研究报告 Research Report

木薯泛素结合酶的生物信息学分析

贾利强^{*} 贵州师范学院生物科学学院,贵阳,550018 * 通信作者, liqiangj@zju.edu.cn

摘要 泛素结合酶(ubiquitin conjugating enzyme, E2)在植物蛋白质的泛素化降解系统中处于中心地位 广泛参与调控植物的生长发育以及对逆境胁迫的响应信号途径。木薯(*Manihot esculenta* Crantz)是许多热带国家主要的粮食作物。随着木薯全基因组序列的公布,木薯功能基因的研究进入了快车道,但有关木薯 *E2* 基因的研究尚未有报道。本研究从 Phytozome 木薯数据库中获得了 62 个木薯 *E2* 基因,并对其进行了生物信息学分析。结果表明 62 个木薯 *E2* 基因散布在 18 条染色体上,并且 *chr2* 上定位的 *E2* 基因最多。进化树分析结果表明, 这 62 个木薯 *E2* 基因为成 16 个亚家族,包括两个 UEV 亚家族。基因结构分析结果也支持这一结果。利用半定量 PCR 的方法 检测了部分 *E2* 基因在木薯不同组织器官中的表达模式,以及应答模拟盐和干旱胁迫条件下的表达模式,结果表明, 3 个 *E2* 基因(*MeUBC14*, *MeUBC33* 和 *MeUBC56*)表现出组织特异性表达,而所选的其他 *E2* 基因呈现组成性表达模式。在模拟盐和干旱胁迫条件下,分别有 10 个和 11 个木薯 *E2* 基因表达上调 其中有 8 个基因同时受到模拟盐和干旱的诱导上调表达。在这两种胁迫条件下,*MeUBC8* 基因的表达不受影响。这些结果表明木薯 *E2* 基因可能广泛参与木薯生长发育及抗逆胁迫途径。

Bioinformatic Analysis of the Ubiquitin Conjugating Enzyme Gene Family in Cassava

Jia Liqiang *

School of Biological Sciences, Guizhou Normal College, Guiyang, 550018 * Corresponding author, liqiangj@zju.edu.cn

DOI: 10.13417/j.gab.040.002765

Abstract Ubiquitin binding enzymes (E2) play a central role in the ubiquitination and degradation system of plant proteins and are widely involved in regulating the growth and development of plants and signaling pathways in response to stress. Cassava is a staple food crop and the main income source in many tropical countries. With cassava whole genome sequencing, functional gene research in cassava entered in fast lane. However, the study about cassava *E2* genes has not been reported yet. In this study, 62 *MeE2s* were obtained from the the publicly available database Phytozome and performed bioinformatic analysis. The results showed that 62 *MeE2s* were widely but unevenly distributed on 18 chromosomes and chr2 contains the largest number of *MeE2s* with a total of six genes. The phylogenetic analysis revealed that *MeE2s* can be divided into 16 groups with two UEV subfamily. The analysis of *MeE2* gene structure indicated that *MeE2* members in the same subfamilies shared a similar exon/intron structure. Using semi RT-PCR technic, the expression pattern of some *MeE2s* in different cassava tissues or in responsive to salt/drought stress was detected. The results showed that three *E2* genes (*MeUBC14*, *MeUBC33* and *Me-UBC56*) had tissue specific expression pattern, while the other genes had constitutive expression pattern. Under salt

基金项目 :本研究由贵州师范学院博士科研启动基金项目(2019BS004)资助

引用格式:Jia L.Q., 2021, Bioinformatic analysis of the ubiquitin conjugating enzyme gene family in cassava, Jiyinzuxue yu Yingyong Shengwuxue (Genomics and Applied Biology), 40(7-8 combined issue): 2765-2774. (贾利强, 2021, 木薯泛素结合酶的生物信息学分析, 基因组学与应用生物学, 40(第7-8 期合刊): 2765-2774.)

and drought stress conditions, 10 and 11 MeE2 expression were upregulated, respectively, and 8 MeE2s were induced by two stress conditions at the same time. However, the expression of MeUBC8 was not altered under the two stress conditions. The results indicated that MeE2 gene family is widely involved in cassava growth and abiotic tolerance.

Keywords Manihot esculenta Crantz; Ubiquitin conjugating enzyme; Gene family; Stress; Gene expression

