

基于 label-free 技术的青杨 3 个叶位叶片 比较蛋白质组学分析

王 溢

广东省农业科学院蚕业与农产品加工研究所, 广州 510610

摘要 为了研究青杨不同叶位叶片蛋白质组的表达变化规律和青杨叶片衰老的蛋白质组学机制, 采用非标记蛋白质组学(label-free)方法对杂交青杨子代 3 个叶位叶片蛋白质组变化进行了分析。结果表明: 3 个不同叶位叶片共检测到 111 个差异表达蛋白质, 其中 55% 的差异蛋白质仅在 25 叶位与 5 叶位的比较中差异显著; 差异表达蛋白质功能分析表明, 青杨叶片成熟到衰老过程中与光合作用、生长发育相关蛋白在 10 和 25 叶位多呈现下调表达, 逆境反应、营养分解转运相关蛋白在 10 和 25 叶位多上调表达, 而一些转录翻译与修饰调控相关蛋白质则主要呈现波动趋势; 青杨 3 个叶位中, 10 叶位光合作用和物质合成比 5 叶位活跃, 25 叶位叶片由于衰老营养物质分解转运加强, 物质合成减弱。蛋白质是细胞功能执行者, 可见, 青杨叶片成熟到衰老是受蛋白质表达变化有序调控的过程。

关键词 青杨; 叶位; 蛋白质组; label-free; 衰老

中图分类号 S 792.112 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2019)04-0008-12

叶片从成熟到衰老的过程伴随着叶绿体数量、活性物质成分含量以及酶类活性等生命活动的有序变化^[1-2]。成熟叶片是植物重要的源器官, 为植物的生长发育提供养分^[3]。衰老的植物叶片细胞中的代谢产物和营养物质等经过高度有序的去组装和降解过程, 营养物质又会重新运输到幼叶、幼芽或其他器官中被利用^[4]。有研究指出, 衰老叶片中会发生光合相关蛋白的降解、光合能力下降和叶绿素分解等过程^[5]。然而, 木本植物不同叶位叶片是如何调控叶片成熟到衰老这一过程的, 相关研究还需进一步拓展。

青杨(*Populus*)是我国重要的造林树种, 中国拥有丰富的乡土青杨派基因资源^[6]。对青杨的研究发现: 青杨叶肉细胞内, 随叶位的增加, 叶绿体数量增加, 10 叶位叶片后基本维持不变, 同时对不同叶位叶片进行叶绿体超微结构观测发现, 青杨杂种二倍体 15 叶位以后的叶片中基质片层散乱, 开始出现叶绿体结构解体现象; 25 叶位叶片上, 青杨杂种二倍体嗜饿颗粒大面积出现, 叶绿体结构散乱, 基质片层解体严重^[7-8]。蛋白质是植物生命活动的体现者, 研究不同叶位的差异蛋白质组有助于揭示叶片衰老的遗传调控过程^[9-10]。

蛋白质组是指在不同环境下、不同的发育时期, 某个生物个体或组织细胞表达的所有蛋白质^[11-12]。对穗期水稻功能叶片的研究表明, 随叶位逐渐上升, 光合作用通路的关键蛋白质表达量呈现出逐渐上调的特点; 与此同时, 参与呼吸代谢途径与能量代谢相关蛋白质也表现出相同的趋势, 从而随着叶位上升而积累, 有利于植株生成更多能量和中间代谢产物用于新物质合成, 促进新生器官与组织的生长发育^[3]。Chen 等^[13]通过对 1~4 叶位玉米叶片的蛋白质组学分析, 发现 167 个差异蛋白质中, 53 个与光合作用有关, 并且 48% 的差异蛋白位于叶绿体。目前植物叶片衰老相关的蛋白质组学研究主要集中在禾本科植物, 对木本植物的研究相对较少。本研究以‘哲引 3 号杨’(母本)与‘北京杨’(父本)杂交产生的青杨杂种 F1 代为材料, 采用 label-free 方法, 研究青杨杂种 F1 代中 3 个叶位间的蛋白质组差异, 以期阐明青杨叶片蛋白质组的表达变化规律和青杨叶片衰老的蛋白质组学机制。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本试验所用植物材料由‘哲引 3 号杨’(母本)和

‘北京杨’(父本)通过杂交获得,分别剪成 15 cm 左右的插条,扦插于规格一致的塑料盆中(上口直径 23 cm,下口径 18 cm,盆深 25 cm)。育苗基质为沙土、有机质、蛭石的混合物,质量比为 2:2:1,每盆用土质量一致。于 2015 年 8 月,在 1 年生杂种 F1 代中选取长势一致的 3 株作为试验材料,作为 3 次生物学重复;每株从顶部往下数(图 1),采集完全舒展的第 5、10、25 叶位叶片放入液氮中速冻,分别标记为 2N-H5、2N-H10 和 2N-H25,储存于 -80°C 超低温冰箱。



图 1 青杨叶片采样示意图

Fig.1 Schematic diagram of sampling *Populus* leaves

1.2 蛋白提取

每个样品称取 1 g 叶片,采用三氯乙酸-丙酮法独立提取 9 个样品总蛋白,蛋白质提取参考谢进等^[14]和王溢等^[15]的方法。提取的蛋白质浓度参照 Bradford 法^[16]测定。

1.3 叶片蛋白质样品酶解

在 200 μg 蛋白质样品中加入 DTT,使最终混合溶液中 DTT 浓度为 100 mmol/L。100 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 5 min。冷却后,混入 200 μL UA 缓冲液[8 mol/L 尿素,150 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0)]。混合样品转移至 30 ku 超滤离心管,11 000 r/min 离心 20 min。混入 200 μL UA 重复离心,去滤液;加入 100 μL 含有 50 mmol/L IAA 的 UA 缓冲液,振荡 1 min。室温黑暗条件下反应 30 min,随后 11 000 r/min 离心 20 min,重复此步骤 2 次。加 100 μL 碳酸氢铵缓冲液,11 000 r/min 离心 20 min,重复此操作 2 次。加入 40 μL 胰酶缓冲液,充分振荡,并在 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育 16~18 h。用新的无菌收集管离心(11 000 r/min,20 min)后收集滤液,酶解后的滤液经脱盐处理,进行 OD_{280} 定量。

1.4 LC-MS/MS 分析

根据定量后的酶解产物浓度,从各样品酶解产

物中取 2 μg 进行上样。样品酶解产物通过毛细管高效液相色谱分离。分离梯度如下:0~100 min,B 液线性梯度从 0% 到 45%;100~108 min,B 液线性梯度从 45% 到 100%;108~120 min,B 液维持在 100%。实验采用 Q-Exactive 质谱仪(Thermo Finnigan)进行质谱分析。

1.5 Maxquant 非标记分析

将青杨蛋白样品 LC-MS/MS 原始数据导入 Maxquant 软件(版本号 1.3.0.5)进行数据库搜索,对各组原始数据进行鉴定和相对表达量的比较。本研究所采用的数据库为 *populus_173773_20160518.fasta*。

1.6 差异蛋白筛选及生物信息学分析

以第 5 叶位为对照,将青杨 10、25 叶位的质谱非标记定量强度与第 5 叶位比较,以 3 次生物学重复的平均值作为蛋白表达的差异倍率,青杨 10、25 叶位与 5 叶位差异蛋白筛选的条件为 P 值小于 0.05、上下调差异倍数 1.5 倍以上,如果上下调差异倍数小于 1.5 则认为该蛋白质表达量无差异。采用 GO 数据库(<http://www.geneontology.org/>)和 KEGG 通路数据库(<http://www.genome.ad.jp/kegg/>)对差异蛋白进行 GO 功能注释和参与的代谢通路分析,获得差异蛋白质的生物功能、参与的生物过程以及细胞定位等信息。

