

青稞籽粒硬度基因*HvHinb-1* 鉴定及其表达特性分析

郭凤贵^{1,3}, 彭雅婷^{1,3}, 王燕^{2,3}, 谢润东^{2,3}, 姚有华^{2,3}, 姚晓华^{2,3}

(1. 青海大学农牧学院, 青海西宁 810016; 2. 青海大学农林科学院, 青海西宁 810016;

3. 青海省青稞遗传育种重点实验室/国家麦类改良中心青海青稞分中心/青藏高原种质资源研究与利用实验室, 青海西宁 810016)

摘要:为获得青稞籽粒硬度相关基因*HvHinb-1*的优异基因型,选取硬度差异显著的青稞品种苏马(硬度值:14.66±1.55)和南木林(硬度值:21.42±1.83),通过PCR克隆并测序获得*HvHinb-1*基因序列,分析不同基因型序列特征、蛋白理化性质及表达模式;分析*HvHinb-1*在21份硬度不同的青稞品种的分布及基因型,并利用实时荧光定量PCR(qRT-PCR)技术检测*HvHinb-1*在籽粒发育不同阶段(乳熟早期、中期和晚期)的表达量。结果表明,从青稞品种苏马和南木林中均可克隆到*HvHinb-1*基因,其编码蛋白序列一致性为98.64%,存在2个氨基酸差异。*HvHinb-1*为亲水性碱性蛋白,等电点8.69,分子量16.12~16.14 kDa,二级结构组成以 α -螺旋和无规卷曲为主。经系统进化分析,青稞与大麦*HvHinb-1*亲缘关系最近。在12份硬度较小(硬度:9.04~15.04)青稞材料中,*HvHinb-1*的氨基酸序列在第78和94处为H,9份硬度较大(硬度:18.93~22.76)青稞材料中,其氨基酸序列在第78和94处为Q。通过qRT-PCR分析,在乳熟早期籽粒中,*HvHinb-1*在苏马中的表达量显著高于南木林,而在乳熟中期,在南木林中表达量极显著高于苏马,说明该时期可能是籽粒硬度形成的关键阶段。

关键词:青稞; *Hinb-1* 基因; 籽粒硬度; 克隆; 表达分析

中图分类号:S512.3;S330

文献标识码:A

文章编号:1009-1041(2026)03-0312-09

Identification and Expression Characteristics Analysis of the Grain Hardness Gene *HvHinb-1* in Hulless Barley

GUO Fenggui^{1,3}, PENG Yating^{1,3}, WANG Yan^{2,3}, XIE Rundong^{2,3}, YAO Youhua^{2,3}, YAO Xiaohua^{2,3}

(1. College of Agriculture and Animal Husbandry of Qinghai University, Xining, Qinghai 810016, China; 2. Qinghai University

Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Xining, Qinghai 810016, China; 3. Qinghai Provincial Key Laboratory of

Qingke Genetic Breeding/ Qinghai Barley Subcenter of National Wheat Improvement Center/ Laboratory of Germplasm

Resources Research and Utilization on the Qinghai-Tibet Plateau, Xining, Qinghai 810016, China)

Abstract :To obtain the superior genotype of *HvHinb-1* gene related to the hardness of hulless barley grains, two hulless barley varieties with significant differences in hardness were selected: Suma(hardness value: 14.66±1.55) and Nanmulin(hardness value: 21.42±1.83). The *HvHinb-1* gene sequence through PCR were done to analyzed the sequence characteristics, protein physicochemical properties, and expression patterns of different genotypes, and explored their roles in the formation of hulless barley grain hardness. The distribution and genotype of *HvHinb-1* in 21 hulless barley varieties with different hardness were analyzed, and the expression of *HvHinb-1* in different stages of grain development(early, middle and late milk ripening) was detected by real-time quantitative PCR(qRT-PCR). The results showed that the *HvHinb-1* was cloned from both the Suma and Nanmulin, with a sequence identity of 98.64%, and two amino acid differences. *HvHinb-1* is a hydrophilic basic protein

收稿日期:2025-04-02

修回日期:2025-05-21

基金项目:青海大学农牧学院农科拔尖创新人才科研训练项目(NKX202410);青海省青稞育种联合攻关项目;国家大麦(青稞)产业技术体系专项(CARS-05)

第一作者 E-mail:2790066752@qq.com(郭凤贵);3508597744@qq.com(彭雅婷)

通讯作者 E-mail:yaoxiaohua009@126.com(姚晓华)

with an isoelectric point of 8.69 and a molecular weight of 16.12 to 16.14 kDa, primarily composed of α -helices and random coils. Phylogenetic analysis indicated that hulless barley *HvHinb-1* has the closest genetic relationship to wheat. In the preliminary identification of 12 samples of low-hardness hulless barley (hardness value range: 9.04–15.04), the amino acid sequence at the mutation sites 78 and 94 was H, and in 9 samples of high-hardness hulless barley (hardness value range: 18.93–22.76), the amino acid sequence at the mutation sites 78 and 94 was Q. qRT-PCR analysis showed that in early milk ripening grains, the expression level of *HvHinb-1* was significantly higher in Suma than that in Nanmulin, and in mid-milk ripening, it was extremely higher in Nanmulin than in Suma, suggesting that this period may be crucial for grain hardness formation.

Keywords: Hulless barley; *Hinb-1* gene; Grain hardness; Cloning; Expression analysis

青稞 (*Hordeum vulgare* L. var. *nudum* Hook. F.) 是青藏高原的特色作物, 在提供藏族人民食物和草料方面发挥着至关重要的作用^[1]。因其具有耐旱、抗寒、耐盐碱、抗逆性强、生长期短等特点, 在西藏、甘肃、四川、青海等高原地区广泛种植, 是最具有高原特色的农作物, 也是海拔 4 500 m 以上的高寒地区可以成熟的少数作物之一^[2-3]。青稞富含膳食纤维、蛋白质和维生素, 且脂肪和可溶性糖含量较低^[4], 还蕴含丰富的 β -葡聚糖、阿拉伯木聚糖、黄酮类物质、多酚等多种抗氧化剂和其他具有生理活性的化合物^[5]。研究表明, 长期摄入青稞有助于降低某些慢性和代谢疾病的风险, 包括降血糖血脂以及降低冠心病、肥胖症以及癌症产生的风险, 提高人体免疫力, 被认为是药食同源的食品^[6-7]。

作物籽粒硬度取决于蛋白质与胚乳中淀粉颗粒结合的紧密程度, 主要由遗传控制^[8]。青稞的籽粒硬度不仅与产量和加工品质密切相关, 而且还直接影响其储存稳定性和经济效益^[9-10]。挖掘与青稞籽粒硬度相关的基因对青稞品质性状改良十分必要。研究表明, 青稞硬度位点 *Ha* 包含 *Hina*、*Hinb-1*、*Hinb-2* 和 *Gsp* 基因, 并被证明与晶粒硬度和干物质消化率 (DMD) 相关^[11]。在小麦中与 *Ha* 密切相关的基因分别是 *Pina*、*Pinb* 和 *Gsp-1a*^[12]。目前鲜见与青稞籽粒硬度相关基因的报道。

