

植物生理 与分子生物学

(第4版)

主编 陈晓亚 薛红卫

PLANT PHYSIOLOGY
AND
MOLECULAR
BIOLOGY (4th EDITION)

植物生理 与分子生物学

(第4版)

主编 陈晓亚 薛红卫

ZHIWU SHENGLI YU FENZI SHENGWUXUE

PLANT PHYSIOLOGY
AND
MOLECULAR
BIOLOGY (4th EDITION)

内容提要

本书内容包括“植物分子遗传与基因组学”、“植物细胞生物学”、“光合与呼吸”、“营养、物质代谢调控”、“植物生长发育与调控”、“植物信号与信号转导”、“植物与环境”、“植物生物技术及其应用”等八篇43章,基本涵盖了当代植物生理和分子生物学的各个领域,汇总了当前的最新进展。本书突出体现了从分子生物学角度对重要生理现象和过程的解析,便于读者在分子遗传和细胞层面理解植物生命活动的规律。

本书既是研究生教材,又是相关科研人员的重要参考书,主要阅读对象是生命科学、农业科学和环境科学等相关领域的研究生、教师和科研人员。

图书在版编目(CIP)数据

植物生理与分子生物学 / 陈晓亚, 薛红卫主编.

—4版. —北京: 高等教育出版社, 2012.6

ISBN 978-7-04-035155-2

I. ①植… II. ①陈…②薛… III. ①植物生理学—

研究生—教材②植物学—分子生物学—研究生—教材

IV. ①Q945

中国版本图书馆CIP数据核字(2012)第112891号

策划编辑 吴雪梅 林金安

责任编辑 李光跃

封面设计 王凌波

版式设计 张楠

责任印制 朱学忠

出版发行	高等教育出版社	咨询电话	400-810-0598
社 址	北京市西城区德外大街4号	网 址	http://www.hep.edu.cn
邮政编码	100120		http://www.hep.com.cn
印 刷	涿州市星河印刷有限公司	网上订购	http://www.landraco.com
开 本	889×1194 1/16		http://www.landraco.com.cn
印 张	50	版 次	1992年10月第1版
插 页	16		2012年6月第4版
字 数	1570千字	印 次	2012年6月第1次印刷
购书热线	010-58581118	定 价	98.00元

本书如有缺页、倒页、脱页等质量问题,请到所购图书销售部门联系调换

版权所有 侵权必究

物 料 号 35155-00

《植物生理与分子生物学》(第4版)

编委会

主 编 陈晓亚 薛红卫

编 委 韩 斌 林鸿宣 杨贞标 黄 海 郭房庆

文啟光 黄勇平 蔡伟明 何祖华 李来庚

黄继荣 龚继明 张 鹏

第4版序

《植物生理与分子生物学》作为植物生理和分子生物学及相关领域的研究生教材以及有关科技人员的重要参考书，已是第4版了。本书的前身是为纪念已故的中国科学院植物生理研究所所长罗宗洛教授(1898—1978)，在1987年由科学出版社出版、《植物生理学通讯》编辑部主编的《植物生理学专题讲座——纪念罗宗洛教授》，该书的主要内容是在为所内研究生讲授“高级植物生理学”课程的基础上，经增订而成。当时全书仅23讲，由殷宏章教授写了第一讲导言。随后在1992年由余叔文研究员主编，出版了《植物生理与分子生物学》，内容扩增到40讲。到1998年由余叔文、汤章城研究员主编的第2版时，由于植物生理和分子生物学研究的迅速发展，涉及的领域也不断拓展，为此将全书分成八篇共53章。2007年由陈晓亚、汤章城研究员主编第3版，并改由高等教育出版社出版，内容又进行了较大的调整，成七篇28章。本书第4版由陈晓亚、薛红卫研究员主编，又扩充到八篇43章，基本上包括了当代植物生理和分子生物学的各个领域。

在过去十几年中，植物科学又有了极大的发展，随着拟南芥、水稻和杨树基因组测序的完成，针对不同植物的基因组、转录组、蛋白质组、代谢组等不同“组学”的研究，高通量技术和高维数据分析方法，全基因组关联分析和单细胞荧光标记及分子检测等细胞生物学技术的建立，为大规模解析植物的各种复杂生理过程和生命现象构建了平台，使植物科学研究人员进行多学科综合研究，从微观到宏观，在分子、细胞、个体、群体乃至生态层面探讨植物生命活动的基本规律成为现实，这也是我国几代植物生理学家所追求的理想。从我国的《植物生理学报》改名为《Molecular Plant》，《植物学报》改名为《Journal of Integrative Plant Biology》，以及“中国植物生理学会”改名为“中国植物生理学与分子生物学学会”，也反映了植物科学发展的这一趋势。为了使读者能更好地了解当代分子遗传和细胞生物学对植物科学的影响和渗透，本书扩充了植物分子遗传和细胞生物学的篇幅，分列成两篇，这将有助于读者在分子和细胞层面更好地理解植物生命活动的规律。植物生理学期长期研究中所积累的大量关于生长发育、代谢方面的知识为植物分子生物学的发展奠定了扎实的生物学基础，也为构思植物基因工程和作物改良的蓝图提供了理论依据。随着在分子和细胞水平上对植物生长发育和形态建成、光合作用、代谢和养分利用、植物抗病虫害和抗逆境等过程及其调控的深入了解，在作物中更多有重要价值的基因

以及各种调控元件的分离克隆，根据人类的需求定向进行“作物分子设计”已成为现实。为此，本书最后专列了一篇“植物生物技术及其应用”，介绍转基因技术和基因工程策略与应用范例。

本书过去三版的作者中，不少老一辈的植物生理学家已经过世，在本书第4版出版时，我们缅怀他们为中国植物生物学的科研和教学所作出的贡献。得益于国家对农业科技和植物科学研究资助的增加，以及大批从事这方面研究的海外学者回国工作，一大批重要的研究项目得到了资助和加强，中国的植物科学研究在过去十几年中取得了很快的发展，一批优秀的中青年植物生物学家已经涌现出来，这从这一版各章的作者以及他们的研究工作可以看出，这是十分可喜的。

