

谷子酸性磷酸酶 ACP 家族基因鉴定与 *SiACP1* 耐低磷单倍型分析

赵雄伟¹, 吴年隆², 乔佳辉¹, 李旭凯¹, 韩渊怀³, 邢国芳³

(1. 山西农业大学 生命科学学院, 山西 太谷 030801; 2. 山西农业大学 文理学院, 山西 太谷 030801;
3. 山西农业大学 农学院, 山西 太谷 030801)

摘要: 细胞内酸性磷酸酶(ACP)是一种将液泡内的磷酸酯水解为无机磷的酶,普遍存在于植物组织中,在调控植物磷营养方面起着重要作用。谷子具有耐贫瘠特性,蕴藏着重要的耐低磷优异位点。挖掘谷子 *SiACP* 基因的关键变异位点和单倍型,促进分子标记辅助培育新品种,是解决土壤有效磷缺乏的主要遗传育种途径之一。通过同源序列比对的方式共获得了 13 个谷子以及其他 3 种禾本科作物的 ACP 家族基因,并对其进行生物信息学分析,结果发现,ACP 家族基因在禾本科作物的数量和分布具有一定的规律性,均具有高度保守的磷酸酶结构域和基序。通过家族进化树分析发现,单子叶植物 ACP 基因与双子叶植物 ACP 基因在进化过程中出现明显的分支。转录组数据的表达模式结果显示,C4 植物谷子的 *SiACP1* 基因表达模式具有明显的组织表达特异性,而 *SiACP2* 和 *SiACP3* 基因在整个生长发育阶段的不同组织表达量均较高。通过候选基因关联分析和单倍型分析发现,位于 *SiACP1* 启动子的 SNP 与耐低磷相关性状显著关联,并初步鉴定到一个与谷子耐低磷性状相关的有利单倍型 ACPHap2。研究结果将为作物耐低磷优良种质育种提供一定的基因遗传信息参考。

关键词: 谷子; ACP 家族基因; 耐低磷; 单倍型

中图分类号: S515.03; Q78 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2020)04-0035-11

doi: 10.7668/hbxb.20191202



Identification of the Acid Phosphatase-encoding Family Genes in Foxtail Millet and *SiACP1* Haplotype Analysis with Low Phosphorus Tolerance

ZHAO Xiongwei¹, WU Nianlong², QIAO Jiahui¹, LI Xukai¹, HAN Yuanhuai³, XING Guofang³

(1. College of Life Sciences, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China;

2. College of Arts and Sciences, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China;

3. College of Agriculture, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China)

Abstract: Intracellular acid phosphatase (ACP) is an enzyme which hydrolyzes phospholipids in vacuoles to inorganic phosphorus. The ACP enzyme is also ubiquitous in plant tissues and plays an important role in regulating plant phosphorus nutrition. It will be one of the main genetic and breeding approaches to solve the deficiency of available phosphorus in soil by developing new varieties assisted superior alleles and haplotypes in *SiACP* genes. First identified 13 ACP family genes from foxtail millet and other three gramineous crops by homologous alignment. After systematic bioinformatics analysis, it was found that the number and distribution of ACP family genes in gramineous crops had certain regularity, and they all had highly conserved phosphatase domains and motifs. In addition, through the analysis of family evolutionary tree, it was found that the ACP genes of monocotyledons and dicotyledons had obvious branches in the evolutionary process. Finally, expression pattern analysis of transcriptome data showed that *SiACP1* genes in foxtail millet apparently exhibited a tissue specific expression, while the higher expression of *SiACP2* and *SiACP3* genes was found in different tissues through the growth and development stage. Mean-

收稿日期: 2020-03-20

基金项目: 国家自然科学基金项目(31901598); 山西农业大学科技创新基金项目(2018YJ050); 山西省优秀博士来晋工作奖励资金科研项目(SXYBKY2019006); 山西省高等学校科技创新项目(2019L0367)

作者简介: 赵雄伟(1988-), 男, 甘肃陇西人, 讲师, 博士, 主要从事谷子逆境分子遗传育种研究。

通讯作者: 邢国芳(1981-), 女, 山西夏县人, 副教授, 博士, 主要从事杂粮优异种质功能基因组研究。

while, through candidate gene association analysis and haplotype analysis, SNPs located in *SiACP1* promoter was significantly associated with the traits with low phosphorus tolerance. Interestingly, a haplotype ACPHap2 which was favorable to low phosphorus tolerance of foxtail millet was preliminarily identified. Research results will provide some genetic information reference for the discovery of excellent germplasm with low phosphorus tolerance and molecular breeding of crops in further.

Key words: Foxtail millet; ACP family gene; Low phosphorus tolerance; Haplotype

磷作为维持植物生长发育等生命活动必需的重要矿质元素,对作物的新陈代谢、生长发育、高产及优质具有重要意义。土壤一旦缺磷,将会严重限制作物产量和品质的提升。在我国,土壤有效磷低于 10 mg/kg 的土壤面积占总耕地面积的 50% 左右^[1]。即使土壤中总磷含量较高,绝大部分有效磷也会很快被土壤胶体吸附或固定,只有 20%~30% 的磷酸盐被植物吸收和利用^[2]。虽然施用磷肥能缓解土壤中磷素供应不足,但是磷矿资源枯竭已成为一个全球普遍关心的问题,而且过度施用磷肥会使水体富营养化。当土壤磷含量较低时,磷高效型品种通过根系吸收、磷素的转运能力和体内对磷同化代谢的能力(代谢效率)获取足够的有效磷来维持植株的正常生长^[3]。因此,利用分子生物学手段解析植物自身转换有机磷的分子机制,对提高作物产量和品质具有重要的生态环境意义。

酸性磷酸酶(Acid Phosphatase, ACP)是一种在酸性条件下水解磷酸酯并释放出磷酸的酶,普遍存在于植物组织中,与植物体的有机磷分解再利用有着密切的关系。目前,关于低磷诱导的磷酸酶研究可分为 2 类:一类是分泌型酸性磷酸酶,能将衰老组织中的有机磷再活化并被转运至幼嫩组织中,如 Robinson 等^[4]研究发现,紫色酸性磷酸酶 AtPAP26 可促进拟南芥衰老叶片磷的再活化和再利用过程;而另一类是细胞内的酸性磷酸酶,在磷饥饿条件下,细胞内的活化酸性磷酸酶将液泡内的有机磷转化为无机磷,并通过液泡膜上的磷转运蛋白向细胞质转运,从而维持细胞质中磷含量的动态平衡。近 10 a 来,关于分泌型紫色酸性磷酸酶(PAP)的研究较多,主要集中在根系分泌紫色酸性磷酸酶的功能及其调控机制等领域^[5],而对细胞内尤其是液泡内的酸性磷酸酶研究较少。2014 年,Zhang 等^[6]通过全基因组关联分析方法研究发现了酸性磷酸酶基因 *GmACP1*,过表达 *GmACP1* 的大豆耐低磷特性显著提高。由此可见,细胞内的酸性磷酸酶在调控植物有机磷代谢过程中同样起着非常重要的作用。

谷子(*Setaria italica*)作为传统优质杂粮作物之一,具有较强的耐贫瘠特性,其蕴藏着丰富的种质

资源和重要的磷高效基因资源,如何快速鉴定耐低磷或磷高效基因的优异等位点,并应用于作物遗传改良是目前种质资源和基因资源研究的中心任务之一。

鉴于 ACP 家族基因在植物耐低磷方面的重要性,本研究鉴定了谷子基因组的胞内酸性磷酸酶 ACP 家族基因,并通过候选基因进行关联分析和单倍型分析,初步检测到一个耐低磷的关键 *SiACP1* 基因及其优异单倍型,旨在为谷子 *SiACP* 家族基因的功能研究和耐低磷分子育种提供新的基因遗传信息。

