

# 利用 RAPD 和 ISSR 标记分析烤烟品种间遗传关系

肖炳光

(中国烟草育种研究(南方)中心, 云南省烟草科学研究所, 云南玉溪 653100)

**摘要:** 利用 RAPD 和 ISSR 标记对 22 份烤烟(*Nicotiana tabacum* L.)品种进行了遗传关系研究。在 RAPD 分析中筛选到 13 个引物, 共扩增出 167 条带, 其中多态性带 50 条, 多态性比率为 29.9%; 在 ISSR 分析中筛选出 7 个引物, 共扩增出 96 条带, 其中多态性带 44 条, 多态性比率为 45.8%。两种标记相结合估算出的品种间遗传相似系数在 0.881~0.979 之间, 平均为 0.933。单独基于 RAPD 标记和 ISSR 标记的聚类结果有一定差异; 两种标记结合起来的聚类分析结果与系谱信息吻合程度更高。定向选择可能对烤烟品种间遗传关系有较大影响; 国外引进品种与国内育成品种并未完全分开, 表明分子水平的遗传关系和地理来源间缺乏必然联系。

**关键词:** 烤烟(*Nicotiana tabacum* L.); RAPD; ISSR; 聚类分析; 遗传关系

中图分类号: Q346.5; S572

文献标识码: A

文章编号: 1000-470X(2006)05-0392-05

## Assessment of Genetic Relationships between the Flue-cured Tobacco Varieties by RAPD and ISSR Markers

XIAO Bing-Guang

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

**Abstract:** The genetic relationships between 22 flue-cured tobacco varieties were assessed by RAPD and ISSR markers. For RAPD analysis, 13 random primers were identified with polymorphism among the entries. In total 167 bands were produced, of which 50 bands were polymorphic. Percentage of polymorphic bands was 29.9%. For ISSR analysis, 7 primers were identified with polymorphism among the entries. In total 96 bands were produced, of which 44 bands were polymorphic. Percentage of polymorphic bands was 45.8%. Pairwise similarity coefficients combining both RAPD and ISSR markers ranged between 0.881 and 0.979, with an average of 0.933. Clustering of genotypes had some differences when RAPD- and ISSR-derived dendograms were compared. The dendrogram combining both two markers was more comparable to the information on pedigree. The selection pressure had great effects on the genetic relationships between varieties. The fact that the introduced varieties from abroad were not separated from the developed varieties in China implied that the genetic relationships based on the molecular marker data did not correspond well with the geographic sources.

**Key words:** Flue-cured tobacco(*Nicotiana tabacum* L.); RAPD; ISSR; Cluster analysis; Genetic relationship

烟草(*Nicotiana tabacum* L.)是我国重要的经济作物之一。我国栽培的烟草一般分为烤烟、晒烟、晾烟、白肋烟、香料烟、黄花烟 6 种类型, 其中烤烟是我国、也是世界上栽培面积最大的烟草类型<sup>[1]</sup>。自 20 世纪初开展烤烟育种以来, 由于国内外一般都集中使用少数骨干亲本, 加之定向选择, 根据表型难以对烤烟品种间的遗传关系做出准确评价。

分子标记直接在 DNA 水平上阐明遗传差异, 与基因表达无关, 从而为遗传差异评价提供了有效手段。RAPD(random amplified polymorphic DNA)技术

是由 Williams 等<sup>[2]</sup>创立的一种建立在 PCR 基础之上的分子标记技术, 它使用一系列具有 10 个左右碱基的单链随机引物, 对基因组 DNA 进行 PCR 扩增, 以检测多态性; 由 Zierkiewicz 等<sup>[3]</sup>发展起来的 ISSR (inter-simple sequence repeats) 技术则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。这两种标记均不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, 因而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

收稿日期: 2006-02-14, 修回日期: 2006-08-07。

基金项目: 中国烟草总公司云南省公司科技计划项目(02A01, 05-03)。

作者简介: 肖炳光(1971-), 男, 助理研究员, 博士, 从事烟草遗传育种研究(E-mail: xiaobg@263.net)。

状基因定位等方面得到了广泛应用<sup>[4,5]</sup>。

近年来,关于烟草品种的 RAPD<sup>[6-9]</sup>、ISSR<sup>[10,11]</sup>和 SRAP<sup>[12]</sup>分析已有报道,但对我国现有推广品种和骨干亲本的遗传关系研究较少。本研究的主要目的是利用 RAPD 和 ISSR 技术对我国烤烟主要推广品种和优质抗病亲本进行遗传关系分析,为合理选配亲本提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试烤烟(*Nicotiana tabacum* L.)品种 22 个(见表 1),由中国烟草育种研究(南方)中心提供。其中包括当前主栽品种如“K326”、“云烟 85”和“NC89”,优质亲本如“红花大金元”、“G-28”和“株 41”,抗性材料如“Coker176”(抗 TMV)、“净叶黄”(抗赤星病)和“Ti245”(抗 TMV 和 CMV)等。

