



五倍体草莓及其十倍体的叶片差异表达蛋白分析

宁传丽, 蔡斌华, 王 涛, 乔玉山*

(南京农业大学 园艺学院, 南京 210095)

摘 要:以二倍体绿色草莓(*Fragaria viridis* Duch.)为父本、八倍体栽培草莓‘房香’(*F. × ananassa* ‘Fusanoka’)为母本杂交所得的五倍体草莓(株系代号: FxLs-11-37, $2n=5x=35$)及其染色体加倍而成的十倍体(株系代号: A3, $2n=10x=70$)草莓为试材, 观察记载其部分农艺性状、SPAD 值以及净光合速率, 利用双向凝胶电泳技术对草莓染色体加倍后叶片蛋白质进行了分析, 获得了分辨率高、重复性好的电泳图谱。结果表明: (1)与五倍体 FxLs-11-37 相比, 十倍体 A3 的株型明显矮化、植株冠径变大、叶长叶宽增大、叶片增厚以及叶色浓绿, 其叶片的 SPAD 值与净光合速率显著高于 FxLs-11-37。 (2)通过 PDQuest 软件对图谱分析表明, 两者在等电点 4~7、分子量 14.4~66.2 kD 范围内蛋白质斑点分布最多, 可识别的总蛋白质斑点数超过 700 个, 其中蛋白质表达差异水平在 1.5 倍以上的有 18 个, 2.0 倍以上的有 4 个。利用 MALDI-TOF-MS/MS 质谱技术鉴定了这 4 个差异蛋白质, 分别是草莓主要过敏原 a 1-E、核内不均一核糖核蛋白 1、叶绿体硫辛酰基合酶 1、NAD(P)H 脱氢酶(醌)FQR1 类似蛋白质。这些差异蛋白质主要与抗逆、mRNA 转运、物质与能量代谢相关。荧光定量 PCR 对上述 4 个蛋白编码基因的转录表达水平检测表明, 与蛋白质表达差异的趋势一致。该研究获得了草莓染色体加倍后差异表达的蛋白质, 为深入研究提供了线索。

关键词:草莓; 五倍体; 染色体加倍; 差异蛋白质

中图分类号: Q343.2⁺44; Q591.2; Q753 **文献标志码:** A

Differentially Expressed Proteins in Strawberry Leaves between Pentaploid and Its Corresponding Allodecaploid

NING Chuanli, CAI Binhua, WANG Tao, QIAO Yushan*

(College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: Pentaploid strawberry (FxLs-11-37, $2n=5x=35$) derived from the hybridization between diploid *Fragaria viridis* (male) and octaploid *F. × ananassa* ‘Fusanoka’ (female), and its allodecaploid (A3, $2n=10x=70$) were employed for conducting proteomic analysis with two dimensional gel electrophoresis technology under observation of agronomic traits, soil and plant analyzer development (SPAD) readings, and the net photosynthetic rate. (1) Compared with FxLs-11-37, A3 showed a significant dwarf type, larger crown, increased leaf length and leaf width, much thicker in leaf, more dark green leaves, and it also has a bigger SPAD for leaf and net photosynthetic rate; (2) Protein spots of FxLs-11-37 and A3 analyzed using PDQuest software were mainly scattered in the isoelectric point ranging from pH 4 to 7, and molecular weight ranging from 14.4 to 66.2 kD. More than 700 expressed protein spots in FxLs-11-37 and A3 were detected. Expression levels of 18 protein spots changed over 1.5 fold after chromosome doubling, and

收稿日期: 2016-05-23; 修改稿收到日期: 2016-09-01

基金项目: 江苏省农业科技自主创新资金(CX(15)1029)

作者简介: 宁传丽(1985—), 女, 在读硕士研究生, 主要从事草莓生物技术研究。E-mail: 2013104032@njau.edu.cn

* 通信作者: 乔玉山, 教授, 博士生导师, 主要从事果树育种与生物技术研究。E-mail: qiaoyushan@njau.edu.cn

4 protein spots changed over 2.0 fold. We identified these 4 protein spots with MALDI-TOF-MS/MS mass spectrometry technology, and results showed that the 4 proteins are major strawberry allergen Fra a 1-E, heterogeneous nuclear ribonucleoprotein 1, lipoyl synthase 1, chloroplastic, and NAD(P)H dehydrogenase (quinine) FQR1-like. These proteins are involved in stress resistant, mRNA transport, material and energy metabolism. Results of real-time quantitative PCR of gene encoding the above four proteins demonstrated that the difference tendency of gene transcriptional expression was consistent with the proteins levels. We obtained the differentially expressed proteins in strawberry chromosome doubling, which provided tracks for further research.

