

西藏青稞品系藏青 148 响应低温的蛋白组学分析

原红军^{1,2}, 曾兴权^{1,2}, 王玉林^{1,2}, 徐其君^{1,2},
扎桑^{1,2}, 于明寨^{1,2}, 顿珠加布^{1,2}, 尼玛扎西^{1,3*}

(1. 省部共建青稞和牦牛种质资源与遗传改良国家重点实验室, 西藏 拉萨 850002; 2. 西藏自治区农牧科学院农业研究所, 西藏 拉萨 850002; 3. 西藏自治区农牧科学院, 西藏 拉萨 850002)

摘要:为进一步了解冷驯化后的青稞苗对低温胁迫的响应机制,本研究采用藏青 148 作为材料,利用同位素相对标记与绝对定量技术(isobaric tags for relative and absolute quantitation, iTRAQ) 标记联合液相色谱串联质谱(LC-MS/MS) 技术并结合生物信息学和分子生物学技术对青稞低温诱导的蛋白组差异蛋白谱进行分析。结果表明,在 iTRAQ 测序分析的常温及冷驯化后低温处理的样品肽段图谱中,共鉴定出 5111 个蛋白质,肽链长度主要分布在 6~24 个氨基酸之间。通路分析显示,鉴定到的蛋白质被富集到 126 个通路。COG 分析显示,R 类蛋白数量最多,同时鉴定的蛋白涉及能量代谢、信号转导、防御机制等多个方面。对照常温和低温处理 18h 筛选到的差异蛋白有 886 个,存在 499 个上调,387 个下调,且在代谢通路、乙醛酸代谢、三羧酸循环、糖酵解四条通路显著富集。

关键词:青稞;蛋白组;低温胁迫;差异表达蛋白

中图分类号:S512.1 **文献标识码:**A

Analysis of Proteomics Induced by Cold Stress in Tibetan Hulless Barley ‘Zangqing 148’

YUAN Hong-jun^{1,2}, ZENG Xing-quan^{1,2}, WANG Yu-lin^{1,2}, XU Qi-jun^{1,2},
Zhasang^{1,2}, YU Ming-zhai^{1,2}, Dunzhujabu^{1,2}, Nimazhaxi^{1,3*}

(1. State Key Laboratory of Hulless Barley and Yak Germplasm Resources and Genetic Improvement, Tibet Lhasa 850002, China; 2. Agricultural Research Institute, TAAAS, Tibet Lhasa 850002, China; 3. Tibet Academy of Agricultural and Animal Husbandry Sciences(TA-AAS), Tibet Lhasa 850002, China)

Abstract:In order to deep our understanding of the response mechanism of cold acclimated hulless barley to low temperature stress, we used Zangqing 148 as experimental material to analyze the different protein profile of hulless barley induced by cold stress using iTRAQ labeling techniques combined with bioinformatics and molecular biology assays. A total of 5111 proteins were identified from the peptide fragment information of the samples at room temperature and cold acclimation. The peptide chain length mainly distributed between 6 and 24 amino acids. Pathway analysis revealed that the identified proteins were enriched into 126 pathways. COG analysis showed that the number of R-class proteins was the highest, involving energy metabolism, signal transduction, and defense mechanisms. There were 886 different proteins screened at low temperature for 18h, 499 up-regulated and 387 down-regulated. These proteins significantly enriched in four pathways: metabolic pathway, glyoxylate metabolism, tricarboxylic acid cycle and glycolysis.

Key words:Holless barley;Proteome;Cold stress;Differential expression proteins

青稞 (*Hordeum vulgare* L. var. *nudum* Hook. f.), 禾本科大麦属禾谷类作物,主要种植在海拔高于 1000 m 以上的地方,包括西藏等高寒地区。由于种植地区海拔普遍较高,温度较低,青稞在生长发育

期往往遭受恶劣天气的胁迫。同其他禾谷类相比,具有一定的低温适应能力,适应性广,高产早熟,备受西藏人民的喜爱,是其主要粮食^[1]。

温度是植物生长的必要条件,过高和过低的温度都会使植株发育不良。在高原地区,低温是普遍存在的逆境因子。逆境胁迫下,植物体内大量的基因、蛋白在表达的种类和丰度上会发生很大的变化。目前的研究表明,植物通过细胞膜的状态感受温度^[2],而低温被感知后,经过一系列的信号转导,有

