

# 草坪草分子遗传图谱的构建与应用研究进展

郑轶琦<sup>1,2</sup>, 刘建秀<sup>2\*</sup>

(1. 南京农业大学园艺学院, 江苏 南京 210095; 2. 江苏省中国科学院植物研究所, 江苏 南京 210014)

**摘要:** 草坪草分子遗传图谱的构建始于 20 世纪 90 年代, 构建高密度的分子遗传图谱研究将有助于提高草坪草的育种水平。近年来, 分子标记技术的发展加速了草坪草分子遗传图谱构建的研究。然而与农作物相比, 草坪草分子遗传图谱构建的研究还相对滞后。增加作图群体的数量、提高分子遗传图谱的饱和度、抗逆性 QTL 的定位以及中国本土暖季型草坪草资源开发利用等方面, 是我国今后草坪草分子遗传图谱构建研究的重要发展方向。

**关键词:** 草坪草; 分子遗传图谱; 研究进展; QTL; 比较基因组学

**中图分类号:** S688.4; Q946-33 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-5759(2009)01-0155-08

\* 草坪草是指构成草坪植被的草本植物, 包括禾本科植物, 少数几种莎草科植物以及一些符合草坪草特性的其他植物。草坪草具有保持水土、改造自然、美化环境等多种功能, 在改善城市人居环境和营造休闲场所等方面起重要作用<sup>[1]</sup>。随着经济的发展和生态环境意识的提高, 近半个世纪以来, 国内外草坪建设和研究有了迅猛发展。我国近代草坪业起步较晚, 草坪草种绝大部分依赖进口。与此同时, 我国拥有较丰富的野生草坪草种质资源, 所以开发我国丰富的草坪草种质资源, 培育拥有自主知识产权的草坪草新品种是我国草坪业可持续发展的一个前提和基础。

遗传连锁图谱是指以遗传标记(已知性状的基因或特定 DNA 序列)间重组频率为基础的一条染色体或基因内位点的相对位置线性排列图。20 世纪 80 年代以来, DNA 分子标记的发现为遗传图谱的构建及应用建立了一个新的里程碑。目前几乎所有重要农作物都构建了分子遗传连锁图谱。遗传图谱的构建是基因组研究中的重要环节, 是基因定位与克隆乃至基因组结构与功能研究的基础<sup>[2]</sup>。利用 DNA 分子标记技术构建草坪草分子遗传连锁图谱, 进行草坪草分子标记辅助选择育种, 开发草坪草新品种是今后草坪草育种工作的一个重要发展方向。本研究就目前草坪草分子遗传连锁图谱构建及其应用研究简要概述如下, 并对今后的研究工作进行了展望。

## 1 草坪草分子遗传连锁图谱的构建

较早的草坪草分子遗传连锁图谱是由 Hayward 等<sup>[3]</sup>应用同工酶、RFLP(限制片段长度多态性, restriction fragment length polymorphism)、RAPD(随机扩增多态性 DNA, random amplified polymorphic DNA)等分子标记构建的多年生黑麦草遗传连锁图谱, 此后草坪草的遗传图谱构建研究相继展开。据不完全统计, 目前已经建立的草坪草遗传连锁图谱有近 30 张, 涉及的草坪草种有多年生黑麦草(*Lolium perenne*)、高羊茅(*Festuca arundinacea*)、匍匐剪股颖(*Agrostis stolonifera*)、草地早熟禾(*Poa pratensis*)、狗牙根(*Cynodon* sp.)、结缕草(*Zoysia japonica*)等(表 1)。其中研究最多的是多年生黑麦草, 目前已构建 16 张遗传图谱。高羊茅、匍匐剪股颖、草地早熟禾、狗牙根、结缕草的研究较少, 其他草坪草未见报道。

1994 年 Hayward 等<sup>[3]</sup>以多年生黑麦草与一年生黑麦草的 F<sub>1</sub> 后代为作图群体, 应用同工酶、RFLP、RAPD 共 61 个分子标记, 构建了草坪草的第 1 张分子遗传连锁图谱, 该图谱包括 13 个连锁群, 遗传距离为 754.0 cM, 标记间的平均间距为 12.36 cM, 由于该图谱定位的标记数目少, 图谱的饱和度很低, 连锁群的数目也与其染色体数  $2n=14$  不符, 所以在前期研究基础上于 1998 年构建了第 2 张遗传连锁图<sup>[4]</sup>, 该图谱将 106 个标记定位于 7 个连锁群上, 遗传距离为 692.0 cM, 标记间的平均间距为 6.53 cM, 该图谱定位的标记数目和饱和度都大大高于第

