

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2021.11.007

感染赤星病后烟草叶片的蛋白质表达差异

耿莉娜, 赵敏, 张艳, 徐宸, 汪代斌

重庆烟草科学研究所, 重庆 400715

摘要: 为了解烟草受赤星病菌感染后蛋白质表达变化情况, 探讨不同抗性烟草品种的差异, 对“云烟 87”“K326”和“Beinhart1000-1”的叶片进行了人工接种, 通过双向电泳比较分析感染前和感染后第 6 d 烟草叶片蛋白差异点。结果表明, 通过双向电泳共有 148 个表达差异明显的蛋白质点, 选取差异点进行质谱分析, 通过质谱结果及数据库搜索鉴定, 共成功鉴定到 38 个差异蛋白质点。经过分析, 根据这 38 个蛋白所参与的代谢途径和生化功能将它们归纳成 5 个类群: 碳代谢途径相关的蛋白质、光合作用相关的蛋白质、能量代谢相关的蛋白质、防御相关的蛋白质和蛋白合成相关的蛋白质, 同时还有 5 个未知蛋白。

关键词: 烟草赤星病; 双向电泳; 质谱鉴定; 烟草叶片;

蛋白质表达

中图分类号: Q946.1

文献标志码: A

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



文章编号: 1673-9868(2021)11-0048-11

Differential Expression of Proteins in Leaves of Different Tobacco Varieties Infected by the Pathogen of Tobacco Brown Spot

GENG Lina, ZHAO Min, ZHANG Yan,
XU Chen, WANG Daibin

Chongqing Tobacco Science Research Institute, Chongqing 400715, China

Abstract: In order to understand the changes in protein expression after tobacco brown spot infection and investigate the differences of different tobacco cultivars in disease resistance, three tobacco cultivars ('Yunyan 87', 'K326' and 'Beinhart1000-1') were artificially inoculated with the pathogen of tobacco brown spot, and the protein levels at 6 days before and after infection were investigated with two-dimensional e-

收稿日期: 2020-08-28

基金项目: 重庆市基础科学与前沿技术研究项目(cstc2017jcyjAX0334); 中国烟草总公司重庆市公司项目(NY20150401070001, NY20150601070012); 中国烟草总公司重大专项项目(110201501015)。

作者简介: 耿莉娜, 高级农艺师, 博士研究生, 主要从事烟草植保研究。

lectrophoresis(2-DE). Using 2-DE and image analysis system, 148 significantly different expression protein spots were detected. The differentially expressed proteins were analyzed by mass spectrometry. A total of 38 differentially expressed protein spots were identified by MALDI-TOF/TOF MS analysis and database searching. Based on the metabolic pathways and biochemistry functionals, we grouped them into 6 clusters: carbon metabolism pathway-related proteins, photosynthesis-related proteins, energy metabolism-related proteins, defensive response-related proteins, protein synthesis-related proteins and 5 uncharacterized proteins. The results of this study suggested that differently expressed proteins might play an important role in functional cloning of resistance-related genes in tobacco.

Key words: tobacco brown spot; two-dimensional electrophoresis (2-DE); MALDI-TOF/TOF MS; tobacco leaf; protein expression

烟草属于收获叶片的作物, 在我国经济中占有比较重要的地位. 烟草病害发生后对烟叶产量与质量影响很大, 严重时会造成毁灭性的经济损失. 目前, 烟草赤星病是严重制约我国烟叶生产的一类真菌病害, 该病具有潜育期短、爆发快的特点, 在温湿度适宜的条件下, 短时间内即可大面积流行, 给烟叶生产造成巨大损失. 长期使用化学药剂防治该病害会引起环境污染、农药残留、抗药性等问题; 生物防治虽无毒无害无污染, 但其作用缓慢、稳定性差、易受外界环境影响等缺点成为开发的难点, 因此研究烟草的抗病性和选育抗赤星病烟草品种是防治该病最经济有效的途径^[1-2].

目前, 对于烟草自身抗病性机理的研究, 主要集中在抗病性诱导^[3-5]、抗病基因定位^[6-7]、分子标记筛选^[8-9]及抗性基因的转化^[10]. 这些研究都集中在分子水平上, 而在蛋白质水平上的研究报道很少. 烟草自身的抗病性与蛋白的表达与调控密切相关, 因此本研究从蛋白质水平入手, 研究不同烟草品种接种赤星病菌后差异表达的蛋白质, 旨在探讨不同抗性烟草品种在蛋白质组学水平上存在的差异及其对赤星病抗性的影响, 为进一步明确烟草的抗赤星病机制提供新内容.

1 材料和方法

1.1 供试材料

供试烟草品种为“云烟 87”“K326”和“Beinhart1000-1”, 由中国农业科学院烟草研究所提供. 播种于温室花盆内, 后移栽于温室, 常规管理, 当 8~10 片真叶完全展开时接种. 供试菌株在 PDA 培养基上 25 °C 培养 7 d 后待用.

1.2 取 样

在烟草植株 10 叶期, 选择烟株下部未变黄的叶片接种菌饼, 每张叶片上接种 2 个菌饼, 接种 3 片叶片, 接种后 25 °C 保湿培养, 每天观察叶片受病菌侵染后情况, 感染后第 6 d 取样, 取接种叶片的上部第一片叶片, 以接种前作空白对照, “云烟 87”感染前(Y0d)、“云烟 87”感染后第 6 d(Y6d)、“K326”感染前(K0d)、“K326”感染后第 6 d(K6d)、“Beinhart1000-1”感染前(B0d)和“Beinhart1000-1”感染后第 6 d(B6d)共 6 个样本. 每个样本称取 2 g 叶片, 样品液氮速冻后-80 °C 保存备用.

