

大麦钩芒突变体的遗传解析

安朝丹^{1,2}, 高广奇², 杨平², 程小毛¹, 蒋枞聰²

(¹西南林业大学园林园艺学院, 昆明 650224; ²中国农业科学院作物科学研究所, 北京 100081)

摘要: 大麦(*Hordeum vulgare* L.)的芒是其穗部小花的外稃上端延伸出的针状特化结构,内部有绿色组织细胞和维管组织。芒在大麦的防御、光合作用、籽粒自然脱落后在土壤中的固着和萌发出土等方面均具有重要作用。在禾谷类作物中,大麦是少数仍保留着芒结构的栽培作物,在自然群体中其形态变异丰富。研究大麦芒形态的遗传调控与变异分布,具有重要的理论与应用价值。本研究鉴定了1个大麦的钩芒突变体M7966,通过分离群体遗传分析证实该突变由单个显性遗传位点控制;随后利用遗传群体的分离单株混池测序分析,定位和克隆了引起钩芒表型的目标基因*HvKNOX3*。在突变体中,该基因第4内含子中的一处305 bp序列原位重复与钩芒突变表型共分离;*HvKNOX3*为homeobox类转录因子,在发育早期1~1.5 cm长的幼穗及播种后35 d的穗轴中特异性表达,在大麦泛基因组包含的20个品种间保守性高,仅在其外显子区域发现少数核苷酸序列变异,其余序列变异均位于非编码区域。通过设计共显性分子标记对我国不同地区来源的238份栽培大麦地方品种进行了基因型鉴定,结果发现该305 bp突变在西藏地方品种中具有较高的分布比例,为钩芒突变起源于喜马拉雅地区的理论假设提供了证据。

关键词: 栽培大麦;芒;突变体;极端单株混合池分析;地方品种

Genetic Dissection of Hooded Awn Mutation in Cultivated Barley (*Hordeum vulgare* L.)

AN Chaodan^{1,2}, GAO Guangqi², YANG Ping², CHENG Xiaomao¹, JIANG Congcong²

(¹College of Landscape Gardening, Southwest Forestry University, Kunming 650224; ²Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081)

Abstract: Awn is a specialized extension at the tip of lemma or glume of floret in cereal species, consisting of chlorenchyma cells and vascular bundles which support photosynthesis and nutrients transport, respectively. The awn plays important roles in plant defense, photosynthesis and grain filling, as well as facilitate the threshed grains embedding in soil and the germinated seedlings come up. Cultivated barley (*Hordeum vulgare* L.) has awn remained post domestication, and various morphological diversifications of the awns have been observed within natural population. Studies on genetical regulation and distribution of the barley awn variants have both theoretical and practical significance. In this study, a barley mutant with hooded awn was identified and genetically attributes to a single dominant mutation. By taking use of bulked-segregants-analysis (BSA) the mutation was mapped towards the end of short arm of the barley chromosome 4H, where the barley gene *HvKNOX3* resides in the interval. A local duplication of 305 bp fragments in the fourth intron of *HvKNOX3* was found to co-segregate with the hooded phenotype. *HvKNOX3*, which encodes a homeobox protein with function in transcriptional regulation, expressed specifically in young spikelets 1~1.5 cm long at early development and the rachis of 35 days after planting. By analyzing the sequence diversity of the *HvKNOX3* among 20

收稿日期: 2023-06-08 修回日期: 2023-07-05 网络出版日期: 2023-07-19

URL: <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20230608001>

第一作者研究方向为大麦基因资源, E-mail: anchaodan995190@163.com

通信作者: 程小毛, 研究方向为植物分子与生理, E-mail: xmcheng@swfu.edu.cn

蒋枞聰, 研究方向为大麦基因资源, E-mail: jiangcongcong@caas.cn

基金项目: 兴滇英才支持计划“青年人才”专项(YNWR-QNBJ-2019-280)

Foundation project: Xingdian Talent Support Program "Young Talents" Special Project (YNWR-QNBJ-2019-280)

representative landraces/cultivars of the barley pan-genome, the coding sequences were highly conserved while the exons or untranslated regions were detected with rich amount of variations, others are located in non-coding regions. With a co-dominant marker that captures the 305 bp fragmental duplication in genotyping of 238 Chinese barley landraces, a significant high ratio of the hooded genotype was observed amongst germplasms that collected from Tibet, providing evidence for the presumption that the hooded awn variant was originated from Himalayan area.

Key words: cultivated barley (*Hordeum vulgare* L.); awn; mutant; bulked-segregants-analysis (BSA); landrace

大麦(*Hordeum vulgare* L.)是禾本科大麦属物种,是世界上最古老的谷类作物之一,具有生育期短、早熟的特点,在全球各地均有分布。在禾本科作物中,全球大麦的种植面积和总产量仅次于玉米、小麦、水稻^[1]。随着畜牧业的发展、啤酒工业的兴盛和大麦保健品的兴起,我国对于大麦的需求量逐年增加,2015-2020年年均进口量高达726万吨,是仅次于大豆的第二大进口粮食作物^[2]。

芒是外稃或者颖片上的针状延伸,其变异类型丰富,是大麦穗部重要的光合器官,在大麦发育后期旗叶叶片衰老且光合速率随之下降,而芒仍然保持较高的光合速率^[3],可以为发育中的种子提供碳水化合物,因此芒对籽粒产量具有重要意义。芒还可在收获前防止动物采食,帮助在野外分散干燥的种子,并将萌发的种子固定在土壤中^[4-5]。此外,芒不易受环境影响,遗传稳定,不同材料间芒的有无及形状可作为区分不同品种及基因定位的重要形态学标记^[6]。

吴明霞^[7]通过统计分析大麦种质资源的相关农艺性状,证实大麦芒的长短对产量有影响。陈培元等^[8]在小麦抽穗3 d后去芒,发现粒数和粒重都有所下降;Liller等^[9]通过去芒的方法,分析芒长对籽粒宽度、长度以及千粒重的影响,证实芒长影响大麦籽粒灌浆;Rebetzke等^[5]通过构建小麦有芒、无芒的近等基因系,发现有芒品种小麦的产量明显高于无芒品种;Milner等^[10]验证大麦中的芒通过光合作用促进产量的增加,当芒缺失时,其产量显著下降。尽管芒长对谷物产量的重要性已得到广泛认可,但对芒长影响产量这种特性所涉及的基因仍然知之甚少。在小麦中,*BI*^[11-12]、*B2*^[13]、*Hd*^[10]是目前已知的芒显性抑制基因;在水稻中,许多参与调控芒形成和伸长的基因已被克隆,包括*ANI*^[14]、*AN2*^[15]、*LABAI*^[16]、*DL*^[17]、*GADI*^[18]等基因。大麦多具有丰富的芒,因此也是研究芒性状遗传以及作用机制的模式作物^[19]。Liller等^[9]检测到12个控制大麦芒长的

