

温敏核不育系培矮 64S 及其 *eui* 突变体长选 3S 最上节间蛋白质组差异分析

肖辉海, 郝小花, 李荣, 杨友伟, 陈春霞

(湖南文理学院生命科学系, 湖南 常德 415000)

摘要: 为从蛋白质表达水平了解长穗颈温敏核不育水稻(*Oryza sativa*)最上节间伸长机理, 采用双向凝胶电泳方法对温敏核不育系培矮 64S 及其 *eui* 突变体长选 3S 抽穗前 2 d 的最上节间蛋白质进行了分离, 并获得了分辨率和重复性较好的双向凝胶电泳图谱。选取 50 个差异蛋白质点进行 MALDI-TOF-TOF-MS 肽质谱指纹图谱分析, 从中鉴定出 31 个已知蛋白质, 相对于培矮 64S, 在长选 3S 中上调表达的 11 个蛋白质和下调表达的 20 个蛋白质。这些差异蛋白质按照其功能可分为 7 类。这些差异蛋白质可能与长选 3S 抽穗期最上节间剧烈伸长生长有关, 水稻 *eui* 基因可能是通过调节抽穗期最上节间这些蛋白质的表达, 从而控制最上节间细胞分裂, 尤其是细胞的伸长生长。

关键词: 温敏核不育; 水稻; 长穗颈突变体; 蛋白质组学; 半定量 RT-PCR

doi: 10.11926/j.issn.1005-3395.2016.05.008

Proteomics Differences Analysis of the Uppermost Internode between TGMS Rice Line Pei'ai 64S and Its *eui* Mutant Changxuan 3S

XIAO Hui-hai, HAO Xiao-hua, LI Rong, YANG You-wei, CHEN Chun-xia

(Department of Life Science, Hunan University of Arts and Science, Changde 415000, Hunan, China)

Abstract: In order to understand the elongation mechanism of the uppermost internode of TGMS rice (*Oryza sativa* L.) at protein expression level, the proteins in the uppermost internodes of *eui* mutant 'Changxuan 3S' and 'Pei'ai 64S' (control) before 2 days to heading were isolated by two-dimensional (2-DE) electrophoresis. A 2-DE map with a high resolution and good reproducibility were obtained by Coomassie brilliant blue staining. Fifty differentially expressed protein spots from 2-DE map were analyzed using MALDI-TOF/TOF-MS peptide mass fingerprint method, in which thirty-one differential proteins were identified. Compared with Pe'ai 64S, there were eleven proteins up-regulated in Changxuan 3S, and twenty proteins down-regulated. All of thirty-one differential proteins were divided into 7 categories according to their function. It was suggested that these differential proteins might play roles in elongation of the uppermost internode in 'Changxuan 3S' at heading stage, and *eui* gene in rice might regulate the expression of these proteins in uppermost internode at heading stage, thus promote cell division, especially cell elongation.

Key words: Thermo-sensitive-genic male sterile (TGMS); Rice; *eui* mutant; Proteomics; Semi-quantitative RT-PCR

水稻(*Oryza sativa*)雄性不育系都存在“包颈”现象, 即最上节间短、穗不能完全抽出剑叶叶鞘的遗

传缺陷, 导致稻穗 30%~60%的颖花包裹在叶鞘中, 严重影响了杂交制种产量的提高。传统做法是在抽

收稿日期: 2015-11-16 接受日期: 2016-02-01

基金项目: 湖南省自然科学基金资助重点项目(12JJ2018); 湖南省重点学科建设项目(湘教发[2011]42 号)资助

This work was supported by the Natural Science Foundation of Hunan Province (Grant No. 12JJ2018), and the Project of Key Discipline Construction in Hunan Province (Grant No. 2011-42).

作者简介: 肖辉海(1962~), 男, 博士, 教授, 主要从事植物发育与分子生物学研究。E-mail: xhh-07@126.com

穗期喷施赤霉素(GA₃)以促进最上节间伸长,降低包颈率、提高杂交制种产量。然而,喷施 GA₃不仅会导致籽粒穗上发芽、缩短种子贮藏寿命、杂交种子质量下降,而且还会增加杂交种子生产成本和污染环境。同时,GA₃促进抽穗的效果也受气象因素的制约,在阴雨连绵天,喷施 GA₃的效果很差,导致杂交制种产量很低。因此,从遗传上解除水稻雄性不育系的“包颈”问题一直是杂交水稻亲本创新研究的目标之一。

1981年Rutger等^[1]在粳稻Mg/Terso的F₃群体中发现了1个最上节间伸长型的高秆隐性突变体76:4512,并把控制此性状的基因命名为最上节间伸长(Elongated uppermost internode)基因,即*eui*基因。*eui*基因是控制水稻抽穗期最上节间明显伸长的隐性单基因,水稻*eui*突变体抽穗期最上节间剧烈伸长,其最上节间长度比野生型EUI水稻的长近1倍。因此,*eui*基因被用来从遗传上解决水稻雄性不育系的包颈难题^[2-5]。近年来,我国已育成含*eui*基因的水稻雄性不育系材料20余个,其中部分材料已通过了省级鉴定,并应用于杂交制种^[6]。

长选3S是用从培矮64S中选出的1个不育临界温度低的新株系(96-5-2S)的干种子通过350Gy⁶⁰Co γ -射线直接辐射处理后,从其M₂代群体中筛选出的长穗颈温敏核不育水稻。长选3S的长穗颈性状为1对隐性的*eui*基因控制,而且其*eui*基因与*eui1*基因等位,既保持了原培矮64S的优良特性,如育性稳定、亲和性强、配合力好、适应性广等,又从遗传上解除了包颈,制种时能大幅降低赤霉素的施用量、提高异交结实率,而且还可极大降低夏季制种时可能出现的盛夏低温导致不育系育性恢复的风险,确保制种安全^[7-9],因此,*eui*突变体长选3S较其野生型不育系培矮64S具有更好的应用前景。

已有研究表明,无论在花粉可育还是在不育情况下,长选3S在抽穗期最上节间的GA₁、IAA和ZR含量均极显著地高于其野生型培矮64S,ABA含量则显著低于培矮64S^[10-11];最上节间伸长最快的时期为抽穗前第4天至抽穗当天,且此时段长选3S最上节间日均伸长长度约为培矮64S的2.2倍;最上节间中最内层和最外层薄壁细胞数目均比培矮64S显著增多,最内层和最外层薄壁细胞平均长度亦均比培矮64S的显著增长,从而导致抽穗时长选3S不包颈或包颈程度大大减轻^[11-12]。Zhu等^[13]对野生型ZS97和其*eui*突变体的研究表明,EUI基因编

码1种细胞色素P450单加氧酶CYP714D1,此酶具有降解生物活性GA₄的功能,在赤霉素生物合成中起负调控作用。与野生型EUI基因相比,突变型*eui*基因编码的P450单加氧酶CYP714D1活性降低,导致*eui*突变体内GA₄积累增加,从而促进植株最上节间显著伸长。可见,抽穗期水稻*eui*突变体(尤其是水稻雄性核不育系*eui*突变体)最上节间伸长明显优于其野生型,首先基于EUI基因突变导致突变体最上节间中内源激素水平的改变(促进生长的激素水平相对较高、而抑制生长的激素水平相对较低),其次是基于突变体最上节间由于内源激素水平改变所引起最上节间的细胞快速分裂和伸长。但是,有关抽穗期水稻*eui*突变体最上节间因内源激素水平改变并导致其显著伸长这一过程所涉及到的许多分子机理目前尚未完全明确。

