

SCoT 分子标记在植物研究中的应用进展

龙治坚¹, 范理璋¹, 徐 刚¹, 胡尚连¹, 韩国辉²

(¹西南科技大学生命科学与工程学院, 四川绵阳 621010; ²重庆市农业科学院果树研究所, 重庆 401329)

摘要: SCoT 是一种新型的目的基因分子标记, 该标记不仅能获得与性状联系紧密的目的基因, 而且能对性状进行跟踪, 已被广泛应用于多种植物的研究。本文概述了 SCoT 标记的原理、引物设计方法及特点, 并从 PCR 反应体系建立与优化、种质资源遗传多样性与亲缘关系分析、种质鉴定与指纹图谱构建、基因差异表达与分子遗传连锁图谱构建等方面总结了 SCoT 标记的应用进展。同时, 对其存在的问题进行了讨论, 并展望了该标记的发展应用前景。

关键词: SCoT; 种质鉴定; 遗传多样性; 图谱构建; 基因差异表达

Application Advance of SCoT Molecular Markers in Plants

LONG Zhi-jian¹, FAN Li-zhang¹, XU Gang¹, HU Shang-lian¹, HAN Guo-hui²

(¹ College of Life Science and Engineering, Southwest University of Science and Technology, Mianyang Sichuan 621010; ² Fruit Research Institute of Chongqing Agriculture Science Academy, Chongqing 401329)

Abstract: Start codon targeted polymorphism (SCoT) is a novel gene-targeted marker that could achieve tightly linked target gene and follow the tracks of the traits properly. As a new kind of marker, it has been widely used in diverse plant species. In this paper, we summarized the principles and the characteristics of SCoT, as well as the primer design and the optimization of SCoT-PCR system. Its applications, such as genetic diversity and phylogenetic relationship analysis, germplasm identification and fingerprinting, gene expression profiling, and genetic linkage mapping, were also reviewed. Besides, the potential problems and the future prospects of SCoT marker were further discussed.

Key words: start codon targeted polymorphism (SCoT); germplasm of identification; genetic diversity; map of construction; gene differential expression

随着 DNA 分子标记开发技术及结构和功能基因组学的飞速发展, 标记类型已由随机 DNA 分子标记 (RDMs, random DNA markers) 向目的基因分子标记 (GTM, gene targeted markers) 和功能性分子标记 (FMs, functional markers) 发展。RDMs (如 RFLP、RAPD、AFLP 等) 基于基因组中随机多态性位点开发而成, 检测的多态性在基因组的位置大多为随机分布, 因此获得的位点通常与目标性状基因距离较远, 这使它在应用上与其目标有一定的偏差^[1-2]。

GTM (如 SCoT、SRAP 等) 和 FMs 因其本身可能是目的基因的一部分或与目的基因紧密连锁而受到研究者的重视^[3]。

目标起始密码子多态性 (SCoT, start codon targeted polymorphism) 标记是 C. Y. Collard 和 D. J. Mackill^[4] 于 2009 年新开发的一种目的基因分子标记。这种标记不仅能获得与性状联系紧密的目的基因, 并能对性状进行跟踪, 具有操作简单、多态性高、遗传信息丰富、成本低廉、引物通

收稿日期: 2014-05-10 修回日期: 2014-06-10 网络出版日期: 2015-02-06

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20150206.1517.003.html>

基金项目: 西南科技大学实验室开放基金 (14xnf31); 西南科技大学博士研究基金 (13zx7154); 四川省应用基础研究基金 (2013JY0182); 重庆市科委重大项目 (cstc2013yykf80002)

第一作者研究方向为植物分子细胞遗传。E-mail: long20053182@126.com; 范理璋为共同第一作者

通信作者: 胡尚连, 研究方向为植物生理与生物技术。E-mail: hushanglian@126.com

韩国辉, 研究方向为园艺植物遗传育种与生物技术。E-mail: hghui2007@126.com

用性强等优点^[3]。经过近多年的迅速发展,已广泛应用于多种植物和多个研究领域,在植物种质资源遗传多样性与亲缘关系分析、种质鉴定和指纹图谱构建、基因差异表达和分子图谱构建等方面均取得了阶段性的进展。本文对 SCoT 标记在植物研究中的应用现状进行综述,以期为该标记的研究和应用提供参考。

1 SCoT 分子标记技术

1.1 SCoT 分子标记的原理

起始密码子(ATG)是一个基因翻译的起始点,

其侧翼的序列具有较高的保守性和一致性^[5-6]。根据这一特性,设计引物扩增功能基因。与 RAPD、ISSR 类似,SCoT 分子标记的引物亦为单引物,但 RAPD 的引物较短(约 10 bp),这导致其特异性差、随机性强;ISSR 引物扩增的是介于反向重复序列位点间的序列;而 SCoT 的引物则以功能基因双链 DNA 正负链上的 ATG 翻译起始位点为结合点,扩增两结合位点之间的片段,可以作为 RAPD 和 ISSR 的有效补充^[3-4,7]。

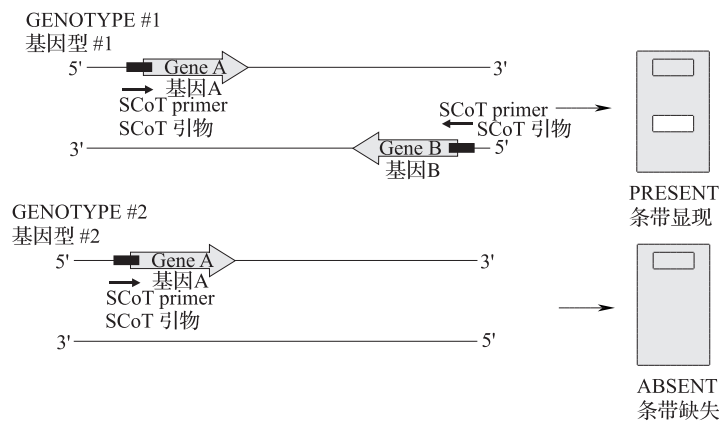


图 1 SCoT 分子标记的原理示意图^[4]

