

# 西藏青稞品系藏青 13 氮胁迫的蛋白组学分析

王玉林<sup>1,2</sup>, 曾兴权<sup>1,2</sup>, 徐其君<sup>1,2</sup>, 原红军<sup>1,2</sup>,  
扎桑<sup>1,2</sup>, 于明寨<sup>1,2</sup>, 顿珠加布<sup>1,2</sup>, 尼玛扎西<sup>1,3\*</sup>

(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:**氮元素过多过少都可能导致植株表型发生明显变化,甚至影响植株的正常生长发育。为了探究西藏青稞对不同氮浓度的响应,本研究采用藏青 13 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适氮、缺氮、低氮和高氮处理样品的蛋白谱进行分析。iTRAQ 测序结果表明,在根组织共鉴定得到 8589 个蛋白质,肽链长度主要分布在 6~18 个氨基酸之间;在叶组织中鉴定得到 4608 个蛋白质,肽链长度主要分布在 6~16 个氨基酸之间。COG 分析显示,R 类蛋白数量最多,同时鉴定的蛋白涉及次生代谢生物合成、信号转导、防御机制等多个方面。在不同氮素浓度处理下,其中缺氮处理与对照(适氮处理)相比,所筛选到的差异蛋白最多,有 1518 个蛋白,其中 810 个上调,708 个下调。四个处理共同筛选到的差异蛋白共富集到 47 个功能项中,包含 20 个生物过程 GO 功能项,15 个细胞组分 GO 功能项,12 个分子功能 GO 功能项。

**关键词:**西藏青稞;蛋白组;氮胁迫;差异表达

中图分类号:S512.3 文献标识码:A

## Analysis of Proteomics of Tibetan Hulless Barley Zangqing 13 in Response to Endure Nutrient Deficiency

WANG Yu-lin<sup>1,2</sup>, ZENG Xing-quan<sup>1,2</sup>, XU Qi-jun<sup>1,2</sup>, YUAN Hong-jun<sup>1,2</sup>,  
Zhasang<sup>1,2</sup>, YU Ming-zhai<sup>1,2</sup>, Dunzhujiabu<sup>1,2</sup>, Nimazhaxi<sup>1,3\*</sup>

(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:** Excessive and too little nitrogen can cause significant changes in plant phenotype, and even lead to plant growth and development. In order to deep our understanding of the response mechanism of hulless barley to respond to different nitrogen stress, we used Zangqing 13 as experimental material to analyze the different protein profile of hulless barley induced by different nitrogen stress (optimal-nitrate (ON) treatment, low-nitrate (LN) treatment, free-nitrate (FN) treatment, high-nitrate (HN) treatment) using iTRAQ labeling techniques combined with bioinformatics and molecular biology assays. The results showed that 8589 proteins were identified in the root tissue by iTRAQ sequencing analysis. The peptide chain length was mainly distributed between 6 and 18 amino acids; there were 4608 proteins identified in the leaf tissue. The peptide chain length was mainly distributed in the between 6 and 16 amino acids. COG analysis showed that the number of R-class proteins was the highest, and the identified proteins involved in secondary metabolic biosynthesis, signal transduction, and defense mechanisms. Under different nitrate concentrations, the difference between the free-nitrate treatment and optimal-nitrate treatment was the highest, with 1518 proteins, of which 810 were up-regulated and 708 were down-regulated. The four differentially screened proteins were enriched into 47 functional items, including 20 GO functional categories in the biological process, 15 GO functional categories in the cellular components, and 12 GO functional categories in the molecular function.

**Key words:** Tibetan Holless barley; Proteome; Nitrogen stress; Differential expression protein

收稿日期:2018-09-12

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:王玉林(1986-),男,硕士,副研究员,主要从事青稞遗传育种研究, E-mail: wangyulin8609@126.com, \* 为通讯作者。

氮素是生命的必要元素,是大多数大分子和蛋白质、核酸和激素等次生代谢产物的基本组成部分,在植物的生长发育中起着至关重要的作用<sup>[1]</sup>。植物需要有效地从土壤中获取氮素,特别是在氮素有效性高度波动的条件下,并开发复杂的吸收系统来

应对土壤中的氮素波动,维持植物正常的生长发育<sup>[2]</sup>。但是不合适的氮浓度也会严重影响植物的生长发育,大量研究表明,缺氮会导致植物体内氮代谢和光合作用等重要的生物学过程发生剧烈变化,甚至会中断<sup>[3-4]</sup>;氮完全缺失会降低叶面积指数、株高和苗重,最终限制植物生产力<sup>[5-8]</sup>;同时,过量的氮也会对植物的生长产生负面影响<sup>[9-10]</sup>,包括根系生长受限、叶片扩张受限和整株发育受限等<sup>[11]</sup>。氮还可以作为信号分子,通过信号转导调控植物的生长发育代谢等生物学过程。

