园艺学报，2015，42 (2)：321－331.
Acta Horticulturae Sinica
doi：10.16420/j.issn.0513-353x.2014-0221；http：//www. ahs. ac. cn

低温锻炼对两种绣线菊光合作用蛋白及光合能力的影响

刘慧民，苏　青，仉　茜，刘计璇，车代弟*
（东北农业大学园艺学院，哈尔滨 150030）

摘　要：以抗寒力不同的毛果绣线菊与金山绣线菊为试验材料，测定低温下光合特性的变化，利用蛋白质组学核心技术建立两种绣线菊低温下光合作用蛋白的表达图谱，并鉴定光合作用蛋白种类，探讨两种绣线菊对低温锻炼的响应机制。结果表明：低温下两种绣线菊的光合能力下降，利用弱光的能力增强，利用强光的能力降低，抗寒能力较强的毛果绣线菊利用弱光能力强于抗寒能力较弱的金山绣线菊。在不同低温水平下分别鉴定出涉及能量代谢与运输的光合作用蛋白共 17 种，低温下金山绣线菊中参与卡尔文循环、三羧酸循环、磷酸戊糖途径和光合磷酸化的酶显著上调和下调表达，毛果绣线菊中仅参与卡尔文循环的酶和参与 PSⅡ光合电子传递的蛋白明显上调和下调表达；低温使两种绣线菊光合作用均受到影响，金山绣线菊光合作用蛋白在低温下的变化更为显著。

关键词：绣线菊；低温锻炼；光合作用；光合蛋白；光合能力
中图分类号：S 685　　　**文献标志码**：A　　　**文章编号**：0513-353X（2015）02-0321-11

Effects of Low Temperature on Photosynthetic Proteins and Photosynthetic Capacities of Two Species of *Spiraea*

LIU Hui-min，SU Qing，ZHANG Qian，LIU Ji-xuan，and CHE Dai-di*
（*College of Horticulture*，*Northeast Agricultural University*，*Harbin* 150030，*China*）

Abstract：*Spiraea trichocarpa* Nakai and *S. bumalda*‘Gold Mound’，which have different cold resistance ablilty were used as experimental materials，for measuring the change of photosynthetic characteristics，establishing the different expression protein patterns of two species *Spiraea* in low temperature by the core technology of proteomics and then identifying the species of photosynthetic proteins，investigating the respond mechanism of two species *Spiraea* to low temperature treatments. The results showed that the photosynthetic capacities of two *Spiraea* species decreased in low temperature，but their capacities of using weak light increased and the capacities of using strong light decreased，*S. trichocarpa* Nakai with stronger cold resistance showed a better ability of using weak light than that of *S. bumalda*‘Gold Mound’with the weaker cold resistance. Seventeen kinds of photosynthetic proteins involved in energy metabolism and transport were identified seperately under different low temperature，

收稿日期：2014－08－06；**修回日期**：2014－12－12
基金项目：中国博士后基金面上项目（415152）；黑龙江省博士后基金项目（LBH-Z09288）；东北农业大学博士启动项目；国家自然科学基金面上项目（31171986）
* 通信作者 Author for correspondence（E-mail：898462546@qq.com）

the enzymes involved in Calvin cycle，TCA cycle，the pentose phosphate pathway and photophosphorylation of *S. bumalda*‘Gold Mound’showed obvious up and down regulation，while in *S. trichocarpa* Nakai only the enzymes involved in Calvin cycle and the proteins of photosynthetic electron transportation in PSⅡ showed obvious up and down regulation in low temperature；The photosynthesis of two species *Spiraea* were affected by low temperature，the change of the photosynthetic proteins in *S. bumalda*‘Gold Mound’were more significant.

Key words：*Spiraea*；low temperature treatment；photosynthesis；photosynthetic proteins；photosynthetic capacities

植物与低温相互作用过程中，逐渐形成了一套低温适应机制。研究发现低温对部分蔬菜光合作用的影响与这些蔬菜的光补偿点（LCP）和光饱和点（LSP）显著相关，低温下黄瓜的光补偿点较低，对弱光利用能力较强，光饱和点也较低，对强光利用能力较弱，导致叶片对光能利用范围变小，证明温度是光合作用的限制因子（庞金安 等，2000）。一些学者认为低温锻炼诱导新蛋白合成，部分光合机构蛋白发生变化，植物光合能力随之变化，使植物抗寒力变化（Weiser，1970；Hsiao，1973；Fetcher et al.，1983；Somervill，1986）。Renaut 等（2004）研究低温对杨树蛋白表达的影响，发现低温时消失或下调表达的蛋白多是与光合能量代谢相关蛋白。Cui 等（2005）通过渐进低温处理，鉴定水稻低温蛋白主要参与光合作用、光呼吸、能量代谢和能量转运等过程。Yan 等（2006）研究水稻叶片低温胁迫蛋白的动态变化，其中表达量显著变化的 97 个蛋白，大部分参与光合作用、光呼吸及能量代谢等过程。目前对植物低温蛋白质组学已展开了大量研究，其中对模式植物低温蛋白质组学的研究比较系统，已鉴定很多低温响应蛋白，阐明植物响应低温是复杂的网络反应（Bae et al.，2003；Yan et al.，2006；席景会，2007；Wu et al.，2013）。Gammulla 等（2011）发现水稻叶片低温响应蛋白中有 12 种光合作用蛋白，这些蛋白的表达量受低温影响显著。Cheng 等（2013）发现低温下过表达 *AtCBF1* 的烟草与非转基因烟草间表达的差异蛋白主要是光合作用蛋白。

绣线菊属（*Spiraea*）植物的抗寒能力是其适应高寒地区环境的关键。根据绣线菊抗寒评价的结果（刘慧民 等，2014），毛果绣线菊（隶属函数值 0.347，半致死温度 –27.2 ℃）的抗寒能力强于金山绣线菊（隶属函数值 0.386，半致死温度 –20.7 ℃）。本试验中以这两种绣线菊为材料，测定低温下的光合速率拟合光响应曲线，利用蛋白质组学核心技术（夏其昌和曾嵘，2004）探讨低温锻炼中其光合作用蛋白的变化并鉴定蛋白种类，从蛋白质水平探讨其光合作用对低温锻炼的响应机制。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以抗寒力较强的毛果绣线菊（*Spiraea trichocarpa* Nakai）和抗寒力较弱的金山绣线菊（*S. bumalda*‘Goldmound’）为试验材料。采用 2 年生扦插苗，于 2011 年 6 月栽植于 13 cm × 13 cm 的苗钵内置于露地，每钵土壤 500 g，常规管理。每种试验材料各 200 钵，随机分成 4 组，每组 50 钵，分别用于 4 个试验处理。当幼苗长至高 15 ~ 20 cm、分枝数 6 ~ 8 条、叶片 20 ~ 30 片时进行处理。

