

DOI: 10.3724/SP.J.1006.2012.00780

## 小麦磷饥饿前后根系蛋白质组差异表达谱建立及差异表达蛋白的鉴定

冯万军<sup>1,2</sup> 李振兴<sup>1,2</sup> 郭宝健<sup>1,2</sup> 彭惠茹<sup>1,2</sup> 姚颖垠<sup>1,2</sup> 倪中福<sup>1,2,\*</sup>  
孙其信<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup> 农业生物技术国家重点实验室 / 教育部杂种优势研究与利用重点实验室 / 北京市作物遗传改良重点实验室 / 农业部作物基因组与遗传改良重点实验室 / 中国农业大学, 北京 100193; <sup>2</sup> 国家植物基因研究北京中心, 北京 100193

**摘 要:** 以耐低磷的小麦基因型洛夫林 10 号为材料, 采用蛋白质双向电泳技术, 结合质谱鉴定, 分析了正常磷供应和无磷处理 7 d 后根系中的蛋白质组表达谱差异, 以期深入探讨小麦响应磷胁迫的分子机理提供蛋白水平上的数据和资料。研究发现, 在可重复检测到的 1 144 个蛋白点中, 有 87 个在磷胁迫处理前后发生了明显的表达改变, 占总数的 7.6%, 包括磷胁迫前特异表达、磷胁迫后特异表达、磷胁迫后上调和磷胁迫后下调表达等 4 种差异表达模式。在 87 个差异表达蛋白点中, 有 39 个通过质谱技术被成功鉴定, 涉及到代谢、细胞生长和分裂、转录和翻译、抗病、信号转导、转座元件及未知功能蛋白等功能类别, 说明小麦可能通过细胞的代谢状态和基因表达改变来适应磷胁迫, 进而维持体内磷含量的平衡状态。最后, 还对差异表达点与磷胁迫的关系进行了分析和讨论。

**关键词:** 磷营养; 蛋白质组表达谱; 根系; 小麦

## Identification of Differential Expressed Proteins Responding to Phosphorus Starvation Based on Proteomic Analysis in Roots of Wheat (*Triticum aestivum* L.)

FENG Wan-Jun<sup>1,2</sup>, LI Zhen-Xing<sup>1,2</sup>, GUO Bao-Jian<sup>1,2</sup>, PENG Hui-Ru<sup>1,2</sup>, YAO Ying-Yin<sup>1,2</sup>, NI Zhong-Fu<sup>1,2,\*</sup>, and SUN Qi-Xin<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup> Key Laboratory of Crop Heterosis and Utilization (MOE) / State Key Laboratory for Agrobiotechnology / Key Laboratory of Crop Genomics and Genetic Improvement (MOA) / Beijing Key Laboratory of Crop Genetic Improvement / China Agricultural University, Beijing 100193, China; <sup>2</sup> National Plant Gene Research Centre (Beijing), Beijing 100193, China

**Abstract:** Growth inhibition caused by phosphorus (P) deficiency is a serious problem for crop production. Plants can respond defensively to this stress by modifying their metabolic pathways and root morphologies through changes of quantity of low-Pi responding genes. To better understand the adaptation mechanisms of wheat to Pi deficiency conditions, a comparative proteome analysis was conducted in this study using wheat root samples treated 7 days without (–P) and with phosphorus (+P). Among 1 144 protein spots reproducibly detected, eighty seven of which (7.6%) were differentially expressed, including those present in treatments of only in –P or +P, and up- or down-regulated in –P. Moreover, 39 of the differentially expressed proteins were revealed to be involved in various biological processes such as metabolism, cell growth and division, transcription and translation, disease and defense, signal transduction, acting as transposable elements and unclassified proteins. Taken together, our results showed that wheat responds to the Pi starvation stress through an array of changes in metabolic states of cells and genes expression, which results in the maintenance of a relative P homeostasis in plants.

**Keywords:** Phosphorus nutrition; Proteomic analysis; Root; *Triticum aestivum* L.

磷素是植物生长和发育必需的大量营养元素之一。作为一个关键因子, 磷素参与重要的代谢途径, 包括能量转运、信号转导、大分子合成以及光合作用和呼吸等<sup>[1]</sup>。由于磷素在土壤中的有效性低、移

本研究由国家重点基础研究发展计划(973计划)前期项目(2007CB109000), 国家杰出青年科学基金(30925023), 国家自然科学基金项目(30671297)和国家高技术研究发展计划(863计划)项目(2012AA10A309)资助。

\* 通讯作者(Corresponding authors): 倪中福, E-mail: wheat3392@cau.edu.cn; 孙其信, E-mail: qxsun@cau.edu.cn

Received(收稿日期): 2011-09-05; Accepted(接受日期): 2011-12-19; Published online(网络出版日期): 2012-03-05.

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1809.S.20120305.1038.008.html>

动性差, 磷素供应不足经常造成作物减产<sup>[2]</sup>。为了适应低磷胁迫的环境, 高等植物进化出了一系列形态和生理机制以增强磷素利用效率。植株形态的变化有根系结构的改变, 主要是初生根生长量减少和侧根增加以及根毛的形成<sup>[3-7]</sup>。生理生化水平的变化包括碳代谢变化、酸性磷酸酶合成和分泌、有机酸渗出和高亲和力磷酸盐转运子增强表达等<sup>[8-11]</sup>。

过去的10年间, 许多低磷胁迫响应基因被发现, 例如酸性磷酸酶<sup>[12-13]</sup>、磷转运子<sup>[14-15]</sup>、转录因子(*PHR1*、*PHR2*、*WRKY75*、*ZAT6* 和 *BHLH32*)<sup>[16-20]</sup>和核酸酶(RNases)<sup>[21]</sup>。最近, 芯片技术被应用到寻找低磷胁迫响应基因中<sup>[22-27]</sup>。拟南芥低磷胁迫下全基因转录表达谱的分析结果表明植物对缺磷的反应是通过一个高度协调的基因表达程序进行调控的<sup>[22-27]</sup>。此外, 也有关于植物在缺磷情况下蛋白差异表达的报道。有研究表明玉米在磷缺乏情况下根系生长和蛋白组均发生了变化<sup>[28]</sup>, 另有关于水稻在低磷和高浓度铝的胁迫下体内蛋白发生差异表达的报道<sup>[29]</sup>。这些结果表明, 植物对低磷胁迫的响应似乎是一个复杂的代谢过程, 由复杂的调控系统控制。

小麦是全球最重要的粮食作物之一, 占据17%的耕地却给我们提供了近55%的碳水化合物<sup>[30]</sup>。小麦的生产区通常会出现磷胁迫现象, 但是有关的研究却很少, 而且主要集中在遗传分析层面<sup>[31-32]</sup>。根系是高等生物重要的磷素吸收器官, 而磷元素是植物生长和代谢必须的, 且在低磷胁迫下表现出很强的可塑性<sup>[3-5, 33]</sup>。最近, 通过cDNA-AFLP方法研究表明在低磷处理后的小麦根系中有142个和94个ESTs分别出现上调和下调表达<sup>[34]</sup>。然而, 到目前为止, 有关小麦在低磷胁迫下的蛋白组学研究还未见报道。在我们的研究中, 我们采用双向电泳分析了0和250  $\mu\text{mol L}^{-1}$   $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 处理7 d的小麦根系蛋白差异表达谱, 利用质谱技术成功鉴定出了39个差异表达蛋白, 这些结果对我们理解小麦低磷忍耐的机理有重要帮助, 进一步为我们提供了低磷胁迫响应基因的信息。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料种植

