

李立群,程显,殷楠,等. 基于 HRM 技术的小麦光周期基因功能标记的开发和应用[J]. 江苏农业科学,2018,46(18):17-20.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.18.005

# 基于 HRM 技术的小麦光周期基因功能标记的开发和应用

李立群,程显,殷楠,郑锦娟,任慧丽,南春芹,杨智全

(西北农林科技大学农学院,陕西杨凌 712100)

**摘要:**根据前期研究小麦光周期基因 *TaCO9-1A* 在春性品种和冬性品种间存在的差异,开发特异的分子标记 TWS[T 代表小麦(*Triticum aestivum* L.),W 代表冬性(winter),S 代表春性(spring)],利用该标记通过高分辨率熔解曲线(high resolution melting curve,简称 HRM)技术对典型的强冬性品种中麦 895、春性品种宁春 4 号、223 份小麦自然群体及冬春杂交的 2 个  $F_2$  代群体进行基因分型,并利用传统的聚丙烯酰胺凝胶电泳(polyacrylamide gel electrophoresis,简称 PAGE)检测方法进行分型验证。结果表明,HRM 技术能准确、快速地检测出样本基因型,结果与聚丙烯酰胺凝胶电泳检测结果完全一致,223 份材料中 99 份材料为春性小麦(TS)型,124 份材料为冬性小麦(TW)型, $F_2$  代分离群体中可明确分离 TW/TS/W(杂合)、TS 基因型,且分离比为 1:2:1,说明该标记可应用于自然群体及  $F_2$  代分离群体的基因分型。田间调查及关联分析表明,TWS 标记与小麦春冬性及早熟性显著关联( $P<0.01$ )。该标记的开发及其高通量分子检测方法的应用对小麦分子标记辅助选择育种、小麦品种冬春性检测及品种区划布局等具有重要的指导作用。

**关键词:**小麦;HRM;春冬性;*TaCO9-1A*;分子标记

**中图分类号:** S512.103.53 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)18-0017-04

小麦光周期反应特性及春化作用直接影响小麦品种の利用、种植区划、引种及栽培技术,间接影响产量、抗病、抗逆等许多重要的农艺性状<sup>[1]</sup>。挖掘小麦光周期基因及其春化特性,对于利用分子育种选育小麦新品种具有重大意义。

笔者所在课题组通过同源克隆得到与小麦春化作用和光周期密切相关的小麦光周期基因 *TaCO9-1A*,该基因冬性品种较春性品种的第二外显子在 321 bp 处有 6 个碱基的缺失,关联分析表明,该等位变异与抽穗期及开花期显著关联,是一个与冬春性相关的基因<sup>[2]</sup>。

高分辨率熔解曲线分析技术(high resolution melting curve,简称 HRM)是一种基于碱基熔解温度差异所形成的不同熔解曲线的基因分析新技术。该分析技术因具有通量高、成本低、结果准确、不受检测位点限制等优点得到普遍关注<sup>[3-5]</sup>。尤其对于多样本基因分型、突变扫描、甲基化分析、序列匹配等检测优势显著<sup>[6-8]</sup>。目前,在医学疾病诊断、蔬菜、果树等作物种质资源和新品种鉴定方面应用较广<sup>[9-11]</sup>,但在小麦中的应用研究才刚刚起步。

本研究依据 *TaCO9-1A* 基因在冬春性品种中的序列差异,开发标记,利用高分辨率熔解曲线分析技术对 223 份小麦品种及冬春品种杂交的  $F_2$  代群体进行基因分型,并采用传统

的聚丙烯酰胺凝胶电泳技术进行分型验证。田间表型及基因型相关分析表明,该标记及高通量分子检测方法可以快速、简单地区分小麦的冬春性。本研究对于分子标记辅助选择育种、品种冬春性检测及品种区划等具有重要的指导意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

本试验所用材料为典型的强冬性小麦品种中麦 895 和春性小麦品种宁春 4 号以及其他来自不同麦区的 223 份自然群体。2 个分离群体,即春性品种扬麦 14 与冬性品种中麦 895 杂交后代 103 株  $F_2$  代及其对应的  $F_3$  代株系(群体 I);扬麦 14 和冬性品种陕农 56 杂交后代 297 株  $F_2$  代及其对应的  $F_3$  代株系(群体 II)。

