

KASP 标记技术在主要农作物中的应用及展望

杨青青 唐家琪 张昌泉 高继平 刘巧泉

(植物功能基因组学教育部重点实验室 江苏省作物基因组学和分子育种重点实验室 江苏省粮食作物现代产业技术协同创新中心 扬州大学农学院, 扬州 225009)

摘要: 随着基因测序技术的发展, 植物基因组数据越来越丰富, 其中的单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 数据由于具有高密度、高通量和易于自动化分析等特点而被广泛用于分子标记的开发和应用。竞争性等位基因特异性 PCR (kompetitive allele-specific PCR, KASP) 技术是近些年来发展起来的一种主要基于 SNP 的高通量基因分型技术。该技术由于其高通量、低成本和可操作性强等优点而在农作物性状改良等领域具有很大的应用潜力。本文介绍了 KASP 技术的发展、原理和方法步骤, 综述了该技术在主要农作物的种质资源鉴定、分子标记辅助育种、基因定位和种子纯度鉴定等遗传育种中的应用, 并讨论了该技术的优缺点, 以期为今后农作物育种研究提供参考依据。

关键词: KASP; 高通量基因分型; 遗传鉴定; 分子育种; 农艺性状改良

DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2021-1378

Application and Prospect of KASP Marker Technology in Main Crops

YANG Qing-qing TANG Jia-qi ZHANG Chang-quan GAO Ji-ping LIU Qiao-quan

(Key Laboratory of Plant Functional Genomics of the Ministry of Education, Jiangsu Key Laboratory of Crop Genomics and Molecular Breeding, Jiangsu Co-innovation Center for Modern Production Technology of Grain Crops, College of Agriculture, Yangzhou University, Yangzhou 225009)

Abstract: With the development of gene sequencing technology, plant genome data are becoming more and more abundant. Single nucleotide polymorphism (SNP) data are widely used in the development and application of molecular markers because of their high density, high throughput and easy automated analysis. Kompetitive allele-specific PCR (KASP) is a high-throughput genotyping technology mainly based on SNP. Because of its high flux, low cost and strong operability, this technology has great application potential in the field of crop character improvement. This paper introduces the development, principle and method steps of KASP technology, summarizes the application of KASP technology in genetic breeding such as germplasm resource identification, molecular marker assisted breeding, gene mapping and seed purity identification of main crops, and discusses the advantages and disadvantages of KASP technology in order to provide reference basis for crop breeding research in the future.

Key words: KASP; high-throughput genotyping; genetic identification; molecular breeding; improvement of agronomic characters

遗传变异是农业发展的基础, 农作物育种的目的是创造和利用这些遗传变异。在漫长的农作物育种历史中, 育种方式经历了原始育种、传统育种和分子育种三个时代的跨越, 形成了具有典型时代特征的各种技术版本^[1-2]。我国当下农作物的育种方

式主要包括传统的常规育种、基于分子标记的辅助选择育种和基于基因遗传修饰的转基因育种等。其中常规育种依赖育种家根据个人经验将所用育种材料的有利基因进行随机组合, 效率较低。而分子标记辅助选择育种和转基因育种通常针对个别性状进

收稿日期: 2021-11-03

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31825019, 31872860), 江苏省科技计划 (JBGS (2021) 001, CX (20) 3004)

作者简介: 杨青青, 女, 硕士研究生, 研究方向: 水稻主要品质性状 KASP 标记的开发; E-mail: 2644178488@qq.com

通讯作者: 刘巧泉, 男, 博士, 教授, 研究方向: 水稻品质性状遗传改良; E-mail: qqliu@yzu.edu.cn

行精确改良,效率较高。但是由于转基因育种涉及产品商业化问题,所以目前在农业生产中主要以分子标记为主^[3]。众所周知,生物性状的遗传调控是由众多基因参与的复杂调控网络。因此,农作物品种的改良涉及一系列功能基因的利用,而高通量基因特异性分子标记的开发与利用将能更有效地促进农作物品种的定向改良^[4]。

随着高通量测序技术的发展,目前 DNA 分子标记已经发展到第三代。第一代是基于分子杂交技术的标记技术,包括限制性片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism, RFLP);第二代是基于 PCR 技术的分子标记技术,包括序列标志位点(sequence tagged sites, STS)、简单重复序列(simple sequence repeat, SSR)、扩增片段长度多态性(amplified fragment length polymorphism, AFLP)等;而单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)被称为第三代分子标记:它是基于 DNA 芯片技术的一种分子标记技术。与第一、第二代分子标记相比,它具有分布密度高、遗传稳定性好、二等位基因型等特点,因此,更容易实现高通量和自动化检测^[5]。近些年来,由于下一代测序(next generation sequencing, NGS)等技术的发展,促进了基于芯片的标记平台的开发,各种高通量基因分型技术也被开发和利用起来^[6],如英国政府化学家实验室(Laboratory of the Government Chemist, LGC)基于竞争性等位基因特异性 PCR(kompetitive allele-specific PCR, KASP)原理开发的 KASP 高通量 SNP 检测技术^[7]和美国富鲁达公司(Fluidigm)基于微流体芯片技术开发的 Fluidigm 基因分型平台^[8]。其中 KASP 技术由于其高通量、低成本和可操作性强等优点而在农作物性状遗传和改良研究领域备受关注,现已发展成为全球基准技术^[7]。本文主要从 KASP 技术的发展、原理和在水稻、小麦、玉米等主要农作物的遗传育种中的应用等方面展开综述,同时展望了其在作物遗传育种中的应用前景。

1 KASP 技术的特点与实验原理

1.1 KASP 技术的发展与特点

在过去 30 年中,分子标记从低通量限制性片段长度多态性(RFLP)开始,到最近达到的基于

NGS 技术的 SNP 标记,已经经历了三代。KASP 是一种基于荧光的同质基因分型技术,最初由英国的 KBioscience 公司所开发^[7]。KBioscience 公司成立于 2002 年,在优化基因分型分析的相关技术以及 KASP 技术的开发方面拥有近 10 年的经验。他们不仅开发了一套自己的 SNP 基因分型仪器,而且拥有约 500 000 个经过验证的 KASP 分析库存。随后,该公司在 2011 年被英国的 LGC 公司收购。不久, LGC 公司开发出了一套灵活、快速且高通量的 SNPLine 仪器平台和实验方案,基于该公司的平台,每天可检测的 SNP 数量从 20–500 000 个,样本数可从单个到数万个以上,有很强的灵活性。

KASP 技术具有灵活、便宜、准确等特点。一方面,它是以常规 PCR 和荧光检测为基础,能够在普通实验室操作的基础上满足低、中、高通量基因分型的要求。因此,具有一定的灵活性,更容易实现高通量和自动化检测^[7]。另一方面, KASP 作为 TaqMan 的替代品,在原理上与 TaqMan 类似(也是基于终端荧光读取判断),但它与 TaqMan 技术不同之处在于:其采用的是通用探针,可以与各种不同的基因特异引物配合使用,而不需要针对每个特定的位点进行探针合成,这极大降低了实验的试剂成本^[9]。研究表明,采用 KASP 技术的商业服务成本比采用 TaqMan 探针法低约 80%^[10]。其次,基于 KASP 技术的基因分型是一种简单的不依赖于凝胶电泳检测的方法,其不需要专门的设备,研究人员可以使用常规的 qPCR 仪器进行 SNP 基因分型,具有良好的兼容性。通过设计两个引物对等位基因特异性单核苷酸多态性位点进行不同方向的扩增,可以将单核苷酸多态性转化为长度多态性。此外, KASP 实现了更高的分析设计成功率(98%–100%)和转化为成功的工作检测(93%–94%)(与 TaqMan 的 72% 和 61% 相比)(LGC Genomics 应用说明: http://www.kbioscience.co.uk/reagents/KASP_TaqMancomparison.pdf)。而将 KASP 与基于芯片的 Illumina GoldenGate 平台相比, KASP 对阳性对照 DNA 样品中的平均基因分型误差为 0.7%–1.6%, 低于使用 GoldenGate 观察到的(2.0%–2.4%), 具有较高的准确性^[7]。

从发展趋势上看,高通量、低成本和操作友好型是分子标记技术发展的主要方向,而 KASP 检

测技术能够同时满足这3个要求。目前该技术已广泛应用于植物、动物和人类的遗传学研究与群体分型^[11-13]。研究人员可以选择几种简单的方法进行KASP分析,例如:可以直接向LGC公司或其他商业测试公司提供核酸样本和引物进行检测;或者通过订购KASP试剂,自行利用qRT-PCR仪进行结果分析;又或者购买全套检测设备,建立自己的高通量SNP分析平台。

