

分子辅助选择技术在现代烟草育种上的应用

徐向丽, 卢秀萍*

(云南省烟草农业科学研究院, 云南 玉溪 653100)

摘要: 分子辅助选择是现代烟草育种的策略之一, 具有选择准确可靠、效率高、时间早、利于导入远缘优良基因等优点。概述了分子辅助选择的基础工作以及在现代烟草育种上的应用研究和发展策略, 指出中国近期烟草育种应采用 MAS 技术主攻品种质量。

关键词: 现代烟草育种; 分子辅助选择; 应用研究; 策略

中图分类号: S572.035 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2010)03-0295-05

Application of molecular assisted selection in modern tobacco breeding

XU Xiang-li, LU Xiu-ping*

(Yunnan Academy of Tobacco Agriculture Sciences, Yuxi, Yunnan 653100, China)

Abstract: One of the strategies of modern tobacco breeding is the using of molecular assistant selection (MAS), which have distinguished superiority, such as being accurate, highly efficient, early and favorable for distant eminent and genes' transferring. In this paper, foundation work of MAS have been summarized. Then MAS's application and development strategies in modern tobacco breeding have been also discussed. It was pointed out that the aim of breeding in the near future was to stress on quality of tobacco varieties.

Key words: modern tobacco breeding; molecular marker asisted selection; application; strategies

随着烟草种质资源鉴定及育种技术的改进, 中国烟草育种工作体系已建立一个较好的协作网络。但是, 在育种研究方面仍存在种质资源基础研究不够深入、优质高香气低危害品种缺乏、地方特色品种少等问题。加强烟草育种基础研究, 选育一批具有突破性和鲜明地方特色的烟草新品种, 更好地满足卷烟生产对原料的需求, 已成为现代烟草育种研究工作的重点。

选择是育种中重要环节之一。决定烟草品种品质表现的因素比较复杂, 一些基础性的研究尚存在攻关性缺口。在特色品种选育方面, 传统育种方法难以形成突破。利用分子辅助选择(molecular marker

assisted selection, MAS)技术, 可加快遗传背景恢复速度, 缩短育种年限和减轻连锁累赘等^[1]。

1 分子辅助选择的优越性

大量研究发现, MAS 比以表现型为基础的选择更有效率, 其优越性主要体现在以下几个方面:

(1) 直接反映 DNA 的序列差异, 不受基因表达的影响, 结果可靠性强, 同时标记位点丰富, 遍布于整个基因组。

(2) 克服性状基因型鉴定的困难。对分离群体中目标基因的选择, 尤其是对隐性农艺性状的选择十分便利, 其共显性标记可区分纯合体和杂合体,

收稿日期: 2010-01-06

基金项目: 云南省科学技术厅项目(2006NG07)

作者简介: 徐向丽(1972—), 女, 江苏徐州人, 博士, 助理研究员, 主要从事烟草分子育种工作, xxl200255@yeah.net; *通讯作者, xplu1970@163.com

不需下代再鉴定^[2]。

(3) 允许早期选择，对目标性状的选择不受植物的生长发育阶段及环境条件的影响，可在早代进行准确的选择，加速育种进程，提高育种效率^[3]。

(4) 标记形式多样，主要有 RFLP、RAPD、AFLP、SSR、SCAR、EST-SSR 等多种分子标记。

(5) 可进行非破坏性性状评价和选择，可有效地对抗病性、抗逆性和根部性状等表型鉴定困难的性状进行基因型鉴定。

(6) 利用基因聚合(gene pyramiding)技术提高育种效率^[4]。

(7) 提高回交育种效率，克服不良性状连锁，有利于导入远缘优良基因^[5-6]。

2 分子辅助选择的基础性工作

2.1 饱和遗传图谱的构建

分子标记遗传图谱也称为框架图谱，是基因定位的基础。近年来，国内外已初步构建了5张烟草分子遗传图谱^[7-11](表1)。但标记数量和种类较少，无法验证是否覆盖所有连锁群及整个基因组，不利于基因组分析及性状的精细定位，因而仍需要采用高效分子标记技术，开发锚定标记，构建并整合高密度遗传图谱。这将对于推进烟草分子标记辅助育种、提高育种效率、加快突破性品种选育等具有重要意义。

