

· 研究报告 ·

## 小桐子半胱氨酸蛋白酶家族和相应miRNAs的鉴定及其对低温锻炼的响应

吴丹丹<sup>1</sup>, 陈永坤<sup>1,2</sup>, 杨宇<sup>1</sup>, 孔春艳<sup>1</sup>, 龚明<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>云南师范大学生命科学学院, 生物能源持续开发利用教育部工程研究中心, 云南省生物质能与环境生物技术重点实验室, 昆明 650500; <sup>2</sup>新疆师范大学生命科学学院, 乌鲁木齐 830054

**摘要** 小桐子(*Jatropha curcas*)是一种极具潜力的能源植物及冷敏植物, 12°C低温锻炼可显著提高其耐冷性。在全基因组水平上对小桐子半胱氨酸蛋白酶家族及靶向其基因的miRNAs进行鉴定、生物信息学分析和表达特性分析, 并对该基因家族成员与miRNAs互作参与调控小桐子对低温锻炼的响应进行解析。结果表明, 在小桐子基因组中共鉴定到39个半胱氨酸蛋白酶基因, 定位于11条染色体上, 可分为6个亚家族(C1A、C2、C12、C13、C14和C15), 编码181–2 158个氨基酸残基的多肽, 均具有Cys和His活性位点。基于miRNA组和降解组测序结果, 发现有283个miRNAs靶向调控小桐子半胱氨酸蛋白酶基因家族的14个成员。对靶向*JcDEK1*、*JcRD21B*和*JcXBCP3L*的miRNAs在12°C低温锻炼过程中的共表达分析表明, 这些miRNAs参与半胱氨酸蛋白酶基因表达的调控, 且这种调控可能与低温锻炼诱导的小桐子耐冷性增强有关。研究结果有助于深入理解小桐子半胱氨酸蛋白酶基因家族功能及其与相应miRNAs的互作, 以及通过互作调控小桐子对低温的响应。

**关键词** 小桐子, 半胱氨酸蛋白酶, 基因家族, miRNAs, 低温响应

吴丹丹, 陈永坤, 杨宇, 孔春艳, 龚明 (2021). 小桐子半胱氨酸蛋白酶家族和相应miRNAs的鉴定及其对低温锻炼的响应. 植物学报 56, 544–558.

半胱氨酸蛋白酶(cysteine protease)是植物体内一类催化蛋白质水解的酶, 是植物蛋白水解酶的主要组成部分(Grudkowska and Zagdanska, 2014)。其活性位点含有Cys残基, 一般通过抑制剂来鉴定该类酶的活性位点(Ahmad et al., 2014)。半胱氨酸蛋白酶家族可分为6个亚家族。其中C1A (papain-like)亚家族亦称木瓜类蛋白酶, 是植物中研究最为深入的半胱氨酸蛋白酶。该类酶具有3个二硫键, 其肽链折叠形成一个球状蛋白, 在其表面有一条裂隙有利于结合底物, 具有Cys和His两个催化位点(Wang et al., 2018b)。C2亚家族属于钙依赖半胱氨酸蛋白酶(calpains), 是一类不包含信号肽的多肽, 主要是胞质蛋白(Rawlins and Salvesen, 2013)。C12亚家族又称泛素C-末端水解酶, 其家族的所有肽酶成员在没有前肽的情况下合成, 并保留在细胞内, 对泛素C-末端Gly形成的键的水解具有高度选择性(Wilkinson et al.,

1999; Rawlings et al., 2010)。C13亚家族为液泡加工酶(vacuolar processing enzymes, VPEs), 属于豆类天冬氨酸蛋白酶家族, 其主要作用为加工前体蛋白和降解液泡内的蛋白质。VPEs已被证明参与多种生化过程中的蛋白质加工, 与各种空泡蛋白的成熟和激活有关(Hara-Nishimura, 1995; Shimada et al., 2003)。此外, 一些VPEs还通过其天冬氨酸蛋白酶活性在植物发育和防御反应中调节程序性细胞死亡(Kuroyanagi et al., 2005; Hatsugai et al., 2006)。C14亚家族属于天冬氨酸特异性的半胱氨酸蛋白酶(caspases), 在原核和真核生物细胞中广泛存在, 包含具有催化作用的Cys和His残基, 已知细胞凋亡级联反应主要由C14亚家族的caspases控制(Earnshaw et al., 1999)。C15亚家族为焦谷氨酰胺酶I (PGP-1), 在哺乳动物中, PGP-1已被证明可通过促甲状腺素释放激素、神经降压素、蛙皮素和白介素释放焦谷氨酸(pGlu)

