

植物与病原菌互作的蛋白质组学研究进展

丁丽娜^{1*} 杨瑞英² 杨国兴³

(1. 江苏大学生命科学研究院 江苏 镇江 212013)

(2. 实验中学 山东 鄄城 274600)

(3. 南京农业大学动物医学院 江苏 南京 210095)

摘要: 蛋白质组学作为功能基因组学研究的主要内容之一,在阐述基因功能、了解生命现象和本质的分子机制等方面发挥着重要作用。植物蛋白质组学作为蛋白质组学的一个分支,研究应用也越来越广泛,尤其是探索植物与病原菌互作机制是其中的一个研究热点。本文就多年来植物与真菌、病毒、细菌互作的蛋白质组学研究做一综述,并对当前该领域今后的研究方向进行展望,以期对相关研究提供一些参考和理论基础。

关键词: 植物, 病原菌, 蛋白质组学, 防卫机制

Advances in proteomic studies on plant-pathogen interactions

DING Li-Na^{1*} YANG Rui-Ying² YANG Guo-Xing³

(1. College of Life Sciences, Jiangsu University, Zhenjiang, Jiangsu 212013, China)

(2. Laboratory Middle School, Juancheng, Shandong 274600, China)

(3. College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu 210095, China)

Abstract: Proteomics is one of the main contents of functional genomics era, and plays an important role in understanding gene function, molecular mechanisms, etc. Plant proteomics, which is regarded as a branch of proteomics, has been applied and investigated more and more extensively, especially in exploring how plants and pathogens recognize each other and differentiate to establish either a compatible or an incompatible relationship. This review have summarized the proteomic studies on plant-pathogen interactions from both the plant and pathogen view points in recent years, particularly focused on plant response to fungi, viruses and bacteria infection. Finally, the prospects are forecasted to provide some references and theoretical basis for further study.

Keywords: Plant, Pathogen, Proteomics, Defense mechanism

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 31200209); China Postdoctoral Science Foundation (No. 2013M531277); Jiangsu Postdoctoral Science Foundation (No. 1201070C); Research Foundation for Advanced Talented Scholars of Jiangsu University (No. 11JDG121)

***Corresponding author:** E-mail: lnding6@126.com

Received: April 14, 2015; **Accepted:** May 28, 2015; **Published online** (www.cnki.net): June 24, 2015

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31200209); 中国博士后科学基金项目(No. 2013M531277); 江苏省博士后科研基金项目(No. 1201070C); 江苏大学高级人才项目(No. 11JDG121)

***通讯作者:** E-mail: lnding6@126.com

收稿日期: 2015-04-14; **接受日期:** 2015-05-28; **优先数字出版日期**(www.cnki.net): 2015-06-24

蛋白质组学已广泛应用于生命科学研究的许多领域。植物蛋白质组学作为蛋白质组学的一个分支, 研究应用也越来越广泛, 但还是远远落后于动物和酵母。1999 年, Thiellement 等发表了第一篇关于植物蛋白质组学(Plant proteomics)的综述, 广泛地讨论了 1999 年以前植物蛋白质组学的发展^[1]。这之前的许多研究由于没有涉及质谱, 因此不能比较表达水平, 主要集中于运用双向电泳(2-DE)来发展不同基因型和表型与系统发育关系鉴定的标记。随着第一个植物基因组拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)基因组测序工作的完成, 以及其他植物基因组和 EST 数据库的日益完善, 植物蛋白质组的研究逐渐成为一个活跃的领域。目前, 除了模式作物如拟南芥和水稻(*Oryza sativa*)外, 小麦(*Triticum aestivum*)、玉米(*Zea mays*)、大豆(*Glycine max*)和大麦(*Hordeum vulgate*)等也是蛋白质组学的研究对象。植物蛋白质组研究的主要内容包括植物生长发育^[2-3]、组织和器官的分化^[4]、植物遗传关系^[5]及激素和逆境的调节机制^[6-9]等方面, 其中一个重要方向是植物与病原菌相互作用的分子机制研究。

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, 引起植物相应的反应机制(图 1)。所以病害的发生和抗病性的形成与蛋白质的数量和功能的改变密切相关。从植物蛋白质组数据着手, 对关键的差异蛋白质进行定量和定性测定, 获得蛋白质与病原菌胁迫之间的关系, 揭示这些蛋白质参与应答胁迫及代谢调控的规律, 将是研究植物与病原菌互作机制的重要手段之一。目前已在模式植物及主要农作物研究中取得了一定的成果^[10-11]。下面我们主要介绍近几年来关于植物与真菌、病毒、细菌互作的蛋白质组学研究。

1 蛋白质组学研究新技术

1.1 蛋白质分离技术

最初的蛋白质分离技术主要依赖于双向电泳技术(Two dimensional electrophoresis, 2-DE)。2-DE 发展至今在技术上有了很大的改进, 使其重复性和灵敏度大大提高, 相比较其它电泳技术而言仍具有自己独特的优越性, 但它无法分离一些较大的疏水性蛋白、低丰度的蛋白及具有极端分子量和等电点

