

谷子光敏色素基因光周期、非生物胁迫响应特性及关键自然变异位点鉴定

贾小平, 张博, 何占祥, 李剑峰, 张小梅, 葛迪, 王振山, 桑璐曼, 宋志伟

河南科技大学 农学院, 河南 洛阳 471023

贾小平, 张博, 何占祥, 李剑峰, 张小梅, 葛迪, 王振山, 桑璐曼, 宋志伟. 谷子光敏色素基因光周期、非生物胁迫响应特性及关键自然变异位点鉴定. 生物工程学报, 2022, 38(5): 1929-1945.

JIA XP, ZHANG B, HE ZX, LI JF, ZHANG XM, GE D, WANG ZS, SANG LM, SONG ZW. The responsive characteristics of phytochrome genes to photoperiod, abiotic stresses and identification of their key natural variation sites in foxtail millet (*Setaria italica* L.). Chin J Biotech, 2022, 38(5): 1929-1945.

摘要: 比较分析光敏色素基因家族成员对光周期、非生物胁迫响应模式并鉴定其有利自然变异类型,为全面了解光敏色素基因家族在光周期调控谷子生长发育及应对非生物胁迫中的作用机制、开展关键性状的分子辅助选择奠定基础。文中利用 RT-PCR 技术从超晚熟谷子农家种‘毛粟’中克隆了 3 个光敏色素基因 *SiPHYA*、*SiPHYB* 和 *SiPHYC*; 在进行生物信息学分析后,利用荧光定量 PCR 技术研究了 3 个基因的光周期调控模式及对聚乙二醇 (polyethylene glycol, PEG) 模拟干旱、自然干旱、脱落酸 (abscisic acid, ABA)、高温、NaCl 五种非生物胁迫的响应特性; 最后检测这 3 个基因在 160 份谷子材料的突变位点,通过单倍型分析确定基因的功能效应。结果表明,获得了基因 *SiPHYA*、*SiPHYB* 和 *SiPHYC* 包含完整编码区的 cDNA 序列,长度分别为 3 981、3 953、3 764 bp,其中基因 *SiPHYB* 和 *SiPHYC* 具有较近的进化关系。基因 *SiPHYA*、*SiPHYB* 和 *SiPHYC* 均受光周期调控,但光周期对 *SiPHYB*、*SiPHYC* 昼夜表达模式的影响要强于 *SiPHYA*; 短日照条件临近抽穗 *SiPHYA*、*SiPHYB* 表达水平显著低于长日照,暗示其在谷子长日照抑制抽穗中发挥作用。*SiPHYB* 和 *SiPHYC* 共同响应 PEG 模拟干旱、自然干旱、ABA、高温 4 种胁迫;*SiPHYA* 和 *SiPHYB* 以不同方式响应盐胁迫,*SiPHYC* 没有参与谷子盐胁迫响应过程。基于 160 份谷子材料重测序数据发现基因 *SiPHYB* 高度保守,基因 *SiPHYA* 含有两个错义突变:单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 7 034 522^{C→T}, SNP7 036 657^{G→C},导致延迟抽穗、增加株高。基因 *SiPHYC* 含有一个错义突变 (SNP5 414 823^{G→T}),导致短日照缩短抽穗期,长日照延长抽穗期,对株高、穗长的增加作用不受光温环境影响。光周期对基因 *SiPHYA*、*SiPHYB* 和 *SiPHYC* 具有不同的调控作用,

Received: August 26, 2021; Accepted: December 9, 2021; Published online: January 4, 2022

Supported by: National Natural Science Foundation of China (31471569)

Corresponding author: JIA Xiaoping. E-mail: jiaxiaoping@haust.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金 (31471569)

除了盐胁迫, *SiPHYB* 和 *SiPHYC* 共同响应多种非生物胁迫, 相比参考基因型, *SiPHYA*、*SiPHYC* 突变延迟抽穗、增加株高和穗长。

关键词: 谷子; 光敏色素基因; 非生物胁迫; 表达分析; 单倍型

The responsive characteristics of phytochrome genes to photoperiod, abiotic stresses and identification of their key natural variation sites in foxtail millet (*Setaria italica* L.)

JIA Xiaoping, ZHANG Bo, HE Zhanxiang, LI Jianfeng, ZHANG Xiaomei, GE Di, WANG Zhenshan, SANG Luman, SONG Zhiwei

College of Agriculture, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471023, Henan, China

Abstract: The responsive patterns of phytochrome gene family members to photoperiod and abiotic stresses were comparatively analyzed and the favorable natural variation sites of these genes were identified. This would help understand the mechanism of phytochrome gene family in photoperiod-regulated growth and development and abiotic stress response. In addition, it may facilitate the molecular marker assisted selection of key traits in foxtail millet. In this study, we used RT-PCR to clone three phytochrome genes *SiPHYA*, *SiPHYB* and *SiPHYC* from ultra-late maturity millet landrace variety ‘Maosu’. After primary bioinformatics analysis, we studied the photoperiod control mode and the characteristics of these genes in responding to five abiotic stresses including polyethylene glycol (PEG)-simulated drought, natural drought, abscisic acid (ABA), high temperature and NaCl by fluorescence quantitative PCR. Finally, we detected the mutation sites of the three genes among 160 foxtail millet materials and performed haplotype analysis to determine the genes’ functional effect. We found that the cloned cDNA sequences of gene *SiPHYA*, *SiPHYB* and *SiPHYC* were 3 981, 3 953 and 3 764 bp respectively, which contained complete coding regions. Gene *SiPHYB* and *SiPHYC* showed closer evolutionary relationship. Photoperiod regulated all of the three genes, but showed more profound effects on diurnal expression pattern of *SiPHYB*, *SiPHYC* than that of *SiPHYA*. Under short-day, when near heading, the expression levels of *SiPHYA* and *SiPHYB* were significantly lower than that under long-day, indicating their roles in suppressing heading of foxtail millet under long-day. *SiPHYB* and *SiPHYC* were responsive to PEG-simulated drought, natural drought, ABA and high temperature stresses together. *SiPHYA* and *SiPHYB* responded differently to salt stress, whereas *SiPHYC* did not respond to salt stress. Re-sequencing of 160 foxtail millet materials revealed that *SiPHYB* was highly conservative. Two missense mutations of *SiPHYA*, such as single nucleotide polymorphism (SNP) 7 034 522^{C→T} and SNP7 036 657^{G→C}, led to delaying heading and increasing plant height. One missense mutation of *SiPHYC*, such as SNP5 414 823^{G→T}, led to shortening heading under short-day and delaying heading under long-day, as well as increasing plant height and panicle length regardless of photo-thermal conditions. Photoperiod showed different regulatory effects on *SiPHYA*, *SiPHYB* and *SiPHYC*. *SiPHYB*

and *SiPHYC* jointly responded to various abiotic stresses except for the salt stress. Compared with the reference genotype, mutation genotypes of *SiPHYA* and *SiPHYC* delayed heading and increased plant height and panicle length.

Keywords: foxtail millet; phytochrome genes; abiotic stress; expression analysis; haplotype

光敏色素是植物重要的光受体，主要感知红光/远红光。一般光敏色素蛋白由 2 个单体以二聚体的形式发挥功能，每个单体包含 N 端光感受结构域和 C 端光调节结构域^[1]。光敏色素在植物中有 2 种存在形式：红光吸收型 (Pr) 和远红光吸收型 (Pfr)。Pr 型吸收红光后转变为 Pfr 型，相反 Pfr 型吸收远红光后会回复到 Pr 型，其中 Pfr 型具有生物活性^[2]。光敏色素能够调节种子的休眠与萌发、光形态建成、避阴反应和开花期等多种植物生长发育过程以及参与植物对逆境胁迫的抵御过程，具有重要研究价值。

有关光敏色素的研究在模式植物拟南芥 (*Arabidopsis thaliana* L.) 和水稻 (*Oryza sativa* L.) 中较为深入。*A. thaliana* 中共发现 5 种光敏色素基因 (*PHYA-E*)，其中除了 *PHYA* 在光下不稳定，其余 4 种光敏色素蛋白均属于光稳定型^[3]。*A. thaliana* 5 种光敏色素基因功能上既有各自独特性又存在一定冗余，其中 *PHYA*、*PHYB*、*PHYC* 起主要作用。如 *PHYB* 可以通过调节光敏色素互作因子 1 (phytochrome-interacting factor 1, PIF1) 的活性来抑制或激活赤霉素 (gibberellins, GAs) 合成代谢及信号传导途径，从而促进种子的休眠或萌发；*PHYB* 和 *PHYA* 分别在胚乳和胚中以时空特异性的方式协调控制 *A. thaliana* 种子的萌发^[4]。在花期调控方面 *PHYB* 抑制开花，*PHYA*、*PHYC* 长日照条件下共同促进开花，短日照条件下 *PHYC* 抑制开花^[5]。除了 *PHYC*，*A. thaliana* 其余 4 种

