

小麦杂交 F_1 和双亲幼苗动态蛋白质组分析

甘 富 段 爽 彭永康

(天津师范大学 生命科学学院 细胞遗传与分子调控天津市重点实验室 天津 300387)

摘要:分别以2、3、5 d叶龄的栽培小麦京411、偏硬001和杂交 F_1 幼苗为材料,利用动态蛋白质组技术,对 F_1 及双亲的蛋白质变化做了比较分析。结果表明,在双亲及 F_1 中蛋白质差异表达现象被观察到,其中在5 d的叶子中最为明显。如在发育2 d和3 d的 F_1 叶子中,各有15个蛋白质斑点的含量产生变化,而在5 d叶龄的叶子中,这种有变化的蛋白质斑点达27个,在这些变化的蛋白质中,偏双亲和低于双亲的为多数,如5 d的叶子中分别占41%和44%,同时,在 F_1 叶片中观察到有蛋白质消失和新的蛋白质诱导现象产生。这些结果表明,杂种中存在蛋白质的差异表达现象,展开这方面的研究有助于对杂种优势形成机理的理解。

关键词:杂种优势;动态蛋白质组;差异表达;小麦;偏双亲

中图分类号:S512.1;Q816 文献标识码:A 文章编号:1000-7091(2012)02-0085-06

Dynamic Changes of Leaves Proteome Between Wheat F_1 -hybrid and Its Parental Lines

GAN Fu, DUAN Shuang, PENG Yong-kang

(Tianjin Key Lab of Cytogenetical and Molecular Regulation, College of Life Science, Tianjin Normal University, Tianjin 300387, China)

Abstract: In this study, proteome approaches were applied to a comparative analysis of hybridization in wheat F_1 -hybrid and its parent lines by using 2, 3, 5 d leaves. The results indicated that protein expression differences were observed between F_1 -hybrid and parents. In the 5 d leaves, 27 protein spots were changed in the protein abundances and only 15 protein spots were changed in the protein abundances at 2 d, 3 d leaves in F_1 hybrid. In these changed proteins, most protein spots were showed "two parental lines" characterisation (41%) and "low parents" characterisation (44%) in protein abundances. we also observed the some protein sports were lost and some new protein spots were induced in the F_1 -hybrid. These results indicated that hybridization between two parental lines could cause expression differences between wheat hybrid and its parents at protein abundances.

Key words: Hybridization; Dynamic proteome; Difference expression; Wheat; Parental ditype parents

作物杂种优势分子机理的研究因在优势利用上有重要的指导意义,而引起研究者的高度重视^[1-11]。目前,利用基因差异表达来研究水稻杂种优势的分子机理已积累了大量的文献资料^[12-19],利用mRNA差异显示^[20]、基因表达与转录特性^[21-23]、同工酶与蛋白质组^[24-27]等分析方法,探讨玉米杂种优势的分子机理也已取得明显成绩。上述研究结果均表明,作物杂种优势与基因表达、转录和蛋白质合成密切相关。水稻和玉米杂种优势在生产上作用明

显,并产生了巨大的经济效益,而对于水稻、玉米杂种优势机理研究也是所有作物中最透彻最系统的。与上述2种作物相比,小麦被认为是一种杂种优势不明显的作物,因此,对其优势利用相对滞后,对杂种优势形成机理的研究也相对较晚。但近10年中,一些研究者利用基因差异表达方法,研究小麦杂种优势^[28-36],取得明显进展,表明小麦中存在杂种优势现象,只要我们对杂种优势形成机理展开广泛的研究,小麦杂种优势在生产上能够发挥积极作用。

收稿日期:2011-12-06

基金项目:天津市科委重大支撑项目(10ZCKFNC00200)

作者简介:甘富(1986-),男,云南玉溪人,在读硕士,主要从事细胞分子生物学研究。

通讯作者:彭永康(1950-),男,浙江绍兴人,教授,博士生导师,主要从事植物分子生物学研究。

蛋白质组是 20 世纪 90 年代发展起来的一种分子生物学研究方法,由于它可以在整体水平上研究细胞内蛋白质组成及其活动规律,能够更直接与基因功能相关联,揭示生命活动的规律与本质,因此,已被广泛用于作物生长发育机制^[37-38]、逆境适应(如低温^[38]、干旱^[39]、水分^[40]和盐^[41])等研究中。近几年来,杂种优势与蛋白质组变化间的关系研究已有一些报道,如小麦^[30,42]、水稻^[43]、玉米^[44]等。

