



玉米泛素结合酶基因家族的生物信息学及表达分析

陈 曙, 赵秋芳, 陈宏良, 贾利强*

(中国热带农业科学院 南亚热带作物研究所/农业农村部热带果树生物学重点实验室, 广东 湛江 524091)

摘要:【目的】利用生物信息学分析玉米泛素结合酶(E2)基因家族的理化性质和功能,并研究低磷处理下泛素E2基因在玉米幼苗不同组织部位的表达情况,为深入研究泛素E2基因响应低磷胁迫的分子机制提供理论参考。【方法】以MEGA 6.0邻接法(NJ)构建拟南芥、水稻和玉米E2基因家族成员的系统发育进化树,利用生物信息学方法对75个玉米E2基因进行序列分析及理化性质预测。对玉米幼苗进行低磷处理,分别在0、1、6和24 h时采集其根部和叶片样品,并分别通过实时荧光定量PCR(qRT-PCR)检测其E2亚家族XVIII成员基因即*ZmUBC17*、*ZmUBC18*、*ZmUBC48*、*ZmUBC57*和*ZmUBC58*在玉米幼苗不同组织中的表达情况。【结果】拟南芥、水稻和玉米的E2基因可划分为18个亚家族,各亚家族间基因功能和进化关系较相近,但含有的E2基因数量差异明显,以亚家族VI的成员最多,亚家族X、XII和XV的成员数最少,均为3个,各亚家族中均分别含拟南芥、水稻和玉米E2基因各1个。玉米E2基因的编码区序列(CDS)长度为402~2616 bp,编码133~871个氨基酸,外显子数目数量存在明显差异,以4~6个居多,最少为1个,最多为12个。86.8%的玉米E2蛋白为不稳定蛋白。玉米E2亚家族XVIII成员中,*ZmUBC18*、*ZmUBC48*、*ZmUBC57*和*ZmUBC58*蛋白UBC结构域序列具有高度相似性,但与*ZmUBC17*存在明显差异,且这4个基因在玉米根和叶中均有表达,基因表达模式相似,整体上在低磷处理6 h时的表达量最高;低磷处理下*ZmUBC17*基因在根中不同时间点的表达量变幅较小,但在叶0~24 h时的表达量呈逐渐升高的变化趋势,尤其是24 h时表达量达最高,表明*ZmUBC17*基因的响应部位是叶片。【结论】玉米泛素E2蛋白可能参与调控对磷元素的吸收,尤其是*ZmUBC17*基因具有组织表达特异性,在叶片中大量表达,推测*ZmUBC17*基因通过调控玉米对磷元素吸收和转运间接影响光合作用效率。

关键词: 玉米; 泛素结合酶(E2); 生物信息学; 系统发育进化树; 基因表达

中图分类号: S513.035.3

文献标志码: A

文章编号: 2095-1191(2018)08-1476-08

Bioinformatics and expression analysis of ubiquitin conjugating enzyme gene family in maize

CHEN Shu, ZHAO Qiu-fang, CHEN Hong-liang, JIA Li-qiang*

(Institute of South Subtropical Crop Research, Chinese Academy of Tropical Agricultural Science/Key Laboratory of Tropic Fruit Biology, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Zhanjiang, Guangdong 524091, China)

Abstract:【Objective】The ubiquitin conjugating enzyme(E2) gene family members were searched by using bioinformatics tools to analyze the physicochemical property, for studying how E2 genes expressed in maize seedlings when dealing with low phosphorous. This would lay a foundation for further study on the molecular mechanism of ubiquitin E2 genes responding to low phosphorus stress. 【Method】A phylogenetic tree was constructed using MEGA 6.0 neighbor-joining(NJ) method based on arabidopsis, rice and maize E2 gene family members. The prediction of physiological and chemical properties and sequencing analysis of 75 maize E2 genes were performed using bioinformatics method. Maize seedlings were treated with low phosphorus, and root samples and leaf samples were collected at 0, 1, 6 and 24 h. The real-time fluorescent quantitative PCR(qRT-PCR) was performed to test the expression of E2 subfamily XVIII members (*ZmUBC17*, *ZmUBC18*, *ZmUBC48*, *ZmUBC57*, *ZmUBC58*) in different parts responding to low phosphorus at 0, 1, 6 and 24 h in maize. 【Result】The arabidopsis, rice and maize E2 gene family members were divided into 18 subfamilies. A similar function and the close evolutionary relationship were found in different subfamilies. The E2 genes number con-

收稿日期: 2018-05-03

基金项目: 中央级非盈利性科研院所基本科研业务费项目(1630062017015); 农业部国际交流与合作项目(13232697606221573)

作者简介: *为通讯作者, 贾利强(1976-), 副研究员, 主要从事热带玉米种质资源收集与创新利用研究工作, E-mail: 1600200061@qq.com. 陈曙(1988-), 主要从事重要农艺性状基因挖掘与功能鉴定研究工作, E-mail: 709778271@qq.com

tained varied largely. Subfamily VI had the largest members, while X, XII and XV had the least(three members), X, XII and XV contained one maize gene, one arabidopsis gene and one rice gene. The results showed that the coding region sequence(CDS) length ranged from 402 to 2616 bp, encoded amino acids were between 133 to 871. The numbers of E2 exon varied from 1 to 12, while the most number existed between 4 to 6. The difference was large. 86.8% maize E2 proteins were authenticated unsteadily. *ZmUBC17*, *ZmUBC18*, *ZmUBC48*, *ZmUBC57* and *ZmUBC58* belonged to E2 subfamily XVIII of maize, and they all had UBC domain whose sequences had high similarity except gene *ZmUBC17*. Genes *ZmUBC18*, *ZmUBC48*, *ZmUBC57*, *ZmUBC58* expressed in root and leaf, and almost had the same expression patterns. The expression reached the peak at 6 h when dealing with low phosphorus. The expression level of *ZmUBC17* in root changed slightly after treated with low phosphorus at different time points, but the expression in leaf increased during 0-24 h, and reach the peak at 24 h, which indicated that the response part of gene *ZmUBC17* was in leaf. 【Conclusion】Ubiquitin E2 gene family of maize play an important role in maize phosphorus absorption. Gene *ZmUBC17* has tissue specificity, expresses abundantly only in leaf. It is speculated that it may be related to photosynthesis and affect the photosynthesis efficiency by regulating phosphorus absorption.

