

小麦芒性基因的定位与候选基因分析

耿君佑, 陈建辉, 董中东, 任妍, 张宁, 孙丛苇, 陈锋, 赵磊

(河南农业大学农学院 / 省部共建小麦玉米作物学国家重点实验室, 郑州 450046)

摘要: 芒是小麦重要的穗部器官之一, 在小麦的光合作用、抗虫、防鸟和产量形成中都起着重要的作用。但是麦芒形成的分子机制仍不是十分清晰。本研究利用 Wheat 90K SNP 芯片对 206 份来自于黄淮海地区的小麦材料进行全基因组关联分析, 结果显示检测到的与小麦芒性显著关联的 SNP 位点主要分布于 1A、2A、2B、5A 和 7A 染色体上, 但显著性较高的位点集中在 5A 染色体上。同时借助 Wheat 660K SNP 芯片对一个重组自交系群体进行集群分离分析法 (BSA) 分析, 共检测到 500 个差异 SNP, 其中有 158 个位于 5A 染色体上, 且主要集中在 696.6~706.6 Mb 区间。结合 2 种分析方法结果, 并根据中国春参考基因组注释最终确定候选基因为前人报道的 *B1* 位点, 将其命名为 *Tipped1*; 进一步对该基因进行克隆和多态性分析, 结果表明小麦芒的调控可能是由位于 *Tipped1* 基因启动子区 -346 bp 处 25 bp 的插入 / 缺失多态性和 -284 bp 处的连锁型 SNP 多态性共同调控的。本研究能够解析小麦芒发育的遗传机制和分子育种提供重要参考信息。

关键词: 小麦; 芒; *Tipped1*; 基因克隆; 多态性分析

Mapping and Candidate Gene Analysis of Awn Type in Common Wheat

GENG Jun-you, CHEN Jian-hui, DONG Zhong-dong, REN Yan, ZHANG Ning,

SUN Cong-wei, CHEN Feng, ZHAO Lei

(College of Agronomy, Henan Agricultural University/National Key Laboratory of

Wheat and Maize Crop Science, Zhengzhou 450046)

Abstract: Awn in common wheat is one of the important spike organs and plays a critical role in photosynthesis, insect resistance, bird-preventing and yield formation. The genetic basis on its formation and development remains largely unclear. To identify novel genetic loci involved in awn development, a genome-wide association study (GWAS) was performed using a diversity panel of 206 wheat accessions from Huang Huaihai region based on a Wheat 90K SNP array. The results showed that SNPs associated with phenotypic variation were detected on chromosomes 1A, 2A, 2B, 5A and 7A. SNPs with the highest significance were mainly located on chromosome 5A. Moreover, the bulked segregant analysis (BSA) in a recombinant inbred line population were analyzed using Wheat 660K SNP array. Out of 500 polymorphic SNPs, 158 were found in the 696.6-706.6 Mb interval of chromosome 5A, where the previously reported *B1* locus encoding for *Tipped1* was resided on the gene annotation of Chinese Spring. Gained from the re-sequencing result of this gene in parental lines, the wheat awn may be associated with a 25 bp insertion/deletion polymorphism located at -346 bp and a linkage SNP at -284 bp in the promoter region. Collectively, this study provided information for understanding the genetic mechanism of wheat awn development and molecular breeding.

Key words: common wheat; awn; *Tipped1*; gene cloning; polymorphism analysis

收稿日期: 2020-12-03 修回日期: 2021-02-18 网络出版日期: 2021-04-15

URL: <http://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20201203002>

第一作者研究方向为小麦分子育种, E-mail: gjyou0310@163.com

通信作者: 赵磊, 研究方向为小麦分子育种, E-mail: leizhao2016@163.com

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31971947); 河南省科技攻关项目 (212102110246)

Foundation projects: National Natural Science Foundation of China (31971947), Key Scientific and Technological Project of Henan Province (212102110246)

小麦芒是穗状花序的重要组成部分,是由小花外稃的顶端延伸而形成的刺状物,着生在穗颖和稃片的顶端,是小麦适应环境和长期选择的结果,在种子传播和萌发中起着重要的作用^[1]。小麦芒在穗上的分布有芒长均匀分布、顶部和基部较短而中上部芒较长的钟形分布、从顶部到穗基部芒长依次变短的倒塔形分布等类型^[2]。小麦芒由 3 个维管束和绿衣组织组成,具有光合作用的能力,其产物是小麦籽粒同化物的来源之一^[3]。麦芒还能相对提高水分利用效率,促进水分和营养物质向穗部运转^[3-4]。研究表明,在温暖、干旱、多雨的环境下,小麦和大麦的芒更有助于提高产量^[5]。除生物学功能外,芒的有无、形状、长短及颜色还是小麦品种特性之一,可作为区分不同小麦品种和基因定位的重要形态标记。

目前,禾本科作物关于芒形成机理的研究已经取得了一定的进展。在大麦中,早期 Muller 等^[6]发现同源异型盒基因 *Knox3* 会产生带帽结构,促使异位分生组织在外稃上发育,从而不能形成正常的芒。之后有研究发现大麦芒的发育主要由 *Lks2* 基因所编码的短节间 (SHI) 家族转录因子所调控^[7]。此外,与油菜素甾体 (BR) 生物合成或信号传导有关的基因也被证明会影响大麦芒的长度^[8]。在水稻中也已经克隆出多个芒发育相关基因。*An-1* 编码一个 bHLH 蛋白,主要分布于水稻的芒原基中,在水稻幼穗发育晚期特异性高表达^[9]; *An-2/LABAI* 编码一个细胞分裂素激酶,对水稻芒原基中的细胞分裂素起正向调控作用,从而控制水稻芒的延伸和芒刺的形成^[10-11]; *RAE2*^[12]/*GADI*^[13] 编码一个表皮模式因子类蛋白 EPFL1,在芒原基的维管束高度表达,可调控芒的伸长。上述研究为理解小麦芒的遗传机制提供了参考信息,然而小麦芒的发生似乎与这些研究的同源基因无关^[14]。

