

热门关键字： 四要 云烟87 利国惠民

搜索

探秘烟草基因组·功能基因组学研究

日期：2014/7/30 9:40:48 作者：曹祥金 江一舟 吴清海 刘洋 来源：东方烟草报

热点新闻

- “云南省烟叶生产技术系列丛书”服
- 绿色防控虫害 生态平衡“天敌”
- 云南省烟草农科院组织专家服务团会
- 2012年“世界烟草品种园”增品
- 昆明烟区首次实现亩收益5000元
- 烟草新品种的摇篮
- 云南省烟草农科院召开2012年病
- 第二届云南烟草科学技术大会隆重召

>>更多

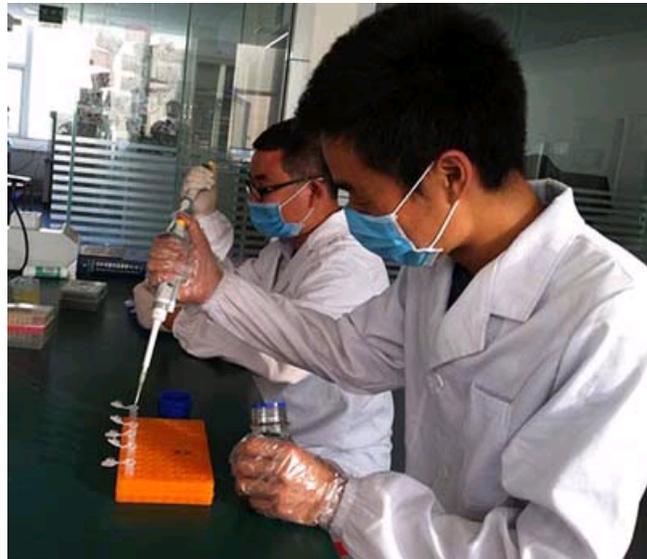
推荐新闻

- 探秘烟草基因组?功能基因组学研究
- 探秘烟草基因组?结构基因组学研究
- 开启烟草分子育种新时代——专访烟
- 探秘烟草基因组?分子育种
- 云南烟草农科院烹制“科技大餐”加
- 烟草白茎基因定位获得重要突破
- 不懈攀登的科技——纪念中国烟草博
- 中美日三国专家联合考察研讨烟草生

>>更多



国家烟草基因研究中心科研人员将烟草DNA溶液注入基因芯片。



“烟草主要品种和核心种质资源基因组差异研究”项目组成员张吉顺（右）、郭玉双在提取烟草DNA。



位于青州所的烟草突变体低温储存库中，保存了20多万份烟草突变体种子。



青州所生物技术研究室博士吴新儒（右）和同事向小华在实验基地观察抗TMV烟草突变体植株性状。



国家烟草基因研究中心博士李锋在洗涤染色基因芯片。

运用遗传技术，通过识别其在一个或多个生物模型中的作用来认识新发现基因的功能。
烟草功能基因组研究的方向主要有基因表达谱研究与应用、烟草突变体库创制与筛选、烟草代谢组学分析、烟草重要基因克隆与功能分析等。

烟草全基因组基因芯片制作——基因研究“芯”力量

7月3日，郑州烟草研究院，国家烟草基因研究中心（以下简称“基因研究中心”）。

静静的实验室里，科研人员手持塑料水枪形状的工具，从一个透明的塑料管里抽出些许溶液，小心翼翼地注入一个黑色的磁盘卡片。

“这个黑色的小卡片就是我们研究制作的烟草全基因组基因芯片。”基因研究中心分子生物学实验室主任杨军向记者介绍，当前他们正在做的是红花大金元品种的基因表达谱研究。

随着烟草基因组计划重大专项的启动实施，行业对烟草基因的研究愈加深入，先后绘制完成了栽培烟草、绒毛状烟草、林烟草全基因组序列图谱及物理图谱。面对海量的基因序列数据，如何构建一种高效检测、分析烟草基因的工具十分紧迫。

