作物学报 ACTA AGRONOMICA SINICA 2024, 50(2): 354–362 http://zwxb.chinacrops.org/
ISSN 0496-3490; CN 11-1809/S; CODEN TSHPA9 E-mail: zwxb301@caas.cn

DOI: 10.3724/SP.J.1006.2024.33013

渗透胁迫下玉米自然反义转录本 *cis*-NAT$_{ZmNAC48}$ 启动子的功能分析

毛 燕[1,*] 郑名敏[1] 牟成香[1] 谢吴兵[2] 唐 琦[2]

[1] 成都师范学院, 四川成都 611130; [2] 四川农业大学玉米研究所, 四川成都 611130

摘 要: 前期研究发现自然反义转录本 *cis*-NAT$_{ZmNAC48}$ 可负调控干旱响应基因 *ZmNAC48*, 为了进一步探索 *cis*-NAT$_{ZmNAC48}$的功能, 本研究以 *cis*-NAT$_{ZmNAC48}$ cDNA 序列、*ZmNAC48* 蛋白质编码序列检索玉米 B73 参考基因组, 获取基因上游启动子序列, 并利用 PlantCARE[1]和 New PLACE[2]预测启动子调控元件, 发现 *cis*-NAT$_{ZmNAC48}$ 和 *ZmNAC48* 启动子序列中除含有 CAAT-box, TATA-box 等基本元件外, 还含有激素响应元件以及转录因子结合元件等。构建 *cis*-NAT$_{ZmNAC48}$和 *ZmNAC48* 启动子融合 GUS 的表达载体, 并通过花序侵染法获得转基因拟南芥。分析 GUS 染色和 GUS 酶活性发现, Pro$_{cis\text{-}NATZmNAC48}$:GUS 和 Pro$_{ZmNAC48}$:GUS 转基因拟南芥根、茎、叶中均有 GUS 表达, 且渗透胁迫处理后 Pro$_{cis\text{-}NATZmNAC48}$:GUS 转基因拟南芥中 *GUS* 基因的表达量和 GUS 酶活性显著降低, 而 Pro$_{ZmNAC48}$:GUS 转基因拟南芥中 *GUS* 基因的表达量和 GUS 酶活性显著增加, 可见 *cis*-NAT$_{ZmNAC48}$和 *ZmNAC48* 启动子均响应渗透胁迫。DNA 甲基化是影响启动子活性的调控事件之一, 本研究通过分析 *cis*-NAT$_{ZmNAC48}$启动子区域 DNA 甲基化情况, 发现在 *cis*-NAT$_{ZmNAC48}$序列前 400~1000 bp 存在 DNA 甲基化修饰, 渗透胁迫处理后, 该甲基化区域甲基化富集情况发生了显著的变化, 但发生显著性变化的甲基化位点并未在顺式调控元件上。这些结果为后续 *cis*-NAT$_{ZmNAC48}$的调控分析奠定了重要的基础。

关键词: 玉米; 自然反义转录本; 启动子; 渗透胁迫

Function analysis of the promoter of natural antisense transcript *cis*-NAT$_{ZmNAC48}$ in maize under osmotic stress

MAO Yan[1,*], ZHENG Ming-Min[1], MOU Cheng-Xiang[1], XIE Wu-Bing[2], and TANG Qi[2]

[1] Chengdu Normal University, Chengdu 611130, Sichuan, China; [2] Maize Research Institute, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, Sichuan, China

Abstract: Previous studies indicate that natural antisense transcript, *cis*-NAT$_{ZmNAC48}$, acts as a negative regulator for maize drought stress response gene *ZmNAC48*. To further characterize the function of *cis*-NAT$_{ZmNAC48}$, we used *cis*-NAT$_{ZmNAC48}$ cDNA sequence and ZmNAC48 protein coding sequence to retrieve maize B73 reference genome and obtain the upstream promoter. PlantCARE and New PLACE were used to predict promoter regulatory elements, which revealed that the promoter of *cis*-NAT$_{ZmNAC48}$ and *ZmNAC48* contained not only CAAT-box, TATA-box, and other basic elements, but also hormone response elements and transcription factor binding element. Plant expression vectors of GUS fusion with *cis*-NAT$_{ZmNAC48}$ and *ZmNAC48* promoters were constructed and transgenic *Arabidopsis thaliana* was obtained by infecting inflorescences. GUS staining analysis showed that Pro$_{cis\text{-}NATZmNAC48}$:GUS and Pro$_{ZmNAC48}$:GUS was expressed in roots, stems, and leaves of *Arabidopsis thaliana*. After osmotic stress treatment, the relative expression level of *GUS* gene and GUS enzyme activity of Pro$_{cis\text{-}NATZmNAC48}$:GUS transgenic *Arabidopsis* were significantly decreased and increased significantly in Pro$_{ZmNAC48}$:GUS transgenic *Arabidopsis*, which indicating that both *cis*-NAT$_{ZmNAC48}$ and *ZmNAC48* promoters responded to osmotic stress. DNA methylation was one of the regulatory events that affected promoter activity. In this study, we found that DNA methylation modification existed in the promoter region of *cis*-NAT$_{ZmNAC48}$. After osmotic stress treatment, the methylation enrichment changed significantly, but the methylation sites

本项目由四川省自然科学基金项目(2022NSFSC0152)资助。

This study was supported by the General Project of Natural Science Foundation of Sichuan Province (2022NSFSC0152).

* 通信作者(Corresponding author): 毛燕, E-mail: 2469018993@qq.com

第一作者联系方式: E-mail: 2469018993@qq.com

Received (收稿日期): 2023-03-05; Accepted (接受日期): 2023-09-13; Published online (网络出版日期): 2023-09-27.

URL: https://link.cnki.net/urlid/11.1809.S.20230927.1326.010

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

with significant changes were not in the *cis*-regulatory elements. These results laid an important basis for the analysis of *cis*-NAT$_{ZmNAC48}$ regulation.

