

植物响应非生物胁迫的磷酸化修饰组学研究进展

李亚超¹, 刘 静¹, 周梦岩¹, 吴鹏飞^{1,2}, 马祥庆^{1,2}, 李 明^{1,2*}

(1 福建农林大学 林学院, 福州 350002; 2 福建省杉木种质创新及产业化工程研究中心, 福州 350002)

摘 要: 植物具有固着生活的特点, 高温、低温、干旱和盐等生境中常见的非生物胁迫会严重影响植物的生长发育。蛋白质磷酸化是植物应对非生物胁迫的重要机制, 主要通过蛋白质的磷酸化和去磷酸化修饰来调控植物细胞对外界胁迫的应激反应, 在植物细胞快速传递胁迫信号并激活对胁迫环境的形态、生理和分子水平适应机制的过程中起重要作用。该文主要介绍了植物磷酸化蛋白质的富集、检测和鉴定技术, 并对近年来国内外有关植物响应高温、低温、干旱、淹水、盐、养分亏缺和元素毒害等非生物胁迫的磷酸化修饰蛋白组学研究进展进行综述。

关键词: 植物, 非生物胁迫, 磷酸化

中图分类号: Q942.6; Q789 **文献标志码:** A

Advances in the Studies of Plant Protein Phosphorylation Modifications under Abiotic Stresses

LI Yachao¹, LIU Jing¹, ZHOU Mengyan¹, WU Pengfei^{1,2}, MA Xiangqing^{1,2}, LI Ming^{1,2*}

(1 College of Forestry, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China; 2 Fujian Cunninghamia Lanceolata Germplasm Innovation and Industrialization Engineering Research Center, Fuzhou 350002, China)

Abstract: Plants have the characteristics of fixed life. The abiotic stresses common in habitats such as high temperature, low temperature, drought and salt which seriously affect the growth and development of plants. Protein phosphorylation is an important mechanism for plants to respond to abiotic stress, mainly through the phosphorylation and dephosphorylation modification of proteins to regulate the stress response of plant cells to external stress, quickly transmit stress signals in plant cells and activate the morphology of the stress environment. Physiological and molecular levels play an important role in the process of adaptation mechanism. This article mainly introduces the enrichment, detection and identification techniques of plant phosphorylated proteins, and reviews the phosphorylated modified proteome of plants in recent years in response to abiotic stresses such as high temperature, low temperature, drought, flooding, salt, nutrient deficiency and elemental toxicity. The progress of scientific research aims to provide a reference for understanding the protein phosphorylation modification of plants in response to abiotic stress.

Key words: plant; abiotic stress; phosphorylation

作为固着性生物, 植物必须直面极端温度、干旱、高盐、有效养分低、元素毒害等非生物胁迫环境。植物体必须调整其生理和发育状态, 以保证其在短

时间的昼夜、月份、季节, 以及长时间的几年甚至数十年的生命周期中忍受各种各样的环境压力。在长期的进化过程中, 植物形成了一系列适应和对抗非

收稿日期: 2020-04-26; 修改稿收到日期: 2020-06-22

基金项目: 国家自然科学基金(31971674); 国家自然科学基金海峡联合基金(U1405211)

作者简介: 李亚超(1996-), 女, 在读硕士研究生, 主要从事林木分子生物学研究。E-mail: liyachaozy@163.com

* 通信作者: 李 明, 副教授, 硕士生导师, 主要从事林木种质资源研究。E-mail: limingly@126.com

生物胁迫的形态、生理生化和分子机制,以维持植物正常的生理代谢过程。其中,蛋白质翻译后修饰(Post-Translational Modifications, PTMs)是植物响应非生物胁迫最早和最快的反应之一,能够精细地调控蛋白质的活性、功能、定位和蛋白质间的相互作用,从而减轻环境压力对植物的伤害。植物中磷酸化、甲基化、乙酰化、琥珀酰化、糖基化、泛素化、羧基化、SUMO化、亚硝基化等是常见 PTMs 类型。蛋白质的磷酸化是植物遭遇非生物胁迫时发生的最基本、最普遍、也是最重要的 PTMs,细胞内有超过三分之一的蛋白都会发生磷酸化修饰,且磷酸化介导的信号转导在植物环境胁迫防御机制的调控中发挥着重要作用。

蛋白质的磷酸化修饰在植物中是普遍发生的, Mergner 等^[1]利用转录组、蛋白质组和磷酸化修饰组对拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)进行了定量分析,发现获得质谱鉴定的拟南芥 18 210 个蛋白中存在 43 903 个磷酸化修饰位点,且各个蛋白受到磷酸化修饰的位点数目具有很大差异,其中与逆境胁迫和渗透调节有关的 LEA 蛋白家族成员几乎每个丝氨酸(Ser)、苏氨酸(Thr)和酪氨酸(Tyr)都可以被磷酸化修饰。蛋白质的磷酸化修饰是依赖磷酸化激酶的催化作用来实现的,通过将 ATP 或 GTP 上的磷酸基团转移到底物蛋白质的氨基酸残基上实现磷酸化,并且可以通过蛋白磷酸酶来实现去磷酸化。蛋白质的磷酸化修饰主要发生在羟基化的氨基酸上,其中在 Ser、Thr 和 Tyr 上最为常见。蛋白激酶是植物体内一类重要的调节因子,通过膜受体蛋白激酶感知外界环境胁迫信号,导致细胞内一些离子和分子浓度改变,如 Ca^{2+} 、 Na^+/K^+ 、脱落酸(ABA)和水杨酸(SA)等,进而激活不同蛋白磷酸化途径,调控下游抗逆基因的转录表达,启动相应的生理生化等适应性反应来降低或消除危害^[2]。蛋白质的磷酸化和去磷酸化可以改变受体蛋白的活性,快速传递胁迫信号并与其他蛋白质修饰相互作用,从而调节植物在逆境下的免疫调控、信号转导、蛋白质合成和能量转移等响应过程^[3]。研究表明,植物蛋白质磷酸化途径调节了植物体内大多数的生理和生化途径,如防御、碳代谢、根系生长、RNA 代谢、协调花药发育、促进种子萌发等^[4-5]。

因此,研究植物响应非生物胁迫的蛋白质磷酸化修饰现象,可以鉴定胁迫响应下的差异蛋白质类型、丰度和修饰位点,从而揭示蛋白质丰度和磷酸化修饰与植物抗逆性之间的可能关系。近年来,随着

磷酸化蛋白富集、鉴定和分析技术的不断进步,磷酸化蛋白质组学研究在植物响应温度、水分、盐分、养分和元素毒害相关非生物胁迫的研究中取得了新的进展,已逐渐成为植物非生物胁迫研究的热点(表 1)。

1 植物磷酸化蛋白组学研究方法

1.1 磷酸化蛋白的分离富集

磷酸化蛋白存在丰度较低、化学计量值低、磷酸化状态短暂、磷酸键容易断裂等固有特点,导致蛋白样品中大量非磷酸化肽段的存在严重干扰磷酸化肽段的检测,使得磷酸化肽段的选择分离和富集成为磷酸化蛋白质组定量分析的前提和关键。因此,试验中常采用液相色谱等技术对蛋白酶解后的肽段混合物进行分离和富集,再进行基于质谱的蛋白质定量检测分析。近年来,磷酸化肽段富集技术的发展有力推动了磷酸化蛋白质组学的进步,可以实现大规模筛查细胞内磷酸化蛋白,并准确鉴定发生磷酸化修饰的氨基酸残基。