光敏色素基因均参与避阴反应^[5]。*PHYB* 在双子叶植物应对非生物胁迫方面也发挥着重要作用，当环境温度较高时，*A. thaliana* 下胚轴和叶柄比正常植株变得更加纤细，花期也会提前，这种现象可能是通过 *PHYB* 与光敏色素互作因子 4 (phytochrome-interacting factor 4, PIF4) 的结合使细胞内 PIF4 的含量下降，从而进一步影响了生长素的合成和含量，最终导致植株的生长状态和对环境高温的抗性发生改变^[6-7]。在水分胁迫条件下过表达 *PHYB* 的转基因棉花 (*Gossypium* spp. L.) 植株相比于野生型在单株结铃数、籽棉产量以及单铃质量上都有增加^[8]。此外，*PHYB* 可以抑制光敏色素抑制子 (suppressor of phyA-105, SPA1)-组成型光形态建成蛋白 1 (Constitutive photomorphogenic protein1, COP1)-PIF1 激酶调控复合体，激活抗盐基因 (salt tolerance, STO) 的转录，从而参与了 *A. thaliana* 对盐胁迫抗性的调节过程^[9]。

O. sativa 光敏色素基因只有 *PHYA*、*PHYB*、*PHYC* 三种，且只感受红光/远红光，其中 *PHYB* 在光周期调控开花途径中发挥重要作用，长日照条件下 *PHYB* 通过抑制早穗基因 (early heading date 1, *Ehd1*)、成花素基因 (heading date 3a, *Hd3a*) 的表达，或者通过调节抽穗基因 (heading date 1, *Hd1*) 抑制 *Hd3a* 的表达实现对 *O. sativa* 开花的抑制^[10-12]。C4 作物玉米 (*Zea mays* L.)、高粱 (*Sorghum bicolor* L.) *PHYB* 同样在长日照条件下抑制开花，而珍珠粟 (*Pennisetum glaucum* L.) 决定开花时间的基因位于 *PHYC*

区^[13-15]。因此,不同植物中光敏色素家族各成员在光周期调控开花过程中扮演的角色也不尽相同。*PHYB*在*O. sativa*非生物胁迫中也发挥着重要作用,*PHYB*缺失的*O. sativa*突变体抗氧化系统明显增强,开花期提前,相比野生型植株抗旱能力有所提升;促进*O. sativa*高亲和力钾离子转运蛋白基因 (high-affinity K^+ transporters, *OsHKTs*) 的表达,降低细胞内 Na^+ 的含量,增强抗盐性;在低温环境下降低电渗漏、提高幼苗存活率^[16-19]。

目前对光敏色素基因的研究虽然取得了一定进展,但是对家族各成员功能上的异同仍缺乏较全面的了解,特别是在禾本科作物中,缺少对 *PHYA*、*PHYB*、*PHYC* 三个成员在光周期调控途径及非生物胁迫过程中作用特点系统性的比较分析。此外,目前的研究多以单一品种为对象揭示光敏色素基因的作用机制,缺少基因在自然群体中突变类型的分析,获得的有利突变基因型有限,限制了将光敏色素基因用于分子辅助育种的潜力。谷子 (*Setaria italica* L.) 作为我国传统的杂粮作物,具有严格自花授粉、基因组小 (约 510 Mb)、生命周期短以及抗旱、耐贫瘠、高光合效率等优点,同时拥有丰富的光温敏感型自然变异材料,是探索禾本科 C4 类作物基因组进化、抗逆性以及光周期敏感性形成生理遗传机制的理想模型^[20-22]。本研究利用同源克隆技术从光周期敏感型超晚熟 *S. italica* 农家种‘毛粟’克隆 *SiPHYA*、*SiPHYB* 和 *SiPHYC* 三个光敏色素家族基因,并且用荧光定量 PCR 技术系统比较分析了这 3 个基因在不同光周期条件下以及不同非生物胁迫条件下的表达规律;结合前期于海南省乐东黎族自治县、河南省洛阳市、吉林省吉林市、公主岭市调查 160 份 *S. italica* 材料 10 个农艺性状数据,利用重测序检测 *SiPHYA*、*SiPHYB* 和 *SiPHYC* 在

160 份 *S. italica* 材料中自然变异位点,比较它们进化过程中的保守性,发掘与主要性状紧密关联的关键突变位点,初步揭示了 *SiPHYA*、*SiPHYB* 和 *SiPHYC* 光周期调控模式、非生物胁迫响应特性的差异以及对主要农艺性状的功能效应。

1 材料与方法

1.1 试验材料及种植方式

本试验用于光敏色素基因克隆及表达分析的 *S. italica* 品种为‘毛粟’,属于对光温极度敏感的超晚熟农家品种。用于重测序及基因突变位点检测的 160 份 *S. italica* 资源于 2015 年、2016 年连续 2 年种植在海南省乐东黎族自治县、河南省洛阳市、吉林省公主岭市、吉林市 3 个不同光温环境 (4 个试验点),每个品种从萌发到 50%植株抽穗的天数记为抽穗期 (HS),成熟期取行中部 10 株测量株高 (PH)、叶片数 (LN)、穗长 (PL)、穗粗 (PD)、穗码数 (PBN)、码粒数 (GNB)、穗重 (PW)、穗粒重 (GW) 和千粒重 (1 000-GW),求出每个性状的均值作为最终测量值,用于基因单倍型效应分析。同时于三叶期采集幼嫩叶片提取每份 *S. italica* 资源基因组 DNA,送上海美吉生物医药科技有限公司进行重测序及 SNP 位点的开发。

选取‘毛粟’单穗饱满种子均匀播种于装有营养土的 10 cm×10 cm 塑料方盆中,种植 4 盆,置于 25 °C、14 h 光照/10 h 黑暗光周期条件的人工气候室萌发,待幼苗长出两片叶时定苗,每盆 4 株,并转入短日照 (8 h 光照/16 h 黑暗) 光照培养箱生长 14 d,剪取幼苗顶端第一、二片叶保存在液氮中,用于光敏色素基因克隆。

将‘毛粟’单穗饱满种子均匀地撒播于装有营养土的 10 cm×10 cm 的小塑料盆中,共计 40 盆,每盆 4 株,然后放入智能人工气候箱中在

25 °C、12 h 光照/12 h 黑暗条件下培养, 幼苗长至 2 叶期时 20 盆进行长日照 (15 h 光照/9 h 黑暗) 处理, 20 盆进行短日照 (9 h 光照/15 h 黑暗) 处理, 其中长日照处理光照时间为 6:00–21:00, 短日照处理光照时间为 6:00–15:00。每个处理设 2 次生物学重复, 每个重复为 10 盆。植株长至三叶期开始采样, 取样至九叶期, 采样时间为早上光照开始 3 h 之后, 每个叶期重复取样 3 次, 采集植株顶端的第一、第二片叶, 用于长、短日照条件不同叶龄基因表达分析; 此外植株生长至五叶期时, 从光照开始进行第一次取样, 此后每隔 3 h 取一次样, 连续取样 48 h, 采集植株顶端的第一、第二片叶, 用于长、短日照条件光敏色素基因昼夜表达分析。

此外 25 °C、14 h 光照/10 h 黑暗光周期条件下种植的 70 盆谷苗生长至四叶期时分别进行 ABA (100 μmol/L)、高温 (42 °C)、PEG (20%) 模拟干旱、NaCl (250 mmol/L) 和自然干旱胁迫处理, 其中 PEG 和 NaCl 胁迫实验采用水培法, 所用培养液为 1/2 Hoagland 培养液, 对照为 25 °C 在 1/2 Hoagland 培养液中正常生长的幼苗; 自然干旱、ABA 胁迫以及高温胁迫处理实验材料均采用土培法, ABA 采用叶面喷施处理, 高温处理将谷苗转入 42 °C 培养箱进行, 对照为 25 °C 营养土中正常生长的谷苗。前 4 种胁迫处理均在处理后的 0.5、1、2、4、6、8、10、12 h 取顶部两片叶, 自然干旱在四叶期停止浇水, 停水后的第 1、3、5、7 天分别取植株顶部两片叶, 所取样品用于光敏色素基因在不同胁迫条件下的表达分析。上述所有胁迫处理每处理 10 盆, 对照 10 盆。

1.2 *SiPHYA*、*SiPHYB* 和 *SiPHYC* 基因的克隆及生物信息学分析

通过检索 phytozome (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>) 网站的 *S. italica* 基因组

数据库, 获得 *SiPHYA* (登录号: Seita.9G113600)、*SiPHYB* (登录号: Seita.9G427800)、*SiPHYC* (登录号: Seita.9G089700) 基因序列信息。以 3 个基因的转录序列为模板, 使用 DNAMAN 7.0 设计基因特异引物 (表 1)。用康为世纪的 Ultrapure RNA Kit 提取叶片总 RNA, 用 TaKaRa 公司的 PrimeScript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit 反转录合成第一链 cDNA (以表 1 中 QT 引物代替反转录试剂盒中引物)。以所获 cDNA 为模板, 采用分段克隆法获得含有完整编码区的基因序列, 具体为 M 系列引物扩增目的基因中间序列, PCR 反应程序为: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 58 °C 40 s, 72 °C 80 s, 共 34 个循环; 72 °C 5 min。S 系列引物对目的基因两端序列进行扩增, 采用 Touch Down PCR 技术, 94 °C 5 min; 94 °C 40 s, 65–56 °C 40 s, 72 °C 1 min, 共 34 个循环 (65 °C 4 个循环, 62 °C 8 个循环, 59 °C 18 个循环, 最后 56 °C 4 个循环); 72 °C 5 min, 4 °C 保存。将扩增产物纯化后连接到艾德莱生物公司的 pTOPO-TA 载体, 再转化大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 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, 将所得序列进行拼接获得完整基因 cDNA 序列。

