

# 苹果 U-box 型 E3 泛素连接酶 MdPUB24 的耐盐性和 ABA 敏感性鉴定

齐晨辉, 赵先炎, 韩朋良, 姜 翰, 王永旭, 胡大刚\*, 郝玉金\*

(山东农业大学园艺科学与工程学院, 作物生物学国家重点实验室, 农业部黄淮地区园艺作物生物学与种质创制重点实验室, 山东泰安 271018)

**摘 要:** 从‘皇家嘎拉’苹果 (*Malus × domestica* Borkh.) 中克隆了一个 E3 泛素连接酶基因 (序列号: MDP0000199588)。基因序列测序发现, 该基因包含长为 1 212 bp 完整的开放阅读框, 编码 404 个氨基酸。系统进化树分析表明, 这一 E3 泛素连接酶与拟南芥 AtPUB24 同源序列相似性最高, 因此将其命名为 MdPUB24。利用 PlantCare 数据库进行启动子顺式作用元件预测分析表明, MdPUB24 启动子序列中含有与脱落酸、光、茉莉酸及干旱信号相关的顺式作用元件。荧光定量 PCR 分析表明, MdPUB24 在‘皇家嘎拉’苹果的不同组织中均有表达, 且在叶片中最高; 外源 ABA、NaCl 和低温胁迫处理能够抑制‘皇家嘎拉’苹果组培苗中 MdPUB24 的表达。MdPUB24 过量表达的‘王林’苹果愈伤组织和异位表达的拟南芥幼苗在盐胁迫条件下, 生长势与野生型相比明显变弱, 表明 MdPUB24 负调控盐胁迫。相反, 在外源 ABA 处理条件下, MdPUB24 过量表达苹果愈伤和异位表达拟南芥与对照相比, 生长势明显增强, 表明 MdPUB24 对 ABA 不敏感。

**关键词:** 苹果; E3 泛素连接酶; MdPUB24; 盐胁迫; 脱落酸胁迫

**中图分类号:** S 661.1

**文献标志码:** A

**文章编号:** 0513-353X (2017) 12-2255-10

## Functional Identification of Salt Tolerance and ABA Sensitivity of Apple U-box E3 Ubiquitin Ligase MdPUB24

QI Chenhui, ZHAO Xianyan, HAN Pengliang, JIANG Han, WANG Yongxu, HU Dagang\*, and HAO Yujin\*

(State Key Laboratory of Crop Biology, MOA Key Laboratory of Horticultural Crop Biology (Huanghuai Region) and Germplasm Innovation, College of Horticulture Science and Engineering, Shandong Agricultural University, Tai'an, Shandong 271018, China)

**Abstract:** An E3 ubiquitin ligase gene (Gene ID: MDP0000199588) was cloned from ‘Royal Gala’ apple (*Malus × domestica* Borkh.). Sequence analysis showed that the length of MdPUB24 gene was 1 212 bp, which encoded 404 amino acids. A phylogenetic tree analysis indicated that our cloned apple E3 ubiquitin ligase exhibited the highest sequence similarity to *Arabidopsis* AtPUB24, so named MdPUB24. In silico analysis suggested that the promoter sequence of MdPUB24 contained several typical *cis*-acting elements, including abscisic acid-, light-, MeJA- and drought-responsive elements using PlantCare

**收稿日期:** 2017-09-22; **修回日期:** 2017-12-21

**基金项目:** 国家自然科学基金项目 (31601728); 农业部“948”国际交流项目子课题 (2016-X11); 山东省自然科学基金项目 (ZR2016CQ13); 山东农业大学杰出青年基金项目 (564024); 山东农业大学科技创新基金项目 (24024)

\* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: fap\_296566@163.com; haoyujin@sdau.edu.cn)

Databases. qPCR analysis showed that *MdPUB24* widely expressed in different tissues of ‘Royal Gala’ apple, and highly expressed in apple leaves. The expression of *MdPUB24* was significantly inhibited by exogenous ABA and NaCl and low temperature. The growing potential of *MdPUB24*-expressing apple calli of ‘Orin’ cultivar and *Arabidopsis* were much weaker than that of control under salt stress condition, suggesting that *MdPUB24* negatively regulated salt tolerance. In contrast, the growing potential of *MdPUB24*-expressing apple calli of ‘Orin’ and *Arabidopsis* were much stronger than that of control in the presence of exogenous ABA, suggesting that *MdPUB24* was insensitive to exogenous ABA.

