

强休眠玉米种子休眠前后的蛋白差异表达

兰海¹, 冷亦峰², 周树峰¹, 刘坚¹, 荣廷昭¹

(¹四川农业大学玉米研究所/农业部西南玉米生物学与遗传育种重点实验室, 成都 611130; ²四川省农业科学院作物研究所, 成都 610066)

摘要:以强休眠玉米自交系 08-641 为试验材料, 分别对处于休眠状态下的新鲜收获种子和经过 10 d 后熟作用破除休眠的种子进行了蛋白质组学差异表达分析。结果表明, 通过双向电泳技术在 3 次重复试验下休眠状态的 08-641 鲜种子蛋白 2-DE 图谱上共检测到约 600 个蛋白质点, 在经过 10 d 后熟作用破除休眠的 08-641 种子蛋白 2-DE 图谱上共检测到约 620 个蛋白质点, 其中下调表达蛋白质点 4 个, 上调表达蛋白质点 4 个, 新增蛋白质点 8 个, 缺失表达蛋白质点 7 个。经过质谱鉴定的差异表达蛋白质主要涉及球蛋白、胚胎晚期丰富蛋白、豆球蛋白等贮藏物蛋白质; 蛋白酶体、山梨醇脱氢酶等参与物质代谢的蛋白质; 热激蛋白等参与蛋白质结构、细胞功能调控的蛋白质。推测 08-641 种子休眠是由于种子内休眠相关蛋白的过量表达或缺失抑制了种子的正常萌发。

关键词:玉米; 种子休眠; 贮藏物质; 双向电泳; 蛋白质组

Proteomic Analysis of Storage Substances during after-ripening of Dormant Seeds with Dry Ripening Process in Maize Inbred Line 08-641

LAN Hai¹, LENG Yi-feng², ZHOU Shu-feng¹, LIU Jian¹, RONG Ting-zhao¹

(¹Maize Research Institute, Sichuan Agricultural University/Key Laboratory of Biology and Genetic Improvement of Maize in Southwest Region, Ministry of Agriculture, Chengdu 611130; ²Crop Research Institute, Sichuan Academy of Agricultural Sciences, Chengdu 610066)

Abstract: Maize inbred line 08-641 was used as material to analyze the proteome difference during seed dormancy breaking by mean of 2-D electrophoresis method. The results showed that 600 protein spots were detected in fresh dormant seed and 620 protein spots were detected when seed dormancy was broken through 10 d after-ripening, respectively. Among the 23 differential protein expressions spots, there were 4 down-regulated protein spots, 4 up-regulated proteins, 8 protein spots with additional expression, and 7 protein spots with missing expression. The proteins identified by MALDI-TOF-MS were main included globulin, late embryogenesis abundant protein, legumin and other storage proteins, proteasome and sorbitol dehydrogenase involved in metabolism, heat shock protein involved in protein structure and cell function regulation. The seed dormancy of maize inbred line 08-641 was due to lack of expression or over-expression of some dormancy-related proteins.

Key words: maize; seed dormancy; storage substances; two dimensional electrophoresis; proteome

休眠是植物在长期的系统发育过程中形成的一种生物学特性。具有正常活力的种子处于适宜的萌发条件而不能正常萌发, 称为种子休眠^[1]。Bewley 将种子休眠定义为在足够的水分、温度和氧气条件

下, 种子萌发被抑制的一种内在状态。不同研究者对种子休眠问题有着不同的研究对象, 导致对休眠的定义难成定论, 这可能是因不同物种种子的休眠要用不同的方法才能被打破。随着植物种子休眠相

收稿日期: 2014-03-09 修回日期: 2014-05-06 网络出版日期: 2014-12-19

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20141219.1434.001.html>

基金项目: 国家“863”重点课题 (2011AA10A103); 四川省青年科技基金项目 (09ZQ026-012)