2009年7月，来自全球不同国家和地区的13个植物科学学会的理事长和代表在夏威夷开会，决定成立“Global Plant Council”，呼吁各国政府及全球科学家关注农业，关注农业科学和植物科学的发展。2010年11月，美国《Science》杂志发表社论文章，呼吁重视植物科学研究，迎接人类面临的新挑战。这是因为当前全球农业发展中还有许多重要的问题需要全球的科学家共同关注，包括全球环境变化和生态保护、粮食稳定生产、食品的结构和营养、人类的健康等，无不与植物科学有关。2011年，C. S. Grierson等14名全球知名的植物科学家又在《New Scientist》上发表文章，列出了100个植物科学研究面临的重要问题。为此，植物科学家应与农学家、生态学家和环境专家共同应对，为发展低碳农业，开发新型能源植物和工业原料，提供健康食品和开发药物，合理利用土地和水资源，改善环境等方面的问题提供思路 and 新的技术，为地球和人类社会的可持续发展作出贡献。希望本书也能为读者从植物科学的角度提供这方面的背景，开拓思路。

许智宏 沈元钢

2011年11月30日

前 言

植物不但为人类提供食物，也在生态环境中发挥着重要作用。对植物重要生理过程的系统解析将了解植物生长发育的调控机制，作物新品种培育，进而实现可持续的农业发展和环境保护提供理论基础和方法。植物生理学研究针对植物发育和生理过程的调控，与其他学科共同构成了植物科学的基础。

近些年来遗传学、分子生物学、生物化学的迅猛发展，各种新技术（特别是组学技术）的出现，以及多种植物基因组的序列测定、大规模突变群体的建立，为植物重要性状的解析、相关功能基因的分离和植物科学的深入发展提供了可能和基础。植物生理学研究，特别是从分子生物学角度对重要生理现象和过程的解析近些年来取得了长足进展，获得了大量成果，对其汇总就显得及时和必要，也会为今后的研究工作提供线索和基础。

为了介绍植物生理学和分子生物学的前沿进展，在《植物生理与分子生物学》（第3版）的基础上，我们和众多编者一起共同进行了修改和补充。《植物生理与分子生物学》（第4版）共含“植物分子遗传与基因组学”、“植物细胞生物学”、“光合与呼吸”、“营养、物质代谢调控”、“植物生长发育与调控”、“植物信号与信号转导”、“植物与环境”、“植物生物技术及其应用”等八篇43章，基本上涵盖了当代植物生理和分子生物学的各个领域，并汇总了当前的最新进展。

和第3版相比，《植物生理与分子生物学》（第4版）扩充了“分子与细胞生物学基础”的篇幅，改为“植物分子遗传与基因组学”和“植物细胞生物学”两篇，增加了表观遗传学并大幅增加了细胞生物学的内容，以便于读者在分子遗传和细胞层面理解植物生命活动的规律。在“光合作用”部分增加了叶绿体的分子生物学内容。极大地扩充了“植物生长发育与调控”、“植物信号与信号转导”的篇幅，增添了当前的最新进展，以使读者对于植物生长发育及其信号传导有一个综合、全面的了解。此外，增加了“植物生物技术及其应用”，介绍转基因技术和基因工程的策略与应用。

希望本书能成为从事植物生理学和分子生物学及相关领域研究的科研人员及研究生的有益参考书。

众多编者参与了《植物生理与分子生物学》（第4版）的撰写，值出版之际，我们对他们及编辑人员表示深深的谢意！

陈晓亚 薛红卫

2012年5月

目 录

1

第一篇 植物分子遗传与基因组学

- 第1章 植物遗传学与功能基因组 林鸿宣 晁代印 /002
- 第2章 植物基因组学 韩 斌 /023
- 第3章 植物表观遗传学 徐 麟 黄 海 /041
- 第4章 植物蛋白质组学 孙卫宁 / 059

2

第二篇 植物细胞生物学

- 第5章 染色质的结构、动态与功能 方玉达 /076
- 第6章 植物减数分裂过程中同源染色体之间的相互作用 王应祥 程祝宽 马 红 /086
- 第7章 细胞周期调控 王 芳 国 静 张宪省 /103
- 第8章 细胞极性 菅新宇 秦 源 杨贞标 /123
- 第9章 植物细胞骨架 黄善金 王 娟 /139
- 第10章 植物内膜系统的发育及运输 李 晖 秦 源 杨贞标 /154
- 第11章 细胞核与细胞质间的分子运输 方玉达 /178
- 第12章 植物细胞壁 李来庚 宋东亮 /187

3

第三篇 光合与呼吸

- 第13章 叶绿体的分子生物学 胡 勇 赵进东 何奕昆 /214
- 第14章 原初反应和氧的释放 郭进魁 张立新 /234
- 第15章 光合电子传递与磷酸化 米华玲 沈允钢 /249
- 第16章 光合效率及调节 许大全 /267
- 第17章 光合碳同化与呼吸作用 朱新广 /280

4

第四篇 营养、物质代谢调控

- 第18章 矿质营养及代谢 廖 红 王永飞 鲍 娟 龚继明 /294
- 第19章 糖代谢与运输 阮勇凌 王 璐 /317
- 第20章 脂代谢 洪月云 王学敏 /343
- 第21章 植物次生代谢 卢 山 陈晓亚 /369
- 第22章 植物代谢组学 王国栋 漆小泉 /390

5

第五篇 植物生长发育与调控

- 第23章 植物根系：结构、发育与生理功能 须 健 /406
- 第24章 株型发育调控 王永红 李家洋 /424
- 第25章 叶形态建成的控制 崔晓峰 黄 海 /440
- 第26章 花发育 杨 军 罗 达 /457
- 第27章 植物生殖发育生理 叶 德 /477
- 第28章 种子发育 薛红卫 邢梅青 张 花 /497
- 第29章 植物叶片衰老及其调控 郭房庆 /514

6

第六篇 植物信号与信号转导

- 第30章 激素的生物合成及信号转导 文啟光 薛红卫 /524
- 第31章 植物保卫细胞的信号感受和转导 周 云 郝福顺 宋纯鹏 /557
- 第32章 植物G蛋白信号转导 黄继荣 /579
- 第33章 高等植物光控发育的分子基础 杨洪全 /593
- 第34章 植物向重性及信号转导 蔡伟明 /615

