

引用格式:

刘泓畅, 马恩慧, 王翠玲, 张严玲, 陈钰姝, 刘青青. 玉米 MADS-box 基因家族的鉴定及表达模式分析[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2024, 50(6): 10–21.

LIU H C, MA E H, WANG C L, ZHANG Y L, CHEN Y S, LIU Q Q. Identification of MADS-box gene family in maize and their expression pattern analysis[J]. Journal of Hunan Agricultural University(Natural Sciences), 2024, 50(6): 10–21.

投稿网址: <http://xb.hunau.edu.cn>



玉米 MADS-box 基因家族的鉴定及表达模式分析

刘泓畅, 马恩慧, 王翠玲, 张严玲, 陈钰姝, 刘青青*

(河南科技大学农学院, 河南 洛阳 471000)

摘要: 利用生物信息学方法对玉米(*Zea mays*)骨干自交系黄早四及玉米自交系 B73 全基因组中的 MADS-box 基因家族成员进行鉴定并依据转录组数据分析其表达模式。结果显示: 黄早四基因组中有 87 个 MADS-box 家族成员, B73 基因组中该家族成员有 84 个; 2 个自交系间的 MADS-box 成员共存在 113 个共线基因对, 表明 MADS-box 家族在 2 个自交系间进化较为保守; 在花粉粒和双核雄性配子体组织中显著表达的 MADS-box 家族成员数量最少, 穗原基中显著表达的成员数量最多; 非生物胁迫下, 在冷、热、紫外线逆境胁迫处理下, 相比于对照组, MADS-box 家族成员中多为下调表达, 而在盐、干旱、干旱及盐复合逆境胁迫下多为上调表达, 提示 MADS-box 家族成员通过不同的调节方式和途径参与玉米生长发育和逆境胁迫响应。

关键词: 玉米; 黄早四; MADS-box 基因家族; 全基因组鉴定

中图分类号: S571

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2024)06-0010-12

Identification of MADS-box gene family in maize and their expression pattern analysis

LIU Hongchang, MA Enhui, WANG Cuiling, ZHANG Yanling, CHEN Yushu, LIU Qingqing*

(College of Agriculture, Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan, 471000, China)

Abstract: In this study, we used bioinformatics method to identify MADS-box family members in the whole genome of maize(*Zea mays*) backbone inbred line Huangzaosi and maize inbred line B73, and then analyzed their expression patterns based on the transcriptome data. The results showed that 87 members of MADS-box gene family were identified in the genome of Huangzaosi, and 84 members were identified in the genome of B73. 113 homologous gene pairs were found among the members of MADS-box gene family between the two inbred lines, indicating the MADS-box gene family were evolutionarily conservative between the two inbred lines. The MADS-box genes expressed the least in microspore and bicellular male gametophyte, while the most in the tassel primordia tissue. Compared to the control, the expression analysis of under abiotic stress showed that the MADS-box genes were almost down-regulated under cold, heat, and UV stress, while most of the MADS-box genes were up-regulated under salt, drought stress or the combined stress of drought and salt. The analysis results of expression pattern suggested that members of MADS-box gene family were involved in the development and the response to abiotic stress in maize through different regulatory ways.

Keywords: *Zea mays*; Huangzaosi; MADS-box gene family; genome-wide identification

收稿日期: 2024-04-09

修回日期: 2024-11-20

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目(31901561); 2023 年国家级大学生创新创业训练计划项目(202310464090); 河南省重点研发与推广专项(222102110002)

作者简介: 刘泓畅(1998—), 女, 黑龙江拜泉人, 硕士研究生, 主要从事玉米抗病遗传研究, 2582426473@qq.com; *通信作者, 刘青青, 博士, 讲师, 主要从事作物分子遗传学、作物抗病遗传研究, 9905683@haust.edu.cn

MADS-box 基因家族广泛存在于植物中且数量众多,参与植物花器官发育、果实成熟等生长发育调控以及植物对生物和非生物胁迫的逆境应答途径。酵母细胞中参与细胞生长的基因 *MCMI*、对拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)花器官生长特征起决定作用的基因 *AG*、参与调控金鱼草花(*Antirrhinum majus*)生长发育的基因 *DEF* 以及调控细胞增殖、分化、生长等多种重要生命活动的基因 *SRF* 这 4 种基因的首字母组成 MADS^[1-3]。序列分析表明, MADS 蛋白 N 端的 50~60 个氨基酸组成 1 个 MADS 盒的结构域,高度保守^[4],称为 MADS-box^[5]。MADS-box 按照有无 K-box 结构域区分为 TypeI 和 TypeII 2 类,其中, TypeI 型包括典型且保守的 SRF-like MADS 结构域和 C 端可变结构域^[6],根据结构域间的序列差异可将 TypeI 型细分为 M α 、M β 、M γ 、M δ 4 个亚族^[7]; TypeII 型包含 M 结构域(MEF2-like MADS-box)、I 结构域(Intervening)、K 结构域(Keratin-like)以及 C 端可变结构域;因此, TypeII 型又称为 MIKC 型,依据 I、K 结构域的氨基酸序列差异将其进一步分为 MIKC^C 和 MIKC* 2 个亚族^[8]。

MADS-box 几乎存在于所有植物中,从苔藓(*Bryophyta*)等低等植物到水稻(*Oryza sativa*)等被子植物中均有报道^[9-10]。其中,在苔藓中鉴定出了 29 个 MADS-box 家族基因^[11],在拟南芥、小麦(*Triticum aestivum*)和水稻中分别鉴定出 107、180、75 个^[12-14]。植物中 MADS-box 基因家族成员数目众多,显示其在植物中发挥重要生物功能^[15]。玉米(*Zea mays*)已成为中国产量最大的粮食作物,对中国粮食安全与保障具有重要作用。黄早四作为中国重要的玉米种质资源之一,具有优良的农艺性状和极高的育种价值,是遗传育种与功能基因组学的重要研究材料^[16-17]。玉米在整个生长发育过程中受到外界多种因素的影响,干扰玉米的正常生长发育,严重影响玉米产量。因此,挖掘玉米中抗胁迫因子一直是玉米研究领域的热点。MADS-box 家族蛋白广泛参与植物的抗逆胁迫响应,且在生长发育中参与多种代谢调控途径^[18]。水稻中 *OsMADS23* 通过调控脱落酸生物合成增强水稻耐旱、耐盐表现^[19];拟南芥中的 MADS-box 家族基因 *AGL16*、*AGL21* 分别在干旱逆境胁迫、种子萌发中发挥负调控作用^[20-21]; *SiMADS51* 在谷子(*Setaria italica*)中作为负调控因子

参与耐旱调控网络^[5]。在玉米中亦有多多个 MADS-box 家族基因的生物功能被证实, *MADS26* 可被乙烯诱导表达,正向调控玉米种子萌发^[22];过表达 *zmm28* 可提高玉米的光合能力及氮利用率从而提高玉米籽粒产量^[23]; *ZmMADS1a* 在玉米合成淀粉过程中发挥正调节作用^[24]; *ZMM4* 参与玉米花诱导和花序发育过程^[25]; *ZmMADS42* 作为重要调节因子调节玉米开花期及株高性状^[26]。鉴于 MADS-box 基因家族在作物生长发育及抗逆反应中的重要功能,鉴定和分析玉米自交系黄早四基因组中的 MADS-box 家族成员对挖掘玉米种质中参与抵御逆境胁迫或生长发育调节的 MADS-box 基因具有一定的意义。

本研究对黄早四中 MADS-box 家族成员进行了全基因组的鉴定,并对各成员的序列特征展开分析,以期为研究 MADS-box 基因家族在玉米抵御逆境胁迫及生长发育中的作用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 黄早四 MADS-box 家族成员的鉴定及理化性质和亚细胞定位分析

