

钙影响花生胚胎发育/败育特异蛋白质的筛选与鉴定

张君诚^{1,2} 蔡宁波² 张新文¹ 庄伟建^{2,*}

(¹三明学院应用生物技术研究所, 福建三明 365004; ²福建农林大学作物学院油料研究所, 福建福州 350002)

摘要:花生 (*Arachis hypogaea* L.) 缺钙造成严重空荚(胚胎败育), 导致减产、降质, 长期困扰南方花生生产。以大田足(施足钙)、缺(缺钙地大田本底)钙条件下花生的种植与观察为基础, 利用改良的传统双向电泳、MALDI-TOF 质谱和蛋白质数据库等手段, 得到 7 个与受钙影响花生早期胚胎发育/发育有关的差异表达蛋白。4[#] 差异蛋白是与菠菜 (*Spinacia oleracea*) 的 70 kD 的叶绿体被膜休克相关蛋白高度相似的缺钙组表达上调的特异蛋白; 6[#] 差异蛋白与三叶胶 (*Hevea brasiliensis*) 的线粒体前体中 ATP 合酶的 β 链高度相似, 该蛋白在缺钙幼胚缺失; 7[#] 差异蛋白在低钙组缺失, 其与马铃薯 (*Solanum tuberosum*) 的肌动蛋白 97 或 100 类似。研究结果提示, 受钙胁迫花生幼胚败育可能与早期幼胚内能量转化、氧化还原系统、细胞内膜以及细胞骨架功能维持相关的功能基因的表达异常有关。初步揭示了受钙影响花生胚胎发育的分子机理。

关键词: 胚发育; 胚败育; 钙; 蛋白质; 花生 (*Arachis hypogaea* L.)

Isolation and Identification of Specific Expressed Proteins from Peanut (*Arachis hypogaea* L.) Development /Abortion Embryo Mediated by Calcium

ZHANG Jun-Cheng^{1,2}, CAI Ning-Bo², ZHANG Xin-Wen¹, and ZHUANG Wei-Jian^{2,*}

(¹ Institute of Applied Biotechnology, Sanming College, Sanming 365004, Fujian; ² College of Crops Science, Fujian Agriculture and Forest University, Fuzhou 350002, Fujian, China)

Abstract: Empty pods and ill-filled pods by calcium deficient has been a long existing problem in peanut production in the red and yellow soil regions in the southern China. Based on the measurements and comparisons in the field experiments with different levels of calcium, the seven differentially expressed proteins which related to the development /abortion embryos of peanut were got by 2-D electrophoresis, MALDI-TOF-MS and protein databases. The results searched from the protein databases were as follows: 4[#] protein, which up-regulated in embryos from deficient calcium group, showed high homology with the 70 kD protein from the chloroplast envelope membrane of *Spinacia oleracea* L.; 6[#] protein disappeared in embryos from deficient calcium group showed high homology with the β -chain of the (ATPB) ATP synthase from *Hevea brasiliensis* L.; and 7[#] protein also disappeared in embryos from deficient calcium group was considered similar to the Actin 97&100 from *Solanum tuberosum*. All the results indicated that the molecular mechanism of embryo abortion mediated by calcium may be relevant to some genes controlling energy transferring (ATP synthesis), oxidoreduction system, endo-membrane system and cytoskeleton structure system which are transcribed or expressed unnormally.

Keywords: Embryo development; Embryo abortion; Calcium; Protein; Peanut (*Arachis hypogaea* L.)

胚胎早期发育是花生产量和品质形成的重要时期, 其幼胚发育的正常与否直接关系以种子为收获物的生产效益。花生是需钙量大的植物, 钙与花生胚胎发育关系极为密切, 缺钙引起花生严重空荚或不饱满(胚胎早期败育), 导致花生减产降质, 这是南方酸性红黄壤地区沙质土壤花生生产上长期存在的

问题^[1]。缺钙对花生荚果的形成未见明显影响, 但钙间接促成种子内含物的形成, 对种子能否充实饱满起关键性的作用, 因此缺钙往往导致空荚。关于花生荚果正常发育过程中的内外形态及贮藏物质的积累规律已有较多报道^[2-3], 但对南方沙质旱地花生受钙胁迫导致空荚而大幅度减产降质这个问题尚报

基金项目: 国家自然科学基金项目(30070481); 福建省三明市科技局资助项目(2003-C-3)

作者简介: 张君诚(1968-), 男, 福建顺昌人, 副教授, 博士, 主要从事花生分子生物学研究工作。E-mail: jchzhang302@163.com

* 通讯作者(Corresponding author): 庄伟建, 教授, 博士, 博士生导师。Tel: 0591-83789103; E-mail: zhuangwj@pub.fz.fj.cn

Received(收稿日期): 2006-05-31; Accepted(接受日期): 2006-10-06.