近年来,氮应激反应相关的应答基因和机制引起了人们的广泛关注,其潜在的调控机制也引起了人们的关注。通过对拟南芥、玉米等模型植物的广泛研究中,硝酸盐会存在不同的诱导模式包括低硝酸盐和高硝酸盐处理后的瞬态诱导和两种处理后 mRNA 的短暂增加或持续增加等<sup>[12]</sup>。西藏青稞 (*Hordeum vulgare* L. var. *nudum* Hook. f.),属禾本科大麦属禾谷类作物,主要种植在西藏等高寒地区<sup>[13]</sup>,对于氮浓度的响应也十分明显,但是关于它的基因调控和信号通路与氮应激反应的关系还鲜有报道。最近,西藏青稞基因组的测序已被报道<sup>[14]</sup>;这为后续西藏青稞对基因鉴定和功能鉴定提供研究方向。为了更好地理解氮应激反应的机制,本试验采用藏青 13 作为材料,通过 iTQAR 标记分析其不同氮条件下的蛋白组变化,通过蛋白组分析自由硝酸,低硝酸盐和高硝酸应激反应差异蛋白。本试验的结果将有助于进一步发现氮应激反应蛋白,并

更加全面和深入地了解青稞氮应激反应的分子机理,并对研究其他作物的氮应激调控机制具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 供试材料

试验材料藏青 13 来由西藏自治区农牧科学院农业研究所青稞育种与栽培研究室提供。选择饱满的藏青 13 种子,经 3.5 % 的次氯酸钠或 10 % 过氧化氢溶液溶液消毒 15 min,用蒸馏水冲洗干净,置于光照培养箱中催芽 5 d(温度为 28/22 ℃,光周期为 14/10h(白天/黑夜),光照强度(225 ± 25) μmol · m<sup>-2</sup> · s<sup>-1</sup>,60 % ~ 70 % 的相对湿度),选择发芽较为一致的种子移至蛭石盘中,在温室内进行培养,待大部分植株具有 2 ~ 3 片叶时(消耗自身胚乳的营养),移至浓度减半的营养液中进行培养(营养液按照 Hoagland 配方配制)1 d,然后再转移至正常浓度的营养液中进行培养 2 周,每 2 d 换一次营养液(保持 pH 6.0 的稳定性),并定时用气泵充氧,然后进行 N 胁迫处理,胁迫 2 d 后取样。

1.2 氮胁迫处理

将培养 2 周的待长势良好青稞苗进行氮胁迫处理,胁迫 2 d 后取样。营养液配制如表 1,其中 Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> · 4H<sub>2</sub>O、NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>、CaCl<sub>2</sub> 的浓度改变,并保持该营养液 pH 稳定在 6.0。每组处理有 2 个生物学重复,每组重复为 4 个混合样品。

表 1 培养营养液配方法

Table 1 Methods of nutrient solution preparation

	适氮处理(ON) Optimal-nitrate treatment	低氮处理(LN) Low-nitrate treatment	缺氮处理(FN) Free-nitrate treatment	高氮处理(HN) High-nitrate treatment
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O (mmol/L)	4	0.04	0	4
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> (mmol/L)	3	0.03	0	66
KCl (mmol/L)	6	6	6	6
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (mmol/L)	1	1	1	1
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O (mmol/L)	2	2	2	2
CaCl <sub>2</sub> (mmol/L)	—	3.96	4	—
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O (μmol/L)	50	50	50	50
EDTA · 2Na (μmol/L)	50	50	50	50
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> (μmol/L)	46	46	46	46
MnSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O (μmol/L)	9.55	9.55	9.55	9.55
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O (μmol/L)	0.32	0.32	0.32	0.32
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O (μmol/L)	0.76	0.76	0.76	0.76
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> (4H <sub>2</sub> O) (μmol/L)	0.0162	0.0162	0.0162	0.0162

表 2 Mascot 搜索参数  
Table 2 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)

1.3 蛋白质提取及 iTRAQ 标记

将 4 组处理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。其中适氮处理为对照组即 ON,低氮处理为 LN,缺氮处理为 FN,高氮处理为 HN。每组处理有 2 个生物学重复,每组重复为 4 个混合样品。

