

环割阻断木薯光合作用与储藏根淀粉积累的蛋白质组学

乔景娟^{1,2}, 厉辉³, 潘冉冉^{1,2}, 曹萌萌³, 陈松笔^{2,*}

¹海南大学热带农林学院, 海口570228

²中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所/农业部木薯种质资源保护与利用重点实验室, 海南儋州571737

³南京农业大学农学院, 南京210095

摘要: 木薯叶片光合作用影响储藏根淀粉的积累, 但从全蛋白质组学分析其影响的分子机理尚未报道。本研究以SC5为试验材料, 环割木薯种茎阻断木薯光合作用与储藏根淀粉积累代谢通路, 用蛋白质组学方法分析叶片光合作用对储藏根淀粉积累的影响。结果表明木薯种茎环割后, 叶片 P_n 、 G_s 、 C_i 和 T_r 显著降低, 叶片蛋白酶SPS、AGPase表达显著降低。双向电泳和质谱法鉴定储藏根的30个差异蛋白质, 其功能涉及碳和能量代谢、分子伴侣、解毒和抗氧化等。利用差异蛋白质互作调控网络分析环割阻断叶片光合作用对储藏根淀粉积累的影响因子, 推测当具有强互作关系的蛋白质如PGM2、AT3G29320和ADG1及枢纽蛋白PGK下调, 会导致木薯叶片光合效率下降、储藏根淀粉积累减少和鲜薯产量降低。

关键词: 木薯; 种茎环割; 光合作用; 储藏根产量; 蛋白质组

木薯(*Manihot esculenta* Crantz)原产美洲热带, 是大戟科(Euphorbiaceae)木薯属(*Manihot*)灌木状多年生植物, 在全世界热带地区广为种植(Ribeiro等2012)。木薯于19世纪20年代引入我国(单文启等2013), 现已广泛分布于华南地区, 是我国南部地区重要的淀粉工业原料和潜在的粮食安全有效补充(陈松笔等2015)。

环割即环状割伤, 是在枝干上横割一道或数道深达木质部的圆环。环割直接导致表皮筛管破坏, 继而引起由叶片生产的光合产物通过表皮向下运输的过程受阻。光合产物在环割口上部的堆积会引起反馈调节, 使得光合速率降低(Di Vaio等2011; Roper和Williams 1989)。在许多物种中观察到环割会降低植物的光合作用(Urban和Alphonsout 2007; Zhou和Quebedeaux 2003)。通常认为环割引起的源库失衡是导致叶片光合速率下降的主要原因。但也有研究指出, 环割使植物光合作用的降低并不一定与碳水化合物积累有关。环割后叶片颜色会从绿色到黄色或红色转变(顾祝禹等2015), 颜色变化不仅由于叶绿素比类胡萝卜素更容易降解, 而且也与变黄过程中花青素和酚类化合物等的合成有关。本研究选用木薯品种‘华南5号’作为研究材料, 采用种茎环割处理, 利用双向电泳和质谱法研究储藏根的全蛋白质, 从全蛋白质水平分析叶片光合作用对储藏根淀粉积累的影响, 为选育高光效和高淀粉积累木薯品种提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本试验所用材料木薯(*Manihot esculenta* Crantz)‘华南5号’(SC5)来自中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所国家木薯种质资源圃。种植第7个月对木薯种茎环割, 环割宽度约为3 cm, 以未环割木薯SC5作为对照。

1.2 环割木薯叶片光合特性分析

选定种植第10个月时的环割木薯和对照健康植株顶端第4片完全展开功能叶, 采用便携式光合仪LI-6400 (LI-COR Biosciences公司, 美国)于上午10:00分析功能叶净光合速率(P_n)、气孔导度(G_s)、 CO_2 浓度(C_i)和蒸腾速率(T_r)。设定内置光源强度: $1\ 200\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$; CO_2 浓度: $500\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。每个处理选取植株3株, 每株选取3片功能叶, 重复3次读数(Lü等2009)。

1.3 环割木薯储藏根产量分析

分析种植第10个月时的环割木薯和对照单株鲜薯重, 每个处理15株, 用来分析木薯鲜薯产量。

1.4 环割木薯储藏根全蛋白质提取和分离

木薯SC5环割后储藏根全蛋白质提取采用

收稿 2018-09-03 修定 2018-12-01

资助 国家自然科学基金NSFC-CGIA重大国际地区合作项目(31361140366)和中国热带农业科学院蛋白质组学创新团队项目(17CXTD-29)。

* 通讯作者(songbichen@catas.cn)。

Chen等(2006)苯酚提取法,全蛋白质样品溶解后用Bradford试剂盒定量分析,蛋白质分离采用Chen等(2006)双向电泳方法。以未环割SC5储藏根全蛋白质图谱为对照,采用Delta2D双向电泳软件确定SC5环割后储藏根的差异蛋白质点,对平均差异表达量在 ± 1.50 以上的蛋白质进行标记(安飞飞等2015)。

1.5 蛋白质酶解及蛋白质质谱法鉴定

采用胰蛋白酶液酶解差异蛋白质点,利用MALDI-TOF-TOF-MS/MS进行蛋白质鉴定,最大允许漏切位点为1,二级质谱肽段质量精确度为0.5 Da。多肽带点情况为+1;参照数据库为Phytozome V12.1木薯数据库。

1.6 环割木薯储藏根蛋白质表达水平的分析

利用Western blot方法(Li等2010)对储藏根3种与淀粉积累相关的蛋白酶进行表达水平分析,包括尿苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶(UDP-glucose pyrophosphorylase, UGPase; Agrisera; 货号AS05086; 分子量: 51.6 kDa)、腺苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶(ADP-glucose pyrophosphorylase, AGPase; Agrisera; 货号AS111739; 分子量: 49.4 kDa)和蔗糖磷酸合成酶(sucrose phosphate synthase, SPS; Agrisera; 货号AS03035A, 分子量: 120~130 kDa, 可能检测到30/90 kDa的片段),用肌动蛋白(Actin Agrisera公司: 货号AS132640; 分子量: 45 kDa)作对照。

