DOI: 10.3724/SP.J.1006.2020.94107

谷子 PEPC 基因的鉴定及其对非生物逆境的响应特性

赵晋锋** 杜艳伟** 王高鸿 李颜方 赵根有 王振华 王玉文 余爱丽*

山西省农业科学院谷子研究所 / 特色杂粮种质资源发掘与育种山西省重点实验室, 山西长治 046011

摘要: 磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(phosphoenolpyruvate carboxylase, PEPC)是 C_4 植物光合作用关键酶, 并在植物多种代谢途径及逆境信号应答过程中起重要作用。本研究通过序列比对, 从谷子基因组中筛选出 6 个 *SiPEPC* 候选基因。*SiPEPC* 蛋白特征参数相似度很高, 序列非常保守, 都含有 PEPC 基因特征功能域 PEPcase Motif。*SiPEPC* 成员主要被定位在细胞质、细胞核和线粒体。在 *SiPEPC* 成员启动子序列中含大量有光、激素、逆境以及其他生长调控相关的顺式应答元件。苗期逆境 qRT-PCR 表达谱分析表明, 5 个 *SiPEPC* 基因(*SiPEPC1*、*SiPEPC2*、*SiPEPC3*、*SiPEPC5*、*SiPEPC6*)不同程度受 ABA、PEG、高盐和低温诱导表达, 表明其参与了苗期对非生物逆境的响应。5 个 *SiPEPC* 基因表达量在正常生长条件下随着谷子的生长呈增强趋势, 且在不同生育时期干旱胁迫下明显增加, 表明其参与了拔节、抽穗、灌浆期的干旱胁迫应答。拔节期弱光可诱导 5 个 *SiPEPC* 基因的表达, 而在拔节期中等强度光照以及抽穗期和灌浆期的中等光照和弱光照下表达量均急剧降低, 揭示光照强度严重影响 *SiPEPC* 基因的表达。

关键词: 谷子; 磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶; 非生物逆境; 表达分析

Identification of PEPC genes from foxtail millet and its response to abiotic stress

ZHAO Jin-Feng**, DU Yan-Wei**, WANG Gao-Hong, LI Yan-Fang, ZHAO Gen-You, WANG Zhen-Hua, WANG Yu-Wen, and YU Ai-Li*

Millet Research Institute, Shanxi Academy of Agricultural Sciences / Shanxi Key Laboratory of Genetic Resources and Breeding in Minor Crops, Changzhi 046011, Shanxi, China

Abstract: Phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC) is a key enzyme in photosynthesis of C_4 plants and plays an important role in a variety of metabolic and stress pathways. In this study, we identified six candidate PEPC genes from foxtail millet genome via sequence alignment. The characteristic parameters of all *SiPEPC* protein were very similar and the sequences were very conservative. All *SiPEPC* genes contained the PEPcase motif, which is the characteristic domain of PEPC gene. *SiPEPCs* were localized in cytoplasm, nucleus and mitochondrion. Promoter analysis identified a variety of light, hormonal, stress, and other growth-related cis-elements in the promoter sequences of *SiPEPC* members. The qRT-PCR expression profiles showed that the five *SiPEPC* genes (*SiPEPC1*, *SiPEPC2*, *SiPEPC3*, *SiPEPC5*, *SiPEPC6*) were induced by ABA, PEG, high salt and low temperature at seedling stage, indicating that five *SiPEPC* genes are involved in abiotic signaling pathway at the seedling stage. The expression of five *SiPEPC* genes increased with the growth of foxtail millet under normal growth conditions, and increased significantly under drought stress at different growth stages, indicating that five *SiPEPCs* are involved in drought stress response at jointing, heading and filling stages. The weak light at jointing stage could induce the expression of five *SiPEPC* genes, while the expression level decreased sharply under moderate light intensity at jointing stage, moderate and weak light intensity at heading and filling stages, showing that light intensity seriously affects the expression of *SiPEPC* genes.

Keywords: foxtail millet; phosphoenolpyruvate carboxylase; abiotic stress; expression analysis

本研究由山西省农业科学院项目(YGJPY2009, YGG17021, YCX2019T05), 国家现代农业产业技术体系建设专项(CARS-06-13.5-A23)和国家农业环境数据中心观测检测任务(ZX03S0410)项目资助。

This study was supported by the Project Plan of Shanxi Academy of Agricultural Sciences (YGJPY2009, YGG17021, YCX2019T05), the China Agricultural Research System (CARS-06-13.5-A23), and the National Agricultural Environmental Data Center Observation and Detection Mission (ZX03S0410).

* 通信作者(Corresponding author): 余爱丽, E-mail: yuailimail@163.com, Tel: 0355-2204195

** 同等贡献(Contributed equally to this work)

第一作者联系方式: 赵晋锋, E-mail: zhaojfmil@126.com, Tel: 0355-2204195

Received (收稿日期): 2019-07-24; Accepted (接受日期): 2020-01-15; Published online (网络出版日期): 2020-02-14.

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1809.S.20200214.1339.002.html>

光合作用是植物生长发育过程中极其重要的化学反应^[1]。依据光合作用对无机碳固定过程不同,植物被划分为 C₃ 光合途径、C₄ 循环途径及景天酸代谢(CAM)途径植物^[2]。C₃ 途径是最原始最基本的二氧化碳同化途径,可以合成蔗糖、淀粉、脂肪和蛋白质等稳定光合产物,而 C₄ 和 CAM 途径不能独立合成相对稳定的光合作用产物,其主要作用是对二氧化碳进行固定、运输、暂时存储^[3]。C₄ 循环途径比 C₃ 循环途径光合能力大幅提高,主要是因为 C₄ 植物中有特殊的花环型结构,可以使 CO₂ 在 Rubisco 羧化酶周围高浓度聚集,大大提高了对水分、氮的充分利用,即使在高光强照射、高温、干旱和 CO₂ 浓度低等逆境环境下, C₄ 植物仍然具有较高的光合速率^[4]。磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(phosphoenolpyruvate carboxylase, PEPC)是 C₄ 植物光合作用的重要关键酶之一,在 1953 年首次从藜科植物菠菜中分离出来^[5]。研究表明 PEPC 是一种细胞质酶,主要功能是以 Mg²⁺ 或 Mn²⁺ 为辅助因子,催化磷酸烯醇式丙酮酸(phosphoenolpyruvate, PEP)和 HCO₃⁻ 生成草酰乙酸(oxaloacetate, OAA) 和无机磷酸(inorganic phosphate, Pi)的不可逆反应^[6]。PEPC 是一种变构调节酶,主要在真菌、藻类、蓝细菌、光合细菌、部分非光合细菌、动物以及植物中广泛存在^[7]。目前 PEPC 基因相继在拟南芥、大豆、水稻、玉米、甘蔗等植物中得到鉴定^[8-11]。高等植物中的 PEPC 是四聚体三维结构,由约 970 个氨基酸(110 kDa)组成, C 末端含有 PEPC 保守功能域^[12]。PEPC 在植物多种代谢途径中具有广泛生理功能,主要包括参与光合作用碳同化,提高油料作物种子脂肪酸含量,促进种子蛋白质合成,调节细胞质 pH 值、根系离子吸收、气孔开放、氮同化以及参与逆境胁迫应答^[13]。随着转基因研究的发展,近年来 PEPC 逆境分子生物学研究逐渐成为新的热点。研究表明 PEPC 在植物应对逆境胁迫过程中起重要作用^[14]。丁在松等^[15]研究转 PEPC 基因水稻在干旱、高温、强光等逆境胁迫下的光合特征,发现逆境胁迫下转基因水稻较对照具有明显光合优势。焦德茂等^[16]以转玉米 PEPC 基因水稻为研究材料,发现在高温、高光强条件下转基因水稻的光饱和点和饱和光合效率均显著高于对照。方立峰等^[17]发现转 PEPC 基因水稻在苗期干旱胁迫下维持了相对较高的光合能力,具有较强的抗氧化和渗透调节能力。另外 Jeanneau 等^[18]认为在适度干旱条件下 PEPC 基因过表达能提高玉米水分利用率,增加

