

玉米抗旱突变体*edt1*抗旱机制的初步解析

翟晨蕾^{1,2}, 刘文娟^{2,3}, 张霞², 丁万红⁴, 唐勇⁴, 路小铎², 冯怀章⁴, 张春义², 林宏辉^{1,*}, 赵军^{2,*}

¹四川大学生命科学学院, 成都610064

²中国农业科学院生物技术研究所, 北京100081

³四川农业科学院分析测试中心, 成都610066

⁴新疆农业科学院综合试验场, 乌鲁木齐830012

摘要: 为了选育玉米抗旱新品种, 并进一步探究玉米应对干旱胁迫的分子调控机制, 本研究采用田间抗旱筛选得到的抗旱突变体*edt1*, 分别进行中度和重度2种干旱胁迫处理, 并测定相关参数。结果表明:在中度干旱胁迫下, *edt1*的净光合速率(P_n)显著高于野生型‘郑58’, PSII基因 $psbA$ 、 $lhcb3$ 和 $lhcb4$ 的表达与‘郑58’相比显著增强;在重度干旱胁迫下, *edt1*的质膜受损程度较轻, PSII的最大光化学效率(F_v/F_m)、叶片相对含水量及活性氧清除均显著高于‘郑58’, 抗氧化酶活基因 $Mn-sod3$ 、 apx 、 $cat2$ 及 $cat3$ 的表达较‘郑58’中均显著增加。以上结果说明, 干旱胁迫下, *edt1*具有较强的光合能力与活性氧清除能力, 这与PSII反应中心、捕光复合体及抗氧化酶基因的表达调控密切相关。

关键词: *edt1*突变体; 抗旱; 光合作用; 活性氧

在全球三大谷物中, 玉米的总产量与平均单产均居世界首位。通过系统分析, 人们发现干旱是限制中国玉米生产发展和产量提高的第一要素(胡瑞法等2004)。研究表明, 干旱胁迫可显著影响植物的生长发育, 并严重降低粮食产量(Boyer 1982; Tollenaar和Lee 2002)。因此, 选育抗旱玉米品种、提高玉米对于干旱胁迫的耐受能力, 对维持我国的粮食产量、提高我国的粮食安全均具有重大意义。

植物在干旱胁迫下, 光合速率迅速下降, 质膜遭受过氧化损伤, 体内迅速启动多重调控机制以应对干旱胁迫, 其中主要包括提高抗氧化能力、调解渗透平衡、促进ABA的积累(Gong等2014; Shao等2016; Sah等2016)。研究指出, 不同的抗旱玉米品种其可能采取不同的分子调控机制(Avramova等2017)。一般而言, 玉米的抗旱能力与体内氧化还原平衡的调节过程密切相关, 一些ROS清除酶如SOD、POD、APX、CAT等在此过程中发挥了重要作用(Rong等2012)。此外, 干旱胁迫能够影响植物生理变化的多个方面, 其中对植物光合作用的影响尤为显著(Pinheiro等2011)。光系统II (PSII)是由一系列蛋白单体构成的复合物, 在植物的光合作用中发挥着重要作用(Wollman等1999)。在PSII反应中心, D1和D2蛋白能结合大多数氧化还原反应辅因子, 共同参与电子传递(Nelson和Yocum 2006)。干旱条件下, 干旱敏感型玉米编码捕光色素复合体(light harvesting complex, LHC)蛋白亚基

的 $lhca/B$ 基因表达下调, 导致光能的捕获和吸收过程受阻, 编码PSII蛋白复合物和ATP合成酶的相关基因也表达下调, PSII结合能力受损、电子传递机制受到抑制, 从而降低了植物的光合能力; 然而, 抗旱玉米品种体内上述基因的表达调控则正好相反(Min等2016)。

目前一般在玉米苗期进行抗旱性筛选与鉴定, 该方法具有时间短、可控性强等优点(Avramova等2016)。化学诱变剂甲基磺酸乙酯(EMS)广泛用于创造作物新种质, 在玉米遗传资源创造方面也已取得良好效果(刘治先等1998; 李海军等2002)。本实验选用EMS诱变玉米自交系‘郑58’花粉, 经田间抗旱性筛选得到抗旱突变体 ems drought tolerance1 (*edt1*), 以*edt1*突变体M₄代与‘郑58’为实验材料, 分别测定两者在中度(moderate drought stress, MS)和重度(severe drought stress, SS)干旱胁迫下ROS的产生与清除、质膜受损程度以及光合能力的变化, 并结合PSII相关基因和抗氧化酶活相关基因的表达调控分析, 初步解析*edt1*突变体的抗旱机制, 为进一步克隆*EDT1*基因、研究其对玉米抗旱能力的调节作用奠定基础。

收稿 2017-04-07 修定 2017-12-29

资助 国家重点研发计划课题(2016YFD0101002)和科技支疆项目(201491140)。

* 共同通讯作者: 赵军(zhaojun01@caas.cn)、林宏辉(hhlin@scu.edu.cn)。

1 材料与方法

1.1 材料的培养与处理

选择籽粒饱满、大小一致的玉米(*Zea mays* L.)种子,播种于长60 cm、宽20 cm的长方形塑料花盆中,每盆各播种10粒*edt1*突变体和‘郑58’种子,待玉米生长至三叶期,每盆各保留5棵生长基本一致的幼苗,并在中国农业科学院温室中继续培养,其中室温为27°C左右,光周期16 h/8 h,光照强度500~1 000 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$,相对湿度为40%~50%。病虫害的预防按照日常方法管理。

待幼苗生长到四叶期,开始进行干旱处理。分别设置中度干旱(MS)和重度干旱(SS) 2个干旱胁迫梯度,其中MS的土壤相对含水量控制在25%~30%,而SS的土壤相对含水量控制在15%~20%,采取称量盆重的方法以使幼苗处于稳定的干旱环境中,持续干旱1周后,开始测量各项指标。上述实验以正常浇水的幼苗为对照。

