DOI:10.15886/j.cnki.rdswxb.2013.01.006

文章编号: 1674 - 7054(2013) 01 - 0025 - 06

与苦丁茶炭疽病抗性基因连锁的 RAPD 标记

翟丽艳,李娟玲, 刘国民,谢 俊,罗轶奇,成善汉,潘学峰
(海南大学 苦丁茶研究所,海南 海口 570228)

摘 要: 为了研发出与苦丁茶炭疽病抗性基因紧密连锁的 RAPD-SCAR 特异标记,本研究中首先利用 92 条 RAPD 随机引物对苦丁茶冬青中已知对炭疽病高抗或高感的不同种质材料进行 RAPD 分析,并从中寻找到 4 个与苦丁茶炭疽病抗性基因紧密连锁的 RAPD 特异标记特异性片段 S69 - 300,S227 - 300,S227 - 2000 和 S247 - 400。后续的研究可对这些 RAPD 特异片段进行回收,扩增和测序,并将测序结果作为开发与苦丁茶炭疽病抗性基因紧密连锁的 SCAR 标记的基础。

关键词: 苦丁茶冬青; 苦丁茶炭疽病; RAPD
中图分类号: Q 943. 2 **文献标志码:** A

苦丁茶冬青(*Ilex kudingcha* C. J. Tseng) 是"茶药两用"植物,其嫩芽和老叶均可用于制备代茶饮品"苦丁茶",或作为降脂降压和消炎解暑的中药材使用[1-4]。在所有的苦丁茶种类中,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。用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[3-18]。该树种为多年生常绿阔叶树,其整个树体、花序和果实均具有良好的观赏价值。此外,它还是一种珍贵的园林绿化树种,既可作为人道树植于公园或庭院的两旁,亦可定植于回车道或花坛作为中心树。目前,生产上对苦丁茶冬青的产量和品质影响最严重的病害是苦丁茶炭疽病,该病害的病原由刘国民等人首次分离、鉴定和报道[12]。选育高抗苦丁茶炭疽病且优质高产的品种是苦丁茶育种工作者的当务之急。但是传统的杂交育种方法存在费时费力和选择效率低下等问题,尤其是像苦丁茶冬青这类雌雄异株的多年生大型乔木,要通过传统的杂交育种方法培育出一个高抗某种主要病害且优质高产的定型品种更是难上加难。如果针对某种主要病害建立一种技术体系,应用该技术体系可以快速、准确地检测出易感病的育种材料并加以淘汰,且保留有价值的抗病品系,则可以大大地加速育种进程[19]。近年来兴起的分子标记辅助选择技术(Marker assisted Selection, MAS) ,因其可以实现对基因型进行直接选择,故为建立一种快速、准确的检测植物病害的技术体系提供了可能。其中 RAPD-SCAR 分子标记技术就是分子标记辅助选择技术中的一种有效和常用的手段之一。所谓 RAPD-SCAR,即首先采用 RAPD 技术(Random Amplified Polymorphic DNA) 获得与苦丁茶炭疽病抗性基因紧密连锁的特异性 RAPD 标记(特异性 RAPD 片段) ,然后将这些特异性片段分别进行回收、克隆和测序,并根据特异结果设计出特异的 RAPD-SCAR 引物,再分别用这些特异的 RAPD-SCAR 引物进行 PCR 扩增,获得相应的 RAPD-SCAR 标记。这种特异的 RAPD-SCAR 标记检测的是单一型带,操作简便,稳定性和可重复性高,检验成本低廉,适合育种实践中对大批量的苦丁茶冬青育种材料的炭疽病抗性进行早期鉴定,从而尽早确定其炭疽病抗性强弱,以便尽早地淘汰与育种目标不相符的育种材料,从而大大加快苦丁茶冬青的育种进程。本文报道若干与苦丁茶冬青炭疽病抗性基因连锁的 RAPD 特异性标记的研发结果; 而有关这些特异性 RAPD 片段的回收、克隆、测序、RAPD-SCAR 引物的设计及转化成 SCAR 标记等研究结果将另文报道。

