

玉米乙烯信号转导相关基因 *ZmEIL2* 的克隆及表达分析

李 玥, 王兴荣, 张彦军, 李永生, 祁旭升

(甘肃省农业科学院作物研究所, 兰州 730070)

摘要: EIN3/EILs (Ethylene-insensitive proteins/ethylene-insensitive 3-like) 家族蛋白是乙烯信号转导途径中的主要成员, 在植物生长发育及胁迫响应中发挥着重要调控作用。本研究以玉米 (*Zea Mays* L.) 自交系 B73 为材料, 从中分离了乙烯信号转导相关的 *ZmEIL2* 基因, 并对其进行了生物信息学、亚细胞定位及表达模式分析。结果表明, *ZmEIL2* 基因的开放阅读框 (ORF, open reading frame) 全长 1,788 bp, 编码 595 个氨基酸残基, 蛋白分子量为 63.81 kD, 理论等电点为 6.34, 保守结构域分析表明 *ZmEIL2* 基因具有 EIN3/EILs 家族所特有的 EIN3 结构域。系统进化分析表明 *ZmEIL2* 蛋白与高粱 (*Sorghum bicolor* L.) SbEIL1 蛋白亲缘关系最近, 与拟南芥 (*Arabidopsis thaliana* L.) 和大豆 (*Glycine max* (L.) Merr.) 的 EIL 蛋白亲缘关系较远, 且不同物种间存在明显的种属特性。亚细胞定位发现该基因同时定位于细胞膜和细胞核。组织特异性表达分析表明 *ZmEIL2* 基因在玉米苞叶中的表达量最高, 其次为雌穗、雄穗和花丝, 在穗位叶中的表达量最低。同时, *ZmEIL2* 基因的表达受到脱水、PEG、ABA、高盐、高温和低温等非生物胁迫的显著诱导, 其中对 PEG、ABA、高盐的响应较为强烈, 同时叶片中 *ZmEIL2* 基因的表达水平明显高于茎和根系。研究结果将为深入研究 *ZmEIL2* 基因响应逆境胁迫的分子机理奠定理论基础。

关键词: 玉米; *ZmEIL2* 基因; 亚细胞定位; 表达分析

Molecular Cloning and Expression Analysis of Ethylene Signaling Related Gene *ZmEIL2* in Maize

LI Yue, WANG Xing-rong, ZHANG Yan-jun, LI Yong-sheng, QI Xu-sheng
(Institute of Crop Sciences, Gansu Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730070)

Abstract: EIN3/EILs (Ethylene inductive proteins/ethylene inductive 3-like) protein family function as the main members of ethylene signal transduction pathway and play an important regulatory role in plant growth and development and stress response. In this study, *ZmEIL2* was isolated from maize inbred line B73 based on sequence homology (GeneBank ID: KJ727458.1). This gene carries a 1788 bp coding sequence (CDS) that encodes for 595 amino acid residues with a relative molecular mass of 63.81 kD and a theoretical isoelectric point of 6.34. *ZmEIL2* contains an EIN3 domain which is specific to EIN3/EILs family. Phylogenetic tree analysis showed that *ZmEIL2* protein had the closest evolutionary relationship with SbEIL1 protein in *Sorghum bicolor* and was relatively distant from EIL proteins in *Arabidopsis* and soybean. The subcellular localization assay showed that *ZmEIL2* protein was localized to the cell membrane and nucleus. Tissue specific expression analysis showed that *ZmEIL2* gene was highly expressed in bract, followed by ear, tassel and silks, and the lowest expression was detected in mature leaves. The transcripts of *ZmEIL2* gene were inducible under abiotic stresses treatments such as dehydration, PEG, ABA, high salt, heat and cold, particularly under PEG, ABA or high salt treatments. The expression level of *ZmEIL2* gene in leaves was significantly higher than that in stems and roots.

收稿日期: 2021-09-16 修回日期: 2022-10-27 网络出版日期: 2022-11-04

URL: <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20220920002>

第一作者研究方向为农作物种质资源与分子育种, E-mail: lyue31@126.com

通信作者: 祁旭升, 研究方向为农作物种质资源挖掘与利用, E-mail: qixusheng6608@sina.com

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31960431); 甘肃省科技计划项目 (20JR5RA109); 甘肃省农业科学院农业科技创新专项 (2020GAAS48)

Foundation projects: The National Natural Science Foundation of China (31960431); Science and Technology Plan Project of Gansu Province (20JR5RA109); Agricultural Science and Technology Innovation Projects of Gansu Academy of Agricultural Sciences (2020GAAS48)

These results laid a theoretical foundation for further deciphering the molecular mechanism of *ZmEIL2* gene in responses to abiotic stresses.

Key words: maize; *ZmEIL2* gene; subcellular localization; expression analysis

乙烯(Ethylene)是植物体内一种重要的内源激素,调控植物种子萌发、细胞伸长、叶片衰老、生殖、果实成熟等多个生物学过程^[1]。同时,乙烯也在植物逆境胁迫应答中发挥着关键调控作用^[2],当植物受到生物胁迫或非生物胁迫时,体内乙烯含量会发生变化,胁迫刺激产生的乙烯会通过相应的信号转导途径进行传递,调控下游基因的表达,从而引发植物细胞产生一系列的反应来应对胁迫环境^[3]。近年来,研究人员以拟南芥(*Arabidopsis thaliana* L.)乙烯不敏感突变体 *etr1*、*etr2*、*ein2*、*ein3*、*ein5/ain1*、*ein4*、*ein6*、*eir1*, 过敏感突变体 *ctr1* 以及不能形成顶端弯钩的突变体 *hls1* 等为试验材料,建立了一个以 EIN2 为核心的线性乙烯信号转导模型,即 C₂H₄→ETR→CTR→EIN2→EIN3→ERF→乙烯反应。其中, Ethylene-insensitive proteins/ethylene-insensitive 3-like(EIN3/EIL)家族蛋白是乙烯信号途径中的关键转录因子,作用于 EIN2 蛋白的下游,通过与 *ERF1* (Ethylene response factors 1) 启动子中的特定序列结合,激活 *ERF1* 基因的表达^[4-6]。

