

水稻品种“佳辐占”应答细菌性条斑病原菌侵染的蛋白质组学分析

陈芳育¹ 黄青云² 张红心² 林涛² 郭玉春¹ 林文雄¹ 陈亮^{2,*} ①

(¹ 福建农林大学/生物农药与化学生物学教育部重点实验室, 福建福州 350002; ² 厦门大学生命科学学院/细胞生物学与肿瘤工程教育部重点实验室, 福建厦门 361005)

摘要: 运用双向电泳分析高抗水稻品种“佳辐占”受强毒力细菌性条斑病原菌侵染 2 d 后的叶片蛋白质组变化, 共发现 38 个蛋白质发生差异表达, 其中 32 个上调, 5 个下调, 1 个新增。用 MALDI-TOF-MS 分析和数据库检索鉴定出其中的 33 个差异表达蛋白质, 并将它们分为 4 个功能类群, 即信号转导相关蛋白、防卫相关蛋白、代谢相关蛋白和蛋白质稳定相关蛋白。这些蛋白分别参与了信号识别、信号传递、抗氧化、糖代谢、细胞壁加固、植保素合成等抗病生理反应。研究表明, 水稻对细菌性条斑病原菌的侵染存在着一个复杂的抗病信号应答和代谢调控网络, 其作用机理可以通过差异表达的蛋白质(酶)反映出来, 其中差异表达的 8 个 R 蛋白和 3 个 PR 蛋白可能与水稻对细菌性条斑病的抗病性密切相关。本研究为进一步揭示水稻对细菌性条斑病的抗性机理及相关抗病基因的功能克隆提供了依据。

关键词: 水稻; 细菌性条斑病; 蛋白质组学

Proteomic Analysis of Rice Cultivar Jiafuzhan in the Responses to *Xanthomonas campestris* pv. *oryzicola* Infection

CHEN Fang-Yu¹, HUANG Qing-Yun², ZHANG Hong-Xin², LIN Tao², GUO Yu-Chun¹, LIN Wen-Xiong¹, and CHEN Liang^{2,*}

(¹ Key Laboratory of Ministry of Education for Biopesticide and Biochemistry/ Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, Fujian; ² Key Laboratory of Ministry of Education for Cell Biology and Tumor Cell Engineering/ School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, Fujian, China)

Abstract: Rice bacterial leaf streak (BLS) caused by the pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* (Xooc) is one of the major rice diseases in South China. Here we focus on proteomics as a tool for the discovery of differentially expressed proteins closely related to the disease resistance. The leaves of rice cultivar Jiafuzhan (*Oryza sativa* L.) highly resistant to the disease, were infected by “89773-1-1” strain of the Xooc with strong pathogenicity. Total proteins were extracted from the leaves sampled at two days after inoculation, and separated by two-dimensional electrophoresis. It was found that there were thirty-eight proteins expressed differentially, of which thirty-two were up-regulated, five down-regulated and one was “new”. Of the thirty-eight responsive proteins, thirty-three were identified by MALDI-TOF-MS and database searching. Based on the predicted function, we grouped them into four clusters: signal transduction, defensive responses, substance metabolism and protein stabilization, which were involved in many resistant physiological reactions, including signal recognition and transduction, antioxidant reaction, carbohydrate metabolism, cell-wall reinforcement and phytoalexin biosynthesis. In turn a complex signal transduction and metabolic regulative network in the resistant responses to the infection of Xooc was outlined in this work, and the molecular mechanism was revealed by differentially expressed protein/enzyme patterns during Xooc infection. In this study, eight R proteins and three pathogenesis-related (PR) proteins which might relate closely to the disease-resistance were found. This result provides us the basic information to further reveal the resistant mechanism and conduct functional cloning of the resistant-related genes in rice to BLS.

Keywords: Rice (*Oryza sativa* L.); Bacterial leaf streak of rice (BLS); Proteomics

水稻细菌性条斑病 (Bacterial leaf streak) 是由病原菌 *Xanthomonas campestris* pv. *oryzicola* (简写“Xooc”) 侵染引起的, 简称“细条病”, 广泛分布在亚洲的热带、亚热带稻作区。水稻发病后一般减产 15% ~

① 基金项目: 生物农药与化学生物学教育部重点实验室 (福建农林大学) 开放课题基金项目 (KF0411)

作者简介: 陈芳育 (1978-), 男, 讲师。E-mail: cfy307@sohu.com * 通讯作者 (Corresponding author): 陈亮 (1963-), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向: 细胞与分子生物学。E-mail: chenlg@xmu.edu.cn

Received (收稿日期): 2006-10-09; Accepted (接受日期): 2007-01-19

25%, 严重时可达 40%~60%, 细条病已成为我国南方稻区的主要病害之一。因此, 明确水稻对细条病的抗性机理, 阐明其抗病基因功能, 对高产栽培调控和抗病分子育种都具有十分重要的意义。近年来, 对水稻抗细条病的基因定位和分子标记辅助育种的研究已取得一些新的进展^[1,3], 但尚未见有关利用蛋白质组学和生物信息学技术与方法研究其抗性分子机制的报道。

蛋白质组学是“后基因组时代”蓬勃发展的技术体系, 其特点是可以采用高通量、高分辨率的蛋白鉴定技术全景式地研究特定条件下的蛋白表达谱^[4], 已在差异蛋白显示、基因产物识别、基因调控机制分析、环境反应与调节等热点领域成为一种十分有效且应用广泛的研究手段, 该技术有助于在蛋白质水平上全面系统认识病原侵染后植株的抗病特征和细胞代谢等过程。本研究运用蛋白质组学的方法和技术, 寻找与细条病抗性密切相关的差异表达蛋白及相关的蛋白质群, 旨在揭示水稻与细条病病原菌互作的分子基础及抗病信号转导途径。我们已进行的病理研究表明^[5], 在与本试验相同的处理条件下, “佳辐占”接菌后 2 d 是其植株对病原菌侵染的生理应激反应较为激烈并逐步表现抗性的关键时期, 因此本试验重点研究水稻受细条病病原菌侵染 2 d 后的蛋白质组变化。