收稿日期: 2012 - 05 - 17
基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30960096)
作者简介: 翟丽艳(1986 -) ,女,广西钦州人,海南大学农学院 2009 级硕士研究生.
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

1 材料与方法

1.1 供试材料 实验材料为对苦丁茶冬青炭疽病高抗、高感的苦丁茶冬青种质材料的单株嫩叶，均取自海南大学苦丁茶种质资源圃。所有供试材料均系通过人工接种鉴定（并结合历年观察记载）确定其对炭疽病的抗性强弱的供试种质材料。

1.2 方法

1.2.1 试剂 无水乙醇、氢氧化钠、硼酸等均为国产分析纯以及 CTAB，Tris，EDTA，均购自上海生工生物工程技术服务有限公司；所用 RAPD 引物均由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。6 × loading buffer，10 g · L^{-1} RNase A，*Taq* DNA polymerase，4 × dNTPs 等购自上海申能博彩生物科技有限公司。所用 Lambda DNA / *Hind*Ⅲ + *Eco*RⅠ Markers 购自中科瑞泰（北京）生物科技有限公司。

1.2.2 仪器 离心机，紫外分光光度计，电热恒温水浴锅，移液枪，PIC-200 型 PCR 扩增仪，DYCP-31F 型号的电泳仪，紫外成像仪，格兰特制冰机 FM-70，超净工作台等。

1.2.3 苦丁茶冬青 DNA 的提取及 DNA 样品池的构建 采用改良 CTAB 法[28]提取苦丁茶冬青基因组 DNA，紫外分光光度计检测 DNA 浓度和纯度，w = 0.8 % 的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量，最后将样品释稀成 20 ng · L^{-1}，分别等量混合 12 份高抗苦丁茶冬青种质材料和 12 份高感型苦丁茶冬青种质材料的 DNA，构成高抗型 DNA 样品池和高感型 DNA 样品池。

1.2.4 RAPD 分析实验体系 RAPD 基本反应体系及扩增程序在张凤琴[29]基础上进一步优化建立。反应体系组成为：10 × buffer 2.5 μL，$MgCl_2$ 1.5 mmol · L^{-1}，DNA 模板 40 ng，引物 0.2 μmol · L^{-1}，*Taq* 酶 1.5 U，dNTPs 200 μmol · L^{-1}，最后用无菌超纯水补足至 25 μL。PCR 基本扩增程序为：94 ℃预变性 4 min，然后 94 ℃变性 30 s，36 ℃退火 30 s，72 ℃延伸 120 s，进行 40 个循环后 72 ℃延伸 10 min，16 ℃条件下取出。扩增产物用 w = 1.5 % 的琼脂糖凝胶（含 0.5 mg · L^{-1} EB）在 0.5 × TBE 缓冲液中电泳，以 100 bp plus DNA ladder 作为相对分子质量标准参照物，在 UVP 型凝胶成像分析系统下照相并记录。

1.2.5 RAPD 标记的筛选和分析 首先用 DNA 筛选多态性 RAPD 引物，再根据抗病性的鉴定结果，从供试的苦丁茶冬青种质材料中选择高抗型种质材料和高感型种质材料各 12 份，用于分别制备抗病型 DNA 样品池和感病型 DNA 样品池。进行选择性基因型的标记筛选，即选择那些在 10 株以上的抗病和感病单株中表现多态性并能出现特异性条带的标记用于连锁分析。

1.2.6 特异片段的回收、克隆和测序 RAPD-PCR 扩增产物在 w = 1.5 % 的琼脂糖凝胶上电泳，回收目标条带，与载体 pMD® 18-T Vector 连接，转化大肠杆菌感受态 DH5α；转化产物在含有 X-Gal，IPTG，Amp 抗性的 LB 固体培养基上培养，蓝白斑筛选挑取白色菌落，提取阳性克隆质粒 DNA，用 *Eco*RⅠ和 *Hind*Ⅲ双酶切鉴定重组质粒 DNA。当酶切经 PCR 法以及电泳确认鉴定出目的 DNA 片段后，用新鲜菌液送往上海生工生物工程技术服务有限公司或者北京诺赛基因组研究中心有限公司测序。

