抗感褐飞虱水稻遗传群体差异蛋白质组分析

崔百元!张扬2朱庆锋!刘圣杰!何丽云!张振飞2*

(1. 广东省农业科学院农业生物基因研究中心, 广州510640; 2. 广东省农业科学院植物保护研究所, 广东省植物保护新技术重点实验室, 广州510640)

摘要:为明确抗感褐飞虱Nilaparvata lugens水稻遗传群体在细胞水平的生理变化差异,通过蛋白 质组学法对抗褐飞虱水稻遗传群体16W19-1-1和感稻飞虱水稻遗传群体16W45水稻叶片的差异 蛋白质组进行研究,采用串联质谱标签标记和液相色谱-串联质谱联用仪进行差异蛋白质谱分析, 利用 Mascot search results软件进行搜库以确定差异表达蛋白,应用 qPCR技术对差异蛋白关联基因 在抗感褐飞虱遗传群体中的表达情况进行验证分析。结果表明,从抗感褐飞虱遗传群体中共鉴定 出7625个蛋白,其中差异蛋白229个,涉及上调蛋白156个,下调蛋白73个,主要集中在代谢蛋白、 氧化还原蛋白和应激蛋白,主要参与了氰胺基酸代谢、牛磺酸代谢、聚糖降解、脂肪酸链伸长等通 路。最终找到9个关键蛋白,关联6种酶,分别为γ-谷氨酰基转移酶、β-葡糖苷酶、β-N-乙酰-D-氨基 葡萄糖酶、谷氨酸脱羧酶、甚长链烯酰-CoA还原酶和甚长链3-氧酰辅酶,对应8个基因。表明以上 6种酶与植物抗虫性关系密切,可能在上述水稻品系抗褐飞虱中起着重要作用。 关键词:水稻;褐飞虱;抗虫性;蛋白质组学;抗虫基因

Differential quantitative proteomics analysis between rice genetic populations resistant and susceptible to brown planthoppers

 CUI Baiyuan¹ ZHANG Yang² ZHU Qingfeng¹ LIU Shengjie¹ HE Liyun¹ ZHANG Zhenfei^{2*}
 (1. Agricultural Biological Gene Research Center, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, Guangdong Province, China; 2. Guangdong Provincial Key Laboratory of High Technology for Plant Protection, Plant Protection Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, Guangdong Province, China)

Abstract: In order to clarify the difference in physiological changes at the cellular level between the rice genetic populations resistant and susceptible to brown planthopper, *Nilaparvata lugens*, the proteomics methods were used to investigate the differentially expressed proteins (DEPs) between resistant rice line 16W19-1-1 and susceptible rice line 16W45. The spectrum of differential proteins was analyzed by using tandem mass tag (TMT) mark coupled with LC-MS/MS. Mascot search results software was used to search protein library for identification of DEPs. The mRNA expression level at different rice lines were detected by using qPCR technique. The results showed that 7 625 proteins were been identified, among which 229 proteins were DEPs, including 156 up-regulated proteins and 73 down-regulated proteins. The DEPs mainly belonged to metabolic proteins, redox proteins and stress proteins, and mainly participated in the pathways of cyanamidic acid metabolism, taurine metabolism, degradation of glycans, fatty acid chain elongation, etc. Nine key proteins related to six enzymes (gamma-glutamyltransferase, beta-*N*-acetyl-D-glucosaminidase, glutamate decarboxylase, very-long-chain enoyl-CoA reductase, very-long-chain 3-oxoacyl-CoA synthase) and eight protein-associated genes were identified

基金项目:国家自然科学基金(31501633),广东省农业科学院院长基金(201725)

^{*} 通信作者 (Author for correspondence), E-mail: zhangzhenfei@gdaas.cn 收稿日期: 2019-05-07

through pathway analysis. Moreover, the correlation between the six enzymes and insect resistance of host plants were analyzed. The six enzymes possibly had a close relationship with host resistance and might play an important role in the resistance of above rice lines to the brown planthopper. **Key words:** rice; *Nilaparvata lugens*; insect resistance; proteomics; insect-resistant genes

褐飞虱 Nilaparvata lugens 是我国主要粮食作物 水稻的重大害虫,每年给我国水稻生产造成极大的 损失,由于其迁飞性、高繁殖率、高致害性变异等特 性,在我国水稻种植区处于高发、频发状态(程家安 等,2008)。利用水稻品种自身抗性、推广应用抗虫 品种被认为是防治褐飞虱较为经济和有效的手段 (商科科等,2011)。挖掘抗虫基因并利用这些基因 进行分子育种,以及利用作物抗虫性进行水稻品种 布局是未来褐飞虱防控的重要发展方向。截至目 前,共有31个水稻抗褐飞虱基因被陆续定位到12条 水稻染色体的其中6条(染色体2、3、4、6、11和12) 上,精细定位18个基因,包括Bph3(Liu et al., 2014) , Bph6 (Guo et al., 2018) , Bph9 (Hu et al., 2016)、Bph14(Du et al., 2009)在内的7个基因已完 成克隆和功能的研究,这些研究为将外源抗虫基因 导入水稻,增强作物对褐飞虱抗虫性奠定了基础。 但单个抗虫基因导入的抗虫效果有限,水稻品种容 易因为褐飞虱致害性变异导致品种抗性丧失(Jairin et al., 2007; Horgan et al., 2015)。而聚合多个抗性 基因到栽培稻中,能够延缓褐飞虱高致害性产生,同 时提升主栽品种抗虫性的强度和持久性(Prahalada et al., 2017; 陈梦婷等, 2018)。

