

基于 iTRAQ 技术的不同发育时期石榴籽粒的定量蛋白质组学研究

牛娟¹, 曹达², 李好先¹, 薛辉¹, 陈丽娜¹, 刘贝贝¹, 王企¹, 曹尚银^{1*}

(¹中国农业科学院郑州果树研究所, 郑州 450009; ²墨尔本大学, 澳大利亚 3010)

摘要:【目的】探究石榴籽粒软硬形成的分子机制。【方法】以‘突尼斯’软子石榴和‘三白’硬子石榴籽粒为试材, 利用 iTRAQ 技术分析软子石榴与硬子石榴在籽粒硬度形成过程中蛋白表达丰度的差异。【结果】通过质谱鉴定, 共得到 1 940 个蛋白, 其中被定量的蛋白有 1 889 个, 根据蛋白的表达丰度, 将相对表达量大于或小于 1.5 倍且 *T* 检验值小于 0.05 的蛋白点定为差异表达蛋白, 通过分析, 共得到 154 个差异表达的蛋白, 其中上调表达的蛋白有 75 个, 下调表达的蛋白有 60 个, 共同表达蛋白的有 19 个。对这些差异表达的蛋白进行了功能注释如 GO 注释、亚细胞定位、KEGG 代谢通路注释、功能富集聚类分析如 GO 富集、结构域富集、代谢通路富集等生物信息学分析。【结论】发现在籽粒发展过程中, 数个蛋白基因涉及到次生细胞壁生物合成与降解中, 如 F5H、XYL、Elongation factor 1-β、Elongation factor 1-δ 及 Profilin 等, 为阐明石榴籽粒软硬形成的分子机制奠定理论基础。

关键词: 石榴; iTRAQ; 籽粒; 蛋白质组学

中图分类号: S665.4

文献标志码: A

文章编号: 1009-9980(2017)Suppl.-048-08

Proteomic changes during seed different development period by iTRAQ quantitative proteomics in pomegranate (*Punica granatum* L.)

NIU Juan¹, CAO Da², LI Haoxian¹, XUE Hui¹, CHEN Lina¹, LIU Beibei¹, WANG Qi¹, CAO Shangyin^{1*}

(¹Zhengzhou Fruit Research Institute, CAAS, Zhengzhou 450009, Henan, China; ²School of Biosciences, Faculty of Science, The University of Melbourne, Victoria 3010, Australia)

Abstract: 【Objective】This study aims to investigate the molecular mechanism underlying pomegranate seed hardness by comparing the protein expression profiles between soft- and hard-seeded varieties in 60 and 120 days after flowering (DAF). 【Methods】The protein expression profiles between soft- and hard-seeded pomegranate varieties were analysed by using the isobaric mass tags for relative and absolute quantitation technology (iTRAQ). 【Results】In total, 1 940 protein groups were identified from pomegranate, of which 1 889 proteins were quantified. When setting quantification ratio of >1.5 as up-regulated threshold and <0.67 as down-regulated threshold, 154 differentially expressed proteins were obtained in each group, 75 up-regulated, 60 down-regulated, and 19 co-expression. Intensive bioinformatics analysis was then carried out to annotate those quantifiable targets, including protein annotation, functional classification, functional enrichment, functional enrichment-based cluster analysis, etc. 【Conclusion】In all, during the development of seed, several proteins involved in the secondary cell wall biosynthesis and degradation, such as F5H, XYL, Elongation factor 1-β, Elongation factor 1-δ and Profilin, set the foundation for further research on molecular mechanisms related to pomegranate seed hardness.

Key words: Pomegranate; iTRAQ; Seeds; Proteomics

收稿日期: 2017-08-10

接受日期: 2017-09-10

基金项目: 国家科技基础性工作专项重点项目“我国优势产区落叶果树农家品种资源调查与收集”(2012 FY110100); 中国农业科学院科技创新工程: 特色果树资源与育种(CAAS-ASTIP-2017-ZFRI)

作者简介: 牛娟, 研究方向为果树遗传育种。E-mail: 18530982362@163.com

*通信作者 Author for correspondence. Tel: 0371-65330963, E-mail: 13937192127@163.com

石榴(*Punica granatum* L.)原产中亚地区,在我国已有2000多年的栽培历史,是中国近年来发展迅速的优良小杂果类果树之一,它以较高的经济价值、营养价值、医药价值和保健功能,越来越受到消费者的青睐^[1]。石榴有软子和硬子之分,硬子石榴种皮的木质化程度较高,比较坚硬,严重影响石榴的可食性和加工性。而软子石榴因籽多仁软、品质优良等优点而更加受到消费者的喜爱,发展潜力非常大,市场售价是硬子石榴品种的2~4倍,是增加农民收入的好品种。但目前对石榴籽粒硬度的研究并不多,主要有陆丽娟^[2]利用RAPD-SCAR技术找到了软子与硬子石榴之间的1条变异条带,为石榴软子品种的早期鉴定提供了参考依据,并且认为石榴种子硬度可能是由微效多基因控制的数量性状。Cao等^[3]对‘中农红’软子石榴和‘三白’硬子石榴籽粒进行差异蛋白质组学分析,发现在石榴果实成熟期丙酮酸脱氢酶E- β 家族蛋白的表达可能在石榴种子硬度形成中起重要作用。Dalimov等^[4]指出石榴种皮中木质素和纤维素含量较高,是影响籽粒硬度的主要成分;Xue等^[4]对不同石榴品种进行了转录组分析,找出一些可能与籽粒硬度形成相关的基因如MYB, NAC等转录因子。

