

## 棉花 RGAP、DGAP 和 DDRT 标记的定位研究

杨 昶, 高玉龙, 胡重怡, 周兆华, 郭旺珍, 张天真\*

(南京农业大学作物遗传与种质创新国家重点实验室, 南京 210095)

**摘要:**根据本实验室已克隆的 RGAs 和 DGAs, 设计 48 条 RGAs 和 4 条 DGAs 特异引物, 以“海 7124×TM-1”组合的 BC<sub>1</sub> 群体为材料把 5 个 RGAP 和 2 个 DGAP 标记定位到棉花的染色体上; 以一个高抗黄萎病陆地棉品系 5026 为材料, 在接种黄萎病菌后不同时期提取根部 RNA, 用 mRNA 差异显示(DDRT-PCR)技术, 获得 164 个差异片段, 根据这些片段设计 34 对 DDRT 引物。用已构建好的“海 7124×军棉 1 号”组合的 F<sub>2</sub> 群体, 将 3 个 RGAP 和 5 个 DDRT 定位到了相应的染色体上。用 Joinmap3.0 软件把两张连锁图谱整合为一张图谱, 并将这些标记与抗黄萎病 QTLs 进行连锁分析。

**关键词:**棉花; RGAP; DGAP; DDRT; 定位

中图分类号: S562.035 文献标识码: A

文章编号: 1002-7807(2009)02-0133-05

### Mapping of RGAP, DGAP and DDRT Markers in Cotton

YANG Chang, GAO Yu-long, HU Zhong-yi, ZHOU Zhao-hua, GUO Wang-zhen, ZHANG Tian-zhen\*

(National Key Laboratory of Crop Genetics & Germplasm Enhancement, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

**Abstract:** According to the sequences of RGAs and DGAs cloned in our laboratory, 48 primers of RGAP and four primers of DGAP were designed, five RGAP and two DGAP markers were located on the chromosomes of cotton genome using a BC<sub>1</sub> population derived from the cross of ‘Hai 7124×TM-1’; the root RNA was extracted in different period after inoculating the isolate of *Verticillium dahliae* to 5026, a *G. hirsutum* line high resistant to *Verticillium* wilt. Totally 164 differential fragments were gotten using mRNA differential display method, and 34 DDRT primers were designed. Three RGAP and five DDRT loci were mapped to the chromosomes using an F<sub>2</sub> population derived from the cross of ‘Hai 7124×Junmian 1’. The two linkage maps were integrated into one using Joinmap 3.0 software, and the linkage relationship was analyzed between the markers and the QTLs resistant to *Verticillium* wilt.

**Key words:** cotton; RGAP; DGAP; DDRT; mapping

在植物抗病基因和防卫基因中利用特定结构域中的保守序列设计简并引物可以扩增得到抗病基因类似物(resistance gene analogs, RGAs)与防卫基因类似物(defense gene analogs, DGAs)。这些片段可能是抗病基因部分序列或者可能与抗病基因连锁<sup>[1-2]</sup>。利用这些序列发现的与抗病基

因或防卫基因相关的标记叫 RGAP(resistance gene analogs polymorphism)或 DGAP(defense gene analogs polymorphism)。RGAP 或 DGAP 作为一种新型的标记已经在一些作物上用于遗传图谱的构建<sup>[3-5]</sup>, 并且成功地用于抗病基因/QTL 的定位上<sup>[6-11]</sup>。

收稿日期: 2007-09-07

作者简介: 杨昶(1979-), 男, 博士, ychang\_shy@yahoo.com.cn; \* 通讯作者, cotton@njau.edu.cn

mRNA 差异显示 (mRNA Differential Display, DDRT-PCR) 技术已经成功应用于植物胚胎发育、形态发生、信号传导、抗逆、抗病相关基因的克隆上<sup>[12-13]</sup>。在实际操作过程中虽然存在一定假阳性片段,但是根据这些差异片段开发成标记,用于基因/QTL 定位,其效率在理论上高于一般的分子标记。

