

DOI: 10.3724/SP.J.1006.2021.04139

谷子 *SiPRR37* 基因对光温、非生物胁迫的响应特点及其有利等位变异鉴定

贾小平^{1,*} 李剑峰¹ 张博¹ 全建章² 王永芳² 赵渊¹ 张小梅¹
王振山¹ 桑璐曼¹ 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: 从谷子品种延谷 11 号克隆生物钟基因 *SiPRR37*, 通过生物信息学分析、组织特异性表达分析、4 种不同光温组合条件的昼夜表达模式分析以及对 NaCl、ABA、PEG、低温、Fe 5 种非生物胁迫的响应特点分析, 揭示 *SiPRR37* 参与谷子光温互作调控以及应对非生物胁迫的作用机制; 并对 160 份谷子材料重测序检测 *SiPRR37* 基因的突变位点进行单倍型分析, 探究该基因对谷子主要农艺性状的影响。结果表明, *SiPRR37* 基因蛋白质编码区(sequence coding for amino acids in protein, CDS)全长 2247 bp, 编码 748 个氨基酸, 含有 REC 和 CCT 2 个结构域, 基于 PRR37 蛋白的系统进化分析发现, 谷子与糜子、高粱、玉米亲缘关系最近; 启动子预测分析发现, *SiPRR37* 启动子区存在光、温、生长素、赤霉素、脱落酸、茉莉酸甲酯、干旱和盐胁迫等多种应答元件。*SiPRR37* 相对表达量从高到低依次为根、穗颈、穗、顶叶、次顶叶、茎秆; 4 个光温组合条件 *SiPRR37* 均只在光照期出现 1 个表达峰, 无论高温(27℃)还是低温(22℃), 短日照相比长日照表达峰均要提前, 无论长日照还是短日照, 低温(22℃)相比高温(27℃)表达峰均要提前; NaCl、低温(15℃)胁迫能够抑制 *SiPRR37* 表达, PEG 模拟干旱胁迫和 Fe 胁迫能够诱导 *SiPRR37* 基因表达, *SiPRR37* 参与了 ABA 信号传导过程。位于 *SiPRR37* CDS 区的 10 个 SNP 将 160 份谷子材料分为 19 个单倍型, 其中 3 个单倍型(Hap_7、Hap_10、Hap_19)是改善穗部性状的有利单倍型。谷子 *SiPRR37* 基因表达具有昼夜节律性, 同时受光周期和温度调控, 并且参与了谷子对盐胁迫、低温胁迫、干旱胁迫和铁胁迫的应答反应, 同时 *SiPRR37* 与抽穗期和多个穗部性状相关, 在开展谷子高产分子辅助选育中具有一定应用潜力。

关键词: 谷子; *SiPRR37*; 光温组合; 非生物胁迫; 表达分析; 单倍型

Responsive features of *SiPRR37* to photoperiod and temperature, abiotic stress and identification of its favourable allelic variations in foxtail millet (*Setaria italica* L.)

JIA Xiao-Ping^{1,*}, LI Jian-Feng¹, ZHANG Bo¹, QUAN Jian-Zhang², WANG Yong-Fang², ZHAO Yuan¹, ZHANG Xiao-Mei¹, WANG Zhen-Shan¹, SANG Lu-Man¹, and DONG Zhi-Ping^{2,*}

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

Abstract: In this study, the clock gene *SiPRR37* was cloned from the foxtail millet variety Yangu 11, and bioinformatics analysis, tissue specific expression analysis, diurnal expression patterns analysis under four different photo-thermal combinational conditions and responsive characteristics analysis to five abiotic stresses such as NaCl, ABA, PEG, low temperature and Fe were performed to reveal the mechanisms that *SiPRR37* participated in regulating of photo-thermal interaction and coped with abiotic stresses. Mutation sites of *SiPRR37* were detected by re-sequencing of 160 millet materials, which were used for haplotype analysis to explore the effect of *SiPRR37* on main agronomic traits. The results showed that the CDS length of *SiPRR37* gene was 2247

本研究由国家自然科学基金项目(31471569)资助。

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (31471569).

* 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): 2020-06-25; Accepted (接受日期): 2020-10-14; Published online (网络出版日期): 2020-11-20.

URL: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1809.S.20201120.1412.004.html>

bp, which encoded 748 amino acids and contained REC and CCT domains. The phylogenetic analysis based on PRR37 proteins showed that foxtail millet had the closest relationship with broomcorn millet, sorghum and maize. Promoter prediction analysis found that various responsive elements to light, temperature, auxin, GA, ABA, MeJA, drought and salt stresses were detected in promoter region of *SiPRR37*. The decreasing order of relative expression level of *SiPRR37* was root, panicle neck, panicle, parietal leaf, secondary parietal leaf and stem. Under four photo-thermal combinational conditions, *SiPRR37* gave only one expression peak during the light period, and regardless of high temperature (27^{°C}) or low temperature (22^{°C}), the expression peak advanced under short-day condition compared to long-day condition, regardless of long-day or short-day, the expression peak advanced at low temperature (22^{°C}) compared to high temperature (27^{°C}). The expression of *SiPRR37* was inhibited by NaCl and low temperature (15^{°C}) stresses, induced by PEG-simulated drought stress and Fe stress. *SiPRR37* participated in ABA signaling transduction process. The 10 SNPs in CDS region of *SiPRR37* divided 160 millet materials into 19 haplotypes, of which Hap_7, Hap_10 and Hap_19 were favorable haplotypes for improving panicle traits. *SiPRR37* exhibited circadian expression, and was regulated by photoperiod and temperature simultaneously. *SiPRR37* participated in the responses of foxtail millet to salt stress, low temperature stress, drought stress and Fe stress. At the same time, *SiPRR37* was correlated with heading stage and multiple panicle traits, showing certain application potential in high-yield molecular-assisted breeding of foxtail millet.

Keywords: foxtail millet; *SiPRR37*; photo-thermal combinations; abiotic stress; expression analysis; haplotype

伪应答调控蛋白(pseudo-response regulators, PRRs)基因属于 CCT 基因家族中的 PRR 亚家族, 所编码蛋白的氨基端含有 1 个 PRR 结构域, 羧基端含有 1 个 CCT 结构域, 这 2 个结构域被 1 个不太保守的可变域分割^[1-2]。作为生物钟核心组分, PRRs 基因广泛参与植物光周期调控开花、抵御非生物胁迫及生物量积累等多个生长发育过程^[3-5]。

OsPRR37 是从水稻中克隆的 1 个非常关键的生物钟基因, 与控制光周期敏感性的主效 QTL Hd2 密切相关, 影响株高、开花期和每穗小穗数^[6-7]; *OsPRR37* 的天然突变促进了水稻向亚洲高纬度地区的扩张, 使其地理适应性和种植面积都得到提升^[8-10]。大麦 *Ppd-H1*、小麦 *Ppd-D1* 和高粱 *SbPRR37* 与 *OsPRR37* 同源, 同样在对应作物光周期调控开花过程中发挥重要功能, 影响区域适应性^[11-13]。PRR37 蛋白提前终止、CCT 结构域和 PRR 结构域中的错义突变会影响作物对光周期的敏感性, 进而影响表型性状, 因此可以把 PRR37 作为改变生态适应性的靶点, 通过选择特定的碱基突变类型(单倍型)从而达到所需的适应性表型, 发掘该基因有利等位变异, 在作物广适应性高产分子辅助选择育种中展现良好应用前景^[5,11,14-16]。如水稻开花期与 *OsPRR37* 表达水平显著相关, 利用 *OsPRR37* 可以增强水稻光温敏感性, 从而实现对开花期的调节^[17]。除了与生态适应性密切相关, PRR37 的直系同源基因 *PRR7* 还参与了拟南芥对干旱胁迫的抵御过程, 其许多靶基因能够负调控植物 ABA 以响应干旱胁迫^[18-20]。*PRR7* 基因的作用靶点还包括 fer1、fer3 和 fer4 三种铁蛋白, 在植物铁过量应激反应中具有保护作用^[21]。此外低

温诱导可使 *PRR37* 及其他生物钟基因形成不同的可变剪切体, 导致不同的转录本产生, 通过负调控抗冷基因 *CBF* (C-repeat-binding factor)表达来响应冷胁迫^[20,22-23]。

