科学通报 2023 年 第 68 卷 第 28-29 期: 3857 ~ 3868
论 文
《中国科学》杂志社
SCIENCE CHINA PRESS

籼稻福香占耐储藏性的蛋白质组学分析

王颖姮[1,2†], 谢鸿光[1,2†], 陈飞鹤[1,2], 林强[1,2], 崔丽丽[1,2], 吴方喜[1,2], 魏毅东[1,2], 罗曦[1,2], 陈丽萍[1,2], 蔡秋华[1,2], 谢华安[1,2], 张建福[1,2*]

1. 福建省农业科学院水稻研究所, 福州 350019;
2. 农业农村部华南杂交水稻种质创新与分子育种重点实验室/福州(国家)水稻改良分中心/福建省作物分子育种工程实验室/福建省水稻分子育种重点实验室/福建省作物种质创新与分子育种省部共建国家重点实验室培育基地/杂交水稻国家重点实验室华南研究基地/水稻国家工程研究中心, 福州 350003

† 同等贡献

* 联系人, E-mail: jianfzhang@163.com

2023-06-14 收稿, 2023-07-25 修回, 2023-07-28 接受, 2023-08-02 网络版发表
福建省人民政府-中国农业科学院协同创新“5511”工程项目(XTCXGC2021001)和福建省省属公益类科研院所专项(2021R1023007)资助

摘要 稻谷耐储藏性对于国家粮食安全、种质资源保存及种业安全具有非常重要的意义. 本研究通过人工老化处理分析福香占和航2号种子活力的变化趋势, 扫描电子显微镜观察老化21 d后糙米淀粉粒结构, 并对关键时间点的种胚蛋白质组进行定量分析. 结果表明, 人工老化后14~21 d, 航2号种子活力快速下降, 淀粉粒结构受到严重破坏, 种子耐储藏性较差. 而福香占在人工老化21 d后仍具有较强种子活力, 淀粉粒结构保持良好, 耐储藏性优; 蛋白质组分析表明, 福香占和航2号在人工老化的不同阶段, 脂类、蛋白质、碳水化合物等生物合成及代谢、遗传信息加工、转录调控、营养保持、信息传递、氧化还原调节等方面均表现出差异; 差异蛋白质显著富集到4个代谢通路, 即亚油酸代谢, 角质、木栓和蜡质的生物合成, 谷胱甘肽代谢和甘油磷脂代谢. 老化21 d与处理前相比较, 福香占真核生物核糖体生物发生、萜类骨架生物合成、叶酸生物合成等代谢通路发生差异表达, 而航2号主要为氮代谢、淀粉和蔗糖代谢及mRNA监测等途径. 本研究为稻谷耐储藏性遗传机理的深入解析及培育耐储藏水稻新品种奠定了基础.

关键词 福香占, 稻谷耐储藏性, 种子活力, 脂肪氧化酶, 蛋白质组

稻谷收获后, 随着储藏时间增加, 尤其我国南方地区夏季高温高湿, 稻谷常会发生劣变并丧失活力. 水稻是全世界最重要的粮食作物之一. 我国是水稻的生产和消费大国, 每年因稻谷储存过程中发生陈化变质, 造成巨额的经济损失. 稻谷既是粮食, 也是种子, 稻谷活力的保持不仅关系到国家粮食安全, 对种质资源保存和保障种业安全同样具有重要意义.

稻谷主要由碳水化合物、蛋白质、脂肪、矿物质、维生素和水分等组成. 淀粉在稻谷中含量最高, 在稻谷储藏过程中, 淀粉会被缓慢水解, 其结构受到破坏、理化性质发生改变, 使得米饭黏度和食味品质下降[1]; 而脂肪是最不稳定的, 自由脂肪酸极易发生氧化酸败, 过氧化的脂质不仅会引起蛋白质、淀粉、维生素E等损失, 还会进一步降解为醛酮醇类挥发性物质, 使大米产生臭味. 脂质过氧化是导致种子活力丧失的主要原因[2]; 蛋白质在储藏过程中巯基间可以相互形成二硫键, 形成蛋白质网状结构, 影响淀粉吸水膨胀, 对米饭黏度产生影响[1]; 随着储存年限增加, 自由氨基

引用格式: 王颖姮, 谢鸿光, 陈飞鹤, 等. 籼稻福香占耐储藏性的蛋白质组学分析. 科学通报, 2023, 68: 3857–3868
Wang Y H, Xie H G, Chen F H, et al. Analysis of the high seed storability trait in *indica* rice “Fuxiangzhan” (in Chinese). Chin Sci Bull, 2023, 68: 3857–3868, doi: 10.1360/TB-2023-0574

© 2023《中国科学》杂志社

酸也会显著减少[3], 产生美拉德非酶促褐变反应[1], 使得糙米表面颜色变暗, 营养价值降低.

不同种质间耐储藏性存在较大差异, 种子的储藏性受到基因型、成熟度和储存条件等影响. 研究表明, 脂肪氧化酶(lipoxygenase)含量低或缺失的品种具有较好的耐储藏性[4]; 另外, 植物自身的抗氧化系统能通过清除活性氧(reactive oxygen species, ROS)自由基从而延缓衰老进程[5]; 而不同品种间寡糖、储藏蛋白、胚胎发育晚期丰度蛋白(late embriogenesis abundant protein, LEA)和热休克蛋白(heat shock proteins, HSP)累积、内源激素水平、自身修复系统[6]等的差异都可能影响稻谷耐储藏性[7]. 通过提高稻谷自身的耐储性, 选育耐储藏的优良水稻新品种, 是解决或减缓稻谷陈化变质这一问题最经济、有效的方法. 2012年, 台湾台东区农业改良场育成的台东33具有较好耐储藏性. 本研究室近年来育成了常规籼稻福香占[8]、三系杂交稻内10优7185[9]等系列耐储藏性较好的水稻新品种. 其中, 福香占具有米质优、耐储藏、有香味等优点, 属于高档香型优质稻, 其大米在福建省自然储藏两年后仍然有较好口感.

种子老化过程涉及一系列复杂的生理学和生化反应, 包括细胞信号传导、氧化还原调节、生物大分子合成代谢等. 这些复杂的过程使得稻谷耐储藏性的遗传机理至今仍然不甚清楚, 而这些生物学过程都离不开蛋白质的催化调节或介导. 因此, 本研究选择耐储藏性较好的福香占和不耐储藏的籼稻恢复系航2号, 通过人工老化箱模拟高温高湿环境加速种子老化, 来研究种子活力变化趋势[10], 采用Label-free定量蛋白质组分析老化不同时间点蛋白质的表达差异变化, 对种子老化过程的蛋白质组进行比较分析, 系统分析差异蛋白质参与的代谢通路及表达模式, 旨在为阐明福香占耐储藏性的遗传机理, 并为进一步培育耐储藏水稻新品种奠定基础.

1 材料和方法

1.1 人工老化分析种子活力变化趋势

福香占、航2号均由福建省农业科学院水稻研究所选育. 将2019年秋季同一地点收获的种子, 放在42°C烘箱中干燥, 将种子含水量保持在13%. 每个时间点的样品分别选取饱满种子100粒放在小网袋中, 挂在恒温恒湿箱(BINDER, 德国)进行人工加速老化处理. 处理条件为: 42°C, 88%相对湿度(relative humidity, RH). 老化处理的不同时期(0、7、14、21、28、35、42 d)分别取样测定种子发芽率.

发芽率测定方法为: 将小网袋中的种子全部置于铺3层滤纸的普通培养皿, 按照16 h/8 h, 光照和黑暗交替培养, 温度30°C, 70%(RH), 在培养室中清水培养10 d, 统计种子发芽率. 人工老化处理及发芽率测定每个时间点均设3次生物学重复.

