

DOI: 10.3724/SP.J.1006.2026.53046

植物胆碱单加氧酶基因家族的进化与表达分析

王 婷** 段武丽** 王 蕊 刘海岚*

四川农业大学玉米研究所, 四川成都 611130

摘 要: 植物甘氨酸甜菜碱(glycine betaine, GB)普遍存在于植物、动物、细菌、藻类中, 可在细胞质中累积达到一定水平以后调节渗透压, 维持细胞的水分平衡, 对于植物的渗透胁迫具有重要的作用。胆碱单加氧酶(choline monooxygenase, CMO)是植物 GB 生物合成途径的限速酶。本研究对 168 个基因组进行分析, 其中 131 个基因组中含 CMO 同源基因, 鉴定得到 169 个 CMO 成员。通过基因对选择压分析, 结果表明该基因主要受纯化选择, 只有 7 个基因对受到正向选择。另外, CMO 基因家族被划分为 6 个亚家族, 除 F 亚家族外, 5 个亚家族中均检测到正选择位点。Ring hydroxyl A 结构域和 Rieske 结构域的选择压分析结果表明, 2 个结构域的 dN/dS 值呈极显著正相关, 发生了协同进化。通过 qRT-PCR 分析显示玉米 CMO 基因在 MgSO₄ 胁迫下表达整体表现为上调。本研究结果从多方面探讨了 CMO 基因的进化与表达情况, 以期后续深入利用该基因进行作物抗逆育种提供了理论依据。

关键词: 植物甘氨酸甜菜碱; 胆碱单加氧酶基因; 选择压; 纯化选择; 玉米

Evolution and expression analysis of the choline monooxygenase gene family in plants

Wang Ting**, Duan Wu-Li**, Wang Rui, and Liu Hai-Lan*

Maize Research Institute, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, Sichuan, China

Abstract: Glycine betaine (GB) is a compatible solute widely found in plants, animals, bacteria, and algae, where it plays a key role in regulating osmotic pressure and maintaining cellular water balance upon accumulation in the cytoplasm. As such, GB is crucial for plant responses to osmotic stress. Choline monooxygenase (CMO) is a rate-limiting enzyme in the biosynthetic pathway of GB in plants. Among 168 genomes analyzed in this study, 131 were found to contain homologous CMO genes, with a total of 169 CMO members identified. Selective pressure analysis revealed that most gene pairs have undergone purifying selection, while only seven gene pairs exhibited signs of positive selection. Phylogenetic analysis classified the CMO gene family into six subfamilies, with positive selection sites detected in five subfamilies except subfamily F. Further analysis of the Rieske domain and Ring-hydroxyl A domain showed a significant positive correlation between their dN/dS values, suggesting co-evolution. qRT-PCR analysis demonstrated that the expression of CMO genes in maize was upregulated under MgSO₄-induced stress. This study provides a comprehensive analysis of the evolution and expression of the CMO gene family, offering a theoretical foundation for the future application of CMO genes in improving crop tolerance to abiotic stress.

Keywords: plant glycine betaine; choline monooxygenase gene; selection pressure; purifying selection; maize

植物甜菜碱包括 12 种, 其中植物甘氨酸甜菜碱(glycine betaine, GB)是甜菜碱中最早被发现的^[1], 也是研究最广泛的一类^[2]。植物 GB 是一种双极性化合物, 易溶于水但不与水反应^[3], 在高浓度时, 不干

扰细胞功能, 能保护大分子结构免受不良环境的影响^[4]。它属于植物体内无毒副作用的渗透调节物质之一, 外源甜菜碱很容易被植物吸收, 且长时间存在植物体内而不易降解, 在植物的抗逆性中起着至

本研究由国家自然科学基金项目(32271984)资助。

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (32271984).

* 通信作者(Corresponding author): 刘海岚, E-mail: liu.hailan@foxmail.com

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

第一作者联系方式: 王婷, E-mail: wangt117117@163.com; 段武丽, E-mail: 1986048369@qq.com

Received (收稿日期): 2025-07-06; Accepted (接受日期): 2025-09-10; Published online (网络出版日期): 2025-09-24.

URL: <https://link.cnki.net/urlid/11.1809.S.20250924.1131.004>

This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

关重要的作用^[5]。在高等植物中, 甜菜碱合成的第 1 步由依赖铁氧还蛋白的胆碱单加氧酶(choline monooxygenase, CMO)将胆碱催化生成甜菜碱醛, 第 2 步由依赖 NAD⁺的甜菜碱醛脱氢酶催化甜菜碱醛生成植物 GB^[6-9]。研究表明大多数甜菜碱是在叶绿体基质中, 比如菠菜、大麦等, 少数在细胞质中, 比如滨海碱蓬。植物抵御胁迫的能力与叶绿体中的 GB 含量呈正相关, 与细胞质中的 GB 没有相关性。位于胞浆中的胆碱通过转运蛋白被运送到叶绿体参与 GB 的合成, 胆碱的含量与转运蛋白的活性均直接影响叶绿体内 GB 的合成^[10-11]。

CMO 是植物 GB 生物合成途径的限速酶^[12], 主要含有 Rieske 和 Ring hydroxyl A 两个保守结构域^[13], 将 CMO 基因导入其他植物之后, 能提高植物的抵抗能力。盐胁迫、干旱、低温或 ABA 均可诱导 CMO 基因表达, 盐胁迫下基因表达上调更为显著^[14]。目前已从菠菜(*Spinacia oleracea* L)、甜菜(*Beta vulgaris*)、茶树(*Camellia sinensis*)、北美海蓬子(*Salicornia bigelovii* Torr)、山菠菜(*Atriplex hortensis*)、杜梨(*Pyrus betulifolia*)中克隆了 CMO 基因^[12, 14-17]。对于 CMO 基因功能已经有了大量的研究, 但其分子进化机制仍不清楚, 本研究利用 168 个植物基因组进行 CMO 基因的同源基因鉴定和进化分析, 旨在为作物抗逆遗传改良提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 基因组数据下载、同源基因的鉴定和保守结构域的分析

从 Ensembl plant、NCBI、MaizeGDB、Gigadb、Spinachbase、Snapdragon Genome Database、Solanaceae Genomics、Buckwheat Genome Database、Eggplant Genome Database、Popgenie、PlantTFDB Database Commons 数据库中下载了 168 个基因组数据(附表 1)。

利用玉米 B73 的 CMO 基因作为目的基因进行本地 BLAST^[18]比对, 步骤如下: 在 168 个基因组中先进行本地 BLASTN ($E \leq 1e-9$)比对, 接下来使用 BLASTP ($E \leq 1e-9$)比对获得候选的同源基因。然后从 Pfam (<http://pfam.xfam.org>)数据库下载 CMO 基因的 Rieske 和 Ring hydroxyl A 保守结构域信息文件 PF00355.29 和 PF00848.22。再通过 HMMER^[19]利用这 2 个文件对上面获得的 CMO 同源基因进行鉴定, 只有同时具有上述 2 个功能域的基因才被认为是 CMO 的同源基因。

1.2 系统发育分析

使用 MEGAG-X^[20] (<https://www.megasoftware.net>)内置的 MUSCLE 对 CMO 基因的同源基因进行基于密码子序列的比对, 采用 Maximum Likelihood Tree 方法构建物种系统发育树, Bootstrap 抽样值为 1000, 替换类型(substitutions type)选择 Nucleotide。

1.3 蛋白质理化性质和保守基序的分析

使用在线软件 ExPasy (<https://web.expasy.org/protparam>)中的 ProtParam tool 查看蛋白序列的氨基酸数(number of amino acid)、分子量(molecular weight)、理论等电点(theoretical pI)、不稳定性指数(instability index)、脂族指数(aliphatic index)、亲水性总平均值(grand average of hydropathicity)。使用在线程序 MEME5.5.0 (<http://meme.nbcr.net/meme/intro.html>)查看氨基酸的保守域, 设置保守基序数目为 10。

