



外源海藻糖增强高表达转玉米C₄型PEPC水稻耐旱性的机制

李佳馨^{1,2}, 李霞^{1,2,3*}, 谢寅峰¹

¹南京林业大学生物与环境学院, 南京 210037; ²江苏省农业科学院粮食作物研究所/江苏省优质水稻工程技术研究中心/国家水稻改良中心南京分中心, 南京 210014; ³扬州大学农学院, 江苏省粮食作物现代产业技术协同创新中心, 扬州 225009

摘要 为揭示海藻糖(Tre)调控转玉米(*Zea mays*) C₄型PEPC基因水稻(*Oryza sativa*) (PC)的耐旱性机制, 以PC及其野生型Kitaake (WT)为材料, 通过水培试验, 研究了Tre和12% (m/v)聚乙二醇(PEG)单独或联合处理对水稻生理生化特性的影响。结果表明, Tre处理可促进PC和WT水稻幼苗生长, 缓解干旱逆境导致的植株生长抑制, 但对PC的效应更显著。与DS处理相比, Tre+DS联合处理可维持功能叶较高的相对含水量、光化学效率和抗氧化酶活性。在DS处理下, 与WT相比, 外施Tre可使PC的内源Tre和蔗糖含量显著增加, 而葡萄糖含量显著降低, Tre代谢和SnRK1s相关基因表达量增加; 施用Tre也显著促进了ABA合成、信号转导与干旱响应基因的表达, 和维持较稳定的光合能力, 从而使PC表现更强的耐旱性。

关键词 转C₄-PEPC基因水稻, 干旱胁迫, 磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶, 海藻糖, 水稻

李佳馨, 李霞, 谢寅峰 (2021). 外源海藻糖增强高表达转玉米C₄型PEPC水稻耐旱性的机制. 植物学报 56, 296–314.

水稻(*Oryza sativa*)是世界上重要的粮食作物, 也是较易受干旱影响的植物之一(Oladosu et al., 2019)。干旱逆境是全球性普遍存在且不断加剧的环境问题, 干旱胁迫导致水稻减产, 造成严重的粮食生产损失, 威胁世界粮食安全。目前, 在充分利用传统作物育种技术的基础上, 要想实现产量潜力的显著提升, 改善光合作用成为今后最值得研究的方向之一(Morales et al., 2020)。C₄植物较水稻等C₃植物更耐旱, 在干旱条件下具有明显的生长及产量优势, 主要表现为光合能力、能量及水分利用率较高(Ermakova et al., 2020)。磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(phosphoenolpyruvate carboxylase, PEPC)是参与C₄植物光合作用的关键酶, 可为三羧酸循环(tricarboxylic acid cycle, TCA)提供草酰乙酸(oxaloacetic acid, OAA), 并参与调节植物的碳、氮代谢和气孔运动, 尤其在耐旱机制中发挥重要作用(Karki et al., 2013; Shi et al., 2015)。现已通过基因工程技术获得了高表达转玉米(*Zea mays*) C₄型PEPC基因水稻(Ku et al., 1999) (以

下简称PC)。已有研究表明, PC水稻不仅光合能力增强、产量提高, 且表现出耐高光强、耐光氧化、耐旱及耐低氮等特性(Jiao et al., 2003; 李霞等, 2005; Bandyopadhyay et al., 2007; Ding et al., 2012, 2013; Liu et al., 2017a; Tang et al., 2018), 深入研究该材料的耐旱机制, 将为抵御水稻干旱胁迫提供有效手段。

近年来, 关于PEPC在植物逆境耐性中的分子机制已成为新的研究热点, 而对PC水稻耐旱机制的研究, 也为深入了解该酶的生物学功能提供了新线索。已有研究表明, 干旱使PC触发第二信使, 如过氧化氢(hydrogen peroxide, H₂O₂) (Ren et al., 2014)、一氧化氮(nitric oxide, NO) (Chen et al., 2014)、钙离子(calcium ion, Ca²⁺) (Qian et al., 2015a, 2015b; Liu et al., 2017a, 2017b)和磷脂酸(Li et al., 2011), 通过调控钙依赖和糖信号激酶相关基因, 如CPK4、CPK9以及蔗糖非发酵1 (sucrose nonfermenting-1, SNF1) 相关蛋白激酶(sucrose nonfermenting-1-related

收稿日期: 2020-10-12; 接受日期: 2021-04-22

基金项目: 国家自然科学基金(No.31571585)、国家重点研发计划(No.2016YFD0300501-03)和江苏省重点研发计划(现代农业) (No. BE2019377)

* 通讯作者。E-mail: jsplpx@jaas.ac.cn

protein kinase, SnRKs) 亚家族中 *SnRK1s* 基因 (*OsSnRK1a*、*OsSnRK24*和*OsSnRK35*) 激活级联反应, 诱导靶基因 *C₄-PEPC* 的转录与翻译, 积累渗透调节物质并维持稳定的光合作用, 进而抵御胁迫(刘小龙等, 2015; Huo et al., 2017; Zhang et al., 2017; 张金飞等, 2018)。此外, PC 响应胁迫的调节过程都与其内源糖水平的差异密切相关(Zhang et al., 2017)。PC 内源的高蔗糖含量通过调节花青素及合成相关基因的表达, 增强花青素代谢而表现耐旱(何亚飞等, 2018)。外源葡萄糖可通过调控内源糖代谢激活内源 *SnRK3s* 基因 (*OsSnRK3.1* 和 *OsSnRK3.4*) 与钙调蛋白基因(*CBL*) 在 PC 耐旱机制中发挥作用(张金飞等, 2018)。PC 中内源蔗糖和葡萄糖与 *SnRK2s* 基因表达密切相关, 参与花青素代谢的调节(He et al., 2020), 表明糖信号在 PC 干旱响应中发挥重要作用。然而, 内源糖组分是多元的, 且彼此间涉及复杂的信号网络, 需要更多深入的研究。

糖水平与细胞的能量状态直接相关, 糖既是中间新陈代谢的底物, 也是将碳代谢与植物生长发育联系起来的信号分子(Li et al., 2020)。植物中海藻糖(trehalose, Tre) 是参与糖信号传递的3种主要糖之一, 由海藻糖-6-磷酸磷酸酯酶(trehalose-6-phosphate phosphatase, TPP) 磷酸化海藻糖-6-磷酸(trehalose-6-phosphate, T6P) 生成, 其含量极低(Lunn et al., 2014)。已发现外源施加海藻糖能提高多种植物对环境胁迫的耐受性, 且主要通过增强光合能力和抗氧化防护能力以及诱导信号分子(如H₂O₂和NO)等调节抗逆相关基因的表达来实现(Alam et al., 2014; Shahbaz et al., 2017; Feng et al., 2019; Kosar et al., 2019)。此外, 海藻糖代谢还在调控葡萄糖信号转导、蔗糖代谢和淀粉合成中发挥重要作用(Akram et al., 2016)。SnRKs 是植物中的一类糖信号相关蛋白激酶, 包括3个亚族(*SnRK1s*、*SnRK2s*和*SnRK3s*), 是联系糖信号与胁迫响应之间的枢纽(张金飞等, 2017)。海藻糖可通过修饰蛋白激酶与14-3-3蛋白互作(Delorge et al., 2014), 参与T6P/SnRK1介导的糖信号级联放大(John et al., 2017), 控制源库能量平衡。然而, 禾本科植物中T6P与SnRK1之间涉及更多额外的信号转导, 如己糖激酶(hexokinase, HXK)途径(Baena-González and John, 2020)、脱落酸(abscisic acid,

ABA)介导的气孔导度调节(Wang et al., 2015)以及与NO相关的硝酸还原酶(nitrate reductase, NR)和SnRK2s的共价修饰(Tian et al., 2019), 且依赖于第二信使分子H₂O₂和NO (Claeys et al., 2019; Liu et al., 2020)。值得注意的是, T6P途径也是激活PEPC活性的潜在机制之一(Figueroa and Lunn, 2016)。前期研究发现, HXK和ABA均参与PC的干旱响应(吴敏怡等, 2017)。海藻糖是否在PC的耐旱机制中发挥作用是一个值得深入研究的科学问题。本研究通过外源引入海藻糖, 解析光合、抗氧化酶系统以及相关的信号转导途径参与PC的干旱响应过程, 探明海藻糖代谢与糖信号相关基因*SnRKs*、ABA信号以及下游干旱响应基因的变化特点, 旨在从海藻糖代谢和信号转导的角度解析PC响应干旱的作用机制, 丰富海藻糖在水稻干旱响应中的相关信息, 并为“C₄稻”在干旱胁迫中的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究所用水稻(*Oryza sativa* L.)是由Ku等(1999)以日本粳稻Kitaake为受体, 通过农杆菌介导的转化体系将完整的玉米C₄-PEPC基因导入水稻, 产生了高表达转玉米C₄-PEPC基因水稻(PC), 其中导入的玉米PEPC基因包含所有外显子、内含子、启动子(从-1 212 bp)和约2.5 kb的终止子, 基因全长8.8 kb (Matsuoka and Minami, 1989), 以未转基因原种Kitaake (以下简称WT)为对照。本研究最初使用的转基因材料是由Ku教授馈赠的T₃植株。选择同年收获的大小一致、颗粒饱满的水稻种子经75%乙醇消毒5分钟, 去离子水充分冲洗后, 用50%次氯酸钠消毒10分钟, 再用去离子水充分冲洗, 然后挑选大小一致、饱满的种子, 在恒温黑暗培养箱中30°C催芽3天。将催芽后的种子插入水培培养盒中, 置于人工气候培养箱以30°C/25°C (昼/夜)、14小时/10小时(光/暗)培养。1周后用清水培养, 长至第2周更换用国际水稻所(International Rice Research Institute)标准营养液培养(Yoshida et al., 1971), 以后每3天更换1次营养液。待水稻长到4—5叶期, 选择株型、长势以及叶片大小均一的植株, 用于后续处理, 并统一测定生理指标。

1.2 试验设计

将4周苗龄的WT和PC幼苗各自分为4个处理, 分别为对照组(CK)、海藻糖组(CK+Tre)、模拟干旱组(drought stress, DS)、模拟干旱+海藻糖组(DS+Tre), 所有幼苗均置于人工气候培养箱以30°C/25°C (昼/夜)、14小时/10小时(光/暗)培养。于处理前1天在黑暗条件下, 采用0.5 mmol·L⁻¹海藻糖预处理10小时, 次日, 在光照条件下用12% (m/v)聚乙二醇6000 (polyethylene glycol-6000, PEG-6000)进行模拟干旱处理, CK和CK+Tre使用国际水稻所标准营养液正常培养。将供试材料稻苗分为2组, 一组用于模拟干旱处理后短期响应的机制研究, 于处理2小时后测定植株倒二叶的叶绿素荧光参数并同步收获倒二叶, 液氮速冻后立即放入-80°C冰箱中保存, 统一分析相关生理指标及基因相对表达量; 另一组用于观察稻苗模拟干旱处理后的生长表现, 处理6天后测定相关生长指标。

1.3 生长指标

测定指标包括株高、茎粗、单株鲜重和单株干重。测量每个植株的株高和茎粗后, 用蒸馏水冲洗植株, 用吸水纸去除表面水分, 立即测定全株鲜重。随后用锡箔纸包裹置于烘箱中, 于105°C杀青15分钟, 75°C烘至恒重, 测定单株干重。每个处理9株, 独立重复3次。

1.4 叶绿素荧光参数

选取水稻倒二叶, 将叶片充分暗适应30分钟后获得暗处理数据, 随后选择光合有效辐射值为800 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 使叶片充分光适应后, 用叶绿素荧光成像系统(CF Imager, Technologica, UK)测定各处理的叶绿素荧光参数, 包括最大光化学效率(F_v/F_m)、有效光化学效率(F_v'/F_m')、实际光化学效率(Φ_{PSII})、光化学淬灭系数(photochemical quenching coefficient, qP)和非光化学淬灭系数(non-photochemical quenching coefficient, NPQ)。计算平均值。每个处理测定6株, 独立重复3次。

1.5 相对含水量

参照Smart和Bingham (1974)的方法测定倒二叶的相对含水量(relative water content, RWC)。剪取倒二叶中间叶片10片, 用千分之一天平精确称其鲜重(fresh

weight, F_w), 然后迅速将称好的叶片悬浮于含有蒸馏水的培养皿中, 4°C处理12小时后取出, 用吸水纸吸干表面水分, 称取饱和鲜重(turgid fresh weight, T_w)。最后将叶片置于烘箱, 先105°C杀青15分钟, 然后调至80°C烘干至恒重, 即干重(dry weight, D_w), 并精确称量记录。每个处理至少3次重复。相对含水量按如下公式计算: $RWC(\%) = (F_w - D_w) / (T_w - D_w) \times 100\%$, 作为植株耐旱程度的指标。