干物质积累量。干旱、盐和冷害等非生物逆境也被报道能够强烈诱导 PEPC 基因的表达,参与植物对环境的抗逆反应^[19-21]。上述研究结果表明逆境胁迫能诱导 PEPC 基因过量表达,参与植物体对环境胁迫的抗逆生理生化反应。

谷子[*Setaria italica* (L.) P. Beauv.]是 C₄ 禾本科重要粮食作物和饲草作物,起源于我国,在全球一些温带、亚热带和热带的干旱和半干旱地区广泛种植,具有抗旱、耐瘠、适应性广等特点^[22-24]。谷子在生长过程中会经常遇到干旱、盐渍、低温、高温、洪涝以及病虫害侵染等,这些逆境严重影响了谷子的生长发育和产量品质^[25]。2012 年谷子基因组测序已完成并公布,为开展谷子抗逆分子生物学研究提供了极为便利的条件^[26-27]。迄今为止 PEPC 研究主要聚焦在 C₄ 型 PEPC 基因在提高 C₃ 植物光合作用和耐胁迫应答领域,在 C₄ 作物玉米、高粱中研究较多,但是在 C₄ 作物谷子中 PEPC 基因非生物逆境相关研究鲜有报道。本研究检索了谷子中的 PEPC 基因家族成员,并对其氨基酸序列、蛋白特征、功能、亚细胞定位、启动子区域顺式应答元件等参数特征分析和预测,随后检测了家族基因在幼苗期逆境胁迫下的动态表达模式及在拔节、抽穗、灌浆 3 个生育时期干旱胁迫和不同光照处理下的表达情况,旨在为进一步分析 PEPC 基因在谷子逆境应答信号途径中的功能和机制以及为利用基因工程方法改善作物光合速率和提高产量提供数据支持。

1 材料与方法

1.1 试验材料

选用谷子品种‘豫谷 1 号’,种子保存于山西省农业科学院谷子研究所生物技术课题。在组培室中培养谷子幼苗,温度为(22±2)℃,湿度为 60%,光照周期为 16 h 光照/8 h 黑暗。

1.2 试验设计

待组培室幼苗长至三叶一心期时,分别对其进行 20% PEG-6000 模拟干旱、盐(250 mmol L⁻¹ NaCl)、ABA (100 μmol L⁻¹)和低温(4℃)胁迫处理,苗期逆境表达谱分析取样时间点为处理后 0、1、3、6、12 和 24 h,整株取样^[28]。旱棚种植‘豫谷 1 号’,对照处理生育期内正常浇水;干旱处理只浇 3 次关键水,分别为拔节(6月 20 日)、抽穗(8月 5 日)和灌浆期(8月 30 日)浇透水,其他时间采用自然控水方式控水。光照处理为当植株出苗后用黑色遮阳网分别遮挡 1

层(中等光照, 拔节期、抽穗期、灌浆期测量光照强度分别为 221.8、411.6、164.6 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), 2 层(弱光照, 拔节期、抽穗期、灌浆期测量光照强度分别为 52.1、95.8、58.8 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)至成熟收获。光照强度用标智光强测定仪(GM1040)于晴天上午 9:00—10:00 测量 10 次数值, 取平均值。干旱处理试验与光照处理试验为同一对照。对照、中等光照处理和弱光照处理生育期内正常浇水, 其他农田管理措施相同。分别在拔节、抽穗、灌浆期时取旱棚干旱处理与光照强度处理材料和对照旗叶叶片, 立即在 -80°C 冰箱中速冻备用。

1.3 谷子 PEPC 基因的鉴定及基因结构、蛋白序列分析

在 Phytozome 数据库中以拟南芥和玉米的已知 PEPC 氨基酸序列为递交序列, 进行 BlastP 比对, 搜索具有完整阅读框的谷子同源序列, 获得谷子候选 PEPC 基因。基因参数和蛋白序列来源于 Phytozome 数据库。利用 ExPASy 网站在线工具预测蛋白分子量和等电点。利用 PLACE 在线软件对基因启动子区域顺式元件进行分析, 采用 GSDS 软件绘制基因结构图, 用在线工具 CELLO v.2.5 进行亚细胞定位预测,

预测置信度计算参考 Yu 等^[29]描述方法。使用 Blast 工具在 NCBI 上查找不同物种氨基酸同源性序列, 用 ClustalX1.83 软件分析比对基因序列^[30], 用 Mega6.0 软件邻接法构建不同物种 N-J 系统进化树^[31]。

1.4 总 RNA 提取、cDNA 合成及引物设计

按照说明书, 使用生工 TRIzol 试剂盒提取植物总 RNA; 使用生工第 1 链 cDNA 合成试剂盒合成 cDNA。所用引物由 Primer Primer 5.0 设计, 引物信息见表 1。

1.5 Real-time PCR 分析

样品 cDNA 均一化后作为实时定量 PCR 模板, 以谷子 $\beta\text{-actin}$ 基因(Seita.7G294000)作为内参基因。反应体系为 20 μL , 包含 10 μL 2 $\times$ 荧光染料混合液、0.4 μL 正向引物($10 \mu\text{mol L}^{-1}$)、0.4 μL 反向引物($10 \mu\text{mol L}^{-1}$)、2 μL cDNA 模板、7.2 μL 无菌水。经预试验优化后 PCR 程序为 95°C 3 min; 95°C 7 s, 57°C 10 s, 72°C 15 s, 45 个循环。试验设计 3 次重复, 采用相对定量 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 方法计算基因在某种逆境处理下某个时间点相对于对照的转录水平变化^[32]。SiPEPC 成员在苗期不同逆境、不同生育期干旱和不同光照下 Real-time PCR 表达分析结果利用百迈克云平台在线工具聚类热图绘制(Pretty Heatmaps)热图, 参数默认。