1.7 数据统计分析

利用SPSS 22.0软件进行数据分析,用Image J软件分析Western blot得到的条带,利用Microsoft Excel (2016版)软件绘图。采用双向电泳软件(Delta2D)分析SC5环割后木薯储藏根蛋白质图谱斑点的丰度,以未环割SC5作为对照。

2 实验结果

2.1 环割木薯叶片光合特性及储藏根产量分析

对种植第7个月时的木薯SC5种茎进行环割,待种植第10个月时,以未环割木薯SC5为对照,分

析环割木薯叶片的光合特性及其储藏根的鲜薯产量。结果表明木薯环割后, P_n 、 G_s 、 C_i 和 T_r 显著降低($P < 0.05$),同样,环割木薯储藏根的鲜薯产量也显著降低($P < 0.05$) (表1)。

2.2 淀粉合成相关蛋白质表达分析

SC5环割处理后,利用Western blot方法研究与淀粉积累相关的蛋白质UGPase、SPS和AGPase在储藏根的表达水平,以Actin为对照,确保每个处理储藏根样品的上样量一致(图1-A),研究结果表明环割处理后,UGPase表达水平(图1-B)与对照未环割木薯相比没有显著性差异($P > 0.05$),相反,SPS(图1-C)和AGPase(图1-D)的表达水平显著低于对照($P < 0.05$)。

2.3 环割木薯储藏根差异蛋白质分析

以未环割木薯SC5作为对照,通过苯酚沉淀法提取储藏根全蛋白质,经定量后,进行双向电泳分离、染色,得到重复性较好的对照(图2-A)和环割处理(图2-B)储藏根蛋白质双向电泳图谱,经过Delta2D软件分析储藏根的电泳图谱,得到平均差异表达量在1.5倍(安飞飞等2013)以上的蛋白质点30个(图2-C),包括上调表达点11个(红色箭头所指),下调表达点19个(蓝色箭头所指);有2个蛋白质点用灰色箭头表示上调或下调平均差异表达量低于1.5倍。通过差异蛋白质点的质谱分析及NCBI和Phytozome V12.1数据库搜索比对,成功匹配蛋白质点32个,运用KEGG数据库把鉴定出的蛋白质按功能分为9类(表2),包括碳代谢及能量代谢相关蛋白(10个,蛋白质点1、4、6、7、15、17、19、20、22和27)、分子伴侣蛋白(9个,蛋白质点2、3、5、13、14、16、30、31和32)、防御蛋白(3个,蛋白质点9、10和24)、结构蛋白(1个,蛋白质点21)、蛋白质生物合成蛋白(4个,蛋白质点12、18、23和29)、DNA及RNA代谢相关蛋白(1个,蛋白质点28)、次生代谢合成相关蛋白(2个,蛋白质点8、26)、抗氧化及解毒蛋白质(1个,蛋白质点11)与未

表1 环割木薯叶片光合特性和储藏根产量分析

Table 1 The analysis of photosynthetic characteristics of leaves and storage root yield from cassava using girdling treatment

处理方式	$P_n/\text{mmol}(\text{CO}_2)\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$	$G_s/\text{mol}(\text{H}_2\text{O})\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$	$C_i/\mu\text{mol}(\text{CO}_2)\cdot\text{mol}^{-1}(\text{air})$	$T_r/\text{mmol}(\text{H}_2\text{O})\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$	单株鲜薯产量/kg
对照	5.93 \pm 1.46 ^a	0.24 \pm 0.07 ^a	198.09 \pm 11.60 ^a	3.73 \pm 0.77 ^a	3.75 \pm 0.75 ^a
环割处理	2.94 \pm 1.37 ^b	0.07 \pm 0.04 ^b	172.45 \pm 12.08 ^b	1.50 \pm 0.75 ^b	1.25 \pm 0.56 ^b

表中同一列内标有不同小写字母的值表示在0.05水平上差异显著。

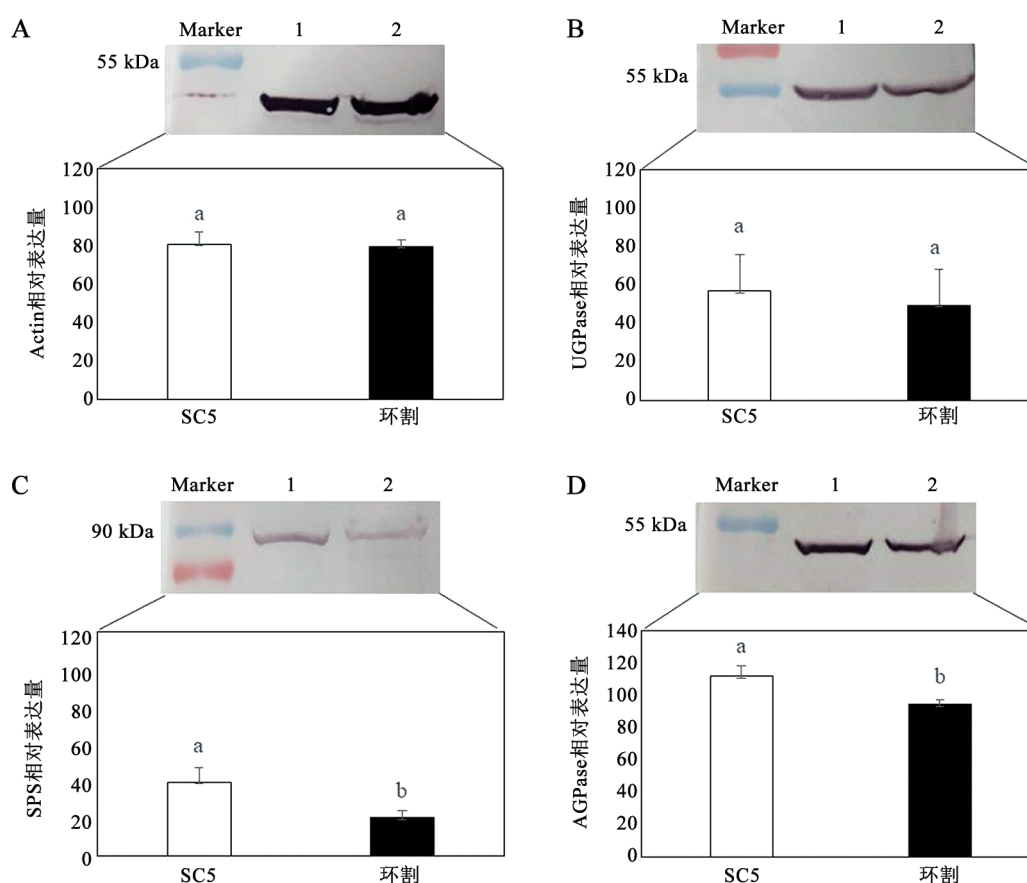


图1 淀粉合成相关蛋白质表达分析

Fig.1 Expression analysis of proteins related with starch synthesis in storage roots of girdled cassava

