作物学报 ACTA AGRONOMICA SINICA 2025, 51(9): 2318−2329 http://zwxb.chinacrops.org/
ISSN 0496-3490; CN 11-1809/S; CODEN TSHPA9 E-mail: zwxb301@caas.cn

DOI: 10.3724/SP.J.1006.2025.53011

玉米低温响应基因 *ZmNTL1* 和 *ZmNTL5* 的鉴定及功能分析

高 源** 王宇琦** 姜佳宁 赵健雄 王雪贺缘 王浩宇 张芮嘉 徐晶宇 贺 琳*

黑龙江八一农垦大学, 黑龙江大庆 163319

摘 要: 低温是限制东北地区玉米产量的主要逆境之一。膜 NAC 转录因子在植物抵御逆境过程中发挥着重要作用, 探究其功能将为玉米耐低温育种提供一定的理论依据。本研究通过生物信息技术分析了 9 条玉米 *NTL* 基因的分子特性, 利用已发表的玉米低温 RNA-seq 数据, 发现 6 个成员在根和叶中同时受到低温诱导显著上调表达。选取蛋白同源性达到 80.04%的 *ZmNTL1* 与 *ZmNTL5* 基因, 采用基因敲除技术构建了该 2 条基因的双敲材料 *zmntl1zmntl5*。在低温胁迫条件下, *zmntl1zmntl5* 株系的叶片离子渗透率显著高于 B104 株系; 而其地上部干重和鲜重、地下部干重和鲜重以及叶绿素含量均显著低于 B104 株系; *zmntl1zmntl5* 株系的 O_2^- 和 H_2O_2 含量显著高于 B104 对照株系, 而 GST、SOD、POD 和 CAT 活性均显著低于 B104 株系。此外, 低温胁迫下 *ZmGST24*、*ZmNCED3*、*ZmDREB1.6* 和 *ZmDREB2A* 基因在 *zmntl1zmntl5* 株系中的表达量较 B104 株系显著降低。综上所述, *ZmNTL1* 与 *ZmNTL5* 的缺失降低了植物对低温的耐受性, 表明二者是玉米低温耐受性的正调控因子。本研究为耐冷玉米品种改良和新品种培育提供了重要的理论基础和宝贵的遗传资源。

关键词: 玉米; 低温; RNA-seq; *NTL*; 基因编辑

Identification and functional analysis of low temperature responsive genes *ZmNTL1 and ZmNTL5* in maize

GAO Yuan**, WANG Yu-Qi**, JIANG Jia-Ning, ZHAO Jian-Xiong, WANG Xue-He-Yuan, WANG Hao-Yu, ZHANG Rui-Jia, XU Jing-Yu, and HE Lin*

Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, Heilongjiang, China

Abstract: Low temperature is one of the major abiotic stresses limiting maize yield in Northeast China. Membrane-bound NAC transcription factors play important roles in plant stress responses. Investigating their function provides a theoretical basis for breeding maize with enhanced cold tolerance. In this study, the molecular characteristics of nine maize *NTL* genes were analyzed using bioinformatics approaches. Analysis of publicly available RNA-seq data revealed that six of these genes were significantly upregulated by low temperature stress in both roots and leaves. Among them, *ZmNTL1* and *ZmNTL5*, which share 80.04% sequence homology, were selected for further study. A double knockout mutant (*zmntl1zmntl5*) was generated using gene-editing techniques. Under low temperature stress, the ion leakage rate in the leaves of *zmntl1zmntl5* was significantly higher than in the wild-type B104. The fresh and dry weights of both aboveground and belowground tissues, as well as chlorophyll content, were significantly lower in *zmntl1zmntl5* compared to B104. In contrast, *zmntl1zmntl5* exhibited significantly higher levels of O_2^- and H_2O_2, while the activities of antioxidant enzymes GST, SOD, POD, and CAT were significantly reduced. Furthermore, the expression levels of *ZmGST24*, *ZmNCED3*, *ZmDREB1.6*, and *ZmDREB2A* were markedly decreased in *zmntl1zmntl5* compared to B104 under cold stress. In summary, the absence of *ZmNTL1* and *ZmNTL5* compromises cold tolerance in maize, suggesting that both

本研究由国家自然科学基金项目(31701328)和黑龙江省博士后科研启动金项目(LBH-Q21160)资助。

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (31701328) and the Postdoctoral Research Foundation of Heilongjiang Province (LBH-Q21160).

* 通信作者(Corresponding author): 贺琳, E-mail: linlinhe65@sina.com

** 同等贡献(Contributed equally to this work)

第一作者联系方式: 高源, E-mail: 644909333@qq.com; 王宇琦, E-mail: 3496668542@qq.com

Received (收稿日期): 2025-02-19; Accepted (接受日期): 2025-06-01; Published online (网络出版日期): 2025-06-10.

URL: https://link.cnki.net/urlid/11.1809.S.20250610.1426.007

This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

genes function as positive regulators in the cold stress response. This study provides a valuable theoretical foundation and genetic resources for the improvement of cold-tolerant maize varieties and the development of new cultivars.
Keywords: maize; low temperature; RNA-seq; *NTL*; gene editing

低温是限制植物生长、发育、产量及地理分布的主要环境因子之一, 据统计全球目前约有 20%的可耕地受到低温冷害的影响[1]。植物在响应低温时需要经历复杂的信号级联反应, 首先通过质膜定位蛋白感知低温信号, 随后产生 Ca^{2+}信号, 激活或抑制 Ca^{2+}相关激酶, 然后启动转录因子(transcription factors, TF)介导的信号转导, 最终引发生理反应[2-4]。转录因子在植物响应低温时主要扮演信号传递者的角色, 通过与靶基因结合, 将外界胁迫信号传递到细胞核, 从而影响植物体内低温胁迫相关基因的转录[5-6]。多数转录因子定位于细胞核, 另有一些转录因子为膜结合转录因子(membrane-bound transcription factors, MTFs), 因为拥有跨膜结构域, 使其翻译后被转运到细胞膜或内质网膜上[7-8]。一旦细胞受到刺激, 跨膜结构域水解, MTFs 从细胞膜或内质网膜上解离并迁移至细胞核, 在细胞核内执行基因调控功能, 因为这一过程不涉及转录和翻译, 使得植物能够迅速响应外界信号刺激[9]。

目前已发现植物中有 2 类转录因子存在膜结合成员, 分别为 bZIP 和 NAC。膜结合 NAC 又被称为 NTM1 (NAC with transmembrane motif 1)或 NTL (NTM1-like), 其蛋白 C-端区域含有 1 到多个 α–螺旋跨膜元件(transmembrane motif, TM)。多数 NTL 编码基因均可以被逆境所诱导, 参与调控植物逆境反应。例如, 大豆 *GmNTLs* 基因可被低温和 H_2O_2 诱导, 积极调控植物非生物胁迫耐受性[10]。拟南芥 *AtNTL8* 基因受高盐诱导, 参与调控赤霉素(GA)介导的盐胁迫下种子萌发[11]; 拟南芥 ANAC016/AtNTL3 转录因子通过直接与 *AREB1* 启动子中特异性基序结合, 抑制 *AREB1* 转录, 进而负调控拟南芥对干旱的耐受性[12]。小麦 *TaNTL1* 基因可被 PEG-6000 和脱落酸(ABA)诱导表达, 缺失跨膜域的 *TaNTL1* 积极调控植物对干旱胁迫的耐受性[13]。百合 NTL 基因 *LINAC014* 被高温诱导后积极调控植物耐热性[14]。此外, 缺失跨膜域的玉米 *ZmNTL1*、*ZmNTL2* 和 *ZmNTL5* 基因积极调控拟南芥对 H_2O_2 的耐受性[15], *ZmNAC074* (*ZmNTL1*)基因积极调控拟南芥对盐、旱和热胁迫的耐受性[16-17]。

