

蛋白质组学分析揭示玉米籽粒发育过程中胁迫相关蛋白的表达特性

于涛, 李耕, 刘鹏, 董树亭, 张吉旺, 赵斌

(山东农业大学农学院/作物生物学国家重点实验室, 山东泰安 271018)

摘要:【目的】从蛋白质组学的层面探讨玉米籽粒发育过程中胁迫相关蛋白的表达特性, 分析其功能, 揭示籽粒自身防御系统的分子调控机理。【方法】大田条件下, 以玉米品种登海 661 (DH661) 为供试材料, 67 500 株/hm² 密度下种植, 开花期人工饱和授粉后第 3、5、10、15、20、30、40 和 50 天 (DAP) 取果穗中部籽粒。TCA-丙酮沉淀法提取籽粒总蛋白, 用同位素标记相对定量 (iTRAQ) 技术进行蛋白质组学分析。通过匹配 Uniprot 玉米蛋白数据库鉴定籽粒总蛋白, 并且用基因本论 (GO) 注释按照生物过程、分子功能及细胞组件进行功能分类。分析鉴定籽粒发育过程中显著差异表达的胁迫相关蛋白, 并且将其分层聚类以展示其在籽粒发育过程中的表达模式。【结果】通过匹配玉米蛋白数据库, 籽粒中总计鉴定到 4 751 个蛋白, 这些蛋白涉及多种生物过程与分子功能, 其中代谢过程与分子过程是最主要的两个生物过程, 而催化活性与绑定功能是最主要的两个分子功能类别, 表明这些生物过程与分子功能对籽粒发育具有重要作用。定量分析检测到 123 个胁迫相关蛋白在玉米籽粒发育过程中显著差异表达, 主要参与籽粒蛋白修饰 (33 个)、活性氧 (ROS) 体内平衡 (31 个)、贮藏物质保护 (17 个)、病虫害响应 (8 个) 及其他胁迫响应过程 (34 个)。蛋白修饰相关蛋白主要包含一系列的热激蛋白、肽基脯氨酰顺反异构酶及蛋白二硫键异构酶, 并且这些蛋白在籽粒不同发育阶段均显著积累, 这对稳定籽粒中的蛋白结构具有重要作用。ROS 相关蛋白包含不同的抗氧化酶系, 并且主要在籽粒发育前、后期显著积累, 维护了 ROS 的体内平衡。贮藏物质保护相关蛋白主要包含多种蛋白酶抑制剂、油脂体蛋白及油脂体固醇蛋白, 并且这些蛋白随着籽粒发育不断上调表达, 保护了贮藏物质的合成与积累。病虫害响应相关蛋白同样在籽粒发育后期显著积累, 增强了籽粒对生物胁迫的抗性。其他胁迫响应相关蛋白主要包括一系列的晚期胚胎丰富蛋白 (LEA)、膜联蛋白、脂质转移蛋白、非特异性脂质转移蛋白及脂氧合酶, 其中 LEA 在籽粒发育后期显著积累, 膜联蛋白与脂氧合酶主要在发育前期显著表达, 而脂质转移蛋白及非特异性脂质转移蛋白在籽粒不同发育阶段均有积累, 表明这些蛋白在籽粒不同发育阶段发挥重要作用。【结论】胁迫相关蛋白在籽粒不同发育阶段显著积累, 构建了一个协同、多样、稳定的防御调控机制, 维护了籽粒正常的发育过程。

关键词: 玉米; 籽粒发育; iTRAQ 蛋白质组学; 胁迫相关蛋白; 蛋白功能

Proteomic Analysis of Maize Reveals Expression Characteristics of Stress-Related Proteins During Grain Development

YU Tao, LI Geng, LIU Peng, DONG ShuTing, ZHANG JiWang, ZHAO Bin

(College of Agronomy, Shandong Agricultural University/State Key Laboratory of Crop Biology, Taian 271018, Shandong)

收稿日期: 2016-09-29; 接受日期: 2017-02-20

基金项目: 国家自然科学基金 (31371576, 31401339)、国家重点研发计划项目 (2016YFD0300106, 2016YFD0300205)、国家科技支撑计划项目 (2013BAD07B06-2)、国家公益性行业(农业)科研专项经费项目(201203100, 201203096)、山东省现代农业产业技术体系项目(SDAIT-02-08)、国家现代农业产业技术体系建设项目 (CARS-02-20)、山东省高等学校科技计划项目 (J14LF10)、山东省农业重大应用技术创新课题、山东省玉米育种与栽培技术企业重点实验室

联系方式: 于涛, E-mail: yutaosdnd@163.com. 通信作者刘鹏, E-mail: liupengsdau@126.com. 通信作者董树亭, E-mail: stdong@sdau.edu.cn

Abstract: 【Objective】 In order to understand the molecular regulation mechanism of defense system in maize grain, the expression characteristics of stress-related proteins during grain development were studied by using approach of plant proteomics. **【Method】** Denghai 661 (DH661) was used as experimental material and planted at 67 500 plants/hm² in field. The middle grains were harvested after flowering artificial saturation pollination at 3, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 d, respectively. The total proteins were extracted by the TCA-acetone precipitation method and then were analyzed by isobaric tags for relative and absolute quantitation (iTRAQ) proteomics. The proteins in maize grain were identified by searching the Uniprot maize protein database and gene ontology (GO) annotation was used to classify the functions of these proteins according to the biological process, molecular function and cellular component. Quantitative analysis was applied to identify stress-related proteins that were significantly differentially expressed during grain development. Hierarchical cluster analysis was used to show the expression patterns of these stress-related proteins during grain development. **【Result】** A total of 4 751 proteins were identified in maize grain by matching the maize protein database, and these proteins were involved in diverse biological processes and molecular functions, of which the metabolic process and molecular processes were the main biological processes, and the catalytic activity and binding function were the main molecular categories, showing that these biological processes and molecular functions played important roles in maize grain development. Quantitative analysis detected 123 stress-related proteins were significantly differentially expressed during grain development, and these proteins were mainly involved in grain protein modification (33), reactive oxygen species (ROS) homeostasis (31), storage material protection (17), disease response (8) and other stress response process (34). The proteins related to protein modification mainly included a series of heat shock protein, peptidyl-prolyl cis-trans isomerase and protein disulfide isomerase, and these proteins significantly accumulated at different development stages, which played important roles in stability of protein structure. ROS related proteins contained a variety of antioxidants, and mainly significantly accumulated at both early and late development stages, which maintained the homeostasis of ROS. Storage material protection related proteins mainly contained a variety of protease inhibitors, oleosin and steroleosin, and the expression of these proteins were constantly raised with the grain development, which protected the synthesis and accumulation of storage material. The proteins involved in disease response also significantly accumulated at late development stage, which enhanced the grain resistance to biological stresses. Proteins involved in other stress response mainly included a series of late embryogenesis abundant protein (LEA), annexin, lipid transfer protein, nonspecific lipid transfer protein and lipoxygenase, of which all of the LEA significantly accumulated at late development stage, annexin and lipoxygenase significantly accumulated at early development stage, while lipid transfer protein and nonspecific lipid transfer proteins were accumulated at different development stages, showing that these proteins played important roles in different grain development stages. **【Conclusion】** Stress-related proteins were accumulated during maize grain different development stages, which constructed a harmonious, diverse and stable defense regulatory mechanism, and thus maintained the normal development of maize grain.

Key words: maize; grain development; iTRAQ proteomics; stress-related protein; protein function

0 引言

【研究意义】 玉米作为食物、饲料的重要来源, 其籽粒发育好坏直接关系到最终的产量与品质。然而, 籽粒发育过程中不可避免地遭受复杂多样的环境胁迫, 显著影响籽粒产量与品质的形成。蛋白是生命活动的直接调控者。因此, 在蛋白水平上, 深入研究玉米籽粒发育过程中胁迫相关蛋白的表达特性, 对于解析籽粒自身防御系统的分子调控机理, 增强玉米的抗逆能力, 提高籽粒产量与品质具有重要意义。同时, 对于玉米育种与栽培种植也具有指导价值。**【前人研究进展】** 玉米籽粒发育源于双受精过程, 可划分为三个不同的阶段: 早期发育阶段(库容建成期)、灌浆期及成熟期^[1]。然而, 籽粒在不同发育阶段常常受到多重胁迫, 尤其在籽粒成熟期, 含水量迅速下降, 收

获时的籽粒含水量一般低于 20%^[2]。这种低水分条件下, 玉米其他营养组织细胞会迅速失活, 而籽粒在吸胀后仍能正常萌发, 表明籽粒在发育过程中必须获得充足的耐脱水能力^[3]。前人对生物胁迫如细菌、真菌感染^[4-5]及非生物胁迫包括干旱^[6]、高温^[7-8]、弱光^[9]和淹水^[10-11]对籽粒发育的影响及籽粒应对这些胁迫形态、生理生化的响应机制进行了大量研究。然而, 对其发育过程中防御系统的分子调控过程鲜见报道。蛋白质组学可以在蛋白水平解析籽粒发育过程中胁迫响应的分子调控机理, 其中同位素标记相对定量技术(iTRAQ)能够在复杂样品中大规模鉴定与定量蛋白^[12]。以 iTRAQ 为基础的蛋白质组学分析在小麦^[13]、水稻^[14]中的研究表明, 多种胁迫相关蛋白在籽粒发育过程中显著差异表达, 这些协同表达的蛋白参与籽粒防御调控, 保证籽粒在不同发育阶段的正常发育。**【本**

研究切入点】前人针对玉米籽粒发育过程中形态、生理生化的胁迫响应进行了大量研究,但涉及籽粒发育防御系统的分子调控过程鲜见报道。籽粒在不同发育阶段胁迫相关蛋白的表达特性尚不清楚。【拟解决的关键问题】本研究利用 iTRAQ 蛋白质组学方法,旨在鉴定及描述玉米籽粒不同发育阶段胁迫相关蛋白的表达特性。通过分析这些蛋白的表达特性及潜在的生物学功能,以进一步揭示玉米籽粒发育过程中防御调控的分子机理,为培育玉米耐胁迫新品种及栽培种植提供生物学基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料与设计

本试验于 2015 年在黄淮海玉米区域技术创新中心及山东农业大学作物生物学国家重点实验室进行。试验采用玉米品种登海 661,播种前精细整地、造墒。6 月 15 日播种,10 月 5 日收获,种植密度 67 500 株/hm²。小区面积 60 m² (6 m×10 m)。田间管理按照大田标准进行,生育期内水分供应充足,病虫害草害预防及时。

