

· 研究报告 ·

玉米ZmICE2基因调控气孔发育

周文期^{1*}, 周玉乾¹, 李永生¹, 何海军¹, 杨彦忠¹, 王晓娟¹, 连晓荣¹, 刘忠祥¹, 胡筑兵^{2*}

¹甘肃省农业科学院作物研究所, 兰州 730070; ²河南大学生命科学学院, 省部共建作物逆境适应与改良国家重点实验室, 开封 475004

摘要 植物表皮在调节光合作用、呼吸作用、热量散失和水分利用等方面发挥重要作用。在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)等双子叶植物中, 气孔发育机理研究取得显著进展, 报道了3个非常重要的bHLH正调控转录因子(SPCH、MUTE和FAMA), 它们在气孔系细胞分裂与分化的不同阶段特异表达, 分别与转录因子SCRM/ICE1和SCRM2/ICE2形成异二聚体, 共同调控气孔细胞系在3个分裂阶段的细胞形态转换和变化, 最终发育形成气孔复合体。然而, 在单子叶植物尤其是禾本科植物玉米(*Zea mays*)中, 调控表皮形态建成的基因研究较少。该文利用反向遗传学手段分离到2个单基因隐性遗传突变体Zmice1-1 (*inducer of cbf expression1-1*)和Zmice2-1, 与对照B73相比, Zmice2-1植株矮小, 叶片黄化, 育性降低, 叶片气孔密度和气孔指数极显著降低, 打破了1个气孔间隔1个表皮长细胞的排列模式; Zmice1-1从五叶一心期开始叶片逐渐发黄, 后期全部黄化, 生长停滞, 纯合不育, 其叶片气孔密度与对照无显著差异。利用CRISPR-Cas9基因编辑技术获得不同位点的等位突变体, 表型鉴定发现Zmice2-2具有气孔异常表型, 并且与Zmice2-1的气孔表型类似, 表明ZmICE2参与调控气孔发育。B73和Zmice2-1的转录组分析表明, ZmICE2主要通过影响细胞分裂和分化来调控气孔发育, 参与玉米表皮形态建成。研究结果有助于进一步完善玉米表皮形态建成机制, 并为提高农作物的抗逆性和产量性状的遗传改良提供了有益的基因资源。

关键词 玉米, 气孔发育, 气孔密度, 表皮形态建成, CRISPR-Cas9基因编辑

周文期, 周玉乾, 李永生, 何海军, 杨彦忠, 王晓娟, 连晓荣, 刘忠祥, 胡筑兵 (2023). 玉米ZmICE2基因调控气孔发育. 植物学报 58, 866–881.

气孔复合体是高等植物表皮上的一种特化结构, 由1对保卫细胞和中间的微孔组成。在蒸腾作用中水蒸气通过气孔口从体内排到体外, 在光合和呼吸作用中植物通过气孔与外界进行气体交换。因此, 气孔在维持地球碳氧平衡、水分平衡及植物的生命活动中发挥重要作用(Pillitteri and Torii, 2012; Hepworth et al., 2018; Han and Torii, 2019)。大约在4亿年前, 植物逐渐从水生过渡到陆地生长(Chen et al., 2017)。化石记录显示, 早在先驱植物出现的同时, 其表皮已随之产生了孔状结构。苔藓植物是最早适应陆地生活的植物, 但最早的苔类植物(liverworts)并没有真正的气孔, 而是通过表皮上的通气孔与外界环境进行气体交换, 其形态和结构与气孔不同(Cuming et al., 2007)。

藓类(mosses)和角苔(hornworts)是最早出现气孔的物种, 其气孔的结构和功能都与高等植物的气孔类似, 但发育过程不尽相同。随着陆地生物的进化和适应, 植物逐渐演化出气孔这一新的器官, 以克服陆地环境的不利因素, 帮助植物迅速适应陆生环境, 进而极大地拓展了植物的生活范围(Edwards et al., 1998)。气孔的起源早于植物的花、种子、叶、根以及维管系统, 表明气孔在植物进化中扮演着重要角色(Rudall et al., 2013)。当外界环境(如温度、光照和二氧化碳浓度)和叶片含水量发生变化时, 植物通过调节气孔大小来控制 and 平衡自身与外界的水分和气体交换, 从而更好地适应外界环境(Chater et al., 2017)。

收稿日期: 2022-11-14; 接受日期: 2023-04-18

基金项目: 河南大学省部共建作物逆境适应与改良国家重点实验室开放课题(No.2021KF04)、兰州大学细胞活动与逆境适应教育部重点实验室开放基金(No.lzujbky-2022-kb03)、国家自然科学基金(No.32160490, No.31860384)和甘肃省重大专项计划(No.21ZD11NA005, No.21ZD10NF003)

* 通讯作者。E-mail: zhouwenqi850202@163.com; zhubinghu@henu.edu.cn

气孔最早出现在角苔类植物中, 其保卫细胞发育和调控机制均与高等植物类似(Rudall et al., 2013)。在高等双子叶植物拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中, 气孔的形成依赖于一系列连续的细胞分裂和细胞命运转变, 产生气孔系的5种主要细胞类型包括拟分生组织母细胞(meristemoid mother cell, MMC)、拟分生组织(meristemoid, M)、气孔系基础细胞(stomatatal lineage ground cell, SLGC)、保卫母细胞(guard mother cell, GMC)和保卫细胞(guard cell, GC) (陈亮和侯岁稳, 2017; 周玉乾等, 2018)。气孔发育起始于叶表皮原表皮特定细胞的MMC, MMC起始于不等分裂, 形成1个小三角形的具有干细胞活性的M和1个大的姊妹细胞SLGC。M能够进行0–3次扩增不等分裂, 进行自我更新, 同时增加SLGC的数量。M最终转变为GMC, GMC进行1次均等分裂, 产生2个形状大小一致且高度特化的GCs, 随后, 2个GCs的细胞壁加厚并分离, 形成微小孔, 然后特化形成成熟的气孔(Nadeau and Sack, 2002; Bergmann and Sack, 2007; Lau and Bergmann, 2012; Pillitteri and Torii, 2012; 王宏亮等, 2018)。部分SLGC也可以获得MMC命运并进行不均等分裂, 在远离原有气孔或气孔前体细胞(M和GMC)的位置产生卫星M, 这种不对称分裂避免了气孔的簇生, 被称为“定向的不均等间隔分裂”, 其它SLGC也最终分化为M或者直接发育成扁平细胞(Serna, 2011; Pillitteri and Torii, 2012)。

对拟南芥气孔发育及调控机理的研究比较深入, 其信号通路主要包括转录因子、配体与受体、MAPK级联信号、植物激素和环境因子等(Chater et al., 2017; 陈亮和侯岁稳, 2017; 商业绯等, 2017; 周玉乾等, 2018)。但在单子叶植物玉米(*Zea mays*)和水稻(*Oryza sativa*)中, 调控气孔及表皮细胞生长发育与形态建成的分子机制亟待研究和揭示(Hepworth et al., 2018; 王宏亮等, 2018)。单子叶植物尤其是禾本科植物气孔与其它植物明显不同, 其具有典型的副卫细胞(subsidiary cell, SC)。利用这种特殊的气孔复合体, 可以迅速响应外界环境变化, 最大化光合作用效率, 进而适应极端的生长环境(Chen et al., 2017)。禾本科植物气孔发育产生的细胞系主要包括6种类型: 气孔起始细胞系(cell files)、GMCs、GCs、SLGC、副卫细胞母细胞(subsidiary mother cell, SMCs)和副卫细胞(Frank and Smith, 2002; Zhou et al., 2016)。

气孔发育分为6个阶段: (1) 细胞分裂形成能够决定产生气孔列的起始细胞系; (2) 起始细胞系中的细胞经历1次不对称分裂, 产生较小的GMC和SLGC; (3) GMC传递信号, 诱导其两侧的表皮细胞产生SMC细胞命运; (4) 1对SMCs再经历1次不对称分裂, 产生1对椭圆形的SCs; (5) GMC进行1次对称分裂, 形成2个棒状的GCs; (6) 气孔经过延伸生长和形态变化, 椭圆形的SCs变成倒三角形, 棒状的GCs变为哑铃状, 最终形成1对由SCs包裹1对GCs的气孔复合体, 发育为成熟的气孔(周文期, 2015; Raissig et al., 2016)。由此可见, 单、双子叶植物在气孔发育过程、构成和分布上的差异暗示其发育机制可能不同。禾本科植物的气孔呈线性排列, 严格遵循1个气孔1个SLGC的排布原则(Frank and Smith, 2002)。气孔发育起始于叶片基部一些特殊的细胞系, 随着叶片位置向上, 气孔发育阶段也逐渐趋于成熟。禾本科植物气孔特殊的结构需要独特的发育过程来构建, 这些细胞分裂和分化过程由一系列关键的转录因子和基因共同调控(Wu et al., 2019; McKown and Bergmann, 2020)。

在模式植物拟南芥中, 前人报道了非常重要的3个bHLH (basic helix-loop-helix) 正调控转录因子SPCH (speechless)、MUTE和FAMA, 它们在气孔系细胞分裂与分化的不同阶段特异表达, SPCH调控表皮原细胞形成MMC的过程, MMC通过不对称分裂形成M和SLGC (MacAlister et al., 2007); MUTE调控M通过1–3次极性分裂形成GMC (Pillitteri et al., 2007); FAMA调控GMC经过1次非极性分裂形成2个成熟的GCs, 可终止前体细胞继续增殖(Ohashi-Ito and Bergmann, 2006)。SCRM/ICE1 (scream/inducer of cbf expression1)和SCRM2/ICE2 (scream2/ice2)是2个旁系同源bHLH蛋白。*Atice1-2 (scrm)*中GMC持续分裂, 与*fama*表型相似, *Atice1-2/scrm2/+*中M多次分裂, 不能形成GMC, 与*mute*表型相似, *Atice1-2/scrm2*双突变并未形成气孔, 只有表皮扁平细胞, 表型与*spch*一致。研究表明, SCRM/ICE1和SCRM2/ICE2与SPCH、MUTE和FAMA均有互作, 分别形成异二聚体, 共同调控气孔系细胞依次由MMC向M, M向GMCs, 及GMCs向GCs这3个关键转变过程, 最终发育形成成熟的气孔复合体(Kanaoka et al., 2008; Matos et al., 2014; Han et al., 2018)。ICE1/SCRM2作为支架蛋白可介导MPK3/6与SPCH的相互作用,