1.3 双向电泳

取 2 g 叶片样品液氮研磨成细粉状, 加入 10 mL 预冷的 TCA-丙酮(1:9), 涡旋混匀, 置于-20 °C 沉淀过夜, 4 °C 离心 40 min(6 000 r/min), 弃上清. 加入预冷丙酮, 洗涤 3 次. 通风橱中干燥沉淀. 分别加入 500 μ L 2D 裂解液(9.5 mol/L 尿素, 4% CHAPS, 60 mmol/L DTT, 体积分数为 2%的 ampholytes, 使用时每 500 μ L 裂解液加入 10 μ L 50 \times Protein Inhibitor Cocktail Set I), 震荡混匀重悬沉淀, 冰浴超声处

理(100 W, 持续 10 s, 间隔 8 s, 重复 8 次), 4 °C 离心 30 min(12 000 r/min), 取上清, 使用 Bradford 法进行定量, 测蛋白质浓度后, 分装于-80 °C 冰箱保存. 取处理好的蛋白样品 20 μ L, 使用 12% 分离胶, 5% 浓缩胶进行 SDS-PAGE, 再经考马斯亮蓝 R-250 染色检测.

分别取样品 100 μ g, 进行双向电泳, 13 cm IPG 预制胶条(pH 值为 3~10, 非线性胶条), 采用 Ettan™ IPGphor™ 等电聚焦系统(GE Amersham)进行等电聚焦, IPG 胶条在水化缓冲液中再水化 12 h, IEF 分 4 步进行: 30 V, 12 h; 500 V, 1 h; 1000 V, 1 h; 8000 V, 8 h. 等电聚焦结束后, 使用两步法进行平衡^[11], 然后转移到 12.5% SDS-聚丙烯酰胺凝胶上之后将条带进行第二维电泳. 使用 Hofer SE 600 系统(GE Amersham)以 15 mA/块凝胶进行电泳 30 min, 待样品完全转移出 IPG 胶条, 加大电流至 30 mA/块凝胶, 直到溴酚蓝到达凝胶下沿 0.5 cm 处, 电泳结束.

电泳结束后取出凝胶, 加入固定液(40% 乙醇, 10% 冰醋酸)固定过夜, 再加入浸泡液(30% 乙醇, 6.8% NaAc, 0.312% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)处理 30 min, 倒掉, 用 MilliQ 水冲洗 3 次, 每次 5 min; 将清洗后的胶加入染色液(0.25% 硝酸银)中染色 20 min, 倒掉染色液, 用 MilliQ 水冲洗 2 次, 每次 1 min; 放置于显影液(2.5% 无水碳酸钠, 0.04% 甲醛)中显色, 直至蛋白质点清晰可见, 加入终止液(1.46% ED-TA-2Na \cdot 2H₂O), 终止反应; 加入 MilliQ 水洗 3 次, 每次 5 min, 再加入 10% 冰醋酸保存.

1.4 图像分析

使用 UMax Powerlook 2110XL(UMax)扫描染色的凝胶, 并使用 ImageMaster 2D Platinum(版本 5.0, GE Amersham)完成图像分析. 手动验证每个配对斑点以确保在 3 份数据中产生的标准化点胶体之间的高度再现性. 选择重叠测量比以发现蛋白质表达变化, 并且具有 1.2 倍或更大重叠率阈值过滤的蛋白质被认为是差异表达的. 确定差异表达的蛋白质点, 并从胶上挖取差异点.

1.5 MALDI-TOF/TOF 分析及数据库检索

1.5.1 胶内酶解及 Ziptip 脱盐

将目标蛋白点切下, 装入离心管中做好标记, 将胶粒切碎后加入 50 μ L 银染脱色液(银染脱色液: $V_{30 \text{ mmol/L 铁氰化钾}} : V_{100 \text{ mmol/L 硫代硫酸钠}} = 1 : 1$ 混合)脱色, 清洗脱色至透明, 吸弃上清, 再加入 100 μ L 100 mmol/L 碳酸氢铵, 室温孵育 15 min, 吸弃上清冻干, 之后加入 5 μ L 10 mg/L 测序级 Trypsin(胰蛋白酶, Promega)溶液, 37 °C 反应过夜(20 h 左右); 将过夜消化的酶解液吸出, 转移至新的离心管中, 在原管加入 100 μ L 60% ACN/0.1% TFA, 超声溶解 15 min, 合并酶解液冻干; 若有较多盐分, 则用 Ziptip(millipore)进行脱盐. 首先用 50% 的 ACN 湿润吸嘴, 再用 60% ACN/0.1% TFA 润洗两次, 然后用吸嘴反复吸打样品液, 以除去盐类和杂质, 最后用 60% ACN/0.1% TFA 清洗吸嘴两次, 将所有溶液合并冻干.

1.5.2 质谱分析

将冻干后的酶解样品, 取 2 μ L 20% 乙腈复溶. 取 1 μ L 溶解后的样品, 直接点于样品靶上, 让溶剂自然干燥后, 再取 0.5 μ L 过饱和 CHCA 基质溶液(溶剂为 50% ACN/0.1% TFA)点至对应靶位上并自然干燥. 样品靶经氮气吹净放入仪器进靶槽并用串联飞行时间质谱仪(5800 MALDI-TOF/TOF, AB SCIEX)进行测试分析, 激光源为 355 nm 波长的 Nd: YAG 激光器, 加速电压为 2 kV, 采用正离子模式和自动获取数据的模式采集数据, 一级质谱(MS)扫描范围为 800~4 000 Da, 选择信噪比大于 50 的母离子进行二级质谱(MS/MS)分析, 每个样品点上选择 8 个母离子, 二级质谱(MS/MS)累计叠加 2 500 次, 碰撞能量 2 kV, CID 关闭.

1.5.3 数据库检索

质谱测试原始文件用 Mascot 2.2 软件检索相应的数据库, 最后得到鉴定的蛋白质结果. 搜库参数设置如下: Database: NCBI; Taxonomy: XXX; Type of search: Combined(MS+ MS/MS); Enzyme: Trypsin; Fixed modifications: Carbamidomethyl (C); Dynamical modifications: Oxidation(M); Mass values:

Monoisotopic; Protein Mass: Unrestricted; Peptide Mass Tolerance: $\pm 100 \times 10^{-6}$; Fragment Mass Tolerance: ± 0.4 Da; Peptide Charge State: 1+; Max Missed Cleavages: 1.