QTL位点,并将其中最重要的位点*AL7.1*进一步精细定位到0.9 cM的区间内,验证了*AL7.1*位点不影响株高、开花时间等性状。到目前为止,已经在小麦中克隆了*Kap1*、*lks2*、*lks5*、*trp1*等多个芒调控基因。*Kap1*基因位于4H染色体上,其突变表型为芒顶端着生1个反向的小花,这种表型又被称为钩芒^[20-21];*lks2*基因位于7H染色体长臂上,编码1个短节间(SHI, a short internodes)转录因子,对芒的长度和雌蕊形态都有影响^[22];*lks5*是1个短芒隐性自发突变,位于4H染色体,但*lks5*的表达需要隐性纯合的基因*lel2*遗传背景^[23-24];*trp1*基因被定位在4H染色体上,其突变表型为在外稃上有3个芒,在遭受热胁迫时,*trp1*表达增强^[21,25]。

大麦芒的多样性和发育调控一直是遗传研究的热点^[25],利用现代分子生物学与基因组学技术加强芒的发生、发育和功能研究,有利于更加深入挖掘芒对禾谷类作物遗传改良的理论意义和应用价值。

1 材料与方法

1.1 试验材料

2020年春季,在北京(中国农业科学院北圃场试验田)种植大麦地方品种哈铁系(HTX)及其衍生的EMS诱变群体中2000个M₃家系,各M₃家系按单行种植,每行12株,株距20 cm,行距25 cm。野生型亲本HTX作为对照,按每50行种植材料设置一行HTX对照。2020年4-5月间,调查M₃单株的表型变异情况,从中发现具有钩芒表型的突变植株2株,将其命名为T-M₃-7966;2020年6月初分单株收获。

2020年10月,将其中一个纯和钩芒突变单株的种子(M₄)种植于河南新乡(中国农业科学院作物科学研究所新乡基地),按单行种植,每行12株,株距20 cm,行距25 cm;2021年5月,收获有钩芒表型的M₄单株及其野生型M₄单株。

2021年9月,随机挑取有钩芒表型的12个M₄

单株收获的 M₅ 种子种植于中国农业科学院北圃场温室, 培养条件 18~26 °C, 光照 14 h, 黑暗 10 h, 形成 12 个 T-M₅-M7966 家系(表 1), 每家系种植 12 个 M₅ 单株, 用于调查表型分离情况。根据 M₄ 单株收获的

种子数量, 挑选出种子数充足且表型分离的 M₅ 家系 T-M₅-M7966-4 及 T-M₅-M7966-9, 于 2022 年春季种植于中国农业科学院北圃场试验田, 用于表型鉴定和基因组 DNA 混池测序分析。

表 1 钩芒突变体 T-M₅-M7966 自交衍生的 M₅ 家系表型统计

Table 1 Phenotypic segregations in each of the M₅ families which were descended from the hooded mutant T-M₅-M7966

M ₅ 家系 M ₅ Family	野生型单株数目 No. of wild-type plants	突变型单株数目 No. of hooded plants	M ₄ 单株基因型 Deduced M ₄ genotype	卡方测验 χ^2 -test
T-M ₅ -M7966-1	12	0	WT	Na
T-M ₅ -M7966-2	0	12	MT	Na
T-M ₅ -M7966-3	2	10	Het	Na
T-M ₅ -M7966-4	21	85	Het	$\chi^2_{1,3}=1.789$
T-M ₅ -M7966-5	4	8	Het	Na
T-M ₅ -M7966-6	12	0	WT	Na
T-M ₅ -M7966-7	3	9	Het	Na
T-M ₅ -M7966-8	1	11	Het	Na
T-M ₅ -M7966-9	27	76	Het	$\chi^2_{1,3}=0.051$
T-M ₅ -M7966-10	5	7	Het	Na
T-M ₅ -M7966-11	0	12	MT	Na
T-M ₅ -M7966-12	0	12	MT	Na

WT: 纯合野生型; MT: 纯合突变型; Het: 杂合型; Na: 未做测验; $\chi^2_{0.05}=3.841$

WT: Homozygous wild-type; MT: Homozygous mutant; Het: Heterozygous; Na: Not analyzed by χ^2 -test

2021 年 11 月, 在温室对野生型 HTX 和钩芒突变型纯合 M₅ 家系的单株进行正反杂交; 2022 年春季将杂交 F₁ 种子种植于中国农业科学院北圃场试验田, 用于进一步证实钩芒突变的遗传显隐性关系。

前期从国家作物种质库提取了 238 份我国不同地区来源的大麦/青稞种质资源, 于 2017 年秋季种植于中国农业科学院北圃场温室, 收集叶片样品进行 DNA 提取。

1.2 植株叶片 DNA 提取与基因片段扩增

对野生型 HTX、突变体 T-M₅-M7966、T-M₅-M7966 家系各单株以及 238 份大麦/青稞种质资源, 于幼苗期对植株叶片进行取样, 采用改进的 CTAB 提取法^[26]进行样品总 DNA 提取。利用分光光度计 NanoDrop 2000/2000c (Thermo Fisher Scientific, USA) 测定 DNA 浓度, 通过 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量。DNA 浓度调整至 25 ng/ μ L 作为 DNA 聚合酶链式反应 (PCR) 的模板。用于 Sanger 测序的基因片段采用 Phanta[®] Max Super-Fidelity DNA Polymerase 试剂盒 (南京诺唯赞生物科技) 进行扩增, PCR 扩增反应体系 25 μ L, 包含 2 \times Phanta Max Buffer 12.5 μ L, Dntp Mix 0.5 μ L, 10 μ mol/L 特异引

物各 0.5 μ L, Phanta[®] Max Super-Fidelity DNA Polymerase 0.5 μ L, DNA 模板 1 μ L, ddH₂O 7.5 μ L。基因片段长度多态性检测采用 2 \times Rapid Taq Master Mix 试剂 (南京诺唯赞生物科技) 进行扩增, PCR 扩增反应体系 10 μ L, 包含 2 \times Taq Master Mix 5 μ L, 10 μ mol/L 特异引物各 0.2 μ L, DNA 模板 1 μ L, ddH₂O 3.6 μ L。扩增程序为 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 15 s; 退火温度 60 °C; 72 °C 延伸 90 s; 35 个循环; 72 °C 延伸 5 min; 4 °C 保存。使用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测片段大小, 目的基因的片段扩增引物详见表 2。

1.3 分离单株混合池测序与关联位点分析

对符合单基因分离比例的 T-M₅-M7966 家系, 将野生型与钩芒突变型单株提取 DNA, 将单株 DNA 样品进行等量 (各单株取 DNA 2 μ g) 混合, 形成野生型与突变型两个分离单株混合池。分别提取野生型纯合家系 T-M₅-M7966-1 和钩芒突变型纯合家系 T-M₅-M7966-12 中一个单株的总 DNA 作为分离群体的双亲样品。对总 DNA 样品进行全基因组重测序文库构建, 并利用华大基因 T7 二代测序技术平台进行测序。亲本样品每个测序数据量为 40 Gb, 分离单株混合池样品每个测序数据量为 150 Gb。

表2 钩芒调控基因 *HvKNOX3* 的片段扩增引物Table 2 Primers used for amplifying fragments of the gene *HvKNOX3*