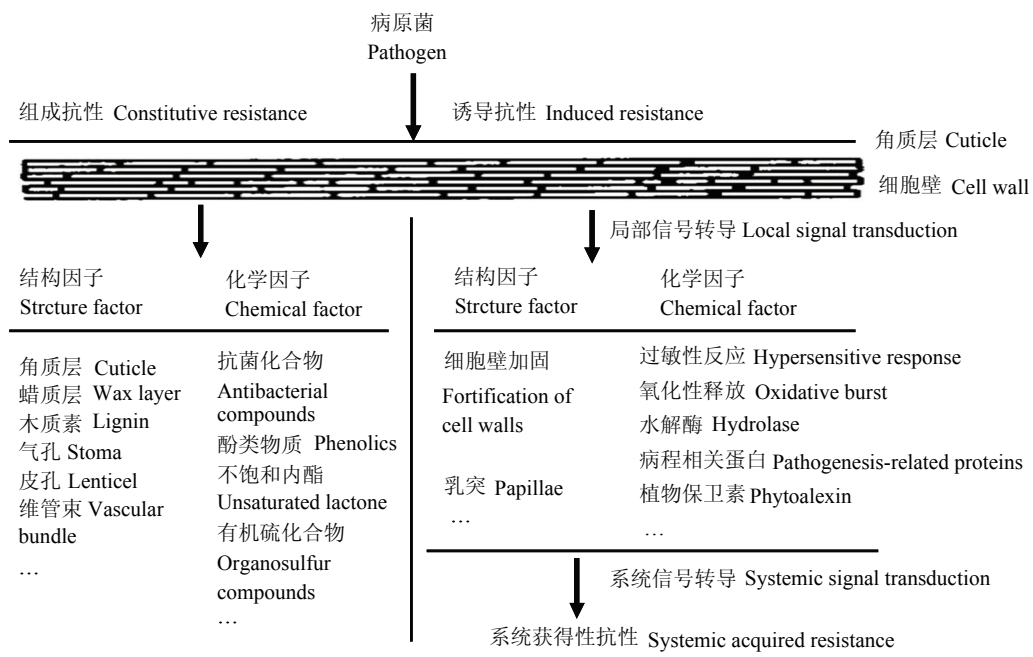


图 1 病原菌侵染后植物的防御机制
Figure 1 Defense mechanism of plants induced by pathogen infection

的蛋白等^[12]。近几年,蛋白质组学的急剧发展对其研究技术也有了新的需求和挑战,目前已在原有技术的基础上改进和衍生出许多新的技术。如:(1) 多维液相色谱技术 (Multi-dimension liquid chromatography, MDLC),即将样品在第一根液相色谱柱的洗脱液依次注入后续的色谱柱进行分离的技术。样品中各组分以进样点为原点在多维的分离方向上展开,减少了峰的重叠,提高了系统分辨率。将多维液相色谱与质谱连用能够满足蛋白质组学研究高通量的要求,还具有高峰容量、高灵敏度、易于实现自动化等优点^[13]。(2) 在传统的 2-DE 基础上,Amersham Biosciences 公司又开发了双向荧光差异凝胶电泳(Differential-gel electrophoresis, 2D-DIGE),它是唯一使用内标来衡量每块胶上每个点变化,可以保证精确度及检测到的蛋白质丰度变化的真实性。内标、实验组、对照组分别用不同的荧光标记物如 Cy2、Cy3、Cy5 标记,用不同标记对应的激发波长来检测被不同荧光基团所标记的蛋白质,实现在同一块胶上多个样品的表达并进行定量。这种技术的缺点是其标记条件比较苛刻,在荧光标记时只有当约 1%-2%的赖氨酸残基被修饰才可以维持被标记蛋白质在电泳时的溶解性。因此,用它标记赖氨酸含量少的蛋白质有一定困难。(3) 多重蛋白质组(Multiplexed proteomics, MP)是先具有不同激发或放射光谱的荧光染料检测这些样品的特定属性,比如糖基化、磷酸化、药物结合能力及药物代谢能力等,再使用相同的荧光团检测所有凝胶分离的总蛋白谱,即它可以并行地检测蛋白表达量及蛋白的特定功能^[14]。多重蛋白质组技术相比 DIGE 技术优越性在于可以提供更宽波段的信息,对 2D 胶的数量不限,不同的图谱可以通过任何方式的叠加进行匹配,总蛋白谱和功能属性谱之间不需要共享太多的标记。该技术在蛋白质的表达分析及蛋白质翻译后修饰等研究中得到了应用^[15]。

1.2 蛋白质鉴定技术

质谱技术由于高灵敏度和高通量的特点已经

代替了传统的蛋白质鉴定方法,如 Edman 降解法、氨基酸分析法等。但它一般只适用于 20 个氨基酸以下的肽段,而且无法区分分子量和带电荷相同的同分异构体的质量,在分析蛋白质与蛋白质相互作用及结构与功能的相互关系方面也存在局限性。由于蛋白质组研究中要求大规模、高通量的蛋白质鉴定方法。近年来发展起来许多不基于凝胶的质谱蛋白质组技术,如:(1) 多维蛋白质鉴定技术 (Multidimensional protein identification technology, MudPIT),它的运用推动了“鸟枪法”这种非凝胶质谱蛋白质组学技术的发展。MudPIT 由两个正交的分离系统组成,强阳离子交换(SCX)和反向色谱柱(RP)。该技术相比基于凝胶的蛋白质组学技术具有高通量、高灵敏度的优点。其缺点是不能量化,但用事先对蛋白样品进行标记的方法可以克服。目前, MudPIT 技术已广泛应用于全蛋白质组分析、差异蛋白表达分析、膜蛋白的检测及蛋白质泛素化等研究中。(2) 同位素标记亲和标签(Isotope coded-affinity tags, ICAT)技术,该技术最早是由 Gygi 等于 1999 年发展起来的^[16]。其原理是对来源不同的两种蛋白质样品分别用不同的同位素亲和标签标记,然后两样品混合、酶解,在经过生物素亲和层析分离后,将吸附在柱上的标记多肽用液相色谱-质谱或液相色谱-串联质谱进行分析,可见不同来源的同种多肽成对或邻近地展现在质谱图上, M_w 差值为 8 Da 或 4 Da (肽段带两个电荷)。两者峰面积差为蛋白质在两样品中的表达差异^[16],这种方法的优点是能够快速准确地找出差异蛋白质,而且可以快速定性和定量鉴定低丰度蛋白质,尤其是膜蛋白等疏水性蛋白。缺点是所采用的试剂只能对含有半胱氨酸的蛋白质进行分析,对小肽段的鉴定存在困难。(3) 同位素重标签定量(Isobaric tags for relative and absolute quantity, iTRAQ)是美国应用生物公司开发的一种同时对 4 种样品进行绝对和相对定量的方法,来自不同样品的多肽标记后等摩尔浓度混合,经二维 LC 分离后进行 MS 和 MS/MS 分析。

