

旱地小麦区试品系中抗旱高产相关基因的KASP标记检测

高洁¹, 王富延², 宋国琦¹, 孔淑鑫³, 李玉莲¹, 张淑娟¹,
张荣志¹, 李吉虎¹, 李根英¹, 刘鹏², 李玮¹

(1. 山东省农业科学院作物研究所/农业农村部黄淮北部小麦生物学与遗传育种重点实验室/小麦玉米国家工程实验室, 山东济南 250100; 2. 德州市农业科学研究院, 山东德州 253015; 3. 山东农业工程学院农业科技学院, 山东德州 251100)

摘要:利用分子标记检测小麦区试品系,明确其优异等位基因组成,有利于进一步精准改良利用。分析KASP标记检测中存在的问题,有助于促进分子育种应用。以山东省2021—2022年小麦旱地区试24份参试品系为材料,利用32个抗旱高产相关基因的KASP标记,分析KASP标记检测中存在的异常结果和材料的优异等位基因利用情况。结果表明,未知基因型产生的主要原因是KASP反应失败或非特异扩增。混合DNA样品检测结果为杂合的主要原因是单株间基因型不一致,次要原因是错误分型。32个KASP标记中,14个标记的优异等位基因检出率超过83%,表明这些基因在育种中已经得到有效利用;17个标记的优异等位基因检出率低于50%,其中,WRKY51-2B、AX-95025477-7B、SnRK2.4A3、TaMoc-2433和NCED1 5个标记的优异等位基因未检出,表明这些基因在育种中利用较少,可通过分子标记辅助选择开展遗传改良。24份材料中,HQ04携带20个优异等位基因,是数量最多的,可作为基因供体用于育种。利用KASP标记开展辅助选择定向精准提高优异等位基因在小麦育种中的利用率仍有可为。

关键词:小麦;抗旱;功能基因;KASP标记;区试品系

中图分类号:S512.1 文献标识码:A 文章编号:1002-2481(2024)04-0009-07

KASP Marker Detection of Genes Related to Drought Resistance and High Yield in Dryland Regional Trial Wheat Lines

GAO Jie¹, WANG Fuyan², SONG Guoqi¹, KONG Shuxin³, LI Yulian¹, ZHANG Shujuan¹,
ZHANG Rongzhi¹, LI Jihu¹, LI Genying¹, LIU Peng², LI Wei¹

(1. Crop Research Institute, Shandong Academy of Agricultural Sciences/Key Laboratory of Wheat Biology and Genetic Improvement in the North Yellow & Huai River Valley, Ministry of Agriculture and Rural Affairs/National Engineering Laboratory for Wheat & Maize, Ji'nan 250100, China; 2. Dezhou Academy of Agricultural Sciences, Dezhou 253015, China; 3. School of Agricultural Science and Technology, Shandong Agriculture and Engineering University, Dezhou 251100, China)

Abstract: To detect wheat regional trial lines with molecular markers and clarify favorable allele composition is conducive to the further precise improvement and utilization. Analyzing the problems in KASP marker detection will promote application in molecular breeding. In this study, using twenty-four advanced lines participated the 2021-2022 wheat dryland regional trial of Shandong province as materials, a total of 32 KASP markers associated with drought resistance and high yield were used to analyze the abnormal results in KASP marker detection and utilization of the favorable allele. The results indicated that the main reason for unknown genotypes was KASP reaction failure or non-specific amplification. The main reason for heterozygous results of mixed DNA samples was genotypic inconsistency among individuals, and the secondary reason was genotyping error. Among the 32 markers detected, the favorable allele detection rate of 14 KASP markers was above 83%, indicating that they were already efficiently applied in breeding programs, and the detection rate of the favorable alleles of 17 markers was below 50%. Among the 17 markers, the favorable alleles of the five markers including WRKY51-2B, AX-95025477-7B, SnRK2.4A3, TaMoc-2433, and NCED1 were not detected, indicating that the genes were applied less in breeding. Those less applied genes could be utilized through marker assisted selection for future genetic improvement. Among the 24 tested lines, HQ04 carried 20 favorable alleles which was the most and it could be used as a gene donor for breeding. There is still room for accurate and directive improvement of utilization rate of favorable alleles in wheat breeding through KASP marker-assisted selection.

Key words: wheat; drought resistance; functional gene; KASP marker; regional trial lines

收稿日期:2023-10-31

基金项目:山东省农业良种工程项目(2021LZGC009,2022LZGCQY002,2021LZGC013);山东省农业科学院创新工程项目(CXGC2023A01)