道不多,缺乏系统研究和深度探讨,目前也没有较好抗低钙胁迫的花生品种可供生产需要。

本研究分离并鉴定受钙影响的花生胚发育与败育相关的特异蛋白,以期揭示受钙胁迫花生胚胎败育的分子机理,为进一步克隆与鉴定相关重要基因,阐明植物胚胎发育中钙胁迫的机理提供基础。

1 材料与方法

1.1 花生材料与处理

泉花10号花生(*Arachis hypogaea* L.)种子由福建农林大学油料研究所提供。在福建平潭县小楼村选择典型缺钙的花生空荚产地,设足钙和缺钙两处理。足钙组每667 m²施石膏CaSO₄·2H₂O(湖北应城产,含交换性钙151.82 g kg⁻¹)75 kg;缺钙组即对照组,不施钙,以缺钙土壤本底水平为准^[1,4]。3组重复,春季种植。据本试验前期的形态学和细胞学观察证明花生幼胚早期败育发生自第6天和9天,故取果针入土后6 d、9 d的幼果,迅速剥取幼胚,-70℃保存备用。

1.2 药品与试剂

pH 3.5~10、6~9、5~7两性电解质(Carrier ampholyte)为军事医学科学院产品;Urea、SDS、Tris、β-Me、考马斯亮蓝R-250、PVP、Triton X-100、Chaps、DTT、Acr、Bis、TEMED、APS等试剂均购自上海生工生物工程技术有限公司;三氟乙酸、丙酮等试剂均为国产分析纯。

三氟乙酸(TFA)为日本东京化成工业株式会社产品;乙腈(ACN)为国产色谱纯;碘乙酰胺(Iodoacetamide),购自美国Sigma公司;测序级胰蛋白酶(Trypsin)购自Promega公司;其他试剂为国产分析纯。

1.3 实验方法

1.3.1 蛋白样品制备 花生幼胚蛋白提取方法见文献[5],略加修改。

1.3.2 胚胎各阶段蛋白质含量的比较测定 参照Lowry等^[6]方法测定花生幼胚早期发育阶段(3~18 d)蛋白质含量的动态变化。

1.3.3 花生幼胚蛋白双向电泳 采用改良的载体两性电解质自制胶条和考马斯亮蓝染色的花生幼胚SDS-PAGE双向电泳技术体系^[7]。

1.3.4 特异蛋白点的选择与挖取 从电泳后并经过考马斯亮蓝染色的凝胶上寻找并切下特异蛋白点,同时从无蛋白质染色区切下一块大致相同的胶块以作对照,把胶切成1 mm³大小,放入0.5 mL离心管中。

1.3.5 蛋白点的胶内酶解 (1)胶块的洗脱:用2倍体积的50% ACN洗脱胶块(1或2次,每次15 min),在胶块变为白色后,弃乙腈,用0.1 mol L⁻¹ NH₄HCO₃泡5 min;加等体积乙腈溶液(ACN: NH₄HCO₃ = 1:1),温浴15 min,弃溶液,真空干燥胶块。(2)还原和烷基化:把胶块浸入还原液,56℃孵育45 min;弃多余液体,迅速加入大约等体积新鲜的55 mmol L⁻¹碘乙酰胺(用0.1 mol L⁻¹ NH₄HCO₃新配制)溶液,室温暗处孵育30 min;弃碘乙酰胺溶液,用0.1 mol L⁻¹ NH₄HCO₃和ACN多次洗胶块,真空干燥30 min。(3)胶内消化:加入胰酶50~100 μL(12.5 ng μL⁻¹),4℃振荡30 min,37℃过夜。(4)胶内酶解的萃取:酶解后,加入5% TFA 120 μL,室温放置1 h;吸出上清液,加2.5% TFA和50% ACN溶液120 μL,室温1 h;吸出合并上清液,离心干燥。

