



## 低温胁迫下西瓜嫁接苗的蛋白质组学分析

孟佳丽,沈虹,吴绍军,杨年福,余翔,张黎杰

(江苏省农业科学院 宿迁农科所,江苏宿迁 223800)

**摘要** 为了研究西瓜嫁接苗遭遇到低温胁迫后,蛋白表达丰度的变化,深入了解西瓜苗期耐冷响应过程中所涉及的代谢途径,探讨相关的分子调控机理。本研究对西瓜嫁接苗和自根苗进行低温处理,采用 iTRAQ 技术对其进行蛋白质组学的鉴定和定量分析,然后利用数据库进行比对,并采用 GO 及 KEGG 注释其功能和代谢通路,最终获得了差异蛋白 985 个,其中上调蛋白 545 个,下调蛋白 440 个,涉及以下 4 种主要类别的蛋白质:碳水化合物代谢(26.52%)、遗传信息翻译(19.78%)、能量代谢(17.83%)和氨基酸代谢(13.70%)。蛋白质组学分析显示,与自根苗相比,嫁接苗低温耐受性的增加与甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)和核酮糖二磷酸羧化酶(Rubisco)的积累有关。

**关键词** 低温胁迫;西瓜;嫁接苗;蛋白质组学

近几年,中国设施栽培面积和产量不断增加,尤其是瓜类蔬菜。但是中国设施结构较为简陋,主要为拱棚和地膜覆盖。在早春时节极易受到倒春寒的影响<sup>[1]</sup>。低温冻害是冬、春季农业生产中,经常碰到的大面积灾害。在全球范围内,冷害也是阻碍农业种植的重要原因之一。作物在生长发育的过程中,需要适宜的温度才能正常生长,从而达到较为满意的产量和品质。较低的温度会抑制种子的萌发和根系的发育,从而导致一系列严重的后果,比如产生生理障碍、开花坐果时间延迟、化瓜、畸形果的概率升高等,同时低温还会阻碍果实的生长发育,比如阻滞果实内养分合成及运输,造成西瓜果实品质和产量降低<sup>[2]</sup>。

西瓜来自非洲,喜温喜光,最适宜生长温度苗期 20℃~25℃、生长期 25℃~30℃<sup>[3]</sup>。相关科学研究证明<sup>[4]</sup>,当气温低于 10℃时,西瓜的幼苗发育会停滞,出现大面积的冻害现象,如果继续处在低温条件下,时间一长,幼苗将会面临死亡的威胁。在中国的设施栽培过程中,西瓜为了获得更好的经济效益,赶在五一前后上市,经常会在头年 12 月开始育苗,正值冬季,所以中国的设施西瓜生产经常会遇到低温弱光的天气,从而导致西瓜

幼苗长势变弱、生长发育不良,进而给西瓜后期的产量和品质造成了不良影响。早春设施西瓜栽培,温度成为了制约西瓜产业化发展和农民增产增收的关键因素<sup>[5]</sup>。

目前已有研究表明嫁接可以提升瓜类蔬菜的耐低温能力<sup>[6]</sup>。通过嫁接,瓜类植物的根系发生了改变,砧木的根系活力更强,水分和养分吸收能力得到大大提升,植株通过提高水分和养分的供应,从而显著提高光合效率,同时植株的抗氧化防御系统也得到进一步改善,植物长距离运输能力也得到大幅度提高,包括激素信号、mRNA、RNAs 和蛋白质在内,从而提高植株的抗逆性<sup>[7]</sup>。研究人员发现,嫁接后的甜瓜苗,细胞膜完整性明显优于自根苗,通过检测发现,嫁接苗叶片中的渗透调节物质(例如可溶性糖、可溶性蛋白和游离脯氨酸)含量显著高于自根苗,还有包括 SOD、CAT、POD 在内的抗氧化酶活性也显著高于自根苗<sup>[8-9]</sup>;通过进一步分子生物学分析,可知植物抗寒相关基因(CAT、APX、GolS1、ERF1、DREB1、NAC、bZIP2)的相对表达量也上调,这几方面的原因叠加后产生的结果提高了甜瓜的耐冷性<sup>[10]</sup>。西瓜与其相似,相关机理有相通之处。

收稿日期:2023-07-28 修回日期:2023-10-12

基金项目:宿迁市科技计划 2021 自然科学基金(K202120)。

第一作者:孟佳丽,女,硕士,研究方向为设施新品种选育及栽培技术推广。E-mail:jiali1415118@163.com

通信作者:余翔,男,硕士,副研究员,研究方向为蔬菜育种。E-mail:yx003@163.com

通过生命科学的中心法则明确地知道,基因仅负责遗传编码,在生命活动中,毫无疑问,蛋白质才是真正起到作用的物质。Wilkins 等<sup>[11]</sup>早在 1994 年提出蛋白质组学的概念,主要指从大规模的研究方向来分析蛋白质的特点,其中包括:蛋白质的表达水平,翻译后修饰和不同蛋白之间相互作用等,把所有蛋白看成一个整体的蛋白组,从而得到在大规模水平上时某些疾病的产生和细胞代谢等过程的整体而全面的认识。蛋白质既是生物有机体发挥各项生理功能的实施者,也是各种生理疾病情况的直观表现者。研究人员在蛋白质的层面上,来分析逆境胁迫中的植株差异,可以更好地阐明植物的抗逆机制<sup>[12]</sup>。

冷调控蛋白(COR)、抗冷蛋白(AFP)、冷激蛋白(CSP)、热激蛋白(HSP)和脱水蛋白(DHN)等五大类蛋白是低温诱导蛋白的主要组成部分。这五大类蛋白在系统中主要功能有以下几个方面:①提高细胞耐低温、耐脱水的性能;②在水势较低的时候,保持代谢酶的活性的稳定;③以 RNA 伴侣蛋白的形式维持 RNA 结构;④在低温条件下,预防磷脂膜相变;⑤维持质膜的稳定性等<sup>[10,13]</sup>。

本试验采用分子生物学的手段,分析了低温处理后的西瓜嫁接苗和自根苗之间的蛋白质组学差异,通过研究低温响应差异蛋白及其代谢途径,挖掘与耐低温紧密相关的蛋白(基因),从而揭示嫁接苗耐低温的分子机制,为培育早春设施栽培西瓜新品种提供依据。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 植物材料及试验处理

