

不同光长条件下大豆蛋白质组比较研究

赫卫,姜振峰,赵琳,韩英鹏,李文滨

(东北农业大学大豆研究所,教育部大豆生物学重点实验室,黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要:对大豆光周期敏感型品种东农42分别进行16 h光照和8 h光照处理,提取处理和对照相同叶位叶片的全蛋白质进行双向电泳,通过PDQuest和液相离子阱质谱(LC-ESI-MS)技术对差异表达蛋白进行分析,获得二级质谱图谱,用Mascot软件搜索NCBI数据库,鉴定出16个差异表达蛋白,其中12个表达量上调,4个表达量下调。对谷胱甘肽S-转移酶、二硫键异构酶、TCTP、半胱氨酸合成酶、Rieske铁硫蛋白前体、金属蛋白酶等主要差异蛋白进行功能分析,表明这些蛋白与植物的光合作用、信号转导、细胞凋亡的调控、防卫解毒和能量代谢等多种植物的生理生化功能相关。

关键词:大豆;双向电泳(2-DE);蛋白质组学;光周期;离子阱质谱分析

中图分类号:S565.1

文献标识码:A

文章编号:1000-9841(2009)03-0388-06

A Comparative Study on Soybean Leaf Proteomics under Different Photoperiod Treatments

HE Wei,JIANG Zhen-feng,ZHAO Lin,HAN Ying-peng,LI Wen-bin

(Soybean Research Institute of Northeast Agricultural University,Key Laboratory of Soybean Biology of Chinese Education Ministry,Harbin 150030,Heilongjiang,China)

Abstract: Dongnong 42, a photoperiod sensitive cultivar, was treated with 8 h and 16 h light illuminations, respectively. The leaf tissues were then sampled and two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) was performed to separate the protein spots. The gels were stained with Coomassie Blue G-250. The difference between the protein maps of leaves from two different photoperiod treatments was analyzed with the PDQuest image software (Bio-rad). The liquid and ion trap mass spectrometry (LC-ESI-MS) was used to obtain the MS/MS of the differentially expressed proteins and the MASCOT software was used to search the protein database. A total of 16 differentially expressed proteins were identified, of them nine proteins showed up-regulation expression and four showed down-regulation expression. The major differentially expressed proteins, glutathione-S-transferase, disulfide isomerase, metalloproteinases, TCTP, Rieske iron-sulphur protein precursor cysteine synthetic enzymes, were reviewed and discussed. These proteins might be related to plant photosynthesis, signal transduction and apoptosis control, detoxification and plant defense and other physiological and biochemical function.

Key words: Soybean; Two-dimensional gel electrophoresis (2-DE); Proteomics; Photoperiod; Liquid and ion trap mass spectrometry

植物对昼夜相对长度的反应称为光周期现象(photoperiodism)。大豆是光周期反应敏感的短日照植物,在光周期反应的早期研究中被作为重要的模式植物^[1]。光周期敏感这一特性严重阻碍大豆品种的跨区域种植,降低了大豆品种的适应性,影响产量水平的有效发挥。

蛋白质是生理功能的执行者,蛋白质组学(pro-

teomics)核心技术包括以双向电泳为主的蛋白质分离技术、以质谱分析为核心的蛋白鉴定技术、计算机图像数据处理与蛋白质组数据库。该技术方法已被成功应用于大豆多方面的研究。Mooney等^[2]已研究得到大豆成熟干种子的双向电泳图谱,并鉴定了部分蛋白。Hajduch等^[3]研究大豆种子发育的进程,得到了大豆种子不同发育时期的2-DE图谱,鉴

收稿日期:2009-01-15

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30671318);第四十三批中国博士后科学基金面上资助项目;东北农业大学博士启动基金资助项目。