1.2 KASP技术的实验原理与步骤

KASP是一种基于荧光检测的基因分型技术,能够在复杂的基因组DNA样品中对特定位点上的SNPs和插入缺失(insertion-deletions, InDels)序列进行精准的双等位基因检测。具体的检测体系包括:DNA模板、2个通用荧光探针、2个通用淬灭探针、2个与目标位点特异结合的引物以及共同的反向引物。该技术是基于引物末端碱基的特异匹配来对SNP以及InDel位点进行检测,即基于PCR反应结束后的荧光读取工作^[10]。针对每个孔采用双色荧光检测,一个样本对应一个检测位点,而每个位点都存在3种可能的基因型(纯合1,纯合2或杂合),极大地提高了检测效率。

KASP技术的操作步骤可概括为三大步:第一步,引物和探针设计。首先设计针对特定SNP的2个正向PCR引物,每个引物通过调整3'末端来对应一个SNP的等位基因^[14]。例如如图1,等位基因1引物3'末端对应A,等位基因2引物3'末端对应C。其次,在每个正向引物的5'末端添加标签序列,如图1中的标签序列1和2。此外,设计与标签序列对应的荧光探针,如探针1和探针2。在探针1的5'端添加有FAM荧光基团,探针2的5'端添加有HEX荧光基团^[15]。同时,对应2个探针,各设计一个3'端带淬灭基团的淬灭探针。在实际操作中只需要针对特定SNP设计添加5'末端标签序列的普通引物即可,而探针通常由试剂盒提供。第二步,普通PCR扩增。在第一轮PCR扩增中,等位基因特异引物(3'末端能配对的)就可识别特定等位基因模板,完成等位基因识别(图1)。从第2轮PCR扩增开始,产物中出现携带通用标签序列的模板,这步完成把通用标签序列引入与SNP对应的PCR产物中。随后在

PCR扩增过程中,携带荧光的探针通过与通用序列互补的DNA链结合而添加到PCR产物中,经多轮PCR扩增,更多的荧光探针退火到新合成的、没有淬灭基团的互补链上,而逐渐增强PCR产物荧光强度。第三步,荧光检测和分析。利用专用的荧光信号检测仪或普通的荧光定量PCR仪(配有FAM和HEX检测通道)进行信号读取并用软件采集信号和判别等位基因类型。

2 KASP技术在主要农作物中的应用

2.1 KASP技术在种质资源鉴定与亲缘关系研究中的应用

种质资源是农业生产最基本的生产资料,是加速农作物育种改良的重要物质基础^[16]。同时,种质资源在持续提高作物产量、品质和保证粮食安全等方面发挥着重要作用。种质资源的广泛收集及妥善保存是确保种质资源遗传多样性最有效的方法之一^[17]。由于KASP标记的高通量和低成本特性,近年来越来越多的研究利用该标记开展了种质资源的鉴定和应用分析。

在水稻中,Shikari等^[18]采用KASP技术对克什米尔河谷的温带水稻种质资源的213个基因组位点进行了分析。通过消除冗余,最终选择了114个SNPs设计成KASP标记。通过群体结构分析,将该批材料分成了3个明显的亚群。Yang等^[19]借助已有的SNPs和InDels数据库,成功开发了565对与水稻重要农艺性状相关的KASP标记,并将其中多态性较好的467对标记用于481份水稻种质的群体结构分析。根据KASP标记基因分型结果,将该材料分为3个组群。此外,贵州禾是贵州省特有的一种原生态水稻品种,吴娴等^[20]利用120对KASP标记对贵州禾资源和一些其他地区的水稻品种的遗传多样性和群体结构进行了研究。结果表明,贵州禾的遗传多样性较为丰富,与贵州及江苏地方粳稻的亲缘关系更为密切。

在小麦中,谢静敏等^[21]设计了5412对KASP标记对青海省一批小麦品种进行了遗传多态性分析。结果显示KASP标记多态性比率为90.4%,多态性结果显示该批小麦品种可分为5个或12个类群。Federico等^[22]用85对KASP标记对168份来自阿

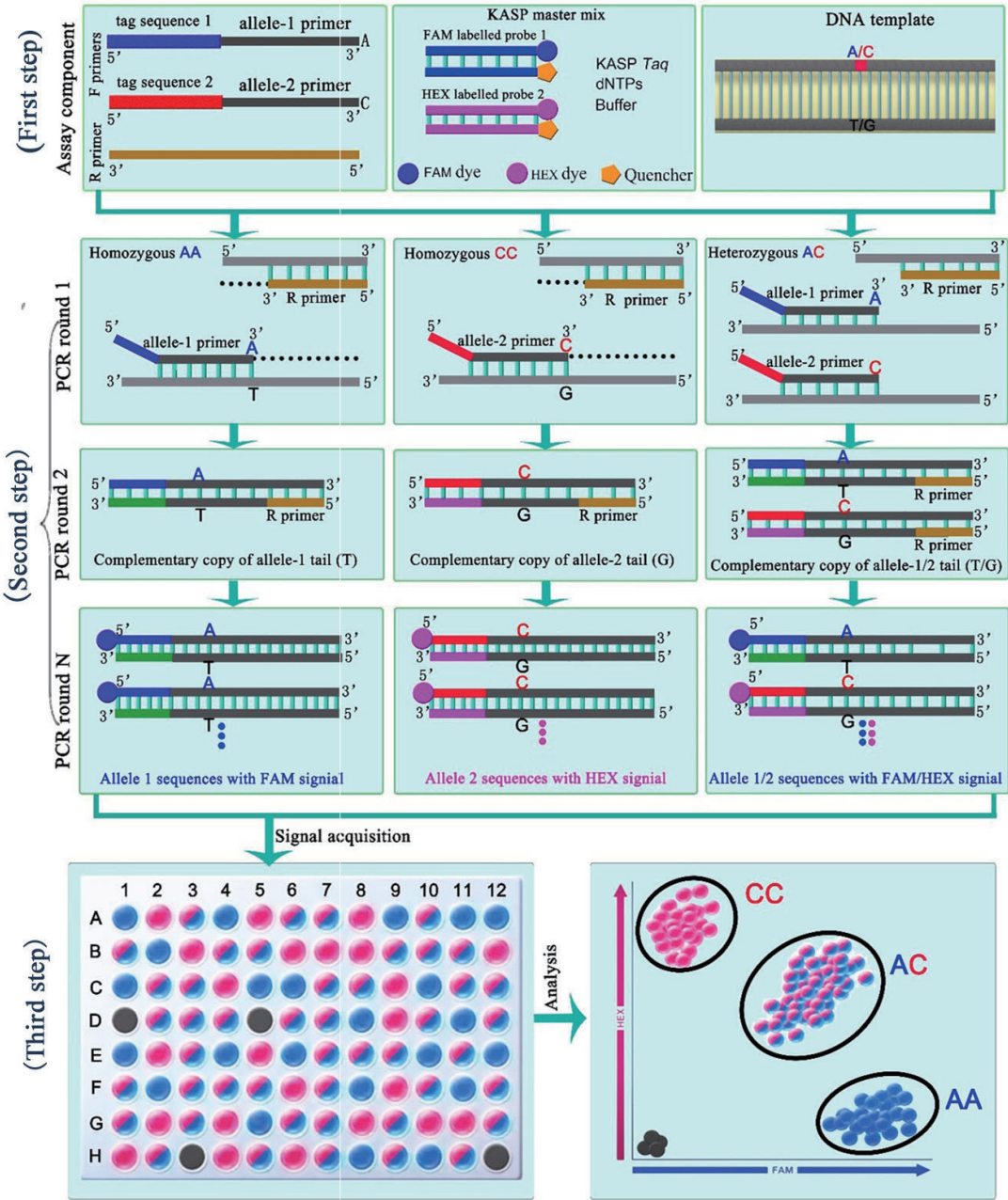


图 1 KASP 技术基因分型的基本原理示意图

Fig.1 Principal of the KASP genotyping assay

根廷和其他国家的硬粒小麦的遗传多样性进行分析，得出遗传分化系数值为 0.139。这些品种可被分为两个亚群，并且发现其分析结果与 119 份材料中使用 AFLP 标记分析所获得的信息是互补的。Zhang 等^[23] 将与小麦籽粒产量、品质、适应性和抗逆性有关的 44 个 SNPs 开发成 KASP 标记，进而对 207 份面包

小麦品种进行群体结构分析，将其分为两个亚组：第一亚群主要指宁夏的地方品种和栽培品种；第二类主要是从国外和中国其他省份引进的品种。

在玉米中，陆海燕等^[24] 利用不同来源的玉米自交系全基因组重测序数据鉴定出了一系列 SNPs 位点并开发出 700 对 KASP 分子标记，从中选择

202 对具有代表性 KASP 标记进一步用于系统进化树构建及群体结构分析。结果显示, 基于 KASP 标记位点的聚类分析结果和基于总 SNPs 位点的聚类分析结果高度吻合, 两者的遗传距离相似性系数高达 89.5%, 能成功区分玉米的杂种优势群。因此, KASP 标记亦可在玉米种质资源分析、以及杂种优势群划分等方面发挥重要作用。