Key words: strawberry; pentaploid; chromosome doubling; differential protein

草莓属(*Fragaria* Duch.)植物染色体基数 $x=7$, 倍性水平丰富, 主要有二倍体($2x=14$)、四倍体($4x=28$)、八倍体($8x=56$)等类型。人工杂交获得的草莓属多样性倍性资源^[1-2], 为草莓倍性育种奠定了基础, 也为多倍体形成机制研究提供了宝贵资源。随着倍性的改变, 植物基因组的结构和基因的表达会发生一系列的变化, 如染色体重组、基因沉默、基因的非加性表达等^[3-4]。植物多倍体的表型常表现出植株粗壮、节间变短、叶色更深^[5]、生长缓慢、开花推迟^[6-7]及抗性增强^[8]等特征, 这些变化归根结底是蛋白质表达的结果^[9-10]。

蛋白质组学为蛋白水平上的差异研究提供了新技术, 在植物研究中的应用越来越广泛, 如雄性不育^[11]、抗病抗逆研究^[12]等。植物多倍化的蛋白质组学方面的研究已有不少报道, 涉及木薯^[13]、拟南芥^[14]、香蕉^[15]、甘蓝^[16]、棉花^[17]、马铃薯^[18]和小麦^[19-20]等。虽然草莓是较早开展蛋白质表达谱研究的果树种类之一^[21], 但有关草莓属植物多倍体蛋白质组学的相关研究尚属空白。本研究采用双向电泳技术进行蛋白质组学分析, 探寻草莓五倍体种间杂种与染色体加倍后蛋白质表达谱的差异, 并对差异蛋白点进行基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS/MS)鉴定, 进一步丰富草莓染色体加倍的分子生物学机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

以二倍体绿色草莓(*Fragaria viridis* Duch.)为父本、八倍体栽培草莓‘房香’(*F. × ananassa* ‘Fusanoka’)为母本种间杂交获得草莓实生苗, 经染色体计数确认为五倍体的株系 FxLs-11-37($2n=5x=35$)为试材, 用 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 秋水仙素溶液浸泡茎尖 48 h, 获得经染色体基数确定为十倍体的株系 A3($2n=10x=70$)^[22]。上述试材盆栽于南京农业大学牌楼实验基地, 于 6 月上旬, 选取长势整齐的植

株, 剪取靠近顶端生长点往外数第一张展开叶(复叶)的中心叶, 液氮速冻后存于 -70°C 冰箱备用。

1.2 农艺性状、SPAD 值、净光合速率的测定

1.2.1 农艺性状及 SPAD(Soil plant analysis development)值测定 随机选取长势旺盛且一致的 FxLs-11-37 与 A3 各 10 株, 按照赵密珍等^[23]的描述测量其株高、中心叶的叶长及叶宽以及植株冠径。采用 SPAD-502 Plus 便携式叶绿素测定仪分别测量成熟叶片和幼叶的 SPAD 值, 测定标准为: 幼叶测定靠近顶端生长点往外数第一张展开叶(复叶)的中心叶, 成熟叶片测定靠近顶端生长点往外数第三张展开叶(复叶)的中心叶, 计算平均值, 方差分析采用 SPSS 19.0。

1.2.2 净光合速率的测定 分别选取 5 株长势旺盛且一致的 FxLs-11-37 与 A3, 在阳光较好的天气, 利用 LP-6400 型便携式光合仪测定靠近顶端生长点第三张展开叶(复叶)的中心叶在 7:30、9:00、10:30、12:00、15:00、16:30 与 18:00 等 7 个时间点的净光合速率(net photosynthetic rate, P_n), 计算平均值, 方差分析采用 SPSS 19.0。

1.3 蛋白质提取

采用 TCA-丙酮沉淀法提取草莓叶片总蛋白质。分别称取约 0.6 g 样品液氮中研磨成粉, 转至 10 mL 离心管, 加入 7 mL -20°C 预冷的质量浓度为 $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ TCA/丙酮(含 0.07% DTT), -20°C 沉淀 1.5 h 后于 4°C 、12 000 r/min 离心 30 min, 弃上清; 将沉淀重悬浮于 -20°C 预冷丙酮溶液(含 0.07% DTT), -20°C 过夜, 4°C 、12 000 r/min 离心 30 min, 弃上清, 重复此步骤直至上清液无色。将盛有沉淀的离心管用封口膜封口, 扎孔, 置于 4°C 冰箱干燥成蛋白质干粉。每 1 mg 蛋白质干粉加入 10 μL 的蛋白质裂解缓冲液 4°C 裂解 3.5 h 后于 4°C 、12 000 r/min 离心 30 min, 取上清液, 重复该步骤 1~2 次至裂解缓冲液中无杂质。