Keywords: maize; natural antisense transcript; promoter; osmotic stress

渗透胁迫是由于外界水分亏缺和细胞失水过多, 进而使细胞水势降低, 最终导致植物生长受影响的过程。包括干旱、高温和高盐等非生物胁迫。非生物胁迫是全球农作物减产的主要原因之一, 可直接导致作物的产量降低 50%以上, 造成巨大经济损失[3]。因此, 研究植物对渗透胁迫的响应机制对于后续作物改良育种具有重要的意义。

自然反义转录本(Natural Antisense Transcripts, NATs)是生物体内产生的一种内源性 RNA, 可与其对应的互补 RNA 通过碱基配对, 形成自然正义-反义转录物配对的双链 RNA[4]。在植物生长发育和逆境响应等过程中发挥着重要的作用。在盐胁迫下, 拟南芥胁迫相关基因Δ^1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase (*P5CDH*)与其自然反义转录 *SRO5* 形成 24 nt 的 siRNA 并指导 *P5CDH* 初始剪切, 为后形成的 21 nt siRNA 建立一个相位, 进一步降解 *P5CDH*, 进而调控拟南芥的耐盐性[5]。Zhao 等[6]研究发现低温下, *MADS AFFECTING FLOWERING4* (*MAF4*)被其反义转录本 *MAS* 激活, 抑制拟南芥过早开花。“高产”和“早熟”在水稻产量中是 2 个矛盾的因素, 阻碍着水稻产量的进一步提高。水稻开花促进因子 *OsSOC1* 的自然反义转录本 Early flowering-completely dominant (*Ef-cd*)在不影响作物产量的情况下可将水稻成熟时间提前 7~20 d [7]。*AsDOG1* 是 Delay of Germination 1 (*DOG1*)的自然反义转录本, 在种子成熟过程中以顺式的调控方式抑制 *DOG1* 基因的表达, 防止种子进入休眠[8]。此外, Yatusevich 等[9]研究发现抑制 *asDOG1* 的表达可增加拟南芥的耐旱性。

启动子作为基因表达的关键调控区域, 其在基因转录调控中发挥关键作用。因此, 通过分析渗透胁迫下玉米自然反义转录本启动子表达特性, 有助于了解 NATs 的调控机制。关于 NATs 启动子的研究, 仅在少量文献中有报道, 其主要目的在于探索自然反义转录本的表达模式[10-11]。前期研究表明, *cis*-NAT$_{ZmNAC48}$是位于玉米 *ZmNAC48* 基因位点的自然反义转录本, 缺乏蛋白编码潜能, 其可能通过双链 RNA 依赖机制负调控玉米 *ZmNAC48* 基因表达进而影响玉米气孔开闭, 调控植物耐旱性[12]。为了进一步探索 *cis*-NAT$_{ZmNAC48}$在渗透胁迫的功能, 本研究通对 *cis*-NAT$_{ZmNAC48}$ 启动子序列分析, 初步了解 *cis*-NAT$_{ZmNAC48}$启动子序列各调控元件及功能。通过获得 Pro$_{cis\text{-}NATZmNAC48}$: GUS 和 Pro$_{ZmNAC48}$: GUS 转基因材料, 以确定 *cis*-NAT$_{ZmNAC48}$启动子活性是否受渗透胁迫的影响。通过分析渗透胁迫下 *cis*-NAT$_{ZmNAC48}$ 启动子甲基化情况, 进一步明确 *cis*-NAT$_{ZmNAC48}$在渗透胁迫下的表达机制。

1　材料与方法

1.1　试验材料

供试材料玉米耐旱自交系 AC7643 和干旱敏感自交系 AC7729/TZSRW 由四川农业大学玉米研究所提供。拟南芥哥伦比亚 0 型(COL)由本实验室保存。

1.2　玉米干旱试验

在人工气候中, 将 AC7643 和 AC7729/TZSRW 玉米种子催芽后, 将其移入装有蛭石的发芽盘上, 放入培养室中生长, 用蒸馏水灌溉。待其长到二叶一心后, 使用营养液进行水培, 每 3 d 换 1 次营养液(营养液配方参照《无土栽培原理与技术》), 每天通 3 h 的氧气。长日照(16 h 光/8 h 黑暗)下生长, 待其长到五叶一心后, 随机选择部分幼苗采用 20% PEG-6000 处理, 其他幼苗仍然在正常的营养液中生长作为对照。分别取处理和对照 6 h 材料的根, 用液氮速冻后放于–80℃冰箱保存, 用于 DNA 提取, 该部分 DNA 用作甲基化分析; 其中用 20% PEG-6000 处理后的 AC7729/TZSRW 根系中提取的 DNA 作为 PCR 模板用于启动子区域片段的扩增。

1.3　*cis*-NAT$_{ZmNAC48}$ 和 *ZmNAC48* 启动子生物信息分析

以*cis*-NAT$_{ZmNAC48}$ cDNA序列、*ZmNAC48*蛋白质编码序列在EnsemblPlants网站(http://plants.ensembl.org/index.html)上检索玉米B73参考基因组, 获取*cis*-NAT$_{ZmNAC48}$和*ZmNAC48*上游启动子序列。将获取基因上游启动子序列, 利用生物信息网站PlantCARE (https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/)[1]和New PLACE (https://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/?action=newplace)[2]预测启动子调控元件。

1.4　DNA 提取及启动子克隆

用GENEOU Plant DNA Isolation kit (LabGENE)试剂盒提取玉米 AC7643 和 AC7729/TZSRW 根系

DNA。利用Primer 5.0设计引物PNA-1F/1R和PNS-1F/1R (表1), 用于*cis*-NAT$_{ZmNAC48}$和*ZmNAC48*启动子克隆。以提取的AC7729/TZSRW根系DNA为模板, 采用Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase (Vazyme, 江苏南京)进行PCR扩增。扩增产物与pEASY-Blunt (北京全式金生物技术股份有限公司)载体链接, 转化T1感受态细胞(北京全式金生物技术股份有限公司), 菌液检测、测序, 最终获得序列正确的单克隆。

