

# 大麦芒型突变基因 *cal-d* 的遗传定位

赵雪芳, 张仁旭, 高爱农, 张京, 王春超

(中国农业科学院作物科学研究所/国家作物种质库, 北京 100081)

**摘要:** 芒是麦类作物穗部器官的重要组成部分, 在提高籽粒产量、促进种子传播和防御虫害等方面具有重要作用。大麦具有丰富的芒型突变体, 加之其二倍体的特性, 成为麦类作物芒器官形态建成研究的理想作物。本研究报道了一个大麦芒型突变体材料 *calcaroides*, 表现为外稃顶端或是稃芒基部异形凸起, 形成呈钩状不完全花器结构, 属基部钩芒类型。突变体芒较短并伴随抽穗期推迟, 株高、穗长和穗粒数显著降低等表型。遗传分析表明, 突变体的芒型突变性状受单隐性基因 *cal-d* 控制。前期利用 *cal-d* 导入系 BW106 × Bowman 的 F<sub>2</sub> 群体, 结合简化基因组测序 (GBS, genotyping by sequencing) 分析, 将 *cal-d* 基因初步定位于 3H 染色体。进一步利用来自 F<sub>2</sub> 的杂合单株, 包括 13000 株单株的 F<sub>2,3</sub> 群体进行精细定位, 最终将 *cal-d* 基因定位于 3H 染色体 153 ~ 329 Mb 区间的近着丝粒区域。通过转录组混池测序分析结合大麦基因组和表达谱资源数据库, 初步筛选了 9 个候选基因。本研究结果为大麦芒型突变基因 *cal-d* 的克隆与功能验证奠定了基础, 对于解析麦类作物芒的遗传发育机制具有重要的意义。

**关键词:** 大麦; *cal-d*; 基因定位; 芒; 穗发育

## Genetic Mapping of an Awn Mutant Gene *cal-d* in Barley

ZHAO Xuefang, ZHANG Renxu, GAO Ainong, ZHANG Jing, WANG Chunchao

(Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences/National Crop Gene Bank, Beijing 100081)

**Abstract:** Awn is an important part of spikes in crops such as wheat and barley, and plays a crucial role in improving grain yield, seed dispersal, and resistance to pests. Several awn mutants have been reported in barley, and its diploid characteristics make it an ideal genetic model for the morphological formation of awns in Triticeae crops. This study reported the genetic mapping of the gene *cal-d* of barley *calcaroides* awn-type mutant. The mutant belonged to base-hooked awn with a hooked-like structure between the top of lemma and the base of awn, and displayed a reduction significantly in plant height, spike and awn length, grain number per spike, and the delayed heading date. Genetic segregation analysis revealed that the trait of *cal-d* was controlled by a recessive gene. Firstly, the *cal-d* gene was preliminarily mapped to chromosome 3H, using the *cal-d* introgression line derived from a cross between BW106 and Bowman to combine the F<sub>2</sub> population through genotyping by sequencing (GBS). With genotyping a total of 13,000 F<sub>2,3</sub> plants derived from F<sub>2</sub> heterozygous plants to fine-map the gene, *cal-d* was delimited ultimately between 153-329 Mb, where the meager recombination rate was observed. Nine candidate genes were identified by transcriptome sequencing analysis in combination with the barley genome and expression profile resource database. Collectively, the results lay the foundation for the cloning and functional verification of the *cal-d* gene in barley mutant, and have important significance for analyzing the function of awn in Triticeae crops.

**Key words:** barley; *cal-d*; gene mapping; awn; spike morphology

收稿日期: 2023-08-17 修回日期: 2023-10-20 网络出版日期: 2023-11-24

URL: <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20230817001>

第一作者研究方向为大麦种质资源鉴定评价, E-mail: zhaoxf0803@163.com

通信作者: 王春超, 研究方向为大麦种质资源遗传多样性, E-mail: wangchunchao@caas.cn

张京, 研究方向为大麦种质资源与遗传育种, E-mail: zhangjing03@caas.cn

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFD1000706-1); 国家大麦青稞产业技术体系(CARS-05); 中国农业科学院科技创新工程

**Foundation projects:** National Key R&D Program of China (2018YFD1000706-1); China Agriculture Research System of MOF and MARA (CARS-05); Agricultural Science and Technology Innovation Program of Chinese Academy of Agricultural Sciences

大麦(*Hordeum vulgare* L.)因其优良的适应性和耐逆性,在世界范围内广泛种植。芒是外稃尖端延伸而出的针状结构,是禾本科作物的重要穗部性状<sup>[1]</sup>。在栽培稻驯化过程中,芒由于不利于收割和种子贮藏而被淘汰,而小麦、大麦的芒因具备较强的光合作用能力而被保留<sup>[2-5]</sup>。因此深入研究芒的形态建成及其分子机理对麦类作物育种和生产应用具有重要意义<sup>[6]</sup>。

