果 树 学 报 2019,36(9):1101-1111
Journal of Fruit Science

DOI:10.13925/j.cnki.gsxb.20190208

‘鸭梨’及其自交亲和性突变体‘金坠梨’花粉蛋白质组比较分析

沈 辉[1],殷亚蕊[2],武军凯[2],王海静[2],黄 佳[2],左 波[2],张立彬[2],于凤鸣[1*]

([1]河北科技师范学院农学与生命科技学院,河北秦皇岛 066004;[2]河北科技师范学院园艺科技学院,河北秦皇岛 066004)

摘 要:【目的】分析‘鸭梨’和‘金坠梨’花粉蛋白差异,探讨‘金坠梨’花粉侧自交亲和突变的机制。**【方法】**以‘鸭梨’及其自交亲和性芽变‘金坠梨’花粉为材料,利用双向电泳技术(two-dimensional electrophoresis,2-DE)对二者花粉总蛋白进行分离,并对差异蛋白进行功能和质谱分析,通过qRT-PCR进行相关差异基因的表达验证。**【结果】**分离得到23个差异蛋白,其中14个蛋白在‘金坠梨’中上调表达,9个蛋白在‘金坠梨’下调表达;对其中差异显著的10个蛋白点质谱检测结果表明,1个为半胱氨酸甲基转移酶(cysteine S-methyltransferase,4 803),1个为存储蛋白(Storage protein,5 413),4个为蛋白酶类:果糖激酶(fructokinase,5 316)、顺乌头酸水合酶(aconitate hydratase,5 811)、烯酰-ACP-还原酶(Enoyl-ACP reductase,7 303)和JPR ORF1蛋白(JPR ORF1 protein,7 506),4个为HSP家族蛋白:HSP70伴侣26(HSP70-type chaperone 26,8 633)、HSP 90.5(8 822)和2个ER结合蛋白(ER-binding protein,4 209和8 805)。这些蛋白涉及到遗传信息处理、碳水化合物代谢、能量代谢、酶和氨基酸代谢等生理过程;qRT-PCR对8个基因进行验证,发现部分基因在蛋白水平与基因表达水平有明显差异。这些差异的蛋白在不同的信号途径中参与了‘金坠梨’花粉侧自交亲和突变。**【结论】**明确了‘鸭梨’和‘金坠梨’花粉侧自交亲和性突变中差异表达蛋白,为进一步研究梨亚科自交不亲和性的调控机理提供理论依据。

关键词:梨;花粉;自交不亲和;双向电泳;蛋白质组学

中图分类号:S661.2 **文献标志码:**A **文章编号:**1009-9980(2019)09-1101-11

Comparative proteome analysis of pollens from ‘Yali’ pear and its self-compatible mutant, ‘Jinzhui’ pear

SHEN Hui[1], YIN Yarui[2], WU Junkai[2], WANG Haijing[2], HUANG Jia[2], ZUO Bo[2], ZHANG Libin[2], YU Fengming[1*]

(*[1]College of Life Science and Technology, Hehei Normal University of Science&Technology, Qinhuangdao 066004, Hebei, China; [2]College of Horticultural Science and Technology, Hehei Normal University of Science&Technology, Qinhuangdao 066004, Hebei, China*)

Abstract:【Objective】The differentially expressed proteins of pollens from ‘Yali’ pear (self-incompatibility) and ‘Jinzhui’ pear (self-compatible mutant of ‘Yali’) were analyzed, and the mechanism of self-compatible mutation in ‘Jinzhui’ pear was discussed.【Methods】The pollens of ‘Yali’ pear and self-compatible pollen-part mutant ‘Jinzhui’ pear were used as the materials, and the pollen proteins were separated. Thereafter, the proteins were tested by dyeing technology and BIO-RAD GS-900 Calibrated Densitometer scanning. PDQuest 8.0.1 software was used to analyze the gel images, and the differential protein spots were obtained. The differentially expressed proteins were finally identified through enzymatic hydrolysis of differentially expressed proteins and LC-MS/MS analysis in the UniProt database. The raw file of mass spectrometry data was processed by the Mascot software, and meanwhile the quality of data was controlled. The results of identified proteins were obtained. Using the online website NCBI and Gene Ontology Database (GO), the identified proteins were compared and analyzed according to

收稿日期:2019-05-09 接受日期:2019-06-10

基金项目:国家自然科学基金(31401853)

作者简介:沈辉,女,硕士,主要从事果树遗传育种与分子生物学研究。Tel:18733519285,E-mail:1055407883@qq.com

*通信作者 Author for correspondence。Tel:13503238763,E-mail:yfm8371@163.com

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

cell components, biological processes and molecular functions. Protein sequences were submitted to Kyoto Encyclopedia of Gene and Genomes (KEGG) and bi-directional best hit (BBH) method was used to compare similarities to find the most similar proteins and determine the KO (KEGGORTHOLOG) classification of retrieval proteins. According to the gene sequences of differential proteins, gene-specific primers were designed by NCBI on-line primer design tool Primer-BLAST, and the transcription level of related genes was verified by qRT-PCR.【Results】The results of two-dimensional electrophoresis (2-DE) of total pollen proteins showed that the protein spots were clearly visible and the separation quality was high. It was found that the protein spots were mainly distributed in the region of pH 3-10, the relative molecular weights were about 10-200 kDa, and about 550 protein spots could be detected. Using PDQuest 8.0.1 software, 23 differential proteins were isolated. All the differential proteins were mainly concentrated in isoelectric points (pH): 5-8, relative molecular weights (Mr): 40-200 kDa. Fourteen of the proteins were up-regulated in ‘Jinzhui’ pear, and their numbers were 3 504, 4 209, 4 307, 4 616, 5 316, 5 411, 5 413, 5 704, 5 717, 6 808, 7 103, 7 303, 7 419 and 8 805, respectively. Nine proteins were down-regulated in ‘Jinzhui pear, and their numbers were 4 401, 4 803, 5 802, 5 811, 6 611, 7 506, 8 633, 8 822 and 9 301, respectively. According to the expression levels of different proteins, the differences in 14 up-regulated proteins and 9 down-regulated proteins in ‘Jinzhui’ pear were analyzed. It was found that the expression levels of six proteins, 4 209, 4 616, 5 316, 5 413, 7 303 and 8 805, were extremely significantly higher ($p < 0.01$) than those of ‘Yali’ pear, while the expression levels of eight other differential proteins, 3 504, 4 307, 5 411, 5 704, 5 717, 6 808, 7 103 and 7 419, were significantly higher ($p < 0.05$) than those of ‘Yali’ pear. Among the 9 down-regulated differentially expressed proteins in ‘Jinzhui’ pear pollen, 4 differentially expressed proteins (5 802, 5 811, 8 633 and 8 822) were extremely significantly lower ($p < 0.01$) than those in ‘Yali’ pear, and 5 (4 401, 4 803, 6 611, 7 506 and 9 301) were significantly lower ($p < 0.05$) than those in ‘Yali’ pear. Twenty-three differentially expressed proteins were isolated by PDQuest 8.0.1 software, and fourteen of which were up-regulated and nine were down-regulated. Mass spectrometry was used to detect 10 protein spots of 23 differentially expressed proteins, including 1 amino acid: DL-methionine（4 803）, 1 hexamerin (5 413), 4 enzymes: fructokinase, (5 316), aconitate hydratase, (5 811), Enoyl-ACP reductase (7 303) and JPR ORF1 protein (7 506), and four HSP family proteins: HSP70-type chaperone 26 (8 633), HSP90.5 (8 822) and two ER-binding proteins (4 209, 8 805). Through GO annotation, 10 differential proteins were successfully annotated. According to molecular functional MF classification, the five proteins numbered 4 803, 5 316, 5 811, 8 633 and 8 822 belonged to the specific biological process. The 10 differential proteins could be divided into five functional groups by KEGG annotation, including genetic information processing (4 209, 8 633, 8 805 and 8 822), carbohydrate metabolism (5 316 and 5 811), energy metabolism (5 413), enzyme (7 303 and 7 506) and amino acid metabolism (4 803). The mRNA expression of fructokinase (5 316), unidentified protein (4 803) and HSP90.5 (8 822) in ‘Jinzhui’ pear were higher than those in ‘Yali’ pear by qRT-PCR. The expression levels of ER binding protein (4 209), enoyl-ACP-reductase (7 303), ER binding protein (8 805), HSP70 chaperone 26 and JPR ORF1 protein in ‘Jinzhui’ pear were lower than those in ‘Yali’ pear. Only HSP70 chaperon 26 (8 633), JPR ORF1 protein (7 506) and fructokinase (5 316) expressed consistently at protein level and transcriptional level. However, there were some differences in the expression of some proteins at both transcriptional level and protein level such as enoyl-ACP-reductase (7 303) and two ER-binding proteins (4 209 and 8 805) were up-regulated at the protein level, while down-regulated at the transcriptional level. Unidentified proteins (4 803) and HSP 90.5 (8 822) were down-regulated at the protein level, but up-regulated at the transcriptional level.