A: Actin; B: UGPase; C: SPS; D: AGPase; 图中柱上不同小写字母的值表示在0.05水平上差异显著。

知功能蛋白(1个, 蛋白质点25)。其中, 碳代谢与能量代谢相关的差异蛋白质所占比例最大, 为33.3%, 分子伴侣次之, 占30.0%。从表2可知, 木薯SC5环割后, 与结构、蛋白质合成、DNA及RNA代谢和次生代谢合成相关的蛋白质在储藏根均下调表达。在碳代谢及能量代谢中, 有70%的蛋白质下调表达, 在分子伴侣蛋白中, 有55.6%的蛋白质上调表达。灰色箭头表示的蛋白质点6和25分别鉴定为UGP2和功能未知蛋白质。

2.4 环割木薯储藏根蛋白质互作调控网络构建

将匹配得到的25个蛋白质和经Western blot方法验证的蛋白质SPS通过String在线软件构建蛋白质互作调控网络, 由图3可知有20个蛋白质发生互作关系, 有6个蛋白质没有发生互作关系。互作最多的蛋白质是磷酸甘油酸酯激酶(phosphoglycerate kinase, PGK; 点27)和70 kDa热休克蛋白(cpHsc70-2,

点2和3), 它们均同10种蛋白质发生互作关系; 其次是70 kDa热休克蛋白1/8 (HSP70, 点16), 含9种蛋白质互作关系; 再次是淀粉磷酸化酶(starch phosphorylase, AT3G29320, 点1、7和15)和蛋白二硫异构酶(protein disulfide isomerase like 1-1, PDIL1-1; 点18), 含6种蛋白质互作关系。4个碳代谢及能量代谢相关蛋白质葡萄糖磷酸变位酶(phosphoglucomutase, PGM2)、淀粉磷酸化酶(AT3G29320)、葡萄糖-1-磷酸腺苷酰转移酶(glucose-1-phosphate adenylyltransferase, ADG1)和尿苷三磷酸-葡萄糖-1-磷酸尿苷酰基转移酶(UTP-gucose-1-phosphate uridyltransferase, UGP2)有很强互作关系; 而6个分子伴侣蛋白质70 kDa热休克蛋白1/8 (HSP70)、25.3 kDa热休克蛋白(HSP21)、II类热休克蛋白(HSP17.6II)、热休克蛋白(ATHSP22.0)、抑瘤蛋白13 (TDX)和小热休克蛋白HSP 20家族(AT1G53540)有很强的互作关系。

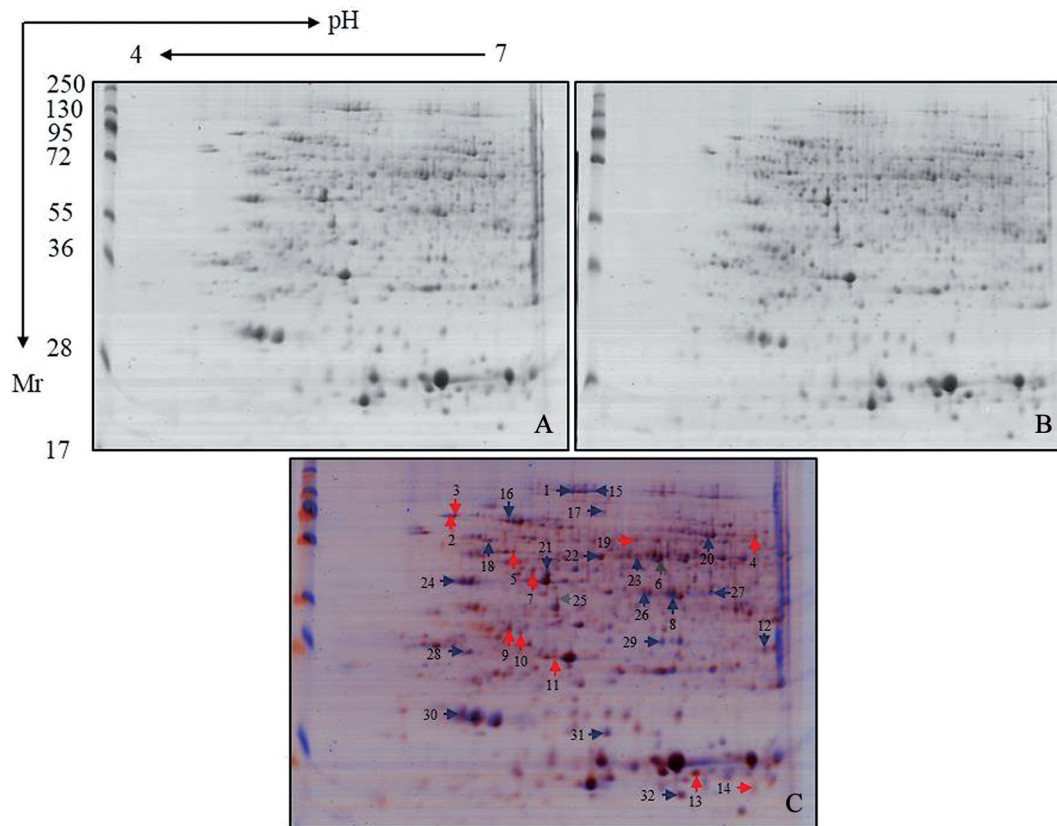


图2 环割木薯储藏根差异蛋白质分析

Fig.2 The analysis of differential proteins from storage roots of girdled cassava

