扩增带有 127 条,占总扩增带数的 52%,每一引物检测的 RAPD 多

态性的平均数是 4.2。由此可见,烤烟由于是自花授粉作物,与异花授粉作物相比异质性程度不高^[3-7,13]。利用不同引物均可从分子水平上检测出烤烟品种的遗传差异。因此,利用 RAPD 技术能从基因组水平上检测到不同烤烟栽培品种之间的差异,表明 RAPD 标记是进行烤烟品种分类研究的一种较为理想的方法。

2.2 RAPD 技术在烤烟品种鉴定和纯度分析上应用的可行性

RAPD 是利用一系列引物对整个基因组 DNA 进行多态性检测,检测区域几乎可以覆盖整个基因组,可以检测出不同品种间的微小差异。本研究结果表明,烤烟品种间的遗传多态性有明显差异,即使父母本亲缘关系很近的品种,也能分开。如“云烟 85”是用“云烟 2 号”和“K326”杂交选育而成,它们的亲缘关系很近,利用 RAPD 技术很容易分开(图 1)。由于

表 2 不同引物扩增 31 个烤烟品种 DNA 片段数

Table 2 DNA fragments amplified with different primers in 31 flue-cured tobacco cultivars

Primer	Sequence 5'→3'	No. of amplified bands (No. polymorphic)	Primer	Sequence 5'→3'	No. of amplified bands (No. polymorphic)
S1	GTTTCGCTCC	5(4)	S30	GTGATCGCAG	4(3)
S4	GGACTGGAGT	7(3)	S31	CAATCGCCGT	7(5)
S5	TGCCCCCTTC	6(3)	S34	TCTGTGCTGG	7(4)
S7	GGTGACGCAG	9(5)	S38	AGGTGACCGT	9(7)
S12	CCITGACGCA	6(1)	S44	TCTGGTGAGG	12(8)
S18	CCACAGCAGT	10(5)	S51	AGCCCCATTG	9(5)
S21	CAGGCCCTTC	10(5)	S53	GGGGTGACGA	6(2)
S22	TGCCGAGCTG	5(3)	S56	AGGGCGTAAG	10(9)
S23	AGTCAGCCAC	7(3)	S79	GTTGCCAGCC	6(3)
S24	AATCGGGCTG	9(5)	S142	GGTGCGGGAA	6(3)
S25	AGGGGTCTTG	10(4)	S160	AACGGTGACC	10(3)
S26	GGTCCCTGAG	10(5)	S265	GCCGGATAAG	8(4)
S27	GAAACGGGTG	9(5)	S290	CAAACGTGGG	12(5)
S28	CTGACGTAGG	8(4)	S301	CTGGGCACGA	8(3)
S29	GGGTAACGCC	11(5)	S323	CAGCACCGCA	10(3)

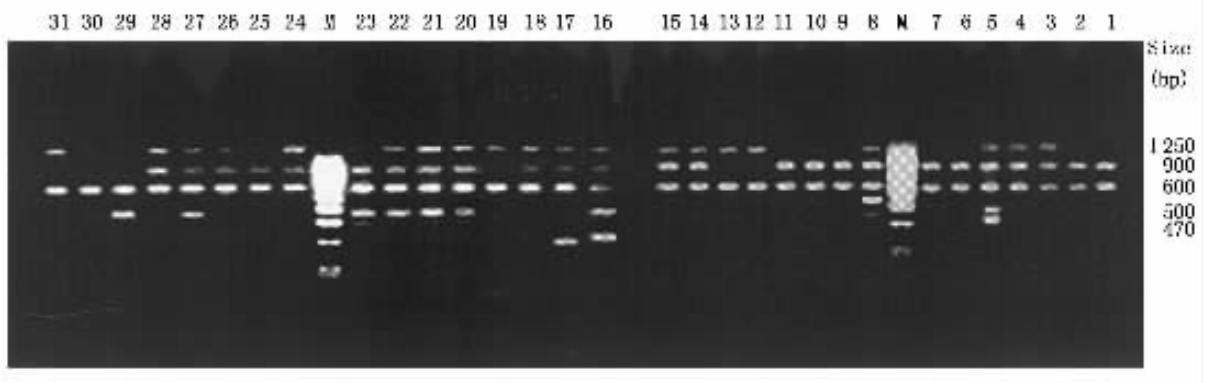


图 1. 引物 S21 对烤烟不同品种的扩增结果(不同品种显示不同带型)。

Fig. 1. RAPD polymorphism of flue-cured tobacco cultivars using primer S21 (Different cultivars showing different polymorphism). The number on the top of this figure represents cultivar code which is shown in Table 1; M, 100 bp ladder.

