

孙扬名, 张明亮, 葛 敏, 等. 玉米 *ZmZIM* 家族基因鉴定及其对氮素的响应特征[J]. 江苏农业学报, 2024, 40(4): 577-590.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2024.04.001

玉米 *ZmZIM* 家族基因鉴定及其对氮素的响应特征

孙扬名^{1,2}, 张明亮², 葛 敏², 邬 奇², 赵 涵²

(1. 南京农业大学农学院, 江苏 南京 210095; 2. 江苏省农业科学院种质资源与生物技术研究所, 江苏 南京 210014)

摘要: 为明确玉米 *ZmZIM* 家族基因结构、位置、编码蛋白质性质及其对氮素的响应特征, 本研究利用 TBtools、MEGA X 等软件分析玉米 *ZmZIM* 家族基因的结构、染色体位置、顺式作用元件及系统发育关系及其编码蛋白质的理化性质、保守结构域及基序, 结合玉米不同发育时期不同器官的转录组数据及充足氮与低氮水平下四叶一心期玉米地上部转录组数据解析玉米 *ZmZIM* 家族基因的表达模式及差异。结果表明: 从玉米全基因组中共鉴定到 32 个玉米 *ZmZIM* 基因, 主要分布于 1 号、2 号、5 号和 7 号染色体, 8 号和 10 号染色体上无 *ZmZIM* 基因。32 个 *ZmZIM* 基因可划分为 4 个亚类, 其编码蛋白质由 134~467 个氨基酸残基构成, 均为亲水性蛋白质且全部定位在细胞核中。32 个 *ZmZIM* 基因启动子区域顺式作用元件主要有调控元件、光信号响应元件、激素信号响应元件、胁迫响应元件、生长发育元件及蛋白质结合位点等 6 大类。不同发育时期, *ZmZIM* 基因在玉米不同器官中存在差异性表达; 在充足氮与低氮处理下, 随着处理时间的增加, 玉米植株地上部 12 个 *ZmZIM* 基因无表达或相对表达量较低, 6 个 *ZmZIM* 基因相对表达量较高且稳定, 其余的 14 个 *ZmZIM* 基因的相对表达量差异较大; *ZmZIM5*、*ZmZIM16*、和 *ZmZIM31* 3 个基因的相对表达量普遍高于其他基因。充足氮条件下, *ZmZIM8*、*ZmZIM15*、*ZmZIM20*、*ZmZIM24*、*ZmZIM29* 和 *ZmZIM31* 基因的相对表达量普遍高于低氮条件。本研究结果为玉米氮高效吸收利用基因筛选和利用奠定基础。

关键词: 玉米; *ZIM* 转录因子; 基因家族分析; 氮响应

中图分类号: S513 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2024)04-0577-14

Identification of *ZmZIM* family genes and their response to nitrogen in maize

SUN Yang-ming^{1,2}, ZHANG Ming-liang², GE Min², WU Qi², ZHAO Han²

(1. College of Agriculture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. Institute of Germplasm Resources and Biotechnology, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

Abstract: In order to clarify the structure, location, encoded protein properties and response characteristics of maize *ZmZIM* family genes to nitrogen, this study used TBtools, MEGA X and other softwares to analyze the structure, chromosome location, *cis*-acting elements and phylogenetic relationships of maize *ZmZIM* family genes and the physical and chemical properties, conserved domain and motifs of their encoded proteins. The expression patterns and differences of maize *ZmZIM* family genes were analyzed by combining the transcriptome data of different organs at different development stages of maize and the transcriptome data of maize shoots at four-leaf and one-heart stage under sufficient nitrogen and low nitrogen

levels. The results showed that a total of 32 *ZmZIM* genes were identified from the whole genome of maize, which were mainly distributed on chromosomes 1, 2, 5 and 7, and no *ZmZIM* genes were found on chromosomes 8 and 10. The 32 *ZmZIM* genes could be divided into four subclasses, and the encoded proteins were composed of 134~467 amino acid residues, all of which were hydrophilic

收稿日期: 2023-05-09

基金项目: 国家自然科学基金项目(32272133); 江苏省种业振兴“揭榜挂帅”项目[JBSG(2021)012]

作者简介: 孙扬名(1998-), 男, 吉林长春人, 博士研究生, 主要从事玉米氮素吸收及高效利用研究。(Tel) 18151665609; (E-mail) Sunyangming9808@163.com

通讯作者: 赵 涵, (E-mail) zhaohan@jaas.ac.cn

proteins and located in the nucleus. The *cis*-acting elements in the promoter region of 32 *ZmZIM* genes were mainly divided into six categories: regulatory elements, light signal response elements, hormone signal response elements, stress response elements, growth and development elements and protein binding sites. At different developmental stages, *ZmZIM* gene was differentially expressed in different organs of maize. Under sufficient nitrogen and low nitrogen treatments, with the increase of treatment time, the 12 *ZmZIM* genes in the aboveground part of maize plants had no expression or low relative expression, the relative expression of six *ZmZIM* genes was high and stable, and the relative expression of the remaining 14 *ZmZIM* genes varied greatly. The relative expression levels of *ZmZIM5*, *ZmZIM16*, and *ZmZIM31* were generally higher than other genes. Under sufficient nitrogen conditions, the relative expression levels of *ZmZIM8*, *ZmZIM15*, *ZmZIM20*, *ZmZIM24*, *ZmZIM29* and *ZmZIM31* were generally higher than those under low nitrogen conditions. The results of this study lay a foundation for the screening and utilization of nitrogen efficient absorption and utilization genes in maize.

Key words: maize; ZIM transcription factors; gene family analysis; nitrogen response

ZIM (Zinc-finger protein expressed in Inflorescence Meristem) 转录因子含有 C2C2-GATA 锌指结构 (CX2CX20CX2C, 其中 X 代表任意氨基酸), 由 Nishii 等^[1]从拟南芥花序分生组织中发现, 因此被命名为 ZIM。随后 GATA 锌指结构在其他蛋白质中也被发现, 相应的蛋白质被归入植物特异性转录因子 GATA 家族^[2-3]。ZIM 蛋白除了含锌指结构域外, 还包含一段由 36 个氨基酸残基构成的结构域 (T[L/L]F[F/Y]XG, 其中 X 代表任意氨基酸), 但该结构域在各数据库中使用的基序略有不同。White^[4]报道了拟南芥中另外两个分别由 *AT4G14713* 和 *AT4G14720* 基因编码的 PEAPOD1 蛋白和 PEAPOD2 蛋白, 含有 TIFY 及一段特殊结构域。与 ZIM 蛋白不同的是, PEAPOD 蛋白不存在 GATA 结构域, 因此将其归类为 C2C2-GATA 家族并不准确, Vanholme 等^[5]认为应将其重新命名并归类为 TIFY 家族。在 TIFY 超转录因子家族中仅含有 TIFY 结构域的蛋白划分为 TIFY 亚族, 含有 TIFY 结构域和 Jas 结构域的划分为 JAZ 亚族, 同时含有 TIFY、GATA 和 CCT 结构域的划分为 ZML 亚族, 在 N 端包含一段 PEAPOD 蛋白且序列中含有 TIFY 结构域的划分为 PPD 亚族^[4,6-9]。本研究沿用以 ZIM 命名的蛋白质进行研究。玉米是世界上最主要的粮食作物之一, 在工业、农业、食品等行业都起着重要的作用^[10-11], 但生产中由于氮肥的过度施用, 导致玉米的氮肥利用效率较低^[12]。ZIM 家族在植物生长发育、非生物胁迫 (高盐、低温和干旱) 应对及茉莉酸信号通路调控等多种反应中发挥重要作用^[13-14]。因此研究玉米 ZIM 基因家族的特征、表达模式, 解析玉米 ZIM 基因家族在氮素响应中的分子机制对选育氮高效玉米品种具有重要意义。

自 2000 年 Nishii 等^[1]从拟南芥中首次鉴定到

AtZIM1 基因以来, 水稻^[15]、葡萄^[16]、二穗短柄草^[13]、大豆^[17]、棉花^[18-19]、小麦^[20]、西瓜^[21]、木薯^[22]、番茄^[6]、杜仲^[14]、柑橘^[23]等植物中的 ZIM 基因继续得到了鉴定。同时 ZIM 家族基因的功能也得到了广泛研究。拟南芥 JAZ 蛋白可与 AtMYB21 和 AtMYB24 的 R2R3 结构域结合导致拟南芥雄性不育, 接收到茉莉酸信号后 COI1 结合 JAZ 蛋白并被泛素化降解使 AtMYB21 和 AtMYB24 激活下游基因表达调控雄蕊发育^[24]; 苹果 MdABI4 蛋白与 ICE1 和 JAZ 蛋白互作形成 JAZ-ABI4-ICE1-CBF 模块调控 ABA (脱落酸) 信号介导的苹果耐冷性^[25]; SIJAZ10 和 SIJAZ11 蛋白不仅可通过茉莉酸信号来抑制番茄叶片衰老, 还可通过协同电信号、钙离子信号等调控番茄再生^[26]; 丙烯可诱导 *MaTIFY1* 基因表达, 加快香蕉果实成熟^[27]; 小麦 *TaZIM-A1* 基因的表达量有明显的昼夜节律, 且过表达 *TaZIM-A1* 基因会下调部分关键开花调控基因的表达量进而导致小麦开花时间的推迟^[28]; 盐胁迫下过表达 *TdTIFY11a* 基因可使小麦在高渗透压条件下仍保持较高的成活率及发芽率^[29], 同样 PnJAZ1 蛋白赋予核桃种子较高的萌发率及耐盐性^[30]; TIFY 家族基因积极参与毛果杨对高盐、极端温度、干旱等非生物胁迫的调控过程^[31]。

