

文章编号:1674-7054(2010)04-0293-08

应用 SCAR 标记技术对苦丁茶炭疽病抗性进行早期鉴定的构想

李娟玲, 潘学峰, 刘国民

(海南大学 苦丁茶研究所, 海南 海口 570228)

摘要: 讨论了苦丁茶冬青的经济价值及其抗炭疽病育种的必要性和紧迫性; 论述了 RAPD-SCAR 和 AFLP-SCAR 双重分子标记对苦丁茶抗炭疽病育种的重要意义, 以及对苦丁茶冬青炭疽病抗性基因成功进行 SCAR 标记所必须完成的主要研究内容和必需解决的关键问题; 提出了研究方案, 并对其可行性进行了分析; 预测了此项研究工作的预期结果, 并就 RAPD-SCAR 和 AFLP-SCAR 双重分子标记技术应用于苦丁茶冬青的抗炭疽病育种工作的创新意义进行了探讨。

关键词: 苦丁茶冬青; 苦丁茶炭疽病; RAPD-SCAR; AFLP-SCAR

中图分类号: Q 78

文献标志码: A

1 苦丁茶冬青的经济价值及其抗炭疽病育种工作的紧迫性

“苦丁茶”是我国民间一大类传统代茶植物的统称。据统计, 在我国不同地区, 作为“苦丁茶”使用的原植物种类, 至少涉及 12 科 13 属, 共 30 余种(包括变种和变型)。其中在国内外影响较大的“苦丁茶”主要有两大类, 一类是以苦丁茶冬青(*Ilex kudingcha* C. J. Tseng)为代表的冬青科苦丁茶; 另一类则是以粗壮女贞[*Ligustrum robustum* (Roxb.) Blue.]为代表的木犀科苦丁茶。在所有的苦丁茶种类中, 又以苦丁茶冬青在全国的种植面积最大, 产量和价格均居各类苦丁茶之首。因而, 以苦丁茶冬青的嫩芽制备的苦丁茶产品, 在国内外影响较大, 已远销十几个国家和地区^[1-16]。

任何一种农作物, 无论采取任何一种育种手段, 育种材料和由其所培育出的品系或品种对该种作物之主要病害的抗性始终是育种工作者所必须关注的重要目标性状之一, 甚至是决定育种工作成功与否的关键。就苦丁茶冬青而言, 对产量和品质影响最严重的病害是苦丁茶炭疽病, 该病害由刘国民等首次报道^[9]。苦丁茶炭疽病由苦丁茶炭疽病菌所引致, 经原中国植物病理学会真菌专业委员会主任张中义教授鉴定为一个新种, 并命名为 *Colletotrichum illicis-kudingchae* G. M. Liu et Z. Y. Zhang, 是目前苦丁茶冬青种植业中最严重的病害。不同基因型的苦丁茶种质材料对苦丁茶炭疽病的抗性存在极大的差异, 据刘国民等人的多年观察, 部分基因型对于该病几乎是“免疫的”, 即几乎任何生长发育阶段在植株的叶片上均找不到一个病斑; 而另一些基因型则是高感的, 每年发病高峰期, 几乎在植株上找不到一个无病斑的健康叶片。目前, 生产上种植的苦丁茶冬青种苗至今尚无一个经省级或省级以上农作物品种审定机构进行过技术鉴定的定型品种, 通常是直接从野生植株上取枝条剪成插穗进行扦插育苗, 并再经多代扦插繁育; 或者, 从野生植株上获取果实, 取其中种子繁育成实生苗, 再将实生苗多代扦插繁育。正因为如此, 如果提供插穗或种子的母树是一种对炭疽病高感的基因型材料, 由此繁育出来的种苗大都是对炭疽病高感的种苗群体。这类种苗经定植后, 会在生产上造成极大的损失。总之, 尽快培育出高产、优质和对炭疽病高抗

收稿日期: 2010-11-05

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30960096)

作者简介: 李娟玲(1972-), 女, 湖南祁东人, 海南大学苦丁茶研究所高级实验师, 硕士。

通信作者: 刘国民(1955-), 男, 湖南祁东人, 教授, 博士, 博士生导师. E-mail: 13005082258@163.com

的苦丁茶冬青品种,已成为苦丁茶育种工作者的当务之急。

2 RAPD-SCAR 和 AFLP-SCAR 双重分子标记技术对苦丁茶抗炭疽病育种的重要意义

如采用传统的杂交育种方法对苦丁茶冬青进行抗炭疽病育种,将会面临诸多困难。首先,苦丁茶冬青是一种多年生大型乔木,其实生苗或组培苗从定植到初次开花至少经历 6 个年头,且幼龄阶段或成龄期每年的无花无果季节中均没有任何特殊的形态特征指示其性别。因此,在幼龄阶段或每年的无花无果的季节中就无法确定杂交亲本。其次,就苦丁茶冬青抗炭疽病育种而言,如采用传统的方法对育种材料的炭疽病抗性进行鉴定,则其结论往往会受到许多条件的限制:例如,在一年之中的不同季节,炭疽病的发病指数往往存在显著差异;同一基因型对炭疽病的抗性与植株或其叶片的发育阶段密切相关;进行抗病鉴定时必须限定在一定区域内进行,而且需要比较严格的实验条件支撑,结果才能准确可靠;野外环境的不可控变化往往会影响到鉴定结果的准确性。因此,在苦丁茶冬青的育种实践中,欲把“对炭疽病高抗”作为一个重要的目标性状来考虑,如采取传统的杂交育种方法,则是一件十分耗时(需数十年甚至逾百年)而且手续十分繁杂的艰巨工作。