表 1 供试烤烟品种及其系谱

Table 1 The flue-cured tobacco varieties and their pedigrees in this study

编号 No.	品种 Variety	系谱 Pedigree	来源 Source
1	NC2326	((Hicks × 9102) × Hicks) × Hicks	美国
2	G-28	(Oxford 1-181 × Coker139) F <sub>4</sub> × NC95	美国
3	净叶黄	长脖黄系选	河南
4	K326	McNair225 × (McNair30 × NC95) (Coker258 × (61-10 × Coker319) × Coker258 × (Coker139 × 59-84-2F)) × (Coker258 × (61-10 × Coker319) × Coker258 × (Coker139 × 59-84-2F)) DWARF	美国
5	Coker176	大金元系选	云南
6	红花大金元	6129 × Coker319	美国
7	NC82	云烟 4 号 × K326	云南
8	株 41	云烟 4 号 × K326	云南
9	云烟 317	云烟 4 号 × K326	云南
10	NC89	NC95 × Hicks	美国
11	SC71	(Coker139 × Va45) × NC95	美国
12	K358	McNair926 × 80241	美国
13	云烟 85	云烟 2 号 × K326	云南
14	77089-12	临朐 1 号 × Va115	云南
15	CF965	((((NC82 × 9210) × NC82) × NC82) × NC82) × NC82	山东
16	云烟 2 号	红花大金元 × G-28	云南
17	CV87	(CV58 × G-28) × (CV58 × (G-28 × NC82) F <sub>1</sub> )	山东
18	大白筋 599	大白筋系选	山东
19	中烟 90	(单育 2 号 × G-28) × (G-28 × 净叶 黄)	山东
20	G-80	G-45 × G-28	美国
21	C151	Ti245 × 75-81	广东
22	Ti245	不详	美国

### 1.2 DNA 提取

每份材料播种在铺有湿润滤纸的培养皿中,取萌发 20 d 左右的芽 0.2 g,利用 DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) 提取基因组 DNA,调节 DNA 浓度为 20 ng/μL。

### 1.3 RAPD 分析

PCR 反应体积为 25 μL/管,反应体系中含 1 × Buffer (10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.3, 50 mmol/L KCl, 0.1% Triton X-100), 2.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 4 种 dNTP 各 0.2 mmol/L, 1U Taq 酶(以上 PCR 试剂均购自 Promega), 0.5 μmol/L 引物(由大连宝生物有限公司合成), 20 ng 模板 DNA。PCR 扩增在 GeneAmp PCR System 9600 (Perkin Elmer) 上进行,先在 94℃ 下预变性 4 min; 再进行 45 个循环的变性(94℃ 30 s)、退火(36℃ 30 s)、延伸(72℃ 66 s) 步骤; 最后在 72℃ 下继续延伸 5 min。

扩增产物加 1/6 体积的上样缓冲液(40% 蔗糖, 0.025% 溴酚蓝), 取 10 μL 在 1.4% 的琼脂糖凝胶中电泳(5 V/cm), 0.5 μg/mL 溴化乙锭中染色 30 min 左右, 在 VDS (Pharmacia) 上观测结果并照相。

### 1.4 ISSR 分析

PCR 反应体系中 MgCl<sub>2</sub> 浓度为 1.5 mmol/L, 4 种 dNTP 浓度各为 0.1 mmol/L, 引物浓度为 0.4 μmol/L, 退火温度为 45℃, 其它与 RAPD 分析相同。

### 1.5 数据处理

扩增产物仅定性地以同样长度的片段在各品种中出现(计为 1)或缺失(计为 0)进行统计,建立 1,0 型数据。每两个品种间的遗传相似系数用 Nei 等<sup>[13]</sup>的公式计算:  $GS_{ij} = 2N_{ij}/(N_i + N_j)$ , 式中  $N_{ij}$  指两品种共有的带数,  $N_i + N_j$  指两品种所有带数之和。利用 NTSYSpc Version 2.0 软件<sup>[14]</sup>按照 UPG-MA 法进行聚类分析,构建聚类图。

