

77 份新收集烟草种质资源的鉴定评价与整理编目

刘国祥, 邹昆晏, 任 民, 佟 英, 冯全福, 杨爱国, 戴培刚, 张兴伟

(农业部烟草生物学与加工重点实验室/中国农业科学院烟草研究所, 山东青岛 266101)

摘要:为将湖北省种质资源普查与收集行动收集到的 77 份烟草种质资源入国家烟草种质资源中期库进行编目和保存, 对其进行田间鉴定, 获得各烟草种质资源的主要农艺性状和主要病毒病抗性鉴定等数据, 并对各种质资源的株型、叶片、花序、花冠、蒴果等拍摄照片。经鉴定 B035、B075 和 B076 等种质抗多种主要病毒病, B025 免疫 TMV (Tobacco mosaic virus)。利用田间表型鉴定和 SSR 标记鉴定的结果对拟编目资源进行鉴定整理, 剔除重复收集的种质资源。本研究结果为丰富国家烟草种质资源库遗传多样性及烟草育种工作奠定良好基础。

关键词:烟草; 种质资源; 新编目; 分子鉴定; 主要性状

Evaluation and Cataloguing of 77 Newly-collected of Tobacco Germplasm Resources

LIU Guo-xiang, ZOU Kun-yan, REN Min, TONG Ying, FENG Quan-fu,
YANG Ai-guo, DAI Pei-gang, ZHANG Xing-wei

(Key Laboratory of Tobacco Biology and Processing, Ministry of Agriculture/Tobacco Research Institute,
Chinese Academy of Agricultural Sciences, Qingdao Shandong 266101)

Abstract: To catalog and preserve 77 tobacco germplasm resources collected from Hubei Province into the National Bank of Tobacco Germplasm Resources, field identification and evaluation of these tobacco germplasm resources were carried out. Data on period of duration, morphological characteristics, main agronomic traits and resistance to major virus diseases, have been obtained, and the photos of plant type, leaf, inflorescence, corolla and capsule also have been taken individually. Result showed that the accessions B035, B075 and B076 have resistance or mid-resistance for more than two virus diseases, while B025 is completely resistant to TMV. Field phenotypic characterization and SSR marker analysis were applied to identify the cataloging germplasm, in order to remove the repeated collection germplasm resources. The obtained results of this study will lay a good foundation for enriching the genetic diversity of National Bank of Tobacco Germplasm Resources and assisting the tobacco breeding.

Key words: tobacco; germplasm resources; new catalog; molecular identification; primary characters

烟草 (*Nicotiana tabacum* L.) 是我国重要经济作物之一, 其优良品种选育的关键在于遗传多样性亲本的丰富程度。国内烟草育种多采用有限的几个国外引进品种进行杂交, 导致后代品种存在遗传基础狭窄、品种老化、优质抗病品种稀缺、远缘杂交育种

基础薄弱等诸多问题, 不利于国内烟草行业的发展。因此, 加快烟草种质资源收集、鉴定、编目, 丰富国家烟草种质资源中期库材料遗传多样性是烟草育种工作的基础。我国在 20 世纪 50 年代就开始有计划地进行烟草种质资源的收集工作, 经过全国烟草单位

收稿日期: 2017-04-29 修回日期: 2017-06-09 网络出版日期: 2017-10-13

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20171013.0846.002.html>

基金项目: 国家烟草专卖局专项 (国烟办综[2005]501 号); 中国烟草总公司海南省公司项目 (20164600020007); 中国农业科学院科技创新工程 (ASTIP-TRIC01); 山东省自然科学基金 (ZR2017BC022)

第一作者主要研究方向为烟草种质资源。E-mail: liuguoxiang@caas.cn

通信作者: 张兴伟, 主要研究方向为烟草种质资源。E-mail: zhangxingwei@caas.cn

多年努力,截至 2007 年,收集、编目的种质资源数量达 4312 份^[1]。截至 2016 年底,国家烟草种质资源中期库中保存的资源数量达 5607 份。中国农业科学院烟草研究所近 32 年来一直负责向全国各烟草公司和科研单位分发烟草种质资源,对烟草行业育种工作、烟草基因组测序及重要基因克隆工作起到重要支撑作用^[2]。

编目是烟草种质资源入国家烟草种质资源中期库必要条件。系统地对全国各烟草公司和科研单位收集、引进、选育的烟草资源进行编目和入库保存,通过获得国家统一编号的方法来进行种质认证,来实现种质的产权保护、保存和利用^[3-9]。烟草种质资源鉴定采用表型观察和分子鉴定相结合的方法。分子标记重复性、稳定性好,能够在植株不同发育时期进行鉴定^[10]。1974 年,T. Grozdicker 等^[11]首先通过限制性内切酶酶解的方法获得一系列 DNA 差异片段,完成了对腺病毒 DNA 突变体的鉴定工作,随后 DNA 分子标记技术日趋成熟、完善^[12-13]。烟草最初利用 RAPD 标记进行资源鉴定^[14],但 RAPD 标记多态性低、稳定性差,已经不适用于分子鉴定,此外还有研究者采用 AFLP 和 ISSI 标记等方法^[15-18]。与其他几种常用的分子标记技术相比,SSR 标记在烟草育种、遗传进化分析、基因定位与克隆等方面应

用广泛,在烟草基础研究和应用研究方面作出重要贡献^[19-20]。

2015 年 7 月 10 日,农业部为贯彻落实《全国农作物种质资源保护与利用中长期发展规划(2015-2030 年)》(农种发[2015]2 号),印发《第三次全国农作物种质资源普查与收集行动实施方案》(农种发[2015]26 号)。该行动将全面系统地对全国农作物种质资源进行普查和抢救性收集工作。烟草作为重要的经济作物,由中国农业科学院烟草研究所承担普查和收集工作。本研究对 77 份湖北省新收集的烟草种质资源与烟草种质于国家烟草种质资源中期库中保存的湖北省种质资源进行田间表型鉴定(生育期、形态特征、主要农艺性状调查、抗病性)和分子鉴定等评价工作,去除重复收集的种质资源,开展烟草种质资源编目,为丰富我国烟草种质资源遗传多样性和抢救性保护珍稀资源奠定良好基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试的 103 份资源包括 2015 年在湖北省进行种质资源考察收集的 77 份烟草资源,中国农业科学院烟草研究所国家烟草种质资源中期库提供的 26 份资源,具体编号、名称及基本信息等见表 1。

