

doi:10.7668/hbxb.2014.06.011

# 毛尖紫萼藓类泛素蛋白基因的克隆与表达分析

张梅娟<sup>1</sup>,沙伟<sup>1,2</sup>,刘博<sup>2</sup>,安洪雪<sup>2</sup>,宋璐<sup>2</sup>

(1. 东北林业大学 生命科学院,黑龙江 哈尔滨 150040;2. 齐齐哈尔大学 生命科学与农林学院,黑龙江 齐齐哈尔 161006)

**摘要:**为研究类泛素蛋白基因在苔藓植物中的生物学功能,从毛尖紫萼藓干旱 cDNA 文库中获得了类泛素蛋白基因 cDNA 全长序列,命名为 *Gp-UBL5*。该基因 cDNA 全长 471 bp,包含 1 个 222 bp 的完整开放阅读框,编码 73 个氨基酸组成的蛋白。生物信息学分析表明,*Gp-UBL5* 基因编码蛋白分子质量为 8.525 kDa,等电点为 7.84,为稳定型蛋白。进化分析显示,该编码蛋白与二穗短柄草、大麦等类泛素蛋白具有较高一致性,达 96%~99%。实时荧光定量 PCR 结果表明,*Gp-UBL5* 基因在复水和快速干旱的各个时期均有表达,推测该基因可能在毛尖紫萼藓的抗旱机制中发挥作用。

**关键词:**毛尖紫萼藓;类泛素蛋白基因(*Gp-UBL5*);基因克隆;实时荧光定量 PCR

中图分类号:Q78 文献标识码:A 文章编号:1000-7091(2014)06-0058-05

## Cloning and Expression Analysis of Ubiquitin-like Protein Gene in *Grimmia pilifera*

ZHANG Mei-juan<sup>1</sup>, SHA Wei<sup>1,2</sup>, LIU Bo<sup>2</sup>, AN Hong-xue<sup>2</sup>, SONG Lu<sup>2</sup>

(1. College of Life Science, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China;

2. College of Life Science and Agriculture and Forestry, Qiqihar University, Qiqihar 161006, China)

**Abstract:** In order to study biological function of ubiquitin-like protein (UBL) in bryophytes, A full-length cDNA sequence of ubiquitin-like protein (UBL) gene was obtained from *Grimmia pilifera* cDNA library, named *Gp-UBL5*. The full length of *Gp-UBL5* was 471 bp, contained a 222 bp open reading frame (ORF), and encoding a protein with 73 amino acids. Bioinformatics analysis suggested that this protein was a stable protein with a calculated molecular mass of 8.525 kDa and a theoretical pI of 7.84. Phylogenetic analysis indicated that *Gp-UBL5* protein had 96% to 99% identities with other UBL5 proteins from different species, such as *Brachypodium distachyon* and *Hordeum vulgare*. The qRT-PCR result showed that *Gp-UBL5* gene could express in rehydration and dehydration. It was speculated that the gene might play an important role in response to drought. These results provided important information for the further study of functional verification.

**Key words:** *Grimmia pilifera*; Ubiquitin-like protein gene (*Gp-UBL5*); Gene clone; Real-time qPCR

自然界中,蛋白质是生命的物质基础,没有蛋白质就没有生命。生物体内存在成千上万的蛋白,细胞可通过调控蛋白的合成和降解来完成生物体正常的生长过程。蛋白合成的转录和翻译过程一直是生物学领域研究的热点,而蛋白的降解直到近几十年才引起重视<sup>[1]</sup>。细胞内蛋白的降解是一个复杂的过程,而在此过程中扮演重要角色的一个成员就是泛素(Ubiquitin)。泛素是真核生物中广泛存在的一类具有 76 个氨基酸残基的高度保守的小蛋白,在动植物、藻类和酵母中仅有 1~3 个氨基酸差异,主要功