2 结果与分析

2.1 RAPD 分子标记筛选和分析 从 92 条引物中筛选出能对苦丁茶冬青的基因组 DNA 进行有效扩增的 79 条引物，其中有 26 条可以在抗性 DNA 样品池和感病 DNA 样品池之间显示多态性。图 1 为 S82，S98，S109，S136，S227，S247，S430，S485，S1126，S58，S11 和 S20 等 12 个供试引物的试验结果。图 2 为 S17，S23，S24，S25，S33，S51，S56，S58，S63，S69，S70，S71 等 12 个供试引物的试验结果。为便于对照分析，点样时分别将每个供试引物检测的抗病型/感病型 DNA 混样成对并排在相邻的 2 条泳道上。从图 1 可以看出，在 12 个供试引物中，对苦丁茶炭疽病有特异反应的有 S227，S247，S430，S1126，S58，S11 和 S20 等 7 个供试引物。从图 2 可以看出，在 12 个供试引物中，对苦丁茶炭疽病有特异反应的有 S63 和 S69。图中箭头所指处为特异性 RAPD 条带（特异 RAPD 片段），也就是说，这种特异性条带仅在抗病型 DNA 混样或者感病型 DNA 混样中的 1 个泳道中出现此条带。

以构成 DNA 样品池 24 份种质材料的 DNA 单样（其中高抗类型和高感类型的种质材料各 12 份）为模板，分别对 26 条引物进行进一步分析，发现仅有 3 个引物（S69，S227 和 S247）可以在以 DNA 单样为模