1.2 露地自然低温锻炼及其取样

2011 年 9 月上旬露地昼夜平均温度刚刚达 15 ℃时对 1 组试验材料取样作为对照。其他 3 组试

验材料分别在自然温度降到 15、10 和 5 ℃时开始一周后取样。期间平均光照为 860 ~ 1 100 μmol · m^{-2} · s^{-1}。

从每组 50 钵试验材料中随机选取 30 个单株，按照对角线法随机采集位于中上部的当年生枝条上第 2 ~ 8 片生长最佳的叶片，分别采集 3 ~ 6 g 叶片，用液氮处理后保存于 – 80 ℃冰箱待测定蛋白；同时对 15 ℃和 10 ℃组随机选取 20 个植株测定叶片的光合生理指标。每个处理均进行 3 次重复随机取样、平行样测定，测定结果取平均值。

1.3　光合指标的测定及蛋白质鉴定

净光合速率、光补偿点、光饱和点采用光合仪器法（LI-6400）、光响应曲线法（樊超，2008）测定。于晴朗微风天气 9：00—11：30 用 LI-6400 便携式光合分析仪测定植株中上部叶片最大净光合速率（$P_{n,\max}$），采用开放气路，空气流速 0.5 L · min^{-1}，叶室温度 10 ~ 19 ℃，相对湿度 50% ~ 55%，CO_2 浓度 360 μmol · L^{-1}。测定时采用光合仪的人工光源，依次设定光合有效辐射（*PAR*）为 0、30、50、100、300、500、800、1 000、1 200、1 400、1 600、1 800、2 000、2 200 μmol · m^{-2} · s^{-1} 的光照梯度，每处理重复 3 次，每次测定一片叶片，记录 3 个测定值。利用 Origin 7.02 软件拟合绘制光响应曲线，根据公式求得光饱和点（LSP）、光补偿点（LCP）与净光合速率等。

叶片蛋白质的提取、双向凝胶电泳、凝胶固定与染色、胶内酶解、MALDI-TOF-MS 质谱鉴定参照夏其昌和曾嵘（2004）、刘慧民等（2009）的试验方法。其中每个样品的凝胶电泳重复 3 次，最后合成一个参考胶（Wu et al.，2013），胶条长 24 cm，pH 4 ~ 7。

用图像分析软件 Image Master 2D Elite 对图谱进行斑点检测、匹配，查询和检索质谱数据库 NCBInr 鉴定蛋白。为确定差异蛋白点，首先每种绣线菊不同低温处理水平的图谱分别与本种对照的图谱比较，排除非低温诱导的假阳性蛋白点并确定显著的差异点，其次两种绣线菊相同低温水平间的图谱再做比较，再次确定显著的差异点，以 2 次确定的显著差异蛋白作为低温诱导蛋白待鉴定。

试验数据采用 SPSS 17.0 软件进行方差分析。

2　结果与分析

2.1　低温锻炼处理两种绣线菊光合生理指标变化

持续低温锻炼处理，两种绣线菊的最大光合速率、光饱和点、光补偿点均显著下降（图 1），但下降幅度各不相同。

金山绣线菊光合速率、光补偿点、光饱和点下降幅度分别为 10.8%、54%和 14.5%，毛果绣线菊光合速率、光补偿点、光饱和点下降幅度分别为 12.8%、28.5%、55.3%。光合速率下降，说明两种绣线菊低温下的光合能力降低。光补偿点下降，说明两种绣线菊低温下利用弱光的能力加强。光饱和点下降，说明两种绣线菊低温下利用强光的能力降低（Oraby et al.，2005）。金山绣线菊光补偿点降幅显著大于毛果绣线菊的降幅，毛果绣线菊光补偿点显著低于金山绣线菊，说明低温时毛果绣线菊利用弱光的能力强于金山绣线菊；毛果绣线菊光饱和点降幅显著大于金山绣线菊，10 ℃时毛果绣线菊光饱和点显著低于金山绣线菊，说明低温下毛果绣线菊利用强光的能力显著低于金山绣线菊，金山绣线菊光饱和点降幅很小，低温期间比毛果绣线菊更具利用强光的能力。北方低温季节光照较弱，抗寒力强的毛果绣线菊适应低温弱光环境，抗寒力弱的金山绣线菊适应强光，在低温低光强环境其抗寒力降低。

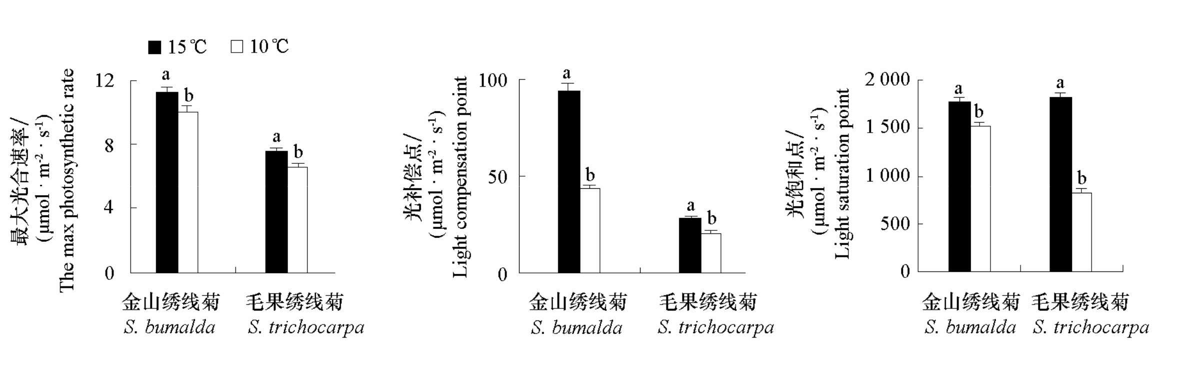

图 1　两种绣线菊低温锻炼处理光合生理指标的变化

不同字母表示不同温度间差异显著（$P < 0.05$）。

Fig. 1　The change of photosynthetic physilolgyical indexs of two species of *Spiraea* with low temperature treatments

The letters in pictures indicate significance at $P < 0.05$.