表 1 种质名称及编号

Table 1 Name and number of germplasm

编号 Code	种质名称 Germplasm name	来源 Sources	备注 Remarks	编号 Code	种质名称 Germplasm name	来源 Sources	备注 Remarks
B001	二花草	湖北巴东	湖北收集	B017	红余烟	湖北长阳	湖北收集
B002	巴东二花糙	湖北巴东	中期库	B018	毛把烟	湖北长阳	中期库
B003	矮人头	湖北巴东	湖北收集	B019	辽叶烟	湖北长阳	湖北收集
B004	大柳子叶	湖北巴东	湖北收集	B020	大白金	湖北长阳	湖北收集
B005	大毛烟	湖北巴东	湖北收集	B021	小白金	湖北长阳	湖北收集
B006	大毛烟	湖北建始	湖北收集	B022	青毛烟	湖北恩施	中期库
B007	建始大毛烟	湖北建始	中期库	B023	青毛烟	湖北恩施	中期库
B008	红叶烟	湖北长阳	湖北收集	B024	沙把青毛烟	湖北恩施	湖北收集
B009	红叶烟	湖北长阳	湖北收集	B025	青毛烟	湖北恩施	湖北收集
B010	小筋红叶烟	湖北枝江	中期库	B026	罗三湾青毛烟	湖北利川	中期库
B011	枇杷烟	湖北长阳	湖北收集	B027	小乌烟	湖北恩施	湖北收集
B012	大枇杷叶	湖北长阳	湖北收集	B028	小乌烟	湖北利川	湖北收集
B013	大枇杷烟	湖北长阳	湖北收集	B029	毛把烟	湖北五峰	湖北收集
B014	大枇杷烟	湖北保康	湖北收集	B030	毛把烟	湖北丹江口	中期库
B015	小枇杷叶	湖北长阳	湖北收集	B031	黄筋烟	湖北五峰	湖北收集
B016	大黑高烟	湖北长阳	湖北收集	B032	黄筋菟	湖北鹤峰	湖北收集

表 1(续)

编号 Code	种质名称 Germplasm name	来源 Sources	备注 Remarks	编号 Code	种质名称 Germplasm name	来源 Sources	备注 Remarks
B033	黄筋莼	湖北鹤峰	中期库	B069	鄖西柳子烟	湖北鄖西	湖北收集
B034	青筋烟	湖北五峰	湖北收集	B070	鄖西柳子烟	湖北鄖西	湖北收集
B035	青筋莼	湖北鹤峰	湖北收集	B071	竹山大柳叶	湖北竹山	湖北收集
B036	青筋莼	湖北鹤峰	中期库	B072	竹山大柳子	湖北竹山	湖北收集
B037	把把烟	湖北鹤峰	中期库	B073	竹山大柳子	湖北竹山	湖北收集
B038	鹤峰把把烟	湖北鹤峰	中期库	B074	竹山小柳叶	湖北竹山	湖北收集
B039	蒲扇烟	湖北鹤峰	中期库	B075	竹山小柳子	湖北竹山	湖北收集
B040	鹤峰乌烟	湖北鹤峰	湖北收集	B076	四川大金堂	四川	湖北收集
B041	人头黄烟	湖北鹤峰	湖北收集	B077	小河柳子	湖北鄖西	湖北收集
B042	人头烟	湖北竹溪	湖北收集	B078	均州柳子	湖北鄖西	湖北收集
B043	鹤峰晾晒烟	湖北鹤峰	湖北收集	B079	竹山晒烟	湖北竹山	湖北收集
B044	鹤峰晾晒烟	湖北鹤峰	中期库	B080	寸三片	湖北五峰	中期库
B045	瓢瓜烟	湖北利川	湖北收集	B081	白洋筋烟	湖北五峰	湖北收集
B046	利川黄烟	湖北利川	湖北收集	B082	白洋筋烟	湖北五峰	湖北收集
B047	利川兰花烟	湖北利川	湖北收集	B083	宣恩乌烟	湖北宣恩	湖北收集
B048	癩蛤蟆乌烟	湖北利川	湖北收集	B084	咸丰乌烟	湖北咸丰	湖北收集
B049	利川癩蛤蟆烟	湖北利川	中期库	B085	咸丰大柳叶烟	湖北咸丰	中期库
B050	小铁梗烟	湖北利川	湖北收集	B086	咸丰大柳叶烟	湖北咸丰	湖北收集
B051	利川毛烟	湖北利川	湖北收集	B087	咸丰兰花烟	湖北咸丰	湖北收集
B052	大乌烟	湖北利川	湖北收集	B088	咸丰兰花烟	湖北咸丰	中期库
B053	大乌烟	湖北竹溪	湖北收集	B089	把儿烟	湖北兴山	湖北收集
B054	大乌烟	湖北竹溪	湖北收集	B090	把烟	湖北兴山	湖北收集
B055	大乌烟	湖北竹溪	湖北收集	B091	黄粮把儿烟	湖北兴山	中期库
B056	大乌烟	湖北竹溪	湖北收集	B092	川柳子烟	湖北兴山	湖北收集
B057	大乌烟	湖北竹溪	湖北收集	B093	白果川柳子	湖北兴山	中期库
B058	大乌烟	湖北利川	中期库	B094	南漳土烟	湖北南漳	湖北收集
B059	铎口烟	湖北来凤	中期库	B095	南漳旱烟	湖北南漳	湖北收集
B060	铎口烟	贵州黄平	中期库	B096	四川毛烟	四川	湖北收集
B061	铁板烟	湖北来凤	中期库	B097	大潦叶烟	湖北秭归	湖北收集
B062	铁板烟	湖北五峰	湖北收集	B098	大潦叶烟	湖北秭归	湖北收集
B063	神农架晒烟	湖北神农架	湖北收集	B099	黑耳烟	湖北秭归	湖北收集
B064	旱烟晒红烟	湖北神农架	湖北收集	B100	竹溪枇杷叶	湖北竹溪	湖北收集
B065	大河柳子	湖北鄖西	湖北收集	B101	保康小火烟	湖北保康	湖北收集
B066	大河柳子	湖北鄖西	湖北收集	B102	保康小火烟	湖北保康	湖北收集
B067	大河柳叶子	四川奉节	中期库	B103	小柳叶烟	湖北咸丰	中期库
B068	鄖西柳子烟	湖北鄖西	湖北收集				

1.2 田间设计

编目鉴定的材料于 2016-2017 年在山东省青岛市即墨农场种植,试验数据为 2 年的平均值。田间

试验为完全随机设计,田间管理采用常规管理方法。设 2 次重复,每行 20 株,株行距 40 cm × 110 cm,在现蕾期、开花期每行选择 7 株套袋、繁种,期间进行

2 次疏花疏果,每次间隔 10 d。种子活力测定在蒴果成熟后,经脱粒、过筛、精选、称重后进行。

1.3 活力测定

每份资源取种子 100 粒,做 3 次重复试验。在玻璃皿的海绵上加一张滤纸作为发芽床,浸湿后整齐摆放上种子,放入人工气候箱内发芽(温度:28 ℃,光照:80 W),每天统计种子发芽粒数,7 d 统计发芽势(GE),14 d 统计发芽率(GP)^[21]。

1.4 性状记载及拍照

田间性状记载按照《烟草种质资源描述规范和数据标准》^[22],依据种质的各项特征特性逐株进行鉴定,2 次重复鉴定的平均数为最终鉴定结果,并制作标准表格。盛花期按入库要求对各种质的整株、上中下部叶片、花序、花冠和蒴果进行拍照记录。