1.4 选择压分析

使用 PAML (phylogenetic analysis by maximum likelihood)^[21]软件的 codeml 方法中 Runmode = -2 来计算基因对间的选择压。使用 PAML 软件中的 Site 模型(M0、M1、M2、M3、M7、M8)计算 dN/dS 并确定正选择位点(经验贝叶斯法), 并对 M0/M3、M1/M2、M7/M8 三对似然比值进行似然比检验(likelihood ratio test, LRT)。分枝模型(branch-model)中的自由比率模型(free-ratio model)对系统发育树的每一个分枝的选择压进行分析。

1.5 玉米 CMO 基因在不同组织中的表达分析

川单 99 是目前西南地区年推广面积和市场影响力最大的玉米品种, 具有抗逆、高产、耐瘠和广适等特点^[22]。本研究以该品种为材料, 将饱满且均匀的种子用 75%乙醇消毒 15 min, 然后蒸馏水清洗 4~6 次, 蒸馏水浸泡 4 h, 在发芽纸中发芽, 并在相对湿度为 50%±10%的 25℃/20℃的生长室中生长。生根 2 d 后, 转移至霍格兰德营养液中培养, 每 3 d 换一次营养液, 生长温度为 25℃, 光周期为 14 h 光照/10 h 黑暗。生长至 2 叶 1 心时, 选取长势良好且一致的幼苗, 用 100 mmol L⁻¹ MgSO₄ 溶液进行胁迫处理, 处理时间为 6 h、12 h 和 24 h, 设置 3 个重复, 取各个处理时间段的根和叶, 用液氮进行研磨, 放置在-80℃的冰箱保存备用。采用 Trizol 法提取各玉米样品总 RNA。采用 HiScript III RT SuperMix for qPCR (南京诺维赞生物科技股份有限公司)逆转录酶合成第 1 链 cDNA, 用于之后的 qRT-PCR 分析。其中 qRT-PCR 反应体系与程序参考 ChamQ Uni

表 1 玉米 CMO 基因家族引物

Table 1 Primers for the maize CMO gene family

基因名称 Gene name	正向引物 Forward primer (5'-3')	反向引物 Reverse primer (5'-3')
<i>Zm00001eb273050_T002</i>	AAGGCTACAAGAATATCAGGAAT	CTTCAGTGGACTCATCATCAA

versal SYBR qPCR masier Mix (Vazyme, Q221)试剂盒说明书, 使用 BIO-RADCFX96 仪器, 用 10 μ L 体系进行 qRT-PCR 反应, 引物见表 1, 每个样品设置 3 个技术重复, 使用公式 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 对获取到的 CT 值进行相对表达量计算, 使用 Origin 软件绘制表达模式图。

2 结果与分析

2.1 植物 CMO 基因家族鉴定及理化性质的分析

利用 BLAST 和 HMMER 对 168 个基因组进行分析, 其中 131 个植物基因组中含 CMO 同源基因, 总共鉴定得到 169 个 CMO 的同源基因。结菱草 (*Zoysia japonica*)、椰子 (*Cocos nuciferacds*) 和细叶满江红 (*Azolla filiculoides*) 等 37 个基因组中无 CMO 同源基因, 菠萝 (*Ananas comosus*)、大麦 (*Hordeum vulgare*) 等 104 个基因组含有 1 个基因, 罗汉果 (*Siraitia grosvenorii*)、甜菜 (*Beta vulgaris*)、菠菜 (*Spinacia oleracea*) 等 18 个基因组含有 2 个基因, 野稗 (*Echinochloa crusgalli*)、小麦 (*Triticum aestivum*)、斯卑尔脱小麦 (*Triticum spelta*) 等 7 个基因组含有 3 个基因, 甜根子草 (*Saccharum spontaneum*)、藜麦 (*Chenopodium quinoa*) 2 个基因组含有 4 个基因(附表 2)。包含 CMO 基因的植物的门分类涉及被子植物、苔藓植物和蕨类植物 3 个门, 纲分类涉及双子叶植物纲、单子叶植物纲、木兰纲、蕨纲、石松纲、藓纲 6 个纲, 科分类有豆科、禾本科、十字花科等 52 个科。

蛋白质理化性质分析表明, CMO 的同源蛋白的氨基酸数最少为 236 个, 最多为 1464 个, 平均值为 421 个。分子量的最小值为 26,405.74 D, 最大值为 164,552.67 D, 平均值为 47,326.86 D。理论 pI 最小值为 4.91, 最大值为 8.88, 平均值为 6.13。不稳定性指数最小值为 27.79, 最大值为 52.70 平均值为 37.92。脂肪族氨基酸指数的最小值为 69.84, 最大值为 88.57, 平均值为 79.17。亲水性总平均值最小为 -0.549, 最大为 -0.086, 平均为 -0.240 (附表 3)。

2.2 植物 CMO 基因家族系统发育关系及保守基序分析

为了探究 CMO 基因家族的进化关系, 将鉴定

出来的同源基因构建系统发育树, 以江南卷柏 (*Selaginella moellendorffii*) 和小立碗藓 (*Physcomitrium patens*) 作为外类群, CMO 基因家族被分为 6 个亚家族, 其中 A 亚家族有 44 个基因, B 亚家族有 22 个基因, C 亚家族有 25 个基因, D 亚家族有 51 个基因, E 亚家族有 13 个基因, F 亚家族有 11 个基因(图 1)。使用 MEME 分析蛋白质的保守基序, 有 118 个基因的保守基序从碳端到氮端依次为 motif 7、motif 3、motif 5、motif 9、motif 6、motif 2、motif 8、motif 1、motif 4、motif 10, 占比达到 69.82%; 剩余的 51 个基因中, 有 10 个基因也含有这 10 个 motif, 但排列的顺序不一样, 有 17 个基因的 motif 数量为 9 个, 有 11 个基因的 motif 数量为 8 个, 有 6 个基因的 motif 数量为 7 个, 有 7 个基因的 motif 数量为 6 个(图 1)。以上结果表明, 大部分植物 CMO 基因含有的 motif 数量和排列顺序均高度相似, 说明在进化过程中高度保守。

2.3 CMO 基因亚家族选择压的位点模型分析

基于 CMO 基因结构和保守基序的分析结果表明, 不同亚家族及亚家族内成员间存在差异。为探究其进化动力, 采用 PAML 的 codeml 方法对各亚家族进行选择压力分析, 计算各亚家族的 dN/dS 值(表 2)。

CMO 基因亚家族中, 亚家族 A、B、C、D、E 和 F 的 M0 和 M3 之间似然比检验(LRT)显示差异极显著 ($P < 0.001$), 表明这些亚家族有位点受到了不同的选择压。在亚家族 A 中, M1 和 M2 的似然值检验不显著 ($P = 1.000$), M7 和 M8 的似然值检验值极显著 ($P < 0.001$), 约有 10.80% 的位点受到正选择, ω 的值为 1.185, 正选择位点有 3 个。亚家族 B 中, M1 和 M2 的似然值检验值极显著 ($P < 0.001$), 有 4.00% 的位点受到正选择, ω_2 的值为 4.004, 正选择位点有 6 个; M7 和 M8 的似然值检验值极显著 ($P < 0.001$), 约有 7.40% 的位点受到正选择, ω 的值为 2.312, 正选择位点有 8 个。亚家族 C 中, M1 和 M2 的似然值检验值极显著 ($P < 0.001$), 有 5.80% 的位点受到正选择, ω_2 的值为 2.390, 正选择位点有 4 个; M7 和 M8 的似然值检验值极显著 ($P < 0.001$), 约有 11.10% 的位点受到正选择, ω 的值为 1.610, 正选择