玉米(*Zea mays* L.)原产于热带地区, 对低温胁迫十分敏感。东北地区是我国玉米主产区, 但是由于地理原因, 春季经常遭受低温冷害的侵袭, 造成玉米大面积死亡。因此, 有必要研究玉米的低温响应机制。玉米全基因组中共有 9 条 *ZmNTLs*, 目前关于 *ZmNTLs* 在玉米低温应答反应中的调控功能未见报道。本研究利用生物信息学分析了 9 条 *ZmNTLs* 的基因结构、蛋白保守基序、跨膜域和蛋白进化关系; 利用已发表的玉米低温 RNA-seq 数据, 发现 6 个成员在根和叶中同时受到低温诱导显著上调表达。选取同源性高达 80.04%的 *ZmNTL1* 与 *ZmNTL5* 基因, 采用基因敲除技术构建了该 2 条基因的双敲材料 *zmntl1zmntl5*。通过分析 *zmntl1zmntl5* 双敲材料的生长表型、生理指标和逆境相关基因表达情况, 进而证明 *ZmNTL1* 和 *ZmNTL5* 正调控玉米低温耐受性。本研究为进一步解析 *ZmNTL1* 和 *ZmNTL5* 在玉米低温应答反应中的分子调控机制提供了线索。

1　材料与方法

1.1　试验材料

玉米(B104 自交系与 *zmntl1zmntl5* 突变体)种子用 10%次氯酸钠溶液消毒 30 min, 无菌水冲洗数次, 然后置于温室下催芽, 2~3 d 后将幼苗移到蛭石与土壤体积比为 1∶1 的混合基质上培养。生长室温度控制 24℃恒温, 光照周期为 16 h 光照、8 h 黑暗。待植株生长至二叶一心期将部分幼苗转移至光照周期相同、温度为 4℃的人工培养箱中进行低温胁迫处理, 其余 24℃下生长的幼苗作为非处理对照。4℃低温处理 24 h、72 h 后分别取样, 分别用于 RNA 提取和生理指标测定。

1.2　*ZmNTLs* 保守序列、基因结构、理化性质和低温胁迫下表达模式分析

基因的染色体定位信息、CDS 序列和蛋白序列来源于 Phytozome 数据库(https://phytozome-next.jgi.doe.gov/)。利用在线网站 ExPasy (https://web.expasy.org/protparam/)分析获得蛋白分子量、等电点、不稳定指数、脂肪酸指数和亲水系数等信息。

使用在线网站 MEME (http://meme-suite.org/)进行保守基序预测, 预测基序数目设为 10, 氨基酸数目设为 6~50。借助在线网站 GSDS (http://gsds.gao-

lab.org/)分析基因结构, 利用 TMHMM-2.0 软件预测蛋白质结构域。分析本实验室前期已发表文献的 RNA-seq 数据(登录号: SRX2672484 和 SRR13312968), 从中提取 9 条 *ZmNTLs* 基因低温下在根和叶中的表达数据, 利用 TBtools 软件绘制表达模式热图[18-19]。

1.3 ZmNTLs 系统进化树构建

利用 Phytozome 网站的 Blastp 功能筛选并下载与 ZmNTLs 同源的拟南芥和水稻 NTL 蛋白序列。使用 MEGA7.0 软件中的 Align By Muscle 功能, 对 22 条 NTL 蛋白序列(包括 9 条 ZmNTLs、7 条 AtNTLs、5 条 OsNTLs 和 1 条 TaNTLs)进行多序列比对, 采用邻接法(neighbor-joining method)构建系统进化树。利用泊松校正法计算进化距离, 设置 Bootstrap 值为 1000 次重复校验, 利用在线软件 iTOL (https://itol.embl.de/index.shtml)进行编辑和注释。

1.4 基因编辑材料的获得和靶基因突变鉴定

设计 *ZmNTL1* 与 *ZmNTL5* 基因的共有靶点(target), 利用同源重组法构建到 pCPB-Cas9 基因编辑载体。将重组基因编辑载体转入 B104 玉米自交系, 提取 DNA, 扩增 *ZmNTL1* 与 *ZmNTL5* 的靶标区域, Sanger 测序检测 PCR 产物, 鉴定基因型。

1.5 玉米形态指标和生理指标测定方法

1.5.1 *干、鲜重的测定* 分别取二叶一心期玉米幼苗地上部和地下部, 用蒸馏水冲洗干净, 滤纸吸干水分后称鲜重, 将样品置于烘箱中, 先在 105℃下杀青 30 min, 然后调至 80℃烘干至恒重。

1.5.2 *离子渗透率的测定* 将剪碎的玉米叶片进行真空处理 10 min, 使用离子测量仪测定初始电导值。将样品在 95℃下煮沸 1 h, 待恢复至室温后再次测量电导值。

1.5.3 *叶绿素含量的测定* 取不同株系同等部位叶片, 剪成条状, 用 95%无水乙醇浸泡 72 h, 随后用分光光度计测定提取液在 645 nm、663 nm、652 nm 波长下的吸光值。

1.5.4 *其他生理指标的测定* 使用苏州格锐思生物科技有限公司提供的检测试剂盒, 分别测定超氧化物歧化酶(SOD)活性、过氧化物酶(POD)活性、过氧化氢酶(CAT)活性、谷胱甘肽 S-转移酶(GST)活性、丙二醛(MDA)含量、超氧阴离子(O_2^-)含量和过氧化氢(H_2O_2)含量。

1.6 DAB 和 NBT 染色

将 DAB 和 NBT 粉末分别溶解于 Tris-HCl 和磷酸缓冲液中, 玉米叶片浸入染色液中, 室温下避光染色过夜。75%乙醇沸水浴脱色, 观察染色结果。

1.7 实时荧光定量 PCR

采用 Trizol 法提取玉米叶片总 RNA, 经 DNase I 处理后, 使用微量分光光度计检测 RNA 纯度(OD_{260}/OD_{280}), 利用试剂盒(HIScript III 1st Strand cDNA Synthesis Kit, Vazyme)反转录为 cDNA。借助 Primer Premier 5 设计引物(表 1), 以 *ZmUbi* 作为内参基因。实时荧光定量 PCR 反应体系与程序参考 ChamQ Universal SYBR qPCR Masier Mix (Vazyme)试剂盒说明书, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算基因的相对表达量。

表 1 本研究所用引物
Table 1 Primers used in this study

引物名称 Primer name	序列 Sequence (5′–3′)	作用 Function
pCPB-Cas9-F	GACGGCCAGTGCCAAGCTTGCTGTTTTTGTTAGCCCCATCG	载体构建 Vector construction
pCPB-Cas9-R	CTAGCTCTAAAACAATCCTGGTGGCAGGTGCATAATTCGGTGCTTGC	载体构建 Vector construction
ZmNTL1-F	CTTCTGCATTTCTAGGCATGATTG	测序 Sequencing
ZmNTL1-R	CCGTCTATCTGCCTATGATTCTCAA	测序 Sequencing
ZmNTL5-F	CTCGGGTGCTGTGTTTCTGTTTG	测序 Sequencing
ZmNTL5-R	GAGGATACAGATTGACAGGCATCACTT	测序 Sequencing
ZmUbi-F	TGGTTGTGGCTTCGTTGGTT	实时荧光定量 PCR qRT-PCR
ZmUbi-R	GCTGCAGAAGAGTTTTGGGTACA	实时荧光定量 PCR qRT-PCR
ZmGST24-F	CCGGAGTGCACCTGATAGC	实时荧光定量 PCR qRT-PCR
ZmGST24-R	TGACCCACGACTTGTACCTC	实时荧光定量 PCR qRT-PCR
ZmNCED3-F	CCGAGGAAAGCGGACGG	实时荧光定量 PCR qRT-PCR
ZmNCED3-R	CGTAGACCCCGTCGATGAAG	实时荧光定量 PCR qRT-PCR

(续表 1)

引物名称 Primer name	序列 Sequence (5′–3′)	作用 Function
ZmDREB1.6-F	TTGAGGTGGATGTGTTCGGC	实时荧光定量 PCR qRT-PCR
ZmDREB1.6-R	CCACAGCTCCATCTCACCAG	实时荧光定量 PCR qRT-PCR
ZmDREB2A-F	ATCACTCGGACATCGCATCC	实时荧光定量 PCR qRT-PCR
ZmDREB2A-R	AGATACCAGGGCTGTCCCAT	实时荧光定量 PCR qRT-PCR

ZmGST24 基因 ID: GRMZM2G032856。*ZmNCED3* 基因 ID: GRMZM2G014392。*ZmDREB1.6* 基因 ID: GRMZM2G175856。*ZmDREB2A* 基因 ID: GRMZM2G006745。

ZmGST24 gene ID: GRMZM2G032856. *ZmNCED3* gene ID: GRMZM2G014392. *ZmDREB1.6* gene ID: GRMZM2G175856. *ZmDREB2A* gene ID: GRMZM2G006745.