以磷高效小麦品种洛夫林10号为材料, 在室内用水培法培养小麦幼苗。洛夫林10号种子经3%的双氧水表面消毒30 min, 蒸馏水洗净, 25℃在培养皿滤纸上萌发, 生长至一叶一心, 选择整齐一致的幼苗去胚乳后移栽到塑料盒中, 塑料盒规格为

2 L, 每盒4株。24 h通气, 全营养条件下培养生长至三叶期。选择一半的幼苗, 浮植于改进的1/4霍格兰氏营养液上, 具体营养成分如下: 正常供磷对照(CK):  $[\text{K}_2\text{SO}_4\ 7.5\times 10^{-4}\ \text{mol L}^{-1}, \text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}\ 6.5\times 10^{-4}\ \text{mol L}^{-1}, \text{KCl}\ 1.0\times 10^{-4}\ \text{mol L}^{-1}, \text{KH}_2\text{PO}_4\ 2.5\times 10^{-4}\ \text{mol L}^{-1}, \text{MnSO}_4\cdot \text{H}_2\text{O}\ 1.0\times 10^{-5}\ \text{mol L}^{-1}, \text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}\ 1.0\times 10^{-6}\ \text{mol L}^{-1}, \text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}\ 1.0\times 10^{-7}\ \text{mol L}^{-1}, (\text{NH}_4)_6\text{MoO}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}\ 5.0\times 10^{-8}\ \text{mol L}^{-1}, \text{Ga}(\text{NO}_3)_3\cdot 4\text{H}_2\text{O}\ 2.0\times 10^{-3}\ \text{mol L}^{-1}, \text{H}_3\text{BO}_3\ 1.0\times 10^{-6}\ \text{mol L}^{-1}, \text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}\ 1\times 10^{-4}\ \text{mol L}^{-1}, \text{Na}_2\text{EDTA}\ 1\times 10^{-4}\ \text{mol L}^{-1}]$ <sup>[35]</sup>。低磷胁迫处理除不含 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 外, 其他成分与对照一致。每2 d换一次营养液, 24 h通气, 每天9:00调节pH到6.0, 随时补充蒸发的水分。每天光照时间为16 h, 平均温度28℃(白天)/16℃(夜间)。

### 1.2 取样方法

低磷胁迫处理后7 d(长期胁迫), 处理和对照样品各取3个重复, 按单株分叶片和根系两部分迅速冻于液氮中, -70℃保存。另取分叶片和根系两部分, 在105℃杀青15 min, 80℃烘干至恒重, 称叶片干重和根干重, 并计算总干重, 分叶片和根系分别进行含磷量的测定。植物含磷量的测定采用钒钼黄比色法<sup>[36]</sup>。

### 1.3 根系总蛋白的提取

方法见于Trizol试剂盒(Invitrogen, USA)。将整条根系于液氮中研磨, 分装于1.5 mL离心管, 每管约含0.1~0.2 g鲜样。加入Trizol, 剧烈振荡混匀后, 室温放置15 min。按每1 mL Trizol加入0.2 mL氯仿, 剧烈振荡15 min, 室温静置3 min。4℃10 000×g离心15 min。取下层有机相, 加入乙醇倒置混匀沉淀DNA, 室温静置3~5 min, 2 500×g离心10 min。取上清, 加入的异丙醇室温静置10 min沉淀蛋白, 13 000×g离心10 min。弃上清, 加入0.3 mol  $\text{L}^{-1}$ 盐酸胍/95%乙醇, 重悬沉淀, 室温静置20 min, 9 500×g离心5 min。此步骤重复3遍。后用乙醇重悬沉淀, 室温静置20 min, 9 500×g离心5 min。弃上清, 并将残余液体彻底吸干。真空离心干燥40 min。将蛋白干粉溶重悬于上样水化液[7 mol  $\text{L}^{-1}$ 脲, 2 mol  $\text{L}^{-1}$ 硫脲, 2% CHAPS (W/V), 0.5% pH 4~7 IPG buffer (V/V)(GE Healthcare, USA)和36 mmol  $\text{L}^{-1}$  DTT (5.6 mg  $\text{mL}^{-1}$ )]中, 室温振荡溶解1 h, 室温13 000×g离心15 min, 吸取上清蛋白溶液, -80℃冻存。蛋白含量测定按照Bradford法。标准曲线绘制中所用标准品为牛血清白蛋白。

### 1.4 根系总蛋白的双向电泳

用480  $\mu\text{L}$  (含200  $\mu\text{g}$ 总蛋白)上样水化液在泡胀

盘中重泡胀 IPG 胶条(线性 pH 4~7, 24 cm, ) 12 h 后转入一向等电聚焦仪 IPGhorII (GE Healthcare, USA) 进行等电聚焦电泳。等电聚焦的电压参数设置为 150 V 1.5 h, 500 V 0.5 h, 1 000 V 0.5 h, 8 000 V 4 500 V h (梯度), 8 000 V 64 000 V h。胶条转入平衡管用 10 mL 平衡液平衡 2 次, 每次 15 min。平衡母液配方: 0.05 mol L<sup>-1</sup> Tris-HCl, pH 8.8, 6 mol L<sup>-1</sup> 尿素, 30% (W/V) 甘油和 2% (W/V) SDS, 配制后分小瓶分装 -80℃ 保存。取配好的平衡母液 10 mL, 加入 0.1 g DTT 配制成平衡液一; 取配好的平衡母液 10 mL, 加入 0.25 g 碘代乙酰胺配制成平衡液二。平衡后转入二向 12.5% SDS-PAGE 胶之上, 使两胶面契合紧密, 并用 1% 琼脂糖封胶。将板胶置于 Ettan Dalt six (GE Healthcare, USA), 连接好电泳仪(EPS 601)(GE Healthcare, USA) 和控温循环水浴(MultiTemp III) (GE Healthcare, USA) 进行第二向变性胶电泳, 功率参数设置为: 2.5 J s<sup>-1</sup> Glue 0.5 h<sup>-1</sup>, 15 J s<sup>-1</sup> Glue 12~14 h<sup>-1</sup>。银染采用的是 PlusOne Silver Staining Kit (GE Healthcare, USA) 提供的方法。用 40% 乙醇/10% 乙酸固定 30 min。30% 乙醇/0.2% 硫代硫酸钠/6.8% 乙酸钠, 敏化 30 min。蒸馏水洗 3 遍, 每遍 5 min。0.25% 硝酸银染色 20 min, 快速水洗胶的两面, 每遍 20 s。加 2.5% 碳酸钠/0.015% 甲醛显色。待显色完全时, 用 1.5% EDTA-Na<sub>2</sub> 终止反应 10 min。用蒸馏水清洗 3 遍, 每遍 10 min。清洗干净的胶, 用保鲜膜包裹, 浸没于蒸馏水中 4℃ 保存。

### 1.5 图像处理

用 Labscan (GE Healthcare, USA) 进行图像扫描, 分辨率为 300 dpi, 并用 Imagemaster 2D Platinum Software Version 5.0 (GE Healthcare, USA) 进行图像分析。首先是蛋白点的自动检测, 3 个参数 smooth、minimum area 和 saliency 的设置分别为 2.0、22.0 和 4.5, 随后进行手动编辑(点的增减、切割、合并和轮廓修正); 在软件自动均一化处理后, 将所有胶与参比胶进行自动匹配, 后进行手动修改。应用分析程序, 分别根据蛋白点在线性胶条中的迁移率与蛋白分子量 Marker (购自中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所) 的相对位置, 确定其等电点和分子量。

