

• 综 述 •

近 5 年我国药用植物遗传连锁图谱构建的研究进展

陈 喆, 何仁锋, 姜梦莹, 孙 涛, 应奇才, 冯尚国*, 王慧中*

杭州师范大学生命与环境科学学院, 浙江省药用植物种质改良和质量监控重点实验室, 浙江 杭州 310036

摘 要: 遗传连锁图谱的构建是基因组研究中的重要环节, 也是基因定位与克隆、分子标记辅助育种及数量性状定位等研究的基础, 加之分子标记技术的蓬勃发展, 为构建高密度遗传连锁图谱奠定了技术基础。对遗传图谱的构建步骤、分子标记的种类、作图群体的种类及近 5 年我国药用植物遗传图谱的研究进展进行了简要概述, 并探讨了目前该领域研究中存在的主要问题及今后的研究方向。

关键词: 药用植物; 遗传连锁图谱; 分子标记; 辅助育种; 目的基因定位和克隆

中图分类号: R282.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2015)03-0435-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.03.025

Research progress in construction of genetic linkage maps of medicinal plants in recent five years

CHEN Zhe, HE Ren-feng, JIANG Meng-ying, SUN Tao, YING Qi-cai, FENG Shang-guo, WANG Hui-zhong
Zhejiang Provincial Key Laboratory for Genetic Improvement and Quality Control of Medicinal Plants, College of Life and Environmental Sciences, Hangzhou Normal University, Hangzhou 310036, China

Abstract: Genetic linkage mapping is one of the key steps in genomic research, which is the cornerstone of a wide spectrum of biotechnology applications, including gene localization, map-assisted cloning, molecular marker-assisted selection in breeding, and quantitative trait loci. Furthermore, the prospering of the molecular marker technology laid the technological foundation of constructing high density genetic linkage map. This paper briefly reviewed the procedure of genetic mapping, types of molecular markers, mapping populations, and research progress in construction of the genetic linkage maps of medicinal plants in recent five years. In addition, the existing problems and the future direction have been discussed in this field.

Key words: medicinal plant; genetic linkage map; molecular marker; assistant breeding; gene localization and cloning

遗传连锁图是指以遗传标记(已知性状的基因或特定 DNA 序列)间重组频率为基础的染色体或基因位点的相对位置线性排列图^[1]。遗传连锁图谱的构建是进行分子生物学研究的基础, 也是基因组研究中的重要环节。构建好的高密度遗传图谱可应用于数量性状定位、分子标记辅助育种、目的基因的定位与克隆等方面。此外, 遗传连锁图谱为药用植物的分类、种质资源保存及基因资源的整合等研究提供了科学依据。由此可见, 分子遗传图谱研究在遗传育种学和基因工程学研究中具有越来越重要的地位, 也将成为药用植物育种学的一个热门研

究方向。

1 遗传连锁图谱的构建

1.1 遗传连锁图谱构建的理论基础

遗传连锁图谱构建的理论基础是染色体的交换与重组。基因连锁是指位于同一染色体上的基因在遗传过程中一般倾向于维系在一起。基因重组是通过一对同源染色体的 2 个非姐妹染色单体之间的交换来实现。1903 年, Sutton 和 Boveri 分别提出了遗传因子位于染色体上的理论, 该理论又叫做 Sutton-Boveri 染色体遗传理论^[2], 他们将染色体看作是孟德尔基因的物理载体, 发现了染色体与基因之间的平行现象。

收稿日期: 2014-10-28

基金项目: 国家自然科学基金项目(31070298, 31470407); 浙江省科技计划项目(2014C32090); 浙江省自然科学基金项目(LQ13H280006); 浙江省药用植物种质改良与质量控制技术重点实验室开放项目(201304); 浙江省大学生科技创新活动计划暨新苗人才计划(ZX13005002067)

作者简介: 陈 喆(1989—), 女, 湖北黄冈人, 硕士研究生, 主要从事药用植物系统发育研究。Tel: 15757121751 E-mail: 8chenzhe@sina.com

*通信作者 王慧中(1962—), 男, 浙江义乌人, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事药用植物遗传资源研究。E-mail: whz62@163.com

冯尚国(1980—), 男, 山东菏泽人, 博士, 主要从事药用植物的分子遗传学研究。E-mail: shangguo007@126.com

1.2 遗传图谱构建的步骤

遗传连锁图谱构建的步骤流程图见图 1。

1.3 构建遗传连锁图谱的遗传标记

遗传学发展至今，遗传标记主要有 4 种：形态学标记、细胞学标记、生物化学标记和 DNA 分子

标记。其中，DNA 分子标记是在 DNA 水平上进行的检测，因其具有无表型效应、不受环境限制和影响等特殊优点，故而广泛应用于遗传学研究。目前已发展出十几种 DNA 标记技术，它们各具特点（表 1），并为不同的研究目标提供了丰富的研究手段。

