

引用:段文成,谭孝婷,李慧. 玉米 *ZmAOS* 基因家族的鉴定及生物信息学分析[J]. 聊城大学学报(自然科学版),2025,38(3): 444-455.

Citation:DUAN Wencheng,TAN Xiaoting,LI Hui. Identification and bioinformatics analysis of *ZmAOS* gene family in maize [J]. Journal of Liaocheng University (Natural Science Edition),2025,38(3):444-455.

文章编号 1672-6634(2025)03-0444-12

DOI 10.19728/j.issn1672-6634.2024100007

玉米 *ZmAOS* 基因家族的鉴定及生物信息学分析

段文成,谭孝婷,李慧

(济南大学 生物科学与技术学院,山东 济南 250022)

摘要 为了揭示玉米丙二烯氧化物合酶(*Allene Oxide Synthase*, AOS)的基因功能和机制,采用生物信息学方法在玉米基因组水平鉴定 AOS 家族成员,并通过实时荧光定量聚合酶链式反应对家族基因非生物胁迫表达水平进行分析。结果表明:在全基因组水平筛选鉴定出 7 个玉米 AOS 基因;染色体定位分析表明玉米 AOS 家族成员集中分布在 4 条染色体上;系统进化分析将 7 个玉米 AOS 基因分为 4 组进化分支,各组内基因结构和蛋白序列保守,但各组间差异较大,可能存在功能差异;顺式作用元件、逆境表达模式分析表明,玉米 AOS 可能参与玉米生长发育和逆境响应过程;互作蛋白预测结果显示玉米 AOS 可能通过与 LOX、AOC、HPL、OPR 等家族蛋白互作,进而参与茉莉酸通路,以调节植物生长发育,并在响应非生物胁迫中发挥作用。

关键词 玉米;AOS;基因家族;生物信息学;茉莉酸通路

中图分类号 S513

文献标志码 A

开放科学(资源服务)标识码(OSID)



Identification and bioinformatics analysis of *ZmAOS* gene family in maize

DUAN Wencheng,TAN Xiaoting,LI Hui

(School of Biological Science and Technology, University of Jinan, Jinan 250022,China)

Abstract In order to reveal the gene function and mechanism of *Allene Oxide Synthase* (AOS), bioinformatics methods were used to identify AOS family members at the maize genome level, and the expression level AOS genes were analyzed by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction under abiotic stress. Finally, seven maize AOS (named *ZmAOS*) genes were identified at the genome-wide level and distributed on four chromosomes. Furthermore, the seven *ZmAOS* genes were divided into four subgroups of evolutionary branches, and the gene structure and protein sequences were relatively conserved within each group, but there were large differences between groups, suggesting that there may be functional differences. Besides, the analysis of cis-acting elements and stress expression patterns showed that *ZmAOS* genes may be involved in maize growth, development and stress response. And the interaction protein prediction that *ZmAOS* may interact with LOX, AOC, HPL, OPR and so on, and then participate

收稿日期:2024-10-19

基金项目:国家自然科学基金项目(32272075)资助

通信作者:李慧,女,汉族,博士,教授,研究方向:作物遗传育种,E-mail:bio_lih@ujn.edu.cn。

in the jasmonic acid pathway to regulate plant growth and development, and respond to abiotic stress.

Keywords maize; Allene Oxide Synthase; gene family; bioinformatics; Jasmonic acid pathway

0 引言

茉莉酸(Jasmonic Acid, JA)是一种植物激素,广泛存在于植物体内,调节着植物的生长发育,并且对环境胁迫做出响应^[1]。玉米(*Zea mays* L.)的 AOS 基因家族主要在 JA 的合成中发挥作用^[2]。13-羟基过氧化物被 AOS 转化为 12,13-环氧-植物烯酸^[3]。AOS 在这一过程中起关键作用,其催化效率和表达水平直接影响 JA 的合成速率。

对植物进行盐处理后,拟南芥^[4]、番茄^[5]和马铃薯^[6]的内源 JA 含量增加。马铃薯胁迫的转录谱分析显示,在盐胁迫条件下,JA 水平显著升高,以应对盐胁迫的影响^[7]。在受到盐胁迫时,盐敏感植物的 JA 含量立即持续增加,而耐盐植物的 JA 含量变化不显著^[6]。已有研究发现,在刺槐中,外源添加 MeJA 后,其超氧化物歧化酶(Superoxide Dismutase, SOD)和抗坏血酸过氧化物酶(Ascorbate Peroxidase, APX)活性均升高,从而增强了刺槐的耐盐能力^[8]。Faghih 等人在草莓中也发现了相似的研究结果^[9]。这些证据表明,JA 可能通过增加植物内源激素水平和加强抗氧化系统来减轻盐胁迫的影响。

在双子叶和单子叶植物中,AOSs 都被进行了广泛地研究^[10],AOS 基因的数量在不同物种之间有所不同。例如,在拟南芥^[11]、亚麻^[12]和苜蓿^[13]中均分别报道了一个 AOS 基因。在大麦^[14]和番茄^[15]中报道了两个 AOS 基因,在马铃薯^[16]中报道了 3 个 AOS 基因。

温度、盐碱、干旱等逆境胁迫限制了野生植物和农作物的地理分布,成为制约生产力的主要因素。不同植物由于分子机制的不同,对寒冷、盐碱和干旱的耐受性也不相同。玉米是我国最主要的粮食作物,生产潜力大,经济效益高,但在生长发育过程中,逆境胁迫会严重影响玉米的产量和品质。因此,探究逆境相关基因的功能对提高玉米抗逆性具有重要意义。目前关于玉米 AOS 基因家族的研究报道较少,对玉米 AOS 家族基因的全基因组鉴定分析有助于进一步探索 AOS 家族参与生长发育和逆境胁迫响应的分子机制。本文对玉米 AOS 基因的系统发育关系、基因结构、保守基序、顺式元件、染色体分布等进行综合分析,并预测蛋白互作关系,为进一步探索玉米 AOS 基因的功能与调控机制提供理论支撑。

1 材料与方法

1.1 玉米 AOS 基因的鉴定及理化性质分析

玉米 AOS 基因家族成员的基因组、编码序列(CDS)和氨基酸序列数据均下载于 MaizeGDB 数据库(<https://maizegdb.org/>)^[17]。拟南芥 AOS 基因家族成员相关数据均下载于拟南芥信息资源(TAIR, <https://www.arabidopsis.org>)^[18]。水稻、小麦和高粱 AOS 基因家族成员相关数据均下载于植物比较基因组学 Phytozome 数据库(<https://p-hytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>)^[19]。

根据玉米 AOS 基因家族的保守结构域 PLN02648 序列,在 NCBI(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>)和 Phytozome 数据库中通过蛋白质 BLAST^[20]序列比对,搜索玉米 AOS 基因家族的候选蛋白序列,将置信度 E 值小于或等于 10^{-5} 的序列确定为最初的候选蛋白。然后利用 NCBI 的批量保守结构域搜索(Batch CD-Search)工具和 InterPro 数据库(<https://www.ebi.ac.uk/interpro>)^[21]分析候选蛋白序列的结构域,将包含 AOS 基因特有结构域的序列确定为最终的候选蛋白,以此鉴定出 AOS 家族基因成员。拟南芥、水稻、小麦和高粱的 AOS 基因家族成员也用此方法获取。

