

DOI: 10.3724/SP.J.1006.2020.94144

不同光温条件谷子光温互作模式研究及 *SiCCT* 基因表达分析

贾小平^{1,*} 袁玺垒¹ 李剑峰¹ 王永芳² 张小梅¹ 张博¹ 全建章²
董志平^{2,*}

¹河南科技大学农学院, 河南洛阳 471023; ²河北省农林科学院谷子研究所 / 国家谷子改良中心, 河北石家庄 050035

摘要: 光周期和温度是影响作物生长发育、生态适应性和产量的 2 个重要环境因素, 揭示光温互作对作物生长发育的效应及其分子机制对育种实践和理论研究具有重要意义。本研究设置长日照高温、长日照低温、短日照高温、短日照低温 4 个光温处理, 调查‘黄毛谷’抽穗期、株高、叶片数和穗长。结果表明, 光周期对谷子的发育起关键作用, 温度的改变不影响长日照比短日照延迟谷子生殖生长的效应, 温度的作用随光周期的不同而异, 短日照条件下, 高温缩短谷子营养生长期而低温延长营养生长期, 长日照条件下则相反; 对谷子生殖生长的促进作用是短日照高温 > 短日照低温 > 长日照低温 > 长日照高温。利用 RT-PCR 技术从‘黄毛谷’叶片克隆了一个 CCT 结构域基因(*SiCCT*), 该基因编码 286 个氨基酸, 属于 CMF 亚家族成员, 基于 CCT 域基因氨基酸序列的系统进化分析, 谷子与高粱、玉米亲缘关系较近。实时荧光定量 PCR 分析发现, *SiCCT* 基因在‘黄毛谷’叶片中高表达, 其次为幼穗和叶鞘; 长日照、短日照处理 *SiCCT* 基因均表现 24 h 昼夜节律性特点, 短日照七叶期表达水平最高, 八叶期(抽穗)及穗后表达迅速降低, 长日照七叶至十叶期‘黄毛谷’处于营养生长期, *SiCCT* 基因维持较高表达水平; 无论高温低温, 长日照条件下 *SiCCT* 基因在各叶期表达量整体高于短日照处理, 长日照条件下低温处理 *SiCCT* 基因的相对表达量明显低于高温处理, *SiCCT* 基因的总表达量与‘黄毛谷’营养生长期存在正相关。总之 *SiCCT* 基因受光周期调控, 同时也受温度调控, 因而推测 *SiCCT* 基因参与了光周期途径和感温性途径, 并通过二者互作调控谷子营养生长和生殖生长的全过程。
关键词: 谷子; 光周期; 感温性; 光温互作; CCT 域基因

Photo-thermal interaction model under different photoperiod-temperature conditions and expression analysis of *SiCCT* gene in foxtail millet (*Setaria italica* L.)

JIA Xiao-Ping^{1,*}, YUAN Xi-Lei¹, LI Jian-Feng¹, WANG Yong-Fang², ZHANG Xiao-Mei¹, ZHANG Bo¹, QUAN Jian-Zhang², and DONG Zhi-Ping^{2,*}

¹College of Agriculture, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471023, Henan, China; ²Institute of Millet, Hebei Academy of Agriculture and Forestry Sciences / National Millet Improvement Center, Shijiazhuang 050035, Hebei, China

Abstract: Photoperiod and temperature are two important environmental factors that affect growth and development, ecological adaptability and yield of crops. Uncovering the effect of interaction between photoperiod and temperature on crop growth and development and the molecular mechanism for this interaction has important influence on breeding practice and theoretical research. In this study, four photo-thermal treatments (long-day and high temperature, long-day and low temperature, short-day and high temperature, short-day and low temperature) were designed to investigate heading stage, plant height, leaf number and panicle length of ‘Huangmaogu’. The photoperiod played a key role on growth of foxtail millet, while changes in temperature had no more effect on delaying reproductive growth by long-day treatment compared with that by short-day treatment. The effect of temperature differed with the difference of photoperiod, high temperature shortened vegetative growth period and low temperature prolonged vegetative growth period under short-day condition, while it was opposite under long-day condition. The effect on reproductive growth was short-day and high temperature treatment > short-day and low temperature treatment > long-day and low

本研究由国家自然科学基金项目(31471569)和“十二五”国家科技支撑计划项目(2011BAD06B01-1)资助。

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (31471569) and the “Twelfth Five-Year” National Science and Technology Support Program (2011BAD06B01-1).

* 通信作者(Corresponding authors): 贾小平, E-mail: jiaxiaoping2007@163.com; 董志平, E-mail: dzp001@163.com

Received (收稿日期): 2019-09-27; Accepted (接受日期): 2020-01-15; Published online (网络出版日期): 2020-01-24.

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1809.S.20200123.2018.012.html>

productive growth was short-day and high temperature treatment > short-day and low temperature treatment > long-day and low temperature treatment > long-day and high temperature treatment. Furthermore, a CCT-motif gene named *SiCCT* was cloned from leaf of 'Huangmaogu' by RT-PCR technology, which encodes 286 aa and belongs to CMF subfamily. Phylogenetic analysis based on aa sequences of CCT-motif genes showed that there existed a close relationship among foxtail millet, sorghum and maize. Real-time PCR analysis showed that the expression level of *SiCCT* was higher in leaf than in young panicle and leaf sheath. The *SiCCT* showed a circadian expression pattern under both long-day and short-day conditions. The expression level of *SiCCT* was the highest at 7-leaf stage, and decreased rapidly at 8-leaf stage (heading) and after heading under short-day condition. The expression of *SiCCT* maintained high level from 7-leaf stage to 10-leaf stage under long-day condition, during which 'Huangmaogu' was at vegetative growth phase. No matter high temperature or low temperature, the expression level of *SiCCT* at different leaf stages was totally higher in long-day treatment than in short-day treatment, and lower in low temperature than in high temperature under long-day condition. The general expression level of *SiCCT* was positively correlated with vegetative growth period of 'Huangmaogu'. In summary, *SiCCT* is regulated by both photoperiod and temperature, suggesting that *SiCCT* participates in photoperiod pathway and thermosensory pathway, and regulates the whole vegetative and reproductive growth process of foxtail millet through interaction between the two pathways.

Keywords: foxtail millet; photoperiod; thermosensory; photo-thermal interaction; CCT-motif gene

光周期和温度是决定植物开花时间的重要环境因素,对农作物的生态适应性和产量有重要影响^[1]。光周期和温度存在复杂的互作效应,如拟南芥在长日照(16 h)诱导条件下温度从 23℃ 升高到 27℃ 能够有效促进开花^[2];大麦在长日照条件下 25℃ 比 15℃ 培养能达到更高级的生殖发育期,而在短日照条件下结果则相反^[3];长日照加高温是最不利于开花诱导的光温组合,长日照条件下,高温抑制大豆的生殖发育,低温减弱长日照对发育的抑制作用;低温处理的大豆能正常出现花序,而在高温处理下,大多数植株一直处于营养生长期或部分发生花序的逆转,表明高温增强了长日照对大豆生殖生长的抑制^[4-6]。虽然目前通过对拟南芥、水稻的研究,光周期调控植物开花的分子机制已经较为清晰^[7-8],有关环境温度调控植物开花分子机制的报道也逐渐增多^[9],但主要集中在光周期或者温度单一因素对植物开花调控作用,对光温互作分子机制的研究极少。目前的研究初步发现拟南芥 CO 蛋白在光温互作调控机制中发挥着重要作用,短日照条件低温(16℃)增加了组蛋白 H2A.Z 在成花素 *FT* 位点的占领,阻止了光敏色素互作因子 4 (PIF4)与 *FT* 基因启动子的结合,高温(27℃)则使 H2A.Z 与 *FT* 位点分离,诱导 CO 蛋白在中午积累,并与 PIF4 形成复合体,结合 *FT* 启动子,促进基因表达,诱导开花;而长日照条件低温使短营养期蛋白(SVP)与 *FT* 启动子结合抑制其表达,温度改变使 SVP 在黄昏时活性增加,同时也增加了夜晚 CO 的稳定性,从而使 *FT* 基因表达模式改变^[10]。