分子标记技术可以为苦丁茶冬青的育种工作提供强有力的辅助工具,可以弥补传统的抗性鉴定的某些不足,并可大大加快育种进程。利用密切关联的分子标记完全有可能在短时间内对不同基因型的苦丁茶冬青幼苗之炭疽病抗性进行早期鉴定。

基于基因或基因组差异的分子标记技术对育种材料之目标性状所进行的早期鉴定是最为准确可靠的。目前,发展得比较成熟、而且应用较普遍的分子标记技术已有多种,包括 RAPD (随机扩增多态性 DNA, Random Amplified Polymorphic DNA), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism, 扩增片段长度多态性), RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism, 限制性片段长度多态性), SSR (Simple Sequence Repeat, 简单序列重复区间), SRPA (Sequence-Related Amplified Polymorphism, 相关序列扩增多态性),以及由 Paran 等^[23]发展起来的一种新型的分子标记 SCAR (Sequence Characterized Amplified Regions, 特征序列扩增区域)等。这些分子标记方法均已被证明是鉴定物种或同一物种不同基因型之间的某些特定性状标记的良好方法。但在应用到具体的研究对象和不同的研究目的时,又各有其优缺点,或各有其的局限性。

为了弥补某一种分子标记技术的弱点,笔者认为,在研究苦丁茶冬青的炭疽病抗性的早期鉴定时,可以采用双重分子标记(Dual Molecular Marker)。所谓双重分子标记,就是在研究生物的某一种性状的分子标记时,首先采用一种相对复杂的分子标记技术(包括 RAPD, RFLP, AFLP 以及 SRAP 等等),找出与该性状决定基因密切关联的分子标记(特异条带),然后将这种特异条带进行回收、克隆和测序,并根据测序结果,在两端序列的原引物上延长 18 ~ 25 bp,设计出一对较长的特异引物以提高退火温度,增强反应的严谨性和可重复性,进而以新设计出的特异引物进行 PCR 扩增,将第一种标记方法所获得的特异标记转化为另一种只检测单一带型,而且可转化为共显性的,操作简便快速,实验成本低廉,适合大批量样品检测,在生产上有推广应用前景的新型分子标记技术(例如 SCAR 标记或 STS 标记)。

以 RAPD-SCAR 为例,RAPD 是一种以 PCR 为基础的分子标记技术,它利用人工合成的较短的随机系列寡聚脱氧核酸片段作为引物,对基因组 DNA 进行扩增而显示多态性的 DNA 图谱,RAPD 技术具有快速、简便、灵敏度高、实验成本低廉以及引物的通用性强等优点;但同时,用于 RAPD 对反应条件较为敏感,重复性较差,故在应用上受到限制^[17-22]。SCAR 标记是在 RAPD 标记的基础上发展起来的。在 SCAR 标记中,它需将扩增的 RAPD 特异片段克隆、测序,再根据两端序列在原引物基础上延长 18 ~ 25 bp,从而设计出特异引物进行 PCR 扩增。与 RAPD 标记相比,SCAR 标记所用的特异引物比 RAPD 的随机引物延长了十几个碱基,提高了退火温度和反应的严谨性,检测的带型为单一带,而且可以转化为共显性标记。因此,RAPD-SCAR 复合标记技术,目前在分子辅助选择育种研究领域得到了比较普遍的关注与应用^[23-28]。

AFLP 分子标记技术是由荷兰 Keygene 公司 Zabeau 等人发展起来的一种新型的 DNA 指纹技术^[29-30]。它的基本原理是基于 PCR 技术扩增基因组 DNA 的限制性片段,先利用两种限制性内切酶切割目的基因组 DNA,形成具有不同酶切末端的限制性内切片段,然后在所得的酶切片段上加双链接头,作为 PCR 扩增时引物的结合区。AFLP 的引物序列包括核心序列、酶切识别序列和选择性碱基。用选择性引

物对酶切片段进行 PCR 扩增后,通过变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测扩增片段的多态性。AFLP 是在 RFLP 和 RAPD 的基础理论上发展起来的,它是 RFLP 和 RAPD 的结合,但不是简单的技术嫁接,而是克服了两者各自的缺点,集中了两者的优点。AFLP 既具有 RFLP 可靠性好、重复性高的特点,同时又具有 RAPD 的高效性、安全性和方便性等优点。AFLP 不需要了解基因组信息,且只需少量纯化的基因组 DNA 即可对整个基因组 DNA 酶切片段进行选择性的扩增^[30~36]。因此,AFLP 被认为是一种十分理想、有效和非常先进的一种分子标记技术。但 AFLP 也不是完美无缺的,例如,这种分子标记方法所需的化学试剂和仪器设备均比较昂贵,操作技术要求严格,不适合大批量样品的检测等。