作者简介:赫卫(1981-),女,硕士研究生,研究方向为大豆蛋白质组学研究。E-mail:hw.he@yahoo.com.cn。

通讯作者:李文滨,教授,博士生导师。E-mail:wenbinli@yahoo.com。

定了考染胶上全部的蛋白。徐晓燕等^[4]鉴定出与种子萌发相关的6个蛋白质,分别是核苷二磷酸激酶、热激蛋白、硫氧还蛋白、35ku种子成熟蛋白及种子成熟蛋白PM36。郑蕊等^[5]改进了大豆种子双向电泳技术。曾维英等^[6]在大豆质核互作雄性不育系 NJCMS2A 和保持系 NJCMS2B 花药的蛋白质图谱的比较中,推测雄性不育性可能与能量代谢紊乱、细胞程序化死亡(PCD)、淀粉合成受抑制和花器官发育调节基因作用失控等有关。陈丽霞等^[7]以大豆野生型东农42和矮秆突变体东泽11的叶片为材料,利用双向电泳鉴定出9个蛋白差异点,其中6个上调表达,3个下调表达。Bennett等^[8]用荧光2-DE揭示早期栽培不影响主要种子储藏蛋白的相对积累,却提高了大豆的质量。Natarajan等^[9]认为增加大豆蛋白中含硫氨基酸的浓度,可以显著改善大豆蛋白的品质。Krishnan等^[10]认为氮肥虽然能提高总蛋白的含量,但降低了大豆的品质。可见,用2-DE能方便地找到与品质相关的蛋白。

目前,尚未有大豆光周期相关蛋白质组的研究报道。从这一点出发,选择大豆光周期敏感品种东农42的叶片进行蛋白质组学研究,比较长短光照下蛋白质表达的差异,并鉴定差异蛋白质,从蛋白质分子水平上探寻不同光照下大豆叶片蛋白质的变化情况,间接反映出在诱导下基因的表达情况,同时反映叶片生理代谢对不同光照条件的适应情况,有助于理解大豆光周期敏感的分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料

东农42品种表现为晚熟,具有无限结荚习性。将其培养于光照培养箱,昼温25~26℃,夜温20~22℃,250 μmol m⁻²sec⁻¹白光,长日照(LD)(16 h/8 h光/暗)条件下生长;待第一片三出复叶展开后(出苗后第10 d)分为2组,一组用短日照(SD)处理(8 h/16 h光/暗),另一组用长日照处理(16 h/8 h光/暗),分别在处理后第1、8、15、22天的黑暗/光照交替时,同时对两个样本取材,剪取第一片三出复叶,−80℃保存用于双向电泳。

1.2 方法

1.2.1 叶片蛋白样品制备 叶片1 g在液氮中研成粉末,加入10 mL冷丙酮(含10% TCA,0.07%疏

基乙醇),振荡混匀,在−20℃放置沉淀1 h。4℃,13 000 r·min⁻¹离心45 min,弃去上清液。加10 mL冷丙酮(含0.07%疏基乙醇),4℃,13 000 r·min⁻¹离心20 min,弃去上清液。重复二次。置于−20℃冷冻干燥。沉淀按20 μL·mg⁻¹比例加入样品溶解液(7 mol·L⁻¹尿素,2 mol·L⁻¹硫脲,4% CHAPS,65 mol·L⁻¹ DTT,2% pH 3-10 Bio-Lyte),35℃水浴1 h。4℃,13 000 r·min⁻¹离心45 min,取上清液分装到1.5 mL Eppendorf管中,在上清中加5倍冷丙酮(含0.07%疏基乙醇),振荡混匀。4℃,13 000 r·min⁻¹离心20 min,弃去上清液。−80℃保存备用。参照Bradford法^[11]测定样品液中蛋白质的浓度。

1.2.2 双向凝胶电泳((2-DE) 参照Bio-rad公司双向系统指南进行(略有改动)。每个样品用水化上样缓冲液(7 mol·L⁻¹尿素,2 mol·L⁻¹硫脲,4% CHAPS,65 mmol·L⁻¹ DTT,2% pH 3-10 Bio-Lyte,溴酚蓝0.001%)溶解混匀,13 000 r·min⁻¹离心15 min,取上清液上样。pH4~7,17 cm线性IPG预制胶条考染蛋白质上样量约为1.2 mg,总上样体积为350 μL。等电聚焦在Bio-Rad公司IPGphor™电泳仪上进行。水化和聚焦的温度为20℃,等电聚焦的程序为:50 V主动水化12 h,250 V,25 min,1 000 V 1 h,10 000 V 4 h,10 000 V稳压聚焦80 000 Vh。聚焦结束后,胶条在6 mL平衡缓冲液I(尿素6 mol·L⁻¹,0.375 mol·L⁻¹ pH8.8 Tris-HCl,2% SDS,20%甘油,2% DTT)中于摇床上振荡15 min,再在平衡缓冲液II(尿素6 mol·L⁻¹,0.375 mol·L⁻¹ pH8.8 Tris-HCl,2% SDS,20%甘油,2.5%碘乙酰胺)平衡15 min。进行第二向SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳,凝胶浓度为12%。