采用西瓜(*Citrullus lanatus*)新品种‘迁丽 4 号’为接穗,南瓜(*Cucurbita moschata*)‘京研砧壮’为砧木。选取大小一致的种子于 26 °C 催芽,播种到穴盘中,每组设置 3 个重复。当砧木一叶一心、接穗子叶平展时进行嫁接。培养至三叶一心期后,将对照组西瓜自根苗及嫁接苗进行 4 °C 低温胁迫,15 d 后取新叶进行蛋白提取、iTRAQ 标记和相关数据分析。

### 1.2 试剂与设备

采用的主要试剂有:BCA 试剂盒(Micro bio-lab 公司生产,规格 500 mL,货号 BCAF-500)、胰蛋白酶(Promega 公司生产,规格 MS 级,货号 V5280)、TMT 试剂(Pierce 公司生产,货号

90111)、RIPA 裂解液(Thermo Fisher 公司生产,规格 250 mL,货号 89900)、C<sub>18</sub> SPE 柱(Phenomenex 公司生产,规格 10 mg/mL,货号 8B-S100-AAK)。

采用的主要仪器设备有:纳升超高效液相色谱(Thermo 公司生产,型号 EASY-nLC 1200)、四级杆轨道阱质谱(Thermo Scientific 公司生产,型号 Q-Exactive HFX)、常规高效液相色谱(Shimadzu 公司生产,型号 LC20AD)。

### 1.3 蛋白质提取

将叶片用液氮研磨,每个样品 0.1 g,放入 2 mL 离心管中,低温备用。在离心管中加入 1 mL 裂解液,置于冰上,脱色摇床上轻轻震荡裂解 1~2 h。随后把样品放入离心机,4 °C、12 000 r/min 离心 15 min,取上清液,备用。

### 1.4 同位素标记相对和绝对定量(iTRAQ)测序流程

按 ROSS 等<sup>[14]</sup>描述的方法将提取的蛋白质进行酶解和 iTRAQ 标记,采用高效液相色谱对样品进行质谱分析,质谱鉴定工作采用 Q-Exactive 质谱仪。

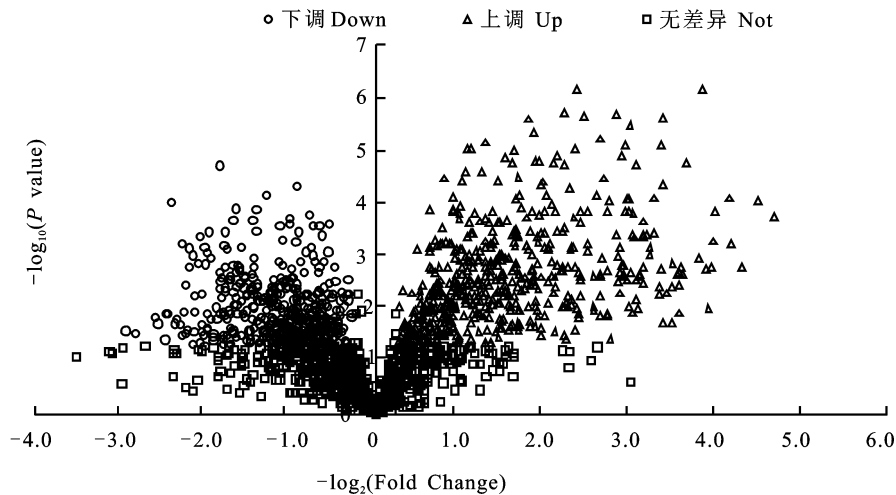
### 1.5 数据分析

对质谱鉴定得到的肽段进行峰识别,之后构建参考数据库,并使用 Mascot 2.3.02 和 Proteome Discoverer 1.4(Thermo)进行进一步的查库鉴定和定量分析。最后利用 Uniport 和 NCBI 的数据库<sup>[15]</sup>对获得的肽段和蛋白质进行分析,采用 GO 注释及 KEGG 注释<sup>[16]</sup>对其功能和代谢通路分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 蛋白质鉴定

在所有西瓜苗样品中共鉴定出置信度在 95% 以上的蛋白质 1 829 个,用圆点表示每个蛋白,标注在图 1 中。在鉴定出的 1 829 个蛋白中,嫁接苗和自根苗差异蛋白有 985 个(图 1 中虚线以上绿色和红色的圆点);非差异蛋白 884 个(图 1 中虚线以下灰色的圆点)。其中,以自根苗为对照,嫁接苗中的上调蛋白 545 个(图 1 中红色圆点),下调蛋白 440 个(图 1 中绿色的圆点)。两样品间表达量倍数差异越大,横坐标绝对值越大;差异表达越显著,纵坐标数值越大,数据的结果越可靠。



横坐标为该蛋白在两种样品中表达量差异倍数的对数值,纵坐标为  $P$ -value 的负对数值

The horizontal axis represents the logarithmic value of the fold difference in protein expression between the two samples, while the vertical axis represents the negative logarithmic value of  $P$ -value

图 1 差异表达火山图

Fig. 1 Volcano plot of differential expressions

### 2.2 差异蛋白功能分析

对获得的差异表达蛋白,采用 COG、GO、KEGG 和 Swissprot 等数据库开展蛋白功能注释,每个数据库注释到的蛋白数目不尽相同,最终

注释到具有功能性的差异蛋白数量共 983 个,其中 KEGG 数据库得到的差异蛋白数目最详尽,见表 1。

表 1 注释到的差异表达蛋白数量统计表

Table 1 Statistical table of annotated differentially expressed protein counts

差异表达蛋白集 Differential expression protein set	总体 Total	COG	GO	KEGG	Swissprot
自根苗 VS 嫁接苗 Self rooted seedlings VS grafted seedlings	983	516	831	983	860

注:第二行的第三列到最后一列的数字代表从不同的功能数据库获得的差异表达蛋白数量。

Note: The numbers from the third column to the last column in the second row represent the number of differentially expressed proteins from different functional databases.

