

DOI: 10.3969/j.issn.1672-5565.201701005

沙田柚 RING-H2 finger 基因的生物信息学分析

李惠敏, 罗琼, 肖君, 李少梅, 刘华英, 秦新民*

(广西师范大学 生命科学学院, 广西 桂林 541004)

摘要:为探讨沙田柚自交不亲和性的机理,利用高通量测序技术对沙田柚自交和异交花柱进行转录组测序,通过差异分析得到了沙田柚 RING-H2 finger 基因序列。采用生物信息学方法,对其编码的蛋白质从序列特征、理化性质、跨膜结构域、高级结构以及功能域等方面进行了预测和分析。结果表明:该基因全长为 845 bp,开放阅读框(ORF)全长为 387 bp,编码 128 个氨基酸,编码蛋白质的分子量为 13.61 KDa,理论等电点为 4.26;该蛋白质含有一个植物 RING-H2 finger 蛋白家族的保守结构域,为疏水性不稳定蛋白。氨基酸序列分析表明,其编码的氨基酸与甜橙(Cs4g15340.1) RING-H2 finger 蛋白的相似度为 98%。这些分析结果可为今后深入研究该蛋白的结构特征和功能提供参考。

关键词:沙田柚;RING-H2 finger 蛋白基因;生物信息学;环指结构域

中图分类号:S576 文献标志码:A 文章编号:1672-5565(2017)03-149-07

Bioinformatics analysis of RING-H2 finger gene from *Citrus grandis* var. *Shatianyu* Hort

LI Huimin, LUO Qiong, XIAO Jun, LI Shaomei, LIU Huaying, QIN Xinmin*

(College of Life Science, Guangxi Normal University, Guilin 541004, Guangxi, China)

Abstract:To explore the molecular mechanism of self-incompatibility, the transcriptomes of the self-pollinated style and cross-pollinated style of *Citrus grandis* var. *Shatianyu* Hort were sequenced by high-throughput sequencing technology. RING-H2 finger gene sequence of *Citrus grandis* var. *Shatianyu* Hort was obtained through differential analysis method, and some characters of the RING-H2 finger protein were analyzed and predicted by bioinformatics method, including the composition of amino acid sequence, physicochemical parameters, hydrophobicity, transmembrane domain, structure and function of protein etc. The results showed that RING-H2 finger gene was 845 bp in length with an open reading frame(ORF) of 387 bp, encoding 128 amino acids with deduced molecular weight of 13.61 KDa, and theoretical pI value of 4.26, and contained a RING-H2 finger domain. Bioinformatics analysis showed that RING-H2 finger protein was a hydrophobic and unstable protein. The homology analysis of amino acid sequence indicated that the RING-H2 finger protein shared high similarity with RING-H2 finger protein of *Citrus sinensis* Cs4g15340.1 (98%). This work will provide the useful reference for further investigation of the structure and function of the RING-H2 finger protein.

Keywords: *Citrus grandis* var. *Shatianyu* Hort; RING-H2 finger protein gene; bioinformatics; RING finger domain

自交不亲和(self-incompatibility)是广泛存在于显花植物中的一种生殖隔离现象,从而能够拒绝自交花粉的生长,使非自交花粉完成正常的授粉受精^[1-2]。阐明自交不亲和性的分子机理在植物生殖学和培育无子品种等方面具有重要的理论和应用价值。目前研究

表明,S-核酸酶(S-RNase)为花柱S-决定因子。花柱中的S-RNase进入花粉管,S-RNase的细胞毒素作用使自交花粉管中的RNA降解,导致蛋白质合成终止,花粉管生长受到抑制,产生自交不亲和现象^[3-5]。在花粉决定因子方面,F-box基因可能在植物自交不亲和中发

收稿日期:2017-01-20;修回日期:2017-05-04.

基金项目:国家自然科学基金(31360477);广西高校科研项目(2013YB036).

作者简介:李惠敏,女,副教授,研究方向:植物分子生物学;E-mail:75727614@qq.com.

*通信作者:秦新民,男,博士,教授,研究方向:植物分子生物学;E-mail:xmqin@mailbox.gxnu.edu.cn.

挥作用。Lai 等^[6]在金鱼草(*Antirrhinum*)中克隆了一个在花粉中特异性表达的 F-box 基因(*AhSLF-S₂*)。随后,分别从茄科矮牵牛(*Petunia inflata*)中得到 S-locus F-box 基因 *PiSLF2*^[7],梅(*Prunus mume*)和扁桃(*Prunus dulcis*)中鉴定出特异性的 S-locus F-box 基因 *PmSLF* 和 *PdSFB*^[8-10]。