1.1.1 固相金属离子亲和层析 固相金属离子亲和层析(Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography, IMAC)技术主要根据色谱柱中的固相金属离子(Fe^{3+} 、 Ga^{2+} 和 Cu^{2+} 等)与蛋白质的磷酸基团在静电作用下的亲和力不同,从而将带有非磷酸化基团的杂质洗脱掉,并将产生磷酸化的肽段分离和富集起来。IMAC 能够较好地富集多磷酸化肽,但部分单磷酸化肽段与金属离子的吸附特异性差而容易丢失;同时,一些金属离子的流失也会造成 IMAC 效果降低。降低肽段混合物的 pH 值,改善材料亲水性或疏水性,或者分离前将肽段中的羧基转化为羧甲酯,可有效提升磷酸化肽段的富集效率。近年来,研究者对 IMAC 材料做出许多创新,如 CCC- Ti^{4+} 纤维具有简便快速、磷酸化特异性较高等特点, Ti^{4+} -G@PD 材料具有生物相容性高、亲水性强的特点。 Ti^{4+} -IMAC 材料在复杂生物样品的磷酸化肽富集具有良好效果^[6-7]。

1.1.2 金属氧化物亲和层析 金属氧化物亲和层析(Metal Oxide Affinity Chromatography, MOAC)是近些年广泛应用的一种磷酸化蛋白质分离技术,已成功应用到很多植物磷酸化蛋白质组学研究中,如麻疯树(*Jatropha curcas*)^[8]、构树(*Broussonetia papyrifera*)^[9] 和 大豆(*Glycine max*)^[10] 等。MOAC 使用的金属氧化物常为 TiO_2 、 ZrO_2 等。目前,MOAC 的机理仍然不是很清楚,一般认为,这类金属氧化物多为两性物质,在酸性溶液中,金属原子

会因为质子化呈现路易斯酸,与带负电的磷酸基团相结合;在碱性溶液中表现为路易斯碱,与磷酸化基团分离,从而达到富集效果。不同类型的金属氧化物对不同类型的磷酸化肽的富集效果差别较大,如 TiO_2 倾向于对多磷酸化肽段的富集,而 ZrO_2 倾向于对单磷酸化肽段的富集^[11]。与 IMAC 相似,MOAC 也受到了非特异性结合的干扰,这类非磷酸化肽段大部分为酸性氨基酸,而加入 1% 的三氟乙酸,可有效提高金属氧化物与磷酸化肽段的结合效率^[12]。

1.1.3 强阳离子交换层析 强阳离子交换层析 (Strong Cation Exchange Chromatography, SCX) 是基于酸性溶液中胰蛋白酶水解后的磷酸化修饰肽段带 1 个正电荷,而非磷酸化肽段大多带 2 个负电荷,从而在阳离子交换层析中由于流速不同而被洗脱分离开来。SCX 在磷酸化蛋白质富集中的应用较多,但也存在对样品量要求大、不能分离带碱性残基的磷酸化肽段等局限性。

1.1.4 抗体技术 抗体技术主要是通过磷酸化蛋白的特异抗体与总蛋白进行免疫共沉淀,并通过电泳技术分离并获取蛋白质位点,并通过质谱进行蛋白鉴定。抗体技术目前主要用于磷酸化 Tyr 蛋白的分离富集。抗体法在 N-磷酸蛋白质或肽的富集上很经典,但也有很多问题,除了抗体种类少和价格昂贵外,更重要的是它们具有肽段序列偏向性,只对某一类 N-磷酸蛋白质或肽具有识别作用,这些限制了其在磷酸化蛋白质研究中的使用。

1.1.5 磷酸钙沉淀法 磷酸钙沉淀法基于钙离子可以在碱性条件下与磷酸基团发生沉淀,当条件变为酸性时,被螯合的蛋白质又被释放出来。磷酸钙沉淀法可以快速、准确地分离出磷酸化肽,特别是在复杂的样品中使用效果更佳,但其获得的磷酸化肽浓度较低。

分离富集磷酸化肽段的方法有很多种,但是每一种都各具优势,又同存缺点,多种分离富集方法的联合使用更加有益解决实际问题。如磷酸钙沉淀法可以准确获取磷酸化肽,但是所获取的磷酸化肽浓度低,可以再使用 MOAC 或 IMAC 进行富集,从而提高磷酸化肽浓度。MOAC 更倾向单磷酸化肽,可以在 IMAC 下游与 IMAC 互补增强磷酸化肽捕捉能力。在 SCX 中,带有单电荷的磷酸化肽与填充物的结合能力弱,从而先流出,之后再进入 IMAC,可以减少固相离子与负电荷的结合,从而提高 IMAC 的分离富集效率。此外,将磷酸钙沉淀法与 IMAC

结合也可以有效提高磷酸化肽段的富集质量。因此,多种磷酸化肽段分离富集技术的联合使用灵活性较强,适用范围较广,是目前磷酸化蛋白分离富集的有效方法。

1.2 磷酸化蛋白的检测

1.2.1 Pro-Q DPS 染色 Pro-Q DPS 染色具有可以在 SDS-聚丙烯酰胺凝胶和 2-D 凝胶上直接运用的特点,并可以直接检测磷酸化蛋白质,如丝氨酸磷酸化、苏氨酸磷酸化等,除此之外 Pro-Q DPS 还可以检测磷酸化过程中的酶与底物,但不适合检测 DNA、RNA 等大分子物质。在对低磷胁迫下的玉米 (*Zea mays*) 使用 Pro-Q DPS 分析下,发现 6% 的磷酸化蛋白位点在低磷处理后发生磷酸化状态变化^[13]。尽管 Pro-Q DPS 具有灵敏性较高的优势,但其存在试剂价格较高,重复性差的缺点,Pro-Q DPS 在基于 2-DE 上的磷酸化蛋白质的检测,由于 2-DE 本身的缺陷,仍限制着多种磷酸化蛋白质的检测。

1.2.2 质谱 质谱 (Mass Spectrum, MS) 是对蛋白质检测的主要方法,特别是液相色谱/串联质谱 (LC-MS/MS) 技术目前已成为蛋白质磷酸化修饰组学研究的核心技术。由于蛋白质表达具有高度动态性且通常以少量存在,其他物质可能会干扰有效蛋白质的表征检测,所以仅靠 MS 技术已经无法满足需要。Spicer 等^[14] 研究发现 3D HPLC-MS 在所有三个维度上均具有反相分离功能,可进行大规模的自下而上的蛋白质组学和肽保留数据收集。与常用的 HPLC-MS 技术相比,毛细管电泳-质谱联用 (CE-MS) 技术需要的样品量更少、分离效率更高、分析速度更快,在蛋白质组学等领域中,已经作为 HPLC-MS 的补充应用于复杂样品的分析^[15]。

1.3 磷酸化蛋白质的定量

虽然有很多种对蛋白质定量的方法,但是基于 MS 的蛋白质定量方法具有非同一般的处理大数据的能力。目前,常用的有 PRM、Label free、TMT、iTRAQ 和 DIA 等技术。高分辨率和精确质量仪器的发展促进了 PRM 的发展,以限制复杂样品中的潜在背景干扰和避免限制靶向肽的数量^[16]。Lenard 等^[17] 研究表明直接的 PRM 方法是最简单、最快的方法,可潜在地用于大量更丰富的磷酸化位点,如果发现灵敏度问题,则必须使用 TiO_2 -PRM 方法。TMT 技术是由美国 Thermo Scientific 公司研发的一种多肽体外标记的技术,可同时比较 2 组、6 组、10 组或 16 组不同样品中蛋白质的相对含量。Li 等^[18] 所介绍的基于异丁基-脯氨酸铵离子报告结