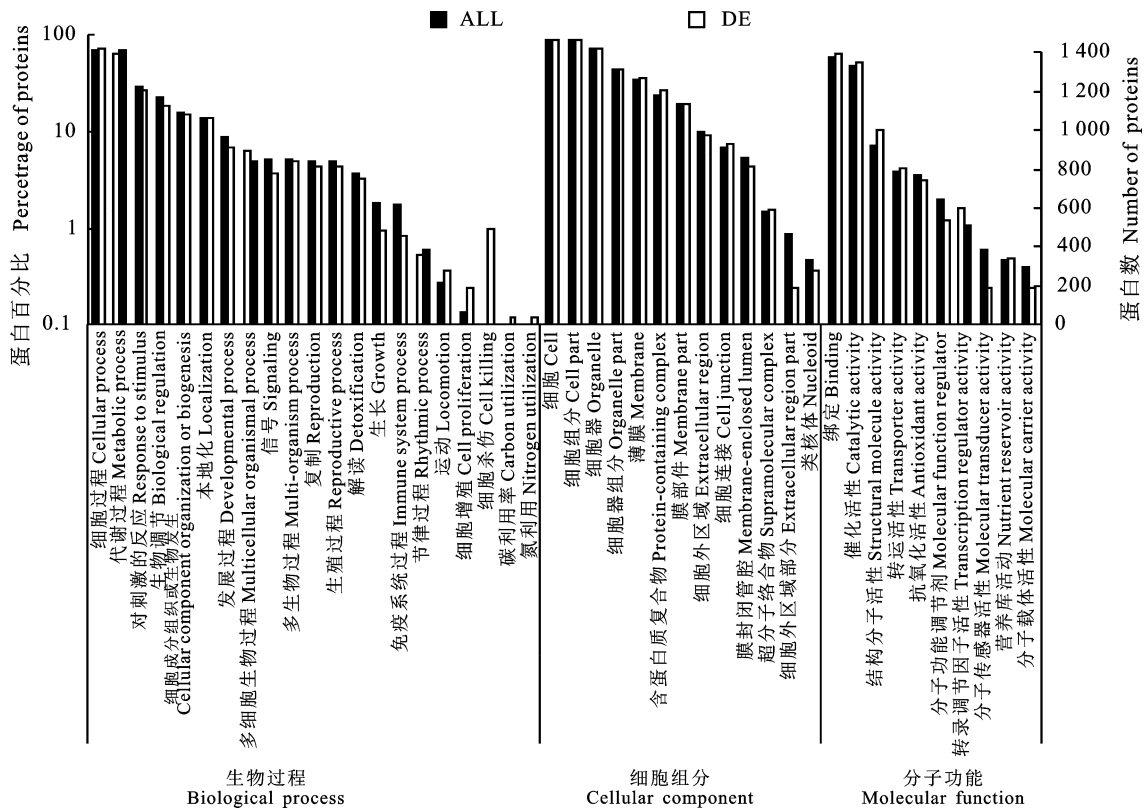
与其他数据库相比,GO 数据库是一个结构化的标准生物学注释系统,适用于各个物种。GO 数据库总共有三大类,分别是生物学过程、细胞成分和分子功能,各自描述了基因产物可能行使的分子功能,所处的细胞环境,以及参与的生物学过程。

采用 GO 数据库分析自根苗和嫁接苗的蛋白样本后,共注释到 831 条差异蛋白,参与了 21 个生物过程、13 个细胞成分和 10 个分子功能,见图 2。差异蛋白在生物过程(代谢过程、细胞增殖、碳固定、氮固定、运动和节律过程)中所占比例较高,均超过 60%。上调蛋白质参与碳固定、氮固定、运动及节律过程,下调蛋白参与细胞增殖生物过程。结果表明,组成细胞的差异蛋白质,多数存在于含蛋白的复合物中;在具有分子功能的蛋白中,与催化活性、结构分子活性和转运蛋白活性有关

的蛋白占据了较大的比例,尤其值得注意的是,其中具有结构分子活性的分子功能蛋白,表达量上调。

### 2.3 差异蛋白通路分析

根据 KEGG 中的通路类型,整理嫁接苗和自根苗的差异表达蛋白,如图 3 所示。被注释到通路上的差异蛋白共有 460 条,存在一个蛋白在多个通路中重复出现现象。结果表明,差异蛋白一共参与了 87 个信号转导通路。其中,涉及的主要代谢通路有:15 个碳水化合物代谢途径、14 个氨基酸代谢途径、11 个脂质代谢途径、6 个能量代谢途径、5 个其他氨基酸的代谢途径、5 个萜类化合物和聚酮化合物的代谢途径、5 个辅因子和维生素的代谢途径和 6 个遗传信息处理的折叠、分类和降解途径。



横坐标为 GO 注释蛋白功能分类,纵坐标的左边代表了蛋白数目所占的百分比,右边显示全部蛋白的数量。深色柱状为差异表达蛋白,浅色柱状为全部蛋白

the abscissa is the functional classification of GO annotated proteins, the left side of the ordinate represents the percentage of the number of all proteins, and the right side shows the number of proteins. Deep color is the differentially expressed protein, and light color is the whole protein

图 2 差异表达蛋白 GO 注释分类统计图

Fig. 2 Statistical diagram of GO annotation classification for differentially expressed proteins