作者简介:高洁(1985-),女,山东禹城人,助理研究员,主要从事小麦分子育种研究工作。

通信作者:李玮(1982-),男,陕西蓝田人,助理研究员,博士,主要从事小麦分子育种研究工作。

长期以来干旱是导致小麦减产的重要因素之一,制约着小麦产量水平的提高。河北省和山西省是水资源缺乏重灾区,河北省先后选育出节水高产品种石家庄 8 号^[1]、高产优质品种石优 20^[2]等,山西省选育出了晋麦 47^[3]、晋麦 101^[4]等节水小麦品种。实践证明,通过选育和推广抗旱节水小麦新品种是干旱半干旱地区提高小麦产量和品质的重要途径。山东是小麦生产大省,据山东统计年鉴数据,近几年山东小麦播种面积在 400 万 hm^2 左右,居全国第 2 位;其中旱地小麦约占 1/3,而产量不足 1/4^[5]。山东省先后育成了鲁麦 21^[6]、山农 27^[7]等抗旱小麦品种。近年来,山东省农业科学院作物研究所先后选育了济麦 262^[8]、济麦 60^[9]、济麦 379^[10]等抗旱新品种,为山东旱地小麦生产作出重要贡献。培育抗旱节水小麦新品种是抵御干旱、保障旱地小麦高产稳产的根本途径。传统抗旱育种以常规杂交为主,通过水旱交叉选择实现丰产性和抗旱性兼顾。随着现代生物技术的发展,现代生物育种正在从传统育种向精准设计育种转变,通过分子标记辅助选择可以实现优异等位基因的快速精准选择。

KASP (Kompetitive allele specific PCR) 标记是 LGC 公司开发的一种检测 SNP 的技术方法,被广泛用于各种作物的分子标记检测。RASHEED 等^[11]在小麦中开发和验证了 70 个 KASP 标记,其中

包括 2 个抗旱相关标记,是较早报道的小麦抗旱 KASP 标记。KHALID 等^[12]报道了另外 3 个与抗旱适应性相关的 KASP 标记,使抗旱相关标记增加到 5 个。UR REHMAN 等^[13]进一步开发了 11 个抗旱相关 KASP 标记,使可用标记的数量进一步增加。李玮等^[14]新报道了与抗旱、抗寒、根系等相关的 11 个 KASP 标记,丰富了 KASP 标记关联的抗旱相关性状种类。越来越多小麦抗旱相关 KASP 标记的开发为开展抗旱分子标记辅助选择育种提供了便利。

小麦旱地区试的参试品系代表了小麦抗旱育种的水平,新的抗旱品种将从此脱颖而出,然而,目前对抗旱品种(系)携带优异等位基因分布情况的报道较少。本研究以 2021—2022 年山东省小麦旱地区试的参试品系为材料,选择与抗旱高产性状遗传位点相关的 32 个 KASP 标记进行检测,分析参试品系携带优异等位基因数量,旨在了解小麦抗旱等相关优异等位基因利用情况,以促进利用 KASP 标记进行抗旱小麦遗传改良。

1 材料和方法

1.1 试验材料

供试的 23 份 2021—2022 年山东省小麦旱地区试参试品系(HQ01-HQ23)和对照品种山农 27(表 1),均取自德州市农业科学研究院试验基地。

表 1 参试品系和对照品种
Tab.1 Trial lines and the control

编号 Code	名称 Name	选育单位 Breeding institute
HQ01	济农 Y42	济宁市农业科学研究院
HQ02	临 902	临沂市农业科学院
HQ03	济麦 54	山东省农业科学院作物研究所
HQ04	SH4103	淄博禾丰种业科技股份有限公司
HQ05	金来 27	山东金来种业有限公司
HQ06	SN715	山东农业大学
HQ07	淄麦 83	淄博市农业科学研究院
HQ08	TKM6151	泰安市农业科学院
HQ09	W19Y5393	山东农业大学
HQ10	航麦 4031	中国农业科学院作物科学研究所、山东希望种业有限公司
HQ11	航麦 905	中国农业科学院作物科学研究所
HQ12	荷麦 217	菏泽市农业科学院
HQ13	BC17PT161	山东省农业科学院作物研究所
HQ14	LY141	德州鲁玉农业科技有限公司
HQ15	济农 18377	济宁市农业科学研究院
HQ16	金来 20	山东金来种业有限公司
HQ17	v2021	青岛绿丰园种业有限公司、山东省潍坊市农业科学院、山东菲达种业科技有限公司
HQ18	临农 11	临沂市农业科学院
HQ19	青麦 9 号	青岛农业大学
HQ20	山农 711577	山东农业大学
HQ21	圣麦 206	山东圣丰种业科技有限公司
HQ22	LS82157	山东农业大学
HQ23	烟农 151	山东省烟台市农业科学研究院
HQCK	山农 27	山东农业大学

1.2 DNA 提取

返青期取小麦单株叶片长度 2 cm 左右,每个编号随机选取长势一致的 3 个单株,采用简化高盐低 pH 值法^[15]分别提取 DNA,调整质量浓度至 100 ng/ μ L,相同编号的 3 个单株 DNA 等量混合后进行检测。

1.3 KASP 标记检测

32 个 KASP 标记 9 个和根系相关,21 个和抗旱相关,2 个和抗寒相关。KASP 反应体系和反应程序均参考 RASHEED 等^[11]的报道,所用 32 个 KASP 标记见表 2。