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

引物名称 Primer name	用途 Function	正向引物 Forward primer (5'–3')	反向引物 Reverse primer (5'–3')
PNA-1F/1R	*Cis*-NAT$_{ZmNAC48}$ 启动子序列扩增 Amplification of the promoter in *cis*-NAT$_{ZmNAC48}$	TATGGTTAGGCCCACTACTAG	GTACGTGCCGGCTGGCCAC
PNS-1F/1R	ZmNAC48 启动子序列扩增 Amplification of the promoter in *ZmNAC48*	ATGCAACCCTGGTTATGTGCT	TGTCCCCAAAGAAATTCCTTT
pCAMBIA1391-*Cis-NAT$_{ZmNAC48}$*	*Cis*-NAT$_{ZmNAC48}$ 启动子序列载体构建 Construction of *cis*-NAT$_{ZmNAC48}$ promoter vector	tgggcccggcgcgccaagcttTATGGTTAGGCCCACTACTAG	TCTTAGAATTCCCGGGGATCCGTACGTGCCGGCTGGCCAC
pCAMBIA1391-*ZmNAC48*	ZmNAC48 启动子序列载体构建 Construction of *ZmNAC48* promoter vector	tgggcccggcgcgccaagcttATGCAACCCTGGTTATGTGCT	TCTTAGAATTCCCGGGGATCCTGTCCCCAAAGAAATTCCTTT
3F/4R	*Cis*-NATZmNAC48 启动子甲基化检测 Detected the methylation of *cis*-NAT$_{ZmNAC48}$ promoter	ATTGGGGATATATAGAAATTTTGTATATAA	CAAAAAAACGACACTTGATAAATACCCTC
1F/1R	ZmNAC48 启动子甲基化检测 Detected the methylation of *ZmNAC48* promoter	GGATGAATTATTTATATTTAGTTTTT	ACCTACCTCCTACCAATTTAACACA

1.5 启动子载体构建

将扩增的*cis*-NAT$_{ZmNAC48}$ (1284 bp)和*ZmNAC48* (1246 bp)启动子序列构建到载体pCAMBIA1391 (采用双酶切, *Hin*d III和*Bam*H I)。运用试剂盒ClonExpress Multis one step cloning kit (Vazyme, 江苏南京)将线性的载体pCAMBIA1391和加上同源序列的目的序列进行连接反应。反应结束后, 进行大肠杆菌感受态转化(菌株Trans1-T1), 测序, 获得Pro$_{cis\text{-}NATZmNAC48}$:GUS和Pro$_{ZmNAC48}$:GUS载体。质粒提取采用Plasmid mid kit D6904 (Omega, 美国)试剂盒。

1.6 Pro$_{cis\text{-}NATZmNAC48}$:GUS 和 Pro$_{ZmNAC48}$:GUS 拟南芥材料获得

将构建的 Pro$_{cis\text{-}NATZmNAC48}$:GUS 和 Pro$_{ZmNAC48}$:GUS 载体转化到农杆菌菌株 EHA105 中(北京博迈德基因技术有限公司), 通过花序侵染法转化拟南芥[13]。获得 T_0 代种子用 75%酒精清洗 10 min, 再用清水清洗 2~3 次后播种到含 50 mg mL^{-1} 卡那霉素 1/2 MS 培养基, 阳性植株移栽至土壤中, 取 T_1 代叶片提取 DNA, 检测目的基因, 直到筛选出纯合植株。

1.6 转基因拟南芥 GUS 染色

将 21 d 大小的 *Pro$_{ZmNAC48}$*: GUS 和 *Pro$_{cis\text{-}NATZmNAC48}$*: GUS 转基因拟南芥放入新鲜 GUS 染色液[0.1 mol L^{-1} 磷酸缓冲液(pH 7.0), 50 mmol L^{-1} $K_3Fe(CN)_6$, 50 mol L^{-1} $K_4Fe(CN)_6$, 0.5 mol L^{-1} Na_2EDTA, 1% Triton, 20 mmol L^{-1} X-Gluc]中于 37℃恒温避光过夜, 用无水乙醇脱色, 直至组织色素被去除, 在普通显微镜下观察染色情况。

1.7 转基因拟南芥 GUS 酶活性测定

将转基因拟南芥的种子和野生型材料的种子用 75%酒精清洗 10 min 后, 用清水清洗 2~3 次后播种到 1/2 MS 固体培养基(不含任何抗生素)上, 4℃生长 2 d, 移到长日照条件下生长 5 d 后, 将拟南芥移到新的 1/2 MS 固体培养基上, 继续长日照培养 7 d 后, 将转基因拟南芥和野生型材料幼苗移出分别放置在 1/2 MS 液体培养基和含 20% PEG-6000 的 1/2 MS 液体培养基继续培养 6 h 后取样, 一部分样品用于 RNA 提取, 测定 *GUS* 基因表达量; 另一部分样品用于测定 GUS 酶活性, GUS 酶活性测定采用 GUS 荧光分析的方法[11], 共进行 3 次生物学重复。

1.8 BSP (Bisulfite sequencing PCR)技术

用试剂盒 EZ DNA Methylation-gold kit (ZYMO RESEARCH)处理所提取的 DNA。处理后的 DNA 双链中的“C”转化为“U”, 通过 PCR 将“U”转化为“T”。利用在线引物设计网站 MethPrimer 设计引物(表 1), 以处理后的 DNA 作为模板克隆目的序列。所得到的目的序列连接到 T 载体上, 挑取至少 20 个单克隆, 送样测序。测序结果正确的序列利用网站 Kismeth (http://katahdin.mssm.edu/kismeth/revpage.pl#) 进行比对分析[14]。

2 结果与分析

2.1 玉米 *cis*-NAT$_{ZmNAC48}$及其正义基因 *ZmNAC48* 启动子序列分析

以 *cis*-NAT$_{ZmNAC48}$序列和 *ZmNAC48* 蛋白质编码序列检索玉米 B73 参考基因组, 获取基因上游启动子序列。利用生物信息网站 PlantCARE 和 New PLACE 预测启动子调控元件发现(表 2 和表 3), *cis*-NAT$_{ZmNAC48}$ (2000 bp)和 *ZmNAC48* (1500 bp)启动子序列中除具有 CAAT-box, TATA-box 等基本元件外, *cis*-NAT$_{ZmNAC48}$启动子序列中还包含 ACE, G-box 等的光响应元件, TGA-element 生长素响应元件以及 ABRE 脱落酸响应元件, 同时也包含 WRKY 转录因子结合序列 W-box; *ZmNAC48* 启动子区域中包含 GA-motif 光响应元件, 厌氧相关元件 ARE, 玉米醇溶蛋白代谢调节相关元件 O2-site, 组织特异表达调控元件 NON-box, 以及转录因子 MYB 结合位点 MBS, Myb-binding sites。