Fig. 1 Principle of SCoT-PCR amplification^[4]

1.2 SCoT 分子标记的引物设计

SCoT 引物设计是根据植物基因翻译起始位点侧翼区域的保守性和一致性,将起始密码子第 1 个碱基(A)所在的位置记为 +1,其下游碱基则依次记为 +2、+3、……;而上游碱基则依次记为 -1、-2、-3、……。

同时,确保待设计引物的位置 +1 为 A、+2 为 T、+3 为 G、+4 为 G、+7 为 A、+8 为 C、+9 为 C,其余位置可以根据设计需要而发生变化(图 2)。而引物长度以 18 bp 左右为宜,其中 GC 含量介于 50% ~ 72% 之间,无兼并碱基,避免引物二聚体和发夹结构的形成^[3,8]。

相对位置	...	-2	-1	+1	+2	+3	+4	+5	+6	+7	+8	+9	+10	...
碱基	*	*	*	A	T	G	G	*	*	A	C	C	*	*
*: 任何碱基					*: Any base									

图 2 SCoT 分子标记引物设计

Fig. 2 Primers design of SCoT molecular markers

1.3 SCoT 分子标记的特点

通过长期和广泛的应用,传统的随机 DNA 分子标记(RDMs)已被证明是有效而可靠的,但是这些标记也存在一定的缺点和不足。例如:RFLP 标记需运用特殊的探针和放射性同位素,成本高昂,存在放射性危害^[9];RAPD 标记引物较短,试验重复性较差,稳定性不好^[1];AFLP 标记试验成本高、技术繁

琐、耗时较长,对样本 DNA 的纯度和内切酶的质量要求较为严格^[10];SSR 标记引物开发成本高,且只能对重复序列区域进行染色体定位^[11]。

与之相比,SCoT 标记具有以下特点:(1) 建立于 PCR 基础之上,扩增产物可用琼脂糖凝胶电泳检测,操作步骤少而简单;(2) 引物设计简单,且通用性强;(3) 对 DNA 质量要求低、用量少,灵敏度高,

稳定性好,成本低廉;(4)遗传信息丰富,条带的多态性高^[12-16]; (5) SCoT 是目的基因分子标记的一种,其本身可能是目的基因的一部分,或与目的基因相近,或与之紧密连锁,能有效产生和性状连锁的标记。

2 SCoT 分子标记在植物研究中的应用进展

2.1 PCR 反应体系建立与优化

随着技术的发展,DNA 分子标记与 PCR 的结合程度日益紧密。利用不同的分子标记类型分析同一材料时,PCR 最优反应体系存在差异;而同一标记类型应用于不同的材料时,其体系也存在不同^[13]。因此,建立并优化适合特定标记类型和材料的 PCR 反应体系是应用该标记的基础。

自 2009 年 C. Y. Collard 和 D. J. Mackill^[4] 开发 SCoT 标记以来,已建立了多种材料的 PCR 反应体系(表 1)。陈虎等^[17] 率先采用单因素试验建立并优化龙眼 SCoT-PCR 的反应体系,结果表

明该体系不仅稳定性好,而且可重复性好,为龙眼的研究提供了新的技术方法。随后,研究者陆续利用单因素试验、 $L_{16}(4^5)$ 正交设计、 $L_{25}(5^6)$ 正交设计以及单因素试验和正交试验相结合,先后优化了葡萄^[18]、柑橘^[12]、枇杷^[13]、牡丹^[19]、番木瓜^[20]、铁皮石斛^[21-22]、澳洲坚果^[23]、石蒜属植物^[24]、草莓属植物^[25]、芥菜^[14]、大豆^[26] 以及甘蔗^[27] 等植物 SCoT-PCR 反应体系。然而,PCR 是一个多因素影响的综合反应体系。在不同材料的 SCoT-PCR 反应体系中,各因素对体系影响的程度不同。张君玉等^[18] 优化葡萄 SCoT-PCR 反应体系的结果表明,在反应体系中起关键作用的因素是 dNTPs 的浓度,韩国辉等^[12] 在不同倍性枇杷分析的 SCoT-PCR 扩增体系研究中也得出同样的结论。在诸如牡丹、芥菜、石蒜属植物以及草莓属植物等材料中,对反应体系影响最大的因素则是 Mg^{2+} 浓度^[14,19,24-25]。而以铁皮石斛为材料时,*Taq* DNA 聚合酶的浓度则是影响反应体系的最大因素^[21]。

表 1 SCoT 分子标记的应用

Table 1 Application of SCoT molecular markers

应用领域 Applications	种质资源 Germplasm resources	参考文献 References
体系建立与优化 Establishment and optimization of SCoT-PCR reaction system	柑橘、枇杷、芥菜、龙眼、葡萄、牡丹、番木瓜、铁皮石斛、澳洲坚果、石蒜属植物、草莓属植物、大豆等	[12-14]、[17-27]
遗传多样性与亲缘关系 Genetic diversity and phylogenetic relationship	甘蔗、龙眼、铁皮石斛、桃儿七、益母草、柿、白灵菇、灰毡毛忍冬、斑茅、高牛鞭草、芒果、玄参、苜蓿、罗汉松、菊属植物、扁柑、枇杷、鸭茅、花生、棉花、凉粉草等	[8]、[28-57]
种质鉴定与指纹图谱 Identification of germplasm and fingerprinting	柑橘、芥菜、甜橙、菠萝、割手密、兰属植物、番木瓜、烟草	[12]、[15]、[58-65]
基因差异表达和分子遗传图谱 Gene differential expression and genetic linkage mapping of molecular markers	芒果、甘蔗、柑橘、铁皮石斛、割手密	[16]、[66-73]