从 MaizeGDB 数据库(<https://www.maizegdb.org/>)下载获得玉米自交系黄早四的全基因组序列文件(Zm-Huangzaosi-REFERENCE-CAAS_FIL-1.0_Zm00095aa.1.fa)、蛋白序列文件(Zm-Huangzaosi-REFERENCE-CAAS_FIL-1.0_Zm00095aa.1.protein.fa)及注释文件(Zm-Huangzaosi-REFERENCE-CAAS_FIL-1.0_Zm00095aa.1.gff3)^[27]。从 PfamScan 在线数据网站(<http://pfam-legacy.xfam.org/>)获取 MADS-box 家族 K-box 结构域(PF01486)和 SRF-TF 结构域(PF00319)的 hmm 文件及 seed 文件。运用 HMMER 3.0 软件(<http://hmmer.org/>),在黄早四基因组中分别以 K-box 和 SRF-TF 的隐马尔可夫模型为探针,搜索 $E < 10^{-10}$ 的 MADS-box 家族成员,将得到的数据进行合并及去重处理。为进一步对家族成员进行筛选与鉴定,通过 PfamScan (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/pfamscan/>)网站对所筛选的 MADS-box 家族成员进行结构域鉴定,将单独包含 K-box、SRF-TF 结构域或 2 个结构域均包含的成员鉴定为黄早四 MADS-box 家族成员。

此外,通过 TBTools 软件(<https://github.com/CJ-Chen/TBtools/releases>)的 Protein Paramter Calc (ProtParam-based)功能对 MADS-box 家族成员进行

理化性质分析。通过 Plant-mPLoc 在线网站(<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/plant-multi/>) 进行亚细胞定位预测。

1.2 黄早四 MADS-box 家族系统发育分析

利用 IQ-TREE2 软件(<http://www.iqtree.org/#download>)构建进化树,重复次数设置为 1 000,线程设置为自动,其他参数为默认,得到进化树文件,通过 iTOL 在线网站实现进化树可视化(<https://itol.embl.de/itol.cgi>)。

1.3 黄早四 MADS-box 家族基因结构、保守结构域及启动子顺式作用元件分析

通过 NCBI 在线网站中的 Batch CD Search 功能(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/bwrpsb/bwrpsb.cgi>)对黄早四 MADS-box 家族成员进行保守结构域分析,并在 TBTools 软件的 Gene Structure View(Advanced)功能中导入在 NCBI 得到的保守结构域预测结果、*gff3* 基因注释文件,对保守结构域及基因结构进行可视化。

运用 TBTools 软件提取 MADS-box 家族成员对应的起始密码子上游 2 000 bp 的序列,再通过 PlantCARE 在线网站(<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)对顺式作用元件进行预测,将预测得到的数据进行整理后,利用 TBTools 软件的 Gene Structure View(Advanced)功能进行可视化。

1.4 黄早四 MADS-box 家族蛋白互作网络预测

利用 STRING 在线网站(<https://cn.string-db.org/>)对黄早四 MADS-box 家族成员的互作网络进行预测。

1.5 黄早四 MADS-box 家族成员染色体定位及 2 个玉米自交系间的共线性分析

通过 TBTools 软件的 Gene Location Visualize from GTF/GFF 功能对染色体定位进行可视化。利用 TBTools 软件的 One Step MCScanX-Super Fast 功能对黄早四 MADS-box 家族成员进行共线性分析;利用 MADS-box 的结构域(K-box、SRF-TF)对玉米自交系 B73 基因组(Zm-B73-REFERENCE-NAM-5.0.fa)中的 MADS-box 家族成员进行鉴定,同时对 2 个自交系间的家族成员进行共线性分析。分别利用 Advanced Circos、Dual Systemy Plot 功能

对共线性分析结果进行可视化。

1.6 B73 MADS-box 家族成员的组织表达及非生物胁迫表达模式分析

通过 MaizeGDB 数据库分别获取玉米自交系 B73 中 MADS-box 家族成员在穗原基、精细胞、花粉粒、成熟花粉、双核雄性配子体等 5 个组织的表达数据,以及其在对照、盐胁迫、干旱胁迫、干旱与盐复合胁迫、冷胁迫、热胁迫、紫外线胁迫处理下的胁迫表达数据。利用 TBTools 软件的 HeatMap 功能对组织表达及非生物胁迫表达的数据进行可视化。

2 结果与分析

2.1 黄早四 MADS-box 家族成员鉴定、理化性质及亚细胞定位

在玉米自交系黄早四全基因组中筛选包含 K-box(PF01486)和 SRF-TF(PF00319)结构域的 MADS-box 家族成员,并通过 PfamScan 在线网站进一步对结构域进行鉴定,最终鉴定 MADS-box 家族成员 87 个;运用 HMMER 3.0 软件筛选出基因的顺序,将 87 个基因命名为 *ZmMADS-box1* 至 *ZmMADS-box87*(表 1)。

MADS-box 家族成员理化性质如表 1 所示。87 个 MADS-box 家族成员中,编码氨基酸的数量为 116~470 aa,平均约为 260 aa;相对分子质量为 13 153.04~52 770.80;理论等电点为 4.35~10.50,其中,有 63 个 MADS-box 蛋白等电点大于 7,呈碱性,有 24 个蛋白等电点小于 7,呈酸性;不稳定系数分析结果显示,*ZmMADS-box27*、*ZmMADS-box40*、*ZmMADS-box85*、*ZmMADS-box86* 这 4 个家族成员的不稳定系数在 40 以下,属于稳定蛋白,其余 83 个均为不稳定蛋白;脂肪酸指数为 62.50~101.61;此外,蛋白亲水性系数中所有系数均为负值,说明黄早四中的 MADS-box 家族成员均编码亲水性蛋白;亚细胞定位预测结果显示 87 个家族成员均定位在细胞核内,其中 *ZmMADS-box76* 在叶绿体中也有分布,亚细胞定位预测结果与 MADS-box 家族属于转录因子的属性一致,表明 MADS-box 家族成员需在细胞核中发挥具体的生物功能,同时 *ZmMADS-box76* 亚细胞定位结果的特异性也暗示其功能的多样性。

表 1 黄早四 MADS-box 家族成员理化性质及亚细胞定位

Table 1 Physicochemical properties and subcellular localization of members of MADS-box gene family in Huangzaosi