能是标记生物体内需要分解掉的蛋白质,使其被水解,避免异常蛋白过多积累对生物体造成伤害<sup>[2-4]</sup>。泛素-26S 蛋白酶体降解途径是已知的最重要的蛋白质降解途径<sup>[1,5]</sup>,细胞内 80%~90% 的蛋白通过此途径降解掉<sup>[1,6]</sup>。研究发现,在干旱、高温、寒冷及重金属胁迫等逆境下,各种异常蛋白急剧增加,而泛素-蛋白酶体系统与这些蛋白的降解关系密切<sup>[7-8]</sup>。

随着对泛素研究的深入,一些类泛素蛋白(Ubiquitin-like protein, UBL)也相继被发现,如 1 型

收稿日期:2014-09-09

基金项目:国家自然科学基金项目(31070180;31270254);黑龙江省自然科学基金重点项目(ZD201408)

作者简介:张梅娟(1982-),女,山东海阳人,在读博士,主要从事苔藓植物分子生物学方面的研究。

通讯作者:沙伟(1963-),女,黑龙江齐齐哈尔人,教授,博士,博士生导师,主要从事苔藓植物遗传学和分子生物学研究。

泛素相似修饰物 (Ubiquitin-like modifiers, UBLs), 2 型 UBLs 和 UBL5<sup>[9]</sup>。UBL5 最早发现于视觉疾病中, 该基因编码一种 73 个氨基酸组成的蛋白, 分子质量为 8.5 kDa, 等电点为 8.6<sup>[10]</sup>。虽然其氨基酸序列与泛素的相似性较差, 低于 25%, 但有着与泛素和类泛素蛋白相同的三维核心结构- $\beta$  抓握折叠<sup>[11-13]</sup>。UBL5 的 C 端有双酪氨酸花式, 不同于泛素和其他类泛素蛋白的保守的双甘氨酸花式。目前已在许多物种中发现了 UBL5 基因的同源基因, 被命名为 BEACON 或 HUB1<sup>[9]</sup>。有研究提出, UBL5 具有单泛素化 H2B、参与 mRNA 前体剪接及调节能量代谢等生物功能<sup>[9, 14-15]</sup>, 但具体功能还不完全清楚。UBL5 是否与植物的抗旱性有关不得而知, 目前也未见任何报道。因此, 从苔藓植物毛尖紫萼藓 (*Grimmia pilifera*) 中克隆类泛素蛋白基因 UBL5, 通过分子生物学技术初步研究其与抗旱性的关系具有重要意义。

毛尖紫萼藓属紫萼藓科 (Grimmiaceae) 紫萼藓属 (*Grimmia*), 为典型的小型耐旱藓类植物, 体内蕴藏着巨大的耐旱基因资源。齐齐哈尔大学遗传学实验室在前期构建的毛尖紫萼藓干旱 cDNA 文库中发现一个 EST 序列 (GenBank 登录号: GR307993.1), 与类泛素蛋白基因有较高的同源性。本研究利用 PCR 技术从毛尖紫萼藓中克隆了类泛素蛋白基因的 cDNA 全长序列, 进行了生物信息学分析, 并对其在复水和快速干旱处理下的表达特性进行分析, 以期推测其功能, 为进一步研究毛尖紫萼藓的耐旱机制提供理论依据, 并为植物抗逆境胁迫育种提供新的基因资源。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验材料及处理方法

试验所用材料为 2009 年采自黑龙江省五大连池风景区石龙的毛尖紫萼藓。

将保存于标本馆的毛尖紫萼藓材料取出, 分两部分处理: 一部分提取总 RNA, 用于 *Gp-UBL5* 基因的克隆; 另一部分按照沙伟等<sup>[16]</sup>的方法进行处理, 并提取总 RNA, 用于实时荧光定量 PCR 分析。总 RNA 提取方法为改良的 SDS 法<sup>[16]</sup>, 根据 Invitrogen 公司的 M-MLV 逆转录酶说明, 取总 RNA 2  $\mu$ g, 以 Oligo(dT)<sub>18</sub> 为引物进行逆转录, 合成 cDNA 第一链。