构(TMTpro)的 16 种同量异位试剂是目前可以比较最多组别的试剂。iTRAQ 也是对体外的蛋白或肽段进行化学标记,不受限于活体、不局限于样本类型,具有更好的普适性。iTRAQ 试剂可以在 N 端氨基和赖氨酸(Lys)侧链的蛋白质或胰蛋白酶消化肽侧链标记。DiART 也是一种可对蛋白质/肽段的伯氨基进行稳定同位素标记的方法,其标记和定量原理与 iTRAQ 相似,同为等重标记,并通过二级质谱同位素报告离子峰的强度信息进行定量比较。DIA 结合了 DDA 和 SRM 的特点,将整个扫描范围等分为若干窗口,每个窗口依次选择、碎裂,采集窗口内所有母离子的全部子离子信息^[19]。DIA 无需指定目标肽段,通量无上限,扫描点数均匀,利用谱图库即可实现定性确证和定量离子筛选,同时数据可以回溯,相比传统 DDA 和 SRM 具有明显优势^[20]。相比于标记方法需要复杂、耗时的样品制备和反应,试剂价格昂贵,Label free 本质上是最简单、最经济的方法^[21]。在 Label free 的方向中研究人员提出了各种各样的方法,如无标记拉曼方法^[22]、半合成绿色荧光蛋白的方法^[23]。

2 响应温度胁迫的磷酸化修饰

2.1 低温胁迫

对于植物而言,低温胁迫又分为冷害胁迫(大于 0 ℃)和冷冻胁迫(小于 0 ℃)。低温胁迫是影响热带和亚热带地区许多重要植物生长、分布和产量的主要环境因素。

低温胁迫主要通过影响叶片的渗透作用,使原生质膜产生质壁分离现象,并使叶片叶绿素含量降低。Hsu 等^[24]研究了番茄(*Solanum lycopersicum*)耐冷品系和冷敏感品系在低温胁迫下的蛋白质磷酸化反应,结果显示,超过 5 000 种的磷酸化蛋白质在 2 种品系的番茄中具有表达,SnRK2s 及其底物的激活有助于番茄在低温胁迫下的存活。Chen 等^[25]研究了 2 周龄的水稻(*Oryza sativa*)根系在低温胁迫下的磷酸化反应,在 730 个蛋白质中鉴定出 115 个磷酸化蛋白,其中低温胁迫下 12 个蛋白上调表达,1 个蛋白下调表达,这些差异表达蛋白被发现参与氧化还原平衡、氨基酸或碳水化合物代谢、防御反应和蛋白质代谢等反应。Pi 等^[9]研究低温胁迫下构树幼苗的反应,发现经过 6 h 的低温处理,在幼苗中检测到 427 个磷蛋白发生了显著变化;当低温处理 48 h 后发生明显的生理损伤时,共发现 611 个磷酸化蛋白发生显著变化,这些变化可能与

多种蛋白激酶有关,尤其是 CKII,基因本体论分析结果表明,磷蛋白主要负责冷处理过程中的信号转导、蛋白修饰和翻译。同样在麻疯树幼苗的研究中发现磷酸化蛋白发生了显著变化^[8]。Gao 等^[26]对香蕉(*Musa nana*)和大蕉(*Musa × paradisiaca*)低温胁迫下的磷酸化蛋白质组进行研究,发现大蕉中的 MKK2 磷酸化信号通路和其他磷酸化蛋白在抵御低温胁迫中发挥了重要作用。拟南芥丝裂原活化蛋白激酶激酶 1(MEKK1)在应激低温信号中起重要作用,在低温胁迫下,幼苗中的 MEKK1 磷酸化有丝分裂原活化蛋白激酶激酶 2(MKK2),在 Ca²⁺和钙调蛋白存在下,MEKK1 的磷酸化增强^[27]。

在植物细胞中,质膜流动性的变化是低温胁迫的主要传感器。在低温胁迫下,质膜蛋白冷反应蛋白激酶 1(CRPK1)可以使 14-3-3 蛋白磷酸化,磷酸化的 14-3-3 蛋白从胞质穿梭到细胞核,与关键的冷反应 c-复性结合因子(CBF)相互作用增加其不稳定性,这使植物可以在不断变化的环境条件下微调压力响应和发育过程^[28]。Ding 等^[29]研究表明 OST1 在拟南芥体内外磷酸化 BTF3 和 BTF3L,并促进它们与 CBFs 的相互作用,以提高低温胁迫下 CBF 的稳定性,从而增强对低温的抵抗力。无论是否促进 CBF 稳定都是植物对抗寒冷的一种机制,其一方面可适应外界的低温,另一方面是抵抗外界的低温。植物对低温响应的磷酸化修饰还调节着糖、氮的代谢和渗透调节等代谢通路。Ceclia 等^[30]在水稻响应低温胁迫的研究中发现了 OsCPK17 的 6 个潜在靶点,这些靶点与糖和氮的代谢及渗透调节有关,体外激酶检测,显示蔗糖磷酸合酶 OsSPS4 和水通道蛋白 OsPIP2、OsPIP2 被 OsCPK17 以钙依赖的方式磷酸化(表 1)。

2.2 高温胁迫

高温限制了植物的生长和繁殖,并对植物的生长发育构成威胁。随着全球气候变暖对植物生长的影响日益明显,基于蛋白质组学的植物高温胁迫响应研究也逐渐增多,涉及的植物包括:菠菜(*Spinacia oleracea*)^[31]、拟南芥^[32]、紫苜蓿(*Medicago sativa*)^[33]、小麦(*Triticum aestivum*)^[34]、大豆^[35]、大麦(*Hordeum vulgare*)^[36]和番茄^[37]等。Zhao 等^[31]对耐热性菠菜 Sp75 在高温胁迫下的磷酸化蛋白质组研究表明,45 个磷蛋白的磷酸化水平发生变化,这些蛋白参与信号转导、囊泡运输、转录调控、蛋白质加工以及初级和次级代谢等,都有助于对热的感应、转导和适应。Liu 等^[38]研究葡萄(*Vitis vinifera*)叶