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 2。

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 3。

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

表 3 IQuant 定量参数  
Table 3 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

功能并对其做功能分类统计。

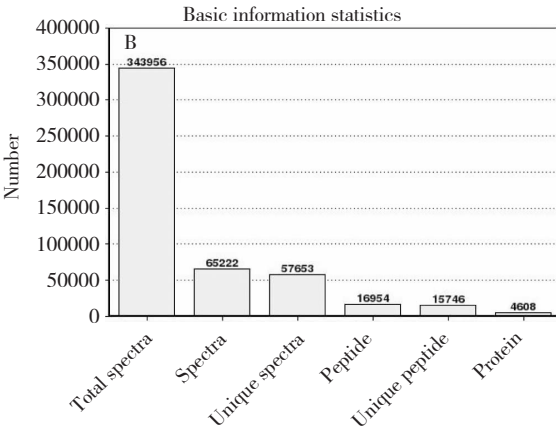
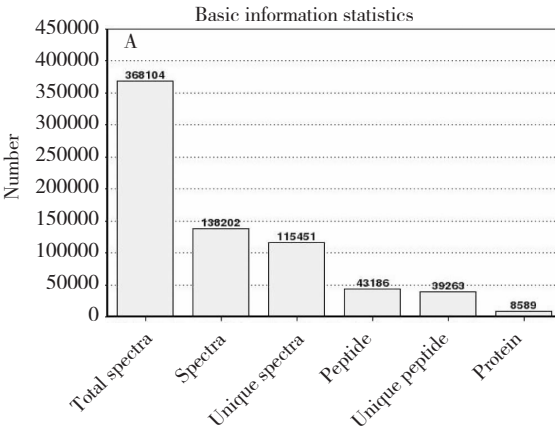
1.7 差异蛋白功能分析

适氮分别与缺氮、低氮、高氮处理两两比较,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。

2 结果与分析

2.1 蛋白质鉴定基本信息

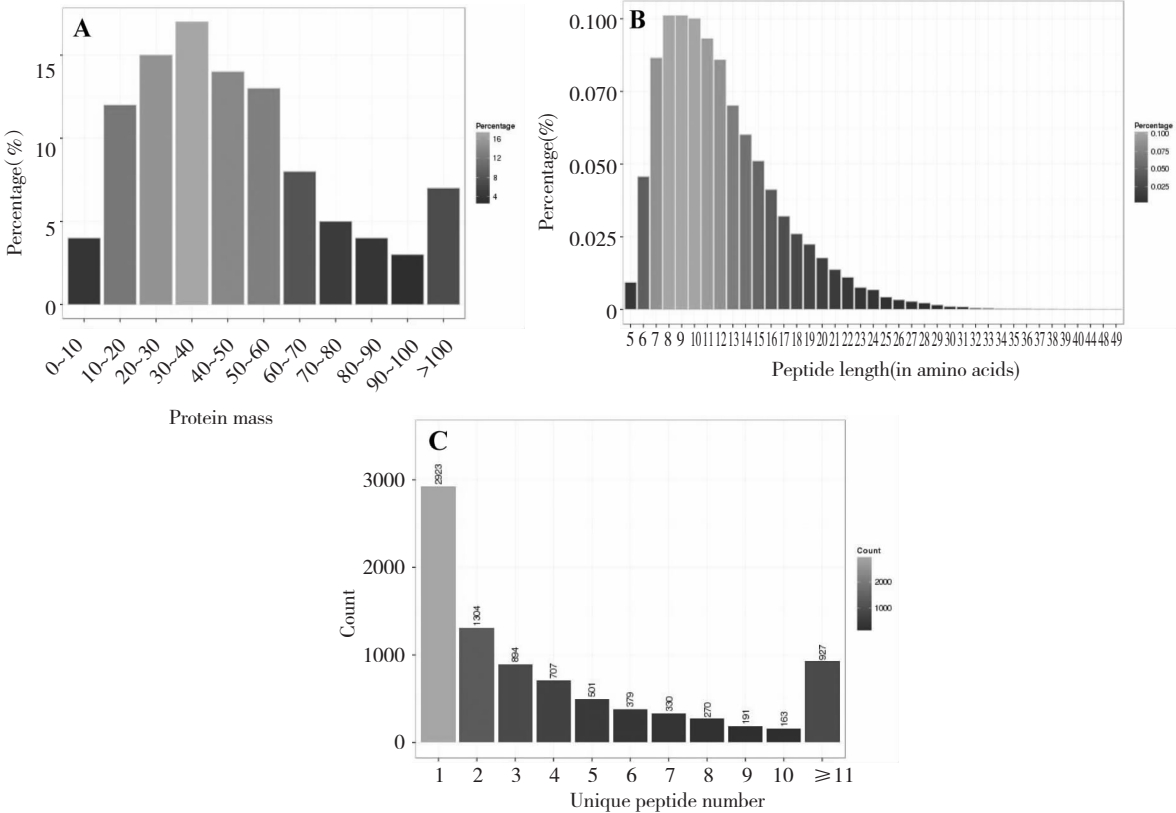
对不同氮浓度下的青稞根及叶 2 个组织的蛋白质表达谱进行统计分析(图 1),结果发现,根和叶组织蛋白质二级谱图总数分别为 368 104 和 343 956 个,经过质量控制,匹配到的谱图数分别为 138 202 和 65 222 个,其中分别有 115 451 和 57 653 个图谱可以匹配到特有的肽段,得到鉴定的肽段分别有 43 186 和 16 954 个,其中分别有 39 263 和 15 746 个表现特有肽段序列,总共鉴定蛋白数量分别为 8589 和 4608 个。较不同的组织中参与氮应激反应的蛋白



