

玉米 *ZmNAC99* 基因的克隆 及干旱诱导表达分析

张 丽¹, 张 庭², 谭登峰², 王 军³, 韩兆雪^{1*}

(1 西北农林科技大学 生命科学学院, 陕西杨陵 712100; 2 西北农林科技大学 农学院, 陕西杨陵 712100; 3 四川省农业科学院经济作物栽培研究所, 成都 610300)

摘 要: 以不同抗旱性玉米自交系为材料, 克隆得到玉米 *ZmNAC99* 基因的 gDNA 序列和 cDNA 序列, 并对其进行初步的生物信息学分析, 同时结合 RT-PCR 和 qRT-PCR 技术对其在不同干旱程度下的表达模式进行了分析。结果显示: (1) *ZmNAC99* 基因的 gDNA 长 1 892~1 908 bp, cDNA 长 1 188 bp, 共编码 395 个氨基酸, 其 N-端具有保守的 NAM 结构域; 系统进化分析表明推断的 *ZmNAC99* 蛋白属于 NAC 家族中的 OsNAC3 亚类。 (2) RT-PCR 和 qRT-PCR 分析表明, 干旱胁迫诱导下 *ZmNAC99* 表达上调; 顺式元件分析进一步揭示了 *ZmNAC99* 基因的推断启动子包含 2 个干旱应答顺式元件 MBS 和 1 个低温应答元件 LTR。 (3) 不同抗旱性玉米自交系来源的 *ZmNAC99* 推断氨基酸序列存在 4 个氨基酸突变, 推测其结构差异对玉米抗旱性可能产生一定影响。研究表明, *ZmNAC99* 可能在植物的抗逆过程发挥作用。

关键词: 玉米; NAC; 转录因子; 干旱胁迫; 基因表达

中图分类号: Q785; Q789

文献标志码: A

Isolation and Drought Induced Expression Characterization of *ZmNAC99* Gene from Maize

ZHANG Li¹, ZHANG Ting², TAN Dengfeng², WANG Jun³, HAN Zhaoxue^{1*}

(1 College of Life Sciences, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China; 2 College of Agronomy, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China; 3 Institute of Crop Cultivation, Sichuan Academy of Agricultural Sciences, Chengdu 610300, China)

Abstract: The gDNA sequence and cDNA sequence of the *ZmNAC99* gene were cloned from maize (*Zea mays*) inbred lines with differentially drought resistance. We carried on the preliminary bioinformatics analysis, and RT-PCR and qRT-PCR techniques were used to analyze the gene expression patterns under drought stress. The results indicated that: (1) the gDNA of *ZmNAC99* were 1 892~1 908 bp and cDNA was 1 188 bp, encoding 395 amino acids, the N-terminal of *ZmNAC99* has a typical NAM domain. Phylogenetic analysis showed that *ZmNAC99* belonged to the OsNAC3 subfamily of the NAC family; (2) RT-PCR and qRT-PCR analysis indicated that *ZmNAC99* could be induced by drought stress treatment; The *cis*-element analysis further revealed that the putative promoter of the *ZmNAC99* gene contained 2 drought-responsive *cis*-elements MBS and 1 low temperature responsive element LTR. (3) The amino acid sequence alignment analysis of *ZmNAC99* from different drought-resistant maize inbred lines suggested that there were 4 amino-acid mutation, and we speculated that the difference of the structure may have an

收稿日期: 2016-12-20; 修改稿收到日期: 2017-03-30

基金项目: 国家自然科学基金(31201268); 陕西省自然科学基金(2011JQ3005)

作者简介: 张 丽(1991—), 女, 硕士研究生, 主要从事玉米抗旱研究。E-mail: 4093951972@qq.com

* 通信作者: 韩兆雪, 副教授, 主要从事玉米抗旱研究。E-mail: zxhan@nwsuaf.edu.cn

effect on the drought resistance of maize. These results suggest that *ZmNAC99* may play an important role in the plant's resistance to stress.

Key words: maize; NAC; transcription factor; drought stress; gene expression

转录因子(transcription factor, TF)又称反式作用因子,是一类重要的调控蛋白,能与真核生物基因启动子区域的顺式作用元件发生特异性结合,从而激活或抑制下游基因以特定的强度、在特定的时间与空间转录和表达的一类 DNA 结合蛋白。依据 DNA 结合域的不同,将转录因子分为不同的家族,其中,NAC 转录因子家族被认为是植物所特有的一类转录因子,广泛存在于各种植物中,而在其他真核生物中还未发现^[1]。

