

网络出版时间:2018-05-25 09:43

DOI:10.13207/j.cnki.jnwfufu.2018.11.010

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20180525.0939.020.html>

干旱胁迫下平邑甜茶叶片差异表达蛋白分析

杨小妮, 王俊花, 杨剑锋, 祁香宁, 段宇敏, 韩明玉, 张林森

(西北农林科技大学 园艺学院, 陕西 杨凌 712100)

【摘要】【目的】探究平邑甜茶在干旱胁迫下的蛋白应激反应,为苹果砧木抗旱分子改良提供参考。【方法】以苹果砧木平邑甜茶为试材,在正常灌水后对其进行干旱胁迫处理(Mh-GD),以持续灌水为对照(Mh-CK),采用生理学和蛋白质组学相结合的研究方法,测定土壤水势、黎明前叶水势、光合作用及其叶片荧光参数,运用 iTRAQ 技术筛选鉴定响应干旱胁迫的差异表达蛋白,并对成功鉴定的蛋白进行 GO 注释及参与 KEGG 通路分析。【结果】①与 Mh-CK 处理相比,Mh-GD 处理平邑甜茶叶片相对含水量(RWC)、黎明前叶水势(ψ_{leaf})、光合速率(Pn)、气孔导度(Gs)、蒸腾速率(Tr)均显著下降。②Mh-GD 处理植株叶片 PSⅡ 的最大光合效率(F_v/F_m)、潜在活性(F_v/F_0)、性能指标(PI)、单位反应中心吸收的光能(ABS/RC)均降低,而荧光动力学曲线升高。③运用 iTRAQ 技术共鉴定出 1 897 个蛋白,其中 181 个蛋白质表达量在 Mh-CK、Mh-GD 处理叶片间有显著差异,上调蛋白 81 个($P < 0.05$,差异倍数 > 1.5),下调蛋白 100 个($P < 0.05$,差异倍数 < 0.67)。181 个蛋白中,86 个蛋白功能已知,95 个蛋白功能未知;已知功能可归为 10 类。【结论】在干旱胁迫下,平邑甜茶的差异表达蛋白质主要参与了光合作用、抗逆、信号转导和碳代谢等过程。

【关键词】 苹果砧木;蛋白组;叶片;水分逆境

【中图分类号】 S661.1

【文献标志码】 A

【文章编号】 1671-9387(2018)11-0070-11

Proteomic analysis of apple leaf under water stress

YANG Xiaoni, WANG Junhua, YANG Jianfeng, QI Xiangning, DUAN Yumin,

HAN Mingyu, ZHANG Linsen

(College of Horticulture, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: 【Objective】The proteomic response of *Malus hupehensis* (Mh) involved in water deficit stress was evaluated to provide basis for improving apple rootstock drought resistant breeding. 【Method】The apple rootstock of *Malus hupehensis* was used for test with the control (Mh-CK) of continuous irrigation and gradual drought (Mh-GD) treatment of persistent drought after irrigation. The combined methods of physiology and proteomics were adopted to measure soil and leaf water potential, photosynthesis and chlorophyll fluorescence parameters. The iTRAQ technology was used to identify the differentially expressed proteins in *Malus hupehensis* leaf under water stress. The proteins were also analyzed by GO annotation and KEGG pathway analysis. 【Result】① Leaf relative water content (RWC), predawn leaf potential (ψ_{leaf}), photosynthesis (Pn), transpiration rate (Tr) and stomatal conductance (Gs) of Mh-GD plants were decreased significantly compared with Mh-CK. ② Chlorophyll fluorescence parameters such as PSⅡ the maximum photosynthetic efficiency (F_v/F_m), PSⅡ potential activity (F_v/F_0), performance index (PI), absorption flux per RC (ABS/RC) of Mh-GD were lower than those of Mh-CK, while the chlorophyll fluorescence intensity was higher. ③ A total of 1 897 proteins were identified by iTRAQ, of which 181 were significantly differently expressed in Mh-CK and Mh-GD leaves. Among the 181 proteins, 81 were up-regulated and 100 were down-regulated.

〔收稿日期〕 2017-07-12

〔基金项目〕 国家苹果产业技术体系项目(CARS-27);陕西省科技统筹创新工程计划项目(2015KJZDNY02-03-02)

〔作者简介〕 杨小妮(1990—),女,陕西宝鸡人,硕士,主要从事果树水分生理研究。E-mail:13605488837@163.com

〔通信作者〕 张林森(1964—),男,江苏镇江人,硕士生导师,主要从事果树生理、肥水高效利用研究。E-mail:linsenzhang@163.com

ted ($P < 0.05$, change fold > 1.5) and 100 were down-regulated ($P < 0.05$, change fold < 0.67). Among the 181 DEPs, 86 functions are known, and 95 functions are unknown. Known functions can be classified into 10 categories. 【Conclusion】 Under gradual drought stress, the Mh proteins responding to water stress mainly involved in photosynthesis pathway, resistance, signal-regulated and carbon metabolism.

Key words: apple rootstock; proteome; leaf; water deficit stress

干旱是影响全世界农业生产最普遍的一种环境胁迫^[1],其会加速植物叶片衰老,减少作物产量,降低经济效益^[2]。植物在长期进化过程中为了适应干旱胁迫形成了一套防御机制,当受到干旱胁迫时,植物体内会发生生理生化反应以响应胁迫。在干旱胁迫下,植物感受系统在感受到化学信号后会将信号进一步传递给转录调控因子,诱导信号传导相关的基因表达(调节基因),利用高通量方法可识别关键调控过程的步骤和基因^[3-5]。然而,越来越多的证据表明,由于蛋白质丰度调节的复杂性,转录组通常与蛋白质组表现不一致^[6],这是因为转录后调控会导致转录与其同源蛋白相关性变差^[7]。由于蛋白质组分析可提供数百到数千蛋白质的综合定性和定量信息,因此它成为研究各种生物过程的重要工具,不仅可以补充转录组调查,还能更直接地了解与特定试验条件相关的代谢过程^[8]。因此,蛋白质组学被证明是探索生物化学途径和植物对各种非生物胁迫的复杂响应机制的有力工具^[9]。

西北黄土高原是世界上苹果连片种植面积最大的区域,其苹果栽种面积居我国第一,为 8.193 万 hm^2 ,总产量达 700.32 万 t,面积和产量分别占全国的 39% 和 35%^[10]。但是该地区降雨少而蒸发强,水资源亏缺严重限制了苹果产业的可持续发展。为适应干旱环境,生产中一般采用抗性砧木嫁接繁殖,平邑甜茶即是常用的一种重要砧木,其具有无融合生产特性,苗木生长高度一致,非常适合用于逆境处理研究。目前对果树的抗旱研究主要集中在生理生化方面^[11-12],而关于果树在干旱胁迫下的分子机理,尤其是在蛋白组水平反应变化的研究鲜见报道。所以,本研究采用同位素标记相对和绝对定量方法(iTRAQ-based),评估苹果砧木在干旱胁迫下的蛋白质应激反应,分析差异蛋白及其参与的生化途径,以理解苹果砧木应答干旱胁迫的分子调控机制,为今后苹果砧木的抗旱分子改良提供基础信息。