表 2 检测的 KASP 标记
Tab.2 KASP markers detected

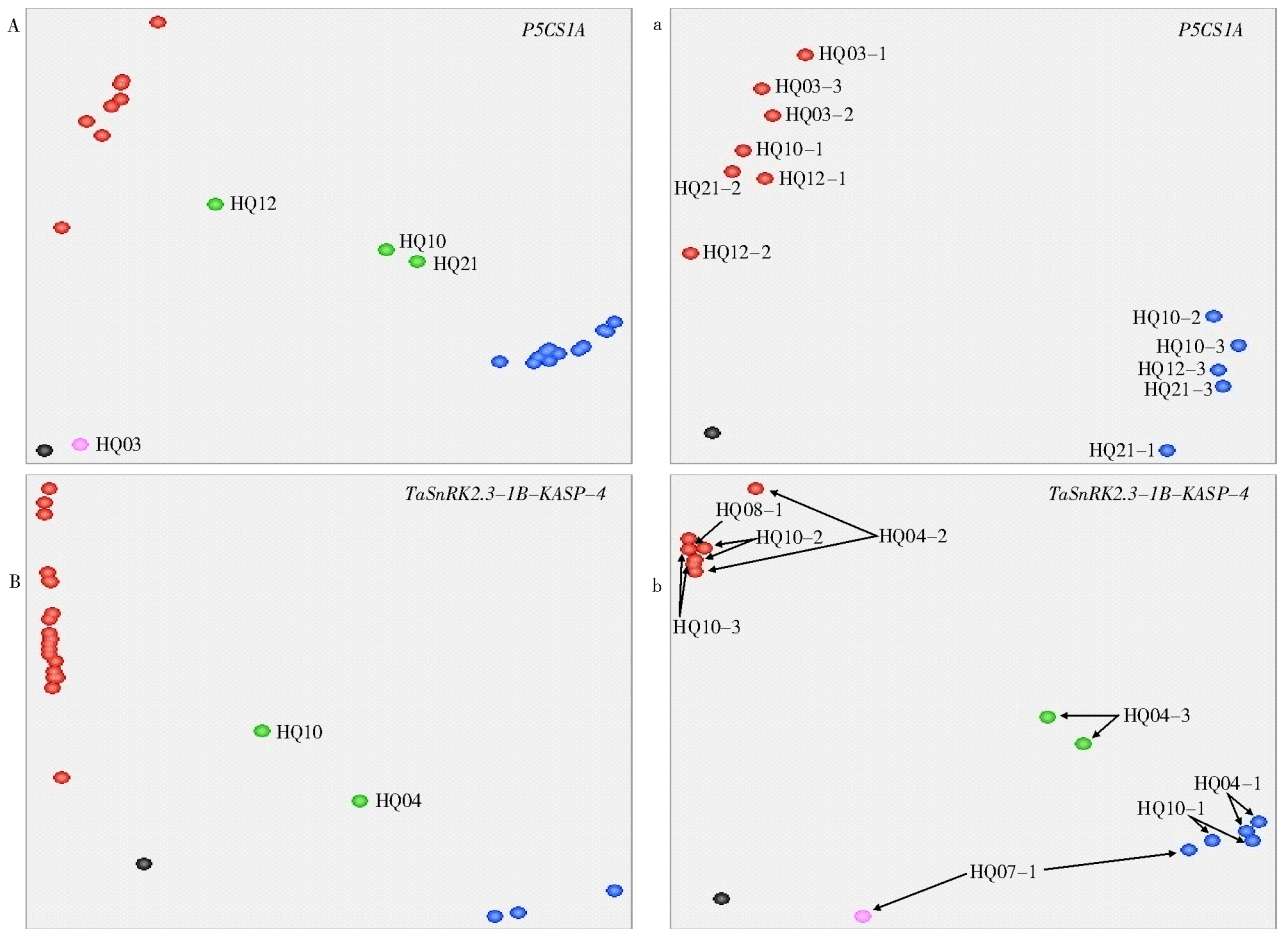
分类 Catalog	标记名称 Marker name	优异等位基因 Favorable allele	关联表型 Phenotype associated	参考文献 Reference
根系 Root	<i>DRO5A</i>	Fam	高千粒质量	[14]
	<i>DRO5B</i>	Hex	高千粒质量	
	<i>SRL14A929</i>	Hex	高千粒质量	
	<i>SRL14A96</i>	Hex	高千粒质量	
	<i>VSR1-2BMITE</i>	Hex	深根	
	<i>WRKY51-2B</i>	Hex	长根	
	<i>WRKY51-2A</i>	Fam	根多	
	<i>AX109558906-6B</i>	Fam	高根干质量	
	<i>AX-95025477-7B</i>	Hex	根表面积大	
	抗寒 Cold resistance	<i>COBL5B</i>	Hex	
<i>Wcor142B</i>		Hex	抗寒	
抗旱 Drought resistance	<i>P5CS1A</i>	Hex	高平均相对发芽率	
	<i>TaDreb_SNP</i>	Fam	抗旱	
	<i>TaPPH-KASP-13</i>	Hex	高千粒质量	
	<i>TaSAP-7B-KASP-8</i>	Fam	高千粒质量	
	<i>TaSnRK2.3-1A-KASP-2</i>	Fam	高千粒质量	
	<i>TaPARG-2A-KASP-9</i>	Hex	高千粒质量	
	<i>TaSnRK2.3-1B-KASP-4</i>	Fam	高千粒质量	
	<i>SnRK2.4A3</i>	Hex	高千粒质量	
	<i>SnRK2.4B3</i>	Hex	高千粒质量	
	<i>TaSnRK2.8-5A-KASP-7</i>	Fam	高苗期生物量	
	<i>TaSnRK2.9-5A-KASP-6</i>	Hex	高千粒质量	
	<i>TaSnRK2.9-5A-KASP-5</i>	Hex	高穗粒数	
	<i>TaLTPs-KASP-11</i>	Fam	穗数多	
	<i>TaLTPs-KASP-12</i>	Fam	高秆	
	<i>TaMoc-2433</i>	Fam	小穗数多	
	<i>OSCA1.4</i>	Hex	小穗数多	
	<i>1feh3</i>	Fam	抗旱	
	<i>PYL1B</i>	Fam	抗旱	
	<i>DTG2BK2</i>	Hex	抗旱	[16]
<i>TaGW2-6A</i>	Hex	高千粒质量	[12]	
<i>NCED1</i>	Hex	抗旱	[17]	