2 个杂交组合的  $F_2$  代于 2014 年 10 月种植在西北农林科技大学斗口综合试验站,对标记的植株单株收获,脱粒。 $F_3$  代于 2015 年 10 月种植在杨凌荣华种业有限公司试验田,2 行种植,行长 1 m,行距 25 cm,自然群体于 2014 年及 2015 年 10 月种植在西北农林科技大学北校试验田,按常规田间管理。

试验所用的主要仪器包括罗氏荧光定量 PCR 仪 LightCycler96、北京君意 JY-5000 电泳仪及 JY-CX3B 电泳槽、Bio-Rad C1000 基因扩增仪等。

### 1.2 方法

**1.2.1 小麦 DNA 的提取** 2014 年 11 月对自然群体叶片进行取材以提取基因组 DNA;对标记的  $F_2$  代群体材料叶片进行取样,并提取叶片基因组 DNA,每份材料取 0.2~0.3 g 新鲜叶片,用液氮预冷后粉碎并放入 1.5 mL 离心管中,按照十

收稿日期:2017-04-06

基金项目:国家转基因生物新品种培育重大专项(编号:2016ZX08002003);国家级大学生创新创业训练计划(编号:201410712018)。

作者简介:李立群(1969—),女,陕西渭南人,硕士,高级实验师,主要从事实验教学、实验室管理和生物技术育种工作。E-mail:liliqun@nwsuaf.edu.cn。

六烷基三甲基溴化铵(hexadecyl trimethyl ammonium bromide, 简称 CTAB)方法提取小麦基因组 DNA。

1.2.2 引物设计 根据美国国立生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, 简称 NCBI)网站中公布的 *TaCO9* 基因序列(Gene 登录号:236233)参照设计引物,引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,纯化方式为聚丙烯酰胺凝胶电泳(polyacrylamide gel electrophoresis, 简称 PAGE)。试验所用的 TWS [T 代表小麦(*Triticum aestivum* L.),W 代表冬性(winter),S 代表春性(spring)]标记扩增引物,上游引物 F:5′-GGAAGAGGCGGCGTA CGAG-3′;下游引物 R:5′-GAGCGGAACCCGAGGTC-3′。

1.2.3 HRM 分析技术反应体系及程序 PCR 和 HRM 分析过程均在罗氏 LightCycler® 96 上进行,反应条件见表 1。HRM 的反应体系为 20 μL: 80 ng 模板 DNA, 上下游引物各 0.4 μmol/L, 10 μL LightCycler HRM Master Mix (Roche), 1.5 mol/L Mg<sup>2+</sup> (Roche), 其余用 ddH<sub>2</sub>O 补足。HRM 分析反应程序中首先是普通 PCR 反应程序,得到 PCR 产物后进行 HRM 分析。

表 1 HRM 分析技术反应条件

分析技术	反应条件
PCR	95 ℃ 10 min
	95 ℃ 10 s
	61 ℃ 15 s
	72 ℃ 15 s
	45 个循环
HRM	72 ℃ 10 min
	95 ℃ 60 s
	40 ℃ 60 s
	65 ℃ 1 s
	97 ℃ 1 s
	37 ℃ 1 s

注:HRM 程序中,每升高 1 ℃ 收集 15 次荧光信号。

1.2.4 HRM 扩增产物的序列分析 本研究采用品种中麦 895 和宁春 4 号的 HRM 反应产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳分离,将目标片段切胶回收,用 pMD18-T 载体进行克隆,由生工生物工程(上海)股份有限公司测序。每个品种至少测定 10 个克隆,以确保核苷酸序列的准确性。引物的扩增产物序列等位变异采用 DNAMAN 软件进行分析,并在 NCBI 数据库上进行比对。

1.2.5 小麦 *TaCO9-1A* 基因功能标记检测群体的多态性 利用 TWS 引物对样品进行 PCR 扩增,PCR 反应采用 25 μL

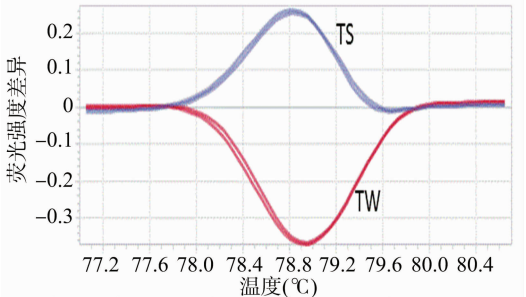
体系:10 × PCR 缓冲液(含 Mg<sup>2+</sup>) 2.5 μL, dNTP Mix (各 2.5 mmol/L)2.0 μL, 10 μmol/L 上、下游引物各 1 μL,模板 DNA 1 μL,5 U/μL *Taq* DNA 聚合酶 0.125 μL,用 ddH<sub>2</sub>O 补至 25 μL。扩增程序:94 ℃ 5 min;94 ℃ 30 s,60 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s,32 个循环;72 ℃ 10 min。用聚丙烯酰胺凝胶电泳检测扩增产物,记录带型。

