



· 研究报告 ·

不同抗性苹果品种应答轮纹病菌胁迫的差异蛋白质组分析

张彩霞, 袁高鹏, 韩晓蕾, 李武兴, 丛佩华

中国农业科学院果树研究所, 农业部园艺作物种质资源利用重点实验室, 兴城 125100

摘要 为鉴定不同抗性苹果(*Malus domestica*)品种响应轮纹病菌胁迫的抗性相关蛋白表达差异, 以抗病品种华月及易感品种金冠为试材, 采用高通量同位素标记定量(IFT)技术结合液相色谱-串联质谱(LC-MS)鉴定技术, 对病原菌处理前后抗、感病品种叶片的蛋白质组差异表达进行分析, 共鉴定出171个差异表达蛋白(DEPs)。GO富集及KEGG通路分析表明, 在细胞组分、分子功能和生物过程3类中共注释到686个GO条目, 其中52个DEPs注释于KEGG通路的18个显著差异途径($P < 0.05$)。亚细胞定位预测分析表明, 171个DEPs中有170个分别定位于8类细胞器。蛋白功能注释分析表明, 46个DEPs注释于7类抗性相关蛋白, 包括类甜蛋白、过氧化物酶、多酚氧化酶、过敏原蛋白、几丁质酶、内切葡聚糖酶以及主乳胶蛋白。此外, 还对抗性相关蛋白的表达特点及基因定量结果进行了分析。该研究结果可为进一步解析抗、感病苹果品种应答轮纹病菌胁迫的抗性机制提供参考。

关键词 苹果, 抗、感病, IFT定量蛋白质组学, 轮纹病, 抗性相关蛋白

张彩霞, 袁高鹏, 韩晓蕾, 李武兴, 丛佩华 (2020). 不同抗性苹果品种应答轮纹病菌胁迫的差异蛋白质组分析. 植物学报 55, 430–441.

苹果(*Malus domestica*)作为多年生木本果树研究的模式植物, 其安全生产对世界水果产业可持续发展具有重要意义(Eccher et al., 2014)。一直以来, 苹果真菌病害的发生严重制约苹果产业可持续发展(Jurick II et al., 2011; Fan et al., 2011)。研究介导真菌病害抗性调控的分子机理是加速苹果抗病种质创新的有效途径。

苹果轮纹病是影响我国苹果生产的重要病害, 其致病菌常通过侵染苹果枝干、叶片和果实使寄主发病, 严重影响苹果树势、产量与品质(Ogata et al., 2000; 张计育等, 2012; Xu et al., 2015; 肖龙等, 2016)。研究表明, 应答病原菌胁迫时, 抗、感病品种的发病症状和免疫应答模式差异明显(周增强等, 2010; Xu et al., 2015)。以往关于苹果轮纹病的研究多关注其病害的防治方法、致病菌分离及抗性资源筛选等方面(Ogata et al., 2000; 张玉经等, 2010; 周增强等, 2010; 杨丽丽等, 2012), 而抗病机理相关研究较少。我们前期研究发现, 苹果应答病原菌胁迫过程中, 不

同胁迫时间(0、24、48和72小时)内, 抗、感病株系在激素调节和免疫应答等方面存在显著差异(Chen et al., 2012a)。苹果叶片经轮纹病菌侵染后, 叶片叶绿体细胞内多个代谢过程可参与轮纹病菌的胁迫应答反应(肖龙等, 2016)。近年来, 我们开展的病原菌与苹果寄主互作的蛋白质组学研究表明, 病原菌诱导后, 寄主可通过启动多个途径实现对病原菌的防御响应, 包括光合作用、能量代谢、胁迫及抗性反应等各类蛋白的差异表达, 筛选鉴定了 β -1,3-葡聚糖酶、APX、GPX、Hsps及Mal d1等抗病相关蛋白(Zhang et al., 2015; 张彩霞等, 2018)。此外, 利用iTRAQ(isobaric tags for relative and absolute quantization)定量鉴定技术, 我们还解析了抗病苹果品种华月应答链格孢菌侵染的抗性相关蛋白的表达特点(张彩霞等, 2018)。进一步针对Mal d1开展功能分析, 我们发现病原菌胁迫48小时内, Mal d1基因的表达量呈现先升后降的趋势, 于24小时达到峰值, 且表达量在抗、感病品种间存在显著差异。由此推测, 抗、感病苹果品

收稿日期: 2019-10-18; 接受日期: 2020-04-26

基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(No.Y2019XK09)、农业部现代农业产业技术体系建设专项资金(No.CARS-27)和中国农业科学院科技创新工程(No.CAAS-ASTIP-2016-RIP-02)

* 通讯作者。E-mail: congph@163.com

种应答病原菌胁迫过程中, 不同胁迫时间的蛋白质组表达模式可能存在差异。同位素标记定量(isobaric tag, IBT)技术作为iTRAQ蛋白定量分析技术的升级版, 已在许多研究中得到成功应用(Chen et al., 2012b; Ramsubramaniam et al., 2013; Xing et al., 2017)。与常规iTRAQ定量分析技术相比, IBT蛋白定量技术鉴定蛋白数量更多、蛋白定量准确性更高、标记样品数量也更多(Paulo et al., 2015; Erickson et al., 2015)。鉴于苹果轮纹病病害发生的严重性, 以及抗病机制研究对于苹果抗病新种质开发的重要意义, 我们在前期工作基础上, 采用IBT标记定量结合液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)分析技术, 对病原菌处理前后4个不同时间点的抗病品种(R)华月和感病品种(S)金冠叶片总蛋白表达情况进行鉴定, 对抗性相关蛋白在抗、感病品种间的差异表达特点进行分析, 旨在为进一步认识抗、感病苹果品种应答轮纹病菌胁迫过程中启动的抗性机制提供参考。

1 材料与方法

本实验于2017–2019年, 在中国农业科学院果树研究所/农业部园艺作物种质资源利用重点实验室/国家苹果育种中心完成。

1.1 材料来源及病原菌接种

实验所用抗病苹果(*Malus domestica* Borkh.)品种华月(杨振英等, 2010)及感病品种金冠(张玉经等, 2010)均来自国家苹果育种中心(辽宁兴城)杂种圃, 树龄均为10年, 树长势健壮, 均采用常规管理。实验于2018年5月开展, 分别采摘华月和金冠新梢部分15–20天叶龄的叶片, 选取大小均一、无机械损伤、无病虫害药的叶片, 表面经初步消毒, 再用无菌水清洗后, 置于无菌保湿大培养皿(直径14 cm)中。

供试苹果轮纹病致病菌(*Botryosphaeria berengeriana* f. sp. *piricola*)菌株LW-xc102由中国农业科学院果树研究所植物保护中心提供。将LW-xc102接种于马铃薯蔗糖琼脂(potato sugar agar, PSA)培养基上, 28°C培养7天, 至菌丝长满培养皿后备用。选取生长均一的LW-xc102菌丝培养物, 以直径5 mm的打孔器打下菌饼, 采用叶片正面针刺法(林月莉等, 2011)接种轮纹病菌。分别在叶片正面主脉两侧用灭菌牙签各刺1个接种点, 将菌饼正面贴于接种点上, 培养时

共设4个时间点(0、6、24和48小时)。取样部位为去除接种及发病部位的其余叶片。抗病品种(R)华月取样叶片分别编号R-0h、R-6h、R-24h和R-48h; 感病品种(S)金冠取样叶片分别编号S-0h、S-6h、S-24h和S-48h。抗(R)、感(S)病品种叶片接种轮纹病菌实验均设3次生物学重复。

