

DOI:10.11686/cyxb2025132

http://cyxb.magtech.com.cn

田鹏宇, 张义茹, 李旭凯, 等. 谷子 *SiCCoAOMT* 基因家族的鉴定及表达分析. 草业学报, 2026, 35(3): 195—209.

TIAN Peng-yu, ZHANG Yi-ru, LI Xu-kai, *et al.* Identification and expression analysis of the *SiCCoAOMT* gene family in *Setaria italica*. Acta Prataculturae Sinica, 2026, 35(3): 195—209.

谷子 *SiCCoAOMT* 基因家族的鉴定及表达分析

田鹏宇¹, 张义茹¹, 李旭凯², 宋敏丽^{1*}

(1. 太原师范学院生物科学与技术学院, 山西 晋中 030619; 2. 山西农业大学生命科学学院, 山西 晋中 030801)

摘要: CCoAOMT 蛋白家族属于 S-腺苷-L-甲硫氨酸 (SAM) 依赖性甲基转移酶, 在植物木质素合成和生长发育中具有关键作用, 但在谷子中的功能尚未被系统研究。本研究以谷子基因组数据为基础, 鉴定 *SiCCoAOMT* 家族成员, 并进行生物信息学分析及非生物胁迫响应验证。结果表明: 在谷子 *SiCCoAOMT* 基因家族中鉴定出 5 个 *SiCCoAOMT* 基因: *Si2g25370*、*Si4g06670*、*Si6g06400*、*Si6g19790* 和 *Si6g19800*, 定位于第 2、4 和 6 号染色体, 编码蛋白的理化性质差异明显。通过系统发育分析, 将谷子 *SiCCoAOMT* 基因与拟南芥、水稻和狗尾草的同源基因划分为两个亚族, 且同一亚族内的成员保守序列和基因结构高度相似。CCoAOMT 基因家族成员均包含相同的蛋白保守结构域 (motif 1、motif 2、motif 4、motif 5 和 motif 6), 同一亚族的成员具有相似的 motif。顺式作用元件预测中, *SiCCoAOMT2* 和 *SiCCoAOMT4* 中含有大量关于光响应 (Sp1)、植物激素 (ABRE、CGTCA-motif 和 TGACG-motif) 和非生物胁迫 (ARE) 的作用元件。谷子与水稻、狗尾草共线性基因对分析发现, 谷子和狗尾草 CCoAOMT 受到中性选择的同时, 还存在纯化选择; 谷子与水稻 CCoAOMT 之间存在正选择效应。加权基因共表达网络分析 (WGCNA) 发现, *SiCCoAOMT2* 和 *SiCCoAOMT4* 被划分在 yellowgreen 模块中。对‘晋谷 21’幼苗进行干旱和低温胁迫处理, 利用 qRT-PCR 对 *SiCCoAOMT* 家族基因进行表达模式分析发现, *SiCCoAOMT2* 和 *SiCCoAOMT4* 表达量明显上调。基于 360 份谷子和 38 份狗尾草种质资源的单核苷酸多态性 (SNPs) 和插入/缺失变异 (InDels) 基因型信息分析发现, *SiCCoAOMT5* 有利于谷子籽粒的生长发育, 对谷子的产量提高和抵抗胁迫有一定的作用。综上所述, 本研究对谷子 *SiCCoAOMT* 基因家族进行了系统地分析, 鉴定出 *SiCCoAOMT2* 和 *SiCCoAOMT4* 是谷子响应干旱及寒冷胁迫的关键基因, 为谷子抗逆境胁迫和生长调控机制的深入研究提供了一定的依据。

关键词: 谷子; CCoAOMT 基因家族; 非生物胁迫; 系统进化; 单倍型

Identification and expression analysis of the *SiCCoAOMT* gene family in *Setaria italica*

TIAN Peng-yu¹, ZHANG Yi-ru¹, LI Xu-kai², SONG Min-li^{1*}

1. College of Biological Sciences and Technology, Taiyuan Normal University, Jinzhong 030619, China; 2. College of Life Sciences, Shanxi Agricultural University, Jinzhong 030801, China

Abstract: The caffeoyl-CoA O-methyltransferase (CCoAOMT) protein family belongs to the S-adenosyl-L-methionine (SAM)-dependent methyltransferase superfamily. Members of the CCoAOMT family are known to play key roles in plant lignin synthesis, as well as in growth and development. However, their function in *Setaria italica* has not been systematically studied. In this study, members of the *SiCCoAOMT* gene family were identified from *S. italica* genomic data, and bioinformatics analysis was conducted. In addition, the expression patterns of these

收稿日期: 2025-04-17; 改回日期: 2025-06-16

基金项目: 国家自然科学基金联合基金项目 (U21A20216) 和山西省研究生教育创新计划科研创新项目 (2024KY699) 资助。

作者简介: 田鹏宇 (2001—), 男, 山西太原人, 在读硕士。E-mail: tdscc@163.com

* 通信作者 Corresponding author. E-mail: smlcc@126.com

genes under abiotic stress were determined. Five *SiCCoAOMT* genes in the *SiCCoAOMT* gene family were identified in the *S. italica* genome, and were located on chromosomes 2, 4, and 6. The physical and chemical properties differed among the five encoded putative proteins. In a phylogenetic analysis, the *SiCCoAOMT* genes of *S. italica* were divided into two subfamilies with homologous genes from *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa*, and *Setaria viridis*. Members of the same subfamily shared high similarity in terms of conserved sequences and gene structures. All members of the *CCoAOMT* gene family contained the same conserved protein structure domains (motif 1, motif 2, motif 4, motif 5, and motif 6), and members of the same subfamily had similar motifs. Prediction of *cis*-acting elements showed that *SiCCoAOMT2* and *SiCCoAOMT4* contained many elements responsive to light (Sp1), plant hormones (ABRE, CGTCA-motif, and TGACG-motif) and abiotic stresses (ARE). Collinearity analysis among *S. italica*, *O. sativa*, and *S. viridis* revealed that the *CCoAOMT* orthologs in *S. italica* and *S. viridis* have been subject to neutral selection and purifying selection, and the *CCoAOMT* orthologs in *S. italica* and *O. sativa* have been subject to positive selection. In a weighted gene co-expression network analysis, *SiCCoAOMT2* and *SiCCoAOMT4* were grouped in the yellowgreen module. To further verify the roles of *SiCCoAOMT* genes in stress responses, seedlings of the cultivar ‘Jingu 21’ were subjected to drought and low-temperature stresses, and the *SiCCoAOMT* transcript levels were analyzed by qRT-PCR. The results showed that the transcript levels of *SiCCoAOMT2* and *SiCCoAOMT4* were significantly up-regulated under both stress conditions. Based on single nucleotide polymorphism and insertion/deletion genotype information for 360 *S. italica* and 38 *S. viridis* germplasm resources, haplotype analysis showed that *SiCCoAOMT5* was beneficial for the growth and development of *S. italica* grains, and contributed to the yield and stress resistance of *S. italica*. Overall, this study systematically characterized the *SiCCoAOMT* gene family in *S. italica*, identifying *SiCCoAOMT2* and *SiCCoAOMT4* as key genes involved in drought and cold stress responses. These findings provide a foundation for further exploration of the stress resistance and growth regulation mechanisms of *S. italica*.

Key words: *Setaria italica*; *CCoAOMT* gene family; abiotic stress; phylogenetic evolution; haplotype

CCoAOMT (caffeoyl-CoA O-methyltransferase) 蛋白家族属于 S-腺苷-L-甲硫氨酸 (SAM) 依赖性甲基转移酶^[1], 其通过催化 G 型木质素前体咖啡酰辅酶 A (caffeoyl-CoA) 3-羟基位点的甲基化反应^[2], 驱动木质部中木质素的生物合成, 从而增强植物茎秆机械强度、维持细胞壁结构完整性、提高病原体抗性 & 水分运输效率, 最终赋予植株高硬度和抗腐烂特性^[3-4]。自 1989 年 Kuhn 与 Pakusch 团队分别在胡萝卜 (*Daucus carota*) 和欧芹 (*Petroselinum crispum*) 悬浮细胞中发现 CCoAOMT 活性以来^[5-6], 该基因功能研究逐步深入: Schmitt 等^[7]于 1991 年首次在欧芹中克隆到 CCoAOMT 的 cDNA, 但没有确定其功能。1994 年 Ye 等^[8]在百日草 (*Zinnia elegans*) 中发现了 5~10 种 CCoAOMT, 确定了 CCoAOMT 参与植物木质素的生物合成。除上述植物外, 在拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)^[9-10]、水稻 (*Oryza sativa*)^[11]、狗尾草 (*Setaria viridis*)^[12]、黄麻 (*Corchorus capsularis*)^[1] 等植物中先后发现了多种 CCoAOMT 基因。例如, 甜菜 (*Beta vulgaris*) *BvCCoAOMT* 基因可以提高作物的抗旱和耐盐特性^[13]; 玉米 (*Zea mays*) *ZmCCoAOMT* 在干旱胁迫下活性显著上调^[14]; 盐诱导可以使水稻 *OsCCoAOMT* 基因显著表达^[15], 表明 CCoAOMT 促使木质素合成增加, 以应对干旱和盐碱等非生物胁迫。

谷子 (*Setaria italica*) 为二倍体禾本科作物, 起源于我国黄河流域, 由狗尾草驯化而来^[16]。其具有抗寒抗旱性强、生育期短、适应性广等特性, 是我国北方传统主栽作物, 亦适宜中国中南部地区种植^[17]。在长期驯化过程中, 谷子形成丰富的抗逆种质资源, 对干旱、高温等胁迫表现出显著适应性^[18]。值得注意的是, 全球气候变暖引发的“种植带北移”现象^[19], 加剧了我国北方干旱、洪涝等极端气候事件, 进一步显示谷子抗逆研究的必要性。作为最早完成基因组测序的杂粮作物, 谷子基因组精简 (约 515 Mb), 遗传操作便捷; 山西农业大学培育的‘晋谷 21’超早熟突变种‘xiaomi’兼具 C₄ 植物高效光合特性与抗逆遗传潜力^[20], 为解析禾本科抗逆机制及基因挖掘提供了理想模型, 本研究选择此变种进行研究。