近年来,在棉花的不同品种上关于抗黄萎病基因/QTL 分子标记定位的研究已陆续有报道<sup>[14-18]</sup>,但是用 RGAP 标记和通过 DDRT 方法转化的标记结合经典的 SSR 标记来定位棉花的抗黄萎病 QTL 的研究到目前还未见有报道。本研究通过克隆 RGA 和 DDRT 方法,开发了一些与抗黄萎病基因相关的标记,把它们定位到染色体上,并与抗黄萎病 QTLs 进行连锁分析,为棉花抗黄萎病育种提供更为有效的信息。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验材料

供试棉花品种为抗黄萎病海岛棉品种海 7124、高抗黄萎病的陆地棉品系 5026 和高感黄萎病陆地棉品种军棉 1 号。试验所用黄萎病菌为强致病力落叶型病菌 VD8。群体材料一个是本实验室已构建好的“海 7124×TM-1”组合的 BC<sub>1</sub> 群体;另一个群体是以海 7124 为母本,军棉 1 号为父本配制杂交组合得 F<sub>1</sub> 代,F<sub>1</sub> 自交得到的 F<sub>2</sub> 分离群体。

遗传图谱是用 BC<sub>1</sub> 群体构建的一张海陆种间棉花遗传图谱;用 SSR 标记分析 F<sub>2</sub> 群体并进行标记间连锁分析,构建了一张全长 2633.6 cM,覆盖棉花基因组 47.4%,平均间距 6.93 cM,涉及棉花 26 条染色体的海陆种间分子遗传图谱,并用此图谱检测到了 4 个苗期抗黄萎病 QTLs 和 3 个成株期抗黄萎病 QTLs。

### 1.2 试验方法

RGAP 和 DGAP 标记的开发用具有连续 ORF 的 48 条 NBS 类与 20 条 STK 类 RGAs 以及 4 条 DGAs 设计的特异引物。

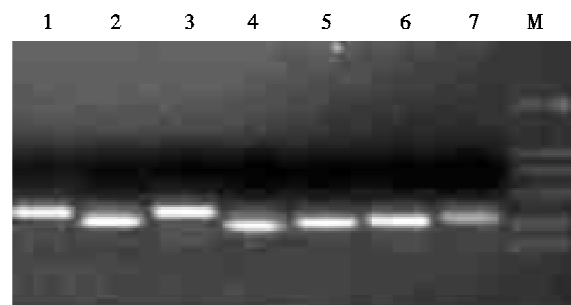
DDRT 标记的开发:(1)病原菌的准备。将生长于 PDA 培养基上的 VD8 病菌菌落,接种到装有已灭菌的 100 mL Czapek's 液体培养基的 250 mL 平底烧杯中,25℃ 振荡培养 8~10 d。将菌悬液经四层纱布过滤,在显微镜下统一计滤液孢子数,3 次重复,配成浓度为 1×10<sup>7</sup> 个·

mL<sup>-1</sup> 的孢子悬浮液,现配现用。(2)棉苗的培养与接种。棉花抗病品系 5026 的种子经浓硫酸脱绒,用 37% 的甲醛熏蒸 24 h 后播于无菌土制的营养钵中,钵一粒。待棉株长到 2 叶 1 心时,挪动营养钵喷洒菌液,平均每株喷洒浓度为 1×10<sup>7</sup> 个·mL<sup>-1</sup> 的分生孢子悬浮液 20 mL。(3)根部 RNA 的提取。根据病菌侵染棉株根部的时间,分别取接种后 12 h、24 h、48 h、96 h、144 h 的棉花幼嫩根部,并取未接种的健康棉花根部为对照,贮藏于 -80℃ 冰箱中。根部总 RNA 的提取参照蒋建雄 CTAB 提取方法。(4)DDRT 标记的设计。将总 RNA 反转成 cDNA,通过差异显示 (DDRT-PCR) 的方法,找出在接种不同时期下特异表达片段,回收、克隆并测序。根据这些序列,用 Primer 5 软件设计特异引物,从而得到 DDRT 标记。(5)连锁图谱的构建和整合。用 BC<sub>1</sub> 群体构建的含有 RGAP 和 DGAP 标记的连锁图谱,用 F<sub>2</sub> 群体构建的含有 RGAP 和 DDRT 标记的连锁图谱以及两张图谱的整合均用 Joinmap 3.0 软件<sup>[20]</sup>。连锁群构建时 LOD 值的范围为 6.0~10.0。

