

云产品牌卷烟主体烟叶原料的复烤烟指纹图谱的构建

樊杰¹, 张奇¹, 吴田^{2*}, 夏莺莺¹

(1.山西昆明烟草有限责任公司, 山西 太原 030012; 2.西南林业大学园林学院, 云南 昆明 650224)

摘 要:以红花大金元、云 87、NC297、NC102、K326 复烤烟品种为研究对象, 进行 ISSR 分析, 发现利用 826、836、841、847、856 ISSR 引物能够区分这 5 个复烤烟品种。在此基础上, 分别利用 826 和 856 引物构建了 5 个复烤烟的 DNA 指纹图谱, 引物 826 在 250~1 000 bp 共读得 6 个水平的 PCR 条带, 引物 856 在 750~2 000 bp 共读得 5 个水平的 PCR 条带。

关 键 词:复烤烟; 简单重复序列间多态性; 指纹图谱

中图分类号: Q789; TS411.1

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2015)06-0627-04

Construction of fingerprint by ISSR for redried tobaccos from main tobacco materials in branded cigarettes made in Yunnan

Fan Jie¹, Zhang Qi¹, Wu Tian^{2*}, Xia Yingying¹

(1. Shanxi Kunming Tobacco Co., Ltd., Taiyuan 030012, China; 2. Key Laboratory of Landscape Plants and Ornamental Horticulture, Southwest Forestry University, Kunming 650224, China)

Abstract: ISSR analysis was conducted on 5 redried cigarettes which were made from 5 tobacco cultivars (Honghuadajinyuan, Yun87, NC297, NC102 and K326). The result showed that these redried cigarettes were differentiated by 5 ISSR primers (826, 836, 841, 847 and 856), based on which the fingerprints of the 5 redried cigarettes were constructed using primers of 826 and 856, respectively. With primer 826, PCR bands in six levels from 250 bp to 1 000 bp were obtained, and with primer 856, PCR bands in five levels from 750 bp to 2 000 bp were obtained.

Keywords: redried cigarette; Inter-simple sequence repeat (ISSR); fingerprint

云南烤烟的大量调出及品种的单一、老化, 造成云产卷烟品牌与省外品牌在产品风格上出现同质化, 使得云产卷烟的原料优势正逐渐消失。红云红河集团原料差异化项目的实施, 从新品种选育和国外品种引进两方面着手, 一定程度改善了这种状况。由于不同烟叶品种在卷烟配方中所起作用不同, 因而需要对烟叶品种进行鉴别。到目前为止, 对于烟叶品种间差异性的鉴定, 仅依据烟叶外观质

量进行评价, 在烟叶生产、收购、复烤、仓储过程中并未形成一套科学的跟踪监测体系, 导致品种混杂、错标等现象, 严重影响了云产卷烟产品质量和风格的稳定性。

DNA 指纹图谱是品质混杂的检测工具^[1]。利用 ISSR 标记(inter-simple sequence repeat, 简单重复序列间多态性)^[1-4]已经成功构建小麦^[5]、红花橙木^[6]、龙眼^[7]、苹果^[8]等种植物的 DNA 指纹图谱^[9]。近

年来 ISSR 技术在烟草上的应用主要集中于种质鉴定^[10-14],但鲜见应用于复烤烟。笔者拟利用 ISSR 分子标记技术对云产品牌所使用的 5 个烟草品种的复烤烟进行 DNA 指纹图谱数据库的构建,以利区分出 5 种不同复烤烟,并以此为切入点,建立一种通过 ISSR 技术检测复烤烟品种混杂的方法。

1 材料与方法

1.1 材料

烟草品种红花大金元、云 87、NC297、NC102、K326 的复烤烟,由红云红河集团昆明卷烟厂提供。PCR 试剂均购自日本 TAKARA 公司。DNA 提取试剂盒、Qiagen 琼脂糖凝胶、矿物油、核酸染料 GoldView 均购自昆明鼎国生物有限公司。根据加拿大 British Columbia 大学设计的 ISSR 引物序列,随机选择 34 条(802、803、806、808、811、812、814、815、818、822、823、825、826、827、834、895、858、835、836、840、841、842、844、845、846、847、853、854、855、856、857、860、866、848),由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 复烤烟 DNA 的提取

