

# 白粉病菌胁迫下黄瓜 R17 抗病品系叶片蛋白质组分析

范海延<sup>1</sup>, 陈捷<sup>2\*</sup>, 邵美妮<sup>1</sup>, 许玉凤<sup>1</sup>, 张春宇<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> 沈阳农业大学生物科学技术学院, 沈阳 110161; <sup>2</sup> 上海交通大学农业与生物技术学院, 上海 201101)

**摘要:** 以黄瓜抗白粉病品系 R17 为试材, 在接种白粉病菌 24、48 和 72 h 后提取叶片蛋白质, 采用双向电泳技术研究白粉病菌胁迫条件下黄瓜叶片蛋白质组的变化。结果表明: 黄瓜幼苗在白粉病菌胁迫下, 24、48 和 72 h 的叶片双向电泳图谱与未接种对照组均存在一定差异。通过质谱分析和数据库搜索, 共鉴定出 7 种表达差异蛋白点, 它们分别为磷脂酰肌醇 - 4 - 磷酸 5 - 激酶、假拟蛋白 g5bf、PS 聚光复合体叶绿素 a/b 结合蛋白、铁氧还蛋白 NADP 氧化还原酶、XS 结构域所含蛋白、肌球蛋白 XI 和苹果酸脱氢酶。这些蛋白都可能是与应答白粉病菌胁迫相关的蛋白质网络中的一部分, 它们在黄瓜抗病反应中起着不同的作用。

**关键词:** 黄瓜; 白粉病; 双向电泳; 质谱分析

**中图分类号:** S 642.2; S 432.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2009) 06-0829-06

## Proteomic Analysis of R17 Cucumber Differentially Expressed Proteins Induced by Powdery Mildew Fungus

FAN Hai-yan<sup>1</sup>, CHEN Jie<sup>2\*</sup>, SHAO Mei-ni<sup>1</sup>, XU Yu-feng<sup>1</sup>, and ZHANG Chun-yu<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> College of Biological Science and Technology, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China; <sup>2</sup> School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 201101, China)

**Abstract:** Two-dimensional gel electrophoresis were employed to analyze the proteome from leaves of cucumber R17 at 24, 48 and 72 h, after inoculating *Sphaerotheca fuliginea*. The results showed that there were significant differences between inoculated plants and control in the 2-DE map. Seven different proteins of R17 seedling leaves with qualitative changes or relatively high abundance were identified by MALDI-TOF/TOF searching NCB I, including a protein of putative phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase, hypothetical protein g5bf, LHC type I chlorophyll a/b-binding protein, ferredoxin-NADP (H) oxidoreductase, putative XS domain containing protein, unconventional myosin XI and malate dehydrogenase. This study gives new insights into pathogen stress response in cucumber leaves and demonstrates the power of the proteomic approach in plant biology studies.

**Key words:** cucumber; powdery mildew; two-dimensional gel electrophoresis; mass spectrometry

植物受到病原菌侵害时, 会通过改变体内蛋白质的表达和酶类的活性等来完成信号的感应、传递以及生物学效应的实现。以往人们对单一防御反应相关酶蛋白和信号做了大量研究, 但多数是依据少数生理因子与抗性关系得出结论。

收稿日期: 2009 - 01 - 02; 修回日期: 2009 - 05 - 31

基金项目: ‘十一五’ 国家科技支撑计划项目 (2006BAD07B02); 辽宁省博士启动基金项目 (1040179)

\* 通讯作者 Author for correspondence (E-mail: jiechen59@sjtu.edu.cn)

致谢: 感谢上海交通大学农业与生物技术学院蔡润教授和潘俊松副教授惠赠黄瓜品种。

随着几种模式生物基因组测序的完成,蛋白质组学成为后基因组时代的重要的研究手段。双向电泳(2-DE)技术可在同一块胶上同时分离数千种蛋白,特别是与质谱分析技术相结合,满足了准确、快速、高通量的蛋白质组学研究需求。

目前应用蛋白质组技术在研究镰孢菌和黄曲霉侵染玉米种胚、弯孢菌叶斑病菌侵染玉米、稻瘟病菌侵染水稻、白叶枯病菌侵染水稻、等方面已有一定进展(Hirosato et al, 2001; Chen et al, 2002; Campo et al, 2004; Chen et al, 2004; Chivasa et al, 2005; Wang et al, 2005; Mahmood et al, 2006; Zhou et al, 2006),但在黄瓜与白粉病菌互作方面的研究尚鲜见报道。