表 1 非生物胁迫下植物磷酸化修饰组学研究

Table 1 Phylogenetic modification of plants under abiotic stress

非生物胁迫类型 Type of abiotic stress	物种 Species	组织 Tissue	相关功能 Related function	参考文献 Reference	
温度胁迫 Temperature stress	水稻 <i>Oryza sativa</i>	根 Root	氧化还原平衡、物质代谢、防御反应 Redox balance, material metabolism, defense reaction	[25]	
	低温 Low temperature	构树 <i>Broussonetia papyrifera</i>	叶 Leaf	信号转导、蛋白修饰和翻译 Signal transduction, protein modification and translation	[9]
		拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	根 Root	防御功能 Defense functions	[29]
	高温 High temperature	番茄 <i>Solanum lycopersicum</i>	叶 Leaf	信号转导 Signal transduction	[24]
		葡萄 <i>Vitis vinifera</i>	叶 Leaf	防御功能 Defense functions	[38]
		小麦 <i>Triticum aestivum</i>	叶和小穗 Leaf and spikelet	防御功能 Defense functions	[40]
		拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	叶 Leaf	防御功能 Defense functions	[32]
		菠菜 <i>Spinacia oleracea</i>	叶 Leaf	信号转导、囊泡运输、转录调控、物质合成和物质代谢 Signal transduction, vesicle transport, transcriptional regulation, substance synthesis and substance metabolism	[31]
水分胁迫 Water stress	拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	根 Root	防御功能 Defense functions	[42]	
	二穗短柄草 <i>Brachypodium distachyon</i>	叶 Leaf	防御功能 Defense functions	[46]	
	小麦 <i>Triticum aestivum</i>	果实 Fruit	信号转导、物质合成、防御和渗透调节 Signal transduction, substance synthesis, defense and osmotic regulation	[47]	
	干旱 Drought	玉米 <i>Zea mays</i>	根 Root	表观遗传控制、基因表达和细胞周期依赖过程 Epigenetic control, gene expression and cell cycle dependent processes	[49]
		海棠 <i>Malus baccata</i>	叶 Leaf	碳氮代谢 Carbon and nitrogen metabolism	[52]
	沙冬青 <i>Ammopi panthus mongolicus</i>	根 Root	信号转导、转录调控、渗透调节、防御和表观遗传调控 Signal transduction, transcriptional regulation, osmotic regulation, defense and epigenetic regulation	[51]	
	玉米 <i>Zea mays</i>	叶 Leaf	光合作用、物质运输、能量代谢 Photosynthesis, material transportation, energy metabolism	[50]	
	淹水 Flooding	水稻 <i>Oryza sativa</i>	叶 Leaf	防御功能 Defense functions	[55]
大豆 <i>Glycine max</i>		根 Root	信号转导、物质合成 Signal transduction, substance synthesis	[54]	
秋茄树 <i>Kandelia candel</i>		叶 Leaf	物质代谢、能量代谢 Material metabolism, energy metabolism	[53]	
盐胁迫 Salt stress	玉米 <i>Zea mays</i>	叶和根 Leaf and root	物质运输、信号转导、物质代谢 Material transport, signal transduction, material metabolism	[56]	
	黄秋葵 <i>Abelmoschus esculentus</i>	叶 Leaf	光合作用和 RNA 降解 Photosynthesis and RNA degradation	[62]	
	拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	叶 Leaf	碳代谢和信号转导 Carbon metabolism and signal transduction	[60]	
养分亏缺 Nutrient deficit	拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	根 Root	物质运输、信号转导 Material transportation, signal transduction	[67]	
	白羽扇豆 <i>Lupinus albus</i>	根 Root	防御功能 Defense functions	[66]	
	玉米 <i>Zea mays</i>	根 Root	碳代谢和信号转导 Carbon metabolism and signal transduction	[13]	
	水稻 <i>Oryza sativa</i>	根 Root	RNA 合成和碳代谢 RNA synthesis and carbon metabolism	[65]	
	拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	根 Root	信号转导 Signal transduction	[63]	
元素毒害 Elemental poisoning	拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	叶 Leaf	防御功能 Defense functions	[70]	
	水稻 <i>Oryza sativa</i>	叶和根 Leaf and root	代谢、信号转导、基因表达调控、物质运输、膜融合和防御功能 Material metabolism, signal transduction, gene expression regulation, material transport, membrane fusion and defense function	[69]	
		叶 Leaf	信号转导、应激耐受和活性氧中和等 Signal transduction, stress tolerance, reactive oxygen species neutralization, etc.	[68]	
复合胁迫 Compound stress	玉米 <i>Zea mays</i>	叶 Leaf	信号转导和防御功能 Signal transduction and defense functions	[71]	

片在高温胁迫时的反应时,鉴定出有 19 个磷酸化蛋白发生变化;通过富集分析和功能分类研究表明, Ser 和精氨酸(Arg)剪接因子的丰度增加原因在于高温胁迫下发生了磷酸化。在对甘蔗(*Saccharum officinarum*)进行高温胁迫时,发现核苷二磷酸激酶 1(NDPK1)中标记的磷酸 Ser 减少 40%,并且这种去磷酸化伴随着 NDPK 酶活性的增加,但 NDPK1 在烟草(*Nicotiana tabacum*)细胞中培养并未出现自磷酸化或酶活性增加的变化情况^[39]。Vu 等^[40]研究了短期高温和增温对小麦叶片和小穗磷酸蛋白质组的影响,结果表明,叶片和小穗中分别鉴定出 3 822(含 5 178 个磷酸化位点)和 5 581 个磷酸肽(含 7 023 个磷酸化位点);叶片中的光合作用机制对温度升高高度敏感,而小穗的表现遗传调控似乎在生殖发育过程中受高温以磷酸化依赖性方式严格调控;同时发现了一个迄今为止尚未报道的相邻磷酸化残基互变的机制,这可能在温度信号传导中起关键作用。Takuya 等^[41]对高温下的水稻叶片进行磷酸化蛋白研究,发现叶绿体中的蛋白磷酸化水平较高,这可能在碳水化合物积累中发挥重要作用。

3 响应水分胁迫的磷酸化修饰

3.1 干旱

Maszkowska 等^[42]对干旱胁迫下的拟南芥进行磷酸化蛋白组学分析, NF1 相关蛋白激酶 2 (SnRK2s) 在受到渗透胁迫的植物中被激活,并且不被 ABA 诱导;干旱胁迫还导致脱水蛋白 ERD10 和 ERD14 被磷酸化,并且磷酸化还会影响 ERD14 的定位。SnRK2s 是调控植物对诸如干旱和高盐度等渗透胁迫的适应性反应的关键调控因子,3 个 B4 Raf 样的 MAP 激酶激酶激酶(MAPKKKs)在渗透胁迫下磷酸化并激活亚类 I SnRK2s 以响应渗透胁迫^[43]。Raf 样激酶(RAFs)的 B2、B3 和 B4 亚家族在早期渗透胁迫以及拟南芥中的 ABA 信号传导中有关键作用;B2、B3 和 B4 RAF 被渗透压快速激活,是 SnRK2s 磷酸化和激活所必需的^[44]。Xue 等^[45]则检测出渗透胁迫下拟南芥中有 169 个磷酸肽被渗透胁迫上调,299 个磷酸肽被渗透胁迫下调。Yuan 等^[46]研究发现,二穗短柄草(*Brachypodium distachyon*)幼叶叶片在 0、6 和 24 h 的干旱胁迫下蛋白质磷酸化水平均有显著变化,最高的磷酸化水平发生在干旱胁迫 6 h。

Zhang 等^[47]通过对干旱胁迫下的面包小麦进行磷酸化蛋白质组比较分析,发现 61 种磷蛋白在干

旱胁迫下发生了显著变化;功能分析表明某些磷蛋白是参与信号转导,淀粉、蛋白质的合成重新折叠、降解,以及压力反应和防御,为了应对缺水,这些 SCPL 蛋白质可能在谷物的早期成熟时参与修复和清除受损蛋白质、渗透调节和细胞排毒。Chen 等^[48]在干旱胁迫的小麦中发现淀粉合成酶(如 GB-SS I、SS II-a 和 SS III)的磷酸化水平显著降低。Bonhomme 等^[49]对玉米响应干旱胁迫的蛋白磷酸化进行了研究,在 2 496 个蛋白质上鉴定出 3 664 个独特的磷酸化位点,分析了 1 250 种磷酸化肽的丰度,发现共 138 种磷酸肽响应干旱胁迫;在水分亏缺和恢复期间,直接或间接参与植物生长发育的关键调控因子发生了广泛磷酸化修饰,这些蛋白参与影响表现遗传控制、基因表达、细胞周期依赖过程和植物激素介导的反应。Hu 等^[50]对玉米突变体 vp5(缺乏 ABA 的生物合成)和野生型 Vp5 在渗透胁迫下 ABA 调控的叶片磷蛋白进行研究,鉴定出多达 3 052 个磷蛋白、4 052 个磷肽,在渗透胁迫下有 512 个磷酸肽(Vp5 中为 379, vp5 中为 133)显示出至少 1.5 倍的磷酸化水平变化,其中 40 个在 2 种基因型中具有相同的共同性,并且受 ABA 差异调节;比较了 vp5 对渗透胁迫的信号传导通路和 Vp5 的信号通路,表明 ABA 在调节这些与 mRNA 合成、蛋白质合成和光合作用有关的通路中起着至关重要的作用。

