

DOI: 10.3724/SP.J.1006.2011.00820

高温胁迫下水稻叶片的蛋白响应及其基因型和生育期差异

周伟辉¹ 薛大伟² 张国平^{1,*}

¹浙江大学农业与生物技术学院, 浙江杭州 310029; ²杭州师范大学生命与环境科学学院, 浙江杭州 310036

摘要: 高温已经成为水稻产量的主要限制因素, 且其影响由于全球温室效应的加剧而呈扩大趋势。本研究在鉴定耐热水稻基因型的基础上, 从生理学和蛋白质组学上进行耐性机制研究。结果表明, 苗期或抽穗期高温处理导致结实率、SPAD 值、株高、根长和生物量下降, 丙二醛、过氧化氢、超氧阴离子含量增加和超氧化物歧化酶活性提高。同时, 高温胁迫对热敏感品种明恢 63 的影响大于对耐热品种密阳 46 的影响。蛋白质组学分析表明, 高温使光合作用相关蛋白、能量类蛋白、代谢类蛋白表达量下降, 抗逆相关蛋白表达量上升。另外, 蛋白试验结果佐证了密阳 46 的耐热性以及水稻抽穗期对高温的敏感性。本研究还首次发现抗逆相关蛋白 2-cys 过氧化物酶 BAS1 的表达量在高温下上升。

关键词: 水稻; 高温; 耐热性; 基因型; 蛋白质组学

Protein Response of Rice Leaves to High Temperature Stress and Its Difference of Genotypes at Different Growth Stage

ZHOU Wei-Hui¹, XUE Da-Wei², and ZHANG Guo-Ping^{1,*}

¹Department of Agronomy, College of Agriculture and Biotechnology, Huajiachi Campus, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China; ²College of Life and Environment Sciences, Hangzhou Normal University, Hangzhou 310036, China

Abstract: High temperature has become a major disastrous factor affecting rice productivity, and the temperature stress becomes more severe due to the global warming effect. The present study was carried out to identify the rice genotypes with high heat tolerance and understand the tolerant mechanisms of both physiology and proteomics. The results showed that seed setting rate, SPAD value, plant height, root length and biomass were dramatically reduced under high temperature, while contents of malondialdehyde, hydrogen peroxide and superoxide anions, and activity of superoxide dismutase were greatly increased, irrespectively of growth stage. Moreover, Minghui 63 (a heat-sensitive genotype) was much more affected by heat stress than Milyang 46 (a heat-tolerant genotype). Proteomic analysis showed that high temperature resulted in down-regulation of the proteins related to photosynthesis, energy and metabolism, while resistance-related proteins were up-regulated. The results also confirmed the heat tolerance of Milyang 46 and the heat sensitivity of the rice plants at heading stage. The up-regulation of anti-stress protein, 2-cys peroxiredoxin BAS1, under heat stress was first reported in this study.

Keywords: Rice; High temperature; Thermo-tolerance; Genotype; Proteomics

蛋白质组(proteome)一词由澳大利亚科学家提出, 源于蛋白质(protein)与基因组(genome)两个词的组合, 意指“一种基因组所表达的全套蛋白质”^[1]。蛋白质组学为在蛋白质水平上研究生物体、细胞、器官和组织, 以及分析比较不同生理条件下的蛋白质表达等提供了一套有力的工具和方法。双向电泳(two dimensional gel electrophoresis, 2-DE)技术与质

谱技术的结合, 能快速鉴定蛋白质以及提供蛋白表达量的变化和翻译后修饰(post-translation modification, PTM)等信息, 可信度高。蛋白质组学技术已有效地应用于分析非生物因子胁迫下植物的蛋白响应过程, 包括热害、冷害、干旱胁迫、氧化胁迫、盐害和重金属毒害等^[2-8]。

Salekdeh 等^[9]研究了 2 个水稻品种在干旱胁迫

本研究由浙江省科学技术厅项目(2008C22069)资助。

* 通讯作者(Corresponding author): 张国平, E-mail: zhanggp@zju.edu.cn

Received(收稿日期): 2010-10-22; Accepted(接受日期): 2011-01-06.

下以及恢复灌溉后叶片的蛋白质组,发现有42个蛋白点的丰度在干旱胁迫状态下变化明显,其中27个点在2个品种中显示不同的反应方式;恢复正常灌溉10 d后,所有蛋白的丰度完全或基本恢复到对照水平。Imin等^[10]用蛋白质组学的方法研究了低温胁迫对水稻花粉发育早期花粉囊成熟的影响。通过2-DE分离和银染检测,发现70个蛋白质在低温处理之后发生了变化,其中1个为低温诱导新产生的,47个为低温上调蛋白质,另外11个为低温下调蛋白质。臭氧及盐胁迫等对水稻的影响也已在蛋白质组学水平上得到揭示^[11-13]。

高温已经成为水稻产量的主要限制因素,且其影响由于全球温室效应的加剧而呈扩大趋势^[14-15]。在蛋白质水平上研究高温胁迫下水稻基因的表达调控机制,可以更直接地找出与高温胁迫相关的基因群,揭示水稻的高温伤害和耐性机制。Lee等^[16]研究了高温(42℃)胁迫下水稻幼苗叶片蛋白质组变化,利用2-DE和基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)技术,成功鉴定到48个蛋白质,其中包括热激蛋白、能量与代谢相关蛋白、氧化还原相关蛋白和调控相关蛋白等。另外,还发现了一些低分子量的小分子热激蛋白(sHSPs)。Han等^[17]对遭受48 h高温(35℃、40℃和45℃)的水稻幼苗叶片进行了蛋白质组学分析,发现高温下蛋白质无论在种类上和表达量上都有很大的变化,且温度越高,水稻植株内形成的保护机制越多。一些维持光合作用能力的保护类蛋白在35℃下被激活,抗氧化相关蛋白在40℃下被激活,而热激蛋白在45℃下才被激活发挥作用。

Satake等^[18]认为,水稻高温伤害主要发生在开花期,此时高温影响授粉受精过程。减数分裂期(抽穗前9~15 d)是水稻高温伤害的次敏感期,此时高温主要影响花粉发育。水稻在孕穗、抽穗期对温度极为敏感(即抽穗前后各10 d),最适宜的温度为25~30℃,日平均温度30℃以上对水稻生理活动会产生不利影响。Jagadish等^[19]对水稻开花期高温胁迫下的花药进行蛋白质组学分析,发现46个差异表达蛋白,用质谱法鉴定了13个。Lin等^[20]研究高温对水稻颖果发育的影响,发现70个差异表达的蛋白,用液相色谱/串联质谱法确定了54个,其中21个参与碳水化合物代谢,14个参与蛋白质的合成与分解,9个是胁迫响应基因,其中蜡质蛋白、过敏原类蛋白和蛋白延伸因子在高温下下调,而小分子热激蛋

白、3-磷酸甘油醛脱氢酶及醇溶蛋白上调。

本研究旨在通过高温胁迫对水稻叶片蛋白质种类和表达量的影响,明确不同耐热性水稻品种和不同生育期在蛋白响应上的差异,从而为揭示水稻的高温伤害和耐性机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验设计

依据前期研究结果,选择耐热性水稻品种“密阳46”(Oryza sativa L. spp. indica)和热敏感品种“明恢63”(Oryza sativa L. spp. indica)为供试材料。根据前人水稻高温试验结果,确定本试验的高温处理温度^[16-17,19]。试验在浙江大学华家池校区实验农场进行。水稻种子经浸种、催芽后,播于盛有过筛细土的塑料育苗盘内,放在温室。

