



# 过表达 *ZmIBH1-1* 提高玉米苗期抗旱性

朱芳芳, 董亚辉, 任真真, 王志勇, 苏慧慧, 库丽霞, 陈彦惠✉

河南农业大学农学院/省部共建小麦玉米作物学国家重点实验室, 郑州 450046

**摘要:**【目的】干旱是严重影响玉米生长发育进程的一个重要因素。挖掘玉米抗旱相关基因, 通过转基因功能验证和转录组分析, 解析关键基因在响应干旱胁迫过程中的分子调控机制, 为抗旱分子育种和遗传改良提供理论依据。【方法】以玉米自交系 B104 (WT) 为背景材料, 利用农杆菌介导方法构建过表达 *ZmIBH1-1* 转基因株系 (*ZmIBH1-1-OE*); 通过对转基因植株进行草铵膦抗性筛选、标记基因和目的基因 PCR 检测, 以及运用实时荧光定量 PCR 检测目的基因的表达情况, 鉴定阳性植株和株系; 以 WT 和 *ZmIBH1-1-OE* 转基因株系为材料, 通过干旱处理 (20% PEG6000), 进行表型鉴定和耐旱生理生化指标测定, 验证 *ZmIBH1-1* 的抗旱功能; 通过对干旱胁迫下玉米 4 叶期转录组的比较分析, 鉴定出差异表达的基因 (differentially expressed genes, DEGs); 结合 DAP-seq (DNA affinity purification sequencing) 分析, 初步确定 *ZmIBH1-1* 蛋白直接调控与抗旱相关的下游靶基因, 利用基因组可视化软件 IGV (integrative genomics viewer) 分析 *ZmIBH1-1* 蛋白结合候选靶基因的位置, 然后通过 Dual-Luciferase 试验验证 *ZmIBH1-1* 蛋白与靶基因的调控关系。

【结果】通过玉米遗传转化获得 12 个转化事件;  $T_3$  代中, 能同时检测到标记基因 *Bar* 和目的基因 *ZmIBH1-1* 的植株有 458 个, 实时荧光定量 PCR 检测结果表明, *ZmIBH1-1-OE* 中 *ZmIBH1-1* 的表达量显著高于 WT, 株系 3 和株系 8 表达量最高, 将其自交获得  $T_4$  代转基因株系用于后续试验。在干旱胁迫条件下, *ZmIBH1-1-OE* 株系存活率、叶片相对含水量、叶绿素含量、可溶性蛋白含量及其生理生化指标 (超氧化物歧化酶、过氧化物酶、过氧化氢酶活性) 均显著高于 WT, 说明玉米中过量表达 *ZmIBH1-1* 赋予玉米更高的耐旱性。转录组分析结果表明, WT 与 *ZmIBH1-1-OE* 株系在干旱胁迫下有 1 214 个差异表达基因; Gene Ontology (GO) 功能富集分析结果表明, 差异表达基因主要涉及生物过程、细胞组分和分子功能, 如在生物过程中主要涉及到光合作用、应激响应、脱水响应等; KEGG 富集分析表明, 差异表达基因主要参与植物激素信号传导、新陈代谢等过程。结合转录组显著差异表达基因和 DAP-Seq 分析得到 *ZmIBH1-1* 蛋白的靶基因, 初步确定 *ZmIBH1-1* 蛋白直接调控与抗旱相关的 11 个候选靶基因, 包括 2 个钙信号相关基因、3 个半胱氨酸代谢相关基因、1 个 bHLH 转录因子、1 个应激响应蛋白、1 个谷胱甘肽转移酶、1 个氧化还原过程蛋白和 2 个乙烯响应因子; 基因组可视化结果显示 *ZmIBH1-1* 蛋白可以结合靶基因启动子区; 随后通过 Dual-Luciferase 试验进一步表明, *ZmIBH1-1* 蛋白可以直接作用于 11 个候选靶基因, 其中, *ZmIBH1-1* 蛋白可以促进 *ZmCa-M*、*ZmSYCO*、*ZmbHLH54*、*ZmGlu-r1*、*ZmCLPB3* 和 *ZmP450-99A2* 的表达, 抑制 *ZmAGD12*、*ZmCYS*、*ZmCYSB*、*ZmERF-107* 和 *ZmEIN3* 的表达。此外, 在干旱胁迫下 NAC、WRKY、MYB 等转录因子在 *ZmIBH1-1-OE* 和 WT 株系中也存在差异表达。【结论】*ZmIBH1-1* 的过表达可以增强玉米苗期的耐旱性; *ZmIBH1-1* 蛋白通过直接调控乙烯信号通路中的 *ZmERF-107* 和 *ZmEIN3* 的表达提高玉米的耐旱性; *ZmIBH1-1* 蛋白通过直接调控钙信号相关基因 *ZmCa-M* 和 *ZmAGD12* 增强玉米的耐旱性; *ZmIBH1-1* 蛋白可能通过间接调控 NAC、WRKY、MYB 等转录因子响应干旱胁迫。

**关键词:** 玉米; 干旱胁迫; *ZmIBH1-1*; RNA-Seq; 转录因子; 基因表达

收稿日期: 2021-04-25; 接受日期: 2021-06-16

基金项目: 国家自然科学基金 (31871639)

联系方式: 朱芳芳, E-mail: 1261546452@qq.com。董亚辉, E-mail: 1018661461@qq.com。朱芳芳和董亚辉为同等贡献作者。通信作者陈彦惠, E-mail: chy9890@163.com

# Over-expression of *ZmIBH1-1* to Improve Drought Resistance in Maize Seedlings

ZHU FangFang, DONG YaHui, REN ZhenZhen, WANG ZhiYong, SU HuiHui, KU LiXia, CHEN YanHui✉

College of Agronomy, Henan Agricultural University/National Key Laboratory of Wheat and Maize Crop Science, Zhengzhou 450046

**Abstract:** 【Objective】Drought is an important factor that affects the growth and development of maize seriously. Through the mining of genes related to drought resistance in maize, transgene function verification and transcriptome analysis, analyzing the molecular regulation mechanism of key genes in response to drought stress, this paper provides the theoretical basis for drought resistance molecular breeding and genetic improvement. 【Method】In this study, the maize inbred line B104 (wild-type, WT) was used as the background to construct the *ZmIBH1-1* overexpression (*ZmIBH1-1*-OE) transgenic line by *Agrobacterium*-mediated method. The transgenic plants and lines were identified via screening transgenic plants for glufosinate-ammonium resistance, PCR detection of marker gene and target gene and expression analysis of target gene by qRT-PCR. We used the *ZmIBH1-1*-OE and WT transgenic lines as materials. Through drought treatment (20% PEG6000), phenotype identification and drought tolerance physiological and biochemical index determination were carried out to verify the drought resistance function of *ZmIBH1-1*; RNA-Seq was used to identify differentially expressed genes (DEGs) under drought stress at the 4-leaf stage; Combined with DAP-seq (DNA affinity purification sequencing) analysis, it is preliminarily determined that *ZmIBH1-1* protein directly regulates downstream target genes related to drought resistance, and IGV (Integrative Genomics Viewer) was used to analyze the position of the *ZmIBH1-1* protein binding candidate target gene, and then the Dual-Luciferase assay was used to verify the regulatory relationship between *ZmIBH1-1* protein and target genes. 【Result】12 transformation events were obtained by genetic transformation of maize. In the T<sub>3</sub> generation, there were 458 plants in which the marker gene *Bar* and the target gene *ZmIBH1-1* were simultaneously detected. The results of qRT-PCR showed that the expression level of *ZmIBH1-1* in *ZmIBH1-1*-OE lines was significantly higher than that of WT and the expression levels of transformation events 3 and 8 were the highest, which were self-crossed to obtain T<sub>4</sub> generation for subsequent experiments. Under drought stress, the survival rate, the relative water content, the chlorophyll content, soluble protein content and the physiological and biochemical indicators (superoxide dismutase, peroxidase, catalase activity) of *ZmIBH1-1*-OE were higher than those of WT significantly, which indicating that the overexpression of *ZmIBH1-1* in maize confers higher drought tolerance. The RNA-Seq results showed that there were 1 214 DEGs between WT and *ZmIBH1-1*-OE lines. Gene Ontology (GO) analysis showed that DEGs were mainly involved in biological processes, cell components and molecular functions, such as photosynthesis, stress response, dehydration response, etc. in biological processes; KEGG enrichment analysis showed that DEGs were mainly involved in the signal transduction of plant hormones, the metabolism and other processes. Combining the significantly DEGs of RNA-Seq and the target genes of *ZmIBH1-1* obtained from DAP-seq analysis, it is preliminarily identified 11 candidate target genes related to drought resistance that may be directly regulated by *ZmIBH1-1*, including 2 calcium signal related genes, 3 cysteine metabolism related genes, 1 bHLH transcription factor, 1 stress response protein, 1 glutathione transferase, 1 redox process protein and 2 ethylene response factor; Integrative genomics viewer showed that *ZmIBH1-1* protein could bind to the promoters of the target genes; Subsequent Dual-Luciferase assay further showed that *ZmIBH1-1* protein can directly act on 11 candidate target genes, of which, *ZmIBH1-1* directly binds to the promoters of *ZmCa-M*, *ZmSYCO*, *ZmbHLH54*, *ZmGlu-r1*, *ZmCLPB3* and *ZmP450-99A2* to promote their expression, and directly binds to the promoters of *ZmAGD12*, *ZmCYS*, *ZmCYSB*, *ZmERF-107* and *ZmEIN3* to repress their expression. In addition, transcription factors such as NAC, WRKY and MYB also differentially expressed between WT and *ZmIBH1-1*-OE under drought stress. 【Conclusion】The overexpression of *ZmIBH1-1* can enhance the drought tolerance of maize; *ZmIBH1-1* improves the drought tolerance of maize by directly regulating the expression of genes *ZmERF-107* and *ZmEIN3* in the ethylene signaling pathway; *ZmIBH1-1* enhances the drought tolerance of maize by directly regulating the calcium signal-related genes *ZmCa-M* and *ZmAGD12*; *ZmIBH1-1* may indirectly regulate NAC, WRKY, MYB and other transcription factors in response to drought stress.

**Key words:** maize; drought stress; *ZmIBH1-1*; RNA-Seq; transcription factor; gene expression

## 0 引言

【研究意义】玉米是世界第一大粮食作物,其产量占全球总谷物产量的 37.2%<sup>[1]</sup>。玉米产量的提高对保障国家粮食安全至关重要。干旱、盐碱、矿物质缺乏等非生物胁迫对玉米正常的生长发育会造成极大的影响,进而导致玉米产量的损失。其中,干旱是制约玉米产量提高的重要因素之一。因此,挖掘玉米抗旱耐旱的关键基因,从分子水平上揭示玉米抗旱机制,为培育抗旱耐旱玉米新品种提供理论依据,对保障粮食产量稳定具有十分重要的意义。【前人研究进展】为了适应复杂多变的自然环境,在漫长的进化过程中,植物自身形成了一种特异的适应机制,植物在应对干旱等逆境时,会启动相应的功能基因,调节其生理生化水平,以适应不良环境<sup>[2-3]</sup>。已有的研究表明,植物中 bHLH、NAC、WRKY、bZIP、NF-Y、MYB 等转录因子家族的基因通过不同的调控路径,在植物抵御逆境胁迫反应中发挥着重要的作用<sup>[4-10]</sup>。在干旱等胁迫条件下,多个玉米转录因子家族基因的过量表达可以提高植物的抗旱耐旱特性。例如,玉米苗期过表达 *ZmNAC111* 可以提高玉米水分利用率并诱导干旱响应基因的表达,进而提高玉米干旱耐受性<sup>[4]</sup>; *ZmNAC55* 的表达受干旱、高盐等胁迫条件诱导,过表达 *ZmNAC55* 可以增强拟南芥干旱耐受性<sup>[5]</sup>。*ZmWRKY106* 作为干旱胁迫和高温胁迫的正调控因子,通过调控 ABA 信号路径相关基因,过表达 *ZmWRKY106* 提高了拟南芥中超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、过氧化物酶 (peroxidase, POD) 和过氧化氢酶 (catalase, CAT) 活性,降低了活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 含量,转基因拟南芥表现出耐旱性和耐热性<sup>[6]</sup>。过表达 *ZmWRKY40* 提高干旱胁迫下转基因拟南芥中 POD 和 CAT 的活性,降低了 ROS 积累,通过调控胁迫相关基因提高转基因拟南芥的抗旱性<sup>[7]</sup>。植物 bZIP 转录因子调节多种功能,包括植物发育、胁迫反应和信号传导等过程,过表达 *ZmbZIP72* 的拟南芥比野生型的电解质渗漏低,水分流失慢,干旱和盐耐受性增强<sup>[8]</sup>。干旱处理 24 h 后,地上部 *ZmbZIP71* 的表达量升高 5.49 倍,推测该基因可能参与了玉米干旱胁迫响应<sup>[9]</sup>。干旱和盐胁迫诱导 *ZmMYB3R* 的表达,拟南芥过表达该基因呈现生长性能增强,存活率高, CAT、POD 和 SOD 活性升高, *ZmMYB3R* 增强了转基因拟南芥对干旱和盐胁迫的耐受性<sup>[10]</sup>。除去转录因子,还有与干旱