泛素 -26S 蛋白酶体系统是植物最重要的蛋白 质周转调控机制。该系统主要由泛素活化酶(E1)、泛 素结合酶(E2)、泛素连接酶(E3)、26S 蛋白酶体和泛 素组成。泛素化是一种重要的蛋白翻译后修饰系统, 该蛋白通常由高度保守的 76 氨基酸组成。经由三步 酶催化反应,标定到要降解的蛋白底物上,随后由 26S 蛋白酶体降解(Nandi et al., 2006)。近些年来的研 究表明 除了蛋白泛素化降解途径外 还存在着蛋白 泛素化非降解途径,并通过该途径参与调控植物生长 发育的诸多方面(Smalle and Vierstra, 2004)。泛素/蛋 白酶体途径是高等植物的主要蛋白质降解途径 在 植物的生长发育诸多方面,如细胞周期调控、程序性 细胞死亡、植物发育、自交不亲和以及光、糖、激素和 营养的代谢和信号转导等方面,都发挥着重要的作 用(Welchman et al., 2005; Xu et al., 2009; Li and Schmidt, 2010; Zhou et al., 2010; Santner and Estelle, 2010; Sadanandom et al., 2012; Park et al., 2012; Park et al., 2014)。此外 近些年来越来越多的研究还发现 泛素 -26S 蛋白酶体系统还对植物病害发生、防卫反应和 抗病性等方面起着重要的调控作用。E2 蛋白通常具 有一段由 140~150 个氨基酸组成的保守区域,叫做 UBC 结构域,具有酶催化活性位点的半胱氨酸残基 (Cys)位于这个保守的结构域内。Cys 活性位点使 E2 与活化的 Ub 分子生成硫酯键,形成 E2-Ub 中间复 合体(Kraft et al., 2005)。UBC 结构域内不包含半胱氨 酸活性位点的 E2 称为泛素结合酶 E2 变体(ubiquitin conjugating E2 enzyme variant, UEV),这些 UEV 蛋白 不具有酶催化活性,但仍发挥着重要的生物学功能 (Burns et al., 2010).

所有的真核生物基因组中都有 E2 基因。不同的物种 E2 基因的数量变化很大。低等真核生物基因组中 E2 的数量少,而高等真核生物中的 E2 基因数量相对较多(Dong et al., 2016)。藻类植物的 E2 基因不超过 20 个,而在高等植物中 E2 很少低于 40 个 (Dong et al., 2016)。在报道的低等真核生物中,酵母 (Saccharomyces cerevisiae)基因组有 15 个 E2/UEV, 12、18 和 19 个 E2/UEV 分布在 Ostreococcus tauri、Micromonas sp. RCC299 和 Chlamydomonas reinhardtii 基因组中(Jue et al., 2015)。而在高等植物中,拟南芥 (Arabidopsis thaliana)基因组中有 45 个 E2/UEV, 番

木薯(Manihot esculenta Crantz)是世界三大薯类 作物之一,享有"淡粉之王"的美称,为全球粮食安全 提供保障(Burns et al., 2010)。然而,有关木薯泛素结 合酶 E2 基因的研究报告还没有。木薯基因组测序的 完成,为木薯功能基因的挖掘提供了保障条件,也为 探究蛋白泛素化降解途径在调控木薯生长发育以及 淀粉代谢平衡方面所发挥的作用提供了可能。本研 究利用木薯数据库,全基因组探测了木薯 E2 的数量 和分布,比较了和拟南芥、水稻(Oryza sativa)等 E2 基 因家族的进化关系,构建了进化树,同时挑选了代表 基因,探测这些基因在木薯组织表达模式以及应答 干旱和盐胁迫的响应模式,为将来阐述木薯 E2 基因 的功能提供有用的线索。

1 结果与分析

1.1 木薯泛素结合酶基因的生物信息学分析

利用已报道的拟南芥和水稻的 E2 基因序列对 木薯基因组进行序列相似性比对,共搜索到 62 个木 薯 E2 基因。利用在线软件 SMART、Pfam 对这 62 个 木薯蛋白的结构域进行搜索,发现这 62 个木薯蛋白 都含有 UBC 结构域,表明搜索到的 62 个木薯蛋白 都含有 UBC 结构域,表明搜索到的 62 个木薯蛋因 属于 UBC 家族基因。为方便起见,这 62 个木薯 E2 基因按照在染色体上的物理定位,依次命名为 MeUBC1~MeUBC62。这 62 个 MeUBC 蛋白大小变化 很大,从 101 到 1 076 aa,对应的 MW 从 11.26 kD 到 118.49 kD (表 1)。

1.2 基因染色体定位及基因结构分析

为了明确这 62 个木薯 UBC 基因在染色体上具体的分布位置,根据其所在的物理位置,利用软件 Mapinspect 构建了基因染色体位置图(图 1)。结果表 明这 62 个木薯 UBC 基因广泛散布在 18 条木薯染色 体上。6 个染色体上(Chr7, Chr10, Chr12, Chr13, Chr17 和 Chr18)分布的基因数目最少,分别只有 2 个基因, 而 Chr2 上存在的基因数目最多,有 6 个基因。

利用在线软件 GSDS (http://gsds.cbi.pku.edu.cn/), 比较了木薯 E2 基因序列和编码区序列,确定了木薯 UBC 基因的外显子和内含子的位置和数目,绘制了 基因结构图(图 2)。结果显示木薯 E2 基因结构变化 比较大,内含子的数目从 0 个到 8 个之间。有 4个基 因(MeUBC15, MeUBC18, MeUBC37 和 MeUBC49)没 有内含子,两个基因(MeUBC14 和 MeUBC38)有 8个内 含子。木薯 E2 基因内含子数目集中在 3~5 个之间, 占比达到 80.6%。在其他作物 E2 的研究中也有类似 的报道(Jue et al., 2015; Dong et al., 2016)。