1.3.6 MALDI-TOF分析 于干燥的离心管中加入5 μL 0.5% TFA溶解,取0.5 μL与等量的HCCA溶液混合,点样品板,干燥后在REFLEX III型基质辅助激光解吸离子化飞行时间质谱仪(MALDI-TOF,德国Bruker产品)进行质谱分析。

1.3.7 肽指纹图谱的获得和分析 搜索网上数据库SWISS-PROT and TrEMBL(http://cn.expasy.org/tools/#_proteome或<http://jpsl.ludwig.edu.au/ucsftml3.4/msfit.htm>或<http://www.matrixscience.com/>),对肽质量指纹图谱进行检索分析。

2 结果与分析

2.1 足、缺钙组大田花生植株结荚比较

花生植株生育后期(100 d及以后),缺钙组植株营养体部分明显强壮于足钙组,表现为地上部植株高,叶大茎粗,返青现象明显,地下部根系异常发达,果针很多,但多为烂针或败育,部分荚果虽正常发育(果实外观正常,子房壁正常膨大),但多为空荚(空秕),提示花生胚胎早期败育(图1)。足钙组植株根系正常,果针量和荚果发育正常。

2.2 足、缺钙条件下不同发育时期花生幼胚蛋白含量比较

分别测定足、缺钙水平花生幼胚发育阶段早期蛋白质含量的动态变化(图2),其含量在6 d左右开始出现显著差异,足钙组胚随着发育进程细胞内蛋白质不断积累,浓度不断提高;而缺钙组虽然果针入土后的0~6 d与足钙组相差无几,但在6 d后蛋白质的积累明显下降。



图1 足、缺钙植株结荚比较

Fig.1 Comparison between pods from deficient calcium group and sufficient calcium group
90 d, 左为缺钙组, 右为足钙组。

About 90 d; left for deficient calcium group, right for sufficient calcium group.

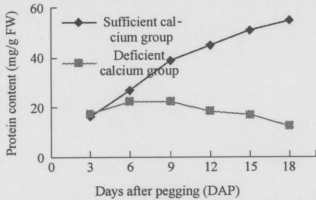


图2 足、缺钙组花生不同发育时期幼胚蛋白质含量比较

Fig.2 Changes of protein content in peanut embryos during different developmental stages from deficient calcium group and sufficient calcium group

2.3 足钙与缺钙组花生早期幼胚蛋白质双向电泳图谱与比较

对缺钙与足钙处理的花生早期幼胚蛋白质进行双向电泳, 经考马斯亮蓝初步染色, 可得到的蛋白质斑点数为 100~200 个, 等电点大多在 5.0~8.0 之间, 分子量约在 15~170 kD 之间, 大多在 25~90 kD 之间蛋白点纵横干扰少, 其形态规则、稳定性高、重复性好, 以利于比较两种钙处理引起的蛋白表达差异研究。

图 3~6 分别为缺钙和足钙组处理的花生于果针入土后 6 d 和 9 d 的幼胚表达蛋白双向电泳结果, 不同时期的幼胚皆存在着表达谱的差异。在重复试验与比较的基础上, 经扫描成像和软件分析, 在 6 d 组和 9 d 组的图谱上选择了差异稳定的 7 个蛋白点, 其中缺钙组特异表达的有 3 个点, 分别标记为 1[#]、4[#]、5[#]; 足钙组特异表达的有 4 个点, 分别标记为 2[#]、3[#]、6[#]、7[#] (图中箭头所示)。小心将这些蛋白点从胶上取下, 用于质谱分析。

2.4 足、缺钙条件下花生幼胚差异表达蛋白质的质谱鉴定与肽指纹图谱数据库分析

对所选取 7 个差异表达蛋白点经 Trypsin 处理

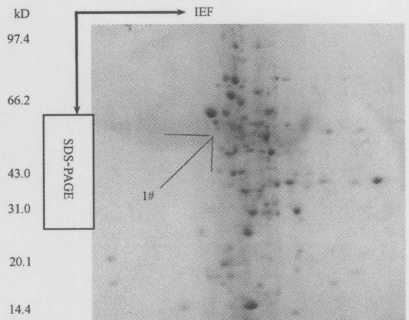


图3 缺钙组果针入土后 9 d 的幼胚珠蛋白质双向电泳图谱

Fig.3 Result of 2-DE of proteins from young peanut embryo at 9 DAP from deficient calcium group