1.5 分子鉴定

1.5.1 供试材料 田间表型鉴定难以区分的材料,采用试剂盒法提取基因组 DNA,TE 溶解 DNA,加入 RNA 酶水浴 30 min。经核酸测定仪(NanoProp 2000 Thermo scientific)测定 DNA 的质量与浓度,将 DNA 浓度统一稀释到 50 ng/μL,在-20 ℃低温下长期保存。

1.5.2 SSR 引物的设计与筛选 六合华大(北京)基因科技有限公司负责 SSR 引物(共 2000 对)的合成工作。利用 5 份烟草育种常用种质(净叶黄、小黄金 1025、K326、NC89、Speight G-28)对合成的 SSR 引物进行 PCR 扩增,筛选出 25 对(前 17 对为常用引物,后 8 对为辅助引物)带型清晰、多态性高、扩增片段长度在 100 ~ 300 bp 的引物,其序列参见表 2。

1.5.3 SSR 引物的 PCR 扩增 反应液体积为 20 μL,在 PCR 反应管中依次加入 2 × Dreamtaq Mix 10 μL、模板 DNA 1 μL、上游引物 1 μL、下游引物 1 μL,最后用双蒸水将反应体系补至 20 μL。

反应程序:95 ℃预变性 5 min;95 ℃变性 45 s,退火温度 60 ℃延伸 30 s,72 ℃延伸 45 s,共 35 个循环;最后 72 ℃延伸 10 min 后停止反应,10 ℃恒温冷却。取出 PCR 反应管,对扩增产物进行非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测。

2 结果与分析

2016-2017 年对 103 份烟草种质资源(77 份新收集资源和 26 份中期库中对照资源)进行主要植物学性状调查,并拍摄典型照片记录,最后筛选出来

源地相同、种质名称相同或相似、田间表型表现一致的 33 份种质进行分子水平鉴定。

2.1 田间表型调查结果

2.1.1 生育期调查 在统计的 103 份种质中,编号 B068 的大田生育期和全生育期最长,分别是 157 d 和 227 d,编号 B020 的大田生育期和全生育期小于编号 B068,分别是 116 d 和 186 d,其次是编号 B012、B013、B022 和 B053 的大田生育期超过 100 d,全生育期超过 170 d;编号 B052 的大田生育期和全生育期最短,分别是 49 d 和 119 d(表 3)。

2.1.2 种质资源形态特征 从各种质的形态特征来看,除编号 B027、B034、B035 和 B048 株型为橄榄形外,大多为塔型,少部分筒型;叶型共有 7 种(披针形、长卵圆、长椭圆、宽卵圆、宽椭圆、椭圆、卵圆),其中编号 B051、B064、B065、B066、B069 和 B078 为披针形;编号 B005、B047 和 B099 的叶尖为钝尖,此外还有急尖、渐尖和尾状,共 4 种;叶面形态特征有平、较平、较皱和皱 4 种;叶缘有平滑、微波和波浪 3 种;叶耳有大、小、中等和无 4 种;编号 B006 和 B099 的叶片为厚,多数为中等,少数叶片为较薄或较厚。花序密度有松散和密集 2 种;花序形状多数为球形,倒圆锥形、扁球形和菱形数量接近;编号 B047 的花色为比较典型的黄色,其余多数为淡红色,少数为红色;编号 B003、B040、B047、B053、B057 和 B099 花冠无尖,其余全为有尖(详细数据见中国烟草品种资源网 <http://www.yesjk.com.cn/>)。

2.1.3 主要农艺性状调查 在田间调查了株高、茎围、节距、叶数和叶长宽等数据,并计算其平均数(表 4)。103 份种质资源中株高最高的是 B060 达 167.20 cm,其次是 B036 和 B071,株高大于 160.00 cm,植株最矮的是 B088 为 55.13 cm;茎围 B034 最大, B047 最小;节距 B043 最大, B018 最小;叶数以 B039 最多为 28 片, B088 最少为 6 片;叶片最长的是 B031 为 71.44 cm,其次为 B034 和 B098,最短的是 B088 为 8.03 cm;叶宽最宽的是 B061 为 52.10 cm,其次为 B036 和 B070,最窄的是 B088 号为 5.98 cm;主侧脉夹角除 B099 为大外,其余为中度;茎叶角度除 B005 为甚大, B013 为小外,其余为大或中度;花冠最长的是 B027,其次是 B009 和 B025, B047 最小;花冠直径以 B014 最大为 2.85 cm,其次是 B001 为 2.70 cm, B078 最小为 1.79 cm;花萼长度最大的是 B027 为 2.38 cm,其次是 B075, B088 最小为 1.19 cm(表 4)。

表 2 SSR 引物序列

Table 2 SSR primer sequences

名称 Name	上游引物 Forward primer	下游引物 Reverse primer	名称 Name	上游引物 Forward primer	下游引物 Reverse primer
PT30380	AACGAGTCTAAACATGCTCCC	CCACCAGCACAAATAATGAACA	PT50336	AGTGACCATTAAAGTATATGCTCTAAGCC	GCGACCCGATTAGCTTCTAT
PT50136	TTTGGGATGGTTCTGCAAAAT	GAAACTTTTCCTAACCGCGAA	PT50425	CGGTCAGAAATTAATAACCCGTGG	TTGCTGTATTTCGTGCAAGC
PT50693	TCATGAGAGGCAGACAGTGT	TTGTGATGTTGTAATCCTGTGG	PT51562	CATTCTTGGCAGGCAATGCT	TTTCGAGTTTGAGAAAAGTCTCA
PT50862	ATGCGCTATGTTGGCTTCT	TCAAAAGTGCAATGCTTCGC	PT50748	CAGATATTAAACCAGCCTATGCAA	AGTCACAACGCCAGCTAGCAA
PT51072	CGATCCGATGACACAATTT	CTTCATTTCTCAAACTCGC	PT20189	AAAGGTTCCGTAATCCAG	ATTGGAGATGACAAACGA
PT51333	GCACCTTTGGTTATCCGACA	TGCTTTAACTCATGTACCAAAATGA	PT20287	CGCCACAACAACCTCACCTTA	TCATGCATGTTTCTCCTCCTT
PT51398	TCCAAAGAAATTCATCCGC	AGCAAATTCCTCACCTTTGC	PT20213	TGTGGAGCTCCTTTCTTTGC	TCAAAATCAACAACAATCCAAT
PT52509	TTGCCATTGCTTTATTTCGG	AAATAACAGAAATCTCTGGCGAA	PT20242	TCCAAAGCTTGGACCGAA	GTCTACATGGGGCTCTT
PT52828	TGAATTATGCGGTGCACATT	ATATTCCAAAGGTGGGTGAA	PT30403	CCAACTCTACCGCTAACTTCAAA	CAGGACTGACGACAGATGGT
PT54339	CCCGTCTGATAAACATTGATTC	CCCCCAGAAACTATTTACA	PT20202	AAAATCATTGTCACCCGAAAA	CAACTTTAGGCATTTTCTCTGT
PT53362	TTCAACTCGTTAAGTTTAGATAGCG	GCTCATTTTCACACGAGTAA	PT51967	CCTCCGACACACGACGTTCTT	CAGCAACGACGAGTTTGAAG
PT54889	GGCTCTAAATAATCGCAATTGAA	CGCAGGTGGACTTAAAGAATC	PT50200	TTCTTCGGGTGATGTTCTCTC	TCTACAGCTCTTCTCTGTATCTGTG
PT30201	GGGTTGCGCAATATGCTACTT	GGCTTCTCCAAACATCATCAAA			