第一作者研究方向为作物遗传育种。E-mail: lanhai_maize@163.com

通信作者: 荣廷昭, 研究方向为作物遗传育种。E-mail: rongtz@sicau.edu.cn

关研究的广泛开展,目前研究者对种子休眠的定义多从种子自身角度进行描述^[2-5]。

种子休眠的基因调控是复杂的,采用转录子组(transcriptome)和蛋白质组(proteome)技术是识别这些基因的最有效的方法^[6]。蛋白质是生物体内各种生理过程的执行体。在植物种子休眠和萌发的过程中,基因表达的变化导致相关蛋白质的变化。蛋白质分离、丰度检测及蛋白质鉴定等常通过以双向凝胶电泳(2D-gel)及质谱(mass spectrometry)分析为技术基础的蛋白质组学分析来完成。K. Gallardo等^[7]以干燥成熟的拟南芥种子为研究对象,通过蛋白质组学方法对种子休眠和萌发过程进行了蛋白质组分析,共分离得到1300种蛋白质。发现其中有74种蛋白质在种子吸胀阶段或在胚突破过程中改变了丰度;同时也新发现了一些与萌发有关的蛋白质(如肌动蛋白异构体和WD-40重复蛋白)。K. Chibani等^[8]研究发现新鲜收获的拟南芥休眠种子和经后熟的非休眠种子中存在32种差异蛋白。成熟干燥和萌发后,橡胶(*Hevea brasiliensis*)种子的蛋白质组之间存在40%的差异。

玉米是世界上重要的粮、饲作物,在农业生产中具有重要的经济地位和作用。在我国西南玉米生产区,部分成熟待收获的玉米自交系或品种如遇阴雨潮湿天气,植株穗发芽现象突出,严重影响玉米后期的产量和品质;而一些休眠性较强的玉米自交系或品种则不会发生穗发芽。因此,对玉米种子的休眠性进行研究,改良易穗发芽的玉米自交系或品种显得尤为必要。对于种子休眠的研究,目前学者对拟南芥等其他植物种子的休眠研究较多^[9-10],对水稻^[11-12]、小麦^[13]等也从不同方向及层次上做了休眠相关研究。兰海等^[14-17]对玉米种子休眠性进行了QTL分析。目前对于玉米种子的休眠研究还相对缺乏,有关玉米种子休眠的研究方法也还有限。近年来随着分子生物学的迅猛发展,蛋白质组学分析技术成为了研究重要生命过程的有效手段。08-641是四川农业大学玉米研究所选育的骨干玉米自交系,经多次发芽鉴定证明其休眠性较强,新收获子粒发芽率均在5%以下,一般要经过一定时间的干燥后熟才能打破休眠。本研究以08-641种子为试验材料,通过双向电泳技术对休眠及休眠破除后种子中的蛋白质组进行差异表达分析,为下一步深入研究其种子休眠机理奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料为四川农业大学玉米研究所选育的优良玉米自交系08-641。材料于2010年种植在四川雅安,材料自交授粉35d后收获果穗,分别取新鲜子粒和带轴自然晾晒风干10d至安全含水量(14%)的玉米子粒进行蛋白质样品制备。3个生物学重复为随机的3个玉米果穗。

1.2 蛋白质样品制备

取1g左右玉米子粒将其用液氮研磨至细粉状,加入预冷的蛋白质提取试剂1,涡旋震荡后于-20℃下放置1h以上,在4℃下20400×g离心30min,弃上清;再加入预冷蛋白质提取试剂2,悬浮、振荡后于-20℃放置1h,离心同上,弃上清,重复3次,最后加入80%预冷丙酮,-20℃下放置1h以上,离心同上,弃上清,风干沉淀;精确称取样品蛋白质干粉,按1mg蛋白干粉与20μL裂解液充分混合,悬浮、振荡2min后在液氮与35℃水浴中反复冻融3次,每融1次涡旋振荡2min,24℃下20200×g离心10min。取上清保存于-80℃冰箱备用。