### 1.2 试验方法

1.2.1 *Gp-UBL5* 基因克隆 从毛尖紫萼藓干旱 cDNA 文库中获得的与类泛素蛋白基因有较高同源性的 EST 序列, 含有完整的开放阅读框 (ORF), 故

设计特异引物 *Gp-UBL5-F* (5'-TGTCGCTGCTATCTCGTTCC-3') 和 *Gp-UBL5-R* (5'-CTCACAGGCAGAGTAAGGCTAG-3'), 利用 PCR 技术扩增毛尖紫萼藓类泛素蛋白基因编码区, 命名为 *Gp-UBL5*。PCR 扩增条件如下: 预变性 94  $^{\circ}$ C 5 min; 94  $^{\circ}$ C 30 s, 55  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 1 min, 35 个循环; 72  $^{\circ}$ C 10 min。扩增的目的片段按照上海生工公司的胶回收试剂盒说明进行回收, 连接到 pMD18-T 克隆载体上 (TaKaRa)。转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 挑取阳性菌落, 经 PCR 鉴定送北京华大基因测序。

1.2.2 *Gp-UBL5* 基因的生物信息学分析 利用 ProtParam、ProtScale、SignalP 4.1、PSORT Prediction 和 SOPMA 等一系列软件工具对 *Gp-UBL5* 基因编码的氨基酸序列进行一级结构和二级结构的预测; 采用 NCBI 中的 BlastX 和 Conserved Domains 对蛋白序列进行同源性比对和结构域预测; 采用 MEGA 5.0 软件构建系统进化树。

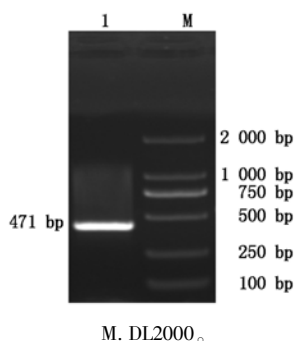
1.2.3 *Gp-UBL5* 基因的实时荧光定量 PCR 分析 根据 *Gp-UBL5* 基因全长 cDNA 序列, 按照荧光定量 PCR 引物设计要求设计引物 *Gp-UBL5-qF* (5'-TAACGACAGGTTGGGAAAGAAG-3') 和 *Gp-UBL5-qR* (5'-ACCATCGTGAATTTTCGTAGTCC-3')。同时以毛尖紫萼藓 18S rRNA 为内参基因, 引物为 18S-F (5'-TTGACGGAAGGGCACCA-3') 和 18S-R (5'-ACCACCACCCATAGAATCAAGAA-3')。

荧光定量 PCR 反应按照 SsoFast™ EvaGreen Super mix 试剂盒说明书提供的方法进行。在 PCR 管中依次加入 10  $\mu$ L SsoFast EvaGreen Supermix (2 $\times$ ), 0.8  $\mu$ L (10  $\mu$ mol/L) 上游引物, 0.8  $\mu$ L (10  $\mu$ mol/L) 下游引物, 2  $\mu$ L 稀释的 cDNA, 无菌水补至 20  $\mu$ L。扩增反应于 CFX-96 实时荧光定量 PCR 仪 (Bio-Rad) 上进行。扩增条件为: 95  $^{\circ}$ C 20 s; 95  $^{\circ}$ C 10 s, 58  $^{\circ}$ C 20 s, 72  $^{\circ}$ C 30 s, 40 个循环; 每个循环结束后采集荧光信号, 溶解曲线分析温度为 65  $^{\circ}$ C 到 95  $^{\circ}$ C, 每升高 0.5  $^{\circ}$ C 保温 5 s。采用 2<sup>- $\Delta\Delta$ CT</sup> 法计算 *Gp-UBL5* 基因的相对表达量。每个样品重复 3 次, 并做阴性对照。