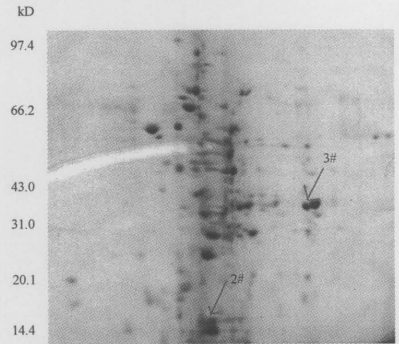


图4 足钙组果针入土后 9 d 的幼胚珠蛋白质双向电泳图谱

Fig.4 Result of 2-DE of proteins from young peanut embryo at 9 DAP from sufficient calcium group

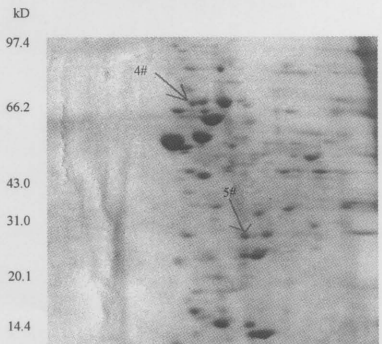


图5 缺钙组果针入土后 6 d 的幼胚珠蛋白质双向电泳图谱

Fig.5 Result of 2-DE of proteins from young peanut embryo at 6 DAP from deficient calcium group

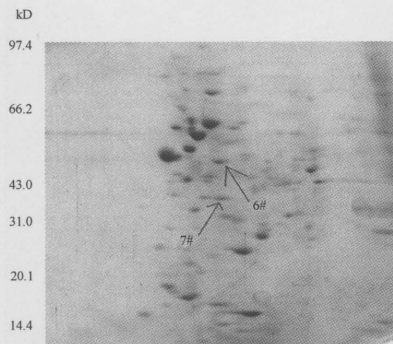


图 6 足钙组果针入土后 6 d 的幼胚珠蛋白双向电泳图谱
Fig. 6 Result of 2-DE of proteins from young peanut embryo at 6 DAP from sufficient calcium group

后进行 MALDI-TOF-MS 质谱分析, 分别利用 PeplIdent 利 profilescan 或 Blast 将以上 PMF 和氨基酸序列信息对 SwissProt 进行搜索, 结果如表 1 所示。

4[#] 差异蛋白点是个缺钙组表达上调的特异蛋白, 经检索与菠菜 (*Spinacia oleracea*) 的一个 70 kD 的叶绿体被膜休克相关蛋白高度相似(在 SWISS-PROT 数据库的编号为 Acc. # P29357. SPIOL 1 2E65B6A8E700187C); 肽段匹配率为 43%, 匹配的多肽段覆盖蛋白中的 29% 的氨基酸, 该蛋白分子量为 71 600.7 Da, pI 为 5.35, 与双向电泳图谱该点的数据极为一致。

6[#] 差异蛋白是个缺钙组缺失(未见表达)的特异蛋白, 经检索与一种在线粒体前体中的 ATP 合酶的 β 链高度相似, 分子量大约在 60 259.0 Da 左右, pI 5.95(Acc. # P29685)。在 SWISS-PROT 数据库中

表 1 7 个特异表达蛋白 PMF 的数据库搜索结果
Table 1 The PMF data base search results for the 7 specific expressed proteins

蛋白序号 No. of spot	匹配值 Score	蛋白描述 Description	所在物种 Species	分子量 MW(kD)	pI	覆盖度 Coverage(%)
1	0.33	精氨酸-tRNA 合成酶 Arginyl-tRNA synthetase	硫磺矿硫化叶菌 <i>Sulfolobus solfataricus</i>	71.38	6.44	16
2	0.27	甘油醛-3-磷酸脱氢酶 Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	一种耐高温真菌 <i>Archaeoglobus fulgidus</i>	37.61	5.61	40
3	0.29	异柠檬酸脱氢酶 Isocitrate dehydrogenase	集胞藻 <i>Synechocystis</i> sp.	52.28	5.41	30
4	0.43	叶绿体被膜休克相关蛋白 70 kD heat shock-related protein	菠菜 <i>Spinacia oleracea</i>	71.60	5.35	29
5	0.15	木糖异构酶 Xylose isomerase	流感嗜血杆菌 <i>Haemophilus influenzae</i>	49.89	5.70	29
6	0.56	线粒体前体中的 ATP 合酶 β 链(ATPB) ATP synthase beta chain, mitochondrial precursor	三叶胶 <i>Hevea brasiliensis</i>	60.25	5.95	21
7	0.32	肌动蛋白 97 或 100 (AC97) Actin 97	马铃薯 <i>Solanum tuberosum</i>	41.00	5.31	41