吐丝期,选择有代表性、生长一致的植株挂牌标记。开花后人工饱和授粉,分别在授粉后第 3、5、10、15、20、30、40 及 50 天 (DAP) 于标记的植株取 3 个果穗。将每个果穗中部籽粒剥离,并选取 100 粒液氮速冻后移至 -80℃ 超低温冰箱内保存。每个取样时期进行 3 次生物学重复,用于 iTRAQ 蛋白质组学的分子生物学研究。

1.2 蛋白提取与含量测定

称取 1 g 籽粒样品于液氮中研磨,样品悬浮于 10 倍体积含有 10% (v/v) TCA 的预冷丙酮溶液中, -20℃ 沉淀 2 h。4℃、20 000×g 离心 30 min,弃上清液,取沉淀。沉淀中再加入 10 倍体积预冷的丙酮溶液,清洗沉淀 (将沉淀捣碎或悬起), -20℃ 沉淀 30 min, 4℃、20 000×g 离心 30 min。重复此过程多次直至沉淀基本为白色,后经真空干燥得到粉末状蛋白。称取 0.2 g 蛋白干粉溶解于 3 mL 裂解液 (8 mol·L⁻¹ Urea, 30 mmol·L⁻¹ HEPES, 1 mmol·L⁻¹ PMSF, 2 mmol·L⁻¹ EDTA, 10 mmol·L⁻¹ DTT), 超声 5 min 助溶, 4℃、20 000×g 离心 30 min,取上清液。上清液中加入 DTT 至终浓度 10 mmol·L⁻¹, 56℃ 水浴 1 h。取出后,迅速加入 IAM 至终浓度 55 mmol·L⁻¹, 暗室静置 1 h。混合样品中再次加入 4 倍体积的预冷丙酮溶液, -20℃ 沉淀 3 h。随后, 4℃、20 000×g 离心 30 min, 取沉

淀。沉淀溶解于 400 μL 的复溶液 (0.5 mol·L⁻¹ TEAB, 0.1% SDS), 超声 3 min 助溶, 4℃、20 000×g 再次离心 30 min, 取上清液。采用蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度。

1.3 蛋白消化与肽段标记

每个籽粒样品取 100 μg 蛋白体积,用含 0.1% SDS 的 TEAB 补齐所有样品体积。每 100 μg 蛋白样品加入 3.3 μg 的胰蛋白酶, 37℃ 水浴 24 h。然后,补加胰蛋白酶 1 μg, 继续 37℃ 水浴 24 h。冻干消化液,然后使用 TEAB (水:TEAB=1:1) 每管 30 μL 重新溶解肽段。按照试剂盒说明,用 8 标 iTRAQ 试剂中的 113、114、115、116、117、118、119 及 121 分别标记 3、5、10、15、20、30、40 及 50 DAP 的籽粒蛋白样品。8 个标记的蛋白样品室温静置 2 h 后混合,真空干燥。试验共进行 3 次生物学重复标记。

1.4 高效液相色谱

混合后的肽段样品溶于 10 倍体积的强阳离子缓冲液 A (10 mmol·L⁻¹ KH₂PO₄, 乙腈 25%, pH 3.0)。使用高效液相色谱系统并装配强阳离子交换色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm, 100Å) 进行肽段分离。缓冲液 B (10 mmol·L⁻¹ KH₂PO₄, 2 mol·L⁻¹ KCl, 乙腈 25%, pH 3.0) 用于流动相,流速设置为 1 mL·min⁻¹。设置强阳离子交换液相色谱分级梯度 (0%, 45 min; 0—5%, 1 min; 5—30%, 20 min; 30—50%, 5 min 并维持 5 min; 50—100%, 5 min 并维持 10 min)。总共收集 36 份洗脱组分,并且根据色谱峰合并为 16 份。随后,洗脱组分根据使用说明,经 C18 反相色谱除盐后冻干, -80℃ 保存。

1.5 质谱鉴定

质谱分析使用纳升液相系统 (Shimadzu, Kyoto, Japan)。混合后的蛋白样品经 C18 色谱柱 (75 μm×2 cm, 5 μm, 100Å) 用含 0.1% 甲酸的乙腈溶液在 45 min 内浓度梯度由 5% 上升到 80% 分离样品,流速为 300 nL·min⁻¹。

质谱分析采用 Q-Exactive 质谱仪 (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) 检测肽段信号。检测方式如下: 正离子模式; 母离子扫描范围 350—2 000 m/z; 一级质谱分辨率: m/z 为 200 时 70 000 次; AGC target: 1e6; 一级最大 IT: 50 ms; 扫描范围数目: 1; 动态排除: 15 s。

多肽和多肽的碎片的质量电荷比,按照下列方法采集: 每次全扫描后采集 20 个碎片图谱,二级质谱激活类型: HCD; 隔离窗: 2 m/z; 二级质谱分辨率: m/z 为 200 时 17 500 次; 微碎片图谱数: 1; 二级最大 IT 值: 100 ms; 规一化碰撞能量: 28 eV; 填充率: 1%。

1.6 数据分析

对于蛋白鉴定, 采用 MASCOT 软件(版本 2.3.01, Matrix Science, London, U.K.) 将原始质谱数据自动匹配 Uniprot 玉米蛋白数据库。搜索参数设置如下: 胰蛋白酶作为消化类型, 并且允许 1 个最大的胰蛋白酶漏切位点; 固定修饰采用半胱氨酸, 可变修饰采用 iTRAQ 8-plex (K)、iTRAQ 8-plex (Y)、iTRAQ 8-plex (N-term) 及 Oxidation (M); 肽段质量误差为 15 ppm; 串联质谱误差为 0.1 Da。蛋白至少含有一个唯一肽段, 并且阳性结果错误率(FDR) $\leq 1\%$ 才被认为鉴定有效。

对于蛋白定量, 由于 iTRAQ 是相对定量的方法, 因此, 在每一个生物学重复中均以 3 DAP 籽粒样品为参考, 将后续每个时期的蛋白样品分别与之进行比对。为保证定量结果的准确性, 只有蛋白的定量信息至少存在于两次生物学重复中才做进一步分析。以 3 次生物学重复的平均值作为最终蛋白表达倍率。籽粒发育过程中, 平均相对表达水平上调或下调差异大于 1.5 倍, 并且在统计学 ANOVA 检验上 $P < 0.05$ 的蛋白定义为显著差异表达的蛋白。

鉴定到的玉米籽粒蛋白进行基因本论(GO)注释, 并且按照生物过程、分子功能及细胞组件的功能范畴进行分类^[15]。采用 Cluster 3.0 软件对籽粒发育过程中显著差异表达的胁迫相关蛋白进行表达模式聚类分析, 聚类参数使用相似性度量及欧氏距离。聚类结果采用 Java TreeView 软件进行可视化处理。

2 结果

2.1 玉米籽粒蛋白鉴定及 GO 注释

8 个时期的籽粒蛋白样品经过提取, 用于 iTRAQ 蛋白质组学分析。通过匹配玉米蛋白数据库, 玉米籽粒中总计鉴定到 4 751 个蛋白, 其中 2 755 个至少存在于两次生物学重复中(图 1)。

玉米籽粒蛋白经 GO 注释, 按照生物过程、分子功能及细胞组件的功能范畴进行分类。如图 2 所示, 玉米籽粒中的蛋白涉及多种生物过程与分子功能。生物过程类别中, 蛋白广泛参与代谢过程(24.58%)、分子过程(22.85%)、单一生物过程(17.80%)、刺激应答(6.50%)、细胞成分组织(6.30%)、生物过程调控(6.22%)和定位(5.60%)等过程, 其中代谢过程(24.58%)与分子过程(22.85%)是其最主要的两个生物过程。分子功能类别中, 蛋白主要具备催化活性(43.59%)、绑定(40.90%)、结构分子活性(5.00%)及转运因子(4.10%)等活性, 其中催化活性(43.59%)

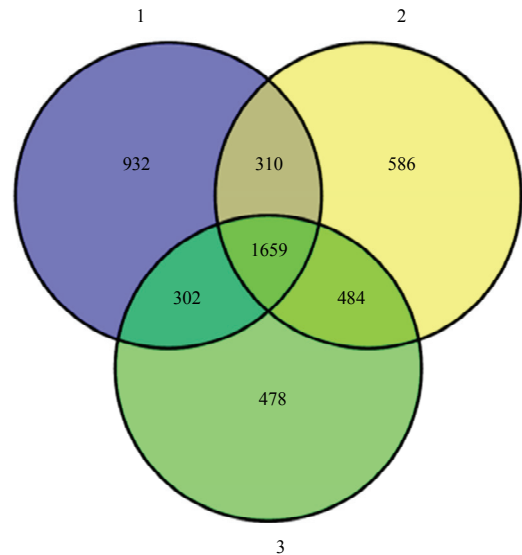


图 1 3 次生物学重复鉴定到的玉米籽粒总蛋白

Fig. 1 Identification of maize grain proteins in three biological repeats

与绑定功能(40.90%) 占据最大的两个功能类别。细胞组件类别中, 蛋白主要定位于细胞(37.62%)、细胞器(28.49)、细胞膜(14.97%)及大分子复合物中(10.59%)。

2.2 胁迫相关蛋白的功能类别与表达特性

如表 1 所示, GO 注释与定量分析发现 123 个胁迫相关蛋白在籽粒发育过程中显著差异表达。根据这些蛋白的生物学功能, 将其划分为以下 5 种功能类别: 蛋白修饰(33 个)、ROS 体内平衡(31 个)、贮藏物质保护(17 个)、病虫害响应(8 个)及其他胁迫响应过程(34 个)。

如图 3 所示, 分层聚类分析将这些胁迫相关蛋白的表达模式划分为 5 种(A、B、C、D 及 E)。表达模式 A 包含 23 个蛋白, 其表达水平在发育前期最高, 后随着籽粒发育不断下调; 表达模式 B 包含 16 个蛋白, 这些蛋白在 5 及 40 DAP 具有两个表达高峰; 表达模式 C 包含 5 个蛋白, 其表达水平在 15—20 DAP 显著积累; 表达模式 D 包含 34 个蛋白, 其表达水平在 15 DAP 开始缓慢上调, 并在 50 DAP 达到最高; 表达模式 E 包含 45 个蛋白, 其表达趋势与 D 相似, 只是在 20 DAP 开始快速上调表达, 并且持续到 50 DAP。

2.3 蛋白修饰相关蛋白的表达特性

33 个蛋白修饰相关蛋白在籽粒发育过程中显著

表 1 籽粒发育过程中鉴定到的显著差异表达的胁迫相关蛋白

Table 1 Identification of stress-related proteins that were significantly differentially expressed during grain development