7

第七篇 植物与环境

- 第35章 植物渗透胁迫适应、耐盐性和抗冷性 张洪霞 郭 岩 /628
- 第36章 植物水分运输与水孔蛋白 苏维埃 孙卫宁 /648
- 第37章 植物对低温的响应 徐云远 邢立静 张景昱 种 康 /659
- 第38章 植物对重金属胁迫的响应及适应 谢婉滢 李 刚 彭佳师 朱永官 龚继明 /679
- 第39章 植物免疫反应与抗病机制 何祖华 周俭民 /695
- 第40章 植物对昆虫的防御 苗雪霞 黄勇平 /716
- 第41章 共生固氮作用 罗 利 /738

8

第八篇 植物生物技术及其应用

- 第42章 转基因技术 杨长青 陈晓亚 /760
- 第43章 基因工程策略与应用范例 张 鹏 /777

第一篇

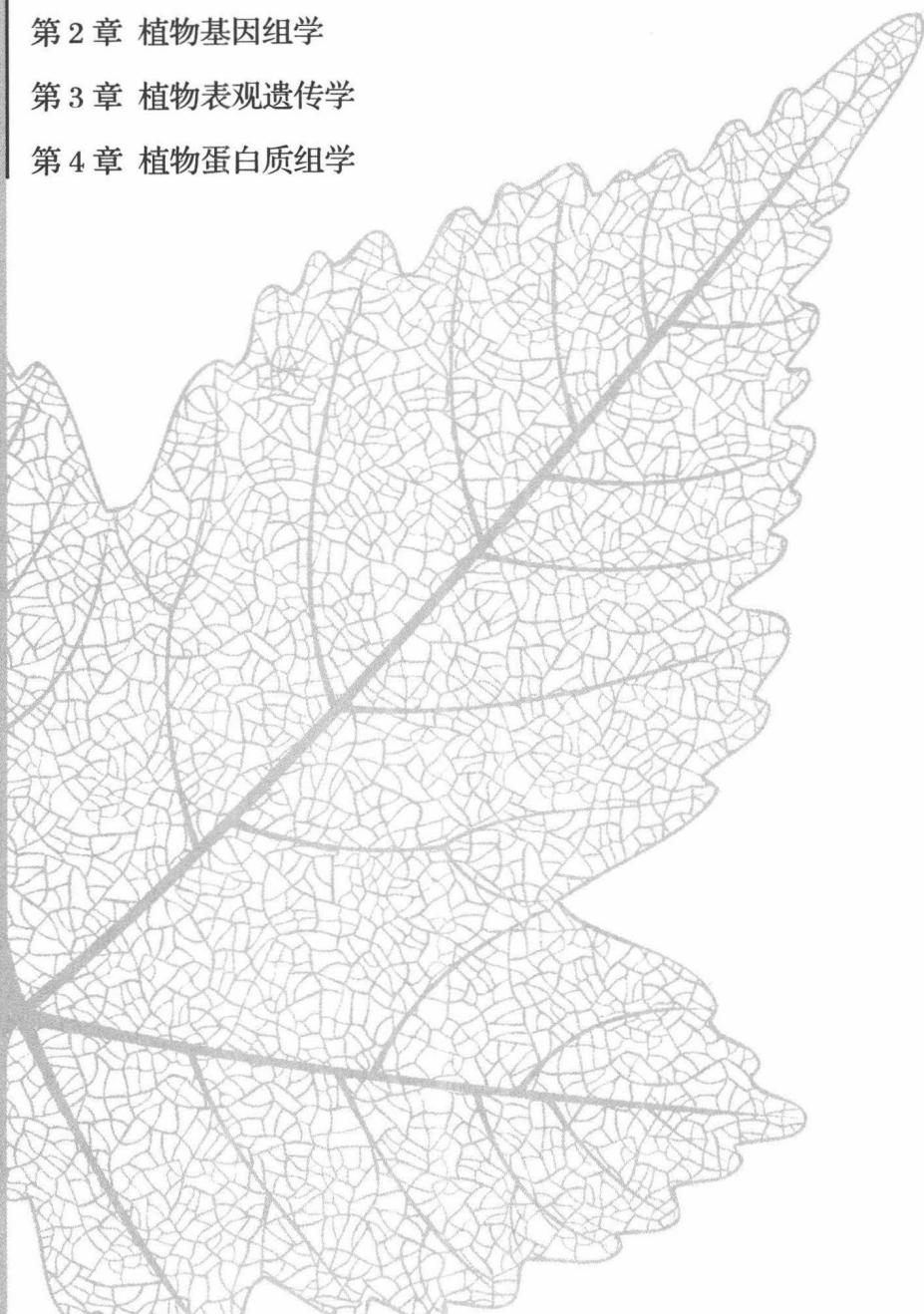
植物分子遗传与 基因组学

第1章 植物遗传学与功能基因组

第2章 植物基因组学

第3章 植物表观遗传学

第4章 植物蛋白质组学



内容提要

近年来新技术引发基因组学的迅速发展极大地推动了功能基因组研究的发展。植物功能基因组的主要研究内容是克隆控制质量和数量性状的基因并阐明相关基因的生物学功能。本章重点介绍控制植物质量和数量性状的遗传特征、分子标记与基因定位、遗传群体的构建、主基因和QTL的图位克隆和功能分析、全基因组关联分析、基因芯片鉴定相关基因、功能基因在育种中的应用等内容。

目 录

1 导言	7.2 LD的计算
2 质量性状与数量性状遗传	7.3 影响LD的因素以及LD的衰减
3 分子标记与连锁图谱	7.4 关联作图的统计分析以及应用软件
3.1 分子标记	8 遗传互补验证与基因功能分析
3.2 连锁图谱	9 基因芯片/微阵列在植物功能基因组研究中的应用
4 遗传群体的构建	9.1 功能基因的鉴定
5 主基因与QTL定位	9.2 表达谱/转录组分析
5.1 主基因定位	9.3 转录调控网络以及转录调节子的鉴定
5.2 QTL定位	9.4 基因芯片在图位克隆中的应用
6 主基因与QTL克隆	9.5 基因芯片在功能基因组中其他方面的应用
6.1 主基因克隆	10 作物分子设计育种
6.2 QTL克隆	10.1 导入有利基因
7 关联作图	10.2 有利基因聚合
7.1 连锁不平衡	10.3 分子设计

