

# 枇杷果皮响应高温强光胁迫的蛋白质组分析

蒋际谋<sup>1,2</sup>, 邓朝军<sup>1,2</sup>, 林永祥<sup>3</sup>, 龚慧文<sup>3</sup>, 许奇志<sup>1,2</sup>, 郑少泉<sup>1,2\*</sup>, 陈伟<sup>3\*</sup>

(1. 福建省农业科学院果树研究所, 福州 350013; 2. 福建省龙眼枇杷育种工程技术研究中心, 福州 350013; 3. 福建农林大学生命科学学院, 福州 350002)

**摘要:** 为探讨枇杷 [*Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl.] 果皮在高温强光胁迫下的蛋白质组分变化, 采用蛋白质组学方法分析了果实日灼抗性差的枇杷种质‘WDYDB’果皮蛋白质对高温强光胁迫的应答反应。结果表明, 在自然高温强光胁迫与遮光处理(对照)下, 枇杷果皮蛋白质双向电泳图谱中表达量差异在 2 倍以上的蛋白点共有 31 个; 通过 MALDI-TOF-TOF/MS 质谱分析成功鉴定出 26 个差异蛋白点, 包括 11 个下调蛋白和 15 个上调蛋白。根据这些蛋白功能, 可将其分为防御应答、碳水化合物和能量代谢、光合作用、其它等 4 类蛋白。同时, 对这些蛋白质在高温强光胁迫下的功能和作用进行了讨论。这些差异蛋白质参与了枇杷对高温强光胁迫的响应。

**关键词:** 枇杷果皮; 高温强光胁迫; 日灼; 差异表达蛋白

doi: 10.3969/j.issn.1005-3395.2014.04.009

## Proteomic Analysis of Loquat Peels under High Temperature and Strong Light Stresses

JIANG Ji-mou<sup>1,2</sup>, DENG Chao-jun<sup>1,2</sup>, LIN Yong-xiang<sup>3</sup>, GONG Hui-wen<sup>3</sup>, XU Qi-zhi<sup>1,2</sup>, ZHENG Shao-quan<sup>1,2\*</sup>, CHEN Wei<sup>3\*</sup>

(1. *Fruit Research Institute of FAAS, Fuzhou 350013, China*; 2. *Fujian Breeding Engineering Technology Center for Longan & Loquat, Fuzhou 350013, China*; 3. *School of Life Sciences, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China*)

**Abstract:** In order to understand the changes in protein components of loquat [*Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl.] under high temperature and strong light stress, the responses of proteins in loquat ‘WDYDB’ peels to stress were analyzed by using proteomic approaches, which fruits were sensitive to sunburn. The results showed that there were 31 protein dots with differential expression of more than two times on dimensional electrophoresis profiles, as compared between treatments of high temperature and strong light stresses and shading (Control). Among them, twenty-six differential proteins were identified by MALDI-TOF-TOF/MS analysis, including 11 down-regulated and 15 up-regulated proteins. These proteins could be divided into 4 categories according to their functions, including defense response, carbohydrate and energy metabolism, photosynthesis and other protein. The functions and roles of these proteins under high temperature and strong light stress were discussed. Therefore, it was suggested that these differential proteins could involve in responses to high temperature and strong light stresses.

**Key words:** Loquat peel; High temperature and strong light stresses; Sunburn; Differential expression protein

收稿日期: 2013-08-19 接受日期: 2013-11-04

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项经费项目(201003073); 农业部作物种质资源保护项目(NB2130135); 农业部热带作物种质资源保护项目(13RZZY-15); 农业部农业科研杰出人才及其创新团队、福建省科技厅重点项目(2013Y1002, 2012Y1001)资助

作者简介: 蒋际谋(1974~), 男, 副研究员, 从事果树育种、种质资源和栽培技术研究。E-mail: jjm2516@126.com

\* 通讯作者 Corresponding authors. E-mails: zsq333555@163.com; weichen909@163.com

果实日灼病,又称“日烧病”、“气灼病”等,是果树生产上常见的生理性病害之一,给生产带来很大损失<sup>[1-2]</sup>。高温与强光引起果实日灼的主要原因,尤其是突发性高温与强光更易引起果实日灼<sup>[3-6]</sup>。高温强光胁迫打破了果皮的生理代谢平衡,产生大量活性氧分子,导致膜损伤,引起酚类物质的酶促和非酶促褐变<sup>[7]</sup>,抗氧化性酶活性发生变化<sup>[6,8]</sup>,细胞中蛋白质种类和表达量上也发生了变化<sup>[9-11]</sup>,从而影响到细胞的功能和代谢,最终表现果皮和果肉组织结构损伤<sup>[12]</sup>,果实商品性下降。