表 1 本试验所用引物

Table 1 Primers used in this study

基因 Gene	上游引物 Forward primer (5'-3')	下游引物 Reverse primer (5'-3')
<i>SiPEPC1</i>	TGCGTGCTGGAATGAGTTACT	CCAATAAGCATACATCCCGTG
<i>SiPEPC2</i>	CAAGAGCCAACTATTGACCTG	TCATACCAGCACGCATTTC
<i>SiPEPC3</i>	ATGGAAGGGTGTCCTCAAAGTT	CCAAGAAGAGAACTGAATGAGAGG
<i>SiPEPC5</i>	GCTACTTCGACGACACCATC	AGGAGGAGAACTGGATGAGC
<i>SiPEPC6</i>	GAGGTGGAAGTGTGGGAAGA	GTAACAGCTGCAGGGTTCTAA
$\beta\text{-Actin}$	CAGTGGACGCACAACAGGTAT	AGCAAGGTCAAGACGGAGAAT

2 结果与分析

2.1 谷子 PEPC 基因成员鉴定与参数分析

通过序列比对和分析, 从谷子中筛选出 6 个 *SiPEPC* 候选基因成员(表 2)。根据基因定位在染色体 1~9 号上的先后位置顺序分别命名为 *SiPEPC1*、*SiPEPC2*、*SiPEPC3*、*SiPEPC4*、*SiPEPC5*、*SiPEPC6*。6 个基因不均分布在 1 号、2 号、4 号、5 号染色体上, 其中 *SiPEPC1*、*SiPEPC2*、*SiPEPC3* 分别分布于 1 号、2 号、4 号染色体上, 而 *SiPEPC4*、*SiPEPC5*、*SiPEPC6* 全部位于 5 号染色体上。*SiPEPC6* 基因有 2 种转录方式, 其他 5 个基因只有 1 种转录方式。功

能域分析发现, 所有 *SiPEPC* 基因都含有 PEPC 基因特征功能域 PEPcase, 功能域在基因中的详细位置见表 2。候选 *SiPEPC* 蛋白参数分析表明, *SiPEPC* 成员之间基因组长度变化明显, 在 4676~8603 bp 之间, 编码氨基酸数目在 964~1032 之间。成员间分子量范围在 109.82~114.89 kD 之间, 蛋白等电点范围在 5.70~7.14 之间, 不稳定指数范围在 44.10~52.09 之间, 脂肪系数范围在 85.81~93.87 之间, 平均疏水指数范围在 $-0.418 \sim -0.277$ 之间。GSDS 在线软件分析 *SiPEPC* 成员基因结构发现, *SiPEPC1*、*SiPEPC2*、*SiPEPC3*、*SiPEPC5*、*SiPEPC6* 分别含 9、9、8、6、9 个内含子, 而 *SiPEPC4* 含 20 个内含子(图 1)。

表 2 预测谷子 PEPc 基因参数
Table 2 Parameters of predicted foxtail millet PEPc genes

基因 Gene	基因 ID Gene ID	染色体位置 Chr. location	基因长度 Genome length (bp)	氨基酸数目 No. of amino acid	等电点 pI	分子量 Molecular weight (kD)	内含子数 Intron number	不稳定指数 Instability index	脂肪系数 Aliphatic index	平均疏水指数 Grand average of hydropathicity	PEPc 保守域位置 PEPc domain location
<i>SiPEPC1</i>	Seita.1G020700	1784608–1791259	6652	965	5.83	109.82	9	48.48	87.36	−0.392	163–965
<i>SiPEPC2</i>	Seita.2G173700	26198697–26204510	5814	967	5.77	110.20	9	44.74	92.41	−0.351	164–967
<i>SiPEPC3</i>	Seita.4G175200	28034663–28043265	8603	964	5.95	109.98	8	45.83	85.81	−0.418	162–964
<i>SiPEPC4</i>	Seita.5G074200	6390259–6398514	8256	1032	7.14	114.89	20	52.09	93.87	−0.277	144–348, 414–1032
<i>SiPEPC5</i>	Seita.5G147000	13061164–13065839	4676	1015	5.89	113.53	6	49.05	87.69	−0.319	213–1015
<i>SiPEPC6</i>	Seita.5G324500	37380598–37387338	6741	969	5.70	110.44	9	44.10	89.79	−0.375	165–969

图 1 *SiPEPC* 成员的基因结构
Fig. 1 Gene structure of *SiPEPC* genes

2.2 *SiPEPC* 蛋白亚细胞定位预测和启动子区域顺式元件分析

采用 Psort 在线工具对谷子 *SiPEPC* 家族成员的亚细胞定位预测表明, *SiPEPC* 成员主要被定位在细胞质、细胞核和线粒体(表 3)。利用 PLACE 在线软件对 *SiPEPC* 成员启动子顺式元件分析(表 4), *SiPEPC* 成

员启动子区域主要包括大量的光应答元件、激素类应答元件(脱落酸、赤霉素、水杨酸、乙烯、茉莉酸甲酯、生长素)、逆境应答元件(逆境防御、低温、干旱、伤害)以及其他生长调控相关顺式元件, 包括缺氧特异性诱导、厌氧诱导必需、分生组织特异性表达、玉米蛋白代谢调控、种子特异性调控、昼夜节律元件等。

表 3 *SiPEPC* 蛋白亚细胞定位预测
Table 3 Prediction of subcellular localization of *SiPEPC* protein

基因 Gene	预测位置 Localization	可信度 Reliability
<i>SiPEPC1</i>	Cytoplasmic; nuclear; mitochondrial	3.395; 0.685; 0.414
<i>SiPEPC2</i>	Cytoplasmic; nuclear; mitochondrial	3.398; 0.831; 0.317
<i>SiPEPC3</i>	Cytoplasmic; nuclear; mitochondrial	3.679; 0.620; 0.321
<i>SiPEPC4</i>	Cytoplasmic; mitochondrial; nuclear	1.838; 1.290; 1.230
<i>SiPEPC5</i>	Cytoplasmic; mitochondrial; nuclear	2.258; 1.092; 0.472
<i>SiPEPC6</i>	Cytoplasmic; nuclear; mitochondrial	3.428; 0.758; 0.338

表 4 *SiPEPC* 基因启动子区域顺式元件预测
Table 4 Putative *cis*-elements in the promoter of *SiPEPCs*