NAC(NAM、ATAF1/2 和 CUC2)转录因子主要结构特点是 N 端含有一段约 150 个氨基酸组成的高度保守的结构域,可以特异结合 DNA 和其他蛋白,该保守结构域包含 5 个子结构域(A、B、C、D、E),其中 A、C、D 高度保守,而 B 和 E 则是变化的^[2-4],C 和 D 主要参与结合 DNA,而 A 则可能参与功能二聚体的形成,B 和 E 子结构域的保守性相对较弱,引起了 NAC 功能的多样化^[5-6];C 端则为高度多样性转录激活调控区,富含丝氨酸、苏氨酸、脯氨酸、谷氨酸等。研究表明,NAC 转录因子不仅参与植物生长发育、营养价值、激素信号途径等的调控,而且在植物应答生物和非生物等多种胁迫过程中具有重要的调控作用^[7-8]。Lu 等^[9]的研究表明,ATAF1 基因表达受干旱和 ABA 的诱导,恢复浇水后又受到抑制。拟南芥渗透胁迫反应基因 *ATAF1* 的表达对抗旱起到负调控作用。Trans 等^[10]通过酵母单杂交方法从拟南芥中分离克隆得到 3 个 NAC 家族基因 *ANAC019*、*ANAC055* 和 *ANAC072*,对其过表达转基因植株进行抗逆功能分析表明,转基因植株的耐旱性均显著提高,其中 *ANAC072* 在依赖 ABA 的信号转导途径中发挥耐旱功能。Hu 等^[11]的研究表明过表达水稻 *SNAC1* 显著提高转基因水稻抗旱性,对生长到四叶期的转基因植株进行耐旱和耐盐性鉴定,结果显示转基因植株在干旱和盐胁迫下存活率显著提高,表明转基因水稻的耐旱和耐盐性较野生型植株显著提高。

玉米作为重要的粮食、饲料和能源作物,在全世界范围内被大面积种植。然而对玉米带地区气象资料和玉米产量的相关数据分析得出,干旱是导致中国玉米产量波动的主要原因^[12]。因此,进行抗旱性研究对于保证玉米生产和产量,促进农业的可持续

发展具有重要的意义。NAC 转录因子在植物抗逆过程中起着重要作用,因此挖掘玉米中重要的逆境胁迫应答 NAC 基因,对于提高玉米抗逆性具有重要的作用。本研究克隆得到一个玉米 NAC 类转录因子基因 *ZmNAC99*(GRMZM2G430849),对其进行了初步的生物信息学分析及其在不同干旱程度处理条件下的表达模式分析,为后续深入探究其抗逆生物学功能奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

供试玉米材料共 5 份,1 份为干旱敏感型玉米自交系材料 B73,另 4 份包括强抗旱自交系 ZM76 和 ZM11 以及弱抗旱自交系 ZM21 和 ZM75,由本实验室孙欢欢鉴定并保存。

质粒 pBluescript II KS 来自西北农林科技大学生命科学学院郁飞老师实验室,大肠杆菌(*Escherichia coli*)Top10 由本实验室保存。

1.2 方法

1.2.1 植物材料的处理 选取饱满的玉米自交系 B73、ZM11、ZM21、ZM75 和 ZM76 的种子,分别用 75%乙醇和次氯酸钠进行消毒,之后用无菌水反复冲洗 4~5 遍,黑暗条件下于无菌水中浸泡 12 h,将种子种植于装有蛭石的花盆中,28 ℃、16 h 光照,22 ℃、8 h 黑暗,培养至三叶期,取叶片迅速置于液氮中,于-80 ℃冰箱保存备用。

发芽的玉米自交系 B73 的种子被转移到装满蛭石的小盆中,培养条件同 1.2.1,空气相对湿度 30%~50%,培养至三叶期,在此期间每天正常供水,以保证土壤的相对含水量在 80%左右(野外条件下,土壤田间最大持水量为 26.2%)^[13]。然后,采用控水法对三叶期的幼苗进行正常浇水、轻度、中度和重度干旱处理,即土壤相对含水量分别为土壤田间最大持水量的 80%、60%、45%和 30%左右,土壤相对含水量 80%作为对照组。分别剪取玉米叶片组织,每个材料取 3 个生物学重复,经液氮速冻后于-80℃冰箱保存备用。

1.2.2 玉米基因组 DNA 和 RNA 的提取及 cDNA 的合成 利用 CTAB 法提取玉米幼苗叶片的基因组 DNA,1%琼脂糖凝胶电泳检测基因组 DNA。利

用 TRIzol Reagent (TAKARA) 提取 RNA, 通过 Nanodrop1000 进行浓度检测, 通过 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 质量和完整性。

DNase I 处理提取的 RNA, 然后使用罗氏公司反转录试剂盒将 RNA 合成 cDNA 第一链。

1.2.3 玉米 *ZmNAC99* 基因的克隆 根据在 Maize GBD 数据库 (<http://www.maizesequence.org/index.html>, release 5b. 60) 中获得 *ZmNAC99* 基因的序列, 利用 Primer Premier 5 软件设计用于扩增全长 gDNA 引物, 引物分别为 *ZmNAC99*-F (CGCGGATC-CATGACGATGGCAGCTACGACG) 和 *ZmNAC99*-R (CGCGGATCCCTAGAACTGTGGGAGCATGT-GGT)。分别以玉米自交系 B73、ZM11、ZM21、ZM75 和 ZM76 的 gDNA 以及 B73 的 cDNA 为模板, 扩增目的基因。25 μ L PCR 反应扩增体系为: ddH₂O 14.8 μ L, 5 $\times$ 缓冲液 5 μ L, dNTP (10 mmol/L) 2 μ L, 上下游引物 (10 μ mol/L) 各 1 μ L, GoldStar Taq DNA 聚合酶 (CW BIO, 5U/ μ L) 0.2 μ L, 模板 2 μ L。PCR 扩增条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min, 按 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 63 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2.25 min, 共进行 35 轮循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 8 min。PCR 产物由 DNA 纯化回收试剂盒 (TIANGEN) 纯化回收后, 经 *Bam*H I (TAKARA) 单酶切后与同种酶切后的 pBluescript II KS 载体连接并转化大肠杆菌 Top10 感受态细胞, 筛选阳性重组子, 经酶切鉴定成功后, 选取 3 个阳性克隆送上海生工生物工程股份有限公司测序。