在质谱图中, iTRAQ 标记的不同样品中的同一蛋白质表现为相同的质荷比, 在质谱扫描中以单峰出现。它与 ICAT 相比减少了质谱图的复杂性^[15]。iTRAQ 的方法克服了传统 2-D PAGE 的一些缺点, 尤其是能够鉴定出许多小分子量的蛋白质, 而 2-D DIGE 也为 iTRAQ 提供了有用的补充^[17]。

2 植物与病原菌互作的蛋白质组学研究

2.1 植物应答真菌感染的蛋白质组学研究

所有侵染性病害中, 真菌性病害数量最为繁多, 约占所有病害数量的 70% 以上。一些农作物感染真菌病害后, 不仅严重减产, 而且品质恶化, 利用价值降低。目前通过蛋白质组学的方法已经鉴定出了一些参与植物-病原菌相互作用的重要真菌蛋白质。禾谷镰刀菌(*Fusarium graminearum*)引起的赤霉病对于小麦、大麦和燕麦的产量和质量都有严重的影响。为了更好地理解单端孢霉烯族毒素产生过程中激活的真菌蛋白和途径, Taylor 等采用 iTRAQ 检测到 130 个赤霉菌蛋白的表达在赤霉菌诱导产生毒素后与诱导前相比发生了显著的变化, 其中有 72 个相比较侵染起始阶段表现出上调表达的趋势, 编码这些蛋白的基因在转录水平也有相同的表达趋势^[18]。Yang 等利用蛋白质组学技术对 *F. graminearum* 的分泌蛋白进行了鉴定, 主要包括一些降解细胞壁、淀粉和蛋白的酶类^[19]。在对马铃薯与致病真菌 *Phytophthora infestans* 互作过程的研究中, Grenville-Briggs 等鉴定出一些 *P. infestans* 蛋白质在孢囊发育成附着孢阶段特异地上调表达。这其中就包括参与氨基酸合成的蛋白, 比如甲硫氨酸合成酶和组氨酸合成酶^[20]。以前也有研究表明在真菌侵染过程中质外体的总氮含量和氨基酸的含量增加^[21]。在受到真菌或卵菌侵染后, 植物体内的许多参与氨基酸合成的蛋白也上调表达, 并与病原菌的致病性相关^[22-23]。为了更好地理解活体营养型大麦白粉病菌(*Blumeria graminis* f. sp. *hordei*) 在侵染过程中的生物学特性, Bindshedler 等比较了白粉病菌在宿主内 3 个不同发育阶段蛋白质组的变化, 在

未萌发的孢子中鉴定出 441 个蛋白, 在附生的产孢菌丝中鉴定出 775 个蛋白, 另外还有 47 个蛋白来自大麦叶子表皮细胞内部的吸器。许多小的吸器蛋白在氮端含有一个具有分泌功能的信号肽, 表明这些候选的效应物蛋白可能在调控宿主代谢及免疫性方面发挥作用^[24]。Shah 等运用 Shotgun 蛋白质组学的方法研究了致病丝状真菌灰霉病菌(*Botrytis cinerea*) 在不同碳源(高度或部分酯化的果胶及蔗糖)下的分泌蛋白质组, 发现在不同的酯化果胶环境下 *B. cinerea* 的生长和蛋白分泌物相似, 表明 *B. cinerea* 从休眠状态到活化并不单独依赖植物细胞壁的果胶酯化程度^[25]。类似地, Li 等利用比较蛋白质组学的方法研究了不同环境 pH 下 *B. cinerea* 的分泌组蛋白, 发现 *B. cinerea* 可以根据环境 pH 的变化调整自身分泌组蛋白的表达模式^[26]。

在植物与病原菌相互作用过程中, 植物会分泌大量不同类型的水解酶作为一种自我防卫机制。Kim 等利用 2-DE 及 MS 分析了水稻悬浮培养细胞受到稻瘟病真菌(*Magnaporthe grisea*) 及其效应物侵染后的分泌蛋白组, 鉴定出 21 个差异表达的蛋白。MS 分析表明大部分蛋白参与防卫反应, 比如 9 个几丁质酶、2 个胚相关蛋白/草酸、5 个分泌蛋白及扩展蛋白。他们进一步分析了抗病品种(KJ401)和感病品种(KJ301)的叶子受到 *M. grisea* 侵染后不同时间段内, 差异表达的蛋白基因在转录水平上的表达, 发现在抗病材料中对这些基因的诱导更迅速和强烈^[27]。

为了揭示响应病原菌侵染的早期事件, Benschop 等发现拟南芥在用诱导物鞭毛蛋白肽(flag22)和真菌诱导物木聚糖酶(Xylanase)处理后, 许多防卫反应相关的膜蛋白被磷酸化。这些诱导物引起的蛋白质磷酸化使我们对于早期信号转导和防卫反应有了新的认识^[28]。Lippert 等应用具有激发子活性的氨基葡萄糖聚合物壳聚糖(Chitosan)处理欧洲云杉(*Picea abies*) 悬浮细胞培养液, 模拟真菌对松类植物的侵染。通过比较松类植物在受到壳聚糖诱导