目前对 *PRR37* 基因的研究主要集中于光周期调控开花、逆境胁迫响应机制方面, 有关该基因在禾本科作物光温互作调控中的作用机制尚未见报道, 同时 *PRR37* 在非生物胁迫中的作用机制研究局限于拟南芥、水稻几种模式植物, 在 C₄ 作物中的研究比较缺乏。谷子(*Setaria italica* L.)是我国的传统杂粮作物, 具有基因组较小(约 515 Mb)、籽粒营养价值高、生育期短、抗旱性强、耐贫瘠和高光效等优点, 已经成为北方干旱半干旱地区重要的粮食作物以及 C₄ 禾谷类作物的理想模型^[24-27]。谷子对光温反应敏感, 自然界存在丰富的光温敏感型变异材料, 是揭示 C₄ 作物光温敏感性形成分子机制的合适对象^[28]。有关谷子光温敏感性研究较少, 主要包括光温敏感性指标筛选、光周期敏感性相关性状 QTL 定位等方面^[29-36]。谷子全基因组序列测定及大量转录组数据的公布为利用反向遗传学方法快速克隆光温敏感性关键基因提供了便利, 这对揭示谷子光温敏感性形成的分子机制具有极大的促进作用, 因此本研究利用 RT-PCR 技术克隆谷子生物钟关键基因 *SiPRR37*, 设置不同光温组合条件、不同非生物胁迫条件分析该基因的表达规律, 并通过对 160 份谷子材料重测序检测基因突变位点, 进行单倍型效应分析, 以期揭示 *SiPRR37* 参与谷子光温互作调控和抵御非生物胁迫的可能机制, 确定其对主要农艺性状的作用。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本研究用于 *SiPRR37* 基因克隆及表达分析的谷子品种为来自陕西的延谷 11 号, 该品种对光温敏感, 是研究春谷品种光温敏感性的理想材料。用于重测序及单倍型分析的 160 份谷子材料见附表 1。

1.2 谷子 *SiPRR37* 基因的克隆

首先通过检索 NCBI 数据库获得 1 条注释为 *PRR37* 基因的谷子 mRNA 序列(XM_022824614), 将该基因命名为 *SiPRR37*, 以此序列为模板设计 3 对特异引物用于基因扩增(表 1)。将延谷 11 号饱满种子种植于口径为 10 cm×10 cm 装有营养土的塑料盆中, 在自然条件下生长至五叶期时采集顶叶, 液氮速冻, 然后用 Ultrapure RNA Kit(康为世纪生物科技有限公司)提取总 RNA, 用 PrimeScript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit(宝日生物医药技术(北京)有限公司)反转录合成第一链 cDNA, 用 3 对特异性引物分段扩增目的基因, 扩增体系包括稀释 10 倍的 cDNA 模板 1 μL、2×Es Taq MasterMix (Dye)(康为世纪生物科技有限公司) 10 μL、10 μmol L⁻¹ 正、反向引物各 0.5 μL, 最后用 ddH₂O 补足到 20 μL。PCR 扩增程序为 94 预变性 5 min; 94 变性 30 s、58 退火 30 s、72 延伸 90 s, 35 个循环; 72 延伸 5 min。用 EasyPure Quick Gel Extraction Kit(北京全式金生物技术有限公司)纯化回收 PCR 产物, 然后连接到 pBM16A 克隆载体(北京艾德莱生物科技有限公司), 再转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 挑选阳性克隆菌液送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

表 1 特异性引物

Table 1 Specific primers

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequences (5'-3')	预期片段大小 Expected fragment size (bp)	用途 Purpose
PRR37-1	F: TGACAAACGACGAGGACG	1295	克隆 <i>SiPRR37</i>
	R: CGTTAGCAATCTCCGTGT		Cloning <i>SiPRR37</i>
PRR37-2	F: CCATTGCTGACTCGCCTAC	1586	
	R: TCCTGTCCCCGCTTGAT		
PRR37-3	F: AAGGCTCCAATGGCAGTAG	1267	
	R: GAACCAGCGAAGGAAGAAC		
SiActin	F: GGC AACACAGGGAGAAGATGA	229	内参荧光定量
	R: GAGGTTGTCGTAAGGTCACG		Internal reference fluorescence quantification
RtPRR37	F: CACCACTTCGTCTACCTCTT	91	<i>SiPRR37</i> 荧光定量
	R: CTGGCATCTTCTAACCG		<i>SiPRR37</i> fluorescence quantification

1.3 谷子 *SiPRR37* 基因的生物信息学分析

利用在线分析工具 SubLoc 软件(<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/plant-multi>)分析基因亚细胞定位; 用 NCBI 的 CDD 数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)搜索谷子 *SiPRR37* 蛋白的保守结构域; 用 DISPHOS (<http://www.dabi.temple.edu/disphos/>)预测谷子 *SiPRR37* 蛋白的磷酸化位点。利用 DNAMAN 5.0 软件将谷子 *SiPRR37* 蛋白序列与 NCBI 数据库中下载的其他 32 个物种的 *PRR37* 蛋白序列进行多序列比对, 用 MEGA 6.05 软件构建分子系统发育树。从 phytozome 数据库(<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>)下载谷子 2 号染色体 *SiPRR37* 基因上游 49,117,628~49,119,628 bp 之间序列, 用启动子分析软件 plantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 分析 *SiPRR37* 基因启动区顺式作用元件。

限公司)提取总 RNA, 用 PrimeScript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit(宝日生物医药技术(北京)有限公司)反转录合成第一链 cDNA, 用 3 对特异性引物分段扩增目的基因, 扩增体系包括稀释 10 倍的 cDNA 模板 1 μL、2×Es Taq MasterMix (Dye)(康为世纪生物科技有限公司) 10 μL、10 μmol L⁻¹ 正、反向引物各 0.5 μL, 最后用 ddH₂O 补足到 20 μL。PCR 扩增程序为 94 预变性 5 min; 94 变性 30 s、58 退火 30 s、72 延伸 90 s, 35 个循环; 72 延伸 5 min。用 EasyPure Quick Gel Extraction Kit(北京全式金生物技术有限公司)纯化回收 PCR 产物, 然后连接到 pBM16A 克隆载体(北京艾德莱生物科技有限公司), 再转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 挑选阳性克隆菌液送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

1.4 谷子 *SiPRR37* 基因的表达分析

将延谷 11 号种子种于口径 10 cm×10 cm 装有营养土的塑料方盆中, 总计种植 115 盆, 每盆种植 4 株。将其中 3 盆放在低温短日照(low temperature short day, LTSD, 22 °C、9 h 光/15 h 暗)条件下培养至抽穗, 然后用剪刀剪取穗、穗颈、茎秆、顶叶、次顶叶和根, 放入液氮速冻, 每个样品 3 次重复, 用于 *SiPRR37* 基因的组织特异性表达分析。

将 64 盆放在自然条件下长至三叶期后分别转至高温短日照(high temperature short day, HTSD, 27 °C、9 h 光/15 h 暗)、低温短日照(low temperature short day, LTSD, 22 °C、9 h 光/15 h 暗)、高温长日照(high temperature long day, HTLD, 27 °C、15 h 光/9 h 暗)、低温长日照(low temperature long day, LTLD, 22 °C、15 h 光/9 h 暗) 4 个培养箱培养, 每个培养箱 16 盆, 2 个重复, 3 周后昼夜 24 h 内每隔 3 h 取植株顶端 2 片

叶液氮速冻, 取样时间点为 6:00、9:00、12:00、15:00、18:00、21:00、0:00、3:00, 所取样品用于 *SiPRR37* 基因昼夜表达分析。

剩余的 48 盆分为 6 组, 1 个对照(CK)组, 5 个胁迫处理组, 每组 8 盆, 在培养室萌发 3 周后分别进行 200 mmol L⁻¹ NaCl、100 μmol L⁻¹ ABA、20% PEG-6000、600 μmol L⁻¹ EDTA-Fe 和 15 ℃ 冷胁迫处理。NaCl、EDTA-Fe 和 PEG-6000 处理采用浇灌法, ABA 处理采用叶面喷洒法, 将整盆植株移入 15 ℃ 冰箱进行冷胁迫处理。分别取各处理组和对照组(CK)在处理前(0 h)和处理后 0.5、1、2、4、8、16、24 h 每株顶端 2 片叶子液氮速冻, 培养室温度为 25 ℃, 光照条件为 14 h 光/10 h 暗, 所取样品用于 *SiPRR37* 基因在非生物胁迫条件下的表达分析。