AFLP-SCAR 双重分子标记技术则在 AFLP 的基础上更前进了一步。与上述的 RAPD-SCAR 双重分子标记中的情况相类似,它首先需要进行 AFLP 标记以获得特异条带,然后将特异条带进行回收和克隆(PCR 扩增),继而将与目标性状密切关联的 AFLP 标记转化为操作简便和表现稳定的 SCAR 标记。

国内外应用 AFLP-SCAR 双重分子标记技术已取得了不少研究成果。例如,Che Kepen 等人在西瓜核心种质的 AFLP 指纹图谱的研究中,已成功地将重要抗病种质材料“P I 296341”的 AFLP 特异带转化成了生产上可以直接利用的 SCAR 标记^[37];王彩虹等人将苹果柱型基因的一个 AFLP 标记成功转换成了简单实用的 SCAR 标记^[38];娄群峰等将黄瓜全雌性基因连锁的 AFLP 标记成功地转达化为操作简便、表现稳定的 SCAR 标记,并将该标记命名为 SA₁₆₆^[39]。

总之,采用双重分子标记技术(RAPD-SCAR 和 AFLP-SCAR)对苦丁茶冬青育种材料的炭疽病抗性进行早期鉴定和筛选,就可以大大提高选择效率,缩短育种周期。如再结合组培快繁或扦插育苗等手段,就可以在较短的时间内培育出一个比较理想的苦丁茶冬青抗炭疽病优良无性品系供生产上推广种植。

3 主要研发内容及需要解决的关键问题

3.1 主要研发内容

3.1.1 针对苦丁茶冬青炭疽病抗性早期鉴定的 RAPD-SCAR 和 AFLP-SCAR 两种双重分子标记技术的开发 首先,要在人工接种鉴定的基础上,结合在资源圃中对苦丁茶冬青炭疽病发病指数观察记载结果,初步筛选出一批极端类型的高抗型种质材料和高感型种质材料,作为本课题的供试植物材料。然后,利用这批材料,通过 RAPD 分析和 AFLP 分析,分别找出与苦丁茶炭疽病抗性基因密切关联的 RAPD 特异分子标记(特异条带),以及与苦丁茶炭疽病抗性基因密切关联的 AFLP 特异分子标记(特异条带),再将这两种特异条带分别进行回收、克隆和测序,并根据测序结果分别设计出比原引物长 18~25 pb 的特异 SCAR 引物,再进一步分别以这些特异引物进行 PCR 扩增,将原先已找出的与苦丁茶炭疽病抗性基因密切关联的 RAPD 特异分子标记和 AFLP 特异分子标记,分别转化为相应的 SCAR 特异分子标记。这种特异的 SCAR 分子标记所检测的是单一带型,操作快速简便,稳定性和可重复性均较高,实验成本低廉,适合在生产上对大批量的检测样品进行炭疽病抗性的早期鉴定。

3.1.2 SCAR 标记的准确性检测 在 RAPD-SCAR 和 AFLP-SCAR 两种针对苦丁茶炭疽病抗性早期鉴定的双重分子标记方法成功地被开发出来之后,可以将两种方法的研究结果进行比较,相互印证。与此同时,一项重要的研究内容就是,需对所获得的两种不同的 SCAR 分子标记进行准确性的实际检测。

利用在构建高抗型 DNA 池和高感型 DNA 池之前,通过人工接种鉴定(并结合历年观察记载)所筛选出来的抗病种质材料和感病种质材料作为 SCAR 标记准确性检测的供试植物材料。

3.2 需要解决的关键问题 本课题中最主要的研究内容是苦丁茶冬青之炭疽病抗性的早期鉴定问题。围绕着该问题的解决,笔者提出,可以采用 RAPD-SCAR 和 AFLP 两种技术手段来实现这一目标。从实验程序上分析,这两种双重分子标记技术能否取得圆满成功,主要取决于以下 2 个关键的技术环节:

1) 怎样获得与苦丁茶炭疽病抗性基因密切关联的 RAPD 特异分子标记,并将其成功地转化为特异的 SCAR 分子标记?

2) 怎样获得与苦丁茶炭疽病抗性基因密切关联的 AFLP 特异分子标记,并将其成功地转化为 SCAR 标记?

以上 2 个难度较大的技术环节的突破虽受到诸多因素的影响,但其中最为重要的是要选用适当的引物。如果没有适当的引物,其他实验条件再适宜,也不能扩增出特异 RAPD 分子标记和 AFLP 标记。因而,随后的“转化成 SCAR 标记”也就无从着手。

考虑到不同物种之间,同类性状(例如对某种病的抗性)的决定基因有可能存在同源性,故在具体实施研究工作时,应该尽可能详尽地索引和查阅相关的文献资料,尽可能多地尝试前人在其他植物中炭疽病(或其他病害)抗性基因进行 RAPD, AFLP 和 SCAR 标记时已获得成功的实例中所采用的那些引物(或引物系列),以减少盲目性,提高获得成功的几率。