1 材料与方法

1.1 试验材料及处理

2016 年 3 月从西北农林科技大学国家苹果产

业技术体系示范苗圃基地($34^{\circ}20'N$, $108^{\circ}24'E$),挑选生长势基本一致的 2 年生健康平邑甜茶(*Malus hupehensis*)砧木平茬,移栽到直径 25 cm、高 30 cm 的盆中,将土、沙和基质按质量比 3 : 1 : 1 拌匀,每盆装 12 kg。每个盆用黑色塑料膜和反光膜包裹以避免土壤蒸发和温度过高的影响。置于防雨棚中培养。试验前给予标准的园艺病虫害管理。

同年 8 月份,随机选取长势一致的平邑甜茶盆栽苗,设置 2 个水分处理(对照 Mh-CK 和逐渐干旱 Mh-GD),随机区组排列,3 次重复。试验前即 2016-08-02 之前每天充分灌溉所有试验材料,开始试验后,Mh-GD 处理不再浇水,一直保持干旱;Mh-CK 处理通过每天称重,补充灌溉其蒸散量,始终保持土壤湿润。13 d 后,Mh-GD 处理植株叶片出现萎蔫情况时采样。轻轻擦洗干净植株顶部叶片,采集后迅速用锡箔纸包好放进液氮速冻,带回存入超低温冰箱备用。

1.2 土壤水势、黎明前叶水势、叶片相对含水量及光合作用的测定

2016-07-28,将连接在 CR1000 数据采集器(Campbell Scientific Inc, USA)上的 4 个 MPS-6 土壤水势传感器(Decagon, USA),分别埋入 2 株平邑甜茶 Mh-CK 处理和 2 株 Mh-GD 处理盆栽苗土中,每 0.5 h 自动采集 1 次数据,实时监测土壤水势的变化,从而抓住植株失水临界点,然后用 Campbell 公司提供的 Loggernet 4.0 软件输出数据,由于埋入的传感器需要土壤沉降才能准确读数,故开始记录数据的日期为 2016-08-02。

预试验发现,当土壤水势低于 -700 kPa 时叶片会出现轻微萎蔫现象。试验开始第 13 天,天气晴朗,Mh-GD 处理的土壤水势达到 -753.9 kPa ,叶片出现了萎蔫现象。当天 06:00 左右,用压力室(MODEL-1000, PMS Instrument, Corvallis, OH, USA)测定黎明前叶水势(ψ_{leaf})。同天上午 09:00—11:00,每株平邑甜茶选取相同部位的 4 片功能叶片,用便携式光合仪(Ciras-2, PPS, England)测定不同处理植株的净光合速率(P_n)、气孔导度(G_s)和蒸腾速率(T_r)等光合作用指标。

试验结束时采集不同处理平邑甜茶叶片,每株 6 片,测定叶片相对含水量(RWC)。

$$RWC = (FM - DM) / (TM - DM) \times 100\%$$

式中:FM、DM 和 TM 分别表示叶片鲜质量、干质量及饱和水下叶片质量。

1.3 叶绿素荧光诱导动力学曲线参数的测定

干旱胁迫第 11 天,即 2016-08-12,在晴朗的上午 09:00—10:00,从不同处理的每株平邑甜茶上选择 5 片成熟叶片,利用便携式叶绿素荧光仪(PPEA, Hansatech instruments LTD, king's Lynn, Norfolk, UK)测定其叶绿素荧光诱导动力学曲线(OJIP)相关参数,即单位反应中心吸收光能(ABS/RC)、性能指标(PI)、PS II 潜在活性(F_v/F_o)和 PSII 最大光合效率(F_v/F_m)。测量前用暗适应夹子使叶片暗适应至少 20 min,采用 3 500 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 的饱和光诱导 OJIP 曲线,荧光信号记录 10 μs 开始,3 s 结束。用 PEA Plus 软件(Hansatech instruments for Handy PEA & Pocket PEA Chlorophyll II Fluorimeters)传输数据导出荧光参数。

1.4 叶片蛋白质的 iTRAQ 标记

2 个处理的平邑甜茶叶片蛋白质采用丙酮沉淀法提取。蛋白质经过还原,封闭胰蛋白酶酶切后,用 iTRAQ 113/114 和 iTRAQ 115/116 分别标记 Mh-CK、Mh-GD 处理的叶片蛋白,建成两个对照组(113/114,115/116)。采用考马斯亮蓝(Bradford)法蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白质浓度,根据 iTRAQ 试剂盒的操作步骤进行蛋白还原烷基化、酶解及标记。应用强阳离子交换色谱方法对混合后的肽段进行 HPLC 分离,然后再进行反向色谱-Triple TOF 检测和分析。采用 Protein Pilot Software V. 5.0(SCIEX, SA)软件分析试验数据,数据库来源于转录组测序数据(Uniprot 蛋白库),筛选出标准为

$FDR < 1\%$ 、 $Unused > 1$ 、肽段数(peptides (95%)) ≥ 1 的可信蛋白。

1.5 差异表达蛋白的筛选

以可信蛋白筛选结果为基础筛选差异表达蛋白,本试验的挑选标准是将差异倍数 >1.5 (上调)或 <0.67 (下调),且 $P < 0.05$ 的蛋白作为显著差异表达蛋白。

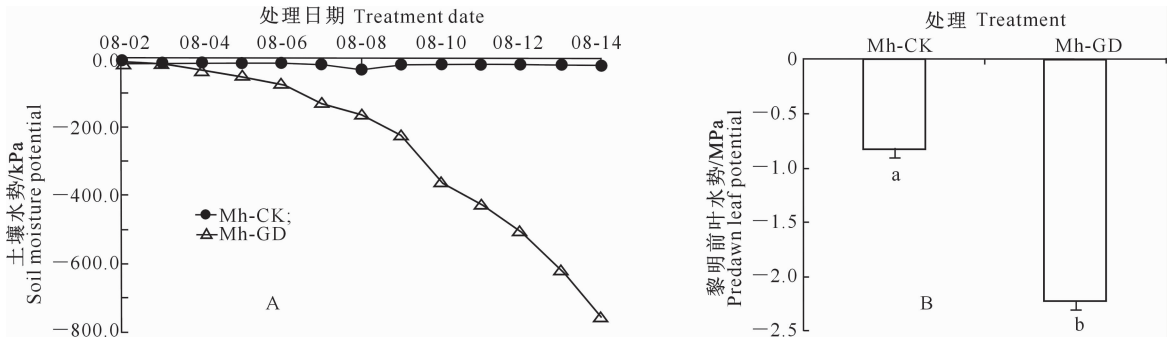
1.6 差异表达蛋白的生物信息学分析

筛选出可信蛋白和差异表达蛋白后,根据差异表达蛋白的 ID 及其在各组处理间的差异倍数(Fold change)进行后续的生物信息学分析。即应用基因本体(GeneOntology, GO)数据库(<http://www.geneontology.org/>)计算每个 term 的差异蛋白数目,然后应用超几何检验,与整个蛋白质背景相比,找出在差异表达蛋白中显著富集的 GO 条目。差异表达蛋白的 Pathway 显著分析同 GO 功能显著富集分析相近,以差异表达蛋白在京都基因与基因组百科全书数据库(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) Pathway 为单位,运用超几何检验,与整个蛋白质的背景相比来确定差异表达蛋白主要富集的 Pathway。

2 结果与分析

2.1 干旱胁迫对平邑甜茶土壤水势、黎明前叶水势的影响

由图 1 可见,随着时间推移,平邑甜茶 Mh-CK 处理的土壤水势一直保持在 -35.0 kPa 内。而 Mh-GD 处理的土壤水势逐渐下降,且下降速率由小变大,第 13 天土壤水势由最初的 -10.4 kPa 下降到 -753.9 kPa ,故在当天采样。干旱第 13 天即 2016-08-14,平邑甜茶 Mh-GD 处理植株叶片出现了萎蔫现象,其黎明前叶水势(ψ_{leaf})显著低于 Mh-CK 处理。