1.2 电子显微镜扫描观察老化前后种胚表面结构

分别取福香占、航2号人工老化0和21 d的种子, 剥掉种子外壳, 将种子横切面粘到镀膜机载物台上面进行喷金(ION COATER, EIKO IB.5). 用扫描电子显微镜(JSM-6380LV, JEOL)观察淀粉粒表面结构.

1.3 Label-free定量蛋白质组分析

1.3.1 蛋白质提取和肽段酶解

分别切下福香占和航2号的0、14、21、28 d四个时间点种胚, 采用SDT裂解液(4%(w/v)SDS, 100 mmol/L Tris/HCl pH 7.6, 0.1 mol/L DTT)提取蛋白质, 然后用二辛可宁酸测定(bicinchoninic acid assay, BCA)法进行蛋白质定量. 每个样品取适量蛋白质用过滤器辅助蛋白质组制备(filter aided proteome preparation, FASP)方法进行胰蛋白酶酶解[11], 采用C18 Cartridge对肽段进行脱盐, 肽段冻干后加入40 μL 0.1%甲酸溶液复溶, 肽段定量(OD280).

1.3.2 LC-MS/MS数据采集和蛋白鉴定定量分析

采用高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)液相系统进行样品分离, 色谱柱以95%的甲酸水溶液(0.1%)平衡, 样品由自动进样器上样到上样柱, 经分析柱分离. 分离后的样品用Q-Exactive质谱仪进行质谱分析. 原始数据RAW文件用MaxQuant (1.5.3.17)软件进行查库鉴定及定量分析.

1.3.3 生物信息学分析

所有鉴定肽段的质量偏差主要分布在10 ppm(1 ppm=1 μg/g)以内, 表明鉴定结果准确可靠. 每一套Label free数据在定性分析工作中均使用Peptide FDR≤0.01和Protein FDR≤0.01作为筛选标准.

将福香占和航2号不同时间点的种胚蛋白质表达丰度分别进行比较, 在显著性差异蛋白质筛选中, 以福香占/航2号表达倍数(fold change, FC)>2倍(上调大于2倍或下调小于原来的一半)且P<0.05(t-test)为标准; 在

“有无”差异比较中，以一组样品(3个重复)中两次及以上不为空值, 另一组所有数据均为空值为筛选标准, 得到差异蛋白质数量.

利用Blast2GO对目标蛋白质集合进行基因本体(gene ontology, GO)注释[12], 利用KAAS(KEGG Automatic Annotation Server)软件, 对目标蛋白质集合进行KEGG通路注释[13]. 采用Fisher精确检验(Fisher’s exact test), 比较各个GO分类(或KEGG通路)在目标蛋白质集合和总体蛋白质集合中的分布情况, 对目标蛋白质集合进行GO注释(或KEGG通路)注释的富集分析. 利用欧易生物在线云平台工具(https://cloud.oebiotech.com)进行主成分(principal component analysis, PCA)分析、韦恩图、GO富集图、KEGG富集图、聚类热图等作图.

1.3.4 qRT-PCR分析

对KEGG通路富集到的差异蛋白质对应的转录本进行实时荧光定量PCR(quantitative real-time PCR, qRT-PCR)验证分析. 反应体系按照FastStart Universal SYBR Green Master (ROX) (Roche, 美国)试剂盒操作. 两步法扩增: (1) 95°C, 5 min; (2) 95°C, 15 s, 60°C, 40 s, 35个循环. 内参选择水稻actin基因, 扩增反应在Applied Biosystems Q6(ABI, USA)上进行, 3次生物学重复. 引物序列见表S1.

2 结果

2.1 人工老化21 d后福香占仍然具有较强的种子活力

对福香占和航2号种子人工老化不同阶段的种子发芽率进行比较(图1(a)). 两个品种在人工老化前(0 d)的发芽率一致, 均高于97.00%. 航2号的发芽率在人工老化的前14 d下降较缓慢, 14~21 d发芽率快速下降到仅有21.00%, 老化28 d, 航2号种子不再发芽(图1(a), (b)). 福香占种子在人工老化第21天, 发芽率仍然高达86.67%, 在第28天, 其发芽率为61.33%; 直到老化后第

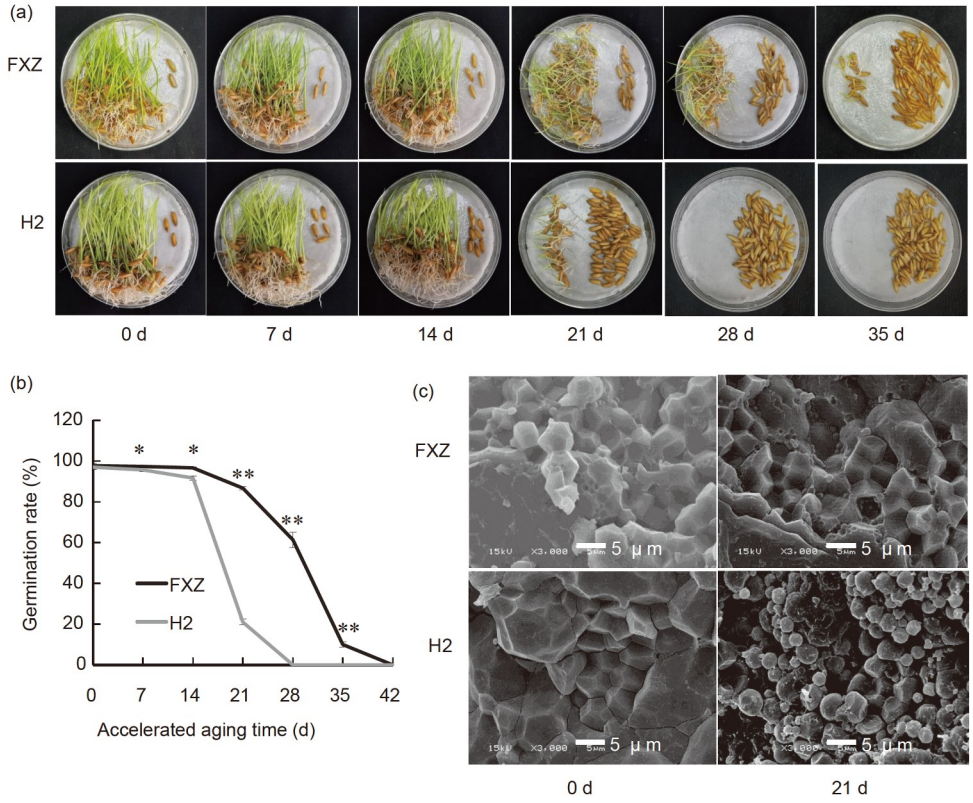


图 1 (网络版彩色)福香占和航2号人工老化后种子活力及淀粉粒结构. (a) 0、7、14、21、28、35 d种子发芽情况. (b) 发芽率变化趋势. (c) 老化0和21 d淀粉粒的表面结构. FXZ: 福香占, H2: 航2号. 平均值标准差n=3. *, P<0.05; **, P<0.01

Figure 1 (Color online) Seed vigor and starch grain structure of Fuxiangzhan and Hang2 after artificial aging. (a) Seeds germination state after 0, 7, 14, 21, 28 and 35 d of aging. (b) Changing trend of germination rate. (c) Starch grain surface structure after 0 and 21 d of aging. FXZ: Fuxiangzhan, H2: Hang2. The data are means ± SD of three measurements. *, P<0.05; **, P<0.01

35天, 发芽率仍有10.00%(图1(a), (b)). 结果表明, 人工老化后第14~21天, 航2号种子活力快速下降, 说明其耐储藏性较差. 而福香占在人工老化21 d后仍然具有较强的种子活力, 耐储藏性好.