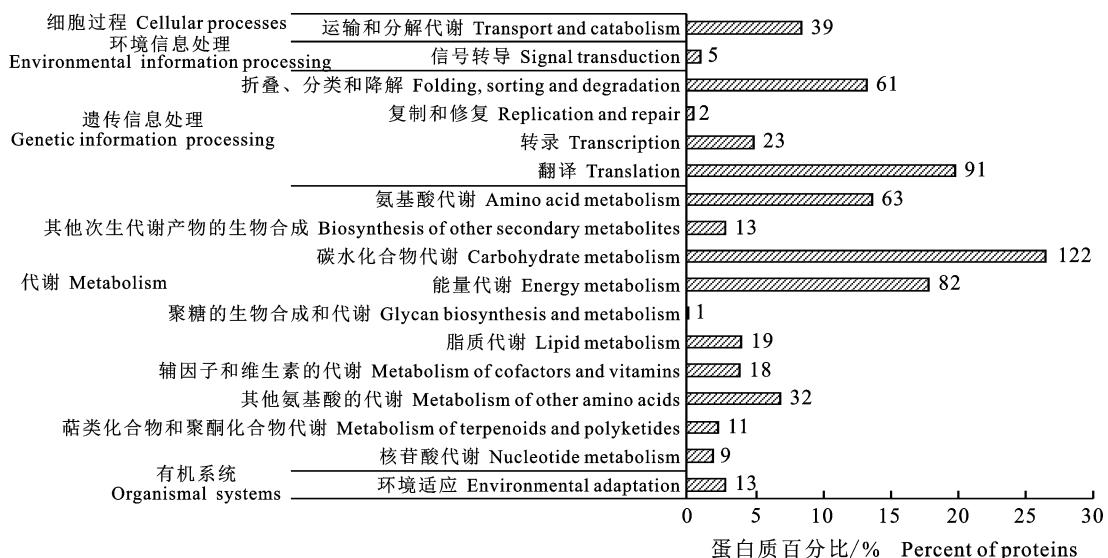


图 3 差异表达蛋白 KEGG 分类图

Fig. 3 KEGG classification diagram of differentially expressed proteins



2.4 目标差异蛋白确定

本研究通过分析所得的差异蛋白,并结合前人研究资料,从嫁接苗和自根苗的差异蛋白中选取 17 个涉及抗寒性的目标蛋白,见表 2。涉及甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)(磷酸化)活性、NADP 结合、谷胱甘肽转移酶活性、ATP 结合、跨

膜转运蛋白活性等分子功能,葡萄糖代谢过程、糖酵解过程、蛋白质谷胱甘肽化、ATP 合成偶联质子转运、蛋白质分解代谢过程等生物过程,以及胞质溶胶、质膜、叶绿体类囊体膜、质子转运 ATP 合成酶复合物、线粒体、过氧化物酶体膜等细胞成分。

表 2 嫁接苗和自根苗目标差异蛋白

Table 2 Target differential proteins of grafted seedlings and self-rooted seedlings

蛋白 ID Protein ID	KEGG 注释 KEGG Annotation	GO 注释 GO Annotation	覆盖率/% Coverage	肽段数 Peptide number	B: A	
Cla97C11G213800.1	K00134 0.0 csv;101214545 K00134GAPDH;甘油醛 3-磷酸脱氢酶[EC:1.2.1.12]	分子功能:甘油醛-3-磷酸脱氢酶(NAD+)(磷酸化)活性(GO:0004365);生物过程:葡萄糖代谢过程(GO:00066);生物过程:糖酵解过程(GO:0006096);分子功能:NADP 结合(GO:00050661);分子功能:NAD 结合(GO:0051287)	30	8	5.35	上调 Up
Cla97C02G039140.1	K21888 1e-123 cmax;111476861 K21888DHAR;谷胱甘肽脱氢酶/转移酶[EC:1.8.5.1.2.5.1.18]	分子功能:谷胱甘肽转移酶活性(GO:0004364);细胞成分:胞质溶胶(GO:0005829);细胞成分:质膜(GO:0005886);生物过程:蛋白质谷胱甘肽化(GO:000731);分子功能:谷胱甘肽结合(GO:0043295);分子功能:谷胱甘肽脱氢酶(抗坏血酸)活性(GO:0045174)	32	6	0.36	下调 Down
Cla97C08G156800.1	K02109 1e-132 cmo;10348320 K02109ATPFOB;F 型 H+ 转运 ATP 酶亚基 b	分子功能:ATP 结合(GO:0005524);细胞成分:叶绿体类囊体膜(GO:0009535);分子功能:质子跨膜转运蛋白活性(GO:0015078);生物过程:ATP 合成偶联质子转运(GO:00015986);细胞成分:膜的整体成分(GO:0016021);细胞成分:质子转运 ATP 合成酶复合物,偶联因子 F(o)(GO:0045263)	32	7	0.25	下调 Down
Cla97C06G126630.1	K13343 0.0 cmo;103502404 K13343 PEX14;过氧化物-14 Peroxide-14	分子功能:信号受体结合(GO:0005102);细胞成分:线粒体(GO:0005739);细胞成分:过氧化物酶体(GO:00055777);细胞成分:过氧化物酶体膜(GO:0005778);细胞成分:胞质溶胶(GO:0005829);细胞成分:质膜(GO:0005886);生物过程:蛋白质靶向过氧化物酶体(GO:0006625);生物过程:过氧化物酶体组织(GO:0007031);分子功能:蛋白质转运蛋白活性(GO:0008565);细胞成分:膜的整体成分(GO:0016021);生物过程:蛋白质导入过氧化物酶体基质,对接(GO:0016560);细胞成分:过氧化物酶体导入物复合物(GO:1990429)	32	7	0.48	下调 Down
Cla97C05G093610.1	K03061 0.0 cms;111456000 K03061PSMC2;26S 蛋白酶体调节亚单位 T1	细胞成分:蛋白酶体复合物(GO:0000502);分子功能:ATP 结合(GO:0005524);细胞成分:细胞核(GO:0005634);细胞成分:细胞质(GO:0005737);分子功能:水解酶活性(GO:00016787);生物过程:蛋白质分解代谢过程(GO:00030163)	32	7	0.43	下调 Down
Cla97C03G056340.1	K08901 1e-148 cm;103485714 K08901psbQ;光系统 II 析氧增强蛋白 3	分子功能:钙离子结合(GO:0005509);细胞成分:叶绿体(GO:0009507);细胞成分:叶绿体类囊体(GO:0009534);细胞成分:叶绿体类囊体膜(GO:0009535);细胞成分:叶绿体基质(GO:0009570);细胞成分:类囊体(GO:0009579);细胞成分:光系统 II 析氧复合物(GO:00009654);生物过程:光合作用(GO:00015979);细胞成分:膜的外来成分(GO:0018988);细胞成分:类囊体管腔(GO:0031977);细胞成分:凋亡(GO:0048046)	34	8	0.42	下调 Down
Cla97C03G064830.1	K04077 0.0 csv;1001217516 K04077groEL;分子伴侣 GroEL	分子功能:ATP 结合(GO:0005524);细胞成分:叶绿体(GO:0009507);生物过程:蛋白质重折叠(GO:0042026)	34	14	6.56	上调 Up
Cla97C05G104530.1	K01602 1e-125 cmo;103489286 K01602rbcS;核酮糖二磷酸羧化酶小链[EC:4.1.1.39]	分子功能:单加氧酶活性 Molecular function; monooxygenase activity(GO:0004497);细胞成分:叶绿体 Cell composition; chloroplasts(GO:0009507);生物过程:光呼吸(GO:0009853);分子功能:核酮糖二磷酸羧化酶活性(GO:0016984);生物过程:还原性磷酸戊糖循环(GO:0019253)	35	8	9.87	上调 Up
Cla97C04G076580.1	K01689 0.0 mcha;111013597 K01689 ENO;烯醇化酶[EC:4.2.1.11]	细胞成分:磷酸丙酮酸水合酶复合物(GO:00000015);分子功能:镁离子结合(GO:000287);分子功能:磷酸丙酮酸水合酶活性(GO:0004634);生物过程:糖酵解过程(GO:0006096)	36	12	3.68	上调 Up

