

Curvularia lunata 侵染不同抗性玉米品系的 应答差异蛋白解析

夏淑春¹ 张茹琴¹ 王 琰² 鲁 闽³ 鄢洪海¹

(1. 青岛农业大学 农学与植物保护学院 山东 青岛 266109; 2. 山东省乳山市农业局 山东 威海 264500;

3. 烟台出入境检验检疫局 山东 烟台 264000)

摘要: 用山东莱西市玉米弯孢叶斑病菌强致病类型菌株 QN-10 接种玉米抗病自交系齐 319 和感病自交系 7922, 采用蛋白质组技术分析其差异蛋白及功能。结果表明, 齐 319 感染弯孢菌 3 d 后, 有 12 个差异蛋白质斑点被诱导合成, 8 个为增量表达蛋白质斑点, 2 个为减量表达蛋白质斑点, 2 个为新产生蛋白质斑点; 自交系 7922 有 3 个蛋白质斑点表达量增加, 2 个斑点表达量下降, 但没有发现新的蛋白质合成。齐 319 差异蛋白质斑点鉴定表明, 分别属于 β -1, 3-葡聚糖酶、F-box 亮氨酸高度重复蛋白、锌指蛋白。

关键词: 弯孢叶斑病菌; 玉米; 蛋白质组; β -1, 3-葡聚糖酶

中图分类号: S432.1; YQ75 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7091(2013)02-0042-04

Proteome Changes in Corn Varieties QI319 and 7922 after Inoculating *Curvularia lunata*

XIA Shu-chun¹ ZHANG Ru-qin¹ WANG Yan² LU Min³ YAN Hong-hai¹

(1. Qingdao Agricultural University, College of Agronomy and plant protection Qingdao 266109, China;

2. Agriculture Bureau of Rushan City, Weihai 264500, China; 3. Yantai Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Yantai 264000, China)

Abstract: The protein of resistant corn variety QI 319 and susceptible variety 7922 was extracted from leaves and separated using two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2-D) at 3d after inoculating prevalent race QN-10 of *Curvularia lunata*. In QI 319, compared with control with no pathogen inoculation, 12 novel proteins were induced; In 7922, three protein spots of and two protein spots of showed increase and decrease in protein abundance, respectively, but there were no novel protein spots induced. Among the 12 novel protein spots induced in QI 319, six spots were identified using MALDI-TOF-MS and NCBI database searching, which were F-box and leucine-rich repeat protein, heavy metal transport/detoxification protein, β -1, 3-glucanase and zinc finger protein.

Key words: *Curvularia lunata*; Maize; Proteome; β -1, 3-glucanase

由 *Curvularia lunata* (Wakker) Boed. 引起的玉米弯孢菌叶斑病在我国玉米主产区普遍发生^[1-2], 20 世纪 90 年代曾给北方玉米产区造成严重损失。目前关于玉米弯孢菌叶斑病抗性机制的研究还主要局限于少数防御反应酶系活性的测定等传统的抗性生理生化分析和基因分析方面, 很难揭示该病害抗性机制的全貌。而病原物侵染后的蛋白质变化和差异蛋白分析是揭示寄主抗病机制的一个重要方面。随着蛋白分离和鉴定技术的发展, 蛋白质组学已成为植物

病理学研究的重要手段^[3-6]。本研究采用双向电泳和质谱鉴定技术对抗、感表现差异明显的齐 319 和 7922 两玉米自交系进行了蛋白表达谱解析, 可为进一步探讨玉米弯孢菌叶斑病抗病机制提供技术支撑。

1 材料和方法

1.1 试验材料

1.1.1 玉米品系 供试玉米品系选用对玉米弯孢菌叶斑病表现感病的 7922 和抗病的齐 319。

收稿日期: 2012-12-06

基金项目: 山东省科技发展项目(2009GG10009022); 山东省自然科学基金项目(ZR2011CL005); 山东省“泰山学者”建设工程专项经费资助(BS2009NY040)