2.2 玉米 *cis*-NAT$_{ZmNAC48}$及其正义基因 *ZmNAC48* 启动子序列克隆及载体构建

为了探究自然反义转录本 *cis*-NAT$_{ZmNAC48}$ 及其正义基因 *ZmNAC48* 启动子在渗透胁迫响应中的功能, 以 B73 基因组获得的上游启动子作为参考序列, 设计特异引物, 以玉米 AC7729/TZSRWB 自交系根系 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 最后经测序显示扩增获得的 *cis*-NAT$_{ZmNAC48}$启动子序列大小为 1284 bp, *ZmNAC48* 启动子序列大小为 1246 bp。将获得的启动子序列构建到含有 GUS 基因的表达载体上, 并转化拟南芥, 获得由 *cis*-NAT$_{ZmNAC48}$ 启动子驱动的 Pro$_{cis\text{-}NATZmNAC48}$:GUS 转基因株系和 *ZmNAC48* 启动子驱动的 Pro$_{ZmNAC48}$:GUS 转基因株系。

2.3 玉米 *cis*-NAT$_{ZmNAC48}$和 *ZmNAC48* 启动子表达模式分析

为了探究 *cis*-NAT$_{ZmNAC48}$和 *ZmNAC48* 的表达模式, 我们将生长至 21 d 大小的拟南芥进行 GUS 染色, 经 GUS 染色分析发现 Pro$_{cis\text{-}NATZmNAC48}$:GUS 和 Pro$_{ZmNAC48}$:GUS 转基因拟南芥根、茎、叶中均有 GUS 表达(图 1-A)。

表 2　*Cis*-NAT$_{ZmNAC48}$ 启动子中主要顺式调控元件
Table 2　*Cis*-elements of *cis*-NAT$_{ZmNAC48}$ promoter

调控元件 Regulatory elements	数量 Number	功能 Function
TATA-box	8	转录起始位点–30 核心启动子元件 Core promoter element around –30 of transcription start
CAAT-box	9	启动子和增强子区的一般顺式作用元件 Common *cis*-acting element in promoter and enhancer regions
A-box	1	顺式作用调控元件 *Cis*-acting regulatory element
Box 4	1	光响应元件 Part of a conserved DNA module involved in light responsivenes
ACE	1	光响应元件 *Cis*-acting element involved in light responsiveness
G-box	3	光响应元件 *Cis*-acting regulatory element involved in light responsiveness
TGACG-motif	3	茉莉酸甲酯响应元件 *Cis*-acting regulatory element involved in the MeJA-responsiveness
TGA-element	1	生长素响应元件 Auxin-responsive element
CGTCA-motif	1	茉莉酸甲酯响应元件 *Cis*-acting regulatory element involved in the MeJA-responsiveness
ABRE	8	脱落酸响应元件 *Cis*-acting element involved in the abscisic acid responsiveness
W box	1	WRKY 转录因子结合位点 Binding site of WRKY
CCGTCC motif	2	诱导应答元件 These elements appear to be necessary but not sufficient for elicitor-or light-mediated PAL gene activation
AAGAA-motif	2	
Unnamed__1	1	
Unnamed__4	4	
STRE	1	

表 3 *ZmNAC48* 启动子中顺式调控元件
Table 3 The *cis*-elements of *ZmNAC48* promoter

调控元件 Regulatory elements	数量 Number	功能 Function
TATA-box	10	转录起始位点–30 核心启动子元件 Core promoter element around –30 of transcription start
CAAT-box	8	启动子和增强子区的一般顺式作用元件 Common *cis*-acting element in promoter and enhancer regions
3-AF3 binding site	1	保守 DNA 序列 Part of a conserved DNA module array (CMA3)
O2-site	1	玉米醇溶蛋白代谢 *Cis*-acting regulatory element involved in zein metabolism regulation
NON-box	1	分生组织特异表达 *Cis*-acting regulatory element related to meristem specific activation
GA-motif	1	光响应元件 Part of a light responsive element
TCCC-motif	1	光响应元件 Part of a light responsive element
ARE	1	厌氧诱导元件 *Cis*-acting regulatory element essential for the anaerobic induction
TGACG-motif	4	茉莉酸甲酯响应元件 *Cis*-acting regulatory element involved in the MeJA-responsiveness
CGTCA-motif	1	茉莉酸甲酯响应元件 *Cis*-acting regulatory element involved in the MeJA-responsiveness
MBS	1	MYB 结合位点涉及干旱诱导 MYB binding site involved in drought-inducibility
Myb-binding site	6	MYB 结合位点 MYB binding site
Myc	1	
Unnamed__4	6	
STRE	2	

为了明确 *cis*-NAT$_{ZmNAC48}$和 *ZmNAC48* 启动子是否为渗透胁迫响应启动子，本研究用 20% PEG-6000 处理 14 d 大小的拟南芥植株 6 h 后，分析转基因材料中 *GUS* 基因表达量和 GUS 酶活性，发现 Pro$_{ZmNAC48}$:GUS 拟南芥中 *GUS* 基因的表达量及 GUS 酶活性显著增加，而 Pro$_{cis\text{-}NATZmNAC48}$: GUS 中 *GUS* 基因的表达量及 GUS 酶活性显著下调(图 1-B)。可见 *cis*-NAT$_{ZmNAC48}$和 *ZmNAC48* 启动子响应渗透胁迫。