蛋白质是生命活动的主要执行者,为了从蛋白质分子表达水平了解温敏雄性核不育水稻*eui*突变体在花粉完全不育条件下抽穗期不包颈的原因,本文主要应用蛋白质组学技术对*eui*突变体长选3S及其野生型培矮64S抽穗期的最上节间进行差异蛋白质组学比较研究,为促进*eui*基因在杂交水稻中的应用及研究调控水稻抽穗的功能蛋白提供科学参考。

1 材料和方法

1.1 材料

温敏雄性核不育水稻(*Oryza sativa*)培矮64S及其*eui*突变体长选3S均由湖南师范大学生命科学学院供种。2014年5月20日,将长选3S和培矮64S播种于实验田,待秧苗生长至5叶期时,各选长势一致的健壮幼苗80株进行盆栽,每盆栽8株(盆深22.0cm,盆底内径19.0cm,盆口内径33.0cm),肥水管理及防治病虫害按照常规方法进行。

1.2 温度处理和取样

为避免因环境温度波动导致不育系的育性恢复、确保温敏雄性核不育水稻的花粉完全不育,在花粉母细胞形成期,将材料放入人工气候箱中25℃恒温处理8d,光照14h d⁻¹,光强1000 μ mol m⁻²s⁻¹。处理后移回自然条件下生长,同时对盆中生长健壮且发育一致的主茎进行挂牌标记。根据前期研究结果^[11],本研究以最上节间伸长最快时期的中间时段(即抽穗前第2天)的最上节间作为蛋白质差异分析

材料。因此,待稻穗发育至抽穗前第 2 天(即花粉完熟期),取挂牌标记的主茎穗顶部的 6 朵颖花镜检花粉育性,将花粉完全不育的稻穗对应的最上节间放入液氮中速冻,然后置于 -80°C 冰箱保存备用。

1.3 双向电泳和质谱分析

等电聚焦仪 IPGphor 为美国 GE Healthcare 公司产品、第二向电泳仪 Protean III Xi Cell 为美国 BioRad 公司产品、质谱仪 MALDI-TOF-TOF-MS 为美国 Bruker Daltonic 公司产品,其他仪器、试剂均为 Sigma 公司产品,双向凝胶电泳分析和 MALDI-TOF/TOF-MS 分析均在中南大学高等研究中心完成。

样品制备 同一材料的全部最上节间剪成约 0.5 cm 的小段后混匀,取 2 g 用液氮研磨后转移到离心管中,按 4:1 (V/W)的比例立即加入蛋白质裂解液(8 mol L^{-1} Urea, 2 mol L^{-1} Thiourea, 100 mmol L^{-1} DTT, 4% CHAPS, 1 mmol L^{-1} PMSF, 1 mmol L^{-1} EDTA),室温放置 2 h。在 4°C 下 $24000\times g$ 离心 1 h,留上清液^[14]。采用 Bradford 法^[15]测定蛋白质含量。

双向凝胶电泳 取 800 μg 蛋白质加入水化液 [8 mol L^{-1} Urea, 4% CHAPS, 100 mmol L^{-1} DTT, 0.5% IPG 缓冲液(pH 3~10),痕量溴酚蓝]至总体积为 350 μL ,充分混合后入胶条槽,将 IPG 干胶条(pH 3~10, $180\text{ mm}\times 3\text{ mm}\times 0.5\text{ mm}$)放入胶条槽,去气泡后覆盖矿物油,在 IPGphor 电泳仪上水化和等电聚焦, 20°C 自动进行,先在 30 V 电压下水化 13 h,然后经 500 V 1 h、1000 V 1 h,最后稳定在 8000 V 下进行。等电聚焦结束后的 IPG 胶条先放在平衡液 A [50 mmol L^{-1} Tris-HCl (pH 8.8)、 6 mol L^{-1} Urea、30%甘油、2% SDS、 100 mmol L^{-1} DTT、痕量溴酚蓝]中平衡 15 min,然后于平衡液 B [50 mmol L^{-1} Tris-HCl (pH 8.8)、 6 mol L^{-1} Urea、30%甘油、2% SDS、 65 mmol L^{-1} 碘乙酰胺、痕量溴酚蓝)中平衡 15 min,将胶条用双蒸水润洗、沥干后用于第二向 SDS-PAGE 电泳。第二向 SDS-PAGE 电泳的分离胶浓度为 12%,先用每胶 2.5 W 恒功率电泳 30 min,然后用每胶 15 W 恒功率电泳至溴酚蓝到达距离胶底约 1~2 cm 处终止电泳^[14,16]。为了获得重复性较高的双向电泳图谱,本实验采用同时进行 6 个样品的 2-DE 凝胶电泳分析,即长选 3S 和培矮 64S 各 3 个重复。

考马斯亮蓝染色和图像分析 第二向 SDS-PAGE 电泳凝胶用染色液(0.12%考马斯亮蓝,10%过硫酸胺,10%磷酸,10%甲醇)染色 4 h,然后用脱

色液(甲醇:超纯水=20:80)脱色 4 次,每次 30 min 以上^[14]。染色后的电泳凝胶用 UTA-1100 扫描仪透射扫描成像,用 PDQuest7.2 软件进行分析。

丰度差异蛋白质点胶内酶解 将经染色和图像分析的差异蛋白质点从胶块上取下置于 Eppendorf 管中,超纯水清洗 2 次后,每管加入 20~50 μL 50% CAN (含 25 mmol L^{-1} NH_4HCO_3 ,浸没胶块即可), 37°C 保温 30 min,脱色;然后用 100% CAN 脱水至不透明状态,弃液体后冷冻干燥。用 1 mmol L^{-1} HCl 将 TPCK-胰蛋白酶配成浓度为 1 g L^{-1} 的酶解母液,然后用 40 mmol L^{-1} NH_4HCO_3 配成浓度为 0.02 g L^{-1} 的酶解工作液。取适量酶解工作液加入冷冻干燥的胶块中,待胶块完全吸胀后吸去过量酶液,再加 20~50 μL 40 mmol L^{-1} NH_4HCO_3 覆盖胶块, 37°C 水浴消化 16~20 h^[14,16]。

MALDI-TOF/TOF-MS 分析 酶解后的肽片段用 50 μL 萃取液 I (50% CAN 含 5% TFA)和萃取液 II (75% CAN 含 5% TFA)各萃取 1 次,每次于 37°C 水浴保温 1 h,再超声 10 min,合并萃取液,冻干。然后溶于 2 μL CCA 饱和基质液中,取 1 μL 点样于质谱点样板上自然干燥。采用反射模式、正离子测定,一级质谱的质量扫描范围为 800~4000 Da,激光波长 337 nm,一级质谱信号单次扫描累加 600~800 次,二级质谱信号单次扫描累加 900~1200 次。使用标准肽混合物作为外标校正^[14,16]。

数据库检索 获得的混合物肽片段数据通过 Mascot (<http://www.matrixscience.com>)网站进行检索。检索数据库为 NCBI nr,物种为 *Oryza sativa*,胰蛋白酶酶切,允许最大的不完全裂解位点数为 1,可变修饰为半胱氨酸碳酰胺甲基化和甲硫氨酸氧化,无固定修饰,MS 质量容差为 100 ppm,MS/MS 质量容差为 0.8 Da。

