

水稻与病原物互作蛋白质组学研究进展

余初浪 杨 勇 王栩鸣 严成其 陈剑平*
(浙江省农业科学院 病毒学与生物技术研究所以,浙江 杭州 310021; * 通讯联系人, E-mail: jpcchen2001@yahoo.com.cn)

Recent Advances in Proteomic Studies on Rice Pathogen Interactions

YU Chu lang, YANG Yong, WANG Xu ming, YAN Cheng qi, CHEN Jian ping*
(Institute of Virology and Biotechnology, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, China; * Corresponding author, E-mail: jpcchen2001@yahoo.com.cn)

YU Chulang, YANG Yong, WANG Xuming, et al. Recent advances in proteomic studies on rice pathogen interactions. Chin J Rice Sci, 2010, 24(6): 647-651.
- Abstract: The molecular mechanisms of plant pathogen interactions have been a longtime hotspot of plant pathology. Recently, functional genomic strategies, including proteomics and transcriptomics, have been widely used in defining gene and protein function and expression profiles. Proteomics, a complementary research content of transcriptomics, has been a powerful tool to systematically analyze the cellular protein expression profiles and post translational modifications under pathogen invasion. Rice, a monocotyledonous plant for which the entire genome was completely sequenced, has been adopted as an ideal model for studying the molecular mechanisms of plant pathogen interactions. In this review, the main research techniques of proteomics, recent advances in proteomic analyses of rice under bacteria, fungi and viruses invasion were highlighted, and an overview on phosphoproteomics analyses of rice pathogen interactions was presented.
Key words: rice; pathogen; proteomics; plant pathogen interaction; experimental technology

余初浪, 杨 勇, 王栩鸣, 等. 水稻与病原物互作蛋白质组学研究进展. 中国水稻科学, 2010, 24(6): 647-651.
摘 要: 植物与病原物互作的分子机制一直是植物病理学研究的热点。近年来, 功能基因组学研究策略, 包括蛋白质组学和转录组学, 已广泛应用于基因、蛋白的功能鉴定和表达谱研究。蛋白质组学作为转录组学研究的一个互补内容, 已成为系统研究植物应答病原物侵染的蛋白质表达谱和翻译后修饰的有力工具。水稻作为已完成基因组测序的单子叶植物, 是研究植物与病原物互作分子机理的理想模型。因此, 着重介绍了蛋白质组学的研究技术, 水稻响应细菌、真菌及病毒等病原物侵染的蛋白质组学研究进展和水稻与病原物互作磷酸化蛋白质组学的概况。
关键词: 水稻; 病原物; 蛋白质组学; 植物与病原物互作; 研究技术
中图分类号: Q946.1; S435.111 文献标识码: A 文章编号: 1001-7216(2010)06-0647-05

植物在与病原物长期的斗争中, 逐渐演化出一系列复杂的抗病机制。在自然界中, 植物抗病表型是普遍的, 而感病表型只在特定的情况下发生。这是由于植物先天具备识别多种病原物的能力, 并能成功防御大多数病原物的入侵。只在少数情况下, 病原物逃避了植物的监控或者抑制了植物的防御机制而导致植物发病^[1]。植物与病原物的互作机制一直是研究者关注的热点。植物抗病防御反应是多基因参与调控的复杂过程。目前, 只有基因芯片和蛋白质组学能在整体上对这个复杂过程进行最大限度的研究。基因芯片主要研究 mRNA 水平上的变化, 蛋白质组学则主要研究蛋白质的表达和翻译后修饰。但实验证明, 组织中的 mRNA 丰度与蛋白质的丰度相关性并不好, 尤其对于低丰度蛋白来说, 相关性更差^[2]。更重要的是, 蛋白质复杂的翻译后修饰、蛋白质的亚细胞定位或迁移、蛋白质之间的互作等都无法从基因表达水平上去判断。因此, 在蛋白质水平上对细胞应激反应的研究是对 mRNA 水平