1.2.3 考马斯亮蓝染色 采用Coomassie-G250染色^[12]。

1.2.4 图像分析 考马斯亮蓝显色后的胶片通过UMAX Powerlook 2100XL扫描仪300 dpi分辨率采集图像,用PDQuest 8.0.1图像分析软件处理图像,对图像进行格式调整、背景消减、斑点检测、胶图匹配等。

1.2.5 质谱分析

1.2.5.1 胶内消化 在胶图匹配后找到了差异点,将移液器所用200 μL吸头的尖端剪去约0.5 cm,用此吸头从胶片上戳挖出差异表达的蛋白质点,将点放入1.5 mL离心管中,用100 μL 1:1混合的ACN和25 mmol·L⁻¹ NH₄HCO₃洗10 min,振荡换溶液,直到考马斯亮蓝颜色消失。在真空浓缩离心机中干燥

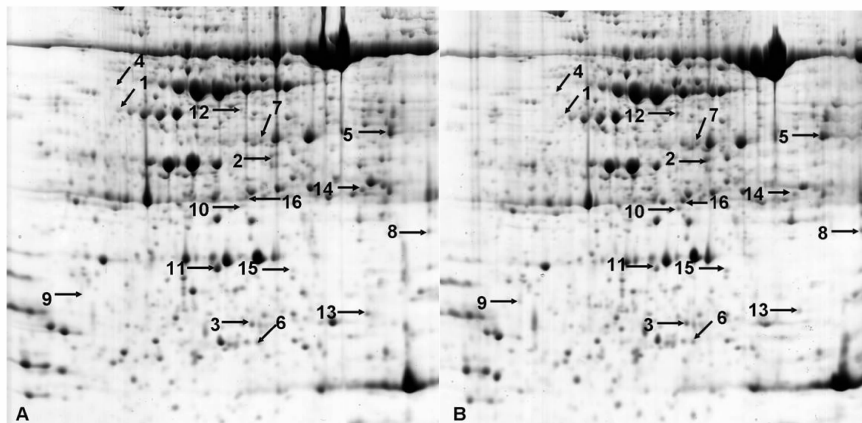
胶点,加 25 μL 含 10 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ DTT 的 25 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NH_4HCO_3 置于 56 $^{\circ}\text{C}$ 金属浴 1 h,加 25 μL 含 55 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ IAA 的 25 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NH_4HCO_3 ,室温黑暗处 45 min,振摇;25 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NH_4HCO_3 洗 10 min,1:1 混合的 ACN 和 25 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NH_4HCO_3 洗 10 min,在真空浓缩离心机中干燥胶条,加 10 μL Trypsin,冰浴 10 min,37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,加 5 μL 甲酸终止酶反应。

1.2.5.2 LC-ESI-MS 质谱数据分析 所使用质谱仪为 Agilent Technologies 1200Series 6320 Ion Trap LC/MS,利用在线 MASCOT 数据库 (www. matrix-science.com) 及 Agilent Technologies 公司质谱配备软件进行氨基酸序列相似性分析。将质谱数据与 NCBI 上的蛋白质数据库进行搜索比对,获取差异表达的蛋白质的相关信息。

2 结果与分析

2.1 大豆叶片不同光照条件下总蛋白的双向电泳图谱

第一向选用 pI 4 ~ 7,17 cm 长 IPG 胶条,由 UMAX Powerlook 2100XL 凝胶成像系统获取 2D 胶考染后的图象后,用 PDQuest8.0.12D 胶图像分析软件进行分析,每块胶上可以分离到 600 多个蛋白质点。通过短日照处理(8 h)和未处理叶片(16 h)蛋白 2-DE 图谱进行比较,发现在 4 个处理时间共有 24 个蛋白质点发生了差异表达,16 个点得到质谱鉴定结果(图 1),其中 12 个表达量上调,4 个表达量下调。从 16 个差异点的放大图谱(图 2)上可以很清楚看出对照与处理的同一点上调或下调表达。



A: 长日照处理;B: 短日照处理;spots1-14: 差异蛋白质点。

A: the control; B: the short day treated plants; spots1-14: differentially expressed protein spots.