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

These results indicated that the transcription and translation of these protein genes were different.【Conclusion】The possible functions of differentially expressed proteins in‘Yali’pear (self-incompatibility) and‘Jinzhui’pear (self-compatible mutant of‘Yali’pear), identified by two-dimensional electrophoresis (2-DE) , were analyzed, and the correlation with the change of self-compatible mutation was also discussed. These results would provide important reference for further research on the mechanism of self-incompatibility in Pomnideae.

Key words: Pear; Pollens; Self-incompatibility; Two-dimensional; Proteomic

‘鸭梨’（*Pyrus bretschneideri* Rehd.‘Yali’）是我国古老栽培品种，属蔷薇科梨亚科苹果族梨属果树，自花授粉表现为自交不亲和性[1-2]。植物的自交不亲和性（Self-Incompatibility，SI）是指能产生功能正常且同期成熟雌雄配子的雌雄同株植物，在自花授粉或具有相同基因型花粉异花授粉时不能产生合子的现象和机制[3]。植物的自交不亲和性根据花粉SI表型遗传控制方式分为孢子体自交不亲和性（Sporophytic SI，SSI）和配子体自交不亲和性（Gametophytic SI，GSI）[4]。梨属果树（*Pyrus* L.）大多为配子体自交不亲和性，主要由花柱决定因子（S-RNase）和花粉决定因子（pollen-S）控制。此外，更多研究表明，自交不亲和识别机制也需要众多的修饰因子（非S因子）参与。目前，已经鉴定出的花柱修饰因子有120-K，HT-B，NaStEP等；花粉修饰因子有Cullin，SSK1，Rbx等[5]。由于蔷薇科植物大多属于木本植物，很难通过转基因技术实现基因功能的验证，所以自交亲和性突变体就成为研究蔷薇科果树自交不亲和机制的重要材料。

‘金坠梨’（*Pyrus bretschneideri* Rehd.‘Jinzhui’）是‘鸭梨’的花粉侧自交亲和性突变体，自花结实率高，不需人工授粉，且其他特性与‘鸭梨’基本一致，因此在生产和科研工作中极具应用价值[6]。‘鸭梨’及其芽变‘金坠梨’花粉的研究内容主要集中在自花授粉表现、花柱抗氧化酶活性、MDA含量等生理生化角度研究，或是非*S*基因*SSK*，*Cullin*同源基因的研究[7-9]。研究方法大多为生理生化、遗传群体、同源基因克隆等数据的统计和分析，而利用蛋白质组学方法对果树上基因突变引起自交不亲和性的相关研究鲜有报道[10-12]。

笔者将蛋白质组学技术应用于自交不亲和性‘鸭梨’与亲和性‘金坠梨’的花粉差异蛋白质的研究，利用双向电泳和质谱分析技术，对其差异蛋白质组进行研究，通过荧光定量PCR技术进行验证，分析关键蛋白表达水平的差异，以期发现相关蛋白质，为自交不亲和机制后续研究提供理论依据，为蔷薇科自交亲和性果树育种奠定基础。

1　材料和方法

1.1　植物材料及取样

‘鸭梨’和其芽变品种‘金坠梨’花粉采集于北京市顺义区大孙各庄基地。所有花粉在散粉前于铃铛期（2016年4月）进行集中采集，采集后将二者花粉置于室温内进行散粉，收集花粉并将花粉储存于−80 ℃冰箱备用。

1.2　花粉蛋白质提取及定量

采用TCA-丙酮法提取‘鸭梨’及‘金坠梨’花粉总蛋白质并稍作修改：从−80 ℃冰箱取花粉0.2 g，在液氮中充分研磨，加入1 mL预冷的10% TCA-丙酮（含10%的三氯乙酸，0.1% DTT），充分混匀后，于−20 ℃静置过夜。4 ℃，12 000 r·min^{-1}离心30 min，弃上清液，加入1 mL的丙酮（含0.1% DTT），充分溶解混匀后，静置于−20 ℃，1 h，重复5次。用预冷的80%丙酮重悬沉淀，充分混匀后置于−20 ℃，1 h，4 ℃，12 000 r·min^{-1}离心30 min，弃上清液，将沉淀物真空干燥，直至凝结成粉末。置于−80 ℃冰箱保存备用。

按照1 mg粗蛋白质干粉加20 μL水化上样缓冲液（含7 mol·L^{-1}尿素，2 mol·L^{-1}硫脲，4% CHAPS，65 mmol·L^{-1} DTT，0.2% Bio-Lyte，0.001%溴酚蓝）溶解，涡旋至糊状，4 ℃下溶解6~7 h，12 000 r·min^{-1}、4 ℃离心30 min后取上清，再14 000 r·min^{-1}离心10 min后取上清，即得蛋白质样品，最后分装在1.5 mL离心管，−20 ℃保存待用。参照Bradford[13]法测定样品蛋白质含量，并进行标准曲线的制作，标准蛋白为牛血清蛋白（BSA）。

1.3　蛋白质双向电泳

参照Bio-Rad双向电泳实验指南，取1 mg总蛋白与水化液（含7 mol·L^{-1}尿素，2 mol·L^{-1}硫脲，4% CHAPS，65 mmol·L^{-1} DTT，0.2% Bio-Lyte，0.001%溴