2 结果与分析

2.1 基于 label-free 方法的差异蛋白筛选

在本研究中,鉴定出的总蛋白数为 2 476 个,青杨 10、25 叶位与 5 叶位相比差异蛋白数为 111 个(表 1),其中 10 叶位与 5 叶位的差异蛋白数为 50 个,而 25 叶位与 5 叶位相比差异表达蛋白数为 93 个(如图 2)。值得关注的是,这些差异蛋白中有 61

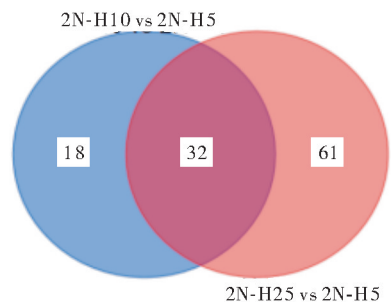


图 2 差异蛋白质维恩图分析

Fig.2 Venn diagrams of differentially expressed proteins

表 1 Label-free 方法鉴定出的 111 个差异表达蛋白

Table 1 111 differentially expressed proteins identified by label-free

登录号 Accession number	蛋白质名称 Protein name	覆盖率/% Sequence coverage	分子质量/kDa Molecular mass		差异倍数 Fold change		P
			2N-H10/ 2N-H5	2N-H25/ 2N-H5			
gi 118481113	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, partial, <i>Populus tremula</i>	81.5	37.123	—	2.28	0.009	
gi 743874667	Uncharacterized aa7F domain-containing protein kinase At1g79600, chloroplastic, <i>Populus euphratica</i>	16.8	78.459	—	2.31	0.001	
gi 743915179	1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase, chloroplastic, <i>Populus euphratica</i>	31.1	51.472	—	0.48	0.017	
gi 743924118	20 ku chaperonin, chloroplastic-like, <i>Populus euphratica</i>	51.6	27.003	0.64	—	0.036	
gi 222854477	26S proteasome subunit 7 family protein, <i>Populus trichocarpa</i>	36.6	47.973	—	0.64	0.037	
gi 222860402	2-Oxoacid dehydrogenase family protein, <i>Populus trichocarpa</i>	28.5	50.721	—	1.87	0.042	
gi 743898559	33 ku ribonucleoprotein, chloroplastic-like, <i>Populus euphratica</i>	15.0	35.666	0.52	—	0.007	
gi 743853841	3-Oxoacyl-[acyl-carrier-protein] reductase 4, <i>Populus euphratica</i>	22.1	33.903	0.31	—	0.045	
gi 118484818	40S ribosomal protein S20, <i>Populus trichocarpa</i>	49.6	13.682	—	0.53	0.002	
gi 118481301	40S ribosomal protein SA, <i>Populus trichocarpa</i>	37.5	34.049	—	0.59	0.027	
gi 550336953	50S ribosomal protein L4, chloroplastic isoform X1, <i>Populus euphratica</i>	34.1	32.086	0.59	0.26	0.014	
gi 743792282	5-Methyltetrahydropteroyltriglutamate-homocysteine methyltransferase-like, <i>Populus euphratica</i>	45.8	89.984	—	0.49	0.036	
gi 550341459	5-Methyltetrahydropteroyltriglutamate-homocysteine methyltransferase-like, <i>Populus euphratica</i>	48.2	90.422	—	0.51	0.040	
gi 118482762	60S ribosomal protein L17-2, <i>Populus euphratica</i>	31.5	20.231	—	0.36	0.014	
gi 550310422	6a-Hydroxymaackiain methyltransferase family protein, <i>Populus trichocarpa</i>	34.0	36.383	1.88	—	0.021	
gi 550338570	Actin cytoskeleton-regulatory complex protein PAN1, <i>Populus euphratica</i>	4.7	133.610	—	1.83	0.022	
gi 118484146	Acyl carrier protein 1, <i>Populus trichocarpa</i>	10.9	14.459	0.38	0.33	0.049	
gi 550328863	Acylpyruvase FAHD1, mitochondrial, <i>Populus euphratica</i>	11.3	29.784	0.42	—	0.014	
gi 550341447	Adaptin family protein, <i>Populus trichocarpa</i>	10.2	112.710	1.66	—	0.043	
gi 222861467	Adenine phosphoribosyltransferase 1 family protein, <i>Populus trichocarpa</i>	20.0	28.146	—	1.61	0.002	
gi 743906612	Aspartic proteinase A1-like, <i>Populus euphratica</i>	42.9	56.234	—	2.81	0.023	
gi 550326763	Aspartyl aminopeptidase family protein, <i>Populus trichocarpa</i>	33.5	53.600	—	2.35	0.041	
gi 109945524	ATP synthase beta subunit (chloroplast), <i>Populus alba</i>	93.0	53.623	—	1.54	0.040	
gi 743934388	Chlorophyll a/b binding protein of LHClI type 1-like, <i>Populus euphratica</i>	58.3	28.077	0.47	—	0.020	
gi 118489712	Chloroplast light-harvesting complex II protein, partial, <i>Populus tremula</i>	63.4	24.379	—	1.83	0.049	
gi 550339988	Chromoplast-specific carotenoid-associated protein CHRC, <i>Populus trichocarpa</i>	53.8	36.059	—	2.19	0.019	
gi 550348021	Citrate synthase family protein, <i>Populus trichocarpa</i>	49.0	53.506	—	2.56	0.032	
gi 550336650	Clustered mitochondria protein homolog, <i>Populus euphratica</i>	11.8	203.460	1.60	0.44	0.004	
gi 222858686	Coatmer alpha subunit-like family protein, <i>Populus trichocarpa</i>	24.8	136.900	1.67	0.64	0.030	
gi 550319222	DegP protease family protein, <i>Populus trichocarpa</i>	8.3	124.470	—	0.34	0.028	
gi 743924555	Dynammin-related protein 3A-like isoform X1, <i>Populus euphratica</i>	12.5	91.646	—	0.66	0.042	
gi 743905791	Endochitinase 2-like, <i>Populus euphratica</i>	48.9	34.275	0.60	2.89	0.019	
gi 222843676	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit C-like, <i>Populus euphratica</i>	19.0	102.960	—	0.55	0.049	
gi 743811650	Ferritin, chloroplastic-like, <i>Populus euphratica</i>	29.5	29.085	0.37	0.24	0.009	
gi 118483009	Gamma-tonoplast intrinsic protein 2, <i>Populus trichocarpa</i>	6.7	26.139	—	2.99	0.001	
gi 550322278	Germin-like protein subfamily T member 2, <i>Populus euphratica</i>	29.1	23.501	0.50	1.81	0.007	
gi 222867201	Glutathione S-transferase U8-like, <i>Populus euphratica</i>	36.0	25.965	0.22	—	0.024	
gi 222859201	GTP-binding protein beta chain, <i>Populus trichocarpa</i>	47.0	36.045	—	0.55	0.017	

