

高粱黄色籽粒基因 *Yellow Seed 2* 的定位及候选基因分析

高栳鑫^{1,2}, 刚爽^{1,3}, 陆晓春², 王平², 李政君², 王艺威^{1,2}, 李金红²

(¹沈阳大学生命科学与工程学院, 沈阳 110044; ²辽宁省农业科学院高粱研究所, 沈阳 110161;

³中国地质调查局东北地质科技创新中心, 沈阳 110034)

摘要: 高粱在我国农业结构调整和酿酒行业中具有重要的作用。籽粒颜色是高粱重要的性状之一, 但有关高粱籽粒颜色的研究并不多。本研究观察了高粱黄色籽粒材料 GLB41 的籽粒发育过程, 花后 1~16 d 为快速生长期, 17~24 d 进入缓慢膨大期, 第 25 天开始进入转色期, 绿色逐渐褪去, 籽粒颜色由乳白色或苍白色逐渐变成浅黄色, 随后颜色加深, 40 d 后籽粒颜色变为深黄色。利用黄色籽粒 GLB41 和白色籽粒 6E16 两个材料构建的群体, 使用重测序 BSA 方法, 将控制黄色籽粒性状的基因初定位在 1 号染色体 15.6 Mb 区间内, 利用 3215 株分离个体将该基因定位在 BR13 和 P2 两个标记之间, 区间内有 7 个候选基因, 对这些基因的功能注释进行分析并测序, 结果表明 GLB41、6E16 两个材料中未被报道过的基因 *Yellow Seed 2* (*Sobic.001G397900*) 的编码区内第 619~621 位插入 CTG 3 个碱基, 导致增加了 1 个 Leu (亮氨酸), 第 819 位 C 突变为 G, 导致 Cys (半胱氨酸) 突变为 Trp (色氨酸); 第 912 位 C 突变为 T, 但氨基酸序列无变化。因此推测 *Yellow Seed 2* 可能参与这两份亲本材料籽粒颜色的形成。本研究为高粱籽粒颜色性状的研究提供了新的基因。

关键词: 高粱; 籽粒颜色; 精细定位; 候选基因

Genetic Mapping and Candidate Gene Analysis of Yellow Grain Gene *Yellow Seed 2* in Sorghum

GAO Zhixin^{1,2}, GANG Shuang^{1,3}, LU Xiaochun², WANG Ping², LI Zhengjun², WANG Yiwei^{1,2}, LI Jinhong²

(¹School of Life Science and Engineering, Shenyang University, Shenyang 110044; ²Sorghum Research Institute, Liaoning

Academy of Agricultural Sciences, Shenyang 110161; ³Northeast Geological Science and Technology Innovation Center,

China Geological Survey, Shenyang 110034)

Abstract: Sorghum plays an important role in agricultural farming and brewing industry of China. The grain color is one of the important traits, while its genetic basis remains largely unclear. By observing the grain development process using yellow grain material GLB41, we found that on 1 to 16 days after flowering the grain grew rapidly, followed by the slow expansion on 17~24 days, and the coloring on 25 days after flowering. At the coloring stage, the green color gradually faded, the grain color gradually changed from milky white or pale white to light yellow, and then the color deepened, and the grain color changed to dark yellow after 40 days. The genetic locus controlling the yellow grain trait was initially mapped to a 15.6 Mb interval on chromosome 1, and was further delimited between two markers BR13 and P2 by fine mapping in 3215 individuals. The functional annotation suggested seven candidate genes. Through Sanger sequencing of the candidate genes in GLB41 (yellow grain) and 6E16 (white grain), we found three sequence variations (insertion at 619'-621', CTG/Leu; mutation at 819',

收稿日期: 2023-12-21 网络出版日期: 2024-07-22

URL: <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20231221002>

第一作者研究方向为分子遗传育种, Email: 954745503@qq.com

通信作者: 李金红, 研究方向为高粱分子育种, E-mail: lijinhong_0315@163.com

基金项目: 辽宁省自然科学基金面上项目(2022-MS-056); 国家现代农业产业技术体系项目(CARS-06-14.5-A3); 中国地质调查局东北地质科技创新中心区创基金项目(QCJJ2022-26)

Foundation projects: General Projects of Natural Science Foundation of Liaoning Province (2022-MS-056); National Modern Agricultural Industrial Technology System Projects (CARS-06-14.5-A3); The Funding Projects of Northeast Geological S&T Innovation Center of China Geological Survey(QCJJ2022-26)

Cys to Trp; synonymous mutation at 912', C to T) at the unreported gene *Yellow Seed 2* (Sobic.001G397900). Therefore, it is speculated that *Yellow Seed 2* may be involved in the formation of the grain color of these two parent materials, as a new gene for further deciphering the functional mechanism of grain color in sorghum.