同时MPK3/6与ICE1/SCRM2之间的直接互作对于ICE1/SCRM2的磷酸化降解是必需的,该过程对于气孔细胞命运的正确分化至关重要(Putarjunan et al., 2019)。综上,在双子叶模式植物拟南芥中,气孔发育及关键基因和信号通路被广泛研究,并取得了一系列重要成果。

单子叶植物二穗短柄草(*Brachypodium distachyum*)中,2个bHLH转录因子同源基因*BdICE1*和*BdICE2*均编码亮氨酸拉链蛋白,在气孔系细胞中广泛表达,调控气孔分裂和分化过程中细胞命运的转变。*bdice1*气孔缺失,*bdscrm2*不具备气孔功能,GMC不能正常分裂(Raissig et al., 2016)。水稻中,*OsICE1*和*OsICE2*共同调控气孔发育,但功能冗余,*OsICE1*起主要作用。突变体*osice1-2*不能形成正常气孔,*osice2-1*气孔发育正常,但是*osice1-2/osice2-1*双突变体中,*osice1-2*的表型加剧,整个表皮无气孔及前体细胞(Wu et al., 2019)。这2个基因在二穗短柄草和水稻中已被报道参与叶片表皮特别是气孔形态建成,控制气孔系细胞发育(Raissig et al., 2016; Wu et al., 2019),但在玉米中尚未被研究。因此,本研究利用反向遗传学手段获得玉米*Zmice1-1*和*Zmice2-1*突变体,对其进行表型精准鉴定和生物学功能分析,以期解析玉米气孔发育机制奠定理论基础。揭示禾本科作物的气孔发育机制,不仅是对植物气孔发育模式的补充,也能从进化的角度深入理解植物与环境的互作对气孔发育的影响,从而为通过调控气孔性状培育高光效作物奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 研究材料

利用反向遗传学方法分离玉米(*Zea mays* L.)气孔发

育异常突变体*Zmice2-1* (*inducer of cbf expression2-1*),其气孔密度极显著降低;黄化株*Zmice1-1* (*inducer of cbf expression1-1*),以自交系B73作为对照。突变体从MEMD (Maize EMS induced Mutant Database) (Lu et al., 2018)突变体库(<http://www.elabcaas.cn/memd>)订购。

1.2 实验方法

1.2.1 玉米叶表皮发育突变体的筛选和鉴定

利用牙齿合成树脂印迹技术(dental resin impression) (周文期等, 2020a, 2020b),在显微镜下观察并计算对照与突变体植株后代的叶片气孔密度、气孔指数,以及扁平细胞分布和气孔发育图式。这种印迹技术不损坏叶片的正常生长,可连续跟踪气孔发展变化,记录表皮形态建成过程。

气孔密度=单位面积内气孔数量/面积(mm²)。

气孔指数=单位面积内气孔数量/(单位面积内气孔数量+单位面积内表皮细胞数量)。

1.2.2 *ZmICE2*基因克隆

从Maize Genetics and Genomics Database网站(<https://maizegdb.org/>)下载基因号GRMZM2G033356的核苷酸序列,功能注释为Helix-loop-helix DNA-binding domain containing protein。*ZmICE2*的DNA序列全长3 252 bp,开放阅读框长度为1 557 bp,编码519个氨基酸残基。以对照自交系B73为模板,用引物*ZmICE2-F*和*ZmICE2-R* (表1)分别扩增得到*ZmICE2* DNA及cDNA片段,连接pUCm T载体,转化大肠杆菌DH5 α ,挑取单克隆进行PCR验证;挑取单个阳性克隆进行菌液培养,提质粒送公司测序。结果发现,无论是DNA或cDNA序列,测序结果与玉米基因组B73数据库碱基序列完全一致。

表1 本研究使用的引物序列

Table 1 Primer sequences used in this study

Primer name	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
ZmICE2	ACCCCAACAAAACCAGGAC	GTCTCTTTTTTCAGCGGTCTTG
T-ice2-1	GAGGAGGACGACGACAAGAAG	GCTAATTGCTACCGAAAACGC
T-ice1-1	GCGACCCATCAACCCATAGC	CGGTGTTGATGGGTTGAAGC
T-ice2-c9	ACGAGAATGGGTGAGTGTGG	AAGAGCGAGAACATCTGCGA
GAPDH	CCATCACTGCCACACAGAAAAC	AGGAACACGGAAGGACATACCAG
RT-ZmICE2	CTTCCTCGGGCGGCGGCGGTG	ACCGTGCTGTTGGCGTTGGAG

1.2.3 *ZmICE2*同源蛋白的序列比对和进化分析

通过同源家族比对挖掘*ZmICE2*在其它物种中的同源蛋白, 进而验证同源蛋白的生物学功能。选择GRMZM2G033356基因进行同源性功能验证和分析, 利用DNAMAN比对开放阅读框, 然后进行氨基酸序列保守性比对和进化树构建。

1.2.4 *ZmICE2*基因的功能验证

利用CRISPR-Cas9基因编辑技术创制等位变异突变体, 在*ZmICE2*起始密码子附近设计玉米靶点, 构建基因编辑载体, 然后委托北京博美兴奥公司进行玉米遗传转化, 获得CRISPR-Cas9基因编辑的阳性后代植株, 筛选功能缺失等位突变体, 并验证候选基因功能。

2 结果与讨论

2.1 玉米突变体*Zmice2-1*和*Zmice1-1*植株的黄花表型

玉米叶表皮形态清晰, 便于显微观察, 是深入研究单子叶植物表皮形态建成的优异材料。目前, 已报道的玉米中调控表皮形态建成的基因较少, 因此, 我们利用反向遗传学手段, 从玉米EMS诱变突变体库(MEMD)中获得了2份玉米突变体*Zmice1-1*和*Zmice2-1* (诱变背景材料均为自交系B73), 对应基因号分别为GRMZM2G173534和GRMZM2G033356。参考前人的研究结果, 暂将这2个基因分别命名为*ZmICE1* (GRMZM2G173534)和*ZmICE2* (GRMZM2G033356) (Feng et al., 2018; Jiang et al., 2022)。其中, *Zmice2-1*是*ZmICE2*基因CDS序列第1 009位碱基C变为T, 导致第337位氨基酸由R (精氨酸)变成W (色氨酸); *Zmice1-1*是*ZmICE1*基因CDS序列第650位碱基A变为C, 导致第217位氨基酸由K (赖氨酸)变成T (苏氨酸)。对上述2个点突变的突变体分别单株种植, 进行表型鉴定和基因位点测序验证。

田间种植后, 在苗期分离到*Zmice1-1*和*Zmice2-1*纯合体(图1)。与对照(自交系B73)相比, *Zmice2-1*幼苗株高明显降低, 叶片黄化, 从发芽后长出第1叶就出现黄叶表型, 叶片长度和宽度均减小(图1A, B), 且差异极显著($P < 0.01$)。随着生育期的推进, 第6叶后, 黄化表型减弱, 呈现黄斑叶, 类似花豹皮斑点(图

1A, C), 虽然突变体植株发育比B73延迟、缓慢, 但仍能正常生长, 成熟期株高和穗位高约为对照的50%。*Zmice2-1*雄穗退化严重、分枝数减少, 花粉量小, 只有少数纯合体植株能开花散粉, 且雄穗和雌穗均比对照小, 植株育性和结实能力较B73极显著降低。

*Zmice1-1*苗期在五叶一心期之前, 表型与B73无显著差异, 但从五叶一心期后, 叶片局部逐渐发黄, 从顶端叶片向基部叶片变黄, 表现出黄叶表型(图1D), 随着植株的生长, 黄叶性状越来越明显, B73开始拔节生长, 但*Zmice1-1*生长迟缓, 株高比B73极显著降低, 拔节生长几乎停止, 最后叶片全部变黄, 光合作用受阻, 停止生长和再发育, 后期叶片枯萎死亡(图1E)。成熟期, *Zmice1-1*最高的植株, 其株高仅为B73的30% (图1F, G), 且叶片全部黄化, 不能发育形成完整的雌雄穗, 不能抽雄散粉和吐丝, 纯合体不育。

2.2 玉米突变体*Zmice2-1*和*Zmice1-1*叶表皮形态

通过叶片离析法(周文期, 2015, 2020a)观察B73、*Zmice2-1*和*Zmice1-1*幼叶(第3、4叶)表皮细胞形态及分布, B73叶片气孔及间隔的表皮扁平细胞呈单线性排列, 1个气孔间隔1个表皮长细胞排列模式, 非常规则, 2列气孔之间也是间隔3—4列表皮细胞列, 且表皮细胞边缘凸出(lobe), 呈锯齿状嵌套(图2A, B)。然而, 在相同大小视野中显微观察, *Zmice2-1*中仅可见极少数成熟气孔, 气孔列也极显著减少(图2B, E), 本应该发育成气孔的细胞, 停滞在GMC阶段, 未能继续分裂与分化, 无法形成完整的气孔结构(图2B, E, 箭头所示), 表皮图式明显打破了1个气孔间隔1个表皮长细胞的排列模式。分别统计B73和*Zmice2-1*幼叶(第3、4叶)和成熟叶(第12、13叶)的气孔密度和氣孔指数, 结果表明相比对照均极显著降低, 仅为对照的10%—20% (图3)。*ZmICE2*基因突变导致气孔系原始细胞未发育成有功能的GMCs, 因此后期不能进行气孔系细胞正常的分裂和分化, 无法形成完整的气孔, 表明*ZmICE2*基因对气孔发育起负调控作用。

同样通过叶片离析法观察B73和*Zmice1-1*幼叶和成熟叶表皮细胞形态, 发现*Zmice1-1*气孔表型(气孔形态和排列分布)明显比*Zmice2-1*弱(图2C, D, F), 分别统计B73和*Zmice1-1*幼叶(第3、4叶)和成熟叶(第12、13叶)的气孔密度和氣孔指数, 突变体*Zmice1-1*

