

# 白花泡桐和毛泡桐丛枝病发生与蛋白质表达谱变化

张雯宇<sup>1</sup>, 翟晓巧<sup>2\*</sup>

(1. 河南农业大学 泡桐研究所, 河南 郑州 450002; 2. 河南省林业科学研究院, 河南 郑州 450008)

**摘 要:**为深入了解泡桐丛枝病发生与蛋白质变化的关系,以白花泡桐和毛泡桐健康、患丛枝病组培幼苗以及经 15 mg · L<sup>-1</sup> 和 75 mg · L<sup>-1</sup> 硫酸二甲酯(DMS)处理的患病组培幼苗为材料,采用 iTRAQ 技术研究这 2 个品种、8 种材料的蛋白质表达谱变化。结果表明,12 种蛋白质与泡桐丛枝病发生密切相关,其主要定位于叶绿体(7 个,58.33%)和线粒体(3 个,25%),功能与光合作用、蛋白质翻译、抗逆性相关。实时荧光定量 PCR 验证结果显示部分蛋白质的基因在 mRNA 的表达水平与 iTRAQ 测试的蛋白质翻译水平结果一致。研究结果为深入揭示泡桐丛枝病发生机理奠定基础。

**关键词:**白花泡桐;毛泡桐;丛枝病;iTRAQ;蛋白质表达谱

**中图分类号:**S792.43      **文献标志码:**A      **文章编号:**1001-7461(2019)02-0161-09

## Changes of Protein Profile and the Occurrence of Witches' Broom in *Paulownia fortunei* and *Paulownia tomentosa*

ZHANG Wen-yu<sup>1</sup>, ZHAI Xiao-qiao<sup>2\*</sup>

(1. Institute of Paulownia, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, Henan, China;

2. Henan Academy of Forestry, Zhengzhou 450008, Henan, China)

**Abstract:** In order to understand the relationship between the occurrence of paulownia witches' broom and the protein profile changes of the host, in this study, the technology of isobaric tags for relative and absolute quantitation (iTRAQ) was adopted to analyze the protein changes in the healthy, infected, and 15 mg · L<sup>-1</sup>, 75 mg · L<sup>-1</sup> dimethyl sulfate treated infected tissue culture plantlets of two *Paulownia* species (*P. fortunei* and *P. tomentosa*). A total of 12 differentially abundant proteins closely related to the witches' broom were obtained. Subcellular localization showed that 7 proteins were located in chloroplasts and 3 located in mitochondria, with functions related to photosynthesis, protein translation, and stress resistance. Then the quantitative real-time PCR (qRT-PCR) showed the expression level of the differentially abundant proteins coding genes were consistent with the generated by iTRAQ results. The results would lay the foundation for revealing the mechanism of paulownia witches' broom.

**Key words:** *Paulownia fortunei*; *Paulownia tomentosa*; witches' broom; iTRAQ; protein profile

泡桐是我国重要的速生用材、庭院绿化和防护林树种之一,其材质优良、花和果实具有药用价值,还能与农作物形成理想的复合生态系统<sup>[1-4]</sup>,因此大量种植泡桐具有重要经济价值和生态意义。由植原体引起的泡桐丛枝病是限制泡桐产业发展的主要因素。植原体是一种寄生性病原菌,可通过昆虫媒介

或者人类活动(如嫁接)进行传播。泡桐感染植原体后其症状有腋芽丛生,节间变短,叶片变黄,韧皮部坏死等,严重时可导致泡桐死亡<sup>[5-6]</sup>。研究发现,植原体侵染泡桐后相关酶类的活性、激素、酚类物质、无机离子的含量等均发生变化<sup>[7-8]</sup>。随着现代生物技术的发展,前人已将不同组学方法(如转录组学、

收稿日期:2018-07-17    修回日期:2018-09-19  
基金项目:河南省科技创新杰出人才项目(174200510001);河南省自然科学基金(162300410158)。  
作者简介:张雯宇,女,在读硕士,研究方向:泡桐生物技术。E-mail:wenyujun716@163.com  
\* 通信作者:翟晓巧,女,研究员,博士,硕士生导师,研究方向:林木遗传育种与生物技术。E-mail:user7117@163.com

代谢组学)已广泛应用于泡桐丛枝病的研究中,并找到了一些与该病害发生相关的 mRNA<sup>[9-11]</sup>、miRNA<sup>[12-14]</sup>、代谢物<sup>[15]</sup>及 lncRNAs<sup>[16-18]</sup>。有报道称,适宜浓度的硫酸二甲酯(dimethyl sulfate,DMS)处理泡桐丛枝病幼苗后,形态恢复为健康且体内检测不到植原体<sup>[19-21]</sup>。但是由于数据量庞大,不同的组学数据间关联性较差,关键信息难以发掘,致使泡桐丛枝病的分子机制仍然知之甚少。

蛋白质是生命活动承担者<sup>[22]</sup>,当植物受到病原菌侵害时植物体内蛋白质的表达会发生变化而引起植物相应的反应机制<sup>[23]</sup>。因此,蛋白质组学已成为了解植物-病原菌互作分子机制的有力工具<sup>[24-26]</sup>。在泡桐丛枝病的研究中,科研工作者曾用双向凝胶电泳发现一些蛋白质的含量发生了显著变化<sup>[27-28]</sup>,但是该技术受蛋白丰度、等电点、分子量等的限制,致使其所得到试验结果重复性差。随着科学技术的发展,同位素标记相对和绝对定量(isobaric tags for relative and absolute quantitation,iTRAQ)技术被广泛应用于蛋白质组学的研究领域中,该技术具有标记样品多、灵敏度高、试验结果可靠等多个优点<sup>[24-26]</sup>。

尽管研究者曾利用 iTRAQ 技术发现部分与泡桐丛枝病发生相关的蛋白质<sup>[29-31]</sup>,为了进一步丰富差异蛋白的数据,本研究采用 iTRAQ 技术对白花泡桐和毛泡桐健康、患丛枝病组培幼苗以及经 15 mg · L<sup>-1</sup>和 75 mg · L<sup>-1</sup> DMS 处理的患病组培幼苗为材料进行分析,以期进一步筛选出更多与丛枝病发生密切相关的蛋白质,为深入解析泡桐丛枝病发生的分子机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与处理

将河南农业大学泡桐研究所林木生物技术实验室培养在不含任何植物生长调节物质的 1/2 MS 培养基(蔗糖浓度 20 g · L<sup>-1</sup>,8 g · L<sup>-1</sup>琼脂)中 30 d 的白花泡桐和毛泡桐的健康以及患丛枝病组培幼苗 4 cm 长的顶芽取下,试验条件和处理方法参照 Wei<sup>[29]</sup>等,每种处理进行 3 个生物学重复。将样品标记为白花泡桐健康幼苗(PF)、患丛枝病组培幼苗(PFI)、经过 15 mg · L<sup>-1</sup>(PFI-15)、75 mg · L<sup>-1</sup>(PFI-75)DMS 浓度处理的患丛枝病组培幼苗;毛泡桐健康苗(PT)、患丛枝病组培幼苗(PTI)、经过 15 mg · L<sup>-1</sup>(PTI-15)、75 mg · L<sup>-1</sup>(PTI-75)DMS 浓度处理的患丛枝病组培幼苗,参照 Wei<sup>[29]</sup>等的方法提取样品,用液氮冷冻后置于-80℃冰箱内备用。