1.2 叶片总蛋白样品制备

抗(R)、感(S)病苹果叶片总蛋白样品制备参照酚抽提方法(Zhang et al., 2015)完成。总蛋白样品经室温风干后, 干粉重悬于裂解缓冲液(lysis buffer) (Zhang et al., 2015)中。采用BCA蛋白浓度检测试剂盒(GE, Cat No.80648356)完成蛋白样品定量。每样品分别取30 μg 蛋白溶液, 采用12% SDS-PAGE电泳方法检测蛋白纯度。总蛋白样品保存于–80°C冰箱中备用。

1.3 同位素标记定量(IBT)及质谱(LC-MS/MS)分析

蛋白样品IBT标记定量及LC-MS/MS分析实验均委托深圳华大基因研究院完成。具体步骤为: 将8个样品编号, 每个样品取100 μg 蛋白溶液, 按40:1的比例加入2.5 μg trypsin酶, 37°C酶解12小时, 酶解肽段经Strata XC18柱除盐后真空抽干。肽段经0.2 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ TEAB (Applied Biosystems, 美国)复溶, 终浓度达4 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 。采用8标IBT试剂标记各蛋白肽段样品(R-0h: 114; R-6h: 115h; R-24h: 116N; R-48h: 116C; S-0h: 117N; S-h: 117C; S-24h: 118N; S-48h: 119)。将标记后的8组肽段样品等量混合, 真空抽干后, 用岛津LC-20AB液相色谱系统结合Gemini C18柱(5 μm , 4.6×250 mm)进行液相分离, 分离后的肽段分别合并后冷冻抽干。IBT标记实验重复3次, 共完成24个样品的标记定量。

抽干后的肽段样品经流动相A (2% ACN, 0.1% FA)复溶, 20 000 $\times g$ 离心10分钟, 取上清进样。样品经Trap柱富集除盐后, 用岛津LC-20AD纳升液相色谱仪进行分离。选用自装C18柱(内径75 μm ; 流速300 $\text{nL}\cdot\text{min}^{-1}$)进行梯度洗脱: 5%流动相B (98% ACN, 0.1% FA) 0–8分钟; 8%–35%流动相B 8–43分钟; 35%–60%流动相B 43–48分钟; 60%–80%流动相B 48–50分钟; 80%流动相B 50–55分钟; 5%流动相B 55–65分钟。

液相分离后肽段经Nano ESI源离子化后进入

Q-Exactive串联质谱仪(Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA)进行DDA (data-dependent acquisition)检测。主要参数设置: 离子源电压1 600 V; 一级质谱质荷比(*m/z*)扫描范围为350–1 600 *m/z*, 分辨率70 000; 二级质谱起始质荷比固定为100 *m/z*, 分辨率17 500。二级碎裂母离子筛选条件: 电荷2+到7+。离子碎裂模式为高能碰撞解离(HCD)。动态排除参数设为15秒。

1.4 生物信息学分析

原始质谱数据经Proteome Discoverer 2.2软件转换为MGF格式文件。利用Mascot 2.3.02蛋白质鉴定软件搜索NCBI中包含337 685个序列的苹果(*Malus domestica* fasta)数据库, 最终选定的可信蛋白必须包含至少1个可信的特异性(unique)肽段。Mascot搜索参数Type of search: MS/MS Ion search; Enzyme: Trypsin; Fragment Mass Tolerance: 0.05 Da; Mass Values: Monoisotopic; Variable modifications: Oxidation (M), IBT 8plex (Y); Peptide Mass Tolerance: 20 ppm; Fixed modifications: Carbamidomethyl (C), IBT 8plex (N-term), IBT 8plex (K); Database: *Malus* (337 685 sequences)。

IBT数据的定量采用IQuant软件(Wen et al., 2014)完成。为降低假阳性率, 蛋白过滤参数设置为protein FDR≤0.01 (Savitski et al., 2015)。比较10个对照组(R-0h/S-0h、R-6h/S-6h、R-24h/S-24h、R-48h/S-48h、S-6h/S-0h、S-24h/S-0h、S-48h/S-0h、R-6h/R-0h、R-24h/R-0h和R-48h/R-0h), 筛选至少在2次生物学重复中均存在的蛋白定量信息开展进一步分析。利用Blast2go软件对差异表达蛋白(DEPs)进行GO (<http://www.geneontology.org>)注释分析。利用KEGG pathway (<http://www.genome.jp/kegg>)数据库对所鉴定的DEPs进行富集分析。筛选参数: Unique peptide≥2, Fold change 大于1.5或小于0.67, *P*-value<0.05。对3次重复数据进行*t*-test检验, *P*<0.05为差异显著。倍数变化大于1.5或小于0.67被认为是差异表达蛋白。

1.5 实时荧光定量PCR (qRT-PCR)分析

筛选5个苹果轮纹病抗病功能基因进行qRT-PCR验证。RNA提取使用北京华越洋生物科技有限公司试剂盒, cDNA第1链合成采用宝生物工程(大连)有限公司

试剂盒(Cat No.RR047A)。各基因的荧光定量引物使用NCBI在线软件(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome)设计, 引物序列见表1, 选用*MdActin*作为内参基因。qRT-PCR在CFX96™ Real-Time System (Bio-Rad Laboratories, USA)仪器上进行。反应体系为: 12.5 μL TB Green, 上、下游引物(10 μmol·L⁻¹)各0.75 μL, 9 μL ddH₂O, 2 μL cDNA, 总体积25 μL。反应条件为: 95°C预变性3分钟; 95°C变性5秒, 58°C退火30秒, 72°C延伸30秒, 40个循环。实验均设3次重复。实验所得数据采用2^{-ΔΔCT}法计算(Livak and Schmittgen, 2001)。利用SPSS18.0软件进行差异显著性分析。

表1 荧光定量PCR引物序列
Table 1 Primers used in fluorescent quantitative PCR

Accession No.	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
gi 657977120	TCACCTTAGCCAT-CTTCTTCGC	TGCTAACTCGAAC-CCTGTGG
gi 658027651	CTCCACTGTGCCTA-TTGCGA	GAGCCGGGTTAG-CGAACAA
gi 658061109	TTGATGCCAGCCC-TGCAAAT	GGGCTTGAAGCT-CGTTGTTG
gi 661567324	GATTGCACCCAG-GCAATCA	TTGTGCTTCACGT-AGCCGTA
gi 658009573	AGGCATTCCCTCA-GGACTAC	TTCCGACTTCATC-CACTGC
<i>MdActin</i>	TGACCGAATGAG-CAAGGAAATTACT	TACTCAGCTTTGG-CAATCCACATC

2 结果与讨论

2.1 华月、金冠苹果应答轮纹病菌侵染的发病特征

为比较抗、感病苹果品种应答轮纹病胁迫的发病特征, 本研究采用叶面针刺结合菌饼接种, 对华月和金冠苹果叶片发病过程进行观察。结果(图1)表明, 病原菌接种3小时, 华月和金冠叶片发病特征均不明显。接种6小时, 抗、感病叶片未见明显病斑。接种24小时, 华月叶片发病不明显, 部分叶片的接种部位可见病斑; 而感病品种金冠发病特征明显, 所有叶片均呈现明显病斑。接种48小时, 华月叶片仅在接种部位有病斑扩展; 而金冠叶片发病病斑均有明显扩展, 部分叶片坏死, 病斑呈现连片分布状态。抗、感病特征与前人关于华月(杨振英等, 2010)和金冠(张玉经等, 2010)的抗、感病表型描述一致。