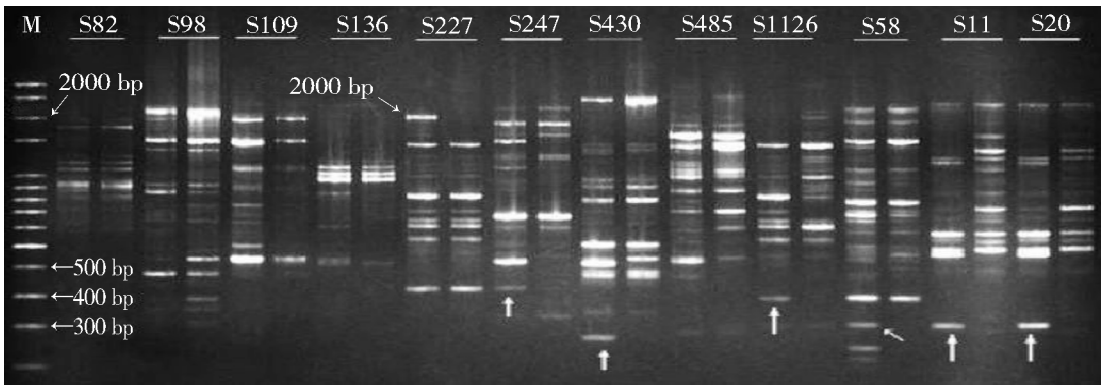

图 1　12 条 RAPD 引物筛选图

Fig. 1　Screening of 12 effective RAPD primers

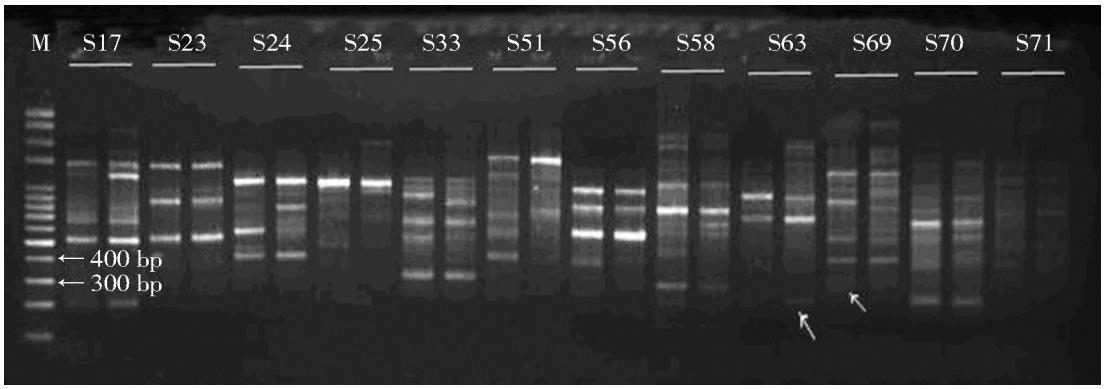

图 2　12 条 RAPD 引物筛选图

Fig. 2　Screening of 12 effective RAPD primers

板时针对苦丁茶冬青种质材料的炭疽病抗性性状扩增出特异性条带,其中引物 S69 可以在 10 份构成抗病型 DNA 样品池的 DNA 单样中扩增出 1 条相对分子质量约为 300 bp 的清晰特异性条带(见图 3) ; 引物 S227 则可以在 12 份构建抗病型 DNA 样品池的 DNA 单样中分别扩增出 2 条清晰的特异性条带,其相对分子质量分别约为 300 bp 和 2 000 bp(见图 3) ; S247 则只能在 10 份构成抗病型 DNA 样品池的 DNA 单样中扩增出 1 条相对分子质量约为 300 bp 的特异性条带(见图 5) 。

分别用 20 份构建抗病型/感病型 DNA 样品池的 DNA 单样(抗病型/感病型 DNA 单样各 10 份) 为模板,用引物 S69 重复进行了 1 次 RAPD-PCR 实验,结果如图 3 所示。从图 3 可以看出,实验结果与第 1 次重复中的情况类似,Marker 左边的 10 份 DNA 均扩增出了 1 条相对分子质量约为 300 bp 的特异带 S69-300; 而 Marker 右边的 10 份感病型 DNA 单样,则仅在 1 份 DNA 单样中出现相对分子质量大小相同的条带。

引物 S227 的扩增结果如图 4 所示。从图 4 可以看出,引物 S227 在位于 Marker 的左边 12 份抗病型 DNA 单样中均扩增出 1 条相对分子质量约为 300 bp 的清晰的特异性; 而在 Marker 右边的 12 份感病型 DNA 单样中,则仅有 1 份 DNA 单样出现相对分子质量大小相同的条带。引物 S227 还可以在位于 Marker 的左边 12 份抗病型 DNA 单样中均扩增出另一条清晰的、相对分子量约为 2 000 bp 的特异性条带; 而位于 Marker 右边的 12 份感病型 DNA 单样中,则仅有 1 份 DNA 单样出现相对分子质量约为 2 000 bp 的条带。这 2 条特异性条带分别暂命名为 S227-300 和 S227-2000。

以 20 份构建抗病型/感病型 DNA 样品池的 DNA 单样(抗病型/感病型 DNA 单样各 10 份) 为模板,用引物 S247 进行了 RAPD 扩增和凝胶电泳(见图 5) 。从图 5 可以看出,在 Marker 左边的 10 份 DNA 中有 7 份单样扩增出 1 条清晰的、相对分子质量约为 400 bp 的特异性条带; 而 Marker 右边的 10 份感病型 DNA 单样中,则没有 DNA 单样扩增出这一条带。因此,该条带可以考虑为特异性条带,暂记作 S247-400。