Key words: maize; ubiquitin conjugating enzyme(E2); bioinformatics; phylogenetic tree; gene expression

0 引言

【研究意义】泛素化修饰作为蛋白质翻译后的重要调控方式之一,广泛存在于真核细胞中。泛素结合酶(E2)是泛素化过程的重要组成部分,参与蛋白质的泛素化修饰过程,通过调节蛋白活性而影响其功能的表达,从而保证生物体生命活动有序进行(Pickart and Eddins, 2004),所有E2蛋白均含有一个保守催化结构域,大约由150个氨基酸组成,被称为UBC结构域,是蛋白质进行选择降解的重要途径(Adam et al., 2011)。玉米是我国重要的粮食作物,其产量影响我国人民生活和社会经济发展。玉米产量受诸多因素的影响,如低温、干旱、病虫害和土壤肥力等生物胁迫或非生物胁迫,而E2在作物的逆境胁迫中发挥重要作用。磷作为植物体内ATP、核酸和磷脂等物质的重要组成部分,对调节植物体内代谢过程及促进植物生长发育等方面均发挥重要作用(田跃辉等, 2014)。因此,研究在低磷条件下E2基因在玉米不同组织中的表达特异性,对探究E2蛋白对玉米吸收磷元素的作用机制具有重要意义。【前人研究进展】近年来,E2基因家族功能已逐渐成为研究热点,在拟南芥(Lau and Deng, 2009)、酵母(王金利等, 2010)、水稻(Bae and Kim, 2014)、玉米(Jue et al., 2015)和香蕉(Dong et al., 2016)等真核生物中均有发现,研究方向集中在植物生长发育、DNA损伤修复及逆境胁迫等方面。Broomfield等(2001)研究发现,拟南芥*AtUBC1*参与蛋白质N末端序列剪切及DNA复制后的损伤修复,从而减少错配率,保证细胞生命活动有序进行。Xu等(2009)对拟南芥进行缺铁处理,结果显示*AtUBC13*基因过表达可提高根部对铁元素的吸收率,增强植株对缺铁症状的耐受性,将*AtUBC13*基因沉默后,植株则表现出明显的缺

铁症状。王安邦等(2013)研究发现,香蕉*MaUCE2*基因在干旱、低温条件诱导下,其基因表达量明显升高,表明*MaUCE2*基因可能参与香蕉的耐冷调控过程。Mario等(2013)将大豆*GmUBC2*基因转入拟南芥中进行过量表达,结果发现,转基因植株的抗干旱和抗盐胁迫能力明显增强。Gu等(2009)研究表明,拟南芥*AtUBC1*和*AtUBC2*基因参与调控花发育,通过上调抑制开花基因*FLC*表达,从而抑制植株开花,双突变体*Atubc1Atubc2*单株表现出明显的早开花和莲座叶减少现象,而单个基因突变体*Atubc1*和*Atubc2*表型与野生型并无明显差异,说明*AtUBC1*和*AtUBC2*基因在功能上存在互补性。Lau和Deng(2009)研究发现,COP10作为E2-like蛋白,通过与DNA损伤结合蛋白DET1和DDB1相互结合形成复合物COP10-DET1-DDB1,参与调控拟南芥叶片的感光性及光周期过程。蔡佳文等(2016)研究发现,在干旱、盐 and 高温胁迫下龙葵*SorUBC3*基因表达具有组织特异性,在叶中其表达量显著高于其他组织,但叶片中MDA、POD和SOD含量无显著差异,表明逆境胁迫下*SorUBC3*基因过表达可抑制植株活性氧的产生,并对其进行清除。此外,Asuka等(2015)研究发现,人体*UBE2T*突变后会引发范可尼贫血症,并导致基因组的不稳定,患癌症概率增加。【本研究切入点】目前,对E2基因功能的研究主要集中在植物抗逆性等方面,而对E2基因在植物吸收大量元素途径中的作用及组织表达特异性和应答模式尚未见研究报道。【拟解决的关键问题】利用生物信息学初步分析玉米E2基因家族的理化性质和生物学功能,同时通过对玉米幼苗进行低磷处理,利用实时荧光定量PCR(qRT-PCR)检测泛素E2基因在不同时间点及不同组织中的表达特性,为后续深入研究E2蛋白生物学功能提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为玉米自交系B73,由中国热带农业科学院南亚热带作物研究所玉米育种中心提供。RNA提取试剂盒(Quick RNA Isolation Kit)购自北京华越洋生物有限公司;逆转录试剂和SYBR Premix Ex Taq II™试剂盒购自TaKaRa公司。主要仪器设备:LightCycler®96实时荧光定量PCR仪[罗氏诊断产品(上海)有限公司]和PRX-250A智能型人工气候箱(上海争巧科学仪器有限公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 样品处理及采集 玉米自交系B73种子萌发后,将其置于光照培养箱中,利用1×Hoagland培养液继续培养,培养条件为(26±1)℃,12 h光照/12 h黑暗。幼苗长至4叶期时,剔除弱苗和死苗,选择健壮、长势一致的幼苗,将其分为处理组和对照组。处理组:将幼苗置于1/20低磷培养液(磷浓度为标准培养液的1/20,其他营养元素成分及含量均不变)中进行培养,分别在培养0(对照)、1、6和24 h时采集幼苗根和叶,每个时间点随机选取5株,立即放入液氮中速冻,-80℃保存备用。对照组:将幼苗置于标准培养液中,取样时间和部位与处理组一致。所有试验均设3个重复。