研究的一个必要补充。
水稻(*Oryza sativa* L.) 是世界主要的粮食作物, 全球有一半以上人口以大米为主食。同时, 水稻是禾谷类作物研究的模式植物, 其基因组测序的完成, 标志着水稻研究进入功能基因组学时代。水稻蛋白质组学研究随着技术体系的不断完善而日渐深入。目前, 水稻的各个组织或器官的蛋白质表达谱分析已相继完成, 研究的重点开始转向研究其在不同发育时期、不同环境条件(包括各种生物或非生物胁迫)下的差异表达蛋白质组和翻译后修饰蛋白质组。在众多影响水稻产量的因素中, 病害是导致水稻减产的主要原因之一, 也因此受到众多研究者的

收稿日期: 2010-06-03; 修改稿收到日期: 2010-07-15。
基金项目: 国家 863 计划资助项目(2008AA02Z125); 国家转基因生物新品种培育重大科技专项资助项目(2009ZX08009-043B); 浙江省自然科学基金重点资助项目(Z307451); 浙江省重大科技专项(优先主题)资助项目(2007C12039); 浙江省重点科技创新团队专项资金资助项目(2009R50032)。

关注。对水稻与病原物之间的互作机理进行深入研究,不仅可为水稻抗病分子育种提供理论基础,同时也为科学家了解植物与病原物互作机制提供一个模型^[3-4]。本文拟就水稻在病原物胁迫下的差异蛋白质组学和磷酸化蛋白质组学研究进展进行简要综述。

1 蛋白质组学研究技术

蛋白质组学的发展及应用与其技术的发展是密不可分的。目前,在蛋白质组学研究中应用的主要有两种技术策略。一种是基于胶的蛋白质组学技术,另一种是基于质谱的蛋白质组学技术。

1.1 基于胶的蛋白质组学技术

基于胶的蛋白质组学技术的核心是双向电泳与生物质谱。双向电泳用于蛋白质的分离和定量分析,质谱则用于蛋白质的鉴定。传统的双向电泳技术由 O'Farrell 于 1975 年建立^[5]。蛋白质先进行第一向等电聚焦 (isoelectrofocusing, IEF),根据其等电点不同进行分离,然后进行第二向十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS PAGE),再根据分子量的大小进行蛋白质分离,经染色形成蛋白质的二维凝胶图谱。随着商品化固相 pH 梯度胶条的出现,使得该项技术在上样量、分辨率和重复性方面得到极大的提高,因而应用日益广泛。双向电泳目前已成为植物蛋白质组学研究中应用最为广泛的技术。但是由于传统的双向电泳技术依赖于不同样本的胶间比较的技术特点,导致该技术无法有效地区分系统误差和样品间的表达差异,因而难以获得具有高可信度的试验结果^[6-7]。在传统双向电泳基础上发展起来的荧光差异双向凝胶电泳技术 (fluorescent two dimensional difference gel electrophoresis, 2D DIGE),采用多重荧光分析的方法,在同一块胶上共同分离多个分别由不同荧光标记的样品,并以荧光标记的所有样本混合物为内标,软件根据每个蛋白点的内标对其表达量进行全自动校准,对每个差异进行统计学可信度分析,以保证所检测到的蛋白丰度变化是真实的,极大地提高了结果的准确性、可靠性和重复性。另外,由于荧光染料具有灵敏度高和检测动态线性范围宽等特性,2D DIGE 技术能够满足高通量差异蛋白质组学研究分析的要求^[8]。

双向电泳作为蛋白质组学最经典的技术手段,随着其自身技术体系的不断发展和完善,还将在蛋

白质组学研究中继续发挥作用。

1.2 基于质谱的蛋白质组学技术

虽然双向电泳技术发展至今,其技术体系已非常成熟。但该技术体系本身存在一些难以克服的缺陷,如对低丰度蛋白质、极高、极低分子量蛋白质、极酸、极碱蛋白质和疏水性蛋白质都难以进行有效的分离检测^[9-10]。

