

# 植物分子标记高通量快速检测技术的研究进展

王 攀

(上海中科荃银分子育种技术有限公司,上海 200230)

**摘要:**分子标记是 DNA 水平遗传变异的直接反映,被广泛应用于分子育种、物种多样性分析及亲缘关系鉴定、杂种优势分析等研究。以高通量植物样本采集、高通量提取植物基因组 DNA 以及高通量快速检测技术这三大关键环节为主,全面梳理分子标记检测的完整流程,并深入剖析当前各个环节的现状与挑战。同时,对植物分子标记的高通量快速检测过程进行了归纳与展望,旨在为未来检测流程的优化与创新提供有力的理论支撑,推动相关技术的不断进步与完善。

**关键词:**分子标记;高通量;SNP;KASP

## Research Progress on High-Throughput Rapid Detection Technology for Plant Molecular Markers

WANG Pan

(Shanghai ZKW Molecular Breeding Technology Co., Ltd., Shanghai 200030)

全球种业的发展经历了原始育种、杂交育种、分子育种 3 个时代,正在迈向更为前沿的 4.0 智能育种时代<sup>[1-3]</sup>。从当前的育种形势可以看出,一些大型的跨国种子公司和国外规模较大的实验室已较早地进入种业 4.0 时代。相比之下,我国种业尚处在从杂交选育为主导,逐步融入分子技术辅助选育的 2.0 到 3.0 过渡阶段<sup>[4]</sup>。在分子标记的辅助下,育种工作者可实现高密度遗传图谱的构建、QTL 定位与主效基因的挖掘、物种进化分析及亲缘关系鉴定、作物种群划分、杂种优势分析及分子育种等研究。

遗传标记是在遗传分析上能反映遗传多样性并用作标记的基因,能表述出生物的某一独特特征,更能将生物性状具象化。从技术水平上看,遗传标记可被细致地划分为形态学标记、细胞学标记、生物化学标记以及分子标记等类型<sup>[5]</sup>。分子标记自出现以来,具有数量多、检测周期短、可高通量检测和对环境影响小等诸多优势<sup>[6]</sup>。这些特点使得分子标记在育种工作中得到了迅猛的发展,为遗传研究带

来了革命性的变革。分子标记短时间内迅猛发展,类型可达数十种,根据检测原理和染色体特性的不同,分子标记可进一步细分为多种类型,例如基于限制性内切酶和 PCR 技术的分子标记有 RFLP、AFLP 和 CAPS;基于 PCR 技术和分子电泳的分子标记则有 RAPD、SSR、ISSR 和 SRAP 等;而基于高通量测序或芯片杂交的分子标记技术则包括 SNP,这些分子标记为遗传分析和育种工作提供了强有力的工具支持<sup>[7]</sup>。

分子标记的深入开发与日益广泛的应用也对其高通量快速检测技术提出了更高需求。高通量检测技术是能同时对多个样本或多个指标进行检测的先进技术与方法,以其高检测量、低成本、高效率的显著优势,成为检验检测方法研发与标准制定的重要发展趋势,更是国内外相关研究的热点与焦点<sup>[8]</sup>。植物分子标记的高通量快速检测技术可大致分为 3 个主要步骤:植物样本获取,植物 DNA 提取,植物样本检测。本文以高通量植物样本采集、高通量提取植物基因组 DNA 及高通量快速检测技术 3 个方面对分子标记检测的整个过程进行综合描述,并对

**基金项目:**上海市 2022 年度“科技创新行动计划”科技型中小企业技术创新资金项目(220H1198600)

植物分子标记的高通量快速检测过程做出总结与展望,以期对未来检测流程的改良优化及创新提供理论参考。

## 1 高通量植物样本采集

植物样本的类型丰富,包括叶片、芽、根、种子等。相对来说,叶片采集更便捷,且用叶片提取的DNA纯度更高,所以通常采集植物新鲜叶片来提取DNA以便后续检测。植物叶片采集通常采用两种方式,分别是人工取样和智能采集系统。