(1) 试验 I: 播种7 d后从中选取生长一致的幼苗以水培方式种在50 mL离心管中,每管2株。依据Yoshida等^[21]的介绍配营养液。培养7 d后进行处理,高温处理为白天43℃(14 h)、黑夜30℃(10 h),相对湿度为75%;对照组为白天30℃(14 h)、黑夜25℃(10 h),相对湿度75%。各处理重复3次,处理3 d后,测定叶绿素相对含量(SPAD值)、株高、根长、地上部鲜重、根鲜重、地上部干重和根干重;选取第1片完全展开叶测定丙二醛(MDA)含量、过氧化氢(H₂O₂)和超氧阴离子(O₂⁻)含量、超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化物酶(POD)活性;同时选取第1片完全展开叶进行蛋白质组学分析。

(2) 试验 II: 播种7 d后选取生长一致的幼苗移栽至网室。抽穗时,选择生长发育进程基本一致的植株移栽于5 L塑料桶中,置入人工气候箱中处理,随机排列基因型,且每天重新排列,以消除位置引起的误差。高温处理为白天40℃(14 h)、黑夜35℃(10 h),相对湿度为75%;对照组设置为白天30℃(14 h)、黑夜22℃(10 h),相对湿度75%。处理3 d后,从人工气候箱中移出植株,放回自然条件下生长,直至成熟。为防止过分拥挤,保证其正常生长,并使单株抽穗开花时间相对集中,去除一些分蘖,使每株只保留3个最大的分蘖。成熟后记录各基因型不同处理植株的单穗结实率。处理结束时,测定剑叶的SPAD值、MDA含量、H₂O₂和O₂⁻含量、SOD和POD活性;同时,取剑叶作为蛋白质组学分析样本。

1.2 植株生长性状考察

选水稻幼苗上部第1片完全展开叶和抽穗期植

株剑叶,用叶绿素仪(Minolta SPAD-502, Japan)测定 SPAD 值。苗期处理时,收获各品种不同处理幼苗,蒸馏水冲洗后,拭干,测定株高、根长和鲜重。将测完鲜重的样品置于烘箱中 105℃杀青 2 h, 70℃烘 48 h, 测定干重。

1.3 生理指标测定方法

按许长成等^[22]的方法测定 MDA 含量。按阮海华等^[23]的方法测定 SOD 和 POD 活性。按 Lin 和 Kao^[24]的方法测定 H₂O₂ 含量。按 Li 等^[25]的方法测定 O₂⁻ 含量。

1.4 蛋白质组学分析

1.4.1 蛋白质提取 按王经源等^[26]的 TCA-丙酮沉淀法进行。用 Bradford 法测定蛋白质含量后,用作电泳样品。

1.4.2 双向电泳与凝胶成像 参考余初浪等^[27]的方法,并做少量修改。第一等电聚焦(IEF)采用 24 cm pH 3~10 IPG 胶条。吸取含 150 μg 蛋白的样品溶液,加入溶胀液至 250 μL。20℃下 500 V 1 h, 1 000 V 1 h, 4 000 V 1 h, 8 000 V 1 h, 50 000 V 1 h, 500 V 足够长时间。第二向聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)的分离胶浓度为 12%, 1 mm 厚度,不用浓缩胶。参照 Yan 等^[28]的方法进行银染。用 Umax PowerLook 扫描仪扫描凝胶图像,构建蛋白质表达图谱; Image Master 5.0 软件分析凝胶图像。参考 Neuhoff 等^[29]的方法将制备胶用考马斯亮蓝染色法染色。

1.4.3 质谱分析与数据库检索 采用美国 ABI 公

司的 MALDI-TOF-MS 质谱仪(ABI 4800 型)进行质谱分析,获得肽指纹图谱(PMF),用 MASCOT 软件检索查询。选用 NCBI 数据库;物种 viridiplantae (green plants);用 Trypsin 酶解;最大未水解酶切位点数(max missed cleavages),选择 1;固定修饰,选择 Carbamidomethyl (C);可变修饰,选择 Oxidation (M);可接受的肽段分子量误差为 0.3 Da。

1.5 数据分析

采用 SAS 9.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)进行所有生理学数据的方差分析和基因型间显著性 ($P<0.05$)检验。耐热系数(heat-tolerant coefficient, HTC, %)=(高温处理株系的结实率/相应株系的自然结实率)×100%。

2 结果与分析

2.1 高温对水稻生长性状的影响

高温处理抑制水稻幼苗生长,表现为两品种的 SPAD 值、株高、根长和生物量下降。敏感品种明恢 63 的下降程度大于耐热品种密阳 46 (表 1)。除密阳 46 的 SPAD 值和根长外,其余所有参数下降均达显著水平 ($P<0.05$)。与对照相比,明恢 63 的 SPAD 值、株高、根长、地上部鲜重、根鲜重、地上部干重和根干重分别下降 11.8%、28.4%、18.8%、58.3%、64.6%、53.5%和 62.5%;相应地,密阳 46 以上参数分别下降 0.3%、20.9%、1.0%、31.2%、32.7%、18.1%和 26.7%。

表 1 高温胁迫对水稻幼苗 SPAD 值及生长性状的影响

Table 1 Effect of high temperature stress on SPAD value and growth traits of two-week old rice seedlings

品种 Variety	处理 Treat.	SPAD 值 SPAD value	株高 PH (cm)	根长 RL (cm)	地上部鲜重 SFW (g)	根鲜重 RFW (g)	地上部干重 SDW (g)	根干重 RDW (g)
明恢 63 Minghui 63	常温 NT	33.1±0.06 a	30.3±0.36 a	6.4±0.06 b	0.516±0.047 a	0.223±0.020 a	0.101±0.011 a	0.024±0.003 a
	高温 HT	29.2±0.15 b	21.7±0.56 c	5.2±0.21 c	0.215±0.026 c	0.079±0.009 c	0.047±0.005 c	0.009±0.001 c
密阳 46 Milyang 46	常温 NT	30.5±1.22 b	25.3±0.49 b	7.0±0.15 a	0.375±0.012 b	0.162±0.013 b	0.072±0.003 b	0.015±0.002 b
	高温 HT	30.4±0.56 b	20.0±0.75 d	6.9±0.10 a	0.258±0.020 c	0.109±0.022 c	0.059±0.005 c	0.011±0.003 c

所有数据均为 3 个重复的平均值。不同字母代表 4 个区组间的显著性差异 ($P<0.05$)。

Data were means of three independent replications. Values within a column followed by different letters are significant by different ($P<0.05$) among the four blocks. NT: normal temperature; HT: high temperature; PH: plant height; RL: root length; SFW: shoot fresh weight; RFW: root fresh weight; SDW: shoot dry weight; REW: root dry weight.

抽穗期高温处理的剑叶 SPAD 值,明恢 63 显著下降,而密阳 46 变化较小(表 2)。高温胁迫对结实率的影响也因品种而异,明恢 63 的结实率从对照的 86.4%下降到处理的 5.9%,密阳 46 则从 79.4%下降到 19.2%,下降程度明显较轻。从图 1 还可以看出,高温胁迫后密阳 46 有较多正常灌浆的籽粒。

2.2 高温对 MDA、H₂O₂ 和 O₂⁻ 含量的影响

如图 2 所示,高温胁迫增加叶片 MDA 含量,且增加程度因品种而异,敏感品种明恢 63 增加较多,苗期和抽穗期分别比对照增加 48.7%和 20.8%;而耐热品种密阳 46 仅分别增加 3.2%和 11.3%。

高温胁迫显著增加水稻幼苗叶片的 H₂O₂ 含量

表 2 高温胁迫对水稻结实率、SPAD 值及耐热系数的影响
Table 2 Effect of high temperature on SPAD value, seed setting rate, and heat-tolerant coefficient

品种 Variety	处理 Treatment	SPAD 值 SPAD value	结实率 Seed setting rate (%)	耐热系数 Heat-tolerant coefficient (%)
明恢 63 Minghui 63	常温 Normal temperature	47.8±0.42 b	86.4±0.70 a	6.8 b
	高温 High temperature	45.3±0.82 c	5.9±1.01 d	
密阳 46 Milyang 46	常温 Normal temperature	49.9±0.10 a	79.4±1.20 b	24.1 a
	高温 High temperature	50.1±0.17 a	19.2±3.89 c	

所有数据均为 3 个重复的平均值。不同字母代表 4 个区组间的显著性差异 ($P < 0.05$)。

Data were means of three independent replications. Different letters indicate significant differences ($P < 0.05$) among the 4 blocks and refer to each subset of data.