1.2 泡桐蛋白质提取

称取 PF、PFI、PFI-15、PFI-75、PT、PTI、PTI-15、PTI-75 8 个样品速冻组织 1.0 g,在液氮中迅速研磨,用含有 1 mmol · L<sup>-1</sup> PMSF 和 2 mmol · L<sup>-1</sup> EDTA(终浓度)的裂解缓冲液(7 mol · L<sup>-1</sup> 尿素,2 mol · L<sup>-1</sup> 硫脲,4% NP40,20 mmol · L<sup>-1</sup> Tris-HCl,pH 8.0~8.5)提取。蛋白质提取具体细节和方法参考 Tang<sup>[32]</sup>等。

1.3 iTRAQ 标记和 SCX 分离

从每个样品溶液中取出总蛋白质(100 μg),然后用蛋白质:胰蛋白酶=30:1 的比例在 37℃下用 Trypsin Gold(Promega, Madison, WI, USA)消化 16 h。胰蛋白酶消化后,通过真空离心将肽干燥,并根据制造商关于 8-plex iTRAQ 试剂(Applied Biosystems)的说明进行处理。iTRAQ 试验在 2 个独立的生物学重复上进行。每组肽段用不同的 iTRAQ 标签标记,室温培养 2 h,然后汇集标记的肽混合物并通过真空离心干燥。

采用岛津 LC-20AB 液相系统、分离柱对样品进行液相分离。将标记后抽干的混合肽段用 4 mL buffer A(25 mmol · L<sup>-1</sup> NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in 25% ACN, pH 2.7)复溶。进柱后以 1 mL · min<sup>-1</sup>的速率进行梯度洗脱:5%~60% buffer B(25 mmol · L<sup>-1</sup> NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,1 mol · L<sup>-1</sup> KCl in 25% ACN,pH 2.7)中洗脱 27 min,100% buffer B 1 min,然后恢复到 5%平衡 10 min。整个洗脱过程在 214 nm 吸光度下进行监测,经过筛选得到 20 个组分。每个组分分别用 StrataX 除盐柱除盐,然后冷冻抽干用于随后的 LC-MS/MS 分析。

1.4 基于 Triple TOF 5600 的 LC-MS/MS 分析

将上述得到的组分分别重悬于 buffer A(5% ACN,0.1% FA),以 20 000 rpm 离心 10 min,复溶至 0.5 μL(约 2.5 μg 蛋白质),以 8 μL · min<sup>-1</sup>的流速在 4 min 内将样品注入到 Shimadzu LC-20 AD nanoHPLC 柱(Shimadzu, Kyoto, Japan)上,多肽被加入到分析用的 10 cm analytical C18 column 柱(内径 75 μm)上。先在 5% buffer B(95% ACN, 0.1% FA)下洗脱 5 min,接着 buffer B 由 5%上升至 35%,以 400 nL · min<sup>-1</sup>的流速洗脱 35 min,然后在 2 min 内 buffer B 增加到 80%并维持 2 min,最后在 1 min 内恢复至 5%并在此条件下平衡 10 min。数据采集根据 TripleTOF 5600(ABSCIEX)进行。

1.5 蛋白质组数据分析

蛋白质组学数据分析使用 Proteome Discoverer 1.2 软件(Thermo Fisher Scientific, USA)处理

质谱数据。使用 Mascot 搜索引擎(Matrix Science, UK)针对包含 1 495 258 个序列的 NCBI 植物数据库进行查对。为了减少假肽识别的可能性,只计算出 Mascot 概率分析中 99%置信区间的显着性评分( $\geq 20$ )高于“同一性”的肽段。对于蛋白质定量,要求蛋白质含有至少 2 个特异性的肽段。鉴定蛋白质的错误发生率(FDR) $\leq 0.01$ 。依据蛋白质丰度水平,当差异倍数 $>1.2$ 或 $<0.83$ ,且 $P<0.05$ 时,视为差异蛋白<sup>[33]</sup>。

1.6 蛋白质功能分析

使用 Blast2 GO 针对 NCBI 非冗余蛋白质数据库进行蛋白质的功能注释。使用 KEGG(kyoto encyclopedia of genes and genomes)、COG(cluster of orthologous groups of proteins)和 GO(gene ontology)数据库对鉴定的蛋白质和差异表达蛋白质进行分析,全面反映蛋白质的功能。

1.7 蛋白质亚细胞定位分析

将与丛枝病发生密切相关蛋白质的氨基酸序列

使用 Cell-PLoc<sup>[33]</sup>工具的 Cell-PLoc 2.0 版本(<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/Cell-PLoc-2/>)对与泡桐丛枝病发生密切相关的差异表达蛋白质进行逐个预测。

1.8 qRT-PCR 验证

将样品 PF、PFI、PFI-15、PFI-75、PT、PTI、PTI-15、PTI-75 利用 Trizol 法(Sangon, Shanghai, China)分别提取其总 RNA。本研究挑选 11 个差异表达蛋白质对应的基因进行转录水平上的 qRT-PCR 验证。差异表达蛋白质对应的基因引物序列见表 1。利用 Beacon Designer version 7.7 对引物进行设计。其反应体系为:每 20  $\mu\text{L}$  反应中含有 1  $\mu\text{L}$  cDNA 模板,正向和反向引物各 0.4  $\mu\text{mol}$ ,7.0  $\mu\text{L}$  无菌蒸馏水。反应程序为:94 $^{\circ}\text{C}$ ,3 min;94 $^{\circ}\text{C}$ ,15 s;60 $^{\circ}\text{C}$ ,60 s;共进行 40 个循环,每个样品 3 次重复。以内参 18S rRNA 进行校正,数据处理使用  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  法计算相对表达量。