2.2 福香占和航2号人工老化前后淀粉粒结构观察

采用扫描电子显微镜观察了福香占、航2号人工老化0和21 d的种子淀粉粒结构(图1(c)). 在老化0 d, 两个品种淀粉粒都以复粒形式存在, 单个淀粉粒呈多棱角多面体样, 排列整齐、紧密, 结构清晰. 人工老化21 d, 福香占淀粉粒仍然排列为较整齐、紧密, 结构较清晰的多棱角多面体复粒结构; 而航2号的淀粉粒多呈现为单粒、近圆形、颗粒间松散、空隙较大, 表明人工老化21 d, 航2号种子淀粉粒结构已经受到严重破坏, 稻米品质下降, 而福香占人工老化21 d后, 淀粉粒结构仍保持较好.

3 蛋白质组学分析

3.1 蛋白质组特征及差异蛋白筛选

由于航2号在人工老化28 d后就不再发芽, 而人工老化前14 d种子发芽率均高于90%, 因此分别取福香占和航2号的0、14、21、28 d四个时间点种胚提取蛋白质进行蛋白质组学分析. 总计有27846条唯一肽段和4569个蛋白质被鉴定. 单个样本鉴定的蛋白质数量范围为2945~3710. 主成分分析显示(图2(a)), 前两个主成分(PC1、PC2)代表约77%的总变异, 可以将福香占和航2号两组样本较好地区分开, 福香占和航2号的0 d样本间差异最大, 随着人工老化, 样本间差异有所变小, 21 d距离最短, 差异最小. 将福香占和航2号人工老化后不同时间点的种胚蛋白质表达丰度分别进行比较, 0、14、21、28 d的差异蛋白质数分别为819、564、416和511个(表S2), 与PCA结果基本一致, 21 d差异蛋白质数最少. 4个时间点筛选到的差异蛋白质间的关系如图2(b)所示, 0、14、21、28 d特有的差异蛋白质比例分别为48.23%、33.16%、31.01%、36.40%, 其余差异蛋白质为2~3个时间点共有. 将福香占和航2号人工老化14、21、28 d的蛋白质表达分度分别与老化前(0 d)比较, 福香占上调表达蛋白质共612个, 14、21、28 d三个时间点上调蛋白质数分别为170、433、354个; 下调表达蛋白质共247个, 3个时间点分别为68、103、158个(图S1(a)). 航2号上调蛋白质数仅为165个, 3个时间点分别为67、84、89个; 下调蛋白质数共301个, 3个时间点分别为109、170、173个(图S1(b)). 福香占各时间点上调蛋白质数均高于下调蛋白质数, 而航2号各时间点下调蛋白质数均高于上调蛋白质数.

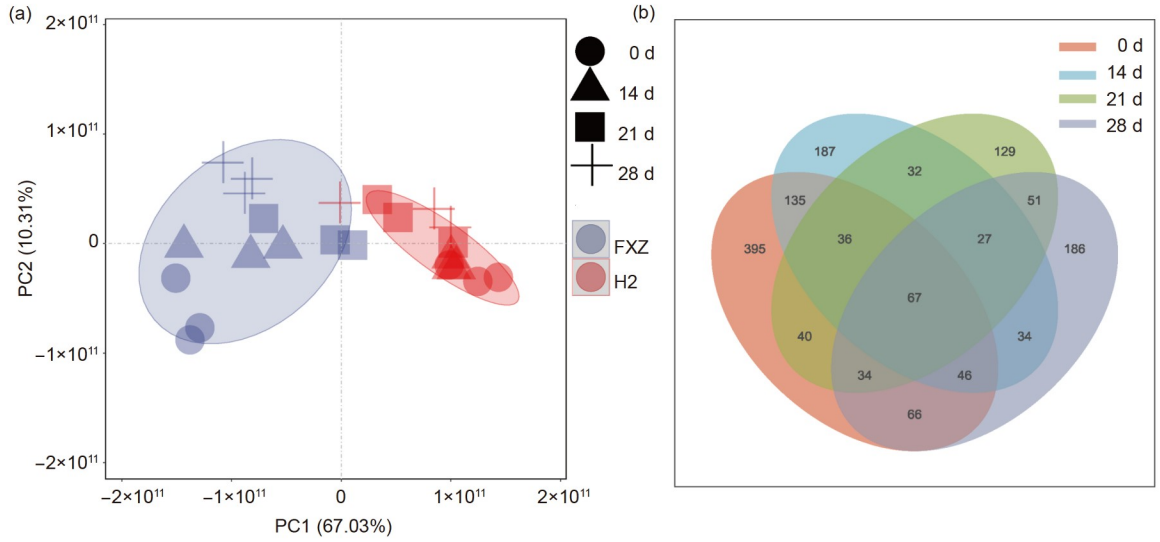


图 2 福香占和航2号人工老化不同时间的蛋白质组特征. (a) 不同时间点蛋白质丰度主成分分析. (b) 不同时间点差异蛋白质韦恩图. FXZ: 福香占, H2: 航2号. 数字表示福香占和航2号间差异蛋白质数

Figure 2 Proteome characteristics of Fuxiangzhan and Hang2 at different time of artificial aging. (a) Principal component analysis of protein abundance at different time points. (b) Venn diagram of differently expressed proteins at different time points. FXZ: Fuxiangzhan, H2: Hang2. The numbers indicate the differently expressed protein numbers between Fuxiangzhan and Hang2

3.2 差异蛋白GO富集分析

分别对人工老化后不同时间点福香占和航2号的差异蛋白质基因本体(GO), 包括生物过程(biological process, BP)、分子功能(molecular function, MF)和细胞成分(cellular component, CC), 进行注释和功能富集分析(图3). 老化0、14、21、28 d, 福香占和航2号的差异蛋白质与BP相关的分别有239、254、60和98个, 0 d主要为应激反应、脂氧化物代谢过程、转录调控、磷脂生物合成等生物学过程(图3(a)), 14 d为过氧化氢及活性氧代谢、遗传信息加工修饰、离子稳态、有机物及次级代谢物合成代谢等(图3(b)), 21 d为脂类合成代谢、碳水化合物代谢、谷胱甘肽合成及代谢、遗传信息修饰加工、组蛋白甲基化等(图3(c)), 28 d涉及蛋白质组装定位运输、碳水化合物代谢、脂质代谢、硫胺素合成代谢等(图3(d)). 4个时间点与MF相关的差异蛋白质分别有101、310、162和208个, 0 d差异蛋白质主要涉及转录调节、(内)肽酶及激酶活性、营养保持活性等(图3(a)), 14 d为(内)肽酶调节活性、营养保持活性、抗氧化酶活性、免疫球蛋白结合、磷酸酶调节活

