

玉米转录因子 ZmbHLH54 的克隆及其响应干旱胁迫的功能

杨紫琼, 宋柏林, 张楠楠, 孟家兴, 何学源, 樊晓伟, 吴建宇

(河南农业大学生命科学学院, 河南 郑州 450046)

摘要: 【目的】克隆碱性螺旋-环-螺旋蛋白 (basic Helix-Loop-Helix, bHLH) 转录因子家族中应答干旱胁迫的新基因 *ZmbHLH54*, 探究该基因在干旱胁迫环境中的响应机制。【方法】采用生物信息学方法分析该基因结构、蛋白质性质, 分析其系统进化关系、保守基序和启动子顺式作用元件; 并通过干旱胁迫下对该基因突变体材料进行表型鉴定、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 和过氧化物酶 (peroxidase, POD) 活性测定, 以及实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 检测相关基因表达水平变化, 初步解析其干旱胁迫响应机制。【结果】*ZmbHLH54* 基因具有典型的 bHLH 结构域, 属于 bHLH 转录因子家族; 编码区 (CDS) 全长 690 bp, 编码 229 个氨基酸; 启动子区域存在多个与激素和干旱胁迫响应有关的元件; *ZmbHLH54* 蛋白为亲水性蛋白, 无跨膜螺旋结构; 干旱胁迫 5 d 后, 阴性对照植株出现明显的叶片卷曲萎蔫现象, 而大部分突变体幼苗仍保持叶片舒展状态或仅有轻微卷曲; 干旱胁迫条件下, *zmbhlh54* 突变体中的 SOD 和 POD 活性显著高于阴性对照, 且 *zmbhlh54* 突变体中活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 清除相关基因 (*ZmSOD3* 和 *ZmSOD4*) 的表达上调, ROS 生成相关基因 (*Zm00001d036557*) 的表达被抑制。【结论】bHLH 转录因子基因家族 *ZmbHLH54* 可能主要通过调节干旱胁迫下的 ROS 清除机制应答干旱胁迫, 增强突变体苗期抗旱性。

关键词: 玉米; 干旱胁迫; *ZmbHLH54* 基因; 活性氧清除机制

中图分类号: S513 文献标志码: A

Cloning and functional analysis of the maize transcription factor ZmbHLH54 in response to drought stress

YANG Ziqiong, SONG Bolin, ZHANG Nannan, MENG Jiaying, HE Xueyuan, FAN Xiaowei, WU Jianyu

(College of Life Sciences, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450046, China)

Abstract: 【Objective】To identify a novel gene, *ZmbHLH54*, within the basic Helix-Loop-Helix (bHLH) transcription factor family that responds to drought stress, and to investigate the response mechanism of this gene in a drought-stressed environment. 【Method】Bioinformatics approaches were employed to systematically analyze the gene structure, protein characteristics, phylogenetic relationships, conserved motifs, and promoter cis-acting elements. Furthermore, phenotypic identification of the gene mutant material was conducted under drought stress conditions. The activities of superoxide dismutase (SOD) and peroxidase (POD) were measured, and the expression levels of relevant genes were quantified using real-time fluorescent quantitative PCR (RT-qPCR).

收稿日期: 2025-03-06

基金项目: 河南省教育厅青年科学基金项目 (242300421571)

作者简介: 杨紫琼 (2000—), 女, 河南郑州人, 硕士研究生, 主要从事玉米优异基因的鉴定与功能研究方面的研究, E-mail: 1161537184@qq.com。

通信作者: 樊晓伟 (1993—), 女, 内蒙古乌兰察布人, 讲师, 博士, E-mail: fanxw1993r@163.com。

These analyses provided preliminary insights into the mechanisms underlying drought resistance.

【Result】 This region is 690bp, encoding 229 amino acids. There are several elements related to hormone and drought stress response in promoter region. ZmbHLH54 is a hydrophilic protein without transmembrane helical structure. After 5 days of drought stress, the negative control plants showed obvious leaf curl and wilting, while most of the mutant seedlings still kept the leaf stretch state or only slightly curled. Under drought stress, SOD and POD activities in *zmbhlh54* mutant were significantly higher than those in the negative control, and the expression of reactive oxygen species (ROS) scavenging genes (*ZmSOD3* and *ZmSOD4*) was up-regulated in *zmbhlh54* mutant. The expression of ROS gene (*Zm00001d036557*) was inhibited. 【Conclusion】 The bHLH transcription factor family ZmbHLH54 may mainly respond to drought stress by regulating ROS clearance mechanism under drought stress, and enhances drought resistance of mutant at seedling stage.

Key words: maize; drought stress; *ZmbHLH54* gene; ROS clearance mechanism

非生物胁迫会干扰植物生理稳态,阻碍其生长发育并降低产量品质,最终对农业生产造成不利影响^[1]。作为全球主要粮食作物之一,玉米在维持农业生产力 and 保障粮食安全方面具有不可替代作用。然而,水分短缺将会对其产量造成显著影响^[2]。玉米各生育阶段均易受到干旱胁迫的威胁,苗期降低出苗率,营养生长期抑制株高和光合效率,中后期则改变同化物分配(优先供应根系),导致穗部发育受阻、籽粒减少和成熟延迟,最终影响产量^[2-5]。植物应对非生物逆境时,转录因子是核心的调控手段,其通过结合靶基因启动子上的顺式元件,调节抗旱相关基因表达,从而减轻干旱胁迫对植物生长的负面影响^[6]。目前,已有多个转录因子家族被报道参与干旱胁迫响应,其中包括 bZIP (basic leucine zipper) 家族、AP2/ERF (apetala2/ethylene-responsive factor) 家族、WRKY (tryptophan-arginine-lysine-tyrosine) 家族及 bHLH (basic helix-loop-helix) 家族^[7-9]等。这些转录因子家族作为不同调控网络的核心节点,在干旱胁迫响应和调控玉米生长发育中具有重要的生物学功能。AP2/ERF 类转录因子 ZmERF21 通过与干旱、激素响应和信号转导等相关基因的启动子结合来调控其表达,以此提升叶绿素含量以及抗氧化酶活性,进而显著增强玉米幼苗的耐旱性^[9]。ZmbZIP33 则在干旱胁迫期间以及复水之后,大幅提升了叶绿素含量、根长以及脱落酸(abscisic acid, ABA)水平,最终增强了拟南芥的抗旱能力与恢复能力^[7]。玉米气孔保卫细胞特异的 MYB (v-myb avian myeloblastosis viral oncogene homolog) 转录因子 ZmMYB56 通过调节 *ZmTOM7* 的表达来调控玉米幼苗的气孔关闭和耐旱性^[10]。*ZmROP8* 过表达能够增加过氧化物酶的活性,减少过氧化氢(hydrogen peroxide, H₂O₂)的积累,增强转基因玉米的抗旱性,是玉米抗旱性的正调节因子,而玉米转录因子 *ZmAL14* 通过抑制 *ZmROP8*, 负调节玉米抗旱^[11]。*ZmWRKY79* 转录因子通过调控 ABA 生物合成,增强活性氧清除能力,减少 H₂O₂ 和丙二醛(malondialdehyde, MDA)积累,提高抗氧化酶活性,从而在干旱胁迫中发挥积极作用^[12]。*ZmHsf28* 蛋白通过茉莉酸(jasmonic acid, JA)和 ABA 信号转导及其他信号通路的影响,提高了单子叶植物玉米和双子叶植物拟南芥的抗旱性^[13]。