枇杷[*Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl.]是原产我国南方的常绿特色果树之一,果实春末夏初成熟,果肉柔软多汁、味道鲜美、营养丰富,且具有清肺和胃、降气化痰之功效,有“早春第一果”的美誉,深受消费者喜好。我国是枇杷最大生产国,但每年5%以上(部分品种50%左右)的果实因日灼伤害而降低或失去商品价值。本课题组在枇杷果实日灼病方面开展了系统研究,明确了枇杷果实日灼病发生的敏感时期<sup>[13]</sup>,探讨了日灼发生期间生理生化指标的变化<sup>[6]</sup>,日灼发生前后果皮的差异蛋白表达变化<sup>[14]</sup>等。‘WDYDB’枇杷是本课题组从国家果树种质福州枇杷圃中鉴定筛选出对果实日灼抗性低的种质资源之一,本文主要分析比较该种质在高温强光胁迫下果皮功能蛋白的差异表达,以揭示枇杷日灼发生的分子生理机制,为枇杷抗日灼育种和日灼防治等提供参考依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料和处理

供试枇杷[*Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl.]种质为日灼抗性弱的‘WDYDB’(全国统一编号:PPM0056),种植在国家果树种质福州枇杷圃。试

验树树龄7 a,树势中庸、生长一致。果实不套袋栽培,常规管理。

根据前期试验结果<sup>[13]</sup>,在天气预报最高气温达到29℃且有阳光的2013年4月23日,在树冠中上部南向方位选择结果性状基本一致,果实处于转色期的果穗10穗挂牌,选留大小一致、果面无损伤的果实(图1),其中临近的5穗于当日13:30–15:30用单层遮阳网覆盖作为对照处理,使阳光不能直接照射在果面上,遮阳网与果穗间有10~20 cm间隔;另5穗无遮阳网覆盖,为自然高温强光胁迫处理。这段时间内,对照果面平均温度26.2℃,平均光强869.3  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ;高温强光胁迫处理果面温度平均38.9℃,平均光强1202.4  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 。15:30开始采摘胁迫处理和对照果,果面用蒸馏水冲洗,吸干水分后立即削取向阳面果皮,迅速置于液氮中预冻后在-80℃超低温冰箱中保存备用。3次重复。

光照、果面温度用PM-11型Phytalk植物生理生态监控系统(Phytali, Phytech Ltd., Israel)观测。

### 1.2 蛋白提取

参照Liu等<sup>[15]</sup>的方法,略微修改。取3 g枇杷果皮用液氮研磨成粉后加入12 mL的提取液和12 mL的pH 8.0 Tris-饱和酚,5500  $\times g$ 离心10 min;取酚层加入0.1 mol L<sup>-1</sup>乙酸铵甲醇液,-20℃静置过夜;20000  $\times g$ 离心20 min,用甲醇洗沉淀;20000  $\times g$ 离心20 min,用20℃预冷的丙酮(含0.07%  $\beta$ -巯基乙醇)洗沉淀,重复1次;沉淀蛋白冷冻干燥,所得干粉置-80℃保存待用。

### 1.3 双向电泳

按照25  $\mu\text{L}$ 裂解液含1 mg蛋白的比例,在蛋白干粉中加入裂解液。37℃恒温水浴2.5 h,20000  $\times g$ 室温离心15 min,取上清液用于蛋白质定量和双向

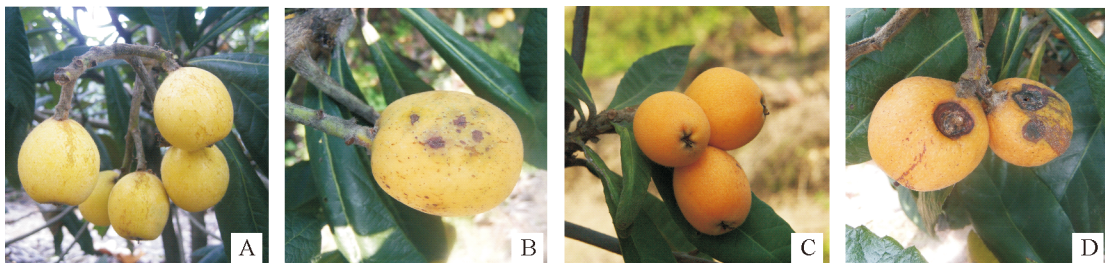


图1 ‘WDYDB’枇杷不同发育时期果实生长状态和日灼伤害。A: 转色期正常果实;B: 转色期日灼果实;C: 黄熟期正常果实;D: 黄熟期日灼果实。  
Fig. 1 ‘WDYDB’ loquat fruits with sunburn injury at different development stages. A: Fruits at turning stage; B: Sunburn fruit at turning stage; C: Fruits at yellow ripening stage; D: Sunburn fruits at yellow ripening stage.

