

转录组和 iTRAQ 技术联合 揭示玉米根系的耐旱机制

白明兴^{1,2}, 庄泽龙^{1,2}, 姬祥卓^{1,2}, 彭云玲^{1,2}

(甘肃农业大学农学院, 甘肃省干旱生境作物学重点实验室/甘肃省作物遗传改良与种质创新重点实验室, 甘肃 兰州 730070)

摘要:采用 RNA-Seq 技术和 iTRAQ 技术对耐旱性不同的两玉米自交系(昌 7-2 和 TS141)的幼苗根系差异基因(DEGs)和差异蛋白(DEPs)进行关联分析。定量关联分析结果表明, Chang 7-2 D1 vs CK1、Chang 7-2 D2 vs CK2、TS141 D1 vs CK1 和 TS141 D2 vs CK2 等 4 个比较组中 mRNA 和蛋白表达趋势相同的基因相关系数分别为 0.7993、0.5673、0.6406、0.6588, mRNA 和蛋白表达趋势相反的基因相关系数分别为 -0.7222、-0.5752、-0.7996、-0.7339; 此外, 通过对每个自交系的 D1 vs CK1 和 D2 vs CK2 关联结果进行整合后发现, 在干旱胁迫下, 昌 7-2 中 mRNA 和蛋白表达趋势相同的基因有 19 个, mRNA 和蛋白表达趋势相反的基因有 9 个, TS141 中 mRNA 和蛋白表达趋势相同的基因有 11 个, mRNA 和蛋白表达趋势相反的基因有 0 个, 表明植物根系在转录和转录后调控过程中存在差异。KEGG 分析发现 4 个比较组所关联到的 DEGs/DEPs 主要涉及苯丙素的生物合成、次生代谢产物的生物合成和核糖体等, 这些通路可能是不同自交系幼苗根系共同响应干旱胁迫的主要通路。在昌 7-2 和 TS141 中挑选 9 个 DEPs/DEGs 表达趋势相同的基因进行 qRT-PCR 分析表明, 9 个 DEPs/DEGs 的表达趋势与它们的 RNA-Seq 和 iTRAQ 结果基本一致。

关键词:玉米; 根系; 转录组; 蛋白质组; 关联分析; 耐旱机制

中图分类号:S513; Q945.78 **文献标志码:**A

Research on drought-tolerant regulatory mechanism of maize roots using transcriptome and iTRAQ techniques

BAI Mingxing^{1,2}, ZHUANG zelong^{1,2}, JI Xiangzhuo^{1,2}, PENG Yunling^{1,2}

(College of Agronomy, Gansu Agricultural University, Gansu Provincial Key Lab of Arid Land Crop Science, Gansu Key Lab of Crop Improvement & Germplasm Enhancement, Lanzhou, Gansu 730070, China)

Abstract: RNA-Seq and iTRAQ techniques were used to analyze the association of differentially expressed genes (DEGs) and differentially expressed proteins (DEPs) in seedling roots of two maize inbred lines, Chang 7-2 and TS141, with different drought tolerance. The results of quantitative correlation analysis showed that the correlation coefficients of genes with the same trend of mRNA and protein expression in Chang 7-2 D1 vs CK1, Chang 7-2 D2 vs CK2, TS141 D1 vs CK1 and TS141 D2 vs CK2 were 0.7993, 0.5673, 0.6406, and 0.6588, respectively. The correlation coefficients of mRNA and genes with opposite protein expression trend were -0.7222, -0.5752, -0.7996, and -0.7339, respectively. Further, by integrating the association of each self-crossing D1 vs CK1 and D2 vs CK2, it was found that there were 19 genes with the same expression trend of mRNA and protein in Chang 7-2, 9 gene with opposite expression trend of mRNA and protein, 11 genes with the same expression trend of mRNA and protein in TS141, and 0 gene with opposite expression trend of mRNA and protein, indicating that there were differences in transcriptional and post-transcriptional regulation in plant roots. KEGG analysis showed that the DEGs/DEPs associated with the four comparison groups were mainly related to phenylpropanoid biosynthesis, biosynthesis of secondary metabolites and ribosome, and these pathways might be the main pathways in response to

drought stress in the roots of different inbred lines. 9 genes with the same expression trend of DEPs/DEGs were selected from Chang 7-2 and TS141 for qRT-PCR analysis, and the results showed that the expression trend of 9 DEPs/DEGs was basically consistent with their RNA-Seq and iTRAQ results.

Keywords: maize; root system; transcriptome; proteome; joint analysis; drought-tolerant mechanism

干旱作为全球最重要的非生物胁迫之一,极大地影响了作物的生长发育和产量。玉米作为我国主要的粮饲兼用作物,是典型的干旱敏感作物,各生育期需水量较大^[1-3]。研究表明,干旱缺水不仅严重影响玉米的生长发育,造成玉米大幅减产,而且会阻碍玉米叶片对 CO₂ 的吸收,进而影响其光合性能^[4-5]。此外,干旱胁迫会导致植物体内活性氧(ROS)不断积累,ROS 在植物生长发育中有着十分重要的作用,正常条件下主要参与调节植物的生长发育,维持动态平衡状态^[6];当遭受非生物胁迫时,植物体内的 ROS 快速积累,多余的 ROS 不能及时清除,动态平衡遭到破坏,从而影响植物的发育^[7]。活性氧是氧分子没有完全还原的产物,其毒性很强,在非生物胁迫下,它不仅可以破坏细胞的结构和功能,而且是信号转导的重要调节因子^[8]。由于 ROS 具有极高的氧化活性,植物体内蛋白质、磷脂和核酸很容易被氧化,造成细胞中蛋白质降解和核酸裂解,以及磷脂过氧化产生丙二醛,破坏细胞膜结构^[9]。且大量研究也表明,ROS 作为信号分子在植物细胞防御响应和细胞程序性死亡等方面扮演着极其重要的角色^[10]。当植物遭受轻度干旱胁迫时,会导致植物体内活性氧清除启动一系列复杂的清除反应^[11],促使超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)和过氧化物酶(POD)等酶活力提高,保护植物免受环境胁迫的危害。根系作为植物吸收和运输土壤中水分及养料的主要器官,在遭遇非生物胁迫时,根系一般最先感受到逆境胁迫,从而改变根系的形态以及分布以适应不利环境。因此,深入剖析玉米苗期根系对干旱胁迫的分子基础及响应机制,对改善干旱和半干旱地区作物的早期生长状况及促进全球粮食生产安全有着极其重要的作用^[12]。