课题组前期利用转录组测序 (RNA-seq) 结果, 筛选获得青稞籽粒硬度相关基因 *HvHinb-1*, 该基因在籽粒硬度不同的青稞品种中表达量差异显著。本研究拟运用基因克隆、多序列比对及生物信息学预测技术解析青稞 *HvHinb-1* 基因, 明确优异基因型, 并采用 qRT-PCR 技术测定该基因表达动态, 为青稞品种选育提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

试验材料苏马 (硬度 14.66 左右)、南木林 (硬度 21.42 左右) 为籽粒硬度差异显著 ($P < 0.05$) 的青稞品种; 通过预试验选取 21 份籽粒硬度不同 (9 份硬度大, 12 份硬度小)、在不同环境下较为稳定的青稞品种用于试验结果验证。

1.2 试验设计

于 2024 年 3 月将供试材料种植于青海大学农林科学院试验田, 即青海西宁试验基地 (36.73°N, 101.75°E)、青海省贵德县农场 (36.04°N, 101.44°E)、青海省海西藏族自治州都兰县香日德农场 (36.03°N, 97.81°E), 品种按行播种, 行距 20 cm, 株距 10 cm, 每行种植 10 粒。于青海西宁试验基地采集 23 份青稞品种苗期的叶片和苏马、南木林乳熟早期 (播种后第 11 周)、乳熟中期 (播种后第 13 周)、乳熟晚期 (播种后第 15 周) 3 个关键生育期的主穗中部籽粒, 3 次生物学重复。所有样本经液氮冷冻后, 保存至 -80 °C 冰箱。所有品种成熟期按行收获, 干燥后进行脱粒、储存。

1.3 测定项目与方法

1.3.1 青稞籽粒硬度测定

每个品种随机选取 10 粒成熟且完整的青稞籽粒, 用自动颗粒硬度计 (山东盛泰仪器有限公司) 测量籽粒硬度, 计算平均值与标准差。

1.3.2 青稞叶片 DNA 的提取

将冷冻保存的青稞叶片研磨成粉状, 利用 DNAsecure 植物基因组 DNA 提取试剂盒 (天根生化科技有限公司) 提取 DNA; 利用超微量核酸蛋白测定仪 (Nano Photometer, 台达电子工业股份有限公司) 检测 DNA 浓度及纯度; 采用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳法检验 DNA 完整性。检测合

格的 DNA 样品分装后保存于-20 ℃低温冰箱。

1.3.3 青稞*HvHinb-1* 基因的克隆

采用 Primer 5.0 软件设计*HvHinb-1* 基因特异性引物(*HvHinb-1*-F/R),引物序列见表 1。以 23 个青稞品种叶片基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增。扩增体系、反应程序及电泳检测均参照前人研究方法^[13]。采用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒(Magen)对目标条带进行回收,并通过超微量核酸分析仪(ADP-90MD H)测定回收产物的浓度与纯度。将回收产物与 pEasy-Blunt 克隆载体连接后,转化至 Trans-T1 感受态细胞中^[14]。通过单菌落 PCR 筛选能扩增出清晰目标条带的阳性菌,接种至 10 mL 含 Kana 的 LB 液体培养基中,于 THD-200D 台式恒温振荡箱(北京亚泰科隆仪器技术有限公司)37 ℃、200 r·min⁻¹ 培养,隔天将菌液样本交由擎科生物公司完成双向测序分析^[15]。

1.3.4 青稞*HvHinb-1* 基因的生物信息学分析

基于 NCBI 数据库对*HvHinb-1* 基因保守结构域生物信息学分析,结合 Expasy Protparma 与 Protscaie 解析其编码蛋白的理化特性^[16]。利用 SignalP 4.1 和 TMHMM-2.0 双平台分别预测该蛋白的信号肽分布及跨膜结构域^[16]。通过 SOP-MA 算法与 SWISS-MODEL 同源建模技术,系统

预测青稞 *HvHinb-1* 蛋白的二级构象与三级空间结构^[16]。借助 NCBI BLASTP 功能模块与 Primer 5.0 软件,将该蛋白氨基酸序列与禾本科代表性物种大麦(*Hordeum vulgare*)、布顿大麦草(*Hordeum bogdanii*)、球茎大麦(*Hordeum bulbosum*)等 12 种禾本科植物进行多序列同源比对;并用 Mega 5.1 构建系统进化树,阐明其进化关系^[16]。

1.3.5 青稞*HvHinb-1* 基因表达模式分析

以扩增并测序获得的*HvHinb-1* 基因序列为参照,利用 Primer 5.0 设计荧光实时定量 PCR 引物*HvHinb-1*-SF/SR(表 1)。将苏马和南木林籽粒乳熟早期(播种后 11 周)、乳熟中期(播种后 13 周)和乳熟晚期(播种后 15 周)的籽粒用北京麦瑞博生物科技有限公司 RNA 试剂盒(TaKaRa MiniBEST Plant RNA Extraction Kit)提取 RNA,并合成 cDNA 模板,*18SrRNA* 为内参基因(表 1),采用 TB Green premixExTaq II 荧光染料(TaKaRa 公司),利用 Light Cyclcr 480 System(罗氏诊断公司)进行实时荧光定量 PCR(qRT-PCR),反应体系:TB Green premixExTaq II 12.5 μL,正反向引物各 1.0 μL,cDNA 3.0 μL,ddH₂O 7.5 μL,共 25 μL。反应程序参照说明书,3 次重复。

表 1 本试验所用引物
Table 1 Primers used in this study

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'-3')	用途 Purpose
<i>HvHinb-1</i> -F	AGAGGAAGTCTCAACCCAT	基因克隆 Gene cloning
<i>HvHinb-1</i> -R	AACCCACCATCAACAAAC	
<i>HvHinb-1</i> -SF	GGATTACGTGATGGAGCGGT	实时定量 Real-time PCR
<i>HvHinb-1</i> -SR	CTGGCAACACTTCTCCGAA	
<i>18SrRNA</i> -F	CGGCTACCACATCCAAGGAA	内参引物 Control
<i>18SrRNA</i> -R	GCTGGAATTACGCGGCT	

1.4 数据处理及分析

利用 Excel 2016 和 SPSS 22.0 对数据进行整理和方差分析,采用 2^{-ΔΔC_t} 法计算*HvHinb-1* 基因的相对表达量。

2 结果与分析

2.1 青稞籽粒硬度分析

对三个试点的青稞品种苏马与南木林进行籽粒硬度测定,其平均值分别为 14.66±1.55 和 21.42±1.83,存在极显著差异(*P*<0.001)。

2.2 青稞*HvHinb-1* 基因的克隆及序列分析

以引物*HvHinb-1*-F/R 对南木林和苏马的叶片 DNA 进行扩增(图 1A),获得 1 条全长为 651 bp 的目的条带,该基因开放阅读框为 444 bp,共编码 147 个氨基酸(图 1B 和 C)。序列比对结果显示,南木林与苏马的核苷酸序列一致性为 99.55%,两者在 234 和 282 bp 处存在差异,导致产生两个氨基酸差异,一致性为 98.64%,南木林的氨基酸序列在第 78 和 94 处均为 Q,苏马均为 H。序列保守结构域预测结果表明,*HvHinb-1* 蛋白属于