2 结果与分析

2.1 蛋白质定量及 SDS-PAGE 电泳检测

对提取的样品使用 Bradford 法进行蛋白质含量测定, 样品质量浓度见表 1, 并进行 SDS-PAGE 电泳检测(图 1), 根据结果显示“云烟 87”对照(Y0d)浓度较低, 后续双向电泳上样量为 $100 \mu\text{g}$, 根据样品质量浓度计算双向电泳上样体积。

表 1 烟叶样品的蛋白质质量浓度

样品名称	质量浓度/($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)
B0d	1.45
B6d	1.94
K0d	2.19
K6d	3.81
Y0d	0.83
Y6d	1.5

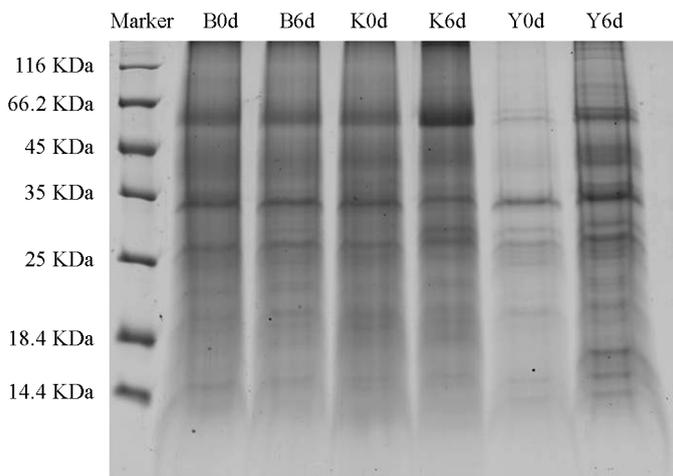


图 1 烟叶样品蛋白 SDS-PAGE 电泳图

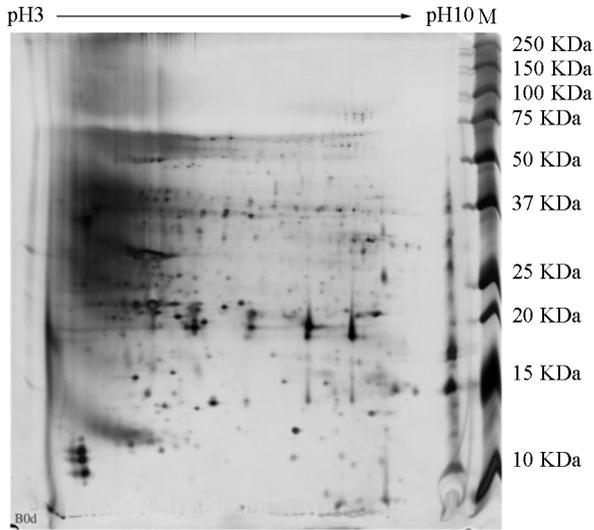
2.2 双向电泳图谱及差异点分析

将提取的蛋白进行双向电泳分析, 使用 pH 值为 3~10, 13 cm 的 IPG 预制胶条, 蛋白上样量为 $100 \mu\text{g}$, 双向电泳银染结果见图 2, 提取的蛋白在各 pH 段都有分布, 蛋白质点较清晰, 分离较好。

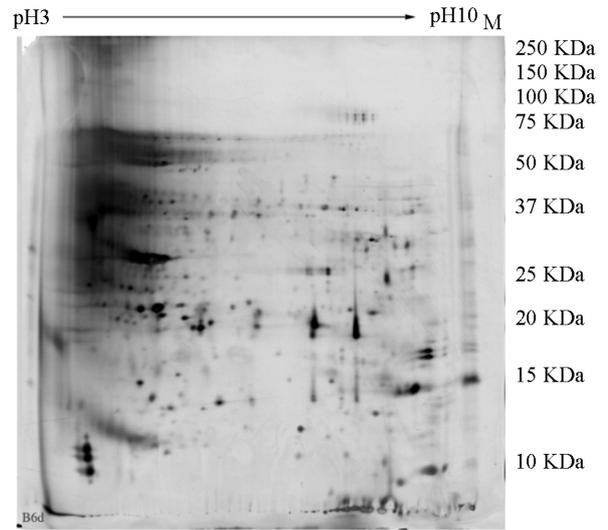
将蛋白质凝胶双向电泳图谱经 Image Master 软件分析, 通过比较感染前和感染后第 6 d 的双向电泳图谱, 检测差异蛋白点(图 3). 比较 B6d 和 B0d 胶图有 41 个表达差异明显的蛋白质点, 比较 K6d 和 K0d 胶图有 46 个表达差异明显的蛋白质点, 比较 Y6d 和 Y0d 胶图有 61 个表达差异明显的蛋白质点, 共有 148 个表达差异明显的蛋白质点. 根据软件分析结果, 结合电泳图谱, 共选取 48 个表达差异显著的蛋白质点进行质谱分析, 其中上调表达的蛋白 33 个, 下调表达的蛋白 15 个, 具体见表 2.

