

• 农业生物技术 •

# 高粱 MYC 基因家族序列、表达模式及自然等位变异分析

柴文婷<sup>1</sup>, 杨博慧<sup>1</sup>, 赵珊珊<sup>1</sup>, 郭志强<sup>1</sup>, 朱立勋<sup>1</sup>, 范佳利<sup>1</sup>, 杨伟<sup>2</sup>, 赵威军<sup>2</sup>, 郝艳平<sup>1</sup>, 吕晋慧<sup>1\*</sup>, 孙文献<sup>3</sup>, 张春来<sup>1\*</sup>

1 山西农业大学农学院/林学院教育部省部共建黄土高原作物协同创新中心 国家粮食局功能杂粮创新中心, 山西 太谷 030801

2 山西农业大学高粱研究所, 山西 榆次 030600

3 中国农业大学植物保护学院, 北京 100193

柴文婷, 杨博慧, 赵珊珊, 郭志强, 朱立勋, 范佳利, 杨伟, 赵威军, 郝艳平, 吕晋慧, 孙文献, 张春来. 高粱 MYC 基因家族序列、表达模式及自然等位变异分析[J]. 生物工程学报, 2024, 40(4): 1170-1194.

CHAI Wenting, YANG Bohui, ZHAO Shanshan, GUO Zhiqiang, ZHU Lixun, FAN Jiali, YANG Wei, ZHAO Weijun, HAO Yanping, LÜ Jinhui, SUN Wenxian, ZHANG Chunlai. Characterization of sequences, expression profiling, and natural allelic variation analysis of the MYC gene family in sorghum (*Sorghum bicolor*)[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(4): 1170-1194.

**摘要:** 高粱蚜(*Melanaphis sacchari*)和丝轴黑粉菌(*Sporisorium reilianum*)侵染高粱, 导致其生长发育受阻、产量和品质下降。采用生物信息学分析和分子生物学方法, 研究高粱发育过程及病虫害发生下的 MYC 基因表达模式变化与自然等位 DNA 变异, 为选育抗逆、高产和优质高粱品种提供参考。结果表明, 高粱基因组含 28 个 MYC 基因, 不均匀分布在 10 条染色体上, 基本螺旋-环-螺旋\_MYC\_N (basic helix-loop-helix\_MYC\_N, bHLH\_MYC\_N)与螺旋-环-螺旋(helix-loop-helix, HLH)结构域是高粱 MYC 基因的保守结构域。基因表达分析显示, *SbbHLH35.7g* 在叶片中表达水平最高; *SbAbaIn* 在早期籽粒中表达强; *SbMYC2.1g* 在成熟花粉中表达水平高。在抗、感蚜品系 5 叶期叶片中, 显著诱导表达的是 *SbAbaIn*、*SbLHW.4g* 和 *SbLHW.2g*。 *SbbHLH35.7g* 在穗组织表达水平最高, 且受丝轴黑粉菌侵染显著诱导表达。 *SbMYCs* 启动子区包含脱落酸、水杨酸、茉莉酸甲酯和干旱诱导等相关元件, 使其更好地响应逆境胁迫。通过分析全基因组重测序数据, 鉴定到 *SbMYCs* 关键的单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)或插入缺失标记(insertion-deletion, INDEL)

资助项目: 国家自然科学基金(31971994, 31470285); 山西省农科院博士基金(ybsjj1404); 种子科学与工程一流专业建设项目(J20220211); 山西省自然科学基金(2014-011-004-01); 山西省百人计划合作共建项目(晋组 2017-30)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31971994, 31470285), the Doctoral Fund of Shanxi Academy of Agricultural Sciences (ybsjj1404), the Seed Science Engineering First Class Professional Construction Project (J20220211), the Natural Science Foundation of Shanxi Province (2014-011-004-01), and the Shanxi Bairen Program Collaboration Project (Jinzu2017-30).

\*Corresponding authors. E-mail: ZHANG Chunlai, chunlaiz@hotmail.com; LÜ Jinhui, lujinhui11@126.com

Received: 2023-09-18; Accepted: 2023-11-28; Published online: 2023-12-04

变异。SbAbaIn 与 TIFY 结构域蛋白等互作, SbbHLH35.7g 与多药剂外泵蛋白(multidrug efflux transporter, MDR)和核转运蛋白(importin)等互作。高粱蚜和丝轴黑粉菌侵染分别诱导 *SbAbaIn* 和 *SbbHLH35.7g* 表达, *SbAbaIn* 通过茉莉酸(jasmonic acid, JA)途径诱导相关基因表达, 增强抗虫性; *SbbHLH35.7g* 可能通过解毒途径提高抗病性。

关键词: 高粱; MYC; 高粱蚜; 丝黑穗病; 基因表达; 自然等位 DNA 变异

## Characterization of sequences, expression profiling, and natural allelic variation analysis of the MYC gene family in sorghum (*Sorghum bicolor*)

CHAI Wenting<sup>1</sup>, YANG Bohui<sup>1</sup>, ZHAO Shanshan<sup>1</sup>, GUO Zhiqiang<sup>1</sup>, ZHU Lixun<sup>1</sup>,  
FAN Jiali<sup>1</sup>, YANG Wei<sup>2</sup>, ZHAO Weijun<sup>2</sup>, HAO Yanping<sup>1</sup>, LÜ Jinhui<sup>1\*</sup>, SUN Wenxian<sup>3</sup>,  
ZHANG Chunlai<sup>1\*</sup>

1 Functional Grains Innovation Center of State Grain Administration, Loess Plateau Crop Collaborative Innovation Center jointly built by Ministry of Education, College of Forestry, College of Agronomy, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, Shanxi, China

2 Institute for Sorghum Research, Shanxi Agricultural University, Yuci 030600, Shanxi, China

3 College of Plant Protection, China Agricultural University, Beijing 100193, China

**Abstract:** Sorghum aphid (*Melanaphis sacchari*) and head smut fungi (*Sporisorium reilianum*) infesting sorghum cause delayed growth and development, and reduce yield and quality. This study use bioinformatics and molecular biological approaches to profile the gene expression pattern during sorghum development and under pest infestation, and analyzed the natural allelic DNA variation of sorghum MYC gene family. The findings provide insights for potential application in breeding the stress resistant and high productivity sorghum varieties. The results indicated that there are 28 MYC genes identified in sorghum genome, distributed on 10 chromosomes. The bHLH\_MYC\_N and HLH domains are the conserved domains of the MYC gene in sorghum. Gene expression analysis showed that *SbbHLH35.7g* exhibited high expression levels in leaves, *SbAbaIn* showed strong expression in early grains, and *SbMYC2.1g* showed high expression levels in mature pollen. In anti-aphid strains at the 5-leaf stage, *SbAbaIn*, *SbLHW.4g* and *SbLHW.2g* were significantly induced in leaves, while *SbbHLH35.7g* displayed the highest expression level in panicle tissue, which was significantly induced by the infection of head smut. Promoter cis-element analysis identified methyl jasmonate (MJ), abscisic acid (ABA), salicylic acid (SA) and MYB-binding sites related to drought-stress inducibility. Furthermore, genomic resequencing data analysis revealed natural allelic DNA variations such as single nucleotide polymorphism (SNP) and insertion-deletion (INDEL) for the key *SbMYCs*. Protein interaction network analysis using STRING indicated that *SbAbaIn* interacts with TIFY domain protein, and *SbbHLH35.7g* interacts with MDR and importin. *SbMYCs* exhibited temporal and spatial expression patterns and played vital roles during the

sorghum development. Infestation by sugarcane aphids and head smut fungi induced the expression of *SbAbaIn* and *SbbHLH35.7g*, respectively. *SbAbaIn* modulated the jasmonic acid (JA) pathway to regulate the expression of defensive genes, conferring resistance to insects. On the other hand, *SbbHLH35.7g* participated in detoxification reactions to defend against pathogens.

**Keywords:** sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench); *MYC*; sugarcane aphid; *Sporisorium reilianum*; gene expression; natural allelic DNA variation

高粱是我国重要的杂粮作物之一, 广泛应用于酿造、饲料和生物能源等多个产业<sup>[1]</sup>。高粱蚜和丝黑穗病分别是高粱主产区的主要虫害和病害, 其发生和流行使产量和品质下降。研究表明 *MYC* 转录因子可调节茉莉酸的合成, 诱导相关抗性基因表达, 一些 *MYC* 成员可负调控脯氨酸生物合成, 参与调控植物抗逆性。拟南芥 *MYC2*、*MYC3* 和 *MYC4* 参与调节种子贮藏蛋白的积累, 表明 *MYC* 转录因子在提高抗逆性、产量和品质方面有较大潜力<sup>[2-3]</sup>。

*MYC* 基因在调节植物生长发育和次生代谢产物积累上发挥重要作用<sup>[4]</sup>。目前已经鉴定多个 *MYC* 基因, 包括水稻 7 个、玉米 7 个、小麦 26 个、二穗短柄草 7 个和红豆杉 5 个<sup>[5-7]</sup>。Ludwig 等<sup>[8]</sup>发现玉米 *R* 基因产物 Lc 是植物中首个含基本螺旋-环-螺旋(basic helix-loop-helix, bHLH)结构域的蛋白, 参与黄酮和花青素合成。Hichri 等<sup>[9]</sup>发现葡萄 *VvMYC1* 和 *VvMYBA1* 诱导花青素或原花青素(proanthocyanidin, PA)合成。*MYC2* 在蓝光介导下调节拟南芥生长发育过程中的基因表达, 遗传分析发现 *AtMYC2* 参与蓝光介导的光形态生长, 是蓝光和远红光调节基因表达的负调节因子<sup>[10-11]</sup>, 在盐胁迫条件下, *MYC2* 受丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)激活, 调节脯氨酸的生物合成, 从而调节盐胁迫反应<sup>[12]</sup>。*AtMYC3* 和 *AtMYC4* 均能调节植株合成花青素<sup>[13-15]</sup>, 红豆杉 *MYC* 基因可参与调控次生代谢产物紫杉醇

的合成<sup>[16]</sup>。作为 bHLH 的亚族, *MYC* 基因家族含有 bHLH\_MYC\_N 结构域, 这是蛋白质相互作用所必需的, HLH 结构域可以促进蛋白质与 DNA 结合<sup>[17]</sup>。

高粱植株和籽粒可积累花青素、单宁等次生代谢物, 控制籽粒颜色的基因分别为 *Y*、*R*、*Z* 和 *I*, 分别位于 *SBI-01*、*SBI-03*、*SBI-02* 和 *SBI-07* 染色体上, *Y* 和 *R* 分别编码 MYB (*Sobic.001G397900*)和 DFR (*Sobic.003G230900*、*Sobic.003G231000*)<sup>[18-19]</sup>, 冯周等<sup>[20]</sup>定位了 *Z*, 初步分析发现其候选基因 *Sobic.002G204200* 编码泛素连接酶, 还未鉴定到 *I* 的候选基因。控制籽粒单宁含量的 2 个主效位点 *Tan1* (*Sorbic.004G280800*) 和 *Tan2* (*Sorbic.002G076600*) 分别位于 *SBI-04* 和 *SBI-02*, 编码 WD40 和 MYC<sup>[21-22]</sup>。Lv 等<sup>[23]</sup>定位了 *SBI-07* 上一个红叶基因 *RL* (*Sobic.007G234100*) 编码细胞壁关联的激酶。高粱生长过程中受干旱、盐碱和病虫等胁迫, 导致减产。全基因组关联分析(genome-wide association analysis, GWAS) 关联到 *SBI-06* 上控制花青素积累、抗冷的 *MYC* 基因<sup>[24]</sup>; 表皮蜡含量与 *SBI-03* 上的 bHLH13 关联<sup>[25]</sup>, 用分子生物学方法也分离到数个控制抗盐的 *bHLH*<sup>[26-27]</sup>。

现代农业的绿色发展要求对高粱品种选育和病虫害防治提出新挑战。高粱蚜(*Melanaphis sacchari*)通过刺吸式口器从高粱组织获取营养, 造成叶片失绿, 严重时穗不能抽出, 籽粒败育, 是高粱生产上重要的虫害<sup>[28]</sup>。丝轴黑粉

菌(*Sporisorium reilianum*)侵染高粱幼苗,导致抽穗期形成花序充满菌丝和孢子,不能结实,是高粱生产上毁灭性的病害<sup>[29]</sup>。生产上主要通过培育抗蚜、抗病品种进行防治。国内外通过遗传作图和基因组关联分析,初步定位抗丝黑穗病和抗蚜基因<sup>[30]</sup>。

高粱全基因组 DNA 的测序工作在 2009 年初步完成,于 2018 年得到完善<sup>[31]</sup>,这使得从基因组水平来揭示高粱重要基因家族的功能成为可能。目前关于高粱 MYC 基因的研究较少,本研究对 MYC 基因表达模式及响应高粱蚜、丝轴黑粉菌侵染与自然等位 DNA 变异分析等进行了研究,旨在为研究 MYC 的生物学功能提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 高粱 MYC 家族成员基因鉴定、染色体定位及共线性分析

以拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)和水稻(*Oryza sativa*) MYC 氨基酸序列作为参考,在 NCBI 数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)中进行 BLASTP 搜寻和比对,利用 CDD 和 Pfam 筛选出含有该结构域的蛋白质序列。在 Phytozome 数据库(V12, <https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>)下载高粱的基因组注释文件以及 *SbMYCs* 基因序列和氨基酸序列。*SbMYCs* 编号以 NCBI 命名为主,少数结合了已完成的功能分析的 MYC 基因<sup>[32]</sup>。同时获取玉米(*Zea mays*)、大豆(*Glycine max*)、水稻和拟南芥的蛋白序列,采用 TBtools<sup>[33]</sup>软件进行高粱 MYC 基因染色体定位及共线性信息绘图。

### 1.2 高粱 MYC 转录因子家族成员基因结构分析

利用 MEGA 11.0 软件的邻接法(neighbor-joining, NJ)构建系统进化树<sup>[34-35]</sup>,利用 GSDS

在线工具(Gene Structure Display Server 2.0, <http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>)绘制高粱 MYC 基因结构图。通过 MEME<sup>[36]</sup>获取 *SbMYC* 家族 motif 位置分布信息,保守序列的最大鉴定数目设置为 10。