**Keywords:** apple; E3 ubiquitin ligase; *MdPUB24*; salt stress; abscisic acid stress

植物为了应对不利的环境条件,进化出抵御机制增强其耐受性(Nakashima et al., 2014)。真核细胞中很多生命周期较短的蛋白通过泛素化系统选择性降解。而泛素化系统与免疫反应、生长发育、程序性细胞死亡有关,在植物免疫信号调节过程中扮演至关重要的作用(Lu et al., 2011; Stegmann et al., 2012; Duplan & Rivas, 2014)。泛素活化酶 E1 在 ATP 酶作用下活化单个游离泛素,将其转运到泛素结合酶 E2, E2 作为一个中间作用物和泛素连接酶 E3 相互作用促使泛素转运到特异性靶蛋白,其中 E3 决定靶蛋白的特异性识别,从而促进下游靶蛋白泛素化降解(Yee & Goring, 2009; Berndsen & Wolberger, 2014)。

依据亚基组成和作用机制将至今已发现鉴定的泛素连接酶 E3 分成 4 个重要的亚家族:HECT 35 结构域家族、RING 结构域家族、cullin-RING ligases (CRLs) 和 U-box 结构域家族,其中 U-box 是在酵母 UFD2 的 C 端被证明的一个高度保守的结构域。在植物中 U-box (PUB) 蛋白形成 5 种不同的亚家族,它们可能具有不同功能(Azevedo et al., 2001)。

在苜蓿中, E3 泛素连接酶 PUB1 和共生受体激酶 LYK3 相互作用,并且被 LYK3 磷酸化负调控根瘤菌感染,同时 PUB1 与受体激酶 DMI2 相互作用,通过泛素化作用负调控根瘤菌和灌木根菌共生(Vernié et al., 2016)。在拟南芥中,两个 U-Box 型 E3 泛素连接酶 PUB12 和 PUB13 与 ABI1 (ABA-INSENSITIVE 1) 相互作用,并且 PUB12/13 能特异性靶向到 ABI1 使其降解,表明植物已经进化出激素信号调节机制以便于快速适应自然环境的挑战(Kong et al., 2015)。相比于以上的负调控因子,在拟南芥中 E3 泛素连接酶 PUB20 和 PUB17 与烟草中 ACRE276 功能同源,能正调节植物的抗病性(He et al., 2015)。此外,在葡萄中, VpPUB24 与 ICE-CBF/DREB1 互作,从而提高其抗冷性(Yao et al., 2017)。

土壤高盐是植物生长中最严重的非生物胁迫之一(Apse et al., 1999)。植物进化出复杂的蛋白调节网络响应盐胁迫,其中泛素化途径已经被广泛研究。例如,在拟南芥中异源表达番茄 SpRing 能在种子发芽和早期幼苗发育过程中增强耐盐性(Qi et al., 2016)。AtPUB18 和 AtPUB19 是含有 E3 泛素连接酶的一类保守蛋白 PUB-ARM,在拟南芥早期发育过程中,AtPUB18 和 AtPUB19 在盐胁迫下抑制种子萌发,而缺乏 PUB-ARM 蛋白后,盐胁迫反应消失,表明泛素化是刺激盐敏感性的关键要素(Bergler & Hoth, 2011)。ABA 在植物响应非生物胁迫时扮演至关重要的角色(Chinnusamy et al., 2008; Raghavendra et al., 2010), E3 连接酶已经被证明参与 ABA 途径。例如,在拟南芥中,类泛素化 SUMO (SUMOylation) E3 连接酶 SIZ1 通过 BZIP 转录因子 ABI5 负调控 ABA 信号,拟南芥 *siz1* 突变体具有 ABA 超敏感性,抑制了种子萌发和根早期发育,表明 SUMO 化调节 ABA 信号(Miura et al., 2009)。AtAIRP2 是 RING 型 E3 泛素连接酶,在拟南芥中正调节 ABA 响应,如种子发芽、气孔关闭及耐旱性(Oh et al., 2017)。

植物 PUB 家族对生物以及非生物胁迫的响应已有初步探究, 但是苹果中 PUB 基因的功能尚未见报道。以‘皇家嘎拉’苹果为试材, 通过基因克隆获得 *MdPUB24*, 利用实时定量 PCR 技术对其在不同组织中和在 ABA、盐胁迫条件下的表达进行研究; 通过遗传转化拟南芥和苹果愈伤组织, 并对其进行非生物胁迫, 鉴定其功能, 为进一步研究其调控机制, 以及苹果砧木改良提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

2016 年 5 月开始取山东省果树研究所果树试验田(中国, 山东泰安)10 年生‘皇家嘎拉’苹果树的生长根、幼茎、新生叶、花(初花期)和果实(花后 20 d), 液氮保存; 另外用 0 (对照)和  $200\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaCl,  $100\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  ABA,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  处理生根后的‘皇家嘎拉’苹果组培苗, 处理 0、3、6、12、24 h 时取整株组培苗迅速用液氮冷冻, 存放于  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱备用。

### 1.2 *MdPUB24* 的克隆

以生长状态良好, 株高约 5 cm, 有 10~12 片叶的‘皇家嘎拉’苹果组培苗叶片为试材, 采用 RNA plant plus Reagent 试剂盒(天根)提取 RNA, 利用反转录试剂盒 PrimeScript<sup>TM</sup> RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time, TaKaRa) 获得 cDNA, 贮存于  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  备用。

根据在苹果基因组数据库中检索到的序列, 设计引物 *MdPUB24*-F(上游引物): 5'-ATGGATGATATTGAAGTTCCTCAG-3'和 *MdPUB24*-R(下游引物): 5'-TCATCTGGGATA CAGAGACATAC-3', 以‘皇家嘎拉’组培苗的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。反应条件:  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min;  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  变性 30 s,  $56\text{ }^{\circ}\text{C}$  退火 30 s,  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  延伸 1 min, 35 次循环;  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。PCR 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶进行电泳并回收目的条带, 连接到 pMD18-T 克隆载体进行测序。