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence (5'-3')	退火温度(°C) T _m	产物大小(bp) Product size	用途 Purpose
KNOX3-F1-2	TCACCTCAAGCTCAATCCGTC	59.95	1365	覆盖CDS1-3的片段扩增
KNOX3-R1	ATGTGGATGCAGGCACAATC	58.65		
KNOX3-F2-2	TCACTTCGCACAGCTGCAGT	59.93	1034	覆盖CDS4-5的片段扩增
KNOX3-R2	ATGCACGTAGCAAGGCATG	57.67		
KNX-F1	AAAGGAGCTCCCTCAGACACAG	60.11	1720	基因全长DNA分段测序
KNX-R1	AGGAATGCCGCGACATTAGA	60.65		
KNX-F2	TGTGAAATTTCTGGGTCCG	60.53	2143(野生型)/2448(钩芒)	
KNOX3-IN3-R2	TGAAAGAATGCATGCAACGA	58.27		
KNOX3-IN3-F1	GCATAGATAGGGTCAGACGTGTG	59.03	2238(野生型)/2543(钩芒)	
KNX-R3	ATGCCACAGGAGTCACATCA	56.20		
KNX-F4	TGAAACCAGGAAGTTTGATG	57.57	1972	
KNX-R4	TGAGGAAAGAAGGGATGTGG	57.19		
KNX-F5	CCACACACCTTAGGCTCTCC	56.89	1574	
KNX-R5	AGCAGTTTAGCACGCATGAA	57.02		
KNOX3-IN3-F1	GCATAGATAGGGTCAGACGTGTG	59.03	1226(野生型)/1531(钩芒)	共显性标记,检测305 bp插入片段
KNOX3-IN3-R2	TGAAAGAATGCATGCAACGA	58.27		

将测序原始数据下载至本地服务器,使用 fastp (v0.20.1)软件^[27]去除接头序列、并去除 $Q < 20$ 的低质量 reads 后,采用 bwa-mem2 (v.2.2.1)软件^[28]将保留的 reads 比对到大麦 MorexV3 版参考基因组上^[29]。使用 samtools (v1.10)软件^[30]将比对结果排序、去除重复 reads。采用 GATK4 (v4.2.6.1)软件的 HaplotypeCaller 功能^[31]对各样品中的高质量 reads 进行变异位点鉴定,之后按照如下标准进行 SNP 过滤:(1)仅保留双等位变异位点;(2)仅保留双亲样本间有变异、且均为纯合型位点;(3)双亲样本仅保留 $2 \leq \text{reads 覆盖度} \leq 100$ 的变异位点,混池样本仅保留 $3 \leq \text{reads 覆盖度} \leq 300$ 的变异位点。

对过滤后获得的所有 SNP 位点,利用 QTLseq (v2.2.3)软件^[32]统计各样品在各位点上的突变型 (Alt)等位基因频率 (Allele frequency),然后利用 R 软件包的 ggplot2 程序^[33]将两个混池样品中的等位基因频率按照 3 Mb 窗口与 1 Mb 步长的间距绘制出拟合曲线图。

1.4 基因序列变异分析

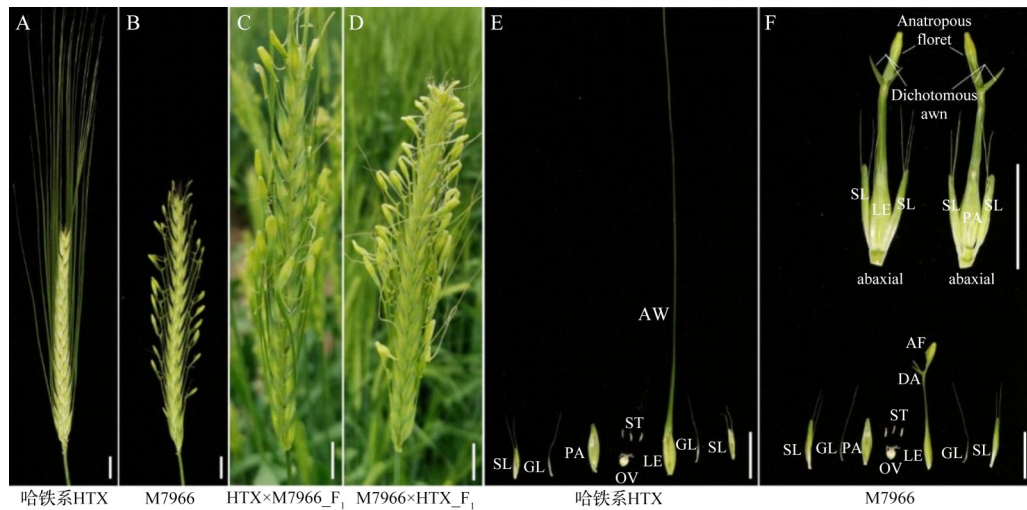
从大麦泛基因组序列^[34]信息中提取20个代表性品

种的 *HvKNOX3* 基因全长序列,将目标基因序列导入 MEGA v. 7.0.26 软件(<https://www.megasoftware.net>)进行序列比对,并导出比对后的多序列 FASTA 文件;将多序列 FASTA 文件导入 DNASP v.5.1 软件(<http://www.ub.edu/dnasp/>)提取其中所有变异位点。

2 结果与分析

2.1 钩芒突变体 T-M₃-M7966 的鉴定与遗传分析

前期以大麦地方品种哈铁系 (HTX) 为 EMS 诱变亲本,创制了一个突变群体^[35]。对该群体 M₃ 代家系进行田间种植与表型变异调查发现,在 M₃-M7966 家系的 12 个 M₃ 单株中,有 2 株表现出钩芒表型的突变植株,于是将其命名为 T-M₃-M7966 (图 1)。野生型 HTX 为长直芒,平均芒长约 10 cm;钩芒突变体的芒,在外稃上延伸约 1 cm 长之后,末端形成一个倒生的小花 (Anatropous floret),并且在与原始的芒交接处出现二叉状的短芒 (Dichotomous awn) (图 1F)。突变体与野生型相比,穗长、穗密度、小花内其他花器官结构、籽粒大小均无显著变化。



A: 野生型 HTX 的整穗; B: T-M₅-M7966-12 家系中纯合钩芒突变体的整穗; C: HTX 与 T-M₅-M7966-12 杂交 F₁ 植株的整穗; D: T-M₅-M7966-12 与 HTX 杂交 F₁ 植株的整穗; E: 野生型 HTX 单个小穗的结构解剖; F: 纯合钩芒突变体单个小穗的结构解剖(下方)与其背、腹面整体形态(上方)。SL: 不育侧生小穗; GL: 外颖; PA: 内颖; LE: 外稃; AW: 芒; ST: 雄蕊; OV: 雌蕊; AF: 倒生小花; DA: 二叉状芒; 图中标尺为 1 cm
A: Spike of the wild-type HTX; B: Spike of the hooded mutant identified from homozygous T-M₅-M7966-12 family; C: Spike of the F₁ plant generated from HTX×T-M₅-M7966-12 hybridization; D: Spike of the F₁ plant generated from T-M₅-M7966-12×HTX hybridization; E: Dissection of the floret organs in wild-type HTX; F: Dissection of the floret organs in hooded mutant (lower), and the intact spikelet (upper). SL: Sterile lateral floret; GL: Glume; PA: Palea; LE: Lemma; AW: Awn; ST: Stamen; OV: Ovary; AF: Anapropous floret; DA: Dichotomous awn;
Bar = 1 cm