图 1 短日照处理和未处理叶片蛋白 2-DE 图谱

Fig. 1 2-DE protein maps of leaf tissues treated with 8 h light and 16 h light, respectively

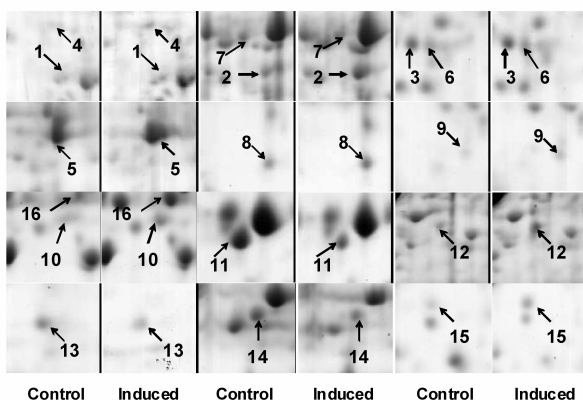


图 2 图 1 中差异蛋白质点放大图

Fig. 2 Enlargements of differentially expressed protein spots in Fig. 1

2.2 差异表达蛋白的液相离子阱质谱 (LC-ESI-MS) 分析

从 PDQuest 软件分析得到的 24 个差异表达蛋白点中鉴定出 16 个蛋白,列在表 1 中,上调表达的有核糖体蛋白 30s 亚基 PSRP-1,果糖-1,6-二磷酸酶 (FBPase),Rieske 铁硫蛋白前体,都是叶绿体前体。上调表达的还有 ATP 合成酶 CF1 ϵ 亚基,蛋白质二硫键异构酶 (PDI),半胱氨酸合成酶 (CS),谷胱甘肽 S-转移酶 (GST),Mn-SOD,翻译控制肿瘤蛋白同源体 (TCTP),NADPH 脱氢酶,质体谷氨酰氨合成酶,Fe-SOD,下调表达的有大豆金属蛋白酶,大豆蛋白 P21,果糖磷酸醛缩酶,磷酸丙糖异构酶。

表 1 差异表达蛋白的质谱鉴定结果
Table 1 Differentially expressed proteins identified by MS

SID	蛋白名称[来源物种] Protein identification [species]	PM/SC(%)/MO	Acce. no.	T. Mr/pI
1	NADPH 脱氢酶[拟南芥] NADPH dehydrogenase[<i>Arabidopsis thaliana</i>] 质体 30s 核糖体蛋白 1, 叶绿体前体 PSRP1[菠菜]	8/18/302	gi 15239282	40643/8.32
2	Plastid - specific 30S ribosomal protein 1, chloroplast precursor (PSRP - 1) (CS - S5) (CS5) (S22) (Ribosomal protein 1) [<i>Spinacia oleracea</i>]	3/7/58	gi 134034	33956/6.69
3	Rieske 铁硫蛋白前体[大豆] Rieske iron - sulphur protein precursor [<i>Glycine max</i>]	7/17/149	gi 158935079	24502/9.01
4	果糖 - 1,6 - 二磷酸酶, 叶绿体前体[菠菜] Fructose - 1,6 - biphosphatase, chloroplast precursor [<i>Spinacia oleracea</i>]	8/10/148	gi 13915687	45715/5.13
5	果糖磷酸醛缩酶[三叶草] Putative fructose biphosphate aldolase [<i>Trifolium pratense</i>]	22/20/150	gi 1781348	38461/5.89
6	ATP 合成酶 CF1 亚基[大豆] ATP synthase CF1 epsilon subunit [<i>Glycine max</i>]	20/32/220	gi 91214127	14744/5.41
7	蛋白质二硫键异构酶[大豆] Protein disulfide isomerase - like protein [<i>Glycine max</i>]	2/7/107	gi 49615095	40402/5.45
8	Mn - SOD[大豆] Manganese - superoxide dismutase [<i>Glycine max</i>]	6/18/177	gi 27526758	15433/6.09
9	翻译控制肿瘤蛋白同源体[大豆] Translationally - controlled tumor protein homolog (TCTP) [<i>Glycine max</i>]	2/6/90	gi 20140683	18983/4.57
10	谷胱甘肽 S - 转移酶[大豆] Glutathione S - transferase GST 9 [<i>Glycine max</i>]	7/21/139	gi 11385433	23618/5.74
11	蛋白 P21[大豆] Protein P21 [<i>Glycine max</i>]	1/6/55	gi 129320	22361/4.84
12	半胱氨酸合成酶[大豆] Cysteine synthase [<i>Glycine max</i>]	9/4/86	gi 126508778	34441/5.53
13	金属蛋白酶[大豆] Metalloprotease [<i>Glycine max</i>]	98/42/386	gi 384337	18944/5.82
14	磷酸丙糖异构酶[大豆] Triosephosphate isomerase [<i>Glycine max</i>]	9/22/105	gi 48773765	27441/5.87
15	质体谷氨酰胺合成酶[芦苇] Plastidic glutamine synthetase [<i>Phragmites australis</i>]	4/7/116	gi 44885916	46740/6.22
16	Fe - SOD[大豆] Superoxide dismutase [Fe], chloroplast precursor[<i>Glycine max</i>]	77/37/264	gi 134646	27824/5.60