虽然 ZIM 家族基因及其功能在多种植物中得到了研究, 但玉米 ZIM 家族基因的鉴定及氮素响应特征研究还鲜见报道。本研究基于玉米 V5 版本的基因组数据, 利用生物信息学及 TBtools 软件鉴定玉米 *ZmZIM* 基因家族成员, 从基因的结构、染色体位置、系统进化关系、启动区域顺式作用元件及表达模式及其编码蛋白质的理化性质、蛋白质结构、保守基序等角度解析 *ZmZIM* 基因家族的特性, 并通过充足氮及低氮水平下玉米地上部的转录组测序, 进一步

分析玉米 *ZmZIM* 家族基因的表达量差异,旨在为 *ZmZIM* 家族基因对氮素的响应机制挖掘及氮高效利用玉米种质选育提供依据。

1 材料与方法

1.1 玉米 *ZmZIM* 家族基因的鉴定及其在染色体上的分布

从 MaizeGDB 网站和 EnsemblPlant 数据库分别下载玉米 B73_RefGen_V5 版本 *ZIM* 家族蛋白质氨基酸序列和全部蛋白质氨基酸序列,利用 TBtools 提取 *ZIM* 家族的蛋白质氨基酸序列,通过氨基酸序列比对后保留序列相同的蛋白质氨基酸序列,并在 NCBI 网站下载玉米 *ZIM* 家族蛋白质氨基酸序列,将两种方式获得的 *ZIM* 家族蛋白质氨基酸序列再次进行比对,选择两次比对结果中氨基酸序列均一致的蛋白质氨基酸序列作为玉米 *ZIM* 家族蛋白质氨基酸序列用于后续分析。使用 TBtools 软件的 Gene Location Visualize from GXF 模块分析玉米 *ZmZIM* 家族基因在染色体上的位置^[32]。

1.2 玉米 *ZmZIM* 基因编码蛋白质的理化性质分析及亚细胞定位

采用 TBtools 软件中 Protein Parameter Calc 程序进行 *ZIM* 家族基因编码蛋白质的氨基酸数目、理论等电点(*PI*)、不稳定指数、脂肪系数、平均亲水系数等理化性质分析。根据蛋白质氨基酸序列采用 Cell-PLoc2.0 网站进行玉米 *ZIM* 蛋白的亚细胞定位。

1.3 基因结构分析及蛋白质结构分析

利用 TBtools 软件结合保守结构域数据库(CDD)和基因编码蛋白质氨基酸序列进行玉米 *ZIM* 家族保守结构域预测。设置保守基序(Motif)最大数值为 20,采用 TBtools 软件的 Simple MEME Wrapper 模块进行玉米 *ZIM* 家族蛋白质保守基序预测。根据 *ZmZIM* 家族基因的编号(ID)下载对应的基因序列,利用 TBtools 软件的 Gene Structures View 模块对下载的 *ZmZIM* 基因序列进行基因非编码区(UTR)及编码序列(CDS)分析。

1.4 启动子顺式作用元件分析

首先利用 TBtools 软件的 GXF Sequences Extract 模块提取玉米基因组全部基因 CDS 上游 2 000 bp 的序列,随后使用 TBtools 中 Fasta Extract 模块提取 *ZmZIM* 家族基因 CDS 上游 2 000 bp 序列,再利用 PlantCARE 在线网站预测启动子区域的顺式作用元件,对各个基

因中存在的无过多生物学意义的元件如 TATA-box、CAAT-box 等元件进行删减后,保留注释文件中具有抗逆、光响应、激素响应等功能的顺式作用元件,利用 TBtools 中 Basic BioSequence View 模块对玉米 *ZmZIM* 家族基因启动子区域顺式作用元件可视化。

1.5 系统发育树分析

采用 MEGA-X 软件的 MUSCLE 模块对玉米 *ZmZIM* 蛋白进行多序列比对^[33],设置 Bootstrap 值为 1 000,利用邻接法(Neighbor-joining, NJ)构建系统发育进化树,并利用 iTOL 在线网站进行进化树的可视化。

1.6 表达模式分析

以玉米自交系 B73 为试验材料,先在育苗盘中育苗,待发芽后选取长势相近的个体移栽至人工搅拌均匀的基质中,每 3 d 补水 1 次,保证基质水分适宜,期间适当施加尿素及复合肥保证植株正常生长。在玉米生长发育的不同阶段对不同组织取样并进行转录组测序,每样品 3 个重复。利用 FastQC v11.9^[34]和 Fastp 软件进行测序结果的质量控制,按照默认参数去除重复和低质量的 read,得到高质量序列(Clean data)。利用 Hisat2 v2.2.1^[35]将 Clean data 比对到玉米参考基因组(B73_RefGen_v5),然后利用 Samtools v1.19^[36]软件将 SAM 文件转化成 BAM 文件并排序,参考基因组数据和注释信息下载自 MaizeGDB 数据库。提取玉米 *ZmZIM* 家族基因的 FPKM 值,统计获得 *ZmZIM* 家族基因的相对表达量。利用 TBtools 软件进行不同生长发育阶段不同组织 *ZmZIM* 家族基因表达量的热图(Heat map)制作与分析。

1.7 *ZmZIM* 家族基因对氮素的响应

以玉米自交系 B73 为试验材料,于 2023 年 3 月进行水培处理。种子发芽后移入含 2 mmol/L KNO_3 的 Hoagland 培养液中,每 3 d 更换 1 次培养液,待植株长至四叶一心时移入充足氮(5.0 mmol/L KNO_3)和低氮(0.5 mmol/L KNO_3 +4.5 mmol/L KCl)的水培液中进行不同氮素水平培育,并于处理后 0 h、0.5 h、1.0 h、1.5 h、2.0 h、3.0 h、4.0 h、6.0 h、8.0 h 时进行地上部取样,取得样品采用植物总 RNA 提取试剂盒(南京诺唯赞医疗科技有限公司产品)提取 RNA 后,送北京贝瑞和康生物技术有限公司进行转录组测序,测序结果参照材料与方法 1.6 中的方法进行质量控制与表达量分析,进而得到不同氮素水平下 *ZmZIM* 家族基因表达量的热图。

2 结果与分析

2.1 玉米 *ZIM* 家族基因的鉴定及分析

根据 MaizeGDB 网站及 NCBI 网站比对后共鉴定出 32 个玉米 *ZIM* 基因。将获得的 32 个 *ZIM* 基因按照其在染色体分布位置依次命名为 *ZmZIM1* ~ *ZmZIM32*。32 个 *ZIM* 基因不均匀分布在玉米 8 条染色体上(图 1)。其中 1 号染色体含有 10 个 *ZmZIM* 基因,2 号、5 号染色体各分布 6 个 *ZmZIM* 基因,3 号、7 号染色体分别分布 2 个和 5 个 *ZmZIM* 基因,4 号、6 号、9 号染色体各分布 1 个 *ZmZIM* 基因。值得注意的

是 *ZmZIM* 基因有时在染色体上成簇分布,每簇包含 3 个 *ZmZIM* 基因,如 1 号染色体含有 2 个 *ZmZIM* 基因簇(*ZmZIM1*、*ZmZIM2*、*ZmZIM3* 和 *ZmZIM6*、*ZmZIM7*、*ZmZIM8*),5 号染色体含有 1 个 *ZmZIM* 基因簇(*ZmZIM22*、*ZmZIM23*、*ZmZIM24*)。32 个 *ZmZIM* 基因的编码蛋白质共鉴定出 3 个典型的特征结构域(图 2),其中含 TIFY 结构域的共 27 个,含 CCT 结构域的共 31 个,仅 *ZmZIM4* 基因的编码蛋白质不含有 CCT 结构域,同时含锌指结构域 GATA、TIFY 结构域和 CCT 结构域的编码蛋白质共 4 个(*ZmZIM9*、*ZmZIM20*、*ZmZIM25* 及 *ZmZIM26*)。