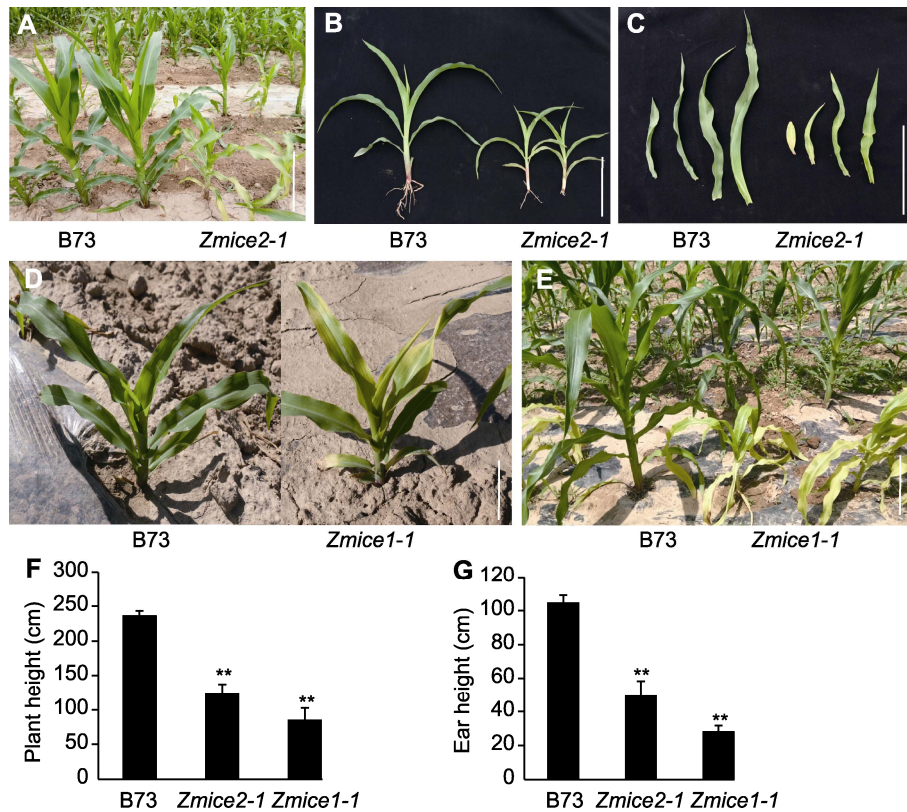


图1 *Zmice1-1*和*Zmice2-1*突变体苗期田间表型

(A)–(C) *Zmice2-1*突变体，苗期表现出黄叶表型，且株型矮小；(D)，(E) *Zmice1-1*突变体，五叶一心期开始出现黄化性状，后期表型更加明显；(F)，(G) *Zmice2-1*和*Zmice1-1*株高和穗位高度比对照极显著降低(**表示差异极显著($P<0.01$))。(G)图中由于*Zmice1-1*纯合体一直未能发育出雌穗，因此统计穗位为成熟期倒6叶距离地面的高度。(B)，(C)，(D) Bars=10 cm；(A)，(E) Bars=20 cm

Figure 1 Field phenotypes of *Zmice1-1* and *Zmice2-1* mutants at seedling stage

(A)–(C) *Zmice2-1* mutant showed yellow leaf phenotype and short plant type at seedling stage; (D), (E) From the five-leaf and one-heart stage, the *Zmice1-1* leaves gradually began to turn yellow, and the phenotype became more obvious at the later stage; (F), (G) The plant height and ear height of *Zmice2-1* and *Zmice1-1* were significantly decreased compared with the control (** indicate extremely significant differences ($P<0.01$)). In the figure (G), since the homozygote of *Zmice1-1* had not developed a female spike, the spike height was calculated as the height from the ground of the fallen 6 leaves at maturity stage. (B), (C), (D) Bars=10 cm; (A), (E) Bars=20 cm

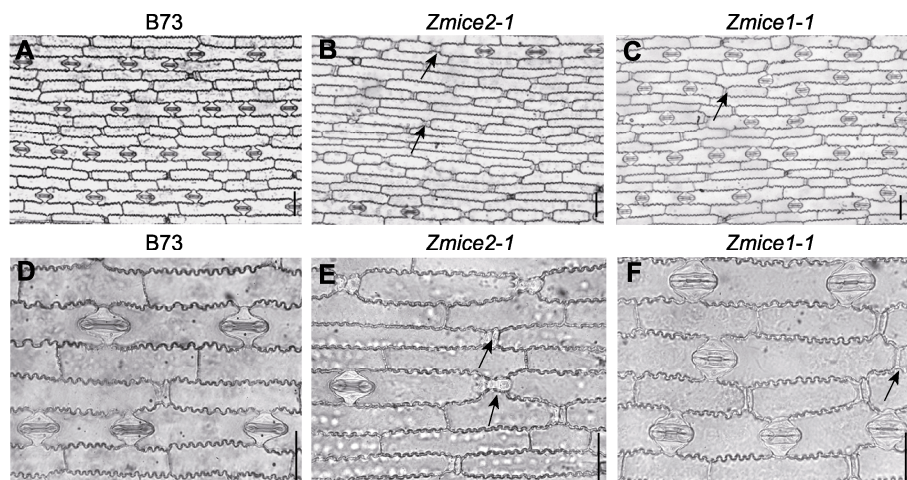


图2
Figure 2

图2 *Zmice1-1*和*Zmice2-1*突变体气孔分布图式

(A) B73幼苗叶片气孔及表皮细胞图式(1个气孔间隔1个表皮长细胞, 呈单线性规则排列); (B) *Zmice2-1*幼叶气孔及表皮细胞图式(相同大小视野中气孔密度显著降低); (C) *Zmice1-1*幼叶气孔及表皮细胞图式(与对照无显著差异); (D) B73表皮细胞形态; (E) *Zmice2-1*结实期表皮细胞形态(气孔数目少); (F) *Zmice1-1*结实期叶片气孔及表皮扁平细胞形态(气孔开度增加)。箭头指示未发育成熟气孔。Bars=20 μm

Figure 2 Morphology and stomatal distribution of *Zmice1-1* and *Zmice2-1* mutants

(A) Schematic diagram of stomata and epidermal cells in leaves of B73 seedlings (with one stomata spaced by one epidermal long cell in a monilinear regular arrangement); (B) Stomata and epidermal cell schema of young leaves of *Zmice2-1* (there were only a few stomata in the same size field of vision, and stomatal density decreased significantly); (C) Stomata and epidermal cell pattern of *Zmice1-1* young leaves (showed no significant difference from the control); (D) Epidermal cell morphology of B73; (E) The epidermal cell morphology of *Zmice2-1* (in the setting stage number of stomata reduced); (F) Stomatal morphology and epidermal flat cell morphology of leaves at *Zmice1-1* setting stage (with increased stomatal opening). Arrows indicate immature stomatas. Bars=20 μm

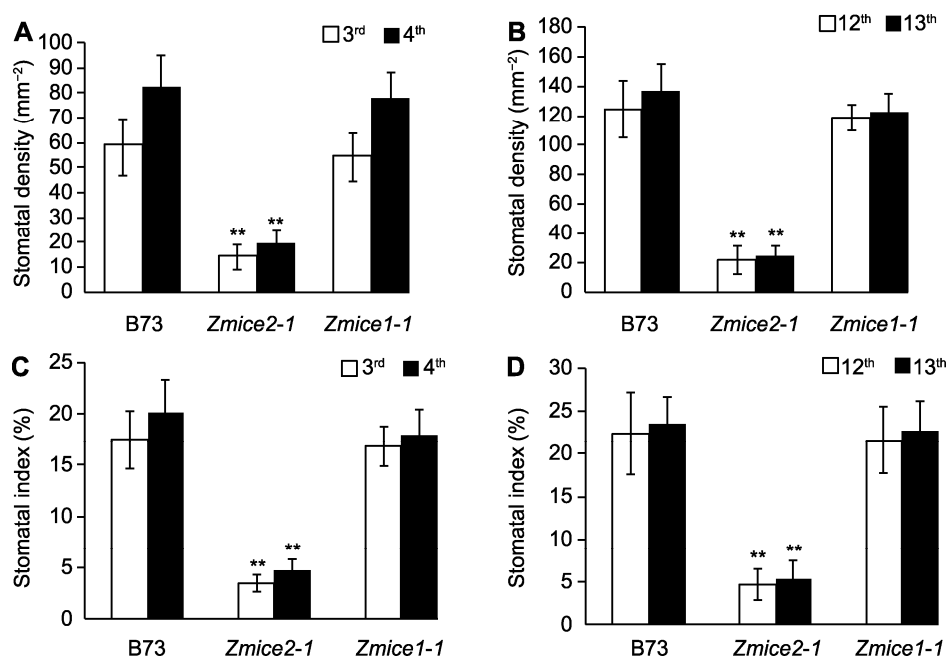


图3 B73和*Zmice*突变体气孔密度及气孔指数

(A), (B) 统计第3、4叶和第12、13叶气孔密度, *Zmice2-1*气孔密度较对照极显著降低, *Zmice1-1*气孔密度无显著变化($n=200$); (C), (D) 统计第3、4叶和第12、13叶气孔指数, *Zmice2-1*气孔指数较对照极显著降低, *Zmice1-1*气孔指数无显著变化($n=200$)。 $n=200$ 表示统计的气孔数目(≥ 15 个显微视野), 3次生物学重复。 ** $P < 0.01$

Figure 3 Stomatal density and stomatal index of B73 and *Zmice* mutants

(A), (B) The stomatal density of the 3rd, 4th, 12th and 13th leaves was calculated, the stomatal density of *Zmice2-1* was significantly lower than that of the control, while the stomatal density of *Zmice1-1* showed no significant change ($n=200$); (C), (D) The stomatal indexes of the 3rd, 4th, 12th and 13th leaves were counted, *Zmice2-1* stomatal indexes were significantly lower than that of the control, while *Zmice1-1* stomatal indexes had no significant change ($n=200$). $n=200$ represented the statistical number of stomata (≥ 15 microscopic fields) and 3 biological replicates. ** $P < 0.01$

与对照相比均未发生显著变化(图3), 大量观察发现 *Zmice1-1*中也存在一些气孔列细胞气孔缺失的表型(图2C, F, 黑色箭头所示), 但由于气孔列数的增加弥补了缺失的气孔数目, 因此并未导致气孔密度和气孔

指数的显著变化, 但是气孔口张开程度比同期B73大, 且*Zmice1-1*气孔长度相比对照变短, 宽度更宽, 呈近圆形(图2C, F)。上述结果表明, 突变体*Zmice2-1*的气孔表型更加明显, 因此后续围绕*Zmice2-1*展开研究。

