

DOI: 10.3724/SP.J.1006.2021.03027

质膜内在蛋白 ZmPIP1;1 参与玉米耐旱性和光合作用的功能分析

周 练 刘朝显 熊雨涵 周 京 蔡一林*

西南大学玉米研究所 / 农业科学研究院 / 南方山地作物逆境生物学国家级培育基地, 重庆 400715

摘 要: 质膜内在蛋白(plasma membrane intrinsic proteins, PIPs)是水通道蛋白主要亚家族成员之一, 在植物生长发育过程中具有重要调节功能。前期研究表明, 玉米 *ZmPIP1;1* 基因表达受到渗透和盐胁迫的强烈诱导, 但在玉米中的生物学功能尚不明确。本研究通过玉米遗传转化获得了 *ZmPIP1;1* 超表达转基因株系, 干旱胁迫实验揭示了 *ZmPIP1;1* 超表达转基因株系较野生型具有较低的水分散失率及较强的干旱胁迫耐性。转录组测序结果表明参与 ABA 生物合成及其信号通路相关基因的表达水平发生了显著变化。在田间正常生长条件下, *ZmPIP1;1* 超表达转基因植株与野生型在生长发育过程中没有明显差异, 但转基因玉米株系具有较高的光合效率, 粒宽和百粒重增加, 玉米单果穗的产量提高。此外, 通过荧光双分子互补实验观察到 ZmPIP1;1 和 ZmPIP2;6 蛋白在玉米叶肉细胞原生质体的细胞质膜和叶绿体膜上存在互作, 并且可能导致了 ZmPIP 蛋白的重定位。该研究为 *ZmPIP1;1* 分子机制的解析奠定了重要基础, 为玉米高光效分子设计育种开辟了新的途径。

关键词: 玉米; ZmPIP; 干旱胁迫; 光合作用; 重定位

Functional analysis of plasma membrane intrinsic protein ZmPIP1;1 involved in drought tolerance and photosynthesis in maize

ZHOU Lian, LIU Chao-Xian, XIONG Yu-Han, ZHOU Jing, and CAI Yi-Lin*

Maize Research Institute / Academy of Agricultural Sciences / State Cultivation Base of Crop Stress Biology for Southern Mountainous Land, Southwest University, Chongqing 400715, China

Abstract: Plasma membrane intrinsic protein (PIP) is one of the main subfamily of aquaporin regulates diverse physiology functions during plant growth and development. In previous research, the expression of *ZmPIP1;1* was induced by osmosis or salt stress. However, the biological function of *ZmPIP1;1* was still unclear in maize. In this study, *ZmPIP1;1* overexpressed transgenic plants were obtained and exhibited less water loss rate and enhanced drought tolerance compared to wild type. Transcriptome sequencing indicated significant changes in the expression levels of genes involved in ABA biosynthesis and its signaling pathways. Photosynthetic activity, kernel width and kernel weight was increased in *ZmPIP1;1* overexpression maize, but not growth under normal condition compared with wild type. Moreover, interaction between ZmPIP1;1 and ZmPIP2;6 was observed by bi-molecular fluorescence complementation (BiFC) experiment, resulting in re-localized on plasma membrane and chloroplast in maize mesophyll protoplast. Our study laid an important foundation for understanding the molecular mechanism of *ZmPIP1;1*, and provided a new method of molecular breeding for high photosynthetic efficiency.

Keywords: maize; ZmPIP; drought stress; photosynthesis; re-localization

全球气候变暖导致极端天气和水资源缺乏的加剧, 也极大的影响了植物的生长和繁殖, 对于玉米生产来说更是巨大的威胁^[1]。在农业生产力大幅提高的迫切需求下, 通过育种和遗传工程增强植物对

非生物胁迫的耐性以及优化植物光合效率成为提高农作物产量的关键^[2-3]。水通道蛋白(aquaporins, AQPs)属于主要内在蛋白(major intrinsic proteins, MIPs)超家族, 在植物膜系统中广泛存在, 是植物运

本研究由国家自然科学基金项目(31601312)资助。

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (31601312).

* 通信作者(Corresponding author): 蔡一林, E-mail: caiyilin1789@163.com

第一作者联系方式: E-mail: zhoulianjojo@swu.edu.cn

Received (收稿日期): 2020-05-14; Accepted (接受日期): 2020-09-13; Published online (网络出版日期): 2020-10-06.

URL: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1809.S.20200930.1638.010.html>

输水分和 CO₂ 在内的小分子的主要通道^[4-7]。质膜内在蛋白(plasma membrane intrinsic proteins, PIPs)作为 AQPs 主要亚家族成员之一, 在植物水分调节和光合作用中具有重要作用。因此, 研究玉米 PIPs 在响应水分胁迫及光合作用中的功能对于增强玉米抗逆性和提高玉米产量具有重要意义。

高等植物中 AQPs 有 5 个主要的亚家族: 质膜内在蛋白(PIPs)、液泡膜内在蛋白(tonoplast intrinsic proteins, TIPs)、NOD26 相似内在蛋白(nodulin26-like intrinsic proteins, NIPs)、小分子碱性内在蛋白(small basic intrinsic proteins, SIPs)和未鉴定的膜内在蛋白(X Intrinsic proteins, XIPs)^[8-14]。其中 PIPs 在植物水分运输和分布上具有重要作用。PIPs 具有非常典型 AQPs 结构, 包含由 5 个环(A-E)相连接的 6 个跨膜 α 螺旋^[15]。其中第 2、3 跨膜结构域之间的 B 环和第 5、6 跨膜结构域之间的 E 环分别包含 1 个保守的 NPA(天冬氨酸-脯氨酸-丙氨酸, Asn-Pro-Ala)基序, 这个基序对于 PIPs 水分选择通道的形成非常关键^[7-8]。基于序列的相似性, PIPs 又能进一步分为 PIP1 和 PIP2 两个亚类, 其中 PIP1 的 C 端序列相比 PIP2 较短。报道称部分 PIP1 能够与 PIP2 互作, 从而表现更有效的水分通道活性或导致亚细胞重定位^[16-20]。植物基因组中 AQPs 数量庞大, 玉米中含有 31 个 AQPs^[9]。此多样性也反映出 AQPs 在植物多个生理生化过程中具有重要功能。PIPs 作为最重要的 AQPs 亚家族, 在响应植物水分胁迫和光合作用中具有巨大的潜力。研究发现, 植物在受到干旱或其他非生物胁迫时, 部分 PIPs 的转录水平会发生改变, 这可能揭示其在植物水分平衡调控中的作用^[21]。例如拟南芥、葡萄和杨树中, 干旱胁迫会诱导部分 *PIP* 基因的表达上调, 同时部分 *PIP* 基因表达下调或维持不变^[18,22-23]。随着基因工程和功能基因组学的发展, 在拟南芥、烟草、香蕉或人参等不同植物中, 超表达特定的 *PIP* 能够增强植物对干旱胁迫的耐性^[24-27], 为揭示植物水分关系的潜在机制提供了有效的方式。相比 PIPs 作为水分通道的功能研究, PIPs 对于 CO₂ 等小分子物质通道活性的研究较少。植物中, CO₂ 是光合作用速率的限制因素, 因此 AQPs 调控 CO₂ 在膜上透性的生理过程同样至关重要。研究发现, 烟草中降低 *NtAQP1* 的表达会导致叶肉细胞减少对 CO₂ 的吸收, 从而降低光合作用^[28]。水稻中超表达 *HvPIP2;1* 能够增加胞内 CO₂ 导度和叶绿体中 CO₂ 浓度, 导致光合速率增加^[29]。拟南芥 *AtPIP1;2*