关于 EIN3/EIL 家族蛋白生物学功能的研究表明,EIN3/EIL 不仅参与植物的生长发育过程,还在植物生物及非生物胁迫响应中发挥着重要调控作用。在生长发育方面,EIN3/EIL 蛋白在棉花(*Gossypium arboreum* L.)纤维发育^[7]、黄瓜(*Cucumis sativus* L.)花发育及成熟过程^[8]、番茄(*Solanum lycopersicum* L.)乙烯响应及果实发育^[9]中发挥重要调控作用。在生物胁迫响应方面,拟南芥中 *EIN3*、*EIL1* 基因负向调控拟南芥对丁香假单胞杆菌(*Pseudomonas syringae*)的抗性^[10],小麦(*Triticum aestivum* L.)TaEIL1 蛋白通过与 TaMED25 蛋白互作负向调控小麦的白粉病抗性^[11]。在非生物胁迫应答方面,EIN3/EIL1 作为转录激活因子响应低硫胁迫,同时调控拟南芥叶绿素代谢^[12-13],*EIN3* 基因的等位基因 *AMOT1* (Ammonium tolerance 1) 在铵离子耐受性方面发挥着重要作用^[14]。拟南芥中 *EIN3*、*EIL1* 基因通过抑制细胞内活性氧(ROS)的过量累积从而增强了拟南芥的耐盐性^[6]。木薯(*Manihot esculenta* Crantz)在干旱胁迫 6 h 后叶片中 *MeEIL1*、*MeEIL2* 基因的表达量较对照显著上调,茎和根中 *MeEIL1*、*MeEIL2* 基因的表达量在所有干旱胁迫时间段上均显著高于

对照^[15]。

在玉米(*Zea Mays* L.)基因组中共鉴定发现 9 个 *EIL* 基因^[16],其中 *ZmEIL1* 基因已经被克隆,并发现其表达受乙烯诱导,同时在授粉 20 d 后的雌穗中表达量最高^[17]。但关于 EIN3/EIL 家族成员在玉米非生物胁迫方面的研究仍鲜见报道。本研究从玉米脱水胁迫转录组测序数据(未发表)中筛选到 1 个受脱水胁迫诱导上调表达的 *EIL* 基因 *ZmEIL2*,根据 GeneBank 中公布的 *ZmEIL2* 基因的 mRNA 序列信息,从玉米自交系 B73 中克隆到 *ZmEIL2* 基因的开放阅读框(ORF, open reading frame),并进行了生物信息分析、亚细胞定位、组织特异性表达及非生物胁迫表达分析,以期为进一步研究该基因的抗逆调控机制提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 供试材料及试验处理

供试玉米自交系 B73、本氏烟草(*Nicotiana tabacum* L.)种子由国家作物种质资源库-甘肃分库保存,根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)菌株 GV3101、pCAM35-GFP 载体质粒由农业农村部西北寒旱区作物基因资源与种质创新重点实验室保存。挑选饱满一致的 B73 种子,用 70% 的酒精消毒 5~10 min,用 ddH₂O 清洗后播于无菌的珍珠岩中催芽,待幼苗长至两叶一心时改用 1/2 MS 培养液进行水培,培养室温度为 25 ℃,光周期条件为 16 h 光照/8 h 黑暗。幼苗生长到三叶一心期时分别进行脱水、20% PEG、200 μmol/L ABA、250 mmol/L NaCl、42 ℃ 高温和 4 ℃ 低温处理,在处理 0 h、1 h、3 h、6 h、12 h 和 24 h 分别采集幼苗叶片、茎和根系组织,另外,在玉米抽雄期采集玉米穗位叶、苞叶、雌穗、雄穗、花丝样品,DEPC 水清洗干净后液氮速冻,保存于 -80 ℃ 冰箱中用于总 RNA 提取。

1.2 *ZmEIL2* 基因克隆及生物信息学分析

利用 TRIzol Reagent (Invitrogen) 提取脱水处理 12 h 的三叶一心期玉米幼叶总 RNA,反转录获得 cDNA (TaKaRa)。根据 GenBank 中公布的玉米 *ZmEIL2* 基因 mRNA 序列 (GenBank 登录号: KJ727458.1),利用 Primer premier 5 软件设计 RT-PCR 扩增引物 EIL2-F、EIL2-R (表 1)。以获得的

cDNA 为模板进行 PCR 扩增,反应体系包含 5× PrimeSTAR HS Buffer (Mg²⁺ plus) 5.0 μL、dNTP Mixture (2.5 mmol/L each) 2.0 μL、上下游引物(10 μmol/L)各 0.5 μL、PrimeSTAR HS DNA Polymerase 0.3 μL、cDNA 1.0 μL,用 ddH₂O 补足至 25 μL。反应条件为

98 °C 4 min; 94 °C 10 s, 61.5 °C 15 s, 72 °C 2 min, 35 个循环。用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物后,将目的基因片段与 pEASY-Blunt 载体连接后进行测序验证,得到测序正确的克隆载体质粒 pEASY-Blunt-ZmEIL2。

表 1 引物信息

Table 1 Primer information

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence (5'-3')	产物大小(bp) Product length
EIL2-F	ATGATGGGAGGAGGGACGC	1788
EIL2-R	TCAGTAGAACCAATTGGCG	
qEIL2-F	GAGTGCTTCTTTGGAGAGGAAG	101
qEIL2-R	CTCATCATCATCTCGTCCAAGG	
qEF1a-F	TGGGCCTACTGGTCTTACTACTGA	135
qEF1a-R	ACATACCCACGCTTCAGATCCT	
EIL2-GFP-F	<u>AGAACACGGGGGACGAGCTCATGATGGGAGGAGGGACG</u>	1785
EIL2-GFP-R	<u>ACCATGGTGTCTCGACTCTAGAGTAGAACCAATTGGCGTTGGAG</u>	