顺式元件 <i>cis</i> -element	典型序列 Typical sequence	特性 Characteristic	基因 Gene
Box 4	ATTAAT	Light responsive element	<i>SiPEPC1</i> , <i>SiPEPC2</i> , <i>SiPEPC3</i>
G-Box	CACGTT	Light responsive element	<i>SiPEPC1</i> , <i>SiPEPC2</i> , <i>SiPEPC3</i> , <i>SiPEPC4</i> , <i>SiPEPC5</i> , <i>SiPEPC6</i>
GATA-motif	AAGGATAAGG	Light responsive element	<i>SiPEPC1</i> , <i>SiPEPC6</i>
AE-box	AGAAACAA	Light responsive element	<i>SiPEPC2</i> , <i>SiPEPC4</i> , <i>SiPEPC6</i>
GT1-motif	GGTTAAT	Light responsive element	<i>SiPEPC2</i> , <i>SiPEPC4</i> , <i>SiPEPC5</i>
ACE	GACACGTATG	Light responsive element	<i>SiPEPC3</i> , <i>SiPEPC5</i>
Sp1	GGGCGG	Light responsive element	<i>SiPEPC3</i> , <i>SiPEPC4</i>
ABRE	ACGTG	Abscisic acid responsiveness	<i>SiPEPC1</i> , <i>SiPEPC2</i> , <i>SiPEPC3</i> , <i>SiPEPC4</i> , <i>SiPEPC5</i>
P-box	CCTTTTG	Gibberellin-responsive	<i>SiPEPC1</i> , <i>SiPEPC2</i>
TATC-box	TATCCCA	Gibberellin-responsiveness	<i>SiPEPC2</i> , <i>SiPEPC4</i>
GARE-motif	TCTGTTG	Gibberellin-responsive element	<i>SiPEPC6</i>
TCA-element	CCATCTTTT	Salicylic acid responsiveness	<i>SiPEPC1</i> , <i>SiPEPC2</i> , <i>SiPEPC5</i> , <i>SiPEPC6</i>
ERE	ATTTCATA	Ethylene-responsive element	<i>SiPEPC2</i> , <i>SiPEPC4</i>
CGTCA-motif	CGTCA	MeJA-responsiveness	<i>SiPEPC3</i> , <i>SiPEPC6</i>
TGACG-motif	TGACG	MeJA-responsiveness	<i>SiPEPC3</i> , <i>SiPEPC6</i>

(续表 4)

顺式元件 <i>cis</i> -element	典型序列 Typical sequence	特性 Characteristic	基因 Gene
TGA-element	AACGAC	Auxin-responsive element	<i>SiPEPC1</i> , <i>SiPEPC4</i>
TC-rich repeats	GTTTTCTTAC	Defense and stress responsiveness	<i>SiPEPC1</i> , <i>SiPEPC3</i>
LTR	CCGAAA	Low-temperature responsiveness	<i>SiPEPC2</i> , <i>SiPEPC3</i> , <i>SiPEPC4</i> , <i>SiPEPC6</i>
WUN-motif	TTATTACAT	Wound-responsive element	<i>SiPEPC3</i>
MBS	CAACTG	MYB binding site involved in drought-inducibility	<i>SiPEPC5</i>
ARE	AAACCA	Anaerobic induction	<i>SiPEPC1</i> , 3, 4, 6
CCGTCC-box	CCGTCC	Meristem specific activation	<i>SiPEPC1</i> , 2, 4, 6
GC-motif	CCCCCG	Anoxic specific inducibility	<i>SiPEPC1</i> , 2, 6
O2-site	GATGACATGG	Zein metabolism regulation	<i>SiPEPC2</i> , 4, 5
RY-element	CATGCATG	Seed-specific regulation	<i>SiPEPC3</i>
circadian	CAAAGATATC	Circadian control	<i>SiPEPC5</i>
CAT-box	GCCACT	Meristem expression	<i>SiPEPC6</i>

2.3 PEPC 序列比对及进化分析

谷子 PEPC 成员氨基酸序列比对发现成员之间序列非常保守, 相似性较高, 其序列一致性为 67.71%。所有成员都含有 PEPC 蛋白特征功能域 PEPcase, 其中 *SiPEPC1*、*SiPEPC2*、*SiPEPC3*、*SiPEPC5*、*SiPEPC6* 序列相似性较高, 整体序列一致性为 74.03%, 而 *SiPEPC4* 在特征功能域内由于有几个片段的插入和缺失, 因此与其他几个 *SiPEPC* 序列一致性较低, 在 32.92%~34.06%之间。为进一步了解谷子 *SiPEPC* 进化关系, 推测其生物功能, 在 NCBI 数据库中检索了不同物种已知 PEPC 基因。序列比对发现所有物种 PEPC 整体一致性非常高, 为 72.88%, 说明 PEPC 基因在进化过程中非常保守。利用 MEGA6.0 软件构建了谷子和不同物种 PEPC 蛋白成员的 Neighbor-Joining 进化树(图 3)。

从图 3 可以看出, 谷子的 *SiPEPC* 基因与高粱、玉米 *PEPC* 基因聚合在一起, 揭示谷子与高粱、玉米亲缘关系较近(同属禾本科 C_4 作物), 另一方面也暗示它们在某些功能上可能具有相似性。玉米、高粱、谷子的 PEPC 成员与拟南芥、马铃薯、花生、蓖麻、烟草 PEPC 成员相互嵌合在一起, 表明 PEPC 基因在单、双子叶植物分化以前就已经存在。另外发现一些同源基因对, 例如 *AtPEPC1* 和 *AtPEPC3*、*StPEPC* 和 *NiPEPC1*、*AhPEPC1* 和 *RcPEPC*、*SbPEPC* 和 *ZmPEPC2*、*SiPEPC1* 和 *SbPEPC1*、*SbPEPC3* 和 *ZmPEPC1*, 这些相同或不同物种的 PEPC 基因聚在一起表明, 它们可能由共同祖先进化而来, 而且具有类似的生物功能。