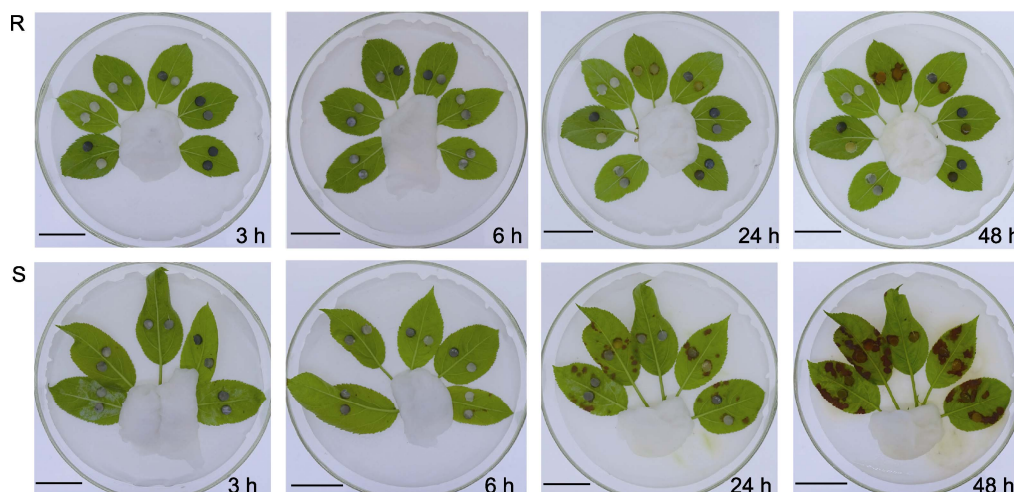


图1 抗、感病苹果品种华月和金冠应答轮纹病菌侵染的发病特征比较

R: 抗病品种华月; S: 感病品种金冠。Bars=1 cm

Figure 1 Comparison of morphological characteristics of resistant and susceptible apple cultivars Huayue and Golden Delicious in response to ring rot disease

R: Resistant cultivar Huayue; S: Susceptible cultivar Golden Delicious. Bars=1 cm

2.2 差异蛋白质鉴定与IBT定量

分别对病原菌处理前后4个时间点的抗病品种(R)华月和感病品种(S)金冠叶片进行总蛋白提取及IBT定量分析。结果显示, 24个样品共产生835 617张二级图谱, 在 $FDR \leq 0.01$ 过滤标准下, 鉴定到9 816条肽段, 9 425条Unique肽段, 最终成功鉴定蛋白5 319个。

进一步对已鉴定的差异蛋白进行显著性分析, 在Unique peptide ≥ 2 、Fold change >1.5 、 P -value <0.05 的筛选条件下, 4个时间点(0、6、24和48小时), 抗(R)、感病(S)品种内(R/R、S/S)、品种间(R/S)各比对照组共鉴定出171个DEPs, 其中抗性相关蛋白共46个(含重复), 分属7类18个不同蛋白。其它蛋白中重复鉴定2次以上的83个, 分属30个不同蛋白。鉴定数量唯一的蛋白共计42个(附录1)。

抗、感病品种间4个比对照组(R-0h/S-0h、R-6h/S-6h、R-24h/S-24h和R-48h/S-48h)共鉴定出71个DEPs, 其中39个为上调表达, 32个为下调表达; 感病品种内3个比对照组(S-6h/S-0h和S-24h/S-0h、S-48h/S-0h)共鉴定出20个DEPs, 其中13个为上调表达, 7个为下调表达; 抗病品种内3个比对照组(R-6h/R-0h、R-24h/R-0h和R-48h/R-0h)共鉴定出80个DEPs, 其中上调表达39个, 下调表达41个(图2)。从表达特点来看, R-48h/S-48h及R-48h/R-0h两个比对照组中, 下调DEPs数量均明显高于上调DEPs数量。

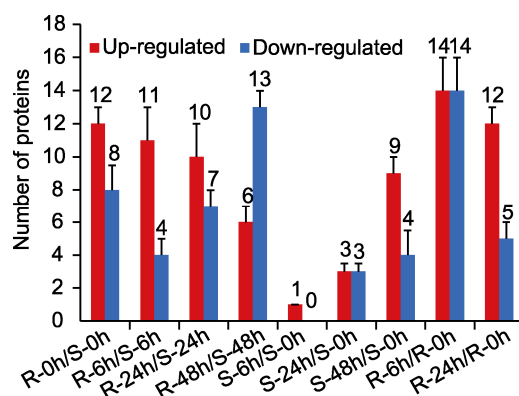


图2 抗、感病苹果品种叶片应答轮纹病菌胁迫的差异表达蛋白(DEPs)分布

R: 抗病品种华月; S: 感病品种金冠

Figure 2 Distribution of differentially expressed proteins (DEPs) of apple leaves susceptible and resistant to ring rot disease, respectively

R: Resistant cultivar Huayue; S: Susceptible cultivar Golden Delicious

而其余比对照组均为上调数量多于下调数量或持平。总体来看, 感病品种3个比对照组(S/S)仅有20个DEPs, 明显低于抗、感病品种间比对照组(R/S)及抗病品种内比对照组(R/R) (图2)。

2.3 差异表达蛋白(DEPs)的GO和KEGG代谢通路富集分析

对鉴定到的DEPs进一步开展GO富集分析, 由于1

个蛋白可以注释到多个GO条目(GO term)中, 171个DEPs共注释到686个GO条目, 其中细胞组分(cellular component)注释条目306个;分子功能(molecular function)注释条目166个;生物过程(biological process)注释条目214个(图3)。

将鉴定到的171个DEPs进行KEGG富集分析, 经 $P<0.05$ 筛选后, 共有52个DEPs注释于18个显著差异代谢途径。其中9个DEPs注释于脂肪酸合成、延伸、代谢及不饱和脂肪酸合成相关途径, 13个DEPs注释于核糖体途径(表2)。

2.4 差异表达蛋白(DEPs)的亚细胞定位

对171个DEPs进行亚细胞定位预测分析, 结果表明,

除S-6h/S-0h比对组鉴定的天冬氨酸蛋白酶结合蛋白(MDP0000301576)未得到预测结果, 其余9个比对组共170个DEPs预测定位于8个细胞器。其中, 57个(33.53%) DEPs定位于叶绿体(chlo), 54个(31.76%) DEPs定位于细胞质(cyto), 21个(12.35%) DEPs定位于胞外(extr), 15个(8.82%) DEPs定位于细胞核(nucl), 9个(5.29%) DEPs定位于线粒体(mito), 5个(2.94%) DEPs定位于细胞骨架(cysk), 5个(2.94%) DEPs定位于细胞质膜(plas), 4个(2.35%) DEPs定位于液泡膜(vacu) (图4)。