综上,SCoT 标记应用于新的材料时,有必要对其 PCR 反应体系进行优化。上述材料 SCoT-PCR 最适反应体系的建立与优化,为该标记在材料的种质遗传多样性评价与亲缘关系分析、种质资源鉴定、指纹图谱与分子连锁图谱构建、基因表达差异、分子标记辅助育种以及功能基因克隆等方面的研究奠定了基础。

2.2 种质资源遗传多样性与亲缘关系分析

植物遗传多样性、亲缘关系和分类及系统演化的研究,对植物资源合理保护和利用、遗传改良和种质创新以及杂交育种亲本的选择等均具有重要的意义。SCoT 标记是一种能对性状进行跟踪,并能获得与性状相关目的基因的分子标记,它的应用可以更好地揭示种质资源的遗传背景,更清楚地显示不同

资源的亲缘关系和遗传结构。

研究表明植物种质资源的遗传多样性与亲缘关系和生态地理分布、主要表型有一定的相关性。陈虎等^[28]利用 SCoT 标记研究来自广西、广东、福建及东南亚 24 份龙眼品种资源,研究结果表明该标记能将 24 份龙眼品种完全区分开,并在一定程度上反映了品种的地理分布情况,据此推测地理因素对龙眼的亲缘关系研究有很大影响。杨翠^[8]以来自国内外的 107 份甘蔗无性系为试材,利用 20 条 SCoT 引物分析材料的遗传多样性,结果表明国内外种质资源间的遗传基础差异大,并认为两类种质的杂交利用有望明显提高杂交后代的遗传多样性。赵瑞强^[29]利用优化的铁皮石斛 SCoT-PCR 反应体系分析 17 个居群的遗传多样性,结果发现铁皮石斛遗传多样性主要分布于居群间,种质的亲缘关系与其地理纬度具有显著的相关性。D. X. Chen 等^[30]采用 SCoT 检测来源于我国西藏、青海、四川等地的 6 个桃儿七野生居群遗传多态性,聚类结果将 6 个居群分为 2 类,而相同地理来源或相似生境的材料倾向于聚为一类,揭示了珍稀濒危药用植物桃儿七的遗传多样性水平及居群遗传结构特点。张维瑞等^[31]在研究河南伏牛、太行、大别和桐柏 4 大山脉的 8 个益母草居群 66 个样品的遗传多样性时,发现河南野生益母草种群具有较高的遗传多样性,聚类说明其遗传距离与地理距离存在明显的相关性。邓立宝等^[32]在调查和收集广西西北部云贵高原地区柿种质资源的基础之上,分别利用表型系统聚类和 SCoT 标记研究其遗传背景,结果发现 SCoT 标记能将 31 份柿种质完全区分开,并在相似系数 0.686 的水平将其分为 5 大类,这与表型分析结果基本一致。赵梦然等^[33]分析了新疆裕民、托里、青河等 3 个县的 63 株野生白灵菇,聚类分析和主坐标分析结果高度相似,几乎将供试样本完全按地理分布划分为 3 大类群,表明野生白灵菇的遗传多样性与地理分布密切相关;相关性分析表明,遗传距离与直线地理距离和经向地理距离均不存在相关性,而与纬向地理距离存在明显的正相关性。

赵丹等^[34]采用 ISSR 与 SCoT 分析贵州省黔西县、绥阳县和道真县等地的灰毡毛忍冬栽培类群遗传多样性,其聚类结果与地理来源相符。宋焕忠等^[35]利用 SCoT 研究了采自广西的 50 份斑茅无性系的遗传多样性,在相似系数为 0.73 处,可将 50 份斑茅无性系归为 4 大类;在相似系数为 0.76 处,可将第 IV 类分成 6 种类型,同一地区的斑茅无性系基

本聚在同一类,呈现出一定的地域性分布规律。黄秀等^[36]利用 SCoT 标记对来源于四大洲的 46 份牛鞭草种质资源的遗传多样性和亲缘关系进行了研究,结果表明供试材料具有丰富的遗传多样性;而聚类分析和主成分分析结果高度相似,基本将供试材料按牛鞭草种类及地理来源分为 4 大类,说明供试材料的遗传多样性与牛鞭草种类及其地理来源具有一定的相关性。S. Mulpuri 等^[37]基于 SCoT 标记技术,研究 48 份可食用和有毒的麻风树种质资源,聚类发现有毒和无毒的种质可分别聚成两大类。D. L. Guo 等^[38]分析了 64 份葡萄种质资源,基于 SCoT 标记的聚类能将起源于美国和中国的野生葡萄截然分开。C. Luo 等^[39]利用 SCoT 标记研究芒果的种质资源遗传多样性,聚类分析结果与种质的起源及主要表型相一致,为芒果种质资源的鉴定、评价、保存、利用以及育种提供了科学依据^[40-41]。

然而,也有研究表明种质资源的遗传多样性与亲缘关系和地理位置、主要表型没有必然联系。陈大厦等^[42]对来源于全国各地的 48 份玄参种质进行遗传多态性分析,聚类结果显示栽培玄参亲缘关系较为复杂:有的种质具有明显的地理相关性;有的种质聚类混杂,与地理分布无明显相关性;也有来源于同一地区的种质仅部分聚在一起,呈现出一定的地域性分布规律。据此,研究人员建议在建立种质资源圃时需要考虑不同地理来源及不同的生态型,尽可能多的收集不同的居群和单株。何庆元等^[43]利用优化的 SCoT 反应体系分析 34 个苜蓿品种,聚类分析表明:从安徽和江苏两地收集的野生南苜蓿和栽培苜蓿的遗传距离最远,单独聚为一类;而秋眠型、半秋眠型、非秋眠型苜蓿并未单独聚类。