大麦芒型变异丰富、遗传稳定,是形态学变种分类的重要依据,在形态上主要分为直芒和钩芒两大类<sup>[7-8]</sup>。直芒的基部粗宽,顶端尖细,横切面呈等腰三角形,钩芒形态展现多种类型,一般在基部延伸一定距离后向两侧分叉,形成的叶耳状附属物与芒组合形成三叉裂片<sup>[9]</sup>。大麦 *calcaroides* 突变体是二棱春大麦 Foma 经 X 射线诱变产生的一系列芒型突变体中的一种,其命名源于拉丁文 *calcar*, 中文译为“足跟形凸起”。突变体稃芒较短,在其外稃顶端与芒的基部之间异形发育出钩形不完全花器凸起,属于钩芒的一种,称为基部钩芒。突变体的外稃生长极性与直芒野生型的相反,推测突变表型的形成与生长素的浓度梯度分布有关<sup>[10]</sup>。目前鉴定出的 *calcaroides* 突变体包括 *cal-a*、*cal-b*、*cal-C*、*cal-d* 与 *cal-23* 等 5 种类型,均由人工诱变获得,尚未有自然变异的报道<sup>[10-11]</sup>。其中 *cal-d* 的等位基因有 *d4*、*d14* 与 *d22*<sup>[11]</sup>。Castiglioni 等<sup>[12]</sup>将 *cal-d* 基因定位到 3H 染色体上,发现该基因对植株发育也表现出多效性影响,包括株高降低、籽粒数减少、穗长缩短等。

大麦中已经鉴定了大量的芒发育异形突变体,但只有少数基因被克隆,如钩芒基因 *HvKnox3*<sup>[13]</sup>、短芒基因 *Lks2*<sup>[14]</sup>、齿芒基因 *HvRAW1*<sup>[15]</sup> 及侧小穗芒基因 *lr*<sup>[16]</sup> 等。芒形态变异的分子机制尚未完全解析,克隆芒发育相关基因并阐述其作用机制,对于解析作物穗部器官建成与发育的遗传机制具有重要的意义。本研究通过将 *calcaroides* 突变体导入系 BW106 与 Bowman 杂交构建遗传作图群体,结合分子标记进行了基部钩芒基因 *cal-d* 的染色体分子标记定位,并利用混合分组转录组分析(BSR, bulked segregant RNA-seq)的策略初步筛选确定了候选基因。本研究为 *cal-d* 基因克隆奠定了基础,也为进一步解析大麦芒器官形态建成的遗传发育分子机制提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料与性状调查

本研究的大麦芒型突变体 *cal-d* 由育成品种

Foma 经 X 射线诱变产生,与轮回亲本 Bowman 进行多代回交得到近等基因系 BW106,其穗部稃芒表型与突变体 *cal-d* 一致。BW106 与 Bowman 杂交构建定位群体,亲本与杂种 F<sub>1</sub> 及 F<sub>2</sub> 群体种植于中国农业科学院作物科学研究所东圃场,1 m 行长,每行 15 株,试验田间管理同于大麦大田生产。温室盆栽种植来自 F<sub>2</sub> 杂合植株的 F<sub>2,3</sub> 分离群体,每盆种植 1 株。成熟后考察单株穗子芒型,使用刻度标尺(精度 0.1 cm)测量株高与穗长,并统计穗粒数。农艺性状测量参考《大麦种质资源描述规范和数据标准》<sup>[17]</sup>,并利用 SPSS Statistics v19 软件进行 *t* 检验分析。

### 1.2 *Cal-d* 基因定位

在幼苗三叶期,选取 F<sub>2</sub> 分离群体的 370 株单株及亲本 Bowman、BW106 的叶片,利用改良 CTAB 法<sup>[18]</sup>提取叶片基因组 DNA,经过片段选择及纯化构建基因组测序(GBS, genotyping by sequencing)文库,基于 Illumina NovaSeq 6000 平台完成测序。使用 fastp(v0.23.2)软件完成测序 reads 的质控(参数为“--detect\_adapter\_for\_pe -q 30 --length\_required 100”),使用 BWA(v0.7.17-r1188)软件将质控后的 reads 比对到大麦 Morex V1 参考基因组上(<https://ftp.ensemblgenomes.ebi.ac.uk/pub/plants/current/fasta/hordeumvulgare/dna/>)(参数为“bwa mem -M”),利用 GATK(v4.1.2)的 HaplotypeCaller 模块进行变异检测,利用 VariantFiltration 模块过滤低质量变异(参数为“QD < 2.0 || FS > 60.0”)。利用 WinQTLCart(v2.5)软件进行遗传作图。利用 WASP 在线网站(<http://bioinfo.biotech.or.th/WASP>)根据 SNP 位点上下游各 60 bp 序列设计 KASP 引物(表 1),检测亲本的多态性。采用 5 μL 的 PCR 扩增体系,其中 2.5 μL 2×KASP Master Mix、0.07 μL Primer Mix、1.18 μL ddH<sub>2</sub>O、1.25 μL DNA。利用 Applied Biosystems® Veriti® 384-Well Thermal Cycler 进行 PCR 反应。KASP PCR 反应程序为 94 °C 预变性 15 min; 94 °C 变性 20 s, 61 °C 退火、延伸 1 min, 每个循环温度降低 0.6 °C, 共 10 个循环; 94 °C 变性 20 s, 55 °C 退火、延伸 1 min, 共 34 个循环; 4 °C 保存。扩增产物通过实时荧光定量 PCR 仪 Applied Biosystems 7900 HT 检测荧光信号,最后利用 Kluster caller™ 软件对 SNP 分型结果进行统计,结合表型进行连锁分析<sup>[19]</sup>。KASP™ 基因分型的技术方法参考 LGC Genomics 网站(<http://www.lgcgenomics.com/genotyping/kasp-genotyping-reagents/>)。普通 PCR 体系采用 40 μL 反应体系,其