DNA 提取按照试剂盒说明书进行。用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 完整性,并用分光光度计检测 DNA 提取纯度及浓度。

1.2.2 ISSR 引物筛选

PCR 反应液体系为 25 μ L,其中包含 1 \times PCR Buffer(包含 $MgCl_2$),0.2 mmol/L dNTPs,0.3 μ L 单引物(20 μ mol/L),1 U *Taq* DNA 聚合酶,50 ng 总 DNA,反应液用适量矿物油覆盖,在 PCR 仪(德国,Eppendorf)上进行扩增。PCR 程序为 94 $^{\circ}C$ 预变性 3 min,进入下述 PCR 循环:94 $^{\circ}C$ 变性 45 s,53 $^{\circ}C$ 退火 45 s,72 $^{\circ}C$ 延伸 90 s,40 个循环;循环结束后

72 $^{\circ}C$ 延伸 10 min。扩增产物在 1 \times TAE 缓冲系统下用 2.0% 的 GoldView 琼脂糖凝胶电泳分离,电泳完毕后在 UVP 凝胶成像系统上照像并保存。

1.2.3 ISSR 扩增

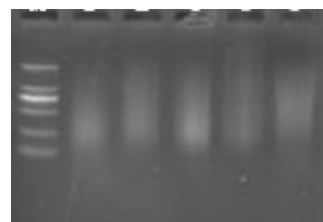
将上述有 PCR 扩增产物的引物分别在待考察的 5 个复烤烟 DNA 中进行 PCR 扩增,其中退火温度在 47 $^{\circ}C$ 至 60 $^{\circ}C$ 之间调整。电泳完毕后照像并保存。将图谱进行读带,谱带记录选择清晰、稳定、重复性好的条带。有带记为 1,无带记为 0,形成 0、1 矩阵。

2 结果与分析

2.1 复烤烟基因组 DNA 提取的检测结果

对复烤烟基因组 DNA 的提取结果(图 1)表明,DNA 呈现明显的弥散状态,主要是由复烤烟样品在烤制过程中 DNA 双螺旋结构解链及断裂引起。经超微量分光光度计检测,复烤烟基因组 DNA 的 OD_{260}/OD_{280} 值为 1.71~1.85, OD_{260}/OD_{230} 值为 1.99~2.14。

M 1 2 3 4 5



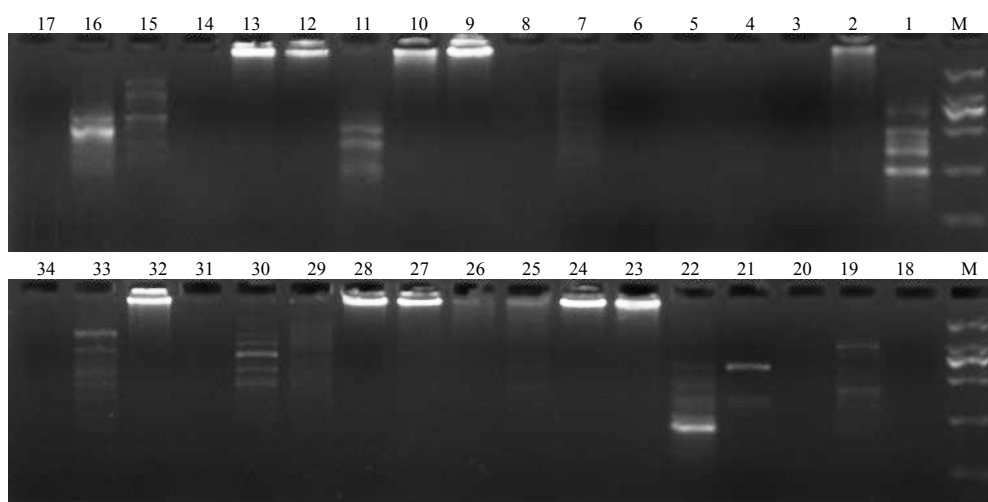
M DNA Marker 2000; 1~5 泳道 红花大金元、云 87、NC297、NC102、K326 的 DNA。