电泳分析。蛋白浓度测定参照 Bradford 法<sup>[16]</sup>,以牛血清蛋白(BSA)作为标准蛋白。双向电泳参考邓朝军等<sup>[14]</sup>方法,蛋白上样量为 1.3 mg, IPG 胶条为 pH 4~7, 24 cm。20℃下水化 14 h,设置等电聚焦程序 200 V(1 h) → 500 V(1 h) → 1000 V(1 h) → Gradient-8000 V(0.5 h) → 8000 V(6 h) → 1000 V(2 h),运行条件:温度为 20℃,最大电流为 50 μA Strip<sup>-1</sup>。染色脱色参考邓朝军等<sup>[14]</sup>的方法。

### 1.4 凝胶图像分析和胶内酶解

凝胶用 EPSON 图谱扫描仪(300 dpi)进行扫描,图片用 PDQuest 软件进行分析,从凝胶上切取差异两倍以上蛋白点,参照 You 等<sup>[9]</sup>的方法用胰蛋白酶对凝胶蛋白点进行酶解。

### 1.5 质谱鉴定及数据库检索

参照 Liang 等<sup>[17]</sup>的方法,将酶解后的蛋白溶液

进行 MALDI-TOF-TOF/MS 质谱分析;质谱数据在 NCBI (National Center for Biotechnology Information) 蛋白数据库中搜寻,获取成功匹配(匹配分值 ≥ 75)的蛋白。

## 2 结果和分析

### 2.1 枇杷果皮双向电泳图谱分析

从图 2 可以看出,得到的双向电泳图谱背景清晰、分离效果较好,其蛋白质组分主要分布在等电点 pI 5~6、分子量 21~90 kDa 的范围内。利用 ImageMaster 2D Platinum 5.0 软件对 2-DE 图谱进行分析,结果显示,在处理和对照的 2-DE 图谱上分别检测到 1025 和 1011 个蛋白点。处理与对照之间表达量差异在 2 倍以上的蛋白点共有 31 个(图 3),其中上调表达的蛋白点 17 个,下调表达的 14 个。在上调表达的蛋白点中,差异最高达 4.80 倍;

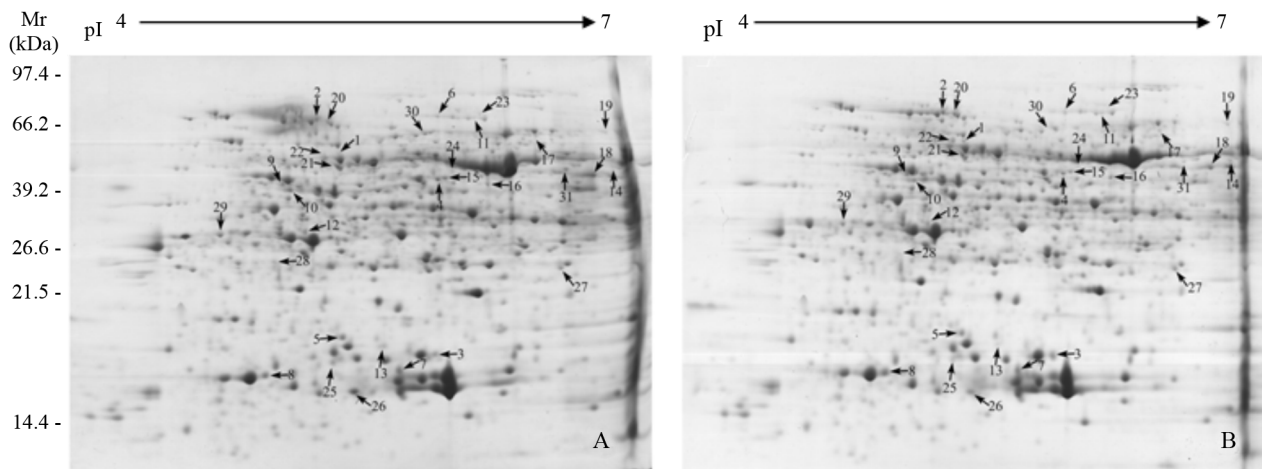


图 2 ‘WDYDB’枇杷果皮蛋白质的双向电泳图谱。A: 对照; B: 高温强光胁迫。

Fig. 2 2-DE profiles of proteins in ‘WDYDB’ loquat peels. A: Control; B: High temperature and strong light stresses.

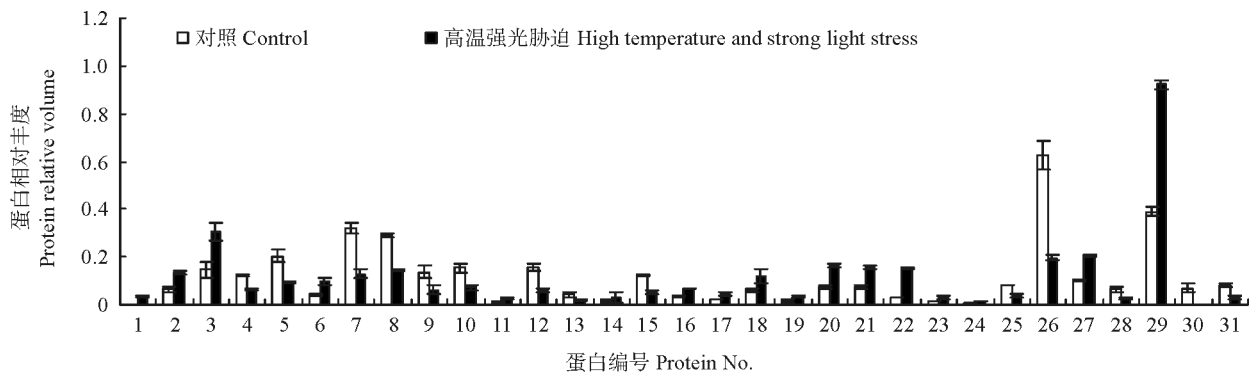


图 3 高温强光胁迫后‘WDYDB’枇杷果皮差异蛋白点的相对丰度

Fig. 3 Relative volume of differentially expressed proteins of ‘WDYDB’ loquat peels under high temperature and strong light stresses