胁迫响应相关的基因的报道。例如,干旱处理后,过表达 *ZmPTPN* 转基因玉米成活率显著提高,而 *ZmPTPN* 敲除突变体对干旱表现出更加敏感,说明 *ZmPTPN* 增强了玉米干旱耐受性<sup>[11]</sup>。ZHANG 等<sup>[12]</sup>发现过表达 *ZmTIP1* 的转基因玉米根毛长度增加,对水分亏缺的耐性提升。DING 等<sup>[13]</sup>发现 *ZmGRXCC14* 的遗传变异与玉米苗期抗旱性显著关联。玉米 *gl6* 突变体表皮蜡质减少、角质层渗透性增加,降低了幼苗抗旱性<sup>[14]</sup>。*ZmPIP1;1* 通过诱导胁迫响应基因和提高 ROS 清除酶活性,可能在干旱和盐胁迫耐受中起作用<sup>[15]</sup>。WANG 等<sup>[16]</sup>鉴定到一个玉米 I 类 SUMO 结合酶基因 (*ZmSCE1d*),该基因在干旱胁迫下表达上调,拟南芥中过表达该基因则增强其抗旱性。在干旱条件下,过表达 *ZmASR3* 的转基因株系通过提高 SOD 和 CAT 的活性,增加气孔关闭,减少 ROS 的积累正向调控植物耐旱性<sup>[17]</sup>。bHLH 家族是仅次于 MYB 家族的第二大家族<sup>[18]</sup>,在植物抗旱中发挥着重要作用。*AmDEL* 与 *VvbHLH1* 编码典型的 bHLH 转录因子,可以促进转基因拟南芥体内类黄酮生物合成、脱落酸 (abscisic acid, ABA) 信号通路、脯氨酸生物合成及 ROS 清除酶等基因表达上调,增强拟南芥耐旱性<sup>[19-20]</sup>。胡杨基因 *PebHLH35* 被干旱诱导后表达上调,主要通过调节气孔密度和大小、光合作用及生长发育等从而提高其抗旱性<sup>[21]</sup>。茶树在干旱胁迫下有 39 个 bHLH 转录因子表达上调<sup>[22]</sup>。拟南芥 *AtbHLH122* 是耐旱性、耐盐性等多个逆境胁迫信号的调节因子<sup>[23]</sup>。在水稻中, *OsbHLH148* 高量表达显著提高了水稻的抗旱性<sup>[24]</sup>。*ZmPTF1* 是一种磷酸饥饿诱导的 bHLH 转录因子,过表达 *ZmPTF1* 株系改善玉米根系发育,增加 ABA 含量,激活 ABA-、CBF4-、ATAF2-和 NAC30 介导的胁迫响应,提高玉米的耐旱性<sup>[25]</sup>。【本研究切入点】*ZmIBH1-1* 编码一个 bHLH 型转录因子,在叶夹角形成发育中负向调控玉米叶夹角的大小<sup>[26]</sup>。然而,关于 *IBH1-1* 是否可以提高植物的耐旱性,目前尚未报道。

【拟解决的关键问题】本研究以 B104 (WT) 及 B104 为背景的过表达 *ZmIBH1-1* 转基因 (*ZmIBH1-1-OE*) 株系为材料,对玉米幼苗进行干旱胁迫处理,结合 RNA-Seq 和 DAP-Seq 数据分析,解析 *ZmIBH1-1* 响应干旱胁迫的分子机制,为挖掘玉米抗旱基因及选育抗旱型玉米新品种奠定理论基础。

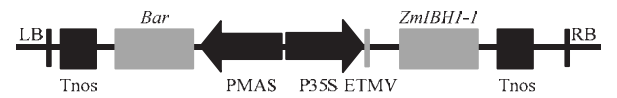
## 1 材料与方法

试验于 2018 年 6 月—2020 年 10 月在河南农业大

学农学院/省部共建小麦玉米作物学国家重点实验室完成。

1.1 试验材料

玉米遗传转化所用农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 菌株 EHA105 购自河南三瑞生物科技有限公司; pFGC5941 植物表达载体购自 BioVector NTCC 典型培养物保藏中心; 过表达 *ZmIBH1-1* 重组质粒由河南农业大学省部共建小麦玉米作物学国家重点实验室陈彦惠教授课题组构建, T-DNA 区结构如图 1 所示; 玉米遗传转化由北京博美兴奥科技有限公司完成; T<sub>1</sub>—T<sub>4</sub> 自交纯合及阳性转基因植株鉴定由河南农业大学省部共建小麦玉米作物学国家重点实验室陈彦惠教授课题组完成。过表达 *ZmIBH1-1* 转基因株系命名为 *ZmIBH1-1-OE*。



LB: T-DNA 的左边重复序列; Tnos: 终止子; Bar: 除草剂筛选基因; PMAS: MAS 启动子; P35S: 35S 启动子; ETMV: TMV 增强子; RB: T-DNA 的右边重复序列  
LB: Left border repeat of T-DNA; Tnos: Terminator; Bar: Herbicide screening gene; PMAS: MAS promoter; P35S: 35S promoter; ETMV: TMV enhancer; RB: Right border repeat of T-DNA

图 1 过表达 *ZmIBH1-1* 重组质粒的 T-DNA 区示意图  
Fig. 1 Schematic diagram of the T-DNA region of the *ZmIBH1-1* overexpression recombinant plasmid

1.2 转基因植株的检测

采用除草剂抗性筛选、标记和目的基因 PCR 鉴定和目的基因的荧光定量 PCR 表达分析 3 种方法对转基因植株进行检测鉴定。除草剂抗性筛选: 利用 WT 和 *ZmIBH1-1-OE* 为材料, 从植株 3 片叶开始, 每隔 3—5 d 向叶片喷施草铵膦 (300 mg·L<sup>-1</sup>), 共喷施 3 次, 处理一周后观察抗性表型, 初步筛选转基因阳性植株。标记和目的基因 PCR 鉴定: 以提取的植株叶片 DNA 为模板, 利用标记基因 *Bar* 特异引物 (Bar-F 和 Bar-R) 和 *ZmIBH1-1* 特异引物 (ZmIBH-F 和 ZmIBH-R) 进行扩增检测, 根据扩增条带鉴定出转基因阳性植株, 所用引物序列见表 1。目的基因的荧光定量 PCR 表达分析: 用 Trizol 法提取玉米第 4 片完全展开叶的 RNA, 按 PrimeScrip<sup>TM</sup> RT reagent Kit (TaKaRa) 的操作步骤进行 RNA 反转录, 用 *ZmIBH1-1* 定量引物 (qIBH-F 和 qIBH-R) 和内参引物 (Tublin-F 和 Tublin-R) 进行

荧光定量 PCR 检测, 采用 2<sup>-ΔΔC<sub>t</sub></sup> 法进行定量分析<sup>[27]</sup>检测阳性植株。每个样品 3 次生物学重复, 3 次技术重复, 引物序列见表 1。将转基因不同世代经过 PCR 检测到的阳性单株移栽到大田, 在开花期进行人工套袋自交获得种子。

表 1 试验所用引物  
Table 1 Primers used in the study

引物名称	引物序列
Primer name	Primer sequence (5'-3')
Bar-F	CATCGAGACAAGCACGGTC
Bar-R	AAACCCACGTCATGCCAGTT
ZmIBH-F	CAATTACATTACAATTACCATGGTCATGGCCA GGAAGAGGAC
ZmIBH-R	CTCTCTAGACTCACCTAGGATCCTCATTGGGCG GAGAAG
qIBH-F	AGGAACCAACCGCCAAACC
qIBH-R	GCHTCTCCGACGAGGAC
Tublin-F	CCGCTATCTCCGTCGC
Tublin-R	GTTCTTGGATGGCGGTCTG

1.3 干旱胁迫下 WT 和 *ZmIBH1-1-OE* 的表型鉴定

干旱胁迫处理: 将 *ZmIBH1-1-OE* 和 WT 玉米籽粒置于 10% 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 中浸泡洗涤 20 min, 无菌水洗涤 3 次, 每次 5 min。消毒后的种子放在无菌湿润的发芽纸中, 28℃ 黑暗培养 2 d, 挑选发芽均一的籽粒种植蛭石中, 在 (30±2)℃ 恒温培养室中培养 (12 h 黑暗/12 h 光照)。玉米幼苗生长至 2 叶 1 心转入 Hoagland 营养液, 4 叶 1 心时采用添加 20% PEG-6000 的 Hoagland 营养液进行干旱处理, 同时设置对照 (Hoagland 营养液), 试验重复 3 次。

耐旱表型鉴定: 选取对照和干旱处理的 WT 和 *ZmIBH1-1-OE* 植株进行存活率统计和相对含水量测定。

相对含水量 (relative water content, RWC) 的测定: 干旱处理 24 h 后取新鲜叶片擦干净后称重 (fresh weight, FM), 将叶片放入水中 5—6 h, 使叶片吸水达到饱和状态后, 取出叶片并擦干叶片表面水分后再称重 (saturation weight, TM), 再将叶片放入烘箱, 105℃ 杀青 30 min, 然后在 80℃ 环境下烘至恒重, 称重 (dry weight, DM)。叶片相对含水量 RWC (%) = (FM-DM) / (TM-DM) × 100。

1.4 生理生化指标的测定

干旱处理 24 h 后取处理组和对照组的植株叶片,

用于生理生化指标的测定,每个指标 3 次生物学重复。用韩赞平<sup>[28]</sup>方法进行 SOD、POD、CAT 活性测定;用叶绿素用丙酮-乙醇混合液的萃取方法<sup>[29]</sup>进行叶绿素含量(chlorophyll contents, Cht)和类胡萝卜素含量(carotenoids, Car)测定,称取 0.2 g 新鲜玉米叶片,加入 80%预冷的丙酮,研磨成匀浆,于 6 000 r/min 离心 15 min,抽取上清液测定其在 665、649 和 470 nm 波长下的吸光值,试验在黑暗环境中进行。计算公式为:

叶绿素 a 浓度 (mg·L<sup>-1</sup>)  $C_a = 13.95A_{665} - 6.8A_{649}$

叶绿素 b 浓度 (mg·L<sup>-1</sup>)  $C_b = 24.96A_{649} - 7.32A_{665}$

叶绿素浓度 (mg·L<sup>-1</sup>)  $Cht = C_a + C_b$

类胡萝卜素浓度 (mg·L<sup>-1</sup>)  $Car = (1000A_{470} - 2.05C_a - 114.8C_b) / 248$

采用考马斯亮蓝染色法<sup>[30]</sup>,对可溶性蛋白(soluble protein, SP)含量进行测定,称取 0.1 g 新鲜玉米叶片,采用 Tris-HCL 缓冲液(pH6.8)进行可溶性蛋白研磨提取,通过测定 595 nm 处吸光值测定可溶性蛋白含量。

## 1.5 数据分析

应用 Microsoft Excel 2010 进行数据分析和作图。

## 1.6 转录组测序及分析

以正常、干旱处理的 WT 和 *ZmIBH1-1*-OE 植株的叶片(2 个生物学重复)为材料,委托武汉希望组生物科技有限公司完成 RNA 提取和文库构建,然后通过 MGI-T7 平台对文库进行 PE150 测序,共构建 8 个 cDNA 文库。使用在线软件 Trim Galore ([www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim\\_galore/](http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim_galore/))处理测序产出的原始数据,去除含有接头、poly-N 及低质量 reads 后获得高质量 clean reads,并对 Q20、Q30、GC 含量以及重复序列进行统计;将上述高质量的 clean reads 与玉米基因组 B73\_V4 (AGPV4 版本)进行比对,通过 FPKM (Fragments per Kilobase per Million Mapped Fragments)对基因表达量进行标准化,以 FPKM>1 为表达标准,随后根据正常与干旱处理的 WT 和 *ZmIBH1-1*-OE 的比较,用 DESeq(|log<sub>2</sub> FC(fold change)|≥1 和 P-value/FDR<0.05)确定 DEGs。利用 Uniprot、Swissprot、COG、NR、GO 和 KEGG 等数据库对 DEGs 进行功能注释,利用在线工具 WEGO (<http://wego.genomics.org.cn>)和 Gene Ontology (<http://www.geneontology.org/>)对差异基因进行 GO 功能分类<sup>[31]</sup>。通过 KEGG 分析 DEGs 主要参与的代谢途径和信号通路(<https://www.kegg.jp/>)。