编号 Protein no.	登入号 Accession no.	蛋白名称 Proteins name	得分 Score	序列覆 盖率 Sequence coverage (%)	独特肽 段数 Unique peptides	分子量/ 等电点 Mr/pI	表达倍率 Express ratio					P	表达模式 Expression pattern				
							3	5	10	15	20			30	40	50	DAP
蛋白修饰 Protein modification																	
1	B6UGR5	16.9 kDa I 类热激蛋白 16.9 kDa class I heat shock protein 1	186	29.87	2	17.1/7.42	1	1.4	1.1	1.2	1.9	6.9	9.1	<0.0001	E		
2	B6T339	17.5 kDa II 类热激蛋白 17.5 kDa class II heat shock protein	283	40.85	1	17.8/5.33	1	0.9	1.1	1.4	1.7	2.2	2.7	<0.0001	E		
3	B6U7Y1	90 kDa 热激蛋白 ATP 酶活化剂 Activator of 90 kDa heat shock protein ATPase	211	18.10	4	38.6/5.41	1	0.7	0.8	0.7	0.6	0.5	0.5	0.4	<0.0001	A	
4	B4F848	伴侣蛋白 Chaperonin	502	66.67	13	25.7/8.47	1	0.9	0.9	1.1	1.2	1.5	1.5	1.3	<0.0001	D	
5	B4FE30	伴侣蛋白 Chaperonin	322	79.59	3	10.5/8.4	1	1.1	1.0	0.9	1.2	1.9	2.2	2.1	<0.0001	E	
6	B6SLX1	伴侣蛋白 Chaperonin	317	79.59	2	10.5/6.76	1	1.5	1.1	1.1	1.2	1.7	2.1	1.7	<0.0001	D	
7	B6T646	CHL-CPN10	90.7	18.94	3	14.2/7.14	1	1.7	1.1	1.0	0.9	1.2	1.6	1.5	1.6	0.0004	D
8	B4FLR0	GrpE 蛋白同源 GrpE protein homolog	80.4	8.23	1	36.3/4.6	1	1.3	1.1	1.2	1.5	1.5	1.6	1.4	<0.0001	B	
9	B6TXQ6	GrpE 蛋白同源 GrpE protein homolog	90.9	11.28	3	36/4.64	1	1.2	1.1	1.6	1.7	1.5	1.8	1.8	<0.0001	C	
10	B6U4A3	70 kDa 热激蛋白 Heat shock 70 kDa protein	723	30.83	2	72.7/5.77	1	0.6	0.8	1.1	0.9	0.6	1.0	0.6	0.0016	A	
11	B6SZ69	70 kDa 热激蛋白 2 Heat shock cognate 70 kDa protein 2	955	40.68	1	71.1/5.19	1	2.1	1.4	1.7	2.1	1.9	2.1	1.8	<0.0001	B	
12	Q9S822	热激蛋白 101 Heat shock protein 101	769	33.99	21	101.1/6.16	1	1	0.9	0.9	1.1	1.3	1.4	1.6	<0.0001	E	
13	C4J410	热激蛋白 1 Heat shock protein 1	1049	45.83	2	70.8/5.19	1	1.1	1.1	1.7	1.9	1.4	1.6	1.8	<0.0001	C	
14	B6TE57	IQ 钙调素绑定修饰家族蛋白 IQ calmodulin-binding motif family protein	175	17.23	5	46.1/9.25	1	0.6	0.7	0.7	0.6	0.6	0.5	0.5	<0.0001	A	
15	B4FWJ8	鲁米那绑定蛋白 3 Luminal-binding protein 3	1214	48.72	18	73.1/5.24	1	1	1.1	1.3	1.4	1.4	2.1	1.7	<0.0001	D	
16	B6TCE9	肽基脯氨酸顺反异构酶 Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	366	38.31	6	26.2/9.19	1	1.3	1.1	1.2	1.5	1.8	1.8	1.8	<0.0001	D	
17	P21569	肽基脯氨酸顺反异构酶 Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	437	65.70	6	18.3/8.69	1	1	1.1	1.4	1.5	1.6	1.4	1.6	<0.0001	D	
18	B4FUK2	肽基脯氨酸顺反异构酶 Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	637	39.69	3	61.2/5.85	1	1	1.1	1.1	1.3	1.4	2.7	2.9	3.1	<0.0001	E
19	B6SRE7	肽基脯氨酸顺反异构酶 Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	240	38.29	5	18.6/7.75	1	1.2	1.2	1.3	1.6	2.1	2.1	2.1	<0.0001	D	
20	B6STE5	肽基脯氨酸顺反异构酶 Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	166	32.90	2	16.4/8.79	1	1.3	1.1	1.2	1.2	1.6	2.2	2.6	<0.0001	D	
21	B6TIP7	肽基脯氨酸顺反异构酶 Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	336	45.58	6	23.1/9.57	1	0.9	1.1	1.2	1.3	1.6	1.5	1.3	<0.0001	D	
22	B6UG32	肽基脯氨酸顺反异构酶 Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	179	29.58	2	15/5.57	1	1	0.8	0.9	0.9	1.7	1.3	2.2	<0.0001	E	
23	K7TWW7	肽基脯氨酸顺反异构酶 Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	185	45.03	2	18.3/8.18	1	1.2	1.1	1.3	1.4	2.9	1.9	1.8	<0.0001	D	
24	K7VS53	肽基脯氨酸顺反异构酶 Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	73.1	11.80	1	17.2/10.18	1	1.2	1.6	1.3	1.5	1.6	1.1	1.4	<0.0001	B	
25	B6T5S0	前折叠素亚基 6 Prefoldin subunit 6	58.8	24.43	3	14.8/9.5	1	1	1.1	1.1	0.9	1.1	1.7	1.4	1.4	<0.0001	D
26	Q5EUD5	蛋白二硫键异构酶 Protein disulfide isomerase	321	31.89	12	46.9/5.58	1	0.9	1.1	1.4	1.6	1.3	1.5	1.4	<0.0001	C	

续表 1 Continued table 1

编号 Protein no.	登入号 Accession no.	蛋白名称 Proteins name	得分 Score	序列覆 盖率 Sequence coverage (%)	独特肽 段数 Unique peptides	分子量/ 等电点 Mr/pI	表达倍率 Express ratio 3:5:10:15:20:30:40:50 DAP	P	表达模式 Expression pattern
27	K7VRQ5	蛋白二硫键异构酶亚型 1 Protein disulfide isomerase isoform 1	42.6	7.18	2	58.8/5.07	1:1.1:1:1.3:1.5:1.4:1.7:1.6	<0.0001	D
28	Q5EUE1	蛋白二硫键异构酶 Protein disulfide-isomerase	1202	65.95	18	56.8/5.15	1:0.9:1.2:2.2:2.3:1.6:1.7:1.6	<0.0001	C
29	B4G0G4	推测的热激蛋白 20 伴侣家族蛋白 Putative HSP20-like chaperone domain family protein	309	43.05	2	33.6/5.36	1:1.2:1.1:1.2:1.2:1.7:1.6:1.9	<0.0001	D
30	B6TKY3	推测的 TCP-1/cpn60 伴侣家族蛋白 Putative TCP-1/cpn60 chaperonin family protein	316	22.94	12	59.2/6.09	1:0.8:0.9:0.8:0.8:0.6:0.6:0.6	<0.0001	A
31	K7UCH1	推测的 TCP-1/cpn60 伴侣家族蛋白 Putative TCP-1/cpn60 chaperonin family protein	400	28.10	4	58.9/5.43	1:0.8:1:0.9:0.8:0.9:0.6:0.7	<0.0001	A
32	B6UFB3	基质的 70 kDa 热激蛋白 Stromal 70 kDa heat shock-related protein	1110	45.66	7	74.6/5.21	1:1.1:1:2:2.3:2.3:3.4:3.2	<0.0001	D
33	B4F8V9	T-复合体蛋白 1 δ 亚基 T-complex protein 1 subunit delta ROS 体内平衡 ROS homeostasis	446	30.47	2	57.6/7.21	1:0.9:0.9:0.8:0.8:0.7:0.7:0.7	<0.0001	A
34	A2SZW8	1-Cys 过氧化物酶 1-Cys peroxiredoxin	631	64.63	14	24.9/6.8	1:1.1:1:1.2:1.6:3.8:5.5:8.5	<0.0001	E
35	B6TM55	APx1 细胞质抗坏血酸过氧化物酶 APx1-cytosolic ascorbate peroxidase	649	64.80	1	27.3/5.83	1:2:1.4:0.9:1.2:1.7:1.4:1.3	<0.0001	B
36	B4FA06	APx4-过氧化物酶体抗坏血酸过氧化物酶 APx4-peroxisomal ascorbate peroxidase	61.6	14.19	3	31.7/7.96	1:0.6:1:1.1:1:0.8:0.7:0.7	<0.0001	A
37	B4F817	脱氢抗坏血酸还原酶 Dehydroascorbate reductase	385	52.34	6	23.4/5.45	1:0.9:0.9:1:1.1:1.7:1.7:1.6	<0.0001	E
38	B4FT31	脱氢抗坏血酸还原酶 Dehydroascorbate reductase	366	63.55	7	23.3/5.82	1:0.9:1:1:1.1:1.9:2.1:2.3	<0.0001	E
39	C0P9V2	脱氢抗坏血酸还原酶 Dehydroascorbate reductase	52.1	7.92	1	29.2/9.03	1:1.2:1.7:1.8:2.2:3.1:2.8:1.8	<0.0001	D
40	P43401	锌金属硫 II 类蛋白 Zinc metallothionein class II	98.1	62.34	3	7.7/7.33	1:1:0.8:0.8:0.9:7.9:33.1:44.3	<0.0001	E
41	Q6JAH6	谷胱甘肽过氧化物酶 Glutathione peroxidase	201	48.21	2	18.4/7.08	1:0.9:1:1.3:1.4:2:2.3:2.3	<0.0001	E
42	B6T7H0	谷胱甘肽 S-转移酶 6 Glutathione S-transferase 6	46.5	7.08	1	25.8/7.56	1:0.4:0.6:0.3:0.3:0.2:0.3:0.2	<0.0001	A
43	Q9FQC0	谷胱甘肽 S-转移酶 19 Glutathione S-transferase GST 19	96.6	16.44	3	25.2/7.85	1:1.1:2.5:1.8:1.7:1.5:1.7:1.7	0.0008	B
44	Q9FQB7	谷胱甘肽 S-转移酶 22 Glutathione S-transferase GST 22	85	11.35	3	25.1/6.07	1:1:1:0.6:0.7:0.8:0.7:0.8	<0.0001	A
45	Q9FQA9	谷胱甘肽 S-转移酶 30 Glutathione S-transferase GST 30	59.7	8.66	2	25.2/5.5	1:1.3:1.1:1.6:1.8:3.3:3.2:3.2	<0.0001	D
46	B4FTD1	谷胱甘肽 S-转移酶 III Glutathione S-transferase III	382	61.09	1	23.9/6.52	1:0.8:1:0.7:0.5:0.4:0.4:0.4	<0.0001	A
47	B6T7B6	谷胱甘肽 S-转移酶, C-末端 Glutathione S-transferase, C-terminal-like	26.5	4.32	1	36.5/6.62	1:1.2:1.2:1.2:1.2:1.3:1.4:1.6	<0.0001	D
48	B6SN61	Grx_C2.1-谷氧还蛋白亚组 I Grx_C2.1-glutaredoxin subgroup I	221	49.24	4	13.9/7.87	1:1.3:1.1:1.1:1.3:2.5:2.5:2.2	<0.0001	D
49	B4FXZ3	Grx_C2.2-谷氧还蛋白亚组 I Grx_C2.2-glutaredoxin subgroup I	235	51.33	5	11.9/7.85	1:1:1:1:1.1:1.9:2.2:2.3	<0.0001	E