表 3 各种质生育期表现

Table 3 Growth stages of germplasm

编号 Code	大田生育期(d) Field growth period	全生育期(d) Whole growing period	编号 Code	大田生育期(d) Field growth period	全生育期(d) Whole growing period	编号 Code	大田生育期(d) Field growth period	全生育期(d) Whole growing period
B001	76	146	B036	71	141	B071	67	137
B002	82	152	B037	83	153	B072	65	135
B003	83	153	B038	88	158	B073	75	145
B004	83	153	B039	78	148	B074	88	158
B005	88	158	B040	85	155	B075	67	137
B006	82	152	B041	93	163	B076	80	150
B007	87	157	B042	98	168	B077	90	160
B008	87	157	B043	93	163	B078	85	155
B009	93	163	B044	85	155	B079	90	160
B010	80	150	B045	85	155	B080	88	158
B011	83	153	B046	71	141	B081	93	163
B012	104	174	B047	83	153	B082	88	158
B013	106	176	B048	83	153	B083	78	148
B014	83	153	B049	85	155	B084	85	155
B015	83	153	B050	78	148	B085	63	133
B016	85	155	B051	78	148	B086	83	153
B017	78	148	B052	49	119	B087	68	138
B018	82	152	B053	104	174	B088	83	153
B019	80	150	B054	83	153	B089	80	150
B020	116	186	B055	90	160	B090	80	150
B021	85	155	B056	100	170	B091	88	158
B022	103	173	B057	85	155	B092	85	155
B023	89	159	B058	83	153	B093	85	155
B024	78	148	B059	65	135	B094	93	163
B025	78	148	B060	68	138	B095	86	156
B026	85	155	B061	68	138	B096	88	158
B027	75	145	B062	83	153	B097	93	163
B028	78	148	B063	88	158	B098	93	163
B029	80	150	B064	93	163	B099	83	153
B030	88	158	B065	93	163	B100	90	160
B031	93	163	B066	83	153	B101	80	150
B032	93	163	B067	79	149	B102	89	159
B033	90	160	B068	157	227	B103	85	155
B034	88	158	B069	78	148			
B035	88	158	B070	62	132			

表 4 各种质主要农艺性状表现

Table 4 Statistics of agronomic traits of the germplasms

编号 Code	株高 (cm) Plant height	茎围 (cm) Stem girth	节距 (cm) Nobe distance	叶数 No. of leaves	叶长 (cm) Leaf length	叶宽 (cm) Leaf width	叶柄 (cm) Petiole	主侧脉 夹角 (°) Angle of costa and side	茎叶 角度 (°) Angle of stem and leaf	花冠 长度 (cm) Corolla length	花冠 直径 (cm) Corolla diameter	花萼 长度 (cm) Calyces length
B001	98.31	9.15	4.51	20	59.37	36.44	0.00	中	中	5.34	2.70	1.99
B002	98.58	8.39	3.50	22	57.35	28.38	0.00	中	中	5.65	2.64	1.96
B003	97.43	8.68	4.11	26	56.80	35.68	0.00	中	中	5.56	2.65	1.89
B004	108.65	9.12	5.78	18	59.98	37.78	0.00	中	中	5.28	2.43	1.90
B005	105.90	7.15	8.50	10	48.38	35.45	0.00	中	甚大	5.30	2.41	1.97
B006	78.57	11.30	3.49	15	63.99	42.64	0.00	中	大	5.29	2.64	1.93
B007	93.93	8.29	3.60	17	57.70	32.58	0.00	中	中	4.97	2.23	1.76
B008	94.55	7.34	5.55	15	53.04	28.43	0.00	中	中	5.29	2.14	1.52
B009	129.30	10.34	6.16	18	65.38	31.30	0.00	中	中	5.90	2.13	1.84
B010	100.13	9.36	4.60	17	61.22	37.00	0.00	中	中	5.21	2.30	1.76
B011	118.76	9.53	5.55	18	56.38	24.23	0.00	中	大	5.40	2.18	1.85
B012	132.13	10.05	5.15	20	65.50	32.70	0.00	中	大	5.35	2.26	1.88
B013	137.40	9.09	4.21	22	61.54	31.67	0.00	中	小	5.37	2.21	1.78
B014	66.50	5.33	3.06	15	40.99	19.82	5.89	中	大	5.03	2.85	1.68
B015	114.83	8.11	5.30	17	51.80	23.01	0.00	中	中	5.32	2.13	1.90
B016	68.88	7.30	4.90	13	51.80	32.57	0.00	中	中	5.25	2.23	1.79
B017	80.63	8.20	5.53	12	56.96	36.08	0.00	中	中	4.75	2.35	1.74
B018	56.08	6.29	2.86	16	42.21	25.09	0.00	中	中	4.86	2.19	1.86
B019	88.80	7.10	4.92	17	48.66	20.73	0.00	中	中	5.72	2.45	1.91
B020	116.30	10.02	8.25	17	40.30	26.80	0.00	中	中	5.13	2.32	1.80
B021	114.60	10.30	5.11	18	55.28	31.42	0.00	中	大	5.53	2.51	1.97
B022	98.28	9.30	4.21	17	59.94	40.91	0.00	中	中	5.19	2.23	1.80
B023	90.00	8.84	4.10	16	58.75	38.04	0.00	中	中	4.87	2.22	1.93
B024	91.75	9.18	3.61	17	60.84	39.04	0.00	中	大	5.30	2.33	1.94
B025	116.18	9.04	6.42	16	61.08	32.83	0.00	中	中	5.84	2.32	2.14
B026	108.59	7.94	6.66	13	52.00	34.81	1.41	中	中	5.34	2.36	1.74
B027	113.98	9.02	5.96	18	58.12	28.23	0.00	中	中	6.03	2.51	2.38
B028	108.64	10.14	5.28	17	63.13	37.24	0.00	中	大	5.43	2.37	1.89
B029	110.15	9.53	5.27	15	58.32	39.03	0.00	中	大	5.20	2.34	1.76
B030	123.88	9.27	5.90	19	60.95	33.46	0.00	中	中	5.27	2.25	1.90
B031	105.85	10.39	4.49	18	71.44	40.11	0.00	中	大	5.26	2.41	1.93
B032	138.54	9.46	5.65	18	64.34	30.71	0.00	中	大	5.18	2.34	1.87
B033	134.84	9.94	5.09	25	61.79	35.03	0.00	中	中	4.89	2.27	1.61
B034	119.75	12.90	4.29	18	69.37	42.59	0.00	中	中	4.75	2.35	1.70
B035	129.15	10.48	5.55	20	66.18	39.94	0.00	中	中	4.87	2.35	1.97
B036	160.60	10.86	5.46	25	63.35	49.85	0.00	中	中	4.71	2.25	1.62
B037	141.28	10.30	7.35	18	65.65	40.28	0.00	中	中	4.98	2.10	1.69
B038	101.33	8.51	5.17	22	48.40	31.14	7.73	中	中	4.98	2.57	1.69
B039	124.79	9.33	4.09	28	56.87	35.33	0.00	中	中	5.04	2.27	1.52
B040	133.73	9.62	7.22	15	62.58	39.41	0.00	中	大	5.04	2.20	1.58
B041	124.55	10.35	4.35	21	67.68	39.35	0.00	中	中	5.05	2.40	1.79
B042	124.73	9.32	10.55	12	61.20	37.01	0.00	中	大	4.93	2.51	1.75
B043	130.73	10.32	11.55	14	62.30	38.01	0.00	中	大	5.13	2.61	1.82
B044	154.38	10.18	8.35	18	64.91	45.51	0.00	中	中	4.75	2.34	1.79
B045	126.90	10.16	5.52	20	60.50	41.97	5.17	中	大	5.11	2.20	1.80
B046	142.80	9.77	8.02	15	63.70	38.89	0.00	中	大	5.21	2.06	1.68
B047	60.00	3.70	5.98	9	14.50	7.78	4.11	中	中	1.88	1.93	1.23
B048	111.75	9.98	4.02	21	60.54	39.32	0.00	中	中	5.19	2.19	1.81
B049	114.48	8.69	6.37	13	51.60	37.44	3.73	中	中	4.82	2.50	1.71
B050	83.35	8.40	4.57	17	56.41	27.56	0.00	中	大	4.99	2.33	1.59
B051	86.35	8.12	4.58	19	54.80	18.73	0.00	中	中	5.64	2.13	2.06