1 导言

19世纪末,孟德尔(G. J. Mendel)以质量性状为研究对象,进行了豌豆杂交实验,对杂交后代进行细致的观察和统计分析,认为性状是由遗传因子控制的,首次提出分离和独立分配两个遗传基本规律,开创了遗传学。1910年以后,摩尔根(T. H. Morgan)等以果蝇为材料进行遗传分析,分析性状连锁现象,证明基因以直线排列

方式位于染色体上,提出遗传学第三基本规律即连锁遗传规律,在此基础上进一步发展为细胞遗传学。1941年G. W. Beadle等以红色面包霉为材料,进行基因的生理生化功能等研究,发现基因通过酶起作用,提出“一个基因一个酶”假说。20世纪50年代前后,O. T. Avery、O. T. Hershey和M. Chase等证明脱氧核糖核酸(DNA)是具有遗传传递作用的遗传物质。1953年沃森(J. D. Watson)和克里克(F. H. C. Crick)在《Nature》上发表具有划时代

意义的研究论文，他们通过X射线衍射分析，提出DNA分子结构模式（双螺旋结构模型）理论。该模型解释DNA的理化性质并明确结构与功能的关系，证明基因是DNA分子上的一个片段，开创了分子遗传学并极大地推动了该学科的发展。可见经过100多年的努力，遗传学取得了突飞猛进的发展，由经典遗传学发展为细胞遗传学和数量遗传学，再发展为分子遗传学、分子数量遗传学、分子生物学、基因工程学、基因组学、生物信息学等多个分支学科。为了阐明控制作物重要性状的基因功能和遗传调控机制，需要借助上述多门学科开展深入研究。

2 质量性状与数量性状遗传

我们把生物体中表现的形态特征和生理特性统称为性状，如水稻叶色、谷粒形状、株高、产量、品质、抗病虫性和抗逆性等。遗传性状根据其变异情况可分为质量性状和数量性状，在杂种后代的分离群体中表现不连续变异的性状称为质量性状而表现连续变异的性状称为数量性状（图1-1）。质量性状由一个或几个主基因控制，在杂种后代分离群体中，可将表型明确划分为几种类型，计算不同类型之间的比率，易于研究这类性状的遗传动态。孟德尔就是利用豌豆杂交实验研究质量性状的遗传传递规律，从而建立了两大遗传学规律——分离规律和独立分配规律。摩尔根等以果蝇为材料研究质量性状的遗传传递，建立了遗传学第三基本规律——连锁遗传规律。例如，水稻的紫色叶与绿色叶为一对相对性状，紫色叶亲本与绿色叶亲本杂交 F_1 代表现为紫色时，表明紫色叶为显性性状，在 F_2 代中出现紫色叶植株与绿色叶植株两种表型分离，紫色叶植株为360株，绿色叶植株为130株，分离比符合3:1（ $\chi^2 = 0.53 < \chi_{0.05}^2 = 3.84$ ），证明水稻叶色性状是由一对基因控制的质量性状。

大多数重要农艺性状如产量、品质、抗逆性（包括耐盐、抗旱、耐冷、耐高温等）等都是数量性状。因此研究数量性状的遗传规律具有重要的理论和现实意义。这些性状是由多个数量性状基因位点（quantitative trait loci, QTL）控制的，遗传复杂，易受环境影响，在杂种后代的分离群体中为连续分离（图1-1），不能明确划分为几种类型，只能对性状进行数量化，用统计学方法分析才能了解其遗传动态，因此根据表型难于判断基因型。可见数量性状的遗传研究难度非常大。长期以来数量遗传学

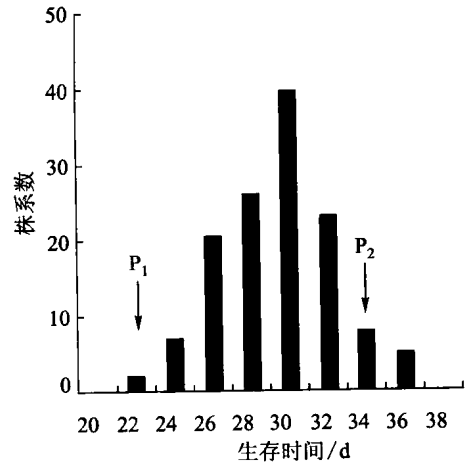


图1-1 在 F_2 群体中盐胁迫下（140 mmol/L NaCl）的水稻苗期生存时间（引自Lin等，2004）

家引入数理统计学方法将控制数量性状的多基因作为一个整体进行研究，采用群体的平均数、方差和协方差来反映数量性状的遗传特征。根据多基因假说，数量性状是多个基因作用的结果，每个基因的效果较微小，各基因的表现为不完全显性 or 无显性，各基因的作用是累加的。尽管如此，控制数量性状的各个基因的遗传方式实际上服从于孟德尔的遗传规律。然而经典的数量遗传学方法无法阐明数量性状各个基因在染色体上的位置和遗传效果，也就无法在育种中有目的地对数量性状进行遗传操作。20世纪80年代，发展了DNA分子遗传标记及其连锁图，与数量遗传学相结合，从而发展了分子数量遗传学。分子标记的出现使数量性状的研究进入了分子遗传研究时代，同时也极大地推动了质量性状的分子遗传研究进程。

3 分子标记与连锁图谱

3.1 分子标记

第一代遗传标记是形态标记，是一些有遗传多态性的外观性状，如叶色（紫叶与绿叶、白化叶与绿叶等）、株高（高秆与矮秆）、粒型（圆粒与长粒、长护颖与短护颖、长芒与短芒等）、穗型（稀穗与密穗）。这些形态标记性状在遗传群体中分离明显，肉眼就能观察和识别，在早期的遗传研究中如构建经典连锁图谱和基因初步定位中发挥了重要作用。但这类标记数目有限，如在水稻中经过几代科学家近百年的努力仅报道了约300个形态标