### 1.6 胶内酶切

手动挖出差异蛋白点, 至于 1.5 mL 离心管中。对于低丰度点可合并 2~4 张胶进行富集。将 30 mmol L<sup>-1</sup> 铁氰化钾和 100 mmol L<sup>-1</sup> 硫代硫酸钠 1:1 混合, 对

蛋白点进行脱色。待脱色完全, 水洗 3 遍终止反应。25 mmol L<sup>-1</sup> 碳酸氢铵/50% 乙腈清洗胶块, 后用 100% 乙腈脱水。真空干燥胶块 20 min。加入 5~10 μL 10 ng μL<sup>-1</sup> 质谱级胰蛋白酶(Modified Sequencing Grade, Roche Diagnostics GmbH Mannheim, Germany), 4℃ 吸胀 40 min, 后用 25 mmol L<sup>-1</sup> 碳酸氢铵覆盖胶块, 37℃ 酶切 12~16 h。肽段用 0.1% 三氟乙酸抽提一遍, 0.1% 三氟乙酸/70% 乙腈抽提 2 遍, 将抽提液合并, 冷冻干燥 2 h, 将体积浓缩至约 10 μL, -80℃ 冻存, 待质谱测定。

### 1.7 质谱鉴定

使用 AUTOFLEX II TOF-TOF (Bruker Daltonics, Germany) 进行肽指纹图谱及二级质谱测定。样品点于 Anchorchip 384 板: 配制 0.1% 三氟乙酸/70% 乙腈溶液, 将基质 HCCA 按 4 mg mL<sup>-1</sup> 溶于该溶液中; 同时将样品溶于 0.1% 三氟乙酸/70% 乙腈溶液中。上样 1 μL 待风干后再上样 1 μL, 然后加入 0.3 μL 基质饱和溶液。待风干后, 用 0.1% 三氟乙酸脱盐 2 遍。外标(Bruker Daltonics, Germany)原液以 1:39 的比例与基质饱和液混合均匀后, 取 0.5 μL 点于 4 个样品靶点围绕的小孔中, 彻底风干准备激光打靶。选择胰蛋白酶自解峰 2 163.333 和 2 273.434 为内标。将每个样品的 PMF or CID MS/MS 肽段质量列表保存, 以用于数据比对。峰图分析软件为 Auto Flexanalysis (Bruker Daltonics, Germany) 和 Mascot Distiller (Matrix Science)。将 PMFs and CID MS/MS 肽段列表输入 Matrix Science (<http://www.Matrixscience.com>) 搜索引擎在 NCBI nr 库中进行匹配: 分类学种类选择 Viridiplantae (Green Plants); 每次匹配允许一个酶切位点的丢失; 所有肽段质量峰都为单同位素峰并质子化; PMF 肽段质量精确度为 0.2 Da; 二级图谱肽段质量精确度为 0.2 Da; 分别选择甲硫氨酸氧化和半胱氨酸脲基甲基化作为可变和固定修饰。被认定是阳性结果的条件是: (1) MOWSE 分值高于或等于 MASCOT 所给出的 5% 显著性水平的分值; (2) 至少有 4 个不同肽段与已知蛋白的肽段匹配; (3) 匹配肽段的覆盖率高于 15%; (4) 实际与理论肽段质量误差小于 0.2 Da<sup>[37-38]</sup>。此外, 一些蛋白的实际与理论等电点或分子量相差很多, 但如果以上 4 个条件都可满足, 则也被认定是阳性结果。造成这种实际值和理论值间偏差的可能因素很多, 如蛋白翻译后修饰、蛋白多聚体、蛋白水解、不同种属间差异、或理论值推断的误差等。

## 2 结果与分析

### 2.1 磷胁迫处理 7 d 小麦根系及地上部与对照的干重和磷浓度比较分析

经过测量分析发现, 低磷胁迫处理 7 d 后, 与对照相比, 小麦叶片干重和总干重明显降低(达到  $P < 0.01$  显著水平), 而根干重没有显著差异(图 1-A),

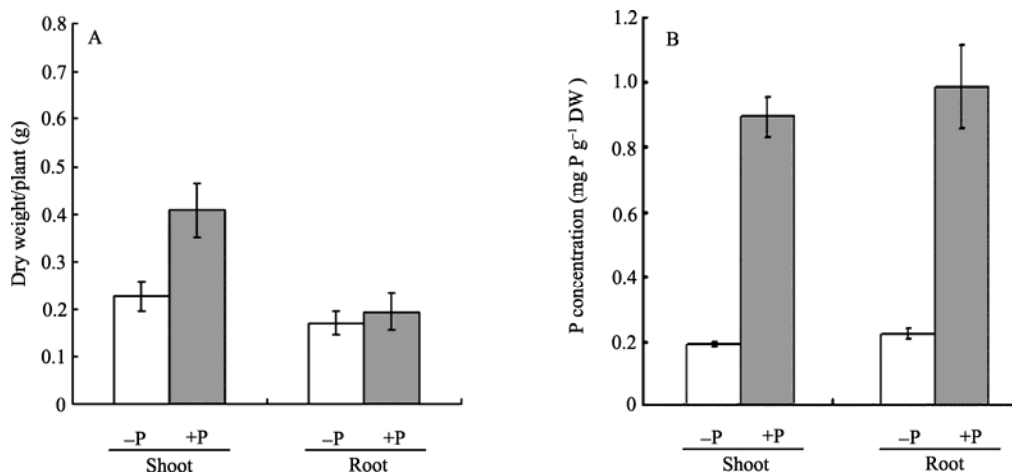


图 1 磷饥饿(-P)和正常供磷(+P)处理 7 d 后小麦根系生物量(A)和磷含量(B)测定

Fig. 1 Dry weight and P concentration in shoot and roots of wheat seedlings treated with 0 mmol L<sup>-1</sup> (-P) or 0.25 mmol L<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (+P) for 7 days

误差线指的是标准误( $n=8$ )。Error bars indicate SE ( $n=8$ ).

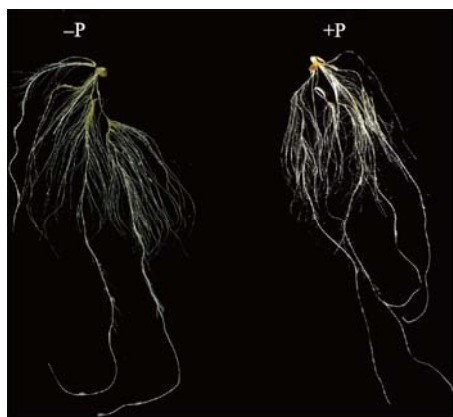


图 2 磷饥饿(-P)和正常供磷(+P)处理 7 d 后小麦根系表型比较

Fig. 2 Morphology of wheat seedling roots treated with 0 mmol L<sup>-1</sup> (-P) or 0.25 mmol L<sup>-1</sup> (+P) KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> for 7 days

### 2.2 磷胁迫处理小麦根系差异表达蛋白谱分析

采用 24 cm pH 4~7 线性胶条, 通过双向电泳技术对小麦根系蛋白样品进行了分离, 经过硝酸银染色后获得了磷高效基因型小麦洛夫林 10 号在低磷胁迫处理 7 d 后小麦幼苗根系及其对照的 2-D 胶图, 分别选择低磷处理和正常供磷不同材料的独立的 3 个生物学重复, 总共 6 张 2-D 胶, 采用 Imagemaster 软