得到的 16 个蛋白点根据功能可分为五类, 参与光合作用的蛋白: 蛋白点 2、3、4、5; 参与信号传导的蛋白: 蛋白点 7、10、12; 参与能量代谢的蛋白:

蛋白点 6、14; 参与防卫解毒的蛋白: 蛋白点 1、8、11、15、16; 参与细胞凋亡的蛋白: 蛋白点 9、13 (如图 3)。

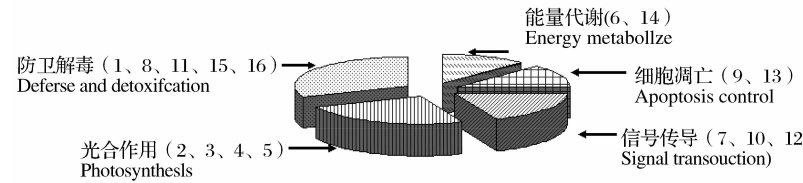


图 3 蛋白质的功能分类
Fig. 3 Function classification of the identified proteins

3 讨论与结论

生物体在不同条件下合成类型和数量不同的蛋白质,这些动态变化的蛋白质组构成了细胞某一时刻的特征性生命活动的基础,是认识生命活动本质的一个恰当而直接的途径^[13]。因此运用蛋白质组学技术着重研究植物光周期反应过程中动态变化的蛋白。

植物 GST 作为植物激素连接蛋白起作用,受植物激素调节。GST 参与光信号传导途径^[14]。Haibiao Gong 等研究直接证明了 GST 调节植物生长和开花^[15]。这与本研究结果一致,GST 在短光照条件下上调表达,参与光周期调节。可能是植物激素调节光周期的一个信号传导途径。

依赖锌的基质金属蛋白酶,负责细胞外基质及细胞表面蛋白质水解,在形态建成,组织特异功能获得或缺失,特别是在开花和衰老进程中起关键作用^[16]。研究中,其含量变化明显,可知其参与光周期调节。植物金属蛋白酶在开花和衰老过程中的作用机制还不明确,有待进一步研究^[16-17]。

TCTP 对细胞外刺激高度敏感,暗诱导 TCTP mRNA 积累^[18]。TCTP 通过激活蛋白激酶 PKR,参与抗胁迫、抗衰老等程序的信号传导途径^[19]。在试验中,短日照诱导 TCTP 上调表达,通过信号传导影响光周期,防止植物衰老。

Rieske 铁硫蛋白是 Cyt b6/f 复合体构象改变的调节部位,Cyt b6/f 复合体通过构象的改变进行电子传递,与氧化还原信号传导途径联系,对环境变化做出反应^[21]。日照长度的不同必然引起光合系统的变化,推测可能通过 Cyt b6/f 复合体与氧化还原途径的联系传递短日照信号。

Cyt b6/f 复合体通过电子传递的方式推动 ATP 合酶的运转,从而影响光合作用中所积累能量的转换^[20]。ATP 合成酶 CF1 ϵ 亚基是调控酶的运转动力,阻止 ATP 水解的重要亚基。Rieske 铁硫蛋白与 CF1 ϵ 亚基上调表达说明短日照对植物能量代谢的影响主要是通过 Cyt b6/f 复合体与 ATP 合酶,将短时间捕获的光能更多地集中积累起来,能在短时间内储存更多能量,以弥补光照时间短造成的能量缺乏。