表 1 qRT-PCR 分析所用引物序列  
Table 1 Primers for qRT-PCR analysis

登录号	蛋白质名称	正向引物(5'-3')	反向引物(5'-3')
gi 284433792	核苷二磷酸激酶	CATTGCTGATCTACCATTG	CCGAATAAGTGCTGAATC
gi 29465854	锰超氧化物歧化酶	ACCATAACAAGAAGTCTGAG	CCGTAATCGTAGGGAAGA
gi 1173055	60S 核糖体蛋白 L11	TCAAGAAGAAGGCTCCAA	GGTATTGGCTCTGGTTAA
gi 1561575	亲环素	CTGAAGAATGTCCAAGAAC	GTCTCCTGTCTGAATCATA
gi 146741370	谷氨酰胺合成酶	TGGAGAAGACAGTGAAGT	CCTGCTGGTGATAAGTATC
gi 223452696	苯甲醛脱氢酶	GACACTGCTAATACCTTGA	CCTTCCAATTCCACTCAT
gi 4754913	碳酸酐酶	ATTCTTGTTCTTGTGCTCTC	TCTCGCTATCTTCTTCGTAA
gi 118485188	核糖体蛋白 L12	ATCGGTGAGGATATAGCC	TGCCTTGATGACTAATGC
gi 225459918	叶绿素 a-b 结合蛋白 CP26	TGTTGAAGGTGAAGGAGAT	CATAAGCCTGGAGGAAGA
gi 445116	叶绿素 a-b 结合蛋白 CP29.2	CTCAAAGTCAAGGAAATC	ATAATGATGTCTCCAATGT
gi 21388550	NAD-依赖性苹果酸脱氢酶	TCCTCTCGTCATATACTC	CCAATGCCTTGTCAATA

2 结果与分析

2.1 iTRAQ 鉴定的差异表达蛋白质基本信息

基于差异倍数 $>1.2$ 或 $<0.83$ ,且 $P<0.05$ 筛选差异表达蛋白质,iTRAQ 鉴定结果表明,白花泡桐经两次生物学重复共得到 253 个差异表达蛋白质,不同比对组差异表达蛋白质个数见表 2。鉴定到的蛋白质的相对分子质量主要集中在 20~60 kD,肽段长度主要集中在 9~15 个氨基酸,大部分覆盖到的蛋白质肽段数量在 10 以内,且蛋白质数量随着匹配肽段数量的增加而减少。在毛泡桐中,经两次生物学重复共得到 258 个差异表达蛋白质,不同比对组差异表达蛋白质个数见表 2。鉴定到的蛋白质的相对分子质量主要集中在 20~60 kD,肽段长度主要集中在 9~15 个氨基酸,大部分覆盖到的

蛋白质肽段数量在 6 以内且蛋白质数量随着匹配肽段数量的增加而减少。这些结果表明蛋白质组数据可靠性较强,可以用于后续分析。

2.2 差异表达蛋白质的生物信息学分析

将 2 种泡桐鉴定到的差异表达蛋白质进行功能注释(图 1)。

首先,通过 GO 功能注释结果表明,白花泡桐中与“细胞组分”相关的蛋白质主要集中在细胞部分(20.29%)和细胞器(17.89%);与“分子功能”相关的蛋白质主要分类在结合(23.97%)、催化活性(20.55%);而与“生物学过程”相关的蛋白质主要集中在代谢过程(19.18%)、对刺激的响应(13.01%)及多细胞生物过程(6.16%)。毛泡桐中大部分蛋白质参与了细胞部分(18.02%)和细胞(11.45%);与“分子功能”这一大类中,催化活性(28.13%)、结合

(18.75%)所涉及的蛋白质较多;而“生物学过程”这一组分中代谢过程(16.67%)、对刺激的响应(10.42%)及细胞过程(9.38%)所占比例较多。由此可见,植原体侵染泡桐后导致寄主体内蛋白质发生较大变化,并参与多个生物学过程,其中对刺激的响应所占比例较大,参与代谢进程和细胞过程的蛋白所占比例较高。

表 2 白花泡桐和毛泡桐差异表达蛋白质数量统计  
Table 2 Statistics analysis of the differentially abundant proteins in *P. fortunei* and *P. tomentosa* 个

比对照组 (对照 VS. 处理)	上调蛋白 数量	下调蛋白 数量	总差异蛋白 数量
重复 1			
PF vs. PFI	52	59	111
PT vs. PTI	51	38	89
PFI vs. PFI-15	49	46	95
PTI vs. PTI-15	42	45	87
PFI vs. PFI-75	52	32	84
PTI vs. PTI-75	35	54	96
重复 2			
PF vs. PFI	58	83	141
PT vs. PTI	52	38	88
PFI vs. PFI-15	51	35	86
PTI vs. PTI-15	44	42	86
PFI vs. PFI-75	45	35	80
PTI vs. PTI-75	43	46	89
总结果			
PF vs. PFI	37	67	104
PT vs. PTI	51	37	88
PFI vs. PFI-15	44	38	82
PTI vs. PTI-15	41	48	89
PFI vs. PFI-75	43	26	69
PTI vs. PTI-75	41	40	81

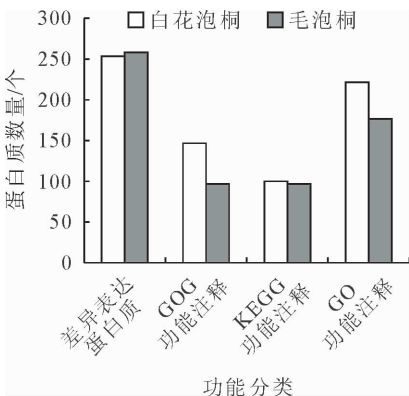
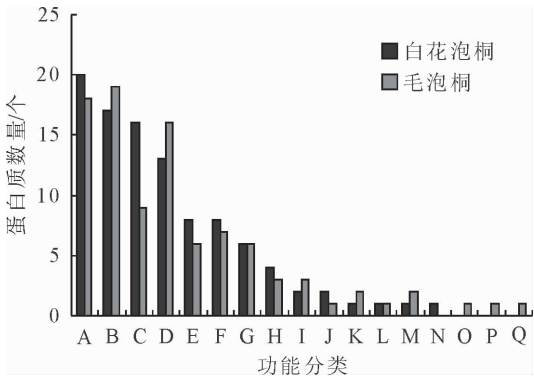


图 1 白花泡桐和毛泡桐差异表达蛋白质功能注释统计  
Fig. 1 Statistics differentially abundant proteins functional annotation in *P. fortunei* and *P. tomentosa*

其次,COG 功能注释表明(图 2),白花泡桐差异蛋白质被分为 14 个 COG 类别中,有 20%的蛋白质参与翻译后修饰、蛋白质周转、伴侣;17%的蛋白质参与能量产物与转换;16%的蛋白质参与翻译、核糖体结构和起源,毛泡桐差异蛋白质被分为 16 个 COG 类别

中,有 19.79%的蛋白质参与能量产物与转换;18.75%的蛋白质参与翻译后修饰、蛋白质周转、伴侣;16.67%的蛋白质碳水化合物转运与代谢。2 种泡桐中的其他蛋白质可分别归入细胞壁/薄膜/膜的生物合成、信号转导与氨基酸转运与代谢等方面。



注:A:翻译后修饰、蛋白质转运、分子伴侣;B:能量生成与转换;C:翻译、核糖体结构和起源;D:碳水化合物转运与代谢;E:一般功能预测;F:无机离子转运与代谢;G:氨基酸转运与代谢;H:细胞壁/薄膜/膜的生物合成;I:核苷酸转运与代谢;J:信号转导机制;K:染色质结构;L:细胞骨架;M:未知功能;N:脂质转运与代谢;O:次级代谢产物的合成、转运和代谢;P:复制、重组和修复;Q:辅酶转运与代谢。