A: 未环割木薯储藏根双向蛋白图谱; B: 环割处理木薯储藏根双向蛋白图谱; C: 未环割和环割处理木薯储藏根双向蛋白图谱叠加图。以未环割木薯SC5作为对照, 红色箭头表示上调, 蓝色箭头表示下调, 灰色箭头表示既不上调也不下调。

3 讨论

在木薯生长发育过程中, 光合作用决定着储藏根干物质的积累; 而光合速率是评价木薯品种丰产性的重要指标。影响净光合速率的因素主要有光合速率、气孔导度、细胞间 CO_2 浓度和蒸腾速率等, 它们在光合作用过程中协同作用, 使光合作用的同化物合成能顺利进行(李健等2014)。由此可知叶片的光合作用能力能显著影响木薯储藏根产量的形成(Zhang等2015)。木薯环割处理后, 通过测量光合速率发现, 木薯叶片净光合速率、气孔导度、胞间 CO_2 浓度和蒸腾速率均显著下降, 导致光合作用显著受到抑制, 进而使木薯储藏根产量降低。

通过Western blot方法分析对照SC5和环割处理后木薯储藏根与淀粉合成相关蛋白质UGPase、SPS和AGPase的表达水平, 显示SPS和AGPase的表

达水平显著下降; 而UGPase的表达水平没有发生显著变化。Munch-Petersen等(1953)在酵母细胞中发现UGPase催化UTP和葡萄糖-1-磷酸生成UDP-葡萄糖(UDP-glucose, UDPG)和 PPi ; 而在高等植物中, 产物UDPG被发现作为主要的葡萄糖基供体参与蔗糖、糖蛋白、纤维素等许多糖类代谢(吴晓俊等2000)。双向电泳和Western blot结果均显示环割对UGPase的表达没有造成影响。作为木薯淀粉合成中的关键限速酶, AGPase催化葡萄糖-1-磷酸与ATP作用生成ADP-葡萄糖(ADP-glucose, ADPG), 为木薯淀粉合成提供葡萄糖基, 进而决定木薯储藏根的产量(Sweetlove等1999), 是影响木薯产量的关键酶。SPS最早在小麦胚芽中发现(Leloir和Cardini 1995), 是以UDPG为供体, 以6-磷酸果糖(F-6-P)为受体的糖转移酶。SPS是蔗糖合成过程中的限速酶, 催化6-磷酸蔗糖脱磷酸并水解形成蔗糖和磷酸根离子(李永庚等2001)。蔗糖是高等植物光合

表2 环割木薯储藏根蛋白质鉴定

Table 2 Identification of the proteins extracted from storage roots of girdled cassava

类别	序号	功能	对应拟南芥 蛋白质名称	序列号	分子量/ kDa	等电 点	差异量 (均值标准差)	数目/个	独特肽段 数目/个	独特肽段序列
碳与能量代谢	1	淀粉磷酸化酶	AT3G29320	Manes.02G052600.1.p	108.15	6.21	5.00±2.54(-)	2	EEVVAEPPPK; VVSGSDGK	
	4	苹果酸酶	NADP-ME3	Manes.16G109900.1.p	65.25	6.37	7.49±0.48(+)	15	AYELGLATR; DAHYLR; DEFYIGLR; GGASVLDMDPK; GLAFTEK; GLIVSSR; GLLPPVVASQQLQEK; INAPIEEAR; LPRPENLVK; QNYGEK; RINAPIEEAR; SIQVIVVTDGER; YAESCMYSPVYR; YGSIFK; YMAMMELEER	
	6	尿苷三磷酸-1- 葡萄糖-1- 磷酸尿苷酰 基转移酶	UGP2	Manes.02G080600.1.p	51.64	6.03	1.06±0.11(-)	19	FFDHAIGINVPR; GGTLISYEGK; ILSHLIR; LDSLLQGK; LEIPDGAIVNK; LNGGLGTTMGCTGPK; LVEADALK; LVVEDFTPLPSK; MEIIPNPK; NKNEYCMEVTPK; NGFISLVAR; NKNEYCMEVTPK; SAVAGLNQISENEK; SIPSIIELDLSLK; SNVEIHFNQSQYPR; SVIEVR; VLQLETAAGAAIR; VSNFLSR; YLSGEAQQVEWSK	
	7	淀粉磷酸化酶	AT3G29320	Manes.02G052600.1.p	108.15	6.21	2.14±0.04(+)	12	AFVATAQSVR; AVEALANAEEK; EAWNITQR; ESDLLEK; HEPDAALGNGLGR; LGHDLESVAR; NDISYPVK; STINLR; VVSGSDGK; WEDEPEK; WSLDLMOQK; YHAEFTPLFSPEK	
	15	淀粉磷酸化酶	AT3G29320	Manes.02G052600.1.p	108.15	6.21	2.86±1.53(-)	11	AYEALANAEEK; DFPSSVYECQEK; ESDLLEK; FADNEDFQIQR; FCNPDLK; HEPDAALGNGLGR; LGHDLESVAR; NDISYPVK; STINLR; WEDEPEK; YHAEFTPLFSPEK	
	17	NADH脱氢酶 (泛醌)铁硫 蛋白1	EMB1467	Manes.02G078500.1.p	81.22	5.92	5.31±3.72(-)	12	AAIENFYMTDPVTK; ALSEVAGVR; DAIFSTVEAIAK; GADGLFK; GMTVLQACEVAGVDIPR; GSSEEIGTYVEK; GTESIDVTDVAGSNIR; LNDPMIR; LINEDINEEWISDK; LPYDTIGAVR; LSDAESMMALK; NLGPLVK	
	19	磷酸甘油酸脱 氢酶	EDA9	Manes.10G074000.1.p	63.18	7.01	1.79±1.34(+)	11	APDDLDIR; FASAIISDTGEIK; GGVIDEEALVK; LAVQLVAGSGGVK; LGEAGLELLK; MLNDETEAK; QAVMAIGVDEQPK; QVDQPGMIGK; TLAVVMGFVK; VAYGSAR; YVGVSLVKG	
	20	葡萄糖磷酸变 位酶	PGM2	Manes.15G131800.1.p	63.66	6.37	2.23±0.27(-)	14	AIKPTVLIGSSGVGR; AYELGLATR; DEFYIGLR; GGASVLDMDPK; GLAFTEK; GLIVSSR; GLLPPVVASQQLQEK; INAPIEEAR; IWLVDK; LPRPENLVK; SIQVIVVTDGER; YAESCMYSPVYR; YGSIFK; YMAMMELEER	
	22	葡萄糖-1-磷酸 腺苷酰转移酶 小亚基	ADG1	Manes.12G067900.1.p	57.58	7.16	3.46±1.70(-)	7	ELPFIASMGIVVYSK; IIEFAEKPK; IINGDNVQEAAR; MLDADVTDSVIGEGCVIK; NSQICLDPDASR; NVMLDLR; VDTTILGLDDEE	