1.2.6 田间性状调查及其关联分析 对田间种植材料的抽穗期和开花期进行调查,记录日期。小区 60% 以上的穗部露出 2/3 记为抽穗,小区 60% 以上的穗中部小穗开花记为开花。其中 F<sub>2:3</sub> 群体抽穗期和开花期以平均值替代。用 Excel 2007 对田间表型数据进行初步处理,然后使用 SPSS 软件对不同基因型所对应表型平均值进行 *t* 检验和 Duncan's 检验(由于表型数据为日期且多为 4 月份,因此以 4 月 1 日为参考标准,将其换算成具体时间,例如 4 月 16 日等同于 16 d,5 月 3 号等同于 33 d)。

2 结果与分析

2.1 HRM 技术分析中麦 895 和宁春 4 号的基因型

用特异 TWS 标记引物对材料中麦 895 和宁春 4 号进行 HRM 分析,结果显示,这 2 个材料的高分辨率溶解曲线差异明显(图 1),这是由于中麦 895 的扩增产物有 6 bp 碱基的缺失,而宁春 4 号有 6 bp 碱基的插入,因此产生了 2 种截然不同的溶解曲线,将宁春 4 号命名为春性小麦(TS)基因型材料,将中麦 895 命名为冬性小麦(TW)基因型材料。



红色、蓝色曲线分别表示 TWS 引物组合在中麦 895、宁春 4 号中的扩增产物溶解曲线  
图1 中麦 895 与宁春 4 号的高分辨率溶解曲线

2.2 扩增产物的序列分析

通过比对 TWS 引物扩增产物测序结果,发现宁春 4 号的扩增产物序列比中麦 895 的序列多 6 个碱基的插入(图 2)。说明 HRM 分析的溶解曲线的差异是由 *TaCO9-1A* 基因 6 bp 碱基的插入/缺失引起的。

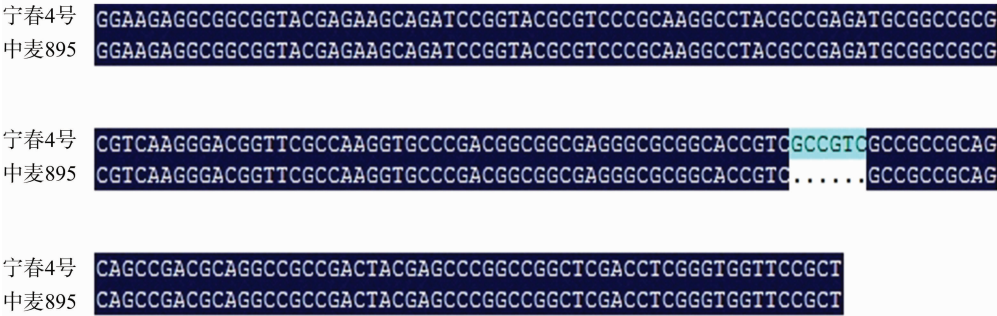


图2 *TaCO9-1A* 基因在 2 个品种间的序列差异

### 2.3 HRM 技术对自然群体的基因分型

将中麦 895 与宁春 4 号作为对照,利用 HRM 技术分析自然群体材料的 TS 基因型与 TW 基因型,高分辨率熔解曲线与宁春 4 号相近的材料为 TS 基因型,与中麦 895 相近的材料为 TW 基因型。结果显示,在 223 份材料中有 99 份材料的熔解曲线与宁春 4 号的熔解曲线相近,124 份材料的熔解曲线与中麦 895 的熔解曲线相近(具体材料未列表),由此得出供试材料中 TS 基因型材料有 99 份,TW 基因型材料有 124 份(图 3),表明 HRM 分析技术能够用于基因碱基缺失/插入等位变异的高通量分子检测。