图 1 野生型 HTX 与钩芒突变体的整穗与单个小穗形态对比

Fig. 1 The spike and spikelet morphology of the wild-type HTX and the hooded mutant

鉴于 EMS 突变体多为功能丢失型隐性突变, M₃-M7966 家系 12 株 M₃ 植株中仅 2 株表现为钩芒突变表型, 因此将 T-M₃-M7966 钩芒单株作为纯合突变体分别收获其种子。种植 12 株 M₄ 单株进行表型观察发现, M₄-M7966 家系内表型分离, 其中 2 株为野生型(长直芒)、10 株为钩芒, 因此推测该钩芒表型为显性遗传。对 12 株 M₄ 单株分别收获种子, 由此衍生 12 个 M₅ 家系, 每个 M₅ 家系各种植 12 株, 用于推导 M₄ 单株基因型及突变的显隐性遗传关系。结果发现, 其中 2 个家系为野生型、3 个家系为突变型、7 个家系出现表型分离(表 1)。此外, 将野生型 HTX 与纯合突变型 M₅ 单株进行杂交创制 F₁ 杂合植株。正反交获得的 F₁ 植株穗部小花均为钩芒, 但与纯合突变体的钩芒表型不完全相同: F₁ 植株的钩芒结构在倒生小花的外稃末端延伸出长约 3 cm 软质的芒(图 1C、D)。以上结果证实, T-M₃-M7966 的钩芒表型为显性遗传。

2.2 钩芒表型突变基因的遗传定位

为了对 T-M₃-M7966 携带的钩芒突变基因进行遗传定位, 挑选了两个 M₅ 分离家系 T-M₅-M7966-4 和 T-M₅-M7966-9, 扩大单株样本数量种植于大田条件下。两个家系内的野生型与钩芒突变型植株的分离比例均符合 1:3(表 1), 说明该钩芒表型由单一

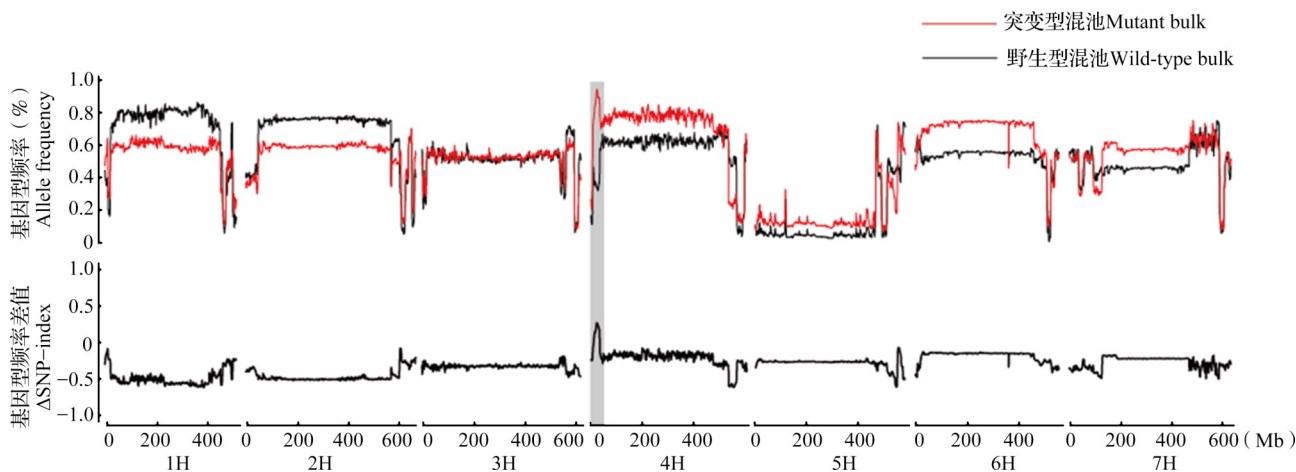
基因位点决定。选择 T-M₅-M7966-9 家系中的 27 个野生型单株和 30 个钩芒突变型单株分别构建分离混合池, 采用纯合野生型家系 T-M₅-M7966-1、纯合突变型家系 T-M₅-M7966-12 中的单株分别作为双亲, 进行全基因组重测序。经过测序序列比对、SNP 鉴定与 SNP 过滤后, 在双亲样本间共检测到 5, 850, 607 个 SNP 位点。分析两个混池样本中各个 SNP 位点的突变型基因频率, 在大麦 4H 染色体前端 19.9~30.4 Mb 区间内检测到一个显著关联位点, 将其命名为 *HOOD*^{M7966}; 其中 SNP 位点在钩芒混池中的突变基因型频率显著偏高, 在野生型混池中则反向偏离, 两个混池样品间的突变基因型频率差值显著高于随机分离情况(图 2)。

2.3 钩芒基因 *HvKNOX3* 的克隆

早期报道的大麦钩芒决定基因 *HvKNOX3* (*HORVU.MOREX.r3.4HG0339120*)^[20] 染色体物理位置为 chr4H: 24, 234, 352~24, 242, 112, 与关联位点 *HOOD*^{M7966} 的物理位置重叠, 由此推测 T-M₅-M7966 的钩芒表型由该基因变异引起。 *HvKNOX3* 基因全长序列为 7, 761 bp, 包含 6 个外显子(一段 5' UTR 区和 5 段编码区)和 5 个内含子(图 3A), 其中 CDS 序列总长 1, 095 bp, 编码 364 个氨基酸; 第 4 个内含子长达 5, 662 bp, 含有多个与 *HvKNOX3* 基因转录水

平相关的顺式作用元件^[36]。通过 Sanger 测序和序列对比结果显示,在该基因的 CDS 区域野生型 HTX 与钩芒突变体之间无碱基变异,在非编码区域具有 28 处序列变异,分别位于 5'-UTR, 3'-UTR 和多个

内含子中。其中,在 T-M₃-M7966 钩芒突变体中,该基因第 4 个内含子中存在一处 305 bp 的序列插入(图 3A),该序列变异在前人研究中被证实可以导致钩芒突变表型^[20]。



上部为野生型单株混池与钩芒单株混池中全基因组 SNP 位点上的突变型基因频率拟合曲线;下部为各 SNP 位点上突变型基因频率在两个混池中的差值拟合曲线;灰色长框表示显著关联位点

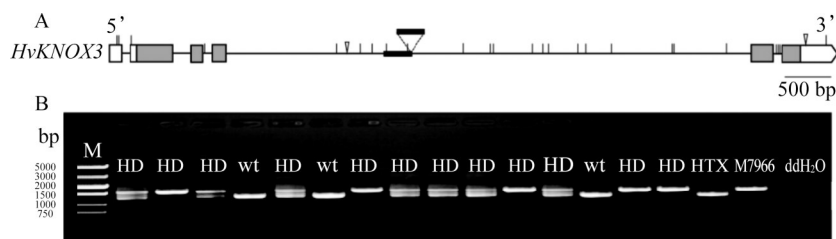
The upper panel shows fitted curve of mutant allele frequency at each SNP in the wild-type bulk and the mutant bulk, respectively; The lower panel shows fitted curve of differences on mutant allele frequency at each SNP between the two bulks; Grey long frame indicate significant association sites