用在线分析软件 Scan Prosite (<https://prosite.expasy.org/scanprosite/>)、Cell-PLoc (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/plant/>) 分别预测蛋白质的保守结构域和亚细胞定位; 利用 NCBI BLASTp 程序 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 同源搜索获得 *Z. mays*、*S. bicolor*、*O. sativa*、*A. thaliana* 的光敏色素基因蛋白序列, 使用 MEGA 7.0 软件构建系统进化树。

1.3 不同光周期及非生物胁迫条件下 *SiPHYA*、*SiPHYB* 和 *SiPHYC* 基因表达分析

按照 1.2 步骤提取各处理的‘毛粟’叶片总

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

Name	Sequence (5'→3')
Reverse transcription primers	
QT	CCAGTGAGCAGAGTGACGAGGACTCGAGCTCAAGCT ₍₁₇₎
Q0	CCAGTGAGCAGAGTGACG
Q1	GAGGACTCGAGCTCAAGC
M primers	
M-PHYA	F-GGCAACTGGTTGTCTGG; R-TTCCTTATTCTCCTCCTCA
M-PHYB	F-CTCGCTGCTCAACCCGCTAT; R-TCGCCAGGACAGGCAAACC
M-PHYC	F-CGAGGTTCTGTTCCCTTTCC; R-GCTGTTACAGTTCTGGGTGC
S primers	
S-A-5	F-CCCCTATATTATGCGTACTTGC; R-AGCAAGCTTGTAAGACTGCAAAG
S-PHYA	F-TGTACGGCGATGGTATTCGG; R-TGATCTGGCAGCAATGTGGT
S-PHYB	F-ATGGCGTCGGGCAGCCGC; R-AATCATTTCGACCCGGTTCT
S-PHYC	F-ATTTGCTCCTGTTCCCTTCG; R-GATGTGCCTCTCCTTTGCCT
S-Z-PHYB-3'	CCAGCGAAAATGGCTGGGT
S-Z-PHYC-3'	TGTGGCCAGCCCAGAGCTTC
Fluorescence quantitative PCR primers	
q-PHYA	F-AACAGTGCATTAGCCGGTGA; R-TCCGGTGACAACACCATCTG
q-PHYB	F-GAAGTTGTTGCTGAGTGCCG; R-AATCATTTCGACCCGGTTCT
q-PHYC	F-TTCGTTTCCTTTCCCGCTA; R-ATGTGCCTCTCCTTTGCCT
q-SiActin	F-GGCAAACAGGGAGAAGATGA; R-GAGGTTGTCGGTAAGGTCACG

RNA 及合成第一链 cDNA, 以 cDNA 为模板, 使用表 1 中 q 系列引物扩增目标基因片段, actin 引物扩增内参基因 *Actin* 特异片段^[23]。定量 PCR 采用 TaKaRa 的 TB GreenTM Premix Ex TaqTM II 试剂盒。按照试剂盒中的使用说明, 采用两步法 PCR 程序, 扩增程序为: 95 °C 30 s; 95 °C 30 s, 60 °C 30 s, 共 40 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 的方法计算相对表达量。实验设置 3 次独立重复, 用 Excel 2016 计算标准差并作图。

1.4 *SiPHYA*、*SiPHYB* 和 *SiPHYC* 基因保守性及功能分析

根据基因 *SiPHYA*、*SiPHYB* 和 *SiPHYC* 在 *S. italica* 基因组中的位置信息, 从 160 份 *S. italica* 材料重测序获得的 SNP 数据中提取基因内 SNP, 分析每个基因内含子、外显子等区域 SNP 分布情况, 比较 3 个基因的保守性; 挑选每个

基因中导致可变剪切、错义突变、翻译提前终止的关键 SNP 位点, 去除其中存在杂合位点的 SNP, 利用 dnasp 5 软件进行单倍型分析, 统计每个单倍型包含的品种数, 计算各性状的均值, 用 Excel 2016 绘制柱形图, 用 SPSS 19.0 软件进行单倍型间各性状差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 ‘毛粟’ *SiPHYA*、*SiPHYB* 和 *SiPHYC* 基因的克隆及生物信息学分析

利用所设计的基因特异引物采用分段扩增法均获得了 3 个基因预期大小片段, 将每个基因的扩增片段经测序后进行拼接, 获得包含 *SiPHYA*、*SiPHYB*、*SiPHYC* 完整编码区的 cDNA 序列, 长度分别为 3 981 bp、3 953 bp 和 3 764 bp, 其中编码区长度分别为 3 396 bp、3 507 bp 以及

3 408 bp (GeneBank 登录号分别为: OL743527、OL743528 和 OL743529)。结构域预测表明, SiPHYA、SiPHYB 和 SiPHYC 均含有 GAF、PAS、HisKA、HATPase_C 结构域, 除以上结构域外, SiPHYA 和 SiPHYC 还有一个 PAC 结构域, 它被认为有助于 PAS 结构域折叠 (图 1)。亚细胞定位预测发现 SiPHYA、SiPHYB 和 SiPHYC 均定位于细胞核中 (表 2)。

利用同源搜索获得的 *A. thaliana* 的 AtPHYA (XP_020870255.1)、AtPHYB (P14713.1) 和 AtPHYC (P14714.1) 蛋白序列, *O. sativa* 的 OsPHYA (A2XLG5.2)、OsPHYB (A2XFW2.2) 和 OsPHYC (Q10CQ8.1) 蛋白序列, *Z. mays* 的 ZmPHYA (GRMZM2G157727)、ZmPHYB (GRMZM2G092174)

和 ZmPHYC (GRMZM2G057935) 蛋白序列, *S. bicolor* 的 SbPHYA (P93526.1)、SbPHYB (P93527.2) 和 SbPHYC (P93528.1) 蛋白序列, 和本研究获得的 *S. italica* SiPHYA、SiPHYB 和 SiPHYC 蛋白序列构建分子系统发育树, 结果表明, 所有 5 个物种的 PHYA 单独位于一个进化分支, 而 PHYB 和 PHYC 共同位于另一个进化分支, 进一步说明 PHYB 和 PHYC 进化关系较近, 它们与 PHYA 进化关系较远 (图 2)。

2.2 不同光周期条件下 *S. italica* 基因 *SiPHYA*、*SiPHYB* 和 *SiPHYC* 昼夜表达分析

首先 *SiPHYA*、*SiPHYB*、*SiPHYC* 具有相似的表达特点, 具体表现在 3 个基因除了凌晨 3:00 长日照条件下表达量高于短日照外, 其余时间

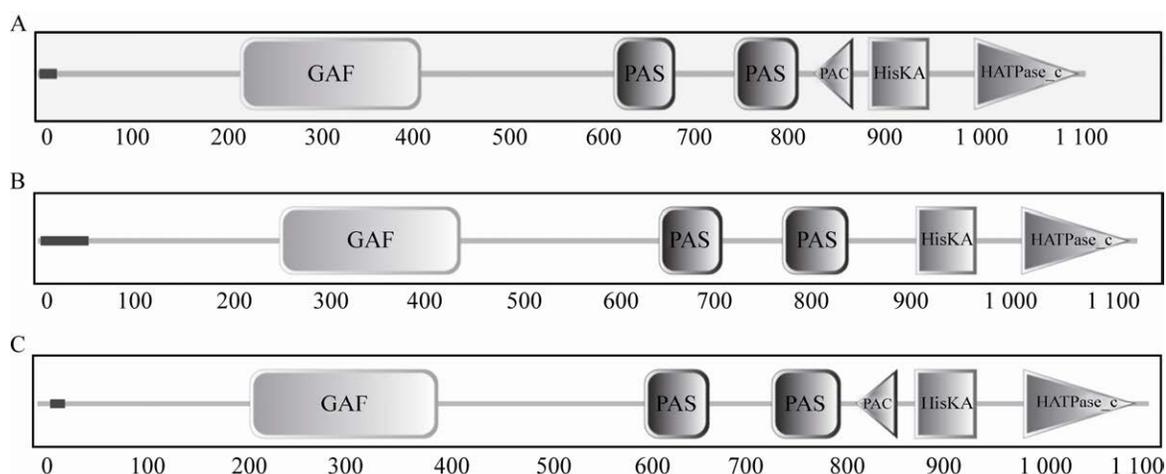


图 1 *SiPHYA*、*SiPHYB* 和 *SiPHYC* 蛋白结构域预测

Figure 1 Functional domain prediction of *SiPHYA*, *SiPHYB* and *SiPHYC* proteins. (A) *SiPHYA*. (B) *SiPHYB*. (C) *SiPHYC*.