α-淀粉酶抑制剂和种子储存蛋白亚家族(AAI-SS)(图 1D、E)。

HvHinb-1 蛋白理化性质分析结果表明,苏马的 HvHinb-1 蛋白分子式为 C₇₁₅H₁₁₀₃N₁₉₇O₂₀₂S₁₄, 分子量为 16.14 kDa,不稳定指数为 33.86,脂溶指数为 67.01,理论等电点为 8.69,其中负电荷残基为 11 个,正电荷残基为 16 个。南木林的 HvHinb-1 蛋白分子式为 C₇₁₃H₁₁₀₅N₁₉₅O₂₀₄S₁₄, 分子量为 16.12 kDa,不稳定指数为 37.79,脂溶指数为 67.01,理论等电点为 8.69,其中负电荷残基为 11 个,正电

荷残基为 16 个(表 2)。HvHinb-1 蛋白为亲水性的稳定碱性蛋白(图 2A、B),存在信号肽(图 2C、D)和跨膜结构(图 2E、F)。

二级结构预测结果(图 3A 和 3B)表明,在苏马和南木林中,HvHinb-1 蛋白组成均以 α-螺旋、无规则卷曲和延伸链为主,苏马中 3 者占比分别为 58.5%、38.1%、3.4%,南木林中 3 者占比分别为 56.46%、39.46%和 4.08%。三级结构预测结果(图 3C 和 3D)表明,该蛋白为含有 α-螺旋与无规则卷曲结构的低聚态单体。

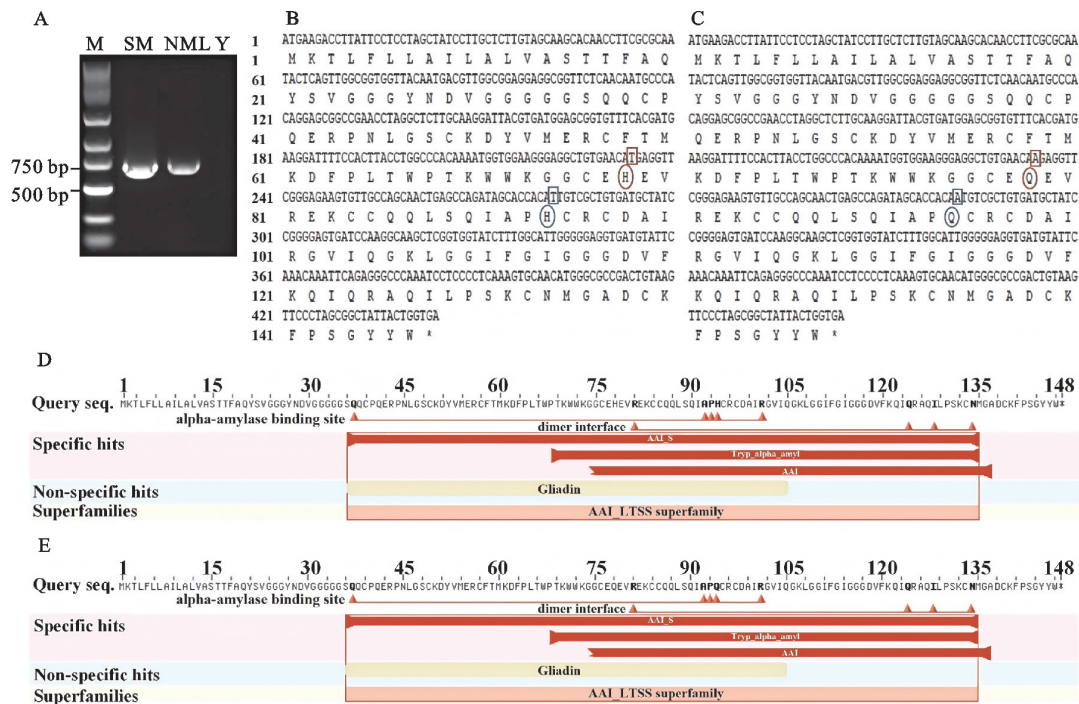


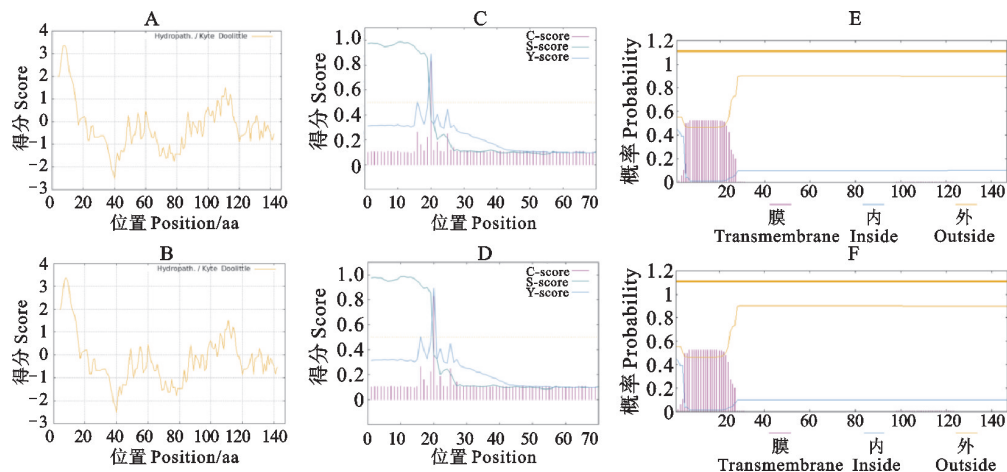
图 A 中,M、SM、NML 和 Y 分别为 DL2000、苏马、南木林和阴性对照。图 B 和 C 分别为苏马和南木林中*HvHinb-1* 基因的核酸和氨基酸序列,其中红、蓝色方框表示两个品种间核苷酸序列的差异,红、蓝色圆圈表示二者在氨基酸序列上的差异。图 D 和 E 分别为苏马和南木林中 HvHinb-1 蛋白的保守结构域。

In figure A, M is DL2000, SM, NML and Y are Soma, Nanmulin and the negative control, respectively. Figure B and C are nucleotide acid sequences and deduced amino acid sequences of *HvHinb-1* genes in Soma and Nanmulin, and the red and blue boxes represent the differences of nucleotide sequence between the two varieties, and the red and blue circles represent the differences of amino acid sequences between the two varieties, respectively. Figure D and E are the conserved domain prediction of *HvHinb-1* protein in Soma and Nanmulin, respectively.

