

6-苄基腺嘌呤延缓水稻衰老效应的蛋白质组学分析

邵彩虹¹, 唐秀英¹, 李明心², 李 瑶¹, 王 萍¹, 陈 金¹, 谢金水¹

(1. 江西省农业科学院 土壤肥料与资源环境研究所, 江西 南昌 330200; 2. 江西经济管理干部学院, 江西 南昌 330200)

摘要:以苗期杂交水稻威优 916 为试验材料, 分别以蒸馏水和 8 mg/L 6-苄基腺嘌呤溶液培养, 通过对功能叶片蛋白质组差异表达分析, 以揭示养分胁迫下 6-苄基腺嘌呤延缓水稻衰老的效应及其机理。叶片全蛋白质经双向电泳分离, 获得了 22 个响应 6-苄基腺嘌呤处理的蛋白质, 经质谱分析, 其中 15 个功能得到鉴定, 涉及光合作用、呼吸作用、激素代谢及逆境反应等多个代谢途径。分析结果显示, 养分胁迫下, 6-BA 诱导了叶片中光合蛋白质、呼吸代谢相关蛋白质的表达量上调, 减少衰老发生密切相关蛋白质的积累, 从而提高叶片光合能力, 促进呼吸, 满足植株生长对物质及能量的需求, 延缓植株衰老。

关键词:水稻; 6-苄基腺嘌呤; 衰老; 蛋白质组学

中图分类号: S312.03; Q78 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7091(2014)01-0014-06

Proteomics Analysis of Mechanism of 6-benzyl Adenine Deferring Contabescence of Rice

SHAO Cai-hong¹, TANG Xiu-ying¹, LI Ming-xin², LI Yao¹, WANG Ping¹, CHEN Jin¹, XIE Jin-shui¹

(1. Soil and Fertilizer and Resources and Environment Institute, Jiangxi Academy of Agriculture Sciences, Nanchang 330200, China; 2. Jiangxi Institute of Economic Administrators, Nanchang 330200, China)

Abstract: In order to reveal the mechanism of 6-benzyl adenine deferring contabescence of rice, the hybrid rice Weiyou 916 seedlings were cultivated with distilled water and 6-benzyl adenine (8 mg/L), respectively, and the proteins expression profile of functional leaves were investigated by using the approach of proteomics. Proteins were extracted from rice functional leaf and separated by two-dimensional gel electrophoresis, then 22 differential expression proteins that induced by 6-benzyl adenine were obtained, among which 15 proteins were identified by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry, and categorized into 4 groups of functions including photosynthesis, respiration, hormone metabolism and stress response. Results showed that under nutrient stress condition, 6-benzyl adenine had beneficial effect on rice plant; the expression abundance of proteins associated with photosynthesis and respiration increased, and proteins associated with contabescence were down-regulated in expression abundance. Thereby, application of 6-benzyl adenine could enhanced the photosynthesis and respiration directly, provided the material and energy for plant growth and deferred rice contabescence.

Key words: Rice; 6-benzyl adenine; Contabescence; Proteomics

细胞分裂素类植物生长调节剂对调控作物衰老和增产有着重要作用^[1-2], 作为一种重要的细胞分裂素类调节剂, 6-苄基腺嘌呤 (6-BA) 具有促进蛋白质的生物合成和细胞分裂, 以及延缓叶片衰老等作用^[3-4]。水稻穗分化期叶面喷施 6-BA 可降低穗部细胞分裂素氧化酶基因 (*OsCKX2*) 的表达, 促进枝梗

和颖花的分化^[5], 还能显著或极显著增加孕穗期、抽穗期单株不定根总长, 促进前期根系最长根长的增加^[6]; 叶面喷施 6-BA 可促进叶片叶绿素的合成, 延缓叶片衰老, 喷施籽粒, 可减少秕粒, 提高结实率, 特别是提高弱势粒的结实率, 增加产量^[7-8], 6-BA 作为生长促进剂能延缓植物叶片的衰老, 提高作物

收稿日期: 2013-10-13

基金项目: 国家科技支撑计划项目 (2011BAD16B04; 2013BAD07B00; 2012BAD04B00); 江西省自然科学基金项目 (20114BAB214010; 20132BAB204034)