表 1 荧光定量 PCR 引物
Table 1 Specific primers used in qPCR

蛋白质点 Spot	正向引物 Forward primer(5'→3')	反向引物 Reverse primer(5'→3')
<i>Actin</i>	TGGCTGTGCACGATGATTGC	TAACTTCCCACCAGATATCC
8106	GATGCCTTGTCAGAGAAC	GTGGTCCTTGAGGTATCC
8515	GCTCAAGGTTATGGTTATGG	CCACTTCCGATGTATCCA
8006	TGGATATACTGACACTTGGA	CACTGGCTACATAACGAAAT
5121	GAGGTGGACAAGAGACTAC	AGTTCGAGTTCAGAAGGTT

1.4 蛋白质质量浓度测定

草莓叶片总蛋白质量浓度测定采用 Bradford^[24]法:以牛血清蛋白(BSA)为标准蛋白,测定其在 595 nm 波长下的吸光度 A_{595} ,以不同质量浓度的 BSA 为横坐标,测得的吸光度 A_{595} 为纵坐标,绘制标准曲线($R^2 \geq 0.99$),计算样品中蛋白质的含量。

1.5 双向凝胶电泳

通过计算,取一定量含 1.5 mg 蛋白质的溶液加入裂解液至总体积为 350 μ L,沿 IPG 胶条槽缓慢均匀加入,将 17 cm pH 4~7 的 IPG 预制胶条胶面朝下覆盖在样品上,在胶面上覆盖少许矿物油,盖上盖子。将胶条槽放在 IPGphor 等电聚焦电泳仪中,设置等电聚焦程序:50 V 水化 13 h,250 V 慢速升压 1 h,500 V 慢速升压 1 h,1 000 V 线性升压 1 h,2 000 V 线性升压 1 h,10 000 V 线性升压 4 h,10 000 V 快速聚焦使运行电压与时间的乘积达 65 000 VH,完成蛋白等电聚焦分离,等电聚焦过程温度设为 19 $^{\circ}$ C。

等电聚焦结束后,立即进行胶条的平衡。将 IPG 胶条放于 10 mL 平衡缓冲液 1 中,在水平摇床上振荡 15 min,取出 IPG 胶条冲洗,放入 10 mL 平衡缓冲液 2 中,水平摇床上振荡 15 min。平衡结束后,将浸洗后的胶条转入体积浓度为 12%的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)板中进行第二向垂直电泳。电泳结束后,采用 G-250 胶体考染法染色 8 h,超纯水脱色至背景清晰。上述电泳分析重复 3 次。

1.6 凝胶扫描及质谱分析

使用 Image Scanner 扫描仪对染色后的凝胶进行扫描,获得蛋白质点图像,扫描模式为灰度模式,光密度值为 300 dpi。采用 PDQuest 8.0 分析软件对扫描图像进行分析。与参考胶的蛋白质点表达量相比,选取 1.5 倍以上差异且统计学测验具有显著性差异的蛋白质点做为差异表达蛋白质点。

取 2 倍以上差异表达蛋白质点进行酶解,酶解方法参照 Katayama 等^[25]的方法:将含有差异蛋白

质点的胶块切下,重新溶解于 5 μ L 含 0.1% TFA 的溶液中,然后按照 1:1 的比例与含 50% ACN 和 1% TFA 的 α -氰基-4-羟基肉桂酸饱和溶液混合后,取 1 μ L 样品用 ABI5800 串联飞行时间质谱仪(MALDI-TOF-TOF)(Applied Biosystems)进行质谱点靶鉴定。

1.7 差异蛋白质相关基因的 qRT-PCR 分析

采用 CTAB 法分别提取 FxLs-11-37 及 A3 的幼嫩叶片样品总 RNA,用核酸蛋白分析仪测量体积浓度并以 1.0%琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性。总 RNA 为模板按照反转录试剂盒 PrimescriptTM reagent Kit with gDNA Eraser(TaKaRa)说明书反转录得到 cDNA 第一链。根据差异蛋白质对应的核苷酸序列,采用 Beacon Designer 8.13 软件设计实时荧光定量 PCR 引物(表 1)。采用草莓 *Actin* 基因作为内标,以 cDNA 为模板对 4 种差异蛋白质的相关基因进行 qPCR 分析:20 μ L 反应体系包括 SYBR[®] Premix Ex TaqTM II (TaKaRa)10 μ L,正、反向引物分别为 0.3 μ L,稀释 10 $\times$ cDNA 模板 1 μ L,超纯水 8.4 μ L;反应程序为:94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min;94 $^{\circ}$ C 变性 20 s,56 $^{\circ}$ C 退火 20 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 40 s,40 个循环,重复 3 次,仪器为 7300 Real Time PCR System 实时荧光定量 PCR 仪。利用 Excel 2007 软件进行数据录入,使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法,以 FxLs-11-37 为对照,进行差异蛋白质相关基因相对表达量分析。