中 20  $\mu$ L 2 $\times$ Taq PCR Master Mix、17  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O、1  $\mu$ L Forward primer、1  $\mu$ L Reverse primer、1  $\mu$ L 模板 DNA。普通 PCR 反应程序为 94  $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94  $^{\circ}$ C 变性 30 s, 56  $^{\circ}$ C 退火 50 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 重复 33 个循环; 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min; 4  $^{\circ}$ C 保存。

表 1 用于基因定位的分子标记及序列

Table 1 The sequences of molecular markers for *cal-d* mapping

标记 Marker	引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence(5'-3')
M1	FAM-F	CGCTGCTCCATAGTTTTGGGGGGT
	HEX-F	CGCTGCTCCATAGTTTTGGGGGGG
	Common-R	GTACATATATGGTGTCTTTGCG
M2	FAM-F	CGCACGCACGCCATAATTGGTCGC
	HEX-F	CGCACGCACGCCATAATTGGTCGT
	Common-R	CCGGCGACCGCGTCGGCGTC
M3	FAM-F	TCATAAAGCGACTGACAATGCCGAC
	HEX-F	TCATAAAGCGACTGACAATGCCGAT
	Common-R	TTACTTGGTGAACACAAGACC
M4	FAM-F	CAACCCCAACTGCATGAATGCACTA
	HEX-F	CAACCCCAACTGCATGAATGCACTG
	Common-R	ATCCGGAGCGCCTGAGCTTAAA
M5	FAM-F	TCAGGCGGCTTAATATACATTG
	HEX-F	TCAGGCGGCTTAATATACATTA
	Common-R	ATCAAAACCGTTTTCCAGTA
M6	FAM-F	TGGTGGCAGGGAGATATTTTTTTTT
	HEX-F	TGGTGGCAGGGAGATATTTTTTTTTG
	Common-R	AATAACGCATCACCAGCTGGTGC
M8	FAM-F	TGGATGGATGCTATCAACACTTGC
	HEX-F	TGGATGGATGCTATCAACACTTGG
	Common-R	TCTGCCAGAGAATACTAATACTAC
M9	FAM-F	TCGACGTTGTTTTGCTGACATTTCG
	HEX-F	TCGACGTTGTTTTGCTGACATTCA
	Common-R	TTGGTATGGAAATCGAGGCAGG
M10	Forward	GATTTCTTTGGGAGGGACGG
	Reverse	TTTGGAGGCCTCTTGTCACT

### 1.3 混池外显子捕获测序

在 F<sub>2</sub> 交换单株中分别选取野生直芒表型和基部钩芒 *cal-d* 突变表型的等量 DNA, 各自分别混合成一组用于外显子测序分析。其中野生型池包括 BW106\_Bo\_1\_69、BW106\_Bo\_2\_16、BW106\_Bo\_3\_4、BW106\_Bo\_3\_44、BW106\_Bo\_5\_18 和 BW106\_

Bo\_5\_75, 突变型池包括 BW106\_Bo\_1\_3、BW106\_Bo\_2\_47、BW106\_Bo\_2\_48、BW106\_Bo\_4\_26 和 BW106\_Bo\_5\_21 (野生型池和突变型池的编号为材料名称+果穗序号+单株序号)。使用标准大麦外显子组捕获实验方案<sup>[20]</sup>, 突变池、野生池和 BW106 亲本 DNA 用于文库构建和外显子组捕获测序。

### 1.4 转录组混池测序

为获得突变基因 *cal-d* 的遗传变异, 选择 F<sub>2</sub> 不同发育时期(长度)的幼穗进行转录组测序。分别选取野生型长度为 0.4 cm、0.6 cm、1.2 cm、1.5 cm 和 3.0 cm, 突变体长度为 0.6 cm、0.8 cm、1.2 cm、1.5 cm 和 3.0 cm 的新鲜幼穗, 相同时期取 8 个幼穗混合为一个样本, 用于提取 RNA。采用 Trizol 法<sup>[21]</sup> 提取总 RNA, 然后进行 mRNA 纯化并反转录构建 cDNA 文库, 不同长度的幼穗样本各自混合, 基于 Illumina NovaSeq 6000 平台完成测序。使用 fastp(v0.23.2) 软件完成测序 reads 的质控(参数为“--detect\_adapter\_for\_pe -q 30 --length\_required 100”), 使用 STAR(v2.7.5a) 2-pass 将质控后的 reads 比对到大麦 Morex V1 参考基因组上, 使用 GATK(v4.1.2) 的 HaplotypeCaller 模块进行变异检测, 利用 VariantFiltration 模块过滤低质量变异(参数为“QD < 2.0 || FS > 60.0”)。利用 SnpEff(v4.3t) 工具进行变异功能注释。基于大麦 Morex V1 参考基因组的注释文件, 结合不同组织和时期的全基因组表达谱(<https://ics.hutton.ac.uk/barleyrtd/index.html>), 对目的区间内的功能变异基因分析以进一步确定 *cal-d* 的候选基因。

