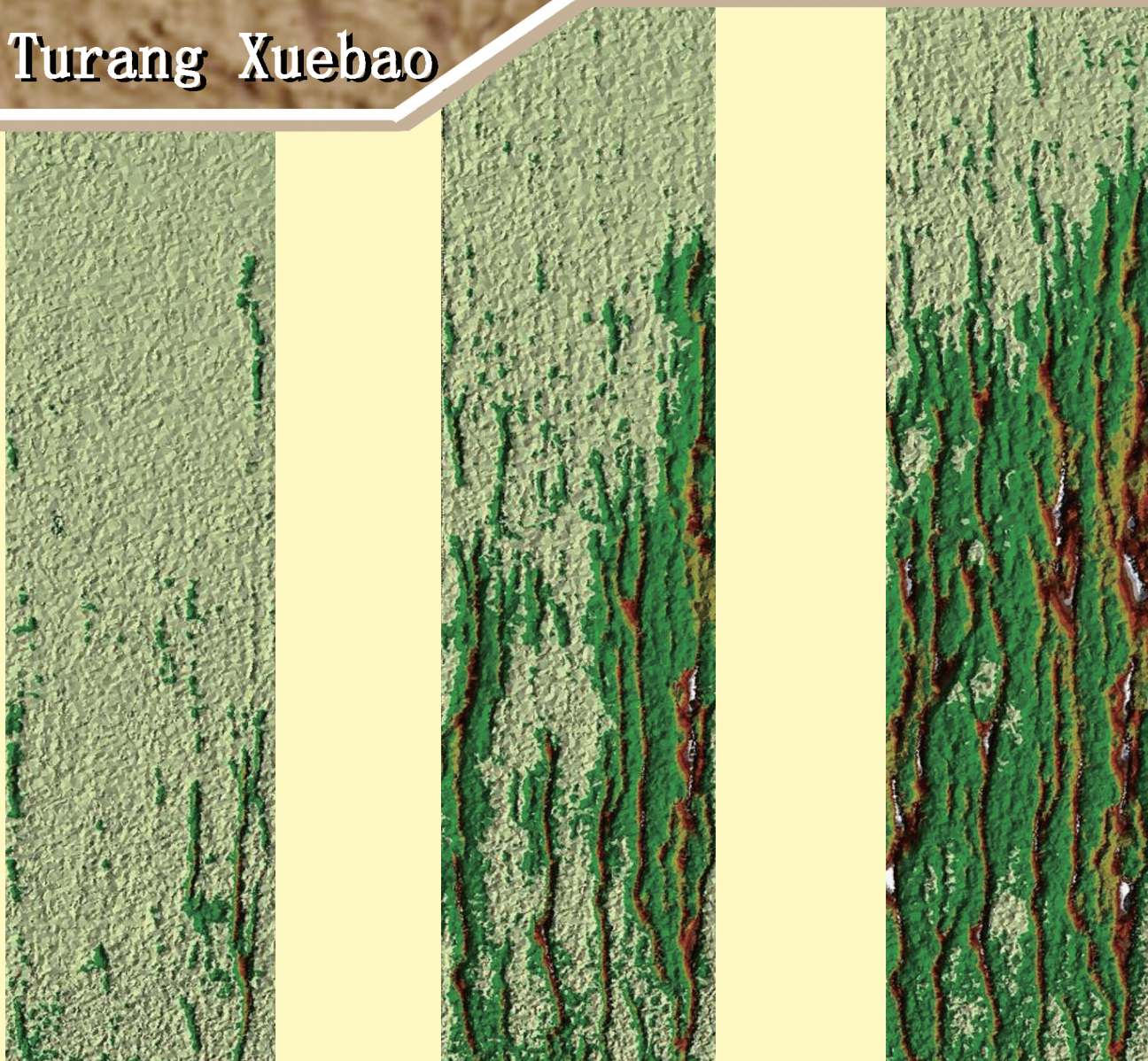


ISSN 0564-3929

Acta Pedologica Sinica 土壤学报

Turang Xuebao



土壤学报

第五十二卷

第一期

二〇一五年一月

科学出版社



中国土壤学会
科学出版社

主办
出版

2015

第52卷 第1期

Vol.52 No.1

《土壤学报》编辑委员会

主 编：史学正

执行编委：(按姓氏笔画为序)

丁维新	巨晓棠	王敬国	王朝辉	史 舟	宇万太	朱永官
李永涛	李芳柏	李保国	李 航	吴金水	沈其荣	张玉龙
张甘霖	张福锁	陈德明	邵明安	杨劲松	杨明义	杨林章
林先贵	依艳丽	周东美	周健民	金继运	逢焕成	胡 锋
施卫明	骆永明	赵小敏	贾仲君	徐国华	徐明岗	徐建明
崔中利	常志州	黄巧云	章明奎	蒋 新	彭新华	雷 梅
窦 森	廖宗文	蔡祖聪	蔡崇法	潘根兴	魏朝富	

编辑部主任：陈德明

责任编辑：汪枫生 卢 萍 檀满枝

土 壤 学 报

Turang Xuebao

(双月刊,1948年创刊)

第52卷 第1期 2015年1月

ACTA PEDOLOGICA SINICA

(Bimonthly, Started in 1948)

Vol. 52 No. 1 Jan., 2015

编 辑 《土壤学报》编辑委员会
地址：南京市北京东路71号 邮政编码：210008
电话：025-86881237
E-mail: actapedo@issas.ac.cn

Edited by Editorial Board of Acta Pedologica Sinica
Add: 71 East Beijing Road, Nanjing 210008, China
Tel: 025-86881237
E-mail: actapedo@issas.ac.cn

主 编 史学正
主 管 中国科学院
主 办 中国土壤学会
承 办 中国科学院南京土壤研究所

Editor-in-Chief Shi Xuezheng
Superintended by Chinese Academy of Sciences
Sponsored by Soil Science Society of China
Undertaken by Institute of Soil Science,
Chinese Academy of Sciences

出 版 科 学 出 版 社
地址：北京东黄城根北街16号 邮政编码：100717

Published by Science Press
Add: 16 Donghuangchenggen North Street,
Beijing 100717, China

印刷装订 北京中科印刷有限公司
总 发 行 科 学 出 版 社
地址：北京东黄城根北街16号 邮政编码：100717
电话：010-64017032
E-mail: journal@mail.sciencep.com

Printed by Beijing Zhongke Printing Limited Company
Distributed by Science Press
Add: 16 Donghuangchenggen North Street,
Beijing 100717, China
Tel: 010-64017032
E-mail: journal@mail.sciencep.com

国外发行 中国国际图书贸易总公司
地址：北京399信箱 邮政编码：100044

Foreign China International Book Trading Corporation
Add: P. O. Box 399, Beijing 100044, China

国内统一刊号：CN 32-1119/P

国内邮发代号：2-560

国外发行代号：BM45

定价：60.00元

国 内 外 公 开 发 行



ISSN 0564-3929



9 770564 392156

DOI: 10. 11766/trxb201405200240

硅介导番茄青枯病抗性的土壤定量蛋白质组学研究*

陈玉婷 林威鹏 范雪滢 蔡昆争[†]

(华南农业大学农业部华南热带农业环境重点实验室, 广州 510642)

摘要 番茄 (*Solanum lycopersicum*) 是一种重要的经济作物。由青枯菌 (*Ralstonia solanacearum*) 侵染所产生的青枯病是一种严重影响茄科类作物的细菌性土传病害。传统的防治方法, 如培育抗性品种、轮作、药剂防治等均存在一定的局限。而硅作为一种作物生长的有益元素, 在提高植物适应生物胁迫和非生物胁迫中均起重要作用。本研究以易感青枯病的番茄品种“台湾红圣女”作为试验材料, 利用 iTRAQ (isobaric tags for relative and absolute quantitation) 定量蛋白质组学技术, 研究硅和/或青枯菌接种对番茄青枯病抗性及其土壤蛋白质组的影响。结果表明, 2.0 mmol L⁻¹ 硅处理能显著降低番茄青枯病的病情指数, 增强抗病性。基于 iTRAQ 定量蛋白质组学技术, 硅和/或青枯菌处理对土壤蛋白质组的研究表明, 在鉴定的 30 个土壤蛋白质中, 有 29 个蛋白差异表达显著 (上调 ≥ 1.2 倍, 下调 ≤ 0.8 倍差异)。青枯菌侵染诱发 22 个土壤蛋白下调表达, 5 个上调表达。在不接菌的条件下, 硅处理有 5 个土壤蛋白上调, 19 个蛋白下调; 而接菌条件下则有 8 个蛋白上调, 14 个蛋白下调。将这 29 个差异蛋白进行 GO 基因功能分类结果显示, 硅和/或青枯菌处理主要影响生理代谢过程以及核酸结合蛋白。硅对番茄青枯病的作用机理主要体现在: 改变微生物的代谢能力, 调控与抗性代谢、蛋白质的合成与翻译、信号转导以及免疫系统过程和胁迫响应有关蛋白的表达, 影响钙离子信号转导等。

关键词 硅; 番茄; 青枯病; 定量蛋白质组学; iTRAQ; 抗性

中图分类号 S511 **文献标识码** A

青枯病是一种由青枯菌 (*Ralstonia solanacearum*) 引起的主要发生于茄科类作物 (如番茄、烟草、辣椒等) 的细菌性土传病害, 是常见的系统性维管束病害之一, 能侵染 450 多种单子叶和双子叶植物^[1]。在高温高湿 (如热带、亚热带和温带一些地区)、连作、积水、土壤 pH 偏酸等情况下, 该病容易发生^[2,3]。青枯病的防治方法主要包括: 培育抗性品种、化学防治、生物防治、轮作和有机肥等^[4,5]。抗病品种由于病原菌变化快, 品种抗性容易丧失; 化学防治效果不佳, 而且对食品安全及环境有较大负作用; 其他防治方法也存在一定局限。