1.3 双向电泳及其图谱分析

将蛋白质样品用适量水化上样缓冲液稀释至300μL上样量,充分混匀后沿聚焦槽边缘线性加入样品,采用Bio-Rad生产的17cm、pH范围3~10的非线性IPG胶条。等电聚焦电压设置为:500V水化12h,然后依次经过250V1h、1000V3h、10000V5h,最后稳定在10000V6h,最终总电压时间积为90000Vh。等电聚焦结束后将胶条移至平衡槽中,先后在胶条平衡缓冲液I和II中平衡15min,然后进行第二向SDS-PAGE电泳。初始以5mA/gel低电流电泳1h,再加大电流至20~30mA/gel,待溴酚蓝指示剂到达距凝胶底部边缘1cm左右时停止电泳。用UMAX2100扫描仪扫描双向电泳凝胶并保存图像,每个蛋白质样品重复3次。使用Bio-rad公司的PDQuest 8.0凝胶图象分析软件分析双向电泳图谱,图谱上表达量相差2.0倍以上的蛋白点作为真实存在的差异表达蛋白点,并将差异蛋白点洗脱出来进行质谱鉴定。

1.4 差异蛋白质质谱检测

质谱鉴定工作由国家生物医学分析中心完成,使用胰酶解肽段混合物的基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)检测。通过Mascot程序对MALDI-TOF-MS质谱检测得到的肽质量指纹

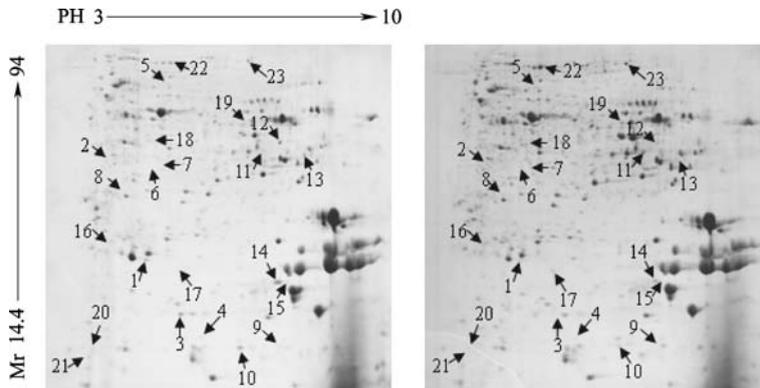
图谱进行检索。数据库选择 NCBIInr, 种属选择 Green Plants, 氨基酸固定修饰方式选择 Carbamidomethyl(C) 修饰, 可能的修饰方式选择 Oxidation(M) 修饰, 选取单同位素峰检索, 可接受的肽段分子量误差设为 0.3 Da。为使鉴定结果可靠, 每一个查询结果要求至少有 5 个匹配肽段, 且其在蛋白质整个序列的覆盖率至少为 15%; 对小于 20kDa 的蛋白质, 则要求至少有 3 个匹配肽段和 20% 的覆盖率。

2 结果与分析

2.1 玉米种子休眠及休眠破除后的双向电泳图谱分析

分别从新鲜收获和风干 10 d 的 08-641 种子中采用 TCA-丙酮法提取种子全蛋白进行双向电泳, 运

用 PDQuest 8.0 软件对得到的双向电泳图谱进行蛋白质点的检测和分析, 2-DE 图谱上着色斑点的变化可以理解为蛋白质点的合成、降解或翻译后修饰等。在 3 次重复试验的种子蛋白 2-DE 图谱上一共检测到了 626 ± 12 个蛋白质点, 然后通过对种子后熟前后两种生理状态下的 2-DE 图谱的比对, 共得到玉米种子后熟的差异表达蛋白质点 23 个(图 1、图 2)。图中“PH”表示第一向电泳等电聚焦, “Mr”表示第二向电泳 SDS-PAGE。在这 23 个表达丰度有差异的斑点中, 玉米种子经过后熟作用新增诱导表达蛋白质点 8 个, 缺失表达蛋白质点 7 个, 丰度增加的上调表达蛋白质点 4 个, 丰度减少的下调表达蛋白质点 4 个。