上述所有样品 RNA 提取、反转录同 1.2, 将反转录好的 cDNA 作为 Real-time PCR 的模板, 用表 1 中的 SiActin 引物和 RtPRR37 引物分别扩增内参基因和 *SiPRR37* 基因特异片段, 每个样品做 3 个重复, 扩增体系及循环程序参照宝日微生物技术(北京)有限公司的 TB Green Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) 试剂说明书, 首先配制 10 μL 扩增体系, 包含 cDNA 模板 1 μL、TB Green Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) 5 μL、10 μmol L⁻¹ 的 RtPRR37 正向和反向引物各 1 μL、ddH₂O 2 μL。使用 Roche Light Cycler 96 实时定量 PCR 仪, 采用两步法 PCR 反应程序, 扩增程序为 95 ℃ 预变性 30 s; 95 ℃ 变性 30 s, 58 ℃ 退火 30 s, 共 40 个循环。分析得到的扩增曲线、溶解曲线, 并计算 $\Delta\Delta CT$ 值, 采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 计算相对表达量。

1.5 *SiPRR37* 基因单倍型效应分析

从 160 份谷子材料重测序数据中获得 *SiPRR37* 基因 SNP 位点, 利用 dnasp 5 软件对 *SiPRR37* 基因编码区的 SNP 位点进行单倍型分析, 利用本实验室于 2015、2016 连续 2 年在海南乐东、河南洛阳、吉林吉林市、公主岭市调查的 160 份谷子材料 8 个农艺性状表型数据进行单倍型效应分析^[30]。

2 结果与分析

2.1 谷子 *SiPRR37* 基因的克隆及生物信息学分析

首先提取延谷 11 号叶片总 RNA, 经 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测所提 RNA 质量较好, 无明显降解, 可以用于后续的反转录试验(图 1)。以反转录合成的第一链 cDNA 为模板, 用 PRR37-1、

PRR37-2 和 PRR37-3 3 对特异性引物分段扩增 *SiPRR37* 基因, 均获得预期大小片段(图 2-A, B)。将 3 个扩增片段测序后经过拼接得到谷子 *SiPRR37* 基因含有完整编码区域的 cDNA 序列, 该序列长度为 2953 bp, 包含 2247 bp 的 CDS 区域, 编码 748 个氨基酸(附图 1)。

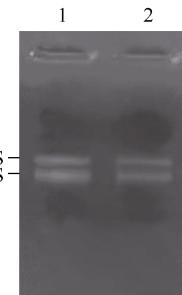


图 1 延谷 11 号叶片总 RNA 电泳结果

Fig. 1 Electrophoresis results of total RNA extracted from leaves in Yanggu 11

1, 2: 提取的两管 RNA。1, 2: two tubes of RNA extracted.

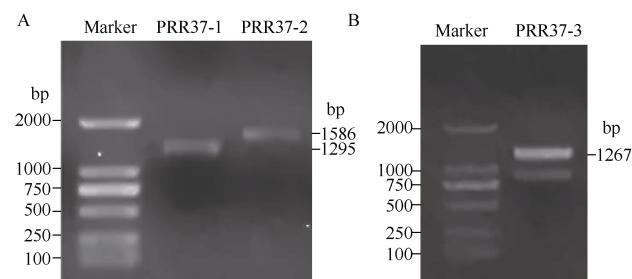


图 2 *SiPRR37* 基因的 RT-PCR 产物电泳结果

Fig. 2 RT-PCR results of *SiPRR37* genes

M: marker DL2000; A: PRR37-1, PRR37-2 扩增产物; B: PRR37-3 扩增产物。

M: marker DL2000; A: amplified products of PRR37-1 and PRR37-2; B: amplified product of PRR37-3.

生物信息学分析发现, 谷子 *SiPRR37* 蛋白定位于细胞核中, 该蛋白含有 2 个明显的结构域, 即 REC 和 CCT 结构域(图 3); *SiPRR37* 蛋白的多肽链中只有丝氨酸(Ser)可能发生磷酸化, 85 个丝氨酸残基中较易发生磷酸化的有 14 个, 占 16.47% (附图 2)。

在 NCBI 数据库中下载与谷子 *SiPRR37* 蛋白具有直系同源关系的大麻(*Cannabis sativa* XP_030488228.1)、枣(*Ziziphus jujuba* XP_015877113.1)、蓖麻(*Ricinus communis* XP_015578380.1)、澳洲棉(*Gossypium australe* KAA3464109.1)、番木瓜(*Carica papaya* XP_021910105.1)、葡萄(*Vitis vinifera* XP_010658157.1)等 32 种植物的 PRR37 蛋白序列, 采用 NJ 法构建分子系统进化树发现, 谷子与糜子亲缘关系最近, 其次是高粱和玉米, 这 4 种 C₄ 作物聚

为一个小亚群, 与同为禾本科作物的小麦和水稻聚为一个较大的群, 其余物种聚在另一个大群里(图 4)。

分析 *SiPRR37* 基因上游启动子区发现, 除了 TATA-box、CCAAT-box 核心启动子元件外, 还有 8 个光响应元件、1 个低温响应元件、2 个赤霉素响应元件、1 个生长素响应元件、2 个ABA 响应元件和 2 个茉莉酸甲酯响应元件, 说明 *SiPRR37* 基因受光温和多种激素调控。此外启动子区还发现 2 个参与干旱、盐等逆境胁迫的作用元件, 说明 *SiPRR37* 在谷子应对逆境胁迫中可能发挥作用(表 2)。

2.2 *SiPRR37* 基因的组织特异性表达分析

通过分析 *SiPRR37* 基因在延谷 11 茎秆、根、穗颈、顶叶、次顶叶和穗 6 个部位的相对表达量发现, 在抽穗后, *SiPRR37* 基因在根中表达量最高, 茎秆中表达量最低, 相对表达量从高到低依次为根>穗颈>穗>顶叶>次顶叶>茎秆(图 5)。

2.3 *SiPRR37* 基因在 4 种光温组合条件下的表达分析

在 4 种光温组合条件下 *SiPRR37* 基因均在光照期出现 1 个表达峰, 且光照期的表达量明显高于黑

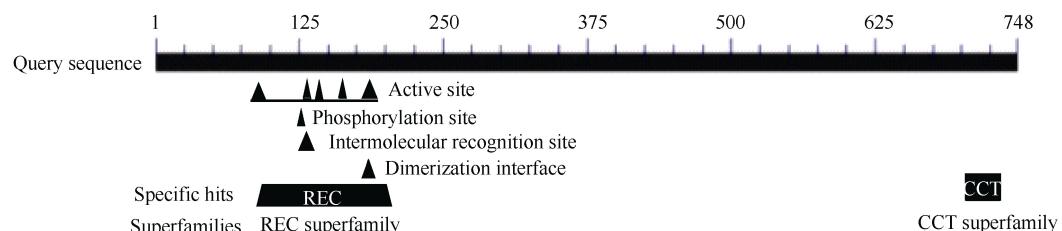


图 3 谷子 *SiPRR37* 蛋白的结构域分析

Fig. 3 Domain analysis of *SiPRR37* protein in millet

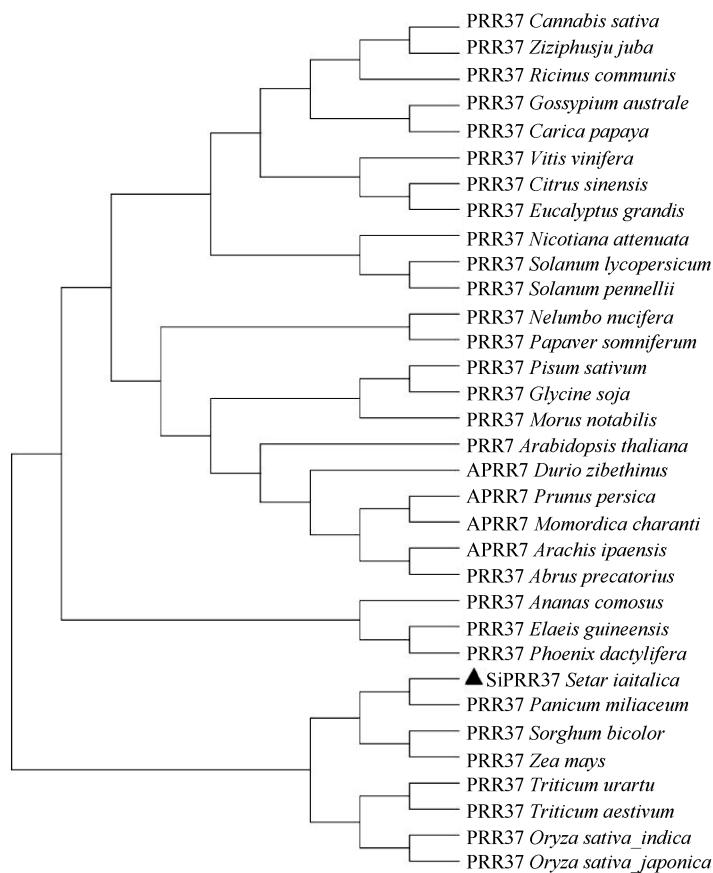


图 4 PRR37 蛋白的分子系统进化树

Fig. 4 Molecular phylogenetic tree of PRR37 protein

表 2 *SiPRR37* 启动子区顺式作用元件分析Table 2 Analysis of cis-acting elements in promoter region of *SiPRR37*

