

鉴定烟草种质资源 SSR 核心引物筛选和验证

尹国英¹, 杨小燕¹, 何其波¹, 曲存民^{1,2}, 张建奎^{1,2}, 戴秀梅^{1,2}

(¹西南大学农学与生物科技学院, 重庆 400716; ²重庆烟草科学研究所, 重庆 400716)

摘要: 核心引物对遗传多样性分析、种质资源鉴定、品种纯度和真实性检测、指纹图谱构建等研究具有重要价值。本研究利用均匀分布于烟草 24 条染色体的 278 对 SSR 引物, 对 20 份亲缘关系相对较远的烟草材料进行初步筛选, 筛选出 32 对引物。再加上 10 份亲缘关系较近的材料, 共 30 份烟草材料对 32 对引物进行复筛, 最终确定 14 对为核心引物, 并通过 12 份系谱已知的烟草材料进行有效性验证。利用 14 对核心引物对 39 份烟草材料进行遗传多样性聚类分析, 与农艺性状聚类分析相比较, 结果表明该套 SSR 核心引物适用于烟草种质资源鉴定和遗传多样性分析。

关键词: 烟草; SSR; 核心引物; 多态性

Screen and Identification of SSR Core Primers for Tobacco Germplasm

YIN Guo-ying¹, YANG Xiao-yan¹, HE Qi-bo¹, QU Cun-min^{1,2}, ZHANG Jian-kui^{1,2}, DAI Xiu-mei^{1,2}

(¹College of Agronomy and Biotechnology, Southwest University, Chongqing 400716;

²Chongqing Tobacco Scientific Research Institute, Chongqing 400716)

Abstract: Core primers are important for genetic diversity analysis, germplasm identification, purity and genuineness test, and fingerprint establishment. 278 pairs of SSR primers which evenly distributed in 24 chromosomes tobacco were initial screened on 20 tobacco germplasm stocks with relatively distant, and 32 pairs of primers were selected out. Another 10 germplasm stocks with similar relationship were used to screen the 32 pairs of primers and 14 pairs of SSR core primers were obtained. 14 pairs of SSR core primers were conducted on pedigree research, genetic diversity analysis and agronomic traits clustering study in 39 germplasm stocks. The results showed that the core primers could be applied to germplasm identification and genetic diversity study in tobacco.

Key words: tobacco; SSR; core primers; polymorphism

烟草作为一种嗜好性经济作物, 在国民经济中占有重要地位。随着生活水平的提高, 优质少害的烟草制品成为人们追求的目标。而优良烟草品种的选育需要发掘优异种质基因, 因此种质资源在现代烟草育种中的地位越来越重要^[1]。目前, 我国烟草种质库共收集到 5210 份资源, 是世界上烟草种质资源保存数量最多的国家。20 世纪 90 年代以来, 种质资源的研究也已从形态学、细胞学、生理生化等方面逐渐发展为以分子标记技术为核心的分子水平。目前, RAPD、RFLP、AFLP、SSR 等标记技术已在农作物遗传分析中被广泛应用^[2]。烟草分子标记研究

多以 RAPD 和 AFLP 为主, 任学良^[3]运用烟草种质资源的 16 对核心 SRAP 引物构建了 DNA 指纹图谱, 限于这些分子标记多态性较低, 因此, 筛选和建立一套数量较少的 SSR 核心引物十分必要。SSR 技术简单快速、具有共显性、可重复性高、遗传多态性丰富等特点, 在玉米、小麦、水稻、大豆等作物中已有核心 SSR 引物的构建和探索相关研究报道^[4], 但有关烟草种质核心 SSR 引物的研究尚未见报道。

本研究首先选用 30 份烟草种质资源, 综合考虑 PIC 值大小、带型清晰度、引物重复性及连锁群分布等因素, 从 278 对 SSR 引物中筛选出 14 对引物为适合于