## 2 结果与分析

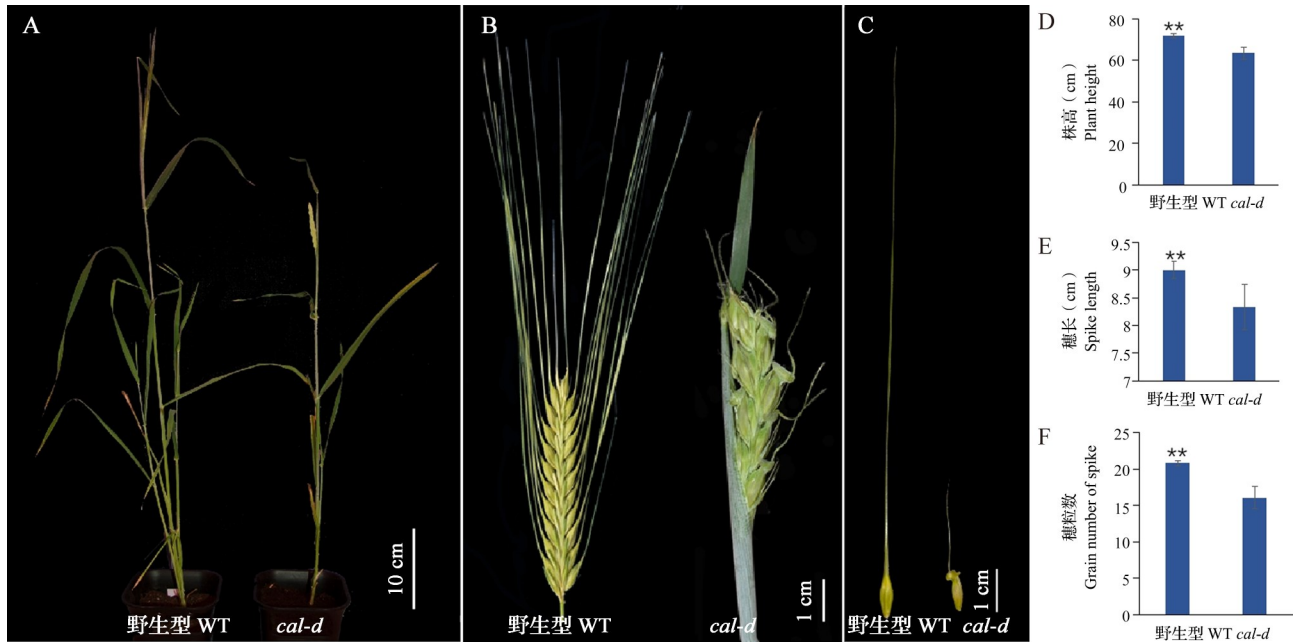
### 2.1 表型分析

与野生型 Bowman 的直芒相比, 突变体 *cal-d* 的稃芒基部具有钩形不完全花器结构, 表现为基部钩状芒形, 并且芒长较短。同时, 突变体抽穗期延迟, 株高、穗长和穗粒数显著低于野生型(图 1D~F, 表 2)。这表明突变基因 *cal-d* 可能具有多效性, 在控制大麦芒型的同时, 对株高、穗长和穗粒数也有一定的影响。

### 2.2 遗传分析与初定位

将突变体 *cal-d* 与正常直芒品种 Bowman 杂交, F<sub>1</sub> 植株呈现直芒, 表明基部钩芒性状为隐性突变。F<sub>2</sub> 370 株植株中, 直芒与基部钩芒植株的比例为 283:87, 卡方( $\chi^2$ ) 测验( $\chi^2=0.44$ ,  $\chi^2_{0.05,1}=3.84$ ) 表明该性状遗传符合 3:1(显性:隐性) 的孟德尔分离。





A ~ C: 分别为野生型与突变体 *cal-d* 的整株、穗部和芒部表型比较; \*\*表示在  $P < 0.01$  水平差异显著  
 A-C: Comparison of whole plant, spike and awn phenotypes between WT and mutant *cal-d*, respectively; \*\* indicates the difference is extremely significant at the level of  $P < 0.01$ ; WT: Wild type, the same as below

图1 野生型和突变体 *cal-d* 的表型比较

Fig.1 Phenotypic comparison between WT and mutant *cal-d*

表2 野生型和突变体 *cal-d* 的株高、穗长、穗粒数性状

Table2 Plant height, spike length and grain number per spike of wild type and mutant *cal-d*

表型 Phenotype	野生型 Wild type	突变型 <i>cal-d</i>	P 值 P value
株高 (cm)	71.91±1.19	63.50±2.99	0.00753
穗长 (cm)	9.01±0.15	8.33±0.41	0.0477
穗粒数	20.81±0.36	16.06±1.54	2.24E-05

提取 370 株  $F_2$  单株的基因组 DNA, 利用简化基因组测序鉴定基因型, 结合表型开展连锁分析, 将 *cal-d* 基因定位于 3H 染色体的 85 ~ 438 Mb 区间 (图 2)。

### 2.3 *cal-d* 基因精细定位

根据突变型池和野生型池的 SNP-index 结果, 筛选出大约 700 个多态性 SNP 标记, 进一步用于高分辨率作图 (图 3A)。通过表型与分子标记关联分析将 *cal-d* 基因定位于 3H 染色体上 G101-73 (chr3H: 101733471) 与 G438-30 (chr3H: 438300262) 标记之间, 该区间位于着丝粒附近, 遗传距离为 4 cM。在该区间内加密开发 5 个 SNP 标记 M1、M2、M3、M4 和 M5, 筛选到 8 个交换单株: 1\_3、1\_69、2\_1、2\_14、2\_48、4\_4、3\_44 和 5\_75, 经连锁分析将 *cal-d* 基因定位于 M2 与 M4 之间。为了精细定位 *cal-d* 基因, 进一步在该区间内开发 4 个 KASP 标记 M6、M8、M9 和 M10, 对  $F_{2,3}$  代 13000 棵单株进行目的