2.3 差异表达蛋白点的质谱鉴定

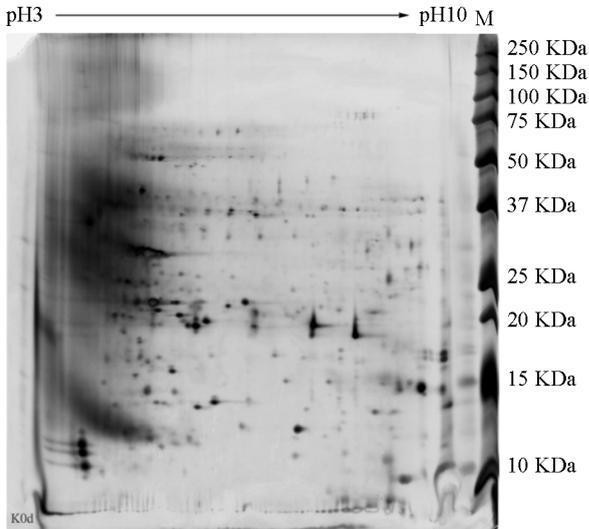
对选取的 48 个差异蛋白点进行质谱鉴定, 成功鉴定出 38 个蛋白质点(质谱匹配肽段得分高于 60, 并且匹配得分可信度大于 95%), 结果见表 3, 其中上调表达蛋白 28 个, 下调表达蛋白 10 个. 根据这 38 个蛋白所参与的代谢途径和生化功能将它们归纳成以下类群: 碳代谢途径相关的蛋白质有甘油醛-3-磷酸脱氢酶(B308, K328)和羧甲烯丁烯羧酸内酯酶同系物(B559); 光合作用相关的蛋白质包括铁氧还蛋白酶还原酶(B412, Y607), PsbP 结构域蛋白 6(B619), 类囊体腔 15kDa 蛋白 1(B889), 叶绿素 a-b 结合蛋白 8(K581), 类 PsbP 蛋白 1(K774), 果糖二磷酸醛缩酶 1(Y537), 类囊体内腔 19 kDa 蛋白(Y875)和 1,5-二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶(RuBisCo)相关蛋白(K820, Y440, Y462, Y1172); 能量代谢相关的蛋白质包括类 DNA 甲基化因子 4(B728), 磷酸甘油酸激酶(K270), 苹果酸脱氢酶(K342, Y579), PNSL5(K742), ATP 合成酶 CF1 ϵ 亚基(K789), 磷酸甘油酸激酶(Y449)和碳酸酐酶(Y769); 防御相关的蛋白质包括过氧化物酶 N1(K421), 谷胱甘肽 S-转移酶(K607), PR-5(K633), GGAT(Y331), PP2-B11(Y1039)和铜/锌超氧化物歧化酶(Y1088); 蛋白合成相关的蛋白质包括 2-亚甲基-3-咪喃酮还原酶(B330, Y535, Y538)和 FKBP19(Y958); 同时还有 5 个未知蛋白(B319, B531, K409, K427, Y637).



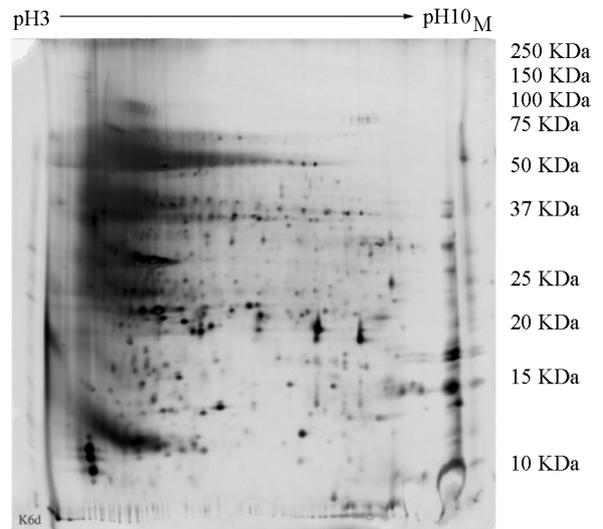
a. “Beinhart 1000-1”感染前(B0d)烟叶的双向电泳图谱



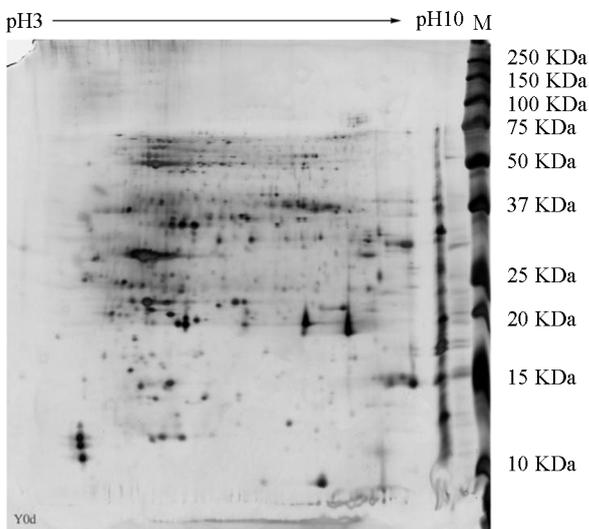
b. “Beinhart 1000-1”感染后第6 d(B6d)烟叶的双向电泳图谱