RAPD 扩增的随机性,每一个引物只能检测基因组的有限区域,因而不同的引物在扩增同一品种时,会出现不同的带型,有些引物扩增可表现出很强的多态性,有些引物则不能分开亲缘关系很近的品种。目前烤烟育种和生产上所用的优良亲本主要是十几个骨干品种,且长时间种质资源的互导已使品种间的亲缘关系变得很近,有的品种用一个引物进行 RAPD 扩增难以区别,必须采用几个引物。从我们试验结果来看,利用多个引物是可以将 31 个烤烟品种完全分开的。根据 127 条多态性带在 31 个品种间的表现情况可以将这些品种十分容易地区分开来,扩增的多态性带及所鉴别的品种见表 3,其中 (+)(-)分别表示该带在某品种中出现、缺乏。22 个品种具有自己的独特扩增带,如“红花大金元”的特征带为 S24-1400、S27-900;“云烟 85”的特征带为 S18-320;“净叶黄”的特征带为 S30-950 等。剩下的品种通过少数品种间共有的特征性扩增带很容易分开,如“云烟 317”与“K358”有共同带 S12-420,可与其他品种区分开来,但“云烟 317”没有“K358”的特征带 S38-1200,又可将两者分开(表 3)。

因此,对烤烟品种进行引物筛选和建立 RAPD 标准模式很有必要,通过建立标准模式就可以利用少数几个引物分开不同的品种。当然,这些工作可以在品种审定时就建立杂交种及其亲本的 RAPD 标准模式,以标准 RAPD 电泳图谱作对照,就可以快速鉴别品种和进行纯度分析。也可以进一步在这些烤烟品种的基础上,寻找目前

推广的主要烤烟品种的特异分子标记,进行分子标记辅助育种以提高选育新品种的工作效率。同时也可用来检测种子纯度和防止销售流通领域的种子混杂。RAPD 标记是在 DNA 水平上检测基因组,它只反映不同基因组 DNA 顺序的差异,而不受试验材料所处的发育时期、取样部位和环境条件的影响。所以,RAPD 分析能比依赖基因表达的形态学方法、种子贮藏蛋白电泳和同工酶电泳等传统技术更准确地鉴定烤烟品种。

2.3 31 个烤烟品种 DNA 指纹的聚类分析

由聚类图可以看出,31 个烤烟品种基本上聚为 4 大类:第一大类将 19 个具有美国古老品种 Orinoco 及其衍生种质亲缘关系的烤烟品种聚在一起(图 2a)。没有 Orinoco 亲源的品种则相隔较远。美国的许多优质烤烟品种直接或间接来源于 Orinoco,这是一个香味和口感较好的原始种^[1],由此衍生出 400、Virginia Bright Leaf、Hicks、Yellow Mammoth 4 大分支,前三者是育成品种的主体。用它们作亲本,美国育成了“Coker139”(15)、“G-28”(31)、“NC95”(3)、“NC2326”(9)、“K326”(24)等一大批优质品种;我国也从引进的这些品种中选出了“红花大金元”(27)、“永定一号”(22)、“中烟 90”(25)、“云烟 85”(21)、“云烟 317”(29)等优质品种。其余 12 个品种分别聚为 3 类:第一支包括 RG11(10)和 8813(4)(图 2b),表明二者亲缘关系较近;第二支包括“寸茎烟”(13)、“辽烟 15”(14)、“V2”(17)、“中烟 151”(18)和临朐一号(20)聚为一支(图 2c),它们正好全为从我国本土

表 3 RAPD 扩增出的部分多态性带及所鉴别的品种

Table 3 Some of the amplified bands and their applications in the identification of the cultivars