柱上标不同小写字母表示不同处理间差异显著($P < 0.05$)。下图同

Different lowercase letters show significant difference between treatments ($P < 0.05$). The same below

图 1 不同处理下土壤水势(A)和平邑甜茶黎明前叶水势(ψ_{leaf})(B)的变化

Fig. 1 Soil moisture potential (A) and change of predawn leaf potential (B) of *Malus hupehensis* under different treatments

2.2 干旱胁迫对平邑甜茶光合作用和叶片相对含水量的影响

由图 2 可见,Mh-CK 处理平邑甜茶的净光合速率(Pn)、气孔导度(Gs)和蒸腾速率(Tr)、叶片相对

含水量(RWC)均显著高于 Mh-GD 处理,分别高出 130%,170%,360%,13%,说明在干旱胁迫下,Mh-GD 处理平邑甜茶通过降低叶片含水量、Pn、Gs 及 Tr 来抵御胁迫。

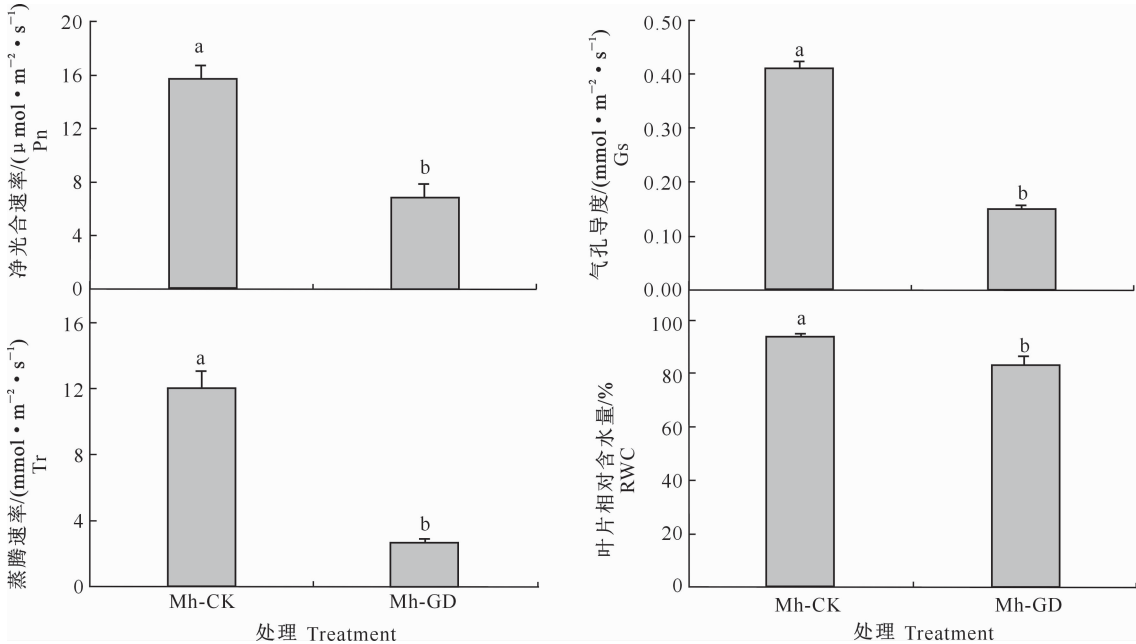


图 2 干旱胁迫对平邑甜茶光合作用及叶片相对含水量的影响

2.3 干旱胁迫对平邑甜茶叶绿素荧光参数的影响

由图 3 可以看出,在干旱胁迫下 Mh-GD 处理平邑甜茶植株的叶绿素荧光动力学曲线高于 Mh-CK 处理。Mh-CK 处理植株的单位反应中心吸收光能(ABS/RC)、性能指标(PI)、PS II 潜在活性(F_v/F_0)和 PS II 最大光合效率(F_v/F_m)分别高出 Mh-GD 处理 80%,129%,10%,2%。Mh-GD 处理的 F_v/F_0

下降,表明 PS II 活性中心受干旱胁迫的影响,光合原初反应过程受阻。PI 反应可决定潜在光合作用能力,如反应中心密度、用于电荷分离过程的光子吸收率和电子传递速率,干旱胁迫后 PI 显著下降,说明 Mh-GD 处理叶片的光能转换效率、电子传递速率、光能吸收率均下降。

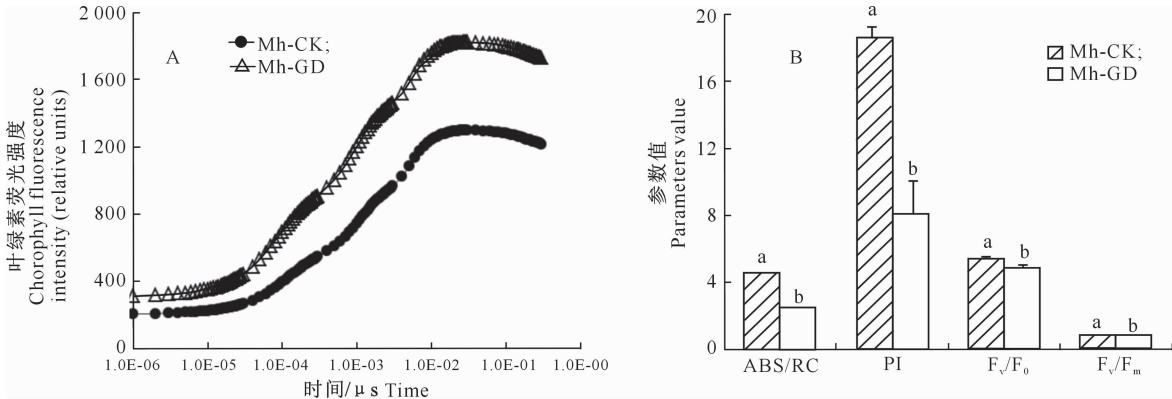


图 3 干旱胁迫对平邑甜茶叶片荧光动力学曲线(A)及叶绿素荧光参数(B)的影响

Fig. 3 Effect of gradual drought treatments on chlorophyll fluorescence intensity curve (A) and chlorophyll fluorescence parameters (B) of *Malus hupehensis*

2.4 干旱胁迫下平邑甜茶的蛋白水平变化

利用 iTRAQ 技术,对 Mh-CK、Mh-GD 处理平

邑甜茶叶片组织蛋白进行相对定量与定量技术分析,共鉴定到 1 897 个蛋白。经过进一步鉴定发现,

有 181 个共同表达的显著差异蛋白,其中上调蛋白 81 个($P<0.05$,差异倍数 >1.5),下调蛋白 100 个($P<0.05$,差异倍数 <0.67)。

2.5 平邑甜茶差异表达蛋白的 GO 富集分析

对平邑甜茶差异表达蛋白进行 GO 显著性分

析,确定其行使的主要生物学功能,结果见表 1。由表 1 可见,在生物学过程中,差异表达蛋白主要参与代谢过程、生物合成过程。作为细胞组分的蛋白质主要集中在细胞质中,而与分子功能相关的蛋白主要是“结合”蛋白和“催化”蛋白(酶)。

表 1 不同处理平邑甜茶差异表达蛋白的 GO 显著富集分析

Table 1 Significant enrichment GO analysis of differentially expressed proteins (DEPs) of *Malus hupehensis*