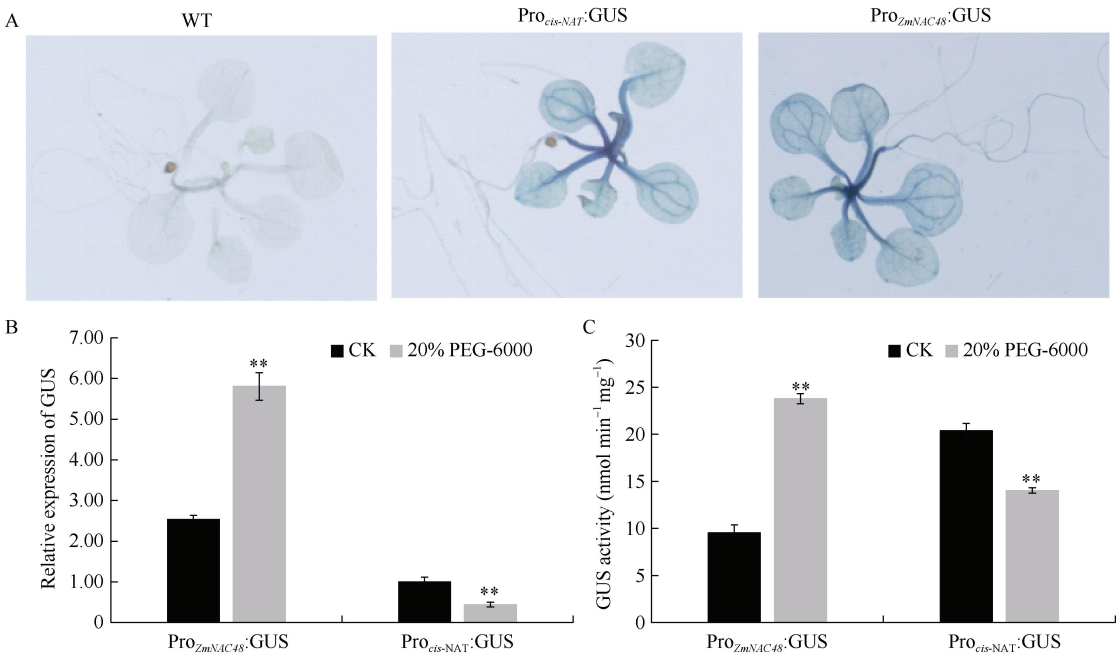


图 1 *Cis*-NAT$_{ZmNAC48}$和 *ZmNAC48* 启动子功能分析
Fig. 1 Function analysis of *cis*-NAT$_{ZmNAC48}$ and *ZmNAC48* promoter

A~C: Pro$_{ZmNAC48}$:GUS 和 Pro$_{cis\text{-}NATZmNAC48}$:GUS 转基因拟南芥中 GUS 染色，GUS 表达量及 GUS 酶活。CK 表示将 14 d 大小的拟南芥放于 1/2 MS 液体培养基中生长 6 h; 20% PEG-6000 表示将 14 d 大小的拟南芥放于含 20% PEG-6000 1/2 MS 液体培养基中生长 6 h。WT 表示野生型拟南芥哥伦比亚 0 型。显著性分析采用 *t* 检验，**表示 $P < 0.01$。

A–C: GUS staining, GUS expression and GUS enzyme activity in transgenic *Arabidopsis* with Pro$_{ZmNAC48}$:GUS and Pro$_{cis\text{-}NATZmNAC48}$:GUS. CK represents 14-day *Arabidopsis* was grown in 1/2 MS liquid medium for 6 h, and 20% PEG-6000 represents 14-day *Arabidopsis* was grown in 1/2 MS liquid medium contained 20% PEG-6000 for 6 h, WT represents COL. ** indicates significant difference at $P < 0.01$ by Student's *t*-test.

2.4　玉米 *cis*-NAT$_{ZmNAC48}$ 和 *ZmNAC48* 启动子区域 DNA 甲基化水平分析

为了解析 *cis*-NAT$_{ZmNAC48}$ 和 *ZmNAC48* 启动子应答渗透胁迫后调控自然反义转录本的表达的特异性，我们分析了玉米耐旱自交系 AC7643 和干旱敏感自交系 AC7729/TZSRWB 根系在正常供水和含 20% PEG-6000 处理 24 h 后根系中 *cis*-NAT$_{ZmNAC48}$ 和 *ZmNAC48* 启动子序列中 DNA 甲基化情况发现，在 *cis*-NAT$_{ZmNAC48}$ 序列前 400~1000 bp 为 DNA 甲基化区域，渗透胁迫后，该区域甲基化并没有发生显著变化(图 2-A)。*ZmNAC48* 转录起始位点前 500~900 bp 为 DNA 甲基化区域，渗透胁迫处理后该甲基化富集程度降低(图 2-B)。

为了进一步验证启动子甲基化在渗透胁迫下的变化情况，我们采用 BSP 的方法，分析渗透胁迫处理后，*cis*-NAT$_{ZmNAC48}$ 和 *ZmNAC48* 启动子甲基化区域甲基化变化。如图 3-A~E，可以看到在 *cis*-NAT$_{ZmNAC48}$ 启动子甲基化区域检测到了 GC、GCH 和 CHH 甲基化富集，且胁迫处理后玉米耐旱自交系 AC7643 中甲基化富集增加，干旱敏感自交系 AC7729/TZSRWB 中甲基化富集减少。且在胁迫处理中仅 CHH 类甲基化发生显著变化，GC 类和 GCH 类甲基化未发生显著变化。

分析单个位点甲基化变化，发现显著变化的甲基化位点均不在各顺式调控位点上(图 4)。当我们对 *ZmNAC48* 启动子甲基化区域进行扩增时，仅扩增到如图 2-B 中引物 1F/1R 间的区域，该区域并未检测到甲基化富集(图 3-F)。