收稿日期:2018 - 09 - 19
基金项目:西藏财政专项(2017CZZX002, XZNKY-2018-C-021);
西藏重大科技专项(XZ201801NA01)
作者简介:原红军(1979 -),男,硕士,副研究员,主要从事青稞遗传育种研究,E-mail:yuanzhenbin@126.com,* 为通讯作者。

大量的基因和蛋白被诱导表达,从而应对低温逆境胁迫。其中部分转录因子对低温逆境的调控有越来越重要的作用,主要包括 bZIP、MYB、WRKY、AP2/ERF、NAC 类转录因子。通过转录组水平对低温响应机制已经有较多的报道,相较于转录组数据而言,蛋白质组数据更能反映植株的表型变化的原因^[3-4]。因此,目前对于蛋白质组学研究的技术(2DE、MS、iTRAQ 等)被广泛地应用在植物抗逆抗病的研究中,包括拟南芥^[5]、水稻^[6]、棉花^[7]、柑橘^[8]、马铃薯^[9]等。最近,西藏青稞基因组的测序已报道^[10],这为后续基因鉴定和功能鉴定提供研究方向。

为了可以更加深入地理解低温响应的机制,又由于西藏青稞的冷驯化后植株的蛋白质表达、翻译后修饰等情况的相关研究尚未报道。因此,本研究采用对低温较为敏感的藏青 148 作为材料,通过 iTRAQ 标记分析其在常温 and 低温处理下的蛋白组差异蛋白谱分析,从而了解其响应低温胁迫的蛋白组调控机制,为后续结合转录组、代谢组、表观组等研究,更加全面和深入地了解青稞响应低温胁迫的分子机理打下基础,并对研究其他作物的低温调控机制提供丰富的数据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

品系藏青 148 抗寒性弱,为低温敏感材料。播种于塑料钵钵内,在温室中生长至 3 叶期后移至实验室光照培养箱:温度为 20/15 ℃(白天/晚上),12 h 光周期,相对湿度 75 %。

1.2 低温处理

待长势良好青稞苗的第 3 叶完全展开时,将其转移到温度为 3/1 ℃(白天/黑夜)的培养箱中预处理 5 d 作冷驯化处理。按照 Bosco 等^[11]稍作改进的

表 1 Mascot 搜索参数

Table 1 Mascot search parameters

ITEM	Value
Type of search	MS/MS Ion search
Enzyme	Trypsin
Fragment mass tolerance	0.1Da
Mass values	Monoisotopic
Variable modifications	Oxidation (M), iTRAQ8plex (Y)
Peptide mass tolerance	0.05Da
Fixed modifications	Carbamidomethyl (C), iTRAQ8plex (N-term), iTRAQ8plex (K)
Database	barley (78749 sequences)

方法进行低温处理。具体操作如下,常温培养的材料与冷驯化处理的材料放置 -2 ℃处理 4 h 作缓冲,后移到 -8 ℃黑暗处理 18 h 作低温处理。同时置于常温培养的材料继续培养作对照。

1.3 蛋白质提取及 iTRAQ 标记

通过处理共选择 3 个时间点的样品送至深圳华大基因科技有限公司,进行蛋白提取和 iTRAQ 标记分析。其中冷驯化处理样品为 T1,冷驯化后的放置 -2 ℃处理 4 h 的材料即为 T2_1,继续 -8 ℃处理 18 h 的材料为 T3_1。并在相同时间点取置于常温培养的材料作为对照分别标位 CK1、CK2、CK3。每个组有 2 个重复,每个重复分别取 3 株不同部位叶片作混合样品。

1.4 数据库的选择与搜索

利用数据库检索的方法对串联质谱进行蛋白质鉴定是目前广泛采用的方法。本试验中采用 NCBIInr、SwissProt、UniProt 等。采用 Mascot 软件对蛋白质进行鉴定,相关参数如表 1。

1.5 蛋白质鉴定信息统计

采用 IQuant 自动化软件,来进行蛋白肽的定量分析。主要流程包括蛋白鉴定、标签杂质校正、数据归一化、缺失值估算、蛋白比计算、统计分析、结果呈现。其中主要定量参数如表 2。

1.6 COG 注释

将鉴定到的蛋白质与 COG 数据库进行比对 (BlastP, E-value = 0.00001),预测该蛋白质可能的功能并对其做功能分类统计。

1.7 差异蛋白功能分析

选择同一时间点的 2 个处理两两比较,采用 IQuant 自动化软件,经过多重假设检验 (False discovery rate, FDR) 进行校正,取 FDR 值小于 1 % 的,且依据蛋白质丰度水平,当差异倍数达到 1.2 倍以上,且统计检验 $P < 0.05$ 时视为差异蛋白。并统计上、下调差异蛋白数量,同时对差异表达蛋白进行 KEGG 富集分析,获得不同温度下差异基因的功能和调控网络信息。