作者简介: 夏淑春(1964-), 女, 辽宁锦州人, 副教授, 主要从事植物有害生物综合治理研究。

通讯作者: 鄢洪海(1964-), 男, 吉林九台人, 教授, 博士, 主要从事植物病理生理与分子生物学研究。

1.1.2 供试菌株 从采自山东省莱西市的玉米弯孢菌叶斑病病株上分离获得,经单孢培养纯化后,将编号为 QN-10 的菌株用于接种实验。

1.2 试验方法

1.2.1 供试玉米植株的栽培 自交系 7922 和齐 319 种子在水中浸泡 12 h,之后于 25 °C 培养箱中催芽,待白色幼芽长出时播种于盛有湿润营养土(草炭土:沙土=4:1)的营养钵中,每营养钵 4 株。幼苗生长至 13 片叶时,3 盆接种玉米弯孢菌,作为试验处理组;1 盆在同样条件下生长但不做任何接种处理,作为对照组。从育苗到取样,玉米植株均生长于 25~28 °C,光照周期为 16 h 光/8 h 暗的玻璃温室中。

1.2.2 接种 将玉米弯孢菌叶斑病菌在 PDA 培养基中培养 7 d,之后用无菌水冲洗菌体制成病菌孢子悬浮液,调整浓度为每 400 × 视野显微镜下有孢子 5~7 个。于傍晚喷施供试植株,之后继续保温保湿培养,记录发病情况直至取样完毕。

1.2.3 取样 在处理组中选取 3 株玉米植株,于接种后第 3 d 分别剪取叶片,做好标记,迅速冻存于液氮中。同时,从对照组中任选 3 株,与处理组样品对应剪取其相应叶片,迅速冻存于液氮中。

1.2.4 蛋白样品的制备与含量测定 采用三氯乙酸(TCA)/丙酮沉淀法^[3]提取玉米蛋白:称取 0.2 g 玉米叶片放入预冷的研钵,在液氮中研磨成精细的粉末,然后加入 2 mL 预冷的 TCA-丙酮蛋白提取液,在冰上研磨至匀浆。匀浆液转入 10 mL 离心管中,4 °C 下 20 000 r/min 离心 15 min,弃上清。沉淀用 2 mL 预冷的丙酮(含 10 mmol/L 巯基乙醇)重悬,-20 °C 下沉降 3 h 后于 4 °C 下 20 000 r/min 离心 15 min,弃上清。用 2 mL 预冷的丙酮洗沉淀,-20 °C 下沉降 1.5 h 后于 4 °C 下 20 000 r/min 离心 15 min,弃上清。再次用丙酮清洗沉淀后,-20 °C 下沉降 0.5 h,4 °C 下 20 000 r/min 离心 15 min,尽量弃去上清,沉淀置 -20 °C 保存使丙酮挥发,即得蛋白干粉,于 -80 °C 保存。

称取蛋白干粉 20 mg,真空干燥后加入 1 mL 样品裂解液(9 mol/L 尿素、4% CHAPS、50 mmol/L 的 DTT、0.2% Bio-Lyre 载体两性电解质 pH 值 3~10),超声处理 10 min,4 °C 下 12 000 r/min 离心 15 min,取上清,利用 Bio-Rad 蛋白质浓度测定试剂盒测定蛋白质浓度。

1.2.5 IPG-SDS-PAGE 双向电泳 第一向固相 pH 值梯度等电聚焦电泳(IPG)采用 pH 值 4.5~8.5,17 cm 线性 IPG 预制胶条,上样量为 408 µg,上样体积 350 µL。水化和聚焦过程在 20 °C 下自动进行。电泳缓冲液为 25 mmol/L Tris,192 mmol/L 甘氨酸,

0.1% SDS, pH 值 8.3。程序设置为:50 V 聚焦 12 h;250 V 聚焦 1 h,1 000 V 聚焦 2 h,8 000 V 聚焦 2 h。聚焦完毕后,取出胶条,在 5 mL 平衡液 I(0.375 mol/L Tris-HCl pH 值 8.8,6 mol/L 尿素,20% 甘油,2% SDS,2% DTT)和 5 mL 平衡液 II(2.5% 碘乙酰胺代替 2% DTT,其余组分同平衡液 I)中先后震荡平衡 15 min,然后将经过 2 次平衡后的胶条转移至 13% SDS-PAGE 胶上,每根胶条 10 mA 预电泳至样品完全走出 IPG 胶条,浓缩成一条线。加大电流以 35 mA 电泳至溴酚蓝指示剂到达底部边缘时停止电泳。