续表 1 Continued Table 1

Accession number	登录号	蛋白质名称 Protein name	覆盖率/% Sequence coverage	分子质量/kDa Molecular mass		差异倍数 Fold change		P
				2N-H10/ 2N-H5	2N-H25/ 2N-H5			
gi 222851303		H ⁺ -transporting two-sector ATPase family protein, <i>Populus trichocarpa</i>	66.5	59.969	0.33	—	0.029	
gi 743924977		Heme-binding-like protein At3g10130, chloroplastic isoform X2, <i>Populus euphratica</i>	10.0	34.190	1.66	2.67	0.018	
gi 743888841		HEV1.2 family protein, <i>Populus trichocarpa</i>	23.5	22.043	0.31	1.70	0.030	
gi 222861628		Hydroxyproline-rich glycoprotein, <i>Populus trichocarpa</i>	42.9	45.779	—	1.73	0.043	
gi 550346298		Hypothetical protein POPTR_0001s02300g, <i>Populus trichocarpa</i>	15.3	44.375	1.93	2.33	0.006	
gi 222845278		Hypothetical protein POPTR_0001s09660g, <i>Populus trichocarpa</i>	14.9	100.240	—	0.65	0.005	
gi 550343163		Hypothetical protein POPTR_0003s14580g, <i>Populus trichocarpa</i>	34.0	42.393	1.87	—	0.003	
gi 118489288		Hypothetical protein POPTR_0006s14270g, partial, <i>Populus trichocarpa</i>	19.6	30.515	2.78	—	0.042	
gi 550336970		Hypothetical protein POPTR_0006s24090g, <i>Populus trichocarpa</i>	28.9	98.241	—	1.62	0.005	
gi 550332366		Hypothetical protein POPTR_0008s03690g, <i>Populus trichocarpa</i>	14.7	44.310	—	2.31	0.018	
gi 118481677		Hypothetical protein POPTR_0009s11920g, <i>Populus trichocarpa</i>	50.0	16.996	0.57	0.31	0.031	
gi 222864836		Hypothetical protein POPTR_0010s10330g, <i>Populus trichocarpa</i>	6.0	22.015	—	2.72	0.024	
gi 118489706		Hypothetical protein POPTR_0015s07630g, <i>Populus trichocarpa</i>	16.8	20.600	—	1.94	0.026	
gi 550318417		Hypothetical protein POPTR_0018s09780g, <i>Populus trichocarpa</i>	14.8	67.383	0.52	—	0.022	
gi 550316734		Hypothetical protein POPTR_0019s04040g, <i>Populus trichocarpa</i>	22.0	32.838	—	3.26	0.037	
gi 550317061		Hypothetical protein POPTR_0019s08950g, <i>Populus trichocarpa</i>	27.5	67.934	—	2.54	0.001	
gi 550317356		Hypothetical protein POPTR_0019s12380g, <i>Populus trichocarpa</i>	44.0	29.428	0.38	0.63	0.038	
gi 550326953		Inositol monophosphatase family protein, <i>Populus trichocarpa</i>	33.5	40.803	—	1.61	0.003	
gi 550339354		Long chain acyl-CoA synthetase 9, chloroplastic-like, <i>Populus euphratica</i>	17.8	76.079	—	0.39	0.003	
gi 743892504		Low quality protein: uncharacterized protein LOC105136146, <i>Populus euphratica</i>	11.4	58.580	—	0.19	0.040	
gi 550347864		Lysosomal Pro-X carboxypeptidase-like isoform X1, <i>Populus euphratica</i>	10.6	58.412	—	1.72	0.030	
gi 743896090		Magnesium-protoporphyrin IX monomethyl ester, oxidative cyclase, chloroplastic-like isoform X1, <i>Populus euphratica</i>	35.8	47.303	—	2.31	0.000	
gi 109676310		Mago nashi-like protein, <i>Populus trichocarpa</i>	20.7	29.535	0.56	0.46	0.004	
gi 743820304		Malate dehydrogenase, chloroplastic-like, <i>Populus euphratica</i>	52.9	43.516	—	1.63	0.027	
gi 743913125		Mitochondrial fission 1 protein A-like, <i>Populus euphratica</i>	32.9	18.528	—	2.59	0.026	
gi 118486782		Mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim17/Tim22/Tim23 family protein, <i>Populus trichocarpa</i>	39.7	15.259	0.45	—	0.036	
gi 550323076		Mitochondrial import receptor subunit TOM40-1-like, <i>Populus euphratica</i>	36.4	34.979	0.55	—	0.029	
gi 118483361		Molybdate-anion transporter-like, <i>Populus euphratica</i>	4.4	50.870	0.60	—	0.040	
gi 743939444		Nitrogen-inducible protein 288, partial, <i>Populus tremula</i> × <i>Populus alba</i>	20.1	36.078	0.24	6.34	0.030	
gi 550317914		Nucleoid DNA-binding family protein, <i>Populus trichocarpa</i>	13.6	51.077	0.64	0.27	0.004	
gi 222842633		One-helix protein 2, <i>Populus trichocarpa</i>	47.3	20.257	0.40	0.50	0.002	
gi 550348962		Oxidoreductase family protein, <i>Populus trichocarpa</i>	25.8	34.409	—	0.51	0.040	
gi 550346899		Pathogenesis-related thaumatin, partial, <i>Populus deltoides</i>	54.1	26.814	—	4.24	0.048	
gi 550324216		Pectinesterase family protein, <i>Populus trichocarpa</i>	13.1	62.765	0.61	0.43	0.028	
gi 118482948		Peroxiredoxin Q family protein, <i>Populus trichocarpa</i>	44.4	23.553	—	0.64	0.028	
gi 109945567		Photosystem I iron-sulfur center (Photosystem I subunit III chloroplast), <i>Populus alba</i>	84.0	9.038	—	0.36	0.033	
gi 57336888		Plasma membrane intrinsic protein PIP1.5, <i>Populus trichocarpa</i> × <i>Populus deltoides</i>	26.6	29.907	2.57	2.33	0.006	
gi 743798989		Plasmodesmata callose-binding protein 3-like isoform X1, <i>Populus euphratica</i>	9.9	23.062	—	0.35	0.026	

续表 1 Continued Table 1

Accession number	登录号	蛋白质名称 Protein name	覆盖率/% Sequence coverage	分子质量/ku Molecular mass		差异倍数 Fold change		P
				2N-H10/ 2N-H5	2N-H25/ 2N-H5			
gi 743809413		Plastid lipid-associated protein 3, chloroplastic-like isoform X1, <i>Populus euphratica</i>	36.9	39.919	—	2.09	0.012	
gi 550345309		Plastid-lipid associated protein PAP, <i>Populus trichocarpa</i>	22.4	38.623	—	2.11	0.034	
gi 984390642		Polyphenol oxidase family protein, <i>Populus davidiana</i> × <i>Populus alba</i> var. <i>pyramidalis</i>	34.7	65.016	0.10	4.30	0.005	
gi 743869216		Probable plastid-lipid-associated protein 13, chloroplastic, <i>Populus euphratica</i>	41.1	34.071	0.50	1.93	0.030	
gi 743781374		Probable zinc metalloprotease EGY2, chloroplastic isoform X1, <i>Populus euphratica</i>	8.8	61.686	—	2.15	0.040	
gi 743797675		Protein CHUP1, chloroplastic, <i>Populus euphratica</i>	14.7	109.880	—	0.37	0.045	
gi 743905324		Protein SGT1 homolog, <i>Populus euphratica</i>	24.0	40.163	—	0.60	0.035	
gi 118482519		Protein translation factor SU11 1 family protein, <i>Populus trichocarpa</i>	19.5	12.594	0.60	0.57	0.043	
gi 610532206		Purple acid phosphatase, <i>Populus nigra</i>	35.0	53.939	0.32	2.34	0.032	
gi 222857139		Purple acid phosphatase 2-like isoform X2, <i>Populus euphratica</i>	45.8	53.662	—	2.93	0.004	
gi 811766251		Putative gamma-glutamyl transferase, partial, <i>Populus tremula</i> × <i>Populus alba</i>	24.3	62.905	0.45	0.59	0.028	
gi 222866458		Pyruvate kinase-cytosolic isozyme-like, <i>Populus euphratica</i>	21.7	57.926	—	0.65	0.022	
gi 222855117		Rhodanese-like domain-containing family protein, <i>Populus trichocarpa</i>	31.1	24.072	—	1.61	0.037	
gi 109945553		Ribosomal protein L14 (chloroplast), <i>Populus alba</i>	64.8	13.565	0.53	0.39	0.035	
gi 222863598		Serine/threonine protein phosphatase 2A 57 ku regulatory subunit B' theta isoform-like, <i>Populus euphratica</i>	9.3	58.222	1.82	1.18	0.035	
gi 550349180		Sodium/calcium exchanger family protein, <i>Populus trichocarpa</i>	7.0	63.852	0.62	1.78	0.036	
gi 283135856		TAU class glutathione transferase GSTU19, <i>Populus trichocarpa</i>	45.2	24.978	1.87	4.07	0.020	
gi 283135840		TAU class glutathione transferase GSTU2, <i>Populus trichocarpa</i>	39.1	25.457	0.40	1.49	0.038	
gi 118485971		Thioredoxin m family protein, <i>Populus trichocarpa</i>	28.3	19.512	—	0.42	0.028	
gi 118488834		Thioredoxin M-type-chloroplastic-like, <i>Populus euphratica</i>	31.3	19.331	—	0.60	0.040	
gi 550330537		Transcription factor DIVARICATA-like, <i>Populus euphratica</i>	8.1	26.522	4.66	—	0.012	
gi 118481497		Translationally controlled tumor-like protein, partial, <i>Populus tremula</i> × <i>Populus alba</i>	49.4	19.399	—	0.47	0.009	
gi 222849812		Tubulin beta-2 chain-like, <i>Populus euphratica</i>	52.1	50.843	2.32	0.61	0.007	
gi 550326158		Ubiquinol oxidase 2, mitochondrial, <i>Populus euphratica</i>	32.1	39.989	—	2.23	0.017	
gi 550336306		Ubiquinone biosynthesis protein COQ9-B, mitochondrial, <i>Populus euphratica</i>	31.9	35.581	—	1.70	0.027	
gi 743907385		Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 12, <i>Populus euphratica</i>	17.0	131.170	—	0.66	0.021	
gi 118484173		Ubiquitin-fold modifier 1-like isoform X2, <i>Populus euphratica</i>	64.9	9.986	0.66	1.53	0.045	
gi 333035984		UDP-glucose pyrophosphorylase, <i>Populus deltoides</i>	68.7	51.640	1.50	1.81	0.037	
gi 118484871		Unknown, <i>Populus trichocarpa</i>	66.1	47.927	—	2.14	0.003	
gi 118486419		Unknown, <i>Populus trichocarpa</i>	74.2	29.266	2.14	0.67	0.019	
gi 118485696		Unknown, <i>Populus trichocarpa</i>	40.1	46.014	—	0.52	0.022	
gi 550310623		Unknown, <i>Populus trichocarpa</i>	57.1	42.528	0.44	0.35	0.032	
gi 118485192		Unknown, <i>Populus trichocarpa</i>	12.4	35.806	1.85	1.58	0.032	
gi 118485836		Unknown, <i>Populus trichocarpa</i>	65.3	7.672	—	4.50	0.043	
gi 550343980		Yrophosphate-dependent phosphofructokinase alpha subunit family protein, <i>Populus trichocarpa</i>	38.5	67.393	—	0.61	0.013	

