

doi: 10.3969/j.issn.0490-6756.2018.02.036

拟南芥 AtTR1 相互作用蛋白质筛选和鉴定

朱旭辉, 黄奎, 姚润东, 彭露, 裴林森, 刘志斌, 王健美

(四川大学生命科学学院生物资源与生态环境教育部重点实验室, 成都 610065)

摘要: 本研究利用酵母双杂交系统筛选与 E3 连接酶 AtTR1 存在相互作用的靶蛋白。首先, 根据 AtTR1 所含有的结构域, 我们对其进行了不同程度的截断以及点突变处理, 以验证其各个片段的自激活活性和毒性。最终我们选取 AtTR1- Δ 119 为诱饵蛋白对拟南芥归一化通用型 cDNA 文库进行筛选, 结果初步获得了 13 个与其有潜在互作的候选蛋白。经酵母正向和反向多次验证发现转化了 AtTR1 与 CURT1C 和 AtTR1 与 SWEET5 的酵母在三缺和四缺培养基中均正常生长, 而且在含有 X- α -gal 的培养基中出现蓝斑。双分子荧光互补技术也证明 AtTR1 与 CURT1C 或 SWEET5 之间也有相互作用。

关键词: 拟南芥; E3 连接酶 AtTR1; 酵母双杂交; 类囊体膜曲率相关蛋白 1C; 蔗糖转运蛋白 5
中图分类号: Q945 **文献标识码:** A **文章编号:** 0490-6756(2018)02-0419-06

Screening and validation of candidate proteins interacting with AtTR1 in *Arabidopsis thaliana*

ZHU Xu-Hui, HUANG Kui, YAO Run-Dong, PENG Lu, PEI Lin-Sen, LIU Zhi-Bin, WANG Jian-Mei
(Key Laboratory of Bio-Resources and Eco-Environment, Ministry of Education, College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610065, China)

Abstract: In this study, yeast two-hybrid system was used to screen the target protein that interacts with AtTR1, an E3 ligase. First of all, according to the domains of AtTR1, we truncated and mutated it to some extent and verified their self-activation activity and toxicity. Finally, we selected AtTR1- Δ 119 as the bait protein to screen *Arabidopsis thaliana* Normalized universal cDNA library. As a result, 13 candidate proteins with potential interactions were obtained. Multiple validation with forward and reverse two-hybrid system revealed that diploid yeast containing AtTR1 & CURT1C or AtTR1 & SWEET5 grew on SD/-Trp/-Leu/-His and SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade/X- α -gal minimal media and generated blue-colored product. BiFC technique also demonstrated that AtTR1 interacts with CURT1C or SWEET5. All this will lay a foundation for better understanding of its functions and molecular mechanism.

Keywords: *Arabidopsis thaliana*; E3 ligase AtTR1; Y2H; CURT1C; SWEET5

1 引言

本实验室之前从油菜中克隆到一个参与热胁迫应答并可提高植物热耐受性的基因, 简称为 *Bn-*

TR1 (Thermal Resistance 1)^[1], 在后续研究中发现其定位于细胞膜且在体外具有 E3 泛素连接酶活性^[2]。在油菜中, *BnTR1* 的过表达株系对热、盐、双氧水和甘露醇模拟干旱等逆境胁迫表现出很强

收稿日期: 2017-03-14

基金项目: 国家自然科学基金(31271758)

作者简介: 朱旭辉(1991-), 男, 山西吕梁人, 硕士研究生, 研究方向为遗传学. E-mail: 1366825496@qq.com

通讯作者: 王健美. E-mail: wangjianmei@scu.edu.cn

的抗性^[2],另外该株系还表现出一定的铀耐受性^[3].在烟草中,*BnTR1*的转基因株系也表现出对盐和干旱的抗性^[4].同样的,*BnTR1*的转基因的水稻不仅表现出对热的耐受性提高,而且产量也得到了提高^[5].研究证明拟南芥的 *AtTR1* 与钙离子信号通路高度关联,并且可对多个钙依赖性蛋白激酶进行泛素化修饰,另外该基因的表达受盐诱导^[5].