引物序列中下划线为载体序列

The vector sequence is shown as the underline in the primer sequence

在 Gramene 网站(<https://ensembl.gramene.org>) 查找 *ZmEIL2* 基因的 gDNA 序列,利用 DNAMAN 软件对 *ZmEIL2* 基因 cDNA 序列与 gDNA 序列进行基因组结构分析;利用 ProtParam 工具(<http://www.expasy.org/tools/protparam.html>)对 *ZmEIL2* 蛋白的基本理化性质进行预测;利用基于 Hphob./Kyte & Doolittle 算法的 ProtScale 在线软件(<http://web.expasy.org/protscale/>)进行蛋白亲水/疏水性分析;用 SOPMA 工具(https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html)对 *ZmEIL2* 蛋白的二级结构进行预测;*ZmEIL2* 蛋白的保守结构域分析通过 NCBI 中的 CD-Search 工具(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)进行。使用 Blast(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)工具在 NCBI 上查找同源性较高的 EIL 蛋白序列,采用 Cluster X2 和 GeneDoc 软件进行多序列比对,用 MEGA7.0 软件中的 Neighbor-Joining 法进行系统进化树构建。

1.3 *ZmEIL2* 蛋白的亚细胞定位

设计特异性引物 EIL2-GFP-F/EIL2-GFP-R,以测序正确的克隆载体质粒 pEASY-Blunt-ZmEIL2 为模板,进行亚克隆。回收目的片段,经测序验证后将其连接至经 *Sac* I 和 *Xba* I 双酶切后的 pCAM35-GFP 线性化载体上,通过同源重组连接到绿色荧光蛋白的 N 端,获得亚细胞定位载体 pCAM35-ZmEIL2-GFP。将 pCAM35-ZmEIL2-GFP 质粒转化

农杆菌 GV3101,获得阳性菌株后,扩大培养制备浸染液,通过注射器将农杆菌液注入到烟草叶片内,用记号笔圈定侵染区域,48 h 后,切取侵染区域,撕取表皮制片,通过激光共聚焦显微镜观察 *ZmEIL2* 蛋白的亚细胞定位情况。

1.4 *ZmEIL2* 基因的表达分析

利用 Primer premier 5 软件设计定量引物(表 1),提取采集样品总 RNA,并反转录合成 cDNA 第一链。以玉米 *ZmEF-1α* 基因为内参,在 LightCycler[®]96 荧光定量 PCR 仪(Roche)上进行荧光定量分析(Platinum[®] SYBR[®] Green qPCR SuperMix-UDG, Invitrogen)。反应体系包括 Platinum[®] SYBR[®] Green qPCR SuperMix-UDG 12.5 μL、cDNA 模板 1.0 μL、上下游引物(10 μmol/L)各 0.5 μL,用 ddH₂O 补足至 25 μL。反应条件为 95 °C 2 min; 95 °C 15 s, 60 °C 30 s, 72 °C 30 s, 共 40 个循环。定量分析数据按照 2^{-ΔΔCt} 法^[18] 计算基因不同时间点不同组织的相对表达量,设 3 次生物学重复。用 Excel2019 和 SPSS16.0 进行数据整理和最小显著差异性检验(Duncan's 新复极差法),并用 Origin2021 软件作图。

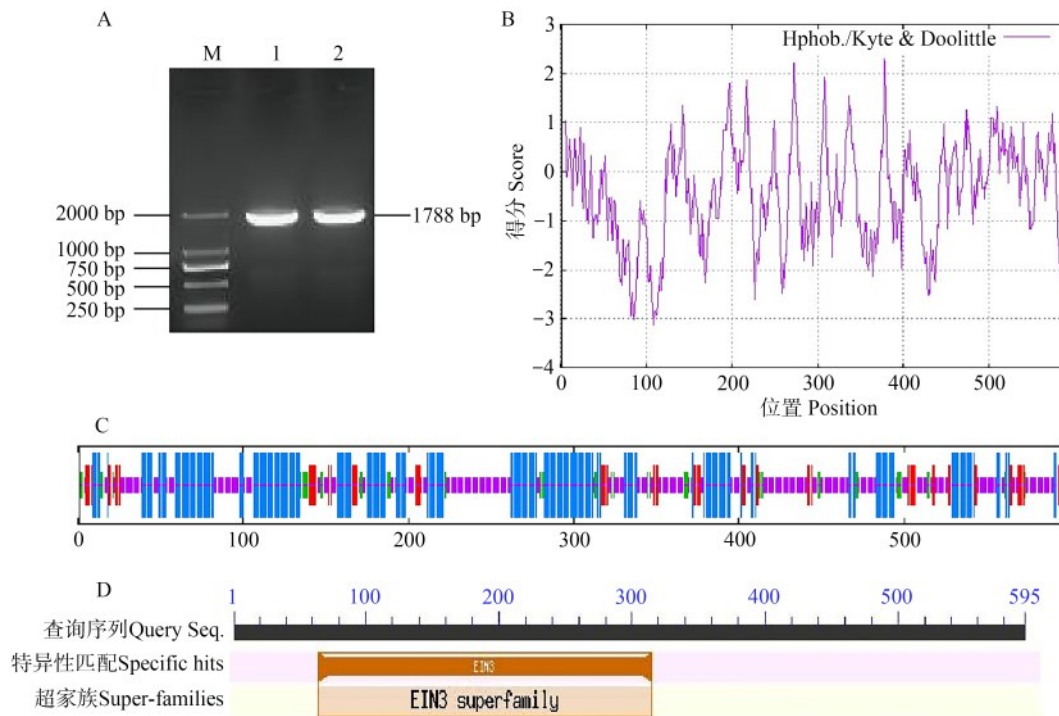
2 结果与分析

2.1 *ZmEIL2* 基因的克隆及生物信息学分析

以脱水处理 12 h 的三叶一心期玉米叶片为材料,提取总 RNA 并反转录为 cDNA。以 cDNA 为模板,扩增得到约 1800 bp 的特异性条带(图 1A),回收

扩增产物,连接至 pEASY-Blunt 克隆载体,测序后发现,扩增产物与已公布的 *ZmEIL2* 基因序列一致性为 99.41%,编码区全长 1788 bp,编码 595 个氨基酸残基。通过与基因组 DNA 进行比对发现,*ZmEIL2* 基因只有 1 个外显子,不存在内含子结构。理化性质分析发现,*ZmEIL2* 蛋白分子量为 63.8 kD,理论等电点为 6.34,不稳定指数是 59.27,大于 40,属于不稳定蛋白。亲水性/疏水性分析发现,*ZmEIL2* 蛋白第 378 位的丙氨酸(Ala)分值最高,为 2.300,疏水性最