位点有 20 个。亚家族 D 中, M1 和 M2 的似然值检验值极显著($P < 0.001$), 有 5.10% 的位点受到正选

择, ω_2 的值为 3.345, 正选择位点有 1 个; M7 和 M8 的似然值检验值极显著($P < 0.001$), 约有 7.00% 的

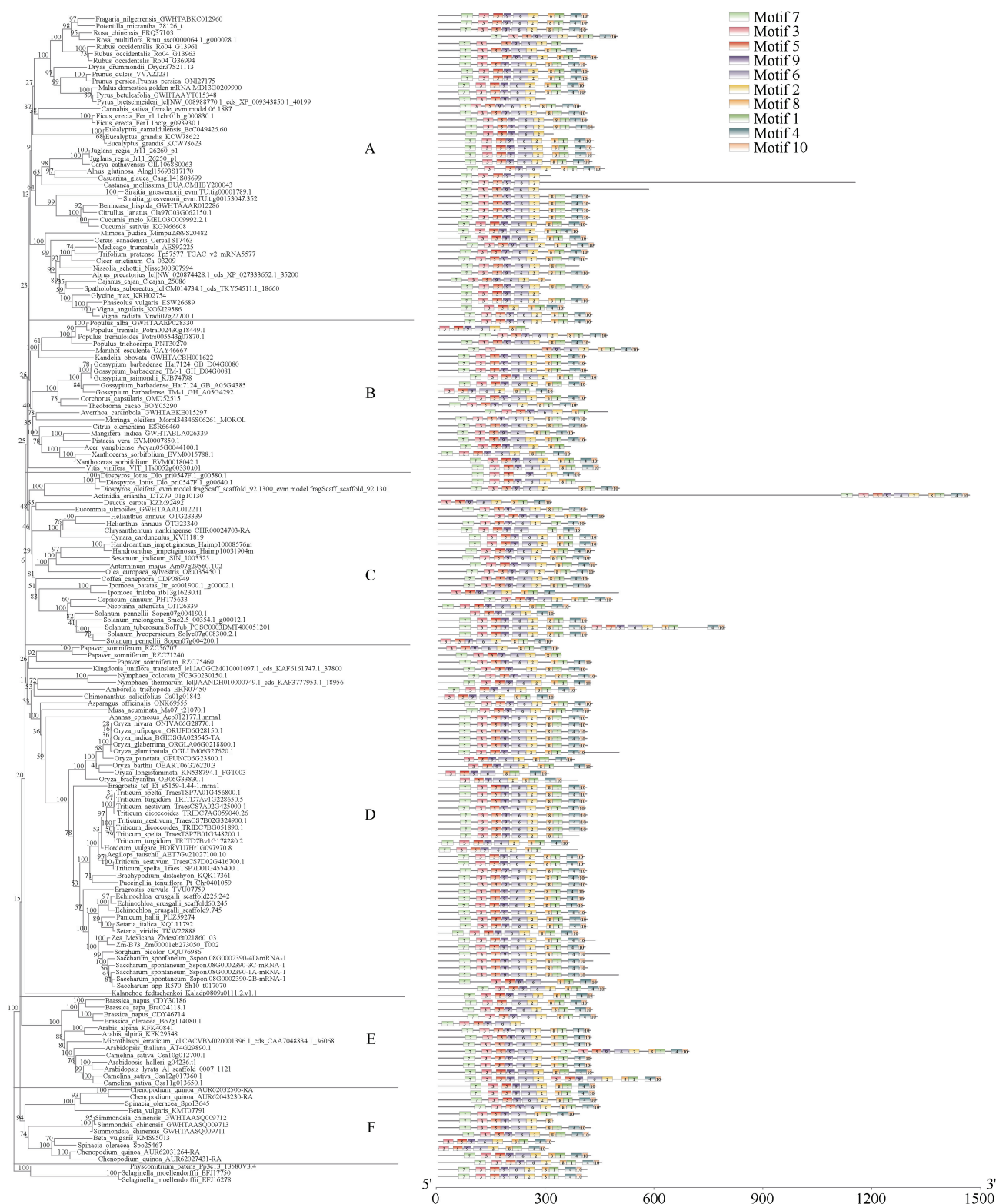


图 1 CMO 基因家族系统进化树和保守基序

Fig. 1 Phylogenetic tree and conserved motifs of the CMO gene family

该基因家族被分为 6 个亚家族: A、B、C、D、E 和 F。

This gene family was classified into six subfamilies: A, B, C, D, E, and F.

表 2 位点模型下 CMO 基因家族 dN/dS 估计和似然比检验

Table 2 Estimation of dN/dS values and likelihood ratio test of the CMO gene family under site models

亚家族 Subfamily	模型 Model	dN/dS (ω)	参数估计 Estimates of parameters	正选择位点个数 Number of positively selected sites	似然值检验 P 值 P -value of Likelihood ratio test
A	M0	0.261	$\omega = 0.261$	None	$2\Delta\ln l$ (M0 vs M3) =
	M3	0.314	$p_0 = 0.259, \omega_0 = 0.015; p_1 = 0.516, \omega_1 = 0.213; p_2 = 0.226, \omega_2 = 0.890$	—	1320.096, $P < 0.001$
	M1	0.361	$p_0 = 0.744, \omega_0 = 0.142; p_1 = 0.256, \omega_1 = 1.000$	Not allowed	$2\Delta\ln l$ (M1 vs M2) =
	M2	0.361	$p_0 = 0.744, \omega_0 = 0.142; p_1 = 0.069, \omega_1 = 1.000; p_2 = 0.187, \omega_2 = 1.000$	—	0.000, $P = 1.000$
	M7	0.306	$p = 0.478, q = 1.081$	Not allowed	$2\Delta\ln l$ (M7 vs M8) =
	M8	0.320	$p_0 = 0.892 (p_1 = 0.108), p = 0.680; q = 2.434, \omega = 1.185$	3	40.802, $P < 0.001$
	M0	0.228	$\omega = 0.228$	None	$2\Delta\ln l$ (M0 vs M3) =
	M3	0.349	$p_0 = 0.509, \omega_0 = 0.044; p_1 = 0.378, \omega_1 = 0.354; p_2 = 0.113, \omega_2 = 1.704$	—	835.826, $P < 0.001$
B	M1	0.323	$p_0 = 0.760, \omega_0 = 0.109; p_1 = 0.240, \omega_1 = 1.000$	Not allowed	$2\Delta\ln l$ (M1 vs M2) =
	M2	0.459	$p_0 = 0.749, \omega_0 = 0.116; p_1 = 0.211, \omega_1 = 1.000; p_2 = 0.040, \omega_2 = 4.004$	6	43.476, $P < 0.001$
	M7	0.279	$p = 0.371, q = 0.953$	Not allowed	$2\Delta\ln l$ (M7 vs M8) =
	M8	0.369	$p_0 = 0.926 (p_1 = 0.074), p = 0.519; q = 1.883, \omega = 2.312$	8	78.597, $P < 0.001$
	M0	0.244	$\omega = 0.244$	None	$2\Delta\ln l$ (M0 vs M3) =
	M3	0.352	$p_0 = 0.481, \omega_0 = 0.054; p_1 = 0.377, \omega_1 = 0.346, p_2 = 0.142, \omega_2 = 1.381$	—	1432.434, $P < 0.001$
	M1	0.361	$p_0 = 0.735, \omega_0 = 0.131; p_1 = 0.265, \omega_1 = 1.000$	Not allowed	$2\Delta\ln l$ (M1 vs M2) =
	M2	0.460	$p_0 = 0.720, \omega_0 = 0.138; p_1 = 0.222, \omega_1 = 1.000; p_2 = 0.058, \omega_2 = 2.390$	4	34.748, $P < 0.001$
C	M7	0.304	$p = 0.436, q = 0.992$	Not allowed	$2\Delta\ln l$ (M7 vs M8) =
	M8	0.364	$p_0 = 0.889 (p_1 = 0.111), p = 0.658; q = 2.455, \omega = 1.610$	20	93.993, $P < 0.001$
	M0	0.260	$\omega = 0.260$	None	$2\Delta\ln l$ (M0 vs M3) =
	M3	0.377	$p_0 = 0.469, \omega_0 = 0.042; p_1 = 0.381, \omega_1 = 0.344; p_2 = 0.150, \omega_2 = 1.510$	—	1697.515, $P < 0.001$
	M1	0.371	$p_0 = 0.706, \omega_0 = 0.108$	Not allowed	$2\Delta\ln l$ (M1 vs M2) =
	M2	0.508	$p_0 = 0.691, \omega_0 = 0.113; p_1 = 0.258, \omega_1 = 1.000; p_2 = 0.051, \omega_2 = 3.345$	1	106.877, $P < 0.001$
	M7	0.317	$p = 0.368, q = 0.790$	Not allowed	$2\Delta\ln l$ (M7 vs M8) =
	M8	0.403	$p_0 = 0.930 (p_1 = 0.070), p = 0.469; q = 1.379, \omega = 2.402$	1	135.394, $P < 0.001$
D	M0	0.313	$\omega = 0.313$	None	$2\Delta\ln l$ (M0 vs M3) =
	M3	0.377	$p_0 = 0.553, \omega_0 = 0.026; p_1 = 0.340, \omega_1 = 0.486; p_2 = 0.107, \omega_2 = 1.839$	—	237.886, $P < 0.001$
	M1	0.336	$p_0 = 0.711, \omega_0 = 0.067; p_1 = 0.289, \omega_1 = 1.000$	Not allowed	$2\Delta\ln l$ (M1 vs M2) =
	M2	0.395	$p_0 = 0.711, \omega_0 = 0.072; p_1 = 0.258, \omega_1 = 1.000; p_2 = 0.032, \omega_2 = 2.699$	—	7.991, $P = 0.018$
	M7	0.316	$p = 0.162, q = 0.351$	Not allowed	$2\Delta\ln l$ (M7 vs M8) =
	M8	0.377	$p_0 = 0.921 (p_1 = 0.079), p = 0.268; q = 0.857, \omega = 2.007$	2	16.603, $P < 0.001$
	M0	0.187	$\omega = 0.187$	None	$2\Delta\ln l$ (M0 vs M3) =
	M3	0.224	$p_0 = 0.220, \omega_0 = 0; p_1 = 0.621, \omega_1 = 0.170; p_2 = 0.168, \omega_2 = 0.703$	—	158.336, $P < 0.001$
E	M1	0.276	$p_0 = 0.828, \omega_0 = 0.126; p_1 = 0.172, \omega_1 = 1.000$	Not allowed	$2\Delta\ln l$ (M1 vs M2) =
	M2	0.276	$p_0 = 0.828, \omega_0 = 0.126; p_1 = 0.043, \omega_1 = 1.000; p_2 = 0.130, \omega_2 = 1.000$	—	0.000, $P = 1.000$
	M7	0.217	$p = 0.690, q = 2.456$	Not allowed	$2\Delta\ln l$ (M7 vs M8) =
	M8	0.225	$p_0 = 0.950 (p_1 = 0.050), p = 0.838, q = 3.627, \omega = 1.000$	—	1.821, $P = 0.402$