### 1.3 高粱 MYC 基因家族蛋白质理化性质分析

从 Phytozome 数据库和 ExPASy-Compute pI/Mw ([http://web.expasy.org/compute\\_pi/](http://web.expasy.org/compute_pi/))<sup>[37]</sup>获取 *SbMYC* 蛋白理化性质相关信息,包括氨基酸数目、分子量大小、理论等电点、不稳定系数、脂溶性系数和亲水性平均值。

### 1.4 高粱 MYC 家族蛋白二级结构、亚细胞定位分析

采用 PSORT ([psort1.hgc.jp/form.html](http://psort1.hgc.jp/form.html))和 SOPMA<sup>[38]</sup> ([https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=npsa\\_sopma.html](https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html))分别对高粱 MYC 蛋白二级结构和亚细胞定位进行分析。

### 1.5 高粱 MYC 基因启动子顺式作用元件分析

从 NCBI 下载 MYC 基因启动子上游 2 000 bp 序列,提交至 PlantCARE 数据库(Plant Cis-Acting Regulatory Element, <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>),进行 *SbMYCs* 的启动子顺式作用元件分析。

### 1.6 高粱 MYC 系统进化树分析

通过 MEGA 11.0 软件,对高粱、拟南芥、水稻、玉米和大豆 MYC 家族氨基酸序列进行比对,用邻接法构建系统进化树,采用 iTOL (<http://itol.embl.de>)在线工具对进化树进行美化。

### 1.7 高粱 MYC 家族进化选择压力分析

通过 MEGA 11.0 软件对 *SbMYC* 家族基因的编码序列(coding sequence, CDS)进行对比,再利用 TBtools 软件中 Simplement Ka/Ks Calculator (NG)计算出基因的进化选择压力。

### 1.8 高粱 MYC 基因表达分析

从 Phytozome 数据库中下载高粱 MYC 基因

在各个生育期、不同器官部位的表达量, 利用 TBtools 软件作出表达量的热图。

### 1.9 *SbMYC* 基因表达及蚜虫和丝黑穗侵染影响分析

抗、感高粱蚜品系 2457B、5-27sugB 在可控光照生长箱生长, 抗丝黑穗病品系 1383-2×7050B F4-12Res、感病品系 1383-2×7050B F4-12Sus

以及 R111 和 SSA1 在温室生长, 高粱丝轴黑粉菌、高粱蚜侵染取样及基因表达分析的详细步骤参照赵珊珊等<sup>[39]</sup>的方法。在授粉后 10 d 和 20 d, 对幼嫩籽粒取样, 提取 RNA, 采用实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR detecting system, qPCR) 检测基因表达水平。qPCR 参照范佳利等<sup>[40]</sup>的方法, 基因专一性引物见表 1。

表 1 *SbMYCs* 在高粱组织表达的 qPCR 引物

Table 1 Primers used for quantification of expression of *SbMYCs* in sorghum tissues by qPCR

Gene	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')
<i>SbMYC2.1g</i>	TGCCATCTTTTGGCAGTCCT	GCCGGAGATGAGGGAATTGA
<i>SbLHW.2g</i>	TGGATGCATGGGAATCAACA	CATCGATGCTTTGATGCATTTGG
<i>SbTan2/GLABRA3</i>	GTTCTACCTCATGTGCGCCT	GGACACCATCGTTGACTGGA
<i>SbMYC2.2g2</i>	GCTGTACGTGTGAGGAGCTA	ATGACGGCTCGGAAAAGGAG
<i>SbMYC2.2g1</i>	TGACAATGGACGACCTGCTC	CTCCCCTGGCCATAGGTC
<i>SbbHLH13.3g</i>	AGCTCTTGTTGAATCCATTGAGG	GGCATAGTAACAAGATGAACATGGC
<i>SbMYC2.3g</i>	CAACGGTGCAATGGATGACC	CTGGTGGAGCTCATGTCCTG
<i>SbAbaIn</i>	ATCTTCGGCAAGGACCTCTC	GAAGTCTATGCTCCTGGGCG
<i>SbbHLH155.3g</i>	GAAGGGCTGATGGGAAAGGT	ATGGTCTGGATGCCTGATGC
<i>SbTDR</i>	TAGGTGACCTGCCTCCATCA	GTGGTCTAGGAGCACGTCTG
<i>SbbHLH155.4g</i>	CGGCATATACGACCGGACAA	TGAAGAAGAGCTCAGGCTGC
<i>SbLHW.4g</i>	ATATGGGGAGAAACCGCCAC	ACTCGCCTGTCCTGAAACAG
<i>SbLHW.5g</i>	AGCCTGGTCCATTTGGAAGC	CTGCTGGGTCTGGAACCTCTG
<i>SbMYC4.5g</i>	TGCCATCTTTTGGCAGTCCT	GCCGGAGATGAGGGAATTGA
<i>SbR-S4</i>	GGTCCTACTCCGATGAAGCG	TTTCCTGGGCTGTTTCGTACC
<i>SbR-S3</i>	ATACTCGGAAGAGCCGACCT	GCATTGAACAAGCTGACGGG
<i>SbR-S2</i>	CAGGAATAGTAAGGGGAGCG	TGTAGAACCCGTCCTCCAT
<i>SbR-S1</i>	CCTTCCGCCTCAACAGGAAT	CGACCTGGTTGAGTGCTTGA
<i>SbLHW.6g</i>	ATATTTATCAGCCCCCTCTCCC	AGGGTCTTGGGGATGGAAGC
<i>SbbHLH35.7g</i>	GCCCCTTGCGCATTATAGGA	TCCCCTGTAGAGACCATCC
<i>SbMYC2.7g1</i>	GTCCCCCAGTCATCCTTCTG	TTCTTCGCCGAGTAGCCATT
<i>SbMYC4.7g</i>	TCAGTCCCCAGCCTTCTTCT	GTGCCTAACACTGTCGCTGT
<i>SbMYC2.7g2</i>	AACGCTTGAGCTGGATCACT	AACATCAGTGGAGACGCAGT
<i>SbMYC3.7g</i>	TGCCCTGTGATTTCTGAG	GGCTGTTGGTGTGTTACGG
<i>SbLHW.8g</i>	CTGAAGAAGCTGGGTGTGAG	AACCTCGGGTCTGAGATTGTG
<i>SbMYC2.9g</i>	GCCATTCTCGGCTTGCATA	GCATCTTTCAGCTGATGCT
<i>SbbHLH13.9g</i>	TGACCAGACAGAAGATGCGG	CACCAACGTGACGTGGAAC
<i>SbbHLH155.10g</i>	CATATGCCGGGGACTGTGAG	GCCGCCACTTCCCTATCAG
<i>18S rRNA</i>	GCCTTTCGAAGCACTTTCAC	AACCAAACCTCCATGCTCAC

### 1.10 高粱 MYC 基因 DNA 自然等位变异

对上述高粱基因型以及 1383-2/15、3030、2457A3、91SPbigspike、B35、R111、Apo111、3chi3Mid、Pin626、JF1、4003、961541、Xinliang7、EBA-3、C1-1-1、44B、Jinliang5、SP42、V4A2、E35B、SP91dw 和 961541H 在 BMKcloud.com 平台分析 DNA 变异, 获得 *SbMYC* 基因单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)、插入缺失标记(insertion-deletion, INDEL)变异位点, 通过 Excel 筛选整理整合相同基因型, 统计变异位点, 分析单倍型。其中 2457A3、V4A2 为高粱杂交种组配的雄性不育系, 2457B、5-27sugB 和 44B 为雄性不育系的保持系, 1383-2/15、3030、91SPbigspike、R111、Apo111、3chi3Mid、Pin626、JF1、4003、961541、Xinliang7、C1-1-1、Jinliang5、SP42、E35B、SP91dw 和 961541H 为雄性不育系的恢复系, B35 为叶片持绿特异种质, EBA-3 为含 *Ma5* 和 *Ma6* 的特异种质, 均由本团队收集和保存。

### 1.11 高粱 *SbTan2* 基因单倍型分析

根据高粱单宁含量测定方法(GB/T 15686—2008)对上述高粱材料单宁含量进行测定, 利用上述重测序中的 DNA 变异信息, 分析单倍型和表型数据的关联性。

### 1.12 *SbMYC* 互作蛋白预测

通过 STRING 数据库(<https://cn.string-db.org/>), 交互蛋白数量设置为 10 个以内, 构建高粱 MYC 互作蛋白网络图。

## 2 结果与分析

### 2.1 *SbMYCs* 基因家族基本信息、染色体定位及共线性分析

结合高粱转录组测序数据, 并通过结构域验证最终获取到 28 个 MYC 基因(表 2)。染色体定位发现 MYC 基因在高粱 10 条染色体上均

有分布, *SBI-06* 和 *SBI-07* 号染色体上基因个数最多(5 个), *SBI-01*、*SBI-08* 和 *SBI-10* 号染色体上分布基因最少(仅 1 个), 多数 *SbMYCs* 基因分布在染色体两端(图 1), 可能避免了异染色质区, 基因长度为 771–17 879 bp, CDS 序列 291–2 676 bp。

对 *SbMYC* 基因家族成员与拟南芥和水稻进行共线性分析(图 2), 结果显示, *SbMYCs* 与拟南芥存在 3 个同源基因对, 与水稻有 21 个同源基因对, 表明高粱和水稻 MYC 基因功能更相近, 调控途径更相似。

### 2.2 高粱 MYC 转录因子家族成员基因结构分析

如图 3A 所示, 将 *SbMYCs* 基因进行聚类分析, 共分为 5 个亚族, 同一亚族下亲缘关系越近, motif 分布的种类、数量、位置、内含子-外显子结构和保守基序越相似。

高粱 MYC 基因结构分析见图 3B, *SbMYCs* 基因内含子数量的变化范围从 0–11 个不等。除 *SbMYC2.2g2*、*SbMYC2.7g1*、*SbMYC2.3g*、*SbMYC2.7g2*、*SbMYC4.7g*、*SbR-S3* 和 *SbTan2* 这 8 个基因上下游非编码区有缺失, 其余 *SbMYC* 基因均存在上下游非编码区。其中 *SbLHW.4g*、*SbLHW.6g*、*SbTan2/GLABRA3*、*SbLHW.2g*、*SbLHW.5g* 和 *SbLHW.8g* 的内含子数量最多, 高达 11 个; 多数 I 类成员不含内含子。

对高粱 MYC 蛋白保守结构域进一步分析(图 3C)发现, 高粱 MYC 蛋白包含 HLH 和 bHLH\_MYC\_N 两种结构域, 其中 8 个 MYC 转录因子同时包含这 2 种结构域; 18 个 MYC 蛋白含有保守结构域 bHLH\_MYC\_N。

保守基序有助于理解 MYC 转录因子的功能, 对高粱 MYC 转录因子 motif 位置分布进行分析(图 3D), 共发现 10 个 motif。其中 motif 1、motif 3 和 motif 4 均有 50 个氨基酸(图 4)。Motif 1

表 2 高粱 MYC 染色体位置和基因结构

Table 2 Sorghum MYC chromosome location and gene structure

Gene name	Gene ID	Chromosome	Genome location	Length (bp)	CDS (bp)
<i>SbMYC2.1g</i>	<i>Sobic.001G287600</i>	<i>SBI-01</i>	56 318 190–56 321 348	3 158	2 124
<i>SbLHW.2g</i>	<i>Sobic.002G001500</i>	<i>SBI-02</i>	196 754–57 321 348	5 405	1 908
<i>SbTan2/GLABRA3</i> <sup>[32]</sup>	<i>Sobic.002G076600</i>	<i>SBI-02</i>	7 975 936–58 321 348	9 285	2 034
<i>SbMYC2.2g2</i>	<i>Sobic.002G267000</i>	<i>SBI-02</i>	65 126 279–59 321 348	1 098	831
<i>SbMYC2.2g1</i>	<i>Sobic.002G267100</i>	<i>SBI-02</i>	65 136 135–60 321 348	1 443	891
<i>SbbHLH13.3g</i>	<i>Sobic.003G004500</i>	<i>SBI-03</i>	429 258–61 321 348	3 564	1 869
<i>SbMYC2.3g</i>	<i>Sobic.003G077100</i>	<i>SBI-03</i>	656 034–62 321 348	771	771
<i>SbAbaIn</i>	<i>Sobic.003G272200</i>	<i>SBI-03</i>	60 842 727–63 321 348	2 434	1 455
<i>SbbHLH155.3g</i>	<i>Sobic.003G324600</i>	<i>SBI-03</i>	65 124 587–64 321 348	4 815	1 380
<i>SbTDR</i>	<i>Sobic.004G017500</i>	<i>SBI-04</i>	1 370 525–65 321 348	3 478	1 716
<i>SbbHLH155.4g</i>	<i>Sobic.004G241500</i>	<i>SBI-04</i>	58 961 101–66 321 348	3 283	1 149
<i>SbLHW.4g</i>	<i>Sobic.004G284600</i>	<i>SBI-04</i>	62 680 454–67 321 348	5 063	2 334
<i>SbLHW.5g</i>	<i>Sobic.005G045100</i>	<i>SBI-05</i>	4 268 573–68 321 348	6 145	2 613
<i>SbMYC4.5g</i>	<i>Sobic.005G061601</i>	<i>SBI-05</i>	671 436–69 321 348	999	219
<i>SbR-S4</i>	<i>Sobic.006G076900</i>	<i>SBI-06</i>	44 126 382–70 321 348	14 007	1 770
<i>SbR-S3</i>	<i>Sobic.006G175200</i>	<i>SBI-06</i>	53 044 178–71 321 348	5 199	1 773
<i>SbR-S2</i>	<i>Sobic.006G175500</i>	<i>SBI-06</i>	53 062 306–72 321 348	17 878	1 641
<i>SbR-S1</i>	<i>Sobic.006G175700</i>	<i>SBI-06</i>	53 102 700–73 321 348	8 329	1 767
<i>SbLHW.6g</i>	<i>Sobic.006G182000</i>	<i>SBI-06</i>	53 688 464–74 321 348	5 392	2 517
<i>SbbHLH35.7g</i>	<i>Sobic.007G051800</i>	<i>SBI-07</i>	5 299 966–75 321 348	2 088	867
<i>SbMYC2.7g1</i>	<i>Sobic.007G182900</i>	<i>SBI-07</i>	61 594 875–76 321 348	916	837
<i>SbMYC4.7g</i>	<i>Sobic.007G183000</i>	<i>SBI-07</i>	61 602 262–77 321 348	840	840
<i>SbMYC2.7g2</i>	<i>Sobic.007G183050</i>	<i>SBI-07</i>	61 608 734–78 321 348	792	792
<i>SbMYC3.7g</i>	<i>Sobic.007G183200</i>	<i>SBI-07</i>	61 641 933–79 321 348	4 885	813
<i>SbLHW.8g</i>	<i>Sobic.008G044000</i>	<i>SBI-08</i>	4 344 861–80 321 348	5 783	2 676
<i>SbMYC2.9g</i>	<i>Sobic.009G036333</i>	<i>SBI-09</i>	3 328 869–81 321 348	3 975	1 263
<i>SbbHLH13.9g</i>	<i>Sobic.009G088100</i>	<i>SBI-09</i>	15 112 562–82 321 348	4 235	1 764
<i>SbbHLH155.10g</i>	<i>Sobic.010G095800</i>	<i>SBI-10</i>	8 617 650–83 321 348	3 037	1 203