表 2 *SiPHYA*、*SiPHYB* 和 *SiPHYC* 蛋白的亚细胞定位预测

Table 2 Subcellular localization prediction of *SiPHYA*, *SiPHYB* and *SiPHYC* proteins

Protein name	Prediction result
<i>SiPHYA</i>	Nucleus
<i>SiPHYB</i>	Nucleus
<i>SiPHYC</i>	Nucleus

点短日照条件下表达量均高于长日照, 表现出一定光周期依赖性。在短日照条件下 3 个基因均在早晨 6:00 光照开始时出现 1 个小的表达峰, 随后到中午 12:00 的 6 h 光照期表达量均有所降低, 但在下午 15:00 光照结束时 *SiPHYA* 仍维持较低表达量, 而 *SiPHYB*、*SiPHYC* 表达量开始上升, 随后的黑暗期 3 个基因表达量除了

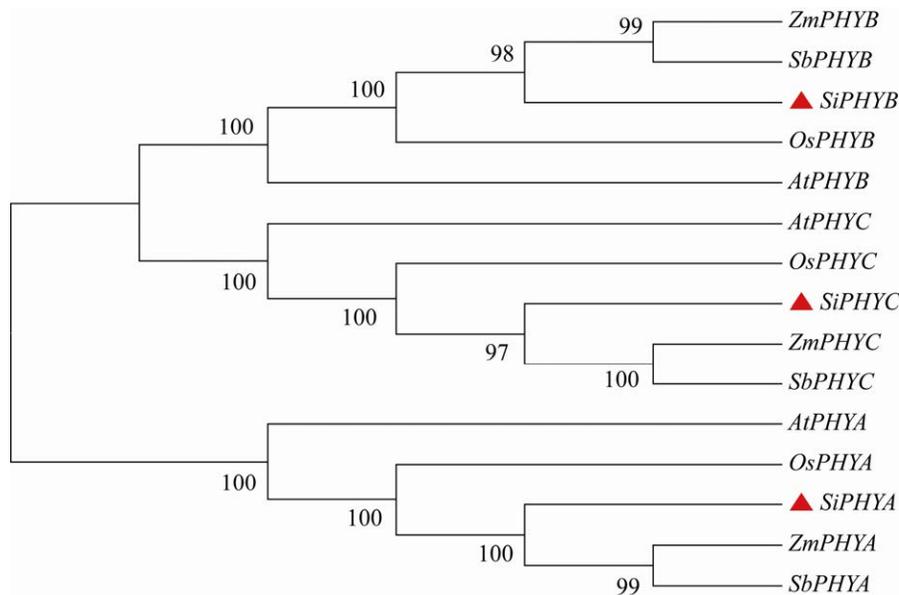


图 2 基于 PHYA、PHYB 和 PHYC 氨基酸序列构建的系统发育树

Figure 2 Phylogenetic tree based on PHYA, PHYB, and PHYC protein sequences.

凌晨 3:00 较低外, 其余时间点均有较高表达水平, 且 *SiPHYA*、*SiPHYB* 在黑暗 6 h (21:00) 出现第二个强表达峰, 而 *SiPHYC* 第二个强表达峰在黑暗 3 h (18:00) 出现。长日照条件早晨 6:00 光照开始时 3 个基因均有一定表达量, 但 *SiPHYA* 除了在光照结束时 (21:00) 出现 1 个表达峰, 在凌晨 3:00 还有 1 个表达峰, 而 *SiPHYB*、*SiPHYC* 在光照后期 (15:00 至 21:00) 表达量明显提高, 表达峰均比 *SiPHYA* 提前。综合以上分析可以发现, 光周期不仅影响 *SiPHYA*、*SiPHYB*、*SiPHYC* 的表达量, 还影响表达峰出现的时间和数目, *SiPHYA* 在长、短日照条件下表达模式比较接近, 除了长日照第一个表达峰 (凌晨 3:00) 相比短日照 (早晨 6:00) 提前 3 h 出现; *SiPHYB*、*SiPHYC* 长、短日照条件下表达模式差异较大, *SiPHYB* 长日照条件下 2 个表达峰均比短日照提前, *SiPHYC* 由短日照条件下 2 个表达峰变为长日照条件下 1 个表达峰, 说明光周期对 *SiPHYB*、*SiPHYC* 昼夜表达影响要强于 *SiPHYA* (图 3)。

2.3 不同光周期条件下 *S. italica* 基因 *SiPHYA*、*SiPHYB* 和 *SiPHYC* 不同发育时期表达分析

无论长日照还是短日照条件, ‘毛粟’从三叶期到九叶期均未抽穗, 短日照在十叶期抽穗, 长日照培养 4 个月一直未抽穗。*SiPHYA*、*SiPHYB*、*SiPHYC* 在三叶至七叶期均表现出短日照表达量高于长日照的特点, 而短日照条件下八叶期、九叶期临近抽穗, *SiPHYA* 表达量明显下降, 且长日照表达量明显高于短日照, *SiPHYB* 九叶期长日照表达量也显著高于短日照, 只有 *SiPHYC* 短日照表达量仍高于长日照 (图 4), 此时长日照 *S. italica* 仍处在营养生长期, 暗示长日照条件下 *SiPHYA*、*SiPHYB* 高表达对抽穗起到了抑制作用, 而 *SiPHYC* 可能与长日照 *S. italica* 抽穗延迟关系不大。

2.4 *S. italica* 基因 *SiPHYA*、*SiPHYB* 和 *SiPHYC* 在非生物胁迫条件下表达分析

在对谷苗 PEG 胁迫处理的 12 h 内, 基因

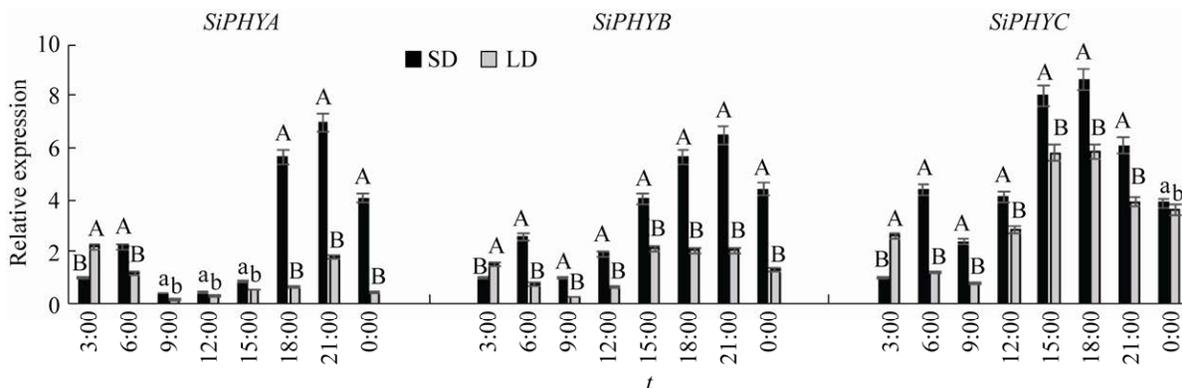


图 3 不同光周期条件下 *S. italica* 光敏色素基因的昼夜表达规律

Figure 3 The circadian expression of phytochrome genes of millet under different photoperiod treatments. SD: short-day; LD: long-day. Values followed by different uppercase letters and lowercase letters above the bar represent significant difference at the 0.01 and 0.05 probability level, respectively.

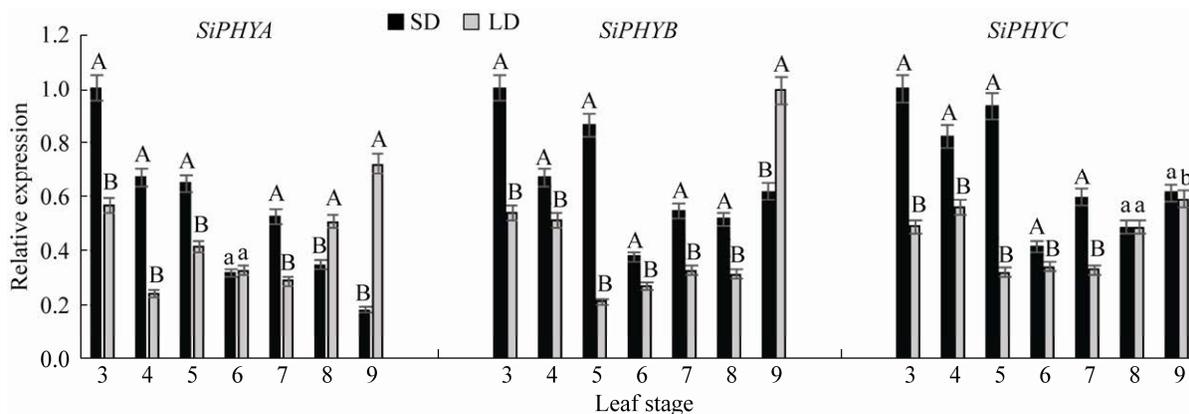


图 4 不同光周期条件下 *S. italica* 光敏色素基因在不同叶期表达规律

Figure 4 Expression pattern of phytochrome genes at different leaf stages of millet under different photoperiod conditions. SD: short-day; LD: long-day. Values followed by different uppercase letters and lowercase letters above the bar represent significant difference at the 0.01 and 0.05 probability level, respectively, the same as follows.

