



大麦半矮秆基因 *ari-e.GP* 的分子标记开发

谢思宇^{1,2}, 吴康靖^{1,2}, 王飞凤^{1,2}, 赖丽华¹, 朱靖环³, 贾巧君^{1,2}

(1. 浙江理工大学生命科学与医药学院, 杭州 310018; 2. 浙江省植物次生代谢调控重点实验室, 杭州 310018;
3. 浙江省农业科学院作物与核技术利用研究所, 杭州 310021)

摘要: 大麦品种 Golden Promise 携带的隐性半矮秆基因 *ari-e.GP* 对大麦矮秆育种具有重要利用价值。为了使 *ari-e.GP* 基因在大麦分子标记辅助选择育种中得到高效和快速利用, 开发一个 dCAPS 功能性分子标记 dcDep1。dcDep1 标记属于共显性标记, 在携带野生型 *Ari-e.GP* 基因的中高秆品种和携带突变型 *ari-e.GP* 基因的半矮秆品种间存在明显的多态性, 能准确区分这两种基因型。利用 dcDep1 标记对藏 QB09/Golden Promise 的 F2 和 Dash/VB9104 双单倍体(Double haploid, DH)分离群体进行基因型检测和株高测定, 发现 *ari-e.GP* 基因型结果和株高表型结果完全吻合, 进一步证实 dcDep1 分子标记选择的准确性。利用该方法对 *ari-e.GP* 基因进行分子标记辅助选择育种, 可有效快速导入目标大麦品种, 加快大麦矮秆品种选育进程。

关键词: 大麦; 半矮秆; *ari-e.GP*; dCAPS 标记

中图分类号: S512.3

文献标志码: A

文章编号: 1673-3851(2019)05-0374-06

Development of a molecular marker for the barley semi-dwarf gene *ari-e.GP*

XIE Siyu^{1,2}, WU Kangjing^{1,2}, WANG Feifeng^{1,2}, LAI Lihua¹, ZHU Jinghuan³, JIA Qiaojun^{1,2}

(1.College of Life Sciences and Medicine, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China;
2. Key Laboratory of Plant Secondary Metabolism and Regulation of Zhejiang Province, Hangzhou 310018, China;
3.Institute of Crop and Nuclear Technology Utilization, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, China)

Abstract: The recessive semi-dwarf gene *ari-e.GP* derived from barley variety Golden Promise has the most important value for barley dwarf breeding. In order to promote the application of *ari-e.GP* gene in marker-assisted selection of barley breeding, a dCAPS (Derived Cleaved Amplified Polymorphic Sequence) functional molecular marker dcDep1 was developed in this study. The marker dcDep1 is a co-dominant marker and shows the significant polymorphism between medium/tall barley variety with *Ari-e.GP* and semi-dwarf variety with *ari-e.GP*. So, it can accurately distinguish the two genotypes. The dcDep1 marker was used to carry out genotype detection and plant height determination for Zang QB09/Golden Promise F2 and Dash/VB9104 double haploid (DH) segregation population. It was found that the genotype outcome of *ari-e.GP* was totally in accordance with the phenotype of plant height, which further verifies the accuracy of dcDep1 molecular marker selection. This method was applied for marker-assisted selection of breeding for *ari-e.GP*, which could effectively and fast introduce the target barley varieties, and speed up the breeding process of semi-dwarf barley varieties.

Key words: barley; semi-dwarf; *ari-e.GP*; dCAPS marker

收稿日期: 2019-01-13 网络出版日期: 2019-04-01

基金项目: 国家自然科学基金项目(31471495); 浙江省基础公益研究计划项目(2017C32071); 浙江省大学生科技创新项目(2018R406038); 浙江省农业(粮食)新品种选育重大科技专项(2016C02050-9-6); 浙江理工大学科研启动项目(16042063-Y)

作者简介: 谢思宇(1993-), 女, 河南信阳人, 硕士研究生, 主要从事大麦分子生物学方面的研究。

通信作者: 贾巧君, E-mail: jiaqiaojun@163.com

0 引言

大麦是世界第四大禾谷类作物,其种植面积和总产量仅次于小麦、水稻和玉米,目前世界大麦总产量约为1.3亿~1.5亿吨。中国大麦面积和总产量次于水稻、小麦、玉米和粟,居第5位。由于大麦茎秆的机械组织不发达,纤维化程度低,在高水肥栽培条件下,品种的抗倒性尤为重要^[1]。倒伏不但降低大麦产量,且影响大麦品质,因此倒伏已成为大麦产量和品质的主要限制因素^[2]。适度矮化的大麦品种有利于增强抗倒性和机械化收获^[3]。矮秆基因是大麦矮化育种的重要资源,合理利用矮秆基因可增强大麦抗倒伏能力,有效提高大麦产量^[4]。

