

DOI: 10.3724/SP.J.1006.2026.54133

甘蓝自交不亲和相关基因 *BoPUB3L* 的克隆与表达分析

左同鸿^{1,**} 张贺翠^{1,**} 曾 静² 朱利泉^{1,*}

¹ 西南大学农学与生物科技学院, 重庆 400716; ² 长江师范学院现代农业与生物工程学院, 重庆 408100

摘 要: PUB 蛋白(plant U-box protein)是一类 E3 泛素连接酶, 在植物自交不亲和、激素反应、防御和非生物胁迫反应等过程中发挥作用。本研究通过对甘蓝自花授粉(self-pollination, SP) 0~60 min 的花柱转录组数据进行分析, 筛选到 1 个受 SP 诱导上调表达的 PUB 蛋白家族基因 *BoPUB3L*。该基因的开放阅读框为 2214 bp, 编码 737 个氨基酸, 理论等电点为 6.04, 其相对分子质量为 81.27 kD, 不含信号肽和跨膜域, 含有 1 个 U-box 结构域和 5 个 ARM 臂重复结构域, 定位于细胞核中。*BoPUB3L* 启动子中含有光响应、脱落酸应答、生长素应答、赤霉素应答、与分生组织表达相关等多种顺式作用元件。*BoPUB3L* 基因在甘蓝的不同组织中均有表达, 在花柱中的表达量最高, 在萼片、花瓣、花蕾中的表达量次之, 同 GUS 染色结果一致。该基因在自花授粉 0~30 min 持续上调表达, 在自花授粉 15 min 时差异达到最大, 是异花授粉时的 15.65 倍。酵母双杂交、pull down 和 BiFC 试验结果表明, *BoPUB3L* 蛋白与 SRK 胞内激酶域有相互作用。以上研究结果推测, *BoPUB3L* 可能是一种参与甘蓝自交不亲和和反应过程的新基因, 这对进一步了解甘蓝自交不亲和机制提供了新的研究视角。

关键词: 甘蓝; 基因克隆; 自交不亲和; 表达分析; 酵母双杂交

Molecular cloning and expression analysis of *BoPUB3L* associated with self-incompatibility in *Brassica oleracea*

Zuo Tong-Hong^{1,**}, Zhang He-Cui^{1,**}, Zeng Jing², and Zhu Li-Quan^{1,*}

¹ College of Agronomy and Biotechnology, Southwest University, Chongqing 400716, China; ² College of Modern Agriculture and Bioengineering, Yangtze Normal University, Chongqing 408100, China

Abstract: U-box E3 ligases (PUBs) regulate plant self-incompatibility (SI), hormone signaling, and stress responses. By mining time-course transcriptome data from *Brassica oleracea* following self-pollination (0–60 min), we identified *BoPUB3L*, a *PUB* gene that is rapidly and specifically upregulated by self-pollination. The 2214 bp open reading frame encodes a 737-aa protein (81.27 kD; pI 6.04) containing a single U-box and five ARM repeats, lacking a signal peptide and transmembrane domain, and localizing to the nucleus. The *BoPUB3L* promoter contains multiple *cis*-acting elements related to light responsiveness, abscisic acid, auxin, and gibberellin responses, as well as meristem-associated expression. *BoPUB3L* is most highly expressed in the style, followed by sepals, petals, and buds, as confirmed by GUS staining. Transcript abundance increased continuously during the first 30 min after self-pollination and peaked at 15 min, reaching a level 15.65-fold higher than that after cross-pollination. Yeast two-hybrid, pull-down, and BiFC assays further showed that *BoPUB3L* interacts with the kinase domain of the S-locus receptor kinase (SRK). Together, these results identify *BoPUB3L* as a previously uncharacterized component of the SI response in *B. oleracea* and provide new insight into the molecular basis of self-incompatibility in crucifers.

Keywords: *Brassica oleracea*; gene cloning; self-incompatibility; expression analysis; yeast two-hybrid

本研究由国家自然科学基金项目(31572127), 重庆市研究生科研创新项目(CYB22138, CYS18085)和横向项目(M2022052)资助。

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (31572127), the Chongqing Graduate Research and Innovation Project (CYB22138, CYS18085), and the Horizontal Project (M2022052).

* 通信作者(Corresponding author): 朱利泉, E-mail: zhuliquan@swu.edu.cn

** 同等贡献(Contributed equally to this work)

第一作者联系方式: 左同鸿, E-mail: zuotongh@163.com; 张贺翠, E-mail: zhanghecui226@163.com

Received (收稿日期): 2025-10-21; Accepted (接受日期): 2026-02-27; Published online (网络出版日期): 2026-03-09.

URL: <https://link.cnki.net/urlid/11.1809.S.20260306.1548.010>

This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

自交不亲和性(self-incompatibility, SI)是植物经长期进化形成的限制自交、促进异交的重要遗传机制^[1-2]。甘蓝是典型的自交不亲和植物,当前研究认为,SI信号传导是由SRK-ARC1-Exo70A1等介导的蛋白质泛素化降解途径,即甘蓝等芸薹属植物自花授粉(self-pollination, SP)后,S-位点半胱氨酸富集蛋白(S-locus cysteine-rich protein, SCR/SP11)^[3]特异性识别并结合S-位点受体激酶(S-locus receptor kinase, SRK)^[4],导致SRK构象的变化,释放出原本与SRK激酶结构域结合的类硫氧还蛋白1/2 (thioredoxin-H-like 1/2, THL1/2)^[5-7];同时引发SRK自体磷酸化,与M位点蛋白激酶(M-locus protein kinase, MLPK)形成SRK-MLPK复合物^[8-10],诱导臂重复蛋白ARC1 (ARM repeat containing 1)^[11-12]磷酸化;磷酸化的ARC1使Exo70A1经泛素化过程被降解^[13],Exo70A1与MOD^[14]的反应得到阻断,从而使自身花粉在花柱柱头上不能正常水化和萌发,最终导致发生自交不亲和反应^[15-16]。

有研究表明,自交不亲和反应中的ARC1是泛素系统中的E3泛素连接酶,属于植物泛素蛋白家族成员(plant U-box protein, PUB),最初在欧洲油菜(*Brassica napus*)中被鉴定出。通过酵母双杂交试验发现,ARC1与SRK互作区域是其C端的臂重复区(ARM)^[11]。而反义抑制琴叶拟南芥(*Arabidopsis lyrata*)和甘蓝型油菜中ARC1的表达^[17-18],以及在甘蓝型油菜中过表达Exo70A1基因^[13],可以部分降低植物的自交不亲和性;同时,在亲和拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中ARC1是没有功能的拟基因,仅转入SRK-SCR基因,表现出不同程度的自交不亲和性^[19-21],这表明存在除ARC1外的SRK下游信号元件。Stone等^[22]发现,在自花授粉的过程中,花柱内泛素蛋白的活性急剧增加,由此推测可能存在其他泛素蛋白与SRK发生反应,继续向下游传递SI信号。因此,寻找其他参与调控自交不亲和反应的泛素蛋白,对甘蓝自交不亲和分子机理的深入研究具有重要意义。

PUB 蛋白广泛存在于真核生物中,是由一类具有 U-box 结构域的基因编码而成的 E3 泛素连接酶,U-box 结构域最初是从酵母 UFDZ 蛋白中鉴定出来的,由 70 个氨基酸残基组成,在酵母、植物和动物等真核生物中高度保守^[23-24]。据报道,与酵母和人类基因组中鉴定出的 2 个和 21 个 U-box 基因相比^[23-25],植物中 PUB 基因的数量要高得多,如在拟南芥、水稻、大豆、香蕉、甘蓝和马铃薯基因组

中分别鉴定出 64、77、125、91、99 和 74 个 U-box 基因^[26-31]。根据 PUB 蛋白的结构域和特点,可将 PUB 蛋白划分为 9 种类型,除含有 U-box 结构域外,有的 PUB 蛋白还包含其他结构域,如 ARM 基序、激酶结构域、WD40 结构域、MIF4G 基序等^[25-27]。研究发现,PUB 蛋白主要在植物开花时间、自交不亲和、种子萌发、激素应答、生物和非生物胁迫等过程中发挥重要作用。如拟南芥 *PUB13* 和水稻同源基因 *SPL11* 能够调控植物的细胞死亡、抗病和开花时间^[32-33]。*CMPG1* 基因^[34]在烟草与番茄中参与多个抗病基因介导的抗性反应。水稻 *OsPUB41* 基因可在干旱胁迫下被 *OsUBC25* 激活,与 *OsCLC6* 蛋白互作发挥负调控作用^[35]。