Key words: sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench); grain color; fine mapping; candidate genes

高粱 (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) 是世界上仅次于玉米、小麦、水稻和大麦的第五大禾谷类作物, 作为食用、饲用、酿酒和生物能源原料具有广泛的应用。在我国, 高粱主产区在东北、华北和西南地区, 其中80%以上的高粱籽粒用于酿酒^[1], 几乎所有的国内著名品牌白酒都是以高粱为主要酿造原料, 如汾酒、泸州老窖、五粮液和茅台等^[2]。在与白酒品质相关的物理特性和生化特性中, 高粱籽粒中单宁含量对酿造不同香型的白酒具有重要的作用^[3]。

一般来说, 籽粒颜色与单宁的含量相关, 籽粒颜色越深、单宁含量越高^[4], 但籽粒颜色并不是判断单宁含量高低的唯一标准, 高粱籽粒的颜色受多种因素调控。譬如外果皮颜色、中果皮厚度、种皮的有无等^[5], 高粱籽粒果皮中的缩合单宁又称原花青素, 是高等植物次生代谢类的黄酮类物质^[6-7]。除缩合单宁外, 高粱籽粒的果皮中还含有酚酸和黄酮类物质等酚类化合物, 这些酚类化合物使高粱籽粒呈现不同的颜色。经典的遗传模型揭示籽粒颜色和种皮色素由多个位点控制^[8-10], 高粱籽粒的果皮颜色由控制红色籽粒 *R* 基因和控制黄色籽粒 *Y* 基因相互作用使高粱籽粒呈现红色、橙色和白色等不同颜色, 分别对应于 *R_Y_*、*rrY_* 和 *R_yy* (或 *rryy*) 的基因型。同样地, Wang 等^[11] 研究发现果皮颜色不受种皮色素或单宁的影响。

B1 和 B2 是调控种皮单宁合成的两个位点。由于 *S* 基因的存在, *B1_B2_ss* 基因型高粱籽粒只有种皮含有单宁, 而 *B1_B2_S_* 基因型籽粒种皮和果皮中均含有单宁, 通常使高粱籽粒果皮呈棕色。此外还有几个基因可以改变高粱籽粒果皮的基本颜色, 例如 *I* 基因和 *Z* 基因, 可使高粱籽粒产生从白色到黑色的一系列颜色^[12]。GWAS 分析 242 份中国高粱种质资源确定 25 个与籽粒颜色显著相关的 SNP, 其中最显著的 SNP 对应 *Yellow Seed 1* (Sobic.001G398100), *Yellow Seed 1* 是高粱 MYB 转录因子, 是控制高粱籽粒果皮颜色的重要基因之一。在 242 份中国高粱种质资源中 *Yellow Seed 1* 有 Hap1、Hap2 和 Hap3 三种单倍型, Hap1 和 Hap3 的籽粒果皮呈红色或棕色, Hap2 的品种果皮呈白色或黄色^[13]。泛基因

组鉴定出包括参考基因组 BTX623 中 *Yellow Seed 1* 存在 3216 bp 片段的缺失, 导致 *Yellow Seed 1* 基因功能丧失^[14-15]。

本研究分析了黄色籽粒材料 GLB41 不同发育时期的颜色变化, 同时利用构建的 F_2 定位群体对黄色籽粒进行精细定位, 最终将 *Yellow Seed 2* 基因定位在 BR13、P2 两个标记之间, 筛选候选区间内的基因, 获得调控高粱籽粒颜色的新基因。

1 材料与方法

1.1 试验材料

亲本材料 GLB41 (黄色籽粒材料) 和 6E16 (白色籽粒材料) 是由本课题组连续多年自交保存的自然群体材料。 F_1 套袋自交, 获得 F_2 遗传分离群体 3215 个单株。2023 年种植于辽宁省农业科学院试验基地, 2 个亲本分别种植 3 行, F_2 分离群体种植约 95 行, 行长 8 m, 株距 0.25 m, 行距 0.6 m, 常规田间管理。

1.2 试验方法

1.2.1 高粱黄色籽粒发育形态变化的鉴定 于 2023 年在辽宁省农业科学院试验基地种植高粱材料, 在盛花期时对 GLB41 植株采用挂牌、套纱网袋和用记号笔标记相结合的方式标记开花日期, 每日标记 5 株。采集不同发育天数的高粱籽粒, 置于日本尼康 Nikon ECLIPSE 80i 体视显微镜下, 拍照得到新鲜籽粒的形态。

1.2.2 控制高粱黄色籽粒性状基因 *Yellow Seed 2* 的初定位 利用重测序 BSA (Bulked segregant analysis) 测序对高粱调控黄色籽粒的基因 *Yellow Seed 2* 进行初定位。在自然群体 GLB41×6E16 的 F_2 分离群体中分别选取黄色籽粒表型植株和白色籽粒表型植株的新鲜叶片各 50 株, CTAB 改良法提取基因组 DNA, 将检测合格的基因组 DNA 进行等量混合, 分别构建混池; 机械法破碎基因组 DNA、纯化、末端修复、加 A、加接头后, 琼脂糖电泳后进行片段选择和 PCR 富集; 构建测序文库, 文库构建好后进行文库质检, 经检测合格的文库用 Illumina 平台进行测序, 对控制黄色籽粒性状的基因 *Yellow Seed 2* 进行初定位。