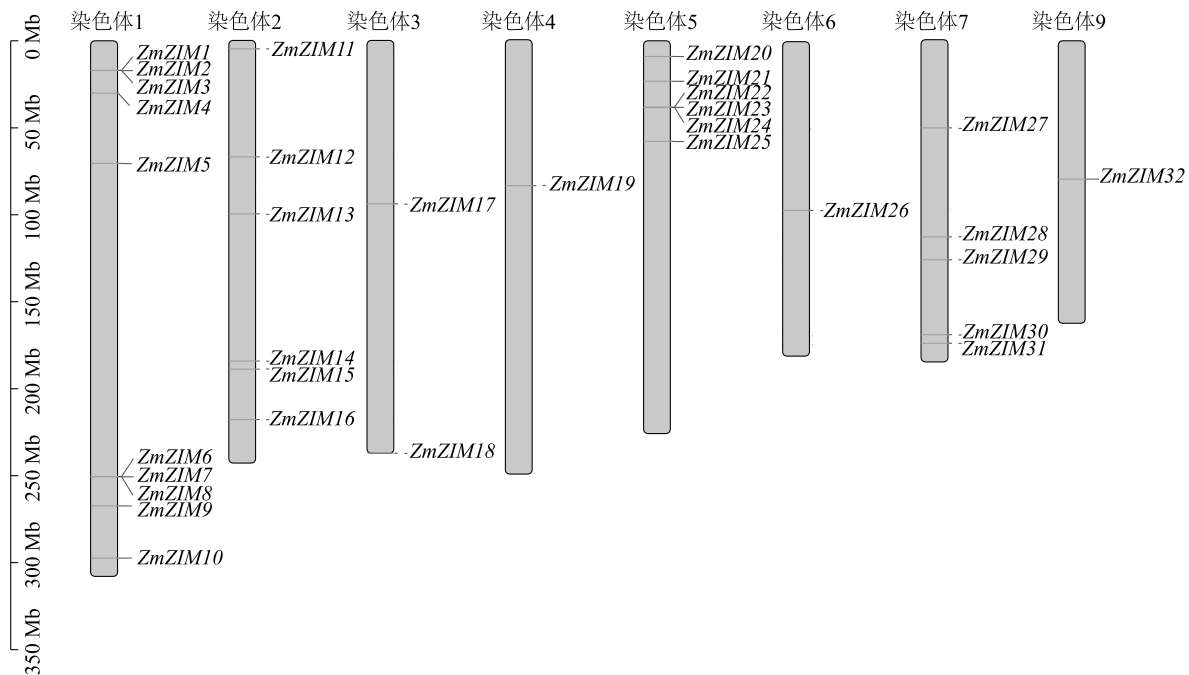


图 1 玉米 *ZmZIM* 家族基因在染色体上的定位

Fig.1 Chromosomal localization of *ZmZIM* family genes in maize

上述 32 个 *ZmZIM* 蛋白由 134~467 个氨基酸残基构成,相对分子质量为 14 161.23~52 501.39,理论等电点(*PI*)为 4.60~10.18,其中等电点大于 7.0 的蛋白质有 23 个,表明大多数 *ZmZIM* 蛋白偏碱性,32 个 *ZmZIM* 蛋白均为亲水性蛋白(表 1)。亚细胞定位预测结果显示,32 个蛋白质均定位在细胞核中。

2.2 玉米 *ZmZIM* 家族基因结构分析及编码的蛋白质结构域预测

32 个 *ZmZIM* 基因中 *ZmZIM13*、*ZmZIM17* 和 *ZmZIM27* 没有非编码区(UTR),其余 29 个 *ZmZIM* 基因均含 1~2 个 UTR 及多个编码序列(CDS)。*ZmZIM14*、

ZmZIM19、*ZmZIM25*、*ZmZIM26*、*ZmZIM28*、*ZmZIM20* 和 *ZmZIM9* 含有不少于 7 个 CDS(图 3),这些基因形成剪切体的潜在能力较高。*ZIM31* 和 *ZIM5* 具有较为相似的结构,表明这 2 个基因的进化过程可能较为相似。

32 个 *ZmZIM* 基因编码的蛋白质均含有多个保守基序(Motif)(图 4)。其中, Motif1、Motif3、Motif4 出现次数较多,表明 *ZmZIM* 家族基因可能具有较为相似的功能,一些基因编码的蛋白质独有特定的 Motif 说明这些基因可能有特殊的功能。基因编码的蛋白质保守基序的多样性与基因编码的蛋白质的保守结构域多样化基本一致。

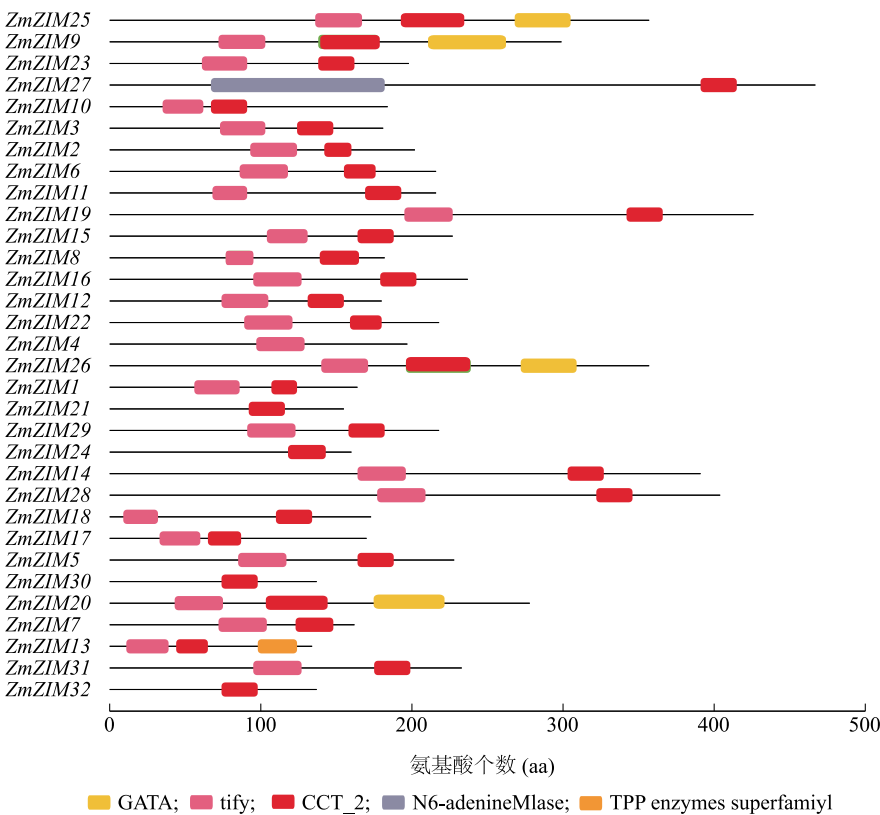


图 2 玉米 *ZmZIM* 基因编码蛋白的保守结构域
Fig.2 Conserved domains of proteins encoded by *ZmZIM* genes in maize

表 1 玉米 *ZmZIM* 家族成员蛋白质特征
Table 1 Protein characteristics of *ZmZIM* family members in maize

基因				基因编码的蛋白质					
编号	基因名称	登记号	所在染色体	氨基酸数目 (aa)	相对分子质量	等电点	不稳定指数	脂肪系数	亲水性平均系数
Zm00001eb005980	<i>ZmZIM1</i>	NP_001151145	1	164	17 215.76	9.15	72.85	75.85	-0.212
Zm00001eb005990	<i>ZmZIM2</i>	NP_001357488	1	202	21 237.02	7.89	48.94	72.28	-0.351
Zm00001eb006000	<i>ZmZIM3</i>	NP_001149525	1	181	18 740.36	9.16	63.45	74.31	-0.206
Zm00001eb009620	<i>ZmZIM4</i>	NP_001142774	1	197	21 336.31	5.32	45.92	81.27	-0.348
Zm00001eb019470	<i>ZmZIM5</i>	NP_001143811	1	228	23 975.22	7.73	47.86	69.17	-0.419
Zm00001eb048740	<i>ZmZIM6</i>	XP_008664988	1	216	23 106.23	10.05	44.57	64.77	-0.459
Zm00001eb048770	<i>ZmZIM7</i>	NP_001151346	1	162	16 691.16	10.18	48.67	83.27	-0.106
Zm00001eb048780	<i>ZmZIM8</i>	NP_001151261	1	182	18 636.39	9.69	59.21	85.60	-0.076
Zm00001eb053170	<i>ZmZIM9</i>	NP_001149566	1	299	31 934.40	4.60	54.92	64.41	-0.705
Zm00001eb061650	<i>ZmZIM10</i>	XP_035820190	1	184	21 080.22	6.12	60.43	73.80	-0.392
Zm00001eb068050	<i>ZmZIM11</i>	NP_001170674	2	216	22 797.77	6.64	71.80	74.21	-0.414
Zm00001eb084980	<i>ZmZIM12</i>	NP_001142202	2	180	18 911.38	9.90	57.73	65.28	-0.336
Zm00001eb087540	<i>ZmZIM13</i>	XP_020404895	2	134	14 532.84	7.93	63.71	94.63	-0.128
Zm00001eb099240	<i>ZmZIM14</i>	NP_001288506	2	391	40 921.21	9.61	70.58	66.09	-0.283
Zm00001eb100130	<i>ZmZIM15</i>	NP_001130163	2	227	23 964.99	5.67	54.82	70.22	-0.437
Zm00001eb109190	<i>ZmZIM16</i>	NP_001148852	2	237	25 233.82	9.52	49.13	75.91	-0.433
Zm00001eb132920	<i>ZmZIM17</i>	XP_023157856	3	170	18 067.78	6.60	66.90	81.76	-0.120