在其它农作物方面, Yang 等^[25] 选择了 53 对 KASP 标记对 34 份大白菜材料进行基因分型, 这 53 对标记平均分布在每条染色体上。通过对该批材料的遗传多样性的评估, 可将这 34 份材料根据抽穗类型分为三大类。Shen 等^[26] 通过对西兰花基因型进行全基因组测序, 选择了 100 个 SNPs 用于 KASP 标记的开发。随后利用这些标记对 372 份西兰花材料进行群体结构分析, 发现这些材料可分为两个主要类群, 但类群分化相对较弱。王富强等^[27] 使用一批葡萄种质筛选出 46 对优质 KASP 标记。而其中的 25 对标记即可对这些材料进行有效区分, 鉴定效率达到 95.69%。聚类分析结果显示可将该批葡萄种质细分为 6 个亚类。Wang 等^[28] 利用成功开发的 78 对 (转化率为 61.41%) KASP 标记将 94 份小扁豆材料分为两个主要类群: 国内种质和国外种质, 并且发现国内种质的聚类更为集中, 而国外种质的分布则更为广泛。这与使用 EST-SSR 标记的分类结果高度一致。此外, KASP 技术还被用于咖啡^[29]、花生^[30] 等农作物的种质资源鉴定和亲缘关系等方面的研究。

2.2 KASP 技术在分子标记辅助育种中的应用

传统育种一般是通过对群体中大量个体进行性状观测来选育优良后代, 这一过程不仅操作繁琐、耗费时间, 而且效率低下。随着分子生物技术的快速发展, 分子标记辅助选择已经成为现代分子育种的有效工具^[31-32]。在众多的分子标记中如何选择高通量且低成本的分子标记是现代分子标记辅助育种研究中所首要关注的。基于 KASP 标记在成本和通量方面的优势, 其在农作物的标记辅助选择育种中也得到了广泛应用。

在水稻中, Shao 等^[33] 基于水稻基因组计划 (rice genome project, RGP) 的 3 000 份重测序数据, 对控制稻米直链淀粉含量的 *Wx* 基因开展了等位变异分

析, 并成功开发了 6 对 KASP 标记, 这些标记大致能够区分现有的所有 *Wx* 等位基因材料。他们利用这些标记对 1976–2018 年的杂交亲本品种进行了 *Wx* 基因分型发现, 杂交稻亲本中主要存在 3 种 *Wx* 等位类型: Wx^a 、 Wx^b 和 Wx^{lv} 。 Wx^b 广泛应用于杂交水稻的父本; Wx^a 和 Wx^{lv} 用于早期杂交稻的母本, 并随着杂交稻的选育进程, 逐渐被 Wx^b 所取代。另外, 根据 Wx^{mq} 基因第 4 外显子的 SNPs 信息, 牛付安等^[34] 开发了 Wx^{mq} -KASP, 用其对一些粳稻软米品种和相关 F_2 群体进行了基因分型研究, 证明 Wx^{mq} -KASP 可以高效应用于水稻低直链淀粉含量的分子标记辅助选择育种。Addison 等^[35] 对 2 932 份水稻品种的香味基因 *Badh2* 的 SNPs 进行了分析, 开发出能区分 *Badh2* 单倍型的 9 对 KASP 标记, 并对一些美国水稻材料进行检测, 发现 Hap6 能够有效鉴定美国种质中的香味品种。同年, Li 等^[36] 开发了两对与 *Badh2*-E2 (第 2 外显子的 7 bp 缺失) 和 *Badh2*-E7 (第 7 外显子 8 bp 缺失及 3 bp 变异) 等位基因变异相关的 KASP-SNP 标记, 并将其应用于香稻种质鉴定和 F_2 群体筛选。结果发现, 164 份香米品种中有 160 份可以使用这两对标记进行鉴定, 并推测大多数香米品种携带 *Badh2*-E2 和 *Badh2*-E7 两种等位类型。李瑶等^[37] 开发了 *SKCI*^{NB} (耐盐性)-KASP, 利用该标记对一个 BC_3F_2 群体进行了检测, 发现其能够有效区分群体中纯合个体和杂合个体。此外, 在抗病性方面, 一些研究证明 KASP 标记能够很好地鉴定水稻材料中抗病基因的不同等位基因类型^[38-41]。

在小麦方面, KASP 技术多用于与小麦抗病性和抗非生物胁迫相关的基因方面的研究。例如, Rasheed 等^[42] 开发并鉴定了 152 对与普通小麦适应性、产量、品质、生物和非生物胁迫抗性相关的 KASP 标记, 并利用这些标记对 4 个小麦分离群体的基因型进行鉴定, 结果显示所有的 KASP 标记都与栽培品种以及双亲群体中的相关表型显著关联。该研究还发现 KASP 标记的检测效率是基于凝胶电泳的传统 PCR 标记的 45 倍, 并且能有效提高杂交亲本和高代品系的鉴定效率。2018 年, Qureshi 等^[43] 借助 20 对 KASP 标记证实了小麦抗条锈病 *Yr34* 和 *Yr48* 为同一个基因。而在这之后, Fang^[44] 就小麦抗叶锈基因 *Lr34* 开发了两对 KASP 标记: *Lr34*-E11-

KASP 和 *Lr34*-E22-KASP, 这两对标记可在小麦育种工程中加速对 *Lr34* 基因的选择。Rehman 等^[45] 选择与小麦耐旱性相关的 16 个基因座的等位基因开发了 KASP 标记, 对 47 份小麦材料进行了等位变异与籽粒产量的相关性分析。该批 KASP 标记的转化率 >98%, 并且其对材料的分析结果与基于凝胶的 PCR 标记的分析结果一致。此外, 王志伟等^[46] 利用 3 对抗旱基因的 KASP 标记 (*TaDreb_SNP*、*fehw3_SNP*、*CWI4A_SNP*) 和 3 对抗穗发芽基因的 KASP 标记 (*PHS_646*、*SDR_SNP*、*Vp1b1-83_IND*) 对云南育成的小麦品种 (系) 进行了基因型检测, 发现这 6 对标记能够有效区分抗穗发芽和易穗发芽的品种以及抗旱和非抗旱品种。Su^[47] 就小麦赤霉病 (fusarium head blight, FHB) 开发了 *TaHRC*-KASP 标记, 并对来自中国和日本的几个抗赤霉病的地方品种进行了筛选, 发现在不同背景下, *TaHRC*-KASP 标记均可鉴定 *Fhb1* 基因。另外, Khalid 等^[48] 利用 124 对 KASP 标记, 对一批六倍体小麦品系进行分析, 以研究 87 个具有育种价值的功能基因的等位变异规律。从而为进一步调控小麦重要农艺性状的表达提供了一套目标基因。Anuarbek 等^[49] 利用 32 对 KASP 标记分析了来自哈萨克斯坦的四倍体硬粒小麦材料, 并对主要农艺性状进行评估, 发现其中有 8 对 KASP 标记的检测结果显示与小麦的 5 个农艺性状显著相关。

在玉米方面, Jagtap 等^[50] 开发了 100 对与高温胁迫响应 (heat stress response, HSR) 有关基因的 KASP 标记, 发现其中 71% 的标记具有多态性, 21% 的标记只产生一种基因或只有杂合型基因, 其余的 8% 未能产生有用的扩增信号。通过比较, 发现该研究中的 KASP 标记开发有效率 (71%) 高于小麦^[51] (67%) 和水稻^[52] (49.9%), 但低于鹰嘴豆^[11] (80.6%)。此外, ВолкоБа 等^[53] 以玉米为例, 介绍了 KASP 基因分型的结果及其在遗传育种和种子生产中的应用, 证明通过 KASP 基因技术进行的基因组选择能够有效提升玉米抗旱性遗传改良。

在其它作物中, Ongom 等^[54] 利用开发的 17 个豇豆 KASP 标记对 225 个杂交组合产生的 1 436 个 F_1 代植株进行了分子指纹图谱和杂合性检测, 结果表明 KASP 标记能够对豇豆亲本和杂合体有效区分, 为豇豆的分子育种提供了重要信息。王鹏等^[55] 设