后早期蛋白质组和转录组的变化,发现钙介导的信号转导、氧化性胁迫及一类富含阿拉伯半乳糖/脯氨酸的蛋白质参与壳聚糖诱导的早期响应^[29]。携带 Cf-4 抗性基因的番茄植株受到致病真菌叶霉病菌(*Cladosporium fulvum*)分泌的诱导物 Avr4 侵染时表现出依赖激活磷酸化级联反应的超敏反应。Stulemeijer 等分析了同时表达 Cf-4 和 Avr4 的番茄幼苗的磷酸化蛋白谱,鉴定出 12 个在超敏反应引发后与对照相比丰度发生变化的磷酸化肽。他们的结果表明在超敏反应早期阶段光合活性以磷酸化依赖的方式特异地被抑制。他们还发现,与对照相比,4 种 Hsp90 异构体的磷酸化在 Cf-4/Avr4 幼苗中表现出不同的变化,表明 Hsp90 的异构体在防卫信号转导途径中有不同的作用^[30]。

寻找在抗感材料中差异表达的蛋白质,有助于探索植物抗病的分子机制。Ding 等利用蛋白质组学的方法分析了抗赤霉病种质望水白及其感病突变体 Meh0106 在赤霉菌侵染 12 h 后穗部蛋白表达谱的变化,质谱分析和功能注释表明其中 37 个蛋白点的蛋白与防卫反应相关。这些蛋白参与茉莉酸/乙烯合成,活性氧的产生和清除,抗菌化合物合成,脱毒及细胞壁修饰等。为了进一步确定这些代谢及调控途径与赤霉病抗性的关系,以及它们在响应赤霉菌侵染中的作用,作者检测了一些能代表这些途径的基因在望水白及 Meh0106 中的时程表达差异。结果发现小麦在响应赤霉菌侵染的早期抗病反应中,SA 和 JA/ET 途径均被激活,并通过双相策略相互协调。在感病突变体中 SA 途径的延迟激活可能引发 SA 对 JA 途径的拮抗作用,导致感病^[31]。Sharma 等利用比较蛋白质组学的方法分析了感黑胫病的 *B. napus* 和抗黑胫病的 *B. carinata* 在受到病原菌侵染后的变化。在两个品种中共检测到 64 个蛋白质的表达发生了显著的变化,其中参与自由基脱毒的酶在 *B. carinata* 中上调,在 *B. napus* 中没有变化^[32]。Geddes 等发现在大麦开花期接种赤霉菌 3 d 后,一些参与氧化性释放及氧化性胁迫反

应的蛋白质如过氧化物酶、病程相关蛋白(Pathogenesis related protein, PR)等在具有不同赤霉病抗性的 6 种基因型中表现出 3 种不同的变化趋势^[33]。Liao 等研究了水稻近等基因系 C101A51 和 CO39 受到 *M. grisea* 处理后的差异表达的蛋白。在鉴定出的 21 个差异表达蛋白中,除去个别例外,都在抗病材料 C101A51 中诱导更快,表明抗病系对防卫反应启动更快^[34]。上述这些研究表明植物在受到真菌侵染后抗感材料中许多代谢和调控途径都受到影响并发生显著的变化,比如植物激素的合成、活性氧的暴发、植保素的产生、木质素的积累以及广泛的代谢变化等。但不同的研究之间也存在差异,可能和取材时间有关。同时真菌胁迫下植物蛋白质组上重叠了一些病原菌的蛋白质组,从而增加了分析和鉴定差异蛋白质的难度,某些情况下可以考虑使用激发子、化学合成物或机械损伤来模拟病原菌侵害。

2.2 植物应答病毒侵染的蛋白质组学研究

病毒感染植物时,首先以机械或载体运输的方式进入细胞,并在细胞内复制,然后通过胞间连丝移动到邻近的细胞,最后到达维管束组织,通过韧皮部到宿主的库组织进行系统循环。病毒通过新一轮的复制和运动进行系统侵染。在感病宿主和抗病宿主中,病毒分别利用宿主蛋白帮助侵染和对抗侵染^[35]。Casado-Vela 等研究了番茄果实在病毒侵染前后的蛋白质组变化,发现肽酶、内切葡聚糖酶、几丁质酶和参与抗坏血酸-谷胱甘肽循环的蛋白在对照和烟草花叶病毒(TMV)侵染的果实中表达有差异^[36]。李痘病毒(PPV)在侵染豌豆植物后,导致叶绿体代谢的改变和活性氧的积累。蛋白质组学分析表明 PPV 侵染主要影响光合代谢,对光合系统 II 有直接或间接的作用,干扰光合电子传递链,诱导活性氧的积累,表明在病毒病发生过程中叶绿体可能是氧化性胁迫的来源^[37]。Clemente-Moreno 等发现经 L-2-氧-4-噻唑烷-羧酸(OTC)预处理后,PPV 侵染的植株表现出与光合作用、碳及氨基酸代谢及光

合呼吸相关蛋白的表达量上升,表明 OTC 可能对 PPV 侵染后植物侧光合击叶绿体代谢有保护作用,因此 OTC 在农业中对于提高植物活力及对病原菌的免疫力有重要的实践意义^[38]。Brizard 等首次利用一种有效分离病毒-宿主蛋白复合体的方法,对水稻黄斑病毒(Rice yellow mottle virus)和水稻宿主蛋白复合体进行分离,并对宿主蛋白质进行质谱鉴定。他们发现病毒在不同的侵染阶段募集结合不同的宿主蛋白,这些蛋白参与植物防卫反应、代谢、翻译、蛋白合成及转运等不同的途径,对于病毒的生命周期及优化病毒翻译效率是很关键的^[39]。这种分析方法有助于我们寻找新的抗病毒侵染的靶蛋白。