表 4(续)

编号	株高(cm)	茎围(cm)	节距(cm)	叶数	叶长(cm)	叶宽(cm)	叶柄 (cm)	主侧脉 夹角(°)	茎叶 角度(°)	花冠 长度(cm)	花冠 直径(cm)	花萼 长度(cm)
Code	Plant height	Stem girth	Nobe distance	No. of leaves	Leaf length	Leaf width	Petiole	Angle of costa and side	Angle of stem and leaf	Corolla length	Corolla diameter	Calyces length
B052	97.18	8.72	4.88	18	49.98	24.70	0.00	中	中	5.70	2.07	1.59
B053	88.38	7.62	7.52	14	49.10	32.08	0.00	中	大	5.59	2.32	1.96
B054	120.65	9.09	5.08	17	50.75	36.88	5.48	中	大	5.14	2.18	1.80
B055	105.98	9.25	6.28	14	60.20	40.30	0.00	中	大	4.73	2.41	1.85
B056	110.40	7.38	10.16	12	55.95	34.00	0.00	中	大	5.50	2.25	1.72
B057	102.54	7.59	5.55	15	58.81	35.33	0.00	中	大	5.04	2.01	1.70
B058	101.90	9.04	6.33	14	58.53	38.45	0.00	中	中	5.11	2.22	1.81
B059	97.35	9.15	6.20	14	62.85	45.50	0.00	中	中	4.50	2.05	1.72
B060	167.20	9.57	8.13	19	57.23	36.13	4.62	中	中	5.65	2.16	2.03
B061	99.96	9.00	7.50	19	63.50	52.10	0.00	中	中	4.35	2.45	1.84
B062	109.63	9.49	6.33	17	57.58	35.43	0.00	中	大	5.18	1.97	1.73
B063	79.29	5.29	7.26	12	35.62	27.13	3.38	中	大	4.96	2.21	1.76
B064	121.58	8.14	5.01	20	58.75	21.98	0.00	中	中	5.20	2.27	2.04
B065	84.20	6.59	5.21	14	48.09	25.79	0.00	中	中	5.10	2.40	1.90
B066	94.88	7.48	4.53	19	55.03	24.40	0.00	中	大	5.20	2.40	2.08
B067	92.80	7.54	3.92	19	55.15	32.18	0.00	中	中	4.69	2.07	1.72
B068	112.10	10.35	4.38	23	69.08	34.50	0.00	中	中	4.93	2.24	1.89
B069	78.15	5.57	4.67	15	49.58	16.13	0.00	中	中	5.27	2.38	1.99
B070	79.40	7.55	6.05	16	60.35	51.25	0.00	中	中	4.20	2.10	1.77
B071	161.48	9.08	3.65	24	66.73	24.58	0.00	中	中	5.36	2.28	1.98
B072	90.73	7.65	4.04	17	59.65	25.65	0.00	中	中	5.30	2.47	1.95
B073	86.85	6.74	3.84	17	50.48	25.35	0.00	中	大	5.23	2.30	1.92
B074	74.34	6.37	3.99	16	50.88	20.76	0.00	中	大	5.12	1.92	1.81
B075	83.32	6.30	3.57	18	45.09	14.27	0.00	中	大	5.34	1.94	2.18
B076	141.80	10.06	7.04	14	62.36	34.00	0.00	中	大	4.73	2.12	1.68
B077	98.10	8.01	5.02	15	50.39	22.69	0.00	中	大	5.31	2.26	2.08
B078	92.96	9.51	4.11	19	54.86	20.26	9.28	中	中	5.00	1.79	1.72
B079	99.85	8.64	6.90	13	55.81	29.98	0.00	中	大	4.98	2.33	1.88
B080	135.50	9.73	6.28	15	58.46	28.96	7.81	中	中	4.88	2.48	1.71
B081	117.28	10.22	4.52	20	60.83	33.66	0.00	中	中	5.36	2.62	1.94
B082	102.33	10.69	4.49	16	58.83	29.13	0.00	中	中	5.25	2.59	1.77
B083	82.25	9.90	3.45	20	51.50	28.62	0.00	中	大	4.61	2.11	1.52
B084	96.28	9.14	4.10	15	49.65	30.30	3.69	中	大	5.01	2.30	1.69
B085	118.45	7.85	4.80	22	51.28	28.48	0.00	中	中	5.03	2.16	1.94
B086	112.73	9.63	4.22	18	52.17	25.24	0.00	中	大	4.91	2.00	1.81
B087	118.52	9.48	4.93	16	53.84	35.11	3.02	中	大	5.19	2.37	1.81
B088	55.13	4.31	3.98	6	8.03	5.98	0.00	中	中	4.65	1.91	1.19
B089	85.30	8.95	4.45	14	57.89	31.27	2.03	中	大	4.73	2.05	1.49
B090	103.23	9.93	4.94	18	59.95	27.41	0.00	中	大	4.47	2.38	1.73
B091	103.38	10.15	5.60	13	58.54	40.29	7.31	中	中	4.23	2.29	1.79
B092	92.33	9.62	4.35	16	55.64	31.36	7.45	中	大	4.34	2.18	1.68
B093	92.80	7.82	6.19	11	53.57	25.42	0.00	中	中	4.56	2.09	1.71
B094	97.23	9.02	6.16	12	51.19	36.69	6.83	中	大	4.52	2.21	1.78
B095	105.58	8.97	5.95	12	49.96	33.96	6.01	中	中	4.75	2.27	1.72
B096	106.05	10.12	4.45	17	53.17	34.10	7.87	中	大	4.59	2.21	1.72
B097	92.38	10.20	5.03	15	63.71	33.43	0.00	中	中	5.04	2.24	1.81
B098	116.50	10.00	6.18	15	69.51	34.34	0.00	中	中	5.14	2.33	1.90
B099	147.05	8.86	7.08	16	52.48	34.51	0.00	大	大	4.81	2.28	1.58
B100	117.43	9.82	5.59	17	62.75	33.56	0.00	中	中	5.10	2.32	1.94
B101	120.48	7.54	6.44	13	41.39	24.53	0.00	中	中	4.95	2.15	1.79
B102	118.03	7.92	5.92	14	45.41	24.06	0.00	中	大	4.68	2.21	1.58
B103	95.95	7.95	4.55	17	48.50	20.73	0.00	中	中	4.82	2.09	1.72