2.2　低温锻炼两种绣线菊光合作用蛋白电泳图谱变化

在不同低温水平从金山绣线菊图谱中检测到 668 个蛋白点，从毛果绣线菊中检测到 595 个蛋白点，其中低温下表达量显著差异的蛋白点 49 个；鉴定出涉及能量代谢与运输的光合作用蛋白 17 种（图 2，图 3），其中上调表达的 3 种，包括 1 个新增蛋白点；下调表达的 8 种，包括 2 个消失蛋白点。

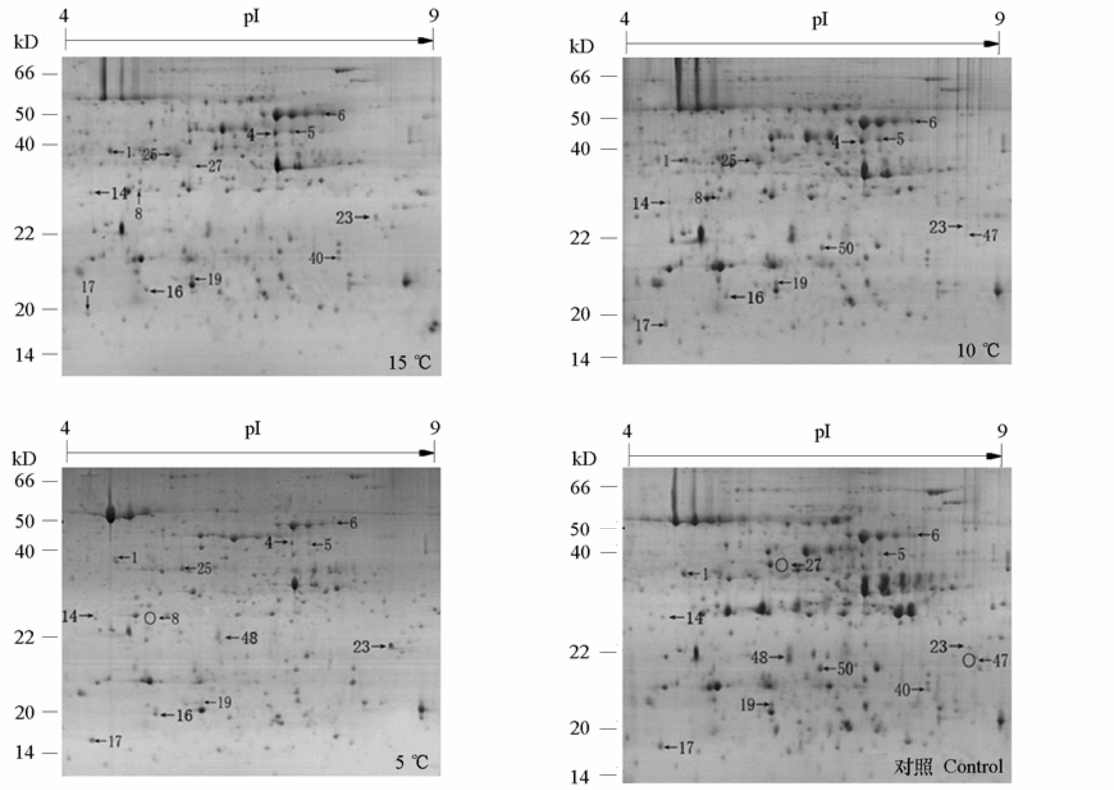

图 2　金山绣线菊低温锻炼处理光合机构蛋白表达图谱

Fig. 2　The expressed patterns of proteins related to photosynthesis in *S. bunmalba*‘Goldmound’ with low temperatures treatments

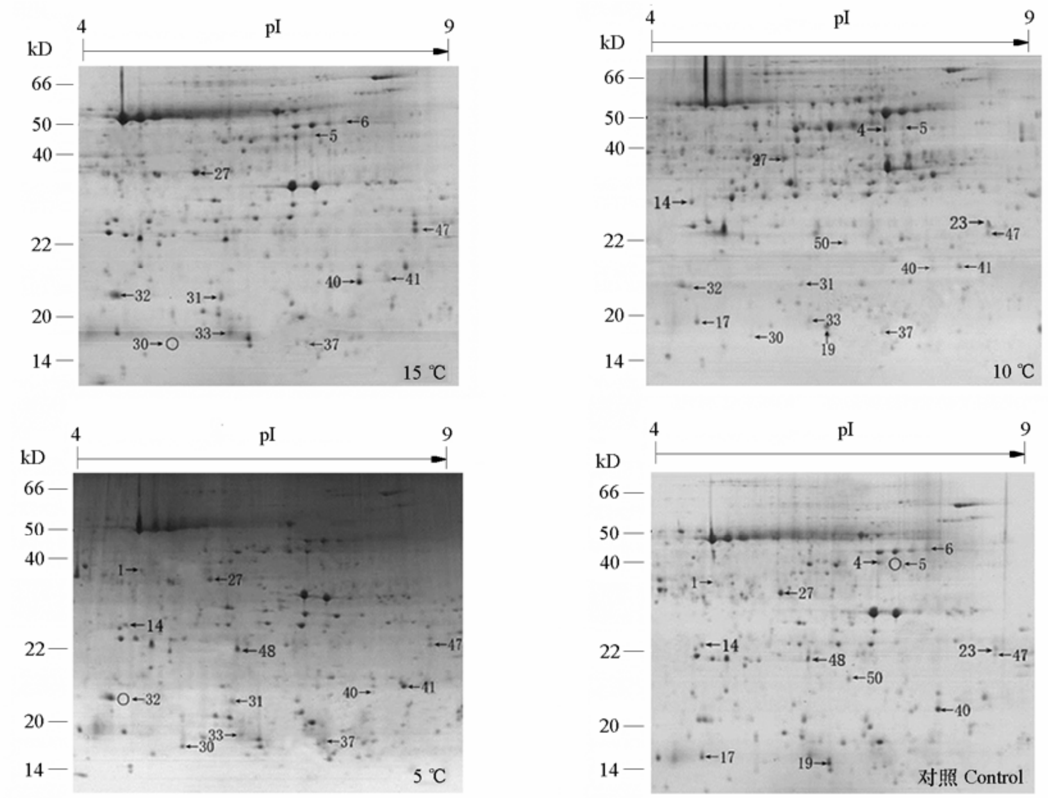

图 3 毛果绣线菊低温锻炼处理光合机构蛋白表达图谱

Fig. 3 The expressed patterns of proteins related to photosynthesis in *S. trichocarpa* Nakai with low temperatures treatments