表1 已发表的烟草分子连锁图谱

Table 1 Features of previously published molecular genetic maps of tobacco

编号	作图群体	作图亲本	群体大小/个	图谱密度	标记数量及类型
1	F ₂ 群体	<i>N. plumbaginifolia</i> × <i>N. longiflora</i>	99	171个标记，图谱长度为1 062 cM，分为19个连锁群，标记间的平均距离为6.21 cM	69个RFLP标记 102个RAPD标记
2	DH群体	白肋烟 W6×Michinoku	125	95个标记，图谱长度为383 cM，分为10个连锁群，标记间平均距离为4.03 cM	95个AFLP标记
3	DH群体	烤烟品种 Speight G-28×NC2326	137	169个标记，图谱长度为2 094.6 cM，分为27个连锁群，标记间平均距离15.95 cM	11个ISSR标记 158个RAPD标记
4	F ₂ 群体	烤烟品种 Hicks Broad Leaf×Red Russian	186	293个标记，图谱长度为1 920 cM，分为24个连锁群，标记间平均距离2.55 cM	293个SSR标记
5	F ₂ 群体	烤烟品种台烟7号×白肋烟品种白肋21	187	112个标记，图谱长度为1 560.2 cM，分为26个连锁群，标记间平均距离为18.1 cM	92个SRAP标记 20个ISSR标记

2.2 目标基因在遗传图谱上的定位

将目标基因定位于遗传图谱上又称为基因标记(gene tagging)。MAS的可靠程度取决于目标性状基因与标记之间的重组率。如果在目标基因的两侧均能找到与之连锁的标记会大大提高选择的可靠性。目前，烟草性状的基因定位主要集中在抗性上，已鉴定出与根黑腐病抗性基因^[12]、野火病抗性基因^[13]、黑胫病抗性基因^[14-16]、霜霉病抗性基因^[17]、马铃薯Y病毒(PVY)感病基因(*Va*)^[18]、番茄斑萎病毒(TSWV)抗性基因^[19]等相连锁的一些分子标记。另外，肖炳光等^[20]对4种不同生长环境下的烟叶中的总糖、烟碱、氧化钾进行了QTL初步定位。

3 MAS在现代烟草育种上的应用

3.1 MAS在烟草回交育种上的应用

3.1.1 前景选择

分子辅助选择技术通过与目标基因紧密连锁的

分子标记可对单株是否带有目标基因进行前景选择，从而大大加快了育种进程。Noguchi等^[21]用1 300个引物对只在PVY抗性上有差异的NILs进行RAPD分析，再用筛选出来的引物对抗、感组合的F₂代进行分析，获得10个RAPD标记，这些标记在感病品种中存在，在抗病品种中不存在。徐秀红^[22]以抗野火病亲本*N. longiflora*与感病亲本Speight G-140配置杂交组合，利用BSA法筛选到一个与抗性基因紧密连锁的标记S52₂₀₀₀，该标记与目的基因的遗传距离为4.88 cM。BC₁群体验证表明，该标记可以对野火病抗性基因进行跟踪检测和辅助选择。

3.1.2 背景选择

在回交育种中，分子辅助选择技术可以快速选出以轮回亲本基因组为主要遗传背景的单株。孟金陵等^[23]认为，采用分子辅助选择技术，借助于饱和的遗传图谱，对各选择单株进行整个基因组的组成

分析,选出了带有多个目标性状而且遗传背景良好的理想个体。Goff等^[24]通过计算机模拟分析表明,如果从每个回交世代含有目标基因的30个单株中,通过分子辅助选择选出一株带有轮回亲本基因组比率最高的个体作为下一次回交的亲本,则几乎完全恢复到轮回亲本基因组的基因型只需3代,而在传统的育种方法中,要达到99%的轮回亲本恢复比率需要 (6.5 ± 1.7) 代。Johnson等^[14]利用BSA法找到了与烤烟品种Coker 371-Gold中黑胙病抗性基因 Ph 连锁的RAPD标记,通过MAS将 Ph 基因从Coker371-Gold中转育到K326,经后代验证对 Ph 基因的分子辅助选择育种是有效的。

3.1.3 减少连锁

连锁累赘是影响回交育种的一个主要限制因素,传统的解决方法一般是通过扩大选择群体或增加回交次数。Tanksley等^[5]的研究表明,用位于目标基因两侧1 cM的2个分子标记进行辅助选择,通过2个世代就可获得含目标基因长度不大于2 cM的个体。这样的结果如果采用传统的育种方式需要100代才能达到,因此,分子辅助选择可以对目标基因附近发生了重组的个体进行鉴定。Tajima等^[25]将烤烟品种Kerti No.1中的PVY抗性基因(va/va)回交转入到Coker319时,利用Kerti No.1特有的与 va 无连锁的86个标记及与 va 相连锁的2个标记进行背景选择,得到的CKM1(BC₃S₂株系)抗PVY,且其农艺性状、烟叶外观品质与Coker319无显著差异,表明在通过回交转入PVY抗性的同时,大大减少了遗传连锁累赘。