作者简介: 邵彩虹 (1978-), 女, 安徽泗县人, 助理研究员, 博士, 主要从事作物生理与分子生态学方面的研究。邵彩虹、唐秀英为同等贡献作者。

通讯作者: 谢金水 (1960-), 男, 江西赣州人, 研究员, 博士, 主要从事水稻方面的研究。

产量已成定论。此外,6-BA 在提高作物抗逆性方面也具有重要的作用^[9-10],以溶液培养的方式可显著延缓植物离体器官的衰老^[11]。

目前,关于6-BA 延缓植物衰老的机理研究,多集中在对叶片的光合、根系活力及产量构成等相关生理指标的定量测定。事实上,蛋白质是一切生命功能的执行者,蛋白质组学可从全息化的视角研究作物生命的本质和遗传规律及对环境应答机理,水稻对6-BA 调控的响应亦是通过一系列的蛋白质组相互作用来实现的,任何的调控手段都会引起组织细胞内蛋白质组发生差异表达。本研究拟在养分胁迫条件下,采用6-BA 溶液培养水稻植株,通过分析叶片响应6-BA 调控的蛋白质表达量变化及其功能,揭示6-BA 延缓水稻衰老的效应及机理。

1 材料和方法

1.1 试验材料

以筛选出的易早衰杂交水稻威优916 为供试材料。

1.2 培养与取样

于六叶一心期将生长一致的秧苗移栽至250 mL 锥形瓶中,脱脂棉固定,每瓶3 株,设200 mL 浓度8 mg/L 的6-BA 溶液培养和200 mL 纯水(蒸馏水)培养2 种处理,10 次重复。放入人工气候箱中培养(27 ℃,黑暗/光照各12 h,湿度60%),每隔3 d 更换一次培养液,同时测定叶片SPAD 值及根系活力,至12 d 取各处理完全展开倒一叶,立即用液氮速冻后置于-80 ℃冰箱中保存备用,同时观察叶片气孔开度。

1.3 试验方法

1.3.1 蛋白质提取 称取混匀叶片1 g 左右,放入预冷的加入0.5 g 聚乙烯吡咯烷酮的研钵中研磨成均匀粉末,研磨过程中不断加入液氮以保持样品中蛋白质稳定性,研磨后样品用TCA/丙酮法沉淀蛋白质,即加入预冷的10% 三氯乙酸丙酮溶液(含0.07% β -巯基乙醇),混匀;样品于-20 ℃放置过夜,在0~4 ℃、15 000 r/min 条件下离心30 min,去上清液,沉淀用预冷的80% 丙酮(含0.07% β -巯基乙醇)重悬,按上述方法沉淀并离心,可重复多次,每次间隔8 h 以上,直至样品的上清液呈无色。沉淀真空干燥后制成蛋白干粉。蛋白干粉加入适量蛋白质裂解液(8 mol/L Urea,4% CHAPS,40 mmol/L Tris,65 mmol/L DTT)于20~25 ℃水浴超声30 min 充分溶解,25 ℃ 18 000 r/min 离心15 min,弃沉淀,上清即蛋白质样品溶液,于-80 ℃贮存待用。

1.3.2 蛋白质含量测定 蛋白质溶液参考Bradford 方法^[12-13],用牛血清蛋白作标准曲线测定样品浓度。

1.3.3 双向电泳与凝胶成像 电泳的第一向采用人工制备的胶条,pH 值3.5~10,胶条长度18.5 cm,蛋白样品的上样量为180 μ g,聚焦条件:200,300,400,500,600 V 分别聚焦30 min;800 V 聚焦10 h;1 000 V 聚焦4 h。

第二向 SDS-PAGE 电泳:胶条置于平衡缓冲液(60 mmol/L Tris-HCl,pH 值6.8,2% SDS,5% β -巯基乙醇,10% 甘油,0.05% 溴酚蓝)平衡30 min,平衡后的胶条放置于制好的第二向 SDS-PAGE 胶上,并轻压使胶条与 SDS-PAGE 胶面充分结合,用加有少量溴酚蓝的1% 琼脂糖封顶,进行二向电泳,参数为:10 mA/板,约10 h。