基因名称	基因 ID	氨基酸数量/aa	相对分子质量	理论等电点	不稳定系数	脂肪酸指数	蛋白亲水性系数	亚细胞定位
<i>ZmMADS-box1</i>	Zm00095aa011693	272	31 092.34	9.16	69.46	74.01	-0.871	细胞核
<i>ZmMADS-box2</i>	Zm00095aa029833	268	30 784.02	9.17	71.83	76.49	-0.871	细胞核
<i>ZmMADS-box3</i>	Zm00095aa025204	255	29 133.19	8.85	50.69	73.88	-0.691	细胞核
<i>ZmMADS-box4</i>	Zm00095aa021528	247	28 163.22	9.14	49.01	77.04	-0.715	细胞核
<i>ZmMADS-box5</i>	Zm00095aa032813	247	28 372.32	9.45	61.40	80.48	-0.731	细胞核
<i>ZmMADS-box6</i>	Zm00095aa014552	268	30 101.94	9.05	48.90	76.23	-0.620	细胞核
<i>ZmMADS-box7</i>	Zm00095aa005801	240	27 335.21	8.27	53.99	83.75	-0.568	细胞核
<i>ZmMADS-box8</i>	Zm00095aa021527	241	27 340.18	7.06	61.50	82.61	-0.582	细胞核
<i>ZmMADS-box9</i>	Zm00095aa018352	240	27 396.05	8.87	47.57	88.12	-0.677	细胞核
<i>ZmMADS-box10</i>	Zm00095aa025101	240	27 414.99	8.54	47.07	89.75	-0.683	细胞核
<i>ZmMADS-box11</i>	Zm00095aa037739	225	25 808.18	5.91	57.58	88.89	-0.643	细胞核
<i>ZmMADS-box12</i>	Zm00095aa010142	243	27 967.75	9.01	47.44	81.07	-0.757	细胞核
<i>ZmMADS-box13</i>	Zm00095aa031871	244	27 940.74	8.84	42.72	81.15	-0.702	细胞核
<i>ZmMADS-box14</i>	Zm00095aa018806	261	29 736.95	9.00	51.45	74.06	-0.577	细胞核
<i>ZmMADS-box15</i>	Zm00095aa003645	240	27 903.75	8.92	57.57	77.63	-0.807	细胞核
<i>ZmMADS-box16</i>	Zm00095aa040239	264	30 671.55	6.68	54.80	77.54	-0.819	细胞核
<i>ZmMADS-box17</i>	Zm00095aa013819	287	32 176.90	9.20	45.73	85.40	-0.422	细胞核
<i>ZmMADS-box18</i>	Zm00095aa041368	265	29 897.07	8.81	51.87	81.77	-0.533	细胞核
<i>ZmMADS-box19</i>	Zm00095aa025496	242	27 451.32	9.38	57.64	81.86	-0.655	细胞核
<i>ZmMADS-box20</i>	Zm00095aa005799	186	21 150.07	5.51	57.32	81.83	-0.576	细胞核
<i>ZmMADS-box21</i>	Zm00095aa011910	278	31 321.45	9.40	55.04	66.01	-0.775	细胞核
<i>ZmMADS-box22</i>	Zm00095aa023352	260	29 187.07	6.08	54.52	82.23	-0.530	细胞核
<i>ZmMADS-box23</i>	Zm00095aa000166	228	25 940.92	9.21	47.69	74.47	-0.817	细胞核
<i>ZmMADS-box24</i>	Zm00095aa010749	199	22 416.15	5.33	56.11	75.03	-0.784	细胞核
<i>ZmMADS-box25</i>	Zm00095aa028359	328	37 072.38	9.33	61.49	62.50	-0.907	细胞核
<i>ZmMADS-box26</i>	Zm00095aa040599	232	26 404.25	9.38	48.68	76.90	-0.841	细胞核
<i>ZmMADS-box27</i>	Zm00095aa027255	227	25 841.32	8.95	36.79	73.52	-0.638	细胞核
<i>ZmMADS-box28</i>	Zm00095aa000848	241	28 007.66	6.12	56.62	86.97	-0.754	细胞核
<i>ZmMADS-box29</i>	Zm00095aa042696	199	22 880.41	8.44	59.54	93.07	-0.415	细胞核
<i>ZmMADS-box30</i>	Zm00095aa041204	245	27 529.15	8.76	57.20	82.12	-0.600	细胞核
<i>ZmMADS-box31</i>	Zm00095aa039576	224	25 660.30	9.30	56.04	84.87	-0.780	细胞核
<i>ZmMADS-box32</i>	Zm00095aa017954	214	24 792.36	9.46	59.23	83.41	-0.688	细胞核
<i>ZmMADS-box33</i>	Zm00095aa033943	259	29 267.22	9.22	59.36	69.69	-0.708	细胞核
<i>ZmMADS-box34</i>	Zm00095aa026196	221	25 142.91	6.97	46.08	92.22	-0.335	细胞核
<i>ZmMADS-box35</i>	Zm00095aa017348	227	25 487.26	8.30	43.53	88.50	-0.340	细胞核
<i>ZmMADS-box36</i>	Zm00095aa037420	276	30 172.97	5.54	53.83	80.22	-0.441	细胞核
<i>ZmMADS-box37</i>	Zm00095aa019406	228	25 480.50	5.39	57.90	86.40	-0.643	细胞核
<i>ZmMADS-box38</i>	Zm00095aa025702	228	25 526.59	5.41	53.71	84.74	-0.676	细胞核
<i>ZmMADS-box39</i>	Zm00095aa030398	116	13 385.35	8.88	54.67	74.05	-0.786	细胞核
<i>ZmMADS-box40</i>	Zm00095aa007970	217	24 503.02	7.70	33.85	97.00	-0.505	细胞核
<i>ZmMADS-box41</i>	Zm00095aa044623	247	27 201.63	6.26	61.66	78.54	-0.480	细胞核
<i>ZmMADS-box42</i>	Zm00095aa027434	234	25 960.16	5.19	56.51	85.43	-0.476	细胞核
<i>ZmMADS-box43</i>	Zm00095aa023673	131	15 018.36	9.08	53.09	81.98	-0.530	细胞核
<i>ZmMADS-box44</i>	Zm00095aa027162	237	27 403.63	8.89	56.59	90.55	-0.387	细胞核
<i>ZmMADS-box45</i>	Zm00095aa030055	211	24 756.09	9.60	52.53	88.72	-0.301	细胞核
<i>ZmMADS-box46</i>	Zm00095aa004187	228	26 175.80	8.61	46.06	88.07	-0.626	细胞核

表 1(续)

基因名称	基因 ID	氨基酸数量/aa	相对分子质量	理论等电点	不稳定系数	脂肪酸指数	蛋白亲水性系数	亚细胞定位
<i>ZmMADS-box47</i>	Zm00095aa000641	235	26 607.09	7.70	59.76	79.23	-0.688	细胞核
<i>ZmMADS-box48</i>	Zm00095aa029921	255	29 337.59	8.50	59.95	76.20	-0.563	细胞核
<i>ZmMADS-box49</i>	Zm00095aa007056	255	29 084.23	8.51	55.07	76.20	-0.564	细胞核
<i>ZmMADS-box50</i>	Zm00095aa035051	212	24 697.08	9.00	51.08	73.54	-0.886	细胞核
<i>ZmMADS-box51</i>	Zm00095aa035075	212	24 877.38	9.39	47.67	74.91	-0.902	细胞核
<i>ZmMADS-box52</i>	Zm00095aa015578	201	22 759.88	7.02	45.35	81.00	-0.635	细胞核
<i>ZmMADS-box53</i>	Zm00095aa036366	210	23 911.14	7.74	46.92	82.14	-0.659	细胞核
<i>ZmMADS-box54</i>	Zm00095aa014571	209	24 062.57	8.43	42.83	86.32	-0.711	细胞核
<i>ZmMADS-box55</i>	Zm00095aa002078	204	23 324.71	9.21	52.66	72.65	-0.658	细胞核
<i>ZmMADS-box56</i>	Zm00095aa005516	281	31 661.19	8.40	53.72	77.01	-0.386	细胞核
<i>ZmMADS-box57</i>	Zm00095aa029601	247	25 302.44	6.92	53.97	77.65	-0.150	细胞核
<i>ZmMADS-box58</i>	Zm00095aa003648	118	13 754.62	10.00	74.70	72.80	-0.827	细胞核
<i>ZmMADS-box59</i>	Zm00095aa040992	121	13 153.04	9.54	57.58	78.18	-0.426	细胞核
<i>ZmMADS-box60</i>	Zm00095aa037385	386	42 417.90	8.09	57.58	76.14	-0.464	细胞核
<i>ZmMADS-box61</i>	Zm00095aa028659	391	43 754.74	4.90	52.46	74.55	-0.368	细胞核
<i>ZmMADS-box62</i>	Zm00095aa031524	279	32 159.14	8.24	51.99	82.47	-0.372	细胞核
<i>ZmMADS-box63</i>	Zm00095aa014300	166	18 501.70	8.85	50.16	71.87	-0.778	细胞核
<i>ZmMADS-box64</i>	Zm00095aa012365	174	19 566.86	9.40	56.94	71.32	-0.847	细胞核
<i>ZmMADS-box65</i>	Zm00095aa031085	272	30 964.34	8.34	57.68	82.10	-0.426	细胞核
<i>ZmMADS-box66</i>	Zm00095aa030335	269	28 749.41	8.76	48.95	73.98	-0.405	细胞核
<i>ZmMADS-box67</i>	Zm00095aa041736	252	27 878.01	9.74	45.11	68.85	-0.449	细胞核
<i>ZmMADS-box68</i>	Zm00095aa029972	331	38 100.65	6.33	50.11	82.78	-0.355	细胞核
<i>ZmMADS-box69</i>	Zm00095aa021406	358	40 949.90	5.78	51.39	83.10	-0.233	细胞核
<i>ZmMADS-box70</i>	Zm00095aa016507	439	48 647.73	6.11	51.96	78.02	-0.478	细胞核
<i>ZmMADS-box71</i>	Zm00095aa022016	275	29 666.92	7.13	50.41	75.64	-0.397	细胞核
<i>ZmMADS-box72</i>	Zm00095aa024499	285	30 288.81	8.39	46.24	86.67	-0.184	细胞核
<i>ZmMADS-box73</i>	Zm00095aa028608	303	32 152.28	6.45	44.50	70.53	-0.273	细胞核
<i>ZmMADS-box74</i>	Zm00095aa030336	291	30 689.75	4.35	53.99	65.77	-0.370	细胞核
<i>ZmMADS-box75</i>	Zm00095aa011564	192	20 981.03	10.50	76.82	87.45	-0.446	细胞核
<i>ZmMADS-box76</i>	Zm00095aa033037	383	42 525.77	10.01	51.42	92.90	-0.099	细胞核、叶绿体
<i>ZmMADS-box77</i>	Zm00095aa038668	467	52 770.82	9.22	50.86	91.99	-0.387	细胞核
<i>ZmMADS-box78</i>	Zm00095aa038484	246	27 134.31	10.33	46.27	88.05	-0.437	细胞核
<i>ZmMADS-box79</i>	Zm00095aa043854	234	26 586.30	7.14	65.16	85.47	-0.726	细胞核
<i>ZmMADS-box80</i>	Zm00095aa035973	470	50 698.24	8.48	69.72	63.98	-0.609	细胞核
<i>ZmMADS-box81</i>	Zm00095aa043832	457	49 006.25	6.96	70.73	63.24	-0.583	细胞核
<i>ZmMADS-box82</i>	Zm00095aa029907	391	42 006.24	6.68	76.93	77.93	-0.576	细胞核
<i>ZmMADS-box83</i>	Zm00095aa042089	316	34 174.72	5.81	56.53	101.61	-0.129	细胞核
<i>ZmMADS-box84</i>	Zm00095aa016675	247	27 532.50	9.31	53.00	78.22	-0.616	细胞核
<i>ZmMADS-box85</i>	Zm00095aa034233	451	47 876.98	4.53	37.60	65.65	-0.369	细胞核
<i>ZmMADS-box86</i>	Zm00095aa010648	462	48 883.50	5.42	34.60	66.54	-0.370	细胞核
<i>ZmMADS-box87</i>	Zm00095aa027843	194	20 596.71	9.83	62.86	88.04	-0.037	细胞核