和 motif 2 分布数量最多,分布在 25 个和 27 个高粱 MYC 蛋白中,SbMYC4.5g 仅存在 motif 4。说明 motif 1 和 motif 2 为较为保守的基序,与 MYC 基因的功能密切相关。

### 2.3 SbMYC 蛋白质理化性质

由表 3 可知:SbMYC 蛋白质编码氨基酸数目在 72–891 aa 之间;分子量大小在 7 659.79–94 767.82 Da 之间;理论等电点在 4.51–7.15 之间;25 个

SbMYC 蛋白质等电点小于 7 为酸性蛋白。不稳定系数分析表明,26 个 SbMYC 蛋白为不稳定蛋白,SbLHW.4g 和 SbMYC4.5g 为稳定蛋白。SbMYC 脂溶性系数在 54.77–96.25 之间,除 SbLHW.2g 和 SbMYC4.5g 蛋白外,其余 26 个 SbMYC 蛋白的脂溶系数均小于 90,表明 SbMYC 蛋白的流动性较弱。亲水性平均值都小于 0,表明 SbMYC 蛋白质均为亲水性蛋白。

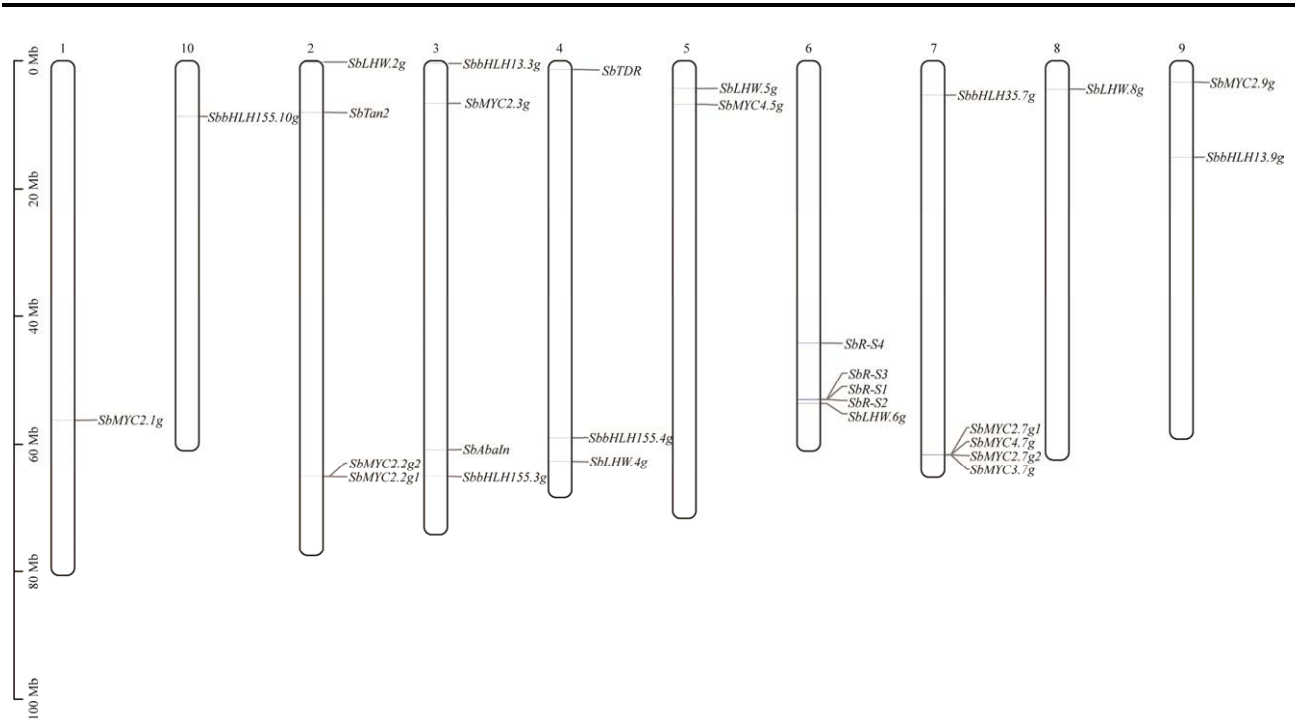


图 1 *SbMYCs* 基因家族染色体分布

Figure 1 Chromosome location of *SbMYCs*.

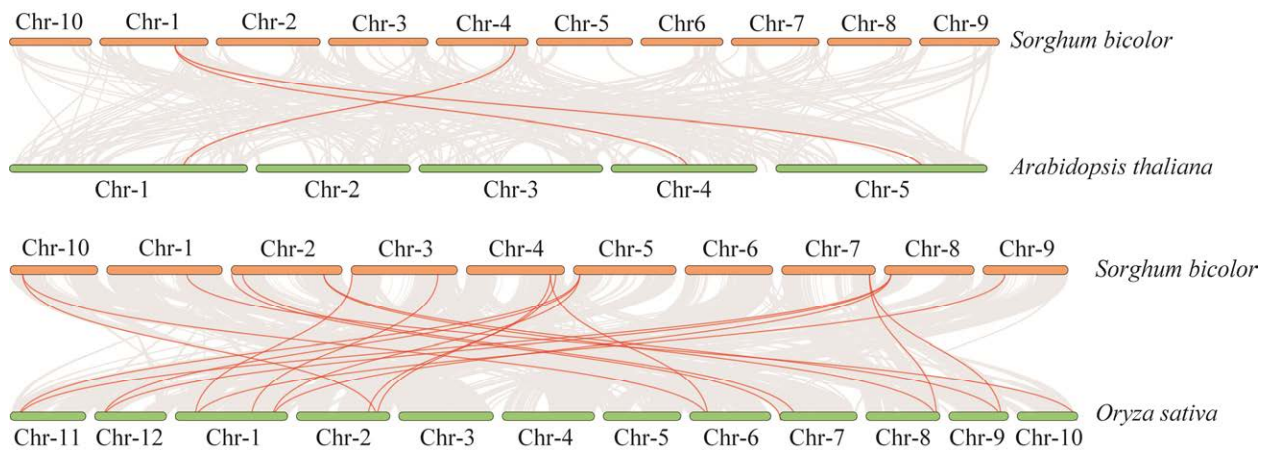


图 2 *SbMYCs* 基因共线性分析

Figure 2 Collinear analysis of *SbMYCs*.

## 2.4 高粱 MYC 家族蛋白二级结构、亚细胞定位分析

高粱 MYC 家族成员蛋白的二级结构预测结果见表 4, 高粱 MYC 家族各成员的二级结构中均含有  $\alpha$ -螺旋、 $\beta$ -折叠、延伸链和无规则卷曲。其中,  $\alpha$ -螺旋(25.93%–51.48%)和无规则卷

曲(37.78%–54.68%)为二级结构的主要存在形式, 而延伸链和  $\beta$ -折叠占比则相对较少, 散布在整个蛋白质中。

对高粱 MYC 家族成员进行亚细胞定位, 结果表明, 28 个 MYC 蛋白分别定位于细胞核、叶绿体、细胞质、内质网、微体和质膜内, *SbMYC2.1g*、



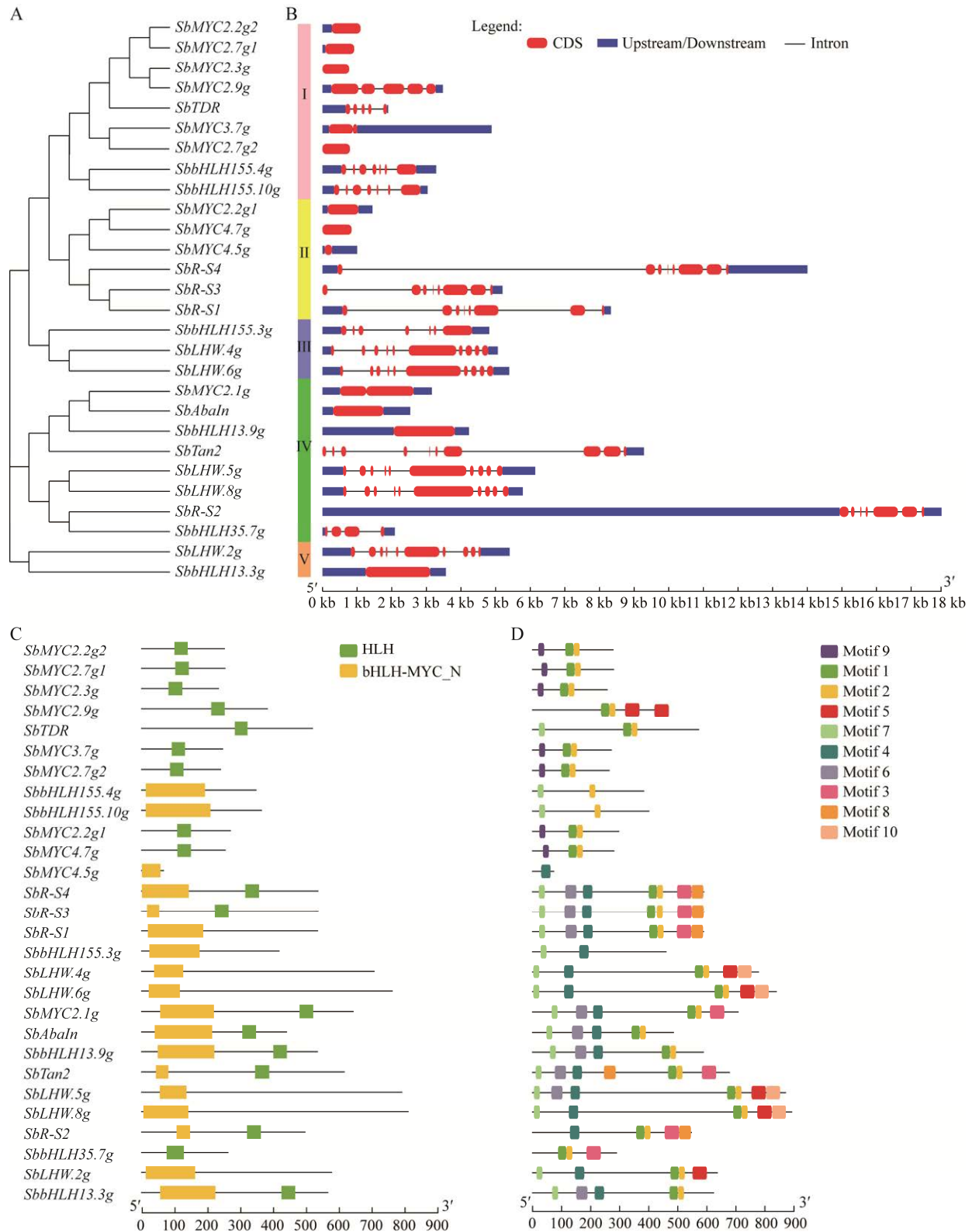


图3 *SbMYCs* 基因聚类图(A)、基因结构(B)、结构域(C)和 motif 位置分布(D)

Figure 3 *SbMYCs* cluster diagram (A), gene structure (B), domain (C) and motif location distribution (D).



图 4 SbMYCs 蛋白 10 个保守基序序列标识

Figure 4 Sequence logos of the 10 conserved motifs in SbMYCs proteins.