这个工具就是基因芯片。

所谓基因芯片，就是通过微加工技术，将数以百万计特定序列的DNA片段，有规律地排列固定于硅片、玻片等支持物上，构成一个二维的DNA探针阵列。这与计算机的电子芯片十分相似，所以被称为基因芯片。

作为一种高通量分析全基因组基因表达谱的工具，基因芯片可用于研究烟草不同生长发育时期组织和器官的基因表达模式，进而鉴定出与烟草生长、抗性、品质等关键性状相关的关键基因，是发现基因、研究基因的重要手段。

2012年1月，作为重大专项项目，“烟草全基因组基因表达图谱构建和分析”项目正式启动。以杨军为负责人、基因研究中心及行业内科研机构相关研究人员组成的项目组开始了对烟草全基因组基因芯片的探索研究。

“烟草有7万多个基因，通过基因芯片可以一次性检测所有基因以及它们的活动规律，哪些是高表达的、哪些是不表达的等。这可以让科研人员缩小筛选范围，锁定要寻找的目标基因。”杨军打了个比方，“就像行军地图之于指挥员，通过基因芯片检测分析所得到的基因表达谱也像一张地图，能帮助科研人员准确锁定目标的大致方位。”

小小的一个芯片，储存着巨大的能量，也是推动行业深入开展基因研究不可或缺的工具。然而，研制基因芯片的道路并不平坦。

“在林烟草和绒毛状烟草7万多个基因中，有1万多个属于高度同源基因，就像孪生兄弟一样十分相像，常规的表达谱芯片探针设计难以有效区分鉴别。如何准确界定这些基因，把它们的活动规律表达出来，是我们面临的一大难题。”杨军告诉记者，为破解这一难题，项目组与美国一家公司合作，进行了大量深入的分析研究，共同确定了覆瓦式探针设计思路，专门针对基因的差异位点设计探针，进而有效区分各个高度同源基因。

寻找---确认---验证，科研的征程中没有捷径可走，也来不得半点含糊，他们必须反复确认、验证，确保每一个基因的探针设计准确无误。

2012年年底，经过科研人员近一年的努力，基因芯片制作完成，这是全球第一套烟草全基因组基因芯片。该款芯片覆盖了36728个林烟草和绒毛状烟草高度同源基因、38406个林烟草和绒毛状烟草非高度同源基因、18966个栽培烟草基因，烟草基因探针集总数为2190855个，基因覆盖度和芯片质量均处于国际领先水平，并且中国烟草对该款芯片拥有完全的知识产权。

对项目组而言，基因芯片的研制成功仅仅是一个开始。“这个芯片做的只是自然环境下典型产区的基因表达谱，下一步我们还要做理想环境下的基因标准表达谱，还有病害、低温、干旱等胁迫条件下的基因表达谱。”杨军说，这样的基因表达图谱实际指导意义更强。

烟草香型代谢组学分析研究——“小分子”蕴含“大能量”

烟叶烘烤过后呈现出的品质、香味差异，是否在鲜烟叶生长过程中就存在？同样的品种“生淮南则为橘，生于淮北则为枳”，是否有基因层面的差别？这些问题，都将在烟草香型代谢组学分析研究中陆续得到解答。

代谢组学是上世纪90年代发展起来的一门新兴学科，主要研究植物在代谢过程中产生或消耗的小分子物质，发现代谢规律，找到影响主要代谢物积累转运的关键基因。

“作为烟草来说，烟支在燃烧过程中产生的烟气，就是代谢物。”国家烟草基因研究中心烟草代谢组学研究室（以下简称“研究室”）学科带头人周会娜介绍说，就是这些小分子，使烟叶组织散发出香味。而烟草香型代谢组学研究，就是要弄明白烟草中所有香味物质的代谢规律，有效判断和预测烟草香味物质的代谢变化，为培育不同香型的烟草品种服务。

说起来简单，做起来着实不易。此前，行业很少有人接触过代谢组学，研究的客观条件不容乐观。

2012年1月，研究室同中国科学院大连化学物理研究所开始了长期合作。该研究所是国内最早开展代谢组学研究的科研机构。通过项目合作和学习培训，研究思路逐渐明确：

----以烟草香型、品质为研究切入点;

----对质谱检测信号进行定性定量分析、对定性化合物进行基本规律分析;

----对全部质谱检测信号进行基本规律分析和数据挖掘,全面了解烟草香味物质、有害成分的代谢基础,建立烟草“指纹”图谱,加快烟草品种选育和品质鉴定的科学化进程。

.....