RING finger 基因编码的蛋白是一个庞大的蛋白家族,其典型的结果特点是序列内包含环指结构域(RING finger domain)。目前的研究结果表明大部分的 RING finger 蛋白具有泛素连接酶 E3(Ubiquitin-protein ligating enzyme)活性,是泛素调节的蛋白降解途径中识别底物的关键因子。RING finger 蛋白通过单泛素化修饰和多聚泛素化修饰靶蛋白而广泛参与植物的胚胎发生、细胞周期调节、生长发育、激素信号转导、程序化死亡,以及逆境胁迫等过程^[11]。泛素化降解途径为解释植物配子体自交不亲和和机理的模型之一。RING finger 蛋白在该途径中起关键作用^[12-13]。金鱼草中发现的 S 位点 F-box 基因 *AhSLF-S₂*,在花粉中特异表达,能与 Skp 和 Cullin-like 蛋白结合形成 SCF(Skp1-Cullin-F-box)复合物^[6,14]。SCF 复合物中包括 RING finger domain 的蛋白 Rbx/Roc/Hrt 负责募集泛素化的 E2(Ubiquitin-conjugating enzyme)中间体^[15-16]。单亚基的 RING finger E3 泛素蛋白连接酶 ARC1,在结合底物之后经 U-box 结构域与同源的 E2 相互作用,将底物泛素化,再由 26S 蛋白酶体降解,导致自交不亲和反应的发生。

沙田柚属于芸香科配子体高度自交不亲和果树。目前,沙田柚自交不亲和的细胞学、形态学以及蛋白质化学等方面的研究取得一定进展:沙田柚属于配子体自交不亲和类型,花柱的 1/2 左右为花粉管生长抑制部位^[17];分离和鉴定了沙田柚自交花柱^[18]和花粉管中的特异蛋白^[19];对花柱通道细胞中的特异蛋白和花粉管中特异蛋白产生部位以及分布位置进行了确认^[20-21]。为了进一步探讨沙田柚自交不亲和的机理,本文对自交和异交花柱进行了转录组测序,通过对自交和异交花柱差异基因的比对,获得了沙田柚 RING finger 基因,并对该基因编码的蛋白质进行了生物化学特征分析,旨在为沙田柚自交不亲和分子机理的深入研究提供帮助。

1 试验材料与方法

1.1 试验材料

沙田柚实验材料采自广西灵川县潮田乡大山口

村果园 10 年生结果树。在盛花期对沙田柚样树进行人工自交(沙田柚×沙田柚)授粉和异交授粉(酸柚×沙田柚),分别收集自交和异交 1~3 d 的授粉花柱以及当天未开花的花柱,立即放入液氮中保存,并放入-80℃超低温冰箱备用。

1.2 试验方法

1.2.1 RNA 的提取、建库和测序

总 RNA 提取采用了改良的 Trizol 法^[22],检测合格的 RNA 交由深圳华大基因科技服务有限公司进行建库和测序。建库和测序的程序和方法详见文献^[23]。

1.2.2 序列分析和系统树构建

使用 DNAMAN、ORF Finder、TMPRED、Phyre2、NetPhos2.0 等软件对序列以及蛋白质理化性质进行分析,使用 DNAMAN 软件对氨基酸序列 RING-H2 finger 蛋白的系统进化树进行建树。

1.2.3 基因表达量及差异统计

使用 RPKM 法(Reads per kb per million reads),即每百万 read 中来自某一基因每千碱基长度的 read 数目计算基因表达量。如果一个基因存在多个转录本,则用该基因的最长转录本计算其测序覆盖度和表达量。根据基因的表达量(RPKM 值)计算该基因在不同样本间差异表达倍数。FDR(false discovery rate)值越小,异倍数越大,表明表达差异越显著。本文确定 FDR≤0.001 且差异表达倍数不低于 2 倍(log₂Ratio≥1)的条件对自交和异交花柱之间的基因进行差异表达统计。自交/异交 1 d 花柱之间的差异表达基因为 3 467 个,自交/异交 2 花柱之间的差异基因为 3 460 个,自交/异交 3 d 花柱之间的差异表达基因数量为 3 609 个。分别将这些差异基因序列比对到 NR、NT、Swiss-Port、COG 等数据库中,得到差异基因编码蛋白的功能。其中 Unigene20689_All 定为 RING finger 蛋白基因。