2 结果与分析

2.1 五倍体草莓染色体加倍后农艺性状、SPAD 值和净光合速率的变化

与五倍体草莓株系 FxLs-11-37 比较,染色体加倍的株系 A3 农艺性状、SPAD 值和净光合速率均发生了显著的变化。其中,十倍体株系 A3 表现出明显的株型矮化、植株冠径变大,叶宽增大以及叶长略增大、叶片略增厚以及叶色浓绿等性状特征(表 2);成熟叶片的 SPAD 值(48.29)明显高于 FxLs-11-37(39.81),其幼叶的 SPAD 值(33.83)略高于

FxLs-11-37(30.53)(表 3);除 18:00 外,其余时段 A3 叶片的净光合速率比 FxLs-11-37 高(表 3)。

2.2 五倍体草莓与其十倍体草莓的差异蛋白分析

经 PDQuestTM 2-D Analysis 软件分析,3 个重复都具有的点才被认为是确定的点,结果显示重复组的相似系数平均为 73.5%,表明重复性较好。获得的染色体加倍前后叶片清晰且重复性较好的 2-DE 图谱(图 1),FxLs-11-37 与 A3 蛋白质的分布模式图相似,总蛋白质点数均超过 700 个,集中分布在等电点 4~7 和分子量 14.4~66.2 kD 范围内。以表达量大于 1.5 倍为差异点,获得差异表达蛋白质

点 18 个,A3 表达上调的 2 个、下调的 16 个,其中表达量超过 2 倍的差异点有 4 个,编号依次为 8106、8515、8006、5121。经 MALDI-TOF-MS/MS 技术进行鉴定,这 4 个差异蛋白质是:草莓主要过敏原 a1-E(major strawberry allergen Fra a1-E,8106)、核内不均一核糖核蛋白 1(heterogeneous nuclear ribonucleoprotein 1,8515)、叶绿体硫辛酰基合酶 1(lipoyl synthase 1,chloroplastic,8006)、NAD(P)H 脱氢酶(醌)FQR1 类似蛋白质(NAD(P)H dehydrogenase (quinone)FQR1-like,5121,表 4),这些差异蛋白质(点)是下一步需要分析的对象。

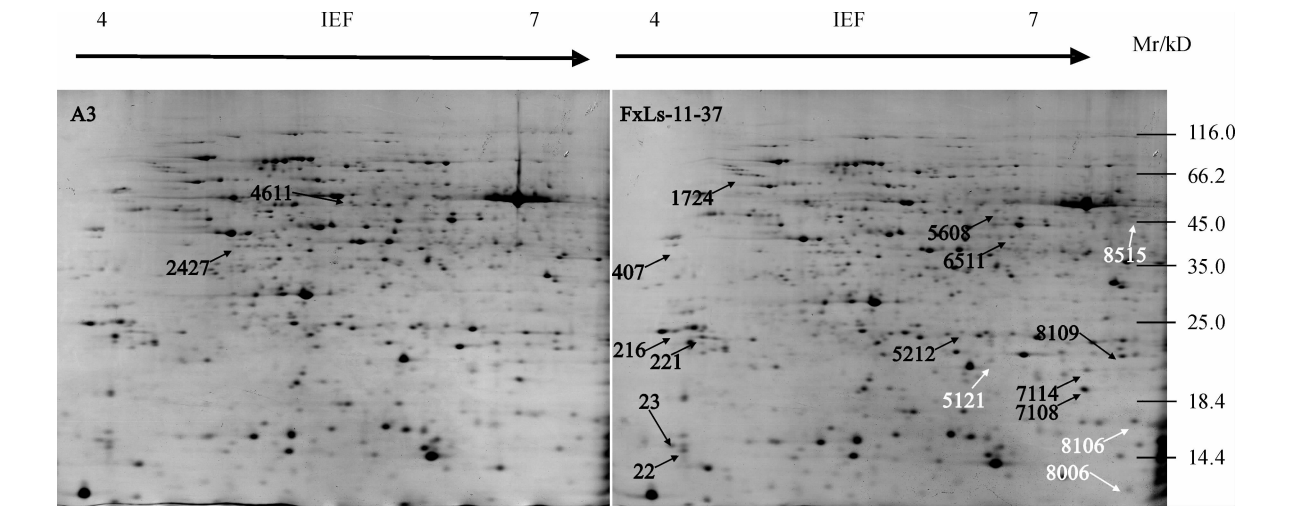
表 2 五倍体草莓与其十倍体草莓的部分农艺性状
Table 2 Some agronomic traits of FxLs-11-37 and A3