以上均是 SCoT 标记在分析种质与地理来源、主要表型之间联系的报道。此外,SCoT 标记还成功应用于多种植物的遗传关系分析,为该标记在遗传连锁图谱构建、亲本选择应用方面打下基础。韦泳丽等^[44]采用 SCoT 分子标记技术分析 8 份罗汉松种质材料遗传多样性,10 条引物共检测到 122 条多态性条带(占 88.97%),而主成分分析结果与聚类分析结果相一致。徐旭栋等^[45]则发现不同来源的铁皮石斛人工栽培种存在较大的遗传差异,表明药材市场中的人工栽培铁皮石斛遗传多样性丰富。李丕睿等^[46]运用优化的菊属 SCoT-PCR 体系分析 18 份菊花近缘种属材料的遗传多样性及亲缘关系,聚类分析显示,在相似系数 0.530 处可以将 18 份材料分成 I、II 2 个大组;I 组在相似系数 0.615 水平又分

为 6 个亚组。郭丽英等^[47]采用 SCoT 分子标记技术对广西地方柑橘 26 份种质材料进行遗传多样性研究,结果显示:9 条引物共扩增出 65 条 DNA 片段,其中 43 条具有多态性,说明 SCoT 标记能够有效揭示柑橘材料间的遗传多样性。贾志刚^[48]和龙治坚^[49]先后利用 SCoT 标记研究二倍体、三倍体枇杷,验证了 SCoT 分子标记在枇杷遗传多样性研究上的可行性。

蒋林峰等^[50]应用 SCoT 标记研究 32 个鸭茅栽培驯化品种与引进品种间的遗传变异差异,以期对鸭茅新品种选育提供理论依据,结果表明:遗传变异更多存在于鸭茅类群内;引进品种和国内栽培驯化品种间差异较大,前者的遗传多样性更为丰富,而后者相对来说整齐度差,品种结实性差,适应范围小。花生栽培种遗传基础狭窄,大多数分子标记技术都难以检测到丰富的多态性。熊发前等^[51]利用 SCoT 标记研究了花生属种间和栽培种内遗传多样性和亲缘关系,结果表明该标记能在花生栽培种内检测出一定程度的 DNA 多态性,为花生属野生种在改良栽培种方面的有效利用和花生分子标记辅助育种提供了有力的技术支撑。贺梁琼等^[52]研究花生属异源多倍化过程中基因组变化行为,发现 ATG 翻译起始位点及其侧翼区域在花生种间杂交异源多倍化早期迅速发生广泛而剧烈的变化,其生物学功能可能与多倍体的进化和稳定有关,说明 SCoT 可以应用于花生属及其他物种多倍体进化中基因组遗传变化的研究。

除单独应用外,SCoT 标记还常被研究者用于多种分子标记的比较和综合分析。李正鹏等^[53]利用 SCoT 和 SRAP 标记进行棉花遗传多样性的研究及比较分析;李晓晖等^[54]利用 SCoT 和 ISSR 标记对凉粉草遗传多样性进行分析;陈虎等^[55]将 SCoT 和 ISSR 标记同时用于不同龙眼资源遗传多样性的比较分析;B. Amirmoradi 等^[56]利用 SCoT、DAMD 以及 ISSR 比较分析鹰嘴豆及其近缘属植物的遗传变异,结果表明,*Cicer reticulatum* 的亲缘关系与鹰嘴豆栽培种较远,而与野生种更为接近,侧面支持 *Cicer reticulatum* 是鹰嘴豆栽培种祖先的假说。上述研究结果均表明 SCoT 标记与其他分子标记的聚类分析基本一致,但 SCoT 标记更能揭示供试材料的亲缘关系,说明 SCoT 标记的高效性,同时也说明 SCoT 标记可以和其他标记同时使用,有利于缩小单一标记使用时的误差^[49,53-56]。

2.3 种质鉴定和指纹图谱构建

近年来,随着各地域相互引种,种质交流日益频繁,这不可避免会出现同物异名或同名异物的现象,导致对种质的鉴定提出了更高的要求。同时,通过传统鉴定方法进行品种的鉴别和杂种鉴定,其周期较长,而且表型性状等形态学因素容易受到环境条件的影响,因此 SCoT 分子标记的应用为植物种质鉴定和指纹图谱构建等研究又提供了一种新的技术^[1,57]。

在种质鉴定方面,SCoT 标记已成功应用于甜橙、菠萝等多种植物。韩国辉等^[12]利用该体系对 Wan2 橘橙 × Li2 甜橙的杂交后代及沙田柚四倍体进行分析,7 个引物在 Wan2 橘橙、Li2 甜橙及其杂交后代中共扩增出 48 条多态性条带,并且在杂交后代植株中出现了非双亲新位点和亲本位点的缺失。聚类结果显示,13 株杂种后代与母本聚为一大类;其余 5 株和父本分别聚类,表明杂交后代出现了不同程度的遗传变异,表现出了较丰富的遗传多样性。Q. Q. Jiang 等^[58]应用 SCoT 标记分析了 24 份甜橙种质,通过对目的片段克隆、测序以及分析发现,供试材料存在单碱基的缺失与替换;BLAST 结果显示,该目的片段编码的蛋白质与核糖体蛋白 S3 的 N 端同源性高;利用单碱基变异可以鉴别其中的 12 个甜橙变异株系和安江香柚^[59]。

陈香等^[60]利用 SCoT 标记研究了 36 份菠萝种质资源的遗传多样性,从分子水平上论证了菠萝品种中存在的同物异名、同名异物现象,并验证植物分子水平分类是形态分类的一个重要补充;而在菠萝品种鉴别方面,SCoT 技术所揭示的多态性是真实可靠的,弥补了菠萝传统分类方法的不足,为资源的收集、保存、分类以及有效利用提供理论基础;同时发现,野生菠萝种是优异基因的重要来源,对菠萝品种改良和新品种的选育有重要作用。罗霆等^[61]以割手密 GXS85-30 × GXS87-16 的杂交后代为材料,利用具有双亲特征条带的 5 条 SCoT 引物进行杂种鉴定,结果表明,供试材料中有 88 份不具备父母本的特征条带,鉴定为自交种或假杂种;而余下的 157 份材料均具有双亲的特征条带,鉴定为真杂种,构成 F₁ 杂种群。刘超等^[62]采用 SCoT 分子标记对烟草品种云烟 87 × 蓝茉莉叶烟草 (*N. plumbaginifolia*) 的杂交后代进行杂种鉴定,17 条 SCoT 引物均能在子代中扩增出母本特异条带,17 条中有 11 条能在子代中扩增出父本的特异条带。据统计,子代具有与母本相同的特异条带 76 条,与父本相同的特异条带