SiPHYA、*SiPHYB*、*SiPHYC* 整体表现出表达受抑制现象,特别是 *SiPHYB* 和 *SiPHYC* 表达模式比较接近,表现出早期胁迫表达受抑制明显、胁迫中期抑制减弱、胁迫后期抑制最强的特点,而 *SiPHYA* 则表现出胁迫早期表达几乎不受影响、胁迫 8 h 表达被强烈诱导、8 h 之后表达明显抑制的特点(图 5)。本研究表 明, *SiPHYA* 对 PEG 胁迫响应较慢, *SiPHYB*、*SiPHYC* 则响应迅速,不同于 *SiPHYB*、*SiPHYC*

整个胁迫过程表达均受到抑制的情况, *SiPHYA* 在胁迫 8 h 表达水平显著提高,这可能反映了 *SiPHYA* 具有不同的 PEG 胁迫应答机制。

自然干旱处理谷苗 7 d, *SiPHYB* 和 *SiPHYC* 均在处理 1 d 表达就受到抑制,随后 3-5 d 表达均受到较弱的抑制作用,处理第 7 天表达受到强烈抑制; *SiPHYA* 在处理 1-5 d 表达不受影响,在处理第 7 天时,表达同样受到强烈抑制

(图 6)。总体来说 *SiPHYA* 比 *SiPHYB*、*SiPHYC* 较晚响应自然干旱胁迫。

对谷苗盐胁迫处理 12 h, *SiPHYA*、*SiPHYB*、*SiPHYC* 均在胁迫处理最初 (0.5 h) 诱导表达, 随着时间的延长 *SiPHYA* 几乎都处于诱导状态, 且从胁迫 4 h 开始表达量明显提高, 而 *SiPHYB* 在胁迫处理 4 h 内被诱导表达, 4 h 后表达均处于抑制状态, *SiPHYC* 则随着胁迫时间的延长表

达没有明显的规律性, 各时期胁迫与对照的表达量基本接近 (图 7)。研究结果表明, *SiPHYA* 和 *SiPHYB* 以不同的机制响应盐胁迫, 而 *SiPHYC* 在盐胁迫过程中可能没有发挥作用。

S. italica 幼苗经 ABA 喷施处理 12 h, *SiPHYB* 和 *SiPHYC* 具有相似的表达模式, 即除了在处理 8 h 诱导表达外, 其余时间点均表现为表达受抑制或者不受胁迫影响, 而 *SiPHYA*

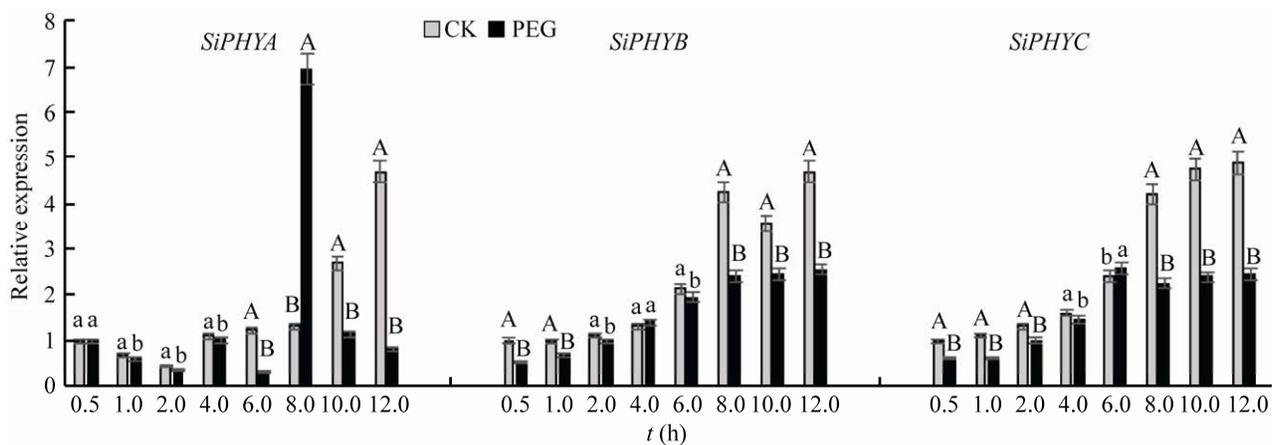


图 5 PEG 胁迫条件下 3 个光敏色素基因的表达规律

Figure 5 Expression rules of three phytochrome genes under PEG stress. Values followed by different uppercase letters and lowercase letters above the bar represent significant difference at the 0.01 and 0.05 probability level, respectively, the same as follows.

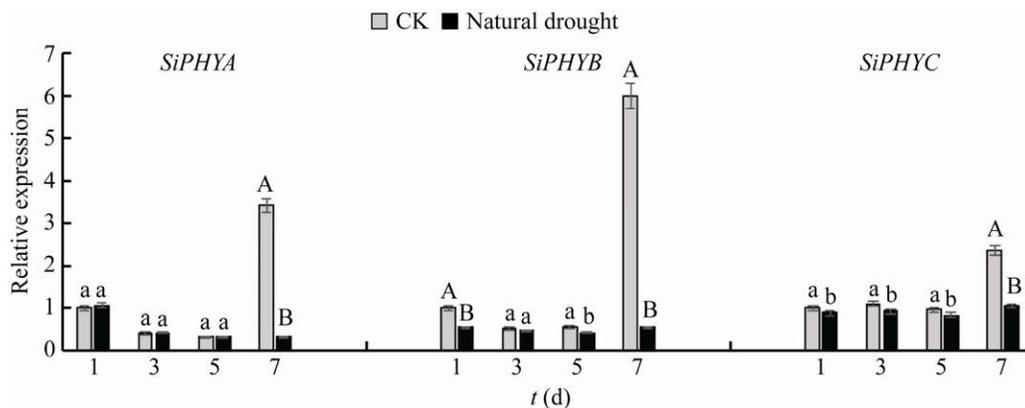


图 6 自然干旱条件下 3 个光敏色素基因的表达规律

Figure 6 Expression patterns of three phytochrome genes under natural drought stress. Values followed by different uppercase letters and lowercase letters above the bar represent significant difference at the 0.01 and 0.05 probability level, respectively, the same as follows.

在处理 1 h、8 h 两个时间点均表现强诱导表达, 处理 2 h 仍为诱导表达, 但较弱, 其余时间点均表现为抑制表达 (图 8), 说明 *SiPHYB*、*SiPHYC* 和 *SiPHYA* 具有不同的 ABA 响应模式。

对谷苗 42°C 高温胁迫处理 12 h, *SiPHYB*、*SiPHYC* 具有相似的应答模式, 两者均在处理 4 h、8 h 强诱导表达, 其余时间点表达受到抑制或者不受影响; *SiPHYA* 则只在胁迫处理 8 h 时强诱导表达, 其余时间点表达几乎都受到抑

制 (图 9), 推测 *SiPHYA* 应对高温胁迫作用机制与 *SiPHYB* 和 *SiPHYC* 存在差异。

2.5 *S. italica* 基因 *SiPHYA*、*SiPHYB* 和 *SiPHYC* 关键功能位点鉴定

通过对 160 份 *S. italica* 材料重测序检测 *SiPHYA*、*SiPHYB* 和 *SiPHYC* 突变位点, 发现 *SiPHYA* 检测到的 SNP 位点最多, 达到 163 个, 这些 SNP 变异类型最丰富, 包括无义突变 (62)、错义突变 (59)、翻译提前终止 (3) 和非

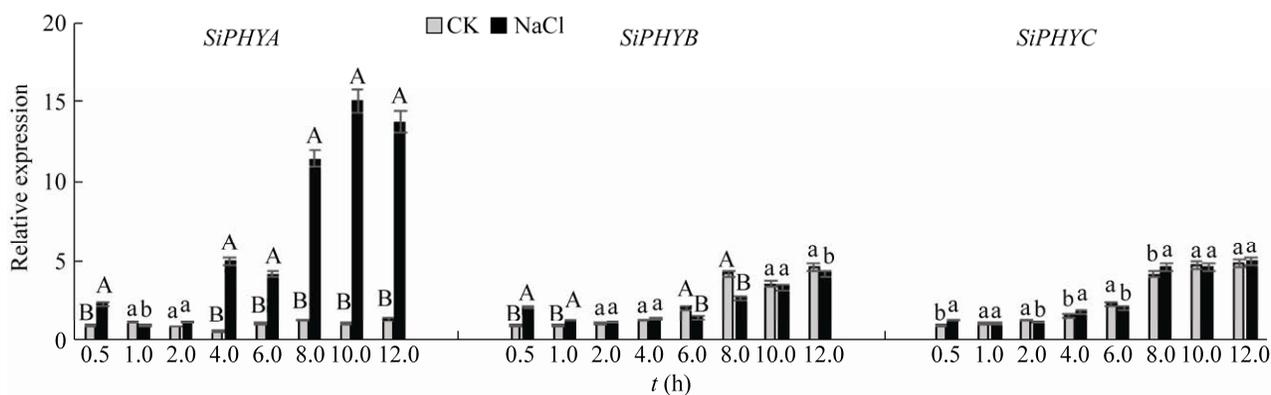


图 7 盐胁迫条件下 3 个光敏色素基因的表达规律

Figure 7 Expression patterns of three phytochrome genes under salt stress. Values followed by different uppercase letters and lowercase letters above the bar represent significant difference at the 0.01 and 0.05 probability level, respectively, the same as follows.

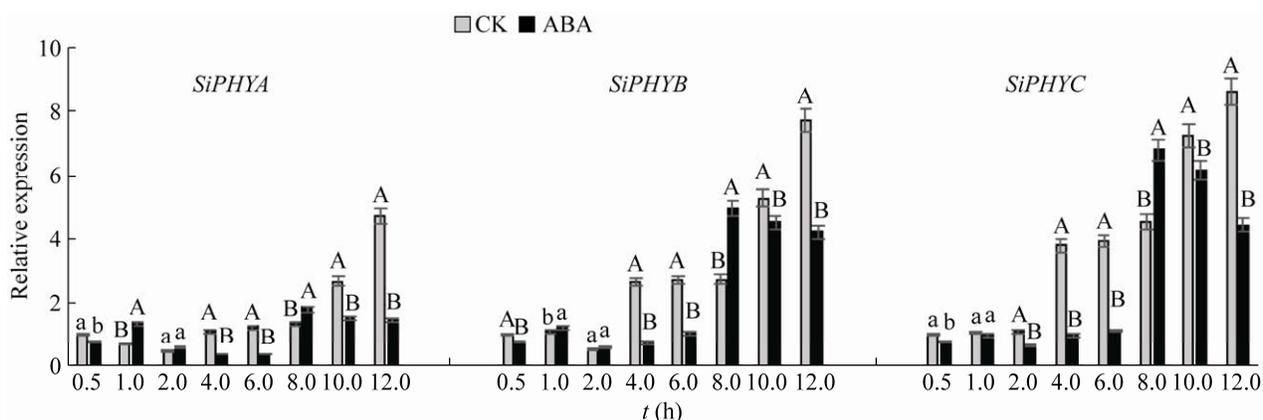


图 8 ABA 胁迫条件下 3 个光敏色素基因的表达规律

Figure 8 Expression patterns of three phytochrome genes under ABA stress. Values followed by different uppercase letters and lowercase letters above the bar represent significant difference at the 0.01 and 0.05 probability level, respectively, the same as follows.