突变后能够限制胞内 CO₂ 导度和光合效率^[30]。上述研究报道说明, 挖掘 *PIP* 基因在提高植物对水分胁迫的耐性和光合效率中的功能具有可行性。

玉米作为典型的 C₄ 植物, 是世界主要的粮经饲作物。玉米基因组中共有 13 个 ZmPIPs, 包括 6 个 ZmPIP1 和 7 个 ZmPIP2 亚类蛋白^[9]。前期研究表明, 玉米 *ZmPIP1;1* 和 *ZmPIP2;6* 的表达受到渗透和盐胁迫的诱导, 在拟南芥中超表达 *ZmPIP1;1* 或 *ZmPIP2;6* 基因能增强拟南芥对干旱和盐胁迫的耐性^[27,31], 但 ZmPIP 在玉米中的生物学功能尚不清楚。

本研究通过对 *ZmPIP1;1* 超表达转基因玉米(C01 背景)的干旱胁迫耐性进行鉴定, 分析转基因玉米中转录组测序结果以及 ABA 合成和信号通路的差异表达基因, 测定转基因玉米的光合指标以及籽粒粒宽、粒重等产量相关性状, 鉴定与 ZmPIP1;1 互作的蛋白, 解析 ZmPIP1;1 在玉米干旱胁迫耐性和光合作用中的重要功能。

1 材料与方法

1.1 *ZmPIP1;1* 超表达株系的获得与鉴定

以玉米 B73 叶片 cDNA 为模板, 通过 PCR 扩增 *ZmPIP1;1* 的全长 cDNA 序列并测序验证, 将正确的序列连接到含有 Ubiquitin 启动子的双元转化载体 pCAMBIA3301 (由西南大学玉米研究所提供并改造), 并将载体转化到农杆菌菌株 EHA105 中。玉米遗传转化委托中国种子集团有限公司生命科学技术中心完成, 自交系玉米 C01 是本研究中玉米遗传转化的受体材料。转基因后代通过 PCR、qRT-PCR 和测序进行鉴定, 其中 PCR 鉴定引物的上游引物位于载体启动子末端区域, F1: 5'-CTTGGATGATGGCATATGCAGCAG-3', 下游引物位于终止子前端区域, R1: 5'-TCTGTTGAATTACGTTAAGCATGTAA-3'。

1.2 干旱胁迫处理

土培干旱实验在温室进行, 使用 T₃ 代玉米转基因材料的 3 个独立株系及野生型 C01。玉米种子表面消毒后在装有腐殖质的小盆中萌发, 萌发 7 d 的幼苗移栽至拌有缓释肥的大花盆中。2 周大的幼苗开始进行干旱处理, 连续 15 d 不浇水; 正常对照每 3 d 浇 1 次水。

检测基因表达所进行的干旱处理在光照培养室进行, 使用 T₃ 代玉米转基因材料的 3 个独立株系及野生型。玉米种子表面消毒后在装有腐殖质的小盆中萌发, 萌发 7 d 的幼苗移栽至营养液中进行水培,

使用的是改良后的 1/2 Hoagland 溶液^[27]。野生型和转基因玉米在水培条件下培养至 2 周大, 干旱处理时将野生型和转基因玉米从水培液取出并放置在培养室的实验台滤纸上, 放置 2 h。

1.3 相对地上部分生物量和水分散失率测定

分别将对照和干旱处理的野生型和转基因玉米植株的地上部分剪下, 称量鲜重。将干旱处理后植株的地上部分鲜重与对照植株的地上部分鲜重相比取百分比值, 即为相对地上部分生物量。正常土培条件下生长 2 周的野生型和转基因玉米植株, 摘下第 3 片完全展开叶放在通风橱的滤纸上, 6 h 内每小时分别称鲜重。水分散失率通过不同时间点的样品鲜重进行计算。

1.4 转录组测序

采集 2 周大的野生型和转基因玉米的第 3 片完全展开叶, 提取总 RNA 的方法参考之前实验^[31], 进行转录组测序分析。测序和组装的详细过程由百迈客公司(中国)进行。采用 2 倍相对变化阈值和 $FDR < 0.01$ 检验差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs)的显著性, 计算每项的基因数, 进行数据库 DEGs 到同源组聚类(clusters of orthologous groups, COG)的分析。通过与转录组背景序列比对, 找到 DEGs 显著富集的 COG, 并绘制保守序列的 COG 功能分类图。所有与 KEGG (kyoto encyclopedia of genes and genomes)数据库相关的 DEGs 均被绘制成通路富集分析图。每个测序材料 3 个生物学重复。

1.5 qRT-PCR

分别将 2 周大的对照和干旱处理的野生型和转基因玉米的第 3 片完全展开叶快速采集, 并在液氮里冷冻, 放置在 -80°C 保存。提取总 RNA 并逆转录得到 cDNA, 方法参考之前实验^[31]。设计定量引物时, 避开 ZmPIPs 蛋白序列中的保守序列。qRT-PCR 中利用玉米 *ZmACTIN1* 基因在各个 cDNA 样品中的表达量作为内参, 样品间同一基因的相对表达量通过下列公式计算: $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 。

1.6 气体交换测定

选择大田中 T_3 长势一致的转基因玉米和野生型植株, 测定最新的玉米完全展开叶, 每个处理 4 个生物学重复, 测量在下午 2:00 进行。叶片的气体交换通过开放气体交换系统 Li-6400 (LI-COR) 进行测定。光合作用通过 $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 的饱和光照和 $400 \mu\text{mol mol}^{-1}$ 的叶周 CO_2 进行诱导。叶片温度保持在 30°C , 叶-气蒸气压差在所有测量过程中保持在 2~4 kPa 左右。

1.7 玉米籽粒表型分析

大田实验连续 2 年分别在校外北碚和合川试验基地进行。野生型和转基因玉米采用重复分段种植, 玉米种子通过肥团萌发育苗, 将生长一致的玉米幼苗移栽到田间, 在自然条件下正常生长整个生长季。玉米籽粒性状调查统计各采用 30 个果穗, 分别测量玉米籽粒的十粒长、十粒宽、百粒重、每穗粒数、每穗粒重等指标。