\* 收稿日期: 2008-03-18; 改回日期: 2008-06-26

基金项目: 国家自然科学基金(30670200)资助。

作者简介: 郑轶琦(1977-), 女, 河南洛阳人, 讲师, 在读博士。E-mail: botanyzyq@yahoo.com.cn

\* 通讯作者。E-mail: turfunit@yahoo.com.cn

1 张图谱,连锁群数目也与其染色体数目相符。此后,多年生黑麦草的分子遗传图谱研究相继展开,目前已构建了近 14 张,作图群体包括  $F_1$ 、 $F_2$ 、 $BC_1$  等类型,所用标记有同工酶、RFLP、RAPD、AFLP(扩增片段长度多态性, amplified restriction fragment polymorphism)、SSR(简单序列重复, simple sequence repeat)、STS(序列标签位点, sequence tagged site)、EST-SSR(表达序列标签-简单序列重复, expressed sequence tag simple sequence repeat)及 EST-RFLP(表达序列标签-限制片段长度多态性, expressed sequence tag restriction fragment length polymorphism)等标记,目前多年生黑麦草的遗传图谱日趋饱和,其中饱和度最高的为 Gill 等<sup>[15]</sup>构建的图谱,其标记间平均间距为 1.75 cM。其他草坪草的遗传图谱构建研究相对较少,起步也较晚,尤其是暖季型草坪草,目前仅在狗牙根和结缕草中有相关报道,且数量较少。

表 1 已构建的草坪草遗传连锁图谱

Table 1 Genetic linkage maps constructed for turfgrass

草坪草种 Turfgrass species	作图群体 Mapping population		标记种类 Type of marker	图谱 Map			
	种类 Type	群体大小 Size		标记数目 Number of marker	遗传距离 Length of map (cM)	连锁群数 Number of linkage group	标记间平均间隔 Mean interval between markers (cM)
多年生黑麦草 <i>L. perenne</i> <sup>[3~15]</sup>	$F_1$	89	同工酶 Isozyme, RFLP, RAPD	61	754.0	13	12.36
	$F_1$	89	同工酶 Isozyme, RFLP, RAPD	106	692.0	7	6.53
	$F_1$	95	AFLP、同工酶 Isozyme、EST	471	930.0	7	1.97
	$F_1$	155	SSR, RFLP, AFLP 等 Etc	172	814.0	7	4.73
	$BC_1$	183	RFLP, AFLP	240	811.0	7	3.38
	$F_2$	180	RFLP, AFLP	74	515.0	7	6.96
	$BC_1$	156	RFLP, AFLP	134	565.0	7	4.22
	$F_2$	180	RFLP, AFLP, SSR 等 Etc	157	628.0	7	4.00
	$F_1$	91	AFLP, RAPD, RFLP 等 Etc	205	712.0	7	3.47
				184	537.0	7	2.92
	$F_1$	157	EST-RFLP, EST-SSR	156	963.0	8	6.17
				126	757.0	8	6.01
	$F_2$	184	SSR, AFLP	93	490.4	7	5.27
	$F_1$	156	RFLP	359	664.0	7	1.85
	$F_1$	252	AFLP, SSR, RFLP, STS	227	744.0	7	3.28
$F_2$	—	SSR, RFLP	385	675.6	7	1.75	
高羊茅 <i>F. arundinacea</i> <sup>[16,17]</sup>	$F_2$	—	RFLP	108	1 274.0	19	11.80
	$F_1$	91	AFLP, EST-SSR, SSR	558	2 013.0	22	3.61
				579	1 722.0	22	2.97
			922	1 841.0	17	2.00	
匍匐剪股颖 <i>A. stoloniifera</i> <sup>[18]</sup>	$F_1$	94	RAPD, AFLP, RFLP	424	1 110.0	14	2.62
草地早熟禾 <i>P. pratensis</i> <sup>[19]</sup>	$F_1$	67	AFLP, SAMPL	41	367.0	7	8.95
				47	338.4	7	7.20
狗牙根 <i>Cynodon sp.</i> <sup>[20]</sup>	$F_1$	113	SDRFs, DDRFs	172	1 837.3	35	10.68
				95	937.4	18	9.87
结缕草 <i>Z. japonica</i> <sup>[21~23]</sup>	$F_2$	105	RFLP	115	1 506.0	22	13.10
	$F_2$	78	AFLP	364	932.5	26	2.56
	$F_2$	78	SSR, AFLP	540	1 187.0	24	2.20