收稿日期: 2012-11-14 修回日期: 2012-12-27 网络出版日期: 2013-08-09

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20130809.1120.002.html>

基金项目: 中国烟草总公司重庆市公司“烟草种质资源收集整理及遗传背景分析”项目

第一作者主要从事作物遗传育种研究。E-mail: 13883478871@163.com

通信作者: 戴秀梅, 从事作物遗传育种研究。E-mail: dxm72031@swu.edu.cn

烟草品种鉴定的 SSR 核心引物,并通过 12 份系谱已知的烟草材料进行有效性验证。利用建立的这套核心引物对 39 份烟草种质资源进行遗传多样性聚类分析,与农艺性状聚类分析相比较以验证其准确性和实用性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 参试品种(系) 共选用 39 份烟草材料进

表 1 参试品种(系)及其类型

Table 1 Tested accessions and their types

序号 Code	品种(系) Varieties	类型 Type	序号 Code	品种(系) Varieties	类型 Type
1	RG97	烤烟	21	Samsun	香料烟
2	MC944	烤烟	22	贵烟 2 号	烤烟
3	阮 29EC3	晒烟	23	马里兰	晒烟
4	K326	烤烟	24	NC567	烤烟
5	SC71	烤烟	25	河北保定保南烟	晒烟
6	KRK26	烤烟	26	重庆彭水桑柘镇土烟	晒烟
7	云烟 2 号	烤烟	27	威信土烟 1 号	晒烟
8	多叶型白肋烟	白肋烟	28	PVH2254	烤烟
9	中烟 104	烤烟	29	武隆土烟 2 号	晒烟
10	巴斯马	香料烟	30	四川阆中土烟	晒烟
11	南江 3 号	烤烟	31	中烟 103	烤烟
12	西大野烟 2 号	野烟	32	红花大金元	烤烟
13	野 N. stocktonij	野烟	33	云烟 85	烤烟
14	毕纳 1 号	烤烟	34	云烟 87	烤烟
15	coker176	烤烟	35	云烟 97	烤烟
16	甘肃清源镇土烟	晒烟	36	云烟 99	烤烟
17	陕西汉中土烟 1 号	晒烟	37	G28	烤烟
18	涪陵土烟	晒烟	38	秦烟 96	烤烟
19	黄花烟	黄花烟	39	韭菜坪 2 号	烤烟
20	汉中土烟 13 号	晒烟			

行遗传多样性和农艺性状聚类比较,包括烤烟 22 份、晒烟 11 份、白肋烟 1 份、香料烟 2 份、野生烟 2 份、黄花烟 1 份(表 1)。其中 1~30 号材料用于核心引物筛选;31~39 号材料以及 4 号(K326)、9 号(中烟 104)和 11 号(南江 3 号)这 12 份烤烟品种系谱已知,用来进行核心引物有效性验证。材料均由贵州大学及重庆烟草科学研究所提供。

1.1.2 SSR 引物 278 对 SSR 引物均选自 G. Bindler 等^[5]报导的基于烟草遗传图谱的微卫星标记。引物由英潍捷基(上海)贸易有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取 材料均在温室种植,3 叶期选取性状相似的 5~6 株材料嫩叶混合,采用 CTAB 法提取 DNA^[5],并用 Beckman DU600 紫外分光光度计检测纯度与浓度,按照浓度大小稀释成 100 ng/ μ L, -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.2.2 PCR 扩增 PCR 扩增反应总体积为 10 μ L, 反应物包括 10 \times PCR buffer 1.67 μ L, dNTPs

(10 mmol) 0.25 μ L, Taq 酶 (5U/ μ L) 0.125 μ L, MgCl₂ (25 mmol/L) 0.3125 μ L, 前引物 F-Primer (50 ng/ μ L) 0.365 μ L, 后引物 P-Primer (50 ng/ μ L) 0.365 μ L, 模板 DNA (20 ng/ μ L) 1 μ L, 加 ddH₂O 至 10 μ L。PCR 反应在 System-9700 型扩增仪上进行。反应扩增程序为:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,55~60 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,35 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10min,16 $^{\circ}$ C 保存。扩增产物的检测按银染法进行。