M0: 单一比率; M1: 近中性选择; M2: 正选择; M3: 离散分布; M7: beta 分布; M8: beta 分布+正选择。

M0: one-ratio; M1: neutral; M2: selection; M3: discrete; M7: beta; M8: beta & ω .

位点受到正选择, ω 的值为 2.402, 正选择位点有 1 个。亚家族 E 中, M1 和 M2 的似然值检验值显著($P = 0.018$); M7 和 M8 的似然值检验值极显著($P < 0.001$), 约有 7.90% 的位点受到正选择, ω 的值为 2.007, 正选择位点有 2 个。在亚家族 F 中 M1 和 M2 的似然值检验值不显著($P = 1.000$); M7 和 M8 的似然值检验值不显著($P = 0.402$)。

2.4 CMO 基因对间选择压分析

为了检测 CMO 基因对之间的选择压情况, 将

169 个基因两两组合, 计算出 14,196 对 dN/dS 值, 有 4482 对基因的 dN/dS 值不超过 0.100, 9703 对基因的 dN/dS 值为 0.100~1.000, 99.92% 的基因对 dN/dS 值小于 1.000 (图 2)。有 7 个基因对的 dN/dS 值大于 1.000, 涉及的基因组有黑树莓(*Rubus occidentalis*)、甜根子草(*Saccharum spontaneum*)、尼瓦拉野生稻(*Oryza nivara*)、非洲栽培稻(*Oryza glaberrima*)、普通野生稻(*Oryza rufipogon*)、籼稻(*Oryza sativa indica*)、展颖野生稻(*Oryza glumipatula*) (表 3)。

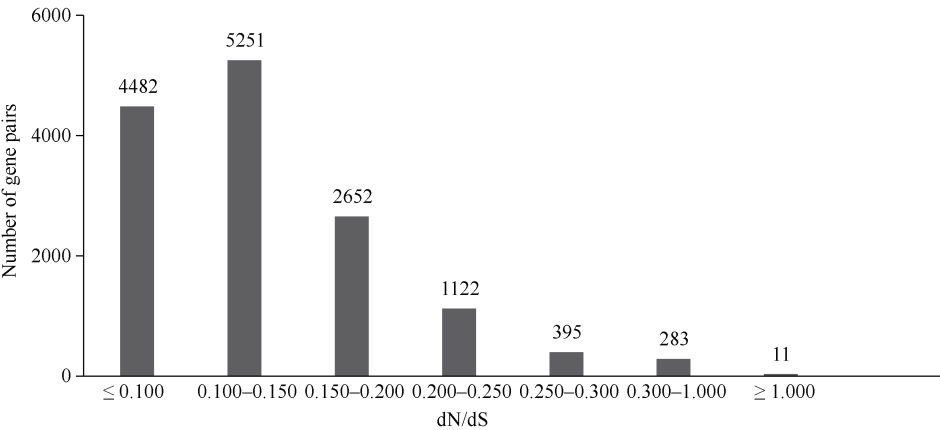


图 2 CMO 基因对间的 dN/dS 值的分布
Fig. 2 Distribution of dN/dS values between CMO gene pairs

表 3 受到正向选择的 7 个 CMO 基因对
Table 3 Seven CMO gene pairs under positive selection

序列 1 Sequence 1	序列 2 Sequence 2	dN/dS 值 dN/dS value
<i>Brassica napus</i> __CDY30186	<i>Brassica rapa</i> __Bra024118.1	1.113
<i>Oryza glaberrima</i> __ORGLA06G0218800.1	<i>Oryza glumipatula</i> __OGLUM06G27620.1	1.868
<i>Oryza glaberrima</i> __ORGLA06G0218800.1	<i>Oryza sativa indica</i> __BGIOGA023545-TA	1.866
<i>Oryza glaberrima</i> __ORGLA06G0218800.1	<i>Oryza nivara</i> __ONIVA06G28770.1	1.602
<i>Oryza glaberrima</i> __ORGLA06G0218800.1	<i>Oryza rufipogon</i> __ORUFI06G28150.1	2.140
<i>Rubus occidentalis</i> __Ro04 G13961	<i>Rubus occidentalis</i> __Ro04 G36994	1.175
<i>Saccharum spontaneum</i> __Sspon.08G0002390-4DmRNA-1	<i>Saccharum spontaneum</i> __Sspon.08G0002390-2BmRNA-1	1.002

表中的物种拉丁文名字与物种的基因名字用__分隔开, 前者为拉丁文名字, 后者为基因名字。
In the table, species names in Latin are combined with gene names using a double underscore __; the former represents the Latin name, and the latter the gene name.