续表 1 Continued 1

基因				基因编码的蛋白质					
编号	基因名称	登记号	所在染色体	氨基酸数目(aa)	相对分子质量	等电点	不稳定指数	脂肪系数	亲水性平均系数
Zm00001eb164160	ZmZIM18	XP_020406798	3	173	17 937.58	9.72	59.50	76.88	-0.014
Zm00001eb179390	ZmZIM19	NP_001151873	4	426	44 546.60	9.68	66.45	60.61	-0.412
Zm00001eb215440	ZmZIM20	NP_001148287	5	278	29 828.90	8.59	53.98	67.52	-0.474
Zm00001eb220310	ZmZIM21	XP_008644697	5	155	16 188.55	9.84	56.78	77.03	-0.092
Zm00001eb223580	ZmZIM22	XP_008644871	5	218	23 100.96	9.60	46.27	62.84	-0.533
Zm00001eb223590	ZmZIM23	XP_008644872	5	198	21 265.96	8.89	67.91	67.73	-0.480
Zm00001eb223620	ZmZIM24	NP_001152572	5	160	16 930.36	9.91	55.07	82.69	-0.328
Zm00001eb226740	ZmZIM25	NP_001144648	5	357	38 001.97	5.17	51.73	60.03	-0.667
Zm00001eb273020	ZmZIM26	NP_001399000	6	357	37 998.28	5.09	45.38	68.74	-0.560
Zm00001eb307210	ZmZIM27	XP_020397125	7	467	52 501.39	5.33	44.94	75.40	-0.528
Zm00001eb312170	ZmZIM28	NP_001141029	7	404	42 525.90	9.72	68.27	63.51	-0.308
Zm00001eb314010	ZmZIM29	NP_001182812	7	218	22 535.39	8.69	38.50	71.38	-0.389
Zm00001eb325530	ZmZIM30	XP_020396682	7	137	14 161.23	10.08	59.53	77.88	-0.045
Zm00001eb327450	ZmZIM31	NP_001308779	7	233	24 965.46	9.27	43.53	76.35	-0.434
Zm00001eb384630	ZmZIM32	XP_020399645	9	137	14 161.23	10.08	59.53	77.88	-0.045

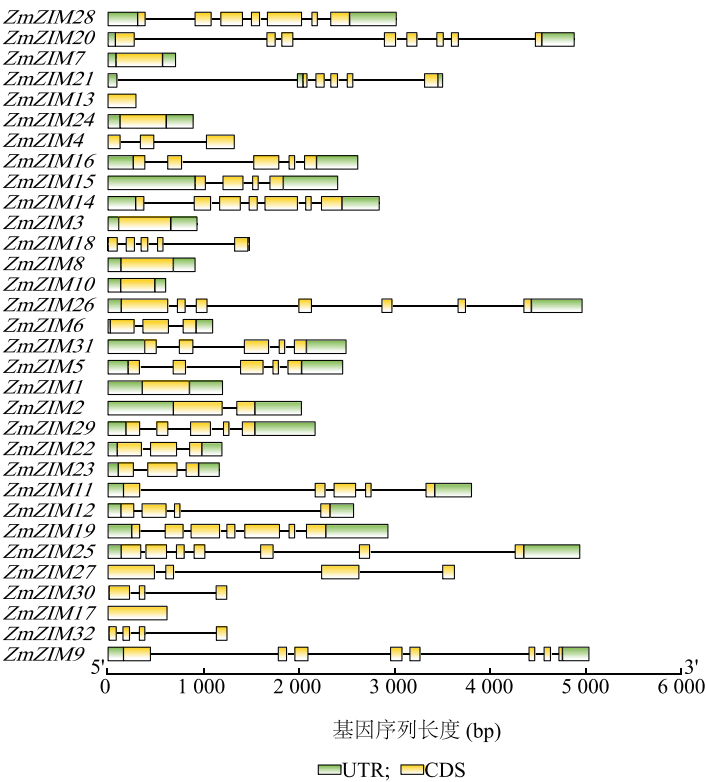
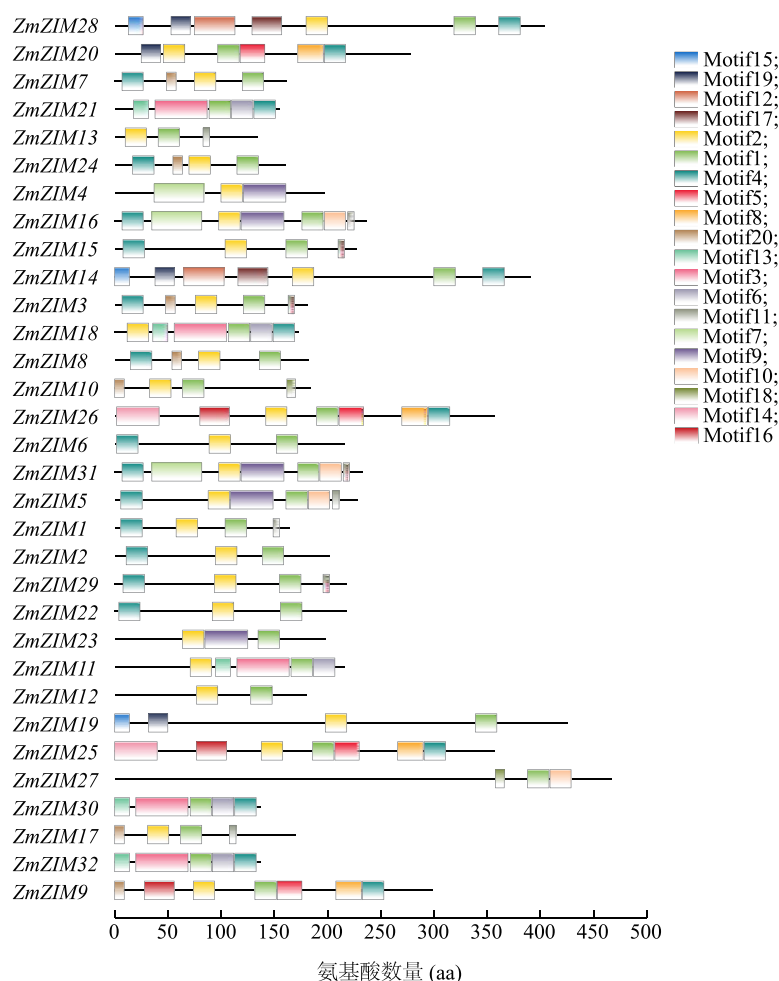


图 3 玉米 *ZmZIM* 家族基因结构
Fig.3 Gene structure of *ZmZIM* family in maize

2.3 玉米 *ZIM* 家族基因启动子顺式作用元件

32 个 *ZmZIM* 基因启动子区域包含的顺式作用元件主要有 6 大类:调控元件、光信号响应元件、激

素信号响应元件、胁迫响应元件、生长发育元件及蛋白质结合位点等(图 5)。其中,光信号响应元件和激素信号响应元件数量最多,分别出现 453 次及

图 4 玉米 *ZmZIM* 基因编码蛋白质的保守基序Fig.4 Conserved motifs of proteins encoded by *ZmZIM* genes in maize

341 次,且每个 *ZmZIM* 中均有 1 个以上的光信号响应元件。这表明 *ZmZIM* 家族可能调控多种信号通路,从而对玉米生长发育及多种胁迫作出应答。同时,*ZmZIM* 家族可能受光信号通路的影响从而存在表达的周期性。胁迫响应元件出现 141 次。上述结果说明 *ZmZIM* 家族可能在调控玉米胁迫应答、激素调节和光信号响应中发挥重要作用。