Elvira 等研究了在分别受到烟草花叶病毒属不亲和菌株 PMMoV-S 及亲和菌株 PMMoV-I 侵染后,携带 L3 基因的辣椒(*Capsicum chinense*)材料 PI159236 的蛋白表达变化,发现在叶子的局部坏死病斑形成中, PMMoV-S 诱导了超敏反应,限制病斑的进一步扩展,涉及到一些 PR 蛋白丰度的变化,如 PR-1、 β -1,3-葡聚糖酶(PR-2)、几丁质酶(PR-3)、类调渗蛋白(PR-5)、过氧化物酶(PR-9)、胚相关蛋白(PR-16)和 PRp27(PR-17)等。在 PMMoV-S 和 PMMoV-I 与辣椒相互作用过程中存在不同的 PR 蛋白积累。在 PMMoV-S 与辣椒相互作用过程中,对 PR 蛋白的聚积和诱导更迅速,积累量也更多^[40]。Wu 等利用比较蛋白质组学的方法研究了抗感玉米品种分别响应甘蔗花叶病毒(Sugarcane mosaic virus)侵染的蛋白表达谱,结果发现参与能量、胁迫反应、光合作用及碳固定的蛋白质表达在抗感之间存在差异,氧化性释放在抗病品种中更强烈,另外作者根据鸟嘌呤核苷酸结合蛋白在抗病品种中显著增加推测, G 蛋白相关的途径可能参与了玉米对甘蔗花叶病毒的抗病反应^[41]。

尽管采用蛋白质组学的方法鉴定出了一些参与病毒复制的植物蛋白,但是还没有发现参与病毒移动的植物因子。由于病毒在植物中的移动具有组织特异性,并且涉及许多很难分离的细胞类型,比

如叶子薄壁组织和韧皮部等,对这些组织的分离还有一定的困难^[42]。

2.3 植物应答细菌侵染的蛋白质组学研究

大多数植物致病细菌诱导抗病寄主超敏反应的能力和感病寄主致病能力受超敏反应和致病性(Hrp)基因控制。有两种调控 Hrp 的关键转录激活子,其中一种是 AraC 类型的转录激活子,如 HrpB。Kang 等利用蛋白质组学的方法分析了在嗜麦芽糖寡养单胞菌(*Burkholderia glumae*)中受 HrpB 调控的蛋白,多数表达发生变化的属于分泌蛋白。HrpB 蛋白的分泌功能主要依赖类型 II 蛋白分泌系统(T2SS)介导。致病性分析表明 T2SS 和 Hrp 类型 III 蛋白分泌系统(T3SS)都对 *B. glumae* 的致病力有重要作用^[43]。群体感应系统(QS)对于细菌的致病性有重要作用, Goo 等分析了野生型 *B. glumae* 菌株及它的 QS 突变体菌株蛋白表达谱的变化,结果发现有 34 个蛋白质通过 T2SS 分泌,并且通过进一步的突变分析证实 T2SS 在 *B. glumae* 的毒力方面发挥很关键的作用^[44]。Andrade 等对感病甘蓝(*Brassica oleracea*)栽培品种与野油菜黄单胞菌(*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*)的互作进行了蛋白质组学的分析。他们收集侵染 6 d 后的细菌进行 2-DE 分析,以水处理作为对照,鉴定了 15 个在体内上调表达的细菌蛋白质,其中一些参与基础代谢、多糖合成及氧化性胁迫反应的蛋白表现出上调表达^[45]。Yuan 等对 *X. campestris* pv. *campestris* 菌株的 *purC* 突变体进行了基因和蛋白分析,结果发现这个嘌呤合成缺陷型突变体几乎丧失了毒力,这也证实了嘌呤合成对于细菌与宿主免疫系统互作有重要作用^[46]。

蛋白质组学还被应用于鉴定植物参与防卫反应的蛋白。Chen 等运用植物质膜蛋白组学的方法,分析携带抗病基因 Xa21 的水稻悬浮细胞培养液在受到亲和与不亲和的白叶枯病菌(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*)侵染后蛋白表达谱的变化,质谱鉴定出 11 个在水稻-白叶枯病菌互作过程中差异表达蛋白点,其中包括 8 个推测的参与水稻早期防卫反

应的质膜相关蛋白,即 H1-ATPase、蛋白磷酸酶、超敏反应诱导响应蛋白、Prohibitin 蛋白、醌还原酶、锌指和 C2 结构域蛋白、胁迫相关蛋白及热激蛋白等^[47]。Trapphoff 等研究了苜蓿细胞悬浮培养液受到卵菌病原菌(*Aphanomyces euteiches*)侵染后蛋白质组的变化,发现侵染 2 d 后与刚诱导时的培养物蛋白质组有明显的不同。这些特异诱导的蛋白按功能可以分为 3 类: (1) 病程相关蛋白; (2) 与次生苯丙素或植保素相关的蛋白; (3) 参与碳水化合物代谢和能量相关的蛋白质。磷酸化蛋白质组学分析表明这些防卫相关的途径在侵染早期阶段就被特异地激活了,这从一个侧面证实了这些蛋白质的表达变化与 *A. euteiches* 侵染有关^[48]。Nühse 等运用 iTRAQ 鉴定出一些可能在拟南芥细胞对细菌诱导物 flg22 的防卫反应中发挥作用的磷酸化蛋白,如 ABC 转运蛋白 PDR8/PEN3、蛋白磷酸酶 2C 及 NADPH 氧化酶 RbohD 等,并证实 flg22 诱导了 RbohD 活化所必需的两个磷酸化位点^[49]。Parker 等比较了抗感两种不同的番茄品种在两个不同时间段对 *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pst*) 的响应,发现抗病品种中蛋白变化多出现在侵染后 24 h,而感病材料中出现在侵染后 4 h^[50]。