进一步对 CMO 亚家族内的基因对进行选择压计算, 其中 A、B、C、D、E 和 F 亚家族的整体平均 dN/dS 值分别为 0.207、0.174、0.174、0.199、0.294 和 0.187。A、B、C 和 F 亚家族 dN/dS 值在 0.150~0.200 区间的数量最多, 分别占 40.70%、41.13%、39.33% 和 40.00%, D 亚家族 dN/dS 值在 0.200~0.250 区间的

数量最多, 占 28.71%, E 亚家族 dN/dS 值在 0.250~0.300 区间的数量最多, 占 53.85% (图 3)。这表明 D 和 E 亚家族相对于 A、B、C 和 F 亚家族发生了选择压放松, 可能更容易发生适应性进化。
综上所述, CMO 同源基因对主要受到强烈的纯化选择, 只有少数的基因对受到正向选择。

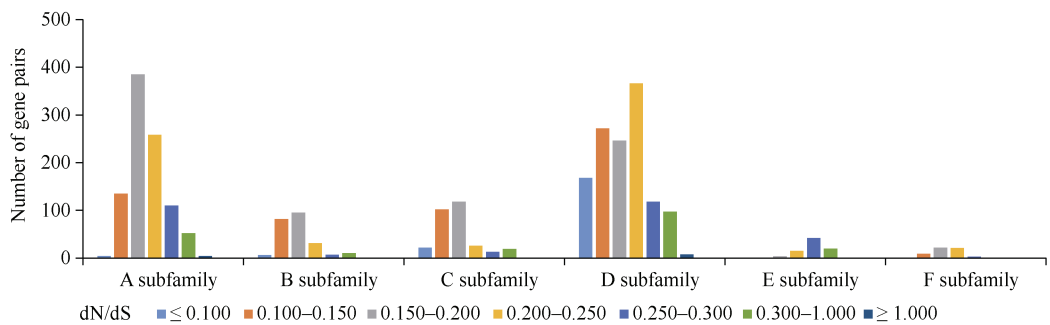


图 3 CMO 基因亚家族中基因对 dN/dS 值分布
Fig. 3 Distribution of dN/dS values among gene pairs within CMO gene subfamilies

2.5 能积累和不能积累 GB 物种中 CMO 基因的 Rieske 和 Ring hydroxyl A 结构域的基因对选择压分析

查阅文献后, 在 168 个基因组中, 已报道能积累 GB 的 16 个物种分别是甜菜(*Beta vulgaris*)、藜麦(*Chenopodium quinoa*)、西瓜(*Citrullus lanatus*)等(表 4)。已报道不能积累 GB 的 6 个物种分别是拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、烟草(*Nicotiana abacum*)、粳稻(*Oryza sativa Japonica*)、毛果杨(*Populus trichocarpa*)、番茄(*Solanum lycopersicum*)和马铃薯(*Solanum tuberosum*) (表 5)。

在 16 个能积累 GB 的物种中, 共有 31 个基因, 计算生成 461 对基因间的 dN/dS 值均小于 1 (剔除了 4 对异常值), Ring hydroxyl A 结构域的基因对间 dN/dS 值与 Rieske 结构域的基因对 dN/dS 值呈极显著正相关($r = 0.338, P = 0.0001, N = 461$), 同时大部分情况下 Ring hydroxyl A 结构域的 dN/dS 值比 Rieske 小(图 4)。

对不能积累 GB 的 6 个物种进行分析发现, 在粳稻(*Oryza sativa Japonica*)中做序列比对鉴定得到了 *Os06t0698785-01* 基因, 但是该基因不含有 CMO 基因的 Rieske 和 Ring hydroxyl A 保守结构域, 为了验

表 4 能积累 GB 的物种
Table 4 Species capable of accumulating GB

物种 Species	文献 Reference	物种 Species	文献 Reference
甜菜 <i>Beta vulgaris</i>	[10]	黄瓜 <i>Cucumis sativus</i>	[25]
大麦 <i>Hordeum vulgare</i>	[10]	粉叶黄毛草莓 <i>Fragaria nilgerrensis</i>	[26]
高粱 <i>Sorghum bicolor</i>	[10]	大豆 <i>Glycine max</i>	[27]
菠菜 <i>Spinacia oleracea</i>	[10]	向日葵 <i>Helianthus annuus</i>	[28]
小麦 <i>Triticum aestivum</i>	[10]	番薯 <i>Ipomoea batatas</i>	[29]
玉米 <i>Zea mays</i>	[10]	甘蔗 <i>Saccharum officinarum</i>	[30]
藜麦 <i>Chenopodium quinoa</i>	[23]	绿豆 <i>Vigna radiata</i>	[31]
西瓜 <i>Citrullus lanatus</i>	[24]	葡萄 <i>Vitis vinifera</i>	[32]

表 5 不能积累 GB 物种
Table 5 Species incapable of accumulating GB

物种 Species	文献 Reference	物种 Species	文献 Reference
番茄 <i>Solanum lycopersicum</i>	[10]	烟草 <i>Nicotiana tabacum</i>	[10]
马铃薯 <i>Solanum tuberosum</i>	[10]	粳稻 <i>Oryza sativa Japonica</i>	[10,33]
拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	[10]	毛果杨 <i>Populus trichocarpa</i>	[34]

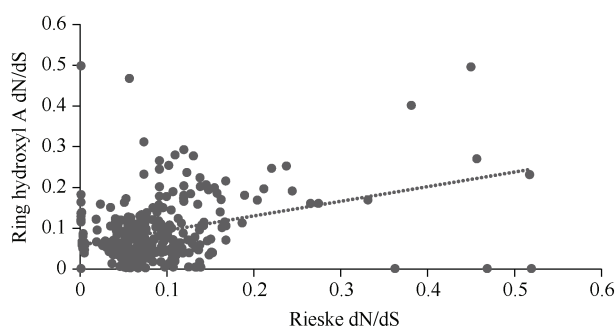


图 4 能积累 GB 物种的 *CMO* 基因 2 个结构域 dN/dS 值的相关性
Fig. 4 Correlation between dN/dS values of the two domains of *CMO* genes in GB-accumulating species

证在稻属中 *CMO* 基因存在与否, 本研究进一步对其他水稻基因组进行了分析, 发现短叶舌野生稻、短花药野生稻、非洲栽培稻、展颖野生稻、籼稻、长花药野生稻、尼瓦拉野生稻、斑点野生稻和普通野生稻均含有 1 个 *CMO* 基因(附表 2), 这表明可能在人工驯化选择过程中该基因在粳稻中发生了丢失。因此后续只对剩余的拟南芥、烟草、毛果杨、番茄和马铃薯这 5 个不能积累 GB 的物种进行了分析, 共找到 11 个 *CMO* 基因, 生成了 55 个基因对, 这些基因对的 2 个功能域的 dN/dS 值均小于 1, Ring hydroxyl A 结构域的基因对间 dN/dS 值与 Rieske 结构域的基因对间 dN/dS 值呈极显著正相关($r = 0.626$, $P = 0.0001$, $N = 55$), 同时大部分情况下 Ring hydroxyl A 结构域的 dN/dS 值比 Rieske 小(图 5)。另外, 结果也表明虽然在这 5 个物种中不能积累 GB, 但 *CMO* 基因可能参与其他代谢途径的调控或具有其他功能。

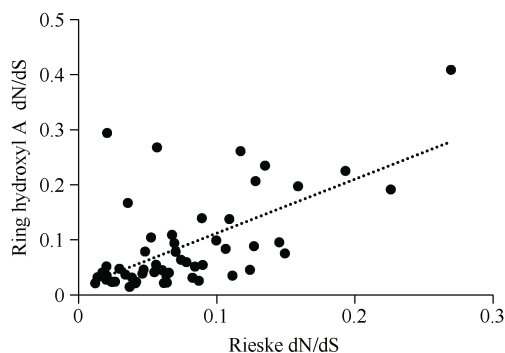


图 5 不能积累 GB 物种的 *CMO* 基因 2 个结构域 dN/dS 值的相关性
Fig. 5 Correlation of dN/dS values between the two domains of *CMO* genes in non-GB-accumulating species

2.6 能积累和不能积累 GB 物种中 *CMO* 基因的选择压的分枝模型分析

将能积累 GB 的 16 个物种构建系统发育树, 小

立碗藓(*Physcomitrium patens*)作为外类群, 计算出每一个分枝的 dN/dS 值。dN/dS 值大于 1 的基因有 9 个, 包括圆锥小麦(*Triticum turgidum*)的 *TRITD7BV1G178280.2* 和 *TRITD7AV1G228650.5*, 小麦(*Triticum aestivum*)的 *TraesCS7B02G324900.1*、*TraesCS7A02G425000.1* 和 *TraesCS7D02G416700.1*, 斯卑尔脱小麦(*Triticum spelta*)的 *TraesTSP7B01G348200.1*、*TraesTSP7A01G456800.1* 和 *TraesTSP7D01G455400.1*, 大豆(*Glycine max*)的 *KRH02754* (图 6)。