迄今,已报导的大麦矮秆突变体有100多个,但在大麦育种中主要应用的仅有4个半矮秆基因,分别是 *hcm1*、*uzul*、*sdw1/denso* 和 *ari-e.GP*^[3]。*hcm1* 半矮秆基因是通过自主突变获得的,位于大麦2HL染色体的基因热点区域,与6棱基因 *vrsl*、抗赤霉病基因和早熟基因 *eam6* 紧密连锁^[3]。目前,该基因尚未被克隆,主要用于美国六棱大麦育种。*uzul* 半矮秆基因位于大麦3HL染色体,广泛应用于中国、日本和韩国大麦育种。张京^[1,5] 调查研究发现,在20世纪80年代前中国选育的大麦矮秆品种中,携带 *uzul* 半矮秆基因的品种占80%;在20世纪80年代后选育的大麦矮秆品种中,携带 *uzul* 半矮秆基因的品种仍超过50%。20世纪30年代,携带 *uzul* 基因的大麦品种在日本种植面积为70%;在韩国种植面积也超过30%^[6]。Chono等^[7] 研究发现,*uzul* 基因即 *HvBRI1*,该基因的单碱基替换显著降低大麦对芸苔素内酯(一种植物生长调节剂)的响应,从而降低了株高。*sdw1/denso* 半矮秆基因也位于大麦3HL染色体,表现为赤霉素敏感型,在美国、加拿大和澳大利亚,*sdw1* 主要用于饲料大麦育种,而 *denso* 被广泛应用于欧洲的啤酒大麦育种^[8]。2009年,Jia等^[9] 克隆另一重要的大麦半矮秆基因 *sdw1/denso*,该基因与水稻半矮秆基因 *sd1* 同源,编码GA20氧化酶,参与赤霉素合成。通过序列比对分析,开发用于鉴定 *sdw1/denso* 基因的分子标记;*sdw1/denso* 半矮秆基因不但用于欧美、澳大利亚大麦育种中,而且在中国甘肃和云南等省的大麦品种选育中也有应用^[10-11]。*ari-e* 也是重要的大麦隐性半矮秆基因,有不同来源的等位基因,如 *ari-e.1*、*ari-e.30*、*ari-e.39*、*ari-e.119*、*ari-e.156*、*ari-e.166*、*ari-e.178*、*ari-e.222* 和 *ari-e.228*;

大麦半矮秆品种 Golden Promise 携带的半矮秆基因命名为 *Gpert*^[12-13]。1969年,Persson^[14] 将 *ari-e* 基因定位于大麦5HS染色体;Thomas等^[15] 将 *Gpert* 基因定位于大麦5H染色体;Franckowiak^[16] 通过等位基因检测,发现 *ari-e* 与 *Gpert* 互为等位基因,因此将 *Gpert* 改名为 *ari-e.GP*。

Golden Promise 是英国大麦育种家在1956年通过 γ 射线诱变 Maythorpe 品种选育获得的,并于1968年开始推广^[15]。20世纪70年代以来,Golden Promise 及其衍生系苗期都表现为直立型,具有半矮秆、早熟、高产和啤酒品质佳等特性^[15],广泛应用于欧美啤酒大麦育种,是欧美大麦矮秆育种的重要的矮源之一^[17]。20世纪70年代至21世纪初,Golden Promise 一直是苏格兰威士忌的上等原料,现今大部分35~40年威士忌都是以 Golden Promise 为原料酿造的。