2.5 抗性相关蛋白差异表达分析

功能注释结果表明, 46个DEPs注释于7类抗性相关蛋

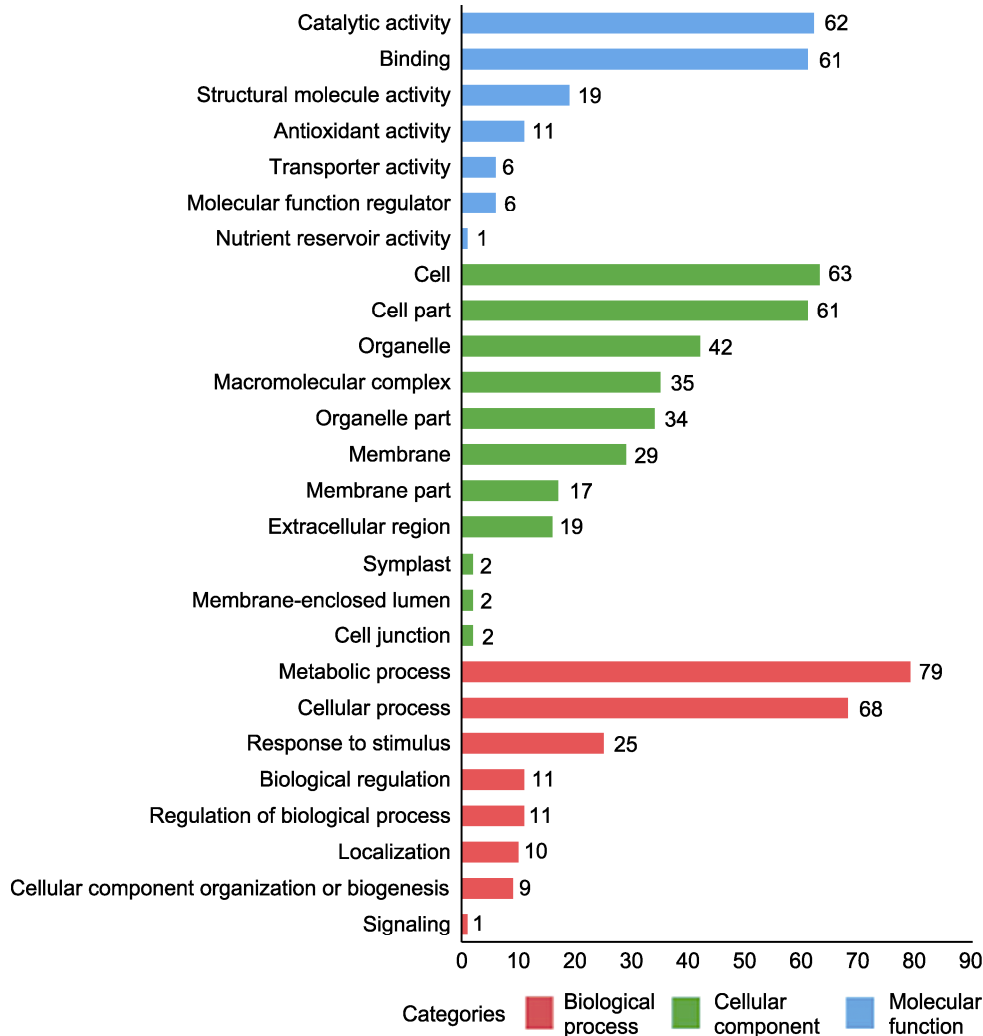


图3 抗、感病品种应答轮纹病菌胁迫的差异表达蛋白(DEPs)的Gene Ontology (GO)分析

Figure 3 Enriched Gene Ontology (GO) analysis of differentially expressed proteins (DEPs) in apple leaves resistant and susceptible to ring rot disease, respectively

表2 差异表达蛋白(DEPs)的KEGG Pathway富集分析

Table 2 KEGG pathways analysis of differentially expressed proteins (DEPs)

No.	Pathway	Pathway ID	DEPs with pathway annotation (326 in total)	All proteins with pathway annotation (14916 in total)	P-value
1	Fatty acid biosynthesis	ko00061	2 (0.61%)	19 (0.13%)	0.011
2	Fatty acid elongation	ko00062	3 (0.92%)	9 (0.06%)	0.040
3	Arginine biosynthesis	ko00220	2 (0.61%)	16 (0.11%)	0.050
4	Alanine, aspartate and glutamate metabolism	ko00250	2 (0.61%)	23 (0.15%)	0.037
5	Cyanoamino acid metabolism	ko00460	2 (0.61%)	20 (0.13%)	0.022
6	Other glycan degradation	ko00511	2 (0.61%)	14 (0.09%)	0.011
7	Monoterpenoid biosynthesis	ko00902	5 (1.53%)	12 (0.08%)	0.035
8	Sesquiterpenoid and triterpenoid biosynthesis	ko00909	1 (0.31%)	2 (0.01%)	0.027
9	Nitrogen metabolism	ko00910	4 (1.23%)	28 (0.19%)	0.014
10	Sulfur metabolism	ko00920	1 (0.31%)	12 (0.08%)	0.036
11	Phenylpropanoid biosynthesis	ko00940	3 (0.92%)	47 (0.32%)	0.041
12	Isoquinoline alkaloid biosynthesis	ko00950	2 (0.61%)	16 (0.11%)	0.028
13	Biosynthesis of unsaturated fatty acids	ko01040	2 (0.61%)	9 (0.06%)	0.016
14	Fatty acid metabolism	ko01212	2 (0.61%)	32 (0.21%)	0.030
15	Ribosome	ko03010	13 (3.99%)	200 (1.34%)	0.005
16	RNA transport	ko03013	2 (0.61%)	33 (0.22%)	0.031
17	Homologous recombination	ko03440	1 (0.31%)	5 (0.03%)	0.039
18	Circadian rhythm-plant	ko04712	3 (0.92%)	9 (0.06%)	0.026

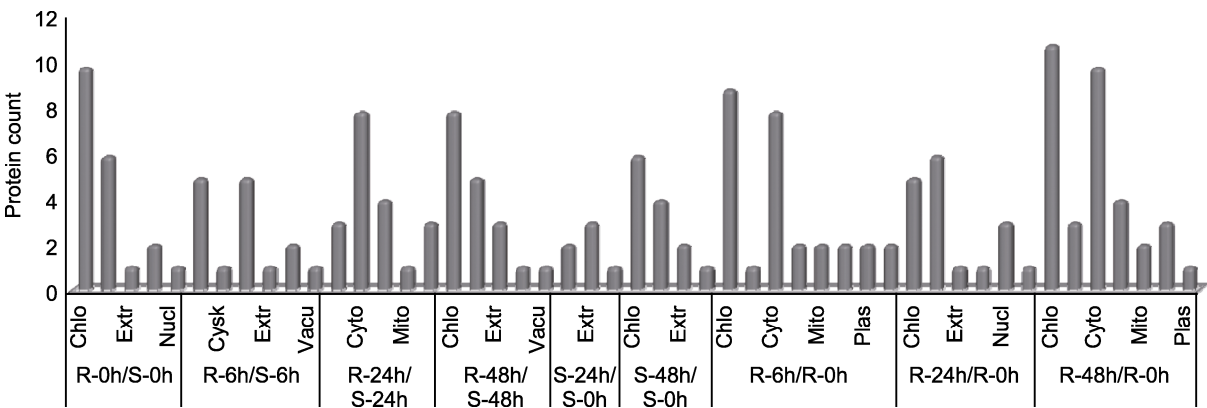


图4 抗、感病苹果叶片应答轮纹病菌胁迫的差异表达蛋白(DEPs)的亚细胞定位

Chlo: 叶绿体; Cysk: 细胞骨架; Cyto: 胞液; Extr: 胞外; Mito: 线粒体; Nucl: 细胞核; Plas: 质膜; Vacu: 液泡膜

Figure 4 Subcellular localization of differentially expressed proteins (DEPs) in apple leaves resistant and susceptible to ring rot disease, respectively

Chlo: Chloroplast; Cysk: Cytoskeleton; Cyto: Cytosol; Extr: Extracellular; Mito: Mitochondria; Nucl: Nucleus; Plas: Plasma membrane; Vacu: Vacuolar membrane

白。其中, 14个DEPs鉴定为类甜蛋白(thaumatin-like protein), 8个DEPs鉴定为过氧化物酶(oxidase), 7个DEPs鉴定为多酚氧化酶(polyphenol oxidase), 6个DEPs鉴定为过敏原蛋白(major allergen Mal d1),

6个DEPs鉴定为几丁质酶(chitinase), 4个DEPs鉴定为内切葡聚糖酶(endo-1,3-beta-glucosidase), 1个DEP鉴定为主乳蛋白(MLP-like protein 423)。其中, 鉴定为类甜蛋白、过氧化物酶、多酚氧化酶和几丁质