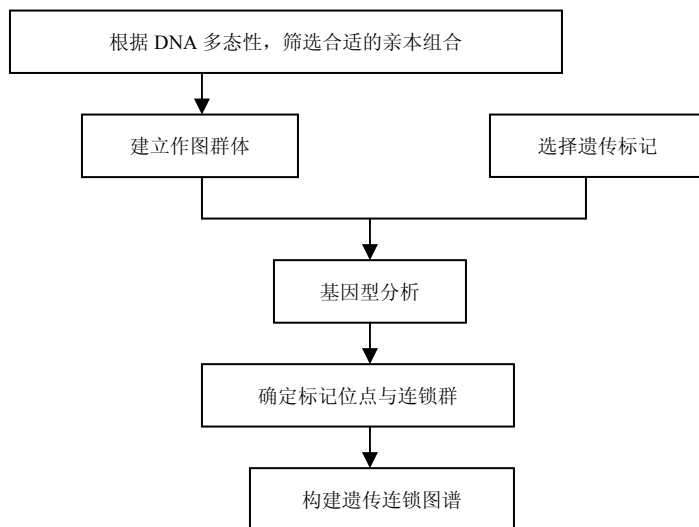


图 1 遗传连锁图谱构建的步骤流程图

Fig. 1 Flow chart of construction steps of genetic linkage map

表 1 遗传连锁图谱构建的主要分子标记及其特点

Table 1 Major molecular markers for construction of linkage map and their characteristics

标记	基于 PCR	遗传特性	多态性	重复性	可靠性	自动化程度	成本	DNA 用量
RFLP	否	共显性	低/中等	好	高	低	高	高
SSR	是	共显性	高	好	高	中/高	高	较高
RAPD	是	显性	中等/高	差	低	中	低	低
STS	是	共显性/显性	高	好	高	中/高	高	高
SCARS	是	共显性	高	好	高	中	高	高
ISSR	是	显性/共显性	高	差	高	中/高	高	低
AFLP	是	显性	高	好	高	中/高	低	高
SNP	是	共显性/显性	极高	好	高	高	高	高
IRAP	是	共显性	高	好	高	中/高	高	高
SRAP	是	共显性	高	好	高	中	高	高

根据对 DNA 多态性检测手段的不同，可将 DNA 分子标记分为 4 大类：①以分子杂交为核心的 DNA 分子标记，如限制性片段长度多态性标记（restriction fragment length polymorphism, RFLP）、DNA 指纹技术（DNA fingerprinting）、原位杂交（*in situ* hybridization）等；②基于 PCR 反应的分子标记，如随机扩增多态性 DNA 标记（random amplified polymorphism DNA, RAPD）、特异性片段扩增区域标记（sequence characterized amplified region, SCAR）、

微卫星重复序列标记（simple sequence repeat, SSR）、简单序列重复区间标记（inter-simple sequence repeat, ISSR）、靶位区域扩增多态性（target region amplified polymorphism, TRAP）^[3]、相关序列扩增多态性（sequence-related amplified polymorphism, SRAP）、序列标签位点（sequence tag site, STS）、目标起始密码子多态性标记（start codon targeted polymorphism, SCoT）等；③基于 PCR 与限制性酶切技术结合的 DNA 分子标记，如扩增片段长度

多态性 (amplified restriction fragment polymorphism, AFLP)、酶切扩增多态性序列 (cleaved amplified polymorphic sequence, CAPS) 等; ④基于单核苷酸多态性的 DNA 分子标记, 如单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP)、表达序列标签 (expressed sequence tags, EST)。最终要依据标记的特点、作图植物的生长发育特性、植物的研究情况及实验目的等情况而定具体选用何种分子标记。

1.4 构建遗传连锁图谱的作图群体

根据遗传稳定性, 可将分离群体分为 2 大类:

一类为暂时性分离群体, 如 F_2 、 F_3 、 F_4 、BC、三交群体等, 这类群体中分离单位是个体, 一经自交或近交其遗传组成就会发生变化, 无法永久使用; 另一类为永久性分离群体, 如重组自交系 (RI)、DH 群体等, 这类群体中分离单位是株系, 不同株系间存在基因型的差异, 而株系内个体间的基因型是相同且纯合的, 是自交不分离的, 即这类群体可通过自交或近交繁殖后代, 而不会改变群体的遗传组成, 可以永久使用。不同类型的分离群体各具优缺点 (表 2), 因此, 构建遗传连锁图谱应结合具体情况加以选用合适的群体。

表 2 主要作图群体及其特征
Table 2 Main mapping populations and their traits

作图群体	群体的形成	是否永久群体	准确度	需群体大小	分离比率	构建费用	构建时间
F_2	F_1 自交个体	否	低	大	1:2:1	低	短
BC	F_1 回交后代	否	低	大	1:1	低	短
BIL	F_2 自交回交后代	否	高	小	1:1	高	长
DH	F_1 花粉培育	是	高	小	1:1	中等	短
RIL	F_2 自交后代	是	高	小	1:1	中等	长
NIL	F_2 回交自交后代	是	最高	小	1:1	高	长

1.5 构建遗传连锁图谱的相关软件

随着各类分子标记在药用植物遗传图谱构建中的广泛应用, 使实验中获得分子标记数据大大增加并带来了更多的作图工作量, 而且其中还包含了许多偏分离位点和假连锁位点等, 所以常规的形态学标记作图方法早已不能满足当前的实验要求, 而更多地需要利用相关的计算机软件来进行作图工作^[4]。作图的算法大多采用 Allard^[5]的计算公式和表格法, 应用比较广泛主要有以下几款软件。