将不能积累 GB 的另外 5 个物种构建系统发育树, 小立碗藓(*Physcomitrium patens*)作为外类群, 计算出每一个分枝的 dN/dS 值。dN/dS 值大于 1 的基因有 2 个, 分别是番茄(*Solanum lycopersicum*)的 *Solyc07g008300.2.1* 和 *Sopen07g004190.1* (图 7)。

2.7 $MgSO_4$ 胁迫下玉米 *CMO* 基因的表达分析

为验证玉米(*Zea mays*)的 *CMO* 基因对 $MgSO_4$ 胁迫处理的响应, 选取川单 99 作为试验材料, 结果显示, 基因 *Zm00001eb273050* 在 $MgSO_4$ 胁迫后 6 h、12 h 和 24 h 条件下在叶和根中极显著上调表达(图 8)。

3 讨论

据统计全球约 43% 的耕地处于干旱和半干旱状态, 约 20% 的耕地处于盐碱状态。干旱、盐胁迫等严重威胁着作物的生长发育, 造成作物产量减少 40% 以上。植物为了能在逆境中生存和保证后代的繁育, 经过世代交替已经进化出了一系列的生物合成途径来应对各种非生物胁迫。GB 是一种高效的渗透保护剂, 具有渗透保护、提高耐冷性、保护细胞分子结构免受物理化学因素影响等作用。通过对植物实施外源施加 GB 和通过转基因工程引入 GB 合成途径等操作, 可以显著提高非生物胁迫条件下植物内源 GB 的含量, 从而提高其非生物胁迫抗性。在高等植物中, GB 的合成是由酶促反应来完成, 其中 *CMO* 是植物 GB 生物合成途径的限速酶, 该基因不仅参与植物体内 GB 的生物合成途径, 还在植物应对非生物胁迫的应激响应中发挥关键作用^[35]。大量研究表明, 在多种非生物胁迫条件下, *CMO* 基因的表达上调能够显著增强植物的抗逆性^[12,36]。本研究基于 168 个基因组数据进行鉴定, 有 131 个基因组中含 *CMO* 同源基因, 鉴定得到 169 个 *CMO* 同源基因, 其中有 79.39% 的基因组均含有 1 个 *CMO* 基因, 剩余 20.61% 的基因组含有 2、3 或

4 个 *CMO* 基因。不同的物种鉴定得到的基因数量不一样, 推测可能是不同物种在进化过程中, 产生了不同程度的基因重复, 发生了适应性进化^[37-38]。进一步通过对 14,169 个 *CMO* 基因对的选择压进行分析, 发现 99.92% 基因对的 dN/dS 值均小于 1, 只有 7 个基因对的 dN/dS 值大于 1, 这表明该基因家族在进化过程中主要受到纯化选择, 因而比较保守。

GB 积累量在不同的植物中差异很大, 能大量积累 GB 的植物有菠菜(*Spinacia oleracea*)、玉米(*Zea*

mays)、藜麦(*Chenopodium*)、甜菜(*Beta vulgaris* L.)、大麦(*Hordeum vulgare* L.)。其中一些植物不能积累 GB, 比如梗稻(*Oryza sativa Japonica*)、马铃薯(*Solanum tuberosum*)、番茄(*Solanum lycopersicum*)、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、烟草(*Nicotiana tabacum*)^[10]。这种差异主要源于不同植物物种在 GB 合成途径及转运机制上的遗传变异。部分低积累型植物虽然内源 GB 合成能力有限, 但通过外源施加 GB 或基因工程手段引入 GB 合成途径, 仍可显著提高其抗性^[39-40]。将 *CMO* 基因导入其他植物之后,

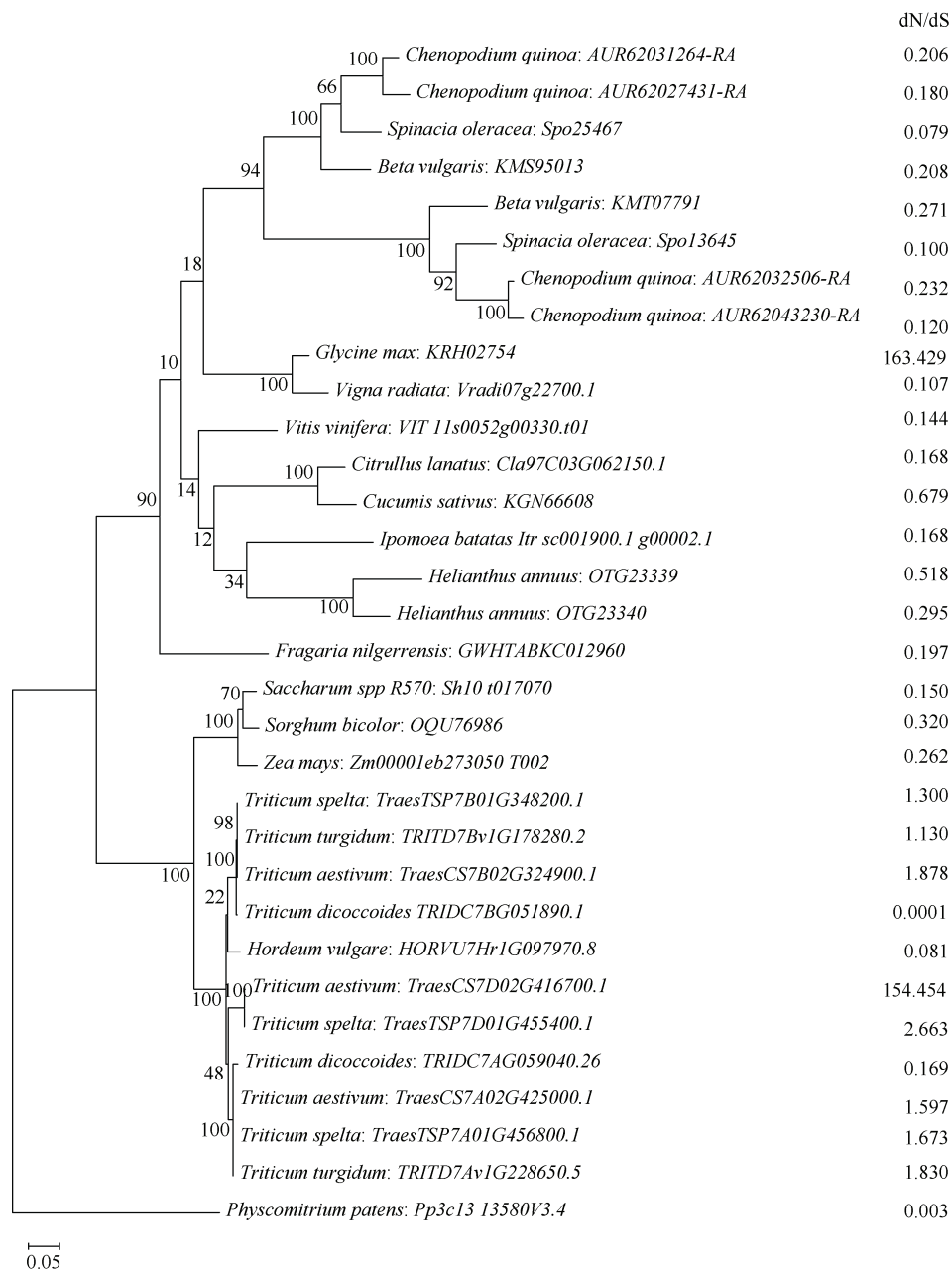
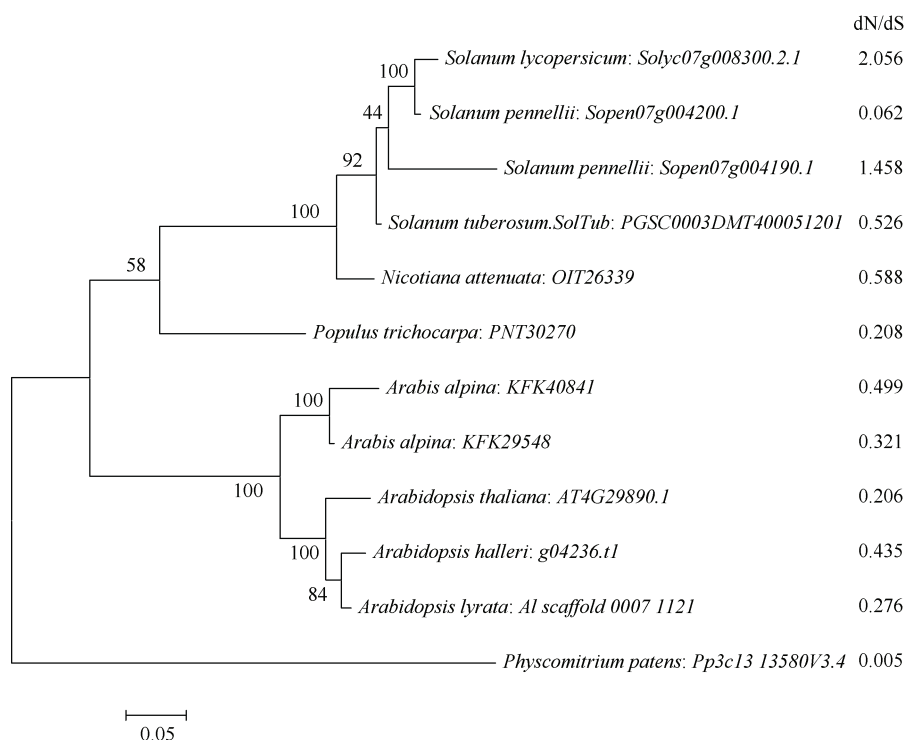
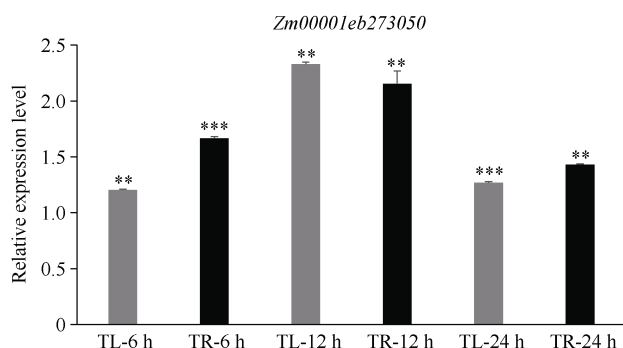