强;第 108 位的谷氨酰胺(Gln)分值最低,为-3.122,亲水性最强,因此,该蛋白为亲水蛋白(图 1B)。二级结构分析表明,该蛋白主要以无规则卷曲为主,占 44.20%,同时 α -螺旋占 37.98%、 β 转角占 10.76%、延伸链占 7.06%(图 1C)。保守结构域分析表明 *ZmEIL2* 蛋白 64~315 位氨基酸之间具有 1 个由 252 个氨基酸组成的典型的 EIN3 结构域(图 1D),说明 *ZmEIL2* 蛋白属于玉米 EIN3/EIL 蛋白家族。



A: *ZmEIL2* 基因的 RT-PCR 扩增结果, M: DL 2000 分子量标准, 1~2: *ZmEIL2* 基因 RT-PCR 扩增产物; B: *ZmEIL2* 蛋白亲水/疏水性分析; C: *ZmEIL2* 蛋白的二级结构分析, 蓝色: α -螺旋, 红色: 延伸链, 绿色: β -折叠, 紫色: 无规则卷曲; D: *ZmEIL2* 蛋白的保守结构域分析
A: RT-PCR amplification of *ZmEIL2* gene, M: DL 2000, 1-2: RT-PCR amplification fragment of *ZmEIL2*; B: Hydrophobic/hydrophilic analysis of *ZmEIL2* protein; C: Analysis of secondary structure of *ZmEIL2* protein, blue: Alpha helix, red: Extended strand, green: Beta turn, purple: Random coil; D: Analysis of conserved domains of *ZmEIL2* protein

图 1 *ZmEIL2* 基因克隆及序列分析

Fig.1 Cloning and sequence analysis of *ZmEIL2*

2.2 *ZmEIL2* 蛋白的氨基酸序列比对及分子进化分析

将玉米 *ZmEIL2* 蛋白序列与水稻 (*Oryza sativa* L.)、小麦、大麦 (*Hordeum vulgare* L.)、高粱、谷子 (*Setaria italic* L.) 及糜子 (*Panicum miliaceum* L.)、拟南芥和大豆 (*Glycine max* (L.) Merr.) 中蛋白同源性较高的 EIL 蛋白序列进行比对,发现 9 种植物的 EIL 蛋白 N 端的 EIN3 结构域保守性较高, C 端保守性较差(图 2A)。利用 MEGA7.0 构建系统进化树发现, 9 个 EIL 蛋白被划分为单子叶植物和双子叶植物 2 组,在单子叶植物中,包括玉米、高粱、谷子、糜子、

水稻、小麦和大麦 7 种植物,其中玉米 *ZmEIL2* 蛋白与高粱 *SbEIL1* 蛋白亲缘关系最近,与谷子 *SiEIL1* 蛋白和糜子 *PmEIL1* 蛋白的亲缘关系次之,与水稻、小麦和大麦 EIL 蛋白亲缘关系较远,在双子叶植物中,拟南芥 *AtEIL1* 和大豆 *GmEIL1* 与玉米 *EIL2* 蛋白亲缘关系较远(图 2B)。可见, EIL 蛋白存在明显的种属特性,并且物种间的变化也符合植物学分类特征。

2.3 *ZmEIL2* 蛋白亚细胞定位

将 N 端融合有 *ZmEIL2* 基因的 pCAM35-GFP 载体转化农杆菌后注射烟草,并以 pCAM35-GFP 空载

体作为对照,通过激光共聚焦显微镜观察荧光信号,发现对照组的烟草表皮细胞中的荧光信号呈散乱分布,在细胞膜、细胞质、细胞核中均有荧光信号,而融合 *ZmEIL2* 基因的烟草表皮细胞中只在细

