

ZmNAP 基因对玉米抗衰老及产量性状的调控效应

张永辉^{1,2}, 曹言勇², 邵强¹, 王利锋², 王浩², 李晶晶², 李会勇^{2*}

(1. 河南师范大学 生命科学学院, 河南 新乡 453007; 2. 河南省农业科学院 粮食作物研究所, 河南 郑州 450002)

摘要: 为了探索 *ZmNAP* 基因在调控玉米抗衰老及产量性状等方面的作用, 根据已知的 *ZmNAP* 基因 cDNA 序列构建玉米 *Ubi* 启动子控制下的 *ZmNAP* 的 RNA 干扰载体 pTCK303ihp*ZmNAP*, 并通过农杆菌介导的方法对 *ZmNAP* 基因进行遗传转化。结果表明: *ZmNAP* 转基因玉米植株在叶片滞绿、籽粒千粒重等方面较野生型植株(WT)有明显优势, 转基因植株比野生型植株千粒重提高 15%~30%。*ZmNAP* 基因在玉米育种中具有重要的应用价值。

关键词: 玉米; *ZmNAP* 基因; RNAi; 抗衰老; 滞绿性; 千粒重

中图分类号: S513 文献标志码: A 文章编号: 1004-3268(2012)10-0019-06

Regulating Effect of *ZmNAP* Gene on Anti-senescence and Yield Traits of Maize

ZHANG Yong-hui^{1,2}, CAO Yan-yong², SHAO Qiang¹, WANG Li-feng²,
WANG Hao², LI Jing-jing², LI Hui-yong^{2*}

(1. College of Life Sciences, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China;

2. Cereal Crops Institute, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: In order to investigate the potential role of *ZmNAP* in regulating the anti-senescence and yield traits of maize, the maize *ZmNAP* RNA interference vector pTCK303ihp*ZmNAP* driven by *Ubi* promoter was created based on the *ZmNAP* cDNA sequence deposited in MaizeGDB, and was transformed into maize by *Agrobacterium tumefaciens*. The results showed that transgenic maize plants had more obvious advantages than control plants in delaying senescence and grain weight. The 1 000-grain weight of transgenic maize plants was 15%–30% higher than that of wild type maize plants. *ZmNAP* gene has potential value in maize breeding.

Key words: maize; *ZmNAP* gene; RNAi; delaying senescence; stay green; 1 000-grain weight

叶片衰老是一个程序性细胞死亡和氮循环的特殊过程, 在细胞水平上表现为叶绿体的解体, 叶绿素含量下降, 蛋白质等多种内容物的降解, 游离氨基酸积累, 光合磷酸化能力降低, 膜脂过氧化加剧, 细胞膜通透性增加, 细胞分裂素(CTK)含量下降, 脱落酸(ABA)含量上升, 多种酶活性发生改变等; 在分

子水平上, 许多生物大分子物质如蛋白质、膜脂、RNA 等降解形成的氮素等营养物质被转运至幼嫩的叶片、发育中的种子, 加以重新利用和储存^[1-3]。植物在叶片衰老时体内存在一种能够保护自身不受外界因子损伤、维持自身活力, 以确保衰老细胞能较长时间高效利用自己组分的机制^[4]。关于叶片衰老

收稿日期: 2012-03-05

基金项目: 国家转基因生物新品种培育重大专项(2011ZX08003-004 和 2009ZX08009-061B)

作者简介: 张永辉(1987-), 男, 河南义马人, 在读硕士研究生, 研究方向: 玉米转基因。E-mail: keaitu68@126.com

* 通讯作者: 李会勇(1977-), 男, 山西高平人, 副研究员, 博士, 主要从事玉米种质资源和功能基因组学研究。

E-mail: lihuiyong1977@126.com

在生理学、生物化学和分子生物学方面已有很多报道,目前人们已从拟南芥^[5]、玉米^[6]、番茄^[7]、油菜^[8]等植物中克隆出许多与衰老有关的基因,这些基因被称为叶片衰老相关基因(SAGs)。