1.3 木薯泛素结合酶蛋白的进化树分析

为了探究木薯 62 个 UBC 基因之间以及与单双 子叶模式植物拟南芥和水稻 UBC 之间的进化关系, 根据文献报道 我们获得了 15 个酵母 UBC 蛋白、45 个拟南芥 UBC 和 48 个水稻 UBC 蛋白序列, 和 62 个木薯 UBC 蛋白序列 ,一起组成了 165 个 UBC 蛋白 数据方阵。利用在线软件 MAFFT 进行序列比对 选 取保守的 UBC 蛋白序列 利用 MEGA7 软件构建 NJ 进化树。结果表明木薯 UBC 蛋白分成 14 个 E2 亚家 族和 2 个 UEV 亚家族(图 3)。以酵母的同源基因来 命名亚家族的名称,这16个亚家族分别命名为 UBC1\UBC2\UBC3\UBC4/5\UBC6\UBC3/7\UBC8\ UBC9\UBC10\UBC11\UBC12\UBC13\UBC14\UB-C15、UBC16、UEV1 和 UEV2。其中 UBC9 和 UBC12 亚家族是类泛素蛋白降解途径,包括 SUMO 蛋白 降解途径和 RUB1 蛋白降解途径。UEV1 和 UEV2 是泛素 E2 两个变异体。有关其他作物 E2 基因家 族进化树的分析结果也得出类似结果。木薯 UBC 不同亚家族中散布的 E2 基因的数目差异很大,亚 家族 UBC4/5 中有 14 个木薯 UBC 基因 ,而 UBC14 亚家族中只有1个木薯 UBC 基因。这一结果也与 前期的研究结果一致(Jue et al., 2015; Dong et al., 2016).

1.4 木薯泛素结合酶基因的组织表达分析

为了探测木薯 UBC 基因在木薯不同组织中的 表达模式,选取木薯的新生幼根根尖(RT)、新生幼根 伸长区(YR)、成熟老根(OR)、新生茎(YS)、老茎(OS)、 叶片(L)以及叶柄(P)。我们探测了 13 个基因在这些 组织中的表达模式,结果表明其中有四个基因, *MeUBC14、MeUBC33、MeUBC55* 和 *MeUBC56* 具有组 织特异性表达(图 4)。*MeUBC14* 主要在叶片中表达, *MeUBC33* 主要在根尖和叶片中表达,*MeUBC55* 主要 在根尖中表达,*MeUBC56* 主要在叶柄中表达,表明 这四个基因在这些器官的生长发育进程中可能发挥 着生物学作用。其他基因在大部分器官中都有表达, 呈现组成性表达,表明这些基因可能在木薯生长发 育过程中发挥着广泛的作用。

1.5 木薯泛素结合酶基因对胁迫的响应模式

作物经常会受到干旱或者盐胁迫的影响而减 产。近期的一些研究表明蛋白泛素化系统广泛地参 与到植物抵御逆境胁迫的响应途径。为了探测 E2 基 因在木薯应答盐胁迫和干旱胁迫时可能所发挥的作 用 我们选择 14 个木薯 E2 基因 探测这些基因在模 拟盐或干旱胁迫条件下的表达模式。结果表明,分别 有 10 个和 11 个木薯 E2 基因的表达受到模拟盐或 干旱胁迫的诱导上调(图 5) 其中有 8 个木薯 E2 基 因受到这两种胁迫的同时诱导上调。表明这些基因 可能参与到木薯抵御盐或干旱胁迫的逆境胁迫途 径。有3个基因(MeUBC35, MeUBC54 和 MeUBC61) 的表达受到盐胁迫的抑制下调,而受到干旱胁迫的 诱导上调,表明这三个基因在应答盐胁迫或干旱胁 迫的途径中所发挥的作用可能是不同的。在这2种 胁迫条件下 MeUBC8 的表达不受影响 表明该基因 可能不参与木薯应答逆境胁迫途径。

2 讨论

木薯是一种高光效、高淀粉产量、抗旱、耐贫瘠 的重要热带粮食作物,是重要的工业原料和潜在的 粮食安全作物。随着木薯全基因组序列测序的完成, 挖掘高产优质抗逆的重要农艺性状基因,为今后通 过分子定向设计育种培育优质抗逆新品种奠定了良 好的基础。近些年的研究结果表明,植物 *E*2 家族基 因在植物的生长发育以及抵御外界逆境胁迫方面发 挥着广泛的作用。这些研究主要集中在模式植物,诸 如拟南芥、水稻、番茄和玉米等植物上,而有关木薯 的 *E*2 研究还很缺乏。本研究利用已报道的拟南芥和 水稻 *E*2 序列对木薯全基因组进行搜索比对,结合

