

玉米逆境胁迫响应基因 *ZmbZIP15* 的克隆与抗旱功能分析

曹丽茹^{1,2}, 叶飞宇¹, 庞芸芸¹, 马晨晨¹, 张新¹, 王振华¹, 鲁晓民^{1,2}

(1. 河南省农业科学院粮食作物研究所, 郑州 450002; 2. 神农种业实验室, 郑州 450002)

摘要: 从转录组数据中筛选到 27 个参与干旱-复水胁迫响应的 *bZIP* 基因, 构建共表达网络图。结果发现, *ZmbZIP15* 处于核心节点位置, 该基因位于第 5 号染色体, 编码 176 个氨基酸, 包含高度保守的 *bZIP* 结构域, 属于亲水性蛋白。蛋白进化树分析发现, 该蛋白与芒草、高粱的亲缘关系最近, 与大麦、小麦的亲缘关系最远。 *ZmbZIP15* 基因 ATG 上游 2 K 启动子的顺式元件分析, 发现含有多个参与调控脱落酸、低温和干旱的结合元件。实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)结果显示, *ZmbZIP15* 是组成型表达基因, 在雌穗高表达, 幼茎的表达量最低。干旱、高温、盐、氮胁迫处理下, 该基因的表达量显著上调, 说明 *ZmbZIP15* 基因积极参与并调控非生物胁迫途径。过表达 *ZmbZIP15* 转基因拟南芥抗旱性检测分析, 发现干旱胁迫处理下过表达 *ZmbZIP15* 基因能够提高拟南芥幼苗的抗旱性。亚细胞定位显示, 该基因编码的蛋白定位于细胞核。

关键词: 玉米; *bZIP*; 非生物胁迫; 抗旱性; 亚细胞定位

中图分类号: S513.035.3

文献标识码: A

Cloning and Drought Resistance Function Analysis of Maize Stress Response Gene *ZmbZIP15*

CAO Li-ru^{1,2}, YE Fei-yu¹, PANG Yun-yun¹, MA Chen-chen¹, ZHANG Xin¹, WANG Zhen-hua¹, LU Xiao-min^{1,2}

(1. Grain Crop Research Institute, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002;

2. The Shennong Laboratory, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: Twenty-seven *bZIP* genes involved in the response to drought-rewater stress were screened from transcriptome data, and *ZmbZIP15* was found to be at the core node by constructing co-expression network map. The gene is located on chromosome 5, encoding 176 amino acids and contains a highly conserved *bZIP* domain, which is a hydrophilic protein. The analysis of the protein evolution tree showed that the protein was the closest relative to miscanthus and sorghum, and the furthest relative to barley and wheat. Cis-element analysis of the 2 K promoter upstream of ATG of *ZmbZIP15* gene revealed multiple binding elements involved in the regulation of abscisic acid, low temperature, and drought. The results from real-time quantitative fluorescence PCR(qRT-PCR) showed that *ZmbZIP15* was a constitutive expression gene, which was highly expressed in female panicle and lowest in young stem. Under drought, high temperature, salt and nitrogen stress, the expression of *ZmbZIP15* gene was significantly up regulated, indicating that *ZmbZIP15* gene actively participated in and regulated abiotic stress pathways. It was found that overexpression of *ZmbZIP15* gene could improve the drought resistance of *Arabidopsis thaliana* seedlings under drought stress. Subcellular localization analysis revealed that the protein encoded by this gene is located in the nucleus.

Key words: Maize; *bZIP*; Abiotic stress; Drought resistance; Subcellular localization

录用日期: 2023-03-03

基金项目: 河南省农业科学院杰出青年科技基金项目“玉米 *ZmGBF1* 基因响应干旱胁迫分子机制研究与应用”(2022JQ02)、河南省青年人才托举工程项目“玉米 *GBF1* 类转录因子响应干旱胁迫作用机制解析与应用”(2022HYTP034)、国家自然科学基金青年基金项目“转录因子 *ZmGBF1* 调控玉米抗旱性的分子机制研究”(32201708)

作者简介: 曹丽茹(1988-), 女, 河南濮阳人, 副研究员, 博士, 主要从事玉米遗传育种及生物信息学分析。

Tel: 13126762817 E-mail: caoliru008@126.com

鲁晓民为本文通信作者。E-mail: luxiaomin2004@163.com

玉米作为重要的粮食和经济作物,其需求量日渐增大。在玉米的生长发育过程中,经常会遭到干旱、高盐、高温、低温等非生物胁迫的侵害^[1,2]。非生物胁迫往往会对玉米造成非常复杂的生理生化、分子水平、形态学等方面的变化,严重时会导致植株死亡^[3]。为了适应这种不利因素,在漫长的进化过程中,植物逐渐形成了一套分子调控机制,从而响应各种逆境胁迫^[4]。其中,转录调控是通过转录因子来调控基因的表达,是最重要的一种防御机制^[5]。转录因子(Transcription factors, TFs)与下游靶基因启动子区域的顺式作用元件进行结合,从而激活或抑制基因的表达,最终调控植物的生长发育^[6]。