记 (Khush, 1987), 并且有些标记性状对生物体是有害的, 如致死、弱势等。进入20世纪80年代, 美国遗传学家 Botstein 等 (1980) 首次提出DNA限制性片段长度多态性 (RFLP) 作为分子遗传标记, 使遗传标记的研究进入DNA水平的时代。80年代后期, 随着PCR (DNA多聚酶链式反应) 技术的诞生和发展, 发展了多种基于DNA多态的分子标记, 如RAPD、SSR、CAPS、AFLP和SNP等, 大大加快了遗传标记检测技术的发展, 使遗传学和功能基因组学研究进入快速发展时期。DNA遗传标记是利用十分丰富的DNA多态性, 因此与形态标记相比具有如下优点: ①数量无限。②遗传上通常为共显性, 在 F_2 群体中可鉴别出三种标记基因型即两种亲本纯合基因型和一种杂合基因型, 而形态标记往往只能鉴别出两种标记基因型即隐性亲本纯合基因型和杂合基因型 (显性纯合和杂合基因型不能识别)。③对生物体为中性, 而有些形态标记对生物体是致死或有害的。④遗传稳定, 不受环境的影响, 而有些形态标记受环境影响。以下简单介绍几种常用的分子标记产生多态的原理和检测方法。

(1) RFLP (restriction fragment length polymorphism, 限制性片段长度多态性) 标记 多态性是由亲本间 (或个体间) 的DNA序列上限制性内切酶酶切位点或位点间区段存在差异产生的, 为共显性标记。DNA上具有许多限制性内切酶酶切位点, 不同亲本或个体之间由于DNA序列的差异引起它们的酶切位点存在变异, 用限制性内切酶酶切样本总DNA时就会产生DNA片段长度的差异 (用凝胶电泳分离), 利用单拷贝的基因组DNA克隆 (约1 kb大小) 或cDNA克隆作为探针, 进行同位素或非放射性标记, 经过Southern杂交分析就能检测出这种限制性片段长度的差异即不同亲本间的多态性。RFLP检测技术存在需要样本DNA量大、时间长和操作过程繁琐等缺点, 目前应用较少。该标记主要用于早期的分子标记连锁框架图构建和基因定位。

(2) RAPD (random amplified polymorphic DNA, 随机扩增多态DNA) 标记 是基于PCR的标记, 具有需要DNA的量极少、对DNA质量要求不高、操作简便等优点。多态性是由于亲本间 (或个体间) 的模板DNA扩增区域上引物结合位点的碱基序列发生突变引起扩增产物的有无而产生。其引物的序列是随机的, 长度较短, 一般为9~10个碱基, 所揭示的多态性高。这类标记一般为显性遗传, 显性纯合和杂合基因型不能被识别, 所提供的信息量较少。对于基因组遗传信息缺乏的物种来说可以用于分子标记连锁框架图的构建。

(3) CAPS (cleaved amplified polymorphic sequence, 劈开扩增多态序列) 标记 (Konieczny and Ausubel, 1993) 多态性是由亲本间 (或个体间) 的特异PCR产物DNA序列内限制性内切酶位点变异产生的, 其产生多态性的原理类似于RFLP标记。根据已知的基因组或cDNA序列设计特异引物 (长度一般为18~20 bp), 对不同亲本总DNA模板进行PCR, 选用相应的限制性内切酶酶切PCR产物, 经过电泳可以检测到长度不同的片段, 从而得到亲本间的多态性。这类标记遗传上为共显性, 在主基因或QTL精确定位和图位克隆中常常被使用, 因为在某个目标基因候选区域里可以根据DNA序列发展大量致密的CAPS标记。

(4) STS (sequence tagged site, 序列标签位点) 标记 多态性是由亲本间 (或个体间) 的特异PCR产物大小有差异产生的。与CAPS标记类似, 根据已知的基因组序列设计特异引物 (长度一般为18~20 bp), 对不同亲本总DNA进行PCR, PCR产物经过电泳可以直接检测到长度不同的片段, 从而揭示亲本间的多态性。这类标记为共显性, 其多态性较低, 在基因或QTL精确定位和图位克隆中是CAPS标记的补充。

(5) SSR (simple sequence repeat, 简单序列重复或microsatellite marker, 微卫星标记) 标记 SSR是由2或3个碱基 (如GA或AC) 组成基本重复单元形成重复, 重复次数通常为10~50, 亲本间 (或个体间) 的重复次数不同, 从而产生多态性。从现有DNA序列数据库中搜索SSR序列, 根据SSR两侧的序列设计特异引物 (长度一般为18~20 bp), 对不同亲本总DNA进行PCR, PCR产物经过琼脂糖或聚丙烯酰胺凝胶电泳直接检测到长度不同的片段, 从而揭示亲本间的多态性。对于基因组序列数据较少的物种, 可以通过构建基因组文库 (一般<10 kb), 利用poly GA或poly AC作为探针筛选出含微卫星的克隆, 然后进行测序, 在SSR两侧设计特异引物而检测出多态性。这是一项比较繁琐而耗财的工作。基因组中存在丰富的SSR, 因此多态性很高, 在基因或QTL初步定位、精细定位和图位克隆中被广泛应用。

(6) SNP (single nucleotide polymorphism, 单核苷酸多态性) 标记 多态性是由亲本间 (或个体间) 在DNA序列上因单个核苷酸的变异所产生的, 这种变异通常由单个碱基的转换 (transition) 或颠换 (transversion) 所致。SNP标记广泛分布于基因组上, 是生物体最普遍、最丰富的一种多态性标记。在人类基因组中至少存在300万个SNP, 平均每500~1000个碱基对中存在1个SNP。在拟

南芥基因组中平均1.4 kb左右存在1个SNP，大约共有82万个SNP位点。最近在水稻中通过对517个地方品种的重测序，鉴定到360万个SNP（Huang等，2010）。随着快速、低成本的新一代测序技术的发展和运用，将会在植物包括作物中发现越来越多的SNP标记，因此SNP标记在功能基因组等研究领域将发挥重要作用。