ari-e.GP 基因不但影响株高、产量和品质等性状,而且对耐盐也有重要影响。高浓度NaCl处理后,由于Golden Promise和Maythorpe区别在于 *ari-e.GP* 基因,因此认为 *ari-e.GP* 基因有助于大麦耐盐性的提高,Golden Promise 地上部Na⁺含量比诱变亲本 Maythorpe 降低50%^[18]。已鉴定大麦矮秆基因中,仅 *ari-e.GP* 与耐盐相关,且在不同遗传背景下都表现耐盐性^[19]。Golden Promise 是大麦遗传转化模式品种。鉴于 *ari-e.GP* 基因对大麦重要农艺性状的影响,研究者采用不同的分子标记结合新一代测序技术对其进行精细定位,试图克隆该基因,但由于大麦基因组信息不够完善而未成功^[20-21]。Wendt等^[13] 采用同源克隆结合电子克隆法获得大麦 *HvDep1* 基因,该基因与水稻 *DEP1* 基因同源,编码G蛋白 γ 亚基。根据 *HvDep1* 基因与 *ari-e.GP* 在大麦染色体上相似的位置以及Golden Promise 和水稻 *DEP1* 突变体相似的表型(半矮秆、密穗等),推测 *HvDep1* 为 *ari-e.GP* 基因的候选基因^[13]。序列分析进一步发现,*ari-e.1*、*ari-e.30* 和 *ari-e.119* 突变体的 *HvDep1* 基因缺失;*ari-e.39*、*ari-e.156* 和 *ari-e.166* 突变体的 *HvDep1* 基因3号外显子2007位点C变为T,导致翻译提前终止;Golden Promise 的 *HvDep1* 基因在第1508、1509位点间插入一个碱基A,该突变位点位于2号外显子,也导致翻译提前终止,造成 *HvDep1* 功能缺失,植株表现半矮秆^[13]。*ari-e.178*、*ari-e.222*、*ari-e.228* 中 *HvDep1* 基因没有变异,进一步表型分析发现,这3个材料苗期不表现直立型,因此以上大麦植

株不是 *ari-e* 的突变体,转基因互补实验进一步证实 *ari-e* 系列突变体是由于 *HvDep1* 基因突变造成的^[13]。

中国在 20 世纪 60 年代中后期开始采用杂交方法培育大麦新品种,将株高从原来的 100~120 cm 降低到现在的 80~95 cm,产量由 893 kg/hm² 提高到 4200 kg/hm²,增长 4.7 倍,显示矮秆品种的丰产潜力^[5]。但中国大麦矮秆育种以 *uzu1* 基因为主,矮源矮源单一,因此有必要拓宽大麦矮秆资源^[1,5]。迄今,*ari-e.GP* 基因在中国大麦育种中的应用未报道,该基因鉴定标记尚未开发。鉴于 *ari-e.GP* 基因的重要性以及 Golden Promise 品种在产量、品质、耐盐、遗传转化上的优异表现,可将其用于中国大麦的矮秆育种。但由于 *ari-e.GP* 基因属于隐性遗传^[21-13],常规矮化育种采用系谱法,选择速度慢,因此有必要开发与 *ari-e.GP* 基因完全连锁的分子标记用于辅助选择育种。本文通过引物设计、PCR、酶切和琼脂糖电泳,开发一种快速鉴定携带半矮秆 *ari-e.GP* 基因的大麦株系或品种的方法,为加快我国大麦矮化育种进程奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

中高秆大麦品种藏 QB09 和 VB9104,半矮秆大麦品种 Golden Promise 和 Dash(携带 *ari-e.GP*)^[21],Dash/VB9104 双单倍体(DH)群体和藏 QB09/Golden Promise F2 群体。其中藏 QB09 由杭州国家大麦改良中心提供,VB9104、Golden Promise、Dash 及 Dash/VB9104 DH 群体由澳大利亚 Murdoch 大学李承道教授提供。藏 QB09/Golden Promise F2 群体由本实验室构建。亲本材料和群体材料种植于海宁试验基地,按常规方法种植管理,并在苗期和成熟期调查其生长特性和株高。

1.2 DNA 提取和检测

取每份大麦材料的幼嫩叶片 100 mg 于加钢珠的 2 mL 离心管中,用组织破碎仪(Biopre-24)磨碎叶片后按照 CTAB 法提取 DNA。所得 DNA 利用 NanoDrop2000 分光光度计检测 DNA 浓度和质量,并将 DNA 稀释为 50 ng/ μ L, -20 °C 冷冻备用。