图 1 *HvHinb-1* 基因的克隆(A)及结构分析(B~E)
Fig. 1 Cloning (A) and structurer analysis(B~E) of the *HvHinb-1* gene

表 2 HvHinb-1 理化性质
Table 2 Physical and chemical properties of HvHinb-1

指标 Index	苏马 Soma	南木林 Nanmulin
分子式 Molecular formula	C ₇₁₅ H ₁₁₀₃ N ₁₉₇ O ₂₀₂ S ₁₄	C ₇₁₃ H ₁₁₀₅ N ₁₉₅ O ₂₀₄ S ₁₄
分子量 Molecular weight/kDa	16.14	16.12
不稳定指数 Instability index	33.86	37.79
脂溶指数 Fat solubility index	67.01	67.01
理论等电点 Theoretical isoelectric point	8.69	8.69
负电荷残基(Asp+Glu) Negatively charged residue	11	11
正电荷残基(Arg+Lys) Positive residue	16	16
氨基酸数量 Number of amino acids	147	147

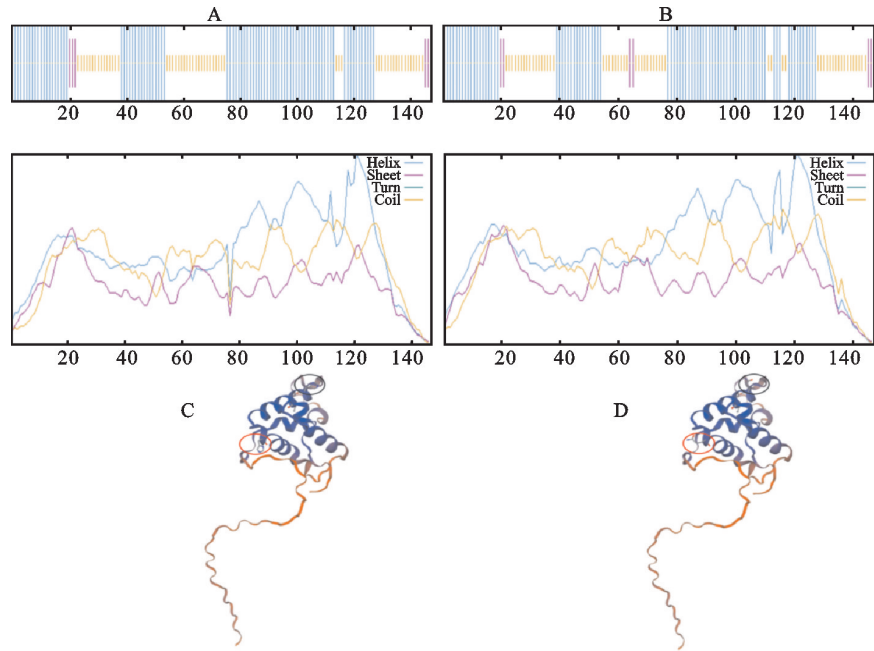


A: 苏马中 HvHinb-1 蛋白的亲水性预测; B: 南木林中 HvHinb-1 蛋白的亲水性预测; C: 苏马中 HvHinb-1 蛋白的信号肽预测; D: 南木林中 HvHinb-1 蛋白的信号肽预测; E: 苏马中 HvHinb-1 蛋白的跨膜结构预测; F: 南木林中 HvHinb-1 蛋白的跨膜结构预测。

A: Hydrophilicity prediction of HvHinb-1 protein in Suma; B: Hydrophilicity prediction of HvHinb-1 protein in Nanmulin; C: Signal peptide prediction of HvHinb-1 protein in Suma; D: Signal peptide prediction of HvHinb-1 protein in Nanmulin; E: Prediction of the transmembrane structure of HvHinb-1 protein in Suma; F: Prediction of the transmembrane structure of HvHinb-1 protein in Nanmulin.

图 2 HvHinb-1 蛋白的亲水性、信号肽、跨膜结构域预测

Fig. 2 Prediction of the hydrophilicity, signal peptide and transmembrane domain of HvHinb-1 protein



A: 苏马 HvHinb-1 基因二级结构预测; B: 南木林 HvHinb-1 基因二级结构预测; C: 苏马 HvHinb-1 蛋白三级结构预测; D: 南木林 HvHinb-1 蛋白三级结构预测; 蓝色为 α -螺旋; 红色为延伸链; 橙色为随机卷圈。

A: Secondary structure prediction of Suma HvHinb-1 Gene; B: Secondary structure prediction of Nanmulin HvHinb-1 Gene; C: Tertiary structure prediction of Suma HvHinb-1 Protein; D: Tertiary structure prediction of Nanmulin HvHinb-1 Protein; Blue: α -helix; Red: Extended chain; Orange: Random coil.

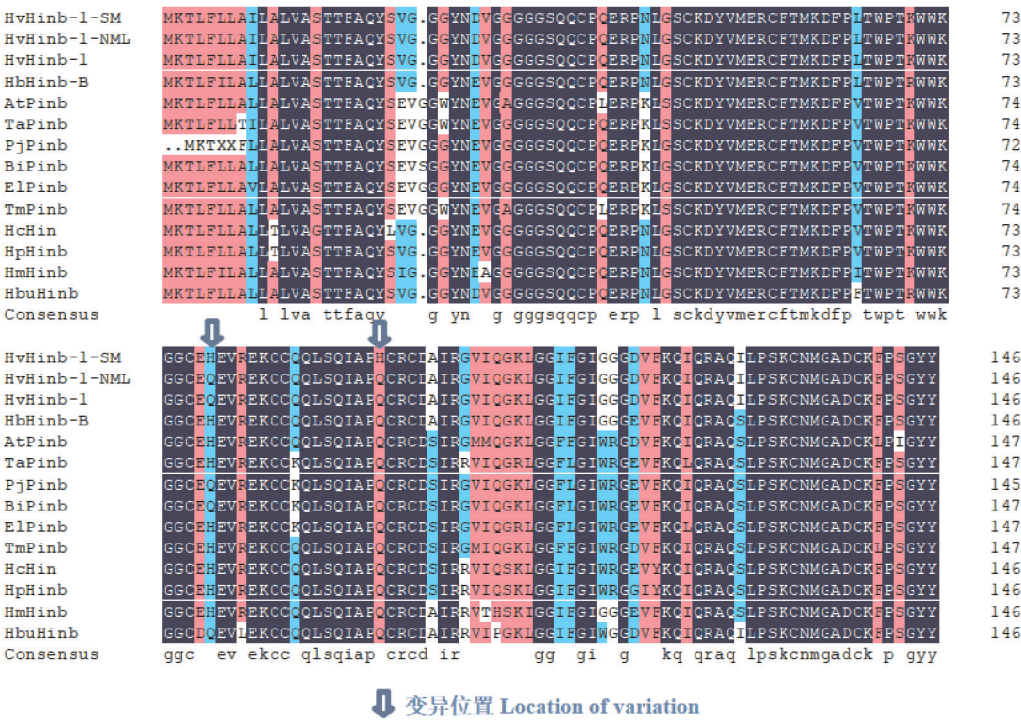
图 3 HvHinb-1 蛋白二级 (A 和 B) 和三级结构 (C 和 D) 预测

