DOI: 10.3724/SP.J.1006.2014.01549

玉米 A 亚族 bZIP 转录因子基因 *ZmbZIP81* 的克隆、表达与功能分析

王 策^{1,2} 杨艳歌^{2,3} 吕维涛^{2,*} 周春菊^{1,*} 孙冬梅³ 邓 馨²

¹ 西北农林科技大学生命科学院, 陕西杨凌 712100; ² 中国科学院植物研究所北方资源植物重点实验室, 北京 100093; ³ 黑龙江八一农垦大学生命科学技术学院, 黑龙江大庆 163319

摘 要: 碱性亮氨酸拉链(basic leucine zipper, bZIP)蛋白是真核生物所特有的一类转录因子, 对于植物在逆境下的基因表达调控具有重要作用。为丰富对玉米 bZIP 转录因子功能的认识, 本研究以从玉米中克隆到的一个 A 亚族 bZIP 转录因子编码基因 *ZmbZIP81* 为对象展开。*ZmbZIP81* 基因位于玉米第 6 染色体, 编码区全长 2492 bp, 由 4 个外显子和 3 个内含子组成, 编码蛋白含 254 个氨基酸。研究表明 *ZmbZIP81* 基因表达受外源 ABA、NaCl 和干旱胁迫诱导。过表达该基因的拟南芥植物表现出 ABA 不敏感和 NaCl 胁迫抗性增强的表型, 推测 *ZmbZIP81* 可能作为 ABA 信号途径的负调控因子参与植物抗逆基因表达调控网络。

关键词: 玉米; bZIP 转录因子; A 亚族; ABA; 逆境胁迫

Cloning, Expression, and Functional Analysis of an A Subfamily bZIP Transcription Factor Gene *ZmbZIP81* in Maize

WANG Ce^{1,2}, YANG Yan-Ge^{2,3}, LÜ Wei-Tao^{2,*}, ZHOU Chun-Ju^{1,*}, SUN Dong-Mei³, and DENG Xin²

¹ College of Life Science, Northwest A&F University, Yangling 712100, China; ² Key Laboratory of Plant Resources, Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China; ³ College of Life Science and Technology, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, China

Abstract: Basic leucine zipper (bZIP) proteins constitute a large family of transcription factors among eukaryotes, which plays important roles in gene expression regulation under abiotic stress in plants. In order to gain a better understanding of bZIPs in maize, we cloned *ZmbZIP81* from maize, which encodes an A subfamily bZIP transcription factor. *ZmbZIP81* is located on chromosome 6. The coding region of *ZmbZIP81* is 2492 bp in length with four exons and three introns, which encodes 254 amino acid residues. Further study showed that the expression of *ZmbZIP81* was induced by exogenous ABA, salt and drought treatments. The transgenic *Arabidopsis* plants overexpressing *ZmbZIP81* were less sensitive to ABA, but more tolerant to salt, compared with the wild type. These results indicated that *ZmbZIP81* may encode a transcription factor, regulate ABA signaling negatively and participate in abiotic stress tolerance regulation in maize.

Keywords: Maize; bZIP transcription factor; A subfamily; ABA; Abiotic stress

bZIP 转录因子广泛存在于动植物和微生物中, 参与多种生物学过程。它是转录因子中一个较大的家族, 所有成员均由一个起二聚体化作用的亮氨酸拉链结构域和一个结合 DNA 的碱性结构域组成^[1]。亮氨酸拉链结构域能够形成一个具有两亲性的 α 螺旋, 通过形成二聚体与 DNA 结合。DNA 结合结构域再通过一个固定的 N-x7-R/K 结构专一性地识别并结合启动子上的顺式作用元件。此外, bZIP 转录

因子一般还含有一个或多个转录激活结构域, 当转录因子与 DNA 结合后起加强转录的作用^[2]。研究表明, 植物 bZIP 转录因子通过参与 ABA 信号转导响应多种非生物胁迫, 如盐胁迫、干旱胁迫、热胁迫等^[3]。拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 中的 bZIP 转录因子家族共有 75 个成员, 可以根据其碱性亮氨酸拉链的同源性和其他保守域的序列特征的不同分为 10 个亚族, A 亚族 bZIPs 主要在种子和植物

本研究由国家转基因生物新品种培育重大专项(2011ZX08009-002)资助。

* 通讯作者(Corresponding authors): 吕维涛, E-mail: wtlv@ibcas.ac.cn, Tel: 13811773675; 周春菊, Tel: 029-87092262

第一作者联系方式: E-mail: wangce_@126.com, Tel: 13681244308

Received(收稿日期): 2014-01-21; Accepted(接受日期): 2014-06-16; Published online(网络出版日期): 2014-06-27.