株系 Line	株高 Height/cm	叶长 Leaf length/cm	叶宽 Leave width/cm	叶片厚度 Leaf thickness/mm	植株冠径 Crown diameter/cm
FxLs-11-37	13.15a	4.97a	4.59a	0.35a	20.80a
A3	11.8b	6.02a	6.46b	0.54a	25.31b

注:表中同列数据后不同的小写字母表示 FxLs-11-37 与 A3 间差异显著(P<0.05),下同
Note: Different normal letters at the end of figure on the same column indicate significant differences (P<0.05). The same as below

表 3 五倍体草莓与其十倍体草莓的 SPAD 值和净光合速率
Table 3 SPAD reading and net photosynthetic rate of FxLs-11-37 and A3

株系 Line	SPAD 值 SPAD reading		净光合速率日动态 Net photosynthetic rate /($\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)						
	成年叶 Functional leaf	幼叶 Young leaf	7:30	9:00	10:30	12:30	15:00	16:30	18:00
FxLs-11-37	38.21a	30.53a	3.28a	7.80a	6.27a	4.04a	5.61a	5.69a	1.14a
A3	48.29b	33.83b	10.15b	11.15b	9.76b	9.49b	6.41b	8.96b	1.04a



黑色数字表示蛋白质表达差异水平在 1.5~2.0 倍的 14 个蛋白点;白色数字表示蛋白质表达差异水平在 2.0 倍以上的 4 个蛋白点;
Mr 为分子量 Marker

图 1 五倍体草莓与其十倍体的叶片双向凝胶电泳图谱

The 14 proteins whose expression levels had a 1.5–2.0 times change were marked in dark numbers, and the 4 proteins whose expression levels had more than 2.0 times change were marked in white numbers. Mr. Molecular weight marker

Fig.1 Two dimensional electrophoresis maps of FxLs-11-37 and A3 strawberry leaves

表 4 五倍体草莓与其十倍体的叶片差异蛋白质 MALDI-TOF-TOF-MS-MS 鉴定

Table 4 Identification of differentially expressed proteins between the FxLs-11-37 and A3 strawberry leaves by MALDI-TOF-TOF-MS-MS

编号 Spot	理论分子量 Molecular weight/kD	等电点 Isoelectric point	得分 Score	肽片段 覆盖率 SC/%	登录号 Accession no	蛋白质名称 Protein name	物种来源 Source organism
8106	17 766	6. 13	528	62	CAJ85645. 1	草莓主要过敏原 a1-E Major strawberry allergen Fra a 1-E	栽培草莓 <i>F. × ananassa</i>
8515	42 353	6. 54	353	25	XP_004296398. 1	核内不均一核糖核蛋白 1 Heterogeneous nuclear ribonucleo- protein 1	森林草莓 <i>F. vesca</i> subsp. <i>vesca</i>
8006	39 940	8. 82	41	1	XP_011463424. 1	叶绿体硫辛酰基合酶 1 Lipoyl synthase 1, chloroplastic c	森林草莓 <i>F. vesca</i> subsp. <i>vesca</i>
5121	21 796	5. 80	369	40	XP_004293489. 1	NAD(P)H 脱氢酶(醌)FQR1 类似蛋 白质 NAD (P) H dehydrogenase (quinone) FQR1-like	森林草莓 <i>F. vesca</i> subsp. <i>vesca</i>