近年来,随着全基因组测序的快速发展,不同学者在研究植物抗逆性方面也逐渐采用转录组和蛋白质组学技术来揭示逆境胁迫中植物的生理、生化和分析响应机制,从而挖掘大量与抗逆相关的基因。ZENDA 等^[13]为了揭示不同玉米自交系对干旱胁迫的耐受性,采用耐旱自交系 YE8112 和干旱敏感自交系 MO17 进行比较转录组分析,通过分析获得了一些耐旱基因和调控干旱胁迫的主要途径,阐

述了不同玉米自交系对干旱胁迫的响应机制,并依据目前研究构建了玉米幼苗抗旱的分子模型。LIU 等^[14]通过对两个杂交品种(耐旱 ND476 和旱敏 ZX978)在干旱胁迫下进行转录组分析发现,玉米对干旱胁迫的适应是一种品种特异性的反应,也是一种阶段性的反应过程,并且该研究也挖掘了一些调控玉米干旱胁迫反应的品种特异性基因和生育期特异性基因。CHEN 等^[15]通过对两份耐盐性不同的玉米自交系根系进行蛋白质组学分析发现,当遭遇盐胁迫时,不同耐盐性自交系差异表达蛋白(DEPs)间虽存在明显差异,但是不同自交系间对盐胁迫的响应也存在一些相同的趋势。JIANG 等^[16]利用 iTRAQ (Isobaric tags for relative and absolute quantification)技术发现玉米幼苗在干旱胁迫下存在多重转录后调控和翻译后修饰,并提出在干旱胁迫下玉米幼苗会通过提高其抗旱性来应对干旱的策略。ZHENG 等^[17]采用耐旱材料 28M 和旱敏感材料 753F 从基因调控水平揭示了 287M 抗旱性的机制,表明 287M 和 753F 的抗旱性差异可能与清除 ROS 能力、信号相互作用网络和某些转录因子有关。HAO 等^[18]利用 RNA 测序技术对耐旱性不同的两自交系根系干旱相关基因进行全基因组鉴定和比较分析,并表明玉米的抗旱性与 ABA 信号通路、海藻糖生物合成、活性氧清除和转录因子相关基因的表达模式有关。以上研究试图从某一组学水平去解析一些生物学现象,不能深入剖析其响应机理。例如,转录组只能关注一些关键编码转录本的表达量变化,而不能了解其转录调控以及对蛋白翻译的影响。因此,利用多组学联合分析剖析一些生物学问题十分必要。转录组和蛋白质组学可以从两个不同层面反映基因的表达情况,所以要了解转录组与蛋白质组的相互调控作用,需要对 mRNA 与蛋白质的表达进行同步监测。关联分析的目的之一是实现数据互补,得到生物体更加完整的表达信息。

因此,为了进一步剖析玉米幼苗对干旱胁迫的响应机制,本研究以耐旱自交系昌 7-2 和干旱敏感自交系 TS141 的苗期根系为试验材料,结合转录组测序和 iTRAQ 技术探究不同玉米自交系对干旱的响应机制并筛选一些耐旱候选基因,为进一步了解玉米耐旱的分子机制提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料处理

用耐旱自交系昌 7-2 (Chang 7-2) 和干旱敏感自交系 TS141 为试材,对两自交系分别进行蒸馏水 (CK) 和 20%PEG(D) 处理。挑选整齐、一致的种子用 0.5%NaClO 表面灭菌 10 min 并用无菌蒸馏水洗涤 5 次。将种子浸泡在处理溶液中 24 h 后点播在营养钵 (15 cm×13 cm) 中,消毒蛭石 (溶液:蛭石 = 1:5 v · m⁻¹) 用与各处理相同的处理溶液搅拌均匀,每钵 10 粒,试验设置 3 次重复。将材料置于人工气候箱,昼夜温度分别为 25℃、20℃,光照和黑暗时间分别为 16、8 h,光照强度为 600 μmol · s⁻¹ · m⁻²。对相应材料每隔 1 d 加入 50 mL 蒸馏水,每 3 d 施加 50 mL 对应处理液,处理 12 d 后收集根系样品进行转录组测序和蛋白质组学测序。

1.2 转录组测序和蛋白质组测序分析

转录组测序参照 CHEN 等^[19]的方法,对两不同玉米自交系处理后 12 d 的幼苗根系进行总 RNA 提取,并进行转录组测序。测序所获得的原始读段 (Raw reads) 进行过滤,得到干净读段 (Clean reads),后续分析都基于 Clean reads,并采用 HISAT 和 RSEM 软件以第三版 B73 玉米参考基因组对 Clean reads 进行比对 (Version ZmB73_5a.59) (<http://ftp.maizesequence.org/>) 和基因表达水平检测。通过 RPKM 计算 12 个样品的基因表达 (每百万 Kbp 读数) 方法,其测序的数据已提交到 NCBI 的 SRA (登录号:PRJNA698088)。为了提高 DEG 数据的准确性,差异基因筛选标准采用 $|\log_2 FC| \geq 1$ 且 $FDR \leq 0.001$ 。而蛋白质组测序的具体方法及相关数据来自 ZENG 等^[20]。采用 WEGO 软件^[21]对筛选出的 DEGs 在 GO 数据库中的功能注释进行分类。通路显著性富集分析基于 KEGG (Kyoto encyclopedia of genes and genomes) 公共数据库 (<http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>) 进行,对显著富集的通路进行鉴定。其中把 $Q \text{ value} \leq 0.05$ 的 Pathway 定义为在 DEGs 中显著富集的 Pathway。