NAC(NAM、ATAF1/2 和 CUC2)是高等植物中所特有的一类转录因子,这些转录因子参与各种生物进程,包括胚胎发育系统^[9]、激素代谢和逆境胁迫应答^[10]。AtNAP 是拟南芥 NAC 家族中的一种转录因子,定位在细胞核中^[11],在幼嫩的叶片中 *AtNAP* 基因不表达;当叶片衰老时,*AtNAP* 基因的表达量迅速升高,且 *AtNAP* 的表达量与叶片的衰老程度成正相关。Guo 等^[12]的研究也表明,*AtNAP* 基因突变植株表现为叶片衰老延迟,这一性状可以通过导入野生型的 *AtNAP* 得到恢复;相反,过量表达 *AtNAP* 可以引起叶片早衰。这些研究结果表明,*AtNAP* 在负调控拟南芥的抗衰老性状方面发挥着重要的作用。为了探索玉米中 *AtNAP* 的直系同源基因 *ZmNAP* 在调控玉米抗衰老过程中的功能,本研究根据数据库中 *ZmNAP* 基因的 cDNA 序列设计引物,构建 *ZmNAP* 的 RNA 干扰(RNA interference, RNAi)载体 pTCK303ihp*ZmNAP*,并对玉米自交系进行遗传转化,旨在探讨 *ZmNAP* 基因在玉米调控叶片衰老及与产量相关性等方面的作用机制,并验证其在玉米育种中的价值。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 受试材料为玉米自交系 A188,来自中国农业大学遗传育种实验室,在河南省农业科学院试验基地种植。授粉 10 d 后,剥取长度为 1.5~2.0 mm 的幼胚作为试验材料。

1.1.2 菌株与载体 农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)菌株为 LBA4404,由河南省农业科学院粮食作物研究所提供;pTCK303^[13]作为 *ZmNAP* 基因 RNAi 转化的植物表达载体。

1.1.3 试验试剂 植物凝胶 GelzanTM 购自 Phyto-Technology Laboratories 公司,毒莠啶(picloram)、潮霉素(hygromycin, Hyg)、青霉素(penicillin)、3-吲哚丁酸(3-indolylbutyric acid, IBA)、2,4-D(2,4-dichlorophenoxy)、6-苄氨基腺嘌呤(6-benzylaminopurine, 6-BA)、次氯酸钠(6.15%有效成分)购自 Sigma 公司,蛋白胨(tryptone)、酵母提取物(yeast extract)购自 OXOID 公司;柱式植物 RNA-out 试剂盒购自北京天恩泽公司, *Taq* DNA

聚合酶、dNTPs、DNA Marker DNA 回收试剂盒购自 Tiangen 公司,引物由生工生物工程有限公司合成;ReverTra ACE- α TM 反转录试剂盒和 THUNDERBIRD SYBR qPCR MIX 购自 TOYOBO 公司,链霉素(streptomycin, SM)、卡那霉素(kanamycin, Kan)等抗生素购自 Sigma 公司。组织培养中用到的其他试剂均为国产分析纯。

1.1.4 试验仪器 分光光度计为日本岛津 UV-2550,离心机和荧光定量 PCR 仪购自 Eppendorf 公司,高压灭菌锅、光照培养箱和制冰机购自 SANYO 公司,PCR 仪购自 Biometra 公司,摇床购自 Thermo 公司,电泳仪购自北京六一仪器厂,凝胶成像系统购自 Alpha Innotech 公司,人工气候箱培养箱购自科力仪器公司。