1.3 特异引物序列设计

根据 Wendt 等^[13]报道的 *HvDep1* (*HORVU5-Hr1G061840*) 基因序列以及引物信息,进行巢式扩

增;选用引物 IL280(上游引物 5'-CGTCAAGTCC-AGTCCACACC-3') 和 IL281(下游引物 5'-CGTGCGAGGATATTGGCGAC-3') 进行第一次扩增,获得一次 PCR 产物(760 bp 左右),1% 琼脂糖电泳检测后割胶回收一次 PCR 产物,并以稀释 10 倍的回收产物为模板,再根据序列特征设计 dCAPS 标记引物 dcDep1(内侧引物)进行巢式扩增,获得二次 PCR 产物,最后进行 *Sal* I 内切酶酶切,酶切产物电泳检测。

dCAPS 引物设计是根据 *HvDep1* 序列以及 Golden Promise 半矮秆大麦品种在该基因序列的第 1508、1509 位点间插入 A 碱基这一特性进行的。利用在线软件 dCAPS Finder 2.0 (<http://helix.wustl.edu/dcaps/dcaps.html>) 确认插入位点的酶切信息,该位点不存在限制性酶切位点,利用反向互补序列,人工引入 2 个错配碱基,查找限制性酶切位点,开发 dCAPS 标记,选择特异、经济的 *Sal* I 作为候选标记所用酶。利用 Oligo 7.0 软件在候选 dCAPS 标记位点两侧设计 PCR 引物 dcDep1,其上游引物序列: 5'-GCTACATTACTTGAAGGGG GTCGA-3' (斜体为错配碱基),下游引物序列为: 5'-CATCCAGACC-TAATTAGCTG-3'。dcDep1 引物扩增产物涵盖插入位点,PCR 产物预期长度大小为 140 bp。理论上,野生型 *Ari-e.GP* 基因(无插入位点)可被 *Sal* I 酶酶切,获得 116 bp 和 24 bp 片段,而突变型 *ari-e.GP* 基因(有插入位点),无法被 *Sal* I 酶识别,获得 140 bp 片段。

1.4 PCR 反应

IL280 和 IL281 引物 PCR 条件为: 95 °C 预变性 3 min, 每个循环 94 °C 变性 30 s, 60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 共 35 个循环, 最后 72 °C 延伸 5 min, 4 °C 保存。引物 dcDep1 的 PCR 条件为: 95 °C 预变性 3 min, 每个循环 94 °C 变性 30 s, 60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 20 s, 共 35 个循环, 最后 72 °C 延伸 5 min, 4 °C 保存。

1.5 PCR 产物回收

采用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒(Magen D2111), 操作方法按说明书进行。

1.6 *Sal* I 酶切和电泳检测

dCAPS 标记的酶切反应体系: 二次 PCR 产物 4.0 μ L, *Sal* I 内切酶反应缓冲液 2.0 μ L, *Sal* I 内切酶 0.4 μ L, ddH₂O 补足 20 μ L, 37 °C 温浴 2 h, 酶切产物用 3% 琼脂糖胶电泳检测。

2 结果与分析

2.1 大麦半矮秆基因 *ari-e.GP* 基因特异性标记的开发

利用上游引物 IL280 和下游引物 IL281 进行第一次 PCR 扩增, 一次 PCR 产物的电泳结果见图 1。由图 1 可知, 大麦品种藏 QB09、VB9104、Golden Promise(携带 *ari-e.GP* 基因)和 Dash(携带 *ari-e.GP* 基因)都获得单一条带。

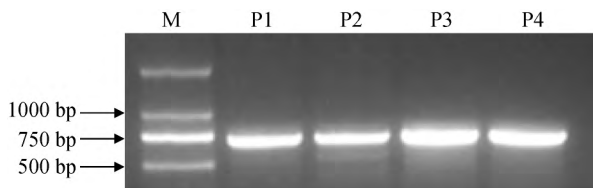


图1 引物 IL280 和 IL281 的一次 PCR 产物电泳图

注: M 为 DNA Marker DL2000; P1 为藏 QB09; P2 为 VB9104; P3 为 Golden Promise; P4 为 Dash。

二次 PCR 产物用 *Sal* I 内切酶进行酶切, 电泳结果见图 2 所示。图 2 表明, 未酶切前, 4 个亲本的产物大小为 140 bp 左右; *Sal* I 内切酶酶切后, 中高秆品种藏 QB09 和 VB9104 检测到约 116 bp 的小片段, 表明二次 PCR 产物被 *Sal* I 内切酶识别; 半矮秆品种 Golden Promise 和 Dash 因插入 A 碱基, 因此不包含被 *Sal* I 内切酶识别序列, 仍然能检测到 140 bp 的大片段。