1.2.2 总RNA提取及cDNA合成 参照RNA提取试剂盒说明分别提取处理组和对照组不同部位和不同采样时间点的样品总RNA,并采用逆转录试剂盒合成cDNA。

1.2.3 系统发育进化树构建及亚家族分类 根据已发表的玉米、水稻和拟南芥E2基因家族相关信息,分别在Maize Genetics and Genomics Database数据库(<https://www.maizegdb.org/>)、The Arabidopsis Information Resource资源信息网(<https://www.arabidopsis.org/>)和 rice 全基因组数据库(<http://rice.plantbiology.msu.edu/>)中搜索下载37个拟南芥E2蛋白(Kraft et al., 2005)、48个水稻E2蛋白(Bae and Kim, 2014)和75个玉米E2蛋白序列(Jue et al., 2015)。为了分析不同作物E2蛋白序列间的同源性,利用Clus-

talW对玉米、拟南芥和水稻中所有含有UBC结构域的E2蛋白序列进行比对,并基于比对结果,利用MEGA 6.0邻接法(Neighbor joining, NJ)构建水稻、玉米和拟南芥E2蛋白的系统发育进化树,使用P-距离模型,重复次数为1000,其他选项均为默认设置。参照Kraft等(2005)的分类方法对水稻、玉米和拟南芥E2蛋白进行亚家族分类。

1.2.4 玉米E2基因的序列分析 从Maize Genetics And Genomics Database数据库(<https://www.maizegdb.org/>)中搜索玉米E2基因,获得其氨基酸数目、编码区序列(CDS)长度和外显子数量等信息。利用SMART(<http://smart.emblheidelberg.de/>)进行蛋白质结构预测,利用ExPASy Proteomics Server(<http://www.expasy.org/proteomics>)进行蛋白质理化性质预测,利用Plant-mPLocServer(<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/plant-multi/#>)进行蛋白质亚细胞定位。

1.2.5 qRT-PCR检测 为了解玉米E2基因在植物组织中的表达模式,以系统发育进化树中的XVIII亚家族玉米E2基因为对象,根据其基因序列,利用Primer Premier 5.0设计qRT-PCR引物(表1),分别以对照组和处理组不同时间点的玉米根和叶的cDNA为模板进行qRT-PCR检测,以β-Actin基因为内参,其引物见表1。反应体系10.0 μL: SYBR Premix Ex Taq II™混合液5.0 μL, 10 μmol/L上、下游引物各1.0 μL, cDNA模板1.0 μL, ddH₂O补足至10.0 μL。扩增程序:94℃预变性30 s;94℃ 30 s, 58℃ 20 s, 72℃ 40 s,进行40个循环,每份待测样品设3个重复,利用2^{-ΔΔCt}计算相对表达量。

1.2.6 数据分析 采用SPSS 19.0进行差异显著性分析,并利用Excel 2016进行数据处理及作图。

2 结果与分析

2.1 玉米E2蛋白系统发育进化树分析结果

系统发育进化树如图1所示,拟南芥、水稻和玉米的E2基因可划分为18个亚家族,各亚家族间基因功能和进化关系较相近,但E2基因数量差异明显,以亚家族VI的成员最多,为25个,其中玉米E2基因数量为9个,分别为ZmUBC10、ZmUBC14、ZmUBC23、

表 1 qRT-PCR引物序列

Table 1 Sequence of qRT-PCR primers

基因 Gene	上游序列 Upstream sequence	下游序列 Downstream sequence
ZmUBC17	5'-CCTGCTTCCACCCCAACGTCGA-3'	5'-CGCGGGCGGCTTGATAGATTTCT-3'
ZmUBC18	5'-CCTACCAGTTGACAGTTGACTT-3'	5'-GCTTTGCTGGCGAACTAGACAACA-3'
ZmUBC48	5'-CCACCGGACTACCCATTCAAACCA-3'	5'-GGACCAACGGATCGTCAGGGTT-3'
ZmUBC57	5'-CCCAACAGCCCGCCATCAGTAA-3'	5'-TGCTGGAGACTCGTCATTCGGACT-3'
ZmUBC58	5'-CAAACAGCCCGCCATCAGTCAGA-3'	5'-TGCCTCAATGTTTGCTGGAGACTCA-3'
β-Actin	5'-CTCCGTGTTTCGCCTGAAGATCAC-3'	5'-AACGAAAGAACAGCCTGGATAGCAAC-3'

ZmUBC26、*ZmUBC32*、*ZmUBC46*、*ZmUBC52*、*ZmUBC61*和*ZmUBC62*，占玉米E2基因总数的12%，拟南芥和水稻E2基因数量分别为8个，分别占各自E2基因总数的21.6%和16.7%；以亚家族X、XII和XV的成员数最少，均为3个，且各亚家族中均分别含拟南芥、水稻和玉米E2基因各1个(亚家族X：*AtUBC22*、*OsUBC33*和*ZmUBC68*；亚家族XII：*AtUBC37*、*OsUBC48*和*ZmUBC27*；亚家族XV：*AtUBC27*、*OsUBC44*和*ZmUBC64*)，表明这3个亚家族E2基因在进化过程中相对保守，在拟南芥、水稻和玉米中功能高度相似，属于直系同源基因。

2.2 玉米E2基因家族成员理化性质预测结果

玉米E2基因家族成员的序列分析结果如表2所示。玉米E2基因的编码区序列(CDS)长度为402~

2616 bp，编码133~871个氨基酸。玉米E2基因外显子数目数量存在明显差异，以4~6个居多，最少为1个(*ZmUBC41*、*ZmUBC59*、*ZmUBC60*、*ZmUBC61*和*ZmUBC74*)，最多为12个。不稳定指数大小表示蛋白稳定性的强弱，不稳定指数>40时被认定为不稳定蛋白，不稳定指数≤40时被认定为稳定蛋白。玉米E2蛋白的不稳定指数≤40的蛋白数目仅为10个，占蛋白家族数目的13.2%，故86.8%的玉米E2蛋白为不稳定蛋白。经亚细胞定位预测发现，大部分玉米E2蛋白定位于细胞核，只有*ZmUBC28*、*ZmUBC34*和*ZmUBC40*定位于细胞质。