续表 1 Continued table 1

编号 Protein no.	登入号 Accession no.	蛋白名称 Proteins name	得分 Score	序列覆 盖率 Sequence coverage (%)	独特肽 段数 Unique peptides	分子量/ 等电点 Mr/pI	表达倍率 Express ratio 3:5:10:15:20:30:40:50 DAP	P	表达模式 Expression pattern
50	B6T3V1	过氧化物酶 72 Peroxidase 72	223	20.72	4	35.7/8.18	1:0.9:0.5:0.5:0.4:0.5:0.4:0.5	<0.0001	A
51	B4FSM5	过氧化物还原蛋白 5 Peroxiredoxin-5	210	36.27	5	20.7/8.37	1:1.6:1.2:1.1:1.2:1.4:1.6:1.3	<0.0001	B
52	K7TGW6	推测的多酚氧化酶家族蛋白 Putative polyphenol oxidase family protein	149	11.91	5	67/7.9	1:0.6:0.6:0.5:0.4:0.5:0.5:0.4	<0.0001	A
53	K7TMU7	推测的多酚氧化酶家族蛋白 Putative polyphenol oxidase family protein	64.6	5.31	2	59.7/6.27	1:1.4:1.6:1.8:1.9:1.5:1.4:1.5	<0.0001	B
54	B4F925	超氧化物歧化酶 Superoxide dismutase	269	38.72	1	25.6/7.71	1:0.6:0.9:1:1.1:0.9:1.2:1.1	0.0014	A
55	B4F9H6	超氧化物歧化酶 Superoxide dismutase	281	39.06	1	25.2/7.27	1:0.7:0.9:1:1:0.8:1.1:1.1	0.0170	A
56	B6TIS2	超氧化物歧化酶 [Cu-Zn] Superoxide dismutase [Cu-Zn]	183	29.66	1	11.8/5.38	1:1:1.1:1:1:1.6:1.9:2.6	<0.0001	E
57	D1MPZ7	超氧化物歧化酶 [Cu-Zn] Superoxide dismutase [Cu-Zn]	330	57.07	6	18.7/5.62	1:1.1:1:1:1:1.1:1.8:2.3:2.7	<0.0001	E
58	P11428	超氧化物歧化酶 [Cu-Zn] 2 Superoxide dismutase [Cu-Zn] 2	251	46.36	2	15.1/5.83	1:0.9:1:0.9:0.9:1.3:1.3:1.6	<0.0001	E
59	B4FFQ0	硫氧还原蛋白 Thioredoxin	232	37.30	4	13.6/4.68	1:1.8:2.5:1.6:1.7:1.4:1.4:1.3	<0.0001	B
60	B6T183	硫氧还原蛋白 Thioredoxin	143	31.15	1	13.1/6.67	1:1.9:1.3:0.8:1.1:1.3:1.4:1.4	<0.0001	B
61	B6SUA0	硫氧还原蛋白 Thioredoxin	27.7	6.77	1	14.6/5.31	1:0.9:1.2:1.7:1.4:1.4:1.2:1.2	<0.0001	C
62	K7VBY5	硫氧还原蛋白 Thioredoxin	113	26.13	3	12.4/8.28	1:0.9:1:1.1:1.1:1.6:1.6:1.7	<0.0001	E
63	B6TP19	硫氧还原蛋白 5 Thioredoxin-like protein 5	237	60.87	1	15.1/5.11	1:1.1:1:1.1:1.5:2.3:2:2.7	0.0001	E
64	B8A1M2	硫氧还原蛋白 5 Thioredoxin-like protein 5	225	60.87	1	15.1/5.22	1:1:1.1:1:1:1.6:1.9:1.9	<0.0001	E
贮藏物质保护 Material storage protection									
65	P13867	α -淀粉酶/胰蛋白酶抑制剂 Alpha-amylase/trypsin inhibitor	183	28.64	1	22.1/7.78	1:1.7:1.3:1:1.3:3:1.3:4.3	<0.0001	D
66	Q2XX01	蛋白酶抑制剂 Protease inhibitor	244	81.43	5	7.4/5.97	1:1.2:1.1:1:1.3:2.6:6.3:8.6:9.3	<0.0001	E
67	B6SNA6	枯草杆菌蛋白酶抑制剂 CI-1B Subtilisin-chymotrypsin inhibitor CI-1B	178	81.43	5	7.5/5.06	1:1.1:1:1:1:1.3:1.5:8:6.4	<0.0001	E
68	B6UH04	枯草杆菌蛋白酶抑制剂 CI-1B Subtilisin-chymotrypsin inhibitor CI-1B	176	78.08	4	8/6.65	1:2.6:1.5:0.8:1.4:3.6:3.3:4.4	<0.0001	D
69	B6U115	枯草杆菌蛋白酶抑制剂 CI-1B Subtilisin-chymotrypsin inhibitor CI-1B	275	61.05	5	10.3/5.76	1:2.3:1.4:1.2:1.9:3.6:4.5:4.7	<0.0001	D
70	Q09HU3	胰蛋白酶抑制剂 Trypsin inhibitor	295	88.19	1	13.6/6.9	1:1.2:1.1:1:1.7:3.3:4.5:6.7:5.8	<0.0001	D
71	B6SPP9	Bowman Birk 型损伤诱导蛋白酶抑制剂 WIP1 Bowman-Birk type wound-induced proteinase inhibitor WIP1	224	48.28	4	9.3/8.34	1:1.2:1:1:1:1.2:3:1:6:3:8.5	<0.0001	E
72	Q4FZ50	半胱氨酸蛋白酶抑制剂 Cystatin	32.6	7.76	1	12.3/5.39	1:2:1.2:1.2:2.2:2.9:3.6:3.3	<0.0001	D
73	B6UGN8	半胱氨酸蛋白酶抑制剂 Cystatin	253	62.79	6	13.9/10.24	1:1.2:1.2:1.3:1.5:2.1:2.1:1.7	<0.0001	D
74	B6TMF0	半胱氨酸蛋白酶抑制剂-1 Cystatin-1	146	36.30	3	14.8/7.4	1:2.2:1.3:1.1:1.8:3.7:3.7:2.6	<0.0001	D
75	Q4A1J7	推测的半胱氨酸蛋白酶抑制剂 Putative cystatin	219	38.94	7	24.5/6.6	1:0.8:1:1:1:1:1:1.6:1.4	<0.0001	D
76	Q4A1J8	推测的半胱氨酸蛋白酶抑制剂 Putative cystatin	65.8	27.84	2	11.1/6.38	1:0.8:1:0.7:0.6:0.7:0.6:0.7	<0.0001	A
77	Q4A1J1	推测的半胱氨酸蛋白酶抑制剂 Putative cystatin	124	30.00	3	12.8/9.17	1:1.3:1.1:1:1.2:1.5:3.1:5.3:8.6	<0.0001	E