2.1.4 各种质田间自然发病情况及主要病毒病抗性鉴定 对 103 份资源主要病毒病 (TMV、CMV、PVY) 抗性进行田间鉴定。由表 5 得出, 大部分种质主要病毒病的抗性鉴定为感病或中感。B035 号青筋莧、B075 号竹山小柳子、B076 号四川大金堂和 B078 号均州柳子等种质抗多种主要

病毒病; 一些种质只抗 1 种病害, 如 B005 号大毛烟、B032 号黄筋莧、B050 号小铁梗烟和 B084 号咸丰乌烟抗 CMV; B027 号小乌烟、B043 号鹤峰晾晒烟和 B078 号均州柳子抗 TMV; B075 号竹山小柳子和 B076 号四川大金堂抗 PVY; B025 号青毛烟免疫 TMV。

表 5 各种质田间自然发病情况及主要病毒病抗性

Table 5 Test for resistance of germplasm against major virus diseases

编号 Code	抗性 Resistance evaluation			编号 Code	抗性 Resistance evaluation			编号 Code	抗性 Resistance evaluation		
	TMV	CMV	PVY		TMV	CMV	PVY		TMV	CMV	PVY
B001	感病	中感	感病	B036	感病	感病	感病	B071	感病	中感	感病
B002	感病	感病	中感	B037	感病	中抗	中感	B072	感病	中感	中感
B003	感病	中感	感病	B038	感病	感病	感病	B073	中感	中抗	感病
B004	感病	中感	中感	B039	感病	感病	中抗	B074	感病	感病	中感
B005	感病	抗病	感病	B040	感病	感病	感病	B075	中抗	中抗	抗病
B006	感病	中抗	感病	B041	感病	中抗	中感	B076	感病	中抗	抗病
B007	感病	中感	中感	B042	中抗	感病	中感	B077	感病	抗病	中感
B008	感病	中感	感病	B043	抗病	感病	中感	B078	抗病	抗病	中感
B009	中感	中感	感病	B044	中抗	感病	中感	B079	感病	中抗	中感
B010	感病	中感	感病	B045	感病	中感	感病	B080	感病	中抗	中感
B011	中感	中感	感病	B046	感病	中抗	感病	B081	感病	中感	感病
B012	感病	中感	中感	B047	感病	感病	感病	B082	感病	中感	中感
B013	感病	感病	感病	B048	感病	中感	中感	B083	感病	中感	感病
B014	感病	中感	感病	B049	中抗	感病	中感	B084	感病	抗病	中感
B015	感病	感病	中抗	B050	感病	抗病	感病	B085	感病	中感	感病
B016	感病	中抗	感病	B051	感病	感病	感病	B086	感病	中感	中感
B017	感病	中感	中感	B052	感病	感病	感病	B087	中感	感病	中感
B018	感病	感病	中抗	B053	感病	中抗	中感	B088	感病	中抗	中感
B019	感病	中抗	感病	B054	感病	中感	中感	B089	感病	中抗	中感
B020	感病	感病	中感	B055	中感	中抗	中感	B090	感病	中感	感病
B021	感病	中抗	感病	B056	感病	感病	感病	B091	感病	中抗	中感
B022	感病	感病	中感	B057	中抗	感病	中感	B092	感病	中抗	中感
B023	中抗	中感	感病	B058	中感	中抗	中感	B093	感病	中抗	感病
B024	中抗	中感	中感	B059	感病	感病	感病	B094	感病	中抗	感病
B025	免疫	中感	中感	B060	感病	中感	中感	B095	感病	中抗	感病
B026	中抗	中感	中感	B061	中感	中抗	中感	B096	感病	中抗	感病
B027	抗病	中感	感病	B062	感病	感病	感病	B097	感病	中感	感病
B028	感病	感病	感病	B063	感病	中感	感病	B098	感病	中感	感病
B029	感病	感病	中抗	B064	感病	中感	中感	B099	感病	中感	中感
B030	感病	感病	感病	B065	中感	中抗	中感	B100	感病	中感	感病
B031	感病	感病	感病	B066	感病	中感	中感	B101	感病	中感	感病
B032	感病	抗病	感病	B067	感病	中感	中感	B102	感病	中感	感病
B033	感病	中抗	中感	B068	感病	中抗	感病	B103	感病	中抗	中感
B034	感病	中感	感病	B069	感病	感病	中感				
B035	中抗	中抗	感病	B070	感病	感病	感病				

2.1.5 种子活力鉴定结果 103 份种子平均发芽势 69.87%、发芽率 79.26%。编号 B027 发芽率较高,超过 97%;有 22 个品种发芽率较低,小于 70%,最低的是编号 B034,只有 7%(表 6)。