选取系统发育进化树(图1)中亚家族XVIII的玉米E2蛋白为研究对象，对其氨基酸序列进行比对，结果如图2所示，并预测分析其表达模式和生物学功

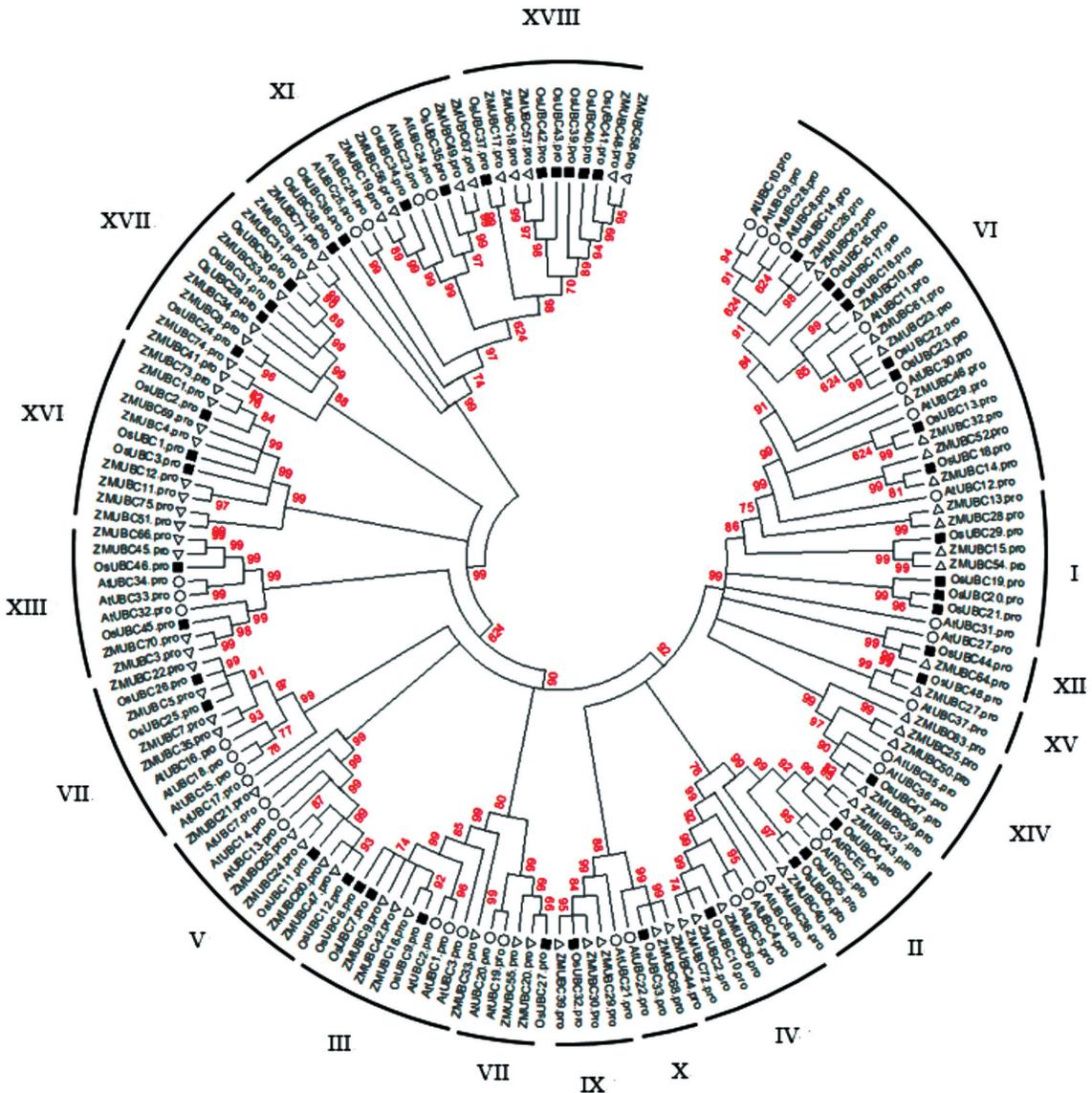


图 1 基于拟南芥、水稻和玉米E2蛋白氨基酸序列构建的系统发育进化树
 Fig.1 Phylogenetic tree based on amino acid sequence of E2 protein in arabidopsis, rice and maize
 ○: 拟南芥E2蛋白; ■: 水稻E2蛋白; △: 玉米E2蛋白
 ○: Arabidopsis E2 protein; ■: Rice E2 protein; △: Maize E2 protein

能。ZmUBC18、ZmUBC48、ZmUBC57和ZmUBC58在蛋白UBC结构域序列上高度重复,但与ZmUBC17存在明显差异,表明ZmUBC18、ZmUBC48、ZmUBC57和ZmUBC58基因的表达模式和生物学功能上可能存在高度相似性,但与ZmUBC17基因存在明显差异。

2.3 E2基因在玉米不同组织中的表达分析

玉米含75个E2蛋白,且均具有E2活性,可对生物体生命活动进行调控(Jue et al., 2015)。本研究选取亚家族XVIII的5个E2基因,分别是ZmUBC17、ZmUBC18、ZmUBC48、ZmUBC57和ZmUBC58。玉米幼苗经低磷处理后,不同时间点这5个基因在

根和叶中的表达情况如图3所示。在玉米叶和根中,ZmUBC17、ZmUBC18、ZmUBC48、ZmUBC57和ZmUBC58基因在处理6和24 h时的表达量均较处理前(0 h)显著升高($P<0.05$,下同)。低磷处理下,ZmUBC17基因在根中不同时间点的表达量变幅较小,但在叶中0~24 h时的表达量呈逐渐升高的变化趋势,且在24 h时的表达量达最高。综上所述,玉米E2基因ZmUBC18、ZmUBC48、ZmUBC57和ZmUBC58在低磷胁迫下,其基因相对表达量在玉米根和叶中均发生明显变化,表明这些基因可能参与植物根和叶对磷素的吸收和运输,而ZmUBC17基因