Fig. 3 Prediction of the secondary (A and B) and the tertiary (C and D) structures of the HvHinb-1 protein

2.3 HvHinb-1 蛋白的同源比较及系统进化分析

同源比对结果 (图 4) 表明, HvHinb-1 蛋白与 大麦 (*Hordeum vulgare*)、布顿大麦草 (*Hordeum bogdanii*)、球茎大麦 (*Hordeum bulbosum*) 的 Hinb-1 蛋白氨基酸序列一致性较高, 分别为 100%、95.24%、94.56%。系统进化分析结果

(图 5) 表明, 在 13 种禾本科植物种中, 青稞与 大麦的 Hinb-1 蛋白亲缘进化关系最近, 与新麦草 (*Psathyrostachys juncea*)、无芒雀麦 (*Bromus inermis*)、披碱草 (*Elymus libanoticus*) 和一粒小麦 (*Triticum monococcum*) 的亲缘进化关系最远。



HvHinb-1-SM: 青稞苏马; HvHinb-1-NML: 青稞南木林; HvHinb-1: 大麦; HbHinb-B: 布顿大麦草; AtPinb: 三芒山羊草; TaPinb: 小麦; PjPinb: 新麦草; BiPinb: 无芒雀麦; ElPinb: 披碱草; TmPinb: 一粒小麦; HcHin: 智利大麦; HpHinb: 小大麦; HmHinb: 野生大麦; HbuHinb: 球茎大麦。图 5 同。

HvHinb-1-SM: *Hordeum vulgare* L. var. *nudum* Hook. f. Suma; HvHinb-1-NML: *Hordeum vulgare* L. var. *nudum* Hook. f. Nanmulin; HvHinb-1: *Hordeum vulgare*; HbHinb-B: *Hordeum bogdanii*; AtPinb: *Aegilops triuncialis*; TaPinb: *Triticum aestivum*; PjPinb: *Psathyrostachys juncea*; BiPinb: *Bromus inermis*; ElPinb: *Elymus libanoticus*; TmPinb: *Triticum monococcum*; HcHin: *Hordeum chilense*; HpHinb: *Hordeum pusillum*; HmHinb: *Hordeum murinum subsp. Glaucum*; HbuHinb: *Hordeum bulbosum*. The same in figure 5.

图 4 HvHinb-1 与禾本科其他植物中 Hinb-1 蛋白的序列比对

Fig. 4 Sequence alignment of HvHinb-1 with Hinb-1 from other plants of the Gramineous family



图 5 HvHinb-1 蛋白与其他禾本科植物 Hinb-1 蛋白的系统发育分析

Fig. 5 Phylogenetic analysis of HvHinb-1 protein and Hinb-1 protein in other Gramineous plants

2.4 21 份青稞品种籽粒硬度分析

将 21 份籽粒硬度存在差异的青稞品种分为大硬度(18.93~22.76,9 份)和小硬度(9.04~15.04,12 份)两组(表 3)。经 SPSS 22.0 分析发现,两组间籽粒硬度存在极显著差异($P<0.01$)。比对 21 个青稞品种的 HvHinb-1 蛋白序列发现,六十天、白青稞等小硬度品种的氨基酸序列与康巴青稞、紫青稞-日喀则等大硬度青稞品种存在两处氨基酸差异,在变异处小硬度品种均为 H,大硬度品种均为 Q(图 6),推测青稞籽粒硬度不同与这两处氨基酸差异有关。

2.5 不同时期青稞籽粒中HvHinb-1 基因的表达

qRT-PCR 结果(图 7)表明,在籽粒中,苏马与南木林两个品种间HvHinb-1 的表达量在乳熟早期存在显著性差异($P<0.05$),苏马是南木林的 1.34 倍;乳熟中期两个品种间的表达量存在极显著差异($P<0.01$),南木林是苏马的 5.53 倍;乳熟晚期两个品种间的表达量差异不显著。推测乳熟早、中期是籽粒硬度形成的关键时期。

表3 21个青稞品种的籽粒硬度

Table 3 Grain hardness of 21 hulless barley varieties

编号 Number	品种 Variety	西宁 Xining	贵德 Guide	海西 Haixi	平均 Average
1	六十天 Liushitian	11.91	9.56	13.80	11.76±2.12
2	白青稞 Baiqingke	13.41	13.76	14.48	13.88±0.55
3	下康布青 Xiakangbuqing	14.14	13.79	15.33	14.42±0.81
4	门嘎如乃那 Mengarunaina	13.32	11.52	15.55	13.46±2.02
5	普兰白青稞 Pulanbaiqingke	14.09	15.10	15.93	15.04±0.092
6	全株黑 Quanzhuhei	15.05	12.37	14.76	14.06±1.47
7	俄载 Ezai	11.97	12.29	14.80	13.02±1.55
8	对芒青 Duimangqing	11.33	12.04	14.52	12.63±1.67
9	萨迦兰 Sajialan	12.98	14.00	15.30	14.09±1.16
10	长芒米大麦 Changmangmidamai	8.42	6.52	12.18	9.04±2.88
11	青青稞 Qingqingke	12.54	12.26	15.86	13.55±2.00
12	藏嘎达仁 Zanggadaren	12.05	12.57	14.29	12.97±1.17
13	康巴青稞 Kangbaqingke	20.16	20.41	18.74	19.77±0.90
14	紫青稞-日喀则 Ziqingke-rikaze	20.53	20.59	20.47	20.53±0.06
15	甘青4号 Ganqing 4	20.61	20.77	24.30	21.89±2.09
16	甘南 Gannan	18.31	20.71	20.94	19.99±1.46
17	蓝青稞 Lanqingke	18.70	18.55	19.54	18.93±0.53
18	长毛青稞 Changmaoqingke	19.18	19.60	21.91	20.23±1.47
19	嘎木 Gamu	19.78	19.14	22.87	20.60±1.99
20	白青稞 Baiqingke	19.40	19.27	22.10	20.26±1.60
21	二道眉白颖灰粒青稞 Erdaomeibaiyinghuiqingke	22.15	23.23	22.90	22.76±0.55

1~12:小硬度青稞品种;13~21:大硬度青稞品种。

1-12: Low-hardness hulless barley varieties; 13-21: High-hardness hulless barley varieties.