1.2 测定方法

1.2.1 叶片相对含水量的测定

称取约1 g玉米叶片,切成小块于称量瓶中,精确称取鲜重。将叶片放入蒸馏水中浸泡至恒重,为叶片的饱和鲜重。再将叶片于105°C烘烤15 min杀死植物细胞组织,于80~90°C下烘至恒重,称干重。叶片相对含水量(%)=(鲜重-干重) \times 100/(饱和鲜重-干重)。

1.2.2 相对电导率的测定

叶片质膜透性采用电导率法测定,具体方法参照Dionisio和Tobita (1998)的方法。相对电导率=原电导率/总电导率 \times 100%

1.2.3 过氧化氢(H_2O_2)含量测定

测定方法参照过氧化氢(H_2O_2)测定试剂盒(南京生物建成公司生产)。提取液的获取方法为称取0.5 g叶片,加磷酸盐缓冲液PBS (0.1 mol \cdot L $^{-1}$, pH 7.4) 2 mL,石英砂研磨,离心。

1.2.4 超氧阴离子自由基(O_2^-)含量的测定

测定方法采用植物超氧阴离子自由基(O_2^-)试剂盒(ELISA)测定(泉州市科诺迪生物科技有限公司生产)。提取液的获取方法为称取0.5 g叶片,加磷酸盐缓冲液PBS (0.1 mol \cdot L $^{-1}$, pH 7.4) 2 mL,液氮研磨,离心。

1.2.5 光合速率的测定

选取相同叶位的功能叶并采用CIRAS-2型光合仪(PP System, America)测定净光合速率(P_n , $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)、气孔导度(G_s , $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)、细胞间隙 CO_2 浓度(C_i , $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$)。测定条件如下: CO_2 浓度为360 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$,相对湿度为40%~50%,光照强度为1 000 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$,温度为27°C,测定时间为上午9:30~11:00。

1.2.6 叶绿素荧光参数的测定

选取相同叶位的功能叶并采用便携式植物荧光检测仪(Handy PEA, Hansatech Instrument Ltd, UK)测定PSII的最大光化学效率(the maximal efficiency of PSII photochemistry, F_v/F_m),测定光源为波长650 nm、光强3 000 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 的红光,荧光信号的记录时长为2 s,测定时间为晚上8:00~10:00。计算公式为 $F_v/F_m=(F_m-F_o)/F_m$,具体生理意义参照朱艳等(2007)方法。

1.2.7 植物总RNA的提取和表达分析

植物总RNA的获得采用RNAprep Pure植物总RNA提取试剂盒(天根生化科技有限公司),RNA反转录成cDNA参照TransScript One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix试剂盒(北京全式金生物技术有限公司);用7500荧光定量PCR仪检测相关基因的表达。引物序列如表1所示。

2 实验结果

2.1 干旱胁迫下玉米*edt1*突变体和‘郑58’的叶片相对含水量与相对电导率的变化

2.1.1 叶片相对含水量

叶片相对含水量(relative leaf water content, RLWC)可反映植物的水分亏损程度。如图1-A所示,在正常生长条件下,*edt1*突变体和‘郑58’的RLWC分别是93.0%和90.68%;中度干旱时,*edt1*突变体和‘郑58’的RLWC分别降低为68.30%和61.61%;在重度干旱胁迫下,突变体和‘郑58’的RLWC分别降低为58.20%和50.82%,此时*edt1*突变体的RLWC显著高于‘郑58’($P<0.05$)。上述结果说明,随着干旱胁迫的加重,2种材料的叶片相对含水量在逐渐下降,但*edt1*突变体叶片的保水能力较好。

表1 qRT-PCR引物序列
Table 1 qRT-PCR primer sequences

基因名称	编码蛋白	引物序列(5'→3')
<i>psbA</i>	PSII反应中心D1蛋白	Fw: GCTATGCATGGTTCTTGGT Rv: CTAAAGCAGTGAACCAGATC
<i>psbD</i>	PSII反应中心D2蛋白	Fw: TTCCGTGCTTTTAACCCAAC Rv: TTCCGTGCACGGATTTCCT
<i>lhcb3</i>	捕光色素叶绿素 a/b 结合蛋白LHCB3	Fw: GCTGGACTACCTCGGCAAC Rv: GAGAACATGGCGAGGCGGCC
<i>lhcb4</i>	捕光色素叶绿素 a/b 结合蛋白LHCB4	Fw: AGCAGAGGAAGGGACATTCA Rv: AGAGATTGTCGATGGGGCCG
<i>Apx</i>	抗坏血酸过氧化物酶APX蛋白	Fw: CCCATCCTATCCTACGCTGA Rv: GTCCTTGTGGCATCTTCCCA
<i>Mn-sod3</i>	超氧化物歧化酶Mn-SOD3蛋白	Fw: GCTGCTTACAAGGGTCTGG Rv: TTCTGTACTGCAGGTAGTA
<i>cat2</i>	过氧化氢酶CAT2蛋白	Fw: GGTTCCCGTCAAGTCTAC Rv: GCAGGCTCTCCGGTGGTGC
<i>cat3</i>	过氧化氢酶CAT3蛋白	Fw: GGACAGGAACGTGGACAAC Rv: TGCATCAAGTTCATGGCGCC