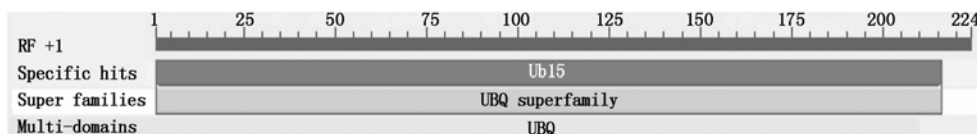
## 2 结果与分析

### 2.1 *Gp-UBL5* 基因的克隆及序列分析

对毛尖紫萼藓干旱 cDNA 文库进行测序, 获得 1 条与类泛素蛋白基因有较高同源性的 EST 序列。根据该序列设计特异引物进行克隆、测序, 获得 1 条 471 bp 的全长 cDNA 序列 (图 1), 含有 1 个 222 bp 的开放阅读框, 编码 73 个氨基酸。5' 非编码区长为 143 bp, 3' 非编码区长为 106 bp (图 2)。

图1 *Gp-UBL5* 基因 PCR 扩增Fig. 1 PCR amplification of *Gp-UBL5* gene

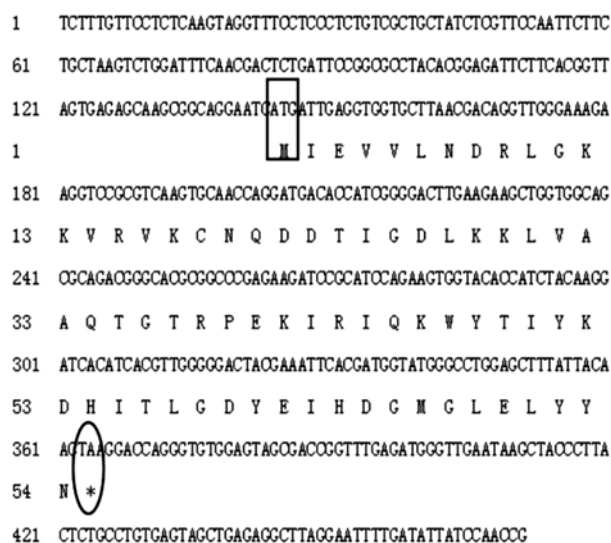
ProtParam 软件预测分析发现, *Gp-UBL5* 基因编码的蛋白分子量是 8.525 kDa, 等电点 pI 为 7.84; 正电荷氨基酸( Arg + Lys) 总数为 12, 负电荷氨基酸( Asp + Glu) 总数为 11; 不稳定系数为 20.72, 属稳定型蛋白( < 40 蛋白稳定), 脂肪系数为 97.40。用 SignalP 4.1 和 ProtScale 软件预测 *Gp-UBL5* 蛋白无信号肽且为亲水性蛋白。PSORT Prediction 软件预测该蛋白定位于细胞质和细胞核。通过 Conserved Domains 对该蛋白进行预测, 发现其具有典型的 UBQ 结构域, 属于泛素超家族(图 3)。SOPMA 软件

图3 *Gp-UBL5* 蛋白功能域预测Fig. 3 Domains prediction of *Gp-UBL5* protein

## 2.2 *Gp-UBL5* 蛋白的同源序列比对和系统进化树分析

将 *Gp-UBL5* 基因在 NCBI 中进行 BlastX 比对, 发现该基因编码的氨基酸序列与多种其他植物的 UBL5 蛋白序列具有较高相似性。选取 12 种其他植物的 UBL5 蛋白与 *Gp-UBL5* 蛋白进行多序列比对(图 4), 结果显示: *Gp-UBL5* 蛋白与二穗短柄草( *Brachypodium distachyon*) 序列的一致性最高, 达到 99%; 与小立碗藓( *Physcomitrella patens*)、可可

进行蛋白质二级结构预测表明, 该蛋白由  $\alpha$ -螺旋、 $\beta$ -折叠和无规则卷曲组成, 其中  $\alpha$ -螺旋占 19.18%、 $\beta$ -折叠占 39.73%、无规则卷曲占 41.09%。



方框代表起始密码子; 圆圈代表终止密码子。

Frame. Initiator codon; Round. Terminator codon.