表 2 IQuant 定量参数

Table 2 IQuant search parameters

ITEM	Value
Quant_peptide	Use all unique peptide
Quant_number	At least one unique spectra
Normalization Protein_Ratio Statistical Analysis	VSN
Mass values	Weighted average
Variable modifications	Permutation Tests

2 结果与分析

2.1 蛋白质鉴定基本信息

如图 1 对低温诱导的青稞叶片蛋白质表达谱进行统计分析,结果发现,蛋白质二级谱图总数为 379 974 个,经过质量控制,匹配到的谱图数为 50 150 个,其中有 44 819 个图谱可以匹配到特有的肽段,得到鉴定的肽段有 19 791 个,其中 18 410 个表现特有肽段序列,总共鉴定蛋白数量为 5111 个。

2.2 蛋白组的整体分布分析

依据相对分子量大小,将利用 iTRAQ 技术鉴定到的所有蛋白质进行统计,结果(图 2)显示,所鉴定到的蛋白主要集中 10~70 kDa,占所鉴定到的蛋白的 82%,多数肽段长度分布在 6~24 个氨基酸,约占所有肽段的 80%左右,其中 8~12 aa 区间为分布高峰期;所鉴定到的蛋白所含肽段的数量大多集中在 10 以内,且随匹配肽段数量增加蛋白数量减少。

2.3 COG 分析

COG 分析结果如图 3,获得功能注释的蛋白 2969 个,其中 R 类(General function prediction only,整体功能类)注释蛋白数量最多,有 813 个蛋白,占

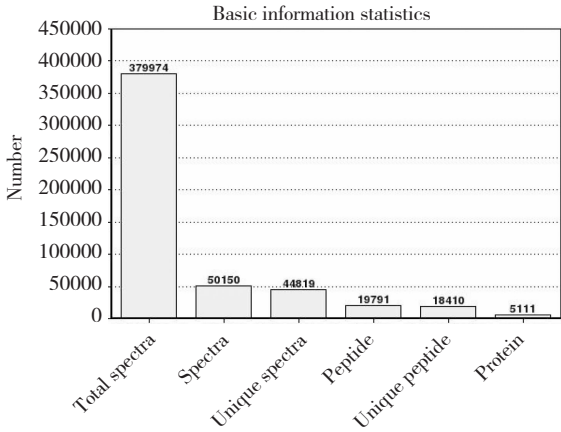
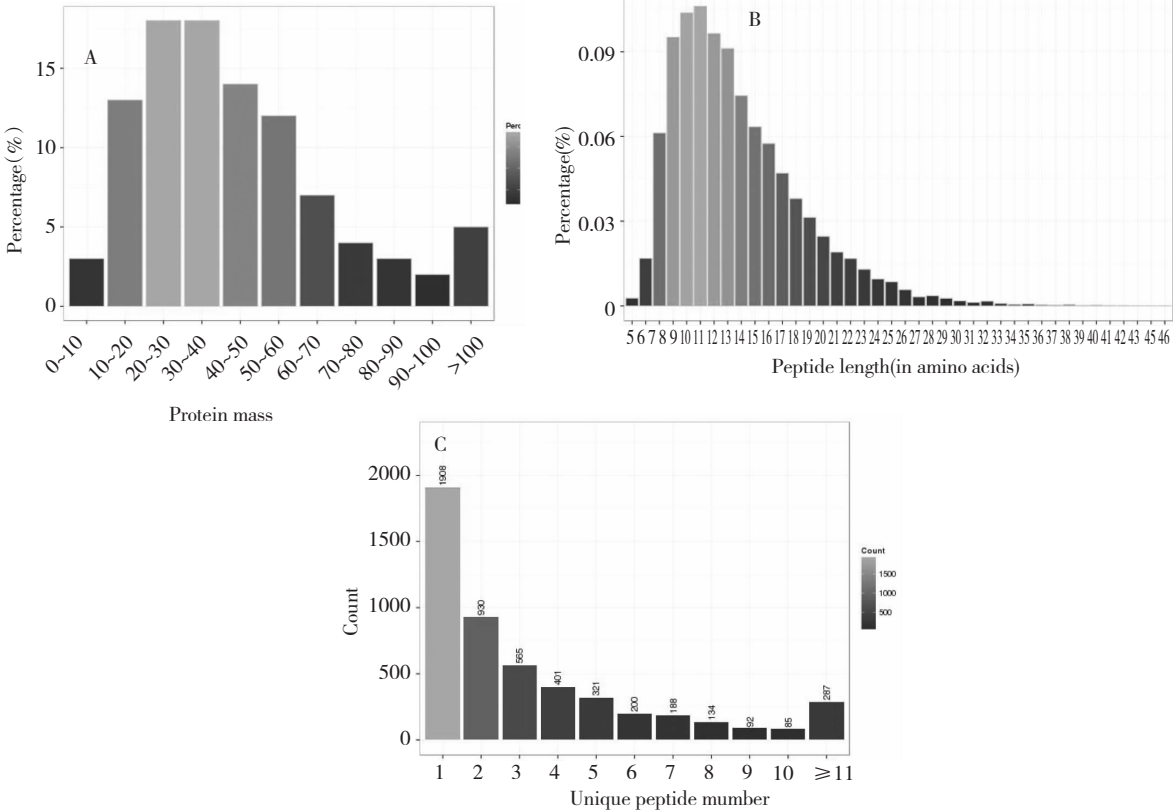