本研究的对象为 *AtTR1*,其与 *BnTR1* 的核苷酸序列相似性高达 86%,且氨基酸序列中都含有一个 C₄HC₃型的 RING 结构域.将 *AtTR1* 基因转入大肠杆菌之后,可以提高微生物的耐热性,这一功能与 *BnTR1* 相同.近年来,温室效应导致全球气温上升,植物的生长受到严重的影响,农作物的生产面临高温逆境的严重挑战.鉴于 *TR1* 所具有的耐热性,因此其在应用前景上非常的广阔.可不论是 *BnTR1* 还是 *AtTR1*,二者既不属于热激蛋白也不是热激转录因子,而是单因子耐热,因此在体内找到与 *AtTR1* 互作的蛋白,推断其参与的信号途径就显得格外重要.我们选用了 Clontech 的 MatchMaker 系列酵母双杂交系统,以拟南芥为模型,筛选拟南芥 cDNA 文库中与 *AtTR1* 互作的蛋白,希望能为植物抗逆机制的研究提供新的线索.

2 材料与方法

2.1 材料与试剂

克隆菌株 DH5 α 和用于烟草瞬时转化根癌农杆菌 GV3101 及相应的双分子载体 pSAT1-nEYFP-N1 和 pSAT1-cEYFP-N1 均为本实验室留存;拟南芥 cDNA 文库和酵母双杂交系统试剂盒购买自 Clontech 公司.

Taq DNA polymerase、PrimeSTAR Max DNA Polymerase、限制性内切酶和 T4 DNA 连接酶均购买于 TaKaRa 公司;同源重组试剂盒 CloneEZ;离心柱型 DNA 纯化回收试剂盒购买自天根生化科技(北京)有限公司;AureobasidinA (AbA)和 X- α -gal 及所有的酵母培养基购自 Clontech 公司.其余无机试剂均为分析纯产品.

2.2 实验方法

2.2.1 酵母双杂交(Y2H)及自激活验证 将目的基因克隆到 BD(pGBKT7)载体上后,转化酵母 AH109 菌株,涂布于缺色氨酸(SD/-Trp)的酵母固体培养基上,30 $^{\circ}$ C 培养 3d.待酵母长出后,挑取酵母单克隆于缺色氨酸的酵母液体培养基(SD/-Trp)中,30 $^{\circ}$ C,220r/min,振荡培养 12~16h.用移

液器量取 5 μ L 培养物滴在缺色氨酸缺组氨酸缺腺嘌呤(SD/-Trp/-His/-Ade)的三缺固体培养基上进行自激活检验,培养 3d 后如果没有长出菌落,说明该蛋白没有自激活活性.

将已克隆的含有目的片段的 AD(pGADT7)转化入上述已含有 BD 的菌株中,涂布于缺色氨酸缺亮氨酸(SD/-Trp/-Leu)两缺固体培养基上,30 $^{\circ}$ C 培养 3d 待酵母长出后,挑取单菌落于 SD/-Trp/-Leu 两缺液体培养基中,30 $^{\circ}$ C,220r/min,振荡培养 12h 后,用移液器移取 5 μ L 分别滴在 SD/-Trp/-Leu 两缺、SD/-Trp/-Leu/-His 三缺和 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade/X- α -gal 四缺固体培养基上培养 3d 后,照相记录. bait 载体为 pGBKT7, prey 载体为 pGADT7.