在下调表达的蛋白点中,差异最高达 3.19 倍。

## 2.2 蛋白质功能分析

将 31 个差异蛋白点进行质谱(MALDI-TOF/TOF MS)分析,根据各蛋白点鉴定所得的 PMF 图谱数据,去除杂峰后,在蛋白质数据库进行匹配检

索。根据鉴定标准,除了 5 个蛋白点(6、15、21、30 和 31)未检测成功外,共有 26 个差异蛋白点得到成功鉴定。在成功鉴定的差异蛋白中包括 11 个下调蛋白和 15 个上调蛋白,其中有 1 个上调蛋白(1)是在高温强光胁迫后出现的(图 3,表 1)。

通过 BLAST 和 KEGG 对这 26 个蛋白进行功

表 1 高温强光胁迫下枇杷果皮差异蛋白的鉴定

Table 1 Identification of differential proteins in loquat peels under high temperature and strong light stress

蛋白点 Spot No.	蛋白 Protein	登录号 GI	物种 Species	匹配率 Match rate (%)	理论分子量/pI Theoretical Mr (kD)/pI 试验分子量/PI Actual Mr (kD)/pI	表达模式 Expression pattern
防御应答 Defense response						
1	分子伴侣前体 Chaperonin precursor	806808	豌豆 <i>Pisum sativum</i>	33	62.96/5.85 63.43/5.25	↑
2	高分子量热休克蛋白 High molecular weight heat shock protein	6969976	苹果 <i>Malus domestica</i>	36	71.17/5.17 69.38/5.17	↑
3	热激蛋白 17.5 Heat shock protein 17.5	186694325	苹果 <i>Malus domestica</i>	48	17.54/6.2 17.79/6.63	↑
4	肉桂醇脱氢酶 Cinnamyl alcohol dehydrogenase	62461970	罗勒 <i>Ocimum basilicum</i>	21	38.74/5.52 50.02/6.22	↓
5	谷胱甘肽过氧化物酶 Glutathione peroxidase	222846793	欧洲大叶杨 <i>Populus trichocarpa</i>	21	19.39/4.78 18.49/5.28	↓
7	主要过敏原 Major allergen Pyrcl	3044216	梨 <i>Pyrus communis</i>	57	17.57/5.62 17.17/6.3	↓
8	类甜蛋白 Thaumatine-like protein	20149276	苹果 <i>Malus domestica</i>	12	22.09/4.34 22.61/5.22	↓
碳水化合物与能量代谢 Carbohydrate and energy metabolism						
19	ATP 合成酶亚基 1 ATPase subunit 1	295311633	西瓜 <i>Citrullus lanatus</i>	45	55.29/6.02 60.36/6.88	↑
20	线粒体 ATP 合成酶 $\beta$ 亚基 Mitochondrial ATP synthase $\beta$ -subunit	18831	巴西橡胶树 <i>Hevea brasiliensis</i>	37	60.22/5.95 66.90/5.97	↑
22	F1-ATP 合成酶 $\beta$ 亚基 F1-ATP synthase, $\beta$ subunit	4388533	高粱 <i>Sorghum bicolor</i>	50	49.11/5.25 59.45/5.99	↑
16	磷酸甘油酸激酶 Chloroplast phosphoglycerate kinase	3738261	黑杨 <i>Populus nigra</i>	26	50.27/8.74 45.35/6.55	↑
14	乙醇脱氢酶 Alcohol dehydrogenase	886885	苹果 <i>Malus domestica</i>	40	41.38/6.48 47.70/6.87	↑
11	转酮酶 1 Transketolase 1	3559814	甜椒 <i>Capsicum annum</i>	15	80.06/6.16 65.86/6.53	↑
17	二氢硫辛酰胺-琥珀酰转移酶-2-酮戊二酸脱氢酶 Dihydrolipoamide succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase	255578100	蓖麻 <i>Ricinus communis</i>	19	50.84/9.27 63.26/6.78	↑
18	甘氨酸脱羧酶-二氢硫辛酰胺脱氢酶 Dihydrolipoamide dehydrogenase of glycine decarboxylase	9955324	豌豆 <i>Pisum sativum</i>	30	49.71/6.06 62.85/6.85	↑

续表(Continued)