表 2 玉米E2基因家族相关信息

Table 2 The related information of maize E2 gene family

基因 Gene	序列号 Serial No.	CDS长度(bp) CDS length	外显子数目 Exon number	氨基酸数目 Number of amino acids	不稳定指数 Instability index	亚细胞定位 Subcellular localization
ZmUBC1	GRMZM2G070047	483	5	160	53.37	细胞核
ZmUBC2	GRMZM2G150867	552	6	183	55.44	细胞核
ZmUBC3	GRMZM5G824629	945	5	313	51.79	细胞核
ZmUBC4	GRMZM2G312693	483	5	160	56.39	细胞核
ZmUBC5	GRMZM2G007381	486	6	163	76.31	细胞核
ZmUBC6	GRMZM2G053764	1113	11	370	54.83	细胞核
ZmUBC7	GRMZM2G116840	417	6	138	72.40	细胞核
ZmUBC8	GRMZM2G022859	486	5	161	28.97	细胞核
ZmUBC9	GRMZM2G120674	459	5	152	69.18	细胞核
ZmUBC10	GRMZM2G102471	447	4	148	50.03	细胞核
ZmUBC11	GRMZM2G038851	480	5	159	55.68	细胞核
ZmUBC12	GRMZM2G341089	762	5	253	56.13	细胞核
ZmUBC13	GRMZM2G016176	447	11	148	48.44	细胞核
ZmUBC14	GRMZM2G000601	480	2	159	51.18	细胞核
ZmUBC15	GRMZM2G113396	573	4	190	40.67	细胞核
ZmUBC16	GRMZM2G022206	459	5	152	68.79	细胞核
ZmUBC17	GRMZM2G010460	1122	7	373	42.14	细胞核
ZmUBC18	GRMZM2G123519	1155	5	384	47.90	细胞核
ZmUBC19	GRMZM2G086583	804	4	267	34.48	细胞核
ZmUBC20	GRMZM2G002830	552	3	183	43.66	细胞核
ZmUBC21	GRMZM2G434519	525	4	174	48.20	细胞核
ZmUBC22	GRMZM2G018447	486	7	161	78.15	细胞核
ZmUBC23	GRMZM5G866947	447	4	148	49.38	细胞核
ZmUBC24	GRMZM2G007300	510	6	169	53.99	细胞核
ZmUBC25	GRMZM5G862131	462	8	153	50.39	细胞核
ZmUBC26	GRMZM5G814314	444	4	147	39.89	细胞核
ZmUBC27	GRMZM2G157605	1734	7	577	57.02	细胞核
ZmUBC28	GRMZM2G106143	954	12	317	41.77	细胞质
ZmUBC29	GRMZM2G461533	402	4	133	48.80	细胞核
ZmUBC30	GRMZM2G161545	474	5	157	44.62	细胞核
ZmUBC31	GRMZM2G027378	447	4	148	24.61	细胞核
ZmUBC32	AC233922.1_FGT008	447	3	147	44.79	细胞核
ZmUBC33	GRMZM2G007260	618	6	205	55.59	细胞核
ZmUBC34	GRMZM2G090172	501	5	166	37.43	细胞质
ZmUBC35	GRMZM2G148130	495	6	164	71.09	细胞核
ZmUBC36	GRMZM2G146374	624	4	207	40.34	细胞核
ZmUBC37	GRMZM2G115939	555	5	184	42.54	细胞核
ZmUBC38	GRMZM2G466265	1149	7	382	52.69	细胞核
ZmUBC39	GRMZM5G828302	474	5	157	43.23	细胞核
ZmUBC40	GRMZM2G411771	984	6	327	33.55	细胞质
ZmUBC41	GRMZM2G147579	1437	1	478	58.96	细胞核
ZmUBC42	GRMZM2G110983	537	6	178	60.79	细胞核
ZmUBC43	GRMZM2G102421	552	5	183	47.26	细胞核
ZmUBC44	GRMZM5G895435	762	6	253	50.03	细胞核
ZmUBC45	GRMZM2G116919	720	9	239	56.82	细胞核
ZmUBC46	GRMZM2G156517	447	4	148	47.08	细胞核
ZmUBC47	GRMZM2G012052	510	6	169	51.78	细胞核
ZmUBC48	GRMZM2G085849	1524	8	507	43.73	细胞核
ZmUBC49	GRMZM2G381709	2616	8	871	35.21	细胞核
ZmUBC50	GRMZM2G007122	465	8	154	50.13	细胞核
ZmUBC51	GRMZM2G433968	534	3	177	51.79	细胞核
ZmUBC52	GRMZM2G173756	447	2	148	50.09	细胞核

续表 2 Table 2(continued)

基因 Gene	序列号 Serial No.	CDS长度(bp) CDS length	外显子数目 Exon number	氨基酸数目 Number of amino acids	不稳定指数 Instability index	亚细胞定位 Subcellular localization
ZmUBC53	GRMZM2G056501	486	4	161	27.95	细胞核
ZmUBC54	GRMZM2G072506	555	4	184	43.01	细胞核
ZmUBC55	GRMZM2G007057	765	2	254	50.07	细胞核
ZmUBC56	GRMZM2G078360	3309	7	1102	42.92	细胞核
ZmUBC57	GRMZM2G122003	1317	7	438	54.30	细胞核
ZmUBC58	GRMZM2G027546	1563	8	520	40.67	细胞核
ZmUBC59	GRMZM2G015287	462	1	153	48.29	细胞核
ZmUBC60	GRMZM2G007276	510	1	169	55.55	细胞核
ZmUBC61	GRMZM2G132759	520	1	169	50.68	细胞核
ZmUBC62	GRMZM2G086088	444	4	147	39.42	细胞核
ZmUBC63	GRMZM2G115828	468	8	155	55.76	细胞核
ZmUBC64	GRMZM2G134176	594	5	197	46.23	细胞核
ZmUBC65	GRMZM2G085600	510	6	169	51.79	细胞核
ZmUBC66	GRMZM2G177276	720	9	239	55.51	细胞核
ZmUBC67	GRMZM2G464572	2616	11	871	35.79	细胞核
ZmUBC68	GRMZM2G153924	759	6	252	44.09	细胞核
ZmUBC69	GRMZM2G163398	483	5	160	53.34	细胞核
ZmUBC70	GRMZM2G121303	552	5	173	53.81	细胞核
ZmUBC71	GRMZM2G440918	957	4	318	48.78	细胞核
ZmUBC72	AC149818.2_FGT006	552	6	183	53.88	细胞核
ZmUBC73	GRMZM2G063931	483	5	160	54.61	细胞核
ZmUBC74	GRMZM2G109582	1053	1	350	44.25	细胞核
ZmUBC75	GRMZM2G146142	1146	9	381	45.51	细胞核