与对照相比地上部和根系的磷含量均显著降低(图 1-B)。此外, 对表型观察发现, 处理后的样品根系发黄, 并且侧根增多, 具有缺磷胁迫的典型症状。这也说明我们选取的这个时期的根系可以作为理想的材料用于研究小麦低磷胁迫适应机制。因此, 我们选取至少 5 株小麦根系作为 1 个生物学重复, 共进行 3 次生物学重复, 作为进一步 2-DE 分析的材料。

件分析后发现, 重复检测到 1 144 个蛋白点(图 3), 分子量范围为 20~150 kD。选择在比较的两组样品 3 次重复中差异表达值 1.5 倍以上的蛋白点, 经过  $t$  测验( $P < 0.05$ )检测, 磷胁迫处理 7 d 根系样品和对照样品之间有 87 个(7.6%)蛋白发生差异表达, 涉及低磷后特异, 上调表达, 下调表达, 正常供磷后特异 4 种表达模式(图 3 和图 4), 分别有 33、25、57、1 个蛋白点。由此, 推测低磷胁迫下, 小麦的根系在翻译水平可能发生了复杂的变化, 有的反应需要某种蛋白的沉默, 有的反应需要某种蛋白的富集, 而另外一些反应则相反。有可能其中的一些蛋白对小麦的低磷胁迫适应机理相关。

### 2.3 差异表达蛋白的质谱鉴定和功能分类

为了确切地理解小麦的耐低磷机制和在低磷胁迫下哪些生理途径发生了变化, 通过质谱技术成功鉴定了 39 个差异表达蛋白, 涉及 37 个不同基因或基因家族。根据前人的功能分类标准<sup>[39]</sup>, 这些蛋白被分为 7 个功能类别, 包括代谢、细胞生长和分裂、转录和翻译、抗病和防御、信号转导、转座元件和功能未知蛋白(表 1)。除未知蛋白(23.1%), 其余以代谢类最多(20.5%), 其次分别为抗病和防御(17.9%)、转

表 1 磷饥饿处理和正常供磷后小麦根系中差异表达蛋白鉴定结果  
Table 1 Identification of differentially expressed proteins between wheat seedling roots of -P and +P treatments

蛋白编号 <sup>a</sup> Spot No. <sup>a</sup>	推测功能 Putative function	物种 Species	比对分数 MOWSE score	匹配肽段数 Peptides matched	序列覆盖率 Sequence covered (%)	实验所得 等电点/分子量 Experimental pI/Mr (kD)	理论 等电点/分子量 Calculated pI/Mr (kD)	NCBI 蛋白编号 Accession number	表达变化比值 Specificity -P:+P
代谢 Metabolism									
187	Nonspecific lipid-transfer protein precursor	<i>Hordeum vulgare</i>	72	4	21	4.33/72	6.78/10.4	gi 128377	1.88:1
295	Isopenicillin N synthase and dioxygenases	<i>Oryza sativa</i>	81	9	28	4.55/109	5.95/40.2	gi 125550691	1.89:1
614	Short-chain alcohol dehydrogenase	<i>Oryza sativa</i>	134	19	42	4.98/90	6.64/56.7	gi 125559650	-1.83:1
687	Serine-type peptidase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	74	11	17	5.13/94	9.22/55.3	gi 18401169	-1.61:1
766	Phosphoglycerate mutase	<i>Triticum aestivum</i>	160	22	63	5.26/99	5.43/29.6	gi 32400802	-1.52:1
786	NADH dehydrogenase 1 alpha subcomplex 9	<i>Ostreococcus lucimarinus</i>	185	17	38	5.31/51	7.71/40.7	gi 145351563	-1.56:1
887	Ketol-acid reductoisomerase	<i>Pisum sativum</i>	119	12	22	5.44/93	6.62/62.8	gi 6491802	-157:1
1175	Putative aconitate hydratase	<i>Oryza sativa</i>	78	10	14	5.86/50	6.35/82.0	gi 54291503	only -P
细胞生长和分裂 Cell growth and division									
289	Chromosome segregation ATPases	<i>Arabidopsis thaliana</i>	87	30	33	4.54/86	4.97/95.5	gi 2388564	only -P
470	Cell division protein FtsZ, tubulin alpha	<i>Medicago truncatula</i>	80	8	22	4.85/78	4.99/49.5	gi 140070666	1.81:1
664	Myosin heavy chain	<i>Oryza sativa</i>	72	16	22	5.08/96	5.08/76.1	gi 116308876	-1.51:1
931	Rutative kinesin-like protein	<i>Oryza sativa</i>	69	18	23	5.53/72	8.85/90.9	gi 31745224	3.10:1
转录和翻译 Transcription and translation									
244	Zn-finger transcription factor	<i>Capsella rubella</i>	82	8	22	4.47/41	7.08/28.6	gi 38260642	-1.66:1
249	Ribosomal protein L2	<i>Nicotiana debneyi</i>	68	8	31	4.47/37	10.06/28.9	gi 132861	only -P
314	GRAS family transcription factor	<i>Oryza sativa</i>	70	16	23	4.59/104	5.7/90.6	gi 115440983	1.95:1
1564	Ribosomal protein S13	<i>Triteleia laxa</i>	69	9	35	5.57/84	10.58/13.5	gi 24636931	-2.11:1
1566	Tat binding protein 1 containing protein	<i>Oryza sativa</i>	72	9	41	5.31/77	6.54/26.2	gi 108710703	only -P
抗病和防御 Disease and defense									
95	Putative disease resistance protein OB8	<i>Phaseolus vulgaris</i>	69	10	44	4.21/54	9.45/19.2	gi 13937098	2.25:1
194	Metallothionein-like protein	<i>Citrus unshiu</i>	97	6	50	4.34/44	4.31/7.0	gi 12830830	1.85:1
322	Major intrinsic protein, putative	<i>Arabidopsis thaliana</i>	90	12	31	4.60/36	5.45/38.0	gi 21593118	2.12:1
323	Putative movement protein	<i>Nicotiana tabacum</i>	71	9	18	4.60/47	8.99/49.9	gi 15963362	1.57:1
448	Chaperonin HSP60, mitochondrial	<i>Solanum tuberosum</i>	70	4	72	4.82/40	8.48/4.2	gi 1345767	only -P
527	Iron-deficiency induced gene	<i>Hordeum vulgare</i>	79	8	34	4.89/29	5.23/23.4	gi 14522834	-2.08:1
587	Iron-deficiency induced gene	<i>Hordeum vulgare</i>	153	11	45	4.99/30	5.23/23.5	gi 14522834	-2.18:1

(续表 1)