普通六倍体小麦基因组庞大而复杂,芒的遗传研究进展较慢。前人利用传统 QTL 定位方法鉴定出多个遗传调控位点,据此推测小麦芒发育主要受 *Tipped 1* (*B1*)、*Tipped 2* (*B2*)、*Tipped 3* (*B3*)、*Hooded* (*Hd*) 和 *A* 等 5 个主效基因及部分微效基因共同调控;其中, *B1*、*B2* 和 *B3* 抑制芒的伸长, *Hd* 是产生钩芒的基因,而 *A* 基因促进芒伸长^[15-17]。随着生物技术的发展,基于 SNP 芯片技术的全基因组关联分析 (GWAS) 和集群分离分析法 (BSA) 等快速高效的定位方法促进了麦类作物遗传研究发展。借助这些方法,多项研究成功克隆 *B1* 基因^[18-20],

并对 *B2* 位点进行精细定位和候选基因预测^[21]。目前虽已鉴定出多个小麦芒调控位点,但仅有 *B1* 被克隆出来,且围绕其开展的部分研究尚存争议。Wang 等^[18]发现位于 *Tipped1* 启动子区存在有 4 个单核苷酸多态性 (SNPs),可以作为有 / 无芒基因型的诊断依据; DeWitt 等^[19]的研究表明,位于该基因下游 4 kb 的 30-nt 缺失对于芒抑制功能单倍型是最具有诊断性的 (但不完全诊断); 而 Huang 等^[20]则认为位于 *B1* 起始密码子上游 709-nt 的 A/G 多态性和起始密码子下游 761-nt 的 A/G 多态性可诊断 *B1* 的功能单倍型。因此,要了解小麦芒的发生机理,仍然需要对其进行深入全面的研究。黄淮海是我国重要的小麦生产区,本研究利用来自黄淮麦区的 206 份小麦材料进行全基因组关联分析,同时对芒长分离明显的 RIL 群体进行 BSA 分析,旨在定位控制小麦芒性的基因位点,并进行候选基因的预测和分析,为小麦芒性基因的克隆和分子育种奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为 206 份黄淮麦区优异小麦种质资源组成的自然群体 (ZZ 群体)、由上海 3 号和 Cbrd 杂交构建的包含 137 个株系的 F₁₀ RIL 群体 (SC 群体),以及课题组收集的 26 份无芒小麦资源材料。SC 群体的亲本上海 3 号表现为无芒, Cbrd 表现为有芒。

1.2 试验方法

1.2.1 田间种植 所有参试材料均于 2018-2019 年生长季种植在河南农业大学科教园区原阳基地,单粒播种,行长 2 m,株距 10 cm,每个参试材料种植 2 行,并进行 2 次重复,生长期间采取正常的田间管理。对芒性进行田间鉴定时,将芒长小于 1 cm 的记为无芒,芒长大于 1 cm 的记为有芒。

1.2.2 全基因组关联分析 (GWAS) 利用 Wheat 90K SNP 芯片对 ZZ 群体进行基因分型。用 PLINK 软件对基因型数据进行 SNP 位点的质量控制,剔除低频基因频率 (MAF) 小于 5% 和分型成功率小于 90% 的 SNP 位点后,以 $P < 0.00001$ 为标准进行分析。对质控后 P 值低于此阈值的 SNPs,则认为与表型显著关联^[22]。基于 R 环境的 GAPIT 软件,采用混合线性 (MLM) 模型进行全基因组关联分析 (GWAS, genome-wide association study)^[23-25],检测与表型相关联的显著性 SNP

位点。

1.2.3 BSA (Bulked segregant analysis) 分析 于 2018 年 4 月从 SC 群体中分别选取 20 个有芒家系和 20 个无芒家系的叶片进行等量混合,构建有芒和无芒混池,并利用 Wheat 660K SNP 芯片进行全基因组扫描。获得基因分型结果后,剔除掉分型成功率小于 90% 的 SNP 位点后,对差异 SNP 染色体分布情况进行统计,并对落入各条染色体的差异 SNP 进行数量、密度的统计分析。

1.2.4 目标基因的克隆和多态性分析 采用十二烷基肌氨酸钠(SLS)法进行参试材料种子 DNA 的提取^[26]。引物利用 Primer 5.0 软件进行设计,由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。用于目的基因克隆的引物上下游序列分别是 5'-TTAGAATGGAGGGCGTAC-3' 和 5'-CTGTCGGTGATCCTGTTT-3'。用于基因多态性分析的引物上下游序列分别为 5'-CGCGAATAGGCATGTGCA-3' 和 5'-GAAAAGGCTTGGAATCATGGAC-3'。PCR 扩增体系为:DNA 1.5 μ L,上、下游引物各 1 μ L,去离子水 8 μ L,Phanta® Max Super-Fidelity DNA Polymerase (南京诺唯赞生物科技有限公司, P505-d1) 0.5 μ L, 2 \times Phanta® Max Buffer 12.5 μ L, dNTP Mix (10 mmol/L each) 0.5 μ L。PCR 扩增程序为:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 95 $^{\circ}$ C 变性 20 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 20 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 进行 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 12 $^{\circ}$ C 永久保存。扩增产物用琼脂糖凝胶进行电泳检测。DNA 测序由生工生物工程(上海)股份有限公司完成,测序结果用 DNAMAN 7.0 软件进行分析。

1.2.5 基因表达分析 选取 SC 群体中无芒和有芒家系的幼穗,利用 Trizol 法提取 RNA 后,采用 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (Takara, RR047A) 反转录试剂盒反转录成 cDNA。用于实时荧光定量 PCR 的上下游特异性引物分别为: 5'-GCCACCAGAACGCTCACA-3' 和 5'-CCCGAACCAGTACCCGTG-3'。利用 BioRad CFX96 荧光定量 PCR 仪进行检测。