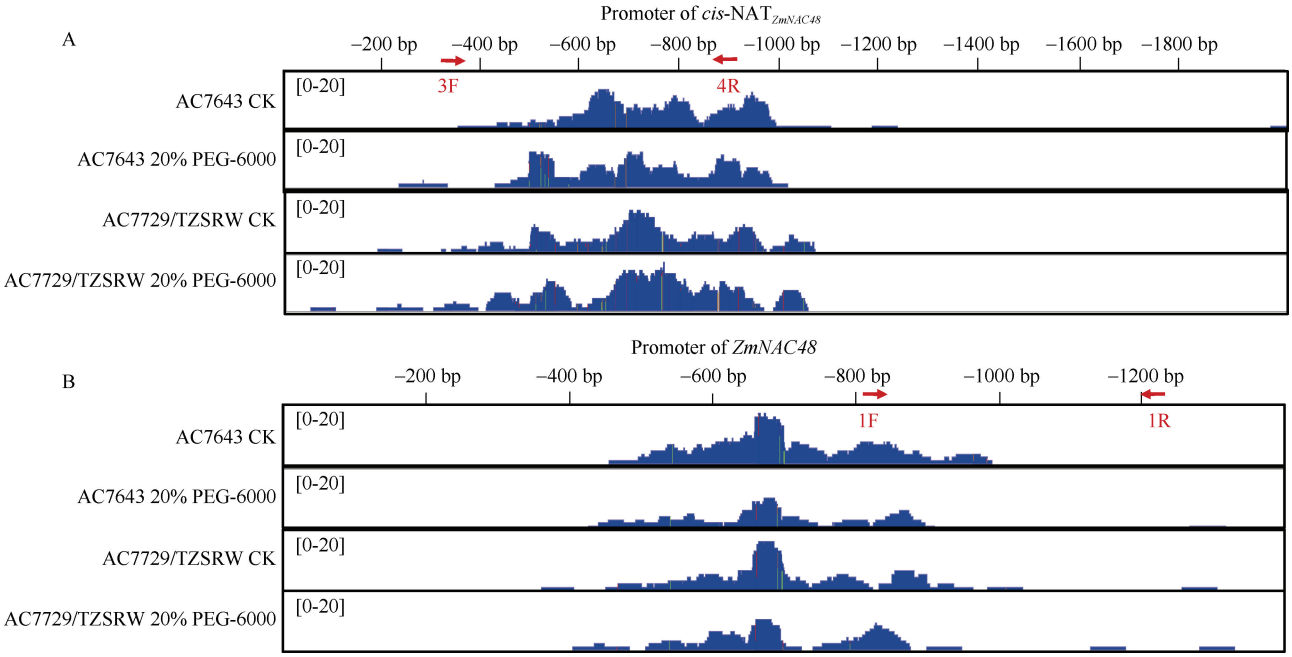
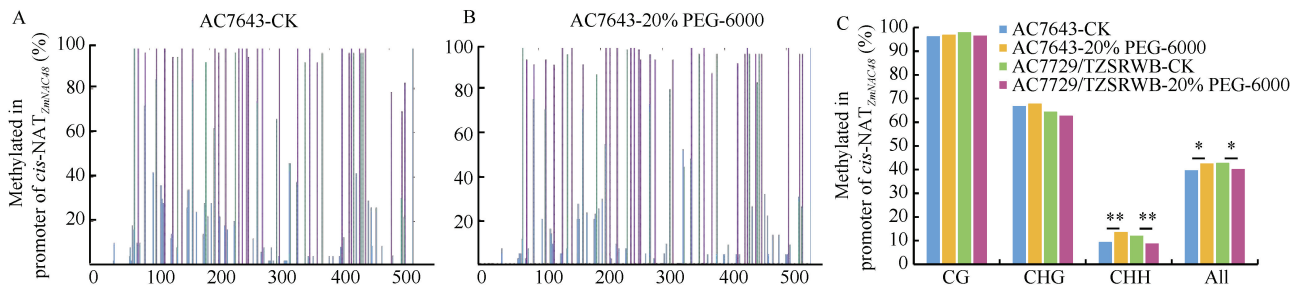


图 2　*Cis*-NAT$_{ZmNAC48}$ 和 *ZmNAC48* 启动子区域 DNA 甲基化

Fig. 2　DNA methylation in *cis*-NAT$_{ZmNAC48}$ and *ZmNAC48* promoter

A: *cis*-NAT$_{ZmNAC48}$ 启动子区域 DNA 甲基化。B: *ZmNAC48* 启动子区域 DNA 甲基化。CK 表示玉米材料正常的营养液中生长的玉米材料, 20% PEG-6000 表示在含有 20% PEG-6000 营养液中处理 24 h。

A: DNA methylation in *cis*-NAT$_{ZmNAC48}$ promoter. B: DNA methylation in *ZmNAC48* promoter. CK: maize grown in normal nutrient solution, and 20% PEG-6000 represents treated maize in containing 20% PEG-6000 nutrient solution for 24 h.



(图 3)

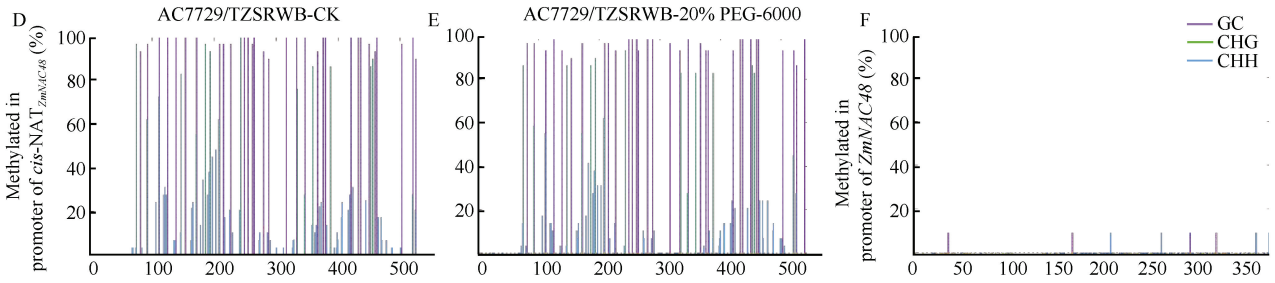


图 3 *Cis*-NAT$_{ZmNAC48}$和 *ZmNAC48* 启动子区域 DNA 甲基化分析

Fig. 3 DNA methylation characteristics in *cis*-NAT$_{ZmNAC48}$ and *ZmNAC48* promoter

A~E: 用 BSP 检测玉米耐旱自交系 AC7643 和干旱敏感自交系 AC7729/TZSRWB 中 *cis*-NAT$_{ZmNAC48}$启动子区域 DNA 甲基化情况。F: 用 BSP 检测 *ZmNAC48* 启动子区域 DNA 甲基化情况。CK 表示对照, 20% PEG-6000 表示用 20% PEG-6000 处理玉米材料 6 h。红色线条表示甲基化类型 GC, 绿色线条表示甲基化类型 CHG, 蓝色线条表示甲基化类型 CHH。显著性分析采用卡方检验, **表示 $P < 0.01$。图 A~B, D~F 中所用到的单克隆个数分别为: 50、44、29、29 和 11。

A–E: DNA methylation characteristics in *cis*-NAT$_{ZmNAC48}$ promoter by bisulfite sequenced analysis in AC7643 and AC7729/TZSRWB. F: DNA methylation characteristics in *cis*-NAT$_{ZmNAC48}$ promoter by bisulfite sequenced analysis. CK represents control, and 20% PEG-6000 represents treating maize material with 20% PEG-6000 for 6 h. Histograms indicated the percentages of CG (red), CHG (green), and CHH (blue), respectively. ** indicates significant difference at $P < 0.01$ by *Chi*-square test. The number of monoclones used in A–B, D–F is 50, 44, 29, 29, and 11, respectively.



