

ISSN 1000-0933
CN 11-2031/Q

生态学报

Acta Ecologica Sinica



第34卷 第10期 Vol.34 No.10 **2014**

中国生态学学会
中国科学院生态环境研究中心
科学出版社

主办
出版



中国科学院科学出版基金资助出版

生态学报

(SHENGTAI XUEBAO)

第 34 卷 第 10 期 2014 年 5 月 (半月刊)

目 次

前沿理论与学科综述

- 景观可持续性与景观可持续性科学..... 赵文武,房学宁 (2453)
- 生态系统服务付费的诊断框架及案例剖析 朱文博,王 阳,李双成 (2460)
- 湿地植物根表铁膜研究进展..... 刘春英,陈春丽,弓晓峰,等 (2470)
- 水生生态环境中捕食信息素的生态学效应..... 覃光球,卢豪良,唐振柱,等 (2481)
- 脊椎动物传播植物肉质果中的次生物质及其生态作用 潘 扬,罗 芳,鲁长虎 (2490)

个体与基础生态

- 中亚热带天然林土壤 CH₄吸收速率对模拟 N 沉降的响应 陈朝琪,杨智杰,刘小飞,等 (2498)
- 塔里木盆地南缘早生芦苇生态特征与水盐因子关系..... 贡 璐,朱美玲,塔西甫拉提·特依拜,等 (2509)
- 黄刺玫叶片光合生理参数的土壤水分阈值响应及其生产力分级..... 张淑勇,夏江宝,张光灿,等 (2519)
- 亚热带杉木和米老排人工林土壤呼吸对凋落物去除和交换的响应..... 余再鹏,万晓华,胡振宏,等 (2529)
- 施钾提高蚜害诱导的小麦茉莉酸含量和叶片相关防御酶活性..... 王 祎,张月玲,苏建伟,等 (2539)
- 高浓度 O₃及太阳辐射减弱对冬小麦 PS II 光合活性及光能耗散的影响
..... 孙 健,郑有飞,吴荣军,等 (2548)
- 蜡样芽孢杆菌 B3-7 在大田小麦根部的定殖动态及其对小麦纹枯病的防治效果
..... 黄秋斌,张 颖,刘凤英,等 (2559)
- 有限供水下冬小麦全程耗水特征定量研究..... 张兴娟,薛绪掌,郭文忠,等 (2567)
- 抗真菌转基因水稻生态适合度评价..... 李 伟,郭建夫,袁红旭,等 (2581)
- 花生叶片蛋白组对 UV-B 辐射增强的响应 杜照奎,李钧敏,钟章成,等 (2589)
- 南海南部悬浮颗粒物脂肪酸组成..... 刘华雪,柯常亮,李纯厚,等 (2599)
- 年龄、集群、生境及天气对鄱阳湖白鹤越冬期日间行为模式的影响..... 袁芳凯,李言阔,李凤山,等 (2608)
- [树]麻雀羽再生的能量预算和水代谢散热调节 杨志宏,吴庆明,杨 渺,等 (2617)
- 低剂量杀虫剂对星豹蛛捕食效应的影响及其机理 李 锐,李 娜,刘 佳,等 (2629)
- 空心莲子草叶甲对越冬保护的响应与控害效能..... 刘雨芳,王秀秀,李 菲,等 (2638)
- ### 种群、群落和生态系统
- 气候变化对鄱阳湖白鹤越冬种群数量变化的影响..... 李言阔,钱法文,单继红,等 (2645)
- 不同退耕年限下菜子湖湿地土壤磷素组分特征变化..... 刘文静,张平究,董国政,等 (2654)

查干湖湿地浮游植物与环境因子关系的多元分析	李然然,章光新,张 蕾 (2663)
闽江河口区淡水和半咸水潮汐沼泽湿地土壤产甲烷菌多样性.....	曾志华,杨民和,余晨兴,等 (2674)
环境及遗传背景对延河流域植物叶片和细根功能性状变异的影响.....	郑 颖,温仲明,宋 光,等 (2682)
衡阳紫色土丘陵坡地植被恢复阶段土壤特性的演变.....	杨 宁,邹冬生,杨满元,等 (2693)
海平面上升影响下广西钦州湾红树林脆弱性评价.....	李莎莎,孟宪伟,葛振鸣,等 (2702)
中国南方3种主要人工林生物量和生产力的动态变化.....	杜 虎,曾馥平,王克林,等 (2712)
杉木人工林土壤真菌遗传多样性.....	何苑曦,周国英,王圣洁,等 (2725)
科尔沁固定沙地植被特征对降雨变化的响应.....	张腊梅,刘新平,赵学勇,等 (2737)
黄土丘陵区退耕还林地刺槐人工林碳储量及分配规律.....	申家朋,张文辉 (2746)

景观、区域和全球生态

南亚热带森林演替过程中小气候的改变及对气候变化的响应.....	刘效东,周国逸,陈修治,等 (2755)
黄淮海平原典型站点冬小麦生育阶段的干旱特征及气候趋势的影响.....	徐建文,居 辉,刘 勤,等 (2765)

资源与产业生态

基于GIS的山西省矿产资源规划环境影响评价	刘 伟,杜培军,李永峰 (2775)
基于效益分摊的水电水足迹计算方法——以密云水库为例	赵丹丹,刘俊国,赵 旭 (2787)

学术信息与动态

全球土地计划第二次开放科学大会 (GLP 2 nd Open Science Meeting) 会议述评	段宝玲,卜玉山 (2796)
---	----------------

期刊基本参数:CN 11-2031/Q * 1981 * m * 16 * 348 * zh * P * ¥ 90.00 * 1510 * 36 * 2014-05



封面图说: 鄱阳湖越冬的白鹤群——白鹤为国家一级保护动物,世界上白鹤东部种群的迁徙路线是从俄罗斯西伯利亚的雅库特,向南迁飞 5100km 到中国长江下游的鄱阳湖越冬,其中途经俄罗斯的雅纳河、印迪吉尔卡河和科雷马河流域,进入中国后主要停歇地有扎龙、林甸、莫莫格以及双台河口、滦河口、黄河三角洲和升金湖等地。多年的监测表明,世界 90% 以上的白鹤种群都在鄱阳湖越冬。越冬初期和末期是白鹤补充能量的关键阶段,因此,研究鄱阳湖国家级自然保护区越冬白鹤种群数量和当地气候变化的相关性具有重要意义。

彩图及图说提供: 陈建伟教授 北京林业大学 E-mail: cites.chenjw@163.com

DOI: 10.5846/stxb201302030223

杜照奎, 李钧敏, 钟章成, 董鸣. 花生叶片蛋白组对 UV-B 辐射增强的响应. 生态学报, 2014, 34(10): 2589-2598.

Du Z K, Li J M, Zhong Z C, Dong M A. proteomic analysis of *Arachis hypogaea* leaf in responses to enhanced ultraviolet-B radiation. Acta Ecologica Sinica, 2014, 34(10): 2589-2598.

花生叶片蛋白组对 UV-B 辐射增强的响应

杜照奎^{1,2}, 李钧敏², 钟章成^{1,*}, 董 鸣^{3,4}

(1. 三峡库区生态环境教育部重点实验室, 西南大学生命科学学院, 重庆 400715;

2. 台州学院生态研究所, 台州 318000; 3. 中国科学院植物研究所植被与环境变化国家重点实验室, 北京 100093;

4. 杭州师范大学生命与环境科学学院, 杭州 310036)

摘要:为揭示 UV-B 辐射增强处理降低花生光合速率和花生抵御 UV-B 辐射增强的分子机制,应用蛋白质双向电泳与质谱联用技术对自然光环境下补增 UV-B 辐射(54 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$)处理 24h 的苗期花生叶片差异表达蛋白质变化进行了分析。结果表明:补增 UV-B 处理下,花生叶片中共检测到丰度变化在 2.5 倍以上的差异表达蛋白点 39 个(其中 22 种蛋白质表达下调,17 种表达上调),经过 MALDI-TOF-TOF 分析及数据库检索,成功鉴定出其中的 27 种蛋白质。被鉴定的 27 种蛋白质按其功能大致可归为 8 类,第 I 类:光合作用相关的蛋白质,包括质体蓝素、1, 5-二磷酸核酮糖羧化酶小亚基、放氧复合物增强子蛋白 1、PsbP 结构域蛋白 6 和果糖二磷酸醛缩酶;第 II 类:糖代谢相关蛋白质,包括苹果酸脱氢酶;第 III 类:能量合成相关蛋白质,包括 ATP 合酶;第 IV 类:氨基酸代谢相关蛋白质,包括半胱氨酸合成酶;第 V 类:蛋白质加工相关蛋白质,包括热激蛋白;第 VI 类:蛋白质翻译相关蛋白质,包括核糖体循环因子;第 VII 类:防御相关蛋白质,包括几丁质酶、过氧化物酶、Cu-Zn 超氧化物歧化酶、二羟肉桂酸 3-O-转甲基酶和类胡萝卜素蛋白;第 VIII 类,未知功能蛋白质。这些研究结果为进一步研究花生抵御 UV-B 辐射的分子机理提供了有意义的线索。