1.3 关联分析

干旱胁迫下,利用 LAN 等^[22]的方法计算了昌 7-2 和 TS141 蛋白质水平与转录水平的 Pearson 相关系数,确定蛋白质与 mRNA 的相关性,并对每个品种关联了两个生物学重复,其中 Chang 7-2 D1 vs CK1 比较组表示耐旱自交系昌 7-2 转录组和蛋白组第一个生物学重复所关联的结果,Chang 7-2 D2 vs CK2 比较组表示耐旱自交系昌 7-2 转录组和蛋

白组第二个生物学重复所关联的结果;而 TS141 D1 vs CK1 和 TS141 D2 vs CK2 比较组分别表示旱敏感自交系 TS141 中两个重复的关联结果。

1.4 qRT-PCR (Quantitative real time-PCR) 验证

采用 RNA 提取试剂盒获取两自交系不同处理下幼苗根系的总 RNA,随后利用 FastKing RT Kit (天根生物技术,北京,中国) 对提取的总 RNA 反转录为 cDNA,备用。利用 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 官网进行引物设计,本试验根据不同基因的表达量共设计了 9 个基因的特异性 PCR 引物对转录组数据和蛋白数据进行验证,实时荧光定量 (qRT-PCR) 分析的具体方法参考 CHEN 等^[19],所选基因的相对表达水平通过 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法计算,并以 Actin 基因的表达水平进行归一化,每个处理使用 3 个生物重复。

2 结果与分析

2.1 转录组和蛋白质组数据分析

2.1.1 转录组测序分析 采用 BGISEQ-500 测序平台对两份玉米自交系根系样品进行 RNA-Seq 测序。结果表明测序样品平均产生 116025890.2 条 Raw reads,经过剔除低质量的 Reads 后,每个样品平均得到 107905100.5 条高质量的 Clean reads。采用 HISAT 软件将获得的 Clean reads 与玉米参考基因组 B73 (<http://ftp.maizesequence.org/>) 进行比对,结果表明不同样品在参考基因组中的平均比对率约 68.77%。此外,以 $|\log_2 \text{Ratio} (FC, \text{Fold Change})| \geq 1$, $P \text{ value} \leq 0.001$ 作为两样品间差异表达基因 (DEGs) 的筛选条件对不同样品间进行差异表达基因筛选,结果表明,在昌 7-2 中鉴定出 7483 个 DEGs,其中 3162 个 DEGs 上调表达,4321 个 DEGs 下调表达;在 TS141 中鉴定出 6829 个 DEGs,其中 3290 个 DEGs 上调表达,3539 个 DEGs 下调表达 (图 1)。

2.1.2 蛋白质组数据分析 采用 iTRAQ 技术对抗旱性不同的两自交系幼苗根系进行蛋白质组学分析,结果共产生了 97374 张光谱、39371 个肽以及 30148 个独特的肽,最终鉴定到 7723 个蛋白质。当蛋白质丰度比达到 0.83 倍以下或 1.2 倍以上,且 $P < 0.05$ 时,认为该蛋白是两个不同样品间的差异表达蛋白 (DEPs)。结果表明,在 Chang 7-2-D vs CK 中鉴定出 1243 个 DEPs,其中 572 个 DEPs 上调表达,671 个 DEPs 下调表达;TS141-D vs CK 中鉴定出 419 个 DEPs,其中 172 个 DEPs 上调表达,247 个 DEPs 下调表达 (图 1)。

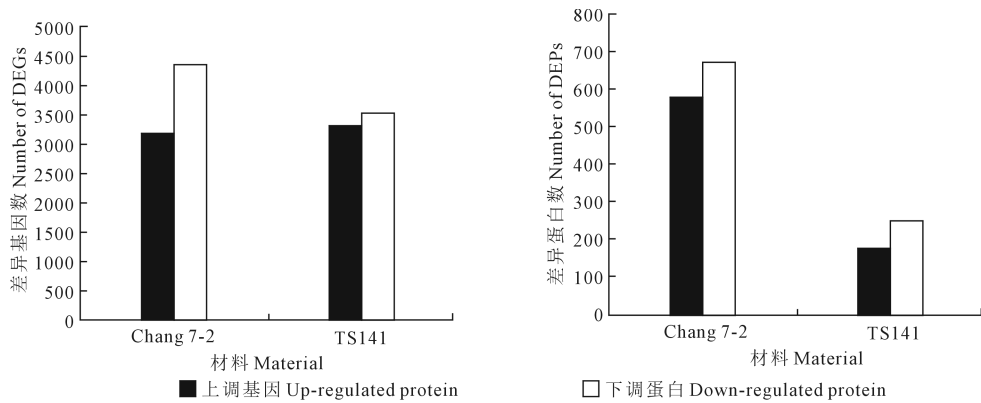


图 1 干旱处理下两玉米自交系的 DEGs 和 DEPs

Fig.1 DEGs and DEPs of two maize inbred lines under drought treatments

2.2 转录组和蛋白质组学关联性分析

2.2.1 转录组和蛋白质组差异表达基因与差异表达蛋白的关联分析 对转录组和蛋白质组数据进行关联分析,当某一个蛋白质在转录组水平有表达量时,被认为关联到。关联结果表明(表 1),在鉴定、定量和显著差异表达 3 个方面,Chang 7-2 D1 *vs* CK1 中 7612 个基因在 mRNA 和蛋白质水平被同时鉴定,并定量到 7609 个基因,有 157 个 DEGs 同 DEPs 关联。Chang 7-2 D2 *vs* CK2 中 7621 个基因在 mRNA 和蛋白质水平被同时鉴定,并定量到 7619 个基因,有 98 个 DEGs 同 DEPs 关联。TS141 D1 *vs* CK1 中 7609 个基因在 mRNA 和蛋白质水平被同时鉴定,并定量到 7606 个基因,有 76 个 DEGs 同 DEPs 关联。TS141 D2 *vs* CK2 中 7619 个基因在 mRNA 和蛋白质水平被同时鉴定,并定量到 7616 个基因,有 116 个 DEGs 同 DEPs 关联。