1.6 膜脂过氧化程度

参照Velikova等(2000)的方法测定倒二叶的丙二醛(malondialdehyde, MDA)和H₂O₂含量。

1.7 抗氧化酶活性

参照Giannopolitis和Ries (1977)的方法测定倒二叶的超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)和过氧化氢酶(catalase, CAT)活性; 参照Foyer和Halliwell (1976)的方法测定倒二叶的谷胱甘肽还原酶(glutathione reductase, GR)活性; 参照Nakano和Asada (1981)的方法测定倒二叶的抗坏血酸过氧化物酶(ascorbate peroxidase, APX)活性。

1.8 可溶性糖及糖组分

参照Ambavaram等(2014)的方法测定植株倒二叶的可溶性总糖、蔗糖、葡萄糖和果糖含量; 参照Ilhan等(2015)的方法测定倒二叶的海藻糖含量。

1.9 钙离子(Ca²⁺)和一氧化氮(NO)含量

参照杨彩琴等(1998)的方法测定倒二叶的Ca²⁺含量; 参照Murphy和Noack (1994)的方法测定倒二叶NO的含量。

1.10 硝酸还原酶、己糖激酶和磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶活性

参照Tachibaana等(1991)的方法测定倒二叶的硝酸还原酶(nitrate reductase, NR)活性; 参照Schaffer和Petreikov (1997)的方法测定倒二叶的己糖激酶(hexokinase, HK)活性; 参照Giglioli-Guivarc'h等(1996)的方法测定倒二叶的磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(phosphoenolpyruvate carboxylase, PEPC)活性。

1.11 总RNA的提取和实时荧光定量聚合酶链式反应(qRT-PCR)

采用TaKaRa Mini BEST Plant RNA Extraction Kit (TaKaRa, Cat No.9769)试剂盒提取总RNA。采用TaKaRa Prime Script RT Master Mix Perfect Real Time (TaKaRa, Cat No.RR036A)试剂盒进行反转录。采用TB Green Premix Ex Taq Tli RNaseH Plus (TaKaRa, Cat No.RR82LR)试剂盒进行Real Time PCR。用Applied Biosystems Step One实时PCR系统(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)进行

分析。qRT-PCR反应程序为95°C10分钟; 94°C30秒, 55°C40秒, 60°C1分钟, 共32次循环。重复3次。采用Primer 3设计引物, 以水稻组成型表达的*Act*基因为内参, 引物序列见表1。

1.12 数据分析

采用Microsoft Excel 2016软件处理数据。使用SPSS 22.0软件对数据进行One-Way ANOVA分析。使用Origin 9.0及R-3.06.0绘图。使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak and Schmittgen, 2001)方法分析qRT-PCR数据。

表1 qRT-PCR的基因和引物

Table 1 Genes and primers for qRT-PCR

Gene	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
<i>Act</i>	CCCTCTTTCATCGGTATGGA	TTGATCTTCATGCTGCTTGG
<i>OsTPP1</i>	CAAATGGATTTGAGCAATAGC	TCACACTGAGTGCTTCTTCCA
<i>OsTPP2</i>	ATGGATTTGAAGACAAGCAAC	TTAAGTGGATTCTCTTCCA
<i>OsTPP3</i>	ATGACGAACACGCCGGC	CTACTTGCCATCAGCCCTTT
<i>OsTPP7</i>	CCTTCATGAGCGAGACGATG	TCACGAACCTCGAACACCTTG
<i>OsTre1</i>	TTGGTACCCCTTACTCCGGCCGATTCA	AAGAGCTCCTGCCTAGCCTAGCCACAT
<i>OsTPS1</i>	AGTTATTATCTGGAAGGAGC	TCAAGAACCTCCTGAATGCC
<i>OsTPS2</i>	ACAAAGATGGGATGAAAGTG	CAGGATTACAAACAGATTTC
<i>OsTPS8</i>	TGAAGAGATAAAATGGCGTG	GAAAAGGTGAATGAATCTGC
<i>OsSnR1a</i>	AACCAGAGGTAACAGGCAGG	CATCTGTCAAGGAATGCAGG
<i>OsSnRK24</i>	CGTGTTGGCTTCAGTGAAT	CCTTCTCTATCTAAGGGCCG
<i>OsSAPK8</i>	ATAGATGATAATGTCCAGCGTGAG	GTTCTTACAGTGGATTTTGGTTG
<i>OsSAPK9</i>	CACAGCAACGCCGTCTCC	CACACTTCCACCGCTACCAA
<i>OsSAPK10</i>	TGCTGATGTGTGGTCGTGTG	TGCTGGTATGGTCGCCTCT
<i>OsABA8ox2</i>	CTACTGCTGATGGTGGCTGA	CCCATGGCCTTTGCTTTAT
<i>OsABA8ox3</i>	AGTACAGCCCATTCCCTGTG	ACGCCTAATCAAACCATTGC
<i>OsNCED3</i>	CCCCTCCCAAACCATCCAAACCGA	TGTGAGCATATCCTGGCGTCGTGA
<i>OsNCED4</i>	TCCATCTCCTTCTCCCTCCTCCCA	CCTCGCACCTTGCTTGATCTTGCC
<i>OsZIP23</i>	CTCTGATCCCTCGTTGCGTTA	CAACACCCAGCACCAAACCT
<i>OsMYB2</i>	GGGCTGAAACGCACAGGCAAGA	GGGCTGAAACGCACAGGCAAGA
<i>OsRab16b</i>	CAACAACCACAGCAGCA	GATCTTGTCCATGAATCCC
<i>OsRab21</i>	AGCAGCAGCATGCCATG	TGGTGCCGGTGGTCAT
<i>OsLEA3</i>	TTCCACACAGGACCAGGCTA	GTCGCCTCCTTGGTATCCT
<i>OsNAC6</i>	CGCTGTACGAGAAGGAG	ACTCGTGCATGATCCAGTTG
<i>C₄-PEPC</i>	GTACCGCGAGTGGCCCGAGG	CGTCCATGAGCTTGCGCCAC
<i>Osppc2a</i>	CAGCTACTCATGCTTAACGC	GCACAGACTACAGCCTGTAC

Act: 肌动蛋白; *TPP*: 海藻糖-6-磷酸磷酸酯酶; *Tre 1*: 海藻糖酶; *TPS*: 海藻糖-6-磷酸合酶; *SnRK/SAPK*: 丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶; *NCED*: 9-顺式-环氧类胡萝卜素双加氧酶; *ABA8ox*: 脱落酸8'-羟化酶; *MYB*: R2R3型MYB转录因子家族蛋白; *bZIP*: 碱性亮氨酸拉链转录因子家族蛋白; *Rab*: ABA应答基因; *LEA*: 晚期胚胎富集蛋白; *NAC*: 含有NAC结构域的蛋白; *C₄-PEPC*: C₄型磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶基因; *Osppc2a*: C₃型磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶基因

Act: Actin; *TPP*: Trehalose-6-phosphate phosphatase; *Tre 1*: Trehalose; *TPS*: Trehalose-6-phosphate synthase; *SnRK/SAPK*: Serine/threonine protein kinase; *NCED*: 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase; *ABA8ox*: ABA-8'-hydroxylase; *MYB*: R2R3-MYB family transcription factor; *bZIP*: Basic-leucine zipper transcription factor family protein; *Rab*: Responsive to ABA gene; *LEA*: Late embryogenesis abundant protein; *NAC*: NAC domain containing protein; *C₄-PEPC*: C₄ phosphoenolpyruvate carboxylase gene; *Osppc2a*: C₃ phosphoenolpyruvate carboxylase gene

2 结果与讨论

2.1 海藻糖处理缓解干旱胁迫对水稻生长的抑制

本研究表明, CK组与CK+Tre组植株的生长差异显著, CK+Tre处理对PC和WT的生长均有明显的促进效应(图1A–E)。与CK相比, DS处理下PC和WT的株高(图1B)、茎粗(图1C)、鲜重(图1D)和干重(图1E)均显著降低。相比DS处理, DS+Tre处理显著提高了PC和WT的上述指标, 其中PC的株高、茎粗、鲜重和干重分别提高了13.88%、18.45%、21.94%和4.83%, 且PC显著高于WT。表明海藻糖处理能促进水稻生长, 且在一定程度上缓解干旱胁迫对水稻生长的抑制, 其中对PC作用更大。

2.2 海藻糖处理提高干旱胁迫下水稻叶片内PEPC的转录及翻译水平

已有研究表明, PC既包括内源的C₃型PEPC基因(*Osppc2a*) (Mamedov et al., 2005), 也包括外源导入的玉米C₄-PEPC基因(C₄-PEPC), 而干旱胁迫下海藻糖处理是否改变了PC中PEPC基因的转录丰度是揭示两材料差异表现的关键。本研究表明, DS处理下, PC中C₄-PEPC表达量显著增高(图2A), 同时PEPC酶活性显著增强(图2B); 海藻糖的引入进一步上调了C₄-PEPC的表达, 且对其PEPC酶活性的诱导效果更显著。与CK相比, PC中*Osppc2a*的转录水平在DS和DS+Tre处理下均显著提高, 而WT中仅在DS+Tre处理下提高。此外, 相比C₄-PEPC表达水平的大幅升高, *Osppc2a*的变幅较小(图2C)。WT中PEPC酶活在各处理间变幅不大, 也表明*Osppc2a*较低的转录水平对PC水稻叶内PEPC酶活影响不大(图2A–B)。显然, 海藻糖增强干旱胁迫下PC耐旱性的关键是对C₄-PEPC转录及翻译水平的调控。

2.3 海藻糖处理维持干旱胁迫下水稻叶片的光合性能

本研究表明, 与CK相比, DS处理下PC和WT的PSII最大光化学效率(F_v/F_m) (图3A)、实际光化学效率(Φ_{PSII}) (图3C)和光化学淬灭系数(qP) (图3D)均显著降低, 其中 F_v/F_m 和 Φ_{PSII} 表现为PC显著高于WT; 同时PC中非光化学淬灭系数(NPQ) (图3E)显著升高, 而WT中差异不明显。DS+Tre较DS处理显著提高了

PC和WT叶片 F_v/F_m 和 Φ_{PSII} 的水平, 降低了NPQ的数值, 且PC的 F_v/F_m 和 Φ_{PSII} 显著高于WT, 而PC的NPQ显著低于WT。此外, PC和WT各处理间有效光化学效率(F_v/F_m')无明显变化, 且两材料间差异不显著(图3B)。与WT相比, 海藻糖处理可以有效改善干旱胁迫下PC功能叶内PSII光化学效率(图3C), 影响线性电子传递, 显著降低非光化学调节的能量耗散。可见, 在干旱胁迫下, 海藻糖处理可在一定程度上缓解干旱胁迫导致的水稻叶片光合性能下降, 尤其对PC作用更显著。

2.4 海藻糖处理降低干旱胁迫下水稻叶片的氧化损伤

本研究表明, 与CK相比, DS处理显著降低了水稻叶片的相对含水量, 其中PC显著高于WT; 而与DS相比, DS+Tre处理则显著提高了两试材的相对含水量, 且PC仍显著高于WT, 说明干旱胁迫下海藻糖预处理提高了PC叶片的保水能力(表2)。我们进一步研究了海藻糖在干旱诱导的叶片细胞氧化损伤中的作用, 结果发现, 与CK相比, DS处理显著提高了MDA含量, 而DS+Tre处理下的MDA含量则显著降低, 且在DS和DS+Tre处理下, PC均显著低于WT。两材料中活性氧H₂O₂含量在DS处理下显著增加, DS+Tre处理下其含量显著低于DS处理, 其中PC叶片内的H₂O₂含量在这2个处理下均显著低于WT (表2)。

已有研究表明, 植物体内抗氧化酶系统在清除活性氧的过程中发挥重要作用(Uzilday et al., 2014)。我们发现, 在CK处理下, PC中CAT、GR和APX的活性显著低于WT (表2)。与CK相比, 外施Tre则显著提高了水稻叶片内CAT、GR和APX的活性。与CK相比, DS处理显著提高了两试材SOD、CAT和GR的活性; 而DS+Tre处理较DS进一步提高了两试材SOD和APX的活性且降低了GR活性, 其中PC内SOD、CAT和GR活性显著高于WT。此外, 在DS和DS+Tre处理下, PC叶片内的GR活性始终高于WT (表2)。可见, 海藻糖通过增强抗氧化酶活性缓解水稻因干旱导致的膜脂过氧化物质增加, 从而有助于水稻耐旱, 其中PC较好的耐旱表现与GR密切相关。