SbLHW.2g 等 10 个蛋白定位于细胞核，概率区间为 30%–98%，SbMYC2.2g1、SbMYC2.2g2 等 7 个定位于叶绿体基质，概率区间为 51.6%–90.4%。SbLHW.4g、SbMYC4.5g 和 SbbHLH155.4g 等 5 个定位于微体，SbAbaIn 和 SbMYC2.9g 定位于内质网。

## 2.5 高粱 MYC 基因启动子分析

高粱 MYC 家族基因启动子顺式作用元件

分析(图5)表明，*SbMYC* 基因家族各成员顺式作用元件的种类和数量都有差异。在 MYC 基因启动子中发现了与植物生长发育、激素调控和胁迫响应相关等不同类型的顺式元件。其中 23 个 *SbMYC* 成员启动子区域含有顺式元件 ABRE，参与脱落酸反应；并发现与光调控相关的元件 G-box、CGTCA-motif 和 TGACG-motif 存在于 22 个启动子中，与茉莉酸甲酯(methyl jasmonate,

表 3 高粱 MYC 转录因子理化性质

Table 3 Physical and chemical characteristics of *SbMYCs*

Proteins	Number of amino acids (aa)	Molecular weight (Da)	Theoretical pI	Instability index	Aliphatic index	Average hydrophilicity
SbMYC2.1g	707	75 519.31	6.12	54.72	63.42	-0.524
SbLHW.2g	635	71 020.99	5.47	50.67	90.43	-0.232
SbTan2/GLABRA3	677	73 741.47	6.16	58.86	78.40	-0.449
SbMYC2.2g2	276	29 255.02	5.74	62.37	85.65	-0.287
SbMYC2.2g1	296	31 907.83	5.21	67.03	76.22	-0.435
SbbHLH13.3g	622	67 721.55	7.12	47.20	75.43	-0.466
SbMYC2.3g	256	27 582.10	6.05	48.53	86.21	-0.297
SbAbaIn	484	51 219.49	7.26	48.48	73.16	-0.388
SbbHLH155.3g	459	49 025.83	5.97	54.25	54.77	-0.506
SbTDR	571	59 313.95	4.53	49.04	77.79	-0.251
SbbHLH155.4g	382	40 208.15	5.25	48.56	75.84	-0.076
SbLHW.4g	777	84 906.83	5.41	40.00	80.55	-0.286
SbLHW.5g	870	94 767.82	6.29	45.98	78.56	-0.369
SbMYC4.5g	72	7 659.79	4.51	38.49	96.25	0.369
SbR-S4	587	64 424.19	5.93	45.43	81.11	-0.324
SbR-S3	580	63 187.17	5.03	49.14	81.26	-0.305
SbR-S2	546	59 640.43	6.04	62.40	79.16	-0.469
SbR-S1	588	65 219.53	5.29	50.00	75.85	-0.409
SbLHW.6g	824	91 047.04	5.14	48.13	79.16	-0.457
SbbHLH35.7g	288	31 252.14	4.72	66.75	82.43	-0.320
SbMYC2.7g1	278	29 532.26	6.31	65.69	77.30	-0.319
SbMYC4.7g	279	29 750.77	6.53	55.20	83.30	-0.193
SbMYC2.7g2	263	28 104.60	6.06	51.92	79.58	-0.323
SbMYC3.7g	270	28 987.88	7.15	53.78	85.41	-0.227
SbLHW.8g	891	96 916.30	6.64	42.11	74.76	-0.437
SbMYC2.9g	420	43 577.55	5.04	73.64	72.21	-0.330
SbbHLH13.9g	587	64 288.53	6.19	46.91	79.42	-0.426
SbbHLH155.10g	400	42 077.11	4.96	60.39	70.17	-0.242

MeJA)诱导植物防御反应相关; 22 个启动子中存在抗氧化逆境响应元件 ARE, 与厌氧诱导相关。

此外, 与光反应(Sp1、G-Box)、水杨酸(TCA-element)、分生组织表达(CAT-box)、生长素反应(AuxRR-core)、种子调控(RY-element)相关的顺式元件, 以及与响应逆境胁迫相关的干旱诱导元件 MBS、低温响应元件 LTR 和防御、

胁迫响应元件 TC-rich repeats 等顺势元件均存在于 *SbMYCs* 启动子中。顺式元件分析表明, *SbMYCs* 在植物的生长发育、信号转导、胁迫响应和调节次生代谢产物等过程中起着重要作用。其中 *SbAbaIn*、*SbTDR* 和 *SbLHW.4g* 同时存在脱落酸、水杨酸、meJA 反应、无氧诱导和光等相关元件, 推测这 3 个基因可能更快响应多种环境胁迫, 行使更多基因功能。

表 4 SbMYCs 蛋白二级结构和亚细胞定位

Table 4 Secondary structure and subcellular localization of SbMYCs

Proteins	Alpha-helix (%)	Beta-turn (%)	Extension chain (%)	Random coil (%)	Intracellular location	Probability (%)
SbMYC2.1g	31.82	2.55	11.32	54.31	Nucleus	70.0
SbLHW.2g	41.42	3.62	12.44	42.52	Nucleus	76.0
SbTan2/GLABRA3	37.22	2.81	9.45	50.52	Nucleus	30.0
SbMYC2.2g2	40.58	1.81	11.59	46.01	Chloroplast stroma	52.4
SbMYC2.2g1	42.23	3.04	10.81	43.92	Chloroplast stroma	57.7
SbbHLH13.3g	33.60	3.70	13.02	49.68	Nucleus	70.0
SbMYC2.3g	36.92	4.64	13.92	44.51	Cytoplasm	45.0
SbAbaIn	36.57	3.10	11.98	48.35	Endoplasmic reticulum	55.0
SbbHLH155.3g	25.93	5.66	13.73	54.68	Microbody	69.4
SbTDR	38.92	6.11	13.26	41.71	Nucleus	98.0
SbbHLH155.4g	41.36	7.33	10.73	40.58	Microbody	52.2
SbLHW.4g	31.92	6.69	17.63	43.76	Microbody	76.0
SbLHW.5g	30.46	5.40	12.64	51.49	Nucleus	76.0
SbMYC4.5g	26.39	8.33	23.61	41.67	Microbody	64.0
SbR-S4	41.57	4.43	11.07	42.93	Plasma membrane	79.0
SbR-S3	40.17	3.28	11.03	45.52	Plasma membrane	79.0
SbR-S2	37.00	3.11	12.82	47.07	Nucleus	96.0
SbR-S1	41.67	3.40	11.90	43.03	plasma membrane	60.0
SbLHW.6g	28.88	4.61	15.05	51.46	Nucleus	76.0
SbbHLH35.7g	46.88	0.00	11.11	39.24	Chloroplast thylakoid space	80.0
SbMYC2.7g1	50.00	2.88	8.63	38.49	Chloroplast stroma	84.7
SbMYC4.7g	46.59	1.79	9.32	42.29	Chloroplast stroma	90.4
SbMYC2.7g2	48.29	2.28	7.98	41.44	Chloroplast stroma	52.6
SbMYC3.7g	51.48	2.59	8.15	37.78	Chloroplast stroma	51.6
SbLHW.8g	28.28	5.84	14.59	51.29	Nucleus	76.0
SbMYC2.9g	44.76	4.29	8.10	42.86	Endoplasmic reticulum	85.0
SbbHLH13.9g	37.31	3.41	12.10	47.19	Microbody	30.0
SbbHLH155.10g	41.50	7.00	11.75	39.75	Nucleus	76.0

## 2.6 高粱与水稻、大豆、玉米和拟南芥 MYC 的系统发育分析

将高粱、玉米、拟南芥、大豆和水稻 MYC 氨基酸序列进行聚类分析(图 6)。高粱 28 个 MYC 可分为 8 个亚族, 高粱 MYC 在各亚族均有分布, 集中分布在第 IV 亚族, 且高粱与玉米 MYC 基因大多聚在同一分支下, 表明高粱和玉米在进化过程中同源关系更为亲近。此外,

*SbR-S2* 与 *Araha.52607s0001* 互为直系同源基因, *Araha.52607s000* 基因参与盐胁迫信号传导, 推测 *SbR-S2* 可能发挥相似的作用。

## 2.7 *SbMYC* 基因家族进化选择分析

遗传上使用非同义突变率( $K_a$ )和同义突变率( $K_s$ )的比值来判断此蛋白编码的基因是否有选择压力。如果  $K_a/K_s < 1$ , 则认为有纯化选择作用。高粱 MYC 同源基因对分析进化选择压力

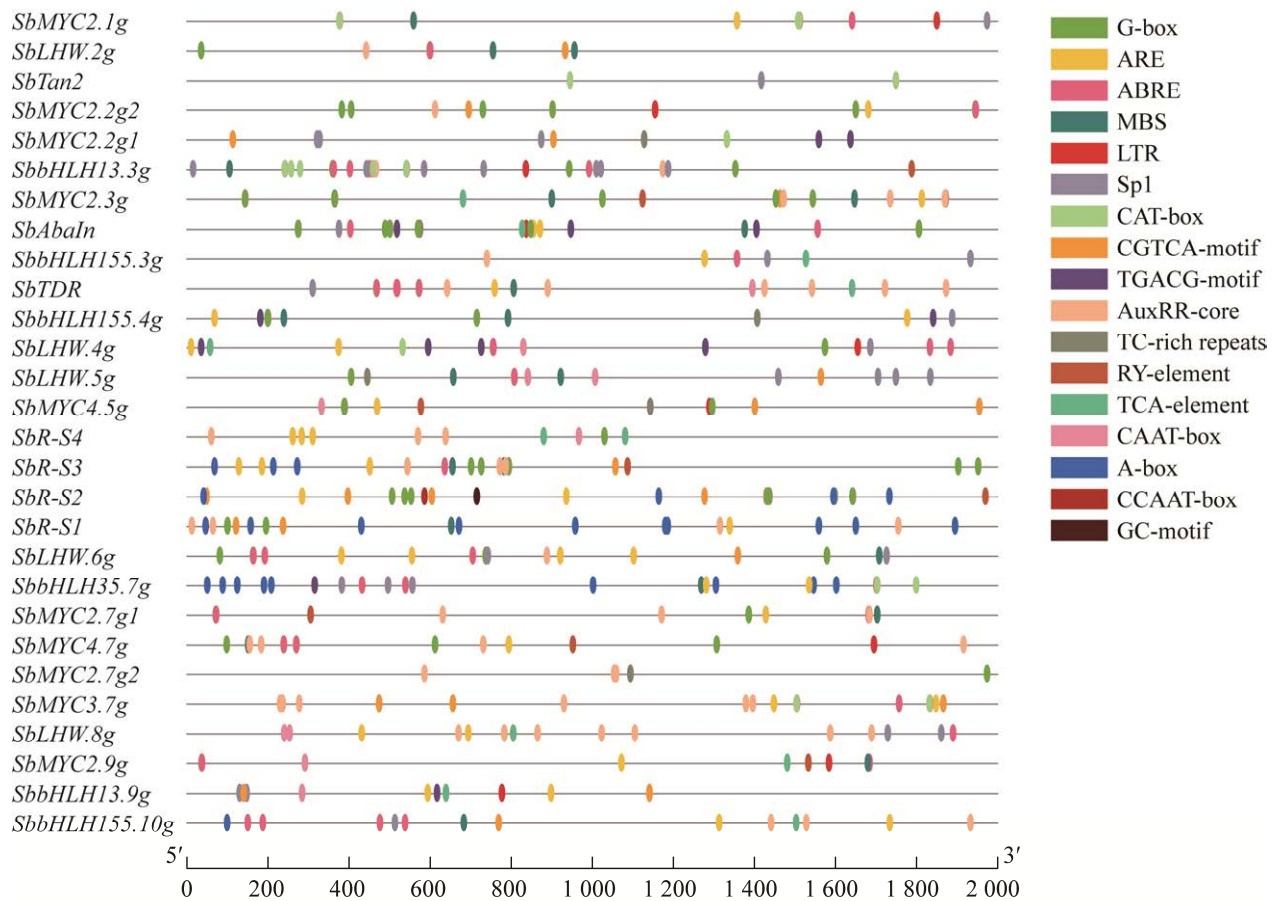


图5 *SbMYCs* 基因启动子区的顺式作用调控元件核心序列及功能

Figure 5 Core sequences and function of the *cis*-acting regulatory elements in promoter regions of *SbMYCs*.

见表5, *SbMYCs* 编码区基因的  $K_a/K_s$  均远小于1, 说明 *SbMYCs* 蛋白编码区基因均受纯化选择作用, 可以保证 *SbMYC* 蛋白功能的稳定性。

## 2.8 高粱 *MYC* 基因表达分析

利用高粱表达数据构建表达量热图(图7), *SbbHLH35.7g* 在生育期根、茎、叶和穗组织表达水平很高, 在幼龄叶片中表达水平最高。*SbLHW.2g* 在根组织表达水平比较高, *SbLHW.8g* 在穗部表达水平较高, *SbMYC2.1g*、*SbbHLH13.3g*、*SbLHW.6g* 和 *SbLHW.8g* 在种子内表达水平比较高。有些基因在整个高粱所有部位表达较低, 如 *SbTan2*、*SbMYC4.5g*、*SbR-S4* 和 *SbR-S3* 等。*SbTan2/GLABRA3* 是报道的控制籽粒单宁合成

基因, *SbR-S4*、*SbR-S1* 是报道的控制植株花青素合成基因, 不表达很可能是所用材料 TX623B 发生了突变。

## 2.9 *SbMYC* 基因表达及蚜虫和丝黑穗侵染影响分析

对高粱品系 R111 和 SSA1 不同发育阶段籽粒 *SbMYCs* 表达分析(图8), 发现发育早期籽粒中 *SbAbaIn* 表达最强, 随籽粒发育降低。*SbbHLH13.3g* 表达水平也较高。*SbLHW.8g* 也有较高的相对表达量, 20 d 较 10 d 增加 2 倍。*SbbHLH155.3g*、*SbTan2* 的表达水平也随籽粒发育表达增强。10 d 籽粒 *SbTan2* 的表达水平 R111 明显高于 SSA1。

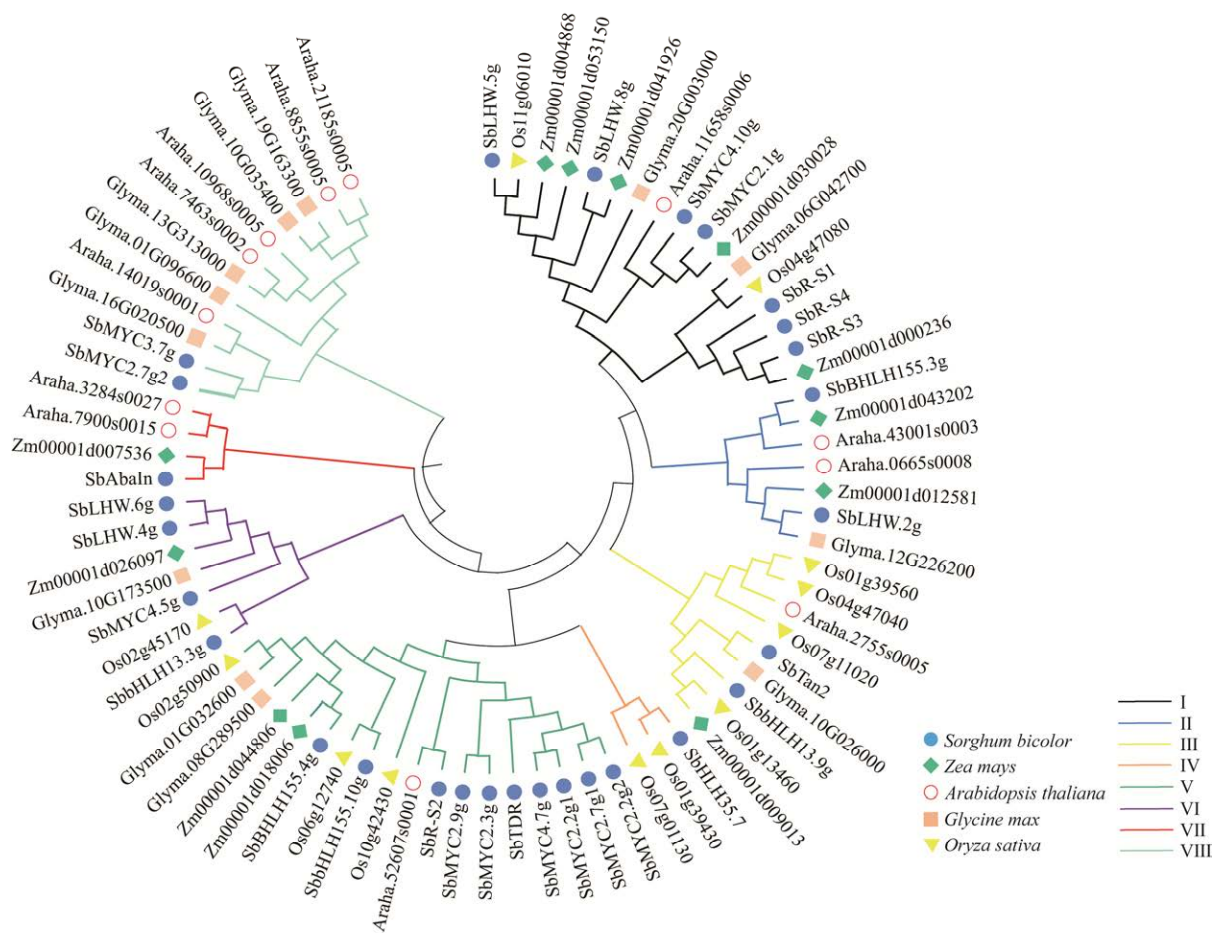


图 6 高粱与玉米、大豆、水稻和拟南芥 MYC 系统进化树分析

Figure 6 Phylogenetic tree of MYCs of *Sorghum bicolor*, *Zea may*, *Glycine max*, *Oryza sativa* and *Arabidopsis thaliana*.

