

# 利用基于 HRM 的功能标记分析水稻 *Wx* 和 *fgr* 的基因型

罗文龙, 郭涛, 周丹华, 陈海英, 王慧, 陈志强\*, 刘永柱\*

(国家植物航天育种工程技术研究中心, 广东 广州 510642)

**摘 要:** *Wx* 和 *fgr* 基因分别调控水稻直链淀粉含量和香气形成。在基于凝胶电泳功能标记的基础上, 发展基于高分辨率熔解曲线(HRM)的功能标记 *Wx*-a/b 和 *BAD2*-E7, 分别用于鉴定 88 份水稻种质 *Wx* 和 *fgr* 的基因型。利用 LightScanner 96 平台进行 HRM 检测, 单次检测在 10 min 内即可完成最多 96 个样品的基因型分析。结果表明, 88 份水稻种质中, 25 份含纯合 *Wx<sup>a</sup>* 基因型的种质, 直链淀粉含量为 25.08%; 59 个含纯合 *Wx<sup>b</sup>* 基因型的种质, 直链淀粉含量为 15.00%, 其余 4 个杂合型(*Wx<sup>a</sup>/Wx<sup>b</sup>*)的直链淀粉含量为 18.13%。携带纯合 *fgr* 基因的 3 份种质(巴太香占、象牙香占和 Basmati 370), 其全部米粒均带有香气, 而携带杂合 *fgr* 的 2 份种质, 只有部分米粒带有香气。

**关 键 词:** 水稻; 高分辨率熔解曲线; 功能标记; 基因分型

中图分类号: S511.035.3

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2013)06-0597-07

## Analysis of rice genotypes rice *Wx* and *fgr* by HRM-based functional marker

LUO Wen-long, GUO Tao, ZHOU Dan-hua, CHEN Hai-ying, WANG Hui, CHEN Zhi-qiang\*, LIU Yong-zhu\*

(National Engineering Research Centre of Plant Space Breeding, Guangzhou 510642, China)

**Abstract:** The amylose content and fragrance in rice are controlled by *Wx* and *fgr* respectively. Here, based on the gel-based FMs reported previously, we developed two HRM(high resolution melting)-based FMs *Wx*-a/b and *BAD2*-E7 to study the genotype of 88 rice accessions in *Wx* and *fgr* gene. We implemented the LightScanner 96 platform to determine the HRM curves, through which each determination for up to 96 samples could be done in less than 10 min. The result showed that the amylose content of 25 homozygous *Wx<sup>a</sup>* accessions and 59 homozygous *Wx<sup>b</sup>* accessions was 25.08% and 15.00%, respectively, and that of 4 heterozygous (*Wx<sup>a</sup>/Wx<sup>b</sup>*) accessions was 18.13%. All grains of 3 accessions (Bataixiangzhan, Xiangyaxiangzhan and Basmati 370) harboring homozygous *fgr* were fragrant, and only partial grains of 2 accessions with heterozygous *fgr* were fragrant. Thus it can be seen that the HRM-derived functional markers could be applied to rapidly and accurately predict their corresponding phenotypes, showing good application prospects in rice breeding practice.

**Key words:** rice; high resolution melting (HRM); functional markers; genotyping

传统的水稻育种选择方法, 是通过表现型间接对基因型进行选择, 周期长、效率低、准确性较差。DNA 分子标记<sup>[1]</sup>为直接对个体基因型进行选择提供了可能。根据与特定基因上引起功能性变异的多态性位点之间的紧密程度, 分子标记被分为 3 种类型, 即随机 DNA 分子标记(RDMs)、靶向基因标记(GTMs)和功能标记(FMs)<sup>[2]</sup>。FMs 来源于特定基因上引起表型变异的多态性功能基序, 能够直接反映目标性状

的表型, 有效避免由于重组引起的遗传信息的丢失, 可以更好地表现自然群体或者育种群体的遗传变异, 对 FMs 的筛选即能对性状进行筛选<sup>[3-5]</sup>。

稻米的直链淀粉含量是影响稻米食用口感最重要的因素之一<sup>[6]</sup>, 研究表明, *Waxy(Wx)*基因对于稻米直链淀粉含量的高低具有决定性的作用<sup>[7-8]</sup>。在非糯水稻品种中, *Wx* 基因座位有 *Wx<sup>a</sup>* 和 *Wx<sup>b</sup>* 2 种等位基因。*Wx<sup>b</sup>* 的第 1 内含子+1 位点由野生型 *Wx<sup>a</sup>*