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

酚蓝）充分混合，上样总体积为450 μL，使用长度24 cm、pH 3~10的线性IPG胶条，于室温放置30~60 min。

在20 ℃恒温下，在BIO-RAD PROTEAN iI2 IEF System电泳仪上进行第一向等电聚焦电泳：30 V 6 h；60 V 6 h；100 V 30 min；250 V 30 min；500 V 30 min；1 000 V 30 min；4 000 V 2 h；10 000 V 3 h；10 000 V 120 000 Vh；500 V任意时间。之后，先将IPG胶条放入平衡缓冲液I（含0.375 mol·L^{-1} pH 8.8 Tris-HCl，6 mol·L^{-1}尿素，20%甘油，2% SDS,1% DTT）中平衡15 min，及平衡缓冲液II（含0.375 mol·L^{-1} pH 8.8 Tris-HCl，6 mol·L^{-1}尿素，20%甘油，2% SDS,4%碘乙酰胺）中平衡15 min。IPG胶条平衡后，在电极缓冲液（含25 mmol·L^{-1} Tris碱，195 mmol·L^{-1}甘氨酸，0.1% SDS）中进行第二向12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶垂直电泳。第二向电泳采用BIO-RAD PROTEAN Ⅱxi凝胶分离系统电泳仪上进行。电泳参数设置：低电流10 mA·gel^{-1}预电泳1 h；待样品完全走出IPG胶条，浓缩成一条线后，用20 mA·gel^{-1}·24 cm^{-1}电流，待溴酚蓝指示剂到达底部边缘，停止电泳。

1.4 改良胶体考染以及凝胶图像

采用饶维桥等[14]考马斯亮蓝G-250染色法进行染色。用BIO-RAD GS-900 Calibrated Densitometer扫描采集考染后的胶，参数设定为透射扫描获取图像。利用PDQuest 8.0.1软件对获取的凝胶图像进行分析。将所有的图谱都进行Boolean分析，比较蛋白质点差异。

1.5 差异蛋白的酶解处理及酶解肽段LC-MS/MS质谱分析

将获得的差异蛋白质点，从凝胶中切下，并放入EP管，经过脱色、酶解、抽提、脱盐处理获得酶解样品。使用高效液相色谱仪Q-Exactive质谱系统对多肽混合物进行质谱检测，获取的质谱数据在uniprot数据库（uniprot-Maloideae48203_201706 database）进行检索，质谱原始文件采用Mascot软件搜库处理，采用Scaffold软件对搜库结果进行质控，最后得到鉴定的蛋白质结果。

1.6 差异表达蛋白质的功能分析

蛋白质谱的结果利用在线网站NCBI（http://www.ncbi.nlm.nil.gov/）和Gene Ontology Database（GO），按照细胞组分、生物学过程、分子功能对已鉴定的蛋白进行比较分析。利用在线分析工具Kyoto Encyclopedia of Gene and Genomes（KEGG）Automatic Anootation Server（KAAS），提交蛋白质序列，采用bi-directional best hit（BBH）方法进行相似性比对，找到最相似的蛋白质，确定检索蛋白的KO（KEGGORTHOLOG）分类。

1.7 差异表达蛋白qRT-PCR分析

根据差异蛋白的基因序列，利用NCBI在线引物设计工具Primer-BLAST（http://www.ncbi.nlm.nil.gov/tools/primer-blast）设计基因特异引物（表1）。在BIO-RAD CFX-96 TOUCH荧光定量PCR仪上进行，每个反应重复3次。按照SYBR Premix EX Taq PCR试剂盒操作指导。

利用RNA提取试剂盒（EASY spin，Biomed）提取花粉总RNA，逆转录得到单链cDNA。分别选取蛋白质点对应的基因，进行半定量RT-PCR分析。PCR扩增程序：95 ℃，5 min；95 ℃，10 s；60 ℃，30 s；40个循环。采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算各差异表达基因表达量，用SPSS和Excel进行统计分析。

表1 qRT-PCR引物

Table 1 Primers used for qRT-PCR

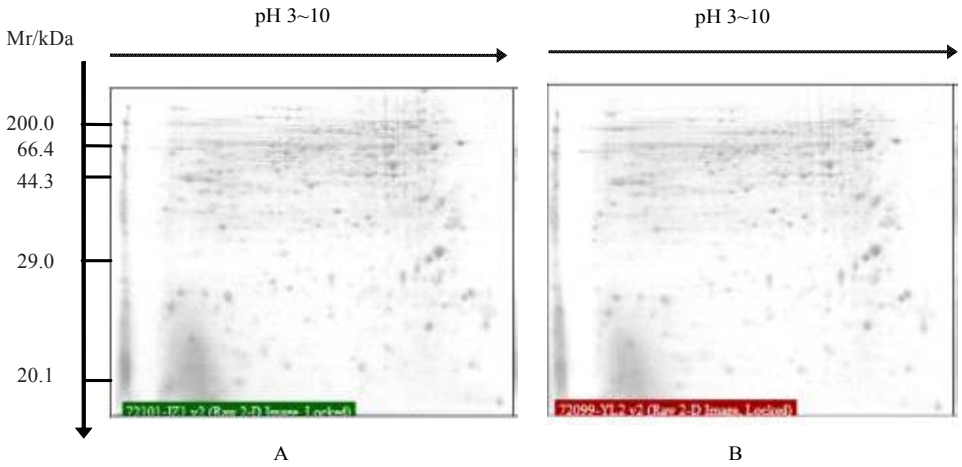
引物名称 Primer name	引物序列（5'-3'） Primer sequence
4 209	F：CAGAAGGACATGAAGCTTG R：AGTAACGACGGCATCCTTGA
4 803	F：GACCTGATGTCAACTTCTCC R：GAAAAGGACTTCTCAACACC
5 316	F：GGCACATGCTGATCAACA R：TAGCAACATGTCAGCACTAG
7 303	F：CACAAGAGCAATGTCAGGAG R：TATCCATGATCATCAGCCAC
7 506	F：TGTCACTCCTCGATATGCTC R：CAACATAATGTCAAGAGGTCG
8 633	F：GTACTACCAACTCATGCGTG R：GAAGTACCACTCTGAGCAATG
8 805	F：CAAGAGAGCACTCAGTAGC R：TCGCTTCTCCAAGCCAGCATC
8 822	F：TTGGAGATTCTGGTGAGCT R：GAAGTACCACTCTGAGCAATG

2 结果与分析

2.1 花粉总蛋白双向电泳的结果

按照上述操作步骤，提取‘金坠梨’和‘鸭梨’花粉的总蛋白进行了双向电泳，获得的双向电泳图谱（图1）蛋白点清晰可见，分离的质量很高。由图分析发现蛋白点主要分布在pH 3~10，相对分子质量

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net



A. 鸭梨花粉总蛋白 2-DE 图; B. 金坠梨花粉总蛋白 2-DE 图。

A. 2-DE gel of Yali pear pollen protein; B. 2-DE gel of Jinzhui pear pollen protein.

图 1　‘鸭梨’和‘金坠梨’花粉总蛋白 2-DE

Fig. 1　2-DE gel of ‘Yali’ pear and ‘Jinzhui’ pear pollen proteins

约为 10~200 kDa 区域，大约能检测到 550 个蛋白质点。实验得到了‘金坠梨’和‘鸭梨’花粉蛋白各 3 次重复的凝胶图谱，分离度、重复性良好，匹配率在 85%~95%。

2.2　花粉差异表达蛋白 PDQuest 分析

选取 95%置信度、1.5 倍差异的差异蛋白质点，用 PDQuest 8.0.1 软件分析‘鸭梨’和‘金坠梨’花粉 2-DE 电泳图进行分析，发现了 23 个差异表达蛋白质点，其分布和序列号已经标注（图 2），所有的差异蛋白点主要集中在等电点（pH）：5~8，相对分子质量