本试验中通过双向电泳差异显示和质谱分析,研究了黄瓜白粉病菌(*Sphaerotheca fuliginea*)侵染黄瓜抗病品系R17后的蛋白质组的变化,这对从根本上揭示黄瓜应答白粉病菌胁迫的本质,进而明确黄瓜抗白粉病的机制具有重要意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

试验于2005年在上海交通大学农业与生物学院蛋白质组学实验室进行。

供试黄瓜为抗黄瓜白粉病病原菌的品系R17,为荷兰温室类型光皮品种‘Nevada’与以色列温室类型光皮品种‘Husen’杂交组合分离的自交7代的品系。

黄瓜白粉病病原菌[*Sphaerotheca fuliginea* (Schlecht) Poll]为上海交通大学农业与生物学院蛋白质组学实验室活体保存的菌种。

### 1.2 方法

将黄瓜种子催芽后播在装有草炭土∶蛭石体积比为1∶2的营养钵中,温室中培养,待长至两片真叶时用浓度 $10^5$ 个 $\cdot$ mL $^{-1}$ 白粉病菌孢子悬浮液进行喷雾接种。分别于接种后24、48和72 h与空白对照同时取第一片真叶,置于-80℃冰箱中待用。

黄瓜叶片的蛋白质提取、双向电泳、质谱分析及数据库检索等实验方法参照文献(郭尧君, 1999; 钱小红和贺福初, 2004; 范海延等, 2007)进行。

## 2 结果与分析

### 2.1 白粉病菌接种不同时间后黄瓜叶片双向电泳图谱的比较

黄瓜叶片接种白粉病菌24、48和72 h后,提取蛋白质样品,经双向电泳,共有近500个蛋白点在考马斯亮蓝染色的2-D胶上分离。

接种白粉病菌24 h的处理有47种蛋白特异表达,43种蛋白含量上调,26种蛋白含量下调,与对照的双向电泳图谱相似系数为0.811。

接种白粉病菌48 h的处理有46种蛋白特异表达,50种蛋白含量上调,37种蛋白含量下调,与对照的双向电泳图谱相似系数为0.876。

病原菌接种72 h的处理有14种蛋白特异表达,40种蛋白含量上调,27种蛋白含量下调,与对照的双向电泳图谱相似系数为0.884。

在不同重复胶的同一位置都出现的蛋白点认为是同一个蛋白,试验重点选取在图谱上表现上调升高的10个蛋白点进行分析鉴定。其中,蛋白点SSP4004、SSP3112、SSP3413和SSP3206在黄瓜R17品系接种白粉病菌后24、48、72 h蛋白表达量均明显升高;SSP7724和SSP7723蛋白点的表达量在接种后48 h显著增加;蛋白点SSP5513在接种后72 h蛋白表达量表现上调升高(图1)。另有3个上调的蛋白点因匹配率太低而未得到鉴定,在此未列出。