## 1.7 *ZmIBH1-1* 对其直接作用的下游靶基因的调控分析

为了明确 *ZmIBH1-1* 在玉米发育过程中的调控网络,CAO 等<sup>[26]</sup>采用 DAP-seq 技术证明了 *ZmIBH1-1* 蛋白通过绑定 4 个 Cis-elements (NNCAAGTNG、CANGTN、CTTCGNN 和 GGNGGAGA)直接作用于启动子区域的靶基因有 1 188 个,结合 RNA-Seq 数据明确了调控玉米叶夹角发育的靶基因。为了进一步明确 *ZmIBH1-1* 响应干旱胁迫所涉及的调控路径,首先用 VLOOKUP 对干旱胁迫下的 RNA-Seq 分析获得的差异表达基因和 *ZmIBH1-1* 蛋白 DAP-seq 获得的 1 188 个靶基因<sup>[26]</sup>进行交集分析,初步确定干旱胁迫响应的候选靶基因。然后用基因组可视化软件 IGV (integrative genomics viewer)分析 *ZmIBH1-1* 蛋白结合候选靶基因的位置。

采用 Dual-Luciferase 试验进一步验证 *ZmIBH1-1* 与靶基因的调控关系。将靶基因的启动子(含有 *ZmIBH1-1* 的结合位点)克隆到 pGreenII0800-luc 载体上(含有报告基因);将基因 *ZmIBH1-1* 克隆到 pCambia1300 载体上。将上述重组载体分别转入农杆菌 GV3101 中,采用 3 种组合(融合有靶基因启动子的双荧光素酶报告载体、过表达转录因子载体以及融合有靶基因启动子的双荧光素酶报告载体、双荧光素酶报告载体(空载))侵染烟草(*N. benthamiana*)叶片。培养(14 h 光照/10 h 黑暗)2 d 后,提取烟草叶片蛋白(Cat#E1910, Promega),使用 Glomax@20/20 生物/化学发光检测仪(Cat#E5311, Promega)测定萤火虫荧光素酶(firefly luciferase, LUC)和海肾荧光素酶(renilla luciferase, REN),每个样品 3 个生物学重复。

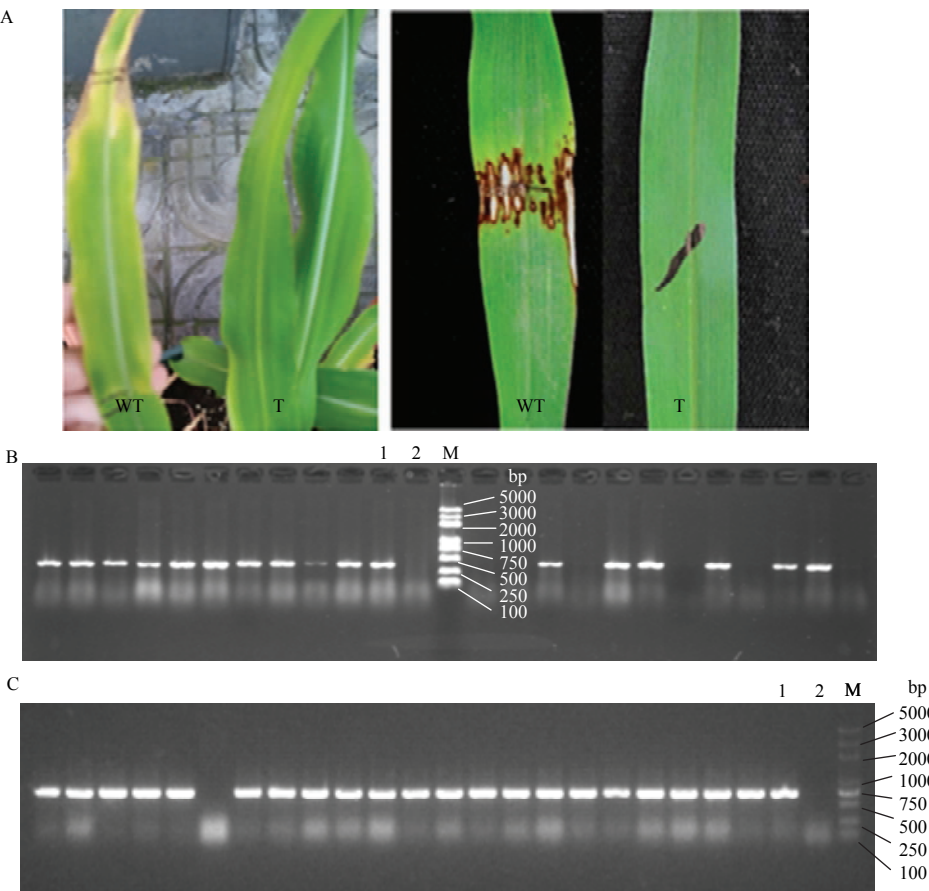
## 2 结果

### 2.1 *ZmIBH1-1*-OE 转基因玉米阳性植株的鉴定

通过玉米遗传转化共获得 12 个转化事件。T<sub>3</sub> 代时,每个转化事件种植 5 个株系,每个株系种植 10 个单株,共 600 个单株,进行鉴定(图 2)。结果表明,T<sub>3</sub> 代株系中约 80%具有筛选标记基因 *Bar* 和目的基因 *ZmIBH1-1*。标记基因和目的基因同时被检测到的植株有 458 个,其中,来自于 2 个(3、8)转化事件的 3 个株系,共 30 个单株全部为阳性。

对 T<sub>3</sub> 代 12 个独立事件的转基因株系在 4 叶期进行 qRT-PCR 检测,结果表明,*ZmIBH1-1*-OE 株系中的 *ZmIBH1-1* 表达量显著高于 WT,且在 3、8 转化事件中该基因的表达量最高(图 3)。结合抗除草剂鉴

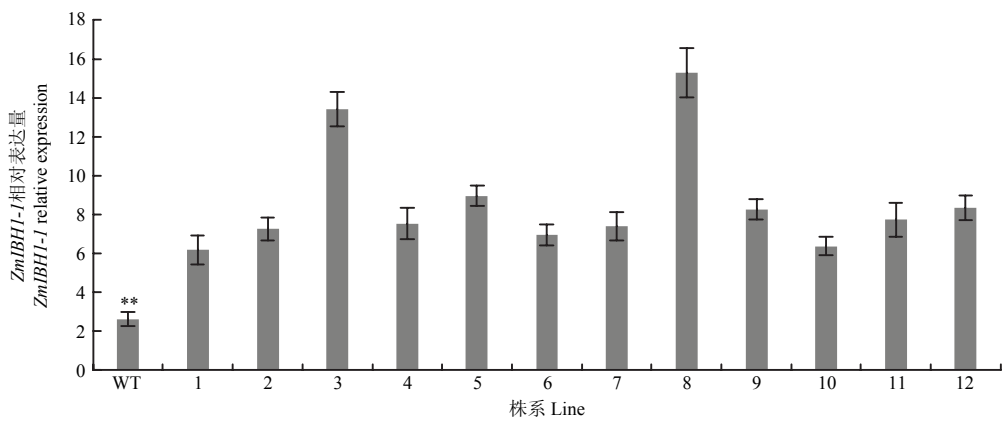




A: 喷洒或涂抹除草剂草胺的表型鉴定; B: *Bar* 引物 PCR 检测; C: *IBH1-1* 引物 PCR 检测。WT: 野生型单株; T: 转基因单株; 1: 阳性对照 (质粒 DNA); 2: 空白对照; M: DL5000 DNA Marker; 其余泳道代表转基因植株  
A: Phenotypic identification of herbicide glyphosate sprayed or applied; B: PCR detection of *Bar*; C: PCR detection of *IBH1-1*. WT: Wild-type plant; T: Transgenic *ZmIBH1-1*-OE plant; 1: Positive control (plasmid DNA); 2: Blank; M: DL5000 DNA Marker; The rest represent transgenic plants

图 2 部分 T<sub>3</sub>转基因玉米植株的鉴定结果

Fig. 2 Identification of some T<sub>3</sub> transgenic maize plants



WT: 野生型; 1—12: 12 个转化事件的 *ZmIBH1-1*-OE 株系 ( $n=3$ ,  $\pm SD$ ,  $**P<0.01$ )  
WT: Wild-type plant; 1-12: 12 transformation events of *ZmIBH1-1*-OE lines ( $n=3$ ,  $\pm SD$ ,  $**P<0.01$ )

图 3 12 个转化事件株系中 *ZmIBH1-1* 的表达量测定

Fig. 3 Expression of *ZmIBH1-1* in 12 transformation events lines

定和 PCR 检测结果, 说明这两个转化事件已经纯合。转化事件 3 和 8 套袋自交获得的 T<sub>4</sub> 代转基因株系用于后续试验研究。

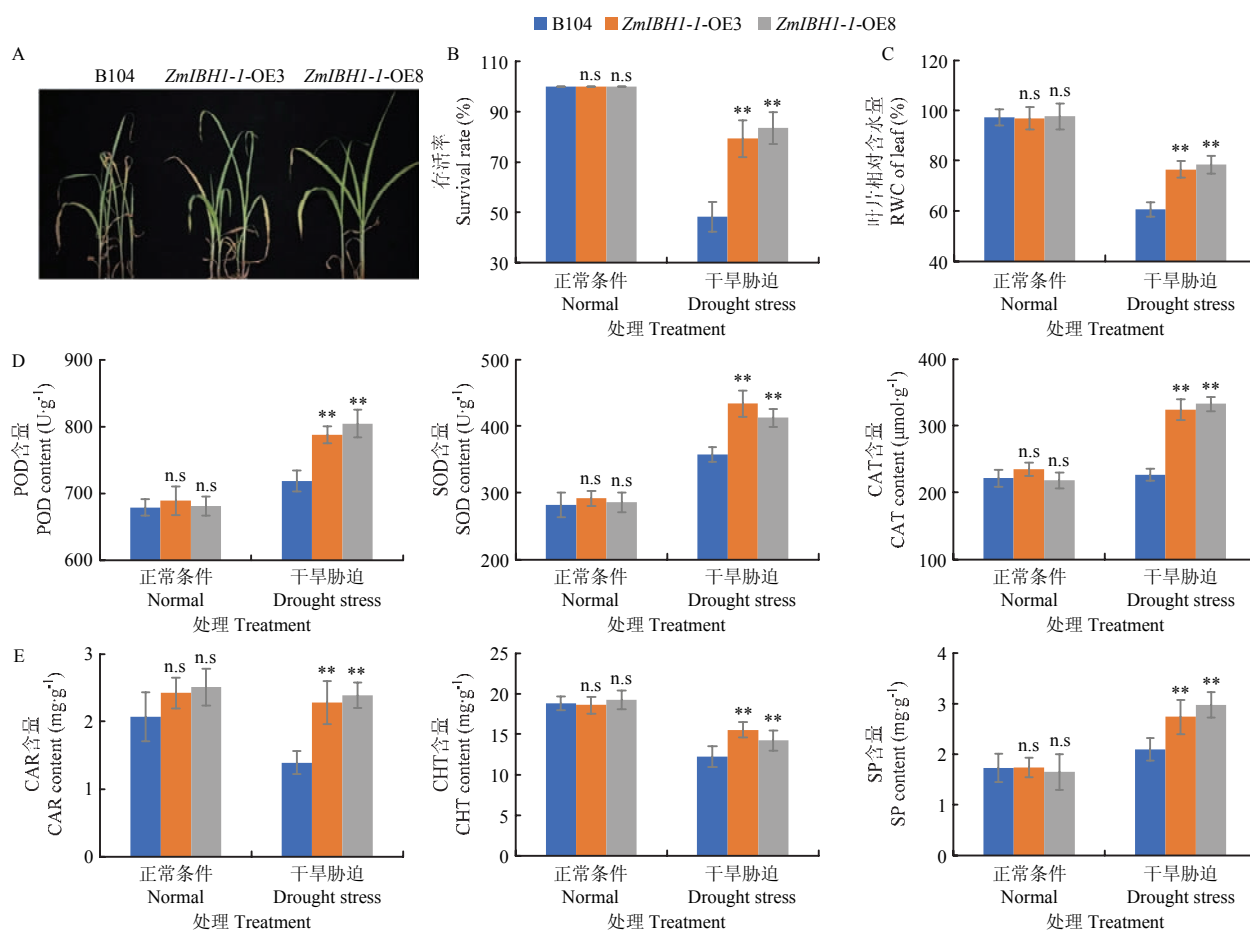
## 2.2 过表达 *ZmIBH1-1* 增强玉米耐旱性

*ZmIBH1-1*-OE 和 WT 植株模拟干旱处理后发现, *ZmIBH1-1*-OE 株系比 WT 植株抗旱性强 (图 4-A)。具体表现为: 干旱胁迫下, *ZmIBH1-1*-OE 株系的存活率显著高于 WT (图 4-B), *ZmIBH1-1*-OE 株系的叶片相对含水量显著高于 WT (图 4-C), *ZmIBH1-1*-OE 株系的 SOD、CAT 及 POD 酶活性均显著高于 WT (图