2.2 黄早四 MADS-box 基因家族的系统发育分析结果

为更好地了解黄早四 MADS-box 家族成员的进化关系,依据是否存在 K-box 结构域将 MADS-box 家族成员分为 TypeI和 TypeII 2类(图 1),根据

序列比对、系统进化树及文献信息将 87 个家族成员细分为 $M\alpha$ 、 $M\beta$ 、 $M\gamma$ 、 $M\delta$ 、MIKC 等 5 个亚族。其中,MIKC 亚族的成员数量最多(59 个); $M\beta$ 成员的数量最少(1 个);属于 $M\alpha$ 亚组的 *ZmMADS-box79* 未与 $M\alpha$ 亚族其他成员聚在一处。

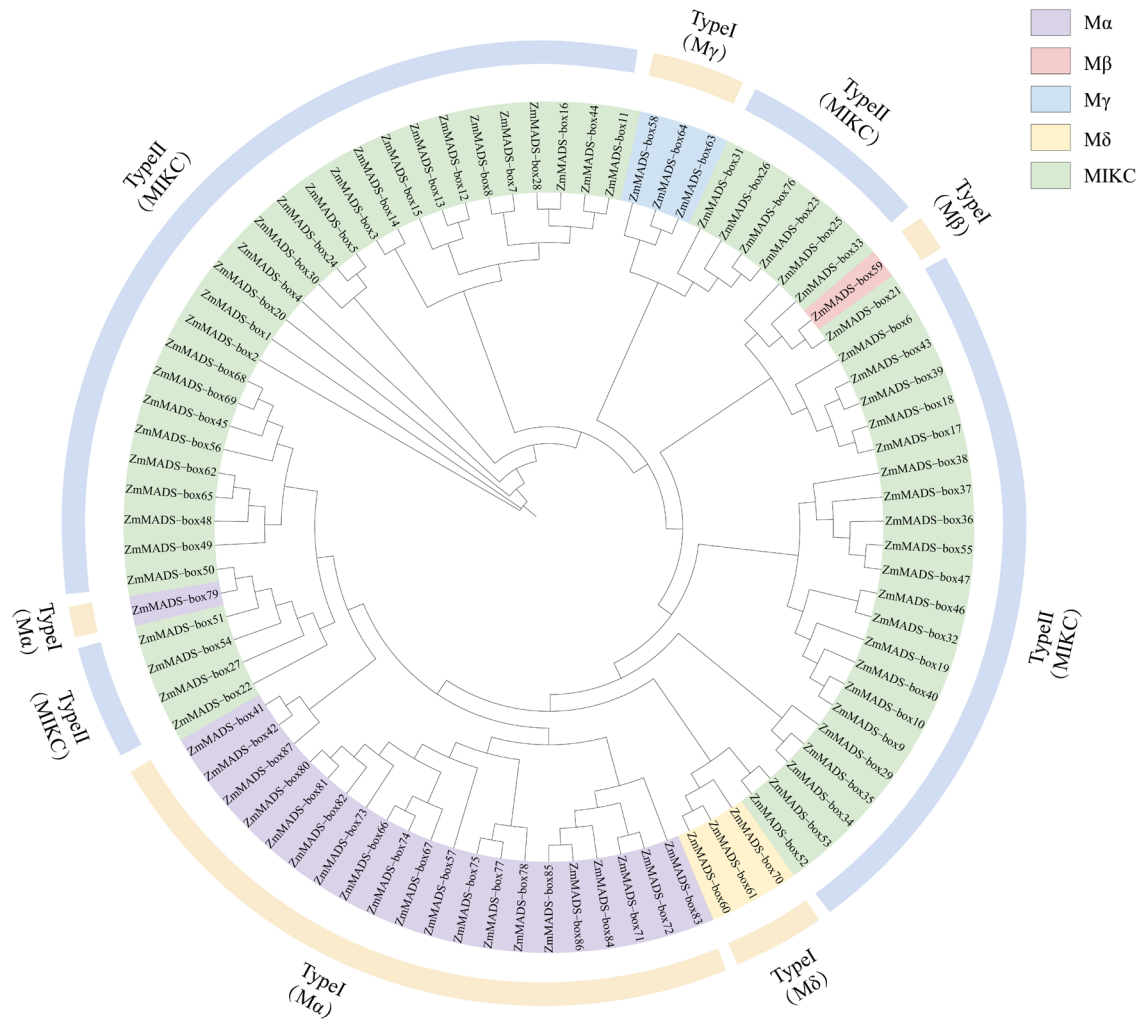


图 1 黄早四 MADS-box 家族系统发育树

Fig.1 Phylogenetic tree of MADS-box gene family in Huangzaosi

2.3 黄早四 MADS-box 家族基因结构、保守结构域及启动子顺式作用元件

对鉴定到的黄早四 MADS-box 家族成员的基因结构、保守结构域进行分析并可视化,发现 87 个基因都含有编码序列(CDS),但并非所有基因都含有非翻译区(UTR);13 个隶属于 Ma 亚族的 TypeI 成员无内含子,而 TypeII 成员由多个内含子和外显子组成,2 类成员的基因结构差异显著;在 MADS-box 家族成员中共预测到 14 个结构域,没有某个结构域存在于所有家族成员中的情况,其中, MADS_MEF2_like、K-box 这 2 个结构域在家族成员中的数量最多,表明 MADS_MEF2_like 和 K-box 结构域在玉米自交系黄早四中的 MADS-box 家族中更为保守,且 TypeII 成员普遍只包含这 2 种结构域,推测在进化过程中 TypeII 成员比 TypeI 成员