2.5 海藻糖处理改变干旱胁迫下水稻叶片内可溶性糖的积累与分配

在干旱条件下糖的积累一方面有利于细胞渗透压的

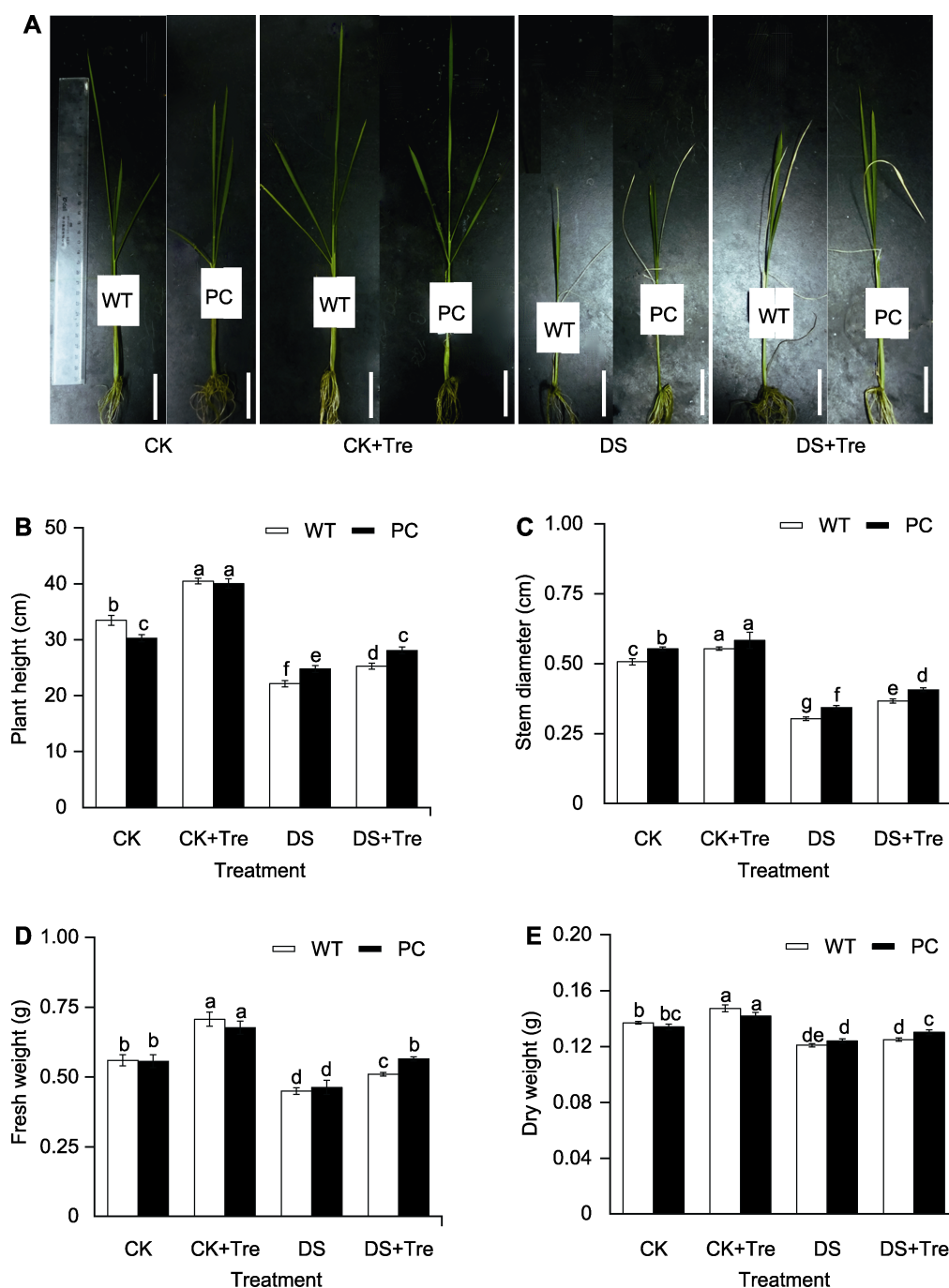


图1 海藻糖处理缓解干旱胁迫对水稻的生长抑制

模拟干旱处理6天后的植株表型(A)、株高(B)、茎粗(C)、鲜重(D)和干重(E)。CK: 正常灌溉; CK+Tre: 正常灌溉+0.5 mmol·L⁻¹海藻糖; DS: 模拟干旱胁迫; DS+Tre: 模拟干旱胁迫+0.5 mmol·L⁻¹海藻糖。图中数值代表来自3个生物学重复的平均值±标准差 (n=9)。不同小写字母的柱值表示差异显著(P<0.05) (Student-Neuman-Keuls)。Bars=1 cm

Figure 1 Trehalose treatments alleviate the growth inhibition of rice under drought stress

Plant phenotype (A), plant height (B), stem diameter (C), fresh weight (D) and dry weight (E) after 6 days of simulated drought treatment. CK: Irrigation; CK+Tre: Irrigation and 0.5 mmol·L⁻¹ trehalose; DS: Simulated drought stress; DS+Tre: Simulated drought stress and 0.5 mmol·L⁻¹ trehalose. Values represent means±SD (n=9) from three biological replicates. Bars labeled with different lowercase letters indicate significant differences (P<0.05) (Student-Neuman-Keuls). Bars=1 cm

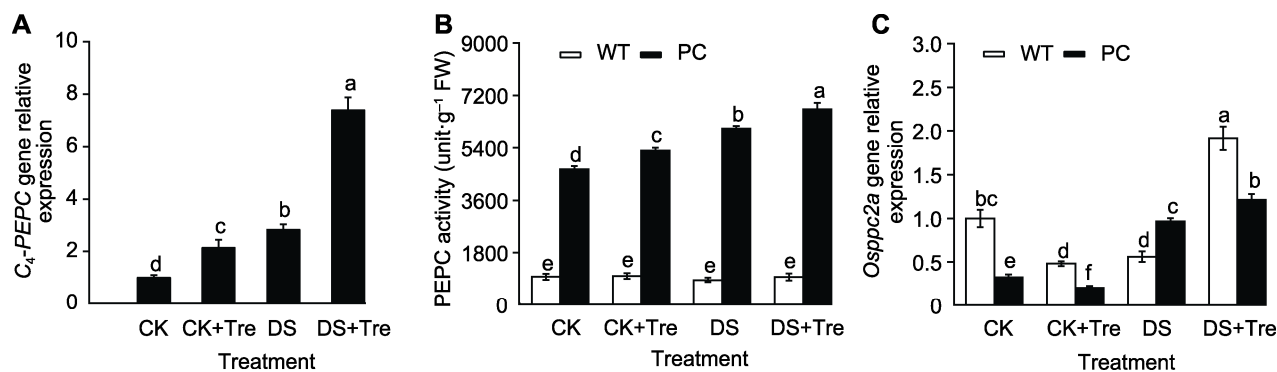


图2 海藻糖处理提高干旱胁迫下水稻叶片内PEPC的转录及翻译水平

模拟干旱处理2小时后 C_4 -PEPC基因的相对表达量(A)、磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(PEPC)活性(B)和 $Osppc2a$ 基因的相对表达量(C)。缩写同图1。图中数值代表来自3个生物学重复的平均值 \pm 标准差($n=6$)。不同小写字母的柱值表示差异显著($P<0.05$) (Student-Neuman-Keuls)。

Figure 2 Trehalose treatments increase PEPC transcription and translation in rice leaves under drought stress

C_4 -PEPC expression (A), phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC) activity (B) and $Osppc2a$ expression (C) after 2 hours of simulated drought treatment. Abbreviations are the same as those given in Figure 1. Values represent means \pm SD ($n=6$) from three biological replicates. Bars labeled with different lowercase letters indicate significant differences ($P<0.05$) (Student-Neuman-Keuls).

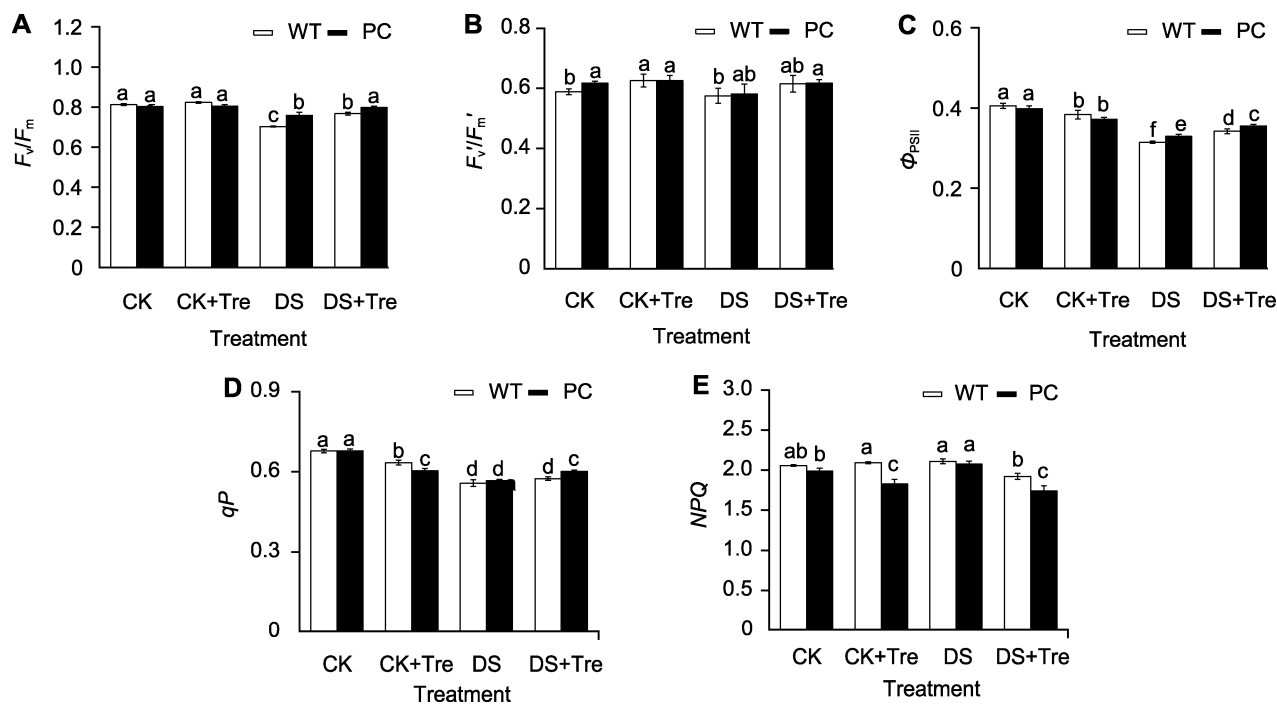


图3 海藻糖处理维持干旱胁迫下水稻叶片的光合性能

模拟干旱处理2小时后PC和WT的最大光化学效率(F_v/F_m) (A)、有效光化学效率(F_v'/F_m') (B)、实际光化学效率(Φ_{PSII}) (C)、光化学淬灭系数(qP) (D)和非光化学淬灭系数(NPQ) (E)。缩写同图1。图中数值代表来自3个生物学重复的平均值 \pm 标准差($n=6$)。不同小写字母的柱值表示差异显著($P<0.05$) (Student-Neuman-Keuls)。

Figure 3 Trehalose treatment maintain the photosynthetic performance of rice leaves under drought stress

F_v/F_m (A), F_v'/F_m' (B), Φ_{PSII} (C), qP (D) and NPQ (E) of PC and WT after 2 hours of simulated drought treatment. Abbreviations are the same as those given in Figure 1. Values represent means \pm SD ($n=6$) from three biological replicates. Bars labeled with different lowercase letters indicate significant differences ($P<0.05$) (Student-Neuman-Keuls).