1 材料和方法

1.1 谷子 *SiACP* 家族基因的鉴定和生物信息学分析

为了筛选较为可靠的谷子 *SiACP* 家族基因,首先以功能已知的大豆 *GmACP1* (*Glyma08g20820*)^[6] 蛋白序列为模板,在大豆基因组(Wm82. a2. v1)数据库中进行搜索,进行同源序列 BlastP 比对(同源性 $P < 10e^{-10}$),以找到大豆的所有 ACP 家族基因;再利用 hmmbuild 软件对检索到的大豆 *GmACP* 基因建立 HMM 模型(Hidden Markov Model,隐马尔科夫模型);然后使用 Hmmssearch 软件搜索谷子基因组(<https://phytozome.jgi.doe.gov/>, *Setaria italica* v2.2)中的 ACP 家族基因;最后,利用 SMART 网站(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)检验谷子 ACP 家族基因的蛋白序列是否包括 HAD 保守结构域(PF12710),并将蛋白质分子质量大于 0.2 ku 的谷子 *SiACP* 基因作为谷子酸性磷酸酶 *SiACP* 家族基因成员。此外,利用 ExPASy ProtParam 在线软件(<https://web.expasy.org/protparam/>)分析谷子 *SiACP* 家族蛋白的分子量、等电点、疏水性等理化性质。

1.2 谷子 *SiACP* 家族基因系统进化分析

为了研究谷子、拟南芥、水稻、玉米、高粱和二穗短柄草 ACP 家族基因的进化关系,首先通过 Clustal X2.1 软件^[7] 比对不同物种的 ACP 蛋白序列。并使用 Mega 7.0 软件的 Neighbor Joining 方法展示不同物种 ACP 家族蛋白的系统发育树,参数 Bootstrap 值设为 1 000 次重复;并用 FigTree 软件构建不同物种间的 ACP 家族基因的系统进化树;然后使用 Gene

Structure Display Server 软件^[8]展示和绘制不同物种的 ACP 家族基因结构;最后,使用在线网站 MEME (<http://meme-suite.org/>)^[9]预测编码保守结构域的 motif, motif 的大小设定为 5~300 个氨基酸。

1.3 谷子 *SiACP* 家族基因的表达模式分析

基于水稻粳稻^[10]、玉米 B73^[11]以及 Phytozome 数据库(<https://phytozome.jgi.doe.gov>)公布的高粱 BT×623 和谷子豫谷 1 号(Yugu 1)转录组(RNA-seq)数据,筛选出 ACP 家族基因的 FPKM 值。并利用 R 语言 pheatmap 软件包绘制基因表达的热图,比较谷子和其他禾本科植物 ACP 家族基因在不同发育时期和不同组织表达模式的差异。

1.4 谷子 *SiACP* 基因变异位点与低磷相关性状的关联分析

为了鉴定到与耐低磷相关的谷子 *SiACP* 关键基因及其优异变异位点,采用了候选基因关联分析策略,基于中国农业科学院刁现民研究员团队^[12]提供的重测序核心谷子种质,用 TASSEL 3.0 软件提取出 *SiACP* 在不同种质中的 SNP 和 InDel,并将最小等位频率(MAF)阈值设为 0.05;然后分析多态性位点(SNP 和 InDel)在 *SiACP* 基因上的具体分布(启动子、5'-UTR、3'-UTR、内含子、外显子)和距离起始密码子 ATG 的距离(变异位点信息);最后结合 160 份核心谷子种质在正常磷和低磷条件下的苗期株高、根长、地上干质量和根干质量表型数据^[13],使用 TASSEL 3.0 软件的一般线性模型 GLM + Q 进行候选基因关联分析^[14-15]。当表型与基因 *SiACP* 多态性位点的关联 *P* 值小于 0.01 时,可被认为基因

SiACP 中对应的多态性位点与谷子耐低磷相关性状存在显著关联。

1.5 谷子耐低磷 *SiACP* 基因的单倍型分析

基于候选基因关联分析结果,对耐低磷相关性状显著关联的基因 *SiACP* 进行单倍型分析。从 160 份种质中挑选出 *SiACP* 基因的多态性位点,使用独自开发的 Perl 脚本 CandiHap.pl (<https://github.com/xukai/CandiHap>)进行单倍型统计,并对不同单倍型的核心种质进化划分归类,去除掉位点为 N(未知)的单倍型;最后用 R 语言的 Ggplot2 和 Ggsignif 软件包绘制对应的表型箱线图,并对不同单倍型的耐低磷相关表型进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 谷子与其他 3 种禾本科植物 ACP 家族基因的鉴定及理化性质分析

以大豆酸性磷酸酶 *GmACP1* 基因的蛋白序列为靶序列^[4],通过 HMM 模型预测和同源序列比对,从谷子和其他 3 种禾本科植物(水稻、高粱、玉米)的全基因组中共鉴定出 13 个 ACP 家族基因(表 1),按照与大豆 *GmACP* 基因的序列同源性顺序进行编号,并根据物种拉丁文名称将 4 种禾本科 ACP 基因编号为 *SiACP1*、*SiACP2*、*SiACP3*、*ZmACP1*、*ZmACP2*、*ZmACP3*、*ZmACP4*、*SbACP1*、*SbACP2*、*SbACP3*、*OsACP1*、*OsACP2*、*OsACP3*。通过生物信息学方法对所有禾本科植物 ACP 基因的染色体分布、编码区和氨基酸长度、分子量、等电点进行分析。由表 1 可知,禾本科植物的 ACP 基因数目和染色体

表 1 谷子和其他 3 种禾本科植物酸性磷酸酶 ACP 家族基因成员信息

Tab. 1 Information of phosphatase ACP family genes in foxtail millet and other three gramineous plants

禾本科植物 Gramineous plant	基因编号 Gene ID	基因名 Name	染色体 数/个 Chromosome	物理位置/bp Physical position	编码区 长度/bp CR	氨基酸 个数/个 AA	分子质 量/ku MW	等电点 PI
谷子	Seita.1G031100	<i>SiACP1</i>	1	2 913 024 - 2 914 559	906	301	32.15	5.19
<i>Setaria italica</i> (v2.2)	Seita.5G215500	<i>SiACP2</i>	5	27 504 777 - 27 509 131	957	318	35.28	6.39
Yugu 1	Seita.5G299700	<i>SiACP3</i>	5	35 461 022 - 35 462 252	828	275	29.81	4.98
玉米	Zm00001d011734	<i>ZmACP1</i>	8	160 235 115 - 160 235 972	858	285	31.03	5.26
<i>Zea mays</i> (v4)	Zm00001d016301	<i>ZmACP2</i>	5	156 275 281 - 156 276 773	978	325	34.86	7.15
B73	Zm00001d044395	<i>ZmACP3</i>	3	227 055 572 - 227 057 360	984	327	35.80	6.41
	Zm00001d043621	<i>ZmACP4</i>	3	205 387 381 - 205 388 211	831	276	29.96	4.99
高粱	Sb03g027020	<i>SbACP1</i>	3	54 136 438 - 54 138 163	963	320	30.35	6.20
<i>Sorghum bicolor</i> (v3.1.1)	Sb03g033100	<i>SbACP2</i>	3	61 499 183 - 61 500 472	837	278	30.29	2.08
BT×623	Sb04g008010	<i>SbACP3</i>	4	8 639 702 - 8 641 383	942	313	33.21	5.39
水稻	LOC_Os01g41660	<i>OsACP2</i>	1	23 583 981 - 23 586 159	855	284	31.46	5.47
<i>Oryza sativa</i> v7	LOC_Os01g52230	<i>OsACP1</i>	1	30 025 249 - 30 026 465	825	274	29.96	5.06
Nipponbare	LOC_Os02g13290	<i>OsACP3</i>	2	7 078 703 - 7 080 035	891	296	31.92	4.65