2 结果与分析

2.1 基因的生物信息学分析

沙田柚 RING finger 蛋白(Unigene20689_All)的基因组序列全长为 845 bp(GenBank 登录号:KY885238)。通过生物信息学软件 DNAMAN 以及 NCBI 网站上的 NCBI ORF Finder(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>)对序列进行分析,该序列的开放阅读框共有 387 bp,编码 128 个氨基酸,如图 1 所示。

```

1      TGATGCTGCAGTCTGTACCTTACGGATTCTGTAAGCTAGTCGAGTCTATCTGTAGACTT
61     AGATTA AAAAAGCTTCTCTATATATAATTATAAATCAAGTACAACGAGCAGAATAGCTCAC
121    AGAAATCTACTTCAAGCTCTATCCCTCAA AATGGCGTCTGCATATTCGTGGCGATCAAC
      M A S A Y S S A I N
181    AACAAACCCGTCTTACGCTGTCCAATAATCGATCTAAGCTTCGACCTCGACGAGGCTCTA
      N N T V L R C P I I D L S F D L D E A L
241    ACGATGACTATCACAGACACTCCGTC AACGCCATCAGATGATCAAGACCAACAGAAGATT
      T M T I T D T P S T P S D D Q D Q Q K I
301    GAAGTCACGGGAACAAACGGTGGACTGCTGATGGTGGCGTCGGACTTGCCACAGGTGCC
      E V T G T N G G L L M V A S D L P T G A
361    GGTAGTGGTACTACTGAATGCGTTTGCATGGTCTGCATGGAAGATTTTGATCCGCAGGAA
      G S G T T E C V C M V C M E D F D P Q E
421    TTCCCGGCAAGCAAGTTCATGCCGACGCTGTTCCACGCGAAGTGATCTCCACGTGG
      F P G K Q V P C G H V F H A K C I S T W
481    ATATCCCTTTCTAATTCTTGCCCTGTGTGCCGCAGTCGATGTATAATCTCCGGCTGACGC
      I S L S N S C P V C R S R C I I S G *
541    TTTCTCGAAAATAAATAAATTGTCTTTGGAGAGTTTGCCCTTTTATTACTTATGTTAAGTC
601    CTGCATTGCGATTTATGATTCGCTAAATTAGGCGTTGCGAAAATTAATGGTGCCTAAA
661    CTATTGATCGGAAATTTGACACGTATAAGAAAAGATTGAAACTTTGTCTTTGAAAAATC
721    TTTTGAGGTGTGATTAATTAATCTGTTGCATTCTCAAATCTATTTTTTATTATAATA
781    AAATTGGTTTTTCGCTACAAATTAACGTCAAATTTTTGCCAAAGACAAGTAAAAATAAAC
841    TCTAC

```

图 1 RING-H2 finger 蛋白基因序列和推测的氨基酸序列

Fig.1 Nucleotide sequence of RING-H2 finger protein gene and the deduced amino sequence

2.2 功能结构域分析

运用 NCBI 上的 Conserved Domain Architecture Retrieval Tool (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/>

gorf.html) 因编码的氨基酸进行分析,该蛋白质具有一个与 RING finger superfamily 蛋白相同的保守结构域,如图 2 所示。

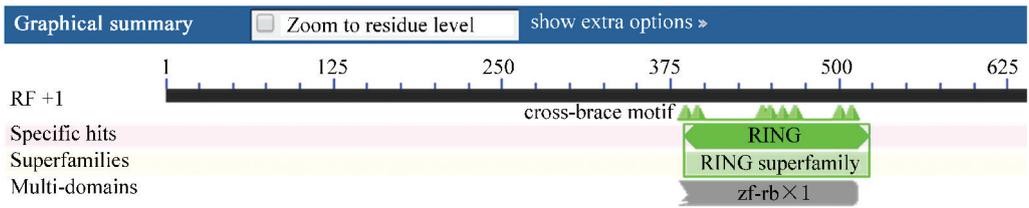


图 2 RING-H2 finger superfamily 蛋白保守结构域

Fig.2 Conserved domains of porcine RING-H2 finger superfamily protein

2.3 编码蛋白质的分析和疏水性预测

运用在线软件(<http://web.expasy.org/protparam/>) 对该蛋白质进行分析该蛋白质的分子量为 13.61 KDa,等电点 pI 为 4.26,分子式为 C₅₇₇H₉₁₉N₁₅₅O₁₉₆S₁₄,不稳定系数为 45.90,属于不稳定蛋白。其

中,该蛋白质携带的负电荷氨基酸(Asp + Glu)总数为 15,正电荷氨基酸(Arg + Lys)总数为 6。蛋白质疏水性分析结果如图 3 所示,从图 3 中可以看出该基因编码的肽链中疏水性最大值约为 2.96,最小值约为-3.65,初步鉴定该蛋白质为疏水蛋白。