2.3 *ZmICE2*在不同物种中的基因注释信息

利用双子叶模式植物拟南芥SCRM/*ICE1*基因(AT3G-26744), 在Rice Genome Annotation Project (<http://rice.uga.edu/>)中查找不同物种中对应的同源基因, 在单子叶禾本科植物水稻(*Oryza sativa*)中的同源基因是*OsICE1* (LOC_Os11g32100), 二穗短柄草中的同源基因为*BdICE1* (*Bradi4g17460*), 玉米中的同源基因暂命名为*ZmICE2* (*GRMZM2G033356*), 也编码bHLH转录因子。其它同源基因注释结果见表2。

2.4 不同物种中ICE1同源蛋白保守性及进化分析

在NCBI数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)中进行Blast比对, 检索到相应基因编码蛋白的氨基酸序列, 用DNAMAN软件进行同源性比对分析。结果发现, 在拟南芥、水稻、玉米、二穗短柄草和高粱(*Sorghum bicolor*) 5个物种中的同源性为68.80%, 重复氨基酸序列相对保守(图4A)。如果将双子叶植物拟南芥序列移除, 仅比对单子叶植物玉米*ZmICE2*与水稻等ICE1的氨基酸序列, 同源性高达84.93%, 且在玉米和高粱中的同源性最高(达95.04%), 同源树和系统进化树分析表明, ICE蛋白在高等植物进化上相对保守, 可能发挥相同的功能(图4B, C)。上述结果表明, 拟南芥*AtICE1*蛋白与单子叶植物, 尤其是禾本科植物水稻、玉米和高粱具有更保守的氨基酸序列和更近的进化关系, 与拟南芥中的同源基因功能存在不同程度的差异。因此, 解析玉米*ZmICE1*和*ZmICE2*基因功能具有重要的生物学意义。

2.5 玉米突变体*Zmice2-1*和B73转录组分析

为阐明*ZmICE2*调控气孔发育的分子机制, 我们对*Zmice2-1*纯合体植株和B73 (均选取幼苗叶片, 两叶一心期, 选取第3心叶)进行转录组测序, 设3组重复, 分别编号为B73-1、B73-2、B73-3和ICE2-1、ICE2-2、ICE2-3。数据分析发现, B73-3的数据与B73-1和B73-2结果聚类误差较大, 因此剔除B73-3的测序数据, 仅用B73-1和B73-2的数据进行比对分析, 相关性分析结果良好(图5A)。转录组分析表明, *Zmice2-1*与B73相比共有3 416个差异表达基因, MA图显示差异表达基因较多(红色点代表上调基因, 绿色点代表下调基因)(图5B)。对差异表达基因进行聚类分析, 识别未知基因的功能或已知基因的未知功能。因同类基因可能具有相似的功能, 或者共同参与同一代谢过程/细胞通路。利用层次聚类(H-cluster), 采用相应的距离算法计算每个基因之间的距离, 然后通过反复迭代, 计算基因间的相对距离, 最后根据基因的相对距离远近分成不同的亚类(subcluster), 从而分析得出同类型的差异表达基因(图5C)。结果表明, *Zm00001d044685* (编码plt7-phospholipid transfer protein7)、*Zm00001d023984* (编码TIDP3581)、*Zm00001d006170* (编码ereb65-AP2-EREBP-transcription factor 65)、*Zm00001d015092*、*Zm00001d013493* (编码lox5-lipoxygenase5)、*Zm00001d038840* (编码vdac2-voltage-dependent anion channel protein2)、*Zm00001d019312* (编码bgaf1-beta gluco-sidase aggregating factor1)和*Zm00001d013133*基因在

表2 *ZmICE2*在不同物种中的基因编号及功能注释

Table 2 Gene code and function annotation of *ZmICE2* in different species

Species	Homologous gene	The function of prediction
<i>Arabidopsis thaliana</i>	AT3G26744	Basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding superfamily protein
<i>Oryza sativa</i>	LOC_Os11g32100	Inducer of CBF expression 1, putative, expressed
<i>Brachypodium distachyum</i>	Bradi4g17460	ICE87
<i>Zea mays</i>	GRMZM2G033356	Helix-loop-helix DNA-binding domain containing protein
<i>Sorghum bicolor</i>	Sb05g019530	Helix-loop-helix DNA-binding domain containing protein
<i>Vitis vinifera</i>	GSVIVG00008637001	Helix-loop-helix DNA-binding domain containing protein
<i>V. vinifera</i>	GSVIVG00032998001	Inducer of CBF expression 1
<i>Populus trichocarpa</i>	POPTR_0012s10780	ICE1; DNA binding/transcription activator/transcription factor
<i>P. trichocarpa</i>	POPTR_0015s11650	ICE1; DNA binding/transcription activator/transcription factor

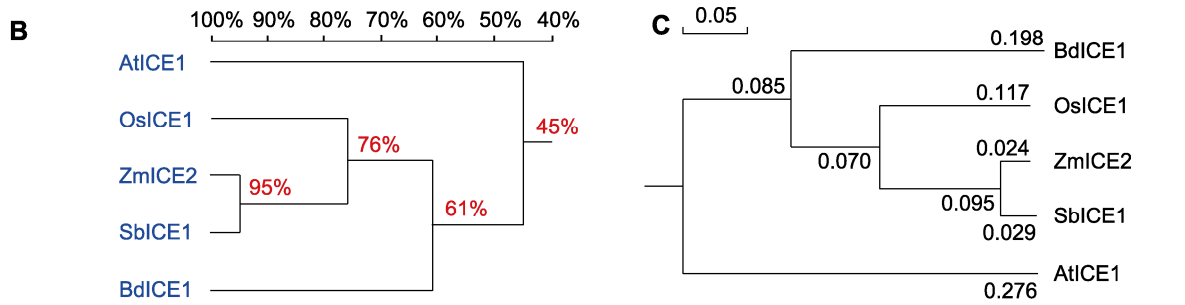
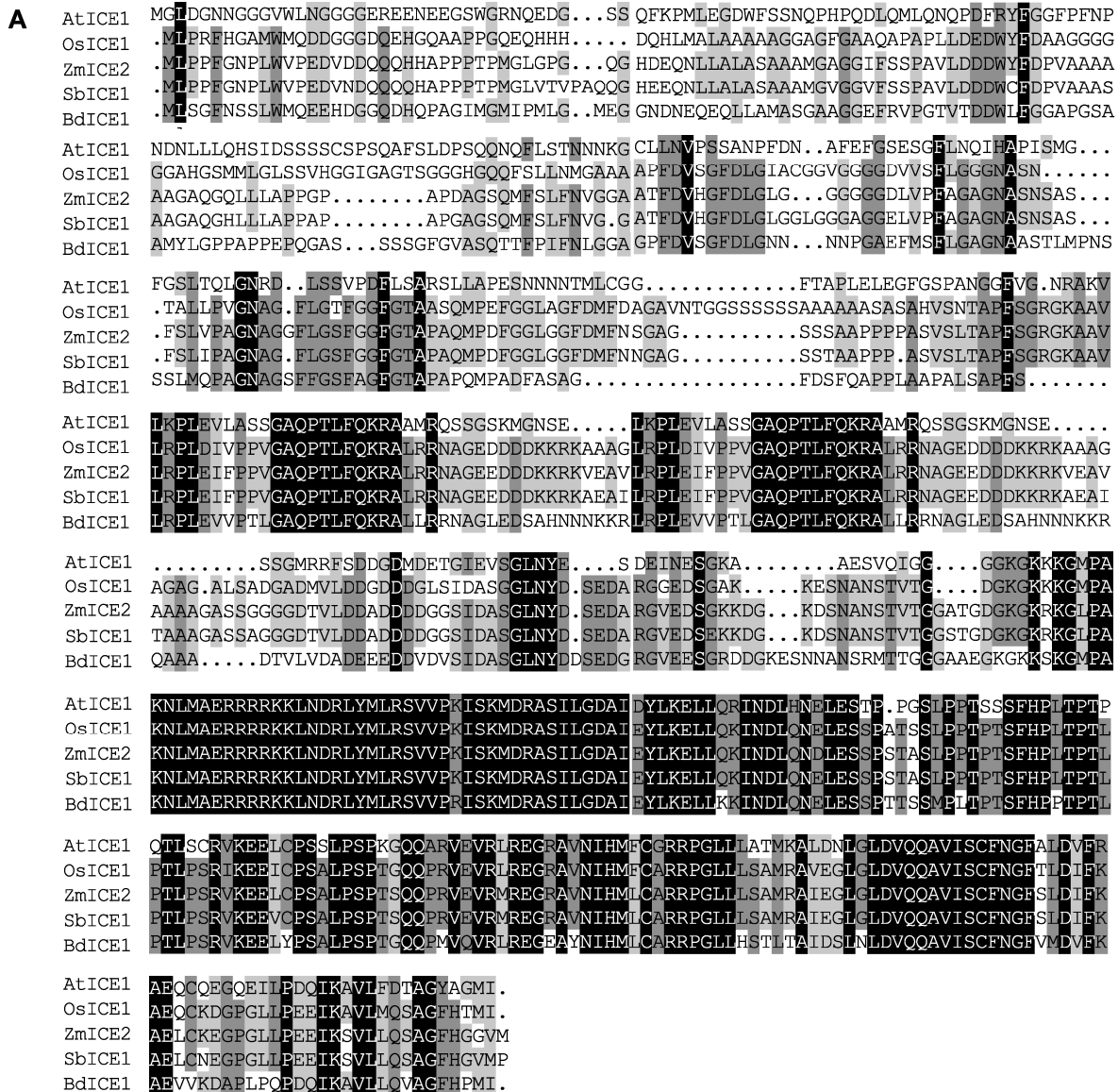


图4 *ZmICE2*同源蛋白氨基酸序列比对及系统进化分析

(A) *ZmICE2*蛋白序列保守性分析(黑色表示氨基酸序列100%相同;深灰色表示75%相同;浅灰色表示50%相同);(B) *ZmICE2*蛋白同源树分析;(C) *ZmICE2*蛋白系统进化树分析

Figure 4 Sequence alignment of amino acid sequence of *ZmICE2* with its homologues and phylogenetic analysis (A) Conservative analysis of *ZmICE2* protein sequences (with black indicating 100% identical amino acid sequences; dark gray means 75% the same amino acid sequences; light gray means 50% the same amino acid sequences); (B) Homologous tree analysis of *ZmICE2* protein; (C) Phylogenetic tree analysis of *ZmICE2* protein