图 2 白花泡桐和毛泡桐差异蛋白质的 COG 分析  
Fig. 2 COG function classification of the differentially abundant proteins in *P. fortunei* and *P. tomentosa*

最后,又将 2 种泡桐鉴定到的差异表达蛋白质进行 KEGG pathway 分析(表 3)。白花泡桐中 222 差异表达蛋白质参与 136 个代谢通路,其中,代谢途径(4 015.69%)、次生代谢产物生物合成(197.45%)、抗生素的生物合成(166.27%)是蛋白质富集最多的途径。在毛泡桐中,有 177 个蛋白质参与 146 个代谢通路,其中,代谢途径(4 918.99%)、次生代谢产物生物合成(186.98%)、不同环境中的微生物代谢(166.2%)是蛋白质富集最多的途径。

2.3 与泡桐丛枝病发生相关的差异表达蛋白质的功能及亚细胞定位分析

为进一步排除 DMS 对蛋白质的影响,将白花泡桐和毛泡桐鉴定到的差异表达蛋白质进行比对,方案如图 3 所示,进而获取与泡桐丛枝病密切相关的蛋白质。经比对,最终得到 12 个与泡桐丛枝病发生密切相关的差异蛋白质,蛋白质名称见表 4。然后将这些蛋白质进行 GO 功能注释和 KEGG pathway 分析。结果表明,差异表达蛋白质注释到 22 个 GO term(图 4)和 16 个代谢途径(图 5)中,在 GO 功能分类,与“细胞组分”相关的差异表达蛋白质主要集中在细胞、细胞部分、细胞器和细胞器部分;与“分子功能”相关的差异表达蛋白质主要集中在结合、催化和分子结构;而与“生物学过程”相关的差异

表达蛋白质主要集中在细胞过程、代谢过程和对刺激的响应。KEGG 分析显示这些蛋白主要参与次生代谢产物的生物合成 (ko01110)、光合作用 (ko00195)和核糖体 (ko03010)代谢途径中。

随后,又对筛选出的 12 个与丛枝病发生相关的

差异蛋白质进行了亚细胞定位,结果表明 7 个 (58.33%)蛋白质定位于叶绿体中,3 个 (25%)定位于线粒体中,1 个 (0.833%)定位于细胞质中,1 个 (0.833%)定位于细胞核中(表 4)。

表 3 白花泡桐和毛泡桐差异蛋白分布比例最多的 10 条代谢通路

白花泡桐差异蛋白质所占比例最多的 10 条代谢通路			毛泡桐总蛋白质所占比例最多的 10 条代谢通路		
Pathway	蛋白质数目 (比例/%)	Pathway ID	Pathway	蛋白质数目 (比例/%)	Pathway ID
代谢途径	40(15.69)	ko01100	代谢途径	49(18.99)	ko01100
次生代谢产物的生物合成	19(7.45)	ko01110	次生代谢产物的生物合成	18(6.98)	ko01110
抗生素的生物合成	16(6.27)	ko01130	不同环境中的微生物代谢	16(6.2)	ko01120
碳代谢	15(5.88)	Ko01200	光合作	15(5.81)	ko00195
不同环境中的微生物代谢	15(5.88)	ko01120	抗生素的生物合成	13(5.03)	ko01130
光合作用	12(4.7)	ko00195	碳代谢	13(5.03)	Ko01200
核糖体	12(4.7)	ko03010	光合生物固碳反应	8(3.1)	ko00710
光合生物固碳反应	9(3.52)	ko00710	乙醛酸和二羧酸代谢	8(3.1)	Ko00630
氨基酸的生物合成	8(3.37)	Ko01230	丙酮酸代谢	6(2.32)	ko00620
乙醛酸和二羧酸代谢	6(2.35)	Ko00630	核糖体	6(2.32)	ko03010

表 4 与丛枝病发生相关的差异表达蛋白质的亚细胞定位

Table 4 Subcellular localization analysis of the differentially abundant proteins related to PaWB				
登录号	蛋白质名称	PF vs. PFI (上调/下调)	PT vs. PTI (上调/下调)	亚细胞定位
	光合作用和能量代谢			
gi 445116	叶绿素 a-b 结合蛋白 CP29.2	下调	下调	叶绿体
gi 225459918	叶绿素 a-b 结合蛋白 CP26	下调	下调	叶绿体
gi 147797758	光系统 I 反应中心亚基 II	下调	下调	叶绿体
gi 30013659	光系统 I 反应中心亚基 III	下调	下调	叶绿体
gi 45386393	光系统 II D2 蛋白	下调	下调	叶绿体
gi 3334201	甘氨酸解离系统蛋白	下调	上调	线粒体
gi 225427234	甘氨酸解离系统蛋白	下调	上调	线粒体
gi 21388550	NAD-依赖性苹果酸脱氢酶	下调	下调	线粒体
	蛋白质翻译			
gi 118485188	核糖体蛋白 L12	上调	上调	细胞质
	抗逆性			
gi 2632088	脂类相关质体蛋白	上调	上调	叶绿体
gi 28172915	3-磷酸甘油酸激酶	下调	上调	叶绿体
gi 302781887	组蛋白 H2B.3	下调	上调	细胞核