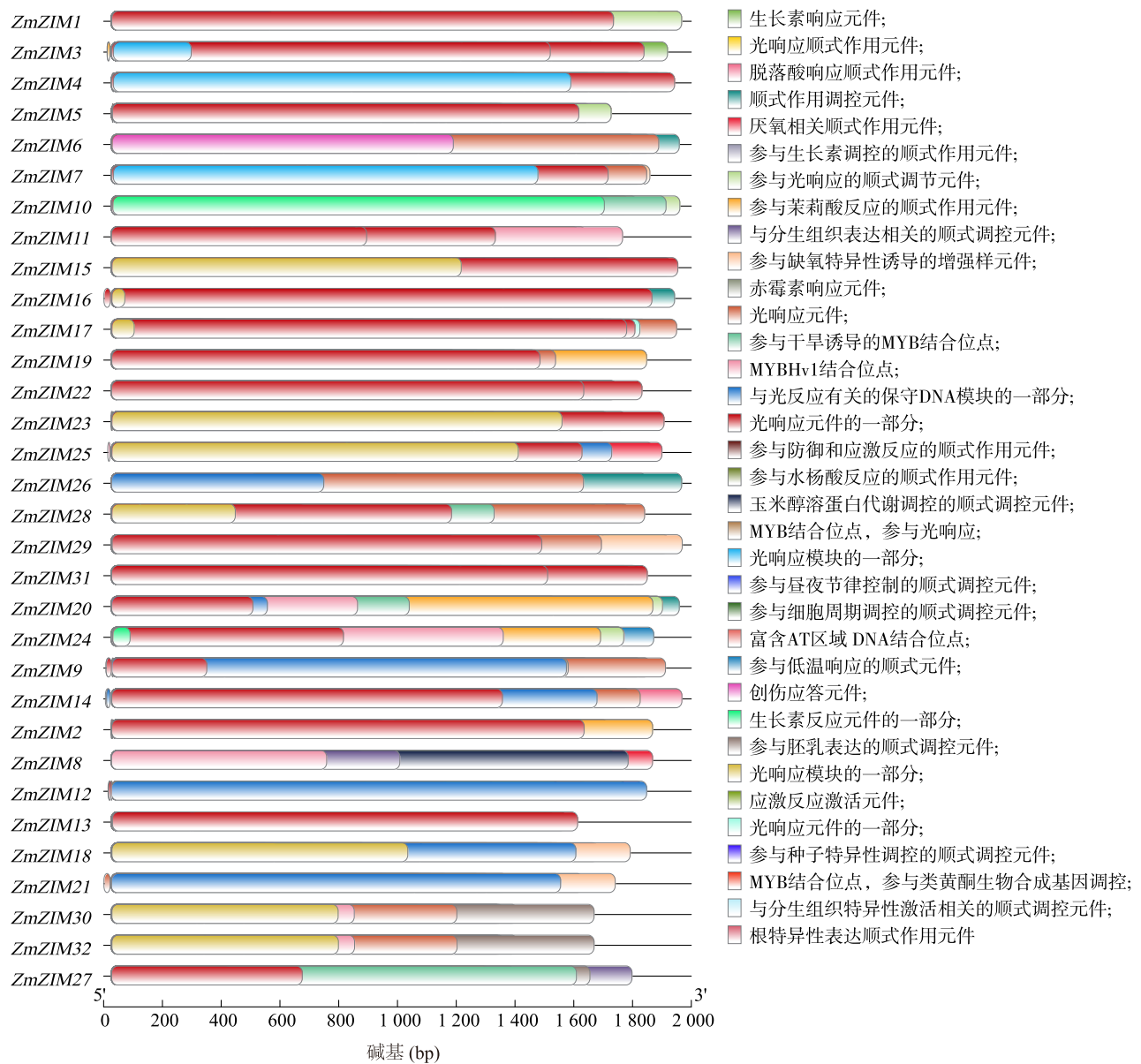
2.4 玉米 *ZIM* 蛋白系统发育树分析

玉米 *ZmZIM* 家族蛋白质系统发育树显示 32 个 *ZmZIM* 蛋白可以划分为 S1、S2、S3、S4 4 个亚类。其中,S4 亚类包含 19 个基因的编码蛋白质,S1 亚类包含 3 个基因的编码蛋白 (*ZmZIM14*、*ZmZIM19*、*ZmZIM28*),S2 和 S3 亚类各含有 5 个基因的编码蛋白质,分别是 *ZmZIM9*、*ZmZIM12*、*ZmZIM20*、*ZmZIM25*、*ZmZIM26* 和 *ZmZIM11*、*ZmZIM18*、*ZmZIM21*、*Zm-*

ZIM30、*ZmZIM32*(图 6)。

2.5 玉米 *ZIM* 家族基因表达模式分析

不同生长发育时期,玉米自交系 B73 不同组织 *ZmZIM* 基因的表达模式如图 7 所示。从图中可以看出,32 个 *ZmZIM* 基因的表达差异显著。15 个基因 (*ZmZIM1*、*ZmZIM2*、*ZmZIM4*、*ZmZIM9*、*ZmZIM10*、*ZmZIM12*、*ZmZIM13*、*ZmZIM14*、*ZmZIM17*、*ZmZIM18*、*ZmZIM22*、*ZmZIM23*、*ZmZIM26*、*ZmZIM27*、*ZmZIM32*) 在玉米生长过程中多个组织中几乎不表达或低表达,*ZmZIM21*、*ZmZIM25* 和 *ZmZIM30* 在玉米生长过程中相对表达量基本稳定,其余 14 个基因在玉米生长过程中相对表达量存在较大差异。在第 9 叶片展开期第 8 叶中 *ZmZIM8*、*ZmZIM15*、*ZmZIM24*、*ZmZIM28* 和 *ZmZIM29* 等基因的相对表达量较高,在第 14 叶片展开期第 13 叶中 *ZmZIM7*、*ZmZIM11*、*ZmZIM19*、*Zm-*

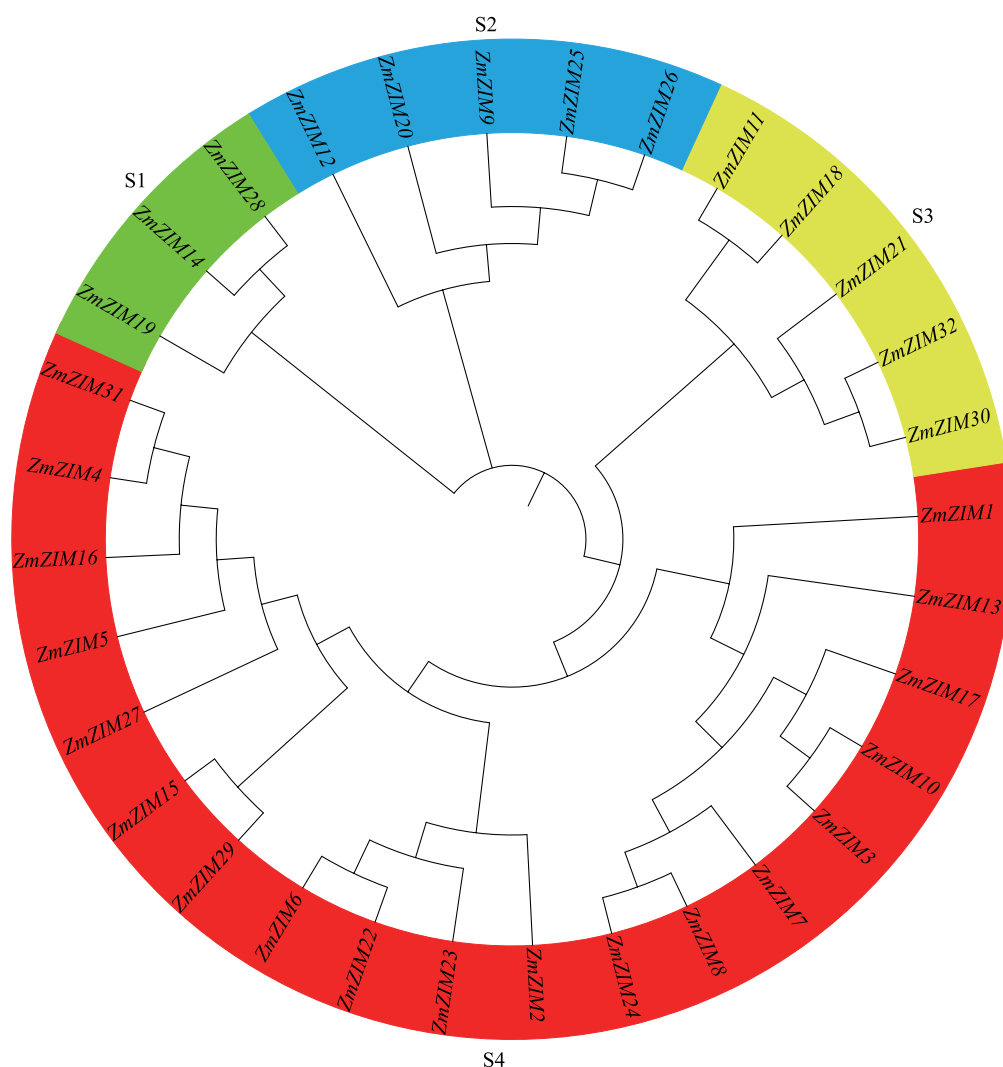
图 5 玉米 *ZmZIM* 基因启动子顺式作用元件Fig.5 Cis-acting elements in the promoter region of *ZmZIM* gene in maize