固氮细菌和豆科植物的根存在共生关系^[51]。近年来,蛋白质组学也逐渐应用于根瘤共生研究。Khatoon 等研究了生长 3 d 的大豆经大豆慢生根瘤菌(*Bradyrhizobium japonicum*)处理后响应淹水胁迫的差异蛋白组,与非胁迫相比,参与防卫反应、蛋白合成、能量和代谢相关的蛋白质上调表达,而且这些蛋白可能也参与了早期共生分化过程中对根毛数量的调控^[52]。Brechenmacher 等利用 2D-PAGE 和鸟枪法等蛋白质组学的方法分析了大豆根毛细胞的蛋白质组,分别鉴定出 527 个和 1 134 个蛋白,其中 443 个为微粒体特异。这些蛋白涉及到基础细胞代谢、水和氮的吸收、囊泡运输、激素及次生代谢等途径^[53]。Nguyen 等研究了经 *B. japonicum* 侵染后大豆根毛的磷酸化蛋白质组的变化,结果发现激

酶-底物及磷酸酶-底物之间复杂的网络可能参与调控了固氮细菌和豆科植物根的共生关系^[54]。van Noorden 等利用 2D-DIGE 和 MS/MS 比较了野生型和多根瘤(*sun*)突变体苜蓿(*Medicago truncatula*)的根受到生长素、苜蓿中华根瘤菌(*Sinorhizobium meliloti*)或对照处理 24 h 后的蛋白表达差异,结果表明生长素参与了根瘤的形成^[55]。这些研究对于深入了解植物与根瘤固氮菌的互利共生关系及其相关分子机制具有重要的意义。

3 总结与展望

长期进化过程中植物与病原物之间相互影响、相互适应、协同进化。一方面,植物为了生存,在进化中逐渐建立了一系列复杂的防御机制,能很好地协调对抗病原菌的侵染;另一方面,病原物为了自身利益也会通过调节植物防卫反应-信号转导途径来抑制诱导型防卫反应,打破植物体内的防御系统,最终使植物表现病症。植物与病原物互作一直是植物研究领域的热点,目前植物与病原菌互作的蛋白质组学的研究主要采用两种策略。一是全蛋白质组分析,即采用高通量的蛋白质组研究技术大规模地鉴定蛋白质,并对其特征进行描述。由于蛋白质的表达随空间和时间不断变化,要分析生物体内所有的蛋白质是一个难以实现的目标。另一条途径着重于寻找和筛选特定因素引起的样品之间差异蛋白表达谱。它可以揭示生命有机体对外界环境刺激的反应途径以及调控机制,并确定相关的关键蛋白。目前通过基因组学和蛋白组学技术已鉴定出许多致病相关的和防卫反应相关的基因和蛋白,使我们对植物的防卫机制和病原物的致病策略有了进一步的了解。植物对死体或半活体营养型病原菌的抗性一般受到多个 QTL 位点的控制。比如在小麦中,除了 7D 以外的小麦染色体都检测到控制赤霉病抗性的 QTL,这也反映了植物抗性机制的复杂性。近年来,通过基因组学或蛋白质组学的手段已鉴定出许多病原菌侵染后表达发生变化的基因或蛋白质。然而,由于不同材料间基因型的差异,技

术分辨率的限制, cDNA 或蛋白质小样本情况, 特别是缺少只在抗感表型上存在差异的材料, 使我们对于某些植物应答病原菌侵染的抗病机制还不是很清楚。所以通过构建遗传背景相同的植物突变体进行蛋白表达谱差异分析, 无疑是探讨植物与病原菌互作机制的一种关键思路。运用基因组学、生化、遗传学等方法进一步证实与病原物响应相关蛋白质的功能也是今后植物蛋白质组学研究的一个重要方向。另外对于一些关键的途径在植物抗性中发挥的作用, 以及不同途径间如何协调调控植物抗性也是未来研究的重点。随着蛋白质组学技术的不断完善及相关基因组和 EST 数据库的充实和发展, 将为我们进一步理解植物与病原菌互作的分子机制, 以及探索和寻找新的抗侵染靶蛋白提供有力的帮助。