在植物基因组数据库 Ensembl Plants(<http://plants.ensembl.org/index.html>)^[22]中查找玉米 AOS 基因的内含子数量、编码氨基酸长度等。利用蛋白质分析软件(ExPASy, <https://web.expasy.org/prot-param/>)检索各蛋白的分子量(MW)、理论等电点(pI)和不稳定系数。在网站 Plant-PLoc2.0(<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/plant-multi/>)^[23]上预测玉米 AOS 蛋白的亚细胞定位。

1.2 AOSs 基因结构分析

在 Phytozome 数据库中检索 AOS 基因家族成员的内含子、外显子、非编码区(UTR)长度、起始位置及

终止位置,运用基因结构显示软件(GSDS2.0,http://gsds.gao-lab.org/)^[24]可视化 AOS 基因结构。

1.3 AOSs 基因家族的系统进化分析

利用 MEGA7 软件^[25]的最大似然法 (ML,maximum likelihood) 构建玉米、拟南芥、水稻、小麦和高粱 AOS 基因家族的系统进化树。其中,自展值 Bootstrap 设定为 1 000,位点覆盖截止值 Site Coverage Cutoff 设定为 95%。最后利用 TBtools 软件^[26]进行优化。在进行植物的基因家族系统发育分析时,通常情况下支持率大于 50%就可以被认为是可信的。

1.4 玉米 AOS 基因的染色体定位

利用 TBtools 软件从玉米 GFF 文件中提取出 AOS 候选基因的染色体位置信息以及玉米各染色体的长度信息,利用绘制基因图在线网站(MG2C,http://mg2c.iask.in/mg2c_v2.1/)^[27]对玉米 AOS 基因的染色体定位进行可视化,标示每个基因在染色体上面的位置,得到各个基因在染色体上的分布。

1.5 玉米 AOS 基因的启动子顺式作用元件分析

在 Phytozome 数据库获取玉米 AOS 基因家族各成员起始密码子上游 2 000 bp 脱氧核苷酸的启动子序列,使用植物顺式作用调节元件数据库 PlantCARE(https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/)^[28]对顺式作用元件进行预测和分析,并利用 TBtools 软件进行可视化。

1.6 AOSs 蛋白的保守基序和结构域分析

使用保守基序分析网站 MEME(https://meme-suite.org/meme/tools/meme)^[29],对 AOS 基因家族的蛋白质保守基序进行分析,保守基序个数设置为 10,再利用 TBtools 软件对 MEME 的分析结果进行可视化。

在 NCBI 的批量保守结构域搜索程序中输入玉米、拟南芥、水稻、小麦和高粱的 AOS 蛋白的氨基酸序列,然后鉴定出蛋白所含有的保守结构域,最后用 TBtools 软件进行可视化分析。

1.7 玉米 AOS 的基因克隆

取玉米自交系 B73 苗期叶片,采用 Trizol 法提取 RNA,并通过反转录得到 cDNA,实验方法见文献[30]。利用 Phytozome^[19]在线网站获得 ZmAOSs 的基因序列,并通过 Primer Premier 5.0 设计特异性引物,以 B73 的 cDNA 为模板进行基因克隆,引物序列详见表 1。

表 1 玉米 AOS 基因克隆所使用的引物
Tab. 1 Primers used for AOS gene cloning in maize

名称	引物序列(5'→3')	核苷酸产物序列长度/bp
ZmAOS1	F:ATGGCGAGCTCCGACCAT	1 449
	R:TTACTCGCTGCCCCGACC	
ZmAOS2	F:ATGGCGACCTCCGTTCGT	1 449
	R:TCACTCGCTGCCCCGACC	
ZmAOS3	F:ATGGCCACGGCGACCTAC	1 560
	R:TCAGAAGGTGGCTTTCTTGAGC	
ZmAOS4	F:ATGGCCACGGCGACCTAC	1 551
	R:TCAGAAGGTGGCTTTCTTGAGC	
ZmAOS5	F:ATGGCCACGGCGATTAC	1 536
	R:TCAGAAGGTGGCTTTCTTGAGC	
ZmAOS6	F:ATGGCATCGAAACGAGCCA	1 530
	R:TCAGGGCTTGACGCTGCTG	
ZmAOS7	F:ATGCTGCCGTCCTTCGTGT	1 509
	R:TCACTGCTGCGCTCCGGC	

1.8 ZmAOS1 互作蛋白预测分析

在功能性蛋白质关联网络 STRING(https://cn.string-db.org)^[31]网站预测 ZmAOS1 的互作蛋白,并

使用 Alphafold3(<https://alphafoldserver.com/>)^[32]预测了 *ZmAOSs* 的蛋白结构以及 *ZmAOS1* 与其互作蛋白的互作结构。

1.9 玉米 AOS 基因的表达式热图分析

在 MaiZeGDB 数据库上,使用 qTeller 功能,收集玉米 AOS 基因家族在对照、低温、高温、盐胁迫这四类条件下的 RNA-seq 值,利用 TBools 软件的 Graph-HeatMap 功能把收集的信息汇聚为热力图以反应出基因在胁迫条件下的表达水平。

1.10 玉米 AOS 基因在盐胁迫下的表达模式分析

本研究以玉米自交系 B73 为研究对象,取生长至两叶一心且长势一致的幼苗进行 200 mmol/L NaCl 处理,分别在 0、6、12、24、36、48 h 采集叶片,置于液氮速冻,后于 -80 °C 冰箱保存。每组进行 3 次重复实验,cDNA 获取方法同 1.7。

利用在线网站(<https://sg.idtdna.com/Scitools/A-ppllications/RealTimePCR/>)^[33]设计实时荧光定量 PCR 所需引物,详见表 2。以 TUB-核糖基化因子作为标准内参,使用 SYBR-Green 试剂在 Bio-Rad CFX Connect™ 上进行 RT-PCR 反应。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法^[34]进行计算,所有反应均重复三次。

表 2 实时荧光定量 PCR 所使用的引物

Tab. 2 Primers used in real-time PCR

名称	引物序列(5'→3')	核苷酸产物序列长度/bp
<i>ZmAOS1</i>	F:TCCGCTACGACACATTCAC	86
	R:GGAGGTAGCTTTCGTGACAC	
<i>ZmAOS2</i>	F:CTCCGTTCTGTGGTTTCAGTAG	126
	R:GACTCGAAGTACTTGTCTCTGG	
<i>ZmAOS3</i>	F:GACAAGACGGACCTGTTTAC	177
	R:GTACACCTCGCGGAACCTTG	
<i>ZmAOS4</i>	F:GACAAGACGGACCTGTTTAC	82
	R:GGTCGATGTACGAGAGCATG	
<i>ZmAOS5</i>	F:TGTGCTTCAACTCCTTCGG	148
	R:GCCTTCATAGTCACCTCGC	
<i>ZmAOS6</i>	F:CCTCCACAACCTCATCTTCC	85
	R:CGCAAGCCACTTCACGAC	
<i>ZmAOS7</i>	F:CTTCTCCGTGTTCTCTGCC	172
	R:CAGCATCTCGTACACCGTC	

2 结果与分析

2.1 玉米 AOS 基因的鉴定及理化性质分析

结合 NCBI 和 Phytozome 数据库的 BLAST 结果,以及蛋白结构域分析结果,最终确定 7 个 *ZmAOS* 基因家族成员,基因编号来源于 MaizeGDB 数据库。