1.2.4 玉米 *ZmNAC99* 基因的序列分析 本研究利用 DNAMAN 软件分析玉米 *ZmNAC99* 序列结构; 利用 ClustalW 在线比对网站进行氨基酸比对; 利用 MEGA6.06 软件进行系统进化分析; 运用 Plantcare 在线软件 (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 进行顺式作用元件分析; 运用 MEME 在线软件 (<http://meme-suite.org/>) 对 *ZmNAC99* 的推断氨基酸序列进行保守 motif 分析。

1.2.5 RT-PCR 和 qRT-PCR 分析 采用玉米自交系 B73 不同干旱处理获取的 cDNA 样品为模板, 进行目的基因的半定量 RT-PCR 和实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 表达分析。利用 Primer Premier5 软件设计引物 *ZmNAC99*-qF (TCGTGCGGT-GAAGAACAAT) 和 *ZmNAC99*-qR (CACTGCGC-CTGAAATGAATAT), 玉米 *GADPH* 基因为内参基因, 扩增引物为 *GADPH*-F (CCCTTCATCAC-

CACGGACTAC) 和 *GADPH*-R (AACCTTCTTG-GCACCACCCT)。

半定量 RT-PCR 反应体系为: 2 $\times$ MasterMix 10 μ L, 正反引物 (10 μ mol/L) 各 1 μ L, cDNA (10~50 ng) 3 μ L, ddH₂O 5 μ L, 共 20 μ L。反应程序为: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 20 s; 72 $^{\circ}$ C 8 min, 25 个循环。通过 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测基因表达情况。

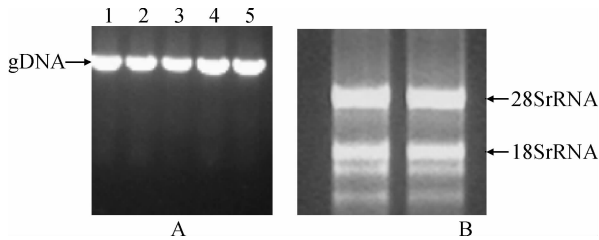
qRT-PCR 反应体系为: 12.5 μ L SYBR Green PCR Master Mix (TaKaRa, 大连), 2 μ L cDNA (稀释后), 正反向引物 (10 μ mol/L) 各 1 μ L, ddH₂O 补充体系至 25 μ L, 每个样品设 3 个生物学重复, 2 个技术性重复。反应程序为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 2 min, 40 个扩增循环 (95 $^{\circ}$ C, 10 s; 58 $^{\circ}$ C, 20 s; 72 $^{\circ}$ C, 30 s), 在 PCR 最后一步对 PCR 产物特异性进行熔解曲线分析 (温度为 65 $^{\circ}$ C~95 $^{\circ}$ C)。

2 结果与分析

2.1 玉米 *ZmNAC99* 基因克隆及结构分析

2.1.1 DNA 和 RNA 质量检测 利用 CTAB 法提取玉米自交系 B73、ZM11、ZM21、ZM75 和 ZM76 的基因组 DNA, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 结果 (图 1, A) 显示, 条带单一, 未出现降解。可用于后续的基因组扩增。

通过 TRIzol Reagent 试剂盒提取的自交系 B73 总 RNA, 纯化后 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测, 结果 (图 1, B) 显示, 出现 4 条带, 28S 和 18S rRNA 边缘清晰, 条带明亮, 且 28S rRNA 条带亮度约是 18S rRNA 条带亮度的 2 倍, 通过核酸蛋白超微量测定仪检测 $A_{260/280}$ 为 1.95, 说明提取的玉米总 RNA 完整度和纯度均较好, 可用于后续实验。



A. 1~5 分别为 B73、ZM11、ZM21、ZM75 和 ZM76 的基因组 DNA ; B. B73 RNA
图 1 玉米 gDNA 和 RNA 的检测
A. 1—5 were the gDNA extracted from B73, ZM11, ZM21, ZM75 and ZM76, respectively; B. The RNA of B73
Fig. 1 Detection of maize gDNA and RNA

2.1.2 玉米 *ZmNAC99* 基因克隆及结构分析 分别以玉米自交系 B73、ZM11、ZM21、ZM75 和 ZM76 的 gDNA 为模板,克隆得到玉米 *ZmNAC99* 基因的 gDNA 序列,扩增长度分别为 1 907、1 892、1 907、1 907 和 1 908 bp,以 B73 cDNA 为模板克隆得到其 cDNA 编码区为 1 188 bp,共编码 395 个氨基酸(图 2)。利用 DNAMAN 软件对测序所得的 *ZmNAC99* 的 gDNA 序列和 cDNA 序列进行比对,结果(图 3)表明,*ZmNAC99* 基因包含 2 个内含子和 3 个外显子。