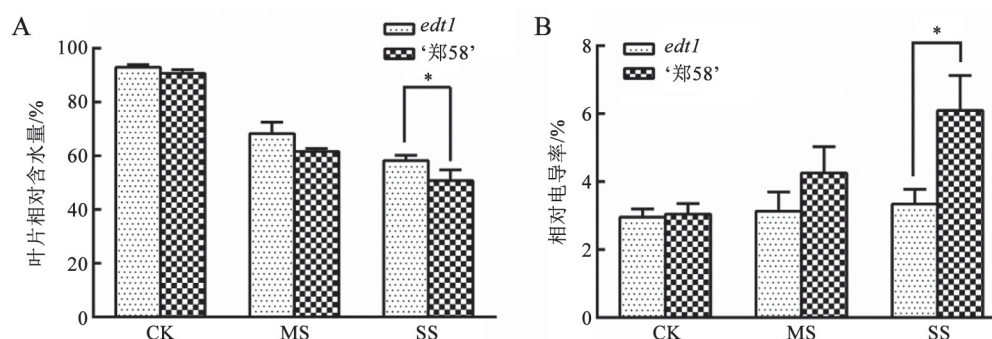


图1 干旱胁迫下玉米 $edt1$ 突变体与‘郑58’叶片相对含水量(A)与相对电导率(B)的变化

Fig.1 Changes in relative leaf water content (A) and relative conductivity (B) of maize $edt1$ mutant and ‘Zheng58’ under drought stress
数值代表3个重复的平均值±标准差(t -test, *: $P<0.05$; **: $P<0.01$). CK: 正常供水; MS: 中度干旱; SS: 重度干旱; 下图同此。

2.1.2 叶片的相对电导率

电解质渗透率的变化可直接反映细胞质膜遭受氧化伤害的程度。如图1-B所示, 随着干旱胁迫的加重, $edt1$ 突变体的相对电导率增幅较小。在重度干旱胁迫下, ‘郑58’的相对电导率显著高于 $edt1$ 突变体($P<0.05$), $edt1$ 突变体与‘郑58’比对照分别升高了19.99%和100.22%。上述结果说明, 干旱胁迫下, $edt1$ 突变体的质膜透性较低, 细胞膜完整性较好。

2.2 干旱胁迫下玉米 $edt1$ 突变体和‘郑58’的活性氧(ROS)含量变化

研究发现, 超氧阴离子自由基(O_2^-)和过氧化氢(H_2O_2)可反映植物在逆境胁迫下遭受过氧化伤

害的程度(Gill和Tuteja 2010)。如图2所示, 在正常生长条件下, 2种材料叶片中 O_2^- 和 H_2O_2 含量较低。中度干旱时, ‘郑58’的 O_2^- 含量显著高于 $edt1$ 突变体($P<0.05$), 其中‘郑58’的 O_2^- 含量相比对照条件下增加了63.20%, $edt1$ 突变体则升高了6.21%; 而 $edt1$ 突变体和‘郑58’的 H_2O_2 含量分别升高了34.7%和15.19%, 两者间无显著性差异。在重度干旱胁迫下, ‘郑58’的 O_2^- 和 H_2O_2 含量均显著高于 $edt1$ 突变体($P<0.05$)。上述结果说明, 在相同的干旱胁迫下, $edt1$ 突变体植物体内ROS的积累量较低。

2.3 干旱胁迫下玉米 $edt1$ 突变体和‘郑58’的光合能力变化

为分析 $edt1$ 突变体在干旱胁迫下光合能力的

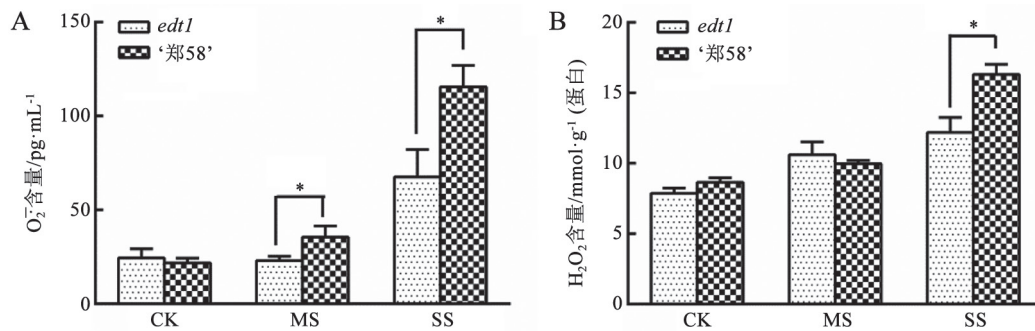


图2 干旱胁迫下玉米*edt1*突变体和‘郑58’叶片超氧阴离子自由基含量(A)与过氧化氢含量(B)的变化
Fig.2 Changes in the contents of O₂⁻ (A) and H₂O₂ (B) in maize *edt1* mutant and ‘Zheng58’ under drought stress

变化, 本研究分别测定了在中度和重度干旱胁迫下2种材料的净光合速率(P_n)、气孔导度(G_s)与胞间CO₂浓度(C_i)的变化。结果显示, 在中度干旱胁迫下, *edt1*突变体的 P_n 要显著高于‘郑58’ ($P < 0.05$); 在重度干旱胁迫下, 2种材料的净光合速率分别下降了86.5%和98.9%, 此时‘郑58’的 P_n 几乎降为零, 而*edt1*突变体还维持一定的 P_n 值(图3-A)。以上结果说明, 在干旱胁迫下, *edt1*突变体光合作用具有较强的耐受能力。

研究发现, 干旱胁迫可降低叶片的 G_s (Chaves

等2003)。中度干旱胁迫下‘郑58’的 G_s 迅速下降, 此时*edt1*突变体的 G_s 显著高于‘郑58’ ($P < 0.05$); 进一步的分析发现, 重度干旱胁迫下, *edt1*突变体和‘郑58’分别下降了87.0%和91.6% (图3-B)。上述结果说明, 干旱胁迫条件下*edt1*突变体的气孔关闭较为缓慢, 从而维持自身较高的光合速率。

如图3-C所示, 随着干旱胁迫的加重, *edt1*突变体的 C_i 呈现出先降低后升高的趋势, 在重度干旱胁迫下, *edt1*突变体的 C_i 要极显著低于‘郑58’ ($P < 0.01$), 而‘郑58’在2种干旱胁迫下 C_i 则分别升高了28.02%