左为休眠种子, 右为休眠破除种子

Left: Fresh seeds, Right: After-ripening seeds

图 1 08-641 种子休眠与休眠破除后的双向电泳图谱

Fig. 1 Two-dimensional electrophoresis maps of fresh and after-ripening seeds for 08-641

从玉米种子前后两种生理状态下的 2-DE 图谱上蛋白质点丰度的变化情况来看, 玉米种子中诱导表达和缺失表达的蛋白质点分别为 8 个、7 个, 上调和下调表达的点相对较少(表 1)。表中“+”表示蛋白表达;“-”表示蛋白缺失;“++”表示蛋白上调表达;“+-”表示蛋白下调表达。对此不难发现, 种子经过后熟前后新出现和消失的蛋白质点变化较大, 占所检测到的差异蛋白质的比例较高, 这说明在种子的后熟过程中, 种子内部发生了复杂的新陈代谢活动, 种子生理生化活动剧烈, 最终反映到蛋白质组上, 表现为蛋白质表达丰度的变化。而对于各差异蛋白质点在种子后熟过程中的具体作用及其代谢规律, 还将通过分析所鉴定蛋白质的功能进行进一步的阐明。

表 1 08-641 种子休眠与休眠破除后蛋白质表达情况及差异蛋白质点

Table 1 Protein expression and different protein spots of fresh and after-ripening seeds in 08-641

| 蛋白质表达 Protein expression | | 差异蛋白点 Different protein spots |
|--------------------------|------------------------------------|----------------------------------|
| 新鲜收获种子 Fresh seeds | 风干 10 d 种子 Dried for 10 d seeds | |
| - | + | 2, 6, 7, 8, 11, 16, 17, 18 |
| + | - | 1, 4, 9, 13, 15, 20, 21 |
| + | ++ | 5, 19, 22, 23 |
| + | +- | 3, 10, 12, 14 |

