中图分类号：S532　　文献标识码：B　　文章编号：1672－3635(2019)06-0338-06

马铃薯高支链淀粉突变体‘P24023’的HRM分子标记开发与应用

范书华[1]，董清山[1*]，赵团结[2]，解国庆[1]，王　艳[1]，赵云彤[1]，时新瑞[1]

（1. 黑龙江省农业科学院牡丹江分院，黑龙江　牡丹江　157000；2. 南京农业大学，江苏　南京　210095）

摘　要：马铃薯支链淀粉在工业中有重要的应用价值，寻找高效、低成本的分子标记对提高高支链淀粉马铃薯的育种效率具有重要的意义。通过建立高分辨率熔解曲线(High resolution melting，HRM)分子标记技术，对马铃薯高支链淀粉突变体‘P24023’和栽培品种‘克新12号’、‘大西洋’、‘夏波蒂’、‘尤金’、‘早大白’、‘东农303’以及‘P24023’×‘克新12号’有性杂交F_2代进行基因分型。结果表明，开发的HRM标记能很好地区分7份马铃薯材料及‘P24023’×‘克新12号’F_2杂交后代，并且该标记分型结果与基因测序、淀粉含量结果完全吻合。因此，开发的HRM分子标记可用于高支链淀粉马铃薯的种质资源鉴定以及分子标记辅助育种。

关键词：马铃薯；高支链淀粉；*GBSS*基因；高分辨率熔解曲线；基因分型

Development and Application of High Resolution Melting (HRM) Molecular Marker for High Amylopectin Mutant 'P24023' in Potato

FAN Shuhua[1], DONG Qingshan[1*], ZHAO Tuanjie[2], XIE Guoqing[1], WANG Yan[1], ZHAO Yuntong[1], SHI Xinrui[1]

(1. Mudanjiang Branch of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Mudanjing, Heilongjiang 157000, China;

2. Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu 210095, China)

Abstract: Potato amylopectin has important application value in industry. In order to improve the breeding efficiency of high amylopectin potatoes, it is very important to find efficient and low- cost molecular markers. Through the establishment of high resolution melting (HRM) molecular marker technology, the genotyping of high amylopectin mutant 'P24023' and the cultivated varieties 'Kexin 12', 'Atlantic', 'Shepody', Youjin', 'Zaodabai', 'Donong 303', and the F_2 progenies of 'P24023' × 'Kexin 12' was carried out. The results showed that the developed HRM markers could distinguish seven potato varieties and the F_2 progenies of 'P24023' × 'Kexin 12', and the results of the marker typing were in good agreement with the results of gene sequence and starch content. Therefore, HRM molecular markers could be used in the identification of germpasm resources and molecular assisted breeding of high amylopectin potatoes.

Key Words: potato; high amylopectin; ***GBSS*** gene; high resolution melting; genotyping

马铃薯(*Solanum tuberosum* L.)淀粉包含支链淀粉和直链淀粉，马铃薯支链淀粉具有抗老化性、改善冻融平衡、高膨胀性、高吸水性及增稠作用等功能，被广泛应用于食品、包装材料的制作、医药和建筑工业等领域[1]。工业生产上分离直链淀粉和支链淀粉工艺复杂、费时、费力[2]，因此，培育出支链淀粉含量更