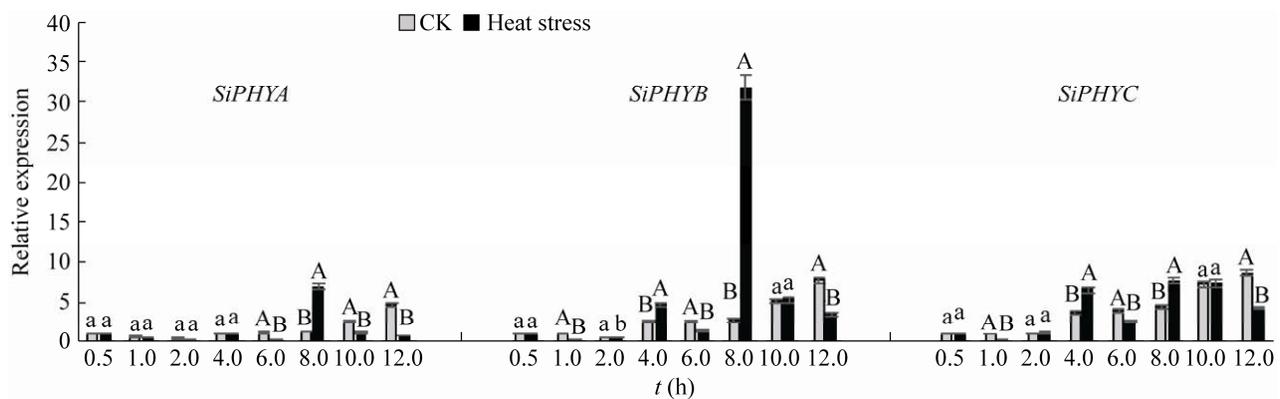


图9 高温胁迫条件下3个光敏色素基因的表达规律

Figure 9 Expression patterns of three phytochrome genes under high-temperature stress. Values followed by different uppercase letters and lowercase letters above the bar represent significant difference at the 0.01 and 0.05 probability level, respectively, the same as follows.

翻译区突变 (7), 其次是 *SiPHYB*, 共检测到 12 个 SNP, 包括内含子突变 (6)、无义突变 (3) 和错义突变 (3) 3 种类型, *SiPHYC* 突变位点最少, 仅检测到 4 个 SNP, 包括内含子突变 (1)、错义突变 (3) 两种类型 (表 3)。研究结果说明, *SiPHYA* 保守性最差, 在进化过程中发生了明显的功能分化, 而 *SiPHYB*、*SiPHYC* 保守性较强。

利用 *SiPHYA* 基因内的 3 个导致翻译提前终止的 SNP 位点和 59 个错义突变 SNP 位点进行单倍型分析, 剔除存在杂合位点的 *S. italica* 材料, 共检测到 2 种单倍型: hapA (CC/GG)、hapB (TT/CC), 由两个错义突变 SNP (SNP7 034 522^{C→T} 和 SNP7 036 657^{G→C}) 产生; 利用 *SiPHYB* 检测到的 3 个错义突变 SNP 位点进行单倍型分析, 发现无纯合突变单倍型产生, 剔除杂合材料只有参考基因组一种单倍型: hapA (AA/CC/GG); 利用 *SiPHYC* 检测到的 3 个错义突变 SNP 位点 (SNP5 414 068^{C→G}、SNP5 414 823^{G→T}、SNP5 415 366^{T→G}) 进行单倍型分析, 剔除杂合材料后共检测到 3 种单倍型: hapA (CC/GG/TT)、hapB (CC/GG/GG) 和 hapC (CC/TT/TT)。无论 *SiPHYA* 还是 *SiPHYC*, ‘毛粟’基因型在早抽穗品种和晚

抽穗品种中均有分布, 说明光敏色素基因序列变异并非导致‘毛粟’长日照晚抽穗的原因。事实上‘毛粟’在不同光温环境抽穗期差异极大, 在海南乐东抽穗期 26 d, 而在河南洛阳延长到 76 d, 在吉林公主岭则不能完成抽穗。前面研究发现, *SiPHYA*、*SiPHYB* 在‘毛粟’八、九叶期长日照表达量明显高于短日照, 说明光敏色素基因长日照条件表达剂量效应而非基因序列变异效应在抑制‘毛粟’抽穗中发挥了重要作用。

由于 *SiPHYB* 基因没有检测到纯合突变类型, 这里只分析 *SiPHYA*、*SiPHYC* 的单倍型效应。对 *SiPHYA* 基因来说, 海南省、洛阳市、吉林省 3 个光温环境 hapB 的抽穗期 (HS) 和株高 (PH) 均显著高于 hapA, 海南省、洛阳市两个光温环境 hapB 的穗码数显著高于 hapA, 而在吉林省光温环境 hapB 的穗码数显著低于 hapA, 说明 SNP7 034 522^{C→T} 和 SNP7 036 657^{G→C} 两个错义突变对 *S. italica* 株高、抽穗期和穗码数均产生显著影响, 但对株高和抽穗期的作用不受光温环境影响, 对穗码数 (PBN) 的作用受光温环境影响 (图 10A)。*SiPHYC* 的 hapC 在海南光温环境抽穗期小于 hapA、hapB, 洛阳、吉林光

表 3 *SiPHYA*、*SiPHYB* 和 *SiPHYC* 在 160 份 *S. italica* 材料中 SNP 分布

Table 3 Distribution of SNPs in *SiPHYA*, *SiPHYB* and *SiPHYC* from 160 *S. italica* materials

Gene name	No. of total SNP	No. of SNP in introns	SNP type and number in exons			
			Nonsense mutation	Missense mutation	Premature termination	UTR
<i>SiPHYA</i>	163	32	62	59	3	7
<i>SiPHYB</i>	12	6	3	3	0	0
<i>SiPHYC</i>	4	1	0	3	0	0