2.2.2 拟南芥酵母文库筛选的方法 挑选 2~3mm 大小的诱饵酵母单斑(BD-TR1- Δ 119)接种于 50mL SD/-Trp 液体培养基中,30 $^{\circ}$ C,250~270 r/min 过夜培养 16~20h,直到 OD₆₀₀ 达到 0.8,4 $^{\circ}$ C,然后 1000 \times g 离心 5 min,弃上清;接着用 4~5mL SD/-Trp 液体培养基重悬酵母细胞.室温融化 1mL 酵母文库和上一步所得诱饵酵母菌混合在 2 L 的锥形瓶中,加入 45mL 2 \times YPDA(含 50 μ g/mL Kana)液体培养基,并用 1mL 2 \times YPDA 清洗酵母文库的 EP 管,重复一次,将液体加入到锥形瓶,30 $^{\circ}$ C,30~50r/min 培养 20~24h.20h 后,吸取一滴培养液在显微镜 40 \times 条件下观察,如能观察结合子就继续下一步,如果观察不到结合子则继续培养 4h.收集细胞,4 $^{\circ}$ C,1000 \times g 离心 10 min,弃上清;与此同时,用 50mL 0.5 \times YPDA(含 50 μ g/mL Kana)液体培养基清洗 2L 锥形瓶 2 次将瓶壁上的细胞洗净并用清洗液重悬,再次收集细胞,4 $^{\circ}$ C,1000 \times g 离心 10 min.用 10mL 0.5 \times YPDA(含 50 μ g/mL Kana)液体培养基重悬细胞.将重悬液涂布于 SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade 平板(约 60 个,每个平板涂布 150 μ L),30 $^{\circ}$ C,培养 5~7d.

2.2.3 酵母菌落 PCR 方法 挑选 2~3mm 大小的酵母菌斑于含 20 μ L 0.02% SDS 的 1.5mL 离心管中,涡旋 30s,加入 180 μ L ddH₂O 吹打混匀,12000r/min,瞬时离心 15s,吸取上清液 2 μ L 作为 PCR 模板(20 μ L 体系).

2.2.4 双分子荧光互补(BiFC) 将需要转化的质粒转入农杆菌 GV3101,然后振荡培养至 OD₆₀₀ = 1.0~1.2,3000 r/min 离心 30 min 收集菌体,用 LM 缓冲液(10 mM 氯化镁,10 mM MES,200 μ M

乙酰丁香酮)重悬至 $OD_{600} = 0.4 \sim 0.6$, p19 的 $OD_{600} = 0.8 \sim 1.0$, 用注射器对 4 周大烟草叶片的下表皮进行注射, 使菌液充满整个叶片, 黑暗放置过夜后正常培养 3d 后用激光共聚焦显微镜观察。

3 研究结果

3.1 AtTR1 的生物信息学分析及诱饵蛋白的自激活性检测

通过 SMART (Simple modular architecture research tool) 网站和在线预测软件 TMHMM 对 AtTR1 蛋白的保守结构域进行了分析^[6,7], 结果表明在 AtTR1 蛋白的 N 端含有一个 C₄ HC₃ 型 RING 结构域, C 端有两个跨膜结构域, 一个在 220~240 之间, 另一个在 180~200 之间(图 1 A)。图 1A 所示的 TR1- Δ 119 表示把 TR1 截短到第 119 位氨基酸处; TR1- Δ 181 表示把 TR1 截短到第 181 位氨基酸处; TR1- Δ 181(PM) 表示把 TR1 截短到第 181 位氨基酸处并把第 98 位的半胱氨酸图

变成丙氨酸; TR1- Δ 181(DM) 表示把 TR1 截短到第 181 位氨基酸处并把第 98 位的半胱氨酸突变成丙氨酸, 第 95 位的组氨酸突变成酪氨酸; TR1-FL 表示 TR1 全长; TR1-FL(PM) 表示把全长 TR1 的第 98 位的半胱氨酸突变成丙氨酸。