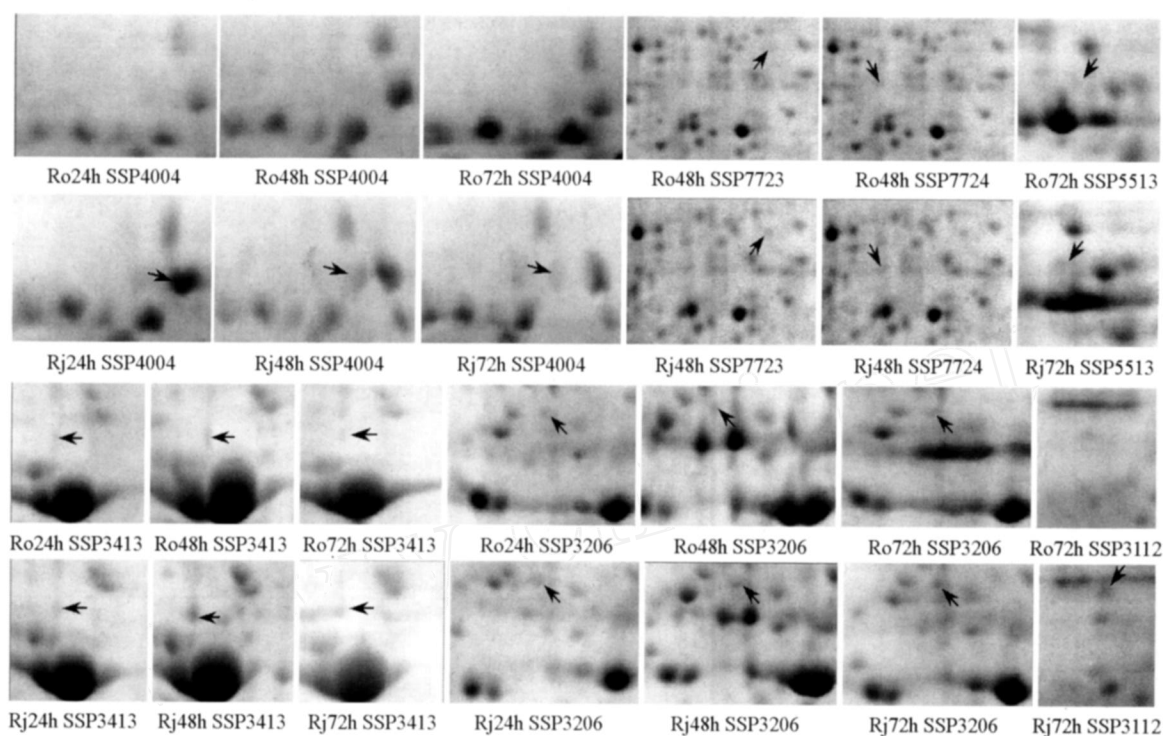


图 1 R17不同处理的差异蛋白点图谱

Rj24h、Rj48h和Rj72h分别表示R17接种后24、48和72h的处理，Ro24h、Ro48h和Ro72h为相应的空白对照；箭头所示为处理后上调蛋白点。

Fig 1 The differential protein spots from pathogen treated R17 plant leaf

Rj24h, Rj48h and Rj72h means treatments of cucumber R17 at 24, 48 and 72 h after inoculating *S. fuliginea* respectively. Ro24h, Ro48h and Ro72h means its control. Arrows indicate the proteins with at least two-fold change after inoculation with *S. fuliginea*.

## 2.2 差异蛋白的质谱鉴定

通过串联飞行时间质谱仪质谱分析和数据库查询，有7个蛋白点成功鉴定（表1）。

蛋白点 SSP4004为磷脂酰肌醇-4-磷酸5-激酶（PIPkin），它在磷脂代谢中参与磷脂酰肌醇4,5-二磷酸（PIP<sub>2</sub>）的合成。

蛋白点 SSP3112为肌球蛋白 XI，肌球蛋白（Myosin）在胞质运动、胞内小泡运动和膜运输方面起着重要作用。

蛋白点 SSP3413是PS聚光复合体叶绿素a/b结合蛋白，该蛋白N-端伸展到基质中，它与粘着基粒膜片层和其苏氨酸残基可逆磷酸化的光调节有关，这二者被认为可介导PSI和PS之间的激发能分布。

蛋白点 SSP3206为XS结构域所含蛋白，关于其生物学功能尚鲜见报道。

蛋白点 SSP7724为假拟蛋白 g5bf，该蛋白在植物中的作用尚属未知。

蛋白点 SSP7723为铁氧还蛋白 NADP氧化还原酶（FNR），它催化还原的铁氧还蛋白（Fd）将电子传递给 NADP<sup>+</sup>，完成非循环式电子传递（李合生，2002）。