1.2.3 核心引物的筛选 选用 20 份(表 1 中序号为 1~20)农艺性状差异较大、亲缘关系相对较远的

烟草种质作为试验材料,对 278 对 SSR 引物进行初步筛选。再加用 10 份(表 1 中序号为 20~30)亲缘关系相对较近的材料对初筛出来的引物进行复筛,以稳定性好、条带清晰、易于统计、多态性丰富作为标准,确定核心引物。

1.2.4 核心引物的验证 利用筛选出的核心引物对已知系谱的 12 个烟草品种(表 1 中序号为 31~39 号及 4 号、9 号、11 号)进行分析,构建遗传聚类图,根据聚类结果验证核心引物系谱分析的有效性。

1.3 数据统计分析

1.3.1 SSR 分子标记分析 统计凝胶电泳上清晰稳定、有差异的条带,有带赋值为 1,无带赋值为 0,根据带型统计结果进行遗传多态性分析。采用 STATISTIC 分析软件 NTSYSpc 1.0.0.0 计算遗传距离(GD, genetic distance),并进行 UPGMA 聚类分析。计算位点多态信息含量(PIC)^[6], $PIC = 1 - \sum P_i^2$; Shannon-Weaver 多样性指数也称基因型多样性(H' , diversity)^[7], $H' = -\sum P_i \ln P_i$; 每个位点的有效等位基因数 N_e (effective number of alleles)^[7], $N_e = 1/\sum P_i^2$, 其中 P_i 为第 i 个等位基因出现的频率。

1.3.2 农艺性状分析 39 份材料均种植在西南大

学试验田中,观察统计不同材料的农艺性状,包括株高、茎围、节距、最大叶长、最大叶宽、有效叶片数、大田生育期、叶层高、叶层宽等 9 个农艺性状,利用 Excel 2003 软件对 39 份烟草材料的农艺性状统计数据进行处理,用 DPS(V7.05) 软件进行聚类,构建农艺性状遗传聚类图,并与 39 份材料的 SSR 分子标记结果进行比较,验证核心引物的实用性。

2 结果与分析

2.1 SSR 核心引物的筛选

根据 G. Bindler 等^[5]报导的基于烟草遗传图谱的微卫星标记,合成了 278 对 SSR 引物,用 20 份表型性状和遗传差异较大的材料进行核心引物初步筛选,有 32 对引物多态性相对较好、带型清晰,占引物总数的 11.51%。增加 10 份遗传距离相对较近的材料复筛后,最终确定 14 对首选核心引物,占复筛引物的 40.63%,占引物总数的 4.68%。图 1 为核心引物 PT40021 对参试材料扩增片段的银染图。由图 1 可以看出,核心引物条带清晰、多态性丰富,在不同品种间差异显著,能有效区分种质。

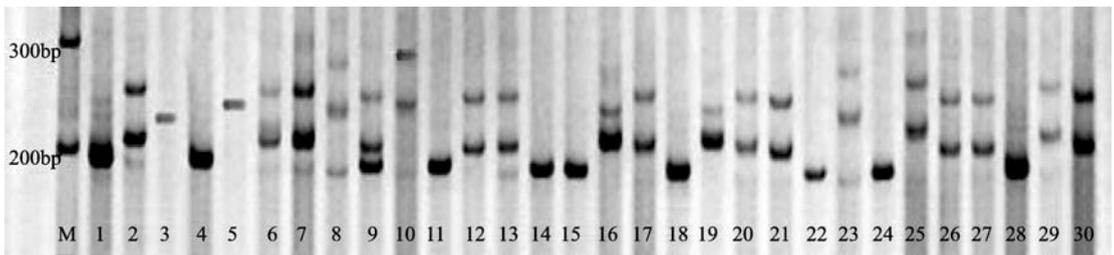


图 1 引物 PT40021 在参试材料中扩增出的等位基因片段银染图

Fig. 1 Original silver-stained profiles of the alleles amplified in materials by SSR primer PT40021