图 2 通过分离单株混池测序分析鉴定到钩芒突变基因位点 *HOOD*^{M7966}

Fig. 2 The locus *HOOD*^{M7966} that determines hooded mutant was genetically mapped through bulked-segregants analysis

为进一步证实 *HvKNOX3* 基因第 4 内含子中的 305 bp 序列插入与钩芒突变表型的关联,针对该片段设计了特异性扩增引物(表 2),对 T-M₅-M7966-4 和 T-M₅-M7966-9 两个 M₅ 分离家系总计 209 个单株进

行了基因型鉴定。结果显示,野生型均不含 305 bp 序列插入,钩芒突变型均含有杂合或纯合的 305 bp 序列插入,证实此处序列变异与钩芒突变表型共分离(图 3B)。



M: AL 5000 DNA Marker; A: *HvKNOX3* 基因结构,白色区段为非翻译区(UTR),灰色区段为编码区(CDS),区段间水平线为内含子区域。黑色垂直短线段表示 HTX 与突变体 M7966 之间的单核苷酸变异(SNP)位点,三角形表示序列插入/缺失变异,中间第 4 内含子上的粗体水平线段表示一处 305 bp 片段的原位串联重复;B: 利用包含 305 bp 重复的特异性扩增片段对 M₅ 分离家系进行基因分型检测, HD: 钩芒表型; wt: 直芒表型

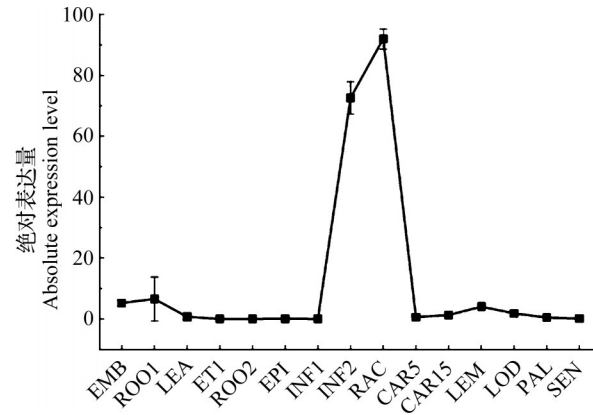
A: *HvKNOX3* gene model, white blocks represent the untranslated regions (UTR), gray blocks represent the coding sequences (CDS), and the lines between blocks represent the intron regions. The vertical sticks indicate single nucleotide variations (SNP) between the wild-type HTX and the mutant M7966, the triangles indicate oligo insertion/deletion (In/Del), the bold horizontal bar indicate a 305 bp local duplication at the fourth intron; B: A co-dominant molecular marker targeting the 305 bp duplication was developed for genotyping of the M₅ segregated families; HD: hooded phenotype; wt: Normal phenotype

图 3 大麦钩芒控制基因 *HvKNOX3* 的结构与变异位点

Fig. 3 Model and variations of the gene *HvKNOX3* that controls the hooded mutation

从 BARLEX(<https://webblast.ipk-gatersleben.de/>) 数据库中检索了 *HvKNOX3* (*HORVU.MOREX.r3.4HG0339120*) 基因的组织时空表达情况,发现该基

因在发育早期 1~1.5cm 长的幼穗及播种后 35 d 的穗轴中特异性表达(图 4)。



EMB:授粉后4 d的幼胚;ROO1:10 cm高幼苗的根系;LEA:10 cm高幼苗的叶片;ETI:播种后10 d的白化幼苗(黑暗条件培养);ROO2:播种后28 d的植株根系;EPI:播种后28 d的叶脉;INF1:发育至5 mm长的幼穗;INF2:发育至1~1.5 cm长的幼穗;RAC:播种后35 d的穗轴;CAR5:授粉后5 d的籽粒;CAR15:授粉后15 d的籽粒;LEM:播种后42 d的外稃;LOD:播种后42 d的子房;PAL:播种后42 d的内稃;SEN:播种后56 d的衰老叶片

EMB: 4 days embryos; ROO1: Roots from seedlings (10 cm shoot stage); LEA: Leaves from seedlings (10 cm shoot stage); ETI: Etiolated seedling, dark cond (10 days safter planting); ROO2: Roots (28 days after planting); EPI: Epidermal strips (28 days after planting); INF1: Young developing inflorescences (5 mm); INF2: Developing inflorescences (1-1.5 cm); RAC: Inflorescences, rachis (35 days after planting); CAR5: Developing grain (5 days after pollination); CAR15: Developing grain (15 days after pollination); LEM: Inflorescences, lemma (42 days after pollination); LOD: Inflorescences, lodicule (42 days after pollination); PAL: Dissected inflorescences, palea (42 days after pollination); SEN: Senescing leaves (56 days after pollination)

图4 *HvKNOX3*在大麦全生育期的时空表达模式

Fig. 4 The expression pattern of *HvKNOX3* along barley growth and development

2.4 钩芒基因 *HvKNOX3* 的群体演化分析

为研究 *HvKNOX3* 基因在自然群体中的序列变异,从大麦泛基因组^[34]序列信息中提取了20个代表性品种的 *HvKNOX3* 基因全长序列。通过多序列比对分析,发现48处序列变异,其中仅2处单核苷酸变异位于外显子区域、可导致编码氨基酸替换,其余序列变异均位于非编码区域。前人推测大麦的钩芒表型起源于喜马拉雅地区^[20]。因此,本研究从

国家作物种质库中随机挑取了155份来源于西藏和83份来源于江苏或浙江的大麦/青稞地方品种,采用 *HvKNOX3* 第4内含子中305 bp片段插入的共显性标记进行基因分型。检测结果发现,155份西藏来源的地方品种中有16份含有305 bp片段重复,比例约占10%;83份江苏/浙江来源的地方品种中仅1份含有该片段重复(表3)。

表3 *HvKNOX3* 基因第4内含子中305 bp片段重复在我国西藏与江苏/浙江大麦地方品种中的分布情况

Table 3 Distribution of the 305 bp fragment insertion at the intron 4 of *HvKNOX3* amongst the Chinese barley landraces that collected from Tibet or Jiangsu/Zhejiang areas

编号 ID	KNOX3_ 305 bp片 段重复 KNOX3_ 305 bp duplication	编号 ID	KNOX3_ 305 bp片 段重复 KNOX3_ 305 bp duplication	编号 ID	KNOX3_ 305 bp片 段重复 KNOX3_ 305 bp duplication	编号 ID	KNOX3_ 305 bp片 段重复 KNOX3_ 305 bp duplication
pZDM01881 (JS)	-	pZDM03083 (ZJ)	-	pZDM05742 (TB)	-	pZDM06702 (TB)	+
pZDM01882 (JS)	-	pZDM03122 (ZJ)	-	pZDM05781 (TB)	-	pZDM06703 (TB)	+
pZDM01883 (JS)	-	pZDM03123 (ZJ)	-	pZDM05782 (TB)	-	pZDM06741 (TB)	+
pZDM01921 (JS)	-	pZDM03161 (ZJ)	-	pZDM05783 (TB)	-	pZDM06742 (TB)	-
pZDM01922 (JS)	-	pZDM03162 (ZJ)	-	pZDM05821 (TB)	-	pZDM06743 (TB)	-
pZDM01923 (JS)	-	pZDM03163 (ZJ)	-	pZDM05823 (TB)	-	pZDM06781 (TB)	-
pZDM01961 (JS)	-	pZDM03201 (ZJ)	-	pZDM05861 (TB)	-	pZDM06782 (TB)	-