进一步对 *ZmAOS* 基因家族成员进行理化性质分析(表 3)。结果显示:7 个玉米 AOS 基因编码蛋白序列长度为 482~519 aa;蛋白分子质量为 53.03~57.22 ku;等电点为 5.86~9.06,其中等电点大于 7 的成员有 5 个,小于 7 的成员有 2 个;不稳定系数(低于 40 说明在体外能够稳定存在)为 27.11~41.39,表明 *ZmAOS* 蛋白稳定性差异较大。亚细胞定位预测结果表明,*ZmAOS1*、*ZmAOS2*、*ZmAOS6* 和 *ZmAOS7* 定位于内质网,*ZmAOS3*、*ZmAOS4* 和 *ZmAOS5* 定位在叶绿体,而 JA 的前体物质 α -亚麻酸,正是在叶绿体中被催化,并通过一系列的氧化和还原反应被转运到过氧化物酶体^[35],这说明 *ZmAOS3*、*ZmAOS4* 和 *ZmAOS5* 很有可能参与这一过程。

表 3 *ZmAOS* 基因家族成员基本信息

Tab. 3 Basic information about members of the *ZmAOS* gene family

基因编号	基因名称	内含子数量/个	氨基酸数量/个	蛋白分子量/u	等电点	不稳定系数	亚细胞定位预测
<i>ZmAOS1</i>	<i>Zm00001d048021</i>	0	482	53 034.73	6.54	27.11	内质网
<i>ZmAOS2</i>	<i>Zm00001d028282</i>	0	482	53 052.88	7.65	31.75	内质网
<i>ZmAOS3</i>	<i>Zm00001d034186</i>	0	519	57 222.59	8.93	41.07	叶绿体
<i>ZmAOS4</i>	<i>Zm00001d034184</i>	0	516	56 936.27	8.93	38.82	叶绿体
<i>ZmAOS5</i>	<i>Zm00001d013185</i>	0	511	56 584.04	9.06	41.39	叶绿体
<i>ZmAOS6</i>	<i>Zm00001d053586</i>	0	509	55 881.03	8.76	41.24	内质网
<i>ZmAOS7</i>	<i>Zm00001d054067</i>	0	502	55 441.51	5.86	40.07	内质网

2.2 玉米 AOS 基因结构分析

对 *ZmAOS* 基因结构进行分析,结果如图 1 所示。*ZmAOS* 基因表现出相似的外显子长度,所有的 *ZmAOS* 基因均不含有内含子和非翻译区(UTR)结构,这说明,玉米 AOS 基因序列具有一定的保守性。

2.3 AOSs 基因家族的系统进化分析

为了研究 *ZmAOS* 的进化关系,利用玉米(7 个)、拟南芥(2 个)、水稻(5 个)、小麦(6 个)和高粱(4 个)共 24 个 AOS 蛋白序列构建系统进化树,如图 1 所示。根据进化树结果分为 4 组进化分支:第 1 组的 AOS 基因数量最多,包含 8 个 AOS 基因,占基因总数的 33.33%;第 2 组和第 3 组都包含 6 个 AOS 基因,各占基因总数的 25.00%;第 4 组的 AOS 基因数量最少,有 4 个,占基因总数的 16.67%。在系统发育分析中,拟南芥、水稻、小麦、高粱和玉米 AOS 基因之间的系统发育树存在结构相似性,在真菌^[36,37]和动物^[38]中,也同样如此,说明 AOS 基因具有一个保守的进化过程。

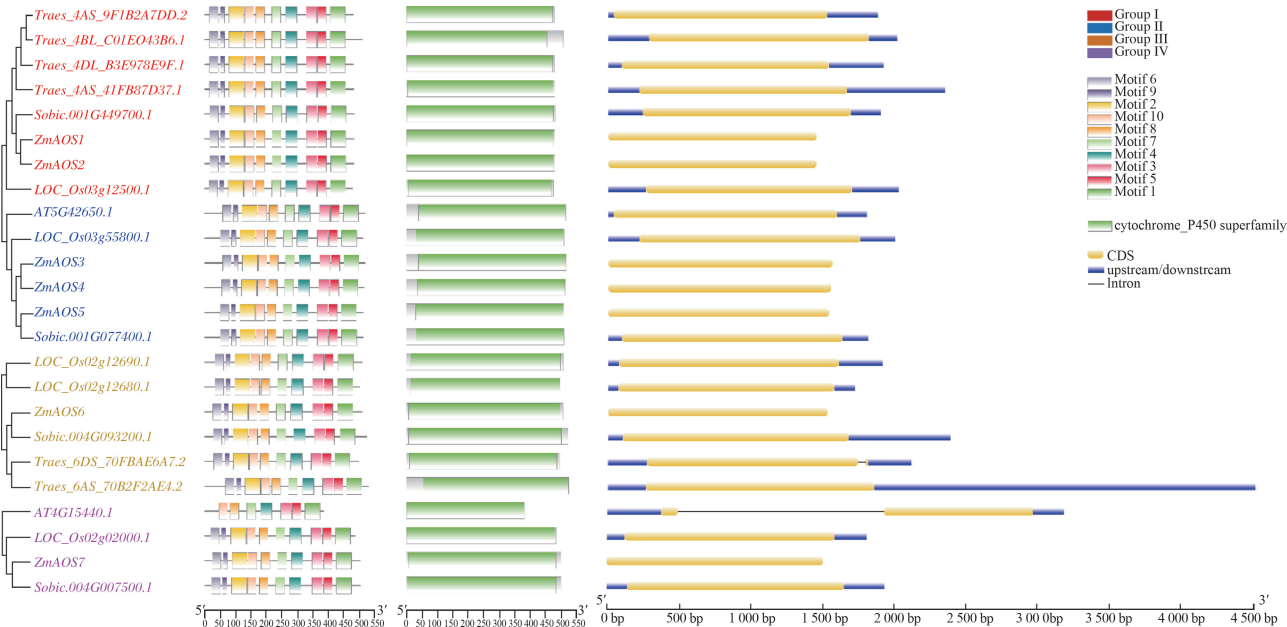


图 1 AOS 基因家族系统进化分析

Fig. 1 Phylogenetic analysis of AOS gene family

2.4 玉米 AOS 基因的染色体定位及位置分析

染色体定位分析结果见图 2,由图可知:7 个 *ZmAOS* 基因分布在 1,4,5 和 9 四条染色体上,其中 1 号染色体上基因分布最多,有 3 个。

2.5 玉米 AOS 基因的启动子顺式作用元件分析

为了进一步探索玉米 AOS 基因的功能和调控机制,对 7 个 *ZmAOS* 基因启动子区域进行顺式作用元件分析,结果如图 3 所示。在大多数 *ZmAOS* 基因启动子中发现了许多参与激素反应的顺式元件,包括脱落

酸响应元件(ABRE)、茉莉酸响应元件(TGACG-motif 和 CGTCA-motif)、水杨酸响应元件(TCA-element 和 SARE)、生长素响应元件(TGA-element 和 AuxRR-core)以及赤霉素响应元件(TATC-box、P-box 和 GARE-motif)。在 *ZmAOS* 基因启动子中还发现了一些被认为参与环境应激反应的顺式元件,如低温响应元件(LTR)、厌氧诱导响应元件(ARE)、防御和应激响应元件(富 AT 和富 TC 的重复序列)。例如,在 *ZmAOS1* 和 *ZmAOS3* 的启动子中发现了参与低温响应的元件,而在 *ZmAOS4* 和 *ZmAOS7* 的启动子中发现了防御和应激响应元件。此外,玉米 AOS 基因启动子中还有一些与植物生长发育相关的元件,如在 *ZmAOS3*、*ZmAOS4*、*ZmAOS5* 和 *ZmAOS6* 中均含有分生组织表达元件,这表明 *ZmAOS* 家族可能在分化过程中也发挥了作用;在 *ZmAOS2*、*ZmAOS5* 和 *ZmAOS6* 中发现了胚乳发育的元件;在 *ZmAOS2* 和 *ZmAOS7* 中发现了玉米醇溶蛋白代谢调控的元件,这些表明 *ZmAOS* 基因可能参与了生长发育过程。