表1木薯泛素结合酶基因及其编码蛋白的基本信息

Table 1 Basic information of MeUBC genes and their coding protein

| 基因名称 | 基因位点 | 大小(aa) | 分子量(kD) | 等电点 | 染色体位置 |
|-----------|-----------------|-----------|---------|------|-------------------------|
| Gene name | Gene locus | Size (aa) | MW (kD) | pI | Chr location |
| MeUBC1 | Manes.01G006100 | 148 | 16.45 | 7.87 | LG1: 1097253~1099380 |
| MeUBC2 | Manes.01G140800 | 137 | 15.41 | 8.30 | LG1: 25388955~25389733 |
| MeUBC3 | Manes.01G189200 | 152 | 17.35 | 5.28 | LG1: 28604884~28607567 |
| MeUBC4 | Manes.01G255200 | 183 | 21.09 | 4.21 | LG1: 33010662~33012602 |
| MeUBC5 | Manes.02G013100 | 148 | 16.53 | 7.87 | LG2: 1107310~1109970 |
| MeUBC6 | Manes.02G021200 | 184 | 21.00 | 4.27 | LG2: 1697259~1699951 |
| MeUBC7 | Manes.02G021300 | 141 | 15.91 | 4.18 | LG2: 1701256~1703486 |
| MeUBC8 | Manes.02G098800 | 161 | 18.37 | 7.83 | LG2: 7355694~7359374 |
| MeUBC9 | Manes.02G191700 | 148 | 16.54 | 8.28 | LG2: 15618811~15619976 |
| MeUBC10 | Manes.02G219500 | 268 | 29.08 | 8.70 | LG2: 28616956~28619201 |
| MeUBC11 | Manes.03G102200 | 153 | 17.22 | 7.24 | LG3: 17872277~17876500 |
| MeUBC12 | Manes.03G110600 | 624 | 69.58 | 6.26 | LG3: 20160411~20162715 |
| MeUBC13 | Manes.03G203400 | 308 | 34.36 | 5.03 | LG3: 28390996~28391934 |
| MeUBC14 | Manes.04G071900 | 1 076 | 118.49 | 4.39 | LG4: 20408918~20421693 |
| MeUBC15 | Manes.04G151300 | 233 | 26.68 | 8.81 | LG4: 27466807~27469077 |
| MeUBC16 | Manes.04G154600 | 422 | 46.79 | 6.93 | LG4: 27757223~27759510 |
| MeUBC17 | Manes.05G026300 | 148 | 16.52 | 7.98 | LG5: 1927333~1931522 |
| MeUBC18 | Manes.05G032700 | 183 | 21.10 | 4.28 | LG5: 2363271~2365171 |
| MeUBC19 | Manes.05G083600 | 342 | 38.76 | 5.25 | LG5: 6383409~6384164 |
| MeUBC20 | Manes.05G154600 | 161 | 18.28 | 8.17 | LG5: 21991590~21994307 |
| MeUBC21 | Manes.05G205200 | 148 | 16.46 | 7.87 | LG5:28042128~28043771 |
| MeUBC22 | Manes.06G095500 | 152 | 17.33 | 5.20 | LG6: 20771018~20773395 |
| MeUBC23 | Manes.06G124300 | 194 | 21.32 | 4.57 | LG6: 23215338~23216798 |
| MeUBC24 | Manes.06G156300 | 148 | 16.58 | 7.87 | LG6: 25842294~25844788 |
| MeUBC25 | Manes.06G161300 | 245 | 27.22 | 6.40 | LG6: 26442290~26443468 |
| MeUBC26 | Manes.07G104200 | 189 | 21.30 | 5.91 | LG7: 23307477~23309887 |
| MeUBC27 | Manes.07G113900 | 173 | 19.28 | 5.61 | LG7: 24221700~24223483 |
| MeUBC28 | Manes.08G030800 | 146 | 13.84 | 7.15 | LG8: 2792994~2795897 |
| MeUBC29 | Manes.08G154200 | 152 | 17.33 | 5.28 | LG8: 31804639~31806749 |
| MeUBC30 | Manes.08G169900 | 148 | 16.49 | 7.87 | LG8: 33006335~33008274 |
| MeUBC31 | Manes.08G169800 | 150 | 16.70 | 7.79 | LG8: 33007173~33008274 |
| MeUBC32 | Manes.09G049200 | 151 | 15.58 | 7.08 | LG9: 6611113~6615135 |
| MeUBC33 | Manes.09G074400 | 269 | 19.17 | 7.85 | LG9: 10854245~10857019 |
| MeUBC34 | Manes.09G122700 | 148 | 16.46 | 7.30 | LG9: 24536819~24538752 |
| MeUBC35 | Manes.10G032100 | 167 | 18.70 | 5.13 | LG10: 2743859~2747201 |
| MeUBC36 | Manes.10G044700 | 187 | 21.03 | 5.39 | LG10: 4150036~4153188 |
| MeUBC37 | Manes.11G009300 | 418 | 46.60 | 6.47 | LG11: 976409~976972 |
| MeUBC38 | Manes.11G012300 | 234 | 26.49 | 8.39 | LG11: 1160244~1165703 |
| MeUBC39 | Manes.11G132200 | 166 | 18.72 | 5.00 | LG11: 24400444~24404985 |
| MeUBC40 | Manes.12G098200 | 310 | 35.07 | 9.17 | LG12: 19321266~19324178 |
| MeUBC41 | Manes.12G106700 | 160 | 18.02 | 8.27 | LG12: 24053343~24056585 |
| MeUBC42 | Manes.13G120200 | 160 | 18.00 | 8.27 | LG13: 24722412~24726593 |
| MeUBC43 | Manes.13G136300 | 183 | 20.88 | 8.14 | LG13: 26396625~26399201 |
| MeUBC44 | Manes.14G005600 | 180 | 19.94 | 5.14 | LG14: 554977~556377 |
| MeUBC45 | Manes.14G019100 | 148 | 16.59 | 7.87 | LG14: 1776947~1779038 |