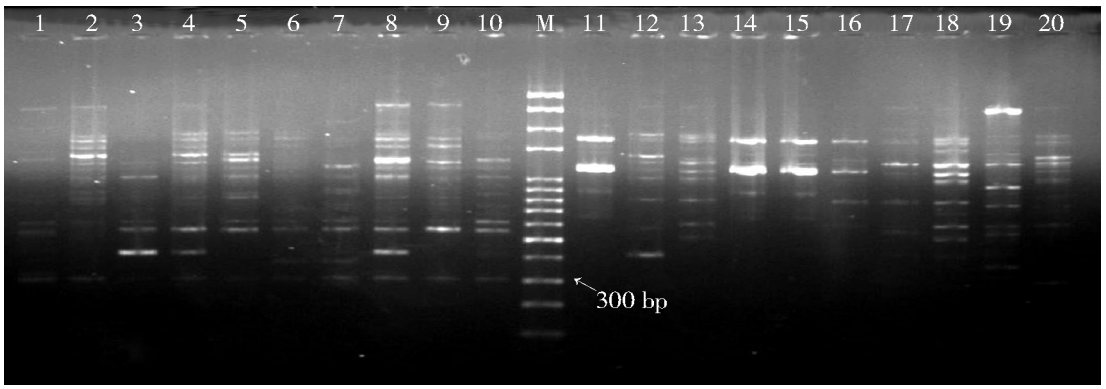

图 3 引物 S69 在 20 份构建 DNA 样品池的 DNA 样品中的扩增结果

1 ~ 10 泳道为构建抗病型 DNA 样品池的 10 份抗病型 DNA 单样; M 为标准分子质量 Marker; 11 ~ 20 泳道为构建感病型 DNA 样品池的 10 份感病型种质材料的 DNA 单样

Fig. 3 The RAPD-PCR amplified results of S69 primer in 20 highly-resistant or highly-susceptible germplasm materials against anthracnose

label Lanes 1 to 10: Construct the DNA pool of the 10 highly-resistant germplasm materials; Lane M was marker; label Lanes 11 to 20: Construct the DNA pool of the 10 highly-susceptible germplasm materials

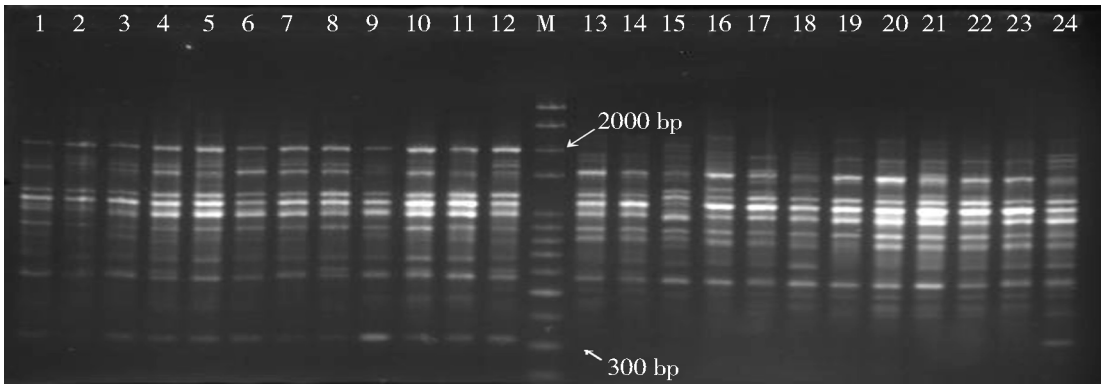

图 4 引物 S227 中在 24 份构建 DNA 样品池的 DNA 样品中的扩增结果

1 ~ 12 泳道为构建抗病型 DNA 样品池的 12 份抗病型种质材料的 DNA 单样; M 为标准分子质量 Marker; 13 ~ 24 泳道为构建感病型 DNA 样品池的 12 份感病型种质材料的 DNA 单样

Fig. 4 The RAPD-PCR amplified results of S227 primer in 24 highly-resistant or highly-susceptible germplasm materials against anthracnose

label Lanes 1 to 12: construct the DNA pool of the 12 highly-resistant germplasm materials; Lane M was marker; label Lanes 13 to 24: construct the DNA pool of the 12 highly-susceptible germplasm materials

3 讨 论

RAPD 技术具有快速、简便、灵敏度高、实验成本低以及引物的通用性强等优点; 同时,由于 RAPD 对反应条件较敏感,重复性较差,实验手续复杂,专一性不强,检测到的并不仅是 1 条带,而且还显示其他一些与目的性状无关的条带, 故在应用上受到一定限制[30-35]。但操作者只要严格控制各种实验条件,通常还是能够得到理想的、可重复的实验结果。在 RAPD-SCAR 标记技术体系中,为了提高 RAPD 标记稳定性,就要把目的 RAPD 片段(如与某目的基因连锁的 RAPD 片段) 进行回收、扩增和测序,并根据原 RAPD 片段末端的序列设计出特定引物(通常比 RAPD 引物长,一般为 18 ~ 24 个碱基对) ,再进行 PCR 特异扩增,进而把与原 RAPD 片段相对应的单一位点鉴定出来。