细胞壁结构是决定果实硬度的关键因素,细胞壁化学组成成分主要是木质素、纤维素、半纤维素及结构蛋白、酶和凝集素等^[5]。如Bezold等^[6]对西葫芦种皮形成期间的次生细胞壁生物合成的基因表达模式进行研究,发现数个基因涉及到次生细胞壁生物合成当中,如纤维素合成酶、蔗糖合成酶、苯丙氨酸解氨酶、肉桂酰-辅酶A还原酶、4-香豆酸-辅酶A连接酶基因等。韩国粉^[7]利用转录组测序筛选软核山楂与硬核山楂的差异表达基因,发现木质素生物合成相关酶*CAH*、*HCT*、*C3H*、*F5H*、*CAD*的编码基因的显著下调可能是山楂软核性状形成的分子机制。此外,由于细胞壁是果实细胞的骨架成分,它使果实具有一定形状和保持硬度,其结构和成分一旦发生变化,会直接导致果实硬度下降。研究证明,在果实成熟软化过程中,细胞壁的降解过程有多种酶的参与,如 α -L-阿拉伯呋喃糖苷酶(α -L- Arabinofuranosidase)、 α -葡萄糖醛缩酶、 β -葡萄糖醛缩酶(beta-glucosidase)、 β -木糖苷酶(beta-D-xylosidase)等^[8]。beta-D-xylosidase作为木聚糖类半纤维素水解酶系的重要组成部分,它在半纤维素的降解过程中具有十

分重要的作用^[9]。Tunicer等^[10]研究发现将beta-D-xylosidase加入纯的木聚糖酶中降解半纤维素,能使桦木木聚糖被分解的效率提高1倍左右。 α -L-Arabinofuranosidase是降解细胞壁重要的辅助酶之一,如在半纤维素降解过程中,它能与其它半纤维素酶协调作用,提高半纤维素的降解效率^[11]。因此,细胞壁的结构和成分是影响种子硬度的主要因素。而种子硬度作为石榴果实品质的一项重要指标,直接影响着口感和可食率,是影响果品商品价值的重要因素之一。随着国际国内市场对石榴品质要求的日益提高,培育优良软子石榴品种、提高果实品质是增强我国果品市场竞争力的关键所在。而石榴种子软硬度的形成是一个极为复杂的生理生化过程,目前对导致种子软硬度的关键酶或基因以及整个调控网络仍不十分清楚。为了探究石榴籽粒软硬形成的分子机制,笔者以‘突尼斯’软子石榴和‘三白’硬子石榴籽粒为试材,利用同位素标记相对和绝对定量(isobaric tags for relative and absolute quantitation, iTRAQ)技术分析软子石榴与硬子石榴在籽粒硬度形成过程中蛋白表达的差异,揭示差异表达蛋白的功能,为阐明石榴籽粒度软硬形成的分子机理奠定基础。

1 材料和方法

1.1 试验材料

以中国农业科学院郑州果树研究所石榴优良品种比较圃7年生白皮的‘三白’石榴与红皮的‘突尼斯’石榴(2品种都是扦插苗定植)为试材,‘三白’石榴为白花、白皮、白籽(硬子),5月中下旬为盛花期,9月中下旬成熟。‘突尼斯’石榴为红花、红皮、红籽(软子),5月上中旬为盛花期,9月上旬成熟。从石榴园中选取树体健壮、大小一致、无病虫害的每品种9株结果树,每3株为一组,每品种共3次重复。在大蕾期标记大小基本一致的花蕾,分别于7月20日和9月20日取花后60 d和花后120 d的树冠北面中部内膛果实,迅速切取果实中部籽粒,立刻用液氮保存,然后放入-80℃冰箱保存备用。

1.2 试剂与仪器

Applied Biosystems公司的iTRAQ Reagents-8plex Chemistry、溴化四乙胺(TEAB),Promega公司的胰岛素、丙烯腈(ACN), NaH_2PO_4 、丙酮、KCl、PVP、DTT等为国产分析纯。主要仪器有Eppendorf

公司的 5430R 型冷冻离心机, Sonics 公司的 VCX130 型超声破碎仪, Millipore 公司的 Milli-Q 超纯水系统, BIO-RAD 公司的 iMark 酶标仪。

1.3 蛋白质制备

用 TCA-丙酮方法提取石榴籽粒总蛋白。称取 1.0 g 的籽粒于预冷的研钵中, 液氮下研磨成粉末(研磨过程中加入适量 PVP)。将磨好的样品粉末加入 5 倍体积的 10% TCA 丙酮, 同时添加终浓度为 $30 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 DTT, $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 下沉淀 2 h; 随后, $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $20\,000 \text{ g}$ 离心 20 min, 弃上清; 然后在沉淀物中加入 $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 预冷的丙酮溶液, 清洗 3 次, 去除丙酮并简单晾干; 加入适量蛋白裂解液, 同时添加终浓度为 10% 的 cocktail 蛋白酶抑制剂, 终浓度为 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 DTT, $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 EDTA; 冰上超声 3 min, $20\,000 \text{ g}$ 离心 10 min, 取上清; 上清液在 $56 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下加入终浓度 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ DTT 处理 1 h, 还原打开二硫键; 再加入终浓度 $55 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ IAM 暗室静置 45 min, 进行半胱氨酸的烷基化封闭; 加入适量冷丙酮, 在 $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 静置 2 h; $20\,000 \text{ g}$ 离心 10 min, 弃上清液; 沉淀在适量体积的 $0.25 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TEAB 中超声溶解 3 min; $20\,000 \text{ g}$ 离心 15 min 后取上清液用于定量。蛋白浓度的测定用的是 Bradford Protein Assay Kit (Brodford, England)。