续表 1 Continuing table 1

| 基因名称 | 基因位点 | 大小(aa) | 分子量(kD) | 等电点 | 染色体位置 |
|-----------|-----------------|-----------|---------|------|------------------------------|
| Gene name | Gene locus | Size (aa) | MW (kD) | pI | Chr location |
| MeUBC46 | Manes.14G047100 | 194 | 21.12 | 4.48 | LG14: 3758261~3761373 |
| MeUBC47 | Manes.14G068300 | 184 | 21.01 | 4.38 | LG14: 5559589~5562377 |
| MeUBC48 | Manes.14G075900 | 152 | 17.33 | 5.28 | LG14: 6162466~6167854 |
| MeUBC49 | Manes.15G000600 | 365 | 41.28 | 9.75 | LG15: 74411~75887 |
| MeUBC50 | Manes.15G093100 | 153 | 17.22 | 7.24 | LG15: 6890492~6895214 |
| MeUBC51 | Manes.15G106700 | 181 | 19.43 | 7.34 | LG15: 8012137~8018967 |
| MeUBC52 | Manes.15G133400 | 159 | 17.86 | 4.90 | LG15: 10190861~10194600 |
| MeUBC53 | Manes.15G181200 | 187 | 21.29 | 4.12 | LG15: 19357401~19359993 |
| MeUBC54 | Manes.16G071900 | 157 | 17.73 | 8.46 | LG16: 22541096~22541555 |
| MeUBC55 | Manes.16G027500 | 929 | 103.42 | 4.79 | LG16: 2705260~2709031 |
| MeUBC56 | Manes.16G116300 | 565 | 61.69 | 7.22 | LG16: 27088917~27091952 |
| MeUBC57 | Manes.17G045600 | 901 | 100.83 | 4.84 | LG17: 18264011~18267479 |
| MeUBC58 | Manes.17G123600 | 187 | 21.25 | 4.19 | LG17: 27207887~27208312 |
| MeUBC59 | Manes.18G100700 | 148 | 16.38 | 7.86 | LG18: 8790755~8791468 |
| MeUBC60 | Manes.18G125800 | 167 | 18.70 | 8.46 | LG18: 13899998~13903124 |
| MeUBC61 | Manes.S090300 | 101 | 11.26 | 8.48 | Scaffold01434: 17110~17715 |
| MeUBC62 | Manes.S000800 | 500 | 56.25 | 4.54 | Scaffold00256: 383495~389793 |

SMART 软件确认完整 UBC 结构域的存在,最终得 到 62 个木薯 E2 基因,包括 54 个 E2 基因和 8 个 UEV 基因。木薯 E2 基因的数量介于 C₃ 模式植物水 稻和 C₄ 模式植物玉米之间。E2 基因家族在生物的进 化进程中不断扩大,即生物进化越高级 E2 基因的 数目越多(Dong et al., 2016)。在低等植物绿藻中 E2 基因的数目不超过 20 个,而在苔藓中 E2 的数目达 到 35 个,进化成拟南芥和水稻等模式植物 E2 的数 目分别为 45 个和 48 个。热带高产作物基因组往往 含有更多的 E2 基因,例如玉米和香蕉(Musa nana)分 别有 75 个和 72 个 E2 基因。本研究结果也表明热带 高产的作物木薯具有比较多的 E2 基因。是否热带高 产的作物都含有更多的 E2 基因 需要将来更多的热 带作物基因组学的研究结果来验证。