2.3 低温锻炼处理两种绣线菊光合作用蛋白鉴定结果

取两种绣线菊不同低温水平 49 个表达差异的蛋白点，经胶内酶解进行 MALDI-TOF-MS 分析，得到蛋白肽质量指纹图谱，经过 MASCOT 数据库搜索，Protein Score 大于 64 分可确定蛋白种类，结合各蛋白得分，在给出的候选蛋白中选择最接近绣线菊物种的蛋白作为鉴定结果，鉴定出 48 种蛋白，鉴定率为 98.0%，包括涉及能量代谢与运输的光合作用蛋白 17 种（表 1），其中苹果酸脱氢酶、1,5 – 二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶大亚基、核酮糖二磷酸羧化酶、核酮糖磷酸 3 – 差向异构酶、1,5 – 二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶小亚基和 23 kD 放氧复合蛋白都是参与光合作用的主要酶类。还鉴定出两种与能量运输有关的蛋白 ATP 合酶 β 亚基（ATP synthase beta subunit）和细胞色素 b6-f 复合体 – 铁 – 硫亚基（Cytochrome b6-f complex iron-sulfur subunit），它们在光合能量运输中执行重要功能。

表 1 所列的 22 个差异蛋白点对应 17 种蛋白，表中有多个蛋白点对应同一种蛋白，统计后发现点 14 和 16 对应同一个蛋白 hypothetical protein、点 47 和 50 对应同一个蛋白 23 kD OEC protein、点 5 和 6 对应同一个蛋白 ATP synthase beta subunit、点 31 和 32 对应同一个蛋白 Cytochrome b6-f complex iron-sulfur subunit，chloroplast precursor，putative，因为这些蛋白的分子量、等电点、来源物种、登录号，甚至蛋白得分都一致或者接近。最后鉴定得到了 17 种不同蛋白。

表 1　两种绣线菊低温锻炼处理鉴定的光合作用蛋白

Table 1　Proteins related to photosynthesis in two species of *Spiraea* indentified by MS under low temperatures treatment

功能 Function	蛋白质点编号 Spot No.	蛋白质名称 Protein name	登录号 Accession No.	序列覆盖/% Sequence coverage	种类 Species	分子量/等电点 Mw/pI 理论值 Theoretical	分子量/等电点 Mw/pI 实际值 Experimental	MALDI-TOF-MS 得分 Score	MALDI-TOF-MS 匹配肽段数 Matched Peptides
能量代谢 Energy metabolic	1	苹果酸脱氢酶 Cytosolic malate dehydrogenase	ABB36659	37	*Malus* × *domestica*	35 571/6.01	38 492/4.65	759	16
	4	未知蛋白 Unknown	ABK96359	21	*Populus trichocarpa* × *Populus deltoides*	52 038/6.28	43 653/6.52	635	14
	8	1,5－二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶大亚基 Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/ oxygenase large subunit	AAF01660	21	*Circaeaster agrestis*	50 221/5.73	32 641/5.10	302	6
	14，16	假想蛋白 Hypothetical protein	CAN66664	17	*Vitis vinifera*	33 592/5.54	32 357/4.10，20 639/5.52	257，230	9，6
	17	1,5－二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶小亚基 Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/ oxygenase small subunit	ACO35888	11	*Ageratina adenophora*	20 016/8.94	19 381/4.70	126	3
	19	核酮糖磷酸 3－差向异构酶 Ribulose-phosphate 3-epimerase	Q43157	12	*Spinacia oleracea*	30 347/8.23	20 867/6.35	130	3
	23	未知蛋白 Unnamed protein product	CAO45547	13	*Vitis vinifera*	35 613/4.81	26 453/8.66	132	3
	25	乳胶质醛缩酶样蛋白 Latex plastidic aldolase-like protein	AAM46780	12	*Hevea brasiliensis*	42 671/8.43	37 465/5.45	334	7
	27	预测蛋白 Predicted protein	XP_002330960	20	*Populus trichocarpa*	43 342/8.15	35 618/5.90	367	8
	30	磷酸核酮糖羧化酶 Ribulose bisphosphate carboxylase	CAA31948	6	*Arabidopsis thaliana*	20 448/7.59	17 294/5.25	70	3
	33	1,5－二磷酸核酮糖小亚基前体 Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase small subunit precursor	AAA82069	8	*Glycine soja*	19 962/8.80	20 274/6.12	127	2
	37	1,5－二磷酸核酮糖羧化酶小亚基　Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase small subunit	AAB95214	8	*Fritillaria agrestis*	16 099/9.08	18 256/7.10	85	2
	47，50	23 kD 放氧复合物蛋白 23 kD OEC protein	ABQ85433	11，34	*Salicornia veneta*	21 544/5.94	24 169/8.80，21 849/6.60	69，21 544	2，211
	48	假想蛋白 Hypothetical protein POPTRDRAFT_551203	XP_002300858	18	*Populus trichocarpa*	28 173/7.68	23 569/6.45	291	8
运输 Transport	5，6	ATP 合酶 β 亚基 ATP synthase beta subunit	AAK72828	49，54	*Photinia* × *fraseri*	51 587/5.34	44 391/7.15，48 275/7.60	1 024，1 128	19，23
	31，32	细胞色素 b6-f 复合体－铁－硫亚基，叶绿体前体 Cytochrome b6-f complex iron-sulfur subunit，chloroplast precursor，putative	XP_002513246	19	*Ricinus communis*	23 447/8.22	21 237/6.09，21 486/4.52	225，256	3，5
	40	细胞色素 b6-f 复合铁硫亚基 2 Cytochrome b6-f complex iron sulfur subunit 2	ABQ41994	20	*Sonneratia caseolaris*	16 601/5.75	21 246/7.80	106	2
	41	ATP 酶艾普森链 ATPase epsilon chain	AAF19791	11	*Lactuca sativa*	13 772/5.42	214 375/8.22	59	1