**1.1 人工取样** 无论是实验室作物还是大田作物,传统人工取样仍旧是育种工作者的首要选择。人工取样灵活性强、准确度高、具有可控性,但是速度慢,耗费更多时间和精力,人工成本相对较高,且由于人为因素的干扰,样本可靠性和一致性有待提高。

**1.2 智能采集系统** 2017年法国ALCI公司研发出高通量植物样品智能采集系统SAS,利用自动化机械臂采集植物叶片,转移至多孔板中,技术采样通量是人工采样的5倍。美国Brooks公司研发的手持式植物叶圆片采样及编码系统PlantTrak Hx,可用于实验室或野外,采样量每台可达1188个,适用于玉米、棉花、大豆等几乎所有植株叶片。这些智能采集系统相较于人工取样来说,虽省工省时,提高了样本采集一致性,但同时,也存在必须单个取样并转移,且转移过程中会出现样本污染的情况。因此为实现更加便捷、快速的高通量检测,研发一种低成本、高通量、高效率的叶片采集装置是非常必要的。

## 2 高通量提取植物基因组DNA

随着植物分子标记及检测技术的发展,对大规模植物DNA提取的需求急剧上升,因而开发出高通量快速DNA抽提的方法尤为重要。在众多提取方法中,十二烷基硫酸钠(SDS)法、TPS法、十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)法、磁珠法及碱煮法均展现出广泛的应用前景。这些方法在原理上殊途同归,均涵盖细胞裂解破碎、DNA释放、杂质去除及DNA纯化等核心步骤<sup>[9]</sup>,确保了高效、准确地获取纯净的植物DNA。

单志等<sup>[9]</sup>结合了传统SDS法提取DNA的稳健性与Silica吸附柱纯化DNA的高效性,成功创设了一种改良版的SDS法,此法具备广泛适用性,经过实践验证,该方法成功地从23种植物中提取出了高质量的基因组DNA。侯泽菁等<sup>[10]</sup>在对多种提取

方法进行系统分析的基础上,亦对SDS法进行了优化与创新,成功打造了一种既低成本又高质量的快速提取方法,此方法在保障DNA提取质量的同时,还能有效简化操作流程、降低试验成本,为高通量样本DNA的提取工作提供了强有力的支持。

张友昌等<sup>[11]</sup>深入比较了多种植物DNA提取方法,经过精心优化与改进,在提取流程中引入了缓冲液预处理技术,并在TPS缓冲液中加入PVP40,这种新方法不仅支持批量取样,还极大地简化了操作步骤,摒弃了氯仿和异戊醇的使用,从而实现了低成本、快速、高通量的棉花叶片DNA提取。蓝碧秀等<sup>[12]</sup>对CTAB法进行了改进,能够同时提取不同样本的基因组DNA,简便、快捷、高通量,特别是在微量提取微胚乳玉米基因组DNA方面,充分满足了以PCR为基础的分子生物学研究的需求,为相关领域的研究提供了有力支持。

磁珠法提取DNA主要有两种类型:直接磁珠法和间接磁珠法。直接磁珠法是指磁珠直接与DNA结合,然后通过磁场将磁珠—DNA复合物从混合物中分离出来。间接磁珠法是指磁珠先与某种能够与DNA结合的物质(抗体或生物素等)结合,然后再通过这种物质与DNA结合,最后通过磁场将磁珠—物质—DNA的复合物从混合物中分离出来。周悦等<sup>[13]</sup>在磁珠法的基础上,开发了一套半自动DNA提取仪及不同作物基因组提取流程,具有简单、高效、准确的优势,且提取过程无毒,安全系数高。