胞膜和细胞核中发现了荧光信号(图3),说明 *ZmEIL2* 蛋白同时在细胞膜和细胞核中发挥调控作用。

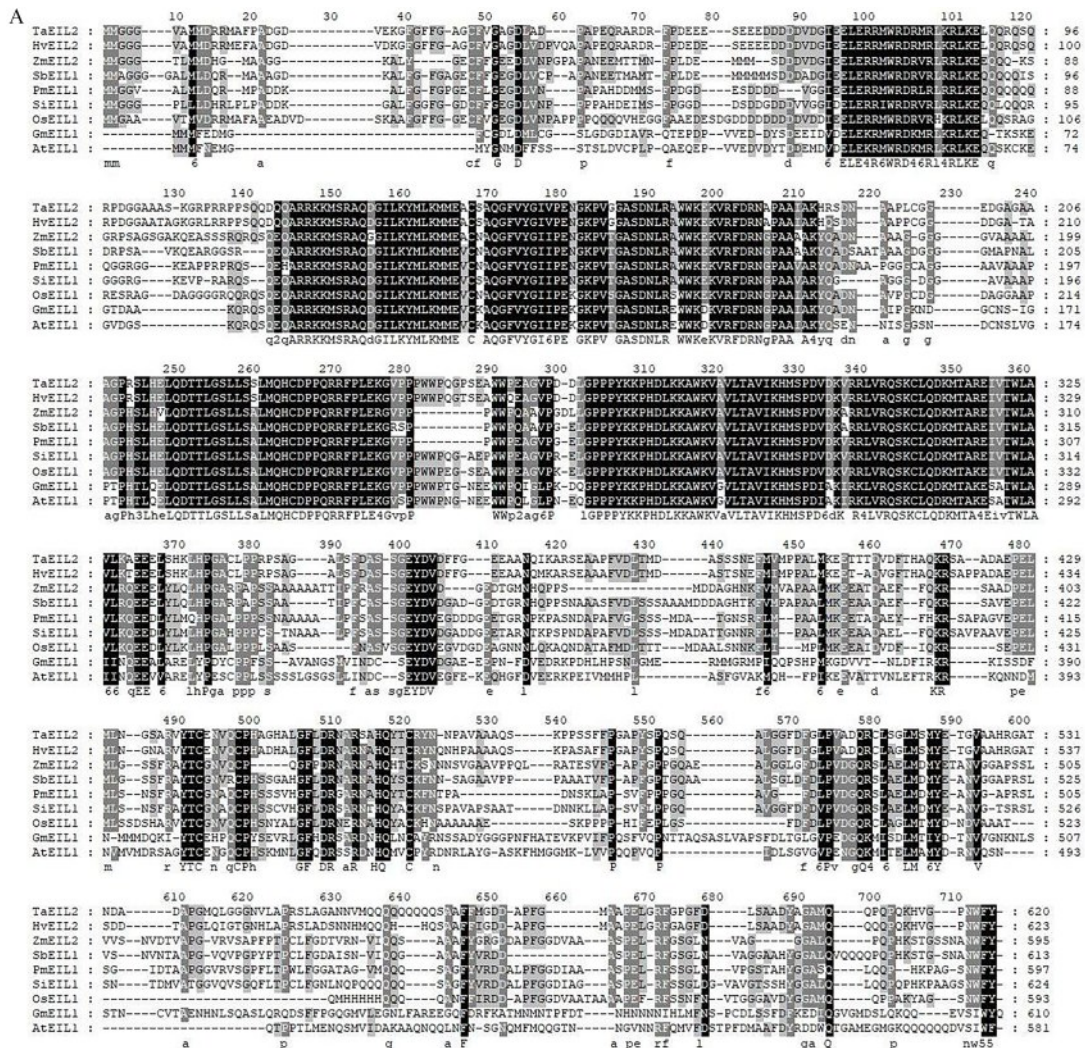
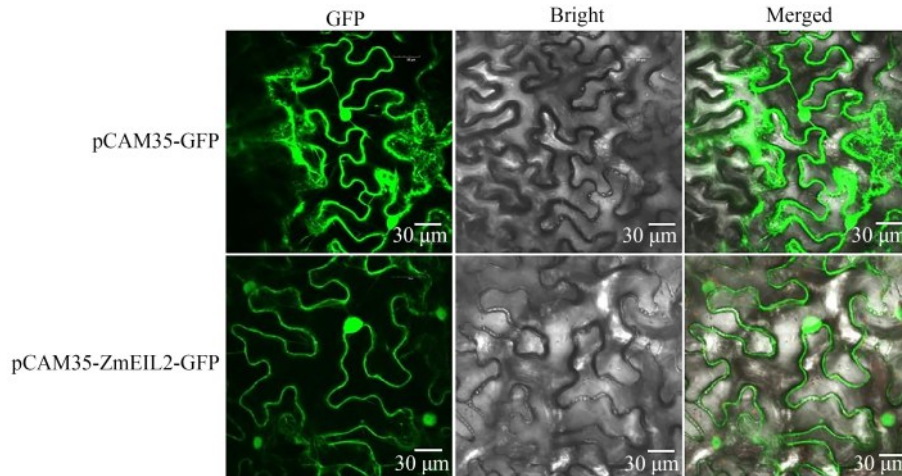


图2 ZmEIL2蛋白的多序列比对和系统进化树构建
 TaEIL2:小麦 TaEIL2 蛋白;HvEIL2:大麦 HvEIL2 蛋白;ZmEIL2:玉米 ZmEIL2 蛋白;SbEIL1:高粱 SbEIL1 蛋白;PmEIL1:糜子 PmEIL1 蛋白;SiEIL1:谷子 SiEIL1 蛋白;OsEIL1:水稻 OsEIL1 蛋白;GmEIL1:大豆 GmEIL1 蛋白;AtEIL1:拟南芥 AtEIL1 蛋白;黑色和灰色区域分别表示在 9 个物种中高度一致和部分一致的氨基酸序列
 TaEIL2: The TaEIL2 protein of wheat; HvEIL2: The HvEIL2 protein of barley; ZmEIL2: The ZmEIL2 protein of maize; SbEIL1: The SbEIL1 protein of sorghum; PmEIL1: The PmEIL1 protein of proso millet; SiEIL1: The SiEIL1 protein of millet; OsEIL1: The OsEIL1 protein of rice; GmEIL1: The GmEIL1 protein of soybean; AtEIL1: The AtEIL1 protein of *Arabidopsis thaliana*; The black and gray region show the highly and partially consistent amino acid sequences among nine species

Fig.2 Multiple sequence alignment and phylogenetic tree construction of ZmEIL2 and related proteins



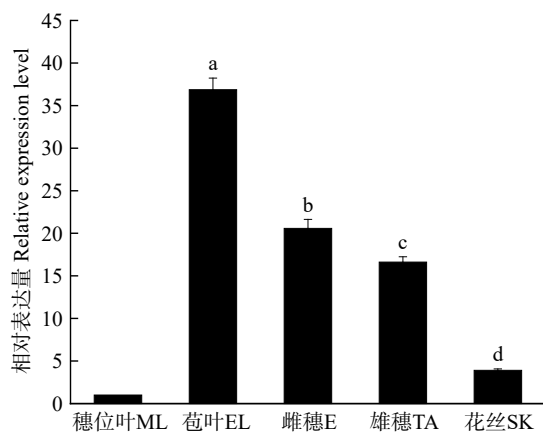
GFP: 绿色荧光蛋白通道; Bright: 明场通道; Merged: 3个通道的叠加照片; 绿色代表 GFP 蛋白在激光共聚焦显微镜下所发出的绿色荧光
GFP: Green fluorescent protein channel; Bright: Open field channel; Merged: Superposition of the three channels; Green indicates the green fluorescence of GFP protein under confocal laser scanning microscope