CO 作为光周期调控途径的关键基因,属于 CCT 结构域基因家族,该家族分为 CMF、COL 和 PRR 三个亚家族,其中 COL 亚家族含有 B-box 锌指

结构域和一个 CCT 结构域,PRR 亚家族含有 PRR 结构域和一个 CCT 结构域,而 CMF 亚家族只有一个 CCT 结构域^[11]。研究表明许多 CCT 结构域基因都直接或者间接参与植物开花调控,是光信号途径中的重要组成部分^[12-13]。水稻中首先被克隆的 CCT 域基因 *Hd1* 是拟南芥中 CO 的同源基因,长日照(LD)处理可以推迟水稻抽穗开花,而短日照(SD)处理促进水稻抽穗开花^[14];LD、SD 条件下, *Hd1* 节律性都在夜间达到一个表达峰值,该基因还可以通过影响每穗的小穗数(粒数)来控制水稻产量^[15]。大麦 *Hd1* 的同源基因 *HvCO1* 不管日照长短,其过表达都上调了 *HvFT1* 的表达,使大麦提前开花^[16]。高粱 CO 同源基因 *SbCO* 是 COL 亚家族一个成员,在缺失 *SbGHD7* 和 *SbPRR37* 的背景下无论长日照还是短日照均能促进植株开花^[17]。继 *Hd1* 之后在水稻中相继克隆了 *Ghd7*、*DTH2*、*OsCOL10*、*Ghd7.1* (*OsPRR37*) 和 *Ghd2* 等含有 CCT 结构域的基因,这些基因多数参与光周期调控的水稻开花过程,但是具体功能有差异,在 LD 条件下 *Ghd7*、*Ghd7.1* 通过抑制 *Ehd1* 和 *Hd3a* 的表达延迟水稻抽穗期^[18-19],与 *Ghd7*、*Ghd7.1* 功能类似,高粱 *SbGhd7*、玉米 *ZmCCT9* 在 LD 条件下同样能够推迟开花^[20-21]; *ZmCCT* 基因启动子中的一个 CACTA 转座子元件可以抑制 *ZmCCT* 的表达,从而降低光周期敏感性,使玉米在 LD 条件下得以传播种植^[22]。*DTH2* 则是通过上调成花素基因 *Hd3a* 和 *RFT1* 的表达来促进水稻提前开花^[23],*OsCOL10* 在 LD 和 SD 条件下均抑制水稻开花,还受到 *Ghd7* 的调控^[24],*Ghd2* 参与对叶片衰老和干旱的调节^[25]。从以上研究概述可以发现, CCT 结构域基因普遍参与植物光周期开花调控,但是这些基因是否参与温度调控的开花过程则极少报道,特别是在

C₄作物中,有关 CCT 结构域基因参与光温互作调控开花的研究尚属空白。

谷子(*Setaria italica*)属于禾本科狗尾草属,是自花授粉的二倍体($2n=2x=18$)作物,具有抗旱、耐瘠和高光效等优良性状,基因组较小(约 515 Mb),且全基因组序列已被测定^[26-27],可以作为 C₄禾谷类理想的模式作物^[28-29]。作为一个短日照喜温作物,谷子对光温较敏感,前期的研究表明不同光周期环境对谷子株高、叶片数及穗部性状均有显著影响^[30],然而自然环境中除了光周期外,温度的变化对作物生长发育也有作用,光周期和温度往往存在复杂的互作效应,因此通过研究光温互作对谷子等 C₄作物生长、发育及产量的影响,为深入揭示以谷子为代表的 C₄禾谷类作物光温互作调控开花机制奠定基础,具有重要的实践和理论意义。本研究设置长日照低温、长日照高温、短日照低温、短日照高温 4 个不同光温处理研究了光温互作对谷子抽穗期、叶片数、穗长、穗码数 4 个性状的影响,明确谷子的光温互作模式,进一步利用同源克隆技术从谷子中分离获得一个 CCT 域基因的完整编码序列,在对其进行生物信息学分析、组织特异性表达分析的基础上,详细分析 4 个不同光温组合条件下该基因的表达模式,揭示该基因参与谷子光温调控开花的可能机制,为进一步深入阐明谷子光温互作调控开花机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

选用对光周期较敏感的河北省谷子农家品种‘黄毛谷’。

1.2 谷子材料种植及表型性状调查

采用盆栽方法,于口径 10 cm×10 cm 的小方盆中装营养土,每盆播 8~10 粒种子,二叶期定苗,每盆保留 4 株长势一致的小苗。8 盆‘黄毛谷’从播种至三叶期均在自然条件下生长,随后移入光照培养箱进行长日照(16 h 光照/8 h 黑暗)处理,4 盆在处理 1 周后采集幼嫩叶片用于总 RNA 的提取及 *SiCCT* 基因克隆,另外 4 盆继续培养至抽穗用于基因组织特异性表达分析,处理期间温度为 25℃。120 盆‘黄毛谷’从播种至三叶期均在 12 h 光照/12 h 黑暗、25℃的条件下培养,三叶期开始将 40 盆‘黄毛谷’转入长日照(15 h 光照/9 h 黑暗)、短日照(9 h 光照/15 h 黑暗)2 个培养箱,每个处理 20 盆,2 次重复,每个重复 10

盆,2 个光周期处理温度均设定为 25℃,用于 *SiCCT* 基因长、短日照条件的表达分析;80 盆移入短日照高温[SD (9 h 光照/15 h 黑暗), 27℃]、短日照低温[SD (16 h 光照/8 h 黑暗), 22℃]、长日照高温[LD (16 h 光照/8 h 黑暗), 27℃]、长日照低温[LD (16 h 光照/8 h 黑暗), 22℃] 4 个培养箱,每个处理 20 盆,2 次重复,每个重复 10 盆,调查抽穗期、株高、穗长及叶片数,用于光温互作模式分析及 *SiCCT* 基因不同光温处理表达分析。

1.3 谷子 *SiCCT* 基因的克隆及生物信息学分析

首先利用生物信息学方法从 NCBI 的 GenBank 数据库中检索到一条谷子 CCT 域基因 mRNA 序列(XM_004983603),根据此序列利用软件 Primer Premier 5.0 设计 1 对特异引物(*SiCCT*-F: 5'-TGGG AGGAGGAAGAGAGGAG-3', *SiCCT*-R: 5'-CTTCTT CAGGTCCGTGGCTA-3'),扩增范围包含基因的完整编码区域,预期大小为 1160 bp。用康为世纪的 Ultrapure RNA Kit 提取总 RNA,用 TaKaRa 公司的 PrimeScript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit 反转录合成第 1 链 cDNA,以合成的 cDNA 为模板,用特异引物扩增目的基因,扩增体系含 cDNA 模板 2 μL、2×GC buffer 10 μL、10 mmol L⁻¹ dNTPs 0.4 μL、2 μmol L⁻¹ 特异引物 4 μL、*Taq* DNA 聚合酶 0.2 μL,以 ddH₂O 补充至 20 μL。PCR 扩增程序为 95℃预变性 3 min; 95℃变性 30 s, 58℃退火 30 s, 72℃延伸 45 s, 共 35 个循环; 72℃延伸 10 min, 4℃保存。将 RT-PCR 扩增产物纯化后连接到 pBM16A 克隆载体上,再转化大肠杆菌 DH5α 感受态细胞,挑选阳性菌液送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

利用 ProtParam、ExPASy、SOPMA 软件分析 *SiCCT* 基因的理化性质、二级和三级结构以及保守结构域。利用 DNAMAN5.0 软件将 *SiCCT* 基因编码的氨基酸序列与 NCBI 下载的其他物种 CCT 域基因氨基酸序列进行多序列比对,使用 MEGA 7.0 软件构建谷子与几个物种的系统进化树。

1.4 谷子 *SiCCT* 基因的表达分析

将自然条件下生长至三叶期的‘黄毛谷’幼苗转入长日照条件培养,取营养生长期的叶片、根、茎节、叶鞘、茎结和生殖生长期的幼穗、穗颈作为试验材料,每个样品取 3 个重复,用剪刀迅速剪下放入 2 mL 离心管,以液氮速冻,用于 *SiCCT* 基因组织特异性表达分析;25℃恒温条件下,长日照、短日照处理的谷苗均从三叶期开始取样,长日照取到十叶