蛋白点 SSP5513为苹果酸脱氢酶（MDH），在植物呼吸作用的三羧酸循环中起重要作用。

表 1 接种白粉病菌后黄瓜 R17品系差异蛋白质谱鉴定结果

Table 1 R17 differentially accumulated proteins identified by MS

| 序号<br>Spot No | 蛋白质名称<br>Protein name   | NCBI 编号<br>Accession No | 得分<br>Score | 等电点<br>PI | 分子量 /Da<br>MW | 匹配度<br>Intensity matched |
|---------------|---|-------------------------|-------------|-----------|---------------|--------------------------|
| SSP4004       | 磷脂酰肌醇 - 4 - 磷酸 5 - 激酶<br>Putative phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase | AAM14925                | 94          | 6.96      | 88 148.3      | 25.722                   |
| SSP7724       | 假拟蛋白 g5bf<br>Hypothetical protein g5bf                                      | T52072                  | 245         | 8.19      | 42 653.0      | 39.307                   |
| SSP3413       | PS 聚光复合体叶绿素 a/b结合蛋白<br>LHC type I chlorophyll a/b-binding protein           | AAF89207                | 125         | 5.13      | 27 950.1      | 22.658                   |
| SSP7723       | 铁氧还蛋白 NADP氧化还原酶<br>Ferredoxin-NADP(H) oxidoreductase                        | CAD30024                | 66          | 8.29      | 38 781.6      | 19.640                   |
| SSP3206       | XS结构域所含蛋白<br>Putative XS domain containing protein                          | AA060001                | 64          | 6.49      | 54 096.3      | 16.128                   |
| SSP3112       | 肌球蛋白 XI<br>Unconventional myosin XI   | AAF43440                | 78          | 8.01      | 171 559.7     | 16.675                   |
| SSP5513       | 苹果酸脱氢酶<br>Malate dehydrogenase  | CAC12826                | 149         | 5.91      | 35 385.2      | 14.175                   |

### 3 讨论

病原物侵入寄主后,植物与病原物的互作过程是一个动态的过程,植物抵御病害的一系列防御反应是许多蛋白质相互作用共同完成的 (Kim et al, 2004)。蛋白质是生命现象的直接体现者,对蛋白质结构和功能进行研究,同时结合基因组学的研究将直接阐明生命在生理和病理条件下的变化机制。本研究对接种黄瓜白粉病菌与对照黄瓜的叶片蛋白质图谱比较分析后发现,在接种 24、48、72 h有大量蛋白质特异表达和含量上调或下调。

R17在接种白粉病菌后 24、48、72 h, PIPkin蛋白含量均明显上调升高。在伤害刺激中,细胞内钙离子浓度首先上升,介导植物磷脂酶 D (PLD) 转移到质膜上发挥其作用, PLD被激活作为伤害刺激早期事件,而磷脂酸 (PtdOH) 则作为效应器或其他调控物的前体起作用 (Chapman, 1998; Wang, 1999)。PtdOH可以调节胞内 PIPkin, PIPkin参与磷脂酰肌醇 4, 5 - 二磷酸 (PIP<sub>2</sub>) 的合成 (Hammond et al, 1997)。在植物伤害刺激和激发子诱导中,可以观察到 PtdOH的大量增加和其他的磷脂代谢,这一过程与受伤害细胞 PLD和其他磷脂酶的释放有关。在以肌醇磷脂代谢为基础的细胞信号系统中,当膜受体接受胞外信号后,由 G - 蛋白介导而使 PIP<sub>2</sub>水解产生二酯酰甘油 (DG) 和肌醇三磷酸 (IP<sub>3</sub>)。IP<sub>3</sub>作用于液泡膜上的受体后,使 Ca<sup>2+</sup>从液泡中释放出来,引起胞内 Ca<sup>2+</sup>水平升高,启动胞内 Ca<sup>2+</sup>信号系统,从而调节依赖 Ca<sup>2+</sup>、钙调素的酶类的活性变化 (孙大业等, 2001)。当有 Ca<sup>2+</sup>存在时, DG、Ca<sup>2+</sup>、磷脂与 PKC分子相结合,使 PKC激活,从而对某些底物蛋白或酶类进行磷酸化,最终导致包括抗病生理反应在内的一系列反应 (Fukami et al, 1992)。可见,在应答白粉病菌胁迫过程中以肌醇磷脂代谢为基础的细胞信号系统起到重要作用。

研究证明植物细胞中普遍存在肌动蛋白和肌球蛋白,与动物的完全相同。Myosin在植物的生长发育过程中起着重要作用,作为细胞骨架的重要组成成分,与细胞的运动有关,如细胞的内吞、胞质环流等。它参与运输、信号传递、细胞分裂、细胞质流动和形态建成等 (Reddy, 2001; Tominaga et al, 2003)。同时, PS 聚光复合体叶绿素 a/b结合蛋白和铁氧还蛋白 NADP氧化还原酶是植物光合作用中的关键性蛋白,这些蛋白质含量的变化可能是白粉病菌侵入后寄主的代谢途径发生变化引起的。苹果酸脱氢酶 MDH催化苹果酸转化形成草酰乙酸, NAD<sup>+</sup>是氢的受体,这是三羧酸循环中第 4 次氧化还原反应,也是最后一步 (王镜岩等, 2002); R17接种 72 h时苹果酸脱氢酶含量明显升高,