我国北方农业区受水资源短缺与极端气候叠加影响^[21],作物减产问题严峻。*CCoAOMT* 基因家族在植物抗逆中的作用已被广泛报道,但目前谷子 *SiCCoAOMT* 的研究较少,仅在研究狗尾草 *SevirCCoAOMT* 时,联合谷子 *SiCCoAOMT*,构建了系统进化树^[22]。本研究基于全基因组鉴定谷子 *SiCCoAOMT* 家族成员,联合狗尾草、水稻、拟南芥进行跨物种进化比较,分析 *CCoAOMT* 家族在禾本科物种间的进化关系;系统分析 *SiCCoAOMT* 家族的结构特征、功能多样性,结合 qRT-PCR 验证 *SiCCoAOMT* 在非生物胁迫下的动态表达模式;通过加权基因共表达网络分析(weighted gene co-expression network analysis, WGCNA)构建了高表达 *SiCCoAOMT* 基因的共表达网络,筛选出模块中的核心基因及候选基因、并对其进行富集分析,系统解析谷子 *SiCCoAOMT* 基因家族的分子特征与抗逆调控网络,为其在谷子抗逆育种中的进一步研究奠定基础,助力应对“温带北移”引发的生态适应性挑战,对保障区域粮食安全具有重要战略意义。

1 材料与方法

1.1 *SiCCoAOMT* 基因家族成员的鉴定及理化性质分析

在国家水稻数据中心(<https://www.ricedata.cn/>)检索已报道的水稻 *OsCCoAOMT* 家族成员作为参考序列,从 MDSi 数据库(<http://foxtail-millet.biocloud.net/home>)进行序列同源比对($E\text{-value}<10^{-5}$),并下载‘xiaomi’基因组和注释文件。在 Pfam 数据库检索 CCoAOMT 蛋白序列的 HMM 特征文件(PF01596),通过 TBtools (v 1.127)^[23]对‘xiaomi’蛋白序列进行同源比对,在蛋白数据库中寻找序列相似的基因(Expect=10)。通过同源比对结果和 HMM 结果,查找 *SiCCoAOMT* 基因家族成员,利用 SMART(<http://smart.embl.de/>)和 Pfam(<http://pfam.xfam.org/>)数据库进行蛋白保守结构域分析,鉴定出含相同保守结构域的基因。

从 Phytozome 数据库(<https://phytozome-next.jgi.doe.gov>)中下载水稻、狗尾草和拟南芥的基因组和注释信息,利用 MEGA 11(v 11.0.13)^[24]对谷子、水稻、狗尾草和拟南芥的 *CCoAOMT* 家族蛋白进行多序列比对,采用近邻相接法构建系统发育树。

1.2 *SiCCoAOMT* 家族成员基因结构、motif 分布、启动子顺式作用元件及共线性分析

使用 MEME (<https://meme-suite.org/meme/tools/meme>) 工具^[25]对谷子、拟南芥、水稻和狗尾草的 *CCoAOMT* 蛋白序列进行 motif 分析。利用 CELLO (v 2.5)^[26]进行亚细胞定位预测。利用 TBtools 中的 Gene Structure View (advanced)功能进行进化树、保守基序和基因结构可视化。

取启动子序列起始密码子上游 2000 bp,将其上传到 PlantCARE 数据库(<https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>),对谷子、拟南芥、水稻和狗尾草 *CCoAOMT* 家族启动子顺式作用元件进行分析。对结果进行筛选整理后,通过 R (4.1.2)软件(<https://www.r-project.org/>)对其作用元件分类和可视化。利用 TBtools 中的 One Step MCScanX 工具对谷子、狗尾草和水稻的 *CCoAOMT* 蛋白序列进行共线性关系分析。并使用 dnaSP 6 软件计算谷子、狗尾草和水稻的共线性基因对的非同义替换率(K_a)与同义替换率(K_s),分析选择压力(K_a/K_s)。

1.3 WGCNA 分析构建谷子 *SiCCoAOMT* 家族基因共表达网络

加权基因共表达网络分析(weighted gene co-expression network analysis, WGCNA)是一种分析多个样本基因表达模式的方法。本研究采用优质谷种‘晋谷 21’^[27],与谷子模式品种‘xiaomi’对比,分析‘晋谷 21’和‘xiaomi’不同组织和发育时期 *SiCCoAOMT* 基因的表达量,并利用 R 4.1.2 软件绘制热图,依据基因表达模式进行聚类。

利用 R 的 WGCNA 包剔除缺失值过多的样本,用 hclust 函数进行样本聚类并过滤离群样本,之后用函数 pick Soft Threshold 确定合适的软阈值(power),构建符合无尺度网络分布的基因网络。基于基因之间相关性 power 次幂,构建 TOM 矩阵和邻接矩阵,划分并挑选出含 *SiCCoAOMT* 基因模块。

1.4 谷子 *SiCCoAOMT* 家族基因非生物胁迫的表达模式分析及验证

2024 年 10 月,以‘晋谷 21’为试验材料,将种子种入栽培基质,置于恒温培养箱(BIC-300,中国上海)中培养。培养条件:16 h 光照/8 h 黑暗、温度 25℃、相对湿度 80%。培养至两叶一心时,取长势一致的谷子幼苗,分别进行干旱[20% (w/v)聚乙二醇 6000(polyethylene glycol 6000, PEG-6000)]和低温(4℃)处理。分别在处理 0、3、6、12 和 24 h 时采集叶片,每个处理时间点 3 次生物学重复,经液氮速冻后,存于-80℃冰箱。

利用孙蓉等^[27]的方法,对上述取样和已有的‘晋谷 21’灌浆 S3 期籽粒样品,进行总 RNA 提取,并进行反转录生成 cDNA。使用 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 网站中的 Primer-BLAST 工具设计引物,以谷子 *Actin7* 基因作为内参基因(表 1),使用 HiScript III U+One Step qRT-PCR Probe 5×Master Mix(诺唯赞)试剂盒,进行 qRT-PCR。反应程序为:95 °C 预变性 2 min;95 °C 变性 10 s,58 °C 退火 10 s,72 °C 延伸 50 s,40 个循环。每个样本设置 3 个机械重复,使用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法^[28]计算 *SiCCoAOMT* 基因相对表达量,使用 R 绘图。

表 1 qRT-PCR 引物序列

Table 1 qRT-PCR primer sequences

基因名称 Gene name	上游引物 Forward primer (5'-3')	下游引物 Reverse primer (3'-5')
<i>SiActin7</i>	AGGGCTGTCTTCCCGAGTAT	ATGGCTCACACCATCACCAG
<i>SiCCoAOMT1</i>	TGATCCATCCGAATCGCCAG	CACCGAGCACGGAGATTGAT
<i>SiCCoAOMT2</i>	TCGGGTTTCGACTTGGAATGG	TCCACAGCGTGTGTGTCGTAG
<i>SiCCoAOMT3</i>	GGCAGCCCTGCTTCACATTA	TGAATCGCAATGCGGCAATC
<i>SiCCoAOMT4</i>	GCGAGTACTACGAGATCGGC	GACGTCCAGACGGAATGGAA
<i>SiCCoAOMT5</i>	GGTGCGCCAAGCCTAAACTG	GGCGTTCAAGGGACGGTACT

1.5 单倍型分析

基于前期研究所得 360 份谷子和 38 份狗尾草种质资源的单核苷酸多态性(SNPs)和插入/缺失变异(InDels)基因型信息^[29],取谷子 *SiCCoAOMT1*~5 上下游编码区 2000 bp,通过 CandiHap 软件^[30]进行单倍型分析。

2 结果与分析

2.1 谷子 *SiCCoAOMT* 家族成员鉴定及系统进化分析

在国家水稻数据中心检索到已报道的水稻 *OsCCoAOMT* 基因 *LOC_Os08g38910*^[31],将其作为种子序列,与‘xiaomi’基因组 blast 序列比对。从 Pfam 数据库利用 HMM(PF01596)检索 *CCoAOMT* 相关蛋白序列,筛选出谷子中含 *CCoAOMT* 基序的基因,其中包含 blast 比对得到的基因。通过 Swiss-Prot 和 SMART 数据库对这些基因的保守结构域进行比对分析,发现 5 个基因的编码蛋白含有 *CCoAOMT* 域(Swiss-Prot:Q43095)。最终确定 5 个谷子 *CCoAOMT* 基因,将其分别命名为 *SiCCoAOMT1*~5。

将谷子 *SiCCoAOMT* 基因与 7 个拟南芥、6 个水稻和 6 个狗尾草的 *CCoAOMT* 基因构建系统发育树(图 1),探究 *CCoAOMT* 蛋白家族的系统进化关系。根据系统发育树,这些蛋白被划分成 2 个亚家族。

2.2 谷子 *SiCCoAOMT* 家族理化性质分析、染色体定位及共线性分析

将拟南芥、水稻、狗尾草和谷子 4 个物种的 *CCoAOMT* 家族蛋白进行理化性质及亚细胞定位分析(表 2)。5 个谷子 *SiCCoAOMT* 家族成员定位于 2、4 和 6 号染色体上(图 2),其中,6 号染色体分布最多,有 3 个 *SiCCoAOMT* 成员。染色体定位表明,*SiCCoAOMT* 家族成员在谷子染色体两端分布,与狗尾草 *SevirCCoAOMT* 基因在染色体上的分布类似;在 6 号染色体上,*SiCCoAOMT* 的个数比 *SevirCCoAOMT* 少 1 个。分析谷子 *SiCCoAOMT* 基因编码蛋白的理化性质发现,*SiCCoAOMT* 蛋白由 202~544 个氨基酸残基组成,分子量(molecular weight, MW)为 22591.96~58335.97 Da,理论等电点(pI)为 4.93~9.01,不稳定指数为 26.21~50.34(表 2)。通过亚细胞定位预测,5 个 *SiCCoAOMT* 被定位于叶绿体、细胞质中,只有 *SiCCoAOMT3* 可能存在于线粒体中。

将谷子 *SiCCoAOMT* 序列与水稻、狗尾草进行比对及共线性分析,发现 *SiCCoAOMT1*~4 基因与水稻、狗尾草的 *CCoAOMT* 成员具有共线性关系,仅 *SiCCoAOMT5* 与水稻、狗尾草基因组没有共线性关系(图 2)。其中 *SiCCoAOMT1* 和 *SiCCoAOMT4* 基因在水稻、狗尾草 *CCoAOMT* 家族中均有 2 个同源基因。进一步计算谷子、水稻和狗尾草的 *CCoAOMT* 共线性基因对的 K_a/K_s 值(表 3),发现谷子与狗尾草共线性基因对的 K_a/K_s 值大部分