在对树木响应干旱胁迫的研究中, Sun 等^[51]发现沙冬青(*Ammopiptanthus mongolicus*)在短期干旱处理后,可检测出 103 个磷酸肽代表的 90 个磷酸化蛋白丰度发生显著变化,主要参与信号转导和转录调控、渗透调节、应激反应和防御、RNA 剪接和转运、蛋白质合成、折叠和降解、表现遗传调控等。Ren 等^[52]研究了海棠(*Malus baccata*)响应干旱胁迫的蛋白磷酸化,共检测出 269 种独特的磷酸肽,304 个磷酸化位点和 219 个定量的磷酸化蛋白,其中有 22 个发生了显著变化的磷酸化蛋白参与了碳氮代谢,从而促进干旱胁迫下叶片碳氮代谢新稳态的产生。

3.2 淹水

淹水胁迫是一种复杂的胁迫,对植物生长发育进行多方面的限制,如 O₂ 和 CO₂ 饥饿等。Pan 等^[53]对秋茄树(*Kandelia candel*)淹水胁迫进行了蛋白质磷酸化修饰分析,在 1 516 个磷酸化蛋白中鉴定出 2 141 个独特的磷酸肽和 2 603 个磷酸化位点,同时检测到 96 个蛋白的磷酸化水平在淹水下发

生显著变化,包括参与丙酮酸代谢和能量代谢的磷酸蛋白,以应对淹水胁迫。Yin 等^[54-55]对早期大豆根尖响应淹水胁迫的磷酸化修饰进行分析,共鉴定了 114 个磷酸化蛋白,其中 34 个在淹水胁迫 3 h 后磷酸化状态发生显著变化,在这些磷酸化蛋白中,真核翻译起始因子被去磷酸化,而一些蛋白合成相关蛋白被磷酸化;对不同淹水处理时间梯度下发生磷酸化修饰的差异蛋白进行互作分析,显示起始因子 4G 位于蛋白互作网络的中央并参与乙烯信号转导途径,通过乙烯及其抑制剂添加试验,证明了乙烯信号转导途径通过蛋白质磷酸化修饰参与大豆根尖在淹水胁迫初期的耐受过程。在淹水胁迫下,水稻中的 OsMPK3 被激活,激活的 OsMPK3 磷酸化乙烯响应因子样蛋白(SUB1A1),从而调控水稻的抗淹水胁迫能力。

4 响应盐胁迫的磷酸化修饰

盐胁迫是限制植物产量和品质的主要非生物胁迫类型之一,针对植物响应盐胁迫的磷酸化修饰组学研究在玉米^[56]、小麦^[57]、大豆^[58]和拟南芥^[59]等植物上已有报道。Zhou 等^[60]研究发现,Tyr 磷酸化和蛋白激酶 MPK3、MPK6 的激活可以增强拟南芥在盐胁迫下的稳定性。Pi 等^[61]比较了耐盐大豆品种和盐敏感大豆品种在盐胁迫下根系蛋白质的磷酸化修饰,鉴定出 1 163 个磷酸化位点存在差异,并通过 qRT-PCR 确认了 89 个差异表达蛋白的表达模式;基于研究结果,他们提出了一种新的耐盐途径,该途径涉及查尔酮代谢,主要由磷酸化的 MYB 转录因子介导。Yu 等^[62]对黄秋葵(*Abelmoschus esculentus*)幼苗盐胁迫响应进行了磷酸化修饰研究,发现根系中有 91 个磷酸化位点进行上调表达,有 307 个呈现下调表达,这些差异表达的蛋白与光合作用、天线蛋白和 RNA 降解密切相关。Zhao 等^[56]研究了 2 个玉米耐盐自交系(Zheng58)和盐敏感自交系(Chang7-2)的根和芽在盐胁迫下的蛋白质磷酸化修饰,在 4 116 磷酸蛋白中检测出 9 448 个独特的磷酸化位点,根和芽中分别有 209 个和 243 个磷酸化蛋白响应盐胁迫,它们参与了碳代谢、谷胱甘肽代谢、转运和信号转导。为应对盐胁迫的伤害,植物体内与光合作用、离子运输、信号转导、能量代谢等相关蛋白会发生变化进而响应盐胁迫。

5 养分亏缺下的磷酸化修饰

氮和磷是植物生长所必需的大量营养素。在拟

南芥中,无机氮转运蛋白的磷酸化无论是在氮过量还是氮缺乏时都起着重要作用。低氮胁迫下,拟南芥根系会增加 NADPH / NADPC 和 ATP / AMP 的比率,从而影响腺苷单磷酸激活的蛋白激酶(AMPK)活性以及核 CRY1 蛋白的磷酸化和丰度^[63]。植物缺氮时,对植物施以硝酸盐或铵盐形式的氮会导致植物磷酸化修饰发生明显变化^[64]。在拟南芥中,无机氮转运蛋白的磷酸化无论是在氮过量还是氮缺乏时都起着重要作用。对缺磷条件下水稻根系进行磷酸化蛋白质组分析,发现磷饥饿处理导致水稻根系有 546 个磷酸化蛋白下调表达,有 8 个磷酸化蛋白上调表达;磷饥饿导致 4 种丝裂原活化蛋白激酶(MAPKs)的磷酸化水平下降,其中包括 OsMAPK6 等 5 种钙依赖性蛋白激酶(CDPKs)和 OsCK2^[65]。在低磷胁迫下,玉米里 6% 的磷酸化蛋白位点在低磷处理后出现磷酸化状态变化,这些蛋白参与了大量的代谢和细胞途径,包括碳代谢和信号转导^[15]。在对白羽扇豆(*Lupinus albus*)的研究中发现,磷缺乏时,蛋白磷酸化水平会有明显上调^[66]。Chen 等^[67]研究表明,硼缺乏会影响植物根部超过 20% 的蛋白质磷酸化,并且在硼缺乏的过程中会修饰许多具有已知生物学功能的磷酸化位点,及未知功能位点。此外,磷酸化动力学数据表明,有丝分裂原激活的蛋白激酶级联介导拟南芥根中硼的极化转运。