1.5.1 MapMaker MapMaker 是 Lander 等开发于 1987 年, 支持 UNIX、VMS、MS-DOS 和 Macos 操作系统, 主要功能是构建分子图谱并进行 QTL 和复合性状基因定位, 适合于 F_2 、BC 和 RILs 等群体。Mapmaker 3.0^[6]是一款优秀的遗传距离计算软件, 其应用也最为广泛^[7]。但其也存在不足之处, 对原始数据的格式要求严格, 增加了遗传图谱构建研究者在原始数据文件制备中的难度和工作量; 无法得到连锁图模型文件; 缺乏对原始数据的检查与分析 (如标记的偏分离情况), 影响作图的精确性甚至产生错误的结果; 没有通用的数据接口, 无法将构建遗传连锁图谱的数据进一步与数据库挂接, 缺

乏数据的可移植性和信息的交流; 命令行形式操作, 界面不友好, 没有经验的人很难使用等。MapMaker 的苹果机版本 MapMaker-ER 3.0 for Mchintoshi^[7]是一款优秀的遗传距离计算和连锁图绘制合二为一的软件, 其绘出的连锁图美观大方, 逐渐被科学家认为是连锁图绘制的一种标准样式^[8]。

1.5.2 MapDraw MapDraw 是依据现有的遗传连锁数据, 如 MapMaker for PC 或其他连锁分析软件得到的数据, 利用 Microsoft Excel 内嵌 Visual Basic 语言开发出来的具有绘制遗传连锁图功能的 Excel 宏^[8]。其继承了宏程序固有的优点: 兼容性和可移植性好, 只依赖于应用系统而与操作系统无关, 使用简便灵活, 绘出的连锁图美观整洁, 而且在 Windows 各应用程序中兼容性也很好, 可轻松地绘出的图形进行各种编辑和修改等, 很大程度上弥补了 MapMaker 在绘图方面的不足^[9]。然而, 该软件还不具有 QTL 曲线图的绘制功能, 许多人都是将 QTL 峰值和区间手工标上连锁图, 很不方便, 若能将软件 MapPlotter^[10]的 QTL 曲线绘制功能用 Excel 的 VBA 语言改写一下, 使绘出的 QTL 曲线为 Windows 矢量图形, 则可能使该软件的功能更完善^[8]。

1.5.3 JoinMap JoinMap 1993年由Stam开发。支持MS-Windows操作系统,界面友好,操作简单。适合F₂、BC、RIL、DH以及CP(outbreeder full-sib family)。近几年使用JoinMap^[11]构建的遗传图谱愈来愈多,特别是JoinMap于2001年推出Windows操作界面的新版本3.0,强大的功能使构建图谱更直观、更方便,可同时在多个LOD值下进行多个连锁群构建。软件中同时整合了MapChart图形软件,可直接输出构建的图谱图形。最新4.1版本可同时处理5万个标记数据,利用锚定标记还可以判断同源连锁群,对不同实验来源的遗传图谱进行比较分析和整合,功能十分强大。

1.5.4 F2 lnksilk 2005年,Wu等^[12]针对雌性个体染色体不发生交换的特别现象,开发了一种新的作图方法软件F2lnksilk。段雪梅等^[13]认为此软件在计算重组率时考虑了家蚕这一类的雌蚕完全连锁现象,避免了过多计算重组子,因而所得到的分析结果更具有真实性。

2 近5年部分药用植物的遗传连锁图谱构建概况

早在20世纪初,学者们就已经开始进行遗传连锁图谱的分析研究,并且一直备受关注。随着DNA多态性技术的开发,使得可利用的遗传标记数目迅速扩增,从而也加速了遗传连锁图谱的构建速度。分子标记技术在西方国家应用最早,发展也最为迅速,在部分药用植物中已成功构建了遗传连锁图谱。我国在遗传连锁图谱的研究上虽然起步晚,但发展也极为迅速,特别是新标记的不断开发利用,使我国药用植物的遗传图谱研究也取得了可观的成果。

李凤岚等^[1]对2008年以前药用植物的遗传连锁构建情况进行了整合。近5年来,药用植物遗传图谱的研究更是吸引了众多研究者的目光。徐燕等^[14]以野生型坛紫菜*Porphyra haitanensis* T. J. Chang et B. F. Zheng纯系为母本、红色型坛紫菜纯系为父本得到DH群体的157个单株,利用SRAP和SSR分子标记构建坛紫菜的遗传图谱,该图谱共有124个位点,5个连锁群,图谱总覆盖长度为879.2 cM,连锁标记间的平均图距为7.09 cM。朱琼琼^[15]以大叶甜叶菊和小叶甜叶菊为亲本得到F₁代410个单株,利用EST-SSR和SRAP分子标记构建双亲的遗传连锁图谱,得到的大叶甜叶菊图谱含74个位点,13个连锁群,总图距1 215.2 cM,标记间的平均图距为16.4 cM;得到的小叶甜叶菊图谱含49个位点,12个连锁群,总图距647.8 cM,标记间的平