硝酸银染色:电泳结束后,SDS-PAGE 胶在固定液(甲醇50%、冰醋酸5%)中固定30 min,双蒸水冲洗3 次放置过夜以降低背景颜色,于增敏液(乙醇30%、硫代硫酸钠0.2%、醋酸钠6.8%)中反应30 min,双蒸水冲洗3 次,每次5 min,用硝酸银染色液(硝酸银2.5%、甲醛0.4%)室温反应20 min,双蒸水冲洗2 次,每次1 min,加显色液(碳酸钠2.5%、甲醛0.2%)显色,用5% 冰醋酸终止显色,双蒸水冲洗3 次,每次5 min,用保鲜膜密封4 ℃保存。每个样品依据染色后效果至少进行3 次重复电泳,以获得效果清晰、重复性好的电泳胶片。

凝胶扫描及质谱分析:银染后的凝胶用Image Scanner 扫描仪扫描,利用Imagemaster 2DElite 5.0 凝胶图像分析软件对其进行分析(分析参数:Smooth 1,Min Area 2, Saliency 2.0),获得差异表达蛋白质点。

1.3.4 质谱分析 切取差异表达蛋白质胶粒,送复旦大学蛋白质组学研究中心做串联质谱(ESI-Q MS/MS)分析,质谱分析数据通过Matrix Science (Matrix Science,London,UK)网站(<http://www.matrixscience.com>)提供的MASCOT 软件(http://www.matrixscience.com/cgi/search_form.pl FORM-VER=2& SEARCH=PMF)进行查询。

1.3.5 根系活力及剑叶SPAD 值测定 将全部根仔细洗净,自茎基1 cm 处切下,吸干水分,称取混合根样1 g,采用TTC 法测定根系活力(以单位时间单位根量还原四氮唑的量(μ g/(g·h)来表达);用SPAD 仪测定不同处理水稻全部主茎及有效分蘖全展开倒一叶的SPAD 值,并取其平均数作为最终测定值。

2 结果与分析

2.1 根系活力、叶片 SPAD 值及叶片气孔开度的变化

水稻长势在处理 12 d 出现显著差异(图 1), 6-BA 溶液处理显著延缓了水稻叶片衰亡, 叶片颜色正常, 并伴有新生叶片长出; 长期的蒸馏水培养造成植株养分缺乏, 抑制了叶片新生物质合成及细胞代谢, 下位叶开始出现黄枯, 2 种处理下, 叶绿素含量变化显示, 6-BA 处理由于促进叶片中可溶性蛋白质合成, 延缓叶绿素 a 和叶绿素 b 的降解^[7], 表现为短期养分胁迫条件下, 叶绿素含量仍然呈递增趋势; 长期的养分胁迫促进了叶绿素逐渐降解, 表现为蒸馏水培养水稻叶片叶绿素含量逐渐降低; 且 6-BA 培养有效扩大了叶片的气孔开度, 叶片光合速率与气孔开度呈正相关, 扩大的气孔开度促进了叶片的光合作用, 有利于增加光合产物合成; 根系活力分析表明, 6-BA 培养的水稻幼苗的根系活力逐渐增强, 而蒸馏水培养的水稻幼苗为了适应养分缺乏的环境, 前期根系活力显著增强, 但持续的养分胁迫导致中后期根系活力明显下降(图 2, 3)。

