

利用不同分子标记分析烟草种质资源多态性

冯吉,程玲,孙光伟,陈振国,蔡长春* (湖北省烟草科学研究院,湖北武汉 430030)

摘要 [目的]研究烟草种质资源的遗传多样性及亲缘关系。[方法]利用 SSR、EST-SSR 和 InDel 这 3 种分子标记对 53 份不同类型的烟草材料进行区别与鉴定。[结果]53 份烟草材料可分为 2 大类群,2 个亚类;与 EST-SSR 和 SSR 分子标记相比,InDel 分子标记以其扩增谱带少、特异性强,易于识别和统计,更适合用于烟草种质资源遗传多样性分析与研究。[结论]该研究能够较好地揭示烟草栽培品种类型间的遗传多样性与亲缘关系,可为烟草种质鉴定和遗传连锁图谱构建提供科学依据。

关键词 烟草;分子标记;遗传多样性
中图分类号 S188 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2017)29-0139-05

Analysis of Genetic Diversity in Tobacco Germplasms (*Nicotiana tabacum* L.) Using Different Molecular Markers
FENG Ji, CHENG Ling, SUN Guang-wei, CAI Chang-chun* et al (Tobacco Research Institute of Hubei Province, Wuhan, Hubei 430030)

Abstract [Objective] To research genetic diversity and relationship in tobacco germplasms. [Method] 53 tobacco materials were distinguished and identified by SSR, EST-SSR and InDel. [Result] 53 tobacco materials could be classified into two groups and two subgroups. Compared with the EST-SSR and SSR molecular marker, it was less amplification band, strong specificity, easy identification and statistics for InDel marker. Therefore, InDel molecular marker was more suitable for genetic diversity analysis and research of tobacco germplasm. [Conclusion] The study is useful in revealing the genetic diversity and relationships among tobacco materials, and providing a scientific basis for the germplasm identification and genetic linkage mapping.
Key words Tobacco;Molecular markers;Genetic diversity

烤烟是我国主要的经济作物之一,其种植面积较大,是卷烟工业重要的基础原料^[1]。但是用于烟草品系选育的材料遗传背景狭窄,且育种周期长和工作效率低制约着传统育种工作的进度,造成我国目前烟草育种创新能力较差^[2]。因此,拓宽烟草栽培品种遗传背景和优化烟草育种选择程序是今后高产、优质、多抗烟草新品种育种工作的关键。分子生物学的发展及分子标记技术的建立为烟草育种工作提供了可量化、不受环境影响的标准方法,越来越多地被应用到烟草种质鉴定工作中。SSR、TRAP、AFLP 等分子标记具有结果可靠、重复性好、多态性丰富、操作简单等特点,已被应用于烟草种质鉴定中^[2-7]。该研究利用已公布的烟草 SSR 标

记,EST-SSR 标记以及自主开发的 InDel 标记对 53 份烟草种质资源的亲缘关系进行分析,为烟草种质资源鉴定和遗传育种研究提供新的分子标记,并为拓宽烟草育种遗传基础以及烟草种质资源的研究和利用奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 不同分子标记

1.1.1 EST-SSR 引物对序列。选取多态性较好的 16 对引物对^[8],引物对序列见表 1。

1.1.2 SSR 引物对序列。选取多态性较好的 20 对引物对^[9],引物对序列见表 2。

表 1 16 对烟草 EST-SSR 引物信息
Table 1 Information of 16 pairs of tobacco EST-SSR primer