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1809.S.20140708.1146.004.html>

组织对 ABA 和逆境胁迫的响应信号网络中发挥重要作用^[4-5]。如 ABI5 蛋白是 ABA 抑制种子萌发和幼苗生长过程中的重要信号组分, 受 ABA、干旱和高盐胁迫诱导表达, 能提高植物对外源 ABA 的敏感性, 在干旱条件下参与靶基因的转录调控, 对植物抗逆性起重要作用^[6]。与拟南芥 ABI5 相似, 水稻 (*Oryza sativa* L.) 中的 OsABI5 能抑制种子萌发和幼苗生长, 可以与 G-box 元件结合并激活抗逆基因的表达^[7]。在种子发育期, AtABI5 和 OsABI5 均可通过对 ABA 的感知诱导胚胎发育晚期丰富蛋白基因的表达^[7]。

玉米 (*Zea mays* L.) 是重要的粮食作物。然而随着生态环境的不断恶化, 土壤盐渍化已成为影响玉米生长发育和结实的一大危害, 严重制约了作物产量^[8]。在一些盐渍化地区种植的玉米往往表现为出苗时间延迟、发芽率降低、光合作用受抑并导致产量降低^[9]。因此, 提高植物的抗盐性、增加盐胁迫下作物产量成为备受人们关注的课题。bZIP 转录因子对植物逆境基因表达调控具有重要作用, 已在玉米研究中受到关注。Wei 等^[10]利用玉米基因组数据库鉴定出 125 个 bZIP 基因, 编码 170 种蛋白, 通过序列分析将其划分为 11 个亚族, 并按染色体中的定位顺序将其命名。Ying 等^[11]和 Yan 等^[12]对玉米 A 亚族 bZIP 转录因子 ZmABI5 和 ZmbZIP72 的研究表明, 它们的基因表达均受 ABA 与逆境胁迫诱导上调, 过表达 ZmbZIP72 使拟南芥转基因株系对 ABA 的敏感性增强, 且抗旱、抗盐; 但过表达 ZmABI5 却导致拟南芥转基因株系对盐、旱、高温和低温胁迫更为敏感。A 亚族中 bZIP 转录因子从系统进化关系上可被进一步分为 3 个分支, ZmbZIP72 与 ABI5 和 OsbZIP72 等构建在同一个系统进化分支上^[11], 而另外两个分支上的 bZIP13/GBF4、bZIP14/27 等在玉米中的同源基因功能尚未见报道。为进一步探究玉米 A 亚族 bZIP 转录因子在 ABA 信号途径与逆境胁迫响应中的作用, 本文对从 ZmGDB (<http://www.plantgdb.org/ZmGDB/>) 数据库搜索到的一个与拟南芥 GBF4 和 AtbZIP13 基因有较高同源性的、被 Wei 等^[10]命名为 ZmbZIP81 的基因进行克隆, 利用实时定量 PCR 技术分析了 ZmbZIP81 在玉米中的胁迫诱导表达模式, 并通过分析过表达该基因的拟南芥植物表型探讨了 ZmbZIP81 在 ABA 信号途径和逆境胁迫抗性中的作用。本研究结果对于研究玉米响应外界环境胁迫的机制、培育抗盐玉米新品种具有参考价值。

1 材料与方法

1.1 玉米材料及处理

将玉米 B73 自交系种子置蒸馏水浸湿的纱布上, 于 28℃ 暗培养 2 d 后, 种植于盛有搅拌均匀的花土和蛭石的小花盆中, 在 28℃、12 h/12 h 光周期条件下培养。参考 Ying 等^[11]的 ABA、NaCl 和干旱处理方法并加以改进: 取三叶一心期的幼苗, 将根部浸没在 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ABA 和 150 mmol L^{-1} NaCl 溶液中, 并以溶剂浸根为对照, 分别于处理 0、2、6 和 12 h 后取样; 另从土中取出同时期幼苗, 在室温下自然干燥, 分别于植株失水量达到鲜重的 20%、40% 和 60% 时取样, 并取土壤中正常生长的植株叶片为对照。将各组样品立即用液氮冷冻并于 -70℃ 保存。