2.2 *ZmNAC99* 推断氨基酸序列比对

通过 ClustalW 在线比对网站对来源不同抗旱性玉米的 *ZmNAC99* 的推断氨基酸序列进行比对,其一致性高达 98.79%,有 4 个氨基酸残基突变位点(图 4)。其中,强抗旱自交系 ZM11 和干旱敏感自交系 ZM21 之间的氨基酸差异位点有 3 个;强抗旱自交系 ZM76 和干旱敏感自交系 ZM75 之间的氨基酸差异位点有 2 个;*ZmNAC99* 的氨基酸序列在 2 个强抗旱自交系 ZM11 和 ZM76 之间的差异存在 2 个,3 个干旱敏感自交系 ZM75、ZM21 和 B73 不存在差异。这说明 *ZmNAC99* 的氨基酸序列在不同玉米自交系品种中存在一定差异,且氨基酸序列特征与玉米自交系抗旱性之间可能存在相关性。

2.3 *ZmNAC99* 基因的系统进化分析及蛋白保守域分析

利用 MAGE6.06 软件,对玉米 *ZmNAC99* 推断氨基酸序列和其他植物来源的已知功能 NAC 基因进行序列比对,比对结果用于构建系统进化树。从系统进化树结果可以看出^[14-17](图 6, A),*ZmNAC99* 与 *ZmNAC111*、*ZmSNAC1* 以及水稻 *OsNAC3* 等亲缘关系较近,可归为一类(*OsNAC3* 亚

类),而其中 *ZmNAC99* 和 *ZmNAC111* 亲缘关系更近,保守结构域氨基酸序列一致性达到 84.3%。Mao 等^[18]的研究结果表明玉米 *ZmNAC111* 基因在提高转基因植物耐旱性方面具有重要作用。基于这几个基因在结构上的保守性,推测 *ZmNAC99* 基因在玉米抗旱过程中也可能发挥重要功能。

运用 MEME(<http://meme-suite.org/>)对 *ZmNAC99* 和其他已报道的功能已知 NAC 基因的推测蛋白进行分析,结果(图 6, B)表明,*ZmNAC99* 与其他已报道的 NAC 蛋白结构具有极高相似性,具有 5 个保守的 motif,且均位于 NAC 保守结构域。

2.4 干旱胁迫诱导 *ZmNAC99* 表达分析

利用半定量 RT-PCR 和 qRT-PCR 方法检测玉米 *ZmNAC99* 在不同干旱程度下表达情况。RT-PCR 结果(图 5, A)显示,与对照相比,在中度和重度干旱胁迫下,*ZmNAC99* 基因表达上调。qRT-PCR 结果(图 5, B)中,将对照组基因相对表达值均一化为 1,中度干旱胁迫下基因相对表达值是对照组的 2.2 倍左右,表明在中度干旱胁迫下 *ZmNAC99* 表达上调,暗示 *ZmNAC99* 基因可能在玉米响应干旱胁迫中起作用。

2.5 *ZmNAC99* 基因启动子的顺式作用元件分析

根据基因转录表达结果,为理解 *ZmNAC99* 基因在玉米非生物胁迫应答中的分子调控机制,使用

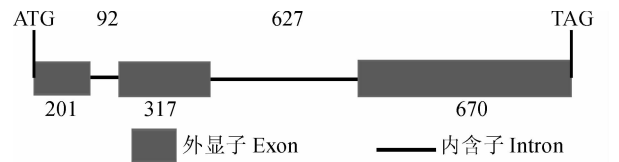
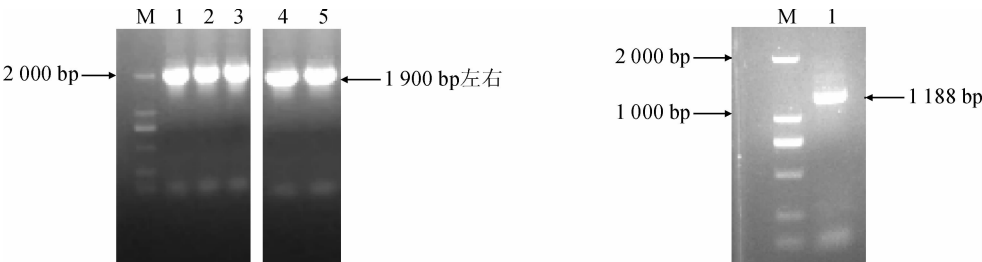


图 3 B73 玉米 *ZmNAC99* 基因结构模式
Fig. 3 The gene structure model of *ZmNAC99* in B73



M. DL2000; A. 1~5 分别是以 B73、ZM11、ZM21、ZM75 和 ZM76 的基因组 DNA 为模板扩增的目的片段;
B. 1 是以 B73 的 cDNA 为模板扩增的目的片段

图 2 玉米 *ZmNAC99* 基因 PCR 扩增

M. DL2000; A. 1—5 represent target fragments amplified by the gDNA of B73, ZM11, ZM21, ZM75 and ZM76 as templates, respectively; B. 1 represents the target fragment amplified by B73 cDNA as a template