编号 Number	左引物 Left primer	右引物 Right primer
TM10574	CCTCGATAAAGTAGTGATGAGGCTA	GACCCATATATCTGCCTCTACTCG
TME0248	GCTAAGGAACAATCGAGTTTACAGA	GCCGGCATAACTCCACAT
TME0423	TCAACCAGCTCACTGACGAC	GCTGACTTCCAGCGAGTTTC
TM10624	CCTGCGTGTTGTAGTTTTC	CAGAAACACTGGAGATCTGAGAGA
TM10899	CAAGCTACGGGATTTGTTACTCTT	ACATCCTCCACCCCATTTGTA
TM11114	TGTGGTGATGATAGCCCTGA	CATTATTGCCCAATTGGGTTG
TM11332	GCAAGTTAGCCAGACACCAAA	GTTCTGTTTTCCTTTGCTTGC
TME0256	TGGATCATCATCTGCTGCTT	GGAGAAAGGCCTAAAGCAATG
TM10004	CATGCATGCCTCTCTCTCTCT	AGGCCAATCACTAAATTC AAGC
TM10053	TGAAAGTAGAGGAGGCAATGG	CGTGAAGAGCCCTAGAAACAA
TM10052	CACACATACAGCGACAACCA	GACCCCTTTTCAACTTTCA
TM10343	GCAGCGACCAACCTAAAATC	CAAGGCTTGAACAATGTGA
TM10944	CCCATACCTTCTCCCTTTC	GCACGCAATCAAGAAAT
TM10998	GTTTGATTCACCTAAAGTCTGTCCT	AGCCCTTCTTCTTCATCT
TM11157	CAGTGCATGATACTTGGACA	GCGGCAAGGAGTAAAGATG
TM11240	GGCTACTGAGACCAGCCACT	CGGGACTATCTAGGGGGTCT

基金项目 中国烟草总公司湖北省公司重点项目(027Y2016-002)。
作者简介 冯吉(1981—),男,湖北武汉人,农艺师,博士,从事分子生物学、生物信息学研究。*通讯作者,副研究员,博士,从事分子生物学研究。
收稿日期 2017-08-11

1.1.3 InDel 引物对序列。随机选择并开发出 45 对引物对,引物对序列见表 3。

1.2 材料 试验材料以烤烟为主,并适当选取其他材料,共计 53 份。其中烤烟 33 份,白肋烟 15 份,晒烟 3 份,香料烟 2

表 2 20 对烟草 SSR 引物信息

Table 2 Information of 20 pairs of tobacco SSR primer

编号 Number	左引物 Left primer	右引物 Right primer
PT20235	GCAACAGGAATCCAACCATC	TTTCTCAGAAAGTGGTGAGTGT
PT20242	TCCAAAGTTGGACCAGAA	GTCTACATGGGGCTCTT
PT20286	ACGCTAGAGCATCCAACA	TAGTGAAGGCAAGCAGG
PT20291	AAACAACCTTCAGCCCTCTT	ACGTCATAACAGCTCACCA
PT20388	AGGCCCTTCTGAGCTGCAT	GGCGTGACACTTCCAACCTT
PT20485	TCCAGGTCAACAAAATCAAGC	GATGTCATTGTGCTGTCACG
PT30005	GGTAGGAGGAGGACGACCTT	AAGACACAATCCCATGGCTA
PT30014	TGCCGTGTAAATTTCAATTTGG	AGGATTCTTAACGTGTATTATGTTCT
PT30018	AAATTACTTGTGCTTGTAAAGTAGCG	TCATTTCAGAAAGCATATATTGGTG
PT30063	TTTGGAATTACAATTATACTCAACGTG	GTTGATTGCTGATGGACGG
PT20289	CATGAACCTTCTCCTCCTCTG	CAATCCAATTCGGGACTGAG
PT30021	CATTTGAACATGGTTGGCTG	CTCAACTCTCGTCCGCTCTTG
PT1085	AGCATGTTTTTTGTCCGGGTA	TGGCAACACTCTAGCGGATA
PT20196	TTCTTTGCTTCTAGCGGA	AGTGGGGGTAGATCCTGA
PT30001	TCATTTCGGGTTGAGTACCTTT	CATATGCTTCGGGAGATTGA
PT20189	AAAGGTTCCGCTATCCAG	ATTGGACGATGAGAACGA
PT20383	TCGTCTTTTGTCTCCCTCATC	TTGGCTCAAGAGAAGGTTGC
PT20192	ATATTTGCTTCTGGGGCT	AAACCACGCGTACCACTA
PT30061	TCGTCCATTTCTTTCTCTCTCA	CATAAATAGTTGCTCATTCATCG
PT20163	CAAGGAATAGATGGTGCG	TCCATCACCAGAAAGCAC