图 1 鉴定基本信息统计

所以鉴定注释蛋白的 23.38%;其次是 O 类(Post-translational modification, protein turnover, chaperones, 翻译后修饰/蛋白质折叠/分子伴侣)和 J 类(Translation, ribosomal structure and biogenesis, 翻译/核糖体结构域生物起源),分别含有 444 个和 354 个蛋白,占 14.95%、11.92%。其中 T 类(Signal transduction mechanisms, 信号转导机制)和 V 类(Defense mechanisms, 防御机制)值得关注,分别含有 194 和



A. 蛋白质相对质量分布;B. 肽段长度分布;C. 特有多肽数量分布
A. Protein mass distribution;B. Peptide length distribution;C. Unique peptide number

图 2 iTRAQ 鉴定到蛋白质的整体分布

Fig. 2 The overall distribution of the iTRAQ quantitative proteomics analysis

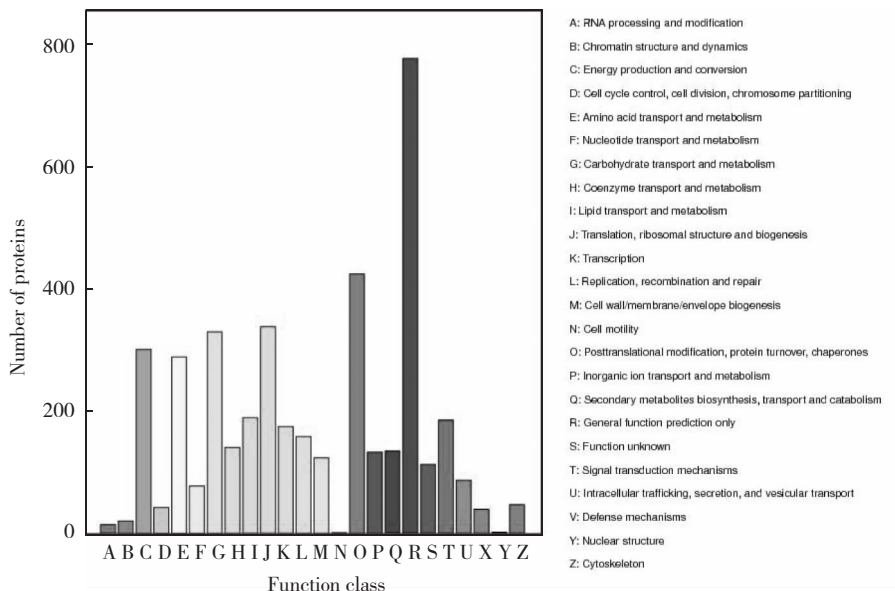


图3 青稞蛋白序列 COG 功能分类

Fig.3 COG function classification of protections

48 个蛋白,占 6.53 %、1.62 %。此外还发现未知功能蛋白 (Function unknown)118 个,占 3.97 %。

2.4 通路分析

Pathway 分析结果显示,3477 个蛋白注释到 126

条通路上。表 3 显示蛋白数目最多的前 20 个通路信息,其中涉及生物代谢、次生物质生物合成、核糖体、苯丙烷类生物合成等通路。表明在低温胁迫下,这些途径中的蛋白积极响应植物低温胁迫的调控。