分布具有一定的规律性,谷子(基因组大小为 491 Mb)、水稻(466 Mb)和高粱(730 Mb)基因组上均鉴定到 3 个 ACP 家族成员,均分布在 2 条染色体上。其中,不同物种同一条染色体上的 2 个 ACP 基因距离为 6.40 ~ 7.95 Mb;而玉米基因组(2 300 Mb)上共鉴定到 4 个 ACP 基因,在 3 号染色体上也鉴定到 2 个 ACP 基因,其相互间距离为 21.67 Mb。

从编码区长度来看,4 种禾本科植物的 ACP 基因编码区长度为 825 ~ 984 bp,其中,最长编码区的基因和最短编码区的基因均出现在同一条染色体上。例如位于谷子第 5 号染色体上的 *SiACP2* 基因编码区长度为 957 bp,*SiACP2* 蛋白质由 318 个氨基酸组成;而 *SiACP3* 基因编码区长度为 828 bp,其蛋白质由 275 个氨基酸组成。除位于 5 号染色体上的玉米 *ZmACP2* 基因等电点大于 7 外,其他禾本科植物的 ACP 蛋白质等电点均小于 7,推测其编码弱酸性蛋白质,在酸性环境中发挥着一定的作用。鉴定到的所有 ACP 蛋白质分子质量为 29.81 ~ 35.80 ku,平均为 32.01 ku,且不同 ACP 蛋白质间的分子质量差异较小。

由此可见,ACP 家族基因在禾本科植物的数量和分布具有一定的规律性。玉米的基因组大小(2 300 Mb)明显大于其他禾本科植物基因组大小(466 ~ 730 Mb),其含有 4 个 *ZmACP* 基因;而其他的禾本科植物只有 3 个 ACP 基因,其中有 2 个 ACP 基因位于同一条染色体上,其编码区长度和氨基酸长度均存在明显的差异。所鉴定到的大部分 ACP 基因可能在酸性环境中发挥着重要的生物学功能。

2.2 谷子和其他物种的 ACP 基因进化和结构分析

为了研究谷子 *SiACP* 家族基因的进化关系,利

用谷子 *SiACP* (Yugu 1)、水稻 *OsACP* (粳稻)、玉米 *ZmACP* (B73)、高粱 *SbACP* (BT × 623)、拟南芥 *AtACP* (Col)、大豆 *GmACP* (Williams 82) 基因的蛋白序列构建了一个单子叶和双子叶物种间的进化关系树。根据系统发育树的结构可将 ACP 基因家族成员划分为 2 个亚家族,含 6 个簇 (I ~ VI) (图 1-A)。其中,第 1 亚族包含了所有双子叶植物的大豆 *GmACP* 和拟南芥 *AtACP* 蛋白,除了大豆 *Glyma08g03350* 蛋白外,其他的大豆 *GmACP* 基因不仅蛋白序列的相似性较高,而且均被聚类到第 1 簇中;而第 2 亚族中包含了所有单子叶的禾本科植物,包括谷子 *SiACP*、水稻 *OsACP*、高粱 *SbACP* 和玉米 *ZmACP* 蛋白;第 IV、V、VI 簇中至少包含一个 *SiACP*、*SbACP*、*ZmACP* 和 *OsACP* 基因家族成员。由此可见,单子叶植物与双子叶植物的 ACP 基因在进化过程中有着明显的序列差异,从而形成了单子叶植物 ACP 基因与双子叶植物 ACP 基因分支。从单子叶禾本科植物亲缘关系来看,C4 植物中 *ZmACP* 蛋白与 *SbACP* 蛋白亲缘关系最近,与 *SiACP* 蛋白亲缘关系次之,而与 C3 植物水稻 ACP 蛋白亲缘关系相对较远。由此可见,在禾本科植物间 ACP 家族基因的亲缘关系划分符合植物分类学特性。

通过绘制不同单子叶植物和双子叶植物的 ACP 基因结构发现(图 1-B),在单子叶植物中,第 V 簇水稻、高粱、玉米和谷子的 ACP 基因不含内含子,大豆 *Glyma08g03350* 和水稻 *OsACP3* 基因只含一个内含子。由此推测,这些 ACP 基因可能产生或分化的时间较晚,其功能相对专一。而其他单双子叶植物的 ACP 基因至少含有 2 个内含子,例如 *SbACP3*、*ZmACP2* 和 *ZmACP3* 均含 2 个内含子,大豆 *Glyma15g02670* 基因含有 5 个内

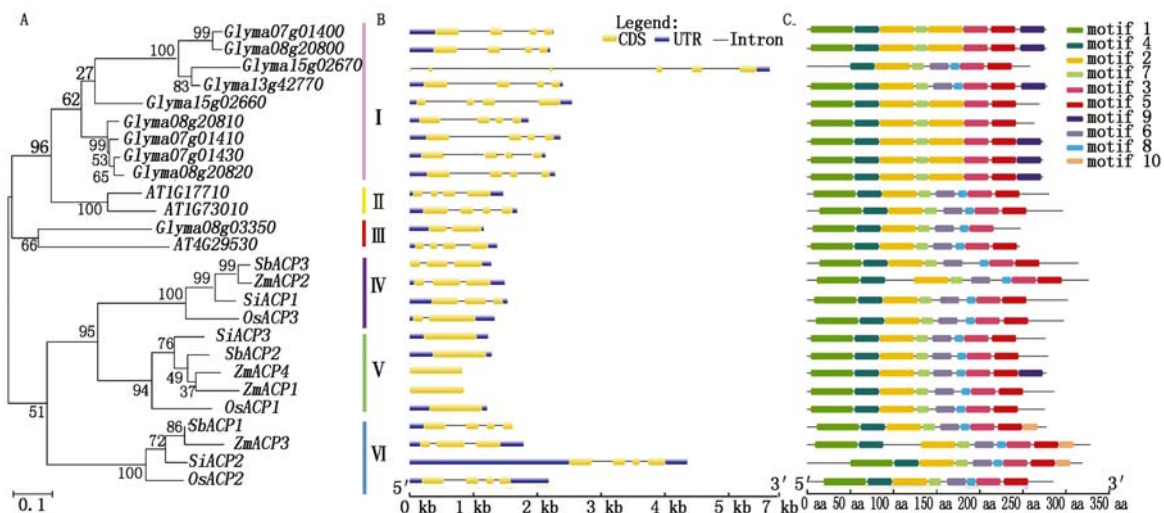


图 1 单双子叶植物 ACP 家族基因进化关系 (A)、基因结构分析 (B) 和蛋白 motif 组成成分分析 (C)

Fig. 1 The analysis of phylogenetic relationships (A), gene structure (B) and motif compositions (C) within ACP family genes in monocotyledon and dicotyledonous