关键词:UV-B; 花生; 蛋白组学; 双向电泳; 质谱

A proteomic analysis of *Arachis hypogaea* leaf in responses to enhanced ultraviolet-B radiation

DU Zhaokui^{1,2}, LI Junmin², ZHONG Zhangcheng^{1,*}, DONG Ming^{3,4}

1 MOE Key Laboratory of Eco-environments of Three Gorges Reservoir Region, School of Life Science, Southwest University, Chongqing 400715, China

2 Institute of Ecology, Taizhou University, Taizhou 318000, China

3 State Key Laboratory of Vegetation and Environmental Change, Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China

4 College of Life and Environmental Sciences, Hangzhou Normal University, Hangzhou 310036, China

Abstract: Ultraviolet-B (UV-B, 280—320 nm) constitutes a minor part of the solar spectrum, which can be absorbed by stratospheric ozone layer. However, a global depletion of the ozone layer, largely due to the release of man-made chlorofluorocarbons, has resulted in an increase of ground-level solar UV-B radiation. UV-B can influence plant processes, either through direct damage or via various regulatory effects. Many researches have warned that excessive UV-B radiation can harm living organisms by damaging DNA, proteins, lipids, and membranes and consequently affecting plant growth, development, morphology, and productivity. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2-D PAGE) is a powerful technique for resolving hundreds of proteins in parallel. Combined with mass spectrometry (MS), it allows rapid and reliable protein identification. In recent years, proteomic-based technologies have been successfully applied to systematic

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30670334, 31270461); 浙江省教育厅科研项目(Y201223322); 中央高校基本科研业务费专项资金资助项目(XDJK2011D009)

收稿日期:2013-02-03; 修订日期:2014-03-21

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: zzhong@swu.edu.cn

studies of the stress responses many plant species, including *Arabidopsis*, soybean, rice, wheat, barley, potato, tomato, and many others. A wide range of abiotic stresses have been examined, such as drought, nutrition deficiency, temperature, oxidative stress, herbicides, wounding, anoxia, salt, and heavy metals. These investigations have provided a wealth of important information on the physiological processes involved in plant stress responses. To explore the molecular mechanisms of the decreased photosynthetic rate and the resistance of peanut (*Arachis hypogaea*) when exposed to enhanced UV-B radiation, 2-D PAGE and MS were used to identify the differentially-expressed proteins in peanut seedling leaves in response to supplementary UV-B radiation ($54 \mu\text{W}/\text{cm}^2$) for 24 h. A total of 39 protein spots were differentially expressed by at least 2.5 fold compared with the controls (22 proteins were down-regulated and 17 were up-regulated) after treatment with supplementary UV-B radiation. Of those protein spots, 27 were successfully identified by MALDI TOF/TOF MS after a database search. Those 27 proteins could be classified into eight categories according to their functions: class I, photosynthesis (plastocyanin, ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase small subunit, oxygen-evolving enhancer protein 1, PsbP domain-containing protein 6, and fructose-bisphosphate aldolase); class II, carbohydrate metabolism (malate dehydrogenase); class III, energy synthesis (ATP synthase); class IV, amino acid biosynthesis (cysteine synthase); class V, protein biosynthesis (ribosome recycling factor); class VI, protein processing (heat shock proteins); class VII, defense responses (chitinase, peroxidase, Cu-Zn SOD, caffeic acid 3-O-methyltransferase, and germin-like protein); class VIII, unknown proteins. In conclusion, we hypothesized that the enhanced UV-B radiation caused a decrease in the photosynthesis rate of peanut leaves mainly via three mechanisms. First, enhanced UV-B may down-regulate the expression of ribosome recycling factor, which caused a decrease in the expression of subunit PsbP in photosystem II, thus destroying the thylakoid membrane structure. Second, the reduced plastocyanin expression may have induced a decrease in photosynthetic electron transport efficiency. Third, the down-regulation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase and fructose-1,6-bisphosphate aldolase resulted in a decrease in carbon assimilation. At the same time, peanut may also enhance its resistance to UV-B stress by increasing the expressions of antioxidant enzymes and non-enzymatic antioxidants, germin-like proteins, pathogenesis-related proteins, and heat shock proteins. These results provide important information for understanding the molecular mechanisms by which *A. hypogaea* responds to elevated UV-B stress.

Key Words: UV-B; *Arachis hypogaea*; proteome; two-dimensional electrophoresis (2-DE); mass spectrometry

人类工业的快速发展使得大量氯氟烃类气体被释放到空气中,导致大气臭氧层变薄,从而提高到达地球表面的 UV-B (ultraviolet-B, UV-B, 280—320 nm) 水平^[1]。UV-B 虽然只是太阳光谱中的一小部分,但是很容易被生物分子(例如:核酸、蛋白质和脂质等)大量吸收,从而引起高等植物中分子和细胞水平的生化反应历程发生改变^[2]。目前,植物对 UV-B 辐射响应的研究报道较多,但大多集中在光合作用、形态变化和生理抗性等。总体而言,增强的 UV-B 辐射会使较多的植物净光合速率降低、株高变低、叶片变厚、生物量下降,并且伴随抗氧化酶活性升高或 UV-B 吸收物质含量增加等^[3]。

当前,评价 UV-B 辐射增强对植物光合作用影响时通常是比较处理与对照间植物的净光合速率 (P_n),如果 P_n 下降,则一般会从 3 个方面进行解

释:一是透射电镜观察叶绿体超微结构遭到破坏^[4],二是核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶(Rubisco)羧化效率下降^[5],三是电子传递效率降低^[6],但深层原因的解釋较少。此外,植物应对 UV-B 辐射方面,较多的研究将重点集中在一些常见的抗氧化酶、非酶抗氧化性物质^[7]和 UV-B 吸收物质(如:类黄酮)等层面,其它方面研究鲜有报道。

植物在生长发育过程中,常常会受到某些非生物胁迫,引发蛋白质在表达量和种类上的显著改变,而以双向电泳与质谱技术为标志的蛋白质组学为从分子水平揭示植物对非生物胁迫(如:干旱、低温、盐、臭氧和重金属等)的响应机制提供了有力保障^[8]。花生(*Arachis hypogaea* L.)是豆科落花生属一年生草本植物,富含脂肪和蛋白质,为重要的食用植物油来源。研究发现,UV-B 辐射可导致花生产量下

降^[9],原因是因为净光合速率降低,株高变矮和叶片数目减少,但有关花生 UV-B 辐射对花生影响的分子机制尚未明确。本课题组在前期研究发现大田种植的花生在接受 UV-B 补增处理 24 h 后,净光合速率显著下降,本研究拟借助于蛋白质组学技术,分析花生幼苗在 UV-B 辐射增强下蛋白质表达的差异,旨在从蛋白质水平揭示:1) UV-B 辐射增强处理降低花生光合速率的分子机理,2) 花生抵御 UV-B 辐射增强的分子机制,从而为最终培育优良抗性品种提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试花生(*A. hypogaea* L.)品种为小京生,该品种为浙江省优异花生,种子购自新昌县种子公司。

1.2 试验设计

试验在浙江省临海市许市村旱地进行,土壤为沙性土,其基本理化性质为:pH 7.57、有机质 26.21 g/kg、全氮 1.08 g/kg、全磷 1.55 g/kg、全钾 15.20 g/kg、碱解氮 36.15 mg/kg、有效磷 112.26 mg/kg、速效钾为 155.62 mg/kg。2012 年 5 月 1 日挑选健康饱满、大小均匀的花生种子于 25 °C 自来水中浸泡 24 h,穴播,每穴 2 粒,行距 40 cm,穴距 20 cm。

花生萌发后,每穴保留 2 棵幼苗,待主茎 4 对真叶全部展开时开始进行补增 UV-B 辐射处理,UV-B 光源采用北京电光源研究所生产的紫外灯管(发射波段 280—320 nm,峰值 308 nm)。将紫外灯具悬挂在试验组花生上方,维持 UV-B 辐射强度在 54 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ 左右(相当于试验地太阳光 UV-B 的 20%,UV enhanced, UV_E),每天辐射时间 8 h,共处理 3d;为保证两组接受太阳光照射条件尽可能一致,对照组(CK)花生上方也悬挂灯架,但不安装灯管。处理结束后,收获植株最顶端 2 张叶片,对照和处理各设 8 个重复,液氮速冻,并保存于 -80 °C 冰箱中,用于蛋白质组学分析。