碱性亮氨酸拉链(Basic leucine zipper, bZIP)蛋白家族是最广泛、最多样化、最保守的转录因子家族之一^[7],普遍存在于植物、动物、微生物以及人类中。bZIP 蛋白家族都具有1个高度保守的bZIP结构域,该结构域一般包含60~80个氨基酸,由N端保守的碱性结构域和亮氨酸拉链结构域组成^[8,9]。近年来,越来越多物种的bZIP家族成员被研究报道。玉米中,*ZmbZIP68*是耐寒性的负调控因子,它能够抑制低温诱导的*DREB1*转录因子基因的表达,可以提高玉米的耐寒性^[10]。拟南芥*AtbZIP4*在根中特异表达,并受非生物胁迫和ABA的诱导;过表达后对非生物胁迫不敏感,可提高其耐受性,同时能够增强基因的表达^[11]。小麦*TabZIP15*是一个盐胁迫响应基因,参与耐盐性的调控;过表达也能够提高其耐盐性^[12]。大豆*GmbZIP152*受大豆菌核病、植物激素、盐胁迫、干旱胁迫和重金属胁迫显著诱导;该基因直接与ABA、JA、ETH和SA诱导的生物和非生物相关基因的启动子结合,在生物和非生物胁迫响应中起着重要作用;过表达*GmbZIP152*能够增强对核盘菌的抗性以及对盐、干旱和重金属胁迫的耐受性^[13]。水稻*Opaque3*编码1个跨膜bZIP转录因子*OsbZIP60*,参与调节贮藏蛋白和淀粉的生物合成,能够维持乳细胞内质网的稳态,在子粒发育中起着重要的作用^[14]。高粱*bZIP19*是适应缺锌的必要调节因子,能够提高缺锌的耐受性^[15]。马铃薯*StbZIP25*基因在盐胁迫处理下显著上调,过表达也能够增强拟南芥的耐盐性^[16]。

本文通过对胁迫后的玉米幼苗和根系进行转录组测序和qRT-PCR分析,发现*ZmbZIP15*基因是处于核心节点的关键基因,编码bZIP蛋白,属于bZIP转录因子家族成员,对该基因进行生物信息学分析、基因克隆、玉米不同组织及逆境胁迫下的表达模式分析、过表达转基因拟南芥的植株表型分析、亚细胞

定位,为进一步的功能研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 转录组测序样品处理

选取饱满的玉米自交系郑8713为试验材料,人工气候长日照培养箱(28℃,16 h光照/8 h黑暗)进行培养。待幼苗生长两周后,选择生长整齐一致的玉米3叶期幼苗进行干旱-复水胁迫处理。利用土壤温湿度测定仪(SYS-WSD)测量土壤水分含量,干旱处理时土壤含水量为45%~50%,复水处理时土壤含水量>95%。取玉米胁迫处理前、干旱5 d、复水3 d的叶片和根,分别命名为T0Y、T5dY、TR3dY和T0G、T5dG、TR3dG,提取RNA,于-80℃保存。5株混为1个样品,每个样品各3个生物学重复。

1.2 DNA与蛋白序列的生物信息学分析

使用Cytoscape软件构建基因共表达网络图。利用玉米基因组数据库MaizeGDB和Gramene查找*ZmbZIP15*(Zm00001d017911)基因的全长cDNA、基因组、所编码的蛋白序列以及外显子-内含子结构。通过SMART在线预测蛋白的保守结构域,使用ExPasy Protpara在线软件分析蛋白的相对分子量、等电点、不稳定系数以及氨基酸组成成分,采用PSORT在线软件预测蛋白的亚细胞定位。利用NCBI在线网站获取不同物种的蛋白氨基酸序列信息,并使用MEME线上软件分析其保守基序,通过MEGA软件构建系统发育进化树。利用PlantCARE在线服务器查找并分析启动子区的顺式作用元件。

1.3 实时荧光定量PCR样品及试验处理

以田间正常生长的玉米自交系郑B73为材料,取3叶期的幼根、幼茎、幼叶以及成熟期的根、茎、叶、雄穗、雌穗等不同组织的样品进行表达模式分析。取0.1 g组织样品于液氮中磨碎,TRIzol法提取试剂盒(Invitrogen)提取总RNA。浓度测定仪检测其浓度和纯度,1%琼脂糖凝胶电泳检测总RNA的质量。取1 μg的总RNA反转录成cDNA(Prime-Script™ RT reagent Kit with gDNA Eraser, TaKaRa),稀释至终浓度为100 μg/μL。根据目的基因的保守性,利用NCBI网站设计特异性引物(*Zm00001d017911*-F: GCCCTCACCTCTTCTTTCA-CA; *Zm00001d017911*-R: AAGAGCCCGCAGGAGATAAG)。以稀释后的cDNA为模板,利用翊圣公司的Hieff qPCR SYBR Green Master Mix(No Rox)进行qRT-PCR扩增。反应体系包括10 μL酶、各0.4 μL引物、1 μL cDNA、8.2 μL ddH₂O。以玉米18S(18S-F: CCTGCGGCTTAATTGACTC; 18S-R: GTTAGCAG-

GCTGAGGTCTGG)为内参。反应程序为,95℃预变性 5 min;95℃变性 10 s,60℃退火 30 s,共进行 40 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算基因的相对表达量^[17],每个处理 3 个重复。

1.4 非生物胁迫试验处理

以饱满的玉米自交系郑 8713 为材料,于温室中(28℃,16 h 光照/8 h 黑暗)培养。待幼苗生长两周后,选择长势一致的玉米 3 叶期幼苗进行胁迫处理。干旱胁迫:利用 20% PEG-6000(Holland 营养液+20% PEG)进行处理;高温胁迫:将温度升高至 42℃进行处理;盐胁迫:利用 200 mmol/L 浓度的 NaCl 进行处理;氮胁迫:利用缺乏铵态氮的 Holland 营养液进行处理。