作物对病虫害的抗性有时由单一主效基因控制 (Horgan et al., 2015),有时由数量性状位点(quantitative trait loci, QTL)决定(Takagi et al., 2013)。大 多数抗性遗传基因研究采取正向遗传学策略,通过 品种间杂交方法获得具有不同抗性水平的遗传群 体,然后利用分子遗传作图进行基因或QTL定位。 Ikeda & Kaneda(1983)用三染色体分析方法得到基 因Bph1所在的染色体和该染色体的遗传标记基因; Hirabayashi & Ogawa(1995)用限制性片段长度多态 性(restriction fragment length polymorphism, RFLP) 标记作图方法进一步确定基因 Bph1 不在染色体 4 上而是在染色体 12 上; Jena et al. (2006)采用 Map-Maker软件进行连锁分析和高分辨率作图等方法找 到了位于染色体 12 上的 Bph18(t) 基因; He et al. (2013)用高分辨率作图和重组分析法找到了位于染 色体4上的Bph27(t)基因。蛋白质组学是研究细胞 水平生理变化的一种有效手段,但采用蛋白质组学 方法来研究抗虫性比较少,如Wei et al.(2009)用定 量蛋白质组学技术分析了感虫品种 TN1 和携带抗 褐飞虱基因 *Bph15*的抗性品系被褐飞虱侵染后水稻 叶鞘的蛋白质组差异,鉴定出693个蛋白,其中72个 蛋白在感虫品种中变化显著,95个蛋白在抗性品系 中变化显著,找到了相关的茉莉酸合成蛋白、氧化 应激反应蛋白、β-葡聚糖酶蛋白、激酶、网格蛋 白、甘氨酸解理系统蛋白、光合作用蛋白、水通道 蛋白,并进一步用实时荧光定量 PCR(quantitative real-time PCR,qPCR)技术研究了8个关键蛋白相 关的基因。

串联质谱标签(tandem mass tag, TMT)技术是 一种多肽体外标记技术。该技术采用10种同位素 的标签标记多肽的氨基基团,利用液相色谱-串联 质谱(liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)联用仪分析,可同时比较10组不同 样品中蛋白质的相对含量。本研究利用TMT技术 和LC-MS/MS联用仪,对遗传背景高度一致的抗感 褐飞虱遗传群体进行差异蛋白质组分析,分析蛋白 差异,明确调控差异蛋白关联基因,并通过 qPCR方 法对候选基因在核酸水平进行验证,以期为筛选水 稻抗褐飞虱新基因提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试水稻材料:本研究选用的感褐飞虱水稻材料16W45、抗褐飞虱水稻材料16W19-1-1均由广东省农业科学院植物保护研究所提供,是利用母本水稻材料万里香和父本水稻材料粤晶丝苗,通过杂交和多代自交、苗鉴法纯合家系筛选等技术手段,获得的纯抗褐飞虱遗传群体和纯感褐飞虱遗传群体。2种水稻种子分别播种在长40 cm×宽20 cm×高10 cm的塑料盒中,每盒30粒,各重复3次,置于温度27±1℃、相对湿度75%±5%、光照时间12 h的人工气候箱培养,待水稻长至3 叶期进行取样。

试剂及仪器:Pierce[™] Protease Inhibitor Mini Tablets、EDTA-free、ThermoPierce[™] BCA Protein Assay Kit、BCA蛋白试剂盒、Pierce[™] Quantitative Colorimetric Peptide Assay 肽段定量试剂盒、TMT0plex[™] Isobaric Label Reagent SetTMT-10Plex标记定量试 剂盒、Bond-Breaker[™] TCEP Solution,美国 Thermo Fisher Scientific 公司;测序级修饰胰蛋白酶,美国 Promega 公司; MiniBEST Universal RNA Extraction Kit RNA 提取试剂盒, 日本 TaKaRa 公司; iScript[™] gDNA Clear cDNA Synthesis Kit 反转录试剂盒、 iTag[™] Universal SYBR[®] Green PCR 定量试剂盒,新 加坡Bio-Rad公司;其余试剂均为国产或进口分析 纯(质谱纯)。Multifuge 1R台式冷冻离心机、串联 Thermo EASY-nLC系统的 Orbitrap Fusion 质谱仪、 ND-2000C超微量紫外/可见分光光度计、Ultimate 3000 系统,美国 Thermo Fisher Scientific 公司; XBridge C18(直径4.6 mm×长250 mm,粒径5 µm) 反向柱,美国Waters公司;Concentrator Plus 真空浓 缩仪,德国Eppendorf公司;CFX Connect荧光定量 PCR仪,美国Bio-Rad公司。