笔者在本实验中获得了 3 个与苦丁茶抗性性状连锁的特异性 RAPD 标记 S69-300,S227-300 和 S227-

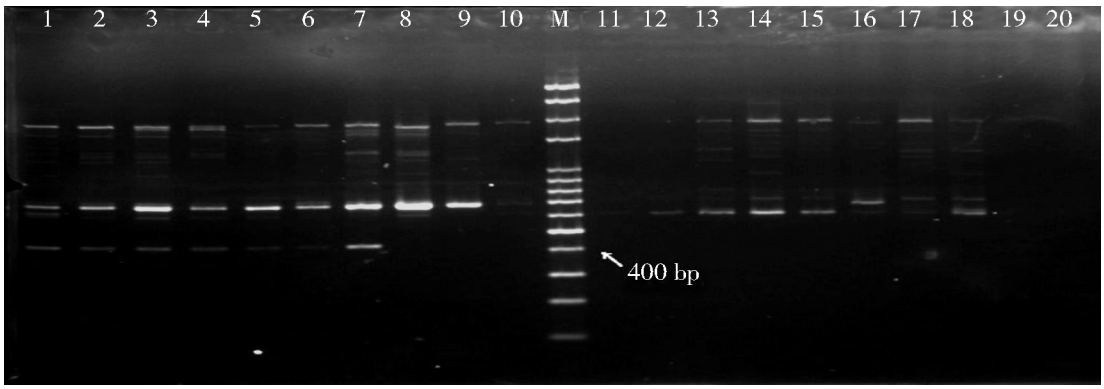

图 5　S247 引物中在 20 份构建 DNA 样品池的 DNA 样品中的扩增结果

1 ~ 10 泳道为构建抗病型 DNA 样品池的 10 份抗病型种质材料的 DNA 单样; M 为标准分子质量 Marker; 11 ~ 20 泳道为构建感病型 DNA 样品池的 10 份感病型种质材料的 DNA 单样。

Fig. 5　The RAPD-PCR amplified results of S247 primer in 20 highly-resistant or high-susceptible germplasm materials against anthracnose

label Lanes 1 to 10: construct the DNA pool of the 10 highly-resistant germplasm materials; Lane M was marker; label Lanes 11 to 20: construct the DNA pool of the 10 highly-susceptible germplasm material

2000。为了能够判断这 3 个特异 RAPD 标记的实验结果是否与田间观察和人工接种的实验结果基本一致(符合率 > 90%),并适合大批量样品的实际检测,就必须将其转化为 SCAR 标记。后续的研究须对这些 RAPD 特异片段进行回收,扩增和测序,并最终将其成功地转化为与苦丁茶炭疽病抗性性状紧密连锁的 SCAR 标记。

参考文献:

[1] 郑道君,刘国民,何声进,等. 苦丁茶冬青不同种质材料的酯酶同工酶分析 [J]. 广西植物,2009,29 (2):242 - 249.

[2] 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: 自然科学版,1997,15 (2): 129 - 133.

[3] 刘国民. 话说绿色黄金 [J]. 热带林业,1997,25(1):37 - 39.

[4] 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(1/2):69 - 77.

[5] ZHENG Daojun, LIANG Yuanfa, LIU Goumin, et al. RAPD analys is of germplasm resources of kuding cha species in Oleaceae [J]. Agricultural Sciences in China, 2009, 8(7):784 - 792.

[6] 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.

[7] 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.

[8] 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.

[9] 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.

[10] 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.

[11] LIU Guomin. A study on the homonym of the kudingcha resources in China [J]. In Research and Development of Tropical Biological Resources, 2002(1):1 - 5.

[12] 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.

[13] 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.

[14] 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.

[15] 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.

[16] 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.

[17] 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.