2.2.2 转录组和蛋白质组相关性分析 基于 mRNA 水平和蛋白质水平的表达结果,使关联到的基因在 mRNA 表达水平和蛋白质水平上存在多种类型,即 mRNA 和蛋白表达趋势相同、mRNA 和蛋白表达趋势相反、mRNA 表达有差异而蛋白表达无差异、mRNA 表达无差异而蛋白表达有差异以及 mRNA 和蛋白表达均无差异 5 种关联类型。本研究发现,Chang 7-2 D1 *vs* CK1、Chang 7-2 D2 *vs* CK2、TS141 D1 *vs* CK1 和 TS141 D2 *vs* CK2 等 4 个比较组中所关联到 DEGs 和 DEPs 的相关性系数分别为 0.3063、0.2208、0.2295 和 -0.0203(图 2)。其中,mRNA 和蛋白表达趋势相同的基因分别为 98(重复基因 2 个)、64、55(重复基因 2 个)、62 个(重复基因 1 个)(表 2),去除组内重复基因后分别为 96、64、53、61;而 mRNA 和蛋白表达趋势相反基因分别为 59(重复基因 1 个)、34(重复基因 2 个)、21(重复基因 1 个)、

表 1 鉴定、定量和显著差异中被关联的基因和蛋白质数量

Table 1 Number of genes and proteins associated in identification, quantification, and significant difference

比较组 Comparable group	鉴定数量 Number of identification	定量数量 Number of quantitation	差异表达数量 Number of differential expression
Chang 7-2 D1 <i>vs</i> CK1	7612	7609	157
Chang 7-2 D2 <i>vs</i> CK2	7621	7619	98
TS141 D1 <i>vs</i> CK1	7609	7606	76
TS141 D2 <i>vs</i> CK2	7619	7616	116

54 个(表 2),去除组内重复基因后分别为 58、32、20、54。

为了进一步剖析两自交系在干旱胁迫下基因表达的调控情况,对每个自交系 D1 *vs* CK1 和 D2 *vs* CK2 的关联结果进行了整合,以获得在干旱胁迫下稳定表达的基因信息。结果表明,Chang 7-2 的 D1 *vs* CK1 和 D2 *vs* CK2 样品中 mRNA 和蛋白表达趋势相同的基因有 19 个(表 3;图 3A),mRNA 和蛋白表达趋势相反的基因有 9 个(表 3;图 3B);TS141 D1 *vs* CK1 和 D2 *vs* CK2 中 mRNA 和蛋白表达趋势相同的基因有 11 个(表 3),mRNA 和蛋白表达趋势相反的基因在两次重复中没检索到较为稳定表达的基因(图 3B)。

2.2.3 GO 富集关联分析 对两个组学中差异表达蛋白和基因进行 GO 功能注释分析,结果表明 Chang 7-2 D1 *vs* CK1、Chang 7-2 D2 *vs* CK2、TS141 D1 *vs* CK1 和 TS141 D2 *vs* CK2 等 4 个比较组的 GO 功能富集总体分为细胞成分(Cellular component, C)、分子功能(Molecular function, F)和生物过程(Biological process, P),而干旱处理下,比较组 Chang 7-2 D1 *vs* CK1 和 Chang 7-2 D2 *vs* CK2 所关联 DEGs/DEPs 的主要细胞组分包括细胞内非膜-b(Intracellular non-membrane-b)、非膜结合细胞器(Non-membrane-bounded organel)、细胞外围(Cell periphery);

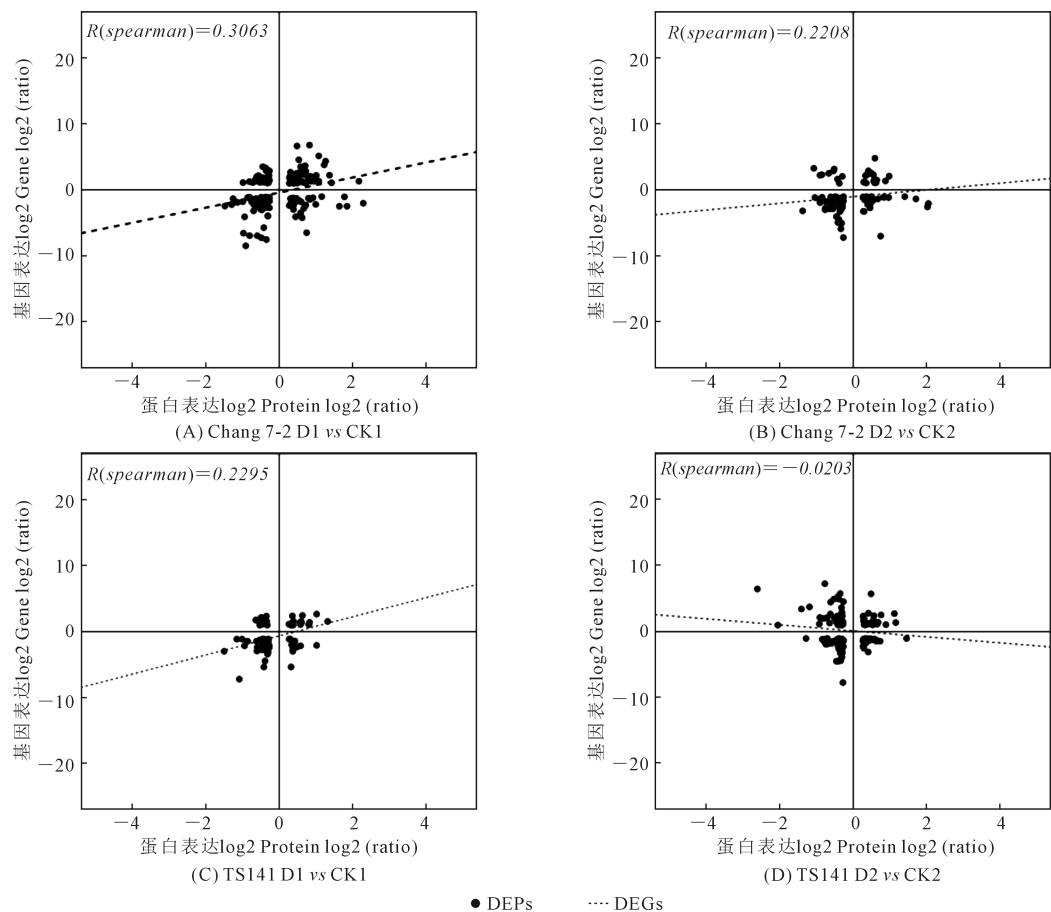


图 2 显著差异蛋白质和显著差异基因表达关联图

Fig.2 Association map of significantly different protein and significantly different gene expression