表 5 *SbMYCs* 家族成员进化选择参数

Table 5 Evolutionary selection parameters for members of the *SbMYCs*

Gene	Ka	Ks	Ka/Ks	Gene	Ka	Ks	Ka/Ks
<i>SbMYC2.1g</i>	0.028 953	0.213 777	0.135 435	<i>SbR-S4</i>	0.115 402	0.316 814	0.364 259
<i>SbLHW.2g</i>	0.105 211	0.257 736	0.408 212	<i>SbR-S3</i>	0.121 883	0.368 833	0.330 454
<i>SbTan2/GLABRA3</i>	0.129 727	0.306 220	0.423 640	<i>SbR-S2</i>	0.129 164	0.654 619	0.197 312
<i>SbMYC2.2g2</i>	0.036 775	0.104 750	0.351 075	<i>SbR-S1</i>	0.140 073	0.617 129	0.226 976
<i>SbMYC2.2g1</i>	0.099 818	0.391 013	0.255 280	<i>SbLHW.6g</i>	0.043 988	0.174 795	0.251 657
<i>SbbHLH13.3g</i>	0.031 224	0.385 553	0.080 985	<i>SbbHLH35.7g</i>	0.033 849	0.075 631	0.374 398
<i>SbMYC2.3g</i>	0.325 899	0.574 851	0.566 928	<i>SbMYC2.7g1</i>	0.103 717	0.277 024	0.742 392
<i>SbAbaln</i>	0.058 421	0.195 530	0.298 783	<i>SbMYC4.7g</i>	0.215 799	0.290 680	0.321 465
<i>SbbHLH155.3g</i>	0.045 718	0.146 283	0.312 533	<i>SbMYC2.7g2</i>	0.060 620	0.188 575	0.613 654
<i>SbTDR</i>	0.024 558	0.115 933	0.211 827	<i>SbMYC3.7g</i>	0.072 284	0.117 793	0.278 681
<i>SbbHLH155.4g</i>	0.103 001	0.196 459	0.524 288	<i>SbLHW.8g</i>	0.034 145	0.122 523	0.608 137
<i>SbLHW.4g</i>	0.056 541	0.143 265	0.394 662	<i>SbMYC2.9g</i>	0.118 961	0.195 615	0.310 306
<i>SbLHW.5g</i>	0.052 835	0.178 414	0.296 139	<i>SbbHLH13.9g</i>	0.091 333	0.294 332	0.246 551
<i>SbMYC4.5g</i>	0.338 765	0.738 211	0.458 900	<i>SbbHLH155.10g</i>	0.056 885	0.230 724	0.321 465

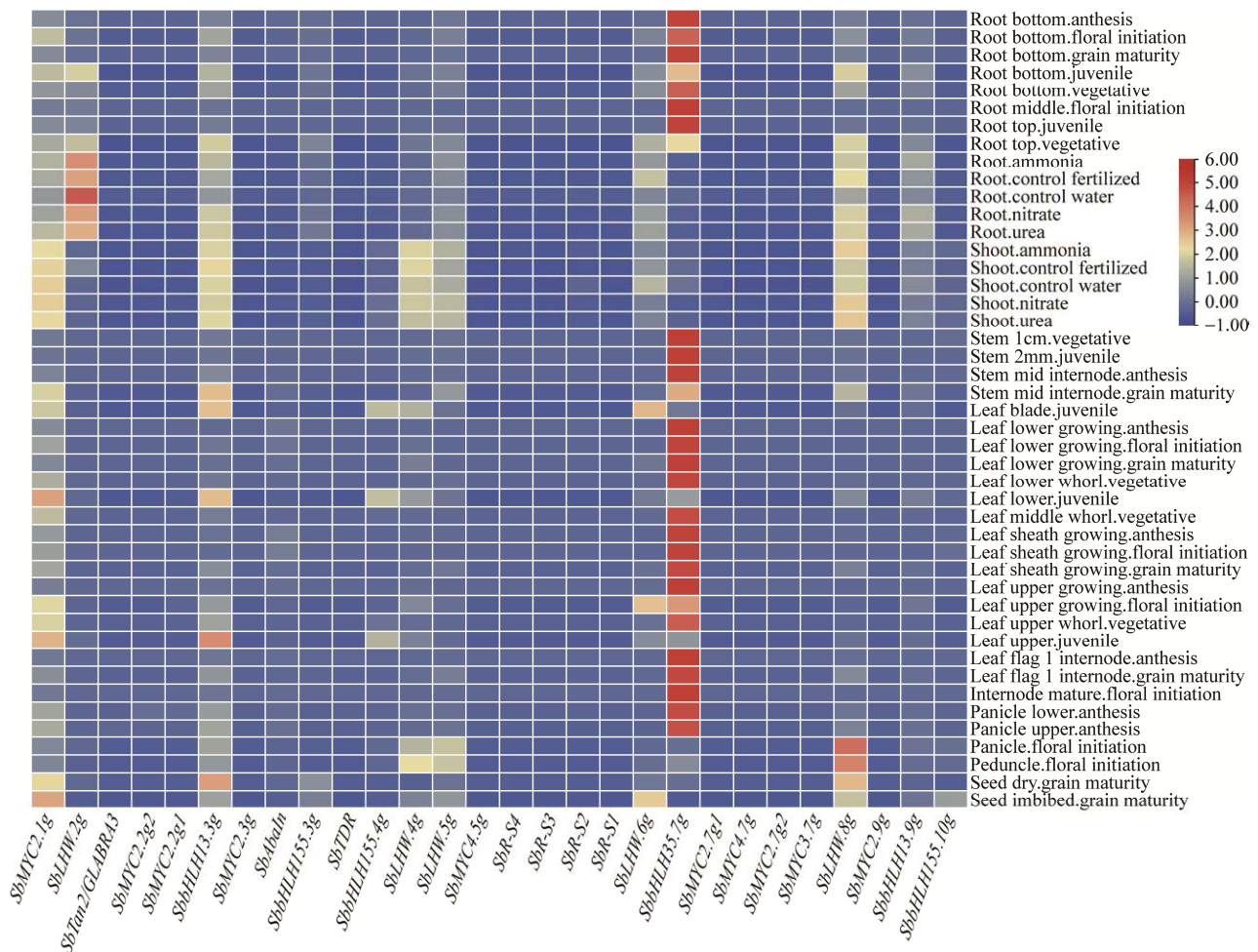


图 7 在高粱不同发育时期器官 *SbMYCs* 的表达

Figure 7 Expression levels of *SbMYCs* in various tissues at different stages.

*SbMYCs* 在成熟花粉中的表达分析显示,在花粉中显著表达的是 *SbMYC2.1g*、*SbAbaIn*、*SbbHLH13.3g*、*SbTDR*、*SbLHW.6g*、*SbLHW.8g* 和 *SbMYC2.2g1*, *SbbHLH13.9g* 次之。其他基因表达水平很低或不表达。

进一步测定了 *SbMYCs* 在抗蚜品系 2457B、感蚜品系 5-27sugB 的 5 叶期叶片中表达水平,图 9A 结果显示 *SbMYC2.1g* 和 *SbAbaIn* 表达水平较高。在抗、感蚜品系中均受到诱导表达的是 *SbAbaIn*、*SbLHW.4g* 和 *SbLHW.2g*。仅在抗蚜品系显著诱导的有 *SbMYC2.1g* 和 *SbLHW.6g*,

在感蚜品系显著诱导的还有 *SbbHLH155.4g*。*SbTan2*、*SbR-S1* 和 *SbR-S2* 在叶片中几乎不表达。

测定 *SbMYCs* 在抗、感丝黑穗病品系穗组织中的表达,图 9B 结果显示 *SbbHLH35.7g* 在穗组织表达水平最高,其次是 *SbMYC2.1g* 和 *SbAbaIn*。受侵染后 *SbbHLH35.7g* 表达水平受到显著诱导,*SbMYC2.1g* 和 *SbHLH13.3g* 也得到诱导,在抗病品系表达明显较高的是 *SbAbaIn*。

## 2.10 高粱 MYC 基因 DNA 自然等位变异

通过 Illumina 全基因组重测序鉴定了所用种质的 SNP 和 INDEL 变异,见表 6。*SbTan2* 在

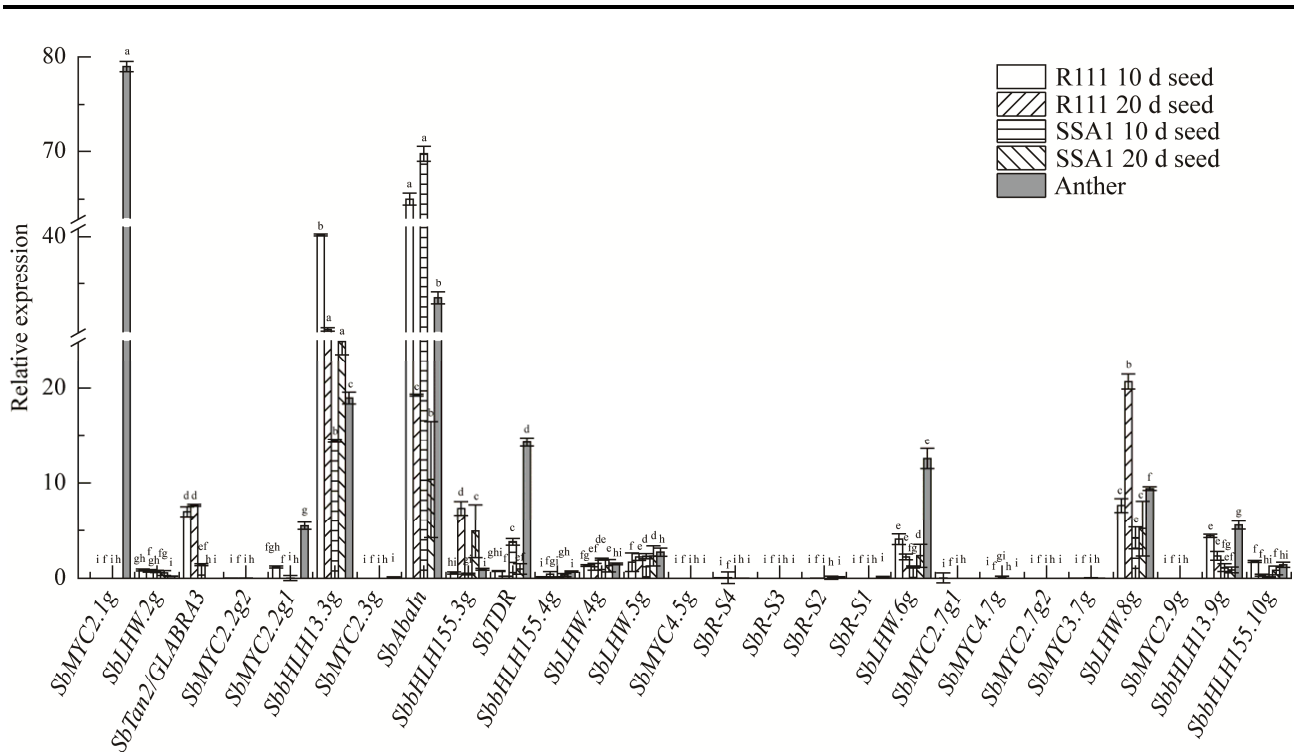


图 8 花粉和种子发育过程 *SbMYCs* 表达水平 不同小写字母代表差异显著

Figure 8 Expression levels of *SbMYCs* in pollen and various development stages of seeds. Different lowercase letters represent significant differences.