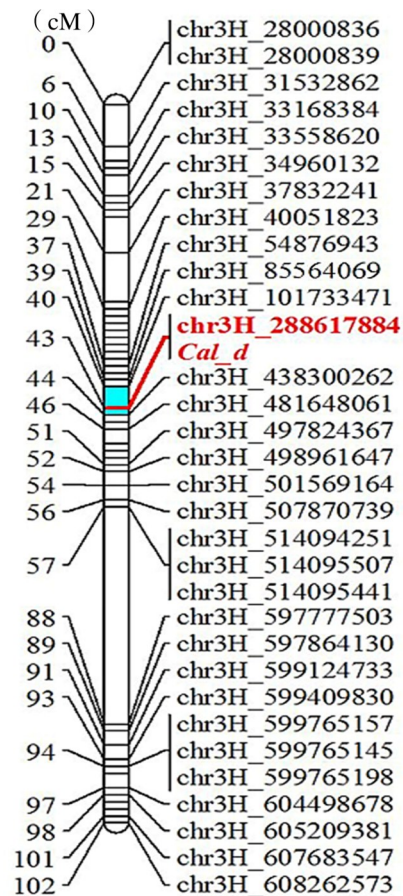
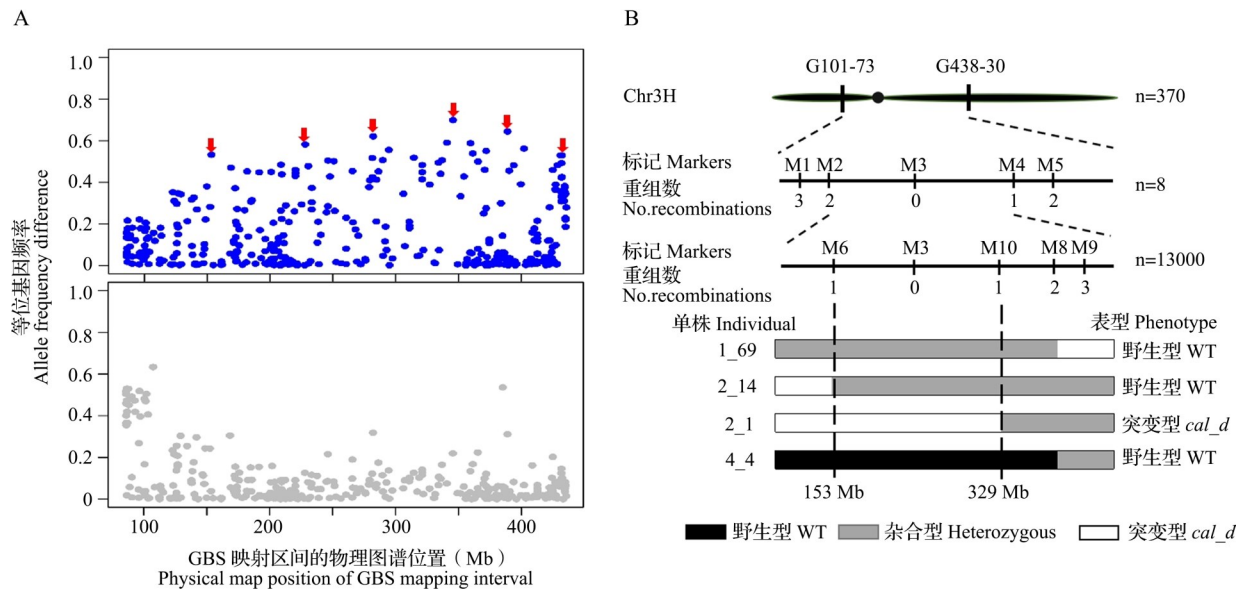


图2 *cal-d* 定位遗传图谱

Fig.2 Genetic map for mapping of *cal-d*

区间杂合型鉴定, 筛选到 2 个有效交换单株。最终将 *cal-d* 基因定位在 M6 和 M10 标记之间 4 cM 的遗传距离内, 对应大麦 Morex V1 的物理图谱位

置分别为 153 Mb 和 329 Mb, 与 M3 标记 (chr3H: 288617884) 完全连锁 (图 3B)。鉴于该区间极低的重组合交换率, 推测该基因位于近着丝粒区域。



A: 突变型池和野生型池的等位频率 (SNP-index), 红色箭头指示 7 个 *cal-d* 相关的 SNP, 可优先验证并用于缩小  $F_2$  重组子的定位区域;

B: *cal-d* 基因精细定位, n 表示子代个体数, 重组数即交换单株的数目

A: Allele frequency difference (SNP-index) of *cal-d* mutant pool and WT pool, the red arrow indicated that 7 correlation SNPs have

the priority to be validated and used for narrow down the mapping region of  $F_2$  recombinants; B: Fine mapping of *cal-d*,

n represents the population size of offspring, and No. recombinations is the number of swapping individuals

图 3 *cal-d* 基因定位

Fig.3 Gene mapping of *cal-d*

## 2.4 *cal-d* 候选基因预测

由于近着丝粒区域的重组合交换抑制, 不太可能通过筛选交换单株克隆 *cal-d* 基因, 所以采用转录组测序进行变异筛选, 从而缩小候选基因的范围。利用转录组混池测序分析, 在目的区间内检测到 644 个遗传变异, 包括 565 个 SNP 和 79 个 InDel, 对变异进行功能预测, 筛选出 80 个变异位点 (包括 67 个 SNP 和 13 个 InDel) 造成了基因编码氨基酸的改变, 包含错义突变、选择性剪切位点突变、移码突变以及转录提前终止。