1 材料与方法

1.1 试验材料

高抗细条病的优质高产品种“佳辐占”, 由厦门大学生命科学学院水稻遗传育种组提供; 细条病病原菌为南方稻区强毒力菌株“89773-1”, 由福建农林大学植保学院提供。

1.2 试剂

主要试剂载体两性电解质 pH 3.0~10.0、pH 5.0~8.0 和 pH 7.0~9.0 均为 Amersham Biosciences 公司产品; 丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、SDS、TEMED、溴酚蓝等为 Sangon 公司产品 (BBI 分装); Tris-base 和甘氨酸为 Cxbio Biotechnology 公司产品; NP-40、碳酸氢铵、三氟乙酸 (TFA)、乙腈 (ACN)、 α -氟基-4-羟肉桂酸 (HCCA) 等为 Fluka 公司产品; 尿素 (超纯)、硫代硫酸钠 ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)、过硫酸铵、铁氰化钾、碳酸钾、 β -巯基乙醇等为 Amresco 公司产品; 碘乙酰胺、DTT、Triton X-100 等为 Sigma 公司产品; 胰蛋白酶 (Trypsin) 为 Promega 公司产品。

1.3 水稻叶片接菌处理

消毒后的水稻种子经浸种催芽后播于育秧盘中育苗, 于二叶一心期选取均匀一致的秧苗移栽至栽培盆。于水稻植株主茎第 6 叶完全展开时, 参照 Tang 等的方法^[1], 用针刺法对处理组 (Treatment) 植株进行叶片接菌处理, 即用针蘸菌液 (菌液浓度约为 9×10^8 个 mL^{-1} , $OD_{600} \approx 1.0$) 在主茎第 4、5 叶主脉各刺 10 个均匀分布的针孔, 并在叶表涂抹菌液; 对照组 (Control) 用无菌水代替菌液, 操作同处理组。

1.4 叶片蛋白质提取

于接菌后 2 d (48 h) 取样, 参照 Salekdeh 等的方法^[6], 每次从 6 株植株剪下其主茎第 4 叶位以上 (包括第 4 叶位) 的叶片, 混合后迅速置液氮冷冻备用; 参照何瑞锋等的方法^[7] 进行叶片全蛋白提取和裂解; 按 Bradford 法^[8] 测定裂解后的样品蛋白质浓度, 每根管状胶蛋白上样量约为 100 μg 。

1.5 双向电泳 (2-DE)

参照何瑞锋等的方法^[7] 及 Pharmacia 公司的蛋白质银染试剂盒操作手册^[9]。

1.6 凝胶图谱分析及差异点的确定

凝胶银染后使用 Umax powerlook II 扫描仪进行扫描, 构建蛋白质表达图谱。用 PDQuest 软件分析凝胶图谱, 确定差异表达的蛋白质点, 并从胶上挖取差异点。同时取一个无差异表达的“看家蛋白”作为参考蛋白, 以利于蛋白质点的定位分析。

1.7 MALDI-TOF-MS 分析及数据库检索

蛋白质点的胶内酶解及肽段提取参照谢锦云等的方法^[10] 进行。MALDI-TOF-MS 分析在厦门大学生命科学学院分析测试中心质谱室进行。用 Reflex III MALDI-TOF 质谱仪进行分析, 采用反射模式, 正离子谱测定获得肽指纹图谱 (PMF)。用 MASCOT 软件搜索 MSDB 和 NCBI nr 数据库。

2 结果与分析

2.1 水稻叶片蛋白质受细条病病原菌侵染的差异表达

处理组和对照组的蛋白质双向电泳后的 2-DE 胶经银染和扫描后 (图 1), 用 PDQuest 7.1 软件进行图谱分析, 每块胶上共有约 1 200 多个蛋白质点。以对照组样品的蛋白质表达图谱作为标准图谱 (图 1-Control), 用于蛋白质点的定位和丰度变化鉴别。

图谱分析表明, 共有 38 个蛋白质点在处理 2 d 后发生了差异表达, 依次命名为 X1~X38 (图 1)。

其中除 5 个蛋白质表达量下调(X2、X9、X10、X13 和 X27)、1 个蛋白质为新增诱导蛋白(X19) 外, 其余 32 个蛋白表达量都表现为上调。各差异表达蛋白质的相对差异表达水平如图 2 所示, 部分差异表达蛋白质的局部放大图如图 3 所示。设定 1 个参考蛋白质点, 并命名为 X39。

2.2 差异表达蛋白质的肽指纹图谱

38 个差异蛋白质点和 1 个参考蛋白质点经 MALDI-TOF-MS 分析, 除 X19 和 X20 外, 共有 37 个蛋白得到肽质量指纹图谱(PMF), 其中 X4 和 X38 的 PMF 如图 4 所示。