2　结果与分析

2.1　*ZmNTLs* 的分子特性及低温下表达模式分析

玉米全基因组共有 9 条 *ZmNTLs*, 分布于 3 号、4 号、7 号、8 号、9 号和 10 号染色体(表 2)。这些 NTLs 的蛋白序列长度为 313~709 aa; 分子量为 34.83~77.98 kD; 等电点 (pI) 为 4.53~9.62。仅 ZmNTL8 为碱性亲水蛋白(表 2)。

基因结构分析显示, 玉米 *NTLs* 基因的外显子数目从 2 个到 7 个不等(图 1-A)。MEME 分析鉴定到 10 个保守基序(motif)。所有成员均含有 motif 1 与 motif 2, 其中 7 条含有 motif 1~motif 4 (图 1-B)。跨膜结构预测显示, ZmNTL8 含 4 个跨膜域, 其余成员含 1 个跨膜域(图 1-C)。

表达模式分析显示, 玉米叶片中有 6 条 *ZmNTLs* 基因(*ZmNTL1/3/4/5/7/9*)在叶中受低温诱导显著上调表达(|$\log_2$FC|>2), 有 5 条 *ZmNTLs* 在根中受低温诱

表 2　*ZmNTLs* 基因理化性质信息统计

Table 2　Physicochemical properties of *ZmNTLs* genes

基因名称 Gene name	基因 ID Gene ID	染色体位置 Chromosomal location	蛋白质长度 Protein length (aa)	分子量 Molecular weight (kD)	理论等电点 Theoretical isoelectric point
ZmNTL1	GRMZM2G064541	3	517	57.50	5.49
ZmNTL2	GRMZM2G125777	4	665	71.82	4.53
ZmNTL3	GRMZM2G113950	4	657	71.98	4.62
ZmNTL4	GRMZM2G004531	7	709	77.98	4.67
ZmNTL5	GRMZM2G167492	8	518	57.33	5.52
ZmNTL6	GRMZM2G163914	9	612	66.81	5.58
ZmNTL7	GRMZM2G003715	10	664	73.61	4.81
ZmNTL8	GRMZM2G158204	8	313	34.83	9.62
ZmNTL9	AC196475.3_FG005	4	633	70.66	4.90

基因名称 Gene name	不稳定指数 Instability index	脂肪酸指数 Fatty acid index	平均亲疏水性 Grand average of hydropathicity	低温叶 $\log_2$FC $\log_2$FC of leaves under low temperature	低温根 $\log_2$FC $\log_2$FC of roots under low temperature
ZmNTL1	49.37	70.60	–0.641	5.19	4.83
ZmNTL2	36.98	74.56	–0.365	–1.00	0.79
ZmNTL3	43.32	67.32	–0.530	2.19	1.47
ZmNTL4	46.98	68.27	–0.508	2.25	2.06
ZmNTL5	49.92	68.40	–0.607	3.32	2.56
ZmNTL6	49.88	79.07	–0.408	–1.21	0.62
ZmNTL7	47.62	67.12	–0.602	4.05	3.50
ZmNTL8	27.62	99.36	0.257	–	–
ZmNTL9	56.17	65.94	–0.772	2.93	3.35

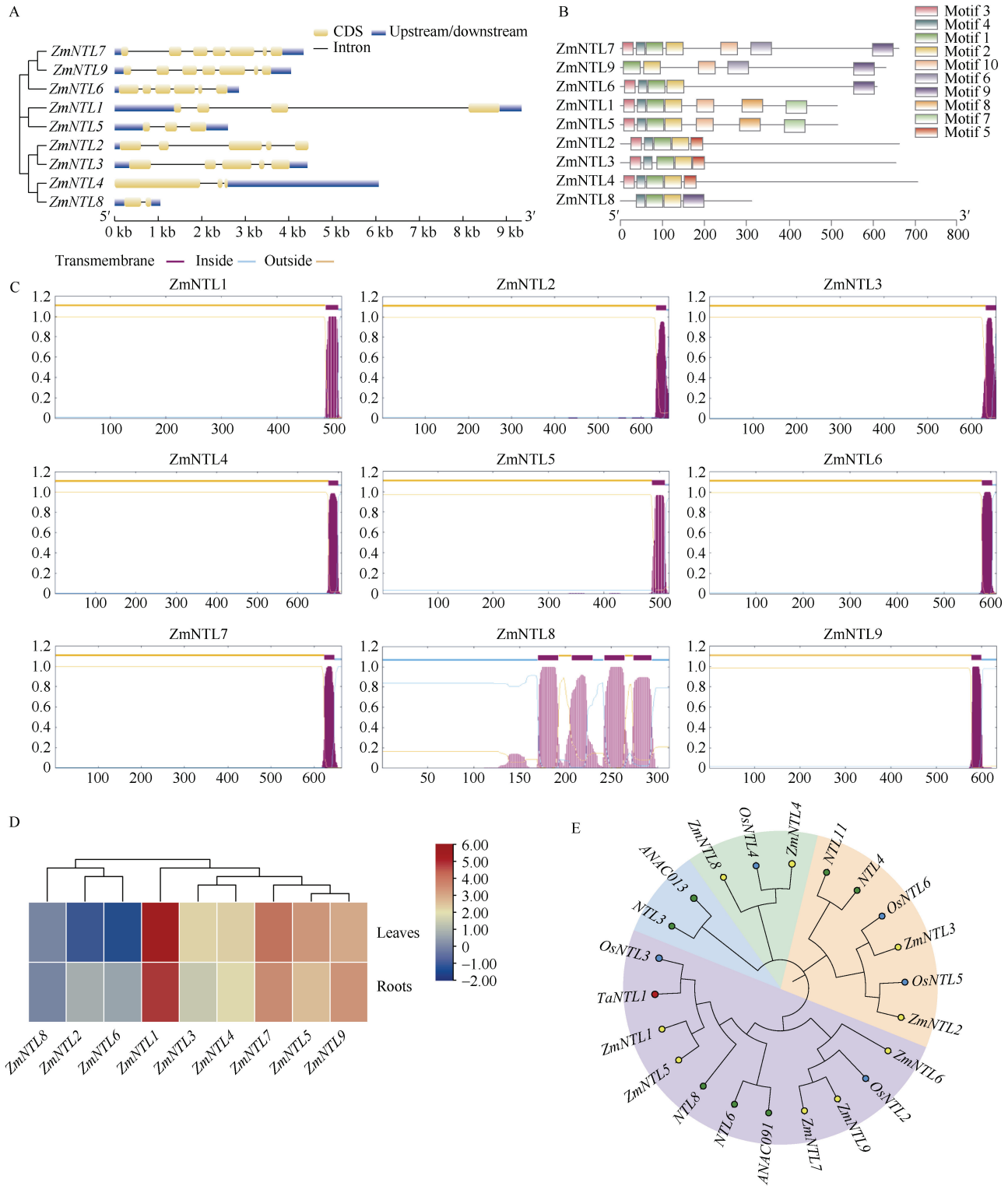


图 1 *ZmNTLs* 基因的分子特性和低温下表达模式分析

Fig. 1 Molecular characterization and expression patterns of *ZmNTLs* gene under low temperature stress

A: *ZmNTLs* 的基因结构。B: ZmNTLs 的保守基序。C: ZmNTLs 蛋白跨膜域预测。D: *ZmNTLs* 在低温胁迫下的表达模式。E: NTLs 的进化关系分析。绿圈代表 7 个拟南芥 *NTLs*，蓝圈代表 5 个水稻 *NTLs*，黄圈代表 9 个玉米 *NTLs*，红圈代表 1 个小麦 *NTL*。

A: gene structures of *ZmNTLs*. B: conservative motifs of ZmNTLs. C: prediction of ZmNTLs protein transmembrane domain. D: expression patterns of *ZmNTLs* under low temperature stress. E: phylogenetic relationship of *NTLs*. Green circles represent 7 *NTLs* from *Arabidopsis thaliana*, blue circles represent 5 *NTLs* from rice, yellow circles represent 9 *NTLs* from maize, red circle represents 1 *NTL* from wheat.