2.2 SSR 标记多态性信息

32 对初筛引物定位在烟草的 22 条染色体上,除 18 号和 21 号染色体以外,其余染色体上均有分布,平均每对染色体上有 1.45 个。14 对复筛引物均匀地分布在不同的染色体组上,1 号和 4 号染色体上分布 2 对,其余染色体各分布 1 对。14 对核心引物分别是 PT20213、PT30021、PT30028、PT30159、PT30224、PT30259、PT30380、PT30399、PT30403、PT30424、PT30470、PT40021、PT40024、PT30421,在 30 个参试种质中共检测到 113 个等位基因变异,平均每个 SSR 有 8.08 个,变幅为 7~12,其中具有多态性的位点为 108 个,占有等位基因的 95.57%。核心引物检测到的位点多态性信息含量(PIC)值为

0.44~0.89,平均 0.68, PIC 在 0.68 以上的引物有 8 对;基因型多样性(H')为 1.46~3.20,平均 2.36;有效等位基因数(N_e)为 2.78~9.30,平均 5.96(表 2)。

2.3 核心引物有效性的理论推测

理论上 SSR 引物可以区分的最大品种数 $N = G_1 \times \dots \times G_n$, 其中 $G_1 \dots G_n$ 分别为 1...n 对引物在参试品种中检测到的基因型个数,出现相同指纹图谱的概率为: $P = 1/N$ ^[8]。本试验筛选出的 14 对核心引物在 30 个品种中共检测到 108 个基因型,那么 14 对核心引物理论上可区分的最大品种数为: $N = 12 \times 10 \times 8 \times 10 \times 7 \times 5 \times 7 \times 7 \times 6 \times 6 \times 7 \times 11 \times 4 \times 8 = 1.46 \times 10^{12}$, 出现相同指纹图谱的概率为: $P = 6.85 \times$

表 2 核心引物在参试种质中的多态性信息

Table 2 Core primers' polymorphism information in the panel

引物 Primer	染色体 Linkage group	等位基因数 No. of allele	有效等位基因数 <i>N_e</i>	基因型多样性 <i>H'</i>	多态信息含量 <i>PIC</i>
PT20213	12	12	9.6782	3.1651	0.7281
PT30021	4	10	7.7398	2.7675	0.7890
PT30028	22	8	6.4819	2.9739	0.4452
PT30159	14b	10	7.6209	3.2010	0.6184
PT30224	4	7	4.8515	2.1890	0.7404
PT30259	1	5	4.1056	1.6226	0.5251
PT30380	10	7	5.3235	2.1801	0.7687
PT30399	17	7	5.2609	2.2243	0.7653
PT30403	14a	6	4.9584	1.8452	0.6620
PT30424	1	6	4.3350	2.1874	0.7693
PT30470	8a	7	5.0114	2.2920	0.8005
PT40021	3b	11	9.2982	2.5508	0.8925
PT40024	24	4	2.7795	1.4615	0.4381
PT30421	9	8	6.2342	2.5410	0.4635

a、b 分别代表同一对染色体中不同的染色单体

a, b respectively represent the same chromosome type chromatid

10^{-13} ; 因此从理论上讲这 14 对核心引物进行烟草品种的鉴定是完全可行的。

2.4 核心引物有效性验证

2.4.1 核心引物系谱分析有效性验证

利用 14 对核心引物对已知系谱的 12 个烟草品种进行分析, 构建遗传聚类图(图 2)。从图 2 可以看出, 当相似系数为 0.87 时聚为 4 类, 云烟 85、云烟 87 和 K326 聚为 I 类, 云烟 97、云烟 99 聚为 II 类, 韭菜坪 2 号、G28、秦烟 96 聚为 III 类, 中烟 104、南江 3 号、中烟 103 和红花大金元聚为 IV 类。I 类品种的亲本中, 均含有 K326 的血缘, II 类品种含有云烟 85 的血缘, III 类和 IV 类分别含有 G28 和韭菜坪 2 号的血缘, 从而严格地聚为一类。相似系数为 0.85 时, 云烟 85、云烟 87、K326、云烟 97 和云烟 99 聚为一类, 因云烟 97 和云烟 99 由云烟 85 与其他品种杂交选育而来, 而云烟 85 是由 K326 与云烟 2 号杂交培育的品种, 因而上述品种均具有 K326 的血缘, 从而可以聚为一类。