图 1 不同温度处理下明恢 63 和密阳 46 的结实情况

Fig. 1 Floret fertility and fulfillment of Minghui 63 and Milyang 46 under different temperature treatments

左侧小穗为高温处理; 右侧小穗为常温处理; 红圈表示发育正常的颖花。

The left panicle was under high temperature treatment, and the right panicle under normal condition. The red circle demonstrates normally-developed florets.

($P < 0.05$) (图 2-C), 其中明恢 63 比对照增加了 57.0%, 而密阳 46 增加了 52.5%。在抽穗期, 高温胁迫使明恢 63 叶片的 H_2O_2 含量比对照增加 23.2%, 而密阳 46 的 H_2O_2 含量未见显著性变化。

高温胁迫也增加叶片的 O_2^- 含量 (图 2-E), 且增加程度亦因品种而异。明恢 63 均表现显著增加, 苗期和抽穗期分别增加 47.6% 和 65.8%。而密阳 46 的 O_2^- 含量, 在苗期高温胁迫处理与对照无显著差异; 在抽穗期增加 38.3%, 增幅小于敏感品种。

2.3 高温对 SOD 和 POD 活性的影响

如图 2 所示, 高温胁迫增加叶片的 SOD 活性, 且增加程度因品种而异, 表现为耐热品种密阳 46 增加更多。与对照相比, 密阳 46 幼苗叶片的 SOD 活性增加 13.6%, 抽穗期增加 9.8%; 而明恢 63 在苗期和抽穗期分别增加 7.7% 和 4.1%, 与对照的差异不显著。

高温处理对 POD 活性的影响不大 (图 2-D)。如抽穗期, 明恢 63 的 POD 活性 ($15.6 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ FW}$) 仅比对照 ($15.4 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ FW}$) 高 1.4%。另外, 无论是高温胁迫还是对照, 耐热水稻品种密阳 46 的 POD 活性均高于敏感品种明恢 63。

2.4 高温胁迫下水稻叶片蛋白质组的变化

为阐明水稻的高温伤害和耐性机制, 利用不同温度处理下的水稻幼苗第 1 片完全展开叶和抽穗期水稻剑叶, 进行了蛋白质组学分析。在每一块 2-DE 胶图上, 均检测到 1 000 多个可重复的蛋白点。在高温胁迫下, 有 50 多个蛋白点至少在其中一个品种中表达量发生了很大的变化。对其中的 35 个蛋白点进行质谱鉴定, 鉴定到 24 个, 分别标记为 1~24; 另外 11 个蛋白点 (编号为 25~35) 在蛋白数据库中没有明显的同源匹配蛋白, 未能成功鉴定 (图 3)。与对照相比, 高温下明恢 63 幼苗叶片的蛋白点中, 表达量

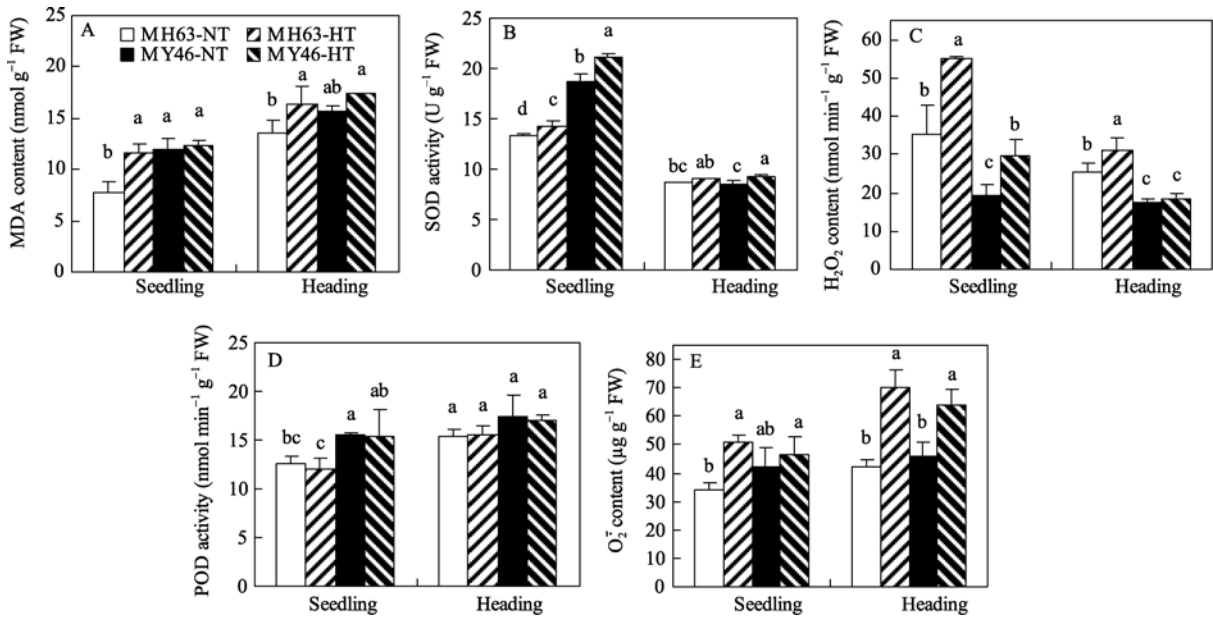


图 2 高温对不同水稻品种叶片 MDA、H₂O₂ 和 O₂⁻ 含量以及 SOD、POD 活性的影响
Fig. 2 Effect of high temperature at seedling stage or heading stage on MDA content (A), activities of SOD (B), H₂O₂ content (C), O₂⁻ content (D), and activities of POD (E) of different heat-tolerant rice genotypes
 MH63: 明恢 63; MY46: 密阳 46; NT: 正常温度; HT: 高温。
 MH63: Minghui 63; MY46: Milyang 46; NT: normal temperature; HT: high temperature. Base marked by different letters are significantly different at *P*<0.05.