bHLH 转录因子因其高度保守的 bHLH 结构域而得名,家族成员数量庞大,近些年来,诸多研究阐明了 bHLH 转录因子在植物应对干旱胁迫响应时的功能以及分子机制。在拟南芥中过表达 *AtbHLH112* 基因,能够显著削减植株体内活性氧的水平,使脯氨酸(Pro)含量得以提高,由此增强转基因拟南芥应对胁迫的耐受能力^[14]。马铃薯中 bHLH118 和 bHLH66 蛋白在调控 ABA 介导的干旱响应过程中发挥相反的作用,过表达 *IbbHLH118* 会降低植株对于干旱胁迫的耐受性,而过表达 *IbbHLH66* 则可以提升植物的耐旱能力^[15]。转录因子 SlbHLH96 通过刺激抗氧化剂、ABA 信号分子等来提高番茄的耐旱性^[16]。水稻中 OsbHLH59 蛋白经过选择性剪接产生不同的亚型,在平衡水稻生长和抗旱性方面具有不同的功能^[17]。在玉米基因组中,共有 208 个 bHLH 基因被鉴定^[18]。研究人员利用含有 20%聚乙二醇 6000 的营养液进行模拟干旱处理,对于干旱-复水处理下玉米中差异表达的 bHLH 基因进行鉴定,共鉴定筛选

出 51 个差异表达 bHLH 基因, 这 51 个玉米 bHLH 基因呈现不同的表达模式。此外, 研究表明, 过表达玉米中的 bHLH 家族基因 *ZmPIF3* 能够增强水稻对干旱和盐胁迫的耐受性^[19]。*ZmBES1/BZR1-1*、-3 和-9 抑制转基因水稻和拟南芥的耐旱性, 而 *ZmBES1/BZR1-4* 蛋白通过调控 *ZmMBP1* 和 *ZmPum6* 来募集 *ZmTLP5*, 从而调控拟南芥、水稻和玉米的耐旱性^[20]。*ZmbHLH47* 蛋白通过 *ZmbHLH4-ZmSnRK2.9* 模块在 ABA 响应和玉米抗旱中的发挥正调控作用^[21]。*ZmPTF1* 基因通过对玉米根系发育以及脱落酸合成起到促进作用, 正向调控玉米耐旱^[22]。转录因子 *ZmbHLH124* 直接结合干旱应答基因 *ZmDREB2A* 的启动子区并激活其表达从而显著提高玉米耐旱性^[23-24]。

综上, bHLH 转录因子在抗旱作物遗传改良中具有巨大潜力。然而, 目前只有有限数量的 bHLH 转录因子被确认参与赋予玉米耐旱性, 有关 bHLH 转录因子在玉米干旱胁迫响应中的功能研究仍较少。本研究为探究转录因子 *ZmbHLH54* 在抵抗干旱胁迫方面的作用, 克隆了 *ZmbHLH54* 基因, 并利用 *ZmbHLH54* 基因的突变体材料, 初步确认了 *ZmbHLH54* 对玉米苗期干旱胁迫响应的负调控。同时, 通过相关基因表达量的检测及生理指标测定, 初步证实转录因子 *ZmbHLH54* 主要通过调节活性氧清除系统应答玉米苗期干旱胁迫。此外, 对 *ZmbHLH54* 基因启动子上顺式作用元件的分析结果表明, 该基因可能涉及玉米抗逆信号网络的整合与调控。因此, 本研究结果将为深入解析玉米 bHLH 转录因子应答干旱胁迫的分子调控网络以及玉米抗旱品种改良提供新的基因资源和重要理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本试验材料以 B73 为遗传背景, 经过化学诱变剂甲基磺酸乙酯(Ethylmethanesulfonate, EMS) 诱变得到的突变体。其中, 杂合突变体植株分离得到纯合阳性突变体植株和阴性对照植株分别以 *zmbhlh54* 和 *ZmbHLH54* 表示。将材料置于温度为 28 °C, 光周期为 16 光照/8 黑暗的培养箱中进行培育, 待幼苗生长 2 周后, 挑选生长状态均匀一致的玉米幼苗进行干旱胁迫处理。

1.2 DNA 与蛋白序列的生物信息学分析

通过 MaizeGDB (<https://maizegdb.org/>) 和 Gramene (<https://www.gramene.org/>) 玉米基因组数据库, 检索并获取 *ZmbHLH54* (*Zm00001d011847*) 基因的全长 cDNA 序列、基因组序列、编码蛋白序列及结构信息。利用 SMART 在线工具 (<https://smart.embl.de/>) 预测保守结构域, 并通过 ExPASy ProtParam 在线软件 (<https://web.expasy.org/protparam/>) 分析蛋白质的分子质量、等电点、不稳定系数以及氨基酸组成。使用 TMHMM 在线软件 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) 对蛋白质的跨膜结构进行预测。借助 ProtScale 工具 (<https://web.expasy.org/protscale/>) 分析其亲疏水性。利用 Predict Protein 工具 (<https://predictprotein.org/>) 预测二级结构。从 NCBI 网站 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 上获取不同物种的蛋白氨基酸序列, 利用 MEME 软件分析其保守基序, 通过 MEGA 软件构建系统发育进化树。此外, 使用 PlantCARE (<https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 在线网站对启动子区的顺式作用元件进行查找分析。

1.3 实时荧光定量 PCR 分析

取 0.15 g 叶片组织样品在液氮中研磨成粉末, 利用全式金 TransZol 提取试剂盒高效完整地提取叶片组织总 RNA, 待 RNA 完全溶解后检测其质量浓度与纯度, 使用诺唯赞公司试剂盒进行反转录 (HiScript IV 1st Strand cDNA Synthesis Kit(+gDNA wiper), Vazyme) 和

qRT-PCR (ChamQ SYBR qPCR Master Mix) 扩增。以 *EF1a* 基因 (F: TGGGCCTACTGG TCTTACTACTGA, R: ACATACCCACGCTTCAGATCCT) 作为内参。反应程序为: 95 °C 预变性 30 s; 95 °C 变性 10 s, 60 °C 退火 30 s, 共进行 40 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法分析计算基因的相对表达量, 每个处理设置 3 个重复。