1.2 RNA 提取及第一链 cDNA 的合成

用总 RNA 提取试剂盒 (TRIzol Reagent, TaKaRa) 提取样品总 RNA, 并用 DNase I (TaKaRa) 纯化。按照 SuperScript III 反转录酶 (Invitrogen) 说明书合成第一链 cDNA, 作为基因扩增及荧光定量 PCR (Real-time quantitative PCR, qRT-PCR) 的模板。

1.3 ZmbZIP81 基因的克隆

以正常条件下生长的三叶一心期 B73 自交系玉米幼苗的 cDNA 为材料, 用基因特异性引物 ZmbZIP81-F 和 ZmbZIP81-R (表 1) 和高保真的 Phusion High-Fidelity DNA 聚合酶 (NEB) 进行基因扩增, 反应程序为 98℃ 预变性 30 s, 之后进入循环程序 98℃ 10 s, 62℃ 20 s, 72℃ 45 s, 退火温度每隔一个循环降低 1℃, 至 49℃, 最后 72℃ 延伸 10 min 的 Touchdown 程序。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 并回收目的条带。产物连接 Gateway 载体 pENTR/D-TOPO (Invitrogen), 转化大肠杆菌感受态 TOP10, 经菌液 PCR 筛选阳性克隆, 测序验证。测序正确的中间载体通过 LR 反应 (LR 克隆酶, Invitrogen) 将扩增片段连入植物表达载体 pLeela (Invitrogen), 测序验证。

1.4 DNA 与蛋白质序列的生物信息学分析

利用 ZmGDB (<http://www.plantgdb.org/ZmGDB/>) 数据库搜索 ZmbZIP81 基因及其所编码的蛋白序列, 并通过 PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 在线服务器查找并分析其启动子区 ABA 与胁迫相关信号响应元件。利用 TAIR (<http://www.arabidopsis.org/>) 数据库查找拟南芥中 A 亚族 bZIP 转录因子蛋白序列。使用 ClustalX 2.0 对 ZmbZIP81 和拟南芥 A 亚族 bZIP 蛋白进行多

重序列比对^[13], 用 GeneDoc 对对比结果进行保守序列分析, 用 MEGA5 构建由 Bootstrap 检测(1000 次抽样)的系统发育树^[14]。利用 MEME (<http://meme.nbcr.net/meme/cgi-bin/meme.cgi>)在线服务器分析保守结构域^[15]。

1.5 玉米苗期 *ZmbZIP81* 基因在胁迫条件下的表达
以 ABA、NaCl 和干旱处理条件下的三叶一心期 B73 自交系玉米幼苗和对照组的 cDNA 为材料, 采用 Toyobo 公司 SYBR Green Master Mix 进行

qRT-PCR 扩增, 反应体系含 cDNA 1 μL、2×SYBR Green Master Mix 7.5 μL、引物(10 pmol μL⁻¹)各 0.3 μL、ddH₂O 5.9 μL。以玉米 *β-tubulin* 为内参, 以 qRT-*ZmbZIP81*-F 和 qRT-*ZmbZIP81*-R, qRT-*β-tubulin*-F 和 qRT-*β-tubulin*-R (表 1)为引物, 用 Eppendorf 公司 Realplex PCR 仪实时定量检测基因表达。反应程序为 94 预变性 30 s, 之后 94 5 s, 55 30 s, 72 20 s, 共 40 个循环。采用 2^{-ΔΔCt} 法分析基因相对表达量^[16]。

表 1 所用引物
Table 1 Primers used in this study

引物 Primer	引物序列 Sequence information (5'-3')	用途 Function
ZmbZIP81-F	CACCGACTGTCTGAAGTTTGTCCC	基因克隆
ZmbZIP81-R	CACGCACAATCACCTAAATGTTTTC	Gene cloning
qRT-ZmbZIP81-F	CTAGGGACAGGAAACAGGCC	荧光定量 PCR, 反转录 PCR
qRT-ZmbZIP81-R	TACCATTCCATGGAGTTGTTTC	Real-time PCR, RT-PCR
qRT-β-tubulin-F	GCTATCCTGTGATCTGCCCTGA	玉米内参照基因
qRT-β-tubulin-R	CGCCAAACTTAATAACCCAGTA	Reference gene as control in maize
RT-actin7-F	CCGGTATTGTGCTCGATTCTG	拟南芥内参照基因
RT-actin7-R	TTCCCGTTCTGCGGTAGTGG	Reference gene as control in <i>Arabidopsis</i>