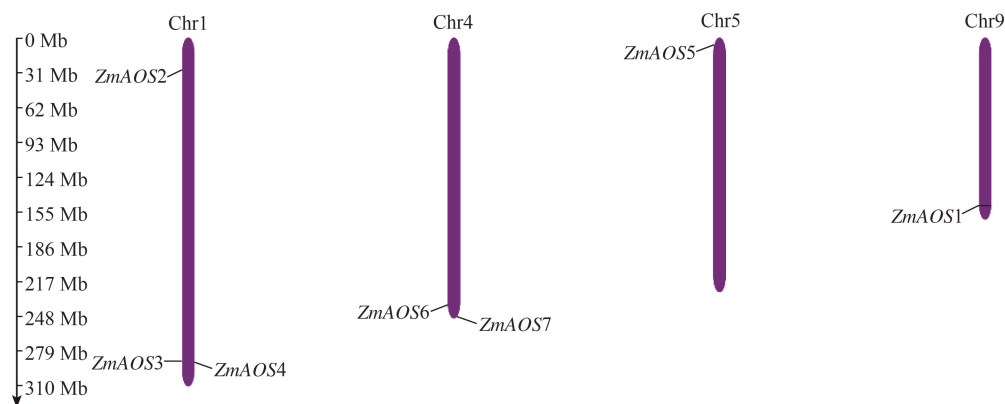


图 2 玉米 AOS 基因染色体定位分析

Fig. 2 Chromosomal localization analysis of AOS gene in maize

综上所述,这些基因的启动子区域存在诸多与植物生长发育、激素与环境胁迫响应有关的顺式作用元件,不同成员之间存在显著差异,表明 *ZmAOS* 家族基因功能强大且影响范围广,涉及植物的生长、发育、繁殖与响应环境信号等过程。

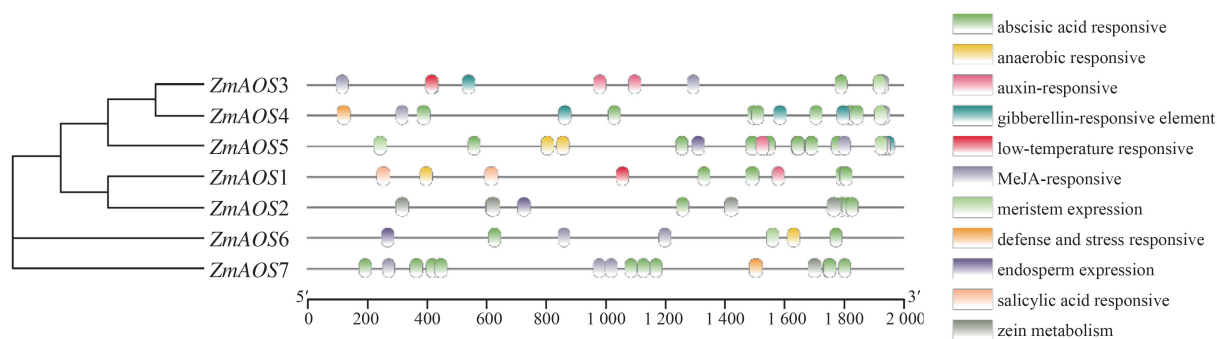


图 3 *ZmAOS* 基因启动子区顺式作用元件分析

Fig. 3 Analysis of cis-acting elements in the promoter region of *ZmAOS*

2.6 AOSs 蛋白的保守基序和结构域分析

为了进一步鉴定 AOS 蛋白保守性,利用 MEME 网站对玉米、拟南芥、水稻、小麦和高粱共 24 个 AOS 蛋白序列保守基序(motif)进行预测,共发现 10 个基序,结果见图 1,保守基序序列见表 4。分析发现,除了 At4G15440.1 外,AOS 蛋白在玉米、拟南芥、水稻、小麦和高粱中具有非常相似的保守基序,都包含 motif1-motif10,且 10 个 motif 的排列顺序基本一致,这说明 AOS 基因在不同物种间的进化是相对保守的,并且可能具有相似的机制和功能。

此外,利用 NCBI 对保守结构域分析,从图 1 可以看出,AOS 家族蛋白只含有 1 个细胞色素 P450 结构域。细胞色素 P450(P450,CYP)是含血红素蛋白的一个超大家族,可催化来自所有主要生命领域的生物体中大量结构不同的内源性和外源性化合物的各种氧化反应。它们的单加氧酶活性依赖于与 P450 血红素铁

结合的分子氧的还原裂解,以及在催化循环过程中将两个电子传递到血红素铁^[39]。这说明玉米 AOS 家族基因可能与血红素和铁离子结合,并且具有单加氧酶和氧化还原酶的活性。

2.7 玉米 AOS 的基因克隆

如图 4 所示,结果显示,在 1 500 bp 左右有且只有 1 条条带,该条带与 ZmAOSs 基因的 CDS 序列长度一致,因此,可能是所需要的目的基因片段。

表 4 玉米 AOS 蛋白保守基序序列
Tab. 4 Conserved motif sequence of maize AOS protein

基序序号	基序氨基酸序列
1	LLQYVYWSNGRETESPSVDNKQCPGKNLVVLVGRLLVAEMFLRYDTFTAD
2	KSFPVLFDMDKVEKKDLFTGTYMPSTSLTGGYRVCSYLDPSEPTHTKVQK
3	MPLVKSVVWEALRMNPPVEFQYGRARRDMVESH
4	GIAREEAVHNILFATCFNSFGGMKILFPSLVKWLGRAG
5	FQVKKGEMLFQYQPCATKDPRVFGDTAKE
6	VPGSYGMPFVSAIRDRLDFYFQGGQDKYF
7	PMVLEEPLLHTFHLPPFLVKGDYRALYKYF
8	DFNKLNDVTSFDFIGEAYFGVRPSATDLG
9	HGSTVVRLNMPPGPF
10	FSLLASRKDAVIPAFRSHFSSLLATVESQ