[18] 刘国民. 绿色黄金苦丁茶[J]. 植物杂志,1997,136(2):15.
[19] YOUNG N D. A cautiously optimistic vision for marker-assisted breeding [J]. Mol Breed, 1999,5:505 - 510.
[20] WILLIANS J G K, KUBELIK A R, LIVAK A R, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers [J]. Nucleic Acid Res. ,1990(18):6531 - 6535.
[21] WELSH J, MCCLEUAND M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers [J]. Nucleic Acids Res. ,1990(18):7213 - 7219.
[22] 盖树鹏,孟祥栋. 利用 RAPD 技术进行植物性状标记及辅助选择[J]. 生物技术通报,1999(6):33 - 38.
[23] 林伯年,徐林娟,贾春蕾. RAPD 技术在杨梅属植物分类研究中的应用[J]. 园艺学报,1999,26(4):221 - 226.
[24] 张恒庆,安利佳,祖元刚. 红松 RAPD 实验中各组成成分含量对实验结果的影响[J]. 植物研究,1999,19(2):183 - 188.
[25] 史永忠,郭文武,邓秀新. 柑橘 RAPD 技术体系建立与体细胞杂种鉴定[J]. 园艺学报,1998,25(2):105 - 110.
[26] 夏 铭,栾非时,李景鹏. RAPD 影响因素的研究及实验条件的优化[J]. 植物研究,1999,19(2):195 - 201.
[27] 严佟明,黄敏仁,朱立煌. 利用 RAPD 标记和单株大配子体构建马尾松的分子标记连锁图谱[J]. 植物学报,1997,39(7):607 - 612.
[28] 李娟玲,刘国民,贾 媛,等. 一种高效提取鹧鸪茶基因组 DNA 的方法[J]. 中国农学通报,2010,26(8):69 - 73.
[29] 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.
[30] IQBAL M J, AZIZ N, SAEED N A, et al. Genetic diversity evaluation of some elite cotton varieties by RAPD analysis [J]. Theor. Appl. Genet. , 1997,94:139 - 144.
[31] WEI J Z, CAMPBELL W F, WANG RR-C. Genetic variability in russian wildrye (*Psathyrostachys juncea*) assisted by RAPD [J]. Genetic Resource and Crop Evolution, 1994, 44:117 - 125.
[32] JARRET R L, AUSTIN D F. Genetic diversity and system atic relationships in sweet potato and related species as revealed by RAPD analysis [J]. Genetic resources and Crop Evolution, 1994, 41:165 - 173.
[33] MILLIAN T, OAUMA F, COBOS S, et al. Using RAPDS to study phylogenetic relationships in rosa [J]. Theor. Appl. Genet. , 1996, 92:273 - 277.
[34] CASTIGLIONE, WANG G, DAMIANI G, et al. RAPD Fingerprints for identification and for taxonomic studies of elite poplar (*Populus* spp.) clones [J]. Theor. Appl. Genet. , 1993, 87:54 - 59.
[35] 张凤青. 黄瓜品质性状的 AFLP 和 SCAR 标记研究[D]. 重庆:西南大学,2007:5 - 6.
[36] 惠东威,陈受宜. RAPD 技术及其应用[J]. 生物工程进展,1992,12(6):1 - 5.

RAPD Markers Linked to the Resistance Gene of *Ilex kudingcha* Against *Colletotrichum illics-kudingchae*

ZHAI Liyan, LI Juanling, LIU Guomin, XIE Jun, LUO Yiqi, CHENG Shanhan, PAN Xuefeng
(Kudingcha Research Institute, Hainan University, Haikou 570228, China)

Abstract: In order to develop specific SCAR markers closely linked to the gene resistant to *Colletotrichum illics-kudingchae* G. M. Liu et Z. Y. Zhang, germplasm materials of *Ilex kudingcha* with high resistance and high susceptibility to *C. illics-kudingchae* were collected for RAPD analysis with 92 random primers, from which a few specific RAPD markers closely linked to the resistance gene were amplified. These markers included the specific fragments: S69-300, S227-320, S227-2000 and S247-400. These specific fragments will be retrieved, amplified and sequenced. The specific RAPD fragment sequencing results can be used for development of SCAR markers linked to the resistance gene against *C. illics-kudingchae*.

Key words: *Ilex kudingcha* C. J. Tseng; *Colletotrichum illics-kudingchae* G. M. Liu et Z. Y. Zhang; RAPD