随着项目的不断推进,基因研究中心初步完成了行业代谢组学平台的建设和第一批研究人才的培养。目前,研究团队已有7名技术骨干,设备检测能力基本完成对烟草代谢物的覆盖,具备了系统进行烟草代谢组学研究的硬件条件。

“研究代谢产物,首先得找到它、分析它。”周会娜告诉记者,建立代谢组学测试分析方法是研究的关键。

自2011年研究启动以来,研究团队自主建立、优化了囊括烟草大部分初生和次生代谢产物的12项测试分析方法,积累了近1万个样本检测数据,检测到烟草代谢物总数2223种。烟叶代谢物检测覆盖度、精确度已处于国际领先地位。

通过分析典型品种不同生育时期中部叶位鲜烟叶代谢基础数据,研究人员得出结论:生态环境对代谢组的影响大于遗传因素;不同香型间代谢组存在明显差异,总体来讲,差异代谢物含量浓香型高于清香型、中间香型;浓香型烟叶生物碱和可溶性糖含量高于清香型、中间香型;部分代谢物在不同香型间的含量差异存在明显的年度波动。

“研究结果表明,鲜烟叶中就存在决定烟叶香味品质的物质基础。”周会娜介绍说,研究烟草关键化学成分合成、积累、转运及变化的规律,解析影响烟草香型的关键代谢途径和代谢网络,找出其遗传和生态成因,能够为培育优质、低害的烟草新品种提供理论指导和技术支撑。

此外,研究团队还在更深层次上发现了关键基因对于烟叶品质的作用---

二萜类物质与烟草香气紧密相关,研究团队克隆了该途径4个关键基因,以主栽品种K326为材料,对其二萜类物质代谢途径关键基因进行沉默或过表达,调控二萜类物质的代谢,研究代谢表型及其机理,烟草二萜类物质代谢途径逐步打通,有望实现对烟草香气物质的调控。

通过对甾醇代谢途径的研究,发现了可以调控甾醇合成途径的关键基因。初步研究结果表明,沉默这些基因表达,可以有效降低烟草甾醇含量。这一研究结果将有助于对烟气中有害成分苯并芘的控制。三年来,随着烟草基因组计划重大专项的实施,行业烟草代谢组学研究设施、团队从无到有,实现了从跟随到自主研究的思路转变,今后将力争让“小分子”释放“大能量”。

烟草主要种质重测序——解码“优异基因”

优良推广品种的利用价值取决于其携带的优异基因。基因组差异研究可提供这些优异基因最基本的遗传信息,从而提高品种选育效率。

自2012年起,贵州烟草科学研究院(以下简称“贵州烟科院”)联合行业内外多个单位,用两年多时间开展了烟草主要品种和核心种质资源基因组差异研究工作,取得了显著进展。

5月22日,该项目正式结题。对于这个项目的意义,科研人员将其总结为“承前启后”。

开展这个项目,主要是通过对重要栽培品种和野生种进行基因组重测序,发掘影响烟草遗传多样性的基因组结构变异,从而夯实下一步烟草分子育种工作的基础。

“就是要找到基因组结构的哪些变异是影响育种性状的,特色品种到底有哪些特殊的结构变异、内含哪些基因。前面烟草全基因组序列图谱已经完成,本项目获得的数据与资料,可以为下一步利用基因组育种提供重要参考。”项目负责人、贵州烟科院副院长任学良说。

项目推进过程中,项目组开展了栽培烟草品种基因组重测序及分析、烟草单交育种模式的基因组遗传变异分析、烟草叶绿体与线粒体基因组组装与分析、烟草野生种转录组测序与分析等研究工作。