1.4 半定量 RT-PCR 分析

Reverse Transcriptase Kit、1 kb DNA Marker、 $2\times$ Easy Taq PCR SuperMix (+dye)均购自 Thermo Scientific 生物技术有限公司。引物(表 1)合成由上海生工生物有限公司合成。

总 RNA 的提取和 cDNA 第一链的合成 取最上节间 0.2 g,按照 TRI-ZOI 试剂盒说明书提取总 RNA,经过 DNase I 消化基因组 DNA,得到纯化的总 RNA。取 2 μg 总 RNA,以 Anchored Oligo(dT)18 为反转录引物,利用 Reverse Transcriptase 反转录合

成第一链 cDNA，于-20℃保存。

半定量 RT-PCR 分析 以合成的第一链 cDNA 为模板，以 *Actin2* 为内参基因进行 RT-PCR 扩增。扩增条件为：94℃ 5 min→[94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 20 s]₂₆→72℃ 10 min。反应完毕后取 5 μL 产物用 1%的琼脂糖凝胶电泳进行检测。用定量软件 Image J (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>)计算所检测基因的相对表达量。

表 1 半定量 RT-PCR 引物

Table 1 Primers sequences used for semi-quantitative RT-PCR analysis

点号 Spot No.	正向引物 Forward primer (5'~3')	反向引物 Reverse primer (5'~3')
1	ACGCCGACTTCTACCAGC	CTTCCTTCTCGCCACTCAC
3	ATACCCACCATCTCCTACGC	TGTCCAAGGTCCCTCAAA
17	GCAGTGCGGCAACCAGAT	CGACGGGAACACGGAGAAG
19	TGGGAAGGGAAGGATGTT	AGGTTGCTCTCCACTCA
26	TGCTGAGTATGTCGTGGAG	CTGCTGGGAATGATGTAA
40	ATCCTCTTCACCTCGCTCTG	AATGGTAAATGGGCTTCC
<i>Actin2</i>	AGGTATCGCTGACCGTATGAG	CATCTGCTGGAATGTGCTGA

2 结果和分析

2.1 最上节间总蛋白质的双向电泳图谱分析

通过对 SDS-PAGE 凝胶进行染色、扫描成像和图像分析，以表达量相差 2 倍以上、且 3 次重复均出现相同变化的差异蛋白质点为研究对象。结果表明，长选 3S 和培矮 64S 的最上节间蛋白质 2-DE 图谱的重复

性较高。图 1 显示，最上节间蛋白质点大多数分布在偏酸性区域(pH=4~7)，分子量多为 59.0~16.0 kDa。通过分析可得，培矮 64S 和长选 3S 抽穗前 2 d 的最上节间共有 50 个差异蛋白质点(Spot 1~50)，图 1: A 中培矮 64S 表达上调的 30 个蛋白质点(spot 1~30)在长选 3S 表达下调；图 1: B 中长选 3S 表达上调的 20 个蛋白质点(spot 31~50)在培矮 64S 表达下调。

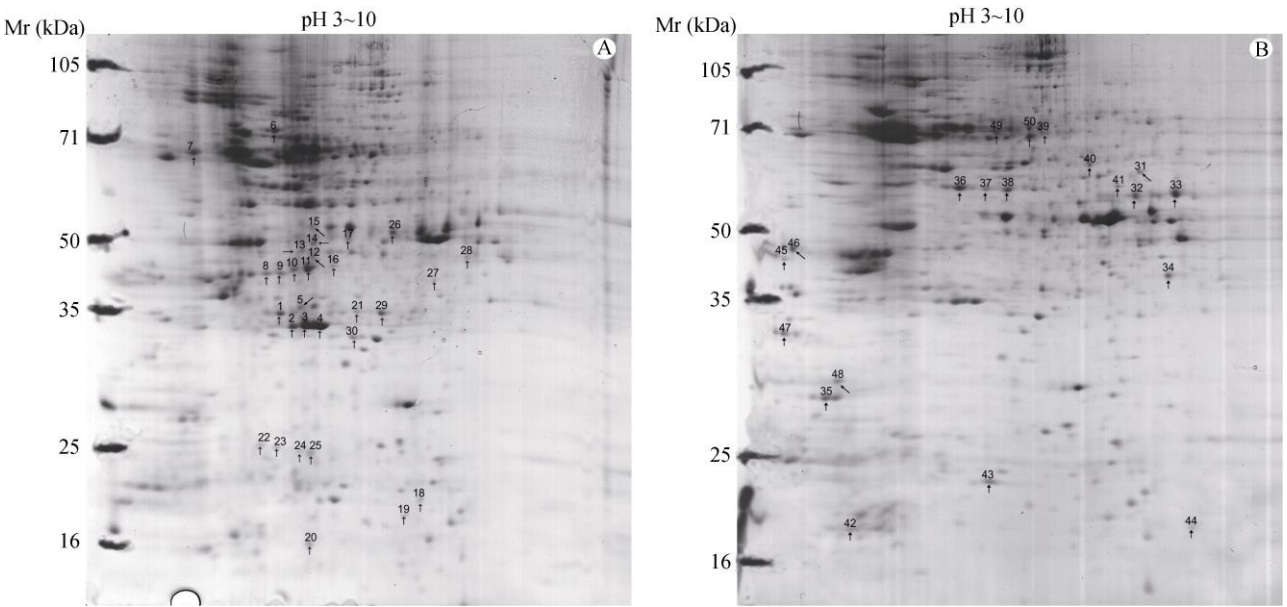


图 1 抽穗前 2 d 培矮 64S (A)和长选 3S (B)最上节间蛋白质 2-DE 凝胶图谱

Fig. 1 2-DE diagrams of proteins in uppermost internode of Pei'ai 64S (A) and Changxuan 3S (B) before 2 days to heading

2.2 差异表达蛋白质点的质谱鉴定

根据差异蛋白的表达量和质量，我们对 50 个差异蛋白质点进行了肽质量指纹图谱分析及数据

库检索，最终有 31 个蛋白质点得到鉴定(表 2)，占总差异蛋白质点的 62%。与培矮 64S 相比，这些鉴定的蛋白质中，有 20 个在长选 3S 中表达下调的蛋

白质(图 2: A)和 11 个表达上调的蛋白质(图 2: B)。分析中肽质谱指纹图分辨率比较低, 灵敏度不够, 其余 19 个蛋白质点由于在 MALDI-TOF-TOF-MS 或者因为匹配率和覆盖率太低未能得到鉴定。

表 2 鉴定的长选 3S 和培矮 64S 抽穗前 2 d 最上节间差异表达的蛋白质

Table 2 Identified different expression protein in uppermost internodes of Changxuan 3S and Pei'ai 64S before 2 days to heading