### 1.3 *MdPUB24* 的生物信息学分析

利用 MEGA5.0 软件对拟南芥 PUB 家族蛋白和预测的苹果 PUB 蛋白进行系统进化树分析并命名。结构功能域预测采用 SMART ([http://smart.embl-heidelberg.de/smart/set\\_mode.cgi?NORMAL=1](http://smart.embl-heidelberg.de/smart/set_mode.cgi?NORMAL=1)) 进行分析; 利用 PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 对启动子上的顺式作用元件进行分析。利用 PSORT 和 SoftBerry ProtComp 9.0 (<http://linux1.softberry.com/berry.phtml?group=programs&subgroup=proloc&topic=protcompan>) 进行亚细胞定位预测。

### 1.4 植物表达载体构建及农杆菌介导的拟南芥和苹果愈伤组织遗传转化

表达载体的构建及农杆菌介导的拟南芥和苹果愈伤组织遗传转化参照 Hu 等(2015)的方法。

### 1.5 qRT-PCR

采用实时定量 RT-PCR 的方法, 用 cDNA 模板检测 *MdPUB24* 在苹果组织中的表达水平及其对非生物胁迫的响应, 以苹果 *18S RNA* 作为等量上样参照, 上游引物为 5'-ACACGGGGAGGTAGTGACAA-3', 下游引物为 5'-CCTCCAATGGATCCTCGTTA-3'。用 qRT-PCR 方法检测转基因拟南芥幼苗, 选取 *MdActin* (GenBank accession number CN938024) 为内参基因。做 qRT-PCR 分析的特定的引物序列为上游 5'-CCAGCTTCTTAGTTCTTATCCCCT-3', 下游 5'-TGTGATGTTCTTGCTCTGGAATAG-3'。用 UltraSYBR Mixture (with ROX) 试剂盒(康为世纪)进行实时荧光定量 PCR 分析。20  $\mu\text{L}$  反应

体系为: 2× UltraSYBR Mixture 10.0 μL, 上游引物 (10 μmol · L<sup>-1</sup>) 1.0 μL, 下游引物 (10 μmol · L<sup>-1</sup>) 1.0 μL, cDNA 1.0 μL, ddH<sub>2</sub>O 7.0 μL。每样本 3 次技术重复。荧光定量 PCR 反应条件: 95 °C 预变性 10 min, 95 °C 变性 15 s, 56 °C 退火 15 s, 65 °C 延伸 10 s, 40 次循环, 每次循环第 3 步进行荧光采集; 最后, 采用 2<sup>-ΔΔCT</sup> 法 (Livak & Schmittgen, 2001) 进行定量数据分析。

## 1.6 NaCl 和 ABA 处理苹果愈伤组织和拟南芥成苗及相关生理指标测定

分别用培养基 MS、MS + 50 μmol · L<sup>-1</sup> ABA、MS + 100 μmol · L<sup>-1</sup> ABA、MS + 150 μmol · L<sup>-1</sup> ABA、MS + 100 mmol · L<sup>-1</sup> NaCl 和 MS + 150 mmol · L<sup>-1</sup> NaCl 处理野生型 ‘王林’ 苹果愈伤组织、MdPUB24 过量表达王林愈伤组织 (MdPUB24-OE-1、MdPUB24-OE-2 和 MdPUB24-OE-3), 重复 3 次。21 d 后分别称量鲜样质量, 3 个为一组测其鲜样质量, 测 3 组 (为 3 个重复), 算其平均值。同时用硫代巴比妥酸法 (Okawa et al., 1978) 测定 NaCl 处理后愈伤组织中的丙二醛含量。

将转基因拟南芥经过 MS + 50 mg · L<sup>-1</sup> 潮霉素抗性培养基筛选后, PCR 检测得到阳性转基因植株, 经过连续 3 代筛选得到 T3 代纯合体, 收取种子, 进行表型分析。

将拟南芥野生型及转基因株系的种子播种到 MS 培养基上, 4 d 后将幼苗分别转接至 MS、MS + 15 μmol · L<sup>-1</sup> ABA、MS + 20 μmol · L<sup>-1</sup> ABA、100 mmol · L<sup>-1</sup> NaCl 和 150 mmol · L<sup>-1</sup> NaCl 培养基上, 放置于 25 °C 光照培养箱中培养。7 d 后测量幼苗的根长, 每种处理的野生型拟南芥幼苗和转基因拟南芥株系各取 30 株计算其平均值。

## 2 结果与分析

### 2.1 MdPUB24 的克隆和保守结构域的分析

以 ‘皇家嘎拉’ 组苗木的 cDNA 为模板, 克隆得到一个约 1 200 bp 的条带 (图 1), 测序分析表明其含有 1 212 bp 的完整开放阅读框, 编码 404 个氨基酸, 与基因序列号 MDP0000199588 的序列一致, 将其命名为 MdPUB24。