收稿日期：2019-10-18

基金项目：南京农业大学作物遗传与种质创新国家重点实验室开放基金项目(ZW201814)。

作者简介：范书华(1974-)，女，硕士，副研究员，主要从事马铃薯育种及栽培技术研究。

***通信作者**(Corresponding author)：董清山，硕士，研究员，主要从事马铃薯育种，E-mail: mdjdqs@126.com。

高的马铃薯品种具有重要的经济和社会意义[3]。

通过对豌豆突变体[4]、马铃薯[5]及禾谷类突变体[6]的研究表明，植物体内如果缺少GBSS蛋白，直链淀粉就不能合成。刘玉汇等[7]利用RNAi技术降低*GBSS*基因转录水平获得了支链淀粉含量比对照高10.31%~20.92%的马铃薯，并发现支链淀粉含量与基因沉默效率呈极显著正相关关系。刘永强[8]通过转基因的方法干扰*GBSS*基因表达从而获得了支链淀粉比例高达99.2%的马铃薯材料。Andersson等[9]通过基因编辑的方法获得了马铃薯GBSS突变体材料‘P24023’，*GBSS*基因功能丧失后，马铃薯支链淀粉含量明显升高。马铃薯栽培品种‘克新12号’是黑龙江省农业科学院马铃薯研究所利用自交种子选育而成的高淀粉品种[10]，具有高产、抗病、淀粉含量高的优点，已经在全国多地推广[11]。‘克新12号’属加工型品种，总淀粉含量为16.5%，直链淀粉占24.7%，支链淀粉占总淀粉比例为75.3%左右[12]。为了培育更适合加工生产支链淀粉的马铃薯种质，本课题组通过有性杂交的方法把高支链淀粉基因*gbss*由‘P24023’导入到‘克新12号’。

高分辨率熔解曲线(High resolution melting，HRM)是近些年发展起来的新技术，该技术可以分辨单个碱基的基因突变，具有灵敏度高，成本低，操作简便的特点，已在水稻、玉米等作物上广泛应用[13]。本研究针对*gbss*基因的功能性变异位点，将其开发为HRM分子标记，为进一步将*gbss*基因导入到更多的适合本地栽培的马铃薯品种中，创制更多高支链淀粉马铃薯品种提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本研究中所用马铃薯突变体材料‘P24023’由瑞士农业科学大学Hofvander教授馈赠，支链淀粉含量占总淀粉含量比例为99.5%；其余11份马铃薯材料由黑龙江省农业科学院牡丹江分院收集保存(表1)。这12份马铃薯材料用于*GBSS*基因突变位点多态性检测。

为了培育适合本地种植的高支链淀粉马铃薯品种，以‘P24023’突变体为供体，利用*gbss*基因改良‘克新12号’。以‘克新12号’为母本和‘P24023’为父本，通过去雄杂交，得到杂交F_1代实生种子，F_1代自交结实得到F_2代实生种子。由于12份马铃薯材料中有11份材料*GBSS*基因的突变区域没有多态性，为控制试验规模，挑选6个当地农业生产中的主栽品种，‘克新12号’、‘尤金’、‘早大白’、‘东农303’、‘大西洋’、‘夏波蒂’和高支链淀粉突变体材料‘P24023’以及‘克新12号’和‘P24023’的F_2代群体用于分子标记功能分析。每个单株取健康叶片用于提取基因组DNA。

常规分子生物学试剂购自上海生物工程有限公司。

1.2 引物设计及信息

根据‘P24023’突变体中的*GBSS*基因序列设计HRM引物gbss-F/gbss-R(gbss-F：5'-tctctataca ggtcatggacgc-3'，gbss-R：5'-cctcaagtctgccgatgaa gcc-3')，引物由深圳华大基因公司合成。

1.3 PCR扩增以及HRM检测

依据刘玉汇等[7]的方法提取马铃薯叶片基因组

表1 12份用于*GBSS*多态性分析的马铃薯品种

Table 1 Twelve potato varieties used for polymorphism analysis of *GBSS*

编号 Number	品种 Variety	编号 Number	品种 Variety
1	克新12号	7	堪内贝克
2	克新2号	8	尤金
3	大西洋	9	早大白
4	夏波蒂	10	东农303
5	斯诺登	11	P24023
6	费乌瑞特	12	东农309

DNA。PCR反应体系如下：10 ng基因组DNA，Buffer（Mg^{2+} plus），250 μmol/L dNTPs，0.1 μmol/L gbss-F/gbss-R引物，0.5 U rTaq DNA聚合酶（TaKaRa，Japan）和0.1 μL 20×EvaGreen荧光染料（Biotium USA），加ddH_2O补足至10 μL。PCR扩增程序如下：94 ℃ 4 min；94 ℃ 30 s，57 ℃ 30 s，72 ℃ 10 s，39个循环；72 ℃ 1 min；95 ℃ 1 min；25 ℃ 1 min。PCR结束后，每个反应体系中加入1 μL温度内参，2 500 r/min离心1 min后即可进行高分辨率熔解曲线采集及分型，后续具体操作参考金名捺等[13]的方法。