蛋白点 Spot No.	蛋白 Protein	登录号 GI	物种 Species	匹配率 Match rate (%)	理论分子量/pI Theoretical Mr (kD)/pI 试验分子量/PI Actual Mr (kD)/pI	表达模式 Expression pattern
光合作用 Photosynthesis						
9	$\alpha$ -Rubisco 活化酶 $\alpha$ -Rubisco activase	290766479	榕豆 <i>Glycine max</i>	20	52.25/5.94 49.75/5.3	↓
10	$\alpha$ -Rubisco 活化酶 $\alpha$ -Rubisco activase	290766489	榕豆 <i>Glycine max</i>	24	52.25/5.94 48.94/5.29	↓
12	放氧蛋白 1 Oxygen-evolving enhancer protein 1	223538464	蓖麻 <i>Ricinus communis</i>	27	35.23/5.58 25.88/5.28	↓
13	叶绿体锰稳定化蛋白 II Chloroplast manganese stabilizing protein-II	239911810	马铃薯 <i>Solanum tuberosum</i>	35	31.21/6.45 21.59/6.18	↓
其它蛋白 Other protein						
25	真核翻译起始因子 5A 2 Eukaryotic translation initiation factor 5A2	333108567	欧洲山杨 <i>Populus tremula</i> × <i>P. alba</i>	33	17.52/5.6 18.48/5.67	↓
28	生长素诱导蛋白 Pent115 Auxin-induced protein Pent115	195635793	玉米 <i>Zea mays</i>	13	38.15/6.28 24.29/5.29	↓
23	氨基乙酰基-tRNA 合成酶 Glycyl-tRNA synthetase	255543218	蓖麻 <i>Ricinus communis</i>	17	77.22/6.6 70.86/6.53	↑
24	叶绿体翻译延长因子 Choloroplast translation elongation factor	2330655	豌豆 <i>Pisum sativum</i>	21	53.02/6.62 52.59/6.27	↑
26	甘氨酸丰富的 RNA 结合蛋白 1 Glycine-rich RNA-binding protein 1	311780287	湖北海棠 <i>Malus hupehensis</i>	54	16.18/6.37 16.44/6.3	↓
27	蛋白磷酸酶 2C 39 Protein phosphatase 2C 39	332642117	拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	27	31.61/5.51 25.10/6.86	↑
29	未知蛋白 Unknown protein	222867625	欧洲大叶杨 <i>Populus trichocarpa</i>	20	25.92/5.06 28.42/4.95	↑
6	未鉴定成功 Unidentified					↑
15	未鉴定成功 Unidentified					↓
21	未鉴定成功 Unidentified					↑
30	未鉴定成功 Unidentified					↓
31	未鉴定成功 Unidentified					↓

能注释,其中 1 个蛋白(29)为未知功能蛋白,还有待于进一步深入研究。其余 25 个蛋白可分为防御应答、碳水化合物与能量代谢、光合作用、其它等 4 类(表 1)。

**防御应答相关蛋白** 通过质谱结果匹配和基因功能分析,有 7 个蛋白(1~5,7~8)可能与高温强光胁迫下防御应答相关。其中,分子伴侣前体(1)、

高分子量热休克蛋白(2)、热激蛋白 17.5 (3)表现出上调表达,而谷胱甘肽过氧化物酶(5)、肉桂醇脱氢酶(4)、主要过敏原 Pyc1 (7)、类甜蛋白(8)表现出下调表达。

**碳水化合物与能量代谢相关蛋白** 与能量代谢有关的 ATP 合成酶亚基 1 (19)、线粒体 ATP 合成酶  $\beta$  亚基(20)、F1-ATP 合成酶  $\beta$  亚基(22);参

与糖酵解途径磷酸甘油酸激酶(16),参与乙醇发酵反应的乙醇脱氢酶(14);参与磷酸戊糖途径的转酮酶 1 (11),参与三羧酸循环的二氢硫辛酰胺-琥珀酰转移酶-2-酮戊二酸脱氢酶( $\alpha$ -酮戊二酸脱氢酶复合体, 17)和参与光呼吸的甘氨酸脱羧酶-二氢硫辛酰胺脱氢酶(18)都上调表达。

**光合作用相关蛋白** 在与光合作用相关的蛋白中,  $\alpha$ -Rubisco 活化酶(9,10)、放氧蛋白 1 (12)、叶绿体锰稳定化蛋白 II (13)均下调表达。

**其它蛋白** 其中的真核翻译起始因子 5A2 (25)和生长素诱导蛋白 Pcnt115 (28)均下调表达。

### 3 讨论

‘WDYDB’枇杷果实对日灼抗性差,受高温强光胁迫容易引发日灼病。植物接收到逆境信号后,经信号传导途径,能够通过调节细胞内蛋白的表达,以应对各种不利环境的变化<sup>[18]</sup>。本研究的蛋白质组学分析结果表明,在高温强光下‘WDYDB’枇杷果皮中的差异表达蛋白积极参与了环境胁迫引起的各种生理生化反应,尤其是 ROS 清除酶、病原菌防御蛋白(酶)和光合作用相关蛋白下调表达,以及无氧呼吸关键酶的上调表达均和日灼伤害密切相关。

#### 3.1 枇杷果皮防御应答相关蛋白对高温强光胁迫的响应

在逆境条件下,热激蛋白作为分子伴侣促进细胞中蛋白的重新折叠、稳定、组装、胞内运输和降解,对受损蛋白的修复有重要作用<sup>[19-21]</sup>。分子伴侣前体、高分子量热休克蛋白、热激蛋白 17.5 等蛋白表达量上调说明枇杷果皮对高温强光胁迫有较强的应激反应,调节细胞内环境以适应外界胁迫。但是,热激反应具有短时性,玉米(*Zea mays*)经 42℃热激 2 h, ZmHSP70 表达量最大,随后下降<sup>[22]</sup>;水稻(*Oryza sativa*)经高温胁迫 12 h 后, sHSP 表达量显著上升, 24 h 后表达量下调<sup>[23]</sup>。在本试验中热激蛋白的上调反应,可能是枇杷对较短时间(2 h)高温强光胁迫的应激反应。