将以上几种分子标记的特点归纳于表1-1。

表1-1 常用分子标记特点

类别	多态性	遗传特点	探针/引物	主要用途
RFLP	中等	共显性	cDNA/gDNA	连锁框架图，现在少用
RAPD	较高	显性	10 bp	连锁框架图，现在少用
CAPS	中等	共显性	18~20 bp	连锁框架图，图位克隆，应用多
STS	中等	共显性	18~20 bp	连锁框架图，图位克隆，应用多
SSR	高	共显性	18~20 bp	连锁框架图，基因/QTL定位，应用多
SNP	极高	共显性		基因/QTL定位，应用多

3.2 连锁图谱

应用遗传标记我们可以构建连锁图谱。由于形态标记数目有限，经典标记连锁图谱的分辨率较低，而且不能覆盖整个基因组。分子标记数量可以说是无限的，因此可以构建分辨率极高、能覆盖整个基因组的分子标记连锁图谱。就拿水稻来说，自1988年发表第一张RFLP连锁框架图谱以来（McCouch等，1988），水稻分子标记连锁图谱的构建取得快速发展，1994年日本水稻基因组项目（RGP）利用粳稻品种（日本晴）和籼稻品种（Kasalath）杂交F₂群体构建了一张致密的分子标记连锁图，该图谱包含1383标记（其中883个为EST），标记间平均图距为300 kb（Kurata等，1994）。过了4年，RGP又发展了一张更致密的分子标记连锁图，该图共分布有2275个标记，覆盖12条染色体，总图距为1521.6 cM，标记间平均图距为0.67 cM（~200 kb）（Harushima等，1998）。以上标记都是基于Southern分析的RFLP标记，使用不便，因此RGP于2002年公布基于PCR的161个STS和171个CAPS标记（<http://rgp.dna.affrc.go.jp/publicdata/caps/index.html>）。由美国、中国、日本和国际水稻所等科学家根据海量的水稻基因组测序结果联合开发了大量的SSR分子标记，构

建一张包含2240个SSR标记的连锁图，加上原有的500个SSR标记，在水稻中至少有2740个SSR标记定位在连锁图上，平均157 kb有1个SSR标记（McCouch等，2002）。这些定位于连锁图上、基于PCR技术的大量分子标记作为作物基因组和功能基因组研究奠定了坚实的基础。

为了构建遗传连锁图，首先需要利用各种标记（探针或引物）筛选不同亲本间的DNA多态性，选择多态性高的两个亲本构建遗传群体（如F₂、BC₁、RI、HD等群体，详见4 遗传群体的构建），检测群体中不同个体的分子标记基因型，然后利用作图软件如MAPMAKER（Lander等，1987）进行作图分析，构建连锁图。在应用软件作图前需要将标记基因型数据化，可以将P₁（亲本1）带型（基因型）记作“A”，P₂（亲本2）带型记作“B”，杂合带型记作“H”，而带型不清或数据缺失者记作“-”；当标记为显性时，P₁对P₂为显性，P₁与杂合带型无法区分，只能当做一种带型记作“D”，另外，P₂对P₁为显性时，P₂与杂合带型无法区分，该带型记作“C”。连锁图上标记间的图距不是用重组率来表示，而是以通过作图函数换算成的厘摩（cM）来表示。有两种作图函数即Haldane函数和Kosambi函数。前者为 $R = - (1/2) \ln (1-2r)$ ，R为图距，单位为M（Morgan），1 M = 100 cM。当两个标记间重组率 $r = 22\%$ 时， $R = - (1/2) \ln (1-2 \times 0.22) = 0.29 M$ ，即29 cM。但Haldane函数有假设前提：假设完全不发生交换干涉，因此有不合理之处。Kosambi函数将交换干涉因素考虑进来，其函数为 $R = (1/4) \ln \frac{(1+2r)}{(1-2r)}$ 。当两个标记间重组率 $r = 22\%$ 时 $R = 23.6 cM$ ，可见该图距与重组率比较接近，通常应用Kosambi函数计算图距。

4 遗传群体的构建

为绘制连锁图谱和定位基因/QTL需要构建各种遗传群体，而群体的构建首先需要选择合适的亲本。两个亲本的选择原则是亲本间DNA多态性高，如选择亲缘较远的不同亚种（籼稻品种与粳稻品种）或不同种的材料作为亲本；遗传纯度要高，杂交后代要有一定的育性。将亲本进行杂交构建各种遗传群体，根据遗传特点将群体可分为两大类，一类为暂时性群体如F₂、BC₁等，由于群体中存在杂合基因型的个体，经自交或近交其基因型会变化，不能永久使用。第二类是永久性群体如重组自交系（recombinant inbred lines, RIL）、双单倍体（doubled hap-

loid, DH)、染色体片段置换系(chromosome segment substitution line, CSSL)、近等基因系(nearly isogenic line, NIL)等。这类群体由株系组成,不同株系间的基因型存在差异,而株系内个体间的基因型相同并且纯合,自交不分离,通过自交或近交不断繁殖后代,可永久使用。以下简单描述几种常用群体的构建和遗传特点。

(1) F_2 群体:这类群体易于构建,经过两亲本杂交获得 F_1 代,再自交即可获得 F_2 群体。其遗传特点是在群体中有三种标记基因型分离即双亲纯合基因型和杂合基因型,三种基因型的个体比率理论上为 P_1 基因型:杂合基因型: P_2 基因型=1:2:1。 F_2 群体优点是构建所用时间较短并且容易获得大规模群体(如几千或几万个个体),在构建分子标记连锁图和主基因定位中常被利用,其缺点是有性繁殖后群体的遗传结构会改变,因此不能长期利用。

(2) BC_1 群体:经过两亲本杂交获得 F_1 代,再用其中亲本之一与 F_1 回交获得 BC_1 群体。其遗传特点是在群体中只有两种标记基因型即回交亲本纯合基因型和杂合基因型,它们在群体中的理论分离比为1:1。与 F_2 群体相比,由于需要回交,因此工作量较大,而且不易获得大规模群体。在杂种 F_1 代育性较低,难于获得 F_2 代种子时可考虑构建 BC_1 群体。这类群体由于存在杂合基因型,后代会产生分离,因此也不能长期利用。