碱煮法是通过高温强碱溶液破除植物细胞壁、变性蛋白质,促使DNA释放。徐宗昌等<sup>[14]</sup>利用改良碱裂解法,提取转基因烟草基因组DNA,无需加热煮沸,上清液可直接用于PCR反应。朱先飞等<sup>[15]</sup>则对碱煮法进行了深入的改进,创制出一种更为快速、高通量且低成本的油菜DNA提取方法,该方法无需研磨,流程更加简化,成本更为低廉,非常适合品种筛选和分子标记辅助选择等大规模应用。俎峰等<sup>[16]</sup>则进一步通过简化碱裂解法与高通量研磨器样品混匀仪的结合,提供了一套集成化快速、高通量、低成本油菜DNA提取方案,该方法可在10h内完成上万份DNA样品的提取,极大地提高了DNA获取效率。

### 3 分子标记的高通量快速检测技术

#### 3.1 CAPS 标记检测技术与 dCAPS 标记检测技术

酶切扩增多态性序列标记检测技术(CAPS, Cleaved amplified polymorphic sequence), 又称限制性片段长度多态性聚合酶链反应(PCR-RFLP), 是 PCR 技术与 RFLP 技术相结合的方法<sup>[17]</sup>。其运作原理在于, 针对 DNA 片段在特定酶切位点的碱基变异情况设计 PCR 引物, 采用专一性的限制性内切酶, 对 PCR 扩增后的 DNA 片段进行酶切处理。这一过程导致不同的电泳图谱的产生, 从而实现对样本多态性的准确鉴定。CAPS 技术在应用上存在固有的局限性, 即只能有效检测位于酶切位点的单核苷酸多态性(SNP), 而对于酶切位点之外的 SNP 则无能为力。为了弥补这一不足, 研究人员进行了深入改造, 通过人为引入错配碱基构建新的酶切位点, 对 SNP 位点进行特定的酶切处理, 再通过凝胶电泳技术对这些多态性进行准确检测, 这一标记技术被称为衍生限制性内切酶多态性标记(称为 dCAPS, Derived cleaved amplified polymorphic sequences)<sup>[17]</sup>。dCAPS 技术的出现, 不仅克服了 CAPS 技术的局限, 而且在操作流程上显得更为简便, 对 DNA 模板的纯度要求也相对较低, 仅需借助常规的实验仪器即可顺利完成。该技术的缺点是有概率形成一些非常用的限制性内切酶位点, 增加了检测成本。

王亦学等<sup>[18]</sup>通过克隆得到谷子 *SiSAP8* 基因, 经多态性分析后, 在第 81 位的 SNP 位点上成功开发了 dCAPS 标记, 这一研究为后期谷子功能鉴定及关联分析提供了有力依据。在植物育种领域, dCAPS 技术同样展现出了其强大的潜力。郭嗣斌等<sup>[19]</sup>利用 dCAPS 分子标记定位了一个穗长主效 QTL——PL9, 通过筛选合适的标记, 成功地提高了水稻穗长这一重要产量性状的育种效率, 为育种工作者节约了成本。杨广阔等<sup>[20]</sup>通过双重参考日本晴序列和 93-11 序列, 针对一个涉及稻瘟病抗性材料 P400 突变基因所定位区间, 结合 dCAPS 策略, 展示了高效开发 SNP-dCAPS 标记的实例, 结果表明, 建立的方法对利用 93-11 为亲本, 开展水稻功能基因分离等工作有积极的借鉴意义。综上所述, dCAPS 技术虽然存在一定的局限, 但其在遗传研究和作物育种领域应用广泛, 产生了深远影响。

#### 3.2 KASP 基因分型技术 竞争性等位基因特异

性 PCR (KASP, Kompetitive allele specific PCR), 即 KASP 技术, 最初由英国 KBioscience 公司研发, 这种技术利用等位基因特异性寡核苷酸延伸和荧光共振能量转移(RET)来进行基因分型<sup>[21]</sup>。KASP 技术原理是针对目标序列的 SNP 位点, 设计 3 条引物, 其中 2 条特异性上游引物仅在引物末端有碱基差异且携带特殊接头, 第 3 条引物是通用的下游引物, 最终根据扩增产物的荧光信号来确定基因型, 实现准确的基因分型。KASP 技术的研发开创了一种高效、精准的基因分型技术, 通过在 PCR 过程中引入荧光信号, KASP 技术大大简化了基因分型的操作流程, 降低了成本, 适用于各种通量的基因分型试验, 并提高了分型的准确性和灵敏度<sup>[22]</sup>。这项技术在分子育种、疾病诊断、人类遗传学等领域具有广泛的应用前景。总的来说, KASP 技术的出现为基因分型提供了一种快速、可靠的解决方案, 不仅可以帮助科研人员更深入地了解等位基因间的差异, 还可以在医学和农业领域为疾病诊断和作物改良提供有力支撑。随着科学技术的不断发展, KASP 技术将在未来发挥更加重要的作用, 推动基因分型领域的持续发展。