前人的研究表明逆境胁迫可使作物体内产生的大量活性氧(ROS),这是其对作物产生不良影响的重要机制<sup>[24]</sup>。谷胱甘肽过氧化物酶(GPX)是酶促清除 ROS 机制中的关键酶类,通过催化过氧化氢

和脂质过氧化物来保护植物细胞免受氧化胁迫<sup>[25]</sup>,如番茄(*Lycopersicon esculentum*)中 LePHGPX 的过量表达能显著提高转基因植株对盐、高温等胁迫的耐受性<sup>[26]</sup>;GPX 在转基因植物中的过量表达可以增强植物对非生物胁迫的耐受力<sup>[27-28]</sup>。但本研究中谷胱甘肽过氧化物酶出现下调表达,说明枇杷果皮中清除过氧化氢和其它有机过氧化物的能力下降,超氧阴离子和丙二醛含量上升<sup>[6]</sup>,细胞膜的结构及功能容易受到干扰及损害,可能这是‘WDYDB’枇杷对日灼抗性弱的一个重要因素。

肉桂醇脱氢酶、主要过敏原 Pycr1、类甜蛋白是重要的植物防御蛋白,有助于植物伤口抵御病原菌及不利环境。许多研究表明,肉桂醇脱氢酶是木质素代谢过程中的一个关键酶,与非生物胁迫有关<sup>[29]</sup>;类甜蛋白与植物的抗逆反应有关,如紫外线、热处理、机械损伤等,类甜蛋白会在植物特定部位迅速表达并积累<sup>[30]</sup>。‘WDYDB’枇杷果皮在高温强光胁迫下肉桂醇脱氢酶、主要过敏原 Pycr1、类甜蛋白下调表达,说明枇杷果皮对逆境的耐受力下降,这和‘WDYDB’枇杷果皮易受日灼伤害有密切关系。

#### 3.2 枇杷果皮碳水化合物与能量代谢相关蛋白对高温强光胁迫的响应

ATP 合成酶广泛存在于高等植物的叶绿体和线粒体中,是植物能量代谢和转运的关键酶,参与氧化磷酸化与光合磷酸化反应<sup>[31-32]</sup>。ATP 合成酶亚基 1、线粒体 ATP 合成酶  $\beta$  亚基、F1-ATP 合成酶  $\beta$  亚基表现出上调表达,可能是在高温强光胁迫下,‘WDYDB’枇杷果皮抵抗外界不良环境的应激反应。

植物在低氧环境下进行无氧呼吸主要是乙醇发酵途径,少数为乳酸发酵途径。本研究结果表明,参与糖酵解的磷酸甘油酸激酶、参与乙醇发酵反应的乙醇脱氢酶表达量上调,这说明在高温强光胁迫下,枇杷果皮的无氧呼吸作用加强,导致不完全氧化产物积累,从而对细胞产生毒性,引起‘WDYDB’枇杷果皮日灼的发生。而磷酸戊糖途径(PPP)关键酶转酮酶 1 与参与光呼吸的甘氨酸脱羧酶表达量都上调表达,说明在高温强光逆境胁迫下枇杷果皮 PPP 呼吸作用途径以及光呼吸加强,这些生理代谢的变化可认为是‘WDYDB’枇杷果皮对高温强光胁迫的一种反应。

### 3.3 枇杷果皮光合作用相关蛋白对高温强光胁迫的响应

在与光合作用相关的蛋白中,  $\alpha$ -Rubisco 活化酶、放氧蛋白 1、叶绿体锰稳定化蛋白均表现出下调表达。 $\alpha$ -Rubisco 活化酶作为分子伴侣保护与类囊体结合的核糖体, 使在类囊体中合成的相关蛋白免受热钝化<sup>[33]</sup>。放氧蛋白 1 和叶绿体锰稳定化蛋白与光合作用的放氧反应有关。高温强光胁迫使这些蛋白下调表达, 这会导致光合速率下降。这个结果与苹果受高温强光胁迫引起光合速率显著下降的结论一致<sup>[34]</sup>。当植物吸收的光能超出其自身的利用能力时, 还会产生活性氧<sup>[35]</sup>。在高温强光胁迫下, 枇杷果皮活性氧含量增加, 膜系统被破坏, 从而导致‘WDYDB’枇杷果皮日灼的产生。

综上所述, 在高温强光胁迫下‘WDYDB’枇杷果皮中酶促清除 ROS 机制中的关键酶、光合作用相关蛋白和病原菌防御蛋白(酶)下调表达, 无氧呼吸加强, 是最终导致‘WDYDB’枇杷果皮日灼发生的主要原因。本研究从蛋白质水平上进一步认识了日灼抗性弱的‘WDYDB’枇杷果皮蛋白在高温强光胁迫下产生日灼的分子生理基础, 并初步探明了枇杷果皮在高温强光胁迫过程中涉及的蛋白质所参与的代谢途径及其作用机理, 为枇杷抗日灼病分子育种研究提供理论依据。