1.2.6 数据统计分析 本研究中的数据分析主要利用 Microsoft Excel 2010 软件进行。

2 结果与分析

2.1 参试材料表型鉴定

对用于 GWAS 分析的 ZZ 群体进行田间性状

调查,统计结果显示,无芒材料仅有 14 份,其余均为有芒材料,表明黄淮麦区的材料大多以有芒为主,有芒特性被广大育种家在育种过程中选择而得以保留。

2.2 自然群体的 GWAS 分析

对 ZZ 群体进行田间表型鉴定后,将无芒表型赋值为 1,有芒表型赋值为 2。利用 PLINK 软件对基因型数据进行 SNP 位点的质控,然后利用质控后的 55092 个 SNP 标记进行 GWAS 分析,分析结果的 Manhattan 和 quantile-quantile (Q-Q) 见图 1a 和图 1b。

结果显示,共检测到 79 个与芒性显著关联的 SNP 标记 ($P < 1.0 \times 10^{-5}$), Q-Q plot 证明了这些显著相关位点的可靠性。除 7D 染色体外,其他染色体上都检测到显著关联的 SNP 位点,且主要分布在 1A、2A、2B、5A、7A 几条染色体上。在检测到的显著性 SNP 位点中,显著性较高的 SNP 位点均位于 5A 染色体上,其中显著性最高的标记 BobWhite_c8266_227, P 值为 3.96×10^{-25} (图 1c)。进一步对 5A 染色体上的 6 个显著性 SNPs (AL-1~AL-6) 进行分析,发现其主要集中于 698.0~698.5 Mb 区段内,表明该位置附近可能存在调控小麦芒发育的基因位点(图 1c)。

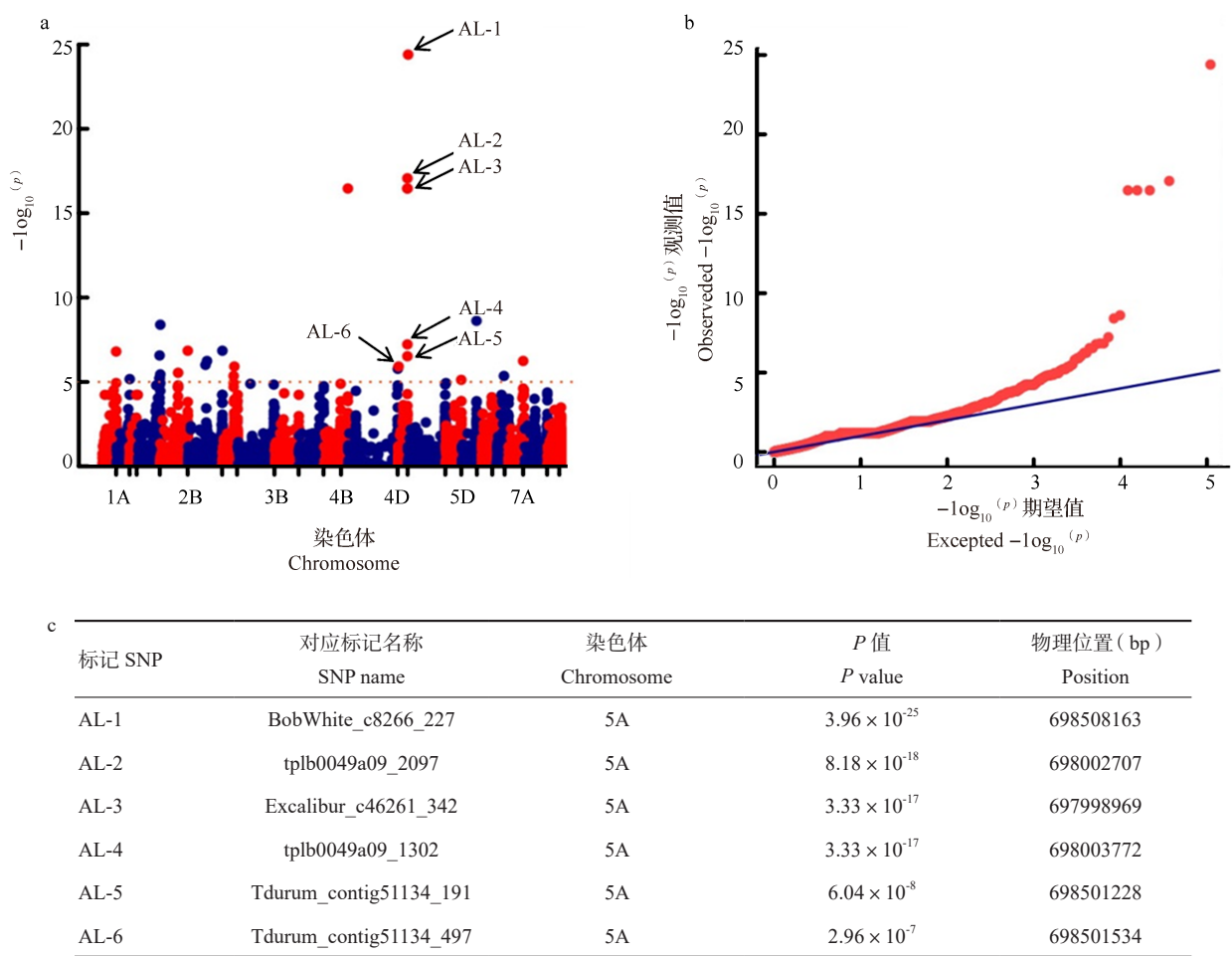
2.3 RIL 群体的 BSA 分析

选取 SC 群体中的有芒和无芒材料分别构建混池,进行 BSA 分析。在剔除掉无效 SNP 位点后,共检测到 500 个差异 SNP 标记,这些 SNPs 在 21 条染色体上均有分布,其中位于 5A 染色体上最多,有 158 个,占 31.60% (图 2a)。