PCR产物同时送到华大基因进行DNA测序，确定不同马铃薯材料的基因类型；序列比对使用Lasergene软件。

1.4　淀粉含量测定

采用水沉淀法[14]制备马铃薯块茎淀粉，采用双波长法分别测定支链淀粉和直链淀粉含量，两者和为总淀粉含量，计算支链淀粉占淀粉的百分率。测定直链淀粉含量采用的波长分别为λ_1 = 500 nm，λ_2 = 600 nm；测定支链淀粉采用的波长分别为λ_3 = 700 nm，λ_4 = 590 nm。

2　结果与分析

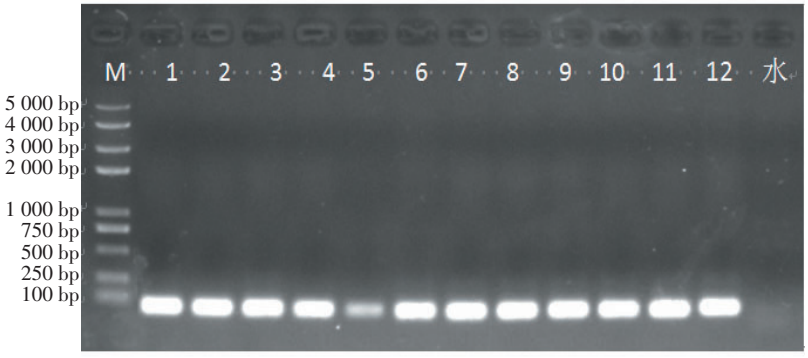
2.1　*GBSS*功能基因特异性分子标记开发

为了给高支链淀粉马铃薯育种提供快速检测的分子标记，本研究在‘P24023’突变体的*GBSS*基因突变位点两侧设计了gbss-F/gbss-R引物，分别以12份马铃薯叶片基因组DNA为模板进行PCR扩增。结果显示PCR扩增特异性好，片段大小也与预测的一致（图1）。

通过对12份马铃薯材料（表1）的基因组进行扩增、测序，对测序结果进行比对分析发现，除‘P24023’外，其他11份材料在GBSS基因突变区域均没有多态性（图2）。

2.2　*gbss*基因功能分子标记的验证

由于12份马铃薯材料中有11份材料*GBSS*基因的突变区域没有多态性，选择了6份栽培品种‘克新12号’、‘尤金’、‘早大白’、‘东农303’、‘大西洋’、‘夏波蒂’和带有*gbss*突变的‘P24023’以及‘P24023’×‘克新12号’的杂交F_2代群体用于标记的功能验证。种植F_2代实生种子共得到单株208株，利用gbss-F/gbss-R引物对上述马铃薯育种材料进行HRM分型检测，结果被检测群体被分为3种类型（图3）。一种是与‘P24023’分为一类的峰图（长实线）共6株，除‘P24023’外，有5株F_2代单株，简称‘P群’；一种是与普通栽培品种分为的峰图（空心曲线）共10株，除6个栽培品种外，有4株F_2代单株，简称‘K群’；而F_2代群体中绝大多数被分为第三类（实心连续曲线），共199株，简称‘F_2杂群’。每份材料做3次重复，每次结果都一致，证明该标记具有很



M：DNA marker；1~12：代表性的供试材料。
M: DNA marker; 1-12: test materials.