图2 *Gp-UBL5* 基因核苷酸及编码蛋白的氨基酸序列Fig. 2 Nucleotide and amino acid sequence of *Gp-UBL5*

琴叶拟南芥 *Arabidopsis lyrata*  
拟南芥 *Arabidopsis thaliana*  
二穗短柄草 *Brachypodium distachyon*  
野茶树 *Camellia sinensis*  
黄瓜 *Cucumis sativus*  
毛尖紫萼藓 *Grimmia pilifera*  
大麦 *Hordeum vulgare*  
麻风树 *Jatropha curcas*  
蒺藜苜蓿 *Medicago truncatula*  
小立碗藓 *Physcomitrella patens*  
可可 *Theobroma cacao*  
芜萍 *Wolffia australiana*  
玉米 *Zea mays*

图4 *Gp-UBL5* 与其他植物的类泛素蛋白的多序列比对Fig. 4 Multiple alignment of *Gp-UBL5* protein and proteins of other plants

为进一步研究植物类泛素蛋白的进化关系, 将这 13 种植物的 UBL5 蛋白构建系统进化树进行分

( *Theobroma cacao*)、芜萍( *Wolffia australiana*)、琴叶拟南芥( *Arabidopsis lyrata*)、黄瓜( *Cucumis sativus*)、拟南芥( *Arabidopsis thaliana*)、玉米( *Zea mays*)、大麦( *Hordeum vulgare*)、麻风树( *Jatropha curcas*)、野茶树( *Camellia sinensis*) 和蒺藜苜蓿( *Medicago truncatula*) 一致性也为 96% ~ 97%。 *Gp-UBL5* 与其他植物的类泛素蛋白在蛋白质水平上表现较高的相似性, 说明类泛素蛋白基因家族在植物中具有高度的保守性。

析。从图 5 可以看出, 以上物种聚为两类, 毛尖紫萼藓与二穗短柄草、小立碗藓、可可、芜萍、琴叶拟南

芥、黄瓜、拟南芥和玉米聚为一类,说明 UBL5 蛋白在这些物种的进化过程中相当保守;大麦、麻风树、野茶树和蒺藜苜蓿聚为一类,推测 UBL5 蛋白在不同的物种中是由不同的分子进化途径产生的。