导显著上调表达(|$\log_2$FC|>2) (图 1-D 和表 2)。*ZmNTL1* 在玉米叶和根中 $\log_2$FC 最高分别为 5.19 和 4.83。进化关系分析显示, *ZmNTL1* 和 *ZmNTL5* 互为旁系同源基因, *ZmNTL1* 与水稻 *OsNTL3*、小麦 *TaNTL1* 互为直系同源基因。此外, *ZmNTL1* 与拟南芥逆境相关 NTL 基因 *NTL8*、*NTL6* 和 *ANAC091* 处于同一进化分支(图 1-E)。

2.2　玉米 *zmntl1zmntl5* 双敲材料创制

鉴于 *ZmNTL1* 与 *ZmNTL5* 互为旁系同源基因, 二者蛋白相似性高达 80.04%, 且二者低温下表达模式相似(图 1-D~E, 图 2-A), 基于 CRISPR-Cas9 技术设计该 2 条基因的共有靶点(target), 构建到 pCPB-Cas9 基因编辑载体。将重组基因编辑载体转入 B104 玉米自交系, 提取 DNA, 扩增 *ZmNTL1* 与 *ZmNTL5* 的靶标区域。Sanger 测序检测, 选取 3 个具有独立编辑事件的纯合 *zmntl1zmntl5* 突变株系, 分别命名为 SQ1、SQ2 和 SQ3, 用于后续的基因功能研究(图 2-B~E)。

2.3　玉米 *ZmNTL1* 和 *ZmNTL5* 在低温下的功能研究

以 B104 为对照, 利用 *zmntl1zmntl5* 突变体研究 *ZmNTL1* 和 *ZmNTL5* 在低温下的功能。正常生长条件下, *zmntl1zmntl5* 突变体和 B104 自交系幼苗在表型上未见差异。然而, 4℃低温处理 72 h, 恢复室温培养 48 h 后, 相比 B104 株系, *zmntl1zmntl5* 突变体

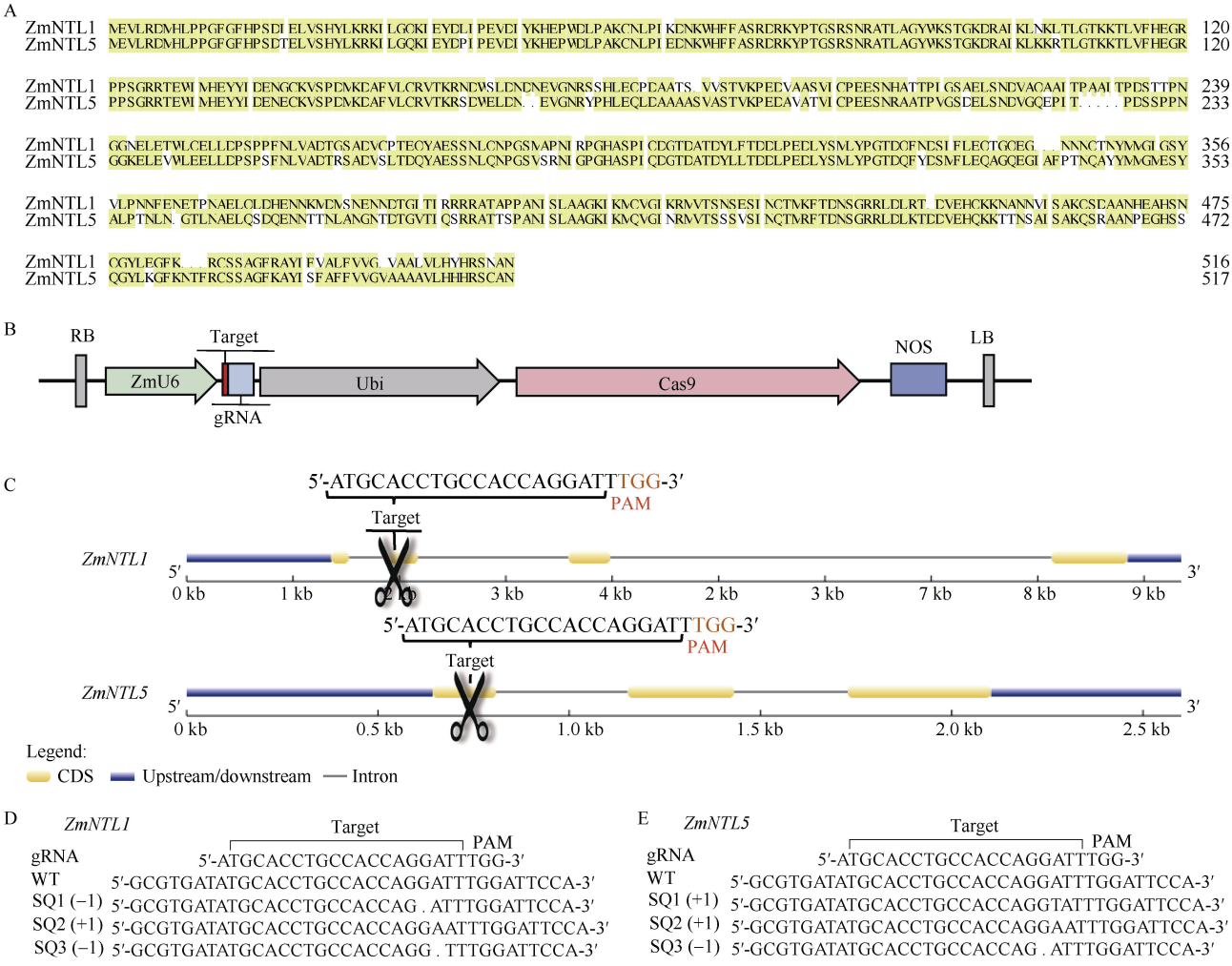


图 2　*zmntl1zmntl5* 突变体材料的创制

Fig. 2　Generation of *zmntl1zmntl5* mutant materials

A: ZmNTL1 与 ZmNTL5 蛋白序列比对。B: pCPB-Cas9 重组载体示意图。C: *ZmNTL1* 与 *ZmNTL5* 的共有靶点设计。D, E: 基因敲除材料中突变等位基因序列的比对。

A: protein sequence alignment of ZmNTL1 and ZmNTL5. B: schematic diagram of the pCPB-Cas9 recombinant vector. C: common target design of *ZmNTL1* and *ZmNTL5*. D, E: alignment of mutant allele sequences in gene knockout materials.