1.8 亚细胞定位

以玉米 B73 叶片 cDNA 为模板, 通过 PCR 扩增 *ZmPIP1;1* 和 *ZmPIP2;6* 的全长 CDS 序列并测序验证, 连接到双分子荧光互补载体 pDOE-3^[32], 构建 *ZmPIP1;1* 和 *ZmPIP2;6* 分别在载体两端的表达载体 pDOE-*ZmPIP1;1*-*ZmPIP2;6* 和 pDOE-*ZmPIP2;6*-*ZmPIP1;1*。将 2 个表达载体和质膜定位标记载体 PM107^[33] 分别通过 PEG 介导共转化玉米原生质体^[34]。在激光共聚焦显微镜 (LSM800, Carl Zeiss) 下观察荧光。

2 结果与分析

2.1 *ZmPIP1;1* 超表达转基因玉米的获得与鉴定

扩增 *ZmPIP1;1* 全长 cDNA 序列, 构建含有玉米 Ubiquitin 启动子的双元表达载体 (图 1-A), 通过玉米遗传转化得到 *ZmPIP1;1* 的玉米转基因株系。 T_1 代转基因玉米株系通过 PCR 进行鉴定, 其中 1~4 号电泳结果含有目标片段, 测序验证其为转基因阳性株系 (图 1-B)。通过 qRT-PCR 方法对 T_3 代转基因阳性株系的 *ZmPIP1;1* 基因的表达量进行检测 (图 1-C), 其中 3 个表达量较高的独立株系 Oe1~Oe3 用于本研究后续实验。

2.2 *ZmPIP1;1* 超表达转基因玉米耐旱性鉴定

2 周大的野生型和 *ZmPIP1;1* 超表达转基因玉米在温室进行干旱处理。正常条件下, 野生型和转基因玉米生长情况无差异。干旱条件下, 野生型表现出植株生长迟缓、叶片卷曲和萎焉等干旱胁迫表型。相比野生型, 转基因植株生长受抑制程度较轻, 叶片卷曲程度也较轻 (图 2-A)。分别测定对照和干旱处理后玉米植株地上部分鲜重, 并计算相对地上部分生物量。结果显示, 干旱处理后野生型植株的地上部分鲜重约为对照的 29%, 而干旱处理后转基因玉米植株的地上部分鲜重约为对照的 76% (图 2-B)。水分散失率测定结果显示, 叶片放置 6 h 后, 野生型叶片相比原始鲜重其水分散失约 24%, 而转基因玉米叶片相比原始鲜重水分散失率低于 18% (图 2-C)。

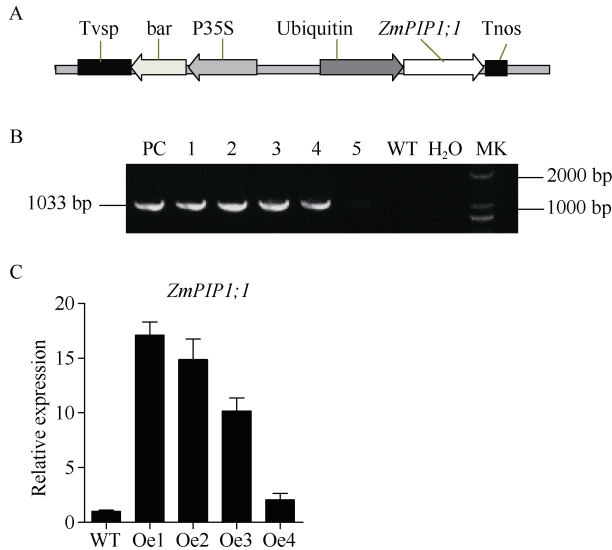


图 1 *ZmPIP1;1* 超表达转基因玉米的检测

Fig. 1 Identification of *ZmPIP1;1* overexpressed transgenic maize

A: *ZmPIP1;1* 超表达载体的 T-DNA 序列示意图。B: *ZmPIP1;1* 超表达 T₁ 代转基因株系的 PCR 检测; 1~5: 独立的转基因株系; MK: DNA marker; PC: 质粒正对照; WT: 野生型。C: 4 个独立的 *ZmPIP1;1* 超表达 T₃ 代转基因株系的 qRT-PCR 分析。

A: schematic illustration of T-DNA sequence of *ZmPIP1;1* overexpression vector. B: PCR detection of T₁ generation of *ZmPIP1;1* overexpression transgenic lines; 1~5: five independent transgenic lines; MK: DNA marker; PC: positive control; WT: wild type. C: qRT-PCR analysis of four representative *ZmPIP1;1* overexpressed transgenic lines.

上述结果说明超表达 *ZmPIP1;1* 基因能够增强玉米植株对干旱胁迫的耐性。

2.3 *ZmPIP1;1* 超表达转基因玉米中胁迫响应基因的表达分析

野生型和 *ZmPIP1;1* 超表达转基因玉米分别进行转录组测序及分析。相比野生型, 转基因玉米中基因组转录水平上有 2595 个基因发生显著变化, 其中超过半数基因表达上调(1344 个基因), 其余的基因表达则下调(1251 个基因)。与 COG 数据库对比查询, 发现有 920 个 unigene 被分类在 25 个 COG 类群中, 其中包含 117 个 unigene 的“信号传导机制”为最大类群, 其次为包含 111 个 unigene 的“碳水化合物的运输与代谢”类群(图 3)。

在 KEGG 众多通路中, ABA 生物合成与信号通路在响应非生物胁迫过程中起着重要作用。qRT-PCR 检测结果发现, 在正常条件下, 转基因玉米中 ABA 生物合成过程中的关键基因 *ZmNCED9-1* 和 *ZmNCED9-2* 的表达量显著低于野生型; 在干旱

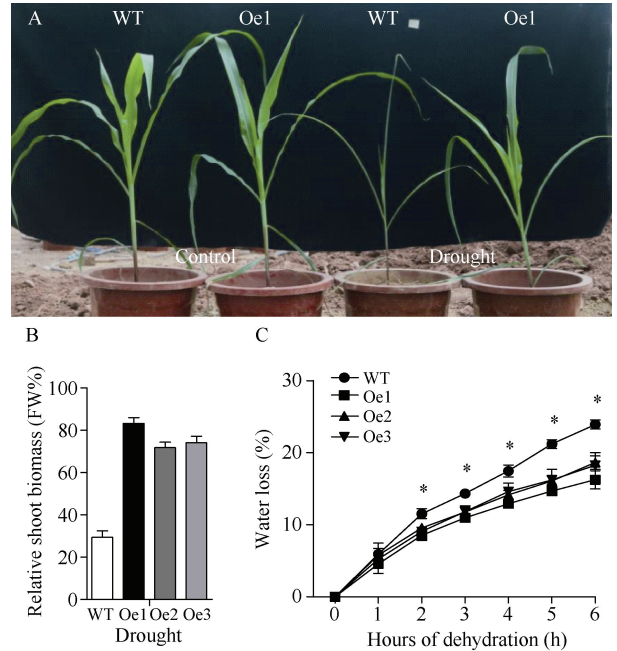


图 2 *ZmPIP1;1* 超表达转基因植株在干旱处理下的表型以及水分散失率

Fig. 2 Phenotypes and water loss rate of *ZmPIP1;1* overexpressed transgenic lines under drought treatment