计了抗番茄黄花曲叶病毒病基因 *Ty-1* 和抗根结线虫基因 *Mi-1* 的 KASP 标记, 并结合已报道的抗番茄花叶病毒病基因 *Tm-2²*、抗番茄斑萎病毒病基因 *Sw-5* 和抗镰刀菌颈腐根腐病基因 *Frl* 的 KASP 标记, 进行了番茄抗病基因 KASP 分型检测, 所得检测结果与传统分子标记检测结果一致。张敬敬等^[56] 开发了西瓜抗枯萎病、抗炭疽病、抗白粉病性状相关的 3 对 KASP, 对 130 份西瓜材料进行了分析, 根据检测结果将试验材料分为携带不同抗病基因的 4 类。棕色中脉 (*bmr*) 表型是高粱的一种隐性性状, 会导致木质素的总体减少^[57]。Burow 等^[58] 开发了 15 对 KASP 标记 (6 对用于 *bmr6*, 9 对用于 *bmr12*), 用于在高粱苗期对 *bmr6* 和 *bmr12* 的等位变异进行研究。因为 *bmr6* 和 *bmr12* 表现出隐性上位型基因互作, 因此, 这些 KASP 标记有助于从单个突变体中鉴定出双突变类型。孟君仁等^[59] 利用 5 对 KASP 标记对桃的自然群体和分离群体进行了检测, 表明开发的 KASP 标记可高效检测桃果实外观、抗性、肉质等重要性状相关基因的等位变异。此外, KASP 技术在马铃薯^[60]、苹果^[61]、辣椒^[62] 和向日葵^[63] 等作物中也进行了相关的育种研究。

2.3 KASP 技术在遗传图谱构建与基因定位中的应用

遗传图谱的构建是基因定位和克隆的前提, 其在数量性状位点 (quantitative trait locus, QTL) 的遗传鉴定中发挥关键作用^[64-65]。早期的遗传图谱构建所采用的分子标记主要是第一代和第二代分子标记, 由于这些分子标记在基因组中分布密度较低, 基于这些标记所定位到的 QTL 往往因为精度有限而无法开展后续的 QTL 精细定位和克隆。近些年来, 随着技术的进步和测序成本的降低, 大规模重测序已经成为可能。利用广泛的重测序可以挖掘大量的遗传标记, 这为构建高密度遗传图谱提供了强有力的数据支持^[66]。其中 SNP 阵列是一种强大而有效的 QTL 作图方法, 而 KASP 技术作为 SNP 标记基因分型的一种, 能够在保证基因分型准确性的情况下, 大大节省实验所消耗的时间^[6]。

在水稻方面, Cheon 等^[67] 开发了 771 对 KASP 标记并成功地用于韩国温带粳稻品种的遗传图谱构

建和抗病性及穗发芽抗性的 QTL 分析。其中, 利用 239 对 KASP 标记对包含 160 个系的重组自交系 (RIL) 进行了抗穗发芽的 QTL 检测。Ghosal 等^[68]通过所构建的两个 F₂ 水稻群体, 分别获得了 170 个和 179 个多态性 SNPs, 并将这些位点设计成 KASP 标记进行检测, 共鉴定出 5 个分别位于染色体 3、5、6、7 和 8 上的与存活率有关的 QTL, 以及 4 个分别位于染色体 1、3 和 7 上的控制幼苗高度的 QTL。有氧水稻生产 (aerobic rice production, AP) 是减少水稻栽培用水的有效方式, 具有窄根锥角 (narrow root cone angle, RCA) 基因被认为是 AP 的一个关键特征。研究表明, *qRCA4* 对于 RCA 变异起重要作用^[69]。Vinarao 等^[70]构建了 3 种不同遗传背景的水稻 F₂ 群体, 利用 9 对 KASP 标记 (其中两对标记: *snpOS00933* 和 *snpOS00944* 被设计用于 QTL 两侧, 而另外 7 对标记被设计在 QTL 内), 最终将 *qRCA4* 精细定位在 720 kb 的区域内。另外, Lei 等^[71]在 7 号染色体上检测到一个与相对地上部长度 (RSL) 相关的主效 QTL: *qRSL7*, 并根据亲本之间的 SNP, 在 *QRSL7* 附近开发了 25 对 KASP 标记, 最终将 *QRSL7* 定位在 222 kb 的距离内。

在小麦方面, 蒋钰婕等^[72]用小麦无芒品种中国春为父本, 有芒品系 MK147 为母本构建了 F₂ 分离群体, 利用 58 对 KASP 标记将控制芒的 QTL 定位在 0.81 cM 的区间内。Zhan 等^[73]利用 20 对 KASP 标记对小麦品种 *T. ponticum* × *Taichung 29* 的 F₂ 分离群体, 进行抗小麦白粉病基因 *PmCH7087* 的定位分析, 最终将目标基因定位在 9.68 Mb 的区间内。Xiong 等^[74]利用突变体 *eh1* 和 LX987 杂交获得的 RIL 进行遗传作图, 检测到 37 个与抽穗期、株高、千粒重、穗长等农艺性状有关的 QTL, 并利用成功开发的 25 对 KASP 标记对这些 QTL 进行了验证, 从而将染色体 4B 和 3A 上的 QTL 分别限定在 0.8 Mb 和 2.5 Mb 的物理间隔内。通过将 KASP 技术与构建遗传图谱相结合, Wu 等^[75-76]分别利用 17 对和 18 对 KASP 标记在染色体 2BS、3BS 和 6BL 上鉴定了 3 个与抗条锈病性相关的 QTL, 并将 6BL 染色体上的 QTL 最终定位在 KASP 标记 IWB71602 和 IWB55937 之间, 其遗传距离为 1.4 cM。

在玉米方面, Nair 等^[77]利用 KASP 标记技术

对 CML206 × CML312 的 F₂ 群体, 进行玉米条纹病抗性基因 *Msv1* 的精细定位, 定位区间为 0.87 cM。玉米致死性坏死 (maize lethal necrosis, MLN) 是撒哈拉以南非洲地区玉米的一种主要疾病, 严重感染时, 产量损失可达 100%^[78]。对此, Awata 等^[79]开发了 500 对可能影响 MLN 表型的 KASP 标记, 通过对 7 个群体的 F₃ 后代进行分析, 检测到了至少有 7 个抗 MLN 的 QTL。其中, 3 号染色体上的 2 个 SNP 位点 (*PHM15449_10* 和 *PZA00920_1*) 与 MLN 抗性密切相关。此外, Wang 等^[80]在 3 号染色体上发现了与高茎秆断裂角度 (影响茎秆的柔韧性和抗倒伏性) 有关的 2 个候选基因: *Zm00001d039769* 和 *Zm00001d039913*, 根据这 2 个候选基因设计的 2 对 KASP 标记, 经过验证也显示出与茎秆断裂角度有显著的相关性。

在其它作物方面, Kante 等^[81]构建了西非高粱的 POP_{CD} (CK60A × DT-298)、POP_{FD} (FambeA × DT-298) 和 POP_{FL} (FambeA × Lata) 的 3 个 F₂ 分离群体, 鉴定了 7 个与育性恢复基因 *Rf* 相关的 QTL, 并利用开发的 11 对 KASP 标记在 POP_{CD} 和 POP_{FL} 的 F_{2:3} 群体中进行了 QTL 位点的验证。Cheng 等^[82]通过遗传作图在 6 号染色体上检测到与大豆镰刀菌抗性有关的 3 个抗性候选基因, 针对其中一个基因 (*Glyma.06g206900*) 设计了 KASP 标记并在不同遗传群体中进行了验证, 发现该标记与病原菌反应之间存在着很强的相关性。提高水分利用效率可以有效减少干旱胁迫造成的生产损失, 为了确定苹果中与调控水分利用效率有关的位点, Wang 等^[83]利用 Honeycrisp 和 Qinguan 两个品种构建的 F₂ 群体进行了干旱胁迫 QTL 的鉴定, 随后用开发的 3 个 KASP 标记对其中的 3 个 QTL 进行了稳定性验证。Scholten 等^[84]利用 1 100 对 KASP 标记对所构建的洋葱种间三交群体进行基因分型, 最终将鳞状葡萄孢杆菌 (*botrytis squamosa*) 的抗性位点定位于 6 号染色体上。此外, KASP 技术还被用于大白菜^[85]、花生^[86]等农作物在遗传图谱构建与基因定位中的研究。

2.4 KASP 技术在种子纯度鉴定中的应用

传统上对种子纯度的鉴定主要依赖于表型鉴定, 效率低下。随着 DNA 分子标记技术的不断发展, 越

来越多的作物开始使用不同类型的分子标记来鉴别种子的真伪和纯度^[87], 但 AFLP、SSR、InDel 等标记存在数量少、操作复杂等不足。而 SNP 标记具有稳定性好、密度高、分布广泛、适于规模化筛选等优点, 已被应用于辣椒、黄瓜等作物的品种鉴定以及种子纯度检测等方面^[88-90]。目前 KASP 标记技术在种子纯度鉴定方面也得到了越来越多的应用(表 1)。