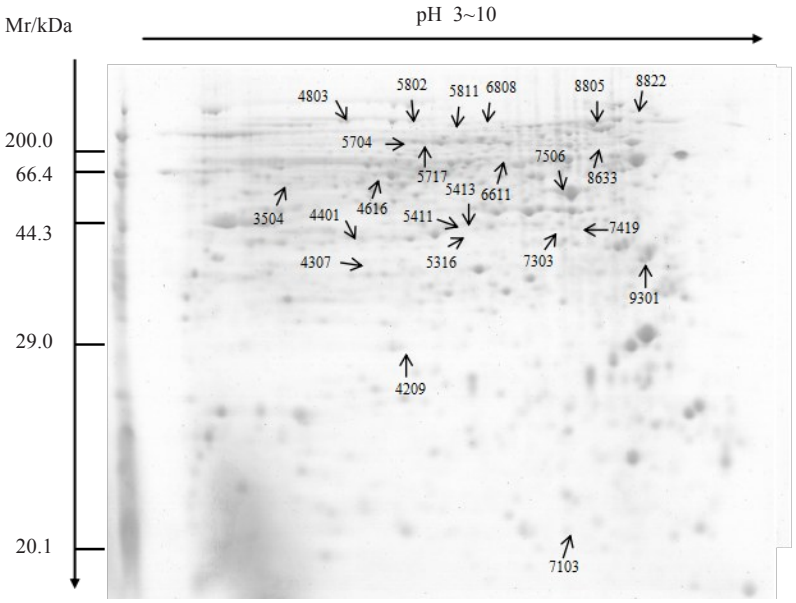


图 2　差异表达蛋白

Fig. 2　Differentially expressed proteins

（Mr）：40~200 kDa。差异蛋白点清晰，分辨率好，适合进行后续蛋白质鉴定实验。

在 23 个差异蛋白中，14 个蛋白在‘金坠梨’花粉中表达上调，其编号分别为 3 504、4 209、4 307、4 616、5 316、5 411、5 413、5 704、5 717、6 808、7 103、7 303、7 419 和 8 805。9 个蛋白在‘金坠梨’花粉中表达下调，其编号分别为：4 401、4 803、5 802、5 811、6 611、7 506、8 633、8 822 和 9 301（表 2）。

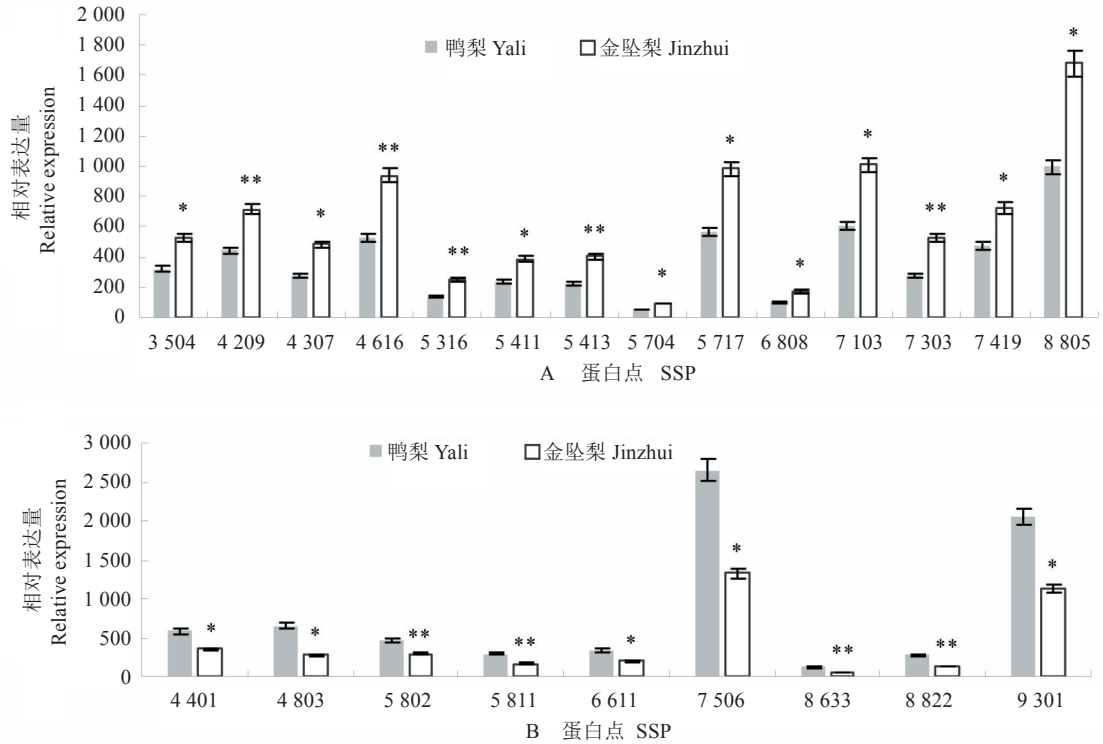
根据各个差异蛋白表达量，对这 14 个在‘金坠梨’花粉上调差异表达蛋白和 9 个下调差异表达蛋白进行差异性分析（图 3）。发现在上调蛋白中，6 个蛋白（4 209、4 616、5 316、5 413、7 303 和 8 805）的表

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

表 2 差异表达蛋白

Table 2 Differentially expressed proteins

序号 SSP	调节 Regulation	鸭梨 Yali	组数 Number of Group	组内差异 Group Coefficient of Variantion/%	金坠梨 Jinzhui	组数 Number of group	组内差异 Group coefficient of variantion/%
3 504	上调 Up-regulated	321.1	3	18.70	521.6	3	8.80
4 209	上调 Up-regulated	441.3	2	4.40	713.5	3	3.90
4 307	上调 Up-regulated	281.5	3	27.40	481.9	3	14.80
4 616	上调 Up-regulated	531.4	3	14.00	938.6	3	14.00
5 316	上调 Up-regulated	132.7	2	2.40	248.8	3	15.10
5 411	上调 Up-regulated	238.1	3	25.90	382.7	3	13.50
5 413	上调 Up-regulated	219.7	3	27.60	405.7	3	2.60
5 704	上调 Up-regulated	53.9	3	29.40	92	3	12.80
5 717	上调 Up-regulated	569	3	14.30	982.6	3	20.10
6 808	上调 Up-regulated	98.9	3	25.40	170.4	3	21.10
7 103	上调 Up-regulated	607.1	3	19.70	1 008.5	3	13.70
7 303	上调 Up-regulated	273.7	3	13.80	521.6	3	4.90
7 419	上调 Up-regulated	477.5	3	14.10	724.8	3	11.80
8 805	上调 Up-regulated	995.6	3	11.70	1 681.1	3	13.30
4 401	下调 Down-regulated	580	3	14.50	347.4	3	25.50
4 803	下调 Down-regulated	647.4	3	26.00	279.9	3	21.40
5 802	下调 Down-regulated	466	3	0.80	289.7	3	21.80
5 811	下调 Down-regulated	291	3	13.20	161.6	3	17.90
6 611	下调 Down-regulated	334.1	3	12.20	200.9	3	24.20
7 506	下调 Down-regulated	2 652.7	3	15.80	1 324.9	3	20.70
8 633	下调 Down-regulated	118.7	3	16.00	50.9	2	8.40
8 822	下调 Down-regulated	277.7	3	11.90	129.2	3	26.40
9 301	下调 Down-regulated	2 041.9	3	12.50	1 122.6	3	20.80
3 504	上调 Up-regulated	321.1	3	18.70	521.6	3	8.80
4 209	上调 Up-regulated	441.3	2	4.40	713.5	3	3.90



显著性水平：*，$p < 0.05$；**，$p < 0.01$; A. 上调表达蛋白; B. 下调表达蛋白。

Levels of significance : *，$p < 0.05$; **，$p < 0.01$; A. Up-regulated proteins；B. Down-regulated proteins.