1.2.3 控制高粱黄色籽粒性状基因 *Yellow Seed 2* 的精细定位 根据初定位结果, 以 Phytozome13 网站

(<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/>) 内的 BTX623 为参考基因组, 对标记进行亲本间多态性的筛选, 利用筛选出的多态性标记对 F_2 群体中 3215 个单株进行精细定位。PCR 体系: DNA 0.5 μ L, 2 \times PCR 预混液 5 μ L, ddH₂O 4 μ L, 正向引物 0.25 μ L, 反向引物 0.25 μ L。PCR 程序: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。PCR 产物经 8% 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 银染、显影、拍照、统计数据, 分析出重组单株。

1.2.4 候选基因的预测 根据定位区间内物理位置查询高粱基因注释网站 (http://plants.ensembl.org/Sorghum_bicolor/Info/Index) 获得基因注释, 结合测序结果, 预测候选基因。PCR 体系: DNA 1 μ L, KOD OneTM Master Mix 10 μ L, 正向引物 1.5 μ L, 反向引物 1.5 μ L, 补 ddH₂O 至 20 μ L。PCR 程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min; 98 $^{\circ}$ C 变性 10 s, 59 $^{\circ}$ C 退火 20 s, 68 $^{\circ}$ C 延伸

10 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 4 min。PCR 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳, 利用 TaKaRa 凝胶回收试剂盒, 将收集的扩增产物回收, 送至天津安升达生物科技有限公司进行测序。

1.2.5 qRT-PCR 的验证 根据 *Yellow Seed 2* 的 CDS 序列和内参基因 *SbActin* 设计引物(表 1), 委托南京金斯瑞生物有限公司合成。利用 TRizol 法提取总 RNA, TaKaRa 反转录试剂盒 (PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser) 获取 cDNA, TaKaRa SYBR 试剂盒 (Power SYBR Green PCR Master Mix) 进行 qRT-PCR 试验。qRT-PCR 体系: DNA 0.5 μ L, SYBR Green PCR Master Mix 酶 5 μ L, ddH₂O 4.1 μ L, 正向引物 0.2 μ L, 反向引物 0.2 μ L。qRT-PCR 程序: 95 $^{\circ}$ C 预变性 1 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 5 s, 58 $^{\circ}$ C 退火 25 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 18 s, 50 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。2^{- $\Delta\Delta$ CT} 法进行数据分析, 用 GraphPad Prism 软件绘图。

表 1 本研究所用引物序列

Table 1 The primer sequences used in this study

引物名称 Primer name	正向引物序列(5'-3') Forward primer sequence(5'-3')	反向引物序列(5'-3') Reverse primer sequence(5'-3')
AR5	TGGCATTCTGCGTCTGTC	GCATTTGAAGGGAAACAGC
AR6	CAGGCTCCATCCTATTGGT	TGGCTCCATGTCAACCAG
BR2	CGTTCCATCCCCACTCTT	GTGGCGATGCTCATGAAA
BR13	GGAGGAATTGCACCCAAG	TGGTCTGCATTAGCACG
P2	CAAGACAGCGATGAATTGCC	ACTCCTCCACATCTACTCCC
P5	AGTGACCATGTGCATGTAGGG	TCTCCCCAGCTGTCCGATT
P7	CGGAGAAACGAGGACAGGAG	GTGCAGCTAGGACGTTGTCT
P8	CACGACGAGCAAACATGAGC	AAGGTCAGTCCAAAGCCC
BR18	TGTTCTGCCTTCCTGGT	GCTGTTTCGTGTTTCCCC
BR20	CGATTGCCATTTTGCTTG	ATGTGAGGAGAGCGCGA
AR8	CCCGTATCCAAGATCCAAA	GCCTTAGTCTAGTCGCGGA
AR9	TTTTTGCTGGAACGGAC	TGGTGTGAATGCCTTGC
AR16	ACTGTGTGACCGTGACCCT	CATTGCTACTGCCGTTGG
Sb.001G397900	CAACTACATTGCGGAGCACG	AGATGTTGCCCTCTTGACG
SbActin	ATGGCTGACGCCGAGGATATCCA	GAGCCACACGGAGCTCGTTGTAG

2 结果与分析

2.1 高粱籽粒的发育过程

高粱籽粒发育过程如图 1 所示, 花后 0~16 d 籽粒进入快速生长期, 17~24 d 籽粒生长速率减慢, 25 d

起籽粒不再膨大, 随后进入转色期, 绿色逐渐褪去, 籽粒颜色由乳白色或苍白色逐渐变成浅黄色, 并从 37 d 颜色逐渐加深至 40 d 籽粒转变为深黄色, 至此颜色不再变化。