A: 野生型和 *ZmPIP1;1* 超表达转基因玉米干旱处理 15 d 的表型。B: 土培干旱处理后不同基因型植株与正常条件下相比的相对地上部分生物量, 数值为 4 个生物学重复的平均值, 误差线为标准误差。C: 野生型和 *ZmPIP1;1* 超表达转基因株系叶片水分散失率的检测。*表示转基因玉米叶片的水分散失率相比野生型在 $P < 0.01$ 水平差异显著。

A: phenotype of WT and *ZmPIP1;1* overexpressed transgenic maize under drought stress treatment for 15 days. B: relative shoot biomass of different genotypes grown in soil with the indicated treatments, compared with normal conditions. Values are means of four biological replicates with error bars indicating standard derivations (SD). C: determination of water loss from detached leaves of WT and *ZmPIP1;1* overexpressed transgenic line. Values followed by * are significantly different at $P < 0.01$.

条件下, 转基因玉米中 *ZmNCED9* 和 *ZmABA1* 的表达量显著高于野生型。正常条件下转基因玉米中 *ZmAAO3* 的表达量高于野生型, 但在干旱条件下却没有差异(图 4-A)。此外, 在正常和干旱条件下, ABA 信号通路上的关键基因 *ZmPYL2* 和 *ZmABI5* 在转基因玉米中的表达量都要显著高于野生型。而与野生型相比, 转基因玉米中 *ZmABF1* 在干旱条件下表达量增加, 而 *ZmSnRK3* 在正常条件下表达量增加(图 4-B)。上述结果都说明超表达 *ZmPIP1;1* 改变了正常和干旱条件下胁迫响应基因的表达, 这也暗示着 *ZmPIP1;1* 可能在 ABA 响应胁迫过程中起重要作用。

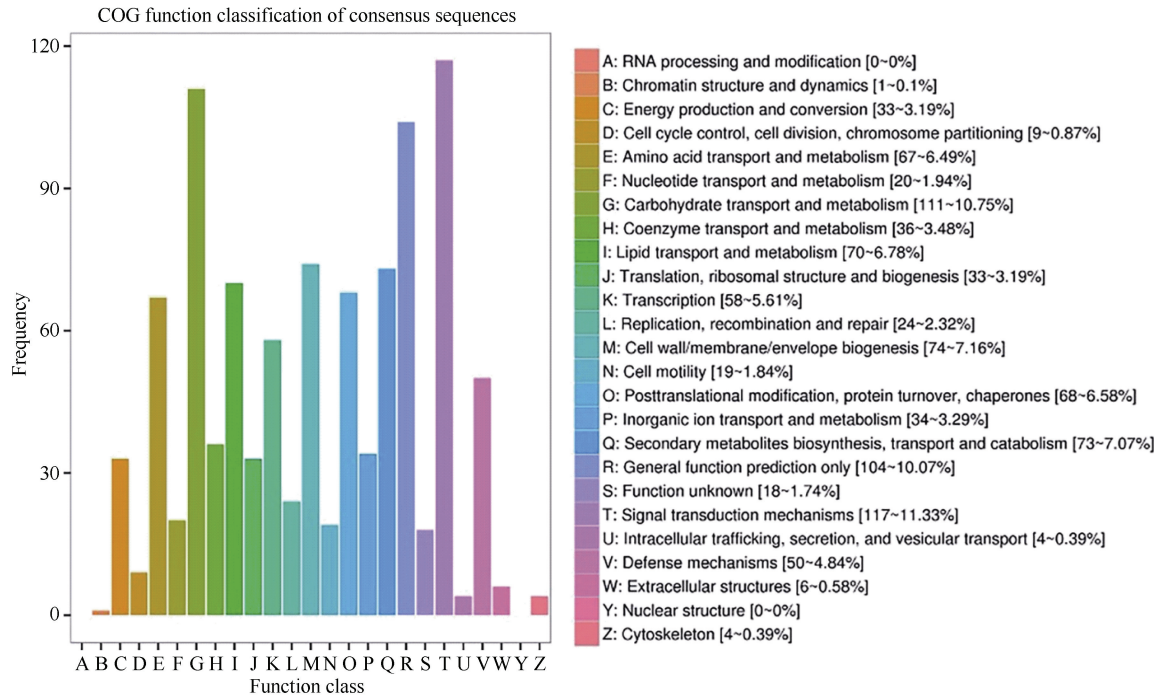


图 3 保守序列的聚类同源组(COG)的功能分类

Fig. 3 Clusters of orthologous groups (COG) function classification of consensus sequences

T 和 G 柱分别代表“信号传导机制”和“碳水化合物运输和代谢”。

T and G columns represent the functions of “signal transduction mechanisms” and “carbohydrate transport and metabolism”, respectively.

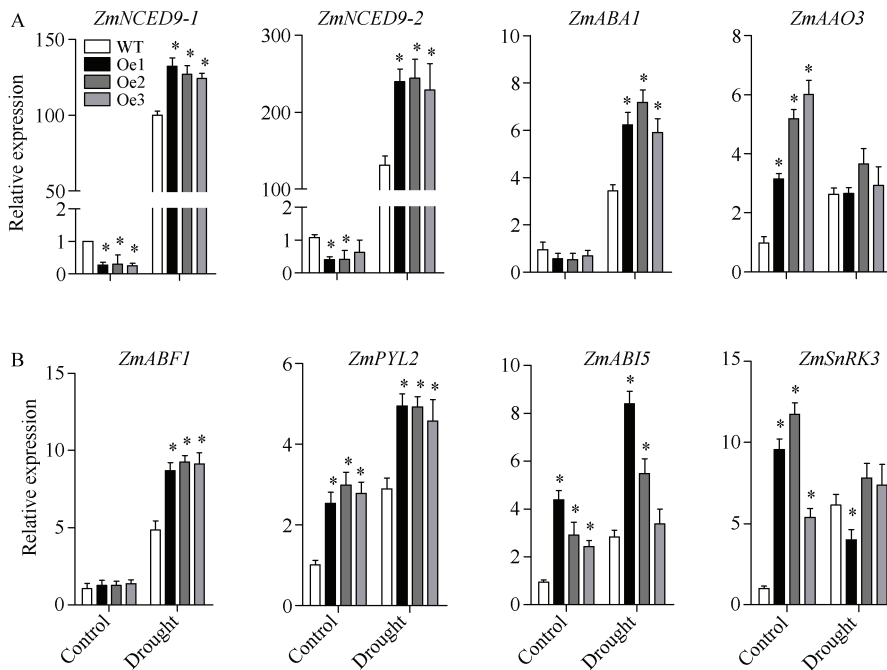


图 4 玉米 ABA 生物合成与信号通路的关键基因的表达分析

Fig. 4 Relative expression level of key genes involved in ABA biosynthesis and its signaling pathway