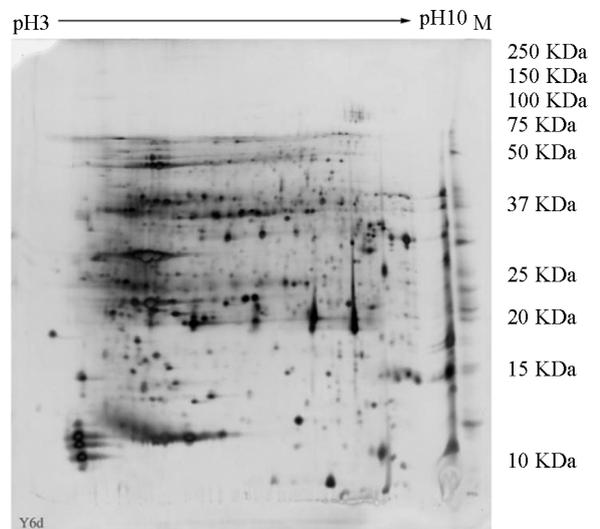
c. “K326”感染前(K0d)烟叶的双向电泳图谱



d. “K326”感染后第6 d(K6d)烟叶的双向电泳图谱

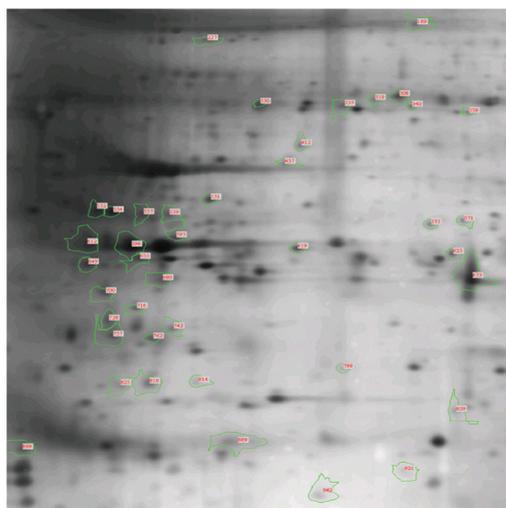


e. “云烟87”感染前(Y0d)烟叶的双向电泳图谱

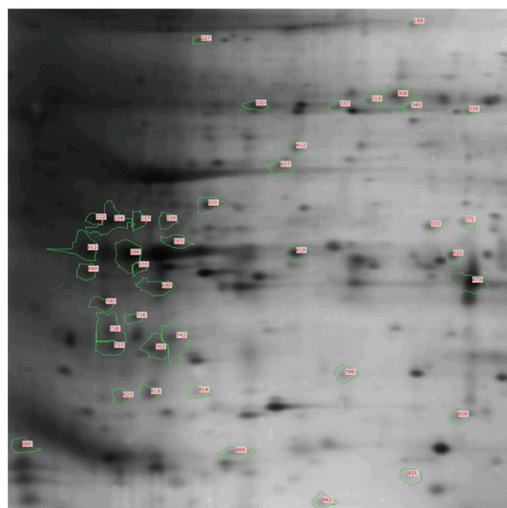


f. “云烟87”感染后(Y6d)烟叶的双向电泳图谱

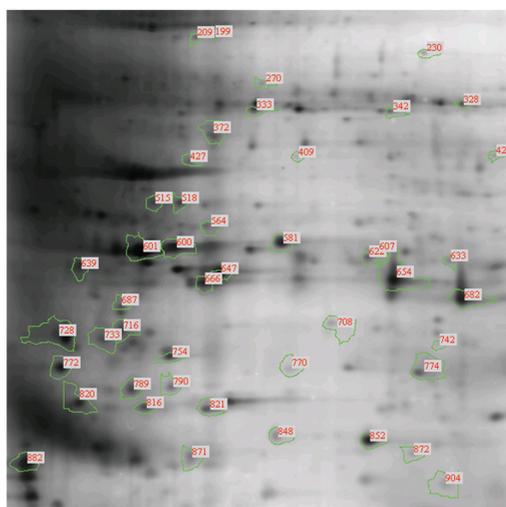
图 2 烟叶样品蛋白双向电泳图(13 cm, pH=3~10, 12.5% SDS-PAGE)



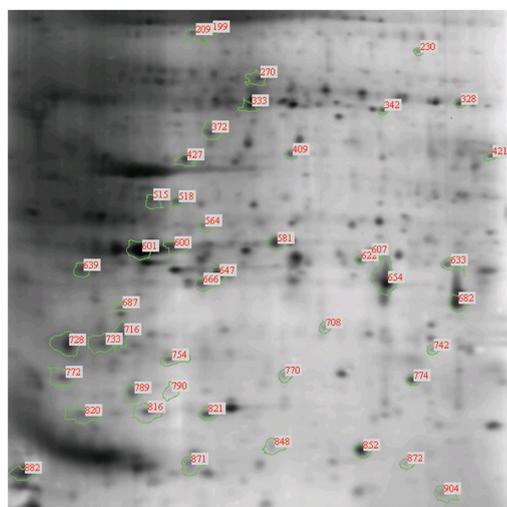
a. “Beinhart 1000-1”感染前(B0d)烟叶的双向电泳图谱



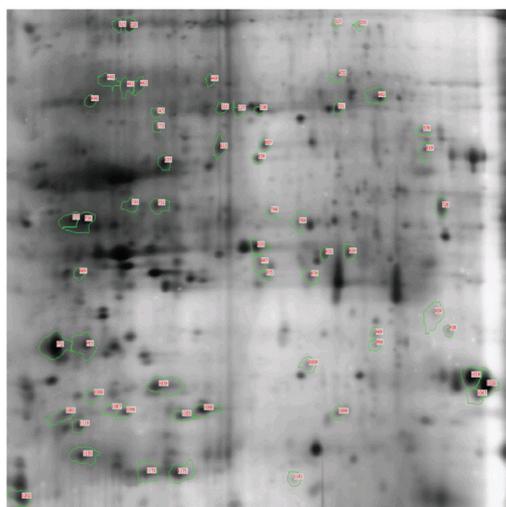
b. “Beinhart 1000-1”感染后第6 d(B6d)烟叶的双向电泳图谱



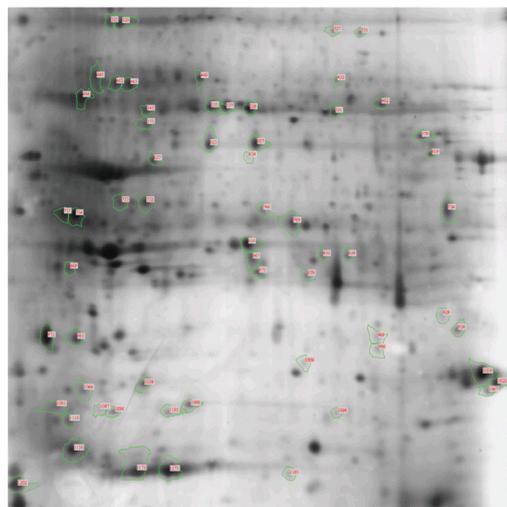
c. “K326”感染前(K0d)烟叶的双向电泳图谱



d. “K326”感染后第6 d(K6d)烟叶的双向电泳图谱



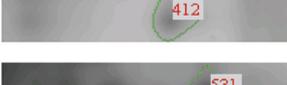
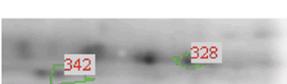
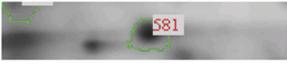
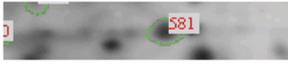
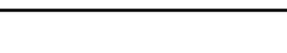
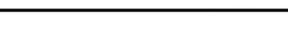
e. “云烟87”感染前(Y0d)烟叶的双向电泳图谱