图 4 *Cis*-NAT$_{ZmNAC48}$ 启动子甲基化区域顺式元件预测

Fig. 4 *Cis*-element prediction of *cis*-NAT$_{ZmNAC48}$ promoter

红色箭头所指位置为胁迫处理后 DNA 甲基化发生显著性变化的位点。图中前面 4 个箭头所在位置是渗透胁迫处理后, 玉米自交系 AC7643 中检测到的甲基化富集发生显著变化的位点, 最后 1 个箭头所在位置是 AC7729/TZSRWB 中检测到的甲基化富集发生显著变化的位点。

Red arrows indicate the sites where DNA methylation changes significantly under osmotic stress. Under the osmotic stress treatment, the sites of significant methylation enrichment were detected in AC7643, and the sites of significant methylation enrichment in AC7729/TZSRWB were detected in the last arrow.

3 讨论

探究渗透胁迫下玉米各基因的分子调控机制, 有利于提高玉米抵抗逆境胁迫的能力, 为玉米抗逆分子育种提供理论基础和基因资源。NATs 作为一类重要的 lncRNAs, 在生物体内普遍存在, 大约有 22%的人类、15%的果蝇、7%的水稻和 9%的拟南芥基因含有 NATs, 在玉米中约 46%的转录本为 NATs, 其中约有 29%的 NATs 响应渗透胁迫[4,15]。因此, 深入研究 NATs 的表达调控, 对理解玉米抗逆分子机制具有重要的意义。此前研究发现 *cis*-NAT$_{ZmNAC48}$ 可能通过双链 RNA 依赖机制负调控玉米 *ZmNAC48* 基因表达进而影响玉米气孔开闭, 调控植物耐旱性[12]。启动子作为基因调控的关键因子, 其序列中分布着与基因功能密切相关的顺式调控元件。因此, 解析渗透胁迫下 *cis*-NAT$_{ZmNAC48}$ 启动子的功能可为后续 *cis*-NAT$_{ZmNAC48}$ 的调控分析奠定重要的基础。

用 PlantCARE[1]和 New PLACE[2]分析启动子序列, 显示玉米 *cis*-NAT$_{ZmNAC48}$启动子含 TGA、ABRE, W-box; *ZmNAC48* 启动子含有 ARE、MBS 等逆境胁迫应答元件(表 2)。ABA-responsive element (ABRE) 是 ABA 应答的核心元件, 其在基因响应脱水、高盐、低温和 ABA 胁迫处理中扮演着重要的角色[16-17]。W-box 序列可被 WRKY 转录因子特异结合, 研究表明 W-box 主要存在于与抗病、损伤、衰老、干旱相

关基因的启动子区域, 因此 WRKY 转录因子与植物的生物与非生物胁迫应答密切相关[18]。Abe 等研究发现 MYB, MYC 转录因子识别位点如 MBS 序列, 在干旱诱导 RD22 基因表达中具有重要作用[19]。可见 *cis*-NAT$_{ZmNAC48}$ 和 *ZmNAC48* 启动子在 *cis*-NAT$_{ZmNAC48}$ 和 *ZmNAC48* 响应逆境胁迫具有重要作用。此外, 通过分析 Pro$_{cis\text{-}NATZmNAC48}$: GUS 和 Pro$_{ZmNAC48}$: GUS 转基因拟南芥在渗透胁迫下 *GUS* 基因表达情况及其 GUS 酶活性, 证明 *cis*-NAT$_{ZmNAC48}$ 和 *ZmNAC48* 启动子响应渗透胁迫。

DNA 甲基化是影响启动子活性的调控事件之一。在有机体中, DNA 甲基化和基因表达之间的关系不是绝对的, 但一般的规律是: 甲基化作用阻止基因表达, 而表达则需要去甲基化作用[20-21]。*TaGli-γ-2.1* 属于小麦麦胶蛋白基因家族成员, 是小麦面筋强度的负调控因子, 其启动子区域的高甲基化导致 *TaGli-γ-2.1* 基因表达量的降低, 提高了小麦面筋强度, 丰富了小麦品质育种资源[22]。渗透胁迫和盐胁迫诱导小麦甘油醛-3 磷酸脱氢酶基因 *TaGAPC1* 启动子区域的 CG 和 CHG 两种类型的甲基化程度降低[23]。本研究中我们发现 *cis*-NAT$_{ZmNAC48}$ 启动子区域甲基化会因为渗透胁迫而发生改变。渗透胁迫处理 6 h, 玉米耐旱自交系 AC7643 中甲基化富集增加, 干旱敏感自交系 AC7729/TZSRWB 中甲基化富集减少(图 3)。其中玉米耐旱自交系 AC7643 根系中 *cis*-NAT$_{ZmNAC48}$ 的表达量没有发生显著变化, 而在干旱敏感自交系 AC7729/TZSRWB 根系中 *cis*-NAT$_{ZmNAC48}$ 的表达量显著减少[12]。渗透胁迫处理 24 h, 玉米耐旱自交系 AC7643 和干旱敏感自交系 AC7729/TZSRWB 中甲基化富集没有变化(图 2)。其中玉米耐旱自交系 AC7643 和干旱敏感自交系 AC7729/TZSRWB 根系中 *cis*-NAT$_{ZmNAC48}$ 的表达量显著减少[12]。因此关于 *cis*-NAT$_{ZmNAC48}$ 启动子区域甲基化变化是否影响 *cis*-NAT$_{ZmNAC48}$, 又是如何影响 *cis*-NAT$_{ZmNAC48}$ 表达, 进而调控植物耐旱性, 还有待进一步研究。但通过本研究我们可以确定的是渗透胁迫会影响 *cis*-NAT$_{ZmNAC48}$ 启动子区域 DNA 甲基化富集。

4　结论

玉米自然反义转录本 *cis*-NAT$_{ZmNAC48}$ 启动子序列中含有 TGA, ABRE, W-box 等非生物胁迫响应应答元件, 响应干旱等非生物胁迫。通过获得转基因材料进一步证明 *cis*-NAT$_{ZmNAC48}$ 和 *ZmNAC48* 启动子响应渗透胁迫。通过分析渗透胁迫下 *cis*-NAT$_{ZmNAC48}$ 启动子甲基化情况发现, *cis*-NAT$_{ZmNAC48}$ 启动子区域 DNA 甲基化受渗透胁迫影响, 但渗透胁迫下 DNA 甲基化变化显著的位点并未在个顺式调控元件中。

References

[1] Magali L, Patrice D, Gert T, Kathleen M, Yves M, Yves V D P, Pierre R, Stephane R. PlantCARE, a database of plant *cis*-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences. *Nucleic Acids Res*, 2002, 30: 325–327.