### 参考文献

- [1] Schrader L E, Kahn C, Elfving D C. Sunburn browning decreases at-harvest internal fruit quality of apples (*Malus domestica* Borkh.) [J]. *Int J Fruit Sci*, 2009, 9(4): 425–437.
- [2] Weerakkody P, Jobing J, Infante M M V, et al. The effect of maturity, sunburn and the application of sunscreens on the internal and external qualities of pomegranate fruit grown in Australia [J]. *Sci Hort*, 2010, 124(1): 57–61.
- [3] Zhang J G, Liu Y F, Sun J S, et al. Studies on artificial induction and threshold temperatures of apple fruit sunburn [J]. *Acta Hort Sin*, 2003, 30(4): 446–448.  
张建光, 刘玉芳, 孙建设, 等. 苹果果实日灼人工诱导技术及阈值温度研究 [J]. *园艺学报*, 2003, 30(4): 446–448.
- [4] Felicetti D A, Schrader L E. Changes in pigment concentrations associated with the degree of sunburn browning of ‘Fuji’ apple [J]. *J Amer Soc Hort Sci*, 2008, 133(1): 27–34.
- [5] Felicetti D A, Schrader L E. Changes in pigment concentrations associated with sunburn browning of five apple cultivars: II. Phenolics [J]. *Plant Sci*, 2009, 176(1): 84–89.
- [6] Deng C J, Xu Q Z, Jiang J M, et al. Changes in antioxidant properties induced by heat injury in loquat peel under high temperature stress [J]. *J Trop Subtrop Bot*, 2012, 20(5): 439–444.  
邓朝军, 许奇志, 蒋际谋, 等. 高温胁迫对枇杷果皮热伤害的抗氧化特性影响 [J]. *热带亚热带植物学报*, 2012, 20(5): 439–444.
- [7] Andrews P K, Johnson J R. Physiology of sunburn development in apples [J]. *Good Fruit Grower*, 1996, 47(12): 33–36.
- [8] Wang J P. Effect of high-temperature and excessive-light stresses on antioxidant capacity in apple fruits [D]. Baoding: Agricultural University of Hebei, 2010: 1–39.  
王静璞. 高温、强光胁迫对苹果果实抗氧化能力的影响 [D]. 保定: 河北农业大学, 2010: 1–39.
- [9] You X R, Wang L X, Liang W Y, et al. Floral reversion mechanism in longan (*Dimocarpus longan* Lour.) revealed by proteomic and anatomic analyses [J]. *J Proteomics*, 2012, 75(4): 1099–1118.
- [10] Lee D G, Ahsan N, Lee S H, et al. A proteomic approach in analyzing heat-responsive proteins in rice leaves [J]. *Proteomics*, 2007, 7(18): 3369–3383.
- [11] Huangpu X Q. Studies on physiological and biochemical responses of different flue-cured tobacco genotypes to different light intensity and thermal environments [D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2012: 1–4.  
皇甫晓琼. 不同基因型烤烟对光温环境的生理生化响应研究 [D]. 福州: 福建农林大学, 2012: 1–4.
- [12] Hao Y Y, Huang W D. Changes in antioxidative system and cell ultrastructure in the fruit peels of apple during sunburn development [J]. *J Plant Physiol Mol Biol*, 2004, 30(1): 19–26.  
郝燕燕, 黄卫东. 苹果日烧病程中果皮抗氧化系统与细胞超微结构的变化 [J]. *植物生理与分子生物学学报*, 2004, 30(1): 19–26.
- [13] Deng C J, Jiang J M, Zhang X Y, et al. Research on influence factors in heat injury of loquat peel [J]. *Fujian J Agri Sci*, 2012, 27(10): 1081–1086.  
邓朝军, 蒋际谋, 张小艳, 等. 枇杷果皮热伤害发生影响因子研究 [J]. *福建农业学报*, 2012, 27(10): 1081–1086.
- [14] Deng C J, Jiang J M, Gong H W, et al. Proteome analysis of loquat peel under sunburn in two varieties [J]. *Fujian J Agri Sci*, 2012, 27(12): 1313–1317.  
邓朝军, 蒋际谋, 龚慧文, 等. 2个枇杷品种果皮日灼伤害差异蛋白质组分析 [J]. *福建农业学报*, 2012, 27(12): 1313–1317.
- [15] Liu H, Liu Y Z, Zheng S Q, et al. Comparative proteomic analysis of longan (*Dimocarpus longan* Lour.) seed abortion [J]. *Planta*, 2010, 231(4): 847–860.
- [16] 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(1/2): 248–254.
- [17] Liang W Y, Zhou Y W, Wang N X, et al. Ultrastructural, physiological and proteomic analysis of *Nostoc flagelliforme* in response to dehydration and rehydration [J]. *J Proteomics*, 2012,