近年,基于质谱的蛋白质组学技术发展迅速,可以克服双向电泳技术的缺陷。这些技术包括细胞培养稳定同位素标记技术 (stable isotope labeling with amino acids in cell culture, SILAC)、同位素标记的亲和标签 (isotope coded affinity tags, ICAT)、同位素标记相对和绝对定量 (isobaric tag for relative and absolute quantitation, iTRAQ) 等。目前,在植物蛋白质组学研究中应用较多的是 ICAT 和 iTRAQ 技术。ICAT 技术是利用一种能与半胱氨酸反应并有“轻”和“重”两种形式稳定同位素的亲和标签试剂,标记两种不同状态下的组织或细胞的蛋白质,经胰蛋白酶水解后,结合液相色谱和串联质谱对不同细胞状态下蛋白质表达差异进行全景式分析。ICAT 方法只能用于含有半胱氨酸的多肽标记和两组样品间的比较。iTRAQ 技术则是利用 4~8 种等质量的胺活性试剂,对蛋白质酶解的肽段进行差异标记,再结合多维蛋白质鉴定技术 (multi dimensional protein identification technology, MudPIT) 进行分析鉴定。该技术能同时进行 4~8 种样品的比较分析,而且适用于所有来源的蛋白质样品,因此,在进行多个样品分析时具有明显优势。

以上 3 种蛋白质定量技术都依赖于稳定同位素标记。近年来,研究人员提出了一种不依赖于同位素标记的蛋白质组学技术,现有的非标记定量技术主要分为基于一级质谱信息和基于二级质谱信息两种。非标记定量技术目前还处于发展完善阶段,其关键问题在于其定量的准确性以及与现有定量方法的相关性。Majeran 等^[11]应用非变性胶双向电泳、iTRAQ 技术和非标记定量技术对玉米叶片的维管束鞘和叶肉细胞的叶绿体蛋白质进行了定量研究。该研究结果验证了非标记定量技术应用于植物大规模定量蛋白质组分析的可行性。

基于胶的蛋白质组学技术与基于质谱的蛋白质组学技术各有优势,两种技术策略可取长补短,优势互补。前者技术体系成熟、稳定,但灵敏度相对较低、通量有限、自动化程度低、能分析的蛋白质种类有限,后者则可以解决基于胶的蛋白质组学技术的

缺陷 ,但其本身存在对仪器依赖程度高、技术体系还不够完善等不足之处。

2 水稻 病原物互作差异蛋白质组学研究

差异蛋白质组学研究是蛋白质组学研究的一个重要内容。它主要侧重于寻找某种特定因素引起样本间的蛋白质表达差异 ,揭示细胞蛋白质组在特定生理或病理状态下的变化。通过对这种变化的进一步分析 ,理论上可以推断造成这种变化的原因^[12]。下面将分述水稻响应细菌、真菌、病毒等病原物侵染的差异蛋白质组学研究。

2.1 水稻响应细菌侵染的蛋白质组学

常见的水稻细菌性病害 ,主要有白叶枯病 (*Xanthomonas oryzae* pv . *oryzae*)、细菌性条斑病 (*Xanthomonas oryzae* pv . *oryzicola*)、细菌性基腐病 (*Erwinia chrysanthemi* pv . *zea*) ,细菌性褐斑病 (*Pseudomonas syringae* pv . *syringae* Van Hall) 等。其中以白叶枯病发病危害最重 ,也最具代表性。

水稻与白叶枯病菌的互作是研究禾本科植物与病原细菌互作的理想模式系统^[13]。Mahmood 等^[14]利用双向电泳技术分析白叶枯病菌亲和小种 (Xo7435)和非亲和小种 (T7174) 接种水稻 Java 14 前后叶片的细胞质蛋白和膜蛋白的表达差异 ,共发现 20 个蛋白的表达在接种前后发生了变化 ,这些蛋白涉及能量、代谢、防御反应。同时 ,发现 T7174、Xo7435 侵染和茉莉酸 (jasmonic acid , JA) 处理都能上调类甜蛋白 (thaumatin like protein , TLP) 和噻菌灵诱导蛋白 (probenazole induced protein , PBZ1) 的表达。另外 ,不管是亲和互作还是非亲和互作都能引起 Rubisco 大亚基的降解。Yu 等^[15]以体细胞杂交的抗白叶枯病新种质叶片为材料 ,利用双向电泳技术研究其与非亲和小种 ZHE173 的互作。共发现 77 个蛋白表达在接种前后发生了变化 ,有 64 个得到鉴定 ,其中 51 个已知功能的蛋白可以被分为 5 类 ,包括光合作用相关蛋白、抗氧化防御蛋白、蛋白更新、信号转导和代谢。另外 ,此研究也同样表明白叶枯病菌的侵染能引起 Rubisco 大亚基的降解。植物细胞膜蛋白在应答病原物侵染后的细胞信号传导中扮演重要角色。Chen 等^[16]以含有 *Xa21* 抗病基因的水稻悬浮细胞为材料 ,利用双向电泳技术研究其在白叶枯病菌亲和小种和非亲和小种胁迫下细胞膜蛋白早期表达变化。共发现 20 个蛋白在病菌侵染前后表达发生变化。经质谱鉴定 ,这些差异蛋白涉及电子和能量传递、磷酸化修饰和