图3 *ZmEIL2* 蛋白的亚细胞定位

Fig.3 The subcellular localization of *ZmEIL2* protein

2.4 玉米 *ZmEIL2* 基因的表达模式分析

2.4.1 玉米 *ZmEIL2* 基因的组织特性表达 分别提取玉米穗位叶、苞叶、雌穗、雄穗及花丝总 RNA, 反转录获得 cDNA 后进行 qRT-PCR 分析。如图 4 所示, *ZmEIL2* 基因在玉米不同组织中的表达量存在较大差异, 将穗位叶的表达量记为 1, *ZmEIL2* 在苞叶中的表达量最高, 为穗位叶的 36.87 倍, 其次为雌穗、雄穗, 分别为穗位叶的 20.58 倍和 16.62 倍, 在花丝中的表达量较低, 为穗位叶的 3.91 倍。



数据为 3 个生物学重复 \pm 标准差, 不同小写字母代表差异显著 ($P < 0.05$)

The error bar represents \pm SD of three biological replication. Different lowercase letters are significantly different at the 0.05 probability level. ML: Mature leaf; EL: Bract; E: Ear; TA: Tassel; SK: Silks

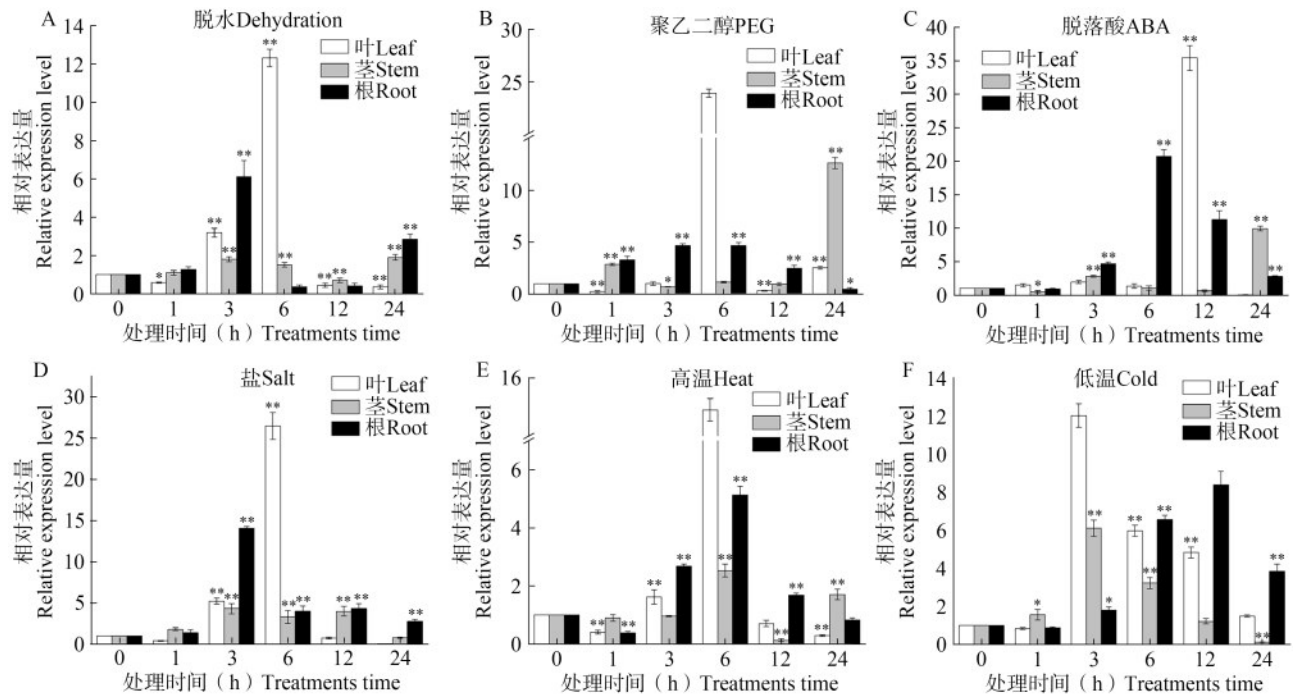
图4 *ZmEIL2* 基因的组织特性表达

Fig.4 Tissue specific expression of *ZmEIL2* in different maize tissues

2.4.2 玉米 *ZmEIL2* 基因在不同非生物胁迫下的表达

为了明确 *ZmEIL2* 基因在不同非生物胁迫下的表达模式, 采用 qRT-PCR 方法分析在脱水、PEG、ABA、高盐、高温和低温 6 种非生物胁迫下玉米叶片、茎及根系中 *ZmEIL2* 基因的表达水平变化。结果发现 *ZmEIL2* 基因的表达受 6 种非生物胁迫的显著诱导, 不同胁迫下的表达模式不尽一致, 其中, 对 PEG、ABA 和盐胁迫的响应最为强烈, 同时叶片中的表达量明显高于茎和根系 (图 5)。

在脱水处理下, *ZmEIL2* 在叶片和根系中的表达量分别在处理后 6 h 和 3 h 最高, 分别为对照 (脱水处理 0 h) 的 12.32 倍和 6.11 倍, 茎中的表达量在 24 h 最高, 为对照的 1.9 倍 (图 5A)。在 20% PEG 胁迫下, 叶片中 *ZmEIL2* 的表达量在 6 h 最高, 为对照的 23.86 倍, 茎中的表达量在 24 h 达到最高, 为对照的 12.59 倍, 根中的表达量在 3 h 和 6 h 最高, 均为对照的 4.67 倍 (图 5B)。200 μ mol/L ABA 处理后叶片中 *ZmEIL2* 的表达量在 12 h 时最高, 为对照的 35.44 倍, 茎中的表达量在 24 h 最高, 为对照的 9.95 倍, 根中的表达量在 6 h 最高, 为对照的 20.74 倍 (图 5C)。在 250 mmol/L NaCl 处理下, 叶片中 *ZmEIL2* 的表达量在 6 h 最高, 为对照的 26.46 倍, 茎和根系中的表达量均在 3 h 最高, 分别为对照的 4.32 倍和 14.07 倍 (图 5D)。在高温处理后, 叶片、茎和根系中 *ZmEIL2* 的表达量均在 6 h 最高, 分别为对照的 14.9 倍、2.53 倍和 5.13 倍 (图 5E)。低温处理后, 叶片和茎中 *ZmEIL2* 的表达量均在 3 h 最高, 分别为对照的 12.02 倍和 6.11 倍, 根中表达量在 12 h 最高, 为对照的 8.38 倍 (图 5F)。