表2 (续1)

类别	序号	功能	对应拟南芥 蛋白质名称	序列号	分子量/ kDa	等电点	差异量 (均值标准差)	独特肽段 数目/个	独特肽段序列
	27	磷酸甘油酸酯 激酶	PGK	Manes.06G176500.1.p	42.53	6.53	2.06±0.34(-)	15	AHASTEGVAK; AQQYVSGSSLVVEEDK; ELDYLVGAVANPK; GVSLLLPDVIADK; GVTTIIGGGDSVAAVEK; IANDCIGEEVEK; IGVIESLLAK; KPFAAIVGGSK; LAALADVYVNDAFGTAHR; LAELSGK; LDLATSLIEK; LSELLGVQVK; NDPEFAK; TFCEALDTTK; VDLNVPLDDNSNITDDTR
分子伴侣	2	70 kDa热休克 蛋白	cpHsc70-2	Manes.07G024700.1.p	75.34	4.95	2.00±0.51(+)	5	DAIADGGSTQGMK; DIDEVILVGGSTR; IAGLEVLR; NDEGIDLLK; QDITTTGASTLPSDEVER
	3	70 kDa热休克 蛋白	cpHsc70-2	Manes.07G024700.1.p	75.34	4.95	1.52±1.51(+)	5	DIDEVILVGGSTR; IAGLEVLR; IVDWLAGNFK; MSEVDEESK; NDEGIDLLK
	5	抑制蛋白13	TDX	Manes.01G074500.1.p	43.71	4.74	2.05±0.04(+)	8	AMLGQWEEAAK; ATEAISEGK; DANAALAINPDSAK; LFVEQCK; LPSSAYDHADSK; MGDPSVEVTEENR; SNPSVLSDPSSLFFR; SYVVEESDEEIEDK
	13	小热休克蛋白 HSP 20家族	AT1G53540	Manes.10G020100.1.p	17.96	6.56	2.22±0.42(+)	10	ANMENGVLK; EEVKVEIEDGR; EQEDVNDK WHR; ETAIAIATR; ETPESHIFTADLPGLK; FRLPENANMDQIR; KEEVKVEIEDGR; LPENANMDQIR; VEIEDGR; VLQISGER EEVKVEIEDGR; KEEVKVEIEDGR; LPENANMDQIR
	14	小热休克蛋白 HSP 20家族	AT1G53540	Manes.10G020100.1.p	17.96	6.56	21.94±0.73(+)	3	EEVKVEIEDGR; KEEVKVEIEDGR; LPENANMDQIR
	16	70 kDa热休克 蛋白1/8	HSP70	Manes.10G032000.1.p	71.52	4.84	2.74±0.82(-)	3	EIAEAYLGSSVK; FSDTSVQNDIK; NALENYSYNMR
	30	25.3 kDa 热休 克蛋白	HSP21	Manes.01G042200.1.p	26.26	8.20	4.38±1.93(-)	8	APWDIK; APWDIKEDENEFK; FDMPLGSK; IFEDAMTLPGSR; LKLPDNCEK; NGVLFISIPK; QMMDTMDR; SLSSYDTR
	31	热休克蛋白	ATHSP22.0	Manes.15G189500.1.p	23.61	6.31	2.67±1.08(-)	8	DDNSLELSLAR; FPDPR; IEVVEENR; LDVPGLR; LENGVLTLSFSK; LPDNVDLESVNAK; VLEQIPFGIER; VVDAVDQERPEPAK
防御保护	32	II类热休克蛋白	HSP17.6II	Manes.16G083600.1.p	17.67	5.85	2.57±0.05(-)	3	AMASTPADIK; LPPPEPK; VQVEDDNVLLISGER
	9	脱水蛋白	COR47	Manes.05G140400.1.p	24.67	5.16	2.54±1.27(+)	6	EEDTTVPIEK; KEEEDTTVPIEK; KGIFEK; KPGLLEK; VQYSEPEEK; YEEAEAAANQADEK
	10	脱水蛋白	COR47	Manes.05G140400.1.p	24.67	5.16	2.11±0.06(+)	5	EEDTTVPIEK; KEEEDTTVPIEK; KGFEK; KPGLLEK; VQYSEPEEK
	24	脱水蛋白	COR47	Manes.05G140400.1.p	24.67	5.16	2.24±0.46(-)	8	AHESETPVVEGSVAESK; EEDTTVPIEK; GLDFMCK; KEEDTTVPIEK; KEEKPGEVIVTEFEK; KGIFEK; KPGLLEK; YEEAEAAANQADEK

表2 (续2)