表 2 mRNA 和蛋白关联变化的 5 种类型基因数量

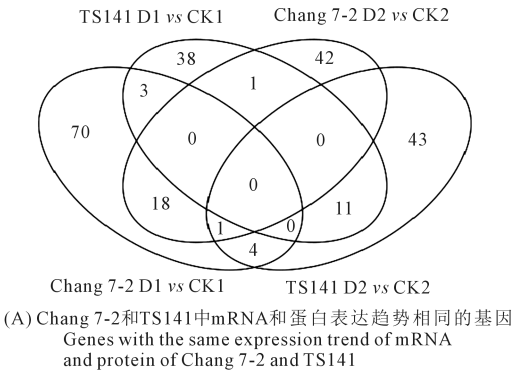
Table 2 Number of five types of genes associated with changes in mRNA and protein				
项目 Item	Chang 7-2 D1 vs CK1	Chang 7-2 D2 vs CK2	TS141 D1 vs CK1	TS141 D2 vs CK2
mRNA 和蛋白 表达趋势相同 Same expression trend	98	64	55	62
mRNA 和蛋白 表达趋势相反 Opposite expression trend	59	34	21	54
蛋白表达有差异而 mRNA 表达无差异 Differences in protein expression only	484	271	169	303
蛋白表达无差异而 mRNA 表达有差异 Differences in mRNA expression only	947	1131	1550	1299
蛋白和 mRNA 表达均无差异 No differences in protein and mRNA expression	6021	6119	5811	5898

生物学过程主要有氧化-还原过程 (Oxidation-reduction process)、胁迫反应 (Response to stress)、碳水化合物代谢过程 (Carbohydrate metabolic proce);

分子功能主要包括金属离子结合 (Metal ion binding)、阳离子结合 (Cation binding)、氧化还原酶活性 (Oxidoreductase activity)。比较组 TS141 D1 vs CK1 和 TS141 D2 vs CK2 所关联到的 DEGs/DEPs 主要细胞组分包括 Intracellular non-membrane-b、Non-membrane-bounded organel 和核糖核蛋白复合物 (Ribonucleoprotein complex);分子功能主要包括 Oxidoreductase activity 和 Metal ion binding;其生物学过程主要有胁迫反应 (Response to stress) 和刺激反应 (Response to stimulus)。此外,我们还发现两玉米自交系幼苗根系所关联到的 DEGs/DEPs 均富集到胁迫响应 (Response to stress) 过程,即遭遇干旱胁迫后,其幼苗根系会立即对干旱胁迫做出响应,并通过促进根系内过氧化物酶活性、氧化还原酶活性等多种酶活性来抵御干旱。

2.2.4 Pathway 富集关联分析 利用 KEGG pathway 数据库对 Chang 7-2 D1 vs CK1、Chang 7-2 D2 vs CK2、TS141 D1 vs CK1 和 TS141 D2 vs CK2 等 4 个比较组的转录组和蛋白质组数据以及所关联到的 DEGs/ DEPs 进行通路富集分析,结果表明,差异基

因和差异蛋白在各代谢通路中富集显著性分为 3 大类:转录组与蛋白质组都显著富集、转录组与蛋白质组任意一个组学数据显著富集和转录组与蛋白质组均无显著富集。而我们仅对转录组与蛋白组两个组学都显著富集的通路进行了分析,发现 4 个比较组所关联到的 DEGs/ DEPs 主要富集的通路包括苯丙素的生物合成 (Phenylpropanoid biosynthesis)、次生代谢产物的生物合成 (Biosynthesis of secondary metabolites) 和核糖体 (Ribosome) (表 4)。由此发现,玉米幼苗在应对干旱胁迫时会发生一系列复杂的代谢活动,而苯丙素的生物合成、次生代谢产物的生物合成和核糖体等相关代谢通路可能是根系响应干旱胁迫的主要通路。



2.2.5 qRT-PCR 验证 为了验证干旱胁迫下两玉米自交系转录组和蛋白质组数据对于干旱胁迫响应的可靠性,我们通过 qRT-PCR 验证了在干旱处理下昌 7-2 和 TS141 中表达水平不同的 9 个基因(表 5、图 4)。我们发现这 9 个基因在两个自交系中的基因表达水平与 RNA-Seq 和 iTRAQ 结果呈现相同趋势,这表明两组学测序数据是可靠的。

3 讨论

为了进一步剖析不同玉米自交系对于干旱胁迫的响应机制,采用耐旱自交系昌 7-2 和干旱敏感自交系 TS141 作为试验材料,在干旱处理 12 d 后对其幼苗根系进行转录组学分析和蛋白质组学分析,并

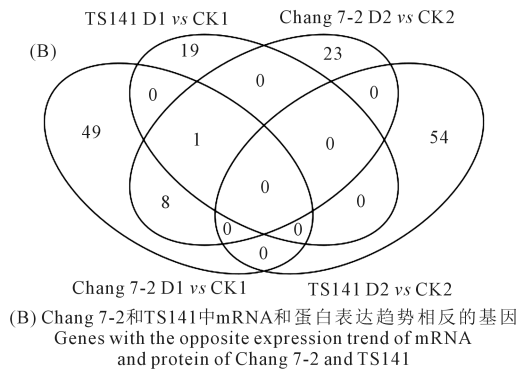


图 3 两玉米自交系在不同处理下 DEGs 和 DEPs 的 Venn 图

Fig.3 Venn diagram of DEGs and DEPs of two maize inbred lines under different treatments

表 4 转录组与蛋白质组在 Pathway 通路中注释数量统计

Table 4 Statistics of the number of annotations in the pathways between transcriptome and proteome