引物序列详见参考文献,由北京擎科生物科技有限公司青岛分公司合成(表 2)。KASP Master Mix 购自 LGC 公司。使用 PHERAstar 检测,检测结果导入 Kluster Caller 软件分型。对于检测结果中出现的未知和杂合基因型,用 3 个单株 DNA 重新检测,以确定杂合基因型产生的原因。

2 结果与分析

2.1 KASP 标记未知和杂合基因型分析

用 24 个混合 DNA 样品检测时,KASP 标记分型图中产生了 Hex 基因型(红色圆点)、Fam 基因型(蓝色圆点)、杂合基因型(绿色圆点)、未知基因型(粉色圆点),黑色圆点为无模板对照(图 1)。



A 和 B 表示混合样本基因分型结果；a 和 b 分别表示未知和杂合基因型混合样本的单株 DNA 检测结果
A and B indicated the genotyping of mix samples; a and b indicated the detection of single wheat DNA from unknown and heterozygous genotype samples

图 1 *P5CS1A* 和 *TaSnRK2.3-1B-KASP-4* 的检测结果
Fig.1 Detection result of *P5CS1A* and *TaSnRK2.3-1B-KASP-4*

图 1-A 显示的是 *P5CS1A* 基因分型情况，其中，HQ03 在该位点的基因型未知，HQ10、HQ12 和 HQ21 为杂合基因型。为了明确这些未知基因型和杂合基因型产生的原因，随即各用 3 个单株进行了验证，结果如图 1-a 所示，HQ03 的 3 个单株 DNA 检测结果全部为 Hex 基因型，说明混样中未知基因型产生的原因之一是 KASP 反应失败；而 HQ10 的检测结果为 1 个 Hex 基因型和 2 个 Fam 基因型，HQ12 的检测结果为 2 个 Hex 基因型和 1 个 Fam 基因型，HQ21 的检测结果为 1 个 Hex 基因型和 2 个 Fam 基因型，说明不同纯合基因型单株的采样是造成混样呈现杂合基因型的主要原因。

共 7 个标记(8 个数据点)的混合 DNA 样本中存在未知基因型，进一步的单株检测发现，AX-95025477-7B 标记在 HQ06 种质的 3 个单株 DNA 仍为未知基因型，其余均成功分型为 Hex 或 Fam 基因型，表明未知基因型产生的主要原因是 KASP 反应失败，重新检测可以成功分型。共 18 个标记(25 个

数据点，图 1-B)在混合 DNA 样本中存在杂合基因型，进一步的单株检测结果发现，17 个数据点表现为 2 种纯合基因型，比如 HQ10 的 *TaSnRK2.3-1B-KASP-4* 标记 3 个单株检测结果分别为 Fam、Hex、Hex(图 1-b)；1 个数据点表现为 Hex、Fam 和杂合 3 种基因型，剩余 7 个数据点的单株 DNA 检测结果一致，为假杂合。以上结果表明，混合 DNA 样品检测结果为杂合的主要原因是单株间基因型不一致，占本研究中全部杂合基因型的 72%，次要原因是错误分型，占比为 28%。

在排除假杂合后共有 6 个品系单株检测的基因型不一致，其中，HQ04、HQ10 和 HQ12 分别有 4、4、7 个标记位点不一致，表明这 3 个品系杂合度可能偏高，但不排除取到混杂单株的可能。而 HQ16、HQ21 和 HQCK 仅有 1 个标记位点不一致，可能该位点未纯合。在后续分析中杂合基因型用单株检测占多数的基因型替代，HQ04 的 *TaSnRK2.3-1B-KASP-4* 标记单株检测结果有 Hex、Fam 和杂合 3 种