均图距为13.2 cM。王耀文^[16]以滇宁1号为母本、野苦荞*Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn为父本得到F₂群体的136个单株,利用SRAP和SSR分子标记构建苦荞的遗传连锁图谱,得到苦荞的图谱含38个位点,10个连锁群,总图距为725.1 cM,连锁标记间的平均图距为25.9 cM。杜晓磊等^[17]以滇宁一号和苦荞野生近缘种杂交得到F₄群体119个单株,利用SSR分子标记构建苦荞的遗传连锁图谱,得到苦荞的图谱含89个位点,15个连锁群,总图距为860.2 cM,连锁标记间的平均图距为9.7 cM。由此可见,药用植物的遗传图谱构建不仅在数量上大有提高,在质量上也是逐步精密化。龚文兵等^[18]以146个单孢分离的单核群体,利用SRAP和TRAP分子标记构建香菇*Lentinus edodes* (Berk.) Sing的遗传连锁图谱,得到香菇的图谱含524个位点,13个连锁群,总图距为1 006.1 cM,连锁标记间的平均图距为2.0 cM。其他部分药用植物遗传连锁图谱构建见表3。

本实验室基于石斛遗传连锁图谱构建取得了一定的研究成果。Xue等^[34]以铁皮石斛*Dendrobium officinale* Kimura et Migo和重唇石斛*Dendrobium hercoglossum* Rchb. f.为亲本得到F₁群体的90个单株,利用RAPD和SRAP分子标记进行双亲的遗传图谱构建,得到铁皮石斛的图谱含62个位点,11个连锁群和3个联体,总长度为629.4 cM,连锁标记间的平均图距为11.2 cM;得到重唇石斛的图谱含112个位点,15个主连锁群和4个小连锁群,总长度为1 304.6 cM,连锁标记间的平均图距为11.6 cM。Lu等^[35]以铁皮石斛和钩状石斛*D. aduncum* Lindl. F₁群体的单株,利用EST-SSR和SRAP分子标记进行石斛的遗传图谱构建,得到石斛的遗传图谱含157个位点,27个主连锁群,总长度为1 580.4 cM,连锁标记间的平均图距为11.89 cM。Shang等^[36]以金钗石斛*D. nobile* Lindl和细茎石斛*D. moniliforme* (L.) Sw为亲本得到F₁群体的90个单株,利用RAPD和ISSR分子标记进行双亲遗传图谱的构建,得到的金钗石斛图谱含116个位点,15个群体,总长度为1 474 cM,得到细茎石斛图谱含117个位点,16个群体,总长度为1 326.5 cM。赵红燕^[37]以铁皮石斛和细茎石斛为亲本得到F₁群体的92个单株,利用EST-SSR、SRAP、ISSR和RAPD分子标记对双亲进行遗传图谱构建,得到铁皮石斛的图谱含563个位点,22个连锁群,总图距1 425.9

表 3 部分已构建的药用植物遗传连锁图谱

Table 3 Parts of constructed genetic linkage maps of medicinal plants

材料	作图群体	群体大小/个	标记类型	图谱密度	文献
北柴胡 <i>Bupleurum chinense</i>	种内杂交得到的 F1 群体	96	ISSR、SSR	80 个标记构成 13 个连锁群, 总图距 2 633.9 cM, 平均图距 33.4 cM	19
罗汉果 <i>Siraitia grosvenori</i>	野红一号×长滩果得到的 F1 群体	150	ISSR、SRAP	203 个标记构成 27 个连锁群, 总图距 1 474.1 cM, 平均图距 7.3 cM	20
蓖麻 <i>Ricinus communis</i>	YC1×YF181 得到的 F2 群体	161	SSR、ISSR	124 个标记构成 10 个连锁群, 总图距 396 cM, 平均图距 7.76 cM	21
杜仲 <i>Eucommia ulmoides</i>	小叶杜仲 LF×秦仲一号 Q1 得到的 F1 群体	122	AFLP	秦仲一号 Q1: 108 个标记构成 12 个连锁群, 总图距 929.57 cM, 平均图距 8.61 cM 小叶杜仲 LF: 127 个标记构成 14 个连锁群, 总图距 1 116.08 cM, 平均图距 8.78 cM	22
耬斗菜 <i>Aquilegia viridiflora</i>	<i>A. flabellate</i> val 'pumila' × <i>A. qxysepala</i> 得到的 F2 群体	148	AFLP、SSR	141 个标记构成 7 个连锁群, 总图距 1 073.4 cM, 平均图距 8.3 cM	23
铁皮石斛 <i>Dendrobium officinale</i>	TP×GZ 得到的 F1 群体	140	SRAP、SSR	157 个标记构成 27 个连锁群, 总图距 1 580.4 cM, 平均图距 11.89 cM	24
莲 <i>Nelumbo nucifera</i>	中国古代莲×美洲黄莲“ALI”得到的 F1 群体	80	SNP	1 515 个标记构成 10 个连锁群, 总图距 563.6 cM, 平均图距 0.38 cM	25
燕麦 <i>Avena sativa</i>	元菝麦×555 得到的 F2 群体	281	AFLP、SSR	95 个标记构成 19 个连锁群, 总图距 1 544.8 cM, 平均图距 20.1 cM	26
香菇 <i>Lentinus edodes</i>	L6×W26 得到的孢子单核体	148	SSR、SRAP、TRAP	581 个标记构成 11 个连锁群, 总图距 963.2 cM, 平均图距 1.70 cM	27
番茄 <i>Solanum lycopersicum</i>	99165-30×LA1777 得到的 F5:6	80	AFLP	125 个标记构成 18 个连锁群, 总图距 662 cM, 平均图距 5.3 cM	28
桉树 <i>Eucalyptus robusta</i> Smith	尾叶桉×细叶桉得到的 F1	54	EST-CAPS、SSR	尾叶桉: 273 个标记构成 22 个连锁群, 总图距 2 680.6 cM, 平均图距 14.0 cM 细叶桉: 296 个标记构成 22 个连锁群, 总图距 2 639.6 cM, 平均图距 13.6 cM	29
茶树 <i>Camellia sinensis</i>	YS×BY 得到的 F1 群体	150	SNP	1 101 个标记构成 15 个连锁群, 总图距 1 632.8 cM, 平均图距 1.5 cM	30
野樱桃 <i>Prunus virginiana</i>	RC×SC 得到的 F1 群体	101	SSR、AFLP	RC: 302 个标记构成 14 个连锁群, 总图距 2 089 cM, 平均图距 6.9 cM SC: 259 个标记构成 16 个连锁群, 总图距 1 562.4 cM, 平均图距 6.0 cM	31
腊梅 <i>Chimonanthus praecox</i>	H4×H29 得到的 F1 群体	61	AFLP、ISSR	H4: 80 个标记构成 12 个连锁群, 总图距 2 417.8 cM, 平均图距 25.61 cM H29: 47 个标记构成 8 个连锁群, 总图距 1 184.2 cM, 平均图距 25.7 cM	32
花生 <i>Arachis hypogaea</i>	<i>A. hypogaea</i> 的 RIL 群体	166	SNP、SSR	1 685 个标记构成 20 个连锁群, 总图距 1 446.7 cM, 平均图距 0.9 cM	33