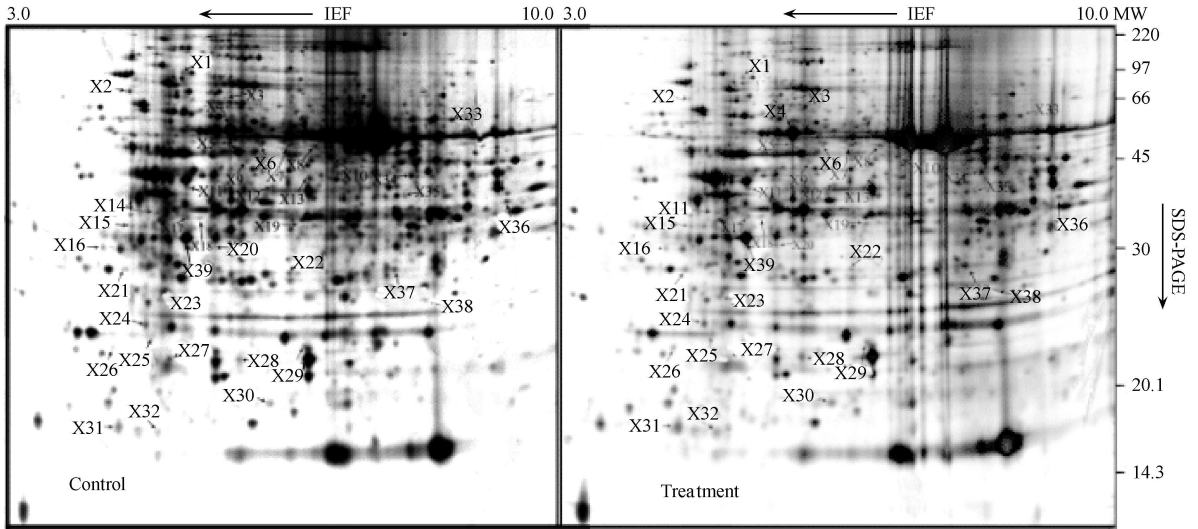


图 1 水稻叶片受细菌性条斑病原菌侵染 2 d 后的蛋白质双向电泳图谱
Fig. 1 The 2-DE map of rice leaf proteins at 2 d after Xoc infection

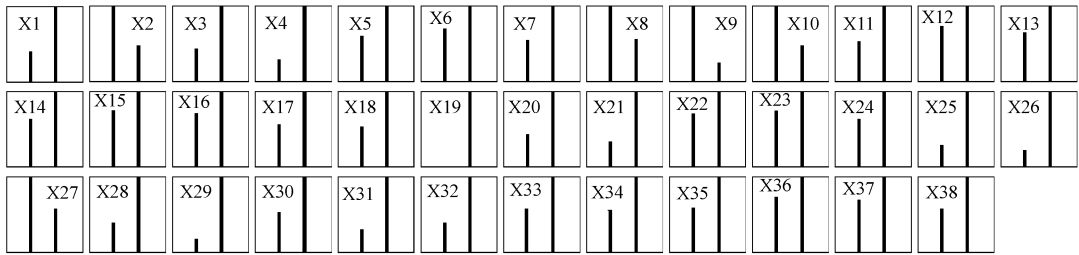


图 2 各差异表达蛋白质点的表达浓度差异
Fig. 2 Quantitative changes for the differentially expressed proteins

用 PDQuest 软件分析各差异表达蛋白质点的相对表达浓度差异, 方框内左边的柱形表示对照, 右边的柱形表示处理。Histogram showing quantitative changes for the differentially expressed proteins using PDQuest software, bars on the left and right side correspond to the control and treatment, respectively.

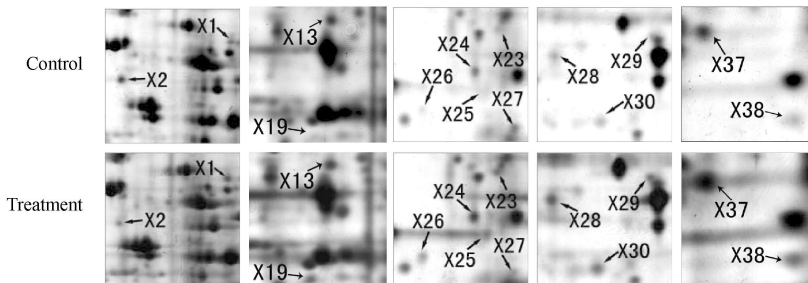


图 3 部分差异表达蛋白质点放大图
Fig. 3 Examples of the differentially expressed proteins

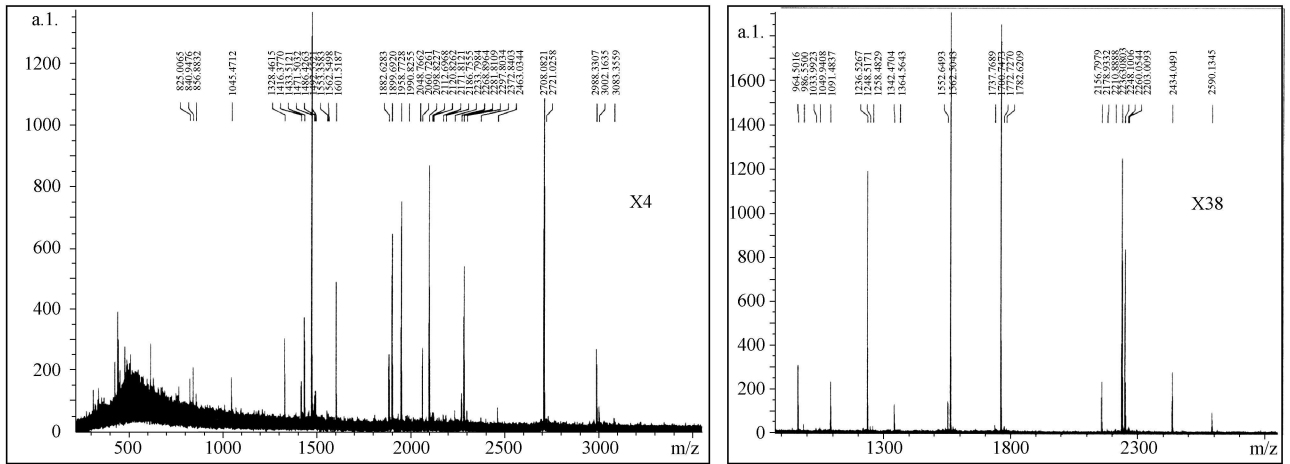


图4 蛋白质点 X4 和 X38 的肽质量指纹图谱
Fig. 4 Peptide mass fingerprinting (PMF) of the spot X4 and X38