### 1.1 构建草坪草遗传图谱的遗传标记

遗传标记主要有 4 种,即形态标记、细胞学标记、生化标记和 DNA 分子标记。目前用于构建草坪草遗传图谱的遗传标记主要是 DNA 分子标记,包括 RFLP、RAPD、AFLP、SSR 和 EST-SSR 等,仅在早期的遗传图谱构建研究中应用了少量的生化标记(表 1)。RFLP 标记是最早用于草坪草图谱构建的分子标记,该标记以分子杂交技术为基础,具有共显性、稳定性及重复性好等优点,比较适合于构建框架图及比较作图的研究,但该标记需要较高的试验条件及技术,花费较高且存在同位素污染等缺点,不适合应用于标记辅助选择的育种实践,且在一般实验室较难开展。RAPD 和 AFLP 标记是构建草坪草遗传图谱中常用的分子标记,这 2 种标记属于显性标记,都不需预知研究材料的基因组信息,尤其是 AFLP 标记具有多态性高,重复性好、信息量大等优点,非常适合于构建高密度的遗传图谱,特别是对于草坪草这类遗传学研究相对薄弱的物种可快速构建比较饱和的遗传图谱。但是这类标记基本上位于基因组的非编码区,在种间及种内不同群体间的保守性较差,构建的图谱间无法进行信息传输,无法进行比较图谱分析,在草坪草改良研究中存在很大的局限性。SSR 标记是一种共显性的标记,具有多态性高,重复性好,可以区分纯合子和杂合子等优点,目前已经应用于多年生黑麦草、高羊茅和结缕草(*Eremochloa ophiuroides*)等草坪草的遗传图谱构建研究中;但该标记也有其局限性,即必须对所研究的物种微卫星位点进行克隆和序列分析,然后设计、合成引物,这一过程既费时费力而且花费较高,对于尚未开发特异性 SSR 标记的草坪草,如假俭草等不能应用该标记进行研究。EST 标记来自于基因表达序列,利用 EST 标记构建的遗传图谱可提供更加丰富的信息,对目标性状基因可以进行有效的定位,由于 EST 标记高度保守,在不同物种间具有较高的通用性,可以弥补物种分子标记不足,丰富标记数量,有利于构建高密度的遗传图谱<sup>[24]</sup>。对于草坪草基因组研究基础薄弱的草种,利用禾本科中重要的农作物如水稻(*Oryza sativa*)、小麦(*Triticum aestivum*)、玉米(*Zea mays*)等及重要的草坪草如多年生黑麦草、高羊茅等已开发 SSR 或 EST 标记,是加速其遗传图谱构建研究的重要途径。

### 1.2 草坪草遗传图谱构建的作图群体及作图策略

绝大多数草坪草属于多年生、高度杂合的异花授粉植物,一般都具有自交不亲和或近交衰退现象,很难像农作物那样,利用高世代群体构建遗传图谱,所以目前草坪草遗传图谱构建中用到的作图群体大多来自于种内品系间或属内种间杂交产生的 F<sub>1</sub> 和 F<sub>2</sub> 群体(表 1)。应用 F<sub>1</sub> 群体进行作图,其基本原理是:高度杂合的植物基因组中,F<sub>1</sub> 代一些位点在一个亲本中为杂合,而在另一亲本中为纯合,将子代中 1:1 分离位点利用回交群体模型进行图谱构建,从而得到双亲的 2 张图谱,这一作图策略由 Grattapaglia 和 Sederoff<sup>[25]</sup> 首先提出,又称“拟测交”(pseudo-testcross)或双假测交(two-way pseudo-testcross)作图策略,目前已经广泛应用于林木、果树等杂合度较高的多年生植物的遗传图谱构建研究中;在草坪草的研究中,Faville 等<sup>[11]</sup>,Chakraborty 等<sup>[18]</sup>,Bethel 等<sup>[20]</sup> 均应用该作图策略构建了遗传图谱。此外在拟测交作图策略的基础上还衍生出一种单假测交(one-way pseudo-testcross)作图策略,该策略要求亲本之一是纯合子或近纯合子,通过该方法可构建母本和子代遗传图谱,而不能构建父本遗传图谱,如 Bert 等<sup>[5]</sup> 和 Jones 等<sup>[6,7]</sup> 的研究中,父本都是双单倍体。

草坪草除了具有高度杂合、自交不亲和等特点外,还具有复杂的倍性,如郭海林等<sup>[26]</sup> 在对我国狗牙根种源的染色体倍性研究中发现,我国狗牙根种源中存在多种倍性水平,如四倍体、五倍体、三倍体、六倍体、二倍体及非整倍体,在对此类草坪草进行作图时,一方面可以选择二倍体材料作为亲本,另一方面在有 RFLP、SSR 等共显性标记存在的前提下,也可采用 SDRF(单剂量限制性片段,single-dose restriction fragment)标记<sup>[27,28]</sup> 来克服多倍体构图的复杂性。SDRF 在作图群体中表现为 1:1 分离的条带,Bethel 等<sup>[20]</sup> 应用该种标记构建了狗牙根的第 1 张框架图。

## 2 草坪草分子遗传连锁图谱的应用

分子遗传连锁图谱主要应用于基因定位、比较基因组研究、图位克隆及标记辅助选择等方面。目前草坪草构建的分子遗传连锁图谱已应用于基因定位和比较基因组研究两方面,在图位克隆和标记辅助选择两方面还未见报道。