调控元件 Regulatory element	核心序列 Core sequence	数目 Number	分布区域 Distribution region (bp)	功能 Function
LTR	CCGAAA	1	658–663	参与低温响应顺式激活元件 cis-acting element involved in low-temperature responsiveness
G-box	CACGTG, TCCACATGGCA, CACGAC	4	123–128, 1870–1879, 1103–1108, 1517–1522	参与光响应顺式作用元件 cis-acting regulatory element involved in light responsiveness
AE-box	AGAAACTT	1	409–416	部分光响应元件 Part of a light responsive element
Box II	CCACGTGGC	1	122–130	部分光响应元件 Part of a light responsive element
Sp1	GGGC GG	1	23–28	光响应元件 Light responsive element
3-AF1 binding site	TAAGAGAGGAA	1	1045–1054	光响应元件 Light responsive element
AuxRR-core	GGTCCAT	1	1536–1542	参与生长素响应顺式作用元件 cis-acting regulatory element involved in auxin responsiveness
TGACG-motif	TGACG, CGTCA	2	29–33, 1563–1567	参与茉莉酸甲酯响应的顺式激活元件 cis-acting regulatory element involved in the MeJA-responsiveness
TATC-box	TATCCC	1	925–931	参与赤霉素响应顺式激活元件 cis-acting element involved in gibberellin-responsiveness
P-box	CCTTTTG	1	1726–1732	赤霉素响应元件 Gibberellin-responsive element
Myb-binding site	CAACAG	1	1154–1159	参与干旱、盐胁迫等逆境响应 Involved in drought, salt dresses responsiveness
DRE1	ACCGAGA	1	342–348	干旱胁迫响应元件
ABRE	ACGTG, CACGTG	2	31–35, 123–128	参与 ABA 响应的顺式激活元件 cis-acting element involved in the abscisic acid responsiveness

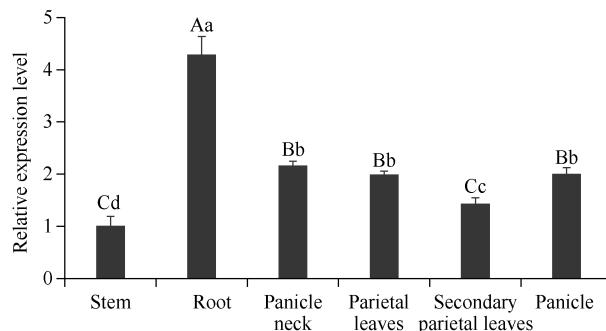
图 5 *SiPRR37* 基因的组织特异性表达分析

Fig. 5 Tissue-specific expression analysis of *SiPRR37* gene
柱上不同大小写字母分别表示在 0.01 和 0.05 水平差异显著。
Values followed by different uppercase and lowercase letters above the bar represent significant difference at the 0.01 and 0.05 probability levels, respectively.

暗期, 说明该基因受光诱导(图 6-A~D)。此外无论低温(22℃)还是高温(27℃), *SiPRR37* 在短日照条件的表达峰均比长日照提前, 低温条件短日照在光照 6 h 表达量最高, 长日照在光照 9 h 表达量最高; 高温条件短日照在光照 9 h 表达量最高, 长日照在光照 12 h 表达量最高。同时可以看出, 温度的提高使 *SiPRR37* 的表达峰无论长日照条件还是短日照条件均发生推迟。说明

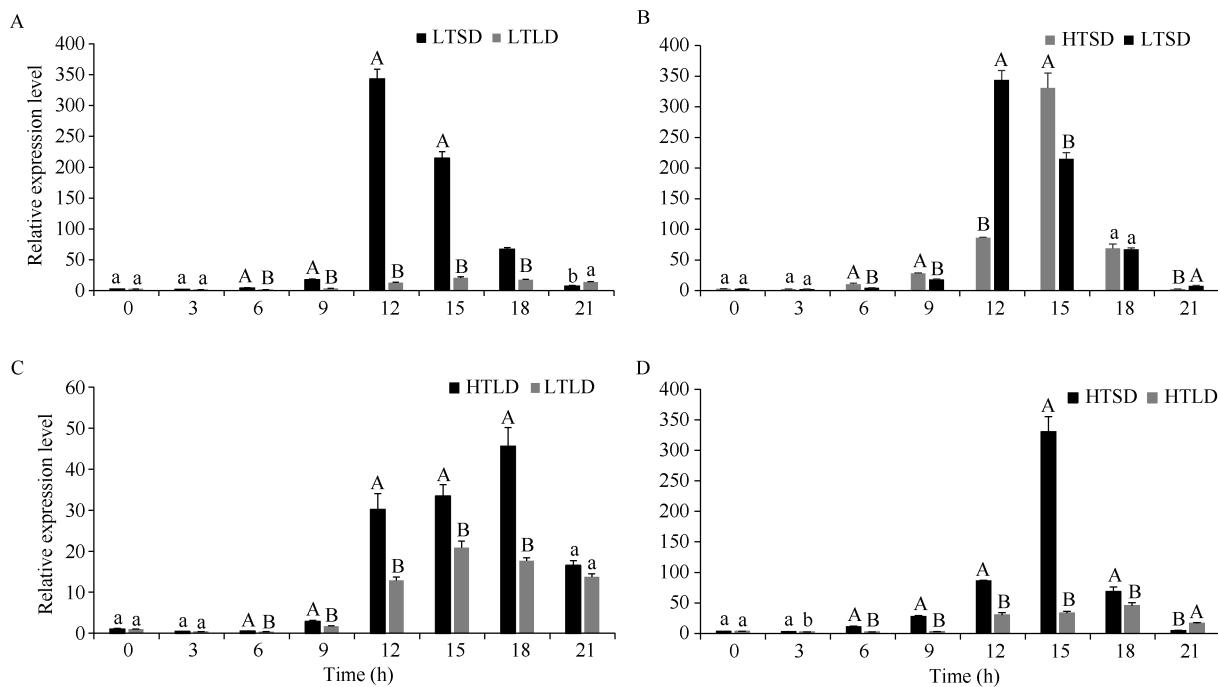
SiPRR37 在受光周期调控的同时也受温度的影响。

2.4 谷子 *SiPRR37* 基因对非生物胁迫的响应

SiPRR37 基因在 NaCl 胁迫处理 24 h 内表达量均显著或极显著低于对照, 说明盐胁迫能够明显抑制 *SiPRR37* 基因的表达(图 7-A); 在 ABA 处理 2~12 h *SiPRR37* 表达水平和对照产生极显著差异, 说明 *SiPRR37* 参与了 ABA 信号传导过程(图 7-B); 在 PEG 胁迫处理 4 h、24 h 与对照表达量无显著差异, 其余时间点表达量均极显著高于对照, 说明 *SiPRR37* 可以被干旱胁迫诱导表达(图 7-C)。