Ertiro 等^[91]使用了 191 对 KASP 标记和 257 268 对 GBS (genotyping by sequencing, 通过测序进行基因分型) 标记对来自玉米品种的 16 个自交系的 2-9 个种子源的遗传纯度和同一性水平进行了评价分析。研究表明基因分型平台的类型和用于分析的标记数量对于不同来源的种子纯度及同一性方面均存在一定差异, 但两种方法得出的总体结论基本相似。说明相较于高标记密度的 GBS 技术, 使用低标记密度的 KASP 技术就可轻松完成材料的质控分析。此外, 尹祥佳等^[92]采用 KASP 技术对甘肃省内推广的 6 份玉米杂交种进行了纯度鉴定, 结果显示 4 对 KASP 标记对品种的纯度鉴定结果在 95.83%-98.96%。王蕊等^[93]筛选获得在玉米染色体上分布均匀、多态性较好的 60 个候选位点, 并转化为 KASP 标记, 转化成功率为 95%。综合考虑标记双亲互补率、多态性、稳定性和分型效果等多项指标, 最终确定 20 个标记作为玉米杂交种纯度鉴定的核心标记, 这些标记能够有效鉴定 99.7% 供试样品纯度。冯子珊等^[94]利用 3 对 KASP 标记对短棒瓢瓜杂交种的 92 份 F_1 及其父、母本材料进行了分析, 结果显示 F_1 种子纯度为 97.8%, 与田间种植纯度鉴定结果一致。匡猛等^[95]利用棉花 63K 全基因组 SNP 芯片对代表性品种进行了筛选与综合评估, 并基于 KASP 技术开发了一套适用于我国棉花杂交种高通量检测的核心 SNP 组合 (合计 26 个), 从而实现了对大量样品的品种纯度的快速检测。为了确定大麦预混麦芽样品“麦特卡夫”的样品纯度, 蒋培基等^[96]筛选鉴定了 4 个能够区分 7 个大麦麦芽品种的 SNP 位点, 开发了对应的 KASP 标记。进一步的分析表明这些标记能够成功分辨出预混麦芽样品。此外, Kim 等^[97]使用 50 对 KASP 标记在 102 个萝卜自交系中进行品种纯度验证发现, 这些自交系的纯合性

在 56%-96%。

3 展望

随着分子生物学和高通量测序技术的发展, 越来越多的农作物品种和品系的基因组重测序使得 SNP 标记日益丰富。基于这些丰富的 SNP 数据, 以 SNP 芯片阵列和重测序 SNP 分型技术为主的基因分型平台得到了快速发展^[98-99]。KASP 作为目前主要的 SNP 分型检测技术之一, 相较于传统的分子标记 (RFLP, STS、SSR 等) 有其独特的优势^[7, 100]。它是一种简单的无凝胶荧光聚合酶链式反应, 能够在普通实验室操作的基础上满足低、中、高通量基因分型的要求, 具有一定的灵活性, 适用于目标位点和样本数量变化很大的实验设计。此外, 相较于其他的 SNP 基因分型平台如: TaqMan 和 Illumina GoldenGate, 它又能很大程度上降低实验成本以及提高实验准确率。该技术目前已在农作物分子标记辅助育种、种质资源鉴定、遗传图谱构建和种子纯度鉴定等领域得到了广泛的利用。

从分子标记的利用看, 传统的 SSR 等标记仍然是大多数研究者常用的标记技术^[101]。究其原因, 虽然现有 SNP 数据非常丰富, 但是这其中包括了大量冗余信息, 研究人员很难快速准确的获得有用的 SNP 信息。其次, 大量的 SNP 信息还难以与功能基因位点关联, 这限制了其在以功能基因利用为主的遗传育种中的应用^[19]。就技术本身而言, 由于 SNP 位点的限制, 在 KASP 引物设计时会受到 SNP 附近序列的限制而造成所设计的引物无法有效进行 PCR 扩增^[14]。此外, 模板 DNA 质量的高低对于 KASP 检测成功率也有重要影响。因此, 为了提升 KASP 技术的利用效率, 在基础研究领域应当注重基因功能位点的收集和汇总, 建立相关功能基因多态性位点的 KASP 数据库。为提高 KASP 对未知样本的检测效率, 在开发功能性 KASP 标记的同时, 应当建立相配套的阳性对照标准品。从 KASP 技术的具体操作来看, 实验室小规模检测条件下应当保证模板 DNA 的质量并调整到相似的浓度。当前分子设计育种已经被作为一项高效和精准的育种技术手段, 而在多种作物中被提出和实施。随着功能基因序列信息的积累和 KASP 分子标记数目的增加, 该技术将

表 1 KASP 技术在主要农作物中的应用

Table 1 Application of KASP technology in crops

作物 Crops	应用 Application	参考文献 Reference
水稻 <i>Oryza sativa</i>	种质资源鉴定与亲缘关系研究	[18–20]
	分子标记辅助育种	[33–41]
	遗传图谱构建与基因定位	[67–68, 70–71]
小麦 <i>Triticum aestivum</i>	种质资源鉴定与亲缘关系研究	[21–23]
	分子标记辅助育种	[42–49]
	遗传图谱构建与基因定位	[72–76]
玉米 <i>Zea mays</i>	种质资源鉴定与亲缘关系研究	[24]
	分子标记辅助育种	[50, 53]
	遗传图谱构建与基因定位	[77, 79–80]
大白菜 <i>Brassica rapa</i>	种子纯度鉴定	[91–93]
	种质资源鉴定与亲缘关系研究	[25]
	遗传图谱构建与基因定位	[85]
西兰花 <i>Brassica oleracea</i>	种质资源鉴定与亲缘关系研究	[26]
葡萄 <i>Vitis vinifera</i>	种质资源鉴定与亲缘关系研究	[27]
小扁豆 <i>Lens culinaris</i>	种质资源鉴定与亲缘关系研究	[28]
咖啡 <i>Coffea arabica</i>	种质资源鉴定与亲缘关系研究	[29]
花生 <i>Arachis hypogaea</i>	种质资源鉴定与亲缘关系研究	[30]
	遗传图谱构建与基因定位	[86]
豇豆 <i>Vigna unguiculata</i>	分子标记辅助育种	[54]
番茄 <i>Lycopersicon esculentum</i>	分子标记辅助育种	[55]
西瓜 <i>Citrullus lanatus</i>	分子标记辅助育种	[56]
高粱 <i>Sorghum bicolor</i>	分子标记辅助育种	[58]
	遗传图谱构建与基因定位	[81]
桃 <i>Amygdalus persica</i>	分子标记辅助育种	[59]
马铃薯 <i>Solanum tuberosum</i>	分子标记辅助育种	[60]
苹果 <i>Malus pumila</i>	分子标记辅助育种	[61]
	遗传图谱构建与基因定位	[83]
辣椒 <i>Capsicum annuum</i>	分子标记辅助育种	[62]
向日葵 <i>Helianthus annuus</i>	分子标记辅助育种	[63]
大豆 <i>Glycine max</i>	遗传图谱构建与基因定位	[82]
洋葱 <i>Allium cepa</i>	遗传图谱构建与基因定位	[84]
瓠瓜 <i>Lagenaria siceraria</i>	种子纯度鉴定	[94]
棉花 <i>Gossypium hirsutum</i>	种子纯度鉴定	[95]
大麦 <i>Hordeum vulgare</i>	种子纯度鉴定	[96]
萝卜 <i>Raphanus sativus</i>	种子纯度鉴定	[97]

成为种质资源鉴定、群体分析和分子设计育种等研究的重要辅助手段。

参 考 文 献

[1] 林敏 . 农业生物育种技术的发展历程及产业化对策 [J] . 生物技术进展 , 2021, 11 (4) : 405-417.

[2] Delannay X, McLaren G, Ribaut JM. Fostering molecular breeding in developing countries [J] . Mol Breed, 2012, 29 (4) : 857-873.

[3] Leng PF, Lübberstedt T, Xu ML. Genomics-assisted breeding - A revolutionary strategy for crop improvement [J] . J Integr Agric, 2017, 16 (12) : 2674-2685.

Lin M. The development course and industrialization countermeasure of agricultural biological breeding technology [J] . Curr Biotechnol, 2021, 11 (4) : 405-417.