### 2.1 基因定位

**2.1.1 质量性状基因定位** 质量性状基因定位相对简单,在已知目标基因染色体位置时,选择该染色体上的遗

传标记与目的基因进行连锁分析即可,在无连锁图或连锁图饱和度较低时,利用 NIL(近等基因系, near-isogenic lines)法和 BSA(集团分离分析法, bulked segregation analysis)法是快速有效地寻找与质量性状基因紧密连锁分子标记的主要途径。Barcaccia 等<sup>[29]</sup>应用 BSA 法定位了草地早熟禾的一个控制孤雌生殖性状的基因,该基因位于 2 个 AFLP 位点之间(Eco+CCA/Mse+AGA/0.36, Eco+CCA/Mse+AGA/0.51),与上述 2 位点间的距离分别为 0.6 和 8.8 cM。Thorogood 等<sup>[30]</sup>定位了多年生黑麦草 2 个自交不亲和位点(S 和 Z),这 2 个位点被分别定位在连锁群 1 和 2 上,与小麦族图谱一致。Shinozuka 等<sup>[31]</sup>定位了多年生黑麦草酪蛋白激酶  $\alpha$  亚单位的 2 个基因(*Lpck2 $\alpha$ -1* 和 *Lpck2 $\alpha$ -2*), *Lpck2 $\alpha$ -1* 定位于连锁群 4 上, *Lpck2 $\alpha$ -2* 定位于连锁群 2 上。Tamura 和 Yamada<sup>[32]</sup>定位了多年生黑麦草的 CBF 基因簇,4 个 CBF 基因(*LpCBFIb*, *LpCBFII*, *LpCBFIIIb* 和 *LpCBFIIIc*)定位于连锁群 5 上的 2.2 cM 区域内,另一个基因 *LpCBFVb* 定位于连锁群 1 上;比较了多年生黑麦草的 CBF 基因家族与麦类作物 CBF 基因家族间的关系,表明二者有保守的同线性关系。

**2.1.2 QTL 定位** 目前在草坪草的 QTL(quantitative trait loci, 数量性状位点)定位研究中,利用遗传连锁图谱已经定位了 8 种 QTL,5 种为抗病相关 QTL,2 种为抽穗期 QTL,1 种为春化作用相关 QTL;7 种为多年生黑麦草的 QTL,1 种为匍匐剪股颖的 QTL(表 2),其他草坪草的 QTL 定位研究未见报道。

Dumsday 等<sup>[33]</sup>定位了多年生黑麦草的抗冠锈病 QTL,1 个主效 QTL 定位在连锁群 2 上,另外还对多年生黑麦草的连锁群 2 和燕麦(*Avena sativa*)的连锁群 B(该区域定位了燕麦的抗病基因簇)进行了比较,结果表明二者具有保守的同线性关系。Armstead 等<sup>[9]</sup>定位了多年生黑麦草的抽穗期 QTL,研究表明,应用区间作图分析定位了 1 个多年生黑麦草的抽穗期 QTL,该 QTL 位于连锁群 7 上(与标记 C764 连锁,最大图距为 29 cM),可解释的变异为 70%;用 MQM 法鉴定了多个抽穗期 QTL,分别定位于连锁群 2(连锁标记为 M4-136、B6106),连锁群 3(连锁标记为 LPSSRK01A11),连锁群 4(连锁标记为 CDO195),连锁群 6(连锁标记为 E39M4908)以及连锁群 7(连锁标记为 C764、LtCOa)上,其中定位于连锁群 7 上的 QTL 可解释的变异为 44%,为主效 QTL;并与水稻的抽穗期 Hd3 位点进行了比较,结果表明位于连锁群 7 上的主效 QTL 与水稻染色体 6 上的抽穗期 Hd3 位点有高度的同线形关系,二者可能属于垂直同源基因。Yamada 等<sup>[34]</sup>定位了 1 个多年生黑麦草抽穗期的 QTL,该 QTL 定位于连锁群 4 上,可解释的表型变异为 20%;此外还定位了 1 个耐霜冻相关的电导率 QTL,该 QTL 定位于连锁群 4 上,可解释的表型变异为 11.8%,并与抽穗期 QTL 相邻。Curley 等<sup>[35]</sup>定位了多年生黑麦草的抗灰斑病 QTL,用不同菌株对多年生黑麦草分别进行接种,结果表明,用 GG9 菌株进行接种试验,在 MFB 亲本图谱的连锁群 3 上定位了 1 个 QTL(与标记 CDO460 连锁),可解释的表型变异为 20%~37%;另一个 QTL 定位在 MFA 亲本图谱的连锁群 6 上(与标记 C19.390 连锁),表型变异解释率为 5%~10%;1 个潜在的 QTL 定位于 MFA 图谱连锁群 2 上(与标记 A-E33M62109 紧密连锁),可解释的表型变异为 4.9%~7.8%;用 6082 菌株进行接种检测到 2 个 QTL,这 2 个 QTL 分别定位在 MFA 图谱连锁群 2(与标记 E8.575 连锁)和 MFB 图谱连锁群 4 上(与标记 E3.650 紧密连锁)。Jensen 等<sup>[12]</sup>定位了多年生黑麦草与春化作用相关的 5 个 QTL,这 5 个 QTL 分别定位于连锁群 2,4,6 和 7 上,解释的总表型变异分别为 5.4%~28.0%,5 个 QTL 解释总表型变异的贡献率为 80%左右,主效 QTL 定位于连锁群 4 上,解释总表型变异的 28.0%,该 QTL 与小麦的 VRN1 为垂直同源基因。Muylle 等<sup>[14]</sup>定位了 4 个多年生黑麦草抗冠锈病的 QTL,分别定位于连锁群 1(QTL2、QTL4)和连锁群 2(QTL1、QTL3)上,可解释的表型变异分别为 24.9%,12.5%,2.6%和 5.5%,主效 QTL 位于连锁群 1 上。Schejbel 等<sup>[36]</sup>也定位了多年生黑麦草的抗冠锈病 QTL,共定位了 6 个 QTL,分别定位在连锁群 1,4 和 5 上,可解释的表型变异从 6.8%~16.4%。