1.2 方法

1.2.1 水稻叶片总蛋白提取

取抗感稻飞虱3叶期水稻10株,将叶片分别剪 碎放入研钵,加入液氮研磨,将研磨好的粉末装入 50 mL离心管,于-80℃保存待用。

取3支15mL离心管分别称取研磨好的粉末2g, 加入-20℃预冷的质量浓度为10%~15%的TCA/丙 酮溶液(含体积分数1%~2%的β-巯基乙醇)8 mL, 涡旋混匀,-20℃放置20 min,4℃、8 000 r/min条件 下离心5min,尽量去除上清液。多次重复至上清液 基本无色。叶片沉淀中加入-20℃预冷的80%丙酮 8 mL,涡旋混匀,-20℃放置20 min,4℃、8 000 r/min 条件下离心5min,尽量去除上清液。重复3次。离 心管用滤纸封口,橡皮筋固定,置于真空浓缩仪中以 干燥浓缩模式去除样品中丙酮。加入4℃预冷的饱 和酚(含体积分数0.1%~0.2%的β-巯基乙醇),使酚 浸润干粉并能涡旋混匀,4℃放置60 min,期间不时 涡旋混匀。然后加入1/2酚体积的饱和蔗糖,涡旋 混匀,4℃放置30 min。14℃、9 000 r/min条件下离 心 20 min, 如果溶液分层不明显, 可以适当补加酚 和蔗糖。取上层清液到新的50mL离心管,按大于 体积比1:5的比例每支加入-20℃预冷的0.1 mol/L 醋酸铵/甲醇溶液,涡旋混匀,-20℃放置过夜, 4℃、6 000 r/min条件下离心 5 min。离心沉淀加入 适量-20℃预冷纯甲醇溶液,涡旋混匀,-20℃放置 10 min,4℃、6 000 r/min条件下离心 5 min,尽量去 除上清液。上述步骤重复3次。蛋白沉淀利用真空 浓缩仪去除剩余甲醇,-80℃保存备用。

1.2.2 水稻总蛋白酶解

按照BCA蛋白试剂盒操作步骤对上述提取的 蛋白浓度进行测定。取100 µg蛋白转移到新EP管 中,用8 mol/L尿素调至100 µL定容。加入0.5 mol/L 三(2-羧乙基)膦2 µL于37℃下反应1 h,然后加入 1 mol/L碘乙酰胺4 µL,室温下避光反应40 min。然 后按样品:丙酮体积比1:5加入-20℃预冷丙酮,并 于-20℃下过夜沉淀。于4℃、12 000 g条件下离心 20 min,并弃去上清液。加入-20℃预冷的90%丙酮 溶液1 mL,涡旋混匀清洗样品后,再于4℃、12 000 g 条件下离心20 min,弃上清液。清洗步骤重复2次。 室温干燥至沉淀表面的丙酮完全挥干后,将其重溶 于 100 µL 的100 mmol/L TEAB缓冲液中,酶:蛋白 按质量比为1:50加入胰蛋白酶,37℃过夜酶解。采 用C18反向柱除盐后,参照肽段定量试剂盒操作说 明测定肽段最终浓度并冻干。

1.2.3 肽段串联质谱标签标记及高pH反相分离

肽段混合物采用TMT-10Plex标记定量试剂盒 参照操作说明进行标记,水稻16W45的3个重复样 品分别标记为127N、127C、128N,水稻16W19-1-1 的3个重复样品分别标记为128C、129N、129C。每 个重复样品的试验重复数为3个。标记肽段样品混 合后冻干。

肽段混合物重溶于 pH 10、20 mmol/L 的甲酸铵 水溶液(流动相A)中,然后用 Ultimate 3000 系统连 接 C18 反向柱,使用反相线性梯度进行高 pH 分离, 40 min 内 pH 10 的 80% 乙腈/20 mmol/L 甲酸铵溶液 (流动相B)浓度由 5% 线性升至 45%。柱子在初始 条件下平衡 15 min,柱流速维持在 1 mL/min,柱温 维持在 30℃。收集到 12 个馏分。各个馏分在真空 浓缩仪中干燥待 HPLC-MS/MS 分析鉴定。

1.2.4 肽段的LC-MS/MS鉴定分析

将除盐冻干后的肽段重溶于 30 μ L 的 0.1% 甲酸 水溶液(流动相 A)后经由配备在线纳喷离子源的 LC-MS/MS 分析。整套系统为串联 Thermo EASYnLC系统的 Orbitrap Fusion质谱仪。总共上样 4 μ L (捕集柱 Thermo Fisher Scientific Acclaim PepMap C18,直径 100 μ m×长 2 cm,分析柱 Acclaim PepMap C18,直径 75 μ m×长 15 cm),采用梯度分离:90 min 内 0.1% 甲酸/乙腈溶液(流动相 B)浓度由 3% 升至 32%。柱流量控制在 300 nL/min,柱温为 40°C,电喷雾 电压为 2 kV。串联质谱图经过 PEAKS Studio 8.5 分 析。PEAKS DB 对水稻 *Oryza sativa*(UP000059680) 数据库(49171 entries)搜库,切割的酶设置为胰蛋白 酶。搜库参数碎片离子质量容许误差:0.05 Da,母 离子质量容许误差:10 ppm,最大漏切数:2,固定修 饰:Carbamidomethylation 57.02,TMT 10 plex(K,Nterm)229.16,可变修饰:Oxidation(M)15.99,Deamidation(NQ)0.98,Acetylation(Protein N-term)42.01。 肽段经过1% FDR和1 unique peptide质控过滤。筛 选差异倍数在1.2倍以上,含有至少2条 unique 肽 段,根据ANOVA算法取差异大于13(P<0.05)的蛋

1.2.5 差异蛋白的生物信息学分析

白作为差异蛋白。

差异蛋白 GO 功能分析中,利用 Blast2GO version 4进行功能注释,通过 BLASTP使用 GO 数据库 对整个蛋白序列数据库进行注释、匹配。差异蛋白 的功能统计使用 Fisher's exact test 进行检验。此功 能分析将生物过程、分子功能、细胞成分 3 种分类下 富集结果中处于 Level 3 的条目按 *P*-value 排序,统 计*P*-value 最小的前 20 个条目中富集到的蛋白数。