1.2.6 硝酸银染色 电泳后的凝胶经超纯水清洗 3 次后,进行银染,方法参考 Xia 等^[5,7]。

1.2.7 双向电泳图谱分析 用 Epson Perfection 1670 扫描仪扫描凝胶,扫描后的图像用 Image Master 2D Platinum 6.0 进行分析,蛋白点检出参数设置为:Smooth-3,Salency-7,Min Area-60。以目标蛋白 3 个重复具有相同趋势,相邻位点相对一致,至少 2 个重复有 2 倍(蛋白质体积比)以上差异作为划定差异表达蛋白质的标准。

1.2.8 差异表达蛋白质点的质谱鉴定 差异蛋白点的肽指纹鉴定采用 4700 Proteomics Analyzer(Applied Biosystems,USA)进行。手工从考染胶上切取蛋白点,利用胰蛋白酶进行胶内酶解。蛋白质分子质量检测范围 0.6~3.5 ku,未水解的酶切位点数为 1,肽分子质量误差为 1×10^{-4} ,串联质谱误差范围为 0.5 u,最少相符的肽数目为 4,可变修饰为甲硫氨酸氧化,自动获取数据后通过 GPS Explorer 软件在 MASCOT 网站检索,检索数据库为 NCBI nr。

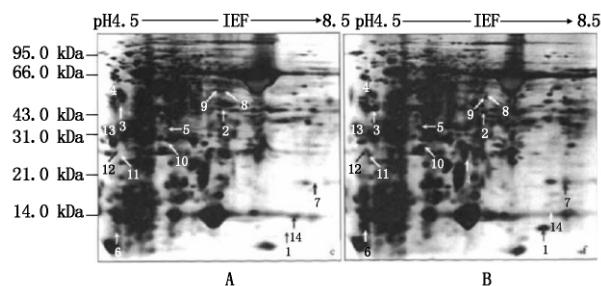
2 结果与分析

2.1 感染弯孢菌后玉米品系齐 319 蛋白质组的变化

对自交系齐 319 接种叶片和对照叶片的电泳图谱检测,分别检测到 414 个(处理组)402 个(对照组)高清晰且重复性强的蛋白质点;对不同处理下蛋白质点的表达丰度进行差异检测,共得到了 12 个差异表达的蛋白质点(图 1、表 1)。其中接种后表现上调蛋白 8 个,下调蛋白 2 个,新增加蛋白 2 个。

2.2 感染弯孢菌后玉米品系 7922 蛋白质组的变化

从玉米自交系 7922 接种叶片和健康叶片的电泳图谱中分别检测到 395(处理组)390 个(对照组)重复性好且清晰的蛋白质点,对不同处理下蛋白质点的表达丰度进行差异检测,差异 2 倍以上的蛋白质点有 5 个(图 2、表 1)。其中接种后表现上调蛋白 3 个(斑点 1,3,4),下调蛋白 2 个(斑点 2,5),没有发现新蛋白(图 2)。



A. CK; B. 接种处理(3 d)。图2同。
A. CK; B. Inoculation treatment(3 d). The same as Fig. 2.

图1 玉米自交系齐319对弯孢菌侵染
应答反应的蛋白质图谱比较

Fig. 1 Protein profiles in maize of QI319 before and after inoculation with *Curvularia lunata*

表1 玉米自交系接种弯孢菌菌株 QN-10 前后差异表达的蛋白点数

Tab. 1 Protein spots in maize leaves before and after inoculation with *Curvularia lunata*

自交系 Inbred lines	蛋白总点数 Total spots of protein		表达差异 2 倍以上的蛋白点数 Spots of protein that expression level being more than 2 times		
	对照 CK	处理 Treatments	上调蛋白 Up-regulated proteins	下调蛋白 Down-regulated proteins	新蛋白 Newly induced proteins
齐 319	402	414	8	2	2
7922	390	395	3	2	0