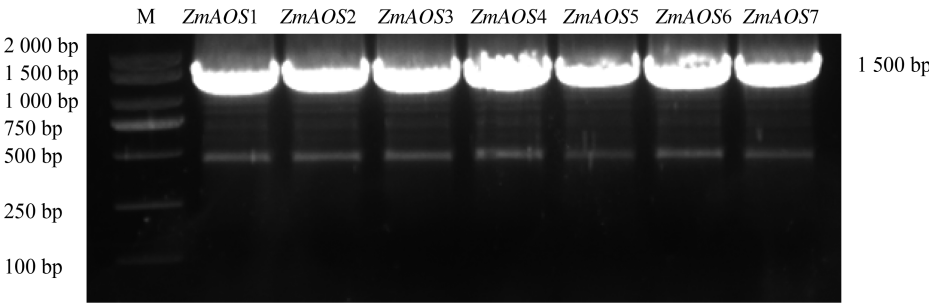


图 4 ZmAOSs 目的基因扩增
Fig. 4 Amplification of the target gene of ZmAOSs

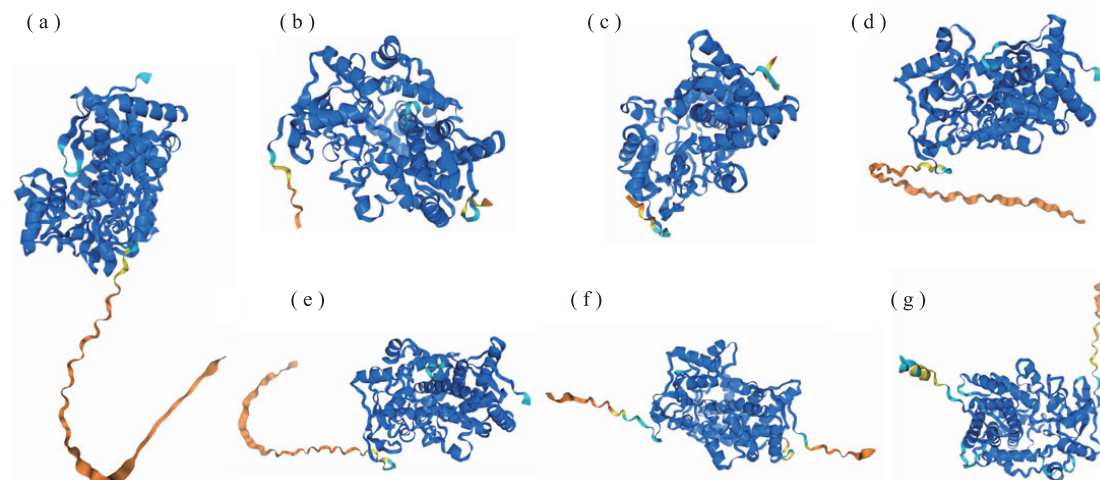
表 5 ZmAOS1 互作蛋白分析
Tab. 5 ZmAOS1 interacting protein analysis

互作基因	基因名称	基因描述	氨基酸长度/aa	互作系数	PTM
Zm00001d029594	ZmAOC1	环氧丙烷环化酶 1	238	0.968	0.81
Zm00001d047340	ZmAOC2	环氧丙烷环化酶 2	249	0.965	0.7
Zm00001d003533	ZmLOX8	脂氧合酶 8	941	0.923	0.6
Zm00001d054067	ZmHPL1	氢过氧化物裂解酶 1	477	0.909	0.52
Zm00001d053675	ZmLOX10	脂氧合酶 10	905	0.873	0.68
Zm00001d025524	ZmLOX7	脂氧合酶 7	929	0.836	0.63
Zm00001d027893	ZmLOX9	脂氧合酶 9	908	0.836	0.6
Zm00001d050107	ZmOPR8	12-氧代植物二烯酸还原酶 8	399	0.781	0.56
Zm00001d015852	ZmLOX11	脂氧合酶 11	911	0.76	0.65
Zm00001d031449	ZmLOX13	脂氧合酶 13	956	0.736	0.63

2.8 ZmAOS1 互作蛋白预测分析

为了进一步分析玉米 AOS 基因的作用机制,使用 STRING 数据库预测了 ZmAOS1 的互作蛋白,结果如表 5 所示。表中的互作蛋白信息显示,ZmAOS1 与脂氧合酶(Lipoxygenases, LOX)、环氧丙烷环化酶

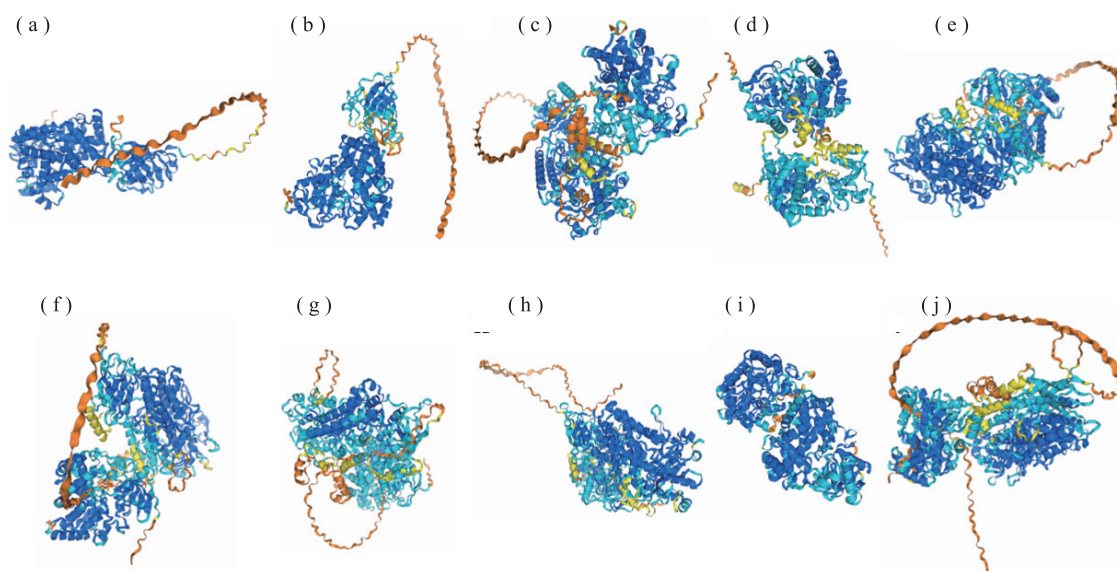
(Allene oxide cyclase, AOC)、氢过氧化物裂解酶(Hydroperoxide lyase, HPL)和 12-氧代植物二烯酸还原酶(12-oxo-phytodienoic acid reductase, OPR)等存在相互作用,这些基因主要参与茉莉酸的合成过程,这表明 *ZmAOS1* 很有可能通过参与茉莉酸通路,以调节植物生长发育,进而在响应非生物胁迫中发挥作用。此外,AlphaFold3 的预测结果显示, *ZmAOS1* 与其互作蛋白的预测模板建模 pTM 分值皆高于 0.5,这说明复合物的整体预测折叠可能与真实结构相似^[40],具体的互作结构如图 6 所示。



注:(a~g)图 A-G 分别是 *ZmAOS4*、*ZmAOS1*、*ZmAOS2*、*ZmAOS3*、*ZmAOS5*、*ZmAOS6* 和 *ZmAOS7* 的蛋白结构预测。

图 5 *ZmAOSs* 蛋白结构预测

Fig. 5 *ZmAOSs* protein structure prediction



注:(a~j)图 A-J 分别是 *ZmAOS1* 与 *ZmAOC1*、*ZmAOC2*、*ZmLOX8*、*ZmHPL1*、*ZmLOX10*、*ZmLOX7*、*ZmLOX9*、*ZmLOX11*、*ZmOPR8* 和 *ZmLOX13* 的互作结构。