1.6 *ZmbZIP81* 转基因拟南芥纯合株系的获得与验证

将植物表达载体转化农杆菌菌株 GV3101 (pMP90RK), 得到的阳性菌克隆经 PCR 验证后采用浸花法侵染野生型拟南芥(Col)植株, 收获成熟 T₀ 代种子。T₀ 代种子经消毒后, 点播在 MS 选择培养基(含 100 μg mL⁻¹ 草甘膦)上筛选抗性植株, 种植收种。在相同选择培养基上筛选 T₁ 代种子抗性与非抗性植株符合 3 : 1 分离比例的单株, 经一代种植后选择在相同选择培养基上不发生分离的 T₂ 代抗性株系种子进行进一步分析。

为分析转基因株系中 *ZmbZIP81* 的表达量, 将各转基因株系与野生型种子播于 MS 培养基上, 4 春化 3 d 后, 在 22 ℃、16 h/8 h 光周期条件下培养 10 d, 取整株幼苗如前述方法提取总 RNA, 并合成第一链 cDNA, 进行 RT-PCR 扩增, 反应体系为 cDNA 1 μL、2×Taq Mix 5 μL、引物 (10 pmol μL⁻¹) 各 0.5 μL、ddH₂O 3 μL。以拟南芥 *Actin7* 为内参, 用引物 qRT-*ZmbZIP81*-F 和 qRT-*ZmbZIP81*-R、RT-actin7-F 和 RT-actin7-R (表 1)分别扩增 *ZmbZIP81* 基因序列和内参序列, 反应程序为 94 预变性 30 s, 之后 94 10 s, 55 30 s, 72 20 s, 共 25 个循环。对 PCR 产

物进行切胶回收与测序验证。
1.7 *ZmbZIP81* 转基因拟南芥 ABA 敏感性和抗盐性分析

参考 Ying 等^[11]的 ABA 和 NaCl 处理方法并加以改进。将 T₂ 代转 *ZmbZIP81* 基因的拟南芥与野生型种子以 70%酒精 30 s、7% NaClO 15 min 消毒后分别播于含 5 μmol L⁻¹ ABA 及 200 mmol L⁻¹ NaCl 的 MS 培养基上, 以未加 ABA 和 NaCl 的 MS 培养基为对照, 4 春化 3 d 后, 在 22 ℃、16 h/8 h 光周期条件下培养并于每 24 h 统计萌发率, 总共统计 7 d。另将转基因拟南芥与野生型种子经同样方法消毒后播于 MS 培养基上, 4 春化 3 d 后, 在 22 ℃、16 h/8 h 光周期条件下培养 3 d, 选取长势相同的幼苗分别移至含有 50 μmol L⁻¹ ABA 及 150 mmol L⁻¹ NaCl 的 MS 培养基上, 以未加 ABA 和 NaCl 的 MS 培养基为对照, 生长一段时间后观察转基因植株和野生型植株的表型差异。

2 结果与分析

2.1 *ZmbZIP81* 序列分析

ZmbZIP81 基因位于玉米第 6 染色体, 编码区全长 2492 bp, 具有 4 段外显子区和 3 段内含子区, 编

码 254 个氨基酸(图 1-A)。除亮氨酸拉链结构域外, *ZmbZIP81* 蛋白还包含 2 个保守域 Motif 1 和 Motif 2 (图 1-B), 它们是一些蛋白激酶的结合位点。2 个保守域中各自包含钙依赖的蛋白激酶(CDPK)等的结合位点 R-X-X-S/T, 以及酪蛋白激酶 II (CK II) 的结合位点 S/T-X-X-E/D。此外, 对 *ZmbZIP81* 基因的启动子区分析发现 2 个分别位于-751 bp 和-460 bp 的 ABRE 元件、1 个位于-1051 bp 的干旱胁迫信号响应的 DRE 元件和 1 个位于-133 bp 的 MYB 类转录因子特异性识别的 CCAAT-box 元件(图 1-A), 表明该基因的表达可能受 ABA 与胁迫信号的调控。将 *ZmbZIP81* 的氨基酸序列与拟南芥中 A 亚族 bZIPs 进行多重序列比对(图 2), 发现它们具有高度保守的序列和结构域。系统发育分析表明, *ZmbZIP81* 与拟南芥中 GBF4 和 bZIP13 亲缘关系最近(图 3), 且序列相似性最高, 均为 42%, 而与 ZmABI5 和 *ZmbZIP72* 亲缘关系相对较远(未列出)。GBF4 是一种能与基因启动子区 G-box 结合的转录因子^[4], 但其具体功能还未见报道。