1.5 拟南芥过表达载体的构建、阳性植株的获得、抗旱性检测

根据 *ZmbZIP15* 的基因序列,设计目的基因引物(*ZmbZIP15*-pFGC5941-AscI-F: ATTACCATGGG-GCGCGCCATGTACCCTGCTGCTGAGAT;*ZmbZIP15*-pFGC5941-BamHI-R: TCTAGACTCACCTAGGATC-CAGAGCCAGGACTCATGGCAC)。原始载体 pFGC5941 经 AscI 和 BamHI 双酶切线性化后,利用同源重组技术(Vazyme)将目的基因连到表达载体 pFGC5941 上。将测序正确的阳性菌落抽取质粒,将质粒转入农杆菌 GV3101,阳性菌落经 PCR 验证后利用花序侵染法侵染 *col* 拟南芥,成熟后收获的种子为 T_0 代。 T_0 代种子消毒后,涂在含有 35 mg/L 除草剂的 1/2 MS 培养基上进行阳性苗的筛选,PCR 验证为阳性的幼苗进行种植,成熟后单株收获,即 T_1 代种子。 T_1 代种子消毒后,涂在不含抗生素的 1/2 MS 培养基上,筛选分离比符合 3:1 的分离单株,PCR 验证为阳性的幼苗进行种植并收获,即 T_2 代种子。相同的培养基再种植 1 代,选择不发生分离的 T_2 代单株进行种植并收获,为纯合的 T_3 代种子。

利用野生型拟南芥 *col* 和稳定纯合的 T_3 代种子,经消毒后分别涂在无抗 1/2 MS 培养基上。生长 5 d 后,选择长势一致的幼苗移至营养土中培养,待生长至 5 片叶,进行干旱胁迫(土壤含水量 45%)处理 1 周,观察表型差异并进行拍照。

1.6 *ZmbZIP15* 基因亚细胞定位

根据玉米 MaizeGDB 公布的 *ZmbZIP15* 基因序列,利用 NCBI 设计目的基因引物(*ZmbZIP15*-pMDC83-GFP-SpeI-F: GGACTAGTATGTACCCTGCTGCTGAGAT;*ZmbZIP15*-pMDC83-GFP-BamHI-R: CGGGATCCAGAGCCAGGACTCATGGCAC)。以测序正确的 *ZmbZIP15*-PMD18 为模板,克隆不带终止密

码子 TGA 的 CDS 序列。原始载体 pMDC83-GFP 经 SpeI 和 BamHI 双酶切将载体线性化后,利用 T4 连接酶(TaKaRa)将目的条带连接到带有 GFP 标签的融合表达载体 pMDC83 上。将菌液 PCR 目的片段正确的阳性菌落送到华大六合公司测序。测序正确的菌液抽取质粒后,使用热激法将该质粒转到农杆菌感受态 GV3101 中。使用注射法将菌液注射到烟草背面的叶肉细胞中,48~96 h 在激光共聚焦显微镜下观察 GFP 绿色荧光信号。

2 结果与分析

2.1 *ZmbZIP15* 的鉴定

对转录组数据中基因的 FPKM 值和功能注释进行分析,发现有 27 个基因参与干旱-复水胁迫响应。选取相关系数大于 0.5 的基因构建共表达网络图。图 1 结果显示,*ZmbZIP15* 基因与其他基因之间的关联度较高,表明 *ZmbZIP15* 基因是核心节点的关键基因。在正常、干旱、复水处理下,*ZmbZIP15* 基因的表达量达极显著差异水平(图 2)。qRT-PCR 分析发现,玉米的叶片和根在干旱 5 d 时相对表达量显著升高,在复水 3 d 的相对表达量又显著降低,逐渐恢复为正常水平。综上可知,*ZmbZIP15* 基因在干旱-复水处理过程中起着重要的作用。

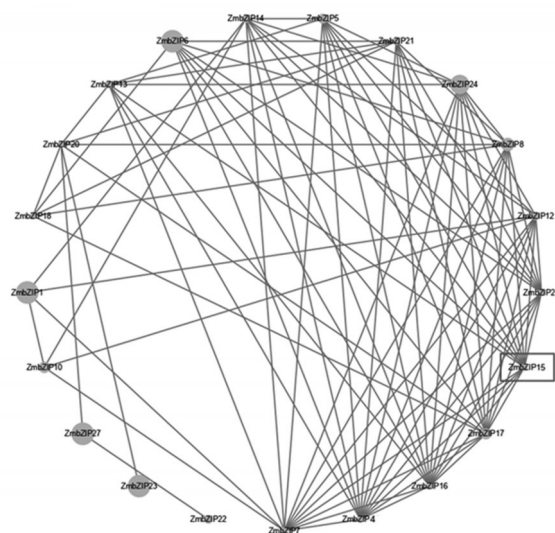
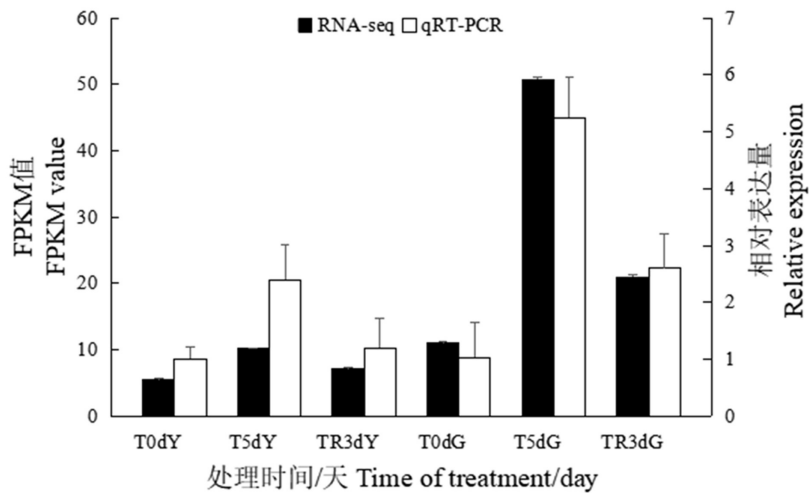


图 1 差异表达基因的共表达网络

Fig.1 Co-expression network of differentially expressed genes

2.2 *ZmbZIP15* 的生物信息学分析

对 *ZmbZIP15* 的基因序列进行分析,发现该基因位于玉米的第 5 号染色体,编码区全长 531 bp,无内含子区,编码 176 个氨基酸(图 3)。对该基因的蛋白保守结构域进行预测,显示 *ZmbZIP15* 具有典型的 bZIP 转录因子结构域。



注: FPKM 为每百万个比对上的 reads 中比对到外显子的每 1 000 个碱基上的片段个数。
Note: FPKM: Fragments per kilo base of transcript per million fragments mapped.