1.4 iTRAQ 实验

1.4.1 蛋白消化 蛋白检验合格后送杭州景杰生物科技有限公司(浙江)进行 iTRAQ 定量。每个样品按照定量结果准确取出 $150 \mu\text{g}$ 蛋白; 按照酶:蛋白=1:50 的比例加入胰蛋白酶, $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 酶解过夜; 然后按照酶:蛋白=1:100 的比例再次加入胰蛋白酶, $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 酶解 4 h; 抽干后使用 0.1% TFA 溶解肽段, 除盐, 抽干, 使用 $20 \mu\text{L}$ $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TEAB 重新溶解。

1.4.2 iTRAQ 标记 胰蛋白酶消化后, 真空离心泵抽干肽段。用 $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TEAB 复溶肽段, 按照手册 (Applied Biosystems) 进行 iTRAQ 标记。解冻一个单位的 iTRAQ 试剂(一个单位标记蛋白质 $100 \mu\text{g}$), 并重新溶解在 $70 \mu\text{L}$ 的异丙醇中。消化的肽被标记为不同的 iTRAQ 标签, 然后分别在室温下孵育 2 h。再将被 iTRAQ 标记的肽段混合物混合, 进行下一步 SCX 分馏。

1.4.3 SCX 分离 SCX 色谱法, 使用 Shimadzu LC-20AB HPLC Pump 系统, 消化的肽用 $4 \mu\text{L}$ 缓冲液 A ($25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸二氢钠, 25% 的乙腈溶液, pH 2.7)

重组, 并装载到一个 $5 \mu\text{m}$ 的 $4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}$ Ultremex SCX (PHENOMENEX) 柱子上。缓冲液 A 洗脱 10 min 流速 $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 5%~35% 的缓冲液 B ($25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸二氢钠, 含 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化钾的 25% ACN, pH 2.7) 洗脱 11 min, 再用 35%~50% 的缓冲液 B 洗脱 1 min。系统在下一次注射之前, 用 80% 缓冲液 B 平衡 3 min, 再用缓冲液 A 平衡 10 min。通过每 min 收集馏分测量 214 nm 处的吸光度, 进行馏分监测并收集。将洗脱的肽段分为 12 份, 用 Strata X C18 柱子 (Phenomenex) 洗去盐分, 并干燥。每一份再悬浮于一定体积的流动相 A (2% 乙腈, 0.1% 甲酸) 中, $20\,000 \text{ g}$ 离心 10 min。最后, 各组分中, 肽的最终浓度平均约为 $0.25 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 。

1.4.4 Nano-LC-MS/MS 本研究用 nanoAcquity (Waters, USA) 与 Triple TOF 耦合分离肽段。本系统运用微过滤器和微流控技术, 用填充物是 Symmetry 的纳米柱 C18 (Sum, $180 \mu\text{m} \times 20 \text{ mm}$) 来联机捕获, 脱盐; 填充物是 BEH130 的纳米柱 C18 ($1.7 \mu\text{m}$, $100 \mu\text{m} \times 100 \text{ mm}$) 用来分离分析。缓冲剂 (Thermo Fisher Scientific, Bremen, USA) 由水/乙腈/甲酸 (A:98/2/0.1%; B:2/98/0.1%) 构成。用 A 缓冲剂将 $2.25 \mu\text{g}$ 样品装载, 以 99% 的 A 作为流动相, 流速为 $2 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$, 进行 15 min 的诱捕和脱盐。以 $300 \text{ nL} \cdot \text{min}^{-1}$ 的速度, 在 5% 的 B 缓冲剂里保持 1 min 进行分离分析。在下面的 64 min 里, 首先在 40 min 内 B 的含量线性增加至 35%。在接下来的肽洗脱窗口, B 的梯度在 5 min 内增加至 80%, 并保持 5 min。初始的色谱条件在 2 min 内恢复。

1.5 生物信息学分析

1.5.1 质谱鉴定及数据分析 在生物信息分析中, 质谱原始文件 (sample.raw) 需要转换成 mgf 格式 (sample.mgf) 后才能被使用, mgf 文件主要包含了二级质谱 (MS/MS) 谱图的信息。该研究中石榴籽粒蛋白鉴定所使用的数据库为石榴转录组数据库。使用的软件版本为 Mascot 2.3.02 (Matrix Science Inc, Boston, MA)。在数据库搜索中, 所有的胰蛋白酶特异性要求容差设定在可接受的范围内。半胱氨酸的烷基化设为固定修饰。N 末端的 Gln \rightarrow pyro-Glu, N 末端的脱氨基, 以及蛋氨酸的氧化都被设定为可变修饰。最初的肽段母离子片段容差被设置成 10×10^{-6} , 并且片段离子水平被设为 0.02 Da , iTRAQ 8-plex 被设为定量。在相对定量时, 将两个样品间同

一个蛋白质的量没有明显增幅的定义为蛋白质,丰度比接近于1。当丰度比在1.5倍以上,且经统计检验其 P -value <0.05 的蛋白则视该蛋白为不同样品间的差异蛋白。