防御反应。

水稻细菌性条斑病是威胁我国南方稻区水稻生产的重要病害。目前 ,关于细菌性条斑病病原菌与水稻互作的蛋白质组学研究鲜有报道。陈芳育等^[17]利用双向电泳技术分析高抗水稻品种“佳辐占”在接种细菌性条斑病菌 2 d 后的叶片蛋白质组学变化 ,共发现 38 个蛋白在接种病原菌后表达发生变化。利用质谱技术成功鉴定了其中的 33 个蛋白 ,这些蛋白可分为 4 个功能类群 ,即信号传导相关蛋白、防卫相关蛋白、代谢相关蛋白和蛋白质稳定相关蛋白。

2.2 水稻响应真菌侵染的蛋白质组学

水稻真菌病害以稻瘟病最具代表性 ,它是世界上大部分水稻产区危害最严重的一种真菌病害。水稻与稻瘟病菌间的互作是研究植物与病原物互作的模式系统^[4]。

Kim 等^[18-20]对水稻在稻瘟病菌胁迫下的蛋白质组学进行了较为系统的研究。Kim 等^[18-19]以水稻悬浮细胞和叶片为研究材料 ,利用双向电泳技术分离稻瘟病菌胁迫下的差异表达蛋白 ,并利用质谱技术对这些差异蛋白点进行鉴定。结果表明 ,稻瘟病菌能诱导病程相关 (pathogenesis related , PR) 蛋白 OsPR 10、PR 5、异黄酮还原酶类似蛋白、- 葡萄糖苷酶、受体类蛋白激酶 (receptor like protein kinase , RLKs)、- 1,3 葡聚糖酶、过氧化物酶及 PBZ1 的表达。同时 ,研究还表明 RLKs、PR 5、OsPR 10 和 PBZ1 等蛋白在水稻与稻瘟病菌非亲和互作中的表达量比亲和互作的表达量要高且受诱导表达的时间要早。另外 ,Kim 等^[20]还以水稻悬浮细胞为研究材料 ,利用双向电泳技术研究其在稻瘟病菌和激发子胁迫下的分泌蛋白质组。共检测到 21 个蛋白点在接种后表达发生变化 ,利用质谱技术成功鉴定了其中的大多数蛋白点 ,包括 9 个几丁质酶、2 个草酸氧化酶、5 个未知功能分泌蛋白和 - 延展素。这项研究是关于水稻在稻瘟病菌和激发子胁迫下的分泌蛋白质组研究的首次报道。

2.3 水稻响应病毒侵染的蛋白质组学

目前 ,水稻响应病毒病害的蛋白质组学研究主要以水稻 水稻黄斑驳病毒互作为模型。Ventelon Debout 等^[21]利用双向电泳技术分析水稻感病品种 IR64 和部分抗性品种 Azucena 的悬浮培养细胞在接种水稻黄斑驳病毒 (rice yellow mottle virus , RYMV) 前后的蛋白质差异情况 ,分别发现有 40 和 24 个差异表达的蛋白 ,各有 19 和 13 个蛋白得到鉴