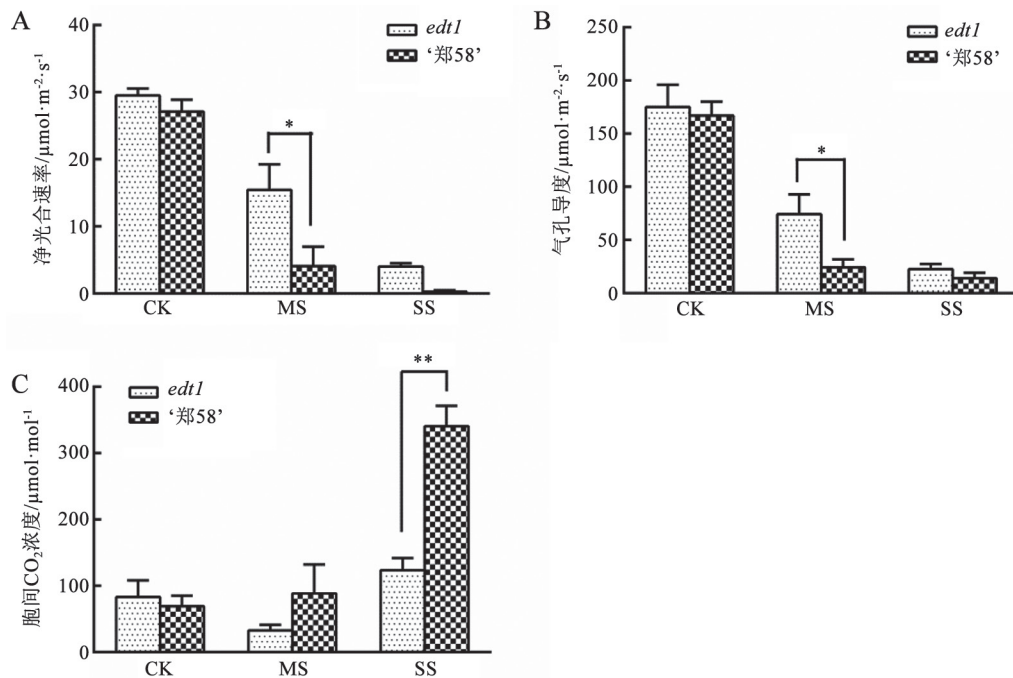


图3 干旱胁迫下玉米*edt1*突变体与‘郑58’叶片净光合速率(A)、气孔导度(B)、胞间CO₂浓度(C)的变化
Fig.3 Changes in net photosynthetic rate (A), stomatal conductance (B) and intercellular CO₂ concentration (C) of maize *edt1* mutant and ‘Zheng58’ under drought stress

和393.24%。事实上,胞间 CO_2 浓度越高,暗示进入胞内参与光合作用暗反应的 CO_2 数量越少(Chaves等2009)。以上结果说明,2种材料胞间 CO_2 的变化趋势不同, $edt1$ 突变体在干旱胁迫下的 CO_2 利用效率更高,因此可维持较高的光合能力。

2.4 干旱胁迫下玉米 $edt1$ 突变体和‘郑58’的 F_v/F_m 变化

为分析两材料在干旱胁迫下PSII的光反应活性,本研究测定了不同干旱胁迫下植物PSII最大光能转化效率(F_v/F_m)的变化。结果显示,随着干旱胁迫的加重, $edt1$ 突变体的 F_v/F_m 下降较为缓慢。在重度干旱胁迫下, $edt1$ 突变体的 F_v/F_m 显著高于‘郑58’($P<0.05$)。上述结果说明,在干旱胁迫下, $edt1$ 突变体PSII的光反应活性较高,具有较高的光能转化与电子传递效率。

2.5 干旱胁迫下玉米 $edt1$ 突变体和‘郑58’的抗旱相关基因的表达分析

2.5.1 光合基因表达

$psbA$ 和 $psbD$ 是编码PSII反应中心D1和D2蛋白的重要基因。如图5-A和B所示,在中度干旱条件下, $edt1$ 突变体与‘郑58’ $psbA$ 、 $psbD$ 两基因的表达量均上调,但 $edt1$ 突变体 $psbA$ 的表达量显著高于

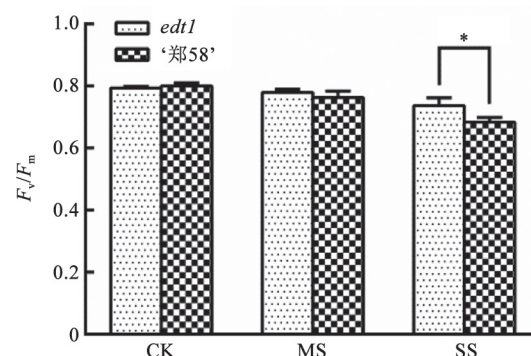


图4 干旱胁迫下玉米 $edt1$ 突变体与‘郑58’ F_v/F_m 的变化
Fig.4 Changes in F_v/F_m of maize $edt1$ mutant and ‘Zheng58’ under drought stress

‘郑58’($P<0.05$);在重度干旱胁迫下,与对照相比, $edt1$ 突变体 $psbA$ 、 $psbD$ 的表达量均升高,而‘郑58’两基因的表达量均下降。上述结果说明,在中度和重度干旱胁迫下, $edt1$ 突变体仍具有较高的PSII反应中心基因表达水平。

$lhcb3$ 、 $lhcb4$ 是编码PSII捕光色素复合体(LH-CII)组成蛋白的重要基因。如图5-C和D所示,在中度干旱胁迫下, $edt1$ 突变体两基因的表达量均极显著高于‘郑58’($P<0.01$),并且中度干旱诱导 $edt1$ 突