对 5A 染色体上的差异 SNP 标记以 20 Mb 为滑窗,对其频率分布进行统计,发现其主要分布于 690~710 Mb 区间内;进一步分析发现其主要集中在 696.6~706.6 Mb 的区段内(图 2b),表明该区段内可能存在调控小麦芒性的基因位点。

2.4 候选基因的预测与多态性分析

结合上述 GWAS 分析与 BSA 分析结果,推测 2 种方法所检测到的可能是同一个芒性基因调控位点,且 2 种方法所定位到的共有区段——5A 染色体上的 698.0~698.5 Mb 区段,极可能是目标基因位点所在区段;并且根据 GWAS 分析结果可知,在上述目标区段内检测到的 6 个显著 SNPs 中有 3 个(包含显著性最高的 SNP)均位于 698.5 Mb 附近,因此进一步推测调控小麦芒性的相关基因可能位于 698.5 Mb 附近。参照中国



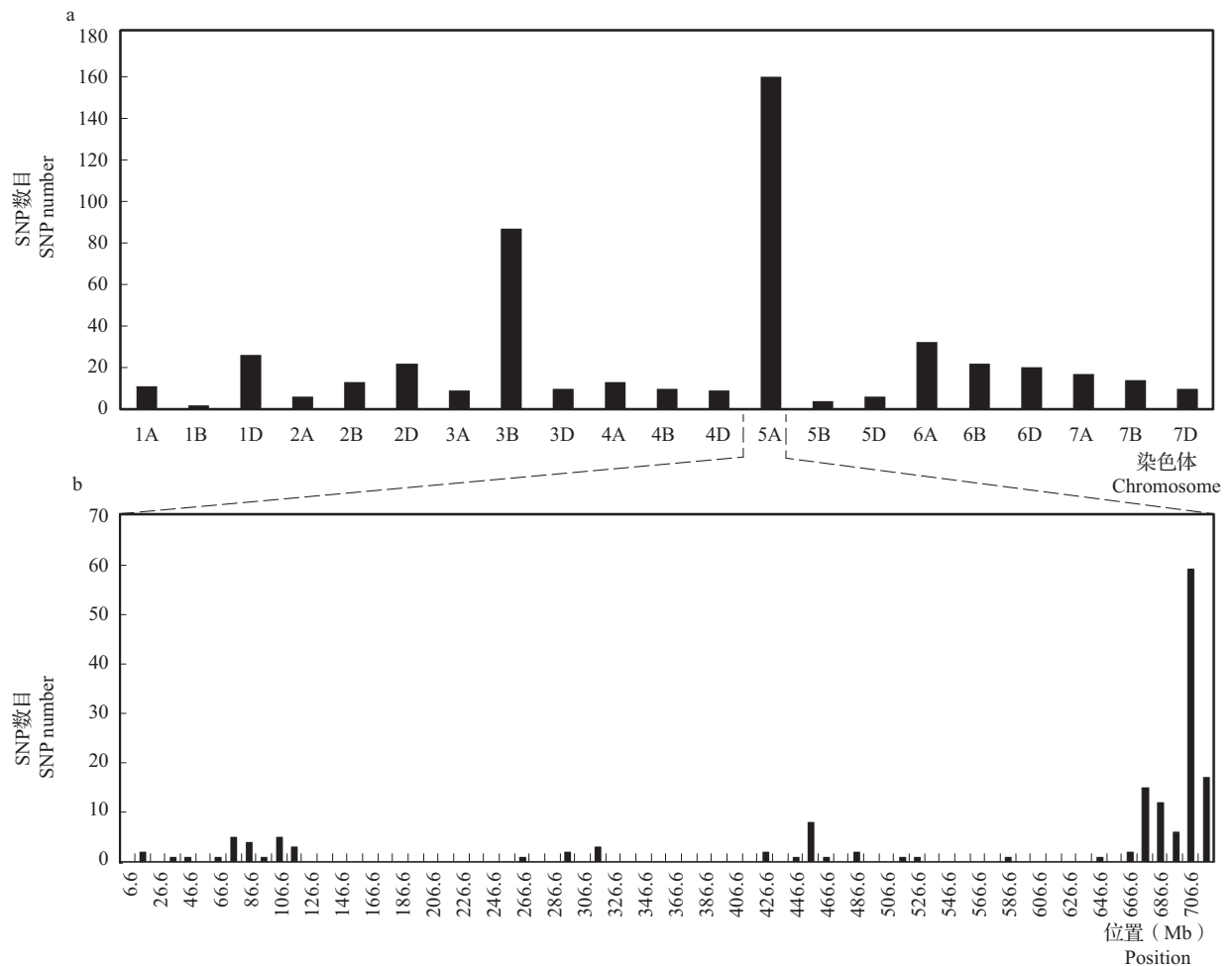
a: 关联分析的 Manhattan 图; b: 关联分析的 Q-Q plot 图; c: 5A 染色体显著性较高 SNP 的信息
a: The Manhattan plot, b: The Q-Q plot, c: SNPs with high significance on chromosome 5A

图 1 自然群体芒性的全基因组关联分析
Fig.1 Genome-wide association analysis of awn in natural population

春基因组注释,对 5A 染色体上 698.5 Mb 附近长 100 kb 区段(698.45~698.55 Mb)内的基因进行分析,发现该区段内共有 6 个注释基因(表 1);其中, *TraesCS5A02G542800* 基因注释为 C2H2 型锌指蛋白。已有研究表明, C2H2 型锌指蛋白家族是一大类转录调节因子,涉及花发育、种子发育、毛状体和根毛形成等多个过程^[27-29];同时通过查询发现 *TraesCS5A02G542800* 即为已经被报道的、参与小麦芒长发育的 *B1* 基因^[18-20]。由此,推测 *TraesCS5A02G542800* 即为本研究所要定位的小麦芒性调控基因,在此命名为 *Tipped1*。根据中国春参考序列进行分析,显示 *Tipped1* 基因只有 1 个外显子,其编码序列(CDS)长 366 bp,且在 4B 和 4D 染色体上分别有同源基因 *TraesCS4B02G345000* 和