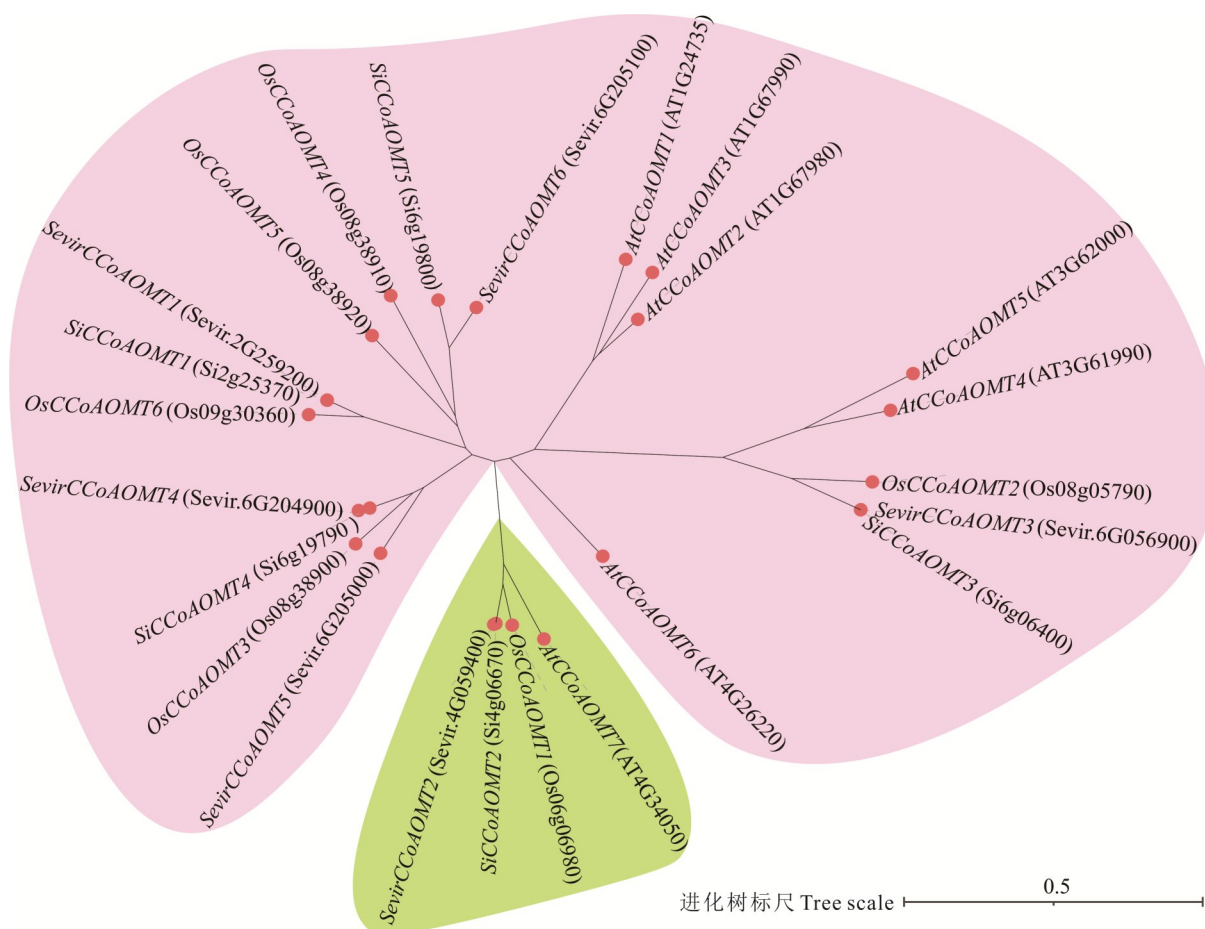


图 1 谷子、拟南芥、水稻和狗尾草 *CCoAOMT* 家族蛋白发育关系

Fig. 1 Phylogenetic relationships of the *CCoAOMT* family proteins in *S. italica*, *A. thaliana*, *O. sativa* and *S. viridis*

趋近于 1, 但是 *SiCCoAOMT3* 与 *Sevir. 6G056900* 的 K_a/K_s 值小于 1 ($K_a/K_s=0.725$)。这说明谷子和狗尾草 *CCoAOMT* 受到中性选择的同时, 还存在纯化选择, 由此可能造成 *CCoAOMT-like* 的减少, 使 *CCoAOMT* 的功能更加集中, 但是会使 *SiCCoAOMT* 的抗逆能力弱于 *SevirCCoAOMT*。谷子与水稻共线性基因对的 $K_a/K_s > 1$, 说明谷子和水稻之间存在正选择效应, *SiCCoAOMT* 可能进化出比 *OsCCoAOMT* 更适应环境的抗逆防御功能, 使谷子更易在干旱、低温等逆境胁迫中生存。

2.3 谷子 *SiCCoAOMT* 家族基因结构和保守序列分析

对谷子、拟南芥、水稻和狗尾草的 *CCoAOMT* 家族基因结构进行分析, 结果表明 *CCoAOMT* 基因包含 4~9 个外显子, 3~8 个内含子 (图 3A)。分析保守序列发现, 4 个物种所有 *CCoAOMT* 成员均包含 motif 1、motif 2、motif 4、motif 5 和 motif 6 (图 3B)。其中拟南芥 *AtCCoAOMT4* 含有的 motif 最少 (6 个)。与其他成员相比, *SiCCoAOMT5* 蛋白序列明显较长。通过对 4 个物种的 *CCoAOMT* 成员保守序列分析发现, motif 1、motif 2、motif 4~6 在 *CCoAOMT* 家族中广泛分布, 4 个物种同一亚族的 *CCoAOMT* 成员中的 motif 组成具有相似性。

2.4 谷子 *SiCCoAOMT* 家族启动子顺式作用元件预测

取谷子、拟南芥、水稻和狗尾草 *CCoAOMT* 家族启动子序列起始密码子上游 2000 bp, 将其上传到 PlantCARE 数据库, 进行启动子顺式作用元件分析。对结果进行筛选整理后, 通过 R 对其作用元件分类和可视化, 以研究谷子 *SiCCoAOMT* 基因在生物和非生物胁迫的应答及植物激素信号可能的机理 (图 4)。谷子 *SiCCoAOMT* 家族成员的功能响应元件包括: 1) 植物生长发育元件: ACE、Box 4、G-box、GATA-motif、Sp1、TCCC-motif、A-box、CAT-box、G-Box、I-box、ATCT-motif、AE-box、GT1-motif、RY-element、TCT-motif 等; 其中, 光响应元件 G-box 在 *SiCCoAOMT2* 和 *SiCCoAOMT4* 中分布较多, *SiCCoAOMT2* 中的光响应元件 Sp1 分布

表 2 4种植物 CCoAOMT 基因家族编码蛋白理化性质

Table 2 Physicochemical properties of CCoAOMT family proteins encoded by the genes of four plant species

基因名称 Gene name	基因号 Gene ID	蛋白长度 Protein length (aa)	分子量 Molecular weight (Da)	等电点 Isoelectric point	不稳定指数 Instability index	亚细胞定位 Subcellular localization
SiCCoAOMT1	Si2g25370	242	25798.61	5.04	33.80	叶绿体 Chloroplast
SiCCoAOMT2	Si4g06670	265	29517.68	5.24	26.54	细胞质 Cytoplasmic
SiCCoAOMT3	Si6g06400	295	32293.69	9.01	50.34	叶绿体 Chloroplast, 线粒体 Mitochondrion
SiCCoAOMT4	Si6g19790	202	22591.96	5.26	26.21	细胞质 Cytoplasmic
SiCCoAOMT5	Si6g19800	544	58335.97	4.93	48.70	细胞质 Cytoplasmic, 叶绿体 Chloroplast
AtCCoAOMT1	AT1G24735	291	33157.44	6.89	31.20	细胞质 Cytoplasmic
AtCCoAOMT2	AT1G67980	232	26114.06	5.16	20.45	细胞质 Cytoplasmic
AtCCoAOMT3	AT1G67990	233	26350.49	5.25	19.47	细胞质 Cytoplasmic
AtCCoAOMT4	AT3G61990	290	32168.92	5.23	41.90	叶绿体 Chloroplast, 细胞核 Nucleus
AtCCoAOMT5	AT3G62000	352	39671.76	9.05	38.35	细胞核 Nucleus
AtCCoAOMT6	AT4G26220	232	25945.79	5.37	36.58	细胞质 Cytoplasmic
AtCCoAOMT7	AT4G34050	286	32473.04	5.81	39.11	细胞质 Cytoplasmic
OsCCoAOMT1	LOC_Os06g06980	260	28847.77	5.21	27.11	细胞质 Cytoplasmic
OsCCoAOMT2	LOC_Os08g05790	317	34307.55	9.08	36.74	叶绿体 Chloroplast
OsCCoAOMT3	LOC_Os08g38900	252	27771.74	5.11	29.60	细胞质 Cytoplasmic
OsCCoAOMT4	LOC_Os08g38910	292	31897.36	5.34	43.26	细胞质 Cytoplasmic
OsCCoAOMT5	LOC_Os08g38920	234	25883.49	5.57	29.56	细胞质 Cytoplasmic, 叶绿体 Chloroplast
OsCCoAOMT6	LOC_Os09g30360	258	27132.08	5.09	34.32	细胞质 Cytoplasmic, 叶绿体 Chloroplast
SevirCCoAOMT1	Sevir.2G259200	242	25798.61	5.04	33.80	叶绿体 Chloroplast
SevirCCoAOMT2	Sevir.4G059400	265	29544.71	5.24	25.82	细胞质 Cytoplasmic
SevirCCoAOMT3	Sevir.6G056900	297	32568.99	9.01	49.82	叶绿体 Chloroplast, 线粒体 Mitochondrion
SevirCCoAOMT4	Sevir.6G204900	246	27324.29	5.09	31.64	细胞质 Cytoplasmic
SevirCCoAOMT5	Sevir.6G205000	245	26808.57	5.17	29.79	细胞质 Cytoplasmic
SevirCCoAOMT6	Sevir.6G205100	309	33724.22	6.27	47.54	叶绿体 Chloroplast, 线粒体 Mitochondrion