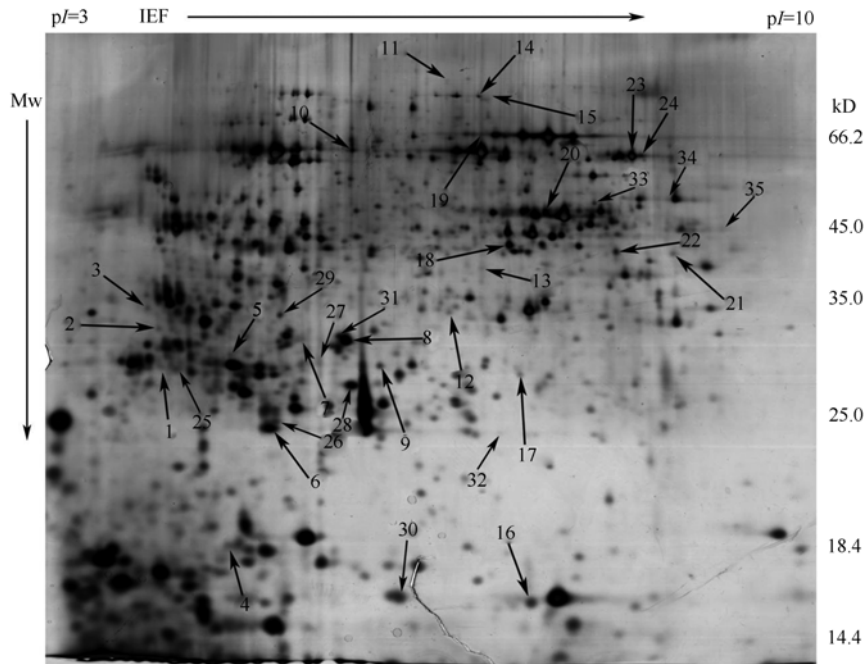


图 3 正常温度下生长的明恢 63 幼苗叶片的双向凝胶电泳图谱
Fig. 3 2-DE gels of proteins extracted from the leaves of rice seedlings of MINGHUI 63 which grew under normal temperature
 数字和箭头标注的即为质谱鉴定确定的 24 个差异蛋白点和未成功鉴定的 11 个蛋白点。
 Twenty-four differentially accumulated protein spots that were identified by MS and 11 unidentified protein spots are numbered and indicated by arrows.

上升的有 3 个(点 3、点 11 和点 24), 下降的有 10 个(点 1、点 7、点 8、点 10、点 12、点 14、点 16、点 18、点 20 和点 22); 相应地, 密阳 46 中表达量上升的蛋白点有 3 个(点 5、点 20 和点 24), 下降的有 2

个(点 10 和点 13)。在抽穗期, 与对照相比, 高温下明恢 63 剑叶的蛋白质组中表达量上升的蛋白点有 3 个(点 3、点 23 和点 24), 下降的有 10 个(点 2、点 8、点 9、点 12、点 15、点 16、点 17、点 19、点 20 和

点 21); 而密阳 46 表达量上升的有 7 个(点 3、点 4、点 5、点 13、点 20、点 23 和点 24), 下降的有 6 个(点 2、点 6、点 9、点 12、点 17 和点 19)。

2.4.1 光合作用相关蛋白 由质谱鉴定和数据库检索结果(表 3)可知, 点 9、点 14、点 15、点 16、点 17、点 18、点 21 和点 22 都为 1,5-二磷酸核酮糖

表 3 质谱鉴定成功的蛋白点的信息
Table 3 Leaf proteins responsive to high-temperature stress identified by MALDI-TOF-MS

编号 ¹⁾ ID ¹⁾	蛋白质名称 Protein name	理论 等电点 ²⁾ H. pI ²⁾	理论 分子量 ³⁾ H. Mw ³⁾	分数 ⁴⁾ Score ⁴⁾	覆盖率 ⁵⁾ SC ⁵⁾ (%)	匹配 肽段数 ⁶⁾ PM ⁶⁾	登录号 Accession No.	物种 Species
1	20 kD 伴侣蛋白 Os09g0438700 (20 kD chaperonin)	5.97	25.5	88	23	9	NP 001063270	<i>Oryza sativa</i>
2	ATP 合成酶 α 亚基 ATPase alpha subunit	5.95	55.1	70	20	17	AAM12499	<i>Oryza sativa</i>
3	Os04g0490800 (Haloacid dehalogenase-like hydrolase domain containing protein)	6.75	39.5	219	34	17	NP 001053167	<i>Oryza sativa</i>
4	2-cys 过氧化物酶 BAS1 Os02g0537700 (2-cys peroxiredoxin BAS1)	5.67	28.1	305	49	16	NP 001047050	<i>Oryza sativa</i>
5	Os01g0501800 (Photosystem II oxygen-evolving complex protein 1)	6.10	34.8	266	31	15	NP 001043134	<i>Oryza sativa</i>
6	放氧复合蛋白 Os07g0141400 (23 kD polypeptide of photosystem II)	8.66	26.9	190	46	16	NP 001058863	<i>Oryza sativa</i>
7	铁氧化蛋白-NADP(H)-氧化还原酶 Putative ferredoxin-NADP(H) oxidoreductase	7.98	40.6	136	28	17	BAD07827	<i>Oryza sativa</i>
8	铁氧化蛋白-NADP(H)-氧化还原酶 Putative ferredoxin-NADP(H) oxidoreductase	7.98	40.6	227	48	25	BAD07827	<i>Oryza sativa</i>
9	1,5-二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶 Rubisco	6.32	49.5	254	25	15	AAC35114	<i>Neomoorea irrorata</i>
10	ATP 合成酶 CF1 α 亚基 ATP synthase CF1 alpha subunit	5.95	55.6	472	53	33	NP 039380	<i>Oryza sativa</i>
11	Fd-谷氨酸合成酶 Putative ferredoxin-dependent glutamate synthase	6.42	174.6	93	14	39	BAD30339	<i>Oryza sativa</i>
12	ATP 合成酶 CF1 α 链 ATP synthase CF1 alpha chain	6.66	58.9	165	26	20	AAS46052	<i>Oryza sativa</i>
13	ATP 合成酶 CF1 α 亚基 ATP synthase CF1 alpha subunit	5.95	55.6	88	20	15	NP 039380	<i>Oryza sativa</i>
14	1,5-二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶大亚基 Rubisco large subunit	6.13	50.5	179	32	19	AAB37133	<i>Caryopteris bicolor</i>
15	1,5-二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶大亚基 Rubisco large subunit	6.45	46.2	75	25	15	BAD60963	<i>Harperocal- lis flava</i>
16	1,5-二磷酸核酮糖羧化酶小亚基 ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase small subunit	9.40	19.6	160	48	11	AAB70543	<i>Oryza sativa</i>
17	1,5-二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶大亚基 Rubisco large subunit	6.33	53.7	240	26	17	YP 654221	<i>Oryza sativa</i>
18	1,5-二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶 Rubisco	6.32	49.5	383	26	19	AAC35114	<i>Neomoorea irrorata</i>
19	FAD-吡啶二硫化核苷酸氧化还原酶 Os01g0328700 (FAD-dependent pyridine nucleotide- disulphide oxidoreductase domain containing protein)	7.21	52.6	295	41	27	NP 001042918	<i>Oryza sativa</i>
20	磷酸吡哆醛-转移酶 Os08g0502700 (pyridoxal phosphate-dependent trans- ferase)	8.19	44.2	120	28	18	NP 001062170	<i>Oryza sativa</i>
21	1,5-二磷酸核酮糖羧化酶大亚基 Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase, large subunit	6.33	51.1	197	29	19	BAA04194	<i>Disporum sessile</i>
22	1,5-二磷酸核酮糖羧化酶 Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase	6.32	49.6	193	28	19	AAK72540	<i>Wolffia australiana</i>
23	过氧化氢酶 Catalase	6.93	56.8	395	38	26	BAA34205	<i>Oryza sativa</i>
24	过氧化氢酶 Catalase	7.36	56.1	162	32	27	BAA34714	<i>Oryza sativa</i>

¹⁾ 斑点 ID (与图 3 相对应); ²⁾ 推断的等电点; ³⁾ 推断的分子量; ⁴⁾ 蛋白质分数; ⁵⁾ 顺序覆盖率; ⁶⁾ 匹配肽段数。

¹⁾ spot ID (corresponding to Fig. 3); ²⁾ hypothetical isoelectrical point; ³⁾ hypothetical molecular weight; ⁴⁾ protein score; ⁵⁾ sequence coverage; ⁶⁾ the number of peptides matched.