收稿日期: 2013-03-06

基金项目: 国家“863”计划项目(2012AA101201); 广东省科技计划项目(2011A020102004); 广东省自然科学基金项目(S2011010001892)

作者简介: 罗文龙(1987—), 男, 云南广南人, 博士研究生, 主要从事水稻分子辅助育种研究, lovenlong@163.com; 郭涛为共同第一作者, guoguo@scu.edu.cn; \*通信作者, chenlin@scu.edu.cn; lively@scu.edu.cn

的 G 突变为 T, 导致第 1 内含子剪接效率降低及剪接不正常, 成熟 *Wx* 转录本含量降低而引起直链淀粉含量下降<sup>[9-10]</sup>。蔡秀玲等<sup>[11]</sup>针对该位点开发了功能标记 PCR-*Acc I*, 通过 *Acc I* 酶切后电泳, 来区分  $Wx^a$  和  $Wx^b$ , 其中基因型为  $Wx^b$  的种质总体上属于中低 AC 型。利用 PCR-*Acc I* 进行 MAS, 可定向导入  $Wx^b$  来改良高直链淀粉含量材料的稻米品质<sup>[12]</sup>。但是, 由于这一功能标记需酶切后再电泳分析, 成本较高, 操作较繁杂, 难以得到普遍应用。

绝大多数香稻品种的香味性状主要受位于第 8 染色体上的 1 对隐性基因 *fgr* 控制<sup>[13-15]</sup>。Bradbury 等<sup>[16]</sup>研究认为, *fgr* 是编码甜菜醛脱氢酶 2 的基因 *BAD2* 在第 7 外显子发生 8 个碱基缺失和 3 处碱基变异, 导致转录提前终止而使得 *BAD2* 酶丧失功能, 进而使其作用底物 2-乙酰-1-吡咯啉(2-acetyl-1-pyrroline, 2AP)的代谢途径中断, 香味物质 2AP 不断积累, 使水稻的叶片和籽粒产生香味。针对该功能变异位点, 基于凝胶电泳的功能标记 GRFM04 已被开发并用于香型水稻种质的鉴定<sup>[4]</sup>。

HRM(high-resolution melting curve, 高分辨熔解曲线)是近年发展的一种 DNA 多态性检测技术, 高分辨率、快速简便且实现了完全的闭管操作<sup>[17-18]</sup>。HRM 可用于 SNP、InDel(插入/缺失)和 SSR(简单重复序列)的分型, 已在马铃薯<sup>[19]</sup>、大麦<sup>[20]</sup>、水稻<sup>[21-23]</sup>等作物中得到良好的应用。笔者拟分别针对 PCR-*Acc I*<sup>[11]</sup>和 GRFM04<sup>[4]</sup>靶向的功能基序, 发展基于 HRM 分析平台的功能标记, 用于鉴定水稻 *Wx* 和 *fgr* 的基因型, 以期筛选中低 AC 的香型水稻种质, 应用于后续育种实践。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

从国家植物航天育种工程技术研究中心保存的水稻种质中, 随机挑取 88 份非糯种质, 分别是增巴丝苗、粳小占、华粳粳 1 号、日本晴、明恢 63、中香 1 号、佳禾早占、香尖、Francis、粤二占、野丝占、矮粳占、粤惠占、巴太香占、马坝油占、金华软占、粤秀占、丰秀占、丰中占、广胜软占、五山油占、银晶软占、丰美占、丰富占 1 号、金丝软占、粤广丝苗、齐粒丝苗、粤晶丝苗 2 号、丰晶软占、黄粤占、禅穗占、源丰占、黄粳占、丰泰占、野丰占、黄丝占、茉莉软占、早花占、象牙香占、

泰丰占、创丰一号、粤香占、粳粳 89、粤华丝苗、龙粳 21、五山丝苗、巴斯马蒂 370、丰莉丝苗、粤特 13、七佛占、黄软占、黄丰占、金农丝苗、粤综占、粤奇丝苗、胜巴丝苗、华航油占、华航 31 号、粤油丝苗、丰秀丝苗、合美占、齐华占、玉丰占、新黄占、黄合占、黄秀占、三澳占、美油占、莉丰占、五广占、固广占、早粳占、小粒香占、粤金油占、五山化稻、R173、红荔丝苗、金航丝苗、广盐 1 号、粤丰新占、合丰占、合丰丝苗、力源占 2 号、玉晚占、中早 25、广超 112、粤抗 113、黄粤丝苗, 均于 2012 年早季播种于华南农业大学试验场, 按常规方法进行播种和管理。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 DNA 提取