2.4.2 烟草种质遗传多样性和农艺性状聚类比较

图 3、图 4 分别为参试材料的遗传关系聚类图和参试材料的农艺性状聚类图。由图 3 和图 4 可以看出, 两个聚类结果基本一致, 均将 39 份材料分为 5 大类, 各类所包含的材料基本吻合, 仅有部分品种有差异, 可能是因为环境等气候因素造成农艺性状有差异或者是由数据统计时的误差造成结果略有偏差。

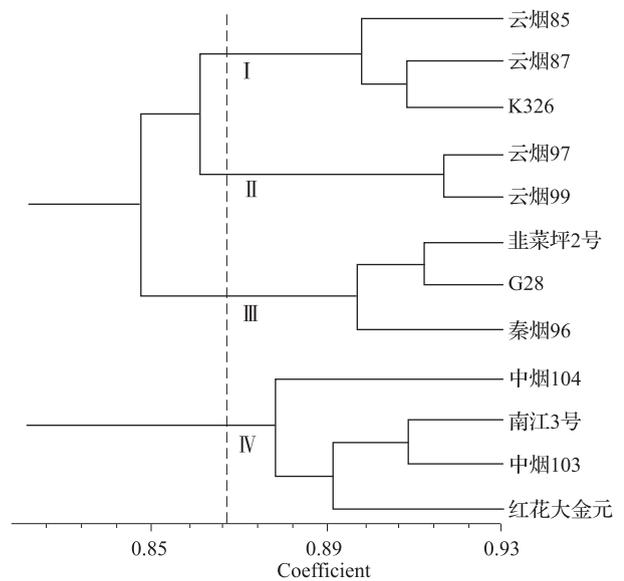


图 2 核心引物验证材料的聚类分析图

Fig. 2 Dendrogram of the tested accessions with core primer identification

14 对 SSR 核心引物能将 39 个参试材料区分为 5 类。I 类共 24 份材料, 包括大多数烤烟, 占有所有材料的 61.52%; II 类包括多数地方烟; III 类为四川阆中土烟; 野 N. S 为 IV 类; V 类包括甘肃清源土烟和黄花烟 2 个品种(系)。从农艺性状的表现来看, V 类烟草植株矮小, 叶片多而小, 生育周期短, 与其他烟草植株存在明显差异; IV 类烟草植株与 V 类相似, 植株小, 叶片多, 但花和果实明显小于 V 类烟草植株; III 类烟草植株叶片厚实而小, 植株矮小, 不适