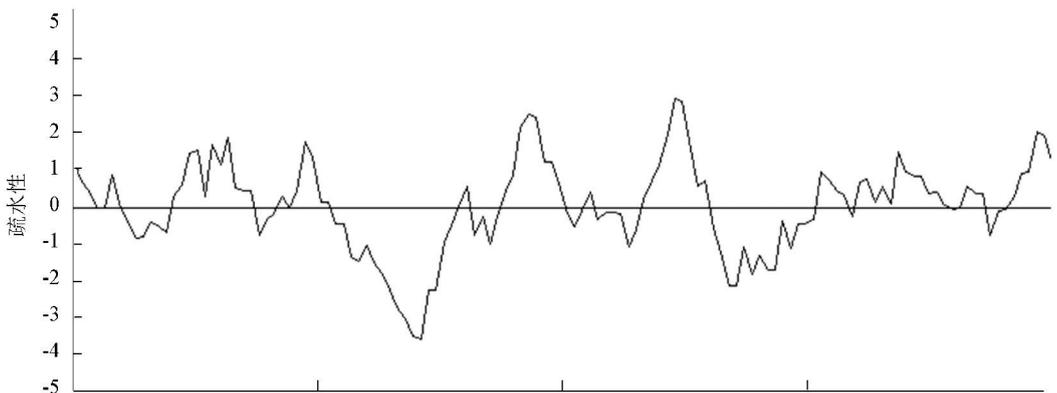


图 3 RING-H2 finger 蛋白疏水性分析

Fig.3 Hydrophobicity Analysing of RING-H2 finger protein

2.4 跨膜预测

运用 TMHMM-2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/>

services/) 对 RING finger 蛋白的跨膜区域进行预测。结果表明不属于跨膜蛋白,如图 4 所示。

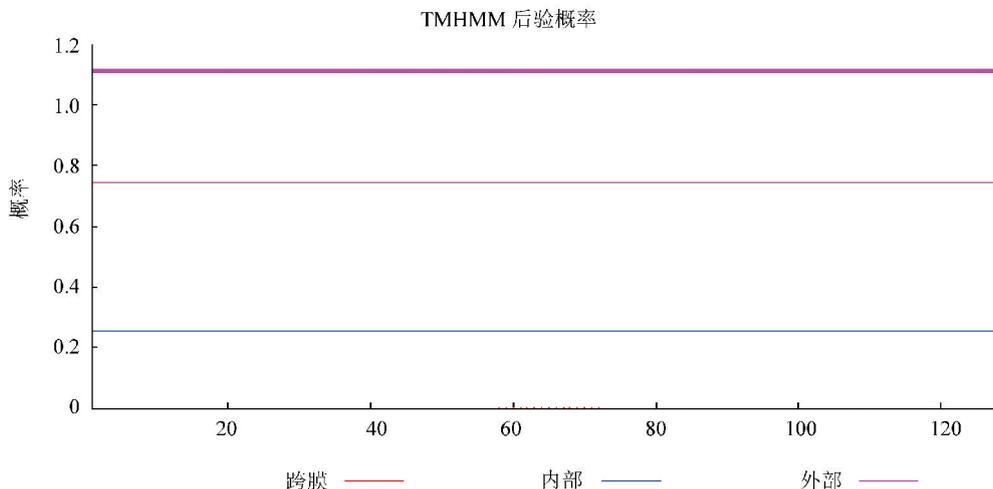


图 4 RING-H2 finger 蛋白的跨膜区预测

Fig.4 Result of TMpred prediction on RING-H2 finger protein

2.5 蛋白质二级以及三级结构的预测

运用在线分析软件 SOPMA (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/secpred_sopma.pl) 对 RING finger 蛋

白二级结构进行预测,预测结果如图 5 所示。结果表明该蛋白的 α -螺旋所占比例为 10.94%,延伸链为 34.38%, β -转角为 7.03%,无规则卷曲为 47.66%。

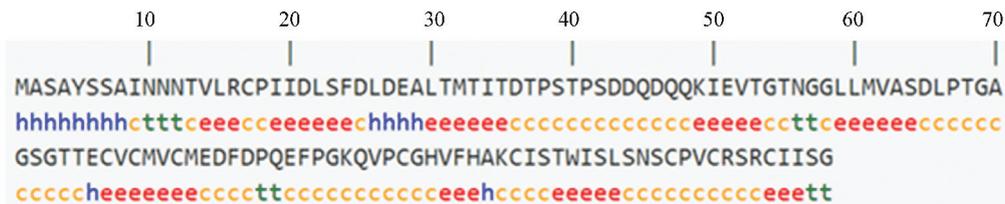


图 5 RING-H2 finger 蛋白的二级结构预测

Fig.5 The secondary structure prediction of RING-H2 finger protein

注:h: α -螺旋;t: β -转角;c 为无规则卷曲;e 为延伸链。

利用在线软件 Phyre2^[24] 对 RING finger 蛋白氨基酸序列进行三级结构进行预测,结构如图 6 所示。结果显示,以 c5d0k1 结构为模板,蛋白 128 个氨基酸序列中有 64 个氨基酸与模板达到 99.7% 的可信度。

守结构域,推测沙田柚 Unigene20689_All 基因编码的蛋白质是 RING-H2 finger 蛋白。

2.6 同源序列比对和系统发育

沙田柚 Unigene20689_All 序列与甜橙数据库 (<http://citrus.hzau.edu.cn/orange/>) 的 RING-H2 finger 蛋白 (Cs4g15340.1) 的 cDNA 相似度为 98%。再从 NCBI 下载其他 9 种植物的 RING-H2 finger 基因编码的氨基酸序列,利用 DNAMan 构建系统发育树,结果表明沙田柚 RING finger 基因编码的蛋白质与芸香科的甜橙 (*Citrus sinensis*) 有很近的亲缘关系,属于同一进化分支,如图 7 所示。经过同源性比较,在氨基酸的 N 端具有一个 RING-H2 finger 蛋白的保