48 条,部分后代还出现父母本不具有的特异条带,说明 10 株杂交后代均为真杂种。

在构建指纹图谱方面,应用相对较少。林清等^[15]利用 SCoT 标记对 46 份芥菜种质资源进行遗传多样性分析,筛选出 16 个清晰的多态性位点,并构建了 46 份芥菜种质的 SCoT 指纹图谱,该 DNA 指纹图谱可将供试材料完全区分开。杨祥燕等^[63]利用 SCoT 标记构建我国 22 个番木瓜主要栽培种质的指纹图谱,每个品种都有唯一的指纹图谱,可以比较容易地将供试材料相互区分开来。A. M. Gorji 等^[64]结合 SCoT、ISSR 等显性性状标记构建土豆的分离群体及其四倍体的指纹图谱,并发现 SCoT 标记更适合应用于土豆品种的鉴别。高岭等^[65]应用 SCoT 分子标记技术对兰属 14 个种的 24 个样品进行研究,23 号和 27 号引物能将所有种区分开,种间差异明显,但是在品种间的差别较小,仅在建兰品种间的变异较高,表明 SCoT 分子标记技术是兰属植物鉴定可信度较高的一种方法,对兰属植物鉴定、品种选育和图谱的构建具有重要意义。

2.4 基因差异表达和分子遗传连锁图谱

随着基因组学研究和分子生物学相关学科的迅猛发展,对基因的研究早已由静态的结构研究向动态的表达和功能研究方向发展。在植物的生长发育过程中,基因的表达具有时空特异性、组织特异性和条件诱导性。基因差异表达将影响植物的生长、发育、对病虫害和逆境的抗性反应^[74]。而分子遗传连锁图谱不仅是遗传育种工作的重要技术平台,也是进行重要性状基因定位克隆及基因组学研究的基础和依据^[75]。

目前,SCoT 标记在基因差异表达的研究主要集中在甘蔗、铁皮石斛以及芒果等植物中。陈香玲等^[66-67]以桂糖 28 号(抗寒性强)和新台糖 22 号(抗寒性弱)为材料,利用已优化的甘蔗 cDNA-SCoT 体系进行差异显示研究,并对其中 7 条差异片段(TDF)进行回收、克隆和测序。结果表明,2 个甘蔗品种在低温下有部分相同的基因表达,5 个 TDF 分别与脱水素、半胱氨酸型肽酶、多胺氧化酶、C4 磷酸羧化酶和过氧化氢酶基因具有较高的同源性;而只在抗寒品种中稳定出现的 2 个 TDF 功能未知,可能与甘蔗的抗寒基因表达相关。吴建明等^[68]利用赤霉素处理甘蔗,并通过 cDNA-SCoT 进行基因差异表达分析,获得的 30 个差异片段中,有 18 个基因片段受赤霉素上调,余下的 12 个基因片段则下调。通过在 NCBI 数据库比对发现,有 16 个 TDFs 序列和数

据库中已录入的基因具有较高的相似性,这些基因与转录因子、代谢、信号传导及细胞凋亡等有关。李东宾等^[69]为了探讨铁皮石斛在冷胁迫下相关基因表达差异的分子机制,利用 cDNA-SCoT 方法筛选出冷胁迫下铁皮石斛的抗寒相关基因,所获得的基因片段分别与膜相关蛋白、渗透调节蛋白、CBF 转录因子、抗逆性蛋白有很高的同源性,其中有 1 个基因片段功能未知,推测可能与铁皮石斛的抗寒有关。罗聪^[16]将改良的 cDNA-SCoT 应用于芒果逆境胁迫差异显示研究,成功获得 92 个基因片段,其中与逆境胁迫、转录因子、生长发育和信号传导相关的基因共有 40 个。在此基础上,利用实时荧光定量技术对 6 个逆境功能基因、6 个转录因子和 4 个保护酶基因进行深入研究,结果表明:在这 3 类基因中,转录因子对逆境胁迫的响应最明显。陈明辉等^[70]利用 cDNA-SCoT 探究甘蔗在宿根矮化病菌胁迫下的抗病分子机制时发现,油菜素内酯合成蛋白、NBS-LRR 类抗性蛋白、茉莉酸诱导蛋白、ABA 胁迫成熟蛋白、富含脯氨酸蛋白等可能参与了甘蔗宿根矮化病病原菌互作的过程。

在利用分子标记构建遗传连锁图谱时,有效构图标记的获得率是研究者关注的焦点之一。AFLP 是目前公认的作图效率最高的分子标记技术。在梨中,有效作图效率为 81.6%^[76];而在大粒裸燕麦中,其有效构图标记的获得率则高达 89.5%^[77]。然而,研究表明 SCoT 标记的有效构图标记获得率也较高,介于 56.67%~75.0% 之间^[71-72]。这说明 SCoT 分子标记在构建植物高密度分子遗传连锁图谱上有很大的应用潜力。罗霆等^[71]同时对比 SCoT、AFLP 和 SSR 分子标记在割手密基因组多态性分析和获得分离标记的效果,证实 SCoT 在扩增 DNA 多态性上优于 SSR 分子标记,在获取分离标记上优于 AFLP 分子标记;在该研究中,AFLP 标记有效构图标记的比例仅为 44.1%,而 SCoT 标记则高达 75.0%。韩国辉等^[72]利用 SCoT、EST-SSR 和 SSR 标记技术构建柑橘分子遗传连锁图谱,最终将 226 个标记定位于已构建的 9 个连锁群上,其中包括 30 个 SCoT 标记。通过比较分析发现 SCoT 标记在连锁群上分布均匀,对原图谱有良好的整合效果,使连锁群的组建更加合理,这极大地提高图谱的利用价值。杨海霞^[73]将 6 个 SCoT 标记、54 个 SSR 标记以及 32 个 AFLP 标记定位于割手密的 30 个连锁群,标记间的最大图距为 37.1 cM,最小图距为 0.6 cM;覆盖基因组总长度为 1182.29 cM,平均图