图1　引物gbss-F和gbss-R对马铃薯基因组DNA的扩增效果检测

Figure 1　Detection of amplification effects of primers gbss-F and gbss-R for potato genomic DNA

好的稳定性。

2.3 淀粉含量测定

根据HRM分型结果，每种群体(P群、F_2杂群和K群)植株分别挑选4个单株，对应植株所结块茎用于淀粉含量测定。结果显示P群植株块茎支链淀粉占总淀粉比例为99.1%，与‘P24023’相当；K群植株的块茎支链淀粉占总淀粉比例为75.5%，与‘克新12号’支链淀粉比例相同；而F_2杂群植株的块茎支链淀粉占总淀粉比例为80.5%(图4)。说明通过杂交转育*gbss*基因可以使块茎中的支链淀粉含量占总淀粉的比例显著上升。

以上结果表明，HRM能够对马铃薯支链淀粉基因的改良过程进行很好的跟踪。因此，gbss-F/gbss-R可以作为鉴定和检测高支链淀粉基因*gbss*的特异性功能分子标记，为马铃薯种质资源的创制和分子标记辅助改良提供技术支持。

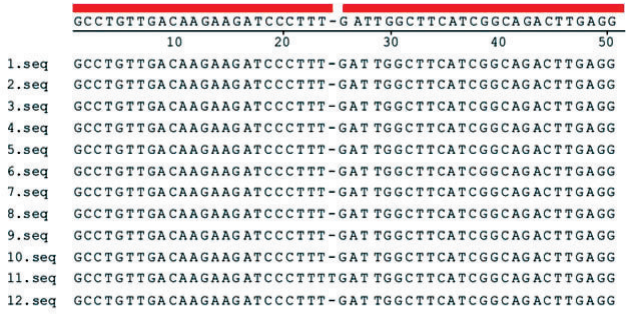
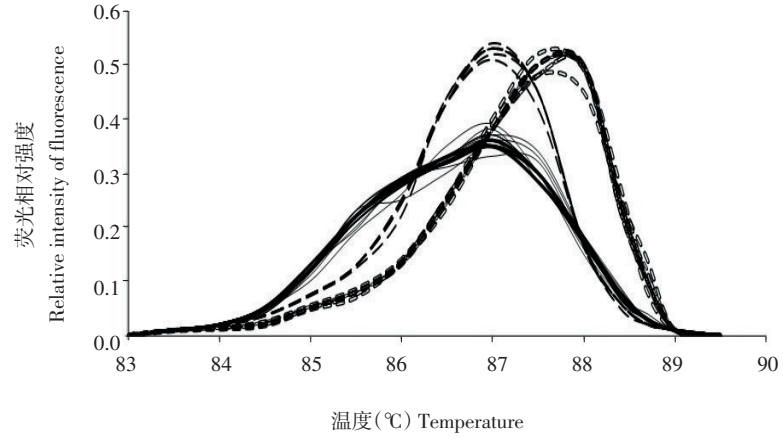


图2 12份马铃薯材料*GBSS*基因位点扩增产物的测序结果比对分析

Figure 2 Sequence analysis of amplified products of *GBSS* locus from 12 potato materials