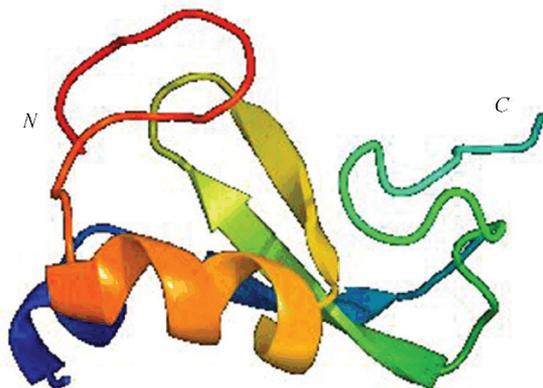


图 6 RING-H2 finger 蛋白的三级结构

Fig.6 The tertiary structure of RING-H2 finger protein

```

Unigene20689_All -----MASAYSSAINNNTVLRC--PIIDLSFDLDEALMTTITDTPS
Citrusinensis -----MASAYSSAINNNTVLRC--PIIDLSFDLDEALMTTITDTPS
Zea MGISSMPEPR-DSLLGYLVYNTVISIAALAG-LVRAALVFLDLQAALPPGGDGGDRLAAS
Solanumlycopersicum MGLSQYPTPADAGVLGVILVNTAISISIIKE-ILRSILRVIGIRIASWED-----YSIE
Solanumnigrum MGLSPYTPADAGVFCVILVNTAISISIVKG-MVRSILHVIGINFASWEE-----YSIE
Arabidopsisthaliana MGLSSLPGPS-EGMLCVILVNTAISISIVKG-IVRSFLGIVGISLSPSSSSPSSVTSSSE
Eutremahalophilum MGLSSLPGPS-EGMLCVILVNTAISISIFKG-IVRSVLHVGLIRLSQSSSSPSSVTASSE
Medicagotruncatula MGLSSLPAQS-EGVLCIILVNTAMSISIFKG-IIRTLHIVGLIASPSSSP--SQDYIPQ
Heveabrasiliensis MCLSNLPASS-EGVICVVMNTAISISIFKG-IVRSVLHIVDNRLAPFSSSSSILFPDY
Ricinuscmmunis MGLSSLPAPS-EGVLCVLLVNTAISISIFKG-IVRSILHVIGIRLSSSSSSTASSDYN-E
      . . * :      : *      . :

Unigene20689_All TPSSDDQDQKIEVTGTNGGLLMVASDLP-----TGAGSGTTECVCMVCMEDFDPQE
Citrusinensis TPSSDDQDQKIEVTGTNGGLLMVASDLP-----TGAGSGTTECVCMVCMEDFDSQE
Zea -----APGLAERFLRAFRLALYEVLASTATTCEADGGGGDDCSVCLAGFRARA
Solanumlycopersicum ---GPLDLSLECRGSPPESEYMEEFRSRTPAFRYDSL--R--ISNHPEQECVCLTKFEPDA
Solanumnigrum ---GPLDPFE-----
Arabidopsisthaliana -NSSTSESFDFRVCQPESEYLEEFRNRTPLRFESL--C-RCKKQADNECSVCLSKFQGDS
Eutremahalophilum --IPASEPFDPRVSHPESEFLEEFRNKTPLRYESL--C-RCKKHEDNECSVCLSKFEEDS
Medicagotruncatula ---NIPSEYETHLSPSDDFVEEFRSRTPLRFDSV--C-NSCKEPEHDCSVCLTQFEPES
Heveabrasiliensis ---SDTESFEFPLHSSDDCVRELRSRPAKRFDAV--S--SCKQPQHDVCLTIQFKPDS
Ricinuscmmunis ---DPTDLFEFRLPPSESYINEFRSRTPATRFDSV--C--RCKQIEHDCSVCLTRFEPES

Unigene20689_All FPGKQVFCGHVFAKCIWISLSN-SCPVCRSRCIISG-----
Citrusinensis FPGKQVFCGHVFAKCIWISLSN-SCPVCRSRCIISG-----
Zea VVN-RLPCGHLFHRACLETWLYRERATCPLCRRAHVFLPADET---PL----LRYPEFE--
Solanumlycopersicum GVN-SLSCGHVFKLCKLEKWLRYWHVTCPLCRNYLMPQQEEDDTCPILNCS
Solanumnigrum -----CLEKWLKNWVTCPLCRDYIMPQE-----
Arabidopsisthaliana EIN-KLRCGHLFHRKTCLEKWIDYWNITCPLCRTPLVWVP---EDHQLSSNVW-----
Eutremahalophilum EIN-KLRCGHLFHRKTCLEKWIDYWNITCPLCRTPLVWVAAAEDQKQLSSNVW-----
Medicagotruncatula EINYCISCGHVFKVCKLEKWLDYWNITCPLCRSPLIPED----DASCLAFDYSEACDE
Heveabrasiliensis EIN-CLSCGHVFKACLEKWLDYRKVTCPLCRSPVMPPE-----EDTSSSW-----
Ricinuscmmunis EIN-CLSCGHVFKVCKLEKWLDYWNVTCPLCRSPVIPSE----EDTSSCFW-----
      * . . * :      . : * * * :