1.3 研究方法

1.3.1 花生蛋白质的提取与制备

将 5 个重复的冷冻样品取出,称取 1 g 左右叶片,混合,液氮中充分研磨;按照 1:10 的比例加入预冷的含 10% 三氯乙酸的丙酮, -20 °C 沉淀 1h; 4 °C, 15000 r/min 离心 15 min,取沉淀,加入预冷丙酮,

-20 °C 沉淀 1h; 4 °C, 15000 g 离心 15 min,取沉淀,真空冷冻干燥;在 20 mg 干燥蛋白粉末中加入 1 ml 样品裂解液(9 mol/L 尿素、4% CHAPS、1% IPG buffer、1% DTT), 30 °C 恒温水浴溶解 1h,使蛋白充分溶解;将溶液在室温下 15000 r/min 离心 15 min,取上清,并再次离心取上清,充分去除不溶性杂质。上清液即为组织的总蛋白溶液,采用 Bradford 法测定提取的蛋白浓度并分装后储存于 -80 °C 备用或直接用于双向电泳。

1.3.2 花生蛋白质的双向电泳

第一向固相 pH 梯度等电聚焦电泳(Isoelectric focusing, IEF):采用 GE Healthcare 生产的 IPG 胶条(24 cm, pH = 3—10),上样蛋白量为 200 μg (体积为 450 μL)。水化和聚焦温度均为 20 °C,等电聚焦程序为:50 V 聚焦 12 h、500 V 聚焦 1h、1000 V 聚焦 1 h、1000—10000 V 梯度升压聚焦 1 h、10000 V 聚焦 10 h。

第二向 SDS-PAGE 电泳:聚焦完毕后,取出胶条,在 10 ml 平衡缓冲液 I [6 mol/L 尿素、50 mmol/L Tris · HCl (pH = 8.8)、30% 甘油、2% SDS、1% DTT 和 0.05% 溴酚兰]和 10 ml 平衡缓冲液 II [6 mol/L 尿素、50 mmol/L Tris · HCl (pH = 8.8)、30% 甘油、2% SDS、2.5% 碘乙酰胺和 0.05% 溴酚兰]的平衡管中缓慢水平摇晃 15 min。在 SDS-PAGE 凝胶(12%)的上表面加入封胶液(25 mmol/L Tris、192 mmol/L 甘氨酸、0.1% SDS 和 0.5% 琼脂糖),将胶条放到第二向 SDS-PAGE 凝胶的上表面,使胶条与 SDS-PAGE 凝胶的胶面充分接触。待琼脂糖完全凝固后,将凝胶转移至电泳槽中,在 15 °C 按如下参数进行电泳:100 V 电泳 45 min 后将电压改为 200V,电泳至溴酚兰前沿刚好跑出凝胶。

1.3.3 硝酸银染色

电泳结束后,轻轻撬开两层玻璃板,取出凝胶按 Shevchenko 等^[10]方法进行硝酸银染色,略有修改。具体操作如下:双蒸水洗 5 min;固定液(30%乙醇、10%乙酸)固定 30 min;10%乙醇洗两遍,每遍 5 min;双蒸水洗两遍,每遍 5 min;敏化液(0.02% 硫代硫酸钠)敏化 1 min;水洗两遍,每次 1 min;银染液(0.1% 硝酸银)染色 20 min;双蒸水洗两次,每次 30 s;显影液(0.25% 碳酸钠,0.04% 甲醛溶液)显影 3 min;至图像满意;停显液(5% 乙酸)终止显色;双蒸水洗 3 次,

每次 5 min,保鲜膜密封。4 °C 保存备用。

1.3.4 双向电泳图谱分析

银染后的凝胶应用 Image Scanner(GE Healthcare)扫描仪进行扫描,扫描模式为灰度模式,光密度值为 300 dpi。使用 PDQuest 8.0 软件(Bio-Rad)对处理和对照的双向电泳图像进行分析,按照软件说明进行凝胶蛋白点检测、图像背景扣除、蛋白点灰度值标准化和不同凝胶间蛋白点匹配,以变化倍数大于 2.5 倍或小于 0.4 倍为标准选择差异蛋白点用于质谱分析。

1.3.5 质谱鉴定与数据库检索

从凝胶上切取差异蛋白质点,用胰蛋白酶于 37 °C 酶解 16 h,利用基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-TOF MS,质谱仪器型号:ABI 5800 Proteomics Analyzer)对蛋白质进行鉴定。将一级和二级质谱数据整合并使用 GPS 3.6 (Applied Biosystems)和 Mascot2.1(Matrix Science)对质谱数据进行分析 and 蛋白鉴定,搜索参数如下:数据库为

NCBI nr 绿色植物数据库(Viridiplantae),酶为胰蛋白酶,允许最大漏切位点为 1,质量允许误差范围为 0.3 Da,在 Protein score C.I.% 大于 95 为鉴定成功。

1.3.6 生物信息学分析

依据 UniProtKB 数据库(<http://www.uniprot.org/>)提供的蛋白质注释信息对蛋白质进行功能分类^[11]。

2 结果与分析

2.1 花生叶片蛋白质双向电泳图谱

花生叶片总蛋白质经 IEF/SDS-PAGE、银染和图像扫描,获得了双向电泳图谱(图 1),可以看出,对照(自然光照)与处理(UV-B 辐射增强)之间叶片蛋白质在 2D 胶上的分布基本一致。用 PDQuest 8.0 软件对其进行分析,经自动检测和人工去除杂点后,从对照和处理 2D 凝胶上分别得到 757 个和 779 个稳定且重复性较好的蛋白质点。

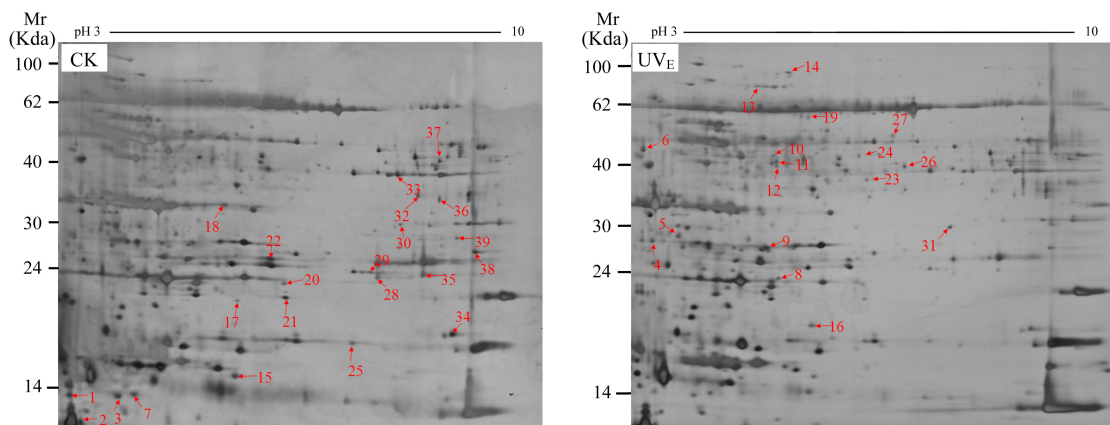


图 1 自然光照(CK)和 UV-B 辐射增强处理(UV_E)下花生叶片蛋白双向电泳图谱

Fig.1 2-DE maps of total proteins from *A. hypogaea* leaves treated with ambient UV-B radiation (CK) and with UV-B radiation enhanced (UV_E)
编号 1—39 为差异表达蛋白点

2.2 UV-B 辐射增强处理后花生叶片差异蛋白点的比较

利用 PDQuest 8.0 软件对 2-DE 图谱进行分析,发现一些蛋白质在对照与处理间的表达丰度存在明显的差异。以对照相对处理蛋白质丰度变化在 2.5 倍以上(或 0.4 倍以下)作为检测阈值,比较对照和处理的 2-DE 凝胶图谱,结果表明 UV-B 辐射增强处理 24 h 后的花生叶片中共有 39 个蛋白质差异表达,为便于蛋白点的比较及质谱鉴定,分别标记为 1—39。在 39 个差异表达的蛋白质点中,UV-B 辐射增