参 考 文 献

- [1] Thiellement H, Bahrman N, Damerval C, et al. Proteomics for genetic and physiological studies in plants[J]. Electrophoresis, 1999, 20(10): 2013-2026
- [2] Dam S, Laursen BS, Ormfelt JH, et al. The proteome of seed development in the model legume *Lotus japonicus*[J]. Plant Physiology, 2009, 149(3): 1325-1340
- [3] Nautrup-Pedersen G, Dam S, Laursen BS, et al. Proteome analysis of pod and seed development in the model legume *Lotus japonicus*[J]. Journal of Proteome Research, 2010, 9(11): 5715-5726
- [4] Dam S, Dyrland TF, Ussatjuk A, et al. Proteome reference maps of the *Lotus japonicus* nodule and root[J]. Proteomics, 2014, 14(2/3): 230-240
- [5] Scossa F, Laudencia-Chingcuanco D, Anderson OD, et al. Comparative proteomic and transcriptional profiling of a bread wheat cultivar and its derived transgenic line overexpressing a low molecular weight glutenin subunit gene in the endosperm[J]. Proteomics, 2008, 8(14): 2948-2966
- [6] Datta R, Sinha R, Chattopadhyay S. Changes in leaf proteome profile of *Arabidopsis thaliana* in response to salicylic acid[J]. Journal of Biosciences, 2013, 38(2): 317-328
- [7] Yıldız M, Akçalı N, Terzi H. Proteomic and biochemical responses of canola (*Brassica napus* L.) exposed to salinity stress and exogenous lipoic acid[J]. Journal of Plant Physiology, 2015, 179: 90-99
- [8] Zhou L, Bokhari SA, Dong CJ, et al. Comparative proteomics analysis of the root apoplasts of rice seedlings in response to hydrogen peroxide[J]. PLoS One, 2011, 6(2): e16723
- [9] Zhang YX, Gao P, Xing Z, et al. Application of an improved proteomics method for abundant protein cleanup: molecular and genomic mechanisms study in plant defense[J]. Molecular & Cellular Proteomics, 2013, 12(11): 3431-3442
- [10] Zhao DW, Fan HY, Wu CF, et al. Progress in proteomics of plants in response to pathogen[J]. Guihaia, 2009, 29(6): 758-762 (in Chinese)
赵大伟, 范海延, 武春飞, 等. 植物响应病原菌胁迫的蛋白质组学研究进展[J]. 广西植物, 2009, 29(6): 758-762
- [11] Fan HY, Li N, Miao Q, et al. Research progress on proteomics to uncover biotic stress tolerance mechanisms in plant[J]. Hubei Agricultural Sciences, 2009, 48(12): 3167-3171 (in Chinese)
范海延, 李楠, 苗青, 等. 植物应答生物胁迫的蛋白质组学研究进展[J]. 湖北农业科学, 2009, 48(12): 3167-3171
- [12] Campostrini N, Areces LB, Rappsilber J, et al. Spot overlapping in two-dimensional maps: a serious problem ignored for much too long[J]. Proteomics, 2005, 5(9): 2385-2395
- [13] Zhang X, Fang AQ, Riley CP, et al. Multi-dimensional liquid chromatography in proteomics—a review[J]. Analytica Chimica Acta, 2010, 664(2): 101-113
- [14] Steinberg TH, Pretty OTK, Berggren KN, et al. Rapid and simple single nanogram detection of glycoproteins in polyacrylamide gels and on electroblots[J]. Proteomics, 2001, 1(7): 841-855
- [15] Zhou HJ, Liu YK, Chui JF, et al. Investigation on glycosylation patterns of proteins from human liver cancer cell lines based on the multiplexed proteomics technology[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2007, 459(1): 70-78
- [16] Gygi SP, Rist B, Gerber SA, et al. Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags[J]. Nature Biotechnology, 1999, 17(10): 994-999
- [17] Alvarez S, Berla BM, Sheffield J, et al. Comprehensive analysis of the *Brassica juncea* root proteome in response to cadmium exposure by complementary proteomic approaches[J]. Proteomics, 2009, 9(9): 2419-2431
- [18] Taylor RD, Saparno A, Blackwell B, et al. Proteomic analyses of *Fusarium graminearum* grown under mycotoxin-inducing conditions[J]. Proteomics, 2008, 8(11): 2256-2265
- [19] Yang F, Jensen JD, Svensson B, et al. Secretomics identifies *Fusarium graminearum* proteins involved in the interaction with barley and wheat[J]. Molecular Plant Pathology, 2012, 13(5): 445-453
- [20] Grenville-Briggs LJ, Avrova AO, Bruce CR, et al. Elevated amino acid biosynthesis in *Phytophthora infestans* during appressorium formation and potato infection[J]. Fungal Genetics and Biology, 2005, 42(3): 244-256
- [21] Solomon PS, Oliver RP. The nitrogen content of the tomato leaf apoplast increases during infection by *Cladosporium fulvum*[J]. Planta, 2001, 213(2): 241-249
- [22] McGaha TL, Huang L, Lemos H, et al. Amino acid catabolism: a pivotal regulator of innate and adaptive immunity[J]. Immunological Reviews, 2012, 249(1): 135-157
- [23] Grohmann U, Bronte V. Control of immune response by amino acid metabolism[J]. Immunological Reviews, 2010, 236(1): 243-264
- [24] Bindschedler LV, Burgis TA, Mills DJS, et al. In planta proteomics and the proteogenomics of the biotrophic barley fungal pathogen *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*[J]. Molecular & Cellular Proteomics, 2009, 8(10): 2368-2381
- [25] Shah P, Gutierrez-Sanchez G, Orlando R, et al. A proteomic study of pectin-degrading enzymes secreted by *Botrytis cinerea* grown in liquid culture[J]. Proteomics, 2009, 9(11): 3126-3135
- [26] Li BQ, Wang WH, Zong YY, et al. Exploring pathogenic mechanisms of *Botrytis cinerea* secretome under different ambient pH based on comparative proteomic analysis[J]. Journal of Proteome Research, 2012, 11(8): 4249-4260
- [27] Kim ST, Kang YH, Wang YM, et al. Secretome analysis of differentially induced proteins in rice suspension-cultured cells triggered by rice blast fungus and elicitor[J]. Proteomics, 2009, 9(5): 1302-1313
- [28] Benschop JJ, Mohammed S, O'Flaherty M, et al. Quantitative phosphoproteomics of early elicitor signaling in *Arabidopsis*[J]. Molecular & Cellular Proteomics, 2007, 6(7): 1198-1214
- [29] Lippert DN, Ralph SG, Phillips M, et al. Quantitative iTRAQ proteome and comparative transcriptome analysis of elicitor-induced Norway spruce (*Picea abies*) cells reveals elements of calcium signaling in the early conifer defense