六十天 Liushitian	MKTLFLIAIALVASTTFAQYSVGGGYNDVGGGGGQQCFQERPNLGSKDYVMERCFTMKDFPLTWPTKWWKG	74
白青稞 Baiqingke	MKTLFLIAIALVASTTFAQYSVGGGYNDVGGGGGQQCFQERPNLGSKDYVMERCFTMKDFPLTWPTKWWKG	74
下康布青 Xiakangbuqing	MKTLFLIAIALVASTTFAQYSVGGGYNDVGGGGGQQCFQERPNLGSKDYVMERCFTMKDFPLTWPTKWWKG	74
门嘎如乃那 Mengarunaina	MKTLFLIAIALVASTTFAQYSVGGGYNDVGGGGGQQCFQERPNLGSKDYVMERCFTMKDFPLTWPTKWWKG	74
普兰白青稞 Pulanbaiqingke	MKTLFLIAIALVASTTFAQYSVGGGYNDVGGGGGQQCFQERPNLGSKDYVMERCFTMKDFPLTWPTKWWKG	74
全株黑 Quanzhuhei	MKTLFLIAIALVASTTFAQYSVGGGYNDVGGGGGQQCFQERPNLGSKDYVMERCFTMKDFPLTWPTKWWKG	74
俄载 Ezai	MKTLFLIAIALVASTTFAQYSVGGGYNDVGGGGGQQCFQERPNLGSKDYVMERCFTMKDFPLTWPTKWWKG	74
对芒青 Duimangqing	MKTLFLIAIALVASTTFAQYSVGGGYNDVGGGGGQQCFQERPNLGSKDYVMERCFTMKDFPLTWPTKWWKG	74
萨迦兰 Sajialan	MKTLFLIAIALVASTTFAQYSVGGGYNDVGGGGGQQCFQERPNLGSKDYVMERCFTMKDFPLTWPTKWWKG	74
长芒米大麦 Changmangmidamai	MKTLFLIAIALVASTTFAQYSVGGGYNDVGGGGGQQCFQERPNLGSKDYVMERCFTMKDFPLTWPTKWWKG	74
青青稞 Qingqingke	MKTLFLIAIALVASTTFAQYSVGGGYNDVGGGGGQQCFQERPNLGSKDYVMERCFTMKDFPLTWPTKWWKG	74
藏嘎达仁 Zanggadaren	MKTLFLIAIALVASTTFAQYSVGGGYNDVGGGGGQQCFQERPNLGSKDYVMERCFTMKDFPLTWPTKWWKG	74
康巴青稞 Kangbaqingke	MKTLFLIAIALVASTTFAQYSVGGGYNDVGGGGGQQCFQERPNLGSKDYVMERCFTMKDFPLTWPTKWWKG	74
紫青稞-日喀则 Ziqingke-rikaze	MKTLFLIAIALVASTTFAQYSVGGGYNDVGGGGGQQCFQERPNLGSKDYVMERCFTMKDFPLTWPTKWWKG	74
甘青4号 Ganqing 4	MKTLFLIAIALVASTTFAQYSVGGGYNDVGGGGGQQCFQERPNLGSKDYVMERCFTMKDFPLTWPTKWWKG	74
甘南 Gannan	MKTLFLIAIALVASTTFAQYSVGGGYNDVGGGGGQQCFQERPNLGSKDYVMERCFTMKDFPLTWPTKWWKG	74
蓝青稞 Lanqingke	MKTLFLIAIALVASTTFAQYSVGGGYNDVGGGGGQQCFQERPNLGSKDYVMERCFTMKDFPLTWPTKWWKG	74
长毛青稞 Changmaoqingke	MKTLFLIAIALVASTTFAQYSVGGGYNDVGGGGGQQCFQERPNLGSKDYVMERCFTMKDFPLTWPTKWWKG	74
嘎木 Gamu	MKTLFLIAIALVASTTFAQYSVGGGYNDVGGGGGQQCFQERPNLGSKDYVMERCFTMKDFPLTWPTKWWKG	74
白青稞 Baiqingke	MKTLFLIAIALVASTTFAQYSVGGGYNDVGGGGGQQCFQERPNLGSKDYVMERCFTMKDFPLTWPTKWWKG	74
二道眉白颖灰粒青稞 Erdaomeibaiyinghuiqingke	MKTLFLIAIALVASTTFAQYSVGGGYNDVGGGGGQQCFQERPNLGSKDYVMERCFTMKDFPLTWPTKWWKG	74
六十天 Liushitian	GCEVREKCCQQLSQIAPRCRCIAIRGVIOGKLGIFGIGGGDVFKQIQRAQILSKCNMGADCKFPSPGY	146
白青稞 Baiqingke	GCEVREKCCQQLSQIAPRCRCIAIRGVIOGKLGIFGIGGGDVFKQIQRAQILSKCNMGADCKFPSPGY	146
下康布青 Xiakangbuqing	GCEVREKCCQQLSQIAPRCRCIAIRGVIOGKLGIFGIGGGDVFKQIQRAQILSKCNMGADCKFPSPGY	146
门嘎如乃那 Mengarunaina	GCEVREKCCQQLSQIAPRCRCIAIRGVIOGKLGIFGIGGGDVFKQIQRAQILSKCNMGADCKFPSPGY	146
普兰白青稞 Pulanbaiqingke	GCEVREKCCQQLSQIAPRCRCIAIRGVIOGKLGIFGIGGGDVFKQIQRAQILSKCNMGADCKFPSPGY	146
全株黑 Quanzhuhei	GCEVREKCCQQLSQIAPRCRCIAIRGVIOGKLGIFGIGGGDVFKQIQRAQILSKCNMGADCKFPSPGY	146
俄载 Ezai	GCEVREKCCQQLSQIAPRCRCIAIRGVIOGKLGIFGIGGGDVFKQIQRAQILSKCNMGADCKFPSPGY	146
对芒青 Duimangqing	GCEVREKCCQQLSQIAPRCRCIAIRGVIOGKLGIFGIGGGDVFKQIQRAQILSKCNMGADCKFPSPGY	146
萨迦兰 Sajialan	GCEVREKCCQQLSQIAPRCRCIAIRGVIOGKLGIFGIGGGDVFKQIQRAQILSKCNMGADCKFPSPGY	146
长芒米大麦 Changmangmidamai	GCEVREKCCQQLSQIAPRCRCIAIRGVIOGKLGIFGIGGGDVFKQIQRAQILSKCNMGADCKFPSPGY	146
青青稞 Qingqingke	GCEVREKCCQQLSQIAPRCRCIAIRGVIOGKLGIFGIGGGDVFKQIQRAQILSKCNMGADCKFPSPGY	146
藏嘎达仁 Zanggadaren	GCEVREKCCQQLSQIAPRCRCIAIRGVIOGKLGIFGIGGGDVFKQIQRAQILSKCNMGADCKFPSPGY	146
康巴青稞 Kangbaqingke	GCEVREKCCQQLSQIAPRCRCIAIRGVIOGKLGIFGIGGGDVFKQIQRAQILSKCNMGADCKFPSPGY	146
紫青稞-日喀则 Ziqingke-rikaze	GCEVREKCCQQLSQIAPRCRCIAIRGVIOGKLGIFGIGGGDVFKQIQRAQILSKCNMGADCKFPSPGY	146
甘青4号 Ganqing 4	GCEVREKCCQQLSQIAPRCRCIAIRGVIOGKLGIFGIGGGDVFKQIQRAQILSKCNMGADCKFPSPGY	146
甘南 Gannan	GCEVREKCCQQLSQIAPRCRCIAIRGVIOGKLGIFGIGGGDVFKQIQRAQILSKCNMGADCKFPSPGY	146
蓝青稞 Lanqingke	GCEVREKCCQQLSQIAPRCRCIAIRGVIOGKLGIFGIGGGDVFKQIQRAQILSKCNMGADCKFPSPGY	146
长毛青稞 Changmaoqingke	GCEVREKCCQQLSQIAPRCRCIAIRGVIOGKLGIFGIGGGDVFKQIQRAQILSKCNMGADCKFPSPGY	146
嘎木 Gamu	GCEVREKCCQQLSQIAPRCRCIAIRGVIOGKLGIFGIGGGDVFKQIQRAQILSKCNMGADCKFPSPGY	146
白青稞 Baiqingke	GCEVREKCCQQLSQIAPRCRCIAIRGVIOGKLGIFGIGGGDVFKQIQRAQILSKCNMGADCKFPSPGY	146
二道眉白颖灰粒青稞 Erdaomeibaiyinghuiqingke	GCEVREKCCQQLSQIAPRCRCIAIRGVIOGKLGIFGIGGGDVFKQIQRAQILSKCNMGADCKFPSPGY	146