Fig. 2 PCR amplification of *ZmNAC99* gene in maize

ZM11	MTMAAITTMMSSAAAQAATSQLPFGFRFHFTDEELILHYLRNRAASAPCFVPIIADVDIYK
ZM76	MTMAAITTMMSSAAAQAATSQLPFGFRFHFTDEELILHYLRNRAASAPCFVPIIADVDIYK
ZM75	MTMAAITTMMSSAAAQAATSQLPFGFRFHFTDEELILHYLRNRAASAPCFVPIIADVDIYK
ZM21	MTMAAITTMMSSAAAQAATSQLPFGFRFHFTDEELILHYLRNRAASAPCFVPIIADVDIYK
B73	MTMAAITTMMSSAAAQAATSQLPFGFRFHFTDEELILHYLRNRAASAPCFVPIIADVDIYK

ZM11	FDPWDLFAKALYGDGEYFFSPRDEKYPNGIRPNRAAGSGYWKATGTDEPIHIAATGEGV
ZM76	FDPWDLFAKALYGDGEYFFSPRDEKYPNGIRPNRAAGSGYWKATGTDEPIHIAATGEGV
ZM75	FDPWDLFAKALYGDGEYFFSPRDEKYPNGIRPNRAAGSGYWKATGTDEPIHIAATGEGV
ZM21	FDPWDLFAKALYGDGEYFFSPRDEKYPNGIRPNRAAGSGYWKATGTDEPIHIAATGEGV
B73	FDPWDLFAKALYGDGEYFFSPRDEKYPNGIRPNRAAGSGYWKATGTDEPIHIAATGEGV

ZM11	GVKKALVIFYKGRPPRGSKTNWIMHEYRLAAVAGSTSPLAAYRPSPKFRNVSMELDLWVLC
ZM76	GVKKALVIFYKGRPPRGSKTNWIMHEYRLAAVAGSTSPLAAYRPSPKFRNVSMELDLWVLC
ZM75	GVKKALVIFYKGRPPRGSKTNWIMHEYRLAAVAGSTSPLAAYRPSPKFRNVSMELDLWVLC
ZM21	GVKKALVIFYKGRPPRGSKTNWIMHEYRLAAVAGSTSPLAAYRPSPKFRNVSMELDLWVLC
B73	GVKKALVIFYKGRPPRGSKTNWIMHEYRLAAVAGSTSPLAAYRPSPKFRNVSMELDLWVLC

ZM11	RIYKKSGHASPMVFPPLADYEHLDRLDGFSPGGFFDDYFCGSTSLYAAAAATGGGAAAAGT
ZM76	RIYKKSGHASPMVFPPLADYEHLDRLDGFSPGGFFDDYFCGSTSLYAAAAATGGGAAAAGT
ZM75	RIYKKSGHASPMVFPPLADYEHLDRLDGFSPGGFFDDYFCGSTSLYAAAAATGGGAAAAGT
ZM21	RIYKKSGHASPMVFPPLADYEHLDRLDGFSPGGFFDDYFCGSTSLYAAAAATGGGAAAAGT
B73	RIYKKSGHASPMVFPPLADYEHLDRLDGFSPGGFFDDYFCGSTSLYAAAAATGGGAAAAGT

ZM11	TNTTTTIPAVVMQHQHQPAAALFRLPKIPSISELLWDEYALAQILDPAADVAADHASFAVHP
ZM76	TNTTTTIPAVVMQHQHQPAAALFRLPKIPSISELLWDEYALAQILDPAADVAADHASFAVHP
ZM75	TNTTTTIPAVVMQHQHQPAAALFRLPKIPSISELLWDEYALAQILDPAADVAADHASFAVHP
ZM21	TNTTTTIPAVVMQHQHQPAAALFRLPKIPSISELLWDEYALAQILDPAADVAADHASFAVHP
B73	TNTTTTIPAVVMQHQHQPAAALFRLPKIPSISELLWDEYALAQILDPAADVAADHASFAVHP

ZM11	SLNQLLAVGDDGSDLMMFSPFPAAAAGGGRKAMVAMNNSPADECAVTANQHQSPAAKRLN
ZM76	SLNQLLAVGDDGSDLMMFSPFPAAAAGGGRKAMVAMNNSPADECAATANQHQSPAAKRLN
ZM75	SLNQLLAVGDDGSDLMMFSPFPAAAAGGGRKAMVAMNNSPADECAATANQHQSPAAKRLN
ZM21	SLNQLLAVGDDGSDLMMFSPFPAAAAGGGRKAMVAMNNSPADECAATANQHQSPAAKRLN
B73	SLNQLLAVGDDGSDLMMFSPFPAAAAGGGRKAMVAMNNSPADECAATANQHQSPAAKRLN

ZM11	GGSCFIDAPQFASGLPATMSSVLGGGLNHMLPQF
ZM76	GGSCFIDAPQFASGLPATMSSVLGGGLNHMLPQF
ZM75	GGSCFIDAPQFASGLPATMSSVLGGGLNHMLPQF
ZM21	GGSCFIDAPQFASGLPATMSSVLGGGLNHMLPQF
B73	GGSCFIDAPQFASGLPATMSSVLGGGLNHMLPQF

