

# 高粱株高相关基因 *SbPH11* 分子标记的开发和应用

段国旗<sup>1,2</sup>, 吕娜<sup>1,2</sup>, 石颖怡<sup>3</sup>, 张怀<sup>4</sup>, 李斌峰<sup>4</sup>, 侯留飞<sup>5</sup>, 许文秀<sup>3</sup>, 闫慧莉<sup>3</sup>, 何振艳<sup>3</sup>, 平俊爱<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>山西农业大学高粱研究所/省部共建有机旱作农业国家重点实验室(筹), 晋中 030600; <sup>2</sup>山西农业大学农学院, 太谷 030801;

<sup>3</sup>中国科学院植物研究所, 北京 100093; <sup>4</sup>青海牛必乐农牧科技有限公司, 西宁 810003; <sup>5</sup>青海省饲草料技术推广站, 西宁 810003)

**摘要:** 生物量是饲用高粱的重要性状, 株高与生物量呈正相关性。本研究以 237 份高粱自交系关联群体为材料, 筛选到株高关联基因 *SbPH11* 的两个功能性 SNP 位点, 两个 SNP 位点组合的单倍型共 3 种: SbPH11-Hap1、SbPH11-Hap2 和 SbPH11-Hap3, SbPH11-Hap2 所对应的高粱材料的株高极显著高于 SbPH11-Hap1 和 SbPH11-Hap3 所对应的高粱材料的株高, SbPH11-Hap1 的高粱材料株高极显著高于 SbPH11-Hap3 的高粱材料株高。针对 *SbPH11* 的两个功能性 SNP 位点开发了 KASP 分子标记, 利用该标记对 30 份高粱种质资源进行了基因分型和表型验证, 结果证实开发的 KASP 分子标记可以准确地鉴定出 *SbPH11* 两个功能性 SNP 位点的基因型。该 KASP 分子标记可高效准确地预测不同高粱种质资源的株高类型, 可应用于高粱株高的早期筛选和分子标记辅助选择育种。

**关键词:** 高粱; 株高; KASP 分子标记; *SbPH11*

## Development and Application of Molecular Markers of Sorghum Plant Height Related Gene *SbPH11*

DUAN Guoqi<sup>1,2</sup>, LYU Na<sup>1,2</sup>, SHI Yingyi<sup>3</sup>, ZHANG Huai<sup>4</sup>, LI Bin Feng<sup>4</sup>, HOU Liufei<sup>5</sup>,

XU Wenxiu<sup>3</sup>, YAN Huili<sup>3</sup>, HE Zhenyan<sup>3</sup>, PING Junai<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Sorghum Research Institute, Shanxi Agricultural University/State Key Laboratory of Sustainable Dryland Agriculture (in preparation), Jinzhong 030600; <sup>2</sup>College of Agriculture, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801; <sup>3</sup>Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093; <sup>4</sup>Qinghai Cattle Prier Husbandry Technology Co.Ltd., Xining 810003; <sup>5</sup>Qinghai Feed and Forage Technology Promotion Station, Xining 810003)

**Abstract:** Biomass is an important trait in forage sorghum, and positively correlates with plant height. In this study, two functional SNPs of the plant height associated gene *SbPH11* were screened from 237 sorghum inbred lines. Three haplotypes, named SbPH11-Hap1, SbPH11-Hap2 and SbPH11-Hap3, at the *SbPH11* locus with different combination of the two SNPs have been identified. The plant height of SbPH11-Hap2 materials was extremely significantly higher than that of SbPH11-Hap1 and SbPH11-Hap3 materials, and that of SbPH11-Hap1 materials was extremely significantly higher than that of SbPH11-Hap3 materials. The KASP marker that associates to plant height was developed based on two functional SNPs of the gene *SbPH11*. The marker was used to genotype and phenotype of 30 sorghum germplasm resources. The KASP marker was confirmed to accurately identify two functional SNPs of *SbPH11*. These results suggested that the newly-developed KASP marker can efficiently and accurately predict the plant height in sorghum germplasm resources, and can be applied in early screening and molecular marker-assisted selection in breeding for sorghum with higher plant height.

**Key words:** sorghum; plant height; KASP molecular marker; *SbPH11*

收稿日期: 2023-06-11 修回日期: 2023-07-24 网络出版日期: 2023-08-02

URL: <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20230611002>

第一作者研究方向为作物遗传育种, E-mail: dgq0928@163.com

通信作者: 平俊爱, 研究方向为高粱遗传育种, E-mail: pingjia1029@163.com

何振艳, 研究方向为植物学, E-mail: hezhenyan@ibcas.ac.cn

**基金项目:** 西宁市重点研发与转化计划(2022-Y-18); 省部共建有机旱作农业国家重点实验室自主研发项目(202002-4); 中国科学院战略性先导科技专项(XDA26030201); 财政部和农业农村部: 国家现代农业产业技术体系(CARS-06)

**Foundation projects:** The Key Research and Development Program of Xining (2022-Y-18); The Research Program Sponsored by State Key Laboratory of Sustainable Dryland Agriculture (202002-4); The Strategic Priority Research Program of the Chinese Academy of Sciences (XDA26030201); China Agriculture Research System of MOF and MARA (CARS-06)

土壤盐碱化已经成为世界范围内一个日益严重的环境问题<sup>[1]</sup>,长期以来,由于农业实践中灌溉措施不当,化学肥料和农药的过量使用,破坏了土壤中原平衡的状态,加速了土壤盐碱化的发生<sup>[2]</sup>。世界上超过6%的土地盐碱化,20%的可耕地受到盐碱化的不同影响<sup>[3-5]</sup>,据第二次土壤普查数据,我国盐碱荒地和部分得到耕种的盐碱地共有5亿多亩,其中约2亿亩具备农业(耕地、草地等)开发的潜力。土壤盐碱化是影响农作物生长和产量下降的主要因素,严重制约了农业的可持续发展。盐碱地是我国重要的后备耕地资源,因地制宜培育和种植耐盐碱作物对盐碱地的改良与高效利用具有重要意义。