叶缘呈现出明显发黄、萎蔫、收缩和枯萎的现象(图 3-A)。进一步的生长指标测定显示, 正常生长条件下, *zmntl1zmntl5* 突变体与 B104 株系的地上部、地下部的鲜重和干重均无显著差异; 然而在 4℃低温处理 72 h 后, 与 B104 株系相比, SQ1、SQ2 和 SQ3 突变体株系的地上部鲜重分别降低 15.27%、18.40%和 18.34%, 地上部干重分别降低 28.51%、25.71%和 30.12%, 地下部鲜重分别降低 14.20%、11.94%和 11.69%, 地下部干重分别降低 15.96%、23.14%和 24.33% (图 3-B~E)。因此, *zmntl1zmntl5* 突变体对低温逆境更为敏感, *ZmNTL1* 与 *ZmNTL5* 积极调控玉米低温耐受性。

离子渗透率是评价逆境引起质膜损伤的重要指标, 叶绿素含量与光合作用密切相关。正常生长条件下, *zmntl1zmntl5* 突变体的 3 个株系与 B104 株系叶片中的离子渗透率和叶绿素含量均未表现出显著

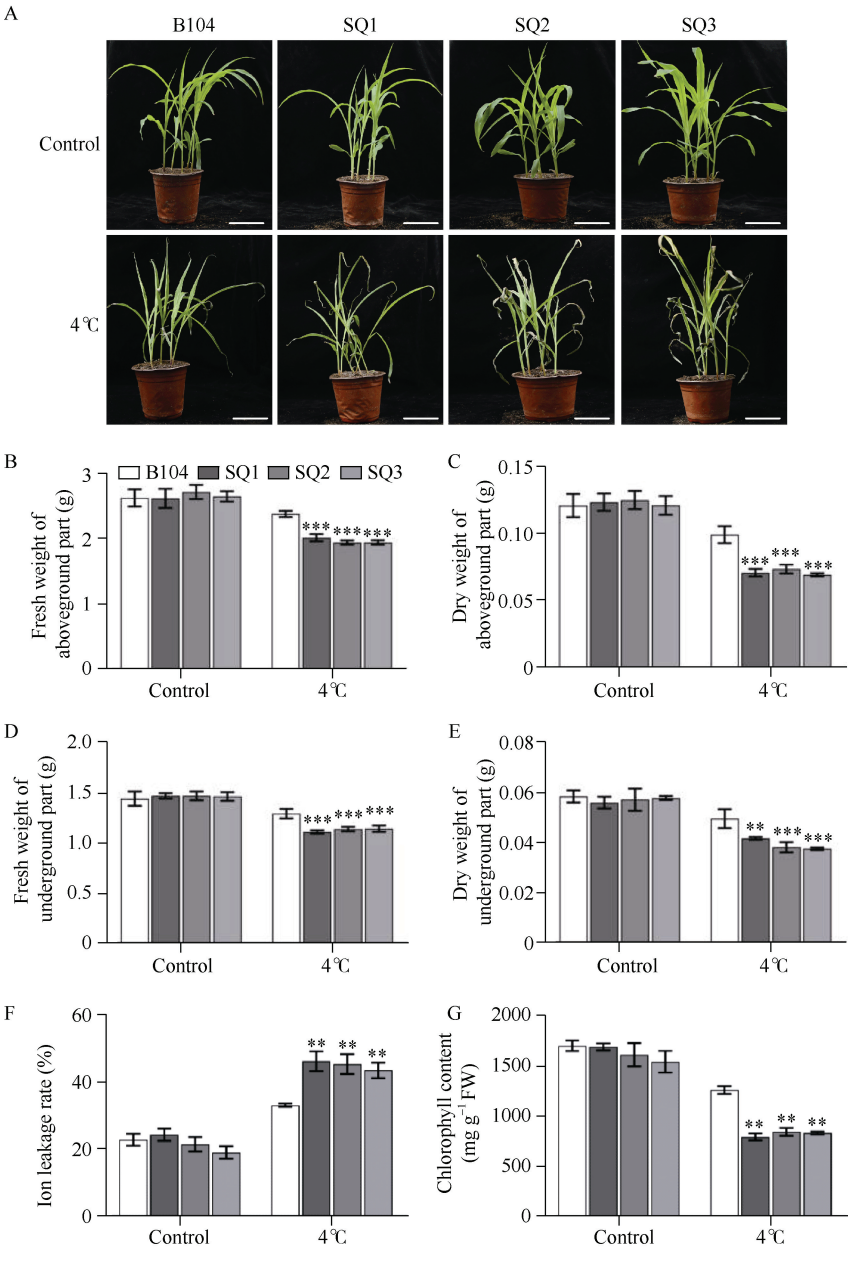


图 3 *ZmNTL1* 和 *ZmNTL5* 的敲除对玉米低温耐受性的影响

Fig. 3 Effect of *ZmNTL1* and *ZmNTL5* knockouts on maize tolerance to low temperature

A: 低温胁迫下 *zmntl1zmntl5* 突变体的表型。B~E: 低温胁迫下 *zmntl1zmntl5* 突变体的地上部鲜重/干重、地下部鲜重/干重变化。F, G: 低温胁迫下 *zmntl1zmntl5* 突变体的离子渗透率和叶绿素含量变化。标尺为 10 cm。**, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$。

A: phenotype of *zmntl1zmntl5* mutant under low temperature stress. B–E: changes of aboveground fresh weight/dry weight and underground fresh weight/dry weight of *zmntl1zmntl5* mutant under low temperature stress. F, G: changes of ion leakage rate and chlorophyll content of *zmntl1zmntl5* mutant under low temperature stress. Scale bar: 10 cm. **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$.

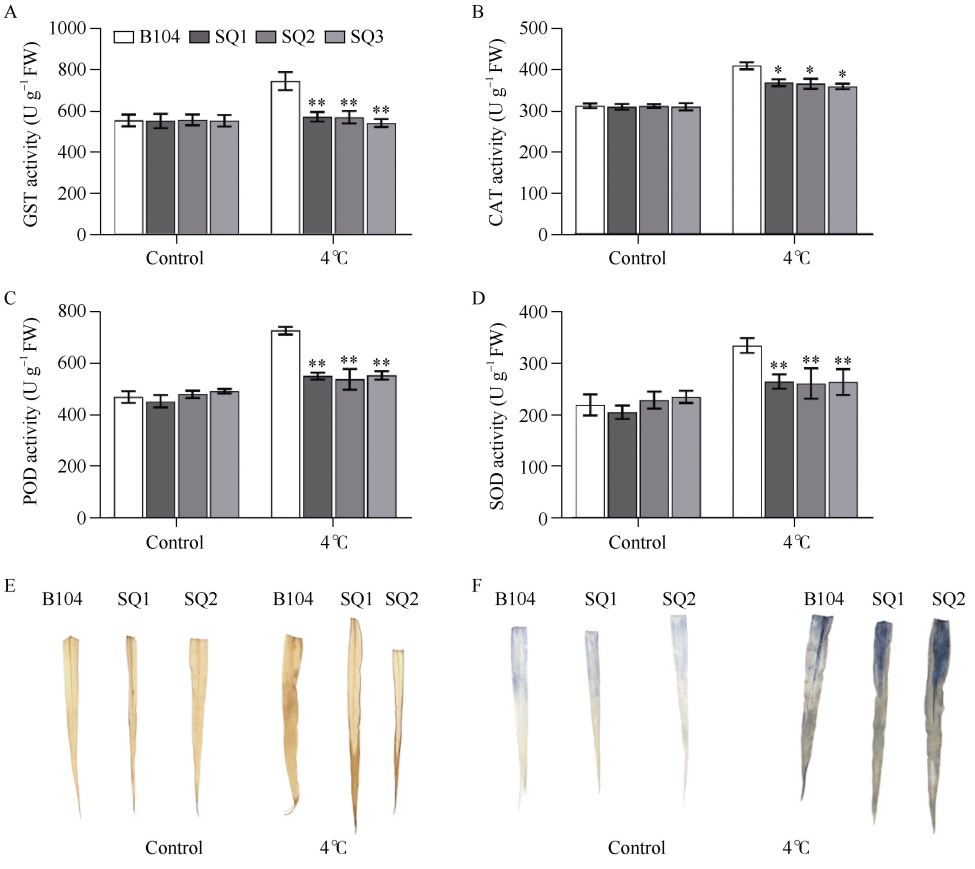
差异。然而, 经过 4℃低温处理 72 h 后, 与 B104 株系相比, SQ1、SQ2 和 SQ3 突变体株系叶片中的离子渗透率分别显著升高 28.48%、27.12%和 24.00% (图 3-F), 同时叶片中的叶绿素含量分别降低 37.20%、33.09%和 34.06% (图 3-G)。这些结果表明, *ZmNTL1* 与 *ZmNTL5* 功能的缺失导致玉米幼苗低温耐受性下降, 进一步证实了 *ZmNTL1* 与 *ZmNTL5* 在玉米低温应答反应中的积极调控作用。