A. 根;B. 叶  
A. Root;B. Leaf

图 1 鉴定基本信息统计

Fig.1 The basic information chart of proteome identification



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 鉴定到根组织蛋白质的整体分布 R

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

存在着差异,根组织中检测到的蛋白远远高于叶组织中。可能是因为根是氮素吸收的主要器官,对氮素浓度的波动感知敏感,并迅速作出相应应激反应。

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,在根组织中所鉴定到的蛋白主要集中 10 ~ 70 kDa,占所鉴定到的蛋白的 77.6 %,多数肽段长度分布在 6 ~ 18 个氨基酸,约占所有肽段的 87 % 左右,其中 7 ~ 12 aa 区间为分布高峰区;所鉴定到的蛋白所含肽段的数量有 89.2 % 在 10 以内,且随匹配肽段数量增加蛋白数量减少。

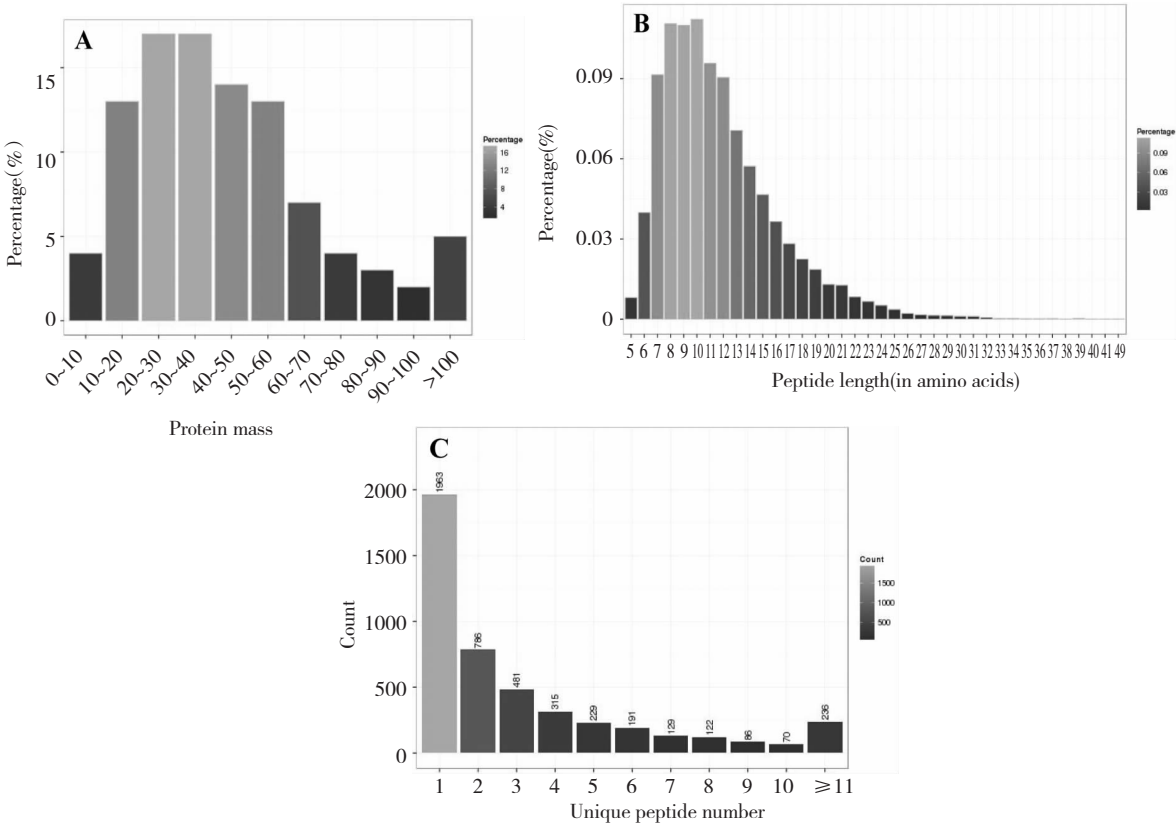
在叶组织中所鉴定到的蛋白主要集中 10 ~ 70 kDa(图 3),占所鉴定到的蛋白的 80.9 % ,;多数肽段长度分布在 6 ~ 16 个氨基酸,约占所有肽段的 84 % 左右,其中 7 ~ 12 氨基酸区间为分布高峰区;所鉴定到的蛋白所含肽段的数量有 94.9 % 在 10 以内,且随匹配肽段数量增加蛋白数量减少。