TraesCS4D02G340000。

参照中国春序列设计引物对 *Tipped1* 基因进行克隆,在 SC 群体中分别选取有芒株系和无芒株系各 3 个进行扩增并测序。结果显示,有芒/无芒个体的编码序列(CDS)没有差异;在启动子区域、起始密码子上游 346 bp 处,有芒/无芒株系基因型之间存在着 25 bp 的插入/缺失(InDel)变异,其中有芒株系基因型为含有 25 bp 的插入(图 3a)。除上述变异外,同时在起始密码子上游 284 bp 处,还伴随有 1 个 SNP 的连锁型多态性,有上述 25 bp 插入时该处差异碱基表现为 G,无插入时表现为 A(图 3a)。本研究中,将拥有 25 bp 插入的这一等位基因型命为 *Tipped1-A1a*,表现为缺失的等位基因型命为 *Tipped1-A1b*。



a: 差异 SNP 在全基因组的分布; b: 5A 染色体上差异 SNPs 的频率分布
a: The distribution of differential SNPs in the whole genome, b: The frequency distribution of differential SNPs on chromosome 5A

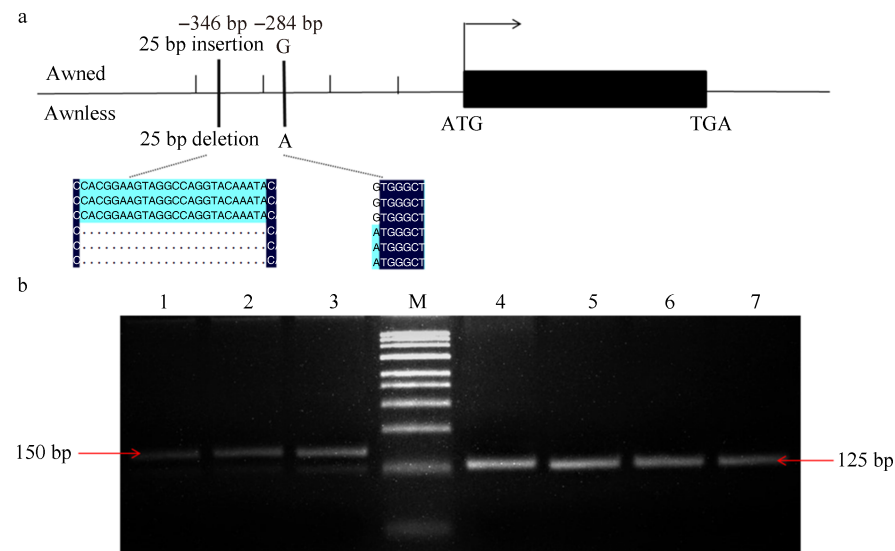
图 2 SC 群体 BSA 分析的结果
Fig.2 Bulk segregant analysis of SC population

表 1 5A 染色体定位区段内基因注释信息
Table 1 Gene annotation information in chromosome 5A location segment

基因名称 Gene name	物理位置 (Mb) Physical position	注释信息 Annotation information
<i>TraesCS5A02G542300</i>	698.453	富含亮氨酸重复受体样蛋白激酶家族蛋白
<i>TraesCS5A01G542400</i>	698.498	乙醇脱氢酶
<i>TraesCS5A01G542500</i>	698.502	磷酸甘油酸突变家族蛋白
<i>TraesCS5A01G542600</i>	698.507	糖转运蛋白
<i>TraesCS5A01G542700</i>	698.507	蛋白激酶
<i>TraesCS5A01G542800</i>	698.513	锌指家族蛋白

利用 SC 群体有 / 无芒株系间启动子区域存在的 25 bp 的插入 / 缺失变异,设计 InDel 标记对 SC 群体全部家系多态性进行鉴定(图 3b)。将基因型同表型结合进行分析,发现绝大多数株系都符合插入有芒、缺失无芒这一规律(表 2)。随后对收集自黄淮麦区的 26 份无芒小麦资源材料进行扩增测序,

结果表明 17 份材料无插入片段,9 份材料存在插入片段;收集的无芒材料大多数为 *Tipped1-Alb* 这一基因型,符合缺失无芒这一规律,也进一步表明 *Tipped1* 是调控小麦芒发育的主效基因位点,且启动子区域存在的变异可能是影响该基因发挥功能的重要原因。



a: 有 / 无芒家系中序列多态性图示; b: 2 种等位基因型的电泳图谱,
1~3 为有芒株系 SC-20、23、26, 4~7 为无芒株系 SC-16、21、27、32, M 为 50 bp Marker
a: The sequence polymorphic in awned/awnless lines, b: The electrophoretic patterns of the two alleles,
1-3 are awned lines SC-20, 23, 26, 4-7 are awnless lines SC-16, 21, 27, 32, M is 50 bp Marker

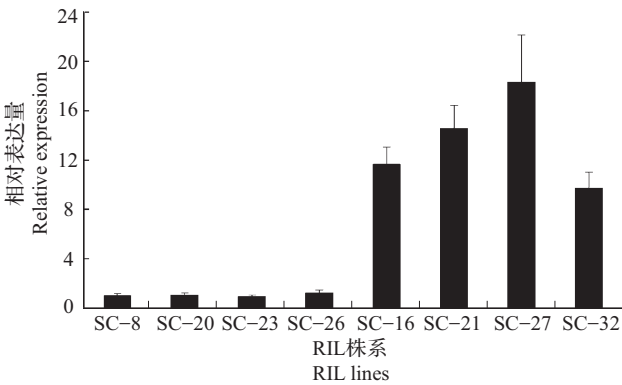
图 3 SC 群体 *Tipped1* 基因序列多态性分析
Fig.3 The polymorphism analysis of *Tipped1* sequence in SC population

表 2 SC 群体和 26 份无芒材料中 2 种等位基因型的频率统计
Table 2 Polymorphism identification of SC population and 26 awnless materials