综上, 短期内 6-BA 对维持养分胁迫下水稻生长, 提高光合能力, 延缓衰亡, 具有显著的效应。

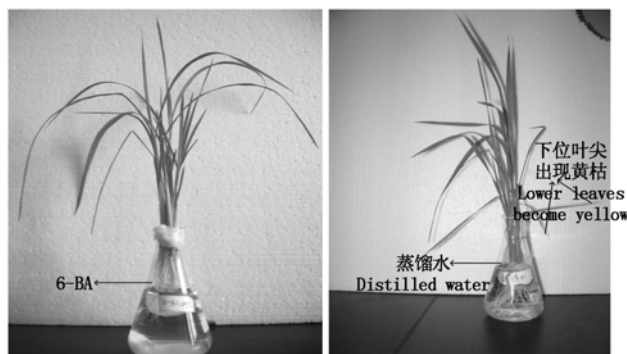


图 1 不同培养下水稻长势情况

Fig. 1 The growth state of rice cultivated with 6-BA and distilled water

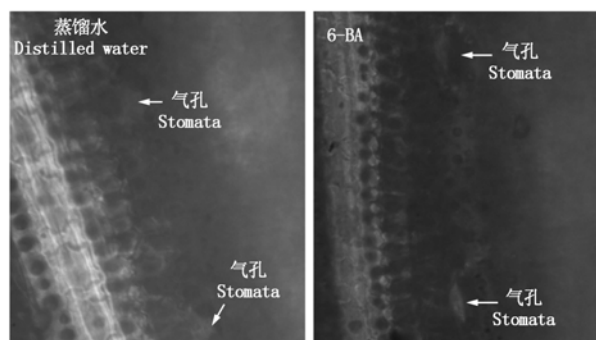


图 2 不同处理下水稻叶片气孔开度

Fig. 2 Leaf stomata of rice cultivated with 6-BA and distilled water

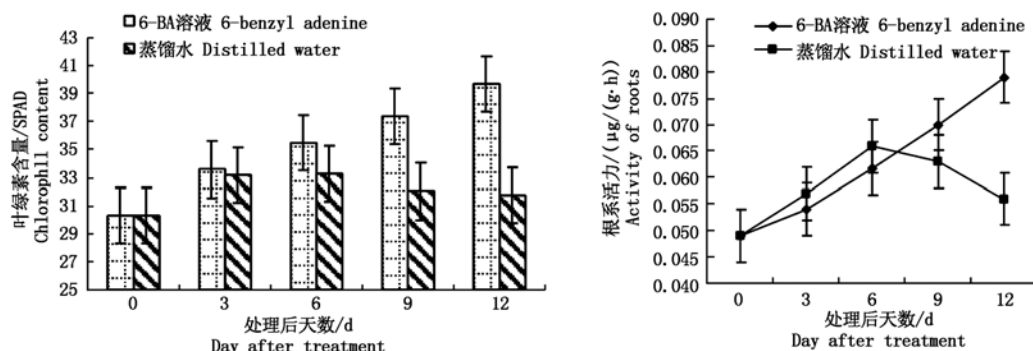


图 3 不同处理下水稻叶片 SPAD 值及根系活力变化

Fig. 3 Changes of chlorophyll content and root activity of rice under different nutrient supplies

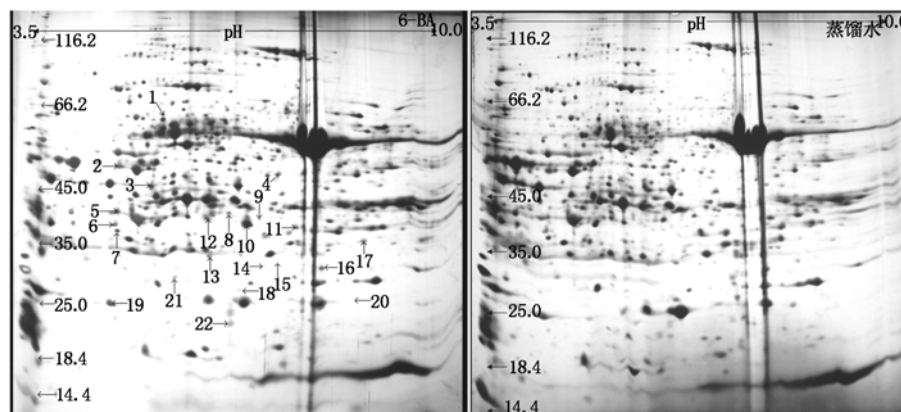


图 4 6-BA 与蒸馏水培养下水稻叶片蛋白质电泳图谱

Fig. 4 Two dimensional electrophoresis separation of proteins of rice seedlings leaves cultivated with 6-BA and distilled water

2.2 6-BA 对养分胁迫下叶片蛋白质组影响

叶片蛋白质经双向电泳分离,凝胶染色扫描后获得电泳图谱,经 Imagemaster 2D Elite 5.0 自动检测蛋白质点,每张图谱中可分辨出 800 多个稳定可重复的蛋白质点,表观分子量 (Mr) 为 14 ~ 120 kDa; 蒸馏水培养的水稻叶片蛋白质电泳图谱为对照,

6-BA 培养诱导了 22 个蛋白质发生差异表达 (图 4, 5), 其中 13 个蛋白质 (编号 1,2,3,4,5,6,7,10,12, 16,17,19,22) 的表达量显著上调,8 个蛋白质 (编号 8,9,13,14,15,18,20,21) 的表达量下调,1 个为新出现的蛋白质 (编号 11)。