将相应的 AtTR1 片段克隆到 BD(pGBKT7) 载体上后, 在三缺的固体培养基上进行自激活检验, 正对照为 AD-T/BD-53, 负对照为 AD-T/BD-Lam。结果显示存在自激活的片段有 TR1- Δ 181、TR1- Δ 181(PM) 和 TR1- Δ 181(DM)(图 1 B); 没有自激活的片段有 TR1- Δ 119、TR1-FL 和 TR1-FL(PM)。这可能因为截断导致 AtTR1 的空间结构发生变化, 具有了转录激活活性。再者 Clontech 的 MatchMaker 系列酵母双杂交系统是基于酵母转录因子 GAL4, 所以该系统适合筛选定位在细胞质和细胞核中的蛋白, 而 AtTR1 含有两个跨膜结构域, 是一个膜定位的蛋白质, 所以我们最终采用 TR1- Δ 119 进行文库筛选。

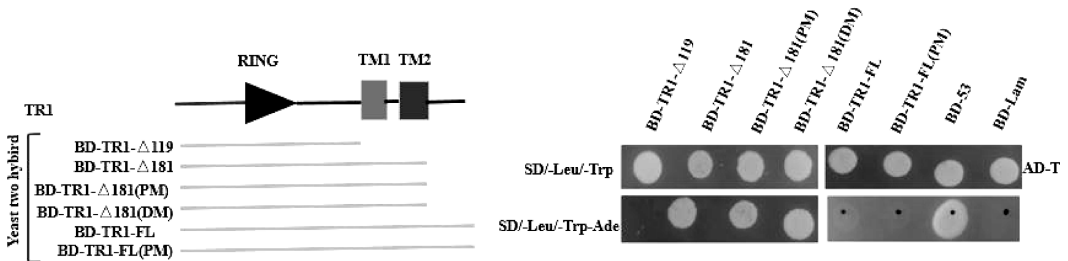


图 1 AtTR1 的自激活验证

A. 用于酵母双杂交筛选中的 AtTR1 截短片段的示意图 B. AtTR1 截断片段自激活验证的结果 SD/-Trp 表示缺少氨基酸(Trp)的培养基; SD/-Leu/-His/-Ade 表示缺少亮氨酸(Leu)、组氨酸(His)和腺嘌呤(Ade)的培养基

Fig. 1 Test TR1 for autoactivation

A. Schematic representation of TR1 deletion constructs used in yeast two-hybrid screens B. The result of TR1 deletion constructs autoactivation SD/-Leu/-Trp stands for synthetic defined (SD) medium lacking leucine (Leu) and tryptophan (Trp); SD/-Leu/-Trp/-His stands for synthetic defined (SD) medium lacking leucine (Leu), tryptophan (Trp) and Adenine (Ade)

3.2 PCR 扩增、测序及序列比对

将 pGBKT7-TR1- Δ 119 酵母转化菌与拟南芥 cDNA 文库杂交后, 涂布四缺培养基(平板直径 150mm)上, 30℃, 培养 5~7d。挑取长势较好的单菌落, 再次转接到含 AbA 的四缺培养基上验证。用 Taq DNA polymerase 对平板上的阳性克隆进行菌液 PCR 检测。图 2 所示的是部分酵母阳性克隆菌落 PCR 扩增结果, 扩增出来的条带, 即表示阳性克隆中 prey 载体的插入片段。将 PCR 产物送成都擎科生物科技有限公司测序分析, 测序结果通过 NCBI 中的 Genbank 进行 blast 分析, blast 结果见表 1, 大致将结果可分成酶、分子伴侣蛋白、转运蛋

白、转录因子及后续进一步研究的 CURT1C 和 SWEET5 等。

3.3 Y2H 验证 AtTR1 与 CURT1C 或 SWEET5 的相互作用

将构建好的 pGADT7-TR1 别于与 pGBKT7-CURT1C、pGBKT7-SWEET5 共转化至 AH109 后, 涂布于二缺的固体培养基上, 30℃ 培养 3d, 待酵母长出后, 挑取单菌落在二缺液体培养基中 30℃ 220 r/min 振荡培养 12 h, 移取 5 μ L 分别滴在二缺、三缺和含 40 μ g/mL X- α -gal 的四缺固体培养基上, 30℃ 培养 3d。在二缺、三缺和四缺平板上均正常生长, 且在四缺培养基中出现蓝斑(图 3),

说明 AtTR1 与 CUR1C 或 SWEET5 存在相互作用. AD-T/BD-53 为正对照, AD-T/BD-Lam 为负对照.