2.4 *ZmNTL1* 和 *ZmNTL5* 的敲除对低温下玉米抗氧化防御系统的影响

谷胱甘肽 S-转移酶(GST)、过氧化氢酶(CAT)、过氧化物酶(POD)和超氧化物歧化酶(SOD)是植物低温等非生物逆境下的重要保护酶。正常生长条件下, *zmntl1zmntl5* 突变体株系和 B104 株系体内的 GST、CAT、POD 和 SOD 酶活性无显著差异。然而, 在 4℃低温条件下, 与 B104 株系相比, SQ1、SQ2 和 SQ3 三个突变体株系叶片中的 GST 酶活性分别降低 23.24%、23.47%和 27.30%, CAT 酶活性分别降低 9.92%、10.58%和 12.20%, POD 酶活性分别降低 24.21%、25.93%和 23.87%, SOD 酶活性分别降低 20.86%、21.98%和 21.14% (图 4-A~D)。

为进一步探究 *ZmNTL1* 和 *ZmNTL5* 与活性氧清除之间的关系, 利用 DAB 和 NBT 染色法分析了不同株系过氧化氢(H_2O_2)和超氧阴离子($O_2^{\cdot-}$)在叶片中的积累情况。结果显示, 正常生长条件下, B104、SQ1 和 SQ2 株系叶片中 H_2O_2 和 $O_2^{\cdot-}$ 的含量均未见明显差异。然而, 经过 4℃低温处理后, *zmntl1zmntl5* 突变体 SQ1 和 SQ2 株系的叶片染色程度较 B104 株系明显加深, 表明在低温条件下, 突变体株系受到活性氧的损伤程度比 B104 株系更为严重(图 4-E, F) (SQ3 株系表型特征与 SQ1、SQ2 呈现一致性, 为简化图示, 其代表性图片未予展示)。进一步的活性氧测定试验显示, 与 B104 株系相比, 低温处理后 SQ1、SQ2 和 SQ3 三个突变体株系叶片中的 $O_2^{\cdot-}$ 含量分别升高 20.57%、18.86%和 28.08%, H_2O_2 含量分别升高 22.53%、20.90%和 23.23% (图 4-G~H)。

上述结果表明, *ZmNTL1* 与 *ZmNTL5* 的敲除降低了低温胁迫下玉米叶片内抗氧化防御系统关键酶 SOD、POD、CAT 和 GST 的活性, 减弱了 $O_2^{\cdot-}$ 和 H_2O_2 的清除能力, 最终提高了玉米对低温的敏感性。因此, *ZmNTL1* 与 *ZmNTL5* 通过积极调控抗氧化防御系统对活性氧的清除能力进而正调控玉米对低温的耐受性。



(图 4)

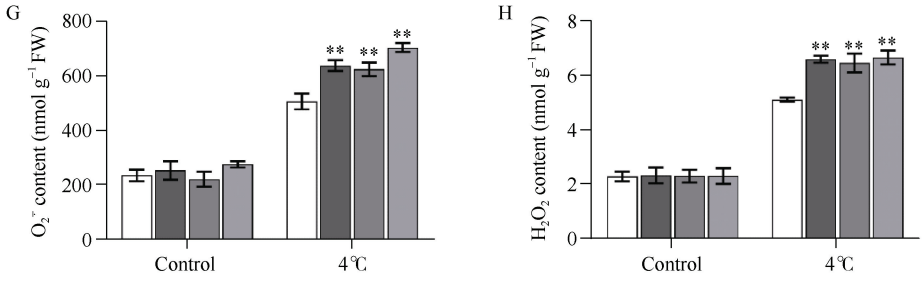


图 4 *ZmNTL1* 和 *ZmNTL5* 的敲除对低温下玉米抗氧化防御系统的影响

Fig. 4 Effects of *ZmNTL1* and *ZmNTL5* knockouts on the antioxidant defense system of maize under low temperature stress

A~D: 低温胁迫下 *zmntl1zmntl5* 突变体的 GST、CAT、POD 和 SOD 酶活变化。E, F: *zmntl1zmntl5* 突变体的 DAB 和 NBT 染色。G, H: 低温胁迫下 *zmntl1zmntl5* 突变体的 O_2^- 和 H_2O_2 含量变化。*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$。

A–D: changes of GST, CAT, POD, and SOD activity of *zmntl1zmntl5* mutant under low temperature stress. E, F: DAB and NBT staining of *zmntl1zmntl5* mutants. G, H: changes of O_2^- and H_2O_2 contents in *zmntl1zmntl5* mutant under low temperature stress. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$.

2.5 *ZmNTL1* 和 *ZmNTL5* 的敲除对逆境相关基因表达的影响

利用实时荧光定量 PCR 分析了谷胱甘肽 S-转移酶(glutathione S-transferases, GSTs)编码基因 *ZmGST24*、ABA 合成途径基因 *ZmNCED3* 和 CBF-COR 通路基因 *ZmDREB1.6*、*ZmDREB2A* 在不同株系中的表达情况。正常生长条件下, *ZmGST24*、*ZmNCED3*、*ZmDREB1.6* 和 *ZmDREB2A* 在 *zmntl1zmntl5* 突变体株系 SQ1 和 B104 株系中未见显著差异表达。然而, 4℃低温处理 24 h 后, 相比 B104 株系, *zmntl1zmntl5* 突变体株系 SQ1 中 *ZmGST24*、*ZmNCED3*、*ZmDREB1.6* 和 *ZmDREB2A* 基因呈现显著下调表达(图 5-A~D) (SQ2、SQ3 数据因与 SQ1 呈现相同趋势, 为提升信息密度未重复展示)。上述结果表明, 在低温胁迫下, *ZmNTL1* 与 *ZmNTL5* 正向调控逆境相关基因 *ZmDREB1.6*、*ZmDREB2A*、*ZmNCED3* 和 *ZmGST24* 的表达。

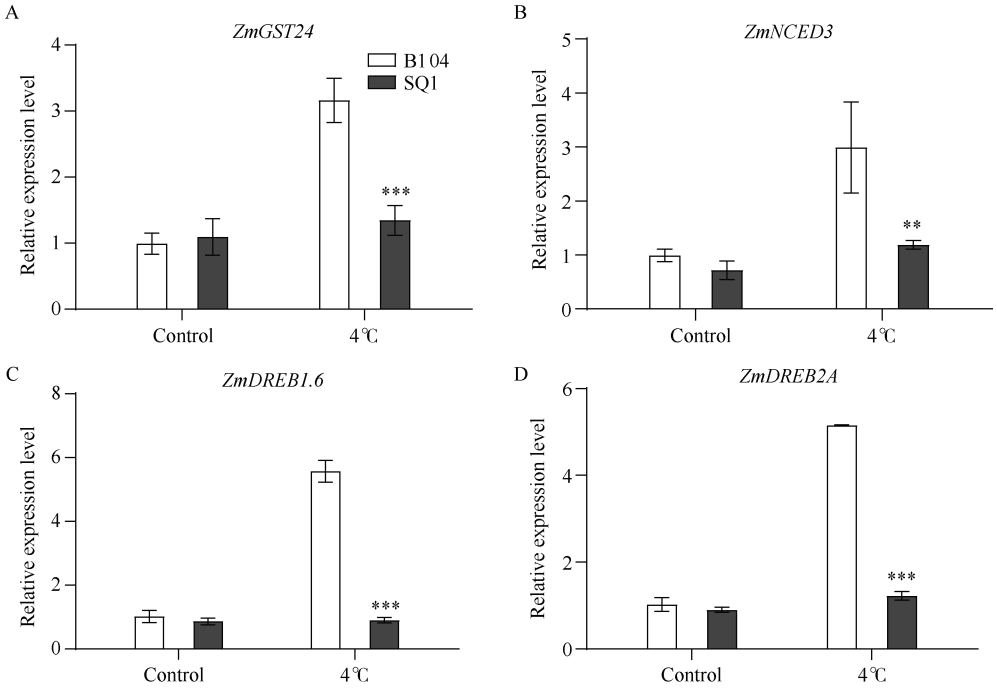


图 5 *ZmNTL1* 和 *ZmNTL5* 敲除对低温胁迫下逆境相关基因表达的影响

Fig. 5 Effects of *ZmNTL1* and *ZmNTL5* knockouts on stress-related gene expression under low temperature stress