类别	序号	功能	对应拟南芥 蛋白质名称	序列号	分子量/ kDa	等电点	差异量 (均值标准差)	独特肽段 数目/个	独特肽段序列
结构	21	肌动蛋白	ACT7	Manes.12G150500.1.p	41.90	5.16	6.86±4.98(-)	12	AGFAGDDAPR; CDVDIR; DAYVGDEAQS; DLTDALMK; ETALAPSSMK; GEYDESGPSIVHR; GYMFTTTAER; HTGVMVGMGQK; IWHHTFYNELR; NYELPDGQVITIGAER; SSSVVEK; VVAPPER
蛋白合成	12	噻唑合酶	THI1	Manes.15G075600.1.p	37.63	6.51	3.00±1.66(-)	6	AAHLALK; ALDMNTAEDAIVR; HAALFTSTMSK; MGPTFGAMMISGQK; SIGMIENVPGMK; VVSSCGHIDGPFEGATGVK
	18	蛋白二硫异构酶	PDIL1-1	Manes.18G078600.1.p	55.89	4.80	2.14±0.78(-)	7	LDATANDIPSDTFDVK; GESSVTGPLVR; IVIVGVFPK; QSGPASVEIK; SAEDASNFVGDK; VAQEESPK; VVADSLQDMVINSKG
	23	亮氨酸氨酶	LAP2	Manes.06G034100.1.p	61.35	7.14	4.61±0.07(-)	16	ASQIVLR; ATGLTQPANIDVVK; DVDVVVEWK; EVFTAAEVSQEK; FDMGSAAVLGAAG; FQNSFLK; GDILTVGVTEK; GLTFDSGGYNIK; ILGEAIAAIAK; LDHLGGLLSEASSEEDFTGK; LNTASAIATGTVLGIYEDNR; QFVDEK; SGVADMVNTGGR; TGPGCSIELMK; TIEVNNIDAEGR; YAGDVSSAVIFGR
	29	噻唑合酶	THI1	Manes.15G075600.1.p	37.63	6.51	2.79±0.39(-)	6	ALDMNTAEDAIVR; HAALFTSTMSK; LFNAAEAEDLIVKNGR; MGPTFGAMMISGQK; SIGMIENVPGMK; VVSSCGHIDGPFEGATGVK
DNA和RNA代谢	28	Ran结合蛋白1	RANBP1	Manes.18G136500.1.p	24.15	4.71	2.52±0.88(-)	3	EENKDATAAADALGK; FASVENCK; LSVEEK
次生代谢合成	8	肉桂醇脱氢酶	CAD6	Manes.13G102500.1.p	39.90	6.08	2.32±0.31(-)	4	IVAGSAMGGMK; VGVGCIIVGACHSCDNCNR; VTVISTTPDK; YYGLAEPGK
	26	激发子激活 基因3-2	ELI3-2	Manes.02G206500.1.p	39.51	6.62	2.19±0.80(-)	2	VTVISTTPDK; YYGLAEPGK
解毒和抗氧化	11	L-抗坏血酸过 氧化物酶2	APX1	Manes.04G026800.1.p	27.77	5.19	3.48±1.51(+)	7	DIVVLSGGHTLGR; EDKPEPPEGR; GCAPLMLR; HAAEQGHAAANGLDIAVR; IAWHSAGTYDVK; TMGLTDK; TNTGGPFGTMR
功能未知蛋白	25	功能未知蛋白	AT5G16990	Manes.01G018800.1.p	38.82	5.25	1.12±1.31(+)	4	DYVSGFPK; LMGCYVVGSAGSQEK; QVVAIAHE; VVDSGHPDFK

表中“+”表示上调表达,“-”表示下调表达。

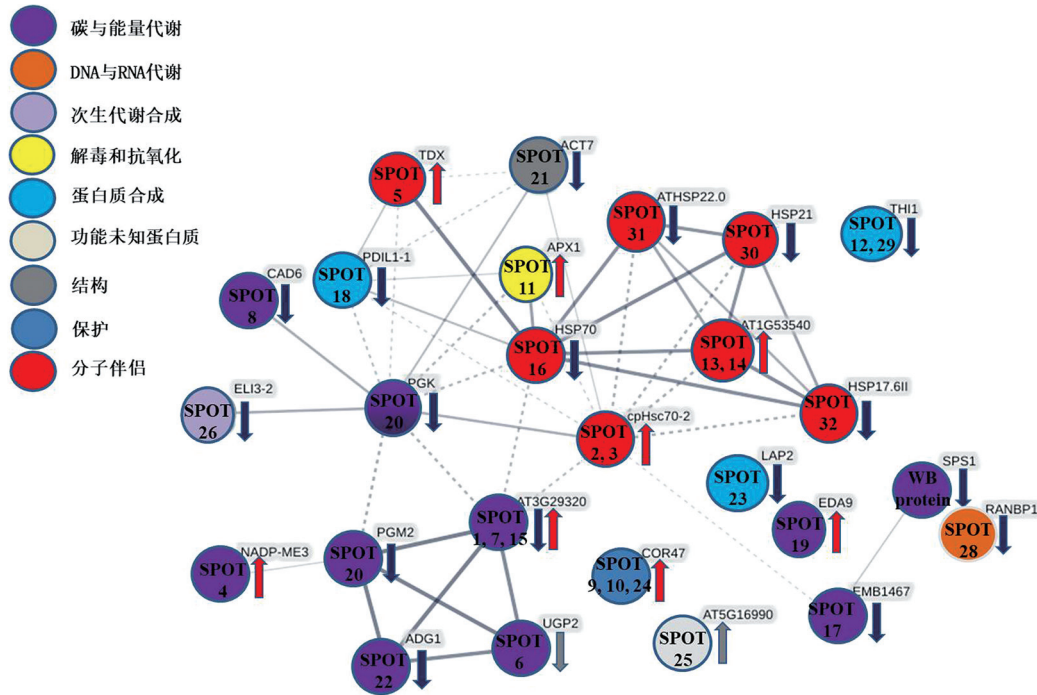


图3 环割木薯储藏根蛋白质互作调控网络构建

Fig. 3 The regulated network of protein-protein interaction from storage roots of girdled cassava

红色箭头表示上调, 蓝色箭头表示下调, 灰色箭头表示蛋白质既不上调也不下调。蛋白质节点的连线表示2个蛋白质间的互作, 粗线条表示强互作能力, 虚线表示弱互作能力。