项目 Item	SC- 有芒材料 SC-awned materials	SC- 无芒材料 SC-awnless materials	26 份无芒材料 26 awnless materials
<i>Tipped1-A1a</i>	74	3	9
<i>Tipped1-A1b</i>	5	42	17
总计 Total	79	45	26
表型解释率 (%) Phenotype explanation rate	93.7	93.3	65.4

2.5 目的基因表达分析

为了明确 *Tipped1* 不同基因单倍型间启动子区域存在的差异是否会引起该基因表达量的变化,自 SC 群体中分别选取符合 *Tipped1-A1a* 的有芒家系和符合 *Tipped1-A1b* 的无芒家系各 4 个,检测 *Tipped1* 在幼穗中的基因表达量。结果显示,拥有 *Tipped1-A1b* 基因型、无芒家系中的表达量均明显高于具有 *Tipped1-A1a* 基因型的有芒家系(图 4),表明不同单倍型间启动子区域存在的差异的确会造成 *Tipped1* 基因表达量的改变,且 *Tipped1-A1b* 基因型可能会引起 *Tipped1* 基因表达量的升高,同时也进一步说明 *Tipped1* 为小麦芒长抑制基因,该基因表达量升高会抑制芒的发生。



SC-8、SC-20、SC-23、SC-26 为有芒家系;
SC-16、SC-21、SC-27、SC-32 为无芒家系
SC-8, SC-20, SC-23, SC-26 are awned lines,
SC-16, SC-21, SC-27, SC-32 are awnless lines

图 4 SC 群体两种基因型家系间 *Tipped1* 基因表达分析
Fig.4 Expression of *Tipped1* gene between two
genotypes in SC population

3 讨论

芒是禾本科作物典型的形态特征之一,有利于种子传播和防止鸟虫害。从结构上讲,麦芒是对小麦生长和繁殖有利的结构特征,与小麦产量存在相关性,是影响小麦产量高低的重要器官。例如,Rai等^[30]和Motzo等^[31]的研究表明有芒品种与无芒品种相比通常可增产10%。而McKenzie^[32]通过2种春小麦品种的正反交,却发现后代材料无芒比有芒品种的产量更高。目前关于小麦芒的长短与产量的关系仍尚无定论,还有待对其继续进行深入和全面的研究。本研究中,用于进行GWAS分析的自然群体中,有芒材料占到93.2%,表明在育种过程中有芒这一性状被广大育种者所选择,在一定程度上暗示有芒可能会更有利于小麦高产的形成。

在大麦和水稻中,多个控制芒发育的基因已经被克隆出来,功能得到初步解析,为理解小麦芒的遗传机制提供了参考信息。然而受限于六倍体小麦复杂的遗传背景,依靠传统的定位方法在很长时间内都未成功克隆出芒性相关基因。因此需进一步加强小麦芒性基因的挖掘与克隆工作,以明确小麦芒的遗传机理及其作用,进而指导实际生产。近些年发展起来的全基因组关联分析(GWAS)为基因快速定位提供了一种新思路。相较于仅利用几百个标记的传统QTL定位,GWAS采用覆盖范围包括数十万甚至数百万个高密度SNP标记,利用遗传多样性丰富的自然群体进行连锁不平衡分析,能够充分利用群体进化过程中产生的重组信息,快速筛选出与复杂性状表型关联的分子标记,从而实现目标性状调控位点的快速高效定位^[33]。另外,集群分离分析法(BSA)可以检测位于特定染色体区段的标记,现在也已成为用来挖掘极端性状相关基因的常用手段^[34]。Wang等^[18]利用364份小麦自然材料进行GWAS分析,将*BI*定位到125 kb(698.516~699.641 Mb)的物理区间,进而结合传统定位方法首个成功克隆该基因;随后DeWitt等^[19]也利用GWAS分析结合传统定位方法成功分离该基因;Huang等^[20]则通过对硬粒小麦的F₂群体采取BSA结合RNA-Seq技术将*BI*定位到5A染色体上698~699.5 Mb的区段内,进而克隆该基因。本研究采用GWAS分析与BSA分析相结合的方法,将候选基因定位在5A染色体上698.0~698.5 Mb区段内,通过进一步分析最终成功鉴定和克隆出控制小麦芒性的重要基因位点*Tipped1*,与前人研究结果

一致。该结果不仅表明*Tipped1*是调控小麦芒发育的主效基因位点,同时也证明了利用GWAS分析与BSA分析进行小麦基因快速挖掘的有效性。

在前人研究中,Wang等^[18]发现位于*BI*启动子区存在的4个SNPs可以作为有/无芒基因型的诊断依据。本研究对该基因启动子序列进行分析发现,在起始密码子上游345 bp处有芒/无芒株系基因型之间存在着25 bp的插入/缺失变异,同时在起始密码子上游284 bp处,还伴随有1个SNP(G/A)的连锁型多态性;并依据上述多态性,将*Tipped1*基因型区分为*Tipped1-A1a*(有芒)和*Tipped1-A1b*(无芒)2种类型(图3a)。利用上述序列多态性差异对SC群体家系进行分析,结果显示绝大多数家系符合该规律(表2)。同时对26份无芒资源材料进行鉴定,发现多数(17/26)也符合该规律;出现少数不符合的情况,推测可能是由于其他芒性调控位点的存在。选取SC群体中不同单倍型家系对*Tipped1*基因表达量进行检测,结果显示*Tipped1-A1b*基因型可能会促使*Tipped1*基因高表达,进一步结合表型分析表明*Tipped1*为小麦芒长抑制基因,这与现有报道一致^[18-20]。本研究所鉴定出的基因多态性与Wang等^[18]研究结果并不一致,推测可能是由于选用遗传材料的差异所造成的。但本研究所鉴定出的多态性差异可以作为小麦进行芒性选择的重要参考依据,具有实际利用价值。此外,作为参考基因组的2个代表性品种中国春(无芒品种)和矮抗58(有芒品种)与本研究以及之前他人研究中所发现的基因多态性结论均不符合,因此未来仍需要更多的研究去继续阐明*Tipped1*如何调控小麦芒性。