2.3 差异表达蛋白的鉴定

分别根据这 37 个蛋白质的肽质量指纹图谱所得的数据, 去除杂质峰值后用 Mascot 软件搜索 MSDB 和 NCBI nr 数据库, 共有 34 个蛋白质得到鉴定 (表 1)。另外 3 个蛋白质 (其编号为 X5、X9 和 X27)

在蛋白数据库中没有明显的同源匹配蛋白, 未能鉴定。

除一个参考蛋白 X39 (推定的 33 kD 光合系统 II 氧复合蛋白) 外, 将所鉴定出的 33 个差异蛋白归纳成以下 4 大功能类群。

表 1 各差异表达蛋白质点的质谱鉴定结果
Table 1 Identification of differentially expressed proteins by MALDI-TOF-MS

蛋白点 Spot	蛋白质名称 Protein name	登录号 Accession	分子量/ 等电点 MW (Da)/ pI	匹配肽段数 Matched peptides	覆盖率 Sequence coverage (%)
X1	NBS-LRR 类蛋白 (推定的白叶枯病抗性蛋白 Xa1) NBS-LRR-like protein (Putative bacterial blight-resistance protein Xa1)	Q8LL83	104315/ 6.28	9	13
X2	推定的泛素激活酶 Putative ubiquitin-activating enzyme	Q84T99	59095/ 5.07	7	20
X3	推定的分子伴侣素 Putative chaperonin	Q5TKQ5	61550/ 6.61	6	18
X4	RICCPCTA NID: (ATP 合成酶 β 亚基) RICCPCTA NID: (ATP synthase beta subunit)	AAA84588	53920/ 5.30	16	48
X6	推定的 S-受体激酶 Putative S-receptor kinase	Q8S5J1	77505/ 6.65	7	14
X7	推定的 GTP 结合蛋白 Putative GTP-binding protein	Q6ZIJ6	44305/ 6.30	5	21
X8	推定的肉桂酸 4 羟化酶 Putative cinnamate-4-hydroxylase	Q5W6F1	56847/ 9.02	5	15
X10	质子泵双链 ATP 酶 β 链 H ⁺ -transporting two-sector ATPase beta chain	PWRZB	53980/ 5.47	7	22
X11	线粒体 DNA of160 (辅酶 Q 氧化还原酶亚基 4) Mitochondrial DNA of160 (ubiquinone oxidoreductase subunit 4)	Q67TM9	18149/ 4.80	3	22
X12	推定的黄酮 3-羟化酶 Putative flavanone 3-hydroxylase	Q8W2X5	38706/ 5.59	5	23
X13	推定的无毒基因 9 诱导子响应蛋白 Putative Avr9 elicitor response protein	Q6H7Y7	44844/ 7.59	4	19
X14	推定的 β-1, 3 葡聚糖酶 Putative β-1, 3-glucanase	Q5VRP4	41196/ 6.39	6	13
X15	推定的转导素 Putative transducin	Q8H3V0	38920/ 4.65	5	22
X16	推定的丝氨酸/苏氨酸激酶 (片段) Putative Ser/Thr protein kinase (Fragment)	Q9SC70	35638/ 7.21	4	15
X17	推定的磷酸甘油醛脱氢酶 Putative glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	Q6K5G8	36545/ 7.68	3	23

续表 1

蛋白点 Spot	蛋白质名称 Protein name	登录号 Accession	分子量/ 等电点 MW (Da)/pI	匹配肽段数 Matched peptides	覆盖率 Sequence coverage (%)
X18	类型 III 过氧化物酶 38 前体 Class III peroxidase 38 precursor (EC 1.11.1.7)	Q5U1Q5	35172/5.80	3	14
X21	推定的共伴侣 CGE1 异构体 b Putative co-chaperone CGE1 isoform b	Q6K635	36535/4.64	3	15
X22	谷胱甘肽 S-转移酶 GSTF14(片段) Glutathione S-transferase GSTF14 (Fragment)	Q6QN20	30709/7.77	4	15
X23	NBS-LRR 蛋白(片段) NBS-LRR protein (Fragment)	Q8LKA5	33792/6.15	6	21
X24	推定的水杨酸结合蛋白 2 Putative salicylic acid-binding protein 2	Q8S0V0	28714/5.25	5	20
X25	咖啡酰辅酶 A-O-甲基转移酶 Caffeoyl-CoA O-methyltransferase	Q9XJ19	28837/5.21	4	23
X26	肉桂酰辅酶 A 还原酶 Cinnamoyl CoA reductase-like	Q5VNM2	25183/8.99	5	30
X28	推定的病程相关奇甜蛋白类蛋白 Putative pathogenesis-related thaumatin-like protein	Q75GR1	24074/6.15	3	24
X29	推定的阳离子过氧化物酶同工酶 40K Putative cationic peroxidase isozyme 40K	Q7XHY0	25412/8.87	5	27
X30	NBS-LRR 类抗性蛋白 NBS-LRR type resistance protein	T02219	19739/7.00	3	36
X31	酸性的病程相关-1 型基因(水稻病程相关蛋白 1a 类)类蛋白 Acidic pathogenesis-related (PR) class 1 gene (OsPR1a)-like protein	Q6ZKH1	14070/4.65	3	37
X32	推定的热激蛋白 Putative heat shock protein	Q943Q3	16639/6.32	3	25
X33	推定的细胞色素 P450 Putative cytochrome P450	Q7XE29	58275/8.26	6	12
X34	推定的白粉病抗性蛋白 PM3b Putative powdery mildew resistance protein PM3b	Q5ZAJ6	126223/7.64	14	17
X35	推定的受体丝氨酸/苏氨酸激酶 putative receptor serine/threonine kinase	gil_50900640	49492/8.70	6	15
X36	果糖二磷酸醛缩酶 fructose-bisphosphate aldolase	ADRZY	38786/8.50	7	22
X37	含铁超氧化物歧化酶 Iron-superoxide dismutase	Q5VSB7	29458/8.84	4	25
X38	生长素运输蛋白类蛋白 Auxin transport protein-like protein	Q84SL8	25523/10.57	3	21
X39*	推定的 33 kD 光合系统 II 氧复合蛋白 Putative 33 kD oxygen evolving protein of photosystem II	Q943W1	35068/6.10	7	31