期结束, 短日照取到八叶期开始抽穗, 抽穗后 7 d、15 d 取样结束, 期间还对长至五至六叶期的谷苗, 从晚 6 时黑暗处理开始 48 h 内取样, 每隔 3 h 取一次, 每个时间点重复取样 3 次, 取完全展开的顶叶和第 2 叶片, 用于 *SiCCT* 基因长、短日照条件表达分析; 4 个不同光温处理的谷苗均从三叶期开始取样直到抽穗, 取完全展开的顶叶和第 2 片叶, 取样时间为光照 3 h 后, 每个叶龄取 1 次样, 3 个重复, 样品以液氮速冻, 用于 *SiCCT* 基因 4 个光温处理的表达分析。所有样品 RNA 提取及反转录过程同实验步骤 1.3。

根据 *SiCCT* 基因 cDNA 序列的编码区来设计实时荧光定量 PCR 引物, Q-F 为 5'-CGTGGACCCGACGATGGAC-3'; Q-R 为 5'-GTCAGGCACCTTGCGGAATC-3'。参考文献用谷子 *Actin* 基因作为内参, 引物为 SiActin-F: 5'-GGCAAACAGGGAGAAGATGA-3'和 SiActin-R: 5'-GAGGTTGTCTCGGTAAGGTCACG-3', 由北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司合成^[31]。

将反转录好的 cDNA 作为 Real-time PCR 的模板, 用引物 Q-F/Q-R 扩增 *SiCCT* 基因的特异保守片段, 同时以引物 SiActin-F 和 SiActin-R 扩增作内参, 每个样品做 3 个重复, 扩增体系及循环程序参照宝生物公司 TB Green Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) 的试剂说明书, 首先配制 10 μ L 扩增体系, 包含 cDNA 模板 1 μ L、TB Green Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) 5 μ L、10 μ mol L⁻¹ 的 Q-F 和 Q-R 特异引物各 1 μ L、ddH₂O 2 μ L。使用 Roche Light Cycler 96 实时定量 PCR 仪, 采用两步法 PCR 程序, 扩增程序为 95℃ 预变性 30 s; 95℃ 变性 30 s, 60℃ 退火 30 s, 共 40 个循环。分析得到扩增曲线、溶解曲线, 并计算 $\Delta\Delta CT$ 值, 采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 计算方法进行相对表达量分析。

2 结果与分析

2.1 谷子光温互作模式

光周期对谷子的生长发育起关键作用, 高温条件下, 长日照处理的‘黄毛谷’比短日照处理抽穗时间推迟了 60.3 d, 株高增加了 30.4 cm, 叶片数增加了 7.7 片, 穗长增加了 7.6 cm, 长日照相比短日照营养生长期明显延长; 低温条件下, 长日照处理的‘黄毛谷’抽穗时间比短日照处理推迟了 21.4 d, 株高增加 7.5 cm, 叶片数几乎一样, 穗长增加了 4.7 cm, 说明温度的变化并不能改变长日照比短日照延长‘黄

毛谷’营养生长期的总体趋势(图 1 和图 2-a~d)。同时光周期也决定着温度的作用方向, 短日照条件下, 高温处理的‘黄毛谷’与低温处理相比株高减少了 11.2 cm, 叶片数减少了 2.0 片, 抽穗期提前了 11.3 d, 穗长减少了 1.2 cm, 说明短日照条件下, 提高温度可以使‘黄毛谷’快速完成营养生长, 进入生殖生长期; 长日照条件下, 高温处理的‘黄毛谷’抽穗时间比低温处理延长了 30 d, 株高增加了 18.8 cm, 叶片数增加了 5.6 片, 穗长减少了 2.1 cm, 说明长日照条件下, 提高温度使‘黄毛谷’营养生长期延长, 推迟进入生殖生长期, 长、短日照条件下温度的作用方向正好相反(图 1, 图 2-a~d)。

短日照高温处理的谷子抽穗期最短, 缩短营养生长期的作用最强, 其次是短日照低温处理; 长日照低温、长日照高温 2 个处理的谷子抽穗期均比短日照低温、高温 2 个处理延长, 且长日照高温组合抽穗期最晚(图 2-a)。

2.2 谷子 *SiCCT* 基因的克隆及生物信息学分析

提取长日照处理的‘黄毛谷’叶片总 RNA, 经 1% 非变性琼脂糖凝胶电泳检测看到, 28S rRNA 和 18S rRNA 条带清晰, 且前者的亮度大约是后者的 1~2 倍(图 3)。经过超微量分光光度计检测, OD_{260/280} 均在 1.97~2.10 之间, 说明总 RNA 完整性比较好, 基本没有降解, 可以进行后续实验。将提取的总 RNA 反转录得到 cDNA, 以此为模板使用基因特异性引物 *SiCCT*-F、*SiCCT*-R 进行 RT-PCR 扩增, 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测得到一条清晰、明亮的特异性条带, 大小在 1000~2000 bp 之间, 与预期目的片段 1160 bp 相接近(图 4)。



A: SD, 27°C B: SD, 22°C C: LD, 27°C D: LD, 22°C

图 1 不同光温处理对‘黄毛谷’生长发育的影响

Fig. 1 Effect of different photo-thermal treatments on growth and development of ‘Huangmaogu’

SD: 短日照; LD: 长日照。SD: short day; LD: long day.

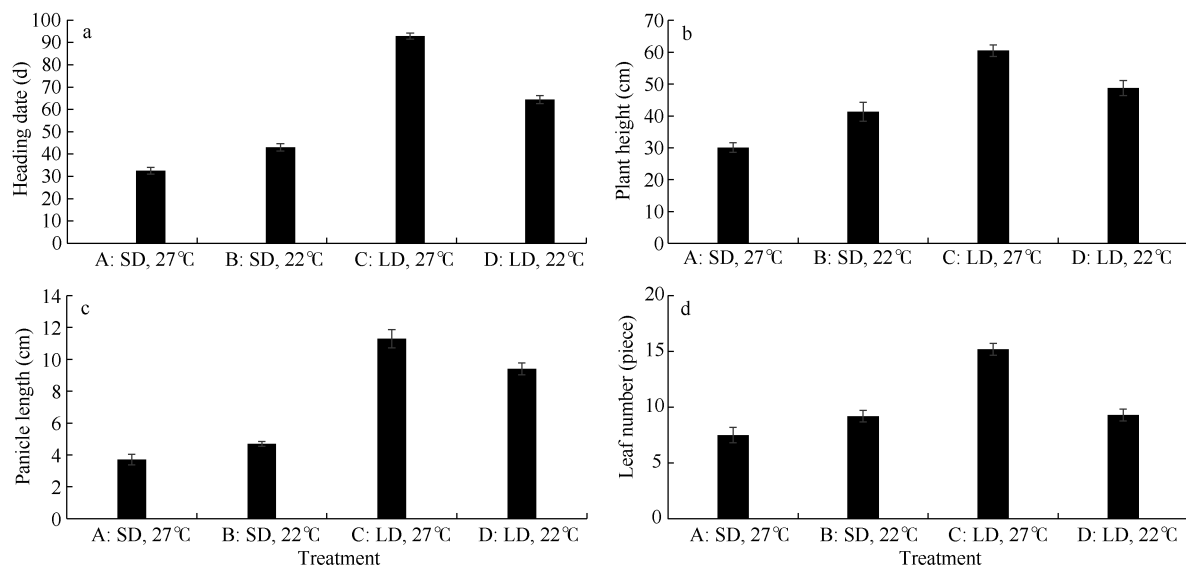


图 2 不同光温处理间‘黄毛谷’4个性状的比较

Fig. 2 Comparison of four traits among different photo-thermal treatments

a: 抽穗期; b: 株高; c: 穗长; d: 叶片数。SD: 短日照; LD: 长日照。

a: heading date; b: plant height; c: panicle length; d: leaf number. SD: short day; LD: long day.