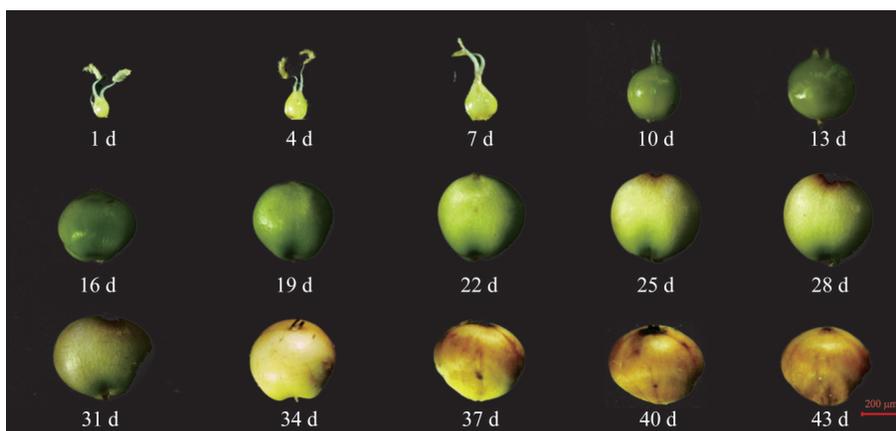


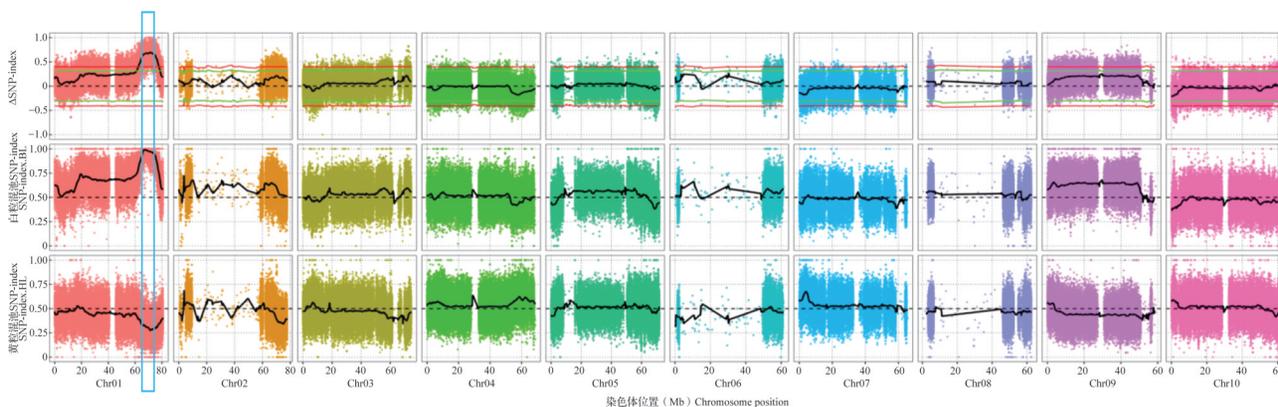
图1 高粱籽粒发育过程

Fig.1 Process of sorghum grain development

2.2 *Yellow Seed 2* 基因的初定位

为了定位控制高粱黄色籽粒的基因,利用亲本材料 GLB41 和 6E16 构建 F_2 分离群体,分别选取黄色籽粒表型植株和白色籽粒表型植株各 50 株,提取基因组 DNA,等量混池成黄色籽粒池和白色籽粒池。混池测序结果如图 2 所示,结合亲本信息,利用

Δ SNP-index 关联分析法,计算 Δ SNP-index,对计算结果进行拟合。结果显示,经计算机模拟实验的拟合结果高于 99% 的阈值,因此将控制高粱黄色籽粒性状的基因 *Yellow Seed 2* 初定位在 1 号染色体上 62402294~77810226 bp 的 15.4 Mb 范围内。



图中绿线为置信度阈值 95%,红线为置信度阈值 99%,蓝框内为初定位的 15.4 Mb 的区间范围

In the figure, the green line is the confidence threshold of 95%, the red line is the confidence threshold of 99%, and the blue box is the interval range of 15.4 Mb that was initially positioned

图2 SNP-index 关联值在染色体上的分布

Fig.2 Distribution of SNP-index correlation values on chromosomes

2.3 *Yellow Seed 2* 基因的精确定位

结合高粱基因注释网站 Phytozome13 网站公布的多个高粱基因组测序品种信息在初定位区间内开发 SSR 和 Indel 分子标记 8359 对。利用筛选的多态性标记 AR5、AR6、BR2、BR13、BR18、BR20、AR8、AR9 和 AR16 对 F_2 分离群体的 3215 个单株进行精确定位,进一步缩小定位区间。结果表明:BR13、BR18 标记间有 200 个交换单株,初步将 *Yellow Seed 2* 定位在这两个标记之间,物理距离为 0.54 Mb。

为进一步缩小定位区间,开发 BR13 和 BR18 间多态性的标记 P2、P5、P7、P8,最终将控制黄色籽粒性状基因 *Yellow Seed 2* 定位于 BR13、P2 标记之间的 108 kb 范围内(图 3)。

2.4 候选基因预测

为了鉴定控制黄色籽粒的基因,根据高粱基因注释网站 (http://plants.ensembl.org/Sorghum_bicolor/Info/Index) 信息查找 108 kb 区间内的所有基因及其功能注释,发现该区间有 7 个候选基因,其中包含 6 个已知编码蛋白基因和 1 个未知功能基因(表 2)。