数据检索的物种来源均选择水稻 (*Oryza sativa*); X39 为参考蛋白。

The species in database searching is *Oryza sativa*; Spot X39 is a reference protein.

2.3.1 信号转导相关蛋白 包括起信号识别功能的 R 蛋白和参与信号传递的蛋白,共 12 个。前者 8 个,包括登录号分别为 Q8LL83、Q8LKA5 和 T02219 的 3 个 NBS-LRR 类 R 蛋白(X1、X23 和 X30)、推定的受体丝氨酸/苏氨酸激酶(X35)、推定的丝氨酸/苏氨酸激酶(片段)(X16)、推定的 S-受体激酶(X6)、推定的无毒基因 9 诱导子响应蛋白(X13)和推定的白粉病抗性蛋白 PM3b(X34)。后者 4 个,包括两个 G 蛋白,即推定的 GTP 结合蛋白(X7)和推定的转导素(X15),一个推定的水杨酸结合蛋白 2(X24)和一个生长素运输蛋白类蛋白(X38)。推定的白粉病抗性蛋白 PM3b(X13)的分子量实际测出值与匹配的理论

值不符,推测可能检测到的是 PM3b 的多肽片段。

2.3.2 防卫相关蛋白 包括病程相关蛋白(pathogenesis-related protein, PR 蛋白)、抗氧化酶类和分子伴侣(molecular chaperones)类蛋白,共 10 个。其中 PR 蛋白 3 个,分别为酸性的病程相关-1 型基因(水稻病程相关蛋白 1a 类)类蛋白(X31)、推定的 β -1,3 葡聚糖酶(X14)和推定的病程相关奇甜蛋白类蛋白(X28)。抗氧化酶类 4 个,分别为推定的阳离子过氧化物酶同工酶 40K(X29)、类型 III 过氧化物酶 38 前体(X18)、含铁超氧化物歧化酶(即 Fe-SOD, X37)和谷胱甘肽 S-转移酶 GSTF14(片段)(X22)。分子伴侣类蛋白 3 个,分别为推定的共伴侣 CGE1 异构体 b

(X21)、推定的分子伴侣素(X3)和推定的热激蛋白(X32)。

2.3.3 代谢相关蛋白 包括参与糖代谢和次生代谢的蛋白共10个。前者5个,含参与糖酵解途径的果糖二磷酸醛缩酶(X36)和推定的磷酸甘油醛脱氢酶(X17);及参与呼吸链电子传递的ATP合成酶 β 亚基(X4)、质子泵双链ATP酶 β 链(X10)和线粒体DNA orf160编号的辅酶Q氧化还原酶亚基4(X11)。后者5个,包括肉桂酰辅酶A还原酶(X26)、咖啡酰辅酶A-O-甲基转移酶(X25)、推定的肉桂酸4-羟化酶(X8)、推定的黄酮酮-3-羟化酶(X12)和推定的细胞色素P450(X33)。

2.3.4 与蛋白质稳定相关的蛋白 只有推定的泛素激活酶(X2)1个。

3 讨论

3.1 水稻应答细条病病原菌侵染的蛋白质组调控

3.1.1 信号转导相关蛋白的响应 病原信号识别是植株抗性应答的原初反应,其实质是水稻R蛋白与Xooc的无毒基因(avrgene)编码的无毒蛋白之间的蛋白互作,抗病信号通过R蛋白的磷酸化或去磷酸化作用激活转导系统。本研究鉴定出增强表达的8个R蛋白,它们对Xooc的识别可能起着决定性作用。抗病反应信号转导启动后,内源信号分子的转导作用逐步贯穿于整个抗病过程。植物G蛋白是联系整个细胞信号转导系统的重要分子开关,已有的研究表明G蛋白参与病原信号的转导,并引发一些抗病相关基因的表达^[11]。鉴定出的推定的GTP结合蛋白和推定的转导素都发生增强表达,表明它们在水稻应答Xooc侵染的信号转导机制中起着调节和介导作用。游离的水杨酸结合蛋白(Sabp)具有过氧化氢酶活性,并受到SA(水杨酸)和具有生理活性的SA类似物的抑制^[12],其表达水平也从侧面反应了内源SA和H₂O₂的水平。SA是抗病反应中重要的内源信号,介导系统获得性抗性(SAR)。鉴定出的推定的水杨酸结合蛋白2表达量下调,反映出水稻在Xooc侵染2d后正逐渐形成SAR。生长素运输蛋白在本研究中呈现增强表达,这可能与病原侵染初期水稻叶片加强吲哚乙酸的合成和运输有关,这是植物对病害侵染的一种普遍的应激反应,并可进一步与POD一起影响酚类次生代谢,从而增强植株抗病性。