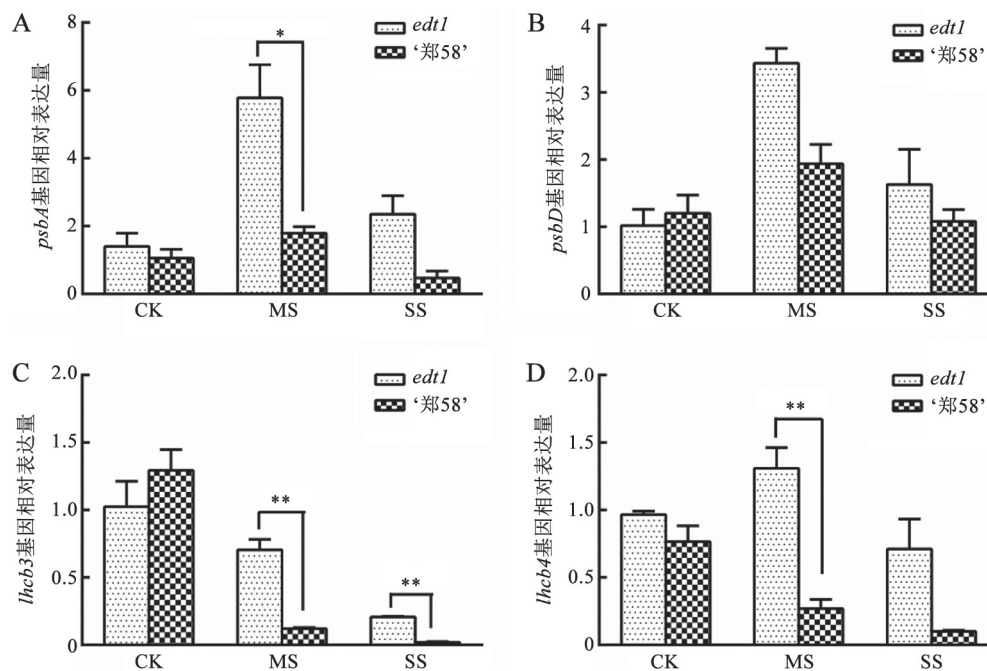


图5 干旱胁迫下玉米 $edt1$ 突变体与‘郑58’ $psbA$ (A)、 $psbD$ (B)、 $lhcb3$ (C)和 $lhcb4$ (D)基因表达分析

Fig.5 Gene expression analysis of $psbA$ (A), $psbD$ (B), $lhcb3$ (C) and $lhcb4$ (D) of maize $edt1$ mutant and ‘Zheng58’ under drought stress

变体的*lhcb4*基因表达上调,而‘郑58’两基因的表达均下降。事实上,*lhcb3*和*lhcb4*在调控PSII光能捕获与吸收的过程中发挥着重要功能,并且*lhcb4*与植物的光保护机制密切相关。上述结果说明,在干旱胁迫下,*edt1*突变体的光能捕获基因具有较高水平的表达。

2.5.2 抗氧化酶基因表达

研究表明,在叶绿体中过表达*Mn-sod3*基因能显著提高玉米对质膜与PSII的保护作用(Breusegem等1999)。如图6-A所示,中度干旱胁迫下,*edt1*突变体和‘郑58’的*Mn-sod3*基因表达均上调;重度干旱胁迫下,*edt1*突变体的*Mn-sod3*表达量显著高于‘郑58’($P<0.05$),其中突变体相比对照升高了71.97%,而‘郑58’的表达量则下降。上述结果说明,重度干旱胁迫下,*edt1*突变体的*Mn-sod3*基因仍具有较高水平的表达。

如图6-B所示,中度干旱诱导*edt1*突变体和‘郑58’的抗坏血酸过氧化物酶基因(*apx*)表达上调;而在重度干旱胁迫下,*edt1*突变体的表达量显著高于‘郑58’($P<0.05$),其中*edt1*突变体升高了30.36%,而‘郑58’的表达量则下降。上述结果说明,中度干旱

诱导*apx*基因表达上调,增强作物抗旱能力;重度干旱胁迫下,*edt1*突变体的*apx*仍具有较高的表达水平。

研究表明,过氧化氢酶(catalase, CAT)是控制植物体内 H_2O_2 水平与植物细胞氧化还原平衡的重要酶类(Gill和Tuteja 2010)。如图5-C所示,随着干旱胁迫的加重,*edt1*突变体的*cat2*表达量逐渐升高,而‘郑58’则逐渐下降。在2种干旱胁迫下,*edt1*突变体的*cat2*表达量均极显著高于‘郑58’($P<0.01$)。*cat3*基因的表达变化如图5-D所示,中度干旱诱导*edt1*突变体的*cat3*基因表达上调,而‘郑58’在两种干旱胁迫下均下降。并且在中度和重度干旱胁迫下,*edt1*突变体的表达量均极显著高于‘郑58’($P<0.01$)。上述结果说明,在干旱胁迫下,*edt1*突变体的*cat*基因转录活性较高,在维持植物体中 H_2O_2 平衡方面发挥重要作用。