距为 12.99 cM。然而,该图谱的标记存在分布不均匀、覆盖范围小、标记间遗传距离大以及饱和密度低等不足,有待进一步的补充。

3 问题与展望

自从 2009 年被开发以来,SCoT 作为一种新型目的基因分子标记越来越受到研究人员的重视。目前,该标记已经成功应用于芒果、枇杷、花生等数十种植物。然而,以前的研究主要集中在供试材料 SCoT-PCR 体系的建立与优化、种质资源遗传多样性与亲缘关系分析、种质鉴定与指纹图谱等方面;在基因差异表达和高密度分子遗传连锁图谱、重要性状精细定位和功能基因克隆等方面的应用则相对较少。

因此,笔者认为,SCoT 标记的利用应加强以下几个方面的研究:(1)大量开发具有材料特异性的 SCoT 引物。SCoT 标记引物的通用性强,但是文献报道的数量依然有限,无法满足研究的需要。因此,根据供试材料基因组的特点设计引物,不仅能弥补引物数量的不足,而且可以增强引物的特异性。(2)SCoT 标记在种质鉴定与指纹图谱构建的应用。以往的分子标记,如 RAPD、ISSR、SSR 等也成功应用于品种的鉴别和杂种鉴定,给生产与研究带来了便利。作为一种新型标记,SCoT 已在甜橙、菠萝、烟草、芥菜、番木瓜以及割手密上表现出特性。其在种质鉴定与指纹图谱构建方面的应用,不仅可以实现品种保护,而且还可提高种质纯度。(3)利用 SCoT 标记构建高密度分子遗传连锁图谱。SCoT 的有效构图标记获得率也较高,最高可达 75%。利用它可寻找与重要目标性状紧密连锁的基因,实现分子标记辅助选择育种。(4)SCoT 标记在基因差异表达、定位以及克隆方面的应用。基因的时空特异性、组织特异性和条件诱导性表达将影响植物的生长、发育、对病虫害和逆境的抗性反应。该标记在研究甘蔗、芒果以及铁皮石斛等植物的基因差异表达时发现了与逆境胁迫、转录因子、生长发育和信号传导相关的基因,这为基因的定位和克隆奠定了基础。尽管 SCoT 分子标记技术在植物研究中的应用尚为起步阶段,但相信随着功能基因组学的发展,其在种质资源的评价与利用、种质鉴定与辅助育种、高密度分子遗传连锁图谱构建、基因定位与图位克隆等方面具有广阔的应用前景。

参考文献

- [1] 龙治坚,王莹,向素琼,等. 枇杷属植物分子标记利用的研究进展[J]. 果树学报,2013,30(3):480-488
- [2] 陆才瑞,喻树迅,于雯雯,等. 功能型分子标记 (ISAP) 的开发

- 及评价[J]. 遗传,2008,30(9):1207-1216
- [3] 熊发前,唐荣华,陈忠良,等. 目标起始密码子多态性 (SCoT): 一种基于翻译起始位点的目的基因标记新技术[J]. 分子植物育种,2009,7(3):635-638
- [4] Collard C Y, Mackill D J. Start codon targeted (SCoT) polymorphism: a simple, novel DNA marker technique for generating gene-targeted markers in plants[J]. Plant Mol Biol Rep,2009,27(1):86-93
- [5] Joshi C, Zhou H, Huang X, et al. Context sequences of translation initiation codon in plants[J]. Plant Mol Biol,1997,35:993-1001
- [6] Sawant S V, Singh P K, Gupta S K, et al. Conserved nucleotide sequences in highly expressed genes in plants[J]. J Genet,1999,78:123-131
- [7] Gupta M, Chyi Y S, Romero-Severson J, et al. Amplification of DNA markers from evolutionary diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats[J]. Theor Appl Genet,1994,89:998-1006
- [8] 杨翠. 基于 SCoT 标记分析甘蔗种质资源遗传多样性[D]. 福州:福建农林大学,2010
- [9] 邢晋祗,帅素容. RFLP 和 PCR-RFLP 技术与猪分子育种[J]. 畜禽业,2001(7):24-25
- [10] 杨春勇,李海涛,李学兰,等. 栽培沉香遗传多样性的 ISSR 和 AFLP 分析比较[J]. 植物遗传资源学报,2013,14(3):553-559
- [11] 罗冉,吴委林,张旻,等. SSR 分子标记在作物遗传育种中的应用[J]. 基因组学与应用生物学,2010,29(1):137-143
- [12] 韩国辉,向素琼,汪卫星,等. 柑橘 SCoT 分子标记技术体系的建立及其在遗传分析中的应用[J]. 园艺学报,2011,38(7):1243-1250
- [13] 韩国辉,汪卫星,向素琼,等. 多倍体枇杷 SCoT 分析体系的建立与优化[J]. 果树学报,2011,28(3):433-437
- [14] 龙治坚,王莹,韩国辉,等. 芥菜 SCoT 分析体系的建立与优化[J]. 西南大学学报:自然科学版,2013,35(4):20-25
- [15] 林清,龙治坚,韩国辉,等. 基于 SCoT 标记的芥菜种质遗传多样性与指纹图谱[J]. 中国蔬菜,2013(12):31-39
- [16] 罗聪. 芒果 SCoT 分子标记与逆境和重要开花时间相关基因研究[D]. 南宁:广西大学,2012
- [17] 陈虎,何新华,罗聪,等. 龙眼 SCoT-PCR 反应体系的优化[J]. 基因组学与应用生物学,2009,28(5):970-974
- [18] 张君玉,郭大龙,龚莹,等. 葡萄目标起始密码子多态性反应体系的优化[J]. 果树学报,2011,28(2):209-214
- [19] 侯小改,王娟,贾甜,等. 牡丹 SCoT 分子标记正交优化及引物筛选[J]. 华北农学报,2011,26(5):92-96
- [20] 杨祥燕,蔡元保,郭凌飞,等. 番木瓜 SCoT 反应体系建立及引物筛选[J]. 热带亚热带植物学报,2012,20(6):578-584
- [21] 徐旭栋,蒋瑞彬,蓝小明,等. 铁皮石斛 SCoT-PCR 反应体系的优化[J]. 中草药,2012,43(12):2481-2484
- [22] 赵瑞强,高燕会,章晓玲,等. 铁皮石斛 SCoT-PCR 反应体系构建及优化[J]. 核农学报,2012,26(4):0648-0655
- [23] 蔡元保,杨祥燕,陈显国,等. 澳洲坚果 SCoT 反应体系的建立及应用[J]. 热带亚热带植物学报,2013,21(3):253-258
- [24] 姜小凤,高燕会,童再康,等. 石蒜属植物 SCoT-PCR 反应体系构建及优化[J]. 浙江农林大学学报,2013,30(3):444-452
- [25] 秦国新,何桥,梁国鲁,等. 草莓属植物 SCoT 分析体系的建立及优化[J]. 果树学报,2012,29(3):393-397
- [26] 李强,苏二虎,高聚林,等. 大豆 SCoT 分子标记技术体系的优化、验证及检测[J]. 中国油料作物学报,2013,35(5):491-498
- [27] 吴凯朝,李杨瑞,杨丽涛,等. 甘蔗 cDNA-SCoT 差异显示分析 PCR 反应体系建立、优化及应用[J]. 热带作物学报,2013,34(5):892-898
- [28] 陈虎,何新华,罗聪,等. 龙眼 24 个品种的 SCoT 遗传多样性分析[J]. 园艺学报,2010,37(10):1651-1654
- [29] 赵瑞强. 基于分子标记的铁皮石斛种质资源遗传多样性研究[D]. 临安:浙江农林大学,2012