2.4 *SiPEPC* 家族基因苗期非生物逆境胁迫下表达分析

由图 4 可知, 谷子三叶一心期幼苗在 4 种胁迫处理下, 除 *SiPEPC4* 由于表达量低未检测到信号外, 其他 5 个 *SiPEPC* 基因在不同时间点表达水平变化趋势不完全相同。*SiPEPC6* 在 ABA 胁迫处理下所有时间点表达量均下调, 其他基因表达量在 4 种胁迫处理过程中至少 1 个时间点有所上调。*SiPEPC1* 在 ABA-12 h、Cold-24 h、PEG-12 h、NaCl-12 h 时其相对表达量达最高, 分别为对照的 8.20、9.70、4.85、9.93 倍; *SiPEPC2* 在 ABA-12 h、Cold-24 h、PEG-6 h、NaCl-6 h 时其相对表达量达最高, 分别为对照的 4.81、8.77、5.69、21.38 倍; *SiPEPC3* 在 ABA-6 h、Cold-24 h、PEG-24 h、NaCl-6 h 时其相对表达量达最高, 分别为对照的 13.91、1.34、3.55、3.22 倍; *SiPEPC5* 在 ABA-6 h、Cold-24 h、PEG-24 h、NaCl-12 h 时其相对表达量达最高, 分别为对照的 16.00、31.70、4.31、9.24 倍; 而 *SiPEPC6* 在 ABA-12 h、Cold-24 h、PEG-12 h、NaCl-12 h 时其相对表达量达最高, 分别为对照的 0.93、5.19、3.53、15.68 倍。试验表明 5 个 *SiPEPC* 基因都参与了苗期谷子对逆境胁迫的响应。

2.5 不同生育期干旱胁迫及不同光照强度下表达分析

为进一步了解 PEPC 基因在谷子不同生育期干旱胁迫下的表达情况, 本研究检测了它们在 3 个关键生育时期(拔节期、抽穗期和灌浆期)干旱胁迫及不同

图 2 PEPC 家族蛋白序列的氨基酸序列多重比对

Fig. 2 Amino acid sequence alignment of PEPCs

AtPEPC1, AtPEPC2, AtPEPC3: 拟南芥 AtPEPC1, AtPEPC2, AtPEPC3; SbPEPC1, SbPEPC2, SbPEPC3: 高粱 SbPEPC1, SbPEPC2, SbPEPC3; GmPEPC: 大豆 GmPEPC; ZmPEPC1, ZmPEPC2: 玉米 ZmPEPC1, ZmPEPC2; StPEPC: 马铃薯 StPEPC; AhPEPC: 花生 AhPEPC; RcPEPC: 蓖麻 RcPEPC; NtPEPC: 烟草 NtPEPC。对应 GenBank 蛋白序列号分别为 Q9MAH0.1、Q5GM68.2、Q84VW9.2、P29195.1、P29194.1、P15804.2、P51061.1、P04711.2、P51059.1、P29196.2、ABY87944.1、ABR29878.1、P27154.1。相同氨基酸残基用黑色表示, 相似氨基酸残基用灰色表示(相似性 $\geq 60\%$)。

AtPEPC1, AtPEPC2, AtPEPC3: *Arabidopsis thaliana* AtPEPC1, AtPEPC2, AtPEPC3; SbPEPC1, SbPEPC2, SbPEPC3: *Sorghum bicolor* SbPEPC1, SbPEPC2, SbPEPC3; GmPEPC: *Glycine max* GmPEPC; ZmPEPC1, ZmPEPC2: *Zea mays* ZmPEPC1, 2; StPEPC: *Solanum tuberosum* StPEPC; AhPEPC: *Arachis hypogaea* AhPEPC; RcPEPC: *Ricinus communis* RcPEPC; NtPEPC: *Nicotiana tabacum* NtPEPC. The corresponding GenBank protein numbers are Q9MAH0.1, Q5GM68.2, Q84VW9.2, P29195.1, P29194.1, P15804.2, P51061.1, P04711.2, P51059.1, P29196.2, ABY87944.1, ABR29878.1, and P27154.1, respectively. The amino acids with an entire homology are shown by a black background, and those shared non-identical conserved identity by a gray background ($\geq 60\%$ similarity).

光照强度下的表达情况。由图 5 可知, *SiPEPC1*、*SiPEPC2* 在正常抽穗期、灌浆期表达量与拔节期相比均有明显提升, 而 *SiPEPC3*、*SiPEPC5*、*SiPEPC6* 在抽穗期表达量下降, 在灌浆期表达量较拔节期有明显提升。干旱胁迫下, *SiPEPC1*、*SiPEPC2*、*SiPEPC3* 在抽穗期、灌浆期表达量与拔节期相比也有明显提升, *SiPEPC5* 在灌浆期、抽穗期表达量与拔节期相比呈现先升后降趋势, 而 *SiPEPC6* 呈现先降后升趋势。表明大部分 *SiPEPC* 基因在正常生长条

件下其表达随谷子生长发育进程呈现增强趋势, 在不同生育期干旱胁迫下其表达量趋势都有明显增加, 揭示这 5 个 *SiPEPC* 基因在关键生育时期都参与了对干旱胁迫的响应。

由图 6 可知, 所有 *SiPEPC* 基因热图颜色从 J-1 期(拔节期对照)偏黑红色向在 J-2 期(拔节期干旱)的鲜红色转变, 即所有基因在 J-2 期表达量与 J-1 期相比均有所提高, 也就是说拔节期干旱诱导了所有 *SiPEPC* 基因的表达。但在 J-3 期(拔节期中等光照)

条件下所有基因表达量全部下降, 而在 J-4 期(拔节期弱光照)所有基因表达量又全部上升。试验结果说明拔节期光照强度影响 *SiPEPC* 基因表达, 弱光条件能诱导 *SiPEPC* 基因在拔节期的表达。与拔节期

图 3 不同物种 PEPC 蛋白的进化关系
Fig. 3 Phylogenetic relationships of PEPC proteins from different species

图 4 *SiPEPC* 基因苗期逆境表达谱
Fig. 4 Expression profile of *SiPEPC* gene under stresses at seedling stage
图中浅绿、深绿、黑色、浅红、深红 5 种颜色代表基因表达水平。绿色表示基因表达弱, 红色表示基因表达强。
Light green, dark green, black, light red and dark red are used to represent gene expression levels. Green indicates weak gene expression; red indicates strong gene expression.

(图 5)

图 5 正常和干旱条件下 *SiPEPC* 基因在不同发育阶段的相对表达量

Fig. 5 Relative expression of *SiPEPCs* during different growth stages under normal and drought conditions

*表示在 0.05 水平上显著; **表示在 0.01 水平上显著。

* Significantly different at $P < 0.05$; ** Significantly different at $P < 0.01$.

图 6 光照和干旱条件下 *SiPEPC* 的相对表达量

Fig. 6 Relative expression of *SiPEPC* under light and drought conditions

图中浅绿、深绿、黑色、浅红、深红五色代表基因表达水平。绿色表示基因表达弱, 红色表示基因表达强。J-1: 拔节期对照; J-2: 拔节期干旱; J-3: 拔节期中等光照; J-4: 拔节期弱光照; H-1: 抽穗期对照; H-2: 抽穗期干旱; H-3: 抽穗期中等光照; H-4: 抽穗期弱光照; F-1: 灌浆期对照; F-2: 灌浆期干旱; F-3: 灌浆期中等光照; F-4: 灌浆期弱光照。

Light green, dark green, black, light red, and dark red are used to represent gene expression levels. Green indicates weak gene expression; red indicates strong gene expression. J-1: control at jointing stage; J-2: drought at jointing stage; J-3: medium light intensity at jointing stage; J-4: weak light intensity at jointing stage; H-1: control at heading stage; H-2: drought at heading stage; H-3: medium light intensity at heading stage; H-4: weak light intensity at heading stage; F-1: drought at filling stage; F-2: drought at filling stage; F-3: medium light intensity at filling stage; F-4: weak light intensity at filling stage.