表 6 种子活力鉴定结果

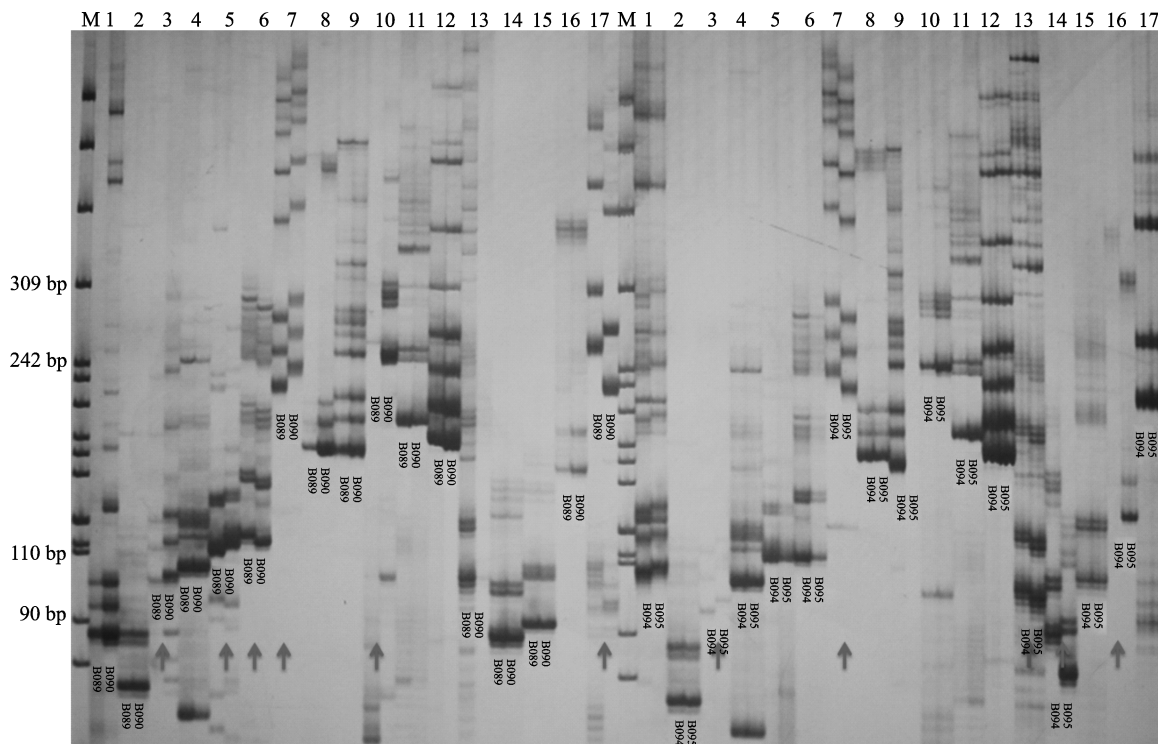
Table 6 Test for seed vitality

编号 Code	发芽势(%) Germination energy	发芽率(%) Germination rate	编号 Code	发芽势(%) Germination energy	发芽率(%) Germination rate	编号 Code	发芽势(%) Germination energy	发芽率(%) Germination rate
B001	95.25	95.50	B036	12.50	15.75	B071	87.50	90.00
B002	87.25	89.75	B037	80.25	80.50	B072	55.25	76.00
B003	80.75	82.00	B038	69.00	70.00	B073	8.50	94.50
B004	92.25	95.25	B039	83.25	85.25	B074	2.75	7.50
B005	49.75	75.25	B040	84.75	84.75	B075	75.75	92.00
B006	90.25	95.00	B041	55.75	59.00	B076	34.75	56.00
B007	31.00	81.50	B042	43.00	81.50	B077	86.75	90.25
B008	67.50	79.50	B043	33.50	34.75	B078	38.75	67.00
B009	91.75	92.25	B044	50.25	51.25	B079	97.00	97.50
B010	63.75	85.00	B045	89.50	91.00	B080	92.00	92.75
B011	57.00	59.00	B046	29.00	53.25	B081	93.75	94.25
B012	88.50	89.50	B047	92.50	93.25	B082	27.00	94.25
B013	88.75	93.00	B048	90.25	90.50	B083	93.75	95.00
B014	59.25	61.25	B049	79.25	86.00	B084	70.00	88.50
B015	73.75	90.25	B050	86.00	88.00	B085	60.00	65.25
B016	95.50	95.75	B051	80.50	91.25	B086	69.50	95.00
B017	86.00	88.25	B052	92.75	93.75	B087	64.50	86.75
B018	93.50	93.50	B053	86.25	86.50	B088	90.25	90.25
B019	93.00	94.00	B054	79.00	82.00	B089	71.75	76.00
B020	88.75	91.00	B055	53.25	57.00	B090	82.00	88.00
B021	75.00	75.25	B056	81.25	82.25	B091	92.25	92.50
B022	92.25	93.25	B057	86.75	86.50	B092	76.75	78.50
B023	92.75	93.00	B058	81.50	87.50	B093	78.50	80.75
B024	87.25	88.75	B059	88.25	93.50	B094	87.25	90.00
B025	93.50	94.25	B060	47.50	57.00	B095	92.50	93.00
B026	73.00	74.25	B061	61.25	63.75	B096	94.00	96.75
B027	97.25	98.25	B062	64.75	76.75	B097	76.25	86.50
B028	88.25	89.50	B063	3.75	14.00	B098	78.50	87.50
B029	69.50	69.75	B064	51.00	77.00	B099	93.50	93.50
B030	13.25	14.00	B065	59.50	89.50	B100	68.00	89.50
B031	34.75	35.50	B066	4.50	95.75	B101	89.00	90.50
B032	67.50	68.25	B067	86.75	88.50	B102	91.50	92.25
B033	52.50	52.75	B068	4.25	73.50	B103	86.00	88.25
B034	6.00	7.00	B069	52.75	91.75			
B035	58.50	61.50	B070	71.75	73.50			

2.2 分子鉴定结果

对田间表型鉴定无法区分的 33 份种质资源 (B022、B023、B024、B026; B029、B030; B032、B033、B034、B035; B041、B042; B048、B049; B052、B053、B054、B055、B056、B057、B058、B060; B071、B072、B073; B089、B090; B094、B095; B097、B098; B101、

B102) 进行分子鉴定, 17 对常用引物的部分鉴定结果如图 1。进行分子鉴定的种质资源间扩增出的多态性不完全一致, 材料之间都存在 2 个以上多态性位点的差异 (表 7)。因此, 进行分子鉴定的烟草种质资源鉴定为新种质。



M: PBR322 DNA/Msp I marker; 1~17: 17 对常用引物 (参照表 2); 图中箭头所示为多态性位点

M: PBR322 DNA/Msp I marker, 1-17: 17 pairs of commonly used primers (according to Table 2), Arrows in the figure show the polymorphic site

图 1 B089 与 B090、B094 与 B095 分子鉴定结果

Fig. 1 B089 and B090, B094 and B095 molecular identification results

3 讨论

以前只通过田间表型鉴定烟草种质资源存在诸多问题, 一旦表型鉴定错误就会造成后续种质繁殖、保存、使用等一系列偏差。所以将田间表型鉴定与分子鉴定充分结合起来, 把种质资源来源地相同、名称相似、田间表型相近的资源进行分子鉴定, 做到准确编目、入库。本研究对全国第三次农作物种质资源普查与收集行动中湖北省收集的 77 份烟草种质资源进行两年一点编目试验, 国家烟草种质资源中期库中已编目湖北省烟草资源 388 份, 从中挑选出与 77 份新收集资源来源地一致、名称相似的 26 份资源进行田间表型鉴定。若中期库中挑选的对照资源与新收集资源或新收集资源之间田间表型差异大 (花色异同、有无叶柄、株型差异等), 则认为新收集

资源为烟草新种质资源, 而田间表型无法区分的资源则进行分子水平鉴定, 保证编目入库资源的特异性。目前, 随着第三代分子标记 SNP 技术的不断发展, 除了第二代分子标记 SSR 在广泛使用外, 其他类型的标记已经很少使用。有研究表明, SNP 标记和 SSR 标记在进行种质资源遗传多样性分析和资源鉴定时结果相差不大^[23]。M. T. Hamblin 等^[24]对 259 份玉米自交系利用 89 个 SSR 标记和 847 个 SNP 标记进行遗传多样性检测, 通过对比两种标记检测结果, 发现 SSR 标记和 SNP 标记检测结果近似。D. Van Inghelandt 等^[25]利用 359 个 SSR 和 8244 个 SNP 对 1537 份玉米自交系进行群体结构和遗传多样性分析, 发现两种标记均可以反映真实结果。SSR 标记具有数量丰富、多态性高且价格相对 SNP 标记更为低廉等诸多优点。因此, 本研究