1.4 干旱胁迫生理指标测定

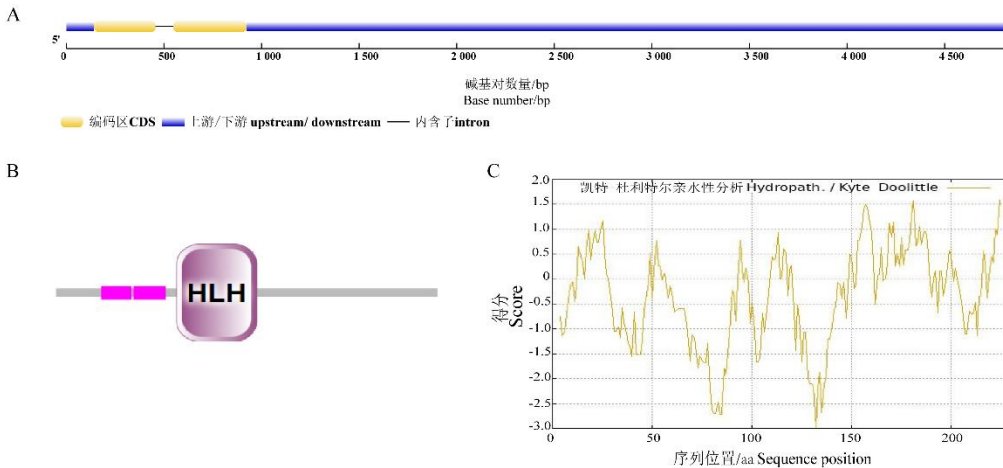
1.4.1 超氧化物歧化酶 (SOD) 活性检测 先称取 0.1 g 干旱胁迫后叶片, 使用索莱宝公司 SOD 活性检测试剂盒处理样品, 再采用酶标仪记录 560 nm 处吸光值, 最后根据说明书上的公式进行 SOD 活性计算。SOD 活性计算时按样本鲜质量计算, 单位为 $U \cdot g^{-1}$ 。其中, 在黄嘌呤氧化酶偶联反应体系中抑制百分率为 50% 时, 反应体系中的 SOD 酶活力定义为 1 个酶活性单位。

1.4.2 过氧化物酶 (POD) 活性检测 先称取 0.1 g 干旱胁迫后叶片, 再使用索莱宝公司 POD 活性检测试剂盒, 按照说明书处理样品, 最后用酶标仪记录 470 nm 下 30 s 时吸光值 A_1 和 90 s 时的吸光值 A_2 并根据公式计算 POD 活性。POD 活性计算时按样本鲜质量计算, 单位为 $U \cdot g^{-1}$ 。其中, 每 g 组织在每毫升反应体系中每 min $A_{470\text{ nm}}$ 变化 0.01 为一个 POD 酶活性单位。

2 结果与分析

2.1 ZmbHLH54 蛋白的基本理化性质分析

ZmbHLH54 基因定位于玉米的第 8 号染色体, 编码区长度为 690 bp, 包含 1 个内含子区, 编码 229 个氨基酸 (图 1-A), 具有典型的 HLH 结构域 (图 1-B), 表明其属于 bHLH 转录因子家族蛋白。进一步对 *ZmbHLH54* 的氨基酸序列进行预测和分析, 结果显示, 其分子式为 $C_{1114}H_{1745}N_{303}O_{346}S_7$; 分子质量为 25.14 kD, 理论等电点 (pI) 为 6.12; 氨基酸组成成分分析显示, Ser (S) 含量最高, 所占比例为 11.8%; 其次为 Leu (L), 所占比例为 11.4%; 含量最低的是 Trp (W) 和 Cys (C), 所占比例为 0.4% 和 1.7%。ProtScale 软件分析的结果证实 *ZmbHLH54* 蛋白为亲水性蛋白 (图 1-C)。



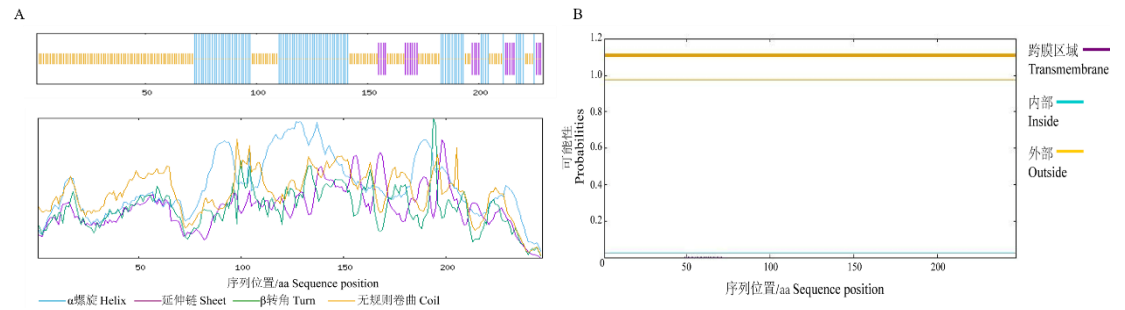
A: *ZmbHLH54* 基因的基本结构; B: *ZmbHLH54* 蛋白的结构域; C: *ZmbHLH54* 蛋白的亲疏水性预测
A: The basic structure of *ZmbHLH54* gene; B: The domain of *ZmbHLH54* protein; C: The prediction of hydrophilicity of *ZmbHLH54* protein

图 1 *ZmbHLH54* 基因结构及蛋白质性质分析

Fig.1 The analysis of structure and protein properties of *ZmbHLH54* gene

2.2 ZmbHLH54 蛋白结构分析

利用 Predict Protein 进行二级结构预测，分析 ZmbHLH54 蛋白的二级结构，该蛋白序列主要含有 α 螺旋、延伸链、不规则卷曲（图 2-A）。其中，不规则卷曲有 128 个氨基酸，所占比例为 55.90%； α 螺旋有 79 个氨基酸，所占比例为 34.50%；延伸链有 22 个氨基酸，所占比例为 9.61%。因此，ZmbHLH54 的主要结构为无规则卷曲和 α 螺旋，所占比例达到 89.40%。利用 TMHMM 进行跨膜螺旋区预测，ZmbHLH54 蛋白不具有跨膜螺旋结构（图 2-B）。