续表 2 Continued table 2

蛋白 ID Protein ID	KEGG 注释 KEGG Annotation	GO 注释 GO Annotation	覆盖率/% Coverage	肽段数 Peptide number	B; A	
Cla97C01G005610.1	K11352   1e-115   cmo; 103504642   K11352NDUFA12; NADH 脱氢酶(泛醌)1 $\alpha$ 亚基 12 NADH dehydrogenase (ubiqui- none) 1 $\alpha$ Subunit 12	细胞成分:线粒体(GO:0005739); 细胞成分:线粒体呼吸链复合物 I(GO: 0005747); 生物过程:对氧化应激的反应(GO:0006979); 分子功能:NADH 脱 氢酶(泛醌)活性(GO:0008137); 分子功能:电子转移活性(GO:0009055); 生 物过程:对细胞分裂素的反应(GO:0009735); 分子功能:钴离子结合(GO: 00050897) Cell composition: mitochondria; Cell composition: mitochondrial respiratory chain complex I; Biological processes: responses to oxidative stress; Molecular function: NADH dehydrogenase(ubiquinone) activity; Molecular function: electron transfer activity; Biological processes: reactions to cytokinins; Molecular function: cobalt ion binding	37	6	0.67	下调 Down
Cla97C07G134850.1	K01601   0.0   rcu; 107261263   K01601rbcL; 核酮糖二磷酸羧 化酶大链[EC:4.1.1.39] Ribulose diphosphate carboxyl- ase large chain	分子功能:镁离子结合(GO:000287); 分子功能:单加氧酶活性(GO:0004497); 细胞成分:叶绿体(GO:0009507); 生物过程:光呼吸(GO:0009853); 分子功能: 核酮糖二磷酸羧化酶活性(GO:0016984); 生物过程:还原性磷酸戊糖循环 (GO:0019253) Molecular function: magnesium ion binding; Molecular function: monooxygenase activity; Cell composition: chloroplasts; Biological process: photorespiration; Mo- lecular function: ribulose diphosphate carboxylase activity; Biological process: re- ducing pentose phosphate cycle	37	10	6.92	上调 Up
Cla97C03G054650.1	K00134   0.0   cm; 103484230   K00134GAPDH; 甘油醛 3-磷酸 脱氢酶[EC:1.2.1.12] Glyceraldehyde 3-phosphate de- hydrogenase	分子功能:甘油醛-3-磷酸脱氢酶(NAD <sup>+</sup> ) (磷酸化) 活性(GO:0004365); 细胞 成分:细胞质(GO:0005737); 生物过程:葡萄糖代谢过程(GO:00066); 生物过 程:糖酵解过程(GO:0006096); 分子功能:NADP 结合(GO:00050661); 分子功 能:NAD 结合(GO:0051287) Molecular function: glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (NAD <sup>+</sup> ) (phos- phorylation) activity; Cell composition: cytoplasm; biological process: glucose me- tabolism process; Biological process: glycolysis process; Molecular function: NAD binding; Molecular function: NAD binding	45	10	8.27	上调 Up
Cla97C01G015370.1	K02716   0.0   cms; 111453388   K02716psbO; 光系统 II 析氧增 强蛋白 1 Photosystem II oxygen evolution enhancing protein 1	分子功能:钙离子结合(GO:0005509); 细胞成分:叶绿体类囊体膜(GO: 0009535); 细胞成分:光系统 II 析氧复合物(GO:00009654); 生物过程:光合作 用(GO:00015979); 细胞成分:膜的整体成分(GO:0016021); 细胞成分:膜的外 来成分(GO:0018988); 生物过程:光系统 II 稳定(GO:0042549) Molecular function: calcium ion binding; cell composition: chloroplast thylakoid membrane; Cell composition: photosystem II oxygen evolution complex; Biological processes: photosynthesis; cell composition: the overall composition of the mem- brane; Cell composition: foreign components of the membrane; Biological process: photosystem II stability	47	14	0.54	下调 Down
Cla97C05G098210.1	K00417   1e-77   hbr; 110637335   K00417QCR7; 泛醌细胞色 素 c 还原酶亚基 7 Panquinone cytochrome c re- ductase subunit 7	细胞成分:线粒体(GO:0005739); 细胞成分:线粒体呼吸链复合物 III(GO: 0005750); 生物过程:线粒体电子传递,泛醌到细胞色素 c(GO:0006122); 生物 过程:有氧呼吸(GO:0009060); 细胞成分:膜(GO:0016020); 生物过程:线粒 体呼吸链复合物 III 组装(GO:0034551); 生物过程:质子跨膜转运(GO: 1902600) Cell composition: mitochondria; Cell composition: mitochondrial respiratory chain complex III; Biological processes: mitochondrial electron transfer, ubiquinone to cytochrome c; Biological process: aerobic respiration; Cell composition: membrane; biological process: assembly of mitochondrial respiratory chain complex III; Bio- logical processes: proton transmembrane transport	49	5	0.42	下调 Down
Cla97C09G180520.1	K03031   0.0   cm; 103493070   K03031PSMD8; 26S 蛋白酶 调节亚基 N12 26S proteasome regulatory sub- unit N12	细胞成分:蛋白酶体复合物(GO:0000502); 细胞成分:细胞核(GO:0005634); 细胞成分:胞质溶胶(GO:0005829); 细胞成分:蛋白酶体调节颗粒,盖亚复合 体(GO:008541); 生物过程:热反应(GO:0009408); 生物过程:暗形态发生 (GO:0009647); 生物过程:对生长素的反应(GO:0009733); 生物过程:对细胞 分裂素的反应(GO:0009735); 生物过程:细胞分裂素激活的信号通路(GO: 0009736); 生物过程:花发育(GO:0009908); 细胞成分:叶绿体包膜(GO: 00009941); 生物过程:蛋白质分解代谢过程(GO:00030163); 生物过程:花青 素生物合成过程的调控(GO:0031540); 生物过程:蛋白酶体介导的泛素依赖 性蛋白质分解代谢过程(GO:0043161); 生物过程:蛋白酶体组装(GO: 0043248); 生物过程:叶片发育(GO:0048366); 生物学过程:胚胎后根发育 (GO:0048528); 生物过程:子叶发育(GO:0048825); 生物过程:对错误折叠蛋 白的反应(GO:0051788) Cell composition: proteasome complex; Cell composition: nucleus; Cell composi- tion: Cytosol; Cell composition: proteasome regulatory granules, Gaia complex; bi- ological process: thermal reaction; biological processes: skotomorphogenesis; Bi- ological processes: reactions to auxin; Biological processes: reactions to cytokinins; Biological processes: signaling pathways activated by cytokinins; Biological proces- ses: flower development; Cell composition: chloroplast envelope; Biological process: protein catabolism process; Biological processes: regulation of anthocyanin biosynthesis process; Biological processes: ubiquitin dependent protein catabolism mediated by proteasomes; Biological process: proteasome assembly; Biological processes: leaf development; Biological processes: embryonic root development; Bi- ological process: cotyledon development; Biological processes: reactions to misfold- ed proteins	52	7	0.31	下调 Down
Cla97C10G196390.1	K02935   2e-93   csv; 10101214721   K02935 RP-L7; 大亚基核糖体蛋白 L7/L12 Large subunit ribosomal protein L7/L12	分子功能:RNA 结合(GO:0003723); 分子功能:核糖体的结构成分(GO: 0003735); 细胞成分:核糖体(GO:0005840); 生物过程:翻译(GO:0006412); 细 胞成分:叶绿体(GO:0009507) Molecular function: RNA binding; Molecular function: structural components of ri- bosomes; Cell composition: ribosome; Biological processes: translation; Cell com- position: chloroplasts	53	8	0.19	下调 Down
Cla97C09G175040.1	K01867   0.0   cpep; 111798430   K01867 WARS; 色氨酸 tRNA 合成酶 [EC:6.1.1.2] Tryptophan tRNA synthetase	分子功能:色氨酸 tRNA 连接酶活性(GO:0004830); 分子功能:ATP 结合 (GO:0005524); 细胞成分:细胞质(GO:0005737); 细胞成分:胞质溶胶(GO: 0005829); 生物过程:色氨酸 tRNA 氨基酰化(GO:0006436) Molecular function: tryptophan tRNA ligase activity; Molecular function: ATP binding; Cell composition: cytoplasm; Cell composition: cytosol; Biological process: aminoacylation of tryptophan tRNA	61	5	0.44	下调 Down