正常和干旱胁迫条件下野生型和 *ZmPIP1;1* 超表达株系叶中(A)参与 ABA 合成的 *ZmNCED9-1*、*ZmNCED9-2*、*ZmABA1* 和 *ZmAAO3* 基因; (B)参与 ABA 信号通路的 *ZmABF1*、*ZmPYL2*、*ZmABI5* 和 *ZmSnRK3* 基因的表达。所有数据为 3 个生物学重复, 误差线代表 SD。*表示转基因株系与野生型的基因表达水平在 $P < 0.01$ 时差异显著。 *ZmACT1* 的表达作为内参。

The relative expression level of (A) *ZmNCED9-1*, *ZmNCED9-2*, *ZmABA1*, and *ZmAAO3* involved in ABA biosynthesis (B) *ZmABF1*, *ZmPYL2*, *ZmABI5*, and *ZmSnRK3* involved in ABA signaling pathway in leaves of the WT and *ZmPIP1;1* overexpressed lines under normal and drought stress treatments. Data are means of three biological replicates with error bars indicating standard deviations (SD). Values followed by asterisk are significantly different at $P < 0.01$. *ZmACT1* was used as the internal control.

2.4 *ZmPIP1;1* 超表达转基因玉米的光合作用测定

为了检测超表达 *ZmPIP1;1* 对玉米植株光合作用的影响, 在大田实验中通过光合测定仪 (LI-6400) 对野生型和 *ZmPIP1;1* 超表达转基因植株进行测定。大田中二者的生长情况没有差异, 但光合测定结果显示, 转基因植株净同化率 (net assimilation rate, A_N) 显著高于野生型, 而胞间 CO_2 浓度 (substomatal concentration of CO_2 , C_i) 较野生型则显著降低 (图 5)。该结果表明超表达 *ZmPIP1;1* 能够提高玉米植株的光合活力。

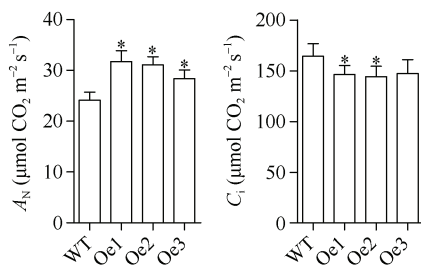


图 5 野生型和 *ZmPIP1;1* 超表达转基因玉米植株的 A_N 和 C_i
Fig. 5 A_N and C_i of WT and *ZmPIP1;1* overexpressing transgenic maize plants

所有数据为平均值 \pm 标准误 ($n = 4$); *表示转基因玉米植株的 A_N 和 C_i 相比野生型在 $P < 0.01$ 水平差异显著。

All data are means \pm standard deviations (SD) ($n = 4$). Values followed by asterisk are significantly different at $P < 0.01$.

2.5 *ZmPIP1;1* 超表达转基因玉米籽粒表型分析

野生型和 *ZmPIP1;1* 超表达转基因玉米在田间生长情况无差异。对不同材料籽粒的粒长、粒宽和粒重等产量相关性状进行统计分析。结果显示, 转基因玉米和野生型的十粒长和每穗粒数没有差异, 但转基因玉米的十粒宽、每穗粒重和百粒重相比野生型均显著增加 (图 6-A, B)。该结果显示超表达 *ZmPIP1;1* 能够增加玉米籽粒大小从而导致籽粒粒重的增加。

2.6 *ZmPIP1;1* 与 *ZmPIP2;6* 的 BiFC 交互验证

通过 BiFC 实验检测 *ZmPIP1;1* 是否与 *ZmPIP2* 亚类蛋白之间存在交互。结果表明 *ZmPIP1;1* 与 *ZmPIP2;6* 分别位于 pDOE-3 的 N 端和 C 端, 都能检测到绿色荧光蛋白信号, 并且该信号与质膜标记的红色荧光蛋白和叶绿体自发红色荧光信号重叠 (图 7)。前期研究表明 *ZmPIP1;1* 定位在细胞质膜和内质网, *ZmPIP2;6* 定位在细胞质膜^[27,31]。实验结果表明, *ZmPIP1;1* 与 *ZmPIP2;6* 在细胞质膜和叶绿体膜上存在交互。这可能是由于 *ZmPIP* 亚类蛋白间的交互从

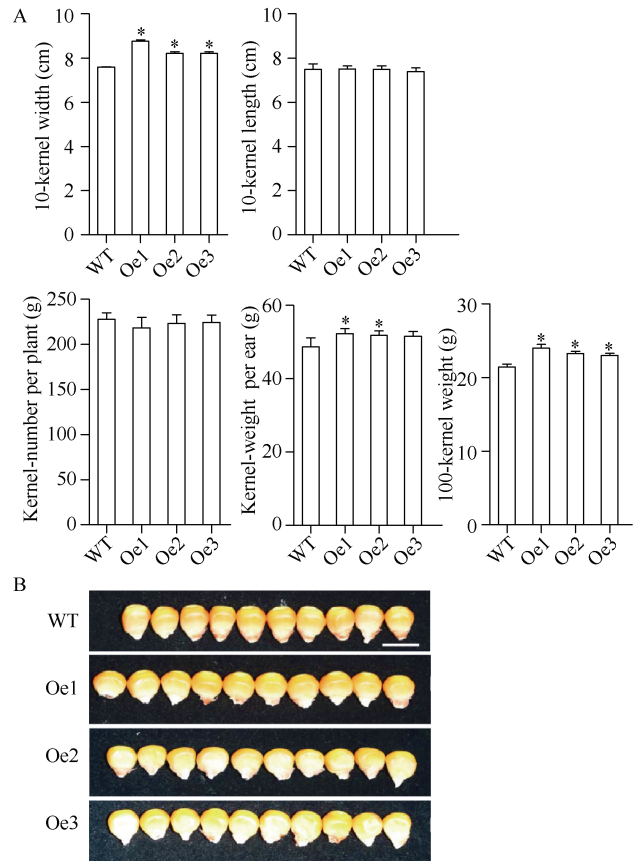


图 6 *ZmPIP1;1* 超表达转基因玉米籽粒的表型鉴定

Fig. 6 Phenotypic characterization of *ZmPIP1;1* overexpressed transgenic maize kernel

野生型和 *ZmPIP1;1* 转基因玉米籽粒表型测定 (A) 和照片 (B)。*表示转基因玉米籽粒的十粒宽、每穗粒重和百粒重相比野生型在 $P < 0.01$ 水平差异显著。标尺为 1 cm。

Phenotypic determination (A) and photograph (B) of *ZmPIP1;1* overexpressed transgenic maize kernel. Values followed by asterisk are significantly different at $P < 0.01$. Bar = 1 cm.