(3) 重组自交系(recombinant inbred lines, RIL):经过两亲本杂交产生 F_1 代,自交获得 F_2 群体,从每个个体上随机留几粒种子播种 F_3 代,苗期随机留下一株收 F_4 代种子,采用同样方法重复种 F_4 代收获 F_5 代种子。如此重复直至至少获得 F_6 代才能育成RIL群体,连续自交8次群体的理论纯合度应达到99.6%。可见RIL群体的不同株系其基因型是不同的,而株系内不同个体的基因型是一致的并且是纯合的,因此可以长久利用。通过不断繁殖可提供大量种子,可以在不同时间、不同地点、不同实验室进行重复实验,除用于构建连锁图外,在QTL定位分析中具有很大的优势。由于需要经过多代自交,因此所花时间很长并且工作量大,而且不易获得大规模群体,这类群体一般由200~300个株系组成。其遗传特点是在群体中只有两种标记基因型即两种亲本纯合基因型,它们在群体中的理论分离比应为1:1。

(4) 双单倍体(doubled haploid, DH):对两亲本杂交产生的 F_1 代进行花药培养,获得单倍体,再对染色体进行自然加倍或秋水仙素处理加倍获得DH植株,经自交繁殖产生DH纯系。其遗传特点是在群体中只有两种标记

基因型即两种亲本纯合基因型,它们在群体中的理论分离比应该为1:1。因此DH群体的不同株系其基因型是不同的,而株系内不同个体的基因型是一致的并且是纯合的,为永久性群体,可以长久利用。与RIL群体一样,DH群体可以进行重复实验,除用于构建连锁图外,十分适合于QTL定位研究。DH群体的构建所需时间比RIL群体短,但需要依赖花药培养技术,所获得的群体也不大,这类群体一般由200~300个株系组成。需要注意的是花药培养能力依赖于基因型,在花药培养过程中会对不同基因型产生选择,容易培养的基因型得苗率偏高,如对水稻来说,粳稻品种比籼稻品种易于花药培养,DH群体中粳稻品种的基因型会偏多,引起较严重的群体偏态分离,这将在一定程度上影响作图的准确性和QTL定位的精确度。

(5) 染色体片段置换系(chromosome segment substitution line, CSSL):这是在相同的遗传背景(轮回亲本)中携带供体亲本的不同染色体片段而这些片段基本覆盖整个供体亲本基因组的一系列株系组成的永久性稳定群体。具体培育过程如下,轮回亲本与供体亲本杂交获得 F_1 代,用轮回亲本与 F_1 回交获得 BC_1F_1 群体,应用基本覆盖整个基因组的大量分子标记对 BC_1F_1 的各个个体基因型进行检测,挑选出目标染色体片段为杂合的个体再次与轮回亲本回交获得 BC_2F_1 。利用分子标记辅助选择方法从 BC_2F_1 中挑选出目标染色体片段为杂合而其他大部分染色体区域尽可能为轮回亲本基因型的个体再次与轮回亲本回交获得 BC_3F_1 (若有必要可以再回交一次获得 BC_4F_1),然后自交获得 BC_3F_2 。利用分子标记辅助选择方法从 BC_3F_2 群体中选择出目标染色体片段为供体亲本纯合基因型而其他大部分染色体区域固定为轮回亲本纯合基因型的个体繁殖种子产生染色体片段置换系。这些染色体片段置换系的每个株系携带一个供体亲本染色体片段(长度一般为20~30 cM),各个株系携带不同的供体亲本染色体片段,这些不同的染色体片段基本覆盖供体亲本的基因组并且相互重叠、而遗传背景为轮回亲本的基因型(图1-2)。这样的永久性稳定群体最大优点是可以在全基因组快速定位QTL,还可作为育种中间材料。这类群体需要多次回交和进行分子标记辅助选择,因此费时、工作量大。

(6) 近等基因系(nearly isogenic line, NIL):这是将携带某一目标主基因或QTL的供体亲本染色体片段导入轮回亲本的遗传背景中的永久性稳定株系。选育方法同以上的染色体片段置换系,但为获得遗传背景高度恢复为轮回亲本的株系,往往需要回交5次(BC_5F_1),再从

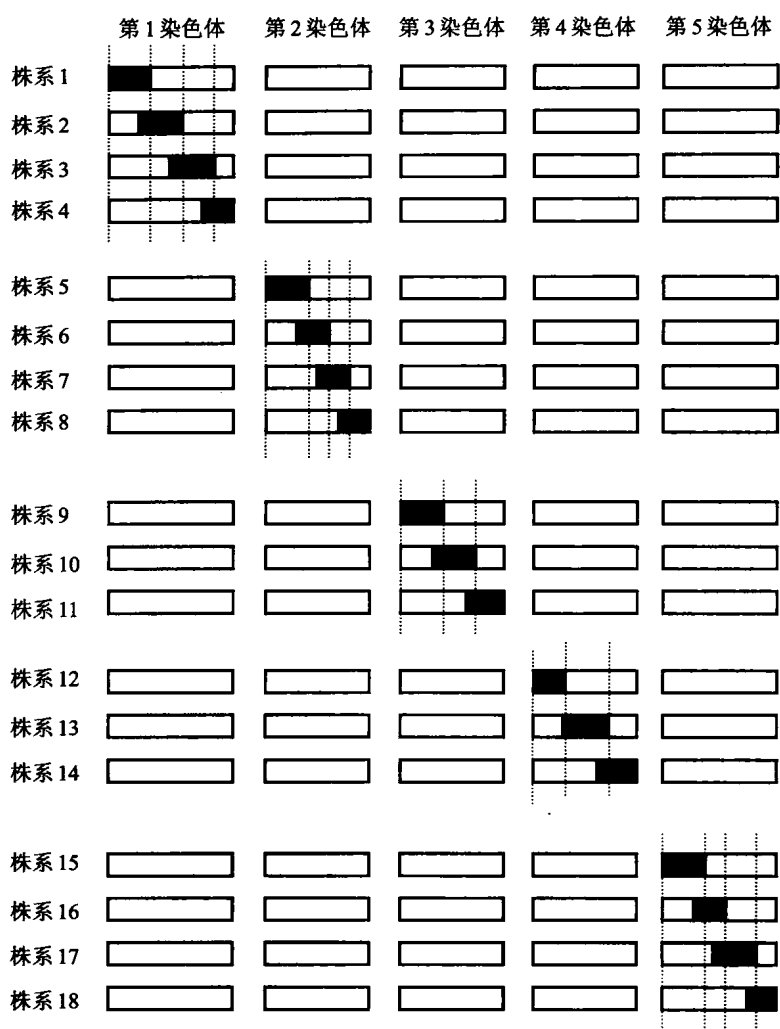


图1-2 染色体片段置换系示意图
黑色区域表示供体亲本染色体片段，无色区域表示轮回亲本染色体片段

BC₃F₂中选育NIL。NIL与CSSL的区别主要是前者携带的供体亲本染色体片段较短（一般 < 10 cM）而后者可长可短（一般10~30 cM，长者可为整条染色体），其次是NIL对遗传背景要求很高而CSSL没有严格要求。NIL在主基因或QTL的功能研究中十分重要。