作用的主要产物, 是碳运输的主要形式, 也是“库”代谢的主要基质; Hubbard等(1989)证实网纹甜瓜果实蔗糖积累与SPS活性上升相关。上述2种与产量相关的主要蛋白酶AGPase和SPS在环割处理后的木薯储藏根中下调表达。

以SC5块根为对照, 比较环割处理后储藏根的全蛋白质变化, 成功鉴定出了30个差异蛋白质点, 其中下调表达蛋白质几乎是上调表达蛋白质的2倍。利用String在线软件构建蛋白质互作调控网络图, 揭示了木薯储藏根淀粉积累的调控关系。在整个互作调控网络图中, 4个与能量代谢相关蛋白具有强互作关系, 除了UGPase表达没有显著变化外, 淀粉磷酸化酶(AT3G29320)既有上调表达, 也有下调表达, 其余2个下调表达。如葡萄糖磷酸变位酶(PGM2)催化葡萄糖-6-磷酸和葡萄糖-1-磷酸的相互转化, 从而保证了淀粉合成过程中葡萄糖-1-磷酸的供应, 促进了木薯储藏根淀粉的合成(李晓屿等2015)。磷酸甘油酸酯激酶(PGK)是糖酵解途径中一个重要的酶, 可催化1,3-二磷酸甘油转变为3-磷酸甘油酸, 同时产生1分子的ATP; PGK与

PGM2、AT3G29320、cpHsc70-2、HSP70、APX1、ACT7、TDX、PDIL1-1、CAD6和ELI3-2产生互作关系, 降低了淀粉的合成。伴侣蛋白参与到每一个生命活动中, 因此伴侣蛋白cpHsc70-2和HSP70的互作关系比较多。Carvalho等(2012)采用LC-MS/MS质谱法从深黄木薯储藏根有染色体中分离出与类胡萝卜素结合的蛋白质83个和不能与类胡萝卜素结合的蛋白质106个, 其中超过一半以上都是分子伴侣蛋白。据报道分子伴侣蛋白质对环境胁迫如热、冷、旱和盐胁迫等有一定的响应作用。在植物中, 分子伴侣蛋白被推测为氧化胁迫下的一种抗氧化剂, 或者是木薯储藏根中调控淀粉含量的重要工具(Qin等2017; An等2016)。

木薯种茎环割使得叶片光合器官对光能的吸收、传递、转化和电子捕获等过程遭到抑制, 使叶片光合速率明显降低, 储藏根鲜薯产量下降。通过从全蛋白质水平揭示储藏根产量降低的分子机理。利用蛋白质互作调控网络推测淀粉合成相关蛋白质参与多个代谢途径, 它们使各个代谢通路的蛋白质紧密相连, 构成一个相互作用的生物

调控网络。通过蛋白质互作调控网络筛选出的关键蛋白质有可能成为选育丰产木薯品种的标记蛋白质。

参考文献(References)

- An FF, Fan J, Li GH, et al (2013). Comparison of leaves proteome and chlorophyll fluorescence of cassava cv. SC8 and its tetraploid mutants. *Sci Agric Sin*, 46 (19): 3978–3987 (in Chinese with English abstract) [安飞飞, 凡杰, 李庚虎等(2013). 华南8号木薯及其四倍体诱导株系叶片蛋白质组及叶绿素荧光差异分析. *中国农业科学*, 46 (19): 3978–3987]
- An FF, Jian CP, Yang L, et al (2015). Chlorophyll contents and photosynthetic characteristics of cassava seedlings in response to NaCl stress. *Jiangsu J Agric Sci*, 31 (3): 500–504 (in Chinese with English abstract) [安飞飞, 简纯平, 杨龙等(2015). 木薯幼苗叶绿体含量及光合特性对盐胁迫的相应. *江苏农业学报*, 31 (3): 500–504]
- An FF, Li G, Li QX, et al (2016). The comparatively proteomic analysis in response to cold stress in cassava plantlets. *Plant Mol Biol Rep*, 34 (6): 1095–1110
- Carvalho LJ, Lippolis J, Chen S, et al (2012). Characterization of carotenoid-protein complexes and gene expression analysis associated with carotenoid sequestration in pigmented cassava (*Manihot esculenta* Crantz) storage root. *Open Biochem J*, 6: 116–130
- Chen SB, An FF, Zhu WL, et al (2015). Application of proteomics in cassava breeding. *Biotechnol Bull*, 31 (11): 18–26 (in Chinese with English abstract) [陈松笔, 安飞飞, 朱文丽等(2015). 蛋白质组学在木薯育种中的应用. *生物技术通报*, 31 (11): 18–26]
- Chen S, Glazer I, Gollop N, et al (2006). Proteomic analysis of the entomopathogenic nematode *Steinernema feltiae* IS-6IJs under evaporative and osmotic stresses. *Mol Biochem Parasit*, 145 (2): 195–204
- Di Vaio C, Petito A, Buccheri M (2011). Effect of girdling on gases-changes and leaf mineral content in the “independence” nectarine. *J Plant Nutr*, 24 (7): 1047–1060
- Gu ZY, Tang GL, Ai KY, et al (2015). Senescence mechanisms induced by phloem girdling in *Karelinia caspia*. *Chin J Plant Ecol*, 39 (11): 1082–1092 (in Chinese with English abstract) [顾祝禹, 唐钢梁, 艾克拜尔·伊拉洪等(2015). 韧皮部诱导下的花花柴衰老机制. *植物生态学报*, 39 (11): 1082–1092]
- Hubbard NL, Huber SC, Pharr DM (1989). Sucrose phosphate synthase and acid invertase as determinants of sucrose concentration in developing muskmelon (*Cucumis melo* L.) fruits. *Plant Physiol*, 91 (4): 1527–1534
- Leloir LF, Cardini CE (1955). The biosynthesis of sucrose phosphate. *J Biol Chem*, 214: 157–165
- Li J, Gu B, Long G, et al (2014). Test results of sanitary quality of edible cassava starch in Guangxi. *Agric Res App*, (3): 41–46 (in Chinese with English abstract) [李健, 古碧, 龙罡等(2014). 广西食用木薯淀粉卫生质量检测结果分析. *农业研究与应用*, (3): 41–46]
- Li K, Zhu W, Zeng K, et al (2010). Proteome characterization of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) somatic embryos, plantlets and tuberous roots. *Proteome Sci*, 8: 10
- Li XY, Li YH, Li H, et al (2015). Advances in research on phosphoglucomutase in plants. *Plant Physiol J*, 51 (5): 617–622 (in Chinese with English abstract) [李晓屿, 李玉花, 李晗等(2015). 植物葡萄糖磷酸变位酶的研究进展. *植物生理学报*, 51 (5): 617–622]
- Li YG, Yu ZW, Jiang D, et al (2001). Studies on the dynamic changes of the synthesis of sucrose in the flag leaf and starch in the grain and related enzymes of high yielding wheat. *Acta Agron Sin*, 27 (5): 658–664 (in Chinese with English abstract) [李永庚, 于振文, 姜东等(2001). 冬小麦旗叶蔗糖和籽粒淀粉合成动态及与其有关的酶活性的研究. *作物学报*, 27 (5): 658–664]
- Lü CG, Ma L, Shi Y (2009). Study on the diurnal changes of net photo-synthetic rate and the impact factors of *Stevia rebaudiana* Bertoni in autumn. *Amer J Plant Physiol*, 4 (1): 18–23
- Munch-Petersen A, Kalckar HM, Cutolo E, et al (1953). Uridyl transferases and the formation of uridine triphosphate; enzymic production of uridine triphosphate: uridine diphosphoglucose pyrophosphorolysis. *Nature*, 172 (4388): 1036–1037
- Qin Y, Djabou AS, An F, et al (2017). Proteomic analysis of injured storage roots in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) under postharvest physiological deterioration. *PLoS ONE*, 12 (3): e0174238
- Ribeiro MDNO, Carvalho SPD, Pereira FJ, et al (2012). Leaf anatomy of the cassava as related to potential for tolerance to different environmental conditions. *Rev Cienc Agron*, 43 (2): 354–361
- Roper TR, Williams LE (1989). Net CO₂ assimilation and carbohydrate partitioning of grapevine leaves in response to trunk girdling and gibberellic acid application. *Plant Physiol*, 89 (4): 1136–1140
- Shan WQ, Shang LM, Wang XM (2013). Present promotion situation and development strategies of cassava in Hainan Province. *Tropic Agric Eng*, 37 (3): 15–19 (in Chinese with English abstract) [单文启, 尚林梅, 王秀明(2013). 海南省木薯的推广现状及其发展策略. *热带农业工程*, 37 (3): 15–19]
- Sweetlove LJ, Müller-Röber B, Willmitzer L, et al (1999). The contribution of adenosine 5'-diphosphoglucose pyrophosphorylase to the control of starch synthesis in potato tubers. *Planta*, 209 (3): 330–337
- Urban L, Alphonsout L (2007). Girdling decreases photosynthetic electron fluxes and induces sustained photoprotec-