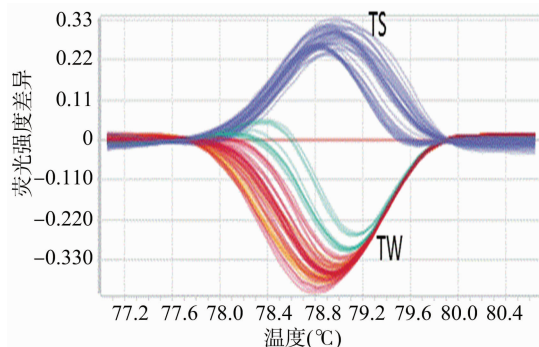


图3 供试材料高分辨率熔解曲线

### 2.4 自然群体中 *TaCO9-1A* 基因型多态性检测

利用特异 TWS 标记对 223 份供试小麦品种 *TaCO9-1A* 基因多态性进行检测,聚丙烯酰胺凝胶电泳结果显示,99 份小麦带型与宁春 4 号的 TS 型一致,124 份小麦带型与中麦 895 的 TW 型一致(图 4)。该检测结果与 HRM 基因分型结果完全相同,说明 HRM 技术可以实现高通量分子检测。

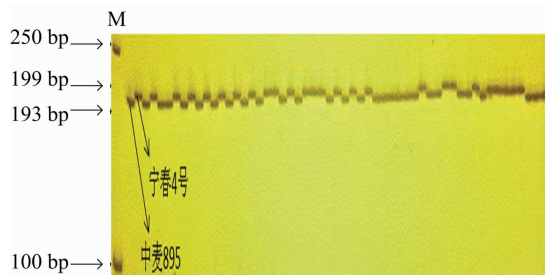


图4 TWS 标记对群体部分材料电泳结果

### 2.5 $F_2$ 代群体的 *TaCO9-1A* 基因型分析

利用 HRM 分析技术对扬麦 14/中麦 895、扬麦 14/陕农 56 2 个组合的  $F_2$  代群体进行检测,得到与图 3 相似的基因分型图。再利用传统的 PAGE 技术进行 *TaCO9-1A* 的遗传多态性分析,PAGE 结果显示 3 种带型:1 种 199 bp 的条带(TS 型)、1 种 193 bp 的条带(TW 型)和既有 199 bp 也有 193 bp 的条带(TS/W 型)。103 株群体 I 中,22 株为 TS 型,50 株为 TS/W 型,31 株为 TW 型;297 株群体 II 中,60 株为 TS 型,157 株为 TS/W 型,80 株为 TW 型(图 5),分型结果与 HRM 分型结果完全一致。且  $F_2$  代基因型 TS 型:TS/W 型:TW 型 = 1:2:1 的分离比例,表明利用该标记的 2 种方法都可以在育种的分离群体中进行基因分型。

### 2.6 自然群体基因型与田间表型的相关性

根据苗期、抽穗期和开花期的生长发育情况综合判断小

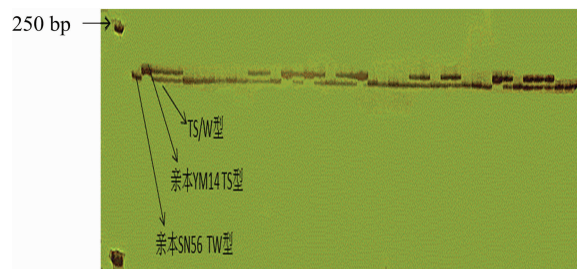


图5 TWS 标记对  $F_2$  代群体部分材料电泳结果

麦品种冬春性。由表 2 可知,供试材料的抽穗期、开花期在 2015 年及 2016 年整体差别不大。具有 TS 型 *TaCO9-1A* 基因的小麦品种抽穗期或开花期较早[(14 ± 2.14) d ~ (23 ± 1.86) d],而具有 TW 型 *TaCO9-1A* 基因的小麦品种抽穗期或开花期较晚[(22 ± 2.47) d ~ (29 ± 2.80) d],且 TS 型品种的平均抽穗期、开花期分别比 TW 型品种提早 8、6 d,该标记与抽穗期及开花期显著关联( $P < 0.01$ )。