图 6 能积累 GB 物种 *CMO* 基因系统发育关系中每一分枝的 dN/dS 值

Fig. 6 Branch-specific dN/dS values in the phylogenetic tree of *CMO* genes in GB-accumulating species

图 7 不能积累 GB 物种 *CMO* 基因系统发育关系中每一分枝的 dN/dS 值Fig. 7 Branch-specific dN/dS values in the phylogenetic tree of *CMO* genes in non-GB-accumulating species图 8 $MgSO_4$ 胁迫下玉米 *CMO* 基因的相对表达量Fig. 8 Relative expression levels of maize *CMO* genes in leaves and roots under $MgSO_4$ treatment at 6, 12, and 24 hours

TR: $MgSO_4$ 处理下的根部; TL: $MgSO_4$ 处理下的叶片。**, *** 分别表示在 0.01 和 0.001 水平差异显著。

TR: roots under $MgSO_4$ treatment conditions; TL: leaves under $MgSO_4$ treatment conditions. **, *** mean significant difference at the 0.01 and 0.001 level, respectively.

能提高植物对盐胁迫的抵抗能力, Nucci 等^[41]将山菠菜 (*Atriplex hortensis*) 的 *CMO* 基因转入烟草 (*Nicotiana tabacum* L.) 后, 其 GB 含量大大提高。根据 GB 积累能力的不同, 将物种分组后构建系统发育树, 进行分枝模型分析, 能积累 GB 组检测到受到正向选择的基因涉及的物种是圆锥小麦 (*Triticum turgidum*)、小麦 (*Triticum aestivum*)、斯卑尔脱小麦 (*Triticum spelta*) 和大豆 (*Glycine max*), 不能积累 GB

组检测到受到正向选择是番茄 (*Solanum lycopersicum*), 这表明这些基因发生了适应性进化, 另外也可以看出多倍体基因组更容易发生适应性进化。另外, *CMO* 基因的 2 个结构域的选择压分析结果表明, 两者的 dN/dS 值均小于 1, 受到纯化选择, 2 个结构域的 dN/dS 值呈极显著正相关, 说明两者是协同进化, Ring hydroxyl A 结构域的 dN/dS 值较 Rieske 的更小, 受到更强的选择压, 在进化过程中更为保守。

4 结论

本研究通过对 168 个基因组进行分析, 发现有 131 个植物基因组含有 *CMO* 同源基因, 总共鉴定到 169 个成员。这些基因被进一步划分为 6 个亚家族。通过基因对选择压分析发现, 该基因主要受到纯化选择, 只有 7 个基因对受到正向选择。另外, 对 *CMO* 基因的 Rieske 和 Ring hydroxyl A 结构域进行分析发现, 这 2 个功能域受到纯化选择, 且两者是协同进化。在 $MgSO_4$ 胁迫条件下, 玉米 *CMO* 基因整体为上调表达, 这可能会增加 GB 含量, 提高玉米的抗逆性。上述研究结果为深入解析物种内 *CMO* 基因的遗传多样性及其分子机制提供了初步的理论依据。

附表 请见网络版: 1) 本刊网站 <http://zwxb.>

chinacrops.org/; 2) 中国知网 <http://www.cnki.net/>;
3) 万方数据 <http://c.wanfangdata.com.cn/Periodical-zuowxb.aspx>.