## 2 结果与分析

### 2.1 DDRT 标记的获得

试验共用 111 对引物(3 个锚定引物和 37 个随机引物)进行筛选,通过差异显示的方法得到 164 个受黄萎病菌诱导表达的片段,将这些片段回收(图 1)、测序。测序结果在 NCBI 的 EST 数据库和蛋白数据库进行 BLAST 分析。根据预测的功能挑出可能与抗病相关的 EST 序列,用这些序列设计特异引物 34 对,得到了 DDRT 标记。



泳道 1~7 为差异片段重扩增, M 为 DNA Maker DL2000

图 1 mRNA DDRT-PCR 差异片段回收后 PCR 重扩增  
Fig. 1 Re-amplification of the differential display cDNA recovered from mRNA DD-PCR

### 2.2 RGAP、DGAP 和 DDRT 定位分析

用 48 对 RGAP 引物和 4 对 DGAP 引物筛选海 7124 和 TM-1 之间的多态,得到了有多态的 5

对 RGAP 引物和 2 对 DGAP 引物,这些引物分别是:Y1020、Y1026、Y1031、Y1032、Y1833、Y1022 和 Y1677,引物的序列见表 1。用本实验室的 BC<sub>1</sub>

作图群体将这些有多态性的标记定位于本实验室建立的棉花连锁图谱上,这 7 个标记分别位于染色体 A11、A3、A13、A12、D5、D4 和 A9 上。

表 1 RGAP、DGAP 和 DDRT 引物序列

Table 1 The sequences of RGAP, DGAP and DDRT primers

引物	编号	正向引物(5'—3')	反向引物(5'—3')
RGAP	Y56	TGATGATGAGCGAGACAAAGA	CGCAGATCTCGAGTATAGAACTCA
	Y1020	GGTGGGGTTGGTAAAAACG	CCTTAAGGGCTAGTGGGA
	Y1026	TGGGGTAGGGAAAACAAC	AACCTTAAGCGCAAGGGG
	Y1031	TGGAGGACATGACGACAAGA	TGGAGGACATGACGACAAGA
	Y1032	CAAGTTCAGCACACACCG	AACCTTCAGAGCGAGGGG
	Y1833	AACTACTAAGCCGTTCALCCA	TTCACCACGATGCTCATCAAA
DGAP	Y1022	GTGCGGGAGCGTTATTTA	CAAGCCGAGTGACACGAA
	Y1677	TGAAGTCCCTCCATCATCT	CCGAGTATAACGAATCCAAC
DDRT	Y2	GGGTGTTCTTGATGACTA	AACTAAAGGTTTCGGTCC
	Y10	CACATTGTATGACTACTTGCTT	GGAGCTGTTTTCTTTTAA
	Y11	AGCAAACCCCACTACCGT	GGAACCAATCCTCCCAGA
	Y13	AGGGAAGGAGATGGATA	TTCGGACTTTCTTTGATA
	Y20	ACGACAAGGAAAAGGAAG	ACGACAAGGAAAAGGAAG

用这 52 对 RGAP 和 DGAP 引物同时筛选亲本抗黄萎病海岛棉品种海 7124 和高感黄萎病陆地棉品种军棉 1 号的多态,仅得到了 3 对具有多态的 RGAP 引物,分别是 Y56、Y1020 和 Y1026,这些引物的序列见表 1。用这 3 对引物分析 F<sub>2</sub> 群体,得到 3 个稳定多态的位点。把这些位点和已有的 SSR 标记位点进行连锁分析和定位,分别定位在染色体 A13、A11 和 A3 上。

用得到的 34 对 DDRT 引物筛选亲本海 7124 和军棉 1 号的多态,得到有多态的引物 5 对,分别是 Y2、Y10、Y11、Y13 和 Y20,这些引物的序列见表 1。用这 5 对引物分析 F<sub>2</sub> 群体,得到了 7 个多态位点,进行连锁分析时有 5 个位点构建到连锁群上,根据连锁群进行染色体的定位。定位结果是 Y10、Y11、Y13、Y20b、Y20c 分别定位于染色体 D2、A10、A9、A13 和 A5 上。