A: 脱水胁迫; B: PEG胁迫 (20% PEG-6000); C: ABA胁迫 (200 $\mu\text{mol/L}$ ABA); D: 盐胁迫 (250 mmol/L NaCl); E: 高温胁迫 (42 $^{\circ}\text{C}$ 高温); F: 低温胁迫 (4 $^{\circ}\text{C}$ 低温); 数据为3个生物学重复 \pm 标准差; *, **分别表示与对照相比在 $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$ 水平上差异显著

A: Dehydration stress; B: PEG (20% PEG-6000); C: ABA stress (200 $\mu\text{mol/L}$ ABA); D: Salt stress (250 mmol/L NaCl); E: Heat stress (42 $^{\circ}\text{C}$); F: Cold stress (4 $^{\circ}\text{C}$). The error bar represents \pm SD of three biological replication. *, ** mean significant difference at the $P < 0.05$ and $P < 0.01$ probability levels, respectively

图5 *ZmEIL2*基因在不同非生物胁迫下的表达

Fig.5 Expression of *ZmEIL2* genes in response to different abiotic stresses

3 讨论

EIN3/EIL蛋白是高等植物所特有的一类转录因子家族,目前多个植物中EIN3/EIL蛋白家族成员已经得到鉴定,在拟南芥、水稻、玉米中均鉴定到9个家族成员^[16,19-20],在小麦和高粱中分别鉴定到21个和15个家族成员^[21-22]。EIN3/EIL蛋白N端含有EIN3结构域,为转录激活区,具有DNA结合活性,该蛋白主要作为转录激活因子在植物体内发挥作用,因此其N端氨基酸序列较为保守,而C端氨基酸序列保守性较差,也是造成EIN3/EIL蛋白功能多样化的主要原因。本研究从玉米自交系B73中克隆得到的*ZmEIL2*基因,编码一个由595个氨基酸残基组成的蛋白,该蛋白64~315位之间存在1个典型的EIN3结构域,证明该蛋白为典型的EIN3/EIL蛋白。通过多序列比对发现,N端氨基酸序列在水稻、小麦、大麦、玉米、高粱、谷子、糜子、拟南芥、大豆等9种植物中高度保守,推测*ZmEIL2*蛋白可能与其他8种植物一样,均发挥转录激活的作用,调控*ERF1*等下游基因的表达,C端保守性较差,说明不同物种间的EIN3/EIL蛋白可能在进化过程中形成了功能的分化^[23-24]。

试验证明大部分EIN3/EIL蛋白是在细胞核中发挥转录调控作用^[22,25-26],高熊枫等^[26]对6个水稻EIN3/EIL蛋白进行亚细胞定位发现,OsEIL1~5均定位在细胞核,而OsEIL6定位于质膜中,可见EIN3/EIL蛋白的亚细胞定位可能存在多样性。本研究对玉米*ZmEIL2*蛋白进行亚细胞定位分析,发现*ZmEIL2*蛋白共定位于细胞膜和细胞核,具体机制还有待进一步分析研究。表达模式分析发现,*ZmEIL2*基因在苞叶中的表达水平显著高于雌穗、雄穗、花丝和穗位叶,同时,在非生物胁迫的诱导下叶片中的表达水平明显高于茎和根系,说明*ZmEIL2*基因的表达存在明显的组织特异性。在20% PEG处理6 h、200 $\mu\text{mol/L}$ ABA处理12 h、250 mmol/L NaCl处理6 h后,叶片中*ZmEIL2*基因的相对表达量分别为对照的23.86倍、35.44倍和26.46倍,表明*ZmEIL2*基因对PEG、ABA、高盐胁迫的响应更为强烈,而这3种胁迫伴随着ABA的大量产生,说明*ZmEIL2*基因在非生物胁迫下乙烯与ABA的交互作用中可能发挥着重要功能。综上所述,*ZmEIL2*基因可能在玉米非生物胁迫响应中发挥着关键调控作用,进一步构建*ZmEIL2*过表达系和缺失突变体,研

究其在不同非生物胁迫下的表型差异,分析其生理生化水平变化,采用转录组测序、免疫共沉淀测序技术挖掘 *ZmEIL2* 基因的互作基因,将有助于深入了解其生物学功能,同时为玉米抗逆分子改良提供重要的基因资源和新的种质材料。

4 结论

ZmEIL2 基因全长 1788 bp 的 ORF 序列,共编码 595 个氨基酸残基,只有 1 个外显子。编码蛋白分子量为 63.81 kD,理论等电点为 6.34,具有 EIN3 保守结构域,属于玉米 EIN3/EIL 蛋白家族,与高粱 SbEIL1 蛋白亲缘关系最近。亚细胞定位于细胞核和细胞膜。*ZmEIL2* 基因在玉米苞叶中的表达量最高,其次是雌穗、雄穗和花丝,在穗位叶中的表达最低,其表达受脱水、PEG、ABA、高盐、高温和低温胁迫显著诱导,其中对 PEG、ABA 和盐胁迫的响应较为强烈,叶片中的表达量明显高于茎和根系。本研究结果为进一步研究 *ZmEIL2* 基因响应玉米逆境胁迫应答的分子机理提供了理论参考。