发现该种蛋白在三叶胶 (*Hevea brasiliensis*)、烟草 (*Nicotiana glauca*)、玉米 (*Zea mays*) 拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 和水稻 (*Oryza sativa*) 等植物中均有报道。其中以与烟草的同源性最高, 肽指纹图谱匹配率为 62%, 匹配的多肽段覆盖蛋白中 26% 的氨基酸。

7[#] 差异蛋白是缺钙组缺失(未见表达)的特异蛋白, 数据库检索可能与马铃薯 (*Solanum tuberosum*) 的肌动蛋白 97 或 100 类似, 其分子量在 50 kD 左右, 等电点在 6 左右, 与双向电泳结果极为一致。两种肽指纹图谱匹配率为 32.4%, 匹配的多肽段覆盖蛋白中 41% 的氨基酸。该种蛋白在烟草 (*Nicotiana tabacum*) 中也有报道, 其蛋白参数为 41739.2/5.46。

3-磷酸甘油醛脱氢酶是完成生物体内氧化反应

主要的脱氢酶之一, 其直接受体不是 O₂, 而只能是某些辅酶(NAD⁺、NADP⁺)或辅基(FAD、FMN), 辅酶或辅基还原后将氢原子传递至线粒体氧化呼吸链, 最后将电子传给氧生成水, 在此过程中释放出来的能量使 ADP 磷酸化生成 ATP, 这类酶还有如琥珀酸脱氢酶、细胞色素体系等。2[#] 差异蛋白与 *Archaeoglobus fulgidus* (真菌) 的 Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase(甘油醛-3-磷酸脱氢酶)具有很高的同源性, 那么该蛋白在缺钙组幼胚的未表达提示缺钙幼胚的氧化还原反应系统可能不正常。

3[#] 差异蛋白与蓝细菌的异柠檬酸脱氢酶有一定的同源性。异柠檬酸脱氢酶和柠檬酸合酶等是生物体内柠檬酸循环组成酶系的重要组成部分。

经多次检索, 1[#] 和 5[#] 蛋白点得分较低, 在数据

库中没有很好的匹配蛋白,有可能是未知蛋白。

3 讨论与结论

我国南方红黄壤地区是花生主产区,种植面积超过110万公顷,但单产却低于全国平均水平。其重要原因是红黄壤大部分呈酸性甚至强酸性(pH 4.5~5.5),使土壤对离子的吸附能力降低,加上南方较多雨水使钙、硼离子大量淋失,易导致花生胚败育或不饱满而大幅度减产,严重者空壳率可达70%~80%。已知钙在植物生长发育中起着重要的作用,参与从种子萌发到开花结果等全过程,对其生理活动进行广泛调节。在细胞水平上,钙对细胞分裂、极性形成、生长、分化、细胞凋亡等过程均有重要的调节功能^[89]。本研究发现花生在缺钙土壤中生长,结荚期的植株及其幼果形态差异甚小,但幼胚在蛋白质表达上已显示出明显的差异,这可能是之后幼胚趋于败育的重要原因。这初步揭示了缺钙极易导致花生空壳的内部因素。