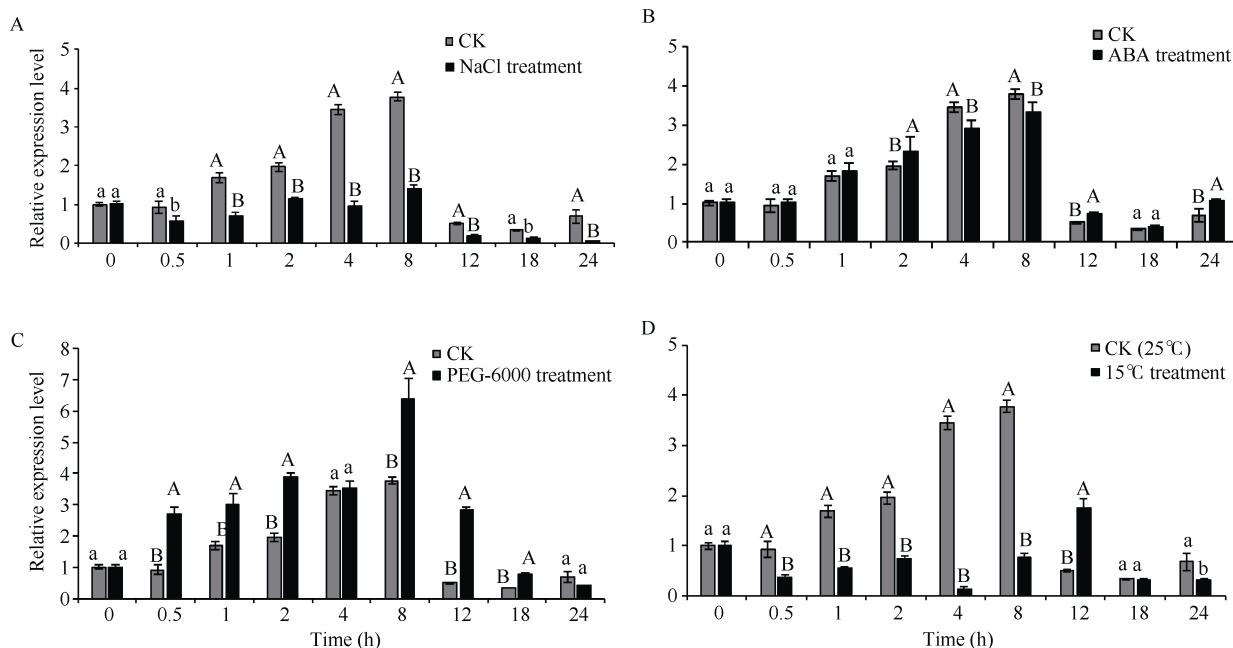
15 低温胁迫处理除了在处理 12 h *SiPRR37* 被诱导表达、处理 18 h 表达水平接近于对照, 其余时间点表达量均显著或极显著低于对照, 说明总体上

15 低温胁迫处理使 *SiPRR37* 表达受到抑制(图 7-D)。Fe 胁迫处理的 24 h 内除了处理 1 h *SiPRR37* 基因的表达量与对照无显著差异, 其余时间点表达水平均显著或极显著高于对照(图 7-E), 说明铁胁迫处理可以诱导 *SiPRR37* 基因的表达, *SiPRR37* 蛋白有 fer1、fer3 和 fer4 3 种铁蛋白作用靶点, 推测其在铁过量应激反应中具有保护作用。

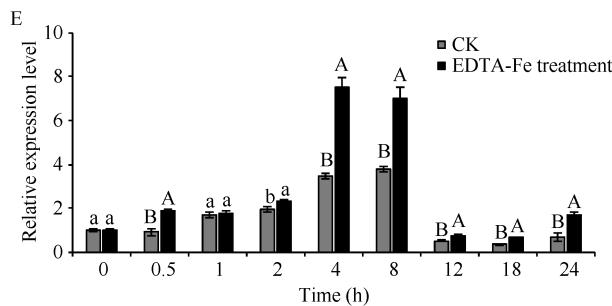
图 6 不同光温组合处理 *SiPRR37* 基因表达特性Fig. 6 Expression characteristics of *SiPRR37* gene under different photo-thermal combinational treatments

A: 低温条件不同光周期对 *SiPRR37* 基因的影响; B: 短日照条件不同温度对 *SiPRR37* 基因的影响; C: 长日照条件不同温度对 *SiPRR37* 基因的影响; D: 高温条件不同光周期对 *SiPRR37* 基因的影响。长日照: 6:00–21:00 光照, 0:00–6:00 和 21:00–0:00 为黑暗; 短日照: 6:00–15:00 光照, 0:00–6:00 和 15:00–0:00 为黑暗。LTSD: 低温短日照; LTLD: 低温长日照; HTSD: 高温短日照; HTLD: 高温长日照。柱上不同大小写字母分别表示在 0.01 和 0.05 水平差异显著。

A: the effect of different photoperiods on *SiPRR37* gene under low temperature condition; B: the effect of different temperatures on *SiPRR37* gene under short-day condition; C: the effect of different temperatures on *SiPRR37* gene under long-day condition; D: the effect of different photoperiods on *SiPRR37* gene under high temperature condition. Long day: 6:00–21:00 light, 0:00–6:00 and 21:00–0:00 dark; Short day: 6:00–15:00 light, 0:00–6:00 and 15:00–0:00 dark. LTSD: low temperature short day; LTLD: low temperature long day; HTSD: high temperature short day; HTLD: high temperature long day. Different uppercase and lowercase letters above the bar represent significant difference at the 0.01 and 0.05 probability levels, respectively.



(图 7)

图 7 谷子 *SiPRR37* 基因对非生物胁迫的响应Fig. 7 Response of *SiPRR37* gene to abiotic stresses in millet

A: 盐胁迫; B: ABA 渗透胁迫; C: PEG 模拟干旱胁迫; D: 低温胁迫; E: 铁胁迫。柱上不同大小写字母分别表示在 0.01 和 0.05 水平差异显著。

A: salt stress; B: ABA osmotic stress; C: PEG simulated drought stress; D: low-temperature stress; E: iron stress. Different uppercase and lowercase letters above the bars represent significant difference at the 0.01 and 0.05 probability levels, respectively.

2.5 *SiPRR37* 基因单倍型效应分析

从 160 份谷子重测序数据中提取获得 14,343 bp 的 *SiPRR37* 基因核苷酸序列, 包括 978 bp 的 5' 非翻译区、2247 bp 的编码区、10,440 bp 的内含子区和 678 bp 的 3' 非翻译区。对 *SiPRR37* 基因结构进行分析发现, 该基因编码区有 7 个外显子、6 个内含子。经对 160 份谷子材料基因序列进行比对共获得 47 个 SNPs, 其中外显子区 10 个 SNPs, 包括 8 个错义突变, 错义突变频率为 80% (表 3)。