Polymorphic bands	No. of cultivar	Polymorphic bands	No. of cultivar	Polymorphic bands	No. of cultivar
S1-970	13,14,21(+)	S27-900	27(+)	S51-370	11(+)
S1-890	29,30,31(+)	S27-1250	11(+)	S51-950	23(+)
S1-900	12,14,15(+)	S27-1450	15(+)	S51-1300	14(-)
S7-720	26(+)	S27-1800	29(+)	S53-680	31,27,30(+)
S7-650	31(+)	S30-620	10(+)	S56-430	14,17(-)
S12-420	30,29(+)	S30-950	16(+)	S56-480	17(+)
S18-880	18,22(+)	S31-870	5(+)	S56-540	15(+)
S18-680	10(+)	S31-1550	6(+)	S56-700	3,19(-)
S18-320	21(+)	S38-420	9(+)	S56-990	14,15(-)
S21-470	17(+)	S38-850	27,2,15(-)	S56-1050	10(+)
S21-500	16(+)	S38-1100	30(+)	S56-1180	26(+)
S21-600	5(+)	S38-1200	30(+)	S56-1320	11(+)
S21-900	8(+)	S38-1350	24,31,17(+)	S79-740	26(+)
S24-650	9,22(+)	S44-370	5(+)	S79-1400	7(+)
S24-750	15(-)	S44-800	10(-)	S142-1600	17(+)
S24-800	15(+)	S44-1000	9(+)	S142-1500	5(+)
S24-1400	27(+)	S44-1100	24,17,25(+)	S160-730	13,19(-)
S24-1500	21(+)	S51-200	4(+)	S290-1350	27,28(-)

Cultivar numbers are the same as those in Table 1.

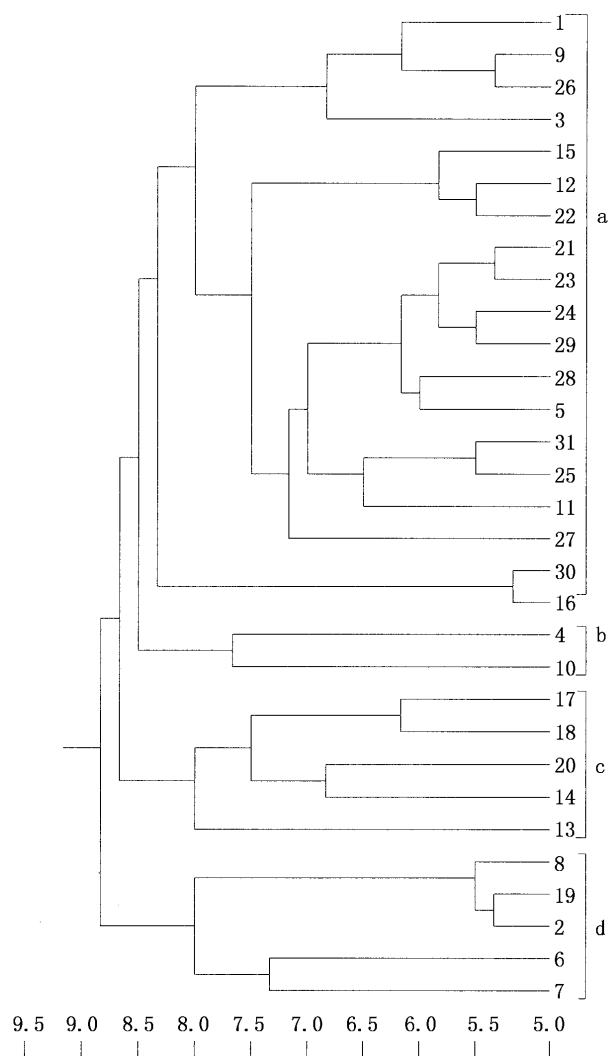


图 2. 31 个烤烟品种聚类分析图(31 个品种 \times 246 带).
Fig. 2. Dendrogram by cluster analysis for 31 flue-cured tobacco cultivars (31 tobacco cultivars \times 246 bands).