硅在自然界广泛分布, 是地壳的重要组成部分, 其在岩石圈平均含量为 28%。尽管硅不是高等植物生长的必需元素, 但是硅在提高植物对逆境胁迫的抗性方面起重要的作用^[6]。已有研究表明, 施硅可以增强多种植物病害的抗性, 如小麦白粉病、

水稻稻瘟病、香蕉黑叶斑病等^[7,9]。还有研究表明, 施硅能缓解干旱胁迫对水稻的光合作用、矿质养分的吸收, 抑制二化螟幼虫对水稻的钻蛀行为等^[10-11]。这种抗性的提高与硅的沉积形成物理屏障、诱导生化抗性及其调控基因表达等有关^[12]。国内外的研究和实践均表明, 硅能显著提高番茄对青枯病的抗性^[13-16]。余万科^[17]报道了采用施硅肥来防治番茄青枯病的实践。Dannon 和 Wydra^[13]研究发现, 硅的施用能缓解番茄青枯病的危害, 感病和抗病品种的发病率分别降低 26.8% 和 56.1%。Diogo 和 Wydra^[14]的试验则表明硅对青枯病的防治效果能达到 38.1% ~ 100%。Ghareeb 等^[15, 18]研究表明, 番茄感染青枯菌后, 硅能诱导植物产生抗性信号分子, 增加与防御有关的茉莉酸和乙烯标记基因、氧化胁迫标记基因的表达, 及看家基因 (house-keeping genes) *PGK*、*TUB* 和 *ACT* 的表达稳定性。

* 国家自然科学基金项目 (31370456)、广东省自然科学基金项目 (S2012010010331) 和教育部博士点基金项目 (20124404110010) 资助

[†] 通讯作者, E-mail: kzeai@scau.edu.cn

作者简介: 陈玉婷 (1988—), 女, 湖南邵阳人, 硕士, 主要从事农业生态学和土壤生态学研究。E-mail: 774039668@qq.com

收稿日期: 2014-05-20; 收到修改稿日期: 2014-07-22

蛋白质是生理功能的执行者和生命现象的直接体现者。蛋白质组学是对蛋白质特别是其结构和功能的大规模研究;差异定量蛋白质组学是通过寻找外界刺激引起的蛋白差异表达,对其进行相对定量,从而揭示生物对外界环境条件的响应机制^[19]。传统的差异定量蛋白质组学技术主要是双向电泳(two-dimensional electrophoresis, 2-DE),但由于双向电泳的重复性差,对极酸或极碱等电点的蛋白质、分子量太大或太小的蛋白质以及丰度低的蛋白质不能被有效地检测出来等局限性^[20],另一种基于质谱检测技术的定量蛋白质组学研究方法:同位素标记相对和绝对定量技术(isobaric tags for relative and absolute quantitation, iTRAQ),因其几乎可以对样本中的每个蛋白质的多个氨基及侧链氨基酸进行标记;可同时对8个不同样本进行定量比较;对其他定量技术无法检测的蛋白质,如膜蛋白等疏水蛋白质和对修饰后的氨基酸,如磷酸化蛋白等也可进行定量研究等优势已逐渐取代传统的研究方法^[21-22]。Sheoran等^[23]用双向电泳(2-DE)和双向差异凝胶电泳(two dimension difference gel electrophoresis, 2-D DIGE)的试验方法研究了野生型和7B-1雄性不育突变体番茄的花药蛋白质组;Dahal等^[24]用2-DE的方法研究了易感病的番茄品种NHG3和抗病品种NHG13在青枯菌侵染后的茎秆蛋白质组。综合国内外文献,尚未见到从土壤蛋白质组学的角度研究硅诱导病害的抗性。本研究选用易感青枯病的番茄品种“台湾红圣女”为试验材料,结合iTRAQ定量蛋白质组学的研究方法,从土壤蛋白质组学角度对硅增强番茄青枯病抗性的作用机理进行了有益的探索,研究结果可为解释硅调控土壤微生态、增强土传病害抗性提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

番茄(*Solanum lycopersicum*)选用易感青枯病的品种“台湾红圣女”作为试验材料,由吉林省科丰种业股份有限公司生产,所用青枯菌的菌种为生理小种1生化型III,由华南农业大学园艺学院提供。供试土壤为番茄与水稻轮作土壤。土壤基本理化性状为:有机质 15.70 g kg^{-1} ,全氮 0.96 g kg^{-1} ,全磷 1.13 g kg^{-1} ,碱解氮 99.91 mg kg^{-1} ,有效磷 146.4 mg kg^{-1} ,速效钾 88.27 mg kg^{-1} ,电导率 0.12 mS cm^{-1} ,土壤pH 4.92,有效硅 399.1 mg kg^{-1} 。

1.2 试验条件

试验在光照培养箱中进行,番茄种子经 50°C 热水消毒后,置于装有双层湿滤纸的培养皿中,恒温 30°C 发芽,当种子露白时即播种于番茄土:营养土=1:1的基质中,育苗盘置于光照培养箱中,培养箱光照时间为 14 h d^{-1} ,光照强度为 $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$,昼夜温度为 $30^\circ\text{C}/25^\circ\text{C}$,相对湿度为80%。番茄长至三片真叶时移苗于装有2 kg土的盆中,盆直径为17 cm、高16.5 cm,每盆2株。移栽前向土壤中加入尿素 95.7 mg kg^{-1} 、过磷酸钙 235.7 mg kg^{-1} 、氯化钾 48.0 mg kg^{-1} 。移栽后继续置于光照培养箱中,培养条件同上。

1.3 试验设计

试验共有4个处理,分别为对照(CK)、加硅(Si)、青枯菌接种(Rs)以及加硅后接种青枯菌(Si+Rs),每个处理4个重复。硅处理中所用硅为 K_2SiO_3 ,浓度为 $2 \text{ mmol L}^{-1} \text{ kg}^{-1}$ 土壤,不加硅的处理中通过添加等量的KCl来补充 K_2SiO_3 所带的钾。当番茄幼苗长至第5~6片叶时进行青枯菌接种处理。接种方法为伤根灌注法,每盆加入5 ml浓度为 $3 \times 10^8 \text{ CFU ml}^{-1}$ 的青枯菌菌悬液,未接菌处理则加入等体积蒸馏水。接菌后第2天开始每天进行病情指数的调查,直至番茄枯死为止。第7天取样后将一部分根区土迅速放入干冰中,然后转至 -80°C 低温冰箱中保存,用于iTRAQ分析土壤蛋白。

1.4 测定方法

病情指数及土壤有效硅含量测定:青枯病发病情况在接菌后第2天开始观察,至第4天植株出现萎蔫时开始调查病情指数,第7天接菌处理植株全部萎蔫停止调查并取样。病情指数的调查依据方中达^[25]的方法。土壤有效硅含量采用柠檬酸浸提—硅钼蓝比色法测定^[26]。

土壤蛋白分析:(1) iTRAQ试剂的组成及其定量原理。iTRAQ试剂由三个部分组成:一端是报告基团(reporter group),中间部分为平衡基团(balance group),另一端为肽反应基团(peptide reactive group)。报告基团标签分子的分子量分别为113、114、115、116、117、118、119和121 Da,平衡基团标签分子的分子量分别为192、191、190、189、188、187、186和184 Da,报告基团和平衡基团的分子量之和均为305 Da,即同位素标签质量相同。iTRAQ定量原理是iTRAQ试剂的肽反应基团与蛋白质酶解产生的肽段N末端和赖氨酸侧链的氨基基团发生反应,从而实现同位素标记。在串联质谱鉴定

时,报告基团、平衡基团和多肽反应基团之间的键断裂,使平衡基团丢失,产生低质荷比(m/z) (113 - 121)的报告基团离子,根据报告基团离子的丰度可对各样品中的肽段进行相对定量^[21]。

(2)土壤蛋白的提取及定量。土壤蛋白质组的提取采用同位素标记相对和绝对定量(iTRAQ)的方法。提取步骤如下:①将土壤样品 20 g 放入 800 ml 烧杯中,加入 500 ml 2% 十二烷基硫酸钠(SDS)于室温搅拌过夜;②用离心桶分批次 $3\ 000 \times g$ 离心 30 min;③上清液用 10 KD 滤膜浓缩至 5 ml,加入终浓度为 $1\ \text{mmol L}^{-1}$ 的苯甲基磺酰氟(PMSF)、 $2\ \text{mmol L}^{-1}$ 的乙二胺四乙酸(EDTA),5 min 后加入终浓度为 $10\ \text{mmol L}^{-1}$ 的二硫苏糖醇(DTT);④加入 5 倍体积的 10% 三氯乙酸(TCA)丙酮溶液, -20°C 沉淀过夜;⑤ 4°C 条件下 $30\ 000 \times g$ 离心 15 min,除上清。向沉淀加入适量纯净冷丙酮,重复洗涤,在 -20°C 沉淀至少 30 min, $30\ 000 \times g$ 离心 15 min 除上清;⑥重复第 5 步三次;⑦简单风干沉淀中残余丙酮,加入裂解缓冲液 $500\ \mu\text{l}$,冰浴超声 15 min;⑧ 4°C 条件下 $30\ 000 \times g$ 离心 15 min,取上清;⑨加入终浓度 $10\ \text{mmol L}^{-1}$ 的 DTT, 56°C 水浴 1 h;⑩加入终浓度 $55\ \text{mmol L}^{-1}$ 的碘乙酰胺(IAM),暗室放置 45 min;⑪用 4 倍体积的丙酮沉淀蛋白液 30 min, $30\ 000 \times g$ 离心 15 min 除上清;⑫简单风干沉淀中残余丙酮,加入 $0.5\ \text{mol L}^{-1}$ 四乙基溴化铵(TEAB) $500\ \mu\text{l}$,冰浴超声 15 min,溶液即为蛋白溶液;⑬取 $10\ \mu\text{g}$ 进行 SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳)上样,并用考马斯亮蓝染色。蛋白定量采用 GE 公司生产的 2-D Quant Kit 试剂盒进行定量。