点号 Spot No.	蛋白 Protein	基因 Gene	登录号 Accession No.	分子量 Mr (kDa)	等电点 PI	覆盖率 Coverage rate (%)	肽段数 Number of peptides	得分 Score	表达 Expression
糖代谢 Glucose metabolism									
2	磷酸丙糖异构酶 Triosephosphate isomerase	<i>TPI</i>	LOC-Os01g05490	27.27	5.19	65	5	70	↓
7	核酮糖二磷酸羧化酶大链 Ribulose biphosphate carboxylase large chain	<i>rbcL</i>	LOC-Osp1g00420	53.42	4.59	52	10	138	↓
13	顺乌头酸酶 Aconitase	<i>ACOC</i>	LOC-Os08g09200	98.59	5.54	58	13	162	↓
14	果糖二磷酸醛缩酶 Fructose- biphosphate aldolase	<i>ALFC</i>	LOC-Os11g07020	42.21	5.92	36	9	126	↓
15	果糖二磷酸醛缩酶 Fructose-biphosphate aldolase	<i>ALFC</i>	LOC-Os11g07020	42.21	5.96	36	8	166	↓
26	3-磷酸甘油醛脱氢酶 1 Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 1	<i>GAPC1</i>	LOC-Os08g03290	36.56	6.68	21	9	174	↓
27	3-磷酸甘油醛脱氢酶 1 Glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase 1	<i>GAPC1</i>	LOC-Os08g03290	36.56	7.26	21	6	149	↓
28	3-磷酸甘油醛脱氢酶 1 Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 1	<i>GAPC1</i>	LOC-Os08g03290	36.56	7.51	21	9	205	↓
32	果糖二磷酸醛缩酶胞质同工酶 Fructose-biphosphate aldolase cytoplasmic isozyme	<i>FBA</i>	LOC-Os05g33380	39.24	8.18	36	7	81	↑
33	果糖二磷酸醛缩酶胞质同工酶 Fructose-biphosphate aldolase cytoplasmic isozyme	<i>FBA</i>	LOC-Os05g33380	39.24	8.45	36	12	197	↑
40	乙醇脱氢酶 1 Alcohol dehydrogenase 1	<i>ADH1</i>	LOC-Os11g10480	41.70	6.79	46	6	64	↑
49	烯醇化酶 Enolase	<i>ENO1</i>	LOC-Os10g08550	48.29	5.81	68	26	374	↑
能量代谢 Energy metabolism									
34	线粒体外膜孔蛋白 1 Mitochondrial outer membrane protein porin 1	<i>VDAC1</i>	LOC-Os09g19734	29.20	8.27	32	6	113	↑
39	ATP 合酶 α 亚基 ATP synthase subunit alpha	<i>ATPA</i>	LOC-Osp1g00310	55.62	6.45	62	15	101	↑
50	ATP 合酶 α 亚基 ATP synthase subunit alpha	<i>ATPA</i>	LOC-Osp1g00310	55.62	6.15	62	6	70	↑
解毒 Cell detoxification									
1	L-抗坏血酸过氧化物酶 2 L-ascorbate peroxidase 2	<i>APX2</i>	LOC-Os07g49400	27.22	5.10	47	8	114	↓
3	L-抗坏血酸过氧化物酶 1 L-ascorbate peroxidase 1	<i>APX1</i>	LOC-Os03g17690	27.25	5.60	59	13	264	↓
4	L-抗坏血酸过氧化物酶 1 L-ascorbate peroxidase 1	<i>APX1</i>	LOC-Os03g17690	27.25	5.98	45	12	219	↓
11	乳酰谷胱甘肽裂解酶 Lactoylglutathione lyase	<i>GLX-I</i>	LOC-Os08g09250	32.88	5.61	49	12	178	↓
29	可能的谷胱甘肽 S-转移酶 Probable glutathione-S-transferase GSTF2	<i>GSTF2</i>	LOC-Os01g55830	24.30	6.57	58	8	128	↓
氨基酸代谢 Amino acid metabolism									
10	半胱氨酸合成酶 Cysteine synthase	<i>RCSI</i>	LOC-Os12g42980	34.40	5.20	48	6	124	↓
20	1,2-二羟基-3-酮-5(甲硫基)戊烯双加氧酶 4 1,2-Dihydroxy-3-keto-5- methylthiopentene dioxygenase 4	<i>ARD4</i>	LOC-Os10g28360	22.06	5.93	39	4	46	↓
21	1,2-二羟基-3-酮-5(甲硫基)戊烯双加氧 酶 4 1,2-Dihydroxy-3-keto-5- methylthiopentene dioxygenase 4	<i>ARD4</i>	LOC-Os10g28360	22.06	6.47	39	4	46	↓

续表(Continued)									
点号 Spot No.	蛋白 Protein	基因 Gene	登录号 Accession No.	分子量 Mr (kDa)	等电点 PI	覆盖率 Coverage rate (%)	肽段数 Number of peptides	得分 Score	表达 Expression
36	谷氨酰胺合成酶同工酶 1-1 Glutamine synthetase cytosolic isozyme 1-1	<i>GLN1-1</i>	LOC-Os02g50240	40.07	5.56	44	19	228	↑
基因表达调控 Gene expression regulation									
6	核输入蛋白亚基 α -1b Importin subunit alpha-1b	<i>IMA1B</i>	LOC-Os05g06350	59.10	5.12	59	7	67	↓
19	核苷二磷酸激酶 1 Nucleoside diphosphate kinase 1	<i>NDKR</i>	LOC-Os07g30970	16.85	6.76	33	5	90	↓
22	DNA 指导的 RNA 聚合酶 β 亚基 DNA-directed RNA polymerase subunit beta	<i>rpoC1</i>	LOC-Osp1g00250	17.45	4.89	55	7	46	↓
46	延伸因子 1- δ 1 Elongation factor 1-delta 1 (EF-1-delta 1)	<i>EF1D1</i>	LOC-Os07g42300	24.90	4.68	43	6	100	↑
信号转导 Signal transduction									
35	翻译控制肿瘤蛋白同源物 Translationally-controlled tumor protein homolog	<i>TCTP</i>	LOC-Os11g43900	18.99	4.79	38	12	232	↑
细胞骨架 Cell cytoskeleton									
17	微管蛋白 β -7 链 Tubulin beta-7 chain	<i>TUBB7</i>	LOC-Os03g56810	50.42	6.44	41	8	100	↓
44	肌动蛋白解聚因子 4 Actin-depolymerizing factor 4	<i>ADF4</i>	LOC-Os03g60590	16.05	8.66	38	6	125	↑

↑: 上调; ↓: 下调。
↑: Up regulation; ↓: Down regulation.