而导致 *ZmPIP* 在亚细胞水平上的重定位。*ZmPIP1;1* 与其他 *ZmPIP2* 亚类蛋白的交互也进行了检测, 但没有观察到荧光信号。由此推测, *ZmPIP1;1* 通过与 *ZmPIP2;6* 相互作用被转运至叶绿体膜, 从而在光合作用 CO_2 的运输及利用中发挥着关键作用。

3 讨论

PIPs 是由遗传多样性丰富的质膜内在蛋白组成的蛋白家族, 在植物发育过程中参与水分和光合作用调节。本文中, 我们对玉米 *ZmPIP1;1* 参与玉米干旱胁迫耐性和光合作用进行了研究。通过玉米遗传转化获得 *ZmPIP1;1* 超表达玉米转基因株系, 其相比野生型具有更低的水分散失率, 并表现出增强的干旱胁迫耐性 (图 2)。转录组测序分析显示 *ZmPIP1;1* 超表达转基因玉米中“信号传导机制”和“碳水化合物

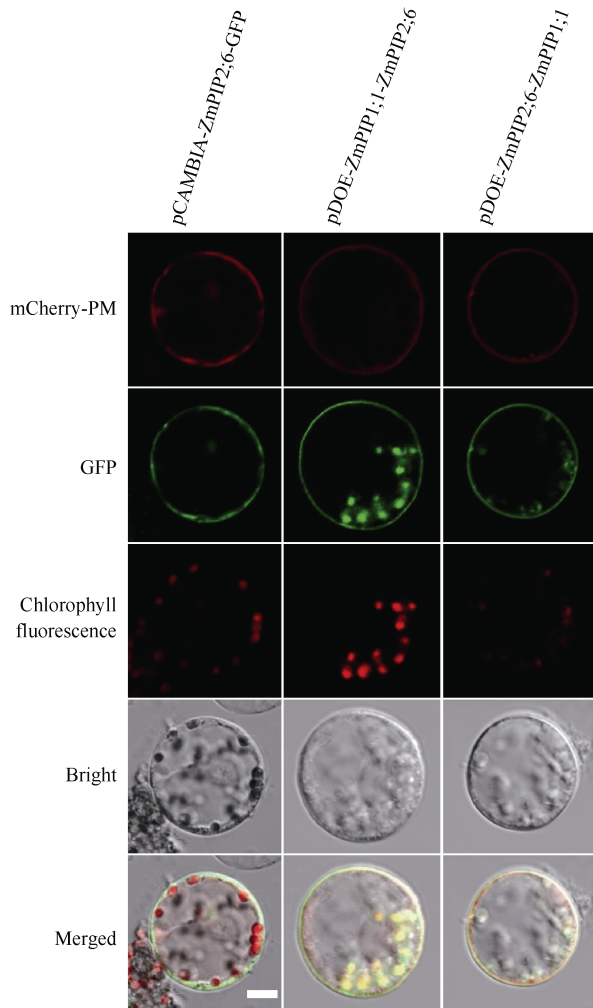


图 7 玉米原生质体中 *ZmPIP1;1* 与 *ZmPIP2;6* 的 BiFC 实验观察

Fig. 7 Observation of BiFC experiment of *ZmPIP1;1* and *ZmPIP2;6* in maize protoplasts

pCambia-*ZmPIP2;6*-GFP, pDOE-*ZmPIP1;1*-*ZmPIP2;6* 和 pDOE-*ZmPIP2;6*-*ZmPIP1;1* 载体与 mCherry 标记的质膜标记(mCherry-PM; CD3-1007)共定位。标尺为 20 μm 。

pCambia-*ZmPIP2;6*-GFP, pDOE-*ZmPIP1;1*-*ZmPIP2;6*, and pDOE-*ZmPIP2;6*-*ZmPIP1;1* were co-localized with a mCherry-labeled plasma membrane marker (mCherry-PM; CD3-1007). Bar = 20 μm .

物运输与代谢”类群中多个基因的表达发生变化(图 3)。进一步分析 104 个 KEGG 通路,发现“植物激素信号传导”通路的差异表达基因 DEGs 数量最多(数据未显示)。ABA 在信号和调控植物响应包括干旱胁迫的非生物胁迫中起着关键作用^[35]。研究显示,在 *ZmPIP1;1* 超表达转基因植株中,ABA 生物合成和信号通路上的部分胁迫响应基因的表达发生了改变。ABA 生物合成通路中的 2 个与拟南芥 *NCED* 基因^[36]同源的 *ZmNCED9* 以及 ABA 信号通路上的 *ZmPYL2* 和 *ZmABI5* 的表达,在转基因玉米中都显著

上调(图 4)。气孔运动会对 CO_2 浓度产生响应,也会受到保卫细胞 ABA 信号通路的调控^[37-38]。ABA 可通过诱导气孔导度和叶肉导度的快速降低从而响应水分的缺乏^[39]。我们研究结果显示, *ZmPIP1;1* 超表达转基因玉米植株更易受到 ABA 生物合成和信号通路基因的响应,并且超表达 *ZmPIP1;1* 导致玉米植株 A_N 增加和 C_i 降低。上述结果表明 *ZmPIP1;1* 可能通过 ABA 信号通路的调节参与植物干旱胁迫响应和光合作用。

前人研究表明,在不同植物中,PIPs 家族成员表达变化都能改变植物对 CO_2 的透性。烟草中超表达 *NaAQPI* 能通过增加叶肉导度、 CO_2 扩散和 A_N , 从而提高正常和盐胁迫条件下的产量^[40]。水稻突变体 *ospip1;1* 的气孔导度和叶肉导度显著降低,说明 *OsPIP1;1* 突变改变植株的 CO_2 透性^[41]。玉米 *ZmPIP1;5* 和 *ZmPIP1;6* 分别在酵母和爪蟾卵母细胞中表达时都显示出水分和 CO_2 的通道活性,说明这两个 *ZmPIP* 都能促进 CO_2 扩散并可能影响光合作用中的碳同化率^[42]。本研究中, *ZmPIP1;1* 超表达转基因玉米相比野生型显示出更高的 A_N 和更低的 C_i (图 5)。值得注意的是,转基因玉米籽粒的粒宽和粒重较野生型也显著增加(图 6)。前人研究显示,大豆中超表达 *GmPIP1;6* 和拟南芥中超表达 *PgTIP1* 都能显著增加种子大小^[43-44],说明该基因的功能在植物进化过程中具有保守性。粒宽是玉米与产量和籽粒外观相关的最重要的性状之一。玉米籽粒大小不仅是产量的组成成分,还与种子装载和种子活力等密切相关。水通道蛋白在植物细胞生长发育中至关重要,不仅影响植物细胞扩增,在种子装载和种子活力上也起着关键作用^[45-47]。我们研究显示,超表达 *ZmPIP1;1* 能增加玉米植株的光合活性,也能增加玉米粒宽从而增加籽粒尺寸。这可能反映出更高的净同化率,但也可能表明种子装载的库限制可通过增加种子装载过程中的水分透性从而得以增加^[47]。