图 3 差异表达蛋白的相对表达量

Fig. 3 Relative abundance of differentially expressed proteins

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

达量极显著高于‘鸭梨’；其他8个差异蛋白（3 504、4 307、5 411、5 704、5 717、6 808、7 103和7 419）的表达量显著高于‘鸭梨’。而在9个‘金坠梨’花粉下调表达差异蛋白中，有4个差异蛋白（5 802、5 811、8 633和8 822）表达量极显著低于‘鸭梨’；有5个差异蛋白（4 401、4 803、6 611、7 506和9 301）差异性的表达量显著低于‘鸭梨’。

2.3　差异蛋白的质谱分析与鉴定

在发现的23个差异表达蛋白质点中，挖取10个差异蛋白质点，进行质谱分析。通过Uniprot Knowledge base、NCBI数据检索分析，得到10个蛋白质谱分析结果。质谱分析结果如下（表3）。

表3　差异蛋白质谱鉴定

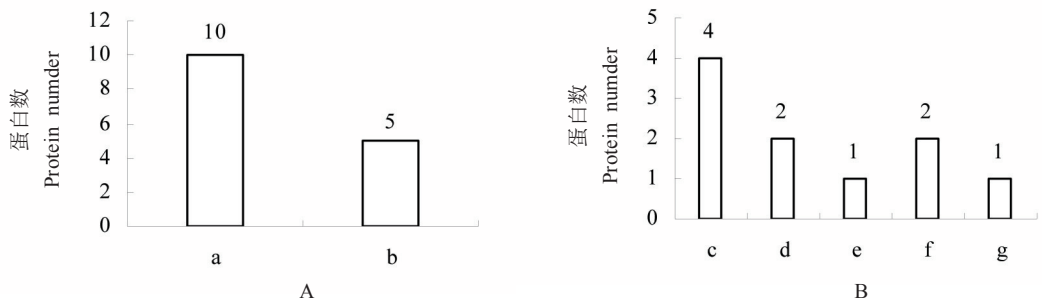
Table 3　Results of differentially expressed proteins by MS/MS

编号 SSP	蛋白名称 Identified proteins	序列号 Accession number	物种 Species	多肽数 Peptides	分子质量 Mr/Da	覆盖率 Percentage coverage/%
4 209	ER结合蛋白	A9UKE0_MALPM	苹果	2	73 573.20	3.30
	ER-binding protein		*Malus pumila*			
4 803	半胱氨酸甲基转移酶 Cysteine S-methyltransferase	M5WFB9_PRUPE	桃 *Prunus persica*	5	84 671.40	6.01
5 316	果糖激酶	M4QC20_PRUPE	桃	4	35 503.20	13.30
	Fructokinase		*Prunus persica*			
5 413	存储蛋白	M5VYX2_PRUPE,M5WIK4_PRUPE	桃	1	38 404.90	2.25
	Storage protein		*Prunus persica*			
5 811	顺乌头酸水合酶 Aconitate hydratase	M5VSW8_PRUPE	桃 *Prunus persica*	3	98 313.00	3.34
7 303	烯酰-ACP-还原酶 Enoyl-ACP reductase	M9T623_MALDO	苹果 *Malus pumila*	4	41 528.50	9.95
7 506	JPR ORF1 蛋白 JPR ORF1 protein	Q9ST36_PYRPY	梨 *Pyrus pyrifolia*	7	46 392.40	13.20
8 633	HSP70 型伴侣26 HSP70-type chaperone 26	A0A140B498_PRUPE,M5VP31_PRUPE	桃 *Prunus persica*	4	79 507.70	5.99
8 805	ER结合蛋白 ER-binding protein	A9UKE0_MALPM	苹果 *Malus pumila*	61	73 573.20	62.20
8 822	HSP90.5	A0A0N9P9N3_MALDO,A0A0N9PZU3_MALDO	苹果 *Malus pumila*	21	89 698.90	25.30

2.4　差异蛋白功能分析

对其中的10个差异表达蛋白进行GO分析和KEGG功能注释分析（图4）。

通过GO注释，10个差异蛋白均注释成功。按分子功能MF分类，其中编号为4 803，5 316，5 811，8 633，8 822的5个蛋白属于标注了具体生物学过程。经KEGG注释，这10个差异蛋白可以分为5个功能类群，包括遗传信息处理：ER结合蛋白



a. 分子功能；b. 生物学过程；c. 遗传信息处理；d. 碳水化合物代谢；e. 能量代谢；f. 酶；g. 氨基酸代谢。

a. Molecular function; b. Biological process; c. Genetic information; d. Carbohydrate metabolism; e. Energy metabolism; f. Enzymes; g. Amino acid metabolism.

图4　差异表达蛋白GO注释（A）和差异表达蛋白KEGG分类（B）

Fig. 4　GO functional analysis (A) and KEGG pathway analysis (B) of differentially expressed protein

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

(4 209)、HSP70型伴侣26(8 633)、ER结合蛋白(8 805)和HSP 90.5(8 822);碳水化合物的代谢:果糖激酶(5 316)和顺乌头酸水合酶(5 811);能量代谢:存储蛋白(5 413);酶:烯酰-ACP-还原酶(7 303)和JPR ORF1蛋白(7 506)和氨基酸代谢:半胱氨酸甲基转移酶(4 803)。

2.5 差异表达蛋白编码基因的转录分析

为进一步了解差异表达蛋白质编码基因在花粉上的转录水平,对其中8个表达差异较大的蛋白质进行qRT-PCR验证分析(图5)。选取的蛋白质包括ER结合蛋白(4 209)、烯酰-ACP-还原酶(7 303)、ER结合蛋白(8 805)、HSP70型伴侣26(8 633)、JPR ORF1蛋白(7 506)、果糖激酶(5 316)、半胱氨酸甲基转移酶(4 803)和HSP 90.5(8 822)。'金坠梨'中果糖激酶(5 316)、半胱氨酸甲基转移酶(4 803)、HSP 90.5(8 822)表达量均高于'鸭梨';'金坠梨'中ER结合蛋白(4 209)、烯酰-ACP-还原酶(7 303)、ER结合蛋白(8 805)、HSP70型伴侣26和JPR ORF1蛋白表达量均低于'鸭梨'。

只有HSP70型伴侣26(8 633)、JPR ORF1蛋白(7 506)和果糖激酶(5 316)3个差异蛋白质在蛋白水平上与转录水平上表达差异保持一致。但有些蛋白的转录水平与蛋白水平表达有明显差异,烯酰-ACP-还原酶(7 303)和2个ER结合蛋白(4 209、8 805)在蛋白表达水平上均为上调表达,而在转录水平上下调表达;半胱氨酸甲基转移酶(4 803)和HSP 90.5(8 822)在蛋白表达水平上均为下调表达,而在转录组表达水平上均为上调表达。