3 讨论

植物遭受干旱胁迫时,可在生理及分子水平做出快速响应,以阻止光合原件发生不可逆的伤害(Chaves等2003)。干旱胁迫下,植物气孔关闭、

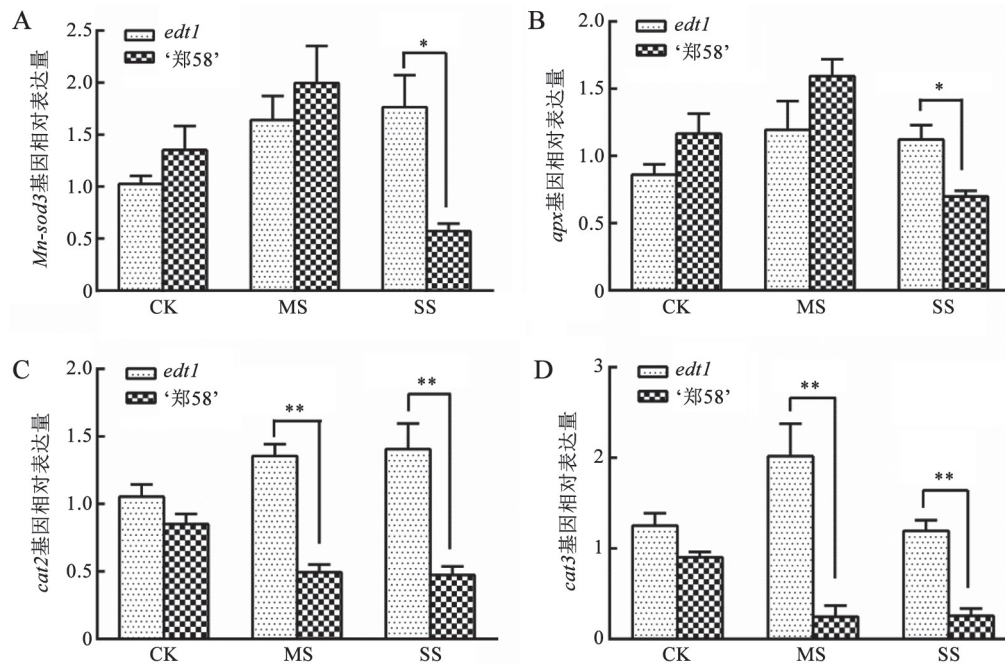


图6 干旱胁迫下玉米*edt1*突变体与‘郑58’抗氧化酶基因*Mn-sod3* (A)、*apx* (B)、*cat2* (C)和*cat3* (D)表达分析
Fig.6 Gene expression analysis of antioxidant enzyme genes including *sod3.1* (A), *apx* (B), *cat2* (C) and *cat3* (D) of maize *edt1* mutant and ‘Zheng58’ under drought stress

叶绿体中CO₂浓度降低,致使植物体内发生光氧化胁迫,产生过多的ROS,是造成膜质过氧化、破坏细胞质膜完整性的重要因素(Posch和Bennett 2009; Gollery等2004)。质膜透性是反应细胞质膜破坏程度的重要指标,叶片的相对电导率越低,耐旱性越强,反之则越弱(彭云玲等2012)。本文结果显示,随着干旱胁迫的加重,两材料的气孔导度逐渐下降,胞间CO₂逐渐升高(图3),并且过氧化氢和超氧阴离子自由基含量逐渐上升(图2),说明在干旱胁迫下,两材料体内发生光氧化胁迫,致使ROS积累量增加。但*edt1*突变体叶片的相对含水量较高,相对电导率增幅较小(图1),气孔导度下降缓慢(图3),说明在干旱胁迫下,*edt1*突变体叶片的保水能力较好,细胞质膜完整性较高,植物体内遭受过氧化胁迫较轻。研究发现,逆境胁迫下,植物细胞的存活与ROS清除密切相关,植物体通过启动抗氧化防御系统与增加抗氧化酶活,保护植物细胞免受氧化胁迫伤害,提高植物的抗旱能力(Gill和Tuteja 2010; Boaretto等2014)。本文结果显示,在重度干旱胁迫下,*edt1*突变体的过氧化氢和超氧阴离子自由基含量均显著低于‘郑58’(图2)。与‘郑58’相比,干旱胁迫可显著诱导*edt1*突变体的*cat2*、*cat3*、*apx*及*Mn-sod3*等ROS清除相关酶的编码基因表达(图6),这表明*edt1*突变体的ROS清除能力与相关酶活基因表达上调密切相关。这可能是两玉米品种在相同的干旱胁迫条件下,*edt1*突变体质膜受损较轻,体内ROS积累量较低的重要原因。事实上,干旱可激活酶依赖性的抗氧化防御系统(Anjum等2017)。目前已有较多关于植物抗氧化酶活与植物抗旱性密切相关的报道。例如,野生型西瓜品种M₂₀在干旱胁迫下体中H₂O₂和O₂⁻含量较少,是由于增大了自身抗氧化酶的活力和相关抗旱基因的表达(Mo等2016)。山咖啡能够在适度的干旱范围内,通过调控自身的抗氧化系统,提高抗氧化酶的活性,来抵御外界干旱(Srivastava和Srivastava 2015)。棕榈植物的抗旱性,可以通过激活酶活相关或非酶活的抗氧化系统,减轻植物本身所受活性氧伤害(Silva等2016)。

干旱胁迫可破坏PSII,后者参与调节电子传递速率和光化学效率,以影响CO₂同化速率(高杰等1991)。干旱胁迫显著降低PSII相关基因的转录水

平,从而减少PSII组件,以阻止光合原件的光合-氧化作用(Hayano等2009)。研究表明,在中度干旱条件下,*edt1*突变体的净光合速率和气孔导度均显著高于‘郑58’(图3),说明*edt1*突变体在干旱胁迫下具有较强的光合能力与自身气孔因素的调节密切相关。为进一步研究*edt1*突变体的抗旱能力及其抗旱机制,本研究通过测定玉米的叶绿素荧光参数发现,随着干旱胁迫的加重,2种材料的F_v/F_m逐渐下降(图4),但*edt1*突变体的F_v/F_m在重度干旱胁迫下显著高于‘郑58’,这表明干旱胁迫下*edt1*的PSII活性中心受损较小、光反应活性较高,从而具有较高的光能捕获与转化效率,说明*edt1*突变体在干旱胁迫下具有较高的光合能力与PSII具有较高的光反应活性等非气孔因素密切相关。通过上述分析,说明干旱胁迫下,*edt1*突变体具有较高的光合速率是由气孔因素和非气孔因素相互影响的结果。

本研究对PSII相关基因转录水平的分析也证明了这一点。中度干旱能够诱导突变体的*psbA*和*psbD*基因显著上调,而‘郑58’的*lhcb3*和*lhcb4*基因则显著下调,说明干旱胁迫下突变体能够通过调节相关基因的表达,加速PSII自身修复以维持光电子运转(图5)。这与前人报道的干旱或高温胁迫下,植物通过提高*psbA*基因的表达量加速PSII自身修复,从而提高自身对逆境胁迫的耐受能力的观点相一致(Bi等2016)。通过在烟草中过表达玉米的*psbA*基因,植物体内抗氧化系统、光合作用和抗旱相关基因的表达水平均被协同调解,进而显著提高自身的抗旱能力(Huo等2015)。此外,Lhcb4蛋白在PSII中具有重要的光保护作用,该蛋白可与类囊体光保护蛋白PsbS相互作用,与植物的能量分配、热耗散密切相关(Teardo等2007; Bianchi等2011)。本研究表明,中度干旱诱导*edt1*突变体的*lhcb4*表达上调,而‘郑58’则显著下降(图5-D),这可能是*edt1*突变体在干旱胁迫下维持较高光化学效率的重要原因。在干旱胁迫下,PSII耗散过剩光能的能力较强,具有更强的自我保护与调控能力。