cM, 得到细茎石斛的图谱含 226 个位点, 20 个连锁群, 总图距为 1 332.6 cM, 两亲本的平均图距为 10.41 cM。通过一系列的实验, 所构建得到的石斛部分遗传连锁图谱能在一定程度上诠释石斛的遗传背景, 为后续对石斛进行目的基因定位、图为克

隆、分子标记辅助育种及数量性状 (quantitative trait locus, QTL) 定位等方面奠定了基础; 同时构建高密度的遗传连锁图谱对于石斛种质资源的保存也有重要意义, 可为基因资源的收集与量比提供科学依据。

3 遗传连锁图谱的相关应用

3.1 数量性状定位

植物的许多重要性状都是由多个基因所控制的,并且易受到环境因素影响,也即通常所说的 QTL。QTL 是连接性状和标记的重要桥梁。传统的数量遗传学研究并不能说明控制数量性状的基因数目、数量性状基因位点在染色体上的位置、各位点的贡献率大小以及基因间的相互关系。利用构建的饱和的遗传图谱,可以确定控制数量性状的基因数目、数量性状位点在染色体上的相对位置、各位点贡献率的大小和基因间相互关系,为后续的标记辅助选择育种奠定理论基础^[1]。孙丽丹^[38]利用构建的梅 *Armeniaca mume* Sieb. 分子遗传图谱,结合复合区间作图法对梅花 6 个表型性状进行 QTL 分析,共检测到控制这些性状的 84 个 QTL 位点,其中控制叶面积和叶脉数目性状的 QTL 位点均最多为 35 个,分布在梅的 LG 1~LG 8 连锁群上,控制地径的 QTL 位点最少为 1 个,分布在梅花的 LG 3 连锁群上,在这些 QTL 位点中,位于 LG6 连锁群的标记 PMSNP 00192 与 PMSNP 00194 间对叶面积的解释率最高,为 13.37%;位于 LG 4 连锁群的标记 PMSNP 00538 与 PMSNP 00536 间对叶面积的解释率最低,为 1.02%。龚文兵等^[39]在构建香菇遗传图谱的基础上,定位了 6 个与香菇双核体菌丝生长速度相关的 QTLs 于 5 个连锁群上。刘遵春等^[40]在构建苹果 *Malus sieversii* (Led.) Roem. 遗传连锁图谱的基础上,共检测到 20 个控制叶片相关性状的 QTL 位点,分布在第 1、2、3、4、5、7、8、10、11、12、16、17 连锁群上,各 QTL 位点的 LOD 值在 2.58~3.55,其中主效 QTL 位点 2 个 (LOD $\geq$ 3.5),可解释 11.63%~6.36% 的表型变异。

3.2 分子标记辅助育种

分子标记辅助选择 (marker-assisted selection, MAS) 就是通过检测与目标性状紧密连锁的分子标记来进行对目标性状的选择,从而达到缩短育种年限的目的。传统的选择主要是对表型性状进行肉眼观测,比较局限,效率低、受生长时期及环境因素影响且耗时长。例如:对于抗病性等质量性状的选择,需用接种方法鉴定筛选;对于株高等数量性状的选择,受环境条件影响较大,选择效率较低;而对于生理生化等性状的选择则更为复杂。构建好的遗传连锁图谱可为植物生长、抗性、产量、品质等主要性状的早期测定提供依据,提高早期测定的精