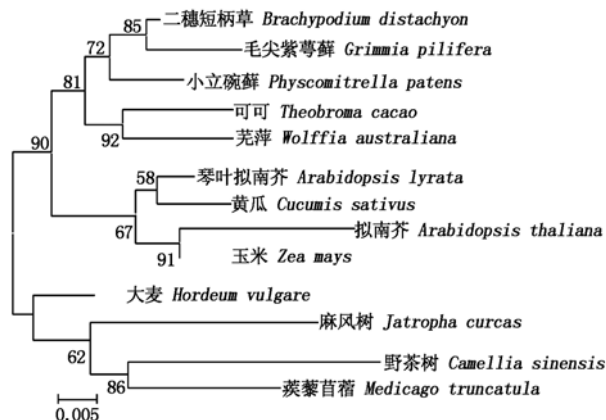


图 5 Gp-UBL5 与其他植物 UBL5 蛋白的系统进化树分析

Fig. 5 Phylogenetic tree analysis of Gp-UBL5 and other known UBL5 proteins

### 2.3 Gp-UBL5 基因的表达分析

利用 qRT-PCR 分析发现,毛尖紫萼藓 *Gp-UBL5* 基因在不同复水和干旱时间中有不同的表达模式。在复水和快速干旱的各个时期,*Gp-UBL5* 基因均有表达,但在不同时间下有所差异。复水 1, 3, 12 h 以及 48 ~ 120 h 时,表达量相对于 CK (复水 144 h, 表达量定义为 1) 是上调的;复水 6, 24 h 时,表达量相对于 CK 是下调的,表达受到抑制。在复水过程中 (图 6-A), *Gp-UBL5* 基因的表达量呈现高-低-高-低的总体趋势,复水 1 h 的表达量最高,为 CK 的 27.47 倍,随着复水时间的延长,表达量逐渐降低,复水 24 h 达到了最低点,48, 72, 120 h 时基因的表

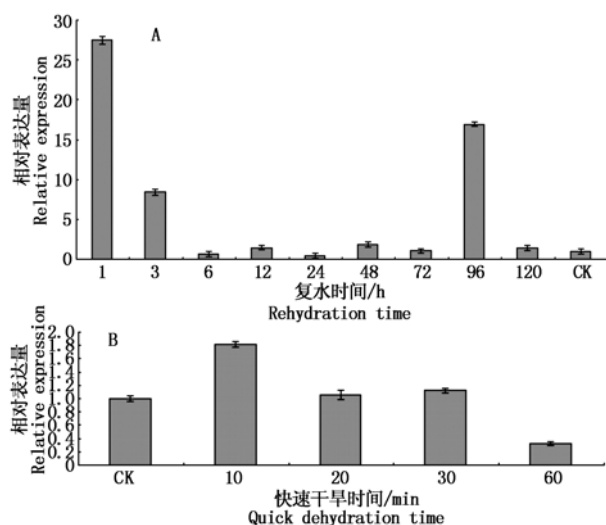


图 6 *Gp-UBL5* 基因在复水 (A) 和快速干旱 (B) 后的相对表达量

Fig. 6 The relative expression of *Gp-UBL5* under rehydration (A) and quick dehydration (B)

达量与 CK 相当,但在复水 96 h 时表达量大幅度提高,为 CK 的 16.91 倍。在硅胶快速干旱处理过程中 (图 6-B), 干旱 10 min 时 *Gp-UBL* 基因的表达量升高,当干旱 20, 30 min 时,表达量与 CK 相当,但在干旱 1 h 时表达量下调,说明表达受到抑制。

## 3 讨论

类泛素蛋白 UBL5 广泛分布于真核生物中,在系统发生中非常保守。目前,植物中有关该基因功能研究的报道较少,且多是有关拟南芥的研究,主要涉及根和叶的生长、开花诱导、种子休眠和抗病性等方面<sup>[17-21]</sup>,还未见在植物耐旱性方面的报道。所以从具有耐旱性的植物中克隆类泛素蛋白基因,进一步研究这一类基因在逆境胁迫下的功能显得非常重要。本研究从耐旱植物毛尖紫萼藓中分离克隆得到类泛素蛋白基因 *Gp-UBL5*。用 ProtParam 软件预测,结果显示 *Gp-UBL5* 基因编码的蛋白分子量为 8.525 kDa,与视觉疾病中 UBL5 基因的分子量相近<sup>[10]</sup>;含有 1 个保守的 UBQ 结构域,属于泛素超家族成员,这与前人的观点相一致<sup>[11-13]</sup>。