表 3 注释蛋白数目最多的钱 20 个代谢通路

Table 3 The top twenty pathway with the largest number of protein

通路 Pathway	差异蛋白与通路注释 Different proteins with pathway annotation (3347)	通路 ID Pathway ID
Metabolic pathways	1134 (33.88 %)	ko01100
Biosynthesis of secondary metabolites	692 (20.68 %)	ko01110
Ribosome	168 (5.02 %)	ko03010
Phenylpropanoid biosynthesis	137 (4.09 %)	ko00940
Protein processing in endoplasmic reticulum	113 (3.38 %)	ko04141
Plant-pathogen interaction	105 (3.14 %)	ko04626
RNA transport	102 (3.05 %)	ko03013
Spliceosome	101 (3.02 %)	ko03040
Starch and sucrose metabolism	99 (2.96 %)	ko00500
Glycolysis /Gluconeogenesis	93 (2.78 %)	ko00010
Oxidative phosphorylation	91 (2.72 %)	ko00190
Phenylalanine metabolism	90 (2.69 %)	ko00360
Plant hormone signal transduction	81 (2.42 %)	ko04075
Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	79 (2.36 %)	ko00520
Purine metabolism	75 (2.24 %)	ko00230
Pyruvate metabolism	75 (2.24 %)	ko00620
Aminoacyl-tRNA biosynthesis	67 (2 %)	ko00970
Carbon fixation in photosynthetic organisms	66 (1.97 %)	ko00710
Glutathione metabolism	60 (1.79 %)	ko00480
mRNA surveillance pathway	55 (1.64 %)	ko03015

2.5 差异表达蛋白统计分析

试验将处理组与对照组两两比较,统计结果如图 4,冷驯化后的植株与正常生长的植株之间(T1-Vs-CK1)存在差异表达蛋白 328 个,其中 206 个上调表达,122 个下调表达。经过 -2℃ 缓冲处理 4 h,处理组与对照组(T2_1-Vs-CK2)存在差异表达蛋白 421 个,其中 205 个上调表达,216 个下调表达。其中一直处于上调的蛋白有 22 个,下调的蛋白有 21 个。经过 -8℃ 低温处理 18 h 后(T3_1-Vs-CK3),鉴定到差异表达蛋白 886 个,其中 499 个上调表达,387 个下调表达。并与 T1-Vs-CK1 获得的差异基因比较,共同上调的有 57 个,下调的有 48 个;与 T2_1-Vs-CK2 获得的差异基因比较,共同上调的有 85 个,下调的有 67 个。而在这 3 组差异表达蛋白中,一直处于上调的有个 6 蛋白,包括查尔酮合酶蛋白、铁氧化还原蛋白、乙酰辅酸 A 羧化酶、伴侣蛋白、冷击蛋白、碳酸酐酶等;一直处于下调的有 4 个蛋白,包括酸性磷酸酶、半胱氨酸蛋白酶、草酸氧化酶。这三组数据中,大多数表现上调蛋白数量大于下调蛋白数量,说明在植物抗寒过程中,主要以蛋白的正调控为主。

2.6 差异表达蛋白富集通路分析

研究对低温诱导的青稞叶片差异蛋白进行通路显著富集分析,发现在这 3 组样品中蛋白均富集在不同的通路中,具体结果见表 4。冷驯化后的植株与正常生长的植株之间存在的差异蛋白富集到了