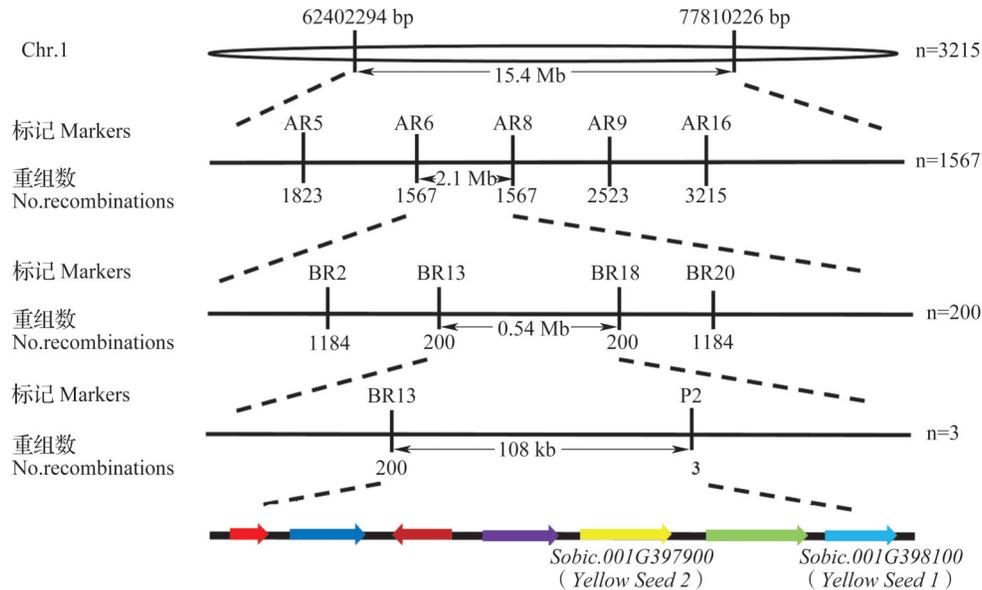


图3 控制高粱粒色性状基因精细定位

Fig.3 Fine mapping of genes controlling sorghum grain color trait

表2 候选基因信息

Table 2 Candidate gene information

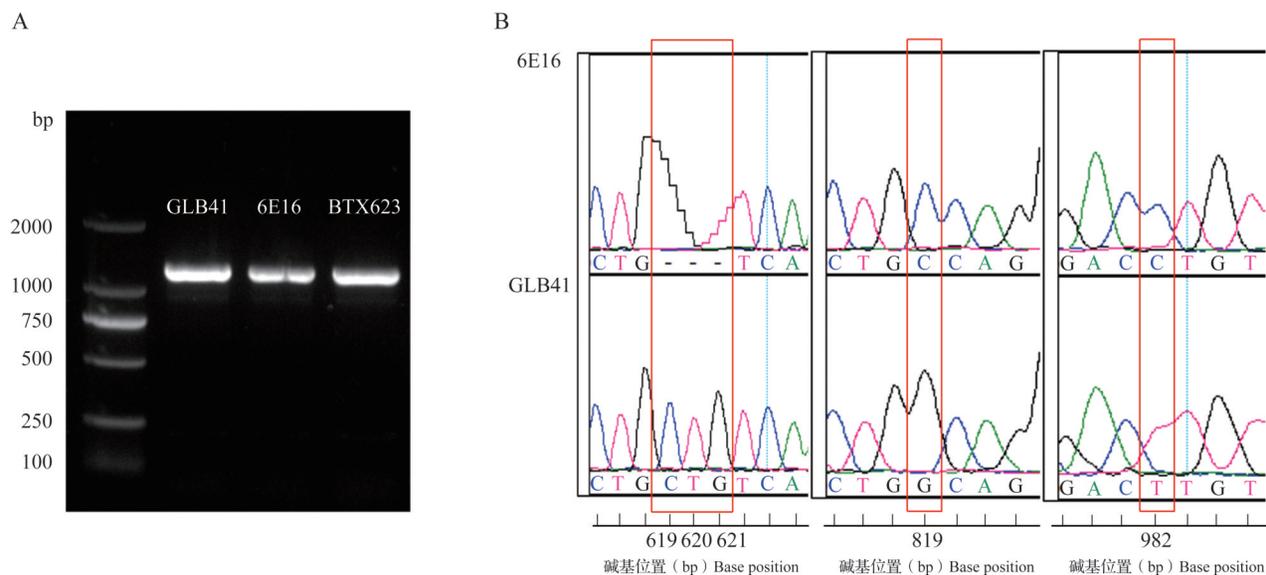
基因ID Gene ID	位置 (bp) Position	功能 Function
<i>Sobic.001G397600</i>	68291784~68294851	类似于负光调节蛋白
<i>Sobic.001G397700</i>	68314676~68318322	类似于TPR结构域蛋白
<i>Sobic.001G397800</i>	68329173~68336300	拓扑异构酶(DNA) II结合蛋白
<i>Sobic.001G397850</i>	68338508~68340278	未知功能
<i>Sobic.001G397900 (Yellow seed 2)</i>	68362756~68367370	与MYB结构域蛋白11相关,类似于MYB的结合蛋白
<i>Sobic.001G398000</i>	68369852~68377166	根特异性表达蛋白
<i>Sobic.001G398100 (Yellow seed 1)</i>	68399400~68400602	与MYB结构域蛋白11相关