确度和可靠性。利用构建的遗传图谱, MAS 可直接从植物的 DNA 水平来检测目的基因的有无,不受环境、植株生长的生长状况、性状是否表达等影响,真实可靠^[41]。因而 MAS 具有传统选择所不具有的优越性,主要体现在以下几个方面^[42]: (1) 克服性状基因型鉴定的困难; (2) 克服性状表现型鉴定的困难; (3) 能进行早期预测选择; (4) 不局限于肉眼观测到的性状,可进行更广泛、强度更大的选择; (5) 其性状评价和选择都是非破坏性的; (6) 大大提高了育种效率。刘肖^[43]利用与抗寒性、需冷量性状相关的 SNP 标记对 29 份杂交 F₁ 代蓝莓 *Semen Trigonellae* 实生苗 DNA 进行早期鉴定,筛选出 2 个抗寒性突出的杂交优株,1 个低需冷量的杂交优株。刘伟^[44]用 36 株 F₂ 群体作为抗南方根结线虫 *Meloidogyne incognita* (Kofold & White) 标记准确性的验证,用紧密连锁的 SRAP 标记 M3E 15-330 对 F₂ 代甘肃桃 *Amygdalus kansuensis* Skeels 单株进行扩增,验证该标记的总准确性为 91.7%,继而应用于分子标记辅助育种。

3.3 目的基因定位与克隆

目的基因的定位是遗传图谱构建最重要的应用之一。通过构建高密度的遗传连锁图谱,可有效、快速地定位目的基因,进而进行基因克隆。利用作图群体中性状分离与标记分离的相关性,确定性状与标记间的连锁,从而可确定与目的基因连锁的分子标记。李爽等^[45]在构建苹果的遗传连锁图谱的基础上,对苹果杂交 F₁ 代早期落叶病进行抗性遗传分析,最后将抗早期落叶病基因定位到了遗传连锁图谱中的第 10 个遗传连锁群上,并与已发表的苹果遗传连锁框架对比结果表明,抗早期落叶病基因被定为在已发表的第 8 连锁群上。

3.4 比较基因组研究

比较基因组学主要涵盖种内比较基因组学和种间比较基因组学。对遗传连锁图谱的利用主要是种间比较基因组学,即通过对不同亲缘关系物种的基因组序列进行比较,能够鉴定出编码序列、非编码调控序列及给定物种独有的序列。而基因组范围内的序列比对,可以了解不同物种在核苷酸组成、同线性关系和基因顺序等方面的异同,进而得到基因分析预测与定位、生物系统发生进化关系等方面的信息。物种的基因起源于共同原始祖先,因而,在进化上相近的物种彼此的染色体存在着同源区段,并且在此区段上基因组的结构、排列顺序等是相同

的,这种现象称之为共线性。因此,比较遗传图谱可预测一些关键基因的染色体的存在与位置,亦可用于快速构建其近缘种的连锁图。刘子记等^[46]利用小麦 *Triticum aestivum* Linn.、短柄草 *Brachypodium sylvaticum* (Huds) Beauv 和水稻 *Oryza sativa* L. 的基因组共线性关系对小麦抗白粉病基因 *pm 42* 进行比较基因组学分析,明确了 *pm 42* 基因所在 2 BS 基因组区域与短柄草第 1 染色体和水稻第 3 染色体直系同源基因组区域的对应关系,开发出了与其相关的 EST-SSCP 标记,并构建了 *pm 42* 基因的 EST 标记遗传连锁图谱。

3.5 建立细胞遗传图

细胞遗传图综合了来自遗传图 (genetic map) 和细胞学图 (cytological map) 2 方面的信息,其既能反映基因或 DNA 标记之间在染色体上的真实距离,又能显示与染色体的细胞学结构间确切的位置关系。构建植物细胞遗传图的宗旨是将遗传图上的诸多标记与其在染色体的具体位置联系起来。目前主要有 2 种方法用于细胞遗传图的构建,较广泛使用的一种方法是借助染色体断点来确定遗传标记在染色体上的位置,另一种方法是利用荧光原位杂交 (FISH) 直接把 DNA 序列定位到染色体上。此外,利用 RN-cM 图也可以把遗传标记定位于粗线期染色体。从细胞遗传图可以看出,染色体两臂的远端有较高的基因密度和重组频率。细胞遗传图在比较近缘植物基因组的同线性、揭示植物的进化关系、研究基因定位克隆等方面都有重要意义^[47]。

4 问题与展望

近 5 年来,我国药用植物遗传图谱的构建发展速度较快,也取得了一定的成果,但纵观所构建的图谱,还存在以下主要问题:(1) 标记间的平均距离,即图谱的总长度除以被定位的标记数,反映的是标记的平均密度。已构建的图谱的平均图距 (≤ 20 cM) 一般均可用来进行 QTL 定位,但对于基因的精细定位和图位克隆 (≤ 2 cM) 则远远不够,所以构建的遗传连锁图谱的密度有待进一步提高,便于后续更大范围和更精确的 QTL 定位;(2) 对于同一物种,通常是多个人、多个实验团体在进行相关的研究,但个人与个人之间、团体与团体之间缺乏相互交流,容易造成资源和劳动力的冗余,所以除了积极开发和构建新的遗传连锁图谱外,加强个人间与团体间的交流和对已有的图谱进行整合也是很有必要的;(3) 已构建的图谱大多都采用的是 F_1 、