表 2 部分小麦品种在不同年份的抽穗期和开花期

品种	基因型	冬春性	抽穗期(月-日)		开花期(月-日)	
			2015 年	2016 年	2015 年	2016 年
宁春 4	TS	春	04-15	04-12	04-26	04-19
洛麦 24	TS	春	04-15	04-13	04-25	04-21
天麦 198	TS	春	04-13	04-11	04-23	04-22
国麦 10	TS	春	04-13	04-11	04-24	04-19
洛麦 23	TS	春	04-16	04-12	04-24	04-21
淮麦 05155	TS	春	04-10	04-09	04-21	04-18
兰考 679	TS	春	04-10	04-10	04-19	04-19
淮麦 30	TS	春	04-10	04-10	04-21	04-20
武农 1 号	TS	春	04-15	04-14	04-25	04-23
武农 988	TS	春	04-15	04-13	04-24	04-21
武农 8 号	TS	春	04-16	04-13	04-25	04-23
徐麦 6 号	TS	春	04-10	04-08	04-23	04-21
新麦 2111	TS	春	04-13	04-11	04-23	04-19
宁春 13	TS	春	04-15	04-13	04-25	04-21
郑麦 7698	TW	冬	04-23	04-21	04-29	04-27
中麦 895	TW	冬	04-21	04-18	04-30	04-28
中麦 856	TW	冬	04-20	04-18	04-25	04-25
双麦 998	TW	冬	04-20	04-17	04-30	04-26
陕农 56	TW	冬	04-25	04-23	05-02	04-30
天麦 989	TW	冬	04-23	04-22	04-30	04-30
中原 18	TW	冬	04-19	04-17	04-25	04-25
周麦 26	TW	冬	04-21	04-19	04-26	04-25
天麦 2098	TW	冬	04-23	04-21	05-02	04-29
周麦 28	TW	冬	04-25	04-23	04-30	04-29
周麦 30	TW	冬	04-21	04-20	04-27	04-26
华成 3366	TW	冬	04-25	04-23	04-30	04-28
农大 1108	TW	冬	04-21	04-20	04-27	04-26
徐麦 9074	TW	冬	04-24	04-22	05-02	04-30
九麦 2 号	TW	冬	04-25	04-23	04-30	04-28

### 2.7 $F_2$ 代群体的基因型与 $F_{2:3}$ 群体田间表型的相关性

对 2 个  $F_{2:3}$  群体的小麦材料抽穗期和开花期进行统计,用 SPSS 软件分别对 2 个群体不同基因型的表型数据进行统计分析,结果显示,2 个群体中均检测到各基因型间抽穗期和开花期的差异达到了极显著水平。可见 *TaCO9-1A* 基因中 6 bp 碱基的插入/缺失突变会使小麦春冬性相关性状的日期

显著提前。由 TWS 标记判定的冬春性小麦品种与田间表现及资料记载的基本一致,说明利用该分子标记检测的小麦的冬春性具有较高的准确性。

### 3 讨论

HRM 分析是一种高度灵敏、快速扫描 PCR 扩增产物内单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, 简称 SNP) 变异的简单有效的方法<sup>[12]</sup>, 该技术已经成功应用于同源四倍体植物苜蓿和马铃薯的 SNP 基因分型和多态性检测<sup>[13-14]</sup>。笔者所在课题组前期利用 HRM 技术进行 *TaGW2-6A* 基因“T”插入突变的分子检测, 准确区分籽粒大小基因型, 并通过常规的 Sanger 测序验证了该方法的可靠性<sup>[15-16]</sup>。本研究利用 HRM 分析技术将小麦材料的冬春性明确分型。可见, HRM 是一种准确而高效的 SNP 检测和基因分型技术, 解决了小麦基因位点单碱基突变和小片段插入/缺失高通量检测的难题, 为小麦分子标记辅助选择育种奠定了技术基础。

本研究同时利用 HRM 分析和特异的 SSR 标记的 PAGE 对 223 份不同小麦品种及 2 个杂交组合  $F_2$  代群体进行了 *TaCO9-1A* 基因分型, 分型结果一致, TS 型材料 99 份, TW 型材料 124 份。相比而言, HRM 操作简单, 灵敏快速、结果直观, 是一种高通量的检测方法。

目前已报道的小麦春化基因主要有 *Vrn-1A*、*Vrn-1B* 和 *Vrn-1D*, 且对冬春性作用大小依次为 *Vrn-1A* > *Vrn-1B* > *Vrn-1D*<sup>[17]</sup>, 可根据这 3 种基因的不同显隐性组成来预测小麦品种的冬春性<sup>[18-19]</sup>。但也有其他调控因子参与影响小麦的冬春性<sup>[20]</sup>。本研究结果表明, 小麦光周期基因 *TaCO9-1A* 明显影响小麦品种的抽穗期和开花期, 针对该基因开发的标记可用于小麦品种的冬春性鉴定。本研究开发的高分辨率熔解曲线分析方法为高通量分子检测及标记辅助选择育种奠定了技术基础。