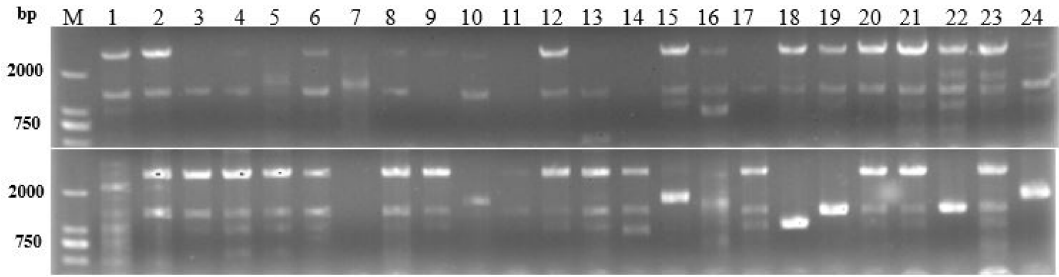


图 2 PCR 产物凝胶电泳检测
M 表示 DNAMarker(DL2000);1-24 是 PCR 产物
Fig. 2 Gel electrophoresis of PCR product.
M: DNA molecular weight marker (DL 2000);1-24:PCR products

表 1 AtTR1 互作蛋白基本信息总结

Tab. 1 Summary of AtTR1 candidate interacting protein basic information

基因编号	名称	功能注释
AT4G25150	HAD superfamily, subfamily IIIB acid phosphatase	酸性磷酸酶活性
AT2G37940	ATIPCS2	肌醇磷脂酰神经酰胺合成酶 2
AT3G14080	LSM1B, SM-LIKE 1B	小核糖核蛋白
AT5G28540	BIP1	结合蛋白(BiP)是一类重要的分子伴侣
AT1G52220	CURT1C	参与类囊体膜的折叠
AT5G61250	ATGUS1	糖苷水解酶
AT1G76440	HSP20-like chaperones superfamily protein	像伴侣蛋白超家族蛋白 HSP20
AT5G62850	ATSWEET5	蔗糖外排转运蛋白家族蛋白
AT1G71960	ABCG25(ATP-binding cassette, ABC)	转运蛋白家族,是目前发现的最大的蛋白家族之一
AT5G61580	PFK4	磷酸果糖激酶 4
AT5G42020	BIP2	结合蛋白(BiP)是一类重要的分子伴侣
AT1G50700	CPK33	植物特有的一类依赖钙激活的蛋白激酶
AT5G15130	ATWRKY72	WRKY 转录调控因子家族

3.4 BiFC 验证 AtTR1 与 CURT1C 或 SWEET5 的相互作用

将构建好的 pSAT1-nEYFP-TR1 分别与 pSAT1-cEYFP-CUR1C 和 pSAT1-cEYFP-SWEET5 共同瞬时转化烟草叶肉细胞,48h 后,在 515nm 黄光激发光、100×物镜激光共聚焦显微镜下观察荧光(黄色)信号,同时设置 pSAT1-nEYFP-MOB1 与 pSAT1-cEYFP-SIK1 为阳性对照, pSAT1-nEYFP-TR1 与 pSAT1-cEYFP、pSAT1-cEYFP-CUR1C 与 pSAT1-nEYFP 和 pSAT1-cEYFP-SWEET5 与 pSAT1-nEYFP 为阴性对照.在激光共聚焦显微镜下检测到黄色荧光信号,表明 AtTR1 与 CURT1C 或 SWEET5 存在相互作用,但信号强度略弱于阳性对照(图 4A 和 B),而且可以观察到它们的相互作用是定位于细胞膜.