1.5.2 蛋白质功能分类 为了充分挖掘定量数据所包含的生物学信息,笔者使用多种方法对石榴籽粒的蛋白质进行分析。针对鉴定出的所有蛋白进行GO (Gene Ontology)功能注释(<http://www.geneontology.org>),分别对基因的分子功能(Molecular Function)、所处的细胞位置(Cellular Component)、参与的生物过程(Biological Process)中所涉及的GO分类进行了统计。并对鉴定出的蛋白使用亚细胞结构预测软件(wolfpsort (<http://wolfpsort.seq.cbrc.jp/>))预测蛋白的亚细胞结构定位,获得的石榴籽粒蛋白质组所有蛋白的基本信息。并对差异蛋白进行GO富集分析,从而看出差异蛋白质与哪些生物学功能显著相关。在生物体内,不同蛋白相互协调使其生物学行为,基于Pathway的分析有助于更进一步了解其生物学功能。KEGG是有关Pathway的主要公共数据库,通过Pathway分析能确定蛋白质参与的最主要生化代谢途径和信号转导途径。差异蛋白Pathway显著性富集分析是以KEGG Pathway为单位,应用超几何检验,找出与所有鉴定到蛋白背景相比,在差异蛋白中显著性富集的Pathway。通过Pathway显著性富集确定差异蛋白参与的最主要生化代谢途径和信号转导途径。

2 结果与分析

2.1 蛋白鉴定质量评估-肽段匹配误差

本研究基于数据库搜索策略的肽段匹配误差控制在0.02 Da以下,大于0.02 Da的为假阳性。图1

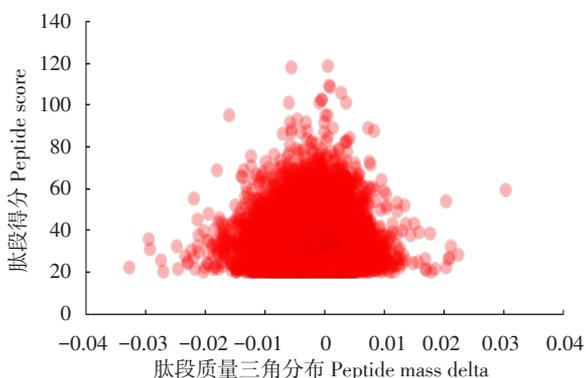


图1 肽段的质量误差分布

Fig. 1 Mass error distribution of all identified peptides

显示了所有匹配到的肽段的相对分子质量的真实值与理论值之间的误差分布,从图中可以看出精度(10^{-6})值较小,主要集中在百万分之十之间。所以本研究中的误差较少,获得的数据是真实可靠的。

2.2 石榴籽粒蛋白鉴定

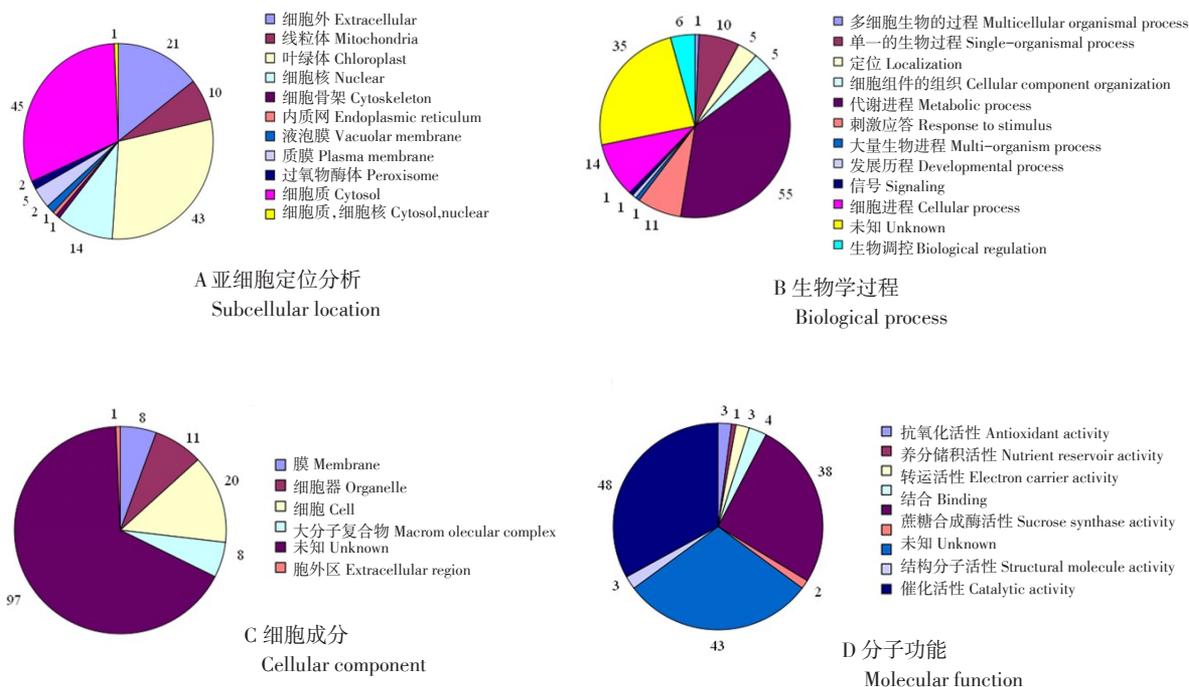
8组样品共鉴定出1940种蛋白,其中可定量的蛋白为1889个,对质谱鉴定到的1889个蛋白进行筛选,依据蛋白质丰度水平,当差异倍数达到1.5倍以上,且经统计检验其 P -value值小于0.05时,视为差异蛋白。通过分析,共得到154个差异表达的蛋白,其中上调蛋白有61个,下调蛋白有93个。其中,花后60 d,‘突尼斯’软子与‘三白硬子’石榴相比,差异表达的蛋白有96个,上调蛋白为44个,下调蛋白为52个;花后120 d,‘突尼斯’软子与‘三白硬子’石榴相比,TC/SC差异表达的蛋白有39个,上调蛋白为31个,下调蛋白为8个;在花后60 d和120 d共同表达的有19个蛋白(Table S1)。