图2 *ZmbZIP15*基因在干旱-复水后 RNA-seq 和 qRT-PCR 的表达
Fig.2 Expression of RNA-seq and qRT-PCR of *ZmbZIP15* gene after drought and rehydration



图3 *ZmbZIP15*基因(A)与编码蛋白(B)结构示意图
Fig.3 Gene structure of *ZmbZIP15*(A) and conserved domains of the protein encoded(B)

对 *ZmbZIP15* 的氨基酸序列进行理化性质的预测和分析,结果表明,分子式为 $C_{874}H_{1380}N_{266}O_{279}S_6$; 相对分子量为 20.27 kDa,理论等电点(PI)为 6.52;带负电荷的残基总数(Asp+Glu)为 23,带正电残基总数(Arg+Lys)为 22,为酸性蛋白;亲水性系数为 -0.882,说明该蛋白是亲水性蛋白;不稳定系数为 78.7,属于不稳定蛋白。对其氨基酸组成成分进行分析,其中, Ser(S)含量最多,占 10.8%;其次为 Leu(L),占 10.2%;

表 1 <i>ZmbZIP15</i> 基因的亚细胞定位预测	
亚细胞结构	可信度
Destination of cell compartment	Certainty
细胞核	0.980
线粒体基质空间	0.100
内质网膜	0.000
内质网腔	0.000

含量最少的是 Trp(W)和 Cys(C),各占 0.6%。

蛋白的亚细胞定位对其蛋白质的功能至关重要。因此,对 *ZmbZIP15* 基因的亚细胞定位进行预测,结果表明,该蛋白分布在细胞核上的可信度为 0.980(表 1)。由此推测,该基因在细胞核上发挥功能,且可能为核蛋白。

2.3 *ZmbZIP15* 蛋白进化树分析及保守基序分析

为了研究玉米 *ZmbZIP15* 与其他物种的亲缘关系,利用 NJ 法构建系统进化树。由图 4 可知,与 *ZmbZIP15* 进化距离最近的是芒草和高粱,即亲缘关系最近;与大麦、小麦的进化距离最远,即亲缘关系最远。对同源物种的 6 个保守基序进行分析,结果发现,这 9 个物种含有相似的保守基序(如 motif 1、motif 2、motif 5、motif 6),说明他们之间可能存在某种相似的生物学功能。除此之外,大麦和小麦中还具有 1 个独特的保守基序 motif 4,这可能是导致与玉米亲缘关系较远的原因。

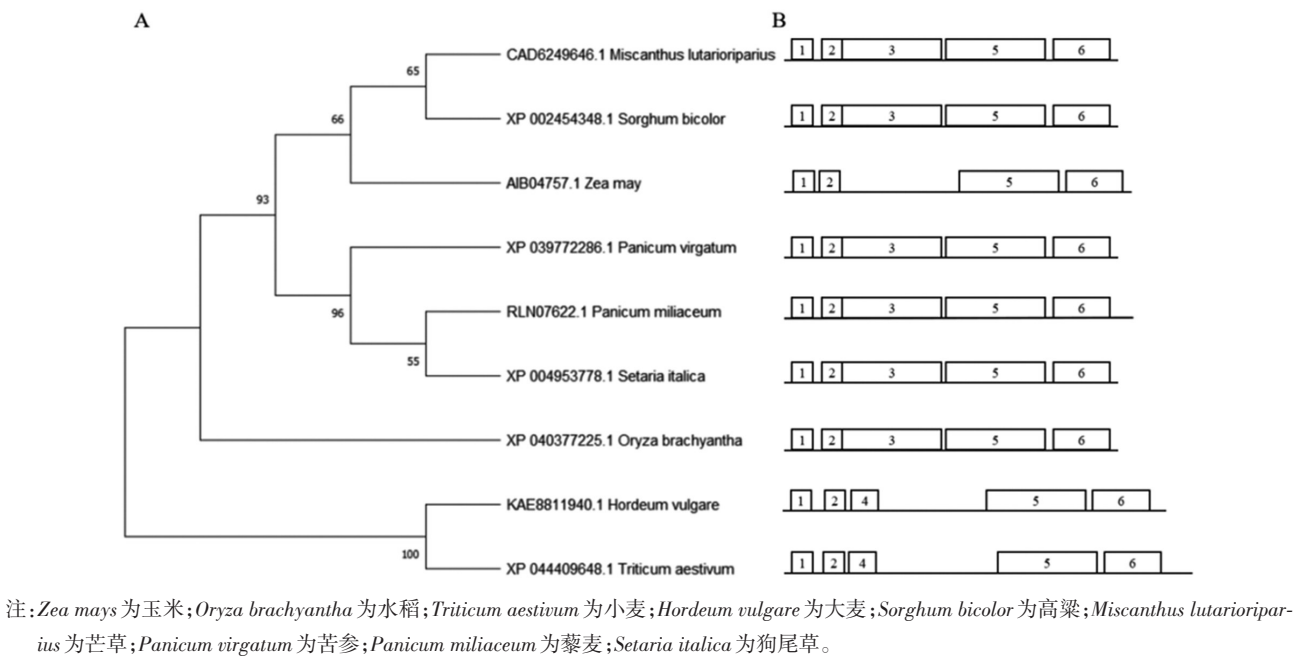


图4 *ZmbZIP15* 蛋白进化树(A)及保守基序(B)分析
Fig.4 Protein evolutionary tree(A) and conserved motifs(B) analysis of *ZmbZIP15*