### 3 讨论

西瓜是深受中国人民喜爱的时令水果,在早春时候种植,提早上市,可获得较为理想的经济效益。早春时节,室外温度较低,如果再遭遇倒春寒,经常会导致植株生长受阻、花期授粉不良、果实发育畸形等。在这一系列生命活动的过程中,

蛋白质扮演了重要的角色,参与许多生理生化反应,如细胞凋亡、糖酵解反应、信号转导等。嫁接可以提高西瓜的抗寒性,本研究从蛋白组学的角度,阐明了受冷害后西瓜嫁接苗和自根苗之间的差异,具有深远的意义。

本研究通过对自根苗和嫁接苗差异蛋白的丰度分析、GO 功能注释和 KEGG 代谢通路分析,

获得了 985 条差异表达蛋白,其中上调蛋白数目为 545,下调蛋白数目为 440。最后通过分析获得差异蛋白情况,并结合前人研究成果,挑选 17 个耐寒相关的目标蛋白。本研究发现冷处理后,与自根苗相比,嫁接苗中的甘油醛 3-磷酸脱氢酶(GAPDH)表达量上升。

在糖酵解反应过程中,甘油醛-3-磷酸脱氢酶的作用很重要,目前常用作参照物来研究其他的基因和蛋白。在植物生理功能上,甘油醛-3-磷酸脱氢酶也是意义重大,它不但在能量代谢过程中起到重要作用,还调节许多亚细胞水平上的活动。

越来越多的研究结果证实,在植物体中,GAPDH 可以提高植物抗外界压力的能力,在耐干旱、耐盐碱和耐高温等方面发挥重要作用。刘志华等<sup>[17]</sup>用粗糙脉孢菌和菜豆炭疽病菌的甘油醛 3 磷酸脱氢酶基因氨基酸序列克隆了球毛壳菌的 GAPDH 基因的 DNA 序列,并采用酵母转化子转化 GAPDH,并对其进行生物功能分析,结果显示该转化子对  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  和高温具有较高的抵抗力,由此推断,GAPDH 确实与植株抗胁迫有关。在细胞质、细胞核间,GAPDH 同时参与多种细胞过程。Krynetski 等<sup>[18]</sup>的研究发现,GAPDH 能够和其他蛋白结合成 DNA-蛋白复合物,从而开启 DNA 的修复作用,除此以外,Sundararaj 等<sup>[19]</sup>的研究发现,GAPDH 可以和端粒进行特异性的结合,在维持端粒的长度和增加 DNA 的稳定性方面发挥了一定的作用。

本研究还发现冷处理后,嫁接苗的核酮糖二磷酸羧化酶(Rubisco)大链蛋白(蛋白 ID-Cla97C07G134850.1)和小链蛋白(蛋白 ID-Cla97C05G104530.1)表达量升高。在光合作用碳同化的过程中,核酮糖二磷酸羧化酶是重要双功能酶。它在卡尔文循环中催化  $\text{CO}_2$  的固定,同时还催化  $\text{O}_2$  加在核酮糖-1,5-二磷酸(RuBP)上的反应。赵军等<sup>[20]</sup>在水稻上的研究和本试验结果基本一致,他们发现在低温胁迫下 Rubisco 的稳定性及低温胁迫结束后正常生长时,Rubisco 活性回复能力提升,采用 SDS-PAGE 分析表明:低温锻炼增加了大、小亚基的合成量。