4 讨论

泛素化系统的分子识别和特异性是由 E3 RING 决定,细胞内许多蛋白质均可被泛素化途径识别和修饰,包括细胞表面受体、信号转导蛋白、转录因子和参与细胞分裂的蛋白等,因此泛素化途径可参与到细胞信号传导、细胞周期、应激反应、细胞分化和植物耐受非生物胁迫等的调节过程中.泛素化系统调节这些过程的普遍机制是通过 26S 蛋白酶体途径调节泛素化底物的水平来调节相应的细胞过程^[8]. AtR1 含有 RING 锌指结构域,是一个 C₄HC₃型锌指蛋白,在体外具有 E3 泛素酶活性.因此,找到 AtR1 的底物蛋白就变得很关键.

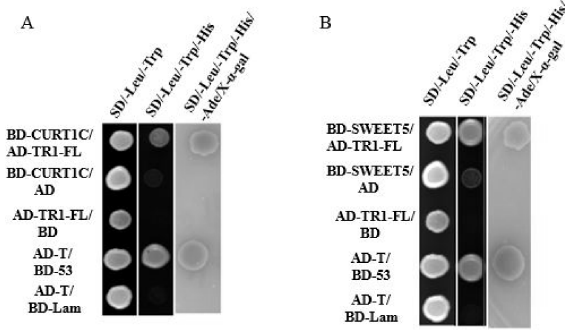


图 3 TR1 与 CURT1C 或 SWEET5 酵母双杂交分析
SD/-Leu/-Trp 表示缺少亮氨酸 (Leu) 和色氨酸 (Trp) 的培养基, SD/-Leu/-Trp/-His 表示缺少亮氨酸 (Leu)、色氨酸 (Trp) 和组氨酸 (His) 的培养基, SD /-Leu/-Trp/-His/-Ade/ X-αgal 表示缺少亮氨酸 (Leu)、色氨酸 (Trp)、组氨酸 (His) 和腺嘌呤 (Ade) 但是包含有 X-αgal 的培养基
Fig. 3 Y2H results show that TR1 interacts with CURT1C and SWEET5

SD/-Leu/-Trp stands for synthetic defined (SD) medium lacking leucine (Leu) and tryptophan (Trp); SD/-Leu/-Trp/-His stands for synthetic defined (SD) medium lacking leucine (Leu), tryptophan (Trp) and histidine (His); SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade/X-αgal stands for synthetic defined (SD) medium lacking leucine (Leu), tryptophan (Trp), histidine (His) and Adenine (Ade), but containing X-αgal

SWEET (sugars will eventually be exported transporters) 是近几年通过荧光共振能量转移传感器手段新鉴定得到的一类参与葡萄糖、蔗糖, 以及其他糖类运输蛋白质^[9]. SWEET 包括 7 次跨膜 α 螺旋, 两个重复的跨膜结构域; 并具有低亲和性双向运输的特点, 而且对能量和 pH 值不产生依赖^[10-12]. SWEET 广泛存在于真核生物中, 包括单核生物、高等植物和动物等. 最近研究发现, 在原核生物中存在 SemiSWEET 蛋白, 它是 SWEET 的同源蛋白, 并且具有相似的功能^[13]. 除了参与糖转运以外, 研究还发现在冷环境胁迫下, 拟南芥中 *AtSWEET15* 基因会发生上调表达; 在干旱和高盐的逆境胁迫时, 该基因也可以被诱导表达^[14]. Klemens 等人发现定位于液泡膜上的 *AtSWEET16* 和 *AtSWEET17* 基因作为同系物, 共同参与逆境胁迫^[15]. Bauer 等人的研究发现, 在干旱条件下, *SWEET5* 在叶片保卫细胞中的表达量增加了 2~6 倍, 说明 *SWEET5* 可能是直接参与糖作为渗透调节物质运输的过程, 或者是作为相对湿度信号机制的一部分参与细胞壁的装载^[16].