高粱作为一种重要的粮食兼经济作物,适应能力强,具有较强的耐旱、耐涝、耐贫瘠、耐盐碱等特性。高粱作为C4作物,生长速度快、灌溉效率高、生物产量高,既可做牧草放牧,又可刈割做青饲、青贮和干草,在畜牧、水产养殖领域表现出广阔的应用前景。有关研究表明,在盐碱地中,高粱比玉米、小麦、水稻等主要作物更易生存,且获得的生物量较高,被认为是最具有耐盐碱品种开发潜力的饲用作物之一<sup>[6-7]</sup>。高粱在有限的投入下可以生产更多的干物质<sup>[8]</sup>,是生产青贮饲料和能源燃料的重要原料。在盐碱地发展高粱产业,不仅可以生产燃料乙醇,还能填补我国优质饲草需求缺口,对于缓解能源矛盾和畜牧业矛盾具有重要意义。

生物量是高粱重要性状之一,与株高、成熟度呈正相关<sup>[9-10]</sup>。其中株高与生物量相关性高,株高对高粱生长、光合作用和农机收割都有重要影响,是决定高粱生物量的关键因素之一<sup>[11-12]</sup>。作物高度与再生新鲜生物量显著相关,拥有较高株高的品种也能产生更大的再生生物量<sup>[13]</sup>,所以选育株高较高的高粱品种可以有效增加高粱生物量,生产更多的能源物质和实现更高的经济价值。通过挖掘与高粱株高相关的遗传标记或潜在基因,利用株高相关分子标记加速高粱理想株型品种选育,从而通过调控高粱株高来提高高粱生物量<sup>[11]</sup>。

高粱株高主要取决于茎秆节间数和节间长度,合理的株高才能促进高粱丰收高产。通过遗传连锁图谱鉴定到几个与高粱株高性状相关的具有较高遗传力的数量性状基因座(QTL, quantitative trait locus)<sup>[14-15]</sup>。许多研究都将株高作为一个指标间接鉴定与生物量相关的基因<sup>[14]</sup>。目前,在高粱中鉴定到调控株高的基因(*Dw1~Dw4*)<sup>[16]</sup>。*Dw1*编码一个

在控制节间细胞增殖方面起作用的假定膜蛋白<sup>[17-18]</sup>。*Dw2*编码一个蛋白激酶,它可以调节茎节间的长度<sup>[19]</sup>。*Dw3*则是编码一种ABC转运蛋白(ATP-binding cassette transporter)超家族成员,在生长素运输中起到重要作用<sup>[20]</sup>。*Dw4*基因定位在4号染色体上的一个染色体区域,但*Dw4*位点的基因尚未确定<sup>[21]</sup>。此外,研究还报道了第5个矮化基因座(*Dw5*)<sup>[22]</sup>,以及两个与株高显著相关的标记基因*Sobic.003G119600*和*Sobic.010G085400*<sup>[23]</sup>。但目前有关高粱株高相关分子标记的报道很少,远不能满足选育预期株高类型的高粱品种的实际需求。

分子标记辅助选择育种可在DNA水平针对目标性状进行选择,不仅结果稳定,而且可以在苗期进行选择,降低表型评价的成本,提高高粱育种效率。其中竞争性等位基因特异性PCR(KASP, kompetitive allele specific PCR)技术具有高度稳定性、准确性和低成本的特点,已经被广泛应用于高通量SNP分型检测<sup>[24-26]</sup>。课题组前期通过高粱自交系关联群体株高表型的全基因组关联分析,挖掘到1个与株高相关的新基因,该基因位于4号染色体上。本研究基于*SbPH11*基因上与高粱株高显著相关的功能性SNP位点开发分子标记,该分子标记可用于高粱株高的早期预测和筛选,对于高粱分子标记辅助选择育种和预期株高品种的选育具有参考价值。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

用于全基因组关联分析的试验材料为237份来自全球的高粱自交系关联群体(由中国科学院植物研究所北方资源植物重点实验室景海春实验室提供),均于2021年5月上旬种植于山东省东营市农高新区轻度盐碱地试验田。用于分子标记验证的试验材料为30份高粱种质资源,分别于2022年4月下旬种植于青海省西宁市城中区试验田,2022年5月上旬种植于山东省东营市农高新区轻度盐碱地试验田。所有试验田均采用随机完全区组设计,试验小区长3 m,宽2 m,每试验小区种植5行,每行10株,株距0.3 m,行距0.5 m,常规管理,正常灌溉。

### 1.2 株高统计

2021年和2022年所有种植材料完全成熟后,在试验小区内每行材料的中间单株中随机选取3株,使用5 m规格的塔尺测量并统计每株主茎的株高,3次重复测量值的平均值作为该材料株高的最终

结果。

### 1.3 功能性位点和单倍型组合的筛选

课题组前期工作中利用高粱自交系关联群体材料的株高表型数据和其基因型数据(基因型数据由中国科学院植物研究所北方资源植物重点实验室景海春实验室提供)<sup>[27]</sup>,通过全基因组关联分析定位到一个与高粱株高相关的基因 *SbPH11*。利用 HaploView 软件 (<https://www.broadinstitute.org>) 对 *SbPH11* 基因序列上的 34 个 SNP 位点进行连锁不平衡分析(LD, linkage disequilibrium), 设置  $r^2 > 0.8$  作为 SNP 位点紧密连锁的阈值, 筛选与高粱株高显著相关的标签 SNP 位点。利用 GraphPad Prism v8.0 软件 (<https://www.graphpad-prism.cn>) 的 t 检验对标签 SNP 位点不同等位基因对应的株高进行显著性差异分析, 筛选出差异显著的优异等位变异作为功能性 SNP 位点; 采用 One-way ANOVA 检验对筛选出的 *SbPH11* 基因单倍型组合进行差异性分析。