KEGG代谢通路分析使用 KOBAS 3.0 软件进行,注释所有差异蛋白,当 P<0.05 时认为该功能可信,分析所参与的代谢过程。KEGG 富集结果用柱形图可视化,对 P-value 最小的前 20 个可信通路作图,纵坐标表示该通路中的蛋白占总差异蛋白数量

的百分比,颜色越深表示P-value越小。

1.2.6 差异蛋白基因的qPCR分析

对差异蛋白KEGG代谢通路分析中获得的可信 通路涉及的关键基因进行qPCR分析。取出-80℃中 保存的约100 mg水稻样品,在液氮中充分研磨成粉 末状后,加至裂解液中裂解,并按照MiniBEST Universal RNA Extraction Kit RNA 提取试剂盒操作步 骤进行 RNA 的抽提。吸取 1 µL RNA 直接在超微量 分光光度计上测定RNA浓度,以DEPC水作空白对 照,同时记录RNA浓度及OD_{260 nm}/OD_{280 nm}的比值。 按照 iScript[™] gDNA Clear cDNA Synthesis Kit 反转 录试剂盒操作步骤进行反转录获得cDNA。以β-actin作为内参基因,对关键基因和 β -actin分别设计引 物(表1),引物均由上海捷瑞生物工程有限公司合成。 按照标准的三步法进行 qPCR 扩增,20 µL 反应体系: cDNA 2 µL、3 µmol/L 上下游引物各 2 µL、2×qPCR Mix 10 µL、ddH₂O 4 µL。反应程序:95℃预变性2 min;95℃变性10s,58℃退火10s,72℃延伸10s,40 个循环。反应后进行熔解曲线分析:72~95℃升温,温 度间隔0.5℃,温度保持时间为10 s;30℃降温30 s。 将在感虫水稻材料中的基因表达量设为1,采用 2-44年法进行关键基因相对表达量的差异分析。

表1	差异蛋白基因及内参基因引物	

Table 1 Primes of differential protein genes and reference gene						
基因Gene	引物序列(5'-3') Primer sequence (5'-3')	退火温度 Annealing temperature				
4324526	F:AGGATCGTCGACAACACCAC;R:CGAAGAGGTGGTTCTCCGTG	F:55.73°C;R:56.11°C				
4333841	F:TCCCTCTTGCGCTTGAGAAG;R:CAGTGCTTGACACGATTGCC	F:55.68°C;R:55.87°C				
4347441	F:ACCCTATCGTGCATGGTGAC;R:CCGATGAAGTCGTAGGAGCC	F:55.45°C;R:55.68°C				
4338802	F:ATGCTGAACGACGAGGTGTC;R:ACGACGGATAACCAACACCC	F:56.11°C;R:55.69°C				
4333932	F:CTAGGGGGACTCTGAAACGGC;R:CTGCCACCTCCTCTTGAAGG	F:55.48°C;R:55.64°C				
4324516	F:TTACTACTGCAACCACCCGC;R:ATAGCCACCGTTACCACTCG	F:55.97°C;R:55.21°C				
9272344	F:GATGAGGAAGGGTGATCGGGG; R:GGAGGTGGTGATCTGTTGGC	F:55.22°C;R:56.30°C				
4350817	F:GGACTTCAAGATGGCGTTCG; R:AGGCCGAGGTTCTTCTCGAT	F:55.04°C;R:56.25°C				
β -actin	F:CACATTCCAGCAGATGTGGA;R:GCGATAACAGCTCCTCTTGG	F:53.51°C;R:54.14°C				

1.3 数据分析

试验数据采用 SPSS13.0 软件进行统计分析,抗 虫水稻和感虫水稻间差异蛋白基因相对表达量采用 *t*测验法进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 水稻总蛋白TMT定量蛋白质组学质谱分析

通过TMT标记的定量蛋白质组学质谱分析,获 得感虫水稻16W45和抗虫水稻16W19-1-1的总蛋 白和差异蛋白信息,结果显示,共鉴定到7625个蛋白,其中差异蛋白229个,涉及上调蛋白156个,下调蛋白73个。

2.2 差异蛋白GO功能分析

对感虫水稻16W45和抗虫水稻16W19-1-1的 差异蛋白进行GO功能分析,各个条目蛋白数量占 比结果显示,根据生物过程来分类,差异蛋白主要包 括有机物代谢、细胞代谢、初级代谢、氮化合物代谢、 小分子代谢、生物合成、分解代谢、氧化还原、应激反 应、非生物刺激反应、分子功能调节、外部刺激反应、 次级代谢、免疫反应、气孔运动等15种蛋白,占比分别为 48.03%、44.54%、42.79%、39.74%、21.40%、18.34%、 14.41%、12.23%、9.61%、5.24%、3.93%、3.06%、1.75%、 1.31%、0.87%(图1-A)。



A: 生物过程; B: 分子功能; C: 细胞成分。A: Biological process; B: molecular function; C: cellular component.