参考文献

- [1] Johnson P R, Ecker J R. The ethylene gas signal transduction pathway: A molecular perspective. *Annual Review of Genetics*, 1998, 32: 227
- [2] Kazan K. Diverse roles of jasmonates and ethylene in abiotic stress tolerance. *Trends in Plant Science*, 2015, 20 (4) : 219-229
- [3] 黎家, 李传友. 新中国成立 70 年来植物激素研究进展. *中国科学: 生命科学*, 2019, 49(10): 1227-1281
Li J, Li C Y. Seventy-year major research progress in plant hormones by Chinese scholars (in Chinese). *Scientia Sinica (Vitae)*, 2019, 49(10): 1227-1281
- [4] Chao Q M, Rothenberg M, Solano R, Roman G, Terzaghi W, Ecker J R. Activation of the ethylene gas response pathway in *Arabidopsis* by the nuclear protein ETHYLENE-INSENSITIVE3 and related proteins. *Cell*, 1997, 89: 1133-1144
- [5] Solano R, Stepanova A, Chao Q, Ecker J R. Nuclear events in ethylene signaling: A transcriptional cascade mediated by ETHYLENE-INSENSITIVE3 and ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1. *Genes & Development*, 1998, 12: 3703-3714
- [6] Peng J Y, Li Z H, Wen X, Li W Y, Shi H, Yang L S, Zhu H Q, Guo H W. Salt-induced stabilization of EIN3/EIL1 confers salinity tolerance by deterring ROS accumulation in *Arabidopsis*. *PLoS Genetics*, 2014, 10: e1004664
- [7] Salih H, He S P, Li H G, Peng Z, Du X M. Investigation of the EIL/EIN3 transcription factor gene family members and their expression levels in the early stage of cotton fiber development. *Plants*, 2020: 9: 128
- [8] Bie B B, Pan, J S, He H L, Yang X Q, Zhao J L, Cai R. Molecular cloning and expression analysis of the ethylene insensitive3 (*EIN3*) gene in cucumber (*Cucumis sativus*). *Genetics and Molecular Research*, 2013, 12: 4179-4191
- [9] Tieman D M, Ciardi J A, Taylor M G, Klee H J. Members of the tomato *LeEIL* (EIN3-like) gene family are functionally redundant and regulate ethylene responses throughout plant development. *Plant Journal*, 2001, 26: 47-58
- [10] Chen H M, Xue L, Chintamanani S, Germain H, Lin H Q, Cui H T, Cai R, Zuo J R, Tang X Y, Li X, Guo H W, Zhou J M. ETHYLENE INSENSITIVE3 and ETHYLENE INSENSITIVE3-LIKE1 repress SALICYLIC ACID INDUCTION DEFICIENT2 expression to negatively regulate plant innate immunity in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 2009, 21(8): 2527-2540
- [11] Liu J, Zhang T R, Jia J Z, Sun J Q. The wheat mediator subunit TaMED25 interacts with the transcription factor TaEIL1 to negatively regulate disease resistance against powdery mildew. *Plant Physiology*, 2016, 170: 1799-1816
- [12] Maruyama-Nakashita A, Nakamura Y, Tohge T, Saito K, Takahashi H. *Arabidopsis* SLIM1 is a central transcriptional regulator of plant sulfur response and metabolism. *Plant Cell*, 2006, 18: 3235-3251
- [13] Zhong S W, Zhao M T, Shi T Y, Shi H, An F Y, Zhao Q, Guo H W. EIN3/EIL1 cooperate with PIF1 to prevent photo-oxidation and to promote greening of *Arabidopsis* seedlings. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2009, 106 (50): 21431-21436
- [14] Li G, Zhang L, Wang M, Di D, Kronzucker H J, Shi W. The *Arabidopsis* AMOT1/EIN3 gene plays an important role in the amelioration of ammonium toxicity. *Journal of Experimental Botany*, 2019, 70: 1375-1388
- [15] Ren M Y, Feng R J, Shi H R, Lu L F, Yun T Y, Peng M, Guan X, Zhang H, Wang J Y, Zhang X Y, Li C L, Chen Y J, He P, Zhang Y D, Xie J H. Expression patterns of members of the ethylene signaling-related gene families in response to dehydration stresses in *cassava*. *PLoS ONE*, 2017, 12: e177621
- [16] Jyoti S D, Azim J B, Robin A H K. Genome-wide characterization and expression profiling of *EIN3/EIL* family genes in *Zea mays*. *Plant Gene*, 2021, 25: 100270
- [17] Shi Q L, Dong Y B, Qiao D H, Zhou Q, Zhang L, Ma Z Y, Li Y L. Characterization and functional analysis of transcription factor *ZmEIL1* in maize. *Biologia Plantarum*, 2017, 61: 266-274
- [18] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408
- [19] Berardini T Z, Reiser L, Li D, Mezheritsky Y, Muller R, Strait E, Huala E. The *Arabidopsis* information resource: Making and mining the "gold standard" annotated reference plant genome. *Genesis*, 2015, 53: 474-485
- [20] Ouyang S, Zhu W, Hamilton J, Lin H, Campbell M, Childs K, Buell C R. The TIGR rice genome annotation resource: Improvements and new features. *Nucleic Acids Research*,

- 2007, 35: 883-887
- [21] He Y Q, Huang W D, Yang L, Li Y T, Lu C, Zhu Y X, Ma D F, Yin J L. Genome-wide analysis of ethylene-insensitive3 (EIN3/EIL) in *Triticum aestivum*. *Crop Science*, 2020, 60: 2019-2037
- [22] Jin J P, Tian F, Yang D C, Meng Y Q, Kong L, Luo J C, Gao G. PlantTFDB 4.0: Toward a central hub for transcription factors and regulatory interactions in plants. *Nucleic Acids Research*, 2017, 45: 1040-1045
- [23] Guo H W, Ecker J R. The ethylene signaling pathway: New insights. *Current Opinion in Plant Biology*, 2004, 7(1): 40-49
- [24] Rieu I, Mariani C, Weterings K. Expression analysis of five tobacco EIN3 family members in relation to tissue-specific ethylene responses. *Journal of Experimental Botany*, 2003, 54: 2239-2244
- [25] Yang C, Ma B, He S J, Xiong Q, Duan K X, Yin C C, Chen H, Lu X, Chen S Y, Zhang J S. MAOHUZI6/ETHYLENE INSENSITIVE3-LIKE1 and ETHYLENE INSENSITIVE3-LIKE2 regulate ethylene response of roots and coleoptiles and negatively affect salt tolerance in rice. *Plant Physiology*, 2015, 169(1): 148-165
- [26] 高熊枫, 李杰, 朱佳美, 寿惠霞. 水稻 EIN3/EIL 转录因子家族克隆与表达分析. *植物生理学报*, 2022, 58(8): 1475-1484
- Gao X F, Li J, Zhu J M, Shou H X. Cloning and expression analysis of EIN3/EIL transcription factor family in rice. *Plant Physiology Journal*, 2022, 58(8): 1475-1484