表 3 45 对烟草 InDel 引物信息

Table 3 Information of 45 pairs of tobacco InDel primer

编号 Number	左引物 Left primer	右引物 Right primer
ToIn001	GTAATGGAACCAAAATCCCTGG	TCCCTCTCCTGAATTACAATCC
ToIn002	GAATTGCACTGGTATGTAAAGC	ACAGGTGTTCATCATCTCAG
ToIn003	ATGCCTCACATTCCGTTGT	GCAAGTCTCAATCCTCCAAA
ToIn004	CTTCCAATTTCCACTTGTGTG	TTCTTGTAACAGTTTGCCATG
ToIn005	GACGATGCCTATCATTC	GCTCTACGATAAAGCCAGTCAG
ToIn006	ACGATGTTTCGGGTTTTGG	AATTTCCCTCCGTATGACA
ToIn007	CGATTTTCTCTTTGATGGTG	TTAGAGCAACTCGTCTGTGTC
ToIn008	AATGGAAGGGGTACATGCTT	TGAAATGGGAGTGGGTGCT
ToIn009	CTCGCCCTTAGTAATTTTACA	AACAAACAAGAAGAGCCACAAC
ToIn010	TGTTTTCAGGCATGGATGG	CGCTGCAAGGAGAACTACC
ToIn011	TTTAGGCAACTCTAGTTCGTCA	TTATTCTGTCTGCGGTATGG
ToIn012	CTGGTTCTGAGGCTGAGTGG	TCACAGGATCGGCCAAAT
ToIn013	ACTCACTACCTGCCTTCACATG	CAACCAATCTAAAAGTCACCCA
ToIn014	GCACATTCGGACATTTTGAG	AGCATGTAACATAGGCATCAAG
ToIn015	AAGGGATGTCAGTGCATTTG	ATCGAGGCCGTAGTTTGTG
ToIn016	TCCCATCATAGCATTTCCG	CCATGACCAGATGGCGTTA
ToIn017	GAACCTCAAGCGAGACATTG	GGCTCTACGATAAAGCCAGATA
ToIn018	TGTCCGACGTAGCAGGATAT	CAGCCACGTCTGACACCTT
ToIn019	GCGGACTGTTGTTGTGGAG	GACTCGTAGCACCTATGAACCT
ToIn020	CCTTATGCTTTGTAGGGTTGC	TTCTTGCCCGAGTCTTTAGTA
ToIn021	TTGTATTAGTCGCTTGTGTCTC	CATAAGTCATGTGGGATGTGAA
ToIn022	TAAGCCCTGCCTCCCTATT	GATGATGCCTTCGGACTATG
ToIn023	AAGGTTTCATCGGCAATAT	AAACAAGGCCAGAGGGTG
ToIn024	TGTAATCAGCTTCAAGTCGTGT	CGGTAGAAATGCTCCACATAG
ToIn025	AAAATTACTCCTGGATGGGC	TGAGTGCAACCTAGTCAGTTCA
ToIn026	CCGCTAGTGCCATACGATAT	AGGGGTTTGGAGACCTGAG
ToIn027	TTATCCCTCAAATCCCTG	ATCCATCTAAGCCTCCTCTGTA
ToIn028	GCAACCTGTAGATGTTTCCAA	CAGTCACAAGGATTTAGCG
ToIn029	TCTTATCCTTCCCCAACCC	TCTACCCTAACCTCCTCCACTA
ToIn030	CAAGTTAGCGGTTGCGTGAT	CCCACAATGATTTCCCTTC
ToIn031	ACTTCTTTTGGGATCAACTGAG	TGAATGAAACCTTATGGACGG
ToIn032	GTGGGGCTCCAAATCAGA	AAACTAAGGACTCAGGGGTA
ToIn033	AAATCATCTTTTCTCTGTGTG	TGTTTGTGTGTGGTGTG
ToIn034	CATTCGGGCTGTTCTTCAT	GCATCGGGAATTACACTCAA
ToIn035	ATGGTCTGTGCGGTGTCCT	CATAGCGATGGTTAAAGTGC
ToIn036	TGAAGAGCTAGTACGGGAATC	GACATACATCGCGTTATGGA
ToIn037	TTAGGCAAGACATGGCACA	AGACGAGACAACACCGGAA
ToIn038	GACTCGGGTCTAGTGTGGT	GCATTTGATCGGAGAAGC
ToIn039	CAAACAAGTTGAGATCGGCTAC	CATTGGCTGGCAAAGAAAG
ToIn040	AGAAGGGCTTTGGTGGCT	GCTGCTTGGATGTGGA
ToIn041	AGGTTTGGCAAGAAATGGAA	TTTGTGCTCTAGGATGGC
ToIn042	ACAAGCAGCAAAGAAAGAAGAG	AGTTTGGGGATTTGATGCAC
ToIn043	TCACCTGAAGTTAGTCCTCTT	GCACCACATAGCTTGCATCTA
ToIn044	CTAGAAGTTCATACGGACCTT	GTGAAACTACCAAGAAGCAACA
ToIn045	ATAGCACCTACGGGGTAATTT	GTTTACTTTTGTGACTTTTCG