强处理使得 22 种蛋白质表达下调(图 1CK 中箭头所指蛋白质点),17 种蛋白表达上调(图 1UV_E 中箭头所指蛋白质点),部分差异表达蛋白质点见图 2。

2.3 花生叶片差异表达蛋白点的质谱鉴定

经过胰蛋白酶酶解、MALDI-TOF-TOF 质谱分析获得肽质量指纹图谱,将肽质量指纹图谱与多肽序列标签数据提交 Mascot 网站,选用 NCBI nr 数据库进行检索,成功对 27 个差异表达蛋白质进行了鉴定,表 1 为各差异表达蛋白质点的质谱鉴定结果。

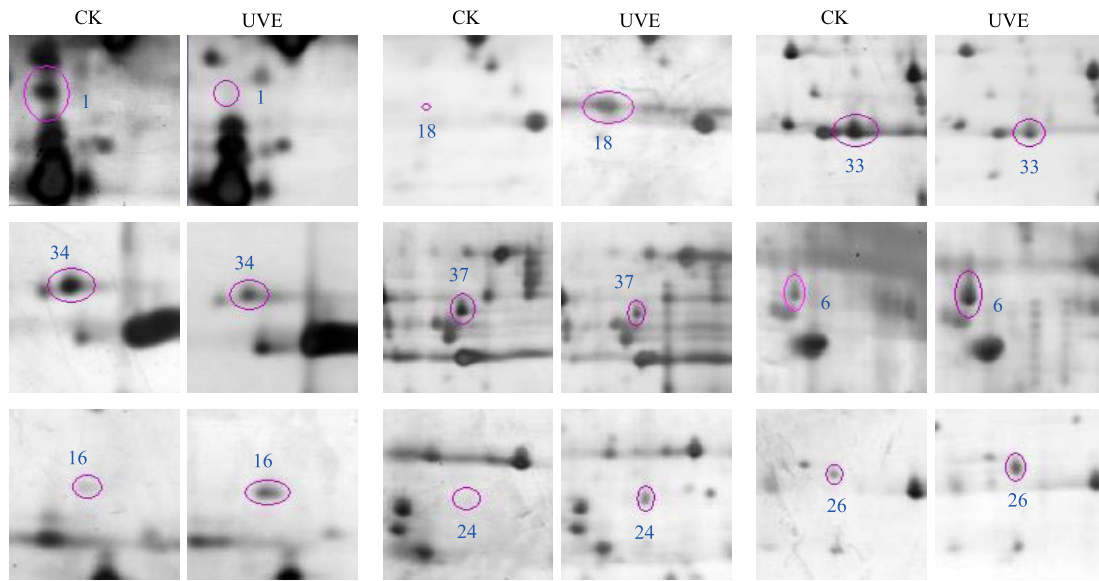


图 2 部分差异表达蛋白点的放大比较

Fig.2 Enlarged images of partial differentially expressed protein spots

表 1 花生叶片差异表达蛋白质点的质谱鉴定结果

Table 1 Identification of differential proteins in peanut leaves by MALDI-TOF-TOF MS

功能 Function	蛋白点编号 Spot No.	登录号 Accession number	蛋白点名称 Protein name	分子量 Molecular weight (Theo. / Exp.) (kD)	等电点 Isoelectric point (Theo. / Exp.)	得分 Score	物种 Species	表达调控 Regulation
光合作用 Photosynthesis	1	gi1351727559	质体蓝素	16.55/16.40	4.82/3.24	177	大豆 <i>Glycine max</i>	↓
	3	gi11079736	核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶小亚基前体	19.98/16.43	8.80/3.95	374	野大豆 <i>Glycine soja</i>	↓
	7	gi11079736	核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶小亚基前体	19.98/16.73	8.80/4.14	374	野大豆 <i>G. soja</i>	↓
	18	gi1131386	放氧增强蛋白 1	35.25/37.50	5.58/5.42	616	菠菜 <i>Spinacia oleracea</i>	↓
	22	gi1356571888	PsbP 结构域蛋白 6	28.51/29.91	5.73/6.33	409	大豆 <i>G. max</i>	↓
	37	gi1351724481	果糖二磷酸醛缩酶	38.66/48.44	6.77/8.51	676	大豆 <i>G. max</i>	↓
糖代谢 Carbohydrate	32	gi137725953	苹果酸脱氢酶	37.39/40.85	7.01/8.29	699	豌豆 <i>Pisum sativum</i>	↓
	33	gi12827080	苹果酸脱氢酶前体	36.00/44.28	8.80/7.97	634	紫花苜蓿 <i>Medicago sativa</i>	↓
metabolism	36	gi137725953	推测的苹果酸脱氢酶	37.39/39.35	7.01/8.51	699	豌豆 <i>P. sativum</i>	↓
能量生物合成 Energy	9	gi1356512762	ATP 合成酶 24kD 亚基	29.98/32.23	8.87/5.16	300	大豆 <i>G. max</i>	↑
biosynthesis	17	gi1356563202	ATP 合成酶 δ 链	27.44/24.70	5.98/5.94	256	花生 <i>Arachis hypogaea</i>	↓
氨基酸生物合成 Amino acid biosynthesis	21	gi1224145221	ATP 合成酶 δ 链	26.94/25.14	6.02/6.52	378	毛果杨 <i>Populus trichocarpa</i>	↓
	23	gi1255567778	半胱氨酸合成酶	43.38/43.39	7.60/6.54	696	蓖麻 <i>Ricinus communis</i>	↑
蛋白质加工 Protein processing	14	gi13999940	70kD 热激蛋白	72.72/78.86	5.95/5.57	1264	菜豆 <i>Phaseolus vulgaris</i>	↑
	16	gi1123556	18.2kD 热激蛋白	18.15/22.86	5.81/5.93	266	紫花苜蓿 <i>M. sativa</i>	↑
蛋白质翻译 Protein translation	38	gi1356536011	核糖体循环因子	28.57/30.91	8.86/8.74	248	大豆 <i>G. max</i>	↓
防御蛋白 Defence protein	4	gi1116330	酸性几丁质酶	31.70/33.09	4.90/3.49	587	赤豆 <i>Vigna angularis</i>	↑
	31	gi11237027	几丁质酶(类型 II)	29.42/40.15	6.29/8.23	557	花生 <i>A. hypogaea</i>	↑
	11	gi1194466268	过氧化物酶	18.84/50.30	5.93/5.33	186	花生 <i>A. hypogaea</i>	↑
	12	gi1194466268	过氧化物酶	18.84/48.96	5.93/5.33	186	花生 <i>A. hypogaea</i>	↑

续表

功能 Function	蛋白点编号 Spot No.	登录号 Accession number	蛋白点名称 Protein name	分子量 Molecular weight (Theo. / Exp.) (kD)	等电点 Isoelectric point (Theo. / Exp.)	得分 Score	物种 Species	表达调控 Regulation
	15	gi171040665	Cu-Zn 超氧化物歧化酶	15.20/18.05	5.27/5.42	284	花生 <i>A. hypogaea</i>	↓
	24	gi1357470923	二羟肉桂酸 3-O-转甲基酶	29.34/51.39	5.59/6.45	328	蒺藜苜蓿 <i>Medicago truncatula</i>	↑
	28	gi1357513969	类萌发素蛋白	23.08/27.33	8.96/7.87	263	蒺藜苜蓿 <i>M. truncatula</i>	↓
	35	gi1357513969	类萌发素蛋白	23.08/27.93	8.96/8.30	263	蒺藜苜蓿 <i>M. truncatula</i>	↓
未知蛋白 Unkown protein	6	gi1359806300	非特征蛋白	37.88/55.00	4.53/3.41	664	大豆 <i>G. max</i>	↑
	30	gi1255638833	未知蛋白	18.13/35.07	6.27/8.00	232	大豆 <i>G. max</i>	↓
	34	gi1351722815	非特征蛋白	21.17/21.49	8.74/8.69	280	大豆 <i>G. max</i>	↓

↑代表蛋白质表达量上调;↓代表蛋白质表达量下调

依据 UniProtKB 数据库提供的蛋白质注释信息,所鉴定的 27 个叶片蛋白质按其功能可归为八类(图 3)。第 I 类:光合作用相关的蛋白质 6 种,包括质体蓝素(1 号)、1, 5-二磷酸核酮糖羧化酶小亚基(3 号和 7 号)、放氧复合物增强子蛋白 1(18 号)、PsbP 结构域蛋白 6(22 号)和果糖二磷酸醛缩酶(37 号);第 II 类:糖代谢相关蛋白质 3 种,包括苹果酸脱氢酶(32、33 和 36 号);第 III 类:能量合成相关蛋白质 3 种,包括 ATP 合酶(9、17 和 21 号);第 IV 类:氨基酸代谢相关蛋白质 1 种,包括半胱氨酸合成酶(23 号);第 V 类:蛋白质加工相关蛋白质 2 种,包括热激蛋白(14 和 16 号);第 VI 类:蛋白质翻译相关蛋白质 1 种,包括核糖体循环因子(38 号);第 VII 类:防御相关蛋白质 8 种,包括酸性几丁质酶(4 和 31 号)、过氧化物酶(11 和 12 号)、Cu-Zn 超氧化物歧化酶(15