(3)胰蛋白酶解与标记。取 $100\ \mu\text{g}$ 蛋白样品按照 30:1 (蛋白:酶)的比例加入 $1\ \mu\text{g}\ \mu\text{l}^{-1}$ 的胰蛋白酶, 37°C 酶解过夜。取 $0.5\ \mu\text{l}$ 酶解后液体,加入 $10\ \mu\text{l}$ 浓度为 0.1% 的不饱和脂肪酸,用微量层析柱(Zip-Tip)除盐,进行基质辅助激光解吸电离(MALDI)点靶并检测消化情况。取出标记试剂,各加入异丙醇 $60\ \mu\text{l}$,混匀离心后,用不同大小的同位素标记不同样品,其中:113 标记 CK, 115 标记 Rs, 119 标记 Si, 121 标记 Si + Rs。混匀后离心,室温静置反应 2 h。

(4)高效液相色谱(HPLC)分离肽段及 SCX 分级。试验所用液相色谱为安捷伦(Agilent)公司生产的 1100 系列。流动相 A 液: $10\ \text{mmol L}^{-1}\ \text{KH}_2\text{PO}_4$, 25% 乙腈(ACN), pH 3.0, B 液: $10\ \text{mmol L}^{-1}\ \text{KH}_2\text{PO}_4$, $2\ \text{mol L}^{-1}\ \text{KCl}$, 25% ACN, pH 3.0, 用

$0.22\ \mu\text{m}$ 滤膜过滤且标记的样品用 A 液稀释 10 倍。色谱柱中一维阳离子交换柱为 Phenomenex Luna 5u SCX 100 A ($250 \times 4.60\ \text{mm}\ 5\ \text{micron}$), 二维反相柱为 strata-X 33u Polymeric Reversed Phase $10\ \text{mg ml}^{-1}$ (Part No. 8 B-S 100-AAK), 总流速为 $1\ \text{ml min}^{-1}$ 。洗脱完之后用 strata 除盐柱除盐。

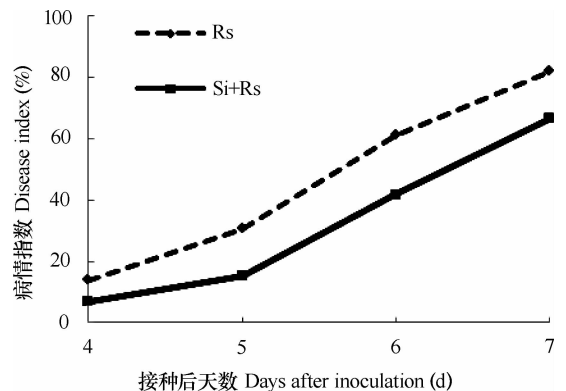
(5) LC-MS/MS 质谱鉴定。将样品用 $20\ \mu\text{l}$ 0.1% 甲酸复溶,然后进入 LC-MS/MS (液相色谱串联质谱联用法) (Thermo Scientific 公司生产的 Q Exactive) 检测,进样量 $10\ \mu\text{l}$ 。质谱条件为,流动相 A: H_2O , 0.1% FA (富里酸), B: ACN, 0.1% FA; 色谱柱为 C 18 反相色谱微柱 ($100\ \text{mm} \times 75\ \mu\text{m}$, $5\ \text{micron}$); 总流速为 $0.000\ 3\ \text{ml min}^{-1}$ 。

(6) 数据库搜索。质谱得到的原始文件(sample. raw) 转换成 mgf 格式(sample. mgf) 后, 导入 mascot 分析软件, 得到最终蛋白信息, 再用 Scaffold 对蛋白进行定量分析, 最后用 Panther 进行蛋白分类(<http://www.pantherdb.org/>)。

2 结 果

2.1 硅处理和青枯菌侵染对番茄生长和病情指数的影响

番茄植株感染青枯菌后生长受到严重抑制, 加硅能显著延缓青枯菌的侵染, 增强对病害的抗性(图 1)。与接菌(Rs)相比, 加硅处理(Si + Rs)能显著降低青枯病的病情指数。接菌后第 4、5、6 和 7 天, 加硅处理分别降低青枯病的病情指数 6.9%、15.3%、19.4% 和 15.3%。



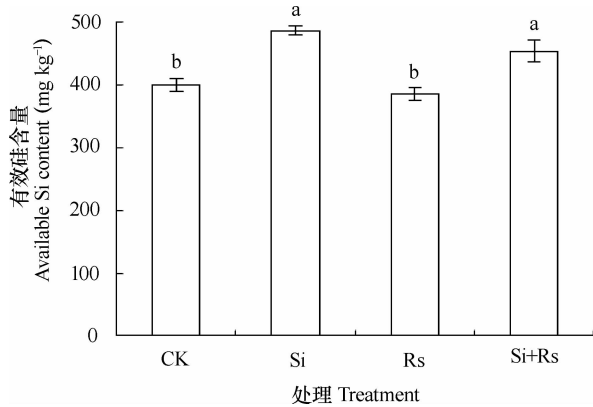
注:Rs:青枯菌接种;Si + Rs:加硅后接种青枯菌 Note: Rs: *R. solanacearum* inoculation; Si + Rs: Si application and *R. solanacearum* inoculation

图 1 硅和青枯菌接种对番茄病情指数的影响

Fig. 1 Effects of Si application and *R. solanacearum* inoculation on disease index of tomato

2.2 硅处理对土壤有效硅含量的影响

硅及青枯菌处理对盆栽土壤中有有效硅含量的影响见图 2。从图 2 可以看出, 无论接菌与否, 硅的加入均能显著提高土壤有效硅的含量。加硅处理较对照的土壤有效硅含量增加了 21.7%, 加硅后接种较单独接种增加了 17.6%, 且无论加硅还是不加硅, 接菌处理对土壤有效硅含量均无显著影响。



注: CK: 对照; Si: 加硅; Rs: 青枯菌接种; Si + Rs: 加硅后接种青枯菌。不同处理中字母不同者为达到 5% 水平显著差异, 下同 Note: CK: Control; Si: Si application; Rs: *R. solanacearum* inoculation, Si + Rs: Si application and *R. solanacearum* inoculation. Different letters mean significant difference between treatments at the level of 5%. The same as below

图 2 硅和青枯菌接种对土壤有效硅含量的影响

Fig. 2 Effects of Si application and *R. solanacearum* inoculation on soil available Si content

2.3 硅和青枯菌接种对土壤蛋白的影响

2.3.1 土壤蛋白的 SDS-PAGE

10 μ g 蛋白上样量得到的 SDS-PAGE 电泳图, 见图 3。由于上样量较大, 故样品与标准 (Marker) 之间空出一个泳道。从图 3 可以看出, 虽然电泳带有渗漏, 但是各个处理蛋白条带之间一致性较好。

2.3.2 差异蛋白鉴定及功能分析

经过 LC-MS/MS 鉴定和 Scaffold 蛋白定量分析共鉴定了 30 个土壤蛋白, 见表 1。除 17 号蛋白外, 其余 29 个为差异表达蛋白 (上调 ≥ 1.2 倍, 下调 ≤ 0.8 倍)。由表 1 可以发现, 这些差异蛋白的等电点最低为 4.1, 最高为 10.7, 相对分子量位于 9 ~ 392 kDa 之间, 置信度 $\geq 95\%$ 。

在这些蛋白中, 硅处理与对照相比 (Si/CK) 有 5 个蛋白上调, 19 个蛋白下调; 接菌与对照相比 (Rs/CK) 有 5 个蛋白上调, 22 个蛋白下调; 硅处理加接菌与单独接菌处理相比 (Si + Rs/Rs) 有 8 个蛋白上调, 14 个蛋白下调 (图 4)。

为了分析硅和青枯菌处理对番茄根系土壤蛋

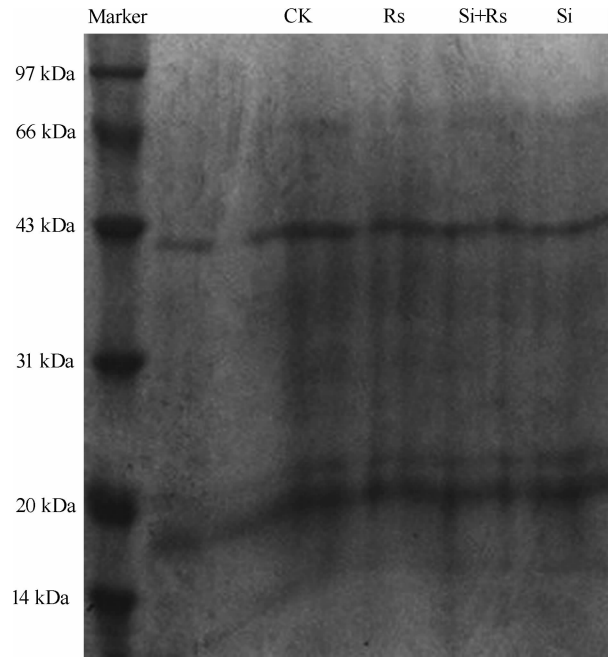


图 3 不同处理土壤蛋白的 SDS-PAGE 图谱

Fig. 3 SDS-PAGE graphs of soil proteins in different treatments

白的影响, 将所有差异表达蛋白进行基因功能分类 (gene ontology, GO) (图 5)。结果表明, 用蛋白质参与的生物过程 (Biological Process) 作为分类依据进行分类时, 29 个差异蛋白有 21.88% 参与的是代谢过程 (metabolic process), 如泛素、果糖-二磷酸醛缩酶; 15.63% 参与的是细胞过程 (cellular process), 如微管蛋白 β -1、钙调蛋白-1; 12.50% 参与细胞交流 (cell communication), 如 14-3-3 蛋白 ζ 。此外, 免疫系统过程 (immune system process) 和胁迫响应 (response to stimulus) 也各占了 3.13% 比例, 如芳基硫酸酯酶 A 和钙调蛋白-1。

以差异蛋白的分子功能 (Molecular Function) 作为分类依据进行分类可以看出, 结构分子活性 (structural molecule activity) 蛋白 (25.64%), 如原肌球蛋白-1、40 S 核糖体蛋白 S 14 A; 结合 (binding) 蛋白 (25.64%), 如真核翻译起始因子 3 亚基 C; 催化活性 (catalytic activity) 相关蛋白 (20.51%), 如芳基硫酸酯酶 A, 占了绝大多数。