此外,在获得特异的 RAPD 分子标记(RAPD 特异片段)或特异的 AFLP 分子标记(AFLP 特异性片段)之后,特异性片段的测序以及特异的 SCAR 引物的设计也是非常重要的,这一步是能否将 RAPD 标记(或 AFLP 标记)成功地转化为 SCAR 标记的关键。可将所获得的各种特异性片段委托专业的测序机构测序;SCAR 引物的设计时可使用软件 Primer Premier 5.0,直接将整理好的片段序列输入,按程序说明进行设计,并选择最佳引物对。

3.3 拟实现的研究目标 上述拟采用的两种双重分子标记技术(RAPD-SCAR 和 AFLP-SCAR),均要求要获得与苦丁茶炭疽病抗性基因紧密连锁的特异分子标记(RAPD 特异标记和 AFLP 特异标记),并要求能够成功地转化为 SCAR 标记;经人工接种鉴定筛选出的高抗型种质材料和高感型种质材料进行实际检测,准确率要求达到 90% 以上。如能实现这一研究目标,即可认为是已发展出一套操作快速简便,实验成本低廉,结果准确可靠的 SCAR 分子标记技术;这种技术可以用来在苦丁茶冬青的抗炭疽病育种工作中对大批量育种材料的炭疽病抗性进行早期鉴定,筛选出符合育种目标要求的高抗育种材料,并及时淘汰感病材料,从而加快育种进程。

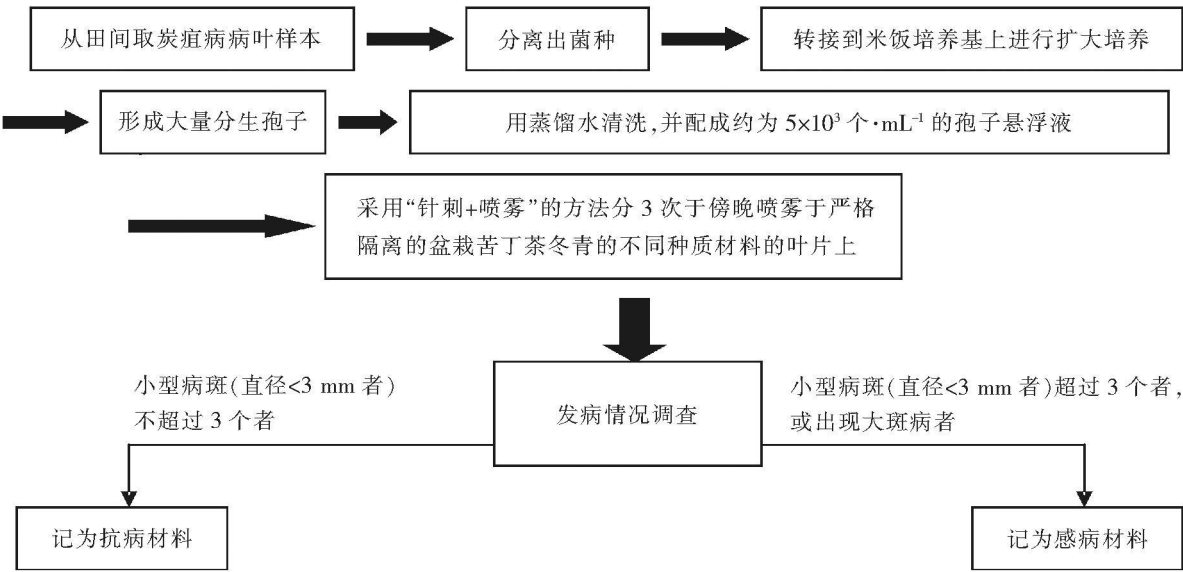
此外,鉴于目前生产上尚缺乏定型的苦丁茶冬青栽培品种,种植者大都是从野生(或栽培)的母树上直接采枝进行扦插育苗的现状,在扦插育苗之前,可以对提供插穗的母树逐株进行炭疽病抗性的 SCAR 分子标记检测,以确认哪些母树是高抗炭疽病的,哪些母树是易感炭疽病的。这可以避免在易感炭疽病的植株上取插穗育苗,从而在生产上可以大大减轻炭疽病对苦丁茶冬青的危害。

总之,无论是采用 RAPD-SCAR 还是采用 AFLP-SCAR 进行炭疽病抗性的早期鉴定,拟开发出的 SCAR 分子标记技术均要求达到“操作快速简便,成本低廉,检测结果可靠,并可以在生产实践中推广应用”的标准。