4-D), 类胡萝卜素、总叶绿素、可溶性蛋白含量也均显著高于 WT (图 4-E)。以上结果说明过表达 *ZmIBH1-1* 增强玉米的耐旱性。

## 2.3 干旱胁迫下 *ZmIBH1-1*-OE 和 WT 叶片转录组分析

为明确 *ZmIBH1-1*-OE 植株在干旱胁迫下转录水平变化, 对正常和干旱胁迫下 WT 和 *ZmIBH1-1*-OE 株系的幼苗进行转录组测序。去除低质量 reads 后, 8 个样品均有超过 91% 的 clean reads。将 clean reads 与玉米 B73 基因组参考序列 V4 进行比对, 8 个样品均有超过 88% 的 unique reads (表 2); PCA 分析结果显



A: B104 和 *ZmIBH1-1*-OE 株系在 PEG6000 胁迫下的表型; B: B104 和 *ZmIBH1-1*-OE 株系在 PEG6000 胁迫下的存活率 ( $n=3$ ,  $\pm SD$ ,  $**P < 0.01$ , n.s. 不显著); C: B104 和 *ZmIBH1-1*-OE 株系在 PEG6000 胁迫下的叶片平均含水量 ( $n=3$ ,  $\pm SD$ ,  $**P < 0.01$ , n.s. 不显著); D: B104 和 *ZmIBH1-1*-OE 株系在 PEG6000 胁迫下的 POD、SOD、CAT 酶活性测定 ( $n=3$ ,  $\pm SD$ ,  $**P < 0.01$ , n.s. 不显著); E: B104 和 *ZmIBH1-1*-OE 株系在 PEG6000 胁迫下的总叶绿素 (Cht)、类胡萝卜素 (Car) 和可溶性蛋白 (SP) 含量的变化测定 ( $n=3$ ,  $\pm SD$ ,  $**P < 0.01$ , n.s. 不显著)

A: The phenotype of B104 and *ZmIBH1-1*-OE lines under PEG6000 stress; B: Mean survival rate of B104 and *ZmIBH1-1*-OE lines under PEG6000 stress ( $n=3$ ,  $\pm SD$ ,  $**P < 0.01$ , n.s. not significant); C: Mean relative water contents (RWCs) of B104 and *ZmIBH1-1*-OE lines under PEG6000 stress ( $n=3$ ,  $\pm SD$ ,  $**P < 0.01$ , n.s. not significant); D: Determination of POD, SOD and CAT enzyme activities of B104 and *ZmIBH1-1*-OE strains under PEG6000 stress ( $n=3$ ,  $\pm SD$ ,  $**P < 0.01$ , n.s. not significant); E: Determination of the contents of Cht, Car and SP of B104 and *ZmIBH1-1*-OE strains under PEG6000 stress ( $n=3$ ,  $\pm SD$ ,  $**P < 0.01$ , n.s. not significant)

图 4 *ZmIBH1-1*-OE 和野生型株系 B104 在干旱胁迫下的表型及各项生理指标变化

Fig. 4 Phenotype and physiological changes of *ZmIBH1-1*-OE and wild type B104 lines under drought stress

表 2 RNA-Seq 数据 reads 数总结

Table 2 The summary of reads analysis from RNA-Seq data

样品 Sample	正常条件 Normal					干旱胁迫 Drought stress				
	原始 reads Raw reads	过滤后的 reads	过滤后的 reads 所占比	比对上的 reads	比对上的 reads 占比	原始 reads Raw reads	过滤后的 reads	过滤后的 reads 所占比	比对上的 reads	比对上的 reads 占比
		Clean reads	Reads keep rate (%)	Mapped reads	Mapped reads rate (%)		Clean reads	Reads keep rate (%)	Mapped reads	Mapped reads rate (%)
WT-1	5407756	5032404	93.05	4492503	89.27	3870308	3532833	91.28	3128759	88.56
WT-2	7232533	6586333	91.06	5987305	90.90	4119004	3813323	92.57	3482561	91.32
OE-1	8523635	7780152	91.27	6893250	88.60	6322179	5776743	91.37	5367210	92.91
OE-2	7647821	6977539	91.23	6289035	90.13	6994016	6490634	92.80	5901352	90.92

示不同样品间存在差异，同一样品不同生物学重复聚集（图 5-A）；相关性分析表明，生物学重复间相关系数高（图 5-B）。以上结果表明转录组数据稳定可靠，可用于后续分析。

转录组分析结果表明，干旱胁迫下 *ZmIBH1-1* 的表达量显著高于正常条件，且在 *ZmIBH1-1*-OE 株

系中表达量显著高于 WT（图 5-C）；WT 与 *ZmIBH1-1*-OE 株系在干旱胁迫下有 1 214 个基因表达差异显著。将 1 214 个差异表达基因进行 GO 注释分析（电子附图 1-A），这些基因主要涉及到生物过程、细胞组分和分子功能。KEGG 代谢通路分析结果表明，差异表达基因主要参与植物激素信号

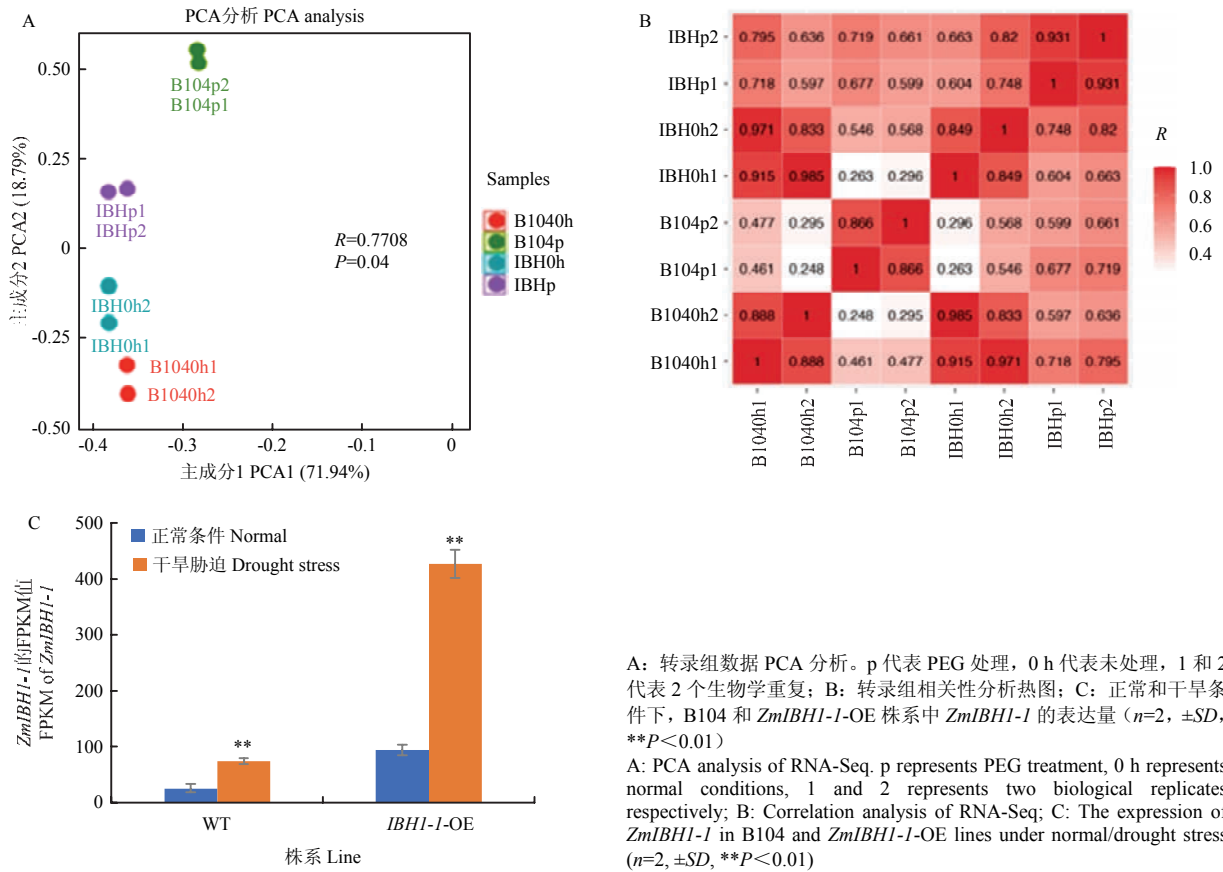


图 5 B104 与 *ZmIBH1-1*-OE 株系在干旱胁迫和正常条件下的转录组数据分析

Fig. 5 RNA-Seq analysis of B104 and *ZmIBH1-1*-OE lines under normal and drought conditions

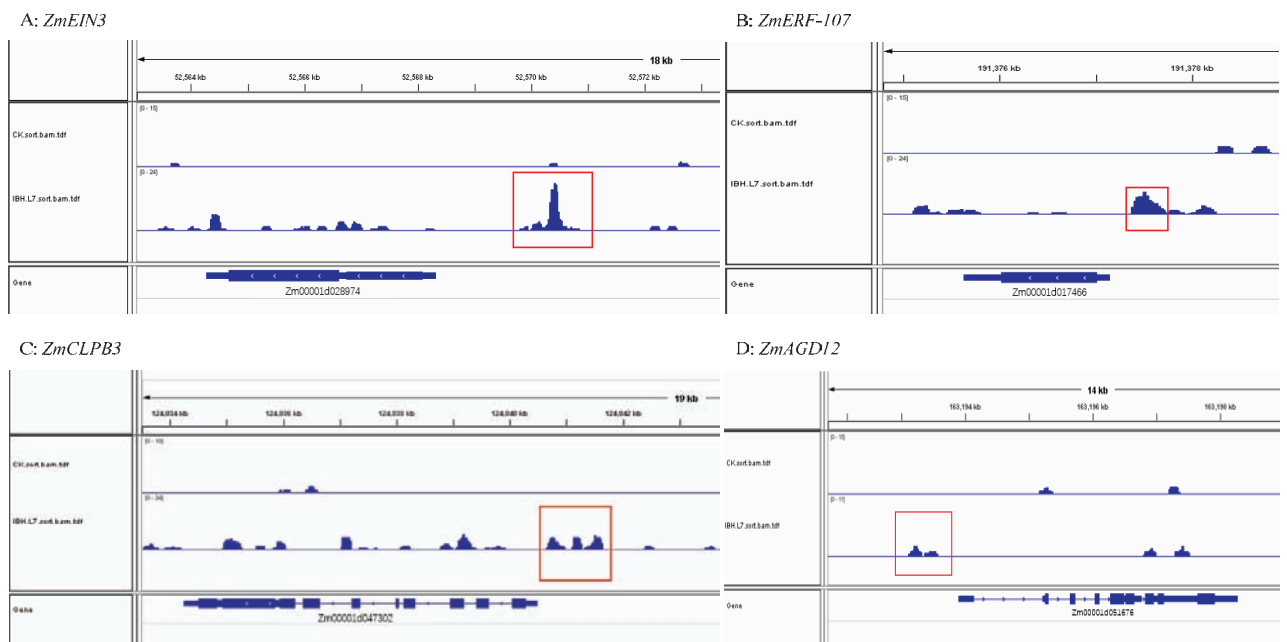


传导、新陈代谢等路径（电子附图 1-C）。1 214 个差异表达基因中还包括  $\text{Ca}^{+}$ 通道蛋白及 NAC、WRKY、MYB 等类型转录因子（电子附图 1-B 和电子附表 1）。

2. 4 ZmIBH1-1 蛋白直接作用的干旱胁迫响应的靶基因分析

为进一步解析 ZmIBH1-1 蛋白直接作用的干旱响应靶基因,对 RNA-Seq 差异表达基因和 DAP-Seq 分析得到的 ZmIBH1-1 蛋白的靶基因<sup>[26]</sup>进行分析,初步确定 11 个 ZmIBH1-1 可能直接调控的与抗旱相关的候选靶基因（电子附表 2），包括 2 个钙信号相关基因（*ZmCa-M*: Zm00001d025340; *ZmAGD12*:

Zm00001d051676）、3 个半胱氨酸代谢相关基因（*ZmSYCO*: Zm00001d034736; *ZmCYS*: Zm00001d049110; *ZmCYSB*: Zm00001d038173）、1 个 bHLH 转录因子（*ZmbHLH54*: Zm00001d011847）、1 个应激响应蛋白（*ZmCLPB3*: Zm00001d047302）、1 个谷胱甘肽转移酶（*ZmGlu-r1*: Zm00001d036951）、1 个氧化还原过程蛋白（*ZmP450-99A2*: Zm00001d029519）和 2 个乙烯响应因子（*ZmERF-107*: Zm00001d017466；*ZmEIN3*: Zm00001d028974）。ZmIBH1-1 的 DAP-Seq 结果显示 ZmIBH1-1 在靶基因启动子区域存在 peaks 富集（图 6），说明 ZmIBH1-1 可以直接结合靶基因启动子。



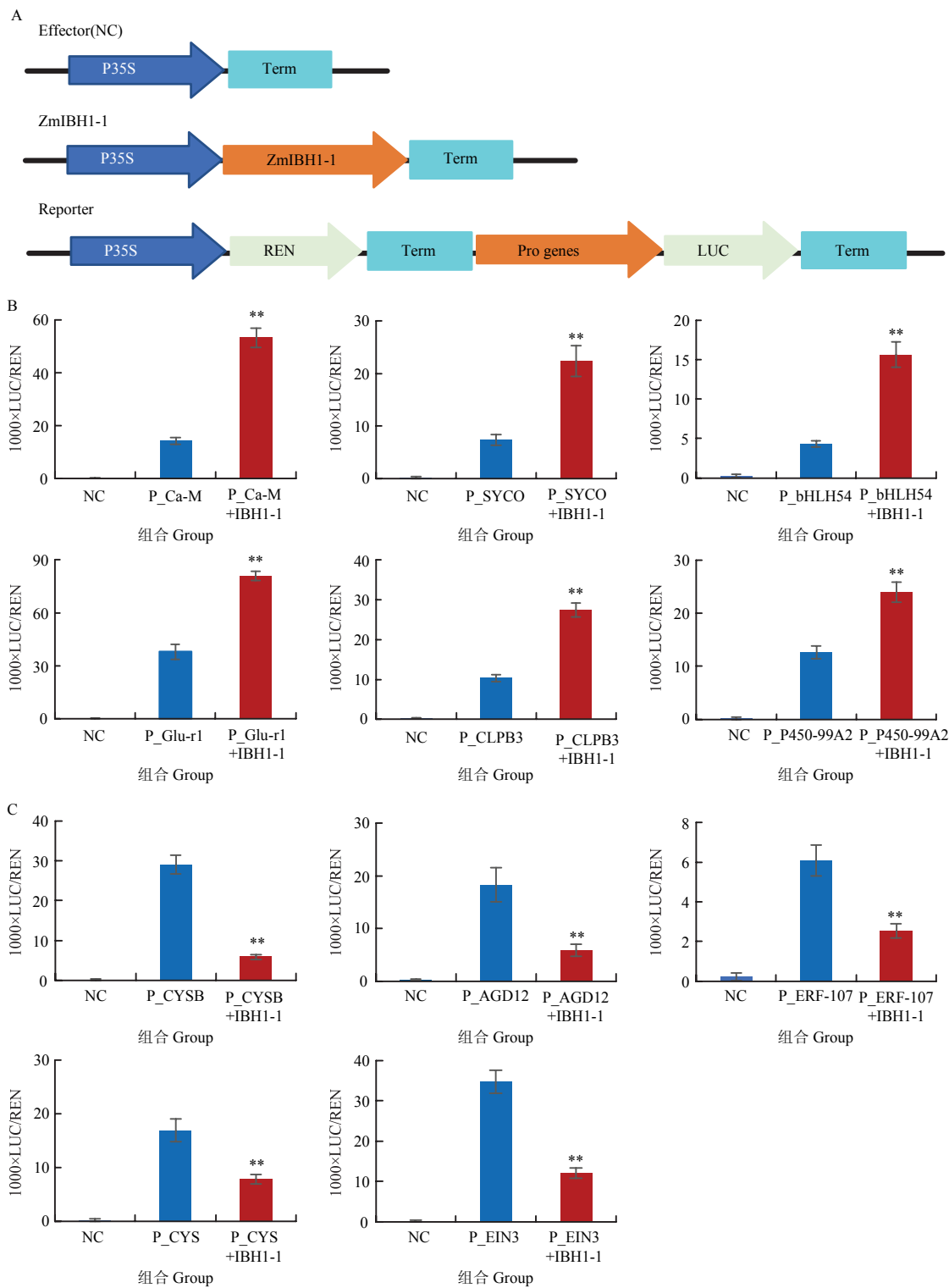
A—D 分别代表 ZmIBH1-1 分别结合 *ZmEIN3*、*ZmERF-107*、*ZmCLPB3* 和 *ZmAGD12* 的启动子区域。红框代表 ZmIBH1-1 结合峰所在位置  
A-D represents that ZmIBH1-1 can bind to the promoter region of target genes *ZmEIN3*, *ZmERF-107*, *ZmCLPB3*, and *ZmAGD12*, respectively. The red box represents the location of ZmIBH1-1 binding peaks

图 6 IGV 展示 ZmIBH1-1 在部分靶基因启动子区域存在 peaks 富集

Fig. 6 IGV showed that ZmIBH1-1 had peaks enrichment in the promoter region of some target genes

随后采用 Dual-Luciferase 试验进一步验证 ZmIBH1-1 对候选靶基因的调控作用（图 7-A）。结果表明, ZmIBH1-1 分别显著增强由 *ZmCa-M*、*ZmSYCO*、*ZmbHLH54*、*ZmGlu-r1*、*ZmCLPB3* 和 *ZmP450-99A2* 的启动子启动的报告基因 *LUC* 的表达（图 7-B），而显著降低由 *ZmAGD12*、*ZmCYS*、*ZmCYSB*、*ZmERF-107* 和 *ZmEIN3* 的启动子启动的报告基因 *LUC* 的表达（图

7-C）；RNA-Seq 结果表明,在干旱胁迫下, *ZmCa-M*、*ZmSYCO*、*ZmbHLH54*、*ZmGlu-r1*、*ZmCLPB3* 和 *ZmP450-99A2* 在 *ZmIBH1-1*-OE 株系中的表达量显著高于 WT, 而 *ZmZmAGD12*、*ZmCYS*、*ZmCYSB*、*ZmERF-107* 和 *ZmEIN3* 在 *ZmIBH1-1*-OE 株系中的表达量显著低于 WT。以上结果表明 ZmIBH1-1 可以直接调控靶基因的表达。



A: 35S 启动子启动海肾荧光素酶 (REN) 作为内参, 基因启动子启动报告基因萤火虫荧光素酶 (LUC) 基因, *ZmIBH1-1* 作为效应因子, 空载体为对照, 在本氏烟草中瞬时表达。B—C: LUC/REN 的比值代表启动子的活性, 每个试验重复 3 次 ( $n=3$ ,  $\pm SD$ ,  $**P<0.01$ )。NC: 阴性对照

A: The 35S: REN-Pro gene *LUC* reporter constructs were transiently expressed in *N.benthamiana* leaves together with control vector or 35S:*ZmIBH1-1* effector, respectively. The expression level of REN was used an internal control; B-C: The LUC/REN ratio represents the relative activity of promoters. Data are values of three independent experiments. Significant differences from the corresponding control values ( $n=3$ ,  $\pm SD$ ,  $**P<0.01$ ). NC: Negative control

图 7 *ZmIBH1-1* 对靶基因的调控

Fig. 7 Regulation of target genes by *ZmIBH1-1*

### 3 讨论

本研究结果表明, 过表达 *ZmIBH1-1* 可以增强玉米的耐旱性, *ZmIBH1-1* 蛋白直接结合 11 个靶基因的启动子调控靶基因的表达, 其中包括 2 个乙烯响应基因 *ZmEIN3* 和 *ZmERF-107*, 因此推测 *ZmIBH1-1* 可能通过乙烯信号通路来响应干旱胁迫。植物在受到干旱胁迫时植物体内的内源乙烯含量会有很大程度的提升<sup>[32]</sup>, 过量的乙烯会诱发植物细胞的衰老和程序性死亡<sup>[33-34]</sup>。在玫瑰中 *RhEIN3* 促进 *RhGAIL* 表达, 而 *RhGAIL* 可以显著抑制乙烯受体蛋白基因 *RhETR* 的表达<sup>[35]</sup>, ETRs 结合乙烯, 减少或抑制乙烯信号转导诱发的细胞死亡<sup>[36]</sup>。*ZmEIN3* 作为 EIN3-like 转录因子, 是乙烯信号通路中的重要转录因子<sup>[37]</sup>。本研究结果表明, 在干旱胁迫下, *ZmEIN3* 的表达被 *ZmIBH1-1* 显著抑制。说明 *ZmIBH1-1* 可能通过直接抑制 *ZmEIN3* 的表达, 间接促进玉米中乙烯受体蛋白基因的表达, 从而减少或抑制乙烯诱发的细胞程序性死亡, 提高玉米的抗旱性。在逆境胁迫下, 植物通过转录因子调控相关基因的表达提高植物体抵御逆境胁迫的能力<sup>[4-10]</sup>。ERF 转录因子在响应逆境胁迫中起到重要作用<sup>[38-39]</sup>。ERF 家族成员通过特异结合基因启动子 GCC-box, 从而参与乙烯应答及非生物胁迫<sup>[38]</sup>。水稻中, 过表达 ERF 转录因子基因 *SNORKEL1* (*SK1*) 和 *SK2* 可以调节内源乙烯等激素合成的功能, 以抵抗淹水胁迫<sup>[39]</sup>。本研究 *ZmIBH1-1* 蛋白通过抑制乙烯响应因子基因 *ZmERF-107* 的表达参与玉米对干旱胁迫响应的调节。

钙离子作为第二信使, 在植物应对非生物胁迫时 (盐、干旱、低温等) 发挥着重要作用<sup>[40-41]</sup>。干旱缺水引起细胞质内钙离子浓度变化从而激活钙依赖性蛋白激酶 (calmodulin-dependent protein kinases, CPKs) 信号导致 ABA 释放, ABA 浓度的积累导致气孔关闭减少水分损失<sup>[42-43]</sup>。本研究中, 在干旱胁迫下, *ZmIBH1-1*-OE 植株的 RWC 显著高于 WT。RNA-Seq 分析发现多个与钙信号相关的基因在 WT 和 *ZmIBH1-1*-OE 株系中存在差异表达, 其中, *ZmIBH1-1* 直接作用于 *ZmCa-M* 和 *ZmAGD12* 的启动子调控其表达, 间接调控钙依赖性蛋白激酶 *Zm00001d014773* 以及钙调素蛋白 *Zm00001d040323* 和 *Zm00001d028948*。说明 *ZmIBH1-1* 可能通过调控钙信号相关基因的表达使气孔关闭减少水分蒸腾, 从而提高玉米 *ZmIBH1-1*-OE 植株的抗旱性。

已有的研究表明, 植物中 bHLH、NAC、WRKY、bZIP、NF-Y、MYB 等转录因子家族的基因通过不同的调控路径, 在植物抵御逆境胁迫反应中发挥着重要的作用<sup>[4-10]</sup>。MAO 等<sup>[4]</sup>克隆了基因 *ZmNAC111*, 该基因过表达明显提高了玉米苗期的抗旱性和水分利用效率, 并诱导应答抗旱基因在干旱胁迫下表达上调。REN 等<sup>[44]</sup>对 NAC 型转录因子 *ZmNST3* 展开了研究, 敲除 *ZmNST3* 导致玉米的耐旱耐盐能力降低。MYB 蛋白是植物抵御各种逆境的重要转录因子。如 *AtMYB60*、*AtMYB12*、*AtMYB75*、*OsMYB3R-2*、*CmMYB2*、*TaMYB22* 等都能通过不同的方式和路径提高植物的抗旱性<sup>[45-49]</sup>。干旱和盐胁迫可以诱导 *ZmMYB3R* 的表达, 拟南芥过表达该基因, CAT、POD 和 SOD 活性升高, 增强了转基因拟南芥对干旱和盐胁迫的耐受性<sup>[10]</sup>。植物特有转录因子 WRKY 在植物非生物胁迫响应过程中发挥重要作用<sup>[50]</sup>。在拟南芥中过表达 *ZmWRKY106*、*ZmWRKY40*, 通过提高 SOD、POD 和 CAT 活性降低 ROS 含量, 进而提高转基因拟南芥的抗旱性和耐热性<sup>[6-7]</sup>。本研究中, 转录组分析表明, 在干旱胁迫下, WT 与 *ZmIBH1-1*-OE 株系的差异表达基因中包括 8 个 NAC、8 个 WRKY、11 个 MYB 类型转录因子 (电子附图 1-B 和电子附表 1)。说明 *ZmIBH1-1* 可能通过间接调控 NAC、MYB 和 WRKY 转录因子参与干旱胁迫响应。

### 4 结论

过表达 *ZmIBH1-1* 可以增强玉米的耐旱性; *ZmIBH1-1* 可以直接结合 11 个靶基因的启动子区域, 调控 11 个靶基因的表达; *ZmIBH1-1* 通过直接调控乙烯信号通路中的基因 *ZmERF-107* 和 *ZmEIN3* 的表达提高玉米的耐旱性; *ZmIBH1-1* 通过直接调控钙信号相关基因 *ZmCa-M* 和 *ZmAGD12* 增强玉米的耐旱性; *ZmIBH1-1* 可能通过间接调控 NAC、WRKY、MYB 等转录因子响应干旱胁迫。

### 参考文献 References

- [1] QU D Y. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Viale delle Terme di Caracalla, Rome, Italy. 2016 [June 2021]. <http://www.fao.org/statistics/databases/en/>.
- [2] 代宇佳, 罗晓峰, 周文冠, 陈锋, 帅海威, 杨文钰, 舒凯. 生物和非生物逆境胁迫下的植物系统信号. 植物学报, 2019, 54(2): 102-111.