蛋白编号 <sup>a</sup> Spot No. <sup>a</sup>	推测功能 Putative function	物种 Species	比对分数 MOWSE score	匹配肽段数 Peptides matched	序列覆盖率 Sequence covered (%)	实验所得 等电点/分子量 Experimental pI/Mr (kD)	理论 等电点/分子量 Calculated pI/Mr (kD)	NCBI 蛋白编号 Accession number	表达变化比值 Specificity -P:+P
信号转导 Signal transduction									
330	Phospholipase D alpha 1	<i>Arachis hypogaea</i>	144	17	20	4.62/107	6.25/90.6	gi 88193695	1.99:1
转座元件 Transposable elements									
107	Retrotransposon protein	<i>Oryza sativa</i>	76	11	43	4.21/45	9.44/32.0	gi 77551065	3.17:1
770	Putative transposase	<i>Vitis vinifera</i>	73	6	42	5.26/116	4.51/15.0	gi 147798858	-1.61:1
884	Transposon protein, putative	<i>Oryza sativa</i>	72	10	35	5.43/51	8.45/43.8	gi 77554227	3.98:1
930	Transposon protein, putative	<i>Oryza sativa</i>	71	11	12	5.52/48	7.61/108.8	gi 32483275	1.92:1
1225	Reverse transcriptase (RT)	<i>Vitis vinifera</i>	184	28	20	6.01/59	8.35/159.8	gi 147856900	1.98:1
未知功能 Unclassified									
280	Hypothetical protein (Unknown function)	<i>Oryza sativa</i>	80	7	40	4.53/109	11.3/17.9	gi 47497814	only -P
356	Hypothetical protein LOC_Os12g38550	<i>Oryza sativa</i>	89	7	18	4.65/92	5.15/41.2	gi 77556891	only -P
463	Hypothetical protein	<i>Medicago truncatula</i>	70	9	50	4.83/32	4.88/9.1	gi 140065127	2.29:1
525	Hypothetical protein	<i>Medicago truncatula</i>	77	5	94	4.89/91	9.78/4.9	gi 140062017	-1.94:1
593	Hypothetical protein	<i>Oryza sativa</i>	92	5	26	4.98/35	9.83/12.0	gi 21644652	1.59:1
616	Hypothetical protein	<i>Oryza sativa</i>	70	6	82	4.98/66	12.18/7.8	gi 47497656	-1.571
883	Os01g0172300	<i>Oryza sativa</i>	69	4	17	5.43/48	4.78/20.2	gi 115434788	only -P
1318	Hypothetical protein	<i>Vitis vinifera</i>	96	8	19	6.22/87	10.21/57.7	gi 147777534	-1.92:1
1553	Hypothetical protein OsI_027958	<i>Oryza sativa</i>	105	7	32	4.63/49	9.11/30.2	gi 125561278	1.73:1

<sup>a</sup> 点编号与图 3 中编号对应。<sup>a</sup> Spot numbers are corresponding to the numbers in Figure 3.

录和翻译(12.8%)、转座元件(12.8%)、细胞生长和分裂(10.3%)和信号转导类(2.6%)。此外,发现有 2 个蛋白点(点 527 和点 587)(图 3)经鉴定均为铁胁迫诱导蛋白,且均呈下调表达模式;与之相反,另有 2 个

蛋白点(点 884 和点 930)(图 3)同为转座蛋白,而呈上调表达模式。这种现象的出现可能是同一蛋白的不同修饰造成的,也可能是不能被成功区分的亲缘关系非常相近的家族成员。

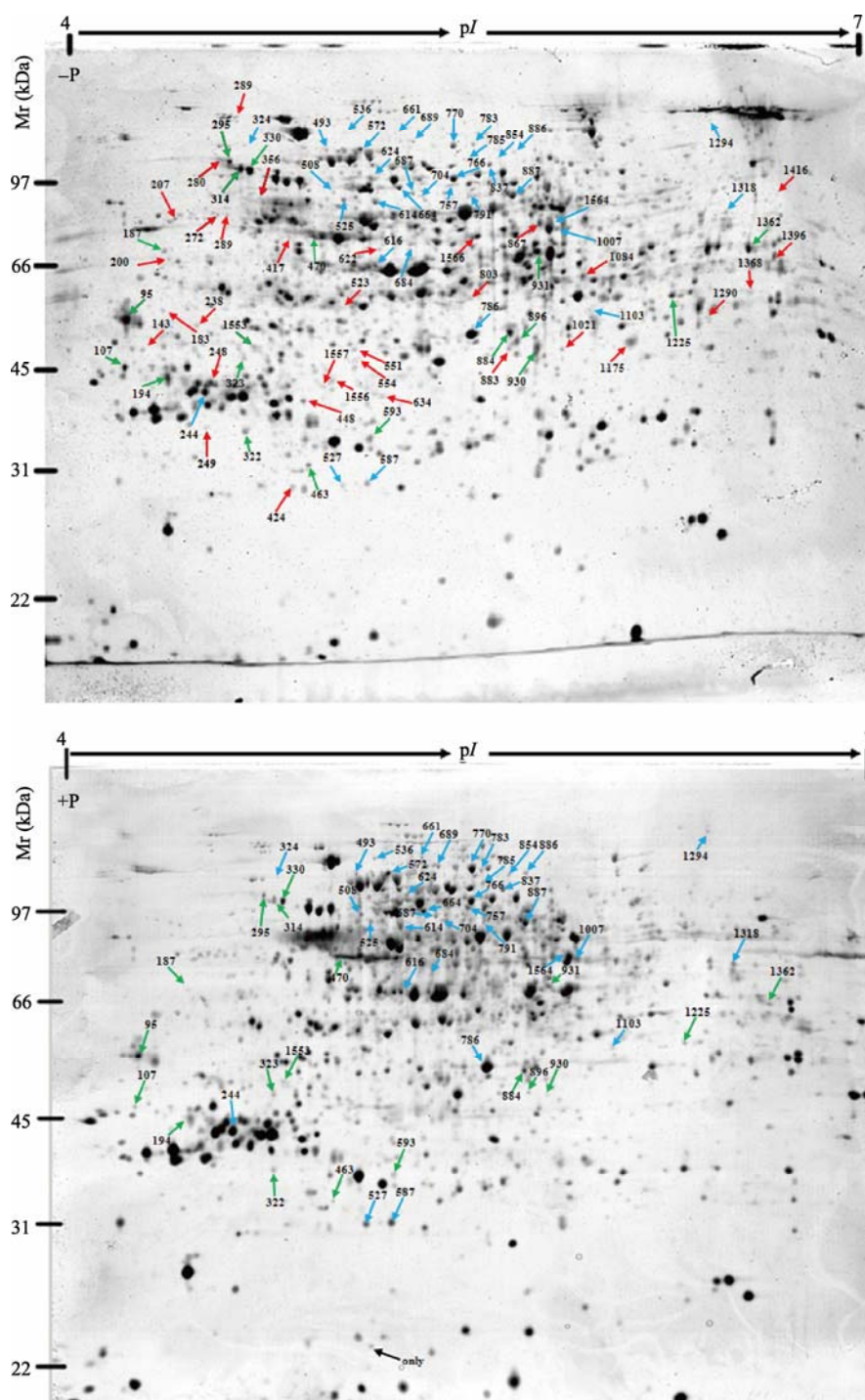


图 3 磷饥饿(-P)和正常供磷(+P)处理 7 d 后小麦根系蛋白表达谱

**Fig. 3** Comparison of 2-DE gels of wheat roots proteins treated with 0 mmol L<sup>-1</sup> (-P) or 0.25 mmol L<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (+P) for 7 days. 红色、绿色、蓝色和黑色箭头分别表示低磷特异、-P 中上调表达、-P 中标下调表达和正常供磷后特异表达 4 种模式, 数字为蛋白点编号。Protein spots exhibiting only in -P, up-regulated in -P, down-regulated in -P and only in +P expression patterns were indicated by red, green, blue and black arrows, respectively, along with their spot identification numbers.