份(表4)。选取新鲜幼嫩的叶片3~5片,每份材料取样3株,每株材料单独保存在超低温冰箱中备用。

表 4 53 份烟草名称
Table 4 53 tobacco names

编号 Number	名称 Names	烟草类型 Tobacco types
1	长脖黄	烤烟
2	Coker176	烤烟
3	K326	烤烟
4	K346	烤烟
5	K358	烤烟
6	K730	烤烟
7	Nc82	烤烟
8	Nc89	烤烟
9	Nc95	烤烟
10	RG11	烤烟
11	RG17	烤烟
12	V2	烤烟
13	CV87	烤烟
14	cash	烤烟
15	coker139	烤烟
16	CV91	烤烟
17	红花大金元	烤烟
18	净叶黄	烤烟
19	中烟 90	烤烟
20	云烟 85	烤烟
21	云烟 97	烤烟
22	毕纳 1 号	烤烟
23	南江 3 号	烤烟
24	中烟 100	烤烟
25	中烟 14	烤烟
26	革新 3 号	烤烟
27	K326LF	烤烟
28	贵烟 2 号	烤烟
29	韭菜坪 2 号	烤烟
30	马里兰 872 号	晒烟
31	千层塔	晒烟
32	九月寒	晒烟
33	ky17(少叶)	白肋烟
34	ky56	白肋烟
35	L-8	白肋烟
36	S. N69	白肋烟
37	W. B68	白肋烟
38	白肋 ky41 A	白肋烟
39	半铁泡	白肋烟
40	BY21	白肋烟
41	BY37	白肋烟
42	KY10	白肋烟
43	KY14	白肋烟
44	KY8959	白肋烟
45	TN86	白肋烟
46	TN90	白肋烟
47	Va509	白肋烟
48	Samsun	香料烟
49	Komotini Basma	香料烟
50	云烟 87(原种)	烤烟
51	MS 云烟 87	烤烟
52	云烟 87(良种 2012)	烤烟
53	云烟 87(良种 2013)	烤烟

1.3 方法

1.3.1 CTAB 小样法提取 DNA。选取 53 份烟草种质资源材料的鲜嫩叶片,DNA 提取方法参考 CTAB 方法^[2-7]。

1.3.2 PCR 扩增。PCR 反应体系含模板 DNA 2 μL,BioTeke 的 2×power Taq PCR MasterMix(PR1701)5 μL,正向和反向引物(50 ng/μL)各 1.5 μL,总体积 10 μL。PCR 反应程序为

94 ℃ 5 min;94 ℃ 30 s,退火温度(50~62 ℃)30 s,72 ℃ 1 min,35 个循环;72 ℃ 10 min;4 ℃ 保存。在 TP600 梯度 PCR 仪(TaKaRa,日本)上进行 PCR 反应。

1.3.3 多态性引物的筛选。对 53 份烟草材料初步筛选 InDel,EST-SSR 和 SSR 引物对;选择电泳条带清晰且稳定、多态性丰富的引物对进行 DNA 扩增。

1.3.4 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测。PCR 扩增产物均用聚丙烯酰胺凝胶(6%)进行电泳分离,电泳所用仪器为 Sequi-Gen sequencing cell(Bio-Rad,USA),缓冲液为 0.5×TBE。电泳时先用恒定功率 100 W 预电泳 30 min 左右(玻璃板面温度约为 50 ℃),上样后,用恒定功率 80 W 电泳 1.0~1.5 h,快速显影方法进行电泳后的染色与显影。