只在叶片中大量表达,推测ZmUBC17作为调控因子参与植物光合作用中磷素转运过程,调控作物对磷元素的吸收从而间接影响植物光合作用效率。

3 讨论

目前,越来越多物种全基因组序列已测序成功,进而实现了在全基因组水平上构建系统发育进化树,以此准确分析各物种间的发育和进化关系。在基因组中具有高保守性的基因或家族常被作为分子标准用于构建系统发育进化树,且使用的基因越多,发育和进化关系分析结果也越准确(Heymans and Singh, 2003; Woodhams and Hendy, 2004)。本研究采用邻接法(NJ)构建水稻、玉米和拟南芥E2蛋白的系统发育进化树,并对其进行亚家族分类,结果显示玉米E2基因家族可分为18个亚家族,各亚家族间E2基因数量差异明显,以亚家族VI的成员最多,以亚家族X、XII和XV的成员数最少,各亚家族内部成员间的基因功能和进化关系较相近。本研究还对玉米75个E2蛋白进行理化性质预测,结果显示,同一个亚家族中,聚合在同一分支的成员理化性质较相似,表明E2基因家族功能相对保守,在进化过程中其功能并未发生改变,被称为直系同源基因;但不同亚家族的成员间理化性质差异明显,其原因是该家族基因在进化过程中形成新生物学功能,进而产生旁系同源基因,以保证生物体更好地适应环境(Thornton and De, 2000)。这与陈学昭等(2015)、赵秋芳等(2016)的研究结论一致。

磷元素作为植物生长发育过程中必需的大量元素之一,可维持生物体正常的光合作用、蛋白质合

ZmUBC17	MPAPVSSTA YNRLRNPRPRAPRVGADLSKHPVDGFSGLVDDSNV	45
ZmUBC18	MAATTSQAS <u>LI LQKQL R</u> L LAKHPVDGFSAGL VDDSNV FEWQYTH	45
ZmUBC48	MASSASQAS <u>LI LQKQL KDL</u> AKNPVDGFSAGL VDDSNV FEWQYTH	45
ZmUBC57	MAGTPSQAS <u>LI LQKQL KDL</u> AKNPVDGFSAGL VDDSNV FEWQYTH	45
ZmUBC58	MATTTTQAS <u>LI LQKQL R</u> L LAKHPVDGFSAGL VDDSNV FEWQYTH	45
ZmUBC17	FEWQYTHIGPPDITLYDGGYFNAIMSFPQNYPNPPSVRFTSEMWH	90
ZmUBC18	<u>G</u> PPDITLYDGGYFNAIMSFPQNYPNPPSVRFTSEMWHPNVYS <u>DCL</u>	90
ZmUBC48	<u>G</u> PPDITLYDGGYFNAIMTFPQNYPNPPSVRFTSEMWHPNVYPDGR	90
ZmUBC57	<u>G</u> PPDITLYDGGYFNAIMTFPQNYPNPPSVRFTSGMWHPNVYPDGR	90
ZmUBC58	<u>G</u> PPDITLYDGGYFNAIMSFPQNYPNPPSVRFTSEMWHPNVYPDGR	90
ZmUBC17	PNGYFHHFWYGSVFNVPQIII LFLVWIWNLGLSTTMMRQS <u>CSKDW</u>	135
ZmUBC18	<u>C</u> ISILHPPGEDIS <u>GYELASERWTPVHTVESIVLSIISMLSSPNDESAA</u>	139
ZmUBC48	<u>C</u> ISILHPPGEDIS <u>NGYELASERWTPVHTVESIVLSIISMLSSPNDESPA</u>	139
ZmUBC57	<u>C</u> ISILHPPGEDIS <u>GYELASERWTPVHTVESIVLSIISMLSSPNDESPA</u>	139
ZmUBC58	<u>C</u> ISILHPPGEDIS <u>NGYELASERWTPVHTVESIVLSIISMLSSPNDESPA</u>	139
ZmUBC17	MISIPPLPRLGSPSPLCPTGTGKQPMELEEVHRPSRLDA	174
ZmUBC18	<u>N</u> EAAK <u>EWRD</u> <u>EREDFKKRV</u> <u>RI</u> TRKSOEML	169
ZmUBC48	<u>N</u> EAAKDWREKRDFFKRV <u>RQCV</u> TRKSOEML	169
ZmUBC57	<u>N</u> EAAKDWREKRDFFKRV <u>RQCV</u> TRKSOEML	169
ZmUBC58	<u>N</u> EAAK <u>EWRD</u> <u>EREDFKKRV</u> <u>RI</u> TRKSOEML	169

图 2 玉米E2亚家族XVIII成员蛋白氨基酸序列比对结果
Fig. 2 The protein amino acid sequence of maize E2 subfamily XVIII member

红色为UBC结构域,绿色为相同序列,下划线为半胱氨酸残基
The UBC domains were marked with red, the same sequence were marked with green, the cysteine residues were underlined

成及细胞分裂、分化等生命活动,也可作为信号分子调控磷酸盐相关基因的表达(Vance et al., 2003)。E2作为泛素一蛋白酶体中重要的组成部分,在细胞周期、信号传递和环境胁迫中发挥重要作用(许传俊和李玲, 2007)。本研究通过对亚家族XVIII的ZmUBC17、ZmUBC18、ZmUBC48、ZmUBC57和ZmUBC58基因进行qRT-PCR检测,结果发现这5个基因在玉米幼苗期根和叶中均有表达,但在不同处理时