## 2 结果与分析

### 2.1 烤烟分子标记的多态性

RAPD 分析中,首先用 6 个品种(“NC2326”、“G-28”、“净叶黄”、“K326”、“Coker176”和“红花大金元”)对 200 个 10 碱基随机引物(operon technologies)进行筛选,13 个引物能扩增出清晰、重复性好、品种间有差异的带型,其它引物没有检测到扩增产物、或扩增产物在品种间没有多态性、或扩增结果不稳定。由这 13 个引物在 22 个品种中共扩增出 167 条带(图 1 为引物 OPA11 的扩增结果),其中多态性



图 1 RAPD 引物 OPA11 的扩增结果

Fig. 1 Profile amplified by RAPD primer OPA11  
[M: 250 bp DNA ladder (Gibco BRL)]

带 50 条(表 2), 多态性比率为 29.9%, 每个引物可扩增出 1~7 条多态性带, 平均产生 3.8 条。

在 ISSR 分析中, 用上述 6 个品种对 90 个 ISSR 引物 (University of British Columbia) 进行筛选时, 7 个引物扩增出清晰、重复性好、品种间有差异的带

表 2 产生多态性带的 RAPD 和 ISSR 引物

Table 2 The RAPD and ISSR primers which produced polymorphic bands

标记 种类 Types of marker	引物 Primer	序列* Sequence (5'-3')	扩增总 带数 Total number of bands	多态性 带数 Number of polymorphic bands	多态性带 比率(%) Percentage of polymor- phic bands
RAPD	OPA8	GTGACGCTAGG	18	5	27.8
	OPA10	GTGATGCGCAG	15	4	26.7
	OPA11	CAATGCGCCGT	18	7	38.9
	OPA16	AGCCAGCGAA	16	6	37.5
	OPB-13	TTCCCCCGCT	14	5	35.7
	OPC-12	CACCGTATCC	10	2	20.0
	OPD-1	ACCCGCAAGG	15	4	26.7
	OPE-7	AGATGCGACCG	10	1	10.0
	OPE-8	TCAACCGGT	7	2	28.6
	OPE-17	CTACTGCGGT	12	6	50.0
	OPF-1	ACCGATCTCG	9	3	33.3
	OPF-6	AAGGGCCGAG	14	3	21.4
合计 Total		167	50	29.9	
ISSR	UBC812	(GA) <sub>8</sub> A	15	5	33.3
	UBC811	(GA) <sub>4</sub> C	10	3	30.0
	UBC830	(TG) <sub>4</sub> G	11	7	63.6
	UBC857	(AC) <sub>4</sub> YG	14	4	28.6
	UBC873	(GACA) <sub>4</sub>	16	8	50.0
	UBC878	(GGAT) <sub>4</sub>	15	13	86.7
	UBC890	VHV(GT) <sub>7</sub>	15	4	26.7
合计 Total		96	44	45.8	

\* Y = C/T; V = A/C/G; H = A/T/C。

型。由这 7 个引物在 22 个品种中共扩增出 96 条带(图 2 为引物 UBC873 的扩增结果), 其中多态性带 44 条(表 2), 多态性比率为 45.8%, 每个引物可扩增出 3~13 条多态性带, 平均产生 6.3 条。

## 2.2 聚类分析

根据 RAPD 和 ISSR 分析建立的 1,0 型数据, 计

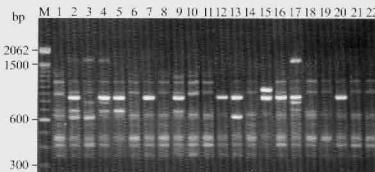


图 2 ISSR 引物 UBC873 的扩增结果

Fig. 2 Profile amplified by ISSR primer UBC873  
[M: 100 bp DNA ladder (Gibco BRL)]

算出成对品种间遗传相似系数分别在 0.909~0.988 和 0.809~0.985 之间。由这两种标记得到的遗传相似系数间呈极显著相关, 但相关系数较小, 仅为 0.232。于是合并这两种标记的分析结果, 计算出成对品种间遗传相似系数在 0.881 (“CV87” 和 “中烟 90”) 与 0.979 (“C151” 和 “T245”) 之间, 平均为 0.933, 表明烤烟品种间遗传相似程度较高, 但不同品种间的遗传相似系数仍有一定变化幅度, 可按需要选择遗传差异不同的品种作为杂交亲本。