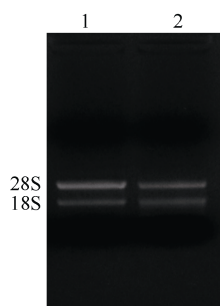


图 3 ‘黄毛谷’叶片总 RNA 电泳图

Fig. 3 Electrophoregram of total RNA extracted from leaves of ‘Huangmaogu’

1, 2: 提取的两管 RNA。

1, 2: two tubes of RNA extracted.

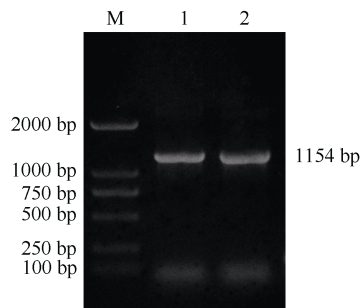


图 4 *SiCCT* 基因 RT-PCR 产物电泳图

Fig. 4 Electrophoregram of RT-PCR products of *SiCCT* gene

M: marker DL2000; 1, 2: 两管 RT-PCR 产物。

M: marker DL2000; 1, 2: two tubes of RT-PCR products.

将 RT-PCR 扩增产物经纯化后连接到 pBM16A 克隆载体上, 再转化大肠杆菌 DH5α 感受态细胞,

挑选阳性菌液送往生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序, 获得大小为 1154 bp 的 cDNA 序列, 该序列的 CDS 全长 861 bp, 编码 286 个氨基酸(附图 1, 附图 2)。分析 *SiCCT* 蛋白的结构域发现在 215~257 aa 之间存在 1 个保守的 CCT 结构域(附图 3), 因此本研究克隆的 *SiCCT* 基因属于 CMF 亚家族。

用 *SiCCT* 蛋白序列同源搜索 NCBI 数据库, 共检索到 9 条与 *SiCCT* 蛋白存在直系同源关系的序列, 这些序列来自水稻(XM_015757733.2)、高粱(XM_002464888.2)、玉米(XM_008660049.2)、节节麦(XP_020151451.1)、二穗短柄草(XM_003574283.3)、海枣树(XP_008796123.1)、油棕(XP_010933637)、野生糜(XP_025825012)、菠萝(XP_020093545) 9 个物种。基于包括 *SiCCT* 蛋白在内的 10 个 CCT 结构域蛋白序列构建系统进化树, 10 个物种可以聚为 3 个组, 谷子、高粱、玉米、水稻、节节麦、二穗短柄草聚在一个组, 亲缘关系较近, 它们同属于禾本科; 油棕、海枣树、菠萝聚为一组; 野生糜单独聚为一组(图 5)。

2.3 谷子 *SiCCT* 基因的组织特异性表达分析

从图 6 可以看出, *SiCCT* 基因在根、茎节、叶、茎结、叶鞘、穗和穗颈 7 个不同组织中都有表达, 但是在叶片中的相对表达量最高, 其次是穗和叶鞘, 在根部的相对表达量最低。

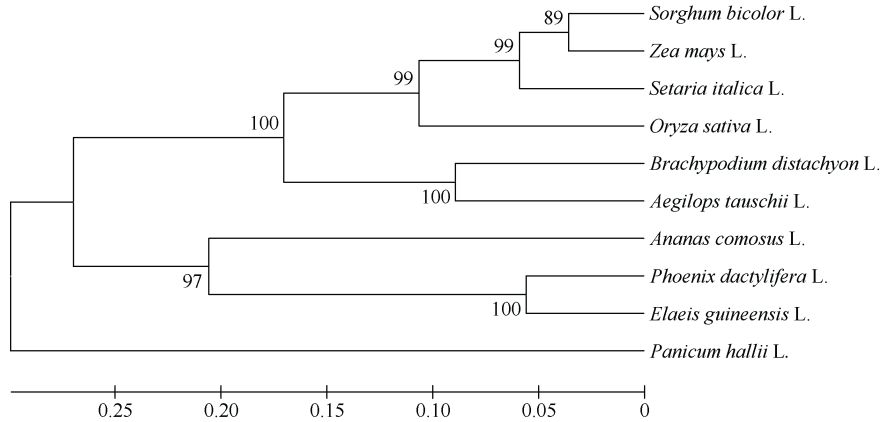
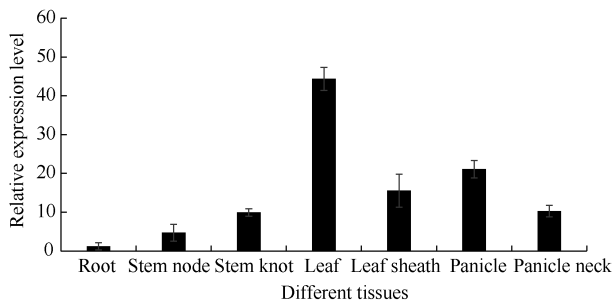


图 5 基于 CCT 域基因蛋白序列的系统发育树

Fig. 5 Phylogenetic tree of CCT-motif genes based on protein sequences

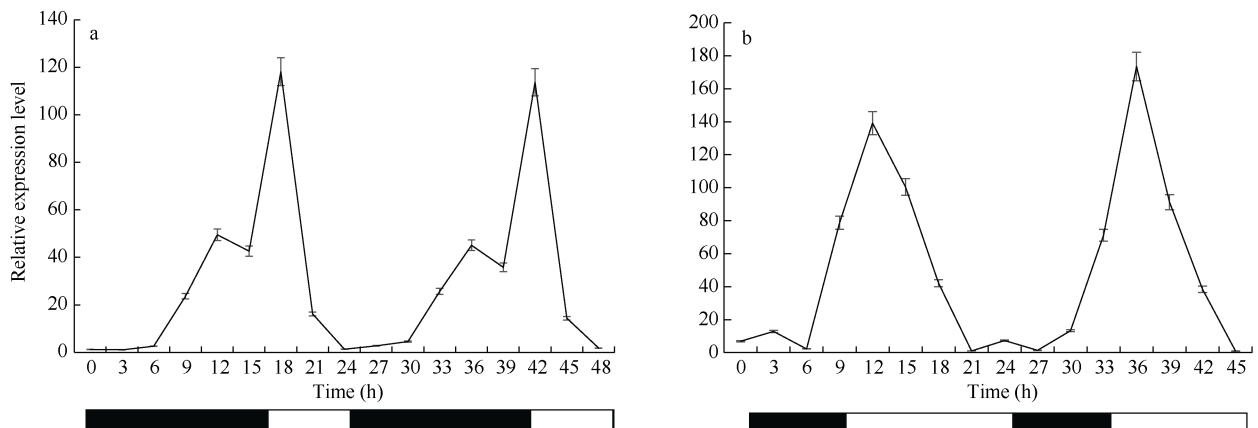
图 6 *SiCCT* 基因在不同组织中的相对表达量Fig. 6 Relative expression of *SiCCT* in different tissues

2.4 不同光周期条件谷子 *SiCCT* 基因的昼夜表达分析

短日照条件下连续取样 48 h, 以研究 *SiCCT* 基因在连续 2 d 中表达的变化情况, 发现 *SiCCT* 基因在‘黄毛谷’叶片中呈现 24 h 节律性表达, 黑暗条件 0~3 h 几乎不表达, 6 h 之后表达量逐渐增高, 黑暗第 12 h 表达达到一个小峰, 随后下降, 在光照开始 3 h

后达到一个峰值, 然后迅速下降, 在 24 h 光照结束后表达量最低; 24 h 之后的下一个循环周期同样 *SiCCT* 基因在黑暗 6 h (30 h) 的时候表达量开始缓慢上升, 在黑暗 12 h (36 h) 时达到一个峰值, 然后缓慢下降, 见光后开始上升, 当光照 3 h (42 h) 后再一次达到高峰, 随后又逐渐下降, 在光照快结束时 (45 h) 达到一个较低的水平。*SiCCT* 基因的表达在 1 d 之内有 2 个峰, 不过白天表达峰值差不多是晚上峰值的 2 倍左右 (图 7-a)。

在长日照条件下, ‘黄毛谷’叶片中 *SiCCT* 基因的相对表达也呈现出 24 h 节律性, 黑暗表达量低, 光照表达量高, 光照开始后表达量迅速增加, 光照 3 h 后达到一个较高峰值, 随后快速下降, 光照结束后表达降到极低水平; 下一个循环周期与前面 24 h 表达模式相似, 同样开始光照后 3 h 表达达到峰值 (图 7-b)。与在短日照条件不同的是长日照条件

图 7 不同光周期条件 *SiCCT* 基因的昼夜表达Fig. 7 Circadian expression of *SiCCT* gene under different photoperiod conditions

a: 短日照处理; b: 长日照处理。黑色条带表示黑暗时段, 白色条带表示光照时段。

a: short-day treatment; b: long-day treatment. Black bars represent dark period, and white bars represent light period.