基因型,在优异等位基因分析时按含有优异等位基因处理,HQ06的AX-95025477-7B标记单株检测结果仍为未知基因型,在优异等位基因分析时按非优异等位基因处理。

2.2 32个KASP标记的检测结果

检测结果表明(图2),14个标记的优异等位基因检出率较高(>80%),包括TaSnRK2.8-5A-KASP-7、TaPPH-KASP-13、TaDreb_SNP、VSR1-2BMITE、DRO5A、TaSAP-7B-KASP-8、TaLTPs-KASP-11、PYL1B、DRO5B、TaPARG-2A-KASP-9、Wcor142B、TaLTPs-KASP-12、lfehw3和SnRK2.4B3;标记P5CS1A的优异等位基因检出率接近50%;12个标记的优异等位基因检出率较低(<21%),携带这些优异等位基因的品系可作为供体亲本,包括携带WRKY51-2A优异等位基因的品系HQ04和HQ14,携带AX109558906-6B优异等位基因的品系HQ04和HQ06,携带TaSnRK2.3-1A-KASP-2优异等位基因的品系HQ12和HQ18,携

带TaSnRK2.3-1B-KASP-4优异等位基因的品系HQ07、HQ15、HQ17,携带SRL14A929和SRL14A96优异等位基因的品系HQ05、HQ18、HQ20,携带TaSnRK2.9-5A-KASP-6和TaSnRK2.9-5A-KASP-5优异等位基因的品系HQ05、HQ12、HQ16、HQ22,携带OSCA1.4优异等位基因的品系HQ07、HQ15、HQ17,携带DTG2BK2优异等位基因的品系HQ12,携带TaGW2-6A优异等位基因的品系有5个,包括HQ02、HQ04、HQ07、HQ17和HQ19,携带COBL5B优异等位基因的品系也有5个,包括HQ02、HQ04、HQ07、HQ12和HQ15。5个标记的优异等位基因未检出,包括WRKY51-2B、AX-95025477-7B、SnRK2.4A3、TaMoc-2433、NCED1。整体来看,32个标记对应基因位点在区试材料里优异等位基因的利用程度呈两极分化趋势,43.75%基因位点的优异等位基因利用较多,另外,56.25%基因位点的优异等位基因利用较少,特别是优异等位基因未检出的5个基因位点有待加强利用。

	HQ01	HQ02	HQ03	HQ04	HQ05	HQ06	HQ07	HQ08	HQ09	HQ10	HQ11	HQ12	HQ13	HQ14	HQ15	HQ16	HQ17	HQ18	HQ19	HQ20	HQ21	HQ22	HQ23	HQCK	
Total	15	16	15	20	16	11	18	13	14	14	14	15	14	13	17	16	18	17	16	16	14	16	14	14	
DRO5A	23	F	F	F	F	F	H	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F
DRO5B	23	H	H	H	H	H	F	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
SRL14A929	3	F	F	F	F	H	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	H	F	H	F	F	F	F	F
SRL14A96	3	F	F	F	F	H	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F
VSR1-2BMITE	22	H	H	H	H	F	H	H	H	H	H	H	F	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
WRKY51-2B	0	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F
WRKY51-2A	2	H	H	H	F	H	H	H	H	H	H	H	H	H	F	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
AX109558906-6B	2	H	H	H	F	H	F	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
AX-95025477-7B	0	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F
COBL5B	5	F	H	F	H	F	F	H	F	F	F	F	H	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F
Wcor142B	23	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
P5CS1A	10	H	H	H	H	F	H	H	F	F	F	F	H	F	F	F	F	H	H	H	F	F	F	F	F
TaDreb_SNP	22	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	H	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F
TaPPH-KASP-13	21	H	F	H	H	H	F	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
TaSAP-7B-KASP-8	23	F	F	F	F	F	H	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F
TaSnRK2.3-1A-KASP-2	2	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	F	H	H	H	H	F	H	H	H	H	H	H	H
TaPARG-2A-KASP-9	23	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
TaSnRK2.3-1B-KASP-4	4	H	H	H	Z	H	H	F	H	H	H	H	H	H	F	H	H	F	H	H	H	H	H	H	H
SnRK2.4A3	0	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F
SnRK2.4B3	24	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
TaSnRK2.8-5A-KASP-7	20	F	F	F	F	H	F	F	H	F	F	F	F	F	H	F	F	F	H	F	F	F	F	F	F
TaSnRK2.9-5A-KASP-6	4	F	F	F	F	H	F	F	F	F	F	F	H	F	F	F	H	F	F	F	F	F	F	F	F
TaSnRK2.9-5A-KASP-5	4	F	F	F	F	H	F	F	F	F	F	F	H	F	F	F	H	F	F	F	F	F	F	F	F
TaLTPs-KASP-11	23	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	H	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F
TaLTPs-KASP-12	24	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F
TaMoc-2433	0	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
OSCA1.4	3	F	F	F	F	F	F	H	F	F	F	F	F	F	F	H	H	F	F	F	F	F	F	F	F
lfehw3	24	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F
PYL1B	23	F	F	F	F	F	H	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F
DTG2BK2	1	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	H	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F
TaGW2-6A	5	F	H	F	H	F	F	H	F	F	F	F	F	F	F	F	H	F	H	F	F	F	F	F	F
NCED1	0	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F