↓ 变异位置 Location of variation

前12个为小硬度青稞品种;后9个为大硬度青稞品种。

The first 12 varieties are low-hardness hulless barley varieties; The last 9 varieties are high-hardness hulless barley varieties.

图6 21份青稞籽粒 HvHmb-1 测序结果

Fig. 6 Sequencing results of HvHmb-1 in 21 hulless barley grain

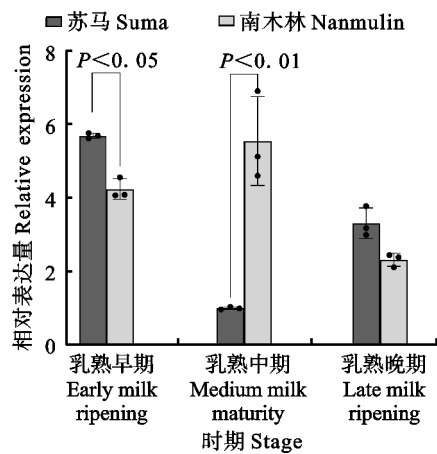


图 7 *HvHinb-1* 在两个品种不同时期籽粒中的表达量

Fig. 7 Expression of *HvHinb-1* in grains of two varieties at different stages

3 讨论

硬度作为青稞籽粒品质的关键评价指标,其重要性体现在多个维度:首先,在加工特性方面,硬度直接影响碾磨效率、出粉率和淀粉损伤程度;其次,在贮藏稳定性上,硬度与籽粒抗机械损伤能力和耐储性密切相关;最后,在终端产品质量方面,硬度决定了最终产品的口感、质地和外观品质^[17]。目前关于籽粒硬度的分子机制研究主要集中在水稻、小麦等主粮作物。Kim 等^[18]通过精细定位发现,水稻中的*OsFLOql2* 基因通过调控胚乳细胞壁中纤维素和半纤维素的沉积模式影响籽粒硬度。Morris^[19]的研究表明,小麦籽粒硬度主要由位于 5DS 染色体上的 puroindoline-a(PINA)和 puroindoline-b(PINB)蛋白基因调控,这两种蛋白与淀粉颗粒表面结合程度决定其硬度。Krishnamurthy 等^[20]的研究证实,将小麦 PINA/PINB 基因转入水稻可降低其籽粒硬度。这不仅揭示了禾本科作物硬度调控的保守机制,也为作物品质改良提供了新思路。相比之下,作为青藏高原特色作物的青稞,其硬度遗传机制研究明显滞后。

本研究从硬度差异显著的青稞品种苏马和南木林中获得与籽粒硬度相关基因*HvHinb-1*。序列分析发现,该基因编码区存在两个导致 H/Q 氨基酸替换的单核苷酸多态性位点。三级结构预测显示,这些突变可能导致蛋白质表面电荷分布和疏水核心的改变。进一步的蛋白功能注释表明,*HvHinb-1* 属于 α -淀粉酶抑制剂和种子储存蛋白亚家族^[21],与小麦 Puroindolines 同属 AAI_LTSS 蛋白家族^[22-23]。基于小麦中已建立的 Pina/Pinb“双基因平衡”调控模式^[24],我们推测青

稞中可能存在由 Hina、Hinb-1、Hinb-2 和 Gsp 组成的更为复杂的调控网络。除遗传因素外,环境条件对籽粒硬度的影响也不可忽视。本研究 3 个试点数据显示,青稞硬度呈现与常规认知相反的纬度分布特征:低纬度的海西地区(36.03°N,97.81°E)硬度值达到 17.65±3.37,显著高于较高纬度的西宁(36.73°N,101.75°E,硬度值 15.72±3.97)和贵德(36.04°N,101.44°E,硬度值 15.62±4.52)。通过环境因子相关性分析发现,这种异常分布可能与海西地区特殊的高原气候(年均温差 25.3℃,日照时数 3 098 h)有关,这可能促进了青稞籽粒中蛋白质和淀粉的积累,从而增加了籽粒的硬度^[25-26]。

基于当前研究进展,未来工作我们将着重于三个方向:首先,采用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术构建*HvHinb-1* 的敲除和点突变材料,以验证其功能;其次,通过多环境试验结合转录组分析,解析“基因型—环境—硬度”的互作网络;再者,建立基于近红外光谱的硬度加工品质预测模型。在育种方面,可针对不同需求开展定向改良:面向主食加工,培育中等硬度的通用型品种;针对功能食品开发,选育高 β -葡聚糖含量的专用品种;为适应高原仓储条件,选育高硬度耐储品种。通过将传统育种与现代分子技术相结合,有望培育出既保持青藏高原特色,又符合现代食品工业需求的青稞新品种,为区域经济发展和特色作物资源利用开辟新途径。

4 结论

青稞硬度相关基因*HvHinb-1* 全长为 651 bp,编码 147 个氨基酸,属于 α -淀粉酶抑制剂和种子储存蛋白亚家族(AAI_SS);小硬度的青稞氨基酸序列在第 78 和 94 处为 H,大硬度的青稞氨基酸序列在第 78 和 94 处为 Q;乳熟早、中期是青稞*HvHinb-1* 基因表达的关键时期。

参考文献:

[1]CHEN L P, YAO Y H, CUI Y M, *et al.* Understanding the molecular regulation of flavonoid 3'-hydroxylase in anthocyanin synthesis: Insights from purple Qingke [J]. *BMC Genomics*, 2024, 25(1): 823.

[2]冯 朵,王 靖,季晓娇,等. 青稞功效成分和保健功能研究进展 [J]. *食品科技*, 2020, 45(9): 57.