于水稻分蘖期, 每份种质分别随机选取 3 个单株的等量叶片混合, 以适当简化的 CTAB 法<sup>[24]</sup>提取水稻总 DNA, 并溶解于 1×TE 中, -20℃ 保存。对 3 个单株均做好标记, 成熟时分别收种, 再取等量谷粒混合。

#### 1.2.2 巢式 PCR-HRM 引物设计

为提高 PCR 产物的特异性, 并保证各样品的等量扩增, 采用了巢式 PCR 进行扩增, 即每个位点分别设计外部和内部引物进行 2 轮 PCR。其中, 内部引物以外引物扩增片段为参考序列, 其扩增产物尽量不超过 100 bp。

PCR-*Acc I* 靶向水稻 *Wx* 基因第 1 内含子+1 位点的 G/T SNP, 该标记通过 *Acc I* 酶的酶切来区分  $Wx^a$  和  $Wx^b$  2 种等位基因型。相对野生型的 *BAD2* 基因, 香型等位基因 *fgr* 在第 7 外显子出现 8 bp 缺失和 3 bp 替换; 功能标记 GRFM04 即通过电泳分析 PCR 产物是否存在 8 bp 缺失来鉴定出 *fgr*。

分别以日本晴 *Wx* 基因(LOC\_Os06g04200)和 *BAD2* 基因(LOC\_Os08g32870)为参考序列, 通过 Primer3 程序(<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>)分别设计覆盖巢式 PCR 引物 PCR-*Acc I* 和 GRFM04 靶向的功能性变异位点。

#### 1.2.3 巢式 PCR 扩增与 HRM 分析

巢式 PCR 的第 1 轮 PCR 扩增, 以基因组 DNA 为模板, 利用外部引物扩增; 第 2 轮 PCR 扩增以稀释的第 1 轮 PCR 扩增产物为模板, 利用内部引物扩增。



$Wx$ -a/b 的 HRM 分型的结果如图 2-A 所示。G 到 T 的突变导致  $T_m$  降低了约  $0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $Wx^a$ 、 $Wx^b$  及其杂合型(混合日本晴和 R173 的 DNA 而得)均得到良好区分。为了对 HRM 分型结果进行验证,按照蔡秀玲等<sup>[18]</sup>的 PCR *ACC I* 酶法对日本晴、R173 及其杂合型进行酶切后,以 2%琼脂糖凝胶电泳检测。结果(图 2-B)表明,基因型  $Wx^a$ (R173)能够被 *ACC I*

酶切,其产物只剩下 403 bp 的片段能被检测到;基因型为  $Wx^b$ (日本晴)的则无法被切开,只有 460 bp 的片段;杂合型则同时检测到 460 bp 和 403 bp 的条带。可见,HRM 标记  $Wx$ -a/b 的分型结果与 PCR *ACC I* 标记的检测结果是完全一致的,2 种标记都能够准确区分  $Wx^a$ 、 $Wx^b$  及其杂合型。