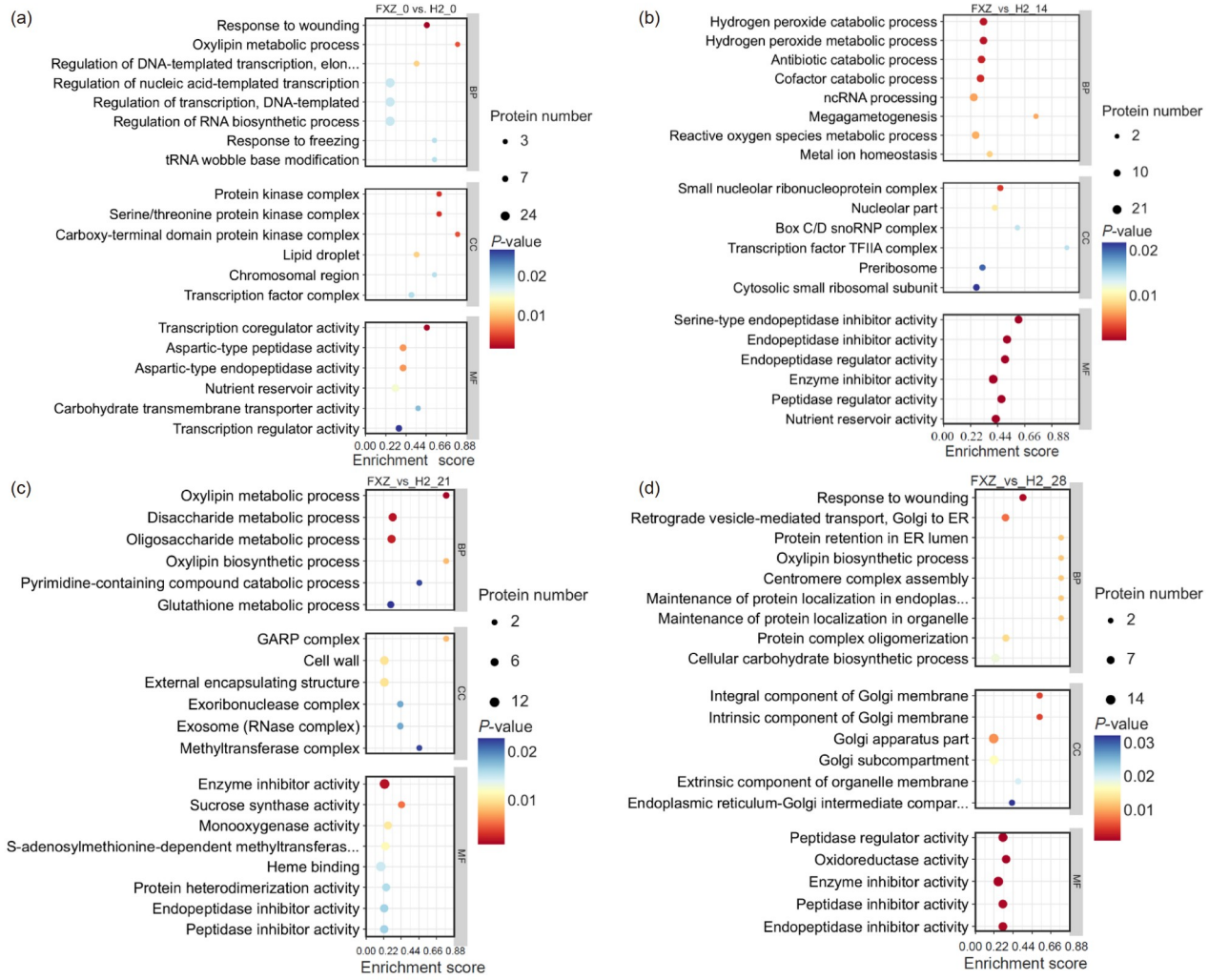


图 3 福香占和航2号人工老化0、14、21、28 d差异蛋白质GO功能富集. (a) 0 d; (b) 14 d; (c) 21 d; (d) 28 d. CC: 细胞结构, BP: 生物过程, MF: 分子功能. 富集分值(enrichment score)越大, 说明该通路的差异蛋白质占比越高; 气泡图上的点越大, 表明特定通路中的差异蛋白质越多, 颜色条越红, *P*值越小

Figure 3 GO function enrichment of differently expressed proteins between Fuxiangzhan and Hang2 after artificial aging at 0, 14, 21 and 28 d. (a) 0 d; (b) 14 d; (c) 21 d; (d) 28 d. CC: Cellular component, BP: Biological process, MF: Molecular function. The higher the enrichment score, the higher the proportion of differently expressed proteins in this pathway. The larger the dot on the bubble map, the more differently expressed proteins in a particular pathway, and the redder the color bar, the smaller the *P* value

性等(图3(b)), 21 d为(内)肽酶调节活性、氧化还原酶活性、甲基转移酶活性、蛋白质异二聚化活性等(图3(c)), 28 d为(内)肽酶调节活性、氧化还原酶活性、转移酶活性、有机酸结合等(图3(d)). 4个时间点与CC相关的差异蛋白质分别有69、57、58和40个, 0 d差异蛋白主要涉及蛋白激酶复合物、染色体、转录因子、脂体等(图3(a)), 14 d涉及小核仁核糖蛋白复合物、转录因子复合物、核糖体等(图3(b)), 21 d为高尔基体相关逆行蛋白(Golgi-associated retrograde protein, GARP)复合物、细胞壁、核糖核酸酶复合物、甲基转移酶复合物等(图3(c)), 28 d主要为高尔基体, 细胞器外膜等(图3(d)).

由于航2号在人工老化14~21 d种子发芽率迅速下降, 因此分别将两个品种人工老化21 d的种胚蛋白质表达量与0 d进行比较. 福香占人工老化21 d, 236个差异蛋白质显著富集到55个GO条目中, 主要为有机物生物合成和代谢、核糖体组装、mRNA剪接位点选择、转录调控等生物学过程; 激酶活性、钙离子结合、氧化还原酶活性、N-甲基转移酶活性、转录调节等分子功能; 蛋白激酶复合物、转录中介体复合物、细胞核内等细胞结构(图S2(a)). 而航2号人工老化21 d, 308个差异蛋白被富集到53个GO条目, 主要为碳水化合物生物合成和代谢、能量储备代谢、氨基酸合成代谢等生物学过程, 营养保持活性、糖基转移酶、葡聚糖分支酶活性、碳酸盐脱水酶活性、糖原(淀粉)合酶活性和几丁质酶活性等分子功能, 细胞结构为造粉体(图S2(b)).

结果表明, 福香占和航2号在人工老化的不同阶段, 脂类、蛋白质、碳水化合物等生物合成及代谢、遗传信息加工、转录调控、营养保持、信息传递、氧化还原调节等方面均表现出差异. 这些差异可能就是福香占和航2号在人工老化过程中种子活力差异及耐储藏性差异的原因.

3.3 差异蛋白KEGG富集分析及验证

稻谷在贮藏过程中, 脂类物质氧化分解, 活性氧累积引起脂类、蛋白质、核酸氧化损伤, 以及淀粉和糖的水解, 从而使得种子活力下降及稻米品质的劣变[1]. 通过分析差异蛋白质在特定代谢通路的表达模式变化及其功能, 可以推测稻谷老化或耐贮藏性可能的机理. 本研究通过KEGG通用数据库(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)进行通路注释. 福香占和航2号人工老化前(0 d)差异蛋白质显著富集到两个代谢通路: 亚油酸代谢(linoleic acid metabolism)及角质、木栓和蜡质的生物合成(cutin, suberine and wax biosynthesis). 14 d差异蛋白质无显著富集通路, *P*值最小的代谢通路为谷胱甘肽代谢(glutathione metabolism), 21 d显著富集2个代谢通路, 为亚油酸代谢和谷胱甘肽代谢, 28 d差异蛋白质显著富集的代谢通路为亚油酸代谢和甘油磷脂代谢(glycerophospholipid metabolism)(图4). 福香占人工老化21 d与0 d比较, 差异蛋白显著富集到真核生物中的核糖体生物发生(ribosome biogenesis in eukaryotes), *P*值较小的还有萜类骨架生物合成(terpenoid backbone biosynthesis)和叶酸生物合成(folate biosynthesis). 航2号人工老化21 d与0 d比较, 差异蛋白富集*P*值最小3个通路为氮代谢(nitrogen metabolism)、淀粉和蔗糖代谢(starch and sucrose metabolism)以及mRNA监测途径(mRNA surveillance pathway)(图S3).

对福香占和航2号老化不同阶段代谢通路涉及的13个蛋白质(表1)对应的转录本进行qRT-PCR验证分析. 13个蛋白质中, 11个转录本在福香占和航2号中的相对表达量与蛋白质组的蛋白质丰度趋势一致, 仅有2个(Q6EN48、Q6Z3A3)转录本相对表达量与蛋白质组的蛋白质丰度趋势不同(图5).