定。这些蛋白可以分为 3 类,即代谢类蛋白、胁迫相关蛋白和参与蛋白翻译的蛋白。研究还发现许多受非生物胁迫调节的蛋白也能在 RYMV 侵染后表达,如:盐诱导蛋白 (salt induced protein, SalT)、热激蛋白 (heat shock proteins, HSPs) 和超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD),但有些蛋白 (如脱水蛋白和一些参与糖酵解的蛋白) 只受水稻黄斑驳病毒的诱导表达。Brizard 等^[22] 同样以水稻-水稻黄斑驳病毒互作为模型,开展了植物与病毒的互作蛋白质组研究。他们首次大规模地分离、鉴定了病毒-宿主复合蛋白,以验证病毒是否可以劫持大量的宿主蛋白。为此,他们建立了一种提取病毒-宿主复合蛋白的新方法:复合蛋白经凝胶排阻色谱纯化、SDS PAGE 电泳,最后用液相色谱串联质谱 (Nano LC-MS/MS) 鉴定蛋白质。研究表明,病毒可以劫持大量的宿主蛋白以保证其自身的生存。

3 水稻病原物互作磷酸化蛋白质组学

蛋白质翻译后修饰决定了蛋白质成熟、结构和功能多样性等多方面特性。目前已知的蛋白质翻译后修饰超过 100 种,常见的蛋白质翻译后修饰有磷酸化、糖基化、泛素化、甲基化和乙酰化等,其中又以蛋白质的磷酸化研究最多^[23]。研究表明,细胞中有 1/3 的蛋白质发生了磷酸化修饰^[24]。蛋白质的可逆磷酸化参与了几乎所有的生命活动,包括细胞的增殖、发育和分化、病理过程和环境应答等,尤其是在调节细胞信号转导过程中起着极其重要的作用。磷酸化蛋白质组学就是鉴定细胞内所有的磷酸化蛋白质,并了解其在应答外界胁迫时蛋白质的磷酸化和去磷酸化的动态变化,从而分析特定磷酸化修饰对生命过程的调控作用及其分子机制^[25]。而要弄清蛋白质磷酸化在细胞信号传导和细胞代谢中所扮演的角色,就必须对特定的磷酸化事件进行定量分析。目前,定量蛋白质组学的研究方法原则上都适用于进行磷酸化蛋白质的定量分析。但是由于磷酸化蛋白质自身的特点,磷酸化蛋白质组的定量分析要比定量蛋白质组学困难得多^[26-27]。第一,磷酸化蛋白质在细胞中的含量比非磷酸化的蛋白少很多,且其化学计量值很低,因而在磷酸化蛋白质组的定量分析前需要大量富集磷酸化蛋白。第二,磷酸化肽段本身带负电,导致其在 MALDI (matrix assisted laser desorption ionization) 源的质谱仪中离子化效率低下,再加上磷酸键较肽键容易断裂,使得鉴定磷酸化蛋白要比非磷酸化蛋白困难得多^[26-27]。

正是由于磷酸化蛋白质的这些特性,磷酸化蛋白质组研究的发展相对缓慢。

目前有关植物与病原物互作的磷酸化蛋白质组学研究主要集中在拟南芥上。Peck 等^[28] 以³²P 脉冲标记的拟南芥悬浮培养细胞为研究材料,利用双向电泳和质谱技术鉴定拟南芥细胞响应细菌和真菌激发子的磷酸化蛋白。其中 AtPhos43 在细菌和真菌激发子胁迫的数分钟内发生磷酸化,而且在番茄和水稻中也存在类似的蛋白。Nühse 等^[29] 利用 iTRAQ 技术并结合液相色谱质谱联用仪 (LC-MS/MS) 对细菌激发子胁迫下的拟南芥悬浮细胞的细胞膜蛋白的磷酸化状态变化进行了定量分析。该项研究显示了定量磷酸化蛋白质组学技术在揭示植物抗病分子调节机制方面的巨大应用潜力。

水稻磷酸化蛋白质组学研究总体上要落后于拟南芥。目前,主要开展了水稻磷酸化蛋白质谱的鉴定及水稻在非生物胁迫下的磷酸化蛋白质组的研究^[30-33],而水稻与病原物互作的磷酸化蛋白质组研究尚未见报道。随着磷酸化蛋白质组分析技术的不断发展和完善,它在水稻与病原物互作研究中必将得到广泛应用。同时,这也是水稻与病原物互作蛋白质组学未来的发展方向之一。