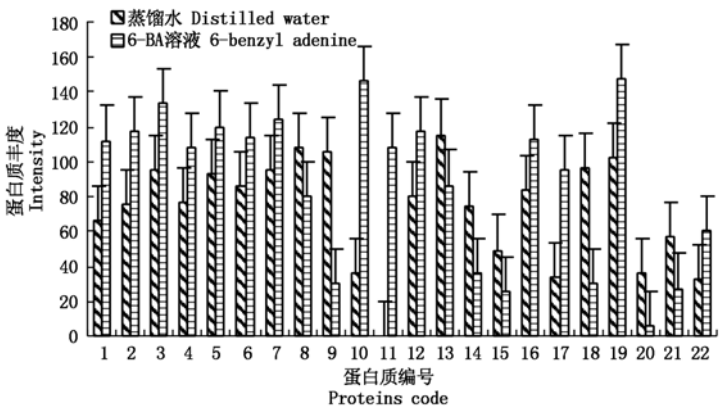


图 5 叶片差异蛋白质表达丰度

Fig.5 The expression abundance of differential protein in rice leaves

2.3 差异表达蛋白质鉴定及功能分析

22 个蛋白质质谱分析数据通过 Matrix Science (Matrix Science, London, UK) 网站 (<http://www.matrixscience.com>) 提供的 MASCOT 软件 ([http://](http://www.matrixscience.com)

www.matrixscience.com/cgi/search_form.pl FORM-VER = 2& SEARCH = PMF) 进行查询,有 15 个蛋白质功能得到鉴定,结果如表 1。

表 1 叶片差异表达蛋白质的质谱鉴定结果

Tab.1 Identification of leaves' differentially-expressed proteins by ESI-Q MS/MS

编号 Code	蛋白质名称 Protein name	登录号 Accession No.	分子量/kDa Molecular weight	等电点 pI
1	糖基转移酶 Glycosyltransferases	ACY56075	67.285	6.26
2	谷氨酰胺合成酶 Glutamine synthetase	NP_001054133	46.613	5.96
3	三磷酸核苷水解酶 Nucleoside triphosphate hydrolases	NP_001068555	38.880	7.56
4	异柠檬酸/异丙基苹果酸脱氢酶 Isocitrate/Isopropylmalate dehydrogenase	CAE05880	36.540	6.94
5	锰稳定光合系统 II 多肽 Manganese-stabilising protein/photosystem II polypeptide	EEC70714	34.870	5.10
6	乙二醛酶 I Glyoxalase I	EAZ22588	37.670	5.13
7	磷酸酯酶 Phosphatase	AAK53865	40.823	5.23
10/11	细胞分裂素脱氢酶 Cytokinin dehydrogenase	EEC70112	59.889	6.86
14	谷胱甘肽-S-转移酶 Glutathione S-transferase	NP_001054470	23.555	5.81
15	硫氧还蛋白 Thioredoxin	NP_001054470	23.555	6.16
16	核酮糖二磷酸羧化酶/加氧酶大亚基 RuBisCo large subunit	CAQ52445	48.895	8.42
17	细胞分裂素脱氢酶 1 前体 Cytokinin dehydrogenase 1 precursor	NP_001042301	10.714	10.16
18	类胚素蛋白 Germin-like protein	BAA74702	21.846	6.13
21	NAC 域 NAC domain	NP_001048709	19.196	5.26
22	放氧复合体蛋白 1 Oxygen-evolving complex protein 1	2002393A	0.027	5.13

依据功能可将 15 个蛋白质划分为以下几个类群:

I 光合作用相关蛋白质:三磷酸核苷水解酶、核酮糖二磷酸羧化酶/加氧酶大亚基、锰稳定光合系统 II 多肽、放氧复合体蛋白 1; II 呼吸代谢及物质合成

相关蛋白质:谷氨酰胺合成酶、异柠檬酸/异丙基苹果酸脱氢酶; III 激素类相关蛋白质:糖基转移酶、细胞分裂素脱氢酶、细胞分裂素脱氢酶 1 前体; IV 逆境胁迫应答蛋白质:乙二醛酶 I、磷酸酯酶、NAC 域、谷胱甘肽-S-转移酶、硫氧还蛋白、类胚素蛋白。