1.1.5 培养基 农杆菌生长培养基:YEB 固体和液体培养基+SM 120 mg/L+Kan 60 mg/L;预侵染培养基(MS-inf):MS+200 μ mol/L 乙酰丁香酮(acetosyringone, AS)+SM 100 mg/L+Kan 60 mg/L;侵染培养基:MS+100 μ mol/L AS;共培养培养基:MS+100 μ mol/L AS+100 μ mol/L AgNO₃;恢复培养基:MS+青霉素 250 mg/L;筛选培养基:MS+青霉素 250 mg/L+Hyg 20 mg/L;分化培养基:MS+6-BA 3 mg/L+青霉素 250 mg/L;生根培养基:1/2MS+0.1 mg/L IBA+青霉素 250 mg/L。

1.2 方法

1.2.1 *ZmNAP* RNAi 植物表达载体的构建 利用登录的 *ZmNAP* 基因的 cDNA 序列(登录号 AZM5_18141)设计 *ZmNAP* RNA 干扰载体的引物,共有 2 对:*ZmNAP*ihp I BamF (5'-ATA GGATCC AGT-GAAGCGGCATGTGGT-3') 和 *ZmNAP*ihp I KpnR (5'-CTA GGTACC ATCCTCATCCGCCTGCF3'),*ZmNAP*ihp II SacF (5'-ATAGAGCTCAGTGAAGCGGCATGTGG-3') 和 *ZmNAP*ihp II SpeR (5'-GCGACTAGT ATCCTCATCCGCCTGCT-3')。这 2 对引物分别含有 *Bam*H I /*Kpn* I 和 *Sac* I /*Spe* I 的酶切位点(如下划线所示)。

以从玉米自交系 A188 中克隆的 *ZmNAP* 基因的 cDNA 序列为模板,用引物对 *ZmNAP*ihp I BamF/*ZmNAP*ihp I KpnR, *ZmNAP*ihp II SacF/*ZmNAP*ihp II SpeR 扩增同一段 cDNA 序列,回收纯化 PCR 产物,并分别用 *Bam*H I /*Kpn* I、*Sac* I /*Spe* I 酶切处理,回收酶切产物,并依次连接到经 *Bam*H I /*Kpn* I、*Sac* I /*Spe* I 酶切处理的 pTCK303 上,经验证正确后即构建成 *ZmNAP*

RNA 干扰载体 pTCK303ihpZmNAP。

1.2.2 玉米遗传转化 授粉 10~15 d 后,选取生长状态良好的玉米果穗,在超净工作台将玉米的包衣,先用 75% 乙醇消毒 30 s,再放入 2.5% 的 NaClO 溶液中消毒 10 min,无菌水洗涤 3 次,晾干后,用手术刀削去 2/3 的种子,用大头针挑出玉米的幼胚,而后将其盾片向上置于幼胚愈伤诱导培养基中,暗培养 7 d 后,剥去多余的芽尖,置于新鲜的愈伤诱导培养基中再暗培养 14~21 d。挑选诱导质量较好的愈伤组织,并将大块的愈伤组织夹碎,放入继代培养基中继代培养,14 d 继代 1 次。将构建好的重组质粒 pTCK303ihpZmNAP 转化到农杆菌 LBA4404 感受态细胞中,经菌液 PCR 验证,获得含有 pTCK303ihpZmNAP 的农杆菌工程菌株。挑取 YEB 固体培养基上的农杆菌单菌斑,在加有 SM 和 Kan 的 YEB 液体培养基中 28 °C、180 min 振荡培养至 OD₆₀₀ 为 0.6~0.8 时,取适量菌液室温、5 000 r/min 离心 5 min 收集菌体,用 MS-inf 液体培养基洗涤一次,去除残留的 YEB 培养基后,将菌体悬浮于适量含有 AS 的 MS-inf 液体培养基中,制备成 OD₆₀₀ 为 0.5 左右的侵染液。将愈伤组织用含有 AS 的 MS-inf 液体培养基浸泡 1 h 左右,转入到侵染液中,颠倒晃动 30 s 后静置 10 min,取出愈伤组织用灭过菌的滤纸吸干表层菌液,盾片向上接种于共培养培养基上,于恒温培养箱中,25 °C 暗培养 3 d。共培养后,用无菌水清洗愈伤 2 次,洗去表面农杆菌,用灭菌滤纸吸干后转入恢复培养基,25 °C 暗培养 7 d。将愈伤组织从恢复培养基转到筛选培养基,28 °C 暗培养,每 14 d 更换一次培养基,经过 3 轮筛选(Hyg 质量浓度依次为 5 mg/L、10 mg/L、20 mg/L)后,剔除严重水渍化及发黑发褐的愈伤组织,将剩余的抗性愈伤组织转入不含潮霉素的培养基恢复 14 d,再转入分化培养基中,28 °C、光强 3 000 lx、12 h 光照条件下分化培养,各基因型会在 4~14 d 不等的时间内分化出绿芽,长成 2~4 cm 的幼苗后,转移至生根培养基中,培养 14~28 d 后,开盖加无菌水炼苗 3~5 d,小心洗去根部培养基后,移至花盆(蛭石和营养土体积比为 1:3)中,于室温 28 °C、光强 2 000 lx、16 h 光照条件下生长。