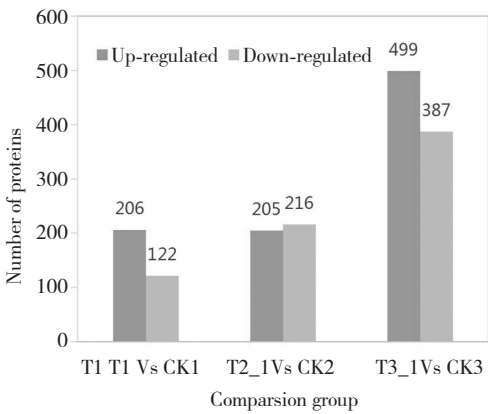


图 4 差异表达蛋白数量统计

Fig. 4 Statistics of difference protein

93 条通路中,其中显著富集的通路有 13 条,且极显著的有 5 条,为核糖体、半乳糖代谢、亚油酸代谢、代谢通路、淀粉和蔗糖代谢。T2_1-Vs-CK2 鉴定出的差异蛋白富集到了 106 条通路中,其中显著富集的通路有 15 条,且极显著的有 8 条,包括在次生代谢产物的生物合成途径、代谢通路、氮代谢、丙酮酸代谢、光合生物固碳、碳代谢、氨基酸的生物合成、卟啉和叶绿素代谢、亚油酸代谢、苯丙烷类生物合成、糖酵解;T3_1-Vs-CK3 鉴定出的差异蛋白富集到了 111 条通路中,其中显著富集的通路有 11 条,且极显著的有 4 条,在代谢通路、乙醛酸代谢、三羧酸循环、糖酵解。综合分析,在植物响应低温胁迫的过程中,糖酵解等其它相关的代谢通路发挥着重要的作用。

表 4 差异蛋白通路分析

Table 4 Pathway analysis of the differ-expressed proteins

处理 Treatments	通路 Pathway	通路注释差异蛋白 Different proteins with pathway annotation	通路注释蛋白 All proteins with pathway annotation	P 值 P-value	通路 ID Pathway ID
T1-VS-CK1	Ribosome	34 (12.69 %)	199 (4.88 %)	1.27E-07	ko03010
	Galactose metabolism	14 (5.22 %)	57 (1.4 %)	1.20E-05	ko00052
	Linoleic acid metabolism	5 (1.87 %)	14 (0.34 %)	0.001451093	ko00591
	Metabolic pathways	110 (41.04 %)	1353 (33.21 %)	0.003323889	ko01100
	Starch and sucrose metabolism	17 (6.34 %)	140 (3.44 %)	0.009565819	ko00500
	Glutathione metabolism	10 (3.73 %)	68 (1.67 %)	0.0124604	ko00480
	Glycine, serine and threonine metabolism	9 (3.36 %)	60 (1.47 %)	0.01537485	ko00260
	Biosynthesis of secondary metabolites	68 (25.37 %)	832 (20.42 %)	0.02465304	ko01110
	Porphyrin and chlorophyll metabolism	8 (2.99 %)	58 (1.42 %)	0.0343349	ko00860
	Alanine, aspartate and glutamate metabolism	6 (2.24 %)	38 (0.93 %)	0.03566299	ko00250
	Nitrogen metabolism	4 (1.49 %)	20 (0.49 %)	0.03842929	ko00910
	Sphingolipid metabolism	4 (1.49 %)	20 (0.49 %)	0.03842929	ko00600
	Phenylalanine metabolism	5 (1.87 %)	31 (0.76 %)	0.04933026	ko00360
T2_1-VS-CK2	Biosynthesis of secondary metabolites	116 (32.22 %)	832 (20.42 %)	2.24E-08	ko01110

续表 4 Continued table 4

处理 Treatments	通路 Pathway	通路注释差异蛋白 Different proteins with pathway annotation	通路注释蛋白 All proteins with pathway annotation	P 值 P-value	通路 ID Pathway ID
T3_1-VS-CK3	Metabolic pathways	165 (45.83 %)	1353 (33.21 %)	1.26E-07	ko01100
	Nitrogen metabolism	8 (2.22 %)	20 (0.49 %)	0.000167597	ko00910
	Pyruvate metabolism	16 (4.44 %)	75 (1.84 %)	0.000655527	ko00620
	Carbon fixation in photosynthetic organisms	13 (3.61 %)	60 (1.47 %)	0.001789274	ko00710
	Carbon metabolism	32 (8.89 %)	215 (5.28 %)	0.001950752	ko01200
	Biosynthesis of amino acids	29 (8.06 %)	196 (4.81 %)	0.003446428	ko01230
	Porphyrin and chlorophyll metabolism	12 (3.33 %)	58 (1.42 %)	0.003992464	ko00860
	Linoleic acid metabolism	5 (1.39 %)	14 (0.34 %)	0.005362733	ko00591
	Phenylpropanoid biosynthesis	22 (6.11 %)	141 (3.46 %)	0.005511415	ko00940
	Glycolysis /Gluconeogenesis	15 (4.17 %)	88 (2.16 %)	0.009263424	ko00010
	Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	11 (3.06 %)	64 (1.57 %)	0.0228151	ko00630
	alpha-Linolenic acid metabolism	8 (2.22 %)	41 (1.01 %)	0.0245952	ko00592
	Terpenoid backbone biosynthesis	6 (1.67 %)	29 (0.71 %)	0.03786607	ko00900
	Pentose phosphate pathway	8 (2.22 %)	46 (1.13 %)	0.04574858	ko0003
	Ribosome	49 (7.57 %)	168 (5.02 %)	0.001055703	ko03010
	Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	19 (2.94 %)	50 (1.49 %)	0.00153337	ko00630
	Citrate cycle (TCA cycle)	17 (2.63 %)	47 (1.4 %)	0.004876824	ko00020
	Glycolysis /Gluconeogenesis	28 (4.33 %)	93 (2.78 %)	0.007637004	ko00010
	Carbon fixation in photosynthetic organisms	21 (3.25 %)	66 (1.97 %)	0.01015386	ko00710
	Pyruvate metabolism	23 (3.55 %)	75 (2.24 %)	0.01181941	ko00620
	Metabolic pathways	243 (37.56 %)	1134 (33.88 %)	0.0160302	ko01100
	Glutathione metabolism	18 (2.78 %)	60 (1.79 %)	0.03033587	ko00480
	Selenocompound metabolism	7 (1.08 %)	17 (0.51 %)	0.03140225	ko00450
	Glycine, serine and threonine metabolism	14 (2.16 %)	45 (1.34 %)	0.03940914	ko00260
	Glycerolipid metabolism	8 (1.24 %)	22 (0.66 %)	0.04650176	ko00561