3.1.2 防卫相关蛋白的响应 本研究共鉴定出3

个增强表达的PR蛋白,OsPR1a(水稻病程相关蛋白1a类)属PR-1类蛋白,其增强表达对SAR的建立具有重要作用。Konishi等^[13]在对水稻叶片应答稻瘟病侵染的蛋白质组学研究中检测到了PR-1蛋白的诱导表达。 β -1,3-葡聚糖酶(属于PR-2类)具有降解病原菌细胞壁成分 β -1,3-葡聚糖的作用,但甜味蛋白类蛋白(属于PR-5类)的具体功能尚不明确。在Kim等^[14]对水稻叶片应答稻瘟病菌侵染的差异表达蛋白质研究中,诱导表达的 β -1,3-葡聚糖酶(Glu)和甜味蛋白类蛋白(TLP)都被鉴定出。虽然各种PR蛋白的具体功能有待进一步明确,但这3个PR蛋白可能在水稻对Xooc侵染的防御及SAR的形成中起着重要作用。本研究中,PR蛋白在Xooc侵染过程中并没有呈现从无至有的诱导表达,可能与对照在试验中也遭到针刺而导致PR蛋白少量诱导表达有关。

许多研究表明,植物抗病性与体内POD、SOD等酶活性呈正相关,而且POD及其同工酶在多酚、植保素、木质素等的生物合成过程及由病原菌诱导的超敏反应中起着重要作用^[15]。谷胱甘肽S-转移酶(GST)活性对植物抗逆境胁迫具有重要意义,由病原菌产生的多种外界毒素以及内源有毒代谢物的清除通常是由SOD、POD,或它们的代谢物联合还原型谷胱甘肽(glutathione)进行,而这些反应则由GST催化^[16]。本试验中4个抗氧化酶类的增强表达表明它们在植株受到细条病侵染后共同参与了防卫反应,以抑制病原菌对植株的深度伤害。

分子伴侣类蛋白在许多胁迫条件被激活,特别是热激蛋白(HSP),其合成与逆境应答具有相关性,具有在逆境中保护细胞的功能。在水稻悬浮培养细胞对黄斑病病毒侵染和玉米悬浮细胞对真菌侵染的蛋白质组学研究中都检测出了分子伴侣类热激蛋白的诱导表达^[16-17]。本研究表明,增强表达的共伴侣CGEI异构体b、分子伴侣素(chaperonin)和推定的热激蛋白等分子伴侣类蛋白可能在水稻对Xooc侵染的防卫响应中扮演着特殊角色。

3.1.3 代谢响应

3.1.3.1 糖代谢的响应 在水稻悬浮培养细胞对黄斑病病毒侵染的响应研究中,鉴定出上调的醛缩酶^[16],干旱胁迫下的水稻叶片中也证实了果糖二磷酸醛缩酶的增强表达^[18]。本研究中果糖二磷酸醛缩酶和推定的磷酸甘油醛脱氢酶的增强表达反映了水稻叶片糖酵解途径在Xooc侵染过程中的特异

性变动, 这可能与“佳辐占”的抗性反应相关。ATP合成酶 β 亚基和线粒体DNA of160编号的辅酶Q氧化还原酶亚基4的增强表达和质子泵双链ATP酶 β 链的减弱表达反映了呼吸电子传递链的动态调整过程, 这可能与XooC侵染导致染病初期水稻叶肉细胞呼吸加强有关。XooC侵染过程中糖代谢的特异性变动可能进而引起整个水稻植株碳氮代谢平衡的特异性变动。

3.1.3.2 抗病次生物质代谢的响应 在病原侵染过程中, 植物通过各种次生代谢途径在体内形成各种同抵抗病原物有关的防卫反应次生物质, 这是其抗病物质基础^[15]。本研究鉴定出了5个差异表达的抗病次生物质代谢相关蛋白。

寄主细胞木质化是植物抵抗病原物侵染最有效的手段之一^[15], 而CCR和CCoAOMT都是木质素生物合成途径中的关键酶。在生化水平上, 木质素的生物合成途径主要通过苯丙烷类代谢途径实现, CCR在整条木质素特异合成途径中处于重要地位^[19]。CCoAOMT在机械损伤或病害入侵等外界因子胁迫时诱导其活性增加, 参与加固细胞壁物质木质素的合成^[20]。在盐胁迫下, CCoAOMT在水稻耐盐基因型品种的根部出现诱导表达^[6]。CCR和CCoAOMT的增强表达反映了XooC侵染后, “佳辐占”叶片木质素合成代谢加强, 促进了叶肉细胞壁的加厚加固和抗菌作用的增强。

植保素的积累和沉淀也是一种重要的抗病机制。C4H和F3H是参与类黄酮植保素生物合成的苯丙烷类代谢途径的关键酶, 它们的增强表达表明水稻在XooC侵染后可能加强了植保素的生物合成代谢。细胞色素P450在植物保护功能的各种次生代谢物的合成方面具有非常复杂而广泛的催化功能^[21]。细胞色素P450的增强表达表明, 它可能与其他抗病相关次生物质的合成代谢相协同。从2D表达谱(图1)可以发现, 处理组(Treatment)样品的条纹较对照组(Control)多, 这可能与叶片受XooC侵染后各种次代谢增强, 样品中含有较多次生物质类(如酚类物质)杂质有关。