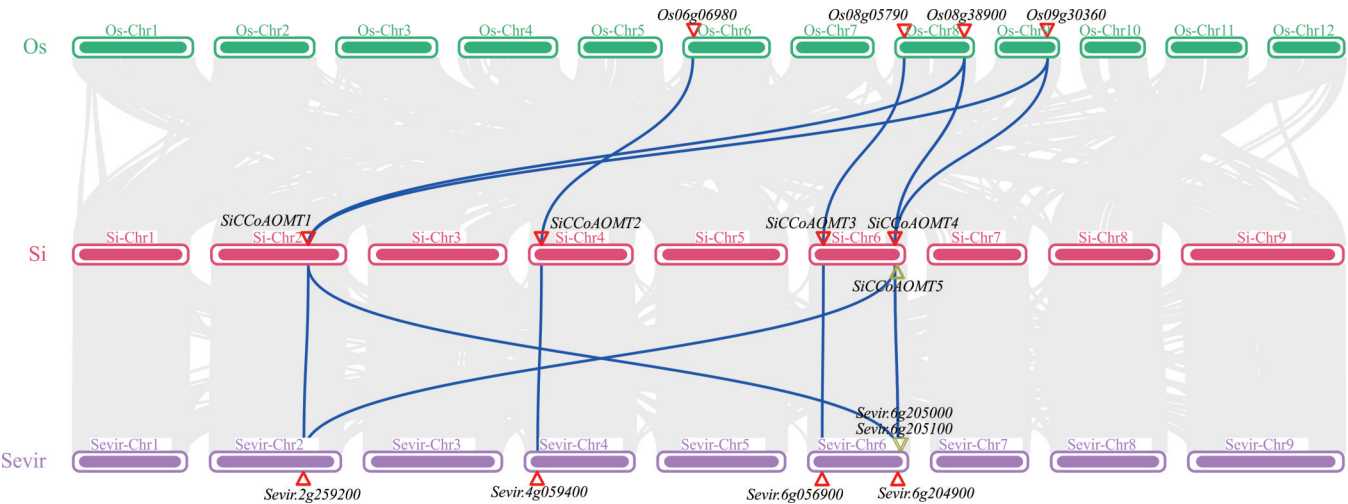


图 2 谷子、水稻和狗尾草 CCoAOMT 家族基因共线性

Fig. 2 Synteny of CCoAOMT family genes among millet, rice, and foxtail millet

较多,大量的光响应元件可以增强对光胁迫的应答,协调昼夜节律,有效应对昼夜较大的温差。2)植物激素应答元件:ABRE(参与脱落酸响应),CGTCA-motif 和 TGACG-motif(参与茉莉酸甲酯响应)、GARE-motif(参与赤霉素响应)、TGA-element 和 AuxRR-core(参与生长素响应)、TCA-element(参与水杨酸响应);其中,ABRE、CGTCA-motif 和 TGACG-motif 在 *SiCCoAOMT2* 和 *SiCCoAOMT4* 中分布较多,ABRE 可以在干旱或盐胁迫条件下激活 ABA 应答基因的表达^[32],MeJA 响应元件(CGTCA-motif 和 TGACG-motif)在遇到病虫害时,可激活防御基因表达^[33]。3)非生物和生物胁迫应答元件:LTR(参与低温响应)、ARE(参与无氧响应)、MBS(MYB 结合位点参与干旱诱导)、TC-rich repeats(参与防御和应激响应);其中,ARE(参与无氧响应)在 *SiCCoAOMT3* 中分布最多,可以在洪涝、水淹等无氧条件下,促使植物产生能量,支持植物在低氧环境中的生存。

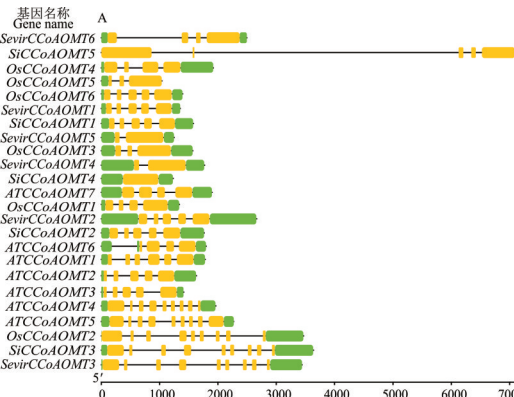


图3 谷子、拟南芥、水稻和狗尾草 *CCoAOMT* 家族基因结构

Fig. 3 Structural of the *CCoAOMT* family genes in millet, arabidopsis, rice, and foxtail millet

A: 拟南芥、水稻、狗尾草、谷子 *CCoAOMT* 家族基因结构 Gene structures of the *CCoAOMT* family in arabidopsis, rice, foxtail millet, and millet; B: 拟南芥、水稻、狗尾草、谷子 *CCoAOMT* 家族基因保守序列及结构域 Conserved motifs and domains of the *CCoAOMT* family genes across arabidopsis, rice, foxtail millet, and millet.

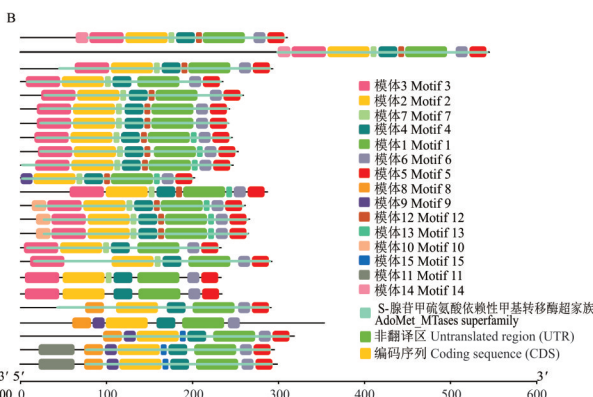
2.5 谷子 *SiCCoAOMT* 家族共表达网络分析

对谷子 RNA-Seq 数据进行 WGCNA 分析,设置 R^2 为 0.9,软阈值为 10,构建基因间的 TOM 矩阵,获得 66 个模块。从中筛选出含有 *SiCCoAOMT* 基因的模块,发现 5 个 *SiCCoAOMT* 分布在 blue、yellow 和 yellowgreen 模块中。通过 Cytoscape (v 3.10.2),对 blue、yellow 和 yellowgreen 模块进行网络可视化。选取谷子 *SiCCoAOMT* 基因家族成员基因作为网络模块的核心基因,yellowgreen 模块的核心基因为 *SiCCoAOMT2* 和 *SiCCoAOMT4*,yellow 模块的核心基因为 *SiCCoAOMT5*,blue 模块的核心基因为 *SiCCoAOMT1*,3 个模块共含有 5 个转录因子(图 5)。对核心基因和候选基因进行 GO、KEGG 富集分析,结果注释到黄酮类物质生物合成和金属离子跨膜运输。*SiCCoAOMT2* 和 *SiCCoAOMT4* 被聚类到一个模块,*SiCCoAOMT2* 被注释到细胞质中(GO:0005829),可

表3 谷子、水稻、狗尾草 *CCoAOMT* 共线性基因对 K_a/K_s 值
Table 3 K_a/K_s values of syntenic gene pairs for *CCoAOMT* in millet, rice, and foxtail millet calculated

同源基因 Homologous gene	同义替 换率 (K_s)	非同义 替换率 (K_a)	非同义替 换/同义替 换 (K_a/K_s)
<i>SiCCoAOMT1-LOC_Os08g38900</i>	0.3068	0.3415	1.113103
<i>SiCCoAOMT1-LOC_Os09g30360</i>	0.0515	0.1322	2.566990
<i>SiCCoAOMT1-Sevir. 2G259200</i>	1.3027	1.3657	1.048361
<i>SiCCoAOMT1-Sevir. 6G204900</i>	1.4866	1.6951	1.140253
<i>SiCCoAOMT2-LOC_Os06g06980</i>	0.0585	0.1486	2.540171
<i>SiCCoAOMT2-Sevir. 4G059400</i>	1.3714	1.3570	0.989500
<i>SiCCoAOMT3-LOC_Os08g05790</i>	0.1405	0.1639	1.166548
<i>SiCCoAOMT3-Sevir. 6G056900</i>	2.1684	1.5731	0.725466
<i>SiCCoAOMT4-LOC_Os08g38900</i>	0.1196	0.2554	2.135452
<i>SiCCoAOMT4-LOC_Os09g30360</i>	0.2908	0.3400	1.169188
<i>SiCCoAOMT4-Sevir. 2G259200</i>	1.1080	1.2859	1.160560
<i>SiCCoAOMT4-Sevir. 6G204900</i>	1.7213	1.6205	0.941440

K_a : Nonsynonymous substitution rate; K_s : Synonymous substitution rate; K_a/K_s : The ratio of nonsynonymous to synonymous substitution rates.



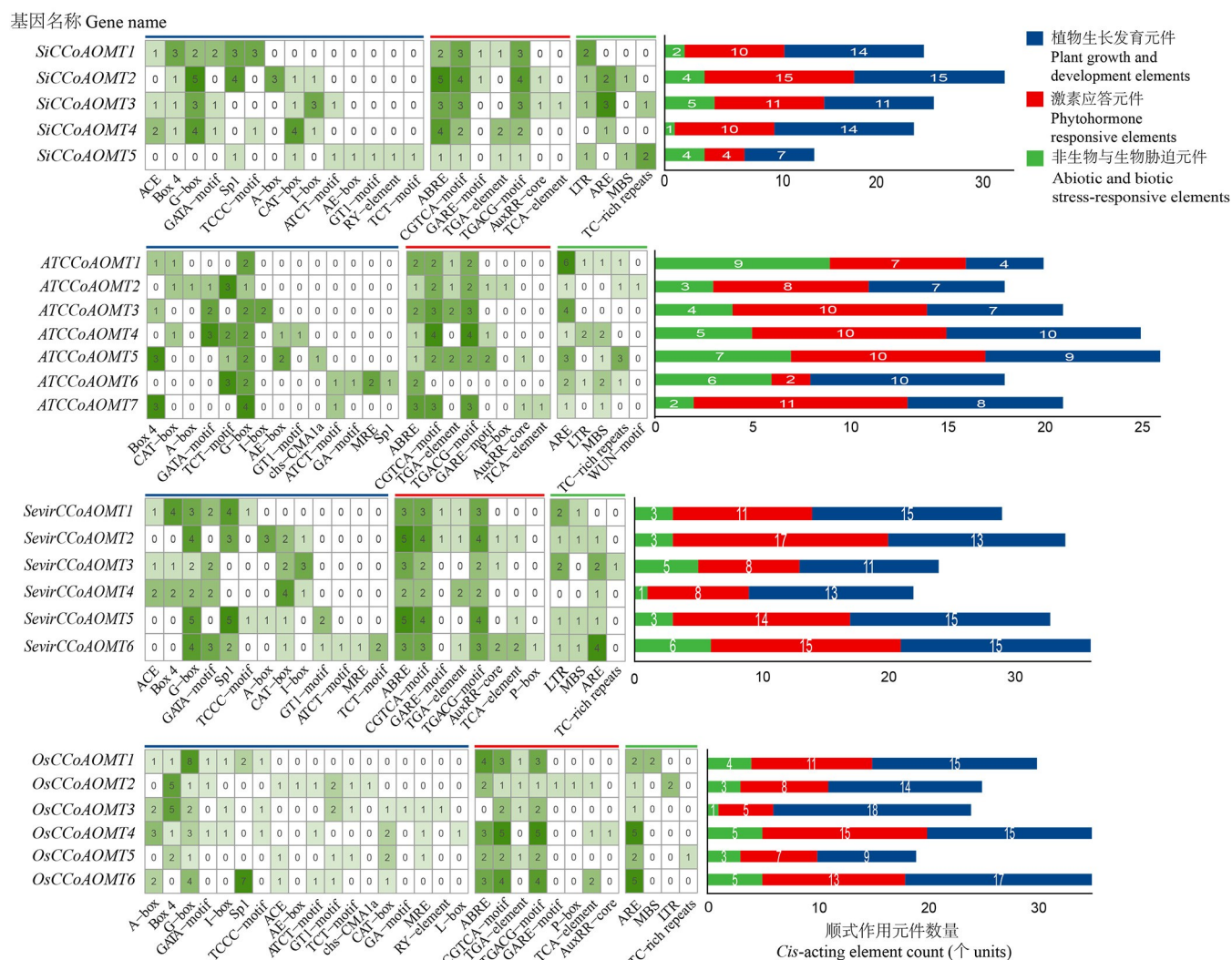


图4 谷子、拟南芥、水稻和狗尾草 *CCoAOMT* 家族启动子顺式作用元件分析

Fig. 4 Cis-acting element analysis of *CCoAOMT* family gene promoters in millet, arabidopsis, rice, and foxtail millet