- [4] Agarwal M, Shrivastava N, Padh H. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences [J] . Plant Cell Rep, 2008, 27 (4) : 617-631.
- [5] Hu W, Zhou TH, et al. Development of whole-genome agarose-resolvable LInDel markers in rice [J] . Rice, 2020 (1) : 1.
- [6] Rasheed A, Hao YF, Xia XC, et al. Crop breeding chips and genotyping platforms : progress, challenges, and perspectives [J] . Mol Plant, 2017, 10 (8) : 1047-1064.
- [7] Semagn K, Babu R, Hearne S, et al. Single nucleotide polymorphism genotyping using Kompetitive Allele Specific PCR (KASP) : overview of the technology and its application in crop improvement [J] . Mol Breed, 2014, 33 (1) : 1-14.
- [8] Seo J, Lee G, Jin Z, et al. Development and application of indica-*Japonica* SNP assays using the Fluidigm platform for rice genetic analysis and molecular breeding [J] . Mol Breed, 2020, 40 (4) : 1-16.
- [9] Majeed U, Darwish E, Rehman SU, et al. Kompetitive allele specific PCR (KASP) : a singleplex genotyping platform and its application [J] . J Agric Sci, 2018, 11 (1) : 11.
- [10] Broccanello C, Chiodi C, Funk A, et al. Comparison of three PCR-based assays for SNP genotyping in plants [J] . Plant Methods, 2018, 14 : 28.
- [11] Hiremath PJ, Kumar A, et al. Large-scale development of cost-effective SNP marker assays for diversity assessment and genetic mapping in chickpea and comparative mapping in legumes [J] . Plant Biotechnol J, 2012, 10 (6) : 716-732.
- [12] Chang CC, Silva BBI, et al. Development and validation of KASP assays for the genotyping of racing performance-associated single nucleotide polymorphisms in pigeons [J] . Genes, 2021, 12 (9) : 1383.
- [13] Landoulsi Z, Benromdhan S, Ben Djebara M, et al. Using KASP technique to screen *LRRK2* G2019S mutation in a large Tunisian cohort [J] . BMC Med Genet, 2017, 18 (1) : 70.
- [14] Rosas JE, Bonnacerrère V, Pérez de Vida F. One-step, codominant detection of imidazolinone resistance mutations in weedy rice (*Oryza sativa* L.) [J] . Electron J Biotechnol, 2014 (2) : 95-101.
- [15] Patterson EL, Fleming MB, Kessler KC, et al. A KASP genotyping method to identify northern watermilfoil, Eurasian watermilfoil, and their interspecific hybrids [J] . Front Plant Sci, 2017, 8 : 752.
- [16] You FM, Jia GF, Xiao J, et al. Genetic variability of 27 traits in a core collection of flax (*Linum usitatissimum* L.) [J] . Front Plant Sci, 2017, 8 : 1636.
- [17] Liu FM, Hong Z, Xu DP, et al. Genetic diversity of the endangered *Dalbergia odorifera* revealed by SSR markers [J] . Forests, 2019, 10 (3) : 225.
- [18] Shikari AB, Najeeb S, et al. KASPTM based markers reveal a population sub-structure in temperate rice (*Oryza sativa* L.) germplasm and local landraces grown in the Kashmir valley, north-western Himalayas [J] . Genet Resour Crop Evol, 2021 (3) : 821-834.
- [19] Yang GL, Chen SP, Chen LK, et al. Development of a core SNP arrays based on the KASP method for molecular breeding of rice [J] . Rice (N Y) , 2019, 12 (1) : 21.
- [20] 吴炯, 徐海峰, 张志斌, 等. 基于 KASP 标记的贵州禾群体遗传多样性与结构分析 [J] . 分子植物育种, 2021, 19 (4) : 1345-1353.
- Wu X, Xu HF, Zhang ZB, et al. Genetic diversity and population structure study of Guizhou He based on KASP marker [J] . Mol Plant Breed, 2021, 19 (4) : 1345-1353.
- [21] 谢静敏, 侯万伟, 张小娟. 基于 KASP 标记的青海省小麦品种遗传多样性分析 [J] . 分子植物育种, 2021. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20210618.1553.006.html>.
- Xie JM, Hou WW, Zhang XJ. Analysis on genetic diversity of wheat varieties in Qinghai province with KASP markers [J] . Mol Plant Breed, 2021. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20210618.1553.006.html>.
- [22] Roncallo PF, Beaufort V, Larsen AO, et al. Genetic diversity and linkage disequilibrium using SNP (KASP) and AFLP markers in a worldwide durum wheat (*Triticum turgidum* L. var durum) collection [J] . PLoS One, 2019, 14 (6) : e0218562.
- [23] Zhang WJ, Zhao JJ, He JS, et al. Functional gene assessment of bread wheat : breeding implications in Ningxia Province [J] . BMC Plant Biol, 2021, 21 (1) : 103.
- [24] 陆海燕, 周玲, 林峰, 等. 基于高通量测序开发玉米高效 KASP 分子标记 [J] . 作物学报, 2019, 45 (6) : 872-878.
- Lu HY, Zhou L, Lin F, et al. Development of efficient KASP molecular markers based on high throughput sequencing in maize [J] . Acta Agron Sin, 2019, 45 (6) : 872-878.
- [25] Yang SJ, Yu WT, Wei XC, et al. An extended KASP-SNP resource for molecular breeding in Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*) [J] . PLoS One, 2020, 15 (10) : e0240042.

- [26] Shen YS, Wang JS, Shaw RK, et al. Development of GBTS and KASP panels for genetic diversity, population structure, and fingerprinting of a large collection of broccoli (*Brassica oleracea* L. var. italica) in China [J]. *Front Plant Sci*, 2021, 12 : 655254.
- [27] 王富强. 葡萄 KASP 标记的开发及在种质资源鉴定中的应用 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2021.
- Wang FQ. Development of KASP marker and its application in identification of germplasm resources in grape [D]. Beijing: The Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2021.
- [28] Wang D, Yang T, Liu R, et al. RNA-Seq analysis and development of SSR and KASP markers in lentil (*Lens culinaris* Medikus subsp. *culinaris*) [J]. *Crop J*, 2020, 8 (6) : 953-965.
- [29] Akperterey A, Padi FK, Meinhardt L, et al. Effectiveness of single nucleotide polymorphism markers in genotyping germplasm collections of *coffea canephora* using KASP assay [J]. *Front Plant Sci*, 2021, 11 : 612593.
- [30] Khara P, Upadhyaya HD, Pandey MK, et al. Single nucleotide polymorphism-based genetic diversity in the reference set of peanut (*Arachis* spp.) by developing and applying cost-effective kompetitive allele specific polymerase chain reaction genotyping assays [J]. *Plant Genome*, 2013, 6 (3) : 1-11.
- [31] 袁建霞, 董瑜, 张博, 等. 从文献计量角度分析作物分子标记辅助育种国际发展态势 [J]. *科学观察*, 2012, 7 (2) : 24-32.
- Yuan JX, Dong Y, Zhang B, et al. A bibliometrical analysis of international development of molecular marker assisted breeding of crop [J]. *Sci Focus*, 2012, 7 (2) : 24-32.
- [32] Collard BCY, MacKILL DJ. Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century [J]. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2008, 363 (1491) : 557-572.
- [33] Shao Y, Peng Y, Mao BG, et al. Allelic variations of the *Wx* locus in cultivated rice and their use in the development of hybrid rice in China [J]. *PLoS One*, 2020, 15 (5) : e0232279.
- [34] 牛付安, 周继华, 曹黎明, 等. 水稻低直链淀粉含量基因 *Wx^{mq}* 的 KASP 标记开发与利用 [J]. *分子植物育种*, 2019, 17 (24) : 8125-8131.
- Niu FA, Zhou JH, Cao LM, et al. Development and utilization of KASP marker for low amylose content gene, *wx^{mq}*, in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *Mol Plant Breed*, 2019, 17 (24) : 8125-8131.
- [35] Addison CK, Angira B, Kongchum M, et al. Characterization of haplotype diversity in the *BADH2* aroma gene and development of a KASP SNP assay for predicting aroma in US rice [J]. *Rice (NY)*, 2020, 13 (1) : 47.
- [36] Li WB, Zeng XH, Li SL, et al. Development and application of two novel functional molecular markers of *BADH2* in rice [J]. *Electron J Biotechnol*, 2020, 46 : 1-7.
- [37] 李瑶, 程灿, 周继华, 等. 水稻耐盐性基因 *SKCI* 的 KASP 标记的开发与利用 [J]. *分子植物育种*, 2021. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20210723.1339.006.html>.
- Li Y, Cheng C, Zhou JH, et al. Development and utilization of KASP marker for salt tolerance gene *SKCI* in rice [J]. *Molecular Plant Breeding*, 2021. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20210723.1339.006.html>.
- [38] 韦宇, 李孝琼, 何新柳, 等. 基于 KASP 技术的稻瘟病抗性基因 *Pi9* 分子标记的开发与评价 [J]. *西南农业学报*, 2019, 32 (6) : 1216-1222.
- Wei Y, Li XQ, He XL, et al. Development and evaluation of rice blast resistance gene (*Pi9*) SNP molecular markers based on KASP technology [J]. *Southwest China J Agric Sci*, 2019, 32 (6) : 1216-1222.
- [39] 杨义强, 朱林峰, 李晓芳, 等. 抗稻瘟病基因 *Pi2* 的基因特异性 KASP 标记开发与应用 [J]. *植物遗传资源学报*, 2021, 22 (5) : 1314-1321.
- Yang YQ, Zhu LF, Li XF, et al. Development and application of KASP marker specific for rice blast resistance *Pi2* gene [J]. *J Plant Genet Resour*, 2021, 22 (5) : 1314-1321.
- [40] Liu Y, Wang FM, Zhang AN, et al. Development and validation of functional markers (*Tetra*-primer ARMS and KASP) for the bacterial blight resistance gene *xa5* in rice [J]. *Australas Plant Pathol*, 2021, 50 (3) : 323-327.
- [41] Kang JW, Shin D, et al. Accelerated development of rice stripe virus-resistant, near-isogenic rice lines through marker-assisted backcrossing [J]. *PLoS One*, 2019 (12) : e0225974.
- [42] Rasheed A, Wen WE, Gao FM, et al. Development and validation of KASP assays for genes underpinning key economic traits in bread wheat [J]. *Theor Appl Genet*, 2016, 129 (10) : 1843-1860.
- [43] Qureshi N, Bariana HS, Zhang P, et al. Genetic relationship of stripe rust resistance genes *Yr34* and *Yr48* in wheat and identification of linked KASP markers [J]. *Plant Dis*, 2018, 102 (2) : 413-420.
- [44] Fang TL, Lei L, Li GQ, et al. Development and deployment of