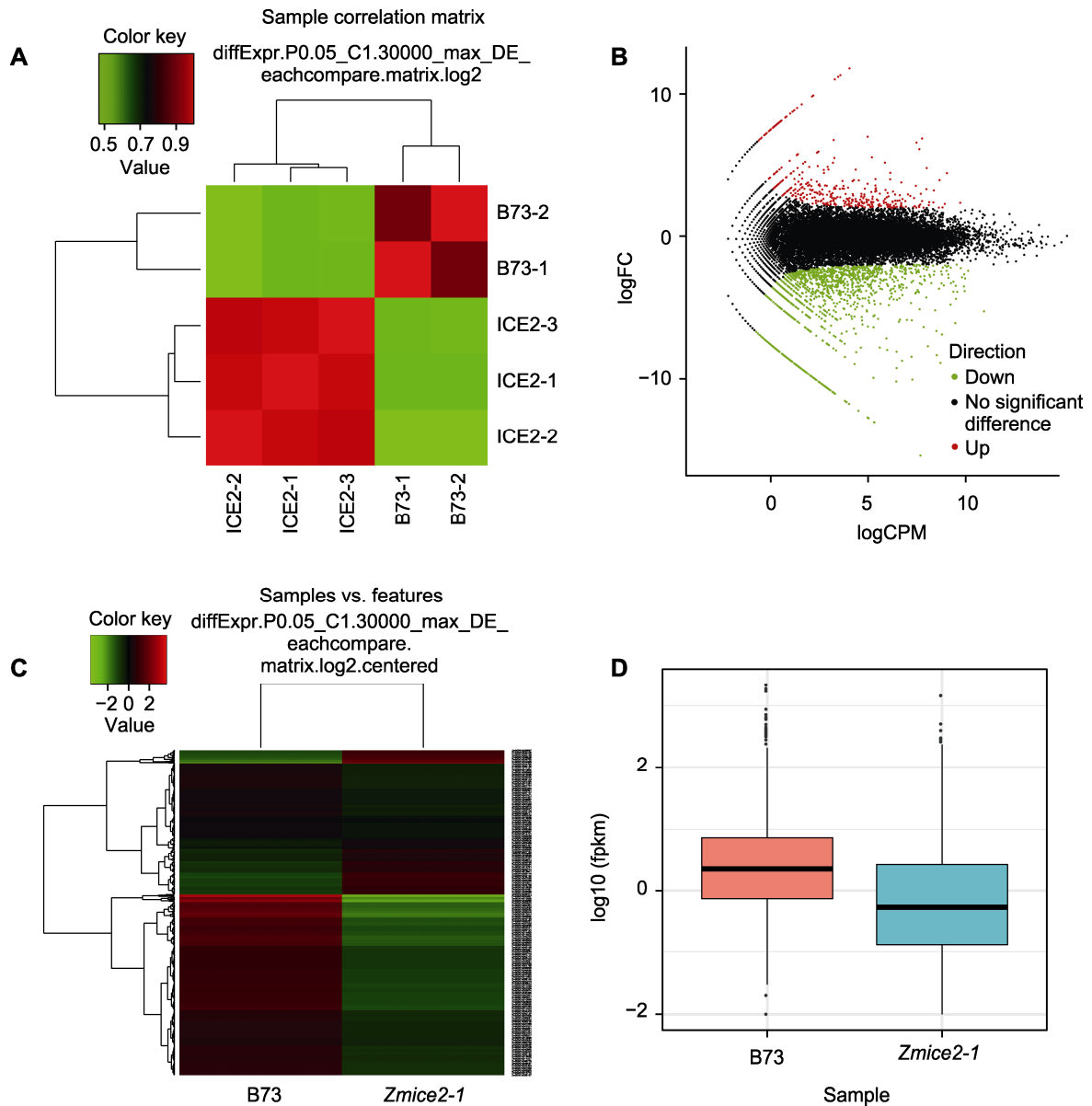


图5 B73与*Zmice2-1*差异表达基因的聚类分析
(A) 样品基于差异表达基因的相关性分析; **(B)** 差异表达基因的MA图(图中每个点表示1个基因); **(C)** 差异表达基因的聚类分析图(每行代表1个基因, 每列代表1个样品); **(D)** 转录本表达的箱线图(*Zmice2-1*中*ZmICE2*表达量降低)

Figure 5 Cluster analysis of differentially expressed genes in B73 and *Zmice2-1*
(A) Sample correlation analysis based on differential expression gene; **(B)** MA map of differentially expressed genes (each dot represents a gene); **(C)** Cluster analysis diagram of differentially expressed genes (each row represents a gene and each column represents a sample); **(D)** Boxplot of transcript expression (*ZmICE2* expression decreased in *Zmice2-1*).

*Zmice2-1*突变体中表达极显著下调; *Zm00001d0-43968* (编码mybr89-MYB-related-transcription factor 89)、*Zm00001d048226*、*Zm00001d021208* (编码ereb115-AP2-EREBP-transcription factor 115)、*Zm00001d011919*、*Zm00001d013956* (编码tip3a-tono-

plast intrinsic protein3)、*Zm00001d023994* (编码glu1-beta glucosidase1)、*Zm00001d011123* (编码IDP535)和*Zm00001d034839* (编码pap2-purple acid phosphatase2)基因在*Zmice2-1*中表达极显著上调(图5C)。分别选取4个上调和下调表达的基因, 利用

RT-PCR进行验证, 结果显示表达差异与测序结果(图5D)吻合。从转录表达的箱线图可以看出, *Zmice2-1* 虽然是一个氨基酸位点变异突变体, 但*ZmICE2*在突变体和对照中表达量差异显著, 在*Zmice2-1*中表达量显著降低(图5D)。利用引物RT-ICE2F和RT-ICE2R进行实时荧光定量PCR (内参基因引物为GAPDH(表1)), 检测了B73与*Zmice2-1*叶片中*ZmICE2*基因的表达量, 验证得到相同的结果, 即*ZmICE2*基因在*Zmice2-1*突变体中的表达量比对照B73降低约30.0% (数据未显示)。

2.6 转录组分析差异表达基因的功能分类

对差异基因进行聚类分析, 利用GO (Gene Ontology)从细胞组分(cellular component, CC)、分子功能(molecular function, MF)和生物学过程(biological process, BP) 3个方面描述基因功能。选取每个分类前20个注释最多的GOlim的二级分类进行绘图(图6), 结果表明, 差异表达基因显著富集在BP分类的生物合成与逆境响应过程。

2.7 玉米突变体*Zmice2-2*基因编辑植株及后代基因型分析

为了进一步验证*ZmICE2*调控玉米气孔起始系细胞发育, 我们对*ZmICE2*进行基因编辑, 获得20株转基因编辑后代(图7A-C, 转化系材料为自交系B104)。对转基因后代进行表型鉴定和基因型检测, 结果显示成功获得基因编辑植株, 编辑位点变异丰富, 其中1个系纯合植株T₀代就表现出黄化表型(图7B), 自交收获T₁代植株, 后代苗期黄化表型显著(图7D), 命名为*Zmice2-2*。观察幼苗期叶表皮形态, 发现与对照相比, *Zmice2-2*叶表皮气孔列中缺失大量气孔, 气孔系细胞停滞在保卫细胞母细胞阶段, 不能发育成正常气孔(图7E, F, 黑色箭头示缺失气孔)。从其它不同编辑类型后代中也筛选到等位变异突变体, 表型与*Zmice2-1*相似。上述结果充分验证了*ZmICE2*控制玉米表皮形态建成。后续将对*ZmICE2*功能进行深入研究, 分析基因位点变异和关键结构域变化, 并通过Chip-seq等方法寻找互作蛋白, 解析其调控气孔发育起始的遗传