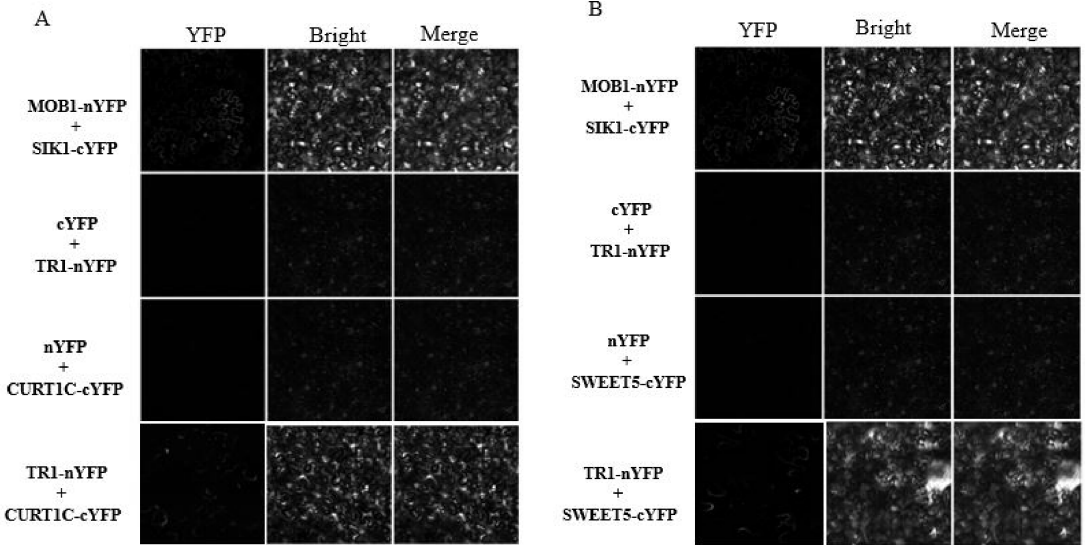


图 4 AtTR1 与 CURT1C 或 SWEET5 双分子荧光互补分析
Fig. 4 BiFC results showing that AtTR1 interacts with CURT1C and SWEET5

高等植物及一些绿藻的叶绿体最显著的一个特征就是类囊体膜分化为基粒膜区和基质膜区. 基粒是指叶绿体中紧密垛叠的类囊体部分, 与基粒相连的非垛叠的膜为基质类囊体. 基粒膜和基质膜互相连接形成一个连续的膜系统. 植物在长期进化中形成基粒很可能有利于光合作用的进行, 如光能捕获、能量转换、电子传递等, 但是这些过程又都受垛

叠区与非垛叠区比例的影响^[17]. 一般认为, 基粒的重要功能之一, 是它对激发能分配的调控. Ute Armbruster 等人证明 CURT1 (CURVATURE THYLAKOID1) A, B, C, and D 通过 CURT1 蛋白表达量的多少控制类囊体片层边缘处的曲率以此来影响类囊体结构的建成^[18].

我们已证明 AtTR1 可以和 CURT1C 或

SWEET5 直接相互作用,而 AtTR1 作为一个 E3 泛素连接酶,又可参与泛素蛋白酶体途径-蛋白降解的一种重要途径,能选择性地降解细胞内多种具有生物活性的蛋白质.例如已有研究报道,在干旱胁迫时,植物叶片保卫细胞中 SWEET5 基因表达量增加. AtTR1 与 SWEET5 存在相互作用,那么 AtTR1 是否会通过单泛素化修饰 SWEET5,还是多泛素化降解 SWEET5? 这些仅仅是我们的猜测,因此接下来我们将通过体外泛素化、体外降解实验和体内泛素化和体内降解实验以及 *curt1c* 和 *sweet5* 两个突变体的表型研究等,来验证这种猜想.