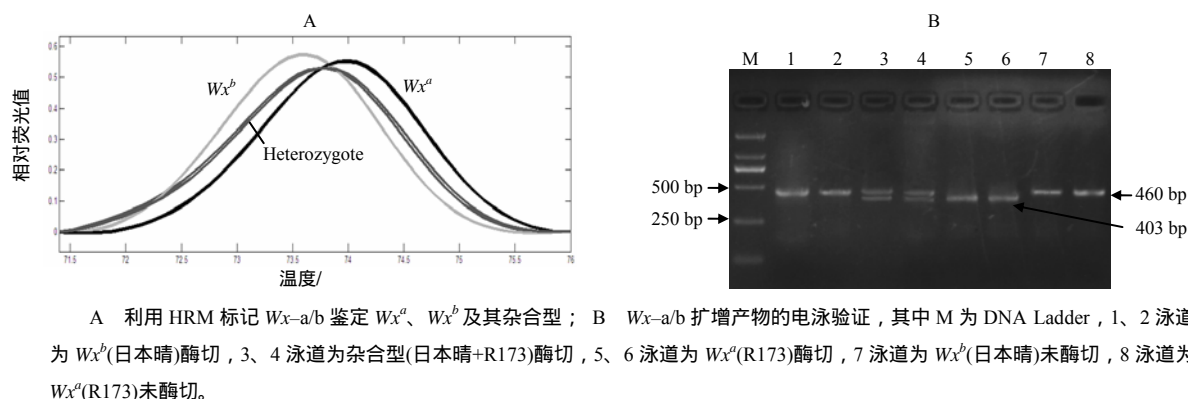


图 2 HRM 功能标记  $Wx$ -a/b 对  $Wx$  基因的分型及其电泳验证

Fig.2 Genotyping for  $Wx$  by using HRM-based FM  $Wx$ -a/b and gel electrophoresis confirmation

*BAD2*-E7 的 HRM 分型的结果如图 3-A 所示。*fgr* 较野生型的 *BAD2* 基因,在目标区域有 8 bp 缺失和 3 个 SNP,两者之间的  $T_m$  值差异很大(约  $1.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ),*fgr*、*BAD2* 及其杂合型(混合日本晴和 Basmati370 的 DNA)之间的溶解曲线有非常明显的

差异。将 *BAD2*-E7 标记经 HRM 分析后的产物进行电泳分析,结果(图 2-B)表明,*fgr*(Basmati370)较野生型的 *BAD2*(日本晴)的条带相差数个碱基,与预期结果完全一致。

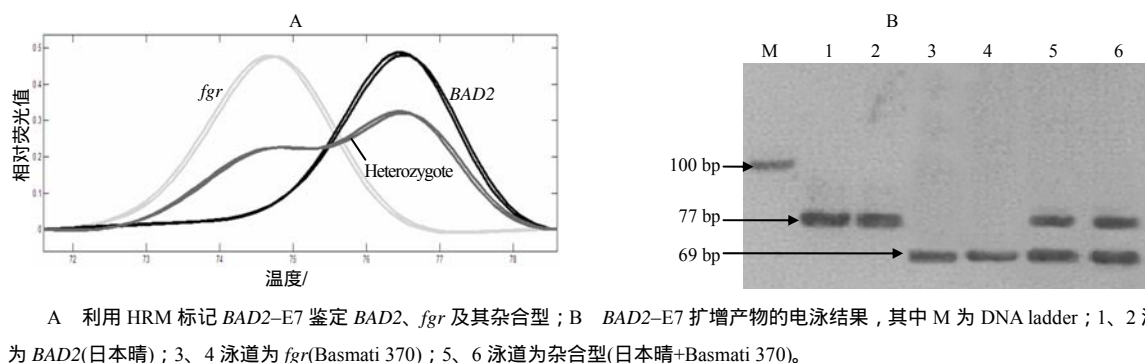


图 3 功能标记 *BAD2*-E7 的 HRM 分型结果及其电泳分析验证

Fig.3 Genotyping for *BAD2* by using HRM-based FM *BAD2*-E7 and gel electrophoresis confirmation

## 2.2 水稻种质的 $Wx$ 基因型鉴定及其稻米直链淀粉含量

利用 HRM 功能标记  $Wx$ -a/b,对 88 个种质的  $Wx$  基因进行分型。其中,基因型为  $Wx^a$  的种质有 25 份,基因型为  $Wx^b$  的种质有 57 份,在该位点上

为杂合状态的种质有 4 份,剩余 2 份种质未能区分其基因型而自动被判定为未知。对于 4 个杂合型及 2 个未知基因型的材料,重新进行第 2 轮 PCR 扩增后再次检测,结果表明,原先未能判定基因型的材料均为  $Wx^b$ ,而 4 份杂合型材料的分型结果与先前完全一致。

88 份种质稻米直链淀粉含量测定结果(表 1)表明, 25 个基因型为  $Wx^a$  的种质, 直链淀粉含量为 15.31%~28.63%, 平均为 25.08%; 基因型为  $Wx^b$  的 59 份种质, 直链淀粉含量为 11.37%~18.15%, 平均为 15.00%; 4 份杂合状态的材料, 直链淀粉含量为 15.45%~23.98%。纯合  $Wx^a$  和  $Wx^b$  基因水稻种质直链淀粉含量分布频率如图 4 所示, 其中  $Wx^a$  型有 2 份材料(巴太香占和马坝油占)直链淀粉含量为