3 结论与讨论

持续的养分胁迫可直接导致水稻叶片中包括核酮糖二磷酸羧化酶/加氧酶在内的光合类蛋白质降解,叶片光合能力下降^[14],外源施用 6-BA 可有效延缓叶绿素降解,延长叶片光合功能期。本研究通过叶片蛋白质组分析发现,6-BA 主要通过延缓水稻叶片的光合蛋白质降解,实现保持叶片较高的光合能力,与前人的研究结果一致,表现为核酮糖二磷酸羧化酶/加氧酶大亚基、三磷酸核苷水解酶、锰稳定光合系统Ⅱ多肽及放氧复合体蛋白 1 在水稻叶片中表达量均显著增加,这些蛋白质分别参与了光合碳同化羧化阶段的第一步反应^[15]、光合电子传递和光合磷酸化过程的酶^[16-18]。6-BA 正是通过扩大叶片气孔开度,增加叶绿素合成,调节参与光合碳同化等多个代谢环节的关键蛋白质上调表达量,从而提高了水稻叶片的光合作用及光合产物的积累。

呼吸作用是植物生命活动所需能量的源泉,同时调控着碳、氮和脂肪等代谢活动,植物体内 95% 的氮通过谷氨酰胺合成酶(GS)/谷氨酸合酶(Glutamate synthetase, GOGAT)循环同化为谷氨,进一步转变为蛋白质、核酸等有机物质,其中 GS 是该循环的关键酶,是无机氮转化为有机氮的枢纽^[19-23]。异柠檬酸/异丙基苹果酸脱氢酶是三羧酸循环中的重要限速酶,在呼吸代谢过程中通过催化异柠檬酸氧化脱羧成 α -酮戊二酸,并向呼吸链提供 NADH 和 H^+ 用于形成跨膜质子动力,推动 ATP 的产生。本研究发现,养分胁迫下,6-BA 可显著增强水稻叶片中 GS 和异柠檬酸/异丙基苹果酸脱氢酶的表达量,增强呼吸代谢,从而为新生蛋白质的合成提供物质与能量,促进新生叶片及根系的生长发育。

植物体内激素含量的动态平衡对植物的生长、发育和环境胁迫应答起到至关重要的作用。细胞分裂素脱氢酶是降解植物体内细胞分裂素的主要酶类^[24-25],糖基转移酶参与的糖基化能降低甚至完全消除植物激素的生物活性^[26]。本研究中,外源 6-BA 的吸收增加了植株体内细胞分裂素含量,直接诱导了细胞分裂素脱氢酶、细胞分裂素脱氢酶 1 前体以及糖基转移酶的表达量上调,从而实现植株体内激素平衡。

磷酸酯酶的主要作用是参与细胞磷代谢和信号传导^[27],磷养分胁迫下,植物细胞必须通过磷酸酯酶的水解从核酸、磷酸化糖和蛋白质中得到机体所需的磷酸盐^[28]。本试验中,2 种培养溶液中磷养分严重缺乏,必须通过磷酸酯酶的水解才能获得所需

的磷养分,与蒸馏水培养的水稻幼苗相比,用 6-BA 培养的水稻幼苗叶片中磷酸酯酶表达量上调,从而增加对植株机体磷酸盐循环供应,满足短期内植株生长发育需求。乙二醛酶是催化丙酮醛合成 GSH 的酶^[29],不但消除了丙酮醛带来的毒性,而且合成的 GSH 是一种解毒剂和抗氧化剂,6-BA 培养的水稻幼苗叶片中乙二醛酶的大量表达对降低植株非生物胁迫下的逆境伤害具有重要意义。NAC 结构域蛋白是一种转录调控因子,其参与植物叶片衰老的过程、植物非生物胁迫和防御反应^[30-33],硫氧还蛋白参与了植物的新陈代谢、转录翻译调控、信号传导以及植物的抗逆反应等^[34],谷胱甘肽-S-转移酶作为胁迫信号蛋白,调节细胞程序衰老作用^[35],类胚素蛋白具有草酸氧化酶活性^[36],它参与产生过氧化氢,对植物体有直接的伤害作用,诱导受损的细胞凋亡。与蒸馏水培养相比,6-BA 显著降低了水稻叶片中 NAC 结构域蛋白、硫氧还蛋白、谷胱甘肽-S-转移酶和类胚素蛋白质的表达量,减弱逆境胁迫对植株造成的伤害,延缓衰亡的发生。