- [30] Chen D X, Zhao J F, Liu X, et al. Genetic diversity and genetic structure of endangered wild *Sinopodophyllum emodi* by start codon targeted polymorphism[J]. China J Chin Mat Med, 2013, 38(2): 278-283
- [31] 张维瑞, 韩远记, 薛愧玲, 等. 河南益母草野生居群遗传多样性的 SCoT 分析[J]. 中草药, 2013, 44(8): 1022-1026
- [32] 邓立宝, 何新华, 李天文, 等. 广西西北部高原地区柿种质资源调查及遗传多样性分析[J]. 园艺学报, 2012, 39(2): 215-224
- [33] 赵梦然, 陈强, 黄晨阳, 等. 中国野生白灵菇遗传多样性的 SCoT 分析[J]. 园艺学报, 2012, 39(12): 2475-2482
- [34] 赵丹, 丁铃, 周涛, 等. 贵州栽培灰毡毛忍冬的遗传多样性 ISSR 与 SCoT 标记[J]. 贵州农业科学, 2014, 42(1): 21-25
- [35] 宋焕忠, 张荣华, 杨海霞, 等. 广西斑茅遗传多样性的 SCoT 标记分析[J]. 西南农业学报, 2014, 27(1): 59-64
- [36] 黄秀, 张新全, 张瑜, 等. 高牛鞭草及其近缘种种质资源 SCoT 多样性分析[J]. 热带作物学报, 2013, 34(11): 2192-2199
- [37] Mulpuri S, Muddanurua T, Francis G. Start codon targeted (SCoT) polymorphism in toxic and non-toxic accessions of *Jatropha curcas* L. and development of a codominant SCAR marker[J]. Plant Sci, 2013, 207: 117-127
- [38] Guo D L, Zhang J Y, Liu C H. Genetic diversity in some grape varieties revealed by SCoT analyses[J]. Mol Biol Rep, 2012, 39(5): 5307-5313
- [39] Luo C, He X H, Chen H, et al. Genetic diversity of mango cultivars estimated using SCoT and ISSR markers[J]. Biochem System Ecol, 2011, 39: 676-684
- [40] Luo C, He X H, Chen H, et al. Analysis of diversity and relationships among mango cultivars using Start Codon Targeted (SCoT) markers[J]. Biochem Syst Ecol, 2010, 38: 1176-1184
- [41] Luo C, He X H, Chen H, et al. Genetic relationship and diversity of *Mangifera indica* L.: revealed through SCoT analysis[J]. Genet Res Crop Evol, 2012, 59(7): 1505-1515
- [42] 陈大霞, 张雪, 王钰, 等. 应用 SCoT 标记分析玄参种质资源的遗传多样性[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(16): 2368-2372
- [43] 何庆元, 王吴斌, 杨红燕, 等. 利用 SCoT 标记分析不同秋眠型苜蓿的遗传多样性[J]. 草业学报, 2012, 21(2): 133-140
- [44] 韦泳丽, 何新华, 罗聪, 等. 罗汉松 SCoT 遗传多样性的分析[J]. 广西植物, 2012, 32(1): 90-93
- [45] 徐旭栋, 蒋瑞彬, 蓝小明, 等. 人工栽培铁皮石斛种质资源遗传多样性的 SCoT 分析[J]. 中华中医药杂志, 2013, 28(7): 2123-2125
- [46] 李丕睿, 蒋甲福, 陈素梅, 等. 菊属植物 SCoT 分子标记技术在遗传多样性分析中的应用[J]. 园艺学报, 2013, 40(10): 2015-2025
- [47] 郭丽英, 郭雁君, 吉前华, 等. 扁柑种质资源的 SCoT 分析[J]. 西南农业学报, 2013, 26(2): 428-431
- [48] 贾志刚. 三倍体枇杷实生后代及杂交后代 SCoT 标记及 DNA 甲基化分析[D]. 重庆: 西南大学, 2011
- [49] 龙治坚. 枇杷属植物的遗传多样性分析和指纹图谱初步构建[D]. 重庆: 西南大学, 2013
- [50] 蒋林峰, 张新全, 黄琳凯, 等. 鸭茅品种的 SCoT 遗传变异分析[J]. 草业学报, 2014, 23(1): 229-238
- [51] 熊发前, 蒋菁, 钟瑞春, 等. 目标起始密码子多态性 (SCoT) 分子标记技术在花生属中的应用[J]. 作物学报, 2010, 36(12): 2055-2061
- [52] 贺梁琼, 熊发前, 钟瑞春, 等. 利用 SCoT 标记分析花生栽培种 \times *A. chacoensis* 组合异源多倍化的早期基因组变化[J]. 中国农业科学, 2013, 46(8): 1555-1563