本研究以栽培小麦杂交 F_1 和双亲为材料,对 2、3、5 d 幼苗叶片蛋白质组的动态变化进行了比较分析,试图从蛋白质组角度对杂种优势形成机理进行初步探讨。

1 材料和方法

1.1 材料培养与蛋白质样品制备

栽培小麦 (*Triticum aestivum* L.) 偏硬 001、京 411 和杂交 F_1 种子分别经 3% $HgCl_2$ 表面消毒 5 min,再用自来水冲洗 2 次,在培养皿中室温下萌发 24 h,然后在 28℃/25℃(白天/晚上)条件下,于人工气候箱 (CLIMACELL) 中分别培养 2、3、5 d,取幼苗叶子为材料,制备蛋白质样品。

1.2 蛋白质制备与 2-DE 分析

按照 Yan 等^[41]方法制备蛋白质,用液氮研磨叶片组织,将匀浆液悬浮于含 0.07% (W/V) DTT 的 10% 冷丙酮, -20℃ 下温育 1 h,然后在 $3\ 500 \times g$ 下离心 5 min,碎片重悬在含有 0.07% (W/V) DTT 的丙酮中,在 -20℃ 下温育 1 h 后, $1\ 500 \times g$ 离心 30 min,这一步骤重复 3 次。将样品冰干,然后溶解于样品缓冲液 [8 mol/L 尿素, 35 mmol/L Tris, 4% (W/V) CHAPS, 1% pH 值 5~7 两性离子, 0.4% pH 值 3~10 两性离子, 1% (W/V) DTT], 参考 Bradford^[45]的方法测定蛋白质含量,并以 BSA 作为标准。

参阅 Castro 等^[46]的方法进行蛋白质的 2-DE 分析,利用 pH 值 3~10 IPG 胶条,长度为 13 cm,根据 Bio-Rad 产品说明书操作。取每个待分析样品各 60 μg ,用样品缓冲液稀释至 300 μL ,将干胶条在含待测样品的缓冲液中水化 10 h (300 V),使待测蛋白质样品吸入胶条中。

第一向等电聚焦程序如下,分别在 300 V 和 1 000 V 下电泳 1 h,然后将电压调至 8 000 V 下 2 h。电泳结束后胶条在平衡液 (60 mmol/L Tris-HCl pH 值 6.8, 1% DDT, 1% 甘氨酸, 2% SDS) 中平衡 20 min。电泳的第二向参考 Laemmli^[47] 12.5% DSD-PAGE。将经聚焦后的凝胶条放在垂直板状胶的上面,用 1% 的内含 0.15 mol/L Bis-Tris, 0.1 mol/L

HCl 和 0.2% (W/V) SDS 的琼脂糖封胶,并使其聚合。80 V 下电泳 5 h。其结果经 3 次重复。采用银染^[48]法显色。用 PDQuest 软件进行凝胶斑点检测,确定双亲和 F_1 之间有差异的蛋白质斑点。