SiCCT 基因只出现一个表达峰, 且是在光照 3 h 后出现, 而短日照条件出现 2 个表达峰, 一个是在黑暗 12 h, 一个是在光照 3 h。

2.5 不同光周期条件、不同生长期谷子 *SiCCT* 基因的表达分析

在短日照条件下, 从三叶期到七叶期‘黄毛谷’叶片中 *SiCCT* 基因表达随叶龄的增加而增加, 七叶期达峰值。八叶期谷子开始抽穗, *SiCCT* 基因的相对表达量明显降低, 抽穗后 7 d 和抽穗后 15 d *SiCCT* 基因的表达也处于较低水平, 说明在谷子营养生长期 *SiCCT* 基因表达水平高, 而抽穗后的生殖生长期表达量始终较低(图 8-a)。在长日照条件下, ‘黄毛谷’叶片中 *SiCCT* 基因从三叶期到十叶期相对表达量均随叶龄增加而增加, 八叶期达峰值, 九叶期、十叶期略下降, 但仍维持较高水平。因为长日照导致营养生长期延长, 十叶期谷子依然处于营养生长期, 没有抽穗, 说明无论短日照还是长日照, *SiCCT* 基因在营养生长期表达量较高(图 8-b)。

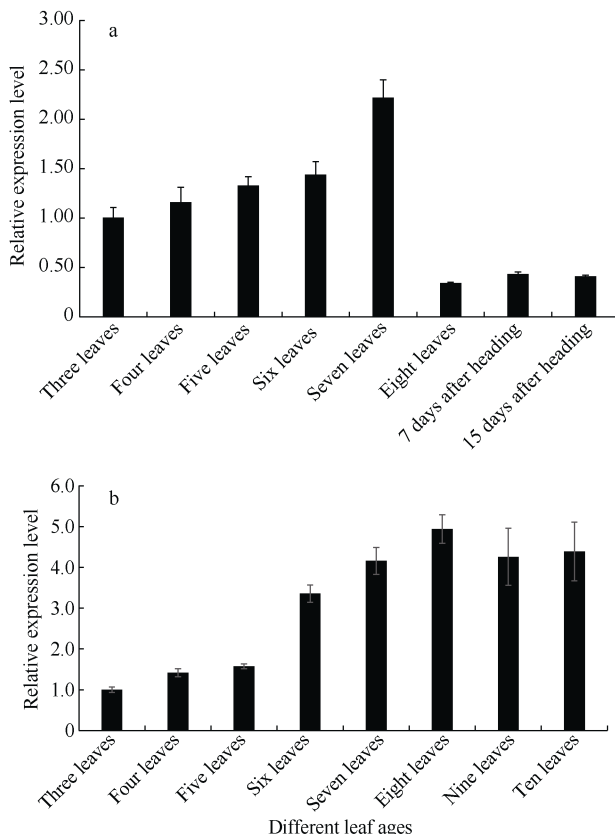


图 8 不同光周期条件 *SiCCT* 基因在不同叶龄的表达水平
Fig. 8 Expression level of *SiCCT* gene at different leaf ages under different photoperiod conditions

a: 短日照; b: 长日照。a: short-day; b: long-day.

2.6 不同光温组合条件谷子 *SiCCT* 基因的表达分析

在高温条件下, 三到五叶期长日照处理的‘黄毛谷’叶片中 *SiCCT* 基因的表达总体低于短日照处理, 从六叶期开始, 长日照处理的 *SiCCT* 基因的表达水平明显高于短日照处理(图 9-a); 在低温条件下, 三叶期到十叶期短日照处理的‘黄毛谷’叶片中 *SiCCT* 基因的表达水平均低于长日照处理(图 9-b)。高温短日照处理‘黄毛谷’八叶期已抽穗, 而低温短日照处理‘黄毛谷’十叶期仍处于营养生长阶段, 说明短日照条件下低温对‘黄毛谷’营养生长具有延长作用; 在短日照条件下, 三叶期到八叶期营养生长阶段总体上低温处理 *SiCCT* 基因的表达水平高于高温处理, 只有五叶期高温处理 *SiCCT* 基因表达水平高于低温处理, 而八叶期后高温处理的‘黄毛谷’开始抽穗, 进入生殖生长期, *SiCCT* 基因表达水平非常低, 低温处理的‘黄毛谷’仍处于营养生长期, 九叶期、十叶期 *SiCCT* 基因的表达水平仍比较高(图 9-c); 长日照条件下, 除了三叶期高温处理和低温处理 *SiCCT* 基因表达水平接近外, 四叶期到十叶期高温处理‘黄毛谷’叶片中 *SiCCT* 基因的表达水平均高于低温处理, 与短日照条件表达模式相反(图 9-d)。

3 讨论

光周期和温度是影响植物开花的 2 个重要环境因子, 而且它们对植物生长发育存在明显的互作效应。本研究发现不论高温还是低温, 长日照条件下的‘黄毛谷’比短日照都晚抽穗, 在短日照条件下, 高温促进‘黄毛谷’抽穗并开花, 低温使‘黄毛谷’持续进行营养生长而延迟抽穗; 长日照条件下, 高温却延迟了‘黄毛谷’的抽穗, 植株长期处于营养生长阶段, 而且大多只抽穗很少开花, 结籽很少, 低温能促进‘黄毛谷’进入生殖生长阶段, 提前抽穗并开花。研究结果表明短日照和高温、长日照和低温对谷子的生殖生长都具有促进作用, 而高温加剧了长日照对谷子生殖生长的抑制作用, 低温减轻了长日照对谷子生殖生长的抑制作用, 谷子和大豆具有相似的光温互作模式^[5-6]。

目前在水稻、玉米、高粱和甘蓝型油菜中已经克隆的 CMF 亚家族成员有 *Ghd7*、*NRR*、*OsCCT01*、*SbGHD7*、*ZmCCT9* 等基因, 这些基因多数受光周期调控, 对作物抽穗期开花期有重要影响^[16,22,25,32-33], 而谷子 CMF 亚家族成员还未有报道, 其与水稻等作