这可能与病原菌侵染促使呼吸作用增强有关。

Ventelon-Debout等 (2004) 研究了水稻黄斑驳病毒对水稻蛋白质组的影响。在抗性品种 ‘R64’ 和敏感品种 ‘Azucena’ 中分别发现了 40 和 24 个差异表达的蛋白, 各有 19 和 13 个蛋白得到了鉴定。这些蛋白可以分为三类: 即代谢类蛋白、胁迫反应相关蛋白和参与翻译的蛋白。范海延等 (2007) 对黄瓜杂交 F<sub>2</sub> 代抗黄瓜白粉病研究表明, 后代抗性与光合作用、呼吸作用、信号转导及抗性基因表达有一定的相关性。本研究中黄瓜应答白粉病菌胁迫的蛋白质主要有与光合作用和呼吸作用有关的代谢类蛋白质, 与信号转导、物质运输相关的蛋白和未知功能蛋白等, 这与前人研究结果有相似之处。这些重要蛋白质各自作用的发挥和群集调控可能控制了黄瓜寄主防御反应。

本研究有利于全面了解白粉病致病过程和黄瓜抗白粉病机制, 但仍有许多抗性相关蛋白需要进一步鉴定。随着蛋白质组学技术应用, 植物抗病分子机理可能会有新的发现, 将更客观的揭示植物防御病害的本质。

## References

- Campo S, Carrascal M, Coca M, Abián J, San Segundo B. 2004. The defense response of germinating maize embryos against fungal infection: A proteomics approach. *Proteomics*, 4 (2): 383 - 396.
- Chapman K D. 1998. Phospholipase activity during plant growth and development and in response to environmental stress. *Trends Plant Sci*, 3: 410 - 426.
- Chen Z Y, Brown R L, Damann K E, Cleveland T E. 2002. Identification of unique or elevated levels of kernel proteins in aflatoxin-resistant maize genotypes through proteome analysis. *Phytopathology*, 92 (10): 1084 - 1094.
- Chen Z Y, Robert L B, Cleveland T E. 2004. Evidence for an association in corn between stress tolerance and resistance to *Aspergillus flavus* infection and aflatoxin contamination. *African Journal of Biotechnology*, 3 (12): 693 - 699.
- Chivasa S, Simon W J, Yu X L, Yalpani N, Slabas A R. 2005. Pathogen elicitor-induced changes in the maize extracellular matrix proteome. *Proteomics*, 5 (18): 4894 - 4904.
- Fan Hai-yan, L Ü Chun-mao, Chen Jie, Zhang Chun-yu, Sun Quan. 2007. Proteomic analysis of F<sub>2</sub> generation of cucumber against the cucumber powdery mildew disease. *Acta Horticulturae Sinica*, 34 (2): 349 - 355. (in Chinese)
- 范海延, 吕春茂, 陈捷, 张春宇, 孙权. 2007. 黄瓜杂交二代抗黄瓜白粉病的蛋白质组学初步分析, *园艺学报*, 34 (2): 349 - 355.
- Fukami K, Furuhashi K, Inagaki M, Endo T, Hatano S, Takenawa T. 1992. Requirement of phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate for actin function. *Nature*, 359: 150 - 152.
- Guo Yao-jun. 1999. Experimental technique of protein electrophoresis. Beijing: Science Press (in Chinese)
- 郭尧君. 1999. 蛋白质电泳实验技术. 北京: 科学出版社.
- Hammond SM, Jenco JM, Nakashima S, Cadwallader K, Gu Q, Cook S, Nozawa Y, Prestwich GD, Frohman M A, Morris A J. 1997. Characterization of two alternately spliced forms of phospholipase D1. *J Biol Chem*, 272: 3860 - 3868.
- Hirotsu K, Kiyoshi I, Setsuko K. 2001. A proteomics approach towards understanding blast fungus infection of rice grown under different levels of nitrogen fertilization. *Proteomics*, 1 (9): 1162 - 1171.
- Kim S T, Yu S, Kim S G, Kim H J, Kang S Y, Hwang D H, Jang Y S, Kang K Y. 2004. Proteome analysis of rice blast fungus (*Magnaporthe grisea*) proteome during appressorium formation. *Proteomics*, 4 (11): 3579 - 3587.
- Li He-sheng. 2002. Plant physiology. Beijing: Higher Education Press (in Chinese)
- 李合生. 2002. 现代植物生理学. 北京: 高等教育出版社.
- Mahmood T, Jan A, Kakishima M, Komatsu S. 2006. Proteomic analysis of bacterial-blight defense-responsive proteins in rice leaf blades. *Proteomics*, 6 (22): 6053 - 6065.
- Qian Xiao-hong, He fu-chu. 2004. Proteomics: Theory and method. Beijing: Science Press (in Chinese)
- 钱小红, 贺福初. 2004. 蛋白质组学: 理论与方法. 北京: 科学出版社.
- Reddy A S. 2001. Molecular motors and their functions in plants. *Int Rev Cytol*, 204: 97 - 178.
- Sun Da-ye, Guo Yan-lin, Ma Li-geng, Cui Su-juan. 2001. Signal transduction. Beijing: Science Press (in Chinese)
- 孙大业, 郭艳林, 马力耕, 崔素娟. 2001. 细胞信号转导. 北京: 科学出版社.