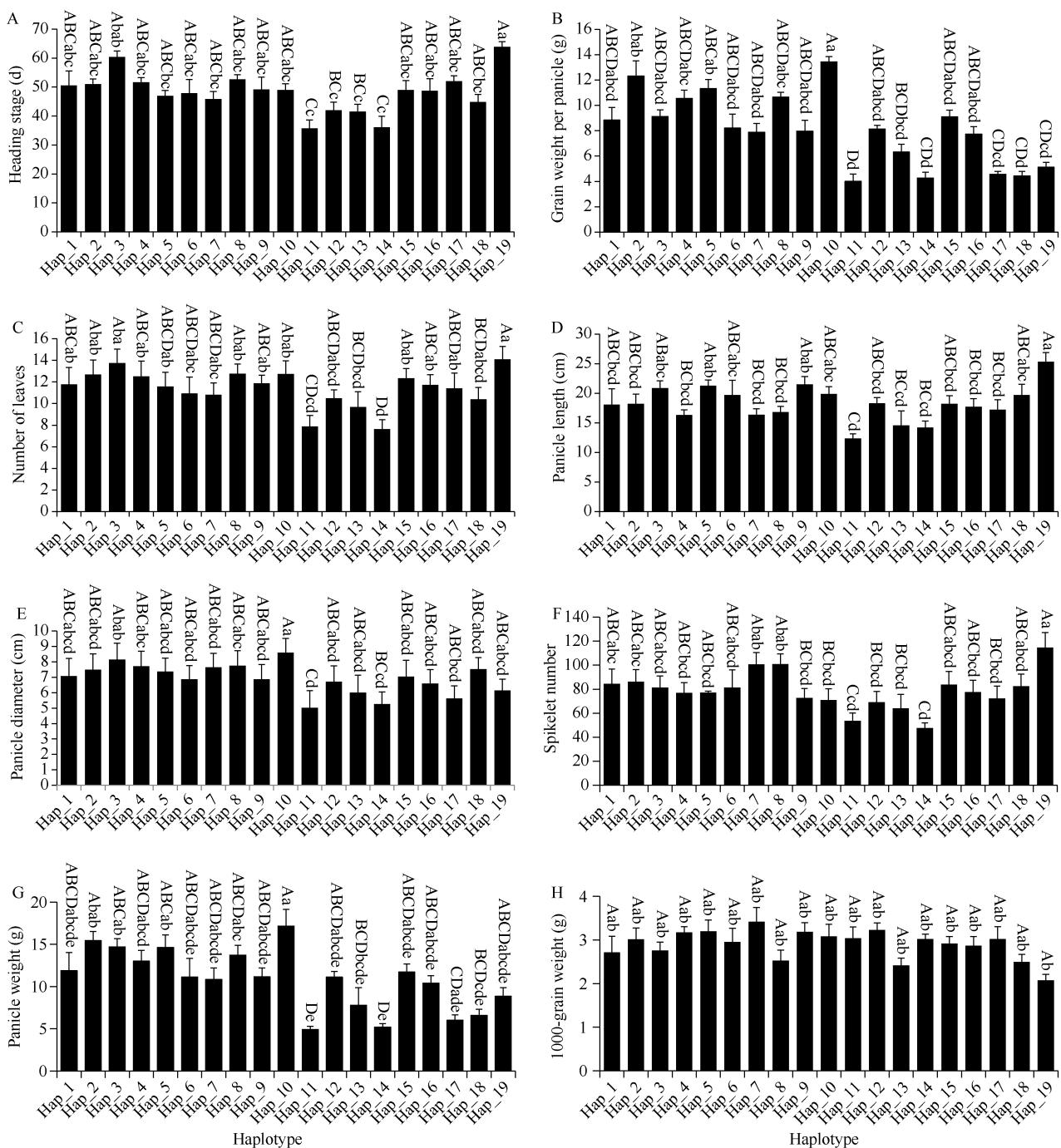
对 *SiPRR37* 基因外显子区的 10 个 SNP 位点进行单倍型分析, 共发现 19 个单倍型, 160 份谷子材料在 19 个单倍型中分布不均衡, 出现频率最高的单倍型是 Hap_1, 包括 84 个谷子品种, 占所有品种的 52.5%; 8 个单倍型(Hap_3、Hap_4、Hap_8、Hap_10、Hap_12、Hap_17、Hap_18 和 Hap_19)只包含 1 个品种, 占所有品种的 5% (附表 2)。对 19 个单倍型进行表型效应分析发现, Hap_19 的抽穗期、叶片数、穗长、穗码数显著高于其他单倍型, 但是千粒重最低(图 8-A, C, D, F, H); Hap_10 的穗粒重、穗粗、穗重显著高于其他单倍型(图 8-B, E, G); Hap_7 的千粒重最高(图 8-H)。

3 讨论

本研究从延谷 11 克隆的 *SiPRR37* 基因与在水稻和高粱中已报道的 *CO*、*OsPRR37*、*SbPRR37* 等基因一样, 均属于 CCT 基因家族中的 PRR 亚家族^[3,13,16,37]。基于 PRR37 蛋白序列的系统进化分析表明, *OsPRR37*、*SbPRR37* 与谷子 *SiPRR37* 有较近的进化关系, 推测它们可能具有相同或类似的功能, 能对节律性变化的环境条件作出应答反应, 参与植物开花期的调控^[8]。*OsPRR37* 基因通过感受外界光周期和温度的变化而调控抽穗开花, 对水稻的环境适应性有重要影响, 是控制水稻抽穗期、株高和每穗小穗数的主效基因^[5-8]; 而高粱 *SbPRR37* 与籽粒成熟度和茎秆甜度相关^[17]; 小麦 *TaPRR37* 对抽穗期、株高和千粒重有显著影响^[38]。表明 PRR37 是一个多效基因, 同时控制多个农艺性状。本研究通过单倍型效应分析发现, *SiPRR37* 基因与谷子抽穗期、穗码数、穗粒重、千粒重等性状相关, 同样具有多效性, 与其他作物报道的 PRR37 基因研究结果一致^[2,5-6,17,38,40]。但是 *SiPRR37* 的表达模式与 *SbPRR37*、*OsPRR37* 存在差异, 虽然三者的表达都是光依赖性的, 属于光

表 3 *SiPRR37* 基因在 160 份谷子材料中检测到的 SNP 位点Table 3 SNP loci of *SiPRR37* gene detected in 160 millet materials

参数 Parameter	5' 非翻译区 5' UTR	外显子区 Exon region	内含子区 Intron region	3' 非翻译区 3' UTR	全长 Full length
序列长度 Sequence length (bp)	978	2247	10,440	678	14,343
SNP 数目 Number of SNPs	6	10	31	0	47
SNP 频率 SNP frequency (bp SNP ⁻¹)	163	224.7	336.77	0	305.17

图 8 基于 *SiPRR37* 基因 SNP 的单倍型效应分析Fig. 8 Haplotype effects analysis based on SNPs of *SiPRR37* gene

柱上不同大小写字母分别表示在 0.01 和 0.05 水平差异显著。

Bars marked with different uppercase and lowercase letters represent significant difference at the 0.01 and 0.05 probability levels, respectively.

周期途径中调控作物开花的主要基因^[7,13], *SbPRR37* 在长日照下具有早晨和黄昏 2 个表达峰, 在短日照下仅有早晨表达峰, 而 *SiPRR37* 无论高温还是低温、长日照还是短日照, 只在光周期出现 1 个表达峰, 在暗期表达峰消失, 其昼夜节律性表达与拟南芥直

系同源基因 *APRR7* 相似^[37]。产生这种结果的原因可能和取样间隔时间有关, 本研究昼夜取样间隔时间为 3 h, 较疏的取样密度可能会漏掉潜在的表达峰。本研究发现, 温度的提高使 *SiPRR37* 的表达峰无论长日照条件还是短日照条件均发生推迟, 但不影响

短日照条件 *SiPRR37* 的表达峰比长日照提前, 说明光周期对 *SiPRR37* 表达起主要调控作用, 但其同时也受温度的影响, *SiPRR37* 可能参与了谷子光温互作调节过程。我们近期发现光周期和温度对谷子生长发育具有明显的互作效应, 长日照条件温度升高使抽穗期延迟, 而短日照条件温度升高使抽穗期缩短, 高温的作用受到光周期的制约^[39], *SiPRR37* 基因在此互作过程中起到怎样的作用值得深入研究。

PRRs 家族基因还广泛参与逆境胁迫调节过程。有研究表明温度主要影响生物钟基因的可变剪切方式, 低温可以使 PRRs 家族基因形成不同的转录本来影响生物钟功能和增强植物对冷胁迫的耐受性^[22]。在冷胁迫中, *PRR9*、*PRR7*、*PRR5* 作为负调节因子来调节抗冷基因 *CBF* 的表达^[20,23]。有研究发现, 水稻受到冷胁迫刺激后, 会促进 *OsPRR37* 的表达^[41], 但是本研究中 *SiPRR37* 基因在 15 °C 低温胁迫下表达被显著抑制, 这表明 PRRs 家族基因在不同的作物中对低温胁迫的应对方式存在差异。铁也是一种非生物胁迫因子, 土壤中过量的铁会损害作物根系细胞, 降低生长能力, 比缺铁时更影响产量。有研究表明 *PRR7* 具有 fer1、fer3 和 fer4 三种铁蛋白作用靶点, 而铁蛋白在作物中能够储存过量的铁, 因此推测 *PRR7* 参与了铁胁迫调节过程^[18,21]。本研究发现, 铁胁迫处理可诱导 *SiPRR37* 基因的表达, 推测该基因也具有铁蛋白作用靶点, 在作物铁过量应激反应中具有保护作用。PRRs 家族基因也参与植物对干旱胁迫的响应^[42]。在水稻中, 干旱可以抑制 *OsPRR73* 的表达, 诱导 *OsTOC1* 的表达, 对 *OsPRR59*、*OsPRR95* 和 *OsPRR37* 基因的影响较小^[43]; 在大豆中, *OsPRR37* 的直系同源基因 *GmPRR7* 在干旱胁迫下表达减弱, 仅 *GmPRR3* 的表达增高, 在响应干旱胁迫中发挥作用。本研究发现, 干旱胁迫可以诱导 *SiPRR37* 的表达, 说明 *SiPRR37* 基因参与了谷子干旱胁迫的应答反应, 与水稻 *OsPRR37* 不同。ABA 在植物对逆境的适应性反应中起着重要作用, 已有的研究表明, PRRs 家族的 *TOC1* 基因与 ABA 调控基因有部分重叠, *TOC1* 能够结合到 ABA 调控基因启动子上抑制 *ABAR*、*CBF*、*ABI3* 等基因的表达, 这些基因的表达又能促进 *TOC1* 表达, 从而能够形成调节 ABA 信号传导的调节环, 以增加植物抗逆性^[44]。本研究发现, *SiPRR37* 在 ABA 胁迫 1 h 后开始响应表达, 随后多数时间点表达受到抑制, 推测 *SiPRR37* 通过某种作用机制参与了 ABA 介导的信号传导过程。