更保守, TypeII 成员可能具有更为相近的生物功能,而 TypeI 成员具有的功能可能更多元化。

为了解黄早四 MADS-box 家族成员可能参与的生物途径,对家族成员的启动子顺式作用元件进行预测与分析。结果显示,在黄早四 MADS-box 家族成员的启动子中存在 13 种元件,其中参与抗氧化响应、光应答、玉米醇溶蛋白代谢调节顺式作用、脱落酸响应及参与厌氧诱导的类增强子的元件数量较多,而富集 GC 的 rab 激活元件、脱落酸响应元件、八聚核苷酸元件顺式作用元件数量最少,没有所有成员都包含某一种顺式作用元件的情况。87 个家族成员中 ZmMADS-box86 的顺式作用元件的种类及数量最多,种类为 7 种,数量为 13 个; ZmMADS-box2、ZmMADS-box7、ZmMADS-box16、ZmMADS-box46、ZmMADS-box80、ZmMADS-box81 的顺式作用元件种类较少,只包含参与抗氧化响应

元件,其中,ZmMADS-box2 的顺式作用元件数量最少,为 1 个。据此结果推测黄早四 MADS-box 家族成员可能参与或涉及光响应、抗氧化反应,进而影响玉米开花及抗逆胁迫等途径;具有多种启动子顺式作用元件的家族成员可能被多种调节因子调控,即在多条生物途径中发挥作用,具有一因多效的潜在功能。

2.4 黄早四 MADS-box 家族蛋白互作网络分析

对黄早四 MADS-box 家族成员进行蛋白互作网络预测(图 2),结果显示,除 ZmMADS-box56、

ZmMADS-box73、ZmMADS-box77、ZmMADS-box82 这 4 个 $M\alpha$ 亚族蛋白成员没有与其他蛋白发生互作外,其他 ZmMADS-box 蛋白之间都具有不同程度的互作。其中,隶属于 $M\alpha$ 亚族的 ZmMADS-box81 蛋白与其他家族成员具有最多的互作,推测该蛋白在 ZmMADS-box 家族成员参与的多种生物途径的调控网络中发挥着重要作用,可与其互作成员共同参与同一生理代谢途径或逆境胁迫应答通路。此外,还发现同属于 TypeI 或 TypeII 的蛋白在互作网络中往往位置较为相近。

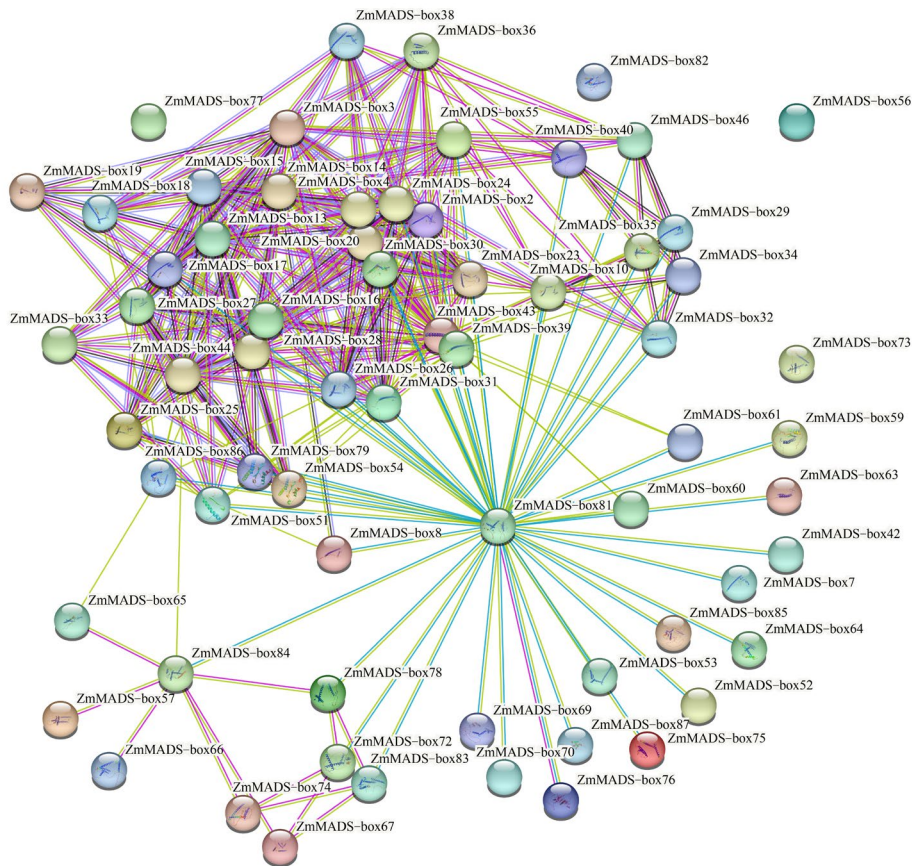


图 2 黄早四 MADS-box 家族蛋白互作网络

Fig.2 Protein interaction network of MADS-box gene family in Huangzaosi

2.5 黄早四 MADS-box 家族成员染色体定位及 2 个玉米自交系间的共线性分析结果

黄早四 87 个 MADS-box 家族成员中有 84 个在玉米 10 条染色体上均有分布(图 3), ZmMADS-box41、ZmMADS-box79、ZmMADS-box81 这 3 个成员暂未定位到染色体的具体位置。第 7 条染色体上分布的基因数最多,其中 8 个 ZmMADS-box 成员呈聚集分布;而在第 8、10 条染色体上分布的家族成员数量最少。

为了解玉米中 MADS-box 家族同源基因的分布及进化关系,进行了共线性分析。结果(图 4)表明,黄早四的 87 个 MADS-box 成员中共发现 23 个基因对,除第 10 条染色体外,其余染色体上均有基因对存在,表明黄早四 MADS-box 成员存在多次复制的情况。其中,在第 8 条染色体上出现基因复制的数量最少;在第 1、5 条染色体上的基因复制数量较多。此外,所有基因对都是在不同染色体上产生的复制,在同一染色体上无基因复制事件出现。