4 拟推荐的研究方案及其可行性分析

4.1 拟推荐的研究方案

4.1.1 苦丁茶冬青炭疽病菌分离与供试种质材料的抗病性鉴定

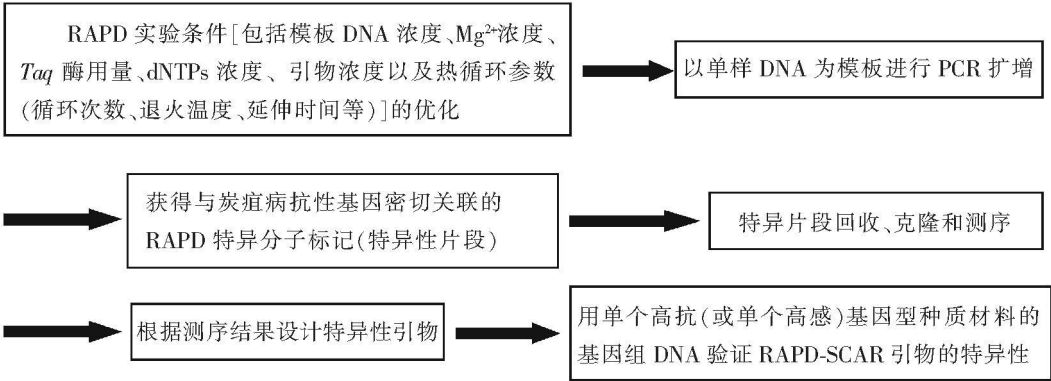


4.1.2 基因组 DNA 提取与 DNA 池(DNA pool)构建 苦丁茶冬青种质材料经上述方法进行抗性鉴定后,分别取 20 份以上的极端类型的高抗炭疽病基因型的种质材料提取基因组 DNA,以制备单个的高抗 DNA 样品;另分别取 20 份以上的极端类型的高感炭疽病基因型的种质材料提取基因组 DNA,以制备单个的高感 DNA 样品。然后,取 10 份高抗基因型的单个 DNA 样品等量混合,组成高抗性 DNA 池;另取 10 份高感基因型的单个 DNA 样品等量混合,组成高感型 DNA 池。这两种不同的 DNA 池可以为 RAPD-SCAR 和

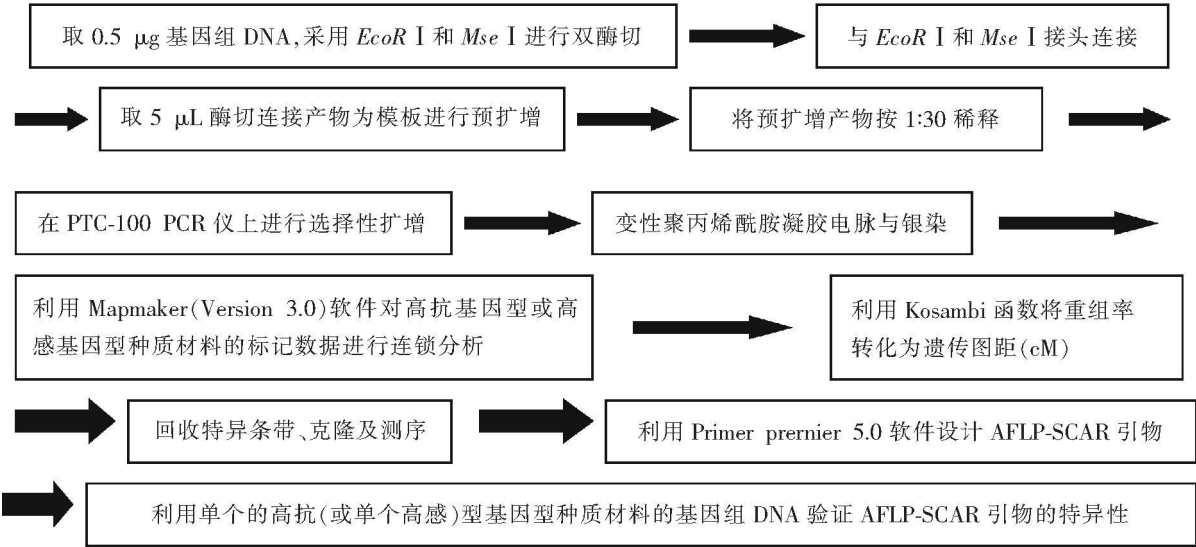
AFLP-SCAR 双重分子标记分别提供具有相同遗传背景的高抗型 DNA 样品和高感型 DNA 样品。

4.1.3 RAPD-SCAR 和 AFLP-SCAR 的实验程序

4.1.3.1 与炭疽病抗性基因密切关联的 RAPD-SCAR 双重分子标记的实验程序



4.1.3.2 与苦丁茶炭疽病抗性基因密切关联的 AFLP-SCAR 双重分子标记的实验程序



4.2 研究方案的可行性分析 拟推荐的研究方案中所采用的核心技术主要是 RAPD, AFLP 和 SCAR 3 种分子标记技术手段,这些技术手段目前均已发展得比较成熟,应用成功的实例有很多报道。其中 SCAR 标记是在 RAPD, AFLP 和 RFLP 标记的基础上,特别是 RAPD 的基础上发展起来的,即先通过 RAPD, AFLP 或 RFLP 标记分别获得与某种性状决定基因连锁的特异 RAPD, AFLP 或 RFLP 分子标记(特异条带),然后将特异条带回收、克隆和测序,根据测序结果设计特异的 SCAR 引物,并利用这种特异的 SCAR 引物进行 PCR 扩增,获得一种反应更为灵敏、稳定可靠、操作简便,只检测单一带型,实验成本非常低廉的特异 SCAR 标记。