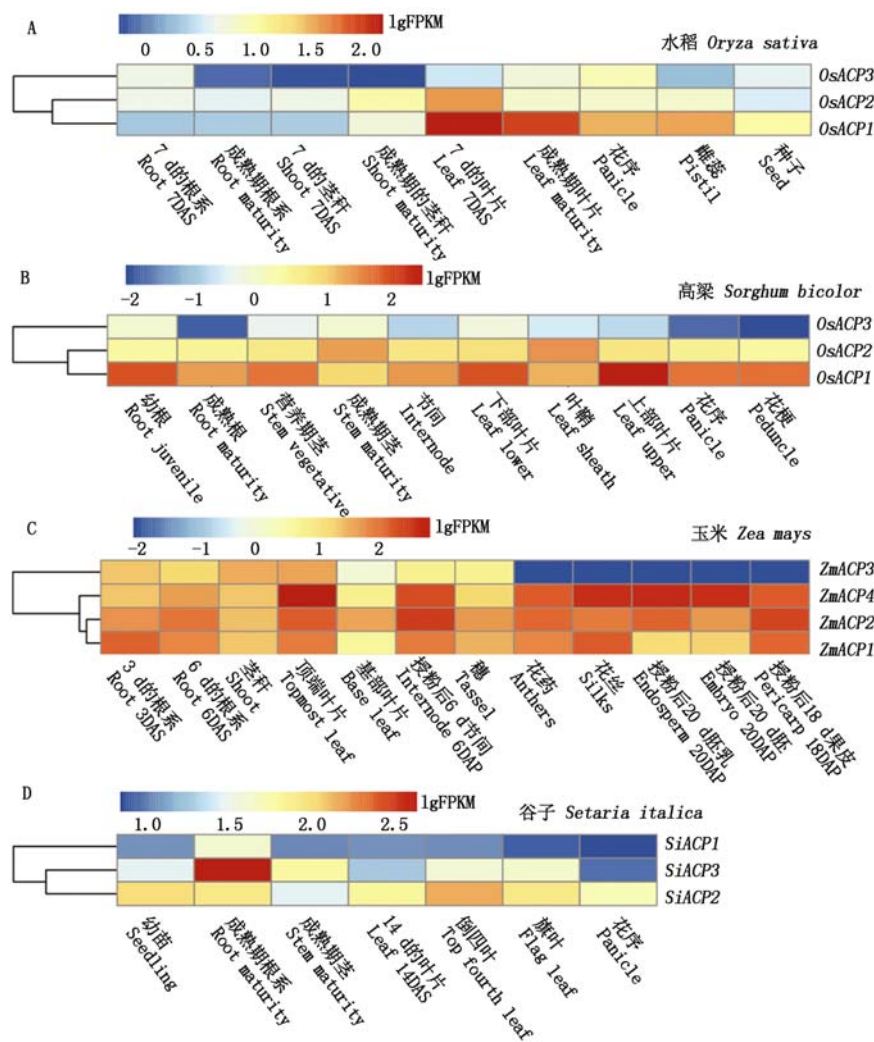
含子。谷子 *SiACP1*、*SiACP3*、*SiACP2* 基因分别含有 2,0,3 个内含子,表明 *SiACP* 基因在进化过程中其生物学功能具有明显的差异。

从不同单双子叶植物 ACP 基因的蛋白序列中共检测到 7~9 个假定的保守基序(motif)(图 1-C),包括 motif 1、motif 2 和 motif 3 编码的磷酸酶结构域。所有的 ACP 蛋白均包含 3~4 个磷酸酶结构域,同一簇的 ACP 蛋白保守基序类型及排列顺序基本一致。但是每个簇之间 motif 数目和组成成分存在一定的区别,例如第 I 簇除了 Glyma15g02670 和 Glyma13g42770 蛋白序列包含 motif 8 外,其他的大豆 GmACP 蛋白序列均不包含 motif 8;此外,II~VI 簇中除了 ZmACP4 外其他的 ACP 蛋白序列均包含 motif 9。ACP 家族蛋白除了磷酸酶结构域外,其他

特异的假定 motif 是否决定了 ACP 蛋白在单、双子叶植物的功能差异,还需进一步分析研究。

2.3 谷子 *SiACP* 家族基因组织表达特异性分析

为了研究 *SiACP* 家族基因在谷子生长发育过程的作用,从不同物种的基因组数据库中筛选出 ACP 家族基因在水稻、高粱、玉米、谷子的不同组织(根、茎、叶、穗及籽粒)和不同发育时期的表达数据,并对不同物种的 ACP 基因表达水平绘制热图。由图 2 可知,不同禾本科植物的 ACP 基因表达模式具有明显的差异,同一基因在不同组织和不同发育时期表达模式也存在一定的差异。比如,在玉米的生长发育过程中,4 个 ZmACP 基因均在不同组织中表达,且表达量都比较高,而其他 3 个物种中均有一个表达量相对较低的 ACP 基因(*OsACP3*、*SbACP1*、*SiACP1*)。



不同颜色表示基因在不同组织的 lgFPKM 值;DAS 为播种后的天数;DAP 为开花后的天数。

Different color shows genes at lgFPKM values of different tissues; DAS, Days after sowing; DAP, Days after pollination.

图 2 禾本科植物水稻、高粱、玉米和谷子 ACP 基因在正常条件下不同组织的表达模式分析

Fig. 2 Expression analysis of ACP family genes in rice, sorghum, maize and foxtail millet of gramineous plants

不同物种的 ACP 基因在不同组织与不同发育阶段所表现的时空特异性也存在一定的差异。在水稻中,*OsACP1* 和 *OsACP2* 基因在根系和茎秆中的表

达量相对较低,主要在叶片中表达,其 FKPM 值范围为 28.70~164.09(图 2-A),此外,*OsACP1* 基因在雌蕊和花序中的表达量也相对较高;而 *OsACP3* 基因除

了在穗部有一定的表达外(FPKM 值为 9.69),在其他组织中的表达量均很低或没表达。在高粱中,*SbACP2* 和 *SbACP3* 基因在整个植株生长发育过程中都有一定的表达(图 2-B)。从组织特异性来看,*SbACP1* 基因除了在中部茎秆(FPKM 值为 26.15)和叶片(FPKM 值为 30.23)表达量相对较高外,在其他组织的表达量较低(FPKM 值为 2.55 ~ 7.07)。而 *SbACP2* 基因主要在茎秆和叶鞘部位表达,其 FPKM 值分别为 26.16 和 30.23。*SbACP3* 基因主要在根系、茎秆、节点和叶片部位表达,其 FPKM 值均大于 26.06。在玉米中,除了 *ZmACP3* 在花药、花丝、胚乳、胚和苞叶组织中没有表达外,其他 *ZmACP* 基因均有相对较高的表达量,例如 *ZmACP1* 基因在根系和花丝中的 FPKM 值高达 140,*ZmACP2* 和 *ZmACP4* 基因在顶部叶片、节点、花药和苞叶的 FPKM 值均高于 123(图 2-C)。由此可见,玉米 ACP 基因主要在生长发育旺盛的组织中表达。在谷子中,所有 ACP 基因均有一定的表达,其 FPKM 值为 9.21 ~ 491.51(图 2-D)。从不同组织的基因表达情况看,*SiACP1* 主要在根系中表达,且表达表现出了明显的组织特异性;*SiACP2* 和 *SiACP3* 在整个生育期的不同组织中均表达,且表达量都比较高,其 FPKM 均值为 96.70。

由此可见,高粱 *SbACP* 和玉米 *ZmACP* 基因在不同组织中的表达量明显高于谷子 *SiACP* 和 水稻 *OsACP*。禾本科作物中,水稻 *OsACP1* 基因、高粱 *SbACP3* 基因、玉米 *ZmACP2* 基因和 *ZmACP4* 基因、

谷子 *SiACP2* 基因表达量明显高于其他 ACP 基因,这些 ACP 基因不仅在不同组织发育过程中起着非常重要的作用,而且在植株最高处的叶片 ACP 基因表达量明显高于基部或中间部位叶片 ACP 基因。