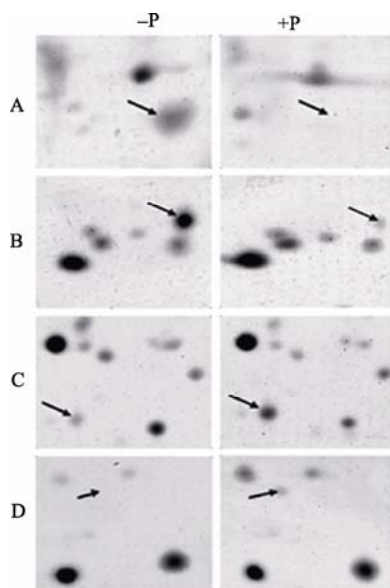


图 4 差异表达蛋白表达模式

Fig. 4 Differential protein expression patterns between wheat seedling roots of -P and +P treatments

A: 低磷特异(点 1175); B: -P 中上调表达(点 107); C: -P 中下调表达(点 587); D: 正常处理后特异(点 only)。

A: only in -P (spot 1175); B: up-regulated in -P (spot 107); C: down-regulated in -P (spot 587); D: only in +P (spot only)。

### 3 讨论

#### 3.1 磷饥饿下小麦根系中差异表达蛋白

目前, 磷胁迫造成的作物减产问题是人类面临的一大挑战。有研究表明, 作物通过调控基因表达来优化根系构型从而可以拓展土壤体积、最大化的吸收磷元素以及提高磷素的利用效率, 而这也可能会减少化肥的施用<sup>[2]</sup>。基于此, 现在有关低磷胁迫的研究主要有磷胁迫响应基因的鉴定和有关信号途径的寻找。利用芯片技术对转录组分析筛选出了大量磷胁迫响应基因<sup>[3-7]</sup>。拟南芥中, 有 2 种研究方案, 以胁迫 3 h 和 72 h 的短时间为早期方案和 7 d 的晚期方案<sup>[22,40]</sup>。晚期的转录方案主要包括特异响应磷胁迫的基因, 这些基因在只在胁迫晚期表达或者是逐渐积累<sup>[22,40]</sup>。最近, 有研究通过 cDNA-AFLP 技术研究找到了一些小麦中低磷胁迫响应的基因<sup>[34]</sup>。在本研究中, 利用双向电泳技术, 在磷饥饿处理 7 d 的小麦根系中, 我们检测到 1 114 个重复出现的蛋白点, 有近 7.6% 蛋白发生了差异表达。在磷饥饿处理的小麦根系中特异表达的蛋白有 33 个, 而正常供磷后特异表达蛋白只有一个, 这说明一些基因可能在翻译水平特异响应磷饥饿。

#### 3.2 磷饥饿下小麦根系中多个功能类别的蛋白受到调控

采用质谱技术, 39 个差异表达蛋白最终通过质谱技术被成功鉴定, 涉及 7 个功能类别, 包括代谢、细胞生长和分裂、转录和翻译、抗病和防御、信号转导、转座元件和功能未知蛋白。这些结果表明小麦通过多重途径来改变细胞的代谢状态和基因表达从而做出对磷饥饿的响应, 最终达到相对的体内磷平衡。

磷素是碳代谢和氨基酸代谢的关键调控因子<sup>[1]</sup>。对低磷胁迫后的根系转录表达谱分析结果显示大量的基因参与这些代谢过程<sup>[3-7]</sup>。本研究中, 4 个蛋白点经鉴定涉及到碳代谢, 包括短链乙醇脱氢酶、磷酸甘油变位酶、NADH 脱氢酶和乌头酸水合酶。2 个氨基酸代谢的蛋白(点 687 和点 887) (图 3) 分别是酮醇酸还原异构酶和丝氨酸型肽酶。虽然这些蛋白在磷胁迫中的确切功能还不是很清晰, 但是值得肯定的是磷胁迫能够通过基因的差异表达来影响碳和氨基酸代谢, 这与先前拟南芥、水稻和玉米中的研究结果一致<sup>[23-24,26,28]</sup>。

核糖体蛋白是核糖体的主要促成部分, 蛋白酶是蛋白降解的机器<sup>[41]</sup>。低磷胁迫处理 7 d 后的拟南芥叶片和根系中许多核糖体蛋白基因下调表达<sup>[23]</sup>。在本研究中, 我们也发现在磷饥饿处理后的小麦根系中核糖体蛋白 S13 的丰度下调了近 2 倍, 另外, 26S 蛋白酶的一个组成部分 Tat 结合蛋白(点 1566) 在磷饥饿处理后的小麦根系中特异表达。作为对生长抑制的代谢适应, 与蛋白合成有关的蛋白的下调和与降解有关的蛋白的上调显得十分合理<sup>[23]</sup>。另外, 我们也发现 1 个核糖体蛋白 L2 磷胁迫后特异表达, 这需要进行进一步的研究。

转录因子在不同的环境刺激下可以调控下游基因的表达<sup>[42-44]</sup>。不断增加的证据表明转录因子是调控这些过程的关键因子。例如, 拟南芥中超表达锌指转录因子(ZAT6)可以组织幼苗的生长从而造成磷吸收能力降低<sup>[19]</sup>。有趣的是, 在我们的研究中, 有一个磷胁迫后下调表达蛋白(244)经鉴定为锌指转录因子。另一个转录因子(点 314)为 GRAS 家族成员呈现出磷胁迫后上调表达模式。转录水平的研究表明, 拟南芥中一些 GRAS 家族基因对磷胁迫有响应<sup>[45]</sup>。然而, 现在还不能确定这些转录因子在耐低磷中的作用, 这些转录因子表达上的变化可能对调控下游基因的表达有重要的作用, 最终提高了磷素的吸收效率。

ABA 是有名的植物胁迫响应激素。磷胁迫造成

的植物生长特点在一定程度上与 ABA 处理后的结果相似<sup>[46]</sup>。种植在磷素缺乏的培养基上的拟南芥叶片中一个 ABA 响应基因 *rab18* 表达量会增加<sup>[47]</sup>。在本研究中, 蛋白点 330 经鉴定为磷脂酶 D (PLD $\alpha$ 1), 且在磷胁迫处理 7 d 后的小麦根系中的表达量增加了近 2 倍。PLD $\alpha$ 1 可以调控 ABA 信号。我们推测 ABA 可能在植物对磷胁迫响应的过程中发挥一定作用, 不过这还需要进一步的研究来确定先前有关磷响应机制和 ABA 信号的关系<sup>[48-49]</sup>。

为了与调控基因表达的蛋白协调变化, 植物可通过增强分化和细胞分裂能力来更好的响应磷胁迫<sup>[50]</sup>。我们发现 3 个参与细胞生长和分裂的蛋白磷胁迫后上调表达, 包括染色体分离 ATPases、细胞分裂蛋白 FtsZ 和  $\alpha$ -tubulin。我们知道, 在真核细胞中微管参与细胞形状、细胞分裂和胞内运输等过程。前人研究指出在拟南芥中  $\alpha$ -tubulin 基因的过低表达会影响根系生长和构型、根毛发育和根系向地性<sup>[51]</sup>。我们的研究显示根系构型在磷胁迫后确实有明显变化(图 2)。这很有可能与  $\alpha$ -tubulin 蛋白的丰度积累导致根系的发育有关, 最终提高了磷素的吸收能力。