2.3 差异表达蛋白的GO和KEGG分析

为了确定哪种类型的蛋白参与石榴籽粒硬度的形成,与‘三白’石榴相比,将鉴定的差异蛋白进行亚细胞定位及GO功能分类分析(图2)。根据UniProt数据库(Swiss-Prot/TrEMBL)和Gene Ontology Database,发现在差异蛋白中,主要定位于细胞质,叶绿体及细胞外等(图2-A)。在生物学过程分析中,差异蛋白主要富集在代谢过程(54.5%),细胞进程(29.0%)及刺激应答(5.52%)(图2-B);在细胞组成分析中,差异表达蛋白主要富集在细胞组分(44.8%),细胞器(20.7%)及大分子复杂部分(17.2%)(图2-C);在分子功能分析中,差异蛋白主要富集在催化活性(59.0%),结合(31.9%)及转运活性(3.47%)(图2-D)。进一步通过KEGG pathway分析,这些差异蛋白主要参与了苯丙烷类的合成与代谢、糖代谢、糖和淀粉代谢及降解代谢(图3)。

2.4 蛋白质组与转录组关联分析

在石榴籽粒的发育过程中,基因表达可能发生在转录和翻译的不同水平。当某一蛋白被鉴定到并且在转录组水平有表达量信息时,被认为关联到。在本研究中,将石榴籽粒蛋白质鉴定结果与其转录组结果进行关联分析,鉴定结果表明在花后60 d有328个蛋白与转录组关联,在花后120 d有1456个蛋白与转录组关联。对得到的差异表达蛋白进行筛选,结果共筛选出功能已知、与转录组有关联、且与



维恩图显示了不同分类蛋白质丰度的百分比。

The Venn diagram show the percentage of different categories in terms of protein abundance.

图 2 差异蛋白的亚细胞定位及 GO 分类分析差异蛋白的 GO 功能分类分析

Fig. 2 Prediction of the differentially expressed proteins subcellular locations and bioinformatics analysis of the mentioned differentially abundant proteins through Gene Ontology (GO) in three domains

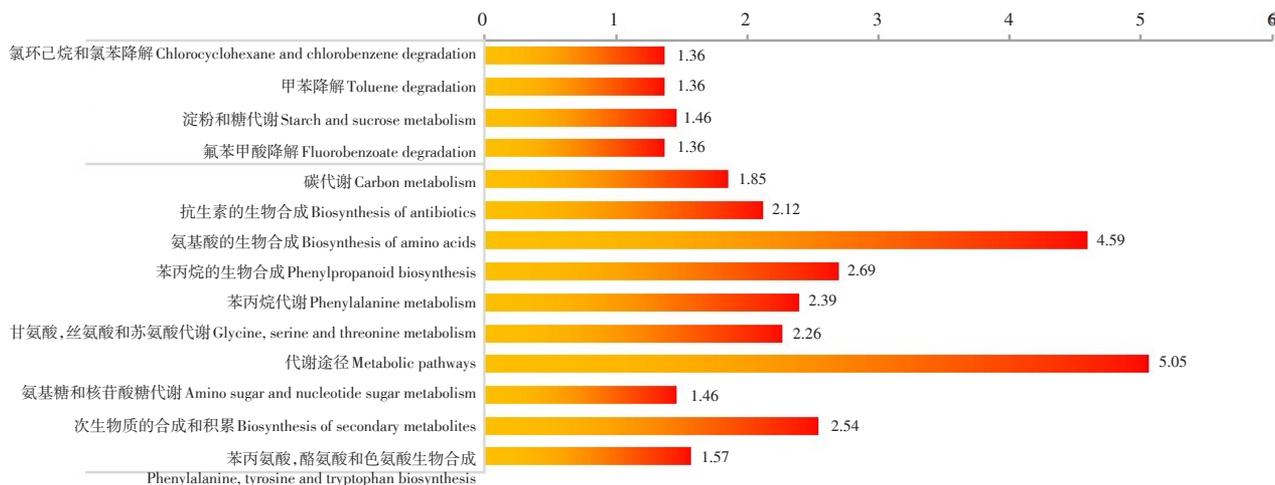


图 3 差异蛋白的 KEGG 富集分析

Fig. 3 KEGG pathway-based enrichment analysis of differentially expressed proteins

差异基因表达趋势相同的蛋白 62 个, 其中下调 38 个, 上调 23 个(图 4)。并且对这 62 个蛋白做了 KEGG pathway 分析(图 5), 结果表明它们主要参与次生代谢、逆境响应、糖代谢、细胞壁组织或生物转化等生物途径。