从理论上说,既然前人在其他植物中应用 RAPD-SCAR 和 AFLP-SCAR 技术分别对抗病基因进行分子标记均能取得成功,如果将其用来分别标记苦丁茶冬青的炭疽病抗性基因,也是可以取得成功的。本文拟推荐的研究方案,既充分考虑了前人已发表的 RAPD, AFLP 和 SCAR 分子标记技术的核心内容,也参考了前人应用 RAPD-SCAR 和 AFLP-SCAR 技术在抗病基因标记时已取得成功的实例中某些值得借鉴的操作方法或程序,同时又考虑了苦丁茶冬青自身的某些特点(例如多年生大型乔木以及对炭疽病的抗性存在极端高抗和极端高感 2 种类型),根据笔者以往的一些工作积累和经验,对实验方法和程序作了一些调整。因此,根据以上分析,笔者认为,拟推荐的研究方案应该是切实可行的。

5 讨 论

5.1 预期的研究结果 按照笔者拟定的技术方案,可取得以下研究结果。

1) 预期 AFLP-SCAR 标记的难度比 RAPD-SCAR 标记的难度要大一些。前人的研究已经指出, AFLP 的特异标记转化为 ACAR 标记的成功率比较低^[38],但是也还是有不少成功的实例^[37-39]。因此,预期在将与炭疽病抗性基因密切关联的 AFLP 特异标记在转化为 SCAR 标记时,可能会遇到较大困难。

2) 在应用已知的高抗型或高感型的种质材料对研究过程中所获得的 SCAR 标记进行实际检测时,预期与炭疽病抗性基因密切关联的 SCAR 标记(包括 RAPD-SCAR 和 AFLP-SCAR)的检测结果中,可能会有 $\leq 10\%$ 的种质材料在检测中出现检测结果与预期不符的情况,即约有 $\leq 10\%$ 的种质材料在检测中可能不会出现某条 SCAR 特征带。Patridge N G^[23]和 Horvath D P 等^[40]在大麦中, Miklas P N 等^[41]在菜豆中均已发现了此类情况。我国学者邹继军等人在大豆中也发现了类似的情况^[42]。通常认为,出现这类情况的原因可能有 2 个方面:一是由于 SCAR 标记与该被标记的基因之间在某些材料中出现了重组;二是由于抗性材料的来源不同,它们中的某一部分材料的抗性有可能是由不同基因所控制的,故导致这种被标记的抗病基因的 SCAR 标记在部分特定来源的材料中,其检测结果与预期不符,即在这类特定来源的种质材料中,不会出现 SCAR 特征条带。

据笔者对全国苦丁茶种质资源普查的结果,以及对收集和保存于海南大学苦丁茶种质资源库的苦丁茶种质材料多年的观察记录的情况来看,我国苦丁茶冬青的野生种质材料,大致上可以根据起源地域划分为海南岛居群(全岛),广西马山地区居群(数县),广西大新地区居群(数县),广东大埔地区居群,广东英德地区居群,以及广东清新地区居群等几大居群;不同居群的种质材料不仅形态特征上存在较大差异,而且在炭疽病抗性方面也存在较大差异。因此预测,很有可能其中的某一个或几居群的种质材料,其对苦丁茶炭疽病的抗性是由不同基因所控制,也有可能就会导致这一部分种质材料在检测时,不会出现 SCAR 特征条带的结果。

3) 只要在上述两种双重分子标记技术中有一种方法能成功地转化为 SCAR 标记,就可以研发出一套成本低廉,操作简便,适合大批量样品检测的分子标记技术,用于苦丁茶冬青苗期的抗病性(抗炭疽病)早期鉴定,从而大大加速育种进程,建立一套高效、快捷的分子辅助育种技术体系。

5.2 关于苦丁茶冬青抗炭疽病育种工作应用 RAPD-SCAR 和 AFLP-SCAR 双重分子标记技术的创新意义 作为一种分子辅助育种手段,在苦丁茶冬青的抗炭疽病育种工作中,采用 RAPD-SCAR 和 AFLP-SCAR 两种双重分子标记技术,至少在以下 2 个方面具有重要的创新意义。

1) 冬青属苦丁茶在历史上曾几近失传^[11,14-16],被挖掘出来并加以开发利用的历史不长(20 世纪 80 年代初期开发)。因此,尽管这种植物具有极高经济价值,但由于历史的原因,人们对它的基础研究及应用研究均尚处于起步的阶段。就分子标记方面来说,目前仅有刘国民及其同事在承担前一个国家自然科学基金资助项目时,才开始应用 RAPD 技术和 ISSR 技术在冬青属苦丁茶种质资源的遗传多样性与分类地位方面作了一些工作。笔者提出拟综合运用 RAPD-SCAR 和 AFLP-SCAR 双重分子标记技术,探索多年生大型乔木——苦丁茶冬青的炭疽病抗性的早期鉴定问题,这不仅在苦丁茶冬青的育种方面尚属首次,而且对于其他多年生林木的育种工作具有重要的参考价值。因而,该项工作具有重要的创新意义,值得深入探索。

2) 由于苦丁茶冬青本身的特点(多年生乔木、雌雄异株、性成熟历期长等),如采用常规的育种方法,不仅占地多,手续极为繁杂,而且极为费时。利用与抗病基因密切关联的分子标记在苗期对育种材料进行早期鉴定,可以及早淘汰与育种目标不符的材料,从而大大加速育种进程。