GO 富集功能 GO enrichment function	富集蛋白数 No. of DEPs	P
生物学过程 Biological process		
有机氮化合物代谢过程 Organonitrogen compound metabolic process	33	8.58E-09
小分子代谢过程 Small molecule metabolic process	29	7.86E-08
有机氮化合物生物合成过程 Organonitrogen compound biosynthetic process	26	1.07E-07
碳水化合物衍生物合成过程 Carbohydrate derivative biosynthetic process	12	2.39E-06
糖基化合物生物合成过程 Glycosyl compound biosynthetic process	8	3.64E-06
单体代谢过程 Single-organism metabolic process	53	3.79E-06
单一生物合成过程 Single-organism biosynthetic process	23	2.09E-05
碳水化合物衍生物合成过程 Carbohydrate derivative metabolic process	15	3.87E-05
氧化代谢过程 Oxoacid metabolic process	18	4.57E-05
有机酸代谢过程 Organic acid metabolic process	18	4.62E-05
细胞组分 Cellular component		
细胞质部分 Cytoplasmic part	28	1.61E-05
细胞质 Cytoplasm	30	6.60E-05
大分子复合物 Macromolecular complex	23	1.18E-04
类囊体 Thylakoid	8	1.25E-04
细胞 Cell	49	2.37E-04
细胞部分 Cell part	48	2.92E-04
膜蛋白复合物 Membrane protein complex	9	3.08E-04
类囊体部分 Thylakoid part	7	3.24E-04
光合作用 Photosystem	5	6.93E-04
质子运输两部分 ATPase 复合物,催化结构域 Proton-transporting two-sector ATPase complex,catalytic domain	3	7.02E-04
分子功能 Molecular function		
转移酶活性,含氮组 Transferase activity,transferring nitrogenous groups	5	4.18E-05
转氨酶活性 Transaminase activity	5	4.18E-05
含核苷酸的化合物激酶活性 Nucleobase-containing compound kinase activity	4	5.01E-04
核苷二磷酸激酶活性 Nucleoside diphosphate kinase activity	2	7.40E-04
磷酸转移酶活性,磷酸基团作为受体 Phosphotransferase activity,phosphate group as acceptor	3	9.29E-04
ATP 酶活性、耦合离子的跨膜运动、旋转机制 ATPase activity,coupled to transmembrane movement of ions,rotational ATPase mechanism	3	9.29E-04
ATPase 活性 ATPase activity,coupled	7	1.43E-03
NAD 结合 NAD binding	4	2.81E-03
ATPase 活性,偶联物质的跨膜运动 ATPase activity,coupled to transmembrane movement of substances	5	3.78E-03
水解酶活性,作用于酸酐、催化物质的跨膜运动 Hydrolase activity,acting on acid anhydrides,catalyzing transmembrane movement of substances	5	4.59E-03

2.6 平邑甜茶差异表达蛋白的 Pathway 富集分析

为了解差异表达蛋白的生物学功能,对平邑甜茶表达差异显著的蛋白进行了 Pathway 分析。结果(表 2)显示,已知的差异表达蛋白显著富集的 Pathway 通路($P<0.05$)集中在碳代谢(16 个蛋白,占 9%)、光合作用(6 个蛋白,占 3%)、代谢途径(17 个蛋白,占 9%)等方面,有 56%(101 个蛋白)的差

异表达蛋白是未知的。

2.7 干旱胁迫下平邑甜茶差异表达蛋白的功能

在干旱胁迫响应中,平邑甜茶叶片差异表达蛋白参与了不同的生物学过程,显著差异表达蛋白共 181 个,其中 95 个(占 52%)蛋白功能未知,已知的 86 个差异表达蛋白功能可归为 10 类(表 3)。包括蛋白质代谢(25 个蛋白,占 13.8%)、信号转导(11

个蛋白,占 6.1%)、碳代谢(10 个蛋白,占 5.5%)、
细胞加工(10 个蛋白,占 5.5%)、能量代谢(5 个蛋白,占 2.8%)、光合途径(6 个蛋白,占 3.3%)、金属
离子结合(4 个蛋白,占 2.2%)、抗逆反应(8 个蛋白,占 4.4%)和其他(7 个蛋白,占 3.9%)(表 3 和表 4)。

表 2 不同处理下平邑甜茶差异表达蛋白 KEGG 通路的显著性富集分析

Table 2 Significant enrichment KEGG pathways analysis of DEPs under different treatments of <i>Malus hupehensis</i>				
通路 Pathway	所占比例/% Ratio	通路编号 Pathway ID	P	富集的蛋白数 No. of DEPs
碳代谢 Carbon metabolism	9.00	pop01200	5.79E-06	16
乙醛酸和二羧酸代谢 Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	0.55	pop00630	5.20E-05	1
丙酮酸代谢 Pyruvate metabolism	2.00	pop00620	1.00E-04	3
光合作用 Photosynthesis	3.30	pop00195	2.05E-03	6
苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成 Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis	1.00	pop00400	1.20E-02	2
2-氧代羧酸代谢 2-Oxocarboxylic acid metabolism	1.00	pop01210	1.37E-02	2
代谢途径 Metabolic pathways	9.00	pop01100	1.61E-02	17
内质网中的蛋白质加工 Protein processing in endoplasmic reticulum	4.00	pop04141	3.12E-02	8
剪接体 Spliceosome	3.00	pop03040	4.17E-02	5
次生代谢物的生物合成 Biosynthesis of secondary metabolites	0.55	pop01110	4.68E-02	1
其他 KEGG 途径 Other KEGG pathways	10.50	N/A	N/A	19
未知途径 Unknown	56.00	N/A	N/A	101

表 3 干旱胁迫平邑甜茶显著差异表达蛋白(P<0.05 和变化倍数≥2.0)

Table 3 Significant differentially expressed proteins under of <i>Malus hupehensis</i> drought treatments (P<0.05 and fold change≥2.0)		
登录号 Accession	差异倍数 Fold change	功能 Function
信号转导 Signal transduction		
A9PEC2	0.397 224	GTP 结合家族蛋白 GTP-binding family protein
B9GQQ0	0.305 113	GTP 结合家族蛋白 GTP-binding family protein
B9N4Q4	0.272 608	钙网蛋白家族蛋白 Calreticulin family protein
U5GVG1	0.375 219	核苷二磷酸激酶 Nucleoside diphosphate kinase
B9I3M0	0.247 218	核苷二磷酸激酶 Nucleoside diphosphate kinase
B9HD76	0.634 038	LRR 激酶家族蛋白 LRR-kinase family protein
B9HJD4	0.520 790	玃狨/β-连环蛋白重复家族蛋白 Armadillo/beta-catenin repeat family protein
B9GJJ1	3.703 983	肌动蛋白家族蛋白 Actin family protein
B9IJN5	0.388 063	激酶家族蛋白 Kinase family protein
B9HB91	0.628 385	磷酸酶 2C 家族蛋白 Phosphatase 2C family protein
B9ILH3	0.433 637	LRR 激酶家族蛋白 Leucine-rich repeat transmembrane protein kinase
细胞加工 Cell processing		
B9GSC5	0.443 943	果胶酶 Pectinesterase
B9GR04	0.368 477	DEAD 盒 RNA 解旋酶家族蛋白 DEAD box RNA helicase family protein
B9H7S0	0.611 000	DNA 结合家族蛋白 Trihelix DNA-binding family protein Trihelix
B9GRX6	2.743 929	琥珀酸-CoA 连接酶亚基 β Succinate-CoA ligase subunit beta
B9H1B1	0.359 513	类 Met-10++家族蛋白 Met-10++ like family protein
U7DWQ4	3.745 333	组蛋白 H4 Histone H4
B9IFV5	0.476 366	膜相关的 30 ku 家族蛋白 Membrane-associated 30 ku family protein
Q9FEU0	0.299 799	果胶酶 Pectinesterase
B9HW67	0.553 395	反向 ATP 依赖性 DNA 解旋酶家族蛋白 Reversed ATP-dependent DNA helicase family protein
B9H1Y2	3.139 462	组蛋白 H2A Histone H2A
碳代谢 Carbon metabolism		
A9PI53	0.512 867	磷酸分解酶 Phosphomannomutase
B9IOS2	0.625 173	淀粉合成酶,叶绿体/淀粉酶 Starch synthase, chloroplastic/amyloplastic
B9HIG2	3.311 518	可逆糖基化多肽 3 家族蛋白 Reversibly glycosylated polypeptide 3 family protein