- DAI Y J, LUO X F, ZHOU W G, CHEN F, SHUAI H W, YANG W Y, SHU K. Plant systemic signaling under biotic and abiotic stresses conditions. *Chinese Bulletin of Botany*, 2019, 54(2): 102-111. (in Chinese)
- [3] BARTELS D, SUNKAR R. Drought and salt tolerance in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 2005, 24(1): 23-58.
- [4] MAO H, WANG H, LIU S, LI Z, YANG X, YAN J, LI J, TRAN L, QIN F. A transposable element in a NAC gene is associated with drought tolerance in maize seedlings. *Nature Communications*, 2015, 6: 8326.
- [5] MAO H, YU L, HAN R, LI Z, LIU H. ZmNAC55, a maize stress-responsive NAC transcription factor, confers drought resistance in transgenic *Arabidopsis*. *Plant Physiology & Biochemistry*, 2016, 105: 55-66.
- [6] WANG C T, RU J N, LIU Y W, LI M, ZHAO D, YANG J F, FU J D, XU Z S. Maize WRKY transcription factor ZmWRKY106 confers drought and heat tolerance in transgenic plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(10): 3046.
- [7] WANG C T, RU J N, LIU Y W, YANG J F, MENG L, XU Z S, FU J D. The maize WRKY transcription factor ZmWRKY40 confers drought resistance in transgenic *Arabidopsis*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(9): 2580.
- [8] YING S, ZHANG D F, JING F, SHI Y S, SONG Y C, WANG T Y, YU L. Cloning and characterization of a maize bZIP transcription factor, ZmbZIP72, confers drought and salt tolerance in transgenic *Arabidopsis*. *Planta*, 2012, 235(2): 253-266.
- [9] 刘彦丹, 英生, 张登峰, 石云素, 宋燕春, 王志川, 王天宇, 黎裕. 玉米逆境胁迫响应基因 ZmbZIP71 的克隆与表达分析. *植物遗传资源学报*, 2011, 12(5): 775-781.
- LIU Y D, YING S, ZHANG D F, SHI Y S, SONG Y C, BAI Z C, WANG T Y, LI Y. Isolation and expression analysis of a stress-responsive gene ZmbZIP71 in maize (*Zea mays* L.). *Journal of Plant Genetic Resources*, 2011, 12(5): 775-781. (in Chinese)
- [10] WU J, JIANG Y, LIANG Y, CHEN L, CHEN W, CHENG B. Expression of the maize MYB transcription factor ZmMYB3R enhances drought and salt stress tolerance in transgenic plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2019, 137: 179-188.
- [11] ZHANG H, XIANG Y, HE N, LIU X, DAI M. Enhanced vitamin C production mediated by an ABA-induced PTP-like nucleotidase improves drought tolerance of *Arabidopsis* and maize. *Molecular Plant*, 2020, 13(5): 760-776.
- [12] ZHANG X, MI Y, MAO H, LIU S, QIN F. Genetic variation in ZmTIP1 contributes to root hair elongation and drought tolerance in maize. *Plant Biotechnology Journal*, 2020, 18(5): 1271-1283.
- [13] DING S, HE F, TANG W, DU H, WANG H. Identification of maize CC-type glutaredoxins that are associated with response to drought stress. *Genes*, 2019, 10(8): 610.
- [14] LI L, DU Y, HE C, DIETRICH C R, ZHENG J. Maize glossy6 is involved in cuticular wax deposition and drought tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 2019, 70(12): 3089-3099.
- [15] ZHOU L, ZHOU J, XIONG Y, LIU C, WANG J, WANG G, CAI Y, WU K. Overexpression of a maize plasma membrane intrinsic protein ZmPIP1;1 confers drought and salt tolerance in *Arabidopsis*. *PLoS ONE*, 2018, 13(6): e198639.
- [16] WANG H, WANG M, XIA Z. The maize class-I SUMO conjugating enzyme ZmSCE1d is involved in drought stress response. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 21(1): 29.
- [17] LIANG Y, JIANG Y, DU M, LI B, WU J. ZmASR3 from the maize ASR gene family positively regulates drought tolerance in transgenic *Arabidopsis*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(9): 2278.
- [18] FELLER A, MACHEMER K, BRAUN E L, GROTEWOLD E. Evolutionary and comparative analysis of MYB and bHLH plant transcription factors. *Plant Journal for Cell & Molecular Biology*, 2011, 66(1): 94-116.
- [19] WANG F, ZHU H, KONG W, PENG R, LIU Q, YAO Q. The antirrhinum AmDEL gene enhances flavonoids accumulation and salt and drought tolerance in transgenic *Arabidopsis*. *Planta*, 2016, 244(1): 59-73.
- [20] WANG F, ZHU H, CHEN D, LI Z, PENG R, YAO Q. A grape bHLH transcription factor gene, VvbHLH1, increases the accumulation of flavonoids and enhances salt and drought tolerance in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Tissue & Organ Culture*, 2016, 125(2): 387-398.
- [21] DONG Y, WANG C, HAN X, TANG S, LIU S, XIA X, YIN W. A novel bHLH transcription factor PebHLH35 from *Populus euphratica* confers drought tolerance through regulating stomatal development, photosynthesis and growth in *Arabidopsis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2014, 450(1): 453-458.
- [22] CUI X, WANG Y X, LIU Z W, WANG W L, LI H, ZHUANG J. Transcriptome-wide identification and expression profile analysis of

- the bHLH family genes in *Camellia sinensis*. Functional and Integrative Genomics, 2018, 18(5): 489-503.
- [23] LIU W, TAI H, LI S, GAO W, ZHAO M, XIE C, LI W X. bHLH122 is important for drought and osmotic stress resistance in *Arabidopsis* and in the repression of ABA catabolism. New Phytologist, 2014, 201(4): 1192-1204.
- [24] SEO J S, JOO J, KIM M J, KIM Y K, NAHM B H, SANG I S, CHEONG J J, LEE J S, KIM J K, YANG D C. OsbHLH148, a basic helix-loop-helix protein, interacts with OsJAZ proteins in a jasmonate signaling pathway leading to drought tolerance in rice. Plant Journal for Cell & Molecular Biology, 2011, 65(6): 907-921.
- [25] LI Z, LIU C, ZHANG Y, WANG B, RAN Q, ZHANG J. The bHLH family member ZmPTF1 regulates drought tolerance in maize by promoting root development and ABA synthesis. Journal of Experimental Botany, 2019, 70(19): 5471-5486.
- [26] CAO Y, ZENG H, KU L X, REN Z, HAN Y, SU H, DOU D, LIU H, DONG Y, ZHU F. ZmLBH1-1 regulates plant architecture in maize. Journal of Experimental Botany, 2020, 71(10): 2943-2955.
- [27] KENNETH J L, THOMAS D S. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. Methods, 2002, 25: 402-408.
- [28] 韩赞平. 玉米种子活力相关性状 QTL 定位及相关基因的克隆[D]. 郑州: 河南农业大学, 2014.
- HAN Z P. QTL mapping of seed vigor related traits and related gene cloning in maize [D]. Zhengzhou: Henan Agricultural University, 2014. (in Chinese)
- [29] 姚晓云, 蓝海军, 邓伟, 陈红萍, 罗晨曦, 况震, 罗宗铭, 王记林, 陈大洲. 水稻淡白叶突变体的叶绿素含量测定及农艺性状比较分析. 江西农业学报, 2020, 32(12): 12-15.
- YAO X Y, LAN H J, DENG W, CHEN H P, LUO C X, KUANG Z, LUO Z M, WANG L J, CHEN D Z. Determination of chlorophyll content and comparative analysis of agronomic traits of pale-white-leaf mutant in rice. Acta Agriculturae Jiangxi, 2020, 32(12): 12-15. (in Chinese)
- [30] 焦洁. 考马斯亮蓝 G-250 染色法测定苜蓿中可溶性蛋白含量. 农业工程技术, 2016, 36(17): 33-34.
- JIAO J. Determination of soluble protein content in Alfalfa by Coomassie brilliant blue G-250 staining. Agricultural Engineering Technology, 2016, 36(17): 33-34. (in Chinese)
- [31] YE J. WEGO: A web tool for plotting GO annotations. Nucleic Acids Research, 2006, 34(Web Server issue): W293-W297.
- [32] PIERIK R, SASIDHARAN R, VOESENEK L. Growth control by ethylene: Adjusting phenotypes to the environment. Journal of Plant Growth Regulation, 2007, 26(2): 188-200.
- [33] LANAHAN M B. The never ripe mutation blocks ethylene perception in tomato. The Plant Cell, 1994, 6(4): 521-530.
- [34] GRBI V, Bleecker A B. Ethylene regulates the timing of leaf senescence in *Arabidopsis*. The Plant Journal, 1995, 8(4): 595-602.
- [35] LUO J, MA N, PEI H, CHEN J, LI J, GAO J. A DELLA gene, RhGAI1, is a direct target of EIN3 and mediates ethylene-regulated rose petal cell expansion via repressing the expression of RhCesA2. Journal of Experimental Botany, 2013, 64(16): 5075-5084.
- [36] HUA J, MEYEROWITZ E M. Ethylene responses are negatively regulated by a receptor gene family in *Arabidopsis thaliana*. Cell (Cambridge), 1998, 94(2): 261-271.
- [37] GUO H W. Paradigms and paradox in the ethylene signaling pathway and interaction network. Molecular Plant, 2011, 4(4): 626-634.
- [38] OHME-TAKAGI M, SHINSHI H. Ethylene-inducible DNA binding proteins that interact with an ethylene-responsive element. The Plant Cell, 1995, 7(2): 173-182.
- [39] HATTORI Y, NAGAI K, FURUKAWA S, SONG X J, KAWANO R, SAKAKIBARA H, WU J, MATSUMOTO T, YOSHIMURA A, KITANO H, MATSUOKA M, MORI H, ASHIKARI M. The ethylene response factors SNORKEL1 and SNORKEL2 allow rice to adapt to deep water. Nature, 2009, 460(7258): 1026-1030.
- [40] KNIGHT H. Calcium signaling during abiotic stress in plants. International Review of Cytology-a Survey of Cell Biology, 1999, 195: 269-324.
- [41] REDDY A, ALI G S, CELESNIK H, DAY I S. Coping with stresses: Roles of calcium- and calcium/calmodulin-regulated gene expression. The Plant Cell, 2011, 23(6): 2010-2032.
- [42] DUBROVINA A S, KISELEV K V, KHRISTENKO V S, ALEYNOVA O A. VaCPK20, a calcium-dependent protein kinase gene of wild grapevine *Vitis amurensis* Rupr., mediates cold and drought stress tolerance. Journal of Plant Physiology, 2015, 185: 1-12.
- [43] ZOU J J, LI X D, RATNASEKERA D, WANG C, LIU W X, SONG L F, ZHANG W Z, WU W H. *Arabidopsis* CALCIUM-DEPENDENT PROTEIN KINASE8 and CATALASE3 function in abscisic acid-mediated signaling and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> homeostasis in stomatal guard cells under drought stress. The Plant Cell, 2015, 27(5): 1445-1460.
- [44] REN Z, ZHANG D, CAO L, ZHANG W, KU L. Functions and