以品种间遗传相似系数为基础, 按 UPGMA 法进行聚类分析并作聚类图。利用 RAPD 标记进行聚类分析时(图 3:A), 在相似系数 0.95 处可将参试品种初步分为 4 类。“NC89”和“NC2326”具有共同亲本 Hicks, “T245”是“C151”的亲本, 它们被聚在类群 I; “G-80”及其亲本“G-28”、“云烟 85”及其亲本“K326”被聚在类群 III; 但也出现与系谱信息不符的情况, 如“云烟 2 号”及其亲本“红花大金元”分别被聚在类群 I 和 III, “中烟 90”及其亲本“净叶黄”分别被聚在类群 III 和 IV。利用 ISSR 标记进行聚类分析时(图 3:B), 在相似系数 0.90 处可将参试品种初步分为 4 类, 其中类群 I 又可在相似系数 0.935 处分为 3 个亚类。与 RAPD 分析类似, “NC2326”和“NC89”、“C151”及其亲本“T245”均被聚在亚类 I a; 而“云烟 2 号”及其亲本“红花大金元”则分别被聚在类群 III 和 I a, “中烟 90”及其亲本“净叶黄”分别被聚在类群 I a 和 IV。比较 RAPD 和 ISSR 标记的聚类分析结果(图 3:A, B), 尽管有相似之处, 但也存在一定差异, 如“CF965”和“云烟 85”在基于 RAPD 标记的聚类图中分别被聚在类群 I 和 III, 而在基于 ISSR 标记的聚类图中则被聚在类群 II。

将 RAPD 和 ISSR 标记结合起来进行聚类分析(图 3:C), 在相似系数 0.93 处可将参试品种初步分为 4 类, 其中类群 I 又可在相似系数 0.945 处分为 3 个亚类。亚类 I a 包括 9 个品种(“NC2326”、“大

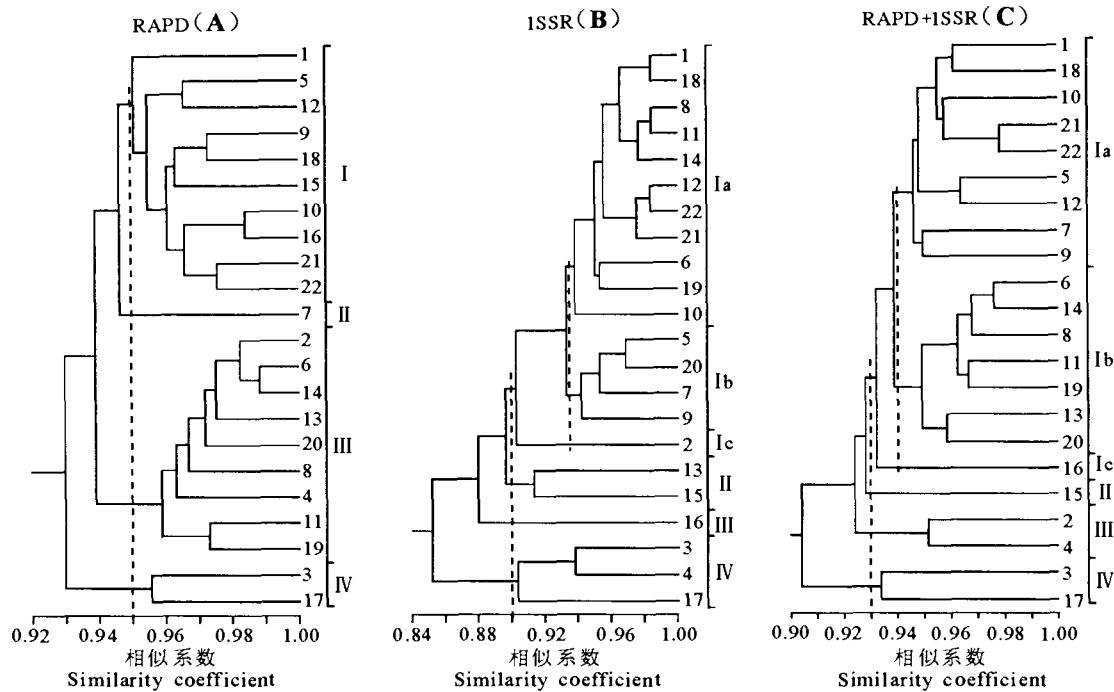


图 3 基于 RAPD(A)、ISSR(B) 及两种标记相结合(C)的烤烟品种聚类图

Fig. 3 Dendrograms generated by UPGMA method using RAPD (A), ISSR (B), and combining both RAPD and ISSR data (C) for the flue-cured tobacco varieties