4 结论

从延谷 11 克隆得到 *SiPRR37* 基因 2953 bp 的 cDNA 序列, 包含 2247 bp 的完整 CDS 区域, 编码 748 个氨基酸; *SiPRR37* 基因含有 REC 和 CCT 2 个结构域, 属于 CCT 基因家族的 PRR 亚家族成员, 与玉米 PRR37、高粱 SbPRR37、糜子 PRR37 蛋白亲缘关系较近; *SiPRR37* 基因表达具有昼夜节律性, 且同时受光周期和温度调控, 可能参与了谷子光温互作调节过程; *SiPRR37* 基因受干旱胁迫和铁胁迫诱导, 受盐胁迫和低温胁迫抑制, 参与了对非生物胁迫的应答; *SiPRR37* 基因和抽穗期及多个穗部性状相关, 具有多效性, 鉴定出 Hap_19、Hap_10、Hap_7 三个用于谷子生育期和穗部性状改良的有利单倍型。

附表和附图 请见网络版: 1) 本刊网站 <http://zwxb.chinacrops.org/>; 2) 中国知网 <http://www.cnki.net/>; 3) 万方数据 <http://c.wanfangdata.com.cn/Periodical-zuowxb.aspx>。

References

- Makino S, Kiba T, Imamura A, Hanaki N, Nakamura A, Suzuki T, Taniguchi M, Ueguchi C, Sugiyama T, Mizuno T. Genes encoding pseudo-response regulators: insight into His-to-Asp phosphorylation and circadian rhythm in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol*, 2000, 41: 791–803.
- 李剑峰, 李婷, 贾小平. PRRs 家族功能基因的研究进展. 植物遗传资源学报, 2019, 20: 1399–1407.
- Li J F, Li T, Jia X P. Advances on unlocking the functional basis of PRRs family genes. *J Plant Genet Resour*, 2019, 20: 1399–1407 (in Chinese with English abstract).
- Farré Eva M, Kay S A. PRR7 protein levels are regulated by light and the circadian clock in *Arabidopsis*. *Plant J*, 2007, 52: 548–560.
- Matsushika A, Makino S, Kojima M, Mizuno T. Circadian waves of expression of the *APRR1/TOC1* family of pseudo-response regulators in *Arabidopsis thaliana*: insight into the plant circadian clock. *Plant Cell Physiol*, 2000, 41: 1002–1012.
- Koo B H, Yoo S C, Park J W, Kwon C T, Lee B D, An G, Zhang Z Y, Li J J, Li Z C, Paek N C. Natural variation in *OsPRR37* regulates heading date and contributes to rice cultivation at a wide range of latitudes. *Mol Plant*, 2013, 6: 1877–1888.
- Nakagawa H, Yamagishi J, Miyamoto N, Motoyama M, Yano M, Nemoto K. Flowering response of rice to photoperiod and temperature: a QTL analysis using a phenological model. *Theor Appl Genet*, 2005, 110: 778–786.
- Liu C, Song G Y, Zhou Y H, Qu X F, Guo Z B, Liu Z W, Jiang D M, Yang D C. *OsPRR37* and *Ghd7* are the major genes for general combining ability of DTH, PH and SPP in rice. *Sci Rep*, 2015, 5: 12803.
- Gao H, Jin M N, Zheng X M, Chen J, Yuan D Y, Xin Y Y, Wang

- M Q, Huang D Y, Zhang Z, Zhou K N, Sheng P K, Ma J, Ma W W, Deng H F, Jiang L, Liu S J, Wang H Y, Wu C Y, Yuan L P, Wan J M. Days to heading 7, a major quantitative locus determining photoperiod sensitivity and regional adaptation in rice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111: 16337–16342.
- [9] Xue W, Xing Y, Weng X, Zhao Y, Tang W, Wang L, Zhou H, Yu S, Xu C, Li X, Zhang Q. Natural variation in *Ghd7* is an important regulator of heading date and yield potential in rice. *Nat Genet*, 2008, 40: 761–767.
- [10] Fujino K, Yamanouchi U, Yano M. Roles of the *Hd5* gene controlling heading date for adaptation to the northern limits of rice cultivation. *Theor Appl Genet*, 2012, 126: 611–618.
- [11] Turner A, Beales J, Faure S, Dunford R P, Laurie D A. The pseudo-response regulator *Ppd-H1* provides adaptation to photoperiod in barley. *Science*, 2005, 310: 1031–1034.
- [12] Beales J, Turner A, Griffiths S, Snape J W, Laurie D A. A pseudo-response regulator is misexpressed in the photoperiod insensitive *Ppd-D1a* mutant of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor Appl Genet*, 2007, 115: 721–733.
- [13] Murphy R L, Klein R R, Morishige D T, Brady J A, Rooney W L, Miller F R, Dugas D V, Klein P E, Mullet J E. Coincident light and clock regulation of *pseudoresponse regulator protein 37* (*PRR37*) controls photoperiodic flowering in sorghum. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108: 16469–16474.
- [14] Shrestha R, Gómez-Ariza J, Brambilla V, Fornara F. Molecular control of seasonal flowering in rice, arabidopsis and temperate cereals. *Ann Bot-London*, 2014, 114: 1445–1458.
- [15] Lister D L, Thaw S, Bower M A, Jones H, Charles M P, Jones G, Smith L M J, Howe C J, Brown T A, Jones M K. Latitudinal variation in a photoperiod response gene in European barley: insight into the dynamics of agricultural spread from ‘historic’ specimens. *J Archaeol Sci*, 2009, 36: 1092–1098.
- [16] Klein R R, Miller F R, Dugas D V, Brown P J, Burrell A M, Klein P E. Allelic variants in the *PRR37* gene and the human-mediated dispersal and diversification of sorghum. *Theor Appl Genet*, 2015, 128: 1669–1683.
- [17] Liu C, Qu X, Zhou Y, Song G, Abiri N, Xiao Y, Liang F, Jiang D, Hu Z, Yang D. *OsPRR37* confers an expanded regulation of the diurnal rhythms of the transcriptome and photoperiodic flowering pathways in rice. *Plant Cell Environ*, 2018, 41: 630–645.
- [18] Liu T, Carlsson J, Takeuchi T, Newton L, Farré E M. Direct regulation of abiotic responses by the *Arabidopsis* circadian clock component *PRR7*. *Plant J*, 2013, 76: 101–114.
- [19] Fukushima A, Kusano M, Nakamichi N, Kobayashi M, Hayashi N, Sakakibara H, Mizuno T, Saito K. Impact of clock associated *Arabidopsis* pseudo-response regulators in metabolic coordination. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106: 7251–7256.
- [20] Nakamichi N, Kusano M, Fukushima A, Kita M, Ito S, Yamashino T, Saito K, Sakakibara H, Mizuno T. Transcript profiling of an *Arabidopsis* pseudo response regulator arrhythmic triple mutant reveals a role for the circadian clock in cold stress response. *Plant Cell Physiol*, 2009, 50: 447–462.
- [21] Briat J F, Ravet K, Arnaud N, Duc C, Boucherez J, Touraine B, Cellier F, Gaymard F. New insights into ferritin synthesis and function highlight a link between iron homeostasis and oxidative stress in plants. *Ann Bot*, 2010, 105: 811–822.
- [22] Grundy J, Stoker C, Carré I A. Circadian regulation of abiotic stress tolerance in plants. *Front Plant Sci*, 2015, 6: 1–15.
- [23] Seo P J, Mas P. STRESSing the role of the plant circadian clock. *Trends Plant Sci*, 2015, 20: 230–237.
- [24] Li H W, Li C H, Pao W K. Cytogenetical and genetical studies of the interspecific cross between the cultivated foxtail millet, *Setaria italica* (L.) Beauv., and the green foxtail millet *S. viridis* L. *J Am Soc Agron*, 1945, 37: 32–54.
- [25] Brutnell T P, Lin W, Swartwood K, Goldschmidt A, Jackson D, Zhu X G, Kellogg E, Van Eck J. *Setaria viridis*: a model for C₄ photosynthesis. *Plant Cell*, 2010, 22: 2537–2544.
- [26] 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.
- [27] 王海岗, 贾冠清, 智慧, 温琪汾, 董俊丽, 陈凌, 王君杰, 曹晓宁, 刘思辰, 王纶, 乔治军, 刁现民. 谷子核心种质表型遗传多样性分析及综合评价. 作物学报, 2016, 42: 19–30.
- Wang H G, Jia G Q, Zhi H, Wen Q F, Dong J L, Chen L, Wang J J, Cao X N, Liu S C, Wang L, Qiao Z J, Diao X M. Phenotypic diversity evaluations of foxtail millet core collections. *Acta Agron Sin*, 2016, 42: 19–30 (in Chinese with English abstract).
- [28] Diao X M, Jia G Q. Origin and domestication of foxtail millet. In: Doust A, Diao X M, eds. Genetics and Genomics of Setaria. Plant Genetics and Genomics: Crops and Models. Cham: Springer Press, 2017. pp 61–72.
- [29] 贾小平, 李剑峰, 全建章, 王永芳, 董志平, 张博, 袁玺垒. 不同光周期条件下谷子农艺性状的光周期敏感性评价. 植物遗传资源学报, 2018, 19: 919–924.
- Jia X P, Li J F, Quan J Z, Wang Y F, Dong Z P, Zhang B, Yuan X L. Evaluation of photoperiod sensitivity of agronomic traits of foxtail millet varieties (*Setaria italica*) under different photoperiod conditions. *J Plant Genet Resour*, 2018, 19: 919–924 (in Chinese with English abstract).
- [30] 贾小平, 袁玺垒, 李剑峰, 张博, 张小梅, 郭秀璞, 陈春燕. 不同光温条件谷子资源主要农艺性状的综合评价. 中国农业科学, 2018, 51: 2429–2441.
- Jia X P, Yuan X L, Li J F, Zhang B, Zhang X M, Guo X P, Chen C Y. Comprehensive evaluation of main agronomic traits of millet resources under different light and temperature conditions. *Sci Agric Sin*, 2018, 51: 2429–2441 (in Chinese with English abstract).
- [31] Margarita M H, Wang X W, Barbier H, Brutnell T P, Devos K M, Doust A N. Genetic control and comparative genomic analysis of flowering time in *Setaria* (Poaceae). *G3: Genes Genom Genet*, 2013, 3: 283–295.
- [32] Ni X M, Xia Q J, Zhang H B, Cheng S, Li H, Fan G Y, Guo T, Huang P, Xiang H T, Chen Q C, Li N, Zou H F, Cai X M, Lei X J, Wang X M, Zhou C S, Zhao Z H, Zhang G Y, Du G H, Cai W, Quan Z W. Updated foxtail millet genome assembly and gene mapping of nine key agronomic traits by resequencing a RIL population. *Gigascience*, 2017, 6: 1–8.
- [33] Doust A N, Mauro-Herrera M, Hodgeand J G, Stromsk J. The C₄ model grass *Setaria* is a short day plant with secondary long day genetic regulation. *Front Plant Sci*, 2017, 8: 1–10.
- [34] 谢丽莉. 谷子光周期敏感相关性状的 QTL 定位与分析. 河南农业大学硕士学位论文, 河南郑州, 2012.