按不同的蛋白质种类 (Protein Class) 进行分类可以发现, 核酸结合蛋白 (nucleic acid binding), 如 60 S 核糖体蛋白 L 15; 水解酶 (hydrolase) 蛋白, 如钙调蛋白-1; 细胞骨架蛋白 (cytoskeletal protein), 如质膜钙运输 ATP 酶 4、内质网型钙运输 ATP 酶, 是三类主要蛋白, 分别占了 19.51%、14.63% 和 9.76% 的比例。

表 1 LC-MS/MS 鉴定的 30 个土壤蛋白具体信息
Table 1 The specific information of 30 soil proteins identified by LC-MS/MS

序号 Group ID	基因名 Gene symbol	蛋白名称 Protein name	分子量 MW (kDa)	等电点 pI	置信度 Protein identification probability	差异表达 Differential expression		
						Si vs CK	Rs vs CK	Si + Rs vs Rs
1	<i>ef1-alpha</i>	Elongation factor 1-alpha 延伸因子 1- α	50	9.2	100%	1.3	1.3	0.9
2	<i>FIBH</i>	Fibroin heavy chain 丝蛋白重链	392	4.4	100%	0.5	1.1	0.7
3	<i>RpS21</i>	40S ribosomal protein S21 40S 核糖体蛋白 S21	9	7.7	100%	1.1	1.3	1.5
4	<i>ARSA</i>	Arylsulfatase A 芳基硫酸酯酶 A	54	5.7	100%	1.5	1.3	1.1
5	<i>Tm1</i>	Tropomyosin-1, isoforms9A/A/B 原肌球蛋白-1,9A/A/B 亚型	39	4.9	100%	1.0	1.0	1.3
6	<i>tef2</i>	Translation elongation factor 2 翻译延伸因子 2	95	6.1	100%	0.8	0.8	0.6
7	<i>PSMC2</i>	26S protease regulatory subunit 7 26S 蛋白酶调控亚基 7	49	5.7	100%	0.6	0.5	0.8
8	<i>GFP</i>	Green fluorescent protein 绿色荧光蛋白	27	5.7	100%	1.1	0.1	1.0
9	<i>14-3-3zeta</i>	14-3-3 protein zeta 14-3-3 蛋白	28	4.9	100%	0.8	0.6	1.3
10	<i>sfrs1a</i>	Splicing factor, arginine/serine-rich1A 精氨酸/丝氨酸富集的剪接因子 1A	28	10.3	99%	0.8	0.7	1.6
11	<i>act10</i>	Actin-10 肌动蛋白-10	42	5.2	100%	0.5	0.4	0.5
12	<i>RPS14A</i>	40S ribosomal protein S14-A 40S 核糖体蛋白 S14-A	15	10.7	100%	0.7	0.6	1.2
13	<i>ubiquitin</i>	Ubiquitin 泛素蛋白	9	6.6	99%	0.7	0.6	1.2
14	<i>tatB</i>	Sec-independent protein translocase protein tatB homolog 转移酶蛋白 tatB 同系物	18	4.9	95%	0.7	0.7	1.1
15	<i>Bcer98_1107</i>	UPF0753 protein Bcer98_1107 UPF0735 蛋白	100	7.2	95%	0.4	0.6	0.5
16	<i>PHF5A</i>	PHD finger-like domain-containing protein5A PHD 类指域蛋白 5A	12	8.8	100%	0.9	0.8	1.6
17	<i>RPS3A</i>	40S ribosomal protein S3-1 40S 核糖体蛋白 S3-1	28	9.6	100%	0.9	0.9	0.9
18	<i>pepA</i>	Probable cytosol aminopeptidase 胞液氨基肽酶	49	8.5	100%	1.2	0.7	0.9

续表

序号 Group ID	基因名 Gene symbol	蛋白名称 Protein name	分子量 MW (kDa)	等电点 pI	置信度 Protein iden- tification probability	差异表达 Differential expression		
						Si vs CK	Rs vs CK	Si + Rs vs Rs
19	<i>RpL17</i>	60S ribosomal protein L17 60S 核糖体蛋白 L17	22	10.4	100%	1.3	1.2	0.8
20	<i>CAM1</i>	Calmodulin-1 钙调蛋白-1	17	4.1	100%	0.7	0.6	0.7
21	<i>Chc</i>	Clathrin heavy chain 网格蛋白重链	191	5.5	100%	0.7	0.6	0.8
22	<i>eIF3-S8</i>	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit C 真核翻译起始因子 3 亚基 C	102	6.3	100%	0.5	0.4	1.5
23	<i>eIF3A</i>	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I 真核翻译起始因子 3 亚基 I	37	5.7	100%	0.4	0.5	0.6
24	<i>LTV1</i>	Protein LTV1 homolog LTV 蛋白同系物	55	4.8	100%	0.6	0.8	0.9
25	<i>TUBB1</i>	Tubulin beta-1 chain β 微管蛋白	50	5.9	99%	0.6	0.5	0.6
26	<i>RpL5</i>	60S ribosomal protein L5 60S 核糖体蛋白 L5	34	10.0	98%	1.7	1.3	0.8
27	<i>Ald</i>	Fructose-bisphosphate aldolase 果糖-二磷酸醛缩酶	39	6.0	97%	0.9	0.6	0.8
28	<i>Atp2b4</i>	Plasma membrane calcium-transporting ATPase 4 质膜钙运输 ATP 酶 4	133	6.2	100%	0.6	0.5	1.0
29	<i>Ca-P60A</i>	Calcium-transporting ATPase endoplasmic reticulum type 内质网型钙运输 ATP 酶	112	5.0	100%	0.7	0.8	0.8
30	<i>Samui</i>	BAG domain-containing protein Samui BAG 域蛋白	76	5.4	97%	0.7	0.8	0.8

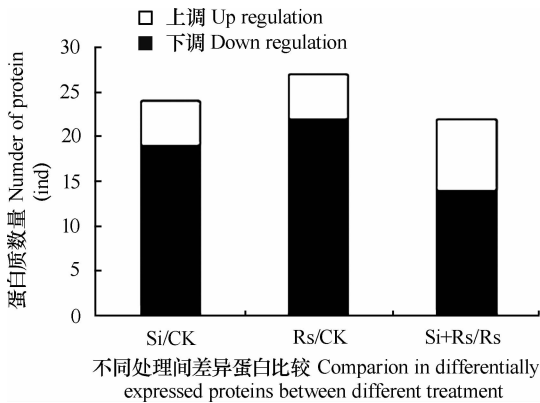


图 4 硅和青枯菌接种差异表达的土壤蛋白数量
Fig. 4 Number of differentially expressed soil proteins as affected by Si and/or *R. solanacearum* inoculation

为更好了解加硅后接菌和接菌对土壤蛋白的影响,将 Si + Rs/Rs 得到的 22 个差异蛋白进一步分析,结果见图 6。由图 6 可以看出,与接菌相比,加硅后接菌处理有 8 个蛋白上调表达,上调最高可达 1.6 倍,如 PHD 类指域蛋白 5 A (1.6 倍差异)、40 S 核糖体蛋白 S 21 (1.5 倍差异)、14-3-3 蛋白 ζ (1.3 倍差异);下调的 14 个蛋白中,最低下调倍数为 0.5 倍,如肌动蛋白 - 10 (0.5 倍差异)、微管蛋白 β-1 (0.6 倍差异)、钙调蛋白-1 (0.7 倍差异)。

图 7 是 Si + Rs/Rs 得到的 22 个差异蛋白的 GO 功能分类。由图可以看出,加硅对青枯病的影响主要是改变生物过程中的代谢过程(如 40 S 核糖体蛋白 S 21)和细胞过程(如 β 微管蛋白),分子功能中