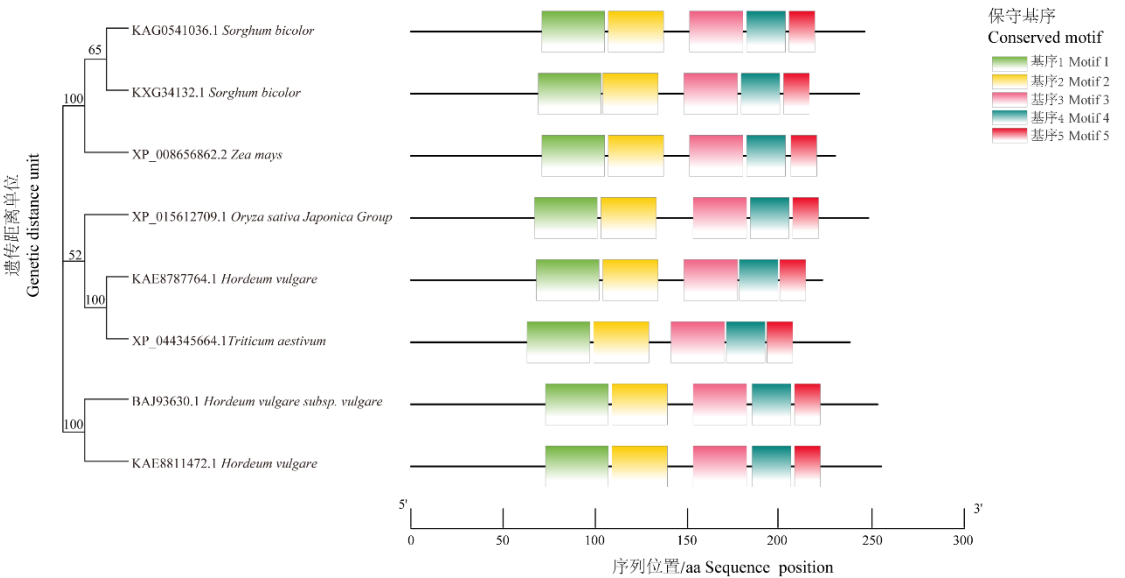


A: ZmbHLH54 蛋白质的二级结构预测；B: ZmbHLH54 蛋白的跨膜结构预测
A: The secondary structure prediction of ZmbHLH54 protein; B: The transmembrane structure prediction of ZmbHLH54 protein

图 2 ZmbHLH54 蛋白质的结构分析
Fig.2 The structure analysis of ZmbHLH54 protein

2. 3 ZmbHLH54 蛋白进化树及保守基序分析

为研究玉米 ZmbHLH54 基因与其他物种的亲缘关系，以 ZmbHLH54 基因的蛋白序列作为检索序列，利用邻接法（neighbor joining, NJ）构建系统进化树。由图 3-A 可知，在众多物种中，高粱与 ZmbHLH54 在进化树上分支紧邻，表明二者可能源于较近的祖先；大麦、小麦与其进化距离最远，即亲缘关系最远。对同源物种的 5 个保守基序进行分析，结果发现，这 6 个物种具有类似的保守基序，由此推测它们具备某些相似的生物学功能（图 3-B）。



A: 为 ZmbHLH54 蛋白的进化树分析，其中 Sorghum bicolor 为高粱；Zea mays 为玉米；Oryza sativa Japonica Group 为粳稻；Triticum aestivum 为小麦；Hordeum vulgare 和 Hordeum vulgare subsp. vulgare 为大麦。B: 6 个物种的保守基序分析。

A: Evolutionary tree analysis of ZmbHLH54 protein, *Sorghum bicolor* is sorghum; *Zea mays* is corn; *Oryza sativa Japonica Group* is Japonica rice; *Triticum aestivum* is wheat; *Hordeum vulgare* and *Hordeum vulgare subsp. vulgare* are barley. B: Analysis of conserved motifs of 6 species.

图 3 ZmbHLH54 蛋白进化分析

Fig.3 Evolutionary analysis of ZmbHLH54 protein

2. 4 ZmbHLH54 的启动子顺式元件分析

顺式作用元件凭借其特定核苷酸序列，可与转录因子或其他调控蛋白相结合，从而对基因转录的起始、速率以及效率发挥调控效能^[25]。根据表 1 可知，在 *ZmbHLH54* 基因的启动子区域内包含多种顺式作用元件，例如光响应元件如 G-box、ATCT-motif、Box4 和 TCT-motif 等，这些元件可感知外界光信号的变化，无论是光质、光强还是光周期的改变，都能触发其与特定转录因子的结合；生长发育相关元件如 AAGAA - motif、circadian 元件和 O₂-site 等元件参与玉米整个生长周期的调控；激素响应元件如其中包含与 ABA 相关的 ABRE 元件，以及与生长素、JA、茉莉酸甲酯、水杨酸（salicylic acid，SA）等激素相关的元件；胁迫响应元件如与干旱胁迫相关的 MYB 和 MYC 元件，在干旱条件下，能够启动一系列胁迫响应基因表达。这些发现表明，*ZmbHLH54* 基因的启动子区域可能具有复杂的调控机制，能够响应多种外界刺激和内部发育信号。

表 1 ZmbHLH54 基因启动子顺式元件分析

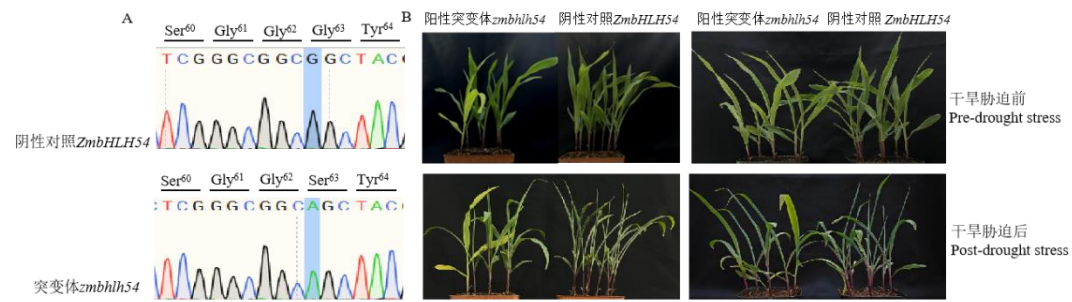
Table 1 Cis-element analysis of ZmbHLH54 gene promoter

主要元件	位点个数	功能注释
Main element	Number of sites	Function annotation
MYB-like sequence	1	MYB 响应元件
O ₂ -site	2	参与玉米醇溶蛋白代谢调节的顺式作用调节元件
TATA-box	50	核心启动子元件之一
ATCT-motif	1	参与光响应的保守 DNA 模块中的一部分
STRE	2	应激响应元件
TCA-element	1	水杨酸响应元件
G-Box	1	光响应元件
MYB	2	MYB 响应元件
MYC	2	MYC 响应元件
circadian	1	参与昼夜节律控制的顺式调控元件
TCT-motif	1	光响应元件的一部分
CGTCA-motif	1	茉莉酸甲酯响应元件
AAGAA-motif	1	脱落酸响应元件
Box4	2	参与光响应的保守 DNA 模块中的一部分
ABRE	1	脱落酸响应元件