羧化酶/加氧酶(Rubisco)相关蛋白,这类蛋白在高温胁迫下表达量大幅度下降(图4)。Rubisco是存在于绿色植物中的重要蛋白复合体,是决定C₃植物光合效率的关键酶,具有同时参与光合CO₂固定及光呼吸CO₂释放的双重功能,其活性与光合作用密切相关^[30]。Bose和Ghosh^[31]研究证明,40℃以上的高温胁迫显著降低Rubisco亚基的活性和表达量。其他一些试验也得到类似的结果^[16-17]。

20 kD 伴侣蛋白(点1)也与光合作用关系密切,它在植物体内主要与cpn60家族协同作用,促进Rubisco大小亚基装配成具有活性的全酶,利于CO₂的固定。PSII 23 kD 蛋白(点6)是光系统II(PSII)的外周蛋白,具有增加Ca²⁺和Cl⁻的结合、维持放氧活性的作用^[32]。高温胁迫导致20 kD 伴侣蛋白和PSII 23 kD 蛋白表达量的下降(图4)。

放氧复合蛋白(oxygen-evolving complex protein)存在于质膜的PSII中,主要位于PSII将H₂O氧化释放O₂的位置。研究表明,PSII放氧复合蛋白含有19个亚基(16个位于内部,3个位于外部),这些亚基有的可作为载体,有的则作为共转录因子^[33]。高温胁迫导致PSII放氧复合蛋白1(点5)表达量的增加(图4)。氧化胁迫和渍水胁迫等也会导致PSII放氧复合蛋白1表达量的上升^[34-35]。

2.4.2 能量相关蛋白 由表3可知,点2、点10、点12和点13都是ATP合成酶相关蛋白。高温胁迫导致ATP合成酶活性的下降(图4)。ATP合成酶是内膜上的一种多亚基复合蛋白,是ATP生物合成过程中的主要酶。ATP合成酶有2个主要部分F₀和F₁,F₀在膜的外侧,有3个接触位点,由5个不同的亚基组成;而F₁则形成一个跨膜蛋白,由3个亚基组成。高温胁迫下ATP合成酶表达量的下降将会影响需要独立能量供应的生物化学反应。Wang等^[36]认为,CF₁ α-亚基在ATP合成酶的多亚基装配过程中有组织功能。

2.4.3 代谢相关蛋白 高温胁迫导致明恢63叶片中铁氧化蛋白-NADP(H)-氧化还原酶[ferredoxin NADP(H) oxidoreductases, FNR](点7和点8)表达量的下降(图4)。植物体内的FNR与PSI、PSII、电子传递、氮素固定等有关。FNR能提供NADPH以利于CO₂的固定,而且它也能利用NADPH还原铁氧化蛋白。高温减少FNR的表达量在大豆叶片中也曾发现过^[37]。Girardini等^[38]研究认为,FNR不仅参与固醇类化合物的生物合成,而且在ROS导致的细胞

损伤或线粒体损伤中起保护酶的作用。

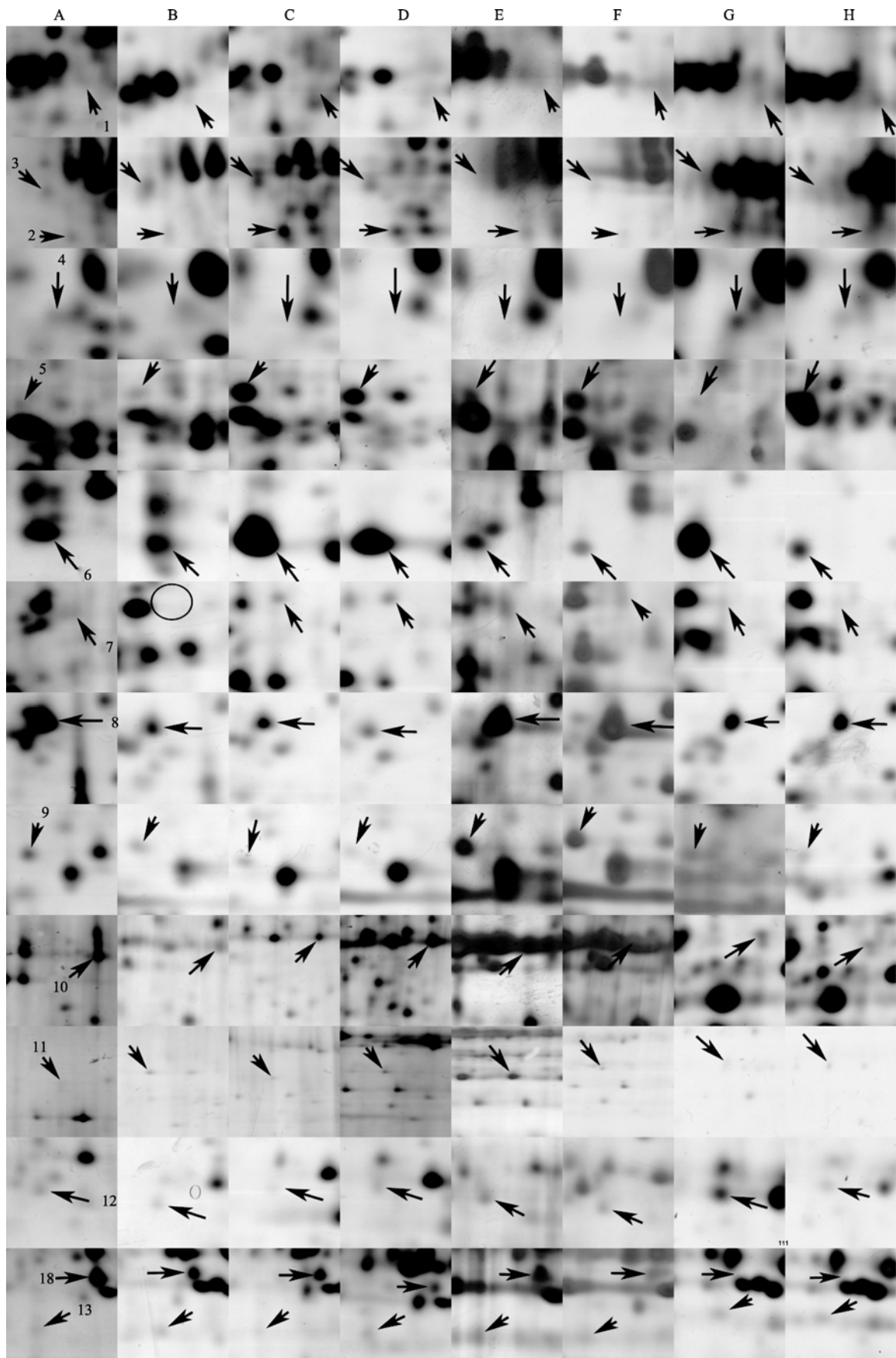
谷氨酸合酶(glutamate synthase, GOGAT)催化谷氨酰胺的胺基在NAD(P)H或还原型铁氧还蛋白的存在下,还原转移于α-酮戊二酸,生成2分子谷氨酸。高温胁迫下,Fd-GOGAT(点11)表达量的增加利于维持植物体内的正常代谢。同时,高温胁迫导致FAD-吡啶二硫化核苷酸氧化还原酶(FAD-dependent pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase)(点19)表达量的下降。FAD-吡啶二硫化核苷酸氧化还原酶能有效地催化二硫键的形成^[39]。另外,磷酸吡哆醛-转移酶(pyridoxal phosphate-dependent transferase)(点20)和Haloacid dehalogenase-like hydrolase (HDHD)(点3)都为代谢类蛋白。