表 3(续) Continued table 3

登录号 Accession	差异倍数 Fold change	功能 Function
碳代谢 Carbon metabolism		
A9PFJ7	2.522 549	丙酮酸激酶 Pyruvate kinase
B9GMQ4	1.825 956	丙酮酸脱氢酶家族蛋白 Pyruvate dehydrogenase family protein
B9IKG4	0.424 080	苹果酸酶 Malic enzyme
A9P8R3	2.017 771	苹果酸脱氢酶 Malate dehydrogenase
B9GUL0	0.666 807	糖基水解酶家族 3 家族蛋白 Glycosyl hydrolase family 3 family protein
B9HRF0	0.541 188	依赖性山梨糖醇 6-磷酸脱氢酶家族蛋白 NADP dependent sorbitol 6-phosphate dehydrogenase family protein NADP
U5GDS8	0.285 317	甘油-3-磷酸脱氢酶 Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
能量代谢 Energy metabolism		
B9HWA2	1.614 975	ATP 合酶亚基 β ATP synthase subunit beta
B9HZK6	3.363 394	ATP 合酶 γ 链 1 家族蛋白 ATP synthase gamma chain 1 family protein
B9IFR5	26.417 360	P 糖蛋白 1 P glycoprotein1
A0A0P0FAY8	2.165 793	ATP 合酶亚基 α ATP synthase subunit alpha
B9H1J0	1.563 562	甘油脱氢酶家族蛋白 Glycerate dehydrogenase family protein
抗逆反应 Anti inverse reaction		
B9I6X4	0.480 057	过氧化物酶 Peroxidase
U7DVX5	12.412 660	17.5 kd 热休克家族蛋白 17.5 kd heat shock family protein
Q1XFN0	5.486 899	过氧化氢酶 Catalase
B9N9W6	5.581 193	热休克蛋白 70 同源 Heat shock protein 70 cognate
C1KA94	0.224 386	过氧化物酶 Peroxidase
A0A0B4SWQ5	0.398 935	抗氧化蛋白 Peroxiredoxin
B9HTJ7	3.209 303	热休克蛋白 70 Heat shock protein 70
B9H5I0	2.167 704	过氧化氢酶 Catalase
金属离子结合 Iron binding		
B9GQ47	0.461 346	多铜氧化酶 1 型家族蛋白 Multi-copper oxidase type 1 family protein
A9PEX7	0.497 686	硫胺噻唑合酶, 氯塑 Thiamine thiazole synthase, chloroplastic
B9N7C4	3.822 091	乳糖基谷胱甘肽裂解酶家族蛋白 Lactoylglutathione lyase family protein
B9I6A3	3.347 055	吡啶核苷酸-二硫化物氧化还原酶家族蛋白 Pyridine nucleotide-disulfide oxidoreductase family protein
光合途径 Photosynthesis		
B9GRC9	0.143 008	气孔密度和分布家族蛋白 Stomatal density and distribution family protein
A9PHA9	0.385 399	O ₂ 发展复杂的 33 ku 家族蛋白 O ₂ evolving complex 33 ku family protein
A4GYS7	0.526 612	细胞色素 b559 亚基 β Cytochrome b559 subunit beta
Q41089	2.477 658	碳酸酐酶 Carbonic anhydrase
A9PI20	0.468 226	光系统 I 链Ⅲ家族蛋白 Photosystem I chain Ⅲ family protein
A4GYS8	0.470 942	细胞色素 b559 亚基 α Cytochrome b559 subunit alpha
蛋白质代谢 Protein metabolism		
A9PE28	1.993 703	翻译起始因子 eIF-1A 家族蛋白 Translation initiation factor eIF-1A family protein
B9GSG3	0.335 827	硫氧还蛋白家族蛋白 Thioredoxin family protein
U5FNH0	0.523 976	分泌酶家族蛋白 Subtilase family protein
U5GKF8	2.409 931	基质 70 ku 热休克相关家族蛋白 Stromal 70 ku heat shock-related family protein
B9IAF0	10.445 020	核糖体蛋白 L6 Ribosomal protein L6
B9GFB2	0.341 329	核糖体蛋白 Ribosomal protein
B9I516	2.897 375	反向 ATP 依赖性 RNA 解旋酶家族蛋白 Reversed ATP-dependent RNA helicase family protein
U7DVH1	2.224 903	反向 AMP 依赖性合成酶和连接酶家族蛋白 Reversed AMP-dependent synthetase and ligase family protein
A9PF21	0.343 028	磷酸 2-脱氢-3-脱氧庚酸醛缩酶 Phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase
A9P9C8	0.562 134	肽基脯氨酰顺式反式异构酶 Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase
A9PGU4	5.547 912	HSP80 家族蛋白 HSP80 family protein
A9P8Z7	0.194 294	富含甘氨酸的 RNA 结合家族蛋白 Glycine-rich RNA-binding family protein
B9IHR5	0.534 073	铁氧还蛋白依赖型谷氨酸合酶家族蛋白 Ferredoxin-dependent glutamate synthase family protein
B9HT66	0.586 238	真核翻译起始因子 3 亚基 G Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit G

表 3(续) Continued table 3

登录号 Accession	差异倍数 Fold change	功能 Function
蛋白质代谢 Protein metabolism		
B9HAD7	2.045 548	延伸因子 Tu 家族蛋白 Elongation factor Tu family protein
B9H085	6.658 230	脱水酶家族蛋白 Dehydratase family protein
B9GTT6	2.725 432	网格蛋白组装家族蛋白 Clathrin assembly family protein
B9HFT9	1.704 749	支链氨基酸氨基转移酶 Branched-chain-amino-acid aminotransferase
A9PHH1	1.745 177	天冬氨酸转氨酶 Aspartate aminotransferase
B9HP22	2.426 411	氨基转移酶 2 家族蛋白 Aminotransferase 2 family protein
U5GE19	0.297 367	氮甲基转移酶 Aminomethyl transferase
A9P8I4	3.256 107	60S 核糖体蛋白 L23 60S ribosomal protein L23
B9IEM3	4.362 291	40S 核糖体蛋白 S3 40S ribosomal protein S3
A9PGL4	3.513 142	40S 核糖体蛋白 S19 40S ribosomal protein S19
A9P9A0	4.605 380	40S 核糖体蛋白 S16 40S ribosomal protein S16
其他 Others		
Q8H6V5	0.308 797	苯丙氨酸氨裂解酶 Phenylalanine ammonia-lyase
Q45HK6	0.588 153	脂氧合酶 Lipxygenase
B9HKS3	0.417 691	长链醇氧化酶 Long-chain-alcohol oxidase
A9PGE3	0.396 538	4-香豆酸-CoA 连接酶家族蛋白 4-coumarate-CoA ligase family protein
B9I2G5	0.426 900	漆酶 Laccase
B9N1T0	0.580 789	羟基谷胱甘肽水解酶细胞质家族蛋白 Hydroxyacylglutathione hydrolase cytoplasmic family protein
B9GSZ3	0.425 620	S-腺苷甲硫氨酸合成酶 S-adenosylmethionine synthase