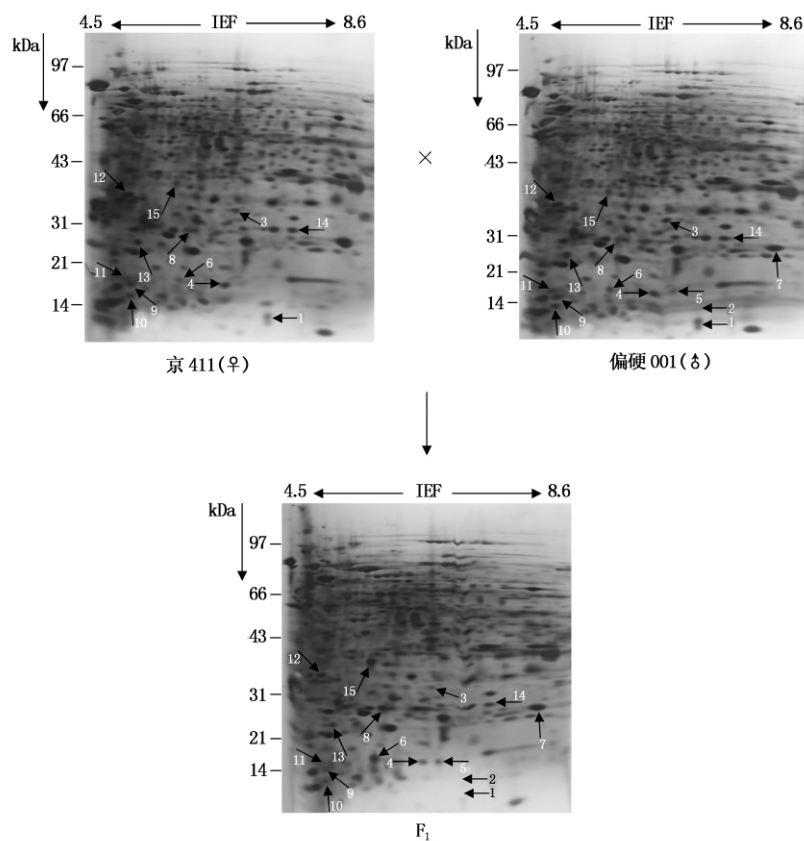
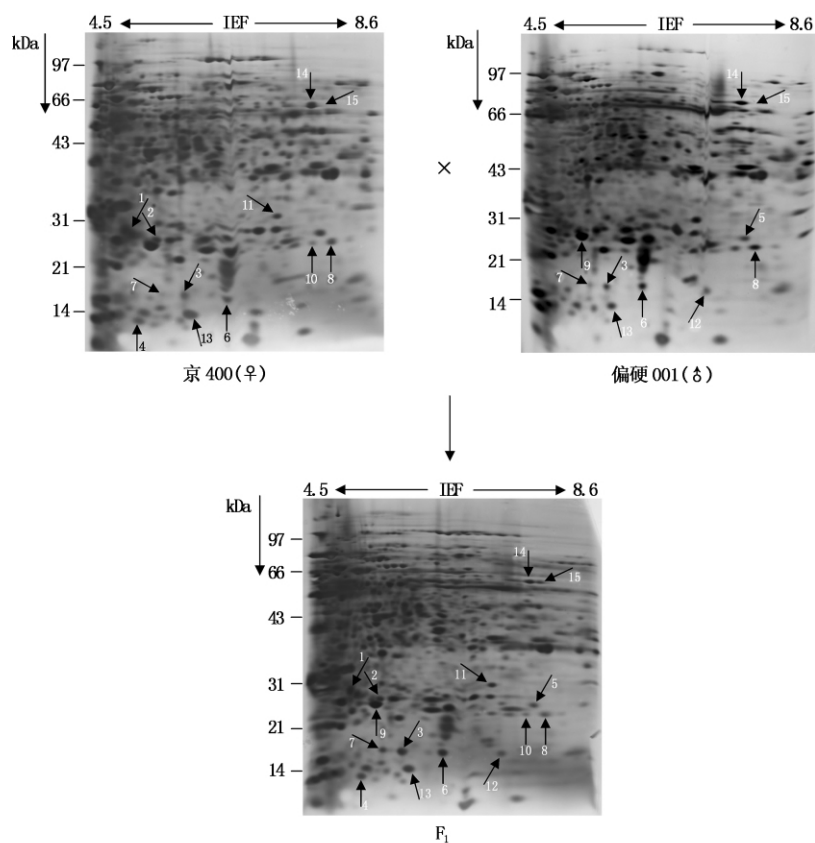
2 结果与分析

2.1 小麦杂交 F_1 和双亲叶子内的蛋白质组

图 1 是栽培小麦偏硬 001、京 411 和杂交 F_1 2 d 叶片中的全蛋白质组谱型,第一向水平轴表示的是等电聚焦, pH 值 4.5~8.6,第二向为表示分子量的 SDS-PAGE 垂直胶,分子量范围为 10~110 kDa。利用 PDQuest (Bio-Rad) 分析软件,约有多于 500 个蛋白质斑点被检测到。图中箭头表示的是杂交 F_1 和双亲中有表达变化的蛋白质斑点,但从这些变化的蛋白质斑点看,主要表现在蛋白质表达的含量上,这种变化有 3 种情况: (1) 偏于双亲的,即蛋白质含量与双亲或某一亲本含量相同,如偏硬 001 中的斑点 2 (10 kDa/pI 6.7)、5 (16 kDa/pI 6.5)、7 (26 kDa/pI 8.1); (2) 高于双亲的,如 F_1 中的斑点 6 (16 kDa/pI 5.8)、8 (28 kDa/pI 6.3)、15 (40 kDa/pI 5.7) 或低于双亲的,如斑点 3 (36 kDa/pI 6.4)、4 (18 kDa/pI 6.5)、9 (18 kDa/pI 4.8)、10 (16 kDa/pI 4.7)、11 (19 kDa/pI 4.7)、12 (36 kDa/pI 5.0)、13 (27 kDa/pI 5.1)、14 (29 kDa/pI 7.2); (3) F_1 中被抑制表达的,如斑点 1 (10 kDa/pI 6.8)。