2.4 *ZmbZIP15*的启动子顺式元件分析

表2 *ZmbZIP15*基因启动子顺式元件分析
Table 2 Cis-element analysis of *ZmbZIP15* gene promoter

核心元件 Core element	位点个数 Number of sites	功能注释 Function annotation
GC-motif	1	enhancer-like element involved in anoxic specific inducibility
TGACG-motif	4	cis-acting regulatory element involved in the MeJA-responsiveness
TGA-element	2	auxin-responsive element
circadian	1	cis-acting regulatory element involved in circadian control
ABRE	2	cis-acting element involved in the abscisic acid responsiveness
TCA-element	3	cis-acting element involved in salicylic acid responsiveness
A-box	1	cis-acting regulatory element
LTR	1	cis-acting element involved in low-temperature responsiveness

启动子顺式作用元件是特定的DNA序列,与基因串联,在基因表达的调控过程中起着重要作用。表2结果发现,在*ZmbZIP15*基因的启动子区域存在多个胁迫响应元件,包括4个茉莉酸甲酯(MeJA)结合元件(TGACG-motif)、4个参与生长素(TGA-element)和脱落酸(ABRE)应答元件、1个低温响应元件(LTR)以及其他元件,说明*ZmbZIP15*基因的表达可能受JA、激素、低温等胁迫的调控。

2.5 *ZmbZIP15*基因组织表达模式分析

分析*ZmbZIP15*基因在玉米不同时期不同组织中的表达情况。图5结果显示,该基因在所有检测的组织中均表达,但表达模式存在明显的差异。其

中,雌穗的表达量最高,幼根和成熟茎表达量次之,幼茎的表达量最低。

2.6 *ZmbZIP15*基因在非生物胁迫诱导表达模式分析

为探讨*ZmbZIP15*基因在逆境胁迫下的表达模式,对该基因在干旱、高温、盐、氮处理下的表达量进行分析。结果显示,在上述处理下*ZmbZIP15*基因的表达量均显著上调。在干旱处理条件下,*ZmbZIP15*基因的表达量显著上调,且上升趋势一直持续到12 h,此时表达量达到处理前水平的10.8倍;之后表达量缓慢下调至84 h;复水处理12 h时,表达量急剧上升,此时表达量已上调至处理前水平的21.4

倍,为最高水平;复水处理36 h时,表达量缓慢降低(图6)。在高温处理条件下,*ZmbZIP15*基因的表达量变化趋势与干旱处理相似,高温处理32 h时,表达量已上调至26.3倍;复水处理12 h时,表达量是处理前水平的51.7倍,已达到峰值。在盐处理条件下,*ZmbZIP15*基因的表达量呈上调趋势,盐处理8 h时,表达量为处理前水平的21.5倍,为最高水平;之后表

达量明显下降;解除胁迫12~36 h,表达量逐渐上调。在氮处理条件下,*ZmbZIP15*基因的表达量也呈显著上调趋势,氮处理24 h时,表达量上调至30倍;而解除胁迫后,表达量恢复至处理前水平。以上结果表明,干旱、高温、盐、氮处理均可诱导*ZmbZIP15*基因的表达,可能在逆境胁迫中发挥着重要作用。