2.3 COG 分析

COG 分析结果如图 4,在根组织中获得功能注

释的蛋白 4757 个,其中 R 类(General function prediction only,整体功能类)注释蛋白数量最多,有 1407 个蛋白,占有鉴定注释蛋白的 29.58 % ;其次是 O 类(Posttranslational modification,protein turnover,chaperones,翻译后修饰/蛋白质折叠/分子伴侣)含有 670 个蛋白,占 14.1 % 。其中 T 类(Signal transduction mechanisms,信号转导机制)值得关注,分别含有 470 个蛋白,占 9.99 % 。此外还发现未知功能蛋白(Function unknown)184 个,占 3.87 % 。

在叶组织中获得功能注释的蛋白 2832 个,其中 R 类(General function prediction only,整体功能类)注释蛋白数量最多,有 710 个蛋白,占所以鉴定注释蛋白的 25.07 % ;其次是 O 类(Posttranslational modification,protein turnover,chaperones,翻译后修饰/蛋白质折叠/分子伴侣)含有 426 个蛋白,占 15.04 % 。其中 T 类(Signal transduction mechanisms,信号转导机制)值得关注,含有 183 个蛋白,占 6.46 % 。此外还发现未知功能蛋白(Function unknown)88 个,占 3.11 % 。



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3 iTRAQ 鉴定到叶组织蛋白质的整体分布  
Fig.3 The overall distribution of theiTRAQ quantitative proteomics analysis in leaves

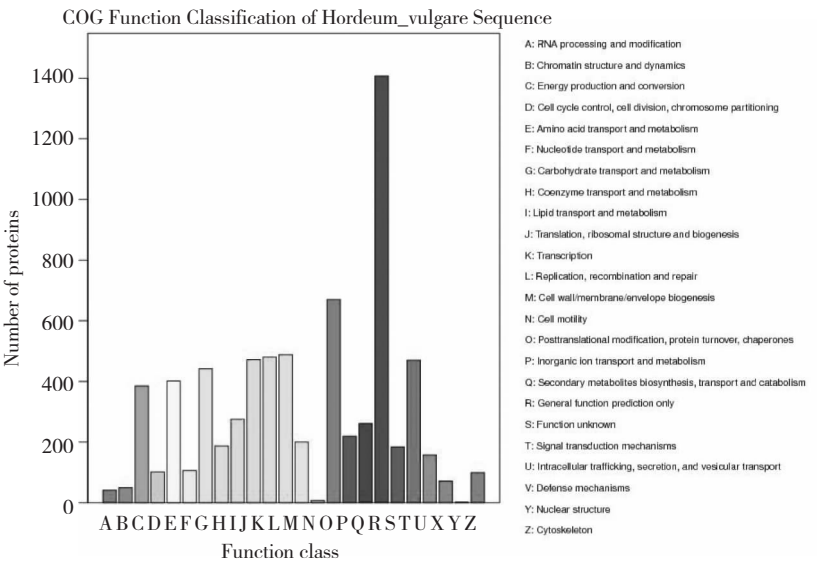


图4 青稞根组织中蛋白序列 COG 功能分类  
Fig.4 COG function classification of protein sequences in roots