3.2 利用 MAS 进行多基因聚合

作物的有些农艺性状(抗病等)表达呈基因累加作用,即集中到某一品种中同效基因越多,则性状表达越充分。基因聚合就是将分散在不同品种中的优良性状基因通过杂交、回交、复合杂交等手段聚合到同一个品种中。在这一过程中,一般只考虑目标基因(前景)选择,而不进行背景选择。最成功的例子是抗病基因聚合。何光明等^[4]采用分子辅助选择与生物学鉴定相结合的方法,将 ipt 基因与 $Xa23$ 及抗稻瘟病基因进行聚合,最终在4个水稻BC₂F₁回交组合中获得了7株携带 ipt 基因和 $Xa23$ 基因的

植株。利用基因聚合技术培育优质、多抗、安全性高的烟草新品种将是一条快速有效的途径。

3.3 MAS 在数量性状定位中的应用

作物大多数农艺性状(如产量、品质、抗逆性等)表现为数量性状遗传特点,表现型与基因型之间往往缺乏明显对应关系,表达不仅受生物体内部遗传背景影响,还受外界环境条件和发育阶段影响。虽然数量性状的操作较质量性状困难得多,但近年来也取得了许多可喜成果。Nishi等^[8]将分子标记与抗性鉴定结合起来进行QTL分析,鉴定出白肋烟品种W6的青枯病抗性QTL及与之连锁的15个AFLP标记,该QTL能解释30%的抗性。肖炳光等^[20]利用烤烟DH群体,对4个环境下8个农艺性状和7种烟叶化学成分进行QTL定位,共获得分布于13个连锁群的62个QTL,贡献率为7.7%~25.5%,填补了国内外这方面的研究空白,为这些性状的分子辅助选择奠定了基础。

3.4 MAS 在品种鉴定和遗传多样性分析中的应用

烟草品种鉴定一直是烟草行业非常注重的问题,同时也是烟草育种亲本选配的基础。由于烟草栽培品种间形态差异较小,形态学鉴定费时费力,因遗传背景狭窄,使同工酶电泳分析受到极大限制。分子标记成为烟草种质亲缘关系分析和检测遗传多样性的有效工具。Filippis等^[26]利用RAPD标记将形态标记和传统生物学方法不能分辨的普通烟草或黄花烟草与它们的杂种成功区分开。Ren等^[24]利用AFLP标记技术对46个烟草栽培种和7个烟草野生种进行了遗传多样性分析,结果将46个栽培种分为6类,栽培种的遗传多样性低,而7个野生种的遗传多样性比较丰富。杨本超等^[28]利用ISSR标记,叶兰钦^[29]和刘胜传等^[30]利用SSR标记分析了烟草种质的遗传多样性。王日新等^[31]对不同烟草品种间进行SRAP分析,获得4个引物,可将烤烟、晾烟同其他普通烟草栽培类型区分开来。目前,分子标记技术已能较好地对烟草不同亲缘关系物种间的分类、遗传距离、系统发育、亲缘关系等进行研究。

3.5 品种纯度鉴定

鉴定作物品种纯度的常规方法是田间表

型性状进行鉴定,后来发展为利用同工酶的方法.近年来多应用品种的分子标记指纹图谱进行纯度鉴定,这种鉴定方法快速、准确、简便、成本低,在幼苗或种子阶段就可鉴定出品种的纯度.何川生^[32]和梁明山等^[33]分别利用 RAPD 技术对烟草种质资源进行鉴定和烟草品种的纯度进行了检测,表明分子标记技术在烟草品种纯度的检测上更为方便、准确、快捷.

4 MAS 在现代烟草育种中的研究策略

近 10 多年来,分子标记辅助育种已经取得了较大的发展,在烟草中已获得很多重要基因的标记,但育成品系或品种的报道还相对较少,绝大多数研究仍停留在标记鉴定、初步定位、遗传作图等基础环节^[34],通过分子辅助选择提高效率,大规模培育优良品系或品种的期望仍未实现.在今后的研究策略上应重视以下几个方面:

(1) 利用分子标记技术加快种质资源的鉴定和筛选.国内现在保存的品种资源有近 4 000 份,仅烤烟引进品种资源就有 200 多份,但尚未进行深入研究,不能充分发挥作用.

(2) 首选对采用常规育种比较费时费力,但又十分重要的目的性状,特别是要加强香气特点、低焦油、多抗性和抗逆特色等性状的选择.

(3) 加快烟草遗传图谱构建及图谱整合的步伐,使育种工作从间接观察转变到直接检测,从操作数量表现型尽快过渡到操作数量基因型.