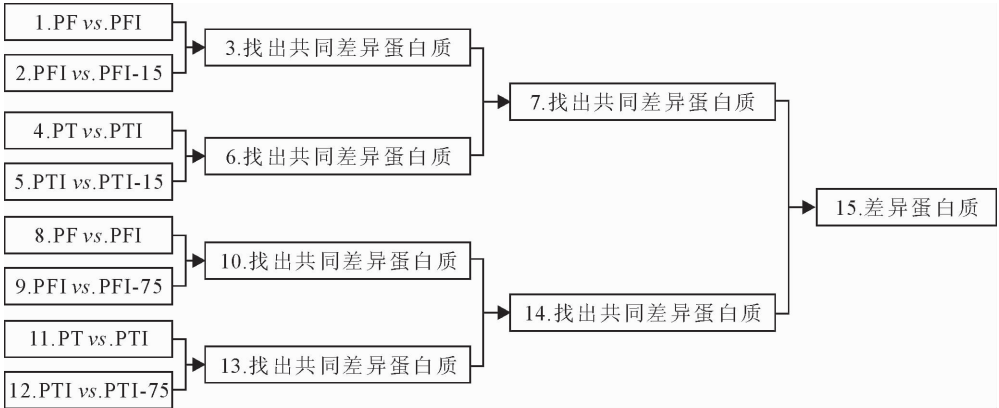


图 3 与丛枝病发生相关差异表达蛋白质的比对方案

Fig. 3 Comparison of differentially abundant proteins related with PaWB

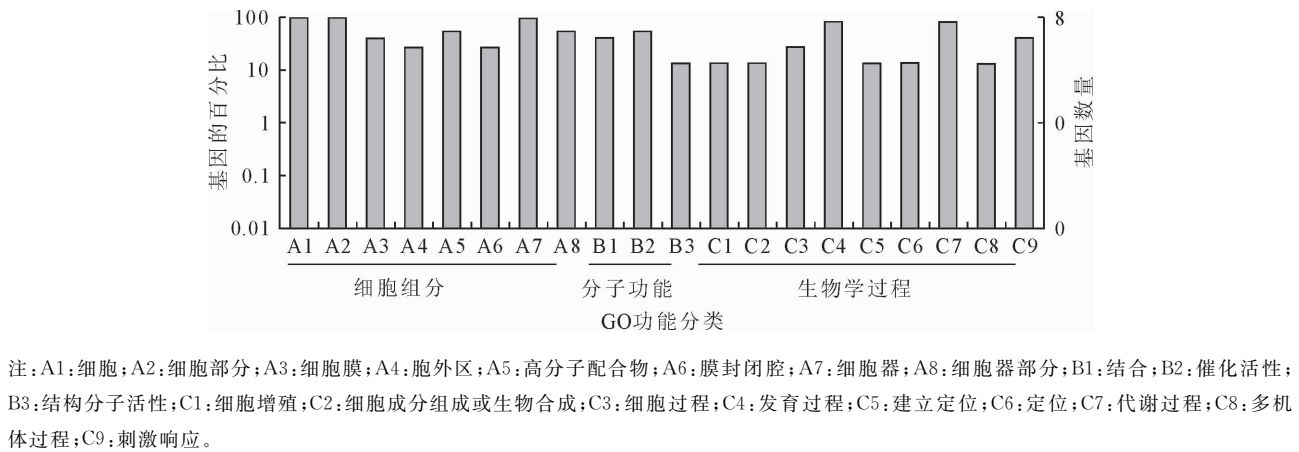


图 4 与泡桐丛枝病发生相关蛋白质的 GO 功能分析结果

Fig. 4 GO function analysis of the proteins related to PaWB

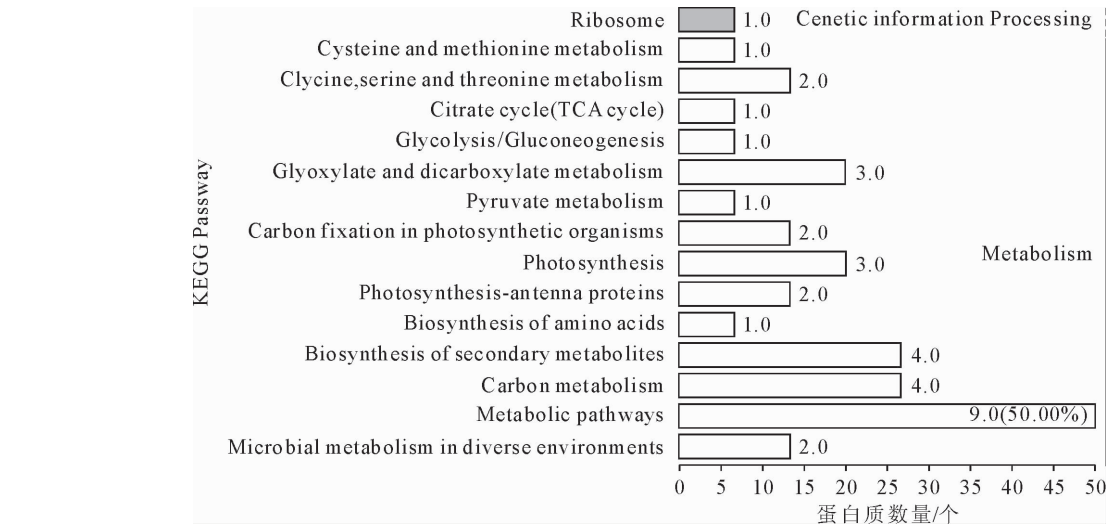


图 5 与泡桐丛枝病发生相关蛋白质的 KEGG 代谢通路

Fig. 5 KEGG pathway analysis of the proteins related to PaWB

### 2.4 差异表达蛋白质的 qRT-PCR 验证

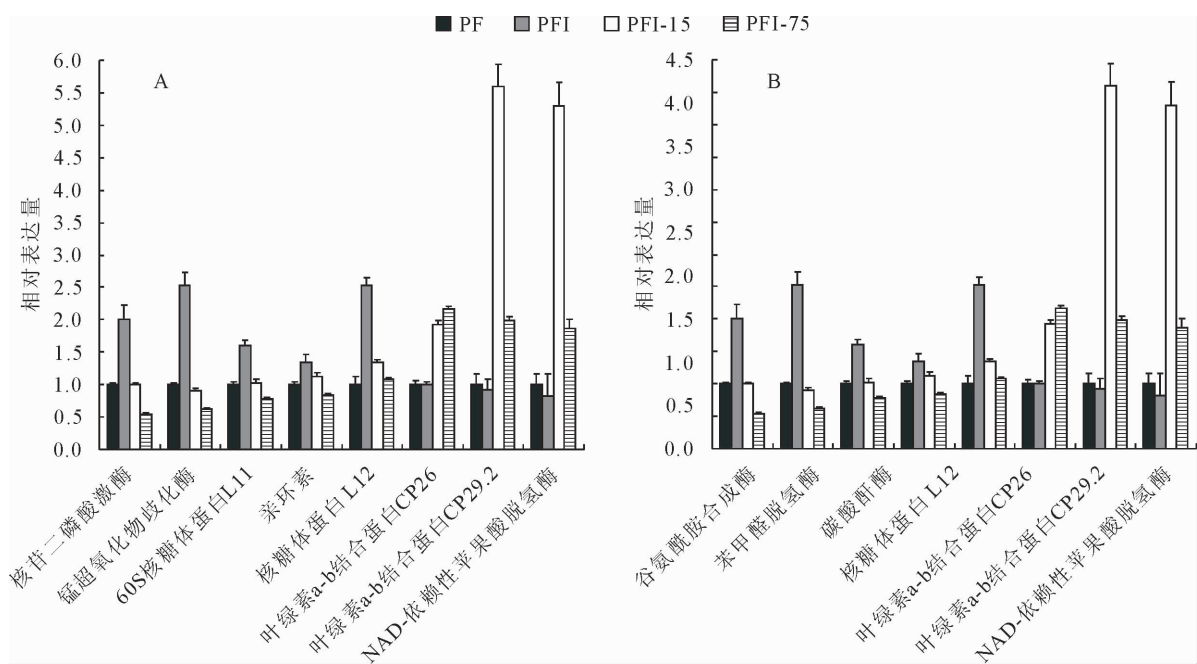
为了验证 iTRAQ 技术分析结果的可靠性,本研究挑选 11 个蛋白质进行 qRT-PCR 验证。结果显示(图 6),在白花泡桐中核苷二磷酸激酶、锰超氧化物歧化酶、60S 核糖体蛋白 L11、核糖体蛋白 L12 和叶绿素 a/b 结合蛋白 CP26 在 mRNA 水平与它们的蛋白质水平呈现一致的表达趋势,亲环素(环孢素 A 结合蛋白)、叶绿素 a/b 结合蛋白 CP29.2 和 NAD-依赖性苹果酸脱氢酶在转录水平与蛋白质水平表达趋势不一致。而在毛泡桐中谷氨酰胺合成酶、核糖体蛋白 L12、叶绿素 a/b 结合蛋白 CP26、叶绿素 a/b 结合蛋白 CP29.2 和 NAD-依赖性苹果酸脱氢酶在 mRNA 与蛋白质水平上呈现趋势具有一致性,碳酸酐酶、苯甲醛脱氢酶在转录水平和蛋白质水平上不一致。造成该结果可能与 mRNA 的降解、蛋白的降解、折叠修饰、种间差异等因素有关<sup>[26]</sup>。