2.4　低温锻炼处理两种绣线菊光合作用蛋白表达量变化

通过 Image Mster 2D Elite 软件对蛋白图谱差异蛋白分析结果表明，差异表达的光合作用蛋白低温时其表达量显著变化（图 4，图 5）。由 15 ℃逐渐降至 5 ℃的低温过程中，金山绣线菊（图 4）表达量下降幅度在 60% ~ 80%的蛋白有：核酮糖磷酸 3 – 差向异构酶、苹果酸脱氢酶；下降幅度在 80%以上的蛋白有：ATP 合酶 β 亚基、1,5 – 二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶大亚基，其中 1,5 – 二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶大亚基在 5 ℃低温时蛋白点消失，降幅达 100%。金山绣线菊表达量上升的蛋白有 1,5 – 二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶小亚基，上升幅度为 114.5%。

毛果绣线菊（图 5）表达量下降的蛋白有 23 kD 放氧复合蛋白、1,5 – 二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶小亚基前体和细胞色素 b6-f 复合体 – 铁 – 硫亚基，下降幅度分别为 34.2%、75.9%和 100%，其中细胞色素 b6-f 复合体 – 铁 – 硫亚基在 5 ℃低温时蛋白点消失；表达量上升的蛋白有 1,5 – 二磷酸核酮糖羧化酶小亚基，上升幅度为 352.4%，特别是核酮糖磷酸羧化酶在 15 ℃时未表达，而在 5 ℃时的表达量已达到 0.30。

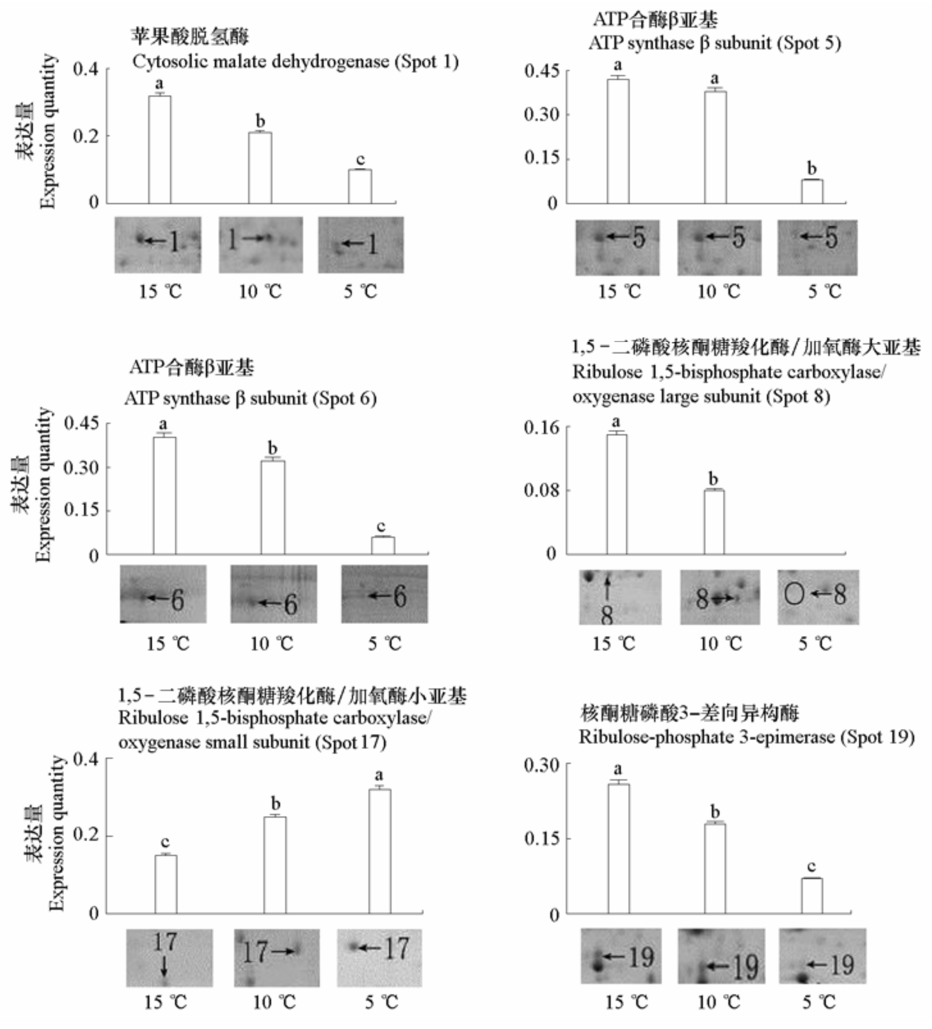

图 4　金山绣线菊低温锻炼处理光合作用蛋白表达量变化

Fig. 4　The change of expression quantity of proteins related to photosynthesis in *S. bunmalba*‘Goldmound’with low temperature treatments