3 讨论

种子硬度作为石榴品质的一项重要指标, 直接影响着口感和可食率, 是影响石榴商品价值的重要因素之一。由于石榴基因组测序还未完成, 国内外

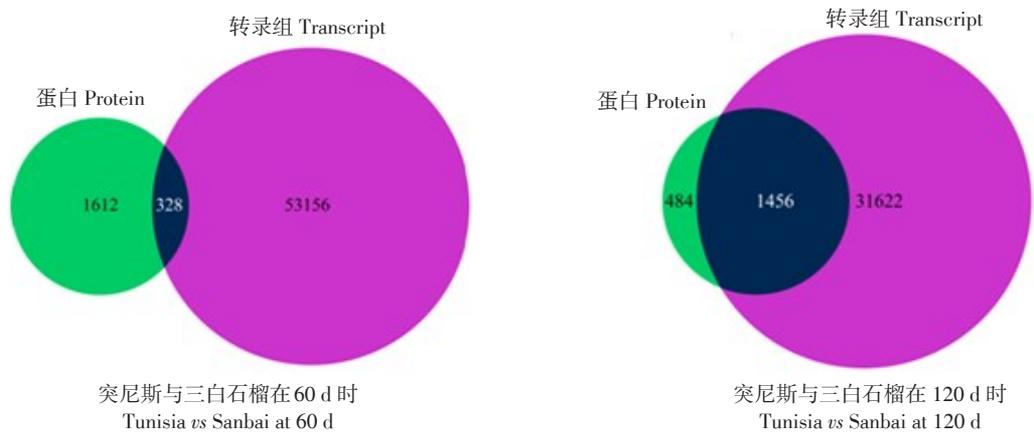
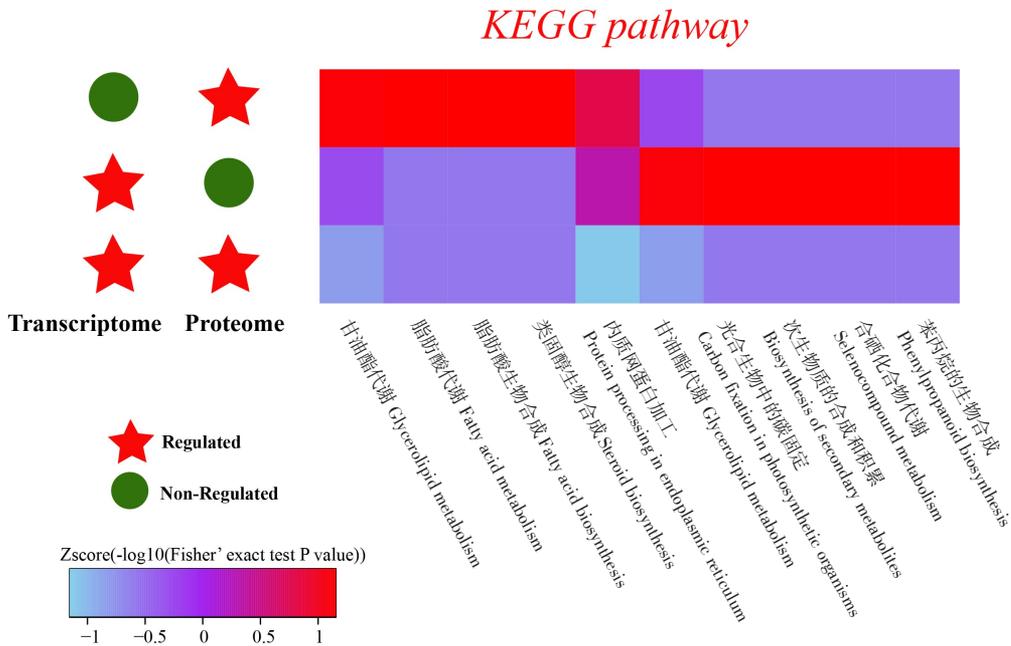


图 4 蛋白与转录组关联分析
 Fig. 4 Venn diagram correlation analysis of protein and mRNA



红色星号表示关联的蛋白质和转录本,绿色圆圈表示非关联的蛋白质和转录本;红色表示显著上调的蛋白质和转录本,蓝色表示显著下调的蛋白质和转录本。
 A red asterisk indicate regulated proteins and transcriptome, Green circles indicate non-regulated proteins and transcriptome; Red indicate significantly up-regulated proteins and transcriptome, Blue indicate significantly down-regulated proteins and transcriptome.

图 5 蛋白质组和转录组具有关联性的差异蛋白 KEGG 通路分析
 Fig. 5 KEGG pathway analysis of differentially expressed proteins and their integration with transcriptome

对于石榴籽粒硬度的分子生物学研究较少,对于石榴籽粒软硬形成的机制研究并不深入。近年来,随着蛋白质组和转录组的不断发展,有越来越多的研究应用组学对果实软硬度的相关蛋白做了鉴定,也为后续的关键蛋白的筛选以及相关基因的研究奠定了基础。如 Xue 等^[1]对‘突尼斯’软子石榴和‘三白’硬子石榴进行了高通量的转录组测序,认为一些与木质素合成相关的基因(如 MYB、NAC 等转录因子)、

过氧化物酶、漆酶等可能与石榴籽粒硬度的形成具有重要关系。韩国粉^[7]利用高通量转录组测序筛选软核山楂与硬核山楂的差异表达基因,发现木质素生物合成相关基因(如 HCT、CCR、F5H、CAD)与山楂软核的形成有关。胡昊^[12]利用双向电泳和质谱技术对桃硬核期内果皮和中果皮的差异蛋白及 MYB、NAC 基因在硬核期间的表达谱进行分析,发现丙酮酸脱氢酶及 MYB、NAC 基因可能在内果皮的发育木