图 6 *ZmAOS1* 与其互作蛋白的结构预测

Fig. 6 Structural prediction of *ZmAOS1* and its interacting proteins

2.9 玉米 AOS 基因的表达热图分析

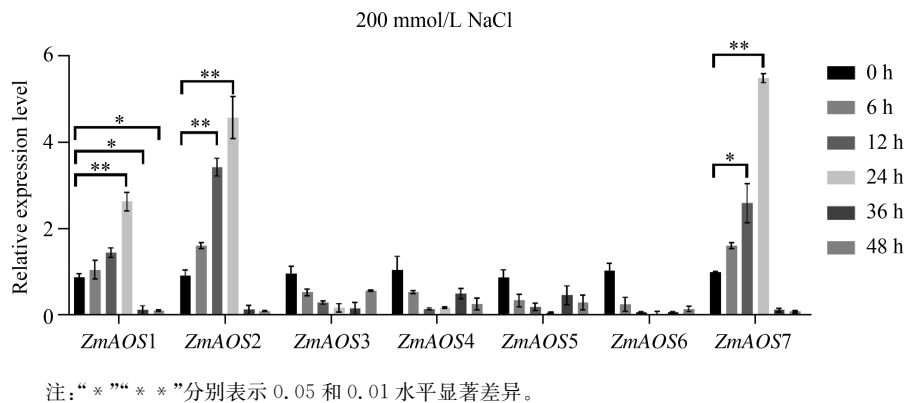
在 MaiZeGDB 数据库中,使用 qTeller 功能,收集玉米 AOS 基因家族在对照、低温、高温、盐胁迫这四类条件下的 RNA-seq 值,利用 TBtools 的 Graph-HeatMap 功能把收集的信息汇聚为热力图以反应出基因在胁迫条件下的水平,结果如图 7 所示。在表达谱中,对照条件下的玉米 AOS 基因表达量普遍较低,这意味着正常生长条件下,这些基因在未受到任何胁迫的诱导时,基础表达水平较低。

ZmAOS7 在冷胁迫条件下,表达被显著诱导,同时 *ZmAOS1* 也呈现明显上调的趋势,表明这些基因可能在植物对低温的应答中扮演着重要的角色;*ZmAOS1* 在热胁迫条件下,表达量升高,说明其也参与了热胁迫应答,但相比冷胁迫,*ZmAOS1* 在热胁迫下的表达上调程度相对较低;*ZmAOS1*、*ZmAOS2* 和 *ZmAOS7* 在盐胁迫条件下,表达均有上调,尤其是 *ZmAOS1*,表达被显著诱导,这表明这些基因在盐胁迫应答中也发挥了重要作用,可能帮助植物调节离子平衡和渗透压。

综上所述,*ZmAOS1* 在不同胁迫条件下的表达变化揭示了其在植物胁迫应答中的多功能性,特别是在低温和盐胁迫应答中发挥了重要作用。

2.10 玉米 AOS 基因在盐胁迫下的表达模式分析

为了验证 *ZmAOS* 在玉米响应盐胁迫中潜在的功能,对玉米自交系 B73 进行了渗透诱导,结果如图 8 所示。与盐处理 0 h 对照组相比,随着处理时间的延长,*ZmAOS1*、*ZmAOS2* 和 *ZmAOS7* 的表达量均呈现上调趋势,且在处理 24 h 后,基因的表达量达到峰值,其中 *ZmAOS7* 在胁迫处理 24 h 后表达量相对于野生型增加了 4 倍,其次是 *ZmAOS2* 增加了 3 倍,最后是 *ZmAOS1* 增加了 2 倍,随后表达量均降低,而 *ZmAOS3*、*ZmAOS4*、*ZmAOS5* 和 *ZmAOS6* 并不响应盐胁迫诱导,这与 2.8 的结果基本一致,这表明 *ZmAOS* 基因可能在玉米应对盐胁迫的反应中发挥作用。



注:“*”“**”分别表示 0.05 和 0.01 水平显著差异。

图 8 玉米 AOS 响应盐胁迫的表达模式

Fig. 8 Expression patterns of AOS in maize in response to salt stress

3 讨论

本研究通过对玉米 AOS 在 NaCl 胁迫下的表达模式进行分析,发现 *ZmAOS1*、*ZmAOS2* 和 *ZmAOS7* 均呈现先上调后下调的表达趋势,结果表明玉米 AOS 明显响应了盐胁迫。此外,水曲柳 *FmAOS* 在盐处理下的表达量不断升高,并在 12 h 时达到高峰;干旱胁迫下,该基因的表达量在处理 6 h 后到达峰值,随后呈现降低的趋势^[41]。在盐处理 12 h 后,白木香 *AsAOS* 的表达量同样最高,而干旱处理对 *AsAOS* 的表达量几乎没有影响^[42]。在甘蔗中,盐处理 24 h 和 PEG 处理 12 h, *ScAOS* 的表达量均达到最大值,且表达量分别是对照的 34.73 和 25.22 倍^[43]。唐古特白刺 *NtAOS* 在茉莉酸和脱落酸处理 24 h 内,该基因的表达量随处理时间的延长而降低^[44]。曹晏彬等人^[45]所克隆到的苹果 *MdAOS* 在 MeJA 和 ABA 处理的同一时期内均表现出先升高,后降低,最后再升高的趋势。综上所述,*ZmAOS* 基因很有可能是通过茉莉酸途径来应答逆境,这也就解释了为何 *ZmAOS* 在胁迫诱导初期能够迅速表达。但关于玉米 AOS 基因是否具有应对其他生物胁迫以及非生物胁迫的作用,以及其他激素对茉莉酸信号通路和茉莉酸合成途径中关键酶的调控机制仍有

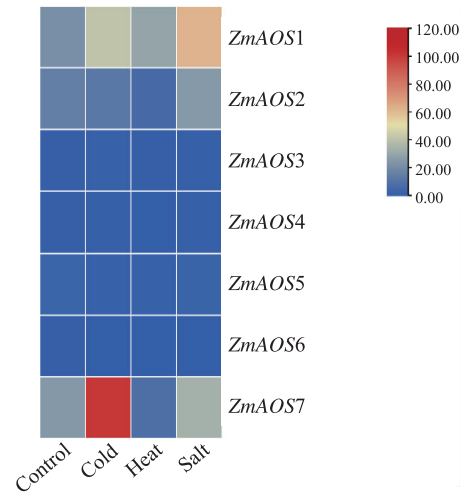


图 7 *ZmAOS* 基因表达热力图

Fig. 7 *ZmAOS* gene expression heat map

待研究。

此外,玉米 AOS 基因的启动子顺式作用元件分析结果表明,*ZmAOS* 家族基因可能在植物的生长、发育、繁殖与响应环境信号等过程中发挥功能。已有研究表明,在番茄中,茉莉酸途径的活性对雌性和雄性的生殖功能都是必要的。在雄性发育方面,茉莉酸可以抑制乙烯的合成,从而防止雄蕊的过早干燥^[46]。在拟南芥中,茉莉酸合成或信号传导的缺陷会影响雄蕊丝的伸长、花粉的活力及其裂解过程。值得注意的是,在雄性不育的 *COI1* 突变体中,通过恢复花药和雄蕊丝表皮内 *COI1* 基因的表达,上述发育缺陷事件得以恢复。这表明,表皮中产生的 JA 依赖性细胞间信号协调了与花粉发育和释放相关的主要事件^[47]。重要的是,茉莉酸类物质也充当受伤营养组织中的发育信号。在拟南芥叶片外植体中,损伤会诱导 JA 依赖的乙烯反应因子 109(*ERF109*)的表达,从而增强生长素的合成,进而驱动根的生长^[48]。在根系中,Zhou 等^[49]研究表明,线虫攻击以及土壤渗透能激活 JA 通路以增加 *ERF109* 的表达。这反过来又激活了 *ERF115* 的表达,从而促进根干细胞的再生。这些研究为 AOS 衍生的信号分子如何与乙烯在植物发育中共同发挥作用提供了良好的示例。本研究得到的分析结果中也初步说明了 AOS 在玉米生长发育方面的作用,但后续还需进行组织表达模式分析,用以深入阐述其作用机制。