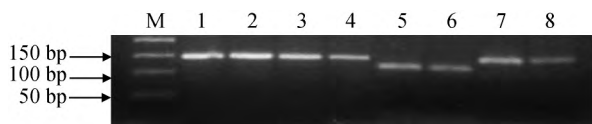


图2 dcDep1 分子标记检测 *ari-e.GP* 基因

注: M 为 DNA Marker 50 bp ladder; 1—4 为大麦品种藏 QB09、VB9104、Golden Promise 和 Dash 的二次 PCR 产物; 5—8 依次为 *Sal* I 内切酶酶切大麦品种藏 QB09、VB9104、Golden Promise 和 Dash 的二次 PCR 产物。

2.2 *ari-e.GP* 基因特异性标记的群体内验证

为验证分子标记 dcDep1 对大麦半矮秆表型的选择效率, 保证分子标记辅助育种结果的准确性, 对藏 QB09 和 Golden Promise 组合的 F2 群体随机选取 107 个单株进行 *ari-e.GP* 基因型鉴定。先用外侧引物(IL280 和 IL281)进行第一次扩增, 再用内侧引物 dcDep1 进行巢式扩增, 最后用 *Sal* I 内切酶酶切和电泳检测, 共有 28 个单株扩增出中高秆亲本藏 QB09 带型, 20 个单株扩增出半矮秆亲本 Golden Promise 带型, 其余 59 个单株为杂合带型。对基因型分型比(28:59:20)进行卡方检验表明符合 1:2:1 的孟德尔单基因分离比($\chi^2 = 2.25 < \chi^2_{0.05} = 5.99$),

基因型鉴定结果和表型鉴定结果吻合, 同时该标记表现为共显性标记。部分样品的电泳结果如图 3 所示。

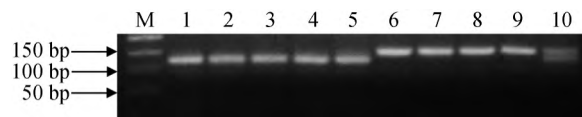


图3 dcDep1 分子标记检测藏 QB09/Golden Promise F2 群体

注: M 为 DNA Marker 50 bp ladder; 1—5 为中高秆株系, 6—9 为半矮秆株系, 10 为杂合株系。

对 Dash 和 VB9104 组合的 DH 群体的 20 个高秆株系和 20 个半矮秆株系进行 *ari-e.GP* 基因型检测, 发现高秆株系都检测到小片段, 而半矮秆株系都检测到大片, 部分样品的电泳结果如图 4 所示。进一步表明 *HvDep1* 基因的插入位点 A 与半矮秆性状共分离。

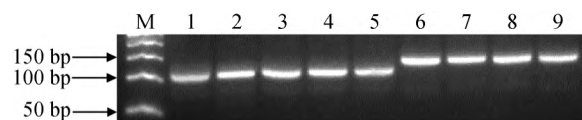


图4 dcDep1 分子标记检测藏 Dash/VB9104 DH 群体

注: M 为 DNA Marker 50 bp ladder; 1—5 为中高秆株系, 6—9 为半矮秆株系。

3 讨论

ari-e.GP 半矮秆基因, 即 *HvDep1*, 是水稻 *DEP1* 的同源基因, 编码 G 蛋白 γ 亚基; 该基因在第 1508、1509 位点间插入 A 碱基, 引起移码突变, 造成翻译提前终止, 使 Golden Promise 表现为半矮秆^[13]。根据 *ari-e.GP* 基因 2 号外显子插入 A 碱基这一特征, 利用在线软件 dCAPS Finder 2.0 设计 dCAPs 标记 dcDep1, 引入错配碱基使野生型 *Ari-e.GP* 基因可被 *Sal* I 内切酶识别, 而突变型 *ari-e.GP* 基因因有插入位点 A, 无法被 *Sal* I 内切酶识别, 因此通过 PCR、酶切和电泳的方式进行 *ari-e.GP* 基因型鉴定。

dCAPS 产物大小一般为 100~300 bp, 鉴于大麦基因组的复杂性和高重复性^[22], 小片段扩增容易产生多个同源序列。因此, 将 *HvDep1* 基因序列比对大麦基因组, 发现其与大麦基因组 3H 染色体上的基因 *HORVU3Hr1G051800* 同源性高达 99.9%。为了避免非目的片段的扩增, 本文通过引入巢式扩增的方法, 先用一对外侧引物(IL280 和 IL281)进行第一次扩增, 然后以一次 PCR 产物为模板, 再通过内侧引物 dcDep1 进行巢式扩增, 获得 dcDep1 标记的特异酶切序列。该方法适合于重复度高、同源基因较多的目标