用 BC<sub>1</sub> 群体定位结果涉及到 7 条染色体,用 F<sub>2</sub> 群体定位结果涉及 7 条染色体。其中,共有的染色体有 4 条,分别是:A3、A11、A13 和 A9。用 Joinmap 3.0 软件把这 4 条共同的染色体整合在一起,构成一张连锁图谱(图 2)。

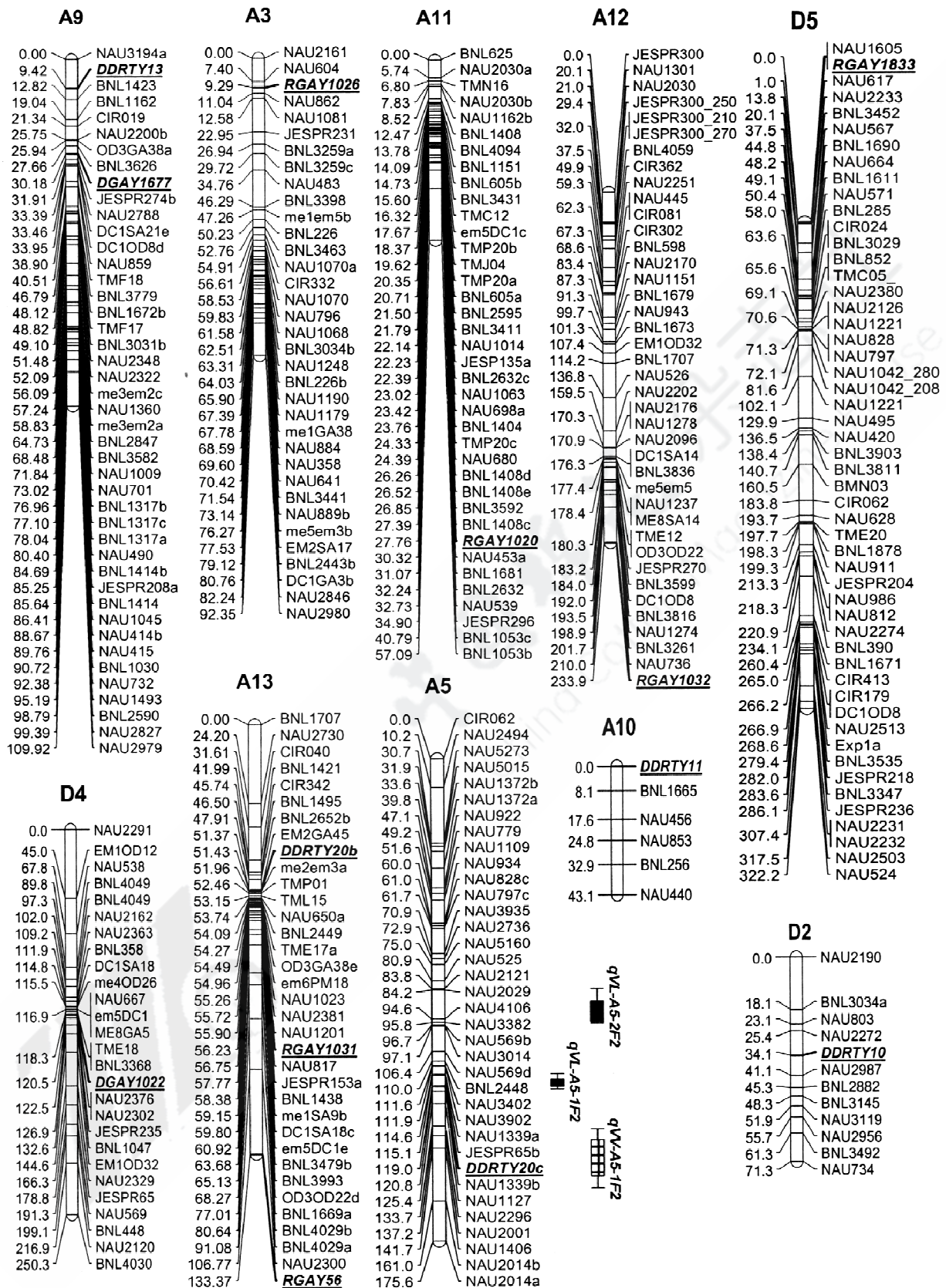
用已构建的 F<sub>2</sub> 群体检测到苗期 4 个抗黄萎病 QTLs 和成株期 3 个抗黄萎病 QTLs(此结果另文发表)。用已定位的 RGAP 和 DDRT 标记