图 1 *ZmbZIP81* 基因(A)与编码蛋白(B)结构示意图
Fig. 1 Gene structure of *ZmbZIP81* (A) and conserved domains of the protein encoded (B)

2.2 玉米苗期 *ZmbZIP81* 基因在胁迫条件下的表达

以三叶一心期玉米幼苗为材料, 分析 *ZmbZIP81* 基因对 ABA、NaCl 和干旱处理的应答表明, 上述处理均可诱导 *ZmbZIP81* 的表达, 并且随处理时间的延长和程度的加重表达量逐渐升高(图 4)。经 ABA 和 NaCl 分别处理 12 h 和 6 h 后, *ZmbZIP81* 基因表达开始明显上调, 且两种胁迫处理 12 h 后, *ZmbZIP81* 表达量达到对照组的近 2 倍(图 4-A, B)。ABA 处理 2 h 时表达量虽有下降, 经分析与对照组无显著性差异。干旱处理下, 当叶片失水率达到 20% 和 40% 时, *ZmbZIP81* 表达量上调约 1.5 倍; 而失水率达到 60% 时, 表达量可达初始水平的 3.65 倍(图 4-C)。说明 *ZmbZIP81* 基因的表达受 ABA、NaCl 和干旱胁迫的诱导。

2.3 植物表达载体构建、拟南芥遗传转化与验证

为进一步研究 *ZmbZIP81* 转录因子的功能, 构

建了 35S::ZmbZIP81 的植物表达载体, 其结构如图 5-A 所示, 并采用农杆菌介导法转化拟南芥, 经抗生素筛选与基因组 PCR 验证获得了纯合单拷贝 T₂ 代过表达拟南芥株系 OE-5、OE-9 和 OE-11。半定量 RT-PCR 验证结果如图 5-B 所示, 在 3 个过表达株系中检测到特异目的条带, 而在野生型拟南芥中未检测到。所用引物的特异性已通过 PCR 产物的切胶回收与测序进行验证。以上结果表明 *ZmbZIP81* 确已转化成功并获得稳定遗传的株系。

2.4 过表达拟南芥对 ABA 的敏感性反应

在 B73 自交系中, *ZmbZIP81* 基因表达显示出受 ABA 诱导上调的特性(图 4)。为验证 *ZmbZIP81* 的功能是否与 ABA 敏感性存在关联, 分析了过表达 *ZmbZIP81* 的拟南芥株系的 ABA 敏感性。如图 6-A, B 所示, 在 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ABA 处理下, 3 个过表达株系种子萌发率均显著高于野生型, 如 OE-5、OE-9 和 OE-11 转基因株系在第 7 天的萌发率分别为 56.5%、36.6% 和 56.9%, 而野生型只有 14.0%; 在对照组培养基上生长的 3 个转基因株系与野生型种子萌发率基本一致, 表明过表达株系种子萌发对 ABA 的敏感性降低。另外, 当 3 d 苗龄的拟南芥幼苗移至含有 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ABA 的 MS 培养基上 25 d 后, 野生型拟南芥黄化较明显, 且部分植株已死亡, 其平均根长为 2.8 cm, 存活率为 61.9%; 而 3 个转基因株系叶片相对大而绿, 几乎全部存活, 平均根长分别为 2.9、3.9 和 4.5 cm, 分析表明 OE-9 和 OE-11 两株系根显著长于野生型, 3 个株系的存活率分别为 95.2%、100% 和 100%, 同期的对照组幼苗长势始终一致(图 7-A, B)。以上结果说明, 在种子萌发期与幼苗期, 与野生型相比, *ZmbZIP81* 过表达拟南芥的 ABA 敏感性降低。因此推测 *ZmbZIP81* 可能作为 ABA 信号途径的负调控因子参与植物抗逆调控网络。

2.5 过表达拟南芥的抗逆性

植物的抗逆性与 ABA 信号途径密切相关。在逆境胁迫下, 植物体可以通过改变内源 ABA 水平调控逆境胁迫相关基因的表达, 从而提高对逆境胁迫的适应性。种子萌发期耐盐性分析表明, 在含有 200 mmol L^{-1} NaCl 的 MS 培养基上, 各植物株系的萌发率在第 7 天均可达到 100%, 但过表达株系种子萌发明显快于野生型, 如第 4 天 OE-5、OE-9 和 OE-11 三个株系萌发率分别为 68.4%、84.9% 和 75.0%, 而野生型只有 54.2%, 经检测差异达到显著水平; 在只含有 MS 的对照组培养基上生长的 3 个转基因株系与野生型种子萌发率基本一致, 第 2 天即可达近