泛素是一种逆境响应蛋白,许多逆境条件 (如干旱) 都会诱导泛素相关基因的表达,使其发挥作用<sup>[1]</sup>。Kiyosue 等<sup>[22]</sup>从拟南芥中克隆得到类似于泛素的 *ERD* 基因,在干旱条件下被诱导表达。Ko 等<sup>[23]</sup>从拟南芥中鉴定出泛素连接酶基因 *XERICO*,在干旱胁迫下,该基因过表达植株中 ABA 含量明显升高,说明 *XERICO* 基因可能通过介导 ABA 来正调控植物响应干旱胁迫。宁约瑟等<sup>[24]</sup>对鉴定出的泛素连接酶 E3 (SCF 复合体、U-box 及 RING-finger 等类型) 参与植物的干旱胁迫调控过程进行了综述。UBL 修饰途径与泛素化修饰途径类似,参与 UBL 修饰途径的酶虽然各不相同,但在进化上都与参与泛素化途径的酶具有相关性<sup>[8]</sup>。因此,初步推断 UBL 修饰途径相关酶类在干旱胁迫发生时也会参与植物的胁迫调控过程。苔藓植物中,有关泛素在逆境响应方面的研究甚少。有报道指出<sup>[1]</sup>,山墙藓 (*Tortula ruralis*) 中有 1 种 1.3 kb 的泛素转录产物,在缓慢和快速失水时都能增加,但再水化时只在快速失水的组织中增加,此现象与其他复水因子的转录产物积累状况恰恰相反,说明快速失水对山墙藓细胞的伤害较严重。Chen 等<sup>[25]</sup>在山墙藓中克隆得到泛素 26S 蛋白酶体的亚基基因 *TrRpt2*, RNA 印迹杂交分析表明,该基因在干旱和复水过程中均能连续表达。沙伟等<sup>[26]</sup>从毛尖紫萼藓中克隆得到泛素延伸蛋白基因,进行了序列分析,为进一步研究在苔藓植物中

的抗非生物胁迫方面的功能提供了理论依据。本研究中,复水和快速干旱处理后,*Gp-UBL5* 基因的表达量发生明显变化,既有表达量大幅度提高的阶段,也有表达被抑制的阶段,可能是该基因在清除一些异常蛋白对植物体进行修复,因此,推测 *Gp-UBL5* 基因可能参与了毛尖紫萼藓抗旱过程并发挥调控作用。

为进一步研究 *Gp-UBL5* 基因与毛尖紫萼藓抗旱反应的关系及其参与的调控机制,现已将其遗传转化模式植物烟草,并通过转转基因烟草进行验证,来推断该基因是否能提高其耐旱能力具有重要的意义。