4 展望

蛋白质组学研究的核心内容是通过大规模检测蛋白质的动态表达、动态修饰、动态相互作用等动态变化,来实现对蛋白质功能的分析。随着技术的迅速发展,蛋白质组学研究已经从蛋白质的简单鉴定走向蛋白质的表达水平及其存在形式变化的定量检测。与拟南芥相比,水稻蛋白质组学研究,尤其是在水稻与病原物互作方面的研究进展相对缓慢,主要表现在以下两个方面:1) 研究技术主要以传统的双向电泳技术为主,而像 2D-DIGE 技术和基于质谱的蛋白质组学技术等新技术的应用相对较少;2) 研究主要集中于环境胁迫下的差异蛋白质组学研究,而对蛋白质翻译后修饰和蛋白质互作的研究较少。

本综述主要介绍了蛋白质组学技术在水稻与病原物互作研究中的应用及取得的进展,但蛋白质组学研究只是我们深入了解水稻与病原物互作复杂机理的一种必要手段,它并不能告诉我们其中的全部答案。要想全面了解水稻与病原物互作的复杂机理,还必须整合基因组学、转录组学、蛋白质组学和代谢组学所取得的研究成果,从整体上系统地解析其中的奥秘。

参考文献：

[1] Staskawicz B J . Genetics of plant pathogen interactions specifying plant disease resistance . *Plant Physiol* , 2001 , 125(1) : 73-76 .

[2] Gygi S P , Rochon Y , Franza B R , et al . Correlation between protein and mRNA abundance in yeast . *Mol Cell Biol* , 1999 , 19(3) : 1720-1730 .

[3] Lee S W , Han S W , Bartley L E , et al . From the academy : Colloquium review . Unique characteristics of *Xanthomonas oryzae* pv . *oryzae* AvrXa21 and implications for plant innate immunity . *Proc Natl Acad Sci USA* , 2006 , 103(49) : 18395-18400 .

[4] Ebbole D J . *Magnaporthe* as a model for understanding host pathogen interactions . *Annu Rev Phytopathol* , 2007 , 45 : 437-456 .

[5] O'Farrell P H . High resolution two dimensional electrophoresis of proteins . *J Biol Chem* , 1975 , 250(10) : 4007-4021 .

[6] Asirvatham V S , Watson B S , Sumner L W . Analytical and biological variances associated with proteomic studies of *Medicago truncatula* by two dimensional polyacrylamide gel electrophoresis . *Proteomics* , 2002 , 2(8) : 960-968 .

[7] Alban A , David S O , Bjørksten L , et al . A novel experimental design for comparative two dimensional gel analysis : two dimensional difference gel electrophoresis incorporating a pooled internal standard . *Proteomics* , 2003 , 3(1) : 36-44 .

[8] Lilley K S , Friedman D B . Difference gel electrophoresis DIGE . *Drug Discov Today : Technol* , 2006 , 3(3) : 347-353 .

[9] Baggerman G , Vierstraete E , De Loof A , et al . Gel based versus gel free proteomics : A review . *Comb Chem High Throughput Screen* , 2005 , 8(8) : 669-677 .

[10] Molloy M P , Witzmann F A . Proteomics : Technologies and applications . *Brief Funct Genomic Proteomics* , 2002 , 1(1) : 23-29 .

[11] Majeran W , Zybailov B , Ytterberg A J , et al . Consequences of C4 differentiation for chloroplast membrane proteomes in maize mesophyll and bundle sheath cells . *Mol Cell Proteomics* , 2008 , 7(9) : 1609-1638 .

[12] 孙言伟 , 姜颖 , 贺福初 . 差异蛋白质组学的研究进展 . 生命科学 , 2005 , 17(2) : 137-140 .

[13] 陈功友 , 邹丽芳 , 王邢平 , 等 . 水稻白叶枯病菌致病性分子遗传学基础 . 中国农业科学 , 2004 , 37(9) : 1301-1307 .

[14] Mahmood T , Jan A , Kakishima M , et al . Proteomic analysis of bacterial blight defense responsive proteins in rice leaf blades . *Proteomics* , 2006 , 6(22) : 6053-6065 .

[15] Yu C L , Yan S P , Wang C C , et al . Pathogenesis related proteins in somatic hybrid rice induced by bacterial blight . *Phytochemistry* , 2008 , 69(10) : 1989-1996 .