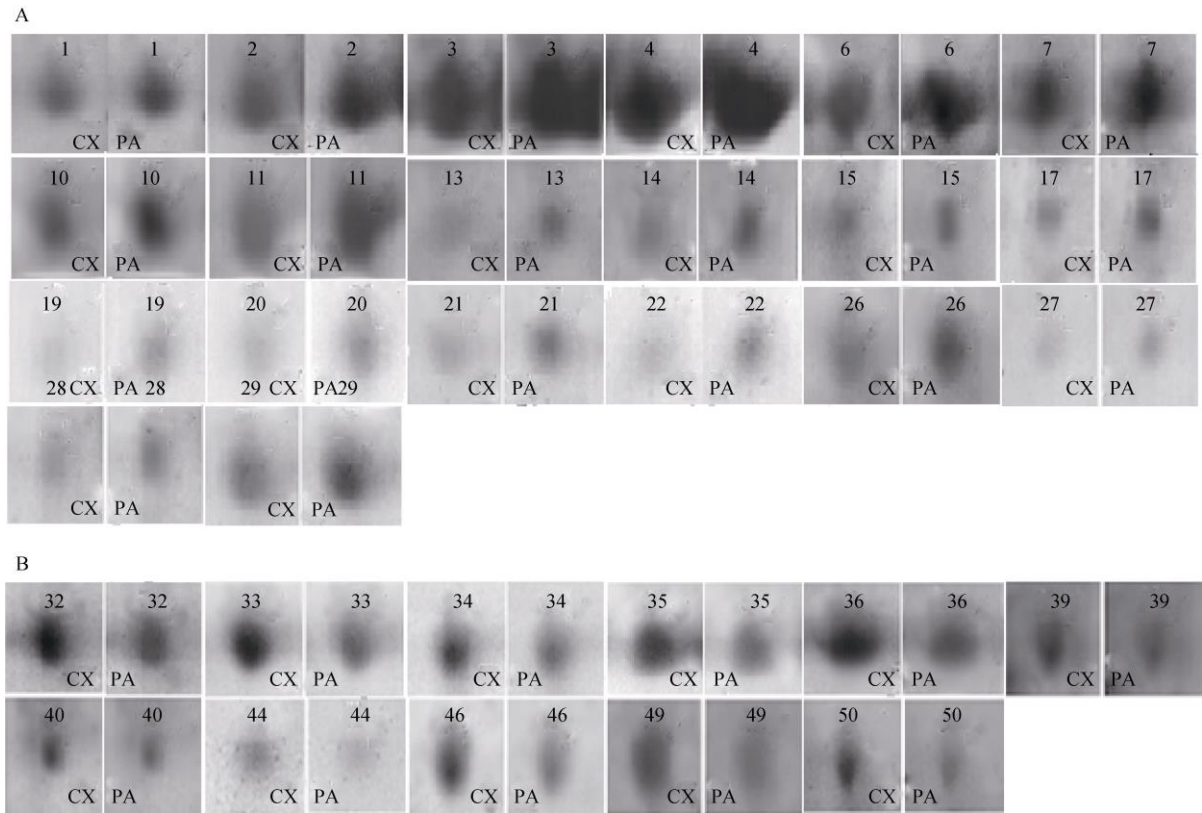


图 2 鉴定的蛋白质点 2-DE 放大图。CX: 长选 3S; PA: 培矮 64S。
Fig. 2 2-DE magnified maps of identified protein spots. CX: Changxuan 3S; PA: Pei'ai 64S.

在图 1: A 中, Spot 3 和 4 被鉴定为胞浆中 L-抗坏血酸过氧化物酶 1; Spot 14 和 15 被鉴定为叶绿体前体果糖二磷酸醛缩酶; Spot 20 和 21 被鉴定为 1,2-二羟基-3-酮-5(甲硫基)戊烯双加氧酶 4; Spot 26、27 和 28 被鉴定为胞浆中 3-磷酸甘油醛脱氢酶。在图 1: B 中, Spot 32 和 33 被鉴定为果糖二磷酸醛缩酶胞质同工酶; Spot 39

和 50 被鉴定为线粒体中 ATP 合酶 α 亚基。这些被鉴定为同一种蛋白质的蛋白质点, 分布在胶上的不同位置, 分子量相近, 但等电点却不一样, 可能是同一种蛋白质的不同形式, 具有不同的翻译后修饰。

2.3 差异表达蛋白质的功能分类

为深入解析 *eui* 突变体长选 3S 的抽穗性状与差异表达蛋白质之间的内在联系, 将鉴定的蛋白质在 Mascot (<http://www.matrixscience.com>) 网站对本地数据库进行检索, 并根据相关文献报道对这些蛋白质按照功能进行分类(表 2)。由表 2 可知, 这些鉴定的蛋白质可分为 7 类: (1) 糖代谢相关蛋白, 占鉴定蛋白数的 38.71% (下同); (2) 能量代谢相关蛋白, 占 12.90%; (3) 细胞解毒相关蛋白, 占 16.13%; (4) 氨基酸代谢相关蛋白, 占 12.90%; (5) 信号转导相关蛋白, 占 3.23%; (6) 基因表达调控相关蛋白, 占 9.68% 和 (7) 细胞骨架相关蛋白, 占 6.45%。其中与代谢相关的蛋白质较多, 占鉴定蛋白数的 67.42%。

2.4 半定量 RT-PCR 分析

为探讨差异蛋白质点在 mRNA 水平的表达情

况, 我们对蛋白点 1、3、17、19、26 和 40 对应的基因进行了半定量 RT-PCR 分析(图 3)。同时, 以这些基因在长选 3S 最上节间的表达量设为相对值 1, 用定量软件 Image J 计算这 6 个基因在培矮 64S 最上节间的表达量, 分别是 0.73 (Spot 1)、1.61 (Spot 3)、1.98 (Spot 17)、0.92 (Spot 19)、1.21 (Spot 26) 和 0.72 (Spot 40), 这与凝胶图显示的结果一致。

根据图 3 可知, Spot 3、17、26 和 40 的蛋白质表达与基因表达(即 mRNA 水平)情况一致, 即在长选 3S 最上节间的 Spot 3、17 和 26 蛋白质对应的基因表达下调的, 蛋白质水平也下调; Spot 40 蛋白质对应的基因表达上调的, 蛋白质水平也上调, 表明这 4 个蛋白对应的基因很可能与最上节间快速伸长有关。但 Spot 1 和 19 蛋白质表达与对应的 mRNA 水平不一致, 即长选 3S 最上节间的这 2 个蛋白质点对应的基因表达上调, 而在蛋白质水平则下调, 两者刚好相反, 可能是这 2 个基因在长选 3S 中转录后的 mRNA 经翻译产生的蛋白质发生了翻译后修饰, 从而减少了对应蛋白的表达量, 这 2 个基因也可能与水稻最上节间伸长有关, 但还需要进一步的研究证明。

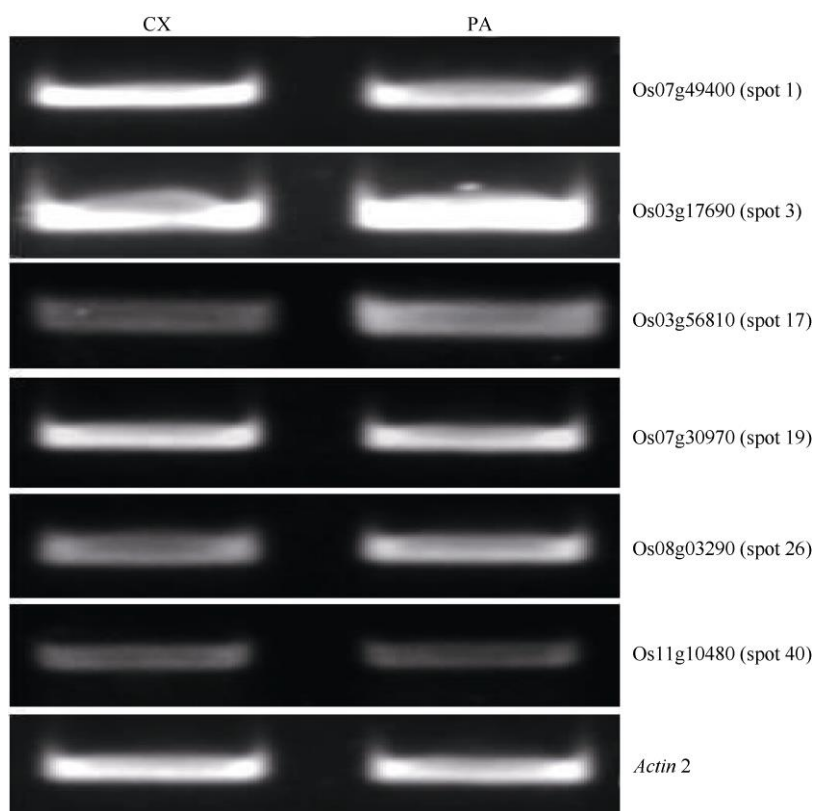


图 3 某些基因的 RT-PCR 分析

Fig. 3 Expression of some genes in Changxuan 3S (CX) and Pei'ai 64S (PA) by RT-PCR