在重测序对象选择上,项目组选取了1910年以来,中国与美国育成的42个重要推广品种与骨干资源,这些品种具备清晰的“家谱”。品种的丰富性为研究结果的权威性奠定了基础。

通过重测序,项目组依照系谱关系追溯了基因组的变异特征。在此基础上,他们绘制了全球烟属物种第一张含标签位点及物理长度的单倍体型草图。这是继栽培烟草序列图和物理图之后,中国烟草在结构基因组研究方面的又一重大突破,为烟草全基因组分子标记辅助育种、高密度遗传图谱构建、基因定位和基因芯片开发等奠定了坚实的基础。

“以高密度遗传图谱构建为例,以前的遗传图谱只有3000多个标记,通过单倍体型草图,我们可以绘制出包含超过10万个标记的遗传图谱。这些标记好比高速公路上的里程碑,过去的图谱就像每隔一公里放置一个路标,如今可以达到每隔1米就放一个,这样基因的方位就更好确定了。”任学良说。

研究过程中，项目组还发现了高度影响栽培烟草遗传多样性的基因组片段。栽培烟草基因组遗传多样性存在“总体低、局部高”的显著特征，有879个高变异区段，约占烟草基因组的4%，却能解释66%的群体遗传多样性。“也就是说，这879个片段是育种选择的重要区域，值得重点探究。”任学良解释道。

尽管项目已经结题，并取得了诸多成果，但在项目组成员心中，这项工作并没有结束。

“数据的挖掘工作还在继续，很多研究结果还需要进一步验证。两年时间看起来比较长，但对于基因组研究来说，它很短暂。”项目组成员余世洲说。

科研工作枯燥。余世洲告诉记者，基因组重测序产生的数据量极为庞大，有时候一个品种的基因组数据就需要大型计算机高速运行一个月才能得到。

“很多时候做了大量研究，到头来却发现跟设想的不一样，比如某些基因变异并没有那么明显。这种时候我们只能安慰自己，至少已经证明设想不对，这也是一种成果。”项目组成员张吉顺说。

虽然遇到了不少困难，但这支研究队伍却迅速成长起来。为了准确开展研究，他们带着问题去学习，阅读外文资料、学习各种软件的应用和各种计算方法的运用等。

贵州烟科院也为这支队伍提供了成长平台与研究环境。为保证项目开展，烟科院为项目组开辟了“专房专机专网”，一方面按照行业要求，增强了数据管理和分析的安全性；另一方面也提升了项目组的设备水平，提高了工作效率。

在各方面的支持下，高通量DNA测序仪和高性能计算机系统投入使用，项目组建立了基因组测序平台，优化了烟草基因组测序流程，建立了烟草基因组重测序、转录组测序和甲基化测序的分析体系。

“我们的项目是烟草基因组计划的一部分，项目实施的最大成果是培养了一支高水平的研究队伍，积累了大量重要基础数据，验收专家认为该项目‘获得了有价值的原创性结果’，为烟草分子育种奠定了基础。烟草基因组研究，需要我们不断学习，戮力前行。”任学良说。

烟草突变体研究——寻找“美丽的偶然”

盛夏7月，中国烟草总公司青州烟草研究所（以下简称“青州所”）诸城试验基地里，烟叶正处于旺长期。

“我左边栽种的是抗烟草花叶病毒（TMV）的品系，右边这片是高香气的品系。”一位戴斗笠、皮肤黝黑的“老农”站在田垄上向记者介绍这些烟株的“与众不同”。

“老农”叫吴新儒，是青州所生物技术研究室的博士。“它们是科研人员从26万份烟草突变体材料中‘淘’出来的，是一些‘美丽的偶然’。”他告诉记者。

烟草突变体，就是人为使烟草基因发生突变得到的材料。自2008年起，青州所就开始进行相关方面的探索。随着2010年烟草基因组计划重大专项正式启动，青州所牵头、行业内外13家单位共同参与的“烟草突变体创制、筛选和分析”项目也同步启动。