在试验过程中发现冷胁迫后,对比自根苗,西瓜嫁接苗中有两组 26S 蛋白酶体调节亚蛋白表达下调,分别为 K03061 PSMC226S(蛋白酶体调节亚单位 T1)和 K03031 PSMD8(26S 蛋白酶体调节亚基 N12),这两组蛋白与泛素-26S 蛋白酶体

系统(ubiquitin-26S proteasome system,UPS)的相关性很高。蛋白质翻译后,UPS 是修饰过程中的重要途径,涉及真核生物生长发育,对植物抵抗非生物胁迫及生长发育发挥举足轻重的作用<sup>[21]</sup>。基因组测序表明,与 UPS 相关的拟南芥蛋白质的编码基因高达 6%以上<sup>[22]</sup>。有研究表明,在干旱胁迫下,拟南芥中 U-box E3 泛素连接酶 At-PUB18 和 AtPUB19 作为负调节因子参与 ABA 介导的气孔关闭<sup>[23-24]</sup>,使得植株对 ABA 更加敏感,并且抗旱能力大大增强。

但还有一些研究表明,一些非生物胁迫因素,如缺水、金属离子污染、温度过高等可以诱导植物体内的泛素结合酶 E2 基因的表达,从而提高植物逆境适应性。Feussner 等<sup>[25]</sup>首次从番茄的 cDNA 文库中,分离出了 E2 的蛋白基因,并证实了,在高温和重金属离子的诱导下,该基因的表达极大地提高。由此可以推测,在非生物胁迫下的异常蛋白的降解过程中,E2 蛋白扮演了重要角色。也有可能因为热胁迫和冷胁迫温度条件恰好相反,这正印证了本试验的结果,冷害处理后嫁接苗 26S 蛋白酶体调节亚蛋白表达下调。

目前,研究人已经发现更多的参与植物抗逆过程的 UPS 家族成员。UPS 作为一个庞大的基因家族,至今只有少数的 UPS 的编码基因的功能被阐明,还有很多基因的作用不明确。另外,泛素化的作用机制、过程,泛素连接酶作用等研究尚少,在植物抗逆过程中,泛素-26S 蛋白酶体系统是如何发挥调控作用的,值得进一步深入研究。

## 4 结论

综上所述,本研究对嫁接苗和自根苗进行低温处理,采用 TRAQ 技术进行蛋白质组学的鉴定和定量分析,然后利用 Uniport 和 NCBI 的数据库对获得的肽段和蛋白质进行分析,并采用 GO 注释及 KEGG 注释分析其功能和代谢通路,最终获得了差异蛋白 985 个,其中上调蛋白 545 个,下调蛋白 440 个。嫁接苗耐冷性的提高主要与糖酵解过程、光呼吸过程和光合作用关键酶的表达有关。嫁接苗增强了接穗的光合作用能力,从而稳定了其他过程,如生物合成、防御反应和抗性的表达等。通过比较嫁接苗和自根苗在冷胁迫下的蛋白质之间的差异,本研究提供了比较详细的说明,以便更好地理解嫁接赋予西瓜幼苗耐低温特性的机制。

## 参考文献 Reference:

- [1] 王牧野,李建平,李俊杰. 中国设施蔬菜历史演变、规模分布与区域布局[J]. 中国瓜菜,2020,33(7):86-89.  
WANG M Y, LI J P, LI J J. Historical evolution, scale distribution, and regional layout of protected vegetables in china [J]. *China Cucurbits and Vegetables*, 2020, 33(7): 86-89.
- [2] 张 瑛,张 甜,王 艳,等. 设施瓜果类蔬菜耐低温冷害研究进展[J]. 江苏农业科学,2018,46(24):23-27.  
ZHANG Y, ZHANG T, WANG Y, *et al.* Research progress of low temperature resistance of facilities melon and fruit vegetables [J]. *Jiangsu Agricultural Science*, 2018, 46(24): 23-27.
- [3] 刘启振. 西瓜引种中国及其本土化研究[D]. 南京:南京农业大学,2019.  
LIU Q ZH. Study on introduction of watermelon into China and its localization [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2019.
- [4] 丁长庆. 西瓜交替氧化酶 CIAOX 及其相关基因 *CICASPL* 在低温胁迫下的功能研究[D]. 杭州:浙江大学,2016.  
DING CH Q. The functional analysis of watermelon CIAOX and its related gene *CICASPL* under cold stress [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2016.
- [5] 沈 虹,孟佳丽,吴绍军,等. 耐低温西瓜种质筛选及低温对西瓜生理指标的影响[J]. 北方农业学报,2021,49(2):115-123.  
SHEN H, MENG J L, WU SH J, *et al.* Screen of low temperature tolerant germplasm and the effect of low temperature on physiological indexes in watermelon [J]. *Journal of Northern Agriculture*, 2021, 49(2): 115-123.
- [6] 鲁军阳. 南瓜砧木嫁接提高西瓜耐冷性的机制研究[D]. 武汉:华中农业大学,2021.  
LU J Y. The mechanism of pumpkin rootstock grafting improve watermelon chilling tolerance [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2021.
- [7] 李 猛,吕亭辉,邢巧娟,等. 瓜类蔬菜耐低温性评价与调控研究进展[J]. 园艺学报,2018,45(9):1761-1777.  
LI M, LÜ T H, XING Q J, *et al.* Research progress on evaluation and regulation of chilling tolerance in cucurbitaceous vegetables [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2018, 45(9): 1761-1777.
- [8] 陈亚丽,朱为民,李育民,等. 厚皮甜瓜嫁接苗亲和性及保护酶活性变化研究[J]. 上海农业学报,2014,30(2):50-53.  
CHEN Y L, ZHU W M, LI Y M, *et al.* Changes of affinity and protective enzyme activity of grafted muskmelon seedlings [J]. *Acta Agriculturae Shanghai*, 2014, 30(2): 50-53.
- [9] 李 瑶. 嫁接提高甜瓜耐低温生理机制的研究[D]. 长春:吉林大学,2014.  
LI Y. Physiological mechanisms of low temperature tolerance improved by grafting in melon [D]. Changchun: Jilin University, 2014.
- [10] 李 琼,李丽丽,侯 娟,等. 瓜类作物响应低温胁迫机制的研究进展[J]. 园艺学报,2022,49(6):1382-1394.  
LI Q, LI L L, HOU J, *et al.* Advances on mechanism of cucurbit crops in response to low temperature stress [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2022, 49(6): 1382-1394.
- [11] WILKINS M R, PASQUALI C, APPEL R D, *et al.* From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis [J]. *Nature Biotechnology*, 1996, 14(1): 61-65.
- [12] 金 勋,杨 柳,李 娜,等. 植物逆境生物学中的蛋白质组学技术运用探析[J]. 现代园艺,2022,45(2):180-182.  
JIN X, YANG L, LI N, *et al.* Analysis of the application of proteomics techniques in plant stress biology [J]. *Contemporary Horticulture*, 2022, 45(2): 180-182.
- [13] 李严曼,蔡秀秀,朱 磊,等. miR160a 与其靶基因在西瓜嫁接苗中参与抵御低温胁迫[J]. 中国生物化学与分子生物学报,2022,38(12):1703-1713.  
LI Y M, CAI X X, ZHU L, *et al.* The roles of miR160a and its target genes in grafted watermelon seedlings under chilling stress [J]. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2022, 38(12): 1703-1713.
- [14] ROSS P L, HUANG Y N, MARCHESE J N, *et al.* Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents [J]. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2004, 3(12): 1154-1169.
- [15] TATUSOV R L, GALPERIN M Y, NATALE D A. The COG database: a tool for genome scale analysis of protein functions and evolution [J]. *Nucleic Acids Research*, 2000, 28(1): 33-36.
- [16] KANEHISA M, GOTO S, HATTORI M, *et al.* From genomics to chemical genomics: new developments in KEGG [J]. *Nucleic Acids Research*, 2006, 34(1): 354-357.
- [17] 刘志华,杨 谦. 球毛壳菌甘油醛-3-磷酸脱氢酶基因克隆及特性分析[J]. 微生物学报,2005,45(69):885-889.  
LIU ZH H, YANG Q. Cloning and characterization of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene from chaetomium globosum [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2005, 45(69): 885-889.
- [18] KRYNETSKI E Y, KRYNETSKAIA N F, GALLO A E, *et al.* A novel protein complex distinct from mismatch repair binds thioguanlylated DNA [J]. *Molecular Pharmacology*, 2001, 59(2): 367.
- [19] SUNDARARAJ K P, WOOD R E, PONNUSAMY S, *et al.* Rapid shortening of telomere length in response to ceramide involves the inhibition of telomere binding activity of nuclear glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(7): 6152-6162.
- [20] 赵 军,王以柔,李美茹,等. 低温锻炼对水稻幼苗叶片中 Rubisco 的影响[J]. 植物生理学报,1997,23(2):123-129.  
ZHAO J, WANG Y R, LI M R, *et al.* The effect of low-temperature exercise on Rubisco in rice seedling leaves