植物胚胎发育是基因在内外因素协同作用下,在时间和空间上顺序表达的过程,表达方式以合成某种蛋白质为主。目前已在不同植物的胚性细胞、胚性愈伤组织、胚状体、合子胚、种子等不同细胞、组织或器官中检测到一些特异蛋白,由于这些蛋白质很可能是体细胞或生殖细胞形成的特定时期特异基因的表达产物,因此与该时期或某种生理状态下胚胎细胞或组织的形态建成及生理生化变化密切相关^[10]。20世纪70年代以后由于双向电泳技术的重大改进,使植物胚胎特异蛋白的研究进入一个新的发展阶段。张斌等^[11]应用该技术分析比较了水稻胚不同发育时期蛋白质组分的变化,结果表明,稻胚总蛋白按其在胚胎发育过程中的动态可分为7类,其中组成性的蛋白质约占85%,在不同发育时期基本不变;具有发育时期特异性的蛋白质约占15%。因此认为在胚胎分化过程中一些发育阶段特异蛋白是胚胎正常发育的基础。陈伟等^[5]在对双向电泳技术改进的基础上,研究了顽拗荔枝胚胎发育特异蛋白,得到从鱼雷胚到子叶胚的4个特异蛋白。另外,在龙眼^[12-13]、小麦^[14]、大麦^[15]和大蒜^[16]等植物合子或体胚发育过程中均有发育特异蛋白报道,说明植物胚胎发育与体内的许多重要蛋白的表达与调控密切相关。

本文对缺钙花生幼胚蛋白的双向电泳分析得到了7个差异表达蛋白,可以推测这些蛋白是与花生

胚形态建成有一定关系。4^{*}差异蛋白点提示钙缺乏时花生胚胎细胞的内膜系统可能破坏,从而影响胚胎内部与周围组织的信号、能量与物质传递。这与洪法等^[17]报道的结果相一致,其研究指出,缺钙导致植物出现叶绿体基粒片层膨胀、基粒消失、内膜和外膜逐步瓦解;随着缺钙时间的延长,叶绿体被膜和内部片层结构受到严重损伤;线粒体也发生膨大,外膜模糊,内膜数目减少,线粒体变得较透明;最后,细胞核和质膜被破坏,质膜完整性消失。膜的破坏必然引起膜透性变化,使细胞发生“物质渗透”,最终整个细胞结构破坏瓦解,叶片死亡^[18]。因此,我们认为,该差异表达蛋白可能是个重要的标志蛋白,与胚胎败育密切相关。

ATP是器官、组织和细胞所有活动的能量来源,ATP合酶的合成障碍将直接影响器官、组织和细胞的基本生命活动,也直接导致胚胎发育严重受阻。因此,我们认为,6^{*}差异蛋白在缺钙幼胚缺失提示花生幼胚受钙胁迫时ATP合酶的合成和组装严重受阻,导致幼胚发育受阻。

肌动蛋白是动植物细胞骨架和收缩系统的主要成分,参与细胞内众多生理生化过程^[19],与细胞分裂等重要生命活动密切相关,因此,缺钙组胚缺失7^{*}差异蛋白,可能是导致细胞骨架系统发育或细胞分裂等重要生理活动受阻的原因,从而发生胚胎早期败育。

另外,2^{*}、3^{*}蛋白在缺钙组胚缺失则提示胚细胞内肌动蛋白缺失或不足导致细胞骨架系统发育障碍或细胞分裂受阻,以及氧化还原系统的发育和运动处在一种不正常状态,最终发生胚胎早期败育。

上述为钙胁迫下花生幼胚早期败育部分可能的生理与分子机理,进一步确认尚需深入的研究。

References

- [1] Zhang J-C(张君诚), Zhou E-S(周恩生), Zhang H-P(张海平), Guan D-Y(官德义), Zhuang W-J(庄伟建). Field showings and preventing measures to peanut barepods in sandy and drought soil. *Seed (种子)*, 2004, (5):51-54(in Chinese with English abstract)
- [2] Zhuang W-J(庄伟建), Peng S-Y(彭时尧), Lin M-S(林木山). The changes of the morphology and structure of cotyledon storage cell and their relation to the accumulation of oil and protein in peanut. *Sci Agr Sin (中国农业科学)*, 1991, 24(3):8-15 (in Chinese with English abstract)
- [3] Wang X-C(王小纯), Ma X-M(马新明), Chang S-M(常思敏), Tang F-S(汤丰收). Study on changes of organic composition and development of peanut pod among different peanut cultivars. *China J Oil Crop Sci (中国油料作物学报)*, 2003, 25(1):37-39 (in Chinese with English abstract)
- [4] Zhang H-P(张海平), Shan S-H(单世华), Cai L-L(蔡来龙), Guan