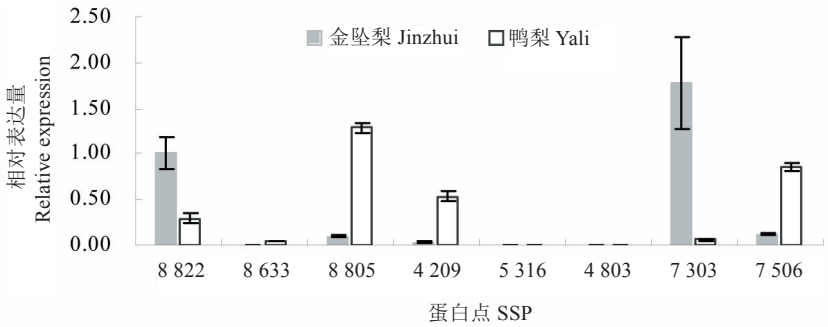


Fig. 5 qRT-PCR analysis of the differentially expressed proteins

3 讨 论

3.1 差异蛋白分析

本研究鉴定的10个差异蛋白功能各异,其中参与遗传信息处理的蛋白,包括HSP90.5(8 822)、HSP70伴侣26(HSP70-type chaperone 26)(8 633)和2个ER结合蛋白(ER-binding protein)(4 209、8 805),均为热激蛋白家族(Heat shock protein,HSP)。HSP大部分作为"分子伴侣"在新生多肽的折叠、成熟和运输,逆境胁迫受损蛋白的修复和重折叠中起着重要作用。按照SDS电泳分子量的不同可分5类:HSP110,HSP90,HSP70,HSP60和小分子量热激蛋白smHSP[15]。HSP70伴侣26蛋白属于HSP70家族,HSP90.5蛋白属于HSP90C亚家族。HSP90通常位于内质网上,在植物发育中表达,某些HSP90 mRNA在根冠,芽端,花及发育的花粉中表达量很高[16]。HSP90.5在'金坠梨'中下调,推测可能影响自交不亲和识别过程中相关蛋白的正常折叠和运输的功能,而导致自交亲和。HSP70家族则以与未折叠的蛋白质选择性和非共价的形式相互作用,在玉米和小麦中,定位于内质网、线粒体等细胞器中的伴侣26蛋白质需要在HSP70的结合下以非折叠的状态穿过亚细胞膜,使蛋白质保持没有活性的状态到达所需的位置。在'金坠梨'中,HSP70伴侣26蛋白表达量下降,具体参与自交不亲和的机制尚不清楚。

另外两个内质网结合蛋白(ER-binding protein)BiP家族同源蛋白(4 209、8 805),也属于热激蛋白家族,BiP最早由Galante等[17]发现。BiP在N端有一个ATP酶结构,同时在C端有一个蛋白结合域。这种特性使BiP能够通过ATP水解及ADP转换结合和释放未折叠蛋白[18]。BiP蛋白植物的C端存在一个KDEL/HDEL的内质网腔滞留信号,使BiP蛋白能够存留在内质网腔中。作为最主要的内质网分子伴侣

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

之一，BiP在蛋白质合成，折叠和装配中发挥了重要作用。烟草中BiP主要在含有分泌组织的花器官和快速分裂细胞所占比例较高的组织中转录积累[19]。此外，BiP具有结合Ca^{2+}的区域，是内质网中主要Ca^{2+}结合蛋白。Ca^{2+}常作为第二信使，参与生物体的很多生理过程。Ca^{2+}是花粉萌发及花粉管伸长所必需的，调控了花粉管延伸[20-21]。Ca^{2+}由于胞内外Ca^{2+}浓度相差大，花粉管在尖端区浓度分布不同，可能需要相关蛋白来实现Ca^{2+}的胞间运输，确保花粉管延伸。两个ER结合蛋白BiP（4 209、8 805），均在‘金坠梨’花粉中的表达量增多，推测可能参与花粉管相关蛋白从胞外将Ca^{2+}运输到花粉管细胞内部，以及其他Ca^{2+}相关蛋白的生理过程，进而影响了自交不亲和性的识别过程，需要进一步的试验进行验证相关功能。

顺乌头酸水合酶（5 811）、果糖激酶（fructokinase，5 316）均是参与碳水化合物代谢的相关蛋白。其中，果糖激酶是果糖分解代谢的关键酶，在植物组织代谢和分配中起到重要作用[22]，果糖激酶还可作为信号分子，通过影响植物生活周期来调控代谢和生长发育[23]。果糖激酶基因FRK属于pfkB碳水化合物激酶家族，这些基因与ATP和糖结合的区域高度保守。通过对番茄的SIFRK4启动子克隆和功能研究，发现SIFRK4是花粉发育过程中是一种重要调节基因[24]。定量PCR检测番茄三种不同部位FRK相关表达量，发现番茄雄蕊中*LeFRK4*是特有表达基因[25]。结合已有研究数据，我们推测果糖激酶在‘金坠梨’花粉中表达上调可能促进了花粉管伸长，导致了不亲和反应的紊乱。另外，顺乌头酸水合酶在三羧酸循环中，使顺乌头酸生成柠檬酸或异柠檬酸，是一个立体专一性可逆反应[26]，它能够使TCA反应进行，为植物提供能量以及中间各种代谢产物，为DNA的修复与复制、蛋白质的合成与分解等大分子代谢过程提供能量。实验中顺乌头酸酶在‘金坠梨’表达的降低，推测TCA循环和乙醛酸循环受到影响，从而使线粒体能量产生减低，可能间接影响不亲和反应的过程。

参与氧化还原反应的蛋白：烯酰-ACP还原酶（Enoyl-ACP reductase，ENR，7 303）和JPR ORF1蛋白（JPR ORF1 protein，7 506）都属于氧化还原反应酶。在脂肪酸合成代谢中，烯酰-ACP还原酶能够调节饱和与不饱和脂肪酸的含量[27]。脂肪酸代谢受逆境诱导表达，在抗胁迫方面起着重要作用。在‘金坠梨’中表达量升高，如何参与自交亲和机制尚不明确。JPR ORF蛋白（7 506）属于二氢嘧啶脱氢酶家族，催化CH-CH基团作为氢或电子供体，使$NADP^+$生成NADPH。NADPH也可用于合成脂质、胆固醇、延长脂肪酸链等合成代谢途径中。当JPR ORF蛋白酶表达下降时，可能导致光合作用减慢，干物质积累减少，但是如何影响‘金坠梨’自交不亲和性的反应机制需要进一步试验验证。

差异表达蛋白半胱氨酸甲基转移酶（4 803）参与了甲硫氨酸的生物合成，甲硫氨酸（DL-methionine）是植物必须的氨基酸，大部分合成的甲硫氨酸会转化成S-腺苷甲硫氨酸（SAM），是一种重要的含硫化合物，参与植物的生长发育调节，花粉萌发和花粉管生长等[28]。Chen等[29]在拟南芥突变株mat3（缺失SAMS3基因），发现花粉萌发、花粉管生长受抑制是由于SAM合成受到抑制。我们试验结果表明半胱氨酸甲基转移酶（4 803）含量降低，可能降低了甲硫氨酸的含量，从而减少了S-腺苷甲硫氨酸（SAM）的量，影响了‘金坠梨’花粉的萌发，产生了一定的败育率，与已报道研究结果吻合，具体分子机制需要试验进一步的验证[9]。