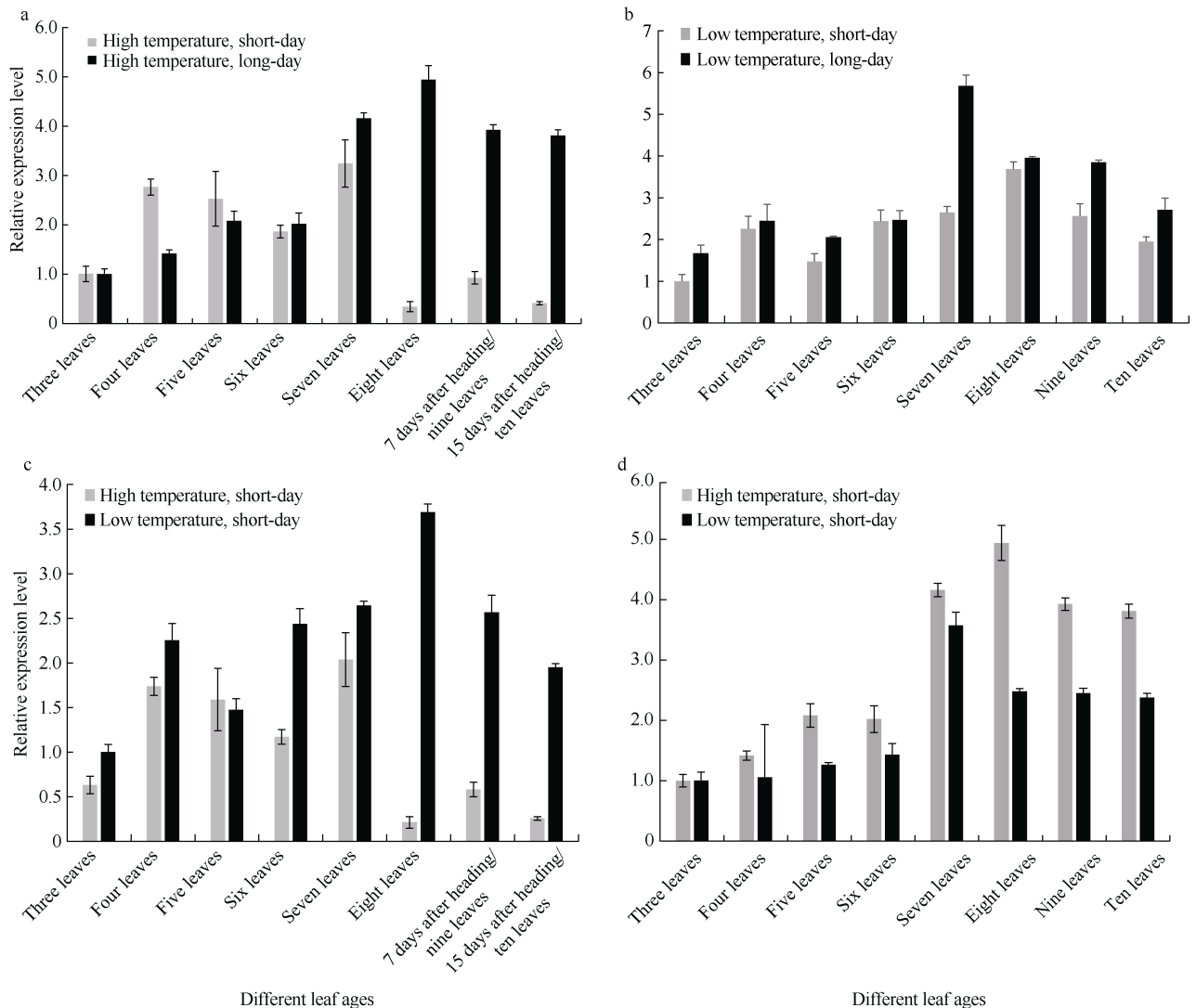


图 9 不同光温组合 *SiCCT* 基因的表达特点

Fig. 9 Expression feature of *SiCCT* gene under different photo-thermal combinations

a: 高温长日照、高温短日照; b: 低温长日照、低温短日照; c: 短日照高温、短日照低温; d: 长日照高温、长日照低温。

a: high temperature and long-day, high temperature and short-day; b: low temperature and long-day, low temperature and short-day;

c: short-day and high temperature, short-day and low temperature; d: long-day and high temperature, long-day and low temperature.

物受光周期调控的模式是否相同仍是未知。本研究首次从谷子中分离到一个 CMF 亚家族成员, 命名为 *SiCCT*, 组织特异性表达分析表明该基因在叶片中表达量最高, 其次是幼穗, 与水稻 *Ghd7* 基因具有相似的组织表达特异性^[16], 而多数受光信号调控的基因在叶片中的相对表达量较高, 因此推测谷子 *SiCCT* 基因受光周期调控。进一步分析发现 *SiCCT* 基因无论短日照还是长日照, 均表现昼夜节律性表达, 短日照条件光照期和黑暗期各有一个表达峰, 前者远高于后者; 长日照条件只有光照产生一个表达峰。水稻 *Ghd7* 基因无论长日照还是短日照仅在白天有一个表达峰^[16], 高粱 *Ghd7* 的同源基因 *SbGHD7*

在长日照条件下有 2 个表达峰, 分别在清晨和夜晚产生^[25], 说明谷子 *SiCCT* 基因与 *Ghd7*、*SbGHD7* 昼夜表达模式存在差异。然而谷子 *SiCCT* 基因与 *Ghd7*、*SbGHD7*、*ZmCCT9* 也具有相似的表达模式, 即无论长日照还是短日照, 整个营养生长期表达量都较高, 短日照条件谷子抽穗及抽穗后 *SiCCT* 基因表达量降到极低水平, 而长日照条件一直维持营养生长, *SiCCT* 基因表达量维持在较高水平。因此推测 *SiCCT* 基因与 *Ghd7*、*SbGHD7*、*ZmCCT9* 具有相似的功能, 在长日照条件下高水平的表达抑制抽穗, 延长营养生长期。

本研究充分说明 *SiCCT* 基因和许多 *CCT* 域基因

一样参与了光周期调控开花途径^[34-35], 而光周期和温度对谷子生长发育有明显的互作效应, 因此 *SiCCT* 基因是否也受温度调控, 参与光周期途径和感温性途径的交互作用, 是需要弄清楚的下一个问题。通过对拟南芥光温互作机制研究发现, *CO* 基因在光周期途径和感温性途径交互作用中非常关键, 短日照条件低温(16℃)增加了组蛋白 H2A.Z 在成花素 *FT* 位点的占领, 阻止了光敏色素互作因子 4 (PIF4)与 *FT* 基因启动子的结合, 高温(27℃)则使 H2A.Z 与 *FT* 位点分离, 诱导 *CO* 蛋白在中午积累, 并与 PIF4 形成复合体, 结合 *FT* 启动子, 促进基因表达, 诱导开花; 而长日照条件低温使短营养期蛋白 (SVP)与 *FT* 启动子结合抑制其表达, 温度增加使 SVP 在黄昏时活性增加, 同时也增加了夜晚 *CO* 的稳定性, 从而使 *FT* 基因表达模式改变^[10]。本研究发现 *SiCCT* 基因在受光周期调控的同时也受温度调节, 长日照条件下, 低温处理的‘黄毛谷’叶片中 *SiCCT* 基因的相对表达量明显低于高温处理, 说明在长日照条件下高温促进 *SiCCT* 基因的表达, 而低温抑制 *SiCCT* 基因的表达, 这与水稻长日照条件下低温(23℃)处理促进 *Ghd7* 表达的结果相反^[36]。而本研究发现高温增加了长日照对‘黄毛谷’生殖发育的抑制作用, 低温减轻了长日照对‘黄毛谷’生殖发育的抑制作用, 这与长日照条件下高温 *SiCCT* 基因表达量明显高于低温是相对应的, 更能说明 *SiCCT* 基因表达水平与‘黄毛谷’营养生长期存在正相关。无论高温还是低温, 长日照条件下 *SiCCT* 基因在不同叶期整体表达水平都高于短日照, 说明 *SiCCT* 基因总体上受光周期调控的作用要大于温度。本研究证明了 *SiCCT* 基因同时受光周期和温度调控, 而该基因如何与感温性途径的基因相互作用, 并且如何共同作用于谷子成花素基因, 从而实现光温互作对谷子的开花调控, 是后续的主要研究目标。

4 结论

光周期对谷子的发育起关键作用, 不论高温还是低温, 长日照条件下谷子营养生长期要比短日照延长; 温度的作用随光周期的不同而不同, 在短日照条件下, 高温缩短谷子营养生长期而低温促使营养生长期延长, 长日照条件下则相反, 高温延长谷子营养生长期而低温缩短谷子营养生长期; 谷子 *SiCCT* 基因在叶片中高表达, 长短日照均表现昼夜节律性表达特点, 整个营养生长期表达量相对较高; *SiCCT* 基因主要受光周期调控, 同时也受温度调控,