注: 差异倍数 ≥ 1.5 表示上调, 差异倍数 ≤ 0.67 表示下调, “—”表示无差异; 2N-H10/2N-H5 表示 10 叶位与 5 叶位蛋白质表达量的比值, 2N-H25/2N-H5 表示 25 叶位与 5 叶位蛋白质表达量的比值。Note: Fold change ≥ 1.5 indicates up-regulated, fold change ≤ 0.67 indicates down-regulated, and “—” indicates no difference; 2N-H10/2N-H5 indicates protein expression ratio of 10th and 5th leaf positions and 2N-H25/2N-H5 indicates protein expression ratio of 25th and 5th leaf positions.

个仅在 25 叶位与 5 叶位的比较中发生差异表达, 占差异蛋白总数的 55%。

2.2 差异蛋白质表达模式分析

参照 Wang 等^[17]的方法, 对从 3 个叶位筛选到的 111 个差异表达的蛋白质采用 Cluster 进行聚类分析, 将显著性差异表达的蛋白质在不同样品中表达量的对数值以不同颜色在热图中展现(图 3), 聚类分析结果显示组内样本重复性较好。

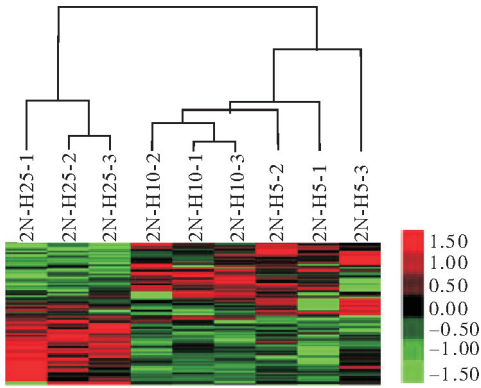


图 3 青杨叶片差异蛋白质聚类分析

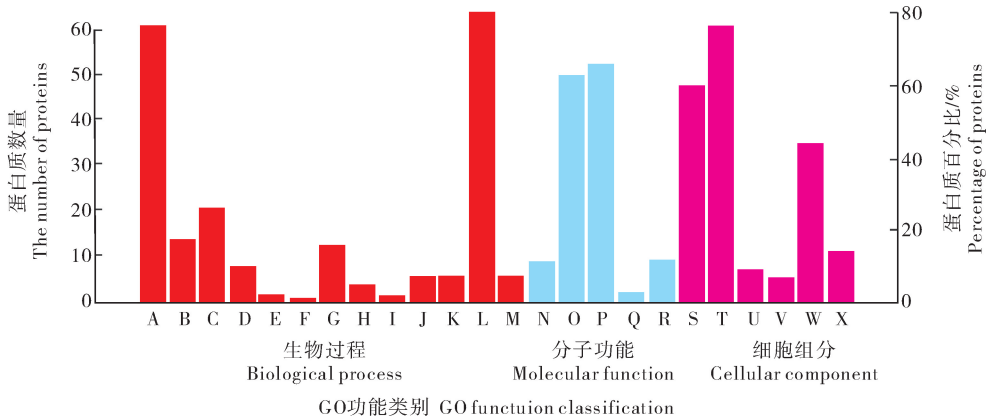
Fig.3 Differential expression proteins clustering analysis in *Populus* leaves

2.3 不同叶位差异表达蛋白质功能注释与分类

为了明确差异表达蛋白质的功能注释与分类, 采用 Blast2GO 软件对筛选出的差异蛋白质进行 GO 功能注释(图 4), 分为生物过程、分子功能和细胞组分, 111 个差异蛋白质中参与的生物过程有 15 个, 其中参与生物过程占比例较高的前 5 个是细胞过程(31.3%)、细胞发育过程(29.7%)、脂质代谢过程(10.0%)、碳水化合物代谢过程(6.9%)、细胞外刺激的反应(6.1%); 分子功能类别中水解酶占 7.1%, 小分子结合活性占 40.9%, 蛋白质结合占 42.9%, 有机环状化合物结合 1.3%, 转移酶活性占 7.8%; 细胞组分中细胞质、细胞骨架、液泡、线粒体、胞内细胞器腔和内质网分别占比为 28.4%、36.5%、4.3%、3.3%、20.9%、6.6%。

2.4 差异蛋白质功能富集分析

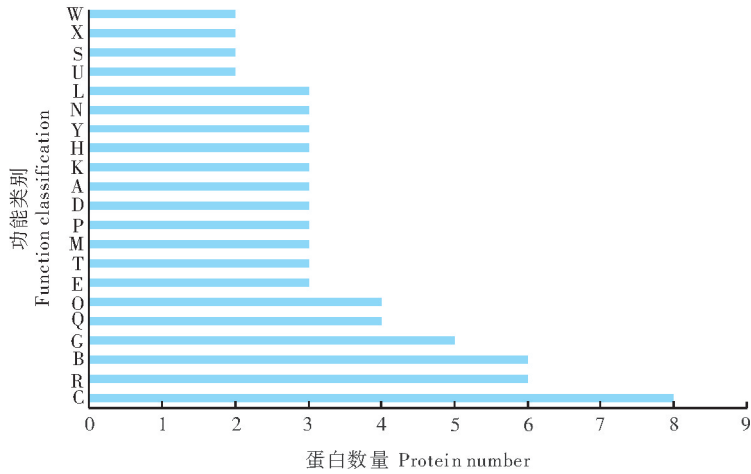
为了了解 3 个叶位差异蛋白所参与的代谢过程, 将全部 111 个差异蛋白进行 KEGG 代谢通路分析, 结果表明, 差异蛋白显著富集的代谢通路一共 21 个(如图 5)。KEGG 富集分析显示, 这些差异基因主要涉及碳代谢、核糖体、氨基酸的生物合成、糖酵解/糖异生、谷胱甘肽代谢、氧化磷酸化、生物光合