2. 5 zmbhlh54 突变体植株抗旱性分析

为明确 *ZmbHLH54* 基因在玉米干旱胁迫中的作用，利用 EMS 突变体验证其功能。突变体的突变位点位于编码区，第 325 个碱基由 G 突变为 A，导致密码子由 GGC 变为 AGC，对应的氨基酸发生非同义突变，由甘氨酸突变为丝氨酸（图 3）。利用 *zmbhlh54* 突变体植株和阴性对照植株作为研究对象，在苗期开展多次干旱胁迫试验。结果显示，尚未实施干旱胁迫时，阴性对照与突变体幼苗生长态势均良好，形态无显著差异；干旱胁迫 5d 后，阴性对照幼苗出现明显的卷叶萎蔫现象，而大部分突变体植株仍保持叶片舒展的状态或仅有轻微的卷叶情况（图 4）。根据以上结果可知，*zmbhlh54* 突变体植株在干旱胁迫下表现出更强

的抗旱性，其生长状态显著优于阴性对照植株。



A: 突变体突变位点的鉴定，图中蓝色选中碱基为突变碱基，对应的氨基酸由甘氨酸（Gly）突变为丝氨酸（Ser）。

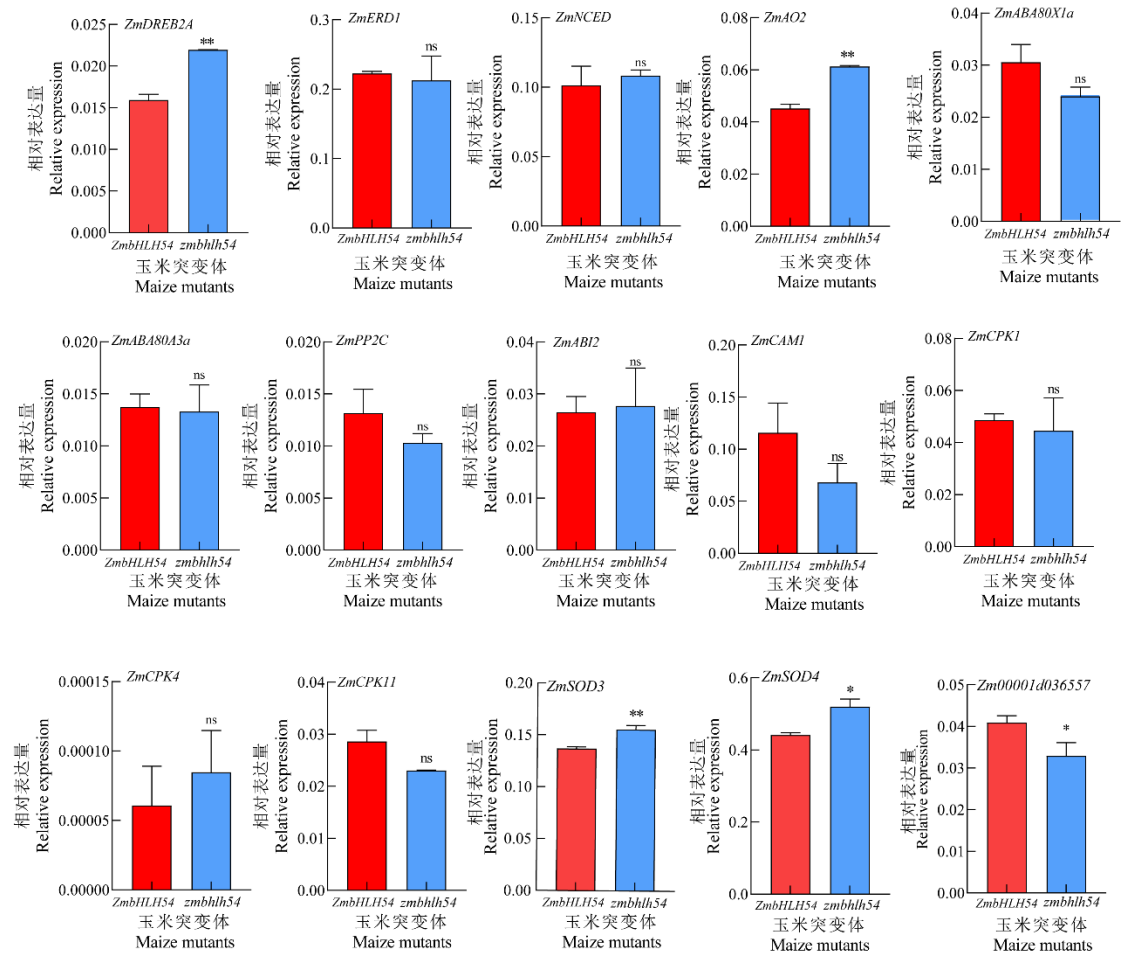
A: Identification of mutant mutation sites, the selected base in blue is the mutant base, and the corresponding amino acid is mutated from glycine (Gly) to serine (Ser) .

图 4 *zmbhlh54* 突变体干旱胁迫下玉米苗期表型鉴定

Fig.4 Identification of maize seedling phenotype of *zmbhlh54* mutant under drought stress

2. 6 干旱胁迫下 *ZmbHLH54* 相关基因表达的调控分析

玉米在干旱胁迫下的生理响应涉及多层次信号网络互作，包括借助调控抗氧化酶 SOD、POD 的活性来达成氧化还原平衡状态以及通过 ABA 信号诱导气孔快速关闭以减少蒸腾失水等。本研究检测了渗透相关（*ZmDREB2A* 和 *ZmERD1*）、ABA 合成相关（*ZmNCED* 和 *ZmAO2*）、ABA 分解代谢相关（*ZmABA80X1a* 和 *ZmABA80A3a*）、ABA 信号传导相关（*ZmPP2C* 和 *ZmABI2*）、钙信号转导相关（*ZmCAM1* 和 *ZmCPK1*）以及与 ROS 生成（*Zm00001d036557*）和清除（*ZmSOD3* 和 *ZmSOD4*）相关基因在突变体植株和阴性对照植株中的表达水平（图 5）。结果表明，干旱胁迫下，基因 *ZmDREB2A*、*ZmAO2*、*ZmSOD3* 以及 *ZmSOD4* 在 *zmbhlh54* 突变体中的表达量显著高于阴性对照，而 NAD（P）H 脱氢酶基因（*Zm00001d036557*）则呈现相反趋势，其他基因在突变体中的响应趋势不显著。综上可知，*ZmbHLH54* 基因可能主要通过调节干旱胁迫下的 ROS 清除机制，使突变体植株表现为对干旱胁迫更耐受。