1.2.3 T₀ 代转基因植株的 PCR 检测 采用 CTAB 方法从 T₀ 代转基因植株的幼叶中提取 DNA。利用引物 Hpt11293S/Hpt11628A 扩增 Hyg 抗性基因,即 *Hpt* 基因的部分片段,扩增的目的片段长约 330 bp;利用引物 TCK303Int-15S/

NAPihp II-143A 扩增目的基因,即 pTCK303 水稻内含子部分、*ZmNAPihp* II 部分片段,扩增的目的片段长约 600 bp。用于检测 *Hpt* 基因的引物为 Hpt11293S: 5'-TCTGCTGCTCCATACAAGC-CAACC-3', Hpt11628A: 5'-GCCCATTCGGACCG-CAAGGA-3';检测目的基因的引物为 TCK303Int-15S: 5'-CAGCCGTGTCATAGTCAATC-3', NAPihp II-143A: 5'-ACAGGACCCGTTCCGGTTTCTT-3'。

1.2.4 T₀ 代转基因植株的定量 RT-PCR 检测 在 T₀ 代转基因玉米植株生长后期,利用柱式植物 RNA-out 试剂盒提取植株叶片的总 RNA,反转录获得 cDNA。使用试剂盒 THUNDERBIRD SYBR qPCR MIX (TOYOBO) 进行荧光定量,反应体系为 20 μL,内含 10 μL SYBR qPCR MIX, 0.3 μmol/L 正向引物和反向引物, 1 μL cDNA 模板。反应程序为: 95 °C 预变性 10 min, 95 °C 变性 15 s, 52 °C 退火 15 s, 72 °C 延伸 20 s, 40 个循环,反应在 Eppendorf realplex mastercycler egradient S 荧光定量 PCR 仪上运行,每个样品 3 个重复。采用 2^{-ΔΔC_t} 法进行定量分析。利用引物 NAP_qF/NAP_qR 扩增 *NAP* 基因的部分片段,扩增的目的片段长约 122 bp。采用 Primer Premier 6.0 (Premier Biosoft Inc., 加拿大) 和 Primer 3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) 设计荧光定量 PCR 引物,由生工生物工程有限公司合成。引物序列为 *ZmNAP_qF*: 5'-AACAAAGCG-CAAGAGATCGAG-3', *ZmNAP_qR*: 5'-AGTCCGTT-GCCTATTTGGAA-3';以 *β-tubulin* 基因为内参,引物序列为 *ZmTUBqF*: 5'-GCTATCCTGTGATCTGC-CCTGA-3', *ZmTUBqR*: 5'-CGCCAAACTTAATAAC-CCAGTA-3'。