续表 1 Continued table 1

编号 Protein no.	登入号 Accession no.	蛋白名称 Proteins name	得分 Score	序列覆 盖率 Sequence coverage (%)	独特肽 段数 Unique peptides	分子量/ 等电点 Mr/pI	表达倍率 Express ratio 3:5:10:15:20:30:40:50 DAP	P	表达模式 Expression pattern
78	Q4A1J3	推测的半胱氨酸蛋白酶抑制剂 Putative cystatin	77.7	18.11	2	13.7/9.48	1:1.6:2.1:1.7:1.6:1.4:1.6:1.6	<0.0001	B
79	B6SIZ2	油脂体蛋白 Oleosin	114	11.29	1	18.3/9.38	1:1.1:0.9:1.1:3.2:6.3:7:16.5	<0.0001	E
80	B6SI42	油脂体蛋白 Oleosin	178	31.25	2	17.5/9.61	1:1:0.9:1.7:3.5:9:11:18.9	<0.0001	E
81	B6UGU4	油脂体固醇蛋白 Steroleosin 病虫害响应 Disease response	49.3	6.29	2	38.5/8.38	1:0.7:0.9:0.9:1:1.4:1.9:2.7	<0.0001	E
82	B6SLF6	抗菌肽 MBP-1 Antimicrobial peptide MBP-1	130	8.40	4	46/7.02	1:1.6:1.2:0.9:1.2:3.3:11.7:11.7	0.0000	E
83	B8QUZ0	几丁质酶 Chitinase	289	30.22	1	29.1/7.8	1:1.3:1:0.9:0.9:1.9:4:5	0.0000	E
84	D0EM57	几丁质酶 Chitinase	307	35.61	3	29.2/8.07	1:0.9:0.9:0.9:1:2.9:5.9:6.9	0.0000	E
85	Q5XLE0	Bet v I 过敏原 Bet v I allergen	319	53.90	1	17.1/4.82	1:1.5:1.1:1.2:1.2:1.4:2.4:1.3	0.0000	B
86	B6TL22	P21 蛋白 Protein P21	178	22.03	1	24/7.3	1:1.5:1.1:0.9:1:3.2:7.4:10.8	0.0000	E
87	Q19VG6	主要乳胶蛋白 22 Major latex protein 22	381	60.39	11	17.1/4.82	1:1.1:1:1.2:1.2:1.5:1.4:1.4	0.0000	D
88	B6SXF5	发病机制相关蛋白 1 Pathogenesis-related protein 1	451	80.00	11	17/5.54	1:1.2:1.3:1.4:1.8:3:2.8:3.5	0.0000	D
89	C5JA66	推测的防御素 Putative defensin 其他胁迫响应 Other stress response	26.7	10.71	1	9.2/8.15	1:2.1:1.9:1.4:1.5:2.9:3.7:3.4	0.0000	D
90	B4FHT1	膜联蛋白 Annexin	474	40.45	12	35.3/7.58	1:0.8:1.1:0.6:0.6:0.5:0.5:0.5	<0.0001	A
91	Q43863	膜联蛋白 Annexin	427	46.50	11	35.5/7.55	1:0.8:0.8:0.6:0.6:0.5:0.5:0.5	<0.0001	A
92	A8IK79	Asr 蛋白 Asr protein	90.4	56.73	3	11.8/7.18	1:1.1:1.2:1.2:1.4:1.9:2.4:3.7	<0.0001	D
93	C4J477	脱水蛋白 Dehydrin	145	23.18	6	31.4/5.85	1:0.9:0.7:0.7:0.9:2.4:2.1:3.3	<0.0001	E
94	B4G1G1	脱水相关蛋白 PCC13-62 Desiccation-related protein PCC13-62	214	19.57	5	34/4.94	1:1.2:1.2:1.6:2:2.3:4:3	<0.0001	D
95	B6SI37	胚胎丰富蛋白 1 Embryonic abundant protein 1	392	68.13	7	9.7/7.27	1:1.1:0.9:0.9:0.9:3.1:8:11.6	<0.0001	E
96	B6T8E4	胚胎丰富蛋白 1 Embryonic abundant protein 1	317	70.80	8	12.1/5.53	1:1.1:0.9:1:1:2.2:4.9:11.8	<0.0001	E
97	B6T8U5	ER6 蛋白 ER6 protein	399	47.31	7	27.7/5.64	1:0.8:0.9:1:1:1.6:1.6:1.7	<0.0001	E
98	B4FNZ9	一般的胁迫蛋白 39 General stress protein 39	428	43.75	12	32.9/6.04	1:1.2:1:1.1:1.9:4:5:6:6:6	<0.0001	E
99	B4FAV5	类萌发蛋白 1 Germin-like protein 1	182	28.04	1	22.3/7.09	1:1.8:2:1.5:1.7:2:2:2.2	<0.0001	B
100	B6SN63	晚期胚胎丰富蛋白 D-34 Late embryogenesis abundant protein D-34	332	51.64	4	21.3/5.44	1:1.3:1:1.1:1:2.3:1.5:5.3	<0.0001	E
101	B6SNS4	晚期胚胎丰富蛋白 D-34 Late embryogenesis abundant protein D-34	217	33.49	3	21.2/5.44	1:1.4:1.1:1:1.1:1.9:3.3:7.1	<0.0001	E
102	B6UH67	晚期胚胎丰富蛋白 D-34 Late embryogenesis abundant protein D-34	696	74.44	12	27.2/5.57	1:1.3:1.1:1:1.1:2.2:5.4:9.4	<0.0001	E
103	B6UH99	晚期胚胎丰富蛋白 14-A Late embryogenesis abundant protein Le14-A	122	44.08	5	16.1/5.99	1:1:1:1:1:1.4:2.4:3.9	<0.0001	E
104	B6SID7	晚期胚胎丰富蛋白 3 Late embryogenesis abundant protein, group 3	407	47.25	9	18.6/8.22	1:1:1:1:1:2.1:5.2:13	<0.0001	E
105	B6SJ28	晚期胚胎丰富蛋白 3 Late embryogenesis abundant protein, group 3	312	40.98	2	21.2/9	1:1.5:1:0.9:1.1:2.8:4.5:6.8	<0.0001	E

续表 1 Continued table 1

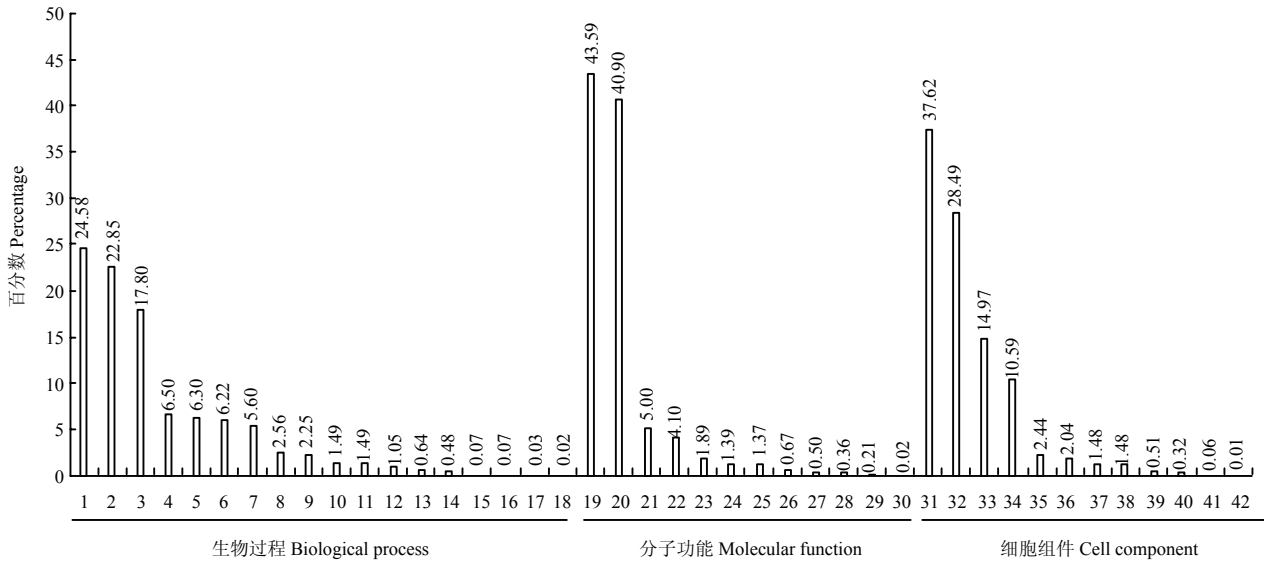
编号 Protein no.	登入号 Accession no.	蛋白名称 Proteins name	得分 Score	序列覆 盖率 Sequence coverage (%)	独特肽 段数 Unique peptides	分子量/ 等电点 Mr/pI	表达倍率 Express ratio 3:5:10:15:20:30:40:50 DAP	P	表达模式 Expression pattern
106	B6UI06	晚期胚胎丰富蛋白 3 Late embryogenesis abundant protein, group 3	319	41.13	3	23.5/8.98	1:1.1:1:1:0.9:2.5:6.3:7.6	<0.0001	E
107	B6T2C9	脂质转移蛋白 Lipid transfer protein	107	17.19	2	19.1/8.12	1:0.9:0.6:0.6:0.8:1:0.9:1	0.0061	A
108	B6TQP7	脂质转移蛋白 Lipid transfer protein	58	14.05	2	18.9/7.72	1:1.6:1:0.9:1.1:1.3:1.6:1.8	<0.0001	B
109	B6TD92	脂质转移蛋白 Lipid transfer protein	26.6	4.66	1	18.8/5.82	1:0.8:0.6:0.4:0.3:0.3:0.3:0.3	<0.0001	A
110	B6SGF4	非特异性脂质转移蛋白 Nonspecific lipid-transfer protein	53.4	22.68	2	9.9/8.48	1:1.5:1.5:1.1:1.8:2.7:3:6.3	<0.0001	D
111	B6TVI1	非特异性脂质转移蛋白 Nonspecific lipid-transfer protein	49	10.66	1	12/9.29	1:2.4:2.1:1.4:1.5:1.7:1.7:2.4	<0.0001	B
112	B8QW69	非特异性脂质转移蛋白 Nonspecific lipid-transfer protein	256	50.46	2	10.5/8.7	1:1.1:1.2:1:0.9:1.8:3.6:5.6	<0.0001	E
113	Q2XX18	非特异性脂质转移蛋白 Nonspecific lipid-transfer protein	290	54.13	1	10.5/8.53	1:1.1:0.8:1.1:1.3:7.3:22.2:18.1	<0.0001	E
114	Q2XX23	非特异性脂质转移蛋白 Nonspecific lipid-transfer protein	276	53.64	2	10.6/8.51	1:1.1:0.9:0.9:1.5:2.8:11.4:17.6	<0.0001	E
115	P83506	可能的非特异性脂质转移蛋白 2 Probable non-specific lipid-transfer protein 2	139	88.57	4	7.3/8.72	1:1.2:1.1:1:1.4:3.4:4.8:8.6	<0.0001	E
116	B6STY9	耐盐蛋白 Salt tolerance protein	355	41.69	1	35.2/5.11	1:1.2:1.1:0.7:0.6:0.5:0.7:0.8	<0.0001	A
117	B6TIK3	胁迫蛋白 Stress protein	97.8	9.06	2	27.3/7.27	1:1.3:1.2:1.5:1.5:2.4:2.3:2.9	<0.0001	D
118	B6TFB6	胁迫响应蛋白 Stress responsive protein	186	36.68	5	22.1/7.42	1:1.1:0.9:1.3:2.2:2.2:2.1:2.1	<0.0001	D
119	B6TWE1	USP 家族蛋白 USP family protein	146	20.90	3	28/5.11	1:1.5:1:1:1.1:1.3:1.2:1.2	<0.0001	B
120	A1XC10	脂氧合酶 Lipoxigenase	449	19.39	11	100.3/6.84	1:0.7:0.6:0.4:0.3:0.3:0.4:0.4	<0.0001	A
121	B6U297	脂氧合酶 Lipoxigenase	252	11.11	6	98/6.67	1:2:1.3:0.8:0.8:0.8:0.7:0.8	<0.0001	A
122	B7ZZ50	脂氧合酶 Lipoxigenase	273	12.76	9	94.9/5.69	1:1:0.9:0.7:0.6:0.6:0.6:0.6	<0.0001	A
123	Q8W0V2	脂氧合酶 Lipoxigenase	355	16.78	9	96.4/6.09	1:1.4:1.6:1.1:1.1:1.2:1.3:1.7	<0.0001	B

差异表达, 其中包括一系列的热激蛋白, 如热激蛋白 16.9 kDa I 类热激蛋白 (编号 1)、17.5 kDa II 类热激蛋白 (编号 2)、推测的热激蛋白 20 伴侣家族蛋白 (编号 29)、热激蛋白 101 (编号 12)、热激蛋白 1 (编号 13) 及 3 个 70 kDa 热激蛋白 (编号 10、11 及 32) (表 1)。此外, 其他参与蛋白修饰的蛋白还主要包括 9 个肽基脯氨酰顺反异构酶 (编号 16—24) 及 3 个蛋白二硫键异构酶 (编号 26—28) (表 1)。分层聚类分析显示有 6 个 (A), 4 个 (C) 及 20 个 (D 和 E) 蛋白分别在发育的前、中及后期显著积累, 而 3 个 (B) 在发育的前、后期均显著积累 (表 2)。