表 4 干旱胁迫平邑甜茶差异表达蛋白的功能分类

Table 4 Functional classification of differentially expressed proteins under drought treatments

生物学功能 Biological process	富集的差异蛋白数 No. of DEPs	表达上调蛋白数 Up-regulated DEPs	表达下调蛋白数 Down-regulated DEPs	差异蛋白所占比例/% The DEPs to total DEPs
信号转导 Signal transduction	11	1	10	6.1
抗逆反应 Anti inverse reaction	8	5	3	4.4
碳代谢 Carbon metabolism	10	4	6	5.5
蛋白质代谢 Protein metabolism	25	16	9	13.8
细胞加工 Cell processing	10	3	7	5.5
金属离子结合 Iron binding	4	2	2	2.2
能量代谢 Energy metabolism	5	5	0	2.8
光合途径 Photosynthesis	6	1	5	3.3
其他 Others	7	7	0	3.9
未知功能 Unknown function	95	44	51	52.5

3 讨论与结论

3.1 干旱胁迫下平邑甜茶植株的生理指标响应

随着土壤干旱胁迫的进行,Mh-CK 处理平邑甜茶的 ϕ_{leaf} 、光合作用参数及 RWC 均显著高于 Mh-GD 处理。多年来,人们都将黎明前叶水势(ϕ_{leaf})作为衡量土壤水分状态的直接指标。前人在苹果^[13]和橡树^[14]上的研究结果显示,干旱胁迫下 ϕ_{leaf} 明显下降。Kautz 等^[15]研究结果表明,干旱胁迫会引起 RWC、叶绿素含量、Pn 下降,叶片厚度变薄,脯氨酸含量升高。这些变化均是对干旱胁迫的响应。

植株正常生理状态下,多数高等植物的 F_v/F_m 处于 0.8~0.85,低于这个范围时,表示植物受到了

胁迫。张永强等^[16]研究显示,水分亏缺使冬小麦 F_v/F_m 、 F_v/F_0 、稳态荧光(F_t)均显著下降,PSⅡ原初光能转化效率、PSⅡ潜在活性受到抑制,说明干旱胁迫直接影响了光合作用的电子传递和 CO₂ 同化。衣艳君等^[17]研究表明,在脱水过程中毛尖紫萼藓的 F_v/F_m 对叶片含水量的响应存在相对含水量阈值,若低于此阈值则各荧光参数值会迅速下降。在本研究中,Mh-GD 处理的 F_v/F_m 高于 0.8,可能是因为叶片相对含水量大于 F_v/F_m 的响应阈值。孙山等^[18]研究发现,当‘金太阳’杏叶片的 RWC 低于 59%时,OJIP 曲线和光吸收曲线形状发生显著变化,但对 PSⅡ的 F_v/F_m 影响较小;光合性能指数 PI 比 F_v/F_m 能够更加全面地反映 PSⅠ和 PSⅡ之间电

子传递的变化,PI 随着干旱的加重而逐渐降低。这与本研究结果一致,表现为 Mh-GD 处理植株的 PI 显著低于 Mh-CK 处理。

3.2 平邑甜茶叶片差异表达蛋白的功能

比较 Mh-GD 和 Mh-CK 处理平邑甜茶叶片的差异蛋白发现,与抗逆、蛋白质合成代谢等过程相关的蛋白表达总体上调,而与光合途径、细胞加工、碳代谢、信号转导等过程相关的差异蛋白表达总体下调。Mh-GD 处理差异蛋白表达与 Mh-CK 处理相比有升有降,说明干旱胁迫通过抑制或提高平邑甜茶体内某些蛋白的合成来增强植株对干旱环境的适应性。

3.2.1 信号转导蛋白 平邑甜茶通过信号感受器官感受外界的干旱刺激,然后把信号传递到细胞核内,从而关闭或启动一些相关基因表达以达到抵御胁迫的目的。本研究发现了 11 种与信号转导相关的蛋白。在植物中,G 蛋白是活细胞内一类具有重要生理调节功能的蛋白质,它参与多种跨膜信号的转导^[19],包括响应植物体内的激素信号与糖信号^[20],参与调控气孔运动^[21]、对病原体的防卫^[22],植物光信号转导^[23]等。本研究中,2 个 G 蛋白 A9PEC2 和 B9GQQ0 表达出现下调。钙网蛋白参与调节各种细胞功能,可以作为内质网伴侣蛋白,也可起存储钙离子和信号转导作用。本研究中的钙网蛋白家族(B9N4Q4)表达下降。核苷二磷酸激酶 2 (NDPK2)是拟南芥光敏色素信号转导途径中的一个上游成分,参与光敏素 A 的响应,它作用于光敏色素的 C-末端,是介导光敏色素光信号转导途径的一种正调节信号组分^[24]。本研究发现,2 个 NDPK (U5GVG1 和 B9I3M0)表达量降低,说明它们参与平邑甜茶叶片在干旱胁迫下光信号的转导。磷酸酶 2C 家族蛋白(PP2C)参与 ABA 负调控作用与保卫细胞信号转导途径^[25]。本研究中 PP2C(B9HB91)表达下调,意味着在干旱胁迫下 ABA 含量增多。富亮氨酸重复类受体蛋白激酶(the leucine-rich repeats receptor-like protein kinase,LRR-RLK)是目前植物中最大的一类植物类受体蛋白激酶。Xing 等^[26]将杨树中 1 个 LRR-RLK 基因 PdERECTA 在拟南芥中表达,发现过表达植株较野生型植株对水分的利用率提高。前人研究发现,LRR-RLK 能够介导逆境胁迫信号的感知及传递,对植物响应逆境胁迫具有重要的调控作用^[27-28]。本研究发现,干旱胁迫下 2 个 LRR-RLK (B9HD76 和 B9ILH3)表达下调。 β -连环蛋白信号途径在动物方面的研究较

多,而在植物上鲜有报道,Wnt/ β -连环蛋白信号途径在动物生长发育过程中起重要作用。本研究发现,狢狢/ β -连环蛋白重复家族蛋白(B9HJD4)表达下调,但其功能尚不清楚。

信号转导中唯一上调的蛋白是肌动蛋白家族(B9GJJ1)。多种肌动蛋白结合蛋白参与动态微丝骨架的调节,在植物生长发育和逆境生理中发挥重要作用。本研究中肌动蛋白表达上调可能是参与响应平邑甜茶叶片干旱胁迫下的应答。