品种中选育而来的,仅“V2”来自美国。从聚类图中可见,它们为一群具较近亲缘关系的品种群。最后一支为“8602-123”(7)、“保山团叶烟”(6)、“大萼笋叶”(8)、“AK6”(19)和“金星 6007”(2)(图 2d),全为我国选育的品种,且在形态上也具有相似性。RAPD 分析结果表明,它们是具有较紧密的亲缘关系的类群。这与王元英等¹⁾通过系谱对这些品种亲缘关系分析的结果一致。

本研究 RAPD 分析的结果与根据形态及化学成分等的 14 个性状的聚类分析结果是完全吻合的⁹⁾。基本可以确定我国烤烟的种质资源主要来源于“红花大金元”、“小黄金”、“SpeightG-28”、“Coker 319”、“Hicks”、“金星 6007”、“Coker 139”、“NC95”、“K326”、“Special 400”、“DB101”等品种。无论是形态及化学成分的分析结果,还是 DNA 指纹的聚类结果,

都反映出大部分烤烟品种与原始种 Orinoco 及其衍生种质关系密切。这也反映了烤烟遗传资源的局限性,从而提示我们应广泛收集未利用的种质资源,以拓宽育种基础。

参考文献:

- [1] Wang Y-Y (王元英), Zhou Jian (周健). Parentage analysis of major tobacco varieties and tobacco breeding in America and China. *Acta Tabacaria Sin* (中国烟草学报), 1995, **2**: 11 - 22. (in Chinese with English abstract)
- [2] Gilbert J E, Lewis R V, Wilkinson M J, Caligari P D S. Developing an appropriate strategy to assess genetic variability in plant germplasm collections. *Theor Appl Genet*, 1999, **98**: 1125 - 1131.
- [3] Fu J-H (傅骏骅), Li L-C (李连城), Liu X-Z (刘新芝), Peng Z-B (彭泽斌), Huang C-L (黄长玲). Studies on the protocol optimum and preliminary application RAPD in maize. *Acta Agrono Sin* (作物学报), 1997, **23**: 56 - 61. (in Chinese with English abstract)
- [4] Heun M, Helentjaris T. Inheritance of RAPDs in F₁ hybrids of corn. *Theor Appl Genet*, 1993, **85**: 961 - 968.
- [5] Martin G B, Williams J C K, Tanksley S D. Rapid identification of markers linked to *Pseudomonas* persistence gene in tomato by using random primers and near isogenic lines. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, **88**: 2336 - 2340.
- [6] Yu K F, Pauls K P. Rapid estimation of genetic relatedness among heterogeneous populations of alfalfa by random amplification of bulked genomic DNA samples. *Theor Appl Genet*, 1993, **86**: 788 - 794.
- [7] Yu L X, Nguyen H T. Genetic variation detected with RAPD markers among upland lowland rice cultivars. *Theor Appl Genet*, 1994, **87**: 668 - 672.
- [8] Murray M, Thompson W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucl Acids Res*, 1980, **8**: 4321 - 4325.
- [9] He C-S (何川生), He X-J (何兴金), Li T-F (李天飞), Xu M-L (许美玲), Xu J-M (许介眉). Cluster analysis of germplasm of flue-cured tobacco. *Sci Agric Sin* (中国农业科学), 2000, **33**: 14 - 18. (in Chinese with English abstract)
- [10] He X-J (何兴金), Ge S (葛颂), Xu J-M (许介眉), Hong D-Y (洪德元). A primeval study on the phylogeny of Chinese *Allium* (Liliaceae) using PCR-RFLP analysis. *Acta Bot Sin* (植物学报), 1998, **40**: 1083 - 1086. (in Chinese with English abstract)
- [11] Felsenstein J. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) Version 3.572c. Seattle: Department of Genetics, University of Washington, 1996.
- [12] Nei M. Genetic distances between populations. *Amer Nat*, 1972, **106**: 283 - 292.
- [13] Wang X-Y (王心宇), Guo W-Z (郭旺珍), Zhang T-Z (张天真), Pan J-J (潘家驹). Analysis of RAPD fingerprinting on shortseasoned cotton cultivars in China. *Acta Agrono Sin* (作物学报), 1997, **23**: 669 - 676. (in Chinese with English abstract)

(责任编辑:梁燕)