图 3 *ZmbZIP81* 和拟南芥 A 亚族 bZIP 转录因子的系统发育树
Fig. 3 Phylogenetic tree of *ZmbZIP81* and A subfamily bZIPs in *Arabidopsis*

图 4 *ZmbZIP81* 基因在 ABA、NaCl 和干旱处理条件下的表达

Fig. 4 Expression of *ZmbZIP81* in maize under ABA, salt, and drought treatments

A: ABA 处理($100 \mu\text{mol L}^{-1}$); B: NaCl 处理(150 mmol L^{-1}); C: 干旱处理。各处理条件下, *ZmbZIP81* 基因的相对表达量是对照的倍数。

A: Treatment of MS+ABA ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$); B: Treatment of MS+NaCl (150 mmol L^{-1}); C: Drought treatment. The relative expression level of *ZmbZIP81* under each treatment represents fold change towards the control.

图 5 *ZmbZIP81* 过表达载体示意图(A)和 $35\text{S}::\text{ZmbZIP81}$ 转基因株系的 RT-PCR 结果(B)

Fig. 5 Structure of *ZmbZIP81*-overexpressed vector (A) and analysis of $35\text{S}::\text{ZmbZIP81}$ transgenic lines (B)

p35S: *ZmbZIP81* 基因启动子; *pA35S*: *ZmbZIP81* 基因终止子; *Pat*: 草甘膦抗性基因; *Nos-p*: 草甘膦抗性基因启动子; *Nos-T*: 草甘膦抗性基因终止子; *attB1* 和 *attB2*: LR 反应重组位点; LB: 载体左边界; RB: 载体右边界。

p35S: promoter of *ZmbZIP81*; *pA35S*: terminator of *ZmbZIP81*; *Pat*: glyphosate resistance gene; *Nos-p*: promoter of glyphosate resistance gene; *Nos-T*: terminator of glyphosate resistance gene; *attB1* and *attB2*: LR recombination sites; LB: left border; RB: right border.

3 讨论

在干旱、高盐等逆境条件下, 植物细胞能够迅速合成 ABA。在内源 ABA 诱导下, 大量胁迫相关基

100% (图 6-A, C)。而对过表达株系的幼苗期抗盐胁迫能力检测表明, 在 150 mmol L^{-1} NaCl 处理 30 d 后, 各转基因株系拟南芥幼苗长势与野生型无明显差异, 抗盐性基本一致(图 7-A, C)。以上结果说明, 与野生型相比, *ZmbZIP81* 过表达拟南芥对盐胁迫的抗性有一定程度的提高, 而这种抗性的提高只体现在种子萌发期, 不体现于幼苗期。因此推测 *ZmbZIP81* 基因可能并不参与植物幼苗期的盐胁迫反应, 而只在种子萌发期发挥抗盐作用。我们还同时采用 40% PEG-8000 模拟的渗透胁迫分析了转基因拟南芥萌发期与幼苗期的抗旱性, 结果显示, 渗透胁迫下, 转基因拟南芥与野生型在种子萌发期以及幼苗期的长势基本一致(未列出), 表明 *ZmbZIP81* 基因在植物抗旱性方面可能无明显作用。

因被表达, 从而参与植物抗逆反应。拟南芥中的 A 亚族 bZIP 转录因子多数已被较为深入地研究, 它们对于植物对 ABA 和外界胁迫响应具有重要作用^[17]。已报道的几个拟南芥中的 A 亚族 bZIP 转录因子表达受 ABA 诱导, 且其编码蛋白作为正调控因子参与植物逆境胁迫响应^[4], 具有代表性的基因包括 *ABI5*、*ABI5-like*、*ABF1-4* 等。已报道的 2 个玉米 A 亚族 bZIP 转录因子基因 *ZmABI5* 和 *ZmbZIP72* 均受 ABA 与逆境胁迫诱导上调, 且参与植物逆境胁迫响应^[11-12]。其中 *ZmbZIP72* 过表达使转基因植物对 ABA 的敏感性增强, 且抗旱、抗盐, 但 *ZmABI5* 是作为负调控因子参与逆境下植物对盐、旱、高温和低温等非生物胁迫的响应^[12]。

本研究从玉米中克隆到另一个 A 亚族 bZIP 转录因子基因 *ZmbZIP81*, 并通过序列分析证明其编码蛋白与拟南芥中 A 亚族 bZIP 转录因子具有相似的序列特征, 它们都有 1 段保守的 bZIP 结构域和 2 个保守性较高的基序, 在系统进化上与拟南芥中的 *GBF4*