6 响应元素毒害的磷酸化修饰

镉具有植物毒性,植物根系暴露在相对较低浓度的 Cd²⁺ 溶液中就足以抑制根系酶活性、光合作用和气孔运动并干扰蒸腾作用。对水稻幼苗进行不同 Cd²⁺ 浓度溶液培养,发现有 482 种磷蛋白的磷酸化水平发生不同程度的变化,在 100 mol · L⁻¹ Cd²⁺ 处理中的差异磷酸化蛋白质数量是在 10 mol · L⁻¹ 中的 6 倍,对差异磷酸化蛋白的功能分析表明,大量的差异磷酸化蛋白参与了信号传导、应激耐受和活性氧中和等^[68]。Fang 等^[69]对镉敏感系水稻 D69 和镉不敏感系水稻 D28 进行镉胁迫下的磷酸化蛋白组学分析,检测有 53 种差异表达的磷酸化蛋白,主要参与代谢、信号转导、基因表达调控、物质运输和膜融合,同时发现水稻中的磷酸化修饰途径能够快速响应镉胁迫并具有抵抗镉胁迫的作用。Raichaudhuri^[70]对砷胁迫下的拟南芥磷酸化蛋白组学进行研究,发现 AtMRP1 C 末端 NBD 丝氨酸三联体的磷酸化,在拟南芥抵抗砷胁迫中发挥重要

作用。

7 与复合胁迫有关的磷酸化修饰

对于植物而言,非生物胁迫往往是以复合形式存在的,就像高温常常伴随干旱胁迫等。Hu 等^[71]对干旱、高温以及高温与干旱复合胁迫下玉米根系磷酸化蛋白质组进行研究,发现高温、干旱和复合胁迫显著改变了 172、149 和 144 个磷酸肽的磷酸化水平,其中 23 个磷酸化蛋白质仅对复合胁迫有反应,30 个磷酸化蛋白质响应干旱胁迫,75 个磷酸化蛋白质只响应高温胁迫;值得注意的是,差异表达的蛋白中有 19 个在不同位点发生磷酸化修饰,以分别响应干旱、高温和复合胁迫;此外,干旱、高温和复合胁迫下根系磷酸化蛋白参与的信号通路明显不同。潘德灼等^[72]在金钟枇杷响应高温、日灼复合胁迫时发现与糖酵解途径相关的磷酸果糖激酶等发生显著上调表达。

8 展 望

植物对非生物胁迫的响应涉及大量的蛋白质磷酸化反应,植物体内蛋白质的磷酸化和去磷酸化会显著影响蛋白质的结构和功能,从而导致植物产生对胁迫的形态和生理适应。伴随着高精度蛋白分离和质谱鉴定技术的不断进步,以及蛋白质磷酸化修饰数据库和分析软件的不断完善,使得大规模分析植物磷酸化修饰水平的磷酸化蛋白质组学研究在近

年来取得了飞速发展。虽然目前已经开发了 IMAC、MOAC、SCX、抗体法等多种磷酸化蛋白分离富集方法,也采用了多高精度串联质谱、液相色谱质谱联用等技术来鉴定磷酸化蛋白,但是磷酸化蛋白质的分离与鉴定依然是困扰磷酸化蛋白质组深度发展的瓶颈技术,各种技术方法普遍存在低丰度蛋白检测弱、自动化程度低、假阳性率高、分离的蛋白具有选择性等弱点,仍然需要新的突破性技术来提升磷酸化蛋白质的分离和鉴定水平。

基于蛋白质组学技术对非生物胁迫下植物的蛋白质磷酸化修饰进行分析,可以精确获取蛋白磷酸化的位点变化和功能表达,从而揭示植物在分子和细胞水平上依赖蛋白质磷酸化修饰的非生物胁迫响应策略。目前对植物响应非生物胁迫的蛋白质磷酸化修饰已经揭示了植物一些共性防御机制,如温度胁迫下的磷酸化蛋白质代谢、信号转导、碳水化合物代谢、渗透调节,水分胁迫下的渗透调节、能量代谢、碳代谢,盐胁迫下物质运输、能量代谢,养分欠缺下的碳代谢和信号转导等。目前,针对植物响应非生物胁迫的磷酸化修饰研究已经鉴定了大量磷酸化修饰位点和相关生物信息,但这些修饰位点的功能、通路和作用机制的研究尚未深入,特别是对自然界中常见的多种复合胁迫的生物机制研究还未展开,基于转录组、代谢组和表型组的多组学方法联合来揭示植物蛋白质磷酸化修饰的功能机制是未来的重要研究方向。

参考文献:

- [1] MERGNER J, FREJNO M, LIST M, *et al.* Mass-spectrometry-based draft of the *Arabidopsis* proteome [J]. *Nature*, 2020, **579**(7 799): 409-414.
- [2] 裴丽丽,郭玉华,徐兆师,等. 植物逆境胁迫相关蛋白激酶的研究进展[J]. 西北植物学报,2012,**32**(5): 1 052-1 061.
PEI L L, GUO Y H, XU Z S, *et al.* Research progress of plant stress-related protein kinases [J]. *Acta Bot. Boreal-Occident. Sin.*, 2012,**32**(5): 1 052-1 061.
- [3] YIN X J, KOMATSU S. Comprehensive analysis of response and tolerant mechanisms in early-stage soybean at initial-flooding stress[J]. *Journal of Proteomics*, 2017, 169: 225-232.
- [4] ZHANG Z B, HU M H, FENG X B, *et al.* Front cover: proteomes and phosphoproteomes of anther and pollen: availability and progress[J]. *Proteomics*, 2017, **17**(20): 1 770 151.
- [5] ARSOVA B, WATT M, USADEL B. Monitoring of plant protein post-translational modifications using targeted proteomics[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2018, 9: 1168. DOI: 10.3389/fpls.2018.01168.
- [6] HE X M, CHEN X, ZHU G T, *et al.* Hydrophilic carboxyl cotton *Chelator* for titanium(IV) immobilization and its application as novel fibrous sorbent for rapid enrichment of phosphopeptides[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2015, **7**(31): 17 356-17 362.
- [7] 欧俊杰,张海洋,马淑娟,等. 一种磷酸功能化和 Ti-IMAC 碳材料及其制备和应用: CN110575825A[P]. 2019-12-17.
- [8] LIU H, WANG F F, PENG X J, *et al.* Global phosphoproteomic analysis reveals the defense and response mechanisms of *Jatropha curcas* seedling under chilling stress[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, **20**(1): 208.
- [9] PI Z, ZHAO M L, PENG X J, *et al.* Phosphoproteomic analysis of paper mulberry reveals phosphorylation functions in