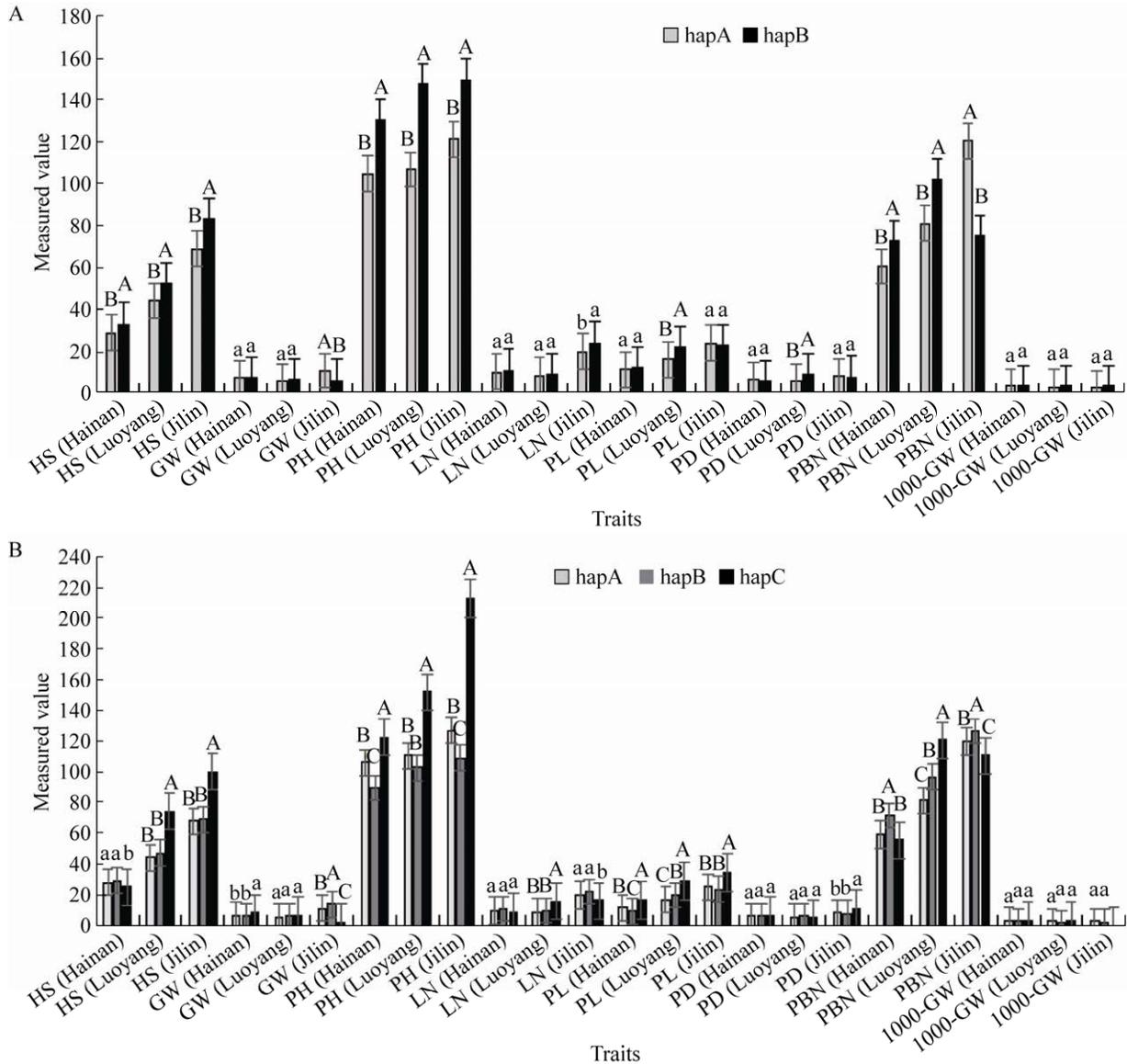


图 10 *SiPHYA*、*SiPHYC* 单倍型效应分析

Figure 10 Haplotype effect analysis of *SiPHYA* and *SiPHYC*. HS: heading stage. (A) *SiPHYA*. (B) *SiPHYC*. GW: grain weight. PH: plant height. LN: leaf number. PL: panicle length. PD: panicle diameter. PBN: panicle branch number. 1000-GW: 1000-grain weight. Values followed by different uppercase letters and lowercase letters above the bar represent significant difference at the 0.01 and 0.05 probability level, respectively, the same as follows.

温环境则显著大于 hapA、hapB, 但株高和穗长 (PL) 不受环境影响, 3 个光温环境 hapC 的株高、穗长均显著高于 hapA、hapB (图 10B), 由于 hapC 是由 SNP5 414 823^{G→T} 发生错义突变产生的, 因此该 SNP 位点是导致抽穗期、株高、穗长变异的关键突变位点。

3 讨论

作为重要的光受体, 光敏色素基因在植物生长发育中发挥着重要作用。研究表明, *PHYA* 与蓝光受体基因 *CRY2* 共同作用于生物钟传导链中的相关基因, 从而促进 *A. thaliana* 长日照条件下的成花过程^[23-24]。*Z. mays* *ZmPHYA* 在黑暗条件下的表达丰度很高, 两个不同转录本 *ZmPHYA1* 和 *ZmPHYA2* 都受光周期的调节, 在短日照条件下其表达丰度是长日照下的 2–5 倍^[25]。本研究发现, *SiPHYA* 在黑暗中表达峰的转录丰度达到光照表达峰的 14.85 倍, 同时在短日照条件下的表达量远远超过长日照, 与 *Z. mays* *ZmPHYA* 的研究结果相一致。在长日照条件下, *Z. mays* 中 *ZmPHYC* 转录表达在进入光照阶段 10 h 时和进入黑暗阶段 4 h 时均有一个峰值^[26], 而本研究中长日照条件下 *SiPHYC* 的起峰时间在光照 9 h, 光照 12 h 仍维持峰值表达水平, 在黑暗中并未发现另一个表达峰, 与 *Z. mays* *ZmPHYC* 表达存在差异。

O. sativa 长日照条件下 *PHYA* 的存在使抑花因子 *GRAIN NUMBER* 的表达受到诱导, 从而间接降低了 EHD1 蛋白的丰度, 导致其对 *O. sativa* 的开花诱导作用减弱, 最终延迟了开花期^[27]。同样, 长日照条件下 *O. sativa* *PHYB* 通过调控光周期途径下游基因 *Ehd1*、*Hd3a*、*Hd1* 来抑制开花^[10-12]。本研究发现, ‘毛粟’ *SiPHYA*、*SiPHYB* 在短日照临近抽穗 (八、九叶期) 时表达水平远低于长日照, 此时长日照 *S. italica* 仍处于营

养生长状态, 说明和 *O. sativa* 一样, 长日照条件下 *SiPHYA*、*SiPHYB* 活跃表达与抑制 *S. italica* 抽穗密切相关。本研究发现, *SiPHYA* 两个单倍型间抽穗期差异极显著, 且这种差异不受光温环境影响, 进一步说明 *SiPHYA* 对 *S. italica* 抽穗开花具有调节功能, 也说明光周期主要通过 *SiPHYA* 转录强度的调节而非通过编码序列变异来调控 *S. italica* 抽穗。*O. sativa* 的 *phyA*、*phyB* 双突变体完全丧失了对远红光的感知能力, 而 *phyB* 或 *phyC* 的单一突变在长日照条件下引起中等程度的早花, 当 *phyA* 突变分别与 *phyB* 或 *phyC* 突变相结合时则会引起开花期提前, 这表明在 *O. sativa* 花期调控中, *PHYA* 和 *PHYB*、*PHYC* 分为两大类基因并存在一定的功能协同, 并且在功能上 *PHYA* 和 *PHYB* 起主要作用^[28]。本研究系统进化分析也将 *SiPHYB*、*SiPHYC* 聚为一组, 而 *SiPHYA* 单独聚为一组, 但 *SiPHYC* 短日照临近抽穗表达水平与长日照比较接近, 说明其在长日照条件下并非通过高表达水平来抑制抽穗, 和 *O. sativa* 一样, 长日照条件下 *SiPHYA*、*SiPHYB* 高水平表达对 *S. italica* 抽穗起主要抑制作用。*O. sativa* *PHYA* 和 *PHYC* 的双重突变比 *PHYC* 单突变对开花的促进效应更加明显, 说明 *PHYA* 和 *PHYC* 在抑制开花方面具有加和效应^[29]。本研究发现, *SiPHYC* 由 1 个错义突变形成的单倍型 (hapC) 在海南省使抽穗期缩短, 而在洛阳市、吉林省抽穗期明显延长, 说明 *SiPHYC* 序列变异对抽穗期的作用受光温环境影响, 长日照条件对抽穗的抑制作用最强。

光敏色素与植物对非生物胁迫的抵抗能力有密切关系。通过对 *A. thaliana* 光敏色素 A、B 和 E 的功能缺失突变体在缺水和 ABA 胁迫下的气孔导度进行研究, 发现野生型相比于光敏色素功能缺失突变体在应对干旱环境时有更迅速

的气孔导度变化,说明光敏色素具有通过调整气孔导度起到节水的作用,且不同的光敏色素在这种作用上是有加性效应的^[30]。*O. sativa phyB* 突变体植株相较于野生型植株叶面积更小,减少了水分从叶片往环境中的蒸腾,从而耐受干旱环境的能力显著提高^[31]。本研究表明,在 PEG 模拟干旱、自然干旱胁迫条件下,*SiPHYB* 和 *SiPHYC* 表达模式比较接近,且对胁迫响应迅速,而 *SiPHYA* 对胁迫响应较慢,说明 *SiPHYB* 和 *SiPHYC* 共同参与了 *S. italica* 干旱胁迫的应答,而 *SiPHYA* 以不同的方式参与干旱胁迫调节。光敏色素还可以通过调节 ABA 的代谢来参与植物抗逆调控^[32-33]。*O. sativa phyB* 突变体和对照植株比较后发现,有 4 类基因在突变体中表达丰度远远高于野生型,这些基因均与植物 ABA 合成直接相关,而 ABA 分解基因 *OsABAOX1* 表达丰度严重下降^[34]。在缺水条件下,烟草野生型植株的 ABA 和水分均低于其光敏色素功能缺失突变体植株^[35]。本研究发现,在 ABA 胁迫处理时 *SiPHYB* 和 *SiPHYC* 具有相似的表达模式,只在处理 8 h 诱导表达产生 1 个表达峰,而 *SiPHYA* 在处理 2 h、8 h 均诱导表达,产生 2 个表达峰,说明 *SiPHYB* 和 *SiPHYC* 共同参与了 ABA 胁迫的响应过程,且与 *SiPHYA* 的响应方式存在差异。光敏色素和植物的耐盐性、耐热性也相关^[36-38]。本研究发现,盐胁迫处理 *SiPHYA* 一直处于诱导表达状态,而 *SiPHYB* 在胁迫处理 4 h 内被诱导表达,4 h 后表达均处于抑制状态,说明 *SiPHYA* 和 *SiPHYB* 参与了 *S. italica* 盐胁迫响应过程,而 *SiPHYC* 受盐胁迫影响较小,可能没有参与 *S. italica* 耐盐过程。对谷苗 42 °C 高温胁迫处理 12 h, *SiPHYB*、*SiPHYC* 均在处理 4 h、8 h 强诱导表达,产生 2 个表达峰,具有相似表达模式,而 *SiPHYA* 则只在胁迫处理 8 h 时强诱导表达,产