3 讨论

3.1 糖代谢和能量代谢相关蛋白

叶绿体中果糖二磷酸醛缩酶和核酮糖二磷酸羧化酶大链前体蛋白在利用 ATP 和 NADPH 同化 CO₂ 形成糖类过程中发挥作用^[17]。与培矮 64S 相比, 长选 3S 最上节间中这 2 个蛋白表达下调, 表明其将 ATP 和 NADPH 中活跃化学能转换为贮存在糖类中稳定化学能的速率也可能下降。胞浆中果糖二磷酸醛缩酶、磷酸丙糖异构酶、3-磷酸甘油醛脱氢酶、烯醇化酶和乙醇脱氢酶是催化糖酵解产生 ATP 和 NAD⁺ 的酶, ATP 可直接供能, NAD⁺ 进入线粒体可调节柠檬酸循环^[18]。与培矮 64S 相比, 长选 3S 最上节间胞浆中果糖二磷酸醛缩酶同工酶、烯醇化酶、乙醇脱氢酶 1 表达上调, 而磷酸丙糖异构酶、3-磷酸甘油醛脱氢酶表达下调, 表明长选 3S 可能通过这些酶蛋白的上调或下调表达来实现对糖酵解作用的调节, 积累 ATP 和 NAD⁺, 调节柠檬酸循环。胞浆中顺乌头酸酶是乙醛酸循环体中催化柠檬酸转变为异柠檬酸的酶^[18], 长选 3S 中此酶表达下调, 可降低乙醛酸循环中柠檬酸合酶催化草酰乙酸与乙酰-CoA 形成柠檬酸的速率, 减少乙酰-CoA 的消耗、从而促进柠檬酸循环。线粒体 ATP 合酶 α 亚基是构成 ATP 合酶的重要组成部分之一, 线粒体外膜孔蛋白构成的孔道介导 ATP、NAD、乙酰-CoA 等物质的跨膜转运^[18]。长选 3S 最上节间中这两个蛋白质表达上调, 说明其合成和利用 ATP 的潜力较强。因此, *eui* 突变体长选 3S 可能是通过调节最上节间上述酶蛋白的表达来调节糖代谢和能量代谢过程, 提高 ATP 及其它代谢中间产物的合成和利用效率, 从而保证节间细胞快速分裂和伸长生长所需要的物质和能量供给。

3.2 细胞解毒相关蛋白

植物体内 L-抗坏血酸过氧化物酶 1 和 L-抗坏血酸过氧化物酶 2 在清除 H₂O₂ 等活性氧、维持正常生理功能方面具有重要作用^[19]。谷胱甘肽-S-转移酶是植物中重要的抗性相关蛋白, 在抵御活性氧伤害, 保护 DNA 和某些蛋白质分子避免受到损害等方面具有重要作用^[20-21]。乳酰谷胱甘肽裂解酶和乙二醛酶 2 共同组成的乙二醛酶系统在降低甲基乙二醛生理活性浓度, 避免细胞受到损害过程中发挥作用^[22]。与培矮 64S 相比, 长选 3S 抽穗期最上节间上述酶均

表达下调, 这可能与长选 3S 最上节间的细胞分裂与生长速率快、代谢旺盛、产生活性氧等有害物质相对减少、在细胞内有害物质的产生与清除之间重新建立了新的动态平衡有关。

3.3 氨基酸代谢相关蛋白

1,2-二羟基-3-酮基-5-甲硫基戊烯双加氧酶 4 (ARD4) 是参与蛋氨酸循环途径的酶^[23-24]。半胱氨酸合成酶催化 H₂S 与 O-乙酰丝氨酸生成的半胱氨酸作为蛋氨酸中硫的供体参与蛋氨酸的合成^[18]。植物体内蛋氨酸水平直接影响到乙烯的产率^[17]。有研究表明, 水稻矮秆品种及其衍生的半矮秆品种, 其植株内源 ABA 含量和乙烯释放率都明显高于相应的高秆品种, 乙烯可能参与了水稻矮生性状的表达、并抑制水稻茎的伸长生长^[25]。与对照培矮 64S 相比, 长选 3S 抽穗期最上节间中 ARD4 和半胱氨酸合成酶表达下调, 说明它可能是通过下调节间组织中乙烯的产率, 从而降低乙烯对节间伸长生长的抑制作用, 促进节间细胞伸长生长。谷氨酰胺合成酶是氮素同化过程中的关键酶, 在无机氮转化为有机氮的过程中起关键作用^[26], 长选 3S 中此酶表达上调, 说明其最上节间的氮素同化能力可能比培矮 64S 的强, 从而保证节间细胞快速分裂和伸长生长对蛋白质的需求。

3.4 信号转导相关蛋白

翻译调控肿瘤蛋白(TCTP)是普遍存在于真核细胞中的 1 个蛋白家族。Berkowitz 等对拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 中 TCTP 的研究表明, TCTP 在植物分生组织细胞和伸展细胞中的表达都明显高于其他组织, TCTP 在 Ras 蛋白 GTP-GDP 转换中具有鸟苷酸交换因子(GEF)的功能, 活化 Ras 蛋白, 参与 Ras-MAPK (有丝分裂原活化蛋白激酶) 信号通路, 调节植物内源生长素动态平衡, 促进细胞分裂和细胞伸长生长等^[27]。本研究结果表明, 与培矮 64S 相比, 长选 3S 最上节间中 TCTP 表达上调, 说明 TCTP 可能在促进节间细胞分裂和伸长过程中发挥着重要作用。

3.5 基因表达调控相关蛋白

核输入蛋白 α -1b 亚基参与亲核蛋白的入核转运, 在细胞分裂与分化、细胞凋亡及基因表达调控等方面发挥作用^[28-30]。核苷二磷酸激酶 1 在维持细

胞内核苷三磷酸浓度,调节细胞增殖、分化和发育中发挥重要作用^[31]。DNA 指导的 RNA 聚合酶 β 链是构成 RNA 聚合酶的亚基之一,真核延伸因子 1-delta 1 是蛋白质翻译过程中肽链延伸的因子之一,两者都是基因表达过程中不可或缺的组分。与培矮 64S 相比较,长选 3S 最上节间核输入蛋白 α -1b 亚基、核苷二磷酸激酶 1 和 DNA 指导的 RNA 聚合酶 3 个参与基因复制、转录的蛋白表达下调,而参与 mRNA 翻译的延伸因子 1-delta 1 则表达上调,导致长选 3S 在最上节间快速伸长期最上节间细胞分裂、尤其是细胞伸长生长明显比培矮 64S 的快,因为细胞伸长生长涉及大量有机物(其中主要是蛋白质)的生物合成。