低单宁品系显示非同义 SNP 或 INDEL 阅读框改变。如在品系 44B 中, *SbTan2* 在 *SBI-02* 的 7 994 472 处发生非同义突变, 氨基酸由组氨酸突变为谷氨酰胺。*SbTan2* 在 *SBI-02* 的 7 994 628 处发生移码突变, 由 G 突变为 GCCCTC。

### 2.11 高粱 *SbTan2* 基因单倍型分析

为进一步挖掘 *SbTan2* 基因的自然变异, 对该基因进行单倍型分析(图 10A), 发现有 6 个 SNP 变异位点和 7 个 INDEL 变异位点, 共 10 种单倍型。Hap1 为主要单倍型, 出现频次最多, 共 15 次; Hap5 出现 2 次。其余单倍型出现频次为 1。在低单宁品系 44B 中发现 4 个 INDEL 变异、3 个 CODON\_DELETION 和 1 个 FRAME\_SHIFT, 分别由编码核苷酸删除和插入引起的。

进一步分析这 4 个变异与单宁含量的相关

性(图 10B), 发现 *SBI-02* 上 7 987 151、7 994 628、7 994 862、7 995 026 bp 位点处的 INDEL 变异, 分别由 CGGA 突变为 C, G 移码突变为 GCCCTC, GCGCCGC 突变为 G, 由 GCAT 突变为 G。且在 25 个品系中, 高粱品系 44B 发生 INDEL 变异, 系推测高粱品系 44B 的低单宁含量由于 *SbTan2* 的 INDEL 变异导致转录提前终止引起的。

### 2.12 *SbMYC* 互作蛋白预测

用 STRING 预测 *SbAbaIn* 和 *SbbHLH35.7g* 的互作蛋白(图 11), 结果表明 2 种基因的互作蛋白差异较大, 受蚜虫诱导表达的 *SbAbaIn* 与如下蛋白互作(表 7): 4 个 Jasmonate ZIM domains (JAZs) 结构域蛋白(TIFY), 分别由 *SORBI\_3006G056400*、*SORBI\_3003G410300*、*SORBI\_3002G036150* 和 *SORBI\_3002G036100*



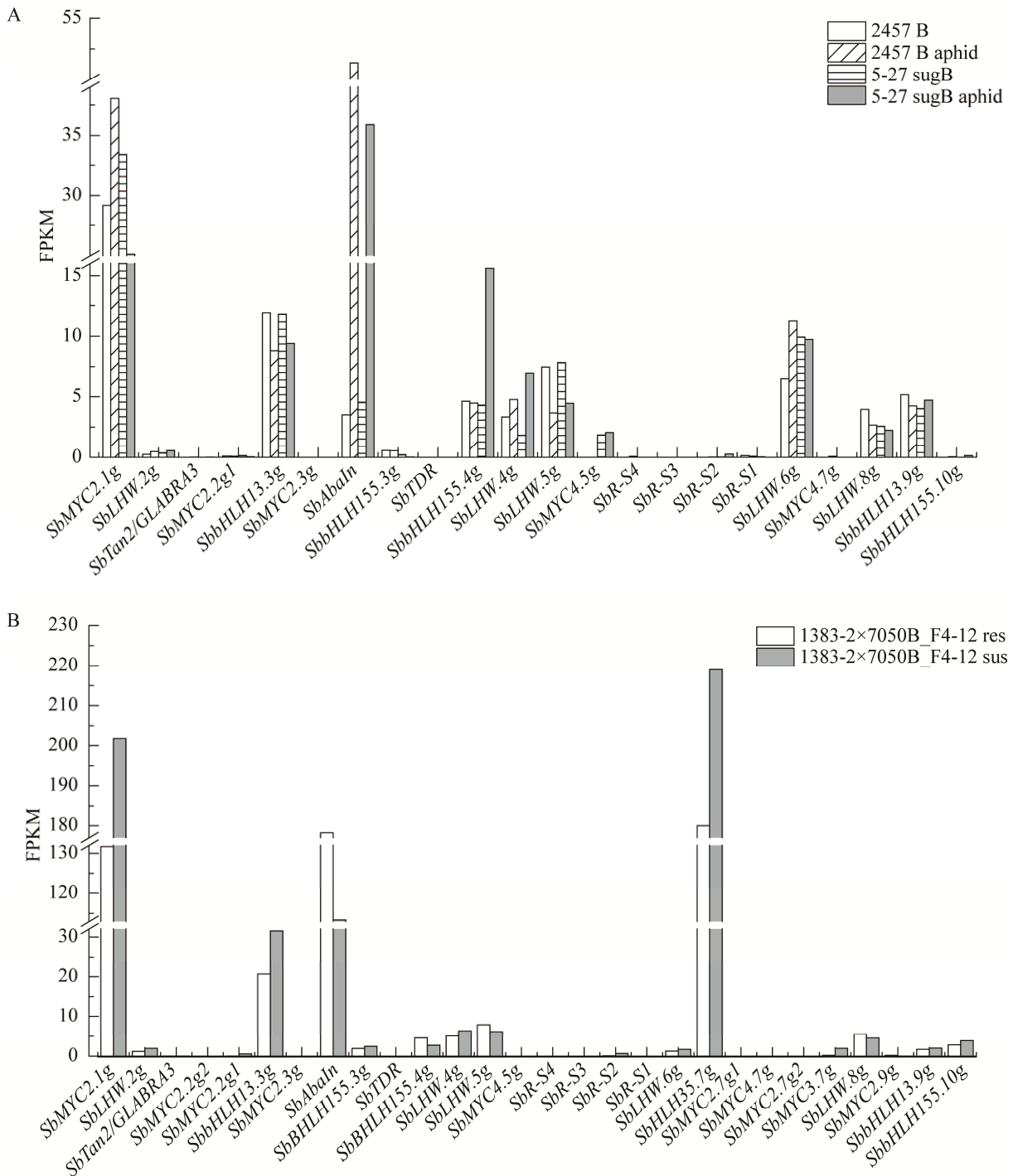


图9 高粱蚜和丝轴黑粉菌侵染对高粱组织中 *SbMYCs* 表达的影响 A: 高粱蚜侵染叶片. B: 丝轴黑粉菌侵染穗部

Figure 9 Effect of aphid and head smut infection on *SbMYCs* gene expression in sorghum tissues. A: Aphid infestation induced the expression of *SbMYCs* in sorghum leaves. B: Expression of *SbMYCs* in sorghum floral tissues infected by *Sporisorium reilianum*.

表 6 高粱品系 *SbMYCs* 的 DNA 变异检测Table 6 DNA variation of *SbMYCs* among sorghum lines

Gene	Reference	2457B	5-27A3R	R111	44B	Effect (other mutated line)
<i>SbTan2/GLABRA3</i>	SBI-02: 7 994 472 T	T	T	T	G	Non-syn
<i>SbTan2/GLABRA3</i>	SBI-02: 7 987 112 CCAA	CCAA	CCAA	CCAA	N	Codon deletion (V4A2)
<i>SbTan2/GLABRA3</i>	SBI-02: 7 994 628 G	G	G	G	GCCCTC	Frame shift
<i>SbMYC2.2g2</i>	SBI-02: 65 112 543 C to T	C	C	N	C	Non-syn (3030, C1-1)
<i>SbbHLH155.3g</i>	SBI-03: 72 859 488 ATT	AT	N	ATT	N	Upstream deletion
<i>SbAbaIn</i>	SBI-03: 60 870 863 G	G	R	A	N	Non-syn (1383-2)
<i>SbR-S2</i>	SBI-06: 53 992 608G	T	T	G	G	Non-syn
<i>SbR-S2</i>	SBI-06: 53 992 631C	G	G	C	C	Non-syn
<i>SbR-S2</i>	SBI-06: 53 991 888 G	GTCC	GTCC	G	G	Codon insertion
<i>SbMYC2.1g</i>	SBI-01: 49 162 013 T	TCTGGTG	TCTGGTG	TCTGGTG	TCTGGTG	Codon insertion
<i>SbTDR</i>	SBI-04: 1 389 907 A	A	N	A	T	Non-syn
<i>SbTDR</i>	SBI-04: 1 389 989 G	GGGCGCCGCC GCC	G	N	G	Codon insertion
<i>SbbHLH35.7g</i>	SBI-07: 5 264 926 C	T	T	T	C	Non-syn
<i>SbbHLH35.7g</i>	SBI-07: 5 264446 CTCG	C	C	C	CTCG	Codon deletion

编码；3个锌指-FLZ结构域蛋白(FCS-like zinc finger 1-related, FLS)由 *SORBI\_3006G194300*、*SORBI\_3006G194100* 和 *SORBI\_3004G278300* 编码，其中 *SORBI\_3006G194300* 与红细胞转录因子 GATA-1 亚基 A 相似；还有由 *SORBI\_3010G206400* 编码的转录因子 Ets1、晚胚发生富集蛋白(late embryogenesis abundant protein, LEA-2) 和 ROH1-like。说明 *SbAbaIn* 通过茉莉酸(jasmonic acid, JA)途径提高高粱抵抗蚜虫侵染。

受丝轴黑粉菌诱导的 *SbbHLH35.7g* 与如下蛋白互作：多药剂外泵蛋白(multidrug efflux transporter, MDR)由 *SORBI\_3006G179400* 编码；3个核转运蛋白 importin 由 *SORBI\_3007G022000*、*SORBI\_3008G135200* 和 *SORBI\_3009G102900* 编码；3个 aurora 激酶由 *SORBI\_3004G216200*、*SORBI\_3001G078600* 和 *SORBI\_3003G034600* 编码；3个多肽酶由 *SORBI\_3001G183000*、*SORBI\_3003G241100* 和 *SORBI\_3001G104900*

编码。推测 *SbbHLH35.7g* 通过毒素外运、降解等途径提高高粱防御能力。

### 3 讨论与结论

高粱是典型的杂粮作物，但易遭受蚜虫、丝黑穗病等生物胁迫，遭受胁迫后的植株长势变弱且生长缓慢，穗发育受阻，严重降低生物量和产量。已有研究表明，MYC 基因在植物抗性和次生代谢产物积累方面起重要作用，分析高粱 MYC 的功能对提高抗性、产量与品质有重大意义。

已有研究表明，MYC 转录因子调节植物抗性与生长发育的过程受 JA 信号调控，MYC2 也是脱落酸 ABA 信号转导的正调节因子，已被证明与 ABA 介导的发芽抑制相关<sup>[41]</sup>。大多高粱 MYC 基因家族启动子区富含 4 种顺式元件 ABRE、CGTCA-motif、G-Box 和 TGACG-motif。*SbMYC2.1g* 和 *SbAbaIn* 在 5 叶期高粱叶片中显

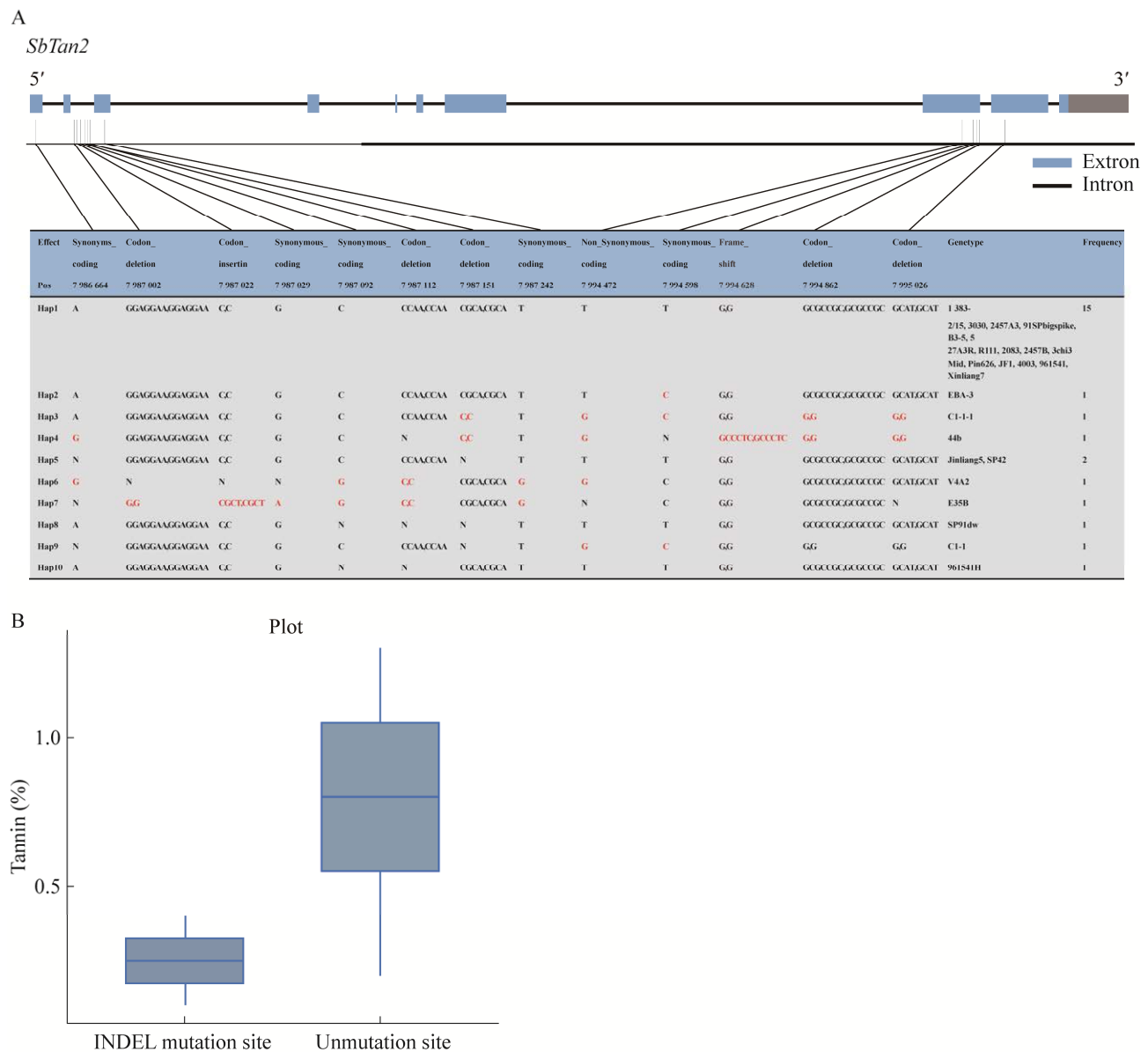


图 10 高粱 *SbTan2* 单倍型分析 A: 25 份高粱品系 *SbTan2* 基因单倍型. B: 单宁含量分布

Figure 10 Haplotype analysis of sorghum *SbTan2*. A: 25 haplotypes of *SbTan2* gene in sorghum materials. B: Distribution of tannin content.