用 SMART ([http://smart.embl-heidelberg.de/smart/set\\_mode.cgi?NORMAL=1](http://smart.embl-heidelberg.de/smart/set_mode.cgi?NORMAL=1)) 分析其蛋白的保守结构域发现含有一个 UBOX 保守结构域。利用 PSORT 和 SoftBerry ProtComp 9.0 进行亚细胞定位预测发现, 其预测数值在细胞质基质中最高, 表明其可能定位在细胞质基质中 (表 1)。

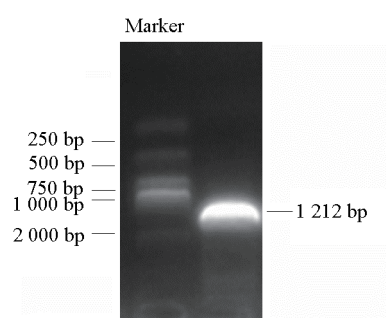


图 1 MdPUB24 编码区全长的 PCR 扩增  
Fig. 1 Amplification of the full length of MdPUB24 gene with PCR

表 1 MdPUB24 蛋白亚细胞定位预测值

Table 1 Prediction of the sub-cellular localization of MdPUB24 protein

细胞核 Nuclear	质膜 Plasma membrane	细胞质基质 Cytoplasmic	线粒体 Mitochondrial	内质网 Endoplasmic reticulum	高尔基体 Golgi	叶绿体 Chloroplast	液泡 Vacuolar
0.05	0.23	8.17	0.14	0.15	0	0.78	0.47

利用 PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 对 *MdPUB24* 上游的启动子序列进行分析, 结果表明 *MdPUB24* 启动子序列含有多个抗性相关的响应元件, 例如脱落酸响应元件 ABRE, 干旱诱导相关的 MYB 结合位点 MBS 及厌氧感应所需的顺势调控元件 ARE, 同时, *MdPUB24* 上游的启动子序列中还有一些与植物激素相关的响应元件, 例如与茉莉酸响应元件 CGTCA-motif 等 (表 2)。这些植物激素都参与植物的逆境响应过程, 进一步说明 *MdPUB24* 可能与植物的抗性反应相关。

表 2 MdPUB24 上游调控序列顺式作用元件分析  
Table 2 cis-acting regulatory elements in the upstream regulatory sequences of MdPUB24

顺式元件名称 cis-element name	信号序列 cis-element sequence	功能 Function	起始位点/bp Start site	终止位点/bp Termination site
ABRE	CCGCGTAGGC	与脱落酸响应相关的作用元件 cis-acting element involved in the abscisic acid responsiveness	- 190; - 464	- 200; - 473
ARE	TGGTTT	厌氧感应所需的顺势调控元件 cis-acting regulatory element essential for the anaerobic induction	- 825	- 831
Box 4	ATTAAT	涉及光响应的保守的 DNA 模块部分 Part of a conserved DNA module involved in light responsiveness	- 95; - 800; - 1 013	- 101; - 806; - 1 019
Box-W1	TTGACC	真菌诱导子响应元件 Fungal elicitor responsive element	- 1 200	- 1 206
CGTCA-motif	CGTCA	茉莉酸响应元件 cis-acting regulatory element involved in the MeJA-responsiveness	- 1 284	- 1 289
MBS	CAACTG	与干旱诱导相关的 MYB 结合位点 MYB binding site involved in drought-inducibility	- 743	- 746

2.4 MdPUB24 的组织表达分析及对非生物胁迫的响应

荧光定量 PCR 分析表明, MdPUB24 在苹果根、茎、叶片、花以及幼果中都有表达, 在叶片中的表达水平最高(图 3)。MdPUB24 的表达受 ABA(100 μmol · L<sup>-1</sup> ABA)、盐胁迫(100 mmol · L<sup>-1</sup> NaCl)和低温(4 °C)诱导, 在 ABA、盐胁迫处理 3、6、12 和 24 h 后表达量显著下降, 低温胁迫 12 和 24 h 时显著下降(图 3)。