F_2 等暂时性群体,虽然能提供大量的遗传标记信息,但作图材料不能复制,难以进行连续性研究,重复性差,而且作图群体的大小也大多偏小;(4) 要得到一个完整的遗传图谱,还必须知道染色体上标记和着丝粒之间的距离,染色体上缢痕、随体及端粒都是必不可少的结构,所以需要结合其他方法和技术手段对图谱加以完善;(5) 目前能用来构建图谱的分子标记有限且耗财费时,应充分利用已有标记的优点,同时开发新型的标记对其进行补充和完善。

总之,高饱和化、通用化和实用化是分子遗传连锁图谱的发展趋势,将图谱与更灵敏的 QTL 搜寻软件相结合,为分析产量、品质等重要经济性状的遗传规律及其与环境相互关系的研究提供理论依据。另外,结合 MAS 育种及常规育种,提高效率,培育优势植株,缩短药用植物育种年限,达到理论与实践相结合的初衷。中药材是我国的物质瑰宝之一,对药用植物的遗传背景和性状加以深入的分析,将对中药的继承和传扬具有深远的意义。

参考文献

- [1] 李凤岚, 马小军. 药用植物分子遗传图谱研究进展 [J]. 中草药, 2008, 39(1): 129-133.
- [2] 戴灼华, 王亚馥, 栗翼玖. 遗传学 [M]. 第 2 版. 北京: 高等教育出版社, 2008.
- [3] Hu J, Vick B A. Target region amplification polymorphism: A novel marker technique for plant genotyping plant [J]. *Mol Biol Report*, 2003, 21(3): 289-294.
- [4] 谭远德, 万春玲, 周泽阳, 等. 构建分子标记连锁图谱的图论构图方法 [J]. 生物数学学报, 1999, 14(3): 338-347.
- [5] Allard R W. Formulas and table to facilitate the calculation of recombination values in heredity [J]. *Hilgardia*, 1956, 24(10): 235-278.
- [6] 何祯祥, 林国忠, 施季林. 遗传作图软件应用及辅助软件的研制 [J]. 南京林业大学学报, 1999, 23(3): 1-5.
- [7] Lander E S, Green P, Abrahamson J, et al. MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations [J]. *Genomics*, 1987, 1(1): 174-181.
- [8] 王竹林, 杨 睿, 杨兴圣, 等. Mapmaker 3.0 和作图软件使用 [J]. 实验室研究与探索, 2012, 31(11): 61-65.
- [9] 刘仁虎, 孟金陵. MapDraw 在 Excel 中绘制遗传连锁图的宏 [J]. 遗传, 2003, 25(3): 317-321.
- [10] 沈利爽, 郑先武, 朱立煌. Mapplotter: 一个输出遗传图谱、图示基因型和 QTL 曲线图形的软件 [J]. 遗传, 2000, 22(3): 172-174.
- [11] 周淼平, 张 旭, 任丽娟, 等. 用 JoinMap 3. 0 初步构建小麦遗传连锁图 [J]. 江苏农业学报, 2003, 19(3):