著表达, 后者显著受高粱蚜诱导。*SbbHLH35.7g* 在穗组织表达水平最高, 受丝轴黑粉菌侵染后显著上调, 推测是 *MYC* 基因参与了 JA 信号转导, 茉莉酸通路的相应顺式元件可使其响应逆境胁迫, 从而调节生长发育。*SbMYCs* 启动子区包含茉莉酸甲酯、脱落酸、水杨酸、光和干旱诱导

相关等顺式作用元件等, 表明此基因家族成员能更快地响应光反应和逆境胁迫。

热图分析表明, *SbbHLH35.7g* 在生育期多数组织中表达水平比较高, 在叶片和茎中表达水平达到最高, 说明这个部位代谢活动强, 具有重要功能。*SbR-S2* 在 *SBI-06* 上存在 2 个突变位

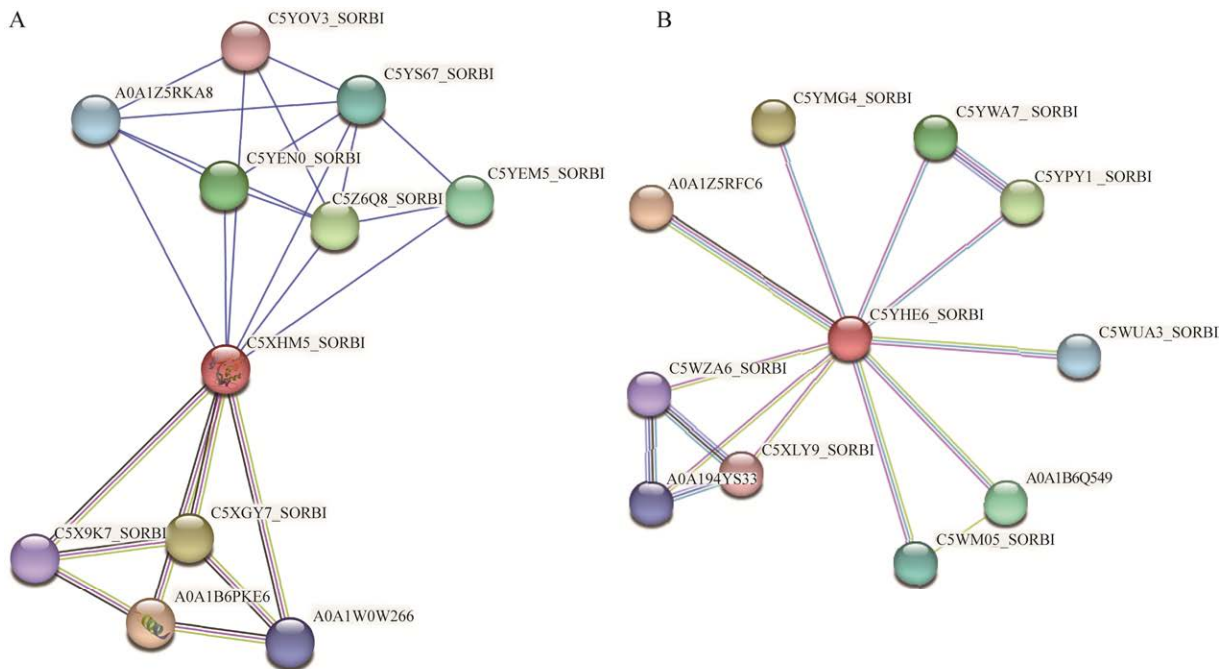


图 11 STRING 预测 *SbAbaIn* (A)和 *SbbHLH35.7g* (B)蛋白互作网络

Figure 11 STRING prediction of protein interaction network of *SbAbaIn* (A) and *SbbHLH35.7g* (B).

点, *SBI-06* 上有叶鞘色基因 *Rs* 和成株颜色 *Q*<sup>[18]</sup>, *SbR-S1* 和 *SbR-S3* (*Sobic.006G175700*、*Sobic.006G175200*) 是已鉴定的叶片花青素合成调控基因, 本研究通过转录组数据分析发现其有多达 25 个转录本, 编码 MYB 的 *Sobic.005G014100* 也影响花青素合成。Chopra 等<sup>[24]</sup>发现 *Sobic.006G025040* 属于 bHLH 转录因子, 与叶片的紫色色素沉着有关, 也在高粱抗冷性上发挥关键作用。MYC 参与受伤反应, 可提高抗旱、抗病虫能力<sup>[42]</sup>。

高粱籽粒发育过程中 *SbMYCS* 表达水平呈升高或降低 2 种模式。*SbABAI*n 在籽粒中表达最强, 随籽粒发育降低; 而 *SbbHLH13.3g*、*SbLHW.8g*、*SbbHLH155.3g* 和 *SbTan2* 的表达水平随籽粒发育表达增强; *SbTan2* 的表达水平因品种的单宁含量而异。Wu 等<sup>[22]</sup>发现 *SbTan2/Sobic.002G076600* 调控单宁合成, 指出 Tx430 的 *SbTan2* INDEL 变异导致转录提前终止。这在

本研究得到证实, 同时发现有些无、低单宁基因型存在非同义 SNP。Ayalew 等<sup>[43]</sup>鉴定到与籽粒蛋白含量关联的 *bHLH* 基因, 包括 *Sobic.001G416500*、*Sobic.001G349700* 和 *Sobic.001G350300*。Morris 等<sup>[44]</sup>鉴定到籽粒积累相关的多酚合成的控制位点, 包括黄酮代谢酶 F3'H 基因 *Sobic.004G200800*、*Sobic.004G200900* 和 *Sobic.004G201100*。Pinheiro 等<sup>[45]</sup>指出干旱可增加无单宁高粱的黄酮和 3-脱氧花青素, 提高了其籽粒功能特征。通过诱变育种, 已经获得富含 3-脱氧花青素的红叶突变体 *RG*, 但并未报道受突变的基因<sup>[46]</sup>。Mizuno 等<sup>[47]</sup>指出切割诱导植株褐色形成机制, 黄酮合成酶 II (*FNSII*) 的表达导致芹菜素 (apigenin) 合成, 表达 *FNSII* 和黄酮类 3'-羟化酶 (flavonoid 3'-hydroxylase, F3'H) 导致 apigenin 和木犀草素 (luteolin) 合成, 表达黄酮 4-还原酶和 F3'H 导致合成 3-脱氧花青素。这些为解析高粱籽粒和植株颜色提供了很好的范例。

表 7 高粱 *SbAbaIn* 和 *SbbHLH35.7g* 蛋白互作网络分析Table 7 STRING predicted functional partners for *SbAbaIn* and *SbbHLH35.7g*

5XH5M5, <i>SbAbaIn</i>			C5YHE6, <i>SbbHLH35.7g</i>		
Predicted functional partners	Annotation	Score	Predicted functional partners	Annotation	Score
A0A1B6PKE6 <i>SORBI_3006G056400</i>	Jasmonate ZIM domain-containing protein, <i>TIFY</i> domain-containing protein	0.530	A0A1Z5RFC6 <i>SORBI_3006G179400</i>	Multidrug efflux transporter (MDR), cholesterol transporter 1, <i>SSD</i> domain-containing protein	0.977
C5XGY7 <i>SORBI_3003G410300</i>	Jasmonate ZIM domain-containing protein, <i>TIFY</i> domain-containing protein	0.530	C5YMG4 <i>SORBI_3007G022000</i>	Importin N-terminal domain-containing protein	0.761
C5Z6Q8 <i>SORBI_3010G206400</i>	Transcription factor Ets-1, SAM domain-containing protein	0.512	C5YPY1 <i>SORBI_3008G135200</i>	Importin N-terminal domain-containing protein	0.761
C5YEN0 <i>SORBI_3006G194300</i>	Erythroid transcription factor GATA-1 subunit A, <i>Zf-FLZ-type</i> domain-containing protein	0.504	C5YWA7 <i>SORBI_3009G102900</i>	Importin N-terminal domain-containing protein	0.761
C5YEM5 <i>SORBI_3006G194100</i>	FCS-like zinc finger 1-related, <i>Zf-FLZ-type</i> domain-containing protein	0.494	A0A1B6Q549 <i>SORBI_3003G241100</i>	Endopeptidase S2P, peptidase_M50 domain-containing protein	0.705
C5YS67 <i>SORBI_3008G042900</i>	Late embryogenesis abundant protein LEA-2, <i>LEA_2</i> domain-containing protein	0.484	C5WM05 <i>SORBI_3001G104900</i>	Zinc metallopeptidase egypt3, chloroplastic-related, peptidase M50 domain-containing protein	0.705
A0A1Z5RKA8 <i>SORBI_3004G006500</i>	Transmembrane helix, ROH1-like, BPS1	0.483	C5WUA3 <i>SORBI_3001G183000</i>	Metalloendopeptidase, <i>PDZ</i> domain-containing protein	0.705
A0A1W0W266 <i>SORBI_3002G036150</i>	Jasmonate ZIM domain-containing protein, <i>TIFY</i> domain-containing protein	0.480	A0A194YS33 <i>SORBI_3004G216200</i>	Aurora kinase, protein kinase domain-containing protein	0.602
C5X9K7 <i>SORBI_3002G036100</i>	Jasmonate ZIM domain-containing protein, <i>TIFY</i> domain-containing protein	0.480	C5WZA6 <i>SORBI_3001G078600</i>	Aurora kinase, protein kinase domain-containing protein	0.602
C5Y0V3 <i>SORBI_3004G278300</i>	FCS-like zinc finger 1-related, <i>Zf-FLZ-type</i> domain-containing protein	0.476	C5XLY9 <i>SORBI_3003G034600</i>	Aurora kinase, protein kinase domain-containing protein	0.602

高粱生产主要依赖于雄性不育基础上的杂种优势,但对花粉发育、雄性不育形成的分子机制了解较少<sup>[48-49]</sup>。本研究鉴定到 *SbTDR* (*ZmMS40*) 与 *SbEAR* 等水稻、玉米花粉发育同源基因<sup>[50-51]</sup>,发现花粉中表达最强的是 *SbMYC2.1g*, 其次是

*SbAbaIn*、*SbbHLH13.3g* 和 *SbTDR*, 同时找到了这些基因的 SNP 或 INDEL 标记,有助于高粱育性研究。

本研究从高粱基因组鉴定到 28 个 *MYC* 基因,其表达存在时空差异。*SbMYCs* 受蚜虫和丝

黑穗诱导表达, 在抗、感蚜品系显著诱导的是 *SbAbaIn*、*SbLHW.4g* 和 *SbLHW.2g*。受丝轴黑粉菌侵染后 *SbbHLH35.7g*、*SbMYC2.1g* 和 *SbHLH13.3g* 显著表达, 且侵染后在花粉中表达水平较强的是 *SbMYC2.1g*、*SbAbaIn*、*SbbHLH13.3g* 和 *SbTDR* 等。*SbTan2*、*SbR-S4* 等的 SNP、Indel 变异, 为高粱性状形成的分子机制奠定了基础。

## 致谢

山西农业大学(山西省农业科学院)高粱研究所张福耀研究员和柳青山研究员分别提供了 SSA1 和 1383-2 原始种子, 特此致谢。

## REFERENCES

- [1] 李顺国, 刘猛, 刘斐, 邹剑秋, 陆晓春, 刁现民. 中国高粱产业和种业发展现状与未来展望[J]. 中国农业科学, 2021, 54(3): 471-482.  
LI SG, LIU M, LIU F, ZOU JQ, LU XC, DIAO XM. Current status and future prospective of sorghum production and seed industry in China[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2021, 54(3): 471-482 (in Chinese).
- [2] 谢鹏飞, 朱蕾, 冯玲, 吴进才, 刘景澜. 转录因子 MYC<sub>2</sub> 介导植物抗生物胁迫的研究进展[J]. 应用昆虫学报, 2020, 57(4): 781-787.  
XIE PF, ZHU L, FENG L, WU JC, LIU JL. Research progress in transcription factor MYC<sub>2</sub> mediating plant resistance to biological stress[J]. Chinese Journal of Applied Entomology, 2020, 57(4): 781-787 (in Chinese).
- [3] GAO CH, QI SH, LIU KG, LI D, JIN CY, LI ZW, HUANG GQ, HAI JB, ZHANG M, CHEN MX. MYC<sub>2</sub>, MYC<sub>3</sub>, and MYC<sub>4</sub> function redundantly in seed storage protein accumulation in *Arabidopsis*[J]. Plant Physiology and Biochemistry: PPB, 2016, 108: 63-70.
- [4] PIRES N, DOLAN L. Origin and diversification of basic-helix-loop-helix proteins in plants[J]. Molecular Biology and Evolution, 2010, 27(4): 862-874.
- [5] LEDENT V, VERVOORT M. The basic helix-loop-helix protein family: comparative genomics and phylogenetic analysis[J]. Genome Research, 2001, 11(5): 754-770.
- [6] STRYGINA KV, KHLESTKINA EK. Myc-like transcriptional factors in wheat: structural and functional organization of the subfamily I members[J]. BMC Plant Biology, 2019, 19(1): 59-69.
- [7] ZHANG M, JIN XF, CHEN Y, WEI M, LIAO WF, ZHAO SY, FU CH, YU LJ. TcMYC2a, a basic helix-loop-helix transcription factor, transduces JA-signals and regulates taxol biosynthesis in *Taxus chinensis*[J]. Frontiers in Plant Science, 2018, 9: 863.
- [8] LUDWIG SR, HABERA LF, DELLAPORTA SL, WESSLER SR. *Lc*, a member of the maize *R* gene family responsible for tissue-specific anthocyanin production, encodes a protein similar to transcriptional activators and contains the myc-homology region[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1989, 86(18): 7092-7096.
- [9] HICHRI I, HEPPEL SC, PILLET J, LÉON C, CZEMMEL S, DELROT S, LAUVERGEAT V, BOGS J. The basic helix-loop-helix transcription factor MYC1 is involved in the regulation of the flavonoid biosynthesis pathway in grapevine[J]. Molecular Plant, 2010, 3(3): 509-523.
- [10] SRIVASTAVA M, SRIVASTAVA AK, ROY D, MANSI MS, GOUGH C, BHAGAT PK, ZHANG CJ, SADANANDOM A. The conjugation of SUMO to the transcription factor MYC2 functions in blue light-mediated seedling development in *Arabidopsis*[J]. The Plant Cell, 2022, 34(8): 2892-2906.
- [11] YADAV V, MALLAPPA C, GANGAPPA SN, BHATIA S, CHATTOPADHYAY S. A basic helix-loop-helix transcription factor in *Arabidopsis*, MYC2, acts as a repressor of blue light-mediated photomorphogenic growth[J]. The Plant Cell, 2005, 17(7): 1953-1966.
- [12] VERMA D, JALMI SK, BHAGAT PK, VERMA N, SINHA AK. A bHLH transcription factor, MYC2, imparts salt intolerance by regulating proline biosynthesis in *Arabidopsis*[J]. The FEBS Journal, 2020, 287(12): 2560-2576.
- [13] ABE H, YAMAGUCHI-SHINOZAKI K, URAO T, IWASAKI T, HOSOKAWA D, SHINOZAKI K. Role of *Arabidopsis* MYC and MYB homologs in drought- and abscisic acid-regulated gene expression[J]. The Plant Cell, 1997, 9(10): 1859-1868.
- [14] CHINI A, MONTE I, ZAMARREÑO AM, HAMBERG M, LASSUEUR S, REYMOND P, WEISS S, STINTZI A, SCHALLER A, PORZEL A, GARCÍA-MINA JM, SOLANO R. An OPR3-independent pathway uses 4,5-didehydrojasmonate for jasmonate synthesis[J]. Nature Chemical Biology, 2018, 14(2): 171-178.