目前,有关甘蓝泛素蛋白 *PUB* 基因的克隆和功能研究报道相对较少。为进一步探索是否存在其他 PUB 蛋白成员参与自交不亲和反应,本研究通过前期对授粉后的甘蓝花柱转录组数据进行分析,成功筛选出与 ARC1 属同一家族的泛素蛋白成员 *BoPUB3L*,进而通过基因克隆、生物信息学分析、组织特异性分析、启动子活性分析、原核表达、亚细胞定位、酵母双杂交、pull down 和 BiFC 等深入探索,旨在为甘蓝 SI 的深入研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

2种甘蓝高度自交不亲和系A₄和E₁植株均由西南大学十字花科蔬菜研究所提供,其中,A₄为S28单倍型,E₁为S7单倍型,二者异交亲和。用长势一致的A₄和E₁成熟花粉分别对去雄的A₄花柱进行自花授粉和异花授粉(cross-pollination, CP),在授粉后0、15、30和60 min取下花柱放入液氮中速冻保存,同时取叶片、茎、花蕾、萼片、花瓣、花药和花柱于液氮中速冻保存,后放入-80℃保存备用。本试验所用的拟南芥为哥伦比亚野生型拟南芥。

1.2 *BoPUB3L* 基因的克隆与生物信息学分析

将 SP 和 CP 后 0、15、30 和 60 min 的花柱材料送北京百迈客生物科技有限公司进行 Illumina HiSeq 高通量测序,采用 FPKM (fragments per kilobase of transcript per million fragments mapped)作为衡量转录本或基因表达水平的指标。在差异表达基因检测过程中,将差异倍数 Fold Change ≥ 2 且错误发现率(false discovery rate, FDR) < 0.01 作为筛选标准,以未授粉时期为对照,利用不同授粉方式相

同授粉时期作比较,筛选出自花授粉与异花授粉在相同授粉时期的差异表达基因,进一步结合转录组注释文件,以 ARC1 的 U-box 和 ARM 结构域为对象,筛选出表达差异显著的 *PUB* 基因。

根据转录组测序获得的cDNA序列,结合芸薹属数据库(<http://brassicadb.cn>)、同源重组酶原理以及亚细胞定位表达载体pCAMBIA-1300-GFP的序列特征,用Primer primer 6.0软件设计引物BoPUB3L-GFP-F/R (表1),以结球甘蓝A₄花蕾cDNA为模板,进行PCR扩增。利用同源重组技术将其连接到pCAMBIA-1300-GFP载体,经菌液PCR挑选出的阳

性克隆送上海生物工程股份有限公司测序。利用在线工具ExPASy-ProtParam tool分析蛋白质的理化性质;利用在线软件SignalP和TMHMM预测蛋白质的信号肽和跨膜结构;利用在线网站SMART和PROSITE分析蛋白质的高级结构域和功能位点;利用在线软件NetPhos和NetNGlyc预测蛋白质的磷酸化位点和N-糖基化位点;通过PlantCARE分析启动子的顺式作用元件。用MEGA-X软件结合NCBI网站上的蛋白质数据库构建系统进化树,利用在线网站MEME分析蛋白质的保守基序,结合结构域信息后用Tbtools展示。

表 1 本研究所用引物
Table 1 Primers used in this study

引物名称	引物序列	用途
Primer name	Primer sequence (5'-3')	Function
BoPUB3L-BK	F: ATGGCCATGGAGGCCGAATTCATGGATCCTGTGCCGGTTC	酵母双杂交 Yeast two-hybrid
	R: ATGCGGCCGCTGCAGGTCGACTGATCTACCTTCTTCATCCTTGC	
BoSRKj-AD	F: CCGGAATCTCTCTGAAAAGAAAACAAAAGC	
	R: CGCGGATCCTTAGGCATCGATGAGTGAGCAGGT	
BoPUB3L-GUS	F: CAAGCTTGGCTGCAGGTCGACAGTGTCTCAGTCACACCACATATG	启动子活性分析 Promoter activity analysis
	R: GGTGGACTCCTCTTAGAATTCTCAAAACTACAAAGCTGAAGAACAC	
RT-qPCR	F: ATTGCAAAGTACCTCCTGATGA	荧光定量 PCR 引物 RT-qPCR primers
	R: CATTCAATCTCCTGCATACACC	
<i>dAction</i>	F: GGCTGATGGTGAAGATATTCA	内参引物 Internal reference primers
	R: CAAGCACAATACCAGTAGTAC	
BoPUB3L-nYFP	F: GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGATCCTGTGCCGGTTC	双分子荧光互补 Bimolecular fluorescence complementation
	R: GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTGATCTACCTTCTTCATCCTTGC	
BoSRK-cYFP	F: GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCAAAAAGAAAACAAAAGCGTGCAAAAG	
	R: GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTAGGCATCGATGAGTGAGCAGGTG	
BoPUB3L-GST	F: GATCTGGTTCCGCGTGGATCCATGGATCCTGTGCCGGTTC	原核表达 Prokaryotic expression
	R: CTCGAGTCGACCCGGGAATTCTGATCTACCTTCTTCATCCTTGC	
BoPUB3L-GFP	F: AAGTCCGAGCTAGCTCTAGAATGGATCCTGTGCCGGTTC	亚细胞定位 Subcellular location
	R: GCCCTTGCTCACCATGGATCCTGATCTACCTTCTTCATCCTTGC	

1.3 *BoPUB3L* 基因的表达分析

根据 *BoPUB3L* 基因序列设计荧光定量 PCR 引物(表 1),以叶片、茎、花蕾、萼片、花瓣、花药和花柱组织的 cDNA 为模板,同时以未授粉花柱、自花授粉(15、30 和 60 min)和异花授粉(15、30 和 60 min)的花柱 cDNA 为模板,以 *dActin* 作为内参基因,对目的基因进行扩增。反应体系为 20 μL,扩增程序为 95℃ 1 min; 95℃ 15 s, 58℃ 15 s, 72℃ 30 s, 40 个循环。设置 3 次重复,采用 2^{-ΔΔCT} 法计算 *BoPUB3L* 的相对表达量。

1.4 启动子活性分析

通过甘蓝数据库查找 *BoPUB3L* 启动子序列,在 ATG 上游 1500 bp 左右的碱基序列设计引物 BoPUB3L-GUS-F/R, 序列见表 1,以甘蓝 A₄ 花蕾 gDNA 为模板扩增目的片段,胶回收测序无误后用于 GUS 表达载体的连接。提取 pCAMBIA1391 质粒,以 *Sal* I/ *Eco*R I 双酶切 45 min 后胶回收,质粒线性化片段与 *BoPUB3L* 启动子序列以 1 : 3 的摩尔比在 50℃连接 1 h,将连接产物转化大肠杆菌感受态细胞 DH5α,挑选阳性克隆,测序正确后提取质粒;再将

质粒转化农杆菌感受态细胞 GV3101, 利用花序侵染法转化拟南芥, 获得阳性转基因植株, 并通过潮霉素筛选至 T_2 代。分别取 T_2 代转基因植株的幼苗、茎、叶和花, 进行 GUS 染色观察。

1.5 原核表达

将测序验证正确的 *BoPUB3L*-GST 重组载体转化至 *E. coli* BL21 (DE3) 中, 经 PCR 鉴定后, 挑取阳性单克隆, 按 1:100 接种于含 $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ 氨苄青霉素的 LB 培养基中, 37°C 振荡培养至 OD_{600} 为 0.6~0.8。加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol L^{-1} , 16°C 过夜诱导。诱导结束后, 收集菌体, 超声破碎, 离心取上清液, 用 GST 磁珠纯化蛋白。以 pGEX-4T-1 空载为对照, SDS-PAGE 电泳检测蛋白的表达。

1.6 亚细胞定位

将测序正确的重组质粒 *BoPUB3L*-1300-GFP 转化农杆菌 GV3101, 选取四至六叶期健壮的本氏烟草, 从叶片下表皮注射到烟草叶片内, 48 h 后用激光共聚焦荧光显微镜 (LSM800, Zeiss, 德国) 观察 *BoPUB3L*-1300-GFP 融合蛋白的表达部位。

以生长 4 周龄的拟南芥叶片为材料, 提取原生质体^[36]。将重组质粒 *BoPUB3L*-1300-GFP 和空载质粒 1300-GFP 转入拟南芥原生质体中, 23°C 黑暗培养 12~16 h 后在激光共聚焦荧光显微镜下观察绿色荧光表达部位。

1.7 *BoPUB3L* 与 *BoSRK* 相互作用分析

扩增甘蓝 SRK 胞内激酶结构域的片段并构建 *BoSRKj*-pGADT7 重组表达载体与 *BoPUB3L*-pGBKT7 重组表达载体。按照聚乙二醇/醋酸锂法 (PEG/LiAc) 将 *BoSRKj*-pGADT7 与 *BoPUB3L*-pGBKT7 质粒共转化 Y2Hgold 酵母感受态, 并设置阴性对照 (pGADT7-T×pGBKT7-Lam) 和阳性对照 (pGADT7-T×pGBKT7-p53), 共转化后的菌液涂布于 DDO (SD/-Leu/-Trp) 平板上, 倒置培养 3~5 d。挑选单克隆, 稀释 100 倍点涂在 QDO (SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade) 平板上倒置培养, 观察菌落生长情况。