5 主基因与QTL定位

前面提到植物性状分为质量性状与数量性状，它们分别由主基因和QTL控制。为了分子育种应用和克隆主基因以及QTL，首先需要对它们进行染色体定位。由于主基因和QTL的遗传特点不同，因此它们的定位方法有所不同。

5.1 主基因定位

（1）全基因组定位 选择目标性状有差异（如抗病与感病）并且多态性高的两个亲本进行杂交构建F₂群体（约200个个体）。应用较均匀分布于整个基因组的分子标记（对于水稻一般需要120个标记，标记间平均距离15~20 cM）对F₂群体的每个个体检测标记基因型，如前面所述予以A（抗病亲本基因型）或B（感病亲本基因型）或H，同时对相应的每个个体观察性状基因型（如抗病对感病为显性，则抗病个体予以D，感病个体予以B）。应用MAPMAKER软件进行分析，构建连锁框架图，就可以将抗病主基因定位在某染色体上，确定与抗病主基因连锁的两侧分子标记。

（2）近等基因池方法定位基因 同样选择目标性状有差异（如抗病与感病）并且多态性高的两个亲本进行

杂交构建F₂群体（约200个个体）。对群体进行目标性状观察，从中分别选择表型差异明显的个体组成两组（每组个体15~20株），分别将两组的个体的DNA均匀混合，形成两个DNA池，相当于一对近等基因DNA池。如从F₂群体中选择15~20个明显抗病的个体均匀混合它们的DNA形成抗病DNA池，同时选择15~20个明显感病的个体均匀混合它们的DNA形成感病DNA池。应用较均匀分布于整个基因组的亲本间显示多态的分子标记（对于水稻一般需要120个标记）筛选两个DNA池间显示多态性的标记，同时用双亲的DNA作为对照。当检测到两个DNA池间显示多态性的标记时，该标记可能与目标基因连锁，这样可以初步定位到目标基因。为了获得可靠的结果，还需要利用原来F₂群体作进一步的验证。该方法只有两个DNA池样本，加上双亲，仅检测4个样本的标记基因型，而全基因组定位方法需要检测F₂群体每个个体（通常200个样本）的标记基因型，因此近等基因池分析法的工作量比全基因组定位法少许多。但近等基因池分析法所用的标记有时会比全基因组定位法多。

5.2 QTL定位

（1）方差分析（ANOVA）当某标记与某QTL不连锁时，群体中标记的基因型的分离与该QTL所控制的性状表型分离是随机的。当某标记与某QTL存在连锁关系时，该标记与该QTL存在一定的共分离，因此该标记的不同基因型之间的数量性状表型平均值和方差会有差异。通过方差分析（如F测验）检验某标记不同基因型间

的平均值差异是否达到显著，当统计上达到显著性水准（ $P < 0.05$, 0.01或0.001等）时就可推测该标记与控制该性状的某个QTL连锁。某标记不同基因型间的平均值差异越大，方差分析的F值越大，表明标记与QTL间连锁越紧密。图1-3显示利用F₂群体（192个个体）定位控制株高QTL的方差分析结果。标记CA1571的三种基因型A、B和H对应的平均株高和方差差异较大，计算的F值为3.11，达到极显著水准（大于 $F_{0.01} = 1.43$ ），表明该标记与控制株高的某QTL连锁。而C039的三种基因型的平均株高和方差差异较小，F值为0.99，未达到显著，因此该标记与控制株高的QTL没有连锁关系。一般控制数量性状的QTL是多个的，并且分布于不同染色体区域。为了全面定位QTL，需要利用基本分布整个基因组的上百个分子标记，然后对这些标记一一进行方差分析，可以找到与多个QTL连锁的对应分子标记。这样的统计分析工作量大，需要借助统计软件如SAS统计包进行分析。

（2）区间作图法（interval mapping）构建分子标记连锁框架图，对两个标记位点之间的区间每隔一定的距离（如1~2 cM）计算QTL存在的可能性。QTL存在的可能性以LOD（log of odds）表示，是QTL存在可能性的似然函数与QTL不存在可能性的似然函数之比值，即 $LOD = \lg [L(u_p, \sigma^2, y_1, y_2, \dots, y_n) / L_0(u_p, \sigma_p^2, y_1, y_2, \dots, y_n)] = \lg [\text{Prob}(\text{QTL存在}) / \text{Prob}(\text{QTL不存在})]$ 。通常 $LOD > 2$ 时可作为判断QTL存在的阈值，但LOD阈值与基因组大小成正比，水稻的LOD阈值一般采用2.4。在同一连锁群上的所有标记间每隔1或2 cM

株号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	→ 192
CA1571	B	A	A	H	H	B	H	B	A	H	→ H
C039	B	H	A	B	H	H	A	H	B	A	→ A
M100	B	H	A	B	H	H	A	H	B	A	→ A
株高/cm	178.5	67.5	81.0	137.0	145.0	159.0	147.0	168.0	90.0	157.0	→ 147.0

	A		B		H		$F = \frac{4S_T^2}{S_A^2 + S_B^2 + 2S_H^2}$
	平均值	S^2	平均值	S^2	平均值	S^2	
CA1571	84.6	744.6	166.1	424.0	144.3	389.0	3.11
C 039	131.8	1 654.1	131.3	1 500.1	137.5	1 452.0	0.99

$F_{0.05}=1.29; F_{0.01}=1.43$

图1-3 F₂代群体的株高QTL方差分析