f. “云烟87”感染后(Y6d)烟叶的双向电泳图谱

图 3 双向电泳图谱差异点分析

表 2 差异点选取

组别	差异点编号	差异情况	差异倍数	感染前图谱	感染后图谱
B6d/B0d	B308	上升	2.1352 1		
B6d/B0d	B319	上升	4.0340 1		
B6d/B0d	B330	上升	1.6479 7		
B6d/B0d	B412	上升	1.9009 6		
B6d/B0d	B531	上升	1.7960 5		
B6d/B0d	B559	下降	2.2993 7		
B6d/B0d	B619	上升	1.8757 2		
B6d/B0d	B575	上升	1.5683 6		
B6d/B0d	B625	上升	1.6581 3		
B6d/B0d	B716	下降	2.0075 8		
B6d/B0d	B728	上升	3.0536 5		
B6d/B0d	B742	上升	3.1880 1		
B6d/B0d	B762	上升	3.9483 3		
B6d/B0d	B798	上升	2.5747 8		
B6d/B0d	B889	下降	2.9153 7		
K6d/K0d	K270	上升	2.1242 5		
K6d/K0d	K409	上升	3.7210 8		
K6d/K0d	K427	上升	1.6396 8		
K6d/K0d	K328	上升	1.5244 6		
K6d/K0d	K342	下降	2.5089 1		
K6d/K0d	K421	上升	2.3350 7		
K6d/K0d	K581	下降	1.8046 3		
K6d/K0d	K607	上升	1.9578 1		
K6d/K0d	K633	上升	2.7490 8		

续表 2

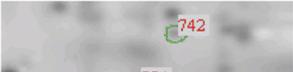
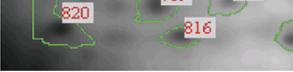
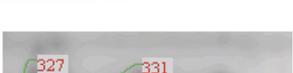
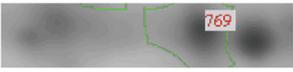
组别	差异点 编号	差异情况	差异倍数	感染前图谱	感染后图谱
K6d/K0d	K742	上升	3.1457 1		
K6d/K0d	K774	下降	2.7794 7		
K6d/K0d	K716	下降	2.6701 5		
K6d/K0d	K789	下降	1.5917 8		
K6d/K0d	K790	下降	2.9160 2		
K6d/K0d	K820	下降	2.6070 7		
Y6d/Y0d	Y331	上升	2.4338 9		
Y6d/Y0d	Y440	上升	4.6359 8		
Y6d/Y0d	Y462	上升	3.4289 3		
Y6d/Y0d	Y449	上升	3.1891 9		
Y6d/Y0d	Y535	上升	3.8498 0		
Y6d/Y0d	Y537	上升	2.9854 1		
Y6d/Y0d	Y538	上升	4.0614 7		
Y6d/Y0d	Y607	上升	2.7498 8		
Y6d/Y0d	Y634	下降	4.2568 6		
Y6d/Y0d	Y637	下降	1.5866 9		
Y6d/Y0d	Y579	上升	3.3237 4		
Y6d/Y0d	Y769	上升	4.5603 9		
Y6d/Y0d	Y875	上升	3.1576 4		
Y6d/Y0d	Y958	上升	2.4311 3		
Y6d/Y0d	Y1039	下降	3.1702 4		
Y6d/Y0d	Y1088	下降	2.0616 9		
Y6d/Y0d	Y1098	下降	2.3934 9		
Y6d/Y0d	Y1172	上升	2.4029 5		

表 3 差异表达蛋白的 MALDI-TOF/TOF 质谱结果

编号	差异	登录号	蛋白质	分子量/等电点	物种	蛋白得分	蛋白得分可信度/%
B308	上升	XP_016510865.1	甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)	36 984.1/6.62	<i>Nicotiana tabacum</i>	367	100
B319	上升	XP_016444722.1	未知蛋白	30 343.8/9.63	<i>Nicotiana tabacum</i>	70	97.288
B330	上升	XP_016503412.1	类 2-亚甲基-3-咪唑酮还原酶	41 083.8/7.71	<i>Nicotiana tabacum</i>	375	100
B412	上升	XP_016447586.1	铁氧还蛋白酶还原酶(FNR)	40 250.4/8.38	<i>Nicotiana tabacum</i>	217	100
B531	上升	XP_019262470.1	未知蛋白	33 315.4/8.64	<i>Nicotiana attenuata</i>	371	100
B559	下降	XP_009787586.1	羧甲基丁烯酸内酯酶同系物(CMBL)	26 374.2/5.28	<i>Nicotiana sylvestris</i>	214	100
B619	上升	XP_009796942.1	PsbP 结构域蛋白 6(PPD6)	31 214.2/8.31	<i>Nicotiana sylvestris</i>	232	100
B728	上升	XP_016498170.1	类 DNA 甲基化因子 4	60 752.2/6.88	<i>Nicotiana tabacum</i>	71	98.035
B889	下降	XP_009798861.1	类囊体腔 15kDa 蛋白 1	23 276.7/6.56	<i>Nicotiana sylvestris</i>	352	100
K270	上升	NP_001312375.1	磷酸甘油酸激酶	42 337.6/5.69	<i>Nicotiana tabacum</i>	143	100
K409	上升	XP_009763734.1	未知蛋白	38 254.6/9.00	<i>Nicotiana sylvestris</i>	70	97.526
K427	上升	XP_016512661.1	未知蛋白	35 924.3/8.11	<i>Nicotiana tabacum</i>	77	99.433
K328	上升	XP_016494031.1	甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)	36 614.0/7.03	<i>Nicotiana tabacum</i>	83	99.851
K342	下降	XP_009593526.1	苹果酸脱氢酶	36 123.1/8.91	<i>Nicotiana tomentosiformis</i>	238	100
K421	上升	CAH17984.1	过氧化物酶 N1	31 675.1/7.72	<i>Nicotiana tabacum</i>	320	100
K581	下降	OIT27366.1	叶绿素 a-b 结合蛋白 8	29 128.0/8.61	<i>Nicotiana attenuata</i>	94	99.988
K607	上升	XP_009789274.1	谷胱甘肽 S-转移酶	23 847.3/6.24	<i>Nicotiana sylvestris</i>	102	99.998
K633	上升	XP_009782397.1	类渗调蛋白(OLP), PR-5	27 522.6/6.40	<i>Nicotiana sylvestris</i>	285	100
K742	上升	XP_016454904.1	PNSL5	26 496.5/9.22	<i>Nicotiana tabacum</i>	116	100
K774	下降	XP_016449885.1	类 PsbP 蛋白 1	26 597.5/8.69	<i>Nicotiana tabacum</i>	217	100
K789	下降	AMM05552.1	ATP 合成酶 CF1 ϵ 亚基	14 597.8/5.18	<i>Nicotiana tabacum</i>	306	100
K820	下降	AIF75364.1	1, 5-二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶小亚基(RuBisCo)	17 486.7/6.81	<i>Nicotiana tomentosiformis</i>	113	100
Y331	上升	XP_009765091.1	谷氨酸-乙醛氨基转移酶 2(GGAT)	53 473.2/7.04	<i>Nicotiana sylvestris</i>	146	100
Y440	上升	NP_001312578.1	二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶 2(RuBisCo)	48 312.5/8.14	<i>Nicotiana tabacum</i>	102	99.998
Y462	上升	XP_016477286.1	二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶 2(RuBisCo)	48 282.4/7.57	<i>Nicotiana tabacum</i>	584	100
Y449	上升	XP_016476661.1	磷酸甘油酸激酶	50 019.8/8.48	<i>Nicotiana tabacum</i>	320	100
Y535	上升	XP_016435133.1	2-亚甲基-3-咪唑酮还原酶	41 194.8/7.71	<i>Nicotiana tabacum</i>	196	100
Y537	上升	XP_009613926.1	f 果糖二磷酸醛缩酶 1	42 574.9/7.59	<i>Nicotiana tomentosiformis</i>	358	100
Y538	上升	XP_016435133.1	2-亚甲基-3-咪唑酮还原酶	41 194.8/7.71	<i>Nicotiana tabacum</i>	507	100
Y607	上升	XP_009794242.1	铁氧还蛋白酶还原酶(FNR)	40 280.5/8.56	<i>Nicotiana sylvestris</i>	449	100
Y637	下降	XP_016512661.1	未知蛋白	35 924.3/8.11	<i>Nicotiana tabacum</i>	419	100
Y579	上升	XP_009616819.1	苹果酸脱氢酶, 乙醛酸	37 574.7/8.10	<i>Nicotiana tomentosiformis</i>	215	100
Y769	上升	XP_009614637.1	碳酸酐酶	35 896.4/6.72	<i>Nicotiana tomentosiformis</i>	127	100
Y875	上升	XP_016437043.1	类囊体内腔 19 kDa 蛋白	26 929.7/7.78	<i>Nicotiana tabacum</i>	225	100
Y958	上升	XP_009800700.1	肽基-脯氨酸顺反异构酶 FKBP19	20 405.4/8.52	<i>Nicotiana sylvestris</i>	79	99.659
Y1039	下降	XP_016462432.1	PP2-B11	19 048.9/5.59	<i>Nicotiana tabacum</i>	462	100
Y1088	下降	ABW97848.1	铜/锌超氧化物歧化酶	8 929.4/5.34	<i>Nicotiana tabacum</i>	418	100
Y1172	上升	XP_009595081.1	二磷酸核酮糖羧化酶小链(RuBisCo)	20 268.1/7.57	<i>Nicotiana tomentosiformis</i>	341	100