3.2.2 碳代谢蛋白 本研究发现,参与葡萄糖代谢、三羧酸循环(TCA)、GDP-甘露糖生物合成和淀粉合成等碳水化合物合成过程的酶分别为甘油-3-磷酸脱氢酶(U5GDS8)、苹果酸酶(B9IKG4)、磷酸分解酶(A9PI53)、淀粉合成酶(B9I0S2)、糖基水解酶家族 3 蛋白(B9GUL0)及催化底物 NADP 依赖性山梨糖醇 6-磷酸脱氢酶家族蛋白(B9HRF0)。它们具有氧化还原活性,表达均下降,可能是光合作用下降导致的。丙酮酸脱氢酶家族蛋白(B9GMQ4)和苹果酸脱氢酶(A9P8R3)参与 TCA,丙酮酸激酶(A9PFJ7)参与糖酵解(EMP)过程,这 3 种蛋白表达上调说明呼吸作用增强。在干旱胁迫下,光合碳同化的速率下降,细胞呼吸作用加强,碳水化合物消耗增加。纤维素是一种多糖物质,也是植物细胞壁的重要组成部分,在干旱胁迫下植物为了维持细胞的形态和植物体的挺拔形态,合成纤维素的蛋白表达量上调。本研究中可逆糖基化多肽 3 家族蛋白(B9HIG2)表达上调可能是为了维持细胞的形态。

3.2.3 抗逆反应蛋白 在逆境胁迫下,植物体会产生一些有害的化学物质,导致自身受损,自由基、活性氧(ROS)是最常见的逆境有害物质。ROS 的性质极其活泼,能够与一切植物体内的生物大分子反应,从而破坏其活性构象,打乱细胞正常代谢^[29]。但细胞中也存在着超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)等保护酶,可在干旱胁迫下清除 ROS,维持代谢平衡,保护膜结构^[30]。本研究中,抗氧化蛋白(A0A0B4SWQ5)、过氧化物酶(B9I6X4、C1KA94)表达下调,热休克蛋白 HSP70(U7DVX5、B9HTJ7 和 B9N9W6)和过氧化氢酶(B9H5I0 和 Q1XFN0)表达上调。随着干旱程度的加剧,叶片 SOD 活性逐渐下降,POD 活性随着干旱加重则有不同程度增加;CAT 活性在中度干旱胁迫下会有所增加而在重度干旱下会降低^[31]。HSP70 家族在热休克蛋白家族中属于最保守、最主要的一类。在大多数生物中,HSP70 是含量最多的

一类热休克蛋白,当细胞受到胁迫后其含量会显著提高,参与各种机体细胞的保护。HSP 的诱导合成,可以稳定细胞结构,维持细胞正常生理功能,使机体对逆境胁迫如热害、冷害、病毒感染等相应抵抗能力增加^[32-34]。本研究中平邑甜茶可能通过上调 CAT 和 HSP70 表达来增强植物对于干旱胁迫的抗性。

3.2.4 光合途径蛋白 在干旱胁迫下,植物光合作用是非常敏感的生理指标。本研究中光系统Ⅱ家族蛋白(A9PI20)、气孔密度和分布家族蛋白(B9GRC9)及 O₂ 发展复杂的 33 ku 家族蛋白(A9PHA9)参与光反应的电子传递、暗反应的碳同化。细胞色素 b559(Cyt b 559)是由两个亚基 α 、 β 构成的一种血红蛋白,是 PSⅡ复合体的必需组分^[35-37]。一些研究推测在 PSⅡ内部可能存在一条保护 PSⅡ免遭光破坏的循环电子传递途径,在此循环中,Cyt b559 可能发挥着重要作用^[38]。本研究发现,细胞色素 b559 亚基 β (A4GYS7)和 Cyt b559 亚基 α (A4GYS8)及 A9PI20、B9GRC9、A9PHA9 蛋白表达均下调,表明光合作用降低。这与本试验测定的生理指标 Pn 和 Gs 反映的结果一致,Mh-GD 处理植株的 Pn 和 Gs 均显著低于 Mh-CK 处理。碳酸酐酶(CA)是植物适应胁迫环境的光合碳代谢调节酶,在保持光合碳代谢稳定方面具有重要作用^[39]。CA 催化 CO₂ 与 HCO₃⁻ 之间的可逆反应,能够重新固定细胞呼吸释放的 CO₂ 且用于光合作用。当空气或土壤干旱时会引起叶片气孔开度变小,从而造成叶肉细胞的 CO₂ 浓度下降,最终导致光合作用受限。本研究中,碳酸酐酶(Q41089)表达上调推测是为了在干旱胁迫下增强 CO₂ 的积累从而维持正常的光合作用。

3.2.5 蛋白质代谢 本研究中参与蛋白质合成的酶类,如反向 AMP 依赖性合成酶和连接酶家族蛋白(U7DVH1)、脱水酶家族蛋白(B9H085)、反向 ATP 依赖性 RNA 解旋酶家族蛋白(B9I516),以及翻译起始因子 eIF-1A 家族蛋白(A9PE28)、网格蛋白组装家族蛋白(B9GTT6)、延伸因子 Tu 家族蛋白(B9HAD7)和多种核糖体蛋白,如 60S 核糖体蛋白 L23(A9P8I4)、40S 核糖体蛋白 S19(A9PGL4)、40S 核糖体蛋白 S3(B9IEM3)、40S 核糖体蛋白 S16(A9P9A0)和核糖体蛋白 L6(B9IAF0)表达均上调,表明植物体通过增加一些相关蛋白的合成来抵御干旱胁迫。

[参考文献]

- [1] Bray E A. Molecular response to water deficit [J]. *Plant Physiology*, 1993, 103(4): 1035-1040.
- [2] Rivero R M, Kojima M, Gepstein A, et al. Delayed leaf senescence induces extreme drought tolerance in a flowering plant [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104(49): 19631-19636.
- [3] Taniguchi Y. Quantifying *E. coli* proteome and transcriptome with single-molecule sensitivity in single cells [J]. *Science*, 2011, 334(6055): 453.
- [4] Vogel C, Marcotte E M. Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses [J]. *Nature Reviews Genetics*, 2012, 13(4): 227-232.
- [5] Walley J W, Shen Z, Sartor R, et al. Reconstruction of protein networks from an atlas of maize seed proteotypes [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110(49): E4808-E4817.
- [6] Ashoub A, Beckhaus T, Berberich T, et al. Comparative analysis of barley leaf proteome as affected by drought stress [J]. *Planta*, 2013, 237(3): 771-781.
- [7] Pradet-Balade B, Boulmé F, Beug H, et al. Translation control: bridging the gap between genomics and proteomics [J]. *Trends Biochem Sci*, 2001, 26(4): 225-229.
- [8] Yang Q S, Wu J H, Li C Y, et al. Quantitative proteomic analysis reveals that antioxidation mechanisms contribute to cold tolerance in plantain (*Musa paradisiaca* L.; ABB group) seedlings [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2012, 11(12): 1853-1869.
- [9] Ali G M, Komatsu S. Proteomic analysis of rice leaf sheath during drought stress [J]. *Journal of Proteome Research*, 2006, 5(2): 396-403.
- [10] 李明霞, 杜社妮, 白岗栓, 等. 渭北黄土高原苹果生产中的问题及解决方案 [J]. *水土保持研究*, 2010, 17(4): 256-261.
Li M X, Du S N, Bai G S, et al. Problems and solutions of apple production in Weibei Loess Plateau [J]. *Research of Soil and Water Conservation*, 2010, 17(4): 256-261.
- [11] Yu D J, Kim S J, Lee H J. Stomatal and non-stomatal limitations to photosynthesis in field-grown grapevine cultivars [J]. *Biologia Plantarum*, 2009, 53(1): 133-137.
- [12] Li C, Tan D X, Liang D, et al. Melatonin mediates the regulation of ABA metabolism, free-radical scavenging, and stomatal behaviour in two *Malus* species under drought stress [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2015, 66(3): 669-680.
- [13] Atkinson C J, Policarpo M, Webster A D, et al. Drought tolerance of clonal *Malus* determined from measurements of stomatal conductance and leaf water potential [J]. *Tree Physiology*, 2000, 20(8): 557-563.
- [14] Thomas F M, Gausling T. Morphological and physiological responses of oak seedlings (*Quercus petraea* and *Q. robur*) to moderate drought [J]. *Ann For Sci*, 2000, 57(4): 325-333.
- [15] Kautz B, Noga G, Hunsche M. PEG and drought cause distinct changes in biochemical, physiological and morphological parameters of apple seedlings [J]. *Acta Physiologiae Plantarum*,