1.3.5 数据处理。统计数据时,InDel,EST-SSR 和 SSR 多态性定义为在扩增产物凝胶电泳带型的某一相同迁移位置上,品种某一条带的有或无,每 1 个多态性条带记作 1 个等位基因(假定相同迁移率的条带均来自同一位点上的同一等位基因)。将电泳图谱上清晰出现的条带记为“1”,同一位置无带记为“0”,不清楚难以判断的带记为“.”或“-”,获得“0”和“1”组成的数字矩阵。

1.3.6 遗传多样性分析和聚类树的绘制。将 53 个烟草种质资源材料的分子标记数据按要求制成表格,并采用聚类软件 NTSYS 计算遗传相似性系数,然后根据遗传相似性系数进行类平均法(UPGMA,unweighted pair group method arithmetic averages)聚类,形成数字矩阵,绘出聚类树,形成种质资源的分类。

2 结果与分析

2.1 InDel 分子标记的开发 利用 B37(红)和 B37(白)的重测序数据^[9],与已发表的 K326 和 TN90 数据^[10-11]进行生物信息分析,预测得到 353 349 个 InDel 位点。通过 InDel 标记建立矩阵,利用矩阵分析样本之间的多态性,参考前人研究筛选参数^[12]:插入/缺失碱基数为 5~15 bp、插入/缺失变异率(变异率=同类插入/缺失占重测序总样品量的百分比)为 30%~70% 的 InDel 位点,最终随机选择并设计出具有代表性 InDel 引物 45 对。

2.2 烟草 InDel,EST-SSR 和 SSR 的多态性检测

2.2.1 InDel 分子标记的多态性检测。用 45 对 InDel 引物对 53 份烟草种质资源材料进行多态性检测,其中只有 20 对 InDel 引物多态性检测能力较强,多态性比例为 44.44%。利用这 20 对 InDel 引物在 53 份烟草材料中发现清晰、稳定并可重复的 40 个多态性位点,每对引物能得到 2 条多态性条带。部分 InDel 引物对烟草材料的扩增电泳图谱见图 1。

2.2.2 EST-SSR 分子标记的多态性检测。用 16 对 EST-SSR 引物对 53 份烟草种质资源材料进行多态性检测,其中只有 9 对 EST-SSR 引物多态性检测能力较强,多态性比例为 56.25%。利用这 9 对 EST-SSR 引物在 53 份烟草材料中发现清晰、稳定并可重复的 33 个多态性位点,每对引物能得到 2~6 条多态性条带,平均为 4 条。部分 EST-SSR 引物对烟草材料的扩增电泳图谱见图 2。

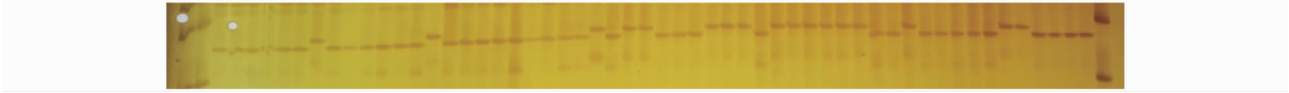


图1 InDel 引物(ToIn031)对烟草材料的扩增结果

Fig.1 The amplification results of InDel primer(ToIn031) on tobacco materials



图2 EST-SSR 引物(TM11157)对烟草材料的扩增结果

Fig.2 The amplification results of EST-SSR primer(TM11157) on tobacco materials

2.2.3 SSR 分子标记的多态性检测。用 20 对 SSR 引物对 53 份烟草种质资源材料进行多态性检测,其中只有 15 对 SSR 引物多态性检测能力较强,多态性比例为 75.00%。利用这 15 对 SSR 引物在 53 份烟草材料中发现清晰、稳定并可重复的 70 个多态性位点,每对引物能得到 2~9 条多态性条带,平均为 5 条。部分 SSR 引物对烟草材料的扩增电泳图谱见图 3。