表3 (续)

编号 ID	KNOX3_ 305 bp 片 段重复 KNOX3_ 305 bp duplication	编号 ID	KNOX3_ 305 bp 片 段重复 KNOX3_ 305 bp duplication	编号 ID	KNOX3_ 305 bp 片 段重复 KNOX3_ 305 bp duplication	编号 ID	KNOX3_ 305 bp 片 段重复 KNOX3_ 305 bp duplication
pZDM01962 (JS)	-	pZDM03202 (ZJ)	-	pZDM05862 (TB)	-	pZDM06783 (TB)	-
pZDM01963 (JS)	-	pZDM03203 (ZJ)	-	pZDM05863 (TB)	-	pZDM06821 (TB)	-
pZDM02001 (JS)	-	pZDM03241 (ZJ)	-	pZDM05902 (TB)	-	pZDM06861 (TB)	+
pZDM02002 (JS)	-	pZDM03242 (ZJ)	-	pZDM05903 (TB)	-	pZDM06862 (TB)	-
pZDM02003 (JS)	-	pZDM03243 (ZJ)	-	pZDM05941 (TB)	-	pZDM06863 (TB)	+
pZDM02041 (JS)	-	pZDM03281 (ZJ)	-	pZDM05942 (TB)	-	pZDM06901 (TB)	-
pZDM02042 (JS)	-	pZDM03282 (ZJ)	-	pZDM05943 (TB)	-	pZDM06902 (TB)	-
pZDM02081 (JS)	-	pZDM03283 (ZJ)	-	pZDM05981 (TB)	-	pZDM06942 (TB)	-
pZDM02082 (JS)	-	pZDM03321 (ZJ)	-	pZDM05982 (TB)	-	pZDM07021 (TB)	-
pZDM02083 (JS)	-	pZDM03322 (ZJ)	-	pZDM05983 (TB)	-	pZDM07022 (TB)	+
pZDM02121 (JS)	-	pZDM03323 (ZJ)	-	pZDM06022 (TB)	-	pZDM07062 (TB)	+
pZDM02122 (JS)	-	pZDM03361 (ZJ)	-	pZDM06023 (TB)	-	pZDM07101 (TB)	-
pZDM02123 (JS)	-	pZDM04402 (TB)	-	pZDM06061 (TB)	-	pZDM07143 (TB)	-
pZDM02202 (JS)	-	pZDM04441 (TB)	-	pZDM06062 (TB)	-	pZDM07183 (TB)	-
pZDM02241 (JS)	-	pZDM04443 (TB)	-	pZDM06063 (TB)	-	pZDM07221 (TB)	-
pZDM02281 (JS)	-	pZDM04482 (TB)	-	pZDM06101 (TB)	-	pZDM07223 (TB)	-
pZDM02282 (JS)	-	pZDM04483 (TB)	-	pZDM06102 (TB)	+	pZDM07261 (TB)	-
pZDM02361 (JS)	-	pZDM04521 (TB)	-	pZDM06103 (TB)	+	pZDM07263 (TB)	-
pZDM02362 (JS)	-	pZDM04523 (TB)	+	pZDM06142 (TB)	-	pZDM07303 (TB)	-
pZDM02363 (JS)	-	pZDM04561 (TB)	-	pZDM06143 (TB)	-	pZDM07343 (TB)	-
pZDM02441 (JS)	-	pZDM04562 (TB)	-	pZDM06182 (TB)	+	pZDM07381 (TB)	-
pZDM02442 (JS)	-	pZDM04563 (TB)	+	pZDM06183 (TB)	-	pZDM07383 (TB)	-
pZDM02681 (ZJ)	-	pZDM04641 (TB)	-	pZDM06221 (TB)	-	pZDM07421 (TB)	-
pZDM02682 (ZJ)	-	pZDM04643 (TB)	-	pZDM06222 (TB)	-	pZDM07422 (TB)	-
pZDM02683 (ZJ)	-	pZDM04682 (TB)	-	pZDM06223 (TB)	-	pZDM07423 (TB)	-
pZDM02721 (ZJ)	-	pZDM04683 (TB)	-	pZDM06261 (TB)	+	pZDM07461 (TB)	-
pZDM02722 (ZJ)	-	pZDM04721 (TB)	-	pZDM06262 (TB)	-	pZDM07463 (TB)	-
pZDM02723 (ZJ)	-	pZDM04722 (TB)	-	pZDM06263 (TB)	-	pZDM07501 (TB)	-
pZDM02761 (ZJ)	-	pZDM04882 (TB)	-	pZDM06301 (TB)	-	pZDM07502 (TB)	-
pZDM02762 (ZJ)	-	pZDM05103 (TB)	-	pZDM06302 (TB)	-	pZDM07503 (TB)	-
pZDM02763 (ZJ)	-	pZDM05141 (TB)	-	pZDM06303 (TB)	-	pZDM07541 (TB)	-
pZDM02801 (ZJ)	-	pZDM05142 (TB)	-	pZDM06341 (TB)	-	pZDM07542 (TB)	-
pZDM02802 (ZJ)	-	pZDM05143 (TB)	-	pZDM06342 (TB)	-	pZDM07543 (TB)	-
pZDM02803 (ZJ)	-	pZDM05181 (TB)	-	pZDM06343 (TB)	-	pZDM07581 (TB)	-
pZDM02841 (ZJ)	-	pZDM05182 (TB)	-	pZDM06381 (TB)	-	pZDM07582 (TB)	-

表 3 (续)