- [15] YU ZX, LI JX, YANG CQ, HU WL, WANG LJ, CHEN XY. The jasmonate-responsive AP2/ERF transcription factors AaERF<sub>1</sub> and AaERF<sub>2</sub> positively regulate artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L.[J]. *Molecular Plant*, 2012, 5(2): 353-365.
- [16] YANG YF, ZHANG KK, YANG LY, LV X, WU Y, LIU HW, LU Q, CHEN DF, QIU DY. Identification and characterization of MYC transcription factors in *Taxus* sp.[J]. *Gene*, 2018, 675: 1-8.
- [17] ZHONG JY, JIN ZH, JIANG L, ZHANG LX, HU ZT, ZHANG YH, LIU YB, MA JB, HUANG Y. Structural basis of the bHLH domains of MyoD-E47 heterodimer[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2022, 621: 88-93.
- [18] MACE ES, JORDAN DR. Location of major effect genes in sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench)[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2010, 121(7): 1339-1356.
- [19] 张春来, 李艳锋, 赵威军, 赵靓, 王晨, 梁笃, 周福平. 高粱品质性状改良的分子遗传学基础[J]. *植物生理学报*, 2015(5): 610-616.  
ZHANG CL, LI YF, ZHAO WJ, ZHAO L, WANG C, LIANG D, ZHOU FP. Molecular genetic basis for biotechnological improvement of grain quality characteristics in sorghum[J]. *China Industrial Economics*, 2015(5): 610-616 (in Chinese).
- [20] 冯周, 曹宁, 丁延庆, 徐建霞, 高旭, 程斌, 邹桂花, 张立昇. 利用超高密度 Bin 图谱定位高粱籽粒物理性状的 QTL[J]. *植物遗传资源学报*, 2022, 23(6): 1746-1755.  
FENG Z, CAO N, DING YQ, XU JX, GAO X, CHENG B, ZOU GH, ZHANG LY. Mapping QTL for sorghum physical properties using ultra-high-density Bin map[J]. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2022, 23(6): 1746-1755 (in Chinese).
- [21] XIE P, SHI JY, TANG SY, CHEN CX, KHAN A, ZHANG FX, XIONG Y, LI C, HE W, WANG GD, LEI FM, WU YR, XIE Q. Control of bird feeding behavior by tannin1 through modulating the biosynthesis of polyphenols and fatty acid-derived volatiles in sorghum[J]. *Molecular Plant*, 2019, 12(10): 1315-1324.
- [22] WUYI, GUO TT, MU Q, WANG JY, LI X, WU Y, TIAN B, WANG ML, BAI GH, PERUMAL R, TRICK HN, BEAN SR, DWEIKAT IM, TUINSTRAN MR, MORRIS G, TESSO TT, YU JM, LI XR. Allelochemicals targeted to balance competing selections in African agroecosystems[J]. *Nature Plants*, 2019, 5(12): 1229-1236.
- [23] LV Y, CHEN J, ZHU MJ, LIU YS, WU XY, XIAO X, YUYAMA N, LIU FX, JING HC, CAI HW. Wall-associated kinase-like gene *R1* contributes to red leaves in sorghum[J]. *The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology*, 2022, 112(1): 135-150.
- [24] CHOPRA R, BUROW G, BURKE JJ, GLADMAN N, XIN ZG. Genome-wide association analysis of seedling traits in diverse sorghum germplasm under thermal stress[J]. *BMC Plant Biology*, 2017, 17(1): 1-15.
- [25] ELANGO D, XUE WY, CHOPRA S. Genome wide association mapping of *epi*-cuticular wax genes in *Sorghum bicolor*[J]. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 2020, 26(8): 1727-1737.
- [26] FAN Y, YANG H, LAI DL, HE AL, XUE GX, FENG L, CHEN L, CHENG XB, RUAN JJ, YAN J, CHENG JP. Genome-wide identification and expression analysis of the bHLH transcription factor family and its response to abiotic stress in sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench)[J]. *BMC Genomics*, 2021, 22(1): 415.
- [27] SONG YS, LI SM, SUI Y, ZHENG HX, HAN GL, SUN X, YANG WJ, WANG HL, ZHUANG KY, KONG FY, MENG QW, SUI N. SbbHLH85, a bHLH member, modulates resilience to salt stress by regulating root hair growth in sorghum[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2022, 135(1): 201-216.
- [28] 刘国庆, 杜瑞恒, 侯升林, 吕芑, 籍贵苏, 李素英. 高粱抗蚜研究进展[J]. *植物学报*, 2012, 47(2): 171-187.  
LIU GQ, DU RH, HOU SL, LV F, JI GS, LI SY. Research progress on sorghum resistance to aphid[J]. *Chinese Journal of Botany*, 2012, 47(2): 171-187.
- [29] 邹剑秋, 李玥莹, 朱凯, 王艳秋. 高粱丝轴黑粉菌 3 号生理小种抗性遗传研究及抗病基因分子标记[J]. *中国农业科学*, 2010, 43(4): 713-720.  
ZOU JQ, LI YY, ZHU K, WANG YQ. Study on inheritance and molecular markers of sorghum resistance to head smut physiological race 3[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2010, 43(4): 713-720 (in Chinese).
- [30] WANG FM, ZHAO SM, HAN YH, SHAO YT, DONG ZY, GAO Y, ZHANG KP, LIU X, LI DW, CHANG JH, WANG DW. Efficient and fine mapping of *RMES1* conferring resistance to sorghum aphid *Melanaphis sacchari*[J]. *Molecular Breeding*, 2013, 31(4): 777-784.
- [31] MCCORMICK RF, TRUONG SK, SREEDASYAM A, JENKINS J, SHU SQ, SIMS D, KENNEDY M, AMIREBRAHIMI M, WEERS BD, MCKINLEY B, MATTISON A, MORISHIGE DT, GRIMWOOD J,

- SCHMUTZ J, MULLET JE. The *Sorghum bicolor* reference genome: improved assembly, gene annotations, a transcriptome atlas, and signatures of genome organization[J]. *The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology*, 2018, 93(2): 338-354.
- [32] 张晓. 高粱单宁调控基因 *Tannin2* 互作蛋白的鉴定及分子标记开发[D]. 泰安: 山东农业大学硕士学位论文, 2023.
- ZHANG X. Identification of protein interacting with *Tannin2* gene and development of related-molecular markers[D]. Taian: Master's thesis of Shandong Agricultural University, 2023 (in Chinese).
- [33] CHEN CJ, CHEN H, ZHANG Y, THOMAS HR, FRANK MH, HE YH, XIA R. TBtools: an integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data[J]. *Molecular Plant*, 2020, 13(8): 1194-1202.
- [34] CHENNA R, SUGAWARA H, KOIKE T, LOPEZ R, GIBSON TJ, HIGGINS DG, THOMPSON JD. Multiple sequence alignment with the clustal series of programs[J]. *Nucleic Acids Research*, 2003, 31(13): 3497-3500.
- [35] TAMURA K, PETERSON D, PETERSON N, STECHER G, NEI M, KUMAR S. MEGA 5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2011, 28(10): 2731-2739.
- [36] BAILEY TL, BODEN M, BUSKE FA, FRITH M, GRANT CE, CLEMENTI L, REN JY, LI WW, NOBLE WS. MEME SUITE: tools for motif discovery and searching[J]. *Nucleic Acids Research*, 2009, 37(web server issue): W202-W208.
- [37] ARTIMO P, JONNALAGEDDA M, ARNOLD K, BARATIN D, CSARDI G, de CASTRO E, DUVAUD S, FLEGEL V, FORTIER A, GASTEIGER E, GROSDIDIER A, HERNANDEZ C, IOANNIDIS V, KUZNETSOV D, LIECHTI R, MORETTI S, MOSTAGUIR K, REDASCHI N, ROSSIER G, XENARIOS I, et al. ExPASy: SIB bioinformatics resource portal[J]. *Nucleic Acids Research*, 2012, 40(web server issue): W597-W603.
- [38] GEOURJON C, DELÉAGE G. SOPMA: significant improvements in protein secondary structure prediction by consensus prediction from multiple alignments[J]. *Computer Applications in the Biosciences: CABIOS*, 1995, 11(6): 681-684.
- [39] 赵珊珊, 郭志强, 朱立勋, 范佳利, 杨博慧, 柴文婷, 孙慧琼, 冯凡, 梁月秀, 邹春雷, 姜晓东, 赵威军, 吕晋慧, 张春来. 高粱高亲和硝酸盐转运蛋白 NRT2/3 基因家族鉴定、表达与 DNA 变异分析[J]. *生物工程学报*, 2023, 39(7): 2743-2761.
- ZHAO SS, GUO ZQ, ZHU LX, FAN JL, YANG BH, CHAI WT, SUN HQ, FENG F, LIANG YX, ZOU CL, JIANG XD, ZHAO WJ, LÜ JH, ZHANG CL. Identification, expression and DNA variation analysis of high affinity nitrate transporter *NRT2/3* gene family in *Sorghum bicolor*[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2023, 39(7): 2743-2761 (in Chinese).
- [40] 范佳利, 朱立勋, 郭志强, 尹梦娇, 杨博慧, 柴文婷, 赵珊珊, 孙慧琼, 李莎莎, 丁鹏程, 王爱萍, 姜晓东, 贾举庆, 杨珍平, 吕晋慧, 高志强, 张春来. 普通小麦 JAZ 基因家族鉴定及其响应冻害时基因差异表达和 DNA 变异分析[J]. *植物生理学报*, 2022, 58(10): 1873-1889.
- FAN JL, ZHU LX, GUO ZQ, YIN MJ, YANG BH, CHAI WT, ZHAO SS, SUN HQ, LI SS, DING PC, WANG AP, JIANG XD, JIA JQ, YANG ZP, LÜ JH, GAO ZQ, ZHANG CL. Identification of JAZ gene family and analysis on their differential expression under freezing stress and DNA variation in common wheat[J]. *Plant Physiology Journal*, 2022, 58(10): 1873-1889 (in Chinese).
- [41] ALEMAN F, YAZAKI J, LEE M, TAKAHASHI Y, KIM AY, LIZX, KINOSHITA T, ECKER JR, SCHROEDER JI. An ABA-increased interaction of the PYL6 ABA receptor with MYC2 transcription factor: a putative link of ABA and JA signaling[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 28941.
- [42] TREUTTER D. Significance of flavonoids in plant resistance and enhancement of their biosynthesis[J]. *Plant Biology*, 2005, 7(6): 581-591.
- [43] AYALEW H, PEIRIS S, CHILUWAL A, KUMAR R, TIWARI M, OSTMEYER T, BEAN S, JAGADISH SVK. Stable sorghum grain quality QTL were identified using SC35×RTx430 mapping population[J]. *The Plant Genome*, 2022, 15(3): e20227.
- [44] MORRIS GP, RHODES DH, BRENTON Z, RAMU P, THAYIL VM, DESHPANDE S, ACHARYA C, MITCHELL SE, BUCKLER ES, YU JM, KRESOVICH S. Dissecting genome-wide association signals for loss-of-function phenotypes in sorghum flavonoid pigmentation traits[J]. *G3 (Bethesda, Md)*, 2013, 3(11): 2085-2094.
- [45] PINHEIRO SS, de MORAIS CL, ANUNCIACÃO PC, de MENEZES CB, VIEIRA QVA, MARTINO HSD,



- DELLA LCM, PINHEIRO SAHM. Water stress increased the flavonoid content in tannin-free sorghum grains[J]. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2021, 100: 103892.
- [46] PETTI C, KUSHWAHA R, TATENO M, ELIZABETH HARMAN-WARE A, CROCKER M, AWIKA J, DeBOLT S. Mutagenesis breeding for increased 3-deoxyanthocyanidin accumulation in leaves of *Sorghum bicolor* (L.) Moench: a source of natural food pigment[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2014, 62(6): 1227-1232.
- [47] MIZUNO H, YAZAWA T, KASUGA S, SAWADA Y, KANAMORI H, OGO Y, HIRAIMY, MATSUMOTO T, KAWAHIGASHI H. Expression of *Flavone synthase II* and *Flavonoid 3'-hydroxylase* is associated with color variation in Tan-colored injured leaves of sorghum[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7: 1718.
- [48] DHAKA N, SHARMA S, VASHISHT I, KANDPAL M, SHARMA MK, SHARMA R. Small RNA profiling from meiotic and post-meiotic anthers reveals prospective miRNA-target modules for engineering male fertility in sorghum[J]. *Genomics*, 2020, 112(2): 1598-1610.
- [49] KANTE M, RATTUNDE HFW, NÉBIÉ B, WELTZIEN E, HAUSSMANN BIG, LEISER WL. QTL mapping and validation of fertility restoration in west African sorghum A<sub>1</sub> cytoplasm and identification of a potential causative mutation for *Rf<sub>2</sub>*[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2018, 131(11): 2397-2412.
- [50] KIYOSAWA A, YONEMARUJI, MIZUNO H, KANAMORI H, WU JZ, KAWAHIGASHI H, GOTO K. Fine mapping of *Rf5* region for a sorghum fertility restorer gene and microsynteny analysis across grass species[J]. *Breeding Science*, 2022, 72(2): 141-149.
- [51] KO SS, LI MJ, KU MSB, HO YC, LIN YJ, CHUANG MH, HSING HX, LIEN YC, YANG HT, CHANG HC, CHAN MT. The bHLH142 transcription factor coordinates with TDR1 to modulate the expression of *EAT1* and regulate pollen development in rice[J]. *The Plant Cell*, 2014, 26(6): 2486-2504.

(本文责编 陈宏宇)