4 讨论

稻谷在储藏过程中, 逐渐发生陈化变质, 表现为种子活力降低, 发芽率下降, 糙米发黄变暗, 品质下降, 营养成分也遭到破坏. 稻谷中的脂肪最先发生氧化变质,

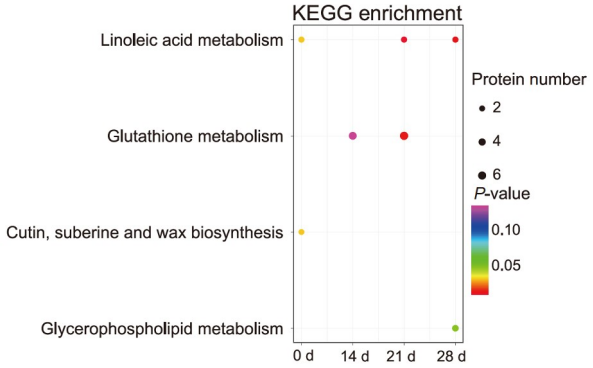


图 4 福香占和航2号人工老化0、14、21、28 d差异蛋白质KEGG富集. 气泡图上的点越大, 表明特定通路中的差异蛋白质越多, 颜色条越红, *P*值越小

Figure 4 KEGG enrichment of differently expressed proteins between Fuxiangzhan and Hang2 after artificial aging at 0, 14, 21 and 28 d. The larger the dot on the bubble map, the more differently expressed proteins in a particular pathway, and the redder the color bar, the smaller the *P* value

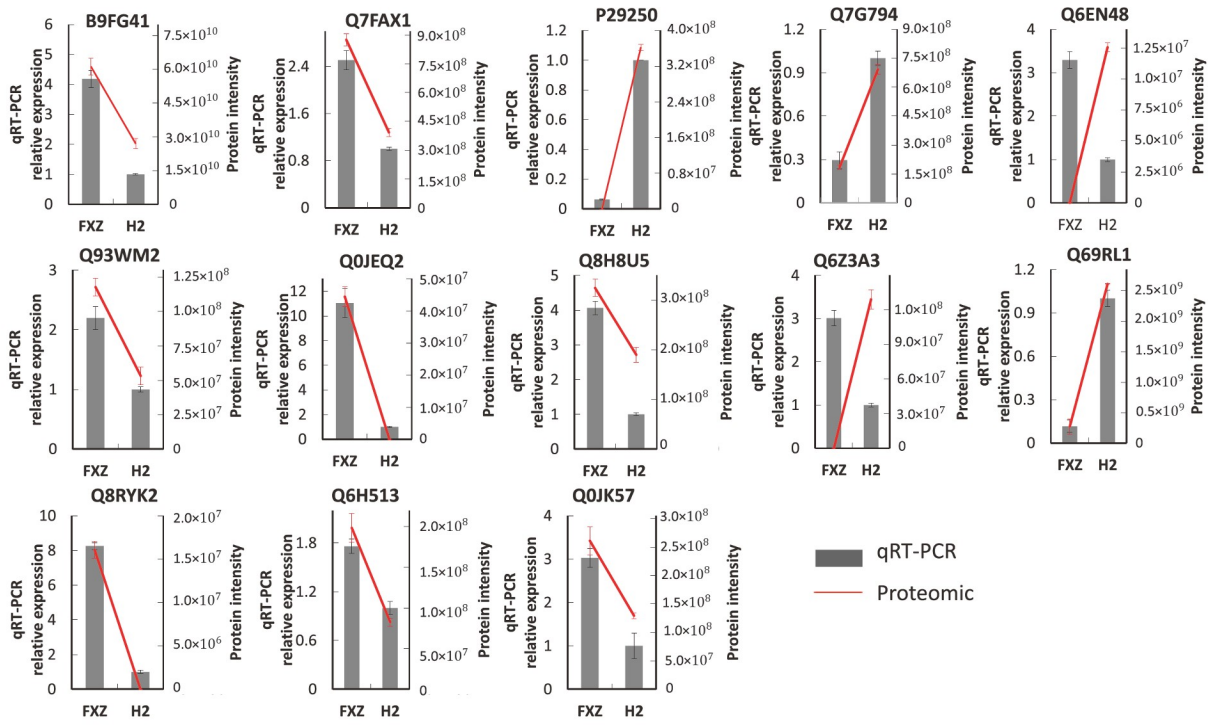


图 5 (网络版彩色)差异蛋白质转录水平qRT-PCR验证
Figure 5 (Color online) qRT-PCR verified of differently expressed proteins at transcription level

油酸(oleic acid, OA)和亚油酸(linoleic acid, LA)是脂质组分中最重要的脂肪酸, 种子贮藏期间, OA和LA的绝对含量下降, 游离脂肪酸含量上升[14,15], 而OA在各脂类组分中的比例略有增加, LA则有所减少[16], 表明LA首先被脂肪酶降解. 植物脂氧合酶(lipoxygenase, LOX)是催化LA发生过氧化的关键酶. 水稻成熟种胚中存在3种LOX同工酶,分别命名为LOX1、LOX2和LOX3. 研究表明, 抑制水稻胚乳*lox*3[17]和*lox*2[18]基因表达, 会增加种子活力, 延长种子寿命. Suzuki等人[4]利用单克隆抗体筛选到水稻种子脂肪氧化酶*lox3*缺失的品系Daw-dam, 加速老化后, 其糠中过氧化值和羰基值均比对照品质低[19]. 而在本研究中, LA代谢途径的两个蛋白质(P29250和Q7G794, EC.1.13.11.58), 在福香占中的表达丰度均低于航2号(图6(a), (b)), 这两个蛋白质正是LOX2和LOX3. 福香占种胚中, 在人工老化的0、14、21、28 d均未检测到P29250, 而Q7G794的丰度仅为航2号的0.19~0.31倍(表1). qRT-PCR对其转录本验证, 结果一致, *LOX2*在福香占中的表达量极低, *LOX3*在福香占的表达量约为航2号的1/3, 表明福香占种胚中LOX活性较航2号低, 这可能是其种子耐储藏的关键原因.

脂质在植物逆境胁迫应答的生理过程中扮演着非常重要的角色. 一方面, 膜脂的稳定有利于对逆境胁迫的抵抗; 另一方面, 逆境胁迫后, 脂质组分合成代谢速率升高, 代谢产物还可以作为信号分子参与到干旱[20]、盐[21]、温度[22]等胁迫感知和信号传递. 磷脂(phospholipid)是指含有磷酸的脂类, 是组成生物膜的主要成分. 其中卵磷脂(lecithin)是由胆碱(ethanolamine)和磷脂酸连接而成. 胆碱先磷酸化, 再连接胞苷二磷酸(cytidine diphosphate, CDP)作为载体, 最后与甘油二酯(diacylglycerol)生成卵磷脂. 胆碱则由磷脂酰乙醇胺甲基转移酶(phosphoethanolamine N-methyltransferase, PEMT)催化, 将脑磷脂的乙醇胺进行3次甲基化, 最终生成卵磷脂, 而甘油磷脂的分解则由磷脂酶(phospholipases, PL)催化. 本研究中, 人工老化28 d, 甘油磷脂代谢途径被显著富集, 福香占中3个蛋白质发生上调表达, 为Q8RYK2、Q6H513、Q0JK57, 分别为PLC (EC3.1.4.3)、磷酸胆碱转胞苷酰酶(choline-phosphate cytidylyltransferase)(EC2.7.7.15)和PEMT(EC2.1.1.103) (图6(a), (b)). Q8RYK2在福香占中为“有”, 而在航2号中为“无”, Q6H513和Q0JK57在福香占中丰度均为航2号的2倍以上(表1). 福香占在人工老化过程中, 脂质过氧化一直处于较低水平, 直到人工老化28 d, 甘油磷脂代

表 1 福香占人工老化后与耐储藏性相关的差异蛋白质

Table 1 Differentially expressed proteins related to storability of "Fuxiangzhan" after artificial aging