### 1.4 KASP 分子标记开发

针对 *SbPH11* 基因的优异等位变异位点的上下

游序列设计 KASP 分子标记引物组。KASP 标记的引物组由两条上游特异性引物(引物 A 和引物 B)和一条下游通用引物(引物 C)组成。鉴定 SNP1 位点(4\_53908336)多态性的引物组包括特异性引物 F<sub>1</sub>-A 和 F<sub>1</sub>-B、通用引物 F<sub>1</sub>-C; 鉴定 SNP2 位点(4\_53908312)多态性的引物组包括特异性引物 F<sub>2</sub>-A 和 F<sub>2</sub>-B、通用引物 F<sub>2</sub>-C(表 1)。在设计好的引物 F<sub>1</sub>-A 和 F<sub>2</sub>-A 的 5' 末端用 6-羧基荧光素(FAM)染料标记; F<sub>1</sub>-B 和 F<sub>2</sub>-B 的 5' 末端用六氯-6-甲基荧光素(HEX)染料标记。引物 F<sub>1</sub>-A 与 F<sub>1</sub>-C 所示的单链 DNA 分子扩增 SNP1 位点为 A 的片段; 引物 F<sub>1</sub>-B 与 F<sub>1</sub>-C 所示的单链 DNA 分子扩增 SNP1 位点为 C 的片段。引物 F<sub>2</sub>-A 与 F<sub>2</sub>-C 所示的单链 DNA 分子扩增 SNP2 位点为 C 的片段; 引物 F<sub>2</sub>-B 与 F<sub>2</sub>-C 所示的单链 DNA 分子扩增 SNP2 位点为 T 的片段。模板中与 FAM 序列或 HEX 序列结合的荧光基团的荧光信号可被酶标仪或荧光定量 PCR 仪读取到。SNP1 和 SNP2 的特异性引物序列, 均由中玉金标记(北京)生物技术股份有限公司合成。

表 1 *SbPH11* 分子标记引物序列

Table 1 Sequences of *SbPH11* molecular marker primer

SNP 位点 SNP sites	引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence(5'-3')
SNP1	F <sub>1</sub> -A	<u>GAAGGTGACCAAGTTCATGCTT</u> GTGCTTTCTGACACACATA
	F <sub>1</sub> -B	<u>GAAGGTGCGGAGTCAACGGATTCT</u> TTGTTCTCTTTCTGACACACATC
	F <sub>1</sub> -C	GAACGCTAGGGAGAGTAGAGTAGTA
SNP2	F <sub>2</sub> -A	<u>GAAGGTGACCAAGTTCATGCTT</u> GCCTACCTCGCTACCCCTC
	F <sub>2</sub> -B	<u>GAAGGTGCGGAGTCAACGGATTGT</u> GCCTACCTCGCTACCCCTT
	F <sub>2</sub> -C	GAACGCTAGGGAGAGTAGAGTAGTA

引物 F<sub>1</sub>-A 和 F<sub>2</sub>-A 中下划线序列为 FAM 染料标记序列; F<sub>1</sub>-B 和 F<sub>2</sub>-B 中下划线序列为 HEX 染料标记序列

The underlined sequences in primer F<sub>1</sub>-A and F<sub>2</sub>-A are FAM dye-labelled sequences; The underlined sequences in primer F<sub>1</sub>-B and F<sub>2</sub>-B are HEX dye-labelled sequences

### 1.5 基因型鉴定

采集试验小区内高粱材料的叶片, 确保叶片状态鲜嫩良好, 无干枯染病, 叶面干净无尘, 使用 4 mm 直径打孔器取 10 片大小一样的叶片, 确保叶片取量一致。每个 96 孔盘添加一个不同位置的阴性对照, 用于提取空白对照和孔盘之间的区分。装样后的 96 孔盘使用液氮快速冷冻保存, 将速冻好叶片的 96 孔盘在高速磨样机研磨, 1300 r/min 3 min。研磨好的叶片离心至于盘底, 加入 CTAB 裂解液, 震荡混匀, 放入烘箱孵育 65 °C, 30 min。孵育好的叶片室温静置, 离心加入氯仿萃取, 混匀后离心 4000 r/min, 4 °C, 15 min。取上清液到新的 96 孔盘, 加入 0.7 倍的异丙醇

沉淀 DNA, 离心去上清, 用 75% 的酒精漂洗 2 遍。晾干 DNA, 使用 10 mmol/L Tris-HCl pH8.0 100 μL 溶液溶解, 用于后续实验。

配制引物混液: 将 F<sub>1</sub>-A、F<sub>1</sub>-B、F<sub>1</sub>-C、F<sub>2</sub>-A、F<sub>2</sub>-B 和 F<sub>2</sub>-C 这 6 条引物分别用 ddH<sub>2</sub>O 稀释成 100 mmol/L, 取引物 F<sub>1</sub>-A 溶液 60 μL、F<sub>1</sub>-B 溶液 60 μL、F<sub>1</sub>-C 溶液 150 μL, 加入 10 mmol/L Tris-HCl 230 μL, 得到引物混液 F<sub>1</sub>。取引物 F<sub>2</sub>-A 溶液 60 μL、F<sub>2</sub>-B 溶液 60 μL、F<sub>2</sub>-C 溶液 150 μL, 加入 10 mmol/L Tris-HCl 230 μL, 得到引物混液 F<sub>2</sub>。使用 SNP 引物组 F<sub>1</sub> 和引物组 F<sub>2</sub> 分别对得到的模板进行 PCR 扩增, 2 μL PCR 荧光定量仪检测反应体系包括: 基因组 DNA 50 ng, 引物混液