生 1 个表达峰,其余时间点 3 个基因表达几乎都受到抑制,说明 *SiPHYA* 与 *SiPHYB*、*SiPHYC* 以 2 种不同作用方式应对高温胁迫。

4 结论

从 *S. italica* 农家品种‘毛粟’克隆了 *SiPHYA*、*SiPHYB* 和 *SiPHYC* 含有完整编码区的 cDNA 序列,*SiPHYB*、*SiPHYC* 比 *SiPHYA* 具有更近的进化关系。*SiPHYA*、*SiPHYB*、*SiPHYC* 均受光周期调控,但光周期对 *SiPHYB*、*SiPHYC* 昼夜表达模式的影响要强于 *SiPHYA*,长日照条件下 *SiPHYA*、*SiPHYB* 依靠高表达水平而非编码序列变异来抑制‘毛粟’抽穗。*SiPHYB*、*SiPHYC* 与 *SiPHYA* 以 2 种不同的作用方式应对 PEG 模拟干旱、自然干旱、ABA、高温 4 种胁迫;*SiPHYA* 和 *SiPHYB* 参与 *S. italica* 盐胁迫调节,*SiPHYC* 没有参与 *S. italica* 耐盐过程。基于 160 份 *S. italica* 材料重测序及农艺性状调查数据发现 *SiPHYA* 2 个错义突变 (SNP7 034 522^{C→T}, SNP7 036 657^{G→C}) 导致延迟抽穗、增加株高,*SiPHYC* 1 个错义突变 (SNP5 414 823^{G→T}) 导致短日照缩短抽穗期,长日照延长抽穗期,对株高、穗长的增加作用不受光温环境影响。

REFERENCES

- [1] Rockwell NC, Su YS, Lagarias JC. Phytochrome structure and signaling mechanisms. *Annu Rev Plant Biol*, 2006, 57: 837-858.
- [2] Bae G, Choi G. Decoding of light signals by plant phytochromes and their interacting proteins. *Annu Rev Plant Biol*, 2008, 59: 281-311.
- [3] Kami C, Lorrain S, Hornitschek P, et al. Light-regulated plant growth and development. *Curr Top Dev Biol*, 2010, 91: 29-66.
- [4] De Wit M, Galvão VC, Fankhauser C. Light-mediated hormonal regulation of plant growth and development. *Annu Rev Plant Biol*, 2016, 67: 513-537.

- [5] 马朝峰, 戴思兰. 光受体介导信号转导调控植物开花研究进展. 植物学报, 2019, 54(1): 9-22.
Ma CF, Dai SL. Advances in photoreceptor-mediated signaling transduction in flowering time regulation. Chin Bull Bot, 2019, 54(1): 9-22 (in Chinese).
- [6] Franklin KA, Toledo-Ortiz G, Pyott DE, et al. Interaction of light and temperature signalling. J Exp Bot, 2014, 65(11): 2859-2871.
- [7] Foreman J, Johansson H, Hornitschek P, et al. Light receptor action is critical for maintaining plant biomass at warm ambient temperatures. Plant J, 2011, 65(3): 441-452.
- [8] Shamim Z, Rashid B, ur Rahman S, et al. Expression of drought tolerance in transgenic cotton. Sci Asia, 2013, 39(1): 1.
- [9] Junior CAS, D'amico-Damião V, Carvalho RF. Phytochrome type B family: the abiotic stress responses signaller in plants. Ann Appl Biol, 2021, 178(2): 135-148.
- [10] Lee YS, Jeong DH, Lee DY, et al. OsCOL4 is a constitutive flowering repressor upstream of Ehd1 and downstream of OsphyB. Plant J, 2010, 63(1): 18-30.
- [11] Ishikawa R, Aoki M, Kurotani KI, et al. Phytochrome B regulates heading date 1 (Hd1)-mediated expression of rice florigen Hd3a and critical day length in rice. Mol Genet Genom, 2011, 285(6): 461-470.
- [12] 詹克慧, 李志勇, 侯佩, 等. 利用修饰光敏色素信号途径进行作物改良的可行性. 中国农业科学, 2012, 45(16): 3249-3255.
Zhan KH, Li ZY, Hou P, et al. A new strategy for crop improvement through modification of phytochrome signalling pathways. Sci Agric Sin, 2012, 45(16): 3249-3255 (in Chinese).
- [13] Sheehan MJ, Kennedy LM, Costich DE, et al. Subfunctionalization of PhyB1 and PhyB2 in the control of seedling and mature plant traits in maize. Plant J, 2007, 49(2): 338-353.
- [14] Yang S, Murphy RL, Morishige DT, et al. Sorghum phytochrome B inhibits flowering in long days by activating expression of SbPRR37 and SbGHD7, repressors of SbEHD1, SbCN₈ and SbCN₁₂. PLoS One, 2014, 9(8): e105352.
- [15] Wang N, Chen B, Xu K, et al. Association mapping of flowering time QTLs and insight into their contributions to rapeseed growth habits. Front Plant Sci, 2016, 7: 338.
- [16] Yoo YH, Nalini Chandran AK, Park JC, et al. OsPhyB-mediated novel regulatory pathway for drought tolerance in rice root identified by a global RNA-seq transcriptome analysis of rice genes in response to water deficiencies. Front Plant Sci, 2017, 8: 580.
- [17] Du H, Huang F, Wu N, et al. Integrative regulation of drought escape through ABA-dependent and-independent pathways in rice. Mol Plant, 2018, 11(4): 584-597.
- [18] Kwon CT, Song G, Kim SH, et al. Functional deficiency of phytochrome B improves salt tolerance in rice. Environ Exp Bot, 2018, 148: 100-108.
- [19] He Y, Li Y, Cui L, et al. Phytochrome B negatively affects cold tolerance by regulating *OsDREB1* gene expression through phytochrome interacting factor-like protein OsPIL16 in rice. Front Plant Sci, 2016, 7: 1963.
- [20] Bennetzen JL, Schmutz J, Wang H, et al. Reference genome sequence of the model plant *Setaria*. Nat Biotechnol, 2012, 30(6): 555-561.
- [21] Lata C, Gupta S, Prasad M. Foxtail millet: a model crop for genetic and genomic studies in bioenergy grasses. Crit Rev Biotechnol, 2013, 33(3): 328-343.
- [22] Diao XM, Jia GQ. Origin and domestication of foxtail millet. Genetics and Genomics of *Setaria*. Cham: Springer International Publishing, 2016: 61-72.
- [23] 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 XW, Hu YG. 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).
- [24] Johnson E, Bradley M, Harberd NP, et al. Photoresponses of light-grown *phyA* mutants of *Arabidopsis* (phytochrome A is required for the perception of daylength extensions). Plant Physiol, 1994, 105(1): 141-149.
- [25] Halliday KJ, Salter MG, Thingnaes E, et al. Phytochrome control of flowering is temperature sensitive and correlates with expression of the floral integrator FT. Plant J, 2003, 33(5): 875-885.
- [26] Sheehan MJ, Farmer PR, Brutnell TP. Structure and expression of maize phytochrome family homeologs. Genetics, 2004, 167(3): 1395-1405.

- [27] 牛骧, 郭林, 杨宗举, 等. 2个玉米光敏色素C基因的转录丰度对多种光质处理的响应. 中国农业科学, 2017, 50(12): 2209-2219.
Niu X, Guo L, Yang ZJ, et al. Transcription abundances of two phytochrome C in response to different light treatments in *Zea mays*. *Sci Agric Sin*, 2017, 50(12): 2209-2219 (in Chinese).
- [28] Osugi A, Itoh H, Ikeda-Kawakatsu K, et al. Molecular dissection of the roles of phytochrome in photoperiodic flowering in rice. *Plant Physiol*, 2011, 157(3): 1128-1137.
- [29] Takano M, Inagaki N, Xie X, et al. Distinct and cooperative functions of phytochromes A, B, and C in the control of deetiolation and flowering in rice. *Plant Cell*, 2005, 17(12): 3311-3325.
- [30] Takano M, Hirochika H, Miyao A. Control of plant flowering time by regulation of phytochrome C expression: US7566815[P]. 2009-07-28.
- [31] Boggs JZ, Loewy K, Bibee K, et al. Phytochromes influence stomatal conductance plasticity in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Growth Regul*, 2010, 60(2): 77-81.
- [32] Liu J, Zhang F, Zhou JJ, et al. Phytochrome B control of total leaf area and stomatal density affects drought tolerance in rice. *Plant Mol Biol*, 2012, 78(3): 289-300.
- [33] Staneloni RJ, Rodriguez-Batiller MJ, Casal JJ. Abscisic acid, high-light, and oxidative stress down-regulate a photosynthetic gene via a promoter motif not involved in phytochrome-mediated transcriptional regulation. *Mol Plant*, 2008, 1(1): 75-83.
- [34] Carvalho RF, Quecini V, Peres LEP. Hormonal modulation of photomorphogenesis-controlled anthocyanin accumulation in tomato (*Solanum lycopersicum* L. cv Micro-Tom) hypocotyls: physiological and genetic studies. *Plant Sci*, 2010, 178(3): 258-264.
- [35] 顾建伟, 张方, 赵杰, 等. 光敏色素B介导光信号影响水稻的脱落酸途径. 科学通报, 2012, 57(25): 2371-2379.
Gu JW, Zhang F, Zhao J, et al. Light signals mediated by phytochrome B affect abscisic acid pathway in rice. *Chin Sci Bull*, 2012, 57(25): 2371-2379 (in Chinese).
- [36] Kraepiel Y, Rousselin P, Sotta B, et al. Analysis of phytochrome- and ABA-deficient mutants suggests that ABA degradation is controlled by light in *Nicotiana plumbaginifolia*. *Plant J*, 1994, 6(5): 665-672.
- [37] Chen XY, Ding X, Xu S, et al. Endogenous hydrogen peroxide plays a positive role in the upregulation of heme oxygenase and acclimation to oxidative stress in wheat seedling leaves. *J Integr Plant Biol*, 2009, 51(10): 951-960.
- [38] Li L, Ljung K, Breton G, et al. Linking photoreceptor excitation to changes in plant architecture. *Genes Dev*, 2012, 26(8): 785-790.

(本文责编 郝丽芳)