样品 Sample	通路名称 Pathway name	蛋白质数量 Number of proteins	基因数量 Number of genes	关联数量 Number of correlations
Chang 7-2 D1 vs CK1	苯丙烷类化合物的生物合成 Phenylpropanoid biosynthesis	40	146	15
	次生代谢物的生物合成 Biosynthesis of secondary metabolites	154	684	46
Chang 7-2 D2 vs CK2	淀粉和蔗糖代谢 Starch and sucrose metabolism	17	125	3
	苯丙烷类化合物的生物合成 Phenylpropanoid biosynthesis	32	130	12
	神经节苷脂生物合成-神经节苷脂系列 Glycosphingolipid biosynthesis-ganglio series	3	22	1
	糖酵解/糖异生 Glycolysis / Gluconeogenesis	14	68	4
TS141 D1 vs CK1	核糖体 Ribosome	18	363	16
TS141 D2 vs CK2	苯丙烷类化合物的生物合成 Phenylpropanoid biosynthesis	29	188	14
	核糖体 Ribosome	56	201	17

表 5 用于 qRT-PCR 分析的基因
Table 5 Genes for qRT-PCR analysis

材料 Material	基因 ID Gene ID	基因描述 Gene description
Chang 7-2	100283098	内皮素 A Endochitinase A
	100276695	渗透素样蛋白 OSM34 Osmotin-like protein OSM34
	100193279	乳酸/苹果酸脱氢酶家族蛋白 Lactate/malate dehydrogenase family protein
	100273479	过氧化物酶 5 Peroxidase 5
	103629478	茉莉酮酸氧甲基转移酶 Jasmonate O-methyltransferase
TS141	542376	丙酮酸脱羧酶 1 Pyruvate decarboxylase 1
	100282243	三磷酸腺苷酶抑制剂 ATPase inhibitor
	100381459	呼吸爆发氧化酶同源蛋白 B Respiratory burst oxidase homolog protein B
	100272381	脯氨酸 4-羟化酶 4 Prolyl 4-hydroxylase 4

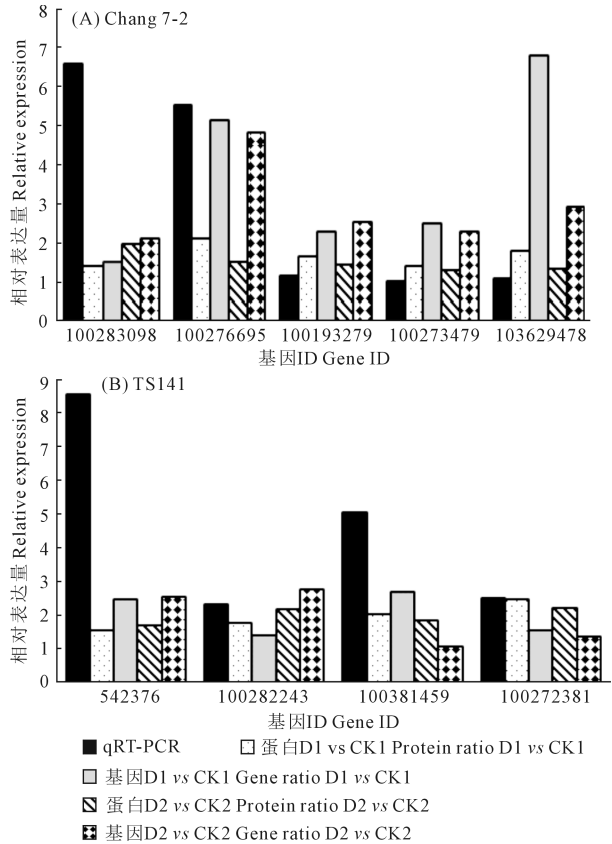


图 4 qRT-PCR 验证所选基因的相对表达量
Fig.4 The relative expression of the selected gene was verified by qRT-PCR

对其根系差异基因与差异蛋白组表达趋势相同的部分基因进行了进一步分析。

3.1 耐旱玉米自交系昌 7-2 根系对干旱的响应机制

Jasmonate O-methyltransferase 作为催化茉莉酸合成 MeJA 最重要的限速步骤^[23], 是 MeJA 合成途

径遗传改造的最重要位置。研究表明,茉莉酸类化合物作为信号分子参与调控植物的生长发育与代谢途径,响应低温、干旱和盐等多种非生物胁迫^[24]。此外,茉莉酸类物质在植物对逆境防御及胁迫传递信号等方面有着极其重要的作用。MA 等^[25]和 WU 等^[26]研究结果也表明,茉莉酸甲酯缓解物质通过调节小麦 (*Triticumaestivum*) 和甘蓝 (*Brassica oleracea*) 气孔运动及相关基因表达来调节干旱缺水对作物所带来的损伤,提高植物的抗旱性。本研究在昌 7-2 中也发现一个编码 Jasmonate O-methyltransferase 的基因 (103629478) 在转录组和蛋白质组中均上调表达,推测其在干旱胁迫下通过调节幼苗根系的气孔开度抗氧化酶活性来抵御干旱。

几丁质酶 (Endochitinase) 是一种能够将几丁质分解成几丁质单糖—N-乙酰基葡萄糖的酶,几乎在植物各器官中都有分布。有研究表明,当植物遭受干旱、低温、冻害及重金属离子等多重胁迫时,其组织内几丁质酶的活性会快速升高并水解病原菌细胞壁几丁质,抑制病原菌在植物体内的生长繁殖^[27]。近年来,关于几丁质酶基因的研究在不同植物中也不断被报道,陈鹏等^[28]通过对小麦进行干旱胁迫后发现,随着干旱胁迫程度的增加,其体内几丁质酶的活性也在不断上升,复水处理后又逐渐恢复至正常水平,表明在干旱胁迫下几丁质酶可以提高植物抗旱性。MUOKI 等^[29]通过对茶树进行环境胁迫后发现,几丁质酶基因 Chi 与 Thaumatin 蛋白可共同响应干旱胁迫,进而促进茶树的抗旱性,减弱干旱对茶树的损害。在本研究中,我们也发现当昌 7-2 在遭遇干旱胁迫后其根系内几丁质酶相关基因出现差异上调表达。