氧化还原调控参与包括细胞增殖、分化和凋亡等的细胞信号转导和基因表达调控。谷胱甘肽化、巯基/二硫键转换反应等构成了胞内氧化还原信号

转导的主要机制。蛋白质二硫键异构酶(PDI)为催化谷胱甘肽化及巯基/二硫键转换反应主要酶之一^[21]。光逆境条件如延长叶片暗(饥饿)处理时间,明显导致叶片谷胱甘肽积累。半胱氨酸合成酶(GCS)是谷胱甘肽合成限速酶。可能是谷胱甘肽化的限制步骤。在试验中,GCS 与 PDI 上调表达,推测是合成大量谷胱甘肽,参与氧化还原调节,传递短日照刺激信号,引起植物的光周期敏感反应。

暗诱导引起植物细胞内反应性氧化物水平升高,抗性蛋白在暗诱导衰老过程中的表达起到抵抗氧化压力和防止衰老的保护作用,使细胞免于过早死亡^[22]。因此,Fe-SOD 和 Mn-SOD 含量增加。

从蛋白质组学角度初步探讨大豆叶片光周期的分子机理,获得短日照诱导差异表达的与光合作用、信号传导、细胞凋亡防卫等有关的蛋白,为进一步揭示光周期分子机制以及代谢调控的关系提供了有益信息。同时获得了大量的差异表达蛋白质信息,分析这些蛋白质的功能以及蛋白质之间的相互作用,还有待做更进一步的研究。

参考文献

- [1] Garner W W, Allard H A. Effect of the relative length of day and night and other factors of the environment on growth and reproduction in plants [J]. Journal of Agricultural Research, 1920, 18: 553-606.
- [2] Mooney B P, Thelen J J. High-throughput peptide mass fingerprinting of soybean seed proteins: automated workflow and utility of UniGene expressed sequence tag databases for protein identification [J]. Phytochemistry, 2004, 65: 1733-1744.
- [3] Hajduch M, Ganapathy A, Stein J W. A Systematic proteomic study of seed filling in soybean. Establishment of high resolution two-dimensional reference maps, expression profiles, and an interactive proteome database [J]. Plant Physiology, 2005, 137: 1397-1419.
- [4] 徐晓燕,郑蕊,立春梅,等.大豆种子萌发过程中的差异蛋白质组研究[J].生物化学与生物物理进展,2006,33(11):1106-1112. (Xu X Y, Zheng R, Li C M, et al. Differential proteomic analysis of seed germination in soybean [J]. Progress in Biochemistry and Biophysics, 2006, 33(11): 1106-1112.)
- [5] 郑蕊,喻德跃.适于蛋白质组研究的大豆种子双向电泳技术的改进[J].大豆科学,2005,24(3):166-170. (Zheng R, Yu D Y. Improvement of two-dimensional electrophoresis of bean seed protein for proteome analysis [J]. Soybean Science, 2005, 24(3): 166-170.)
- [6] 曾维英,杨守萍,喻德跃,等.大豆质核互作雄性不育系 NJC-MS2A 及其保持系的花药蛋白质组比较研究[J].作物学报,2007,33(10):1637-1643. (Zeng W Y, Yang S P, Yu D Y. A comparative study on anther proteomics between cytoplasmic-nu-