邓钊等<sup>[23]</sup>借助参考基因组及水稻测序数据库进行 SNP 变异位点分析, 开发出 3 个 KASP 连锁标记, 可用于水稻 *Bph43* 基因型鉴定。赵传超等<sup>[24]</sup>成功开发了水稻稻瘟病抗性基因 *Pi2* 的 KASP 分子标记, 建立了水稻 *Pi2* 基因的 KASP 基因分型体系, 对遗传育种及品种改良研究有重要的应用价值。Kang 等<sup>[25]</sup>开发并验证了水稻条纹病毒抗性基因的 KASP 分子标记, 具有高通量、准确性高等优点。Addison 等<sup>[26]</sup>利用 KASP 技术分析了水稻香味基因 *BADH2* 的 297 个基因组位点, 最终确定了 9 个 SNP 的 KASP 标记, 并成功鉴定水稻香味基因。通过该检测技术, 研究人员可精确进行水稻基因分型, 也可以更好地了解水稻基因的遗传多样性, 加速了从实验室到田间的转换过程, 为育种改良奠定了基础。这些研究为水稻育种研究提供了重要的技术支持, 有助于培育出更优良的水稻品种, 推动了水稻种质资源的合理利用和保护。

**3.3 基于芯片的分子标记检测技术** 在分子育种中, 研究者往往需要借助高效的基因分型技术手段, 对海量种质资源进行基因型检测, 从而完成更加高



效、精准的品种选育。1991年Affymetrix公司的Fordor首次利用光蚀刻技术制备了基于玻片的微阵列,使生物芯片成为可实际应用的分子生物学技术,为高通量分子标记检测技术开辟了新的道路。如今,芯片技术已经得到了长足的发展。其中DNA芯片是应用最广泛的一种。DNA芯片可用于SNP位点检测,为基因定位提供了重要工具<sup>[27]</sup>。同时,芯片技术的不断创新和发展进步,进一步提高了基因分型的效率和准确性。基因芯片可分为固相芯片和液相芯片。固相芯片主要用于检测单核苷酸多态性(SNP)等标记,而液相芯片因其高通量特性在大规模样本处理中表现优异,研究者可根据试验目的及自身需求选择合适的芯片类型,以达到预期效果。综合来看,DNA芯片技术的发展在基因分型领域发挥着不可替代的作用。通过结合SNP检测和分型技术,DNA芯片为基因定位和功能基因组学研究提供了重要工具和支撑。随着技术的不断进步,基因芯片的应用范围和效率将进一步提升,为分子育种研究和其他领域的基因分型工作带来更多的可能性和机遇。

**3.3.1 固相芯片检测技术** 固相基因芯片市场中,应用最多的检测芯片主要来自两大厂家,Illumina和Affymetrix。Illumina采用微球芯片生产工艺,通过微米级氧化硅微球固定寡核苷酸探针,每个微球耦合多条探针,可检测1个SNP位点。探针设计中,Address序列识别微球身份,Probe序列与DNA片段杂交<sup>[28-29]</sup>。扫描仪可检测红绿荧光,区分碱基。该技术高通量、准确可靠,但需要高标准的探针设计。在玉米和小麦遗传研究中<sup>[30-31]</sup>,Illumina芯片技术可用于构建连锁图谱和基因分型,为遗传机制研究和分子标记辅助育种奠定基础。