3.6 细胞骨架相关蛋白

β -微管蛋白是微管的基本结构单位之一,在细胞分裂和细胞伸长等生物学过程中发挥着重要作用。玉米(*Zea mays*)幼苗快速分裂的根尖组织中 β -微管蛋白转录水平显著高于停止分裂的根尖组织^[32]。不同浓度 GA_3 处理的燕麦(*Avena sativa*)茎切段长度变化与其 β -微管蛋白转录水平变化基本一致,两者之间呈正相关性^[33]。抽穗前第 4 天至抽穗当天,长选 3S 最上节间伸长长度是培矮 64S 的约 2.2 倍,其节间伸长速率明显比培矮 64S 的快^[11]。本研究结果表明,抽穗期长选 3S 最上节间微管蛋白 β -7 链的表达水平低于培矮 64S,表达下调,节间长度变化与 β -微管蛋白表达水平的变化不一致,这可能与植物微管蛋白是以基因家族形式存在,且各成员间相互协作调节植物的生长发育有关,如水稻中已报道 9 个 α 微管蛋白基因和 16 个 β 微管蛋白基因^[34]。微丝在高等植物形态发生的细胞分裂和伸长过程中起着关键的调节作用^[35]。肌动蛋白解聚因子(ADF)通过解聚和切割微丝来调节微丝的功能^[36]。拟南芥 *ADF4* 基因在转基因烟草中的过量表达可抑制细胞伸长生长,使根毛、下胚轴和花粉管变短变粗^[37]。本研究结果表明,与培矮 64S 相比,长选 3S 最上节间中 *ADF4* 表达上调,暗示在最上节间快速伸长期,长选 3S 可能通过上调表达 *ADF4*,从而调节微丝的组装和去组装,进而调节节间的伸长生长。

综上所述,在鉴定的培矮 64S 和长选 3S 抽穗前 2 d 最上节间差异表达的 31 个蛋白质主要是参与细胞代谢的相关蛋白,其次是参与基因表达调控相

关蛋白和细胞骨架相关蛋白。*eui* 基因促进水稻抽穗期最上节间伸长,可能是通过 *eui* 基因表达使其最上节间 GA_4 积累增加^[13],调节最上节间内源激素之间平衡^[10-11],进而调节参与细胞代谢、基因表达调控、细胞骨架等相关蛋白的上调或下调表达,促进节间细胞快速分裂和伸长生长,最终实现最上节间剧烈伸长的。

本研究鉴定出的差异表达蛋白质中并没有调控细胞分裂和伸长的关键蛋白因子,如周期蛋白、膨脹素、木葡聚糖内转葡萄糖基酶蛋白等。今后在开展 *eui* 基因促进水稻最上节间伸长的分子机理研究时,应增加节间快速伸长期的取样次数,同时将节间分区段(即居间分生组织区、伸长区和成熟区)分别进行 2-DE 凝胶电泳分析和 MALDI-TOF-TOF-MS 肽质谱指纹图谱分析,分析参与细胞增殖与伸长关键事件调控的蛋白质,克隆编码这些蛋白质的基因并利用基因敲除、反义 RNA、酵母双杂交等方法鉴定其生物学功能。

致谢 本研究得到了中南大学高等研究中心刘健平博士的大力支持。

参考文献

- [1] RUTGER J N, CARNAHAN H L. A fourth genetic element to facilitate hybrid cereal production-a recessive tall in rice [J]. *Crop Sci*, 1981, 21(3): 373-376. doi: 10.2135/cropsci1981.0011183X002100030005x.
- [2] SHEN Z T, HE Z H. Interaction between *eui* gene and WAMS cytoplasm of rice and improvement of panicle exertion of MS line [J]. *SABRAO J*, 1989, 4(6): 753-756.
- [3] HE Z H, SHEN Z T. Inheritance of panicle exertion and improvement of male sterile line in rice [J]. *Chin J Rice Sci*, 1991, 5(1): 1-6.
何祖华, 申宗坦. 水稻穗伸出度的遗传和不育系改良 [J]. *中国水稻科学*, 1991, 5(1): 1-6.
- [4] HE Z H, SHEN Z T. Sensitivity of elongated internode gene to GA_3 and improvement of MS line in rice [J]. *Acta Agron Sin*, 1994, 20(2): 161-167.
何祖华, 申宗坦. 水稻长节间基因对 GA_3 敏感性和不育系改良 [J]. *作物学报*, 1994, 20(2): 161-167.
- [5] YANG R C, ZHANG S B, HUANG R H, et al. Breeding technology of *eui*-hybrids of rice [J]. *Sci Agri Sin*, 2002, 35(3): 233-237. doi: 10.3321/j.issn:0578-1752.2002.03.001.
杨仁崔, 张书标, 黄荣华, 等. 高秆隐性杂交稻(*e*-杂交稻)的育种技