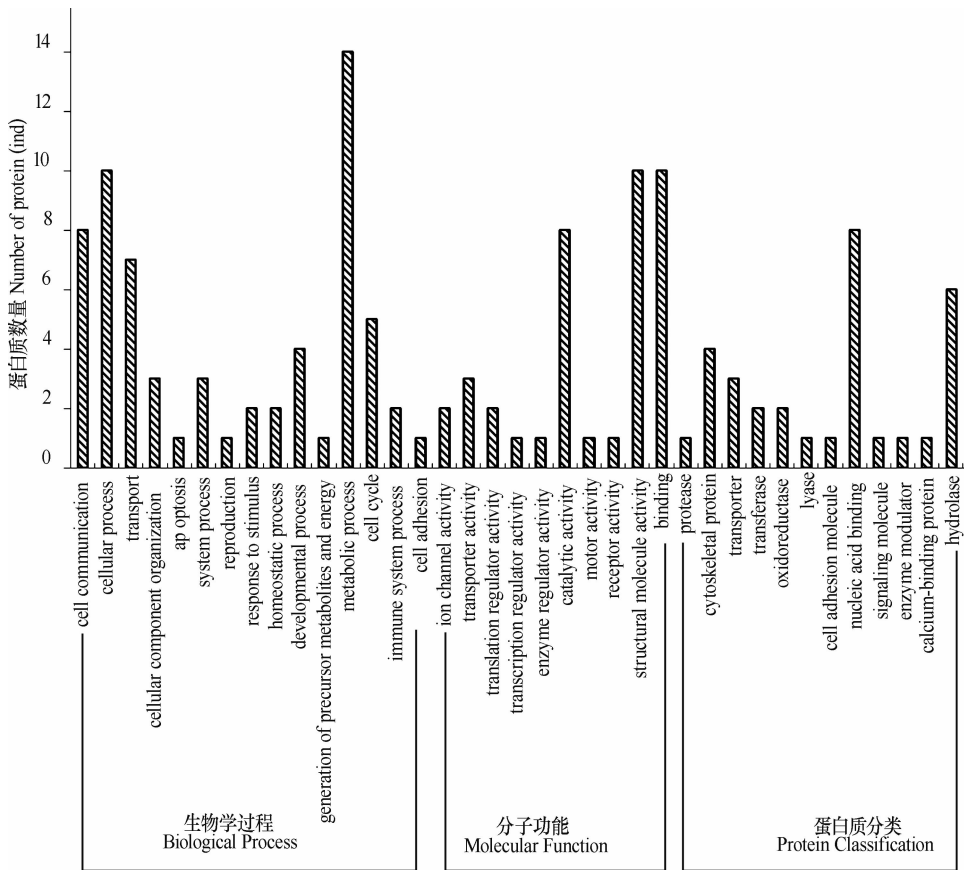


图 5 29 个土壤差异蛋白的 GO 功能分类

Fig. 5 GO analysis of 29 differentially expressed proteins

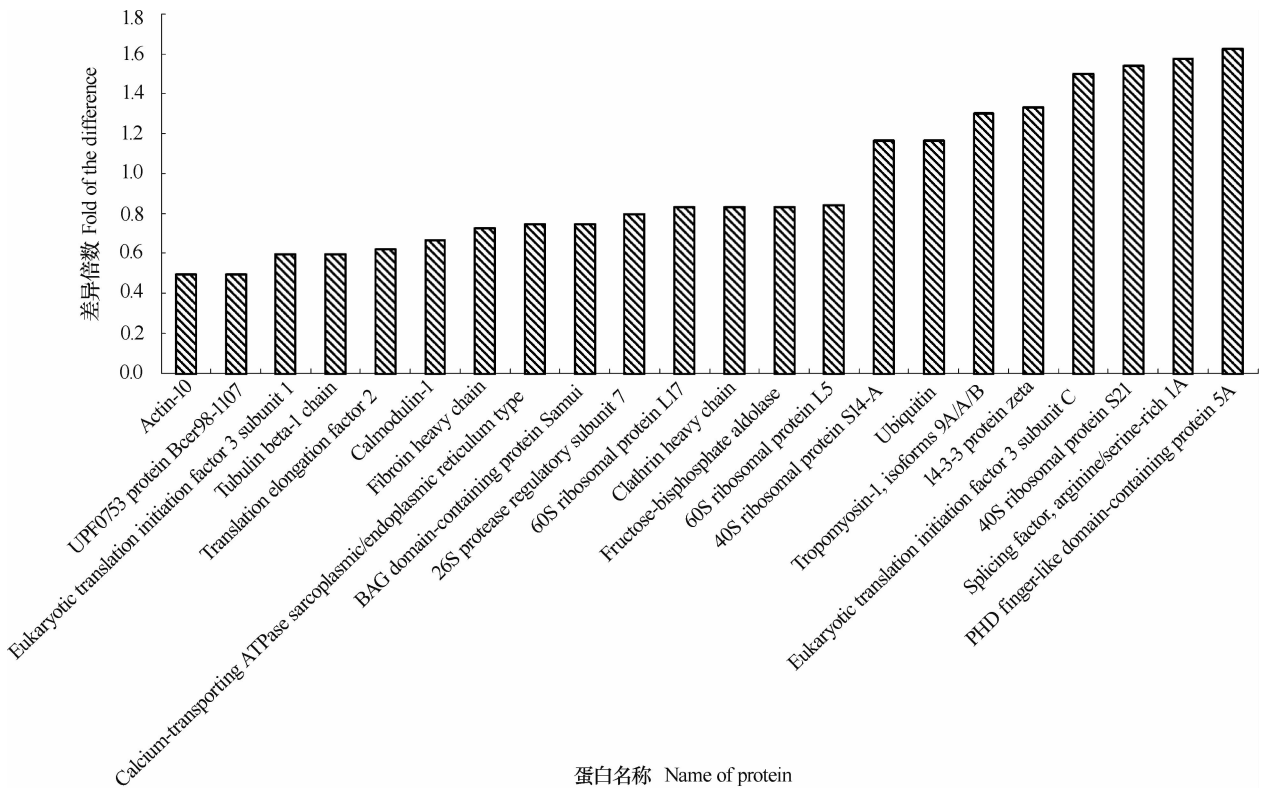


图 6 Si + Rs/Rs 差异蛋白的差异倍数

Fig. 6 Fold of the difference in differentially expressed proteins between Treatments Si + Rs and Rs

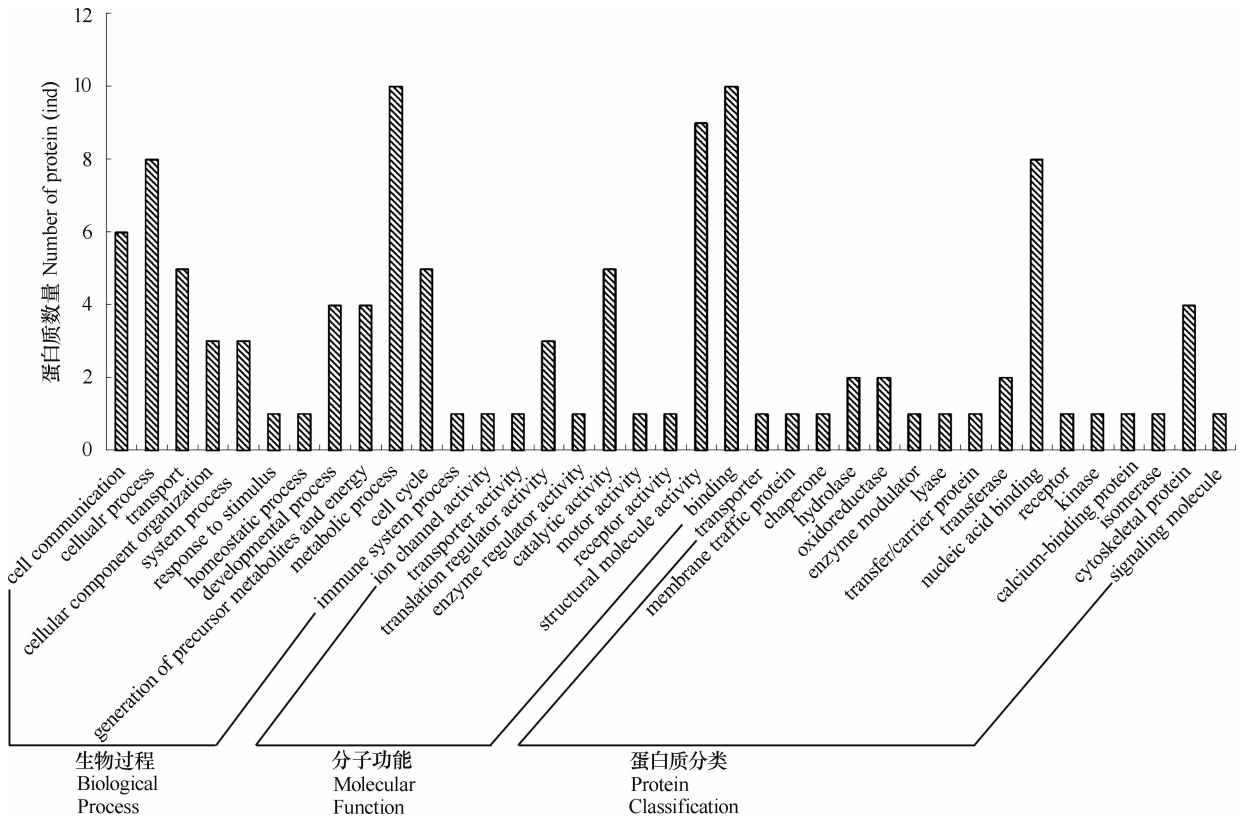


图7 Si + Rs/Rs 差异蛋白 GO 功能分析

Fig. 7 GO functional analysis of differentially expressed proteins in Treatments Si + Rs and Rs

的结合蛋白(如钙调蛋白-1)和结构分子活性蛋白(如原肌球蛋白-1)以及蛋白质分类中的核酸结合类蛋白(如真核翻译起始因子3亚基I)和细胞骨架蛋白(如肌动蛋白-10)。

3 讨论

3.1 硅对番茄青枯病抗性的影响

本研究表明,硅处理能显著降低青枯病的病情指数,且加硅后土壤有效硅含量明显上升,说明硅对番茄青枯病有一定的防治能力,与 Dannon 和 Wydra^[13] 研究结果相似。关于硅提高青枯病的抗性的作用机制,有研究认为与硅的物理屏障作用有关^[14],即加硅后增强了番茄根系细胞壁的抗病能力。Ghareeb 等^[15] 研究认为硅诱导植物产生抗性信号分子,调控抗病基因如茉莉酸和乙烯标记基因、氧化胁迫标记基因的表达及看家基因 *PGK*、*TUB* 和 *ACT* 的表达稳定性。Wang 等^[16] 从土壤微生物角度研究表明,在接种青枯菌条件下,硅处理能降低土壤青枯菌的数量,增加土壤中细菌和放线菌的数量,降低真菌/细菌比值,增加土壤酸性磷酸酶和脲酶的活性,从而使感病土壤恢复到与健康土壤类

似的微生物数量和组成状态。因此硅肥作为一种环境友好型的新型病害综合防治措施,对于降低农产品中农药残留、为人类食品安全提供保障具有重要的现实意义。

3.2 硅介导的青枯病抗性与土壤蛋白的关系

土壤蛋白质组学能够从一个宏观的角度来研究土壤生态系统,研究内容主要包括土壤微生物蛋白质组,以及部分土壤动物和植物分泌的蛋白质组^[27]。本文将 29 个差异蛋白进行 GO 基因功能分类的结果表明,加硅或/和接菌处理主要改变代谢过程、细胞过程以及细胞交流等生物学过程,还有少量蛋白参与的是免疫过程和胁迫响应。泛素是一种由 76 个氨基酸组成的普遍存在于大多数真核细胞中的小蛋白,它能与蛋白酶体结合,形成泛素/蛋白酶体系统,参与蛋白质代谢,降解受损伤或不需要的蛋白质,在该系统中,泛素的作用是标记需要水解的靶蛋白^[28]。Hieng 等^[29] 研究了干旱对菜豆蛋白酶体的影响表明,干旱能导致错误或未折叠蛋白的积累。本文中,接菌处理泛素(No. 13)下调表达,直接影响了泛素/蛋白酶体系统和错误折叠蛋白的水解,而加硅及接菌处理泛素上调表达,说明硅能使微生物的错误蛋白降解和代谢恢复正常。