相似, 在 H-2 期(抽穗期干旱)所有基因表达量较对照 H-1 期(抽穗期对照)均有明显提高, 但在 H-3 (抽穗期中等光照)和 H-4 (抽穗期弱光照)条件下所有基因表达量都是下降的。说明抽穗期干旱诱导了所有 *SiPEPC* 基因的表达, 抽穗期中等、弱光照抑制 *SiPEPC* 基因的表达。在灌浆期的各个处理下(F-1、F-2、F-3、F-4), 除了 *SiPEPC3* 在 F-2 期(灌浆期)干

旱表达量提升外, 其他所有基因在各处理下表达量均呈下降趋势。说明灌浆期大部分 *SiPEPC* 基因在干旱、中等和弱光照处理下表达量下降, 揭示 *SiPEPC* 基因在灌浆期可能对干旱、中等光照以及弱光照响应较弱。

3 讨论

本研究在谷子基因组中检索得到 6 个 *SiPEPC* 基因, 序列比对显示, 谷子 *PEPC* 基因序列相似性很高, 揭示它们在进化上非常保守。系统进化树(图 3)表明, 在单、双子叶植物分离以前 *PEPC* 基因就已经存在。进化树中谷子成员多与高粱、玉米成员紧密嵌合在一起, 而与拟南芥、马铃薯、花生、蓖麻、烟草成员相对较远, 揭示了谷子与高粱、玉米亲缘关系相对较近, 而与拟南芥、马铃薯、花生、蓖麻、烟草亲缘关系相对较远。值得一提的是, *SiPEPC4* 基因由于在进化过程中存在一些片段的插入和缺失, 而且在基因组成上含有 20 个内含子, 远比其他 *SiPEPC* 基因内含子数目多, 因此推测 *SiPEPC4* 在功能上可能与其他 *SiPEPC* 基因有所不同。随后的表达分析也证明了这一点, 在所有表达谱分析中都检测不到 *SiPEPC4* 基因的表达, 说明 *SiPEPC4* 与其他 *SiPEPC* 基因在功能上有明显不同, 可能参与了谷子生长与发育中的其他信号途径。另外在进化树中发现一些同源基因对, 揭示这些同源基因对可能由共同祖先进化而来, 另一方面也暗示它们在某些信号通路中可能具有相似的功能。

随后本研究对谷子 6 个 *SiPEPC* 基因生物信息学特征进行了系统的预测和分析, 期望能够发现对于功能研究有帮助信息。预测结果显示, *SiPEPC* 成员很多性状和参数非常接近类似, 比如亚细胞定位分析 *SiPEPC* 成员都主要被定位在细胞质、细胞核和线粒体, 这些位置都是植物光合作用的关键位置, 揭示了 *SiPEPC* 基因可能在植物光合作用信号途径中起比较重要作用。这些结论不仅验证了它们同属

PEPC 基因家族, 而且预示不同 *SiPEPC* 基因可能共同参与或调控某些信号途径。顺式元件分析表明, 在 *SiPEPC* 启动子区域含有 ABA、低温、干旱和防御应激反应等顺式元件。一般来讲如果基因启动子区域存在某种顺式元件则暗示该基因很可能参与相应的信号途径^[33]。研究表明在非生物逆境, 比如干旱、盐、低温、高温以及伤害等胁迫下会导致植物细胞内的 ABA 水平升高, 而且众所周知, ABA 是在非生物逆境应答中起重要作用的激素^[34-36]。因此我们推测谷子 *SiPEPC* 家族基因很可能参与植物对非生物逆境胁迫的响应。

Real-time PCR 检测结果表明, 5 个谷子 *SiPEPC* 基因在 4 种处理下其表达量有显著变化, 除了几乎所有基因表达量在 4 种胁迫处理过程中至少 1 个时间点均有所上调。试验结果表明, 谷子 *SiPEPC* 家族基因广泛参与了植物苗期非生物逆境胁迫应答。本研究结果同已有关于 PEPC 在逆境应答方面研究结果是相一致的^[19-21]。为了进一步了解 *SiPEPC* 在不同关键生育期干旱胁迫下的表达情况, 本研究检测了 *SiPEPC* 成员在关键生育期(拔节期、抽穗期和灌浆期)干旱胁迫及不同光照强度(中等光照强度 I 和弱光照强度 II)下的表达情况。如图 5 所示, 试验结果表明 *SiPEPC* 基因成员不同处理下表达情况各有特点。例如在正常条件下 *SiPEPC1*、*SiPEPC2* 在抽穗期、灌浆期表达量较拔节期均有明显提升, 而 *SiPEPC3*、*SiPEPC5*、*SiPEPC6* 在抽穗期表达下降, 在灌浆期表达明显提升。*SiPEPC1*、*SiPEPC2*、*SiPEPC3* 在干旱胁迫下抽穗期、灌浆期表达较拔节期也有明显提升, *SiPEPC5* 在灌浆期、抽穗期表达量呈现先升后降趋势, 而 *SiPEPC6* 呈现先降后升趋势。结果揭示 *SiPEPC* 基因在正常生长条件下随着谷子生长发育进程其表达趋势增强, 在不同生育期干旱胁迫下其表达量趋势都明显增加, 表明 5 个 *SiPEPC* 基因在不同生育期都参与了对干旱胁迫下的响应。不同生育期干旱、不同光照处理下表达分析(图 6)表明, 所有 *SiPEPC* 基因在 J-2 期(拔节期干旱)表达量提高, 但在 J-3 期(拔节期中等光照)全部下降, 而在 J-4 期(拔节期弱光照)又全部上升。在 H-2 期(抽穗期干旱)所有基因表达量均有明显提高, 但在 H-3 (抽穗期中等光照) H-4 (抽穗期弱光照)条件下都是下降的。在灌浆期的各个处理下(F-1、F-2、F-3、F-4), 只有 *SiPEPC3* 在 F-2 期(灌浆期)干旱表达量提升, 其他所有基因在各处理下表达量均呈下降趋势。试验结果