2.2 小麦杂交 F_1 和双亲叶子 (3、5 d) 蛋白质组的动态变化

由于蛋白质组的表达受时空的调控,因此,对小麦杂交 F_1 和双亲不同发育时期幼苗 (3、5 d 叶子) 蛋白质的动态变化做了比较分析。图 2、3 分别是在 3 d 和 5 d 叶子中检测到的全蛋白质组图谱。在发育 3 d 的叶子中,蛋白质组的变化比较明显,主要有 4 种变化被观察到: (1) 偏双亲的蛋白质斑点,如 F_1 中蛋白质变化与京 411 相近的斑点 1 (28 kDa/pI 5.0)、2 (26 kDa/pI 5.5)、4 (12 kDa/pI 5.5)、10 (26 kDa/pI 7.8)、11 (33 kDa/pI 7.3),与偏硬 001 相近的斑点 5 (28 kDa/pI 7.8)、9 (26 kDa/pI 5.5)、12 (17 kDa/pI 7.3); (2) 表达量高于或低于双亲的,如斑点 3 (16 kDa/pI 5.8)、6 (15 kDa/pI 6.6)、7 (16 kDa/pI 5.1) 高于双亲,斑点 8 (26 kDa/pI 7.9) 低于双亲; (3) 介于双亲间的斑点 13 (14 kDa/pI 6.0) 和斑点 14 (60 kDa/pI 7.6); (4) F_1 中新增的斑点 15 (66 kDa/pI 8.0)。而在发育 5 d 的叶子中,蛋白质斑点偏于双亲或低于双亲的斑点占多数,如 1 (20 kDa/pI 6.0)、2 (20 kDa/pI 7.3)、25 (68 kDa/pI 4.8) 偏偏硬 001;

图 1 小麦杂交 F_1 和双亲幼苗 (2 d 叶子) 蛋白质 SDS-PAGE 分析Fig. 1 SDS-PAGE analysis of protein in 2 d leaves of wheat F_1 -hybrid and its parental lines图 2 小麦杂交 F_1 和双亲幼苗 (3 d 叶子) 蛋白质 SDS-PAGE 分析Fig. 2 SDS-PAGE analysis of protein in 3 d leaves of wheat F_1 -hybrid and its parental lines

斑点 3(48 kDa/pI 7.7) 、4(18 kDa/pI 5.2) 、5(80 kDa/pI 6.0) 、6(46 kDa/pI 7.5) 、7(18 kDa/pI 5.2) 、8(23 kDa/pI 7.7) 、10(31 kDa/pI 6.3) 、16(65 kDa/pI 5.7) 偏京 411; 而斑点 9(19 kDa/pI 6.7) 、11(80 kDa/pI 5.6) 、12(68 kDa/pI 7.5) 、13(88 kDa/pI 5.9) 、14(88 kDa/pI 6.0) 、15(88 kDa/pI 6.1) 、17

(43 kDa/pI 5.7) 、18(66 kDa/pI 5.8) 、19(66 kDa/pI 5.7) 、22(24 kDa/pI 6.0) 、23(16 kDa/pI 4.8) 、27(33 kDa/pI 4.6) 表达量低于双亲 ,另外 ,还有 4 个斑点 斑点 20(66 kDa/pI 7.4) 、21(29 kDa/pI 5.7) 、24(58 kDa/pI 4.8) 、26(80 kDa/pI 4.8) 在双亲中有表达 ,但在 F₁ 中缺失。