2.4 谷子 *SiACP* 基因的多态性位点与耐低磷相关性状的关联分析

为了分析谷子 *SiACP1*、*SiACP2* 和 *SiACP3* 基因在谷子核心种质资源中的多态性,以及挖掘耐低磷相关性状的优异变异位点,本研究基于 Jia 等^[12] 利用高通量测序 Illumina HiSeq 2000 平台重测序的 916 份谷子种质资源,挑选出具有耐低磷相关表型的 160 份谷子种质基因型^[13],分析了 *SiACP1*、*SiACP2*、*SiACP3* 基因在试验材料中的变异位点和序列多样性,包括起始密码子 ATG 上游 1 000 bp 的启动子。通过过滤掉缺失率和杂合度大于 20%、最小等位频率(MAF)小于 0.05 的多态性位点,最终在 *SiACP1* 基因中共检测到 87 个 SNP 和 2 个 InDel(图 3-A),平均每 28 bp 存在一个变异位点(SNP 或 InDel);在 *SiACP2* 基因中共检测到 11 个 SNP(图 3-B),平均每 486 bp 有一个 SNP;在 *SiACP3* 基因中共检测到 21 个 SNP 和 7 个 InDel,平均每 79 bp 有一个变异位点(SNP 或 InDel)(图 3-C)。*SiACP* 基因的核苷酸多态性位点非均匀地分布在启动子、5'-UTR、编码区、非编码区以及 3'-UTR。其中,多态性位点最多的 *SiACP1* 基因启动子(包含 5'-UTR 区和 3'-UTR 区)($\pi > 7.4 \times 10^{-2}$)的多态性最高。

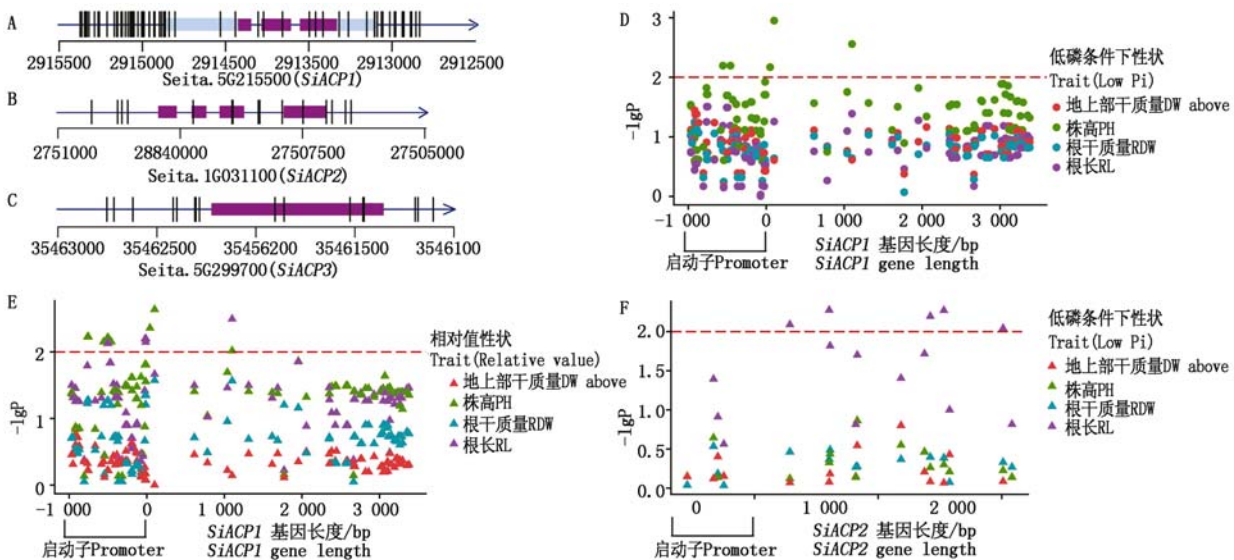


图 3 谷子 *SiACP* 基因的多态性位点分布及其与低磷条件下苗期相关表型的关联分析

Fig. 3 Locus distribution of *SiACP* genes and associate analysis between natural variation in *SiACPs* and correlated phenotype under low Pi conditions at seedling stage

为了筛选耐低磷相关的关键 *SiACP* 基因和优异等位变异位点,本研究基于前期 160 份谷子核心

种质的苗期株高(PH)、根长(RL)、地上部干质量(DW above)和根干质量(RDW)表型数据^[13],对候

选基因 *SiACP1*、*SiACP2* 和 *SiACP3* 进行关联分析。由图 3-D、E、F 可知,利用 GLM + Q 模型,在阈值为 0.01 水平下共鉴定到 16 个 SNP 与耐低磷相关性状存在显著关联(表 2)。在 *SiACP1* 基因的多态性位点中,共检测到 11 个 SNP 与低磷条件下株高(PH)、相对株高(RPH)和相对根长(RRL)存在显著关联($P < 6.83 \times 10^{-3}$),其中位于起始密码子 ATG 上游第 459 bp、第 556 bp 和第二外显子第 1 100 bp 的 SNP 均与 LPH(低磷条件的株高)、RPH、RRL 表型存在显著关联,但是位于编码区的显著 SNP 为非同义突变。此外,位于 5' UTR 区的 2 个 SNP 均与 LPH、RPH 存在显著关联;在 *SiACP2* 基因

中共检测出 5 个 SNP,仅与低磷条件下相对根长(RRL)存在显著关联(图 3-F),并没有鉴定到与表现共性的显著位点,其中,有 3 个 SNP 位于基因下游,2 个 SNP 位于 *SiACP2* 基因的第 2 和第 3 外显子区,其中在起始密码子 604 bp 处的 SNP 导致氨基酸从丙氨酸变成甘氨酸;在 *SiACP3* 基因的多态性位点中,并没有鉴定到与耐低磷相关性状显著关联的位点。由此可见,*SiACP1* 的启动子区不仅具有较高的多态性,而且存在多个与低磷条件下的株高、相对株高和相对根长表型显著关联的共性 SNP,故推断谷子 *SiACP1* 基因是导致低磷条件下谷子种质资源表型变异的主要关键细胞内酸性磷酸酶基因。

表 2 基因 *SiACP* 多态性位点与耐低磷相关性状的关联分析

Tab. 2 Associations between the natural variations within *SiACPs* and phenotype related to low-phosphorous tolerance

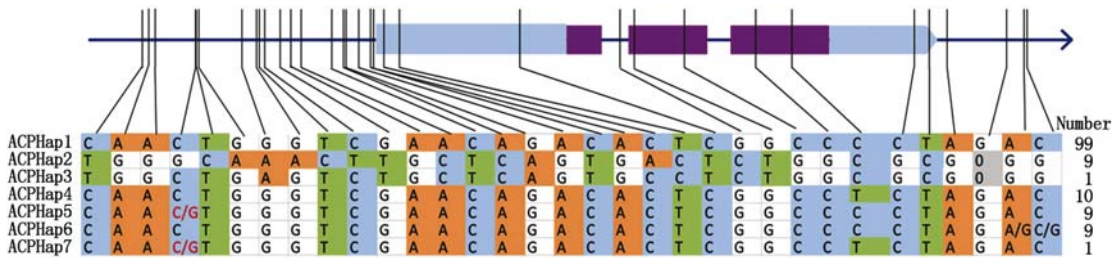
基因 Gene	性状 Trait	变异 Allele	变异位点信息 (距离基因 <i>SiACP</i> 起始密码子 ATG 的距离) Locus information	最小等位频率 Minor allele frequency	<i>P</i> 值(10^{-3}) <i>P</i> value
<i>SiACP1</i>	RPH	T/C	上游 763 bp	7.71	5.96
	RPH	G/A	上游 752 bp	7.71	5.96
	LPH RPH RRL	G/A	上游 556 bp	7.46	6.83
	RPH	G/A	上游 507 bp	7.64	6.19
	RPH	T/C	上游 505 bp	7.64	6.19
	RPH	C/T	上游 495 bp	7.64	6.19
	LPH RPH RRL	G/T	上游 459 bp	7.46	6.83
	RRL	A/G	上游 14 bp	7.38	7.13
	RPH LPH	C/A	5'UTR 35 bp	10.20	6.20
	LPH RPH	T/C	5'UTR 101 bp	10.20	1.71
	LPH RPH RRL	G/T	第 2 外显子 1 100 bp;同义突变	8.29	5.19
<i>SiACP2</i>	RRL	T/G	第 2 外显子 286 bp;非同义突变(A/G)	7.13	8.12
	RRL	T/C	第 3 外显子 604 bp;同义突变	7.93	5.30
	RRL	A/G	下游 1 422 bp	7.59	6.36
	RRL	A/G	下游 1 532 bp	7.91	5.34
	RRL	A/G	下游 2 011 bp	6.93	9.04