2.2 差异蛋白质的质谱分析

切取分析确定的 23 个差异表达蛋白质点, 经质谱分析有 13 个蛋白质得到鉴定(Score > 75)(表 2)。

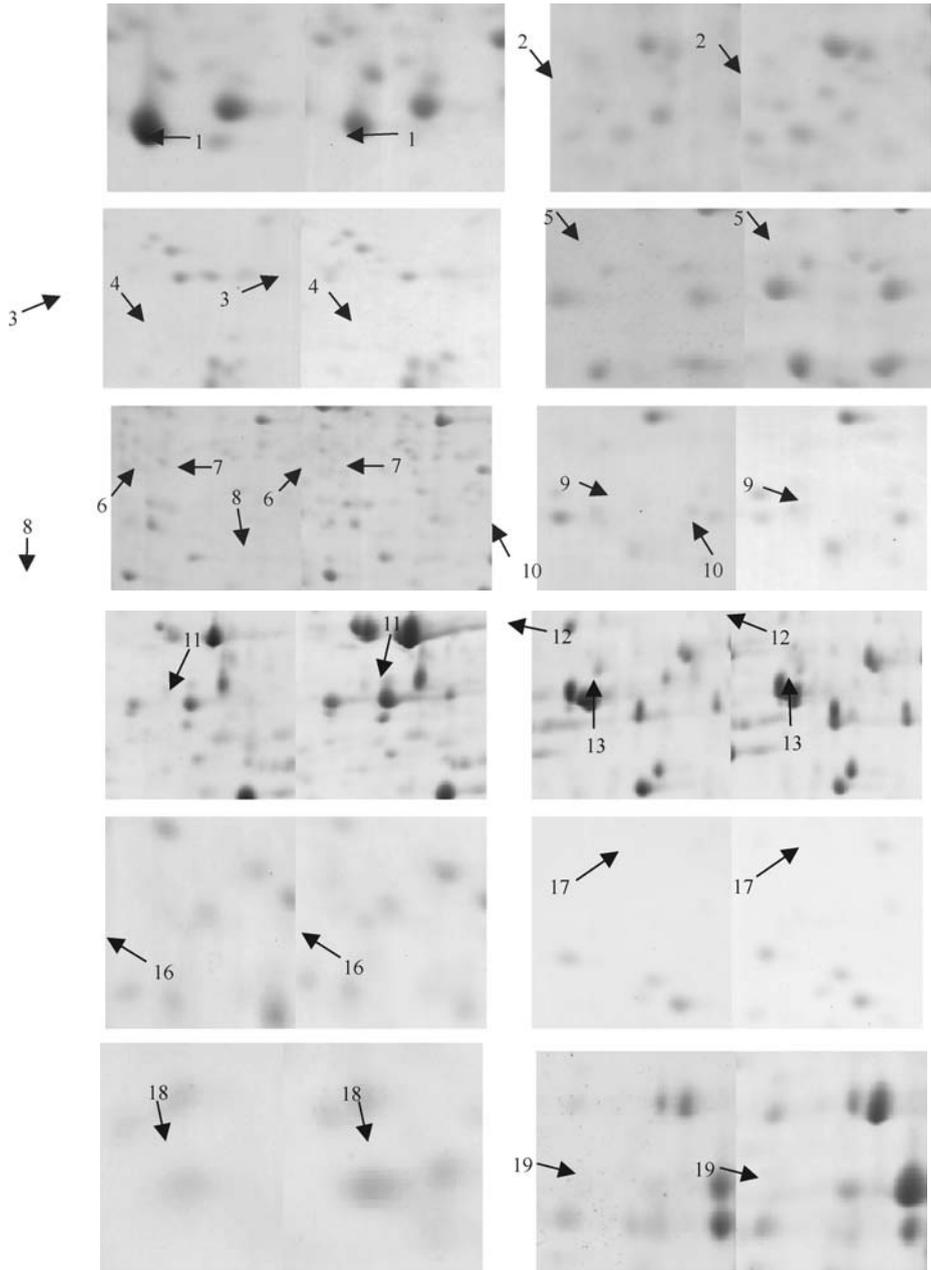


图2 08-641 休眠解除前后部分差异蛋白点放大图

Fig.2 Enlarged view of partial different protein spots between dormancy and non-dormancy seeds in 08-641

3 讨论

种子休眠是植物在长期系统发育过程中获得的一种适应环境变化的生物学特性,这种特性能够确保物种在恶劣的环境中存活,减少同一物种中个体之间的竞争,以及防止种子在不适宜的季节萌发。对于农业生产上的栽培作物而言,一方面要求作物种子能够快速发芽、成苗快,以获得较高的生产回报;另一方面,不具备休眠性的作物种子通常在成熟收获前便已萌发,尤其是成熟期如遇高温、多雨天气时,种子在穗上即开始萌发,这样的穗发芽现象已成

为禾谷类作物生产中面临的一个严重问题,包括水稻、小麦、大麦和玉米等^[18-20]。本研究中的玉米自交系 08-641,同等条件下进行比较发芽试验,其发芽率低甚至不能够萌发,表现出较强的种子休眠性。

多种环境因素对萌发的影响以及此过程受到多个基因的控制使休眠表现为典型数量性状^[21]。目前对种子休眠的研究比较多,研究方法大多停留在一些常规的鉴定及生理生化指标测定方面,而对于较深层次的遗传机制研究还比较缺乏。有关种子休眠机理的探讨也层出不穷,有从激素方面进行解释