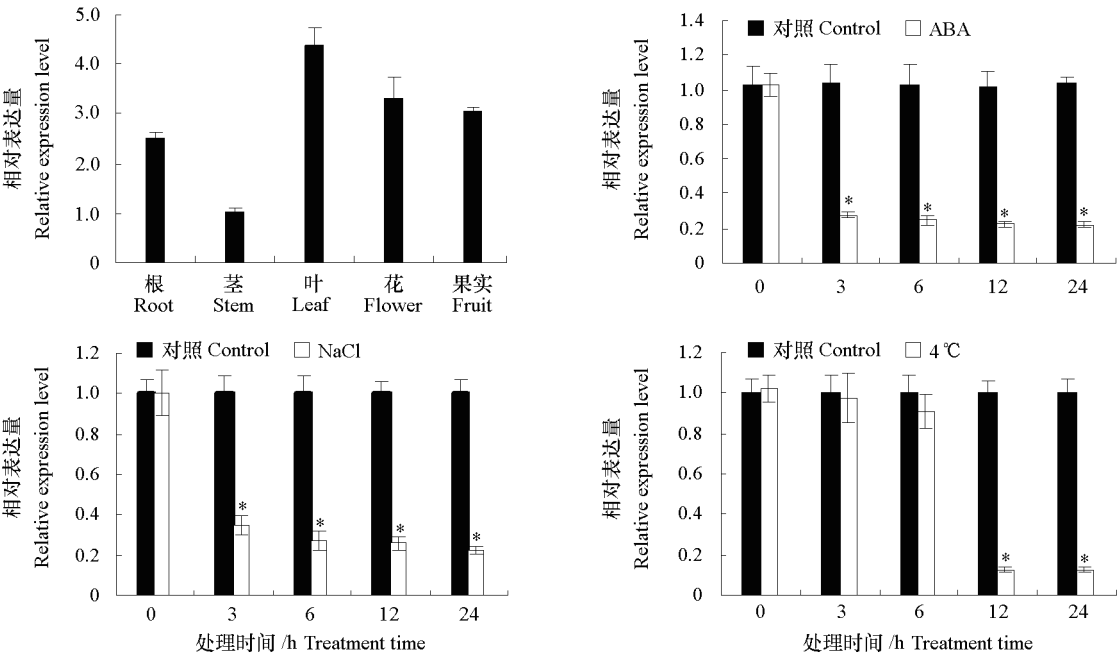


图 3 MdPUB24 的组织表达分析和在 ABA、盐和低温胁迫下的表达水平  
Fig. 3 Expression pattern of MdPUB24 gene in different tissues of apple and under ABA, salt stress and low temperature  
\* P < 0.05.

2.5 MdPUB24 过量表达苹果愈伤组织不受 ABA 抑制并负调控盐胁迫抗性

构建 MdPUB24 的过量表达‘王林’苹果愈伤组织, 用免疫印迹试验(Western Blotting)检测转基因愈伤组织, 证明 MdPUB24 转入愈伤组织中, 获得 3 个转基因细胞系, L1 (MdPUB24-OE-1)、L2 (MdPUB24-OE-2) 和 L3 (MdPUB24-OE-3)(图 4)。



在 MS 培养基上 (对照), 野生型愈伤 (WT) 以及 3 个细胞系转基因鲜样质量相差不大 (图 5)。但是, 在 MS + 50  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  ( $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) ABA 培养基上处理 21 d 后, 转基因细胞系长势比野生型强, 并且在 MS + 100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  ABA、MS + 150  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  ABA 培养基上表现出相同的长势 (图 6), 说明过量表达 *MdPUB24* 的愈伤组织不受 ABA 抑制。

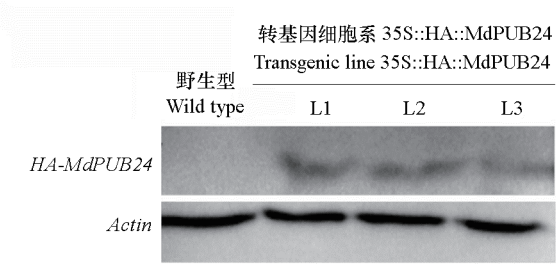


图 4 免疫印迹试验检测 *MdPUB24* 转基因苹果愈伤组织  
Fig. 4 Detection of *MdPUB24* transgenic apple calli with Western Blotting assay

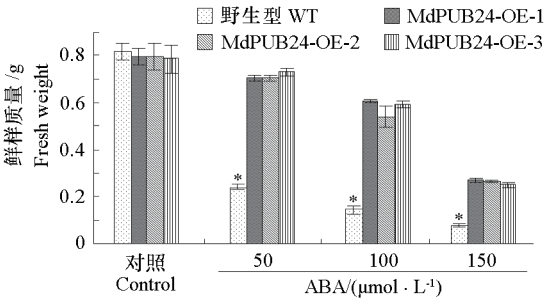


图 5 转基因株系在 ABA 处理下生长 21 d 的鲜样质量  
Fig. 5 Fresh weight of 21-day-old overexpression transgenic line calluses under ABA stress  
\*  $P < 0.05$ .

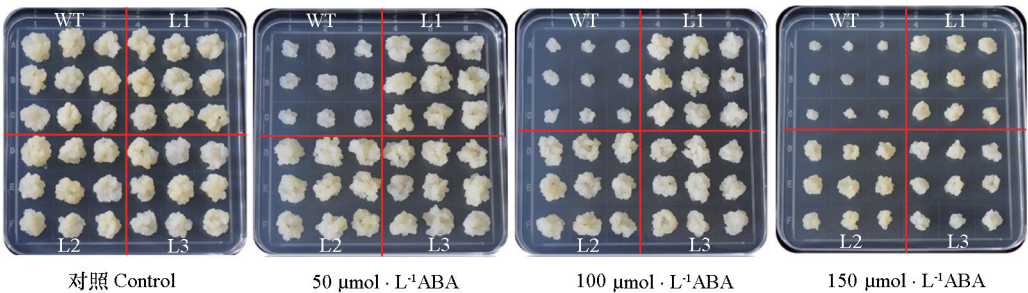


图 6 野生型苹果愈伤 (WT)、转基因 3 个株系在 ABA 处理下生长 21 d 的状态  
Fig. 6 Growth status of 21-day-old wild type apple (WT), overexpression transgenic line calluses under ABA stress