说明拔节期干旱和弱光条件能诱导 *SiPEPC* 基因的表达, 抽穗期干旱诱导了所有 *SiPEPC* 基因的表达, 灌浆期大部分 *SiPEPC* 基因在干旱、中等和弱光照处理下表达量下降, *SiPEPC* 基因参与了拔节期和抽穗期的干旱胁迫响应, 不同光照强度影响 *SiPEPC* 基因在不同生育期的表达, 弱光可诱导 *SiPEPC* 基因在拔节期的表达。光强对 PEPC 有调节作用, 穗期玉米遮阴后其叶片的 PEPC 活性显著降低, 且随光照强度的减弱而加剧, 穗期遮阴结束后 PEPC 活性能恢复到对照水平^[37]。本研究结果只表明弱光可诱导 *SiPEPC* 基因在拔节期的表达, 未出现随光照强度的减弱而诱导加剧情况, 而在谷子抽穗期和灌浆期大部分 *SiPEPC* 基因没有检测到弱光能诱导 PEPC 表达的现象。这可能是谷子与玉米物种差别或是 PEPC 基因在不同生育期功能差别造成, 需要我们下一步详尽的试验验证, 但是这些结果进一步验证了顺式元件分析结果, 证明了 *SiPEPC* 基因在植物逆境应答中起一定作用。顺式元件分析还显示在 *SiPEPC* 基因启动子区域存在茉莉酸甲酯、水杨酸、赤霉素顺式原件。研究表明病原体感染通常导致细胞中茉莉酸甲酯、水杨酸、乙烯等激素水平的增加^[38], 因此推断 *SiPEPC* 基因可能在生物应激反应中起一些作用。此外还发现了缺氧特异性诱导(GC-motif)、分生组织表达(CAT-box)、厌氧诱导必需(ARE)、玉米醇溶蛋白代谢调控(O2-site)、种子特异性调控(RY-element)、昼夜节律(circadian)等核心元件, 这些顺式元件的存在暗示 PEPC 可能参与相应的生理生化过程。需要注意的是在启动子区域还发现了大量的光应答元件, 众所周知谷子是光温敏感性作物, 而且 PEPC 是光合作用中的关键酶, 预示 *SiPEPC* 可能参与调控谷子的光温应答调控并在其中起重要作用。

本文报道的谷子 *SiPEPC* 基因也为进一步阐明 *SiPEPC* 在谷子逆境应答中的功能、机制提供了试验依据。尽管这些结论与推测需进一步严谨详尽的试验证明, 但是仍然为我们理解 C_4 植物的关键酶 PEPC 在非生物逆境下的表达特征及光强对植物 PEPC 基因表达特性影响提供有益线索, 对深入了解 C_4 植物光合特点对提高 C_3 植物的光合效率和对 C_3 植物的改造将具有一定意义。

4 结论

从谷子全基因组中鉴定出 6 个 PEPC 基因成员, 集中分布在谷子的 1 号、2 号、4 号、5 号染色体上。

所有蛋白序列高度保守,都具有 PEPC 基因特征保守功能域 PEPcase。谷子 PEPC 家族基因成员主要存在于细胞质、细胞核和线粒体。*SiPEPC* 家族基因广泛参与了谷子苗期非生物逆境胁迫应答。*SiPEPC* 成员参与了谷子在拔节、抽穗、灌浆期的干旱应答,而光照强度会严重影响 *SiPEPC* 基因在不同生育期的表达。