3 讨 论

甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)是糖酵解反应中一种非常关键的酶,常用作研究其他基因和蛋白表达的内参。随着研究的深入,越来越多的试验证实 GAPDH 蛋白功能的多样性,如 GAPDH 在植物中与各种环境的压力表现出抗逆性有关^[12]。有研究人员在分子水平上检测到马铃薯的 GAPDH 基因受病原物侵染诱导表达^[13],并且在致病疫霉侵染马铃薯最初的 24 h 内就有反应^[14],本研究鉴定到的两个甘油醛-3-磷酸脱氢酶(B308, K328)在受到病原菌侵染后均上调表达,也进一步在蛋白水平上验证了 GAPDH 蛋白在病原菌侵染过程中发挥作用,另外,根据结果也可以得出在研究病菌侵染过程中 GAPDH 基因不适合作为基因表达的内参。

本研究共鉴定到 12 个与光合作用有关的蛋白质,其中有 8 个上调表达的蛋白:铁氧还蛋白酶还原酶(B412, Y607), P_{sbP} 结构域蛋白 6(B619), 果糖二磷酸醛缩酶 1(Y537), 类囊体内腔 19 kDa 蛋白(Y875), 1,5-二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶(RuBisCo)相关蛋白(Y440, Y462, Y1172); 4 个下调表达的蛋白:类囊体内腔 15kDa 蛋白 1(B889), 叶绿素 a-b 结合蛋白 8(K581), 类 P_{sbP} 蛋白 1(K774)和 1,5-二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶小亚基(K820)。其中 1,5-二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶(RuBisCo)是光合作用中的一个关键酶,本研究发现 4 个 RuBisCo 相关蛋白,其中在“K326”中鉴定到的 1, 5-二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶小亚基在被赤星病菌侵染后下调表达,“云烟 87”中有 2 个二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶 2 和 1 个二磷酸核酮糖羧化酶小链在被赤星病菌侵染后上调表达。光合作用是植物中最重要的代谢过程,赤星病侵染显著影响光合作用的速率, RuBisCo 作为光合作用中的一个关键酶,其表达量增加会增强光合作用以供给更多能量从而抵抗病毒侵染,而酶的减少表明植株在受到病菌侵染后光合作用下降,同时部分蛋白开始降解,植株开始逐渐衰弱,进一步降低了对病原菌的抵抗能力,从而加速了植株的发病,这也表明了“云烟 87”和“K326”对赤星病侵染的抗性不同。

本研究共鉴定到能量代谢相关的蛋白质 8 个,其中有 6 个上调表达的蛋白:类 DNA 甲基化因子 4(B728), 磷酸甘油酸激酶(K270), 苹果酸脱氢酶(Y579), PNSL5(K742), 磷酸甘油酸激酶(Y449), 碳酸酐酶(Y769); 2 个下调表达的蛋白苹果酸脱氢酶(K342)和 ATP 合成酶 CF1 ϵ 亚基(K789)。ATP 合成酶是参与能量代谢的关键酶,有研究提出病原菌的侵染初期,作为细胞内能量转换核心酶的 ATPase 下调表达,表明烟草在被侵染初期电子传递和能量传递能力减弱,即在病原物侵染初期某些生理途径被病原菌破坏,或被病原菌产生的降解酶和毒素抑制从而降低植株呼吸作用强度,触发植物的主动抗病机制,是植株主动防御机制起作用的必要过程^[15]。