4 结论

在全基因组水平共鉴定了 7 个玉米 AOS 基因,并对其序列长度、分子量、等电点、亚细胞定位等基本信息进行分析,得到主要结论:(1) 玉米 AOS 基因家族成员集中分布在 4 条染色体上,其中 1 号染色体上基因分布最多,包含 3 个成员。(2) 系统进化将 7 个玉米 AOS 基因分为 4 组进化分支,且各组内基因结构和蛋白序列保守。(3) 不同玉米 AOS 基因启动子区域包含不同数量和种类的顺式作用元件,这表明 *ZmAOS* 家族可能参与植物生长发育并且响应植物的非生物胁迫,这也与诱导表达结果一致。(4) 根据互作蛋白推测 *ZmAOS1* 很有可能通过参与茉莉酸通路,以调节植物生长发育,并在响应非生物胁迫中发挥作用。

综上所述,本研究对玉米 AOS 基因进行了生物信息学分析并初步探讨了该基因对外界盐胁迫下的响应机制。但 *ZmAOS* 在玉米生长发育及逆境应答中的功能尚不清楚。本研究不仅可以为深入探索 *ZmAOS* 的逆境响应机制及功能鉴定奠定理论基础,还可为玉米抗逆基因的发掘及抗性改良育种提供新的思路。

参 考 文 献

- [1] NURUZZAMAN M, SHARONI A M, KIKUCHI S. Roles of NAC transcription factors in the regulation of biotic and abiotic stress responses in plants[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2013, 4: 1-16.
- [2] ALI M S, BAEK K H. Jasmonic acid signaling pathway in response to abiotic stresses in plants[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(2):621-628.
- [3] DUMIN W, ROSTAS M, WINEFIELD C. Identification and functional characterisation of an allene oxide synthase from grapevine[J]. *Molecular Biology Reports*, 2018, 45(3): 263-277.
- [4] ELLLOUZI H, BEN HAMED K, CELA J, et al. Increased sensitivity to salt stress in tocopherol-deficient *Arabidopsis* mutants growing in a hydroponic system[J]. *Plant Signaling & Behavior. Behav*, 2013, 8: 1-13.
- [5] PEDRANZANI H, RACAGNI G, ALEMANO S, et al. Salt tolerant tomato plants show increased levels of jasmonic acid[J]. *Plant Growth Regulation*, 2003, 41: 149-158.
- [6] DE DOMENICO S, TAURINO M, GALLO A, et al. Oxylin dynamics in *Medicago truncatula* in response to salt and wounding stresses[J]. *Physiologia Plantarum*, 2019, 165: 198-208.
- [7] ZHANG H, ZHANG Q, ZHAI H, et al. Transcript profile analysis reveals important roles of jasmonic acid signalling pathway in the response of sweet potato to salt stress[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 1-12.
- [8] JIANG M Q, XU F L, PENG M, et al. Methyl jasmonate regulated diploid and tetraploid black locust (*Robinia pseudoacacia* L.) tolerance to salt stress[J]. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2016, 38: 1-13.
- [9] FAGHIH S, GHOBADI C, ZAREI A. Response of Strawberry plant cv. 'Camarosa' to salicylic acid and methyl jasmonate application under salt stress condition[J]. *Journal of Plant Growth Regulation*, 2017, 36: 651-659.
- [10] MOSBLECH A, FEUSSNER I, HEILMANN I. Oxylin: structurally diverse metabolites from fatty acid oxidation[J]. *Plant Physiol-*

- ogy and Biochemistry, 2009, 47(6):511-517.
- [11] LAUDERT D, PFANNSCHMIDT U, LOTTSCHEICH F, et al. Cloning, molecular and functional characterization of Arabidopsis thaliana allene oxide synthase (CYP 74)[J]. Plant Molecular Biology, 1996, 31(2): 323-335.
- [12] HARMS K, ATZORN R, BRASH A, et al. Expression of a flax allene oxide synthase cDNA leads to increased endogenous jasmonic acid (JA) levels in transgenic potato plants but not to a corresponding activation[J]. Plant Cell, 1995, 7(10): 1645-1654.
- [13] HUGHES R K, BELFIELD E J, CASEY R. CYP74C3 and CYP74A1, plant cytochrome P450 enzymes whose activity is regulated by detergent micelle association, and proposed new rules for the classification[J]. Biochemical Society Transactions, 2006, 34(Pt 6): 1223-1227.
- [14] MAUCHER H, HAUSE B, FEUSSNER I, et al. Allene oxide synthases of barley (*Hordeum vulgare* cv. Salome): tissue specific regulation in seedling development[J]. The Plant Journal, 2000, 21(2): 199-213.
- [15] SIVASANKAR S, SHELDRIK B, ROTHSTEIN S J. Expression of allene oxide synthase determines defense gene activation in tomato [J]. Plant Physiology, 2000, 122(4): 1335-1342.
- [16] STUMPE M, GÖBEL C, DEMCHENKO K, et al. Identification of an allene oxide synthase (CYP74C) that leads to formation of alpha-ketols from 9-hydroperoxides of linoleic and linolenic acid in below-ground organs of potato[J]. The Plant Journal, 2006, 47(6): 883-896.
- [17] WOODHOUSE M R, CANNON E K, PORTWOOD J L, et al. A pan-genomic approach to genome databases using maize as a model system[J]. BMC Plant Biology, 2021, 21(1): 385-391.
- [18] BERARDINI T Z, REISER L, LI D H, et al. The Arabidopsis information resource: making and mining the “gold standard” annotated reference plant genome[J]. genome, 2015, 53(8): 477-485.
- [19] GOODSTEIN D M, SHU S Q, HOWSON R, et al. Phytozome: a comparative platform for green plant genomics[J]. Nucleic Acids Research, 2012, 40(D1): D1178-D1186.
- [20] ALTSCHUL S F, GISH W, MILLER W, et al. Basic local alignment search tool[J]. Journal of Molecular Biology, 1990, 215(3): 403-410.
- [21] PAYSAN-LAFOSSE T, BLUM M, CHUGURANSKY S, et al. InterPro in 2022[J]. Nucleic Acids Research, 2023, 51(D1): D418-D427.
- [22] YATES A D, ALLEN J, AMODE R M, et al. Ensembl Genomes 2022: an expanding genome resource for non-vertebrates[J]. Nucleic Acids Research, 2022, 50(D1): D996-D1003.
- [23] CHOU K C, SHEN H B. Plant-mPLoc: a top-down strategy to augment the power for predicting plant protein subcellular localization [J]. PLoS One, 2010, 5(6): e11335.
- [24] HU B, JIN J P, GUO A Y, et al. GSDB 2.0: an upgraded gene feature visualization server[J]. Bioinformatics, 2015, 31(8): 1296-1297.
- [25] KUMAR S, STECHER G, LI M, et al. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing Platforms Free[J]. Molecular Biology and Evolution, 2018, 35(6): 1547-1549.
- [26] CHEN C J, CHEN H, ZHANG Y, et al. TBtools: an integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data[J]. Molecular Plant, 2020, 13(8): 1194-1202.
- [27] CHAO J T, LI Z Y, SUN Y H, et al. MG2C: a user-friendly online tool for drawing genetic maps[J]. Molecular Horticulture, 2021, 1(1): 16-21.
- [28] LESCOT M, DÉHAIS P, THIJS G, et al. PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences[J]. Nucleic Acids Research, 2002, 30(1): 325-327.
- [29] BAILEY T L, ELKAN C. Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymers[J]. Proceedings. International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology, 1994, 2: 28-36.
- [30] 刘超. 玉米分生组织发育中受体蛋白 FEA3 介导的信号通路及下游信号分子的鉴定[D]. 济南: 山东大学, 2022.
- [31] SZKLARCZYK D, KIRSCH R, KOUTROULI M, et al. The STRING database in 2023: protein-protein association networks and functional enrichment analyses for any sequenced genome of interest[J]. Nucleic Acids Research, 2023, 51(D1): D638-D646.
- [32] HE X H, LI J R, SHEN S Y, et al. AlphaFold3 versus experimental structures: assessment of the accuracy in ligand-bound G protein-coupled receptors[J]. Acta Pharmacologica Sinica, 2024, 6: 01429.
- [33] Owczarzy R, Tataurov A V, Wu Y H, et al. IDT SciTools: a suite for analysis and design of nucleic acid oligomers[J]. Nucleic Acids Research, 2008, 36(Web Server issue): W163-W169.
- [34] SHI L, ZHANG X B, SHI Y F, et al. OsCDC48/48E complex is required for plant survival in rice (*Oryza sativa* L.)[J]. Plant Molecular Biology, 2019, 100(1): 163.
- [35] XUE X S, LI R Q, ZHANG C J, et al. Identification and characterization of jasmonic acid biosynthetic genes in *Salvia miltiorrhiza* Bunge [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(16): 9384.