- [J]. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 1997, 23(2):123-129.
- [21] 宁约瑟, 王国梁, 谢旗. 泛素连接酶 E3 介导的植物干旱胁迫反应[J]. *植物学报*, 2011, 46(6):606-616.  
NING Y S, WANG G L, XIE Q. E3 ubiquitin ligase-mediated drought responses in plants [J]. *Chinese Bulletin of Botany*, 2011, 46(6):606-616.
- [22] LYZENGA W J, STONE S L. Abiotic stress tolerance mediated by protein ubiquitination[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2012(2):63.
- [23] LIU Y C, WU Y R, HUANG X H, *et al.* AtPUB19, a U-Box E3 ubiquitin ligase, negatively regulates abscisic acid and drought responses in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Molecular Plant*, 2011, 4(6):938-946.
- [24] DONG H S, RYU M Y, JAMMES F, *et al.* Roles of four arabidopsis U-Box E3 ubiquitin ligases in negative regulation of abscisic acid-mediated drought stress responses[J]. *Plant Physiology*, 2012, 160(1):556-568.
- [25] FEUSSNER K, FEUSSNER I, LEOPOLD I, *et al.* Isolation of a cDNA coding for an ubiquitin-conjugating enzyme UBC1 of tomato—the first stress-induced UBC of higher plants 12[J]. *Febs Letters*, 1997, 409(2):211-215.

## Proteomics Analysis of Grafted Watermelon Seedlings under Low Temperature Stress

MENG Jiali, SHEN Hong, WU Shaojun, YANG Nianfu,  
YU Xiang and ZHANG Lijie

(Suqian Institute of Agricultural Sciences, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Suqian Jiangsu 223800, China)

**Abstract** To investigate the changes in protein expression abundance of grafted watermelon seedlings under low temperature stress, and gain deeper understanding of the metabolic pathways involved in the cold tolerance response process during watermelon seedling stage, as well as to explore the relevant molecular regulatory mechanisms, low-temperature treatment was conducted on both grafted and self rooted seedlings for identification and quantitative analysis using iTRAQ technology. Then, the obtained peptides and proteins were analyzed using databases, and their functions and metabolic pathways were annotated using GO and KEGG. In total, 985 differential proteins were identified, including 545 upregulated proteins and 440 downregulated proteins. These proteins were categorized into four main groups: carbohydrate metabolism (26.52%), genetic information translation (19.78%), energy metabolism (17.83%), and amino acid metabolism (13.70%). Proteomics analysis showed that the enhanced low temperature tolerance observed in grafted seedlings was related to the accumulation of Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and Ribulose biphosphate carboxylase (Rubisco) compared to self-rooted seedlings. The results of this study provide a scientific basis for grafting to enhance the cold tolerance of watermelon seedlings.

**Key words** Low temperature stress; Watermelon; Grafted seedlings; Proteomics

**Received** 2023-07-28

**Returned** 2023-10-12

**Foundation item** 2021 Natural Science Fund of Suqian Science and Technology Plan (No. K202120).

**First author** MENG Jiali, female, master. Research area: new variety breeding and cultivation technology extension in facility agriculture. E-mail: jiali1415118@163.com

**Corresponding author** YU Xiang, male, master, associate research fellow. Research area: vegetable breeding. E-mail: yx003@163.com

(责任编辑: 潘学燕 Responsible editor: PAN Xueyan)