2 结果与分析

2.1 *ZmNAP* 基因 RNAi 植物表达载体的构建

在前期克隆的玉米自交系郑 58 的 *ZmNAP* cDNA 序列选取一小段序列(216 bp)设计 2 对带有酶切位点的引物(*ZmNAPihp* I *Bam*F/*ZmNAPihp* I *Kpn*R 和 *ZmNAPihp* II *Sac*F/*ZmNAPihp* II *Spe*R)。以测序正确的 *ZmNAP* 基因 cDNA 为模板,2 次 PCR 扩增该目的片段并回收 PCR 产物,然后分别进行 *Bam*H I/*Kpn* I、*Sac* I/*Spe* I 酶切,酶切产物依次连接到经相同酶切处理的 pTCK303 上,进行酶切鉴定,至此构建成 pTCK303ihpZmNAP。具体构建过程如图 1 所示。

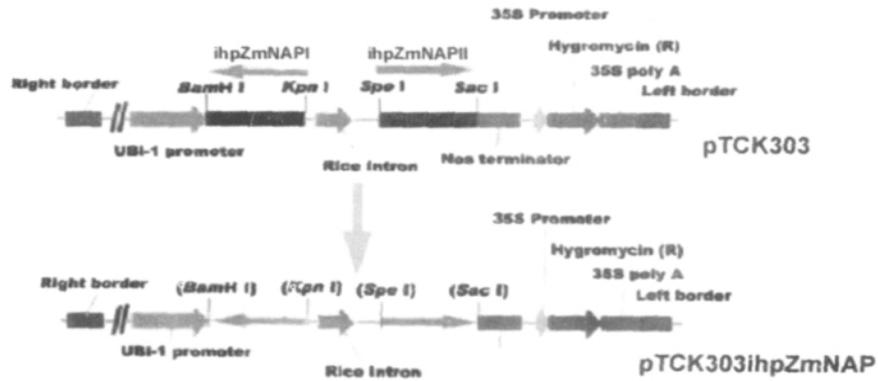
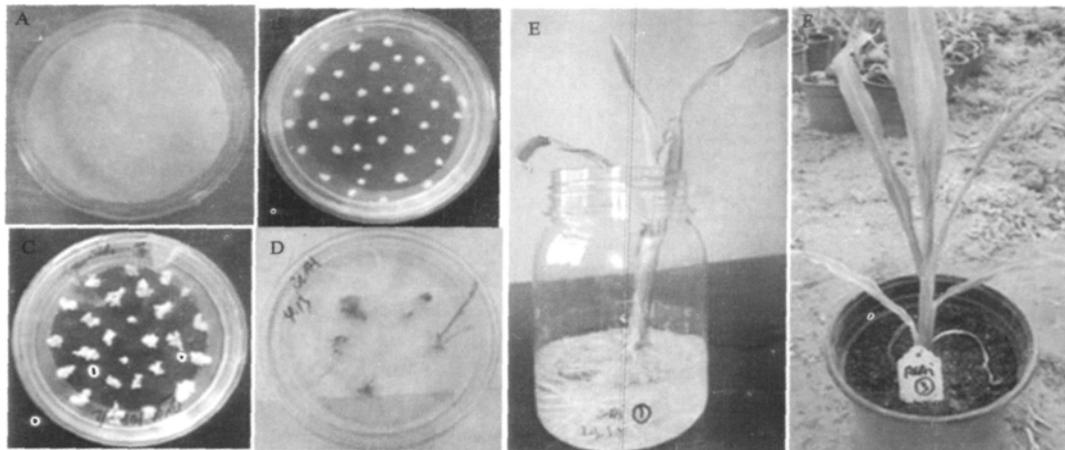