- 术 [J]. 中国农业科学, 2002, 35(3): 233–237. doi: 10.3321/j.issn:0578-1752.2002.03.001.
- [6] ZHANG R X, LIU H P, ZHANG H L. Study progress in breeding and application of e-type hybrid rice [J]. Acta Agri Jiangxi, 2002, 14(3): 40–45. doi: 10.3969/j.issn.1001-8581.2002.03.008.
- 张瑞祥, 刘海平, 张红林. e 型杂交水稻育种与利用研究进展 [J]. 江西农业学报, 2002, 14(3): 40–45. doi: 10.3969/j.issn.1001-8581.2002.03.008.
- [7] ZHOU G Q, CHEN L B, LIANG M Z, et al. Development of TGMS rice with *eui*-gene coincided with double low critical temperature [J]. Life Sci Res, 2000, 4(4): 290–294. doi: 10.3969/j.issn.1007-7847.2000.04.002.
- 周广治, 陈良碧, 梁满中, 等. 长穗颈双低温敏核不育水稻的选育 [J]. 生命科学研究, 2000, 4(4): 290–294. doi: 10.3969/j.issn.1007-7847.2000.04.002.
- [8] LIANG M Z, ZHONG W H, XU M L, et al. Genetic analysis of TGMS rice Shuangdi Pei eS with *eui* gene [J]. Acta Agron Sin, 2004, 30(8): 739–744. doi: 10.3321/j.issn:0496-3490.2004.08.014.
- 梁满中, 钟卫华, 徐孟亮, 等. 长穗颈温敏核不育水稻双低培 eS 遗传特性的研究 [J]. 作物学报, 2004, 30(8): 739–744. doi: 10.3321/j.issn:0496-3490.2004.08.014.
- [9] XIAO H H, WANG W L, HAO X H. Studies on GA₃ spraying dosage for *eui* TGMS rice Changxuan 3S in its hybrid seed production [J]. Agri Sci Techn, 2010, 11(6): 61–64.
- [10] XIAO H H. Relationship between uppermost internodes elongation of TGMS rice with *eui* gene and endogenous plant hormones [J]. Plant Physiol Commun, 2008, 44(4): 656–660.
- 肖辉海. 长穗颈温敏核不育水稻穗颈节间伸长与内源激素的关系 [J]. 植物生理学通讯, 2008, 44(4): 656–660.
- [11] XIAO H H, HAO X H, WANG W L. Effect of temperature on uppermost internode elongation of thermosensitive-genic male sterility rice with elongated uppermost internode gene [J]. Chin Bull Bot, 2011, 46(2): 138–146. doi: 10.3724/SP.J.1259.2011.00138.
- 肖辉海, 郝小花, 王文龙. 温度对温敏核不育水稻 *eui* 突变体最上节间伸长的影响 [J]. 植物学报, 2011, 46(2): 138–146. doi: 10.3724/SP.J.1259.2011.00138.
- [12] XIAO H H. Variations in length and cell numbers of the uppermost internode of TGMS rice with *eui* gene [J]. J Trop Subtrop Bot, 2007, 15(3): 224–228. doi: 10.3969/j.issn.1005-3395.2007.03.007.
- 肖辉海. 长穗颈温敏核不育水稻穗颈节间长度及细胞学观察 [J]. 热带亚热带植物学报, 2007, 15(3): 224–228. doi: 10.3969/j.issn.1005-3395.2007.03.007.
- [13] ZHU Y Y, NOMURA T, XU Y H, et al. Elongated uppermost internode encodes a cytochrome P450 monooxygenase that epoxidizes gibberellins in a novel deactivation reaction in rice [J]. Plant Cell, 2006, 18(2): 442–456. doi: 10.1105/tpc.105.038455.
- [14] XIAO X J. Proteome analysis of plant development mutants [D]. Changsha: Hunan University, 2008: 61–64.
- 萧小鹏. 植物发育突变体的蛋白质组学研究 [D]. 长沙: 湖南大学, 2008: 61–64.
- [15] WANG X K. Principles and Techniques of Plant Physiological Biochemical Experiment [M]. 2nd ed. Beijing: Higher Education Press, 2007: 190–192.
- 王学奎. 植物生理生化实验技术 [M]. 第二版. 北京: 高等教育出版社, 2007: 190–192.
- [16] YANG Y J. Proteome comparative analysis of cryptochromes of *Arabidopsis* [D]. Changsha: Hunan University, 2008: 24–26. doi: 10.7666/d.y1260987.
- 杨粤军. 拟南芥隐花素蛋白质组学研究 [D]. 长沙: 湖南大学, 2008: 24–26. doi: 10.7666/d.y1260987.
- [17] PAN R C. Plant Physiology [M]. 5th ed. Beijing: Higher Education Press, 2004: 73–76.
- 潘瑞炽. 植物生理学 [M]. 第 5 版. 北京: 高等教育出版社, 2004: 73–76.
- [18] WANG J Y, ZHU S G, XU C F. Biochemistry, Volume 2 [M]. 3rd ed. Beijing: Higher Education Press, 2004: 65–109, 129–137, 159–161, 349–354.
- 王镜岩, 朱圣庚, 徐长法. 生物化学, 下册 [M]. 第 3 版. 北京: 高等教育出版社, 2004: 65–109, 129–137, 159–161, 349–354.
- [19] SHIGEOKA S, ISHIKAWA T, TAMOI M, et al. Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes [J]. J Exp Bot, 2002, 53(372): 1305–1319. doi: 10.1093/jexbot/53.372.1305.
- [20] BARTLING D, RADZIO R, STEINER U, et al. A glutathione S-transferase with glutathione-peroxidase activity from *Arabidopsis thaliana*: Molecular cloning and functional characterization [J]. Eur J Biochem, 1993, 216(2): 579–586. doi: 10.1111/j.1432-1033.1993.tb18177.x.
- [21] MARRS K A. The functions and regulation of glutathione S-transferases in plants [J]. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 1996, 47(6): 127–158. doi: 10.1146/annurev.arplant.47.1.127.
- [22] THORNALLEY P J. The glyoxalase system: New developments towards functional characterization of a metabolic pathway fundamental to biological life [J]. Biochem J, 1990, 269(1): 1–11. doi: 10.1042/bj2690001.
- [23] WRAY J W, ABELES R H. The methionine salvage pathway in *Klebsiella pneumoniae* and rat liver: Identification and characterization of two novel dioxygenases [J]. J Biol Chem, 1995, 270(7): 3147–3153.

- doi: 10.1074/jbc.270.7.3147.
- [24] AL-MJENI F, JU T T, POCHAPSKY T C, et al. XAS investigation of the structure and function of Ni in acireductone dioxygenase [J]. *Biochemistry*, 2002, 41(21): 6761–6769. doi: 10.1021/bi012209a.
- [25] TANG R S, WU G N, ZHANG Y H, et al. Regulation of dwarfism of rice by endogenous abscisic acid and ethylene [J]. *Jiangsu J Agri Sci*, 1991, 7(2): 48–52.
- 汤日圣, 吴光南, 张远海, 等. 水稻矮生性状的內源脱落酸和乙烯调节 [J]. *江苏农业学报*, 1991, 7(2): 48–52.
- [26] LAM H M, COSCHIGANO K T, OLIVEIRA I C, et al. The molecular-genetics of nitrogen assimilation into amino acids in higher plants [J]. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Bio*, 1996, 47(7): 569–593. doi: 10.1146/annurev.arplant.47.1.569.
- [27] BERKOWITZ O, JOST R, POLLMANN S, et al. Characterization of TCTP, the translationally controlled tumor protein, from *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Cell*, 2008, 20(12): 3430–3447. doi: 10.1105/tpc.108.061010.
- [28] CONTI E, UY M, LEIGHTO L, et al. Crystallographic analysis of the recognition of a nuclear localization signal by the nuclear import factor karyopherin α [J]. *Cell*, 1998, 94(2): 193–204. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81419-1.
- [29] ADAM S A, SENGUPTA K, GOLDMAN R D. Regulation of nuclear lamin polymerization by importin α [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(13): 8464–8468. doi: 10.1074/jbc.M709572200.
- [30] KIM B J, LEE H. Caspase-mediated cleavage of importin- α increases its affinity for MCM and downregulates DNA synthesis by interrupting the binding of MCM to chromatin [J]. *Biochim Biophys Acta (BBA) Mol Cell Res*, 2008, 1783(12): 2287–2293. doi: 10.1016/j.bbamer.2008.07.026.
- [31] NARAYANAN R, RAMASWAMI M. Regulation of dynamin by nucleoside diphosphate kinase [J]. *J Bioenerg Biomembr*, 2003, 35(1): 49–55. doi: 10.1023/A:1023441806530.
- [32] HUSSEY P J, HAAS N, HUNSPERGER J, et al. The β -tubulin gene family in *Zea mays*: Two differentially expressed β -tubulin genes [J]. *Plant Mol Biol*, 1990, 15(6): 957–972. doi: 10.1007/BF00039438.
- [33] MENDU N, SILFLOW C D. Elevated levels of tubulin transcripts accompany the GA₃-induced elongation of oat internode segments [J]. *Plant Cell Physiol*, 1993, 34(7): 973–983.
- [34] RAO G D, ZHANG J G. Advances of studies on plant tubulin gene [J]. *World For Res*, 2013, 26(3): 17–20.
- 饶国栋, 张建国. 植物微管蛋白基因研究进展 [J]. *世界林业研究*, 2013, 26(3): 17–20.
- [35] KOST B, MATHUR J, CHUA N H. Cytoskeleton in plant development [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 1999, 2(6): 462–470. doi: 10.1016/S1369-5266(99)00024-2.
- [36] DONG C H, XIA G X, HONG Y, et al. ADF proteins are involved in the control of flowering and regulate F-actin organization, cell expansion, and organ growth in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2001, 13(6): 1333–1346. doi: 10.1105/tpc.13.6.1333.
- [37] PENG S Q, HUANG D F. Expression of an *Arabidopsis* actin-depolymerizing factor 4 gene (*AtADF4*) in tobacco causes morphological change of plants [J]. *J Plant Physiol Mol Biol*, 2006, 32(1): 52–56. doi: 10.3321/j.issn:1671-3877.2006.01.008.
- 彭世清, 黄冬芬. 拟南芥肌动蛋白解聚因子 4 基因(*AtADF4*)在烟草中表达引起植株形态变化 [J]. *植物生理与分子生物学学报*, 2006, 32(1): 52–56. doi: 10.3321/j.issn:1671-3877.2006.01.008.