#### 参考文献:

- [1] 郭启芳. 改善泛素系统提高植物逆境适应性研究[D]. 泰安:山东农业大学,2007.
- [2] Jones A M, Vierstra R D, Daniels S M, et al. The role of separate molecular domains in the structure of phytochrome from etiolated *Avena sativa* L. [J]. *Planta*, 1985, 164(4):501-506.
- [3] Callis J, Vierstra R D. Ubiquitin and ubiquitin genes in higher plants [J]. *Plant Molecular and Cell Biology*, 1989, 6:1-30.
- [4] Callis J, Carpenter T, Sun C W, et al. Structure and evolution of genes encoding polyubiquitin and ubiquitin-like proteins in *Arabidopsis thaliana* ecotype Columbia [J]. *Genetics*, 1995, 139(2):921-939.
- [5] 王高鸿, 黄久常. 蛋白质的选择性降解[J]. *生命科学*, 1999, 11(1):24-26.
- [6] 吴慧娟, 张志刚. 泛素-蛋白酶体途径及意义[J]. *国际病理科学与临床杂志*, 2006, 26(1):7-10.
- [7] Belknap W R, Garbarino J E. The role of ubiquitin in plant senescence and stress responses [J]. *Trends in Plant Science*, 1996, 1(10):331-335.
- [8] Dreher K, Callis J. Ubiquitin, hormones and biotic stress in plants [J]. *Annals of Botany*, 2007, 99:787-822.
- [9] 商书交, 周燕, 姜兴亮, 等. *UBL5* 基因的结构与功能研究[J]. *北京林业大学学报*, 2010, 32(5):172-176.
- [10] Friedmann J S, Koop B F, Raymond V, et al. Isolation of a ubiquitin-like (*UBL5*) gene from a screen identifying highly expressed and conserved iris genes [J]. *Genomics*, 2001, 71(2):252-255.
- [11] Ramelot T A, Cort J R, Yee A A, et al. Solution structure of the yeast ubiquitin-like modifier protein Hub1 [J]. *Journal of Structural and Functional Genomics*, 2003, 4(1):25-30.
- [12] McNally T, Huang Q L, Janis R S, et al. Structural analysis of *UBL5*, a novel ubiquitin-like modifier [J]. *Protein Science*, 2003, 12(7):1562-1566.
- [13] Hochstrasser M. Origin and function of ubiquitin-like proteins [J]. *Nature*, 2009, 458(7237):422-429.
- [14] Yashiroda H, Tanaka K. Hub1 is an essential ubiquitin-like protein without functioning as a typical modifier in fission yeast [J]. *Genes to Cells*, 2004, 9(12):1187-1197.
- [15] Dittmar G A, Wilkinson C R, Jedrzejewski P T, et al. Role of a ubiquitin-like modification in polarized morphogenesis [J]. *Science*, 2002, 295(5564):2442-2446.
- [16] 沙伟, 张梅娟, 刘博, 等. 毛尖紫萼藓抗旱相关基因 *Gp-LEA* 的克隆与表达分析 [J]. *西北植物学报*, 2013, 33(9):1724-1730.
- [17] Peeters A M, Blankestijn-de vries H, Hanhart C J, et al. Characterization of mutants with reduced seed dormancy at two novel rdo loci and a further characterization of rdo1 and rdo2 in *Arabidopsis* [J]. *Physiologia Plantarum*, 2002, 115(4):604-612.
- [18] Fleury D, Himanen K, Cnops G, et al. The *Arabidopsis thaliana* homolog of yeast BRE1 has a function in cell cycle regulation during early leaf and root growth [J]. *The Plant Cell*, 2007, 19(2):417-432.
- [19] Liu Y X, Koornneef M, Soppe W J. The absence of histone H2B monoubiquitination in the *Arabidopsis* hub1 (rdo4) mutant reveals a role for chromatin remodeling in seed dormancy [J]. *The Plant Cell*, 2007, 19(2):433-444.
- [20] Dhawan R, Luo H, Foerster A M, et al. HISTONE MONOUBIQUITINATION1 interacts with a subunit of the mediator complex and regulates defense against necrotrophic fungal pathogens in *Arabidopsis* [J]. *The Plant Cell*, 2009, 21(3):1000-1019.
- [21] Lolas I B, Himanen K, Gronlund J T, et al. The transcript elongation factor FACT affects *Arabidopsis* vegetative and reproductive development and genetically interacts with HUB1/2 [J]. *The Plant Journal*, 2010, 61(4):686-697.
- [22] Kiyosue T, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. Cloning of cDNAs for genes that are early responsive to dehydration stress (ERDs) in *Arabidopsis thaliana* L.: identification of three ERDs as HSP cognate genes [J]. *Plant Molecular Biology*, 1990, 25:791-798.
- [23] Ko J H, Yang S H, Han K H. Upregulation of an *Arabidopsis* *RING-H2* gene, *XERICO*, confers drought tolerance through increased abscisic acid biosynthesis [J]. *The Plant Journal*, 2006, 47(3):343-355.
- [24] 宁约瑟, 王国梁, 谢旗. 泛素连接酶 E3 介导的植物干旱胁迫反应 [J]. *植物学报*, 2011, 46(6):606-616.
- [25] Chen X, Wood A J. The 26S proteasome of the resurrection plant *Tortula ruralis*: cloning and characterization of the TrRPT2 subunit [J]. *Biologia Plantarum*, 2003, 46(3):363-368.
- [26] 沙伟, 于冰, 刘卓. 毛尖紫萼藓泛素延伸蛋白基因克隆及序列分析 [J]. *生物技术*, 2012, 22(3):9-13.