2.4 通路分析

Pathway 分析结果显示,根组织中有 5797 个蛋白注释到 128 条通路上。表 4 显示蛋白数目最多的

前 10 个通路信息,其中涉及生物代谢、次生物质生物合成、植物与病原菌互作、苯丙烷类生物合成、植物激素信号转导等通路。



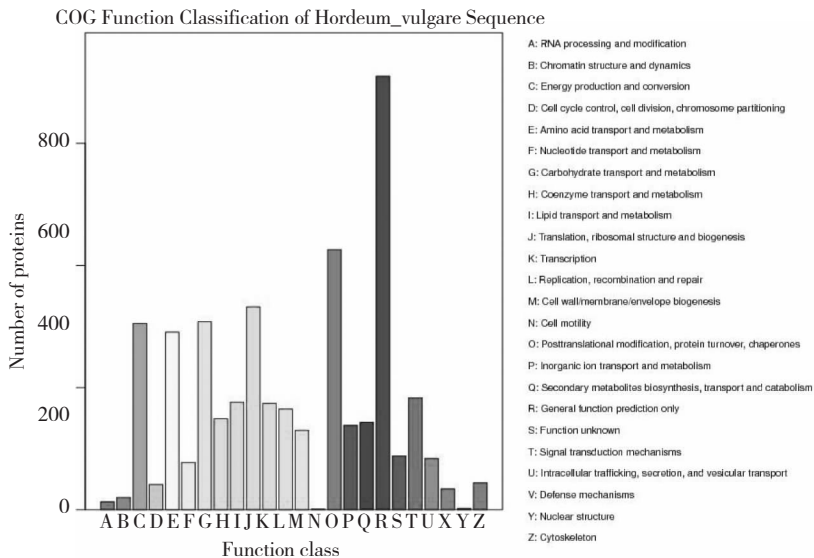


图 5 青稞叶组织蛋白序列 COG 功能分类

Fig.5 COG function classification of protein sequences in leaves

表 4 注释蛋白数目最多的钱 10 个代谢通路

Table 4 The top ten pathway with the largest number of protein

通路 Pathway	差异蛋白与通路注释 Different proteins with pathway annotation(5797)	通路 ID Pathway ID
Metabolic pathways	1674 (28.88 %)	ko01100
Biosynthesis of secondary metabolites	1019 (17.58 %)	ko01110
Plant-pathogen interaction	286 (4.93 %)	ko04626
Phenylpropanoid biosynthesis	241 (4.16 %)	ko00940
Plant hormone signal transduction	220 (3.8 %)	ko04075
Ribosome	200 (3.45 %)	ko03010
Spliceosome	195 (3.36 %)	ko03040
RNA transport	177 (3.05 %)	ko03013
Protein processing in endoplasmic reticulum	176 (3.04 %)	ko04141
Phenylalanine metabolism	156 (2.69 %)	ko00360

在叶片中根组织中有 3239 个蛋白注释到 125 条通路上。表 5 显示叶片蛋白数目最多的前 10 个通路信息,其中涉及生物代谢、次生物质生物合成、核糖体、内质网蛋白加工、苯丙烷类生物合成等通路。结果表明在氮应激反应中,这些途径中的蛋白在各自的组织中积极参与氮胁迫下的分子调控机制。根组织和叶组织中鉴定的蛋白被注释的功能和通路虽存在差异,但整体比例大致相同。氮素经根部吸收,从茎部运输给其他组织,氮素含量减少或者过多,会导致氮素的运输不正常,分配不均,导致各部位均有所改变,其蛋白作相应的抵御。

2.5 差异表达蛋白统计分析

试验将不同氮素处理青稞苗的蛋白组进行比较,统计结果如图 6,在根组织中,适氮处理与缺氮处理之间 (ON-Vs-FN) 存在差异表达蛋白 1518 个,

其中 810 个上调表达,708 个下调表达;适氮处理与高氮处理 (ON-Vs-HN) 存在差异表达蛋白 900 个,其中 375 个上调表达,525 个下调;适氮处理与低氮处理 (ON-Vs-LN) 存在差异表达蛋白 1279 个,其中 692 个上调表达,587 个下调。在叶片组织中,适氮处理与缺氮处理 (ON-Vs-FN) 存在差异表达蛋白 1384 个,其中 692 个上调表达,587 个下调;适氮处理与高氮处理 (ON-Vs-HN) 存在差异表达蛋白 964 个,其中 406 个上调表达,559 个下调;适氮处理与低氮处理 (ON-Vs-LN) 存在差异表达蛋白 1224 个,其中 698 个上调表达,528 个下调。在根和叶中不同处理比较存在的差异蛋白整体上是相近的,在氮素含量减少时,上调蛋白大于下调蛋白数量,在氮素含量超标时,上调蛋白小于下调蛋白数量。说明在青稞氮应激机制中,缺氮时以蛋白的正调控为主,复

表 5 注释蛋白数目最多的钱 10 个代谢通路

Table 5 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(3239)	通路 ID Pathway ID
Metabolic pathways	1116 (34.46 %)	ko01100
Biosynthesis of secondary metabolites	674 (20.81 %)	ko01110
Ribosome	156 (4.82 %)	ko03010
Protein processing in endoplasmic reticulum	106 (3.27 %)	ko04141
Phenylpropanoid biosynthesis	105 (3.24 %)	ko00940
Starch and sucrose metabolism	97 (2.99 %)	ko00500
Oxidative phosphorylation	95 (2.93 %)	ko00190
Plant-pathogen interaction	92 (2.84 %)	ko04626
RNA transport	91 (2.81 %)	ko03013
Glycolysis / Gluconeogenesis	91 (2.81 %)	ko00010

氮时以蛋白的负调控为主。

2.6 差异表达蛋白 GO 富集分析

研究对不同氮浓度诱导的青稞根的差异蛋白进行 GO 显著富集分析,图 7 显示,4 个处理下差异蛋白注释功能最多的是生物过程,然后是细胞组分和分子功能。在生物过程中涉及 20 个 GO 功能类别,注释最多的代谢过程、细胞内过程、单组织过程类别;在细胞组分中涉及 15 个 GO 功能类别,注释最多的是细胞、细胞组分及细胞器类别;在分子功能中涉及 12 个 GO 功能类别,注释差异蛋白数量最多的是结合、催化活性类别。共富集到 47 个功能项中。