2.5 谷子 *SiACP1* 基因变异位点的单倍型分析

基于上述候选基因关联分析结果,为了进一步确定 *SiACP1* 启动区的 SNP 是影响 ACP 基因功能的主要因素,从 160 份谷子核心种质中筛选到的所有 *SiACP1* 的 SNP 和 InDels 位点进行单倍型分析。在检测到的 89 个多态性位点中(SNP/InDel),去除掉 *SiACP1* 基因变异位点为 N(未知)的种质,最终得到 32 个 SNP 和 1 个 InDel。通过对此 33 个多态性位点的随机组合进行分析,结果共得到 7 种单倍型,将 138 份种质不均匀地划分成 7 种单倍型(图 4)。其中,有 99 份种质被划分为 ACP-Hap1(*SiACP1* 基因的第一个单倍型),9 份和 10 份种质(单倍型)分别包括单倍型 ACPHap2 和 ACPHap4,而 ACPHap3 单倍型只包含 1 份种质 B078,而

其余的 ACPHap5、ACPHap6 和 ACPHap7 单倍型中均存在杂合变异位点。

通过分析单倍型 ACPHap1 和 ACPHap4 的 SNP 组合时发现,ACPHap1 和 ACPHap4 单倍型存在一个位于基因起始密码子下游 1 770 bp 的 SNP 差异,该位点引起非同义突变;而比较单倍型 ACPHap1 和 ACPHap2 的 SNP 组合来看,二者之间存在 31 个 SNP 和 1 个 InDel 差异。通过整合基因 *SiACP1* 多态性位点与耐低磷相关性状的关联分析结果,在与株高、相对株高、相对根长存在显著关联的 5 个 SNP 中,有 4 个 SNP 是单倍型 ACPHap2 和 ACPHap3 所特有的 SNP。由此可见,由纯合变异位点组合成的单倍型 ACPHap1、ACPHap2 和 ACPHap3 是影响基因 *SiACP1* 功能变异的主要单倍型。



最右侧的数字代表每一个单倍型包含的种质数目。

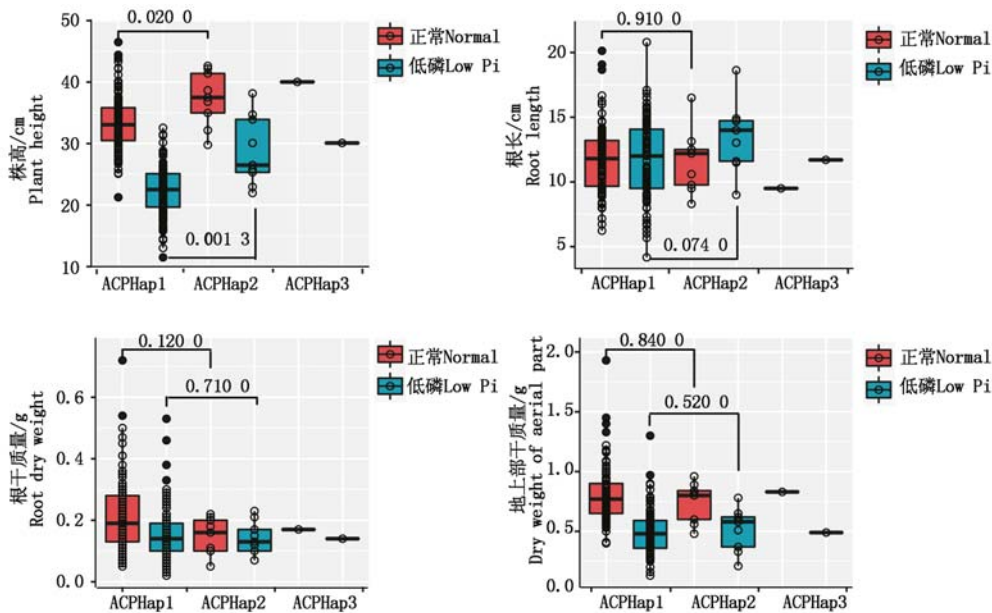
The right most numbers represents the accessions numbers containing each haplotype.

图 4 基因 *SiACPI* 的 7 种单倍型分布及其对应的谷子单倍型数目

Fig. 4 Distributions of the 7 haplotypes in *SiACPI* gene and its corresponding haplotype number of foxtail millet accessions

鉴于具有 ACPHap3 单倍型的种质(1 份)不能进行表型统计分析外,本研究对 ACPHap1、ACPHap2 单倍型在低磷条件下株高、根长、根干质量、地上部干质量的表型进行 *T* 检验差异显著分析(图 5)。由图 5 可知,ACPHap1 单倍型与 ACPHap2 单倍型在正常磷和低磷条件下株高存在显著差异 ($P < 0.05$),而其他表型包括根长、根干质量、地上部干质量均不显著。在同一条件下,对 ACPHap1、

ACPHap2 单倍型的相关性状进行方差分析发现,在正常磷条件下 ACPHap2 单倍型株高比 ACPHap1 单倍型株高显著增加了 11.92% (3.98 cm, $P = 0.02$)。在低磷条件下,与 ACPHap1 单倍型株高和根长相比,ACPHap2 单倍型株高显著增加了 29.70% (6.60 cm, $P = 0.0013$),ACPHap2 单倍型的根长也增加了 1.91 cm,但差异未达到显著水平 ($P = 0.074$)。



横线上方的数字代表 *t* 检验的 *P* 值。图 6 同。

The numbers above the line represent the *P* value of *t* test. The same as Fig. 6.

图 5 不同单倍型在正常磷和低磷条件下株高、根长、根和地上部干质量的差异比较分析

Fig. 5 The comparative analysis between different haplotype for plant height, root length,

root dry weight and dry weight of aerial part under normal phosphorus and low phosphorus conditions

通过比较分析正常磷和低磷条件下的株高、根长、地上部、根干质量的相对值发现,ACPHap1 单倍型与 ACPHap2 单倍型的相对株高、相对根长、根干质量存在显著差异 ($P < 0.05$) (图 6)。例如,ACHap1 和 ACPHap2 单倍型的相对株高平均值分别为 33.45% 和 -23.14%;而 ACPHap2 和 ACPHap1 单倍型的相对根长平均分别为 17.38% 和

-0.02%;此外,ACPHap2 单倍型的相对根干质量为 -2.36%,而 ACPHap1 单倍型的相对根干质量为 -22.83%。由此可见,在低磷条件下,ACPHap2 单倍型的生长发育过程中的根长、株高、地上部和根干质量方面受低磷影响较小,表现出了较强的耐低磷特性。