其表达量与谷子营养生长期具有明显的正相关, 推测 *SiCCT* 基因通过参与光周期和温度互作调控机制来调节谷子抽穗期。

References

- [1] Song Y H, Ito S, Imaizumi T. Flowering time regulation: photo-period- and temperature-sensing in leaves. *Trends Plant Sci*, 2013, 18: 575–583.
- [2] Balasubramanian S, Sureshkumar S, Lempe J, Weigel D. Potent induction of *Arabidopsis thaliana* flowering by elevated growth temperature. *PLoS Genet*, 2006, 2: e106. doi: 10.1371/journal.pgen.0020106.
- [3] Hemming M N, Walford S A, Fieg S, Dennis E S, Trevaskis B. Identification of high-temperature-responsive genes in cereals. *Plant Physiol*, 2012, 158: 1439–1450.
- [4] Cober E R, Stewart D W, Voldeng H D. Crop physiology & metabolism: photoperiod and temperature responses in early-maturing, near-isogenic soybean lines. *Crop Sci*, 2001, 41: 721–727.
- [5] 孙洪波. 大豆光温互作新模式的验证及 PEBP 家族基因的克隆和功能分析. 中国农业科学院博士后出站报告, 北京, 2008. Sun H B. Verification of A New Light-Temperature Interaction Model and Clone, Function Analysis of PEBP Family Genes in Soybean. Postdoctoral outbound Report of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing, China, 2008 (in Chinese with English abstract).
- [6] 刘易科. 大豆光温互作新模型的验证和 FT 家族基因的克隆. 西北农林科技大学硕士学位论文, 陕西杨凌, 2006. Liu Y K. Verification of A New Light-Temperature Interaction Model and Clone of FT Family Genes in Soybean. MS Thesis of Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi, China, 2006 (in Chinese with English abstract).
- [7] 张艺能, 周玉萍, 陈琼华, 黄小玲, 田长恩. 拟南芥开花时间调控的分子基础. *植物学报*, 2014, 49: 469–482. Zhang Y N, Zhou Y P, Chen Q H, Huang X L, Tian C E. Molecular basis of flowering time regulation in *Arabidopsis*. *Acta Bot Sin*, 2014, 49: 469–482(in Chinese with English abstract).
- [8] 孔德艳, 陈守俊, 周立国, 高欢, 罗利军, 刘灶长. 水稻开花光周期调控相关基因研究进展. *遗传*, 2016, 38: 532–542. Kong D Y, Chen S J, Zhou L G, Gao H, Luo L J, Liu Z C. Research progress of photoperiod regulated genes on flowering time in rice. *Hereditas*, 2016, 38: 532–542 (in Chinese with English abstract).
- [9] Capovilla G, Schmid M, Pose D. Control of flowering by ambient temperature. *J Exp Bot*, 2015, 66: 59–69.
- [10] Kinmonth-Schultz H A, Tong X, Lee J, Song Y H, Ito S, Kim S H, Imaizumi T. Cool night-time temperatures induce the expression of CONSTANS and FLOWERING LOCUS T to regulate flowering in *Arabidopsis*. *New Phytol*, 2016, 211: 208–224.
- [11] Cockram J, Jones H, Leigh F J, O’Sullivan D, Powell W, Laurie D A, Greenland A J. Control of flowering time in temperate cereals: genes, domestication, and sustainable productivity. *J Exp Bot*, 2007, 58: 1231–1244.
- [12] Salome P A, McClung C R. PSEUDO-RESPONSE REGULATOR 7 and 9 are partially redundant genes essential for the temperature

- responsiveness of the *Arabidopsis* circadian clock. *Plant Cell*, 2005, 17: 791–803.
- [13] 陈华夏, 申国境, 王磊, 邢永忠. 4 个物种 CCT 结构域基因家族的序列进化分析. 华中农业大学学报, 2010, 29: 669–676.
Chen H X, Shen G J, Wang L, Xing Y Z. Sequence evolution analysis of CCT domain gene family in rice, *Arabidopsis*, maize and sorghum. *J Huazhong Agric Univ*, 2010, 29: 669–676 (in Chinese with English abstract).
- [14] Yano M, Katayose Y, Ashikari M, Yamanouchi U, Monna L, Fuse T, Baba T, Yamamoto K, Umehara Y, Nagamura Y, Sasaki T. *Hd1*, a major photoperiod sensitivity quantitative trait locus in rice, is closely related to the *Arabidopsis* flowering time gene *CONSTANS*. *Plant Cell*, 2000, 12: 2473–2483.
- [15] Hayama R, Yokoi S, Tamaki S, Yano M, Shimamoto K. Adaptation of photoperiodic control pathways produces short-day flowering in rice. *Nature*, 2003, 422: 719–722.
- [16] Campoli C, Drosse B, Searle I, Coupland G, von Korff M. Functional characterization of *HvCO1*, the barley (*Hordeum vulgare*) flowering time ortholog of *CONSTANS*. *Plant J*, 2012, 69: 868–880.
- [17] Yang S S, Wers B D, Morishige D T, Mullet J E. *CONSTANS* is a photoperiod regulated activator of flowering in sorghum. *BMC Plant Biol*, 2014, 14: 1–15.
- [18] 薛为亚. 水稻产量相关基因 *Ghd7* 的分离与鉴定. 华中农业大学博士学位论文, 湖北武汉, 2008.
Xue W Y. Isolation and Identification of Rice Yield Related Gene *Ghd7*. PhD Dissertation of Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hubei, China, 2008 (in Chinese with English abstract).
- [19] 刘海洋. 水稻多效性基因 *Ghd7.1* 的克隆与功能分析. 华中农业大学博士学位论文, 湖北武汉, 2016.
Liu H Y. Cloning and Functional Analysis of Rice Multiplexing Gene *Ghd7.1*. PhD Dissertation of Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hubei, China, 2016 (in Chinese with English abstract).
- [20] Murphy R L, Morishige D T, Brady J A, Rooney W L, Yang S, Klein P E. *Ghd7* (*Ma6*) represses sorghum flowering in long days: alleles enhance biomass accumulation and grain production. *Plant Genome*, 2014, 7: 1–10.
- [21] Huang C, Sun H Y, Xu D Y, Chen Q Y, Liang Y M, Wang X F, Xu G H, Tian J G, Wang C L, Li D, Wu L S, Yang X H, Jin W W, Doebley J F, Tian F. *ZmCCT9* enhances maize adaptation to higher latitudes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, 115: e334–e341.
- [22] Li Y P, Tong L X, Deng L L, Liu Q Y, Xing Y X, Wang C, Liu B S, Yang X H, Xu M L. Evaluation of *ZmCCT* haplotypes for genetic improvement of maize hybrids. *Theor Appl Genet*, 2017, 130: 2587–2600.
- [23] Wu W X, Zheng X M, Lu G W, Zhong Z Z, Gao H, Chen L P, Wu C Y, Wang H J, Wang Q, Zhou K N, Wang J L, Wu F Q, Zhang X, Guo X P, Cheng Z J, Lei C L, Lin Q B, Jiang L, Wang H Y, Ge S, Wan J M. Association of functional nucleotide polymorphisms at *DTH2* with the northward expansion of rice cultivation in Asia. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110: 2775–2780.
- [24] 谭俊杰. 水稻 *CONSTANS*-like 基因 *OsCOL10* 作用于光周期开花途径的分子遗传与生化分析. 湖南大学博士学位论文, 湖南长沙, 2015.
Tan J J. Molecular Genetic and Biochemical Analysis of the Effect of *OsCOL10* on Photoperiod Flowering Pathway in Rice. PhD Dissertation of Hunan University, Changsha, Hunan, China, 2015 (in Chinese with English abstract).
- [25] Liu J H, Shen J Q, Xu Y, Li X H, Xiao J H, Xiong L Z. *Ghd2*, a *CONSTANS*-like gene, confers drought sensitivity through regulation of senescence in rice. *J Exp Bot*, 2016, 67: 5785–5798.
- [26] Bennetzen J L, Schmutz J, Wang H, Percifield R, Hawkins J, Pontaroli A C, Estep M, Feng L, Vaughn J N, Grimwood J, Jenkins J, Barry K, Lindquist E, Hellsten U, Deshpande S, Wang X W, Wu X M, Therese Mitros T, Triplett J, Yang X H, Ye C Y, Mauro-Herrera M, Wang L, Li P H, Sharma M, Sharma R, Ronald P C, Panaud O, Kellogg E A, Brutnell T P, Doust A N, Tuskan G A, Rokhsar D, Devos K M. Reference genome sequence of the model plant setaria. *Nat Biotechnol*, 2012, 30: 555–564.
- [27] Zhang G Y, Liu X, Quan Z W, Cheng S F, Xu X, Pan S K, Xie M, Zeng P, Yue Z, Wang W L, Tao Y, Bian C, Han C L, Xia Q J, Peng X H, Cao R, Yang X H, Zhan D L, Hu J C, Zhang Y X, Li H N, Li H, Li N, Wang J Y, Wang C C, Wang R Y, Guo T, Cai Y J, Liu C Z, Xiang H T, Shi Q X, Huang P, Chen Q C, Li Y R, Wang J, Zhao Z H, Wang J. Genome sequence of foxtail millet (*Setaria italica*) provides insights into grass evolution and biofuel potential. *Nat Biotechnol*, 2012, 30: 549–556.
- [28] Brutnell T P, Lin W, Swartwood K, Goldschmidt A, Jackson D, Zhu X G, Kellogg E, Van Eck J. *Setaria viridis*: a model for C_4 photosynthesis. *Plant Cell*, 2010, 22: 2537–2544.
- [29] Lata C, Gupta S, Prasad M. Foxtail millet: a model crop for genetic and genomic studies in bioenergy grasses. *Crit Rev Biotechnol*, 2013, 33: 328–343.
- [30] 贾小平, 全建章, 王永芳, 董志平, 袁玺垒, 张博, 李剑峰. 不同光周期环境对谷子农艺性状的影响. 作物学报, 2019, 45: 1119–1127.
Jia X P, Quan J Z, Wang Y F, Dong Z P, Yuan X L, Zhang B, Li J F. Effects of different photoperiod conditions on agronomic traits of foxtail millet. *Acta Agron Sin*, 2019, 45: 1119–1127 (in Chinese with English abstract).
- [31] 杨希文, 胡银岗. 谷子 *DREB* 转录因子基因的克隆及其在干旱胁迫下的表达模式分析. 干旱地区农业研究, 2011, 29(5): 69–74.
Yang X W, Hu Y G. Cloning of a *DREB* gene from foxtail millet (*Setaria italica* L.) and its expression during drought stress. *Agric Res Arid Areas*, 2011, 29(5): 69–74 (in Chinese with English abstract).
- [32] Zhang Y, Zhang G, Xiao N, Wang L, Fu Y, Sun Z, Fang R, Chen X. The rice ‘nutrition response and root growth’ (*NRG*) gene regulates heading date. *Mol Plant*, 2013, 6: 585–588.
- [33] Zhang L, Li Q P, Dong H J, He Q, Liang L W, Tan C, Han Z M, Yao W, Li G W, Zhao H, Xie W B, Xing Y Z. Three CCT domain-containing genes were identified to regulate heading date by candidate gene-based association mapping and transformation in rice. *Sci Rep*, 2015, 5: 7663.
- [34] 金敏亮. 玉米泛转录组的构建及玉米开花抑制因子 *ZmCOL3* 的功能解析. 华中农业大学博士学位论文, 湖北武汉, 2018.
Jin M L. Maize Pan-transcriptome Construction and Functional Analysis of Maize Flowering Repressor *ZmCOL3*. PhD Disserta-