维持, 另一方面可作为糖信号调节耐旱性(Asami et al., 2019)。本研究表明, 与CK相比, DS处理显著上调水稻功能叶内的可溶性糖和糖组分的含量, 其中PC的可溶性糖、蔗糖、果糖和海藻糖含量显著高于WT (表3)。与DS处理相比, DS+Tre处理进一步显著上调两试材的可溶性糖、蔗糖、果糖和海藻糖含量, 且PC仍显著高于WT。值得关注的是, 与单独DS处理相比, DS+Tre处理显著下调水稻葡萄糖含量, 且PC显著低于WT (表3)。可见, 外源海藻糖通过改变叶片内源糖

组分的含量, 积累更多的内源海藻糖, 有利于水稻耐旱, 其中PC的作用强于WT。

2.6 海藻糖处理调节干旱胁迫下水稻叶片内海藻糖代谢相关基因的表达

本研究表明, 在DS处理后, PC内源海藻糖含量与CK相比显著上升; 而DS+Tre处理进一步上调PC的海藻糖含量, 且PC显著高于WT (表3)。是否外施海藻糖调节水稻内源海藻糖代谢? 而且为什么PC的含量高于

表2 海藻糖处理调节干旱胁迫下水稻叶片的氧化损伤

Table 2 Trehalose treatments regulate the oxidative damage of rice leaves under drought stress

Index	WT				PC			
	CK	CK+Tre	DS	DS+Tre	CK	CK+Tre	DS	DS+Tre
RWC (%)	91.09 b	92.02 ab	78.05 e	89.21 c	89.68 c	88.30 c	80.81 d	93.00 a
MDA (nmol·mg ⁻¹ prot)	2.26 d	2.22 d	3.39 a	2.52 c	2.40 c	2.18 c	3.03 b	1.89 e
H ₂ O ₂ (μmol·g ⁻¹ FW)	6.87 f	24.84 a	14.59 c	5.09 g	8.01 e	21.68 b	11.96 d	3.63 h
SOD (U·mg ⁻¹ prot)	1087.99 d	1063.79 e	1101.66 c	1126.52 b	1083.80 d	1059.65 e	1102.99 c	1140.24 a
CAT (U·mg ⁻¹ prot)	15.74 e	16.99 c	16.63 d	16.65 d	13.51 f	18.39 a	16.25 d	17.74 b
GR (nmol·g ⁻¹ prot)	1.49 e	2.46 c	2.17 d	0.96 g	1.22 f	3.26 b	3.69 a	2.00 d
APX (U·g ⁻¹ FW)	5.26 c	6.55 b	6.59 b	10.14 a	2.70 f	4.33 d	2.32 g	3.74 e

RWC: 相对含水量; MDA: 丙二醛; H₂O₂: 过氧化氢; SOD: 超氧化物歧化酶; CAT: 过氧化氢酶; GR: 谷胱甘肽还原酶; APX: 抗坏血酸过氧化物酶。其余缩写同图1。表中数值代表来自3个生物学重复的平均值±标准差(*n*=6)。不同小写字母表示差异显著(*P*<0.05) (Student-Neuman-Keuls)。

RWC: Relative water content; MDA: Malondialdehyde; H₂O₂: Hydrogen peroxide; SOD: Superoxide dismutase; CAT: Catalase; GR: Glutathione reductase; APX: Ascorbate peroxidase. Other abbreviations are the same as those given in Figure 1. Values represent means±SD (*n*=6) from three biological replicates. Different lowercase letters indicate significant differences (*P*<0.05) (Student-Neuman-Keuls).

表3 海藻糖处理改变干旱胁迫下水稻叶片内可溶性糖的积累与分配

Table 3 Trehalose treatments change the accumulation and distribution of soluble sugars in rice leaves under drought stress

Index (mg·g ⁻¹ FW)	WT				PC			
	CK	CK+Tre	DS	DS+Tre	CK	CK+Tre	DS	DS+Tre
Soluble sugar content	16.10 e	16.50 e	29.01 c	34.32 b	14.97 f	19.01 d	35.31 b	41.57 a
Sucrose content	9.40 e	10.78 d	10.34 d	12.36 b	8.51 f	11.18 c	11.61 c	13.81 a
Fructose content	4.01 d	4.09 d	4.95 c	5.81 b	3.86 e	3.88 e	5.49 b	7.66 a
Glucose content	1.64 b	1.28 c	2.35 a	1.62 b	0.88 d	0.78 e	1.32 c	0.91 d
Trehalose content	8.22 f	9.46 e	10.84 d	13.60 b	8.55 f	10.40 d	11.23 c	15.80 a

缩写同图1。表中数值代表来自3个生物学重复的平均值±标准差(*n*=6)。不同小写字母表示差异显著(*P*<0.05) (Student-Neuman-Keuls)。

Abbreviations are the same as those given in Figure 1. Values represent means±SD (*n*=6) from three biological replicates. Different lowercase letters indicate significant differences (*P*<0.05) (Student-Neuman-Keuls).

WT? 已有研究表明, 海藻糖代谢相关基因在调控能量平衡中发挥作用(Ge et al., 2008; Zang et al., 2011; Islam et al., 2019)。OsTre1是目前唯一已知参与调控海藻糖酶合成的基因, 海藻糖酶通过分解海藻糖降低植物中海藻糖的含量(Islam et al., 2019)。因此, 本研究进一步分析了海藻糖合成相关基因(OsTPP1、OsTPP2、OsTPP3和OsTPP7)、海藻糖分解相关基因(OsTre1)以及海藻糖合成前体T6P合成相关基因(OsTPP1、OsTPS2和OsTPS8)的表达(图4A)。与CK相比, OsTPP2、OsTPP3和OsTPP7在DS处理下表达量均显著上升, 且PC内的基因表达量均显著高于WT; 与DS相比, DS+Tre处理下两供试材料的OsTPP1和OsTPP3表达量进一步上调, 而OsTPP2和OsTPP7表达量下调, 但PC始终显著高于WT(附表1)。在WT中, DS处理下OsTre1的表达量较CK处理显著上调; 与DS相比, DS+Tre处理在PC和WT中OsTre1的表达量均下调, 且在DS和DS+Tre处理下, PC始终低于WT且差异显著(附表1; 图4A)。此外, 在DS处理下, PC中与海藻糖上游合成前体T6P相关的OsTPS2和OsTPS8表达量较CK均显著上升, DS+Tre处理使其表达量进一步上调, 且PC显著高于WT(附表1)。但WT中上述基因在各处理下变幅不大。可见, 在干旱条件下, 海藻糖处理通过上调海藻糖合成以及下调其分解相关基因的转录水平来提高PC的内源海藻糖含量, 从而表现出较高的海藻糖水平。

2.7 海藻糖处理影响干旱胁迫下水稻叶片内SnRKs相关基因的表达

水稻中SnRK1亚族包括OsSnRK1a、OsSnRK24和OsSnRK35, 它们在调控碳水化合物代谢中发挥重要作用(Wang et al., 2020b)。T6P/SnRK1信号途径响应库限制的蔗糖信号, 在库限制缓解时保证生长的恢复(Simon et al., 2018)。本研究显示, 相比CK, 在DS处理下两材料中OsSnRK1a和OsSnRK24的表达水平均显著升高; DS+Tre处理后, PC的OsSnRK1a和OsSnRK24的表达水平较DS处理进一步上调, 但在WT中SnRK1相关基因的表达量变幅不大, 其中OsSnRK24甚至表现下调(图4B; 附表1), 同时, 在该处理下PC内OsSnRK1a和OsSnRK24的表达量显著高于WT(图4B; 附表1)。可见, 海藻糖处理后PC和WT两材料响应干旱胁迫的差异表现与能量感受相关

的糖信号SnRK1有关。

水稻SnRK2家族中的OsSPAK8、OsSPAK9和OsSPAK10可通过ABA作为气孔运动的调节信号(Simon et al., 2018)。本研究表明, CK处理下, OsSAPK8、OsSAPK9和OsSAPK10的表达量在PC和WT之间无明显差异(图4B)。PC中DS处理较CK处理上调了OsSAPK8和OsSAPK9的表达, 而DS+Tre处理较DS处理进一步上调了OsSAPK8、OsSAPK9和OsSAPK10的表达。而WT在DS处理下较CK上调了OsSAPK8和OsSAPK10表达量, 但引入Tre后较单独干旱仅OsSAPK8表达量进一步上调(图4B; 附表1)。此外, DS+Tre处理组中PC内OsSAPK8和OsSAPK9的表达量显著高于WT。可见, 海藻糖处理使干旱胁迫下PC与WT功能叶内与ABA信号相关的SnRK2部分基因的表达差异增大。

2.8 海藻糖处理影响干旱胁迫下水稻叶片内ABA合成和代谢相关基因的表达

已有研究表明, ABA分解代谢相关基因(OsABA8ox2和OsABA8ox3)和ABA合成代谢相关基因(OsNCED3和OsNCED4)直接参与调控植株ABA含量(Zhu et al., 2009; Li et al., 2015)。本研究发现, ABA分解代谢相关基因(OsABA8ox2和OsABA8ox3)在CK、DS和DS+Tre处理间均表现为PC显著低于WT(图4C; 附表1)。在DS处理下, PC中OsABA8ox2和OsABA8ox3基因表达量较CK处理显著下降, DS+Tre处理后进一步下调; 而WT中OsABA8ox3在DS处理下上调, 在DS+Tre处理下虽然较DS显著下调, 但仍高于CK的表达水平。ABA合成代谢相关基因(OsNCED3和OsNCED4)在各处理间均表现为PC高于WT。在PC中, 相比CK, OsNCED3和OsNCED4的表达水平在DS处理下上调, DS+Tre处理后进一步上调; 而WT内各处理中其表达水平变幅不大(图4C)。可见, 海藻糖处理选择性促进了干旱条件下PC内ABA合成相关基因的上调, 表明ABA代谢途径可能参与海藻糖增强PC的耐旱性机制。

已有研究表明, 水稻OsZIP23和OsMYB2是响应ABA耐旱的转录因子(Yang et al., 2012; Dey et al., 2016), 而OsLEA3、OsNAC6、OsRab16b和OsRab21等作为靶基因(Hong et al., 2009; Duan and Cai, 2012; Hong et al., 2016)在下游发挥作用。为了进一

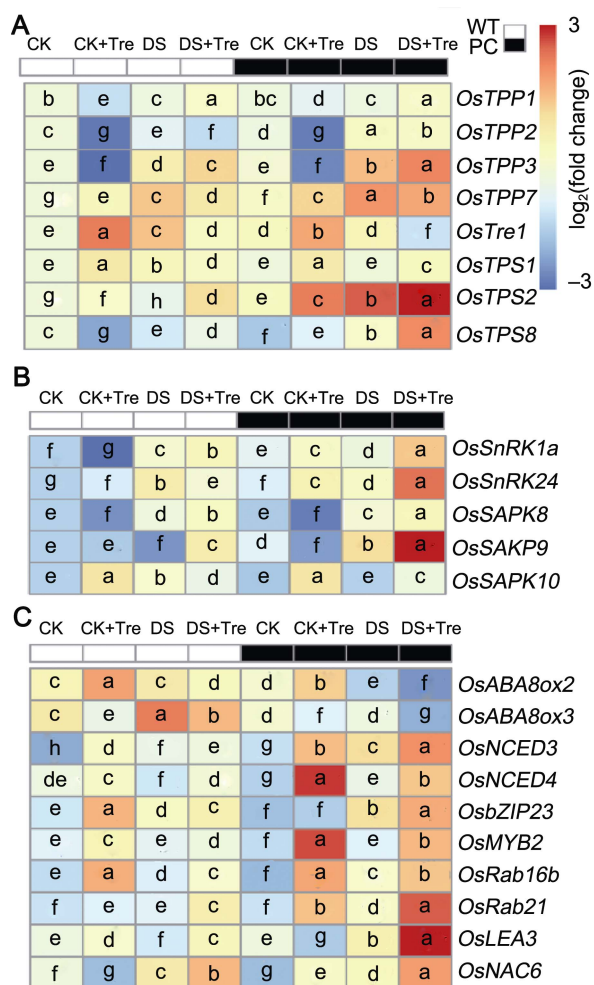


图4 海藻糖处理影响干旱胁迫下水稻叶片内海藻糖、SnRKs及ABA相关基因的表达

(A) 海藻糖合成与代谢相关基因的表达; (B) SnRKs相关基因的表达; (C) ABA代谢相关基因的表达。缩写同图1。热图显示基因相对表达量对数转换均一化值, 显著性分析表示基因相对表达量之间的差异(附表1)。图中不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$) (Student-Neuman-Keuls)。

Figure 4 Trehalose treatments affect the expression of trehalose, SnRKs and ABA-related genes in rice leaves under drought stress

(A) The expression of trehalose biosynthesis and metabolism related genes; (B) The expression of SnRKs-related genes; (C) The expression of ABA metabolism-related genes. Abbreviations are the same as those given in Figure 1. The heat map shows the log-transformed normalized values of relative gene expression, and the significance analysis showed the difference between relative gene expressions (Appendix Table 1). Different lowercase letters indicate significant differences ($P < 0.05$) (Student-Neuman-Keuls).