H、F分别表示2种不同的纯合基因型Hex和Fam;U表示未知基因型;Z表示杂合基因型。下划线和方框分别表示混样的8个未知基因型和25个杂合基因型

H, F, U and Z indicated Hex, Fam, unknown and heterozygous genotypes, respectively. U indicated unknown genotypes; Z indicated heterozygous genotypes. The underline and box indicated 8 unknown genotypes and 25 heterozygous genotypes, respectively

图2 24份小麦材料在32个位点的基因型
Fig.2 Genotyping of 24 wheat materials in 32 loci

从参试品系分析,24份材料携带优异等位基因数量11~20个不等,区试对照品种HQCK的优异等位基因数量为14个,全部为高检出率的优异位点。利用优异等位基因最多的HQ04为20个,除

14个高检出率的优异位点还包括TaGW2-6A、COBL5B、P5CS1A、WRKY51-2A、AX109558906-6B和TaSnRK2.3-1B-KASP-4。利用优异等位基因数量最少的品系HQ06为11个,缺少了高检出率

优异位点 *TaPPH-KASP-13*、*TaDreb_SNP_DRO5A*、*TaSAP-7B-KASP-8* 和 *DRO5B*, 但增加了 *AX109558906-6B* 和 *P5CS1A*。特别注意, 携带优异等位基因多的品系可在育种中多加利用, 如 *HQ07*、*HQ17* 可能是良种。

3 结论与讨论

KASP 技术自开发以来, 因其检测简单快速, 通量灵活等优点, 已被广泛应用于水稻^[18]、玉米^[19]等多种作物的分子标记辅助选择等研究。RASHEED 等^[11]较早将 KASP 技术应用在小麦中, 在其检测结果中有 32 个标记存在未知基因型, 7 个标记存在杂合基因型。ZHAO 等^[20]利用 KASP 标记分析了 1 152 份全球小麦 47 个基因的优异等位基因利用情况, 在其检测结果中 46 个标记有未知基因型, 42 个标记有杂合基因型存在。ZHANG 等^[21]利用 44 个基因的 KASP 标记分析了 207 份小麦, 结果显示, 41 个标记存在未知基因型, 26 个标记存在杂合基因型。李玮等^[22]在对区试品系混合 DNA 样品进行 KASP 标记检测时, 发现杂合基因型比例较高, 可能与混合取样有关。以上结果表明, 在进行 KASP 标记检测时未知基因型和杂合基因型普遍存在。当未知基因型和杂合基因型个数较多时就需要加以关注。本研究利用 32 个 KASP 标记对 24 份小麦混合 DNA 的分析结果中, 共有 7 个标记存在未知基因型, 用单株 DNA 重新检测后仅剩 1 个标记存在未知基因型。一般来说, 未知基因型产生的原因主要包括引物结合位点变异, DNA 质量较差和 KASP 反应失败, 故进一步对未知基因型样品单株 DNA 重新检测后成功分型, 说明本研究前一步未知基因型的出现是由于 KASP 反应失败, 但是个别样品重复检测仍无法分型, 可能和引物结合位点存在变异有关。本研究为了分析混合 DNA 样品检测时 25 个数据点 (18 个标记) 的杂合基因型产生原因, 用单株 DNA 进行了验证, 结果表明, 18 个数据点是由于单株基因型不一致导致, 另外 7 个数据点是错误分型导致的假杂合。单株间基因型不一致的原因可能与品系不纯和种子混杂有关, 为了避免混合取样造成的杂合, 可以考虑进行单株取样并尽量排除可能的杂株。对于非特异扩增导致的错误分型, 可通过提高引物的特异性和优化反应条件来改善。