利用 Gateway 克隆技术构建 BiFC 重组表达载体 *BoPUB3L*-YN 和 *BoSRK*-YC, 引物见表 1 (*BoPUB3L*-nYFP-F/R 和 *BoSRK*-cYFP-F/R), 将测序正确的重组载体质粒转化农杆菌感受态细胞 GV3101。将农杆菌菌落接种在 LB 培养基中生长过夜, 通过离心短暂收集, 并重悬于缓冲液 (含有 10 mmol L^{-1} MES, pH 5.6, 10 mmol L^{-1} MgCl_2 和 $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ 乙酰丁香酮) 中, 等体积混合含 2 种不同质粒的菌体, 注射到生

长状况良好的四至六叶期本氏烟草叶片中。弱光培养 2~3 d 后, 激光共聚焦显微镜下观察荧光信号。

将实验室保存的 *BoSRKj*-pET15b 质粒转移到大肠杆菌 *E. coli* BL21 (DE3) 中诱导表达, 同 1.5 步骤。诱导结束后, 超声破碎, 离心取上清液, 用于 GST pull down 结合试验。向 1.5 获得的 *BoPUB3L*-GST 磁珠复合体系中加入 *BoSRKj*-His 细胞裂解液, 4°C 过夜孵育进行蛋白结合试验, 以 pGEX-4T-1 空载磁珠蛋白复合体系与 *BoSRKj*-His 细胞裂解液孵育作为对照, 孵育结束后, 进行磁珠洗脱, 收集洗脱液, 进行 GST pull down 试验的 Western blot 检测。

2 结果与分析

2.1 *BoPUB3L* 基因的转录水平分析

前期课题组根据甘蓝 0~60 min 授粉后花柱转录组数据, 以未授粉时期为对照, 利用不同授粉方式相同授粉时期作比较, 可得到自花授粉与异花授粉相同授粉时期的差异表达基因。从韦恩图 (图 1) 中可以观察到, 授粉 15 min 时, SP15 特有的差异表达基因为 617 个, CP15 特有的差异表达基因为 683 个, SP15 与 CP15 共同调控的差异表达基因为 1500 个; 授粉 30 min 时, SP30 特有的差异表达基因为 996 个, CP30 特有的差异表达基因为 424 个, SP30 与 CP30 共同调控的差异表达基因为 1904 个; 授粉 60 min 时, SP60 与 CP60 共同调控的差异表达基因为 1237 个, SP60 特有的差异基因 1816 个, CP60 特有的差异表达基因 766 个。ARC1 是植物 PUB 蛋白家族成员, 以正调控的方式促进 SI 信号传递。有研究发现, 下调甘蓝型油菜和琴叶拟南芥中 *ARC1* 基因表达, 可以部分打破材料的不亲和性, 且观察到自花授粉过程中柱头内泛素蛋白的活性急剧增加, 说明拟南芥中存在其他途径, 即与 *ARC1*-EXO70A1 不一样的信号元件和通路, 把 SRK 传递的 SI 信号继续传递下去。PUB 是一个多基因的超家族, 那么在甘蓝中是否存在其他与 *ARC1* 同源的 PUB 蛋白参与柱头上的 SI 反应? 因此, 本研究从甘蓝授粉后的花柱转录组数据出发, 以未授粉时期为对照, 以 *ARC1* 的 U-box 和 ARM 结构域为筛选对象, 结合转录组注释文件, 筛选到一个自花授粉后表达量存在差异的 *PUB* 基因, 对该基因序列进行 Blast 比对, 发现它与拟南芥中具有泛素蛋白连接酶活性的 PUB 家族蛋白基因 *AtPUB3* 高度同源, 将其命名为 *BoPUB3-Like* (*BoPUB3L*)。

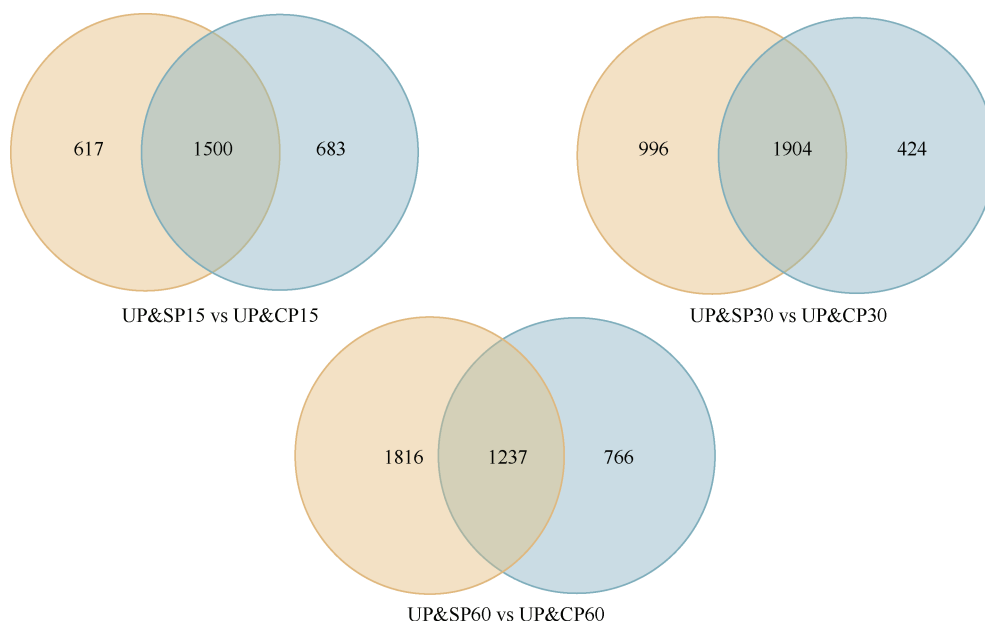


图 1 自花授粉与异花授粉后差异表达基因维恩图

Fig. 1 Venn diagram of difference expression genes after self-pollination and cross-pollination

UP: 未授粉; SP: 自花授粉; CP: 异花授粉。UP&SP 指以未授粉为对照, 自花授粉差异表达基因; UP&CP 指以未授粉为对照, 异花授粉差异表达基因。15、30、60 指授粉时间(min)。

UP, unpollinated; SP, self-pollination; CP, cross-pollination. UP&SP indicates DEGs in SP relative to UP; UP&CP indicates DEGs in CP relative to UP. 15, 30, and 60 indicate time after pollination (min).

BoPUB3L 基因的相对表达量随授粉时间发生显著变化(图 2), 其在自花授粉 0 min 开始上调表达, 15 min 时表达量最高为 24.52, 之后就开始持续显著下调表达; 而其在异花授粉后表现为先下调再微上调后又下调表达; 在授粉 30 min 内, 自花和异花授粉后的表达趋势刚好相反, 且目前研究发现 SI 反应的发生主要存在于授粉后的 0~30 min, 表明该基因可能参与自交不亲和信号转导。

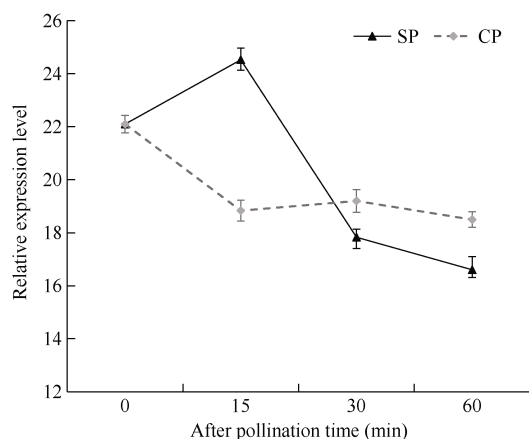


图 2 转录组数据分析 *BoPUB3L* 自花授粉和异花授粉后的表达模式

Fig. 2 Expression patterns of *BoPUB3L* after self-pollination and cross-pollination based on transcriptome data

SP: 自花授粉; CP: 异花授粉。

SP: self-pollination; CP: cross-pollination.