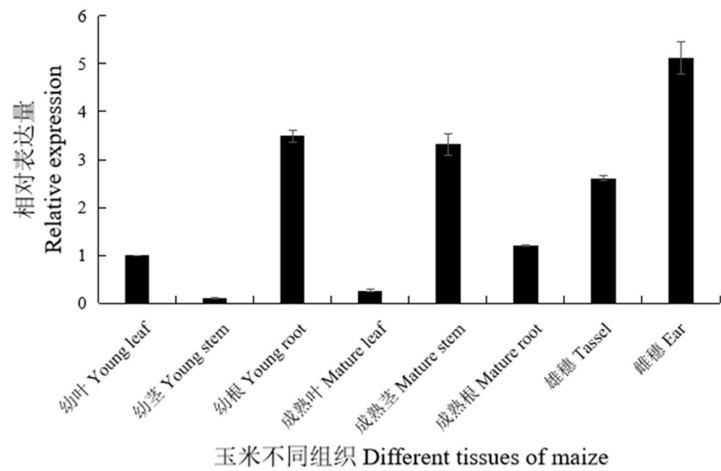


图5 *ZmbZIP15*基因在玉米不同组织中的表达

Fig.5 The expression of *ZmbZIP15* gene in different tissues of maize

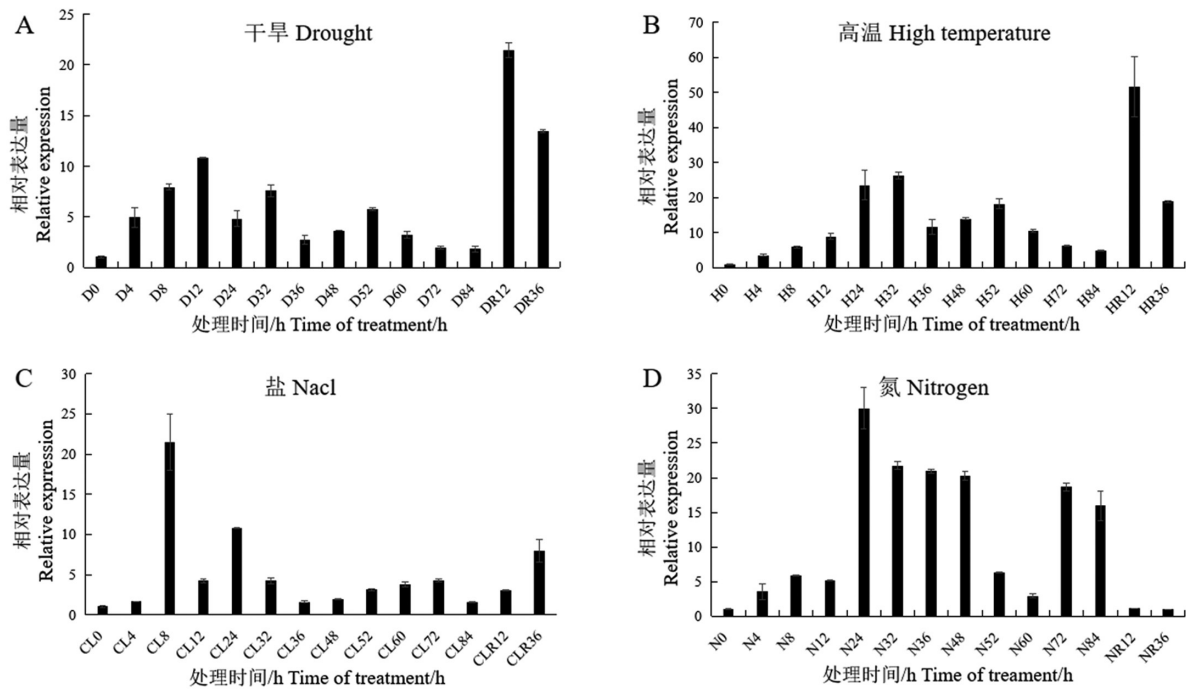


图6 *ZmbZIP15*基因在干旱、高温、盐、氮胁迫下的表达

Fig.6 Expression of *ZmbZIP15* gene under drought, high temperature, NaCl and nitrogen stress

2.7 过表达转基因 *ZmbZIP15* 拟南芥的抗旱性检测

将野生型 col 和转基因 T₃ 代 L1、L2 种子正常培养 5 d 后进行干旱胁迫处理 7 d。在正常处理下,野

生型 col 和转基因植株的长势一致且良好。干旱胁迫处理 7 d 后,发现 col 植株生长受到严重抑制,叶片萎蔫,甚至干死;转基因植株影响较小,但弱于同时期正常处理的 col 植株(图 7)。以上结果说明,在干旱

胁迫处理下,过表达 *ZmbZIP15* 基因能够提高拟南芥的抗旱性。

2.8 *ZmbZIP15* 基因编码蛋白的亚细胞定位

为了进一步验证 *ZmbZIP15* 蛋白在细胞中的位

置,将其进行亚细胞定位。图8结果显示,对照组在细胞核和质膜均能发出绿色荧光信号,而实验组只能在细胞核中观察到绿色荧光信号,说明该基因编码的蛋白定位于细胞核中,属于核蛋白基因。

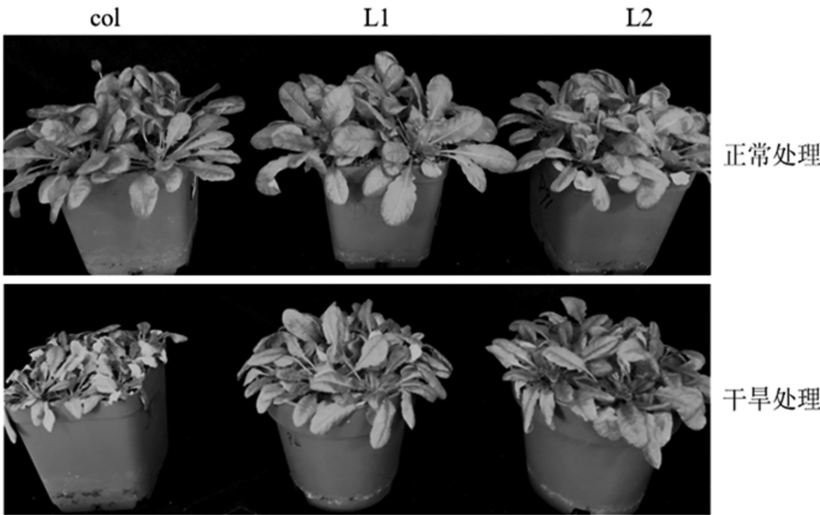


图7 干旱胁迫下 *ZmbZIP15* 转基因拟南芥的幼苗表型

Fig.7 Seedling phenotypes of *Arabidopsis thaliana* transgenic *ZmbZIP15* under drought stress