图1 差异蛋白的GO富集功能分析

Fig. 1 GO Enrichment functional analysis of differential proteins

根据分子功能来分类,差异蛋白主要包括参与水

解酶活性、转移酶活性、氧化还原酶活性、异构酶活性、

辅因子结合、溶酶活性、酶调节活性、脂结合、硫化物结合等蛋白,占比分别为20.96%、19.21%、11.79%、4.37%、6.55%、4.37%、3.06%、2.18%和0.87%(图1-B)。

根据细胞成分来分类,差异蛋白主要包括参与 细胞组分、膜界细胞器、器官组分、细胞-细胞连接、 DNA包装复合物、蛋白-DNA复合物、细胞外区域组 分等蛋白,占比分别为43.67%、28.82%、14.41%、 3.06%、1.31%、1.31%和1.31%(图1-C)。

2.3 差异蛋白KEGG代谢通路分析

感虫水稻16W45和抗虫水稻16W19-1-1的差 异蛋白KEGG代谢通路分析结果显示,差异蛋白主 要参与了氰胺基酸代谢(差异蛋白4个,占比 1.75%,P=0.006)、牛磺酸代谢(差异蛋白2个,占比 0.88%,P=0.009)、糖胺聚糖降解(差异蛋白2个,占 比0.88%,P=0.03)、脂肪酸链伸长(差异蛋白2个,占 比0.88%,P=0.035)等通路,其中参与氰胺基酸代谢 通路P值最小,差异蛋白数量最多(图2)。

2.4 差异蛋白基因表达量分析

KEGG代谢通路分析中得到的5条主要代谢通路 osa00460、osa00430、osa00531、osa00511、osa00062, 涉及到9个蛋白,UniProt代码分别是A0A0P0UYM7、 Q75I93、Q0J0N4、Q53NF0、Q5WMR0、Q6ASV4、 Q5ZED1、Q0IRW8、B7F5B4,前8个差异蛋白在抗虫 水稻16W19-1-1中的表达量高于与感虫水稻16W45 中的表达量,两者之间的差异倍数分别为1.26、1.20、 1.24、1.32、1.29、1.29、1.44、1.22,而B7F5B4蛋白在抗 虫水稻16W19-1-1中的表达量低于与在感虫水稻 16W45中的表达量,前者是后者的48.50%;对应6种 酶,分别是γ-谷氨酰基转移酶、β-葡糖苷酶、β-N-乙 酰-D-氨基葡萄糖酶、谷氨酸脱羧酶、甚长链烯酰- CoA还原酶、甚长链3-氧酰辅酶,以及8个基因,基因 ID号分别为4324526、4333841、4347441、4338802、 4333932、4324516、4350817、9272344(表2)。

针对上述8个关键基因进行qPCR分析,结果表 明基因4324526、4333841和4324516在抗虫水稻 16W19-1-1中的表达量极显著高于在感虫水稻 16W45中的表达量(P<0.01),基因4338802和 4333932在抗虫水稻16W19-1-1中的表达量显著高 于在感虫水稻16W45中的表达量(P<0.05)(图3)。 抗、感水稻间关键基因表达差异与蛋白表达差异大 部分相同。



1: 氰胺基酸代谢; 2: 糖胺聚糖降解; 3: 牛磺酸代谢; 4: 其它聚糖降解; 5: 脂肪酸链伸长。 1: Cyanamide acid metabolism; 2: glycosaminoglycan degradation; 3: taurine metabolism; 4: other glycan degradation; 5: fatty acid chain elongation.

图 2 抗虫水稻 16W19-1-1 相比感虫水稻 16W45 差异蛋的 KEGG 通路分析

Fig. 2 KEGG pathway analysis of differential proteins of resistance rice line 16W19-1-1 and susceptible rice line 16W45

通路 Pathway	酶Enzyme	EC 号 EC number	基因 ID Gene ID	UniProt 代码 UniProt code
osa00460	γ-谷氨酰基转移酶Gamma-glutamyltransferase	EC2.3.2.2	4324526	A0A0P0UYM7
	β-葡糖苷酶 Beta-glucosidase	EC3.2.1.21	4333841	Q75193
	β-葡糖苷酶 Beta-glucosidase	EC3.2.1.21	4347441	Q0J0N4
				Q53NF0
osa00531	β-N-乙酰-D-氨基葡萄糖酶Beta-N-acetyl-D-glucosaminidase	EC3.2.1.52	4338802	Q5WMR0
osa00511	β-N-乙酰-D-氨基葡萄糖酶 Beta-N-acetyl-D-glucosaminidase	EC3.2.1.52	4338802	Q5WMR0
osa00430	γ-谷氨酰基转移酶Gamma-glutamyltransferase	EC2.3.2.2	4324526	A0A0P0UYM7
	谷氨酸脱羧酶 Glutamate decarboxylase	EC4.1.1.15	4333932	Q6ASV4
osa00062	甚长链烯酰-CoA还原酶 Very-long-chain enoyl-CoA reductase	EC1.3.1.93	4324516	Q5ZED1
	甚长链 3-氧酰辅酶 Very-long-chain 3-oxoacyl-CoA synthase	EC2.3.1.199	4350817	Q0IRW8
	甚长链 3-氧酰辅酶 Very-long-chain 3-oxoacyl-CoA synthase	EC2.3.1.199	9272344	B7F5B4

表2 抗虫水稻16W19-1-1与感虫水稻16W45差异蛋白信息 Table 2 Information of differential proteins of resistance rice line 16W19-1-1 and susceptible rice line 16W45





Fig. 3 Relative expressions of eight genes in resistance rice line 16W19-1-1 and susceptible rice line 16W45 图中数据为平均数±标准误。*和**分别表示不同水稻同种基因表达量之间经*t*测验法检验在*P*<0.05和*P*<0.01水平差 异显著。Date are mean±SE. * or ** indicates significant difference between rice lines 16W19-1-1 and 16W45 for the same gene at *P*<0.05 or *P*<0.01 level by *t* test.