编号 ID	KNOX3_ 305 bp 片 段重复 KNOX3_ 305 bp duplication	编号 ID	KNOX3_ 305 bp 片 段重复 KNOX3_ 305 bp duplication	编号 ID	KNOX3_ 305 bp 片 段重复 KNOX3_ 305 bp duplication	编号 ID	KNOX3_ 305 bp 片 段重复 KNOX3_ 305 bp duplication
pZDM02842 (ZJ)	-	pZDM05183 (TB)	-	pZDM06382 (TB)	-	pZDM07583 (TB)	-
pZDM02843 (ZJ)	-	pZDM05461 (TB)	-	pZDM06383 (TB)	-	pZDM07623 (TB)	-
pZDM02881 (ZJ)	-	pZDM05462 (TB)	-	pZDM06421 (TB)	-	pZDM07661 (TB)	-
pZDM02882 (ZJ)	-	pZDM05463 (TB)	-	pZDM06422 (TB)	+	pZDM07662 (TB)	-
pZDM02883 (ZJ)	-	pZDM05501 (TB)	-	pZDM06423 (TB)	-	pZDM07701 (TB)	-
pZDM02921 (ZJ)	-	pZDM05502 (TB)	-	pZDM06461 (TB)	-	pZDM07702 (TB)	-
pZDM02922 (ZJ)	-	pZDM05503 (TB)	-	pZDM06462 (TB)	-	pZDM07703 (TB)	-
pZDM02923 (ZJ)	-	pZDM05541 (TB)	-	pZDM06463 (TB)	-	pZDM07741 (TB)	-
pZDM02961 (ZJ)	-	pZDM05543 (TB)	-	pZDM06501 (TB)	-	pZDM07742 (TB)	-
pZDM02962 (ZJ)	-	pZDM05582 (TB)	-	pZDM06541 (TB)	-	pZDM08381 (TB)	-
pZDM02963 (ZJ)	-	pZDM05583 (TB)	-	pZDM06543 (TB)	-	pZDM08382 (TB)	-
pZDM03001 (ZJ)	-	pZDM05622 (TB)	+	pZDM06581 (TB)	-	pZDM08383 (TB)	-
pZDM03002 (ZJ)	-	pZDM05661 (TB)	-	pZDM06583 (TB)	-	pZDM08503 (JS)	-
pZDM03003 (ZJ)	-	pZDM05662 (TB)	-	pZDM06621 (TB)	-	pZDM08623 (JS)	-
pZDM03041 (ZJ)	-	pZDM05663 (TB)	-	pZDM06622 (TB)	-	pZDM08662 (JS)	-
pZDM03042 (ZJ)	-	pZDM05701 (TB)	-	pZDM06662 (TB)	-	pZDM08663 (JS)	-
pZDM03081 (ZJ)	-	pZDM05702 (TB)	-	pZDM06663 (TB)	-		
pZDM03082 (ZJ)	+	pZDM05703 (TB)	-	pZDM06701 (TB)	+		

括号内字母代表种植资源的地区来源, JS 表示江苏, ZJ 表示浙江, TB 表示西藏; + 表示有 305 bp 片段插入, - 表示无 305 bp 片段插入

The letters in brackets represent the regional source of planting resources, JS indicates Jiangsu, ZJ indicates Zhejiang, and TB indicates Tibet; + indicates that there has 305 bp fragment inserted, - means that there has not been inserted with the 305 bp fragment

3 讨论

栽培大麦自然群体中存在丰富的芒形态变异, 例如有芒与无芒、长芒与短芒、直芒与钩芒, 还有多芒、卷芒、叶状芒等^[25]。芒在植株防御、籽粒光合产物积累、籽粒的传播和再萌发过程中发挥重要的作用, 持续探究芒的发育调控与形态建成具有重要的生物学意义。本研究通过对一个钩芒突变体 M7966 开展遗传分析与基因定位, 证实钩芒表型由基因 *HvKNOX3* 内含子区域的一处 305 bp 序列插入引起。钩芒突变体 M7966 是在一个 EMS 诱变群体的 M₃ 家系中发现, 然而对野生型亲本 HTX 和钩芒突变体 M7966 的 *HvKNOX3* 基因进行测序发现, 二者间存在 28 处核苷酸变异, 其中包括一处 305 bp 序列插入, 这显然不是由 EMS 诱变造成的结果。因此

推测该钩芒突变体是由于前期种植试验中 HTX 诱变群体中的个别植株接收了来自周围钩芒品种的花粉污染而导致。尽管栽培大麦是自花授粉作物, 但是诱变群体往往具有较高的不育及小花开颖频率, 因此其异交频率会高于自然群体。

前期研究已经证实 *HvKNOX3* 基因是大麦钩芒突变体的决定因子, 但其在自然群体中的核苷酸序列变异情况并不清楚。本研究从已发表的数据信息中提取了大麦泛基因组 20 个代表性地方品种的 *HvKNOX3* 全长序列进行比较分析。这 20 个大麦地方品种地理来源广泛、遗传距离远, 可以反应全球大麦资源的遗传变异范围^[34]。 *HvKNOX3* 基因的编码序列高度保守, 但是其非编码区序列则存在大量单核苷酸或寡核苷酸变异。前人研究发现 *HvKNOX3* 第 4 个内含子 (5, 662 bp) 中含有多个与

基因自身转录水平相关的顺式作用元件^[36];这一区域内大量的序列变异是否具有精密调控基因自身表达水平的功能有待深入研究。*HvKNOX3*是homeobox类转录因子^[20],它的作用模式中可能存在剂量效应,由此导致纯合突变型与杂合型在钩芒表型的程度上有所不同,如钩芒突变体M7966与野生型HTX正反杂交产生的F₁植株虽然也表现为钩芒,但在钩芒倒生小花的外稃上会衍生出2~3 cm长的软芒。

前人基于少数资源的鉴定结果推测,钩芒突变起源于喜马拉雅地区^[20]。中国国家作物种质库保存了约1.5万份我国的大麦/青稞种质资源,其中来自西藏地区的资源接近半数,来自东部传统的大麦种植区域江苏与浙江地区的资源数目也位居前列。本研究从中随机挑取了155份西藏来源的、83份江苏或浙江来源的代表性大麦/青稞地方品种,发现*HvKNOX3*基因内含子中305 bp序列插入在西藏自然群体中比例达10%,远高于其他地区,由此为前人对钩芒变异的起源推测提供了证据。