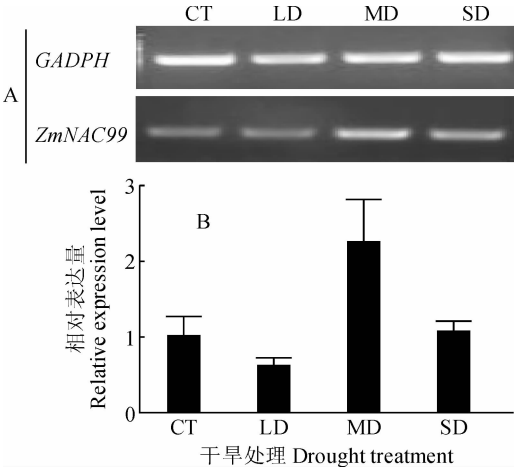
图 4 5 个玉米自交系 *ZmNAC99* 推断氨基酸序列分析

Fig. 4 Sequence analysis of deduced amino acid of *ZmNAC99* from five maize inbred lines

PlantCare 在线预测软件对其启动子中潜在的非生物胁迫应答顺式作用元件进行了分析。结果显示,除了包含核心启动子元件如 TATA-box 和 CAAT-box 之外,*ZmNAC99* 基因启动子中也存在非生物胁迫应答元件,如在 *ZmNAC99* 的 ATG 上游 141 和 738 bp 的 2 个位置分别存在一个响应干旱的 MYB 结合位点 MBS,在 766 bp 的位置存在一个响应厌氧胁迫的 ARE 位点,此外,在 165 bp 处还存在一个响应冷害胁迫的 LTR 位点(图 7),这说明该基因可能参与了植物干旱和冷害应答过程。

3 讨 论

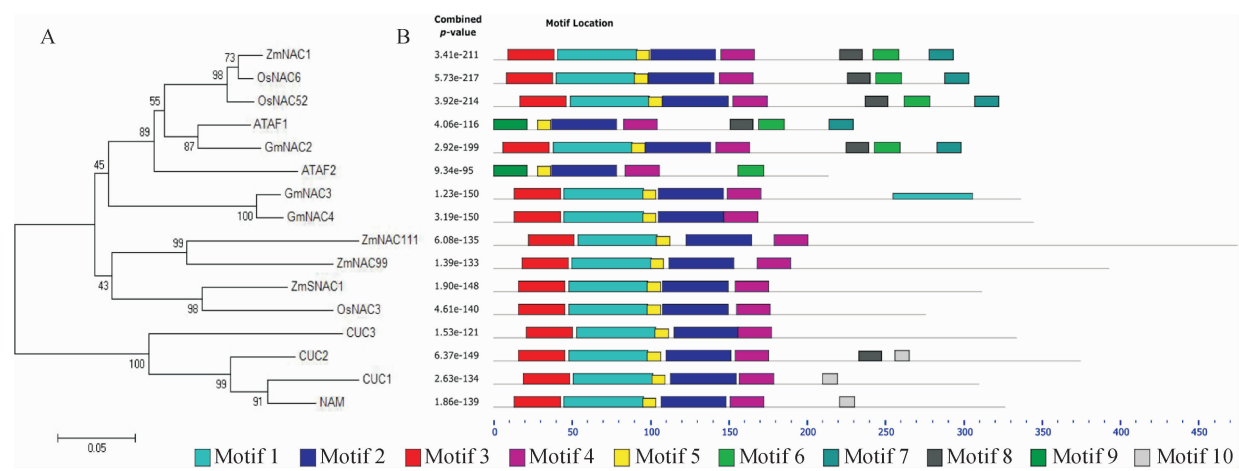
NAC 转录因子不仅广泛参与调节植物形态建设、根部的生长与伸长和叶片衰老等,而且在参与调控植物抵抗干旱、高盐、低温、病毒等胁迫损伤中也具有重要作用^[19-20]。基于 NAC 转录因子在植物抗逆过程中的重要作用,本研究从不同抗旱性玉米自



CT. 对照组;LD. 轻度干旱;MD. 中度干旱;SD. 重度干旱;
A. RT-PCR;B. qRT-PCR

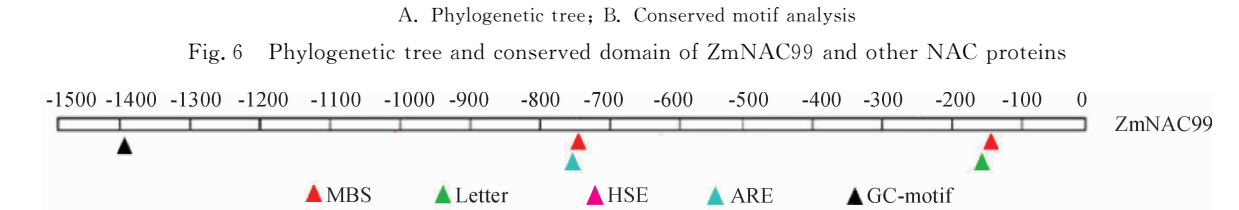
图 5 玉米 *ZmNAC99* 基因在不同干旱程度下的表达
CT. Control test, LD. Light drought, MD. Moderate drought,
SD. Severe drought; A. RT-PCR; B. qRT-PCR