但是,如采用单一的 RAPD 标记技术,由于 RAPD 标记是用 10 个碱基的随机引物进行 PCR 扩增得到的,对反应条件(包括反应体系各组分的相对含量以及循环程序)的变化很敏感,因而重复性差;如单一地采用 AFLP 标记技术,又具有实验成本高,风险大,操作技术要求严格,实验设备和条件要求高等特点,难以在大批量材料的抗病性鉴定时推广应用,更难以直接应用于生产实践。笔者提出拟采用 RAPD-SCAR 和 AFLP-SCAR 双重分子标记技术,即首先采用 RAPD 技术或 AFLP 技术找出 RAPD 特异条带,然后将其转化为特异的 SCAR 标记。这种 SCAR 标记具有操作简便(在实际应用时,只需关注 SCAR 标记,无需再进行 RAPD 或 AFLP 的 PCR),实验成本低廉,标记结果准确可靠等优点。因为 SCAR 标记技术提高了退

火温度和反应的严谨性,而且所检测的带型为单一带,并可转化为共显性标记。这项工作对苦丁茶冬青方面尚属首次。

参考文献:

- [1] 刘国民. 中国木犀科代茶植物的多样性与开发状况[J]. 贵州科学, 2003, 21(2): 69 – 77.
- [2] ZHENG Dao-jun, LIANG Yuan-fa, LIU Gou-min, et al. RAPD Analysis of Germplasm Resources of Kudingcha Species in Oleaceae[J]. Agricultural Sciences in China, 2009, 8(7): 784 – 792.
- [3] 张凤琴, 刘国民, 周鹏, 等. 用 RAPD 技术探讨冬青属苦丁茶的遗传差异、亲缘关系与分类地位[J]. 云南植物研究, 2004(6): 637 – 644.
- [4] 张凤琴, 徐立新, 周鹏等. 苦丁茶冬青的 RAPD 影响因素及实验条件的优化[J]. 云南植物研究, 2003, 25(3): 347 – 353.
- [5] 史学群, 刘国民, 徐立新, 等. 冬青属苦丁茶不同种质材料之过氧化物酶同工酶和酯酶同工酶研究初报[J]. 贵州科学, 2003, 21(3): 46 – 50.
- [6] 付乾堂, 张桂和, 刘国民, 等. 冬青属苦丁茶不同种质材料的过氧化物酶同工酶研究[J]. 贵州科学, 2004, 22(3): 67 – 76.
- [7] 刘国民, 李娟玲, 陈榆, 等. 我国苦丁茶冬青种质材料的形态学研究I. 茎叶的形态学研究[J]. 贵州科学, 2004, 22(3): 9 – 23.
- [8] LIU Guo-min. A Study on the Homonym of the Kudingcha Resources in China [J]. In Research and Development of Tropical Biological Resources, 2002(1): 1 – 5.
- [9] 刘国民, 刘媛, 付乾堂, 等. 苦丁茶炭疽病菌一新种[J]. 云南农业大学学报, 2004, 19(5): 553 – 555.
- [10] 刘国民, 李娟玲, 彭超, 等. 苦丁茶液插繁殖技术的研究[J]. 贵州科学, 2001, 19(3): 25 – 33.
- [11] 刘国民. 浅议新资源食品与苦丁茶产品的卫生管理[J]. 热带林业, 1999, 27(3): 126 – 134.
- [12] 刘国民. 苦丁茶扦插繁殖的研究[J]. 海南大学学报: 自然科学版, 1998, 16(1): 69 – 75.
- [13] 刘国民, 陈秀蕙, 李任珠, 等. 苦丁茶树茎段离体培养的研究[J]. 海南大学学报: 自然科学版, 1997, 15(4): 291 – 297.
- [14] 刘国民. 话说绿色黄金[J]. 热带林业, 1997, 25(1): 37 – 39.
- [15] 刘国民. 海南岛野生苦丁茶树的发现及其植物学特征特性的观察[J]. 海南大学学报: 自然科版, 1997, 15(2): 192 – 133.
- [16] 刘国民. 绿色黄金苦丁茶[J]. 植物杂志, 1997, 136(2): 15.
- [17] KAYA Z. Utility of Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for linkage mapping in Turkish Red Pine (*Pinus brutia* ten) [J]. Silvae Genetica 1995, 44: 110 – 116.
- [18] IQBAL M J. Genetic diversity evaluation of some elite cotton varieties by RAPD analysis [J]. Theor Appl Genet, 1997, 94: 139 – 144.
- [19] WEIJ Z. Genetic variability in Russian Wildrye (*Psathyrostachys juncea*) assisted by RAPD [J]. Genetic Resource and Crop Evolution, 1994, 44: 117 – 125.
- [20] JARRET R L. Genetic diversity and systematic relationships in sweet potato, and related species as revealed by RAPD analysis [J]. Genetic resources and Crop Evolution, 1994, 41: 165 – 173.
- [21] MILLIAN T. Using RAPDS to study phylogenetic relationships in Rosa [J]. Theor Appl Genet, 1996, 92: 273 – 277.
- [22] CASTIGLIONE S. RAPD Fingerprints for identification and for taxonomic studied of elite poplar (*Populus* spp.) clones [J]. Theor Appl Genet, 1993, 87: 54 – 59.
- [23] PARRET P, DEIOUME R, FEISSET N, et al. Development of a SCAR (Sequence characterized amplified region) marker for molecular tagging of the dwarf BREIZH (Bzh) gene in *Brassica napus* L [J]. Theor Appl Genet, 1998, 97: 820 – 823.
- [24] PATRIDGE N G, COLLINS N C, BENDAHMANE A, et al. Development of YLM, a codominant PCR maker closely linked to the YDZ gene for resistance to barely yellow dwarf disease [J]. Theor Appl Genet, 1998, 96: 1170 – 1177.
- [25] PARAN I, MIEHELMORE R W. Development of a sequence characterized amplified region (SCAR) based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce [J]. Theor Appl Genet, 1993, 85: 985 – 993.
- [26] OHMORI T, MURADA M, MOTOYOSHI F. Molecular characteristics of RAPD and SCAR makers linked to the Tm – 1 locus in tomato [J]. Theor Appl Genet, 1996, 82: 151 – 156.
- [27] DEDRYVER F, JUBIER M F, THOUVENIN J, et al. Molecular makers linked to the leaf rust resistance gene L-24 in different sheat cultivars [J]. Genome, 1996, 39: 830 – 835.
- [28] KAWCHUK L M, HACHEY J, LYNCH D R. Development of sequence characterized DNA makers linked to a dominant verticillium wilt resistance gene in tomato [J]. Genome, 1998, 41: 91 – 95.
- [29] ZABEAU M, VOS P. Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting: Europe, 924026297 [P]. 1992.
- [30] VOS P, HOGERS R, BLEEKER R. et al. AFLP: A New Technique for DNA fingerprinting [J]. Nucleic Acids Research,