```

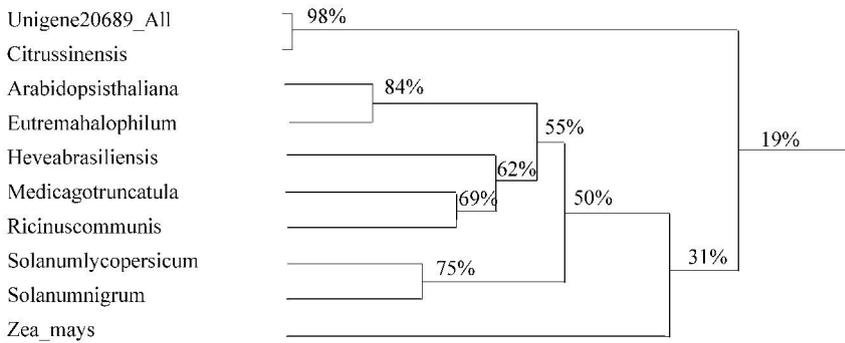


图 7 10 种植物 RING-H2 finger 蛋白的氨基酸序列比较

Fig.7 The comparison plant on amino acid sequence RING-H2 finger protein of 10 plant species

注:Unigene 20689(沙田柚, KY885228), Arabidopsis thaliana(拟南芥, NP_178507.1), Citrus sinensis(甜橙, Cs4g15340.1), Eutrema halophilum(山俞菜, AAM19707.1), Hevea brasiliensis(橡胶树, AAP46154.1), Medicago truncatula(蒺藜苜蓿, XP_003601512.1), Ricinus communis(蓖麻, XP_002533895.1), Solanum lycopersicum(番茄, XP_004251547.1), Solanum nigrum(龙葵, ADW66146.1), Zea mays(玉米, DAA40340.1).

3 讨论

26S 泛素蛋白酶体途径(ubiquitin-proteasome pathway)是已知真核生物中主要的蛋白质降解途径,主要由泛素(Ub)、泛素激活酶(E1)、泛素结合酶(E2)、泛素蛋白连接酶(E3)和 26S 蛋白酶体组

成^[25],其中,泛素连接酶 E3 在底物的特异性选择降解过程中发挥关键作用。根据其结构和功能,目前已经发现的 E3 可以分为 2 大类:HECT 结构域 E3 和 RING E3。RING E3 泛素连接酶具有一个 RING finger 域或一个与 RING finger 在结构上相关的 U-box 域,如 SCF、ARC1 等。

26S 泛素蛋白酶体途径的生物学功能广泛,在

植物的生长发育、抗病反应、激素反应、胁迫反应中起着重要的作用。此外,泛素/蛋白酶体途径与高等植物的有性生殖有关。Callis 等^[26]发现玉米花粉成熟时,其游离泛素和泛素缀合蛋白的含量都急剧下降,分别只有早期单核小孢子中的 1/10 和 1/50。Kulikauskas 等^[27]发现一些禾本科植物花粉成熟时伴随着游离泛素水平的显著下降,而其他植物的花粉成熟时都具有高水平的游离泛素这一特征。Li 等^[28]发现泛素及泛素缀合蛋白在 *Nicotiana glauca* 雌雄蕊中的分布具有时间、组织特异性,并认为泛素系统对高等植物生殖结构的分化过程起调节作用。同时,泛素/蛋白酶体途径在 *Actinidia deliciosa* 花粉萌发过程中起重要作用,并参与建立并维持 *Actinidia deliciosa* 花粉管的极性生长模式^[29-30]。此外,26S 泛素蛋白酶体途径还与植物自交不亲和相关。Qiao 等^[31]认为而在不亲和授粉中,花粉受体分子为 SLF(S-locus-encoded F-box proteins),它含有一个 F-box 结构域 SLF 与 S-RNase 以等位基因特异性形式结合,这样就不会形成 SCF 复合体,S-RNase 的核酸酶活性就会被保持下来,从而降解花粉管中的 RNA,使花粉管停止生长,最终导致自交不亲和反应。

4 结 论

本文克隆的 Unigene20689_All 序列与甜橙的 RING-H2 finger 基因编码的氨基酸序列的相似度为 98%,通过与其他含有 RING-H2 finger 结构域的植物进行同源性比对,其在 C-端含有一个 RING-H2 finger 保守结构域,说明 Unigene20689_All 序列为 RING-H2 finger 基因。推测该基因可能在沙田柚泛素调节的蛋白质降解途径中扮演识别底物的角色,但在沙田柚自交不亲和反应中的具体功能还有待进一步研究。

参考文献 (References)