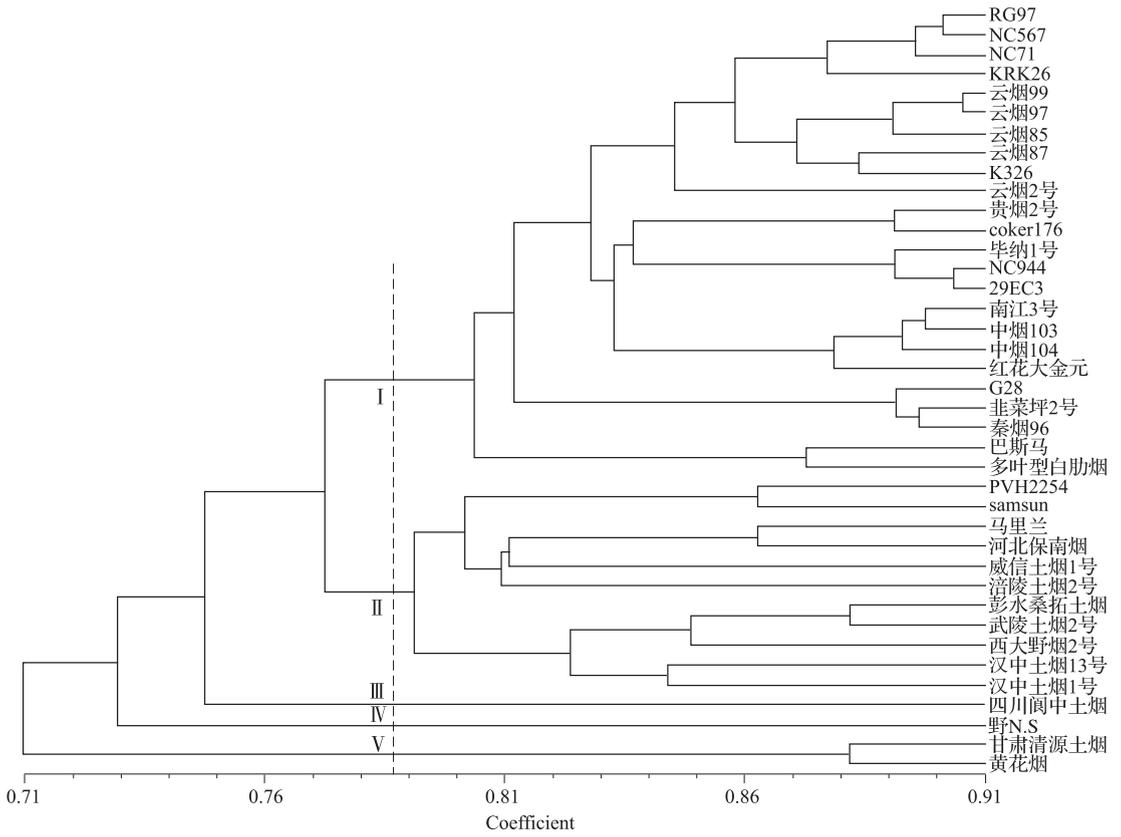


图3 参试材料的遗传关系聚类分析

Fig. 3 Dendrogram of genetic relationship of the tested accessions

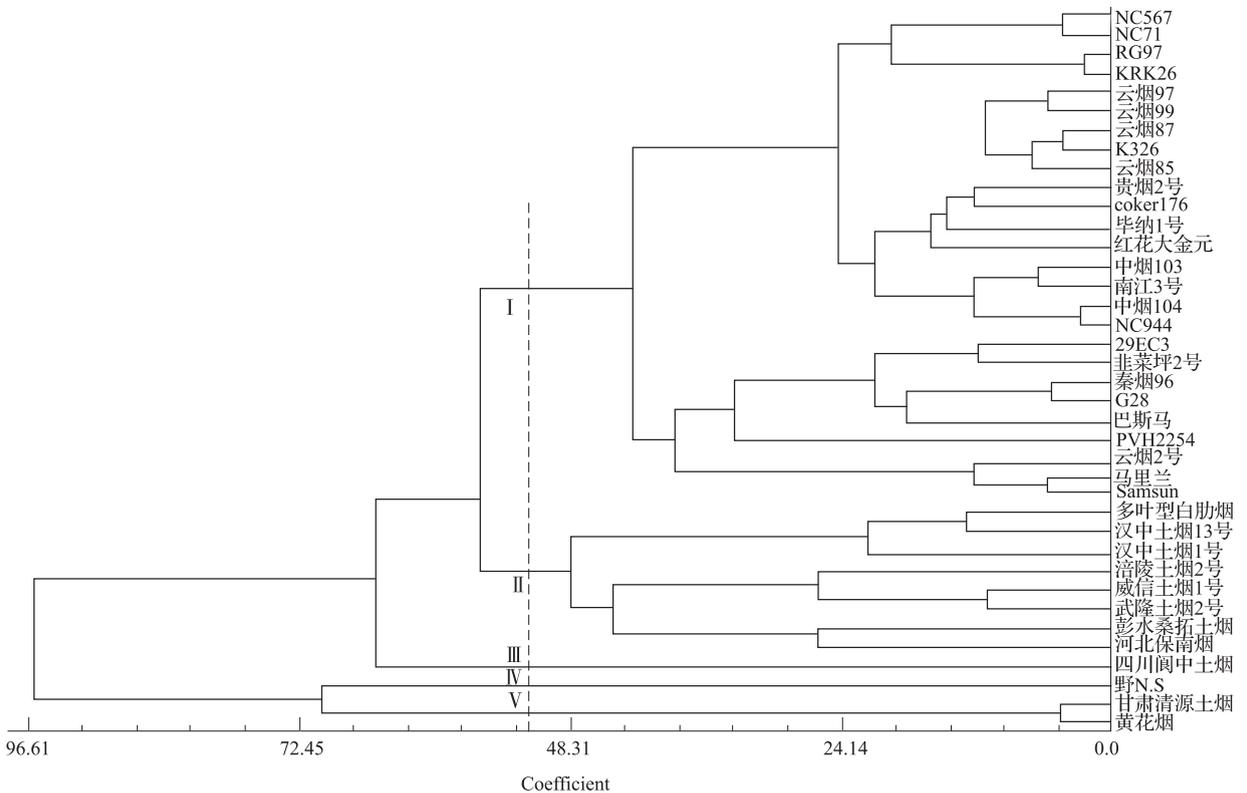


图4 参试材料的农艺性状聚类分析

Fig. 4 Dendrogram of agronomic characters of the tested accessions

应于大田生产; II 类烟草和 I 类烟草各种农艺性状表现良好, 与其他烟草植株相比存在明显优势。因此, 核心引物的聚类结果与烟株田间性状相吻合, 说明该套引物可以用于烟草种质资源的遗传多样性分析。

3 讨论

近年来, SSR 分子标记被广泛应用于作物的遗传多样性和育种研究^[9], 并在多种作物上都已经建立了核心引物研究体系, 如魏丽娟^[10]筛选出 190 对甘蓝型油菜 SSR 核心引物, 并用于油菜种质资源的遗传多样性分析; 王栋等^[11]用 100 份具有代表性的甘蓝型油菜品种对 746 对 SSR 引物进行筛选, 确定 20 对首选核心引物。张小娟等^[12]利用 60 对 SSR 核心引物对大豆遗传完整性进行了分析。利用核心引物在分子水平上研究种质资源, 是提高作物育种效率的有效方法^[13]。