酶的4类抗性相关的35个DEPs在不同对比组中表达趋势均不一致,而鉴定为过敏原蛋白、主乳胶蛋白和内切葡聚糖酶的3类抗性相关的11个DEPs在不同对比组中差异表达趋势相同,均呈现一致的上调/下调表达(图4;附录1)。

值得注意的是,主乳胶蛋白仅在1个对比组(R-6h/S-6h)中呈现明显的上调表达。鉴定为内切葡聚糖酶的4个DEPs仅在3个对比组(R-0h/S-0h、R-48h/S-48h和R-48h/R-0h)中呈现明显的下调表达。鉴定为多酚氧化酶的7个DEPs在4个对比组(R-0h/S-0h、R-6h/S-6h、S-48h/S-0h和R-6h/R-0h)中呈现明显的上调表达,而在另3个对比组(R-48h/S-48h、R-6h/R-0h和R-48h/R-0h)中呈现明显的下调表达。鉴定为

几丁质酶的6个DEPs在品种间的4个对比组(R-0h/S-0h、R-6h/S-6h、R-24h/S-24h和R-48h/S-48h)中均呈现明显的下调表达,而在感病品种的1个对比组(S-48h/S-0h)中呈现明显的上调表达。

2.6 抗性相关蛋白编码基因的表达模式

为验证抗、感病品种4个时间点IBT定量蛋白质组比较分析结果的可信度,我们对筛选后的5个抗性相关蛋白的编码基因进行qRT-PCR表达分析。结果(图5)发现,抗、感病品种应答轮纹病菌胁迫过程中,过敏原蛋白Mal d1及主乳胶蛋白MLP423编码基因的表达模式与IBT定量蛋白质组比较分析结果一致(图5B, E)。类甜蛋白和多酚氧化酶编码基因的表达模式与蛋白

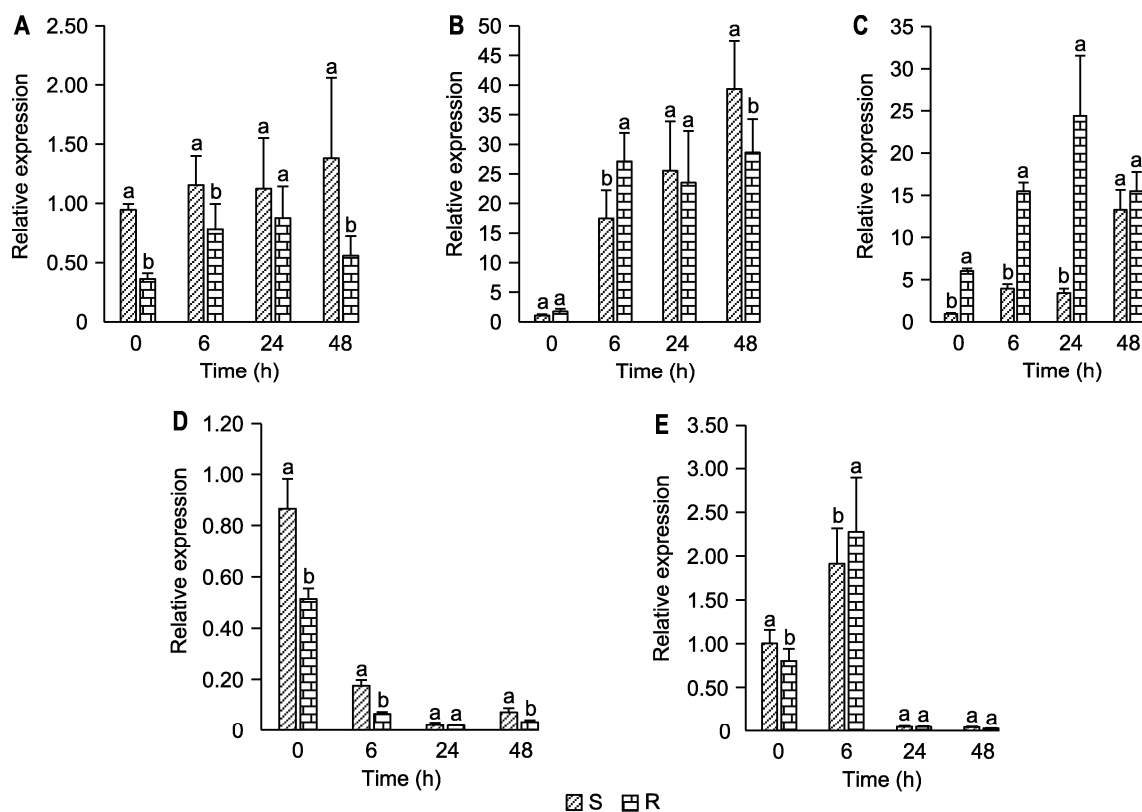


图5 抗、感病苹果叶片轮纹病关键抗病相关蛋白编码基因的实时荧光定量PCR分析

(A) 类甜蛋白编码基因(MD04G1018400); (B) Mal d1编码基因(MD16G1160700); (C) β -1,3-葡聚糖酶编码基因(MD11G1189000); (D) 多酚氧化酶编码基因(MD10G1299100); (E) MLP423编码基因(MD16G1088600)。R: 抗病品种华月; S: 感病品种金冠; 不同小写字母表示抗病与感病品种间差异显著($P < 0.05$)。

Figure 5 Quantitative real-time PCR analysis of genes encoding key resistance-related proteins in apple leaves resistance and susceptible to ring rot disease

(A) A gene encoding a thaumatin (MD04G1018400); (B) The gene encoding Mal d1 (MD16G1160700); (C) A gene encoding a beta-1,3-glucosidase (MD11G1189000); (D) A gene encoding a polyphenol oxidase (MD10G1299100); (E) The gene encoding MLP423 (MD16G1088600). R: Resistant cultivars Huayue; S: Susceptible cultivars Golden Delicious; Different lowercase letters indicate significant differences between resistant and susceptible cultivars ($P < 0.05$).

质组鉴定结果部分一致(图5A, D)。 β -1,3-葡聚糖酶编码基因的表达模式与IBT定量蛋白质组比较分析结果相反(图5C)。

2.7 讨论

苹果真菌病害的发生严重影响其树体发育、产量与品质, 制约苹果产业的可持续发展。研究真菌病害抗性调控的分子机理对于加速苹果抗病种质创新具有重要意义(Jurick II et al., 2011; Fan et al., 2011; Mazzeo et al., 2014)。本研究利用高通量的IBT标记定量蛋白质组分析技术, 筛选病原菌处理前后4个不同时间点, 抗(R)、感(S)病品种华月和金冠在不同对照组中差异表达的抗性相关蛋白, 进一步认识了关键抗性相关蛋白的表达特点。

2.7.1 差异表达蛋白(DEPs)分离鉴定及表达特点分析

蛋白质分离鉴定技术是影响蛋白质组学研究的关键(Chen et al., 2012b)。已有的相关研究多基于2-DE结合质谱鉴定, 筛选的DEPs仅为有限的几十个(张彩霞等, 2015; 孙天骅等, 2018)。本研究利用升级后的IBT标记定量分析技术(Ramsubramaniam et al., 2013; Xing et al., 2017), 分别对病原菌处理前后4个时间点的抗、感病品种华月和金冠叶片进行总蛋白分析, 成功鉴定到5 319个蛋白, 显著多于以往研究鉴定的蛋白数量。