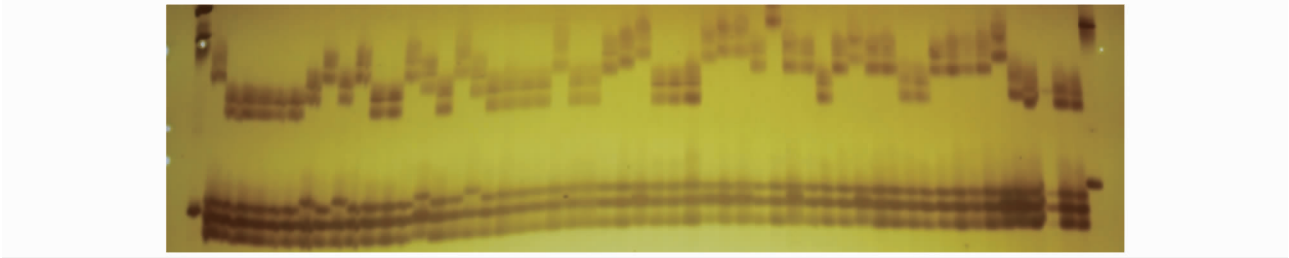


图3 SSR 引物(PT20289)对烟草材料的扩增结果

Fig.3 The amplification results of SSR primer(PT20289) on tobacco materials

2.3 烟草遗传多样性分析和聚类树的绘制 利用 NTSYS 软件计算种质资源的遗传相似性系数。53 份材料的遗传相似性系数为 0.37~0.97,平均为 0.75。说明 53 份烟草种质资源的遗传多样性较低,遗传背景变异较少。基于遗传相似性系数,进一步对 53 份材料进行聚类分析,绘制了 UPGMA 聚类图(图 4)。在遗传相似性系数为 0.48 时,53 份材料被分为 2 类群。其中第一类群为所有晾晒烟材料(包含白肋烟、晒烟和香料烟)和部分烤烟材料,第二类群为烤烟材料。