- regulatory framework of ZmNST3 in maize under lodging and drought stress. *Plant Cell and Environment*, 2020, 43(9): 2272-2286.
- [45] OH JE, KWON Y, KIM JH, NOH H, HONG SW, LEE H. A dual role for MYB60 in stomatal regulation and root growth of *Arabidopsis thaliana* under drought stress. *Plant Molecular Biology*, 2011, 77(1/2): 91-103.
- [46] NAKABAYASHI R, YONEKURA-SAKAKIBARA K, URANO K, SUZUKI M, YAMADA Y, NISHIZAWA T, MATSUDA F, KOJIMA M, SAKAKIBARA H, SHINOZAKI K. Enhancement of oxidative and drought tolerance in *Arabidopsis* by overaccumulation of antioxidant flavonoids. *The Plant Journal*, 2014, 77(3): 367-379.
- [47] DAI X Y, XU Y Y, MA Q B, XU W Y, WANG T, XUE Y B, CHONG K. Overexpression of an R1R2R3 MYB gene, OsMYB3R-2, increases tolerance to freezing, drought, and salt stress in transgenic *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 2007, 143(4): 1739-1751.
- [48] HONG S, CHEN S, JIANG J, CHEN F, CHEN Y, GU C, LI P, SONG A, ZHU X, GAO H. Heterologous expression of the chrysanthemum R2R3-MYB Transcription Factor CmMYB2 enhances drought and salinity tolerance, increases hypersensitivity to ABA and delays flowering in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Biotechnology*, 2012, 51(2): 160-173.
- [49] QIN Y, WANG M, TIAN Y, HE W, LU H, XIA G. Over-expression of TaMYB33 encoding a novel wheat MYB transcription factor increases salt and drought tolerance in *Arabidopsis*. *Molecular Biology Reports*, 2012, 39(6): 7183-7192.
- [50] FINATTO T, VIANA V E, WOYANN L G, BUSANELLO C, OLIVEIRA A. Can WRKY transcription factors help plants to overcome environmental challenges? *Genetics & Molecular Biology*, 2018, 41(3): 533-544.

(责任编辑 李莉)



A: B104和*ZmIBH1-1*过表达株系在干旱胁迫下差异表达基因的基因功能注释分析; B: 热图显示了与胁迫和光合作用相关的基因的表达式差异, 颜色越深表达量越高; C: 在正常和干旱胁迫下差异表达基因的信号通路富集分析, 圆圈大小代表基因的个数, 颜色深浅代表富集的显著性, 越红越显著。

A: GO annotation analysis of DEGs in B104 and *ZmIBH1-1* overexpression lines under drought stress; B: Heat map show the expression difference of photosynthesis and response to stress related genes. The deeper the color, the higher the expression; C: KEGG pathways with significantly enriched DEGs between B104 and *ZmIBH1-1-OE* under normal and drought stress. The circle size represents the number of genes, the color depth represents the significance of enrichment, the redder the more significant.

附图1 B104与*ZmIBH1-1*过表达株系在干旱胁迫和正常条件下的转录组数据分析

Supplementary Fig. 1 RNA-Seq analysis of B104 and *ZmIBH1-1* overexpression lines under normal and drought

附表 1 正常和干旱条件下, B104 和 *ZmIBH1-1* 过表达株系中胁迫和光合作用相关的差异表达基因

Supplementary table 1 Differentially expressed genes related to stress and photosynthesis in B104 and *ZmIBH1-1* overexpression lines under normal and drought stress

基因名称	基因 ID	基因描述	正常条件 normal conditions		干旱条件 drought stress	
			B104	<i>ZmIBH1-1-OE</i>	B104	<i>ZmIBH1-1-OE</i>
ERF-r1	Zm00001d051584	乙烯响应蛋白	9.73827	9.69101	50.5363	16.4478
ERF-r2	Zm00001d009103	类乙烯响应因子蛋白 1%3B 推定的 AP2/EREBP 转录因子超家族蛋白	1.62794	1.46868	40.3757	1.83912
		factor-like protein 1%3B Putative AP2/EREBP transcription factor superfamily protein				
ERF-1	Zm00001d026191	乙烯响应转录因子 1A	3.1141	4.3891	28.0284	8.58974
ERF-3	Zm00001d015639	乙烯响应转录因子 3	5.89355	4.57925	14.5053	4.9654
ERF-r3	Zm00001d042717	乙烯响应转录因子 ABR1	6.9844	5.34725	19.6983	1.18884
ERF-25	Zm00001d017591	乙烯响应转录因子 ERF025	2.16	1.91733	15.3663	1.564006
ERF-55	Zm00001d048208	乙烯响应转录因子 ERF055	16.90861	12.8044	13.0494	2.29171
ERF-61	Zm00001d039077	乙烯响应转录因子 ERF061	5.43717	4.11421	29.474	12.9972
ERF-115	Zm00001d016616	乙烯响应转录因子 ERF115	0.429199	0.845956	8.33073	0.274008
ERF-r4	Zm00001d025050	乙烯受体同源物 2	6.24097	3.36015	15.2785	4.02251
ERF-107	Zm00001d017466	AP2-EREBP 转录因子 107	0.551548	1.08062	6.05003	0.810114
ERF-r4	Zm00001d038907	包含 AP2/ERF 和 B3 结构域的转录抑制子 TEM1	1.72308	1.06207	10.936	0.909127
		transcription repressor TEM1				

ERF-r5	Zm00001d036298	推定的 AP2/EREBP 转录因子超家族蛋白 superfamily protein	Putative AP2/EREBP transcription factor	2.50443	3.75229	9.39798	2.74154
ERF-r6	Zm00001d045204	推定的 AP2/EREBP 转录因子超家族蛋白 superfamily protein	Putative AP2/EREBP transcription factor	6.67324	7.96818	66.4355	10.155
ERF-r7	Zm00001d052167	推定的 AP2/EREBP 转录因子超家族蛋白 superfamily protein	Putative AP2/EREBP transcription factor	0.36	0.230475	16.8768	0.346164
ERF-r8	Zm00001d025281	推定的 AP2/EREBP 转录因子超家族蛋白 superfamily protein	Putative AP2/EREBP transcription factor	1.905287	1.73539	10.3986	0.864657
ERF-r9	Zm00001d053195	推定的 AP2/EREBP 转录因子超家族蛋白 superfamily protein	Putative AP2/EREBP transcription factor	1.51574	0.277069	73.3231	0.761239
ERF-r10	Zm00001d008546	推定的 AP2/EREBP 转录因子超家族蛋白异构体 1%3B/异构体 2 transcription factor superfamily protein isoform 1%3B/isoform 2	Putative AP2/EREBP	33.4662	18.9666	90.5302	30.342
ABA-r1	Zm00001d003712	脱落酸胁迫催熟 3 abscisic acid stress ripening3		187.026	215.65	1836.56	470.229
ABA-r2	Zm00001d016760	脱落酸胁迫催熟 6 abscisic acid stress ripening6		2.49241	1.12588	23.861	1.93199
ABA-r3	Zm00001d012296	ABA 响应元件结合因子%3B 推测的 bZIP 转录因子超家族蛋白 ABA response element binding factor%3B Putative bZIP transcription factor superfamily protein	ABA response element	0.0116976	0.03	8.38649	0.110156
Ca-r1	Zm00001d053293	类钙调磷酸酶 B-12 calcineurin B-like12		5.03927	3.24329	52.0673	12.5683
Ca-r2	Zm00001d014773	钙依赖蛋白激酶 1 calcium dependent protein kinase1		17.5834	18.3733	30.7906	11.8491
Ca-r3	Zm00001d018625	类钙调神经磷酸酶金属磷酸酯酶超家族蛋白 superfamily protein	Calcineurin-like metallo-phosphoesterase	14.4002	17.4863	5.56094	13.1305
Ca-r4	Zm00001d006238	类钙脂结合蛋白 Calcium lipid binding protein-like		80.5314	103.482	163.824	59.6623
Ca-r5	Zm00001d014325	钙结合 EF 家族蛋白 Calcium-binding EF-hand family protein		59.2436	62.3622	245.792	77.6535
Ca-r6	Zm00001d047535	钙结合蛋白 CML42 Calcium-binding protein CML42		0.852177	0.854518	8.38224	1.86107
Ca-r7	Zm00001d051846	钙依赖性脂质结合 (CaLB 结构域) 家族蛋白 Calcium-dependent lipid-binding (CaLB domain) family protein	Calcium-dependent lipid-binding (CaLB	16.9772	14.1308	7.51552	15.0993
Ca-r8	Zm00001d052457	质膜型钙转运 ATPase 4 Calcium-transporting ATPase 4 plasma membrane-type		32.6718	49.1057	77.1805	30.7203

Ca-r9	Zm00001d023258	质膜型钙转运 ATPase 4	Calcium-transporting ATPase 4 plasma membrane-type	19.2957	17.8524	6.34276	15.0819
Ca-r10	Zm00001d026253	质膜型钙转运 ATPase 9	Calcium-transporting ATPase 9 plasma membrane-type	0.981728	0.838105	11.533	2.40394
Ca-r11	Zm00001d040323	钙调素-1	Calmodulin-1	66.735	74.6984	145.59	54.1179
Ca-r12	Zm00001d043144	钙调素-7	Calmodulin-7	3.59366	2.78696	28.7627	6.65772
Ca-r13	Zm00001d028948	钙调素-7	Calmodulin-7	42.5292	32.2993	108.61	31.0874
Ca-r14	Zm00001d008278	钙调素-7	Calmodulin-7	13.1702	11.2819	58.0127	17.2773
Ca-r15	Zm00001d049940	可能的钙结合蛋白 CML48	Probable calcium-binding protein CML48	41.1074	19.9842	111.613	23.4095
Ca-r16	Zm00001d052458	可能的钙结合蛋白 CML50	Probable calcium-binding protein CML50	31.8017	14.736	81.6271	33.2299
Ca-r25	Zm00001d033818	跨膜和螺旋结构域蛋白 1	Transmembrane and coiled-coil domains protein 1	1.73809	2.10173	15.6159	3.07833
Ca-r26	Zm00001d013364	类 CSC1 蛋白 RXW8	CSC1-like protein RXW8	22.7799	28.2947	4.50398	13.2622
Glu-r1	Zm00001d036951	谷胱甘肽转移酶 19	glutathione transferase19	79.1369	79.8878	273.204	325.696
Glu-1	Zm00001d043382	谷氨酸草酰乙酸转氨酶 1	glutamate-oxaloacetate transaminase1	28.9854	41.2541	342.735	94.5672
Glu-2	Zm00001d024839	谷胱甘肽 S-转移酶 2	glutathione S-transferase2	6.30069	5.37887	135.81	18.0371
Glu-23	Zm00001d020780	谷胱甘肽转移酶 23	glutathione transferase23	14.7672	8.56796	352.652	29.0777
Glu-30	Zm00001d029708	谷胱甘肽转移酶 30	glutathione transferase30	1.470291	1.89651	22.5236	5.75882
Glu-6	Zm00001d018809	谷胱甘肽转移酶 6	glutathione transferase6	4.09163	3.15277	43.9796	123.961
Glu-7	Zm00001d042104	谷胱甘肽转移酶 7	glutathione transferase7	18.63392	15.7371	318.254	33.4171
Glu-r2	Zm00001d034035	谷胱甘肽转运蛋白 1	glutathione transporter1	153.544	174.775	21.0028	114.162
Glu-r3	Zm00001d029707	谷胱甘肽 S-转移酶 GST 38	Glutathione S-transferase GST 38	15.3868	17.7359	20.4421	42.5639
Glu-r4	Zm00001d029696	谷胱甘肽 S-转移酶 U16	Glutathione S-transferase U16	5.23822	3.23902	19.6417	7.359
Glu-r5	Zm00001d042096	谷胱甘肽 S-转移酶 U16	Glutathione S-transferase U16	7.9038	8.94233	44.303	107.654
Glu-r6	Zm00001d009797	乳糖谷胱甘肽裂解酶/乙二醛酶 I 家族蛋白	Lactoylglutathione lyase / glyoxalase I family protein	12.8765	12.3662	19.0192	3.11151
Per-r1	Zm00001d014608	过氧化物酶 16	Peroxidase 16	3.86411	1.33217	21.6073	2.68255
Glu-r7	Zm00001d002704	谷胱甘肽过氧化物酶	Glutathione peroxidase	71.1466	99.2398	1065.77	165.984
Glu-r8	Zm00001d002426	类囊体内腔 29kDa 蛋白叶绿体	Thylakoid lumenal 29 kDa protein chloroplastic	773.415	749.631	83.6147	180.872