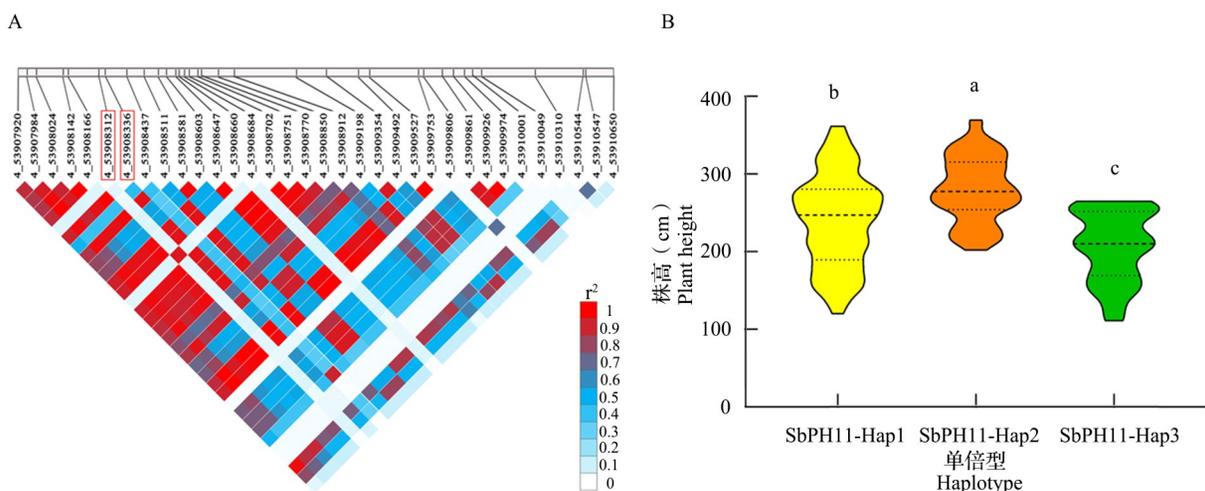
0.02  $\mu\text{L}$ , 1 $\times$ KASP Mix (Low Rox) (LGC(Laboratory of the Government Chemist)公司,英国) 0.6  $\mu\text{L}$ ,其余为 $\text{ddH}_2\text{O}$ 。PCR反应程序为:95  $^\circ\text{C}$ 预变性10 min,10个循环的降落PCR[95  $^\circ\text{C}$  20 s,65  $^\circ\text{C}$   $\rightarrow$  55  $^\circ\text{C}$  (-1  $^\circ\text{C}$ /循环)],35个循环的扩增(95  $^\circ\text{C}$  20 s,55  $^\circ\text{C}$  1 min)。检测扩增产物SNP位点的多态性(核苷酸种类),对 $F_1$ 引物组和 $F_2$ 引物组的PCR产物进行荧光数据读取,用Douglas专用软件Kraken进行荧光信号处理(Douglas-Araya高通量流水线式荧光信号扫描仪)。

## 2 结果与分析

### 2.1 高粱株高相关基因*SbPH11*的单倍型鉴定

课题组前期工作中鉴定到一个与高粱株高相关的基因*SbPH11*,对*SbPH11*基因上的SNP位点进行连锁不平衡分析(图1A),*SbPH11*基因序列上的34个SNP位点共筛选得到9个标签SNP位点,SNP1(4\_53908336)、SNP2(4\_53908312)、SNP3(4\_53908159)、SNP4(4\_53908437)、SNP5(4\_53908475)、SNP6(4\_53908463)、SNP7(4\_53908323)、SNP8(4\_53907979)、SNP9(4\_53908357)。对筛选得到的9个标签SNP位点的不同等位基因型对应的株高进行显著性差异分析,结果显示,SNP1、SNP2和SNP4 3个SNP位点不同等位基因型所对应的株高存在极显著性差异,其他6个SNP位点不同等位基因型对应的株高无显著性差异。3个差异极显著的SNP位点中SNP1和SNP2是错义突变位点,将SNP1和SNP2作为关键SNP位

点进行单倍型分析,结果(图1B)显示,SNP1和SNP2两个SNP位点不同等位基因型组合的单倍型对应株高之间存在极显著性差异。其中SNP1位于高粱自交系BTx623(BTx623(v3.1)高粱基因组序列信息)(<http://plants.ensembl.org>)第4号染色体上第53908336位,其核苷酸为A或C,当位点由A突变为C,致使140位氨基酸由酪氨酸(Y)突变为天冬氨酸(D),该位点可解释10.46%的表型变异。SNP1位点有AA、CC或AC 3种基因型,基因型AA是SNP1为A的纯合型,基因型CC是SNP1为C的纯合型,基因型AC是SNP1为A和C的杂合型;其中SNP2对应于高粱自交系BTx623第4号染色体上第53908312位,其核苷酸为C或T,当位点由C突变为T,致使164位氨基酸由谷氨酸(E)突变为赖氨酸(K),该位点可解释5.2%的表型变异。SNP2位点有CC、TT或CT 3种基因型,基因型CC是SNP2为C的纯合型,基因型TT是SNP2为T的纯合型,基因型CT是SNP2为C和T的杂合型。在237份高粱品种中,这2个SNP的组合共存在3种单倍型:基因型为CCTT的单倍型SbPH11-Hap1、基因型为CCCC的单倍型SbPH11-Hap2和基因型为AACC的单倍型SbPH11-Hap3。根据前期237份种质资源的测序结果,92个材料的单倍型为SbPH11-Hap1,株高平均值为240.67 cm;118个材料的单倍型为SbPH11-Hap2,株高平均值为280.33 cm;27个材料的单倍型为SbPH11-Hap3,株高平均值为206.50 cm(表2)。



A:SNP位点连锁不平衡图谱;红框内为SNP1(4\_53908336)和SNP2(4\_53908312);B:数据以平均值表示;

采用单因素方差分析来检验显著性,不同的字母表示在 $P<0.01$ 时具有统计学意义的差异;下同

A: The linkage disequilibrium map of SNP sites; SNP1(4\_53908336) and SNP2(4\_53908312) are shown in red boxes;

B: The data was represented as mean. One-way ANOVA was used to test the significance, and the statistical significance

with a  $P<0.01$  were represented by different letters; The same as below

图1 SNP位点筛选与基因单倍型分析

Fig. 1 SNP sites screening and gene haplotype analysis

结果表明, *SbPH11*-Hap2 所对应的高粱材料的株高极显著高于 *SbPH11*-Hap1 和 *SbPH11*-Hap3 所对应的高粱材料的株高 ( $P < 0.01$ ); *SbPH11*-Hap1 所对应的高粱