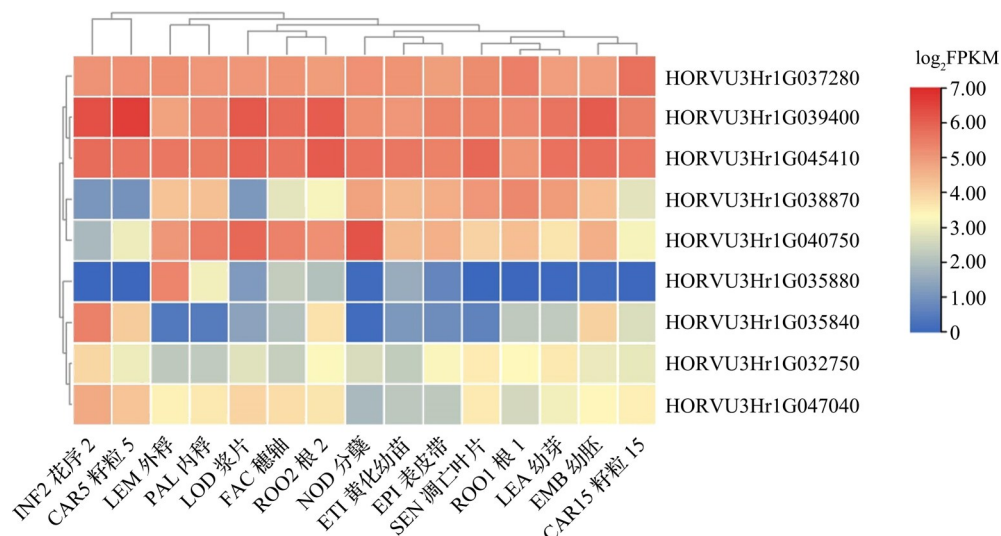
这 80 个显著变异位点分布在 62 个基因上, 结合大麦不同组织特异性表达谱数据挖掘, 发现其中 9 个基因在发育的花序组织或外稃中具有较高表达 (图 4), 是 *cal-d* 潜在的候选基因。这 9 个候选基因上的遗传变异包括错义突变和移码突变, 影响编码蛋白的正常功能 (表 3), 该结果为后续克隆 *cal-d* 基因并解析其遗传分子机制提供参考。

## 3 讨论

大麦突变体 *cal-d* 的芒型变异明显, 其芒基部具

有倒钩形、与外稃相似的组织异化凸起, 但与外稃生长极性相反, 是来自外稃和芒之间过渡区组织的异位结构, 呈现为基部钩芒形态, 其钩形凸起结构的着生位置与常见的顶端钩芒刚好相反。且与顶端钩芒基因型不同的是, 突变体 *cal-d* 芒的钩形异化组织不会形成额外的小花。与野生型相比, 突变体 *cal-d* 除了芒型变化外, 芒长缩短了 1/2, 株高降低近 1/4, 抽穗期延迟一周左右, 籽粒变小, 千粒重降低近 1/3, 叶片卷曲, 穗长缩短, 结实率下降, 穗粒数减少。由此可见, 隐性突变基因 *cal-d* 不仅影响大麦芒的形态建成, 同时对茎叶及穗部其他性状发育具有多重影响。

Nils Stein 教授利用 EST 标记, 通过另一个相对独立的较小的  $F_2$  群体 Morex  $\times$  BW106, 将 *cal-d* 基因锁定在标记 GBM1413 和 IP7125 之间 1.5 cM 的距离, GBM1413 和 IP7125 标记分别在大麦 Morex V1 参考基因组 3H 染色体的 169 Mb 和 430 Mb (该实验数据未发表)。这一结果显然大于本研究关于 *cal-d* 基因定位在大麦 3H 染色体 153 ~ 329 Mb 的区间。



花序2:发育中的花序(1~1.5 cm);籽粒5:发育中的籽粒(授粉5 d);根2:根(授粉28 d);分蘖:第三节间发育的分蘖;  
根1:幼苗的根(10 cm的芽期);幼芽:幼苗的芽(10 cm的芽期);幼胚:4 d的幼胚;籽粒15:发育中的籽粒(授粉15 d)

INF2: Developing inflorescences (1-1.5 cm); CAR5: Developing grain (5 days after pollination); LEM: Lemma; PAL: Palea; LOD: Lodicule;  
RAC: Rachis; ROO2: Roots (28 days after pollination); NOD: Developing tillers in the third internode; ETI: Etiolated seedling;  
EPI: Epidermal strips; SEN: Senescing leaves; ROO1: Roots from seedlings (10 cm shoot stage); LEA: Shoots from seedlings  
(10 cm shoot stage); EMB: 4-day embryos; CAR15: Developing grain (15 days after pollination).