Per-r2	Zm00001d042022	过氧化物酶 12	Peroxidase 12	11.5497	16.1038	22.5856	8.44152
Per-r3	Zm00001d016802	L-抗坏血酸过氧化物酶 S 叶绿体/线粒体	L-ascorbate peroxidase S chloroplastic /mitochondrial	560.847	543.718	110.752	228.829
Glu-r9	Zm00001d026154	谷胱甘肽过氧化物酶	Glutathione peroxidase	7.61939	9.52189	15.586	4.65614
Per-r4	Zm00001d008173	过氧化物酶 2	Peroxidase 2	4.25335	1.31618	5.01524	49.6826
Per-r5	Zm00001d022457	过氧化物酶 3	peroxidase3	12.9545	5.46758	185.672	28.3143
Nac-32	Zm00001d038221	NAC 结构域蛋白 32	NAC domain containing protein 32	3.17698	4.03037	196.717	12.5324
Nac-84	Zm00001d049860	NAC 结构域蛋白 84	NAC domain containing protein 84	24.3636	13.7538	53.7589	5.78016
Nac-r1	Zm00001d022424	NAC 转录因子	NAC domain transcription factor	6.60315	10.0357	25.3986	3.48081
Nac-2	Zm00001d013003	NAC 结构域蛋白 2	NAC domain-containing protein 2	66.4164	6.95645	403.963	61.3288
Nac-79	Zm00001d050893	NAC 结构域蛋白 79	NAC domain-containing protein 79	13.6211	8.54337	115.226	26.8325
Nac-29	Zm00001d023294	NAC 转录因子 29	NAC transcription factor 29	19.0397	10.7846	59.2072	4.6765
Nac-r2	Zm00001d023669	推测的 NAC 结构域转录因子超家族蛋白	Putative NAC domain transcription factor superfamily protein	18.041	7.37085	34.382	4.58105
Nac-r3	Zm00001d008399	推测的 NAC 结构域转录因子超家族蛋白	Putative NAC domain transcription factor superfamily protein	1.25173	1.47926	15.2737	0.181713
Wrky-r1	Zm00001d006001	可能的 WRKY 转录因子 34	Probable WRKY transcription factor 34	23.4039	20.3776	20.1214	5.97298
Wrky-r2	Zm00001d043950	可能的 WRKY 转录因子 71	Probable WRKY transcription factor 71	0.805607	1.22828	7.5454	1.42646
Wrky-r3	Zm00001d044162	可能的 WRKY 转录因子 71	Probable WRKY transcription factor 71	0.0516861	0.0294458	15.1621	0.237672
Wrky-r4	Zm00001d011527	可能的 WRKY 转录因子 71	Probable WRKY transcription factor 71	0.455454	1.91673	7.30515	0.542759
Wrky-r5	Zm00001d011625	推测的 WRKY 手蛋白激酶家族蛋白	Putative WAKY receptor-like protein kinase family protein	12.9684	6.20573	29.3899	7.3995
Wrky-r6	Zm00001d049173	推测的 WRKY-DNA 结合超家族蛋白	Putative WRKY DNA-binding domain superfamily protein	5.97217	7.22195	11.8081	0.974042
Wrky-r7	Zm00001d046805	推测的 WRKY-DNA 结合超家族蛋白	Putative WRKY DNA-binding domain superfamily protein	2.86443	0.121102	6.21568	0.0440563

WtKy-r8	Zm00001d020136	具有 WRKY 和锌指结构域的 TFs 的 WRKY74 超家族 having WRKY and zinc finger domains	WRKY74-superfamily of TFs	3.17624	18.1573	4.16009
Myb-15	Zm00001d014029	MYB 结构域蛋白 15 myb domain protein 15	1.248231	2.47872	16.5157	0.356266
Myb-16	Zm00001d033124	MYB 结构域蛋白 60 myb domain protein 60	13.7483	16.716	7.08571	15.0837
Myb-r1	Zm00001d011614	推定的 MYB-DNA 结合域超家族蛋白 Putative MYB DNA-binding domain superfamily protein	3.0037	3.13318	7.71219	1.33171
Myb-r2	Zm00001d048647	推定的 MYB-DNA 结合域超家族蛋白 Putative MYB DNA-binding domain superfamily protein	9.88593	2.50212	28.8073	0.793834
Myb-r3	Zm00001d008808	推定的 MYB-DNA 结合域超家族蛋白 Putative MYB DNA-binding domain superfamily protein	4.35559	4.60127	13.7369	5.37016
Myb-r4	Zm00001d038288	推定的 MYB-DNA 结合域超家族蛋白 Putative MYB DNA-binding domain superfamily protein	7.590499	8.43347	138.319	1.41267
Myb-r5	Zm00001d046981	推定的 MYB-DNA 结合域超家族蛋白 Putative MYB DNA-binding domain superfamily protein	3.77568	0.983473	58.3882	0.845381
Myb-44	Zm00001d036768	MYB 转录因子 44 Transcription factor MYB44	4.87575	6.2547	57.2278	0.949212
Myb-86	Zm00001d038878	MYB 转录因子 86 Transcription factor MYB86	0.105285	0.281343	0.553612	4.29412
Myb-100	Zm00001d030644	MYB 转录因子 100 MYB-transcription factor 100	1.17841	1.96214	13.0034	0.981337
Myb-6	Zm00001d042665	MYB 转录抑制因子 6 Transcription repressor MYB6	4.79475	3.89775	21.2493	7.85925
Phl-r1	Zm00001d046786	光系统 I 叶绿素 a/b 结合蛋白 3-1 叶绿体 Photosystem I chlorophyll a/b-binding protein 3-1 chloroplastic	12020.4	10525.5	671.507	2138.93
Phl-r2	Zm00001d005814	光系统 I 叶绿素 a/b 结合蛋白 6 叶绿体 Photosystem I chlorophyll a/b-binding protein 6 chloroplastic	404.65	364.6	192.228	474.775
Phl-r3	Zm00001d005446	光系统 I 反应中心亚基 IV A Photosystem I reaction center subunit IV A	6411.02	5966.38	671.097	1652.55
Phl-r4	Zm00001d005996	光系统 I 反应中心亚基 IV Photosystem I reaction center subunit V	5591.15	5054	500.39	1138.6
Phl-r5	Zm00001d008706	光系统 I 反应中心亚基 XI 叶绿体 Photosystem I reaction center subunit XI chloroplastic	2638.61	2468.12	250.244	648.429
Phl-r1	Zm00001d035135	光系统 II 核心复合蛋白 psbY%3B 光系统 II 核心复合蛋白 psbY Photosystem II core	686.605	617.207	91.4961	198.364

complex protein psbY%3B Photosystem II core complex proteins psbY							
PhII-r2	Zm000001d042178	光系统 II 反应中心 psb28 蛋白	Photosystem II reaction center psb28 protein	237.128	180.954	55.2406	132.492
PhII-r3	Zm000001d047532	光系统 II 修复蛋白 PSB27-H1 叶绿体	Photosystem II repair protein PSB27-H1 chloroplastic	501.476	494.965	28.7935	92.7796
PhII-r4	Zm000001d029049	光系统 II 修复蛋白 PSB27-H1 叶绿体	Photosystem II repair protein PSB27-H1 chloroplastic	628.35	618.428	78.6443	212.644
Ox-r1	Zm000001d021703	析氧复合物 2	oxygen evolving complex2	3817.36	3307.28	406.843	984.66
PhI-r6	Zm000001d003767	光系统 I 亚基 O	Photosystem I subunit O	9211.09	8179.86	261.801	1238.02
Ch-r1	Zm000001d011819	叶绿体叶绿素 a 加氧酶	Chlorophyllide a oxygenase chloroplastic	229.135	195.741	5.44597	22.7628
Dh-r1	Zm000001d027363	二氢二羧酸还原酶 1	dihydropicolinate reductasel	67.9778	43.3382	8.3719	41.5761
Lh-r1	Zm000001d007267	捕光叶绿素 a/b 结合蛋白 5	light harvesting chlorophyll a/b binding protein5	3101.57	3664.1	51.1829	190.585
Lh-r2	Zm000001d026599	捕光叶绿素 a/b 结合蛋白 6	light harvesting chlorophyll a/b binding protein6	4249.76	4103.33	25.9824	125
Lh-r3	Zm000001d018157	捕光复合物 a/b 蛋白 4	light harvesting complex a/b protein4	787.923	954.357	171.173	460.456
Lh-r4	Zm000001d006663	捕光复合物 A1	light harvesting complex A1	7717.53	7094.49	297.495	876.81
PhII-r5	Zm000001d021763	光系统 II 亚基 29	photosystem II subunit29	6970.67	6228.95	378.763	1474.96
Ph-r1	Zm000001d018727	植物磺基肽前体 1	phytosulfokine peptide precursor1	0.281145	0.0896541	8.58271	0.569947
Ch-r2	Zm000001d021906	叶绿素 a-b 结合蛋白	Chlorophyll a-b binding protein	5543.72	4780.28	163.624	516.571
Ch-r3	Zm000001d050403	叶绿素 a-b 结合蛋白 4	Chlorophyll a-b binding protein 4	4953.9	4234.31	191.534	672.066
Ch-r4	Zm000001d032197	叶绿素 a-b 结合蛋白 4 叶绿体	Chlorophyll a-b binding protein 4 chloroplastic	8864.33	7764	290.033	907.104
Ch-r5	Zm000001d048998	叶绿素 a-b 结合蛋白 CP26 叶绿体	Chlorophyll a-b binding protein CP26 chloroplastic	5687.92	4903.08	168.113	626.039
Ch-r6	Zm000001d021784	LHCII III 型叶绿素 a-b 结合蛋白	Chlorophyll a-b binding protein of LHCII type III	8837.57	7823.56	113.686	387.488
Lh-r4	Zm000001d039040	捕光复合物叶肉 7	Light harvesting complex mesophyll7	7782.77	6826	244.703	624.782
Lh-r5	Zm000001d001857	光捕获复合光系统 II 亚基 6	light harvesting complex photosystem II subunit 6	918.795	1249.86	27.8348	88.4894
Ox-r2	Zm000001d018779	析氧增强蛋白 2-1 叶绿体	Oxygen-evolving enhancer protein 2-1 chloroplastic	3548.19	3342.61	419.185	1145.11

附表 2 干旱条件下, *ZmIBH1-1* 直接调控的差异表达基因

Supplementary table 2 DEGs directly regulated by *ZmIBH1-1* under drought stress

基因名称 Gene name	基因 ID Gene ID	正常条件 normal conditions		干旱条件 drought stress		基因描述 Gene description	绑定位点距 TSS Distance to TSS
		B104	<i>ZmIBH1-1-OE</i>	B104	<i>ZmIBH1-1-OE</i>		
ZmCa-M	Zm00001d025340	73.9638	68.0368	34.5461	55.2747	钙调神经磷酸酶金属磷酸酯酶超家族蛋白 Calcineurin-like metallo-phosphoesterase superfamily protein	753
ZmAGD12	Zm00001d051676	8.2644	7.88823	21.1185	7.44443	钙依赖性 ARF 型 GTPase 激活蛋白家族 Calcium-dependent ARF-type GTPase activating protein family	240
ZmSYCO	Zm00001d034736	22.3135	20.5554	11.3073	23.726	半胱氨酸 tRNA 合成酶/叶绿体蛋白质合成 I CysteinyI-tRNA synthetase/chloroplast protein synthesis I	1695
ZmCYS	Zm00001d049110	1.21176	0.446181	19.8098	1.70471	巯基蛋白酶抑制剂 cysteine proteinase inhibitor	134
ZmCYSB	Zm00001d038173	76.0838	143.713	212.356	63.2436	胱抑素 5 cystatin5	721
ZmbHLH54	Zm00001d011847	2.50257	2.31164	0.13551	9.53378	bHLH 转录因子 54 bHLH-transcription factor 54	2581
ZmERF-107	Zm00001d017466	0.551548	1.08062	6.05003	0.810114	AP2-EREBP 转录因子 107 AP2-EREBP-transcription factor 107	297
ZmGlu-r1	Zm00001d036951	79.1369	79.8878	273.204	425.696	谷胱甘肽转移酶 19 glutathione transferase 19	1411
ZmCLPB3	Zm00001d047302	8.55164	13.9107	5.83901	11.4596	酪蛋白裂解蛋白酶 B3 casein lytic proteinase B3	1506
ZmP450-99A2	Zm00001d029519	91.3301	75.7081	23.2331	56.3637	细胞色素 p450 类 99a2 cytochrome p450 99a2-like	400
ZmEIN3	Zm00001d028974	76.7705	52.0303	120.403	65.0731	乙烯不敏感 3 ethylene insensitive-like3	2257

注: TSS 转录起始位点

Note: TSS: transcription start site