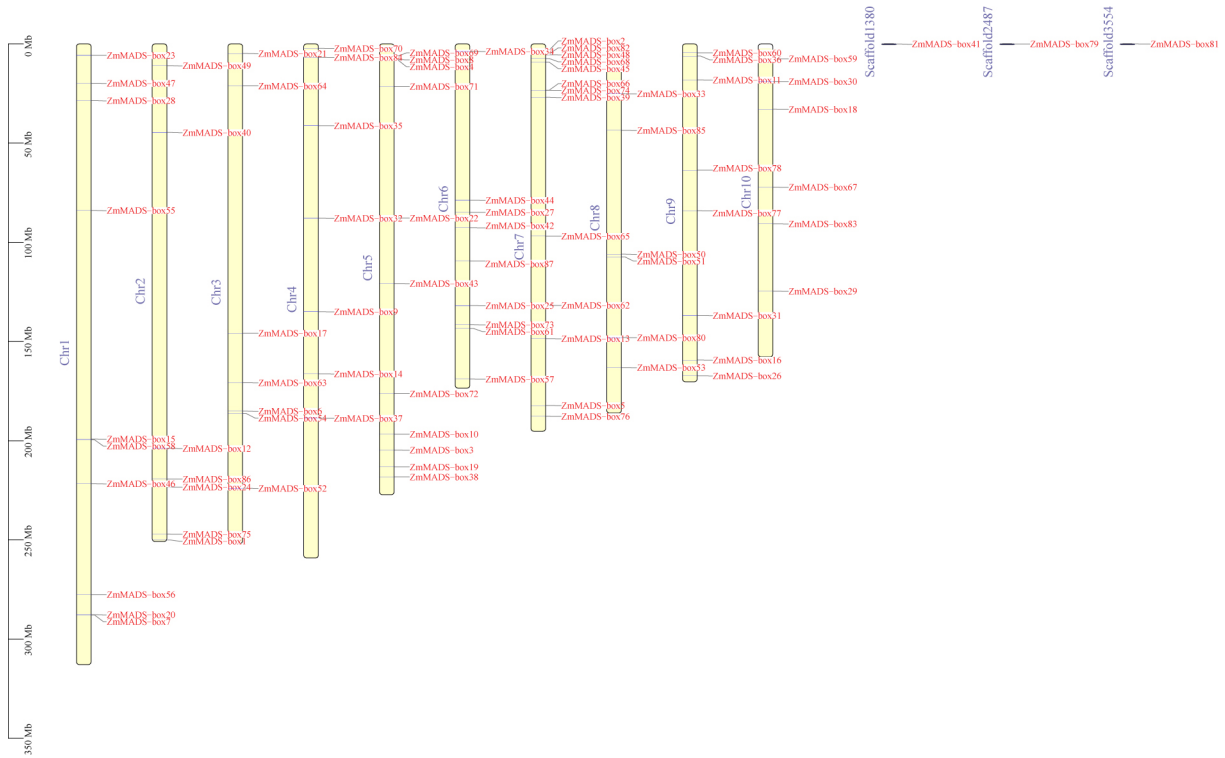


图 3 黄早四 MADS-box 家族成员染色体分布定位

Fig.3 Chromosomal distribution of members of MADS-box gene family in Huangzaosi



图 4 黄早四 MADS-box 家族共线性分析结果

Fig.4 Collinearity analysis result of MADS-box gene family in Huangzaosi

为分析 MADS-box 家族成员在不同玉米自交系中的分布差异,利用 K-box 和 SRF-TF 结构域对玉米自交系 B73 进行全基因组鉴定,共鉴定到 84

个 MADS-box 家族成员,并对该家族成员在黄早四与 B73 这 2 个自交系间的共线性进行分析。结果(图 5)表明, MADS-box 家族成员在 2 个玉米自交系间

共有 113 个共线基因对, 其中 65 个基因对在同号染色体的相近位置具有共线性关系; 10 条染色体上均存在位置相近的基因对, 第 1、5 号染色体上位置相近的基因对数量最多, 为 8 对; 第 8、10 号染色体上位置相近的基因对数量最少, 为 5 对。此外,

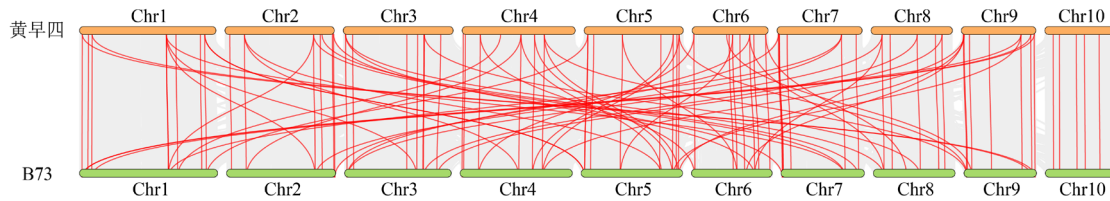


图 5 黄早四与 B73 的 MADS-box 家族共线性分析结果

Fig.5 Collinearity analysis result of MADS-box gene family between Huangzaosi and B73