(4) 在育种群体内定位目的基因,使基因作图和辅助选择同步进行.在选择杂交亲本上应尽量考虑与育种直接相关,所构建的群体也应尽可能既是遗传研究群体,又是育种群体,这样就有可能缩短基因定位研究与育种应用的距离.

(5) 在聚合分散于多个育种材料中的有利基因时,最好以一个优良品种为共同杂交亲本,以便在基因聚合时,也使优良品种得到改良,可直接应用于育种或生产.

(6) MAS 技术离不开常规育种,同时尝试结合生态育种、轮回选择等多途径育种办法.另外,加强新品种配套技术研究,做到特色品种有特定的配套技术措施.

(7) 在育种实践中,由于分子辅助选择要求对育种群体进行大规模检测,因而检测的方法要求简单、快速、低成本、高效率,同时检测过程(包括烟草 DNA 的提取、分子标记的检测、数据分析等)要实现自动化,才能增强该技术的实用性.

5 展 望

针对中式卷烟对原料的要求,中国近期烟草育种应主攻品种质量.烟草品种质量多数是由数量性状控制的^[31],生理生化机制很复杂,优良品种选育成为世界性难题.采用 MAS 技术,找到影响烟草品质的遗传控制的关键遗传因子或相关标记,不仅对于品质育种,而且对今后的工业化生产烟叶香气物质,都将具有特殊意义^[35-36].

参考文献:

- [1] 方宣钧,吴为人,唐纪良.作物 DNA 标记辅助育种[M].北京:科学出版社,2001:4-6.
- [2] 潘海军,王春连,赵开军,等.水稻抗白叶枯病基因 *Xa23* 的 PCR 分子标记定位及辅助选择[J].作物学报,2003,29(4):501-509.
- [3] Mohan M, Nair S, Bhagwat A, et al. Genome mapping, molecular markers and marker assisted selection in crop plants[J]. Mol Breeding, 1997(3): 87-103.
- [4] 何光明,孙传清,付永彩,等.水稻抗衰老 *ipt* 基因与抗白叶枯病基因 *Xa23* 的聚合研究[J].遗传学报,2004,31(8):836-841.
- [5] Tanksley S D, Young N D, Paterson A H, et al. RFLP mapping in plant breeding: New tools for old sciences[J]. Biotechnology, 1989(7): 257-264.
- [6] Kuchel H, Fox Rebecca, Reinheimer Jason, et al. The successful application of a marker-assisted wheat breeding strategy[J]. Molecular breeding, 2007, 20(4): 878-883.
- [7] Lin T Y, Kao Y Y, Lin S, et al. A genetic linkage map of *Nicotiana plumbaginifolia*: *Nicotiana longiflora* based on RFLP and RAPD markers[J]. Theor Appl Genet, 2001, 103: 905-911.
- [8] Nishi T, Tajima T, Noguchi S, et al. Identification of DNA markers of tobacco linked to bacterial wilt resistance[J]. Theor Appl Genet, 2003, 106: 765-770.
- [9] 肖炳光,徐照丽,陈学军,等.利用 DH 群体构建烤烟分子标记遗传连锁图[J].中国烟草学报,2006,12(4): 35-40.