号)、二羟肉桂酸 3-O-转甲基酶(24 号)和类萌发素蛋白(28 和 35 号);第 VIII 类,未知功能蛋白质 3 种,包括 6、30 和 34 号。

3 讨论

在质谱鉴定中,位置邻近的蛋白质点被鉴定为同一种蛋白质(3 号和 7 号被鉴定为 1, 5-二磷酸核酮糖羧化酶小亚基、17 号和 21 号均被鉴定为 ATP 合成酶 δ 链、28 和 35 号被鉴定为类萌发素蛋白),类似的情况在小麦等作物中也存在,这可能是由于这些蛋白质表达丰度过高,在等电聚焦和二向分离时发生了位置偏移而造成的^[12];当然也有可能是这些蛋白质发生局部降解或存在翻译后修饰现象。蛋白质翻译后修饰在植物体内可以参与植物生长发育、病理、非生物逆境应答等细胞信号转导过程,常见形式有磷酸化、糖基化、甲基化和乙酰化等^[13]。

本研究以油料作物花生为材料,运用差异蛋白质组学技术试图从蛋白质表达水平揭示植物对 UV-B 辐射增强响应的分子机制。结果表明,室外补增 UV-B 处理改变了花生叶片中与光合作用、糖代谢、能量合成、氨基酸合成、蛋白质加工、蛋白质翻译和防御蛋白等代谢相关蛋白的表达。

3.1 UV-B 辐射增强对光合作用相关蛋白质的影响

光合作用光反应中光系统 II (PS II) 易受 UV-B 辐射损伤,尤其是反应中心的 D1 (*psbA* 基因编码) 和 D2 (*psbD* 基因编码) 蛋白,即使在非常低的 UV-B 辐射剂量下它们都能够被降解。UV-B 辐射下 PS II 活性与 *psbA* 基因转录产物及其翻译产物 D1 蛋白的稳定性密切相关^[14]。扫描电镜结果表明,UV-B 辐射增强会破坏叶绿体的超微结构^[4]、叶绿素荧光动力

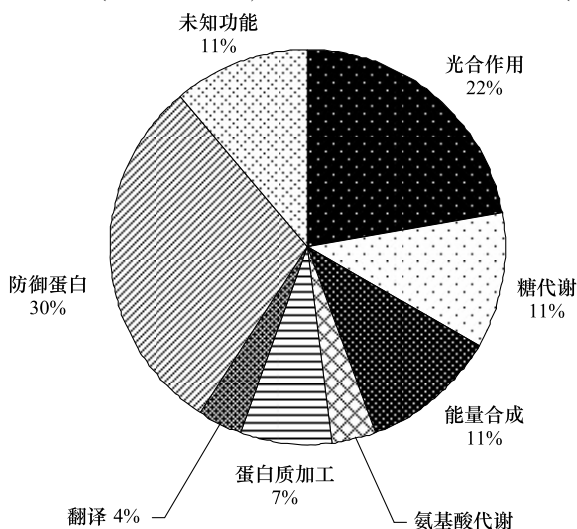


图 3 27 个鉴定蛋白功能分类图

Fig. 3 The distribution of the 27 identified proteins by functional category

学研究表明遭受 UV-B 辐射的植物叶片 PS II 活性和光合电子传递速率显著降低^[15],从而降低其净光合速率^[6],但 UV-B 如何破坏叶绿体和类囊体结构以及降低电子传递速率原因目前仍未明确。

PsbP 为构成 PS II 的亚基,大小约 20.1kD,具有与 Ca^{2+} 、 Cl^- 和 Mg^{2+} 相结合的能力,对光合放氧具有重要的作用^[16]。Yi 等^[17]运用 RNA 干扰技术抑制拟南芥 PsbP 蛋白的表达后(PsbP 的含量仅为对照的 13%),结果发现叶绿体肿胀变圆,基粒类囊体内径变大且垛叠无序,据此推断 PsbP 对于稳定类囊体和叶绿体结构具有重要作用。本研究发现 UV-B 辐射后会引引起花生叶片中 PsbP 结构域蛋白 6 表达量的下调(蛋白质点 22),暗示 UV-B 或许通过下调 PsbP 的表达量进而破坏植物类囊体的结构,降低植物的光合能力。

核糖体循环因子(ribosome recycling factor, RRF)是蛋白质合成体系中核糖体循环再利用的关键因子,对菠菜^[18]和水稻^[19]的研究结果表明,RRF 均由核基因编码,转录后被转运至线粒体或叶绿体中发挥作用。Wang 等^[20]最近报道,拟南芥 RRF 突变株 *hfp108-1* 叶绿体类囊体膜系统发育不成熟,基粒和基质类囊体模糊,免疫印迹发现:叶绿体蛋白,如 D1、D2、CP43、CP47、PsbA 和 PsbB 等蛋白表达量下降。本研究中,试验组花生 RRF 表达量下调,同时叶绿体蛋白 PsbP 表达量也出现下降,由此,我们推测可能是 RRF 量的不足影响 PsbP 的表达量降低,这需要试验进一步验证。

质体蓝素(plastocyanin, PC)于类囊体膜内表面,是高等植物中为 Cytb6/f 与光系统 I (PS I) 之间传递电子的一种含铜离子的蛋白质,为光合电子传递链中的重要成员^[21]。研究显示,PC(蛋白质点 1)在 UV-B 辐射增强下表达下调,PC 含量的减少会影响到类囊体膜上电子传递的效率,使植物同化作用减弱。

核酮糖-1, 5-二磷酸羧化酶(Ribulose 1, 5-bisphosphate carboxylase, Rubisco)催化卡尔文循环中的羧化反应,UV-B 对 Rubisco 含量的影响较大, Jordan 等^[22]用 UV-B 处理豌豆 3d 后,发现可溶性蛋白质下降了 33%,其中 Rubisco 小亚基含量下降了 56%,定量 PCR 检测发现 Rubisco 小亚基 mRNA 在处理 4 小时后下调量高于 20%,时间更长甚至检测

不出。果糖-1, 6-二磷酸醛缩酶(fructose-1, 6-bisphosphate aldolase, FBA)也是控制光合碳同化速率的重要酶之一。Uematsu 等^[23]将拟南芥 FBA 基因转入烟草后,促进了 RuBP 的生成并提高了光合速率, Hatano-Iwasaki 和 Ogawa^[24]研究表明,转化 FBA 基因的拟南芥也能显著提高 CO_2 同化速率。本研究表明,UV-B 辐射降低了花生卡尔文循环中 Rubisco(蛋白质点 3 和 7)和 FBA(蛋白质点 37)两种酶的含量,这或许是对光合作用碳循环影响的主要因素。

3.2 防御相关蛋白质对 UV-B 辐射增强的响应

大多数学者认为,紫外吸收物质(如:类黄酮、花色素苷和类胡萝卜素等)含量的诱导增加是植物应对 UV-B 辐射的重要防御机制,它们在植物应对 UV-B 辐射方面的重要性逐渐被证实。但也有研究表明^[25],UV-B 辐射拟南芥使得叶片中芥子酰葡萄糖和芥子酰苹果酸含量提高,说明芥子酸酯在植物响应 UV-B 辐射过程中起重要作用。二羟肉桂酸 3-O-转甲基酶(caffeic acid 3-O-methyltransferase, COMT)可催化 5-羟基阿魏酸甲基化生成芥子酸^[26],本研究表明,花生也有可能通过 COMT(蛋白质点 24)的上调来提高芥子酸的生成,进而大量合成芥子酸酯达到保护植株的目的,这与 Meißner 等^[27]认为芥子酰苹果酸只是在植物受到 UV-B 辐射初期能及时地起到保护作用较为相似。此外,COMT 也可催化 5-羟基松柏醇甲基化生成芥子醇,芥子醇是构成木质素的重要成分,因而 COMT 对木质素的合成具有调控作用。紫外线照射梁平柚(*Citrus grandis* L.)后,柚皮中 COMT 基因转录水平显著提高^[28],且 Yamasaki 等^[29]研究表明植物在接受 UV-B 辐射增强处理后,叶片中木质素含量较对照显著提高。本研究发现试验组花生叶片中 COMT 表达量上调,可能会加速叶片中木质素的合成,木质素或许对于抵御紫外线的辐射具有一定的作用。