[2] Higo K, Ugawa Y, Iwamoto M, Korenaga T. Plant *cis*-acting regulatory DNA elements (PLACE) database. *Nucleic Acids Res*, 1999, 27: 297–300.

[3] Hrishikesh U, Lingaraj S, Sanjib K P. Molecular Physiology of Osmotic Stress in Plants. Berlin, Germany: Springer, 2013 [2023-06-05]. doi: 10.1007/978-81-322-0807-5.

[4] Lapidot M, Pilpel Y. Genome-wide natural antisense transcription: coupling its regulation to its different regulatory mechanisms. *EMBO Rep*, 2006, 7: 1216–1222.

[5] Borsani O, Zhu J, Verslues P E, Sunkar R, Zhu J K. Endogenous siRNAs derived from a pair of natural *cis*-antisense transcripts regulate salt tolerance in *Arabidopsis*. *Cell*, 2005, 123: 1279–1291.

[6] Zhao X, Li J, Lian B, Gu H, Li Y, Qi Y. Global identification of *Arabidopsis* lncRNAs reveals the regulation of MAF4 by a natural antisense RNA. *Nat Commun*, 2018, 9: 5056.

[7] Fang J, Zhang F, Wang H, Wang W, Zhao F, Li Z, Sun C, Chen F, Xu F, Chang S, Wu L, Bu Q, Wang P, Xie J, Chen F, Huang Y, Zhang Y, Zhu X, Han B, Deng X, Chu C. Ef-cd locus shortens rice maturity duration without yield penalty. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2019, 116: 18717–18722.

[8] Fedaka H, Palusinskaa M, Krzycczmonika K, Brzezniak L, Yatusevich R, Pietras Z, Kaczanowski S, Swiezewski S. Control of seed dormancy in *Arabidopsis* by a *cis*-acting noncoding antisense transcript. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113: E7846–E7855.

[9] Fedaka H, Palusinskaa M, Krzyczmonika K, Brzezniaka L, Yatusevicha R, Pietrasa Z, Szymon K B, Szymon S. Antisense transcription represses *Arabidopsis* seed dormancy QTL DOG1 to regulate drought tolerance. *EMBO Rep*, 2017, 18: 2186–2196.

[10] Zubko E, Merer P. A natural antisense transcript of the *Petunia hybrida* Sho gene suggests a role for an antisense mechanism in cytokinin regulation. *Plant J*, 2007, 52: 1131–1139.

[11] Mehdi J D S, Cécile L, Christophe R, Qingya S, Yves P. A rice *cis*-natural antisense RNA acts as a translational enhancer for its cognate mRNA and contributes to phosphate homeostasis and plant fitness. *Plant Cell*, 2013, 25: 4166–4182.

[12] Mao Y, Xu J, Wang Q, Li G, Tang X, Liu T, Feng X, Wu F, Li M, Xie W B, Lu Y L. A natural antisense transcript acts as a negative regulator for the maize drought stress response gene *ZmNAC48*. *J Exp Bot*, 2021, 72: 2790–2806.

[13] Clough S J, Bent A F. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 1998, 16: 735–743.

[14] Gruntman E, Qi Y, Slotkin R K, Roeder T, Martienssen R A, Sa-

chidanandam R. Kismeth: analyzer of plant methylation states through bisulfite sequencing. *BMC Bioinform*, 2008, 9: 371.

[15] Xu J, Wang Q, Freeling M, Zhang X, Xu Y, Mao Y, Tang X, Wu F K, Lan H, Cao M J, Rong T Z, Damon L, Lu Y L. Natural antisense transcripts are significantly involved in regulation of drought stress in maize. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45: 5126–5141.

[16] Narusaka Y, Nakashima K, Shinwari Z K, Sakuma Y, Furihata T, Abe H, Narusaka M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. Interaction between two *cis*-acting elements, ABRE and DRE, in ABA-dependent expression of *Arabidopsis rd29A* gene in response to dehydration and high-salinity stresses. *Plant J*, 2003, 34: 137–148.

[17] Nakashima K, Fujita Y, Katsura K, Maruyama K, Narusaka Y, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. Transcriptional regulation of ABI3- and ABA-responsive genes including RD29B and RD29A in seeds, germinating embryos, and seedlings of *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol*, 2006, 60: 51–68.

[18] Rushton P J, Somssich I E, Ringler P, Shen Q J. WRKY transcription factors. *Trends Plant Sci*, 2010, 15: 247–258.

[19] Hiroshi A, Kazuko Y S, Takeshi U, Toshisuke I, Daijiro H, Kazuo S. Role of *Arabidopsis* MYC and MYB homologs in drought and abscisic acid-regulated gene expression. *Plant Cell*, 1997, 9: 1859–1868.

[20] Krebs J E. 江松敏译. Lewin 基因 X (中文版). 北京: 科学出版社, 2013. pp 588–612.
Krebs J E. Jiang S M, trans. Lewin Genes X. Beijing: Science Press, 2013. pp 588–612 (in Chinese).

[21] Smith J, Sen S, Weeks R J, Eccles M R, Chatterjee A. Promoter DNA hypermethylation and paradoxical gene activation. *Trends Cancer*, 2020, 6: 392–406.

[22] Zhou Z, Liu C, Qin M, Li W, Hou J, Shi X, Dai Z, Yao W, Tian B, Lei Z, Li Y, Wu Z. Promoter DNA hypermethylation of TaGli-gamma-2.1 positively regulates gluten strength in bread wheat. *J Adv Res*, 2022, 36: 163–173.

[23] Fei Y, Xue Y, Du P, Yang S, Deng X. Expression analysis and promoter methylation under osmotic and salinity stress of TaGAPC1 in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Protoplasma*, 2017, 254: 987–996.