3 讨 论

一个基因的表达会受不同水平的调控,如转录调控、转录后调控、翻译调控、翻译后调控等,蛋白质组便是从翻译水平来阐述其表达情况,反应其在不同处理下的实际状态,并利用差异表达蛋白对不同环境因素下蛋白表达的种类、丰度、修饰状况等进行比较研究,从而为植物蛋白响应低温胁迫的调控机制提供重要的理论依据。目前,植物响应低温胁迫的蛋白组学研究已在拟南芥^[12]、水稻^[13]、小麦^[14-15]、马铃薯^[16]等中有了一定的研究。在小麦冷胁迫的蛋白组研究中,发现其在低温暴露 24h 时达到最高的诱导水平,然后降低到不可检测的水平^[14]。因此本实验选择低温处理 18h 进行测定,防止蛋白组以降低,检测不到差异蛋白。有人在小麦霜冻的研究中,Jimai22 存在 21 个差异蛋白,13 个蛋

白上调,8 个蛋白夏天;在 Luyuan301 存在 22 个差异蛋白,9 个上调,13 个下调^[15]。同一作物在同一处理下,其响应机制会存在些许差别,本试验采用低温敏感性的青稞,对低温的感知能力更强,抗寒能力弱,若后续研究抗寒能力强的品种,可为探究其抗旱能力强弱的原因。在水稻响应低温胁迫的蛋白质组中,通过 iTRAQ 技术共鉴定 85 种响应低温的蛋白,并显示它们参与转运、光合作用、前提代谢产物生产和能量代谢,其中组蛋白类和维生素 B 类生物合成蛋白会受到冷应激的影响^[17]。在拟南芥的研究中,低温胁迫下的差异蛋白主要参与了淀粉降解、三羧酸循环和蔗糖代谢途径^[18]。在本研究的青稞响应低温胁迫过程中,发现其差异蛋白参与代谢、乙醛酸代谢、三羧酸循环、糖酵解途径。这与拟南芥等模式植物的研究结果相似。在 COG 注释分析中,发现存在少量未知功能的蛋白,说明青稞对低温胁迫响应

的复杂性,可能存在其它未发现的直接相关的因素参与其中。在甘蓝型油菜响应低温胁迫的蛋白组研究中,发现了大量的未知显著差异蛋白参与响应低温胁迫的调控^[19],这些因子可能在抗寒调控网络关键的因子。

本实验中 6 个样品 (T1-Vs-CK1-Vs-T2_1-Vs-CK2-Vs-T3_1-Vs-CK3) 共同差异蛋白表达分析,获得 6 个蛋白上调,4 个蛋白下调,他们主要参与代谢信号转导、次生代谢、翻译后的修饰、无机离子的转运和代谢等生物途径,说明这些代谢通路在植物响应低温胁迫的过程中发挥着重要的作用。由于植物抗寒的分子机制主要包括低温信号的感知、信号转导、调控机制和响应机制,而每一部分的又会存在互作,本研究从蛋白组水平确定了部分青稞响应低温胁迫的抗寒相关代谢通路及抗性相关蛋白,为青稞抗寒机制提供了理论依据,及以后其他作物研究低温调控机制具有重要意义。