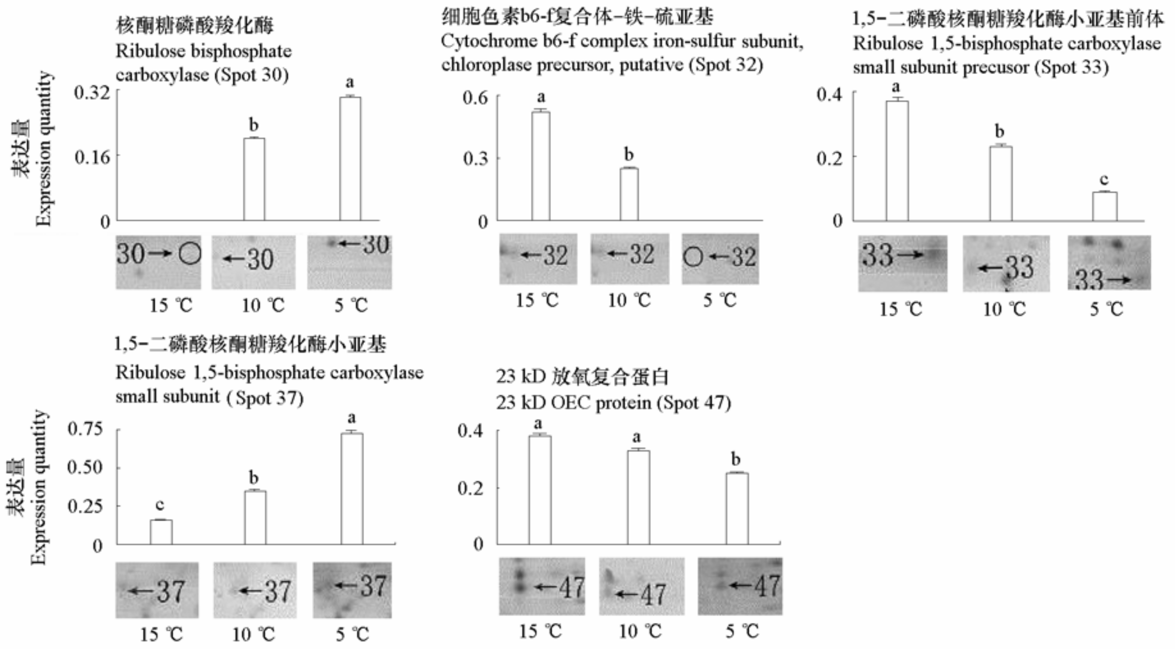

图 5　毛果绣线菊低温锻炼处理光合作用蛋白表达量变化

Fig. 5　The change of expression quantity of proteins related to photosynthesis in *Spiraea trichocarpa* Nakai with low temperature treatments

3　讨论

3.1　低温锻炼处理两种绣线菊能量代谢相关蛋白的表达与绣线菊的抗寒能力

苹果酸脱氢酶（Spot 1，cytosolic malate dehydrogenase）在三羧酸循环中参与苹果酸氧化成草酰乙酸的代谢过程，在金山绣线菊中经低温后其表达量显著降低（图 4），会造成下游物质草酰乙酸合成量减少，三羧酸循环中物质循环受到的影响，还导致三羧酸循环最终产生的能量减少（Nogueira et al.，2007）；草酰乙酸是糖异生代谢中的初始物质，其表达量降低还导致糖异生终产物可溶性糖含量减少。植物生长发育和低温胁迫中需要消耗能量和代谢物质，苹果酸脱氢酶表达量显著下降，导致能量合成减少，抗寒保护性物质可溶性糖含量降低，推测这是导致金山绣线菊抗寒能力较低、抗寒性差的原因之一。

1,5–二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶（RuBisCo）在植物体内含量最丰富，RuBisCo 在卡尔文循环中催化第一个碳固定反应（梅杨　等，2007），将二氧化碳转化为贮能分子并合成淀粉等。金山绣线菊中 1,5–二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶大亚基（Spot 8，Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit）、毛果绣线菊中 1,5–二磷酸核酮糖小亚基前体（Spot 33，RuBisCo small chain precursor）低温时表达量明显下调，1,5–二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶大亚基在 5 ℃低温时未表达（图 4）。RuBisCo 下调表达直接影响两种绣线菊光合固定二氧化碳，影响吸收和利用光能，使两种绣线菊光合能力下降，减少抗寒保护物质可溶性糖生成。尤其金山绣线菊中 RuBisCo 不表达，说明低温对金山绣线菊光合作用影响更严重，推测也是造成金山绣线菊抗寒力弱的原因之一，与金山绣线菊光合生理指标变化一致。Yan 等（2006）发现水稻低温时 RuBisCo 发生降解并鉴定 19 个降解蛋

白片段，其中 1,5 – 二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶大亚基发生降解并表达量下降，与试验结果与其一致。两种绣线菊中 1,5 – 二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶小亚基（Spot 17、Spot 37、Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase small subunit）、毛果绣线菊中 RuBisCo 羧化酶（Spot 30、Ribulose bisphosphate carboxylase）都是卡尔文循环中催化作用酶类，低温时表达量都显著上调（图 4），可增强两种绣线菊的光合能力，增加抗寒保护物质可溶性糖含量，产生更多能量用于代谢活动和抗性反应，提高绣线菊抗低温能力（Mittler，2006）。Hurry 等（1995）报道低温时卡尔文循环中催化蛋白酶也上调表达，Strand 等（1999）发现低温时拟南芥也发生同样变化，证明低温胁迫明显影响光合作用。植物体内代谢途径相互联系，一种蛋白参与多个代谢途径并受若干因素影响，一方面低温对代谢活动产生破坏作用，另一方面植物会调节并主动适应低温环境（Kwang & Daniel，2003），低温胁迫可使能量代谢蛋白的表达量下调或上调变化。

PSⅡ中的放氧复合蛋白（OEC）是由分子量分别为 16、23 和 33 kD 的 3 条多肽链再附加锰聚体（Mncluster）组成的复合体，3 条肽链的功能是稳定和保护锰聚体免受外部不良环境影响以进行正常光合作用。其中 23 kD OEC 与 33 kD OEC 放氧复合蛋白属于锰聚体稳定蛋白（Chloroplast manganese stabilizing protein-Ⅱ），研究发现 23 kD 蛋白降解后锰聚体更易受不良环境影响，说明 23 kD 蛋白保护锰聚体（Laudenbach et al.，1990）。本试验中毛果绣线菊 23 kD OEC（Spot 47）低温后表达量持续下调（图 4），推测影响了毛果绣线菊 PSⅡ的锰聚体稳定性，其光合作用受到影响，与毛果绣线菊光合生理指标的变化一致；研究还发现缺少 23 kD 蛋白的拟南芥突变体相对适应弱光抑制（于勇 等，2001），毛果绣线菊中 23 kD OEC 表达量降低说明其适应弱光环境以保持光合能力，与毛果绣线菊低温下光合生理指标的变化一致。

糖酵解（EMP）、三羧酸循环（TCA）和磷酸戊糖（PPP）等代谢途径为植物提供能量和各种代谢产物。核酮糖磷酸 3 – 差向异构酶（Ribulose-phosphate 3-epimerase）特异作用于糖类及其衍生物，在磷酸戊糖途径中催化核糖的生物合成，促进戊糖间转化和衔接磷酸戊糖途径与糖酵解过程，保证正常的光合作用（储菲菲 等，2011）。低温时金山绣线菊中该酶（Spot 19）表达量显著下降（图 4），降低其光合能力和抗寒能力。