### 3 结论与讨论

当植物受到病原菌侵害时,植物将改变体内蛋白质的表达来完成信号的感应、传递,进而引发植物相应的反应机制。植物体内蛋白质的变化在一定程度上反应了植物对外界环境的适应<sup>[35]</sup>,因此,对蛋白质的表达模式和功能模式进行研究,可以更好地了解植物和病原菌之间的互作机制。在泡桐丛枝病的蛋白质组学研究中,研究者通过比较分析不同试剂处理下的蛋白质表达图谱后挖掘出部分与丛枝病发生相关的蛋白质<sup>[29-31]</sup>。为了进一步筛选与丛枝病发病密切的蛋白质,本研究利用 iTRAQ 技术对白花泡桐和毛泡桐健康、患丛枝病组培幼苗及 15 mg · L<sup>-1</sup>和 75 mg · L<sup>-1</sup> DMS 处理患病组培幼苗为材料进行分析,筛选与泡桐丛枝病发生密切相关的蛋白质,有利于泡桐丛枝病发病机制的进一步研究。

叶绿体是生物胁迫期间发挥关键作用的细胞





注:A. 白花泡桐差异表达蛋白质的 qRT-PCR 验证;B. 毛泡桐差异表达蛋白质的 qRT-PCR 验证。

图 6 白花泡桐和毛泡桐差异表达蛋白质的 qRT-PCR 验证

Fig. 6 Quantitative RT-PCR analysis of differentially abundant proteins in *P. fortunei* and *P. tomentosa*

器,当植物受病原菌侵染时,一些病原菌的效应子能够破坏寄主体内叶绿体的功能以利于病原的繁殖<sup>[36]</sup>。本研究筛选出 12 种与泡桐丛枝病发生密切相关的差异表达蛋白质,其主要定位于叶绿体(7 种,58.33%),表明泡桐叶片细胞中的叶绿体蛋白主要参与了病原菌胁迫后的宿主应答反应。

病原侵染植物后对其光合作用机制破坏较大,其中,光合器官是最易受病原菌侵染的部位,且光系统Ⅱ被认为比光系统Ⅰ更加脆弱<sup>[36]</sup>。在这项研究中,与丛枝病发生密切相关的蛋白质中 5 种(41.67%)参与了光合作用,3 种属于光系统Ⅱ(叶绿素 a-b 结合蛋白 CP29.2、叶绿素 a-b 结合蛋白 CP26、光系统Ⅱ D2 蛋白)、2 种属于光系统Ⅰ(光系统Ⅰ反应中心亚基Ⅱ、光系统Ⅰ反应中心亚基Ⅲ),且表达量均下调。本研究鉴定出的这 5 种蛋白质在 Z. Wang<sup>[30]</sup> 等和 Z. Cao<sup>[31]</sup> 等研究中没有发现,原因可能是研究背景和处理试剂不同且只在白花泡桐或者毛泡桐一个种中进行研究。Z. Wei<sup>[29]</sup> 等研究表明,叶绿素 a-b 结合蛋白 CP29.2 和光系统Ⅰ反应中心亚基Ⅲ蛋白与丛枝病发生相关且表达量下调,在泡桐响应植原体侵染时发挥重要作用,这与本研究结果一致。陈默<sup>[37]</sup> 等发现,稻瘟病菌侵染后叶绿素 a/b 结合蛋白在敏感水稻品种中显著下调,同时光合作用减弱,光合作用贮存能量的过程受到严重影响。在本研究中,叶绿素 a-b 结合蛋白 CP29.2 和叶绿素 a-b 结合蛋白 CP26 在植原体侵染后表达量

下调,在 DMS 处理后形态恢复的幼苗体内表达量上调,进而影响了捕光复合物(LHC)的合成,从而阻碍了捕光色素将光能传递到反应中心,造成寄主在感病时期的光合作用减弱,导致叶片发黄。

研究发现核糖体蛋白除了在翻译机制中的作用外,其在参与植物—病原体互作中也发挥重要作用<sup>[38]</sup>。Z. Wei<sup>[29]</sup> 和 Z. Wang<sup>[30]</sup> 等鉴定到核糖体蛋白 L12 与泡桐丛枝病发生相关,其表达量上调,泡桐体内翻译机制发生改变,响应丛枝病的发生。曹广英<sup>[39]</sup> 等从花生中克隆了核糖体蛋白 L29-1 基因,分析发现其在花生植株青枯菌胁迫条件下表达上调,与花生抗青枯病相关。在本研究中核糖体蛋白 L12 在白花泡桐和毛泡桐患病后均上调,为应对外界环境和内部的压力泡桐翻译机制发生变化,响应植原体侵染。但是由于核糖体蛋白有 80 多种,功能非常复杂,具体在泡桐中的功能还有待继续深入研究。

已有研究发现脂类相关质体蛋白(plastid-lipid-associated protein,简称 PAPs)也参与了植物的抗病反应。P. Margaria<sup>[40]</sup> 等研究发现植原体侵染酿酒葡萄后,PAPs 表达量上调。王欢<sup>[41]</sup> 等克隆了抗病野生华东 PAPs 基因 VpPAP1,在叶片上接种白粉菌后该基因上调表达,参与葡萄抗白粉病反应。本研究 PAPs 在植原体侵后的白花泡桐和毛泡桐中均上调表达,推测该蛋白参与了泡桐应答植原体侵染后的防御反应。

综上所述,本研究利用 iTRAQ 技术,筛选出了 12 种与泡桐丛枝病发生密切相关的蛋白质。功能分析表明,泡桐丛枝病的发生与光合作用、蛋白质翻译和抗性相关蛋白的差异表达密切相关。这些结果对于阐明泡桐感染丛枝病过程中蛋白质变化具有重要的意义,但是与泡桐丛枝病相关的蛋白并不能完全通过生物信息学进行分析,需要后续试验进行验证。