参考文献:

- [1] 杨菁, 迟德钊, 吴昆仑. 青藏高原不同生态区栽培措施对青稞产量的影响[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(24):14573-14577.
- [2] Sangwan V, Foulds I, Singh J, et al. Cold-activation of Brassica napus BN115 promoter is mediated by structural changes in membranes and cytoskeleton, and requires Ca^{2+} influx[J]. Plant Journal for Cell & Molecular Biology, 2001, 27(1):1-12.
- [3] Kosová K, Vítámvás P, Prášil I. T. . Proteomics of stress responses in wheat and barley-search for potential protein markers of stress tolerance[J]. Frontiers in Plant Science, 2014, 5(711):1-14.
- [4] Kosová K, Vítámvás P, Urban M O, et al. Biological Networks Underlying Abiotic Stress Tolerance in Temperate Crops—A Proteomic Perspective[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2015, 16(9):20913-20942.
- [5] Ng D W, Zhang C, Miller M, et al. Proteomic divergence in Arabidopsis autopolyploids and allopolyploids and their progenitors[J]. Heredity, 2012, 108(4):419-430.
- [6] Cui S, Huang F, Wang J, et al. A proteomic analysis of cold stress responses in rice seedlings[J]. Proteomics, 2005, 5(12):3162-3172.
- [7] Hu G, Houston N L, Pathak D, et al. Genomically Biased Accumulation of Seed Storage Proteins in Allopolyploid Cotton[J]. Genetics, 2011, 189(3):1103-1115.
- [8] Yun Z, Jin S, Ding Y, et al. Comparative transcriptomics and proteomics analysis of citrus fruit, to improve understanding of the effect of low temperature on maintaining fruit quality during lengthy post-harvest storage[J]. Journal of Experimental Botany, 2012, 63(8):2873-2893.
- [9] Hoehenwarter W, Larhlmi A, Hummel J, et al. MAPA Distinguishes Genotype-Specific Variability of Highly Similar Regulatory Protein Isoforms in Potato Tuber[J]. Journal of Proteome Research, 2011, 10(7):2979-2991.
- [10] Zeng X, Long H, Wang Z, et al. The draft genome of Tibetan hull-less barley reveals adaptive patterns to the high stressful Tibetan Plateau. [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015, 112(4):1095-1100.
- [11] Dal B C, Busconi M, Govoni C, et al. cor Gene expression in barley mutants affected in chloroplast development and photosynthetic electron transport. [J]. Plant Physiology, 2003, 131(2):793-802.
- [12] Amme S, Matros A, Schlesier B, et al. Proteome analysis of cold stress response in *Arabidopsis thaliana* using DIGE-technology[J]. Journal of Experimental Botany, 2006, 57(7):1537-1546.
- [13] Yang P, Li X., Liang Y, et al. Proteomic Analysis of the Response of Liangyoupeijiu (Super High-Yield Hybrid Rice) Seedlings to Cold Stress[J]. Bulletin of Botany, 2006, 48(8):945-951.
- [14] Danyluk J, Rassart E, Sarhan F. Gene expression during cold and heat shock in wheat[J]. Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologiecellulaire, 1991, 69(5-6):383-391.
- [15] Zhang S, Song G, Yulian L I, et al. Comparative proteomic analysis of cold responsive proteins in two wheat cultivars with different tolerance to spring radiation frost[J]. Frontiers of Agricultural Science and Engineering, 2014, 1(1):37-45.
- [16] Yang Y, Qiang X, Owsiany K, et al. Evaluation of Different Multi-dimensional LC-MS/MS Pipelines for Isobaric Tags for Relative and Absolute Quantitation (iTRAQ)-Based Proteomic Analysis of Potato Tubers in Response to Cold Storage[J]. Journal of Proteome Research, 2011, 10(10):4647-4660.
- [17] Neilson K A, Mariani M, Haynes P A. Quantitative proteomic analysis of cold-responsive proteins in rice. [J]. Proteomics, 2011, 11(9):1696-1706.
- [18] Li T, Xu S L, Osés-Prieto J A, et al. Proteomics Analysis Reveals Post-Translational Mechanisms for Cold-Induced Metabolic Changes in Arabidopsis[J]. Molecular Plant, 2011, 4(2):361-374.
- [19] 杜春芳. 甘蓝型油菜低温诱导的转录组和蛋白组分析[D]. 武汉:华中农业大学, 2016.