在 MS 培养基上野生型以及 3 个转基因细胞系愈伤组织鲜样质量相差不大, 但是在 MS + 100  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaCl 和 MS + 150  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaCl 培养基上处理 21 d 后, 转基因细胞系愈伤长势不如野生型强 (图 7), 丙二醛含量高于野生型 (图 8), 说明过量表达 *MdPUB24* 降低苹果愈伤组织对盐胁迫的抵抗能力。

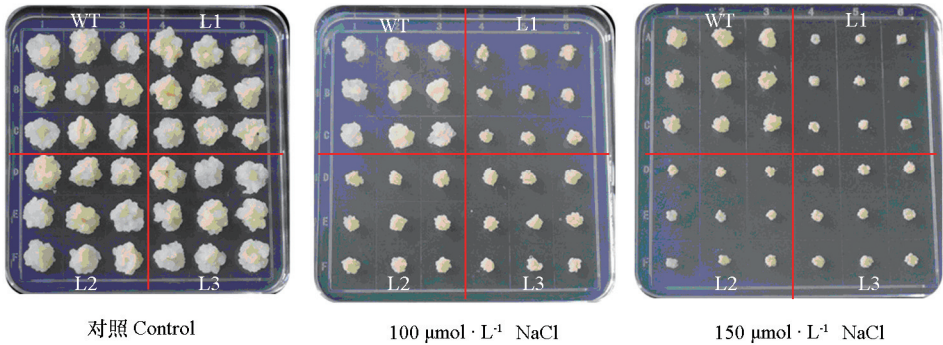


图 7 野生型苹果愈伤 (WT) 和过表达转基因愈伤 3 个株系在 NaCl 处理下生长 21 d 的状态  
Fig. 7 Growth status of 21-day-old wild type apple (WT), overexpression transgenic line calluses under NaCl stress

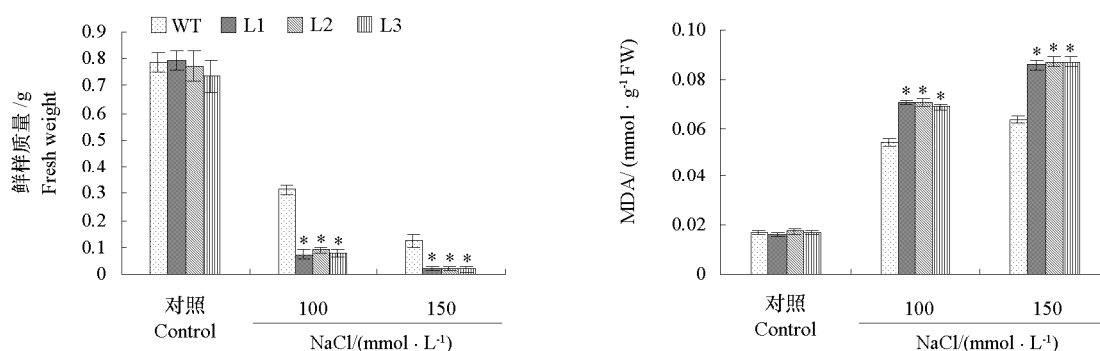


图 8 野生型苹果愈伤 (WT) 和过表达转基因愈伤 3 个株系在 NaCl 处理下生长 21 d 的鲜样质量和丙二醛含量

Fig. 8 Fresh weight and MDA content of 21-day-old wild type apple (WT), overexpression transgenic line calluses under NaCl stress

\*  $P < 0.05$

## 2.6 异源表达 *MdPUB24* 拟南芥不受 ABA 抑制并负调控盐胁迫抗性

用 qRT-PCR 方法检测转基因拟南芥幼苗, 证明 *MdPUB24* 拟南芥中异位表达 (图 9)。

培养 7 d 发现, MS 培养基上野生型与转基因拟南芥长势相似, 根长相差不大, 而在 ABA 处理下, 野生型和转基因拟南芥根长均变短, 且野生型的更短, 表明在拟南芥中异源表达 *MdPUB24* 不受 ABA 抑制; 在 NaCl 处理下, 野生型和转基因拟南芥根长变短, 但野生型明显长于转基因拟南芥, 表明在拟南芥中异源表达 *MdPUB24* 降低了对盐的抗性 (图 10)。

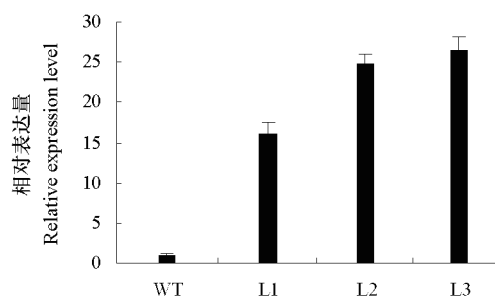


图 9 qRT-PCR 分析野生型 (WT) 拟南芥和异源表达株系

Fig. 9 Quantitative RT-PCR analysis of *MdPUB24* expression in wild type (WT) *Arabidopsis thaliana* and heterogeneous expression lines