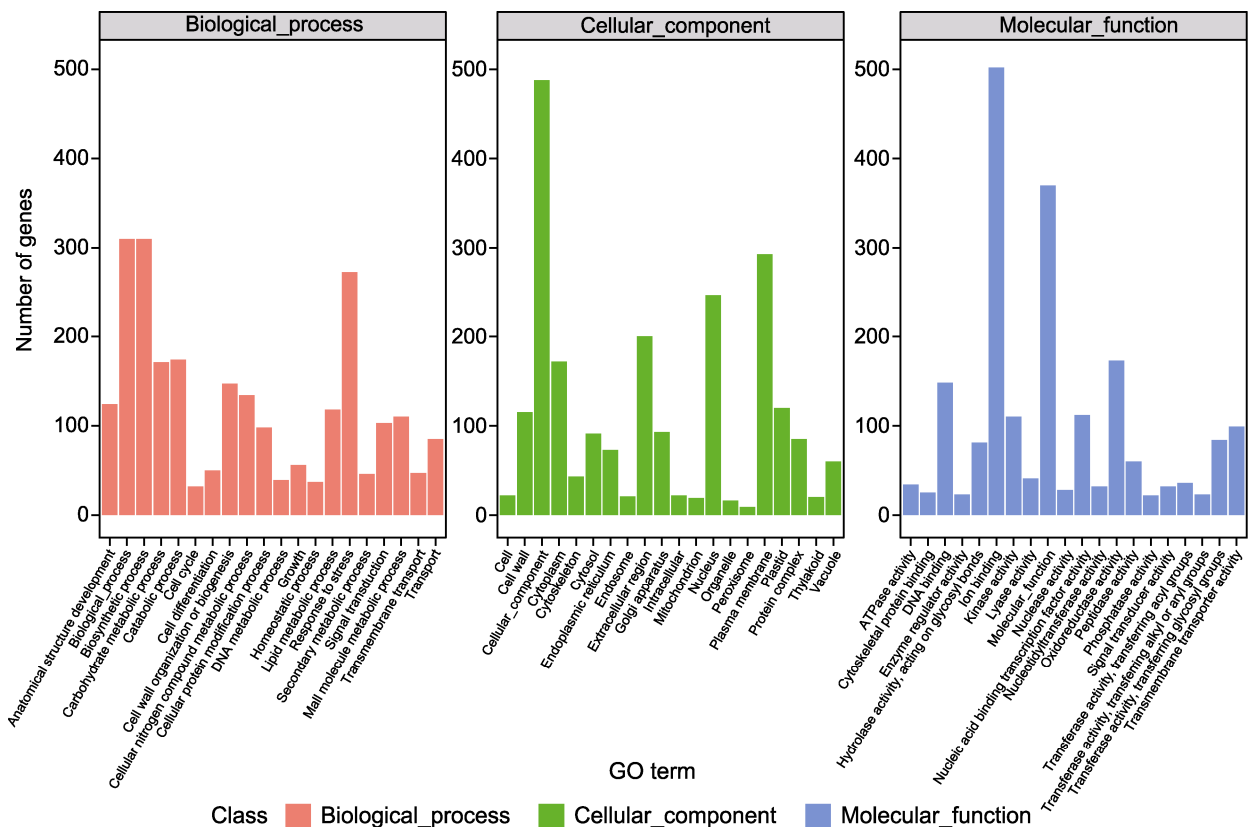


图6 B73与*Zmice2-1*差异表达基因的GO聚类

Figure 6 GO cluster of differentially expressed genes in B73 and *Zmice2-1*

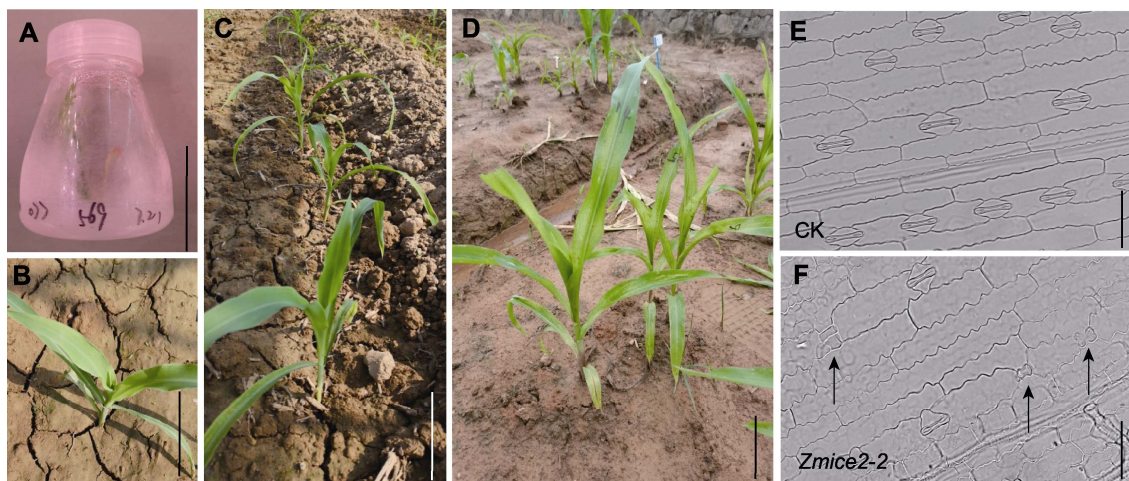


图7 *ZmICE2*基因编辑突变体表型

(A) *ZmICE2*转基因试管苗; (B), (C) *ZmICE2*基因编辑 T_0 代转基因田间植株表型; (D) T_2 代转基因田间植株表型(叶片黄化); (E), (F) 对照(CK)与*Zmice2-2*表皮气孔图式(*Zmice2-2*大量气孔缺失, 不能形成正常气孔)。箭头指示未发育成成熟气孔。(A)–(D) Bars=10 cm; (E), (F) Bars=20 μ m

Figure 7 Phenotype of *ZmICE2* gene editing mutant

(A) *ZmICE2* transgenic test-tube seedlings; (B), (C) Phenotype of *ZmICE2* gene editing T_0 generation transgenic plant in field; (D) Phenotype of T_2 generation transgenic plant in field (leaf yellowing); (E), (F) The epidermal stomatal schema of control (CK) and *Zmice2-2* (*Zmice2-2* lacked a large number of stomata and could not form normal stomata). Arrows indicate immature stomata. (A)–(D) Bars=10 cm; (E), (F) Bars=20 μ m

机理。

2.8 讨论与结论

气孔是植物与外界环境进行水分和气体交换的主要通道, 对调节植物的水分利用效率具有重要作用(Zoulias et al., 2018; 周玉萍等, 2022)。大多数作物(如水稻和玉米)都是禾本科植物, 它们的气孔排列和结构与其它物种明显不同(Liu et al., 2009; Hepworth et al., 2018)。禾本科植物的气孔在植物表皮呈线性间隔排列, 并且具有高度分化的副卫细胞。随着全球气候变暖不断加剧, 干旱和高温事件频发, 严重威胁作物生产安全, 开发节水型作物迫在眉睫。调节气孔密度是改变植物抗旱能力的有效手段, 可促进植物适应不断变化的环境(周文期等, 2022)。因此, 研究禾本科植物气孔发育的分子机制将为未来提高作物水分利用效率, 开发节水型作物奠定理论基础。

研究发现, 无论在单/双子叶植物中, 气孔的分化均受到一类bHLH家族(basic-helix-loop-helix)转录因子的调控, 主要包括SCRM/ICE1、SCRM2/ICE2、SPCH、MUTE和FAMA(Liu et al., 2009; Raissig et

al., 2017; Hepworth et al., 2018; Serna, 2020)。拟南芥*AtICE1*和*SCRM2*的功能冗余, 而禾本科植物中这2个基因的功能发生分化, 分别调控气孔发育的不同阶段(Raissig et al., 2016)。*ICE1/SCRM2*在长期进化过程中产生方式的不同导致其功能分化, 拟南芥*ICE1*和*SCRM2*是由于芸薹属植物基因重复产生了2个同源基因, 而禾本科植物中*ICE1*和*SCRM2*是由独立的基因重复产生, 因而其功能存在分化(Raissig et al., 2016)。在单子叶植物二穗短柄草中, *STL*(*STOMATALESS*)基因功能缺失导致叶片中不能形成气孔, 并且已证明*STL*基因就是拟南芥与水稻中*ICE1*的同源基因, *BdICE1*功能缺失导致无法产生气孔, 说明单个基因的突变足以导致气孔缺失的表型, 在拟南芥*scrm1/scrm2*纯合双突变体中才能出现这一表型, 因此, *BdSCRM1*可能特异性地在气孔系细胞中促进GMC的形成(Raissig et al., 2016)。利用基因编辑技术获得了*bdscrm2*突变体, 虽然能形成GMCs和SCs, 但是GMCs不能正常分裂, 表明*BdSCRM2*功能缺陷突变体产生GCs不成熟的气孔复合体, 不能分化形成成熟的气孔, 类似于水稻*Osfama-1*突变体的表型。因

此, *BdSCRM2*可能主要参与GCs的分化, 超表达YFP标记的*BdICE1*和*BdSCRM2*, 只能在气孔列细胞中检测到荧光(Raissig et al., 2016; Wu et al., 2019)。水稻强突变体*Osice1-2*中完全没有气孔, 弱突变体*Osice1-1*气孔密度剧烈减少, 突变体可以通过起始不均等分裂产生少量的拟分生组织, 但这些拟分生组织很快退出气孔发育, 分化成一个小的表皮细胞, 说明*OsICE1*调控起始不等分裂和拟分生组织到GMC的分化, 与二穗短柄草中调控气孔发育功能类似(Wu et al., 2019)。在*Osice1-2/Osice2-1*双突变体中, 原表皮细胞完全不能起始不等分裂和形成拟分生组织, 表皮没有任何气孔及其前体细胞, 说明*OsICE1*和*OsICE2*功能冗余, 共同调控气孔的发育, 且*OsICE1*起主要作用(Wu et al., 2019)。水稻*Osscsm2-1*无明显的气孔缺陷表型, 超表达*OsICE1*和*OsSCRM2*也无明显的气孔表型, 表明禾本科植物中*ICE1*和*SCRM2*可能受到严格的蛋白修饰调控其降解(Wu et al., 2019)。上述研究结果与我们在玉米中观察到的表型非常相似。*Zmice2-1*中强表型仅有少数正常气孔, 且数量很少, 植株不能成活, 生长至第6-7叶死亡, 较弱表型气孔密度极显著降低, 但是纯合体可育;*Zmice1-1*中, 气孔结构和空间排列基本正常(图2, 图3)。为了进一步探究*ZmICE2*是否影响气孔的后续发育过程, 同样观察发育后期成熟叶片的气孔表型, *Zmice2-1*中约有60%的拟分生组织退出气孔发育, 未能获得GMCs的功能, 很多GMCs不能进行细胞不均等分裂, 无法产生正常的气孔。上述结果表明, *ZmICE2*可能正调控早期气孔系细胞向M, 以及M向GMC的分化, 进而控制早期气孔的形成和发育。目前鉴定到的*Zmice2-1/Zmice1-1*双突变体中几乎观察不到气孔, 可能也是气孔缺失表型, 说明*ZmICE2*蛋白在单子叶植物中调控气孔起始发育的功能比较保守。

此外, 对拟南芥的研究表明, *AtICE1*的磷酸化、脱磷酸化、泛素化或类泛素化等转录后修饰过程对*ICE1*蛋白活性至关重要(Chinnusamy et al., 2003; Kidokoro et al., 2020)。研究表明, *AtICE1*通过影响花药脱水来控制植物的雄性育性, 功能缺失突变体存在花药不开裂、花粉活力低及萌发率低的缺陷均由异常的花药脱水引起, 花药的转录组分析显示*AtICE1*调控的基因与水分运输和离子转运相关(Wei et al., 2018)。玉米突变体中, 同样观察到*Zmice2-1*植株苗