- 1995, 23(21): 4407–4414.
- [31] 伊冬明, 黄敏仁. AFLP 分子标记及其在植物育种上的应用[J]. 生物工程进展, 1997, 17(1): 6–12.
- [32] 王斌, 翁曼丽. AFLP 的原理及其应用[J]. 杂交水稻, 1996, (5): 27–30.
- [33] 翁跃进. AFLP—1 种 DNA 分子标记新技术[J]. 遗传, 1996, 18(6): 29–31.
- [34] 翁曼丽, 谢伟武, 伏健民, 等. 新一代分子标记技术—ALFP[J]. 应用与环境生物学报, 1996, 2(4): 424–429.
- [35] 吴敏生, 戴景瑞. 扩增片段多态性(AFLP)—1 种新的分子标记技术[J]. 植物学通讯, 1998, 15(4): 68–74.
- [36] 邹喻苹, 葛颂, 王晓东. 系统与进化植物学中的分子标记[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [37] CHE Ke-pen, XU Young, LIANG Chun-yang, et al. AFLP Fingerprint and SCAR Marker of Watermelon Core Collection [J]. Acta Botanica Sinica, 2003, 45(6): 731–735.
- [38] 王彩虹, 王倩, 戴供义, 等. 苹果柱型基因 Co 的一个 AFLP 标记的 SCAR 转换[J]. 园艺学报, 2002, 29(2): 100–104.
- [39] 娄群峰, 陈劲枫, JOHN M, 等. 黄瓜全雌性基因连锁的 AFLP 和 SCAR 分子标记[J]. 园艺学报, 2005, 32(2): 23–26.
- [40] HORVATH D P, DEHLEEN L S, STEBBING J, et al. Co-dominant PCR-based marker for assisted selection of durable stem rust resistance in barely[J]. Crop Sci, 1995, 35: 1445–1450.
- [41] MIKLAS P N, STAVELY J R, KELLY J D. Identification and potential use of a molecular marker for rust resistance in common bean[J]. Theor Appl Genet, 1993, 85: 745–749.
- [42] 邹继军, 杨庆凯, 陈爱宜, 等. 大豆灰斑病抗病基因 RAPD 标记的分子特征及抗、感种质的 SCAR 标记鉴定[J]. 科学通讯, 1999, 44(23): 2544–2550.

Early Identification of Anthracnose Resistance in *Kudingcha colletotrichum* (*Colletotrichum illicis-kudingchae*) by SCAR Mark

LI Juan-ling, PAN Xue-feng, LIU Guo-min

(Institute of Kudingcha, Hainan University, Haikou, 570228, China)

Abstract: In the paper, the economic value of *Ilex kudingcha* C. J. Tseng was discussed and the necessity and urgency of its anthracnose resistant breeding to *Colletotrichum illicis-kudingchae* were elucidated; the significance of the Dual Molecular Marker, i. e. RAPD-SCAR and AFLP-SCAR, to the resistant breeding to *Colletotrichum illicis-kudingcha* were introduced, and the research strategy for the key problems which must be solved so that the resistibility could be successfully marked by SCAR were proposed and the feasibility were analyzed; the results of this project were anticipated and the creative significance of the application of the dual Molecular Mark, i. e. , RAPD-SCAR and AFLP-SCAR, in the resistant breeding to *Colletotrichum illicis-kudingchae* C. J. Tseng. were also discussed.

Key words: *Ilex kudingcha* C. J. Tseng; *Colletotrichum illicis-kudingchae*; RAPD-SCAR; AFLP-SCAR