对 GLB17 和 6E16 两个亲本进行测序验证,结果显示, *Sobic.001G397600*, *Sobic.001G397850*, *Sobic.001G398000* 的核苷酸序列未发生变化; *Sobic.001G397700*, *Sobic.001G397800* 核苷酸序列有 5 个 SNP 差异,但是氨基酸序列没有发生改变。*Yellow Seed 1* 与 MYB 结构域蛋白 11 有关,为调控高粱籽粒果皮颜色的基因^[16-17];泛基因组分析揭示包括测序品种 BTX623 在内的 4 个高粱品种中该基因的 5' 非翻译区和前两个外显子缺失,进而导致该基因功能的丧失^[13,15]。经琼脂糖凝胶电泳验证,本研究两个亲本材料中的 *Yellow Seed 1* 基因均与 BTX623 材料一样缺失 3.2 kb,包括 5' 非翻译区和第 1、2 外显子(图 4A)。但由于这两个亲本材料的籽粒分别呈现黄色和白色,因此认为籽粒颜色的差异不是由 *Yellow Seed 1* 调控的,而是由候选区间内另一个类似于 MYB 结合蛋白的编码基因调控,因其调控高

粱黄色籽粒性状,因此将其命名为 *Yellow Seed 2*。测序结果显示,相较于 6E16, GLB41 的 *Yellow Seed 2* 编码区内第 619~621 位插入 CTG 3 个碱基,导致增加了 1 个 Leu(亮氨酸),第 819 位 C 突变为 G,导致 Cys(半胱氨酸)突变为 Trp(色氨酸);第 912 位 C 突变为 T,但氨基酸序列无变化(图 4B),因此认为 *Yellow Seed 2* 是新的调控高粱籽粒颜色的基因。

2.5 *Yellow seed 2* 表达分析

进一步利用 qRT-PCR 对 *Yellow seed 2* 进行组织特异性表达分析(图 5),结果表明 *Yellow seed 2* 在不同的组织部位均有表达,成熟期种子表达量最高,其次是叶片和茎,根中表达量最低。GLB41 中 *Yellow seed 2* 的表达量显著高于 6E16 中籽粒。这可能是由于 *Yellow seed 2* 正向调控类黄酮类物质的生成进而影响高粱籽粒粒色的变化。



A: *Yellow Seed 1* 在 GLB41、6E16、BTX623 三份材料的琼脂糖电泳图; B: *Yellow Seed 2* 在 GLB41、6E16 两份材料的测序峰图
A: Agarose electropherogram of *Yellow Seed 1* in GLB41、6E16、BTX623; B: Sequencing peaks of *Yellow Seed 2* in GLB41 and 6E16

图4 凝胶电泳图及测序峰图

Fig.4 Agarose electropherogram and sequence peak map

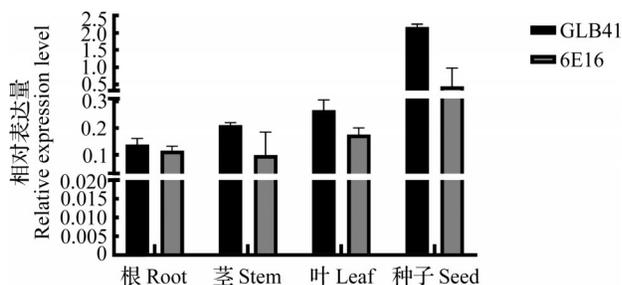


图5 *Yellow seed 2* 不同组织部位表达分析

Fig.5 Quantitative PCR expression analysis of *Yellow seed 2*

3 讨论

本研究采用两个不同粒色的材料 GLB41 和 6E16 构建 F_2 定位群体, 将控制高粱粒色性状基因精细定位至 1 号染色体上 BR13、P2 标记之间的 108 kb 内, 该区间的 7 个候选基因中 *Yellow seed 1* 和 *Yellow seed 2* 基因注释均为 MYB 转录因子。MYB 转录因子广泛存在于植物中, 是最大的转录因子家族之一, 功能丰富且重要, 参与很多基因的表达调控^[18-19]。MYB 常与 WD40、bHLH 形成 MBW 复合体, 调控类黄酮类物质合成途径上基因的表达, 进而调控黄酮、黄烷酮、黄酮醇和花色苷等类黄酮类物质的合成^[20-22]。模式植物拟南芥 MYB 转录因子中 R2R3 家族共分 25 个亚组^[23-25], S4~S7 亚组成员参与黄酮类的合成, 其中 S7 亚组成员 *AtMYB12*、*AtMYB11* 和 *AtMYB111*, 正向参与黄酮醇的生成^[26]; S6 亚组成员 *AtMYB75* 正向调控花色苷的合

成^[27-28]。白菜型油菜 *BrTT1* 基因是调节种皮色素生物合成的转录因子, 对 22 份不同籽粒颜色(黑籽、红褐籽和黄籽)的白菜型油菜 *BrTT1* 测序表明: 黄籽油菜的 *BrTT1* 外显子有 7 个 SNP, 内含子有 2 个片段的缺失, 这种差异造成油菜籽粒颜色的变化^[29-32]。