参与能量代谢相关蛋白：存储蛋白（Storage protein，5 413）一般是在种子发育后期大量的积累和合成，根据特性，可以分为清蛋白、球蛋白、谷蛋白和醇溶蛋白。在后期的种子萌发过程中逐渐降解。是幼苗生长发育期所需营养物质的来源。在玉米合子胚发育过程中，11-12S球蛋白大量积累于种子发育阶段，有利于后期萌发代谢的加速。本实验结果显示‘金坠梨’花粉中存储蛋白表达量高于‘鸭梨’，这类蛋白可能为花粉的发育提供能量，从而促进‘金坠梨’花粉管的生长打破自交不亲和识别的限制。而这类蛋白同样也需要进行后续鉴定，通过功能试验验证是否参与了‘金坠梨’自交亲和性的改变。

3.2　基因转录水平与蛋白表达水平比较

HSP70型伴侣26（8 633）、JPR ORF1蛋白（7 506）和果糖激酶（5 316）在蛋白水平上与转录水平上表达差异保持一致。与‘鸭梨’花粉相比，HSP70型伴侣26（8 633）在蛋白水平上下调约2倍，而在转录水平上下调约60倍；JPR ORF1蛋白（7 506）在蛋白水平上下调约2倍，而在转录水平上下调约25倍；果糖激酶（5 316）在蛋白水平上上调2倍，在转录水平上

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

上调7倍。说明这3个蛋白mRNA表达与蛋白质的表达存在相关性。朱燕[30]在利用qRT-PCR实验验证不同EGCG含量的野生茶的9个差异蛋白试验中，发现一些基因的表达量与蛋白质表达量变化一致。宁传丽等[31]在研究了五倍体草莓及其十倍体叶片差异表达蛋白，qRT-PCR表达分析发现，4个差异表达蛋白表达量下降，其相应基因转录水平表达量也下降。这些试验也说明部分基因表达水平与蛋白水平具有较高的一致性。

与‘鸭梨’花粉相比，ER结合蛋白（4 209）、烯酰-ACP-还原酶（7 303）和ER结合蛋白（8 805）在‘金坠梨’花粉蛋白水平上表达均上调了约2倍，而在转录水平上表达分别下调了25倍、100倍和25倍。而半胱氨酸甲基转移酶（4 803）和HSP 90.5（8 822）在蛋白水平上均下调了约2倍，但在转录水平上分别上调35倍和2倍。可能与蛋白质的修饰作用和蛋白翻译的滞后性有关。目前研究也发现转录水平与翻译水平存在差异，认为各种转录、翻译及翻译后调控等因子影响了DNA转录成mRNA及翻译成蛋白质的过程[32-33]。事实上，转录水平与翻译水平并不完全一致，它们甚至拥有低于50%的关联性[34]。RNA翻译水平直接影响很多蛋白的表达水平，这些蛋白基因的转录水平不能影响其蛋白表达水平[35]。至于相关差异蛋白在梨自交亲和性突变过程中所起到的作用，尚需要后续试验进一步深入研究。

参考文献 References:

[1] 齐国辉，徐继忠，黄瑞红 . 自花结实鸭梨授粉受精过程中生理代谢变化规律研究[J]. 河北农业大学学报，2011，34(1)：42-46.
QI Guohui，XU Jizhong，HUANG Ruihong. Physiological metabolic role of self-compatibility of self-fruitfulness mutations of ‘Yali’ pear (*Pyrus bretschneideri* Rehd.) in the process of pollination and fertility[J]. Journal of Agriculture University of Hebei，2011，34(1): 42- 46.

[2] 滕元文 . 梨属植物系统发育及东方梨品种起源研究进展[J]. 果树学报，2017，34(3): 370-378.
TENG Yuanwen. Advances in the research on phylogeny of the genus *Pyrus* and the origin of pear cultivars native to East Asia [J]. Journal of Fruit Science，2017，34(3): 370-378.

[3] DE NETTANCOURT D. Incompatibility in angiosperms[J]. Sex Plant Reproduction ，1997，10:185-199.

[4] 胡彬，蒋建雄，易自力 . 植物配子体自交不亲和机制研究进展[J]. 中国农学通报，2012，28(18): 168-173.
HU Bin，JIANG Jianxiong，YI Zili. Advances on mechanisms of gametophytic self-incompatibility in plant[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin，2012，28(18): 168-173.

[5] 武军凯 . ‘金坠梨’自交亲和性分子遗传分析及 *MdSFBB9α* 和 *MdSFBB9β* 基因功能研究[D]. 北京：中国农业大学，2013.
WU Junkai. Molecular genetic analysis self-compatible ‘Jin Zhui’ and functional study of the pollen *S* genes *MdSFBB9α* and *MdSFBB9β* [D]. Beijing:China Agriculture University，2013.

[6] 吴华清，张绍铃，吴巨友，王迎涛，吴俊 . ‘金坠梨’自交亲和性突变机制的初步研究[J]. 园艺学报，2007，34(2): 295-300.
WU Huaqing，ZHANG Shaoling，WU Juyou，WANG Yingtao，WU Jun. Mutational mechanism of self-compatible pear cultivar ‘Jinzhui’ pear(*Pyrus bretschneideri*)[J]. Acta Horticulturae Sinica，2007，34(2): 295-300.

[7] 武军凯，王海静，吕换男，马聚泽，张颖，申晴，张立彬 . ‘鸭梨’及其自交亲和性芽变‘金坠梨’花粉转录组测序比较分析[J]. 果树学报，2018，35(8): 917-927.
WU Junkai，WANG Haijing，LÜ Huannan，MA Juze，ZHANG Ying，SHEN Qing，ZHANG Libin. Sequencing analysis of pollen transcriptome of ‘Yali’ and its spontaneous self-compatible mutant ‘Jinzhui’[J]. Journal of Fruit Science，2018，35(8): 917-927.

[8] XU C，LI M F，WU J K，GUO H，LI Q，ZHANG Y，CHAI J J，LI T Z，XUE Y B. Identification of a canonical SCF^{SLF} complex involved in S-RNase-based self-incompatibility of *Pyrus* (Rosaceae)[J]. Plant Molecular Biology，2013，81(3): 245-257.

[9] WU J K，LI M F，LI T Z . Genetic Features of the spontaneous self-compatible mutant，‘Jin Zhui’ (*Pyrus bretschneideri* Rehd.) [J]. PLoS One，2013，8 (10): e76509.

[10] TANAKA N，MATSUOKA M，KITANO H，ASANO T，KAKU H，KOMATSU S. Gidl，a gibberellin-insensitive dwarf mutant，shows altered regulation of probenazole- inducible protein (PBZI) in response to cold stress and pathogen attack[J]. Plant，Cell & Environment，2006，29(4): 619-631.

[11] WANG Z，ZHAO F，ZHAO X，GE H，CHAI L，CHEN S，PERL A，MA H. Proteomic analysis of berry-sizing effect of GA_3 on seedless Vitis vinifera[J]. Proteomics，2012，12(1): 86-94.

[12] ZHUANG W B，SHI T，GAO Z H，ZHANG Z，ZHANG J Y. Differential expression of proteins associated with seasonal bud dormancy at four critical stages in Japanese apricot[J]. Plant Biology，2013, 15(1): 233-242.