3.2 低温锻炼处理两种绣线菊能量运输相关蛋白的表达与绣线菊的抗寒能力

ATP 合酶广泛存在于叶绿体和线粒体中，参与光合磷酸化和氧化磷酸化反应，利用与电子传递耦联的跨膜质子动力势（proton motive force）将 ADP 和无机磷合成 ATP，它由 CF_0 和 CF_1 两部分组成，β 亚基是 CF_1 的主要催化亚基（倪张林和魏家绵，2003）。低温使金山绣线菊中的 ATP 合酶 β 亚基（Spot 5 和 Spot 6）下调表达（图 4），可影响光合磷酸化产生 ATP，间接影响卡尔文循环，减少抗寒保护物质可溶性糖合成量，降低金山绣线菊抗寒能力。

细胞色素 b6-f 复合体是类囊体膜上的多亚基膜蛋白，由细胞色素 f 和 b6、1 个铁硫蛋白分子和 4 个多肽组成，其中 3 个多肽是电子载体。细胞色素 b6-f 复合体参与 PSⅡ中电子传递，最终形成两个电子的跨膜位点（桑敏 等，2012）。推测毛果绣线菊中细胞色素 b6-f 复合体 – 铁 – 硫亚基（Spot 31 和 Spot 32）是细胞色素 b6-f 复合体中降解的铁硫蛋白，一方面细胞色素 b6-f 复合体降解可使电子传递受到影响和正常光合作用受阻，使低温下毛果绣线菊的光合能力下降；另一方面低温下细胞色素 b6-f 复合体 – 铁 – 硫亚基在毛果绣线菊中表达量下调，尤其 5 ℃低温后未表达（图 4），推测低温导致其细胞色素 b6-f 复合体数量减少，仍然影响其光合能力与抗寒力。

4 结论

低温使两种绣线菊的光合速率、光补偿点、光饱和点均降低，但下降幅度各不相同；低温使两种绣线菊的光合能力均下降，且利用弱光的能力增强，利用强光的能力降低；毛果绣线菊利用弱光的能力强于金山绣线菊，毛果绣线菊通过适应低温下的弱光环境提高其抗寒能力，金山绣线菊低温下表现适应强光的趋势，低温低光强环境导致其抗寒能力降低。

不同低温水平分别鉴定出涉及能量代谢与运输的光合作用蛋白 17 种，金山绣线菊中卡尔文循环的酶（RuBisCo small subunit 和 RuBisCo large subunit）发生显著的上调和下调表达，参与光合磷酸化的 ATP 合酶（ATP synthase beta subunit）、TCA 循环中的苹果酸脱氢酶（cytosolic malate dehydrogenase）、磷酸戊糖途径的核酮糖磷酸 3 – 差向异构酶（Ribulose-phosphate 3-epimerase）的表达量均显著下调；毛果绣线菊中参与光合作用的酶（Ribulose bisphosphate carboxylase、RuBisCo small subunit 和 RuBisCo small chain precursor）发生明显的上调和下调表达，其 PSⅡ中的 23 kD 放氧复合蛋白（23 kD OEC protein）和细胞色素 b6-f 复合体 – 铁 – 硫亚基（Cytochrome b6-f complex iron-sulfur subunit）的表达量均显著下调。

金山绣线菊和毛果绣线菊的光合作用均受到低温影响，金山绣线菊光合作用蛋白在卡尔文循环、TCA 循环、磷酸戊糖途径、光合磷酸化等代谢过程中发生显著变化，毛果绣线菊中光合作用蛋白只在卡尔文循环和 PSⅡ中发生显著变化；金山绣线菊光合作用蛋白受低温影响变化更为显著。

References

Bae M S，Cho E J，Choi E Y，Park O K. 2003. Analysis of the *Arabidopsis* nuclear proteome and its response to cold stress. Plant Journal，36 (5)：652 – 663.

Cheng Han，Cai Hai-bin，An Ze-wei. 2013. Comparative proteomics analysis revealed increased expression of photosynthetic proteins in transgenic tobacco by overexpression of *AtCBF1* gene. Plant Omics，(6)：240 – 245.

Chu Fei-fei，Xing Qing-chao，Mu Wan-meng，Zhang Tao，Miao Ming，Jiang Bo，Zhou Liu-ming. 2011. Cloning expression and characterization of *Clostridium cellulolyticum* D-tagatose 3-epimerase. Journal of Food Science and Biotechnology，30 (2)：283 – 286. (in Chinese)
储菲菲，邢庆超，沐万孟，张　涛，缪　铭，江　波，周榴明. 2011. *Clostridium cellulolyticum* D – 塔格糖 3 – 差向异构酶基因的克隆表达及酶活性. 食品与生物技术学报，30 (2)：283 – 286.

Cui Y B，Zhang Y B，Wang J，Yue J C，Fang X H. 2005. Corrigendum to rotary torque produced by proton motive force in FoF1 motor. Biochemical and Biophysical Research Communications，345 (4)：1663.

Fan Chao. 2008. Adaptability studies on the six species *Spiraea* under weak light treatment and weak light dis-treatment environment[M. D. Dissertation]. Harbin：Northeast Agricultural University. (in Chinese)
樊　超. 2008. 6 种绣线菊对弱光及解除弱光环境的适应性研究[硕士论文]. 哈尔滨：东北农业大学.

Fetcher N，Strain B R，Oberbauer S F. 1983. Effects of light regime on the growth，leaf morphology，and water relations of seedings of two species of tropical trees. Oecologia，58 (3)：314 – 319.

Gammulla C G，Pascovici D，Atwell B J，Haynes P A. 2011. Differential proteomic response of rice（*Oryza sativa*）leaves exposed to high and low-temperature stress. Proteomics，11 (14)：2839 – 2850.

Hsiao T C. 1973. Plant response to water stress. Annual Review of Plant Physiology，24：519 – 570.

Hurry V M，Strand A，Tobiaeson M，Gardestrom P，Oquist G. 1995. Cold hardening of spring and winter wheat and rape results in differential effects on growth，carbon metabolism，and carbohydrate content. Plant Physiology，109 (2)：697 – 706.