基因的 dCAPS 分子标记的开发。

分子标记辅助选择育种能有效提高育种选择效率,成为传统育种方法的有效补充^[23]。Andersen 等^[24]提出功能性分子标记,其定义是基于与表型性状紧密相关的功能基因内部的多肽序列而开发的分子标记。功能性分子标记避免传统基因连锁标记存在的遗传累赘和重组等问题^[24],因此是分子辅助选择育种的理想标记^[24]。大麦中仅研发小部分与农艺性状相关的功能性分子标记,如基于错配技术的 SNP 分型法鉴定大麦蜡质 *Waxy* 基因^[26],春化基因 *Vrn-H1* 和半矮秆基因 *sdw1/denso* 的 InDel 标记^[10,27]、抗白粉病基因 *mlo* 基因的 CAPS 标记和 InDel 标记^[28]。本文开发的 dcDep1 分子标记位于功能基因 *ari-e.GP* 内,属于功能性分子标记,对 *ari-e.GP* 基因的选择准确率达 100%。通过对藏 QB09/Golden Promise F2 群体和 Dash/VB9104 DH 群体中 *ari-e.GP* 基因型的准确选择,进一步验证了 dcDep1 分子标记能有效的用于大麦矮秆分子标记辅助选择育种。随着大麦全基因组序列的公布和完善,分子标记技术和高通量测序技术的日益成熟,越来越多的大麦功能基因被克隆和相应功能分子标记被发掘,功能性分子标记的大量应用必将极大提高分子标记辅助选择的效率,从而节省大麦品种选育的人力、物力和财力。

4 结 论

为了使大麦 *ari-e.GP* 半矮秆基因在我国大麦矮秆育种中进行有效应用,本文利用该基因 2 号外显子单碱基插入突变位点设计并开发 dCAPS 功能性分子标记 dcDep1,主要结果如下:

a)dcDep1 分子标记扩增条带清晰,亲本间差异明显,且位于 *ari-e.GP* 基因序列内,因此标记选择准确度为 100%。

b)两个遗传群体的基因型鉴定与田间观察结果完全吻合,进一步证实该分子标记筛选的准确性。

c)dcDep1 分子标记操作简单,只需 PCR 扩增和酶切就可完成,而且属于共显性标记,检测效率高,因此非常适合用于隐性大麦半矮秆基因 *ari-e.GP* 的分子标记辅助选择。

参考文献:

- [1] 张京. 我国大麦育种的矮源分析[J]. 中国农业科学, 2002, 35(7):758-764.
- [2] 徐忆中, 陈世明, 杨建明, 等. 大麦离体诱变后代中一

个早熟突变的发生及遗传分析[J], 大麦科学, 1996, 4(4):6-9.