此外,当昌 7-2 遭受干旱胁迫时,其体内与热激蛋白 (100283821, Hsp20)、渗透蛋白 (100276695, Osmotin-like protein OSM34) 及过氧化物酶 (100285894、100273479、541674、107548102) 相关基因及蛋白也发生上调或下调表达。研究表明,热激蛋白作为植物响应非生物胁迫的重要蛋白之一,在植物耐寒耐旱、保护植物相关蛋白完成正确的折叠、翻译和聚集及结构功能方面发挥着重要作用^[30],目前已发现多种类型热激蛋白,例 HSP60、HSP70 和 HSP90 等家族^[31-32]。另外,干旱胁迫下,渗透调节蛋白基因和过氧化物酶 (POD) 对植物应对逆境胁迫有非常重要的作用。Osm 基因 (即 ProBA 基因) 是一种可增强植物细胞抗渗透胁迫能力的蛋白质,其主要功能为在逆境胁迫下促进脯氨酸在细胞内的合成和累积^[33],而在逆境胁迫下不同

类型的 POD 相互作用可有效清除植物体内活性氧。因此,我们推测昌 7-2 受到干旱胁迫后,其幼苗根系会通过调节体内热激蛋白和渗透蛋白相关基因上调,同时通过调控不同类型的过氧化物酶上或下调来减轻干旱所带来的损伤。

3.2 玉米干旱敏感自交系 TS141 根系对干旱的响应机制

当对 TS141 进行干旱处理后,我们发现其 mRNA 和蛋白表达趋势相同的基因主要编码 6-磷酸葡萄糖酸内酯酶(100285843)、核苷二磷酸激酶 I(100217209)、脯氨酸-4-羟化酶(100272381)及丙酮酸脱氢酶(541919、542376)等一系列基因上、下调表达来减轻其对干旱胁迫的响应,而这些基因的功能多数与糖酵解生成丙酮酸的途径相关联。丙酮酸脱羧酶(Pyruvate decarboxylase, PDC)是一种以焦磷酸硫胺素为辅酶的羧基裂解酶,是发酵途径中的关键酶。PDC 通过与 PDH 竞争代谢丙酮酸参与植物体内能量代谢和物质代谢,响应植物多种非生物胁迫,如缺氧、高盐及低温等^[34-35]。研究表明,在逆境胁迫下丙酮酸对植物的呼吸作用有交替作用,而植物保持较高的交替呼吸本身便是一种抗逆机制,对植物抗旱等方面具有重要意义^[36-37]。因此,我们推测当 TS141 感受到干旱胁迫后,主要通过诱导其糖酵解途径来促进根系进行交替呼吸,进而抵御干旱所带来的损伤。

4 结 论

本研究以两份耐旱性不同的玉米自交系昌 7-2 和 TS141 为试材,对其幼苗进行 12 d 干旱胁迫后进行转录组分析和蛋白质组学分析,以剖析不同自交系对干旱胁迫的响应机制及其抵御反应。结果表明,当玉米幼苗根系遭遇干旱胁迫后,为抵御干旱胁迫其体内会发生一系列生理生化反应,且不同自交系的根系在转录和翻译变化方面也存在明显的差异。此外,在干旱胁迫下,我们在昌 7-2 和 TS141 中分别鉴定了 19、11 个 mRNA 和蛋白表达趋势相同的基因,9 和 0 个趋势相反的基因,并且这些基因主要涉及苯丙素的生物合成、次生代谢产物的生物合成和核糖体等代谢通路,可为今后了解玉米耐旱性的分子机制提供一定的参考。

参 考 文 献:

[1] HE Z H, ZHONG J W, SUN X P, et al. The Maize ABA receptors ZmPYL8, 9, and 12 facilitate plant drought resistance[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2018, 9:422.

[2] ŽALUD Z, HLAVINKA P, PROKEŠ K, et al. Impacts of water availa-

bility and drought on maize yield — a comparison of 16 indicators[J]. *Agricultural Water Management*, 2017, 188:126-135.

[3] DONG W L, ZHANG L Z, DUAN Y, et al. Ridge and furrow systems with film cover increase maize yields and mitigate climate risks of cold and drought stress in continental climates[J]. *Field Crops Research*, 2017, 207:71-78.

[4] CHAVES M M, OLIVEIRA M M. Mechanisms underlying plant resilience to water deficits: prospects for water-saving agriculture[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2004, 55(407):2365-2384.

[5] BAI L P, SUI F G, GE T D, et al. Effect of soil drought stress on leaf water status, membrane permeability and enzymatic antioxidant system of maize[J]. *Pedosphere*, 2006, 16(3):326-332.

[6] MØLLER I M, SWEETLOVE L J. ROS signalling — specificity is required[J]. *Trends in Plant Science*, 2010, 15(7):370-374.

[7] WASZCZAK C, CARMODY M, KANGASJÄRVI J. Reactive oxygen species in plant signaling[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2018, 69:209-236.

[8] MITTLER R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance[J]. *Trends in Plant Science*, 2002, 7(9):405-410.

[9] ANJUM S A, WANG L C, FAROOQ M, et al. Brassinolide application improves the drought tolerance in maize through modulation of enzymatic antioxidants and leaf gas exchange[J]. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 2011, 197(3):177-185.

[10] FREDERICKSON MATIKA D E, LOAKE G J. Redox regulation in plant immune function[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2014, 21(9):1373-1388.

[11] IMPA S M, NADARADJAN S, JAGADISH S V K. Drought stress induced reactive oxygen species and anti-oxidants in plants[C]//AH-MAD P, PRASAD M. *Abiotic stress response in plants*. New York: Springer Science, Business Media, 2012:131-147.

[12] MIN H W, CHEN C X, WEI S W, et al. Identification of drought tolerant mechanisms in maize seedlings based on transcriptome analysis of recombination inbred lines[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7:1080.

[13] ZENDA T, LIU S T, WANG X, et al. Key maize drought-responsive genes and pathways revealed by comparative transcriptome and physiological analyses of contrasting inbred lines[J]. *International journal of molecular sciences*, 2019, 20(6):1268.