干旱已成为目前影响农作物生长的一个重要因子,提高农作物品种的抗旱能力具有重要应用意义。本研究证明,在干旱胁迫下,*edt1*突变体具有较高的光合速率与ROS清除能力,这可能与PSII相关基因及ROS清除酶相关基因表达上调、从而

加速植物体中PSII的修复和清除植物体内过多的ROS密切相关。本研究分别从生理变化及基因调控两方面对*edt1*突变体的抗旱能力做了初步的分析与探讨,但对于该突变体*edt1*对光合作用与ROS的具体调控机制有待于深入研究。为了深入了解*edt1*对植物抗旱能力的具体调控机制,接下来还需克隆该基因并开展功能验证工作。

参考文献(References)

- Anjum SA, Ashraf U, Tanveer M, et al (2017). Drought induced changes in growth, osmolyte accumulation and antioxidant metabolism of three maize hybrids. *Front Plant Sci*, 8: 69
- Avramova V, Abdelgawad H, Vasileva I, et al (2017). High antioxidant activity facilitates maintenance of cell division in leaves of drought tolerant maize hybrids. *Front Plant Sci*, 8: 84
- Avramova V, Nagel KA, Abdelgawad H, et al (2016). Screening for drought tolerance of maize hybrids by multi-scale analysis of root and shoot traits at the seedling stage. *J Exp Bot*, 67 (8): 2453–2466
- Bi AY, Fan JB, Hu ZR, et al (2016). Differential acclimation of enzymatic antioxidant metabolism and photosystem II photochemistry in tall fescue under drought and heat and the combined stresses. *Front Plant Sci*, 7: 453
- Bianchi SD, Betterle N, Kouril R, et al (2011). *Arabidopsis* mutants deleted in the Light-Harvesting Protein Lhcb4 have a disrupted Photosystem II macrostructure and are defective in photoprotection. *Plant Cell*, 23 (7): 2659–2679
- Boaretto LF, Carvalho G, Borgo L, et al (2014). Water stress reveals differential antioxidant responses of tolerant and non-tolerant sugarcane genotypes. *Plant Physiol Biochem*, 74: 165–175
- Boyer JS (1982). Plant productivity and environment. *Science*, 218: 443–448
- Breusegem FV, Slooten L, Stassart JM, et al (1999). Effects of overproduction of tobacco MnSOD in maize chloroplasts on foliar tolerance to cold and oxidative stress. *J Exp Bot*, 50 (330): 71–78
- Chaves MM, Flexas J, Pinheiro C (2009). Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Ann Bot*, 103 (4): 551–560
- Chaves MM, Maroco JP, Pereira JS (2003). Understanding plant responses to drought—from genes to the whole plant. *Funct Plant Biol*, 30: 239–264
- Dionisio MLS, Tobita S (1998). Antioxidant responses of rice seedlings to salinity stress. *Plant Sci*, 135 (1): 1–9
- Gao J, Li QF, Xue JQ, et al (2016). Physiological compensation mechanism of photosystem II in maize leaves induced by drought stress and re-watering condition. *Plant Physiol J*, 52 (9): 1413–1420 (in Chinese with English abstract) [高杰, 李青凤, 薛吉全等(2016). 干旱复水激发玉米叶片光系统II性能的生理补偿机制. *植物生理学报*, 52 (9): 1413–1420]
- Gill SS, Tuteja N (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol Biochem*, 48 (12): 909–930
- Gollery M, Breusegem FV, Mittle R, et al (2004). Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci*, 9 (10): 490–498
- Gong F, Yang L, Tai F, et al (2014). “Omics” of maize stress response for sustainable food production: opportunities and challenges. *Omics J Integ Biol*, 18 (12): 714–732
- Hayano KC, Calderón VC, Ibarra LE, et al (2009). Analysis of gene expression and physiological responses in three Mexican maize landraces under drought stress and recovery irrigation. *PLoS ONE*, 4 (10): e7531
- Hu RF, Meng ECH, Zhang SH, et al (2004). Prioritization for maize research and development in China. *Sci Agri Sin*, 37 (6): 781–787 (in Chinese with English abstract) [胡瑞法, Meng ECH, 张世煌等(2004). 采用参与式方法评估中国玉米研究的优先序. *中国农业科学*, 37 (6): 781–787]
- Huo Y, Wang M, Wei Y, et al (2015). Overexpression of the maize *psbA* gene enhances drought tolerance through regulating antioxidant system, photosynthetic capability, and stress defense gene expression in tobacco. *Front Plant Sci*, 6: 1223
- Li HJ, Chi SM, Liu ZZ, et al (2002). Studies on reform of corn inbred line by EMS. *J Maize Sci*, 10 (3): 36–37 (in Chinese with English abstract) [李海军, 池书敏, 刘志增等(2002). 利用EMS化学诱变改造玉米自交系的研究. *玉米科学*, 10 (3): 36–37]
- Liu ZX, Wright AD, Chang MT (1998). Induced mutations and genetic analysis on high oleic acid content of maize. *Acta Agron Sin*, 24 (4): 447–451 (in Chinese with English abstract) [刘治先, Wright AD, Chang MT (1998). 高油酸玉米突变体的诱导和遗传分析. *作物学报*, 24 (4): 447–451]
- Min H, Chen C, Wei S, et al (2016). Identification of drought tolerant mechanisms in maize seedlings based on transcriptome analysis of recombination inbred lines. *Front Plant Sci*, 7: 1080
- Mo YL, Yang RP, Liu LH, et al (2016). Growth, photosynthesis and adaptive responses of wild and domesticated watermelon genotypes to drought stress and subsequent re-watering. *Plant Growth Regul*, 79 (2): 229–241
- Nelson N, Yocum CF (2006). Structure and function of photosystems I and II. *Annu Rev Plant Biol*, 57: 521–565
- Peng YL, Wang T, Li Y, et al (2012). Effects of drought stress on physiological characteristics of drought-tolerant line