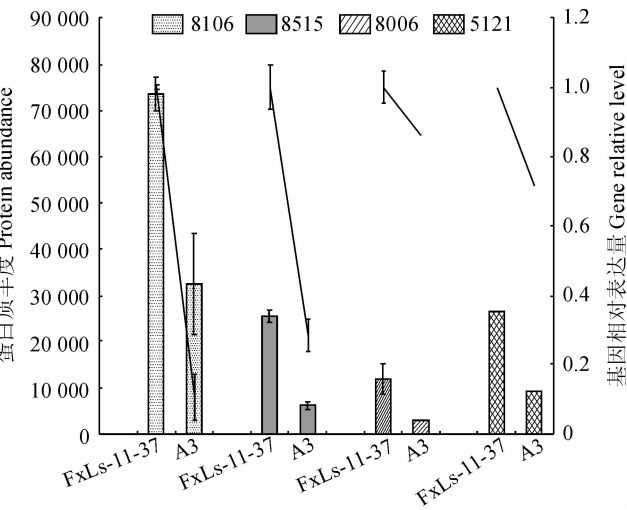


图 2 五倍体草莓与其十倍体的差异表达蛋白质及其相应基因转录表达量

Block diagram. Protein abundance; Line segment. Gene expression level

Fig. 2 Differentially expressed proteins and their corresponding gene expression levels in FxLs-11-37 and A3 leaves

2.3 差异蛋白质相关基因的表达分析

对 A3 与 FxLs-11-37 差异蛋白质相应基因进行 qPCR 表达分析, A3 与 FxLs-11-37 相比, 草莓主要过敏原 a 1-E 蛋白质表达量下降 230%, 基因相对表达量下降 940%; 不均一核糖核蛋白 1 蛋白质表达量下降 410%, 基因相对表达量下降 350%; 叶绿体硫辛酰基合酶 1 蛋白质表达量下降 410%, 基因相对表达量下降 120%; NAD(P)H 脱氢酶(醌) FQR1 类似蛋白质(简称 FQR1)表达量下降 280%, 基因相对表达量下降 140%。4 个差异蛋白表达量下降, 其相应基因转录表达量也下降, 两者趋势相同(图 2)。

3 讨论

多倍体植物因其具有更强的抗逆性, 使多倍体育种成为提高植物抗逆性的有效途径^[26]。由于杂交及倍性水平的影响, 特别是异源多倍体会发生非随机的序列消除现象、偏向性表达以及基因沉默等基因组印记, 从而维持新生基因组的稳定和进化^[27]。基因组印记的产生, 与多倍体形成后的遗传及表观变化有关。在表观遗传上, 常通过 DNA 甲基化、组蛋白修饰、RNA 干扰以及剂量补偿等方式来影响基因表达并产生显著的表型效应^[28]。本研究发现, 十倍体草莓株系在植株冠径, 叶宽叶长、叶片厚度以及叶色等皆超过五倍体草莓株系, 叶绿素含量(SPAD 值)也较高且具更高的净光合速率, 这可能赋予十倍体草莓株系更强的适应性或抗逆性。

植物染色体加倍后, 基因的剂量效应和基因互作效应使多倍体植株发生一系列变化, 增强多倍体的适应性^[26]。草莓主要过敏原 a 1-E, 作为发育调控防御系统的一部分, 参与植物防御反应, 是病程相关生物刺激应激反应蛋白质, 在正常情况下, 植物体内过敏原含量低, 在受到病原菌侵染时, 过敏原含量会升高; 叶绿体硫辛酰基合酶 1 基因可能参与植物抗逆反应, 逆境条件下, 盐地碱蓬种子内硫辛酰基含量会升高, 而在正常状态下, 硫辛酰基合酶表达量很少^[29], 上述这两种蛋白表达量降低可能与十倍体草莓株系抗性或适应性强相关。Avery 和 Pottorf^[30]指出多倍体植株生长发育缓慢可能与生长素含量低导致细胞分裂缓慢有关, FQR1 基因受生长素的诱导^[31], 当生长素含量低时, FOR1 表达量也低, 这可能是五倍体草莓加倍而成的十倍体草莓植株生长缓慢的原因之一。

由于双向凝胶电泳本身的局限性,本实验未能检测到更多的差异蛋白质,实际上在其他植物染色体加倍过程中所产生的参与信号传导^[32-33]、转录因子^[34]和激素代谢^[35]等差异蛋白质是广泛存在的,

下一步我们将利用新的高通量手段如 iTRAQ 等技术对草莓染色体加倍前后蛋白质表达的差异进行全面分析,以期更全面了解植物染色体加倍后影响植物表型的相关因素。

参考文献:

[1] ELLIS J R. *Fragaria-Potentilla* intergeneric hybridization and evolution in *Fragaria* [J]. *Proceedings of the Linnean Society of London*, 1962, **173**(2): 99-106.

[2] 雷家军, 薛 莉, 代汉萍. 草莓十二倍体种间杂种的获得及其回交研究[J]. 中国农业科学, 2012, **45**(22): 4 651-4 659.