2.4.4 抗逆相关蛋白 2-cys 过氧化物酶(2-cys peroxiredoxin)是过氧化物蛋白(Prxs)的一种。Prxs是一类新的过氧化物酶,它可以催化H₂O₂还原为水,或在供氢体的存在下,催化各种烷基过氧化物还原为水和相应的醇。植物体内的2-cys过氧化物酶被称为BAS1(点4),高温胁迫导致其表达量上升(图4)。由图4可知,高温胁迫诱导过氧化氢酶(点23和点24)表达量的上升。Majoul等^[40]研究发现,六倍体小麦在开花期受高温胁迫后,过氧化氢酶表达量增加显著。而高温胁迫同样也造成番茄叶片中过氧化氢酶等抗氧化酶类活性的增加^[41]。过氧化氢酶可保护高温胁迫下水稻的正常生长和发育。

3 讨论

高温对水稻生长发育的影响曾有过不少报道^[16-17,19]。本试验表明,无论在苗期还是在抽穗期,高温都降低水稻的SPAD值。苗期高温还导致水稻株高、根长和生物量的下降,而抽穗期高温严重影响水稻的结实率。高温胁迫下水稻叶片的H₂O₂和O₂⁻以及MDA含量增加,说明氧化胁迫加重(图2),与此相对应,一些抗氧化酶的活性增加。同时,高温对水稻生长及生理性状的影响因品种而异。本试验中,高温对耐热品种密阳46的影响明显小于对敏感品种明恢63的影响。如高温对密阳46的SPAD值影响很小,苗期叶片的MDA值和抽穗期剑叶的H₂O₂含量与对照无显著差异。蛋白质组学分析结果则佐证了生理学分析结果。

高温胁迫导致水稻叶片中光合作用相关蛋白以及能量类、代谢类蛋白表达量的下降(表3和图4)。同时,高温胁迫也诱导产生了一些抗逆蛋白。另外,



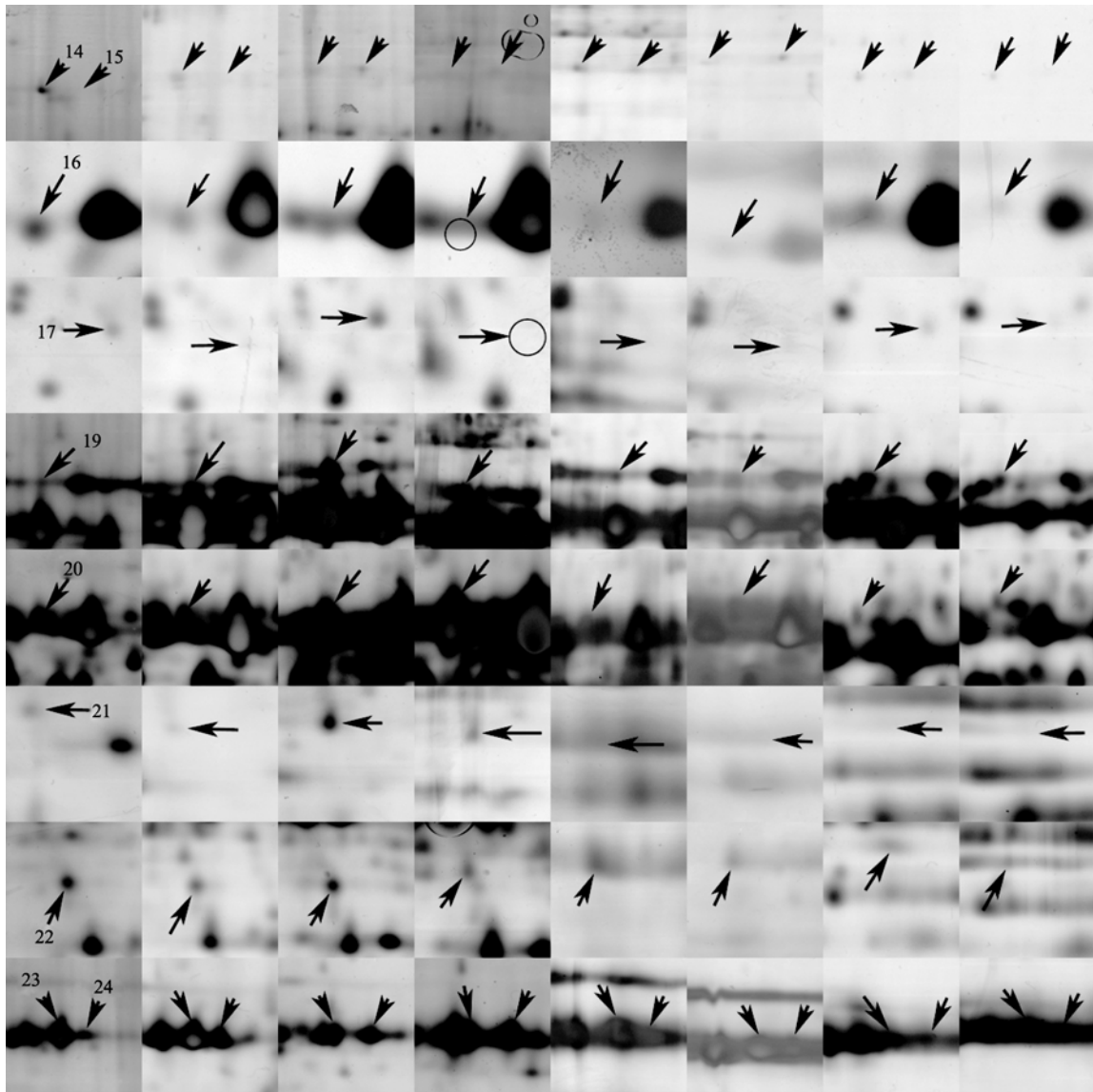


图 4 差异蛋白在各处理下的表达情况

Fig. 4 Close-up views of the differentially expressed proteins identified by MALDI-TOF-MS analysis

A: 明恢 63, 正常温度, 苗期; B: 明恢 63, 高温, 苗期; C: 明恢 63, 正常温度, 抽穗期; D: 明恢 63, 高温, 抽穗期; E: 密阳 46, 正常温度, 苗期; F: 密阳 46, 高温, 苗期; G: 密阳 46, 正常温度, 抽穗期; H: 密阳 46, 高温, 抽穗期。箭头标注的蛋白点与图 3 一致。

A: Minghui 63, normal temperature, at seedlings stage; B: Minghui 63, high temperature, at seedlings stage; C: Minghui 63, normal temperature, at heading stage; D: Minghui 63, high temperature, at heading stage; E: Milyang 46, normal temperature, at seedlings stage; F: Milyang 46, high temperature, at seedlings stage; G: Milyang 46, normal temperature, at heading stage; H: Milyang 46, high temperature, at heading stage. Arrows indicate the protein spots which were consistent with these in Fig. 3.