- clear male-sterile line NJCMS2A and its maintainer of soybean [J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2007, 33(10):1637-1643.)
- [7] 陈丽霞. 利用双向电泳技术分离大豆矮秆突变体相关蛋白 [J]. *中国生物工程杂志*, 2007, 27(3):76-82. (Chen L x, Li Y H, Ren Z Y. Isolation of proteins related to the dwarf mutant by two-dimensional gel electrophoresis in soybean [J]. *China Biotechnology*, 2007, 27(3):76-82.)
- [8] Bennett J O, Yu O, Heatherly LG, et al. Accumulation of genistein and daidzein, soybean isoflavones implicated in promoting human health, is significantly elevated by irrigation [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004, 52(25):7574-7579.
- [9] Krishnan H B, Bennett J O, Kim W S, et al. Nitrogen lowers the sulfur amino acid content of soybean (*Glycine max* [L.] Merr.) by regulating the accumulation of Bowman-Birk protease inhibitor [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, 53(16):6347-6354.
- [10] Natarajan S S, Xu C, Bae H, et al. Characterization of storage proteins in wild (*Glycine soja*) and cultivated (*Glycine max*) soybean seeds using proteomic analysis. [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006, 54(8):3114-3120.
- [11] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding [J]. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72:248-254.
- [12] Candiano G, Bruschi M, Musante L, et al. Blue silver: A very sensitive colloidal coomassie G-250 staining for proteome analysis [J]. *Electrophoresis*, 2004, 25:1327-1333.
- [13] 何大澄, 肖雪媛. 差异蛋白质组学及其应用 [J]. *北京师范大学学报*. 2002, 38(4):558-562. (He D C, Xiao X Y. Differential proteomics and its applications [J]. *Journal of Beijing Normal University Science*, 2002, 38(4):558-562.)
- [14] Chen I C, Huang I C, Liu M J, et al. Glutathione S-transferase interacting with far-red insensitive 219 is involved in phytochrome a-mediated signaling in arabidopsis [J]. *Plant Physiology*, 2007, 143(3):1189-1202.
- [15] Gong H B, Jiao Y X, Hui W W, et al. Expression of glutathione-S-transferase and its role in plant growth and development in vivo and shoot morphogenesis in vitro [J]. *Plant Molecular Biology*, 2005, 57:53-66.
- [16] Gerard M. Sequencing and characterization of the soybean leaf metalloproteinase: structural and functional similarity to the matrix metalloproteinase family [J]. *Plant Physiology*, 1992, 99, 1179-1183.
- [17] Dortje G, Olga V P, Karl J D. Mutation of the matrix metalloproteinase A2-MMP inhibits growth and causes late flowering and early senescence in arabidopsis [J]. *Biological Chemistry*, 2002, 277(7):5541-5547.
- [18] Sage-Ono K, Ono M, Harada H, Kamada H. Dark-induced accumulation of mRNA for a homolog of translationally controlled tumor protein (TCTP) in *Pharbitis* [J]. *Plant & Cell Physiology*, 1998, 39(3):357-60.
- [19] Bommer U A, Anton V, Greagg M A, et al. The mRNA of the translationally controlled tumor protein P23/TCTP is a highly structured RNA, which activates the dsRNA-dependent protein kinase [J]. *RNA* (New York, N. Y.), 2002, 8:478-496.
- [20] Michael R S. The Light Reactions: A guide to recent acquisitions for the picture gallery [J]. *The Plant Cell*, 2005, 17(3):648-663.
- [21] 刘琼明, 张令强, 贺福初, 等. 氧化还原信号转导的分子机制 [J]. *生命的化学*, 2005, 25(1):1-3. (Liu Q M, Zhang L Q, He F C. Molecular mechanisms of redox signal transduction [J]. *Chemistry of Life*, 2005, 25(1):1-3.)
- [22] Bowler C, Alliotte T, De Loose M, et al. The induction of manganese superoxide dismutase in response to stress in *nicotiana glauca* [J]. *The European Molecular Biology Organization Journal*, 1989, 8(1):31-38.
- (上接第 381 页)
- [11] Kantolic A G, Slafer G A. Photoperiod sensitivity after flowering and seed number determination in indeterminate soybean cultivars [J]. *Field Crops Research*, 2001, 72(2):109-118.
- [12] Kantolic A G, Slafer G A. Development and seed number in indeterminate soybean as affected by timing and duration of exposure to long photoperiods after flowering [J]. *Annals of Botany*, 2007, 99:925-933.
- [13] 韩天富, 王金陵, 杨庆凯, 等. 开花后光照长度对大豆化学品质的影响 [J]. *中国农业科学*, 1997, 30(2):47-53. (Han T F, Wang J L, Yang Q K, et al. Effects of post flowering photoperiod on chemical composition of soybeans [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 1997, 30(2):47-53.)
- [14] Byth D E. Comparative photoperiodic responses for several soybean varieties of tropical and temperate origin [J]. *Australian Journal of Agricultural Research*, 1968, 19:879-890.
- [15] Criswell J G, Hume D J. Variation in sensitivity to photoperiod among early maturing soybean strains [J]. *Crop Science*, 1972, 12:657-660.
- [16] 任全兴, 盖钧镒, 马育华. 我国大豆品种生育期生态特性研究 [J]. *中国农业科学*, 1987, 20(5):23-28. (Ren Q X, Gai J Y, Ma R H. A study on the ecological properties of the growth periods of the Chinese soybean varieties [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 1987, 20(5):23-28.)
- [17] 吴宗璞, 高凤兰, 康宗宝, 等. 大豆超早熟育种问题的研究 [J]. *东北农学院学报*, 1988, 19(2):127-134. (Wu Z P, Gao F L, Kang Z B, et al. Breeding of super-early maturing soybean cultivars [J]. *Journal of Northeast Agricultural College*, 1988, 19(2):127-134.)