图 1 *ZmNAP* RNA 干扰植物表达载体的构建过程

2.2 转 *ZmNAP* 基因玉米植株的获得及其 RT-PCR 检测

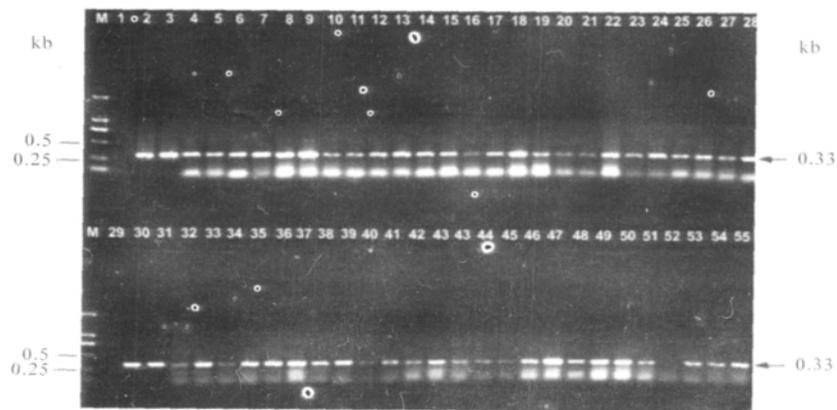
用 pTCK303ihpZmNAP 载体,通过农杆菌介导转化玉米 1 400 个幼胚,经过 Hyg 筛选培养,结合抗性愈伤形态及细胞压片观察结果,选取分化率高的抗

性愈伤组织用于后续分化、生根,共获得了 58 个转 *ZmNAP* 基因再生植株(图 2)。利用引物 Hpt11293S/Hpt11628A 对这些转基因株系进行检测分析,发现有 55 个转基因植株携带 *Hpt* 基因(图 3),利用引物 TCK303Int-15S/NAPihpII-143A 对这些



A. 共培养阶段; B. 共培养后恢复阶段; C. 抗性愈伤的筛选; D. 分化阶段; E. 生根阶段; F. 移栽生长阶段

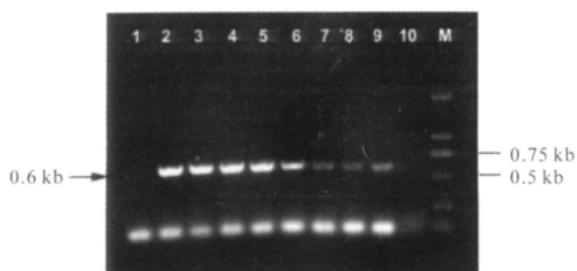
图 2 农杆菌介导的 *ZmNAP* A188 幼胚转化阶段



M 为 D2000 DNA Marker;1、29 为阴性对照;2、30 为阳性对照;3-28、31-55 为转基因植株叶片提取的总 DNA 为模板 *Hpt* 基因片段 PCR 扩增结果

图 3 部分转基因玉米植株 *Hpt* 基因 PCR 检测结果

转基因植株进行目的基因扩增检测,在这些转基因植株中均能检测到目的基因(图 4)。选取其中 6 个综合农艺性状表现正常的 T_0 代转基因植株进行实时荧光定量 PCR 分析,结果表明,这 6 个转基因植株中 *ZmNAP* 基因的表达均被不同程度的抑制(图 5)。



注: M 为 D2000 DNA Marker; 1-9 为转基因植株叶片提取的总 DNA 为模板 pTCK303 水稻内含子、*ZmNAP*ihpII 部分片段 PCR 扩增结果; 10 为阴性对照