A.细胞过程; B.细胞发育过程; C.脂质代谢过程; D.细胞生物合成过程; E.有机物生物合成过程; F.细胞生长; G.碳水化合物代谢过程; H.细胞死亡; I.产生代谢物和能量; J.细胞周期; K.细胞氮化合物代谢过程; L.细胞外刺激的反应; M.发育及生殖过程; N.水解酶活性; O.小分子结合活性; P.蛋白质结合; Q.有机环状化合物结合; R.转移酶活性; S.细胞质; T.细胞骨架; U.液泡; V.线粒体; W.胞内细胞器腔; X.内质网。A.Cell process; B.Cell development process; C.Lipid metabolism process; D.Cell biosynthesis process; E.Organic biosynthesis process; F.Cell growth; G.Carbohydrate metabolism process; H.Cell death; I.Production of metabolites and energy; J.Cell cycle; K.Cell nitrogen metabolism process; L.Extracellular stimulus response; M.Development and reproductive process; N.Hydrolase activity; O.Small molecule binding activity; P.Protein binding; Q.Organic cyclic compound binding; R.Transferase activity; S.Cytoplasm; T.Cytoskeleton; U.Vacuoles; V.Mitochondria; W.Intracellular organelle cavity; X.Endoplasmic reticulum.

图 4 青杨叶片差异蛋白质 GO 注释

Fig.4 GO function enrichment analysis of differential expression proteins in *Populus* leaves



W.脂肪酸代谢; X.淀粉和蔗糖代谢; S.富硒化合物代谢; U.过氧化物酶体; L.二羧酸代谢; N.氨基糖和核苷酸糖代谢; Y.半胱氨酸和甲硫氨酸; H.RNA 转运; K.脂肪酸生物合成; A.光合作用; D.细胞色素 P450 代谢; P.果糖和甘露糖代谢; M.细胞色素 P450 对异生素的代谢; T.柠檬酸循环(TCA 循环); E.生物光合碳固定; O.氧化磷酸化; Q.谷胱甘肽代谢; G.糖酵解/糖异生; B.氨基酸的生物合成; R.核糖体; C.碳代谢。W.Fatty acid metabolism; X.Starch and sucrose metabolism; S.Selenocompound metabolism; U.Peroxisome; L.Glyoxylate and dicarboxylate metabolism; N.Amino sugar and nucleotide sugar metabolism; Y.Cysteine and methionine metabolism; H.RNA transport; K.Fatty acid biosynthesis; A.Photosynthesis; D.Metabolism-cytochrome P450; P.Fructose and mannose metabolism; M.Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450; T.Citrate cycle (TCA cycle); E.Carbon fixation in photosynthetic organisms; O.Oxidative phosphorylation; Q.Glutathione metabolism; G.Glycolysis/Gluconeogenesis; B.Biosynthesis of amino acids; R.Ribosome; C.Carbon metabolism.

图 5 青杨叶片差异蛋白质 KEGG 通路分析

Fig.5 KEGG pathway analysis of proteins differentially expressed in *Populus* leaves

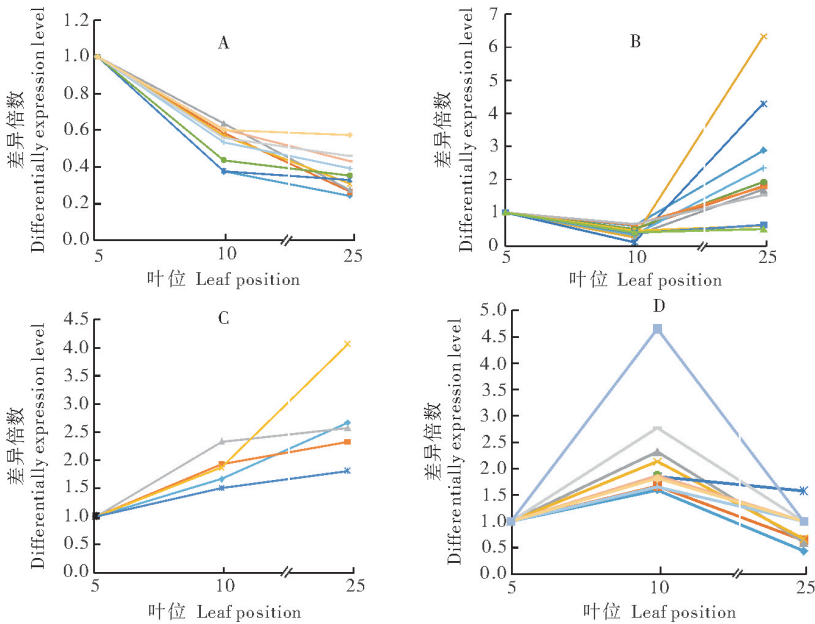


图 6 青杨叶片差异蛋白质在不同叶位的变化规律

Fig.6 Changes level of differential expressed proteins in leaf canopy positions of *Populus*

碳固定、柠檬酸循环(TCA 循环)、细胞色素 P450 代谢、光合作用、RNA 转运、半胱氨酸和甲硫氨酸代谢、氨基糖和核苷酸糖代谢、乙醛酸和二羧酸代谢、过氧化物酶体、淀粉和蔗糖代谢和脂肪酸代谢等代

谢通路。
2.5 叶序下蛋白质的表达量规律分析
 为了分析青杨叶片蛋白质在不同叶位叶片表达量的变化规律,以青杨第5叶位叶片为对照,将10、

表 2 叶序下蛋白质的表达量规律分类

Table 2 Classification of protein expression level under leaf canopy positions

趋势 Trend	蛋白质名称 Protein name	趋势 Trend	蛋白质名称 Protein name
逐渐下降 Decreasing both at 10th and 25th leaf	Ferritin, chloroplastic-like	先下降 后上升 Decreasing at 10th leaf and increasing at 25th leaf	Endochitinase 2-like
	50S ribosomal protein L4, chloroplastic isoform X1		Germin-like protein subfamily T member 2
	Nucleoid DNA-binding family protein		HEV1.2 family protein
	MAGO NASHI-like protein		Nitrogen-inducible protein 288, partial
	Acyl carrier protein 1		Polyphenol oxidase family protein
	Protein translation factor SUI1 1 family protein		Probable plastid-lipid-associated protein 13, chloroplastic
	Ribosomal protein L14, chloroplast		Purple acid phosphatase
	Pectinesterase family protein		Sodium/calcium exchanger family protein
	Hypothetical protein POPTR_0009s11920g		Ubiquitin-fold modifier 1-like isoform X2
	Unknown		Putative gamma-glutamyl transferase, partial
先上升 后下降 Increasing at 10th leaf and decreasing at 25th leaf	Clustered mitochondria protein homolog	先下降 后上升 Decreasing at 10th leaf and increasing at 25th leaf	Mitochondrial import receptor subunit TOM40-1-like
	Coatmer alpha subunit-like family protein		ONE-HELIX protein 2 (<i>Populus trichocarpa</i>)
	Tubulin beta-2 chain-like		20 ku chaperonin, chloroplastic-like
	Serine/threonine protein phosphatase 2A 57 ku regulatory subunit		33 ku ribonucleoprotein, chloroplastic-like
	Transcription factor DIVARICATA-like		3-oxoacyl-[cyl-carrier-protein] reductase 4
	6a-hydroxymaackiain methyltransferase family protein		Acylpyruvase FAHD1, mitochondrial
	Adaptin family protein		Chlorophyll a-b binding protein of LHCII type 1-like
	Hypothetical protein POPTR_0003s14580g		Glutathione S-transferase U8-like
	Hypothetical protein POPTR_0006s14270g, partial		H ⁺ -transporting two-sector ATPase family protein
	Unknown		Mitochondrial import inner membrane
逐渐上升 Increasing both at 10th and 25th leaf	Unknown	先下降 后上升 Decreasing at 10th leaf and increasing at 25th leaf	Translocase subunit
	Heme-binding-like protein At3g10130, chloroplastic isoform X2		Molybdate-anion transporter-like
	UDP-glucose pyrophosphorylase		TAU class glutathione transferase GSTU2
	Plasma membrane intrinsic protein PIP1.5		Hypothetical protein POPTR_0018s09780g
	TAU class glutathione transferase GSTU19		Hypothetical protein POPTR_0019s12380g
	Hypothetical protein POPTR_0001s02300g		