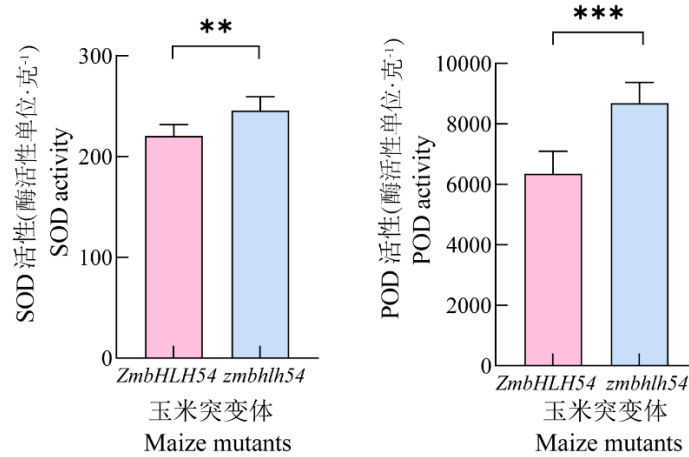
ZmbHLH54 代表阴性对照植株, *zmbhlh54* 代表纯合阳性突变体。*代表 $p < 0.05$, **代表 $p < 0.01$, ns 代表不显著。 *ZmbHLH54* are negative control plants, *zmbhlh54* are homozygous positive mutants. * means $p < 0.05$, ** means $p < 0.01$, ns means not significant.

图 5 *zmbhlh54* 突变体植株及阴性对照植株干旱胁迫响应相关基因表达量检测

Fig.5 Detection of drought stress responsive gene expression levels in *zmbhlh54* mutant and negative control plants

2.7 *zmbhlh54* 突变体植株干旱胁迫下 ROS 清除酶活性分析

实时荧光定量 PCR 结果表明, ROS 代谢通路关键基因呈现显著差异表达, 而植物的抗氧化能力主要依赖于抗氧化酶的作用, 其中 SOD 和 POD 占据关键地位。因此, 我们对干旱胁迫下 *zmbhlh54* 突变体与阴性对照植株的 SOD 和 POD 活性指标进行了测定, 结果如图 6 所示, 干旱胁迫后, *zmbhlh54* 突变体植株的 SOD 和 POD 活性显著高于阴性对照, 表明 *zmbhlh54* 突变体中植株清除活性氧的能力被增强。



ZmbHLH54 代表阴性对照植株, *zmbhlh54* 代表纯合阳性突变体。*代表 $p < 0.05$, **代表 $p < 0.01$, ns 代表不显著。 *ZmbHLH54* are negative control plants, *zmbhlh54* are homozygous positive mutants. * means $p < 0.05$, ** means $p < 0.01$, ns means not significant.

图 6 *zmbhlh54* 突变体植株干旱胁迫下的 ROS 清除酶活性测定结果

Fig.6 Determination of ROS scavenging enzyme activity in *zmbhlh54* mutant plants under drought stress

3 结论与讨论

研究表明, bHLH 蛋白家族于植物的生长发育进程以及应对逆境胁迫反应等方面, 均发挥着至关重要的作用。本研究通过对玉米 *ZmbHLH54* 基因进行生物信息学分析, 并以 EMS 阳性突变体和阴性对照为试验材料进行干旱处理, 初步验证了该基因对玉米苗期抗旱性的负调控作用, 即突变该基因增强玉米抵御干旱胁迫的能力。这一发现为进一步揭示 bHLH 转录因子家族蛋白的生物学功能提供了重要理论依据。

在植物生长进程中, 转录因子通过启动子元件有序调控各项生命活动, 而胁迫响应元件在植物抵御非生物胁迫 (如干旱、高盐、低温等) 及生物胁迫时至关重要。在干旱、高盐、低温等非生物胁迫下, 启动子区域的 MYB 和 MYC 等元件可启动一系列胁迫响应基因的表达, 帮助植物适应恶劣的环境条件^[25]。玉米 *ZmbHLH54* 基因的启动子区域包括干旱胁迫相关元件 (MYB 和 MYC)、ABA 响应元件 (ABRE) 以及应激响应元件 (STRE) 等多个胁迫应答相关的元件。研究表明, 拟南芥 MYB 转录因子 WER 与 bHLH 转录因子 GL3/EGL3 形成复合物, 直接结合并激活基因 *GL2* 的表达, 促进非根毛细胞的产生^[26]。SmJAZs-SmbHLH37/SmERF73-SmSAP4 模块介导了 JA 平衡重要草本植物丹参药用活性成分和耐盐性的分子机制^[27]。然而, 关于 bHLH 转录因子应答干旱胁迫的上游调控机制及分子模块尚不明确, 顺式作用元件的分析为研究 *ZmbHLH54* 分子调控网络奠定了重要基础。此外, bHLH 转录因子 MYC2 是 JA 信号通路的核心调控因子, 而 JA 作为一种重要的逆境信号分子, 在植物应对多种胁迫 (如抗虫、抗病、干旱、温度、盐和重金属胁迫) 中具有重要作用^[28]。植物激素中的 SA 和 ABA, 在植物对不利环境的响应中也起着不可或缺的作用^[29]。*ZmbHLH54* 基因启动子区域除了干旱胁迫相关的元件, 还包括光响应元件以及多个激素响应相关的元件, 如 ABA 响应元件、SA 响应元件、JA 响应元件等。因此, *ZmbHLH54* 基因不仅参与玉米干旱胁迫响应的分子调控, 还可能在植物应对盐碱、高温等多种非生物胁迫过程中发挥关键作用, 其功能可能涉及玉米抗逆信号网络的整合与调控。

植物抗旱性包括多种机制, 在细胞水平上, 干旱信号会促进脯氨酸和海藻糖等代谢产物的产生, 激发抗氧化系统以维持氧化还原稳态, 并通过氧化物酶防止细胞损伤和膜完整性破坏; 此外, 干旱信号也会诱导包括 ABA 等植物激素途径的响应, 并触发各细胞器中 Ca^{2+} 浓