- tion in mango leaves. *Tree Physiol*, 27 (3): 345–352
- Wu XJ, Liu D, Hu ZB (2000). UDP-glucose pyrophosphorylase. *Plant Physiol Commun*, 36 (3): 193–200 (in Chinese with English abstract) [吴晓俊, 刘涤, 胡之璧(2000). 尿苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶. *植物生理学通讯*, 36 (3): 193–200]
- Zhang Y, Ding Z, Ma F, et al (2015). Transcriptional response to petiole heat girdling in cassava. *Sci Rep*, 5: 8414
- Zhou R, Quebedeaux B (2003). Changes in photosynthesis and carbohydrate metabolism in mature apple leaves in response to whole plant source-sink manipulation. *J Amer Soc Hortic Sci*, 128 (1): 113–119

Effects of girdling on proteomic changes related to photosynthesis and starch accumulation in storage root of cassava

QIAO Jing-Juan^{1,2}, LI Hui³, PAN Ran-Ran^{1,2}, CAO Meng-Meng³, CHEN Song-Bi^{2,*}

¹*Institute of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University, Haikou 570228, China*

²*Tropical Crops Genetic Resources Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences/Key Laboratory of Conservation and Utilization of Cassava Genetic Resources, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Danzhou, Hainan 571737, China*

³*College of Agriculture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China*

Abstract: The photosynthesis in leaves affects the starch accumulation in storage roots of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) plants; however, the molecular mechanism of this effects from the whole proteomics was not reported. In the present study, cassava cultivar ‘Southern China No.5’ was used as the experimental materials. Stem girdling of cassava blocked the relations between the pathways of photosynthesis and starch accumulation in the storage roots. The effects of leaf photosynthesis on the accumulation of starch in the storage roots were analyzed by proteomics. The results showed that P_n , G_s , C_i and T_r in leaves significantly reduced after girdling treatment, as well as the expression of sucrose phosphorylase (SPS) and adenosine diphosphate glucose pyrophosphorylase (AGPase). 2-DE in combination with the mass spectrometry was used to identify 30 differentially expressed proteins extracted from the storage root with girdling treatment. They involved in carbohydrate and energy metabolism, molecular chaperones, detoxifying and antioxidant, etc. The effects of photosynthesis on the accumulation of starch in storage roots were analyzed using the protein-protein interaction network generated from differential proteins. We speculated when phosphoglucosylase (PGM2), starch phosphorylase (AT3G29320) and AGPase (ADG1), which had strong relationships in protein-protein interaction network, and the hub protein phosphoglycerate kinase (PGK) were down-regulated, it resulted in the decrease of photosynthetic efficiency in functional leaves, starch accumulation in storage roots and fresh root yield of cassava treated with girdling.

Key words: cassava (*Manihot esculenta*); stem girdling; photosynthesis; storage root yield; proteome

Received 2018-09-03 Accepted 2018-12-01

This work was supported by NSFC-CGIA Major International (Regional) Joint Research Project (31361140366) and the Project of the Proteomics Innovation Team in Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences (17CXTD-29).

*Corresponding author (songbichen@catas.cn).