果糖-二磷酸醛缩酶是一种糖解酶,能催化可逆的醇醛分裂或者缩合果糖-1,6-双磷酸果糖成磷酸二羟丙酮和三磷酸甘油醛^[30]。Alves 等^[31]研究了长期硼缺失对羽扇豆根系蛋白质组的影响,结果表明,硼胁迫能抑制果糖-二磷酸醛缩酶等糖代谢相关蛋白的产生。本文接种青枯菌后果糖-二磷酸醛缩酶(No. 27)下调表达,可能是接菌影响了土壤微生物代谢能力,从而使与土壤代谢相关的蛋白下调表达。14-3-3 蛋白是一种与信号转导有关的蛋白,属于高度保守的酸性蛋白质家族,对植物响应逆境胁迫有重要作用,如能调节信号与转录相关蛋白的表达^[32]。Guo 等^[32]研究表明 3 个 14-3-3 蛋白在两种不同小麦品种响应盐胁迫时均下调表达。本文中,14-3-3 蛋白 ζ (No. 9)接菌后下调表达,说明青枯菌影响了土壤微生物的信号转导,而加硅后接菌处理 14-3-3 蛋白 ζ 则上调表达,说明加硅促进了土壤信号物质的传递,增强了细胞间的信号交流。

从分子功能角度对蛋白质进行分类,本研究所检测的差异蛋白主要参与的是结构分子活性、结合以及催化活性相关蛋白。核糖体蛋白是核糖体的组成部分,能与核酸共同形成核糖体,参与蛋白质的生物合成。Yang 等^[33]研究了长期磷缺失对甜橙根系蛋白的影响,结果表明核糖体相关蛋白均下调表达。本文中,40 S 核糖体蛋白 S14 A(No. 12)接菌后下调表达,说明接菌影响了微生物的蛋白合成,而加硅后接菌处理该蛋白又上调表达,说明硅能使青枯病造成的蛋白质的合成受阻恢复正常。芳基硫酸酯酶主要作用于芳香硫酸酯使之游离出无机硫酸的酶,在土壤硫循环和植物硫营养中扮演重要角色。土壤中的芳基硫酸酯酶主要来自土壤微生物(尤其是真菌)和植物分泌^[34]。接菌处理后,土壤芳基硫酸酯酶 A(No. 4)上调表达,原因是接种后土壤向真菌型转化,导致了该酶增多。真核翻译起始因子是一类参与真核翻译起始阶段的蛋白质^[33],通过这些真核起始因子之间以及不同的真核起始因子与核糖体、mRNA 和起始 tRNA 之间的相互作用,可以完成真核生物的翻译起始。Dahal 等^[35]研究了感病和抗病番茄品种接种青枯菌后茎干细胞壁蛋白质组,结果表明在抗病品种中,真核翻译起始因子 5A-3 下调表达。本文中,真核翻译起始因子 3 亚基 C 接菌后下调表达,可能是接菌降低了土壤微生物的繁殖和分化,进而影响蛋白质的合成,但是加硅后接菌又上调表达,说明硅可能通过增加土壤生物的多样性以及提高与抗病性相关蛋

白的表达来抵抗青枯病的危害。

对差异蛋白进行蛋白质种类的分类结果表明,这些蛋白主要是核酸结合蛋白、水解酶蛋白和细胞骨架蛋白。钙调蛋白是一种水解酶蛋白,能与 Ca^{2+} 结合并调节 Ca^{2+} 依赖的细胞生理活动^[36]。细胞骨架蛋白,如质膜钙运输 ATP 酶 4 以及内质网型钙运输 ATP 酶均能够催化 ATP 水解同时转运 Ca^{2+} 。当植物受到外界刺激时,能将胞外的 Ca^{2+} 通过 Ca^{2+} 运输通道运输至胞内,并与钙调蛋白结合引起植物的生理生化反应,信息传递完成后,又通过 ATP 酶水解等过程将 Ca^{2+} 运出胞外,这个过程称为钙的信号转导^[37]。Yang 等^[33]用 iTRAQ 的试验方法研究了长期磷缺失对甜橙根系蛋白的影响,结果表明,与 Ca^{2+} 传感相关蛋白,如钙调蛋白,均下调表达。Jiang 等^[38]研究了不同浓度的 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 对番茄青枯病的影响,结果表明,接种青枯菌后 20 天,高浓度的钙处理(25 mmol L^{-1})与低浓度的钙(0.5 mmol L^{-1})相比,青枯病病情指数降低了 43.2%。本文中,钙调蛋白-1(No. 20)、质膜钙运输 ATP 酶 4(No. 28)以及内质网型钙运输 ATP 酶(No. 29)接菌之后下调表达,可能原因是接菌影响了土壤中的 Ca^{2+} 的转导,所以与 Ca^{2+} 结合相关的蛋白相应下调,而单独加硅处理这几个蛋白也下调表达,可能原因是硅的诱导抗性与 Ca^{2+} 信号转导功能类似,所以加硅处理能下调与 Ca^{2+} 信号转导相关蛋白的表达。

对影响接菌和加硅后接菌的 22 个差异蛋白的进一步研究表明,硅对青枯病的作用主要是改变代谢过程以及结合蛋白,特别是核酸结合蛋白的变化。说明硅主要是改变土壤微生物的抗性代谢及调控蛋白质的合成与翻译来抑制青枯菌的侵染。

4 结 论

硅处理能显著降低番茄青枯病的病情指数,增强植株抗病能力。基于 iTRAQ 定量蛋白质组学技术的研究结果表明,加硅或/和接菌处理主要改变的是代谢过程、细胞过程以及细胞交流等生物学过程,影响结构分子活性、结合及催化活性相关的分子功能和核酸结合蛋白、水解酶蛋白以及细胞骨架等相关的蛋白质。番茄感染青枯病之后,能下调土壤代谢相关蛋白质的表达,影响错误折叠蛋白质的降解,阻碍土壤微生物与植物或微生物之间的信号交流和 Ca^{2+} 的信号转导,使蛋白的合成受阻;而硅

则通过改变土壤微生物代谢能力,调控与抗性代谢相关蛋白的表达,增加土壤微生物之间或微生物与植物的信号交流与传递,调控土壤蛋白质的合成,调节免疫系统过程和胁迫响应有关蛋白的表达,影响钙离子的信号转导等来抵抗青枯病的危害。

参 考 文 献

- [1] Wicker E, Grassart L, Coranson-Beaudu R, et al. *Ralstonia solanacearum* Strains from Martinique (French West Indies) exhibiting a new pathogenic potential. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 71: 6790—6801
- [2] 卓国豪. 温度和病原接种浓度对番茄青枯病菌感染的影响. *植物检疫*, 2005, 19(3): 143—144. Zhuo G H. Effects of temperature and inoculating concentration on infection by *Pseudomonas solanacearum* (In Chinese). *Plant Quarantine*, 2005, 19(3): 143—144
- [3] Pradhanang P M, Momol M T, Olson S M, et al. Effects of plant essential oils on *Ralstonia solanacearum* population density and bacterial wilt incidence in tomato. *Plant Disease*, 2003, 87: 423—427
- [4] 梅新兰, 赵青云, 谭石勇, 等. 辣椒疫病拮抗菌株筛选、鉴定及其防效. *应用生态学报*. 2010, 21(10): 2652—2658. Mei X L, Zhao Q Y, Tan S Y, et al. Screening, identification, and biocontrol effect of antagonistic bacteria against *Phytophthora capsici* (In Chinese). *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2010, 21(10): 2652—2658
- [5] 蔡燕飞, 廖宗文, 章家恩, 等. 生态有机肥对番茄青枯病及土壤微生物多样性的影响. *应用生态学报*, 2003, 14(3): 349—353. Cai Y F, Liao Z W, Zhang J E, et al. Effect of ecological organic fertilizer on tomato bacterial wilt and soil microbial diversities (In Chinese). *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2003, 14(3): 349—353
- [6] Epstein E. The anomaly of silicon in plant biology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1994, 91: 11—17
- [7] 杨艳芳, 梁永超. 施硅对感染白粉病小麦叶片抗病相关酶活性及硅微域分布的影响. *土壤学报*, 2010, 47(3): 515—522. Yang Y F, Liang Y C. Activities of defence-related enzymes and micro-regional distribution of silicon in leaves of powdery mildew-infected wheat as affected by extraneous silicon (In Chinese). *Acta Pedologica Sinica*, 2010, 47(3): 515—522
- [8] Cai K Z, Gao D, Luo S M, et al. Physiological and cytological mechanisms of silicon-induced resistance in rice against blast disease. *Physiologia Plantarum*, 2008, 134(2): 324—333
- [9] Kablan L, Lagauche A, Delvaux B, et al. Silicon reduces black sigatoka development in banana. *Plant Disease*, 2012, 96(2): 273—278
- [10] 陈伟, 蔡昆争, 陈基宁. 硅和干旱胁迫对水稻叶片光合特性和矿质养分吸收的影响. *生态学报*, 2012, 32(8): 2620—2627. Chen W, Cai K Z, Chen J N. Effects of silicon application and drought stress on photosynthetic traits and mineral nutrient absorption of rice leaves (In Chinese). *Acta Ecologica Sinica*, 2012, 32(8): 2620—2627
- [11] 韩永强, 刘川, 侯茂林. 硅介导的水稻对二化螟幼虫钻蛀行为的影响. *生态学报*, 2010, 30(21): 5967—5974. Hang Y Q, Liu C, Hou M L. Silicon-mediated effects of rice plants on boring behavior of *Chilo suppressalis* larvae (In Chinese). *Acta Ecologica Sinica*, 2010, 30(21): 5967—5974
- [12] 高丹, 陈基宁, 蔡昆争, 等. 硅在植物体内的分布和吸收及其在病害逆境胁迫中的抗性作用. *生态学报*, 2010, 30(10): 2745—2755. Gao D, Chen J N, Cai K Z, et al. Distribution and absorption of silicon in plant and its role in plant disease resistance under environmental stress (In Chinese). *Acta Ecologica Sinica*, 2010, 30(10): 2745—2755
- [13] Dannon E A, Wydra K. Interaction between silicon amendment, bacterial wilt development and phenotype of *Ralstonia solanacearum* in tomato genotypes. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 2004, 64: 233—243
- [14] Diogo R V C, Wydra K. Silicon-induced basal resistance in tomato against *Ralstonia solanacearum* is related to modification of pectic cell wall polysaccharide structure. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 2007, 70: 120—129
- [15] Ghareeb H, Bozsó Z, Ott P G, et al. Transcriptome of silicon-induced resistance against *Ralstonia solanacearum* in the silicon non-accumulator tomato implicates priming effect. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 2011, 75: 83—89
- [16] Wang L, Cai K Z, Chen Y T, et al. Silicon-mediated tomato resistance against is associated with modification of soil microbial community structure and activity. *Biological Trace Element Research*, 2013, 152(2): 275—283
- [17] 余万科. 番茄施硅、钾肥对青枯病的抗性. *长江蔬菜*, 1992(4): 45—46. Yu W K. Application of silicon and potash to bacterial wilt of tomato (In Chinese). *Journal of Changjiang Vegetables*, 1992(4): 45—46
- [18] Ghareeb H, Bozsó Z, Ott P G, et al. Silicon and *Ralstonia solanacearum* modulate expression stability of housekeeping genes in tomato. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 2011, 75: 176—179
- [19] 陈洁. iTRAQ 及非标定量方法分析百合纲类植物叶绿体差异蛋白. 上海: 复旦大学化学系, 2012. Chen J. iTRAQ and label-free quantitative were used to analyse differential proteome of plant chloroplast (In Chinese). Shanghai: Department of Chemistry, Fudan University, 2012
- [20] 秦志英. 基于 iTRAQ 技术的小麦 BNS 雄性不育差异表达蛋白分离鉴定与分析. 河南新乡: 河南科技学院, 2013. Qin Z Y. Separation, identification and analysis of differential expressed proteins of wheat BNS male sterility line based on iTRAQ method (In Chinese). Xinxiang, Henan: Henan Institute of Science and Technology, 2013
- [21] 王林纤, 戴勇, 涂植光. iTRAQ 标记技术与差异蛋白质组学的生物标志物研究. *生命的化学*, 2010, 30(1): 135—140. Wang L Q, Dai Y, Tu Z G. iTRAQ labeling and biomarker discovery in comparative proteomic studies (In Chinese). *Chemistry of Life*, 2010, 30(1): 135—140