2.2 *BoPUB3L* 基因的生物信息学分析

以甘蓝 A_4 花蕾 cDNA 和 gDNA 为模板, 进行 *BoPUB3L* 基因和启动子序列的 PCR 扩增, 获得的 PCR 产物大小约 2200 bp 和 1500 bp (图 3)。经测序 cDNA 序列长度为 2214 bp, 包含了其完整的编码框, *BoPUB3L* 基因和启动子序列的测序结果与数据库获得的序列完全一致。

序列分析发现(图 4), *BoPUB3L* 基因编码含 737 个氨基酸残基的蛋白质, 相对分子质量为 81.27 kD,

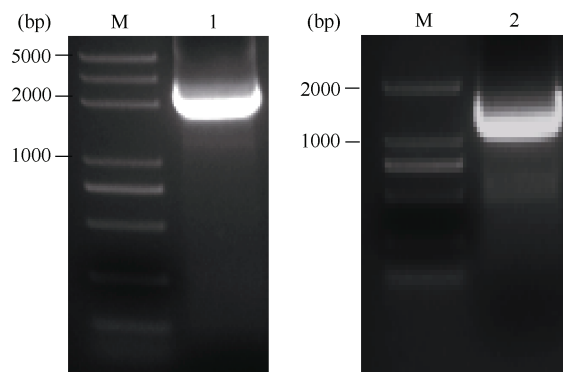


图 3 甘蓝 *BoPUB3L* 基因的 cDNA 和启动子序列扩增电泳图

Fig. 3 PCR amplification of *BoPUB3L* cDNA and promoter sequences in *Brassica oleracea*

M: DNA 分子量标准; 1: *BoPUB3L* 基因 cDNA 的 PCR 扩增; 2: *BoPUB3L* 启动子序列的 PCR 扩增。

M: Marker; 1: PCR amplification of *BoPUB3L* gene; 2: PCR amplification of *BoPUB3L* promoter sequence.

进化分析表明(图 5-A), BoPUB3L 与甘蓝 PUB 蛋白家族成员 BoPUB3 亲缘关系最近, 与甘蓝型油菜 (*Brassica napus*) 亲缘关系次之, 与楝 (*Melia azedarach*) 亲缘关系最远。Motif 和结构域分析表明 (图 5-B~C), BoPUB3L 与其他物种间的 PUB3 同源蛋

白均含有 U-box 结构域和 ARM 臂重复结构域, 属于 PUB-ARM 类蛋白, 且这些蛋白之间均含有 Motif 5、Motif 8、Motif 1、Motif 6、Motif 4、Motif 3、Motif 7 和 Motif 2 保守基序, 说明这些蛋白均具有一致或者相似功能的保守蛋白元件。

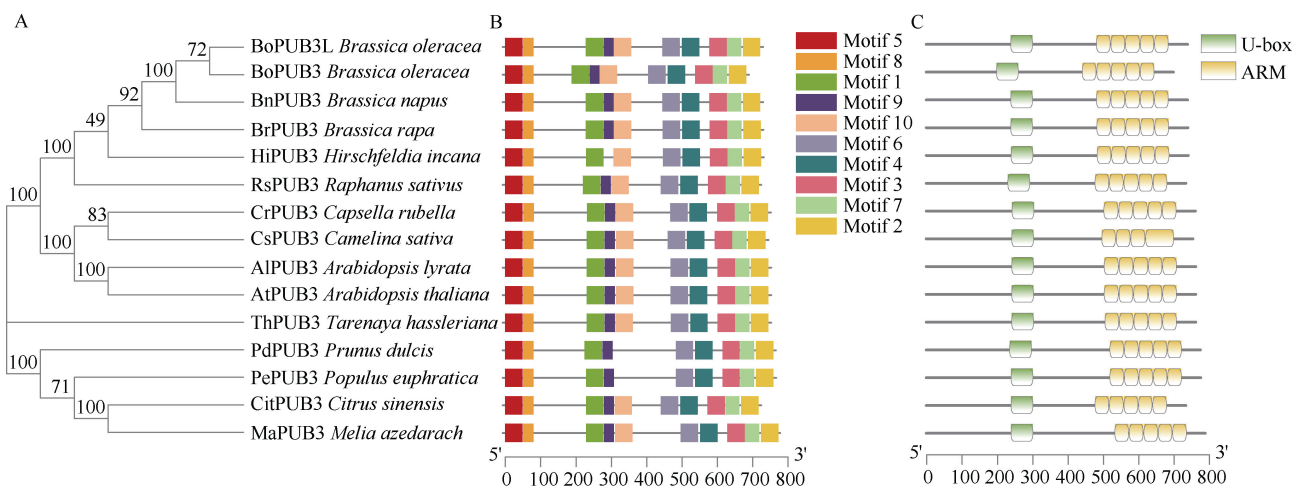


图 5 BoPUB3L 与其他物种 PUB3 蛋白的系统发育(A)、保守基序(B)、结构域(C)分析

Fig. 5 Phylogenetic (A), conserved motif (B), and domain (C) analyses of BoPUB3L and PUB3 proteins from other species

2.3 BoPUB3L 基因的表达分析

对不同授粉处理后花柱中 BoPUB3L 基因的 RT-qPCR 分析(图 6-A)发现, 该基因在自花授粉后表达总趋势是先上调后下调, 异花授粉后先下调后上调表达。BoPUB3L 基因在自花授粉 0~30 min 内快速上调表达, 在自花授粉 15 min 时与异花授粉差异达到最大, 是异花授粉后表达量的 15.65 倍, 自花授粉 30 min 到达最高表达量 9.27, 是异花授粉后表达量的 13.15 倍, 自花授粉 60 min 时该基因的表达量开始下降。自花授粉表达总趋势和转录组结果一致,

且自花授粉 0~30 min 后正是 SI 反应的关键时期, 表明 BoPUB3L 可以响应甘蓝自花授粉后的反应。对甘蓝不同组织 RT-qPCR 结果进行分析(图 6-B)发现, BoPUB3L 在甘蓝不同组织中均有表达, 但表达量存在差异。其中, 在花柱中的表达量最高, 在萼片、花瓣、花蕾中次之; 而在其余组织中的表达量相对较低, 且彼此间的表达量相差不大。

2.4 BoPUB3L 基因的启动子特异性分析

对 BoPUB3L 基因起始密码子上游 1500 bp 的核苷酸序列进行顺式作用元件分析发现, 该基因启动

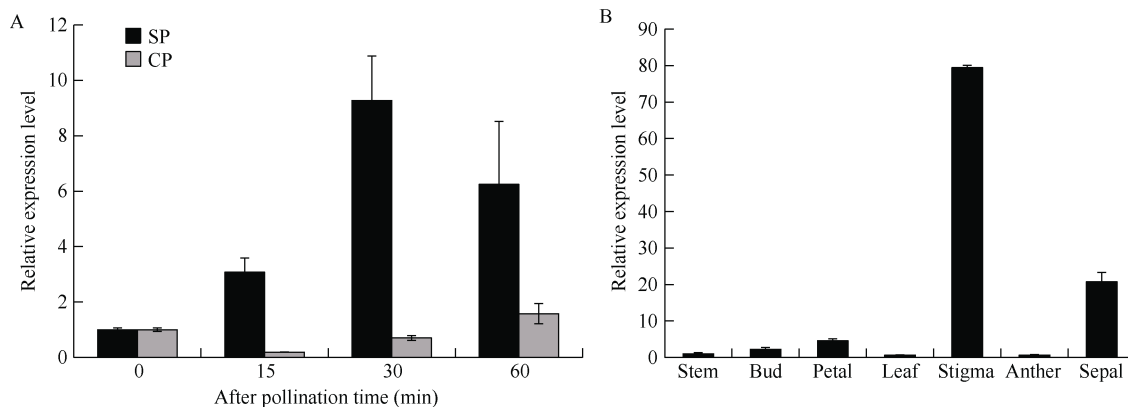


图 6 甘蓝 BoPUB3L 授粉后表达分析(A)和组织表达分析(B)

Fig. 6 BoPUB3L expression after pollination (A) and tissue-specific expression (B) in *Brassica oleracea*

SP: 自花授粉; CP: 异花授粉。SP: self-pollination; CP: cross-pollination.