UV-B 对植物的伤害,其中重要的一条途径就是产生活性氧(如: O_2^- , H_2O_2 和 $\cdot\text{OH}$),对膜系统的过氧化损伤^[30]。为抵御活性氧对植物产生的毒害作用,植物可通过抗氧化酶类或非酶抗氧化系统对活性氧进行清除。超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化物酶(POD)能有效清除植物体内的 O_2^- 和 H_2O_2 ,抗坏血酸-谷胱甘肽(AsA-GSH)也是消除 H_2O_2 的重要成分。本研究发现,试验组花生叶片中 POD(蛋白质点

11 和 12) 含量上升,半胱氨酸合成酶(蛋白质点 23) 表达量上调,使得半胱氨酸和 GSH 的含量可能增加,表明花生清除 H_2O_2 的能力得到了提高;但 Cu/Zn-SOD(蛋白质点 15) 含量下降,说明清除 O_2^- 的能力遭到破坏,花生膜系统可能受到较为严重 O_2^- 胁迫。

类萌发素蛋白(GLPs)以糖蛋白的形式结合存在于细胞外基质中,可以催化草酸氧化产生过氧化氢。过氧化氢能够使植物初生壁中木聚糖交联,令细胞壁更为致密;同时还可诱导与抗性有关的基因表达,从而使植物对不良环境胁迫产生抗性^[31]。将辣椒(*Capsicum chinense* Jacq.) GLPs 基因转入烟草(*Nicotiana tabacum Xanthi nc*)后,提高了烟草对双生病毒的抗性^[32],过表达 GLPs 基因也可让甘蓝型油菜阻止核盘菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)的感染^[33],沉默烟草中的 GLP 基因后,则提高了烟草天蛾(*Manduca sexta*)的取食偏好性^[34]。本研究发现试验组中 GLP(蛋白质点 28 和 35)表达下调,这暗示着随着环境中 UV-B 辐射增强,花生抵抗病毒、细菌感染或采食天敌等方面的能力可能会下降。

病程相关蛋白(PR)是植物受到病原菌侵染或环境因素刺激时会产生多种抗性蛋白,在增强植物抗性方面发挥重要作用,其中,几丁质酶和 β -1, 3-葡聚糖酶是两类重要的 PR 蛋白^[35]。几丁质酶(Chitinase)是一类水解几丁质单体 N-乙酰-D-葡糖胺之间糖苷键的酶^[36],花生易遭受锈病、叶斑病和茎腐病等病害的侵袭,这些病的病原菌均为真菌,由于其细胞壁中存在着丰富的几丁质,UV-B 辐射增强处理后,花生叶片中几丁质酶(蛋白质点 4 和 31)表达上调,意味着花生抵御真菌侵染的能力可能会得到提高。

此外,本研究中,试验组热激蛋白 HSP18.2(蛋白质点 16)和 HSP70(蛋白质点 14)表达上调,推测花生可能通过上调表达 HSP 来促进细胞质或细胞核内新生蛋白质的折叠、组装及跨膜运输等,以此应对 UV-B 对植株的不利影响,与本研究类似,Du 等^[37]用 UV 处理水稻后,也发现 HSP70 表达上调,而 Murakami 等^[38]将来自水稻的 HSP17.1 转入水稻中后发现其抵抗 UV-B 的能力较对照组显著提高。

综上所述,UV-B 辐射增强引起花生叶片光合作用下降的原因主要有三方面:首先可能是由于 UV-B

引起叶片核糖体循环因子表达量下调,导致 PS II 的亚基 PsbP 表达量下降,从而破坏植物类囊体的结构;其次可能是质体蓝素含量下降引起光合电子传递效率降低;第三则可能是由于核酮糖-1, 5-二磷酸羧化酶和果糖-1, 6-二磷酸醛缩酶表达量降低导致碳同化能力下降。同时,花生也可能通过提高抗氧化酶或非酶抗氧化物质、类萌发素蛋白、病程相关蛋白和热激蛋白等的表达量来抵御 UV-B 胁迫。在后续的研究中,将对某些感兴趣差异表达的蛋白质的编码基因进行克隆,构建表达载体转化花生,进一步明确其在抵御 UV-B 过程中的具体作用及分子机制,为今后培育抗 UV-B 辐射的花生品种提供理论依据。

References:

- [1] Blumthaler M, Ambach W. Indication of increasing solar ultraviolet-B radiation flux in alpine regions. *Science*, 1990, 248 (4952): 206-208.
- [2] Xu C, Sullivan J H, Garrett W M, Caperna T J, Natarajan S. Impact of solar Ultraviolet-B on the proteome in soybean lines differing in flavonoid contents. *Phytochemistry*, 2008, 69 (1): 38-48.
- [3] Piri E, Babaeian M, Tavassoli A, Esmailian Y. Effects of UV irradiation on plants. *African Journal of Microbiology Research*, 2011, 5(14): 1710-1716.
- [4] Wu N B, Ma H Q, Hu L T, Hong H, Sun J C, Zhang Y H, Dai D L. Effect of enhanced UV-B radiation on photosynthetic structure and photosynthetic characteristics of *Mentha piperita*. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2009, 34 (23): 2995-2998.
- [5] Choi B Y, Roh K S. UV-B radiation affects chlorophyll and activation of rubisco by rubisco activase in *Canavalia ensiformis* L. leaves. *Journal of Plant Biology*, 2003, 46(2): 117-121.
- [6] Ranjbarfordoei A, Samson R, Damme P. Photosynthesis performance in sweet almond [*Prunus dulcis* (Mill) D. Webb] exposed to supplemental UV-B radiation. *Photosynthetica*, 2011, 49(1): 107-111.
- [7] Ren J, Yao Y, Yang Y, Korpelainen H, Junntila O, Li C. Growth and physiological responses to supplemental UV-B radiation of two contrasting poplar species. *Tree Physiol*, 2006, 26(5): 665-672.
- [8] Yu J J, Dai S J. Research Advances in Plant Proteomics. *Bulletin of Botany*, 2009, 44(4): 410-425.
- [9] Teramura A H. Effects of ultraviolet-B radiation on the growth and yield of crop plants. *Physiologia Plantarum*, 1983, 58 (3): 415-427.
- [10] Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M. Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels.