ACE: 光响应元件 Cis-acting element involved in light responsiveness; Box 4: 保守光响应模块 Part of a conserved DNA module involved in light responsiveness; G-box: 光响应 G 盒 Cis-acting regulatory element involved in light responsiveness; GATA-motif: 光调控 GATA 基序 Light-responsive GATA transcription factor binding site; Sp1: 光响应 Sp1 结合位点 Light-responsive Sp1 transcription factor binding site; TCCC-motif: 光响应 TCCC 基序 Cis-acting element involved in light responsiveness; A-box/I-box: 光调控 A/I 盒 Light-responsive A-box/I-box binding factor recognition site; CAT-box: 光响应 CAT 盒 Cis-acting regulatory element related to light response; ATCT-motif: 光响应 ATCT 基序 Cis-acting element involved in light responsiveness; AE-box: 光调控 AE 盒 Light-responsive AE-box binding factor recognition site; GT1-motif: 光响应 GT1 基序 Light-responsive GT1 transcription factor binding site; RY-element: 种子特异性调控元件 Seed-specific regulatory element; TCT-motif: 韧皮部调控元件 Phloem-specific regulatory element; ABRE: 脱落酸响应相关作用元件 Cis-acting element involved in the abscisic acid responsiveness; CGTCA-motif: 茉莉酸甲酯响应元件 Cis-acting regulatory element involved in methyl jasmonate-responsiveness; TGACG-motif: 茉莉酸甲酯响应元件 Cis-acting regulatory element involved in MeJA-responsiveness; GARE-motif: 赤霉素响应元件 Gibberellin-responsive element; TGA-element: 生长素响应元件 Auxin-responsive element; AuxRR-core: 生长素响应核心元件 Core sequence of auxin response element; TCA-element: 水杨酸响应元件 Cis-acting element involved in salicylic acid responsiveness; LTR: 低温响应元件 Low-temperature responsive element; ARE: 厌氧响应元件 Anaerobic induction responsive element; MBS: 干旱诱导 MYB 结合位点 MYB binding site involved in drought-inducibility; TC-rich repeats: 防御与胁迫响应元件 Defense and stress responsive element. chs-CMA1a: 查耳酮合酶基因调控模块 Cis-acting element involved in light responsiveness for chalcone synthase expression; GA-motif: 赤霉素响应元件 Gibberellin-responsive element; MRE: 金属离子响应元件 Metal ion responsive element; P-box: 赤霉素响应元件 Gibberellin-responsive element; WUN-motif: 损伤响应元件 Wound-responsive element.

以对物理损伤或其他形式的组织破坏所做出的生物学反应(GO:0009611),激活 *SiCCoAOMT* 的酶活性,催化木质素生物合成;而 *SiCCoAOMT4* 被注释到细胞核中(GO:0005634),催化甲基从 SAM 转移到木质素(GO:0008757),*SiCCoAOMT2* 和 *SiCCoAOMT4* 共同完成对木质素生物合成的调控。*SiCCoAOMT5* 存在于线粒体中(GO:0005739),可以在细胞质中形成囊泡(GO:0016023),参与金属离子转运,辅助酶催化木质素的合成,在

遇到盐胁迫时,会显著上调^[34]。*SiCCoAOMT1* 只起到对甲基化的催化作用。由此可见,*SiCCoAOMT2* 和 *SiCCoAOMT4* 是木质素合成过程中的重要候选基因。

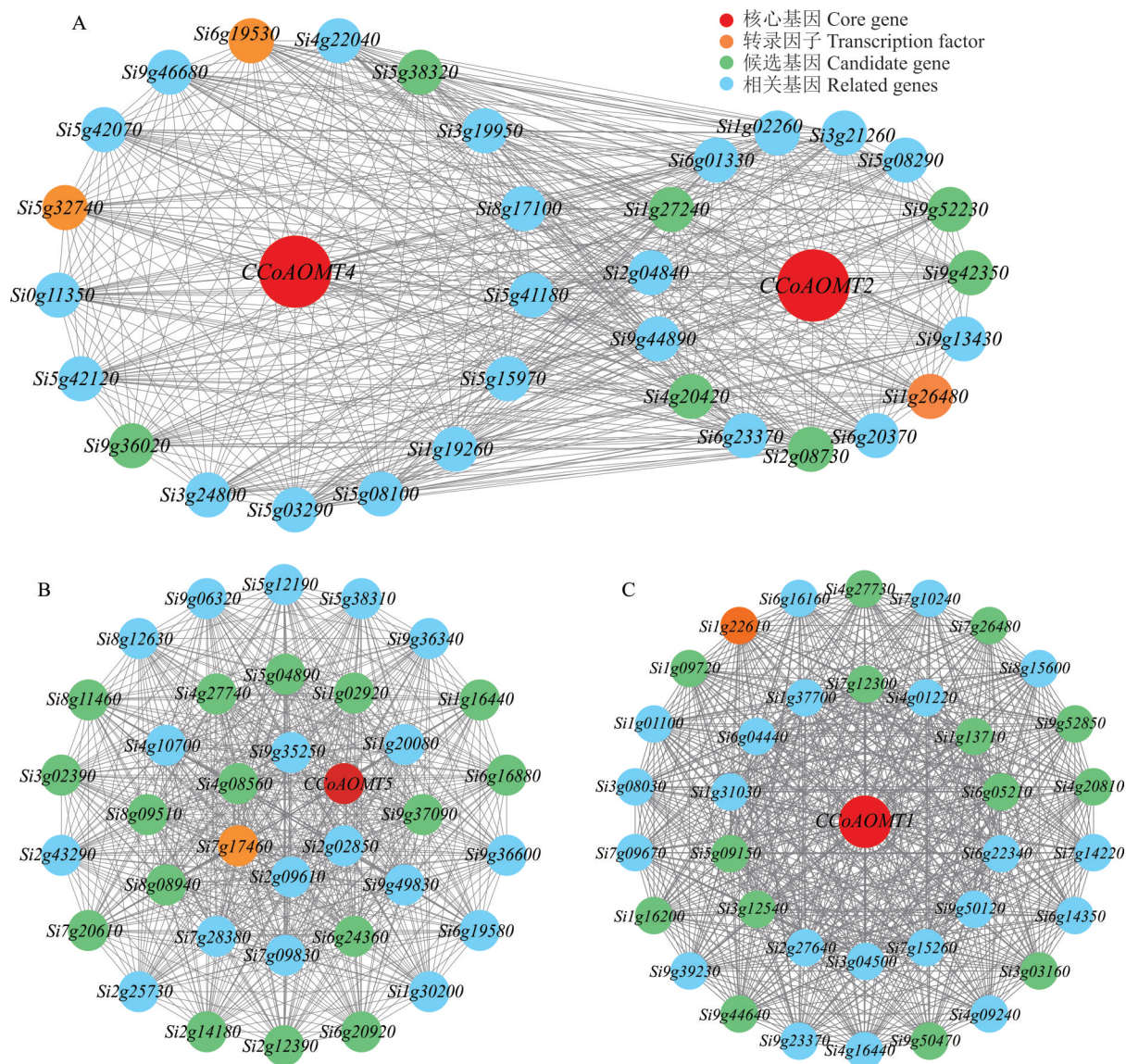


图5 谷子 *CCoAOMT* 家族相关基因局部网络图

Fig. 5 Local network diagrams of millet *CCoAOMT* family-related genes

A: yellowgreen 模块 *SiCCoAOMT* 相关基因网络图 Gene network diagram of millet *CCoAOMT* family genes in the yellowgreen module; B: yellow 模块 *SiCCoAOMT* 相关基因网络图 Gene network diagram of millet *CCoAOMT* family genes in the yellow module; C: blue 模块 *SiCCoAOMT* 相关基因网络图 Gene network diagram of millet *CCoAOMT* family genes in the blue module. 红色表示核心基因, 橙色表示转录因子, 绿色表示候选基因, 蓝色表示其他连通度较高的共表达基因。Red nodes represent core genes, orange nodes represent transcription factors, green nodes represent candidate genes, and blue nodes indicate other highly co-expressed genes.

2.6 谷子 *SiCCoAOMT* 家族特异性表达分析

对谷子 *SiCCoAOMT* 家族成员特异性表达量进行分析,发现 *SiCCoAOMT* 在谷子的不同组织和发育时期中呈偏好性表达。*SiCCoAOMT2* 和 *SiCCoAOMT4* 表达模式相似,在谷子组织中有很高的表达量,尤其是在‘xiaomi’的穗和茎中高度表达,与狗尾草 *SevirCCoAOMT* 表达模式相似^[22];在‘晋谷 21’的籽粒和根中也有较高的表达量。*SiCCoAOMT5* 在‘晋谷 21’的根和籽粒中有较高的表达。*SiCCoAOMT1* 和 *SiCCoAOMT3* 在各部位的表达量均小于 100,没有显著的表达活性,表明其可能不参与木质素的合成。综上,*SiCCoAOMT2* 和 *SiCCoAOMT4* 是谷子中木质素生物合成途径最佳的候选基因。

为更直观地体现 *SiCCoAOMT* 家族成员在谷子不同组织、发育时期的表达差异,对 *SiCCoAOMT* 基因的时空表达模式进行可视化(图 6A)。可以发现,在干旱和低温等逆境条件下,谷子 *SiCCoAOMT2* 和 *SiCCoAOMT4* 对木质素生物合成的调节主要存在于茎秆、根和穗中,这与 Ferreira 等^[22]对狗尾草 *SevirCCoAOMT* 的研究结果一致。谷子根、茎中的木质素合成增加,可以强化其细胞壁,增强其机械强度和抗逆性;谷子穗部木质素合成增加,可以提高籽粒外壳的硬度,有助于抵御真菌等病原体的侵袭,在恶劣环境下保护种子的完整和质量^[35]。因此, *SiCCoAOMT2* 和 *SiCCoAOMT4* 在谷子木质素生物合成过程中起到关键性作用。