图 6 ABA 和 NaCl 处理条件下 35SS::*ZmbZIP81* 转基因拟南芥种子萌发率统计
Fig. 6 Germination assays of 35SS::*ZmbZIP81* transgenic lines of *Arabidopsis* under ABA and salt treatments

A: MS 培养基; B: ABA 处理 ($5 \mu\text{mol L}^{-1}$); C: NaCl 处理 (200 mmol L^{-1}).
A: MS medium; B: MS+ABA ($5 \mu\text{mol L}^{-1}$); C: MS+NaCl (200 mmol L^{-1}).

图 7 ABA 和 NaCl 处理条件下 35SS::*ZmbZIP81* 转基因拟南芥幼苗期生长表型

Fig. 7 Photographs of 35SS::*ZmbZIP81* transgenic lines in seedling stage under ABA and salt treatments

A: MS 培养基; B: ABA 处理 ($50 \mu\text{mol L}^{-1}$); C: NaCl 处理 (150 mmol L^{-1}).

A: MS medium; B: MS+ABA ($50 \mu\text{mol L}^{-1}$); C: MS+NaCl (150 mmol L^{-1}).

和 bZIP13 构成一个分支, 而与 ZmABI5 和 ZmbZIP72 亲缘关系相对较远。我们的实验数据也证明, ZmbZIP81 虽与 ZmABI5 和 ZmbZIP72 具有类似的胁迫诱导表达模式, 但与它们在植物逆境胁迫抗性中的作用却有所不同。ZmbZIP81 转基因拟南芥对外源 ABA 敏感性降低, 抗 NaCl 胁迫能力增强, 表明它可

能是 ABA 信号途径的负调控因子, 但可提高植物抗逆性。这与 Liao 等^[18]报道的几个负调控模式的大豆 bZIP 转录因子 GmbZIP44、GmbZIP62 和 GmbZIP78 相似。这 3 个大豆转录因子分别属于 S、C 和 G 亚族, 它们对 ABA 敏感性降低, 对 NaCl 胁迫抗性增强, 并且 3 个基因表达均受 ABA、NaCl 和干旱胁迫诱导, 说明 ZmbZIP81 可能与 3 个大豆 bZIP 转录因子具有类似的调控模式。另外, 在本实验中虽未发现 ZmbZIP81 基因对植物抗渗透胁迫能力的显著影响, 但基于 ZmbZIP81 基因的表达受干旱诱导, 且较大幅度的表达量上调出现在植株失水量达到 60% 时, 推测 ZmbZIP81 基因可能主要参与严重干旱胁迫的反应, 或者在干旱胁迫反应中的功能需要其他调控形式、或其他调控因子的协同作用。此研究中, 我们的主要目的是对比 ZmbZIP81 与 ZmABI5 和 ZmbZIP72 在基因表达和功能上的差异。由于过表达 ZmABI5 和 ZmbZIP72 两基因的植物表型主要出现在种子萌发期和幼苗期, 所以我们也重点关注这两个阶段。后续对植物生育后期的表型分析, 尤其是在土壤干旱和盐渍条件下植物的抗性以及利用关键 bZIP 转录因子缺失且对盐害敏感的突变体进行互补突变体表型验证, 将有助于更加全面、深入地说明 ZmbZIP81 基因的功能。

玉米作为单子叶作物, 其逆境响应信号网络可能与双子叶植物拟南芥存在较大差异。目前有关玉米 bZIP 转录因子的报道还较少见, 进一步研究其各成员的功能对阐明它们参与依赖于 ABA 的逆境胁迫响应信号通路的机制具有重要意义。盐渍化土壤环境制约了玉米出苗时间与发芽率, 并影响其产量^[9]。因此, 找到能提高玉米抗盐性的关键基因对于提高玉米产量至关重要。本文报道的玉米 bZIP 转录因子基因 ZmbZIP81 可明显提高转基因植物种子在盐胁迫下的萌发速率, 对通过分子育种手段改善玉米抗

逆性进而提高盐渍化土壤种植玉米的产量具有参考价值。

4 结论

从玉米中克隆了一个编码 A 亚族 bZIP 转录因子 ZmbZIP81 的基因。该基因的表达受 ABA、NaCl 和干旱胁迫诱导, 而且过表达该基因的拟南芥株系具有对 ABA 敏感性下降和对 NaCl 胁迫抗性增强的表型。推测 *ZmbZIP81* 基因编码的蛋白可能作为 ABA 信号途径的负调控因子参与植物逆境胁迫下的基因表达调控。