本试验选用的参试种质包括了烤烟、晒烟、白肋烟、香料烟、野生烟、黄花烟 6 种主要烟草品种, 因此, 能筛选出适合不同烟草种质的分子标记, 为研究各种烟草类群提供了方便, 而且参试种质中烤烟的数量最多, 这为研究当前世界上种植面积最多的烤烟品种的多样性提供了对比材料。

本研究选用 30 份烟草材料进行核心引物筛选, 利用其中 20 份亲缘关系较远的材料对 278 对 SSR 引物进行初筛, 筛出了 32 对引物, 再加用 10 份亲缘关系较近的材料进行复筛, 选出 14 对多态性丰富、条带清晰、区分度好的核心引物, 该套核心引物较均匀地定位在不同的染色体组上。引物的位点多态信息含量 (PIC)、基因型多样性 (H')、有效等位基因数 (N_e) 是反映遗传多样性和基因有效性的尺度, D. Botstein 等^[14]提出: $PIC > 0.5$ 为高度多态性, $0.25 < PIC < 0.5$ 为中度多态性, $PIC < 0.25$ 为低度多态性; 另外, 基因型多样性 (H') 值越大表示多态性越丰富, $H' < 1$ 为低多态性, $1 < H' < 3$ 为中度多态性, $H' > 3$ 表示高度多态性^[15-16]。本研究 14 对核心引物 PIC 值为 0.44 ~ 0.89, 平均值为 0.68, PIC 在 0.5 以上的引物有 11 对; H' 为 1.46 ~ 3.20, 平均 2.36; N_e 平均为 5.96, 占有所有等位基因的 95.57%。研究结果表明 14 对核心引物表现出丰富而稳定的多态性, 具有较好的区分度。