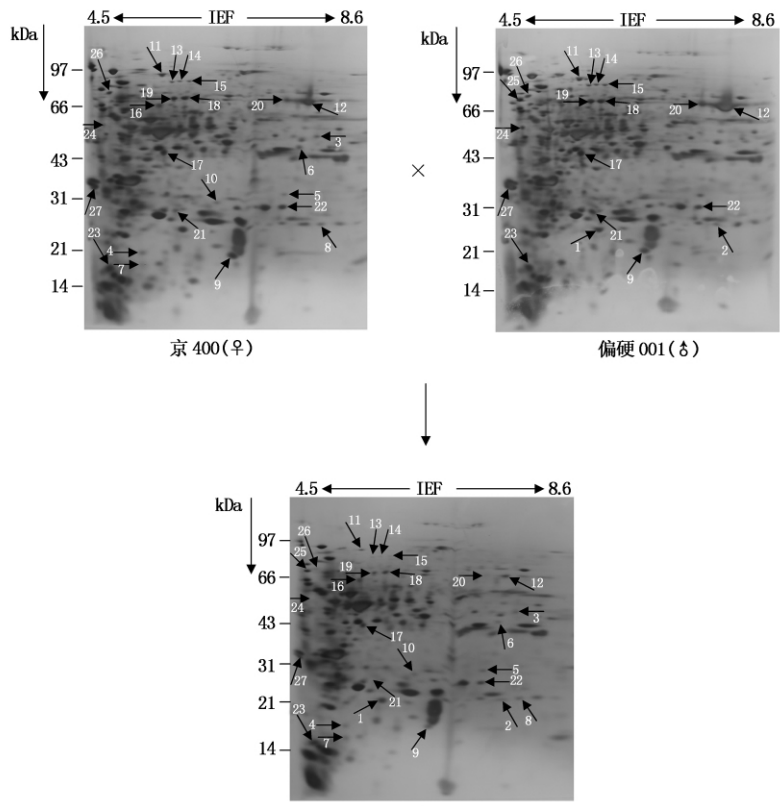


图 3 小麦杂交 F₁ 和双亲幼苗(5 d 叶子)蛋白质 SDS-PAGE 分析

Fig.3 SDS-PAGE analysis of protein in 5 d leaves of wheat F₁-hybrid and its parental lines

2.3 F₁ 叶子中的蛋白质变化类型及变化频率分析

根据杂交 F₁ 和双亲叶子(2 3 5 d) 蛋白质变化结果 ,我们对 F₁ 叶子中的蛋白质变化类型及变化频率进行了分析(表 1) ,结果表明 ,F₁ 叶子中的蛋白质变化类型主要有 5 种现象: 偏于双亲、高于或低于双亲、介于双亲及 F₁ 中缺失或增加。从蛋白质变化

频率上分析发现 ,多数蛋白质斑点表现为偏于双亲或低于双亲 ,如在发育 2 d 的叶子中 ,53% 的蛋白质斑点表现为低于双亲 ,在发育 3 d 的叶子中 ,53% 的蛋白质斑点表现为偏双亲 ,而在发育 5 d 的的叶子中 ,偏于双亲和低于双亲的蛋白质斑点数比例分别为 41% 和 44% 。

表 1 F₁ 中有变化的蛋白质斑点数及变化频率

Tab.1 The change in protein spot numbers and frequencies in F₁-hybrid

发育时期/d Growth stage	有变化的蛋 白质斑点数/个 The numbers of the changed protein spot	偏双亲的 数量/% Parental di-type percentage	高于双亲 的数量/% High parent percentage	低于双亲 的数量/% Low parent percentage	介于双亲 的数量/% Additive type percentage	F ₁ 中缺失或增加 的数量/% Lost or induced in F ₁ -hybrid percentage
2	15	20	20	53		7
3	15	53	20	7	13	7
5	27	41		44		15

3 讨论

利用蛋白质组技术探讨作物杂种优势形成机理

在水稻^[49]、玉米^[44] 等作物中已有报道 ,如 Wang 等^[43] 发现至少有 8 种类型的蛋白质组份参与杂种优势的形成 ,其功能涉及酶活性调节 ,转录、转译调