- chilling tolerance[J]. *Journal of Proteome Research*, 2017, **16**(5): 1 944-1 961.
- [10] GUPTA R, MIN C W, MENG Q F, *et al.* Comparative phosphoproteome analysis upon ethylene and abscisic acid treatment in *Glycinemax* leaves[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2018, **130**: 173-180.
- [11] 龙星宇. 新型磁性亲和纳米探针的制备及其在磷酸化蛋白/多肽分离富集中的应用[D]. 南京: 南京大学, 2017.
- [12] ARYAL U K, ROSS A R S. Enrichment and analysis of phosphopeptides under different experimental conditions using titanium dioxide affinity chromatography and mass spectrometry[J]. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2010, **24**(2): 219-231.
- [13] LI K P, XU C Z, FAN W M, *et al.* Phosphoproteome and proteome analyses reveal low-phosphate mediated plasticity of root developmental and metabolic regulation in maize (*Zea mays* L.) [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2014, **83**: 232-242.
- [14] SPICER V, EZZATI P, NEUSTAETER H, *et al.* 3D HPLC-MS with reversed-phase separation functionality in all three dimensions for large-scale bottom-up proteomics and peptide retention data collection[J]. *Analytical Chemistry*, 2016, **88**(5): 2 847-2 855.
- [15] SCHIAVONE N M, SARVER S A, SUN L L, *et al.* High speed capillary zone electrophoresis-mass spectrometry via an electrokinetically pumped sheath flow interface for rapid analysis of amino acids and a protein digest[J]. *Journal of Chromatography B*, 2015, **991**: 53-58.
- [16] BOURMAUD A, GALLIEN S, DOMON B. Parallel reaction monitoring using quadrupole-Orbitrap mass spectrometer: Principle and applications[J]. *Proteomics*, 2016, **16**(15-16): 2 146-2 159.
- [17] DEKKER L J M, ZENEYEDPOUR L, SNOEIJERS S, *et al.* Determination of site-specific phosphorylation ratios in proteins with targeted mass spectrometry[J]. *Journal of Proteome Research*, 2018, **17**(4): 1 654-1 663.
- [18] LI J M, VAN VRANKEN J G, PONTANO VAITES L, *et al.* TMTpro reagents: a set of isobaric labeling mass tags enables simultaneous proteome-wide measurements across 16 samples[J]. *Nature Methods*, 2020, **17**(4): 399-404.
- [19] 张 伟. 定量蛋白质组学质谱采集技术进展[J]. *分析化学*, 2014, **42**(12): 1 859-1 868.
- ZHANG W. Progress in mass spectrometry acquisition approach for quantitative proteomics[J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2014, **42**(12): 1 859-1 868.
- [20] LAW K P, LIM Y P. Recent advances in mass spectrometry: data independent analysis and hyper reaction monitoring[J]. *Expert Review of Proteomics*, 2013, **10**(6): 551-566.
- [21] CALDERÓN-CELIS F, ENCINAR J R, SANZ-MEDEL A. Standardization approaches in absolute quantitative proteomics with mass spectrometry[J]. *Mass Spectrometry Reviews*, 2018, **37**(6): 715-737.
- [22] ABRAMCZYK H, IMIELA A, BRO ŹEK-PLUSKA B, *et al.* Aberrant protein phosphorylation in cancer by using Raman biomarkers[J]. *Cancers*, 2019, **11**(12): 2 017.
- [23] YIN C, WANG M, LEI C Y, *et al.* Phosphorylation-mediated assembly of a semisynthetic fluorescent protein for label-free detection of protein kinase activity [J]. *Analytical Chemistry*, 2015, **87**(12): 6 311-6 318.
- [24] HSU C C, ZHU Y F, ARRINGTON J V, *et al.* Universal plant phosphoproteomics workflow and its application to tomato signaling in response to cold stress[J]. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2018, **17**(10): 2 068-2 080.
- [25] CHEN J H, TIAN L, XU H F, *et al.* Cold-induced changes of protein and phosphoprotein expression patterns from rice roots as revealed by multiplex proteomic analysis[J]. *Plant OMICS*, 2012, **5**(2): 194-199.
- [26] GAO J, ZHANG S, HE W D, *et al.* Comparative phosphoproteomics reveals an important role of MKK₂ in banana (*Musa* spp.) cold signal network[J]. *Scientific Reports*, 2017, **7**: 40 852.
- [27] FURUYA T, MATSUOKA D, NANMORI T. Phosphorylation of *Arabidopsis thaliana* MEKK₁ via Ca²⁺ signaling as a part of the cold stress response[J]. *Journal of Plant Research*, 2013, **126**(6): 833-840.
- [28] LIU Z Y, JIA Y X, DING Y L, *et al.* Plasma membrane CRPK1-mediated phosphorylation of 14-3-3 proteins induces their nuclear import to fine-tune CBF signaling during cold response[J]. *Molecular Cell*, 2017, **66**(1): 117-128. e5.
- [29] DING Y L, JIA Y X, SHI Y T, *et al.* OST 1-mediated BTF 3L phosphorylation positively regulates CBFs during plant cold responses [J]. *The EMBO Journal*, 2018, **37** (8): e98228. DOI:10.15252/embj.201798228.
- [30] ALMADANIM M C, ALEXANDRE B M, ROSA M T G, *et al.* Rice calcium-dependent protein kinase OsCPK₁₇ targets plasma membrane intrinsic protein and sucrose-phosphate synthase and is required for a proper cold stress response[J]. *Plant, Cell & Environment*, 2017, **40**(7): 1 197-1 213.
- [31] ZHAO Q, CHEN W X, BIAN J Y, *et al.* Proteomics and phosphoproteomics of heat stress-responsive mechanisms in spinach[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2018, **9**: 800. DOI: 10.3389/fpls.2018.00800.
- [32] MIZOI J, KANAZAWA N, KIDOKORO S, *et al.* Heat-induced inhibition of phosphorylation of the stress-protective transcription factor DREB2A promotes thermotolerance of *Arabidopsis thaliana* [J]. *Journal of Biological Chemistry*,