[16] Chen F , Yuan Y X , Li Q , et al . Proteomic analysis of rice plasma membrane reveals proteins involved in early defense response to bacterial blight . *Proteomics* , 2007 , 7(9) : 1529-1539 .

[17] 陈芳育 , 黄青云 , 张红心 , 等 . 水稻品种“佳辐占”应答细菌性条斑病病原菌侵染的蛋白质组学分析 . 作物学报 , 2007 , 33(7) : 1051-1058 .

[18] Kim S T , Cho K S , Yu S , et al . Proteomic analysis of differentially expressed proteins induced by rice blast fungus and elicitor in suspension cultured rice cells . *Proteomics* , 2003 , 3(12) : 2368-2378 .

[19] Kim S T , Kim S G , Hwang D H , et al . Proteomic analysis of pathogen responsive proteins from rice leaves induced by rice blast fungus , *Magnaporthe grisea* . *Proteomics* , 2004 , 4(11) : 3569-3578 .

[20] Kim S T , Kang Y H , Wang Y , et al . Secretome analysis of differentially induced proteins in rice suspension cultured cells triggered by rice blast fungus and elicitor . *Proteomics* , 2009 , 9(5) : 1302-1313 .

[21] Ventelon Debut M , Delalande F , Brizard J P , et al . Proteome analysis of cultivar specific degradation of *Oryza sativa indica* and *O. sativa japonica* cellular suspensions undergoing rice yellow mottle virus infection . *Proteomics* , 2004 , 4(1) : 216-225 .

[22] Brizard J P , Carapito C , Delalande F , et al . Proteome analysis of plant virus interactome : Comprehensive data for virus multiplication inside their hosts . *Mol Cell Proteomics* , 2006 , 5(12) : 2279-2297 .

[23] Pawson T , Scott J D . Protein phosphorylation in signaling : 50 years and counting . *Trends Biochem Sci* , 2005 , 30(6) : 286-290 .

[24] Hubbard M J , Cohen P . On target with a new mechanism for the regulation of protein phosphorylation . *Trends Biochem Sci* , 1993 , 18(5) : 172-177 .

[25] Kersten B , Agrawal G K , Iwahashi H , et al . Plant phosphoproteomics : A long road ahead . *Proteomics* , 2006 , 6(20) : 5517-5528 .

[26] 黄珍玉 , 于雁灵 , 方彩云 , 等 . 质谱鉴定磷酸化蛋白研究进展 . 质谱学报 , 2003 , 24(4) : 494-500 .

[27] Thingholm T E , Jensen O N , Larsen M R . Analytical strategies for phosphoproteomics . *Proteomics* , 2009 , 9(6) : 1451-1468 .

[28] Peck S C , Nühse T S , Hess D , et al . Directed proteomics identifies a plant specific protein rapidly phosphorylated in response to bacterial and fungal elicitors . *Plant Cell* , 2001 , 13(6) : 1467-1475 .

[29] Nühse T S , Bottrill A R , Jones A M , et al . Quantitative phosphoproteomic analysis of plasma membrane proteins reveals regulatory mechanisms of plant innate immune responses . *Plant J* , 2007 , 51(5) : 931-940 .

[30] Khan M , Takasaki H , Komatsu S . Comprehensive phosphoproteome analysis in rice and identification of phosphoproteins responsive to different hormones/stresses . *J Proteome Res* , 2005 , 4(5) : 1592-1599 .

[31] Chitteti B R , Peng Z . Proteome and phosphoproteome differential expression under salinity stress in rice (*Oryza sativa*) roots . *J Proteome Res* , 2007 , 6(5) : 1718-1727 .

[32] Whiteman S A , Nühse T S , Ashford D A , et al . A proteomic and phosphoproteomic analysis of *Oryza sativa* plasma membrane and vacuolar membrane . *Plant J* , 2008 , 56(1) : 146-156 .

[33] Nakagami H , Sugiyama N , Mochida K , et al . Large scale comparative phosphoproteomics identifies conserved phosphorylation sites in plants . *Plant Physiol* , 153(3) : 1161-1174 .