25 叶位叶片上筛选出的 111 个差异蛋白质在 3 个叶位上的上升与下降的趋势进行归类,找出了差异蛋白在 5、10、25 位上的表达规律,其中 50 个差异蛋白质在 5、10、25 这 3 个叶位呈现从上到下蛋白质表达量逐渐下降(图 6A)、先下降后上升(图 6B)、逐渐上升(图 6C)和先下降后上升等 4 种趋势(图 6D)。按照蛋白质相对表达量在叶位顺序上由顶部到下部分为 4 类:逐渐下降 10 个、先下降后上升 24 个、逐渐上升 5 个和先下降后上升 11 个(表 2),而其余 61 个差异蛋白质仅 25 叶位有差异,10 叶位与 5 叶位无显著差异。

3 讨论

3.1 青杨 3 个叶位蛋白质组学差异分析

蛋白质组复杂多变的特点与蛋白质作为细胞功

能执行者的身份直接相关,植物叶片发育过程中,不同叶位叶片蛋白质组发生剧烈变化。通过对 1~4 叶位玉米叶片的蛋白质组学分析,Chen 等^[13]推测 1 叶位叶片展开期是玉米幼苗从异养型向自养型过渡阶段,2 叶位叶片展开期是玉米幼苗从异养型完全转变为自养型的阶段,各叶位叶片在植物不同发育阶段所承担的功能不完全相同,其对整株植物的贡献也不一样。本研究以青杨杂种 F1 代为材料,比较了 10、25 叶位叶片与 5 叶位蛋白质组学差异,结果显示:从 3 个叶位蛋白质相对表达量的趋势来看,有 50 个蛋白质在 5、10、25 叶位上表现为波动的趋势,而占差异蛋白质总数 55%的蛋白质(61 个)仅在 25 叶位与 5 叶位的比较中差异显著,在 10 叶位与 5 叶位的比较中差异不显著,由此可见 25 叶位叶片蛋白质表达发生了剧烈变化,可能与叶片衰老

有关。

仅在 25 叶位与 5 叶位的比较中显示出显著差异的 61 个蛋白质中,44 个差异表达蛋白在 25 叶位表达量升高,主要涉及碳水化合物分解、能量代谢以及胁迫和防御相关蛋白。碳水化合物分解相关蛋白中,柠檬酸合成酶家族蛋白(citrate synthase family protein)、镁-原卟啉 IX 单甲酯[氧化]环化酶(magnesium-protoporphyrin IX monomethyl ester [oxidative] cyclase)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)、质体脂质相关蛋白 PAP(plastid-lipid associated protein PAP)、2-氧代酸脱氢酶家族蛋白(2-oxoacid dehydrogenase family protein)、腺嘌呤磷酸核糖转移酶(adenine phosphoribosyltransferase)等参与糖类、脂质、嘌呤和其他有机物等的分解代谢,表明青杨下部叶片分解代谢加强,可能与叶片衰老过程中相关营养物质被分解、转运再利用有关,同时胁迫和防御相关蛋白上调表达说明衰老可能被植物当作逆境反应来处理^[18]。

此外,27 个差异表达蛋白在 25 叶位表达量显著下降,如:参与蛋白质合成的 40S 核糖体蛋白 SA(40S ribosomal protein SA)、40S 核糖体蛋白 S20(40S ribosomal protein S20)、真核翻译起始因子 3 亚基(eukaryotic translation initiation factor 3 subunit)、翻译控制蛋白(translationally controlled tumor-like protein)、60S 核糖体蛋白 L17-2(60S ribosomal protein L17-2)、参与信号转导的 GTP 结合蛋白 β 链(GTP-binding protein beta chain)、泛素羧基末端水解酶(ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase),表明 25 叶位叶片由于衰老导致物质合成活性下降。此外,1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸还原异构酶(1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase, chloroplastic)、叶绿体长链酰基辅酶 A 合成酶 9(long chain acyl-CoA synthetase 9, chloroplastic-like)、叶绿体蛋白质 CHUP1 (protein CHUP1, chloroplastic)、叶绿体光系统 I 铁硫中心(光系统 I 亚基 VII) [Photosystem I iron-sulfur center (Photosystem I subunit VII) (chloroplast)] 等叶绿体蛋白也在 25 叶位大幅度下降,可能与叶片衰老导致叶绿体解体有关^[8]。

3.2 叶序下青杨蛋白质的表达规律分析

1) 参与光合作用和碳固定的蛋白质。青杨叶片从幼嫩到成熟再趋于衰老的过程中光合速率降低并

伴随蛋白质、光合色素和脂类物质的降解^[19]。本研究中光合作用相关蛋白质总体呈现表达降低的趋势,例如类叶绿体铁蛋白(ferritin, chloroplastic-like)、叶绿体 50S 核糖体蛋白 L4-异构体 X1(50S ribosomal protein L4 ferritin, chloroplastic-like-chloroplastic isoform X1)、核糖体蛋白 L14(叶绿体)(ribosomal protein L14, chloroplast)等叶绿体蛋白在 5、10、25 叶位中的表达量逐渐下降。这与 Liao 等^[8]对青杨 25 叶位叶片的超微结构观察结果相符,其研究结果显示青杨二倍体在第 25 叶位叶片中叶绿体严重解体且基质片层分布散乱,观察到大量嗜饿颗粒。LHCII-1 型的叶绿素 a/b 结合蛋白(chlorophyll a/b binding protein of LHCII type I-like)与 33 ku 类叶绿体核糖核蛋白(33 ku ribonucleoprotein, chloroplastic-like)在 10 叶位先下降后在 25 叶位叶片中的表达上升,可能与这些蛋白质参与叶片不同阶段的发育过程并在衰老初期维持光合作用,而与叶绿体质体-脂质相关蛋白 13(probable plastid-lipid-associated protein 13, chloroplastic)在 25 叶位表达量上升可能与叶绿体脂类在衰老过程中物质转运与再利用有关^[20]。

2) 参与能量产生和碳水化合物代谢的蛋白质。植物细胞中糖类、脂肪和氨基酸等在线粒体中被氧化并偶联磷酸化生成 ATP,同时将有机物中的能量释放出来维持植物中间代谢物与能量的需求,此过程是生物中产生 ATP 的主要途径^[21]。本研究中 UDP-葡萄糖焦磷酸化酶(UDP-glucose pyrophosphorylase)随着叶位表达量逐渐上升,该酶以葡萄糖-1-磷酸和尿苷三磷酸为底物,催化反应生成尿苷二磷酸葡萄糖和焦磷酸,直接参与植物糖代谢的生物合成^[22]。UDP-葡萄糖焦磷酸化酶表达量的变化表明随着叶片的成熟到衰老,多糖分解逐渐增强,单糖合成和转运加强。值得关注的是, H^+ -转运双区 ATP 酶家族蛋白(H^+ -transporting two-sector ATPase family protein)、线粒体酰基丙酮酸酶 FAHD1 (acylpyruvase FAHD1, mitochondrial)、3-氧代酰基-[酰基载体-蛋白质]还原酶 4(3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] reductase 4)、线粒体导入受体亚基-类 TOM40-1 (mitochondrial import receptor subunit TOM40-1-like)和线粒体导入内膜转位酶亚基(mitochondrial import inner membrane translocase subunit)等 5 个线粒体蛋白质在 5、10、25 叶位表现为先下降后上升的趋势,可能暗示 10 叶位叶