4 结论

本研究利用206份来自黄淮麦区的小麦资源材料组成的自然群体进行GWAS分析,结果显示检测到的与小麦芒性关联且显著性较高的SNPs大多位于5A染色体上,进一步发现其主要富集于698.0~698.5 Mb区段内。对RIL群体的有无/芒混池进行BSA分析发现,差异SNPs主要集中在5A染色体696.6~706.6 Mb区段内。结合上述2种分析方法以及生物信息学手段,最终确定了*TraesCS5A02G542800*即为所要寻找的调控小麦芒性的主效基因位点,将其命名为*Tipped1*。对该基因进行克隆和序列分析,发现在所研究的有/无芒材料中,存在*Tipped1-A1a*和*Tipped1-A1b*两种等位基

因型,分别对应有芒和无芒表型,大部分参试材料均符合该规律。基因表达分析结果显示 *Tipped1-Alb* 基因型可能会增强 *Tipped1* 基因表达,进而抑制芒的发生。综合结果表明 *Tipped1* 可能是调控小麦芒发育的主效基因位点,且启动子区域存在的变异是影响该基因发挥功能的重要原因。验证中出现部分材料表型与基因型多态性不相符的情况,推测可能由于小麦芒性同时受多个基因位点共同调控引起,未来还需加强对小麦芒性遗传机制的研究以明确其发生机理。同时本研究中围绕 *Tipped1* 启动子内 25 bp 插入缺失差异所开发的 InDel 标记可用于小麦芒性选择,具有一定的实际意义。

参考文献

- [1] Grundbacher F J. The physiological function of the cereal awn. *Botanical Review*, 1963, 29(3): 366-381
- [2] Watkins A E, Ellerton S. Variation and genetics of the awn in *Triticum*. *Journal of Genetics*, 1940, 40(1): 243-270
- [3] Li X, Wang H, Li H, Zhang L, Teng N, Lin Q, Wang J, Kuang T, Li Z, Li B, Zhang A, Lin J. Awns play a dominant role in carbohydrate production during the grain-filling stages in wheat (*Triticum aestivum*). *Physiologia Plantarum*, 2006, 127(4): 701-709
- [4] 巴青松,傅兆麟,白凡杰. 小麦芒的研究. 淮北师范大学学报: 自然科学版, 2010, 31(1): 29-33
Ba Q S, Fu Z L, Bai F J. The research of wheat awns. *Journal of Huaibei Coal Industry Teachers College: Natural Science*, 2010, 31(1): 29-33
- [5] Rebetzke G J, Bonnett D G, Reynolds M P. Awns reduce grain number to increase grain size and harvestable yield in irrigated and rainfed spring wheat. *Journal of Experimental Botany*, 2016, 67(9): 2573-2586
- [6] Muller K J, Romano N, Gerstner O, Garcia M F, Pozzi C, Salamini F, Rohde W. The barley *Hooded* mutation caused by a duplication in a homeobox gene intron. *Nature*, 1995, 374(6524): 727-730
- [7] Yuo T, Yamashita Y, Kanamori H, Matsumoto T, Lundqvist U, Sato K, Ichii M, Jobling S A, Taketa S A. Short Internodes (*SHI*) family transcription factor gene regulates awn elongation and pistil morphology in barley. *Journal of Experimental Botany*, 2012, 63(14): 5223-5232
- [8] Dockter C, Gruszka D, Braumann I, Druka A, Druka I, Francowiak J, Gough S P, Janeczko A, Kurowska M, Lundqvist J, Lundqvist U, Marzec M, Matyszcak I, Müller A H, Oklestkova J, Schulz B, Zakhrebekova S, Hansson M. Induced variations in brassinosteroid genes define barley height and sturdiness, and expand the green revolution genetic toolkit. *Plant Physiology*, 2014, 166(4): 1912-1927
- [9] Luo J, Liu H, Zhou T, Gu B, Huang X, Shang G Y, Zhu J, Li Y, Zhao Y, Wang Y, Zhao Q, Wang A, Wang Z, Sang T, Wang Z, Han B. *An-1* encodes a basic helix-loop-helix protein that regulates awn development, grain size, and grain number in rice. *Plant Cell*, 2013, 25(9): 3360-3376
- [10] Hua L, Wang D R, Tan L, Fu Y, Liu F, Xiao L, Zhu Z, Fu Q, Sun X, Gu P, Cai H, McCouch S R, Sun C. *LABA1*, a domestication gene associated with long, barbed awns in wild rice. *Plant Cell*, 2015, 27(7): 1875-1888
- [11] Gu B, Zhou T, Luo J, Liu H, Wang Y, Shangguang Y, Zhu J, Li Y, Sang T, Wang Z, Han B. *An-2* encodes a cytokinin synthesis enzyme that regulates awn length and grain production in rice. *Molecular Plant*, 2015, 8(11): 1635-1650
- [12] Bessho-Uehara K, Wang D R, Furuta T, Minami A, Nagai K, Gamuyao R, Asano K, Angeles-Shim R B, Shimizu Y, Ayano M, Komeda N, Doi K, Miura K, Toda Y, Kinoshita T, Okuda S, Higashiyama T, Nomoto M, Tada Y, Shinohara H, Matsubayashi Y, Greenberg A, Wu J, Yasui H, Yoshimura A, Mori H, McCouch S R, Ashikari M. Loss of function at *RAE2*, a previously unidentified *EPFL*, is required for awnlessness in cultivated Asian rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2016, 113(32): 8969-8974
- [13] Jin J, Hua L, Zhu Z, Tan L, Zhao X, Zhang W, Liu F, Fu Y, Cai H, Sun X, Gu P, Xie D, Sun C. *GAD1* encodes a secreted peptide that regulates grain number, grain length, and awn development in rice domestication. *Plant Cell*, 2016, 28(10): 2453-2463
- [14] Yoshioka M, Iehisa J C M, Ohno R, Kimura T, Enoki H, Nishimura S, Nasuda S, Fakumi S. Three dominant awnless genes in common wheat: fine mapping, interaction and contribution to diversity in awn shape and length. *PLoS ONE*, 2017, 12(4): e0176148
- [15] 王忠,顾蕴洁,高煜珠. 麦芒的结构及其光合特性. 植物学报, 1993, 35(12): 921-928
Wang Z, Gu Y J, Gao Y Z. Structure and photosynthetic characteristics of awns of wheat and barley. *Journal of Integrative Plant Biology*, 1993, 35(12): 921-928
- [16] Sourdille P, Cadalen T, Gay G, Gill B, Bernard M. Molecular and physical mapping of genes affecting awning in wheat. *Plant Breeding*, 2002, 121(4): 320-324
- [17] Kosuge K, Watanabe N, Kuboyama T, Melnik V M, Yanchenko V I, Rosova M A, Goncharov N P. Cytological and microsatellite mapping of mutant genes for spherical grain and compact spikes in durum wheat. *Euphytica*, 2008, 159(3): 289-296
- [18] Wang D Z, Yu K, Jin D, Sun L, Chu J, Wu W, Xin P, Gregová E, Li X, Sun J, Yang W, Zhan K, Zhang A M, Liu D C. Natural variations in the promoter of Awn Length Inhibitor 1 (*ALI-1*) are associated with awn elongation and grain length in common wheat. *The Plant Journal*, 2020, 101(5): 1075-1090
- [19] DeWitt N, Guedira M, Lauer E, Sarinelli M, Tyagi P, Fu D L, Hao Q Q, Murphy J P, Marshall D, Akhunova A, Jordan K, Akhunov E, Brown-Guedira G. Sequence-based mapping identifies a candidate transcription repressor underlying awn suppression at the *B1* locus in wheat. *New Phytologist*, 2020, 225(1): 326-339
- [20] Huang D Q, Zheng Q, Melchikart T, Bekkaoui Y, Konkin D J F, Kagale S, Martucci M, You F M, Clarke M, Adamski N M, Chinoy C, Steed A, McCartney C A, Cutler A J, Nicholson P, Feurtado J A. Dominant inhibition of awn development by a putative zinc-finger transcriptional repressor expressed at the *B1* locus in wheat. *New Phytologist*, 2020, 225(1): 340-355