表 2 *BoPUB3L* 基因上游调控区顺式作用元件
Table 2 *Cis-acting elements in the upstream regulatory region of BoPUB3L*

启动子顺式作用元件 <i>Cis-elements in the promoter region</i>	相关功能预测 <i>Associated putative function</i>
AE-box, AT1-motif, ATC-motif, Box 4, Box II	光响应 Light responsive
ABRE, AAGAA-motif	脱落酸(ABA)应答 Absciscic acid responsiveness
TGA-element, ERE	生长素(IAA)应答 Auxin-responsive
GARE-motif, F-box	赤霉素(GA)应答 Gibberellin response
TCA-element	水杨酸(SA)反应 Salicylic acid responsiveness
GCN4_motif	参与胚乳表达的顺式调控元件 <i>Cis-regulatory element involved in endosperm expression</i>
CAT-box	与分生组织表达有关的顺式调控元件 <i>Cis-acting regulatory element related to meristem expression</i>
ARE	厌氧诱导 Anaerobic induction
W box	WRKY 转录因子结合位点 WRKY transcription factor binding site
STRE	热应激响应的顺式作用元件 <i>Cis-acting regulatory element related to heat stress response</i>
MYB, MYB-binding site, MYC	参与干旱、低温、盐胁迫等逆境响应 <i>Involved in drought, low temperature, salt stress and other stress responses</i>
TC-rich repeats	压力与防御相关反应元件 Stress and defense related response elements
WUN-motif	创伤响应元件 Trauma response element

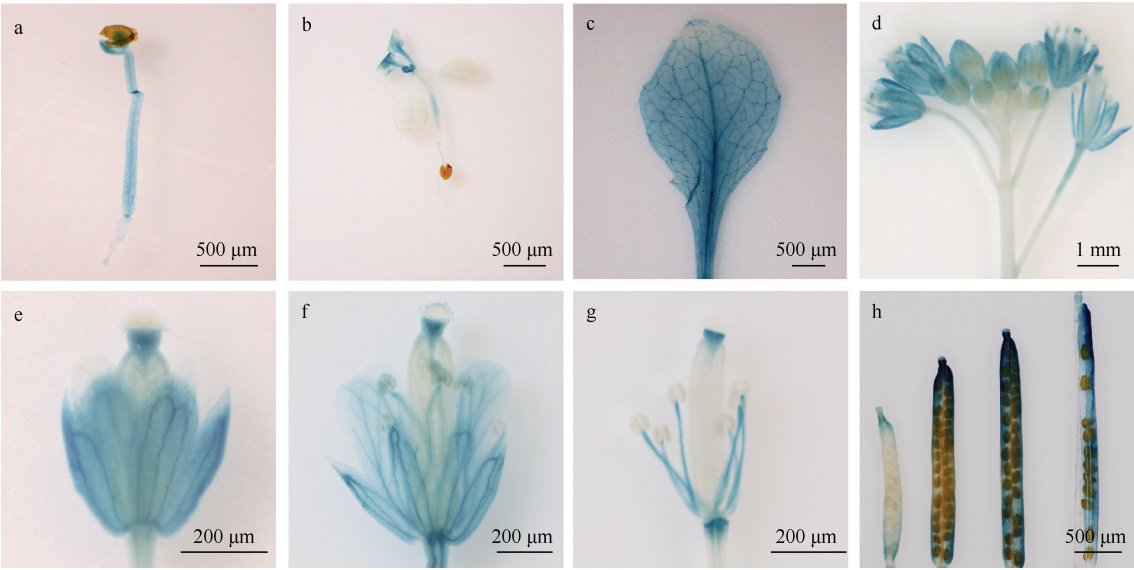


图 7 GUS 染色图
Fig. 7 GUS staining

a, b: 幼苗; c: 叶片; d-g: 花; h: 果荚。a, b: seedlings; c: leaves; d-g: flowers; h: pods.

子除核心启动元件外还含有光响应、脱落酸应答、生长素应答、赤霉素应答、水杨酸反应、厌氧诱导、创伤响应、压力与防御反应、逆境响应(热应激、干旱和盐胁迫)、胚乳表达和分生组织表达等多种顺式作用元件(表2), 表明该基因除能够响应授粉刺激外还可能对多种复杂的生物过程产生应答。

为进一步观察*BoPUB3L*基因的启动子活性, 扩增*BoPUB3L*上游1500 bp的启动子序列(图3)与GUS表达载体 pCAMBIA1391 连接, 将成功构建的

BoPUB3L-pCAMBIA1391重组载体转化农杆菌感受态细胞GV3101后, 通过花序浸染法转化野生型拟南芥植株, 潮霉素筛选至转基因T₂代纯合。将T₂代转基因拟南芥植株的幼苗、莲座期叶片、花期花蕾和果荚等浸没到GUS染液中进行GUS染色。GUS染色结果如图7所示, 在幼苗期, *BoPUB3L*基因主要在子叶中表达(图7-a~b); 在叶片的发育阶段, *BoPUB3L*基因主要在成熟叶的叶脉中表达(图7-c); 在花发育阶段, *BoPUB3L*基因主要集中在花柱、萼片和花丝中表

达,在花柱中高表达,且主要集中在花柱乳突细胞以下的基本组织中(图7-d~g)。在种子发育过程中,*BoPUB3L*基因主要集中在幼嫩果荚的顶部和基部表达,随着果荚的成熟,在果荚的果壳也出现高表达(图7-h)。

2.5 *BoPUB3L* 的原核表达和亚细胞定位

将 *BoPUB3L*-GST 重组菌株扩大培养,并在 16℃ 过夜诱导表达,经海狸 GST 融合蛋白纯化磁珠纯化目的蛋白,进行 SDS-PAGE 电泳,所得结果如图 8 所示。与未诱导的 *BoPUB3L*-GST (泳道 1)、诱导的 *BoPUB3L*-GST (泳道 2)、纯化的 pGEX-4T-1 空载(泳道 3)相比,泳道 4 在 107 kD 左右具有单一纯化条带,其蛋白质相对分子质量与 *BoPUB3L*-GST 估计值相符。其中, pGEX-4T-1 空载体表达量约为 26 kD 蛋白, *BoPUB3L* 蛋白预测的分子大小约 81.27 kD,二者融合约为 107 kD 蛋白,表明 *BoPUB3L*-GST 融合蛋白在原核细胞中诱导表达成功。

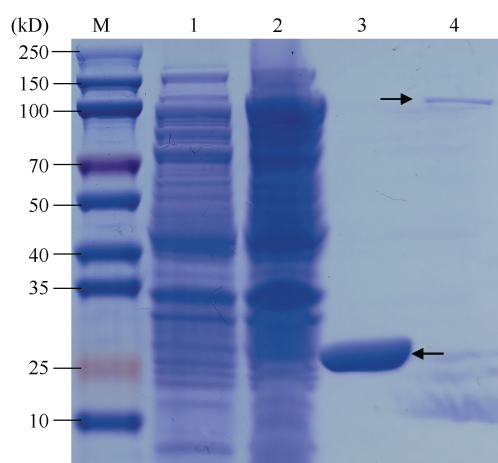


图 8 *BoPUB3L* 蛋白的原核表达

Fig. 8 Prokaryotic expression of *BoPUB3L* protein

M: 蛋白分子量标准; 1: *BoPUB3L*-GST 未诱导蛋白; 2: *BoPUB3L*-GST 诱导蛋白; 3: pGEX-4T-1 纯化蛋白; 4: *BoPUB3L*-GST 纯化蛋白; 箭头指纯化后蛋白。

M: Marker; 1: uninduced control; 2: *BoPUB3L*-GST induced fusion protein; 3: pGEX-4T-1 purified protein; 4: *BoPUB3L*-GST purified protein; arrow refers to purified protein.

利用在线软件 (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/Cell-PLoc/>) 预测甘蓝 *BoPUB3L* 蛋白定位于细胞核中,在烟草叶片表皮细胞和拟南芥原生质体中表达 *BoPUB3L*-1300-GFP 融合蛋白,激光共聚焦显微镜下观察 GFP 绿色荧光,以 1300-GFP 空载为对照。结果表明(图 9),与空载对照相比, *BoPUB3L*-1300-GFP 融合蛋白在拟南芥原生质体和烟草叶片

表皮细胞中的绿色荧光信号均分布在细胞核中,且在烟草叶片细胞中绿色荧光与核 DAPI 重合,与预测结果一致,由此可见,甘蓝 *BoPUB3L* 蛋白位于细胞核中。

2.6 *BoPUB3L* 与 *BoSRK* 之间存在相互作用

将成功构建的 pGBKT7-*BoPUB3L* 重组质粒与 pGADT7 空载质粒利用 PEG/LiAC 法共转化酵母 Y2Hgold 感受态细胞发现,融合蛋白 pGBKT7-*BoPUB3L* 在 DDO (SD/-Leu/-Trp) 平板上有单菌落长出,在 QDO (SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade/) 平板上无菌落长出,与阴性对照结果一致。表明诱饵蛋白 *BoPUB3L* 没有自激活活性,可用于下一步验证。

Gu 等^[1]以 SRK 激酶结构域为诱饵,利用酵母双杂交技术从甘蓝型油菜柱头 cDNA 文库中鉴定出与 SRK 互作的靶蛋白 ARC1。鉴于蛋白质相互作用的复杂性,本研究选择聚焦于激酶结构域进行互作分析。因该结构域是催化功能的核心单元,其互作关系最有可能直接导致功能性的调控后果,从而为阐明其下游信号转导机制提供关键切入点。因此,本研究利用 SRK 激酶结构域构建 *BoSRKj*-pGADT7 重组载体来研究 SRK 与 *PUB3L* 是否发生互作。将重组载体组合 (*BoSRKj*-pGADT7×*BoPUB3L*-pGBKT7)、阴性对照 (pGADT7-T×pGBKT7-Lam) 和阳性对照 (pGADT7-T×pGBKT7-53) 共转化酵母感受态细胞,涂布在 DDO 平板上,30℃ 倒置培养,3 d 后观察平板上菌落的生长情况,如图 10-A 所示。经 PCR 检测均能扩增出目的条带,说明重组质粒成功转入酵母细胞。为进一步检测蛋白质之间的相互作用,将 DDO 平板上的单菌落稀释后转移至 QDO 平板上,倒置培养 3~5 d,发现 *BoPUB3L*/*BoSRKj* 和阳性对照均能在 QDO 平板上生长(图 10-A),阴性对照不生长,表明 *BoPUB3L* 与 *BoSRKj* 之间存在相互作用。