2.4 活性氧 (ROS) 体内平衡相关蛋白的表达特性

如表 1 所示, 31 个显著差异表达的胁迫相关蛋白涉及 ROS 的体内平衡, 主要包括 1-Cys 过氧化物酶 (编号 34)、2 个抗坏血酸过氧化物酶 (编号 35 及 36)、

2 个多酚氧化酶 (编号 52 及 53)、6 个谷胱甘肽 S-转移酶 (编号 41—46)、5 个超氧化物歧化酶 (编号 54—58) 及 6 个硫氧还原蛋白 (编号 59—64)。分层聚类分析显示有 8 个 (A) 及 16 个 (D 和 E) 蛋白分别在发育的前、后期显著积累, 而仅有 1 个 (C) 在发育中期显著表达; 此外, 有 6 个 (B) 蛋白在发育的前、后期均显著积累 (表 2)。值得注意的是同一蛋白的不同亚型 (如谷胱甘肽 S-转移酶、超氧化物歧化酶及硫氧还原蛋白) 具有不同的表达模式, 以硫氧还原蛋白为例, 6 个硫氧还原蛋白亚型中, 1 个 (编号 64) 亚型在发育中期显著积累, 3 个亚型在发育后期显著积累, 剩下的 2 个亚型在发育的前、后期均显著积累 (表 1)。此外, 锌金属硫 II 类蛋白 (编号 40) 在 50 DAP 的表达水平与 3 DAP 相比上调高于 44 倍 (表 1), 显示出其在籽粒发育后期发挥重要作用。



生物过程 Biological process: 1 代谢过程 Metabolic process; 2 分子过程 Cellular process; 3 单一生物过程 Single-organism process; 4 刺激应答 Response to stimulus; 5 细胞成分组织 Cellular component organization or biogenesis; 6 生物过程调控 Biological regulation; 7 定位 Localization; 8 发育过程 Developmental process; 9 多细胞组织过程 Multicellular organismal process; 10 再生 Reproduction; 11 信号 Signaling; 12 多机体过程 Multi-organism process; 13 生长 Growth; 14 免疫系统过程 Immune system process; 15 生物过程调控 Biological regulation; 16 生物附着 Rhythmic process; 17 移动 Locomotion; 18 细胞致死 Cell killing。分子功能 Molecular function: 19 催化活性 Catalytic activity; 20 结合 Binding; 21 结构分子活性 Structural molecule activity; 22 转运因子活性 Transporter activity; 23 分子功能调控 Molecular function regulator; 24 电荷载体活性 Electron carrier activity; 25 抗氧化活性 Antioxidant activity; 26 营养受体活性 Nutrient reservoir activity; 27 分子感应器活性 Molecular transducer activity; 28 核苷酸转录因子活性 Nucleic acid binding transcription factor activity; 29 蛋白质结合转录因子活性 Protein binding and transcription factor activity; 30 金属伴侣活性 Metallo chaperone activity。细胞组件 Cell component: 31 细胞 Cell; 32 细胞器 Organelle; 33 细胞膜 Membrane; 34 大分子复合物 Macromolecular complex; 35 膜结合腔体 Membrane-enclosed lumen; 36 细胞间区域 Extracellular region; 37 胞间连丝 Cell junction; 38 共质体 Symplast; 39 超分子纤维 Supramolecular fiber; 40 病毒体 Virion; 41 核状体 Nucleoid; 42 细胞外液 Extracellular matrix

图 2 GO 分析玉米籽粒中鉴定到的蛋白

Fig. 2 GO analysis of identified proteins in maize grain

表 2 分层聚类分析胁迫相关蛋白及蛋白功能在不同表达模式中的分布

Table 2 Hierarchical clustering analysis of stress-related proteins and distribution of protein functions in different expression patterns

功能分类 Functional classification	蛋白数目 Number of protein					总共 Total
	A	B	C	D	E	
蛋白修饰 Protein modification	6	3	4	14	6	33
ROS 体内平衡 ROS homeostasis	8	6	1	4	12	31
贮藏物质保护 Material storage protection	1	1	0	8	7	17
病虫害响应 Disease response	0	1	0	3	4	8
其他胁迫响应 Other stress response	8	5	0	5	16	34
总共 Total	23	16	5	34	45	123

2.5 贮藏物质保护相关蛋白的表达特性

17 个显著差异表达的胁迫相关蛋白涉及贮藏物质保护，主要包括多种蛋白酶水解抑制剂，如 α-淀粉酶/胰蛋白酶抑制剂（编号 65）、胰蛋白酶抑制剂（编号 70）、3 个枯草杆菌蛋白酶抑制剂（编号 67—69）及 7 个半胱氨酸蛋白酶抑制剂（编号 72—78）（表 1）。此外，2 个油脂体蛋白（编号 79 及 80）及 1 个油脂体固醇蛋白（编号 81）也被成功鉴定。分层聚类分析显示几乎所有的贮藏物质保护相关蛋白（15 个，D 及 E）的表达均随着籽粒发育不断积累，并且在发育后期达到最高（表 2）。

2.6 病虫害响应相关蛋白的表达特性

如表 1 所示，8 个显著差异表达的胁迫相关蛋白涉及病虫害响应，包括抗菌肽 MBP-1（编号 82）、Bet v I 过敏原（编号 85）、P21 蛋白（编号 86）、主要乳胶蛋白 22（编号 87）、发病机制相关蛋白 1（编号 88）、推测的防御素（编号 89）及 2 个几丁

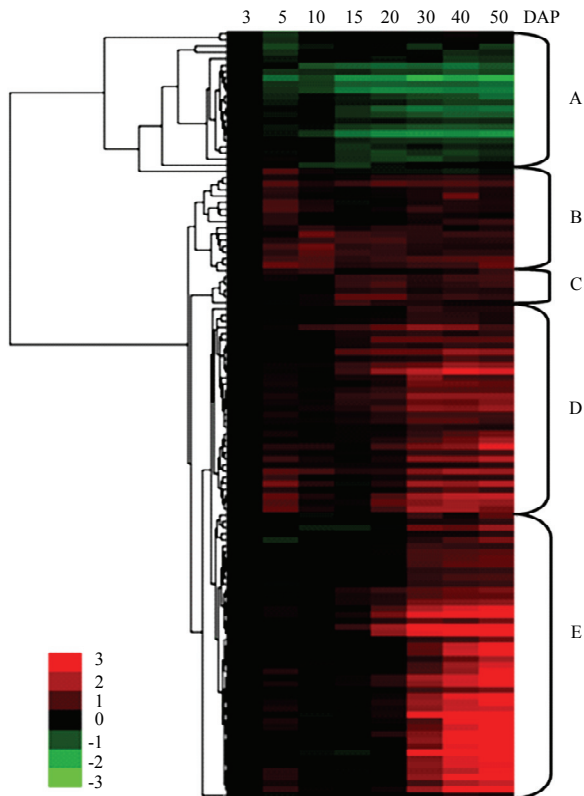


图 3 分层聚类分析胁迫相关蛋白在籽粒发育过程中的表达模式

Fig. 3 Hierarchical clustering analysis of expression patterns of stress-related proteins during grain development

质酶（编号 83 及 84）。与贮藏物质保护相关蛋白的表达模式相似，除了 Bet v I 过敏原蛋白（B）在发育前、后期均显著积累外（表 1），剩下的所有病虫害响应相关蛋白（15 个，D 及 E）均在发育后期显著表达（表 2）。

2.7 其他胁迫响应相关蛋白的表达特性

如表 1 所示，34 个涉及其他胁迫响应的蛋白在籽粒发育过程中显著差异表达，主要包括一系列的晚期胚胎丰富蛋白（LEA），如 2 个 LEA 1（编号 95 及 96）、3 个 LEA D-34（编号 100—102）及 3 个 LEA 3（编号 104—106）。此外，还主要包含 2 个膜联蛋白（编号 90 及 91）、3 个脂质转移蛋白（107—109）、6 个非特异性脂质转移蛋白（编号 110—115）及 4 个脂氧合酶（编号 120—123）（表 1）。分层聚类分析显示 8 个（A）蛋白在发育前期显著积累，5 个（B）蛋白在发育前、中期均显著积累，而绝大多数蛋白（21

个，D 及 E）均随着籽粒发育上调表达，并且在发育后期达到最高（表 2）。

3 讨论

3.1 玉米籽粒中的蛋白质组特性

玉米籽粒发育是一个复杂的生理与分子过程。探讨籽粒发育的分子调控机理是解析籽粒发育过程的重要手段。转录组学^[16-17]分析表明大量基因在玉米籽粒发育过程中转录表达，涉及籽粒的基础代谢和胁迫响应。相比于转录组学，蛋白质组水平上的研究相对较少，并且过去蛋白质组学研究主要依靠凝胶为基础的试验技术，如双向电泳及荧光双向电泳^[18-21]。这些技术存在鉴定通量低、定量不准确等限制因素，如利用双向电泳技术，玉米胚乳^[20]及胚胎^[21]中仅分别鉴定到 504 及 111 个蛋白。较少的蛋白数量必然限制对玉米籽粒整体蛋白质组特性的认识。本研究中，借助 iTRAQ 技术，玉米籽粒中成功鉴定出 4 751 个蛋白，其数量显著高于过去以凝胶电泳为基础的蛋白质组学研究^[18-21]，充分表明 iTRAQ 技术的高通量特性。GO 注释显示玉米籽粒蛋白涉及多种生物过程与分子功能，其中代谢过程与分子过程是最主要的两个生物过程，而催化活性与绑定功能是最主要的两个分子功能类别（图 2）。这些结果与水稻籽粒中的研究相似^[14]，表明这些生物过程与分子功能对籽粒发育具有重要作用。值得注意的是是一部分蛋白仅仅在单个生物学重复中被检测到（图 1），这可能是由个体差异或者每一次独立试验中蛋白肽段提取不一致所导致。

3.2 籽粒发育过程中蛋白修饰相关蛋白的表达特性

籽粒发育过程中的生理代谢受到蛋白的直接调控，而稳定的蛋白结构是其行使功能的首要基础。热激蛋白可作为分子伴侣对新生蛋白进行折叠修饰，特别在胁迫条件下能够稳定蛋白构象、阻止蛋白聚集、对变性及错误修饰的蛋白进行重新折叠修饰^[22]。基于热激蛋白的特性，其广泛参与多种分子过程如蛋白代谢、胁迫响应与信号转导^[22]。本研究中，8 个热激蛋白在籽粒发育过程中显著差异表达且具有不同的表达模式，其中两个 70 kDa 热激蛋白的亚型（编号 10 及 11）分别在发育前、中期积累，另一个亚型（编号 32）与 16.9 kDa I 类热激蛋白、17.5 kDa II 类热激蛋白、热激蛋白 101 及推测的热激蛋白 20