图4 区间内候选基因表达热图

Fig.4 Expression profile of candidate genes in the interval

表3 预测候选基因及其变异位点

Table 3 The predicted candidate genes and variants

基因号 Gene ID	置信度 Confidence	基因注释 Gene annotation	突变型 <i>cal-d</i>	野生型 Wild type	变异类型 Variant type
HORVU3Hr1G032750	HC_U	未知功能	GGCCGGT	G	移码插入
HORVU3Hr1G035840	HC_G	蛋白激酶超家族蛋白	G	C	错义突变
HORVU3Hr1G035880	HC_G	磷脂酶A1-II	T	A	错义突变
HORVU3Hr1G037280	HC_G	RNA结合蛋白1	A	G	错义突变
HORVU3Hr1G038870	HC_G	核糖核酸酶I	C	G	错义突变
HORVU3Hr1G039400	HC_G	葡萄糖苷酶2亚基	A	AACAAT	移码突变/可变剪切
HORVU3Hr1G040750	HC_U	未知功能	T	A	错义突变
HORVU3Hr1G045410	HC_G	2-氧葡萄糖酸酯(2OG)和铁(II)依赖的加氧酶超家族蛋白	T	G	错义突变
HORVU3Hr1G047040	HC_G	HASTY 1蛋白	T	C	错义突变

在减数分裂过程中,染色体着丝粒及其周围区域的重组交换几乎被完全抑制,这已在大多数物种中研究证实,这种重组抑制与物种基因组大小和复杂度无关<sup>[22-23]</sup>。在麦类中,着丝粒附近的干扰区域更长,发生在着丝粒附近的重组交换率极低<sup>[24-26]</sup>,重组抑制区的存在使得一些重要基因的克隆变得非常麻烦或几乎不可能,例如小麦 *Fhb5* 基因<sup>[27]</sup>, *Qtg-wcb.5A*<sup>[28]</sup>, *Pm6*<sup>[29]</sup> 和大麦 *Hv-NAM1/Gpc-1*<sup>[30]</sup>。因此,利用转录组测序、RNAi 等反向遗传学手段开展基因定位研究成为重要的途径。由于 *cal-d* 基因位于

染色体着丝粒附近,因此通过传统的定位方法克隆该基因比较困难。鉴于大麦基部钩芒突变体与野生直芒表型差异较大,本研究对两者不同穗发育阶段的基因进行了遗传变异分析,同时结合不同穗发育时期的组织特异性转录组图谱,给出了该芒型突变候选基因的预测结果,为开展麦类等大基因组作物着丝粒区域的功能基因定位与克隆提供了参考。

## 4 结论

本研究报道了1个由隐性单基因 *cal-d* 控制的



大麦基部钩芒突变体。该突变体芒长变短,且芒基部具有钩状的不完全花器结构,株高变矮、穗长缩短、穗粒数减少,抽穗期推迟,产量降低。构建 BW106 (*cal-d*) × Bowman 分离群体进行基因定位,将 *cal-d* 基因定位在大麦 3H 染色体近着丝粒区域 176 Mb 区间内。通过转录组混池测序结合基因功能注释分析,预测到 9 个在大麦花序或外稃中表达较高的基因为 *cal-d* 的潜在候选基因。本研究为 *cal-d* 基因的克隆与功能研究奠定了基础,为大麦芒形态建成及分子机制解析提供了参考。

**致谢:**感谢德国莱布尼茨植物遗传与作物研究所 (IPK) 的 Nils Stein 教授提供的突变体 *cal-d* 材料和前期工作基础。

### 参考文献

- [1] 卢良恕. 中国大麦学. 北京: 中国农业出版社, 1996  
Lu L S. Chinese barley studies. Beijing: China Agricultural Press, 1996
- [2] Wang Z, Gu Y J. Structure and photosynthetic characteristics of awn of wheat and barley. *Journal of Integrative Plant Biology*, 1993, (12):921-928
- [3] Sato S, Ishikawa S, Shimono M, Shinjyo C. Genetic studies on an awnness gene *An-4* on chromosome 8 in rice *Oryza sativa* L. *Breeding Science*, 2010, 46(4):321-327
- [4] 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 (4):279-282  
Chen P Y, Li Y. The effect of wheat awns on grain weight and their physiological function. *Acta Agronomica Sinica*, 1981 (4):279-282
- [5] 李玲, 刘盼, 张蕾, 张浩, 贾继增, 高丽锋. 小麦芒基因定位及其与农艺性状的相关性分析. *植物遗传资源学报*, 2021, 22(1):102-114  
Li L, Liu P, Zhang L, Zhang H, Jia J Z, Gao L F. Awn genes mapping and correlation analysis for agronomic traits in wheat. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2021, 22(1):102-114
- [6] Pozzi C, Faccioli P, Terzi V, Stanca A M, Salamini F. Genetics of mutations affecting the development of a barley floral bract. *Genetics*, 2000, 154(3): 1335-1346
- [7] Druka A, Franckowiak J, Lundqvist U, Bonar N, Alexander J, Houston K, Radovic S, Shahinnia F, Vendramin V, Morgante M, Stein N, Waugh R. Genetic dissection of barley morphology and development. *Plant Physiology*, 2011, 155 (2):617-627
- [8] 徐东东. 大麦穗部性状功能基因单倍型分析及其遗传演化研究. 北京: 中国农业科学院, 2018  
Xu D D. Haplotypes and evolution analysis of barley ear trait domestication genes. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2018
- [9] Stein N, Muehlbauer G J. The barley genome. *Compendium of plant genomes*. Cham, Switzerland: Springer, 2018:171-208
- [10] Ustafsson K. Mutations in agricultural plants. *Hereditas*, 1947, 33(1-2):1-100
- [11] Price H J, Stebbins G L. The developmental genetics of the *calcaroides* gene in barley. II. Peroxidase activity in mutant and normal plants at progressive stages of development. *Genetics*, 1971, 68(4):539-546
- [12] Castiglioni P, Pozzi C, Heun M, Terzi V, Müller K J, Rohde W, Salamini F. An AFLP-based procedure for the efficient mapping of mutations and DNA probes in barley. *Genetics*, 1998, 149(4):2039-2056
- [13] Muller 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
- [14] Taketa S, Yuo T, Sakurai Y, Miyake S, Ichii M. Molecular mapping of the short awn 2 (*lks2*) and dense spike 1 (*dsp1*) genes on barley chromosome 7H. *Breeding Science*, 2011, 61 (1):80-85
- [15] Milner S G, Jost M, Taketa S, Mazon E R, Himmelbach A, Oppermann M, Weise S, Knupffer H, Basterrechea M, Guo G G, Xu D D, Stein N. Genebank genomics highlights the diversity of a global barley collection. *Nature Genetics*, 2018, 51(2):319-326
- [16] Komatsuda T, Pourkheirandish M, He C, Azhaguvel P, Kanamori H, Perovic D, Stein N, Graner A, Wicker T, Tagiri A, Lundqvist U, Fujimura T, Matsuoka M, Matsumoto T, Yano M. Six-rowed barley originated from a mutation in a homeodomain-leucine zipper I-class homeobox gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104(4):1424-1429
- [17] 张京. 大麦种质资源描述规范和数据标准. 北京: 中国农业出版社, 2006  
Zhang J. Descriptions and data standard for barley (*Hordeum vulgare* L.). Beijing: China Agricultural Press, 2006
- [18] Michelmore R W, Paran I, Kesseli R V. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1991, 88(21): 9828-9832
- [19] 赵海鹏, 赵雪芳, 孙建, 窦婷语, 张仁旭, 阿卜来提·阿力木, 郭爱奎, 王春超, 王化俊, 张京, 孟亚雄, 郭刚刚. 基于诊断标记的 LOX-1 活性缺失大麦种质鉴定评价. *植物遗传资源学报*, 2021, 22(1):115-120  
Zhao H P, Zhao X F, Sun J, Dou T Y, Zhang R X, Ablat A, Guo A K, Wang C C, Wang H J, Zhang J, Meng Y X, Guo G G. Diagnostic marker based null LOX-1 barley germplasm identification. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2021, 22 (1):115-120
- [20] Mascher M, Richmond T A, Gerhardt D J, Himmelbach A, Clissold L, Sampath D, Ayling S, Steuernagel B, Pfeifer M,