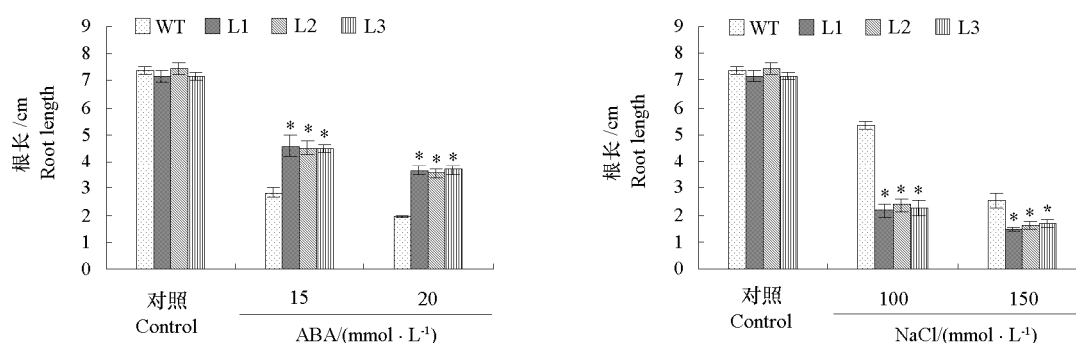


图 10 野生型拟南芥 (WT)、过表达转基因拟南芥 3 个株系在 ABA 和 NaCl 处理下生长 7 d 的根长

Fig. 10 Root length of 7-day-old wild type *Arabidopsis thaliana*, heterogenous expression lines under ABA and NaCl stresses

\*  $P < 0.05$ .



### 3 讨论

植物体内进化出一系列抵抗外界环境的机制, 其中泛素化途径是至关重要的途径之一, 泛素化途径中有 3 个重要的酶, 分别是泛素活化酶 E1、泛素结合酶 E2 和泛素连接酶 E3。其中 E3 泛素连接酶的亚家族 PUB 家族在生物以及非生物胁迫中也发挥了关键作用。例如, 苜蓿中 PUB1 负调控根瘤菌和灌木根菌共生 (Vernié et al., 2016); 拟南芥中 PUB12/13 负调控 ABI1 (Kong et al., 2015); PUB17 和 PUB20 正调控抗病 (He et al., 2015); 水茄中 *StUBCc* 受黄萎病菌侵染诱导 (刘炎霖 等, 2015); 葡萄中 PUB24 调节抗冷 (Yao et al., 2017) 等。这些表明植物进化的抗病、抗逆机制与 PUB 家族可能有很大关系。

先前有研究表明, 在葡萄中, *VpPUB24* 在冷胁迫中扮演了一个重要的角色, 在冷胁迫处理后, 定量 PCR 分析表明 *VpPUB24* 转录水平增加 (Yao et al., 2017), 本研究中以 *MdPUB24* 为研究对象, 定量 PCR 分析发现 *MdPUB24* 在 4 °C 处理后, 转录水平下降, 暗示着 *MdPUB24* 与 *VpPUB24* 在响应低温胁迫机理方面存在明显的不同。

在拟南芥中, ABA 处理突变体 *pub9* 后, 根长相比于野生型并没有发生显著变化 (Samuel et al., 2008), 但是在苹果中, *MdPUB24* 转基因愈伤及异源表达拟南芥用 ABA 处理后, 发现相比于野生型, 转基因愈伤质量以及异源表达拟南芥的根长比野生型大和长, 表明 *MdPUB24* 转基因愈伤及拟南芥根的生长不受 ABA 抑制; 分析 *MdPUB24* 顺式作用元件发现 *MdPUB24* 含有脱落酸响应元件 ABRE, 表明该位置有 ABA 的响应受体蛋白, 推测可能有其他转录因子直接或间接转录激活或抑制 *MdPUB24*, 这还有待进一步鉴定。另外, *MdPUB24* 转基因愈伤及异源表达拟南芥不抗盐, 表明 *MdPUB24* 负调控盐胁迫。但是 *MdPUB24* 具体是通过何种途径调节抗盐目前还不是很清楚。