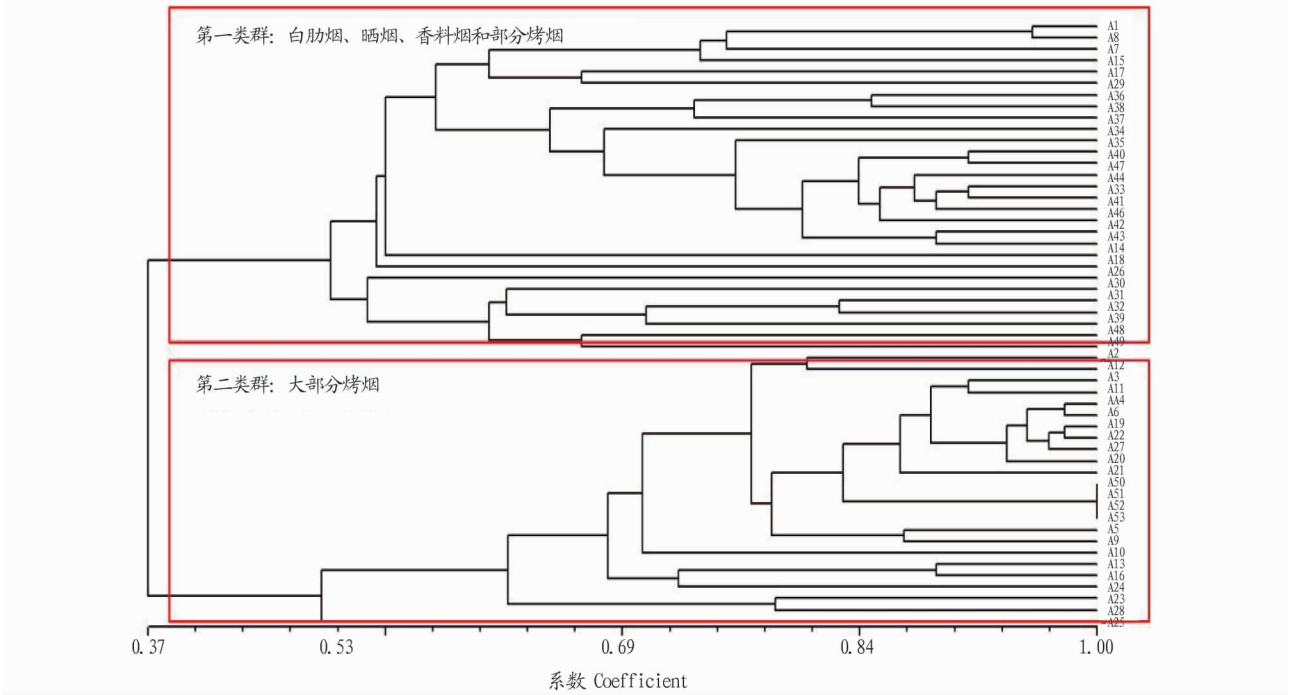


图4 分子标记技术绘制的烟草种质资源 UPGMA 聚类图

Fig.4 UPGMA cluster diagram of tobacco germplasm resources drawn by molecular markers

第一类群在遗传相似性系数为 0.53 处,又可分为 2 亚类。第 1 亚类为大部分的白肋烟材料和部分烤烟材料,第 2 亚类为全部晒烟、香料烟、部分烤烟以及部分白肋烟材料。

以上结果可以说明:分子标记技术在烟草资源遗传亲缘关系分析中的高效性;晾晒烟种质资源材料与烤烟种质资源材料遗传亲缘关系相对较远,而不同晾晒烟种质资源材料之间(包含白肋烟、晒烟、香料烟)的遗传亲缘关系很近。

3 结论与讨论

随着分子生物学的发展及分子标记技术的建立,越来越多的分子标记被应用到烟草种质鉴定、遗传图谱的构建、抗病性研究等工作中^[2-7,9]。该研究中 SSR、EST-SSR 和 InDel 这 3 种分子标记多态性丰富,稳定性强,试验条件较易掌握,都是很好的烟草遗传多样性分析的分子标记方法。但是与 EST-SSR 和 SSR 分子标记相比,InDel 分子标记以其扩增谱带少、特异性强,易于识别和统计,因而更适合用于烟草种质资源遗传多样性分析与研究。

遗传多样性对物种的生存和发展起着决定性的作用,遗传多样性高,对环境变化的适应能力强,容易扩展其分布范围并孕育成新的品种,因此对遗传多样性的研究,可以探讨物种之间的亲缘关系,同时还有助于充分发现和利用各种基因资源,挖掘重要经济性状的变异并加以科学利用和开发。烟草传入我国已有 400 多年时间,虽然经过 400 多年的人工驯化和培养以及不断地从国外引进已经形成的品种资源,但是近年烟草育种中广泛使用的主体亲本只有少数几种,导致我国育成烟草品种遗传基础日益狭窄^[13-14],该研究结果也从分子水平上印证了我国烟草育种资源的匮乏。该研究还发现相同栽培类型的烟草明显地聚为一类,说明烟草经过各自的生态环境和人为利用目的不同的长期选择而逐渐形成

了不同的栽培类型,类型间的差别更多的是因特定生态条件下次生代谢的不同而形成。同时,还发现个别烟草材料偏离原有类型,与其他类型聚为一类,原因一可能是与其血缘关系有关,二可能是与分子标记的偏好有关。

参考文献

[1] 国家烟草专卖局. 中国烟草年鉴:2011-2012[M]. 北京:中国科学技术出版社,2012.

[2] 祁建民,梁景霞,陈美霞,等. 应用 ISSR 与 SRAP 分析烟草种质资源遗传多样性及遗传演化关系[J]. 作物学报,2012,38(5):1425-1434.

[3] 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.

[4] 马冰,代帅帅,程亚增,等. 烤烟种质资源 SSR 核心引物的筛选及验证[J]. 中国烟草科学,2016,37(5):1-5,9.

[5] 曾建敏,陈学军,吴兴富,等. 基于烟草叶绿体基因组和线粒体基因组 SSR 标记的烟属植物遗传多样性分析[J]. 中国烟草学报,2016,22(4):89-97.

[6] 张铭真,邢雪霞,李晓辉,等. 烟草种质资源遗传多样性与群体结构分析[J]. 中国烟草科学,2016,37(4):42-47.

[7] 冯俊彦,蒲志刚,李明,等. 9 份烟草品种(系)及其航天诱变后代的 TRAP 分析[J]. 西南农业学报,2017,30(2):273-279.