tion of Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hubei, China, 2018 (in Chinese with English abstract).

- [35] 章佳. 水稻 CCT 家族基因的功能研究和 *Hdl* 的重新克隆. 华中农业大学博士学位论文, 湖北武汉, 2017.

Zhang J. The Functional Analysis of Rice CCT Family Genes and the Recloning of *Hdl*. PhD Dissertation of Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hebei, China, 2017 (in Chinese with

English abstract).

- [36] 宋远丽, 高志超, 栾维江. 温度和光周期对水稻抽穗期调控的交互作用. 中国科学: 生命科学, 2012, 42: 316–325.

Song Y L, Gao Z C, Luan W J. The interaction of temperature and photoperiod on regulating of heading date in rice. *Sci China Life Sci*, 2012, 42: 316–325 (in Chinese with English abstract).

5'-**TGGGAGGAGGAAGAGAGGAGCGCC**AAGAGAGAGCGAGCTCTTTCCATCAAGCTCATAGGTGCGTGCGCACGGCGACGTCGTCGTACGTAGGATGTCGGCGTCGGCGTCGGGCGCCGCGTGCCGCGTGTGCGGTGGCGTCGGGGAGTGCGCATGCCATGGCTACGGGCACGGGATCGGCGGCGCGGTCGGCGGGGTCGCTGTTGCCGACCTACGCCGCGGTTCCCCGGGATGTGGCACCAGGCGGAGGAGGCCTGGCGTCGTCGTGCGCGGAGGCGCGGCGCGCGCAGCGGGGTGCAGGAGTTCCAGTTCTTTGGCCACGACGAGGATCACGAGAGCGTGACGTGGCTGTTCACGACCCAGCGCCCCACCTGCACCGCGGCCCGGCGCCGGCCGCGGTGCGGAACGGGGTGGCCGACGCCGAGCAGCGGAGGGCGCCGCCGTTATTCGACGGGTACGCGCACGCGCAGTACGCCAGACGTTGCCGGGCCATGGGCTACGTTTCGACGTGCCGCTGAGCCGGGGAGGTGAGGTGGCCGCCGCGCGGTCTGGAGGCCGGGTGGGGCTCGGCGGGCGGCAGCAACCCGGCGACGTCCAGCGCCAAATCATGTCTTCTGCGGGAGCACGTTCACTGACGCGGCGAGCTCCGTTCCGGGCGAGGTCGTCGCGGCGCGGCCAACGGGAGCTCCGGCGGCGGCGTCGTGGACCCGACGATGGACCGGGAGGCGAAGGTGATGCGGTACAAGGAGAAGCGGAAGCGGAGGCGCTACGAGAAGCAAATCCGCTACGCCTCCGCAAGGCCTACGCCGAGATGCGGCCGCGCTCAAGGGCCGATTCCGCAAGGTGCCTGACGGCGAGGCCCGGCGCCACCGGCGGCCGCGCCGCGCGGGCTATGAGCCCGGCCGCTCGATCTCGGGTGGTTCCGTTCATAGCGAGGATGTACACGTAACGTACGTATATGCCGCCGCGCGGAGCAATTTAGCTAGCATAGGCCGTTGATGATTAATTTAAGGCACGTAGATAAATACGAACGGAAATGTATACGTGATCGACGCATGACTAGCCACGGACCTGAAGAAG-3'

附图 1 *SiCCT* 基因 cDNA 序列

Supplementary Fig. 1 cDNA sequences of *SiCCT* gene

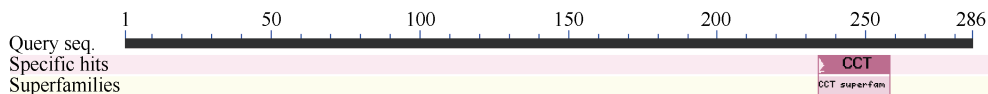
粗体部分为引物序列, 下画线部分为起始密码子和终止密码子。

The bolded parts are primer sequences, the underlined parts are initiation codon and termination codon.

1	MSASASGAAC	RVCGGVGECA	CHGYGHGIGG	ARCGGVAVAD	LSRGFPGMWH	QAEIEPGVVV
61	GGGAAAAAGL	QEFQFFGHDE	DHESVTWLFN	DPAPHLHRGP	APAAVGNGVA	DAEQRRAPPL
121	FDGYAHAQYG	QTLPGHGLTF	DVPLSRGGEV	AAAVALLEAGL	GLGGGGSNPA	TSSAKIMSFC
181	GSTFTDAASS	VPGEVVAAAA	NGSSGGGVVD	PTMDREAKVM	RYKEKRKRRR	YEKQIRYASR
241	KAYAEMRPRV	KGRFAKVPDG	EAPAPPAAAA	AAGYEPGRLD	LGWFRS	

附图 2 *SiCCT* 基因编码的氨基酸序列

Supplementary Fig. 2 The deduced amino acid sequence of *SiCCT* gene



附图 3 *SiCCT* 基因编码蛋白质的保守结构域预测分析

Supplementary Fig. 3 Prediction for the conserved domains of *SiCCT* protein