度快速和瞬时的变化,从而使植物合理应对胁迫^[30-31]。本研究检测了干旱胁迫调节下 *zmbhlh54* 突变体及阴性对照材料中,渗透调节系统、钙信号响应、ROS 信号通路以及 ABA 合成、分解和信号转导相关基因的表达情况。结果表明,ROS 清除相关的基因 *ZmSOD3*、*ZmSOD4* 的表达量在 *zmbhlh54* 突变体中被显著上调,而与 ROS 生成相关的 NAD(P)H 脱氢酶基因 (*Zm00001d036557*) 则与之相反。在正常情况下,ROS 的生成和清除维持在微妙的平衡状态;然而,在干旱胁迫条件下,这种平衡可能会受到干扰,从而导致活性氧产量急剧增^[32]。由此我们推测, *ZmbHLH54* 基因可能参与干旱胁迫下的 ROS 稳态调节。在植物应对 ROS 的防御体系中, SOD 能将氢氧化物自由基转化为 H₂O₂, 随后 POD 通过催化降解作用将 H₂O₂ 分解为水和氧气^[33]。当 ROS 水平超过一定阈值时,会触发进行性氧化损伤,导致生长减慢甚至程序性细胞死亡。为了抵御干旱胁迫,植物必须清除多余的活性氧并恢复稳态水平的活性氧。本研究结果表明,干旱胁迫下 *zmbhlh54* 突变体可以增强 ROS 清除相关基因的转录。此外,进一步对 SOD 和 POD 活性进行测定发现,干旱条件下突变体植株中这两种酶的活性相较于阴性对照显著提升。由此可知, *zmbhlh54* 突变体可能主要通过增强 ROS 清除酶的活性,有效清除体内过量的 ROS 而增强抗旱能力。研究发现,当水稻遭受干旱胁迫时会增强 *OsCHI3* 的转录,进而促进幼苗中类黄酮积累;而类黄酮除了直接清除 ROS 外,还作为信号分子促进 ABA 生物合成。ABA 则通过增强抗氧化酶活性进一步加强水稻 ROS 的清除能力,最终提高水稻苗期耐旱性^[34]。类似的,小麦 bZIP 转录因子 TaFDL2-1A 通过正调节 ABA 生物合成、ABA 反应和 ROS 清除,以提高转基因小麦的抗旱性^[35]。本研究中,干旱胁迫下,ABA 合成相关基因 *ZmAo2* 的表达在 *zmbhlh54* 突变体与阴性对照中同样存在显著差异;并且, *ZmbHLH54* 基因启动子区域存在多个 ABA 响应相关的顺式作用元件。因此,我们推测 *ZmbHLH54* 基因应答干旱胁迫时,同样涉及 ROS 信号与 ABA 信号的相互影响。此外,干旱胁迫下 *ZmDREB2A* 基因的表达在突变体中也显著被上调。前期研究表明, *ZmbHLH124* 蛋白在渗透胁迫信号通路中作用于基因 *ZmDREB2A* 的上游,它通过与 *ZmDREB2A* 的启动子直接结合,促进 *ZmDREB2A* 的表达,从而提高玉米耐旱性^[23]。将谷子中分离到的 *EcDREB2A* 在烟草中超量表达发现,烟草转基因植株通过调节活性氧稳态和上调应激响应基因,表现出更强的耐热性^[36]。因此,后续将进一步验证蛋白 *ZmbHLH54* 与 *ZmbHLH124* 是否形成同源二聚体并协同调控 *ZmDREB2A* 的表达,同时深入探究 *ZmbHLH54* 基因通过干扰 ROS 平衡响应逆境胁迫的分子机制。

综上,本研究鉴定到玉米 bHLH 蛋白家族响应干旱胁迫的新基因 *ZmbHLH54*,并初步证实该基因通过 ROS 清除系统介导的途径增强突变体苗期抗旱性。下一步将通过构建该基因的转基因材料,进一步验证基因功能,并解析其分子调控机制。后续研究也将聚焦于分析该基因的自然变异,筛选耐旱优异等位基因,从而改良骨干自交系。此外,目前 CRISPR 敲除技术在基因编辑中的成功率显著高于过表达系统,且具有无需外源元件筛选与整合的优势,而基因 *ZmbHLH54* 突变后增强玉米苗期抗旱性。因此,之后可直接利用基因编辑技术敲除该基因而实现玉米种质抗旱性的改良。总之,本研究结果为创制抗旱新种质提供了重要的理论基础和基因资源。

参考文献 References:

- [1] MU T T, LUO S L, LI L, et al. A review of the interaction mechanisms between jasmonic acid (JA) and various plant hormones, as well as the core regulatory role of MYC₂[J]. Plant Science, 2025, 353: 112407.
- [2] 袁宏伟, 蒋尚明, 杨继伟, 等. 基于生理生态指标的玉米受旱胁迫响应规律研究[J]. 节水灌溉, 2019(5): 5-10.

YUAN H W, JIANG S M, YANG J W, et al. The response regularity of maize under drought stress based on physiological indexes[J]. Water Saving Irrigation, 2019(5): 5-10.

[3] 王云奇, 陶洪斌, 赵丽晓, 等. 玉米对水分亏缺的响应[J]. 玉米科学, 2014, 22(2): 87-92.

WANG Y Q, TAO H B, ZHAO L X, et al. Response of maize to water deficit[J]. Journal of Maize Sciences, 2014, 22(2): 87-92.

[4] HUANG C, QIN A Z, GAO Y, et al. Effects of water deficit at different stages on growth and ear quality of waxy maize[J]. Frontiers in Plant Science, 2023, 14: 1069551.

[5] 柳海涛, 袁青松, 魏畅, 等. 外源壳聚糖对干旱胁迫下玉米根系构型分级及生理参数的影响[J]. 河南农业大学学报, 2023, 57(4): 646-656.

LIU H T, YUAN Q S, WEI C, et al. Effects of exogenous chitosan on maize root architecture classification and physiological parameters under drought stress[J]. Journal of Henan Agricultural University, 2023, 57(4): 646-656.

[6] ZHANG L, SONG Z Q, LI F F, et al. The specific MYB binding sites bound by TaMYB in the GAPCp2/3 promoters are involved in the drought stress response in wheat[J]. BMC Plant Biology, 2019, 19(1): 366.

[7] CAO L R, LU X M, WANG G R, et al. Maize *ZmbZIP33* is involved in drought resistance and recovery ability through an abscisic acid-dependent signaling pathway[J]. Frontiers in Plant Science, 2021, 12: 629903.

[8] CHEN K, TANG W S, ZHOU Y B, et al. AP2/ERF transcription factor GmDREB1 confers drought tolerance in transgenic soybean by interacting with GmERFs[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2022, 170: 287-295.

[9] WANG Z Y, ZHAO X, REN Z Z, et al. ZmERF21 directly regulates hormone signaling and stress-responsive gene expression to influence drought tolerance in maize seedlings[J]. Plant, Cell & Environment, 2022, 45(2): 312-328.