显著性分析表明, 抗、感病品种10个对照组中共鉴定到171个DEPs, 分属90个不同蛋白。抗、感病品种间4个对照组中共71个DEPs发生显著变化, 且上、下调蛋白数量差异不明显(分别为39和32个)。然而, 感病品种金冠应答病原菌胁迫的3个对照组中仅有20个DEPs发生显著差异表达, 且上调DEPs数量(13个)远多于下调DEPs数量(7个); 抗病品种华月应答病原菌胁迫的3个对照组中有80个DEPs发生显著差异表达, 且上、下调DEPs数量基本一致(39和41个)(图2)。由此表明, 从蛋白质表达水平看, 感病品种应答轮纹病菌感染过程的DEPs数量明显少于抗病品种, 该表达特点可能与品种基因型有关。

本研究中, 抗病品种华月轮纹病菌感染24小时, 共17个DEPs发生显著变化, 其中上、下调DEPs分别为12和5个。结合我们前期基于iTRAQ技术开展

的华月应答斑点落叶病菌胁迫相关研究结果, 即病原菌胁迫24小时后, 有53个DEPs呈现显著差异表达, 且下调DEPs (44个)远多于上调DEPs (9个)(张彩霞等, 2018)。通过比较发现, 同一品种应答不同病原菌感染的DEPs表达特点相反, 推测该结果可能与寄主细胞针对不同病原菌胁迫所产生的不同应激反应相关。

以往关于抗、感病品种应答轮纹病菌胁迫的蛋白质组研究仅以0和24小时2个时间点、4组样品进行差异分析(孙天骅等, 2018), 受2-DE技术的局限性, 鉴定DEPs数量有限。本研究通过对抗、感病品种4个时间点的8组样品进行差异表达分析, 显示抗、感病品种在病原菌胁迫48小时后, 3个对照组(R-48h/S-48h、S-48h/S-0h和R-48h/R-0h)的DEPs数量(67个)远多于胁迫24小时后3个对照组(R-24h/S-24h、S-24h/S-0h和R-24h/R-0h)的DEPs数量(40个)(图2)。进一步表明病原菌胁迫时间也是影响DEPs表达的重要因素。

针对171个差异表达蛋白开展的GO富集及KEGG pathway分析, 细胞组分、分子功能和生物过程共注释到686个GO条目。进一步筛选后发现52个DEPs注释于KEGG的18个显著差异途径, 表明同一蛋白可在多个生物学过程中发挥功能, 且多个蛋白可能参与同一通路。

叶绿体作为植物的重要细胞器, 是光合作用及其它重要生物学过程发挥作用的场所(Berger et al., 2004; Dinakar et al., 2012)。近年来研究表明, 植物与病原菌互作过程中, 多种病程相关蛋白的差异表达发生于叶绿体(Berger et al., 2007; Li et al., 2014; 肖龙等, 2016)。本研究中, 鉴定到的DEPs有1/3定位于叶绿体, 进一步表明轮纹病菌胁迫前后, 苹果叶片细胞中叶绿体蛋白广泛参与了胁迫应答。

2.7.2 关键抗性相关蛋白的差异表达是影响抗、感病苹果品种应答轮纹病菌胁迫的关键因素

本研究中, 10个对照组共46个DEPs (22.8%)注释于7类抗性相关蛋白。其中, 鉴定为类甜蛋白的有14个DEPs。在轮纹病菌胁迫前, 华月(R)叶片中类甜蛋白表达量显著高于金冠(S), 随着胁迫时间的延长, 华月(R)叶片中类甜蛋白的表达量不断降低, 而感病品种金冠(S)叶片中类甜蛋白的表达量显著上调。类甜

蛋白是植物应答病原菌胁迫的重要病程相关蛋白(PR-5) (Kim et al., 2009), 已有研究证实类甜蛋白在苹果叶片应答褐斑病菌胁迫前后呈现显著上调表达(Li et al., 2014)。本研究中, 类甜蛋白在华月(R)和金冠(S) 2个品种应答轮纹病菌胁迫过程中呈现相反的表达模式, 推测该蛋白的差异表达与2个品种的不同抗性有关。

过氧化物酶(POD)是植物应答病原菌胁迫的重要防御酶系, 也是植物细胞内清除活性氧的关键酶(Christensen et al., 1998; Dietz et al., 2006; Kornas et al., 2010)。研究证实, 大豆(*Glycine max*)叶片经叶斑病菌侵染后, POD表达量显著上调(Borges et al., 2013), 在烟草(*Nicotiana tabacum*)中过表达POD编码基因, 可显著提高其抗病性(Dietz et al., 2006)。本研究中, 轮纹病菌胁迫前, POD表达量在华月(R)叶片中显著高于金冠(S), 推测POD是2个品种抗病性差异的关键蛋白之一。在应答轮纹病菌胁迫过程中, 抗病品种POD表达量不断下调, 而感病品种POD表达量不断上调, 进一步推测在抗、感病品种应答轮纹病菌胁迫过程中, 抗病品种通过不断分解POD, 调控叶片细胞内活性氧浓度, 以抵御病原菌侵染。

多酚氧化酶(polyphenol oxidases, PPOs)存在于多种植物中, 是重要的氧化还原酶类防御酶系, 可参与植物的多种防御反应。研究表明, 过表达PPO的转基因番茄(*Lycopersicon esculentum*)叶片, 其细菌抗病性显著增强(Li and Steffens, 2002; Thipyapong et al., 2004)。徐鹏飞等(2010)研究表明, 不同抗性大豆品种在应答病原菌侵染过程中PPO活性存在显著差异, 且抗病品种PPO活性高于感病品种。Golba等(2012)研究证实, 苹果的多酚类物质在苹果应答黑星病菌侵染过程中具有瞬时防御作用。虽然PPO是主要防御酶系, 但在抵御病原菌侵染过程中, PPO发挥作用需要同时满足存在酚类基质, 且PPO能够直接与酚类基质发生作用。由此表明, PPO防御作用的发挥与宿主及病原菌均有一定的相关性, 如果宿主本身酚类浓度过低, 则对病原菌无防御作用。本研究中, PPO在抗、感病品种应答轮纹病菌胁迫的多个对照组中呈现不同的上、下调表达模式, 而在转录水平分析中, PPO表达模式均为下调, 尤其是随着胁迫时间的延长PPO表达量不断降低, 推测该结果可能与抗、感病品种叶片细胞自身PPO活性差异以及侵染过程中

病原菌酚类基质变化有关, 具体影响因素尚待进一步研究证实。

过敏原蛋白(major allergen Mal d1)是苹果属植物重要的抗性相关蛋白(Breiteneder and Ebner, 2000)。我们前期基于2-DE技术开展的苹果叶片应答轮纹病菌胁迫研究表明, Mal d1蛋白在病原菌胁迫前后呈明显的上调表达(Zhang et al., 2015); 进一步从转录水平证实, Mal d1基因在苹果叶片中的表达量明显高于花和果实, 且抗病苹果品种中Mal d1基因的表达量明显高于感病品种(宗泽冉等, 2017)。本研究中, Mal d1在R-0h/S-0h和R-6h/S-6h两个品种间的对照组中均显著上调表达, 且与Mal d1的qRT-PCR表达模式一致; 在感病、抗病品种内的3个对照组中也显著上调表达, 与我们前期开展的苹果应答斑点落叶病菌胁迫蛋白质组分析及转录水平分析结果一致, 表明Mal d1在苹果抗、感病品种应答轮纹病菌胁迫的防御反应过程中发挥重要作用。

几丁质酶是植物细胞抵御病原真菌侵染的重要抗病蛋白, 在寄主植物细胞受病原菌胁迫过程中可被强烈诱导(Grover, 2012)。研究发现, 几丁质酶仅在抗病品种响应病原菌侵染过程中显著上调表达, 推测几丁质酶是苹果应答斑点落叶病菌侵染的重要防御酶系(Ni et al., 2017)。本研究中, 几丁质酶在抗病品种中的表达量显著低于感病品种, 推测不同抗性品种应答不同病原真菌的侵染时, 几丁质酶会呈现不同的表达模式, 具体原因有待深入分析。