- Xie L L. QTL Mapping and Analysis of the Photoperiod-sensitive Traits in Foxtail Millet. MS Thesis of Henan Agricultural University, Zhengzhou, Henan, China, 2012 (in Chinese with English abstract).
- [35] Jia G Q, Huang X H, Zhi H, Zhao Y, Zhao Q, Li W J, Chai Y, Yang L F, Liu K Y, Lu H Y, Zhu C R, Lu Y Q, Zhou C C, Fan D L, Weng Q J, Guo Y L, Huang T, Zhang L, Lu T T, Feng Q, Hao H F, Liu H K, Lu P, Zhang N, Li Y H, Guo E H, Wang S J, Wang S Y, Liu J R, Zhang W F, Chen G Q, Zhang B J, Li W, Wang Y F, Li H Q, Zhao B H, Li J Y, Diao X M, Han B. A haplotype map of genomic variations and genome-wide association studies of agronomic traits in foxtail millet (*Setaria italica*). *Nat Genet*, 2013, 45: 957–961.
- [36] Zhang K, Fan G Y, Zhang X X, Zhao F, Wei W, Du G H, Feng X L, Wang X M, Wang F, Song G L, Zou H F, Zhang X L, Li S D, Ni X M, Zhang G Y, Zhao Z H. Identification of QTLs for 14 agronomically important traits in *Setaria italica* based on SNPs generated from high-throughput sequencing. *G3: Genes Genom Genet*, 2017, 7: 1587–1594.
- [37] Mizuno T, Nakamichi N. Pseudo-response regulators (PRRs) or true oscillator components (TOCs). *Plant Cell Physiol*, 2005, 46: 677–685.
- [38] Guo Z, Song Y, Zhou R, Ren Z, Jia J. Discovery, evaluation and distribution of haplotypes of the wheat *Ppd-D1* gene. *New Phytol*, 2010, 185: 841–851.
- [39] 贾小平, 袁玺玺, 李剑峰, 王永芳, 张小梅, 张博, 全建章, 董志平. 不同光温条件谷子光温互作模式研究及 *SiCCT* 基因表达分析. *作物学报*, 2020, 46: 1052–1062.
- Jia X P, Yuan X L, Li J F, Wang Y F, Zhang X M, Zhang B, Quan J Z, Dong Z P. Photo-thermal interaction model under different photoperiod-temperature conditions and expression analysis of *SiCCT* gene in foxtail millet (*Setaria italica* L.). *Acta Agron Sin*, 2020, 46: 1052–1062 (in Chinese with English abstract).
- [40] Campoli C, Shtaya M, Davis S J, Korff M V. Expression conservation within the circadian clock of a monocot: natural variation at barley *Ppd-H1* affects circadian expression of flowering time genes, but not clock orthologs. *BMC Plant Biol*, 2012, 12: 97.
- [41] 徐江民, 姜洪真, 林晗, 黄苗苗, 付巧丽, 曾大力, 饶玉春. 水稻 *ESI* 参与生物钟基因表达调控以及逆境胁迫响应. *植物学报*, 2016, 51: 743–756.
- Xu J M, Jiang H Z, Lin H, Huang M M, Fu Q L, Zeng D L, Rao Y C. *Early Senescence 1* participates in the expression regulation of circadian clock genes and response to stress in rice. *Bull Bot*, 2016, 51: 743–756 (in Chinese with English abstract).
- [42] Marcolino-Gomes J, Rodrigues F A, Fuganti-Pagliarini R, Bendix C, Nakayama T J, Celaya B, Molinari H B C, Neves de Oliveira M C, Harmon F G, Nepomuceno A. Diurnal oscillations of soybean circadian clock and drought responsive genes. *PLoS One*, 2014, 9: e86402.
- [43] 李佳, 刘运华, 张余, 陈晨, 余霞, 余舜武. 干旱对水稻生物钟基因和干旱胁迫响应基因每日节律性变化的影响. *遗传*, 2017, 39: 837–846.
- Li J, Liu Y H, Zhang Y, Chen C, Yu X, Yu S W. Drought stress modulates diurnal oscillations of circadian clock and drought-responsive genes in *Oryza sativa* L. *Hereditas*, 2017, 39: 837–846 (in Chinese with English abstract).
- [44] Kurup S, Jones H D, Holdsworth M J. Interactions of the developmental regulator *ABI3* with proteins identified from developing *Arabidopsis* seeds. *Plant J*, 2000, 21: 143–155.