白筋 599”、“NC89”、“C151”、“Ti245”、“Coker176”、“K358”、“NC82”和“云烟 317”),其中“Ti245”是“C151”的亲本之一,“NC2326”和“NC89”的亲本中均有 Hicks,“Coker176”和“NC82”的亲本中均有“Coker319”。亚类 I b 由 7 个品种组成(“红花大金元”,“77089-12”,“株 41”,“SC71”,“中烟 90”,“云烟 85”和“G-80”),其中“中烟 90”和“G-80”具有共同亲本“G-28”,“株 41”和“云烟 85”具有共同亲本“K326”。“云烟 2 号”和“CF965”分别独自聚为亚类 I c 和类群 II。类群 III 有 2 个品种(“G-28”和“K326”),两者具有共同亲本“NC95”。类群 IV 有 2 个品种(“净叶黄”和“CV87”),其中“CV87”的亲本中有“CV58”,而“净叶黄”是“CV58”的亲本之一。

可见, RAPD 和 ISSR 标记结合起来的聚类分析结果与系谱信息吻合程度更高。但无论是单独利用 RAPD 或 ISSR 标记、还是结合两种标记进行分析,都可发现一些聚类结果与系谱信息不符的情况,如“株 41”和“云烟 317”的亲本组合完全相同,“净叶黄”是“中烟 90”的亲本,但均聚在不同类群,表明定向选择压力可能对烤烟品种间遗传关系有较大影响。从 3 个聚类图中还可看出,国外引进品种与国内育成品种并未完全聚在各自类群。

### 3 讨论

#### 3.1 烤烟 RAPD 和 ISSR 标记多态性

许明辉等<sup>[6]</sup>关于烤烟和晒晾烟、何川生等<sup>[8]</sup>关于烤烟的报道中,平均每条有效 RAPD 引物(品种间可检测到多态性带的引物)分别能扩增出 2.9 条和 4.2 条多态性带,多态性比率分别为 35.9% 和 51.6%。而杨本超等<sup>[10]</sup>关于烤烟品种的 ISSR 分析中,扩增产物经聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后,平均每条有效引物检测到的多态性带达 14.1 条,多态性比率为 67.8%;祁建民等<sup>[11]</sup>以 4 个烟草种 30 份种质为材料,从 70 个 ISSR 引物中筛选出 16 个多态性引物,共扩增出 309 条谱带,平均每条引物扩增出 19.3 条带,多态性比率达 93.2%,可能与所用材料遗传差异较大有关。本研究进行 RAPD 分析时,平均每条有效引物扩增出 3.8 条多态性带,多态性比率为 29.9%;进行 ISSR 分析时,平均每条有效引物检测到 6.3 条多态性带,多态性比率为 45.8%,高于 RAPD 分析结果。可见,虽然 RAPD 和 ISSR 标记在烤烟品种间均可揭示出较丰富的多态性,但由于 ISSR 分析中引物更长、退火温度更高<sup>[15]</sup>,从而较 RAPD 分析具有更高的严谨性、分析结果更稳定,加