选育小麦抗旱品种是一项长期而艰巨的工作, 随着抗旱相关功能基因的克隆, 利用分子标记辅助选择进行抗旱基因聚合可以有效提高抗旱育种的

效率。RUBAB 等^[23]通过 KASP 功能标记检测和表型性状鉴定筛选出了抗旱性较好的亲本材料, 为抗旱育种提供了参考。ELTAHER 等^[24]分析了 *TaDreb-B1* 和 *1-FEH w3* 等位基因在冬小麦和春小麦群体中与抗旱的关联性, 认为 *TaDreb-B1* 抗旱等位基因与抗旱表型的一致性比 *1-FEH w3* 更好。本研究结果表明, 14 个标记的优异等位基因在育种中已经得到选择利用, 另外 17 个标记的优异等位基因检出率较低, 对这些基因的利用需要加强, 特别是 *WRKY51-2B*、*AX-95025477-7B*、*SnRK2.4A3*、*TaMoc-2433*、*NCED1* 5 个标记的优异等位基因未检出, 因为标记是共显性, 未检出和引物无关, 表明本研究中的 24 份小麦未利用这 5 个基因。携带 *WRKY51-2B* 优异等位基因的品种有晋麦 47、晋麦 92、晋麦 101 等^[14], 携带 *AX-95025477-7B* 优异等位基因的品种有中麦 895、轮选 987、鲁麦 15 等^[25], 携带 *SnRK2.4A3* 优异等位基因的品种有济麦 379 等^[14], 携带 *TaMoc-2433* 优异等位基因的品种有鲁麦 1、中国春等^[13], 携带 *NCED1* 优异等位基因的品种有和尚头、临旱 2 号和德抗 961 等^[17], 其可作为今后育种利用的目标亲本加以关注。在检测的 32 个 KASP 标记中, 区试对照品种山农 27 携带其中 14 个优异等位基因, 而区试品系携带优异等位基因的数量为 11~20 个不等, 通过分子标记辅助选择聚合更多的优异等位基因来选育抗旱品种仍有可为。HQ04 在检测品系中携带优异等位基因最多, 可作为亲本加以利用。值得注意的是随着目标基因数量的增多, 杂交组合方式将变得复杂, 所需的群体大小也呈指数增加, 需要对基因组合方式进行取舍。目前, 抗旱品种选育仍然以传统表型选择为主, 尽管几乎没有通过对抗旱基因选择育成品种的报道, 但从本研究的结果中可以看出, 大部分优异位点仍然在高代品系中被利用。如果能将分子标记辅助选择和传统育种相结合, 有望通过对抗旱基因的定向精准选择提升选择效率。

本研究通过对 24 份小麦旱地区区试品系进行 32 个 KASP 标记检测, 发现 14 个标记的优异等位基因在 24 份参试品系中有 20 份检测结果为阳性, 检出率超过 83%; 另外, 18 个标记的优异等位基因检出率低于 50%, 其中, *WRKY51-2B*、*AX-95025477-7B*、*SnRK2.4A3*、*TaMoc-433* 和 *NCED1* 5 个标记的优异等位基因未检出, 明确了抗旱相关优异等位基因在区试品系中的利用情况, 为利用 KASP 标记开展定向精准分子育种提供了参考。

参考文献:

- [1] 郭进考,史占良.节水、高产、广适冬小麦新品种国审石家庄8号选育报告[J].作物研究,2007,21(3):321-322.
GUO J K, SHI Z L. Breeding report of a new winter wheat variety Guoshen Shijiazhuang No.8 with water saving, high yield and wide adaptability[J]. Crop Research, 2007, 21(3): 321-322.
- [2] 刘彦军,郭进考,郭家宝,等.高产优质小麦新品种‘石优20号’选育及应用[J].中国农学通报,2019,35(12):23-27.
LIU Y J, GUO J K, GUO J B, et al. The new wheat variety ‘shiyou 20’ with high yield and high quality: breeding and application[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2019, 35(12): 23-27.
- [3] 董孟雄,李秀绒,柴永峰,等.旱地小麦新品种:晋麦47号[J].麦类作物学报,2001,21(1):98.
DONG M X, LI X R, CHAI Y F, et al. A new wheat variety in dryland-Jinmai 47[J]. Acta Triticeal Crops, 2001, 21(1): 98.
- [4] 刘新月,裴磊,刘莉,等.强筋抗旱高产小麦新品种‘晋麦101号’的选育[J].分子植物育种,2019,17(12):4016-4024.
LIU X Y, PEI L, LIU L, et al. Breeding of new wheat variety ‘Jinmai101’ with strong gluten, drought resistant and high yield [J]. Molecular Plant Breeding, 2019, 17(12): 4016-4024.
- [5] 王月福,程金亮,王炳军,等.山东省旱地小麦生产发展回顾及展望[J].莱阳农学院学报,2003,20(3):202-205.
WANG Y F, CHENG J L, WANG B J, et al. Review and prospect of dryland wheat production in Shandong province[J]. Journal of Laiyang Agricultural College, 2003, 20(3): 202-205.
- [6] 孙亮,刘洁,王鹏,等.鲁麦21品种特性及在小麦育种中的应用[J].中国农技推广,2019,35(5):21-23.
SUN L, LIU J, WANG P, et al. Variety characteristics of Lumai 21 and its application in wheat breeding[J]. China Agricultural Technology Extension, 2019, 35(5): 21-23.
- [7] 马甲良,乔正明,纪昌英,等.冬小麦品种山农27号的选育与高效栽培技术[J].中国种业,2017(3):57-59.
MA J L, QIAO Z M, JI C Y, et al. Breeding and efficient cultivation techniques of winter wheat variety Shannong 27[J]. China Seed Industry, 2017(3): 57-59.
- [8] 李豪圣,程敦公,刘成,等.抗旱节水小麦新品种‘济麦262’选育及体会[J].农学学报,2021,11(12):24-27,33.
LI H S, CHENG D G, LIU C, et al. Drought-resistant and water-saving wheat variety ‘Jimai 262’: breeding experience[J]. Journal of Agriculture, 2021, 11(12): 24-27, 33.
- [9] 李豪圣,解树斌,陈建友,等.小麦新品种济麦60特征特性及高产栽培技术规程[J].农业科技通讯,2020(5):222-224.
LI H S, XIE S B, CHEN J Y, et al. Characteristics of new wheat variety Jimai 60 and its high-yielding cultivation technical regulations[J]. Bulletin of Agricultural Science and Technology, 2020 (5): 222-224.
- [10] 徐向敏,杨在东,崔德周,等.小麦新品种济麦379的抗旱机理初探[J/OL].烟台大学学报(自然科学与工程版):1-8[2024-06-17]. <https://doi.org/10.13951/j.cnki.37-1213/n.240105>.
XU X M, YANG Z D, CUI D Z, et al. Preliminary study on drought resistance mechanism of new wheat variety Jimai 379 [J/OL]. Journal of Yantai University (Natural Science of Engineering edition) : 1-8[2024-06-17]. <https://doi.org/10.13951/j.cnki.37-1213/n.240105>.
- [11] RASHEED A, WEN W E, GAO F M, et al. Development and validation of KASP assays for genes underpinning key economic traits in bread wheat[J]. TAG. Theoretical and Applied Genetics. Theoretische Und Angewandte Genetik, 2016, 129(10): 1843-1860.
- [12] KHALID M, AFZAL F, GUL A, et al. Molecular characterization of 87 functional genes in wheat diversity panel and their association with phenotypes under well-watered and water-limited conditions[J]. Frontiers in Plant Science, 2019, 10:717.
- [13] REHMAN S U, ALI SHER M, SADDIQUE M A B, et al. Development and exploitation of KASP assays for genes underpinning drought tolerance among wheat cultivars from Pakistan[J]. Frontiers in Genetics, 2021, 12:684702.
- [14] 李玮,孔淑鑫,宋国琦,等.31份小麦材料中抗旱基因的 KASP 检测[J].麦类作物学报,2023,43(10):1241-1247.
LI W, KONG S X, SONG G Q, et al. Analysis of drought resistant genes in 31 wheat breeding materials by KASP marker[J]. Journal of Triticeal Crops, 2023, 43(10): 1241-1247.
- [15] 高洁,宋国琦,李吉虎,等.小麦4个多效抗病基因分子标记的转化和再开发[J].农业生物技术学报,2021,29(5):847-856.
GAO J, SONG G Q, LI J H, et al. Conversion and redevelopment of molecular markers of 4 pleiotropic disease resistance genes in wheat (*Triticum aestivum*) [J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2021, 29(5): 847-856.
- [16] MEI F M, CHEN B, DU L Y, et al. A gain-of-function allele of a DREB transcription factor gene ameliorates drought tolerance in wheat[J]. The Plant Cell, 2022, 34(11):4472-4494.
- [17] 宋国琦,张淑娟,李根英,等. *TaNCE1* 基因 B 基因组 TT/CG SNP 标记与应用:CN110229811B[P]. 2022-03-04.
SONG G Q, ZHANG S J, LI G Y, et al. *TaNCE1* gene B genome TT/CG SNP marker and application there of: CN110229811B[P]. 2022-03-04.
- [18] YANG G L, CHEN S P. Development and utilization of functional KASP markers to improve rice eating and cooking quality through MAS breeding[J]. Euphytica, 2019, 215(4):66.
- [19] CHEN Z J, TANG D G, NI J X, et al. Development of genic KASP SNP markers from RNA-Seq data for map-based cloning and marker-assisted selection in maize[J]. BMC Plant Biology, 2021, 21(1):157.
- [20] ZHAO J J, WANG Z W, LIU H X, et al. Global status of 47 major wheat loci controlling yield, quality, adaptation and stress resistance selected over the last century[J]. BMC Plant Biology, 2019, 19(1):5.
- [21] ZHANG W J, ZHAO J J, HE J S, et al. Functional gene assessment of bread wheat: breeding implications in Ningxia province [J]. BMC Plant Biology, 2021, 21(1):103.
- [22] 李玮,张敏,宋国琦,等.2019—2020 山东小麦区试品系 55 个基因的等位基因分布[J].核农学报,2023,37(1):17-26.
LI W, ZHANG M, SONG G Q, et al. Allele distribution of 55 genes in wheat lines participating in 2019-2020 Shandong trial [J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2023, 37(1): 17-26.
- [23] RUBAB M, JANNAT S, FREEG H, et al. Evaluation of functional competitive allele-specific PCR (KASP) markers for selection of drought-tolerant wheat (*Triticum aestivum*) genotypes [J]. Functional Plant Biology, 2023, 51(1):FP23032.
- [24] ELTAHER S, HASHEM M, AHMED A A M, et al. Effectiveness of *TaDreb-B1* and *1-FEH w3* KASP markers in spring and winter wheat populations for marker-assisted selection to improve drought tolerance[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2023, 24(10):8986.
- [25] YANG M J, WANG C R, HASSAN M A, et al. QTL mapping of seedling biomass and root traits under different nitrogen conditions in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. Journal of Integrative Agriculture, 2021, 20(5):1180-1192.