控、营养及胁迫反应等; Hoecker 等^[44] 在玉米中发现, 与杂种优势形成相关的蛋白质涉及细胞周期、信号转导、能量代谢、疾病防御等方面, 其变化的形式表现为杂种 F_1 某些蛋白质表达量高于双亲, 但多数蛋白质的表达量则低于双亲。这些结果表明, 作物杂种优势的形成为涉及到一个极其复杂的蛋白质多条代谢路线与代谢网络。与水稻、玉米相比, 小麦的杂种优势利用相对滞后, 但小麦中也存在在农业上有利用价值的杂种优势现象, 如印度杂交小麦栽培面积已达 60 000 hm^2 ^[49], 我国利用化学杀雄(chemical hybridizing agent) 和二系法(two line system) 技术, 杂交小麦的面积据 2007 年报道已达 10 000 hm^2 , 产量平均增加 20%^[42], 而利用蛋白质组技术探讨小麦杂种优势形成机理也已有人开展^[30 42]。

本研究利用动态蛋白质组技术分析幼苗发育不同时期(2 3 5 d) 叶子中蛋白质变化, 得出的结果有 2 点值得注意: (1) 与亲本京 411 和偏硬 001 相比较, F_1 叶子中的蛋白质变化类型主要有偏于双亲、高于或低于双亲、介于双亲及 F_1 中缺失或增加等 5 种现象(表 1), 这与一些学者在水稻、玉米、小麦中所得出的结果相类似, 但在蛋白质表达量上的变化与杂种优势形成间的相关性现在还不能明确肯定, 然而对于 F_1 中一些涉及逆境胁迫、病害防御、信号转导相关蛋白质表达量上的增加有利于作物的生长、发育, 进一步保证杂种有强的生活力, 这一点还是有相关性的^[30 44 49]。(2) 动态蛋白质组分析有利于我们较全面的了解杂种优势形成与蛋白质组变化间可能存在的关系, 从表 1 可以看出, F_1 中 3 d 叶子蛋白质斑点的变化类型最多, 而 5 d 叶子则蛋白质变化的斑点数最多, 几乎接近 2 3 d 的 2 倍。与基因组不同, 蛋白质的表达有明显的组织特异性和发育特异性, 即时空现象, 因此, 生物体中某一性状的表达如作物中的杂种优势现象很可能在某一组织或不同的发育时期中检测到, 本研究利用动态蛋白质组分析可能得出的结果会更全面。

杂种优势现象和优势利用是作物遗传育种的重要领域, 目前利用蛋白质组技术探讨杂种优势形成机理刚刚开始, 对于这方面的深入研究有助于我们理解杂种优势形成机理并最终在优势的预测与利用方面发挥作用。

参考文献:

- [1] Hochholdinger F, Hoecker N. Towards the molecular basis of heterosis[J]. Trends Plant Sci. 2007, 12: 427 - 432.
- [2] Lippman Z B, Zamir D. Heterosis: Revisiting the magic[J]. Trends Genet. 2007, 23: 60 - 66.