表 2 已定位的草坪草 QTL

Table 2 QTL mapping in turfgrass

草坪草种 Turfgrass species	QTL 种类 Type of QTL
多年生黑麦草 <i>L. perenne</i>	抗冠锈病 Resistance to crown rust <sup>[27]</sup>
	抽穗期 Heading-date <sup>[9]</sup>
	抽穗期 Heading-date <sup>[28]</sup>
	抗灰斑病 Resistance to gray leaf spot <sup>[29]</sup>
	春化作用 Vernalization <sup>[12]</sup>
匍匐剪股颖 <i>A. stolonifera</i>	抗冠锈病 Resistance to crown rust <sup>[14]</sup>
	抗币斑病 Resistance to dollar spot <sup>[30]</sup>

Chakraborty 等<sup>[37]</sup>定位了匍匐剪股颖抗币斑病 QTL, 1 个主效 QTL 位于连锁群 7.1 上(与标记 3. AW10. 650 连锁), 解释的表型变异为 14.1%~36.0%, 几个微效 QTL 分别定位于连锁群 2.1, 3.2, 4.1, 4.2, 6.2 和 7.2 上, 可解释的表型变异为 5.9%~15.0%。与农作物及主要园艺作物相比, 目前草坪草定位的 QTL 数量很少, 且大多为抗病相关的 QTL, 一些与草坪草抗逆相关的 QTL(如抗旱、抗寒、耐盐等)及与草坪草坪用特性相关的 QTL(如叶长、叶宽、草层高度、叶色等)均未见报道。

## 2.2 比较基因组研究

比较基因组研究主要是利用相同的 DNA 分子标记在相关物种之间进行遗传或物理作图, 比较这些标记在不同物种基因组中的分布特点, 揭示染色体或染色体片段上的基因及其排列顺序的相同(共线性)或相似性(同线性), 并由此对相关物种的基因组结构和起源进化进行分析<sup>[38]</sup>。比较基因组研究最早是在双子叶植物茄科中番茄(*Lycopersicon esculentum*)和马铃薯(*Solanum tuberosum*)<sup>[39]</sup>、番茄与马铃薯以及番茄和胡椒(*Piper nigrum*)之间进行的<sup>[40]</sup>。近年来在单子叶植物尤其是禾本科植物间 RFLP 标记水平的比较基因组研究发展也非常迅速, 水稻和玉米<sup>[41, 42]</sup>, 玉米和小麦<sup>[43]</sup>, 水稻、玉米、小麦和燕麦<sup>[44]</sup>, 甘蔗(*Saccharum officinarum*)、玉米和高粱(*Sorghum vulgare*)<sup>[45]</sup>等作物间的比较基因组研究结果都表明, 许多标记在不同作物的遗传图谱上的位置和顺序都具有高度的保守性。

近年来, 在已构建的遗传连锁图谱基础上也进行了草坪草与其他禾本科植物基于 RFLP 标记水平的比较基因组研究。Chen 等<sup>[46]</sup>应用相同的 RFLP 标记对高羊茅与草地羊茅的比较研究表明, 2 个种有高度保守的连锁群, 在共有的 33 个 RFLP 标记中, 23 个(70%)定位在 2 个种的相应连锁群上, 其中 8 个标记均被定位于草地羊茅的连锁群 I 和高羊茅的连锁群 1 上, 进一步证明了六倍体高羊茅的 P 基因组来自于草地羊茅。Jones 等<sup>[6]</sup>进行了多年生黑麦草与大麦(*Hordeum vulgare*)、小麦、燕麦及水稻间的比较基因组研究, 结果表明 76 个定位在小麦族遗传图谱上的标记覆盖了多年生黑麦草遗传图谱 70% 的区域, 定位于燕麦遗传图谱上的 45 个标记覆盖了多年生黑麦草图谱 50% 的区域, 定位于水稻遗传图谱上的 93 个标记覆盖了多年生黑麦草图谱 66% 的区域, 表明多年生黑麦草与上述作物的基因组间具有保守的同线性关系; 此外该研究还发现, 多年生黑麦草基因组结构更接近于麦类作物, 尽管其在分类学上与燕麦亲缘关系较麦类作物更近。Chakraborty 等<sup>[18]</sup>进行了匍匐剪股颖与水稻的比较基因组研究, 匍匐剪股颖连锁群 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 上保守的同线性区段(最少包括 4 个共有标记)分别对应于水稻的第 5, 7, 1, 3, 8, 2, 6 号染色体; 另外匍匐剪股颖连锁群 2, 5, 7 上的染色体片段(至少包括 2 个公有标记)分别对应于水稻的第 4 号(CDO684. 1, Ast317 和 Ast324. 2), 9 号(CDO 989. 1, Ast551. 2 和 CDO344. 2)和 8 号(Ast5121. 1 和 CDO464)染色体。上述研究均表明禾本科草坪草与水稻、小麦等禾本科作物的基因组具有保守的同线性关系。