3 讨论

蛋白是有机体生命活动的主要体现,抗感水稻 品种或品系间对有害生物抗性差异水平,部分可通过 其蛋白在质和量的变化上体现出来。在蛋白组的整 体水平上对水稻细胞水平生理变化上进行研究,能更 详尽地获得水稻抵御生物胁迫表达的特异性,从而为 系统、全面了解水稻品种抗性机制和调控机理做出科 学解释(刘凯于等,2011)。Wang et al.(2015)应用定 量差异蛋白质组学技术研究水稻条纹病毒(rice stripe virus, RSV)的作用机理时,获得681个差异表 达蛋白,其中65.8%的蛋白处于上调表达,34.2%的 蛋白处于下调表达;生物信息学分析发现,镁螯合酶 和天冬氨酸蛋白酶分别与RSV诱发的萎黄病和细 胞凋亡密切相关。唐成等(2014)应用iTRAQ技术 研究水稻叶片对稻瘟病的应激反应,获得53个与代 谢途径相关的差异表达蛋白,主要分布于氧化还原 平衡、信号转导、光合作用、氨基酸和蛋白质代谢、糖 和能量代谢、防御反应等方面。Du et al.(2015)在对 褐飞虱抗性和敏感性的水稻韧皮部汁液进行定量差 异蛋白质组学分析时,获得63个与代谢途径相关的 差异蛋白,主要分布在防御信号转导、氧化还原调 控、糖类代谢与蛋白质代谢等过程。褐飞虱抗性水 稻通过提高受体糖基磷脂酰肌醇锚定蛋白和富含半 胱氨酸受体蛋白激酶5的表达量,使得水稻组织快 速识别褐飞虱侵害,并通过提高过氧化物酶活性激 活机体的应激反应。杨萌萌等(2016)研究发现取食 不同水稻品种对褐飞虱和稻株体内海藻糖和海藻糖 酶存在影响。本试验利用定量蛋白质组学技术对亲 缘关系密切、遗传背景较为一致的2个水稻品系进行 差异蛋白分析,结果共鉴定出7625个蛋白,其中差 异蛋白229个,涉及上调蛋白156个,下调蛋白73个, 主要包括代谢蛋白、氧化还原蛋白和应激反应蛋白, 这些种类的蛋白与唐成等(2014)、Wang et al. (2015)和Du et al.(2015)报道水稻响应生物胁迫的 蛋白基本一致。本研究发现,上述蛋白主要参与水 稻体内氰胺基酸代谢、牛磺酸代谢、聚糖降解、脂肪 酸链伸长等通路。

目前已报道的具有抗虫性功能的蛋白主要有苏 云金芽胞杆菌 Bacillus thuringiensis(Bt)毒蛋白、蛋 白酶抑制剂、外源凝集素等(袁曦等,2017;周晓静 等,2017;Wang et al.,2019)。本研究最终找到9个 关键蛋白,对应6种酶,分别是γ-谷氨酰基转移酶、β-葡糖苷酶、β-N-乙酰-D-氨基葡萄糖酶、谷氨酸脱羧 酶、甚长链烯酰-CoA还原酶、甚长链3-氧酰辅酶。 γ-谷氨酰基转移酶是催化谷胱甘肽上γ-谷氨酰基转 移,参与谷胱甘肽合成与代谢的关键酶之一,对维持 抗氧化剂谷胱甘肽的水平起着重要作用(乔杰和宋 艳红,2019)。谷胱甘肽是植物体内普遍存在的小分 子抗氧化物质,谷胱甘肽的降解导致植物的氧化性 增强,不利于植食性昆虫的定殖和发育,提高了植物 的抗虫性(陈坤明等,2004)。在氰胺基酸代谢通路 中, β -葡糖苷酶发挥了重要作用(Kassim & Rumbold,2014);同时,也有研究人员发现了β-葡糖苷酶 抗虫基因并对其抗虫机制进行了分析(Mageroy et al.,2015;Kautz et al.,2017)。植物体内可溶性糖含 量与植物抗病虫能力存在密切联系,植物体内可溶 性糖含量越高,害虫排出糖类物质的代谢压力越大, 对害虫越不利,从而使植物对害虫产生一定的抗 性。β-N-乙酰-D-氨基葡萄糖酶在南美白对虾Litopenaeus vannamei防御寄生虫的侵袭时发挥重要作 用(Xie et al., 2009)。谷氨酸脱羧酶是 y-氨基丁酸的 合成酶。Ramputh & Brown (1996) 研究认为,由于 组织损伤引发γ-氨基丁酸的迅速积累,使其在植物 抵抗昆虫的斗争中起重要作用。甚长链烯酰-CoA 还原酶和甚长链3-氧酰辅酶都参与了长链脂肪酸的 合成。长链脂肪酸是植物种子或表面蜡质、木栓质 的重要组成部分,其中植物体表面蜡质层是植物防 御体系的重要组成部分,在防止病原物侵染、昆虫侵 食过程中发挥重要作用(李晓婷等,2018)。可见,本 研究所获得的6种酶与植物抗虫性关系密切,这些 酶可能在水稻品种抗褐飞虱中起着重要作用。

qPCR分析结果表明,γ-谷氨酰基转移酶、β-葡 糖苷酶、谷氨酸脱羧酶、甚长链烯酰-CoA还原酶关 联基因在抗虫水稻品系中的表达量显著高于在感虫 水稻品系中的表达量,证实上述蛋白酶基因与植物 抗虫性相关。因此,进一步研究这些基因的功能和 作用机理,将为水稻褐飞虱绿色防控提供新的基因 资源,为开发多基因聚合超级水稻提供新靶标。

参考文献(References)