- Tominaga M, Kojima H, Yokota E, Orii H, Nakamori R, Katayama E, Anson M, Shimmen T, Oiwa K. 2003. Higher plant myosin XI moves processively on actin with 35 nm steps at high velocity. *The EMBO Journal*, 22: 1263 - 1272.
- Ventelon-Debout M, Delalande F, Brizard J P, Diemer H, van Dorsselaer A, Brugidou C. 2004. Proteome analysis of cultivar-specific deregulations of *Oryza sativa indica* and *O. sativa japonica* cellular suspensions undergoing *Rice yellow mottle virus* infection. *Proteomics*, 4 (1): 216 - 225.
- Wang Jing-yan, Zhu Sheng-geng, Xu Chang-fa. 2002. *Biochemistry*. Beijing: Higher Education Press (in Chinese).
- 王镜岩, 朱圣庚, 徐长法. 2002. *生物化学*. 北京: 高等教育出版社.
- Wang X M. 1999. The role of phospholipase D in signaling cascades. *Plant Physiol*, 22: 645 - 652.
- Wang Y, Yang L, Xu H, Li Q, Ma Z, Chu C. 2005. Differential proteomic analysis of proteins in wheat spikes induced by *Fusarium graminearum*. *Proteomics*, 5 (17): 4496 - 4503.
- Zhou W, Eudes F, Laroche A. 2006. Identification of differentially regulated proteins in response to a compatible interaction between the pathogen *Fusarium graminearum* and its host, *Triticum aestivum*. *Proteomics*, 6 (16): 4599 - 4609.

## “庆祝中国园艺学会创立 80周年暨第 11次 全国会员代表大会”征文通知

中国园艺学会将于 2009 年 11 月在广州召开“庆祝中国园艺学会创立 80 周年暨第 11 次全国会员代表大会”，现征集研究论文摘要，经审查合格者将收入《园艺学报》增刊，于会前出版。

征文内容：有关果树、蔬菜、西瓜甜瓜、观赏园艺植物及其它园艺植物的种质资源、遗传育种、生物技术、栽培技术与生理、采后技术与生理等方面未曾发表过的研究论文摘要（不影响相关论文今后在《园艺学报》全文发表，恕不接收综述摘要和品种介绍等）。

投稿要求：2009 年 8 月 10 日前将摘要一式三份寄送到：北京中关村南大街 12 号中国园艺学会办公室（邮编 100081），并发送电子文件至：cshs@mail.caas.net.cn，同时请交纳审理费 220 元（汇款地址：北京中关村南大街 12 号《园艺学报》编辑部，邮编 100081），经过同行专家审稿决定录用的稿件不再另收出版费用，会前将通知作者参会，不符合要求未录用的稿件恕不退稿和退费。联系电话：010-82109528；010-62192388。

写作要求：每篇摘要限 A4 纸一页（42 行/页，44 字/行），包括题目、作者、单位及邮政编码、研究目的及意义、材料与方法、结果与分析（不写英文和参考文献）。要求层次分明，文字准确精炼，使用规范的名词术语和法定计量单位，植物拉丁文学名和基因符号用斜体（请参照《园艺学报》征稿简则和近期刊登的文章）。不用图表。

写作范例：

### 论文题目（黑体，2 号字）

作者姓名（仿宋，4 号字），，，

（作者单位）（宋体，小 5 号字）（）

目的与意义（宋体，5 号字）

材料与方法（宋体，5 号字）

结果与分析（宋体，5 号字）

中图分类号：（由编辑部填写） 文献标识码：A 文章编号：0513-353X（2009）

中国园艺学会办公室

2009 年 5 月 4 日