β -1,3-葡聚糖酶也是植物细胞内重要的抗性相关蛋白(Li et al., 2011), 在植物应答病原真菌侵染过程中, 可通过直接分解真菌细胞壁或通过释放消化壁诱导植物自身防御反应, 最终保护植物免受真菌侵染(Li et al., 2014)。已有研究证实, 葡聚糖酶在感病品种中表达量显著高于抗病品种(Ni et al., 2017)。本研究中, 轮纹病菌侵染48小时内, 感病品种中 β -1,3-葡聚糖酶表达量高于抗病品种, 与以往研究结果一致。然而, 转录水平分析结果表明, β -1,3-葡聚糖酶在抗病品种中表达量高于感病品种。具体机制有待进一步阐明。

主乳球蛋白(MLP-like protein 423)是一种低分子量的抗性相关蛋白, 在植物抗病或逆境应答中起关键作用(Sun et al., 2010; Wang et al., 2016)。我们前期研究表明, 华月苹果叶片应答轮纹病菌胁迫前后,

MLP蛋白呈现明显的下调表达。本研究中, MLP在华月苹果叶片应答轮纹病菌胁迫前后表达无显著差异, 然而在R-6h/S-6h比对照组中呈现显著上调表达, 推测MLP蛋白也是华月、金冠2个品种抗病性差异相关的关键功能蛋白。

3 结论

在抗、感病苹果品种应答轮纹病菌胁迫过程中, 共筛选到7类抗性相关蛋白的表达模式存在显著差异。其中类甜蛋白、过氧化物酶和几丁质酶3类DEPs可能是不同品种应答轮纹病菌胁迫抗性差异的关键因子。多酚氧化酶、主乳蛋白、内切葡聚糖酶和过敏原蛋白4类蛋白可能通过表达量的调节应答轮纹病菌胁迫反应。研究结果为进一步解析抗、感病苹果品种应答轮纹病菌胁迫的抗性机制提供参考。

参考文献

- 林月莉, 黄丽丽, 索朗拉姆, 高小宁, 陈银潮, 康振生 (2011). 苹果轮纹病室内快速评价体系的建立. 植物保护学报 **38**, 37–41.
- 孙天骅, 李佳, 王涛, 牛宁, 徐继忠 (2018). 抗病与感病苹果叶片应答轮纹病菌侵染的蛋白质表达差异分析. 园艺学报 **45**, 409–420.
- 肖龙, 张彩霞, 宗泽冉, 田义, 张利义, 丛佩华 (2016). 苹果叶片应答轮纹病菌胁迫的叶绿体蛋白质组学分析. 果树学报 **33**, 1357–1366.
- 徐鹏飞, 王萍, 吴俊江, 张淑珍, 范素杰, 李宁辉, 王欣, 陈晨, 李文滨 (2010). 疫霉根腐病菌毒素对大豆不同组织中多酚氧化酶的影响. 作物杂志 (2), 28–31.
- 杨丽丽, 庄艳, 王忆, 张新忠, 韩振海 (2012). 不同抗性苹果果实受轮纹病菌侵染后亚显微结构的变化. 园艺学报 **39**, 963–969.
- 杨振英, 康国栋, 王强, 薛光荣, 张利义, 田义, 杨玲, 张彩霞, 李武兴, 丛佩华 (2010). 黄色苹果新品种‘华月’. 园艺学报 **37**, 1877–1878.
- 张彩霞, 田义, 张利义, 肖龙, 康国栋, 丛佩华 (2015). 苹果枝条表皮应答轮纹病菌侵染的蛋白质组学分析. 植物病理学报 **45**, 280–287.
- 张彩霞, 袁高鹏, 韩晓蕾, 田义, 张利义, 丛佩华 (2018). 基于iTRAQ定量蛋白质组技术筛选‘华月’苹果斑点落叶病抗性相关蛋白. 植物病理学报 **48**, 787–798.
- 张计育, 渠慎春, 薛华柏, 高志红, 郭忠仁, 章镇 (2012). 北海棠病程相关蛋白MhPR8基因的克隆与表达. 中国农业科学 **45**, 1568–1575.
- 张玉经, 王昆, 王忆, 韩振海, 高源, 许雪峰, 张新忠 (2010). 苹果种质资源果实轮纹病抗性的评价. 园艺学报 **37**, 539–546.
- 周增强, 侯琤, 王丽, 朱发亮 (2010). 枝干苹果轮纹病人工接种方法与品种抗性评价. 果树学报 **27**, 952–955.
- 宗泽冉, 田义, 张利义, 韩晓蕾, 张彩霞, 丛佩华 (2017). 抗苹果斑点落叶病基因*Mal d1*的克隆及功能鉴定. 园艺学报 **44**, 343–354.
- Berger S, Papadopoulos M, Schreiber U, Kaiser W, Roitsch T (2004). Complex regulation of gene expression, photosynthesis and sugar levels by pathogen infection in tomato. *Physiol Plant* **122**, 419–428.
- Berger S, Sinha AK, Roitsch T (2007). Plant physiology meets phytopathology: plant primary metabolism and plant pathogen interactions. *J Exp Bot* **58**, 4019–4026.
- Borges LL, Santana FA, Castro ISL, Arruda KMA, de Oliveira Ramos HJ, Moreira MA, de Barros EG (2013). Differentially expressed proteins during an incompatible interaction between common bean and the fungus *Pseudocercospora griseola*. *Mol Breed* **32**, 933–942.
- Breiteneder H, Ebner C (2000). Molecular and biochemical classification of plant-derived food allergens. *J Allergy Clin Immunol* **106**, 27–36.
- Chen Y, Zhang C, Cong P (2012a). Dynamics of growth regulators during infection of apple leaves by *Alternaria alternata* apple pathotype. *Australas Plant Pathol* **41**, 247–253.
- Chen Z, Wang QH, Lin L, Tang Q, Edwards JL, Li SW, Liu SQ (2012b). Comparative evaluation of two isobaric labeling tags, DiART and iTRAQ. *Anal Chem* **84**, 2908–2915.
- Christensen JH, Bauw G, Welinder KG, van Montagu M, Boerjan M (1998). Purification and characterization of peroxidases correlated with lignification in poplar xylem. *Plant Physiol* **118**, 125–135.
- Dietz KJ, Jacob S, Oelze ML, Laxa M, Tognetti V, de Miranda SMN, Baier M, Finkemeier I (2006). The function of peroxiredoxins in plant organelle redox metabolism. *J Exp Bot* **57**, 1697–1709.
- Dinakar C, Djilianov D, Bartels D (2012). Photosynthesis in desiccation tolerant plants: energy metabolism and oxidative stress defense. *Plant Sci* **182**, 29–41.
- Eccher G, Ferrero S, Populin F, Colombo L, Botton A (2014). Apple (*Malus domestica* L. Borkh) as an emerging