步明确海藻糖与ABA在PC干旱调节中的机制, 本研

究测定了ABA耐旱相关转录因子和靶基因的表达量(图4C)。结果表明, 在PC中, DS处理上调了*OsZIP23*的表达量; 相比DS, DS+Tre处理进一步上调了*OsZIP23*和*OsMYB2*的转录水平, 且PC显著高于WT。同时, *OsRab16b*、*OsRab21*、*OsLEA3*和*OsNAC6*在PC叶内CK、DS和DS+Tre处理下的表达模式与*OsZIP23*和*OsMYB2*基本保持一致, 且上述基因的表达水平在DS+Tre处理下均表现为PC显著高于WT(图4C; 附表1)。综上, 与WT相比, 海藻糖可能通过诱导ABA信号转导途径上调与ABA相关的耐旱转录因子及其靶基因的表达水平, 进而增强PC的耐旱性。

2.9 海藻糖处理诱导干旱胁迫下水稻叶片内Ca²⁺和NO的产生以及NR和HXK的酶活性

Ca²⁺和NO是调节植物耐旱性的重要第二信使分子(Corpas and Barroso, 2018; Liu et al., 2020)。本研究表明, 两信号分子的含量在WT和PC间存在差异, 其中Ca²⁺水平在WT的各处理间基本保持稳定(图5A, B)。相比CK, PC中DS处理下的Ca²⁺含量显著升高, 但PC显著低于WT(图5A)。而DS+Tre处理进一步显著增加了Ca²⁺含量, 且PC显著高于WT。有意思的是, 与CK相比, DS处理显著下调了两试材的NO含量, 而DS+Tre处理仅提升了PC叶内的NO水平, 且PC中NO含量在CK+Tre、DS及DS+Tre处理下均显著高于WT(图5B)。以上表明干旱条件下PC中的NO可能作为信号, 低水平时促进ABA的信号转导, 高水平时则起到反馈抑制作用。可见, 与DS处理相比, 海藻糖处理有利于启动信号分子参与干旱响应, 且较WT, PC的促进效应更显著。

海藻糖合成前体T6P通过激活硝酸还原酶来调控PEPC酶的活性(Figueroa and Lunn, 2016)。结合本研究NO含量的变化, 我们进一步测定了其合成关键酶NR的活性(图5C)。结果表明, 不同处理下NR的酶活性与NO含量呈现同步变化, 且PC始终高于WT; 与单独干旱处理相比, DS+Tre处理可能诱导了PC的NR活性, 进而在一定程度上提高其NO水平。此外, HXK途径可负调节PEPC酶活性(吴敏怡等, 2017), 与CK处理相比, DS处理下PC和WT的HXK活性均显著降低(图5D)。DS+Tre处理加剧了PC中HXK酶活性的下降, 但在WT中无显著差异, 且PC显著低

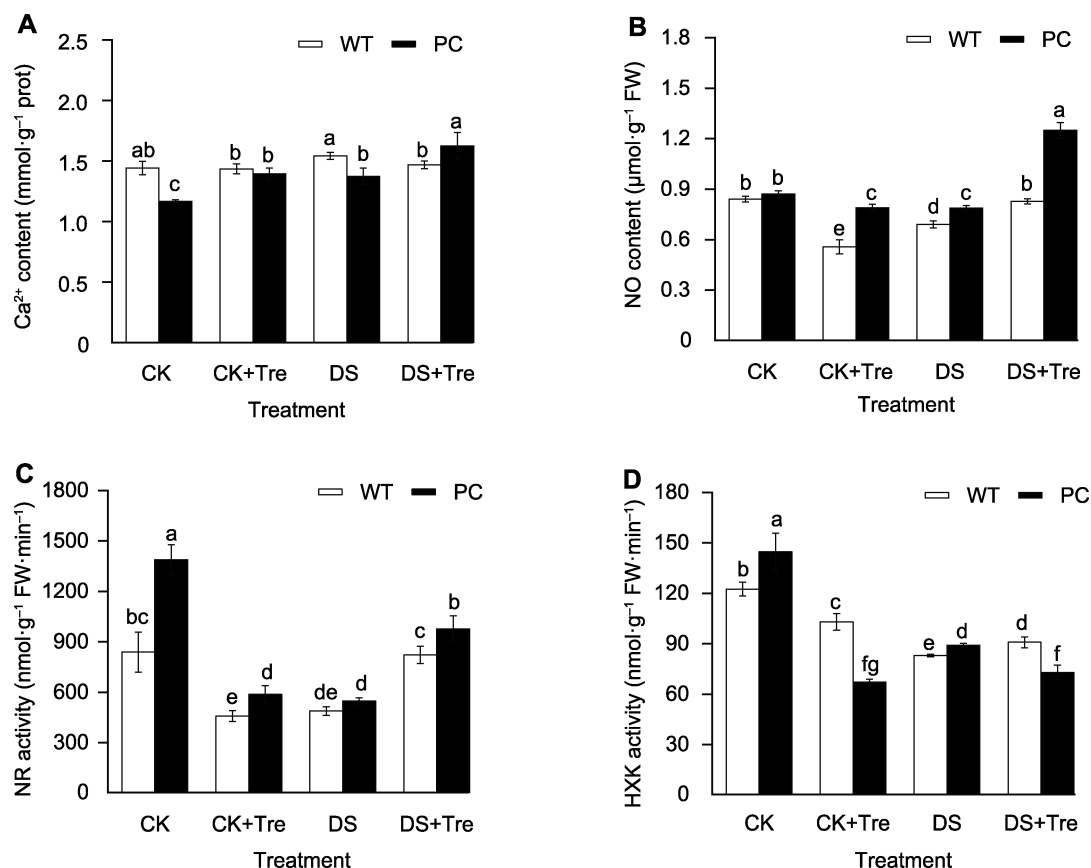


图5 海藻糖处理影响干旱胁迫下水稻叶片内信号分子的含量和相关酶活性

(A) 钙离子含量; (B) 一氧化氮含量; (C) 硝酸还原酶活性; (D) 己糖激酶活性。缩写同图1。图中数值代表来自3个生物学重复的平均值±标准差($n=6$)。不同小写字母的柱值表示差异显著($P<0.05$) (Student-Neuman-Keuls)。

Figure 5 Trehalose treatments affect the content of signal molecules and the activity of related enzymes in rice leaves under drought stress

(A) Ca^{2+} content; (B) NO content; (C) Nitrate reductase (NR) activity; (D) Hexokinase (HXK) activity. Abbreviations are the same as those given in Figure 1. Values represent means±SD ($n=6$) from three biological replicates. Bars labeled with different lowercase letters indicate significant differences ($P<0.05$) (Student-Neuman-Keuls).

于WT (图5D)。因此, 相比WT, 海藻糖处理提高PC耐旱性可能与下调HXK途径有关(图5D)。

2.10 讨论

磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶不仅是植物碳固定和碳回补的主导物, 而且在保卫细胞中也作为一种胞质酶, 主要通过提供苹果酸作为反离子和渗透调节器参与植物的耐逆调节(Akram et al., 2016)。作为具有耐旱特性的高表达转玉米C₄型PEPC基因水稻, PC前期已有系列研究(严婷等, 2019), 表明干旱会使PC触发第二信使, 如H₂O₂ (Ren et al., 2014)、NO (Chen et al., 2014)、Ca²⁺ (Qian et al., 2015a, 2015b; Liu et al.,

2017a, 2017b)、磷脂酸(Li et al., 2011)和糖(Zhang et al., 2017), 通过调控钙依赖和糖信号激酶相关基因, 如CPK4、CPK9 (刘小龙等, 2015)以及SnRKs基因激活级联反应, 诱导外源C₄-PEPC的转录与翻译, 促进渗透调节物质的积累, 并维持稳定的光合作用, 进而表现耐旱(Huo et al., 2017; Zhang et al., 2017; 张金飞等, 2018; He et al., 2020)。本实验室前期的研究表明, 糖是水稻生长发育和基因表达的重要调节因子, 它不仅影响PC代谢途径, 而且在信号转导中具有初级信使作用(吴敏怡等, 2017; 何亚飞等, 2018; 张金飞等, 2018; He et al., 2020)。本研究进一步表明, 在干旱条件下, 海藻糖处理使PC一方面通过蔗糖含量

增加激活 *SnRK1*, 加速动员海藻糖代谢, 促进内源海藻糖合成, 从而提高抗氧化酶活性, 降低膜脂过氧化作用, 缓解对光系统的伤害; 另一方面提高蔗糖含量, 还有利于上调 *NR* 活性并下调 *HXK* 活性, 进而提高 *PEPC* 的转录与翻译水平, 缓解 *PSII* 的光合性能损伤。此外, *PC* 还可能通过诱导 *NO* 和钙离子, 提高 *ABA* 依赖的 *SnRK2* 基因的转录水平, 增强 *ABA* 代谢及其信号转导, 激活下游干旱相关靶基因的表达, 维持植物正常的生长发育, 增强 *PC* 的耐旱性。

光合作用是植物生长发育最重要的物质和能量基础(Ambavaram et al., 2014)。当植物遭受各种环境胁迫时, 其光系统 *PSII* 很容易受到伤害。海藻糖是抵御干旱胁迫的有效保护剂(Sadak, 2016)。本研究表明, 干旱处理抑制水稻幼苗的生长, 引入低浓度海藻糖后, *PC* 较 *WT* 植株所受伤害明显减轻, 这与海藻糖对干旱胁迫所造成的 *PC* 叶片 *PSII* 结构和中心反应活力损伤的缓解作用表现一致, 即海藻糖处理可有效缓解 *PC* 植株 *PSII* 反应中心的光化学活性, 使光化学转化和线性电子传递能力维持稳定, 并通过降低热耗散进一步保护光合机构, 维持叶片光合能力, 进而缓解对植株的生长抑制。

干旱抑制植物光合作用过程可能是由于氧化胁迫引起的光氧化, 破坏了光合器官, 导致光合碳同化降低(Theerakulp and Phongngarm, 2013; Samadi et al., 2019)。已有研究表明, 植物膜脂质过氧化是由暴露在胁迫下的活性氧过度积累所造成的次级伤害(Uzilday et al., 2014)。然而, 活性氧也是双刃剑, 即在适度的活性氧水平下可将胁迫信号传递到下游信号通路, 并与蛋白激酶和转录因子协同作用, 最终调控植物的新陈代谢、发育和抗逆相关基因的表达(Noctor et al., 2018)。有研究显示, 海藻糖诱导的抗氧化酶活性增加可以抑制 H_2O_2 的积累, 从而降低对氧化胁迫的敏感性, 保护光合结构和细胞膜免受氧化损伤(Yu et al., 2019)。与 *C₃* 植物相比, 类 *C₄* 和 *C₄* 植物对 PEG 诱导的渗透胁迫具有更强的耐受性, 且更能防止氧化胁迫造成的伤害(Uzilday et al., 2014)。本研究表明, 海藻糖处理可以降低 *PC* 的膜脂过氧化程度, 提高光合能力, 增强耐旱性, 暗示高表达转玉米 *C₄* 型 *PEPC* 基因水稻赋予了比非转基因的 *WT* 更强的 PEG 处理耐受性。

光合作用的改善与内源糖信号网络的相互作用有关(Feng et al., 2019)。蔗糖是参与光合作用的主要糖类, 己糖是海藻糖的主要合成底物(Wingler, 2018), 而海藻糖对于维持植物的生长以及对逆境的响应至关重要(Lunn et al., 2014)。本研究表明, 海藻糖联合干旱处理使水稻叶片内的蔗糖和海藻糖含量进一步增加, 葡萄糖含量降低(表3), 其中 *PC* 内蔗糖和海藻糖含量显著高于 *WT*, 而葡萄糖含量显著低于 *WT*, 这暗示 *PC* 具有较 *WT* 更强的光合能力与内源糖组分的差异有关。有研究表明, 植物中具有 *C₄* 型 *PEPC* 基因有利于更多光合产物的积累, 同时由于较强的源库活动而对蔗糖积累可能出现的反馈抑制表现出较低的敏感性(Kim et al., 2013)。海藻糖-6-磷酸合酶(trehalose-6-phosphate synthase, *TPS*)催化葡萄糖从 *UDP*-葡萄糖到葡萄糖 6 磷酸酯的转移以形成 *T6P*, 随后 *T6P* 被 *TPP* 磷酸化为海藻糖(Fichtner and Lunn, 2021)。本研究表明, 相比 *WT*, *PC* 一方面在更大程度上维持了其功能叶片光合性能的稳定, 同时也因此积累了相对较多的可溶性糖(蔗糖), 进而增强其耐旱性; 另一方面, *PC* 可通过消耗更多的葡萄糖作为底物进而合成海藻糖, 也有利于植株提高抵御胁迫的能力。已有研究表明, 己糖积累可导致光合作用相关基因表达下调(Wingler, 2018)。植物细胞中 *HXK* 是葡萄糖信号的感受器, *HXK* 可被 *T6P* 抑制(Bláquez et al., 1993)。*HXK* 作为关键信号元件在 *PC* 中维持很低的水平, 尤其是外施海藻糖后其在干旱胁迫下的活性伴随葡萄糖含量而降低, 暗示海藻糖也可能通过下调 *HXK* 途径参与干旱响应。已有研究表明, 转化海藻糖生物合成基因的转基因植物其内源海藻糖含量显著增加, 并表现出更好的抗逆性(Ge et al., 2008; Han et al., 2016; Kosar et al., 2019)。需要特别指出的是, *OsTPP1* 和 *OsTPP2* 可以编码功能性 *TPP*, 与海藻糖含量直接相关, 且 *OsTPP1* 与 *OsTPP2* 在胁迫下协同调控 *TPP* 酶的合成(Pramanik and Imai, 2005), 而 *OsTPP3* 和 *OsTPP7* 作为 II 类 *TPP* 基因对海藻糖含量起主要调节作用(Kretzschmar et al., 2015; Jiang et al., 2019)。水稻 *OsTPP1*、*OsTPP2* 和 *OsTPP3* 通过调控 *ABA* 合成(*OsNCED3* 和 *OsNCED4*)和信号转导基因(*OsRab16*)的表达来响应胁迫, 增强抗性(Ge et al., 2008; Jiang et al., 2019)。拟南芥(*Arabidopsis*

thaliana) *TPS1*基因产物在调节营养以及胚发生组织的生长中发挥至关重要的作用, 其机制涉及ABA和糖代谢(Gómez et al., 2010)。OsTPS8可能通过ABA信号转导调节水稻中的木质素沉积和海藻糖积累, 从而赋予水稻耐盐性(Vishal et al., 2019)。本研究通过外施海藻糖联合干旱处理, 发现PC叶片中OsTPP1和OsTPP2的总表达量显著升高, 表明外施海藻糖可通过增强内源海藻糖代谢途径促进PC内源海藻糖积累(表3), 同时发现OsTPP3和OsTPS8基因的表达显著增强(图4A), 推测海藻糖可能通过调控ABA信号通路抵御胁迫。而OsTPP7在海藻糖代谢中对海藻糖含量起调节作用, 它与T6P/蔗糖和海藻糖含量呈负相关, 即当能量较少时OsTPP7的上调可以促进淀粉酶活化, 调控源库能量平衡(Kretschmar et al., 2015)。本研究还发现OsTPP7的表达下降(图4A), 这与其内源海藻糖含量的增加相反(表3), 推测其在PC的糖代谢过程中可能具有关键的平衡调节功能, 相关推测还需要深入研究加以验证。