有趣的是, 另外还有一些蛋白是与抗病和防御有关的, 包括抗病蛋白 OB8、金属硫蛋白、主要内在蛋白、移动蛋白、热休克蛋白和铁缺乏诱导蛋白。除了铁缺乏诱导蛋白, 其他的蛋白在低磷胁迫后均呈上调表达模式。对拟南芥早期和晚期转录方案研究表明磷诱导的基因在其他非生物胁迫中也是经常出现的<sup>[22,40]</sup>。这说明在不同的生物或非生物胁迫途径间存在相互影响的可能, 而这对植物生存来说是必须的。

转座原件普遍存在于植物界, 在植物基因和基因组进化过程中起重要作用<sup>[52]</sup>。一些反转录转座子可被生物和非生物胁迫的激活<sup>[53-54]</sup>。在我们的研究中也发现有一些转座元件在低磷胁迫后发生了差异表达, 例如反转座蛋白、转座酶和转座蛋白。转座元件可以插入植物基因的两翼或基因内部产生突变, 所以这些转座原件可作为调控序列, 使其他基因的表达方式发生改变<sup>[55-56]</sup>。综合来说, 磷饥饿处理的小麦根系中这些转座元件的表达变化可能调控磷胁迫响应基因的表达。

#### 4 结论

分析了低磷胁迫处理和正常供磷 7 d 后小麦根系中差异表达蛋白谱, 在 1 114 个重复检测到的蛋白

点中发现有 87 个在胁迫处理后发生差异表达, 其中利用质谱技术鉴定了 39 个差异表达蛋白, 涉及 37 个不同基因或基因家族, 说明小麦对磷饥饿的响应是一个复杂的调控过程。

致谢: 中国科学院李振声院士为本研究提供了小麦洛夫林 10 号种子, 谨致谢忱。

#### References

- [1] Vance C P, Uhde-Stone C, Allan D L. Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. *New Phytol*, 2003, 157: 423–447
- [2] Raghothama K G. Phosphate acquisition. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1999, 50: 665–693
- [3] Bates T R, Lynch J P. Stimulation of root hair elongation in *Arabidopsis thaliana* by low phosphorus availability. *Plant Cell Environ*, 1996, 19: 529–538
- [4] Gahoonia T S, Nielsen N E. Direct evidence on participation of root hairs in phosphorus ( $^{32}\text{P}$ ) uptake from soil. *Plant Soil*, 1998, 198: 147–152
- [5] Mollier A, Pellerin S. Maize root system growth and development as influenced by phosphorus deficiency. *J Exp Bot*, 1999, 50: 487–497
- [6] Williamson L C, Ribrioux S P C P, Fitter A H, Leyser H M O. Phosphate availability regulates root system architecture in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 2001, 126: 875–882
- [7] Péret B, Clément M, Nussaume L, Desnos T. Root developmental adaptation to phosphate starvation: better safe than sorry. *Trends Plant Sci*, 2011, 16: 1360–1385
- [8] Ueki K. Control of phosphatase release from cultured tobacco cells. *Plant Cell Physiol*, 1978, 19: 385–392
- [9] Lipton D S, Blancher R W, Blevins D G. Citritations in excludes from P-sufficient and P-starved *Medicago sativa* L. seedling. *Plant Physiol*, 1987, 85: 315–317
- [10] Rao I M, Terry N. Leaf phosphate status photosynthesis and carbon partitioning in sugar beet: II. Diurnal changes in sugar phosphates, adenylates, and nicotinamide nucleotides. *Plant Physiol*, 1989, 90: 820–826
- [11] Hoffland E, Findenegg G R, Nelemans J A. Solubilization of rock phosphate by rape. *Plant & Soil*, 1989, 113: 155–165
- [12] Duff S M G, Sarath G, Plaxton W C. The role of acid phosphatase in plant phosphorus metabolism. *Physiol Planta*, 1994, 90: 791–800
- [13] Wasaki J, Yamamura T, Shinano T, Osaki M. Secreted acid phosphatase is expressed in cluster roots of lupin in response to

- phosphorus deficiency. *Plant & Soil*, 2003, 248: 129–136
- [14] Muchhal U S, Raghothama K G. Transcriptional regulation of plant phosphate transporters. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 5868–5872
- [15] Uta P, Scott K, Christophe R, Briggs S P. Rice phosphate transporters include an evolutionarily divergent gene specifically activated in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99: 13324–13329
- [16] Thibaud M C, Arrighi J F, Bayle V, Chiarenza S, Creff A, Bustos R, Paz-Ares J, Poirier Y, Nussaume L. Dissection of local and systemic transcriptional responses to phosphate starvation in *Arabidopsis*. *Plant J*, 2010, 64: 775–789
- [17] Wu P, Wang X. Role of OsPHR2 on phosphorus homeostasis and root hairs development in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Signal Behav*, 2008, 3: 674–675
- [18] Devaiah B N, Karthikeyan A S, Raghothama K G. WRKY75 transcription factor is a modulator of phosphate acquisition and root development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 2007, 143: 1789–1801.
- [19] Devaiah B N, Nagarajan V K, Raghothama K G. Phosphate homeostasis and root development in *Arabidopsis* are synchronized by the zinc finger transcription factor ZAT6. *Plant Physiol*, 2007, 145: 147–159
- [20] Chen Z H, Nimmo G A, Jenkins G I, Nimmo H G. BHLH32 modulates several biochemical and morphological processes that respond to Pi starvation in *Arabidopsis*. *Biochem J*, 2007, 405: 191–198
- [21] Bariola P A, Howard C J, Taylor C B, Verburg M T, Jaglan V D, Green P J. The *Arabidopsis* ribonuclease gene *RNS1* is tightly controlled in response to phosphate limitation. *Plant J*, 1994, 6: 673–685
- [22] Misson J, Raghothama K G, Jain A, Jouhet J, Block M A, Bligny R, Ortet P, Creff A, Somerville S, Rolland N, Doumas P, Nacry P, Herrera-Estrella L, Nussaume L, Thibaud M C. A genome-wide transcriptional analysis using *Arabidopsis thaliana* Affymetrix gene chips determined plant responses to phosphate deprivation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 11934–11939
- [23] Morcuende R, Bari R, Gibon Y, Zheng W M, Pant B D, Bläsing O, Usadel B, Czechowski T, Udvardi M K, Stitt M, Scheible W R. Genome-wide reprogramming of metabolism and regulatory networks of *Arabidopsis* in response to phosphorus. *Plant Cell Environ*, 2007, 30: 85–112
- [24] Wasaki J, Yonetani R, Kuroda S. Transcriptomic analysis of metabolic changes by phosphorus stress in rice plant roots. *Plant Cell Environ*, 2003, 26: 1515–1523
- [25] Uhde-Stone C, Gilbert G, Johnson J M F, Litjens R, Zinn K E, Temple S J, Vance C P, Allan D L. Acclimation of white lupin to phosphorus deficiency involves enhanced expression of genes related to organic acid metabolism. *Plant & Soil*, 2003, 248: 99–116
- [26] Wasaki J, Shinano T, Onishi K, Yonetani R, Yazaki J, Fujii F, Shimbo K, Ishikawa M, Shimatani Z, Nagata Y, Hashimoto A, Ohta T, Sato Y, Miyamoto C, Honda S, Kojima K, Sasaki T, Kishimoto N, Kikuchi S, Osaki M. Transcriptomic analysis indicates putative metabolic changes caused by manipulation of phosphorus availability in rice leaves. *J Exp Bot*, 2006, 57: 2049–2059
- [27] Chacón-López A, Ibarra-Laclette E, Sánchez-Calderón L, Gutiérrez-Alanís D, Herrera-Estrella L. Global expression pattern comparison between low phosphorus insensitive 4 and WT *Arabidopsis* reveals an important role of reactive oxygen species and jasmonic acid in the root tip response to phosphate starvation. *Plant Signal Behav*, 2011, 6: 382–392
- [28] Li K P, Xu C Z, Zhang K W, Yang A F, Zhang J R. Proteomic analysis of roots growth and metabolic changes under phosphorus deficit in maize (*Zea mays* L.) plants. *Proteomics*, 2007, 7: 1501–1512
- [29] Fukuda T, Saito A, Wasaki J, Shinano T, Osaki M. Metabolic alterations proposed by proteome in rice roots grown under low P and high Al concentration under low pH. *Plant Sci*, 2007, 172: 1157–1165
- [30] Gill B S, Appels R, Botha-Oberholster A M, Buell C R, Bennetzen J L, Chalhouh B, Chumley F, Dvorak J, Iwanaga M, Keller B, Li W L, McCombie W R, Ogihara Y, Quetier F, Sasaki T. A workshop report on wheat genome sequencing: international genome research on wheat consortium. *Genetics*, 2004, 68: 1087–1096
- [31] Davies T G, Su J Y, Xu Q, Li Z S, Li J, Gordon-Weeks R. Expression analysis of putative high-affinity phosphate transporters in Chinese winter wheats. *Plant Cell Environ*, 2002, 25: 1325–1339
- [32] Su J Y, Xiao Y M, Li M, Liu Q Y, Li B, Tong Y P, Jia J Z, Li Z S. Mapping QTLs for phosphorus-deficiency tolerance at wheat seedling stage. *Plant & Soil*, 2006, 281: 25–36
- [33] Tesfaye M, Liu J, Allan D L, Vance C P. Genomic and genetic control of phosphate stress in legumes. *Plant Physiol*, 2007, 144: 594–603
- [34] Gu J-T(谷俊涛), Bao J-X(鲍金香), Wang X-Y(王效颖), Guo C-J(郭程瑾), Li X-J(李小娟), Lu W-J(路文静), Xiao K(肖凯). Investigation based on cDNA-AFLP approach for differential expressed genes responding to deficient-Pi in wheat. *Acta Agron*