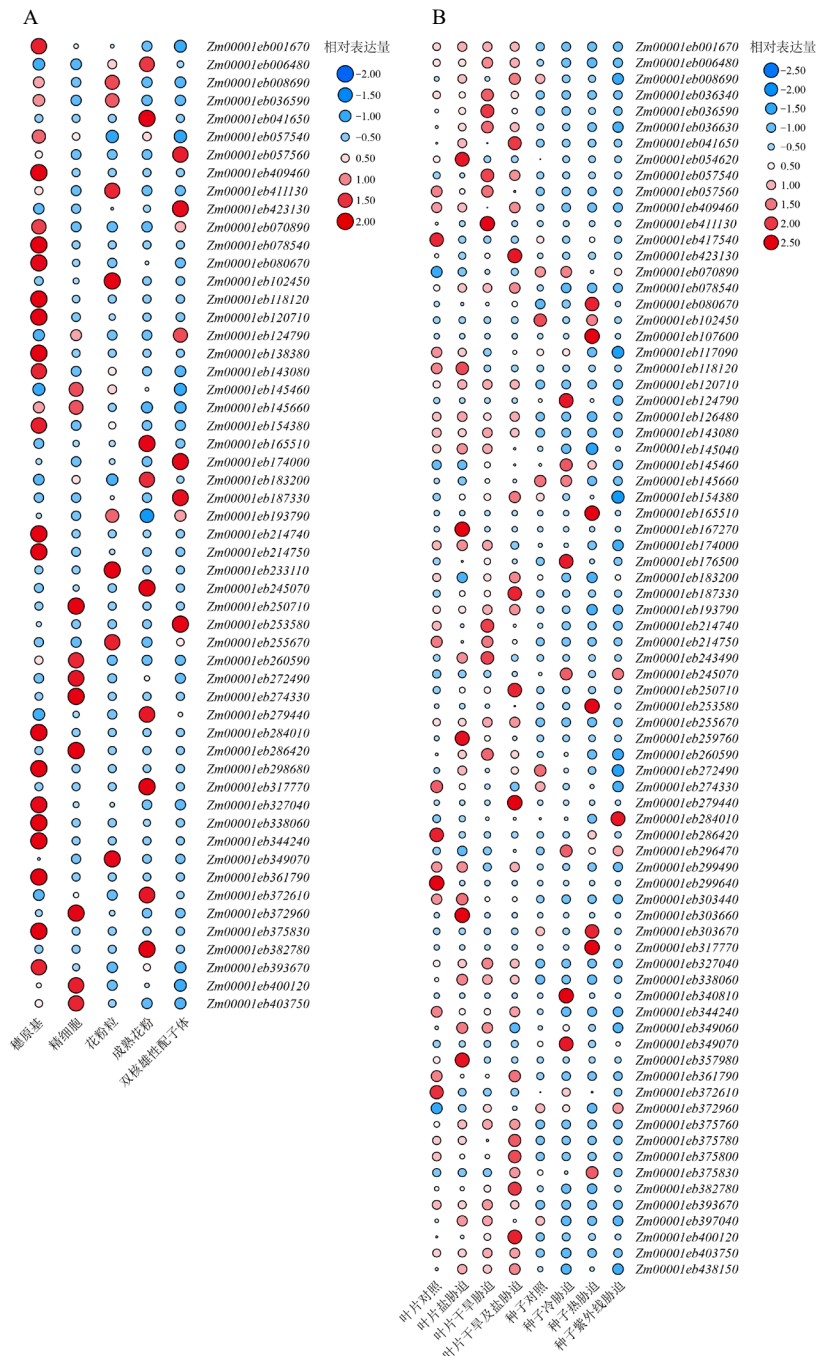
2.6 B73 MADS-box 家族成员组织表达及非生物胁迫表达模式分析结果

为了解 MADS-box 家族成员在玉米开花发育以及抗逆胁迫应答中的作用, 选取玉米自交系 B73 已公布的影响开花相关组织及非生物胁迫处理下玉米叶片、种子的转录组数据作为代表, 对玉米中 MADS-box 家族成员的表达模式进行分析。结果显示, MADS-box 基因在穗原基中有较高水平的表达(图 6-A), 在精细胞、花粉粒、成熟花粉、双核雄性配子体 4 个组织中优势表达基因的数量较少。其中, 精细胞中仅有 7 个基因高表达(相对表达量 ≥ 1.5 倍), 如 *Zm00001eb250710*、*Zm00001eb260590*、*Zm00001eb272490* 等; 花粉粒中优势表达的基因仅有 4 个, 包括 *Zm00001eb411130*、*Zm00001eb102450*、*Zm00001eb233110*、*Zm00001eb349070*, 其中, *Zm00001eb233110* 基因相对表达量最高, 为 1.79 倍; 成熟花粉中仅有 5 个基因显著表达, 包括 *Zm00001eb041650*、*Zm00001eb165510*、*Zm00001eb-245070*、*Zm00001eb317770*、*Zm00001eb382780*; 双核雄性配子体中有 4 个优势表达的基因, 包括 *Zm00001eb057560*、*Zm00001eb174000*、*Zm00001eb-253580*、*Zm00001eb187330*, 其中, *Zm00001eb174000* 基因的相对表达量为 1.68 倍, 但其在其他 4 个组织中的相对表达量较低。穗原基中相对表达量较高的基因数最多, 为 15 个, 如 *Zm00001eb409460*、*Zm00001eb078540*、*Zm00001eb080670* 等, 其中, 有 13 个基因只在穗原基中优势表达, 相对表达量

黄早四与 B73 的多数 MADS-box 家族成员间存在同源倍性关系, 说明 MADS-box 家族成员在黄早四与 B73 这 2 个自交系间相似度且进化相对保守, 在后续对 MADS-box 基因的克隆、表达及功能研究等方面可互相提供参考。

可达 1.7 倍以上, 而在其他 4 个组织中相对表达量较低。推测在穗原基的发育过程中玉米 MADS-box 基因多以较高表达的方式参与其中, 而在精细胞、花粉粒、成熟花粉及双核雄性配子体中仅有少量 MADS-box 基因通过优势表达参与玉米开花发育过程。

非生物胁迫处理下的玉米叶片、种子表达数据分析结果显示, 相比于对照组, 盐胁迫处理下 MADS-box 基因多上调表达(图 6-B), 其中 *Zm00001eb054620*、*Zm00001eb167270*、*Zm00001eb-259760*、*Zm00001eb303660*、*Zm00001eb357980* 此 5 个基因显著上调(相对表达量 ≥ 2 倍), 且仅在盐胁迫下被显著调节, 表明这 5 个基因涉及玉米的抗盐逆境胁迫响应途径。在干旱胁迫下, MADS-box 基因多以上调表达为主, 其中 *Zm00001eb411130* 基因相对表达量上调倍数达 2.43 倍, 表明 MADS-box 家族成员更多地以正调控方式参与干旱响应途径。在干旱及盐复合胁迫下, 多个 MADS-box 基因相对表达量明显上调, 其中, *Zm00001eb2794400* 基因的相对表达量上调 2.47 倍。相比于对照组, 在干旱或盐胁迫下 MADS-box 基因的表达量均下调, 但在复合胁迫下表达被显著上调, 说明此基因以不同于单一胁迫下的响应机制参与复合胁迫响应途径。在冷、热、紫外线胁迫下, 多个 MADS-box 基因的相对表达量无明显差异, 仅有少量基因的相对表达量显著上调。以上结果表明, 玉米中的 MADS-box 基因在不同的非生物胁迫逆境下以多种不同的调节机制参与胁迫应答。



A 为 MADS-box 家族成员组织表达; B 为非生物胁迫表达。

图 6 MADS-box 家族成员组织表达及非生物胁迫表达分析结果

Fig. 6 Tissue expression and abiotic stress expression analysis result of MADS-box gene family members

3 结论与讨论

玉米骨干自交系黄早四作为中国重要的玉米种质资源，在种质创新、品种培育和功能基因组研究方面发挥积极的推动作用^[18]。LI 等^[16]于 2019 年完成了黄早四的全基因组测序与拼接，随着其全基因组序列信息的公布，在黄早四中挖掘重要基因家族成员及分析序列特征成为可能。MADS-box 家族

是转录因子中一个重要的家族，具有广泛的生物功能，已发现其在植物腋芽的生长发育、花器官的发育^[6]、调控根的生长及叶的形状、调节果实成熟、参与植物非生物胁迫调控等方面发挥作用^[28]。本研究通过对黄早四及 B73 这 2 个玉米自交系全基因组中 MADS-box 家族成员进行鉴定，对了解玉米中 MADS-box 家族成员的分布及潜在生物功能具有一定意义，也为进一步挖掘和利用玉米中调控生长

发育及抗逆反应的关键 *MADS-box* 基因提供数据支持。

本研究中依据蛋白质的同源关系将黄早四的 *MADS-box* 家族成员分为 5 个亚族, MIKC 亚族成员数量最多, 为 59 个; M β 成员数量最少, 为 1 个。Zm*MADS-box*41、Zm*MADS-box*79、Zm*MADS-box*81 未被定位到染色体的具体位置, 随着黄早四基因组序列拼接的完善, 可对这 3 个成员的染色体分布情况进行补充与更新。87 个 Zm*MADS-box* 蛋白均被预测定位在细胞核的结果与其转录因子属性吻合, 这也与水稻、拟南芥等研究结果一致^[29]; 而 M α 亚族成员中 Zm*MADS-box*76 也被同时预测定位在叶绿体上, 暗示其可能存在独特的潜在功能。此外, 隶属于 M α 亚族的成员 Zm*MADS-box*79 在玉米自交系黄早四 *MADS-box* 家族的系统发育树中并未与其他 M α 亚族成员聚类在同一处, 暗示其在进化过程中序列发生变异, 导致其功能逐渐改变; 因此, 在后续研究中可对 Zm*MADS-box*79 重点关注。

MADS-box 家族结构分析表明, TypeI 和 TypeII 成员之间的基因结构具有显著差异; 保守结构域的多元化表明 *MADS-box* 进化出了更多潜在功能; 顺式作用元件的预测结果显示, 黄早四 *MADS-box* 家族成员主要在光响应、抗氧化、生长发育及抗逆境胁迫方面发挥作用, 这与已往的研究结果一致^[30]; 蛋白互作网络分析结果显示, 黄早四 *MADS-box* 家族成员中几乎每个蛋白间都具有较强的相互作用, 且 TypeII 蛋白成员间的互作关系普遍要比 TypeI 的多, 表明 *MADS-box* 蛋白间可能通过互作形成复合体共同参与调节生理代谢途径并发挥功能。其中, 属于 M α 亚族的成员 Zm*MADS-box*81 蛋白在整个互作网络中处于较为重要的节点, 暗示其可能存在多重的生物功能。

本研究发现, *MADS-box* 家族成员在黄早四与 B73 这 2 个玉米自交系间相似度高且进化相对保守, 因此选取玉米自交系 B73 已公布的转录组数据作为代表, 对 *MADS-box* 家族成员在玉米开花相关组织及在非生物胁迫下的表达数据进行分析。结果显示, 在玉米 5 个开花相关组织中, 仅在穗原基中大多数 *MADS-box* 家族成员优势表达, 而在其他 4 个组织中表达不强烈。对玉米 *MADS-box* 家族成员的组织特异性表达的分析结果表明 *MADS-box* 家族成员参与玉米开花相关组织的发育及开花途径。对玉米 *MADS-box* 家族成员在非生物胁迫下的表