植物中SnRK1可能在生长发育的不同阶段和不同组织中都需要被抑制和激活, 以适应其生长和发育进程(Zhao, 2019)。已有研究表明, T6P和SnRK1的相互作用是调控细胞响应内源能量及碳状态的中枢信号途径(John et al., 2017)。然而, 禾本科植物中T6P在调节SnRK1中具有双重功能, 并且二者在调节能量平衡时还涉及更多未知的潜在机制(Zhai et al., 2018)。在水稻种子萌发和幼苗生长过程中, SnRK1是养分再动员和供应到生长库所必需的元件(Kretschmar et al., 2015)。代谢组学研究结果也表明, T6P是维持蔗糖水平(光合作用产物)的信号因子, 特别是在植物体内糖代谢和糖流入过程中起重要作用, 且蔗糖水平与T6P浓度的变化呈正相关(Figueroa et al., 2016)。还有研究推测, T6P或海藻糖或海藻糖生物合成酶可能与植物激素以及糖诱导的信号通路相互作用(Durand et al., 2018)。本研究也发现, 海藻糖联合干旱处理, PC中T6P合成相关基因的表达与WT差异明显, 而且T6P基因表达水平的提高伴随着与蔗糖含量和SnRK1相关基因的表达上调, 表明其可能通过蔗糖分子加速PC叶内T6P的清除, 进而动员海藻糖代谢途径响应胁迫。可见, 上述研究结果均可归因于蔗糖-T6P-SnRK1关系的高度动态性质, 以及每个成分参与独立的或相互关联的信号通路

(Zhai et al., 2018)。

ABA主要通过关闭叶片的气孔、减少蒸腾和保持植物体内的水分来提高植物的抗逆性(Feng et al., 2019)。通过外源施加或过量表达基因来增加内源ABA含量, 可以上调ABA信号相关基因的表达, 从而对植物的抗逆性产生积极影响(Yu et al., 2019)。在逆境条件下, 植物ABA生物合成和信号转导基因的普遍上调与海藻糖合成相关基因的上调协同变化(Zhang et al., 2018)。SnRK2基因是ABA信号转导的关键成分, 并通过转录因子AREBs/ABFs的磷酸化, 对ABA诱导的ABA反应基因的激活起重要作用(Zhong et al., 2020), 其中OsSAPK8已被证明是干旱胁迫相关基因OsSLAC1的激活剂(Sun et al., 2016)。海藻糖处理也显著上调了干旱胁迫下番茄(*Solanum lycopersicum*) *SISnRK2.3*和*SISnRK2.4*的转录水平, 减少失水, 增强耐旱能力(Yu et al., 2019)。本研究表明, 与单独干旱胁迫相比, 海藻糖联合干旱处理显著上调了供试材料中与ABA相关的3个SnRK2基因(OsSAPK8、OsSAPK9和OsSAPK10)的表达, 并且选择性地促进ABA合成代谢相关基因的上调和ABA分解代谢相关基因的下调, 这些表现与其耐旱指标(叶片的RWC)表现一致, 而且PC的表达水平显著高于WT, 表明外施海藻糖处理可能增强了供试材料ABA依赖的SnRK2的干旱响应能力, 即增强ABA合成代谢相关基因的表达, 有利于正向激活ABA信号通路, 诱导bZIP和MYB转录因子, 进一步上调相关靶基因*Rab*、*LEA*和*NAC*的表达, 从而有利于增强PC的耐旱性。

植物抗逆调节机制中, 海藻糖与信号分子Ca²⁺和NO以及激素等密切相关(Delorge et al., 2014; Corpas and Barroso, 2018; Wang et al., 2020a)。ABA可快速上调SnRK2基因来磷酸化下游效应蛋白, 响应胁迫(Wang et al., 2015); 同时激活的SnRK2可促进T6P相关基因的表达, 通过NR亚硝基化积累NO, 但当NO达到较高水平时将会对ABA信号途径起负反馈抑制效应(Tian et al., 2019)。本研究也发现, 外源海藻糖联合干旱处理可在一定程度上促进Ca²⁺和NO的产生, 而且NO含量的增加与其主要产生途径硝酸还原酶活性的增强同步, 表明PC中第二信使分子(NO和Ca²⁺)可能参与了海藻糖代谢途径对糖信号及ABA信号响应干旱的调控。在C₃植物中, PEPC对光

合作用几乎不起作用, 为非光合型 *PEPC*, 且相比 C₄ 植物中的光合型 *PEPC*, 其酶活性非常低 (Latzko and, 1983)。大多数 *PEPC* 是变构酶, 其活性受多个新陈代谢效应子的调控 (Izui et al., 2004)。本研究表明, PC 和 WT 在海藻糖处理后可以增强其干旱条件下 C₃ 型 *PEPC* (*Osppc2a*) 基因的转录水平。但相比 PC, WT 的 *PEPC* 活性变幅很小, 说明在 PC 中 *PEPC* 活性的增强主要归因于 C₄ 型 *PEPC* 基因的高表达, 且这部分 *PEPC* 为光合型 *PEPC*, 是 PSII 光合性能增强的关键。有研究表明, T6P 可部分通过 NR 激活 *PEPC* 翻译水平来调节光同化物的分配 (Figueroa et al., 2016), 且 HXK 可负调节 *PEPC* 酶活 (吴敏怡等, 2017)。与之相对应, 海藻糖联合干旱处理后 PC 也表现 *PEPC* 活性的增强伴随 NR 的上调和 HXK 的下调, 表明 PC 也可能通过下调 HXK 途径调节 *PEPC* 活性, 但具体机制尚待深入研究。

已有研究表明, PC 可利用内源的高糖水平加强内源的糖转化和动员 (Zhang et al., 2017)。本研究发现, 外施海藻糖可加强 PC 干旱条件下内源海藻糖代谢, 产生了不同糖的水平变化, 包括上调蔗糖水平, 激活蔗糖-T6P-SnRK1 系统, 下调葡萄糖, 负调节 HXK-葡萄糖系统, 并通过 ABA 信号途径来响应干旱逆境。总之, 糖信号参与的多种适应机制有助于 PC 灵活地响应干旱逆境。至于海藻糖如何与内源信号分子如 ABA、NO 以及钙离子信号互作, 参与 PC 干旱响应的精细机制仍需深入研究。本研究为从海藻糖信号研究 PC 独特的耐旱生理机制提供了新线索, 有助于丰富多元糖信号参与植物响应逆境作用方式的认识。

参考文献

- 何亚飞, 许梦洁, 李霞 (2018). 干旱条件下 DCMU 对高表达转 C₄-*pepc* 水稻的花青素合成基因及其相关信号的影响. 中国生态农业学报 26, 409–421.
- 李霞, 焦德茂, 戴传超 (2005). 转 *PEPC* 基因水稻对光氧化逆境的响应. 作物学报 31, 408–413.
- 刘小龙, 李霞, 钱宝云 (2015). 外源 Ca²⁺ 对 PEG 处理下转 C₄ 型 *PEPC* 基因水稻光合生理的调节. 植物学报 50, 206–216.
- 吴敏怡, 李霞, 何亚飞, 张琛, 严婷 (2017). 脱落酸和己糖激酶抑制剂对高表达 C₄-*PEPC* 转基因稻苗耐旱性的影响. 植物研究 37, 402–415.
- 严婷, 李佳馨, 李霞, 谢寅峰 (2019). 转 C₄ 型 *PEPC* 基因水稻非生物胁迫耐受性研究进展. 淮阴工学院学报 28, 62–68.
- 杨彩琴, 刘伟娜, 赵志弘, 吴海燕 (1998). 血清钙的甲基百里香酚蓝测定法. 光谱学与光谱分析 18, 485–487.
- 张金飞, 李霞, 何亚飞, 谢寅峰 (2018). 外源葡萄糖增强高表达转玉米 C₄ 型 *pepc* 水稻耐旱性的生理机制. 作物学报 44, 82–94.
- 张金飞, 李霞, 谢寅峰 (2017). 植物 SnRKs 家族在胁迫信号通路中的调节作用. 植物学报 52, 346–357.
- Akram NA, Waseem M, Ameen R, Ashraf M (2016). Trehalose pretreatment induces drought tolerance in radish (*Raphanus sativus* L.) plants: some key physio-biochemical traits. *Acta Physiol Plant* 38, 3.
- Alam MM, Nahar K, Hasanuzzaman M, Fujita M (2014). Trehalose-induced drought stress tolerance: a comparative study among different brassica species. *Plant Omics J* 7, 271–283.
- Ambavaram MMR, Basu S, Krishnan A, Ramegowda V, Batlang U, Rahman L, Baisakh N, Pereira A (2014). Coordinated regulation of photosynthesis in rice increases yield and tolerance to environmental stress. *Nat Commun* 5, 5302.
- Asami P, Rupasinghe T, Moghaddam L, Njaci I, Roessner U, Mundree S, Williams B (2019). Roots of the resurrection plant tripogon loliiformis survive desiccation without the activation of autophagy pathways by maintaining energy reserves. *Front Plant Sci* 10, 459.
- Baena-González E, Lunn JE (2020). SnRK1 and trehalose 6-phosphate: two ancient pathways converge to regulate plant metabolism and growth. *Curr Opin Plant Biol* 55, 52–59.
- Bandyopadhyay A, Datta K, Zhang J, Yang W, Raychaudhuri S, Miyao M, Datta SK (2007). Enhanced photosynthesis rate in genetically engineered indica rice expressing *pepc* gene cloned from maize. *Plant Sci* 172, 1204–1209.
- Blázquez MA, Lagunas R, Gancedo C, Gancedo JM (1993). Trehalose-6-phosphate, a new regulator of yeast glycolysis that inhibits hexokinases. *FEBS Lett* 329, 51–54.
- Chen PB, Li X, Huo K, Wei XD, Dai CC, Lu CG (2014). Promotion of photosynthesis in transgenic rice over-expressing of maize C₄ phosphoenolpyruvate carboxylase gene by nitric oxide donors. *J Plant Physiol* 171, 458–466.
- Claeys H, Vi SL, Xu XS, Satoh-Nagasawa N, Eveland AL, Goldshmidt A, Feil R, Beggs GA, Sakai H, Brennan RG, Lunn JE, Jackson D (2019). Control of meristem