图 1 5 个复烤烟的 DNA 电泳检测

Fig.1 Electrophoresis of DNA from 5 redried cigarette samples

2.2 引物筛选结果

以云 87 基因组 DNA 为模板,对 34 条不同的随机引物进行 PCR 扩增,发现有 9 条 ISSR 引物能扩增出产物(图 2),分别为 818、826、827、836、841、842、848、856、866。



M DNA Marker 2000; 泳道 1~17 848、858、802、803、806、808、811、812、814、815、818、822、823、825、826、827、834; 泳道 18~34: 835、836、840、841、842、844、845、846、847、853、854、855、856、857、860、866、895。

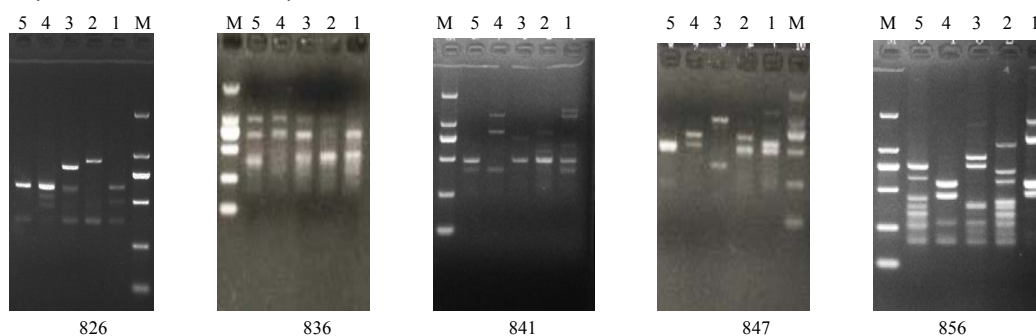
图 2 ISSR 引物筛选结果

Fig.2 Result of ISSR primer screening

2.3 不同引物的 ISSR-PCR 扩增结果

不同引物的最适退火温度不同,且不同引物的扩增清晰度差异较大(图 3)。引物 826 在退火温度为 58 ℃时,PCR 条带清晰,能够很好地区分 5 个复烤烟品种;引物 836 在退火温度 53 ℃时,PCR 扩增条带较清晰,但条带区分不明显;引物 841 在退火

温度 58 ℃时、847 在 53 ℃时扩增条带最清晰,能够区分 5 个品种,但会出现弱带和杂带,对后续 0/1 读带不利,暗示该引物不适合在后续用于构建复烤烟指纹图谱;引物 856 在退火温度 58 ℃时,PCR 条带清晰、稳定,在指纹图谱构建时更有优势。



1~5 泳道分别为红花大金元、云 87、NC297、NC102、K326; M Marker DL2000。

图 3 不同引物的 ISSR-PCR 扩增图谱

Fig.3 ISSR - PCR amplification results with different primer primers

2.4 复烤烟 DNA 指纹图谱的构建

2.4.1 引物 826 构建的指纹图谱

引物 826 在红花大金元、云 87、NC297、NC102、K326 中均有特征条带(图 3),能够区分 5 个供试品种,从而建立起相应的 DNA 指纹图谱。在 250 ~ 1 000 bp,共读得 6 个水平的 PCR 条带,将 6 个水平的条带按照由大到小的顺序依次命名为 M1~M6,其中,M1、M2、M4 处分别只有 NC102、NC297、云 87 有唯一一条带,即 M1、M2、M4 可将

NC102、NC297、云 87 从 5 个供试品种中区分出来;K326 和红花大金元则可通过 M5 处的条带进行区分。若将有带读为 1、无带读为 0,红花大金元、云 87、NC297、NC102、K326 读带的数字代号分别为 001011、100001、011001、001110、001001。

2.4.2 引物 856 构建的指纹图谱

引物 856 在红花大金元、云 87、NC297、NC102、K326 中均有特征条带(图 3),能够区分 5 个供试品种,从而建立起相应的 DNA 指纹图谱。在 750~

2 000 bp, 共读得 5 个水平的 PCR 条带, 将 5 个水平的条带按照由大到小的顺序依次命名为 N1~N5, 其中, N1、N2、N4 处分别只有红花大金元、云 87、NC297 有唯一一条带, 因此, N1、N2、N4 可将红花大金元、云 87、NC297 从 5 个供试品种中区分出来; K326 和 NC102 可以通过 M5 处的条带有无进行区分。若将有带读为 1、无带读为 0, 红花大金元、云 87、NC297、NC102、K326 读带的数字代号分别为 11000、00100、00011、00000、00001。