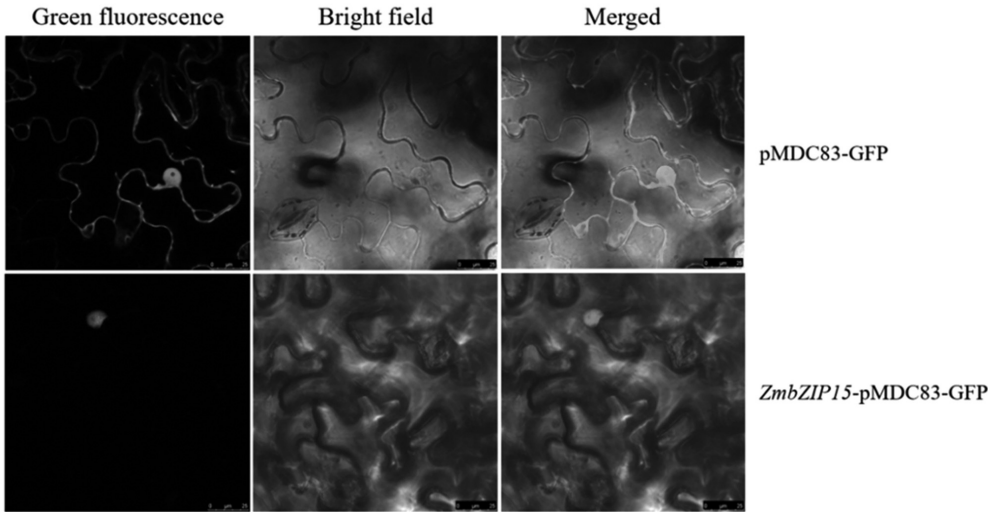


图8 *ZmbZIP15* 的亚细胞定位

Fig.8 Subcellular localization of *ZmbZIP15*

3 结论与讨论

bZIP 蛋白家族在植物生命过程中扮演者不可或缺的角色。自从 *bZIP* 转录因子被发现后,通过各种技术手段对不同物种的 *bZIP* 转录因子进行鉴定并研究其功能。研究表明, *bZIP* 蛋白家族在植物的生长发育以及响应逆境胁迫等过程中起着重要的作用。本文通过转录组测序并分析,获得1个新的玉米 *bZIP* 基因 *ZmbZIP15*, 并对该基因进行生物信息学分析。以玉米自交系郑8713为试验材料,模拟干

旱、高温、盐、氮元素缺乏等逆境条件,系统地研究该基因的表达模式;构建过表达转基因拟南芥进一步验证了该基因的抗旱性;利用亚细胞定位确定该基因在细胞中的位置,这些研究结果为未来深入解析 *ZmbZIP15* 基因的生物学功能提供了科学依据。

启动子调控着基因的表达或抑制。已有研究表明,玉米 *ZmbZIP4* 基因的启动子区域包含 ABRE 元件、CB3 元件、GARE 元件、MeJA 结合元件、低温响应元件、ARE 元件,说明 *ZmbZIP4* 的表达可能受 ABA、JA、GA、冷、干旱等胁迫的调控^[18]。 *ZmbZIP81* 基因

的启动子含有 ABRE 元件、响应干旱胁迫信号的 DRE 元件,表明该基因的表达可能受 ABA 和胁迫信号的调控^[19]。*ZmbZIP71* 基因启动子存在与高低温、厌氧、水杨酸、茉莉酸、赤霉素、光应答、发育等相关结合元件,表明该基因可能响应非生物逆境胁迫、机械损伤以及激素应答等途径^[20]。本研究对 *ZmbZIP15* 基因的启动子顺式元件分析结果显示,该基因存在 MeJA 结合元件、低温响应元件以及参与生长素、脱落酸等结合元件。综上,*ZmbZIP15* 基因与 *ZmbZIP81*、*ZmbZIP71*、*ZmbZIP4* 存在相同的顺式元件。因此 *ZmbZIP15* 基因可能与其他 bZIP 家族基因存在相同或相似的生物学功能。

玉米 *ZmbZIP77* 基因在非生物胁迫处理水平下,高温、干旱、ABA 胁迫下诱导该基因的上调表达,处理后植株的表达水平分别是未处理水平的 1.8、4.5、4.2 倍,盐胁迫对该基因无显著诱导作用。过表达 *ZmbZIP77* 转基因拟南芥的植株形态和生理指标都优于野生型,同时,过表达能够提高拟南芥在干旱胁迫下的耐受性^[21]。*ZmbZIP72* 在 ABA、盐、干旱胁迫处理下,表达量显著上调,在冷胁迫下,表达量逐渐下调;过表达 *ZmbZIP72* 拟南芥种子的萌发对 ABA 和渗透胁迫敏感性大于野生型^[22]。本研究证明,*ZmbZIP15* 基因的表达在玉米中被干旱、高温、盐、氮胁迫显著诱导,并且氮胁迫对基因表达的影响大于干旱、高温、盐的胁迫。另外,过表达 *ZmbZIP15* 转基因的拟南芥幼苗的抗旱能力显著高于野生型,表明过表达能够提高拟南芥的耐旱性,揭示了 *ZmbZIP15* 基因功能的保守性。

一般来说,转录因子大多借助细胞核定位细胞才能进入细胞核,从而启动靶基因的表达。前人研究表明,大多数的玉米 bZIP 蛋白家族定位于细胞核,如 *ZmbZIP77*、*ZmbZIP22*^[23]、*ZmbZIP104*^[24]、*ZmbZIP16*^[25]、*ZmbZIP4* 等。但也有一些家族成员定位于其他细胞器,如 *ZmbZIP60* 定位于内质网,该基因在内质网应激信号传导中发挥作用^[26]。蛋白发生内质网应激反应时,内质网的一侧被切割,含有 bZIP 结构域的一端进入到细胞核内转录激活基因的表达^[27]。本研究结果表明,*ZmbZIP15* 基因定位于细胞核,与大多数 bZIP 蛋白家族成员一致,在细胞核上发挥功能。

综上所述,本研究成功找到并克隆了 1 个 bZIP 蛋白家族基因 *ZmbZIP15*,利用 qRT-PCR 和过表达转基因技术对该基因的抗逆能力进行了分析和观察,并通过亚细胞定位将基因进行了定位。结果表明,*ZmbZIP15* 基因能够积极响应逆境胁迫,并且过

表达可以提高拟南芥的抗旱能力,*ZmbZIP15* 基因是一个核蛋白基因。本研究结果为将来深入研究该基因的生物学功能提供了有价值的参考数据,也为创制抗逆性新品种提供了新的思路。

参考文献:

- [1] SAH S K, REDDY K R, LI J X. Abscisic acid and abiotic stress tolerance in crop plants[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7: 571.
- [2] HUANG G T, MA S L, BAI L P, et al. Signal transduction during cold, salt, and drought stresses in plants[J]. *Molecular Biology Reports*, 2012, 39(2): 969–987.
- [3] KALAIVANI K, NADARAJAH. ROS homeostasis in abiotic stress tolerance in plants[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(15): 5208.
- [4] CARLOS M H, JOHN J F. Identification and validation of promoters and cis-acting regulatory elements[J]. *Plant Science*, 2014, 217–218.
- [5] 刘慧洁,徐恒,邱文怡,等. *bZIP* 转录因子在植物生长发育及非生物逆境响应的作用[J]. *浙江农业学报*, 2019, 31(7): 1205–1214.
- LIU H J, XU H, QIU W Y, et al. Roles of *bZIP* transcription factors in plant growth and development and abiotic stress response[J]. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 2019, 31(7): 1205–1214. (in Chinese)
- [6] TU X Y, MEJÍA G M K, VALDES F A, et al. Reconstructing the maize leaf regulatory network using ChIP-seq data of 104 transcription factors[J]. *Nature Communications*, 2020, 11(1): 5089.
- [7] NIJHAWAN A, JAIN M, TYAGI A K, et al. Genomic survey and gene expression analysis of the basic leucine zipper transcription factor family in rice[J]. *Plant Physiology*, 2008, 146(2): 333–350.
- [8] ZHAO K, CHEN S, YAO W J, et al. Genome-wide analysis and expression profile of the bZIP gene family in poplar[J]. *BMC Plant Biology*, 2021, 21(1): 122.
- [9] LIM C W, JOO H, LEE S C, et al. Post-translational modifications of bZIP transcription factors in abscisic acid signaling and drought responses[J]. *Current Genomics*, 2021, 22(1): 4–15.
- [10] LI Z Y, FU D Y, WANG X, et al. The transcription factor bZIP68 negatively regulates cold tolerance in maize[J]. *Plant Cell*, 2022, 34(8): 2833–2851.
- [11] MINSOO NOH, MAHMUDUL H, KWANG W J, et al. A Stress-Responsive CaM-Binding transcription factor, bZIP4, confers abiotic stress resistance in Arabidopsis[J]. *Journal of Plant Biology*, 2021 (Republish): 1–12.
- [12] BI C X, YU Y H, DONG C H, et al. The bZIP transcription factor TabZIP15 improves salt stress tolerance in wheat[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2020, 19(2): 209–211.
- [13] CHAI M N, FAN R B, HUANG Y M, et al. GmbZIP152, a Soybean bZIP transcription factor, confers multiple biotic and abiotic stress responses in plant[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(18): 10935.
- [14] CAO R J, ZHAO S L, JIAO G A, et al. OPAQUE3, encoding a transmembrane bZIP transcription factor, regulates endosperm storage protein and starch biosynthesis in rice[J]. *Plant Communications*, 2022, 3(6): 100463.

- [15] HENRIQUES A R, FARIAS D R, COSTA O A. Identification and characterization of the bZIP transcription factor involved in zinc homeostasis in cereals[J]. Genetics and Molecular Research: GMR, 2017, 16(2): gmr16029558.
- [16] WANG Q, GUO C, LI Z Y, et al. Identification and analysis of bZIP family genes in Potato and their potential roles in stress responses [J]. Frontiers in Plant Science, 2021, 12: 637343.
- [17] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402–408.
- [18] MA H Z, LIU C, LI Z X, et al. ZmbZIP4 contributes to stress resistance in maize by regulating ABA synthesis and root development [J]. Plant Physiology, 2018, 178(2): 753–770.
- [19] 王 策, 杨艳歌, 吕维涛, 等. 玉米 A 亚族 *bZIP* 转录因子基因 *ZmbZIP81* 的克隆、表达与功能分析[J]. 作物学报, 2014, 40(9): 1549–1556 .
WANG C, YANG Y G, LÜ W T, et al. Cloning, expression, and functional analysis of an a subfamily *bZIP* transcription factor gene *ZmbZIP81* in maize[J]. Acta Agronomica Sinica, 2014, 40(9): 1549–1556. (in Chinese)
- [20] 刘彦丹, 英 生, 张登峰, 等. 玉米逆境胁迫响应基因 *ZmbZIP71* 的克隆与表达分析[J]. 植物遗传资源学报, 2011, 12(5): 775–781 .
LIU Y D, YING S, ZHANG D F, et al. Isolation and expression analysis of a stress-responsive gene *ZmbZIP71* in maize (*Zea mays* L.)[J]. Journal of Plant Genetic Resources, 2011, 12(5): 775–781. (in Chinese)
- [21] 郭 凯. 玉米转录因子 *ZmbZIP77* 耐旱功能初步研究[D]. 荆州: 长江大学, 2021 .
- [22] YING S, ZHANG D F, FU J, et al. Cloning and characterization of a maize bZIP transcription factor, ZmbZIP72, confers drought and salt tolerance in transgenic Arabidopsis[J]. Planta, 2012, 235(2): 253–266.
- [23] LI C B, YUE Y H, CHEN H J, et al. The ZmbZIP22 transcription factor regulates 27-kD γ -Zein gene transcription during maize endosperm development[J]. Plant Cell, 2018, 30(10): 2402–2424.
- [24] 龙 娇. 转录因子 *ZmbZIP104* 介导 ABA 调控玉米淀粉合成的分子机制研究[D]. 成都: 四川农业大学, 2018 .
- [25] 魏劲松. 玉米 *ZmbZIP16* 转录因子的功能鉴定[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2015 .
- [26] WANG B, ZHENG J, LIU Y J, et al. Cloning and characterization of the stress-induced bZIP gene ZmbZIP60 from maize[J]. Molecular Biology Reports, 2012, 39(5): 6319–6327.
- [27] CHEN Y N, SLABAUGH E, BRANDIZZI F. Membrane-tethered transcription factors in Arabidopsis thaliana: novel regulators in stress response and development[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2008, 11(6): 695–701.

(责任编辑: 朴红梅)