体外利用 GST pull down 试验,分别对 *BoPUB3L*-GST 和 *BoSRKj*-His 进行原核表达来验证二者之间的相互作用,结果如图 10-B 所示,表明 *BoPUB3L* 能够沉降 *BoSRKj* 蛋白,对照试验中空载 GST 与 *BoSRKj* 之间不存在相互作用。进一步进行 BiFC 试验,通过成功构建的 *BoPUB3L*-YN 重组载体和 *BoSRK*-YC 重组载体转化 GV3101 农杆菌,共同瞬时转化烟草叶片细胞,在激光共聚焦显微镜下观察荧光信号,以 YN 和 YC 空载为阴性对照组。结果表明,在激光共聚焦显微镜下,试验组 *BoPUB3L*-YN 和 *BoSRK*-YC

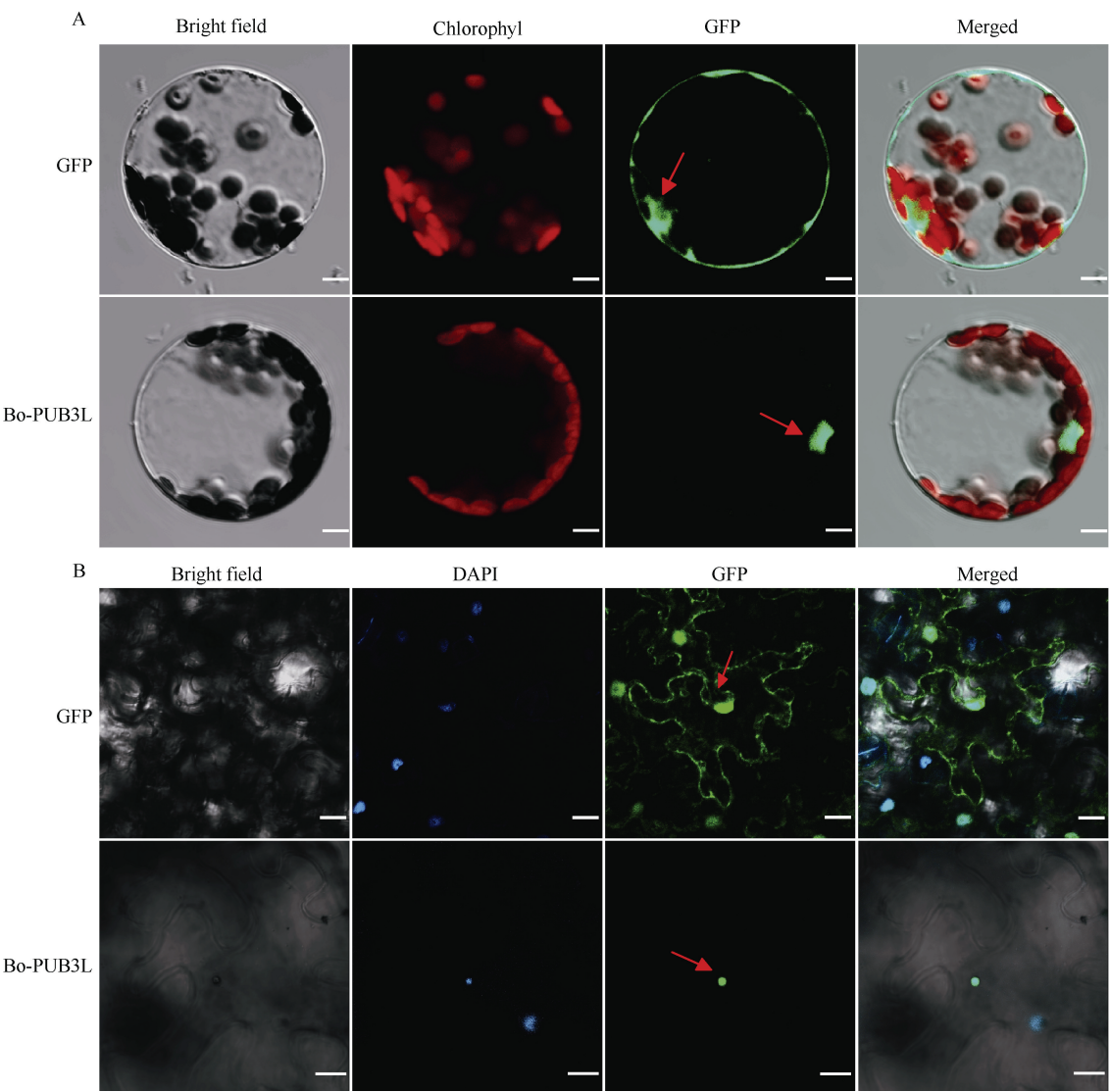
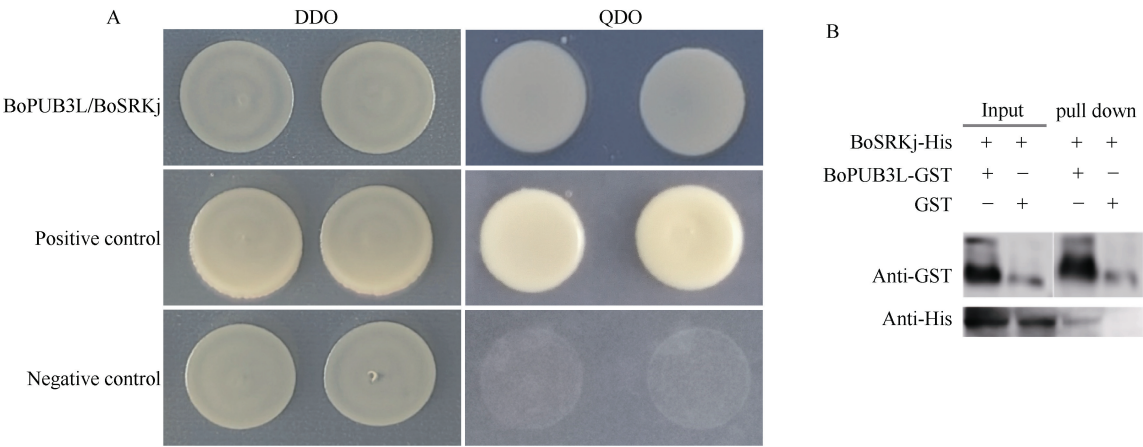


图 9 *BoPUB3L*-GFP 融合蛋白在拟南芥原生质体(A)和烟草叶肉细胞(B)中的亚细胞定位
Fig. 9 Subcellular localization of *BoPUB3L*-GFP in *Arabidopsis* protoplasts (A) and tobacco mesophyll cells (B)
红色箭头所指为细胞核; 标尺为 20 μm。Red arrow: nucleus; scale bar: 20 μm.



(图 10)

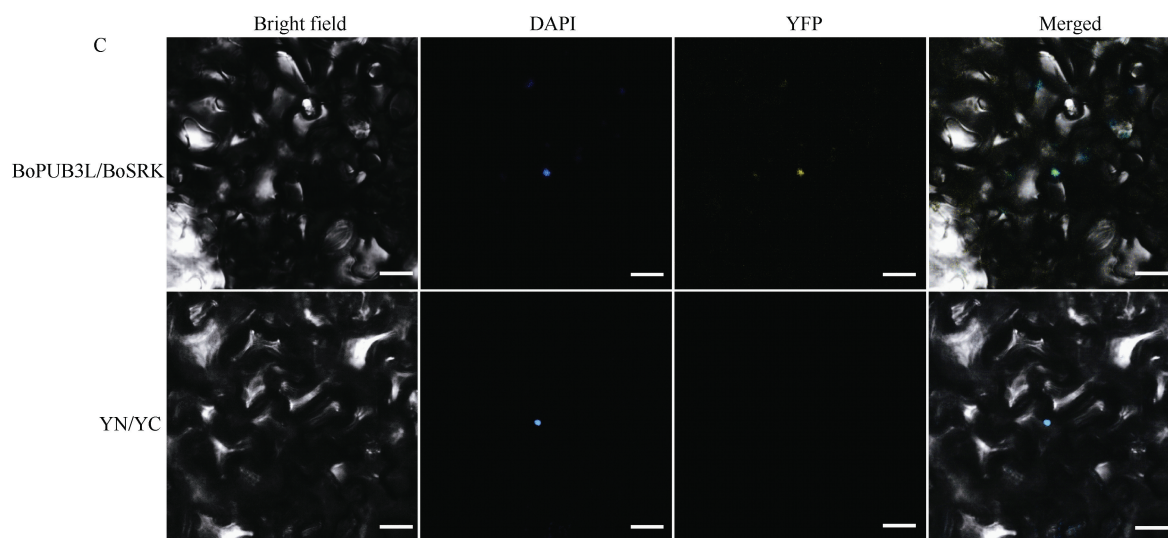


图 10 酵母融合株的相互作用检测(A)、pull down 试验结果(B)和烟草叶肉细胞中的荧光共聚焦检测结果(C)

Fig. 10 Protein-protein interaction assays: yeast two-hybrid (A), pull-down (B), and BiFC in tobacco mesophyll cells (C)

DDO: SD/-Leu/-Trp 酵母二缺培养基; QDO: SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade/酵母四缺培养基。标尺为 20 μm 。

DDO: SD/-Leu/-Trp double dropout medium supplements; QDO: SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade/ quadruple dropout medium supplements. Scale bar: 20 μm .