参考文献:

[1] 宋传生,胡佳续,林彩丽,等. 泡桐丛枝植原体胸苷酸激酶的原核表达、纯化及酶活性测定[J]. 林业科学研究,2014,27(6): 786-793.  
SONG C S, HU J X, LIN C L, *et al.* Prokaryotic expression, purification and enzyme activity assay of thymidylate kinase of the *Paulownia* witches'-broom phytoplasma[J]. Forest Research, 2014, 27(6): 786-793. (in Chinese)

[2] 姚焕英,高志勇,王君龙. 泡桐属植物生物学及药用价值研究[J]. 渭南师范学院学报,2016,31(16):29-34.  
YAO H Y, GAO Z Y, WANG J L. The study on the biology and medicinal value of plants in *Paulownia* [J]. Journal of Weinan Normal University, 2016, 31(16): 29-34. (in Chinese)

[3] 朱志文,李鹏,黄卫华,等. 间作类型对新造泡桐林生长及其土壤养分含量的影响[J]. 湖南林业科技,2017,44(2):15-19.  
ZHU Z W, LI P, HUANG W H, *et al.* Effects on the growth of the new *Paulownia fortunei* plantation and soil chemical properties responded by different intercropping patterns[J]. Hunan Forestry Science & Technology, 2017, 44(2): 15-19. (in Chinese)

[4] 陈占宽,杨艳坤,叶金山,等. 白花泡桐羧基肉桂酰辅酶 A 还原酶 mRNA 全序列克隆及序列分析[J]. 西北林学院学报,2011,26(4):99-103.  
CHEN Z K, YANG Y K, YE J S, *et al.* Cloning and analysis of cinnamoyl-CoA reductase mRNA of *Paulownia fortunei* [J]. Journal of Northwest Forestry University, 2011, 26(4): 99-103. (in Chinese)

[5] 胡佳续,唐芳,张莹,等. 天津滨海新区泡桐丛枝病植原体 16S rDNA 基因序列分析[J]. 中国植保导刊,2016,36(1):5-9.  
HU J X, TANG F, ZHANG Y, *et al.* Sequence analysis of 16S rDNA of phytoplasma causing *Paulownia* witches'-broom in Binhai new district of Tianjin [J]. China Plant Protection, 2016, 36(1): 5-9. (in Chinese)

[6] TAWIDIAN P, JAWHARI M, SOBH H, *et al.* The potential of grafting with selected stone fruit varieties for management of almond witches' broom [J]. Phytopathologia Mediterranea, 2018, 56(3): 458-469.

[7] 郑建伟,毕会涛,寇首道,等. 泡桐丛枝病发生过程中物质变化研究现状[J]. 河南科学,2000,18(4):405-407.

[8] 雷启义,董志,周江菊,等. 泡桐丛枝病的分子生物学研究进展[J]. 安徽农业科学,2008,36(22):9609-9610.  
LEI Q Y, DONG Z, ZHOU J J, *et al.* Advance of the molecular research on *Paulownia* witches' broom disease[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2008, 36(22): 9609-9564. (in Chi-

nese)

[9] LIU R, DONG Y P, FAN G Q, *et al.* Discovery of genes related to witches' broom disease in *Paulownia tomentosa* × *Paulownia fortunei* by a de novo assembled transcriptome[J]. Plos One, 2013, 8(11): e80238.

[10] MOU H Q, LU J, ZHU S F, *et al.* Transcriptomic analysis of *Paulownia* infected by *Paulownia* witches'-broom phytoplasma[J]. Plos One, 2013, 8(10): e77217.

[11] FAN G Q, DONG Y P, DENG M J, *et al.* Plant-pathogen interaction, circadian rhythm, and hormone-related gene expression provide indicators of phytoplasma infection in *Paulownia fortunei* [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2014, 15(12): 23141-23162.

[12] CAO X B, Fan G Q, Deng M J, *et al.* Identification of genes related to *Paulownia* witches' broom by AFLP and MSAP [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2014, 15(8): 14669-14683.

[13] FAN G Q, NIU S Y, ZHAO Z L, *et al.* Identification of microRNAs and their targets in *Paulownia fortunei*, plants free from phytoplasma pathogen after methyl methane sulfonate treatment[J]. Biochimie, 2016, 127: 271-280.

[14] FAN G Q, CAO Y B, DENG M J, *et al.* Identification and dynamic expression profiling of microRNAs and target genes of *Paulownia tomentosa*, in response to *Paulownia*, witches' broom disease[J]. Acta Physiologiae Plantarum, 2017, 39(1): 28.

[15] 曹亚兵,翟晓巧,邓敏捷,等. 泡桐丛枝病发生与代谢组变化的关系[J]. 林业科学,2017,53(6):85-93.  
CAO Y B, ZHAI X Q, DENG M J, *et al.* Relationship between metabolites variation and *Paulownia* witches' broom[J]. Scientia Silvae Sinicae, 2017, 53(6): 85-93. (in Chinese)

[16] WANG Z, ZHAI X Q, CAO Y B, *et al.* Long non-coding RNAs responsive to witches' broom disease in *Paulownia tomentosa* [J]. Forests, 2017, 8(9).

[17] FAN G Q, CAO Y B, WANG Z. Regulation of long non-coding RNAs responsive to phytoplasma infection in *Paulownia tomentosa* [J]. International Journal of Genomics, 2018, 2018(22): 1-16.

[18] CAO Y B, FAN G Q, ZHAI X Q, *et al.* Genome-wide analysis of lncRNAs in *Paulownia tomentosa*, infected with phytoplasmas[J]. Acta Physiologiae Plantarum, 2018, 40(3): 49.

[19] 范国强,赵改丽,翟晓巧,等. 硫酸二甲酯处理豫杂一号泡桐丛枝病幼苗的形态变化及其 SSR 分析[J]. 东北林业大学学报, 2011, 39(5): 30-33.  
FAN G Q, ZHAO G L, ZHAI X Q, *et al.* Morphological changes of *Paulownia tomentosa* × *P. fortunei* seedlings with witches' broom treated with dimethyl sulphonate and their SSR analyses[J]. Journal of Northeast Forestry University, 2011, 39(5): 30-33. (in Chinese)

[20] 赵改丽,赵振利,范国强,等. 硫酸二甲酯对白花泡桐丛枝病幼苗形态变化及 DNA 碱基序列的影响 [J]. 河南农业大学学报, 2011, 45(3): 287-291.  
ZHAO G L, ZHAO Z L, FAN G Q, *et al.* Effects of dimethyl sulphonate on the morphological changes of *Paulownia fortunei* seedlings with witches' broom and their DNA base se-



quences[J]. Journal of Henan Agricultural University, 2011, 45(3): 287-291. (in Chinese)

[21] 范国强, 赵改丽, 翟晓巧, 等. 硫酸二甲酯对毛泡桐丛枝病幼苗植原体及 SSR 扩增位点的影响[J]. 南京林业大学学报: 自然科学版, 2012, 36(3): 5-8.