Affymetrix的基因芯片利用原位光刻合成技术,在基片上直接固定和合成探针。在基片上进行羟基化处理,并使用光敏感的保护基团保护羟基;光刻掩膜遮挡,只有受光照射部位的羟基脱保护,激活进行偶联反应;通过多轮反应,逐步合成DNA探针长链;探针链与基因组DNA杂交后显色,激光进行扫描完成SNP位点分析<sup>[7]</sup>。Affymetrix的Axiom芯片可实现基因组DNA的精准检测。

**3.3.2 液相芯片检测技术** 液相芯片体系由许多均一大小的圆形微球构成,每个微球固定不同的探针

分子,悬浮于液相体系形成液相芯片系统,实现多种分子同时检测,即xMAP技术<sup>[32]</sup>。1997年Luminex公司推出这项技术,使用不同比例红色荧光染料标记微球,编码产生百种以上荧光编号,xTAG技术将特异探针与编码微球结合,将不同探针通过编码微球区分,待测样本与探针—微球复合物杂交,通过流式细胞仪一次完成多种靶序列鉴定,该技术可应用于不同植物,进行种质鉴定、遗传研究、全基因组分析和育种研究<sup>[33-35]</sup>。

Illumina的微球芯片、Affymetrix的原位合成芯片以及Luminex公司的液相芯片均可实现高通量快速检测。微球芯片试验只需1次杂交,最快2d可得结果,效率高;原位合成芯片需2次杂交,工作流程较复杂,检测周期较长;液相芯片需要样本处理、杂交、扩增建库等步骤,时间较长。无论是固相芯片还是液相芯片,均适用于高通量基因分型,涵盖几万至几十万检测位点。

**3.4 靶向测序基因型检测技术** 自1977年第一代测序技术问世以来,测序技术不断发展,从Sanger测序发展至二代测序,再到如今的三代全长测序,测序成本有所降低。然而,对于大规模育种计划中成千上万样本的全基因组测序仍面临高成本和数据处理挑战。为了提高效率、降低成本,简化的基因组测序技术(GBS,Genotyping by sequence)逐渐受到关注。其中,经典的GBS技术原理是利用限制性内切酶等手段来降低基因组的复杂程度,再结合高通量测序,获取标记信息,实现基因分型<sup>[36]</sup>。在高质量参考基因组和图谱的基础上,GBS技术能够用较小的测序量获取高密度全基因组覆盖的分子标记,因此得到广泛应用。冷益丰等<sup>[37]</sup>利用GBS技术,对大凉山360份玉米地方品种资源进行亲缘关系鉴定与遗传分析,分成两大类群,并对检测到的418个基因进行功能注释,为大凉山地区玉米品种资源的改良及保护提供了理论基础。

基于GBS技术的发展,研究者提出了靶向测序基因型检测技术(GBTS,Genotyping by target sequencing),它针对特定靶向位点进行测序和基因型检测。这种靶向的简化基因组测序可对已知区域及位点测序,摒除冗余位点,减少了生信分析数据量,提高了分析效率。GBTS技术包括基于多重PCR的GenoPlexs技术和基于液相探针捕获的



GenoBaits 技术。基于多重 PCR 的靶向测序技术结合了多重 PCR 和二代测序,首先扩增目标区域,通过 PCR 或酶连接引入接头序列,构建扩增文库,再进行测序和生物信息学分析,获取目标区域序列信息,实现基因检测<sup>[38]</sup>。基于液相探针捕获的技术是将目标探针与靶向序列互补结合,基于分子杂交和二代测序,利用生物素探针捕获目标区域,然后通过链霉亲和素和磁珠吸附技术完成捕获和测序,实现基因型分析<sup>[39]</sup>。以上这些技术均具有高通量、准确度高、成本低等优点。石家庄博瑞迪公司利用 GBST 技术自主研发了水稻 1K 和 40K、大豆 40K、玉米 45K、小麦 16K 和 40K 的液相芯片,展示了该技术的广泛应用性<sup>[38]</sup>。Shen 等<sup>[40]</sup>评估了 372 份西兰花材料的遗传多样性、亲缘关系、群体结构和指纹图谱,选择了 1067 个 SNPs 通过靶测序(GBTS)进行基因分型,100 个 SNP 通过 KASP 进行基因型分型,将 372 材料分为 2 个主要类群。这是首次对中国西兰花的多样性和种群结构进行综合研究,也是 GBTS 和 KASP 技术在西兰花遗传特征鉴定中的首次应用,为中国西兰花的育种研究提供了丰富信息。