Fig. 5 Expression of *ZmNAC99* gene in maize under different drought conditions



A. 系统进化树;B. 蛋白保守 motif 分析

图 6 ZmNAC99 与其他 NAC 蛋白的系统进化树及蛋白保守结构域



MBS. MYB 结合位点,参与干旱诱导;ARE. 厌氧诱导;HSE. 热激应答;LTR. 冷害应答;GC-motif. 参与特异性的厌氧诱导

图 7 ZmNAC99 启动子的顺式作用元件分析

MBS. MYB binding site, involved drought-inducibility; ARE. Anaerobic induction; HSE. Heat stress responsiveness

LTR. Low-temperature responsiveness; GC-motif. Anoxic specific inducibility

Fig. 7 Analysis of *cis*-acting elements of *ZmNAC99* promoter

交系中克隆得到 *ZmNAC99* 基因,并对其进行了初步的生物信息学分析和基因表达分析。研究结果表明,*ZmNAC99* 基因推测蛋白与其他已报道的 NAC 类基因的蛋白保守结构域具有很高的相似性,在其 N-端具有 NAC 家族典型的 NAM 结构域,表明其是典型的 NAC 家族的成员。

系统进化分析表明 *ZmNAC99* 属于 NAC 家族中的 OsNAC3 亚类。OsNAC3 亚家族成员被认为参与植物的逆境胁迫应答,比如,在 OsNAC3 类中,玉米 *ZmNAC111* 基因的表达受干旱和 ABA 处理的诱导,在干旱胁迫情况下,转基因拟南芥和转基因玉米的存活率高达 80%,水分利用率(WUE)明显高于对照组,说明 *ZmNAC111* 在抗旱反应中起重要作用^[18];同样,该亚类的 *ZmSNAC1* 基因受 ABA 胁迫和非生物胁迫诱导表达上调,该基因的过量表达能够提高转基因植株在苗期和生殖生长发育时期的抗逆性,说明 *ZmSNAC1* 基因作为 ABA 依赖信号通路内的调节因子,参与逆境胁迫信号在植物体内的传递^[21];另外,高粱 *SbSNAC1* 基因(属于 OS-NAC3 亚类)的表达受干旱、ABA 和高盐等胁迫处

理的诱导,转基因植株的生存率明显高于野生型,并且在干旱处理下转基因植株的电解质渗透率低于野生型,这说明 *SbSNAC1* 参与植物的逆境胁迫应答^[22]。而且,前人的研究结果也表明,基因结构的相似性预示着其蛋白功能的相似性^[1]。本研究基因转录表达的结果表明,不同干旱处理情况下 *ZmNAC99* 可以被干旱所诱导,通过进一步对 *ZmNAC99* 上游启动子顺式作用元件分析发现,在其 ATG 上游存在响应干旱、冷害和厌氧胁迫的位点,由此推断 *ZmNAC99* 可能参与干旱、冷害和厌氧胁迫等多种非生物胁迫应答。

此外,本研究还对玉米 *ZmNAC99* 基因在不同抗旱玉米自交系中的差异进行了初步分析,鉴定结果显示,其氨基酸序列在强抗旱自交系 ZM11 和干旱敏感自交系 ZM21 及强抗旱自交系 ZM76 和干旱敏感自交系 ZM75 之间的差异位点分别有 3 个和 2 个,在 2 个强抗旱自交系 ZM11 和 ZM76 之间的差异位点有 2 个,而在 3 个干旱敏感自交系 ZM21、ZM75 和 B73 之间不存在差异,由此可见 *ZmNAC99* 的氨基酸序列在抗旱水平相当的玉米自交

系之间差异很小,推测其序列特征与玉米自交系抗旱性之间可能存在一定的相关性,后续可对该基因在不同抗旱玉米自交系中的结构差异进一步验证,探索其结构差异对植物的抗旱性可能造成的影响。

目前 *NAC* 基因在拟南芥和水稻等模式植物上的研究已取得重大进展,本研究通过克隆得到玉米

NAC 家族成员中的一个基因,初步研究明确了 *ZmNAC99* 在参与植物抗逆应答过程中可能具有重要作用,但其抗逆功能和作用机制还需进一步研究,从而为后续进一步运用转基因技术获得抗逆转基因作物新材料提供了基因资源。

参考文献:

- [1] 史红飞,高 翔,陈其皎,等. 小麦 *NAC* 转录因子的基因克隆与序列分析[J]. 麦类作物学报, 2011,**31**(3): 395-401.
SHI H F, GAO X, CHEN Q J, *et al.* Genes cloning and sequence analysis of *NAC* transcription factor gene in wheat[J]. *Journal of Triticeae Crops*, 2011,**31**(3): 395-401.
- [2] 伊巴代提·喀迪尔,周 蓉,朱怀稼,等. 玉米 *ZmNAC1* 基因的克隆与分析[J]. 北京农学院学报, 2016,**31**(2): 16-21.
KADIER Y B D T, ZHOU R, ZHU H J, *et al.* Cloning and analysis of *ZmNAC1* gene in maize (*Zea mays* L.) [J]. *Journal of Beijing University of Agriculture*, 2016,**31**(2): 16-21.
- [3] 柳展基,邵凤霞,唐桂英,等. 一个新的玉米 *NAC* 类基因(*ZmNAC1*)的克隆与分析[J]. 遗传, 2009,**31**(2): 199-205.
LIU Z J, SHAO F X, TANG G Y, *et al.* Cloning and characterization of a transcription factor *ZmNAC1* in maize (*Zea mays*) [J]. *Hereditas* (Beijing), 2009,**31**(2): 199-205.
- [4] OOKA H, SATOH K, DOI K, *et al.* Comprehensive analysis of *NAC* family genes in *Oryza sativa* and *Arabidopsis thaliana* [J]. *DNA Research*, 2003,**10**(6): 239-247.
- [5] KIKUCHI K, UEGUCHI-TANAKA M, YOSHIDA K T, *et al.* Molecular analysis of the *NAC* gene family in rice[J]. *Molecular and General Genetics*, 2000,**262**(6): 1 047-1 051.
- [6] DUVAL M, HSIEH T F, *et al.* Molecular characterization of *AtNAM*; a member of the *Arabidopsis* *NAC* domain superfamily[J]. *Plant Molecular Biology*, 2002,**50**(2): 237-248.
- [7] 王彦威,潘金豹,韩 俊,等. 玉米 *NAC* 转录因子片段的克隆与分析[J]. 中国农学通报, 2012,**28**(12): 159-163.
WANG Y W, PAN J B, HAN J, *et al.* Cloning and sequence analysis of *NAC* transcription factor fragments in maize[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2012,**28**(12): 159-163.
- [8] 彭 辉,于兴旺,成慧颖,等. 植物 *NAC* 转录因子家族研究概况[J]. 植物学报, 2010,**45**(2): 236-248.
PENG H, YU X W, CHENG H Y, *et al.* The research status of plant *NAC* transcription factor family[J]. *Chinese Bulletin of Botany*, 2010,**45**(2): 236-248.
- [9] LU P L, CHEN N Z, AN R, *et al.* A novel drought-inducible gene, *ATAF1*, encodes a *NAC* family protein that negatively regulates the expression of stress-responsive genes in *Arabidopsis* [J]. *Plant Molecular Biology*, 2007,**63**(2): 289-305.
- [10] TRANS L S P, NAKASHIMA K, SAKUMA Y, *et al.* Isolation and functional analysis of *Arabidopsis* stress-inducible *NAC* transcription factors that bind to a drought-responsive cis-element in the early responsive to dehydration stress 1 promoter[J]. *Plant Cell*, 2004,**16**(9): 2 481-2 498.
- [11] HU L, DAI M, YAO J, *et al.* Overexpressing a *NAM*, *ATAF*, and *CUC* (*NAC*) transcription factor enhances drought resistance and salt tolerance in rice[J]. *National Acad Sciences*, 2006,**103**(35): 12 987-12 992.
- [12] 陈庆玉. 玉米抗旱性研究[J]. 中国新技术新产品, 2011, (13): 221.
CHEN Q Y. Study on drought resistance of maize[J]. *China New Technologies and Products*, 2011, (13): 221.
- [13] 张仁和,薛吉全,浦 军,等. 干旱胁迫对玉米苗期植株生长和光合特性的影响[J]. 作物学报, 2011,**37**(3): 521-528.
ZHANG R H, XUE J Q, PU J, *et al.* Influence of drought stress on plant growth and photosynthetic traits in maize seedlings[J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2011,**37**(3): 521-528.
- [14] NAKASHIMA K, TRAN L S P, NGUYEN D V, *et al.* Functional analysis of a *NAC*-type transcription factor *OsNAC6* involved in abiotic and biotic stress-responsive gene expression in rice[J]. *Plant Journal*, 2007,**51**(4): 617-630.
- [15] GAO F, XIONG A S, PENG R H, *et al.* *OsNAC52*, a rice *NAC* transcription factor, potentially responds to ABA and confers drought tolerance in transgenic plants[J]. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 2010,**100**(3): 255-262.
- [16] JEONG J S, KIM Y S, *et al.* Root-specific expression of *OsNAC10* improves drought tolerance and grain yield in rice under field drought conditions[J]. *Plant Physiology*, 2010,**153**(1): 185-197.
- [17] LU M, YING S, ZHANG D F, *et al.* A maize stress-responsive *NAC* transcription factor, *ZmSNAC1*, confers enhanced tolerance to dehydration in transgenic *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell Reports*, 2012,**31**(9): 1 701-1 711.
- [18] MAO H D, WANG H W, LIU S X, *et al.* A transposable element in a *NAC* gene is associated with drought tolerance in maize seedlings[J]. *Nature Communications*, 2015, 6: 8 326.
- [19] WANG Z Y, DANE, F. *NAC* (*NAM/ATAF/CUC*) transcription factors in different stresses and their signaling pathway[J]. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2013,**35**(5): 1 397-1 408.
- [20] YANG S D, SEO P J, *et al.* The *Arabidopsis* *NAC* transcription factor *VNI2* integrates abscisic acid signals into leaf senescence via the *COR / RD* genes[J]. *Plant Cell*, 2011,**23**(6): 2 155-2 168.
- [21] LU M, YING S, ZHANG D F, *et al.* A maize stress-responsive *NAC* transcription factor, *ZmSNAC1*, confers enhanced tolerance to dehydration in transgenic *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell Reports*, 2012,**31**(9): 1 701-1 711.
- [22] LU M, YING S, *et al.* Expression of *SbSNAC1*, a *NAC* transcription factor from sorghum, confers drought tolerance to transgenic *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2013,**115**(3): 443-455.

(编辑:宋亚珍)