本研究中候选区间包含两个与 MYB 蛋白有关的基因: *Yellow seed 1* 和 *Yellow seed 2*。前人报道 *Yellow seed 1* 是控制高粱籽粒果皮颜色的重要基因, 在 242 份中国高粱种质资源中有 3 个单倍型, 说明该基因序列在中国高粱种质资源中序列相对保守, 单倍型 Hap1 和 Hap3 的高粱品种果皮呈红色或棕色, 单倍型 Hap2 的高粱品种果皮呈白色或黄色。泛基因组表明: 包括参考基因组 BTx623 等 4 个高粱品系中存在 3.2 kb 的缺失, 导致该基因缺失 5'-UTR、第 1 外显子和第 2 外显子, 造成了该基因功能的丧失^[14-15]。

经琼脂糖电泳显示两份亲本材料与 BTx623 一样缺失 3.2 kb, 但这两个材料的籽粒却呈现不同的颜色, 因此认为这两份材料的籽粒颜色由候选区间内的其他基因调控, 测序结果表明: *Yellow seed 2* 编码区第 619~621 位和第 819 位的改变造成该基因的氨基酸序列的改变, 推测 *Yellow seed 2* 为调控高粱籽粒颜色的新基因。该研究为控制高粱粒色的研究提供新的依据。但有关高粱粒色基因 *Yellow seed 2* 的功能验证以及具体的分子调控机制还需进行后续的深入研究, 可利用基因敲除方法进行功能验证。由于籽粒颜色受到多种因素调控, 类黄酮素、类胡萝卜素、原花青素等其他代谢物在调节籽

粒颜色的过程中发挥重要作用,利用代谢组进行关联分析,有利于后续的深入研究,为高粱籽粒颜色的调控机制以及酿酒和抗鸟害的品种选育提供参考和辅助等作用。

参考文献

- [1] Chen B R, Wang C Y, Wang G P, Zhu Z X, Xu N, Shi G S, Yu M, Wang N, Li J H, Hou J M. Genome-wide association study for starch content and constitution in sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench). *Journal of Integrative Agriculture*, 2019, 18(11):2446-2456
- [2] 张春来, 李艳锋, 赵威军, 赵靛, 王晨, 梁笃, 周福平. 高粱品质性状改良的分子遗传学基础. *植物生理学报*, 2015, 51(5):610-616
Zhang C L, Li Y F, Zhao W J, Zhao J, Wang C, Liang D, Zhou F P. Molecular genetic basis for biotechnological improvement of grain quality characteristics in sorghum. *Plant Physiology Journal*, 2015, 51(5):610-616
- [3] 杨玲, 王琪, 郭旭凯, 段冰, 郭睿, 邵强, 刘青山. 高粱单宁含量对清香型大曲白酒酒醅中细菌种群的影响. *中国酿造*, 2020, 39(7):83-88
Yang L, Wang Q, Guo X K, Duan B, Guo R, Shao Q, Liu Q S. Effect of tannin content of *sorghum* on bacterial community in fermented grains of Fen-flavor Daqu Baijiu. *China Brewing*, 2020, 39(7):83-88
- [4] Kumari P, Kumar V, Kumar R, Pahuja S. *Sorghum* polyphenols: Plant stress, human health benefits, and industrial applications. *Planta*, 2021, 254:47
- [5] 卢庆善, 孙毅. 杂交高粱遗传改良. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2005:40-41
Lu Q S, Sun Y. Genetic improvement of hybrid *sorghum*. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, 2005: 40-41
- [6] Petroni K, Tonelli C. Recent advances on the regulation of anthocyanin synthesis in reproductive organs. *Plant Science*, 2011, 181:219-229
- [7] Lian J P, Lu X C, Yin N W, Ma L J, Lu J, Liu X, Li J N, Lu J, Lei B, Wang R, Chai Y R. Silencing of *BnTT1* family genes affects seed flavonoid biosynthesis and alters seed fatty acid composition in *Brassica napus*. *Plant Science*, 2017, 254: 32-47
- [8] 范志勇, 左国营, 杜新勇, 吴兆征, 赵殿臣. 高粱原料的不同对酱香型白酒产酒情况的影响. *酿酒*, 2014, 41(4):36-41
Fan Z Y, Zuo G Y, Du X Y, Wu Z Z, Zhao D C. The influence of different sorghum raw materials on the production of Maotai-flavor liquor. *Liquor Making*, 2014, 41(4):36-41
- [9] 程度, 曹建兰, 王珂佳, 李豆南, 罗小叶, 陈杰, 邱树毅. 高粱对酱香型白酒品质影响的研究进展. *食品科学*, 2022, 43(7):356-364
Cheng D, Cao J L, Wang K J, Li D N, Luo X Y, Chen J, Qiu S Y. Progress on the influence of sorghum on the quality of Maotai-flavor liquor. *Food Science*, 2022, 43(7):356-364
- [10] Wang Y H, Xiao L, Guo S M, An F Y, Du D Z. Fine mapping and whole-genome resequencing identify the seed coat color gene in *Brassica rapa*. *PLoS ONE*, 2016, 11: 64-66
- [11] Wang Y H, Xiao L, Dun X L, Liu K D, Du D Z. Characterization of the *BrTT1* gene responsible for seed coat color formation in Dahuang (*Brassica rapa* L. landrace). *Molecular Breeding*, 2017, 37: 137-150
- [12] Earp C F, McDonough C M, Rooney L W. Microscopy of pericarp development in the caryopsis of *Sorghum bicolor* Moench. *Journal of Cereal Science*, 2004, 39:21-27
- [13] Zhang L Y, Xu J X, Ding Y Q, Zou G H. GWAS of grain color and tannin content in Chinese *sorghum* based on whole genome sequencing. *Theoretical and Applied Genetics*, 2023, 136:77-94
- [14] Nida H, Girma G, Mekonen M, Lee S, Seyoum A, Dessalegn K, Tadesse T, Ayana G, Senbetay T, Tesso T, Ejeta G, Meng-iste T. Identification of sorghum grain mold resistance loci through genome wide association mapping. *Journal of Cereal Science*, 2019, 85:295-304
- [15] Tao Y, Luo H, Xu J, Cruickshank A, Zhao X, Teng F, Hathorn A, Wu X, Liu Y, Shatte T, Jordan D, Jing H, Mace E. Extensive variation within the pan-genome of cultivated and wild sorghum. *Nature Plants*, 2021, 7:66-77
- [16] Dykes L. *Sorghum* phytochemicals and their potential impact on human health. *Methods in Molecular Biology*, 2019, 1931: 121-140
- [17] Dykes L, Rooney W L, Rooney L W. Evaluation of phenolics and antioxidant activity of black *sorghum* hybrids. *Journal of Cereal Science*, 2013, 58:278-283
- [18] Abe H, Urao T, Ito T, Seki M, Shinozaki K. Arabidopsis AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling. *The Plant Cell*, 2003, 15(1):63-78
- [19] Wang X, Niu Y, Zheng Y. Multiple functions of MYB transcription factors in abiotic stress responses. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(11):6125
- [20] Dubos C, Stracke R, Grotewold E, Weisshaar B, Martin C, Lepiniec L. MYB transcription factors in Arabidopsis. *Trends in Plant Science*, 2010, 15(10):573-581
- [21] Bendahmane M, Dubois A, Raymond O, Bris M L. Genetics and genomics of flower initiation and development in roses. *Journal of Experimental Botany*, 2013, 64(4):847-857
- [22] Nemie-Feyissa D, Heidari B, Blaise M, Lillo C. Analysis of interactions between heterologously produced bHLH and MYB proteins that regulate anthocyanin biosynthesis: Quantitative interaction kinetics by Microscale Thermophoresis. *Phytochemistry*, 2015, 11:21-26
- [23] Stracke R, Werber M, Weisshaar B. The R2R3-MYB gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Current Opinion in Plant Biology*, 2001, 4(5):447-456
- [24] Stracke R, Ishihara H, Huep G, Barsch A, Mehrrens F,