- CHEN KM, GONG HJ, WANG SM. 2004. Glutathione metabolism and environmental stresses in plants. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 24(6): 1119-1130 (in Chinese) [陈坤明, 宫海军, 王锁民. 2004. 植物谷胱甘肽代谢与环境胁迫. 西北植物学报, 24(6): 1119-1130]
- CHEN MT, ZHOU SX, ZHANG YB, YANG LJ, LÜ J, LOU YG.
 2018. Silencing of OsERF7 enhances the resistance of rice to the brown planthopper Nilaparvata lugens and the white-backed planthopper Sogatella furcifera. Journal of Plant Protection, 45(5):
 979–986 (in Chinese) [陈梦婷,周书行,张月白,杨丽娟,吕静,娄 永根. 2018. 沉默转录因子 OsERF7 提高水稻对褐飞虱和白背 飞虱的抗性. 植物保护学报, 45(5): 979–986]
- CHENG JA, ZHU JL, ZHU ZR, ZHANG LG. 2008. Rice planthopper outbreak and environment regulation. Journal of Environmental Entomology, 30(2): 176-182 (in Chinese) [程家安, 朱金良, 祝增 荣, 章连观. 2008. 稻田飞虱灾变与环境调控. 环境昆虫学报, 30

(2): 176-182]

- DU B, WEI Z, WANG ZQ, WANG XX, PENG XX, Du B, Chen RZ, Zhu LL, He GC. 2015. Phloem-exudate proteome analysis of response to insect brown plant-hopper in rice. Journal of Plant Physiology, 183: 13–22
- DU B, ZHANG WL, LIU BF, HU J, WEI Z, SHI ZY, HE RF, ZHU LL, CHEN RZ, HAN B, et al. 2009. Identification and characterization of *Bph14*, a gene conferring resistance to brown planthopper in rice. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 106(52): 22163–22168
- GUO JP, XU CX, WU D, ZHAO Y, QIU YF, WANG XX, OUYANG YD, CAI BD, LIU X, JING SL, et al. 2018. *Bph6* encodes an exocyst-localized protein and confers broad resistance to planthoppers in rice. Nature Genetics, 50(2): 297–306
- HE J, LIU YQ, LIU YL, JIANG L, WU H, KANG HY, LIU SJ, CHEN LM, LIU X, CHENG XN, WANG JM. 2013. High-resolution mapping of brown planthopper (BPH) resistance gene *Bph27(t)* in rice (*Oryza sativa* L.). Molecular Breeding, 31(3): 549–557
- HIRABAYASHI H, OGAWA T. 1995. RFLP mapping of *Bph-1* (brown planthopper resistance gene) in rice. Breeding Science, 45: 369–371
- HORGAN FG, RAMAL AF, BENTUR JS, KUMAR R, BHANU KV, SARAO PS, ISWANTO EH, VAN CHIEN H, PHYU MH, BER-NAL CC, et al. 2015. Virulence of brown planthopper (*Nilaparvata lugens*) populations from South and South East Asia against resistant rice varieties. Crop Protection, 78: 222–231
- HU J, XIAO C, HE YQ. 2016. Recent progress on the genetics and molecular breeding of brown planthopper resistance in rice. Rice, 9: 30
- IKEDA R, KANEDA C. 1983. Trisomic analysis of the gene *Bph1* for resistance to the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* Stål, in rice. Japanese Journal of Breeding, 33(1): 40–44
- JAIRIN J, PHENGRAT K, TEANGDEERITH S, VANAVICHIT A, TOOJINDA T. 2007. Mapping of a broad-spectrum brown planthopper resistance gene, *Bph3*, on rice chromosome 6. Molecular Breeding, 19(1): 35–44
- JENA KK, JEUNG JU, LEE JH, CHOI HC, BRAR DS. 2006. Highresolution mapping of a new brown planthopper (BPH) resistance gene, *Bph18(t)*, and marker-assisted selection for BPH resistance in rice (*Oryza sativa* L.). Theoretical and Applied Genetics, 112 (2): 288–297
- KASSIM MA, RUMBOLD K. 2014. HCN production and hydroxynitrilelyase: a natural activity in plants and a renewed biotechnological interest. Biotechnology Letters, 36(2): 223–228
- KAUTZ S, WILLIAMS T, BALLHORN DJ. 2017. Ecological importance of cyanogenesis and extrafloral nectar in invasive English laurel, *Prunus laurocerasus*. Northwest Science, 91(2): 214–221
- LI XT, ZHAO X, WANG DK, HUANG L, YAO LH, WANG DJ, YU J, GUO YJ. 2018. Chemical profiles of cuticular waxes in arid steppe plant species and their response to continuous grazing. Acta Prataculturae Sinica, 27(6): 137-147 (in Chinese) [李晓婷, 赵 晓, 王登科, 黄蕾, 姚露花, 王党军, 玉吉, 郭彦军. 2018. 天然草

地植物叶角质层蜡质的化学组成及其对自由放牧的响应.草业 学报,27(6):137-147]