伴侣家族蛋白在发育后期显著积累, 而热激蛋白 1 在发育前、后期均显著积累。小麦^[13]、水稻^[14]籽粒蛋白质组学研究中同样观察到热激蛋白多样的表达模式。这些结果反映出不同类型的热激蛋白可能通过不同的表达模式在籽粒发育过程中行使多重功能。此外, 9 个肽基脯氨酰顺反异构酶及 3 个蛋白二硫键异构酶同样显著差异表达(表 1)。这两种类型蛋白均参与蛋白的修饰过程, 在稳定蛋白结构方面发挥重要作用^[23]。值得注意的是除一个肽基脯氨酰顺反异构酶亚型(编号 24)在发育前、中期均显著表达外, 剩下 8 个蛋白亚型均在发育后期显著积累(表 1), 表明肽基脯氨酰顺反异构酶主要在籽粒发育后期发挥重要作用。总之, 本研究结果显示蛋白修饰相关蛋白在籽粒不同发育阶段协同表达, 这有利于稳定蛋白结构, 进而保证蛋白在不同阶段的功能调控。

3.3 籽粒发育过程中的活性氧(ROS)体内平衡调控

ROS 平衡体系对维护植物发育过程中生理及分子代谢的正常进行具有重要作用, 而 ROS 平衡被打破会导致植物细胞积累过多的 ROS, 进而氧化细胞膜, 对细胞结构及重要调控蛋白造成不可逆的损伤^[24]。为维持细胞体内的 ROS 平衡, 控制过多 ROS 带来的毒性影响, 植物建立了多重的抗氧化酶系统^[24]。本研究中, 31 个差异表达的胁迫相关蛋白涉及 ROS 的体内平衡, 包含不同的抗氧化酶系如 1-Cys 过氧化物酶、抗坏血酸过氧化物酶、多酚氧化酶、谷胱甘肽 S-转移酶、超氧化物歧化酶及硫氧还原蛋白(表 1)。ROS 相关蛋白种类的多样性表明多重抗氧化酶系统参与玉米籽粒发育过程的 ROS 调控。表达分析显示, 除 1 个 ROS 相关蛋白在中期显著表达外, 有 8 个和 16 个蛋白分别在发育前、后期显著积累以及有 6 个蛋白在发育前、后期均显著积累(表 2)。分析其原因, 一方面在籽粒发育前期, 由于籽粒表皮发育还未成熟, 外界氧气易通过渗透作用进入籽粒内部而造成籽粒氧含量过高^[25]; 另一方面在籽粒发育后期, 由于水分含量迅速下降易扰乱细胞膜稳定性及破坏电子传递链, 进而导致 ROS 的显著积累^[26]。因此, 玉米籽粒在这两个阶段激活多重的抗氧化酶系统维持了自身 ROS 的体内平衡。同时, 同一蛋白的不同亚型(如谷胱甘肽 S-转移酶、超氧化物歧化酶及硫氧还原蛋白)具有不同的表达模式(表 1), 表明

在籽粒不同发育阶段不同的蛋白亚型发挥作用。此外, 锌金属硫 II 类蛋白属于金属硫蛋白家族, 而该蛋白家族涉及稳定金属离子平衡, 解毒、调控 ROS 平衡等过程^[27]。本研究中一个锌金属硫 II 类蛋白(编号 40)在 50 DAP 的表达水平与 3 DAP 相比上调高于 44 倍(表 1), 显示其在籽粒发育后期发挥重要作用。总之, 进一步深入分析这些抗氧化酶的生化反应, 将有助于我们理解玉米籽粒发育过程中的 ROS 调控网络。

3.4 籽粒发育过程中的贮藏物质保护及对生物胁迫的响应

淀粉、蛋白及油脂是玉米籽粒的贮藏物质, 其在籽粒灌浆期开始合成与积累, 并且在籽粒萌发期间分解, 为幼苗生长提供必要的碳、氮资源。本研究中, 17 个贮藏物质保护相关蛋白被鉴定, 包括多种蛋白酶水解抑制剂, 如 α -淀粉酶/胰蛋白酶抑制剂、胰蛋白酶抑制剂、枯草杆菌蛋白酶抑制剂及半胱氨酸蛋白酶抑制剂(表 1)。这些蛋白能够防止贮藏蛋白的水解, 其中 α -淀粉酶/胰蛋白酶抑制剂还能防止淀粉的水解退化^[28]。除 2 个推测的半胱氨酸蛋白酶抑制剂(编号 77 及 78)外, 剩下的所有蛋白酶水解抑制剂均在籽粒灌浆期开始上调表达, 并且在发育后期到达最高(表 1), 这也与淀粉及贮藏蛋白的积累模式相一致。此外, 2 个油脂体蛋白及 1 个油脂体固醇蛋白也在发育后期显著积累(表 1)。油脂体蛋白及油脂体固醇蛋白是植物油脂体的主要修饰蛋白, 而油脂体是植物储藏油脂的主要场所^[29]。在籽粒发育后期, 由于水分含量迅速下降, 油脂体会相互聚集, 显著积累这两种蛋白可能通过调节油脂体大小以及防止油脂体聚集, 进而保证油脂的正常积累^[29]。总之, 这些贮藏物质保护相关蛋白的协同表达保证了贮藏物质正常的合成与积累。

籽粒发育除了受到非生物胁迫, 还会受到一些生物胁迫如细菌、真菌感染^[4-5]。本研究中, 抗菌肽 MBP-1、Bet v I 过敏原、P21 蛋白、主要乳胶蛋白 22、发病机制相关蛋白 1、推测的防御素及 2 个几丁质酶被鉴定参与籽粒病虫害响应。其中, 几丁质酶能够水解真菌细胞壁, 转几丁质酶基因显著提高棉花对枯萎病和黄萎病的抗性^[30]。与贮藏物质保护相关蛋白的表达模式相似, 除了 Bet v I 过敏原蛋白在发育前、后期均显著积累外, 剩下的所有病虫害

响应相关蛋白均在发育后期显著积累（表 2）。这些协同表达的蛋白显著增强籽粒对生物胁迫的抗性。

3.5 其他胁迫响应相关蛋白对籽粒发育具有重要作用

本研究中, 34 个显著差异表达的蛋白涉及其他的胁迫响应, 其中包括一系列 LEA, 并且这些蛋白均在发育后期显著积累（表 1）, 这也与小麦^[13]、水稻^[14]中的研究结果一致。研究表明水稻中显著积累 LEA 可提升籽粒后期的耐脱水性^[31]。玉米中, 这些蛋白还被认为是籽粒保持高活力的必要因子^[32]。此外, 应对多种生物与非生物胁迫, LEA 也会被诱导积累^[33]。因此, LEA 可以保护籽粒应对多重胁迫, 特别是水分迅速下降所带来的干燥胁迫, 显著积累这些蛋白提升了玉米籽粒的耐脱水能力。

除了 LEA, 2 个膜联蛋白、3 个脂质转移蛋白、6 个非特异性脂质转移蛋白及 4 个脂氧合酶也在籽粒发育过程中显著差异表达（表 1）。膜联蛋白与脂氧合酶的活性在胁迫环境下显著增强, 表明这两类蛋白在胁迫响应中发挥重要作用^[34-35], 其中脂氧合酶还可以通过合成茉莉酸而直接调控胁迫信号的转导^[36]。本研究中, 2 个膜联蛋白及 4 个脂氧合酶中的 3 个亚型（编号 120—122）均在发育前期显著积累（表 1）, 表明膜联蛋白与脂氧合酶主要在此阶段发挥重要作用。脂质转移蛋白及非特异性脂质转移蛋白能够调控脂类化合物的跨膜运输, 广泛参与植物的多重胁迫响应, 如低温、干燥、氧化胁迫及微生物感染^[37]。本研究中, 2 个脂质转移蛋白亚型（编号 107 及 109）在发育前期显著表达, 5 个非特异性脂质转移蛋白亚型（编号 110 及 112—115）在发育后期显著积累, 而 1 个脂质转移蛋白亚型（编号 108）及 1 个非特异性脂质转移蛋白亚型（编号 111）在发育前、中期均显著积累（表 1）。不同的表达模式反映出脂质转移蛋白及非特异性脂质转移蛋白在籽粒不同发育阶段发挥不同功能。

4 结 论

玉米籽粒中鉴定到 4 751 个蛋白, 其中 123 个胁迫相关蛋白在玉米籽粒发育过程中显著差异表达。这些蛋白主要参与蛋白修饰、活性氧（ROS）体内平衡、贮藏物质保护、病虫害响应及其他胁迫响应过程。这

些胁迫相关蛋白在籽粒不同发育阶段显著积累, 构建了一个协同、多样、稳定的防御调控机制, 维护了籽粒正常的发育过程。

References

- [1] SABELLI P A, LARKINS B A. The development of endosperm in grasses. *Plant Physiology*, 2009, 149(1): 14-26.
- [2] MOORE J P, LE N T, BRANDT W F, DRIOUICH A, FARRANT J M. Towards a systems-based understanding of plant desiccation tolerance. *Trends in Plant Science*, 2009, 14(2): 110-117.
- [3] HUANG H, MØLLER I M, SONG S Q. Proteomics of desiccation tolerance during development and germination of maize embryos. *Journal of Proteomics*, 2011, 75(4): 1247-1262.
- [4] 段灿星, 王晓鸣, 宋凤景, 孙素丽, 周丹妮, 朱振东. 玉米抗穗腐病研究进展. *中国农业科学*, 2015, 48(11): 2152-2164.
DUAN C X, WANG X M, SONG F J, SUN S L, ZHOU D N, ZHU Z D. Advances in research on maize resistance to ear rot. *Scientia Agricultura Sinica*, 2015, 48(11): 2152-2164. (in Chinese)
- [5] 李秀坤, 刘昌林, 周羽, 雍洪军, 张德贵, 翁建峰, 王振华. 玉米病毒病的研究进展. *作物杂志*, 2015(3): 13-16.
LI X K, LIU C L, ZHOU Y, YONG H J, ZHANG D G, WENG J F, WANG Z H. Research progress of viral diseases in maize. *Crops*, 2015(3): 13-16. (in Chinese)
- [6] 张仁和, 郭东伟, 张兴华, 路海东, 刘建超, 李凤艳, 郝引川, 薛吉全. 吐丝期干旱胁迫对玉米生理特性和物质生产的影响. *作物学报*, 2012, 38(10): 1884-1890.
ZHANG R H, GUO D W, ZHANG X H, LU H D, LIU J C, LI F Y, HAO Y C, XUE J Q. Effects of drought stress on physiological characteristics and dry matter production in maize silking stage. *Acta Agromica Sinica*, 2012, 38(10): 1884-1890. (in Chinese)
- [7] 赵福成, 景立权, 闫发宝, 陆大雷, 王桂跃, 陆卫平. 灌浆期高温胁迫对甜玉米籽粒糖分积累和蔗糖代谢相关酶活性的影响. *作物学报*, 2013, 39(9): 1644-1651.
ZHAO F C, JING L Q, YAN F B, LU D L, WANG G Y, LU W P. Effects of heat stress during grain filling on sugar accumulation and enzyme activity associated with sucrose metabolism in sweet corn. *Acta Agromica Sinica*, 2013, 39(9): 1644-1651. (in Chinese)
- [8] 赵龙飞, 李潮海, 刘天学, 王秀萍, 僧珊珊, 潘旭. 玉米花期高温响应的基因型差异及其生理机制. *作物学报*, 2012, 38(5): 857-864.
ZHAO L F, LI C H, LIU T X, WANG X P, SENG S S, PAN X. Genotypic responses and physiological mechanisms of maize (*Zea*