KEGG途径	蛋白名称	EC编号	蛋白描述	基因	0 d		14 d		21 d		28 d	
					差异倍数	*P*值	差异倍数	*P*值	差异倍数	*P*值	差异倍数	*P*值
Cutin, suberine and wax biosynthesis	B9FG41	1.11.2.3	Uncharacterized protein	OsJ_15433	2.262448	0.000612						
	Q7FAX1	1.11.2.3	Peroxygenase	OsJ_15434	2.226679	0.006537						
Linoleic acid metabolism	*P*29250	1.13.11.58	Linoleate 9S-lipoxygenase 2	OsJ_12500	无/有				无/有		无/有	
	Q7G794	1.13.11.58	Putative linoleate 9S-lipoxygenase 3	Os03g0700400	0.267565	0.00053			0.316564	0.001173	0.192196	0.006085
Glutathione metabolism	Q6EN48	2.5.1.16	Putative aminopropyl transferase	OsJ_06118					无/有			
	Q93WM2	2.5.1.18	Os01g0374000 protein	Os01g0374000			3.391496	0.016385	2.459396	0.008504		
	Q0JEQ2	1.11.1.11	Probable L-ascorbate peroxidase 3, peroxisomal	OsJ_013310			有/无		有/无			
	Q8H8U5	2.5.1.18	Protein IN2-1 homolog B	Os03g0283100			1.649029	0.236585	2.024891	0.01778		
	Q6Z3A3	6.3.2.2	Glutamate-cysteine ligase B, chloroplastic	Os07g0462000			无/有		无/有			
	Q69RL1	2.5.1.18	Os07g0468100 protein	Os07g0468100			0.128684	5.53×10^{-6}	0.169293	3.85×10^{-6}		
Glycerophospholipid metabolism	Q8RYK2	3.1.4.3	Os01g0955000 protein	Os01g0955000							有/无	
	Q6H513	2.7.7.15	Os02g0173500 protein	Os02g0173500							2.404999	0.001199
	Q0JK57	2.1.1.103	Os01g0695100 protein	Os01g0695100							2.020294	0.002279

谢途径多个酶表达量显著提高，表明其一方面可能通过合成更多的甘油磷脂维持生命有机体，抵抗高温高湿逆境，另一方面可能也通过代谢产物进行抗逆信号的传导，进一步启动下游抗逆反应.

活性氧是种子在老化过程中氧化损伤脂类、蛋白质、核酸等的重要因素. 而植物种子为了能延长寿命，进化出各种抗氧化系统来抵抗氧化损伤，如自由基清除系统，包括超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化物酶(peroxidase, POD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)、谷胱甘肽S转移酶(glutathione S-transferase, GST)、抗坏血酸-谷胱甘肽循环(ascorbate-glutathione, AsA-GSH)等酶促系统. GST通过催化谷胱甘肽与疏水、亲电化合物结合，被转运至液泡，从而达到清除毒素的作用. 在植物盐[23,24]、干旱[25]、低温[26]、除草剂[27]等非生物胁迫抵抗中起重要作用. 本研究中，谷胱甘肽代谢途径有6个蛋白质发生差异表达(图6(a), (c))，其中Q93WM2、Q8H8U5、Q69RL1均为GST(EC 2.5.1.18). 人工老化14和21 d, Q93WM2、Q8H8U5在福香占的蛋白质丰度均高于航2号，而Q69RL1在福香占的蛋白质丰度低于航2号(表1). AsA-GSH循环中，抗坏血酸过氧化物酶(ascorbate peroxidase, APX)利用AsA为电子供体清除H_2O_2，在植物抗病[28]、耐逆[29]的活性氧清除中发挥重要作用. 差异蛋白Q0JEQ2(EC 1.11.1.11)为APX，人工老化14和21 d，福香占中蛋白质表达为"有"，而航2号为"无". 另外两个差异蛋白质Q6EN48和Q6Z3A3分别为精胺合酶(spermine synthase, EC 2.5.1.16)和谷氨酸半胱氨酸连接酶A(glutamate-cysteine ligase A, EC 6.3.2.2)，参与谷胱甘肽合成代谢. 福香占和航2号抗氧化系统蛋白质表达的差异性，可能是在人工老化即高温高湿胁迫下，种子活力保持差异产生的重要原因.

植物角质蜡质是由超长链脂肪酸(VLCFAs)及烷、醇、酯等衍生物在其表皮形成的次生代谢物，广泛参与到植物抗病[30]、抗旱[31]、耐盐、抗虫等生物和非生物抗性生理过程. 其抗性作用包括物理抗性和化学抗性，物理抗性表现为维持植物生长必需的机械强度、影响植物表面疏水性，在真菌侵染时阻碍其侵入，以及相应病原菌刺激上调角质蜡质合成从而加强保护性屏障[32,33]. 化学抗性表现为其某些组分能影响孢子萌发[34]，调控病原菌增殖分化，释放化学成分启动植物的下游免疫反应，以及作为活性氧诱导子及其他信号分子调控免疫反应，从而达到对病原菌的抑制[34,35]. 稻谷