- model for fruit development. *Plant Biosyst* **148**, 157–168.
- Erickson BK, Jedrychowski MP, Mcalister GC, Everley RA, Kunz R, Gygi SP** (2015). Evaluating multiplexed quantitative phosphopeptide analysis on a hybrid quadrupole mass filter/linear ion trap/orbitrap mass spectrometer. *Anal Chem* **87**, 1241–1249.
- Fan HK, Wang F, Gao H, Wang LC, Xu JH, Zhao ZY** (2011). Pathogen-induced MdWRKY1 in 'Qinguan' apple enhances disease resistance. *J Plant Biol* **54**, 150–158.
- Golba B, Treutter D, Kollar A** (2012). Effects of apple (*Malus × domestica* Borkh.) phenolic compounds on proteins and cell wall-degrading enzymes of *Venturia inaequalis*. *Trees* **26**, 131–139.
- Grover A** (2012). Plant chitinases: genetic diversity and physiological roles. *Crit Rev Plant Sci* **31**, 57–73.
- Jurick II WM, Janisiewicz WJ, Saftner RA, Vico I, Gaskins VL, Park E, Forsline PL, Fazio G, Conway WS** (2011). Identification of wild apple germplasm (*Malus* spp.) accessions with resistance to the postharvest decay pathogens *Penicillium expansum* and *Colletotrichum acutatum*. *Plant Breed* **130**, 481–486.
- Kim BG, Fukumoto T, Tatano S, Gomi K, Ohtani K, Tada Y, Akimitsu K** (2009). Molecular cloning and characterization of a thaumatin-like protein-encoding cDNA from rough lemon. *Physiol Mol Plant Pathol* **74**, 3–10.
- Kornas A, Kuźniak E, Slesak I, Miszalski I** (2010). The key role of the redox status in regulation of metabolism in photosynthesizing organisms. *Acta Biochim Pol* **57**, 143–151.
- Li L, Steffens JC** (2002). Overexpression of polyphenol oxidase in transgenic tomato plants results in enhanced bacterial disease resistance. *Planta* **215**, 239–247.
- Li MM, Xu JH, Qiu ZH, Zhang J, Ma FW, Zhang JK** (2014). Screening and identification of resistance related proteins from apple leaves inoculated with *Marssonina coronaria* (Ell. & J. J. Davis). *Proteome Sci* **12**, 7.
- Li ZT, Dhekney SA, Grad DJ** (2011). PR-1 gene family of grapevine: a uniquely duplicated PR-1 gene from a *Vitis* interspecific hybrid confers high level resistance to bacterial disease in transgenic tobacco. *Plant Cell Rep* **30**, 1–11.
- Livak KJ, Schmittgen TD** (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* **25**, 402–408.
- Mazzeo MF, Cacace G, Ferriello F, Puopolo G, Zoina A, Ercolano MR, Siciliano RA** (2014). Proteomic investigation of response to forl infection in tomato roots. *Plant Physiol Biochem* **74**, 42–49.
- Ni WC, Zhu LM, Sha RH, Tao JM, Cai BH, Wang SH** (2017). Comparative iTRAQ proteomic profiling of susceptible and resistant apple cultivars infected by *Alternaria alternata* apple pathotype. *Tree Genet Genomes* **13**, 23.
- Ogata T, Sano T, Harada Y** (2000). *Botryosphaeria* spp. isolated from apple and several deciduous fruit trees are divided into three groups based on the production of warts on twigs, size of conidia, and nucleotide sequences of nuclear ribosomal DNA ITS regions. *Mycoscience* **41**, 331–337.
- Paulo JA, McAllister FE, Everley RA, Beausoleil SA, Bank AS, Gygi SP** (2015). Effects of MEK inhibitors GSK1120212 and PD0325901 *in vivo* using 10-plex quantitative proteomics and phosphoproteomics. *Proteomics* **15**, 462–473.
- Ramsubramaniam N, Tao F, Li SW, Marten MR** (2013). Cost-effective isobaric tagging for quantitative phosphoproteomics using DiART reagents. *Mol Biosyst* **9**, 2981–2987.
- Savitski MM, Wilhelm M, Hahne H, Kuster B, Bantscheff M** (2015). A scalable approach for protein false discovery rate estimation in large proteomic data sets. *Mol Cell Proteom* **14**, 2394–2404.
- Sun H, Kim MK, Pulla RK, Kim YJ, Yang DC** (2010). Isolation and expression analysis of a novel major latex-like protein (MLP151) gene from *Panax ginseng*. *Mol Biol Rep* **37**, 2215–2222.
- Thipyapong P, Hunt MD, Steffens JC** (2004). Antisense downregulation of polyphenol oxidase results in enhanced disease susceptibility. *Planta* **220**, 105–117.
- Wang YP, Yang L, Chen X, Ye TT, Zhong B, Liu RJ, Wu Y, Chan ZL** (2016). Major latex protein-like protein 43 (MLP43) functions as a positive regulator during abscisic acid responses and confers drought tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot* **67**, 421–434.
- Wen B, Zhou R, Feng Q, Wang QH, Wang J, Liu SQ** (2014). IQuant: an automated pipeline for quantitative proteomics based upon isobaric tags. *Proteomics* **14**, 2280–2285.
- Xing LL, Sun LN, Liu SL, Li XN, Zhang LB, Yang HS** (2017). IBT-based quantitative proteomics identifies potential regulatory proteins involved in pigmentation of purple sea cucumber, *Apostichopus japonicus*. *Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics* **23**, 17–26.
- Xu C, Wang CS, Ju LL, Zhang R, Biggs AR, Tanaka E, Li BZ, Sun GY** (2015). Multiple locus genealogies and phenotypic characters reappraise the causal agents of

apple ring rot in China. *Fungal Divers* **71**, 215–231.
Zhang CX, Tian Y, Cong PH (2015). Proteome analysis of
pathogen-responsive proteins from apple leaves induced

by the Alternaria blotch *Alternaria alternata*. *PLoS One*
10, e0122233.

Proteome Analysis of Different Resistant Apple Cultivars in Response to the Stress of Ring Rot Disease

Caixia Zhang, Gaopeng Yuan, Xiaolei Han, Wuxing Li, Peihua Cong*

Key Laboratory of Horticulture Crops Germplasm Resources Utilization, Ministry of Agriculture, Research Institute of Pomology, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Xingcheng 125100, China

Abstract The aim of this study was to investigate the differential expression of resistance related proteins in resistant and susceptible apple leaves in response to ring rot disease. The resistant and susceptible apple cultivars Huayue and Golden Delicious were analyzed by high-throughput isobaric tag (IBT) marker quantitative analysis combined with liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS), proteome differential expression of resistant and susceptible apple leaves before and after pathogen treatment was analyzed, and 171 differential expression proteins (DEPs) were identified. GO enrichment and KEGG pathway analysis showed that 686 GO entries were annotated in cell components, molecular functions, and biological processes, of which 52 DEPs were annotated in 18 distinct pathways of KEGG pathway ($P<0.05$). Subcellular localization prediction analysis showed that 170 DEPs in 171 DEPs were located in 8 organelles. Functional annotation analysis showed that 46 DEPs were annotated in 7 classes of resistance-related proteins, including the thaumatin-like proteins, peroxidases, polyphenol oxidases, Mal d1 proteins, chitinases, endo-1,3-beta-glucosidases and MLP-like proteins. In addition, the expression characteristics and gene quantitative results of resistance-related proteins were analyzed. The results of this study provided a technical reference for further understanding the resistance mechanism of resistant and susceptible apples to the stress of ring rot disease.

Key words apple, resistant and susceptible, IBT proteomics, ring rot disease, resistance-related proteins

Zhang CX, Yuan GP, Han XL, Li WX, Cong PH (2020). Proteome analysis of different resistant apple cultivars in response to the stress of ring rot disease. *Chin Bull Bot* **55**, 430–441.

* Author for correspondence. E-mail: congph@163.com

(责任编辑: 朱亚娜)

附录1 抗、感苹果品种叶片应答轮纹病菌胁迫的差异表达蛋白

Appendix 1 Differentially expressed proteins detected in apple leaves resistant and susceptible to ring rot disease

<http://www.chinbullbotany.com/fileup/1674-3466/PDF/t19-204.pdf>