#### 4 结语与展望

分子标记具有诸多优势且在作物遗传育种中发挥着重要作用,随着分子生物学技术的发展,分子标记的检测将更加高效、高通量、成本更低,进一步实现程序化与自动化。

样本采集作为分子标记检测流程的第 1 步,很大程度上制约着检测流程和育种效率,尤其是目前仍以人工取样为主的育种实验室及科研单位。人工取样成本高、速度慢、效率低,而智能采集系统虽然节省人力资源,但是在对样本进行多次转移的过程中容易出现污染,取样质量及效率上有待改进以实现高通量精准取样。对此,研究者可针对这些缺陷进行改良及创新,探索新的取样方法。例如,在目前的基础上对采样装置进行创新,做到连续取样甚至无限取样,降低人力和时间成本,甚至在取样时同时破碎样本,省去转移步骤,减少误差和污染风险。此外,可结合碱煮法等 DNA 提取方法处理采集的样本,或简化处理程序,在添加试剂提取高纯度 DNA 样本的基础上,直接进行 PCR 反应,大幅降低时间和试剂成本。这些创新方法有助于提高样本取样和 DNA 提取过程的效率和质量。

CAPS 标记检测技术、dCAPS 标记检测技术、KASP 基因分型技术、基于芯片的分子标记检测技术与靶向测序基因型检测技术均可以对 DNA 样本进行高通量、高准确性、高灵敏度、快速的多重检测。但是,这些先进技术存在价格昂贵、设计和操作复杂、扩增产物难以定量、反应容易受污染、无法现场实时检测、缺乏自动化等问题,并且都依赖于较高素质的专业操作人员与专业的实验室环境。因此,对这些技术进行降低成本、简化使用流程、提高灵敏度和准确性方面的优化,可以使其在不同领域中被更广泛地应用。

未来分子标记的高通量检测技术的发展方向涵盖以下几个关键方面。首先,结合 CRISPR/Cas 系统,能实现高灵敏度、高精度的多种基因修饰产物检测,与 LAMP、RPA 等技术结合可快速准确地检测包括 SNP 分子标记和基因编辑在内的复杂序列信息<sup>[41]</sup>。其次,即时检验技术(POCT)结合 PCR 和胶体金免疫层析技术可在田间实现即时检测,帮助育种工作者实现快速筛查和基因型分析。另外,结合化学发光技术、ELISA 和电化学技术等 IVD 诊断技术以及质谱分析技术,可实现高通量快速筛查和基因型精准分析。在技术创新的基础上,应着力降低设备和试剂成本,综合多种技术优势,研发更经济、高效、精准的检测技术,这些发展方向也有望为分子标记的高通量检测带来新的突破,助力育种工作的发展和进步。

#### 参考文献

- [1] 种康,李家洋. 植物科学发展催生新一轮育种技术革命. 中国科学: 生命科学, 2021, 51 (10): 1353-1355
- [2] Wallace J G, Rodgers-Melnick E, Buckler E S. On the road to breeding 4.0: Unraveling the Good, the bad, and the boring of crop quantitative genomics. Annual Review of Genetics, 2018, 52: 421-444
- [3] 景海春, 田志喜, 种康, 李家洋. 分子设计育种的科技问题及其展望概论. 中国科学: 生命科学, 2021, 51 (10): 1356-1365
- [4] 刘国浩, 刘超, 黄岩, 张存岭. 育种 3.0 时代中小种企适应策略. 中国种业, 2023 (4): 18-21
- [5] 邓华凤. 杂交水稻知识大全. 北京: 中国科学技术出版社, 2014
- [6] 余芬, 江思容, 咎逢刚, 夏成材, 吕青, 刘家勇, 夏志强. 基于 SNP 分子标记构建甘蔗指纹图谱. 分子植物育种. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20240311.1213.002.html>
- [7] 李欢, 张文洋, 田志喜, 张震, 叶文超, 周子健, 陈甲法, 吴建宇. 高通量分子标记检测方法的研究进展. 玉米科学, 2022, 30 (3): 1-9