- determinacy by trehalose 6-phosphate phosphatases is uncoupled from enzymatic activity. *Nat Plants* **5**, 352–357.
- Corpas FJ, Barroso JB** (2018). Peroxisomal plant metabolism: an update on nitric oxide, Ca^{2+} and the NADPH recycling network. *J Cell Sci* **131**, jcs202978.
- Delorge I, Janiak M, Carpentier S, van Dijck F** (2014). Fine tuning of trehalose biosynthesis and hydrolysis as novel tools for the generation of abiotic stress tolerant plants. *Front Plant Sci* **5**, 147.
- Dey A, Samanta MK, Gayen S, Sen SK, Maiti MK** (2016). Enhanced gene expression rather than natural polymorphism in coding sequence of the *OsbZIP23* determines drought tolerance and yield improvement in rice genotypes. *PLoS One* **11**, e0150763.
- Ding ZS, Huang SH, Zhou BY, Sun XF, Zhao M** (2013). Over-expression of phosphoenolpyruvate carboxylase cDNA from *C₄* millet (*Seteria italica*) increase rice photosynthesis and yield under upland condition but not in wetland fields. *Plant Biotechnol Rep* **7**, 155–163.
- Ding ZS, Zhou BY, Sun XF, Zhao M** (2012). High light tolerance is enhanced by overexpressed *PEPC* in rice under drought stress. *Acta Agron Sin* **38**, 285–292.
- Duan JL, Cai WM** (2012). *OsLEA3-2*, an abiotic stress induced gene of rice plays a key role in salt and drought tolerance. *PLoS One* **7**, e45117.
- Durand M, Mainson D, Porcheron B, Maurousset L, Lemoine R, Pourtau N** (2018). Carbon source-sink relationship in *Arabidopsis thaliana*: the role of sucrose transporters. *Planta* **247**, 587–611.
- Ermakova M, Danila FR, Furbank RT, Caemmerer S** (2020). On the road to *C₄* rice: advances and perspectives. *Plant J* **101**, 940–950.
- Feng YC, Chen XY, He YL, Kou XH, Xue ZH** (2019). Effects of exogenous trehalose on the metabolism of sugar and abscisic acid in tomato seedlings under salt stress. *Trans Tianjin Univ* **25**, 451–471.
- Fichtner F, Lunn JE** (2021). The role of trehalose 6-phosphate (Tre6P) in plant metabolism and development. *Annu Rev Plant Biol* **72**, 187–220.
- Figueroa CM, Feil R, Ishihara H, Watanabe M, Kölling K, Krause U, Höhne M, Encke B, Plaxton WC, Zeeman SC, Li Z, Schu WX, Hoefgen R, Stitt M, Lunn JE** (2016). Trehalose 6-phosphate coordinates organic and amino acid metabolism with carbon availability. *Plant J* **85**, 410–423.
- Figueroa CM, Lunn JE** (2016). A tale of two sugars: trehalose 6-phosphate and sucrose. *Plant Physiol* **172**, 7–27.
- Foyer CH, Halliwell B** (1976). The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta* **133**, 21–25.
- Ge LF, Chao DY, Shi M, Zhu MZ, Gao JP, Lin HX** (2008). Overexpression of the trehalose-6-phosphate phosphatase gene *OsTPP1* confers stress tolerance in rice and results in the activation of stress responsive genes. *Planta* **228**, 191–201.
- Giannopolitis CN, Ries SK** (1977). Superoxide dismutases I: occurrence in higher plants. *Plant Physiol* **59**, 309–314.
- Giglioli-Guivarc'h G, Pierre JN, Brown S, Chollet R, Vidal J, Gadal P** (1996). The light-dependent transduction pathway controlling the regulatory phosphorylation of *C₄* phosphoenolpyruvate carboxylase in protoplasts from *digitaria sanguinalis*. *Plant Cell* **8**, 573–586.
- Gómez LD, Gilday A, Feil R, Lunn JE, Graham IA** (2010). *AtTPS1*-mediated trehalose 6-phosphate synthesis is essential for embryogenic and vegetative growth and responsiveness to ABA in germinating seeds and stomatal guard cells. *Plant J* **64**, 1–13.
- Han BY, Fu LL, Zhang D, He XQ, Chen Q, Peng M, Zhang JM** (2016). Interspecies and intraspecies analysis of trehalose contents and the biosynthesis pathway gene family reveals crucial roles of trehalose in osmotic-stress tolerance in cassava. *Int J Mol Sci* **17**, 1077.
- He YF, Xie YF, Li X, Yang J** (2020). Drought tolerance of transgenic rice overexpressing maize *C₄-PEPC* gene related to increased anthocyanin synthesis regulated by sucrose and calcium. *Biol Plantarum* **64**, 136–149.
- Hong CY, Chao YY, Yang MY, Cheng SY, Cho SC, Kao CH** (2009). NaCl-induced expression of glutathione reductase in roots of rice (*Oryza sativa* L.) seedlings is mediated through hydrogen peroxide but not abscisic acid. *Plant Soil* **320**, 103–115.
- Hong YB, Zhang HJ, Huang L, Li DY, Song FM** (2016). Overexpression of a stress-responsive NAC transcription factor gene *ONAC022* improves drought and salt tolerance in rice. *Front Plant Sci* **7**, 4.
- Huo K, Li X, He YF, Wei XD, Lu W, Zhao CF, Wang CL** (2017). Exogenous ATP enhance signal response of suspension cells of transgenic rice (*Oryza sativa* L.) expressing maize *C₄-pepc* encoded phosphoenolpyruvate carboxylase under PEG treatment. *Plant Growth Regul* **82**, 55–67.
- Ilhan S, Ozdemir F, Bor M** (2015). Contribution of trehalose biosynthetic pathway to drought stress tolerance of *Caparis ovata* desf. *Plant Biol* **17**, 402–407.
- Islam MO, Kato H, Shima S, Tezuka D, Matsui H, Imai R**

- (2019). Functional identification of a rice trehalose gene involved in salt stress tolerance. *Gene* **685**, 42–49.
- Izui K, Matsumura H, Furumoto, Kai Y (2004). Phosphoenolpyruvate carboxylase: a new era of structural biology. *Annu Rev Plant Biol* **55**, 69–84.
- Jiang DG, Chen WT, Gao J, Yang F, Zhuang CX (2019). Overexpression of the trehalose-6-phosphate phosphatase *OsTPP3* increases drought tolerance in rice. *Plant Biotechnol Rep* **13**, 285–292.
- Jiao DM, Ji BH, Li X (2003). Characteristics of chlorophyll fluorescence and membrane-lipid peroxidation during senescence of flag leaf in different cultivars of rice. *Photosynthetica* **41**, 33–41.
- John R, Raja V, Ahmad M, Jan N, Majeed U, Ahmad S, Yaqoob U, Kaul T (2017). Trehalose: metabolism and role in stress signaling in plants. In: Sarwat M, Ahmad A, Abdin M, Ibrahim M, eds. *Stress Signaling in Plants: Genomics and Proteomics Perspective*, Volume 2. Cham: Springer International Publishing. pp. 261–275.
- Karki S, Rizal G, Quick WP (2013). Improvement of photosynthesis in rice (*Oryza sativa* L.) by inserting the C₄ pathway. *Rice* **6**, 28.
- Kim YM, Heinzel N, Giese JO, Koeber J, Melzer M, Rutten T, von Wirén N, Sonnewald U, Hajirezaei MR (2013). A dual role of tobacco hexokinase 1 in primary metabolism and sugar sensing. *Plant Cell Environ* **36**, 1311–1327.
- Kosar F, Akram NA, Sadiq M, Al-Qurainy F, Ashraf M (2019). Trehalose: a key organic osmolyte effectively involved in plant abiotic stress tolerance. *J Plant Growth Regul* **38**, 606–618.
- Kretzschmar T, Pelayo MAF, Trijatmiko KR, Gabunada LFM, Alam R, Jimenez R, Mendioro MS, Slamet-Loedin IH, Sreenivasulu N, Bailey-Serres J, Ismail AM, Mackill DJ, Septiningsih EM (2015). A trehalose-6-phosphate phosphatase enhances anaerobic germination tolerance in rice. *Nat Plants* **1**, 15124.
- Ku MSB, Agarie S, Nomura M, Fukayama H, Tsuchida H, Ono K, Hirose S, Toki S, Miyao M, Matsuoka M (1999). High-level expression of maize phosphoenolpyruvate carboxylase in transgenic rice plants. *Nat Biotechnol* **17**, 76–80.
- Latzko E, Kelly GJ (1983). The many-faceted function of phosphoenolpyruvate carboxylase in C₃ plants. *Physiol Végét* **21**, 805–815.
- Li CX, Shen HY, Wang T, Wang XL (2015). ABA regulates subcellular redistribution of *OsABI-LIKE2*, a negative regulator in ABA signaling, to control root architecture and drought resistance in *Oryza sativa*. *Plant Cell Physiol* **56**, 2396–2408.
- Li X, Wang C, Ren CG (2011). Effects of 1-butanol, neomycin and calcium on the photosynthetic characteristics of *pepc* transgenic rice. *Afr J Biotechnol* **10**, 17466–17476.
- Li ZW, Zhao Q, Cheng FM (2020). Sugar starvation enhances leaf senescence and genes involved in sugar signaling pathways regulate early leaf senescence in mutant rice. *Rice Sci* **27**, 201–204.
- Liu T, Ye XL, Li M, Li JM, Qi HY, Hu XH (2020). H₂O₂ and NO are involved in trehalose-regulated oxidative stress tolerance in cold-stressed tomato plants. *Environ Exp Bot* **171**, 103961.
- Liu XL, Li X, Dai CC, Zhou JY, Yan T, Zhang JF (2017a). Improved short-term drought response of transgenic rice over-expressing maize C₄ phosphoenolpyruvate carboxylase via calcium signal cascade. *J Plant Physiol* **218**, 206–221.
- Liu XL, Li X, Zhang C, Dai CC, Zhou JY, Ren CG, Zhang JF (2017b). Phosphoenolpyruvate carboxylase regulation in C₄-*PEPC* expressing transgenic rice during early responses to drought stress. *Physiol Plantarum* **159**, 178–200.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2002). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR. *Methods* **25**, 402–408.
- Lunn JE, Delorge I, Figueroa CM, van Dijck P, Stitt M (2014). Trehalose metabolism in plants. *Plant J* **79**, 544–567.
- Mamedov TG, Moellering ER, Chollet R (2005). Identification and expression analysis of two inorganic C- and N-responsive genes encoding novel and distinct molecular forms of eukaryotic phosphoenolpyruvate carboxylase in the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J* **42**, 832–843.
- Matsuoka M, Minami EI (1989). Complete structure of the gene for phosphoenolpyruvate carboxylase from maize. *Eur J Biochem* **181**, 593–598.
- Morales F, Ancín M, Fakhet D, González-Torralba J, Gámez AL, Seminario A, Soba D, Ben Mariem S, Garriga M, Aranjuelo I (2020). Photosynthetic metabolism under stressful growth conditions as a bases for crop breeding and yield improvement. *Plants* **9**, 88.
- Murphy ME, Noack E (1994). Nitric oxide assay using hemoglobin method. *Method Enzymol* **233**, 240.
- Nakano Y, Asada K (1981). Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol* **22**, 867–880.