- Sin (作物学报), 2009, 35: 1597–1605 (in Chinese with English abstract)
- [35] Li Z X, Ni Z F, Peng H R, Liu Z Y, Nie X L, Xu S B, Liu G, Sun Q X. Molecular mapping of QTLs for root response to phosphorus deficiency at seedling stage in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Prog Nat Sci*, 2007, 17: 1177–1184
- [36] Ueda I, Wada T. Determination of inorganic phosphate by the molybdovanadate method in the presence of ATP and some interfering organic bases. *Anal Biochem*, 1970, 37: 169–174
- [37] Donnelly B E, Madden R D, Ayoubi P, Porter D R, Dillwith J W. The wheat (*Triticum aestivum* L.) leaf proteome. *Proteomics*, 2005, 5: 1624–1633
- [38] Porubleva L, Velden K V, Kothari S, Oliver D J, Chitnis P R. The proteome of maize leaves: use of gene sequences and expressed sequence tag data for identification of proteins with peptide mass fingerprints. *Electrophoresis*, 2001, 22: 1724–1738
- [39] Bevan M, Bancroft I, Bent E, Love K, Goodman H, Dean C, Bergkamp R, Dirkse W, Van Staveren M, Stiekema W, Drost L, Ridley P, Hudson S A, Patel K, Murphy G, Piffanelli P, Wedler H, Wedler E, Wambutt R, Weitzenegger T, Pohl T M, Terry N, Gielen J, Villarroel R, Chalwatzis N. Analysis of 1.9 Mb of contiguous sequence from chromosome 4 of the *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, 1998, 391: 485–488
- [40] Hammond J P, Bennett M J, Bowen H C, Broadley M R, Eastwood D C, May S T, Rahn C, Swarup R, Woolaway K E, White P J. Changes in gene expression in *Arabidopsis* shoots during phosphate starvation and the potential for developing smart plants. *Plant Physiol*, 2003, 132: 578–596
- [41] Peters J M. Proteasomes: protein degradation machines of the cell. *Trends Biochem Sci*, 1994, 19: 377–382
- [42] Osborne C K, Schiff R, Fuqua S A, Shou J. Estrogen receptor: current understanding of its activation and modulation. *Clin Cancer Res*, 2001, 7: 4338–4342
- [43] Shamovsky I, Nudler E. New insights into the mechanism of heat shock response activation. *Cell Mol Life Sci*, 2008, 65: 855–861
- [44] Benizri E, Ginouvès A, Berra E. The magic of the hypoxia-signaling cascade. *Cell Mol Life Sci*, 2008, 65: 1133–1149
- [45] Sánchez-Calderón L, López-Bucio J, Chacón-López A, Gutiérrez-Ortega A, Hernández-Abreu E, Herrera-Estrella L. Characterization of low phosphorus insensitive mutants reveals a crosstalk between low P-induced determinate root development and the activation of genes involved in the adaptation of *Arabidopsis* to P deficiency. *Plant Physiol*, 2006, 140: 879–889
- [46] Franco-Zorrilla J M, González E, Bustos R, Linhares F, Leyva A, Paz-Ares J. The transcriptional control of plant responses to phosphate limitation. *J Exp Bot*, 2004, 55: 285–293
- [47] Ciereszko I, Kleczkowski L A. Effects of phosphate deficiency and sugars on expression of *rab18* in *Arabidopsis*: hexokinase-dependent and okadaic acid-sensitive transduction of the sugar signal. *Biochim Biophys Acta*, 2002, 13: 43–49
- [48] Jeschke W D, Peuke A D, Pate J S, Hartung W. Transport, synthesis and catabolism of abscisic acid (ABA) in intact plants of castor bean (*Ricinus communis* L.) under phosphate deficiency and moderate salinity. *J Exp Bot*, 1997, 48: 1737–1747
- [49] Radin J. Stomatal responses to water stress and to abscisic acid in phosphorus-deficient cotton plants. *Plant Physiol*, 1984, 76: 392–394
- [50] Li K P, Xu C Z, Li Z X, Zhang K W, Yang A F, Zhang J R. Comparative proteome analyses of phosphorus responses in maize (*Zea mays* L.) roots of wild-type and a low-P-tolerant mutant reveal root characteristics associated with phosphorus efficiency. *Plant J*, 2008, 55: 927–939
- [51] Bao Y Q, Kost B, Chua N H. Reduced expression of  $\alpha$ -tubulin genes in *Arabidopsis thaliana* specifically affects root growth and morphology, root hair development and root gravitropism. *Plant J*, 2001, 28: 145–157
- [52] Kumar A, Bennetzen J L. Plant retrotransposon. *Annu Rev Genet*, 1999, 33: 479–532
- [53] Mhiri C, Morel J B, Vernhettes S, Casacuberta J M, Lucas H, Grandbastien M A. The promoter of the tobacco *Tnt1* retrotransposon is induced by wounding and by abiotic stress. *Plant Mol Biol*, 1997, 33: 257–266
- [54] Grandbastien M A. Activation of plant retrotransposons under stress conditions. *Trends Plant Sci*, 1998, 3: 181–187
- [55] Fedoroff N. Transposons and genome evolution in plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 7002–7007
- [56] Kashkush K, Feldman M, Levy A A. Transcriptional activation of retrotransposons alters the expression of adjacent genes in wheat. *Nature Genet*, 2003, 33: 102–106