收稿日期: 2021-01-18; 接受日期: 2021-05-07

基金项目: 国家自然科学基金(No.31860062, No.31460059)

\* 通讯作者。E-mail: gongming6307@163.com

(Dando et al., 2003)。半胱氨酸蛋白酶是植物蛋白水解酶活性的主要组成部分, 它们几乎参与植物生长发育的各个方面, 且越来越多的证据表明, 半胱氨酸蛋白酶在多种逆境胁迫的响应与适应中起重要作用(Liu et al., 2018; Vorster et al., 2019)。

小桐子(*Jatropha curcas*)又名麻风树、膏桐、亮桐、臭油桐等, 属大戟科麻风树属, 为落叶灌木或小乔木, 是具有巨大综合开发潜力的多用途能源植物, 也是一种热带亚热带起源的喜温冷敏植物(chilling-sensitive plant), 低温是限制小桐子生长和生产的重要环境因素之一(Montes and Melchinger, 2016)。Ao等(2013a, 2013b)发现, 12°C低温锻炼2天可显著降低小桐子幼苗在1°C低温胁迫下的死亡率、电解质渗透率和丙二醛含量, 提高抗氧化酶活性; 增强小桐子幼苗的渗透调节能力, 提高可溶性糖和脯氨酸等渗透调节物质的含量, 激活渗透调节物质合成途径, 进而提高小桐子的抗冷性。Li等(2014)发现, 12°C低温锻炼可提高小桐子膜脂的不饱和度, 改变脂肪酸组分, 增强细胞膜在低温下的流动性(Li et al., 2014)。12°C低温锻炼下小桐子的转录组分析表明, 有数千个差异表达基因参与低温锻炼有关的信号和代谢通路, 其中半胱氨酸蛋白酶基因也属于对低温锻炼响应显著的差异表达基因(Wang et al., 2013a)。对低温锻炼下的小桐子小miRNA组分析显示, 众多miRNAs参与小桐子的低温响应(Wang et al., 2013b)。近期我们对小桐子半胱氨酸蛋白酶抑制剂(cystatin)基因家族及靶向该家族成员的miRNAs进行了鉴定, 研究了cystatin家族基因与相应miRNAs的互作在调控小桐子低温胁迫响应中可能的作用(吴丹丹等, 2021), 但目前尚未见有关小桐子半胱氨酸蛋白酶基因家族及靶向该家族成员的miRNAs的研究。

miRNA是一类真核生物中广泛存在的长度为20–24 nt的内源非编码RNA, 可能的作用机制主要包括转录本切割、翻译抑制、次生siRNA形成、翻译激活、转录增强和类激素作用6个方面(郝大海和龚明, 2020)。植物miRNA主要通过剪切mRNA或抑制翻译负调控基因表达, 在细胞增殖分化、个体生长发育和抵御逆境胁迫等生理过程中发挥重要作用(张翠桔等, 2020; 王劲东等, 2020)。许多研究表明, miRNAs参与植物对低温的响应、信号转导和适应过程(Megha

et al., 2018), 但miRNAs是否参与调控半胱氨酸蛋白酶家族基因, 以及这种互作如何调控植物耐冷性的研究尚未见报道。基于本实验室前期的工作(Ao et al., 2013a, 2013b; Wang et al., 2013a, 2013b; Li et al., 2014)和近期完成的小桐子低温锻炼过程中转录组、miRNA组和降解组测序结果, 我们对小桐子半胱氨酸蛋白酶家族进行了全基因组鉴定及系统进化、染色体定位、蛋白结构域及基因表达分析; 并基于miRNA组和降解组测序结果, 鉴定了靶向半胱氨酸蛋白酶基因家族成员的miRNAs, 进行共表达分析, 旨在阐明半胱氨酸蛋白酶基因家族及其与对应miRNAs的互作关系以及这种互作如何参与调控小桐子对低温锻炼的响应过程。

## 1 材料与方法

### 1.1 植物材料及培养

小桐子(*Jatropha curcas* L.)种子购于云南元谋。种子表面消毒、浸种、萌发以及幼苗培养等见文献(李忠光和龚明, 2011; 吴丹丹等, 2021)。

### 1.2 低温锻炼处理

小桐子幼苗低温锻炼及样品采集见文献(Ao et al., 2013a; 吴丹丹等, 2021)。所有取样及后续测定均设3次重复。

### 1.3 转录组、miRNA组和降解组测序

用Trizol (Invitrogen, USA)提取总RNA。miRNAs提取按照Plant miRNA Kit R6727-01 (OMEGA)试剂盒(广州飞扬生物工程有限公司)说明书进行。转录组、miRNA组和降解组测序用Illumina 4000高通量测序平台(广州基迪奥生物科技有限公司)进行。测序数据已上传NCBI, 转录组数据登录号为PRJNA661688, miRNA组登录号为PRJNA660857, 降解组登录号为PRJNA661178 (吴丹丹等, 2021)。