15%~20%, 3 份材料(泰丰占、黄丰占和小粒香占)直链淀粉含量为 20%~25%, 其余 20 份材料直链淀粉含量超过 25%;  $Wx^b$  型全部 57 份种质的直链淀粉含量为 10%~20%。可见,  $Wx^a/Wx^b$  基因型与水稻种质直链淀粉含量有密切关系, 含有  $Wx^b$  基因型的非糯性水稻材料, 其直链淀粉含量为 10%~20%, 总体上低于基因型为  $Wx^a$  的种质。

表 1 水稻种质的 *Wx* 基因型与直链淀粉含量  
Table 1 Genotype in *Wx* gene and amylose content of 88 rice accessions

基因型	品种数/个	品种名	直链淀粉含量/%	
			均值±标准差	幅度
$Wx^a$	25	合丰丝苗、籼小占、华粳籼 1 号、野丝占、矮籼占、粤惠占、巴太香占、马坝油占、丰富占 1 号、丰晶软占、泰丰占、创丰一号、粳籼 89、粤特 13、黄丰占、金农丝苗、粤综占、粤奇丝苗、玉丰占、小粒香占、粤金油占、R173、粤丰新占、广超 112、粤抗 113、粤秀占、三澳占	25.08±3.41	15.31~28.63
$Wx^b$	59	增巴丝苗、日本晴、明恢 63、中香 1 号、佳禾早占、香尖、Francis、金华软占、丰秀占、丰中占、五山油占、银晶软占、丰美占、金丝软占、粤广丝苗、齐粒丝苗、粤晶丝苗 2 号、黄粤占、禅穗占、源丰占、黄粒占、丰泰占、野丰占、黄丝占、茉莉软占、早花占、象牙香占、粤香占、粤华丝苗、龙粳 21、五山丝苗、Basmati 370、丰莉丝苗、七佛占、黄软占、胜巴丝苗、华航油占、华航 31 号、粤油丝苗、丰秀丝苗、齐华占、新黄占、黄合占、黄秀占、美油占、莉丰占、五广占、固广占、早粳占、五山化稻、红荔丝苗、金航丝苗、广盐 1 号、合丰占、玉晚占、黄粤丝苗、力源占 2 号	15.00±1.60	11.37~18.15
杂合型	4	广胜软占、合美占、中早 25、粤二占	18.13±3.94	15.45~23.98

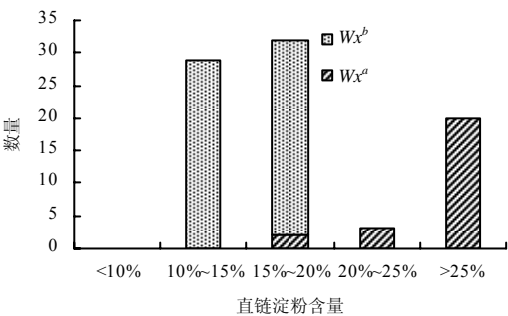


图 4 水稻种质纯合  $Wx^a/Wx^b$  基因直链淀粉含量的分布频率

Fig.4 Genotyping of *BAD2* gene for 88 rice accessions by using HRM-based functional marker *BAD2-E7*

2.3 水稻种质的香味基因分型及其米粒香味

利用功能标记 *BAD2-E7* 对参试的 88 份种质进行 HRM 分型。结果(图 6)表明, 共 3 份种质(巴太香占、象牙香占和 Basmati 370)含有纯合的香型等位基因 *fgr*, 而丰富占 1 号、合美占在该基因上处于杂合状态, 其余 83 份种质含有纯合的野生型 *BAD2*

基因。  
谷粒香味鉴定的结果(表 2)表明, 巴太香占、象牙香占和 Basmati 370 的全部米粒均有香气, 但浓淡有差别; 丰富占 1 号和合美占的部分米粒带有香气, 而其余 83 份种质的米粒均无法鉴定出香气, 功能标记基因型鉴定结果与表型鉴定完全相同, 携带有纯合及杂合香味基因 *fgr* 的个体所形成的米粒均能检测到香气, 只是杂合型材料获得的谷粒存在分离且仅部分谷粒带有香气。