## 3 草坪草遗传图谱构建研究中的问题及展望

近年来, 尽管草坪草分子遗传图谱的构建取得了一定的发展, 但纵观这些分子遗传图谱, 可以看出它们仍存在以下问题, 需要在今后的研究中不断改进。

**3.1 作图个体的数量有限。**一个足够大的作图群体将有助于提高染色体上距离相近标记之间的位置估计的精度<sup>[47]</sup>。在人类利用 5 840 个微卫星标记构建的遗传图谱中, 由于作图群体大小的限制, 图谱位置确定框架图的标记数只有 970 个<sup>[48]</sup>。为保证连锁图谱的精确性, 每个群体都应保证有足够的个体(如 500 个以上), 为了减少工作量, 骨架连锁图的构建可基于大群体中的一个随机小群体(如 150 个单株或家系)<sup>[49]</sup>, 当需要检测到的重组分数达到 0.3, LOD 值为 3.0 时, 需要的个体数在 300 个以上<sup>[50]</sup>。在已构建的草坪草遗传图谱中, 只有研究较多的多年生黑麦草的部分作图群体达到 150 个以上<sup>[6~9, 11, 13, 14]</sup>, 其他草坪草的作图群体均未达到 150 个, 群体个数最少的为草地早熟禾<sup>[19]</sup>, 只有 67 个。所以扩大群体数目提高作图的精度, 是目前草坪草遗传图谱构建的一个发展方向。

**3.2 已构建的草坪草遗传图谱的饱和度均较低。**一个基本的染色体连锁框架图大概要求在染色体上的标记平均间隔不大于 20 cM。如果构建连锁图的目的是为了进行主基因的定位, 其平均间隔要求为 10~20 cM 或更小。用于 QTL 定位的连锁图, 其标记的平均间隔要求在 10 cM 以下。如果构建的连锁图是为了进行基因克隆, 则要

求目标区域标记的平均间隔在 1 cM 以下<sup>[49]</sup>。目前草坪草的饱和图谱尚未建立,并且标记在染色体上的分布不均匀,即使在平均密度较高的图谱上,仍存在较大的间隔区,如 Gill 等<sup>[15]</sup>构建的多年生黑麦草遗传连锁图是目前平均密度最高的草坪草遗传连锁图,其标记间平均间距为 1.75 cM,但是在连锁群 3,5 和 6 上仍分别有 27.8, 12.3 和 37.7 cM 的间隔区。为了填补这些间隔,应针对性地在间隔区上寻找标记,或寻找该间隔所在区域上有差异的亲本构建作图群体,另外利用不同分子标记特征的互补性,将有助于减少遗传图谱中的间隔<sup>[51]</sup>。因此,发展来源不同杂交组合的作图群体和新型的分子标记是填补图谱中的间隔,构建饱和图谱的有效手段。

**3.3 进行 QTL 定位是构建分子遗传图谱的主要目标之一,但目前草坪草植物中分离出的 QTL 较少。此问题的解决有待于开发新的作图群体,构建高饱和的分子遗传图谱和发展更灵敏的统计方法,以便为草坪草重要经济性状的遗传规律及其与环境间相互关系的研究提供理论依据。比较基因组研究不仅显示不同禾本科植物染色体在标记水平具有广泛的共线性<sup>[41]</sup>。许多控制重要农艺性状和抗病性的 QTL 在禾本科植物中也具有共线性关系<sup>[43~45]</sup>。在草坪草与禾本科主要农作物的比较基因组研究中也发现草坪草一些性状的 QTL 与其他植物的相关 QTL 具有同线性关系,如 Armstead 等<sup>[9]</sup>定位的多年生黑麦草抽穗期 QTL 与水稻的抽穗期 QTL 具有保守的同线性关系。所以利用禾本科主要作物的基因组信息进行草坪草的 QTL 定位研究(尤其是抗逆性 QTL 的定位)也是今后草坪草 QTL 定位研究的重要方向之一。**

**3.4 目前已构建的草坪草连锁图大多数为冷季型草坪草,暖季型草坪草仅狗牙根和结缕草有少量的研究,且目前关于草坪草遗传图谱构建的报道全部来自于国外,我国目前尚无草坪草遗传图谱构建的相关报道。我国拥有丰富的暖季型草坪草种质资源<sup>[52]</sup>,这对于开发拥有自主知识产权的草坪草新品种具有无可比拟的优势。应用资源优势对我国暖季型草坪草进行遗传图谱构建、基因定位、图位克隆、比较基因组学等研究,结合分子标记辅助选择技术应该是今后草坪草分子育种发展的重要方向之一。**