[13] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding[J]. Analytical Biochemistry，1976，72(1-2): 248-254.

[14] 饶维桥，肖伟敏，张继远，饶媛，訾金 . 改良的蛋白质电泳考马斯亮蓝染色方法研究[J]. 生物技术通报，2014(9): 58-64.
RAO Weiqiao，XIAO Weimin，ZHANG Jiyuan, RAO Yuan，ZI Jin. The research of an improved method for protein staining in electrophoresis with coomassie brilliant blue[J]. Biotechnology Bulletin，2014(9): 58-64.

[15] 柯世省 . 热激蛋白[J]. 生物学教学，2007，32(6): 7-9.

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

KE Shisheng. Heat shock protein[J]. Biology Teaching，2007，32 (6): 7-9.

[16] POULTER N S，BOSCH M，FRANKLIN-TONG V E. Proteins implicated in mediating self-incompatibility-induced alterations to the actin cytoskeleton of Papaver pollen[J]. Annals of Botany，2011，108(4): 659-675.

[17] 林晓东，傅家瑞，黄上志 . 发育中玉米胚结合蛋白（BiP）的动态变化及定位[J]. 热带亚热带植物学报，2004，12(2)：159-162.
LIN Xiaodong，FU Jiarui，HUANG Shangzhi. Changes and localization of binding protein (BiP) during maize embryo development[J]. Journal of Tropical and Subtropical Botany，2004，12 (2): 159-162.

[18] 汪虎 . 辣椒 *BiP* 家族基因特性分析及 *CaBiP1* 在非生物胁迫中的功能鉴定[D]. 杨凌：西北农林科技大学，2017.
WANG Hu. Characterization of *Bip* gene family of pepped(*capsicum annuum* L.) and the role of *CaBiP1* in response to abiotic stress [D]. Yangling：Northwest Agriculture and Foresty University，2017.

[19] DENECKE J，GOLDMAN M H，DEMOLDER J，SEURINCK J，BOTTERMAN J. The tobacco luminal binding protein is encoded by a multigene family[J]. The Plant Cell，1991，3: 1025-1035.

[20] BREWDAKER J L，KWACK B H. The essential role of calcium-ion in pollen germination and pollen tube growth[J]. American Journal of Botany，1963，50（9）: 859-865.

[21] PIERSON E S，MILLER D D，CALLAHAM D A，SHIPLEY A M，RIVERS B A，CRESTI M，HEPLER P K. Pollen tube growth is coupled to the extracellular calcium ion flux and the intracellular calcium gradient: effect of BAPTA-type buffers and hypertonic media[J]. The Plant Cell，1994，6: 1815-1828.

[22] GRANOT D. Role of tomato hexose kinase[J]. Functional Plant Biology，2007，34: 564-570.

[23] ROLLAND F，BONA-GONZALEZ E，SHEEN J. Sugar sensing and signaling in plants: Conserved and novel mechanism[J]. Annual Review Plant Biology，2006，57: 675-709.

[24] DAVID - SCHWARTZ R，WEI.NTRAUB L，VIBAVSKI R，ZEMACH H，MURAKHOVSKY L，SWARTZBERG D，GRANOT D. The SlFRK4 promoter is active only during late stages of pollen and anther development[J]. Plant Science，2013，199: 61-70.

[25] 王卫平，崔娜，于志海，白丽萍，李天来 . 番茄果实果糖激酶基因的克隆及其表达分析[J]. 华北农学报，2011，26(3):11-15.
WANG Weiping，CUI Na，YU Zhihai，BAI Liping，LI Tianlai. Cloning and expression analysis of fructokinase gene(*FRK*) from tomato fruit[J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica，2011，26 (3): 11-15.

[26] 赵赣，钱芳 . 顺乌头酸酶为何不宜被划分为异构酶[J]. 生物学通报，2012，47(12): 8-9.
ZHAO Gan，QIAN Fang. Why aconitase is not divided into isomerase[J]. Bulletin of Biology，2012，47(12): 8-9.

[27] 柳展基，唐桂英，单雷，毕玉平 . ENR 基因在高油和普通玉米自交系中的克隆和表达分析[J]. 华北农学报，2007，22(4)：1-4.
LIU Zhanji，TANG Guiying，SHAN Lei，BI Yuping. The cloning and expression analysis of *ENR* gene of High-oil and normal inbred lines in maize[J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica，2007，22(4): 1-4.

[28] 陈迪新，张绍铃 . 多胺及其合成抑制剂对梨花粉萌发及花粉管生长的影响[J]. 果树学报，2002，19 (6): 377-380.
CHEN Dixin，ZHANG Shaoling. Effects of polyamines and polyamine synthesis inhibitor on *in vitro* pollen germination and tube growth in pears[J]. Journal of Fruit Science，2002，19 (6): 377-380.

[29] CHEN Y，ZOU T，MCCORMICK S. S-adenosylmethionine synthetase 3 is important for pollen tube growth[J]. Plant Physiology，2016，172(1): 244-253.

[30] 朱燕 . 不同 EGCG 含量野生茶差异蛋白的分析与鉴定[D]. 广州：华南农业大学，2016.
ZHU Yan. Analysis and identification of differentially expressed proteins in wild tea with different EGCG content[D]. Guangzhou: South China Agricultural University，2016.

[31] 宁传丽，蔡斌华，王涛，乔玉山 . 五倍体草莓及其十倍体的叶片差异表达蛋白分析[J]. 西北植物学报，2016，36(9):1794-1800.
NING Chuanli，CAI Binhua，WANG Tao，QIAO Yushan. Differentially expressed proteins in strawberry leaves between pentaploid and Its corresponding allodecaploid[J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica，2016，36(9): 1794-1800.

[32] 马进，郑刚，裴翠明，张振亚 . 基于 iTRAQ 质谱分析技术筛选南方型紫花苜蓿根部响应盐胁迫差异表达蛋白[J]. 农业生物技术学报，2016，24(4): 487-509.
MA Jin，ZHENG Gang，PEI Cuiming，ZHANG Zhenya. Screening differentially expressed proteins in southern type alfalfa (*Medicago sativa* ‘Millenium’) root upon salt stress by iTRAQ protein mass spectrometry[J]. Journal of Agricultural Biochnology，2016，24(4): 487-509.

[33] 金晔，崔海峰，安欣欣，李帅，俞晓平，叶子弘 . 龙茭 2 号耐冷相关差异表达蛋白鉴定及分析[J]. 农业生物技术学报，2015，23 (4): 502-512 .
JIN Ye，CUI Haifeng，AN Xinxin，LI Shuai，YU Xiaoping，YE Zihong. Identification and analysis of differential expression proteins related to chilling tolerance in Longjiao 2 (*Zizania latifolia*) [J]. Journal of Agricultural Biochnology，2015，23(4): 502-512.

[34] KING H C，SINHA A A. Gene expression profile analysis by DNA microarrays: promise and pitfalls[J]. The Journal of the American Medical Association，2001，286(18): 2280-2288.

[35] 何喆 . 樟芝孢子萌发和产生过程的条件优化及蛋白表达差异分析[D]. 无锡：江南大学，2013.
HE Zhe. Germination and Sporulation of *Antrodia camphorata* Arthroconidia: Process optimization and differential expression of proteins[D]. Wuxi: Jiangnan University，2013.

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net