- [1] De NETTANCOURT P D. Incompatibility and incongruity in wild and cultivated plants[M]. Berlin Heidelberg: Springer, 2001. DOI:10.1007/978-3-662-04502-2.
- [2] FRANKLIN-TONG V. Self-incompatibility in flowering Plants: evolution, diversity, and mechanisms[M]. Berlin Heidelberg: Springer, 2008. DOI:10.1007/978-3-662-04502-2.
- [3] HARING V, GRAY J E, MCCLURE B A, et al. Self-incompatibility: a self-recognition system in plants[J]. Science, 1990, 250(4983): 937-941. DOI:10.1126/science.2237440.
- [4] MCCLURE B A, FRANKLIN-TONG V. Gametophytic self-incompatibility: understanding the cellular mechanisms involved in "self" pollen tube inhibition[J]. Planta, 2006, 224(2): 233-245. DOI:10.1007/s00425-006-0284-2.
- [5] STONE J L. Molecular mechanisms underlying the breakdown of gametophytic self-incompatibility[J]. The Quarterly Review of Biology, 2002, 77(1): 17-32. DOI: 10.1086/339200.
- [6] LAI Z, MA W S, HAN B, et al. An F-box gene linked to the self-incompatibility (S) locus of *Antirrhinum* is expressed specifically in pollen and tapetum[J]. Plant Molecular Biology, 2002, 50(1): 29-42. DOI: 10.1023/A:1016050018779.
- [7] SIJACIC P, WANG Xi, SKIRPAN A L, et al. Identification of the pollen determinant of S-RNase-mediated self-incompatibility[J]. Nature, 2004, 429(6989): 302-305. DOI:10.1038/nature02523.
- [8] ENTANI T, IWANO M, SHIBA H, et al. Comparative analysis of the self-incompatibility (S-) locus region of *Prunus mume*: identification of a pollen-expressed F-box gene with allelic diversity[J]. Genes to Cells: Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms, 2003, 8(3): 203-213. DOI:10.1046/j.1365-2443.2003.00626.x.
- [9] YAMANE H, IKEDA K, USHIJIMA K, et al. A pollen-expressed gene for a novel protein with an F-box motif that is very tightly linked to a gene for S-RNase in two species of cherry, *Prunus cerasus* and *P. avium*[J]. Plant Cell Physiology, 2003, 44(7): 764-769. DOI: 10.1093/pcp/pcg088.
- [10] IKEDA K, IGIC B, USHIJIMA K, et al. Primary structural features of the S haplotype-specific F-box protein, SFB, in *Prunus*[J]. Sexual Plant Reproduction, 2004, 16(5): 235-243. DOI:10.1007/s00497-003-0200-x.
- [11] 刘丽娟, 刘爱玲, 陈信波. 植物非生物逆境胁迫相关 RING-H2 finger 蛋白[J]. 生物技术通报, 2014(7): 1-7. LIU Lijuan, LIU Ailing, CHEN Xinbo. Abiotic stress-related RING-H2 finger proteins in plant [J]. Biotechnology Bulletin, 2014(7): 1-7.
- [12] LECKER S H, GOLDBERG A L, MITCH W E. Protein degradation by the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states[J]. Journal of the American Society of Nephrology, 2006, 17(7): 1807-1819. DOI: 10.1681/ASN.2006010083.
- [13] METZGER M B, HRISTOVA V A, WEISSMAN A M. HECT and RING-H2 finger families of E3 ubiquitin ligases at a glance[J]. Journal of Cell Science, 2012, 125(3): 531-537. DOI:10.1242/jcs.091777.
- [14] 李彦泽. 拟南芥 F-box 基因 *AtPP2-B11* 的功能分析及苹果 RING-H2 finger 型泛素连接酶 E3 的家族分析[D]. 泰安: 山东农业大学, 2011.