综上,水稻通过根系吸收 6-BA 溶液,可以有效促进光合及呼吸相关蛋白质合成,提高叶片的光合能力和呼吸代谢,促进了养分胁迫下机体物质的循环利用,满足逆境条件下植株生长发育对物质能量需求,是 6-BA 延缓养分胁迫下植株衰亡的内在机理。本研究为水稻防早衰栽培调控提供了理论依据,并将在下一步的研究中探索 6-BA 与养分复合的新方法,以期实现通过根系吸收的方式调控水稻衰亡。

参考文献:

- [1] 吴岳轩,吴振球. 丁酸对杂交水稻根系代谢活性及叶片衰老进程的影响[J]. 杂交水稻,1991(4):29-34.
- [2] 王少先,彭克勤,萧浪涛. 双氰氨对水稻根系及光合特性和经济性状的影响[J]. 湖南农业大学学报:自然科学版,2003,29(1):18-21.
- [3] 王 丰,程方民. 植物激素与水稻产量的关系及其在生产上的应用[J]. 现代化农业,2003(10):20-21.
- [4] 陶龙兴,王 熹,黄效林,等. 植物生长调节剂在农业中的应用及发展趋势[J]. 浙江农业学报,2001,13(5):322-326.
- [5] 黄静静,王绍华,李刚华,等. 6-苄基腺嘌呤对水稻颖花分化影响机制的研究[J]. 南京农业大学学报,2009,32(3):8-13.
- [6] 杨知建,徐庆国,朱春生,等. 6-BA 处理对水稻根系中后期生长的影响[J]. 湖南农业大学学报,2009,35(5):462-465.
- [7] 蔡永萍,陈静娴,聂 凡. 水稻抽穗期喷施 6-BA, ABA 对旗叶衰老及同化物运输的影响[J]. 安徽农业科学,