之ISSR标记的多态性比率更高<sup>[11]</sup>，因此更适合构建烤烟品种指纹图谱，进行品种鉴定。

### 3.2 烤烟品种间遗传关系

品种间遗传关系研究和遗传多样性评价对于作物育种具有十分重要的意义<sup>[16]</sup>。许明辉等<sup>[6]</sup>利用烟草品种RAPD数据计算出23个品种间遗传距离在0.089~0.425(相似系数0.575~0.911)之间，王志德等<sup>[9]</sup>的研究中任两个样品间遗传距离在0.242~0.822(相似系数0.178~0.758)之间；祁建民等<sup>[11]</sup>利用ISSR标记计算出的烟草种间遗传相似系数在0.29~0.52之间，而栽培种内遗传相似系数在0.54~0.96之间。本研究结合RAPD和ISSR标记计算出的烤烟品种间遗传相似系数在0.881~0.979之间，高于上述报道<sup>[6,9,11]</sup>，其主要原因可能是研究材料不同所致。如许明辉等<sup>[6]</sup>所用材料为烤烟和晒晾烟，王志德等<sup>[9]</sup>的研究中除普通烟草外还包括野生种，祁建民等<sup>[11]</sup>所用栽培种包括烤烟、晒烟、白肋烟、香料烟等不同烟草类型；而本研究所用材料全部为烤烟品种，且多是推广品种和骨干亲本，因此遗传相似程度更高。本研究还表明，单独基于RAPD标记和ISSR标记计算出的遗传相似系数间呈极显著相关，但相关系数较小；得到的聚类结果尽管有相似之处，但也有一定差异。产生差异的主要原因可能是这两种标记所检测的基因座位不同<sup>[17]</sup>及所用的标记数量有限<sup>[18]</sup>。RAPD和ISSR标记结合起来可能较单独使用某一种标记能更好地覆盖基因组的不同区域，因而得到的聚类分析结果与系谱信息吻合程度更高。

本研究通过聚类分析发现，聚类结果与系谱信息多数情况下相符，但也有例外，表明定向选择压力可能对烤烟品种间遗传关系有较大影响，因此仅从系谱上有时难以客观评价烤烟品种间遗传关系。研究还表明，国外引进品种与国内选育品种并未完全聚在各自类群，意味着分子水平的遗传关系和地理来源间缺乏必然联系，与已有研究类似<sup>[6,9]</sup>。分析其原因，一是国内育成品种的亲本中多数有国外引进品种，其次是国内外育种目标和选择方向相近。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，应参考分子标记分析结果<sup>[9,10]</sup>。

### 参考文献：

[1] 陈瑞泰主编. 中国烟草栽培学[M]. 上海: 上海科学技术出版

社, 1987. 4.

- [2] Williams J G K, Kubelik A R, Livak K J, Rafalski J A, Tingey S V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are used as genetic markers[J]. *Nucleic Acid Res*, 1990, **18** (22): 6522~6531.
- [3] Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) - anchored polymerase chain reaction amplification[J]. *Genomics*, 1994, **20**: 176~183.
- [4] 张鹏, 解玉红, 周东坡. 随机扩增多态DNA技术在遗传育种中的应用[J]. 生物技术通讯, 2003, **14** (4): 346~348.
- [5] 王建波. ISSR分子标记及其在植物遗传学研究中的应用[J]. 遗传, 2002, **24** (5): 613~616.
- [6] 许明辉, 郑民慧, 刘广田. 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): 282~284.
- [7] 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[J]. 中国烟草学报, 2000, **6** (2): 10~15.
- [8] 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[J]. 植物学报, 2001, **43** (6): 610~614.
- [9] 王志德, 卞建民, 戴培刚, 王伟峰, 蒋予恩. 部分烟草核心种质RAPD分析[J]. 中国烟草学报, 2003, **9** (4): 20~25.
- [10] 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[J]. 遗传, 2005, **27** (5): 753~758.
- [11] 祁建民, 王涛, 陈顺辉, 梁景霞. 部分烟草核心种质资源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.
- [12] 梁景霞, 祁建民, 陈顺辉. 烟草基因组DNA提取及SRAP分子标记技术体系建立[J]. 中国烟草学报, 2005, **11** (4): 33~38.
- [13] Nei M, Li W. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979, **76** (10): 5269~5273.
- [14] Rohlf F J. NTSYSpc: numerical taxonomy and multivariate analysis system, Version2.0 [CP/DK]. Exeter Software, Setauket, New York, USA, 1998.
- [15] Reddy M P, Sarla N, Siddiq E A. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding[J]. *Euphytica*, 2002, **128** (1): 9~17.
- [16] Schut J W, Qi X, Stam P. Association between relationship measures based on AFLP markers, pedigree data and morphological traits in barley[J]. *Theor Appl Genet*, 1997, **95**: 1161~1168.
- [17] 周延清, 景建洲, 李振勇, 张宝华, 贾敬芬. 利用RAPD和ISSR分子标记分析地黄种质遗传多样性[J]. 遗传, 2004, **26** (6): 922~928.
- [18] Soufmanian J, Gopalakrishna T. A comparative analysis of genetic diversity in blackgram genotypes using RAPD and ISSR markers[J]. *Theor Appl Genet*, 2004, **109**: 1687~1693.