表 2 水稻种质的香味基因分型与香味表型测试  
Table 2 Genotype in *fgr* gene and fragrant test of 88 rice accessions

基因型	数量/个	品种名	香味表型
<i>fgr</i>	3	巴太香占、象牙香占、Basmati 370	全部米粒香
杂合型	2	丰富占 1 号、合美占	部分米粒香
<i>BAD2</i>	83 (略)		全部米粒不香

### 3 讨 论

有研究表明,水稻基因组中 InDel 和 SNP 的分布频率远高于 SSR<sup>[25]</sup>,如何有效地开发和利用这些序列多态性是当前分子标记发展的热点<sup>[26-27]</sup>。利用凝胶电泳检测 InDel 和 SNP 是目前水稻分子标记辅助选择育种最常用的方法之一,特别是大于 5 bp 的 InDel 和可转化为 CAPS 标记的一部分 SNP。然而,多数 InDel 和 SNP 无法通过凝胶电泳检测的,而且凝胶电泳检测操作繁杂,难以批量检测,在分析成千上万的大群体时就显得十分费时费力。HRM 分析是近年发展的一种 DNA 多态性检测技术,具有高分辨率、快速简便、成本较低等优点,并且可实现批量样品的闭管分析<sup>[18]</sup>。在水稻上,已有利用 HRM 对 SSR、InDel 及 SNP 3 种不同序列多态性进行分型的研究报道<sup>[19-22]</sup>。利用 HRM,在一个平台就能够对 SSR、InDel 和 SNP 等不同类型的分子标记进行批量检测,使其有望部分取代凝胶电泳分析技术。

功能标记来源于特定基因上引起表型变异的多态性功能基序,能够直接反映目标性状的表型。本研究针对 *Wx* 和 *BAD2* 已知的 2 个功能性变异位点,设计基于 HRM 的标记对 88 份水稻种质进行基因型鉴定,获得了较理想的结果,与前人基于凝胶电泳开发的分子标记具有很强的可比性。利用 *Wx*-a/b 对 88 个参试材料进行 SNP 分型时,尽管存在 2 个未能自动判定基因型的样品,但是通过重做第 2 轮 PCR,再次检测的即可实现对全部样品的分型,结果准确可靠。基因型为 *Wx<sup>a</sup>* 的材料直链淀粉含量大多高于 25%,而 *Wx<sup>b</sup>* 基因型种质均在 20% 以内,与蔡秀玲等<sup>[11]</sup>和刘爱秋等<sup>[12]</sup>的结果基本一致。*fgr* 基因 8 bp 缺失和 3 个 SNP 导致  $T_m$  值变化大,利用 HRM 标记 *BAD2*-E7 极容易进行分型鉴定,基因分型结果与香味表型是完全符合的。可见,功能标记能够很好地预测其相应的表型值,而通过 HRM 技术进行基因分型,能够有效代替凝胶电泳分型,实现了快速自动检测(10 min 内 96 个样品)和闭管操作,极大地减轻了实验操作人员的工作负担和接触有毒试剂的机会,因此,本研究基于 HRM 技术开