### 参考文献:

- [1] Zhang X K, Xiao Y G, Zhang Y, et al. Allelic variation at the vernalization genes *Vrn-1A*, *Vrn-1B*, *Vrn-1D* and *Vrn-1B3* in Chinese wheat cultivars and their association with growth habit [J]. Crop Science, 2008, 48(2): 458-470.
- [2] 冉从福, 邵 慧, 余 静, 等. 小麦光周期基因 *TaCO9-1A* 的克隆、功能标记开发及其与冬春性关系的研究 [J]. 农业生物技术学报, 2014, 22(2): 1471-1478.
- [3] 许家磊, 王 宇, 后 猛, 等. SNP 检测方法的研究进展 [J]. 分子植物育种, 2015, 13(2): 475-482.
- [4] 黄 好, 黄国庆. 高分辨率熔解——SNP 及突变研究的最新工具 [J]. 生命的化学, 2007, 27(6): 573-576.
- [5] 谭昌渊, 罗九甫, 任兆瑞. 高分辨率熔解曲线分析——分子诊断的新技术 [J]. 生命科学研究, 2009, 13(3): 268-271.
- [6] 甘四明, 李发根, 翁启杰, 等. 高分辨率熔解及其在植物 DNA 变

- 异检测中的应用 [J]. 基因组学与应用生物学, 2010, 29: 1-6.
- [7] 陈 亮, 赵柏淦, 李 玲, 等. 人工诱导柃木扇贝雌核发育胚胎的 SNP 标记分析 [J]. 中国海洋大学学报 (自然科学版), 2014, 44(2): 48-52.
- [8] 胡笑蓉, 毛雄英, 王卫华, 等. 一种基于 HRM 技术的快速 DNA 甲基化检测方法 [J]. 中国卫生检验杂志, 2012, 22(6): 1336-1338.
- [9] Ganopoulos I, Argiriou A, Tsaftaris A. Microsatellite high resolution melting (SSR-HRM) analysis for authenticity testing of protected designation of origin (PDO) sweet cherry products [J]. Food Control, 2011, 22(3/4): 532-541.
- [10] Jeong H J, Jo Y D, Park S W, et al. Identification of Capsicum species using SNP markers based on high resolution melting analysis [J]. Genome, 2010, 53(12): 1029-1040.
- [11] Ganopoulos I, Bosmali I, Madesis P A. Microsatellite genotyping with HRM (High Resolution Melting) analysis for identification of the PGI common bean variety Plake Megalosperma Prespon [J]. European Food Research and Technology, 2012, 234(3): 501-508.
- [12] Cho M H, Ciulla D, Klanderman B J, et al. High-resolution melting curve analysis of genomic and whole-genome amplified DNA [J]. Clinical Chemistry, 2008, 54(12): 2055-2058.
- [13] Han Y H, Khu D M, Monteros M J. High-resolution melting analysis for SNP genotyping and mapping in tetraploid alfalfa (*Medicago sativa* L.) [J]. Molecular Breeding, 2012, 29(2): 489-501.
- [14] de Koeper D, Douglass K, Murphy A, et al. Application of high-resolution DNA melting for genotyping and variant scanning of diploid and autotetraploid potato [J]. Molecular Breeding, 2010, 25(1): 67-90.
- [15] 寇 程, 李学军, 高 欣, 等. 小麦粒重基因 *TaGW2-6A* 等位变异的高通量分子检测 [J]. 麦类作物学报, 2015, 35(11): 1467-1475.
- [16] 寇 程, 高 欣, 李立群, 等. 小麦粒重基因 *TaGW2-6A* 等位变异的组成分析及育种选择 [J]. 作物学报, 2015, 41(11): 1640-1647.
- [17] Loukoianov A, Yan L, Blechl A, et al. Regulation of VRN-1 vernalization genes in normal and transgenic polyploidy wheat [J]. Plant Physiology, 2015, 138(4): 2364-2373.
- [18] 金芬芬, 朱灿灿, 王 翔, 等. 调控小麦春化发育特性的相关基因研究进展 [J]. 河南农业科学, 2012, 41(12): 1-6.
- [19] 曾巧玲, 彭正松, 魏淑红, 等. 小麦春化基因 *Vrn1* 组成的 PCR 检测 [J]. 西华师范大学学报 (自然科学版), 2012, 33(1): 61-67.
- [20] 田芳慧, 阳 霞, 刘路平, 等. 黄淮麦区小麦品种春化光周期基因型及其与产量性状的相关性 [J]. 麦类作物学报, 2013, 33(4): 647-651.