3 讨论

目前,转录水平与蛋白水平的测序手段已广泛地运用到植物的抗逆境研究中,转录组与蛋白组会存在紧密的联系,但并不是一一对应的。在植物的生长发育过程中,其生理代谢是极其复杂的,存在几

个或者几十个乃至几百个基因可能都是共同作用调控某种蛋白质的合成。基因的转录会受蛋白翻译调控、翻译后的调控等,因此转录水平并不能代表蛋白质的表达情况。在 2016 年已有相关报道西藏青稞在氮胁迫下的转录组分析,ON 分别与 FN、LN、HN 鉴定出 2428、1274、1861 个差异基因<sup>[15]</sup>。在蛋白组数据结果中,对照与缺氮处理存在差异蛋白最多,与转录组相似。在本试验差异蛋白统计分析中,在氮素含量过多过少时,上调蛋白与下调蛋白数量存在差异,缺氮时以蛋白的正调控为主,复氮时以蛋白的

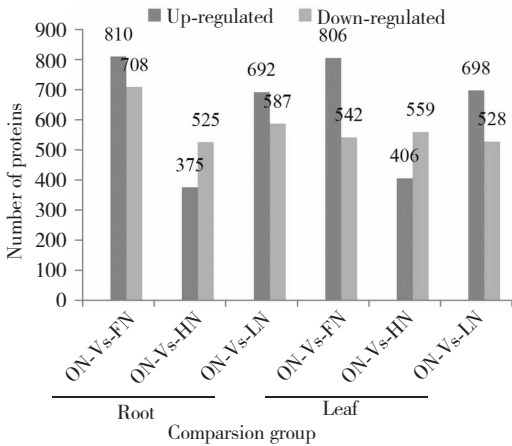


图 6 差异表达蛋白数量统计  
Fig. 6 Statistics of difference protein

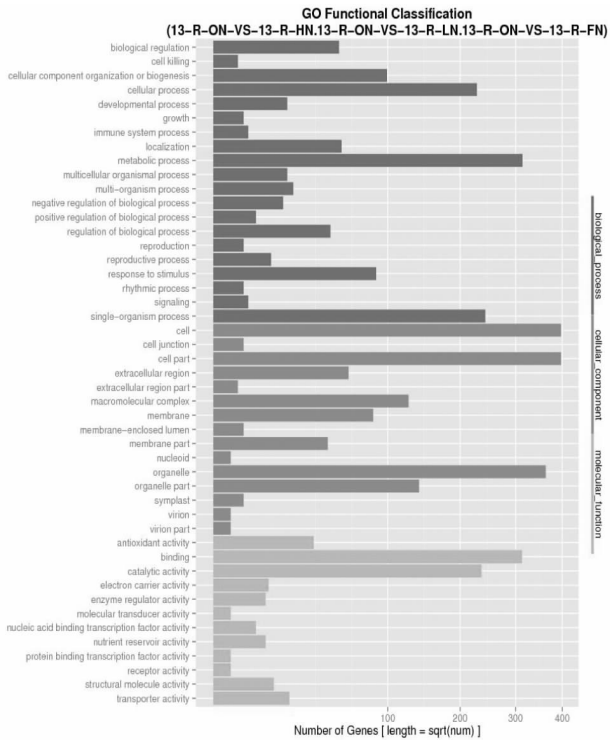


图 7 差异表达蛋白 GO 显著性富集分析  
Fig. 7 GO analysis of differential expressed proteins

负调控为主,认为缺氮和复氮应激反应的潜在调控模式是存在着差异。一个植株不同组织其蛋白的表达是不尽相同的,西藏青稞中根叶两个组织其差异蛋白谱虽整体分布趋势相似,但存在差异。说明蛋白的表达是存在组织特异性的,不同组织对逆境胁迫做出的反应有所差别。已有研究报道,低氮胁迫下烟草差异蛋白共筛选到 5 个蛋白<sup>[16]</sup>,其中有一个 MCM 蛋白属于小染色体修复蛋白<sup>[17]</sup>,而该蛋白的减少说明低氮下 DNA 的复制能力有可能下降,随即影响细胞乃至植株的生长发育,在本试验中,被鉴定的蛋白有 10.26 % 的被注释到了复制/重组/修复 (Replication, recombination and repair),说明在氮元素波动的情况下,会影响部分蛋白的复制重组及修复功能,从而影响了青稞的生长发育。本实试验中氮胁迫下存在的差异表达蛋白被注释生物过程下 GO 条目最多,其中代谢途径占得比例是最大的,具体涉及次生代谢产物生物合成、无机离子运输和代谢、碳水化合物运输和代谢等途径中,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。已有研究表明,在低氮胁迫下,黄瓜叶片内存在一些蛋白质的变化,导致光合能力下降,认为氮胁迫会直接影响植物的光合作用<sup>[18]</sup>;探究黄瓜响应氮饥饿的信号相关基因研究中,低氮胁迫下,乙烯和生长素通过 MYB12 转录因子调控花青素积累,光合体系也发生了变化<sup>[19]</sup>。在本试验中氮胁迫下存在差异表达蛋白,发现有大量的光系统蛋白会对氮胁迫作出应激反应。本研究确定了青稞在氮胁迫下的部分应激蛋白及相关 GO 条目,揭示了其在不同氮处理下的蛋白表达响应机制,为其找到调节植物氮浓度不稳定时的关键调节蛋白提供数据基础,为作物的遗传改良提供重要的理论依据,为以后其他作物研究氮胁迫调控机制提供丰富的数据。