表 2 23 个差异表达蛋白质点的质谱鉴定结果

Table 2 23 differentially expressed protein identified by mass spectrometry

| 编号 Code | 登录号 Accession number | 蛋白质名称 Protein name | 等电点/分子量 pI/MW | 覆盖率(%) Sequence coverage | 分数 Score | 来源物种 Origin species |
|------------|-------------------------|--|------------------|-----------------------------|-------------|---|
| 1 | gi 228310 | globulin 2 | 6.16/50234 | 27 | 72 | <i>Zea mays</i> |
| 2 | gi 225469045 | PREDICTED: hypothetical | 9.24/114993 | 13 | 79 | <i>Vitis vinifera</i> |
| 3 | gi 226504442 | protein | 6.77/17048 | 49 | 79 | <i>Zea mays</i> |
| 4 | gi 116786013 | 16.9 kDa class I heat shock | 6.52/25206 | 37 | 56 | <i>Picea sitchensis</i> |
| 5 | gi 226531654 | protein 1 | 5.51/65074 | 23 | 68 | <i>Zea mays</i> |
| 6 | gi 255567828 | unknown hypothetical protein | 9.09/84728 | 13 | 60 | <i>Ricinus communis</i> <i>Chlamydomonas</i> |
| 7 | gi 1159471908 | LOC100273610 | 5.39/11112 | 55 | 59 | <i>reinhardtii</i> |
| 8 | gi 226531007 | Leucine - rich repeat receptor | 5.19/30282 | 44 | 122 | <i>Zea mays</i> |
| 9 | gi 115220115 | protein kinase EXS precursor, putative | 6.46/46161 | 25 | 54 | <i>Selaginella</i> <i>moellendorffii</i> |
| 10 | gi 218198934 | roadblock/lc7 family protein | 6.05/195037 | 7 | 57 | <i>Oryza sativa</i> |
| 11 | gi 226504732 | proteasome subunit alpha type 1 | 6.27/39528 | 61 | 142 | <i>Indica G</i> |
| 12 | gi 162463479 | hypothetical protein | 6.63/65446 | 24 | 88 | <i>Zea mays</i> |
| 13 | gi 194690156 | SELMODRAF - | 7.52/39002 | 43 | 120 | <i>Zea mays</i> |
| 14 | gi 126632260 | T_77579 | 8.78/17065 | 64 | 96 | <i>Zea mays</i> |
| 15 | gi 168023089 | hypothetical protein OsI_24556 sorbitol dehydrogenase | 7.78/433559 | 4 | 55 | <i>Zea mays</i> <i>Physcomitrella</i> |
| 16 | gi 194701624 | homolog1 | 5.14/19507 | 48 | 86 | <i>patens subsp.</i> |
| 17 | gi 223950453 | globulin - 1 S allele precursor | 6.01/22875 | 38 | 96 | <i>Patens</i> |
| 18 | gi 226501994 | unknown | 5.52/48376 | 26 | 80 | <i>Zea mays</i> |
| 19 | gi 16305144 | RAB17 protein | 6.31/53346 | 37 | 158 | <i>Zea mays</i> |
| 20 | gi 16580762 | predicted protein | 6.19/70802 | 16 | 65 | <i>Zea mays</i> |
| 21 | gi 115237194 | unknown unknown hypothetical protein | 6.84/55604 | 16 | 60 | <i>Juglans regia</i> <i>Arabidopsis</i> <i>thaliana</i> |
| 22 | gi 168586 | LOC100274316 | 5.71/103356 | 21 | 135 | |
| 23 | gi 226503399 | legumin 1 vicilin - like protein precursor MAM1 (METHYLTHIOALKYLMA LATE SYNTHASE 1) 2 - isopropylmalate synthase/ methylthioalkylmalate synthase pyruvate, orthophosphate dikinase LOC100285098 | 6.00/94888 | 32 | 226 | <i>Zea mays</i> <i>Zea mays</i> |