泛素结合酶是泛素蛋白降解途径中重要的中间 环节,现有的研究结果表明泛素结合酶参与调控植 物生长发育以及应答逆境胁迫等诸多方面,如根的 生长发育(Li and Schmidt, 2010),果实成熟调控(Wang et al., 2014),植物的光形态建成(Yanagawa et al., 2004),植物开花(Xu et al., 2009),抵御盐胁迫(Cui et al., 2012),植物营养代谢平衡(Li and Schmidt, 2010; Park et al., 2014)。同时植物泛素结合酶基因的表达 具有组织特异性,以及受到外界逆境胁迫的调控 (Zhou et al., 2010; Cui et al., 2012; Jeon et al., 2012)。 三个水稻 E2 基因(OsUBC2/OsUBC5/OsUBC18)和 5个 拟南芥 E2 基因(AtUBC13/AtUBC17/AtUBC20/AtUB-C26/AtUBC31)的表达受盐或干旱胁迫的抑制下调,而 三个水稻 E2 基因(Osubc13/Osubc15/Osubc45)的表达 水平受到胁迫的诱导而上调(E et al., 2015)。对玉米 E2 基因的研究结果表明,分别有 61 个和 56 个玉米 E2 基因的表达受到盐和干旱胁迫的诱导而上调(Jue et al., 2015)。而在香蕉 E2 相关的研究中,分别有 10 和 21 个受到两种胁迫的诱导上调,分别有 22 和 15 个 香蕉 E2 基因的表达受到两种胁迫的抑制下调(Dong et al., 2016)。我们的研究结果有类似的结论,在所 检测的 14 个木薯 E2 基因中,分别有 10 和 11 个木 薯 E2 基因受到这两种胁迫的诱导上调,表明植物 E2 基因可能广泛参与植物抵御逆境胁迫的应答反 应机制。

木薯是一种典型的高光效、抗旱、耐贫瘠的热带 作物,是中国重要的工业原料和热带粮食作物,主要 用于生产淀粉和燃料乙醇。近年来,由于全球性温室 效应、粮食安全及环境污染问题日益严重,木薯的高 工业附加值、高生物量和抗逆特性将使其成为极具 潜力的粮食作物。由于中国热区面积有限,生产上容 易遭受干旱和土壤盐碱化等逆境胁迫环境,严重影 响木薯产业的发展。泛素结合酶作为蛋白泛素化途 径中的关键酶,在调控植物生长、发育和响应逆境胁



图 1 木薯泛素结合酶基因的染色体分布

Figure 1 The chromosomal location of MeUBCs

迫中发挥着重要的作用。目前,有关木薯 E2 的相关 研究还未见报道。本研究利用生物信息策略,对木薯 全基因组搜索了 E2 基因,确定了其分布、数量以及 和其他模式植物 E2 的进化关系。选取了部分木薯基 因,分析了组织特异性表达模式以及应答逆境胁迫 的响应模式。这些结果为将来深入研究木薯蛋白泛 素化降解途径的功能提供了有价值的参考,也为进 一步揭示该基因家族参与调控木薯生长、发育以及 抵御外界逆境胁迫的机制提供了理论依据。

3 材料与方法

3.1 材料

以田间种植的木薯品种'华南6号'为试验材 料,采取7个组织器官(幼根根尖,幼根伸长区,成 熟根部位,新生茎,成熟茎,叶片和叶柄)迅速用液氮冷 冻处理,保存于-80 ℃冰箱,备用。200 mmol/L的NaCl 溶液胁迫处理和自然干旱胁迫处理流程如下:选取 '华南6号'健康种茎,以盆栽形式种植于含有蛭石 的盆中。木薯苗生长6周后,选取长势一致的植株,进 行 200 mmol/L NaCl 溶液胁迫和自然干旱处理。盐胁 迫处理在0、1、6和24h时分别取样,自然干旱胁迫处 理在0、4、6和8d分别取样,迅速液氮处理,转移到 -80℃保存,备用。总RNA的提取及基因组DNA的去 除用华越洋公司的快速 RNA 提取试剂盒(华越洋, 3.0,中国)进行。cDNA的反转录反应采用 TaKaRa 公 司的 M-MLV 反转录试剂盒(TaKaRa,日本)进行。本 研究中所用到的特异性引物用 Oligo 7 设计(表 2)。

3.2 木薯 UBC 基因的生物信息分析

以拟南芥和水稻的 UBC 保守氨基酸序列作为 原始检索序列,利用 blastp 程序,搜索 Phytozome 数



图 2 木薯泛素结合酶基因的结构

Figure 2 The gene structure of MeUBCs

据库中的木薯全蛋白组序列(http://bioinformatics. psb.ugent.be/plaza/versions/plaza/),共得到 62 个木薯 UBC 蛋白序列。利用在线 SMART 程序(http://smart. embl-heidelberg.de/)检测这 62 个木薯 UBC 蛋白序 列,确定 UBC 蛋白结构域的存在。62 个 MeUBC 基 因结构用在线基因结构分析数据库来计算显示 (http://gsds.cbi.pku.edu.cn/)。根据木薯染色体上MeU-BC 基因的物理位置,利用软件 MapInspect (http:// www.plantbreeding.wur.nl/softwaremapinspect.html)绘 制 MeUBC62 的染色体定位(图 1)。