参考文献

- [1] Jenkins G, 顾千若, 译. 大麦(综述). 麦类作物学报, 1986(2): 27-30
Jenkins G, Gu Q R (translated). Barley (Review). Journal of Triticeae Crops, 1986(2): 27-30
- [2] 孙致陆, 李先德. 大麦进口对我国大麦产业的影响与应对措施. 中国食物与营养, 2015, 21(7): 50-54
Sun Z L, Li X D. Influence of import of barley on Chinese barley industry and countermeasures. Chinese Food and Nutrition, 2015, 21(7): 50-54
- [3] 王忠, 顾蕴洁, 高煜殊. 麦芒的结构及其光合特性. 作物学报, 1993, 35(12): 921-928
Wang Z, Gu W J, Gao Y Z. Structure and photosynthetic characteristics of wheat awn. Acta Agronomica Sinica, 1993, 35(12): 921-928
- [4] Guo Z, Schnurusch T. Costs and benefits of awns. Journal of Experimental Botany, 2016, 67(9): 2533-2535
- [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): erw081
- [6] Qureshi N, Bariana H S, Zhang P, McIntosh R, Bansal U K, Wong D, Hayden M J, Dubcovsky J, Shankar M. Genetic relationship of stripe rust resistance genes *Yr34* and *Yr48* in wheat and identification of linked KASP markers. Plant Disease, 2018, 102(2): 413-420
- [7] 吴明霞. 大麦芒的多样性和遗传基础及其与产量性状的关系. 福州: 福建农林大学, 2019
- [8] 陈培元, 李英. 小麦芒的功能及去芒对籽粒重的影响. 作物学报, 1981, 7(4): 279-282
Chen P Y, Li Y. The effect of wheat awns on grain weight and their physiological function. Acta Agronomica Sinica, 1981, 7(4): 279-282
- [9] Liller C B, Walla A, Boer M P, Hedley P, Macaulay M, Effgen S, von Korff M, van Esse G W, Koornneef M. Fine mapping of a major QTL for awn length in barley using a multiparent mapping population. Theoretical and Applied Genetics, 2017, 130(2): 269-281
- [10] Milner S G, Jost M, Taketa S, Mazón E R, Himmelbach A, Oppermann M, Weise S, Knüpfner H, Basterrechea M, König P, Schüler D, Sharma R, Pasam R K, Rutten T, Guo G, Xu D, Zhang J, Herren G, Müller T, Krattinger S G, Keller B, Jiang Y, González M Y, Zhao Y, Habekuß A, Färber S, Ordon F, Lange M, Börner A, Graner A, Reif J C, Scholz U, Mascher M, Stein N. Genebank genomics highlights the diversity of a global barley collection. Nature Genetics, 2019, 51(2): 319-326
- [11] Huang D, Zheng Q, Melchkart 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
- [12] 耿君佑, 陈建辉, 董中东, 任妍, 张宁, 孙丛苇, 陈锋, 赵磊. 小麦芒性基因的定位与候选基因分析. 植物遗传资源学报, 2021, 22(4): 1090-1098
Geng J Y, Chen J H, Dong Z D, Ren Y, Zhang N, Sun C W, Chen F, Zhao L. Mapping and candidate gene analysis of awn type in common wheat. Journal of Plant Genetic Resources, 2021, 22(4): 1090-1098
- [13] 金迪, 王冬至, 王焕雪. 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): 84-89
Jin D, Wang D Z, Wang H X. Fine mapping and candidate gene analysis of awn inhibiting gene *B2* in common wheat. Acta Agronomica Sinica, 2019, 45(6): 84-89
- [14] Luo J, Liu H, Zhou T, Gu B, Huang X, Shangguan 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
- [15] Gu B, Zhou T, Luo J, Liu H, Wang Y, Shangguan 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
- [16] 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
- [17] Yamaguchi T, Nagasawa N, Kawasaki S, Matsuoka M, Nagato Y, Hirano H Y. The *YABBY* gene *DROOPING LEAF* regulates carpel specification and midrib development in *Oryza sativa*. *Plant Cell*, 2004, 16(2): 500-509
- [18] 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
- [19] Thirulogachandar V, Schnurbusch T. 'Spikelet stop' determines the maximum yield potential stage in barley. *Journal of Experimental Botany*, 2021, 72(22): 7743-7753
- [20] Müller K J, Romano N, Gerstner O, Garcia-Maroto 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
- [21] Pozzi C, di Pietro D, Halas G, Roig C, Salamini F. Integration of a barley (*Hordeum vulgare*) molecular linkage map with the position of genetic loci hosting 29 developmental mutants. *Heredity*, 2003, 90(5): 390-396
- [22] Yuo T, Yamashita Y, Kanamori H, Matsumoto T, Lundqvist U, Sato K, Ichii M, Jobling SA, Taketa S. A SHORT INTERNODES (SHI) family transcription factor gene regulates awn elongation and pistil morphology in barley. *Journal of Experimental Botany*, 2012, 62(14): 5223-5232
- [23] Taketa S, Takahisa Y, Yuki S, Shoko M, Masahiko I. Molecular mapping of the short awn 2 (*lks2*) and dense spike 1 (*dsp1*) genes on barley chromosome 7H. *Breeding Science*, 2011, 61: 80-85
- [24] Rossini L, Vecchietti A, Nicoloso L, Stein N, Franzago S, Salamini F, Pozzi C. Candidate genes for barley mutants involved in plant architecture: An in silico approach. *Theoretical and Applied Genetics*, 2006, 112(6): 1073-1085
- [25] Huang B, Wu W, Hong Z. Genetic loci underlying awn morphology in barley. *Genes*, 2021, 12(10): 1613
- [26] Yang P, Perovic D, Habekuss A, Zhou R, Graner A, Ordon F, Stein N. Gene-based high-density mapping of the gene *rym7* conferring resistance to barley mild mosaic virus (BaMMV). *Molecular Breeding*, 2013, 22(2): 532-539
- [27] Chen S, Zhou Y, Chen Y, Gu J. An ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics*, 2018, 34: 884-890
- [28] Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*, 2009, 25(14): 1754-1760
- [29] Mascher M, Wicker T, Jenkins J, Plott C, Lux T, Koh C S, Ens J, Gundlach H, Boston L B, Tulpová Z, Holden S, Hernández-Pinzón I, Scholz U, Mayer K F X, Spannagl M, Pozniak C J, Sharpe A G, Šimková H, Moscou M J, Grimwood J, Schmutz J, Stein N. Long-read sequence assembly: A technical evaluation in barley. *Plant Cell*, 2021, 33(6): 1888-1906
- [30] Danecek P, Bonfield J K, Liddle J, Marshall J, Ohan V, Pollard M O, Whitwham A, Keane T, McCarthy S A, Davies R M, Li H. Twelve years of SAMtools and BCFtools. *GigaScience*, 2021, 10(2): giab008
- [31] Li H. A statistical framework for SNP calling, mutation discovery, association mapping and population genetical parameter estimation from sequencing data. *Bioinformatics*, 2011, 27(21): 2987-2993
- [32] Sugihara Y, Young L, Yaegashi H, Natsume S, Shea D J, Takagi H, Booker H, Innan H, Terauchi R, Abe A. High-performance pipeline for MutMap and QTL-seq. *PeerJ*, 2019, 10: e13170
- [33] Ito K, Murphy D. Application of ggplot2 to pharmacometric graphics. *American Society for Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 2013, 2(10): e79
- [34] Jayakodi M, Padmarasu S, Haberer G, Bonthala V S, Gundlach H, Monat C, Lux T, Kamal N, Lang D, Himmelbach A, Ens J, Zhang X Q, Angessa T T, Zhou G, Tan C, Hill C, Wang P, Schreiber M, Boston L B, Plott C, Jenkins J, Guo Y, Fiebig A, Budak H, Xu D, Zhang J, Wang C, Grimwood J, Schmutz J, Guo G, Zhang G, Mochida K, Hirayama T, Sato K, Chalmers K J, Langridge P, Waugh R, Pozniak C J, Scholz U, Mayer K F X, Spannagl M, Li C, Mascher M, Stein N. The barley pan-genome reveals the hidden legacy of mutation breeding. *Plant Physiology*, 2020, 588(7837): 284-289
- [35] Jiang C, Lei M, Guo Y, Gao G, Shi L, Jin Y, Cai Y, Himmelbach A, Zhou S, He Q, Yao X, Kan J, Haberer G, Duan F, Li L, Liu J, Zhang J, Spannagl M, Liu C, Stein N, Feng Z, Mascher M, Yang P. A reference-guided TILLING by amplicon-sequencing platform supports forward and reverse genetics in barley. *Plant Communications*, 2022, 3(4): 100317
- [36] Osnato M, Stile M R, Wang Y, Meynard D, Curiale S, Guiderdoni E, Liu Y, Horner D S, Ouwerkerk P B, Pozzi C, Müller K J, Salamini F, Rossini L. Cross talk between the KNOX and ethylene pathways is mediated by intron-binding transcription factors in barley. *Plant Physiology*, 2010, 154(4): 1616-1632