- [10] Bindler G ,Hoeven R ,Gunduz I ,et al . A microsatellite marker based linkage map of tobacco[J] . Theor Appl Genet , 2007 , 114 : 341-349 .
- [11] 马红勃 , 祁建民 , 李延坤 , 等 . 烟草 SRAP 和 ISSR 分子遗传连锁图谱构建[J] . 作物学报 , 2008 , 34(11) : 1958-1963 .
- [12] Bai D , Reeleder R , Brandle J E . Identification of two RAPD markers tightly linked with the *Nicotiana debneyi* for resistance to black root rot of tobacco[J] . Theor Appl Genet , 1995 , 91(8) : 1184-1189 .
- [13] Yi Y H , Rufty R C , Wernsman E A . Identification of RAPD markers linked to the wildfire resistance gene of tobacco using bulked segregant analysis[J] . Tob Sci , 1998 , 42(3) : 52-57 .
- [14] Jonhson E S , Wolff M F , Wernsman E A , et al . Marker assisted selection for resistance to black shank disease in tobacco[J] . Plant Disease , 2002 , 86(12) : 1303-1309 .
- [15] Jonhson E S , Wolf M F , Wernsman E A , et al . Orinin of the black shank resistance gene in tobacco cultivar Coker371 gold[J] . Plant Disease , 2002 , 86(10) : 1080-1084 .
- [16] 刘晓侠 , 王荔 , 文国松 , 等 . 烟草黑胫病抗性基因 *BsI(t)* 的 RAPD 标记[J] . 作物学报 , 2004 , 30(5) : 516-518 .
- [17] Milla S R , Levin J S , Lewis R S , et al . RAPD and SCAR markers linked to an introgressed gene conditioning resistance to *Peronospora tabacina* D.B.Adam.in tobacco [J] . Crop Sci , 2005(45) : 2346-2354 .
- [18] Julio E , Verrier J L , Dorlhac de Borne F . Development of SCAR markers linked to three disease resistances based on AFLP with in *Nicotiana tabacum* L[J] . Theor Appl Genet , 2006 , 112(2) : 335-346 .
- [19] Moon H , Nicholson J S . AFLP and SCAR markers linked to Tomato Spotted Wilt Virus resistance in tobacco[J] . Crop Sci , 2007(47) : 1887-1894 .
- [20] 肖炳光 , 卢秀萍 , 焦芳蝉 , 等 . 烤烟几种化学成分的 QTL 初步分析[J] . 作物学报 , 2008 , 34(10) : 1762-1769 .
- [21] Noguchi S , Tajima T , Yamamoto Y , et al . Deletion of a large genomic segment in tobacco varieties that are resistant to potato *virus* Y(PVY)[J] . Molecular and General Genetics , 1999 , 262 (4/5) : 822-829 .
- [22] 徐秀红 . 烟草野火病的抗性鉴定及其抗性基因分子标记与辅助选择[D] . 泰安 : 山东农业大学农学院 , 2005 : 3 .
- [23] 孟金陵 , Lydiate D , Sharpe A , 等 . 用 RFLP 标记分析甘蓝型油菜的遗传多样性[J] . 遗传学报 , 1996 , 23(4) : 293-306 .
- [24] Stephen A Goff , John M Salmeron . Genomic studies of the world's major grain crops , together with a technology called marker-assisted breeding , could yield a new green revolution[J] . Scientific American , 2004 , 291(2) : 42-49 .
- [25] Tajima T , Noguchi S , Tanoue W , et al . Background selection using DNA markers in backcross breeding program for potato *virus* Y resistance of tobacco [J] . Breeding Science , 2002 , 52 : 253-257 .
- [26] Filippis L de , Hoffmann E , Hampp R . Identification of somatic hybrids of tobacco generated by electrofusion and culture of protoplasts using RAPD-PCR[J] . Plant Science Limerick , 1996 , 121(1) : 39-46 .
- [27] Ren N , Timko M P . AFLP analysis of genetic polymorphism and evolutionary relationships among cultivated and wild *Nicotiana* species[J] . Genome , 2001 , 44(4) : 559-571
- [28] 杨本超 , 肖炳光 , 陈学军 . 基于 ISSR 标记的烤烟物质遗传多样性研究[J] . 遗传 , 2005 , 27(5) : 753-758 .
- [29] 叶兰钦 , 辛明明 , 杜金昆 , 等 . SSR 标记应用于烟草品种遗传多样性研究[J] . 中国农学通报 , 2009 , 25(1) : 56-62 .
- [30] 刘胜传 , 刘仁祥 , 雷红梅 , 等 . 利用 SSR 标记分析部分烟草种质的遗传多样性[J] . 贵州农业科学 , 2009 , 37(7) : 1-3 .
- [31] 王日新 , 任民 , 贾兴华 , 等 . 烟草主要栽培类型的标记研究[J] . 生物技术通报 , 2009(6) : 100-104 .
- [32] 何川生 , 何兴金 , 葛颂 , 等 . 烤烟品种资源的 RAPD 分析[J] . 植物学报 , 2001 , 43(6) : 610-614 .
- [33] 梁明山 , 曾宇 , 周翔 . 遗传标记及其在作物品种鉴定中的应用[J] . 植物学通报 , 2001 , 18(3) : 257-265 .
- [34] 杨友才 , 周清明 , 朱列书 . 烟草品种青枯病抗病性及抗性遗传研究[J] . 湖南农业大学学报 : 自然科学版 , 2005 , 31(4) : 381-383 .
- [35] 赵松义 , 高春阳 , 胡日生 , 等 . 烤烟农艺性状的杂种优势表现[J] . 湖南农业大学学报 : 自然科学版 , 2007 (S1) : 31-35 .
- [36] 卢秀萍 , 许仪 , 许自成 , 等 . 烤烟有机酸含量的杂种优势表现及亲子相关分析[J] . 湖南农业大学学报 : 自然科学版 , 2007 , 33(3) : 289-293 .

责任编辑: 娄 敏

英文编辑: 罗文翠