- [53] 李正鹏, 李廷春, 樊洪泓, 等. 棉花遗传多样性 SCoT 和 SRAP 标记的研究及比较分析[J]. 激光生物学报, 2011, 20(4): 236-244
- [54] 李晓晖, 黎颖菁, 黄荣韶, 等. 凉粉草遗传多样性的 SCoT 和 ISSR 分析[J]. 西南农业学报, 2013, 25(5): 1834-1840
- [55] 陈虎, 何新华, 黄桂香, 等. 不同龙眼资源遗传多样性的 SCoT 和 ISSR 比较分析[J]. 广西植物, 2012, 32(4): 536-541
- [56] Amirmoradi B, Talebi R, Karami E. Comparison of genetic variation and differentiation among annual *Cicer* species using start codon targeted (SCoT) polymorphism, DAMD-PCR, and ISSR markers[J]. Plant Syst Evol, 2012, 298(9): 1679-1688
- [57] 叶翔, 黄晨阳, 陈强, 等. 中国主栽香菇品种 SSR 指纹图谱的构建[J]. 植物遗传资源学报, 2012, 13(6): 1067-1072
- [58] Jiang Q Q, Long G Y, Li W W, et al. Identification of genetic variation in *Citrus sinensis* from Hunan based on start codon targeted polymorphism[J]. Agric Sci Technol, 2011, 12(11): 1594-1599
- [59] 蒋巧巧. 应用分子标记技术鉴定湖南甜橙变异株系的研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2011
- [60] 陈香, 苏伟强, 刘业强, 等. 36 份菠萝种质的遗传多样性 SCoT 分析[J]. 西南农业学报, 2012, 25(2): 625-629
- [61] 罗霆, 杨海霞, 岑华飞, 等. SCoT 分子标记在割手密遗传图谱构建中的应用[J]. 植物遗传资源学报, 2013, 14(4): 704-710
- [62] 刘超, 党江波, 魏炸昕, 等. SCoT 分子标记技术初步应用于烟草属部分材料的遗传分析及种间杂种的鉴定[J]. 中国烟草学报, 2013, 19(5): 107-111
- [63] 杨祥燕, 蔡元保, 黄秋伟, 等. 番木瓜主栽品种 SCoT 指纹图谱构建及遗传变异分析[J]. 西北植物学报, 2013, 33(9): 1756-1761
- [64] Gorji A M, Poczar P, Polgar Z, et al. Efficiency of arbitrarily amplified dominant markers (SCoT, ISSR and RAPD) for diagnostic fingerprinting in tetraploid potato[J]. Am J Potato Res, 2011, 88(3): 226-237
- [65] 高岭, 冯尚国, 何仁锋, 等. 兰属植物目标起始密码子 (SCoT) 遗传多样性分析[J]. 园艺学报, 2013, 40(10): 2026-2032
- [66] 陈香玲, 李杨瑞, 杨丽涛, 等. cDNA-SCoT 基因差异表达两种电泳方法的比较研究[J]. 生物技术通报, 2010(10): 93-95
- [67] 陈香玲, 李杨瑞, 杨丽涛, 等. 低温胁迫下甘蔗抗寒相关基因的 cDNA-SCoT 差异显示[J]. 生物技术通报, 2010(8): 120-124
- [68] 吴建明, 李杨瑞, 王爱勤, 等. 赤霉素诱导甘蔗节间伸长基因的 cDNA-SCoT 差异表达分析[J]. 作物学报, 2010, 36(11): 1883-1890
- [69] 李东宾, 高燕会, 斯金平. 冷胁迫下铁皮石斛抗寒相关基因的 SCoT 差异表达分析[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(4): 511-515
- [70] 陈明辉, 张保青, 宋修鹏, 等. 宿根矮化病菌诱导甘蔗差异表达基因的 cDNA-SCoT 分析[J]. 作物学报, 2013, 39(6): 1119-1126
- [71] 罗霆, 杨海霞, 岑华飞, 等. SCoT 分子标记在割手密遗传图谱构建中的应用[J]. 植物遗传资源学报, 2013, 14(4): 704-710
- [72] 韩国辉. 基于 EST-SSR、Genomic-SSR 和 SCoT 标记的柑橘连锁图谱构建及杂种和多倍体遗传分析[D]. 重庆: 西南大学, 2012
- [73] 杨海霞. 割手密分子遗传连锁图谱的构建[D]. 南宁: 广西大学, 2013
- [74] 汤华, 帅爱华, 向福英. 植物基因差异表达的研究方法及进展[J]. 海南大学学报: 自然科学版, 2006, 24(3): 309-316
- [75] 韩国辉, 向素琼, 洪棋斌, 等. 柑橘分子遗传连锁图谱的构建与比较[J]. 园艺学报, 2013, 40(S): 2620
- [76] 孙文英, 张玉星, 张新忠, 等. 梨分子遗传图谱构建及生长性状的 QTL 分析[J]. 植物遗传资源学报, 2009, 10(2): 182-189
- [77] 徐微, 张宗文, 张恩来, 等. 大粒裸燕麦 (*Avena nuda* L.) 遗传连锁图谱的构建[J]. 植物遗传资源学报, 2013, 14(4): 673-678