*MdPUB24* 负调控盐胁迫及对 ABA 的不敏感性, 这种基因特性为苹果砧木新品种选育提供了理论依据, 具有潜在的价值。

### References

- Apse M P, Aharon G S, Snedden W A, Blumwald E. 1999. Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiport in *Arabidopsis*. *Science*, 285 (5431): 1256 – 1258.
- Azevedo C, Santos-Rosa M J, Shirasu K. 2001. The U-box protein family in plants. *Trends in Plant Science*, 6 (8): 354.
- Bergler J, Hoth S. 2011. Plant U-box armadillo repeat proteins AtPUB18 and AtPUB19 are involved in salt inhibition of germination in *Arabidopsis*. *Plant Biology*, 13 (5): 725 – 730.
- Berndsen C E, Wolberger C. 2014. New insights into ubiquitin E3 ligase mechanism. *Nature Structural & Molecular Biology*, 21 (4): 301 – 307.
- Chinnusamy V, Gong Z Z, Zhu J K. 2008. Abscise acidmediated epigenetic processes in plant development and stress responses. *J Integr Plant Biol*, 50: 1187 – 1195.
- Duplan V, Rivas S. 2014. E3 ubiquitin-ligases and their target proteins during the regulation of plant innate immunity. *Frontiers in Plant Science*, (5): 42.
- He Q, McLellan H, Boevink P C, Sadanandom A, Xie C, Birch P R, Tian Z. 2015. U-box E3 ubiquitin ligase PUB17 acts in the nucleus to promote specific immune pathways triggered by *Phytophthora infestans*. *Journal of Experimental Botany*, 66 (11): 3189 – 3199.
- Hu D G, Sun M H, Sun C H, Liu X, Zhang Q Y, Zhao J, Hao Y J. 2015. Conserved vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase subunit B1 improves salt stress tolerance in apple calli and tomato plants. *Sci Hortic-Amsterdam*, 197: 107 – 116.
- Kong L, Cheng J, Zhu Y, Ding Y, Meng J, Chen Z, Gong Z. 2015. Degradation of the ABA co-receptor ABI1 by PUB12/13 U-box E3 ligases. *Nature Communications*, 6: 8630 – 8630.

- Liu Yan-lin, Chen Yu-hui, Liu Fu-zhong, Zhang Ying, Lian Yong. 2015. Cloning and expression analysis induced by verticillium wilt fungus of ubiquitin-conjugating enzyme gene *StUBCc* from *Solanum torvum*. *Acta Horticulturae Sinica*, 42 (6): 1185 – 1194. (in Chinese)
- 刘炎霖, 陈钰辉, 刘富中, 张映, 连勇. 2015. 水茄泛素结合酶 E2 基因 *StUBCc* 的克隆及黄萎病菌诱导表达分析. *园艺学报*, 42 (6): 1185 – 1194.
- Livak K J, Schmittgen T D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods*, 25 (4): 402 – 408.
- Lu D, Lin W, Gao X, Wu S, Cheng C, Avila J, Shan L. 2011. Direct ubiquitination of pattern recognition receptor FLS2 attenuates plant innate immunity. *Science*, 332 (6036): 1439 – 1442.
- Miura K, Lee J, Jin J B, Yoo C Y, Miura T, Hasegawa P M. 2009. Sumoylation of ABI5 by the *Arabidopsis* SUMO E3 ligase SIZ1 negatively regulates abscisic acid signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106 (13): 5418 – 5423.
- Nakashima K, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. 2014. The transcriptional regulatory network in the drought response and its crosstalk in abiotic stress responses including drought, cold, and heat. *Abiotic Stress: Molecular Genetics and Genomics*, 5: 170.
- Oh T R, Kim J H, Cho S K, Ryu M Y, Yang S W, Kim W T. 2017. AtAIRP2 E3 Ligase affects ABA and high salinity responses by stimulating its ATP1/SDIRIP1 substrate Turnover. *Plant Physiology*, DOI: <http://doi.org/10.1104/pp.17.00467>.
- Okawa H, Ohishi N, Yagi K. 1978. Reaction of linoleic acid hydroperoxide with thiobarbituric acid. *J Lipid Res*, 19: 1053 – 1057.
- Qi S, Lin Q, Zhu H, Gao F, Zhang W, Hua X. 2016. The Ring finger E3 ligase SpRing is a positive regulator of salt stress signaling in salt-tolerant wild tomato species. *Plant and Cell Physiology*, 57 (3): 528 – 539.
- Raghavendra A S, Gonugunta V K, Christmann A, Grill E. 2010. ABA perception and signalling. *Trends Plant Sci*, 15: 395 – 401.
- Samuel M A, Mudgil Y, Salt J N, Delmas F, Ramachandran S, Chilleli A, Goring D R. 2008. Interactions between the S-domain receptor kinases and AtPUB-ARM E3 ubiquitin ligases suggest a conserved signaling pathway in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 147 (4): 2084 – 2095.
- Stegmann M, Anderson R G, Ichimura K, Pecenkova T, Reuter P, Žárský V, Trujillo M. 2012. The ubiquitin ligase PUB22 targets a subunit of the exocyst complex required for PAMP-triggered responses in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 24 (11): 4703 – 4716.
- Vernié T, Camut S, Camps C, Rembliere C, de Carvalho-Niebel F, Mbengue M., Lefebvre B. 2016. PUB1 interacts with the receptor kinase DMI2 and negatively regulates rhizobial and arbuscular mycorrhizal symbioses through its ubiquitination activity in *Medicago truncatula*. *Plant Physiology*, 170 (4): 2312 – 2324.
- Yao W, Wang L, Wang J, Ma F, Yang Y, Wang C, Zhang C. 2017. *VpPUB24*, a novel gene from Chinese grapevine, *Vitis pseudoreticulata*, targets VpICE1 to enhance cold tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 68 (11): 2933 – 2949.
- Yee D, Goring D R. 2009. The diversity of plant U-box E3 ubiquitin ligases: from upstream activators to downstream target substrates. *Journal of Experimental Botany*, 60 (4): 1109 – 1121.