A~D: 低温胁迫下 *zmntl1zmntl5* 突变体中 *ZmGST24*、*ZmNCED3*、*ZmDREB1.6* 和 *ZmDREB2A* 的相对表达水平变化。**, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$。

A–D: relative expression levels of *ZmGST24*, *ZmNCED3*, *ZmDREB1.6*, and *ZmDREB2A* in the *zmntl1zmntl5* mutant under low temperature stress. **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$.

3　讨论

NTL (NTM1-like)是 NAC 转录因子家族中独特的一类。目前, 关于这类转录因子的研究相对较少, 主要集中在模式植物拟南芥中。有报道显示, 将玉米 *ZmNTL1* 基因转入拟南芥能够显著提高植物对氧化胁迫、盐胁迫、干旱胁迫和热胁迫的耐受性[15-17]。然而, 关于 *ZmNTL1* 及其他玉米 *NTLs* 在低温胁迫下的功能, 目前未见报道。本研究基于玉米叶片和根部的低温 RNA-seq 数据, 从全基因组水平鉴定了低温响应基因 *ZmNTLs*。结果显示, 玉米叶片中有 6 条 *NTL* 基因(*ZmNTL1*/*3*/*4*/*5*/*7*/*9*)在低温下出现显著上调表达(|$\log_2$FC|>2), 在玉米根系中显著上调表达(|$\log_2$FC|>1.4), 表明这 6 条 *ZmNTLs* 基因积极参与玉米低温应答反应(表 2 和图 1-D)。其中, *ZmNTL1* 在玉米叶和根中的表达量均达到最高, 暗示 *ZmNTL1* 可能具有更重要的低温调控作用。进化关系分析显示, *ZmNTL1* 和 *ZmNTL5* 互为旁系同源基因, *ZmNTL5* 同样在叶和根中受低温诱导显著上调表达(表 2 和图 1-D~E)。此外, *ZmNTL1* 分别与水稻热调控因子基因 *OsNTL3* [20]、小麦干旱调控因子基因 *TaNTL1* [13]互为直系同源基因(图 1-E)。与 *ZmNTL1* 和 *ZmNTL5* 处于同一进化分支的逆境相关 NTL 基因还包括拟南芥 *NTL8*、*NTL6* 和 *ANAC091* (图 1-E)。*NTL8* 一方面参与调控盐胁迫下赤霉素酸介导的拟南芥种子萌发, 另一方面在春化过程中调控拟南芥长期低温信号的感知[11,21]; *NTL6* 可以将冷信号整合到植物的防御反应中[22], 而 *ANAC091* 则参与调控内质网应激反应[23]。

鉴于 *ZmNTL1* 与 *ZmNTL5* 互为旁系同源基因, 二者蛋白相似性高达 80.04%, 且二者低温下表达模式相似, 推测二者可能在玉米低温应答反应中存在功能冗余(图 1-D~E, 图 2-A)。因此设计了共有靶点, 同时敲除 *ZmNTL1* 与 *ZmNTL5* 基因, 并利用双敲株系 *zmntl1zmntl5* 研究二者在玉米应答低温反应中的功能(图 2-B~E)。正常生长条件下, *zmntl1zmntl5* 突变体与 B104 株系在表型、地上部干/鲜重、地下部干/鲜重、离子渗透率以及叶绿素含量等方面均未表现出显著差异, 这表明 *ZmNTL1* 与 *ZmNTL5* 的缺失并未影响非胁迫条件下玉米苗期的生长发育。可能的原因是 *ZmNTL1* 与 *ZmNTL5* 作为低温响应膜定位转录因子编码基因, 不论是 *ZmNTL1* 与 *ZmNTL5* 基因的转录, 还是 ZmNTL1 与 ZmNTL5 蛋白去掉跨膜域进入细胞核发挥对靶基因的转录调控作用, 均需要低温等逆境信号的诱导, 无外界逆境信号的条件下, 低转录水平的 *ZmNTL1* 与 *ZmNTL5* 以及膜定位的 ZmNTL1 与 ZmNTL5 无法参与调控玉米苗期生长发育。

低温胁迫条件下, *zmntl1zmntl5* 突变体株系的叶片萎蔫度更为严重; 与 B104 株系相比, 其地上部干/鲜重、地下部干/鲜重和叶绿素含量均显著降低, 而离子渗透率则显著升高(图 3-A~G)。这些结果表明, *ZmNTL1* 与 *ZmNTL5* 的缺失降低了植物对低温的耐受性, 表明二者是玉米低温耐受性的正调控因子。此外, 在正常生长条件下, *zmntl1zmntl5* 株系和 B104 株系叶片内的 O_2^- 和 H_2O_2 含量, 以及 GST、SOD、POD 和 CAT 活性均未见显著差异; 然而, 在低温胁迫下, *zmntl1zmntl5* 株系叶片内的 O_2^- 和 H_2O_2 含量积累显著高于 B104 株系, 而 GST、SOD、POD 和 CAT 活性则显著低于 B104 株系(图 4-A~H)。这表明, *ZmNTL1* 与 *ZmNTL5* 通过积极调控抗氧化防御系统中关键酶 SOD、POD、CAT 和 GST 的活性来促进低温胁迫下玉米叶片中 ROS 的清除, 最终提高玉米对低温的耐受性。

脱水响应元件(dehydrate-responsive element, DRE)结合因子 1s (DREB1s)又称 C-repeat binding factors (CBFs), 在植物冷胁迫应答中起着重要作用[24-25]。*NCED3* 是合成 ABA 的关键基因; *GST* 是谷胱甘肽 S-转移酶(glutathione S-transferases, GSTs)编码基因[26-27]。正常生长条件下, *ZmDREB1.6* 等逆境相关基因在 *zmntl1zmntl5* 株系和 B104 株系中的表达无显著差异; 而在低温条件下, *zmntl1zmntl5* 株系中 *ZmGST24*、*ZmNCED3*、*ZmDREB1.6* 和 *ZmDREB2A* 基因呈显著下调表达(图 5-A~D)。*ZmNTL1* 与 *ZmNTL5* 的缺失导致 *ZmGST24*、*ZmNCED3*、*ZmDREB1.6* 和 *ZmDREB2A* 基因无法被低温正常激活, 表明 ZmNTL1 与 ZmNTL5 正向调控逆境相关基因和 ABA 信号途径基因的表达。

本研究的不足在于仅仅证明了 *ZmNTL1* 与 *ZmNTL5* 对苗期玉米低温耐受性的影响, 关于二者对低温下玉米种子萌发以及其他关键生育期(如拔节期、抽雄期、吐丝期、籽粒建成期)生长发育的影响将在后续研究中加以证实。

4　结论

本研究利用玉米低温 RNA-seq 数据, 筛选出 6 条在根和叶中同时受低温诱导显著上调表达的

ZmNTLs 基因。针对其中 2 条高度同源的基因 *ZmNTL1* 和 *ZmNTL5*, 创制了双敲突变体 *zmntl1zmntl5*。在低温胁迫条件下, *zmntl1zmntl5* 突变体株系的叶片萎蔫度和离子渗透率均显著高于 B104 株系; 地上部干/鲜重、地下部干/鲜重和叶绿素含量则均显著低于 B104 株系。此外, *zmntl1zmntl5* 突变体株系的 O_2^- 和 H_2O_2 含量均显著高于 B104 对照株系, 而 GST、SOD、POD 和 CAT 活性均显著低于 B104 株系。进一步分析发现, 相比 B104 株系, *zmntl1zmntl5* 突变体株系中 *ZmGST24*、*ZmNCED3*、*ZmDREB1.6* 和 *ZmDREB2A* 基因在低温条件下呈现显著下调表达。综上所述, *ZmNTL1* 与 *ZmNTL5* 的缺失降低了植物对低温的耐受性, 表明二者是玉米低温耐受性的正调控因子。本研究为进一步探讨 *ZmNTL1* 和 *ZmNTL5* 积极调控玉米低温耐受性的分子机制提供了参考, 并为创制耐低温玉米遗传材料奠定了基因基础。

References

[1] Shikha K, Madhumal Thayil V, Shahi J P, Zaidi P H, Seetharam K, Nair S K, Singh R, Tosh G, Singamsetti A, Singh S, et al. Genomic-regions associated with cold stress tolerance in Asia-adapted tropical maize germplasm. *Sci Rep*, 2023, 13: 6297.