- Analytical Chemistry, 1996, 68(5): 850-858.
- [11] Schneider M, Lane L, Boutet E, Lieberherr D, Tognolli M, Bougueleret L, Bairoch A. The UniProtKB/Swiss-Prot knowledgebase and its plant proteome annotation program. *Journal of Proteomics*, 2009, 72(3): 567-573.
- [12] Shao C H, Qian Y F, Tang X Y, Liu R G, Xie J S, Peng C R, Qiu C F. Proteomics analysis of nutrient deficiency effect on rice grain filling. *Chinese Journal of Rice Science*, 2012, 26(3): 267-274.
- [13] Melo-Braga M N, Braga T V, León I R, Antonacci D, Nogueira F C S, Thelen J J, Larsen M R, Palmisano G. Modulation of protein phosphorylation, glycosylation and acetylation in grape (*Vitis vinifera*) mesocarp and exocarp due to *Lobesia botrana* infection. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2012(11): 945-956.
- [14] Chaturvedi R, Shyam R, Sane P. Steady state levels of D1 protein and psbA transcript during UV - B inactivation of photosystem II in wheat. *Iubmb Life*, 1998, 44(5): 925-932.
- [15] Schmidt É C, Santos R W, Faveri C, Horta P A, de Paula Martins R, Latini A, Ramlov F, Maraschin M, Bouzon Z L. Response of the agarophyte *Gelidium floridanum* after in vitro exposure to ultraviolet radiation B: changes in ultrastructure, pigments, and antioxidant systems. *Journal of Applied Phycology*, 2012, 24(6): 1341-1352.
- [16] Roose J L, Frankel L K, Bricker T M. Documentation of significant electron transport defects on the reducing side of photosystem II upon removal of the PsbP and PsbQ extrinsic proteins. *Biochemistry*, 2009, 49(1): 36-41.
- [17] Yi X, Hargett S R, Frankel L K, Bricker T M. The PsbP protein, but not the PsbQ protein, is required for normal thylakoid architecture in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters*, 2009, 583(12): 2142-2147.
- [18] Rolland N, Janosi L, Block M A, Shuda M, Teyssier E, Miège C, Chéniclet C, Carde J P, Kaji A, Joyard J. Plant ribosome recycling factor homologue is a chloroplastic protein and is bactericidal in *Escherichia coli* carrying temperature-sensitive ribosome recycling factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1999, 96(10): 5464-5469.
- [19] Hu X, Hu H, Hong G F, Han B. The Structural, transcriptional and homology analysis of two *fr* genes in rice. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology*, 2004, 30(1): 105-114.
- [20] Wang L, Ouyang M, Li Q, Zou M, Guo J, Ma J, Lu C, Zhang L. The *Arabidopsis* chloroplast ribosome recycling factor is essential for embryogenesis and chloroplast biogenesis. *Plant Molecular Biology*, 2010, 74(1/2): 47-59.
- [21] Schottler M A. The Role of Plastocyanin in the Adjustment of the Photosynthetic Electron Transport to the Carbon Metabolism in Tobacco. *Plant Physiology*, 2004, 136(4): 4265-4274.
- [22] Jordan B, He J, Chow W, Anderson J. Changes in mRNA levels and polypeptide subunits of ribulose 1, 5-bisphosphate carboxylase in response to supplementary ultraviolet-B radiation. *Plant, Cell and Environment*, 2006, 15(1): 91-98.
- [23] Uematsu K, Suzuki N, Iwamae T, Inui M, Yukawa H. Increased fructose 1,6-bisphosphate aldolase in plastids enhances growth and photosynthesis of tobacco plants. *Journal of Experimental Botany*, 2012, 63(8): 3001-3009.
- [24] Hatano-Iwasaki A, Ogawa K. Biomass production is promoted by increasing an aldolase undergoing glutathionylation in *Arabidopsis thaliana*. *International Journal of Plant Developmental Biology*, 2012, 7: 1-8.
- [25] Li M, Wang Y, Mu X F, Wang Y, Yan X F. Response of sinapate esters in *Arabidopsis thaliana* to UV-B radiation. *Acta Ecologica Sinica*, 2012, 32(7): 1987-1994.
- [26] Singh R, Rastogi S, Dwivedi U N. Phenylpropanoid metabolism in ripening fruits. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2010, 9(4): 398-416.
- [27] Meißner D, Albert A, Böttcher C, Strack D, Milkowski C. The role of UDP-glucose: hydroxycinnamate glucosyltransferases in phenylpropanoid metabolism and the response to UV-B radiation in *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, 2008, 228(4): 663-674.
- [28] Cheng C Z, Zhu S P, Wu B, Yang J W, Bei X J, Ma Y Y, Zhong G Y. Effect of UV-B radiation on gene expression in peels of 'Liangping' pommelo [*Citrus grandis* (L.) Osbeck]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2011, 38(5): 859-866.
- [29] Yamasaki S, Noguchi N, Mimaki K. Continuous UV-B irradiation induces morphological changes and the accumulation of polyphenolic compounds on the surface of cucumber cotyledons. *Journal of Radiation Research*, 2007, 48(6): 443-454.
- [30] Kumari R, Singh S, Agrawal S. Response of ultraviolet-B induced antioxidant defense system in a medicinal plant, *Acorus calamus*. *Journal of Environmental Biology*, 2010, 31(6): 907-911.
- [31] Banerjee J, Das N, Dey P, Maiti M K. Transgenically expressed rice germin-like protein1 in tobacco causes hyper-accumulation of H₂O₂ and reinforcement of the cell wall components. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2010, 402(4): 637-643.
- [32] Guevara-Olvera L, Ruz-Nito M, Rangel-Cano R, Torres-Pacheco I, Rivera-Bustamante R, Muñoz-Sánchez C, González-Chavira M, Cruz-Hernandez A, Guevara-González R. Expression of a germin-like protein gene (*CchGLP*) from a geminivirus-resistant pepper (*Capsicum chinense* Jacq.) enhances tolerance to geminivirus infection in transgenic tobacco. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 2012, 78: 45-50.
- [33] Rietz S, Bernsdorff F E M, Cai D. Members of the germin-like protein family in *Brassica napus* are candidates for the initiation of an oxidative burst that impedes pathogenesis of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Journal of Experimental Botany*, 2012, 63(15): 5507-5519.
- [34] Lou Y, Baldwin I T. Silencing of a germin-like gene in *Nicotiana*

attenuata improves performance of native herbivores. *Plant Physiology*, 2006, 140(3): 1126-1136.

- [35] Balasubramanian V, Vashisht D, Cletus J, Sakthivel N. Plant β -1, 3-glucanases: their biological functions and transgenic expression against phytopathogenic fungi. *Biotechnology Letters*, 2012, 34(11): 1983-1990.
- [36] Leimu R, Kloss L, Fischer M. Inbreeding Alters Activities of the Stress-Related Enzymes Chitinases and β -1, 3-Glucanases. *PLoS one*, 2012, 7(8): e42326.
- [37] Du H, Liang Y, Pei K, Ma K. UV radiation-responsive proteins in rice leaves: a proteomic analysis. *Plant and Cell Physiology*, 2011, 52(2): 306-316.
- [38] Murakami T, Matsuba S, Funatsuki H, Kawaguchi K, Saruyama H, Tanida M, Sato Y. Over-expression of a small heat shock protein, sHSP17.7, confers both heat tolerance and UV-B resistance to rice plants. *Molecular Breeding*, 2004, 13: 165-175.

参考文献:

- [4] 吴能表, 马红群, 胡丽涛, 洪鸿, 孙金春, 张扬欢, 戴大临. 增强 UV-B 辐射对胡椒薄荷叶片光合机构和光合特性的影响. *中国中药杂志*, 2009, 34(23): 2995-2998.
- [8] 喻娟娟, 戴绍军. 植物蛋白质组学研究若干重要进展. *植物学报*, 2009, 44(4): 410-425.
- [12] 邵彩虹, 钱银飞, 唐秀英, 刘光荣, 谢金水, 彭春瑞, 邱才飞. 养分胁迫对水稻籽粒灌浆充实影响的蛋白质组学研究. *中国水稻科学*, 2012, 26(3): 267-274.
- [19] 胡欣, 胡昊, 洪国藩, 韩斌. 水稻两个 *frr* 基因的结构、转录特性及同源性分析. *植物生理与分子生物学学报*, 2004, 30(1): 105-114.
- [25] 李敏, 王垠, 牟晓飞, 王洋, 阎秀峰. 拟南芥芥子酸酯对 UV-B 辐射的响应. *生态学报*, 2012, 32(7): 1987-1994.
- [28] 程春振, 朱世平, 吴波, 阳佳位, 贝学军, 马岩岩, 钟广炎. 紫外线照射对梁平柚果皮基因表达的影响. *园艺学报*, 2011, 38(5): 859-866.

ACTA ECOLOGICA SINICA Vol.34, No.10 May, 2014 (Semimonthly)
CONTENTS

Frontiers and Comprehensive Review

- Landscape sustainability and landscape sustainability science ZHAO Wenwu, FANG Xuening (2453)
- A diagnostic framework of payments for ecosystem services and associated case studies
..... ZHU Wenbo, WANG Yang, LI Shuangcheng (2460)
- Progress in research of iron plaque on root surface of wetland plants
..... LIU Chunying, CHEN Chunli, GONG Xiaofeng, et al (2470)
- Ecological effects of predator chemical cues in aquatic ecosystem QIN Guangqiu, LU Haoliang, TANG Zhenzhu, et al (2481)
- Secondary substances and their ecological effects on seed dispersal in vertebrate-dispersed fleshy fruit plants
..... PAN Yang, LUO Fang, LU Changhu (2490)