ZIM29、*ZmZIM30* 和 *ZmZIM31* 等基因的相对表达量较高。

2.6 玉米 *ZIM* 家族基因对氮素的响应

充足氮和低氮处理后,玉米自交系 B73 地上部 *ZmZIM* 基因表达量的变化分别如图 8 和图 9 所示。从图中可以看出,2 种氮素水平下,随着氮素处理时间的增加,32 个 *ZmZIM* 基因的相对表达量出现不同的变化特征:12 个 *ZmZIM* 基因 (*ZmZIM4*、*ZmZIM6*、*ZmZIM10*、*ZmZIM12*、*ZmZIM13*、*ZmZIM17*、*ZmZIM18*、*ZmZIM21*、*ZmZIM22*、*ZmZIM27*、*ZmZIM30*

和 *ZmZIM32*) 在 2 种氮素水平下均不表达或表达量极低;*ZmZIM9*、*ZmZIM11*、*ZmZIM19*、*ZmZIM20*、*ZmZIM25* 和 *ZmZIM26* 6 个 *ZmZIM* 基因相对表达量较高,且变化比较稳定,其余 14 个 *ZmZIM* 基因的相对表达量差异较大。与处理初始相比,充足氮处理 8 h 后 *ZmZIM1*、*ZmZIM3*、*ZmZIM8*、*ZmZIM29* 和 *ZmZIM31* 基因的相对表达量提高了 4 倍以上。2 种氮素水平下,*ZmZIM5*、*ZmZIM16* 和 *ZmZIM31* 基因的相对表达量普遍高于其他基因。充足氮处理下,*ZmZIM8*、*ZmZIM15*、*ZmZIM20*、*ZmZIM24*、*ZmZIM29*

图6 玉米 *ZmZIM* 蛋白系统发育树Fig.6 Phylogenetic tree of *ZmZIM* proteins in maize

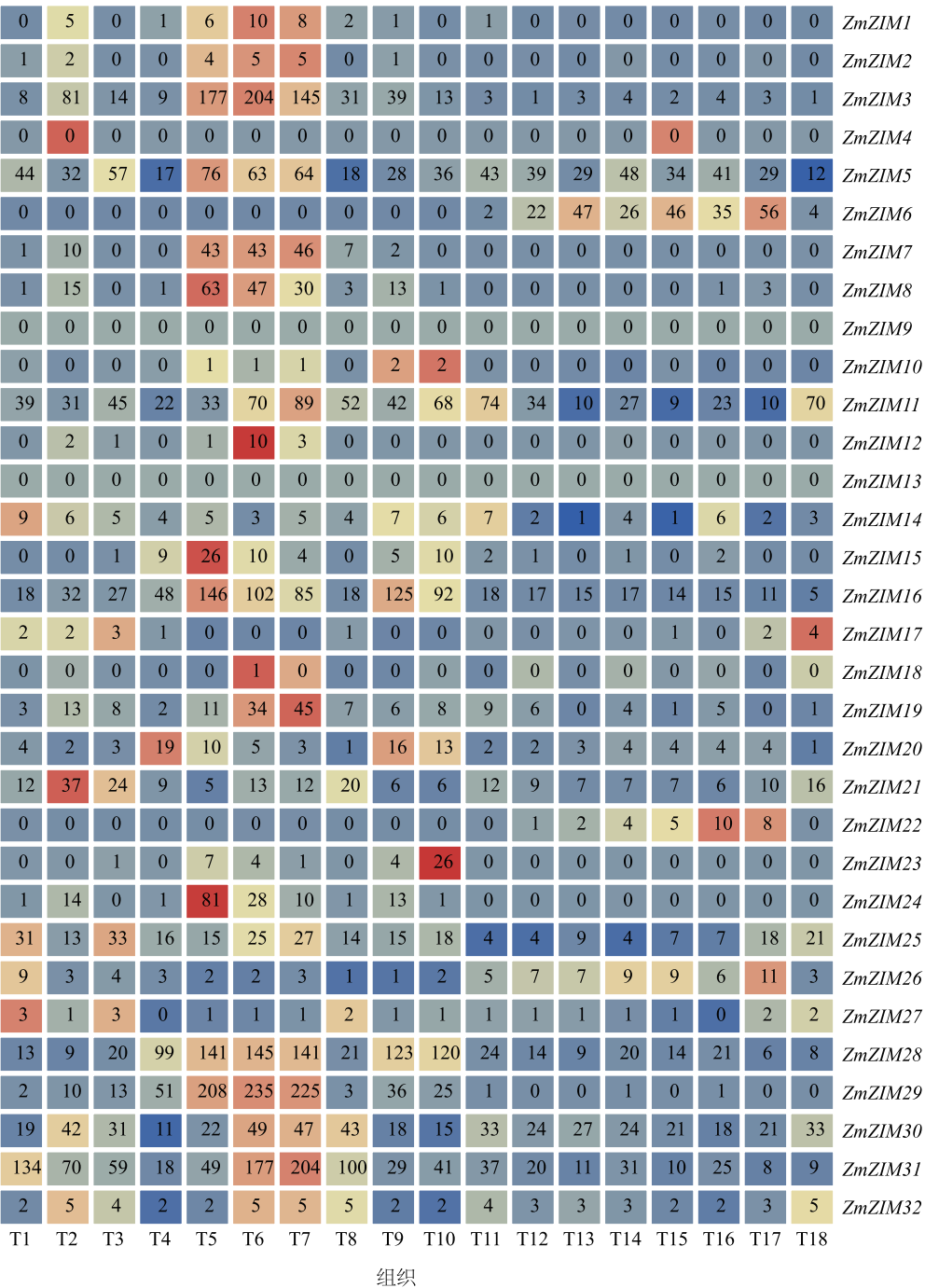
和 *ZmZIM31* 基因的相对表达量普遍高于低氮处理,这表明该家族基因对氮素变化的响应较为明显。因此,可以认为玉米 *ZmZIM* 基因在氮素响应调控中确实发挥了重要功能。

3 讨论

转录因子参与生物体众多生理生化过程的调控,从基因组及转录组水平入手解析转录因子家族结构和功能有助于明确转录因子基因家族的特性^[37-39]。ZIM 蛋白是植物特有的一类转录因子,在植物应对非生物胁迫、光响应、激素信号传导等方面起着重要的作用。本研究通过挖掘 *ZmZIM* 家族基因的染色体位置、结构、顺式作用元件、表达模式及其对氮素的响应特征,初步明确了 *ZmZIM* 基因的功

能及对氮素的响应机制。

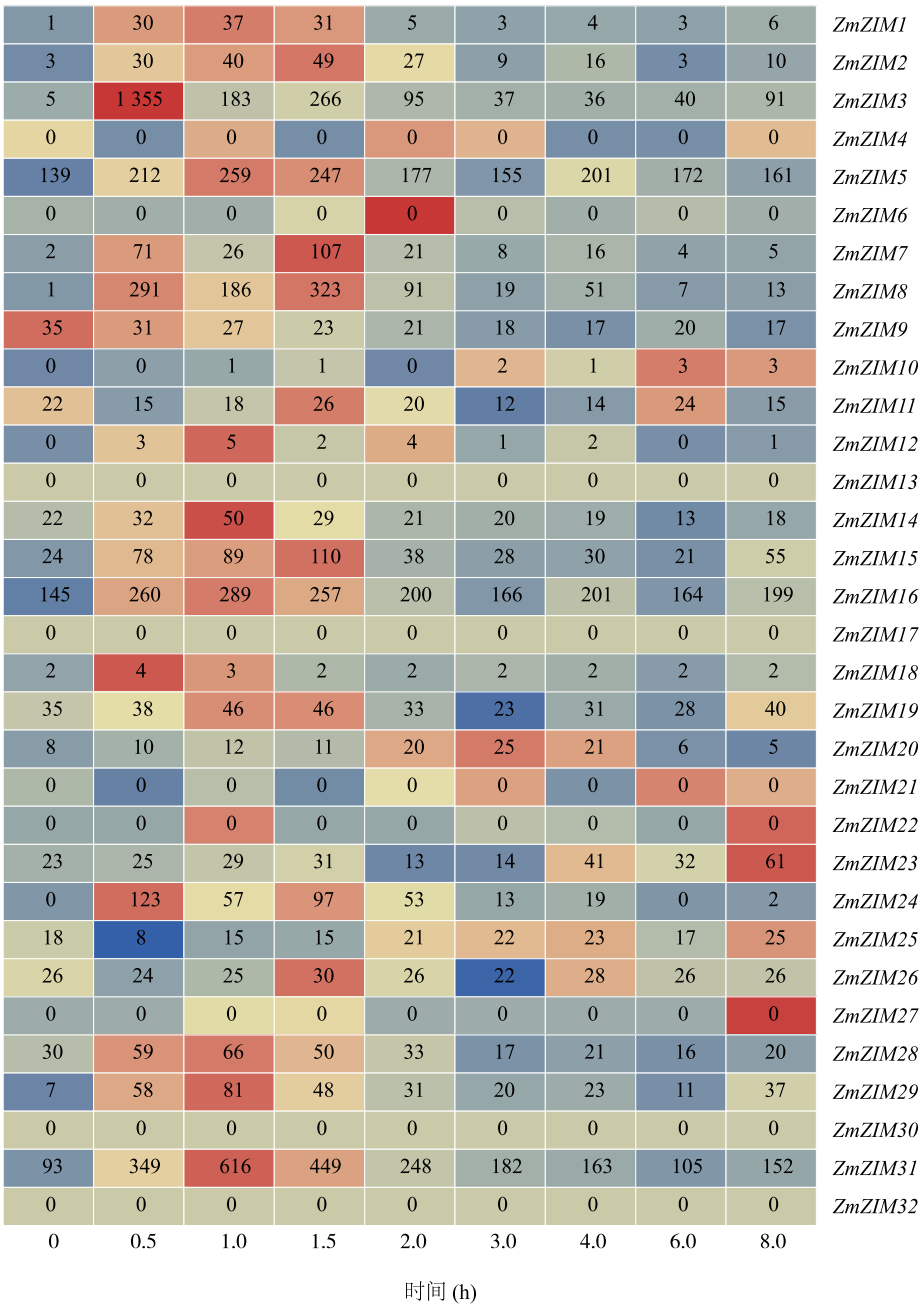
本研究基于最新版本玉米基因组信息鉴定出玉米全基因组中含有 32 个 *ZmZIM* 基因,对前人研究结果进行了补充与完善^[40]。玉米 *ZmZIM* 基因在染色体上的分布较为分散,在 1 号染色体及 5 号染色体有成簇密集分布的现象,这可能与基因的重复、互补功能相关。根据 *ZmZIM* 家族成员结构相似程度及系统进化关系将 32 个玉米 *ZmZIM* 基因分为 4 个亚类。本研究中对该家族成员的分类标准和范畴与其他学者研究有所不同。其他学者^[5]侧重 TIFY 家族的分类,而本研究则是重点关注蛋白质中是否存在 TIFY 结构域、CCT 结构域及 GATA 锌指结构域而进行分类。尽管本研究中 *ZmZIM4* 蛋白仅含 TIFY 结构域,但多次验证后本研究认为该蛋白质仍属于