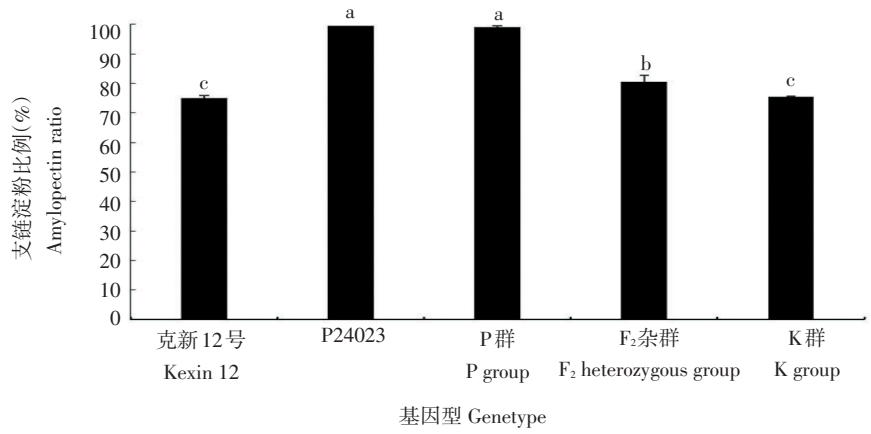


实的长划线代表‘P群’植株的高分辨率熔解峰；空心曲线代表‘K群’植株的高分辨率熔解峰；实心连续曲线代表‘F_2杂群’植株的高分辨率熔解峰。

Em dash curves represent high resolution melting peaks of 'P group' plants; hollow curves represent high resolution melting peaks of 'K group' plants; and solid continuous curves represent high resolution melting peaks of 'F_2 heterozygous group' plants.

图 3 引物gbss-F和gbss-R对马铃薯群体的HRM分型效果

Figure 3 HRM genotyping results of potato populations by gbss-F/gbss-R primer sets



误差线代为标准差。不同小写字母表示差异达0.05显著水平。采用最小显著差法进行检验。

Error bar represents standard deviation. Treatment means with different lowercase letter mean significance at 0.05 level as tested using method of least significant difference.

图4　马铃薯支链淀粉含量测定

Figure 4　Amylopectin content of different potato tubers

3　讨　论

马铃薯是黑龙江省重要作物[15]，除作为食物外，大部分用于工业生产淀粉原料使用。马铃薯淀粉包括直链淀粉和支链淀粉，由于性质不同，工业上需要把两种淀粉分别纯化。如果农业生产出的马铃薯只含有一种淀粉，就省去淀粉分离成本。关于直链淀粉的合成关键基因已有深入的研究，通过反义或干涉表达*GBSS*基因可以得到高支链淀粉含量马铃薯[4-6]。

随着分子生物学的发展，分子辅助育种得到越来越多的应用，分子标记可以准确跟踪一些重要的作物性状，而不受环境影响。目前马铃薯的分子标记主要是采用DNA电泳的方法进行[16]，该方法存在费时、费力、高成本、低效率等缺陷；改进后的小片段HRM方法是一种准确、高效、低成本的突变位点检测方法，高度灵敏性以及优良的准确性使得HRM方法在作物分子标记育种上具有巨大的应用潜力。栽培马铃薯是四倍体作物，四倍体基因组杂合度较高，其基因型研究相对二倍体复杂，其F_2代分离单株应该有多种基因型。本研究所开发的标记将杂交群体后代分为3种类型(图3)，是因为'F_2杂类'的199株单株应该包括了除亲本类型的多种基因型，所以单株间高分辨率熔解曲线有些差别(图3)，具体有哪些基因型还需进一步实验验证。

本研究基于*GBSS*基因突变位点设计的HRM标记分型检测方法能够高效、准确地进行高支链淀粉马铃薯资源的鉴定及改良后代群体的高通量筛选检测。本研究创制的高支链淀粉马铃薯新种质，总淀粉含量跟'克新12号'相当，但支链淀粉含量大幅度升高，为将来生产上提供更适合加工的马铃薯品种提供了优质资源。

[参 考 文 献]

[1] 王丽, 李淑荣, 句荣辉, 等. 马铃薯淀粉与面条品质特性关系研究进展 [J]. 食品工业, 2018, 39(3): 278-280.

[2] 吉宏武, 丁霄霖. 马铃薯直链淀粉与支链淀粉的分离方法 [J]. 食品科技, 2000(6): 6-7.

[3] 张红, 郑世英, 梁淑霞, 等. 高淀粉加工专用型马铃薯育种研究进展 [J]. 作物杂志, 2019(1): 9-14.

[4] Craig J, Lloyd J R, Tomlinson K, *et al*. Mutations in the gene encoding starch synthase II profoundly alter amylopectin structure in pea embryos [J]. Plant Cell, 1998, 10: 413-426.

[5] Hovenkamp-Hermelink J H M, Jacobsen E, Ponstein A S, *et al*.

Isolation of an amylose-free starch mutant of the potato (*Solanum tuberosum* L.) [J]. Theoretical and Applied Genetics, 1987, 75(1): 217-221.