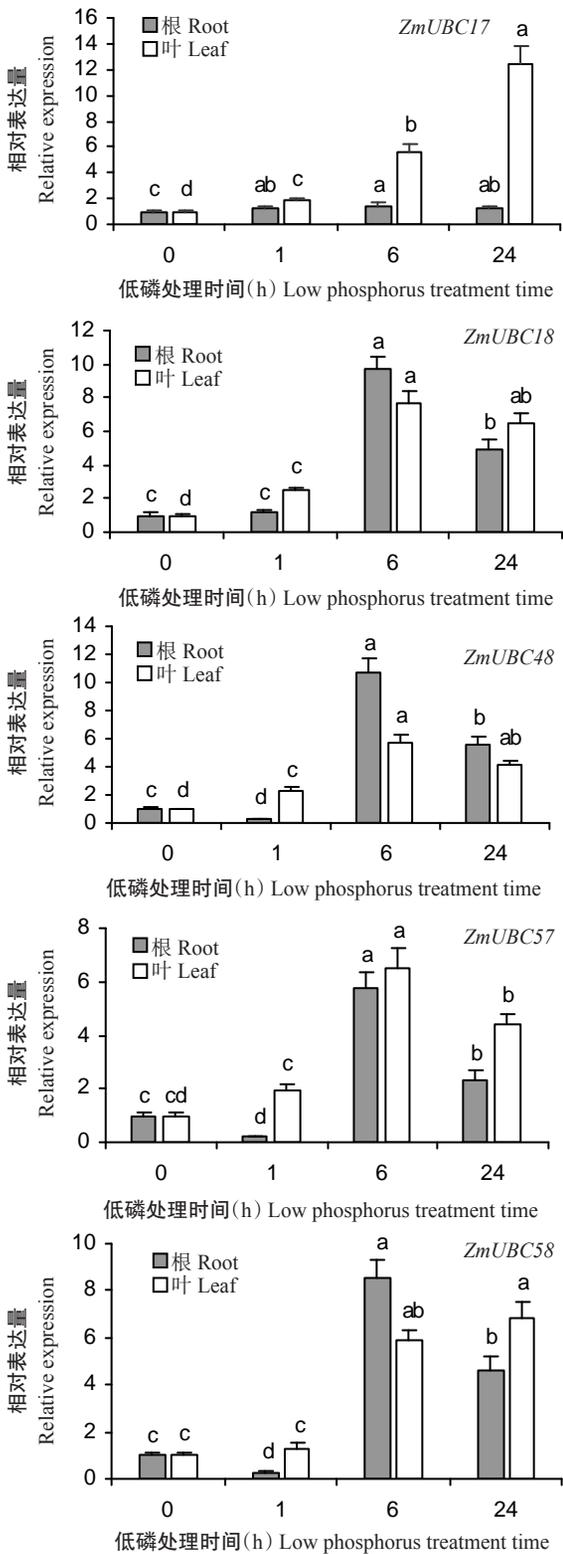


图 3 不同低磷处理时间对玉米E2亚家族XVIII成员在根和叶中表达情况的影响

Fig.3 Effects of low phosphorus treatment time on expressions of maize E2 subfamily XVIII member in root and leaf
不同小写字母表示同一组织不同时间点间存在显著差异($P < 0.05$)
Different lowercase letters represented significant difference in the same tissue at different time points($P < 0.05$)

间点及组织的表达量存在明显差异,推测E2基因在不同植物组织中的表达均具有特异性,与前人研究

结果(覃碧等,2013;张莉等,2018)一致。此外,本研究还发现,*ZmUBC17*基因的表达模式与*ZmUBC18*、*ZmUBC48*、*ZmUBC57*和*ZmUBC58*基因有所不同;低磷处理下,*ZmUBC17*基因在根中不同时间点的表达量变幅较小,但在叶片中0~24 h时的表达量呈逐渐升高的变化趋势,尤其是24 h时的表达量达最高,表明*ZmUBC17*基因响应部位是叶片,推测*ZmUBC17*参与玉米对磷元素的吸收和转运过程,也有可能参与植物的光合作用过程。作物在缺磷条件下其光合作用效率会明显下降。郭延平等(2003)研究发现,低磷处理下柑橘叶片的光合作用参数 F_v/F_m 和电子传递效率大幅降低。李绍长(2003)研究发现,在低磷处理下,玉米叶片PSII关闭程度增大,电子传递和光能转化效率降低。由此推测,*ZmUBC17*基因是植物光合作用中磷素转运过程的调控因子,调控作物对磷元素的吸收从而间接影响植物光合作用效率,但具体调控过程和机理仍有待进一步验证。

4 结论

玉米泛素E2蛋白可能参与调控对磷元素的吸收,尤其是*ZmUBC17*基因具有组织表达特异性,在叶片中大量表达,推测*ZmUBC17*基因是通过调控玉米对磷元素吸收和转运间接影响光合作用效率。

参考文献:

蔡佳文,金晓霞,于丽杰,崔柏杨,魏迅,董延龙. 2016. 龙葵E2泛素结合酶基因*SorUBC*克隆及表达特性分析[J]. 东北农业大学学报,47(11):26-36. [Cai J W, Jin X X, Yu L J, Cui B Y, Wei X, Dong Y L. 2016. Clone and expression pattern analysis of E2 ubiquitin-binding enzyme gene *SorUBC* in *Solanum nigrum* L. [J]. Journal of Northeast Agricultural University, 47(11):26-36.]

陈学昭,张雷,于珊珊,毕彩红,刘春影,祝茜. 2015. 松江鲈(*Trachidermus fasciatus*)泛素结合酶E2-D2基因的分子克隆及组织表达分析[J]. 海洋学报(中文版),37(10):133-140. [Chen X Z, Zhang L, Yu S S, Bi C H, Liu C Y, Zhu Q. 2015. Molecular cloning and expression analysis of ubiquitin-conjugating enzyme E2-D2 in roughskin sculpin, *Trachidermus fasciatus* [J]. Acta Oceanologica Sinica, 37(10):133-140.]

郭延平,周慧芬,曾光辉,张良诚. 2003. 高温胁迫对柑橘光合速率和光系统II活性的影响[J]. 应用生态学报,14(6):867-870. [Guo Y P, Zhou H F, Zeng G H, Zhang L C. 2003. Effects of high temperature sires on net photosynthetic rate and photosystem II activity in citrus [J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 14(6):867-870.]