的^[22],有从代谢途径进行解释的^[28],有从细胞膜进行解释的^[23],khan 的激素调控学说逐渐被学者接受。有关玉米种子休眠在分子水平上的研究还鲜有报道。本研究运用蛋白质组学方法对玉米自交系 08-641 种子休眠进行比较研究,以期能够从蛋白质

水平上对玉米种子休眠有一个新的认识。生物体不同的组织和器官中具有不同的蛋白质含量和水平,同一组织和器官中的蛋白质含量和水平也是不同的,蛋白质作为各项生命活动的功能执行体,在生物体的生理过程中扮演着重要的角色。

本研究表明,08-641 种子在休眠与休眠破除后的两种生理状态下,种子内存在蛋白质表达差异。本研究发现经过 10 d 的干燥后熟作用,球蛋白前体(点 12)在 08-641 种子内的表达量减少,该蛋白表达量的变化很可能就是随着种子的后熟,ABA 含量的变化而引起 *GLB1* 基因的不同表达。本研究还发现,RAB17 蛋白(点 14)在干燥后熟 10 d 后其表达量减少,这与上述研究结果一致,但是 RAB17 具体生理功能尚不清楚,可能其过量表达阻止了渗透胁迫下种子的萌发进程,在生长过程中通过蛋白激酶 CK2 对其磷酸化产生作用,随着种子萌发 RAB 蛋白的影响逐渐消失,推测胚胎晚期丰富蛋白(LEA)在萌发前期的降解对激活干种子的新陈代谢具有重要作用。研究也发现豆球蛋白(19)表达上调,这与 K. Chibani 等^[24]的研究一致。Q. Fu 等^[25]的研究指出,在拟南芥种子萌发过程中 20S proteasome subunit 蛋白显著富集,在水稻萌发期间 proteasome subunit alpha type 2 被诱导表达。在本研究中蛋白酶体(点 8)被干燥后熟作用诱导表达,说明该蛋白质在种子休眠解除过程中具有重要的作用。蛋白点 11 被鉴定为山梨醇脱氢酶同系物,在种子后熟过程中诱导表达,这与 S. M. de Sousa 等^[26]的研究结果不一致,很可能是由于山梨醇脱氢酶同系物与山梨醇脱氢酶对种子的生理调控作用不同而表现出差异。在豌豆种子发育中,I、II 类小分子量热激蛋白(sHSP)受发育调控;在小麦种子胚中也发现有发育依赖性的 sHSP,可能与种子的耐脱水性、胚发育、休眠、萌发、耐热性、寿命形成及维持有密切关系^[27]。植物应激时 HSP 基因转录被激活,其在种子内大量表达,休眠的种子内由于生物优先翻译 HSP 的 mRNA,正常情况下大多数 mRNA 的翻译降低或停止从而导致休眠,而种子经过后熟,正常 mRNA 得以表达从而解除休眠。此外,本研究中还鉴定了 2 个功能未知蛋白,对其功能的解析以及对强休眠玉米自交系 08-641 种子休眠特性的阐释还有待进一步的研究。