[10] LI B Z, LIU R N, LIU J, et al. ZmMYB56 regulates stomatal closure and drought tolerance in maize seedlings through the transcriptional regulation of ZmTOM7[J]. New Crops, 2024, 1: 100012.

[11] WANG Y L, CHENG J K, GUO Y Z, et al. Phosphorylation of ZmAL14 by ZmSnRK2.2 regulates drought resistance through derepressing ZmROP8 expression[J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2024, 66(7): 1334-1350.

[12] GULZAR F, FU J Y, ZHU C Y, et al. Maize WRKY transcription factor ZmWRKY79 positively regulates drought tolerance through elevating ABA biosynthesis[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(18): 10080.

[13] LIU L J, ZHANG Y H, TANG C, et al. Maize transcription factor ZmHsf28 positively regulates plant drought tolerance[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2023, 24(9): 8079.

[14] LIU Y J, JI X Y, NIE X G, et al. *Arabidopsis* AtbHLH112 regulates the expression of genes involved in abiotic stress tolerance by binding to their E-box and GCG-box motifs[J]. New Phytologist, 2015, 207(3): 692-709.

[15] XUE L Y, WEI Z H, ZHAI H, et al. The IbPYL8-IbbHLH66-IbbHLH118 complex mediates the abscisic acid-dependent drought response in sweet potato[J]. New Phytologist, 2022, 236(6): 2151-2171.

- [16] LIANG Y F, MA F, LI B Y, et al. A bHLH transcription factor, SlbHLH96, promotes drought tolerance in tomato[J]. Horticulture Research, 2022, 910.1093: hr.
- [17] NING M, LI Q Y, WANG Y, et al. Alternative splicing drives the functional diversification of a bHLH transcription factor in the control of growth and drought tolerance in rice[J]. Science Bulletin, 2025, 70(2): 153-156.
- [18] ZHANG T T, LV W, ZHANG H S, et al. Genome-wide analysis of the basic Helix-Loop-Helix (bHLH) transcription factor family in maize[J]. BMC Plant Biology, 2018, 18(1): 235.
- [19] GAO Y, JIANG W, DAI Y, et al. A maize phytochrome-interacting factor 3 improves drought and salt stress tolerance in rice[J]. Plant Molecular Biology, 2015, 87(4): 413-428.
- [20] FENG W Q, ZHOU Y H, DUAN H M, et al. Maize ZmBES1/BZR1-4 recruits ZmTLP5 to regulate drought tolerance and seed development by regulating ZmPum6 and ZmMBP1[J]. The Plant Journal, 2025, 122(1): e70162.
- [21] YAN Z W, ZHANG F J, MU C H, et al. The ZmbHLH47-ZmSnRK2.9 module promotes drought tolerance in maize[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2024, 25(9): 4957.
- [22] LI Z X, LIU C, ZHANG Y, et al. The bHLH family member ZmPTF1 regulates drought tolerance in maize by promoting root development and abscisic acid synthesis[J]. Journal of Experimental Botany, 2019, 70(19): 5471-5486.
- [23] WEI S W, XIA R, CHEN C X, et al. ZmbHLH124 identified in maize recombinant inbred lines contributes to drought tolerance in crops[J]. Plant Biotechnology Journal, 2021, 19(10): 2069-2081.
- [24] NARUSAKA Y, NAKASHIMA K, SHINWARI Z K, et al. 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[J]. The Plant Journal, 2003, 34(2): 137-148.
- [25] 皮博艺, 聂治, 杜文平, 等. 玉米 KCS 家族的全基因组鉴定与胁迫响应分析[J]. 西南农业学报, 2025, 38(1): 1-11.
- PI B Y, NIE Z, DU W P, et al. Genome-wide identification and stress response analysis of maize KCS family[J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2025, 38(1): 1-11.
- [26] WANG B H, LUO Q, LI Y P, et al. Structural insights into partner selection for MYB and bHLH transcription factor complexes[J]. Nature Plants, 2022, 8(9): 1108-1117.
- [27] LV B B, DENG H Y, WEI J, et al. SmJAZs-SmbHLH37/SmERF73-SmSAP4 module mediates jasmonic acid signaling to balance biosynthesis of medicinal metabolites and salt tolerance in *Salvia miltiorrhiza*[J]. New Phytologist, 2024, 244(4): 1450-1466.
- [28] KOSAKIVSKAI V, VEDENICHEVA N P, BABENKO L M, et al. Exogenous phytohormones in the regulation of growth and development of cereals under abiotic stresses[J]. Molecular Biology Reports, 2022, 49(1): 617-628.
- [29] ELSISI M, ELSHIEKH M, SABRY N, et al. The genetic orchestra of salicylic acid in plant resilience to climate change induced abiotic stress: critical review[J]. Stress Biology, 2024, 4(1): 31.
- [30] GUPTA A, RICO-MEDINA A, CAÑO-DELGADO A I. The physiology of plant responses to drought[J].

Science, 2020, 368(6488): 266-269.

[31] LIU S, ZHAO L Y, CHENG M Z, et al. Calmodulins and calmodulin-like proteins-mediated plant organellar calcium signaling networks under abiotic stress[J]. The Crop Journal, 2024, 12(5): 1321-1332.

[32] 殷缘, 程爽, 刘定豪, 等. 外源过氧化氢(H₂O₂)影响非生物胁迫下植物生长与生理代谢机制的研究进展[J]. 生物技术通报, 2025, 41(1): 1-13.

YIN Y, CHENG S, LIU D H, et al. Research progress in exogenous hydrogen peroxide (H₂O₂) affecting plant growth and physiological metabolism under abiotic stress[J]. Biotechnology Bulletin, 2025, 41(1): 1-13.

[33] MITTLER R, KIM Y, SONG L H, et al. Gain- and loss-of-function mutations in Zat10 enhance the tolerance of plants to abiotic stress[J]. FEBS Letters, 2006, 580(28/29): 6537-6542.

[34] LIU T, LIU L, ZHOU T S, et al. *Chalcone isomerase* gene (OsCHI3) increases rice drought tolerance by scavenging ROS *via* flavonoid and ABA metabolic pathways[J]. The Crop Journal, 2025, 13(2): 372-384.

[35] WANG B X, LI L Q, LIU M L, et al. TaFDL2-1A confers drought stress tolerance by promoting ABA biosynthesis, ABA responses, and ROS scavenging in transgenic wheat[J]. The Plant Journal, 2022, 112(3): 722-737.

[36] SINGH S, CHOPPERLA R, SHINGOTE P, et al. Overexpression of EcDREB2A transcription factor from finger millet in tobacco enhances tolerance to heat stress through ROS scavenging[J]. Journal of Biotechnology, 2021, 336: 10-24.