- [8] 李明扬,孙娟娟,仵雁北,姜思涵,冀玮. 创新技术支持下的食品安全风险评估与行政监管关系研究综述. 中国食品药品监管,2023 (1):8-25,142-143
- [9] 单志,吴宏亮,李成磊,陈惠,吴琦. 改良 SDS 法提取多种植物基因组 DNA 研究. 广东农业科学,2011,38 (8):113-115
- [10] 侯泽菁,常迺滔. 用改良 SDS 法提取适于 PCR 扩增的小麦基因组 DNA. 江苏农业科学,2014,42 (5):49-51
- [11] 张友昌,冯常辉,别墅,王小娇,易先达,张成,秦鸿德. 改进的 TPS 法:一种棉花叶片 DNA 快速提取方法. 棉花学报,2016,28 (4):413-417
- [12] 蓝碧秀,王凛,吴子恺,姜伯乐. 利用改良 CTAB 法快速小量提取微胚乳玉米基因组 DNA. 基因组学与应用生物学,2015,34 (1):190-194
- [13] 周悦,程溪柳,高英,孙莹璐,王欢,刘君,白江平. 高通量半自动基因组 DNA 提取仪的开发与应用. 植物遗传资源学报,2022,23 (4):1224-1232
- [14] 徐宗昌,王萌,孔英珍. 烟草碱法提取基因组 DNA 的改进. 生物技术通报,2017,33 (2):59-65
- [15] 朱先飞,韩仁长,黄冠,丁龙,余洪根,陈世春,方先勇,夏金凤,刘金师. 油菜 DNA 快速高通量提取方法改良及应用. 园艺与种苗,2023,43 (8):83-85
- [16] 俎峰,李霞,何晓莹,赵凯琴,陈苇,束正齐,董云松. 油菜杂交种 DNA 高通量获取方法. 湖北农业科学,2020,59 (12):179-181
- [17] Li G X, Gelernter J, Kranzler H R, Zhao H Y. M<sup>3</sup>:an improved SNP calling algorithm for Illumina BeadArray data. Bioinformatics, 2012,28 (3):358-365
- [18] 王亦学,郝曜山,张欢欢,董艳辉,王晓清,孙毅. 谷子 *SiSAP8* 基因的克隆及 dCAPS 标记开发. 分子植物育种,2020,18 (15):4997-5002
- [19] 郭嗣斌,李孝琼,韦宇,陈颖,刘开强. 用于鉴定水稻穗长性状的 dCAPS 分子标记及其应用:中国,202310053667. 7,2023-05-12
- [20] 杨广阔,陈子强,陈在杰,苏军,陈松彪,王锋. 基于二代测序数据开发以 93-11 为亲本的水稻 SNP-dCAPS 标记的研究实例. 分子植物育种,2014,12 (6):1288-1295
- [21] Semagn K, Babu R, Hearne S, Olsen M. Single nucleotide polymorphism genotyping using Kompetitive Allele Specific PCR (KASP):overview of the technology and its application in crop improvement. Molecular Breeding,2014,33 (1):1-14
- [22] 杨青青,唐家琪,张昌泉,高继平,刘巧泉. KASP 标记技术在主要农作物中的应用及展望. 生物技术通报,2022,38 (4):58-71
- [23] 邓钊,王凯,杜波,祝莉莉,杨远柱,陈荣智. 水稻抗褐飞虱基因 *Bph43* 紧密连锁 KASP 标记开发与验证. 湖北农业科学,2023,62 (6):169-174
- [24] 赵传超,丛森,梁思怡,谢华斌,陆文字,肖武名,黄明,郭涛,王加峰. 水稻抗稻瘟病基因 *Pi2* 的 KASP 标记开发与应用. 华南农业大学学报,2023,44 (5):725-734
- [25] Kang J W, Lee S B, Lee J Y, Kwon Y H. Development and validation of KASP markers for *Stv-bi*, a rice stripe virus resistance gene in rice (*Oryza sativa* L.). Plant Breeding and Biotechnology,2020,8 (2):196-201
- [26] Addison C K, Angira B, Kongchum M, Harrell D L, Famoso A N. Characterization of haplotype diversity in the *BADH2* aroma gene and development of a KASP SNP assay for predicting aroma in U. S. rice. Rice,2020,13 (1):47