参考文献

- [1] Vleeshouwers L M, Bouwm Eester H J. A simulational model for seasonal changes in dormancy and germination of weed seeds[J]. *Seed Sci Res*, 2001, 11: 77-92
- [2] 唐安军,龙春林,刀志灵. 种子休眠机理研究概述[J]. *云南植物研究*, 2004, 26(3): 241-251
- [3] 侯冬花,萨拉木,艾尼瓦尔,等. 种子休眠与休眠解除的研究进展[J]. *新疆农业科学*, 2007, 44(3): 349-354
- [4] 周丹,孙传清,屠乃美. 谷类种子休眠性的研究进展[J]. *湖南农业大学学报:自然科学版*, 2004, 30(6): 588-592
- [5] 杨期和,叶万辉,宋松泉,等. 植物种子休眠的原因及休眠的多样性[J]. *西北植物学报*, 2003, 23(5): 837-843
- [6] Koorn E M, Bentsink L, Hil, et al. Seed dormancy and germination[J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2002, 5: 533-536
- [7] Gallardo K, Job C, Groot S P C, et al. Proteomic analysis of *Arabidopsis* seed germination and priming[J]. *Plant Physiol*, 2001, 126: 835-848
- [8] Chibani K, Ali-Rachedi S, Job C, et al. Proteomic analysis of seed dormancy in *Arabidopsis*[J]. *Plant Physiol*, 2006, 142: 1493-1510
- [9] 王伟青,程红焱. 拟南芥突变体种子休眠与萌发的研究进展[J]. *植物学通报*, 2006, 23(6): 625-633
- [10] 黄玮,孟繁蕴,张文生,等. 滇重楼种子休眠机理研究[J]. *中国农学通报*, 2008, 24(12): 242-246
- [11] Lu B Y, Xie K, Yang C Y, et al. Genetic analysis of two weak dormancy mutants derived from strong seed dormancy wild type rice N22 (*Oryza sativa*) [J]. *J Integr Plant Biol*, 2011, 53(5): 338-346
- [12] Xu B Q, Lu Z M. Correlation between parents and F₁ and combining ability of parents on seed dormancy in indica rice (*Oryza sativa*) [J]. *rice Sci*, 2009, 16(1): 51-57
- [13] 毛伯初,吴兆苏. 小麦种子休眠特性的遗传及其机理的研究[J]. *中国农业科学*, 1983(6): 53-60
- [14] 兰海,张志明,高世斌,等. 玉米与水稻种子休眠性 QTL 的比较研究[J]. *玉米科学*, 2009, 17(3): 1-4, 9
- [15] 兰海,高世斌,樊庆琦,等. 玉米种子休眠性的数量遗传分析[J]. *作物学报*, 2006, 32(10): 1586-1588
- [16] 兰海,余月,王风格,等. 玉米种子休眠性数量遗传体系的判别[J]. *玉米科学*, 2007, 15(2): 5-8
- [17] 兰海,李新海,王风格,等. 玉米种子休眠性的 QTL 定位[J]. *作物学报*, 2007, 33(9): 1474-1478
- [18] Finkelstein R, Reeves W, Ariizumi T, et al. Molecular aspects of seed dormancy[J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2008, 59: 387-415
- [19] 杨燕,张春利,何中虎,等. 小麦抗穗发芽研究进展[J]. *植物遗传资源学报*, 2007, 8(4): 503-509
- [20] 梅丽,程须珍,刘春吉,等. 绿豆种子休眠性和百粒重的 QTLs 和互作分析[J]. *植物遗传资源学报*, 2011, 12(1): 96-102
- [21] 尹华军,刘庆. 种子休眠与萌发的分子生物学的研究进展[J]. *植物学通报*, 2004, 21(2): 156-163
- [22] Khan A A. 种子休眠和萌发的生理生化[M]. 王沙生,等译. 北京:农业出版社, 1989: 520
- [23] 孙秀琴,田树霞. 元宝槭种子休眠生理的研究[J]. *林业科学研究*, 1991, 4(2): 185-191
- [24] Bewley J D, Black M. *Seeds: Physiology of Development and Germination* (2nd edn) [M]. New York: Plenum Press, 1994: 36-107
- [25] Fu Q, Wang B C. Proteomic analysis and extensive protein identification from dry germinating *Arabidopsis* seeds and young seedlings[J]. *J Biochem Mol Biol*, 2005, 38(6): 650-660
- [26] de Sousa S M, del Giudice Paniago, Arruda P, et al. Sugar levels modulate sorbitol dehydrogenase expression in maize [J]. *Plant Mol Biol*, 2008, 68: 203-213
- [27] 黄祥富,黄上志,傅家瑞. 植物热激蛋白的功能及其基因表达的调控[J]. *植物学通报*, 1999, 16(5): 530-536