材料的株高极显著高于 *SbPH11*-Hap3 所对应的高粱材料的株高。这 2 个 SNP 位点组合的单倍型可作为鉴定或辅助鉴定不同品系高粱株高的分子标记。

表 2 不同单倍型高粱种质材料的株高

Table 2 Plant heights of sorghum germplasm materials with different genotypes

单倍型 Haplotype	基因型 Genotype	数量 Number	平均株高±标准偏差(cm) Mean±SD	中位数 Median
<i>SbPH11</i> -Hap1	CCTT	92	240.67±58.74 <sup>b</sup>	247.00
<i>SbPH11</i> -Hap2	CCCC	118	280.33±41.76 <sup>a</sup>	277.70
<i>SbPH11</i> -Hap3	AACC	27	206.50±45.53 <sup>c</sup>	210.00

## 2.2 *SbPH11* 分子标记的开发与基因分型

利用设计的 KASP 标记, 从 237 份高粱自交系种质资源中选取 10 份高粱材料进行基因型鉴定, KASP 分子标记检测结果(图 2)显示, 其中 5 个材料的基因型为 CCTT, 4 个材料的基因型为 CCCC, 1 个材料的基因型为 AACC。5 个基因型为 CCTT 的材料  $F_1$  引物组荧光信号点为红色, 表明其引物 5' 末端连接 HEX 序列, SNP1 基因型为 CC, 其对应的  $F_2$  引物组荧光信号点为红色, 表明其引物 5' 末端连接 HEX 序列, SNP2 基因型为 TT; 4 个基因型为 CCCC 的材料的  $F_1$  引物组荧光信号点为红色, 表明其引物

5' 末端连接 HEX 序列, SNP1 基因型为 CC, 其对应的  $F_2$  引物组荧光信号点为蓝色, 表明其引物 5' 末端连接 FAM 序列, SNP2 基因型为 CC; 1 个基因型为 AACC 的材料的  $F_1$  引物组荧光信号点为蓝色, 表明其引物 5' 末端连接 FAM 序列, SNP1 基因型为 AA, 其对应的  $F_2$  引物组荧光信号点为蓝色, 表明其引物 5' 末端连接 FAM 序列, SNP2 基因型为 CC; 阴性对照(NTC, no template control)没有荧光信号。KASP 分子标记的基因分型结果与课题组前期测序结果一致, 证明了 KASP 分子标记的准确性。

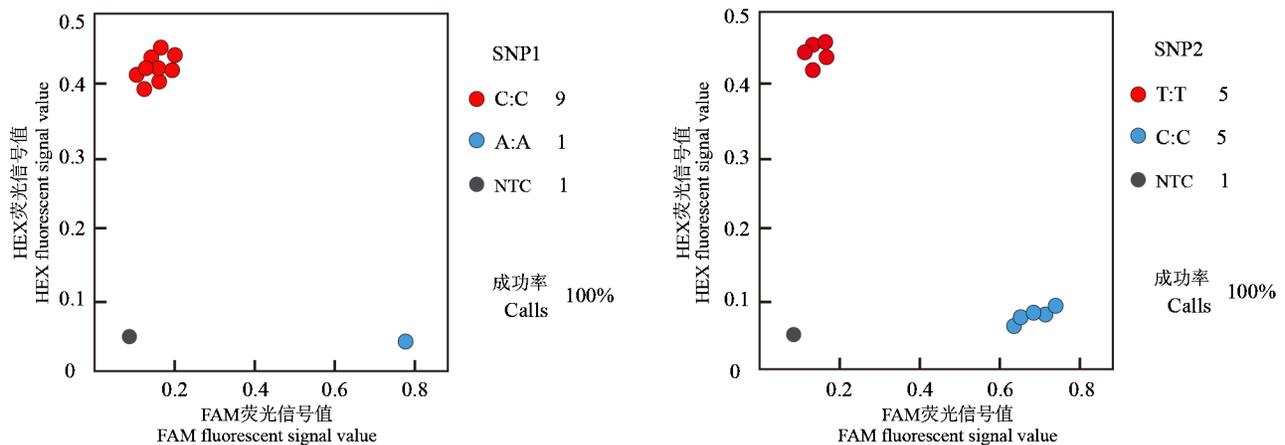


图 2 KASP 分子标记对自交系关联群体材料中 10 个高粱材料基因分型结果

Fig. 2 Genotyping results of 10 sorghum materials associated with inbred lines by KASP molecular markers

## 2.3 *SbPH11* 分子标记的验证

利用开发的 *SbPH11* 分子标记, 另外选取 30 份不同种类的高粱种质资源进行基因型鉴定, 结果(图 3)显示, 7 个材料的基因型为 CCTT, 单倍型为 *SbPH11*-Hap1; 17 个材料的基因型为 CCCC, 单倍型为 *SbPH11*-Hap2; 6 个材料的基因型为 AACC, 单倍型为 *SbPH11*-Hap3。 *SbPH11* 分子标记的检测结果与测序结果一致(表 3), 表明 KASP 标记能够准确的鉴定出不同高粱种质资源中株高相关基因 *SbPH11*

的基因型。30 份高粱种质资源中, 7 个材料为 *SbPH11*-Hap1, 在东营、西宁的平均株高分别为 263.12 cm、278.29 cm; 17 个材料为 *SbPH11*-Hap2, 在东营、西宁的平均株高分别为 307.83 cm、317.87 cm; 6 个材料为 *SbPH11*-Hap3, 在东营、西宁的平均株高分别为 204.56 cm、209.39 cm(表 4)。 *SbPH11*-Hap2 是高秆单倍型, *SbPH11*-Hap3 是矮秆单倍型, 对东营和西宁的 30 份验证材料分别进行显著性分析, *SbPH11*-Hap2 所对应的高粱材料的株高极显著高于

SbPH11-Hap3所对应的高粱材料的株高( $P<0.01$ ), SbPH11-Hap2所对应的高粱材料的株高显著高于SbPH11-Hap1所对应的高粱材料的株高( $P<0.05$ ), SbPH11-Hap1所对应的高粱材料的株高极显著高于SbPH11-Hap3所对应的高粱材料的株高( $P<0.01$ )。

该标记有效地将相同株高类型的种质材料划分到对应的单倍型中,表型数据与基因型鉴定结果相匹配。因此,开发的分子标记能够准确地鉴定出高粱种质资源中株高相关基因*SbPH11*的基因型。