T1: 萌发 24 h 后的种子;T2: 播种 6 d 后初始根;T3: 第 3 叶片展开期的茎;T4: 第 5 叶片展开期第 2 叶片;T5: 第 9 叶片展开期第 8 叶片;T6: 第 14 叶片展开期第 11 叶片;T7: 第 14 叶片展开期第 13 叶片;T8: 第 14 叶片展开期心叶;T9: 雄穗完全抽出时第 13 叶片;T10: 水泡期第 13 叶片;T11: 授粉 10 d 后的籽粒;T12: 授粉 12 d 后的籽粒;T13: 授粉 14 d 后的籽粒;T14: 授粉 16 d 后的籽粒;T15: 授粉 12 d 后的胚乳;T16: 授粉 14 d 后的胚乳;T17: 授粉 16 d 后的胚乳;T18: 授粉 16 d 后的幼胚。图中数字表示基因在不同时期的相对表达量。

图 7 玉米 *ZmZIM* 基因表达模式
Fig.7 Expression pattern of *ZmZIM* genes in maize

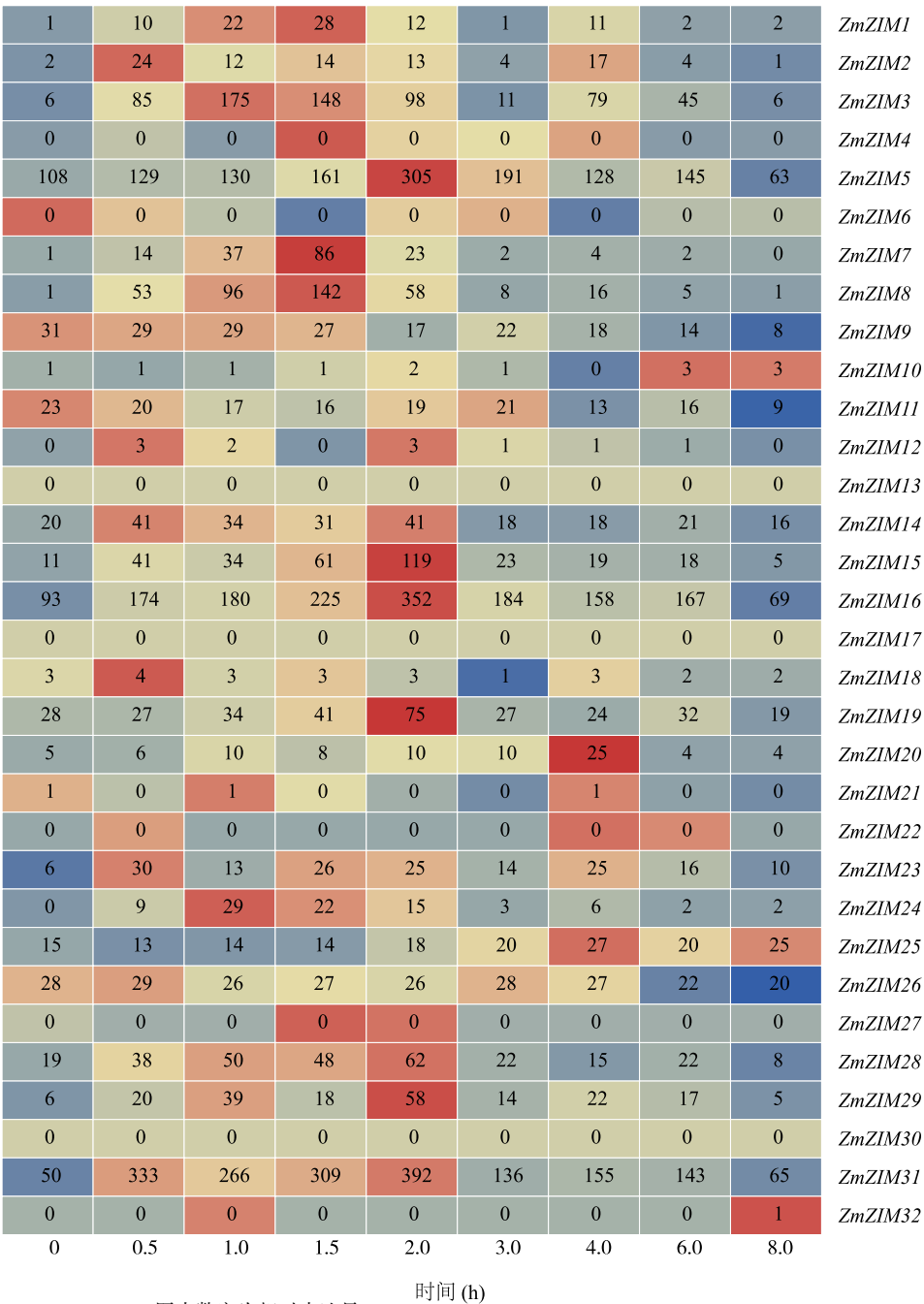
ZIM 家族, 这为 ZIM 家族的进化分析提供了基础。Shikata 等^[3] 研究结果表明长日照条件下 (16 h 光照/8 h 黑暗) 过表达 *AtZIM* 可使拟南芥细胞增大 进而导致拟南芥下胚轴及叶柄伸长, 短日照条件下 (8 h 光照/16 h 黑暗) 过表达 *AtZIM* 则使拟南芥叶片变小, 这说明光周期能影响到该家族基因的表达,



图中数字为相对表达量。
图8 充足氮处理下玉米 *ZmZIM* 基因表达
Fig.8 *ZmZIM* gene expression in maize under sufficient nitrogen treatment

进而调控植株形态。本研究中 *ZmZIM* 基因启动子区域顺式作用元件预测结果显示, *ZmZIM* 基因中光信号响应元件数量最多, 每个 *ZmZIM* 基因至少含有 1 个胁迫响应元件及激素相应元件, 这表明该家族在响应外源激素及非生物胁迫的过程中发挥重要功能。此外, *ZmZIM* 家族基因在玉米叶片中表达量普遍较高, 且在不同生长发育期表达量有显著差异, 推

测 *ZmZIM* 基因可能与其他基因互作来调控玉米叶片的发育。
在充足氮及低氮环境下, 随着氮素处理时间的增加, 12 个 *ZmZIM* 基因不表达或表达量极低, *ZmZIM9*、*ZmZIM11*、*ZmZIM19*、*ZmZIM20*、*ZmZIM25* 和 *ZmZIM26* 等 6 个 *ZmZIM* 基因相对表达量较高, 且变化比较稳定, 其余 14 个 *ZmZIM* 基因的相对表达



图中数字为相对表达量。

图9 低氮处理下玉米 ZmZIM 基因表达

Fig.9 ZmZIM gene expression in maize under low nitrogen treatment

量差异较大;ZmZIM5、ZmZIM16、和 ZmZIM31 等 3 个基因的相对表达量普遍高于其他基因。充足氮条件下,ZmZIM8、ZmZIM15、ZmZIM20、ZmZIM24、ZmZIM29 和 ZmZIM31 等基因的相对表达量普遍高于低氮条件下相对表达量。上述结果说明 ZmZIM 基因可积极响应氮素条件的变化,一些成员在低氮条件下高表达以增强玉米对外界氮素的吸收、同化及