- Niehaus K, Weisshaar B. Differential regulation of closely related R2R3-MYB transcription factors controls flavonol accumulation in different parts of the *Arabidopsis thaliana* seedling. *The Plant Journal*, 2007, 50 (4):660-677
- [25] Appelhagen I, Lu G H, Huep G, Schmelzer E, Weisshaar B, Sagasser M. TRANSPARENT TESTA1 interacts with R2R3 MYB factors and affects early and late steps of flavonoid biosynthesis in the endothelium of *Arabidopsis thaliana* seeds. *Plant J*, 2011, 67: 406-419.
- [26] Gatica-Arias A, Farag M A, Stanke M, Matoušek J, Wessjohann L, Weber G. Flavonoid production in transgenic hop (*Humulus lupulus* L.) altered by PAP1/MYB75 from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Reports*, 2012, 31 (1) : 111-119
- [27] Jeff V, Cahid C, Eunseog Y, Chen J, Cazzonelli C I, Georg S. Transgene silencing and transgene-derived siRNA production in tobacco plants homozygous for an introduced AtMYB90 construct. *PLoS ONE*, 2012, 7 (2):315-341
- [28] Habyarimana E, Dall'Agata M, De Franceschi P, Baloch F S. Genome-wide association mapping of total antioxidant capacity, phenols, tannins, and flavonoids in a panel of *Sorghum bicolor* and *S. bicolor* × *S. halepense* populations using multi-locus models. *PLoS ONE*, 2019, 17: 214-227
- [29] Baudry A, Heim M, Dubreucq B, Caboche M, Weisshaar B, Lepiniec L. TT2, TT8, and TTG1 synergistically specify the expression of BANYULS and proanthocyanidin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 2004, 39:366-380
- [30] Matsui K, Tanaka H, Ohme-Takagi M. Suppression of the biosynthesis of proanthocyanidin in *Arabidopsis* by a chimeric PAP1 repressor. *Plant Biotechnol Journal*, 2004. 2: 487-493
- [31] Gonzalez A, Zhao M, Leavitt J M, Lloyd A M. Regulation of the anthocyanin biosynthetic pathway by the TTG1/bHLH/Myb transcriptional complex in *Arabidopsis* seedlings. *The Plant Journal*, 2008, 53: 814-827
- [32] Yan M L. Cloning and SNP analysis of TT1 gene in *Brassica juncea*. *Acta Agronomica Sinica*, 2010, 36: 1634-1641