- KASP markers for multiple alleles of *Lr34* in wheat [J]. Theor Appl Genet, 2020, 133 (7): 2183-2195.
- [45] Ur Rehman S, Ali Sher M, Saddique MAB, et al. Development and exploitation of KASP assays for genes underpinning drought tolerance among wheat cultivars from Pakistan [J]. Front Genet, 2021, 12: 684702.
- [46] 王志伟, 乔祥梅, 等. 云南小麦品种(系)抗逆性相关基因的 KASP 标记检测 [J]. 西南农业学报, 2020 (8): 1601-1607.
- Wang ZW, Qiao XM, et al. Identification of genes associated with stress resistance in Yunnan wheat cultivars (lines) by KASP assays [J]. Southwest China J Agric Sci, 2020 (8): 1601-1607.
- [47] Su ZQ, Jin SJ, et al. Development and validation of diagnostic markers for Fhb1 region, a major QTL for *Fusarium* head blight resistance in wheat [J]. Theor Appl Genet, 2018, 131 (11): 2371-2380.
- [48] 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]. Front Plant Sci, 2019, 10: 717.
- [49] Anuarbek S, Abugalieva S, Turuspekov Y. Validation of bread wheat KASP markers in durum wheat lines in Kazakhstan [J]. Proc Latv Acad Sci Sect B Nat Exact Appl Sci, 2019, 73 (5): 462-465.
- [50] Jagtap AB, Vikal Y, Johal GS. Genome-wide development and validation of cost-effective KASP marker assays for genetic dissection of heat stress tolerance in maize [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21 (19): 7386.
- [51] Rasheed A, Mujeeb-Kazi A, Oghonnaya FC, et al. Wheat genetic resources in the post-genomics era: promise and challenges [J]. Ann Bot, 2018, 121 (4): 603-616.
- [52] Cheon KS, Baek J, Cho YI, et al. Single nucleotide polymorphism (SNP) discovery and kompetitive allele-specific PCR (KASP) marker development with Korean *Japonica rice* varieties [J]. Plant Breed Biotech, 2018, 6 (4): 391-403.
- [53] Волкова HE, Соколов BM. KASPTM genotyping technology and its use in genetic-breeding programs (a study of maize) [J]. Plant Var Stud Prot, 2017, 13 (2): 131-140.
- [54] Ongom PO, Fatokun C, Togola A, et al. Molecular fingerprinting and hybridity authentication in cowpea using single nucleotide polymorphism based kompetitive allele-specific PCR assay [J]. Front Plant Sci, 2021, 12: 734117.
- [55] 王鹏, 田哲娟, 等. 番茄 5 个抗病基因 KASP 分型技术体系的建立与应用 [J]. 园艺学报, 2021, 48 (11): 2211-2226.
- Wang P, Tian ZJ, et al. Establishment and application of a tomato KASP genotyping system based on five disease resistance genes [J]. Acta Horti Sin, 2021, 48 (11): 2211-2226.
- [56] 张敬敬, 张海英, 等. 河北省 130 份西瓜品种与种质资源抗病基因 KASP 检测分析 [J]. 华北农学报, 2019 (2): 110-116.
- Zhang JJ, Zhang HY, et al. KASP assays of disease resistance genes from 130 watermelon varieties and germplasms in Hebei Province [J]. Acta Agric Boreali Sin, 2019 (2): 110-116.
- [57] Oliver AL, Pedersen JF, Grant RJ, et al. Comparative effects of the *Sorghum* bmr-6 and bmr-12 genes: I. forage *Sorghum* yield and quality [J]. Crop Sci, 2005, 45 (6): 2234-2239.
- [58] Burow G, Chopra R, Sattler S, et al. Deployment of SNP (CAPS and KASP) markers for allelic discrimination and easy access to functional variants for brown midrib genes bmr6 and bmr12 in *Sorghum bicolor* [J]. Mol Breed, 2019, 39 (8): 1-10.
- [59] 孟君仁, 曾文芳, 等. 桃若干重要性状的 KASP 分子标记开发与应用 [J]. 中国农业科学, 2021, 54 (15): 3295-3307.
- Meng JR, Zeng WF, et al. Development and application of KASP molecular markers of some important traits for peach [J]. Sci Agric Sin, 2021, 54 (15): 3295-3307.
- [60] Kaiser NR, Jansky S, Coombs JJ, et al. Assessing the contribution of *sli* to self-compatibility in North American diploid potato germplasm using KASPTM markers [J]. Am J Potato Res, 2021, 98 (2): 104-113.
- [61] Winfield M, BurrIDGE A, Ordidge M, et al. Development of a minimal KASP marker panel for distinguishing genotypes in apple collections [J]. PLoS One, 2020, 15 (11): e0242940.
- [62] Holdsworth WL, Mazourek M. Development of user-friendly markers for the *pvr1* and *Bs3* disease resistance genes in pepper [J]. Mol Breed, 2015, 35 (1): 1-5.
- [63] Gascuel Q, Bordat A, Sallet E, et al. Effector polymorphisms of the sunflower downy mildew pathogen *Plasmopara halstedii* and their use to identify pathotypes from field isolates [J]. PLoS One, 2016, 11 (2): e0148513.
- [64] Toojinda T, Siangliw M, Tragoonrungs S, et al. Molecular genetics of submergence tolerance in rice: QTL analysis of key traits [J]. Ann Bot, 2003, 91 (2): 243-253.