转运用来维持植株自身的生长,而另一部分成员在充足氮素条件下高表达一方面促进氮素的同化及转运,另一方面通过其生长发育响应元件与其他基因互作来调控玉米的生长发育来维持玉米植株碳氮平衡。因此,可以认为玉米 ZmZIM 家族基因在氮代谢过程中可能发挥重要作用,在未来的研究中可通过 ZmZIM 基因的过表达试验、敲除突变体试验及共表

达网络分析,从表型及遗传角度进一步验证和解析 *ZmZIM* 基因的功能,明确 *ZmZIM* 基因在玉米氮代谢中的作用。

参考文献:

- [1] NISHII A, TAKEMURA M, FUJITA H, et al. Characterization of a novel gene encoding a putative single zinc-finger protein, *ZIM*, expressed during the reproductive phase in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2000, 64(7):1402-1409.
- [2] REYES J C, MURO-PASTOR M I, FLORENCIO F J. The GATA family of transcription factors in *Arabidopsis* and rice [J]. *Plant Physiol*, 2004, 134(4):1718-1732.
- [3] SHIKATA M, MATSUDA Y, ANDO K, et al. Characterization of *Arabidopsis ZIM*, a member of a novel plant-specific GATA factor gene family [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2004, 55(397):631-639.
- [4] WHITE D W. *PEAPOD* regulates lamina size and curvature in *Arabidopsis* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2006, 103(35):13238-13243.
- [5] VANHOLME B, GRUNEWALD W, BATEMAN A, et al. The tify family previously known as *ZIM* [J]. *Trends Plant Sci*, 2007, 12(6):239-244.
- [6] CHINI A, BEN-ROMDHANE W, HASSAIRI A, et al. Identification of TIFY/JAZ family genes in *Solanum lycopersicum* and their regulation in response to abiotic stresses [J]. *PLoS One*, 2017, 12(6):e177381.
- [7] CAI Q, YUAN Z, CHEN M, et al. Jasmonic acid regulates spikelet development in rice [J]. *Nat Commun*, 2014, 5:3476.
- [8] TIAN J, CAO L, CHEN X, et al. The OsJAZ1 degron modulates jasmonate signaling sensitivity during rice development [J]. *Development*, 2019, 146(4):dev173419.
- [9] YAN Y, STOLZ S, CHETELAT A, et al. A downstream mediator in the growth repression limb of the jasmonate pathway [J]. *Plant Cell*, 2007, 19(8):2470-2483.
- [10] CUI T T, HE K H, CHANG L G, et al. QTL mapping for leaf area in maize (*Zea mays* L.) under multi-environments [J]. *Journal of Integrative Agriculture*, 2017, 16(4):800-808.
- [11] JU M, ZHOU Z, MU C, et al. Dissecting the genetic architecture of *Fusarium verticillioides* seed rot resistance in maize by combining QTL mapping and genome-wide association analysis [J]. *Sci Rep*, 2017, 7:46446.
- [12] AHMED M, RAUF M, MUKHTAR Z, et al. Excessive use of nitrogenous fertilizers; an unawareness causing serious threats to environment and human health [J]. *Environ Sci Pollut Res*, 2017, 24:26983-26987.
- [13] ZHANG L, YOU J, CHAN Z. Identification and characterization of TIFY family genes in *Brachypodium distachyon* [J]. *J Plant Res*, 2015, 128(6):995-1005.
- [14] 刘俊,陈玉龙,刘燕,等. 杜仲 TIFY 转录因子鉴定与表达分析 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2021, 27(19):165-174.
- [15] YE H, DU H, TANG N, et al. Identification and expression profiling analysis of TIFY family genes involved in stress and phytohormone responses in rice [J]. *Plant Mol Biol*, 2009, 71(3):291-305.
- [16] ZHANG Y, GAO M, SINGER S D, et al. Genome-wide identification and analysis of the *TIFY* gene family in grape [J]. *PLoS One*, 2012, 7(9):e44465.
- [17] ZHU D, BAI X, LUO X, et al. Identification of wild soybean (*Glycine soja*) TIFY family genes and their expression profiling analysis under bicarbonate stress [J]. *Plant Cell Rep*, 2013, 32(2):263-272.
- [18] ZHAO G, SONG Y, WANG C, et al. Genome-wide identification and functional analysis of the *TIFY* gene family in response to drought in cotton [J]. *Mol Genet Genomics*, 2016, 291(6):2173-2187.
- [19] SUN Q, WANG G, ZHANG X, et al. Genome-wide identification of the *TIFY* gene family in three cultivated *Gossypium* species and the expression of *JAZ* genes [J]. *Sci Rep*, 2017, 7:42418.
- [20] XIE S, CUI L, LEI X, et al. The *TIFY* gene family in wheat and its progenitors: genome-wide identification, evolution and expression analysis [J]. *Curr Genomics*, 2019, 20(5):371-388.
- [21] YANG Y, AHAMMED G J, WAN C, et al. Comprehensive analysis of TIFY transcription factors and their expression profiles under jasmonic acid and abiotic stresses in watermelon [J]. *Int J Genomics*, 2019, 2019:6813086.
- [22] ZHENG L, WAN Q, WANG H, et al. Genome-wide identification and expression of TIFY family in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) [J]. *Front Plant Sci*, 2022, 13:1017840.
- [23] 张沪,肖翠,王贵元,等. 柑橘 TIFY 基因结构特征及响应低温表达分析 [J]. *中国南方果树*, 2020, 49(2):34-39.
- [24] SONG S, QI T, HUANG H, et al. The Jasmonate-ZIM domain proteins interact with the R2R3-MYB transcription factors MYB21 and MYB24 to affect Jasmonate-regulated stamen development in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2011, 23(3):1000-1013.
- [25] AN J P, XU R R, LIU X, et al. Abscisic acid insensitive 4 interacts with ICE1 and JAZ proteins to regulate ABA signaling-mediated cold tolerance in apple [J]. *J Exp Bot*, 2022, 73(3):980-997.
- [26] TANG B, TAN T, CHEN Y, et al. SIJAZ10 and SIJAZ11 mediate dark-induced leaf senescence and regeneration [J]. *PLoS Genet*, 2022, 18(7):e1010285.
- [27] 罗冬兰,巴良杰,陈建业,等. 香蕉 MaTIFY1 转录因子特性及其在成熟过程中基因表达分析 [J]. *园艺学报*, 2017, 44(1):43-52.
- [28] LIU H, LI T, WANG Y, et al. TaZIM-A1 negatively regulates flowering time in common wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. *J Integr Plant Biol*, 2019, 61(3):359-376.
- [29] EBEL C, BENFEKI A, HANIN M, et al. Characterization of wheat (*Triticum aestivum*) TIFY family and role of *Triticum Durum* TdTIFY11a in salt stress tolerance [J]. *PLoS One*, 2018, 13(7):e200566.

- [30] LIU S, ZHANG P, LI C, et al. The moss jasmonate ZIM-domain protein PnJAZ1 confers salinity tolerance via crosstalk with the abscisic acid signalling pathway[J]. *Plant Sci*, 2019, 280: 1-11.
- [31] WANG Y, PAN F, CHEN D, et al. Genome-wide identification and analysis of the *Populus trichocarpa* *TIFY* gene family[J]. *Plant Physiol Biochem*, 2017, 115: 360-371.
- [32] CHEN C, CHEN H, ZHANG Y, et al. TBtools: an integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data[J]. *Mol Plant*, 2020, 13(8): 1194-1202.
- [33] KUMAR S, STECHER G, LI M, et al. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms[J]. *Mol Biol Evol*, 2018, 35(6): 1547-1549.
- [34] BOLGER A M, LOHSE M, USADEL B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data[J]. *Bioinformatics*, 2014, 30(15): 2114-2120.
- [35] KIM D, LANGMEAD B, SALZBERG S L. HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements[J]. *Nat Methods*, 2015, 12(4): 357-360.
- [36] LI H, HANDSAKER B, WYSOKER A, et al. The sequence alignment/map format and SAMtools[J]. *Bioinformatics*, 2009, 25(16): 2078-2079.
- [37] RIECHMANN J L, HEARD J, MARTIN G, et al. *Arabidopsis* transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes[J]. *Science*, 2000, 290(5499): 2105-2110.
- [38] QU L J, ZHU Y X. Transcription factor families in *Arabidopsis*: major progress and outstanding issues for future research[J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2006, 9(5): 544-549.
- [39] LIU L, WHITE M J, MACRAE T H. Transcription factors and their genes in higher plants functional domains, evolution and regulation[J]. *Eur J Biochem*, 1999, 262(2): 247-257.
- [40] ZHANG Z, LI X, YU R, et al. Isolation, structural analysis, and expression characteristics of the maize *TIFY* gene family[J]. *Mol Genet Genomics*, 2015, 290(5): 1849-1858.

(责任编辑:石春林)