- 2015,37(8):162.
- [16] 张永强,毛学森,孙宏勇,等. 干旱胁迫对冬小麦叶绿素荧光的影响 [J]. 中国生态农业学报,2002,10(4):13-15.
Zhang Y Q,Mao X S,Sun H Y,et al. Effects of drought stress on chlorophyll fluorescence of winter wheat [J]. Chinese Journal of Eco-Agriculture,2002,10(4):13-15.
- [17] 衣艳君,刘家尧. 毛尖紫萼藓(*Grimmia pilifera* P. Beauv)PSⅡ光化学效率对脱水和复水的响应 [J]. 生态学报,2007,27(12):5238-5244.
Yi Y J, Liu J Y. Photochemical analysis of PSⅡ in response to dehydration and rehydration in moss *Grimmia pilifera* P. Beauv [J]. Acta Ecologica Sinica,2007,27(12):5238-5244.
- [18] 孙 山,王少敏,王家喜,等. 黑暗中脱水对‘金太阳’杏离体叶片 PSⅠ 和 PSⅡ 功能的影响 [J]. 园艺学报,2008,35(1):1-6.
Sun S,Wang S M,Wang J X,et al. Effects of dehydration in the dark on functions of PSⅠ and PSⅡ in apricot (*Prunus armeniaca* L. ‘Jintaiyang’) leaves [J]. Acta Horticulturae Sinica,2008,35(1):1-6.
- [19] Jones J C,Duffy J W,Machius M,et al. The crystal structure of a self-activating G protein α subunit reveals its distinct mechanism of signal initiation [J]. Science Signaling,2011,4(159):ra8.
- [20] Ullah H,Chen J G,Young J C,et al. Modulation of cell proliferation by heterotrimeric G protein in *Arabidopsis* [J]. Science,2001,292(5524):2066-2069.
- [21] Coursol S,Fan L M,Le Stunff H,et al. Sphingolipid signalling in *Arabidopsis* guard cells involves heterotrimeric G proteins [J]. Nature,2003,423(6940):651-654.
- [22] Trusov Y,Jordá L,Molina A,et al. G proteins and plant innate immunity [M]. Integrated G proteins signaling in plants. Berlin:Springer Berlin Heidelberg,2010:221-250.
- [23] Okamoto H,Matsui M,Deng X W. Overexpression of the heterotrimeric G-protein α -subunit enhances phytochrome-mediated inhibition of hypocotyl elongation in *Arabidopsis* [J]. The Plant Cell,2001,13(7):1639-1652.
- [24] Choi G,Yi H,Lee J,et al. Phytochrome signalling is mediated through nucleoside diphosphate kinase 2 [J]. Nature,1999,401(6753):610-613.
- [25] Ma Y,Szostkiewicz I,Korte A,et al. Regulators of PP2C phosphatase activity function as abscisic acid sensors [J]. Science,2009,324(5930):1064-1068.
- [26] Xing H T,Guo P,Xia X L,et al. *PdERECTA*, a leucine-rich repeat receptor-like kinase of poplar, confers enhanced water use efficiency in *Arabidopsis* [J]. Planta,2011,234(2):229-241.
- [27] Xu Z S,Xiong T F,Ni Z Y,et al. Isolation and identification of two genes encoding leucine-rich repeat (LRR) proteins differentially responsive to pathogen attack and salt stress in tobacco [J]. Plant Sci,2009,176(1):38-45.
- [28] Pitorre D,Llauro C,Jobet E,et al. RLK7, a leucine-rich repeat receptor-like kinase, is required for proper germination speed and tolerance to oxidative stress in *Arabidopsis thaliana* [J]. Planta,2010,232(6):1339-1353.
- [29] 王贺正,马 均,李旭毅,等. 水分胁迫对水稻结实期活性氧产生和保护系统的影响 [J]. 中国农业科学,2007,40(7):1379-1387.
Wang H Z,Ma J,Li X Y,et al. Effects of water stress on active oxygen generation and protection system in rice during grain filling stage [J]. Scientia Agricultura Sinica,2007,40(7):1379-1387.
- [30] 范苏鲁,苑兆和,冯立娟,等. 干旱胁迫对大丽花生理生化指标的影响 [J]. 应用生态学报,2011,22(3):651-657.
Fan S L,Yuan Z H,Feng L J,et al. Effects of drought stress on physiological and biochemical parameters of *Dahlia pin-nata* [J]. Chinese Journal of Applied Ecology,2011,22(3):651-657.
- [31] 闻志彬,张明理. 干旱胁迫对 2 种光合类型 C4 荒漠植物叶片光合特征酶和抗氧化酶活性的影响 [J]. 西北植物学报,2015,35(9):1815-1832.
Wen Z B,Zhang M L. C4 photosynthetic enzymes and antioxidant enzymes activities in two photosynthetic subtypes of C4 desert plants under soil drought stress [J]. Acta Botanica Borreali-Occidentalia Sinica,2015,35(9):1815-1832.
- [32] Wang X Y,Manjili M,Chen X,et al. Development of cancer vaccines using autologous and recombinant high molecular weight stress proteins [J]. Methods,2004,32(1):13-20.
- [33] Udon H,Saito T,Ogawa M,et al. HSP-antigen fusion and their use for immunization [J]. Methods,2004,32(1):21-24.
- [34] Cheng E N,Qutob S,Pavliv M,et al. HSP27 is better associated with the expression of inducible thermotolerance in human pancreatic tumor cell lines than HSP70 [J]. J Therm Biol,2002,27(1):47-54.
- [35] Cramer W A,Tae G S,Furbacher P,et al. The enigmatic cytochrome b-559 of oxygenic photosynthesis [J]. Physiologia Plantarum,1993,88(4):705-711.
- [36] Goss R,Richter M,Wild A. Pigment composition of PSⅠ pigment protein complexes purified by anion exchange chromatography: identification of xanthophyll cycle pigment binding proteins [J]. J Plant Physiol,1997,151(1):115-119.
- [37] Mor T,Pakrasi H,Ohad I,et al. The impact of the F26S mutation in the β subunit of cytochrome b559 on the function and stability of photosystemⅡ in tobacco [M]. Photosynthesis: from light to biosphere. Berlin: Springer Netherlands,1995:927-930.
- [38] Barber J,De Las Rivas J. A functional model for the role of cytochrome b559 in the protection against donor and acceptor side photoinhibition [J]. Proc Natl Acad Sci USA,1993,90(23):10942-10946.
- [39] 张震林,高煜珠,王 忠. 碳酸酐酶在高等植物光合碳代谢中的作用 [J]. 江苏农业学报,1992,8(2):7-12.
Zhang Z L,Gao Y Z,Wang Z. The role carbonic anhydrase in photosynthetic carbon metabolism in higher plants [J]. Jiangsu Journal of Agricultural Sciences,1992,8(2):7-12.