参考文献:

- [1] 许发伦,刘志斌,杨远友,等. (45)Ca 示踪技术对转基因油菜耐热机理的研究[A]//中国核科学技术进展报告(第二卷)——中国核学会 2011 年学术年会论文集第 4 册(核材料分卷、同位素分离分卷、核化学与放射化学分卷)[C]. 2011.
- [2] 陈彩丽,曹昊昊,樊莉娟,等. 过量表达 BnTR1 的油菜对多种逆境的综合抗性分析[J]. 四川大学学报:自然科学版,2017,54: 215.
- [3] Zha Z, Wang D, Hong W, *et al.* Influence of Europium speciation on its accumulation in Brassicanapus and over-expressing BnTR1 lines[J]. J Radioanal Nucl Chem, 2014, 301: 257.
- [4] 曹昊昊,王中浩,范智勇,等. 转 BnTR1 基因的烟草对多种逆境胁迫的抗性研究[J]. 四川大学学报:自然科学版,2016,53: 453.
- [5] 樊莉娟,陈彩丽,朱旭辉,等. 拟南芥 AtTR1 对 AtCPK28 和 AtCPK32 的体外泛素化修饰研究[J]. 四川大学学报:自然科学版,2017,54: 617.
- [6] Bork P, Schultz R, Milpetz F, *et al.* SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains[J]. P Natl Acad Sci, 1998, 95: 5857.
- [7] Letunic I, Doerks T, Bork P. SMART: recent updates, new developments and status in 2015[J]. Nucleic Acids Res, 2015, 43: D257.
- [8] Borden K L. RING domains: master builders of molecular scaffolds[J]. J Mol Biol, 2000, 295(5): 1103.
- [9] Lq C, Bh H, S L, *et al.* Sugar transporters for intercellular exchange and nutrition of pathogens. Nature[J]. Nature, 2010, 468: 527.
- [10] 刘畅,姜晶,韩晓雪,等. 植物中 SWEET 基因家族研究进展[J]. 植物生理学报,2014,50: 1367.
- [11] 玄元虎,朱毅勇,胡一兵. SWEET 蛋白家族研究进展[J]. 中国科学:生命科学,2014,44: 676.
- [12] 何佳,黄学勇,关跃峰,等. 拟南芥 MtN3/saliva 基因家族分析[J]. 上海师范大学学报:自然科学版,2010,39: 290.
- [13] Xuan Y H, Hu Y B, Chen L Q, *et al.* Functional role of oligomerization for bacterial and plant SWEET sugar transporter family[J]. P Natl Acad Sci, 2013, 110: 3685.
- [14] He F, Kang J Q, Zhou X, *et al.* Variation at the transcriptional level among Chinese natural populations of *Arabidopsis thaliana* in response to cold stress[J]. Science Bulletin, 2008, 53: 2989.
- [15] Klemens P A, Patzke K, Deitmer J, *et al.* Overexpression of the vacuolar sugar carrier AtSWEET16 modifies germination, growth, and stress tolerance in Arabidopsis [J]. Plant Physiol, 2013, 163(3): 1338.
- [16] Bauer H, Ache P, Wohlfart F, *et al.* How do stomata sense reductions in atmospheric relative humidity [J]. Mol Plant, 2013, 6: 1703.
- [17] 陈晓英,姜闯道,邹琦,等. 类囊体的空间结构及其对激发能分配的调控[J]. 植物生理学报,2002,38: 307.
- [18] Armbruster U, Labs M, Pribil M, *et al.* Arabidopsis CURVATURE THYLAKOID1 proteins modify thylakoid architecture by inducing membrane curvature[J]. Plant Cell, 2013, 25: 2661.