Kwang Hyun，Daniel Z. 2003. Alteration of antioxidant enzyme gene expression during cold acclimation of near-isogenic wheat lines. Plant Science，165 (6)：1221 – 1227.

Liu Hui-min，Zhang Qian，Su Qing，Liu Ji-xuan，Che Dai-di. 2014. Studies on evaluation and screening of cold resistance during seedling stage in

eighteen species or varieties of *Spiraea*. Acta Horticulturae Sinica，41 (12)：2427 – 2436. (in Chinese)
刘慧民，仉　茜，苏　青，刘计璇，车代弟. 2014. 18 种绣线菊苗期抗寒性评价与筛选. 园艺学报，41 (12)：2427 – 2436.

Liu Hui-min，Yan Yong-qing，Che Yan-shuang，Feng Nan-nan，Zhang Chao，Fan Chao，Che Dai-di. 2009. Protein expression of two *Spiraea* species under effects of cold acclimation and de-acclimation. Chinese Journal Ecology，28 (7)：1330 – 1334. (in Chinese)
刘慧民，闫永庆，车艳双，冯楠楠，张　超，樊　超，车代弟. 2009. 两种绣线菊低温锻炼与脱锻炼处理对蛋白质表达的影响. 生态学杂志，28 (7)：1330 – 1334.

Laudenbach D F，Herbert S K，McDowell C，Fork D C，Grossmann A R，Strauss N A. 1990. Cytochrome e-553 is not required for photosynthetic activity in the *Cyanobacterium synechococcus*. Plant Cell，109 (2)：913 – 924.

Mei Yang，Li Hai-lan，Xie Jin，Luo Hong-yi. 2007. Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase（Rubisco）. Plant Physiology Communications，43 (2)：363 – 368. (in Chinese)
梅　杨，李海蓝，谢　晋，罗红艺. 2007. 核酮糖 – 1,5 – 二磷酸羧化酶/加氧酶（Rubisco）. 植物生理学通讯，43 (2)：363 – 368.

Mittler R. 2006. Abiotic stress the field environment and stress combination. Trends in Plant Science，11：15 – 19.

Ni Zhang-lin，Wei Jia-mian. 2003. The structure and catalytic mechanism of ATP synthase. Journal of Plant Physiology and Molecular Biology，29 (5)：367 – 374. (in Chinese)
倪张林，魏家绵. 2003. ATP 合酶的结构与催化机理. 植物生理与分子生物学报，29 (5)：367 – 374.

Nogueira F C S，Gonçalves E F，Jereissati E S，Santos M，Costa J H，Oliveira-Neto O B，Soares A A，Domont G B，Campos F A P. 2007. Proteome analysis of embryogenic cell suspensions of cowpea（*Vigna unguiculata*）. Plant Cell Reports，26：1333 – 1343.

Oraby H，Ransom C，Kravchenko A. 2005. Barley HVA1 gene confers salt tolerance in R3 transgenicoat. Crop Science，45：2218 – 2228.

Pang Jin-an，Ma De-hua，Huo Zhen-rong，Li Shu-ju. 2000. Effect of cold acclimation on photosynthesis of cucumber seedlings. Journal of Henan Agricultural University，34 (1)：40 – 42. (in Chinese)
庞金安，马德华，霍振荣，李淑菊. 2000. 低温锻炼对黄瓜幼苗光合作用的影响. 河南农业大学学报，34 (1)：40 – 42.

Renaut J，Lutts S，Hoffmann L，Hausman J F. 2004. Responses of poplar to chilling temperatures：Proteomic and physiological aspects. Plant Biology，6 (1)：81 – 90.

Sang Min，Qin Xiao-chun，Wang Wen-da，Chen Xiao-bo，Xie Jie，Li Liang-bi，Kuang Ting-yun. 2012. Singlet oxygen formation and scavenging in cytochrome b6-f complex from spinach. Journal of Biological Physiology，28 (10)：848 – 854. (in Chinese)
桑　敏，秦晓春，王文达，陈晓波，谢　杰，李良璧，匡廷云. 2012. 菠菜细胞色素 b6-f 复合体中单线态氧的产生和清除机制. 生物物理学报，28 (10)：848 – 854.

Somervill C R. 1986. Analysis of photosynthesis with mutants of higher plants and algae. Annual Review of Plant Physiology，37：467 – 507.

Strand A，Hurry V，Henkes S，Huner N，Gustafsson P，Gardestrom P，Gardestrom P，Stitt M. 1999. Acclimation of *Arabidopsis* leaves developing at low temperatures. Plant Physiology，119 (4)：1387 – 1397.

Wu Feng-zhang，Wang Bai-chen，Yang Chuan-ping. 2013. Proteomic analysis of chloroplast RNA-binding proteins in birch（*Betula platyphylla* Suk.）. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology，29 (2)：144 – 150.

Weiser C J. 1970. Cold resistance and injury in woody plants knowledge of hardy plant adaptations to freezing stress may help us to reduce winter damage. Science，169 (3952)：1269 – 1278.

Xi Jing-hui. 2007. Differentially expressed proteome under cold stress in *Arabidopsis thaliana*［Ph. D. Dissertation］. Changchun：Jilin University. (in Chinese)
席景会. 2007. 低温胁迫下拟南芥差异蛋白质组学研究［博士论文］. 长春：吉林大学.

Xia Qi-chang，Zeng Rong. 2004. Protein chemistry and proteomic. Beijing：Science Press：275 – 279. (in Chinese)
夏其昌，曾　嵘. 2004. 蛋白质化学与蛋白质组学. 北京：科学出版社：275 – 279.

Yan S P，Zhang Q Y，Tang Z C，Su W A，Sun W N. 2006. Comparative proteomic analysis provides new insights into chilling stress responses in rice. Molecular & Cellular Proteomics，5 (3)：484 – 496.

Yu Yong，Weng Jun，Xu Chun-he. 2001. Research progress of the structure and function of plant photosystem Ⅱ oxygen complex peripheral proteins. Journal of Plant Physiology，27 (6)：441 – 450. (in Chinese)
于　勇，翁　俊，徐春和. 2001. 植物光系统Ⅱ放氧复合体外周蛋白结构和功能的研究进展. 植物生理学报，27 (6)：441 – 450.