- Noctor G, Reichheld JP, Foyer CH** (2018). ROS-related redox regulation and signaling in plants. *Semin Cell Dev Biol* **80**, 3–12.
- Oladosu Y, Rafii MY, Samuel C, Fatai A, Magaji U, Kareem I, Kamarudin ZS, Muhammad I, Kolapo K** (2019). Drought resistance in rice from conventional to molecular breeding: a review. *Intl J Mol Sci* **20**, 3519.
- Pramanik MHR, Imai R** (2005). Functional identification of a trehalose 6-phosphate phosphatase gene that is involved in transient induction of trehalose biosynthesis during chilling stress in rice. *Plant Mol Biol* **58**, 751–762.
- Qian BY, Li X, Liu XL, Chen PB, Ren CG, Dai CC** (2015a). Enhanced drought tolerance in transgenic rice over-expressing of maize C₄ phosphoenolpyruvate carboxylase gene via NO and Ca²⁺. *J Plant Physiol* **175**, 9–20.
- Qian BY, Li X, Liu XL, Wang M** (2015b). Improved oxidative tolerance in suspension-cultured cells of C₄-*pepc* transgenic rice by H₂O₂ and Ca²⁺ under PEG-6000. *J Integr Plant Biol* **57**, 534–539.
- Ren CG, Li X, Liu XL, Wei XD, Dai CC** (2014). Hydrogen peroxide regulated photosynthesis in C₄-*pepc* transgenic rice. *Plant Physiol Biochem* **74**, 218–229.
- Sadak MS** (2016). Mitigation of drought stress on fenugreek plant by foliar application of trehalose. *Int J ChemTech Res* **9**, 147–155.
- Samadi S, Habibi G, Vaziri A** (2019). Exogenous trehalose alleviates the inhibitory effects of salt stress in strawberry plants. *Acta Physiol Plant* **41**, 112.
- Schaffer AA, Petreikov M** (1997). Sucrose-to-starch metabolism in tomato fruit undergoing transient starch accumulation. *Plant Physiol* **113**, 739–746.
- Shahbaz M, Abid A, Masood A, Waraich EA** (2017). Foliar-applied trehalose modulates growth, mineral nutrition, photosynthetic ability, and oxidative defense system of rice (*Oryza sativa* L.) under saline stress. *J Plant Nutr* **40**, 584–599.
- Shi JH, Yi KK, Liu Y, Xie L, Zhou ZJ, Chen Y, Hu ZH, Zheng T, Liu RH, Chen YL, Chen JQ** (2015). Phosphoenol pyruvate carboxylase in *Arabidopsis* leaves plays a crucial role in carbon and nitrogen metabolism. *Plant Physiol* **167**, 671–681.
- Simon NML, Kusakina J, Fernández-López Á, Chembath A, Belbin FE, Dodd AN** (2018). The energy-signaling hub SnRK1 is important for sucrose-induced hypocotyl elongation. *Plant Physiol* **176**, 1299–1310.
- Smart RE, Bingham GE** (1974). Rapid estimates of relative water content. *Plant Physiol* **53**, 258–260.
- Sun SJ, Qi GN, Gao QF, Wang HQ, Yao FY, Hussain J, Wang YF** (2016). Protein kinase OsSAPK8 functions as an essential activator of S-type anion channel OsSLAC1, which is nitrate-selective in rice. *Planta* **243**, 489–500.
- Tachibaana S, Konishi N, Kanda H** (1991). Diurnal variation of *in vivo* and *in vitro* nitrate reductase activity in cucumber plants. *J Jap Soc Hortic Sci* **60**, 593–599.
- Tang YT, Li X, Lu W, Wei XD, Zhang QJ, Lv CG, Song NX** (2018). Enhanced photorespiration in transgenic rice over-expressing maize C₄ phosphoenolpyruvate carboxylase gene contributes to alleviating low nitrogen stress. *Plant Physiol Biochem* **130**, 577–588.
- Theerakulp P, Phongngarm S** (2013). Alleviation of adverse effects of salt stress on rice seedlings by exogenous trehalose. *Asian J Crop Sci* **5**, 405–415.
- Tian LF, Xie ZJ, Lu CQ, Hao XH, Wu S, Huang Y, Li DP, Chen LB** (2019). The trehalose-6-phosphate synthase TPS5 negatively regulates ABA signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Rep* **38**, 869–882.
- Uzilday B, Turkan I, Ozgur R, Sekmen AH** (2014). Strategies of ROS regulation and antioxidant defense during transition from C₃ to C₄ photosynthesis in the genus *Flaveria* under PEG-induced osmotic stress. *J Plant Physiol* **171**, 65–75.
- Velikova V, Yordanov I, Edreva A** (2000). Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants. *Plant Sci* **151**, 59–66.
- Vishal B, Krishnamurthy P, Ramamoorthy R, Kumar PP** (2019). OsTPS8 controls yield-related traits and confers salt stress tolerance in rice by enhancing suberin deposition. *New Phytol* **221**, 1369–1386.
- Wang PC, Zhu JK, Lang ZB** (2015). Nitric oxide suppresses the inhibitory effect of abscisic acid on seed germination by S-nitrosylation of SnRK2 proteins. *Plant Signal Behav* **10**, e1031939.
- Wang WJ, Chen QB, Xu SM, Liu WC, Zhu XH, Song CP** (2020a). Trehalose-6-phosphate phosphatase E modulates ABA-controlled root growth and stomatal movement in *Arabidopsis*. *J Integr Plant Biol* **62**, 1518–1534.
- Wang Y, Wang LP, Micallef BJ, Tetlow IJ, Mullen RT, Feil R, Lunn JE, Emes MJ** (2020b). AKINβ1, a subunit of SnRK1, regulates organic acid metabolism and acts as a global modulator of genes involved in carbon, lipid, and nitrogen metabolism. *J Exp Bot* **71**, 1010–1028.
- Wingler A** (2018). Transitioning to the next phase: the role of sugar signaling throughout the plant life cycle. *Plant Physiol* **176**, 1075–1084.

- Yang A, Dai XY, Zhang WH** (2012). A R2R3-type MYB gene, *OsMYB2*, is involved in salt, cold, and dehydration tolerance in rice. *J Exp Bot* **63**, 2541–2556.
- Yoshida S, Forno DA, Cock J** (1971). Laboratory Manual for Physiological Studies of Rice. Los Banos: International Rice Research Institute. pp. 62.
- Yu WQ, Zhao RR, Wang L, Zhang SJ, Li R, Sheng JP, Shen L** (2019). ABA signaling rather than ABA metabolism is involved in trehalose-induced drought tolerance in tomato plants. *Planta* **250**, 643–655.
- Zang BS, Li HW, Li WJ, Deng XW, Wang XP** (2011). Analysis of trehalose-6-phosphate synthase (TPS) gene family suggests the formation of TPS complexes in rice. *Plant Mol Biol* **76**, 507–522.
- Zhai ZY, Keereetaweep J, Liu H, Feil R, Lunn JE, Shanklin J** (2018). Trehalose 6-phosphate positively regulates fatty acid synthesis by stabilizing WRINKLED. *Plant Cell* **30**, 2616–2627.
- Zhang C, Li X, He YF, Zhang JF, Yan T, Liu XL** (2017). Physiological investigation of C₄-phosphoenolpyruvate-carboxylase-introduced rice line shows that sucrose metabolism is involved in the improved drought tolerance. *Plant Physiol Biochem* **115**, 328–342.
- Zhang C, Peng X, Guo XF, Tang GJ, Sun FL, Liu SD, Xi YJ** (2018). Transcriptional and physiological data reveal the dehydration memory behavior in switchgrass (*Panicum virgatum* L.). *Biotechnol Biofuels* **11**, 91.
- Zhao RQ** (2019). Expression, purification and characterization of the plant Snf1-related protein kinase 1 from *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif* **162**, 24–31.
- Zhong RL, Wang YX, Gai RN, Xi DD, Mao CJ, Feng M** (2020). Rice SnRK protein kinase OsSAPK8 acts as a positive regulator in abiotic stress responses. *Plant Sci* **292**, 110373.
- Zhu G, Ye N, Zhang J** (2009). Glucose-induced delay of seed germination in rice is mediated by the suppression of ABA catabolism rather than an enhancement of ABA biosynthesis. *Plant Cell Physiol* **50**, 644–651.

Mechanism on Drought Tolerance Enhanced by Exogenous Trehalose in C₄-PEPC Rice

Jiaxin Li^{1, 2}, Xia Li^{1, 2, 3*}, Yinfeng Xie¹

¹College of Biology and Environment, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China; ²Nanjing Branch of China National Center for Rice Improvement/Jiangsu High Quality Rice Engineering Technology Research Center/Institute of Food Crops, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China; ³Collaborative Innovation Center for Modern Production Technology of Grain Crops of Jiangsu Province, Agricultural College, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China

Abstract In order to reveal the mechanism of trehalose (Tre) involved in the drought tolerance of transgenic rice (*Oryza sativa*) (PC) expressing the C₄-PEPC gene of maize (*Zea mays*), we analyzed the physiological and biochemistry characteristics of PC and wild-type rice (WT) treated hydroponically with Tre and 12% (m/v) PEG alone or in combination. The results showed that Tre treatment promoted the growth of PC and WT seedlings, and alleviated the inhibition of plant growth caused by drought stress (DS), with the effect being more significant for PC. Compared with DS treatment, Tre+DS treatment maintained functional leaves a higher relative water content, photochemical efficiency and antioxidant enzyme activity. Under DS, compared with WT, PC showed significant increase in the content of Tre and sucrose and decrease in the content of glucose, and up-regulated expression of genes associated with Tre metabolism and SnRK1s after Tre application. Tre application also improved PC the ABA synthesis, and expression of genes related to signal transduction and drought response, and maintained PC a relatively stable photosynthetic capacity, thus possibly conferring stronger drought tolerance of PC.

Key words C₄-type PEPC transgenic rice, drought stress, phosphate phosphoenolpyruvate carboxylase, trehalose, rice (*Oryza sativa*)

Li JX, Li X, Xie YF (2021). Mechanism on drought tolerance enhanced by exogenous trehalose in C₄-PEPC rice. *Chin Bull Bot* 56, 296–314.

* Author for correspondence. E-mail: jsplx@jaas.ac.cn

(责任编辑: 朱亚娜)

附表 1 海藻糖处理调控干旱胁迫下水稻叶片内海藻糖、SnRKs 及 ABA 相关基因的表达

Appendix Table 1 Trehalose treatments regulate the expression of trehalose, SnRKs and ABA-related genes in rice leaves under drought stress

<http://www.chinbullbotany.com/fileup/1674-3466/PDF/t20-168.pdf>

附表 1 海藻糖处理调控干旱胁迫下水稻叶片内海藻糖、SnRKs 及 ABA 相关基因的表达
Appendix Table 1 Trehalose treatments regulate the expression of trehalose, SnRKs and ABA-related genes in rice leaves under drought stress

Gene	WT		PC					
	CK	CK+Tre	DS	DS+Tre	CK	CK+Tre	DS	DS+Tre
<i>OsTPP1</i>	1.00 b	0.43 e	0.86 c	1.27 a	0.92 bc	0.66 d	0.87 c	1.35 a
<i>OsTPP2</i>	1.00 c	0.13 g	0.63 e	0.41 f	0.85 d	0.13 g	1.50 a	1.30 b
<i>OsTPP3</i>	1.00 e	0.11 f	2.10 d	3.23 c	1.09 e	0.15 f	4.09 b	7.57 a
<i>OsTPP7</i>	1.00 g	1.71 e	3.81 c	2.43 d	1.34 f	3.16 c	6.50 a	5.36 b
<i>OsTre1</i>	1.00 e	8.28 a	3.94 c	1.45 d	1.62 d	5.31 b	1.77 d	0.45 f
<i>OsTPS1</i>	1.00 e	2.34 a	1.71 b	1.41 d	0.94 e	2.33 a	1.00 e	1.58 c
<i>OsTPS2</i>	1.00 g	1.27 f	0.73 h	2.95 d	1.54 e	8.27 c	10.61 b	15.14 a
<i>OsTPS8</i>	1.00 c	0.20 g	0.49 e	0.82 d	0.30 f	0.57 e	1.29 b	7.03 a
<i>OsSnRK1a</i>	1.00 f	0.61 g	1.65 c	1.97 b	1.32 e	1.76 c	1.42 d	2.74 a
<i>OsSnRK24</i>	1.00 g	1.19 f	2.19 b	1.63 e	1.22 f	2.07 c	1.82 d	4.05 a
<i>OsSPAK8</i>	1.00 e	0.72 f	1.54 d	1.83 b	0.95 e	0.66 f	1.64 c	1.98 a
<i>OsSPAK9</i>	1.00 e	0.96 e	0.73 f	2.21 c	1.28 d	0.77 f	2.48 b	5.01 a
<i>OsSPAK10</i>	1.00 e	2.34 a	1.71 b	1.41 d	0.94 e	2.33 a	1.00 e	1.51 c
<i>OsABA8ox2</i>	1.00 c	1.56 a	0.92 c	0.80 d	0.74 d	1.28 b	0.53 e	0.40 f
<i>OsABA8ox3</i>	1.00 c	0.53 e	2.04 a	1.41 b	0.66 d	0.45 f	0.56 e	0.26 g
<i>OsNCED3</i>	1.00 h	2.15 d	1.70 f	1.82 e	1.32 g	3.34 b	2.91 c	4.13 a
<i>OsNCED4</i>	1.00 de	1.30 c	0.73 cd	1.10 d	0.62 f	4.05 a	0.96 e	2.17 b
<i>OsZIP23</i>	1.00 e	2.61 a	1.61 d	1.82 c	0.80 f	0.85 f	2.14 b	2.76 a
<i>OsMYB2</i>	1.00 e	1.72 c	1.07 e	1.22 d	0.84 f	4.24 a	0.99 e	2.61 b
<i>OsRab16b</i>	1.00 e	7.26 a	1.24 d	2.39 c	0.66 f	7.78 a	2.47 c	6.02 b

<i>OsRab21</i>	1.00 f	1.17 e	1.21 ^e	2.51 c	0.99 f	3.76 b	1.93 d	6.85 a
<i>OsLEA3</i>	1.00 e	1.22 d	0.72 f	1.49 c	1.06 e	0.55 g	1.65 b	5.54 a
<i>OsNAC6</i>	1.00 f	0.38 g	1.88 ^c	2.85 b	0.39 g	1.31 e	1.50 d	3.83 a

CK: 正常灌溉; CK+Tre: 正常灌溉+0.5 mmol·L⁻¹ 海藻糖; DS: 模拟干旱胁迫; DS+Tre: 模拟干旱胁迫+0.5 mmol·L⁻¹ 海藻糖。图中数值代表来自 3 个生物学重复的平均值±SD ($n=3$)。图中标以不同小写字母的柱值表示差异显著 ($P<0.05$) (Student-Neuman-Keuls)。

CK: Irrigation; CK+Tre: Irrigation+0.5 mmol·L⁻¹ trehalose; DS: Drought stress; DS+Tre: Drought stress+0.5 mmol·L⁻¹ trehalose. Values represent means±SD ($n=3$) from three biological replicates. Bars labeled with different lowercase letters indicate significant differences ($P<0.05$) (Student-Neuman-Keuls).