3 结论

不同卷烟品牌对烟叶的质量风格有不同要求, 揭示特定烟区烟叶质量风格特色对实现品牌导向型烟叶生产具有十分重要的意义^[15]。烤烟在从工业化到商业化的过程中, 品种间会出现混杂现象, 本研究建立的红花大金元、云 87、NC297、NC102、K326 等云产品牌卷烟主体烟叶原料复烤烟品种的 ISSR 指纹图谱, 避免了盲目选取 ISSR 标记构建复烤烟指纹图谱, 提高了筛选效率。指纹图谱具有高度的个体特异性, 分辨率高、稳定可靠, 能够准确地鉴定出生物个体和群体之间的差异, 甚至可以鉴别出一些基因组中的微小变异, 因而是一种理想的品种纯度和真实性检测技术。

引物 826 在退火温度为 58 ℃时的指纹图谱为: 红花大金元 001011, 云 87100001, NC297011001, NC102001110, K326001001。引物 856 在退火温度为 58 ℃时的指纹图谱为: 红花大金元 11000, 云 8700100, NC29700011, NC10200000, K32600001。上述指纹图谱可以作为 5 个复烤烟的标准谱带, 可为复烤烟品种的鉴定提供依据。在实际操作中, 如果需要检测它们是否存在品种混杂的问题, 可以通过分别提取复烤烟的 DNA、用引物 826 或 856 在退火温度为 58 ℃进行 PCR 反应、电泳检测、照相、与本研所得到的标准谱带进行比对即可。在其他复烤烟的试验过程中可以参考所筛选得到的引物和相应的退火温度进行 ISSR-PCR 反应, 进而得到相应品种的指纹图谱, 作为后续比对的标准谱带。

参考文献:

- [1] 林万明. PCR 技术操作和应用指南[M]. 北京: 人民军医出版社, 1993: 73-74.
- [2] Prevost A, Wilkinson M J. A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars [J]. Theoretical and Applied Genetics, 1999, 98: 107-112.
- [3] 祝朋芳. 园林植物育种学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2011: 116-117.
- [4] Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain-reaction amplification [J]. Genomics, 1994, 20: 176-183.
- [5] 王心宇, 陈佩度, 开增军, 等. ISSR 标记在小麦指纹图谱分析中的应用研究初探[J]. 农业生物技术学报, 2001, 9(3): 261-263.
- [6] 董海燕. 利用 ISSR 标记构建红花橙木品种(品系)指纹图谱[D]. 南京: 南京林业大学, 2009.
- [7] 郑姍, 张立杰, 张小艳, 等. 龙眼新品种(品系)的 ISSR 指纹图谱研究初探[J]. 福建农业学报, 2012, 27(12): 1308-1312.
- [8] 宣继萍, 章镇, 房经贵, 等. 苹果品种 ISSR 指纹图谱构建[J]. 果树学报, 2002, 19(6): 421-423.
- [9] 梁明山, 刘煜, 侯留记, 等. 烟草品种的 DNA 指纹图谱和品种鉴定[J]. 烟草科技, 2001(1): 34-38.
- [10] 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.
- [11] 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.
- [12] 肖炳光, 杨本超. 利用 ISSR 标记分析烟草种质的遗传多样性[J]. 中国农业科学, 2007, 40(10): 2153-2161.
- [13] 梁景霞, 祁建民, 方平平, 等. 烟草种质资源遗传多样性与亲缘关系的 ISSR 聚类分析[J]. 中国农业科学, 2008, 41(1): 286-294.
- [14] 吴田, 张奇, 梁子荣, 等. 云产品牌卷烟主体烟叶原料的 ISSR 多态性分析及标记[J]. 烟草科技, 2010(12): 52-56.
- [15] 张发明, 杨虹琦, 何伟, 等. 不同品种烤烟烟叶调制前后理化特性分析[J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2010, 36(1): 30-33.

责任编辑: 罗慧敏

英文编辑: 罗 维