期及成熟期均矮小, 纯合体雄穗变小, 分枝数减少, 育性降低, 结实率降低(图1)。*Zmice1-1*苗期表型与对照无明显差异, 但是生长至五叶一心期, 叶片局部逐渐表现出黄化性状, 且随着植株生长, 性状越来越明显, 最后叶片全部黄化, 发育和生长停滞(图1)。以上结果说明, 玉米2个*ICEs*基因突变后表现出气孔缺陷表型, 参与调控如株型和叶型的形态建成、叶绿素合成和花粉育性等多种性状。前人研究表明, 拟南芥*AtICE1*是冷胁迫诱导和冻害抗性中重要的调节因子。冷胁迫诱导的转录后修饰主要通过*ICE1/SCRM*直接结合并激活CBF3/DREB1A (C-repeat Binding Factor3/Dehydration-Responsive-Element-Binding protein1A)的转录活性来响应冷胁迫(Miura et al., 2007; Ye et al., 2019)。*AtICE1*蛋白的稳定性依赖泛素化HOS1和SIZ1蛋白翻译后修饰来维持(Dong et al., 2006; Miura et al., 2007)。将水稻*OsICE1*和*OsICE2*在拟南芥中过表达可显著增强拟南芥幼苗的耐寒性, 并在冷胁迫反应基因的激活中发挥正调控作用, 从而调节植物的耐冷性(Deng et al., 2017)。Jiang等(2022)结合高分辨质谱和代谢组学技术揭示了冷信号关键转录因子*ZmICE1*启动子区自然变异与玉米耐冷性的关系, *ZmICE1*启动子的自然变异决定了转录激活子*ZmMYB39*的结合亲和力, *ZmMYB39*是玉米耐寒性的正向调节因子, 导致*ZmICE1*的转录和耐寒性在自交系之间存在不同程度的差异。该研究表明*ZmICE1*基因也参与玉米冷胁迫过程, 阐明了*ZmICE1*不仅直接调控*DREB1*基因的表达, 还通过调控氨基酸代谢和活性氧水平调控玉米响应低温的分子机制(Jiang et al., 2022)。Feng等(2018)鉴定出*ZmICE1*能与Opaque11 (O11)直接相互作用, 与O11共调节应激反应靶标*ZmYoda*, *ZmICE1*能结合*ZmYoda*的启动子, 调控应激反应。

控制气孔密度和气孔开关能够提高植物抗旱能力和水分利用效率, 因此, 气孔密度大小和开关的调节是一种潜在的增强作物抗旱性的手段(Gao et al., 2018; Caine et al., 2019; 张一弓等, 2021)。例如, 在水稻中过量表达*OsSDD1* (*Stomatal Density and Distribution1-1*)和*OsDT11* (*Drought Tolerance 11*)基因, 转基因植株气孔密度均降低, 水分散失减少, 植株对干旱胁迫的耐受性显著增强(Yoo et al., 2010; Li et al., 2017)。在烟草中过表达玉米*ZmSDD1*基因,

气孔密度降低了50%，转基因烟草抗旱性增强(刘延波等, 2014)。Caine等(2019)通过过表达水稻表皮模式因子OsEPF1调控发育信号的水平，使高产水稻IR64植株气孔密度大大降低，气孔导度相应降低，抗干旱和高温胁迫能力显著提高。水稻叶表皮异常突变体*lpl2-1*气孔密度和气孔开度均比对照极显著增大，导致对干旱胁迫更敏感(周文期等, 2022)。陈青云(2017)研究表明，*Zmstomagen*是玉米气孔发育的正调控因子，利用CRISPR/Cas9基因编辑技术获得*Zmstomagen-like*突变体。与野生型相比，基因编辑突变体叶片下表皮的气孔密度降低了63.3%，气孔指数降低了57.2%，且气孔导度显著低于野生型，抗旱性增强。干旱胁迫导致气孔密度、大小和开度发生一定程度的变化，引起蒸腾作用和光合作用改变，从而影响植物的抗旱能力。植物受到干旱胁迫后，ABA诱导气孔迅速关闭，气孔导度降低，防止水分过度流失(Qu et al., 2017)。在玉米等禾谷类作物中，同源蛋白在调控表皮形态建成中的功能非常保守，*ZmSPCHs* (玉米中有3个同源基因)、*ZmMUTES* (Wang et al., 2019)、*ZmFAMA*、*ZmICE2*和*ZmICE1*等都可能参与气孔系细胞的分裂与分化，后续将对这些基因进行深入研究，以阐明单子叶植物气孔系细胞形态建成的调控网络。利用先进技术(如单细胞组学技术)分离不同细胞类型，单独分离和研究不同组织时期的保卫细胞或副卫细胞，可获得控制气孔发育的关键转录因子或基因(牛艳丽等, 2017)。对玉米产量无显著负效应的前提下，可通过转基因和基因编辑等分子育种手段选育既节约淡水灌溉，又促进农作物增产的优良品种，对作物品种改良具有重要意义(周玉乾等, 2018)。

本研究获得了2个控制拟南芥气孔发育基因(*AtICE1*和*AtICE2*)在玉米中的同源基因突变体*Zmice2-1*和*Zmice1-1*，对其表型进行精准鉴定和遗传效应分析，证明*ZmICE2*参与调控气孔起始发育，控制由M向GMC，GMC向GC的发育过程，基因功能缺失后能产生少数成熟气孔，气孔密度和气孔指数均比对照极显著降低。

致谢 感谢中国农业科学院生物技术研究所张春义研究员和齐鲁师范学院路小铎教授提供突变体材料；感谢兰州大学侯岁稳教授对本实验的指导和帮助！

参考文献

- 陈亮, 侯岁稳 (2017). 植物气孔发育的分子遗传调控. 中国科学: 生命科学 47, 798–807.
- 陈青云 (2017). 玉米中*STOMAGEN-Like*基因调控气孔发育的功能研究. 硕士学位论文. 南宁: 广西大学. pp. 35–60.
- 刘延波, 项阳, 秦利军, 赵德刚 (2014). 转玉米*ZmSDD1*基因烟草降低气孔密度提高抗旱性. 植物生理学报 50, 1889–1898.
- 牛艳丽, 柏胜龙, 王麒云, 刘凌云 (2017). 单细胞组学技术及其在植物保卫细胞研究中的应用. 植物学报 52, 788–796.
- 商业绯, 李明, 丁博, 牛浩, 杨振宁, 陈小强, 曹高巍, 谢晓东 (2017). 生长素调控植物气孔发育的研究进展. 植物学报 52, 235–240.
- 王宏亮, 郭思义, 王棚涛, 宋纯鹏 (2018). 植物气孔发育机制研究进展. 植物学报 53, 164–174.
- 张一弓, 张怡, 阿依白合热木·木台力甫, 张道远 (2021). 异源过表达齿肋赤藓*ScABI3*基因改变拟南芥气孔表型并提高抗旱性. 植物学报 56, 414–421.
- 周文期 (2015). 调控水稻叶表皮发育的*LPL2*和*DSP1*基因克隆与功能分析. 博士学位. 兰州: 兰州大学. pp. 38–66.
- 周文期, 寇思荣, 连晓荣, 杨彦忠, 刘忠祥, 王晓娟, 何海军, 周玉乾 (2020a). 水稻和玉米叶表皮突变体的筛选和鉴定. 植物生理学报 56, 189–199.
- 周文期, 连晓荣, 周玉乾, 王兴荣, 杨彦忠, 刘忠祥, 王晓娟, 何海军, 寇思荣 (2020b). EMS诱变玉米自交系种质创新应用. 玉米科学 28(6), 31–38.
- 周玉乾, 孟思远, 周文期 (2018). 植物表皮形态建成的分子调控机制. 西北农学报 27, 609–616.
- 周文期, 强晓霞, 王森, 江静雯, 卫万荣 (2022). 水稻*OsLPL2/PIR*基因抗旱耐盐机制研究. 作物学报 48, 1401–1415.
- 周玉萍, 颜嘉豪, 田长恩 (2022). 保卫细胞中ABA信号调控机制研究进展. 植物学报 57, 684–696.
- Bergmann DC, Sack FD (2007). Stomatal development. *Annu Rev Plant Biol* 58, 163–181.
- Caine RS, Yin XJ, Sloan J, Harrison EL, Mohammed U, Fulton T, Biswal AK, Dionora J, Chater CC, Coe RA, Bandyopadhyay A, Murchie EH, Swarup R, Quick WP, Gray JE (2019). Rice with reduced stomatal density conserves water and has improved drought tolerance under future climate conditions. *New Phytol* 221, 371–384.
- Chater CCC, Caine RS, Fleming AJ, Gray JE (2017). Origins and evolution of stomatal development. *Plant Physiol*