LEI J J, XUE L, DAI H P. Obtaining dodecaploid interspecific hybrid in strawberry and its backcross[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2012, **45**(22): 4 651-4 659.

[3] 王 涛, 陈孟龙, 刘 玲, 等. 植物多倍体化中基因组和基因表达的变化[J]. 植物学报, 2015, **50**(4): 504-515.

WANG T, CHEN M L, LIU L, *et al.* Changes in genome and gene expression during plant polyploidization[J]. *Chinese Bulletin of Botany*, 2015, **50**(4): 504-515.

[4] WANG T, LIU L, NING C L, *et al.* Alterations of DNA methylation and gene expression during hybridization and polyploidization in *Fragaria* spp. [J]. *Scientia Horticulturae*, 2016, 201: 218-224.

[5] 侯丽丽, 施和平, 余 武, 等. 烟草毛状根多倍体诱导及其植株再生[J]. 生物工程学报, 2014, **30**(4): 581-594.

HOU L L, SHI H P, YU W, *et al.* Induction of polyploid in hairy roots of *Nicotiana tabacum* and its plant regeneration [J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2014, **30**(4): 581-594.

[6] GARBUTT K, BAZZAZ F A. Leaf demography, flower production and biomass of diploid and tetraploid populations of *Phlox drummondii* Hook. on a soil moisture gradient[J]. *New Phytologist*, 1983, **93**(1): 129-141.

[7] GU X F, YANG A F, MENG H, *et al.* *In vitro* induction of tetraploid plants from diploid *Zizyphus jujuba* Mill. cv. Zhanhua[J]. *Plant Cell Reports*, 2005, **24**(11): 671-676.

[8] ALLUM J F, BRINGLOE D H, ROBERTS A V. Chromosome doubling in a *Rosa rugosa* Thunb. hybrid by exposure of *in vitro* nodes to oryzalin: the effects of node length, oryzalin concentration and exposure time [J]. *Plant Cell Reports*, 2007, **26**(11): 1 977-1 984.

[9] 裴金玲, 杨红兰, 李春平, 等. 转晚期胚胎发生丰富蛋白 (LEA)基因棉花及抗旱性分析[J]. 分子植物育种, 2012, **10**(3): 331-337.

PEI J L, YANG H L, LI C P, *et al.* Transgenic cotton with *late embryogenesis abundant protein* (LEA) gene and its drought tolerance[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2012, **10**(3): 331-337.

[10] 夏志强, 何奕昆, 鲍时来, 等. 植物开花的组蛋白甲基化调控分子机理[J]. 植物学通报, 2007, **24**(3): 275-283.

XIA Z Q, HE Y K, PAO S L, *et al.* Molecular mechanism of plant flowering regulated by histone methylation[J]. *Chinese Bulletin of Botany*, 2007, **24**(3): 275-283.

[11] 伊凤艳, 石凤翎, 龙瑞才, 等. 苜蓿雄性不育植株与可育植株现蕾初期花蕾蛋白组比较[J]. 西北植物学报, 2013, **33**(10): 1 964-1 971.

YI F Y, SHI F L, LONG R C, *et al.* Comparative proteomic analysis of bud proteins of alfalfa male sterile and fertile plants at bud emergence stage[J]. *Acta Bot. Boreal. -Occident. Sin.*, 2013, **33**(10): 1 964-1 971.

[12] 蒋际谋, 邓朝军, 林永祥, 等. 枇杷果皮响应高温强光胁迫的蛋白质组分析[J]. 热带亚热带植物学报, 2014, **22**(4): 383-390.

JIANG J M, DENG C J, LIN Y X, *et al.* Proteomic analysis of loquat peels under high temperature and strong light stresses[J]. *Journal of Tropical and Subtropical Botany*, 2014, **22**(4): 383-390.

[13] 安飞飞, 凡 杰, 李庚虎, 等. 华南 8 号木薯及其四倍体诱导株系叶片蛋白质组及叶绿素荧光差异分析[J]. 中国农业科学, 2013, **46**(19): 3 978-3 987.

AN F F, FAN J, LI G H, *et al.* Comparison of leaves proteome and chlorophyll fluorescence of *Cassava* cv. SC8 and its tetraploid mutants[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2013, **46**(19): 3 978-3 987.

[14] NG D W, ZHANG C, MILLER M, *et al.* Proteomic divergence in *Arabidopsis* autopolyploids and allopolyploids and their progenitors[J]. *Heredity*, 2012, **108**(4): 419-430.

[15] CARPENTIER S C, PANIS B, RENAUT J, *et al.* The use of 2D-electrophoresis and *de novo* sequencing to characterize inter-and intra-cultivar protein polymorphisms in an allopolyploid crop[J]. *Phytochemistry*, 2011, **72**(10): 1 243-1 250.