- [3] 袁隆平. 杂交水稻超高产育种[J]. 杂交水稻, 1997 (6) : 1 - 6.
- [4] Crow J F. Alternative hypotheses of hybrid vigor[J]. Genetics, 1948, 33: 477 - 487.
- [5] 蓝黎明, 柳世君, 程辉, 等. 遗传距离分析在选配甘蓝型杂交油菜强优势组合的应用[J]. 天津农业科学, 2007, 13(2) : 20 - 22.
- [6] Syed N H, Chen Z J. Molecular marker genotypes, heterozygosity and genetic interactions explain heterosis in *Arabidopsis thaliana* [J]. Heredity, 2005, 94: 295 - 304.
- [7] Johansen-Morris A D, Latta R G. Fitness consequences of hybridization between ecotypes of *Avena barbata*: Hybrid breakdown, hybrid vigor and transgressive segregation[J]. Evolution, 2006, 60: 1585 - 1595.
- [8] Meyer S, Pospisil H, Scholten S. Heterosis associated gene expression in maize embryos 6 days after fertilization exhibits additive, dominant and overdominant pattern[J]. Plant Mol Biol, 2007, 63: 381 - 391.
- [9] 陈磊, 管长志, 尹立荣, 胡萝卜杂交制种技术研究[J]. 天津农业科学, 2009, 15(4) : 8 - 10.
- [10] 刘春雷, 张丽琴, 王世杰, 等. 小麦湿面筋含量和面筋指数的杂种优势分析[J]. 华北农学报, 2011, 26(3) : 179 - 181.
- [11] 井立军, 吕敬刚, 崔鸿文. 茄子杂种优势研究[J]. 天津农业科学, 1998, 4(1) : 9 - 12.
- [12] Milborrow B V. A biochemical mechanism for hybrid vigour[J]. J Exp Bot, 1998, 49: 1063 - 1071.
- [13] Song S H, Qu H Z, Chen C, et al. Differential gene expression in an elite hybrid rice cultivar (*Oryza sativa* L.) and its parental lines based on SAGE data[J]. BMC Plant Biol, 2007, 7: 49.
- [14] Cheng S H, Zhuang J Y, Fan Y Y, et al. Progress in research and development on hybrid rice: A super-domesticated in China[J]. Ann Bot, 2007, 100: 959 - 966.
- [15] Luo L J, Li Z K, Mei H W, et al. Overdominant epistatic loci are the primary genetic basis of inbreeding depression and heterosis in rice. II. Grain yield components[J]. Genetics, 2001, 158: 1755 - 1771.
- [16] Xiao J H, Li J M, Yuan L P, et al. Dominance is the major genetic basis of heterosis in rice as revealed by QTL analysis using molecular markers[J]. Genetics, 1995, 140: 745 - 754.
- [17] Li Z K, Luo L J, Mei H W, et al. Overdominant epistatic loci are the primary genetic basis of inbreeding depression and heterosis in rice. I. Biomass and Grain yield[J]. Genetics, 2001, 158: 1737 - 1753.
- [18] Matsumura H, Nirasawa S, Terauchi R. Technical advance: Transcript profiling in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings using serial analysis of gene expression (SAGE) [J]. The Plant Journal, 1999, 20: 719 - 726.
- [19] Yu J, Wong G K, Liu S, et al. A comprehensive crop genome research project: the superhybrid rice genome project in China[J]. Phil Trans R Soc B, 2007, 362: 1023 - 1034.
- [20] Guo M, Rupe M A, Danilevskaya O N, et al. Genome-wide mRNA profiling reveals heterochronic allelic variation and a new imprinted gene in hybrid maize endo-