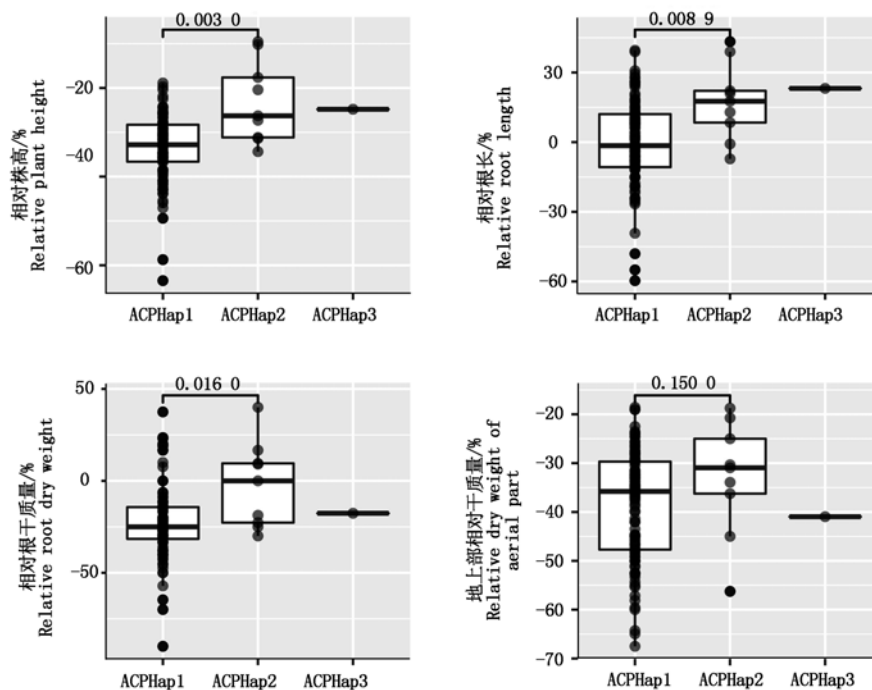


图 6 不同单倍型在正常磷和低磷条件下的株高、根长、根和地上部干质量相对值比较差异分析

Fig. 6 The comparative analysis between different haplotype for relative plant height, root length, root dry weight and dry weight of aerial part under normal phosphorus and low phosphorus conditions

3 结论与讨论

磷是植物生长发育过程中必需的大量营养元素之一,土壤中有效磷含量过低是限制作物高产优质的主要因素。植物在长期进化过程中形成了一系列适应低磷诱导的分子机制,包括重塑根系的形态构型促进根系吸收更多的有效磷、体内有机磷的高效利用^[5]。磷酸酶不仅是一种重要的水解酶,参与碳水化合物转化和蛋白质合成;而且是一种受低磷诱导酶,在土壤中与植株体内的有机磷的分解和再利用有着密切的关联。张丽梅等^[16]研究缺磷对不同耐低磷玉米基因型酸性磷酸酶活性的影响发现,缺磷使得玉米地上部干质量下降,根干质量、根冠比增加,磷诱导玉米叶片、根组织和根系分泌 APase 活性升高。当植物受到低磷诱导时,植物体内会合成大量的去磷酸化酶相关基因,从不同的有机磷底物上水解磷酸基团,增加体内的有效磷素,提高植物在缺磷环境对磷的耐性及磷的高效利用。

细胞内的酸性磷酸酶能够将植物液泡内的有机磷转化为无机磷,并通过液泡膜上的磷转运蛋白转向细胞质,维持细胞质中磷含量的动态平衡。在番茄植物中,成功克隆到了一个低磷诱导的酸性磷酸酶基因 *LePS2*,能编码 269 个氨基酸,该基因只能在低磷条件诱导表达,而不受其他营养物质或非生物胁迫影响^[17]。Tian 等^[18]通过 cDNA 文库鉴定一个

编码 271 个氨基酸的酸性磷酸酶基因 *PvPS2* 发现,该基因在磷饥饿条件下被诱导高表达,且有助于改良菜豆根系形态和结构,耐低磷的植株内磷的转运和酸性磷酸酶活性均增加。Wasaki 等^[19]在低磷胁迫下对白羽扇豆根分泌酸性磷酸酶基因表达研究发现,植株体内的磷含量降低促进了酸性磷酸酶 ACP 基因的表达,并加快了丛生根的形成。在大豆中,低磷条件下植物体内的 *GmACP1* 基因表达量显著增强,导致酸性磷酸酶活性升高,显著提高植物的耐低磷能力^[6]。本研究通过一个功能已知的耐低磷基因 *GmACP1* 进行 BlastP 同源比对,从谷子和其他 3 种禾本科植物的全基因组水平上共鉴定出 13 个 ACP 基因,ACP 家族成员的数量和分布具有一定的规律性,均具有高度保守的磷酸酶结构域。其中,在谷子中,本研究共鉴定的 3 个等电点均小于 7 的酸性磷酸酶基因 *SiACP*,在酸性环境中可能着一定特殊的生物学功能。家族基因进化树分析发现,单子叶植物 ACP 基因与双子叶植物 ACP 基因的蛋白序列、基因结构存在明显的差别,推测在 ACP 家族基因的进化过程出现在双子叶植物纲和单子叶植物形成之前。在单子叶禾本科植物中,属于 C4 植物的谷子 *SiACP* 基因、高粱 *SbACP* 基因和玉米 *ZmACP* 基因之间的亲缘关系较近。

谷子作为传统优质杂粮作物,具有耐贫瘠特性,其蕴藏着重要的磷高效基因资源。挖掘谷子优异的

磷高效等位变异位点,并通过分子标记加快培育磷高效品种,是解决土壤有效磷缺乏、降低种植成本的主要遗传育种途径之一。近几年,随着测序技术的发展和基因组学研究的不断革新,关联分析成为发掘与目标性状显著有关联的变异位点最有效的数量遗传学手段。Weng 等^[20]利用 175 个优良自交系鉴定基因 *ZmIPT2* 位点多态性,并与粒质量进行关联分析,结果检测到 16 个 SNP 和 7 个单倍型与粒质量显著关联。Liu 等^[21]利用候选基因关联策略对玉米 *ZmDREB* 基因和耐旱相关性状进行关联分析,结果发现, *ZmDREB2.7* 基因的启动子区 InDel 位点与根长存在显著关联,该位点是导致 *ZmDREB2.7* 基因功能差异的关键位点,此研究不仅解析了玉米耐旱机制,而且为分子设计育种提供了新的选择靶点。此外, Wang 等^[22]研究发现, *ZmVPP1* 基因启动子区的一个 InDel 与耐旱性状显著关联,并且发现该 InDel 是 3 个 MYB 反式作用因子,调控着基因 *ZmVPP1* 表达,从而提高植株耐旱性。在逆境过程中,基因的启动子在基因表达调控过程中起着重要的作用^[23]。

本研究通过候选基因关联分析发现,基因 *SiACPI* 的启动子不仅具有多态性,而且存在着多个与低磷条件下的株高、相对株高和相对根长表型显著关联的共性 SNP。进一步对 *SiACPI* 基因的多态性位点进行单倍型分析,可将 138 份谷子核心种质划分成 7 种单体型,结合耐低磷相关表型并成功鉴定到一个与耐低磷相关的有利的单倍型 ACPHap2。虽然与 Zhang 等^[6]研究发现的与大豆磷高效相关 *GmACPI* 基因的单倍型位置有一定区别(内含子和外显子),但是单子叶植物 ACP 基因与双子叶植物 ACP 基因进化过程中出现分歧,推测位于 *SiACPI* 基因启动子区的 SNP 很有可能是影响谷子种质在低磷条件下相关表型变化的主要原因。这些结果均证明, *SiACPI* 基因在进化过程中自然变异位点对于抵御土壤磷缺乏较为重要,将为后期大规模筛选耐低磷种质和遗传育种改良新品种提供一定的基因信息。

参考文献:

[1] 曹宁,陈新平,张福锁,曲东. 从土壤肥力变化预测中国未来磷肥需求[J]. 土壤学报,2007,44(3):536-543. doi:10.11766/trxb200601060322.
Cao N, Chen X P, Zhang F S, Qu D. Prediction of phosphate fertilizer demand in China based on change in soil phosphate fertility[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2007, 44(3):536-543.