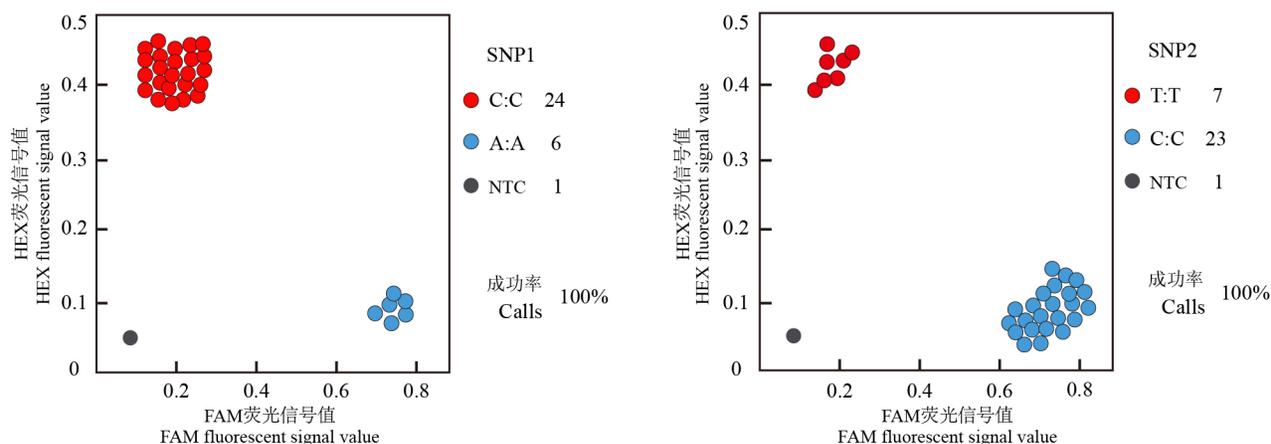


图3 *SbPH11*分子标记对30份高粱种质材料的基因型鉴定

Fig. 3 Genotype identification of 30 sorghum germplasm materials by *SbPH11* molecular markers

表3 30份高粱种质材料的基因型鉴定

Table 3 Genotype identification of 30 sorghum germplasm materials

品种编号 Variety code	KASP基因型 KASP genotype	测序基因型 Sequencing genotype	株高(cm) Plant height		高粱种类 Sorghum species
			东营 Dongying	西宁 Xining	
181	CCTT	CCTT	325.00	333.00	甜高粱
205	CCTT	CCTT	295.00	308.00	甜高粱
263	CCTT	CCTT	291.67	312.33	甜高粱
357	CCTT	CCTT	240.33	251.00	野生高粱
2059	CCTT	CCTT	208.33	232.67	—
J130	CCTT	CCTT	244.50	263.00	甜高粱
WSC93	CCTT	CCTT	237.00	248.00	地方籽粒高粱
159	CCCC	CCCC	270.33	285.67	地方籽粒高粱
192	CCCC	CCCC	293.33	298.67	甜高粱
270	CCCC	CCCC	317.33	333.33	帚高粱
346	CCCC	CCCC	294.67	300.00	地方籽粒高粱
356	CCCC	CCCC	382.00	393.33	帚高粱
370	CCCC	CCCC	293.33	302.00	地方籽粒高粱
2013	CCCC	CCCC	278.00	285.67	甜高粱
2078	CCCC	CCCC	266.00	277.33	甜高粱
2080	CCCC	CCCC	290.00	301.00	甜高粱
J150	CCCC	CCCC	366.33	370.33	帚高粱
J158	CCCC	CCCC	357.67	367.00	地方籽粒高粱
J159	CCCC	CCCC	289.33	305.67	饲草高粱
J42	CCCC	CCCC	301.50	305.50	地方籽粒高粱
J79	CCCC	CCCC	301.67	315.00	帚高粱

表3 (续)

品种编号 Variety code	KASP 基因型 KASP genotype	测序基因型 Sequencing genotype	株高(cm) Plant height		高粱种类 Sorghum species
			东营 Dongying	西宁 Xining	
J87	CCCC	CCCC	278.00	297.33	地方籽粒高粱
SL130	CCCC	CCCC	323.33	330.00	野生高粱
WSC33	CCCC	CCCC	330.33	336.00	甜高粱
177	AACC	AACC	198.33	205.33	甜高粱
206	AACC	AACC	194.67	198.33	甜高粱
359	AACC	AACC	225.00	232.00	帚高粱
J100	AACC	AACC	215.33	218.00	甜高粱
SL141	AACC	AACC	191.00	194.67	野生高粱
WSC60	AACC	AACC	203.00	208.00	地方籽粒高粱

表4 30份高粱种质材料的株高

Table 4 Plant height of 30 sorghum germplasm materials

单倍型 Haplotype	基因型 Genotype	数量 Number	平均值±标准偏差 (cm) Mean±SD	
			东营 Dongying	西宁 Xining
SbPH11-Hap1	CCTT	7	263.12±41.25 <sup>b</sup>	278.29±38.76 <sup>b</sup>
SbPH11-Hap2	CCCC	17	307.83±34.01 <sup>a</sup>	317.87±32.83 <sup>a</sup>
SbPH11-Hap3	AACC	6	204.56±13.09 <sup>c</sup>	209.39±13.73 <sup>c</sup>

### 3 讨论

高粱是世界五大作物之一,为禾本科高粱属一年生草本植物,属于C4作物,光合效率高,生物产量高。高粱的用途广泛,可用于食品、饲料、酿造、生物能源、化工材料等<sup>[28]</sup>。高粱因具有耐旱、耐涝、耐盐碱、耐贫瘠和易于种植等特性,是全球最重要的粮食作物和饲料作物。