为什么要研究突变体呢？“烟草有7万多个基因，要搞清楚每个基因的功能，寻找相应基因的突变体进行对照，是最有效的方法之一。”项目负责人、青州所生物技术研究室研究员刘贯山告诉记者，这项研究对于烟草品种改良意义重大。

自然条件下，烟草发生基因突变的几率极低。研究突变体，首先就要大规模创制突变体。

人为使烟草发生基因突变的方法有很多，项目组采用了以EMS（甲基磺酸乙酯）化学诱变为主的方式。

“EMS就像一位魔术师，经它‘点化’，烟草基因会发生各种可能的突变。”刘贯山介绍说，诱变的原理是EMS会随机促使烟草基因中的某个碱基发生改变，用适宜剂量EMS浸泡烟草种子，就能得到出现各种性状的突变体。

根据计划，2011年，项目组开展了大规模的突变体创制工作。为了保证7万多个基因都有突变体，他们累计种植面积400多亩，种植植株38万多株，最终收获突变体材料20多万份，基本覆盖了烟草基因组在人工诱变条件下可能的突变位点。

2012年5月，他们建成了世界上最大规模的烟草突变体库，为烟草基因功能全面解析和优质品种培育奠定了坚实的材料基础。

走进青州所生物技术研究室四楼烟草突变体低温储存库，就仿佛进入了一个“种子王国”。在这个近50平方米的房间内，18台冰箱次序而立，温度均保持在零下15度左右。每台冰箱里面，都保存有1.2万~1.3万份烟草突变体种子。

除了实物库，项目组还建立了烟草突变体数据库——“中国烟草突变体资源生物信息库和利用平台”，目前已录入烟草突变体信息23万余条。平台具有数据统计、数据检索等功能，为行业基因功能和分子育种研究提供了便利。

随着研究的推进，2012年，项目更名为“烟草突变体筛选与鉴定”，研究重心也转为已有突变体材料的筛选与鉴定。

突变体创制完成，基本素材有了，但这些突变体究竟是怎样突变的，有什么作用？这就需要进一步筛选研究。可是，从20余万份材料中筛选出具有某种性状的突变体，难度无异于大海捞针。

要“淘”到“真金”，就必须建立高效的方法。“到目前为止，我们已经建立了17种筛选方法，包括2个突变序列筛选、7个抗病虫突变体筛选、2个抗逆突变体筛选、5个品质相关突变体筛选、1个长相优异突变体筛选。”刘贯山告诉记者。

比如抗TMV突变体筛选，要用TMV病毒接种，看植株是否发病；高香气突变体筛选，先田间嗅闻，成熟采烤后再评吸鉴定；低害突变体筛选，要在低钾环境中筛选耐低钾突变体……

当然，筛选只是第一步，要确定突变体是否确实具有某个突变性状，还需要多层面的鉴定。“最终要落实到基因层面，找出是什么基因突变导致的这种性状。”刘贯山说。

在青州所生物技术研究室三楼的“烟草行业烟草基因资源利用重点实验室”里，刘贯山指着一组仪器，简单给记者介绍了定位基因的方法：先用PCR（聚合酶链式反应）仪扩增DNA片段，然后用电泳分离，将结果与全基因组序列进行比较，就能将控制某个性状的基因定位到一个位置。

通过这种方式，目前，项目组已将控制烟草白茎性状的两个隐性基因定位在第5和第24连锁群的特定区间内，将抗TMV的一个显性基因定位到第11号连锁群上。

去年以来，在已建立的突变体库和鉴定出的优良突变体基础上，项目组将研究重点转向现有品种的定向改良，开展了针对中烟100品种的抗TMV、高香气性状以及针对翠碧一号品种的抗青枯病性状的定向改良，获得了5个抗TMV、高香气，且综合性状优异的突变体新品系，并进行了小区品系试验。

摇曳在诸城试验基地里的“超级烟叶”，在不久的将来，也将播撒向更广阔的烟区。

责任编辑：黄学跃

本文章已浏览过0次