质化转录调控网络中具有重要作用。在本研究中,我们利用 iTRAQ 技术研究了石榴籽粒不同发育时期、不同品种的差异蛋白质组学分析,成功鉴定到 1 940 个蛋白和 154 个差异蛋白,根据 KOG 和 KEGG pathway 分析,发现这些差异蛋白主要参与了苯丙烷类生物合成与代谢、蛋白折叠与转运、糖代谢等代谢通路,为石榴籽粒硬度形成的分子机制研究提供了良好的理论基础。

细胞壁是影响种子硬度的主要因子之一,主要由木质素、纤维素和半纤维素组成。木质素主要存在于管状分子细胞、厚壁细胞、石细胞和结构纤维的形成,以及某些特殊类型的表皮细胞或薄壁细胞次生壁加厚过程中^[13]。木质素合成相关的基因主要有 Peroxidase (PRX), ferulate-5-hydroxylase (F5H), shikimate Hydroxycinnamoyl Transferase (HCT), cinnamyl-alcohol dehydrogenase (CAD)^[14]等。其中 F5H 对木质素合成起限速作用,在拟南芥突变体中, F5H 表达量的多少决定木质素含量的高低^[15]。Sibout 等^[16]研究认为 F5H 基因是催化 S 型木质素生物合成所必不可少的酶类,并且没有其他物质可以替代。Li 等^[17]研究发现反义抑制 PRX 基因的转基因山杨中, PRX 活性降低,木质素含量减少。Blee 等^[18]研究反义抑制过氧化酶同系物在烟草中表达,发现木质素含量降低了 40%~50%。薛永常等^[19]认为 PRX 主要在木质部发育后期发挥作用。在本研究中,与‘三白’石榴相比,木质素合成相关蛋白 F5H 的表达量在花后 60 d 显著下调, PRX 蛋白的表达量在花后 60 d 显著上调。由于 F5H 蛋白是催化木质素生物合成所必不可少的酶类,因此推测 F5H 丰度变化可能与石榴籽粒硬度的形成存在着重要关联。而 PRX 蛋白的表达变化与其他植物如山杨、烟草等中不一致,可能是由于 PRX 是一个多基因家族,具有多拷贝,它除了参与木质素生物合成外,还涉及其他许多生理过程^[20]。因此,对于 PRX 蛋白是否直接或间接地参与了石榴籽粒木质素的生物合成还需进一步研究。

由于植物次生细胞壁的代谢包括木质素、纤维素、半纤维合成相关蛋白的表达调控,是一个非常复杂的过程,因此可能存在其他的一些因素影响籽粒的硬度。如 Argiriou 等^[21]研究发现 profilin 基因在棉花纤维中优先表达,可能在纤维发育的早期阶段发挥重要的作用。Wang 等^[22]研究发现沉默拟南芥中

的 EF1 β 基因,使总木质素和纤维素含量分别减少 38%和 20%,说明 EF1 β 在细胞壁形成过程中具有重要作用。在本研究中,与‘三白’石榴相比, Elongation factor 1-beta 2, Elongation factor 1-delta 1 及 Profilin-1 蛋白在花后 60 d 显著下调。结合以上结果,推测可能由于次生细胞壁合成受阻,导致‘突尼斯’石榴籽粒变软。此外,果实成熟的不同阶段伴随着一系列相应的细胞壁结构变化及纤维素、半纤维素和木质素等多糖的降解。如木聚糖为半纤维素的主要组成成份,而 β -木糖苷酶 (β -D-xylosidase, XYL) 可与木聚糖酶协同作用,将木聚糖彻底分解,是半纤维素降解的关键酶之一^[23]。如 Goujon 等^[24]研究认为 XYL 基因表达和酶活性降低能改变拟南芥次生细胞壁的组成成分。Ye 等^[25]研究认为 XYL 基因参与了纤维菌半纤维素的降解。在本研究中,与‘三白’石榴相比,XYL 蛋白表达量在花后 60 d 和 120 d, 表达量均显著上升,而且,结合蛋白质组与转录组的关联分析,发现 XYL 蛋白与基因的表达量具有较强的关联性。因此,推测 XYL 蛋白可能在石榴籽粒变软中发挥着重要作用。

通过研究发现,在石榴籽粒发展过程中,数个蛋白基因涉及到次生细胞壁生物合成与降解中,如 F5H、XYL、Elongation factor 1-beta、Elongation factor 1-delta 及 Profilin 等,为阐明石榴籽粒软硬形成的分子机制奠定理论基础。

参考文献 References:

- [1] CAO Shangyin, NIU Juan, CAO Da, LI Haoxian, XUE Hui, Chen Lina, ZHANG Fuhong, ZHAO Diguang. Comparative proteomics analysis of pomegranate seeds on fruit maturation period (*Punica granatum* L.)[J]. Journal of Integrative Agriculture, 2015, 14(12): 2558-2564.
- [2] 陆丽娟. 中国石榴品种资源种子硬度形状研究[J]. 安徽农业大学学报, 2006, 33(3): 356-359.
LU Lijuan. Study on seed hardness of pomegranates cultivars in China[J]. Journal of Anhui Agricultural University, 2006, 33: (3) 356-359.
- [3] DALIMOV D N, DALIMOV G N, BHATT M. Chemical composition and lignins of tomato and pomegranate seeds[J]. Chemistry of Natural Compounds, 2003, 39 (1): 37-40.
- [4] XUE Hui, CAO Shangyin, LI Haoxian, ZHANG Jie, NIU Juan, CHEN Lina, ZHANG Fuhong, ZHAO Diguang. Denovo transcriptome assembly and quantification reveal differentially expressed genes between soft-seed and hard-seed pomegranate (*Punica granatum* L.)[J]. Plos One, 2017, 7:1-15.
- [5] COSGROVE D J. Growth of the plant cell wall[J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2005, 6(11): 850-861.