FAN G Q, ZHAO G L, ZHAI X Q, *et al.* Effect of dimethyl sulphate on phytoplasma of *Paulownia tomentosa* seedling infected by witches' broom and its DNA loci at SSR level[J]. Journal of Nanjing Forestry University: Nat. Sci. Edi., 2012, 36(3): 78 - 84. (in Chinese)

[22] 周凯凯, 张胜, 赵忠. 不同树龄银杏叶片差异蛋白组学研究[J]. 西北林学院学报, 2018, 33(1): 105-112.

ZHOU K K, ZHANG S, ZHAO Z, *et al.* Proteomic analysis on *Ginkgo* leaves with different ages[J]. Journal of Northwest Forestry University, 2018, 33(1): 105-112. (in Chinese)

[23] 张艺萍, 瞿素萍, 杨秀梅, 等. 百合抗病无性系抗枯萎病的蛋白质组学分析[J]. 园艺学报, 2018, 45(3): 530-540.

ZHANG Y P, ZHAI S P, YANG X M, *et al.* Proteomics analysis of lily blight disease-resistant clones[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2018, 45(03): 530-540. (in Chinese)

[24] ZHANG M, CHENG S T, WANG H Y, *et al.* iTRAQ-based proteomic analysis of defence responses triggered by the necrotrophic pathogen *Rhizoctonia solani* in cotton[J]. Journal of Proteomics, 2016, 152: 226-235.

[25] NI W C, ZHU L M, SHA R H, *et al.* Comparative iTRAQ proteomic profiling of susceptible and resistant apple cultivars infected by *Alternaria alternata* apple pathotype [J]. Tree Genetics & Genomes, 2017, 13(1): 23.

[26] LIU J, SUI Y, CHEN H Z, *et al.* Proteomic analysis of Kiwifruit in response to the postharvest pathogen, *Botrytis cinerea* [J]. Frontiers in Plant Science, 2018, 9: 1-15.

[27] 范国强, 李有, 郑建伟, 等. 泡桐丛枝病发生相关蛋白质的电泳分析[J]. 林业科学, 2003, 29(2): 119-122.

FAN G Q, LI Y, ZHENG J W, *et al.* SDS-PAGE of proteins related to *Paulownia* witches' broom[J]. Scientia Silvae Sinicae, 2003, 29(2): 119-122. (in Chinese)

[28] 王鹏伟, 史俊华. 5-氮胞苷和利福平对丛枝病泡桐幼苗形态和蛋白质变化的协同影响[J]. 河南林业科技, 2010, 30(3): 4-7.

WANG P W, SHI J H. Effects of 5-Aza and other extraneous substances on the changes of morphology and protein of *Paulownia* seedlings with witches' broom[J]. Journal of Henan Forestry Science and Technology, 2010, 30(3): 4-7. (in Chinese)

[29] WEI Z, WANG Z, LI X Y, *et al.* Comparative proteomic analysis of *Paulownia fortunei* response to phytoplasma infection with dimethyl sulfate treatment[J]. International Journal of Genomics, 2017, 2017(3): 1-11.

[30] WANG Z, LIU W S, FAN G Q, *et al.* Quantitative proteome-level analysis of *Paulownia* witches' broom disease with methyl methane sulfonate assistance reveals diverse metabolic changes during the infection and recovery processes [J]. Peerj, 2017, 5(7): e3495.

[31] CAO X B, FAN G Q, DONG Y P, *et al.* Proteome profiling of *Paulownia* seedlings infected with phytoplasma[J]. Frontiers in Plant Science, 2017(8).

[32] TANG Z, DU W, DU X L, *et al.* iTRAQ protein profiling of adventitious root formation in mulberry hardwood cuttings [J]. Journal of Plant Growth Regulation, 2016, 35(3): 618-631.

[33] DONG Y P, DENG M J, ZHAO Z L, *et al.* Quantitative proteomic and transcriptomic study on autotetraploid *Paulownia* and its diploid parent reveal key metabolic processes associated with *Paulownia* autotetraploidization [J]. Frontiers in Plant Science, 2016(7).

[34] CHOU K C, SHEN H B. Cell-PLoc 2. 0: an improved package of web-servers for predicting subcellular localization of proteins in various organisms[J]. Natural Science, 2010, 2(10): 1090-1103.

[35] 张彩霞, 李壮, 陈莹, 等. 植物与病原菌互作的蛋白质组学研究进展[J]. 西北植物学报, 2010, 30(3): 626-632. (in Chinese)

ZHANG C X, LI Z, CHEN Y, *et al.* Advances in proteomic studies on the plant-pathogen interactions[J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2010, 30(3): 626-632. (in Chinese)

[36] SU F, VILLAUME S, RABENOELINA F, *et al.* Different arabisidopsis thaliana photosynthetic and defense responses to hemibiotrophic pathogen induced by local or distal inoculation of *Burkholderia phytofirmans* [J]. Photosynthesis Research, 2017: 1-14.

[37] 陈默, 宋吉强, 马洪雨. 水稻响应稻瘟病菌侵染的差异表达蛋白分析[J]. 中国科技论文, 2015, 10(12): 1408-1414.

CHEN M, SONG J Q, MA H Y. Analysis for differentially expressed proteins from rice in response to *Magnaporthe grisea* [J]. China Sciencepaper, 2015, 10(12): 1408-1414. (in Chinese)

[38] NAGARAJ S, SENTHILKUMAR M, RAMU V S, *et al.* Plant ribosomal proteins, RPL12 and RPL19, play a role in nonhost disease resistance against bacterial pathogens [J]. Frontiers in Plant Science, 2016(6): 1192.

[39] 曹广英, 吴琪, 唐月昇, 等. 花生核糖体蛋白 L29-1(RPL29-1) 基因克隆表达分析及载体构建[J]. 分子植物育种, 2016, 14(7): 1730-1736.

CAO G Y, WU Q, TANG Y Y, *et al.* Cloning expression analysis and expression vectors construction of 60S ribosomal protein L29-1(RPL29-1) gene from peanut [J]. Molecular Plant Breeding, 2016, 14(7): 1730-1736. (in Chinese)

[40] MARGARIA P, PALMANO S. Response of the *Vitis vinifera* L. cv. 'Nebbiolo' proteome to flavescent dorée phytoplasma infection[J]. Proteomics, 2011, 11(2): 212-224.

[41] 王欢, 史江莉, 李瑞民, 等. 野生华东葡萄脂类相关质体蛋白基因 VpPAP1 的克隆与表达[J]. 西北植物学报, 2014, 34(4): 645-650.

WANG H, SHI J L, LI R M, *et al.* Molecular cloning and expression of a plastid lipid-associated protein VpPAP1 related to uncinula necator infection in vitispseudoreticulata[J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2014, 34(4): 645-650. (in Chinese)