- [27] 郭刚. DNA 芯片技术与 SNP 分析. 国外医学:卫生学分册,2004 (1):59-62
- [28] 宋志芳,石岗,赵海燕. 基于 SNP 芯片技术对猪性状的应用及其研究进展. 猪业科学,2018 (4):116-117
- [29] 宋宝,刘杰,王哲海. 光纤微珠芯片技术及其在医药研究领域中的应用. 中国医药生物技术,2007 (2):133-135
- [30] Hu X, Wang G, Du X, Zhang J, Chen G, Wang B, Li X, Chen X. QTL analysis across multiple environments reveals promising chromosome regions associated with yield-related traits in maize under drought conditions. The Crop Journal,2021,9 (4):759-766
- [31] Liu G, Mullan D, Zhang A, Liu D, Yan G. Identification of KASP markers and putative genes for pre-harvest sprouting resistance in common wheat (*Triticum aestivum* L.). The Crop Journal, 2023,11 (2):549-557
- [32] 陈玮. 液相芯片技术的原理与应用进展. 成都医学院学报,2008,3 (3):225-231
- [33] Anna K, Olof K, Annika A, Snaevær S, Kerstin L T, Ann S, Tan P. Performance of microarray and liquid based capture methods for target enrichment for massively parallel sequencing and SNP discovery. PLoS One,2011,6 (2):e16486
- [34] Wang W, Mauleon R, Hu Z. Genomic variation in 3010 diverse accessions of Asian cultivated rice. Nature,2018,557:43-49
- [35] Starr J R, Pedro J M, Zuntini A R. Targeted sequencing supports morphology and embryo features in resolving the classification of Cyperaceae tribe Fuireneae s. l. Journal of Systematics and Evolution,2021,59 (4):809-832
- [36] 张羽,周婉莹,孙旺. 基于限制性内切酶简化基因组测序的两种主要技术. 分子植物育种,2020,18 (11):3562-3570
- [37] 冷益丰,罗樊,陈从顺,丁鑫,蔡光泽. 基于 GBS 测序的全基因组 SNP 揭示大凉山玉米地方品种资源的亲缘关系与遗传分化. 浙江农业学报,2024,36 (1):32-47
- [38] 徐云碧,杨泉女,郑洪建,许彦芬,桑至勤,郭子锋,彭海,张丛,蓝昊发,王蕴波,吴坤生,陶家军,张嘉楠. 靶向测序基因型检测 (GBTS) 技术及其应用. 中国农业科学,2020,53 (15):2983-3004
- [39] 许红丽,付文金. 液相芯片技术检测药物基因多态性的应用. 基因组学与应用生物学,2018,37 (5):2214-2219
- [40] Shen Y S, Wang J S, Shaw R K, Yu H F, Sheng X G, Zhao Z Q, Li S J, Gu H H. 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. Frontiers in plant science,2021,12:655254
- [41] 王渭霞,朱廷恒,赖凤香,万品俊,魏琪,傅强. CRISPR/Cas 系统在基因修饰植物及其产品检测应用中的原理和进展. 中国稻米,2023,29 (6):21-27

(收稿日期:2024-04-16)