植物 PIPs 通常都定位在细胞质膜,少部分 PIPs 定位在细胞其他部位,例如 *NtAQPI* 定位在叶绿体^[28]。PIPs 定位在叶绿体,可能与光合作用中 PIPs 对水分和 CO_2 运输和使用的关键作用相关。PIPs 亚类蛋白间可能通过互作,增强 PIPs 的水分透性或导致 PIPs 的亚细胞重定位。例如, *ZmPIP1;2* 和 *ZmPIP2;1* 在爪蟾卵母细胞中通过互作提高其对于水分转运的效率^[16];当 *ZmPIP1* 与 *ZmPIP2* 亚类蛋白在玉米原生质体中单独表达时,两者分别定位在内质

网和细胞质膜, 而当 ZmPIP1 与 ZmPIP2 共表达时, ZmPIP1 则重定位在细胞质膜, 并且细胞中 ZmPIP1 通过与 ZmPIP2 互作从内质网运输到细胞质膜, 在水分运输中行使通道功能^[17]。前期研究表明 ZmPIP1;1 定位在细胞质膜和内质网^[27], ZmPIP2;6 定位在细胞质膜^[31]。BiFC 实验结果显示, ZmPIP1;1 与 ZmPIP2;6 在细胞质膜和叶绿体膜上存在互作(图 7)。推测可能由于 ZmPIP1;1 与 ZmPIP2;6 的互作从而引起 ZmPIP 在亚细胞水平上重定位, 进而导致 ZmPIP 发挥功能的组织部位发生改变, 这也可能与 ZmPIP 在光合作用中 CO₂ 的通道活性的重要功能有关。

4 结论

本研究发现 ZmPIP1;1 在玉米水分关系调节和光合作用中的重要作用, 超表达 *ZmPIP1;1* 基因能够增强玉米的干旱胁迫耐性、光合活性并增加玉米籽粒大小。研究还发现 ZmPIP1;1 可能通过亚类蛋白间互作从而导致 ZmPIP 蛋白在亚细胞水平的重定位。本研究为解析 ZmPIP 在玉米中的作用分子机制奠定了基础, 为玉米高光效分子设计育种提供了新的基因资源。

References

- [1] Yu C. China's water crisis needs more than words. *Nature*, 2011, 470: 307.
- [2] Long S P, Zhu X G, Naidu S L, Ort D R. Can improvement in photosynthesis increase crop yields? *Plant Cell Environ*, 2006, 29: 315–330.
- [3] Nowicka B, Ciura J, Szymanska R, Kruk J. Improving photosynthesis, plant productivity and abiotic stress tolerance—current trends and future perspectives. *J Plant Physiol*, 2018, 231: 415–433.
- [4] Chaumont F, Moshelion M, Daniels M J. Regulation of plant aquaporin activity. *Biol Cell*, 2005, 97: 749–764.
- [5] Maurel C. Plant aquaporins: novel functions and regulation properties. *FEBS Lett*, 2007, 581: 2227–2236.
- [6] Kaldenhoff R, Ribas-Carbo M, Sans J F, Lovisolo C, Heckwolf M, Uehlein N. Aquaporins and plant water balance. *Plant Cell Environ*, 2008, 31: 658–666.
- [7] Chaumont F, Tyerman S D. Aquaporins: highly regulated channels controlling plant water relations. *Plant Physiol*, 2014, 164: 1600–1618.
- [8] Chaumont F, Barriau F, Wojcik E, Chrispeels M J, Jung R. Aquaporins constitute a large and highly divergent protein family in maize. *Plant Physiol*, 2001, 125: 1206–1215.
- [9] Johanson U, Karlsson M, Johansson I, Gustavsson S, Sjovall S, Fraysse L, Weig A R, Kjellbom P. The complete set of genes encoding major intrinsic proteins in *Arabidopsis* provides a framework for a new nomenclature for major intrinsic proteins in plants. *Plant Physiol*, 2001, 126: 1358–1369.
- [10] Ishibashi K. Aquaporin superfamily with unusual npa boxes: S-aquaporins (superfamily, sip-like and subcellular-aquaporins). *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 2006, 52: 20–27.
- [11] Maurel C, Verdoucq L, Luu D T, Santoni V. Plant aquaporins: membrane channels with multiple integrated functions. *Annu Rev Plant Biol*, 2008, 59: 595–624.
- [12] Danielson J A, Johanson U. Unexpected complexity of the aquaporin gene family in the moss *Physcomitrella patens*. *BMC Plant Biol*, 2008, 8: 45–59.
- [13] Bienert G P, Bienert M D, Jahn T P, Boutry M, Chaumont F. Solanaceae XIPs are plasma membrane aquaporins that facilitate the transport of many uncharged substrates. *Plant J*, 2011, 66: 306–317.
- [14] Kammerloher W, Fischer U, Piechotka G P, Schaffner A R. Water channels in the plant plasma membrane cloned by immunoselection from a mammalian expression system. *Plant J*, 1994, 6: 187–199.
- [15] Murata K, Mitsuoka K, Hirai T, Walz T, Agre P, Heymann J B, Engel A, Fujiyoshi Y. Structural determinants of water permeation through aquaporin-1. *Nature*, 2000, 407: 599–605.
- [16] Fetter K, Van Wilder V, Moshelion M, Chaumont F. Interactions between plasma membrane aquaporins modulate their water channel activity. *Plant Cell*, 2004, 16: 215–228.
- [17] Zelazny E, Borst J W, Muylaert M, Batoko H, Hemminga M A, Chaumont F. FRET imaging in living maize cells reveals that plasma membrane aquaporins interact to regulate their subcellular localization. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104: 12359–12364.
- [18] Vandeleur R K, Mayo G, Shelden M C, Gilliam M, Kaiser B N, Tyerman S D. The role of plasma membrane intrinsic protein aquaporins in water transport through roots: diurnal and drought stress responses reveal different strategies between isohydric and anisohydric cultivars of grapevine. *Plant Physiol*, 2009, 149: 445–460.
- [19] Chen W, Yin X, Wang L, Tian J, Yang R, Liu D, Yu Z, Ma N, Gao J. Involvement of rose aquaporin RhPIP1;1 in ethylene-regulated petal expansion through interaction with RhPIP2;1. *Plant Mol Biol*, 2013, 83: 219–233.
- [20] Yaneff A, Sigaut L, Marquez M, Alleva K, Pietrasanta L I, Amodeo G. Heteromerization of PIP aquaporins affects their intrinsic permeability. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111: 231–236.
- [21] Afzal Z, Howton T C, Sun Y, Mukhtar M S. The roles of aquaporins in plant stress responses. *J Dev Biol*, 2016, 4: 9–30.
- [22] Alexandersson E, Danielson J A, Rade J, Moparthy V K, Fontes M, Kjellbom P, Johanson U. Transcriptional regulation of aquaporins in accessions of *Arabidopsis* in response to drought stress. *Plant J*, 2010, 61: 650–660.
- [23] Bae E K, Lee H, Lee J S, Noh E W. Drought, salt and wounding stress induce the expression of the plasma membrane intrinsic protein 1 gene in poplar (*Populus alba* × *P. tremula* var. *glandulosa*). *Gene*, 2011, 483: 43–48.
- [24] Peng Y, Lin W, Cai W, Arora R. Overexpression of a *Panax ginseng* tonoplast aquaporin alters salt tolerance, drought tolerance and cold acclimation ability in transgenic *Arabidopsis* plants. *Planta*, 2007, 226: 729–740.
- [25] Zhou S, Hu W, Deng X, Ma Z, Chen L, Huang C, Wang C, Wang