- [22] 罗治文, 朱樑, 谢谓芬. 同位素标记相对和绝对定量技术研究进展. 中国生物工程杂志, 2006, 26(10): 83—87. Luo Z W, Zhu L, Xie W F. Advances in isobaric tags for relative and absolute quantitation techniques research (In Chinese). China Biotechnology, 2006, 26(10): 83—87
- [23] Sheoran I S, Ross A R S, Olson D J H, et al. Differential expression of proteins in the wild type and 7B-1 male-sterile mutant anthers of tomato (*Solanum lycopersicum*): A proteomic analysis. Journal of Proteomics, 2009, 71: 624—636
- [24] Dahal D, Heintz D, Van Dorsseleer A, et al. Pathogenesis and stress related, as well as metabolic proteins are regulated in tomato stems infected with *Ralstonia solanacearum*. Plant Physiology and Biochemistry, 2009, 47: 838—846
- [25] 方中达. 植病研究方法. 第3版. 北京: 中国农业出版社, 1998: 388. Fang Z D. The methods of plant diseased (In Chinese). 3rd ed. Beijing: China Agriculture Press, 1998: 388
- [26] 戴伟民, 张克勤, 段彬伍, 等. 测定水稻硅含量的一种简易方法. 中国水稻科学, 2005, 19(5): 460—462. Dai W M, Zhang K Q, Duan B W, et al. Rapid determination of silicon content in rice (*Oryza sativa*) (In Chinese). Chinese Journal of Rice Science, 2005, 19(5): 460—462
- [27] Wu L K, Wang H B, Zhang Z X, et al. Comparative metaproteomic analysis on consecutively *Rehmannia glutinosa*-monocultured rhizosphere soil. PLoS One, 2011, 6(5): 1—12
- [28] Smalle J, Vierstra R D. The ubiquitin 26S proteasome proteolytic pathway. Annual Review of Plant Biology, 2004, 55: 555—590
- [29] Hieng B, Ugrinović K, Šuštar-Vozlić J, et al. Different classes of proteases are involved in the response to drought of *Phaseolus vulgaris* L. cultivars differing in sensitivity. Journal of Plant Physiology, 2004, 161: 519—530
- [30] Mininno M, Brugièrè S, Pautre V, et al. Characterization of chloroplastic fructose 1,6-bisphosphate aldolases as lysine-methylated proteins in plants. Journal of Biological Chemistry, 2012, 287: 21034—21044
- [31] Alves M, Moes S, Jenö P, et al. The analysis of *Lupinus albus* root proteome revealed cytoskeleton altered features due to long-term boron deficiency. Journal of Proteomics, 2011, 74: 1351—1363
- [32] Guo G F, Ge P, Ma C Y, et al. Comparative proteomic analysis of salt response proteins in seedling roots of two wheat varieties. Journal of Proteomics, 2012, 75: 1867—1885
- [33] Yang L T, Qi Y P, Lu Y B, et al. iTRAQ protein profile analysis of Citrus sinensis roots in response to long-term boron-deficiency. Journal of Proteomics, 2013, 93: 179—206
- [34] 周礼恺. 土壤酶学. 北京: 科学出版社, 1987. Zhou L K. Soil enzymology (In Chinese). Beijing: Science Press, 1987
- [35] Dahal D, Pich A, Braun H P, et al. Analysis of cell wall proteins regulated in stem of susceptible and resistant tomato species after inoculation with *Ralstonia solanacearum*: A proteomic approach. Plant Molecular Biology, 2010, 73: 643—658
- [36] 孙大业. 钙调节蛋白及其在植物体内的功能. 植物生理学通讯, 1984(6): 13—19. Sun D Y. Calcium regulatory proteins and their functions in plants (In Chinese). Plant Physiology Communications, 1984(6): 13—19
- [37] Galon Y, Finkler A, Fromm H. Calcium-regulated transcription in plants. Molecular Plant, 2010, 3(4): 653—669
- [38] Jiang J F, Li J G, Dong Y H. Effect of calcium nutrition on resistance of tomato against bacterial wilt induced by *Ralstonia solanacearum*. European Journal of Plant Pathology, 2013, 136: 547—555

SOIL QUANTITATIVE PROTEOMIC ANALYSIS OF SILICON-MEDIATED RESISTANCE OF TOMATO (*SOLANUM LYCOPERSICUM*) TO *RALSTONIA SOLANACEARUM*

Chen Yuting Lin Weipeng Fan Xueying Cai Kunzheng[†]

(Key Laboratory of Tropical Agro-environment, Ministry of Agriculture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract Tomato (*Solanum lycopersicum*) is an important economic crop. Bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* is a serious soil-borne disease of Solanaceae crops. Traditional controlling methods, such as cultivation of resistant varieties, crop rotation and use of chemicals, all have certain limitations. Silicon, as a beneficial element to plant growth, plays an important role in enhancing plant adaptability to biotic and abiotic stresses. Proteomics is a new branch of science in post-genome era, focusing on proteomics as object to explore the full extent properties of various proteins, and further on pathogenesis, cell model and functional links of diseases at the protein level. In this study, the variety of tomato “Taiwan red cherry” which is susceptible to *R. solanacearum* was used. The experiment was designed as the following treatments: CK, Treatment Si (Si addition only), Treatment Rs (*R. solanacearum* inoculation only) and Treatment Si + Rs (Si addition followed by *R. solanacearum* inoculation), and the technique of iTRAQ (isobaric tags for relative and absolute quantitation) was used to analyze effects of Si addition on resistance of the tomato to *R. solanacearum*

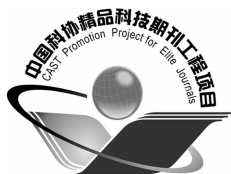
and soil proteome.

Results showed that silicon addition significantly reduced disease index of the tomato crop by 19.4% , increased available silicon content in the soil and enhanced resistance of the tomato to *R. solanacearum*. ITRAQ analysis revealed that out of the 30 soil proteins identified, 29 were differentially expressed (up-regulation ≥ 1.2 fold and down-regulation ≤ 0.8 fold); isoelectric point of differentiated proteins varied between 4.1 and 10.7 and relative molecular weight in the range of 9 ~ 392 kDa; and confidence coefficient was $\geq 95\%$. Compared with CK, Treatment Si had five proteins up-regulated and nineteen down-regulated and Treatment Rs, five up-regulated and twenty-two down-regulated. Compared with Treatment Si, Treatment Si + Rs had eight proteins up-regulated and fourteen down-regulated. Classification based on GO (gene ontology) function shows that of the twenty-nine differentially expressed proteins, 21.88% are involved in metabolic process, 15.63% in cellular process, 12.50% in cell communication, 3.13% in immune system process and another 3.13% in the process of response to stimulus, and classification in light of molecular function reveals that 25.64% are related to structural molecule activity, 25.64% to binding and 20.51% to catalytic activity, the three categories making up a major proportion. Classification according to protein class exposes that nucleic acid binding protein, hydrolase protein and cytoskeletal protein are the three major categories of proteins, accounting for 19.51% , 14.63% and 9.76% , respectively. To better understand effects of Treatment Si + Rs and Treatment Rs on soil proteins, further analysis was done of the 22 differentially expressed proteins obtained from Treatments Si + Rs/Rs. It was found compared with Treatment Rs, Treatment Si + Rs had eight proteins up-regulated by as high as 1.6 folds and fourteen proteins down-regulated by 0.5 fold. All the findings indicate that Si could affect *R. solanacearum* by altering metabolic and cellular processes in biological process, structural molecule active protein and binding protein in molecular function, and nucleic acid binding protein and cytoskeletal protein in protein classification.