#### 参考文献:

- [1] Henderson S P, Perkins N H, Nelischer M. Residential lawn alternatives: A study of their distribution, form and structure[J]. Landscape and Urban Planning, 1998, 42: 135-145.
- [2] 向道权,曹海河,曹永国,等. 玉米 SSR 遗传图谱的构建及产量性状基因定位[J]. 遗传学报, 2001, 28(8): 778-784.
- [3] Hayward M D, McAdam N J, Jones J G, et al. Genetic markers and the selection of quantitative traits in forage grasses[J]. Euphytica, 1994, 77: 269-275.
- [4] Hayward M D, Forster J W, Jones J G, et al. Genetic analysis of *Lolium* I. Identification of linkage groups and the establishment of a genetic map[J]. Plant Breeding, 1998, 117: 451-455.
- [5] Bert P F, Charmet G, Sourdil P, et al. A high-density molecular map for ryegrass (*Lolium perenne*) using AFLP markers[J]. Theoretical and Applied Genetics, 1999, 99: 445-452.
- [6] Jones E S, Mahoney N L, Hayward M D, et al. An enhanced molecular marker based genetic map of perennial ryegrass (*Lolium perenne*) reveals comparative relationships with other Poaceae genomes[J]. Genome, 2002, 45: 282-295.
- [7] Jones E S, Dupal M P, Dumsday J L, et al. An SSR-based genetic linkage map for perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.)[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2002, 105: 577-584.
- [8] Armstead I P, Turner L B, King I P, et al. Comparison and integration of genetic maps generated from F<sub>2</sub> and BC<sub>1</sub>-type mapping populations in perennial ryegrass[J]. Plant Breeding, 2002, 121: 501-507.
- [9] Armstead I P, Turner L B, Farrell M, et al. Synteny between a major heading-date QTL in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) and the *Hd3* heading-date locus in rice[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2004, 108: 822-828.
- [10] Warnke S E, Barker R E, Jung G, et al. Genetic linkage mapping of an annual×perennial ryegrass population[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2004, 109: 294-304.
- [11] Faville M J, Vecchies A C, Schreiber M, et al. Functionally associated molecular genetic marker map construction in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.)[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2004, 110: 12-32.
- [12] Jensen L B, Andersen J R, Frei U, et al. QTL mapping of vernalization response in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.)

- reveals co-location with an orthologue of wheat *VRN1*[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2005, 110: 527-536.
- [13] Sim S, Chang T, Curley J, *et al.* Chromosomal rearrangements differentiating the ryegrass genome from the Triticeae, oat, and rice genomes using common heterologous RFLP probes[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2005, 110: 1011-1019.
- [14] Muylle H, Baert J, Bockstaele E V, *et al.* Four QTLs determine crown rust (*Puccinia coronata* f. sp. lolii) resistance in a perennial ryegrass (*Lolium perenne*) population[J]. *Heredity*, 2005, 95: 348-357.
- [15] Gill G P, Wilcox P L, Whittaker D J, *et al.* A framework linkage map of perennial ryegrass based on SSR markers[J]. *Genome*, 2006, 49: 354-364.
- [16] Xu W W, Slepner D A, Chao S. Genome mapping of polyploidy tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.) with RFLP markers[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1995, 91: 947-955.
- [17] Saha M C, Mian R, Zwonitzer J C, *et al.* An SSR- and AFLP-based genetic linkage map of tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.)[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2005, 110: 323-336.
- [18] Chakraborty N, Bae J, Warnke S, *et al.* Linkage map construction in allotetraploid creeping bentgrass (*Agrostis stolonifera* L.)[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2005, 111: 795-803.
- [19] Porceddu A, Albertini E, Barcaccia G, *et al.* Linkage mapping in apomictic and sexual Kentucky bluegrass (*Poa pratensis* L.) genotypes using a two way pseudo-testcross strategy based on AFLP and SAMPL markers[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2002, 104: 273-280.
- [20] Bethel C M, Sciara E B, Estill J C, *et al.* A framework linkage map of bermudagrass (*Cynodon dactylon* × *transvaalensis*) based on single-dose restriction fragments[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2006, 112: 727-737.
- [21] Yaneshita M, Kaneko S, Sasakuma T. Allotetraploidy of *Zoysia* species with  $2n=40$  based on a RFLP genetic map[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1999, 98: 751-756.
- [22] Cai H, Inoue M, Yuyama N, *et al.* An AFLP-based linkage map of *Zoysiagrass* (*Zoysia japonica*) [J]. *Plant Breeding*, 2004, 123: 543-548.
- [23] Cai H, Inoue M, Yuyama N, *et al.* Isolation, characterization and mapping of simple sequence repeat markers in zoysiagrass (*Zoysia* spp.) [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2005, 112: 158-166.
- [24] 李宏伟, 刘曙东, 高丽锋, 等. 小麦 EST-SSR 的通用性研究[J]. *植物遗传资源学报*, 2003, 4(3): 252-255.
- [25] Grattapaglia D, Sederoff R. Genetic linkage maps of *Eucalyptus urophylla* using a pseudo-testcross mapping strategy and RAPD markers[J]. *Genetics*, 1994, 137: 1121-1137.
- [26] 郭海林, 刘建秀, 郭爱桂, 等. 中国狗牙根染色体数变异研究初报[J]. *草地学报*, 2002, 10(1): 69-73.
- [27] Wu K K, Burnquist W, Sorrells M E, *et al.* The detection and estimation of linkage in polyploids using single-dose restriction fragments[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1992, 83: 294-300.
- [28] Sorrells M E. Development and application of RFLP in polyploidy[J]. *Crop Science*, 1992, 32: 1086-1091.
- [29] Barcaccia G, Mazzucato A, Albertini E, *et al.* Inheritance of parthenogenesis in *Poa pratensis* L.: Auxin test and AFLP linkage analyses support monogenic control[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1998, 97: 74-82.
- [30] Thorogood D, Kaiser W J, Jones J G, *et al.* Self-incompatibility in ryegrass12. Genotyping and mapping the S and Z loci of *Lolium perenne* L. [J]. *Heredity*, 2002, 88: 385-390.
- [31] Shinozuka H, Hisano H, Ponting R C, *et al.* Molecular cloning and genetic mapping of perennial ryegrass casein protein kinase 2 $\alpha$ -subunit genes[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2005, 112: 167-177.
- [32] Tamura K, Yamada T. A perennial ryegrass CBF gene cluster is located in a region predicted by conserved synteny between Poaceae species[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2007, 114: 273-283.
- [33] Dumsday J L, Smith K F, Forster J W, *et al.* SSR-based genetic linkage analysis of resistance to crown rust (*Puccinia coronata* f. sp. lolii) in perennial ryegrass (*Lolium perenne*) [J]. *Plant Pathology*, 2003, 52: 628-637.
- [34] Yamada T, Jones E S, Cogan N O I, *et al.* QTL analysis of morphological, developmental, and winter hardiness-associated traits in perennial ryegrass[J]. *Crop Science*, 2004, 44: 925-935.
- [35] Curley J, Sim S C, Warnke S, *et al.* QTL mapping of resistance to gray leaf spot in ryegrass[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2005, 111: 1107-1117.