为了验证 *SiCCoAOMT* 基因表达数据的准确性,对‘晋谷 21’灌浆期 S3 的籽粒进行了 qRT-PCR 检测(图 6B)。分析显示,在‘晋谷 21’灌浆期 S3 的籽粒中, *SiCCoAOMT4* 基因相对表达量最高(6.1), *SiCCoAOMT3* 相对表达量最低(0.7)。这与转录组分析结果基本一致, qRT-PCR 相对定量结果验证了转录组数据分析的可靠性。

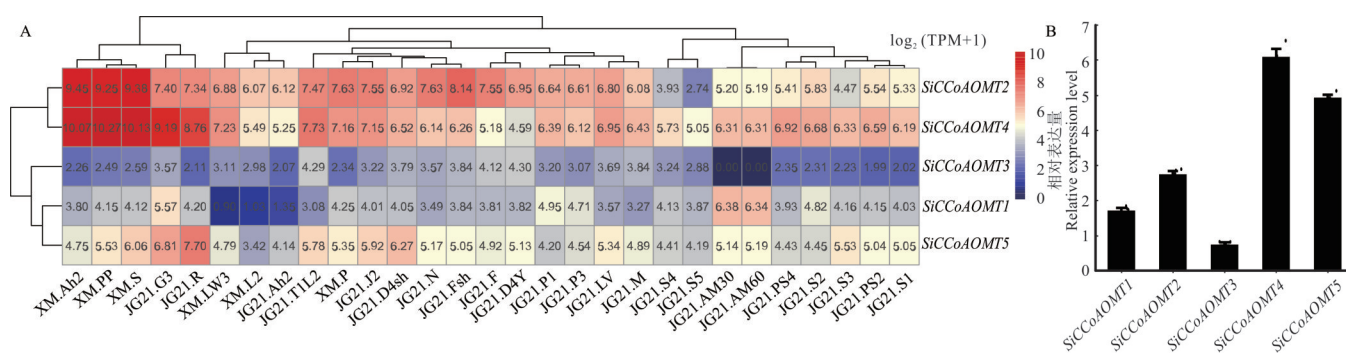


图 6 谷子 *SiCCoAOMT* 家族成员在不同组织和发育时期的表达图谱

Fig. 6 Expression profiles of *SiCCoAOMT* family members in millet across different developmental stages and tissues

A: *SiCCoAOMT* 家族成员在‘晋谷 21’(JG21)和‘xiaomi’(XM)不同组织和发育时期的表达谱(JG21 和 XM 分别包括 23 和 6 个组织时期)。The expression profiles of *SiCCoAOMT* gene family members in different tissues and developmental stages of ‘Jingu 21’ (JG21) and ‘xiaomi’ (XM) (JG21 and XM included 23 and 6 tissue stages, respectively). JG21.G3: 种子萌发 3 d Seed germination 3-days; JG21.T1L2: 两叶一心期幼苗 One-tip-two-leaf stage seedlings; JG21.Ah2: 抽穗 2 d 后 2~3 片顶叶 2~3 top leaves after 2 days of heading; JG21.N: 灌浆期穗颈 Panicle necks at filling stage; JG21.F: 灌浆期旗叶 Flag leaves at filling stage; JG21.Fsh: 灌浆期旗叶叶鞘 Flag leaf sheaths at filling stage; JG21.J2: 灌浆期 S3 的倒二节茎秆 The second stems from the top of S3 at the filling stage; JG21.D4Y: 灌浆期倒四叶 Leaf-top-fourth at filling stage; JG21.D4sh: 灌浆期倒四叶叶鞘 Leaf-sheath-top-fourth at filling stage; JG21.R: 灌浆期根 Roots at filling stage; JG21.P1: 初生分枝分化期小穗 Spikelets at primary branch differentiation stage; JG21.P3: 第 3 级分枝分化期小穗 Spikelets at the third branch differentiation stage; JG21.PS2: 灌浆期 S2 小穗 Spikelets of S2 at filling stage; JG21.PS4: 灌浆期 S4 小穗 Spikelets of S4 at filling stage; JG21.S1~JG21.S5: 灌浆期 S1~S5 籽粒 Grains of S1—S5 at filling stage; JG21.AM30: 成熟 30 d 籽粒 Grains of 30-days-after-maturation; JG21.AM60: 成熟 60 d 籽粒 Seeds of 60-days-after-maturation; JG21.LV: S3 期叶脉 Leaf veins of S3; JG21.M: S3 期叶肉 Mesophyll of S3; XM.LW3: 3 周的叶片 3-week leaves; XM.L2: 抽穗期倒二叶 The second leaves from the top at heading stage; XM.Ah2: 抽穗 2 d 后的穗 Panicles 2 days after heading; XM.PP: 授粉期的穗 Panicles at pollination stage; XM.P: 灌浆期穗 Spikes at filling stage; XM.S: 灌浆期茎 Stems at filling stage. B: *SiCCoAOMT* 基因籽粒灌浆 S3 时期的 qRT-PCR 验证。qRT-PCR validation of *SiCCoAOMT* gene at S3 stage of grain filling.

2.7 谷子 *SiCCoAOMT* 家族非生物胁迫表达分析

为了进一步验证谷子 *SiCCoAOMT* 基因抵御非生物胁迫的功能表达,本研究选取‘晋谷 21’两叶一心期的幼苗,进行干旱和低温胁迫处理,经 3 次生物学重复,分析 *SiCCoAOMT* 成员受胁迫响应变化情况(图 7)。分析发现,干旱胁迫下, *SiCCoAOMT2* 在处理 12 h 时达到表达峰值(13.8), *SiCCoAOMT4* 也表现出明显上调(图 7A)。低温胁迫 24 h 中, *SiCCoAOMT2* 和 *SiCCoAOMT4* 表达均逐步上调,其他基因表达则有下调趋势(图 7B)。这与上文对 *SiCCoAOMT2* 和 *SiCCoAOMT4* 特异性表达分析相符。表明 *SiCCoAOMT2* 和 *SiCCoAOMT4* 受到干旱和低温的诱导表达,在作物抵御非生物胁迫的过程中起到关键作用。 *SiCCoAOMT5* 在谷子两叶一心期有较高的表达量,且在干旱胁迫中也有上调趋势,表明 *SiCCoAOMT5* 也可能参与非生物胁迫的响应。

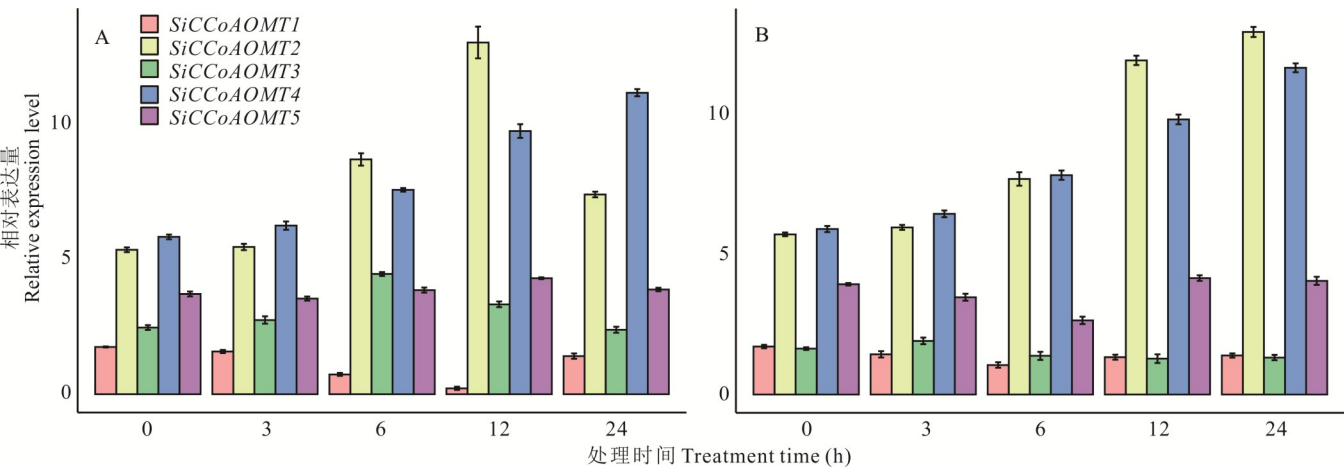


图 7 非生物胁迫下谷子 *SiCCoAOMT* 家族成员的表达模式

Fig. 7 Expression patterns of *SiCCoAOMT* gene family in response to abiotic stress

A: 干旱胁迫下 *SiCCoAOMT* 家族成员的表达模式 Expression patterns of *SiCCoAOMT* gene family under drought stress; B: 低温胁迫下 *SiCCoAOMT* 家族成员的表达模式 Expression patterns of *SiCCoAOMT* gene family under low temperature stress.

2.8 谷子 *SiCCoAOMT* 家族单倍型分析

通过对谷子 *SiCCoAOMT* 单倍型分析,挖掘其抗逆的自然变异类型^[36],发现只有在 *SiCCoAOMT3* 和 *SiCCoAOMT5* 中存在显著的变异差异(图 8)。 *SiCCoAOMT3* 中,Hap 1、Hap 3 和 Hap 4 与参考基因组一致(图 8A);Hap 2 和 Hap 5 是在 4939166 bp 处发生 A/C 变异,在 4939482 和 4940070 bp 处发生 C/T 变异(图 8C)。 *SiCCoAOMT5* 中,Hap 1 和 Hap 3 与参考基因组一致(图 8B),Hap 2 和 Hap 5 在 31085051、31085052 和 31091199