[16] ALBERTIN W, BRABANT P, CATRICE O, *et al.* Autopolyploidy in cabbage (*Brassica oleracea* L.) does not alter significantly the proteomes of green tissues[J]. *Proteomics*,

2005, **5**(8): 2 131-2 139.

[17] HU G, HOUSTON N L, PATHAK D, *et al.* Genomically biased accumulation of seed storage proteins in allopolyploid cotton[J]. *Genetics*, 2011, **189**(3): 1 103-1 115.

[18] HOEHENWARTER W, LARHLIMI A, HUMMEL J, *et al.* MAPA distinguishes genotype-specific variability of highly similar regulatory protein isoforms in potato tuber[J]. *Journal of Proteome Research*, 2011, **10**(7): 2 979-2 991.

[19] AMIOUR N, MERLINO M, LEROY P, *et al.* Chromosome mapping and identification of amphiphilic proteins of hexaploid wheat kernels[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2003, **108**(1): 62-72.

[20] ISLAM N, TSUJIMOTO H, HIRANO H. Proteome analysis of diploid, tetraploid and hexaploid wheat: towards understanding genome interaction in protein expression[J]. *Proteomics*, 2003, **3**(4): 549-557.

[21] ALM R, EKEFJÄRD A, KROGH M, *et al.* Proteomic variation is as large within as between strawberry varieties[J]. *Journal of Proteome Research*, 2007, **6**(8): 3 011-3 020.

[22] 陈丙义. 野生草莓核型分析、基因组大小评估及其种质创新研究[D]. 南京:南京农业大学, 2013.

[23] 赵密珍, 钱亚明, 王静. 草莓优质品种及配套栽培技术[M]. 北京:中国农业出版社, 2010.

[24] 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**(1/2): 248-254.

[25] KATAYAMA H, NAGASU T, ODA Y. Improvement of in-gel digestion protocol for peptide mass fingerprinting by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry[J]. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2001, **15**(16): 1 416-1 421.

[26] 魏 望, 施富超, 王东玮, 等. 多倍体植物抗逆性研究进展[J]. 西北植物学报, 2016, **36**(4): 846-856.

WEI W, SHI F C, WANG D W, *et al.* Research progress on stress resistance in polyploidy plants[J]. *Acta Bot. Boreal. - Occident. Sin.*, 2016, **36**(4): 846-856.

[27] 刘玉玲, 韩兴杰, 李同建, 等. 植物多倍体中的基因组印记[J]. 广西植物, 2014, **34**(3): 290-293.

LIU Y L, HAN X J, LI T J, *et al.* The genomic imprinting in ployploid plants[J]. *Guihaia*, 2014, **34**(3): 290-293.

[28] LIU B, WENDEL J F. Epigenetic phenomena and the evolution of plant allopolyploids[J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2003, **29**(3): 365-379.

[29] 代莉慧. 盐地碱蓬种子萌发过程中耐盐生理指标测定及基因表达分析[D]. 内蒙古包头:内蒙古科技大学, 2013.

[30] AVERY G S, POTTORF L. Polyploidy, auxin and nitrogen in green plant tissue [J]. *American Journal of Botany*, 1945, **32**(10): 669-671.

[31] LASKOWSKI M J, DREHER K A, GEHRING M A, *et al.* *FQR1*, a novel primary auxin-response gene, encodes a flavin mononucleotide-binding quinone reductase[J]. *Plant Physiology*, 2002, **128**(2): 578-590.

[32] TAYLOR C B. GA signaling: Genes and GTPases[J]. *The Plant Cell*, 1998, **10**(2): 131-133.

[33] ASHIKARI M, WU J, YANO M, *et al.* Rice gibberellin-insensitive dwarf mutant gene *Dwarf 1* encodes the α -subunit of GTP-binding protein[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 1999, **96**(18): 10 284-10 289.

[34] MADLUNG A, MASUELLI R W, WATSON B, *et al.* Remodeling of DNA methylation and phenotypic and transcriptional changes in synthetic *Arabidopsis* allotetraploids[J]. *Plant Physiology*, 2002, **129**(2): 733-746.

[35] ALLARIO T, BRUMOS J, COLMENERO-FLORES J M, *et al.* Tetraploid Rangpur lime rootstock increases drought tolerance *via* enhanced constitutive root abscisic acid production [J]. *Plant, Cell & Environment*, 2013, **36**(4): 856-868.

(编辑:宋亚珍)