发的 *Wx* 和 *fgr* 基因功能标记,有望在今后的水稻育种实践中得到广泛应用,也为开发更多的 HRM 功能标记提供借鉴。

### 参考文献:

- [1] Duran C, Appleby N, Edwards D, et al. Molecular genetic markers: Discovery, applications, data storage and visualization [J]. *Curr Bioinform*, 2009, 4: 16-27.
- [2] Andersen J R, Lübberstedt T. Functional markers in plants [J]. *Trends Plant Sci*, 2003, 11: 554-560.
- [3] Bagge M, Xia X C, Lübberstedt T. Functional markers in wheat [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2007, 10: 211-216.
- [4] 王丰, 李金华, 柳武革, 等. 一种水稻香味基因功能标记的开发 [J]. *中国水稻科学*, 2008, 22(4): 347-352.
- [5] Iyer-Pascuzzi A S, McCouch S R. Functional markers for *xa5*-mediated resistance in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *Mol Breed*, 2007, 19: 291-296.
- [6] Champagne E T. Rice: Chemistry and Technology [M]. 3rd ed. Minnesota: Amer Assn of Cereal Chemists, 2004: 109-133.
- [7] Bollich C N, Webb B D. Inheritance of amylose in two hybrid populations of rice [J]. *Cereal Chem*, 1973, 50: 631-636.
- [8] Sano Y. Different regulation of *Waxy* gene expression in rice endosperm [J]. *Theor Appl Genet*, 1984, 68: 467-473.
- [9] Hirano H Y, Eiguchi M, Sano Y. A single-base change altered the regulation of the *Waxy* gene at the posttranscriptional level during the domestication of rice [J]. *Mol Biol Evol*, 1998, 15: 978-987.
- [10] Isshiki M, Nakajima M, Satoh H et al. Dull: Rice mutants with tissue-specific effects on the splicing of the *waxy* pre-mRNA [J]. *Plant J*, 2000, 23: 451-460.
- [11] 蔡秀玲, 刘巧泉, 汤述翥, 等. 用于筛选直链淀粉含量为中等的籼稻品种的分子标记 [J]. *植物生理与分子生物学学报*, 2002, 28(2): 137-144.
- [12] 刘爱秋, 梁奉军, 王平荣, 等. 水稻 *Wx* 基因 PCR-*AccI* 标记与稻米 AC 的关系及其辅助育种效果 [J]. *应用与环境生物学报*, 2006, 12(3): 318-321.
- [13] Cordeiro G M, Christopher M J, Henry R J, et al. Identification of microsatellite markers for fragrance in rice by analysis of the rice genome sequence [J]. *Mol Breed*, 2002, 9(4): 245-250.
- [14] 黄超武, 胡事君. 谷类作物品质性状遗传研究进展 [M]. 南京: 江苏科学技术出版社, 1990: 87-92.
- [15] 李金华, 王丰, 柳武革, 等. 水稻粤丰 B 的香味遗传分析与 SSR 标记定位 [J]. *分子植物育种*, 2006, 4(1):

- 54–58 .
- [16] Bradbury L M T , Fitzgerald T L , Henry R J , et al . The gene for fragrance in rice [J] . Plant Biotechnol J , 2005 , 3 : 363–370 .
- [17] Wittwer C T , Reed G H , Gundry C N , et al . High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen[J] . Clin Chem , 2003 , 49 : 853–860 .
- [18] Wittwer C T . High-resolution DNA melting analysis : Advancements and limitations [J] . Hum Mutat , 2009 , 30(6) : 857–859 .
- [19] De Koeyer D , Douglass K , Murphy A , et al . Application of high-resolution DNA melting for genotyping and variant scanning of diploid and autotetraploid potato[J] . Mol Breed , 2009 , 5 : 13 .
- [20] Hofinger B J , Jing H C , Hammond-Kosack K E , et al . High-resolution melting analysis of cDNA-derived PCR amplicons for rapid and cost-effective identification of novel alleles in barley[J] . Theor Appl Genet , 2009 , 119(5) : 851–865 .
- [21] Li Y D , Chu Z Z , Liu X G , et al . A cost-effective high-resolution melting approach using the EvaGreen dye for DNA polymorphism detection and genotyping in plants[J] . J Integr Plant Biol , 2010 , 52(12) : 1036–1042 .
- [22] 赵均良 , 张少红 , 刘斌 . 应用高分辨率熔解曲线技术分析水稻分子标记基因型[J] . 中国农业科学 , 2011 , 44(18) : 3701–3708 .
- [23] Li J , Wang X , Dong R , et al . Evaluation of high-resolution melting for gene mapping in rice[J] . Plant Mol Biol Rep , 2011 , 29 : 979–985 .
- [24] Allen G C , Flores-Vergara M A , Krasynanski S , et al . A modified protocol for rapid DNA isolation from plant tissues using cetyltrimethylammonium bromide[J] . Nat Protoc , 2006 , 1(5) : 2320–2325 .
- [25] Shen Y J , Jiang H , Jin J P , et al . Development of genome-wide DNA polymorphism database for map-based cloning of rice genes [J] . Plant Physiol , 2004 , 135 : 1198–1205 .
- [26] 潘存红 , 王子斌 , 马玉银 , 等 . InDel 和 SNP 标记在水稻图位克隆中的应用[J] . 中国水稻科学 , 2007 , 21(5) : 447–453 .
- [27] 冯芳君 , 罗利军 , 李荧 , 等 . 水稻 InDel 和 SSR 标记多态性的比较分析[J] . 分子植物育种 , 2005 , 3(5) : 725–730 .

责任编辑: 罗慧敏

英文编辑: 张 健