- [36] SOOMAN L, OLIW E H. Discovery of a novel linoleate dioxygenase of fusarium oxysporum and linoleate diol synthase of Colletotrichum graminicola[J]. Lipids, 2015, 50(12): 1243-1252.
- [37] OLIW E H. Linoleate diol synthase related enzymes of the human pathogens histoplasma capsulatum and blastomyces dermatitidis[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2020, 696: 108669.
- [38] TOPORKOVA Y Y, SMIRNOVA E O, LANTSOVA N V, et al. Detection of the first epoxyalcohol synthase/allene oxide synthase (CYP74 Clan) in the Lancelet (Branchiostoma belcheri, Chordata)[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(9): 4737.
- [39] GUENGERICH F P, WATERMAN M R, EGLI M. Recent structural insights into cytochrome P450 function[J]. Trends in Pharmacological Sciences, 2016, 37(8): 625-640.
- [40] XU J R, ZHANG Y. How significant is a protein structure similarity with TM-score=0.5[J]. Bioinformatics, 2010, 26(7): 889-895.
- [41] 刘春浩, 梁楠松, 于磊, 等. 水曲柳丙二烯氧化物合成酶基因 FmAOS 序列与表达模式分析[J]. 植物生理学报, 2018, 54(5): 855-862.
- [42] 冯莹莹, 张钟秀, 董先娟, 等. 白木香丙二烯氧化物合成酶基因的表达分析[J]. 药学报, 2017, 52(12): 1962-1969.
- [43] 陈丽兰, 王亚如, 郭燕芳, 等. 甘蔗丙二烯氧化物合成酶 ScAOS 的克隆与表达分析[J]. 分子植物育种, 2021, 19(11): 3549-3558.
- [44] 王燕. 唐古特白刺茉莉酸合成途径关键酶基因 NtAOC 和 NtAOS 的克隆及功能分析[D]. 呼和浩特: 内蒙古大学, 2017.
- [45] 曹晏彬, 柏素花, 戴洪义. 苹果丙二烯氧化物合成酶 MdAOS 的克隆和表达分析[J]. 基因组学与应用生物学, 2014, 33(2): 273-281.
- [46] DOBRITZSCH S, WEYHE M, SCHUBERT R, et al. Dissection of jasmonate functions in tomato stamen development by transcriptome and metabolome analyses[J]. BMC Biology, 2015, 13: 28.
- [47] JEWELL J B, BROWSE J. Epidermal jasmonate perception is sufficient for all aspects of jasmonate-mediated male fertility in Arabidopsis[J]. The Plant Journal, 2016, 85(5): 634-647.
- [48] ZHANG G F, ZHAO F, CHEN L Q, et al. Jasmonate-mediated wound signalling promotes plant regeneration[J]. Nature Plants, 2019, 5(5): 491-497.
- [49] ZHOU W K, LOZANO-TORRES J L, BLILOU I, et al. A jasmonate signaling network activates root stem cells and promotes regeneration[J]. Cell, 2019, 177(4): 942-956.

(责任编辑:刘庆松)

(上接第 437 页)

- [36] VOSS U, HOLZMANN R, HOBSON A, et al. Induction of self awareness in dreams through frontal low current stimulation of gamma activity[J]. Nature Neuroscience, 2014, 17(6): 810-812.
- [37] DATRI A, GORGONI M, TORRIGLIA I G, et al. 30 Hz transcranial alternating current stimulation on frontal cortex blocks the spontaneous sleepiness associated with resting state with eyes closed[J]. Journal of Sleep Research, 2016, 25(Suppl. 1): 143-143.
- [38] NELSON J T, MCKINLEY R A, GOLOB E J, et al. Enhancing vigilance in operators with prefrontal cortex transcranial direct current stimulation (tDCS)[J]. Neuroimage, 2014, 85: 909-917.
- [39] ALFONSI V, DATRI A, SCARPELLI S, et al. The effects of bifrontal anodal transcranial direct current stimulation (tDCS) on sleepiness and vigilance in partially sleep-deprived subjects: a multidimensional study[J]. Journal of Sleep Research, 2023, 32(4): e13869.
- [40] WHITE L K, MAKHOUL W, TEFERI M, et al. The role of dlPFC laterality in the expression and regulation of anxiety[J]. Neuropsychopharmacology, 2022, 224: 109355.
- [41] SALEHINEJAD M A, GHANAFAI E, ROSTAMI R, et al. Cognitive control dysfunction in emotion dysregulation and psychopathology of major depression (MD)[J]. Journal of Affective Disorders, 2017, 210: 241-248.
- [42] GUJAR N, YOO S S, HU P, et al. Sleep deprivation amplifies reactivity of brain reward networks, biasing the appraisal of positive emotional experiences[J]. Journal of Neuroscience, 2011, 31(12): 4466-4474.
- [43] FASIELLO E, GORGONI M, SCARPELLI S, et al. Functional connectivity changes in insomnia disorder: a systematic review[J]. Sleep Medicine Reviews, 2022, 61: 101569.
- [44] GUO D L, LI J Y, ZHANG Y, et al. Transcranial direct current stimulation reconstructs diminished thalamocortical connectivity during prolonged resting wakefulness: a resting-state fMRI pilot study[J]. Brain Imaging and Behavior, 2020, 14(1): 278-288.
- [45] RUTTORF M, KRISTENSEN S, SCHAD L R, et al. Transcranial direct current stimulation alters functional network structure in humans: a graph theoretical analysis[J]. IEEE Transactions on Medical Imaging, 2019, 38(12): 2829-2837.
- [46] SPOONER R K, EASTMAN J A, REZICH M T, et al. HD-tDCS dissociates fronto-visual theta lateralization during visual selective attention[J]. Journal of physiology, 2020, 598(5): 987.
- [47] JONES A P, BRYANT N B, ROBERT B M, et al. Closed-loop tACS delivered during slow-wave sleep reduces retroactive interference on a paired-associates learning task[J]. Brain Sciences, 2023, 13(3): 468.

(责任编辑:刘庆松)