## 参考文献:

- [1] Krapp A. Plant nitrogen assimilation and its regulation; a complex puzzle with missing pieces[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2015, 25:115 - 122.
- [2] Wang Y Y, Hsu P K, Tsay Y F. Uptake, allocation and signaling of nitrate[J]. *Trends in Plant Science*, 2012, 17(8):458 - 467.
- [3] Zhao D, Reddy K R, Kakani V G, et al. Nitrogen deficiency effects on plant growth, leaf photosynthesis, and hyperspectral reflectance properties of sorghum[J]. *European Journal of Agronomy*, 2005, 22(4):391 - 403.
- [4] Lu C, Zhang J, Zhang Q, et al. Modification of photosystem II photochemistry in nitrogen deficient maize and wheat plants[J]. *Journal of*

- Plant Physiology*, 2001, 158(11):1423 - 1430.
- [5] McCullough D E, Girardin P, Mihajlovic M, et al. Influence of N supply on development and dry matter accumulation of an old and a new maize hybrid. [J]. *Canadian Journal of Plant Science*, 1994, 74(3):471 - 477.
- [6] Pandey R K, Maranville J W, Admou A. Deficit irrigation and nitrogen effects on maize in a Sahelian environment; I. Grain yield and yield components[J]. *Agricultural Water Management*, 2000, 46(1):15 - 27.
- [7] Tian Q, Chen F, Liu J, et al. Inhibition of maize root growth by high nitrate supply is correlated with reduced IAA levels in roots[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2008, 165(9):942 - 951.
- [8] Wingler A, Purdy S, Maclean J A, et al. The role of sugars in integrating environmental signals during the regulation of leaf senescence[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2006, 57(2):391 - 399.
- [9] Zhang Q. Inaugural Article: Strategies for developing Green Super Rice[J]. *Proceedings of the National Academy of Science*, 2007, 104(104):16402 - 16409.
- [10] Saiz-Fernán I, De D N, Sampedro M C, et al. High nitrate supply reduces growth in maize, from cell to whole plant[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2015, 173:120 - 129.
- [11] Zhang H, Jennings A, Barlow P W, et al. Dual Pathways for Regulation of Root Branching by Nitrate[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999, 96(11):6529 - 6534.
- [12] Wang R C, Guegler K, Labrie S T, et al. Genomic analysis of a nutrient response in Arabidopsis reveals diverse expression patterns and novel metabolic and potential regulatory genes induced by nitrate[J]. *Plant Cell*, 2000, 12(8):1491 - 1509.
- [13] Byungkee B, Steven U. Barley for food: Characteristics, improvement, and renewed interest[J]. *Journal of Cereal Science*, 2008, 48(2):233 - 242.
- [14] Zeng X, Long H, Wang Z, et al. The draft genome of Tibetan hulless barley reveals adaptive patterns to the high stressful Tibetan Plateau[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015, 112(4):1095 - 1100.
- [15] Wei Z, Zeng X, Qin C, et al. Comparative Transcriptome Analysis Revealed Genes Commonly Responsive to Varied Nitrate Stress in Leaves of Tibetan Hulless Barley[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7(298).
- [16] 许俐. 低氮胁迫下烟草叶片差异表达蛋白的筛选及鉴定[D]. 郑州:河南农业大学, 2013.
- [17] Forsburg S L. Eukaryotic MCM Proteins; Beyond Replication Initiation[J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2004, 68(1):109 - 131.
- [18] 冯卓. 低氮胁迫下黄瓜幼苗差异表达基因鉴定与蛋白质组学分析[D]. 哈尔滨:东北农业大学, 2012.
- [19] Zhao W, Yang X, Yu H, et al. RNA-Seq-based transcriptome profiling of early nitrogen deficiency response in cucumber seedlings provides new insight into the putative nitrogen regulatory network[J]. *Plant & Cell Physiology*, 2015, 56(3):455.