References

- [1] Hibberd J M, Quick W P. Characteristics of C₄ photosynthesis in stems and petioles of C₃ flowering plants. *Nature* (London), 2002, 415: 451–454.
- [2] Lara M V, Chuong S D X, Akhani H, Andreo S C, Edwards G E. Species Having C₄ single-cell-type photosynthesis in the chenopodiaceae family evolved a photosynthetic phosphoenolpyruvate carboxylase like that of kranz-type C₄ species. *Plant Physiol*, 2006, 142: 673–684.
- [3] Merkelbach S, Gehlen J, Denecke M, Hirschet H J, Kreuzaler F. Cloning, sequence analysis and expression of a cDNA encoding active phosphoenolpyruvate carboxylase of the C₃ plant *Solanum tuberosum*. *Plant Mol Biol*, 1993, 23: 881–888.
- [4] Hart Y, Mayo A E, Milo R, Alon U. Robust control of PEP formation rate in the carbon fixation pathway of C₄ plants by a bi-functional enzyme. *BMC Systems Biol*, 2011, 5: 171.
- [5] 魏绍巍, 黎茵. 植物磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶的功能及其在基因工程中的应用. *生物工程学报*, 2011, 27: 1702–1710.
Wei S W, Li Y. Functions of plant phosphoenolpyruvate carboxylase and its applications for genetic engineering. *Chin J Biotechnol*, 2011, 27: 1702–1710 (in Chinese with English abstract).
- [6] Lebouteiller B, Gousset-Dupont A, Pierre J N, Bleton J, Tchapl A, Maucourt M, Moing A, Rolin D, Vidal J. Physiological impacts of modulating phosphoenolpyruvate carboxylase levels in leaves and seeds of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci*, 2007, 172: 265–272.
- [7] Muramatsu M, Suzuki R, Yamazaki T, Miyao M. Comparison of plant-type phosphoenolpyruvate carboxylases from rice: identification of two plant-specific regulatory regions of the allosteric enzyme. *Plant Cell Physiol*, 2015, 56: 468–480.
- [8] Sanchez R, Cejudo F J. Identification and expression analysis of a gene encoding a bacterial-type phosphoenolpyruvate carboxylase from *Arabidopsis* and rice. *Plant Physiol*, 2003, 132: 949–957.
- [9] Dong L Y, Masuda T, Kawamura T, Hata S, Izui K. Cloning, expression, and characterization of a root-form phosphoenolpyruvate carboxylase from *Zea mays*: comparison with the C₄-form enzyme. *Plant Cell Physiol*, 1998, 39: 865–873.
- [10] Besnard G, Pincon G, Dhonta A, D'Hont A, Hoarau J Y, Cadet F, Offmann B. Characterisation of the phosphoenolpyruvate carboxylase gene family in sugarcane (*Saccharum* spp.). *Theor Appl Genet*, 2003, 107: 470–478.
- [11] Sullivan S, Jenkins G I, Nimmo H G. Roots, cycles and leaves: Expression of the phosphoenolpyruvate carboxylase kinase gene family in soybean. *Plant Physiol*, 2004, 135: 2078–2087.
- [12] 蔡小宁, 陈茜, 杨平, 任源浩. 磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶的生物信息学分析. *安徽农业科学*, 2008, 36: 914–916.
- [13] 焦进安. 植物磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶的多生理功能. *植物生理学通讯*, 1987, (1): 40–43.
Jiao J A. Multiple function of phosphoenolpyruvate carboxylase in plants. *Plant Physiol Commun*, 1987, (1): 40–43 (in Chinese).
- [14] Bandyopadhyay A, Datta K, Zhang J, Yang W, Raychaudhuri S, Miyao M. Enhanced photosynthesis rate in genetically engineered *indica* rice expressing *pepc* gene cloned from maize. *Plant Sci* (Oxford), 2007, 172: 1204–1209.
- [15] 丁在松, 周宝元, 孙雪芳, 赵明. 干旱胁迫下 PEPC 过表达增强水稻的耐强光能力. *作物学报*, 2012, 38: 285–292.
Ding Z S, Zhou B Y, Sun X F, Zhao M. High light tolerance is enhanced by overexpressed PEPC in rice under drought stress. *Acta Agron Sin*, 2012, 38: 285–292 (in Chinese with English abstract).
- [16] 焦德茂, 李霞, 黄雪清, 迟伟, 匡廷云, 古森本. 转 PEPC 基因水稻的光合 CO₂ 同化和叶绿素荧光特性. *科学通报*, 2001, 46: 414–418.
Jiao D M, Li X, Huang X Q, Chi W, Kuang T Y, Gu S B. Photosynthetic CO₂ assimilation and chlorophyll fluorescence characteristics of transgenic PEPC rice. *Chin Sci Bull*, 2001, 46: 414–418 (in Chinese).
- [17] 方立锋, 丁在松, 赵明. 转 *ppc* 基因水稻苗期抗旱特性研究. *作物学报*, 2008, 34: 1220–1226.
Fang L F, Ding Z S, Zhao M. Characteristics of drought tolerance in *ppc* overexpressed rice seedlings. *Acta Agron Sin*, 2008, 34: 1220–1226 (in Chinese with English abstract).
- [18] Jeanneau M, Gerentes D, Foueillassar X, Zivy M, Vidal J, Toppan A, Perez P. Improvement of drought tolerance in maize: towards the functional validation of the *Zm-Asr1* gene and increase of water use efficiency by over-expressing C₄-PEPC. *Biochimie*, 2002, 84: 1127–1135.
- [19] Gonzalez M C, Sanchez R, Cejudo F J. Abiotic stresses affecting water balance induce phosphoenolpyruvate carboxylase expression in roots of wheat seedlings. *Planta*, 2003, 216: 985–992.
- [20] Sanchez R, Flores A, Cejudo F J. Arabidopsis phosphoenolpyruvate carboxylase genes encode immunologically unrelated polypeptides and are differentially expressed in response to drought and salt stress. *Planta*, 2006, 223: 901–909.
- [21] García-Maurino S, Monreal J, Alvarez R, Vidal J, Echevarría C. Characterization of salt stress-enhanced phosphoenolpyruvate carboxylase kinase activity in leaves of sorghum vulgare: independence of osmotic stress, involvement of iontoxicity and significance of dark phosphorylation. *Planta*, 2003, 216: 648–655.
- [22] 智慧, 牛振刚, 贾冠清, 柴杨, 李伟, 王永芳, 李海权, 陆平, 白素兰, 刁现民. 谷子干草饲用品质性状变异及相关性分析. *作物学报*, 2012, 38: 800–807.
Zhi H, Niu Z G, Jia G Q, Chai Y, Li W, Wang Y F, Li H Q, Lu P, Bai S L, Diao X M. Variation and correlation analysis of hay forage quality traits of foxtail millet [*Setaria italica* (L.) Beauv.]. *Acta Agron Sin*, 2012, 38: 800–807 (in Chinese with English abstract).
- [23] Devos K M, Wang Z M, Beales J, Sasaki T, Gale M D.

- Comparative genetic maps of foxtail millet (*Setaria italica*) and rice (*Oryza sativa*). *Theor Appl Genet*, 1998, 96: 63–68.
- [24] Jayaraman A, Puranik S, Rai N K, Vidapu S, Sahu P P, Lata C, Prasad M. cDNA-AFLP analysis reveals differential gene expression in response to salt stress in foxtail millet (*Setaria italica* L.). *Mol Biotechnol*, 2008, 40: 241–251.
- [25] 赵晋锋, 余爱丽, 田岗, 杜艳伟, 郭二虎, 刁现民. 谷子 CBL 基因鉴定及其在干旱, 高盐胁迫下的表达分析. *作物学报*, 2013, 39: 360–367.
- Zhao J F, Yu A L, Tian G, Du Y W, Guo E H, Diao X M. Identification of CBL genes from foxtail millet (*Setaria italica* [L.] Beauv.) and its expression under drought and salt stresses. *Acta Agron Sin*, 2013, 39: 360–367 (in Chinese with English abstract).
- [26] 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: 549–554.
- [27] 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, 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: 555–561.
- [28] Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. A novel *cis*-acting element in an *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress. *Plant Cell*, 1994, 6: 251–264.
- [29] Yu C S, Chen Y C, Lu C H, Hwang J K. Prediction of protein subcellular localization. *Proteins*, 2006, 64: 643–651.
- [30] Larkin M A, Blackshields G, Brown N P, Chenna R, Mcgettigan P A, McWilliam H, Valentin F, Wallace I M, Wilm A, Lopez R. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 2007, 23: 2947–2948.
- [31] Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol*, 2013, 30: 2725–2729.
- [32] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$. *Methods*, 2001, 25: 402–408.
- [33] Narusaka Y, Nakashima K, Shinwari Z K, Sakuma Y, Furihata T, Abe H, Narusaka M, Shinozaki K, Yamaguchi-shinozaki K. Interaction between two *cis*-acting elements, ABRE and DRE, in ABA-dependent expression of *Arabidopsis rd29A* gene in response to dehydration and high-salinity stresses. *Plant J*, 2003, 621: 137–148.
- [34] Nakashima K, Yamaguchi-shinozaki K. ABA signaling in stress-response and seed development. *Plant Cell Rep*, 2013, 32: 959–970.
- [35] Verma V, Ravindran P, Kumar P P. Plant hormone-mediated regulation of stress responses. *BMC Plant Biol*, 2016, 16: 86.
- [36] Zhang J, Jia W, Yang J, Ismail A M. Role of ABA in integrating plant responses to drought and salt stresses. *Field Crops Res*, 2006, 97: 111–119.
- [37] 张吉旺, 董树亭, 王空军, 胡昌浩, 刘鹏. 大田遮荫对夏玉米光合特性的影响. *作物学报*, 2007, 33: 216–222.
- Zhang J W, Dong S T, Wang K J, Hu C H, Liu P. Effects of shading in field on photosynthetic characteristics in summer corn. *Acta Agron Sin*, 2007, 33: 216–222 (in Chinese with English abstract).
- [38] Bari R, Jones J D. Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Mol Biol*, 2009, 69: 473–488.