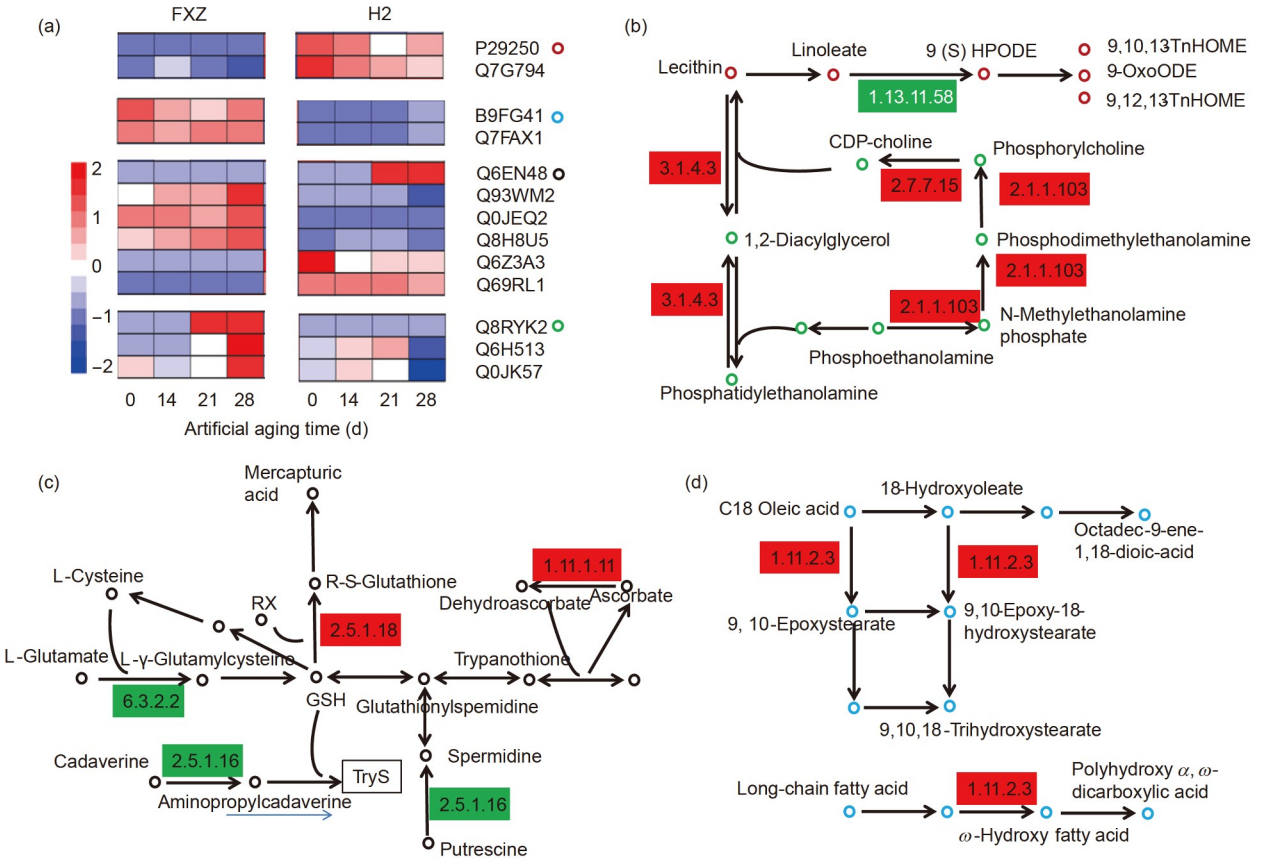


图 6 福香占和航2号鉴定的4个KEGG代谢通路差异表达蛋白. (a) 人工老化处理不同时间差异蛋白质的表达量. 颜色越红, 蛋白质表达量越高, 颜色越蓝, 蛋白质表达量越低. FXZ: 福香占, H2: 航2号. (b) 亚油酸代谢(红圈)和甘油磷脂代谢(绿圈). (c) 谷胱甘肽代谢(黑圈). (d) 角质、木栓和蜡质的生物合成(蓝圈). 红框: 包含上调表达蛋白质的酶; 绿框: 包括下调表达蛋白质的酶. 图中仅显示差异表达蛋白的酶和相关产物

Figure 6 Differently expressed proteins identified in the 4 KEGG pathways between Fuxiangzhan and Hang2. (a) Differently expressed protein expression level after artificial aging. The redder the color, the higher the protein expression, the bluer the color, the lower the protein expression. FXZ: Fuxiangzhan, H2: Hang2. (b) Linoleic acid metabolism (red circle) and Glycerophospholipid metabolism (green circle). (c) Glutathione metabolism (black circle). (d) Cutin, suberine and wax biosynthesis (blue circle). Red box: Enzymes contained up-regulated proteins. Green box: Enzymes contained down-regulated proteins. Only the enzymes with differentially expressed proteins and their substrates and products are shown

脂类在细胞内完整的球体中通常是稳定的, 而当质膜被磷脂酶破坏、物理损伤或高温时, 脂质便在脂肪酶作用下开始水解脂质[1]. 本研究中, 角质、木栓和蜡质生物合成途径的过加氧酶(peroxygenase, EC 1.11.2.3)(图6(a), (d)), 含B9FG41和Q7FAX1两个蛋白质, 在人工老化前的福香占种胚表达丰度均高于航2号, 分别为2.26和2.22倍(表1), 表明福香占种子可能较航2号具有较好的保护性屏障, 在人工老化处理时发挥一定的作用.

本实验通过人工老化及Label-free定量蛋白质组结合生物信息学分析, 对籼稻福香占的耐储藏性遗传机理进行了研究. 我们推测了福香占耐储藏性可能的原因: 福香占稻谷种胚中*LOX*基因表达量及蛋白质丰度都处于低水平, LA过氧化速率低是其耐储藏的关键原因; 高温高湿逆境胁迫后, 福香占谷胱甘肽抗氧化系统迅速响应胁迫, 参与到活性氧清除; 而甘油磷脂代谢途径通过合成更多甘油磷脂进而维持生命有机体活性并参与下游抗逆信号传递; 另外, 福香占种子具有较好的角质、蜡质保护性屏障, 使其在遭受逆境胁迫时能更好地保护自身细胞. 尽管耐储藏水稻新品种的培育取得了一定进展, 但是生产上广泛应用的水稻品种仍不多, 且生产上对水稻品种的需求越来越呈现多样化和个性化的趋势, 这就要求育种家培育出更多耐储藏性好的水稻新品种. 本研究为进一步揭示稻谷耐储藏性的遗传机理及进一步培育优质耐储藏水稻新品种奠定了基础.

参考文献

1 Zhou Z, Robards K, Helliwell S, et al. Ageing of stored rice: Changes in chemical and physical attributes. J Cereal Sci, 2002, 35: 65–78
2 Khan M, Abbas M, Awan F, et al. Physio-biochemic and genetic changes in stored pea (*Pisum sativum*) seeds. Int J Agric Biol, 2013, 15: 951–956
3 Ye X, Li X G, Zhang Y, et al. A preliminary study on the dynamic characteristics of important nutrients during rice aging (in Chinese). J Chin Cereals Oils Assoc, 2004, 19: 4–7 [叶霞, 李学刚, 张毅, 等. 稻米陈化过程中重要营养素变化动力学特征的初步探讨. 中国粮油学报, 2004, 19: 4–7]
4 Suzuki Y, Nagamine T, Kobayashi A, et al. Detection of a new rice variety lacking lipoxygenase-3 by monoclonal antibodies. Jpn Breed Sci, 1993, 43: 405–409
5 Rajjou L, Duval M, Gallardo K, et al. Seed germination and vigor. Annu Rev Plant Biol, 2012, 63: 507–533
6 Wei Y, Xie H, Diao L, et al. Dynamic detection of isoaspartyl contents and expression analysis of total embryo proteins under artificial aging of seeds for rice. Chin Sci Bull, 2020, 65: 174–184
7 Wehmeyer N, Hernandez L D, Finkelstein R R, et al. Synthesis of small heat-shock proteins is part of the developmental program of late seed maturation. Plant Physiol, 1996, 112: 747–757
8 Wu F X, Luo C Q, Wang Y H, et al. Breeding and application of high-quality, blast-resistant, long-shelf-life fragrant Fuxiangzhan rice (in Chinese). Fujian J Agric Sci, 2022, 37: 683–690 [吴方喜, 罗翠琴, 王颖姮, 等. 优质、抗病、耐储藏香稻新品种福香占的选育与应用. 福建农业学报, 2022, 37: 683–690]
9 Xie H G, Chen L P, Wang Y H, et al. Breeding and application of hybrid rice variety Nei 10 you 7185 with good quality, high yield, disease resistance and storage tolerance (in Chinese). China Rice, 2023, 29: 105–108 [谢鸿光, 陈丽萍, 王颖姮, 等. 优质高产抗病耐贮藏杂交水稻新品种内10优7185的选育与应用. 中国稻米, 2023, 29: 105–108]
10 Delouche J C, Baskin C C. Accelerated aging techniques for predicting the relative storability of seed lots. Seed Sci Technol, 1973, 1: 427–452
11 Wiśniewski J R, Zougman A, Nagaraj N, et al. Universal sample preparation method for proteome analysis. Nat Methods, 2009, 6: 359–362
12 Gotz S, Garcia-Gomez J M, Terol J, et al. High-throughput functional annotation and data mining with the Blast2GO suite. Nucleic Acids Res, 2008, 36: 3420–3435
13 Kanehisa M, Goto S, Sato Y, et al. KEGG for integration and interpretation of large-scale molecular data sets. Nucleic Acids Res, 2012, 40: D109–D114
14 Dhaliwal Y S, Sekhon K S, Nagi H P S. Enzymatic activities and rheological properties of stored rice. Cereal Chem, 1991, 69: 18–21
15 Nishiba Y, Sato T, Suda I. Convenient method to determine free fatty acid of rice using thin-layer chromatography and flame-ionization detection system. Cereal Chem, 2000, 77: 223–229
16 Deka S, Sood D R, Gupta S K. Effect of storage on fatty acid profiles of basmati rice (*Oryza sativa* L.) genotypes. J Food Sci Technol, 2000, 37: 217–221
17 Xu H, Wei Y, Zhu Y, et al. Antisense suppression of *LOX3* gene expression in rice endosperm enhances seed longevity. Plant Biotechnol J, 2015, 13: 526–539
18 Huang J, Cai M, Long Q, et al. OsLOX2, a rice type I lipoxygenase, confers opposite effects on seed germination and longevity. Transgenic Res, 2014, 23: 643–655
19 Suzuki Y, Ise K, Li C, et al. Volatile components in stored rice [*Oryza sativa* (L.)] of varieties with and without lipoxygenase-3 in seeds. J Agric Food Chem, 1999, 47: 1119–1124
20 Wang Y, Zhang X, Huang G, et al. Dynamic changes in membrane lipid composition of leaves of winter wheat seedlings in response to PEG-induced water stress. BMC Plant Biol, 2020, 20: 84
21 Zhou Y, Diao M, Cui J, et al. Exogenous GSH protects tomatoes against salt stress by modulating photosystem II efficiency, absorbed light allocation and H_2O_2-scavenging system in chloroplasts. J Integr Agr, 2018, 17: 2257–2272
22 Schroda M, Hemme D, Mühlhaus T. The *Chlamydomonas* heat stress response. Plant J, 2015, 82: 466–480
23 Yang G, Wang Y, Xia D, et al. Overexpression of a GST gene (*ThGSTZ1*) from *Tamarix hispida* improves drought and salinity tolerance by enhancing the ability to scavenge reactive oxygen species. Plant Cell Tiss Organ Cult, 2014, 117: 99–112
24 Xu J, Tian Y S, Xing X J, et al. Over-expression of *AtGSTU19* provides tolerance to salt, drought and methyl viologen stresses in *Arabidopsis*. Physiol Plantarum, 2016, 156: 164–175
25 Wang Z, Huang S, Jia C, et al. Molecular cloning and expression of five glutathione S-transferase (GST) genes from Banana (*Musa acuminataL*. AAA group, cv. *Cavendish*). Plant Cell Rep, 2013, 32: 1373–1380
26 Yang G, Xu Z, Peng S, et al. In planta characterization of a tau class glutathione S-transferase gene from *Juglans regia* (*JrGSTTau1*) involved in chilling tolerance. Plant Cell Rep, 2016, 35: 681–692