[14] LIU S T, ZENDA T, LI J, et al. Comparative transcriptomic analysis of contrasting hybrid cultivars reveal key drought-responsive genes and metabolic pathways regulating drought stress tolerance in maize at various stages[J]. *PLoS One*, 2020, 15(10):e0240468.

[15] CHEN F Q, FANG P, PENG Y L, et al. Comparative proteomics of salt-tolerant and salt-sensitive maize inbred lines to reveal the molecular mechanism of salt tolerance[J]. *International journal of molecular sciences*, 2019, 20(19):4725.

[16] JIANG Z L, JIN F X, SHAN X H, et al. iTRAQ-Based proteomic analysis reveals several strategies to cope with drought stress in maize seedlings[J]. *International journal of molecular sciences*, 2019, 20(23):5956.

[17] ZHENG H X, YANG Z, WANG W Q, et al. Transcriptome analysis

- of maize inbred lines differing in drought tolerance provides novel insights into the molecular mechanisms of drought responses in roots [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2020, 149:11-26.
- [18] HAO L Y, LIU X Y, ZHANG X J, et al. Genome-wide identification and comparative analysis of drought related genes in roots of two maize inbred lines with contrasting drought tolerance by RNA sequencing[J]. *Journal of Integrative Agriculture*, 2020, 19(2):449-464.
- [19] CHEN F Q, FANG P, ZENG W J, et al. Comparing transcriptome expression profiles to reveal the mechanisms of salt tolerance and exogenous glycine betaine mitigation in maize seedlings[J]. *PLoS One*, 2020, 15(5):e0233616.
- [20] ZENG W J, PENG Y L, ZHAO X Q, et al. Comparative proteomics analysis of the seedling root response of drought-sensitive and drought-tolerant maize varieties to drought stress [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(11):2793.
- [21] YE J, FANG L, ZHENG H K, et al. WEGO: a web tool for plotting GO annotations[J]. *Nucleic Acids Research*, 2006, 34 (Web Server-issue):W293-297.
- [22] LAN P, LI W F, SCHMIDT W. Complementary proteome and transcriptome profiling in phosphate-deficient *Arabidopsis* roots reveals multiple levels of gene regulation [J]. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2012, 11(11):1156-1166.
- [23] SEO H S, SONG J T, CHEONG J J, et al. Jasmonic acid carboxyl methyltransferase: a key enzyme for jasmonate-regulated plant responses[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001, 98(8):4788-4793.
- [24] CHEONG J J, CHOI Y D. Methyl jasmonate as a vital substance in plants[J]. *Trends in Genetics*, 2003, 19(7):409-13.
- [25] MA C, WANG Z Q, ZHANG L T, et al. Photosynthetic responses of wheat (*Triticum aestivum* L.) to combined effects of drought and exogenous methyl jasmonate[J]. *Photosynthetica*, 2014, 52(3):377-385.
- [26] WU H L, WU X L, LI Z H, et al. Physiological evaluation of drought stress tolerance and recovery in cauliflower (*Brassica oleracea* L.) seedlings treated with methyl jasmonate and coronatine[J]. *Journal of Plant Growth Regulation*, 2012, 31(1):113-123.
- [27] DAVIS J M, WU H G, COOKE J E, et al. Pathogen challenge, salicylic acid, and jasmonic acid regulate expression of chitinase gene homologs in pine[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2002, 15(4):380-387.
- [28] 陈鹏, 彭海霞, 张静. 水分胁迫对小麦叶片抗病相关酶活性的诱导[J]. *西北农业学报*, 2011, 20(2):56-61.
- CHEN P, PENG H, ZHANG J. Drought induced enzymes related with disease resistance in wheat leaves [J]. *Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica*, 2011, 20:56-61.
- [29] MUOKI R C, PAUL A, KUMAR S, et al. A shared response of *thaumatin like protein*, *chitinase*, and *late embryogenesis abundant protein* 3 to environmental stresses in tea [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze] [J]. *Functional & Integrative Genomics*, 2012, 12(3):565-571.
- [30] ZHANG L, GAO Y K, PAN H T, et al. Cloning and characterisation of a *Primula* heat shock protein gene, *PfHSP 17.1*, which confers heat, salt and drought tolerance in transgenic *Arabidopsis thaliana* [J]. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2013, 35(1):3191-3200.
- [31] GUPTA S C, SHARMA A, MISHRA M, et al. Heat shock proteins in toxicology: how close and how far? [J]. *Life Sciences*, 2010, 86(11/12):377-384.
- [32] KOTAK S, LARKINDALE J, LEE U, et al. Complexity of the heat stress response in plants[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2007, 10(3):310-316.
- [33] 李德全, 邹琦, 程炳嵩. 植物渗透调节研究进展[J]. *山东农业大学学报*, 1991, (1):86-90.
- LI D Q, ZOU Q, CHEN B S. Progress in research on osmotic adjustment of plants[J]. *Journal of Shandong Agricultural University*, 1991, (1):86-90.
- [34] KÜRSTEINER O, DUPUIS I, KUHLEMEIER C. The *Pyruvate decarboxylase 1* gene of *Arabidopsis* is required during anoxia but not other environmental stresses[J]. *Plant Physiology* 2003, 132(2):968-978.
- [35] BOLTON M D, KOLMER J A, XU W W, et al. Lr34-mediated leaf rust resistance in wheat: transcript profiling reveals a high energetic demand supported by transient recruitment of multiple metabolic pathways[J]. *Molecular Plant-microbe Interactions*, 2008, 21(12):1515-1527.
- [36] HU W H, CAO Y L, ZENG J J, et al. Effects of heat and drought stresses on growth and respiration in different cultivar of pepper (*Capsicum annuum* L.) [J]. *Bulletin of Botanical Research*, 2008, 28(2):199-204.
- [37] ZABALZA A, VAN DONGEN J T, FROELICH A, et al. Regulation of respiration and fermentation to control the plant internal oxygen concentration[J]. *Plant Physiol*, 2009, 149(2):1087-1098.