References

- [1] Fujita Y, Fujita M, Satoh R, Maruyama K, Parvez M M, Seki M, Hiratsu K, Ohme-Takagi M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. AREB1 is a transcription activator of novel ABRE-dependent ABA signaling that enhances drought stress tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2005, 17: 3470–3488
- [2] Mehrotra R, Kiran K, Chaturvedi C P, Ansari S A, Lodhi N, Sawant S, Tuli R. Effect of copy number and spacing of the ACGT and GT *cis* elements on transient expression of minimal promoter in plants. *J Genet*, 2005, 84: 183
- [3] Schütze K, Harter K, Chaban C. Post-translational regulation of plant bZIP factors. *Trends Plant Sci*, 2008, 13: 247–255
- [4] Jakoby M, Weisshaar B, Dröge-Laser W, Vicente-Carbajosa J, Tiedemann J, Kroj T, Parcy F. bZIP transcription factors in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci*, 2002, 7: 106–111
- [5] Choi H, Hong J, Ha J, Kang J, Kim S Y. ABFs, a family of ABA-responsive element binding factors. *J Biol Chem*, 2000, 275: 1723–1730
- [6] Lopez-Molina L, Mongrand S, Chua N. A postgermination developmental arrest checkpoint is mediated by abscisic acid and requires the ABI5 transcription factor in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98: 4782–4787
- [7] Zou M J, Guan Y C, Ren H B, Zhang F, Chen F. A bZIP transcription factor, OsABI5, is involved in rice fertility and stress tolerance. *Plant Mol Biol*, 2008, 66: 675–683
- [8] 张立军, 梁宗锁. 植物生理学. 北京: 科学出版社, 2007. pp 399–403
- Zhang L J, Liang Z S. *Plant Physiology*. Beijing: Science Press, 2007. pp 399–403 (in Chinese)
- [9] 张红, 董树亭. 玉米对盐胁迫的生理响应及抗盐策略研究进展. *玉米科学*, 2011, 19(1): 64–69
Zhang H, Dong S T. Research progress on the physiological and biochemistry responses of salt tolerance and strategies of salt resistance in maize. *J Maize Sci*, 2011, 19(1): 64–69 (in Chinese with English abstract)
- [10] Wei K F, Chen J, Wang Y M, Chen Y H, Chen S X, Lin Y N, Pan S, Zhong X J, Xie D X. Genome-wide analysis of bZIP-encoding genes in maize. *DNA Res*, 2012, 19: 463–476
- [11] Ying S, Zhang D F, Fu J, Shi Y S, Song Y C, Wang T Y, Li Y. Cloning and characterization of a maize bZIP transcription factor, ZmbZIP72, confers drought and salt tolerance in transgenic *Arabidopsis*. *Planta*, 235: 253–266
- [12] Yan F, Deng W, Wang X M, Yang C W, Li Z G. Maize (*Zea mays* L.) homologue of ABA-insensitive (ABI) 5 gene plays a negative regulatory role in abiotic stresses response. *Plant Growth Regul*, 2012, 68: 383–393
- [13] Chenna R, Sugawara H, Koike T, Lopez R, Gibson T J, Higgins D G, Thompson J D. Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucl Acids Res*, 2003, 31: 3497–3500
- [14] Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol*, 2007, 24: 1596–1599
- [15] Bailey T L, Boden M, Buske F A, Frith M, Grant C E, Clementi L, Ren J, Li W W, Noble W S. MEME SUITE: tools for motif discovery and searching. *Nucl Acids Res*, 2009, 37: W202–W208
- [16] 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: 402–408
- [17] Yoshida T, Fujita Y, Sayama H, Kidokoro S, Maruyama K, Mizoi J, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. AREB1, AREB2, and ABF3 are master transcription factors that cooperatively regulate ABRE-dependent ABA signaling involved in drought stress tolerance and require ABA for full activation. *Plant J*, 2010, 61: 672–685
- [18] Liao Y, Zou H F, Wei W, Hao Y J, Tian A G, Huang J, Liu Y F, Zhang J S, Chen S Y. Soybean *GmbZIP44*, *GmbZIP62* and *GmbZIP78* genes function as negative regulator of ABA signaling and confer salt and freezing tolerance in transgenic *Arabidopsis*. *Planta*, 2008, 228: 225–240