蛋白质组学分析结果表明, 耐热品种密阳 46 和敏感品种明恢 63 之间存在着差异。高温所导致的 Rubisco 相关蛋白表达量下降, 明恢 63 的下降程度远大于密阳 46; 而密阳 46 叶片中 PSII 放氧复合蛋白 1 的表达有助于其光合作用的正常进行。能量类蛋白中, ATP 合成酶相关蛋白的表达在明恢 63 中显著下降, 且其叶片中 FNR 表达量下降也证明高温造成了严重损伤。在高温胁迫对磷酸吡哆醛-转移酶的表达量的影响上, 明恢 63 叶片表现下降, 而密阳 46 叶片表

现上升, 进一步佐证了密阳 46 的耐热性。高温胁迫诱导密阳 46 叶片中 BAS1 的表达量的上升, BAS1 能保护高温胁迫下光合作用的顺利进行以及清除植物体内过多的 H_2O_2 。

综上所述, 耐热品种密阳 46 有更多的热应对机制, 其通过抗氧化酶(SOD、CAT 和 BAS1)、光合相关蛋白(PSII 放氧复合蛋白 1)和代谢相关蛋白(磷酸吡哆醛-转移酶)的过表达来维持其高温胁迫下的正常生长。Jagadish 等^[19]在研究不同耐热性水稻品种

对开花期高温胁迫的反应时发现, 强耐热品种 N22 中热激蛋白和冷激蛋白表达量上升, 铁缺失蛋白表达量下降; 而热敏感品种 Moroberekan 中热激蛋白和冷激蛋白表达量下降, 铁缺失蛋白和可溶性无机焦磷酸酶(soluble inorganic pyrophosphatase)表达量上升。相应地, 高温使耐热品种 IR64 中热激蛋白、冷激蛋白和核糖体蛋白上升, 丝氨酸蛋白酶(serine protease)、引导蛋白(dirigent)和铁缺失蛋白下降。类似结果在大麦和翦股颖草的高温试验中也被发现^[2-3]。

水稻的生长发育需要一定的温度。一定范围内, 温度升高促进生长, 但过高的温度会抑制水稻生长。苗期高温使秧苗发育不良; 营养生长期遇高温导致营养生育期缩短, 生长发育受阻, 分蘖受抑制; 幼穗分化期遇高温导致花粉发育异常, 致结实率下降^[42]。一般作物的生殖生长都较营养生长更易受到高温胁迫, 抽穗开花期是水稻生长发育过程中对温度变化最敏感的时期^[18,43]。Satake 和 Yoshida^[18]研究发现, 小花在水稻开花期遇 35℃ 以上高温 5 d, 导致花粉败育, 结实率为零。本研究中, 蛋白质组学分析结果表明, Rubisco 相关蛋白的表达量下降主要发生在抽穗开花期。ATP 合成酶的表达量下降在抽穗开花期也十分明显。光合作用相关蛋白 PSII 23 kD 蛋白和代谢类蛋白 FAD-吡啶二硫化核苷酸氧化还原酶的表达量下降也发生在抽穗开花期, 说明抽穗开花期较苗期对温度变化更为敏感。

高温胁迫导致植物体内 ROS 的过多积累, 致使膜结构和功能以及蛋白质和核酸等受损, 甚至导致细胞死亡。为了应对由此造成的氧化损伤, 细胞内有一套抗氧化系统, 以清除过多的 ROS 及其诱导产生的有毒物质。Lee 等^[16]对正常温度和高温胁迫下生长的水稻幼苗叶片进行蛋白质组学分析, 结果显示, 高温使 3 类抗氧化酶, 即谷胱甘肽 S-转换酶(glutathione S-transferase, GST)、脱氢抗坏血酸还原酶(dehydroascorbate reductase, DHAR)和硫氧化酶(thioredoxin *h*-type)上调。Han 等^[17]报道, 温度越高, 水稻幼苗叶片中 DHAR 表达量越大。本研究表明, 高温诱导两水稻品种叶片中 CAT 表达量上升。另外, 抽穗期高温胁迫使耐热水稻品种密阳 46 叶片中 BAS1 表达量上升。

高温使 BAS1 的表达量上升, 这是本研究首次发现的。Dietz 等^[44]研究认为, BAS1 可降低氧化胁迫对叶绿体蛋白的损伤。Baier 和 Dietz^[45]研究认为, BAS1 与烷基过氧化氢还原酶(subunit C of alkyl hydroper-

oxide reductase, AhpC)关系密切, 活跃在类囊体的基质表面。在拟南芥的叶片生长中, BAS1 能保护光合组织免遭氧化胁迫^[46]。BAS1 还可以作为叶绿体中氧化胁迫的信号, 继而引发一系列胞内反应。可以认为, 由于 BAS1 能清除植物体内过多的 H₂O₂, 故能保护高温胁迫下的水稻顺利进行光合作用。

水稻叶片蛋白中大量存在的 Rubisco 对试验结果产生一定的影响。因此, 在今后的蛋白质组学分析中, 应利用聚乙二醇(PEG)预分离技术等去除水稻叶片中的 Rubisco, 以获得更多的相关信息。本研究中一些蛋白质的表达量过低, 使后期数据库检索过程中无法获得明显的同源匹配蛋白, 未能成功鉴定。因此, 拟在今后研究中加大上样量, 对尚未成功鉴定的 11 个差异表达蛋白点继续做质谱鉴定分析, 对已经成功鉴定的部分蛋白质做验证分析(Western-blot)。

4 结论

苗期或抽穗期高温处理导致热敏感品种明恢 63 和耐热品种密阳 46 结实率、SPAD 值、株高、根长和生物量的下降, 丙二醛、过氧化氢、超氧阴离子含量的增加和超氧化物歧化酶活性的提高。同时, 高温胁迫对明恢 63 的影响要大于对密阳 46 的影响。高温胁迫可使水稻叶片蛋白中光合作用相关蛋白和能量代谢类蛋白表达量的下降, 以及抗逆相关蛋白表达量的上升。耐热品种密阳 46 通过抗氧化酶(SOD、CAT 和 BAS1)、光合相关蛋白(PSII 放氧复合蛋白 1)和代谢相关蛋白(磷酸吡哆醛-转移酶)的过表达维持其高温胁迫下的正常生长。

References

- [1] Wilkins M R, Williams K L, Appel R D, Hochstrasser D F. Proteome Research, New Frontiers in Functional Genomics. Berlin: Springer-Verlag, 1997. pp 304-331
- [2] Süle A, Vanrobaeys F, Hajós G, Van Beeumen J, Devreese B. Proteomic analysis of small heat shock protein isoforms in barley shoots. *Phytochemistry*, 2004, 65: 1853-1863
- [3] Xu C P, Huang B R. Root proteomic responses to heat stress in two *Agrostis* grass species contrasting in heat tolerance. *J Exp Bot*, 2008, 59: 4183-4194
- [4] Yan S P, Zhang Q Y, Tang Z C, Su W A, Sun W N. Comparative proteomic analysis provides new insights into chilling stress responses in rice. *Mol Cell Proteomics*, 2006, 5: 484-496
- [5] Pinheiro C, Kehr J, Ricardo C P. Effects of water stress on lupin