3.1.4 蛋白质稳定相关蛋白的响应 泛素激活酶是泛素蛋白酶水解系统(UPPS)的组成部分, 起着重要的催化作用, 其对蛋白质的水解降解可能会引起一些水解酶的活性变化, 如 α 淀粉酶, 而这些水解酶可能与抗病性相关^[15]。推定的泛素激活酶的减弱表达可能与XooC侵染过程中水稻叶片细胞蛋白

质合成与降解的稳定受到影响有关, 同时也反映了水稻蛋白质合成与分解代谢的动态平衡。

4 结论

4.1 水稻对细条病菌侵染的应答调控网络

本研究表明, 高抗水稻品种“佳辐占”对细条病菌病原菌的侵染存在着一个复杂的抗病信号应答和代谢调控网络, 其作用机理可以通过差异表达的蛋白质(或酶)反映出来。在受到XooC侵染时, 水稻可通过改变体内蛋白质的表达和酶类的活性来完成抗病信号的感受、传递以及抗病性的形成, 各种差异表达的功能蛋白通过各种内源信号分子和代谢途径相互联结, 形成了紧密联系的调控网络。R蛋白对病原信号的识别处于整个蛋白质调控网络的开端, 信号转导相关蛋白的差异表达反映了抗病信号的传递和放大; 防卫相关蛋白直接或间接地参与了抗侵染作用及SAR的建立; 糖代谢相关蛋白的差异表达反映了糖代谢的特异性变动, 这为抗病次生物质代谢增强和其他各种抗病性反应提供了必不可少的代谢流和能量; 抗病次生代谢相关酶的增强表达反映了水稻形成化学屏障的抗侵染扩展能力的增强; 而蛋白质稳定相关蛋白的差异表达则对维持整个蛋白质组调控网络的稳定性起着重要作用。各类功能蛋白间的相互调控也反映了水稻叶片受细条病菌病原菌侵染后的细胞信号转导通路网络的错综复杂关系。

4.2 抗细条病密切相关蛋白——R蛋白和PR蛋白

本研究发现了差异表达的8个R蛋白和3个PR蛋白, 它们可能与水稻对细条病的抗性密切相关。这8个R蛋白分属于4个不同类型, 其中编号为Q8LL83、Q8LKA5和T02219的3个NBS-LRR类蛋白和推定的白粉病抗性蛋白PM3b等4个蛋白属于NBS-LRR类, 推定的丝氨酸/苏氨酸激酶属于STK类, 受体丝氨酸/苏氨酸激酶和S-受体激酶属于LRR-TM-STK类, 推定的无毒基因9激发子响应蛋白(cf9蛋白)属LRR-TM类。不同类型的R蛋白其功能结构和识别方式有所差别, 本研究认为, 在XooC侵染初期, 水稻叶片中的R蛋白很可能参与了配体(Avr基因产物)的互作, 并引发了抗病信号的传导。PR蛋白的诱导和积累是植物重要的抗病机制, 发现的3个PR蛋白, 即水稻病程相关蛋白1a类蛋白(OsPR1a)、 β 1,3葡聚糖酶(β -1,3-Glu)和病程相关甜味蛋白类蛋白(TLP)分别属于PR-1类、PR-2类和PR-5类。

植物蛋白质组学的研究正向遗传和育种延伸^[21], 并已成为发掘水稻抗逆新基因和分子育种的重要工具^[6]。这8个R蛋白和3个PR蛋白是我们今后感兴趣的重点研究对象, 它们的编码基因经进一步确证后可作为相关抗性基因的“位置和表达候选基因”^[23], 我们正采用功能克隆的策略展开水稻抗细条病相关基因的分离、克隆及其介导的抗病途径研究, 并已取得初步成果。

此外, 本研究中尚有5个差异蛋白未能得到鉴定, 它们可能与水稻对细条病的抗病性存在一定的相关性。特别是新增的蛋白X19可能蕴含着重要的潜在信息, 但未能得到其PMF, 这可能与CA-IEF(载体两性电解质等电聚焦)技术本身所存在的上样量较低的缺陷, 以及X19的表达丰度较低有关。由于水稻叶片中“看家蛋白”含量丰富, 特别是RubisCO, 约占叶片可溶性蛋白量的50%, 成为限制等电聚焦电泳上样量和图谱分辨率的重要因素, 使得特异表达的稀少蛋白难以检测分离。因此, 有待今后采用RubisCO预去除法^[24]结合IPG-IEF(固相pH梯度等电聚焦)技术加大上样量来进一步研究。

References

[1] Tang D, Wu W, Li W, Lu H, Worland A J. Mapping of QTLs conferring resistance to bacterial leaf streak in rice. *Theor Appl Genet*, 2000, 101: 286-291

[2] Chen Z-W(陈志伟), Wu W-R(吴为人), Zhou Y-C(周元昌), Jing Y-J(景艳军). Screening of microsatellite markers for resistance to bacterial leaf streak and their application to marker-assisted selection in rice. *J Fujian Agric Fore Univ* (Nat Sci Edn) (福建农林大学学报·自然科学版), 2004, 33(2): 202-205 (in Chinese with English abstract)

[3] Zheng J-S(郑景生), Li Y-Z(李义珍), Fang X-J(方宣钧). Detection of QTL conferring resistance to bacterial leaf streak in rice chromosome 2 (*O. sativa* L. spp. *indica*). *Sci Agric Sin* (中国农业科学), 2005, 38(9): 1923-1925 (in Chinese with English abstract)

[4] Wasinger V C, Cordwell S J, Cepa-Poljak A, Yan J X, Gooley A A, Wilkins M R, Duncan M W, Harris R, Williams K L, Humphrey-Smith I. Progress with gene product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis*, 1995, 16(7): 1090-1094