[6] Denyer K, Hylton C M, JennerC F, *et al*. Identification of multiple isoforms of soluble and granule-bound starch synthase in developing wheat endosperm [J]. Planta, 1995, 196(2): 256-265.

[7] 刘玉汇, 王丽, 杨宏羽, 等. 应用ihpRNA干扰技术创制高支链淀粉马铃薯材料 [J]. 中国农业科学, 2013, 46(18): 3750-3757.

[8] 刘永强. 基于RNAi技术获得高含量支链淀粉且抗低温糖化的转基因马铃薯品种 [D]. 呼和浩特: 内蒙古大学, 2014.

[9] Andersson M, Turesson H, Nicolia A, *et al*. Efficient targeted multiallelic mutagenesis in tetraploid potato (*Solanum tuberosum*) by transient CRISPR-Cas9 expression in protoplasts [J]. Plant Cell Reports, 2017, 36(1): 117-128.

[10] 张生, 江乃武. 马铃薯新品种克新12号育成报告 [J]. 中国马铃薯, 1994, 8(3): 191-192.

[11] 郭志平, 夏更寿. 克新12号马铃薯高产施肥措施的研究 [J]. 丽水学院学报, 2007(2): 40-42, 65.

[12] 宿飞飞, 石瑛, 梁晶, 等. 不同马铃薯品种淀粉含量、淀粉产量及淀粉组成的评价 [J]. 中国马铃薯, 2006, 20(1): 16-18.

[13] 金名捺, 丘式浚, 严维, 等. 水稻温敏雄性核不育基因*tms5*功能分子标记的开发与应用 [J]. 分子植物育种, 2018, 16(17): 5644-5652.

[14] Noda T, Tsuda S, Mori M, *et al*. The effect of harvest dates on the starch properties of various potato cultivars [J]. Food Chemistry, 2004, 86(1): 119-125.

[15] 范书华, 董清山, 王艳, 等. 牡丹江地区适宜对俄出口早熟马铃薯品种筛选 [J]. 中国马铃薯, 2012, 26(6): 329-331.

[16] 田再民, 封生霞, 籍立杰, 等. 分子标记在马铃薯育种中的应用 [J]. 河北北方学院学报: 自然科学版, 2013, 29(1): 27-31.

《中国马铃薯》杂志约稿函

《中国马铃薯》杂志是目前全国唯一的马铃薯专业科技期刊，国际刊号：ISSN 1672-3635，国内刊号：CN 23-1477/S，邮发代号：14-167，国内外公开发行。它以繁荣我国马铃薯产业为办刊宗旨，积极报道国内外有关马铃薯的学术研究、科研动态和各种实用技术的最新消息。该刊由东北农业大学和中国作物学会主管，由东北农业大学和中国作物学会马铃薯专业委员会主办。《中国马铃薯》(原名《马铃薯杂志》)创刊于1987年。2000年经申请报国家新闻出版总署审批，更名为《中国马铃薯》，同年改为大16开本，并增加彩色广告。2001年《中国马铃薯》经报黑龙江省科委及省新闻出版局批准，将原来的季刊改为双月刊。

《中国马铃薯》立足国内，并刊登一些其他国家作者的英文稿件。它集学术性和技术性于一体，是马铃薯科研、生产、经销单位和用户之间信息交流的一个平台。《中国马铃薯》不同于其他园艺类期刊，刊登的文章全部是有关马铃薯的，主要栏目包括：遗传育种、栽培生理、病虫防治、土壤肥料、贮藏加工、产业开发、品种介绍、综述及其他。

该刊于2008年1月1日起开始执行作者在线投稿，进一步提高了工作效率和办公自动化水平，方便作者查询。欢迎专业委员会各位委员及广大读者踊跃投稿，投稿时请登录《中国马铃薯》稿件远程处理系统。

网址：http://mlsz.cbpt.cnki.net/WKA2/WebPublication/index.aspx?mid=mlsz。

《中国马铃薯》杂志编辑部