- [36] Schejbel B, Jensen L B, Xing Y, *et al.* QTL analysis of crown rust resistance in perennial ryegrass under conditions of natural and artificial infection[J]. *Plant Breeding*, 2007, 126(4): 347-352.
- [37] Chakraborty N, Curley J, Warnke S, *et al.* Mapping QTL for dollar spot resistance in creeping bentgrass (*Agrostis stolonifera* L.)[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2006, 113: 1421-1435.
- [38] 沈立爽, 朱立煌. 植物的比较基因组研究和大遗传系统[J]. *生物工程进展*, 1995, 15: 23-28.
- [39] Bonierbale M W, Plaisted P L, Tanksley S D. RFLP maps based on a common set of clones reveal modes of chromosomal evolution potato and tomato[J]. *Genetics*, 1998, 120: 1095-1103.
- [40] Tanksley S D, Bernatzky R, Lanttan N L, *et al.* Conservation of gene repertoire but not gene order in pepper and tomato genome[J]. *Genetics*, 1998, 132: 1141-1161.
- [41] Ahn S N, Tanksley S D. Comparative linkage maps of the rice and maize genomes[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1993, 90(17): 7980-7984.
- [42] Wilson W A, Harrington S E, Woodman W L, *et al.* Inferences on the genome structure of progenitor maize through comparative analysis of rice, maize and the domesticated panicoids[J]. *Genetics*, 1999, 153(1): 453-473.
- [43] Devos K M, Chao S, Li Q Y, *et al.* Relationship between chromosome 9 of maize and wheat homeologous group 7 chromosomes[J]. *Genetics*, 1994, 138(4): 1287-1292.
- [44] Van Deynze A E, Nelson J C, O'Donoghue L S, *et al.* Comparative mapping in grasses; Oat relationships[J]. *Molecular Genetics & Genomics*, 1995, 249(3): 349-356.
- [45] Grivet L, D'Hont A, Dufour P, *et al.* Comparative genome mapping of sugarcane with other species within the andropogoneae tribe[J]. *Heredity*, 1994, 73: 500-508.
- [46] Chen C, Sleper D A, Johal G S. Comparative RFLP mapping of meadow and tall fescue[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1998, 97: 255-260.
- [47] Remington D L, Wheten R W, Liu B H, *et al.* Construction of an AFLP genetic map with nearly complete genome coverage in *Pinus taeda*[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1999, 98: 1279-1292.
- [48] Murray J C, Buetow K H, Weber J L, *et al.* A comprehensive human linkage map with centimorgan density[J]. *Science*, 1994, 265: 2049-2054.
- [49] 徐云碧, 朱立煌. 分子数量遗传学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1994. 81-83.
- [50] Botstein D, White R L, Skolnick M, *et al.* Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms[J]. *American Journal of Human Genetics*, 1980, 32(3): 314-331.
- [51] 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. 50-58.
- [52] 刘建秀, 刘永东, 贺善安, 等. 中国暖季型草坪草物种多样性及其地理分布特点[J]. *草地学报*, 1998, 1: 45-52.

### Advances in construction and application of turfgrass molecular genetic maps

ZHENG Yi-qi<sup>1,2</sup>, LIU Jian-xiu<sup>2</sup>

(1. College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. Institute of Botany, Jiangsu Province and Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210014, China)

**Abstract:** Molecular genetic maps of turfgrass were first constructed in the 1990's. High density genetic maps will improve the breeding of turfgrass. With the development of molecular markers, the genetic maps of turfgrasses have advanced in recent years but research on construction of these maps has lagged compared with those for other crops. Addition of more population mapping, increased the map saturation, QTL mapping of stress tolerance and genetic resources development of Chinese native warm season turfgrass and are the important directions of research in the construction of genetic maps in China.

**Key words:** turfgrass; molecular genetic maps; research advances; QTL; comparative genomics