FENG D, WANG J, JI X J, *et al.* Recent progress in research on nutritional qualities and health benefits of highland barley [J]. *Food Science and Technology*, 2020, 45(9): 57.

[3]吕远平,熊莱君,贾利蓉,等. 青稞特性及在食品中的应用 [J]. *食品科学*, 2005, 26(7): 266.

LU Y P, XIONG M J, JIA L R, *et al.* Characteristics of barley

- and application in food industry [J]. *Food Science*, 2005, 26 (7): 266.
- [4] 徐瑶. 青稞和燕麦营养特性及血糖生成指数的研究[D]. 兰州: 兰州理工大学, 2024.
- XU Y. Study on nutritional characteristics and glycemic ogenic index of Qingke and oat [D]. Lanzhou: Lanzhou University of Technology, 2024.
- [5] 王梦倩, 孙颖, 邵丹青, 等. 青稞的营养价值和功效作用研究现状[J]. 食品研究与开发, 2020, 41(23): 206.
- WANG M Q, SUN Y, SHAO D Q, *et al.* Research status of nutritional value and efficacy of highland barley [J]. *Food Research and Development*, 2020, 41(23): 206.
- [6] TANG Y, XIAO L, WU X Y, *et al.* Impact of germination pretreatment on the polyphenol profile, antioxidant activities, and physicochemical properties of three color cultivars of highland barley [J]. *Journal of Cereal Science*, 2021, 97: 103152.
- [7] GUO T L, HORVATH C, CHEN L, *et al.* Understanding the nutrient composition and nutritional functions of highland barley (Qingke): A review [J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2020, 103: 109.
- [8] 李志业. 黄淮麦区小麦品种(系)籽粒硬度相关性状分析及 *Gsp-1* 基因 SNP 变异与籽粒硬度的关联性研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2011.
- LI Z Y. The analysis of characteristics related to grain hardness of wheat varieties (strains) in Huanghuai region and snps of GSP-1 and its relationship with kernel hardness [D]. Yangling: Northwest A&F University, 2011.
- [9] 张业伦. 普通小麦重要品质性状的 QTL 定位[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2008.
- ZHANG Y L. QTL mapping for important quality traits in common wheat [D]. Hefei: Anhui Agricultural University, 2008.
- [10] 刘新红. 青稞品质特性评价及加工适宜性研究[D]. 西宁: 青海大学, 2014.
- LIU X H. Study on quality evaluation and processing suitability of hulless barley [D]. Xining: Qinghai University, 2014.
- [11] TURUSPEKOV Y, BEECHER B, DARLINGTON Y, *et al.* Hardness locus sequence variation and endosperm texture in spring barley [J]. *Crop Science*, 2008, 48(3): 1007.
- [12] CHANTRET N, CENCI A, SABOT F, *et al.* Sequencing of the *Triticum monococcum* hardness locus reveals good microcolinearity with rice [J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 2004, 271(4): 377.
- [13] 姚晓华, 王越, 安立昆, 等. 青稞 *HvtAGO1* 基因的克隆及其在条纹病胁迫下的表达[J]. 西北植物学报, 2021, 41(1): 20.
- YAO X H, WANG Y, AN L K, *et al.* Identification and expression analysis of *HvtAGO1* gene in response to barley leaf stripe in Tibetan hulless barley [J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2021, 41(1): 20.
- [14] 王燕, 姚晓华, 姚有华, 等. 青稞籽粒花青素合成相关基因 *HvnF3'M* 的克隆与表达分析[J]. 西北农业学报, 2022, 31 (9): 1174.
- WANG Y, YAO X H, YAO Y H, *et al.* Cloning and expression analysis of *HvnF3'M* gene related to anthocyanin synthesis of hulless barley [J]. *Acta Agriculturae Boreali-Occidentalia Sinica*, 2022, 31(9): 1174.
- [15] 解国庆. 通过蛋白融合策略提高过氧化氢酶介导的植物耐热性[D]. 昆明: 云南师范大学, 2024.
- XIE G Q. Enhancing catalase-mediated plant heat resistance through protein fusion strategy [D]. Kunming: Yunnan Normal University, 2024.
- [16] PFAFFL M W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR [J]. *Nucleic Acids Research*, 2001, 29(9): e45.
- [17] 陈锋, 李根英, 耿洪伟, 等. 小麦籽粒硬度及其分子遗传基础研究回顾与展望[J]. 中国农业科学, 2005, 38(6): 1088.
- CHEN F, LI G Y, GENG H W, *et al.* Review and prospect of wheat kernel hardness and its molecular genetics basis [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2005, 38(6): 1088.
- [18] KIM E G, PARK J R, *et al.* Quantitative trait locus mapping and *OsFLOQ12* identification for rice grain hardness: Towards improved rice flour for wheat substitution [J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2024, 105(4): 2466.
- [19] MORRIS C F. Puroindolines: The molecular genetic basis of wheat grain hardness [J]. *Plant Molecular Biology*, 2002, 48(5): 633.
- [20] KRISHNAMURTHY K, GIROUX M J. Expression of wheat puroindoline genes in transgenic rice enhances grain softness [J]. *Nature Biotechnology*, 2001, 19(2): 162.
- [21] LONG Q, QIU S C, MAN J M, *et al.* *OsAAIL* increases rice yield and drought tolerance dependent on ABA-mediated regulatory and ROS scavenging pathway [J]. *Rice*, 2023, 16 (1): 35.
- [22] NIRMAL R, FURTADO A, WRIGLEY C, *et al.* Influence of gene expression on hardness in wheat [J]. *PLoS One*, 2016, 11(10): e0164746.
- [23] 刘培勋, 马小飞, 万洪深, 等. 两个不同籽粒硬度小麦的比较蛋白组学分析[J]. 作物学报, 2020, 46(8): 1275.
- LIU P X, MA X F, WAN H S, *et al.* Comparative proteomic analysis of two wheat genotypes with contrasting grain softness index [J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2020, 46(8): 1275.
- [24] 李小燕. *Puroindoline* 基因与小麦籽粒硬度关系研究[D]. 武汉: 华中科技大学, 2019.
- LI X Y. Study on the relationship between *puroindoline* genes and wheat grain hardness [D]. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology, 2019.
- [25] 宋忠康, 刘中旭, 邓昌蓉, 等. 基于青海产区气候特征的高产优质枸杞适生区预测[J]. 应用生态学报, 2025, 36(4): 1118.
- SONG Z K, LIU Z X, DENG C R, *et al.* Predicting suitable habitats of high-yield and-quality *Lycium barbarum* based on climate characteristics in production area of Qinghai, China [J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2025, 36(4): 1118.
- [26] 甘子鹏, 徐海燕, 薛守业, 等. 青藏高原不同气候区青稞品质差异[J]. 中国农业科技导报, 2022, 24(11): 55.
- GAN Z P, XU H Y, XUE S Y, *et al.* Quality of hulless barley in different climatic regions of the Qinghai-Tibet Plateau [J]. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 2022, 24(11): 55.