- 75(18): 5604–5627.
- [18] Shao C H, Wang J Y, Lin W X. Differential proteomics analysis of leaf development at rice (*Oryza sativa*) seedling stage [J]. *Sci Agri Sin*, 2008, 41(11): 3831–3837.  
邵彩虹, 王经源, 林文雄. 苗期水稻叶片发育进程的差异蛋白质组学分析 [J]. *中国农业科学*, 2008, 41(11): 3831–3837.
- [19] Jagadish S V K, Muthurajan R, Oane R, et al. Physiological and proteomic approaches to address heat tolerance during anthesis in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *J Exp Bot*, 2010, 61(1): 143–156.
- [20] Tanaka K I, Namba T, Arai Y, et al. Genetic evidence for a protective role for heat shock factor 1 and heat shock protein 70 against colitis [J]. *Biol Chem*, 2007, 282(32): 23240–23252.
- [21] Mycko M P, Cwiklinska H, Walczak A, et al. A heat shock protein gene (*Hsp70.1*) is critically involved in the generation of the immune response to myelin antigen [J]. *Eur J Immunol*, 2008, 38(7): 1999–2013.
- [22] Li H C, Guo X L, Wang D M, et al. Responses of *HSP70* gene expression to temperature stresses in maize (*Zea mays* L.) [J]. *J Agri Univ Heibei*, 2010, 33(6): 12–15,25.  
李慧聪, 郭秀林, 王冬梅, 等. 玉米热激蛋白70基因对温度胁迫的响应 [J]. *河北农业大学学报*, 2010, 33(6): 12–15,25.
- [23] Chen X H. Studies on heat shock proteins (HSPs) of rice (*Oryza sativa* L.) in response to heat stress [D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2011: 24–26.  
陈新海. 高温胁迫下水稻热激蛋白的作用机理研究 [D]. 福州: 福建农林大学, 2011: 24–26.
- [24] Somerville C K, Meyerowitz E M. *The Arabidopsis Book* [M]. Rockville, USA: American Society of Plant Biologists, 2002: 1–19.
- [25] Noctor G, Gomez L, Vanacker H, et al. Interactions between biosynthesis, compartmentation, and transport in the control of glutathione homeostasis and signalling [J]. *J Exp Bot*, 2002, 53(372): 1283–1304.
- [26] Chen S, Vaghchhipawala Z, Li W, et al. Tomato phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase inhibits cell death induced by bax and oxidative stresses in yeast and plants [J]. *Plant Physiol*, 2004, 135(3): 1630–1641.
- [27] Yoshimura K, Miyao K, Gaber A, et al. Enhancement of stress tolerance in transgenic tobacco plants overexpressing *Chlamydomonas* glutathione peroxidase in chloroplasts or cytosol [J]. *Plant J*, 2004, 37(1): 21–33.
- [28] Gaber A, Yoshimura K, Yamamoto T, et al. Glutathione peroxidase-like protein of *Synechocystis* PCC 6803 confers tolerance to oxidative and environmental stresses in transgenic *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiol*, 2006, 128(2): 251–262.
- [29] Zhang L B, Gu H, Gong D Q, et al. Research progress of cinnamyl alcohol dehydrogenase and its gene [J]. *Acta Bot Boreal-Occid Sin*, 2011, 31(1): 204–211.  
鲁斌, 谷会, 弓德强, 等. 植物肉桂醇脱氢酶及其基因研究进展 [J]. *西北植物学报*, 2011, 31(1): 204–211.
- [30] Jiang X L, Huang Q X, Li H, et al. A review of advances in plant thaumatin-like proteins [J]. *J Zhejiang Agri For Univ*, 2012, 29(2): 279–287.  
姜晓玲, 黄秋嫻, 李虹, 等. 植物类甜蛋白基因家族研究进展 [J]. *浙江农林大学学报*, 2012, 29(2): 279–287.
- [31] Wang Y Q, Zhang J J, Zhu G H, et al. Differential expression of proteins in rice leaves cultivated with different forms of nitrogen nutrients [J]. *J Plant Physiol Mol Biol*, 2006, 32(4): 403–410.
- [32] Han Y R. *Molecular Cytobiology* [M]. 2nd ed. Beijing: Science Press, 2001: 71–75.  
韩贻仁. *分子细胞生物学* [M]. 第2版. 北京: 科学出版社, 2001: 71–75.
- [33] Jin S H, Hong J, Li X Q, et al. Antisense inhibition of Rubisco activase increases rubisco content and alters the proportion of rubisco activase in stroma and thylakoids in chloroplasts of rice leaves [J]. *Ann Bot*, 2006, 97(5): 739–744.
- [34] Sun S. Study on photosynthetic characteristics and mechanism of sunburn in green peel of apple fruit [D]. Tai'an: Shandong Agricultural University, 2009: 1–4.  
孙山. 苹果绿色果皮光合生理特性及果皮灼伤机制的研究 [D]. 泰安: 山东农业大学, 2009: 1–4.
- [35] Henmi T, Miyao M, Yamamoto Y. Release and reactive-oxygen-mediated damage of the oxygen-evolving complex subunits of PS II during photoinhibition [J]. *Plant Cell Physiol*, 2004, 45(2): 243–250.