- LIU KY, WU YY, PENG JX, HONG HZ. 2011. Quantitative analysis of differential proteins between the susceptible and resistant *Trichoplusia ni* cells to Bt Cry1Ac toxin. Journal of Plant Protection, 38(3): 281-282 (in Chinese) [刘凯于, 吴彦燕, 彭建新, 洪华 珠. 2011. 抗Bt Cry1Ac 毒素粉纹夜蛾离体细胞与敏感细胞的差 异蛋白定量分析. 植物保护学报, 38(3): 281-282]
- LIU YQ, WU H, CHEN H, LIU YL, HE J, KANG HY, SUN ZG, PAN G, WANG Q, HU JL, et al. 2014. A gene cluster encoding lectin receptor kinases confers broad-spectrum and durable insect resistance in rice. Nature Biotechnology, 33(3): 301–307
- MAGEROY MH, PARENT G, GEMANOS G, GIGUÈRE I, DELVAS N, MAAROUFI H, BAUCE E, BOHLMANNL J, MACKAY JJ.
 2015. Expression of the b-glucosidase gene *Pgbglu-1* underpins natural resistance of white spruce against spruce budworm. The Plant Journal, 81: 68–80
- PRAHALADA GD, SHIVAKUMAR N, LOHITHASVA HC, GOWDA DKS, RAMKUMAR G, KIM SR, RAMACHANDRA C, HIT-TALMANI S, MOHAPATRA T, JENA KK. 2017. Identification and fine mapping of a new gene, BPH31 conferring resistance to brown planthopper biotype 4 of India to improve rice, *Oryza sativa* L. Rice, 10: 41
- QIAO J, SONG YH. 2019. Research progress on glutamyltranspeptide enzyme. The Journal of Medical Theory and Practice, 32(5): 651-653 (in Chinese) [乔杰, 宋艳红. 2019. 谷氨酰转肽酶的研究进 展. 医学理论与实践, 32(5): 651-653]
- RAMPUTH AI, BOWN AW. 1996. Rapid gama-aminobutyric acid synthesis and the inhibition of the growth and development of oblique-banded leaf-roller larvae. Plant Physiology, 111: 1349– 1352
- SHANG KK, XU XL, WANG H, HU DB, ZHANG QL, YANG CJ, HUA HX. 2011. Resistance to brown planthopper (*Nilaparvata lugens*) of 16 rice varieties (lines). Chinese Bulletin of Entomology, 48(5): 1335–1330 (in Chinese) [商科科, 徐雪亮, 王晖, 胡定邦, 张青玲, 杨长举, 华红霞. 2011. 十六个水稻品种(系)对褐飞虱的 抗虫性评价. 应用昆虫学报, 48(5): 1335–1310]
- TAKAGI H, ABE A, YOSHIDA K, KOSUGI S, NATSUME S, MIT-SUOKA C, UEMURA A, UTSUSHI H, TAMIRU M, TAKUNO S, et al. 2013. QTL-seq: rapid mapping of quantitative trait loci in rice by whole genome resequencing of DNA from two bulked populations. The Plant Journal, 74(1): 174–183

- TANG C, CHEN L, AN MM, MENG D, YANG LM, LUO YM. 2014. Proteomic analysis reveals an intinate protein pathways provoked by blast in rice seedling leaves. Journal of Huaiyin Teachers College (Nature Science Edition), 13(4): 322–328 (in Chinese) [唐成, 陈露, 安敏敏, 孟丹, 杨立明, 罗玉明. 2014. 水稻幼苗叶片应答 稻瘟病侵染的差异蛋白谱分析. 淮阴师范学院学报(自然科学 版),13(4): 322–328]
- WANG B, HAJANO JUD, REN YD, LU CT, WANG XF. 2015. iTRAQ-based quantitative proteomics analysis of rice leaves infected by rice stripe virus reveals several proteins involved in symptom formation. Virology Journal, 12(1): 99
- WANG YM, HUANG C, HUB, WALTER GH, HEREWARD JP. 2019. Gene flow across host-associated populations of the rice stem borer *Chilo suppressalis* Walker (Lepidoptera: Crambidae)-implications for Bt resistance management in rice. Pest Management Science, 9(3): 255–259
- WEI Z, HU W, LIN QS, CHENG XY, TONG MJ, ZHU LL, CHEN RZ, HE GC. 2009. Understanding rice plant resistance to the brown planthopper (*Nilaparvata lugens*): a proteomic approach. Proteomics, 9(10): 2798–2808
- XIE XL, HUANG QS, WANG Y, KE CH, CHEN QX. 2009. Modification and modificatory kinetics of the active center of prawn β-Nacetyl-D-glucosaminidase. Journal of Biomolecular Structure and Dynamics, 26(6): 781–786
- YANG MM, XIE GQ, SHEN QD, LIU Y, YU SS, TANG B. 2016. Effects of *Nilaparvata lugens* (Stål) infestation on the trehalose contents and trehalase activities in both rice and brown planthoppers. Journal of Plant Protection, 43(3): 398–404 (in Chinese) [杨萌萌, 谢国强, 沈祺达, 刘雅, 俞姗姗, 唐斌. 2016. 取食不同水稻品种 对褐飞虱和稻株内海藻糖及海藻糖酶的影响. 植物保护学报, 43(3): 398–404]
- YUAN X, FAN HL, LI DS. 2017. Effects of insect-resistant transgenic rice on enemies in paddy fields: a review. Guangdong Agricultural Sciences, 44(10): 59–65 (in Chinese) [袁曦, 樊海利, 李敦松. 2017. 抗虫转基因水稻对稻田天敌的影响研究进展. 广东农业 科学, 44(10): 59–65]
- ZHOU XJ, XIANG Z, QIANG XJ, JU L, NIU YT. 2017. Research progress of plant lectin in anti-stinging insect pests. Bulletin of Agricultural Science and Technology, (8): 39-41 (in Chinese) [周晓静, 向臻, 强学杰, 鞠乐, 牛银亭. 2017. 植物凝集素在 抗刺吸式害虫中的研究进展. 农业科技通讯, (8): 39-41]

(责任编辑:王 璇)