李绍长. 2003. 低磷胁迫对植物光合和呼吸作用的影响[J]. 石河子大学学报,7(2):157-160. [Li S C. 2003. Effects of low phosphorus on photosynthesis and respiratory action

- in plants[J]. Journal of Shihezi University, 7(2):157-160.]
- 覃碧, 邓治, 刘长仁, 李德军. 2013. 泛素结合酶RAD6的结构与功能研究进展[J]. 热带农业科学, 33(2):36-41. [Qin B, Deng Z, Liu C R, Li D J. 2013. Research advances on the structures and functions of ubiquitin-conjugating enzyme RAD6[J]. Chinese Journal of Tropical Agriculture, 33(2):36-41.]
- 田跃辉, 吴玲, 刘丹, 张素芝, 聂治, 张啸, 苏顺宗, 罗博文, 高世斌. 2014. 玉米*ZmPHO2*基因家族克隆及其低磷胁迫下的表达[J]. 西北植物学报, 34(8):1514-1521. [Tian Y H, Wu L, Liu D, Zhang S Z, Nie Z, Zhang X, Su S Z, Luo B W, Gao S B. 2014. Cloning and expression of *ZmPHO2* gene family members under low phosphate stress in maize[J]. Acta Botanica Boreali-occidentalia Sinica, 34(8):1514-1521.]
- 王安邦, 金志强, 刘菊华, 贾彩红, 张建斌, 苗红霞, 徐碧玉. 2013. 香蕉泛素结合酶基因*MaUCE2*在非生物胁迫下的表达分析[J]. 生物技术通报, (5):77-80. [Wang A B, Jin Z Q, Liu J H, Jia C H, Zhang J B, Miao H X, Xu B Y. 2013. Expression analysis of a banana ubiquitin-conjugating enzyme gene *MaUCE2* under abiotic stress[J]. Biotechnology Bulletin, (5):77-80.]
- 王金利, 史胜青, 贾利强, 江泽平. 2010. 植物泛素结合酶E2功能研究进展[J]. 生物技术通报, (4):7-10. [Wang J L, Shi S Q, Jia L Q, Jiang Z P. 2010. Progress on functions of ubiquitin-conjugating enzyme(E2) in plants[J]. Biotechnology Bulletin, (4):7-10.]
- 许传俊, 李玲. 2007. 泛素/26S蛋白酶体途径与植物的生长发育[J]. 西北植物学报, 27(3):635-643. [Xu C J, Li L. 2007. The ubiquitin 26S proteasome pathway and plant development[J]. Acta Botanica Boreali-occidentalia Sinica, 27(3):635-643.]
- 张莉, 荐红举, 杨博, 张翱翔, 张超, 杨鸿, 张立源, 刘列钊, 徐新福, 卢坤, 李加纳. 2018. 甘蓝型油菜蔗糖磷酸合酶(SPS)基因家族成员鉴定及表达分析[J]. 作物学报, 44(2):197-207. [Zhang L, Jian H J, Yang B, Zhang A X, Zhang C, Yang H, Zhang L Y, Liu L Z, Xu X F, Lu K, Li J N. 2018. Genome-wide analysis and expression profiling of SPS gene family in *Brassica nupus* L.[J]. Acta Agronomica Sinica, 44(2):197-207.]
- 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[J]. 热带作物学报. 37(9):1732-1740. [Zhao Q F, Dong C, Jue D W, Chen H L, Jia L Q. 2016. Bioinformatics preliminary analysis of ubiquitin conjugating enzyme gene family in cacao[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 37(9):1732-1740.]
- Adam R, Mackenzie W, Peter C A. 2011. Evolutionary variation of papillomavirus E2 protein an E2 binding sites[J]. Virology Journal, 8(1):379-386.
- Asuka H, Kenichi Y, Koichi S, Yusuke O. 2015. Mutations in the gene encoding the E2 conjugating enzyme *UBE2T* cause fanconi anemia[J]. The American Journal of Human Genetics, 96(6):1001-1007.
- Bae H, Kim W T. 2014. Classification and interaction modes of 40 rice E2 ubiquitin-conjugating enzymes with 17 rice ARM-U-box E3 ubiquitin ligases[J]. Biochemical and Biophysical Research Communication, 444(4):575-580.
- Broomfield S, Hryciw T, Xiao W. 2001. DNA postreplication repair and mutagenesis in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Mutation Research, 486(3):167-184.
- Dong C, Hu H G, Jue D W. 2016. The banana E2 gene family: Genomic identification, characterization, expression profiling analysis[J]. Plant Science, 245(3):11-24.
- Gu X F, Jiang D H, Wang Y Q. 2009. Repression of the floral transition via histone H2B monoubiquitination[J]. The Plant Journal, 57(3):522-533.
- Heymans M, Singh A K. 2003. Deriving phylogenetic trees from the similarity analysis of metabolic pathways[J]. Bioinformatics, 19(6):1138-1146.
- Jue D W, Sang X L, Lu S Q, Dong C, Zhao Q F, Chen H L, Jia L Q. 2015. Genome-wide identification and expression analyses of the ubiquitin-conjugating enzyme gene family in maize[J]. PLoS One, 10(11):e0143488.
- Kraft E, Stone S L, Ma L, Su N, Gao Y, Lau O S, Deng X W, Callis J. 2005. Genome analysis and functional characterization of the E2 and RING-type E3 ligase ubiquitination enzymes of *Arabidopsis* [J]. Plant Physiology, 139(4):1597-1611.
- Lau O S, Deng X W. 2009. Effect of *Arabidopsis COPIO* ubiquitin E2 enhancement activity across E2 families and functional conservation among its canonical homologs [J]. Biochemical Journal, 418(3):683-690.
- Mario R, Gerardo F P, José L R. Ana L A, Jean J D, Lourdes G, Georgina H. 2013. Two common bean genotypes with contrasting response to phosphorus deficiency show variations in the microRNA 399-Mediated *PvPHO2* regulation within the *PvPHR1* signaling pathway[J]. International Journal of Molecular Sciences, 14(4):8328-8344.
- Pickart C M, Eddins M J. 2004. Ubiquitin: Structures, functions, mechanisms[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1695(1-3):55-72.
- Thornton J W, De S. 2000. Gene family evolution and homology: Genomic meets phylogenetics[J]. Annual Review of Genomics and Human Genetics, 1(1):41-73.
- Vance C P, Uhde S C, Allan D L. 2003. Phosphorus acquisition and use: Critical adaptation by plants for securing a nonrenewable resource[J]. New Phytologist, 157(3):423-447.
- Woodhams M D, Hendy M D. 2004. Reconstructing phylogeny by quadratically approximated maximum likelihood [J]. Bioinformatics, 20(4):1348-1354.
- Xu L, Menard R, Berr A. 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* [J]. The Plant Journal, 57(2):279-288.