[2] 邓美菊,王飞,毛传澡. 植物磷酸盐转运体及其分子调控机制[J]. 植物生理学报,2017,53(3):377-387.

doi:10.13592/j.cnki.ppj.2017.0003.

Deng M J, Wang F, Mao C Z. Plant phosphate transporters and its molecular regulation mechanism [J]. *Plant Physiology Journal*, 2017, 53(3):377-387.

[3] 李喜焕,常文锁,张彩英. 提高植物磷营养效率(候选)基因研究进展[J]. 植物遗传资源学报,2012,13(1):83-97. doi:10.3969/j.issn.1672-1810.2012.01.014.
Li X H, Chang W S, Zhang C Y. Research progress of candidate genes for improving plant phosphorus-efficiency [J]. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2012, 13(1):83-97.

[4] Robinson W D, Carson I, Ying S, Ellis K, Plaxton W C. Eliminating the purple acid phosphatase AtPA26 in *Arabidopsis thaliana* delays leaf senescence and impairs phosphorus remobilization [J]. *New Phytologist*, 2012, 196(4):1024-1029. doi:10.1111/nph.12006.

[5] 田江,梁翠月,陆星,陈倩倩. 根系分泌物调控植物适应低磷胁迫的机制[J]. 华南农业大学学报,2019,40(5):175-185. doi:10.7671/j.issn.1001-411X.201905068.
Tian J, Liang C Y, Lu X, Chen Q Q. Mechanism of root exudates regulating plant responses to phosphorus deficiency [J]. *Journal of South China Agricultural University*, 2019, 40(5):175-185.

[6] Zhang D, Song H N, Cheng H, Hao D R, Wang H, Kan G Z, Jin H X, Yu D Y. The acid phosphatase-encoding gene *GmACPI* contributes to soybean tolerance to low-phosphorus stress [J]. *PLoS Genetics*, 2014, 10(1):e1004061. doi:10.1371/journal.pgen.1004061.

[7] Larkin M A, Blackshields G, Brown N P, Chenna R, McGettigan P A, McWilliam H, Valentin F, Wallace I M, Wilm A, Lopez R, Thompson J D, Gibson T J, Higgins D G. ClustalW and ClustalX version 2.0 [J]. *Bioinformatics*, 2007, 23(21):2947-2948. doi:10.1093/bioinformatics/btm404.

[8] Hu B, Jin J P, Guo A Y, Zhang H, Luo J C, Gao G. GSDS 2.0: an upgraded gene feature visualization server [J]. *Bioinformatics*, 2015, 31(8):1296-1297. doi:10.1093/bioinformatics/btu817.

[9] Bailey T L, Boden M, Buske F A, Frith M, Grant C E, Clementi L, Ren J Y, Li W W, Noble W S. MEME SUITE: tools for motif discovery and searching [J]. *Nucleic Acids Research*, 2009, 37(S2):202-208. doi:10.1093/nar/gkp335.

[10] Xia L, Zou D, Sang J, Xu X J, Yin H Y, Li M W, Wu S Y, Hu S N, Hao L L, Zhang Z. Rice Expression Database (RED): An integrated RNA-Seq-derived gene expression database for rice [J]. *Journal of Genetics and Genomics*, 2017, 44(5):235-241. doi:10.1016/j.jgg.2017.05.003.

[11] Stelpflug S C, Sekhon R S, Vaillancourt B, Hirsch C N, Buell C R, de Leon N, Kaeppeler S M. An expanded maize gene expression atlas based on RNA sequencing and its use to explore root development [J]. *The Plant Genome*, 2016, 9(1):1-16. doi:10.3835/plantgenome2015.04.0025.

[12] 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*) [J]. *Nature Genetics*, 2013, 45 (8): 957–961. doi:10.1038/ng.2673.
- [13] 苑义川, 陈小雨, 李明明, 李萍, 贾亚涛, 韩渊怀, 邢国芳. 谷子苗期耐低磷种质筛选及其根系保护酶系统对低磷胁迫的响应[J]. *作物学报*, 2019, 45 (4): 601–612. doi:10.3724/SP.J.1006.2019.82029.
- Yuan Y C, Chen X Y, Li M M, Li P, Jia Y T, Han Y H, Xing G F. Screening of germplasm tolerant to low phosphorus of seedling stage and response of root protective enzymes to low phosphorus in foxtail millet [J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2019, 45 (4): 601–612.
- [14] Bradbury P J, Zhang Z W, Kroon D E, Casstevens T M, Ramdoss Y, Buckler E S. TASSEL: software for association mapping of complex traits in diverse samples [J]. *Bioinformatics*, 2007, 23 (19): 2633–2635. doi:10.1093/bioinformatics/btm308.
- [15] Jan H U, Guan M, Yao M, Liu W, Wei D Y, Abbadi A, Zheng M, He X, Chen H, Guan C Y, Nichols R A, Snowdon R J, Hua W, Qian L W. Genome-wide haplotype analysis improves trait predictions in *Brassica napus* hybrids [J]. *Plant Science*, 2019, 283: 157–164. doi:10.1016/j.plantsci.2019.02.007.
- [16] 张丽梅, 郭再华, 张琳, 贺立源. 缺磷对不同耐低磷玉米基因型酸性磷酸酶活性的影响 [J]. *植物营养与肥料学报*, 2015, 21 (4): 898–910. doi:10.11674/zwyf.2015.0408.
- Zhang L M, Guo Z H, Zhang L, He L Y. Effects of phosphate deficiency on acid phosphatase activities of different maize genotypes tolerant to low-P stress [J]. *Journal of Plant Nutrition and Fertilizers*, 2015, 21 (4): 898–910.
- [17] Baldwin J C, Karthikeyan A S, Raghothama K G. LEPS2, a phosphorus starvation-induced novel acid phosphatase from tomato [J]. *Plant Physiology*, 2001, 125 (2): 728–737. doi:10.1104/pp.125.2.728.
- [18] Tian J, Venkatachalam P, Liao H, Yan X L, Raghothama K. Molecular cloning and characterization of phosphorus starvation responsive genes in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) [J]. *Planta*, 2007, 227 (1): 151–165. doi:10.1007/s00425-007-0603-2.
- [19] Wasaki J, Yamamura T, Shinano T, Osaki M. Secreted acid phosphatase is expressed in cluster roots of lupin in response to phosphorus deficiency [J]. *Plant and Soil*, 2003, 248 (1–2): 129–136. doi:10.1023/A:1022332320384.
- [20] Weng J F, Li B, Liu C L, Yang X Y, Wang H W, Hao Z F, Li M S, Zhang D G, Ci X K, Li X K, Zhang S H. A non-synonymous SNP within the isopentenyl transferase 2 locus is associated with kernel weight in Chinese maize inbreds (*Zea mays* L.) [J]. *BMC Plant Biology*, 2013, 13 (1): 98. doi:10.1186/1471-2229-13-98.
- [21] Liu S X, Wang X L, Wang H W, Xin H B, Yang Xi H, Yan J B, Li J S, Tran L S P, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K, Qin F. Genome-wide analysis of *ZmDREB* genes and their association with natural variation in drought tolerance at seedling stage of *Zea mays* L. [J]. *PLoS Genetics*, 2013, 9 (9): e1003790. doi:10.1371/journal.pgen.1003790.
- [22] Wang X L, Wang H W, Liu S X, Ferjani A, Li J S, Yan J B, Yang X H, Qin F. Genetic variation in *ZmVPP1* contributes to drought tolerance in maize seedlings [J]. *Nature Genetics*, 2016, 48 (10): 1233–1241. doi:10.1038/ng.3636.
- [23] Zhu L P, Yu Z, Zou C X, Li Q L. Plant stress-inducible promoters and their function [J]. *Hereditas*, 2010, 32 (3): 229–234. doi:10.3724/sp.j.1005.2010.00229.