株高是高粱重要株型性状之一,株高与生物量相关性高,对高粱生长及生物产量有重要影响。基于高粱株高性状的重要性,研究人员相继克隆了影响高粱株高的基因研究其调控机制,*Dw1* 基因编码一种假定膜蛋白,是第1个被广泛使用的半矮化基因,通过调控节间的细胞数量,降低了节间的细胞增殖活性,从而影响高粱的株高性状。*Dw2* 基因编码蛋白激酶,通过调节高粱茎节间生长影响株高性状。*Dw3* 编码玉米 *Br2* 基因的同源物,是一种生长素转运蛋白,通过参与生长素运输调控节间长度,影响高粱株高。*Dw1* 和 *Dw3* 协同作用以缩短节间长度,*dw1* 和 *dw3* 的突变降低了细胞增殖率,协同调控高粱株高<sup>[18]</sup>。*Dw4* 和 *Dw5* 尚未克隆研究其功能。目前尚缺乏有效的功能标记对株高进行快速鉴定,

本研究鉴定到一个与高粱株高相关的基因 *SbPH11*, 通过蛋白序列比对发现,该基因与 *Dw1*、*Dw2*、*Dw3* 的同源性分别为 35.1%、36.4% 和 32.5%,表明该基因因为与高粱株高相关的新基因。

目前高粱育种有籽粒高粱、饲草高粱、甜高粱、生物物质高粱等不同研究领域,不同用途的高粱品种对株高要求也不同,应根据用途培育具有适宜株高的品种,促使高粱生产不断向高产、优质、高效的方向发展。饲草高粱、甜高粱、生物物质高粱等需要选育生物量大的高粱品种,株高是影响高粱生物量的重要因素,大多数高秆品种的生物量都高于矮秆品种的生物量。因此,选育含有高秆等位变异的高粱品种成为提高高粱生物量的有效途径之一。而就籽粒高粱而言主要目标是提高籽粒产量,降低株高,适宜机械化栽培,需选育含有矮秆等位变异的高粱品种。

针对 *SbPH11* 基因中的两个功能性 SNP 位点开发 KASP 分子标记,两个 SNP 位点组合共存在 3 种单倍型: SbPH11-Hap1、SbPH11-Hap2、SbPH11-Hap3。分别在山东东营和青海西宁种植了 30 份不同类型的高粱种质资源材料进行分子标记验证及效应评估,两个环境型中 SbPH11-Hap2 所对应的高

梁材料的株高显著高于 SbPH11-Hap1 和 SbPH11-Hap3 所对应的高粱材料的株高, SbPH11-Hap1 所对应的高粱材料的株高极显著高于 SbPH11-Hap3 所对应的高粱材料的株高。表明本研究开发的高粱材料两个功能性 SNP 位点 KASP 分子标记在两种环境型中均可有效的划分相同株高类型的高粱种质材料。

*SbPH11* 基因的两个功能性 SNP 位点组合成 3 个单倍型, SbPH11-Hap2 是高秆单倍型, 对于饲草高粱、甜高粱、生物质高粱等以选育高生物量为目标的类型, 可选用 SbPH11-Hap2 (CCCC) 对应的分子标记辅助选育高秆品种。SbPH11-Hap3 是矮秆单倍型, SbPH11-Hap3 在 237 份材料中平均株高为 206.50 cm, 在甜高粱和饲草高粱等类型中属于矮秆高粱, 但对于籽粒高粱等以选育籽粒产量为目标的类型, 近年来新培育的籽粒高粱材料株高基本在 1~1.5 m, 因此该标记对籽粒高粱而言不具普遍意义, 还需开发新的矮秆分子标记辅助选育矮秆品种。SbPH11-Hap2 分子标记可用于不同高粱类型株高的早期预测和筛选, 也可用该分子标记辅助选育高秆高粱品种。本研究中开发的高粱株高相关基因 *SbPH11* 的分子标记对有效选育预期株高的高粱品种提供了参考, 但单一标记的效应有限, 后期可开发更多高粱株高相关的分子标记辅助选育高粱理想株型。

#### 参考文献

- [1] Landi S, Hausman J F, Guerriero G, Esposito S. Poaceae V S. Abiotic stress: Focus on drought and salt stress, recent insights and perspectives. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 1214
- [2] 张春霞. Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>胁迫下甜高粱 CBL 基因家族的表达模式分析及功能初探. 长春: 吉林大学, 2011  
Zhang C X. The analysis of preliminary function and expression pattern of CBL gene family in sweet sorghum under sodium carbonate stress. Changchun: Jilin University, 2011
- [3] Yuan F, Leng B, Wang B. Progress in studying salt secretion from the salt glands in recretohalophytes: How do plants secrete salt? *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7: 977
- [4] Yang Z, Li J L, Liu L N, Xie Q, Sui N. Photosynthetic regulation under salt stress and salt-tolerance mechanism of sweet sorghum. *Frontiers in Plant Science*, 2020, 10: 1722
- [5] 董明, 再吐尼古丽·库尔班, 吕芑, 杜瑞恒, 叶凯, 侯升林, 刘国庆. 高粱苗期耐盐性转录组分析和基因挖掘. *中国农业科学*, 2019, 52(22): 3987-4001  
Dong M, Kuerban Z T N G L, Lü P, Du R H, Ye K, Hou S L, Liu G Q. Transcriptome analysis and gene mining of salt tolerance in sorghum seedlings (*Sorghum bicolor* L. Moench). *Scientia Agricultura Sinica*, 2019, 52(22): 3987-4001
- [6] 唐朝臣, 高建明, 韩芸, 罗峰, 裴忠有, 孙守钧. 高粱苗期耐盐碱性 QTL 定位. *华北农学报*, 2015, 30(3): 42-47  
Tang C C, Gao J M, Han Y, Luo F, Pei Z Y, Sun S J. Identification of QTLs associated with complex salt-alkaline tolerance at the seedling stage in sorghum. *Acta Agriculturae Boreali-sinica*, 2015, 30(3): 42-47
- [7] 温黎明. 刈割对黄河三角洲甜高粱产量及光合生理特征的影响. 济南: 山东师范大学, 2019  
Wen L M. Effect of cutting on yield and photosynthetic physiological characteristics of sweet sorghum in the yellow river delta. Jinan: Shandong Normal University, 2019
- [8] Vermerris W. Genetic improvement of bioenergy crops. New York: Springer, 2008: 239
- [9] Habyarimana E, Lorenzoni C, Marudelli M, Redaelli R, Amaducci S. A meta-analysis of bioenergy conversion relevant traits in sorghum landraces, lines and hybrids in the Mediterranean region. *Industrial Crops and Products*, 2016, 81: 100-109
- [10] Upadhyaya H D, Wang Y H, Gowda C L L, Sharma S. Association mapping of maturity and plant height using SNP markers with the sorghum mini core collection. *Theoretical and Applied Genetics*, 2013, 126: 2003-2015
- [11] Upadhyaya H D, Wang Y H, Sharma S, Singh S. Association mapping of height and maturity across five environments using the sorghum mini core collection. *Genome*, 2012, 55: 471-479
- [12] Wang L, Liu Y, Gao L, Yang X, Zhang X, Xie S, Chen M, Wang Y H, Li J, Shen Y. Identification of candidate forage yield genes in sorghum (*Sorghum bicolor* L.) using integrated genome-wide association studies and RNA-seq. *Frontiers in Plant Science*, 2022, 12: 788433
- [13] Murray S C, Rooney W L, Mitchell S E, Sharma A, Klein P E, Mullet J E, Kresovich S. Genetic improvement of sorghum as a biofuel feedstock: II. QTL for stem and leaf structural carbohydrates. *Crop Science*, 2008, 48: 2180-2193
- [14] Salas Fernandez M G, Becraft P W, Yin Y, Lübberstedt T. From dwarves to giants? Plant height manipulation for biomass yield. *Trends in Plant Science*, 2009, 14: 454-461
- [15] Ritter K B, Jordan D R, Chapman S C, Godwin I D, Mace E S, Lynne McIntyre C. Identification of QTL for sugar-related traits in a sweet × grain sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) recombinant inbred population. *Molecular Breeding*, 2008, 22: 367-384
- [16] Quinby J R, Karper R E. Inheritance of height in sorghum. *Agronomy Journal*, 1954, 46: 211-216
- [17] Hilley J, Truong S, Olson S, Morishige D, Mullet J. Identification of *Dw1*, a regulator of sorghum stem internode length. *PLoS ONE*, 2016, 11: e0151271
- [18] Yamaguchi M, Fujimoto H, Hirano K, Araki-Nakamura S, Ohmae-Shinohara K, Fujii A, Tsunashima M, Song X J, Ito Y, Nagae R, Wu J, Mizuno H, Yonemaru J, Matsumoto T, Kitano H, Matsuoka M, Kasuga S, Sazuka T. Sorghum *Dw1*,