[5] Chen F-Y(陈芳育). Differential proteomic analysis on the responses of rice (*Oryza sativa* L.) to *Xanthomonas campestris* pv. *oryzicola* infection. MS Dissertation of Fujian Agriculture and Forestry University, 2005. pp 23-24 (in Chinese with English abstract)

[6] Salekdeh Gh H, Siopongco J, Wade L J, Ghareyazie B, Bennett J. A proteomic approach to analyzing drought and salt responsiveness in rice. *Fidd Crps Res*, 2002, 76: 199-219

[7] He R-F(何瑞锋), Ding Y(丁毅), Zhang J-F(张剑锋), Yu J-H(余金洪). Improvement in the two-dimensional electrophoresis of proteins from the leaves of plant. *Hereditas* (遗传), 2000, 22(5): 319-321 (in Chinese with English abstract)

[8] Wang J-Z(汪家政), Fan M(范明). Manual of Protein Technology (蛋白质技术手册). Beijing: Science Press, 2000 pp 42-46 (in

Chinese)

- [9] Qian X-H(钱小红), He F-C(贺福初). Proteomics: Theory and Methods (蛋白质组学: 理论与方法). Beijing: Science Press, 2003. pp 84 (in Chinese)
- [10] Xie J-Y(谢锦云), Li X-L(李小兰), Chen P(陈平), Cao M-L(曹梦林), Chen L-B(陈良碧), Liang S-P(梁宋平). Preliminary proteomic analysis of the proteins of thermo-sensitive genetic sterile rice anther. *Chin J Biochem Mol Biol* (中国生物化学与分子生物学报), 2003, 19(2): 215-221 (in Chinese with English abstract)
- [11] Beffa R, Szell M, Meuwly P, Pay A, Vogel-Lange R, Métraux J P, Neuhaus G, Meins F Jr, Nagy F. Cholera toxin elevates pathogen resistance and induces pathogenesis-related gene expression in tobacco. *EMBO J*, 1995, 14(23): 5753-5761
- [12] Liu S-Y(刘胜毅), Xu Z-Y(许泽永), He L-Y(何礼远). Plant-parasite interactions and molecular mechanism of resistance. *Sci Agric Sin* (中国农业科学), 1999, 32(suppl): 94-102 (in Chinese with English)
- [13] Konishi H, Ishiguro K, Komatsu S. A proteomics approach towards understanding blast fungus infection of rice grown under different levels of nitrogen fertilization. *Proteomics*, 2001, 1(1): 1162-1171
- [14] Kim S T, Kim S G, Hwang D H, Kang S Y, Kim H J, Lee B H, Lee J J, Kang K Y. Proteomic analysis of pathogen-responsive proteins from rice leaves induced by rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. *Proteomics*, 2004, 4(11): 3569-3578
- [15] Yu S-W(余叔文), Tang Z-C(汤章城), eds. Plant Physiology and Molecular Biology (植物生理与分子生物学), 2nd edn. Beijing: Science Press, 1998. pp 770-784 (in Chinese)
- [16] Vertebn-Debout M, Delalande F, Bizard J P, Diemer H, Van Dusselaer A, Brugidou C. Proteome analysis of cultivar-specific deregulations of *Oryza sativa indica* and *O. sativa japonica* cellular suspensions undergoing Rice yellow mottle virus infection. *Proteomics*, 2004, 4: 216-225
- [17] Campo S, Carrascal M, Coca I M, Abián J, San Segundo B. The defense response of germinating maize embryos against fungal infection: A proteomics approach. *Proteomics*, 2004, 4: 383-396
- [18] Salekdeh Gh H, Siopongco J, Wade L J, Ghareyazie B, Bennett J. Proteomic analysis of rice leaves during drought stress and recovery. *Proteomics*, 2002, 2: 1131-1145
- [19] Bai Y(白勇), Gong W(巩威), Liu T-J(刘天钧), Zhu Y-X(朱玉贤). Cloning and expression analysis of Cinnamoyl-CoA reductase from rice. *Chin Sci Bull* (科学通报). 2003, 48(16): 1780-1784 (in Chinese)
- [20] Zhao H-Y(赵华燕), Shen Q-X(沈庆喜), Liu S-Y(吕世友), Wang T(王台), Song Y-R(宋艳茹). The analysis of the expression character of Caffeoyl-CoA O-methyltransferase (CCoAOMT) in rice. *Chin Sci Bull* (科学通报), 2004, 49(14): 1390-1394 (in Chinese)
- [21] Dai S-M(戴素明), Zhou G-A(周程爱), Xie B-Y(谢丙炎), Feng B-X(冯东昕), Xiao Q-M(肖启明). Role of cytochromes P450 expression in plant defense responding to pathogens. *J Shihezi Univ* (Nat Sci Edn) (石河子大学学报·自然科学版), 2004, 22(suppl): 184-187 (in Chinese with English abstract)
- [22] Qian X-H(钱小红), He F-C(贺福初), trans. Proteomics: from Protein Sequence to Function (蛋白质组学: 从序列到功能). Beijing: Science Press, 2002. pp 229-239 (in Chinese)
- [23] Plomion C, Pionneau C, Brad J, Costa P, Baillères H. Compression wood responsive proteins in developing xylem of maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.). *Plant Physiol*, 2000, 123: 959-969
- [24] Kim S T, Cho K S, Jang Y S, Kang K Y. Two-dimensional electrophoretic analysis of rice proteins by polyethylene glycol fractionation for protein arrays. *Electrophoresis*, 2001, 22: 2103-2109