Autecology & Fundamentals

- Responses of CH₄ uptake rates to simulated N deposition in a nature forest in mid-subtropical China
..... CHEN Chaoqi, YANG Zhijie, LIU Xiaofei, et al (2498)
- Ecological characteristics of *Phragmites australis* and their relationship to water-salt indicators in dry habitats of the southern
marginal zones of the Tarim Basin, China GONG Lu, ZHU Meiling, TASHPOLAT · Tiyp, et al (2509)
- Threshold effect of soil moisture on photosynthetic and physiological parameters in *Rosa xanthina* L. and its photosynthetic
productivity classification ZHANG Shuyong, XIANG Jiangbao, ZHANG Guangcan, et al (2519)
- Contrasting responses of soil respiration to litter manipulation in subtropical *Mytilaria laosensis* and *Cunninghamia lanceolata*
plantations YU Zaipeng, WAN Xiaohua, HU Zhenhong, et al (2529)
- Potassium application for increased jasmonic acid content and defense enzyme activities of wheat leaves infested by aphids
..... WANG Yi, ZHANG Yueling, SU Janwei, et al (2539)
- Combined effects of elevated O₃ concentration and reduced solar irradiance on photosynthetic activity and energy dissipation
of winter wheat SUN Jian, ZHENG Youfei, et al (2548)
- Colonization dynamics of *Bacillus cereus* B3-7 on wheat roots and control efficiency against sharp eyespot of wheat
..... HUANG Qiubin, ZHANG Ying, LIU Fengying, et al (2559)
- Quantitative study of water consumption characteristics of winter wheat under deficit irrigation
..... ZHANG Xingjuan, XUE Xuzhang, GUO Wenzhong, et al (2567)
- Assessment on the ecological fitness of anti-fungal transgenic rice LI Wei, GUO Jianfu, YUAN Hongxu, et al (2581)
- A proteomic analysis of *Arachis hypogaea* leaf in responses to enhanced ultraviolet-B radiation
..... DU Zhaokui, LI Junmin, ZHONG Zhangcheng, et al (2589)
- Composition of fatty acids from suspended particulate matter in southern South China Sea
..... LIU Huaxue, KE Changliang, LI Chunhou, et al (2599)
- The influence of age, flock size, habitat, and weather on the time budget and the daily rhythm of wintering Siberian Cranes
in Poyang Lake YUAN Fangkai, LI Yankuo, LI Fengshan, et al (2608)
- The energy budget and water metabolism heat regulation of tree sparrows *Passer montanus* of toba compensatory regeneration
..... YANG Zhihong, WU Qingming, YANG Miao, et al (2617)
- The effect of low-dose of pesticide on predation of spider and its preliminary mechanisms LI Rui, LI Na, LIU Jia, et al (2629)
- Response of the alligator weed flea beetle, *Agasicles hygrophila* (Coleoptera: Chrysomelidae) to overwintering protection and
its controlling effect on alligator weed *Alternanthera philoxeroides* (Amaranthaceae: Alternanthera)
..... LIU Yufang, WANG Xiuxiu, LI Fei, et al (2638)

Population, Community and Ecosystem

- The effect of climate change on the population fluctuation of the Siberian crane in Poyang Lake LI Yankuo, QIAN Fawen, SHAN Jihong, et al (2645)
- Characteristics of soil phosphorus fractions in wetlands with various restoration age in caizi lake, Anhui Province LIU Wenjing, ZHANG Pingjiu, DONG Guozheng, et al (2654)
- Multivariate analysis of the relations between phytoplankton assemblages and environmental factors in Chagan Lake Wetland LI Ranran, ZHANG Guangxin, ZHANG Lei (2663)
- Diversity of methanogen communities in tidal freshwater and brackish marsh soil in the Min River estuary ZENG Zhihua, YANG Minhe, SHE Chenxing, et al (2674)
- The influence of environment and phylogenetic background on variation in leaf and fine root traits in the Yanhe River catchment, Shaanxi, China ZHENG Ying, WEN Zhongming, SONG Guang, et al (2682)
- Changes of soil properties in re-vegetation stages on sloping-land with purple soils in hengyang of Hunan Province, South-central China YANG Ning, ZOU Dongsheng, YANG Manyuan, et al (2693)
- Vulnerability assessment on the mangrove ecosystems in qinzhou bay under sea level rise LI Shasha, MENG Xianwei, GE Zhenming, et al (2702)
- Dynamics of biomass and productivity of three major plantation types in southern China DU Hu, ZENG Fuping, WANG Kelin, et al (2712)
- Fungal diversity in *Cunninghamia lanceolata* plantation soil HE Yuanhao, ZHOU Guoying, WANG Shenjie, et al (2725)
- Response of sandy vegetation characteristics to precipitation change in Horqin Sandy Land ZHANG Lamei, LIU Xiping, ZHAO Xueyong, et al (2737)
- Characteristics of carbon storage and sequestration of *Robinia pseudoacacia* forest land converted by farmland in the Hilly Loess Plateau Region SHEN Jiapeng, ZHANG Wenhui (2746)

Landscape, Regional and Global Ecology

- Forest microclimate change along with the succession and response to climate change in south subtropical region LIU Xiaodong, ZHOU Guoyi, CHEN Xiuzhi, et al (2755)
- Drought variations of winter wheat in different growth stages and effects of climate trend in Huang-Huai-Hai Plain, China XU Jianwen, JU Hui, LIU Qin, et al (2765)

Resource and Industrial Ecology

- A method of environment assessment of mineral resources planning for shanxi provinces base on GIS LIU Wei, DU Peijun, LI Yongfeng (2775)
- A new approach to assess the water footprint of hydropower: a case study of the Miyun reservoir in China ZHAO Dandan, LIU Junguo, ZHAO Xu (2787)

《生态学报》2014 年征订启事

《生态学报》是由中国科学技术协会主管,中国生态学学会、中国科学院生态环境研究中心主办的生态学高级专业学术期刊,创刊于 1981 年,报道生态学领域前沿理论和原始创新性研究成果。坚持“百花齐放,百家争鸣”的方针,依靠和团结广大生态学科工作者,探索生态学奥秘,为生态学基础理论研究搭建交流平台,促进生态学研究深入发展,为我国培养和造就生态学科人才和知识创新服务、为国民经济建设和发展服务。

《生态学报》主要报道生态学及各分支学科的重要基础理论和应用研究的原始创新性科研成果。特别欢迎能反映现代生态学发展方向的优秀综述性文章;研究简报;生态学新理论、新方法、新技术介绍;新书评价和学术、科研动态及开放实验室介绍等。

《生态学报》为半月刊,大 16 开本,280 页,国内定价 90 元/册,全年定价 2160 元。

国内邮发代号:82-7,国外邮发代号:M670

标准刊号:ISSN 1000-0933 CN 11-2031/Q

全国各地邮局均可订阅,也可直接与编辑部联系购买。欢迎广大科技工作者、科研单位、高等院校、图书馆等订阅。

通讯地址:100085 北京海淀区双清路 18 号 电 话:(010)62941099; 62843362

E-mail: shengtaixuebao@rcees.ac.cn 网 址: www.ecologica.cn

本期责任副主编 祖元刚 编辑部主任 孔红梅 执行编辑 刘天星 段 靖

生 态 学 报
(SHENGTAI XUEBAO)
(半月刊 1981 年 3 月创刊)
第 34 卷 第 10 期 (2014 年 5 月)

ACTA ECOLOGICA SINICA
(Semimonthly, Started in 1981)
Vol. 34 No. 10 (May, 2014)

编 辑 《生态学报》编辑部
地址:北京海淀区双清路 18 号
邮政编码:100085
电话:(010)62941099
www.ecologica.cn
shengtaixuebao@rcees.ac.cn

主 编 王如松
主 管 中国科学技术协会
主 办 中国生态学学会
中国科学院生态环境研究中心
地址:北京海淀区双清路 18 号
邮政编码:100085

出 版 科 学 出 版 社
地址:北京东黄城根北街 16 号
邮政编码:100717

印 刷 北京北林印刷厂
发 行 科 学 出 版 社
地址:东黄城根北街 16 号
邮政编码:100717
电话:(010)64034563
E-mail: journal@cspg.net

订 购 全国各地邮局
国外发行 中国国际图书贸易总公司
地址:北京 399 信箱
邮政编码:100044

广告经营 京海工商广字第 8013 号
许 可 证

Edited by Editorial board of
ACTA ECOLOGICA SINICA
Add: 18, Shuangqing Street, Haidian, Beijing 100085, China
Tel: (010)62941099
www.ecologica.cn
shengtaixuebao@rcees.ac.cn

Editor-in-chief WANG Rusong
Supervised by China Association for Science and Technology
Sponsored by Ecological Society of China
Research Center for Eco-environmental Sciences, CAS
Add: 18, Shuangqing Street, Haidian, Beijing 100085, China

Published by Science Press
Add: 16 Donghuangchenggen North Street,
Beijing 100717, China

Printed by Beijing Bei Lin Printing House,
Beijing 100083, China

Distributed by Science Press
Add: 16 Donghuangchenggen North
Street, Beijing 100717, China
Tel: (010)64034563
E-mail: journal@cspg.net

Domestic All Local Post Offices in China
Foreign China International Book Trading
Corporation
Add: P.O.Box 399 Beijing 100044, China



ISSN 1000-0933
CN 11-2031/Q

国内外公开发行

国内邮发代号 82-7

国外发行代号 M670

定价 90.00 元