[2] Ding Y L, Yang S H. Surviving and thriving: how plants perceive and respond to temperature stress. *Dev Cell*, 2022, 57: 947–958.

[3] Yang Z R, Cao Y B, Shi Y T, Qin F, Jiang C F, Yang S H. Genetic and molecular exploration of maize environmental stress resilience: toward sustainable agriculture. *Mol Plant*, 2023, 16: 1496–1517.

[4] Ding Y L, Shi Y T, Yang S H. Molecular regulation of plant responses to environmental temperatures. *Mol Plant*, 2020, 13: 544–564.

[5] Li Z Y, Fu D Y, Wang X, Zeng R, Zhang X, Tian J G, Zhang S S, Yang X H, Tian F, Lai J S, et al. The transcription factor bZIP68 negatively regulates cold tolerance in maize. *Plant Cell*, 2022, 34: 2833–2851.

[6] Jiang H F, Shi Y T, Liu J Y, Li Z, Fu D Y, Wu S F, Li M Z, Yang Z J, Shi Y L, Lai J S, et al. Natural polymorphism of ZmICE1 contributes to amino acid metabolism that impacts cold tolerance in maize. *Nat Plants*, 2022, 8: 1176–1190.

[7] Seo P J. Recent advances in plant membrane-bound transcription factor research: emphasis on intracellular movement. *J Integr Plant Biol*, 2014, 56: 334–342.

[8] Yang Z T, Wang M J, Sun L, Lu S J, Bi D L, Sun L, Song Z T, Zhang S S, Zhou S F, Liu J X. The membrane-associated transcription factor NAC089 controls ER-stress-induced programmed cell death in plants. *PLoS Genet*, 2014, 10: e1004243.

[9] De Backer J, Van Breusegem F, De Clercq I. Proteolytic activation of plant membrane-bound transcription factors. *Front Plant Sci*, 2022, 13: 927746.

[10] Li S, Wang N, Ji D D, Xue Z Y, Yu Y C, Jiang Y P, Liu J L, Liu Z H, Xiang F N. Evolutionary and functional analysis of membrane-bound *NAC* transcription factor genes in soybean. *Plant Physiol*, 2016, 172: 1804–1820.

[11] Kim S G, Lee A K, Yoon H K, Park C M. A membrane-bound NAC transcription factor NTL8 regulates gibberellic acid-mediated salt signaling in *Arabidopsis* seed germination. *Plant J*, 2008, 55: 77–88.

[12] Sakuraba Y, Kim Y S, Han S H, Lee B D, Paek N C. The *Arabidopsis* transcription factor NAC016 promotes drought stress responses by repressing AREB1 transcription through a trifurcate feed-forward regulatory loop involving NAP. *Plant Cell*, 2015, 27: 1771–1787.

[13] Sun H M, Xie Y Z, Yang W B, Lyu Q, Chen L P, Li J T, Meng Y, Li L Q, Li X J. Membrane-bound transcription factor TaNTL1 positively regulates drought stress tolerance in transgenic *Arabidopsis*. *Plant Physiol Biochem*, 2022, 182: 182–193.

[14] Wu Z, Li T, Xiang J, Teng R D, Zhang D H, Teng N J. A lily membrane-associated NAC transcription factor LlNAC014 is involved in thermotolerance *via* activation of the DREB2-HSFA3 module. *J Exp Bot*, 2023, 74: 945–963.

[15] Wang D X, Yu Y C, Liu Z H, Li S, Wang Z L, Xiang F N. Membrane-bound NAC transcription factors in maize and their contribution to the oxidative stress response. *Plant Sci*, 2016, 250: 30–39.

[16] Qian Y X, Xi Y, Xia L X, Qiu Z L, Liu L, Ma H. Membrane-bound transcription factor ZmNAC074 positively regulates abiotic stress tolerance in transgenic *Arabidopsis*. *Int J Mol Sci*, 2023, 24: 16157.

[17] Xi Y, Ling Q Q, Zhou Y, Liu X, Qian Y X. ZmNAC074, a maize stress-responsive NAC transcription factor, confers heat stress tolerance in transgenic *Arabidopsis*. *Front Plant Sci*, 2022, 13: 986628.

[18] Gu Y N, He L, Zhao C J, Wang F, Yan B W, Gao Y Q, Li Z T, Yang K J, Xu J Y. Biochemical and transcriptional regulation of membrane lipid metabolism in maize leaves under low temperature. *Front Plant Sci*, 2017, 8: 2053.

[19] Zhao X C, Wei Y L, Zhang J J, Yang L, Liu X Y, Zhang H Y, Shao W J, He L, Li Z T, Zhang Y F, et al. Membrane lipids' metabolism and transcriptional regulation in maize roots under cold stress. *Front Plant Sci*, 2021, 12: 639132.

[20] Liu X H, Lyu Y S, Yang W P, Yang Z T, Lu S J, Liu J X. A membrane-associated NAC transcription factor OsNTL3 is involved in thermotolerance in rice. *Plant Biotechnol J*, 2020, 18: 1317–1329.

[21] Zhao Y S, Antoniou-Kourounioti R L, Calder G, Dean C, Howard M. Temperature-dependent growth contributes to long-term cold sensing. *Nature*, 2020, 583: 825–829.

[22] Seo P J, Kim M J, Park J Y, Kim S Y, Jeon J, Lee Y H, Kim J, Park C M. Cold activation of a plasma membrane-tethered NAC transcription factor induces a pathogen resistance response in *Arabidopsis*. *Plant J*, 2010, 61: 661–671.

[23] Yang Z T, Fan S X, Wang J J, An Y, Guo Z Q, Li K, Liu J X. The plasma membrane-associated transcription factor NAC091 regulates unfolded protein response in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci*, 2023, 334: 111777.

[24] Shi Y T, Ding Y L, Yang S H. Molecular regulation of CBF

signaling in cold acclimation. *Trends Plant Sci*, 2018, 23: 623–637.

[25] Nguyen H T, Leipner J, Stamp P, Guerra-Peraza O. Low temperature stress in maize (*Zea mays* L.) induces genes involved in photosynthesis and signal transduction as studied by suppression subtractive hybridization. *Plant Physiol Biochem*, 2009, 47: 116–122.

[26] Liu L, Tang C, Zhang Y, Sha X, Tian S, Luo Z, Wei G, Zhu L, Li Y, Fu J, et al. The SnRK2.2-ZmHsf28-JAZ14/17 module regulates drought tolerance in maize. *New Phytol*, 2025, 245: 1985–2003.

[27] Song X P, Cao B Y, Xu Z P, Liang L, Xiao J C, Tang W, Xie M H, Wang D, Zhu L, Huang Z, et al. Molecular regulation by H_2S of antioxidant and glucose metabolism in cold-sensitive *Capsicum*. *BMC Plant Biol*, 2024, 24: 931.