In a word, Si addition can reduce the disease index of tomato bacterial wilt significantly, thus enhancing the plant resistance to the disease. Infection of *R. solanacearum* down-regulates metabolic-related proteins, influences degradation of misfolded proteins, hinders signal communication and Ca^{2+} signal transduction between microorganisms and microorganisms or plants, blocks synthesis of proteins, while Si helps tomato build up its resistance to *R. solanacearum* infection by affecting soil microbial metabolic capability, regulating expression of resistance and metabolism related proteins, improving signal communication and transduction between microorganisms and between microorganisms and plants, adjusting synthesis of soil proteins and expression of proteins involved in immune system process and stress response and influencing signal transduction of Ca^{2+} .

Key words Silicon; Tomato; *Ralstonia solanacearum*; Quantitative Proteomic; iTRAQ; Resistance

(责任编辑:陈德明)



土壤学报

(Turang Xuebao)



第 52 卷 第 1 期 2015 年 1 月

目 次

综述与评论

农业土壤学研究:侯光炯学术思想形成之考察——纪念侯光炯先生诞辰 110 周年..... 申丽娟 丁恩俊 陈绍兰等(1)

土壤多样性研究趋势与未来挑战 任圆圆 张学雷(9)

土壤磷酸盐氧同位素分析方法和应用研究进展 张 晗 王佳妮 郭庆军等(19)

研究论文

土壤制图中多等级代表性采样与分层随机采样的对比研究 杨 琳 朱阿兴 张淑杰等(28)

河南省典型淋溶土土系划分研究 鞠 兵 吴克宁 李 玲等(38)

黄土坡面细沟侵蚀发育过程与模拟 吴淑芳 刘政鸿 霍云云等(48)

黄土丘陵区小流域土壤有效水空间变异及其季节性特征 高晓东 吴普特 张宝庆等(57)

科尔沁沙丘-草甸相间地区表土饱和和导水率的土壤传递函数研究 孙 丽 刘廷玺 段利民等(68)

砒砂岩风化物对土壤水分特征曲线及蒸发的影响 张 磊 齐瑞鹏 张应龙等(77)

稳定同位素 ²⁰²Hg 稀释技术测定土壤汞有效性——与化学提取方法比较..... 郑顺安 徐志宇 王 飞等(87)

土壤提取液中酰基高丝氨酸内酯的气相色谱-质谱检测方法优化 生弘杰 宋 洋 卞永荣等(95)

复合污染土壤中土霉素的吸附行为及其对土壤重金属解吸影响的研究 陈励科 马婷婷 潘 霞等(104)

污染区千金子和酢浆草根际土壤中 PAHs 结合态残留的梯度分布 王意泽 高彦征 彭安萍等(112)

土壤磷解吸特性对菜稻轮作田间渗漏水总磷浓度的影响 章明清 李 娟 孔庆波(120)

湖区小麦-玉米轮作模式下不同施肥措施调控氮磷养分流失研究 谭德水 江丽华 谭淑樱等(128)

鄱阳湖洲滩湿地土壤-水-植物系统中磷的静态迁移研究 徐 进 徐力刚 丁克强等(138)

菇菜套作对土壤微生物群落的影响 陈 敏 王军涛 冯有智等(145)

黄土高原油松根际土壤酶活性及真菌群落多样性研究——以黄龙山林场为例 褚洪龙 李 莎 唐 明(154)

硅介导番茄青枯病抗性的土壤定量蛋白质组学研究 陈玉婷 林威鹏 范雪滢等(162)

有机无机肥配施对红壤旱地花生生理特性、产量及品质的影响 许小伟 樊剑波 陈 晏等(174)

氮素富集对青藏高原高寒草甸土壤有机碳迁移和累积过程的影响 李林森 程淑兰 方华军等(183)

长期施肥下黑土活性有机质和碳库管理指数研究 何翠翠 王立刚 王迎春等(194)

火烧和保留采伐剩余物对土壤有机碳矿化的影响 吴君君 杨智杰 刘小飞等(203)

研究简报

碳氮稳定同位素检测能力的验证——2013 年实验室间比对分析结果的汇总 曹亚澄 韩 勇 唐昊冶等(212)

土壤厚度的划分标准与案例研究 易 晨 李德成 张甘霖等(220)

积盐条件下土壤酸化过程的特异性研究 王媛华 段增强 赵 宇等(228)

四川省不同区域水稻氮肥施用效果研究 张 智 王伟妮 李 昆等(234)

小叶锦鸡儿灌丛化对退化沙质草地土壤孔隙特征的影响 李宗超 胡 霞(242)

信息

《土壤学报》2013 年度优秀论文评选揭晓 (241)

封面图片:黄土坡面细沟形态发育过程(由吴淑芳提供)

CONTENTS

Reviews and Comments

Agricultural soil science research: Formation of Hou Kuangchun's academic thought—Celebrate 110th anniversary of Mr Hou Kuangchun's birth Shen Lijuan, Ding Enjun, Chen Shaolan, et al. (8)

Study on pedodiversity: Status quo and future challenges Ren Yuanyuan, Zhang Xuelei (17)

Advance in study on method for oxygen isotopic analysis of phosphate in soil and its application Zhang Han, Wang Jiani, Guo Qingjun, et al. (26)

Research Articles

A comparative study of multi-grade representative sampling and stratified random sampling for soil mapping Yang Lin, Zhu A-xing, Zhang Shujie, et al. (37)

Classification of Typical Argosols of Henan Province at soil series level of Chinese Soil Taxonomy Ju Bing, Wu Kening, Li Ling, et al. (47)

Development of rill erosion on loess slope and its simulation Wu Shufang, Liu Zhenghong, Huo Yunyun, et al. (55)

Spatial variability of available soil moisture and its seasonality in a small watershed in the hilly region of the Loess Plateau Gao Xiaodong, Wu Pute, Zhang Baoqing, et al. (66)

Prediction of saturated hydraulic conductivity of surface soil in sand-dune-and-meadow interlaced region of Horqin with pedo-transfer functions method Sun Li, Liu Tingxi, Duan Limin, et al. (75)

Effects of amendment of aeolian sandy soil and loess with soft sandstone on soil water retention curve and evaporation Zhang Lei, Qi Ruipeng, Zhang Yinglong, et al. (85)

Comparison between stale isotope ²⁰²Hg dilution technique and chemical extraction in determining Hg availability in two typical soils of China Zheng Shunan, Xu Zhiyu, Wang Fei, et al. (94)

Optimization of determination of N-acyl-homoserine lactones in soil solution with Gas-Chromatography-Mass Spectrometry Sheng Hongjie, Song Yang, Bian Yongrong, et al. (102)

Sorption behavior of oxytetracycline in complex contaminated soil and its effects on desorption of heavy metals in the soil Chen Like, Ma Tingting, Pan Xia, et al. (111)

Gradient distribution of bound-PAH residues in different layers of rhizosphere soils of moleplant and wood sorrel growing in polluted regions Wang Yize, Gao Yanzheng, Peng Anping, et al. (118)

Soil P desorption characteristics and their effects on total P concentration in percolating water in fields under vegetable-rice rotation system Zhang Mingqing, Li Juan, Kong Qingbo (127)

Effects of fertilization controlling nitrogen and phosphorus loss from farmland under wheat-maize rotation in Nansi Lake region Tan Deshui, Jiang Lihua, Tan Shuying, et al. (137)

Static transfer of phosphorus in the soil-water-plant system of beach wetlands in Poyang Lake Xu Jin, Xu Ligang, Ding Keqiang, et al. (144)

Changes in soil microbial community in response to tomato-*Agaricus bisporus* interplanting Chen Min, Wang Juntao, Feng Youzhi, et al. (152)

Soil enzyme activity and fungal community diversity in rhizosphere of *Pinus tabulaeformis* Carr. growing on Loess Plateau— A case study of Huanglongshan forest farm Chu Honglong, Li Sha, Tang Ming (161)

Soil quantitative proteomic analysis of silicon-mediated resistance of tomato (*Solanum lycopersicum*) to *Ralstonia solanacearum* Chen Yuting, Lin Weipeng, Fan Xueying, et al. (172)

Effect of manure combined with chemical fertilizer application on yield, kernel quality and physiological characteristics of peanut to red soil in subtropical China Xu Xiaowei, Fan Jianbo, Chen Yan, et al. (181)

Effects of nitrogen enrichment on transfer and accumulation of soil organic carbon in alpine meadows on the Qinghai-Tibetan Plateau Li Linsen, Cheng Shulan, Fang Huajun, et al. (192)

Effect of long-term fertilization on labile organic matter in and carbon pool management index of black soil He Cuicui, Wang Ligang, Wang Yingchun, et al. (202)

Effect of prescribed burning and reservation of logging residues on soil organic carbon mineralization Wu Junjun, Yang Zhijie, Liu Xiaofei, et al. (210)

Research Notes

Testing of proficiency for measurement of carbon and nitrogen stable isotopes Cao Yacheng, Han Yong, Tang Haoye, et al. (218)

Criteria for partition of soil thickness and case studies Yi Chen, Li Decheng, Zhang Ganlin, et al. (227)

Specificity of soil acidification affected by salt accumulation Wang Aihua, Duan Zengqiang, Zhao Yu, et al. (233)

Effects of nitrogen fertilization on rice in different regions of Sichuan Province Zhang Zhi, Wang Weini, Li Kun, et al. (240)

Effects of shrub (*Caragana microphylla* Lam) encroachment on soil porosity of degraded sandy grassland Li Zongchao, Hu Xia (248)

Cover Picture: Rill morphological development process on loess slope (by Wu Shufang)