- stem protein analysed by two-dimensional gel electrophoresis. *Planta*, 2005, 221: 716–728
- [6] Wang S B, Chen F, Sommerfeld M, Hu Q. Proteomic analysis of molecular response to oxidative stress by the green alga *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). *Planta*, 2004, 220: 17–29
- [7] Yan S, Tang Z, Su W, Sun W. Proteomic analysis of salt stress-responsive proteins in rice root. *Proteomics*, 2005, 5: 235–244
- [8] Labra M, Gianazza E, Waitt R, Eberini I, Sozzi A, Grassi F, Agradi E. *Zea mays* L. protein changes in response to potassium dichromate treatments. *Chemosphere*, 2006, 62: 1234–1244
- [9] Salekdeh G H, Siopongco J, Wade L J, Ghareyazie B, Bennett J. Proteomics analysis of rice leaves during drought stress and recovery. *Proteomics*, 2002, 2: 1131–1145
- [10] Imin N, Kerim T, Weinman J J, Rolfe B G. Characterisation of rice anther proteins expressed at the young microspore stage. *Proteomics*, 2001, 1: 1149–1161
- [11] Salekdeh G H, Siopongco J, Wade L J, Ghareyazie B, Bennett J. A proteomics approach to analyzing drought- and salt-responsiveness in rice. *Field Crops Res*, 2002, 76: 199–219
- [12] Agrawal G K, Rakwal R, Yonekura M, Kubo A, Saji H. Proteome analysis of differentially displayed proteins as a tool for investigating ozone stress in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. *Proteomics*, 2002, 2: 947–959
- [13] Shen S, Jing Y, Kuang T. Proteomics approach to identify wound-response related proteins from rice leaf sheath. *Proteomics*, 2003, 3: 527–535
- [14] Peng S, Huang J, Sheehy J E, Laza R C, Visperas R M, Zhong X H, Centeno G S, Khush G S, Cassman K G. Rice yields decline with higher night temperature from global warming. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101: 9971–9975
- [15] Grover A, Chandramouli A, Agarwal S, Katiyar-Agarwal S, Agarwal M, Sahi C. Transgenic rice for tolerance against abiotic stresses. In: Datta S K ed. *Rice Improvement in the Genomic Era*. USA: Hawarth Press, 2009. pp 237–267
- [16] Lee D G, Ahsan N, Lee S, Kang K Y, Bahk J D, Lee I, Lee B. A proteomic approach in analyzing heat-responsive proteins in rice leaves. *Proteomics*, 2007, 7: 3369–3383
- [17] Han F, Chen H, Li X J, Yang M F, Liu G S, Shen S H. A comparative proteomic analysis of rice seedlings under various high-temperature stresses. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1794: 1625–1634
- [18] Satake T, Yoshida S. High temperature induced sterility in *indica* rices at flowering. *Jpn J Crop Sci*, 1978, 47: 6–17
- [19] Jagadish S V K, Muthurajan R, Oane R, Wheeler T R, Heuer S, Bennett J, Craufurd P Q. Physiological and proteomic approaches to address heat tolerance during anthesis in rice (*Oryza sativa* L.). *J Exp Bot*, 2010, 61: 143–156
- [20] Lin S K, Chang M C, Tsai Y C, Lur H S. Proteomic analysis of the expression of proteins related to rice quality during caryopsis development and the effect of high temperature on expression. *Proteomics*, 2005, 5: 2140–2156
- [21] Yoshida S, Fornal D A, Cock J H, Gomez K A. *Laboratory Manual for Physiological Studies of Rice*. Philippines: International Rice Research Institute, 1976. pp 62–63
- [22] Xu C-C(许长成), Zhao S-J(赵世杰), Zou Q(邹琦). Interference factors of thiobarbituric acid determination in plant membrane lipid peroxidation. *Plant Physiol Commun* (植物生理学通讯), 1993, 29(5): 361–363 (in Chinese)
- [23] Ruan H-H(阮海华), Shen W-B(沈文飏), Ye M-B(叶茂炳), Xu L-L(徐朗莱). Effects of nitric oxide on oxidative injury in wheat leaves under salt stress. *Chin Sci Bull* (科学通报), 2001, 46(23): 1993–1997 (in Chinese)
- [24] Lin C C, Kao C H. Abscisic acid induced changes in cell wall peroxidase activity and hydrogen peroxide level in roots of rice seedlings. *Plant Sci*, 2001, 160: 323–329
- [25] Li J Y, Jiang A L, Zhang W. Salt stress-induced programmed cell death in rice root tip cells. *J Integr Plant Biol*, 2007, 49: 481–486
- [26] Wang J-Y(王经源), Chen S-Y(陈舒奕), Liang Y-Y(梁义元), Lin W-X(林文雄). Improvement of ISO-DALT electrophoresis system. *J Fujian Agric & For Univ* (福建农林大学学报), 2006, 35(2): 187–190 (in Chinese with English abstract)
- [27] Yu C-L(余初浪), Yan S-P(严顺平), Sun W-N(孙卫宁), Yang L(杨玲). High-resolution two-dimensional electrophoresis for total proteins in rice roots, leaves and suspension cells. *Chin J Rice Sci* (中国水稻科学), 2006, 20(5): 549–552 (in Chinese with English abstract)
- [28] Yan J X, Wait R, Berkelman T, Harry R A, Westbrook J A, Wheeler C H, Dunn M J. A modified silver staining protocol for visualization of proteins compatible with matrix-assisted laser desorption/ionization and electrospray ionization-mass spectrometry. *Electrophoresis*, 2000, 21: 3666–3672
- [29] Neuhoff V, Arnold N, Taube D, Ehrhardt W. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis*, 1988, 9: 255–262
- [30] Makino A, Mae T, Ohira K. Photosynthesis and ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in rice leaves from emergence through senescence. *Planta*, 1985, 166: 414–420
- [31] Bose A, Ghosh B. Effect of heat stress on ribulose 1,5-bisphos-

- phate carboxylase in rice. *Phytochemistry*, 1995, 38: 1115–1118
- [32] Hankamer B, Barber J, Boekema F J. Structure and membrane organization of photosystem II in green plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1997, 48: 641–671
- [33] James B. Crystal structure of the oxygen-evolving complex of photosystem II. *Inorg Chem*, 2008, 47: 1700–1710
- [34] Ahsan N, Lee D G, Lee K W, Alam I, Lee S H, Bahk J D, Lee B H. Glyphosate-induced oxidative stress in rice leaves revealed by proteomic approach. *Plant Physiol Biochem*, 2008, 46: 1062–1070
- [35] Ahsan N, Lee D G, Lee S H, Kang K Y, Bahk J D, Choi M S, Lee I J, Renaut J, Lee B H. A comparative proteomic analysis of tomato leaves in response to waterlogging stress. *Physiol Plant*, 2007, 131: 555–570
- [36] Wang Z Y, Freire E, McCarty R E. Influence of nucleotide binding site occupancy on the thermal stability of the F1 portion of the chloroplast ATP synthase. *J Biol Chem*, 1993, 268: 20785–20790
- [37] Ahsan N, Donnart T, Nouri M Z, Komatsu S. Tissue-specific defense and thermo-adaptive mechanisms of soybean seedlings under heat stress revealed by proteomic approach. *J Proteome Res*, 2010, 9: 4189–4204
- [38] Girardini J E, Dissous C, Serra E. *Schistosoma mansoni* ferredoxin NADP(H) oxidoreductase and its role in detoxification. *Mol Biochem Parasitol*, 2002, 124: 37–45
- [39] Wang C, Wesener S R, Zhang H L, Cheng Y Q. An FAD-dependent pyridine nucleotide-disulfide oxidoreductase is involved in disulfide bond formation in FK228 anticancer decapeptide. *Chem Biol*, 2009, 16: 585–593
- [40] Majoul T, Bancel E, Tribot E, Hamidal J B, Branlard G. Proteomic analysis of the effect of heat stress on hexaploid wheat grain: characterization of heat-responsive proteins from total endosperm. *Proteomics*, 2003, 3: 175–183
- [41] Rainwater D T, Gossetp D R, Millhollon E P, Hanna H Y, Banks S W, Lucas M C. The relationship between yield and the antioxidant defense system in tomatoes grown under heat stress. *Free Radical Res*, 1996, 25: 421–435
- [42] Ai Q(艾青), Mou T-M(牟同敏). Progresses in rice heat tolerance. *Hubei Agric Sci (湖北农业科学)*, 2008, 47(1): 107–111 (in Chinese with English abstract)
- [43] Farrell T C, Fox K M, Williams R L, Fukai S. Genotypic variation for cold tolerance during reproductive development in rice: screening with cold air and cold water. *Field Crops Res*, 2006, 98: 178–194
- [44] Dietz K J, Horling F, Konig J, Baier M. The function of the chloroplast 2-cysteine peroxiredoxin in peroxide detoxification and its regulation. *J Exp Bot*, 2002, 53: 1321–1329
- [45] Baier M, Dietz K J. Alkyl hydroperoxide reductases: the way out of the oxidative breakdown of lipids in chloroplasts. *Trends Plant Sci*, 1999, 4: 166–168
- [46] Baier M, Dietz K J. Protective function of chloroplast 2-cysteine peroxiredoxin in photosynthesis: evidence from transgenic *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 1999, 119: 1407–1414