- [3] Kuczyńska A, Surma M, Adamski T, et al. Effects of the semi-dwarfing *sdw1/denso* gene in barley [J]. Journal of Applied Genetics, 2013, 54(4): 381-390.
- [4] 贾巧君. 大麦半矮秆基因 *sdw1/denso* 的克隆与功能分析[D]. 杭州: 浙江大学, 2015:23-24.
- [5] 张京. 中国大麦育种主要矮源的遗传等位测验[J]. 作物学报, 1998, 24(1):42-46.
- [6] Takahashi R, Yamashi J. Studies on the classification and the geographical distribution of the Japanese barley varieties. III. On the linkage relations and the origin of the "uzu" or semibrachytic characters in barley[J]. Ber Ohara Inst Landwirtsch Biol, 1951, 9: 399-410.
- [7] Chono M, Honda I, Zeniya H, et al. A semidwarf phenotype of barley *uzu* results from a nucleotide substitution in the gene encoding a putative brassinosteroid receptor[J]. Plant Physiol, 2003, 133(3):1209-1219.
- [8] Mickelson H R, Rasmusson D C. Genes for short stature in barley [J]. Crop Science, 1994, 34(5): 1180-1183.
- [9] Jia Q J, Zhang J G, Westcott S, et al. GA-20oxidase as a candidate for the semidwarf gene *sdw1/denso* in barley [J]. Funct Integr Genomics, 2009, 9(2): 255-262.
- [10] 贾巧君, 杨建明, 李承道, 等. 大麦半矮秆基因 *sdw1/denso* 的基因标记及其应用: ZL201410053080 [P]. 2015-06-17.
- [11] Xu Y H, Jia Q J, Zhou G F, et al. Characterization of the *sdw1* semi-dwarf gene in barley[J]. BMC plant biology, 2017, 17(1): 11.
- [12] Pakniyat H, Handley L L, Thomas W T B, et al. Comparison of shoot dry weight, Na⁺ content and $\delta^{13}C$ values of *ari-e* and other semi-dwarf barley mutants under salt stress[J]. Euphytica, 1997, 94(1):7-14.
- [13] Wendt T, Holme I, Dockter C, et al. *HvDep1* is a positive regulator of culm elongation and grain size in barley and impacts yield in an environment-dependent manners[J]. Plos One, 2016, 11(12):e0168924.
- [14] Persson, G. An attempt to find suitable genetic markers for dense ear loci in barley[J]. Hereditas, 1969, 62(3):25-96.
- [15] Thomas W T B, Powell W, Wood W. The chromosomal location of the dwarfing gene present in the spring barley variety Golden Promise [J]. Heredity, 1984, 53(1): 177-183.
- [16] Franckowiak J D. Allelism tests among selected semi-dwarf barleys[J]. Barley Genetics, 1991, 21: 17-23.

- [17] Forster B P. Mutation genetics of salt tolerance in barley: An assessment of Golden Promise and other semi-dwarf mutants [J]. *Euphytica*, 2001, 120: 317-338.
- [18] Forster B P, Pakniyat H, Macaulay M, et al. Variation in the leaf sodium content of the *Hordeum vulgare* (barley) cultivar Maythorpe and its derived mutant cv. Golden Promise [J]. *Heredity*, 1994, 73 (3): 249-253.
- [19] Pakniyat H, Thomas W T B, Caligari P D S, et al. Comparison of salt tolerance of *GPert* and *non-GPert* barleys [J]. *Plant Breeding*, 1997, 116(2): 189-191.
- [20] Liu H, Bayer M, Druka A, et al. An evaluation of genotyping by sequencing (GBS) to map the *Breviatistatum-e* (*ari-e*) locus in cultivated barley [J]. *BMC Genomics*, 2014, 15: 104.
- [21] Jia Q J, Tan C, Wang J M, et al. Marker development using SLAF-seq and whole-genome shotgun strategy to fine-map the semi-dwarf gene *ari-e* in barley [J]. *BMC Genomics*, 2016, 17(1): 911.
- [22] Ariyadasa R, Mascher M, Nussbaumer T, et al. A sequence-ready physical map of barley anchored genetically by two million single-nucleotide polymorphisms [J]. *Plant Physiology*, 2014, 164(1): 412-423.
- [23] Varshney R K, Langridge P, Graner A. Application of genomics to molecular breeding of wheat and barley [J]. *Advances in Genetics*, 2007, 58: 121-155.
- [24] Andersen J R, Lübberstedt T. Functional markers in plants [J]. *Trends in Plant Science*, 2003, 8(11): 554-560.
- [25] 刘国圣, 张大乐. 功能性分子标记在小麦育种中的应用 [J]. *生物技术通报*, 2016, 32(11): 18-29.
- [26] Domon E, Yanagisawa T, Saito A, et al. Single nucleotide polymorphism genotyping of the barley *waxy* gene by polymerase chain reaction with confronting two-pair primers [J]. *Plant Breeding*, 2003, 123(3): 225-228.
- [27] Fu D, Szucs P, Yan L, et al. Large deletions within the first intron in *VRN-1* are associated with spring growth habit in barley and wheat [J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 2005, 273(1): 54-65.
- [28] Kokina A, Legzdina L, Berzina I, et al. Molecular marker-based characterization of barley powdery mildew *MLO* resistance locus in European varieties and breeding lines [J]. *Agronomijas Vestis*, 2008, 11: 77-83.

(责任编辑: 唐志荣)