- LI Yanze. Functional characterization of F-box-containing gene *AtPP2-B11* and genome-wide analysis of the RING-H2 finger proteins in apple[D]. Taian: Shandong Agricultural University, 2011.
- [15] LECHNER A, LEECH C A, ABRAHAM E J, et al. Nestin-positive progenitor cells derived from adult human pancreatic islets of Langerhans contain side population (SP) cells defined by expression of the ABCG2 (BCRP1) ATP-binding cassette transporter[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2002, 293(2): 670–674. DOI: 10.1016/S0006-291X(02)00275-9.
- [16] RISSEEUW E P, DASKALCHUK T E, BANKS T W, et al. Protein interaction analysis of SCF ubiquitin E3 ligase subunits from *Arabidopsis*[J]. *The Plant Journal; for Cell and Molecular Biology*, 2003, 34(6): 753–767. DOI: 10.1046/j.1365-313X.2003.01768.x.
- [17] 薛妙男, 陈腾土, 杨继华. 沙田柚自交和异交亲和性观察[J]. *园艺学报*, 1995, 22(2): 127–132. DOI: 10.3321/j.issn:0513-353X.1995.02.006.
XUE Miaonan, CHEN Tengtu, YANG Jihua. Observations on self and cross-compatibility in *Shatinyu*[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 1995, 22(2): 127–132. DOI: 10.3321/j.issn:0513-353X.1995.02.006.
- [18] 杨继华, 薛妙男, 陆景峰. 沙田柚自交、异交花柱蛋白质的比较分析[J]. *植物学通报*, 1996, 13(专辑): 45.
- [19] 秦新民, 李惠敏, 薛妙男, 等. 沙田柚自交、异交花粉管蛋白的双向电泳分析[J]. *广西植物*, 2004, 24(6): 566–569. DOI: 10.3969/j.issn.1000-3142.2004.06.018.
QIN Xinmin, LI Huimin, XUE Miaonan, et al. Two-dimensional electrophoresis of self and non-self pollinated pollen tube proteins of *Shatinyu*[J]. *GUIHAIA*, 2004, 24(6): 566–569. DOI: 10.3969/j.issn.1000-3142.2004.06.018.
- [20] 薛妙男, 李义平, 张杏辉, 等. 沙田柚自交花柱中识别蛋白的免疫金定位[J]. *园艺学报*, 2001, 28(1): 59–61. DOI: 10.3321/j.issn:0513-353X.2001.01.012.
XUE Miaonan, LI Yiping, ZHANG Xinghui, et al. Immuno-gold localization of recognition protein in the self-pollination style of *Shatinyu*[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2001, 28(1): 59–61. DOI: 10.3321/j.issn:0513-353X.2001.01.012.
- [21] 秦新民, 莫花浓, 石菁萍, 等. 沙田柚花粉管 S1-RNase 免疫胶体金定位研究[J]. *广西农业科学*, 2009, 40(5): 483–485. DOI: 10.3969/j.issn.2095-1191.2009.05.007.
QIN Xinmin, MO Huanong, SHI Jingping, et al. Immuno-gold localization of S1-RNase in pollen tube of *Citrus grandis* var. *Shatinyu* Hort[J]. *Guangxi Agricultural Sciences*, 2009, 40(5): 483–485. DOI: 10.3969/j.issn.2095-1191.2009.05.007.
- [22] BARIOLA P A, HOWARD C J, TAYLOR C B, et al. The *Arabidopsis thaliana* ribonuclease gene *RNA1* is tightly controlled in response to phosphate limitation[J]. *The Plant Journal*, 1994, 6(5): 673–685. DOI: 10.1046/j.1365-313X.1994.6050673.x.
- [23] 秦新民, 张渝, 刘玉洁, 等. 沙田柚 S-RNase 基因的克隆及序列分析[J]. *广西师范大学学报(自然科学版)*, 2015, 33(1): 139–145. DOI: 10.16088/j.issn.1001-6600.2015.01.023.
QIN Xinmin, ZHANG Yu, LIU Yujie, et al. Cloning and sequence analysis of S-RNase gene from *Citrus grandis* var. *Shatinyu* hort[J]. *Journal of Guangxi Normal University: Natural Science Edition*, 2015, 33(1): 139–145. DOI: 10.16088/j.issn.1001-6600.2015.01.023.
- [24] KELLEY L A, MEZULIS S, YATES C M, et al. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis[J]. *Nature Protocols*, 2015, 10(6): 845–858. DOI: 10.1038/nprot.2015.053.
- [25] SMALLE J, VIERSTRA R D. The ubiquitin 26S proteasome proteolytic pathway[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2004, 55(1): 555–590. DOI: 10.1146/annurev.arplant.55.031903.141801.
- [26] CALLIS J, BEDINGER P. Developmentally regulated loss of ubiquitin and ubiquitinated proteins during pollen maturation in maize[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1994, 91(13): 6074–6077. DOI: 10.1073/pnas.91.13.6074.
- [27] KULKAUSKAS R, HOU A, MUSCHIETT J, et al. Comparisons of diverse plant species reveal that only grasses show drastically reduced levels of ubiquitin monomer in mature pollen[J]. *Sexual Plant Reproduction*, 1995, 8(6): 326–332. DOI: 10.1007/BF00243199.
- [28] LI Y Q, SOUTHWORTH D, LINSKENS H F, et al. Localization of ubiquitin in anthers and pistils of *Nicotiana*[J]. *Sexual Plant Reproduction*, 1995, 8(3): 123–128. DOI: 10.1007/BF00242254.
- [29] SPERANZA A, SCOCCIANTI V, CRINELLI R, et al. Inhibition of proteasome activity strongly affects kiwifruit pollen germination. Involvement of the ubiquitin/proteasome pathway as a major regulator[J]. *Plant Physiology*, 2001, 126(3): 1150–1161. DOI: 10.1104/pp.126.3.1150.
- [30] SCOCCIANTI V, OVIDI E, TADDEI A R, et al. Involvement of the ubiquitin/proteasome pathway in the organization and polarised growth of kiwifruit pollen tubes[J]. *Sexual Plant Reproduction*, 2003, 16(3): 123–133. DOI: 10.1007/s00497-003-0182-8.
- [31] QIAO H, WANG H, ZHAO L, et al. The F-box protein Ah-SLF-S2 physically interacts with S-RNases that may be inhibited by the ubiquitin/26S proteasome pathway of protein degradation during compatible pollination in *Antirrhinum*[J]. *Plant Cell*, 2004, 16(3): 582–595. DOI: 10.1105/tpc.017673.