- 2019, **294**(3): 902-917.
- [33] LI W M, WEI Z W, QIAO Z H, *et al.* Proteomics analysis of alfalfa response to heat stress[J]. *PLoS One*, 2013, **8**(12): e82725. DOI:10.1371/journal.pone.0082725.
- [34] WANG X, DINLER B S, VIGNJEVIC M, *et al.* Physiological and proteome studies of responses to heat stress during grain filling in contrasting wheat cultivars[J]. *Plant Science*, 2015, **230**: 33-50.
- [35] VALDÉS-LÓPEZ O, BATEK J, GOMEZ-HERNANDEZ N, *et al.* Soybean roots grown under heat stress show global changes in their transcriptional and proteomic profiles[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2016, **7**: 517. DOI:10.3389/fpls.2016.00517.
- [36] ASHOUB A, BAEUMLISBERGER M, NEUPAERTL M, *et al.* Characterization of common and distinctive adjustments of wild barley leaf proteome under drought acclimation, heat stress and their combination[J]. *Plant Molecular Biology*, 2015, **87**(4-5): 459-471.
- [37] ZHOU S P, SAUVÉ R J, LIU Z, *et al.* Heat-induced proteome changes in tomato leaves[J]. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 2011, **136**(3): 219-226.
- [38] LIU G T, JIANG J F, LIU X N, *et al.* New insights into the heat responses of grape leaves via combined phosphoproteomic and acetylproteomic analyses[J]. *Horticulture Research*, 2019, **6**: 100.
- [39] DHARMASIRI S, HARRINGTON H M, DHARMASIRI N. Heat shock modulates phosphorylation status and activity of nucleoside diphosphate kinase in cultured sugarcane cells [J]. *Plant Cell Reports*, 2010, **29**(11): 1 305-1 314.
- [40] VU L D, ZHU T T, VERSTRAETEN I, *et al.* Temperature-induced changes in the wheat phosphoproteome reveal temperature-regulated interconversion of phosphoforms[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2018, **69**(19): 4 609-4 624.
- [41] INOMATA T, BASLAM M, MASUI T, *et al.* Proteomics analysis reveals non-controlled activation of photosynthesis and protein synthesis in a rice npp1 mutant under high temperature and elevated CO₂ conditions[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, **19**(9): 2 655.
- [42] MASZKOWSKA J, DEBSKI J, KULIK A, *et al.* Phosphoproteomic analysis reveals that dehydrins ERD10 and ERD14 are phosphorylated by SNF1-related protein kinase 2.10 in response to osmotic stress[J]. *Plant, Cell & Environment*, 2018; pce.13465.
- [43] SOMA F, TAKAHASHI F, SUZUKI T, *et al.* Plant Raf-like kinases regulate the mRNA population upstream of ABA-unresponsive SnRK₂ kinases under drought stress[J]. *Nature Communications*, 2020, **11**: 1 373.
- [44] LIN Z, LI Y, ZHANG Z J, *et al.* A RAF-SnRK₂ kinase cascade mediates early osmotic stress signaling in higher plants [J]. *Nature Communications*, 2020, **11**: 613.
- [45] XUE L, WANG P C, WANG L S, *et al.* Quantitative measurement of phosphoproteome response to osmotic stress in *Arabidopsis* based on library-assisted extracted Ion chromatogram (LAXIC) [J]. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2013, **12**(8): 2 354-2 369.
- [46] YUAN L L, ZHANG M, YAN X, *et al.* Dynamic phosphoproteome analysis of seedling leaves in *Brachypodium distachyon* L. reveals central phosphorylated proteins involved in the drought stress response[J]. *Scientific Reports*, 2016, **6**: 35 280.
- [47] ZHANG M, MA C Y, LV D W, *et al.* Comparative phosphoproteome analysis of the developing grains in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) under well-watered and water-deficit conditions[J]. *Journal of Proteome Research*, 2014, **13**(10): 4 281-4 297.
- [48] CHEN G X, ZHEN S M, LIU Y L, *et al.* *In vivo* phosphoproteome characterization reveals key starch granule-binding phosphoproteins involved in wheat water-deficit response[J]. *BMC Plant Biology*, 2017, **17**: 168.
- [49] BONHOMME L, VALOT B, TARDIEU F, *et al.* Phosphoproteome dynamics upon changes in plant water status reveal early events associated with rapid growth adjustment in maize leaves[J]. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2012, **11**(10): 957-972.
- [50] HU X L, LI N N, WU L J, *et al.* Quantitative iTRAQ-based proteomic analysis of phosphoproteins and ABA-regulated phosphoproteins in maize leaves under osmotic stress [J]. *Scientific Reports*, 2015, **5**: 15 626.
- [51] SUN H G, XIA B L, WANG X, *et al.* Quantitative phosphoproteomic analysis provides insight into the response to short-term drought stress in *Ammopiptanthus mongolicus* roots [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2017, **18**(10): 2 158.
- [52] REN J, LI X, MAO J, *et al.* Physiological and quantitative phosphoproteome analyses of drought stress-induced mechanisms in *Malus baccata* (L.) Borkh [J]. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2017, **72**: 47-55.
- [53] PAN D Z, WANG L X, TAN F L, *et al.* Phosphoproteomics unveils stable energy supply as key to flooding tolerance in *Kandelia candel* [J]. *Journal of Proteomics*, 2018, **176**: 1-12.
- [54] YIN X J, SAKATA K, KOMATSU S. Phosphoproteomics reveals the effect of ethylene in soybean root under flooding stress[J]. *Journal of Proteome Research*, 2014, **13**(12): 5 618-5 634.

- [55] SINGH P, SINHA A K. A positive feedback loop governed by SUB1A1 interaction with MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE3 imparts submergence tolerance in rice [J]. *The Plant Cell*, 2016, **28**(5): 1 127-1 143.
- [56] ZHAO X Y, BAI X, JIANG C F, *et al.* Phosphoproteomic analysis of two contrasting maize inbred lines provides insights into the mechanism of salt-stress tolerance[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, **20** (8): 1 886.
- [57] LV D W, ZHU G R, ZHU D, *et al.* Proteomic and phosphoproteomic analysis reveals the response and defense mechanism in leaves of diploid wheat *T. monococcum* under salt stress and recovery[J]. *Journal of Proteomics*, 2016, 143: 93-105.
- [58] PI E X, XU J, LI H H, *et al.* Enhanced salt tolerance of rhizobia-inoculated soybean correlates with decreased phosphorylation of the transcription factor GmMYB183 and altered flavonoid biosynthesis [J]. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2019, **18**(11): 2 225-2 243.
- [59] VIALARET J, DI PIETRO M, HEM S, *et al.* Phosphorylation dynamics of membrane proteins from *Arabidopsis* roots submitted to salt stress [J]. *Proteomics*, 2014, **14** (9): 1 058-1 070.
- [60] ZHOU S, CHEN Q H, SUN Y H, *et al.* Histone H2B monoubiquitination regulates salt stress-induced microtubule depolymerization in *Arabidopsis*[J]. *Plant, Cell & Environment*, 2017, **40**(8): 1 512-1 530.
- [61] PI E X, QU L Q, HU J W, *et al.* Mechanisms of soybean roots' tolerances to salinity revealed by proteomic and phosphoproteomic comparisons between two cultivars[J]. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2016, **15**(1): 266-288.
- [62] YU C L, WU Q, SUN C D, *et al.* The phosphoproteomic response of okra (*Abelmoschus esculentus* L.) seedlings to salt stress[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, **20**(6): 1 262.
- [63] ZHOU Y H, ZHANG Z W, ZHENG C, *et al.* Nitrogen regulates CRY₁ phosphorylation and circadian clock input pathways[J]. *Plant Signaling & Behavior*, 2016, **11** (9): e1219830. DOI:10.1080/15592324.2016.1219830.
- [64] ENGELSBERGER W R, SCHULZE W X. Nitrate and ammonium lead to distinct global dynamic phosphorylation patterns when resupplied to nitrogen-starved *Arabidopsis* seedlings[J]. *The Plant Journal*, 2012, **69**(6): 978-995.
- [65] YANG J, XIE M Y, YANG X L, *et al.* Phosphoproteomic profiling reveals the importance of CK₂, MAPKs and CDPKs in response to phosphate starvation in rice[J]. *Plant and Cell Physiology*, 2019, **60**(12): 2 785-2 796.
- [66] XU W F, ZHANG Q, YUAN W, *et al.* The genome evolution and low-phosphorus adaptation in white lupin[J]. *Nature Communications*, 2020, 11: 1 069.
- [67] CHEN Y M, HOEHENWARTER W. Rapid and reproducible phosphopeptide enrichment by tandem metal oxide affinity chromatography: application to boron deficiency induced phosphoproteomics[J]. *The Plant Journal*, 2019, **98**(2): 370-384.
- [68] ZHONG M, LI S F, HUANG F L, *et al.* The phosphoproteomic response of rice seedlings to cadmium stress[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2017, **18**(10): 2 055.
- [69] FANG Y X, DENG X X, LU X L, *et al.* Differential phosphoproteome study of the response to cadmium stress in rice [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2019, 180: 780-788.
- [70] RAICHAUDHURI A. *Arabidopsis thaliana* MRP1 (AtABCC1) nucleotide binding domain contributes to arsenic stress tolerance with serine triad phosphorylation[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2016, 108: 109-120.
- [71] HU X L, WU L J, ZHAO F Y, *et al.* Phosphoproteomic analysis of the response of maize leaves to drought, heat and their combination stress [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2015, 6: 298. DOI:10.3389/fpls.2015.00298.
- [72] 潘德灼, 邓朝军, 吕晓杰, 等. 日灼胁迫对枇杷果皮蛋白质组的影响[J]. 西北植物学报, 2016, **36**(9): 1 801-1 812.
- PAN D Z, DENG C J, LÜ X J, *et al.* Effects of sunburn stress on the proteome of loquat peel [J]. *Acta Bot. Boreo-Occident. Sin.*, 2016, **36**(9): 1 801-1 812.

(编辑:宋亚珍)