图 4 部分转基因植株 *ZmNAP* 基因 PCR 检测结果

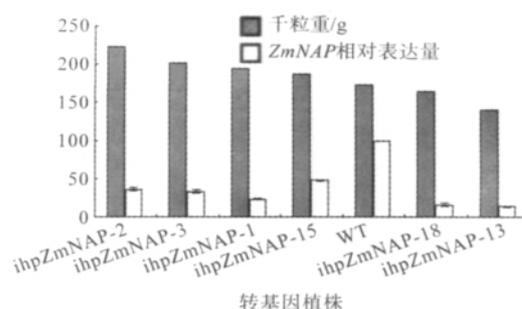


图 5 转基因植株 *ZmNAP* 基因表达量与千粒重的关系

2.3 *ZmNAP* 基因 RNA 干扰后对玉米叶片滞绿性和籽粒千粒重的影响

以受体材料玉米自交系 A188 为对照,对 T_0 代转基因植株进行农艺性状调查。在玉米生长后期,转基因植株较野生型(WT)植株表现出更好的滞绿性,并且随着 *ZmNAP* 基因 RNA 干扰程度的加重,叶片滞绿性也明显增强(图 6),*ZmNAP* 基因在 T_0 代转基因植株中的表达量依次为 $\text{ihpZmNAP-15} > \text{ihpZmNAP-3} > \text{ihpZmNAP-1}$ (图 5)。

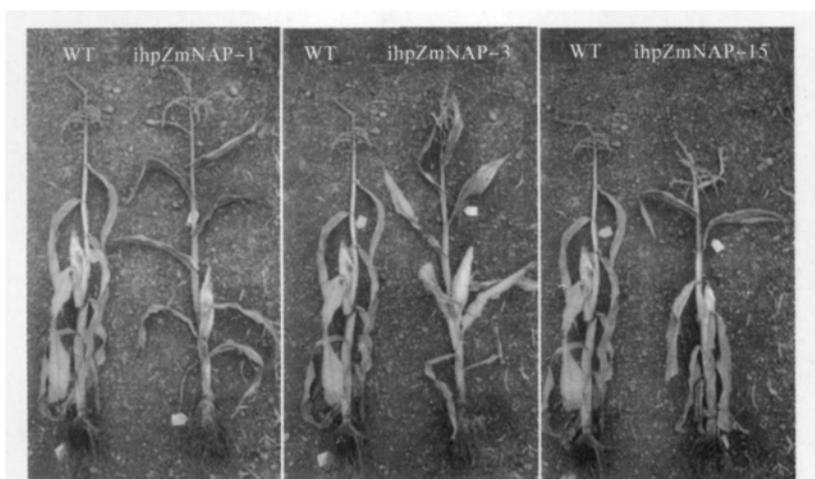


图 6 转基因植株与野生型植株的滞绿性比较

同时,分别对 T_0 代的转基因植株(ihpZmNAP-1、2、3、13、15、18)和野生型植株的千粒重进行了比较。结果表明,在调查的 6 个转基因植株中,4 个被干扰的转基因植株(ihpZmNAP-1、2、3、15)的千粒重比野生型植株提高 15%~30%,但是随着 *ZmNAP* 基因被干扰程度的增加,ihpZmNAP-18 和 ihpZmNAP-13 这 2 个转基因植株的千粒重呈现出下降的趋势。

3 结论与讨论

RNA 干扰因其具有特异的靶向性成为分析基因功能和植物抗逆性研究的有力工具^[14]。通过农杆菌介导法或其他转化方法将目标基因的自身反向

重复序列导入植物细胞,整合到植物基因组后,该序列的转录产物会形成双链 RNA 或自我互补的发卡状双链 RNA(hairpin RNA, hpRNA),被植物 RNA 干扰机制识别后引起目标基因的 RNA 干扰,从而干扰靶基因的正常表达^[15]。李小平等^[16]从大豆叶片中克隆到一个新的 LRP 型类受体蛋白激酶基因 *rlpk2*,并应用 RNA 干扰技术验证了其与大豆叶片衰老有关。

本研究通过农杆菌介导的方法对玉米自交系 A188 进行了遗传转化,将 *ZmNAP* 的干扰载体 pTCK303ihpZmNAP 导入野生型 A188 中,通过检测转基因后代植株中 *ZmNAP* 的 RNA 相对表达水平来研究该基因是否得到有效的沉默,荧光定量