- an agronomically important gene for lodging resistance, encodes a novel protein involved in cell proliferation. *Scientific Reports*, 2016, 6:28366
- [19] Hilley J L, Weers B D, Truong S K, McCormick R F, Mattison A J, McKinley B A, Morishige D T, Mullet J E. Sorghum *Dw2* encodes a protein kinase regulator of stem internode length. *Scientific Reports*, 2017, 7:4616
- [20] Multani D S, Briggs S P, Chamberlin M A, Blakeslee J J, Murphy A S, Johal G S. Loss of an MDR transporter in compact stalks of maize *br2* and sorghum *dw3* mutants. *Science*, 2003, 302:81-84
- [21] Li X, Li X, Fridman E, Tesso T T, Yu J. Dissecting repulsion linkage in the dwarfing gene *Dw3* region for sorghum plant height provides insights into heterosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2015, 112:11823-11828
- [22] Chen J, Xin Z, Laza H. Registration of BTx623 *dw5*, a new sorghum dwarf mutant. *Journal of Plant Registrations*, 2019, 13:254-257
- [23] Enyew M, Feyissa T, Carlsson A S, Tesfaye K, Hammenhag C, Seyoum A, Geleta M. Genome-wide analyses using multi-locus models revealed marker-trait associations for major agronomic traits in *Sorghum bicolor*. *Frontiers in Plant Science*, 2022, 13:999692
- [24] 李珍珠, 彭清祥, 邱先进, 徐俊英, 李志新, 刘海洋. 水稻分蘖角度基因 *TIG1* 功能性分子标记的开发和应用. *植物遗传资源学报*, 2023, 24(3):808-816
- Li Z Z, Peng Q X, Qiu X J, Xu J Y, Li Z X, Liu H Y. Development and application of functional molecular marker of rice tiller angle gene *TIG1*. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2023, 24(3):808-816
- [25] 杨义强, 朱林峰, 李晓芳, 付杰, 黄道强, 邱先进, 周少川, 王重荣. 抗稻瘟病基因 *Pi2* 的基因特异性 KASP 标记开发与应用. *植物遗传资源学报*, 2021, 22(5):1314-1321
- Yang Y Q, Zhu L F, Li X F, Fu J, Huang D Q, Qiu X J, Zhou S C, Wang C R. Development and application of KASP marker specific for rice blast resistance *Pi2* gene. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2021, 22(5):1314-1321
- [26] 徐君, 李婷, 胡敏骏, 蒋玉根, 闫慧莉, 许文秀, 虞轶俊, 何振艳. 水稻籽粒镉积累 KASP 分子标记 LCd-38 的开发与利用. *中国农业科技导报*, 2022, 24(3):40-47
- Xu J, Li T, Hu M J, Jiang Y G, Yan H L, Xu W X, Yu Y J, He Z Y. Development and utilization of KASP marker LCd-38 for cadmium accumulation in rice grain. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 2022, 24(3):40-47
- [27] Wu X Y, Liu Y M, Luo H, Shang L, Leng C Y, Liu Z Q, Li Z G, Lu X C, Cai H W, Hao H Q, Jing H C. Genomic footprints of sorghum domestication and breeding selection for multiple end uses. *Molecular Plant*, 2022, 15(3):537-551
- [28] 周瑜, 李泽碧, 黄娟, 吴毓, 张亚勤, 张志良, 张晓春. 高粱种质资源表型性状的遗传多样性分析. *植物遗传资源学报*, 2021, 22(3):654-664
- Zhou Y, Li Z B, Huang J, Wu Y, Zhang Y Q, Zhang Z L, Zhang X C. Genetic diversity of sorghum germplasms based on phenotypic traits. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2021, 22(3):654-664