- J, He Y, Yang G, He G. Overexpression of the wheat aquaporin gene, *TaAQP7*, enhances drought tolerance in transgenic tobacco. *PLoS One*, 2012, 7: e52439.
- [26] Sreedharan S, Shekhawat U K, Ganapathi T R. Transgenic banana plants overexpressing a native plasma membrane aquaporin *MusaPIP1;2* display high tolerance levels to different abiotic stresses. *Plant Biotechnol J*, 2013, 11: 942–952.
- [27] Zhou L, Zhou J, Xiong Y, Liu C, Wang J, Wang G, Cai Y. Overexpression of a maize plasma membrane intrinsic protein *ZmPIP1;1* confers drought and salt tolerance in *Arabidopsis*. *PLoS One*, 2018, 13: e0198639.
- [28] Uehlein N, Otto B, Hanson D T, Fischer M, McDowell N, Kaldenhoff R. Function of *Nicotiana tabacum* aquaporins as chloroplast gas pores challenges the concept of membrane CO₂ permeability. *Plant Cell*, 2008, 20: 648–657.
- [29] Hanba Y T, Shibasaki M, Hayashi Y, Hayakawa T, Kasamo K, Terashima I, Katsuhara M. Overexpression of the barley aquaporin *HvPIP2;1* increases internal CO₂ conductance and CO₂ assimilation in the leaves of transgenic rice plants. *Plant Cell Physiol*, 2004, 45: 521–529.
- [30] Heckwolf M, Pater D, Hanson D T, Kaldenhoff R. The *Arabidopsis thaliana* aquaporin *AtPIP1;2* is a physiologically relevant CO₂ transport facilitator. *Plant J*, 2011, 67: 795–804.
- [31] 周练, 熊雨涵, 洪祥德, 周京, 刘朝显, 王久光, 王国强, 蔡一林. 玉米质膜内在蛋白 *ZmPIP2;6* 响应渗透、盐和干旱胁迫的功能鉴定. 中国农业科学, 53: 461–473.
Zhou L, Xiong Y H, Hong X D, Zhou J, Liu C X, Wang J G, Wang G Q, Cai Y L. Functional characterization of a maize plasma membrane intrinsic protein *ZmPIP2;6* responses to osmotic, salt and drought stress. *Sci Agric Sin*, 2020, 53: 461–473 (in Chinese with English abstract).
- [32] Gookin T E, Assmann S M. Significant reduction of BiFC non-specific assembly facilitates in planta assessment of heterotrimeric G-protein interactors. *Plant J*, 2014, 80: 553–567.
- [33] Nelson B K, Cai X, Nebenfuhr A. A multicolored set of *in vivo* organelle markers for co-localization studies in *Arabidopsis* and other plants. *Plant J*, 2007, 51: 1126–1136.
- [34] Bart R, Chern M, Park C J, Bartley L, Ronald P C. A novel system for gene silencing using siRNAs in rice leaf and stem-derived protoplasts. *Plant Methods*, 2006, 2: 13–21.
- [35] Nakashima K, Yamaguchi-Shinozaki K. ABA signaling in stress-response and seed development. *Plant Cell Rep*, 2013, 32: 959–970.
- [36] Wang Z Y, Xiong L, Li W, Zhu J K, Zhu J. The plant cuticle is required for osmotic stress regulation of abscisic acid biosynthesis and osmotic stress tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2011, 23: 1971–1984.
- [37] Lee S C, Lan W, Buchanan B B, Luan S. A protein kinase-phosphatase pair interacts with an ion channel to regulate ABA signaling in plant guard cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106: 21419–21424.
- [38] Chater C, Peng K, Movahedi M, Dunn J A, Walker H J, Liang Y K, McLachlan D H, Casson S, Isner J C, Wilson I, Neill S J, Hedrich R, Gray J E, Hetherington A M. Elevated CO₂-induced responses in stomata require ABA and ABA signaling. *Curr Biol*, 2015, 25: 2709–2716.
- [39] Sorrentino G, Haworth M, Wahbi S, Mahmood T, Zuomin S, Centritto M. Abscisic acid induces rapid reductions in mesophyll conductance to carbon dioxide. *PLoS One*, 2016, 11: e0148554.
- [40] Flexas J, Ribas-Carbo M, Hanson D T, Bota J, Otto B, Cifre J, McDowell N, Medrano H, Kaldenhoff R. Tobacco aquaporin *NtAQP1* is involved in mesophyll conductance to CO₂ *in vivo*. *Plant J*, 2006, 48: 427–439.
- [41] Ding L, Gao L, Liu W, Wang M, Gu M, Ren B, Xu G, Shen Q, Guo S. Aquaporin plays an important role in mediating chloroplastic CO₂ concentration under high-N supply in rice (*Oryza sativa*) plants. *Physiol Plant*, 2016, 156: 215–226.
- [42] Heinen R B, Bienert G P, Cohen D, Chevalier A S, Uehlein N, Hachez C, Kaldenhoff R, Le Thiec D, Chaumont F. Expression and characterization of plasma membrane aquaporins in stomatal complexes of *Zea mays*. *Plant Mol Biol*, 2014, 86: 335–350.
- [43] Lin W, Peng Y, Li G, Arora R, Tang Z, Su W, Cai W. Isolation and functional characterization of *PgTIP1*, a hormone-autotrophic cells-specific tonoplast aquaporin in ginseng. *J Exp Bot*, 2007, 58: 947–956.
- [44] Zhou L, Wang C, Liu R, Han Q, Vandeleur R K, Du J, Tyerman S D, Shou H. Constitutive overexpression of soybean plasma membrane intrinsic protein *GmPIP1;6* confers salt tolerance. *BMC Plant Biol*, 2014, 14: 181–193.
- [45] Patrick J W, Zhang W, Tyerman S D, Offler C E, Walker N A. Role of membrane transport in phloem translocation of assimilates and water. *Funct Plant Biol*, 2001, 28: 697–709.
- [46] Liu F, Vantoai T, Moy L P, Bock G, Linford L D, Quackenbush J. Global transcription profiling reveals comprehensive insights into hypoxic response in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 2005, 137: 1115–1129.
- [47] Zhou Y, Setz N, Niemietz C, Qu H, Offler C E, Tyerman S D, Patrick J W. Aquaporins and unloading of phloem-imported water in coats of developing bean seeds. *Plant Cell Environ*, 2007, 30: 1566–1577.