- mays* L.) to high temperature stress during flowering. *Acta Agromica Sinica*, 2012, 38(5): 857-864. (in Chinese)
- [9] 周卫霞, 董鹏飞, 王秀萍, 李潮海. 弱光胁迫对不同基因型玉米籽粒发育和碳氮代谢的影响. *作物学报*, 2013, 39(10): 1826-1834.
ZHOU W X, DONG P F, WANG X P, LI C H. Effects of low-light stress on kernel setting and metabolism of carbon and nitrogen in different maize (*Zea mays* L.) genotypes. *Acta Agromica Sinica*, 2013, 39(10): 1826-1834. (in Chinese)
- [10] 余卫东, 冯利平, 盛绍学, 石磊, 李德. 涝渍胁迫下夏玉米的灌浆特征及其动态模拟. *中国生态农业学报*, 2015, 23(9): 1142-1149.
YU W D, FENG L P, SHENG S X, SHI L, LI D. Analysis of the dynamics and characteristics of grain filling in summer maize under waterlogging stress. *Chinese Journal of Eco-Agriculture*, 2015, 23(9): 1142-1149. (in Chinese)
- [11] 任佰朝, 张吉旺, 李霞, 范霞, 董树亭, 赵斌, 刘鹏. 淹水胁迫对夏玉米籽粒灌浆特性和品质的影响. *中国农业科学*, 2013, 46(21): 4435-4445.
REN B Z, ZHANG J W, LI X, FAN X, DONG S T, ZHAO B, LIU P. Effect of waterlogging on grain filling and quality of summer maize. *Scientia Agricultura Sinica*, 2013, 46(21): 4435-4445. (in Chinese)
- [12] SCHULZE W X, USADEL B. Quantitation in mass-spectrometry-based proteomics. *Annual Review of Plant Biology*, 2010, 61(1): 491-516.
- [13] MA C, ZHOU J, CHEN G, BIAN Y, LÜ D, LI X, WANG Z, YAN Y. iTRAQ-based quantitative proteome and phosphoprotein characterization reveals the central metabolism changes involved in wheat grain development. *BMC Genomics*, 2014, 15(1): 1029.
- [14] ZI J, ZHANG J, WANG Q, ZHOU B, ZHONG J, ZHANG C, QIU X, WEN B, ZHANG S, FU X, LIN L, LIU S. Stress responsive proteins are actively regulated during rice (*Oryza sativa*) embryogenesis as indicated by quantitative proteomics analysis. *PLoS ONE*, 2013, 8(9): e74229.
- [15] CONESA A, GÖTZ S, GARCÍA-GÓMEZ J M, TEROL J, TALÓN M, ROBLES M. Blast2GO: A universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics*, 2005, 21(18): 3674-3676.
- [16] CHEN J, ZENG B, ZHANG M, XIE S, WANG G, HAUCK A, LAI J. Dynamic transcriptome landscape of maize embryo and endosperm development. *Plant Physiology*, 2014, 166(1): 252-264.
- [17] TEOH K T, REQUESSENS D V, DEVAIAH S P, JOHNSON D, HUANG X, HOWARD J A, HOOD E E. Transcriptome analysis of embryo maturation in maize. *BMC Plant Biology*, 2013, 13(1): 19.
- [18] 于涛, 李耕, 刘鹏, 董树亭, 张吉旺, 赵斌, 柏晗. 玉米早期发育阶段粒位效应的蛋白质组学分析. *中国农业科学*, 2016, 49(1): 54-68.
YU T, LI G, LIU P, DONG S T, ZHANG J W, ZHAO B, BAI H. Proteomics analysis of grain position effects during early developmental stages of maize. *Scientia Agricultura Sinica*, 2016, 49(1): 54-68. (in Chinese)
- [19] 刘怀华, 王莉雯, 刘楠, 刘旭, 马侠, 宁丽华, 张华, 崔德周, 姜川, 陈化榜. 玉米花粉与花丝早期互作的蛋白质组学分析. *中国农业科学*, 2010, 43(24): 5000-5008.
LIU H H, WANG L W, LIU N, LIU X, MA X, NING L H, ZHANG H, CUI D Z, JIANG C, CHEN H B. Proteomic analyses of the early pollen-silk interaction in maize. *Scientia Agricultura Sinica*, 2010, 43(24): 5000-5008. (in Chinese)
- [20] MÉCHIN V, BALLIAU T, CHATEAU-JOUBERT S, DAVANTURE M, LANGELLA O, NEGRONI L, PRIOUL J L, THEVENOT C, ZIVY M, DAMERVAL C. A two dimensional proteome map of maize endosperm. *Phytochemistry*, 2004, 65(11): 1609-1618.
- [21] HUANG H, MØLLER I M, SONG S Q. Proteomics of desiccation tolerance during development and germination of maize embryos. *Journal of Proteomics*, 2011, 75(4): 1247-1262.
- [22] WANG W, VINO CUR B, SHOSEYOV O, ALTMAN A. Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends in Plant Science*, 2004, 9(5): 244-252.
- [23] 陈珍, 江琼, 朱诚. 植物中的蛋白质二硫键异构酶及其类蛋白. *植物生理学报*, 2013, 49(8): 715-721.
CHEN Z, JIANG Q, ZHU C. Protein disulfide isomerase and PDI-like proteins in plant. *Plant Physiology Journal*, 2013, 49(8): 715-721. (in Chinese)
- [24] MITTLER R, VANDERAUWERA S, GOLLERY M, BREUSEGEM F V. Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science*, 2004, 9(10): 490-498.
- [25] ROLLETSCHEK H, KOCH K, WOBUS U, BORISJUK L. Positional cues for the starch/lipid balance in maize kernels and resource partitioning to the embryo. *The Plant Journal*, 2005, 42(1): 69-83.
- [26] HOEKSTRA F A, GOLOVINA E A, BUITINK J. Mechanisms of plant desiccation tolerance. *Trends in Plant Science*, 2001, 6(9): 431-438.
- [27] GUO W J, BUNDITHYA W, GOLDSBROUGH P B. Characterization of the *Arabidopsis* metallothionein gene family: Tissue-specific expression and induction during senescence and in response to

- copper. *New Phytology*, 2003, 159(2): 369-381.
- [28] 肖怀秋, 林亲录, 李玉珍, 赵明谋. 蛋白酶抑制剂抗虫基因工程研究进展. *生物技术通报*, 2004(6): 22-25.
- XIAO H Q, LIN Q L, LI Y Z, ZHAO M M. Advances on applied studies of protease inhibitor in gene engineering. *Biotechnology Bulletin*, 2004(6): 22-25. (in Chinese)
- [29] SILOTO R M, FINDLAY K, LOPEZ-VILLALOBOS A, YEUNG E C, NYKIFORUK C L, MOLONEY M M. The accumulation of oleosins determines the size of grain oilbodies in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2006, 18(8): 1961-1974.
- [30] 程红梅, 简桂良, 倪万潮, 杨红华, 王志兴, 孙文姬, 张保龙, 王晓峰, 马存, 贾士荣. 转几丁质酶和 β -1,3-葡聚糖酶基因提高棉花对枯萎病和黄萎病的抗性. *中国农业科学*, 2005, 38(6): 1160-1166.
- CHENG H M, JIAN G L, NI W C, YANG H H, WANG Z X, SUN W J, ZHANG B L, WANG X F, MA C, JIA S R. Increase of fusarium- and verticillium-resistance by transferring chitinase and glucanase gene into cotton. *Scientia Agricultura Sinica*, 2005, 38(6): 1160-1166. (in Chinese)
- [31] SANO N, MASAKI S, TANABATA T, YAMADA T, HIRASAWA T, KANEKATSU M. Proteomic analysis of stress-related proteins in rice seeds during the desiccation phase of grain filling. *Plant Biotechnology*, 2013, 30(2): 147-156.
- [32] WU X, LIU H, WANG W, CHEN S, HU X, LI C. Proteomic analysis of seed viability in maize. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2011, 33(1): 181-191.
- [33] 刘露露, 陈雷, 张春艳, 石瑞杰, 任江萍, 孟凡荣, 尹钧, 李永春. 两个小麦 LEA 基因的特征及其对非生物胁迫的响应. *中国农业科学*, 2014, 47(19): 3736-3745.
- LIU L L, CHEN L, ZHANG C Y, SHI R J, REN J P, MENG F R, YIN J, LI Y C. Characterization of two LEA genes and their response to abiotic stresses in wheat. *Scientia Agricultura Sinica*, 2014, 47(19): 3736-3745. (in Chinese)
- [34] KONOPKA-POSTUPOLSKA D, CLARK G, HOFMANN A. Structure, function and membrane interactions of plant annexins: An update. *Plant Science*, 2011, 181(3): 230-241.
- [35] 何全光, 邝健飞, 陈建业, 陆旺金. 脂氧合酶在香蕉果实成熟过程中的作用. *中国农业科学*, 2011, 44(1): 118-124.
- HE Q G, KUANG J F, CHEN J Y, LU W J. The role of lipoxygenase in banana fruit ripening. *Scientia Agricultura Sinica*, 2011, 44(1): 118-124. (in Chinese)
- [36] FARMER E E, JOHNSON R R, RYAN C A. Regulation of expression of proteinase inhibitor genes by methyl jasmonate and jasmonic acid. *Plant Physiology*, 1992, 98(3): 995-1002.
- [37] GARCÍA-OLMEDO F, MOLINA A, SEGURA A, MORENO M. The defensive role of nonspecific lipid-transfer proteins in plants. *Trends in Microbiology*, 1995, 3(3): 72-74.

(责任编辑 杨鑫浩)