片发育成熟,完成形态建成和生长;而 25 叶位叶片趋于衰老导致呼吸作用加强,物质消耗增加。聚集的线粒体蛋白同系物(clustered mitochondria protein homolog)随着叶位先上升后下降,表明在 10 叶位仍需维持一定的氧化呼吸活动。此外,随着叶位从上到下,酰基载体蛋白 1(acyl carrier protein 1)表达量逐渐下降。在脂肪酸合成过程中,酰基载体蛋白携带酰基链完成缩合、还原和脱氢等酶促反应^[23],表明 25 叶位叶片中脂肪酸的合成代谢可能被抑制。

3) 转录翻译与生长发育相关蛋白。叶片从成熟到衰老的过程其基因表达调控需要大量的 DNA 与蛋白质、转录因子和蛋白质翻译因子相互作用^[24]。本研究中,类核 DNA 结合家族蛋白(nucleoid DNA-binding family protein)、转录因子类 DIVARICATA(transcription factor DIVARICATA-like)在 5、10、25 叶位表现为先升高后下降,而蛋白质翻译因子 SUI1-1 蛋白(protein translation factor SUI1 family protein)则逐渐下降,表明随着叶位由上到下,基因的表达先增强而后被抑制,蛋白质的合成伴随着叶片的成熟和衰老而变化。此外,与植物生长发育相关的蛋白质中,类泛素折叠修饰-1-同型 X2(ubiquitin-fold modifier 1-like isoform X2)和 20 ku 类叶绿体伴侣蛋白(20 ku chaperonin, chloroplastic-like)先下降后上升。泛素折叠与修饰在植物发育调节和病原菌防御信号途径中发挥作用^[24],而 20 ku 类叶绿体伴侣蛋白执行对已损伤的蛋白进行修复的功能^[25],说明青杨叶片在成熟到衰老的过程中需要维持蛋白质构象的稳定。

4) 参与活性氧清除和胁迫防御蛋白质。植物叶片从成熟到衰老的过程中,因细胞器特别是光合膜的损伤等导致大量活性氧的产生,同时光合能力的下降引发碳水化合物饥饿,衰老过程中营养物质与水分的吸收和运输能力下降引起植物营养状况与水分的变化,导致衰老的叶片处于逆境中^[18]。本研究发现在 5、10、25 叶位上 TAU 类谷胱甘肽转移酶-GSTU19(tau class glutathione transferase GSTU19)逐渐上升,而 TAU 类谷胱甘肽转移酶 GSTU2(tau class glutathione transferase GSTU2)、谷胱甘肽-S-转移酶 U8(glutathione S-transferase U8-like)、类内切壳多糖酶 2(endochitinase 2-like)、推定的 γ -谷氨酰转移酶部分(putative gamma-glutamyl transferase, partial)和类萌发素蛋白亚家族 T-2(germin-like protein subfamily

T member 2)等先下降后上升,在 25 叶位上表达量最高。谷胱甘肽-S-转移酶对植物抵御逆境胁迫和解除细胞毒素具有重要作用^[26],GST 基因在植物应对多种生物与非生物胁迫中起重要作用^[27],此外类内切壳多糖酶 2 具有抗真菌的功能,类萌发素蛋白在防御病原体攻击中发挥重要作用^[28]。有研究认为,衰老相当于植物的逆境状态,因此推测随着叶片的衰老,这些植物抗性相关蛋白质被植物衰老信号所诱导,从而导致 25 叶位叶片中植物抗性相关蛋白质的大量表达以维持植株抗病与活性氧清除能力^[29]。

5) 信号转导与物质转运相关蛋白质。植物叶片从成熟到衰老,伴随着广泛的信号转导和物质转运过程。本研究发现,丝氨酸/苏氨酸蛋白磷酸酶 2A 57 ku(serine/threonine protein phosphatase 2A 57 ku regulatory subunit)调节亚基和衔接家族蛋白(adaptin family protein)在 5、10、25 叶位表现为先上升后下降。丝氨酸/苏氨酸蛋白磷酸酶在脱落酸调控的抗逆信号转导过程中起重要作用^[30],接头家族蛋白是网格蛋白和膜之间起衔接作用的一种蛋白质,参与网格蛋白包被小泡形成过程,主要负责分拣蛋白质的功能^[31]。接头家族蛋白与不同蛋白质分子结合参与囊泡的回收过程,是网格蛋白介导的胞吞过程的关键蛋白^[32]。

此外,质膜内在蛋白 PIP1.5(plasma membrane intrinsic protein PIP1.5)逐渐上升,该蛋白是水孔蛋白的一个亚家族,大量研究证明水孔蛋白在植物水分平衡中起重要作用^[33-34]。尤为重要的是钼酸根-阴离子转运蛋白(molybdate-anion transporter-like)、钠/钙交换家族蛋白(sodium/calcium exchanger family protein)和氮诱导蛋白 288 部分(nitrogen-inducible protein 288, partial)物质转运相关蛋白在 5、10、25 叶位表现为先下降后上升的趋势,可能与青杨叶片衰老过程中相关营养元素被分解、转运再利用有关^[35]。

6) 其他蛋白质。按照叶位从上到下,多酚氧化酶家族蛋白(polyphenol oxidase family protein)、紫酸性磷酸酶(purple acid phosphatase)、HEV1.2 家族蛋白(HEV1.2 family protein)、单螺旋蛋白 2(ONE-HELIX protein 2)和微管蛋白 β -2 链状(tubulin beta-2 chain-like)等表现为先上升后下降。其中微管蛋白 β -2 链状植物微管蛋白是构成细胞的骨架成分,这些蛋白质对保持细胞内部结构的有序性

和维持细胞的形态有重要作用^[36]。

总之,这些蛋白质在叶位上的变化揭示了青杨叶片从成熟到衰老是一个十分复杂而循序渐进的过程,不仅伴随着光合作用的降低、物质转运与再利用的加快,同时胁迫防御相关蛋白质大量表达来维持细胞稳定性。本研究所获得的蛋白质数据中,与植物激素合成与光反应相关蛋白质的数据欠缺,可能由于 label-free 技术的局限性,使一些差异表达量低但可能发挥重要的生理功能的蛋白质(如激素合成)未在本研究中被检测到,尚需通过更灵敏的手段如靶向蛋白质组学(data independent acquisition, DIA)等进行深入研究。