- 133-138.
- [12] Wu J X, Zhu J, Jenkins J N, *et al.* Constructing linkage maps with achiasmatic gametogenesis [J]. *Acta Genet Sin*, 2005, 32(6): 608-615.
 - [13] 段雪梅, 徐海明, 徐世清. 应用于家蚕 F_2 代分离群体的两种连锁作图方法的作图效果比较 [J]. *蚕业科学*, 2008, 34(1): 128-131.
 - [14] 徐 燕, 谢潮添, 陈昌生, 等. 坛紫菜遗传连锁图谱构建 [J]. *水产学报*, 2010, 34(9): 1355-1362.
 - [15] 朱琼琼. 甜叶菊分子标记遗传连锁图谱的构建 [D]. 杭州: 浙江大学, 2011.
 - [16] 王耀文. 苦荞 SRAP 和 SSR 分子标记遗传连锁图谱构建 [D]. 太原: 山西大学, 2011.
 - [17] 杜晓磊, 张宗文, 吴 斌, 等. 苦荞 SSR 分子遗传图谱的构建及分析 [J]. *中国农学通报*, 2013, 29(21): 61-65.
 - [18] Gong W B, Liu W, Lu Y Y, *et al.* Constructing a new integrated genetic linkage map and mapping quantitative trait loci for vegetative mycelium growth rate in *Lentinula edodes* [J]. *Fungal Biol*, 2014, 118(3): 295-308.
 - [19] 战晴晴, 隋 春, 魏建和, 等. 利用 ISSR 和 SSR 分子标记构建北柴胡遗传图谱 [J]. *药学报*, 2010, 45(4): 517-523.
 - [20] 刘丽华. 罗汉果遗传图谱构建及农艺性状 QTL 分析 [D]. 北京: 北京协和医院研究院, 2010.
 - [21] 毕 川, 陆建农, 殷学贵. 蓖麻遗传图谱构建初报 [J]. *内蒙古民族大学学报: 自然科学版*, 2013, 28(5): 533-564.
 - [22] 王大玮. 杜仲遗传图谱构建及重要性状的分子标记 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2011.
 - [23] Zhu R R, Gao Y K, Zhang Q X. Quantitative trait locus mapping of floral and related traits using an F_2 population of *Aquilegia* [J]. *Plant Breed*, 2014, 133(1): 153-161.
 - [24] 汪 尚. 铁皮石斛种质资源遗传多样性评价及其遗传连锁图谱的构建 [D]. 杭州: 杭州师范大学, 2012.
 - [25] 刘艳玲. 莲野生居群遗传多样性评价及高密度遗传连锁图谱的构建 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2013.
 - [26] 徐 微, 张宗文, 张恩来, 等. 大粒裸燕麦遗传连锁图谱的构建 [J]. *植物遗传资源学报*, 2013, 14(4): 673-678.
 - [27] 刘 伟. 香菇分子遗传连锁图谱的构建 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2011.
 - [28] 陈丽静, 王 利, 王玉坤, 等. 利用重组自交系群体构建番茄 AFLP 遗传连锁图谱 [J]. *园艺学报*, 2012, 39(12): 2377-2384.
 - [29] 李发根. 尾叶桉和细叶桉 STS 标记连锁图谱构建及生长性状 QTL 定位研究 [D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2010.
 - [30] 马建强. 茶树高密度遗传连锁图谱构建及重要性状 QTL 定位 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2013.
 - [31] Wang H X, Walla J A, Magnusson V A, *et al.* Construction of genetic linkage maps and QTL mapping for X-disease resistance in tetraploid chokecherry (*Prunus virginiana* L.) using SSR and AFLP markers [J]. *Mol Breed*, 2014, 34(1): 143-157.
 - [32] Chen D W, Chen L Q. The first intraspecific genetic linkage maps of wintersweet [*Chimonanthus praecox* (L.) Link] based on AFLP and ISSR markers [J]. *Scientia Hort*, 2010, 124(1): 88-94.
 - [33] Zhou X J, Xia Y L, Ren X P, *et al.* Construction of a SNP-based genetic linkage map in cultivated peanut based on large scale marker development using next-generation double-digest restriction-site-associated DNA sequencing (ddRADseq) [J]. *BMC Genom*, 2014, 15(351): 1471-2164.
 - [34] Xue D W, Feng S G, Zhao H Y, *et al.* The linkage maps of *Dendrobium* species based on RAPD and SRAP markers [J]. *Genet Genom*, 2010, 37(3): 197-204.
 - [35] Lu J J, Wang S, Zhao H Y, *et al.* Genetic linkage map of EST-SSR and SRAP markers in the endangered Chinese endemic herb *Dendrobium* (Orchidaceae) [J]. *Genet Mol Res*, 2012, 11(4): 4654-4667.
 - [36] Shang G F, Hong Y Z, Jiang J L, *et al.* Preliminary genetic linkage maps of Chinese herb *Dendrobium nobile* and *D. moniliforme* [J]. *Genet*, 2013, 92(2): 205-212.
 - [37] 赵红燕. 石斛分子遗传图谱的构建 [D]. 杭州: 杭州师范大学, 2011.
 - [38] 孙丽丹. 梅花遗传连锁图谱构建和表型性状 QTLs 分析 [D]. 北京: 北京林业大学, 2013.
 - [39] 龚文兵, 刘 伟, 卢颖颖, 等. 基于 F_2 群体的香菇遗传连锁图谱构建及其在 QTL 定位中的应用 [J]. *菌物学报*, 2014, 33(2): 297-311.
 - [40] 刘遵春, 苗卫东, 刘大亮, 等. 苹果叶片相关性状的 QTL 定位及其遗传效应分析 [J]. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*, 2014, 34(3): 481-487.
 - [41] 张德水, 陈受宜. DNA 分子标记、基因作图及其在植物遗传育种上的应用 [J]. *生物技术通报*, 1998(5): 15-22.
 - [42] 沈新莲, 张天真. 作物分子标记辅助选择育种研究的进展与展望 [J]. *高技术通讯*, 2003(2): 105-110.
 - [43] 刘 肖. 蓝莓抗寒性、需冷量 SNP 分析与分子辅助育种研究 [D]. 北京: 北京林业大学, 2013.
 - [44] 刘 伟. 甘肃桃遗传连锁图谱的构建及抗南方根结线虫的分子标记 [D]. 南京: 南京农业大学, 2010.
 - [45] 李 爽, 张军科, 党伟锋. 苹果遗传连锁图谱构建及抗早期落叶病的基因定位 [J]. *北方园艺*, 2011(24): 145-149.
 - [46] 刘子记, 朱 婕, 华 为, 等. 小麦抗白粉病基因 *pm42* 基因的 EST 连锁图谱构建和比较基因组学分析 [J]. *作物学报*, 2011, 37(9): 1569-1576.
 - [47] 熊怀阳, 赵丽娟, 李立家. 植物细胞遗传图及其应用 [J]. *遗传*, 2005, 27(4): 659-664.