[8] CAI C, YANG Y, CHENG L, et al. Development and assessment of EST-SSR marker for the genetic diversity among tobaccos (*Nicotiana tabacum* L.) [J]. Genetika, 2015, 51(6):694-703.

[9] BINDLER G, VAN DER HOEVEN R, GUNDUZ I, et al. A microsatellite marker based linkage map of tobacco [J]. Theor Appl Genet, 2007, 114(2):341-349.

[10] SIERRO N, BATTEY J N D, OUADI S, et al. The tobacco genome sequence and its comparison with those of tomato and potato [J]. Nat Commun, 2014, 5:3833.

[11] SIERRO N, BATTEY J N D, OUADI S, et al. Reference genomes and transcriptomes of *Nicotiana sylvestris* and *Nicotiana tomentosiformis* [J]. Genome Biol, 2013, 14(6):60.

[12] 李斯更,沈镭,刘博,等. 基于黄瓜基因组重测序的 InDel 标记开发及其应用[J]. 植物遗传资源学报,2013,14(2):278-283.

[13] 王元英,周健. 中美主要烟草品种亲源分析与烟草育种[J]. 中国烟草学报,1995,2(3):11-22.

[14] 杨友才,周清明,尹晗琪,等. 烟草种质资源遗传多样性及亲缘关系的 AFLP 分析[J]. 中国农业科学,2006,39(11):2194-2199.

(上接第 125 页)

物的数量,抑制有害微生物的生长繁殖。因此,蛹虫草固体饮料可以作为肠道菌群调节剂使用,值得对该蛹虫草固体饮料的具体成分进行进一步研究。

参考文献

[1] 任景乐,李文立,宋晓娜,等. 复合乳酸菌制剂对蛋种鸡育雏期生长性能、免疫机能和盲肠微生物的影响[J]. 中国家禽,2014,36(7):32-37.

[2] CAESAR R, FÅK F, BÄCKHED F. Effect of gut microbiota on obesity and atherosclerosis via modulation of inflammation and lipid metabolism[J]. Journal of internal medicine, 2010, 268(4):320-328.

[3] SEKIROV I, RUSSELL S L, ANTUNES C M, et al. Gut microbiota in health and disease[J]. Physiological reviews, 2010, 9(3):859-904.

[4] MALAISSE W J, COURTOIS P, SCOTT F W. Insulin-dependent diabetes and gut dysfunction: The BB rat model[J]. Horm Metab Res, 2004, 36(9):585-594.

[5] 刘洪明. 益生菌-黄芪多糖合生元的研制及其对腹泻犊牛肠道菌群结构影响的研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学, 2009.

[6] 王丽凤. 益生菌 *L. plantarum* P-8 对肉鸡肠道菌群、肠道免疫和生长性能影响的研究[D]. 呼和浩特:内蒙古农业大学, 2014.

[7] 梁宗琦,刘爱英,刘作易. 中国真菌志:虫草属[M]. 北京:科学出版社, 2007:1-190.

[8] ZHANG G Q, HUANG Y D, BIAN Y, et al. Hypoglycemic activity of the fungi *Cordyceps militaries*, *Cordyceps sinensis*, *Tricholoma mongolicum* and *Omphalia lapidescens* in streptozotocin-induced diabetic rats[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2006, 72(6):1152-1156.

[9] KUO M C, CHANG C Y, CHENG T L, et al. Immunomodulatory effect of exo-polysaccharides from submerged cultured *Cordyceps sinensis*: Enhancement of cytokine synthesis, CD11b expression, and phagocytosis[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2007, 75(4):769-775.

[10] RAO Y K, FANG S H, WU W S, et al. Constituents isolated from *Cordyceps militaris* suppress enhanced inflammatory mediator's production and human cancer cell proliferation[J]. J Ethnopharmacol, 2010, 131(2):363-367.

[11] 燕心慧,齐秋月,汪世华,等. 蛹虫草子实体活性成分的分离鉴定[J]. 菌物学报,2016,35(5):605-610.

[12] 徐德峰,孙力军,王雅玲. 蛹虫草抑菌活性研究开发现状与发展趋势[J]. 食品工业科技,2012,33(8):424-427.