3.3 木薯 UBC 蛋白序列比对及进化树分析

利用前人报道的 UBC 蛋白序列(酵母 15 个, 拟 南芥 45 个, 水稻 48 个) 以及本研究搜索到的 62 个 木薯 UBC 蛋白序列组成 170 个 UBC 蛋白序列矩 阵 利用在线比对软件 MAFFT 进行 UBC 蛋白相似 性比对,去除不保守的序列,最终得到 148 个保守的 UBC 蛋白序列。利用 MEGA 6.0 (http://www.mega software.net)软件中的近邻相接法分析,bootstrap 设 定为 1 000 p-distance 模型,缺失数据处理采用 pairwise deletion $_{\circ}$

作者贡献

贾利强是本研究的实验设计者和实验研究的执 行人 完成了数据分析及论文的写作。本人阅读并同 意最终的文本。

致谢

本研究由贵州师范学院博士科研启动基金项目 (2019BS004)资助。

参考文献

- Burns A., Gleadow R., Cliff J., Zacarias A., and Cavagnaro T., 2010, Cassava: the drought, war and famine crop in a changing world, Sustainability, 2(11): 3572-3607.
- Cui F., Liu L.J., Zhao Q.Z., Zhang Z.H., Li Q.L., Lin B.Y., Wu Y.R., Tang S.Y., and Xie Q., 2012, Arabidipsis ubiquitin conjugase UBC32 is an ERAD component that functions in brassinosteroid-mediated salt stress tolerance, Plant Cell, 24 (1): 233-244.

Dong C., Hu H.G., Jue D.W., Zhao Q.F., Chen H.L., Xie J.H.,



图 3 MeUBCs 基因家族的进化树分析

Figure 3 The phylogenetic analysis of MeUBCs gene family





Figure 4 The expression pattern of some *MeUBCs* in cassava tissues





表 2 RT-PCR 引物

Table 2 RT-PCR primers

| 基因名称 | 正向引物(5'-3') | 反向引物(5'-3') |
|-----------|------------------------|------------------------|
| Gene name | Forward primer (5'-3') | Reverse primer (5'-3') |
| MeUBC8 | CCCGTACAAATCTCCTTCCA | ATGCCGCATCACCATTTAGT |
| MeUBC11 | AACCCTTAGTGGTGCCTCCT | CGGCGAGTCAATTTTTCTTC |
| MeUBC14 | AATTGTTGGGGGCATATGGAA | CCTCTGCCAGTCCACGTATT |
| MeUBC22 | GGTTGCAGAATGATCCACCT | TCGAGAAACAAATCGCACAG |
| MeUBC29 | ACGCAAGGCTTTAAGCAAGA | AAATCACCTGTGGTGCTTCC |
| MeUBC33 | CCAATCTGAGTGTGGTGTTCA | CTAATCAGCCGTCCAACTCTG |
| MeUBC35 | GTGGCACCCAAATGTTTACC | CAACATTGGCAGGAGACTCA |
| MeUBC41 | ACGAAGGGGGGATTCTTCAGT | TGCAAGCTCATAGCCATTTG |
| MeUBC43 | CTAAATACACCGCGGGAAAA | ACGCAAGGCTTTAAGCAAGA |
| MeUBC54 | GCCTGGACACTGGTCTGTTT | TTGCCACGGATTGATAACCT |
| MeUBC55 | ACCAGGTGGAGGAAACTGTG | CTTTTGCAGTCCTTGCCTTC |
| MeUBC56 | CTGCACCAAAGGTTCGATTT | ATTCGTTTTCCAATGCTTCG |
| MeUBC57 | GGCTTTCTGCTGTTTCCAAG | GTTGAGGAGCAGGCAAACTC |
| MeUBC59 | AACGATTATGGGTCCTGCTG | CTGGGCTCCATTGTTCCTTA |
| MeUBC60 | TTGGCAAGCTACCATCATTG | CCATTGCTGTTGATGTTTGG |
| MeUBC61 | TTTGAAAGCAAGGGAAAGGA | GCCCATACGGCTGTAGTGAT |
| β-ACTIN | CAAGGGCAACATATGCAAGC | CCTTCGTCTGGACCTTGCTG |

and Jia L.Q., 2016, The banana *E2* gene family: genomic identification, characterization, expression profiling analysis, Plant Sci., 245: 11-24.

- E Z.G., Zhang Y.P., Li T.T., Wang L., and Zhao H.M., 2015, Characterization of the ubiquitin-conjugating enzyme gene family in rice and evaluation of expression profiles underabiotic stresses and hormone treatments, PLoS ONE, 10(4): e0122621.
- Jeon E.H., Pak J.H., Kim M.J., Kim H.J., Shin S.H., Lee J.H., Kim D.H., Oh J.S., Oh B.J., Jung H.W., and Chung Y.S., 2012, Ectopic expression of ubiquitin conjugating enzyme gene from wild rice, *OgUBC1*, confers resistance against UV-B radiation and *Botrytis* infection in *Arabidopsis thaliana*, Biochem. Biophys. Res. Commun., 427(2): 309-314.
- Jones D., Crowe E., Stevens T.A., and Candido E.P.M., 2002, Functional and phylogenetic analysis of the ubiquitylation system in *Caenorhabditis elegans*: ubiquitin-conjugating enzymes, ubiquitin-activating enzymes, and ubiquitin-like proteins, Genome. Biol., 3(1): RESEARCH0002.
- Jue D.W., Sang X.L., Lu S.Q., Dong C., Zhao Q.F., Chen H.L, and Jia L.Q., 2015, Genome-wide identification, phylogenetic and expression analyses of the ubiquitin-conjugating enzyme gene family in maize, PLoS ONE, 10(11): e0143488.