- D-Y(官德义), Li Y(李毓), Zhuang W-J(庄伟建). Effect of calcium on peanut plant growth and defence system of active oxygen in leaves. *Chin J Oil Crop Sci* (中国油料作物学报), 2004, 26(3):34-37(in Chinese with English abstract)
- [5] Chen W(陈伟), Lu L-X(吕柳新), Huang C-M(黄春梅), Zhou J(周洁), Liang W-Y(梁文裕). Studies on 'Wuye' litchi specific proteins in the embryo development stages. *Acta Hort Sin* (园艺学报), 2001, 28(6):504-508(in Chinese with English abstract)
- [6] Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 1951, 193: 265-275
- [7] Zhang J-C(张君诚), Cai Y(蔡晔), Zhang X-W(张新文), Tang R-H(唐荣华), Cai N-B(蔡宁波), Zhuang W-J(庄伟建). An introduction of the improvement on the two-dimensional electrophoresis for protein from early young embryo of peanut. *J Shansi Agric Univ* (山西农业大学学报), 2005, 25(5): 51-54 (in Chinese with English abstract)
- [8] Chen S-R(陈绍荣), Liang S-P(梁述平), Lu Y-T(吕应堂). Molecular mechanism of calcium and CaM signal transduction. In: Lin Z-P(林忠平) eds. *Green Gene for 21st Century (走向 21 世纪的植物分子生物学)*. Beijing: Chinese Science and Technology Press, 2000. pp 266-270 (in Chinese)
- [9] Poovaih A S, Ready A S N. Calcium and signal transduction in plants. *Crit Rev Plant Sci*, 1993, 12:185-211
- [10] Liang W-Y(梁文裕), Chen W(陈伟), Lu L-X(吕柳新). Advances in specific proteins at different stages of plant embryo development. *J Fujian Agric Univ* (福建农林大学学报), 2003, 32(1):98-103(in Chinese with English abstract)
- [11] Zhang B(张斌), Tang X-H(唐锡华). Studies on rice embryo proteins with developmental stage specificity. *Acta Photophysiol Sin*(植物生理与分子生物学学报), 1992, 17(1):87-94(in Chinese with English abstract)
- abstract)
- [12] Liang W-Y(梁文裕), Chen W(陈伟), Song R-F(宋瑞峰), Zhang F(张凤). Changes in specific proteins in embryos of Longan at different development stages. *J Trop & Subtrop Bot* (热带亚热带作物学报), 2005, 13(3):229-232(in Chinese with English abstract)
- [13] Chen C-L(陈春玲), Lai Z-X(赖钟雄). Analysis of specific proteins by IEF and SDS-PAGE in the process of somatic embryogenesis in longan [*Dimocarpus longan* Lour.]. *J Fujian Agric For Univ* (福建农林大学学报), 2002, 31(1): 135-136(in Chinese with English abstract)
- [14] Yu W-F(余万峰), Zhao J(赵洁). Changes of protein content and profile during the development of anther, ovary and embryo in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Acta Agron Sin* (作物学报), 2002, 28(5): 718-719(in Chinese with English abstract)
- [15] Clark A J. An embryo-specific protein of barely. *Eur J Biochem*, 1991, 199: 115-121
- [16] Du H-F(杜慧芳), Lu G-Y(陆帼一), Gao S-M(高述民). Some special proteins and several variations of physiology and biochemistry during garlic somatic embryogenesis. *Plant Physiol Commun* (植物生理学通讯), 2001, 37(3): 207-210(in Chinese with English abstract)
- [17] Hong F-S(洪法水), Dong Z-J(董振吉), Ma C-C(马成仓), Zhou M-W(周谋文). Effect of Ca^{2+} and PEG on some activities of wheat seedlings under drought stress. *Acta Agron Sin*(作物学报), 1996, 22(1):101-106(in Chinese with English abstract)
- [18] Miao Y(缪颖), Ye G(叶纲), Mao J-Y(毛节琦). Effect on the membrane lipid peroxidation of corn leaves under calcium stress. *J Zhejiang Agric Univ*(浙江农业大学学报), 1997, 23(2):163-167 (in Chinese with English abstract)
- [19] Shterline P, Sparrow J C. *Actin in Plant Profile*. London: Academic Press, 1994. pp 13-21