本研究共鉴定到防御相关的蛋白质 6 个,其中有 4 个上调表达的蛋白:过氧化物酶 N1(K421), 谷胱甘肽 S-转移酶(K607), PR-5(K633)和 GGAT(Y331); 2 个下调表达的蛋白 PP2-B11(Y1039)和铜/锌超氧化物歧化酶(Y1088)。研究表明,在植物受到外界胁迫时,植株体内的 GST 活性会显著升高,以保护生物体免受逆境的损害^[16]。本研究也鉴定到了谷胱甘肽 S-转移酶(K607)在感染赤星病后上调表达,与前期研究一致。本研究还鉴定到一个感染赤星病后上调表达的 osmotin-like protein(K633)类渗调蛋白(OLP),它属于 PR-5 蛋白。PR-5 蛋白包含了具有多种抗逆功能的渗调蛋白(osmotin)和类渗调蛋白(OLP)。有研究表明,马铃薯被致病疫霉(*P. infestans*)感染后能检测到 OLP 蛋白的增加^[17]。PR-5 蛋白具有抗真菌、抗冻和抗渗透压力等多种生物学活性,参与植物系统获得性反应(SAR)和超敏反应(HR),在植物抵御生物和非生物胁迫中具有重要作用^[18]。当受到病原侵害时植物可以产生系统获得性抗性,发生系统获得性抗性过程时植物的细胞内会发生一系列的生理生化反应,其中就包括 PR 蛋白表达。

综上所述,在本研究中,接种病菌后烟草叶片中参与各个代谢过程的相关蛋白并不是呈现单一的变化趋势,烟草的抗性机制是十分复杂的,涉及大量基因的诱导表达与调控,这些基因的表达结果往往导致蛋白质的变化。本研究得到了烟草对赤星病菌应答网络中表达量发生显著变化的差异蛋白,但所得到的差异

蛋白在应答机制中的具体作用有待进一步的深入研究. 总之, 烟草对赤星病抗性机制复杂, 其中涉及众多的信号物质和抗性相关蛋白, 随着蛋白质组学等技术的发展和应用, 将会有更多的抗性相关基因和蛋白被挖掘, 进而大大提高人们对烟草与赤星菌互作机理的认识.

参考文献:

- [1] 孔凡玉. 烟草赤星病的综合防治技术 [J]. 烟草科技, 2002, 35(6): 40-42.
- [2] 刘学敏, 常 稳, 李大壮. 烟草赤星病研究现状及存在问题 [J]. 东北农业大学学报, 2000, 31(1): 80-85.
- [3] 董汉松, 于建立. 赤星菌弱毒株 TBA16 对烟草抗赤星病诱导作用条件的研究 [J]. 植物保护学报, 1993, 20(2): 129-134.
- [4] 张正光, 王源超, 郑小波. 一种新的 90kD 胞外蛋白激发子诱导烟草系统获得抗性研究 [J]. 植物病理学报, 2002, 32(4): 338-346.
- [5] 梁元存, 商明清, 刘爱新, 等. 病菌激发子诱导烟草抗赤星病的研究 [J]. 山东农业大学学报(自然科学版), 2000, 31(1): 8-10.
- [6] 高亭亭, 蒋彩虹, 罗成刚, 等. Beinhart1000-1 抗赤星病基因的 QTL 定位 [J]. 中国烟草学报, 2014, 20(2): 104-107.
- [7] 蒋彩虹, 罗成刚, 任 民, 等. 一个与净叶黄抗赤星病基因紧密连锁的 SSR 标记 [J]. 中国烟草科学, 2012, 33(1): 19-22.
- [8] 朱承广, 任 民, 蒋彩虹, 等. 以关联分析发掘烟草抗赤星病基因分子标记 [J]. 中国烟草科学, 2017, 38(1): 68-72.
- [9] 郭生云, 何川生, 张汉尧, 等. 用 RAPD 技术鉴定烤烟抗赤星病基因连锁标记 [J]. 海南师范学院学报(自然科学版), 2001, 14(2): 10-13.
- [10] 王晓雯, 杨星勇, 李德谋, 等. 转 nsLTPs 类抗菌蛋白基因烟草对赤星病和青枯病的抗病性分析 [J]. 农业生物技术学报, 2006, 14(3): 365-370.
- [11] 崔 萌, 魏娟娟, 苏晓星, 等. 高温对豇豆叶片细胞膜脂过氧化和蛋白质表达的影响 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2016, 38(4): 21-27.
- [12] 禹淞文, 李清明. 甘油醛-3-磷酸脱氢酶的应用进展 [J]. 农产品加工(学刊), 2014(9): 51-53.
- [13] LAXALT A M, CASSIA R O, SANLLORENTI P M, et al. Accumulation of Cytosolic Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase RNA under Biological Stress Conditions and Elicitor Treatments in Potato [J]. Plant Molecular Biology, 1996, 30(5): 961-972.
- [14] BELIGNI M V, LAXALT A M, LAMATTINA L. Temporal and Spatial Patterns of GAPDHc mRNA Accumulation during an Incompatible Potato-Phytophthora Infestans Interaction. Comparison with a Compatible Interaction [J]. Physiologia Plantarum, 1999, 105(2): 280-287.
- [15] 崔宏伟, 孙剑萍, 刘春燕, 等. 烟草叶片接种野火病菌后蛋白质表达差异 [J]. 植物保护, 2012, 38(6): 7-11, 30.
- [16] 雷安平, 陈 欢, 黎双飞, 等. 谷胱甘肽 S-转移酶的功能、应用及克隆表达 [J]. 环境科学与技术, 2009, 32(12): 85-91.
- [17] ZHU B L, CHEN T H H, LI P H. Expression of Three Osmotin-Like Protein Genes in Response to Osmotic Stress and Fungal Infection in Potato [J]. Plant Molecular Biology, 1995, 28(1): 17-26.
- [18] 李 白. 病程相关 5 蛋白功能机理研究进展 [J]. 安徽农业科学, 2011, 39(27): 16661-16663.

责任编辑 潘春燕