与抗黄萎病的 QTLs 进行连锁分析发现,其中一个 DDRT 位点 Y20c 与 QTL qVL-A5-1F<sub>2</sub> 紧密连锁,距离为 0.01 cM。同时,在该位点的上下检测到了两个 QTLs,距离分别是 26.4 cM 和 26.0 cM(图 2)。结合其功能,Y20c 位点上可能存在一个抗黄萎病基因位点;另一个 DDRT 位点 Y13 与 QTL qVV-A9-1F<sub>2</sub> 连锁,其距离是 25.1 cM(图 2),结合其功能,推测在 Y13 位点与抗黄萎病基因位点有较大的相关性。

### 2.3 部分片段的功能预测

根据引物设计时所用的 EST 序列,在 NCBI 数据库中进行比对发现,Y1020 编码一种 NBS-LRR 类的抗病蛋白,Y1026 编码一种 NBS 类抗病蛋白,Y10 是陆地棉中一个抗萎蔫的细胞色素 c 基因,Y11 编码一种与衰老相关的蛋白,Y13 是亚洲棉中一种杜松醇的合成酶基因,Y20 是一个亮氨酸 tRNA 合成酶基因。

本研究是对用 RGAP、DGAP 和 DDRT 标记进行定位并分析与抗黄萎病基因关系研究的初步探讨。由于本研究中开发出的 RGAP 标记数量不多,因此,没有检测到与抗黄萎病 QTLs 连锁的标记。同时,DDRT 标记虽然只有两个 QTLs 与其连锁,但是随着标记的进一步增加,应该会找到更多有价值的标记用于棉花抗病育种。



注:RGAP、DGAP、DDRT 标记用斜体下划线标出;实心方块和空心方块分别表示苗期和成株期检测到的 QTLs。

图 2 含有 RGAP、DGAP、DDRT 标记和部分抗病 QTLs 的整合遗传连锁图

Fig. 2 Integrated linkage map with RGAP, DGAP, DDRT markers and partial resistant QTLs