刘峰等^[8]提出利用 SSR 标记筛选棉花核心引物时, 可以区分的品种数为每个核心引物检测到的

基因型数的乘积。根据这个方法本套核心引物理论上可以区分的品种 (系) 数量最大为 $N = 1.46 \times 10^{12}$ 。因此, 理论上这套核心引物进行烟草品种鉴定是完全可行的。通过系谱有效性聚类分析以及与农艺性状聚类比较可知, 当相似系数为 0.85 时, 可以将含有 K326、云烟 85、G28 和红花大金元血缘的不同品种分别聚为一类, 而且农艺性状表现相似的材料能在核心引物分析中聚为一类。分类结果与系谱来源相吻合, 与田间性状具有较高的一致性。因此本研究确定的 14 套 SSR 核心引物可用于烟草的品种纯度鉴定、遗传多样性分析及 DNA 指纹图谱的构建。

参考文献

- [1] 张艇. 烟草种质资源的遗传多样性研究[J]. 农技服务, 2010, 27(1):101-103
- [2] Paterson A H, Brubaker C L, Wendel J F. A rapid method for extraction of cotton (*Gossypium* spp.) genomic DNA suitable for RFLP and PCR analysis [J]. Plant Mol Biol Rep, 1993, 11: 122-127
- [3] 任学良. 烟草种质资源 DNA 指纹图谱[M]. 北京: 科学出版社, 2010:3-4
- [4] Dong Y C, Cao Y S, Zhang X Y, et al. Establishment of candidate core collections in Chinese common wheat germplasm [J]. J Plant Genet Res, 2003, 26:41-48
- [5] 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
- [6] 沈童伟, 陆徐忠, 刘勋辉, 等. SSR 标记鉴定玉米品种亲系关系的研究 [J]. 安徽农业科学, 2009, 37(25): 12347-12350, 12360
- [7] 潘兆娥, 孙君灵, 王西文, 等. 基于棉花参比种质的 SSR 多态性核心引物筛选 [J]. 生物多样性, 2008, 16(6):555-561
- [8] 刘峰, 冯雪梅, 钟文, 等. 适合棉花品种鉴定的 SSR 核心引物的筛选 [J]. 分子植物育种, 2009, 7(6):1160-1168
- [9] 韩瑞霞, 张宗文, 吴斌, 等. 苦荞 SSR 引物开发及其在遗传多样性分析中的应用 [J]. 植物遗传资源学报, 2012, 13(5): 759-764
- [10] 魏丽娟. 甘蓝型油菜种质资源遗传多样性 SSR 分析及芸薹属核心 SSR 引物筛选 [D]. 重庆: 西南大学, 2012:27-32
- [11] 王栋, 卢新雄, 张志娥, 等. SSR 标记分析种子老化及繁殖世代对大豆遗传完整性的影响 [J]. 植物遗传资源学报, 2010, 11(2):192-199
- [12] 张小娟, 何团结, 陆徐忠, 等. 陆地棉 SSR 核心引物筛选及 95 份骨干种质的遗传多样性分析 [J]. 棉花学报, 2011, 23(6): 529-536
- [13] 李海渤, 杨军, 吕译文, 等. 甘蓝型油菜 SSR 核心引物研究 [J]. 中国油料作物学报, 2010, 32(3):329-336
- [14] Botstein D, White R L, Skolnick M, et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms [J]. Am J Hum Genet, 1980, 32(3):314-331
- [15] 王风格, 赵久然, 戴景瑞, 等. 玉米通用 SSR 核心引物筛选及高通量多重 PCR 复合扩增体系建立 [J]. 科学通报, 2006, 51(23):2738-2746
- [16] 张丽娜, 叶武威, 王俊娟, 等. 棉花耐盐相关种质资源遗传多样性分析 [J]. 生物多样性, 2010, 18(2):137-144