可在细胞核中观察到明显的黄色荧光(图 10-C), 且与核 DAPI 重合, 而对照组 YN 和 YC 则没有检测到荧光, 表明 BoPUB3L 与 BoSRK 之间存在相互作用。

3 讨论

在十字花科植物中, SI 反应途径始于花粉中的 SCR 特异性识别花柱中的 SRK, 随后 SRK 通过其胞内激酶结构域向下游传递 SI 信号。最初 Gu 等^[11]以酵母双杂交系统在芜菁(*Brassica rapa*)中筛选出 SRK 的下游靶蛋白 ARC1。但人们对 ARC1 是否是 SRK 唯一的下游信号蛋白存在质疑。在琴叶拟南芥中, 通过下调花柱中 *ARC1* 基因表达, 材料的不亲和性被部分地打破^[18]; 在拟南芥中, *ARC1* 直系同源基因作为一个假性遗传因子基因, 仅在转入 *SRK-SCR* 基因后就表现出强自交不亲和性^[21]。在油菜 SI 反应过程中, 植物泛素蛋白介导的泛素化作用尤为重要, 利用蛋白酶体抑制剂对花柱中 26S 蛋白酶体的活性进行抑制, 结果发现花粉萌发和花粉管的生长均能正常进行^[22]。Stone 等^[22]推测可能存在其他泛素蛋白或可替代 ARC1 将 SI 信号传递。当使用比较蛋白质组学分析时, Wang 等^[37]和 Zeng 等^[38]未检测到 SRK 的下游信号蛋白。因此, 本研究基于 SI 甘蓝不同授粉处理后的花柱转录组数据, 成功筛选到一个受自花授粉显著上调表达的泛素家族蛋白成员 BoPUB3L。荧光定量结果表明, 该基因表达模式总

趋势与转录组数据基本一致, 在自花授粉 0~30 min 内快速上调表达, 说明 *BoPUB3L* 基因能响应甘蓝自花授粉后的反应。不同组织定量结果和 GUS 染色结果显示, 该基因在花柱中高表达, 符合自交不亲和反应相关基因 *SRK*、*ARC1* 和 *MLPK* 等需在花柱高表达的条件^[4,8-9,11], 进一步表明, *BoPUB3L* 基因可能响应自交不亲和反应。

植物 PUB 蛋白是一种 E3 泛素化连接酶, 其蛋白家族由多基因形成, 因序列和结构的复杂多样而具有不同的生物学功能, 分为 9 种类型^[25]。本研究中 *BoPUB3L* 基因编码含 737 个氨基酸残基的蛋白质, 含有 1 个 U-box 结构域和 5 个 ARM 结构域, 属于 PUB-ARM 类型蛋白。有研究发现, ARC1 蛋白结构域含有 U-box 结构域和 ARM 结构域, 在油菜中作为自交不亲和信号通路的关键组分, 通过负调控花粉萌发所需的下游因子来执行其功能^[22]。在拟南芥中, *AtPUB17* 基因与 *BoPUB3L* 同源, 但 *AtPUB17* 并没有表现出与 *ARC1* 一样的功能, *AtPUB17* 及其功能性烟草同源物 *ACRE276* 的 E3 泛素连接酶活性是细胞死亡和植物防御所必需的^[39]。Liu 等^[40]在拟南芥中发现与自交不亲和相关的 PUB 蛋白是 PUB8, 它可对 SRK 的转录进行调节。Lian 等^[41]研究发现, 甘蓝 *BoPUB7* 能响应自花授粉后的表达, *BoPUB7* 转基因植物的花粉萌发率下降, 而在 *PUB7* 基因的 T-DNA 突变株系中花粉萌发正常, *BoPUB7* 作为花粉萌发的负调节因子,

可能通过与BoUBA2b相互作用来调节花粉萌发,进而参与甘蓝自交不亲和反应。Hu等^[30]通过生物信息学手段在甘蓝中鉴定出99个PUB蛋白家族成员,提出部分PUB基因极有可能与SI反应相关。谢琴琴等^[42]研究发现,BoPUB9与BoSRK存在相互作用,可能参与甘蓝自交不亲和反应。本研究中通过转录组数据得到的*BoPUB3L*基因编码蛋白质具备典型的PUB-ARM蛋白特征,它与ARC1同属于PUB-ARM蛋白,说明PUB3L作为SI相关基因极可能参与自交不亲和反应。为确定BoPUB3L是否与BoSRK相互作用,本研究进行了酵母双杂交、pull down和BiFC试验,结果表明,BoPUB3L与BoSRK之间存在相互作用,进一步验证了*BoPUB3L*可能参与自交不亲和反应。亚细胞定位试验表明,BoPUB3L蛋白定位在细胞核中,与ARC1定位情况不同^[22],表明BoPUB3L和ARC1均是泛素蛋白,但它们参与泛素化的机制可能不同。

此外,PUB蛋白中U-box结构域对植物的非生物胁迫表现出重要作用^[43]。CHIP蛋白的E3活性依赖于C末端的U-box结构域,在拟南芥中,*AtCHIP*基因的表达因高温、强光等多种环境胁迫诱导而上调,从而提高了植物在逆境条件下的适应力^[43]。*AtPUB46*和*AtPUB48*是一对可以编码泛素连接酶(E3s)的旁系同源基因,在植物逆境响应中起作用^[44]。*GmPUB8*基因的异质表达降低了拟南芥对于干旱胁迫的耐受性^[28]。本研究发现,*BoPUB3L*基因启动子中含有多种与胁迫反应、激素反应、代谢调节、分生组织表达相关的顺式作用元件,表明*BoPUB3L*除可能参与自交不亲和反应外,还可能参与调控多种复杂的生物反应过程。

4 结论

本研究从甘蓝不同授粉时间花柱中筛选到差异表达基因*BoPUB3L*,该基因在花柱中的表达量最高,在萼片、花瓣、花蕾中的表达量次之。BoPUB3L蛋白大小约81.27 kD,定位在细胞核中。酵母双杂交、pull down和BiFC试验结果表明,BoPUB3L蛋白与SRK胞内激酶域发生相互作用。

References

- [1] Hamamura Y, Nagahara S, Higashiyama T. Double fertilization on the move. *Curr Opin Plant Biol*, 2012, 15: 70–77.
- [2] 王玉奎, 白晓璟, 廉小平, 等. 甘蓝 *BoSPx* 的克隆与表达分析. *中国农业科学*, 2018, 51: 4328–4338.