- and drought-sensitive line in maize at seeding stage. *Prata Sci*, 29 (9): 1401–1406 (in Chinese with English abstract) [彭云玲, 王涛, 李燕等(2012). 干旱胁迫对玉米耐旱自交系与旱敏感自交系苗期生理特性的影响. *草业科学*, 29 (9): 1401–1406]
- Pinheiro C, António C, Ortuño MF, et al (2011). Initial water deficit effects on *Lupinus albus* photosynthetic performance, carbon metabolism, and hormonal balance: metabolic reorganization prior to early stress responses. *J Exp Bot*, 62 (14): 4965–4974
- Posch S, Bennett LT (2009). Photosynthesis, photochemistry and antioxidative defence in response to two drought severities and with re-watering in *Allocasuarina lehmannii*. *Plant Biol*, 11: 83–93
- Rong ZY, Zhang XH, Yang SL, et al (2012). Involvement of antioxidant defense system in enhancement of drought resistance in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) plants through circular drought-hardening. *Plant Physiol J*, 48 (7): 705–713 (in Chinese with English abstract) [荣智媛, 张晓海, 杨双龙等(2012). 抗氧化系统参与循环锻炼提高烟草植株抗旱性的形成. *植物生理学报*, 48 (7): 705–713]
- Sah SK, Reddy KR, Li JX (2016). Abscisic acid and abiotic stress tolerance in crop plants. *Front Plant Sci*, 7: 571
- Shao HF, Chen Z, Xu JY, et al (2016). Physiological responses of two tobacco cultivar leaves to different drought stresses during seedling stage. *Plant Physiol J*, 52 (12): 1861–1871 (in Chinese with English abstract) [邵慧芳, 陈征, 许嘉阳等(2016). 两种烟草幼苗叶片对不同强度干旱胁迫的生理响应比较. *植物生理学报*, 52 (12): 1861–1871]
- Silva PA, Oliveira IV, Rodrigues KCB, et al (2016). Leaf gas exchange and multiple enzymatic and non-enzymatic antioxidant strategies related to drought tolerance in two oil palm hybrids. *Trees*, 30 (1): 203–214
- Srivastava S, Srivastava M (2015). Growth response and antioxidant enzyme activity of *Cassia occidentalis* exposed to soil moisture stress. *Biolife*, 3: 519–523
- Teardo E, de Laureto PP, Bergantino E, et al (2007). Evidences for interaction of PsbS with photosynthetic complexes in maize thylakoids. *Biochim Biophys Acta*, 1767 (6): 703–711
- Tollenaar M, Lee EA (2002). Yield potential, yield stability and stress tolerance in maize. *Field Crops Res*, 75: 161–169
- Wollman FA, Minai L, Nechushtai R (1999). The biogenesis and assembly of photosynthetic proteins in thylakoid membranes I. *Biochim Biophys Acta*, 1411 (1): 21–85
- Zhu Y, Tian YC, Ma JF, et al (2007). Relationship between chlorophyll fluorescence parameters and spectral reflectance characteristics in wheat leaves. *Acta Agron Sin*, 33 (8): 1286–1292 (in Chinese with English abstract) [朱艳, 田永超, 马吉锋等(2007). 小麦叶片叶绿素荧光参数与反射光谱特征的关系. *作物学报*, 33 (8): 1286–1292]

Dissection of drought tolerance mechanism in maize EMS mutant *edt1*

ZHAI Chen-Lei^{1,2}, LIU Wen-Juan^{2,3}, ZHANG Xia³, DING Wan-Hong⁴, TANG Yong⁴, LU Xiao-Duo², FENG Huai-Zhang⁴, ZHANG Chun-Yi², LIN Hong-Hui^{1,*}, ZHAO Jun^{2,*}

¹College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610064, China

²Biotechnology Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China

³Analysis and Determination Center, Sichuan Academy of Agricultural Sciences, Chengdu 610066, China

⁴Proving Ground, Xinjiang Academy of Agricultural Sciences, Urumchi 830012, China

Abstract: To screen and identify drought-tolerant maize varieties, and determine the mechanism of drought-tolerance in maize (*Zea mays*), a drought-tolerant mutant *edt1* which was obtained from drought-tolerance screening in the field was treated with moderate and severe drought. The results showed that the net photosynthesis (P_n) of *edt1* were higher than ‘Zheng58’ significantly, and the relative expression of PSII gene *psbA*, *lhcb3*, and *lhcb4* increased more significantly than ‘Zheng58’ under moderate drought. Under severe drought treatment, the membrane of *edt1* was only damaged slightly. In addition, the maximal efficiency of PSII photochemistry (F_v/F_m), the relative leaf water content and the ability of reactive oxygen species (ROS) scavenging were significantly higher than those in ‘Zheng58’ respectively. We furtherly found that the relative expression of antioxidant enzyme genes including *Mn-sod3*, *apx*, *cat2* and *cat3* increased more significantly than those in ‘Zheng58’ during severe drought condition. These results together provided a direct evidence that the *edt1* mutant was drought-tolerant and possesses more efficient ROS scavenging mechanism than ‘Zheng58’. Our data indicated that modulation of the expression of genes related to PSII active center, light-harvesting complex and antioxidant enzyme contributes to its drought tolerance in *edt1*.

Keywords: *edt1* mutant; drought tolerance; photosynthesis; reactive oxygen species

Received 2017-04-07 Accepted 2017-12-29

This work was supported by National Key Research and Development Program of China (2016YFD0101002) and Boost Program for the Development of Science and Technology in Xinjiang Uygur Autonomous Region (201491140).

*Co-corresponding authors: Zhao J (zhaojun01@caas.cn), Lin HH (hhlhlin@scu.edu.cn).