- D'Ascenzo M, Akhunov E D, Hedley P E, Gonzales A M, Morrell P L, Kilian B, Blattner F R, Scholz U, Mayer K F, Flavell A J, Muehlbauer G J, Waugh R, Jeddelloh J A, Stein N. Barley whole exome capture: A tool for genomic research in the genus *Hordeum* and beyond. *The Plant Journal*, 2013, 76(3):494-505
- [21] Rio D C, Ares M J, Hannon G J, Nilsen T W. Purification of RNA using TRIzol (TRI reagent). *Cold Spring Harbor Protocols*, 2010(6):pdb.prot5439
- [22] Jensen-seaman M I, Furey T S, Payseur B A, Lu Y, Roskin K M, Chen C F, Thomas M A, Haussler D, Jacob H J. Comparative recombination rates in the rat, mouse, and human genomes. *Genome Research*, 2004, 14(4): 528-538
- [23] Drouaud J, Camilleri C, Bourguigno N P Y, Canaguier A, Vezon D, Giancola S, Brunel D, Colot V, Prum B, Quesneville H, Mezard C. Variation in crossing-over rates across chromosome 4 of *Arabidopsis thaliana* reveals the presence of meiotic recombination "hot spots". *Genome Research*, 2006, 16(1):106-114
- [24] Drouaud J, Mercier R, Chelysheva L, Berard A, Falque M, Martin O, Zanni V, Brunel D, Mezard C. Sex-specific crossover distributions and variations in interference level along *Arabidopsis thaliana* chromosome 4. *PLoS Genetics*, 2007, 3(6): e106
- [25] Lian J, Yin Y, Oliver-bonet M, Liehr T, Ko E, Turek P, Sun F, Martin R. Variation in crossover interference levels on individual chromosomes from human males. *Human Molecular Genetics*, 2008, 17(17):2583-2594
- [26] Saintenac C, Falque M, Martin O C, Paux E, Feuillet C, Sourdille P. Detailed recombination studies along chromosome 3B provide new insights on crossover distribution in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Genetics*, 2009, 181(2):393-403
- [27] Xue S L, Xu F, Tang M Z, Zhou Y, Li G Q, Xia A, Lin F, Xu H B, Jia H Y, Zhang L X, Kong Z X, Ma Z Q. Precise mapping *Fhb5*, a major QTL conditioning resistance to *Fusarium* infection in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 2011, 123(6): 1055-1063
- [28] Brinton J, Simmonds J, Minter F, Leverington W M, Snape J, Uauy C. Increased pericarp cell length underlies a major quantitative trait locus for grain weight in hexaploid wheat. *New Phytologist*, 2017, 215(3):1026-1038
- [29] Wan W T, Xiao J, Li M L, Tang X, Wen M X, Cheruiyot A K, Li Y B, Wang H Y, Wang X. Fine mapping of wheat powdery mildew resistance gene *Pm6* using 2B/2G homoeologous recombinants induced by the *ph1b* mutant. *Theoretical and Applied Genetics*, 2020, 133(4):1265-1275
- [30] Jamar C, Loffet F, Frettinger P, Ramsay L, Fauconnier M L, Jardin P D. *NAM-1* gene polymorphism and grain protein content in *Hordeum*. *Journal of Plant Physiology*, 2010, 167(6): 497-501