2.3 差异蛋白的肽质谱指纹图分析

对齐 319 品系叶片中诱导产生的 12 个差异蛋白进行功能分析,结果仅鉴别确定了其中 5 个斑点(1~5)的归属,功能包括 β -1,3-葡聚糖酶(斑点 1、2 呈两个同工酶形式)、F-box 亮氨酸高度重复蛋白(斑点 3)、 β -1,3-葡聚糖酶前体(斑点 4)、锌指蛋白(斑点 5)(图 1、表 2)。另外 7 个差异蛋白斑点因为蛋白质含量少或因序列覆盖率低、匹配不够理想而未能鉴别。

表2 齐 319 感染玉米弯孢菌叶斑病菌 5d 后
差异蛋白的质谱鉴定

Tab. 2 Identification of differential proteins in
QI319 five days after inoculation

斑点编号 Code of spots	鉴定结果 Identification results	NCBI 登录号 NCBI accession number	变化趋势 Variation trend
1	Endo- β -1,3-glucanase	gi109150350	↑
2	Endo- β -1,3-glucanase	gi109150348	+
3	F-box leucine-rich repeat proteins	gi6912466	↑
4	β -1,3-glucanase precursor	gi4741846	↑
5	Zinc-finger protein	gi114678826	↑

注: ↑. 上调; ↓. 下调; +. 新产生; -. 缺少。

Note: ↑. Means protein up-regulated; ↓. Means protein down-regulated; +. Means protein newly induced; -. Means no proteins.

3 结论与讨论

与对照组相比,接种病菌后无论是抗病还是感病玉米自交系,幼苗叶片的蛋白点数量均明显增加,且抗、感自交系之间总蛋白点数也有明显差异;接种

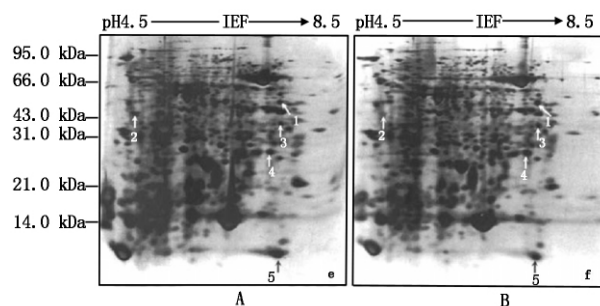


图2 玉米自交系 7922 对弯孢菌侵染应答
反应的蛋白质图谱比较

Fig. 2 Protein profiles in maize of 7922 before and after inoculation with *Curvularia lunata*

强致病菌后,抗病自交系表达量变化 2 倍的蛋白点数高于感病自交系,且抗病自交系上调 2 倍的蛋白点数也多于感病自交系。这一结果与 Campo 等玉米感染茎腐病菌、Wang 等小麦感染赤霉病菌所得结果相类似^[8-9]。本试验仅在抗病自交系齐 319 中检测到了诱导产生的新蛋白斑点,推测齐 319 在遭受弯孢菌侵染后,启动了抗性基因的表达,通过诱导新蛋白质的合成或抑制某些蛋白质的表达,进行防御病菌的侵染。

利用质谱技术鉴别病菌侵染抗病自交系齐 319 诱导应答的 12 种差异蛋白,结果表明:鉴定出的 5 个蛋白为 β -1,3-葡聚糖酶、F-box 亮氨酸高度重复蛋白、锌指蛋白。已有研究表明: β -1,3-葡聚糖酶可降解真菌细胞壁的几丁质成分,抑制病菌扩展^[10-12]。植物中该酶常受真菌诱导产生,正常情况下植物体内含量很低。因此,齐 319 抗玉米弯孢菌叶斑病的部分原因与该酶蛋白上调可能有一定关系。F-box 亮氨酸高度重复蛋白,可以选择性地清除异常多肽和降解蛋白,在细胞周期调控、发育、响应激素和真菌病害防御中具有重要功能^[13-16]。

参考文献:

- [1] 戴法超,王晓鸣,朱振东等. 玉米弯孢菌叶斑病研究[J]. 植物病理学报, 1998, 2: 123-129.
- [2] 李永国,关占良. 东北、华北春玉米生产主栽品种抗玉米弯孢叶斑病、丝黑穗病监测[J]. 植保导刊, 2012, 8: 41-44.
- [3] Campo S, Montserrat C, Maria C, et al. The defense re-