- [6] BEZOLD T, MATHEWS D, LOY J. Molecular analysis of the hull-less seed trait in pumpkin: expression profiles of genes related to seed coat development [J]. *Seed Science Research*, 2005, 3(15): 205–217.
- [7] 韩国粉. 软核山楂与硬核山楂基因表达差异分析及木质素合成相关转录因子基因的克隆与鉴定[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2014.
- HAN Guofen. Screening differentially expressed genes between soft-endocarp and hard-endocarp hawthorns and cloning and identification of transcription factors regulating lignin biosynthesis [D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2014.
- [8] BRUMMELL D A, HARPSTER M H. Cell wall metabolism in fruit softening and quality and its manipulation in transgenic plants[J]. *Plant Molecular Biology*, 2001, 47: 311–339.
- [9] SUNNA A, ANTRANIKIAN G. Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria[J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2008, 17(1): 39–67.
- [10] TUNICER M, BALL A S. Co-operative actions and degradation analysis of purified lignocellulose degrading enzymes from *Thermomonospora fusca* BD25 on wheat straw[J]. *Turkish Journal of Biology*, 2009, 33(4):291–300.
- [11] SAHA B C. α -L-Arabinofuranosidase: biochemistry, molecular biology and application in biotechnology[J]. *Biotechnology Advances*, 2000, 18(5):403–423.
- [12] 胡昊. 桃果实硬核期差异蛋白质组及木质化相关转录因子表达谱的分析[D]. 北京: 北京林业大学, 2012.
- HU H. Analysis of differential proteomes and expression profiling of lignification-related transcription factors during peach hardening [D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2012.
- [13] VANHOLME R, MORREEL K RALPH J, BOERJAN W. Lignin engineering[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2008, 11: 278–285.
- [14] ANDERSEN J R, ZEIN I, WENZEL G. Characterization of phenylpropanoid pathway genes within European maize (*Zea mays* L.) inbreds[J]. *BMC Plant Biol*, 2008, 8:2.
- [15] MARITA J M, RALPH J, HATFIELD R D. NMR Characterization of Lignins in Arabidopsis Altered in the Activity of Ferulate 5-Hydroxylase[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 1999, 96(22): 12328–12332.
- [16] SIBOUT R, EUDES A, MOUILLE G. Cinnamyl Alcohol Dehydrogenase-C and -D are the primary genes involved in lignin biosynthesis in the floral stem of *Arabidopsis*[J]. *Plant Cell*, 2005, 17(7): 2059–2076.
- [17] LI Y, ASPEN, KAJITA S, KAWAI S. Down-regulation of an anionic peroxidase in transgenic Arabidopsis and its effect on lignin characteristics[J]. *Journal Plant Research*, 2003, 116(3): 175–182.
- [18] BLEE K A, CHOI J W, CONNELL A P, SCHUCH W, LEWIS N G, BOLWELL G P. A lignin-specific peroxidase in tobacco whose antisense suppression leads to vascular tissue modification [J]. *Phytochemistry*, 2003, 64(1):163–176.
- [19] 薛永常, 李金花, 卢孟柱, 张绮纹. 木质素单体生物合成途径. *林业科学*, 2003, 39(6):88–90.
- XUE Yongchang, LI Jinhua, LU Mengzhu, ZHANG Qiwen. The biosynthesis pathway of lignin monomer[J]. *Scientia Silvae Sinicae*, 2003, 39(6): 88–90.
- [20] WELINDER K G, JUSTESEN A F, KJAERSGARD I V, JENSEN R B, RASMUSSEN S K, JEPERSEN H M, DUROUX L. Structural diversity and transcription of class III peroxidases from *Arabidopsis thaliana*[J]. *European Journal of Biochemistry*, 2002, 69: 6063–6081.
- [21] ARGIRIOU A, KALIVAS A, MICHAELIDIS G, TSAFTARIS A. Characterization of PROFILIN genes from allotetraploid (*Gossypium hirsutum*) cotton and its diploid progenitors and expression analysis in cotton genotypes differing in fiber characteristics[J]. *Molecular Biology Reports*, 2012, 39(4): 3523–3532.
- [22] WANG Z, CHEN J, LIU W, LUO Z S, WANG P K, ZHANG Y J, ZHENG R H, SHI J S. Transcriptome characteristics and six alternative expressed genes positively correlated with the phase transition of annual cambial activities in Chinese fir (*Cunninghamia lanceolata* L.) [J]. *Plos One*, 2013, 8(8): 71562.
- [23] COLLINS T, GERDAY C, FELLER G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2005, 29: 3–23.
- [24] GOUJON T, FERRET V, MILA I. Down-regulation of the AtC-CR1 gene in *Arabidopsis thaliana*: effects on phenotype, lignins and cell wall degradability[J]. *Planta*, 2003, 217(2): 218–228.
- [25] YE Y, YA B H, HAN Z G, JIA Y L, FAN LI. Characterization of a recombinant multifunctional glycoside hydrolase family 3 β -xylosidase/ α -L-arabinofuranosidase/ β -glucosidase from *Cellulosimicrobium cellulans* sp. 21[J]. *Journal Molecular Catalysis B-Enzym*, 2016:131: 65–72.