- Wang Y K, Bai X J, Lian X P, et al. Cloning and expression analysis of *BoSPx* in *Brassica oleracea*. *Sci Agric Sin*, 2018, 51: 4328–4338 (in Chinese with English abstract).
- [3] Schopfer C R, Nasrallah M E, Nasrallah J B. The male determinant of self-incompatibility in *Brassica*. *Science*, 1999, 286: 1697–1700.
- [4] Stein J C, Howlett B, Boyes D C, et al. Molecular cloning of a putative receptor protein kinase gene encoded at the self-incompatibility locus of *Brassica oleracea*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88: 8816–8820.
- [5] Bower M S, Matias D D, Fernandes-Carvalho E, et al. Two members of the thioredoxin-h family interact with the kinase domain of a *Brassica* S locus receptor kinase. *Plant Cell*, 1996, 8: 1641–1650.
- [6] Rea A C, Nasrallah J B. Self-incompatibility systems: barriers to self-fertilization in flowering plants. *Int J Dev Biol*, 2008, 52: 627–636.
- [7] Rea A C, Liu P, Nasrallah J B. A transgenic self-incompatible *Arabidopsis thaliana* model for evolutionary and mechanistic studies of crucifer self-incompatibility. *J Exp Bot*, 2010, 61: 1897–1906.
- [8] Murase K, Shiba H, Iwano M, et al. A membrane-anchored protein kinase involved in *Brassica* self-incompatibility signaling. *Science*, 2004, 303: 1516–1519.
- [9] Kakita M, Shimosato H, Murase K, et al. Direct interaction between S-locus receptor kinase and M-locus protein kinase involved in *Brassica* self-incompatibility signaling. *Plant Biotechnol*, 2007, 24: 185–190.
- [10] Kakita M, Murase K, Iwano M, et al. Two distinct forms of M-locus protein kinase localize to the plasma membrane and interact directly with S-locus receptor kinase to transduce self-incompatibility signaling in *Brassica rapa*. *Plant Cell*, 2007, 19: 3961–3973.
- [11] Gu T, Mazzurco M, Sulaman W, et al. Binding of an arm repeat protein to the kinase domain of the S-locus receptor kinase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 382–387.
- [12] Samuel M A, Mudgil Y, Salt J N, et al. Interactions between the S-domain receptor kinases and AtPUB-ARM E3 ubiquitin ligases suggest a conserved signaling pathway in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 2008, 147: 2084–2095.
- [13] Samuel M A, Chong Y T, Haasen K E, et al. Cellular pathways regulating responses to compatible and self-incompatible pollen in *Brassica* and *Arabidopsis* stigmas intersect at Exo70A1, a putative component of the exocyst complex. *Plant Cell*, 2009, 21: 2655–2671.
- [14] Ikeda S, Nasrallah J B, Dixit R, et al. An aquaporin-like gene required for the *Brassica* self-incompatibility response. *Science*, 1997, 276: 1564–1566.
- [15] Samuel M A, Yee D, Haasen K E, et al. ‘self’ pollen rejection through the intersection of two cellular pathways in the Brassicaceae: self-incompatibility and the compatible pollen response/self-incompatibility in flowering plants. Berlin, Heidelberg: Springer, 2008. pp 173–191.
- [16] 朱利泉, 周燕. 甘蓝自交不亲和性信号传导元件与传导过程. *作物学报*, 2015, 41: 1–14.
- Zhu L Q, Zhou Y. Protein elements and signal transduction

- process of self-incompatibility in *Brassica oleracea*. *Acta Agron Sin*, 2015, 41: 1–14 (in Chinese with English abstract).
- [17] Stone S L, Arnoldo M, Goring D R. A breakdown of *Brassica* self-incompatibility in *ARC1* antisense transgenic plants. *Science*, 1999, 286: 1729–1731.
- [18] Indriolo E, Tharmapalan P, Wright S I, et al. The *ARC1* E3 ligase gene is frequently deleted in self-compatible Brassicaceae species and has a conserved role in *Arabidopsis lyrata* self-pollen rejection. *Plant Cell*, 2012, 24: 4607–4620.
- [19] Nasrallah M E, Liu P, Nasrallah J B. Generation of self-incompatible *Arabidopsis thaliana* by transfer of two S locus genes from *A. lyrata*. *Science*, 2002, 297: 247–249.
- [20] Nasrallah M E, Liu P, Sherman-Broyles S, et al. Natural variation in expression of self-incompatibility in *Arabidopsis thaliana*: implications for the evolution of selfing. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101: 16070–16074.
- [21] Nasrallah J B, Nasrallah M E. Robust self-incompatibility in the absence of a functional *ARC1* gene in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, 2014, 26: 3838–3841.
- [22] Stone S L, Anderson E M, Mullen R T, et al. *ARC1* is an E3 ubiquitin ligase and promotes the ubiquitination of proteins during the rejection of self-incompatible *Brassica pollen*. *Plant Cell*, 2003, 15: 885–898.
- [23] VanDemark A P, Hill C P. Structural basis of ubiquitylation. *Curr Opin Struct Biol*, 2002, 12: 822–830.
- [24] Hatakeyama S, Yada M, Matsumoto M, et al. U box proteins as a new family of ubiquitin-protein ligases. *J Biol Chem*, 2001, 276: 33111–33120.
- [25] 戴树元, 李魏, 任佐华, 等. 植物 U-box 蛋白在植物先天免疫反应中的作用及其研究进展. *中国农学通报*, 2016, 32(14): 56–61.
- Dai S Y, Li W, Ren Z H, et al. Function of plant U-box protein in plant innate immunity and its research progress. *Chin Agric Sci Bull*, 2016, 32(14): 56–61 (in Chinese with English abstract).
- [26] Wiborg J, O'Shea C, Skriver K. Biochemical function of typical and variant *Arabidopsis thaliana* U-box E3 ubiquitin-protein ligases. *Biochem J*, 2008, 413: 447–457.
- [27] Zeng L R, Park C H, Venu R C, et al. Classification, expression pattern, and E3 ligase activity assay of rice U-box-containing proteins. *Mol Plant*, 2008, 1: 800–815.
- [28] Wang N, Liu Y P, Cong Y H, et al. Genome-wide identification of soybean U-box E3 ubiquitin ligases and roles of GmPUB8 in negative regulation of drought stress response in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol*, 2016, 57: 1189–1209.
- [29] Hu H G, Dong C, Sun D Q, et al. Genome-wide identification and analysis of U-box E3 ubiquitin-protein ligase gene family in banana. *Int J Mol Sci*, 2018, 19: 3874.
- [30] Hu D K, Xie Q Q, Liu Q Y, et al. Genome-wide distribution, expression and function analysis of the U-box gene family in *Brassica oleracea* L. *Genes*, 2019, 10: 1000.
- [31] Liu Z, Wang L, Li Y M, et al. Genome-wide analysis of the U-box E3 ligases gene family in potato (*Solanum tuberosum* L.) and overexpress StPUB25 enhance drought tolerance in transgenic *Arabidopsis*. *BMC Genom*, 2024, 25: 10.
- [32] Li W, Ahn I P, Ning Y S, et al. The U-Box/ARM E3 ligase PUB13 regulates cell death, defense, and flowering time in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 2012, 159: 239–250.
- [33] Liu J L, Li W, Ning Y S, et al. The U-Box E3 ligase SPL11/PUB13 is a convergence point of defense and flowering signaling in plants. *Plant Physiol*, 2012, 160: 28–37.
- [34] González-Lamothe R, Tsitsigiannis D I, Ludwig A A, et al. The U-box protein *CMPG1* is required for efficient activation of defense mechanisms triggered by multiple resistance genes in tobacco and tomato. *Plant Cell*, 2006, 18: 1067–1083.
- [35] Seo D H, Lee A, Yu S G, et al. OsPUB41, a U-box E3 ubiquitin ligase, acts as a negative regulator of drought stress response in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Mol Biol*, 2021, 106: 463–477.
- [36] Abel S, Theologis A. Transient transformation of *Arabidopsis* leaf protoplasts: a versatile experimental system to study gene expression. *Plant J*, 1994, 5: 421–427.
- [37] Wang L, Peng H, Ge T, et al. Identification of differentially accumulating pistil proteins associated with self-incompatibility of non-heading Chinese cabbage. *Plant Biol*, 2014, 16: 49–57.
- [38] Zeng J, Gao Q G, Shi S M, et al. Dissecting pistil responses to incompatible and compatible pollen in self-incompatibility *Brassica oleracea* using comparative proteomics. *Protein J*, 2017, 36: 123–137.
- [39] Yang C W, González-Lamothe R, Ewan R A, et al. The E3 ubiquitin ligase activity of *Arabidopsis* PLANT U-BOX17 and its functional tobacco homolog ACRE276 are required for cell death and defense. *Plant Cell*, 2006, 18: 1084–1098.
- [40] Liu P, Sherman-Broyles S, Nasrallah M E, et al. A cryptic modifier causing transient self-incompatibility in *Arabidopsis thaliana*. *Curr Biol*, 2007, 17: 734–740.
- [41] Lian X P, Zeng J, Zhang H C, et al. PUB7 a pollen expression gene induced by self-pollination, negatively regulates pollen germination. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2019, 51: 548–551.
- [42] 谢琴琴, 左同鸿, 胡煜科, 等. 甘蓝自交不亲和相关基因 *BoPUB9* 的克隆及表达分析. *作物学报*, 2022, 48: 108–120.
- Xie Q Q, Zuo T H, Hu D K, et al. Molecular cloning and expression analysis of *BoPUB9* in self-incompatibility *Brassica oleracea*. *Acta Agron Sin*, 2022, 48: 108–120 (in Chinese with English abstract).
- [43] 鲁玉清, 关宁, 李聪. 拟南芥 U-box 蛋白的研究进展. *分子植物育种*, 2008, 6: 941–948.
- Lu Y Q, Guan N, Li C. Advance in the study on U-box proteins of *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant Breed*, 2008, 6: 941–948 (in Chinese with English abstract).
- [44] Adler G, Konrad Z, Zamir L, et al. The *Arabidopsis* paralogs, PUB46 and PUB48, encoding U-box E3 ubiquitin ligases, are essential for plant response to drought stress. *BMC Plant Biol*, 2017, 17: 8.