Kraft E., Stone S.L., Ma L., Su N., Gao Y., Lau O.S., Deng X.W.

, and Callis J., 2005, Genome analysis and functional characterization of the E2 and RING-type E3 ligase ubiquitination enzymes of Arabidopsis, Plant Physiol., 139(4): 1597-1611.

- Li W., and Schmidt W., 2010, A lysine-63-linked ubiquitin chainforming conjugase, UBC13, promotes the developmental responses to iron deficiency in Arabidopsis roots, Plant J., 62(2): 330-343.
- Nandi D., Tahiliani P., Kumar A., and Chandu D., 2006, The ubiquitin-proteasome system, J. Biosci., 31(1): 137-155.
- Park B.S., Seo J.S., and Chua N.H., 2014, Nitrogen limitation adaptation recruits phosphate2 to target the phosphate transporter PT2 for degradation during the regulation of Arabidopsis phosphate homeostasis, Plant Cell, 26 (1): 454-464.
- Park C.H., Chen S., Shirsekar G., Zhou B., Khang C.H., Songkumarn P., Afzal A.J., Ning Y., Wang R., Bellizzi M., Valent B., and Wang G.L., 2012, The *Magnaporthe oryzae* effector AvrPiz-t targets the RING E3 ubiquitin ligase APIP6 to suppress pathogen-associated molecular pattern-triggered immunity in rice, Plant Cell, 24(11): 4748-4762.
- Sadanandom A., Bailey M., Ewan R., Lee J., and Nelis S., 2012, The ubiquitin-proteasome system: central modifier of plant signaling, New Phytol., 196(1): 13-28.
- Santner A., and Estelle M., 2010, The ubiquitin-proteasome system regulates plant hormone signaling, Plant J., 61(6): 1029-1040.
- Smalle J., and Vierstra R.D., 2004, The ubiquitin 26S proteasome proteolytic pathway, Ann. Rev. Plant Biol., 55: 555-590.
- Wang Y.Y., Wang W.H., Cai J.H., Zhang Y.R., Qin G.Z., and Tian S.P., 2014, Tomato nuclear proteome reveals the involvement of specific E2 ubiquitin-conjugating enzymes in

fruit ripening, Genome Biol., 15(12): 548.

- Welchman R.L., Gordon C., and Mayer R.J., 2005, Ubiquitin and ubiquitin like proteins as multifunctional signals, Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 6(8): 599-609.
- Xu L., Menard R., Berr A., Fuchs J., Cognat V., Meyer D., and Shen W.H., 2009, The E2 ubiquitin-conjugating enzymes, AtUBC1 and AtUBC2, play redundant roles and are involved in activation of *FLC* expression and repression of flowering in *Arabidopsis thaliana*, Plant J., 57(2): 279-288.
- Yanagawa Y., Sullivan J.A., Komatsu S., Gusmaroli G., Suzuki G., Yin J., Ishibashi T., Saijo Y., Rubio V., Kimura S., Wang J., and Deng X.W., 2004, Arabidopsis COP10 forms a complex with DDB1 and DET1 *in vivo* and enhances the activity of ubiquitin conjugating enzymes, Genes Dev., 18 (17): 2172-2181.

Yang S., Arguello J.R., Li X., Ding Y., Zhou Q., Chen Y., Zhang

Y., Zhao R.P., Brunet F., Peng L.X., Long M.Y., and Wang W., 2008, Repetitive element-mediated recombination as a mechanism for new gene origination in *Dorsophila*, PLoS Genet., 4(1): e3.

- Zhao Q.F., Dong C., Jue D.W., Chen H.L., and Jia L.Q., 2016, Bioinformatics preliminary analysis of ubiquitin conjugating enzyme gene family in cacao, Redai Zuowu Xuebao (Chinese Journal of Tropical Crops), 37(9): 1732-1740. (赵 秋芳, 董晨, 决登伟, 陈宏良, 贾利强, 2016, 可可泛素结 合酶基因家族的生物信息学初步分析, 热带作物学报, 37(9): 1732-1740.)
- Zhou G.A., Chang R.Z., and Qiu L.J., 2010, Overexpression of soybean ubiquitin-conjugating enzyme gene *GmUBC2* confers enhanced drought and salt tolerance through modulating abiotic stress-responsive gene expression in Arabidopsis, Plant Mol. Biol., 72(4-5): 357-367.

(责任编辑 庞晓鑫 甘凤琼)