- response[J]. *Proteomics*, 2009, 9(2): 350-367
- [30] Stulemeijer IJE, Joosten MHJ, Jensen ON. Quantitative phosphoproteomics of tomato mounting a hypersensitive response reveals a swift suppression of photosynthetic activity and a differential role for hsp90 isoforms[J]. *Journal of Proteome Research*, 2009, 8(3): 1168-1182
- [31] Ding LN, Xu HB, Yi HY, et al. Resistance to hemi-biotrophic *F. graminearum* infection is associated with coordinated and ordered expression of diverse defense signaling pathways[J]. *PLoS One*, 2011, 6(4): e19008
- [32] Sharma N, Hotte N, Rahman MH, et al. Towards identifying *Brassica* proteins involved in mediating resistance to *Leptosphaeria maculans*: a proteomics-based approach[J]. *Proteomics*, 2008, 8(17): 3516-3535
- [33] Geddes J, Eudes F, Laroche A, et al. Differential expression of proteins in response to the interaction between the pathogen *Fusarium graminearum* and its host, *Hordeum vulgare*[J]. *Proteomics*, 2008, 8(3): 545-554
- [34] Liao M, Li YF, Wang ZZ. Identification of elicitor-responsive proteins in rice leaves by a proteomic approach[J]. *Proteomics*, 2009, 9(10): 2809-2819
- [35] Di Carli M, Benvenuto E, Donini M. Recent insights into plant-virus interactions through proteomic analysis[J]. *Journal of Proteome Research*, 2012, 11(10): 4765-4780
- [36] Casado-Vela J, Sellés S, Martínez RB. Proteomic analysis of tobacco mosaic virus-infected tomato (*Lycopersicon esculentum* M.) fruits and detection of viral coat protein[J]. *Proteomics*, 2006, 6(Supplement 1): S196-S206
- [37] Díaz-Vivancos P, Clemente-Moreno MJ, Rubio M, et al. Alteration in the chloroplastic metabolism leads to ROS accumulation in pea plants in response to plum pox virus[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2008, 59(8): 2147-2160
- [38] Clemente-Moreno MJ, Díaz-Vivancos P, Rubio M, et al. Chloroplast protection in plum pox virus-infected peach plants by L-2-oxo-4-thiazolidine-carboxylic acid treatments: effect in the proteome[J]. *Plant, Cell and Environment*, 2013, 36(3): 640-654
- [39] Brizard JP, Carapito C, Delalande F, et al. Proteome analysis of plant-virus interactome: comprehensive data for virus multiplication inside their hosts[J]. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2006, 5(12): 2279-2297
- [40] Elvira MI, Galdeano MM, Gilardi P, et al. Proteomic analysis of pathogenesis-related proteins (PRs) induced by compatible and incompatible interactions of pepper mild mottle virus (PMMoV) in *Capsicum chinense* L³ plants[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2008, 59(6): 1253-1265
- [41] Wu LJ, Han ZP, Wang SX, et al. Comparative proteomic analysis of the plant-virus interaction in resistant and susceptible ecotypes of maize infected with sugarcane mosaic virus[J]. *Journal of Proteomics*, 2013, 89: 124-140
- [42] Mehta A, Brasileiro ACM, Souza DSL, et al. Plant-pathogen interactions: what is proteomics telling us?[J]. *FEBS Journal*, 2008, 275(15): 3731-3746
- [43] Kang Y, Kim J, Kim S, et al. Proteomic analysis of the proteins regulated by HrpB from the plant pathogenic bacterium *Burkholderia glumae*[J]. *Proteomics*, 2008, 8(1): 106-121
- [44] Goo E, Kang Y, Kim H, et al. Proteomic analysis of quorum sensing-dependent proteins in *Burkholderia glumae*[J]. *Journal of Proteome Research*, 2010, 9(6): 3184-3199
- [45] Andrade AE, Silva LP, Pereira JL, et al. *In vivo* proteome analysis of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in the interaction with the host plant *Brassica oleracea*[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2008, 281(2): 167-174
- [46] Yuan ZH, Wang L, Sun ST, et al. Genetic and proteomic analyses of a *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* purC mutant deficient in purine biosynthesis and virulence[J]. *Journal of Genetics and Genomics*, 2013, 40(9): 473-487
- [47] Chen F, Yuan YX, Li Q, et al. Proteomic analysis of rice plasma membrane reveals proteins involved in early defense response to bacterial blight[J]. *Proteomics*, 2007, 7(9): 1529-1539
- [48] Trapphoff T, Beutner C, Niehaus K, et al. Induction of distinct defense-associated protein patterns in *Aphanomyces euteiches* (Oomycota)-elicited and -inoculated *Medicago truncatula* cell-suspension cultures: a proteome and phosphoproteome approach[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2009, 22(4): 421-436
- [49] Nühse TS, Bottrill AR, Jones AME, et al. Quantitative phosphoproteomic analysis of plasma membrane proteins reveals regulatory mechanisms of plant innate immune responses[J]. *The Plant Journal*, 2007, 51(5): 931-940
- [50] Parker J, Koh J, Yoo MJ, et al. Quantitative proteomics of tomato defense against *Pseudomonas syringae* infection[J]. *Proteomics*, 2013, 13(12/13): 1934-1946
- [51] Yu XM, Cloutier S, Tambong JT, et al. *Bradyrhizobium ottawaense* sp. nov., a symbiotic nitrogen fixing bacterium from root nodules of soybeans in Canada[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2014, 64(Pt 9): 3202-3207
- [52] Khatoon A, Rehman S, Salavati A, et al. A comparative proteomics analysis in roots of soybean to compatible symbiotic bacteria under flooding stress[J]. *Amino Acids*, 2012, 43(6): 2513-2525
- [53] Brechenmacher L, Lee J, Sachdev S, et al. Establishment of a protein reference map for soybean root hair cells[J]. *Plant Physiology*, 2009, 149(2): 670-682
- [54] Nguyen TH, Brechenmacher L, Aldrich JT, et al. Quantitative phosphoproteomic analysis of soybean root hairs inoculated with *Bradyrhizobium japonicum*[J]. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2012, 11(11): 1140-1155
- [55] van Noorden GE, Kerim T, Goffard N, et al. Overlap of proteome changes in *Medicago truncatula* in response to auxin and *Sinorhizobium meliloti*[J]. *Plant Physiology*, 2007, 144(2): 1115-1131