达结果分析显示, *MADS-box* 家族成员在盐胁迫下多被上调表达, 其中 Zm00001eb054620 等 5 个基因相对表达量剧烈上调, 推测此 5 个家族成员在响应抗盐胁迫逆境中发挥重要的正向调控作用。在干旱胁迫下, 大多数的 *MADS-box* 家族成员呈现相对表达量显著上调的情况, 而已有研究表明 Os*MADS26* 基因通过负调控参与水稻抗旱反应^[31], 说明不同品种之间 *MADS-box* 家族成员在逆境胁迫条件下的功能具有差异。在干旱及盐复合胁迫处理下, Zm00001eb2794400 基因表达量均比单一胁迫时剧烈上调, 暗示复合胁迫下玉米响应机制的复杂性。在冷、热或紫外线胁迫处理下, 基因相对表达量多为下调或无明显变化。玉米中 *MADS-box* 家族成员的表达模式分析结果证实 *MADS-box* 基因家族普遍参与玉米开花相关器官的发育及非生物逆境胁迫的应答, 这为后期挖掘开花途径及抗逆反应相关重要基因提供了依据。

综上所述, 本研究在玉米骨干自交系黄早四全基因组中鉴定到 87 个 *MADS-box* 家族成员, 在玉米自交系 B73 中鉴定到该家族成员 84 个。黄早四与 B73 自交系间的 *MADS-box* 家族成员进化保守, *MADS-box* 家族成员参与玉米开花发育过程并在不同的非生物胁迫逆境下以多种不同的调节机制参与胁迫应答, 相关研究结果可为进一步研究该家族基因在玉米开花、抵御非生物胁迫等方面的功能机制研究提供参考。

参考文献:

- [1] HU J, CHANG X J, ZHANG Y, et al. The pineapple *MADS-box* gene family and the evolution of early monocot flower[J]. *Scientific Reports*, 2021, 11(1): 849.
- [2] MOU Y F, YUAN C L, SUN Q X, et al. MIKC-type *MADS-box* transcription factor gene family in peanut: Genome-wide characterization and expression analysis under abiotic stress[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2022, 13: 980933.
- [3] WANG Y S, ZHANG J L, HU Z L, et al. Genome-wide analysis of the *MADS-box* transcription factor family in *Solanum lycopersicum*[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(12): 2961.
- [4] GAN Z C, WU X X, BIAHOMBA S A M, et al. Genome-wide identification, evolution, and expression characterization of the pepper(*Capsicum* spp.) *MADS-box* gene family[J]. *Genes*, 2022, 13(11): 2047.
- [5] ZHAO W, ZHANG L L, XU Z S, et al. Genome-wide analysis of *MADS-Box* genes in foxtail millet(*Setaria*

- italica* L.) and functional assessment of the role of *SiMADS51* in the drought stress response[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2021, 12: 659474.
- [6] SHAO Z W, HE M H, ZENG Z P, et al. Genome-wide identification and expression analysis of the MADS-box gene family in sweet potato [*Ipomoea batatas*(L.) Lam][J]. *Frontiers in Genetics*, 2021, 12: 750137.
- [7] DAI Y S, WANG Y, ZENG L W, et al. Genomic and transcriptomic insights into the evolution and divergence of MIKC-type MADS-box genes in *Carica papaya*[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(18): 14039.
- [8] 王溪唯, 陈璨, 王大玮. 云南柘[木衣]MADS-box 基因家族鉴定与表达分析[J]. *生物工程学报*, 2023, 39(7): 2897–2913.
- [9] 高虎虎, 张云霄, 胡胜武, 等. 甘蓝型油菜 MADS-box 基因家族的鉴定与系统进化分析[J]. *植物学报*, 2017, 52(6): 699–712.
- [10] 王鹏洋, 付泽元, 曲姗姗, 等. 被子植物 MADS-box 基因研究进展[J]. *农产品加工*, 2019(7): 94–96.
- [11] 何浩博. 大豆 MADS-box 家族 *GmAP3* 基因在花发育中的功能分析[D]. 长春: 吉林农业大学, 2022.
- [12] 杨光彬, 王瑾, 陈恺琳, 等. 辣椒 MADS-box 基因家族的鉴定及表达分析[J]. *湖南农业大学学报(自然科学版)*, 2023, 49(5): 558–566.
- [13] LI W H, WANG D X, HONG X K, et al. Identification and validation of new MADS-box homologous genes in 3010 rice pan-genome[J]. *Plant Cell Reports*, 2023, 42(6): 975–988.
- [14] MA J, YANG Y J, LUO W, et al. Genome-wide identification and analysis of the MADS-box gene family in bread wheat (*Triticum aestivum* L.)(J). *PLoS One*, 2017, 12(7): e0181443.
- [15] TANG N, CAO Z Y, WU P Y, et al. Genome-wide identification, interaction of the MADS-box proteins in *Zanthoxylum armatum* and functional characterization of *ZaMADS80* in floral development[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2022, 13: 1038828.
- [16] LI C H, SONG W, LUO Y F, et al. The HuangZaoSi maize genome provides insights into genomic variation and improvement history of maize[J]. *Molecular Plant*, 2019, 12(3): 402–409.
- [17] 赵久然, 李春辉, 张如养, 等. 玉米骨干自交系黄早四的来源探究[J]. *植物遗传资源学报*, 2021, 22(1): 1–6.
- [18] 葛珍珠. 玉米 MADS-box 基因的序列变异及其与产量相关性状的关联分析[D]. 扬州: 扬州大学, 2020.
- [19] LI X X, YU B, WU Q, et al. OsMADS23 phosphorylated by SAPK9 confers drought and salt tolerance by regulating ABA biosynthesis in rice[J]. *PLoS Genetics*, 2021, 17(8): e1009699.
- [20] YU L H, WU J, ZHANG Z S, et al. *Arabidopsis* MADS-box transcription factor AGL21 acts as environmental surveillance of seed germination by regulating *ABI5* expression[J]. *Molecular Plant*, 2017, 10(6): 834–845.
- [21] ZHAO P X, MIAO Z Q, ZHANG J, et al. *Arabidopsis* MADS-box factor AGL16 negatively regulates drought resistance via stomatal density and stomatal movement[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2020, 71(19): 6092–6106.
- [22] MA L L, WANG C, HU Y, et al. GWAS and transcriptome analysis reveal *MADS26* involved in seed germination ability in maize[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2022, 135(5): 1717–1730.
- [23] WU J R, LAWIT S J, WEERS B, et al. Overexpression of *zmm28* increases maize grain yield in the field[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2019, 116(47): 23850–23858.
- [24] DONG Q, WANG F, KONG J J, et al. Functional analysis of *ZmMADS1a* reveals its role in regulating starch biosynthesis in maize endosperm[J]. *Scientific Reports*, 2019, 9(1): 3253.
- [25] LOU H, HUANG Y T, ZHU Z J, et al. Cloning and expression analysis of onion (*Allium cepa* L.) MADS-box genes and regulation mechanism of cytoplasmic male sterility[J]. *Biochemical Genetics*, 2023, 61(5): 2116–2134.
- [26] ZHAO Y, LU J Y, HU B, et al. Cloning and functional analysis of *ZmMADS42* gene in maize[J]. *GM Crops & Food*, 2024, 15(1): 105–117.
- [27] 王雷立, 董柯清, 张严玲, 等. 玉米 DREB 转录因子家族的全基因组鉴定与分析[J]. *湖南农业大学学报(自然科学版)*, 2022, 48(3): 270–281.
- [28] XUE Y J, MA L, WANG H T, et al. The MADS transcription factor GhFYF is involved in abiotic stress responses in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.)(J). *Gene*, 2022, 815: 146138.
- [29] LAI D L, YAN J, HE A L, et al. Genome-wide identification, phylogenetic and expression pattern analysis of MADS-box family genes in foxtail millet (*Setaria italica*)(J). *Scientific Reports*, 2022, 12(1): 4979.
- [30] 姚琦园, 李纷纷, 张林成, 等. 植物 MADS-box 转录因子参与调控非生物胁迫的研究进展[J]. *江西农业学报*, 2018, 30(5): 73–79.
- [31] CASTELÁN-MUÑOZ N, HERRERA J, CAJERO-SÁNCHEZ W, et al. MADS-box genes are key components of genetic regulatory networks involved in abiotic stress and plastic developmental responses in plants[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2019, 10: 853.

责任编辑: 毛友纯
英文编辑: 柳正