References

- [1] Weretilnyk E A, Bednarek S, McCue K F, et al. Comparative biochemical and immunological studies of the *Glycine* betaine synthesis pathway in diverse families of dicotyledons. *Planta*, 1989, 178: 342–352.
- [2] Rhodes D, Hanson A D. Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1993, 44: 357–384.
- [3] Sakamoto A, Murata N. The role of *Glycine* betaine in the protection of plants from stress: clues from transgenic plants. *Plant Cell Environ*, 2002, 25: 163–171.
- [4] Brown A D, Simpson J R. Water relations of sugar-tolerant yeasts: the role of intracellular polyols. *J Gen Microbiol*, 1972, 72: 589–591.
- [5] 侯晓敏, 闫锋, 董扬, 等. 外源甜菜碱对干旱胁迫下谷子萌发及幼苗生理特性的影响. *作物杂志*, 2025(2): 228–233.
Hou X M, Yan F, Dong Y, et al. Effects of exogenous betaine on germination and seedling physiological characteristics of foxtail millet under drought stress. *Crops*, 2025(2): 228–233 (in Chinese with English abstract).
- [6] Yuwansiri R, Park E J, Jeknić Z, et al. Enhancing cold tolerance in plants by genetic engineering of glycinebetaine synthesis. In: Li P H, Palva E T, eds. *Plant Cold Hardiness*. Boston, MA: Springer US, 2002. pp 259–275.
- [7] Chen W P, Li P H, Chen T H H. Glycinebetaine increases chilling tolerance and reduces chilling-induced lipid peroxidation in *Zea mays* L. *Plant Cell Environ*, 2000, 23: 609–618.
- [8] Park E J, Jeknić Z, Chen T H H. Exogenous application of glycinebetaine increases chilling tolerance in tomato plants. *Plant Cell Physiol*, 2006, 47: 706–714.
- [9] Nomura M, Muramoto Y, Yasuda S, et al. The accumulation of glycinebetaine during cold acclimation in early and late cultivars of barley. *Euphytica*, 1995, 83: 247–250.
- [10] Zulfqar F, Ashraf M, Siddique K H M. Role of *Glycine* betaine in the thermotolerance of plants. *Agronomy*, 2022, 12: 276.
- [11] Rath H, Sappa P K, Hoffmann T, et al. Impact of high salinity and the compatible solute *Glycine* betaine on gene expression of *Bacillus subtilis*. *Environ Microbiol*, 2020, 22: 3266–3286.
- [12] Russell B L, Rathinasabapathi B, Hanson A D. Osmotic stress induces expression of choline monooxygenase in sugar beet and amaranth. *Plant Physiol*, 1998, 116: 859–865.
- [13] Rathinasabapathi B, Burnet M, Russell B L, et al. Choline monooxygenase, an unusual iron-sulfur enzyme catalyzing the first step of *Glycine* betaine synthesis in plants: prosthetic group characterization and cDNA cloning. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94: 3454–3458.
- [14] 朱天艺, 龚一富, 刘增美, 等. 北美海蓬子胆碱单加氧酶基因 *CMO* 的克隆及表达研究. *宁波大学学报(理工版)*, 2016, 29(4): 7–12.
Zhu T Y, Gong Y F, Liu Z M, et al. Cloning and expression analysis of choline monooxygenase gene (*CMO*) in *Salicornia bigelovii* Torr. *J Ningbo Univ (Nat Sci Eng Edn)*, 2016, 29(4): 7–12 (in Chinese with English abstract).
- [15] 曹红利, 岳川, 郝心愿, 等. 茶树胆碱单加氧酶 *CsCMO* 的克隆及甜菜碱合成关键基因的表达分析. *中国农业科学*, 2013, 46: 3087–3096.
Cao H L, Yue C, Hao X Y, et al. Cloning of choline monooxygenase gene (*CMO*) and expression analysis of the key *Glycine* betaine biosynthesis-related genes in tea plant (*Camellia sinensis*). *Sci Agric Sin*, 2013, 46: 3087–3096 (in Chinese with English abstract).
- [16] 张慧军, 董合忠, 石跃进, 等. 山菠菜胆碱单加氧酶基因对棉花的遗传转化和耐盐性表达. *作物学报*, 2007, 33: 1073–1078.
Zhang H J, Dong H Z, Shi Y J, et al. Transformation of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) with *AhCMO* gene and the expression of salinity tolerance. *Acta Agron Sin*, 2007, 33: 1073–1078 (in Chinese with English abstract).
- [17] 李慧, 丛郁, 常有宏, 等. 杜梨胆碱单加氧酶基因克隆及胁迫表达. *西北植物学报*, 2012, 32: 1093–1098.
Li H, Cong Y, Chang Y H, et al. Cloning and expression analysis of a choline monooxygenase gene in *Pyrus betulaeifolia bunge* under abiotic stress. *Acta Bot Boreali-Occident Sin*, 2012, 32: 1093–1098 (in Chinese with English abstract).
- [18] Altschul S F, Madden T L, Schäffer A A, et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*, 1997, 25: 3389–3402.
- [19] Eddy S R. Profile hidden Markov models. *Bioinformatics*, 1998, 14: 755–763.
- [20] Kumar S, Stecher G, Li M, et al. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol Biol Evol*, 2018, 35: 1547–1549.
- [21] Yang Z H. PAML 4: phylogenetic analysis by maximum likelihood. *Mol Biol Evol*, 2007, 24: 1586–1591.
- [22] 兰海, 向勇, 李芦江, 等. 玉米新品种川单 99 的选育与推广. *玉米科学*, 2023, 31(2): 25–29.
Lan H, Xiang Y, Li L J, et al. Breeding and promotion of maize new variety Chuandan 99. *J Maize Sci*, 2023, 31(2): 25–29 (in Chinese with English abstract).
- [23] Jiang Y R, Zhu S J, Yuan J J, et al. A betaine aldehyde dehydrogenase gene in quinoa (*Chenopodium quinoa*): structure, phylogeny, and expression pattern. *Genes Genom*, 2016, 38: 1013–1020.
- [24] Xu Z J, Sun M L, Jiang X F, et al. Glycinebetaine biosynthesis in response to osmotic stress depends on jasmonate signaling in watermelon suspension cells. *Front Plant Sci*, 2018, 9: 1469.
- [25] Moosavi-Nejhad M, Estaji A, Karimi H R, et al. *Glycine* betaine induced changes on morphological traits and osmolyte compounds in cucumber under salinity stress. *Acta Hort*, 2021: 413–418.
- [26] Rajashekar C B, Zhou H, Marcum K B, et al. *Glycine* betaine accumulation and induction of cold tolerance in strawberry (*Fragaria X ananassa* Duch.) plants. *Plant Sci*, 1999, 148: 175–183.
- [27] Castiglioni P, Bell E, Lund A, et al. Identification of *GBI*, a gene whose constitutive overexpression increases glycinebetaine content in maize and soybean. *Plant Direct*, 2018, 2: e00040.
- [28] Kumari A, Kapoor R, Bhatla S C. Nitric oxide and light

- co-regulate *Glycine* betaine homeostasis in sunflower seedling cotyledons by modulating betaine aldehyde dehydrogenase transcript levels and activity. *Plant Signal Behav*, 2019, 14: 1666656.
- [29] Fan W J, Zhang M, Zhang H X, et al. Improved tolerance to various abiotic stresses in transgenic sweet potato (*Ipomoea batatas*) expressing spinach betaine aldehyde dehydrogenase. *PLoS One*, 2012, 7: e37344.
- [30] Abbas S R, Ahmad S D, Sabir S M, et al. Detection of drought tolerant sugarcane genotypes (*Saccharum officinarum*) using lipid peroxidation, antioxidant activity, *Glycine*-betaine and proline contents. *J Soil Sci Plant Nutr*, 2014, 14: 233–243.
- [31] Khan M I R, Asgher M, Khan N A. Alleviation of salt-induced photosynthesis and growth inhibition by salicylic acid involves glycinebetaine and ethylene in mungbean (*Vigna radiata* L.). *Plant Physiol Biochem*, 2014, 80: 67–74.
- [32] Mickelbart M V, Chapman P, Collier-Christian L. Endogenous levels and exogenous application of glycinebetaine to grapevines. *Sci Hortic*, 2006, 111: 7–16.
- [33] Shirasawa K, Takabe T, Takabe T, et al. Accumulation of glycinebetaine in rice plants that overexpress choline monooxygenase from spinach and evaluation of their tolerance to abiotic stress. *Ann Bot*, 2006, 98: 565–571.
- [34] Bray L, Chriqui D, Gloux K, et al. Betaines and free amino acids in salt stressed vitroplants and winter resting buds of *Populus trichocarpa* × *deltoides*. *Physiol Plant*, 1991, 83: 136–143.
- [35] Hibino T, Waditee R, Araki E, et al. Functional characterization of choline monooxygenase, an enzyme for betaine synthesis in plants. *J Biol Chem*, 2002, 277: 41352–41360.
- [36] Khan M S, Yu X, Kikuchi A, et al. Genetic engineering of *Glycine* betaine biosynthesis to enhance abiotic stress tolerance in plants. *Plant Biotechnol*, 2009, 26: 125–134.
- [37] Hanada K, Zou C, Lehti-Shiu M D, et al. Importance of lineage-specific expansion of plant tandem duplicates in the adaptive response to environmental stimuli. *Plant Physiol*, 2008, 148: 993–1003.
- [38] Freeling M, Thomas B C. Gene-balanced duplications, like tetraploidy, provide predictable drive to increase morphological complexity. *Genome Res*, 2006, 16: 805–814.
- [39] 刘丹, 李爱华, 刘岱松, 等. 甜菜碱在提高烟草抗逆性中的作用. *安徽农业科学*, 2020, 48(7): 11–13.
Liu D, Li A H, Liu D S, et al. The role of *Glycine* betaine in improving tobacco stress resistance. *J Anhui Agric Sci*, 2020, 48(7): 11–13 (in Chinese with English abstract).
- [40] Zhang J, Tan W, Yang X H, et al. Plastid-expressed choline monooxygenase gene improves salt and drought tolerance through accumulation of *Glycine* betaine in tobacco. *Plant Cell Rep*, 2008, 27: 1113–1124.
- [41] Nuccio M L, Russell B L, Nolte K D, et al. The endogenous choline supply limits *Glycine* betaine synthesis in transgenic tobacco expressing choline monooxygenase. *Plant J*, 1998, 16: 487–496.