- sperm [J]. The Plant Journal 2003 ,36: 30 – 44.
- [21] Swanson-Wagner R A ,Jia Y ,DeCook R *et al.* All possible modes of gene action are observed in a global comparison of gene expression in a maize F₁ hybrid and its inbred parents [J]. Proc Natl Acad Sci 2006 ,103: 6805 – 6810.
- [22] Guo M ,Rupe M A ,Yang X F *et al.* Genome-wide transcript analysis of maize hybrids: Allelic additive gene expression and yield heterosis [J]. Theor Appl Genet , 2006 ,113: 831 – 845.
- [23] Uzarowska A ,Keller B ,Piepho H P *et al.* Comparative expression profiling in meristems of inbred-hybrid triplets of maize based on morphological investigations of heterosis for plant height [J]. Plant Mol Biol 2007 ,63: 21 – 34.
- [24] Gonella J A ,Peterson P A. Isozyme relatedness of inbred lines of maize and performance of their hybrids [J] . Maydica ,1978 ,23: 55 – 61.
- [25] Heidrich-Sobrinho E ,Cordeiro A R. Codominant isoenzymic alleles as markers of genetic diversity correlated with heterosis in maize (*Zea mays* L.) [J]. Theor Appl Genet ,1975 ,46: 197 – 199.
- [26] Hunter R B ,Kannenbergh L W. Isozyme characterization of corn (*Zea mays*) inbreds and its relationship to single cross hybrid performance [J]. Can J Genet Cytol ,1971 , 13: 197 – 199.
- [27] Leonardi A ,Damerval C ,De Vienne D. Inheritance of protein amounts: comparison of two-dimensional electrophoresis patterns of leaf sheaths of two maize lines (*Zea mays* L.) and their hybrids [J]. Genet Res ,1987 ,50: 1 – 5.
- [28] Ni Z F ,Sun Q X ,Wu L M *et al.* Differential gene expression between wheat hybrids and their parental inbreds in primary roots [J]. Acta Bot Sin 2002 ,44: 457 – 462.
- [29] Ni Z F ,Sun Q X ,Liu Z Y. Identification of a hybrid-specific expressed gene encoding novel RNA-binding protein in wheat seedling leaves using differential display of mRNA [J]. Mol Gen Genet 2000 ,263: 934 – 938.
- [30] Song X ,Ni Z F ,Yao Y Y *et al.* Wheat (*Triticum aestivum* L.) root proteome and differentially expressed root proteins between hybrid and parents [J]. Proteomics , 2007 ,7: 3538 – 3557.
- [31] Sun Q X ,Ni Z F ,Liu Z Y. Differential gene expression between wheat hybrids and their parental inbreds in seedling leaves [J]. Euphytica ,1999 ,106: 117 – 123.
- [32] Sun Q X ,Wu L M ,Ni Z F *et al.* Differential gene expression patterns in leaves between hybrids and their parental inbreds are correlated with heterosis in a wheat diallel cross [J]. Plant Sci 2004 ,166: 651 – 657.
- [33] Wang Z K ,Ni Z F ,Wu H L *et al.* Heterosis in root development and differential gene expression between hybrids and their parental inbreds in wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. Theor Appl Genet ,2006 ,113: 1283 – 1294.
- [34] Wu L M ,Ni Z F ,Meng F R *et al.* Cloning and characterization of leaf cDNAs that are differentially expressed between wheat hybrids and their parents [J]. Mol Gen Genet 2003 ,270: 281 – 286.
- [35] Yao Y Y ,Ni Z F ,Zhang Y H *et al.* Identification of differentially expressed genes in leaf and root between wheat hybrid and its parental inbreds using PCR-based cDNA subtraction [J]. Plant Mol Biol ,2005 ,58: 367 – 384.
- [36] Zhang Y H ,Ni Z F ,Yao Y Y *et al.* Analysis of genome-wide gene expression in root of wheat hybrid and its parents using Barley1 GeneChip [J]. Prog Nat Sci ,2006 , 16: 712 – 720.
- [37] Zhao C F ,Wang J Q ,Cao M L *et al.* Proteomic changes in rice leaves during development of field-grown rice plants [J]. Proteomics 2005 (5) : 961 – 972.
- [38] Hashimoto M ,Komatsu S. Proteomic analysis of rice seedlings during cold stress [J]. Proteomics 2007 (7) : 1293 – 1302.
- [39] Salekdeh G H ,Siopongco J ,Wade L J *et al.* Proteomic analysis of rice leaves during drought stress and recovery [J]. Proteomics 2002 (2) : 1131 – 1145.
- [40] Riccardi F ,Gazeau P ,Vieune D D *et al.* Protein changes in response to progressive water deficit in maize [J] . Plant Physiol ,1998 ,117: 1253 – 1263.
- [41] Yan S P ,Tang Z C ,Su W A *et al.* Proteomic analysis of salt stress-responsive proteins in rice root [J] . Proteomics 2005 (5) : 235 – 244.
- [42] Song X ,Ni Z F ,Yao Y Y , *et al.* Identification of differentially expressed proteins between hybrid and parents in wheat (*Triticum aestivum* L.) seedling leaves [J] . Theor Appl Genet 2009 ,118: 213 – 225.
- [43] Wang W W ,Meng B ,Ge X M *et al.* Proteomic profiling of rice embryos from a hybrid rice cultivar and its parental lines [J]. Proteomics 2008 (8) : 4808 – 4821.
- [44] Hoecker N ,Lamkemeyer T ,Sarholz B *et al.* Analysis of nonadditive protein accumulation in young primary roots of a maize (*Zea mays* L.) F₁-hybrid compared to its parental inbred lines [J]. Proteomics ,2008 (8) : 3882 – 3894.
- [45] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. Anal Biochem , 1976 ,72: 248 – 254.
- [46] Castro A J ,Carapito C ,Zorn N *et al.* Proteomic analysis of grapevine (*Vitis vinifera* L.) tissues subjected to herbicide stress [J]. J Exp Bot 2005 ,56: 2783 – 2795.
- [47] Laemmli U K. Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 [J]. Nature (Lond) ,1970 ,227: 680 – 685.
- [48] Wray W ,Boulikas T ,Wray V P *et al.* Silver staining of proteins in polyacrylamide gels [J] . Anal Biochem , 1981 ,118: 197 – 203.
- [49] Xie Z S ,Wang J Q ,Cao M L *et al.* Pedigree analysis of an elite rice hybrid using proteomic approach [J]. Proteomics 2006 (6) : 474 – 486.