- 174, 624–638.
- Chen ZH, Chen G, Dai F, Wang YZ, Hills A, Ruan YL, Zhang GP, Franks PJ, Nevo E, Blatt MR** (2017). Molecular evolution of grass stomata. *Trends Plant Sci* **22**, 124–139.
- Chinnusamy V, Ohta M, Kanrar S, Lee BH, Hong XH, Agarwal M, Zhu JK** (2003). ICE1: a regulator of cold-induced transcriptome and freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Genes Dev* **17**, 1043–1054.
- Cuming AC, Cho SH, Kamisugi Y, Graham H, Quatrano RS** (2007). Microarray analysis of transcriptional responses to abscisic acid and osmotic, salt, and drought stress in the moss, *Physcomitrella patens*. *New Phytol* **176**, 275–287.
- Deng CY, Ye HY, Fan M, Pu TL, Yan JB** (2017). The rice transcription factors OsICE confer enhanced cold tolerance in transgenic *Arabidopsis*. *Plant Signal Behav* **12**, e1316442.
- Dong CH, Agarwal M, Zhang YY, Xie Q, Zhu JK** (2006). The negative regulator of plant cold responses, HOS1, is a RING E3 ligase that mediates the ubiquitination and degradation of ICE1. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**, 8281–8286.
- Edwards D, Kerp H, Hass H** (1998). Stomata in early land plants: an anatomical and ecophysiological approach. *J Exp Bot* **49**, 255–278.
- Feng F, Qi WW, Lv YD, Yan SM, Xu LM, Yang WY, Yuan Y, Chen YH, Zhao H, Song RT** (2018). OPAQUE11 is a central hub of the regulatory network for maize endosperm development and nutrient metabolism. *Plant Cell* **30**, 375–396.
- Frank MJ, Smith LG** (2002). A small, novel protein highly conserved in plants and animals promotes the polarized growth and division of maize leaf epidermal cells. *Curr Biol* **12**, 849–853.
- Gao Y, Wu MQ, Zhang MJ, Jiang W, Ren XY, Liang EX, Zhang DP, Zhang CQ, Xiao N, Li Y, Dai Y, Chen JM** (2018). A maize phytochrome-interacting factors protein ZmPIF1 enhances drought tolerance by inducing stomatal closure and improves grain yield in *Oryza sativa*. *Plant Biotechnol J* **16**, 1375–1387.
- Han SK, Qi XY, Sugihara K, Dang JH, Endo TA, Miller KL, Kim ED, Miura T, Torii KU** (2018). MUTE directly orchestrates cell-state switch and the single symmetric division to create stomata. *Dev Cell* **45**, 303–315.
- Han SK, Torii KU** (2019). Linking cell cycle to stomatal differentiation. *Curr Opin Plant Biol* **51**, 66–73.
- Hepworth C, Caine RS, Harrison EL, Sloan J, Gray JE** (2018). Stomatal development: focusing on the grasses. *Curr Opin Plant Biol* **41**, 1–7.
- Jiang HF, Shi YT, Liu JY, Li Z, Fu DY, Wu SF, Li MZ, Yang ZJ, Shi YL, Lai JS, Yang XH, Gong ZZ, Hua J, Yang SH** (2022). Natural polymorphism of ZmICE1 contributes to amino acid metabolism that impacts cold tolerance in maize. *Nat Plants* **8**, 1176–1190.
- Kanaoka MM, Pillitteri LJ, Fujii H, Yoshida Y, Bogen-schutz NL, Takabayashi J, Zhu JK, Torii KU** (2008). SCREAM/ICE1 and SCREAM2 specify three cell-state transitional steps leading to *Arabidopsis* stomatal differentiation. *Plant Cell* **20**, 1775–1785.
- Kidokoro S, Kim JS, Ishikawa T, Suzuki T, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K** (2020). DREB1A/CBF3 is repressed by transgene-induced DNA methylation in the *Arabidopsis ice1-1* mutant. *Plant Cell* **32**, 1035–1048.
- Lau OS, Bergmann DC** (2012). Stomatal development: a plant's perspective on cell polarity, cell fate transitions and intercellular communication. *Development* **139**, 3683–3692.
- Li XM, Han HP, Chen M, Yang W, Liu L, Li N, Ding XH, Chu ZH** (2017). Overexpression of *OsDT11*, which encodes a novel cysteine-rich peptide, enhances drought tolerance and increases ABA concentration in rice. *Plant Mol Biol* **93**, 21–34.
- Liu T, Ohashi-Ito K, Bergmann DC** (2009). Orthologs of *Arabidopsis thaliana* stomatal bHLH genes and regulation of stomatal development in grasses. *Development* **136**, 2265–2276.
- Lu XD, Liu JS, Ren W, Yang Q, Chai ZG, Chen RM, Wang L, Zhao J, Lang ZH, Wang HY, Fan YL, Zhao JR, Zhang CY** (2018). Gene-indexed mutations in maize. *Mol Plant* **11**, 496–504.
- MacAlister CA, Ohashi-Ito K, Bergmann DC** (2007). Transcription factor control of asymmetric cell divisions that establish the stomatal lineage. *Nature* **445**, 537–540.
- Matos JL, Lau OS, Hachez C, Cruz-Ramírez A, Scheres B, Bergmann DC** (2014). Irreversible fate commitment in the *Arabidopsis* stomatal lineage requires a FAMA and RETINOBLASTOMA-RELATED module. *eLife* **3**, e03271.
- McKown KH, Bergmann DC** (2020). Stomatal development in the grasses: lessons from models and crops (and crop models). *New Phytol* **227**, 1636–1648.
- Miura K, Jin JB, Lee J, Yoo CY, Stirn V, Miura T, Ashworth EN, Bressan RA, Yun DJ, Hasegawa PM** (2007). SIZ1-mediated sumoylation of ICE1 controls CBF3/DREB1A expression and freezing tolerance in *Arabidop-*

- sis. *Plant Cell* **19**, 1403–1414.
- Nadeau JA, Sack FD** (2002). Control of stomatal distribution on the *Arabidopsis* leaf surface. *Science* **296**, 1697–1700.
- Ohashi-Ito K, Bergmann DC** (2006). *Arabidopsis* FAMA controls the final proliferation/differentiation switch during stomatal development. *Plant Cell* **18**, 2493–2505.
- Pillitteri LJ, Sloan DB, Bogenschutz NL, Torii KU** (2007). Termination of asymmetric cell division and differentiation of stomata. *Nature* **445**, 501–505.
- Pillitteri LJ, Torii KU** (2012). Mechanisms of stomatal development. *Annu Rev Plant Biol* **63**, 591–614.
- Putarjunan A, Ruble J, Srivastava A, Zhao CZ, Rychel AL, Hofstetter AK, Tang XB, Zhu JK, Tama F, Zheng N, Torii KU** (2019). Bipartite anchoring of SCREAM enforces stomatal initiation by coupling MAP kinases to SPEECHLESS. *Nat Plants* **5**, 742–754.
- Qu X, Peterson KM, Torii KU** (2017). Stomatal development in time: the past and the future. *Curr Opin Genes Dev* **45**, 1–9.
- Raissig MT, Abrash E, Bettadapur A, Vogel JP, Bergmann DC** (2016). Grasses use an alternatively wired bHLH transcription factor network to establish stomatal identity. *Proc Natl Acad Sci USA* **113**, 8326–8331.
- Raissig MT, Matos JL, Ximena Anleu Gil M, Kornfeld A, Bettadapur A, Abrash E, Allison HR, Badgley G, Vogel JP, Berry JA, Bergmann DC** (2017). Mobile MUTE specifies subsidiary cells to build physiologically improved grass stomata. *Science* **355**, 1215–1218.
- Rudall PJ, Hilton J, Bateman RM** (2013). Several developmental and morphogenetic factors govern the evolution of stomatal patterning in land plants. *New Phytol* **200**, 598–614.
- Serna L** (2011). Stomatal development in *Arabidopsis* and grasses: differences and commonalities. *Int J Dev Biol* **55**, 5–10.
- Serna L** (2020). The role of grass MUTE orthologues during stomatal development. *Front Plant Sci* **11**, 55.
- Wang HL, Guo SY, Qiao X, Guo JF, Li ZL, Zhou YS, Bai SL, Gao ZY, Wang DJ, Wang PC, Galbraith DW, Song CP** (2019). BZU2/ZmMUTE controls symmetrical division of guard mother cell and specifies neighbor cell fate in maize. *PLoS Genet* **15**, e1008377.
- Wei DH, Liu MJ, Chen H, Zheng Y, Liu YX, Wang X, Yang SH, Zhou MQ, Lin J** (2018). INDUCER OF CBF EXPRESSION 1 is a male fertility regulator impacting anther dehydration in *Arabidopsis*. *PLoS Genet* **14**, e1007695.
- Wu ZL, Chen L, Yu Q, Zhou WQ, Gou XP, Li J, Hou SW** (2019). Multiple transcriptional factors control stomata development in rice. *New Phytol* **223**, 220–232.
- Ye KY, Li H, Ding YL, Shi YT, Song CP, Gong ZZ, Yang SH** (2019). BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE2 negatively regulates the stability of transcription factor ICE1 in response to cold stress in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **31**, 2682–2696.
- Yoo CY, Pence HE, Jin JB, Miura K, Gosney MJ, Hasegawa PM, Mickelbart MV** (2010). The *Arabidopsis* GTL1 transcription factor regulates water use efficiency and drought tolerance by modulating stomatal density via transrepression of *SDD1*. *Plant Cell* **22**, 4128–4141.
- Zhou WQ, Wang YC, Wu ZL, Luo L, Liu P, Yan LF, Hou SW** (2016). Homologs of SCAR/WAVE complex components are required for epidermal cell morphogenesis in rice. *J Exp Bot* **67**, 4311–4323.
- Zoulas N, Harrison EL, Casson SA, Gray JE** (2018). Molecular control of stomatal development. *Biochem J* **475**, 441–454.

ZmICE2 Regulates Stomatal Development in Maize

Wenqi Zhou^{1*}, Yuqian Zhou¹, Yongsheng Li¹, Haijun He¹, Yanzhong Yang¹, Xiaojuan Wang¹, Xiaorong Lian¹, Zhongxiang Liu¹, Zhubing Hu^{2*}

¹Crops Research Institute, Gansu Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730070, China; ²State Key Laboratory of Crop Stress Adaptation and Improvement, School of Life Sciences, Henan University, Kaifeng 475004, China

Abstract Plant epidermis is crucial in regulating photosynthesis, respiration, heat dissipation, and water utilization. Significant progress has been made in the study of stomatal development in dicotyledonous plants, such as *Arabidopsis thaliana*. Three important bHLH transcription factors (SPCH, MUTE, and FAMA) have been reported to be specifically expressed at different stages of cell division and differentiation in the stomatal lineage. They form heterodimers with another transcription factors SCRM/ICE1 and SCRM2/ICE2 to regulate the morphological transformation and changes of stomatal lineage cells across three stages of division, finally forming the stomatal complex. However, in monocots, especially in Poaceae plants such as maize (*Zea mays*), studies on genes regulating epidermal morphogenesis are less reported. In this study, two single-gene recessive mutants, *Zmice1-1* (*inducer of cbf expression1-1*) and *Zmice2-1*, were isolated using reverse genetics approaches. Compared to the control B73, *Zmice2-1* exhibited dwarfism, leaf chlorosis, reduced fertility, significantly lower stomatal density and index, disrupted arrangement of epidermal long cells, and absence of spacing between stomata. *Zmice1-1* leaves gradually turned yellow from the five-leaf stage and displayed complete chlorosis at later stages. The homozygous *Zmice1-1* plants are growth-arrested and sterile, but the stomatal density showed no significant difference compared to the control. Different alleles of *Zmice2* were obtained using CRISPR-Cas9 genome editing technology. Phenotypic identification showed that *Zmice2-2* had an abnormal stomatal phenotype similar to *Zmice2-1*, indicating that *ZmICE2* is involved in the regulation of stomatal development. Transcriptome analysis of B73 and *Zmice2-1* revealed that *ZmICE2* primarily regulated stomatal development by affecting cell division and differentiation, participating in the formation of maize epidermal morphology. These results contribute to a better understanding of the mechanisms of epidermal morphogenesis in maize and provide valuable genetic resources for improving crop resilience and yield traits.

Key words maize, stomatal development, stomatal density, epidermal morphogenesis, CRISPR-Cas9 gene editing

Zhou WQ, Zhou YQ, Li YS, He HJ, Yang YZ, Wang XJ, Lian XR, Liu ZX, Hu ZB (2023). *ZmICE2* regulates stomatal development in maize. *Chin Bull Bot* **58**, 866–881.

* Authors for correspondence. E-mail: zhouwenqi850202@163.com; zhubinghu@henu.edu.cn

(责任编辑: 朱亚娜)