27 Jo H J, Lee J J, Kong K H. A plant-specific tau class glutathione S-transferase from *Oryza sativa* with very high activity against 1-chloro-2,4-dinitrobenzene and chloroacetanilide herbicides. Pesticide Biochem Physiol, 2011, 101: 265–269
28 Jiang G, Yin D, Zhao J, et al. The rice thylakoid membrane-bound ascorbate peroxidase OsAPX8 functions in tolerance to bacterial blight. Sci Rep, 2016, 6: 26104
29 Chou T S, Chao Y Y, Kao C H. Involvement of hydrogen peroxide in heat shock- and cadmium-induced expression of ascorbate peroxidase and glutathione reductase in leaves of rice seedlings. J Plant Physiol, 2012, 169: 478–486
30 Serrano M, Aragón W, Reina-Pinto J. The intimate talk between plants and microorganisms at the leaf surface. J Exp Bot, 2017, 68: 5339–5350
31 Zhou L, Ni E, Yang J, et al. Rice OsGL1-6 is involved in leaf cuticular wax accumulation and drought resistance. PLoS One, 2013, 8: e65139
32 Alkan N, Friedlander G, Ment D, et al. Simultaneous transcriptome analysis of *Colletotrichum gloeosporioides* and tomato fruit pathosystem reveals novel fungal pathogenicity and fruit defense strategies. New Phytol, 2015, 205: 801–815
33 Guan Y, Chang R, Liu G, et al. Role of lenticels and microcracks on susceptibility of apple fruit to *Botryosphaeria dothidea*. Eur J Plant Pathol, 2015, 143: 317–330
34 Serrano M, Coluccia F, Torres M, et al. The cuticle and plant defense to pathogens. Front Plant Sci, 2014, 5: 274
35 Kim T H, Park J H, Kim M C, et al. Cutin monomer induces expression of the rice OsLTP5 lipid transfer protein gene. J Plant Physiol, 2008, 165: 345–349

补充材料

表S1 qRT-PCR引物序列
表S2 福香占和航2号不同时间点差异蛋白质
图S1 福香占和航2号人工老化后与老化前差异蛋白质韦恩图
图S2 人工老化21 d与老化前差异蛋白GO功能富集
图S3 人工老化21 d与老化前差异蛋白KEGG功能富集

本文以上补充材料见网络版csb.scichina.com. 补充材料为作者提供的原始数据, 作者对其学术质量和内容负责.

Summary for “籼稻福香占耐储藏性的蛋白质组学分析”

Analysis of the high seed storability trait in *indica* rice “Fuxiangzhan”

Yingheng Wang[1,2†], Hongguang Xie[1,2†], Feihe Chen[1,2], Qiang Lin[1,2], Lili Cui[1,2], Fangxi Wu[1,2], Yidong Wei[1,2], Xi Luo[1,2], Liping Chen[1,2], Qiuhua Cai[1,2], Huaan Xie[1,2] & Jianfu Zhang[1,2*]

[1] *Rice Research Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350019, China;*
[2] *Key Laboratory of Germplasm Innovation and Molecular Breeding of Hybrid Rice for South China, Ministry of Agriculture and Rural Affairs/Fuzhou Branch, National Rice Improvement Center of China/Fujian Engineering Laboratory of Crop Molecular Breeding/Fujian Key Laboratory of Rice Molecular Breeding/Incubator of National Key Laboratory of Fujian Germplasm Innovation and Molecular Breeding Between Fujian and Ministry of Sciences & Technology/Base of South China, National Key Laboratory of Hybrid Rice/National Rice Engineering Laboratory of China, Fuzhou 350003, China*
† Equally contributed to this work
* Corresponding author, E-mail: jianfzhang@163.com

As the duration of rice seed storage increases, the storability of the rice deteriorates, with the seed losing its vigor, especially under conditions of high temperature and high humidity, as occurs in the summer in southern China. The maintenance of rice seed longevity (“shelf life”) during storage is central not only to national food security but also to the conservation of germplasm resources and the security of the seed industry. In the current study, the characteristics of the impacts of artificially accelerated aging stress on seed vigor in two *indica* rice cultivars, namely the high-storability “Fuxiangzhan” and low-storability “Hang2”, were compared. Between 14 and 21 days of artificial aging, the seed vigor of “Hang2” decreased rapidly and the starch grain structure, observed by scanning electron microscopy, showed serious damage, whereas seeds of “Fuxiangzhan” still exhibited strong seed vigor and good starch grain structure after 21 days of artificial aging. Quantitative analysis of the seed embryo proteome showed that the biosynthesis and metabolism of lipids, proteins and carbohydrates, genetic information processing, transcriptional regulation, nutrient retention, signal transduction and redox regulation showed marked differences between “Fuxiangzhan” and “Hang2” at various time points during artificial aging. Differentially expressed proteins between Fuxiangzhan and Hang2 were significantly enriched in four metabolic pathways: linoleic acid metabolism; cutin, suberin and wax biosynthesis; glutathione metabolism; and glycerophospholipid metabolism. We speculate that the possible reasons for the longer shelf life of “Fuxiangzhan” seeds were that the lipid oxidase activity and the linoleic acid peroxidation rate of the seed embryos were lower than in “Hang2”, and that the seeds had an improved protective barrier associated with greater concentrations of cutin and other waxes. Under high temperature and humidity stresses, the glutathione antioxidant system played a role in rapidly scavenging reactive oxygen species and achieving signal transduction in “Fuxiangzhan” seed embryos, where membrane integrity was maintained by the synthesis of higher glycerophospholipid concentrations in this high-storability cultivar. This study lays a firm foundation for the characterization of rice seed storability, which could be exploited in the breeding of rice cultivars with greater storability (“longer shelf life”) under stress conditions.

Fuxiangzhan, rice seed storability, seed vigor, lipid oxidase, proteomics

doi: 10.1360/TB-2023-0574