## 参考文献:

- [1] CHEN Xian-ming, Soria M A, Yan Gui-ping, et al. Development of sequence tagged site and cleaved amplified polymorphic sequence markers for wheat stripe rust resistance gene Yr5 [J]. *Crop Sci*, 2003, 43: 2058-2064.
- [2] PFLIEGER S, Palloix A, Caranta C, et al. Defense response genes co-localize with quantitative disease resistance loci in pepper [J]. *Theor Appl Genet*, 2001, 103: 920-929.
- [3] COLLINS N C, Webb C A, Seah S, et al. The isolation and mapping of disease resistance gene analogs in maize [J]. *Mol Plant Microbe Interact*, 1998, 11: 968-978.
- [4] RAMALINGAM J, Vera Cruz C M, Kukreja K, et al. Candidate defense genes from rice, barley, and maize and their association with qualitative and quantitative resistance in rice [J]. *Mol Plant Microbe Interact*, 2003, 16: 14-24.
- [5] HINCHLIFFE D J, Lu Ying-zhi, Potenza C, et al. Resistance gene analogue markers are mapped to homeologous chromosomes in cultivated tetraploid cotton [J]. *Theor Appl Genet*, 2005, 110: 1074-1085.
- [6] YAN Gui-ping, Chen Xian-ming, Line R F, et al. Resistance gene-analog polymorphism markers cosegregating with the Yr5 gene for resistance to wheat stripe rust [J]. *Theor Appl Genet*, 2003, 106: 636-643.
- [7] COLLINS N, Park R, Spielmeier W, et al. Resistance gene analogs in barley and their relationship to rust resistance gene [J]. *Genome*, 2001, 44: 375-381.
- [8] RADWAN O, Bouzidi M F, Vear F, et al. Identification of non-TIR-NBS-LRR markers linked to the P15/P18 locus for resistance to downy mildew in sunflower [J]. *Theor Appl Genet*, 2003, 106: 1438-1446.
- [9] FEUILLET C, Reuzeau C, Kjellbom P, et al. Molecular characterization of a new type of receptor-like kinase (wlrk) gene family in wheat [J]. *Plant Mol Biol*, 1998, 37: 943-953.
- [10] YAMAMOTO E, Knap H T. Soybean receptor-like protein kinase genes; paralogous divergence of a gene family [J]. *Mol Biol Evol*, 2001, 18: 1522-1531.
- [11] HE Li-mei, Du Chun-guang, Covaleda L, et al. Cloning, characterization, and evolution of the NBS-LRR-Encoding resistance gene analogue family in polyploid cotton (*Gossypium hirsutum* L.) [J]. *Mol Plant Microbe Interact*, 2004, 17: 1234-1241.
- [12] BAUER D, Muller H, Reich J, et al. Identification of differentially expressed mRNA species by an improved display technique [J]. *Nucleic Acid Research*, 1993, 21: 4272-4280.
- [13] 李玉京, 李子银, 李振声. 真核生物 mRNA 差显技术的研究进展 [J]. *生物技术通报*, 1998, 5: 23-30. LI Yu-jing, LI Zi-yin, LI Zhen-sheng. Advances in Eukaryotic mRNA differential display [J]. *Biotechnology Bulletin*, 1998, 5: 23-30.
- [14] 杜威世, 杜雄明, 马峙英. 棉花黄萎病抗性基因 SSR 标记研究 [J]. *西北农林科技大学学报: 自然科学版*, 2004, 32(3): 20-24. DU Wei-shi, DU Xiong-ming, MA Zhi-ying. Studies on SSR markers of resistance gene of *Verticillium* wilt in cotton [J]. *J of Northwest Sci-Tech Univ of Agri and For (Nat Sci Ed)*, 2004, 32(3): 20-24.
- [15] 房卫平, 许守明, 孙玉堂, 等. 棉花抗黄萎病的 RAPD 标记 [J]. *河南农业科学*, 2001 (9): 11-13. FANG Wei-ping, Xu Shou-ming, Sun Yu-tang, et al. The RAPD marker linked with *Verticillium* wilt resistance in cotton [J]. *Henan Agricultural Science*, 2001 (9): 11-13.
- [16] 高五千, 聂以春, 张献龙. 棉花黄萎病基因的 QTL 定位 [J]. *棉花学报*, 2003, 15(2): 73-78. GAO Yu-qian, Nie Yi-chun, Zhang Xian-long. QTL mapping of genes resistance to *Verticillium* wilt in cotton [J]. *Cotton Science*, 2003, 15(2): 73-78.
- [17] 王红梅, 张献龙, 贺道华, 等. 陆地棉对黄萎病抗性的分子标记研究 [J]. *植物病理学报*, 2005, 35(4): 333-339. WANG Hong-mei, Zhang Xian-long, He Dao-hua, et al. Detection of DNA markers associated with resistance to *Verticillium dahliae* in cotton [J]. *Acta Phytopathologica sinica*, 2005, 35(4): 333-339.
- [18] 甄 瑞, 王省芬, 马峙英, 等. 海岛棉抗黄萎病基因 SSR 标记研究 [J]. *棉花学报*, 2006, 18(5): 269-272. ZHEN Run, Wang Xing-fen, Ma Zhi-ying, et al. A SSR marker linked with the gene of *Verticillium* wilt resistance in *Gossypium barbadense* [J]. *Cotton Science*, 2006, 18(5): 269-272.
- [19] BOLEK Y, El-Zik K M, Pepper A E, et al. Mapping of *Verticillium* wilt resistance genes in cotton [J]. *Plant Sci*, 2005, 168(66): 1581-1590. ●