- [21] 金迪,王冬至,王焕雪,李润枝,陈树林,阳文龙,张爱民,刘冬成,詹克慧. 小麦芒长抑制基因 *B2* 的精细定位与候选基因分析. 作物学报, 2019, 45(6): 807-817
Jin D, Wang D Z, Wang H X, Li R Z, Chen S L, Yang W L, Zhang A M, Liu D C, Zhan K H. Fine mapping and candidate gene analysis of awn inhibiting gene *B2* in common wheat. Acta Agronomica Sinica, 2019, 45(6): 807-817
- [22] Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, Thomas L, Ferreira M A, Bender D, Maller J, Sklar P, Bakker P I, Daly M J, Sham P C. PLINK: a tool set for whole-genome association and population- based linkage analyses. The American Journal of Human Genetics, 2007, 81(3): 559-575
- [23] Lipka A E, Tian F, Wang Q, Peiffer J, Li M, Bradbury P J, Gore M A, Buckler E S, Zhang Z. GAPIT: genome association and prediction integrated tool. Bioinformatics, 2012, 28(3): 2397-2399
- [24] Pritchard J K, Stephens M J, Donnelly P J. Inference of population structure using multilocus genotype data. Genetics, 2000, 155(2): 945-959
- [25] Yu J, Buckler E S. Genetic association mapping and genome organization of maize. Current Opinion in Biotechnology, 2006, 17(2): 155-160
- [26] Weining S, Ko L, Henry R J. Polymorphisms in the *α -amy1* gene of wild and cultivated barley revealed by the polymerase chain reaction. Theoretical and Applied Genetics, 1994, 89(4): 509-513
- [27] Takashige I, Ryo I. Domestication loci controlling panicle shape, seed shattering, and seed awning. Rice Genomics, Genetics and Breeding, 2018, 12: 207-221
- [28] Yan A, Wu M, Zhao Y, Zhang A, Liu B, Schiefelbein J, Gan Y. Involvement of C2H2 zinc finger proteins in the regulation of epidermal cell fate determination in *Arabidopsis*. Journal of Integrative Plant Biology, 2014, 56(12): 1112-1117
- [29] Xiao H, Tang J, Li Y, Wang W, Li X, Jin L, Xie R, Luo H, Zhao X, Meng Z, He G, Zhu L. *STAMENLESS 1*, encoding a single C2H2 zinc finger protein, regulates floral organ identity in rice. The Plant Journal, 2010, 59(5): 789-801
- [30] Rai K N, Rao A S. Effect of *d₂* dwarfing gene on grain yield and yield components in pearl millet near-isogenic lines. Euphytica, 1991, 52(1): 25-31
- [31] Motzo R, Giunta F. Awnedness affects grain yield and kernel weight in near-isogenic lines of durum wheat. Crop and Pasture Science, 2002, 53(12): 1285-1293
- [32] McKenzie H. Adverse influence of awns on yield of wheat. Canadian Journal of Plant Science, 1972, 52(1): 81-87
- [33] Flint-Garcia S A. Genetics and consequences of crop domestication. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013, 61(35): 8267-8276
- [34] 陈浣,夏菲,吴新儒,孙玉合. 集群分离分析法在植物基因定位上的应用. 基因组学与应用生物学, 2016, 35(6): 1546-1551
Chen H, Xia F, Wu X R, Sun Y H. The application of bulked segregant analysis in plant gene mapping. Genomics and Applied Biology, 2016, 35(6): 1546-1551