- [65] Liu HJ, Niu YC, et al. An ultra-high-density map as a community resource for discerning the genetic basis of quantitative traits in maize [J]. *BMC Genomics*, 2015, 16 : 1078.
- [66] An YL, Chen LB, Tao LL, et al. QTL mapping for leaf area of tea plants (*Camellia sinensis*) based on a high-quality genetic map constructed by whole genome resequencing [J]. *Front Plant Sci*, 2021, 12 : 705285.
- [67] Cheon KS, Jeong YM, et al. Development of 454 new kompetitive allele-specific PCR (KASP) markers for temperate *Japonica rice* varieties [J]. *Plants (Basel)*, 2020, 9 (11) : 1531.
- [68] Ghosal S, Casal C Jr, Quilloy FA, et al. Deciphering genetics underlying stable anaerobic germination in rice : phenotyping, QTL identification, and interaction analysis [J]. *Rice (N Y)*, 2019, 12 (1) : 50.
- [69] Vinarao R, Proud C, et al. Stable and novel quantitative trait loci (QTL) confer narrow root cone angle in an aerobic rice (*Oryza sativa* L.) production system [J]. *Rice*, 2021, 14 (1) : 28.
- [70] Vinarao R, Proud C, Snell P, et al. QTL validation and development of SNP-based high throughput molecular markers targeting a genomic region conferring narrow root cone angle in aerobic rice production systems [J]. *Plants*, 2021, 10 (10) : 2099.
- [71] Lei L, Zheng HL, Bi YL, et al. Identification of a major QTL and candidate gene analysis of salt tolerance at the bud burst stage in rice (*Oryza sativa* L.) using QTL-seq and RNA-seq [J]. *Rice (N Y)*, 2020, 13 (1) : 55.
- [72] 蒋钰婕. 利用 KASP 标记定位小麦中国春无芒位点 Awn-4A.1 [D]. 杨凌 : 西北农林科技大学, 2020.
- Jiang YJ. Using KASP marker to mapping the awnless locus awn-4A. 1 in wheat variety Chinese spring [D]. Yangling : Northwest A & F University, 2020.
- [73] Zhan HX, Wang YL, Zhang D, et al. RNA-seq bulked segregant analysis combined with KASP genotyping rapidly identified PmCh7087 as responsible for powdery mildew resistance in wheat [J]. *Plant Genome*, 2021, 14 (3) : e20120.
- [74] Xiong HC, Li YT, Guo HJ, et al. Genetic mapping by integration of 55K SNP array and KASP markers reveals candidate genes for important agronomic traits in hexaploid wheat [J]. *Front Plant Sci*, 2021, 12 : 628478.
- [75] Wu JH, Wang QL, Kang ZS, et al. Development and validation of KASP-SNP markers for QTL underlying resistance to stripe rust in common wheat cultivar P10057 [J]. *Plant Dis*, 2017, 101 (12) : 2079-2087.
- [76] Wu JH, Liu SJ, Wang QL, et al. Rapid identification of an adult plant stripe rust resistance gene in hexaploid wheat by high-throughput SNP array genotyping of pooled extremes [J]. *Theor Appl Genet*, 2018, 131 (1) : 43-58.
- [77] Nair SK, Babu R, Magorokosho C, et al. Fine mapping of *Msv1*, a major QTL for resistance to maize streak virus leads to development of production markers for breeding pipelines [J]. *Theor Appl Genet*, 2015, 128 (9) : 1839-1854.
- [78] Wangai AW, Redinbaugh MG, Kinyua ZM, et al. First report of maize chlorotic mottle virus and maize lethal necrosis in Kenya [J]. *Plant Dis*, 2012, 96 (10) : 1582.
- [79] Awata LAO, Beyene Y, Gowda M, et al. Genetic analysis of QTL for resistance to maize lethal necrosis in multiple mapping populations [J]. *Genes*, 2019, 11 (1) : 32.
- [80] Wang XQ, Shi Z, Zhang RY, et al. Stalk architecture, cell wall composition, and QTL underlying high stalk flexibility for improved lodging resistance in maize [J]. *BMC Plant Biol*, 2020, 20 (1) : 515.
- [81] Kante M, Rattunde HFW, Nèbié B, et al. QTL mapping and validation of fertility restoration in West African *Sorghum* A₁ cytoplasm and identification of a potential causative mutation for *Rf2* [J]. *Theor Appl Genet*, 2018, 131 (11) : 2397-2412.
- [82] Cheng P, Gedling CR, Patil G, et al. Genetic mapping and haplotype analysis of a locus for quantitative resistance to *Fusarium graminearum* in soybean accession PI 567516C [J]. *Theor Appl Genet*, 2017, 130 (5) : 999-1010.
- [83] Wang HB, Zhao S, Mao K, et al. Mapping QTLs for water-use efficiency reveals the potential candidate genes involved in regulating the trait in apple under drought stress [J]. *BMC Plant Biol*, 2018, 18 (1) : 136.
- [84] Scholten OE, van Kaauwen MPW, Shahin A, et al. SNP-markers in *Allium* species to facilitate introgression breeding in onion [J]. *BMC Plant Biol*, 2016, 16 (1) : 187.
- [85] 杨双娟, 张晓伟, 魏小春, 等. 大白菜抗根肿病基因 BraA. Ph. 8. 4 的定位及 KASP 标记开发 [J]. *园艺学报*, 2021, 48 (7) : 1317-1328.
- Yang SJ, Zhang XW, Wei XC, et al. Mapping and KASP markers development for clubroot resistance gene BraA. Ph. 8. 4 in Chinese

- cabbage [J]. *Acta Horti Sin*, 2021, 48 (7): 1317-1328.
- [86] Leal-Bertioli SCM, Cavalcante U, et al. Identification of QTLs for rust resistance in the peanut wild species *Arachis magna* and the development of KASP markers for marker-assisted selection [J]. *G3 Genes/Genomes/Genetics*, 2015, 5 (7): 1403-1413.
- [87] Zhang HY, Wang H, Guo SG, et al. Identification and validation of a core set of microsatellite markers for genetic diversity analysis in watermelon, *Citrullus lanatus* Thunb. Matsum. & Nakai [J]. *Euphytica*, 2012, 186 (2): 329-342.
- [88] Jung JK, Park SW, Liu WY, et al. Discovery of single nucleotide polymorphism in *Capsicum* and SNP markers for cultivar identification [J]. *Euphytica*, 2010, 175 (1): 91-107.
- [89] 兰青阔, 张桂华, 王永, 等. 基于 SNP 标记的黄瓜杂交种纯度鉴定方法 [J]. *中国蔬菜*, 2012 (6): 58-63.
- Lan QK, Zhang GH, Wang Y, et al. SNP-based molecular assay for cucumber hybrid seed purity identification by pyrosequencing [J]. *China Veg*, 2012 (6): 58-63.
- [90] 姚丹青, 朱文莹, 张微微, 等. 应用 SNP 标记高效鉴定黄瓜杂交种纯度 [J]. *西北农业学报*, 2016, 25 (4): 595-604.
- Yao DQ, Zhu WY, Zhang WW, et al. Highly efficient identification of seed purity of cucumber hybrid by SNP marker [J]. *Acta Agric Boreali Occidentalis Sin*, 2016, 25 (4): 595-604.
- [91] Ertiro BT, Ogugo V, et al. Comparison of Kompetitive Allele Specific PCR (KASP) and genotyping by sequencing (GBS) for quality control analysis in maize [J]. *BMC Genomics*, 2015, 16: 908.
- [92] 尹祥佳, 李晶, 王雅琳, 等. 基于 SNP 分子标记的玉米杂交种基因型分析与纯度鉴定 [J]. *现代农业研究*, 2021, 27 (6): 102-104, 132.
- Yin XJ, Li J, Wang YL, et al. The genotype analysis and purity identification by SNP markers in maize (*Zea mays* L.) hybrids [J]. *Mod Agric Res*, 2021, 27 (6): 102-104, 132.
- [93] 王蕊, 施龙建, 田红丽, 等. 玉米杂交种纯度鉴定 SNP 核心引物的确定及高通量检测方案的建立 [J]. *作物学报*, 2021, 47 (4): 770-779.
- Wang R, Shi LJ, Tian HL, et al. Identification of SNP core primer and establishment of high throughput detection scheme for purity identification in maize hybrids [J]. *Acta Agron Sin*, 2021, 47 (4): 770-779.
- [94] 冯子珊, 吴晓花, 李艳伟, 等. 基于 KASP 标记快速鉴定瓠瓜杂种 F1 纯度的方法 [J]. *分子植物育种*, 2021. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20210705.1530.017.html>.
- Feng ZS, Wu XH, Li YW, et al. A KASP-based rapid procedure for bottle gourd hybrid F1 seed purity survey [J]. *Molecular Plant Breeding*, 2021. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20210705.1530.017.html>.
- [95] 匡猛, 王延琴, 等. 基于单拷贝 SNP 标记的棉花杂交种高通量检测技术 [J]. *棉花学报*, 2016, 28 (3): 227-233.
- Kuang M, Wang YQ, et al. High-throughput genotyping assay technology for cotton hybrid purity based on single-copy SNP markers [J]. *Cotton Sci*, 2016, 28 (3): 227-233.
- [96] 蒋培基, 王德良, 徐东东, 等. 基于竞争性等位基因特异性 PCR 技术的麦芽品种纯度定性和定量检测 [J]. *食品科学*, 2018, 39 (24): 322-326.
- Jiang PJ, Wang DL, Xu DD, et al. Kompetitive allele specific PCR (KASP) for the qualification and quantification of malt varieties [J]. *Food Sci*, 2018, 39 (24): 322-326.
- [97] Kim J, Manivannan A, et al. Transcriptome sequencing assisted discovery and computational analysis of novel SNPs associated with flowering in *Raphanus sativus* in-bred lines for marker-assisted backcross breeding [J]. *Hortic Res*, 2019, 6: 120.
- [98] McCouch SR, Zhao KY, et al. Development of genome-wide SNP assays for rice [J]. *Breed Sci*, 2010, 60 (5): 524-535.
- [99] Kumar S, Banks TW, Cloutier S. SNP discovery through next-generation sequencing and its applications [J]. *Int J Plant Genomics*, 2012, 2012: 831460.
- [100] 崔阳, 王晓云. 竞争性等位基因特异性 PCR 分型技术在植物抗病遗传育种中的应用 [J]. *分子植物育种*, 2021, 19 (1): 164-172.
- Cui Y, Wang XY. Application of kompetitive allele-specific PCR genotyping technology in plant genetic breeding for disease resistance [J]. *Mol Plant Breed*, 2021, 19 (1): 164-172.
- [101] Miah G, Rafii MY, Ismail MR, et al. A review of microsatellite markers and their applications in rice breeding programs to improve blast disease resistance [J]. *Int J Mol Sci*, 2013, 14 (11): 22499-22528.