参 考 文 献

- [1] 卢超.短季棉品种叶片衰老过程中的蛋白质组学研究[D].杨凌:西北农林科技大学,2018.
- [2] BLUM-SILVA C H, CHAVES V C, SCHWENKEL E P, et al. The influence of leaf age on methylxanthines, total phenolic content, and free radical scavenging capacity of *Ilex paraguariensis* aqueous extracts[J]. *Revista brasileira de farmacognosia*, 2015, 45(1): 1-6.
- [3] 邵彩虹, 谢金水, 黄永兰, 等. 孕穗期水稻不同功能叶的发育蛋白质组学分析[J]. *中国水稻科学*, 2009, 23(5): 456-462.
- [4] 马林. 植物衰老期间生理生化变化的研究进展[J]. *生物学杂志*, 2007, 24(3): 12-15.
- [5] HEBELER R, OELJEKLAUS S, REIDEGELD K A, et al. Study of early leaf senescence in *Arabidopsis thaliana* by quantitative proteomics using reciprocal ¹⁴N/¹⁵N labeling and difference gel electrophoresis [J]. *Molecular cell proteomics*, 2008, 7(1): 108-120.
- [6] BRADSHAW H D, VILLAR M, WATSON B D, et al. Molecular genetics of growth and development in *Populus*. III. A genetic linkage map of a hybrid poplar composed of RFLP, STS, and RAPD markers[J]. *Theoretical and applied genetics*, 1994, 89(2/3): 167-178.
- [7] 廖婷. 青杨异源三倍体营养生长优势形成的分子机理研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2017.
- [8] LIAO T, CHENG S P, ZHU X H, et al. Effects of triploid status on growth, photosynthesis, and leaf area in *Populus* [J]. *Trees*, 2016, 30(4): 1137-1147.
- [9] PANDEY A, MANN M. Proteomics to study genes and genomes [J]. *Nature*, 2000, 405(15): 837-846.
- [10] ABRIL N, GION J M, KERNER R, et al. Proteomics research on forest trees, the most recalcitrant and orphan plant species [J]. *Phytochemistry*, 2011, 72(10): 1219-1242.
- [11] 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: 2131-2139.
- [12] ALBERTIN W, LANGELLA O, JOETS J, et al. Comparative proteomics of leaf, stem, and root tissues of synthetic *Brassica napus* [J]. *Proteomics*, 2009, 9(3): 793-799.
- [13] CHEN Y B, WANG D, GE X L, et al. Comparative proteomics of leaves found at different stem positions of maize seedlings [J]. *Journal of plant physiology*, 2016, 198: 116-128.
- [14] 谢进, 田晓明, 刘淑欣, 等. 适用于毛白杨芽双向电泳分析的蛋白质提取方法[J]. *北京林业大学学报*, 2013, 35(4): 144-148.
- [15] 王溢, 邱彤, 韩强, 等. 不同 2n 雌配子来源的青杨杂种三倍体与其亲本蛋白质组差异研究[J]. *北京林业大学学报*, 2018, 40(5): 1-9.
- [16] 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.
- [17] WANG Y, LI Y, SUO Y J, et al. Proteomic changes between *Populus* allotriploids and diploids revealed using an iTRAQ-based quantitative approach[J]. *Current proteomics*, 2017, 14(3): 166-174.
- [18] 张柳, 王铮, 张亚婕, 等. 烟草叶片衰老期过程中的蛋白质组学分析[J]. *植物生理学报*, 2014, 50(4): 488-500.
- [19] 张柳. 烟草叶片衰老过程变化的蛋白质组和转录组研究[D]. 昆明: 云南农业大学, 2014.
- [20] XU Y H, LIU R, YAN L, et al. Light-harvesting chlorophyll a/b-binding proteins are required for stomatal response to abscisic acid in *Arabidopsis* [J]. *Journal of experimental botany*, 2012, 63(3): 1095-1106.
- [21] 杨桂蓉. 苍术苷的致突性观察及氧化磷酸化的抑制作用研究[D]. 重庆: 西南交通大学, 2012.
- [22] 白蓓蓓, 陈业渊, 盖江涛, 等. 植物 UDP-葡萄糖焦磷酸化酶家族基因鉴定及序列进化分析[J]. *分子植物育种*, 2019(4): 1186-1190.
- [23] 张晓龙, 李立平, 鲁仁义, 等. 基于 iTRAQ 技术分析五倍子作用白念珠菌后的差异蛋白表达[J]. *生物技术进展*, 2018(6): 537-545.
- [24] 严金平, 杨华. 泛素化修饰与植物免疫应答[J]. *生物技术通报*, 2011(2): 18-22.
- [25] 周丽. 水稻叶绿体伴侣蛋白 Cpn60 超表达株系农艺性状和抗盐性研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2015.
- [26] 朱守晶, 史文娟. 苎麻谷胱甘肽-S-转移酶基因 BnGSTU1 的克隆和表达分析[J]. *植物遗传资源学报*, 2018(6): 1197-1204.
- [27] CHOI Y I, NOH E W, KIM H J, et al. Overexpression of poplar GSTU51 confers selective tolerance to both mercury and methyl viologen but not to CDB or cadmium in transgenic poplars [J]. *Plant biotechnology reports*, 2013, 7(2): 175-184.
- [28] IFIKHAR A, TARIQ M. Identification and analysis of regulatory elements in the germin and germin-like proteins family promoters in rice[J]. *Turkish journal of botany*, 2015, 39: 1-12.
- [29] 卢超, 张根连, 范术丽, 等. 短季棉叶片早衰的比较蛋白质组学研究[J]. *棉花学报*, 2013, 2(2): 162-168.
- [30] 何亮, 李富华, 沙莉娜, 等. 玉米 2C 型丝氨酸/苏氨酸蛋白磷酸

- 酶(PP2C)活性与耐旱性的关系[J].作物学报,2008,34(5):899-903.
- [31] 柴佳,苗燕,蔡霞.接头蛋白复合体 AP2B1 基因的克隆与分析[J].基因组学与应用生物学,2018,37(9):3909-3918.
- [32] MCMAHON H T,BOUCROT E.Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis[J].Nature reviews molecular cell biology,2011,12(8):517-533.
- [33] 余歆,彭彦辉,张敏华.冷害及恢复期间水稻质膜内在蛋白(PIP)的表达和水分关系[G]//中国植物生理学会环境生理与营养生理专业委员会.2005年全国植物逆境生理与分子生物学研讨会论文摘要汇编.中国植物生理学会环境生理与营养生理专业委员会:中国植物生理学会,2005:1.
- [34] 周思雨,唐文慧,赵大球,等.芍药水通道蛋白基因 PIP2-2 片段的克隆与表达分析[J].分子植物育种,2017,15(3):800-804.
- [35] 蒋艾平,刘军,姜景民.橡木叶片秋季衰老时叶色、色素和营养元素的关系[J].林业科学研究,2016,29(3):362-368.
- [36] PEARS S T.梨 β -微管蛋白基因及其在矮生型与普通型梨茎尖中的表达差异[J].园艺学报,2016,43(2):320-328.

Label-free approach based comparative proteomics analyses of three leaf positions in *Populus* spp.(*Section tacamahaca*)

WANG Yi

Sericulture & Agri-Food Research Institute,Guangdong Academy of Agricultural Sciences,Guangzhou 510610,China

Abstract In order to reveal rules of proteomic changes in different leaf positions of *Populus* spp.(*Section tacamahaca*) and senescence mechanism of the leaves,proteins expression profile at three leaf positions of *Populus* spp.(*S. tacamahaca*) hybrids were studied with label-free proteomics.The proteins of three different leaf position were detected using label-free method.111 proteins with differential expression were found,only 55% proteins expressed significantly differently in comparison with the 5th and 25th leaf position.Functional analysis of differentially expressed proteins showed that the proteins involved in photosynthesis,growth and development were mostly down-regulated at 10th and 25th leaf position,while proteins involved in stress,nutrient decomposition and transport were mostly up-regulated among the leaf senescence process.However,some proteins related to transcriptional,translation and protein modification regulation had fluctuations among the leaf senescence process.Among the three leaf positions of *Populus* spp.(*S. tacamahaca*),photosynthesis and nutrient synthesis process at 10th leaf position were more active than that at 5th leaf position.The 25th leaf leaves are enhanced by the decomposition and transport of aging nutrients,and the synthesis of the material is weakened.The decomposition and transport of senescence nutrient at 25th leaf position were enhanced and synthesis of nutrient was decreased.Protein is a cell function performer,which shows that the maturity of young leaves to senescence is a process of orderly regulating protein expression changes.

Keywords *Populus*; leaf position; proteomics; label-free; senescence

(责任编辑:张志钰)