RT-PCR 的结果显示, *ZmNAP* 基因在部分转基因植株中的 RNA 表达水平有明显降低; 在这些株系中, 该基因的表达应该能被有效的干扰。观察 *ZmNAP* RNA 干扰 T₀ 代转基因植株的叶片性状发现, 这些植株在抗衰老方面与野生型植株相比表现出了明显的优势; 并且, 随着 RNA 干扰程度的加重, 转基因植株叶片抗衰老的特性也越来越明显, 这充分地证明了 *ZmNAP* 在调控玉米叶片抗衰老方面的作用。

另外, 比较 T₀ 转基因植株与野生型植株籽粒千粒重发现, 叶片的抗衰老性状与千粒重有着密切的关系: 适当的 RNA 干扰能够增加玉米的千粒重 15%~30%, 然而随着 RNA 干扰程度的继续加重, 叶片抗衰老的能力进一步提高, 转基因株系的千粒重却有减少的趋势。可能是因为 RNA 干扰程度较强的株系将更多的光合产物用于叶片的生长而不是产量的增加, 干扰程度适中的株系由于叶片良好的生长状态保证了植株良好的开花结实, 这需要在后续研究中进一步证实。

参考文献:

- [1] 梁秋霞, 曹刚强, 苏明杰. 植物叶片衰老研究进展[J]. 中国农学通报, 2006, 22(8): 282-285.
- [2] 翟荣荣, 冯跃, 曹立勇. 水稻叶片衰老研究进展[J]. 中国稻米, 2011, 17(1): 7-12.
- [3] Clausen S, Apel K. Seasonal changes in the concentration of the major storage proteins and its mRNA in xylem ray cells of poplar trees[J]. Plant Mol Biol, 1991, 17(4): 669-678.
- [4] Buchanan-Wollaston V. The molecular of leaf senescence[J]. Exp Bot, 1997, 48: 181-199.
- [5] Lohman K N, Gan S, John M C, et al. Molecular analysis of natural leaf senescence in *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant Physiol, 1994, 92: 322-328.
- [6] Smart C M, Hosken S E, Thomas H, et al. The timing of maize leaf senescence and characterization of senescence related cDNAs[J]. Plant Physiol, 1995, 93: 673-682.
- [7] Jensen E B, Veierskov B. Interaction between photoperiod, photosynthesis and ethylene formation in tomato plants[J]. Plant Physiol, 1998, 103(3): 363-368.
- [8] Buchanan W V. Isolation of cDNA clones for genes that are expressed during leaf senescence in *Brassica napus* identification of a gene encoding a senescence specific metallothionin like protein[J]. Plant Physiol, 1994, 105: 839-846.
- [9] Olsen A N, Ernst H A, Leggio L L, et al. NAC transcription factors: structurally distinct, functionally diverse[J]. Trends Plant Sci, 2005, 10: 79-87.
- [10] Tran L S, 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: 2481-2498.
- [11] Cokol M, Nair R, Rost B. Finding nuclear localization signals[J]. EMBO Rep, 2000, 1: 411-415.
- [12] Guo Y, Gan S. *AtNAP*, a nac family transcription factor, has an important role in leaf senescence[J]. Plant J, 2006, 46: 601-612.
- [13] Wang Z, Chen C, Xu Y, et al. A practical vector for efficient knockdown of gene expression in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Plant Mol Biol Rep, 2004, 22: 409-417.
- [14] 马建, 刘艺苓, 王丕武. 植物 RNA 干扰的研究进展[J]. 中国油料作物学报, 2008, 30(2): 252-259.
- [15] Waterhouse P M, Helliwell C A. Exploring plant genomes by RNA induced gene silencing[J]. Nat Rev Genet, 2003, 4: 29-38.
- [16] 李小平, 马媛媛, 李鹏丽, 等. 利用 RNA 干扰技术敲减 *rlpk2* 基因的表达可以延缓大豆叶片衰老[J]. 科学通报, 2005, 50(11): 1090-1096.