- 1996, 24(2): 113 - 115.
- [8] 杨安中, 牟筱玲, 李孟良, 等. 喷施细胞分裂素类物质对地膜旱作水稻防衰及增产效应[J]. 水土保持学报, 2005, 19(2): 199 - 200.
- [9] 郭彦, 张文会, 魏秀俭, 等. 6-BA 对干旱胁迫条件下水稻芽期生长的影响[J]. 安徽农业科学, 2005, 33(9): 1592 - 1593.
- [10] 梁建秋, 梁颖. 几种生长物质对油菜幼苗抗湿性的影响[J]. 西南师范大学学报, 2009, 34(1): 58 - 62.
- [11] 徐皓. 6-BA 对蚕豆离体叶片衰老的延缓作用[J]. 江苏农业科学, 2008(4): 49 - 51.
- [12] Wang X C, Li X F, Li Y X. A modified coomassie brilliant blue staining method at nanogram sensitivity compatible with proteomic analysis[J]. Biotechnology Letters, 2007, 29: 1599 - 1603.
- [13] 夏其昌, 曾嵘. 蛋白质化学与蛋白质组学[M]. 北京: 科学出版社, 2004: 278.
- [14] 谢金水, 邵彩虹, 唐秀英, 等. 养分胁迫对籽粒灌浆期水稻叶片衰老影响的蛋白质组学分析[J]. 中国水稻科学, 2011, 25(2): 143 - 149.
- [15] Hajduch M, Rakwal R, Garawal G K, et al. High-resolution two-dimensional electrophoresis separation of proteins from metal-stressed rice (*Oryza sativa* L.) leaves: Drastic reductions/fragmentation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and induction of stress-related proteins[J]. Electrophoresis, 2001, 22(13): 2824 - 2831.
- [16] 瞿礼嘉. 植物生物化学与分子生物学[M]. 北京: 科学出版社, 2004: 131 - 483.
- [17] Wollman F A, Minai L, Nechushtai R. The biogenesis and assembly of photosynthetic proteins in thylakoid membranes I[J]. Biochim Biophys Acta, 1999, 1411(1): 21 - 85.
- [18] Friso G, Giacomelli L, Ytterberg A J, et al. In depth analysis of the thylakoid membrane proteome of *Arabidopsis thaliana* chloroplasts new proteins, new functions, and a plastid proteome database[J]. Plant Cell, 2004, 16(2): 478 - 499.
- [19] Lea P J, Mifflin B J. Alternative route for nitrogen in higher plants[J]. Nature, 1974, 251(5476): 614 - 616.
- [20] Lothier J, Gaufichon L, Sormani R, et al. The cytosolic glutamine synthetase GLN1;2 plays a role in the control of plant growth and ammonium homeostasis in *Arabidopsis* rosettes when nitrate supply is not limiting[J]. Journal of Experimental Botany, 2011, 62(4): 1375 - 1390.
- [21] Hirel B, Bertin P, Quillere I, et al. Towards a better understanding of the genetic and physiological basis for nitrogen use efficiency in maize[J]. Plant Physiology, 2001, 125(3): 1258 - 1270.
- [22] Harrison J, Crescenzo M P, Sene O, et al. Does lowering glutamine synthetase activity in nodules modify nitrogen metabolism and growth of *Lotus japonicus* [J]. Plant Physiology, 2003, 133(1): 253 - 262.
- [23] Cren M, Hirel B. Glutamine synthetase in higher plants: regulation of gene and protein expression from the organ to the cell[J]. Plant Cell Physiology, 1999, 40(12): 1187 - 1193.
- [24] Jones R J, Schreiber B M N. Role and function of cytokinin oxidases in plants[J]. Plant Growth Regulation, 1997, 23(1-2): 122 - 134.
- [25] Werner T, Motyka V, Strnad M, et al. Regulation of plant growth by cytokinin[J]. Proceedings of the National Academy of Science of USA, 2001, 98(18): 10487 - 10492.
- [26] 王军, 侯丙凯. 植物小分子化合物的糖基化与糖基转移酶[J]. 植物生理学通讯, 2008, 44(5): 997 - 1002.
- [27] 吴华, 严定平, 罗越华. 水稻磷酸酯酶 2A 基因蛋白的原核表达载体构建、表达和纯化[J]. 贵州科学, 2009, 27(2): 45 - 49.
- [28] 龚宁萍, 陈朝银. 耐热碱性磷酸酯酶的研究进展[J]. 药物生物技术, 2004, 11(3): 207 - 210.
- [29] Singla-Pareek S L, Reddy M K, Sopory S K. Genetic engineering of the glyoxalase pathway in tobacco leads to enhanced salinity tolerance[J]. Proceedings of the National Academy of Science of USA, 2003, 100(25): 14672 - 14677.
- [30] Collinge M, Boller T. Differential induction of two potato genes, Strpx2 and StNAC, in response to infection by *Phytophthora infestans* and to wounding[J]. Plant Molecular Biology, 2001, 46(5): 521 - 529.
- [31] Fujita M, Fujita Y, Maruyama K, et al. A dehydration-induced NAC protein, RD26, is involved in a novel ABA-dependent stress-signaling pathway[J]. Plant Journal, 2004, 39(6): 863 - 876.
- [32] Tran L S, Nakashima K, Sakuma Y, et al. Isolation and functional analysis of *Arabidopsis* stress-inducible NAC transcription factors that bind to a drought-responsive cis-element in the early responsive to dehydration stress 1 promoter[J]. The Plant Cell, 2004, 16(9): 2481 - 2498.
- [33] Delessert C, Kazan K, Wilson I W, et al. The transcription factor ATAF2 represses the expression of pathogenesis-related genes in *Arabidopsis* [J]. Plant Journal, 2005, 43(5): 745 - 757.
- [34] 孙虎, 薛保国, 杨丽荣, 等. 植物硫氧还蛋白系统[J]. 基因组学与应用生物学, 2010, 29(4): 748 - 753.
- [35] Kampranis S C, Damianova R, Atallah M, et al. A novel plant glutathione S-transferase/peroxidase suppresses Bax lethality in yeast[J]. Journal of Biological Chemistry, 2000, 275(38): 29207 - 29216.
- [36] 王丽, 王晓丽, 刘佳, 等. 植物草酸氧化酶及其基因的研究进展[J]. 中国农学通报, 2010, 26(7): 48 - 51.