表 7 鉴定资源之间多态位点差异

Table 7 The polymorphic information among germplasm resources

编号 Code	差异位点数 Number of different sites	编号 Code	差异位点数 Number of different sites	编号 Code	差异位点数 Number of different sites	编号 Code	差异位点数 Number of different sites	编号 Code	差异位点数 Number of different sites
B022	3	B033	16	B052	13	B054	18	B057	16
B023		B034		B058		B057		B058	
B022	8	B033	17	B052	18	B054	12	B057	16
B024		B035		B060		B058		B060	
B022	16	B034	19	B053	15	B054	17	B058	14
B026		B035		B054		B060		B060	
B023	11	B041	13	B053	17	B055	14	B071	18
B024		B042		B055		B056		B072	
B023	17	B048	20	B053	8	B055	21	B071	16
B026		B049		B056		B057		B073	
B024	19	B052	14	B053	18	B055	19	B072	20
B026		B053		B057		B058		B073	
B029	20	B052	11	B053	13	B055	18	B089	13
B030		B054		B058		B060		B090	
B032	17	B052	14	B053	15	B056	18	B094	12
B033		B055		B060		B057		B095	
B032	17	B052	12	B054	19	B056	12	B097	17
B034		B056		B055		B058		B098	
B032	20	B052	19	B054	12	B056	17	B101	16
B035		B057		B056		B060		B102	

通过对 2000 对 SSR 标记进行筛选,最终得到 25 对多态性高的 SSR 标记用于烟草种质资源分子鉴定。本研究利用 25 对 SSR 标记对 33 份田间表型鉴定不能区分的种质资源进行分子水平鉴定,发现进行分子鉴定的资源之间都存在 2 个位点以上差异,确定进行分子鉴定的新收集资源都为烟草新种质资源。结合表型鉴定,共有 77 份新编目烟草种质资源入国家种质资源库。

本研究通过对湖北省种质资源普查与收集的 77 份烟草种质资源进行田间鉴定,获得其生育期、形态特征、主要农艺性状等一系列编目入库所必需的数据和照片,并对新编目烟草种质资源进行主要病毒病抗性鉴定,发现 B035、B075 和 B076 等种质抗多种主要病毒病,B025 免疫 TMV。随着第三次种质资源普查与收集工作的不断进行,收集、编目的烟草种质资源数量不断增加^[1-2],将大大增加国家烟草种质资源中期库保存资源数目。通过对新收集的种质资源进行鉴定编目并上交国家烟草种质资源中期库,获得国家统一编号来进行统一保存,为以后

烟草种质资源更为广泛的利用提供便利。因此,要充分利用烟草种质资源平台的作用,借助第三次种质资源普查与收集行动,在全国范围内收集、鉴定、编目烟草种质资源,筛选出一批优质、抗病的种质资源作为育种亲本材料,为烟草育种工作奠定坚实基础。

参考文献

[1] 张兴伟,王志德,牟建民,等. 我国烟草种质资源现状与展望[J]. 中国烟草科学,2009,30(6):78-83

[2] 张兴伟,冯全福,杨爱国,等. 中国烟草种质资源分开发利用情况分析[J]. 植物遗传资源学报,2016,17(3):507-516

[3] 金妍姬,崔昌范,金爱兰,等. 延边 7 份新编目烤烟种质资源特征特性分析[J]. 中国烟草科学,2009,30(S):37-40

[4] 巫升鑫,方树民,潘建菁,等. 烟草种质资源抗青枯病筛选鉴定[J]. 中国烟草学报,2004,10(1):22-24,40

[5] 许美玲,赵立红,杨彦明. 抗主要病害烟草种质资源的筛选[J]. 种子,2005,24(7):59-61

[6] 许美玲. 优质抗病烤烟种质资源的筛选[J]. 中国农学通报,2006,22(10):402-406

[7] 许美玲. 优质抗病烤烟种质资源的筛选(续)[J]. 中国农学通报,2007,23(9):514-519

[8] 许美玲,赵立红,段玉琪,等. 抗 TMV 烟草种质资源材料的筛选和综合评价[J]. 植物遗传资源学报,2004,5(2):142-146

[9] 杨春元,王志红,吴春,等. 贵州省新引烤烟种质资源主要性状表现[J]. 中国种业,2009(3):75-78

- [10] 陈学平,王彦亭,孙光玲,等.烟草育种学[M].合肥:中国科学技术大学出版社,2002:36
- [11] Grodzicker T, Williams J, Sharp P, et al. Physical mapping of temperature-sensitive mutations of adenoviruses [J]. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1974, 39:439-446
- [12] 姚红伟,张立冬,孙金阳,等. DNA 分子标记技术概述[J]. 河北渔业, 2010(7):42-46
- [13] 马双武. 苗期标记性状在我国作物育种及种子纯度鉴定上的研究应用进展[J]. 植物遗传资源学报, 2011, 12(2):297-300,306
- [14] 许明辉,郑民慧,刘广田,等. 烟草品种 RAPD 分子标记遗传差异研究[J]. 农业生物技术学报, 1998, 6(3):281-285
- [15] Ren N, Timko M P. AFLP analysis of genetic polymorphism and evolutionary relationships among cultivated and wild *Nicotiana* species[J]. Genome, 2001, 44:559-571
- [16] 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[J]. 农业生物技术学报, 2006, 14(4):585-593
- [17] 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
- [18] 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
- [19] 潘应花,刘艳华,任民,等. 烟草种质不同群体量遗传完整性的 SSR 研究[J]. 植物遗传资源学报, 2013, 14(5):979-984
- [20] 陈杰,杨静,龙胜贤,等. SSR 分子标记在烟草研究中的应用进展[J]. 生物技术通报, 2015, 31(3):43-48
- [21] 姜洪甲,邢世东,马维广. 抗 TMV 烤烟种质资源材料筛选与利用研究初报[J]. 中国烟草科学, 2009, 30(S1):53-55
- [22] 许美玲. 烟草种质库种子清理与重新入库[J]. 中国农学通报, 2006, 22(9):425-428
- [23] Semagn K, Babu R, Hearne S, et al. Single nucleotide polymorphism genotyping using Kompetitive Allele Specific PCR (KASP): overview of the technology and its application in crop improvement [J]. Mol Breeding, 2014, 33:1-14
- [24] Hamblin M T, Warburton M L, Buckler E S. Empirical Comparison of Simple Sequence Repeats and Single Nucleotide Polymorphisms in Assessment of Maize Diversity and Relatedness [J]. PloS One, 2017, 2(12):e1367
- [25] Van Inghelandt D, Melchinger A E, Lebreton C, et al. Population structure and genetic diversity in a commercial maize breeding program assessed with SSR and SNP markers [J]. Theor Appl Genet, 2010, 120:1289-1299