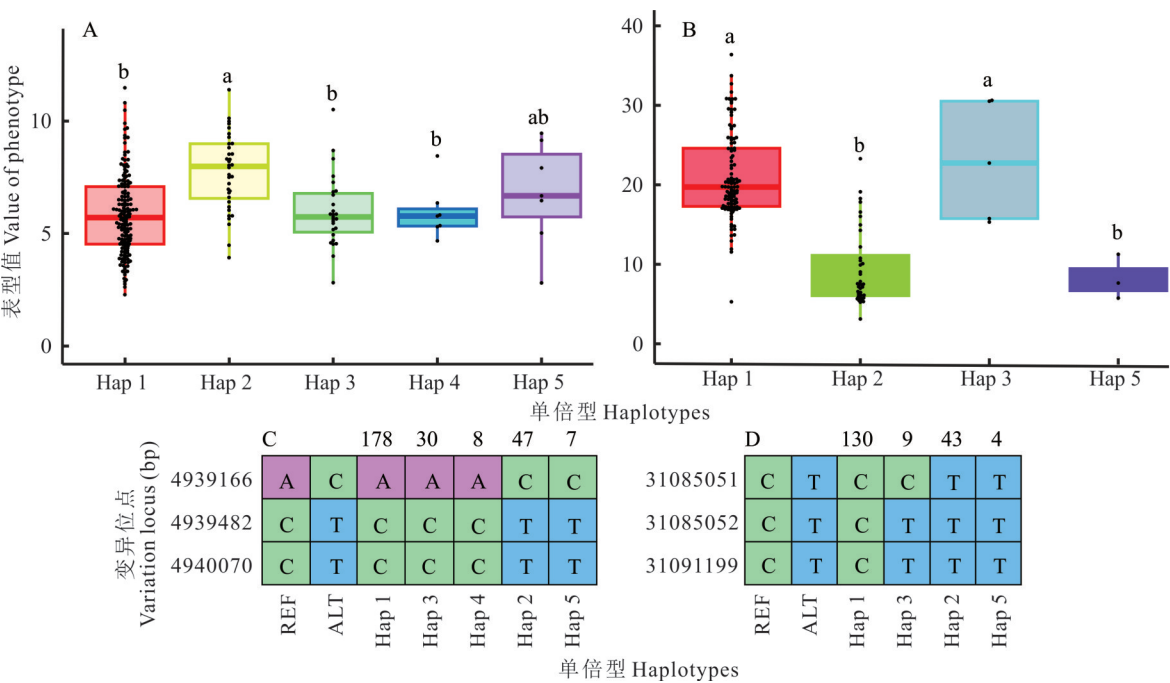


图 8 *SiCCoAOMT* 单倍型分析

Fig. 8 *SiCCoAOMT* gene dominant haplotype

A: *SiCCoAOMT3* 基因单倍型箱线图 Boxplot of *SiCCoAOMT3* gene's haplotype; B: *SiCCoAOMT5* 基因单倍型箱线图 Boxplot of *SiCCoAOMT5* gene's haplotype; C: *SiCCoAOMT3* 基因单倍型位点(上面是单倍型包含样本数量)Haplotype sites of the *SiCCoAOMT3* gene (the data on the top side were the number of samples haplotype contained); D: *SiCCoAOMT5* 基因单倍型位点 Haplotype sites of the *SiCCoAOMT5* gene. 不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$) Different lowercase letters indicate significant differences ($P < 0.05$).

bp处发生C/T变异(图8D),Hap1是主要的单倍型类型,占62.3%。*SiCCoAOMT5*在‘晋谷21’的根和籽粒中有较高的表达,通过比较不同*SiCCoAOMT5*单倍型间的籽粒数量、籽粒重量、籽粒硬度表型发现,Hap1在3种关于籽粒产量相关表型的表现上都显著高于其他表型。qRT-PCR的结果也显示,*SiCCoAOMT5*在灌浆期S3的籽粒中有较高的表达(图6B);由此,可推断*SiCCoAOMT5*可能促进谷子籽粒的生长发育,使其适应在逆境中的成熟与传播。

3 讨论

*CCoAOMT*基因家族是一种起到催化甲基化作用的甲基转移酶,参与G型木质素甲基化,调节木质素生物合成中的相关基因表达,能够使植物的韧性和机械强度增强,进而在植物相应非生物胁迫过程中起重要作用^[37]。本研究对谷子*SiCCoAOMT*基因家族进行系统分析,共鉴定到5个*SiCCoAOMT*基因。将谷子*SiCCoAOMT*与已报道的水稻、狗尾草和拟南芥中的*CCoAOMT*家族进行比较分析,各物种中*CCoAOMT*家族成员数目相近,构建进化树被分为2个亚族,这与Ferreira等^[22]的研究结果一致。理化性质分析显示,除了*SiCCoAOMT5*外,各物种*CCoAOMT*家族序列氨基酸数目接近(202~352),等电点范围为4.93~9.08。亚细胞定位分析结果显示,*CCoAOMT*家族成员大部分分布在细胞质、叶绿体中,只有个别成员也分布在线粒体和细胞核,这与前人的研究一致,例如刺梨(*Rosa roxburghii*)*RrCCoAOMT*^[38]、紫花苜蓿(*Medicago sativa*)*MsCCoAOMT*^[39]均定位在细胞质、叶绿体。染色体定位显示,*SiCCoAOMT*家族成员在谷子染色体两端分布,与狗尾草*SevirCCoAOMT*基因在染色体上的分布类似;不同的是,在6号染色体上,*SiCCoAOMT*的个数比*SevirCCoAOMT*少1个。在计算谷子、水稻和狗尾草*CCoAOMT*家族的共线性基因对 K_a/K_s 值时,发现*SiCCoAOMT3*与*Sevir. 6G056900*的 K_a/K_s 值小于1($K_a/K_s=0.725$),谷子与狗尾草之间存在纯化选择,由此可能造成*SiCCoAOMT*的个数比*SevirCCoAOMT*少1个;谷子和水稻共线性基因对 $K_a/K_s>1$,说明*SiCCoAOMT*受到正选择效应,*SiCCoAOMT*比*OsCCoAOMT*更加适应抗逆的调控。

*CCoAOMT*基因家族成员均包含相同的蛋白保守结构域(motif 1、motif 2、motif 4、motif 5和motif 6),同一亚族的成员具有相似的motif,且排列顺序也接近。顺式作用元件预测中,ABRE、CGTCA-motif和TGACG-motif在*SiCCoAOMT2*和*SiCCoAOMT4*中分布较多,这3种植物激素应答元件可以间接影响*SiCCoAOMT*的表达,促进木质素合成,以增强植物对非生物胁迫的防御;谷子、水稻、狗尾草和拟南芥*CCoAOMT*家族的顺式作用元件组成相似,这些基因可能在功能调控上也具有相似性:Ferreira等^[22]对狗尾草的研究结果表明,狗尾草*SevirCCoAOMT2*和*SevirCCoAOMT4*在非生物胁迫应答中起到关键作用,说明*SiCCoAOMT2*和*SiCCoAOMT4*是抵御非生物胁迫的重要候选基因。

谷子*SiCCoAOMT*基因家族KEGG分析结果注释到黄酮类物质生物合成途径等过程,这与彭赛男等^[40]的研究结果一致:*CCoAOMT*在O-甲基化类黄酮的生物合成中起到重要作用。通过特异性表达分析发现,*SiCCoAOMT2*、*SiCCoAOMT4*在谷子的叶、茎和穗中高度表达。在已有的研究中,水稻*OsCCoAOMT*家族基因*OsCCoAOMT1*在水稻的茎和叶中均高度表达,在促进茎的伸长、营养运输方面发挥重要作用^[41],狗尾草*SevirCCoAOMT2*和*SevirCCoAOMT4*在茎和节间中高度表达,在木质素合成过程中起到关键作用^[22],而*SiCCoAOMT2*、*SiCCoAOMT4*与其表达模式相似且有共线性关系,支持了它们在木质素生物合成中的潜在作用。

‘晋谷21’非生物胁迫下的转录组数据表明,*SiCCoAOMT*家族基因能响应干旱和低温等非生物胁迫,尤其是*SiCCoAOMT2*、*SiCCoAOMT4*在非生物胁迫诱导下表达量显著提高,说明谷子在干旱和低温胁迫的响应中,*SiCCoAOMT2*和*SiCCoAOMT4*起到了主要作用,这与Rakoczy等^[42]对高粱(*Sorghum bicolor*)*SbCCoAOMT*的研究一致。另外,在拟南芥*AtCCoAOMT*基因家族的研究中发现,病原体或激发因子可以诱导*AtCCoAOMT1*基因,其在抗逆功能中起到重要作用^[43]。因此,今后可以对谷子*SiCCoAOMT*基因家族的抗逆作用进行进一步

研究。

4 结论

对谷子 *SiCCoAOMT* 基因家族进行鉴定和分析,共鉴定到 5 个 *SiCCoAOMT* 基因,定位于第 2、4 和 6 号染色体,编码蛋白的理化性质差异明显;系统发育分析将谷子 *SiCCoAOMT* 基因与拟南芥、水稻和狗尾草的同源基因划分为 2 个亚族,且 4 个物种的 *CCoAOMT* 基因家族成员均包含相同的蛋白结构保守域(motif 1、motif 2、motif 4、motif 5 和 motif 6)。谷子与水稻、狗尾草共线性基因对分析中发现,谷子和狗尾草 *CCoAOMT* 受到中性选择的同时,还存在纯化选择;谷子与水稻 *CCoAOMT* 之间存在正选择效应。加权基因共表达网络分析发现, *SiCCoAOMT2* 和 *SiCCoAOMT4* 被划分在 yellowgreen 模块中。进一步研究其表达模式,发现 *SiCCoAOMT2* 和 *SiCCoAOMT4* 可能在调节茎秆生长、籽粒大小和谷穗发育中具有重要作用。非生物胁迫研究中, *SiCCoAOMT2* 和 *SiCCoAOMT4* 在干旱和低温胁迫下,表达量明显上调,是谷子响应干旱和低温胁迫的关键基因。单倍型分析发现 *SiCCoAOMT5* 有利于谷子籽粒的生长发育,对谷子产量提高和抵抗胁迫起到一定的作用,还需要后续试验对其抗逆作用进行进一步验证。本研究揭示了 *SiCCoAOMT* 家族基因在调节谷子茎秆结构强度、逆境响应中的潜在作用,丰富了对谷子基因组的理解。然而,仍需进行进一步的功能验证,如在不同环境条件下 *SiCCoAOMT* 家族基因的抗逆功能和其在木质素合成中的分子作用机制^[44]。

参考文献 References:

- [1] Kahie M A, Wang Y, Fang P, *et al.* Evolution and expression analysis of the caffeoyl-CoA 3-O-methyltransferase (*CCoAOMT*) gene family in jute (*Corchorus L.*). *BMC Genomics*, 2023, 24: 204.
- [2] Liu Q, Luo L, Zheng L Q. Lignins: biosynthesis and biological functions in plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19: 335.
- [3] Hongo S, Sato K, Yokoyama R, *et al.* Demethylesterification of the primary wall by PECTIN METHYLESTERASE35 provides mechanical support to the *Arabidopsis* stem. *Plant Cell*, 2012, 24: 2624—2634.
- [4] Zhao H Y, Sheng Q X, Lv S Y, *et al.* Characterization of three rice *CCoAOMT* genes. *Chinese Science Bulletin*, 2004, 49: 1602—1606.
- [5] Shan C R, Chen X H, Ding Y F, *et al.* Functional analysis of *FmCCoAOMT* gene in *Fraxinus mandshurica* during lignin synthesis and abiotic stress. *Bulletin of Botanical Research*, 2023, 43(5): 768—778.
单超然,陈晓慧,丁云飞,等. 水曲柳 *FmCCoAOMT* 基因在木质素合成及非生物胁迫中的功能分析. *植物研究*, 2023, 43(5): 768—778.
- [6] Kühnl T, Koch U, Heller W, *et al.* Elicitor induced S-adenosyl-l-methionine: caffeoyl-CoA 3-O-methyltransferase from carrot cell suspension cultures. *Plant Science*, 1989, 60: 21—25.
- [7] Schmitt D, Pakusch A E, Matern U. Molecular cloning, induction and taxonomic distribution of caffeoyl-CoA 3-O-methyltransferase, an enzyme involved in disease resistance. *Journal of Biological Chemistry*, 1991, 266: 17416—17423.
- [8] Ye Z H, Kneusel R E, Matern U, *et al.* Multiple cDNAs for caffeoyl-CoA O-methyltransferase in plant tissues. *Plant Journal*, 1994, 6: 211—219.
- [9] Ibrahim R K, Bruneau A, Bantignies B. Plant O-methyltransferases: molecular analysis, common signature and classification. *Plant Molecular Biology*, 1998, 36: 1—10.
- [10] Zhang G Y, Zhang Y J, Xu J T, *et al.* The *CCoAOMT1* gene from jute (*Corchorus capsularis L.*) is involved in lignin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Gene*, 2014, 546: 398—402.
- [11] Zhao H Y, Shen Q X, Lv S Y, *et al.* Expression analysis of caffeoyl-CoA-O-methyltransferase gene (*CCoAOMT*) in rice. *Chinese Science Bulletin*, 2004, 49(14): 1390—1394.
赵华燕,沈庆喜,吕世友,等. 水稻咖啡酰辅酶A-O-甲基转移酶基因(*CCoAOMT*)表达特性分析. *科学通报*, 2004, 49(14): 1390—1394.
- [12] Brutnell T P, Wang L, Swartwood K, *et al.* *Setaria viridis*: a model for C4 photosynthesis. *Plant Cell*, 2010, 22: 2537—2544.
- [13] Wang Y G, Lyu X Y, Ji M C, *et al.* Stress tolerance improvement by BvM14-*CCoAOMT* gene in sugar beet M14 strain.

- Chinese Agricultural Science Bulletin, 2018, 34(34): 30–35.
- 王宇光, 吕笑言, 季美超, 等. 甜菜 M14 品系咖啡酰辅酶 A-O-甲基转移酶提高植物抗逆性功能分析. 中国农学通报, 2018, 34(34): 30–35.
- [14] Riccardi F, Gazeau P, de Vienne D, *et al.* Protein changes in response to progressive water deficit in maize: quantitative variation and polypeptide identification. *Plant and Cell Physiology*, 1998, 117: 1253–1263.
- [15] Salekdeh G H, Siopongco J, Wade L J, *et al.* A proteomic approach to analyzing drought- and salt-responsiveness in rice. *Field Crops Research*, 2002, 76: 199–219.
- [16] Wang C, Chen J F, Zhi H, *et al.* Population genetics of foxtail millet and its wild ancestor. *BMC Genetics*, 2010, 11: 1–13.
- [17] Yan W M. The origin of agriculture and Chinese civilization. *Chinese Rural Discovery*, 2016, 8(5): 38–45.
- 严文明. 农业起源与中华文明. 中国乡村发现, 2016, 8(5): 38–45.
- [18] Diao X M. Breeding innovation creates new development of millet seed industry. *China Seed Industry*, 2022, 4(4): 4–7.
- 刁现民. 育种创新造就谷子种业新发展. 中国种业, 2022, 4(4): 4–7.
- [19] Liu Q. We should attach great importance to the strategic value of “planting belt moving north”. *Farmers Daily*, 2021-11-27(004).
- 刘强. 应高度重视“种植带北移”的战略价值. 农民日报, 2021-11-27(004).
- [20] Yang Z R, Zhang H S, Li X K, *et al.* A mini foxtail millet with an *Arabidopsis*-like life cycle as a C₄ model system. *Nature Plants*, 2020, 6: 1167–1178.
- [21] Song L N, Zhang Y M, Hu C S, *et al.* Comprehensive analysis of emissions and global warming effects of greenhouse gases in winter-wheat fields in the high-yield agro-region of north China Plain. *Chinese Journal of Ecological Agriculture*, 2013, 21(3): 297–307.
- 宋利娜, 张玉铭, 胡春胜, 等. 华北平原高产农区冬小麦农田温室气体排放及其综合温室效应. 中国生态农业学报, 2013, 21(3): 297–307.
- [22] Ferreira S S, Simões M S, Carvalho G G, *et al.* The lignin toolbox of the model grass *Setaria viridis*. *Plant Molecular Biology*, 2019, 101: 235–255.
- [23] Chen C J, Wu Y, Li J W, *et al.* TBtools-II: A “one for all, all for one” bioinformatics platform for biological big-data mining. *Molecular Plant*, 2023, 16: 1733–1742.
- [24] Tamura K, Stecher G, Kumar S. MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Molecular Biology and Evolution*, 2021, 38: 3022–3027.
- [25] Bailey T L, Johnson J, Grant C E, *et al.* The MEME suite. *Nucleic Acids Research*, 2015, 43: W39–W49.
- [26] Yu C S, Lin C J, Hwang J K. Predicting subcellular localization of proteins for Gram-negative bacteria by support vector machines based on n-peptide compositions. *Protein Science*, 2004, 13: 1402–1406.
- [27] Sun R, Yang Y Y, Li Y J, *et al.* Genome-wide identification and analysis of *PLATZ* transcription factor gene family in foxtail millet. *Chinese Bulletin of Botany*, 2023, 58(4): 548–559.
- 孙蓉, 杨宇录, 李亚军, 等. 谷子 *PLATZ* 转录因子基因家族的鉴定和分析. 植物学报, 2023, 58(4): 548–559.
- [28] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} method. *Methods*, 2001, 25: 402–408.
- [29] Li X K, Gao J, Song J, *et al.* Multi-omics analyses of 398 foxtail millet accessions reveal genomic regions associated with domestication, metabolite traits, and anti-inflammatory effects. *Molecular Plant*, 2022, 15: 1367–1383.
- [30] Li X K, Shi Z, Gao J, *et al.* CandiHap: a haplotype analysis toolkit for natural variation study. *Molecular Breeding*, 2023, 43: 21.
- [31] Lee Y J, Kim B G, Chong Y, *et al.* Cation dependent O-methyltransferases from rice. *Planta*, 2008, 227: 641–647.
- [32] Kim J S, Mizoi J, Yoshida T, *et al.* An ABRE promoter sequence is involved in osmotic stress-responsive expression of the *DREB2A* gene, which encodes a transcription factor regulating drought-inducible genes in *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology*, 2011, 52: 2136–2146.
- [33] Hu J, Liu T, Huo H, *et al.* Genome-wide characterization, evolutionary analysis, and expression pattern analysis of the trihelix transcription factor family and gene expression analysis under MeJA treatment in *Panax ginseng*. *BMC Plant Biology*, 2023, 23: 376.
- [34] Jalmi S K, Bhagat P K, Verma D, *et al.* Traversing the links between heavy metal stress and plant signaling. *Frontiers in Plant Science*, 2018, 9: 12.

- [35] Yao T, Zhang J, Xie M, *et al.* Transcriptional regulation of drought response in *Arabidopsis* and woody plants. *Frontiers in Plant Science*, 2021, 11: 572137.
- [36] Guo B, Qin J F, Li N, *et al.* Genome-wide identification and expression analysis of *SHMT* gene family in foxtail millet (*Setaria italica* L.). *Acta Agronomica Sinica*, 2025, 51(3): 586–597.
郭冰, 秦家范, 李娜, 等. 谷子 *SHMT* 基因家族全基因组鉴定与表达分析. *作物学报*, 2025, 51(3): 586–597.
- [37] Guo Z W, Si X Y, Jiao L P, *et al.* Cloning and bioinformatics of *CCoAOMT* relating to resistance of soybean to cyst nematodes. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2023, 38(5): 616–623.
郭子雯, 司修洋, 焦莉苹, 等. 大豆咖啡酰辅酶 A-O-甲基转移酶(*CCoAOMT*)基因克隆及结构分析. *福建农业学报*, 2023, 38(5): 616–623.
- [38] Lu C, Zhang X Y, Lu M, *et al.* Identification and bioinformatics analysis of *RrCCoAOMT* gene family in *Rosa roxburghii*. *Molecular Plant Breeding*, 2023, 21(3): 764–771.
卢晨, 张小英, 鲁敏, 等. 刺梨 *RrCCoAOMT* 基因家族的鉴定与生物信息学分析. *分子植物育种*, 2023, 21(3): 764–771.
- [39] Ma Q, Yan Q, Zhang Z S, *et al.* Identification, evolution and expression analysis of the *CCoAOMT* family genes in *Medicago sativa*. *Acta Prataculturae Sinica*, 2021, 30(11): 144–156.
马倩, 闫启, 张正社, 等. 紫花苜蓿 *CCoAOMT* 基因家族的鉴定、进化及表达分析. *草业学报*, 2021, 30(11): 144–156.
- [40] Peng S N, Li Y K, Luo D D, *et al.* Identification and expression analysis of flavonoid O-methyltransferase gene family in *Artemisia argyi*. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2023, 58(4): 1069–1078.
彭赛男, 李宇琨, 罗丹丹, 等. 艾叶类黄酮 O-甲基转移酶基因家族的鉴定及表达分析. *药科学报*, 2023, 58(4): 1069–1078.
- [41] Suo Q Q, Wu N, Yang H, *et al.* Prokaryotic expression, antibody preparation and application of rice caffeoyl-CoA-O-methyltransferase gene. *Biotechnology Bulletin*, 2022, 38(8): 135–141.
索青青, 吴楠, 杨慧, 等. 水稻咖啡酰辅酶 A-O-甲基转移酶基因的原核表达、抗体制备和应用. *生物技术通报*, 2022, 38(8): 135–141.
- [42] Rakoczy M, Femiak I, Alejska M, *et al.* Sorghum *CCoAOMT* and *CCoAOMT-like* gene evolution, structure, expression and the role of conserved amino acids in protein activity. *Molecular Genetics and Genomics*, 2018, 293: 1077–1089.
- [43] Yang Q, He Y, Kabahuma M, *et al.* A gene encoding maize caffeoyl-CoA O-methyltransferase confers quantitative resistance to multiple pathogens. *Nature Genetics*, 2017, 49: 1364–1372.
- [44] Luo T R, Ma J Z, Du M Y, *et al.* Identification and expression analysis of *LACS* gene family members in *Medicago sativa*. *Acta Prataculturae Sinica*, 2025, 34(4): 124–136.
罗天蓉, 马健芝, 杜明阳, 等. 紫花苜蓿 *LACS* 基因家族成员鉴定及表达分析. *草业学报*, 2025, 34(4): 124–136.