### 1.4 小桐子半胱氨酸蛋白酶家族成员的鉴定

拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、水稻(*Oryza sativa*)、蓖麻(*Ricinus communis*)、杨树(*Populus euphratica*)和番茄(*Solanum lycopersicum*)半胱氨酸蛋白酶的

氨基酸序列从MEROPS数据库(Release 12.0) (<http://www.ebi.ac.uk/merops>)获得。将获得的候选序列与小桐子基因组数据库(JCDB) (<http://jcdb.xtbj.ac.cn/>)进行BLAST比对, 结合MEME (Multiple Em for Motif Elicitation) (<http://meme-suite.org/tools/meme>) 和CDD (Conserved Domain Database) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd>)进一步筛选出具有半胱氨酸蛋白酶结构域的成员(Finn et al., 2016), 并利用HMM构建小桐子半胱氨酸蛋白酶家族的隐马尔科夫模型, 再次对候选序列进行筛选(闫晨阳和陈赢男, 2020)。基于以上2种方法得到的候选序列, 使用ExPASy ProtParam工具(<http://web.expasy.org/protparam/>)计算每个半胱氨酸蛋白酶家族成员的物理化学性质, 包括分子量和理论等电点(Chen et al., 2018; 王海波等, 2019; 宋敏等, 2020)。

1.5 小桐子半胱氨酸蛋白酶家族的系统发育关系、多序列比对、染色体定位和蛋白质结构域分析

为分析水稻和蓖麻与小桐子半胱氨酸蛋白酶家族基因的系统发育关系, 用Clustal X Ver. 1.81对这3种植物的半胱氨酸蛋白酶家族基因进行多序列比对, 然后使用MEGA 7.0基于最大似然法(maximum likelihood)生成包含1 000个bootstrap重复的系统发育树(Zou et al., 2018)。为识别半胱氨酸蛋白酶中的保守基序, 使用MEME在线软件分析半胱氨酸蛋白酶家族的蛋白结构域。从小桐子基因组中获得半胱氨酸蛋白酶基因在相应支架上的具体位置, 利用已构建的连锁图(Wu et al., 2015), 在TBtools中完成染色体定位(Chen et al., 2020)。为对半胱氨酸蛋白酶的蛋白序列进行同源性分析, 本研究选取原则: (1) 比对长度>基因总长度的70%; (2) 同源性>比对长度的74.99%, 进行基因重复事件分析(Wang et al., 2018a)。

1.6 小桐子半胱氨酸蛋白酶家族基因及相应mi-RNAs的数字表达谱分析

利用小桐子数据库(<http://jcdb.xtbj.ac.cn/>)中公开的RNA-seq数据进行数字表达谱分析(Zhang et al., 2019), 其中包括小桐子植株在不同组织/器官的表达信息。本研究采用的小桐子低温锻炼过程的转录组、miRNA组和降解组数据来自本实验室测序数据, 登录号见1.3节。

1.7 筛选和鉴定靶向小桐子半胱氨酸蛋白酶家族基因的miRNAs

为了分析是否存在靶向小桐子半胱氨酸蛋白酶家族基因的miRNAs, 利用本实验室在小桐子低温锻炼过程中测序获得的miRNA组(miRNAome)和降解组(degradome)数据(登录号见1.3节), 筛选和鉴定靶向半胱氨酸蛋白酶家族基因的miRNAs。使用Cyto-scape软件对miRNAs与小桐子半胱氨酸蛋白酶基因之间的调控关系进行可视化展示。

1.8 低温锻炼过程中小桐子半胱氨酸蛋白酶基因及相关miRNAs表达的qRT-PCR验证

为验证半胱氨酸蛋白酶基因与靶向miRNAs的互作关系, 我们挑选小桐子半胱氨酸蛋白酶家族3个基因及相关的miRNAs进行qRT-PCR分析, 根据基因序列设计特异性定量引物(表1), 使用Trizol试剂从冷冻叶片中提取总RNA, 用反转录试剂盒PrimerScript RT Reagent Kit with gDNA Erase (Takara, 大连)将RNA反转录成cDNA, 保存于-80℃冰箱, 备用。

miRNA提取按照Plant miRNA Kit R6727-01试剂盒(OMEGA)说明书进行, 使用miRNA第1链和cDNA合成试剂盒(天根, 北京)进行miRNA反转录, 反转录的cDNA保存在-80℃冰箱, 备用。参照孔春艳等(2019)的方法, U6和GAPDH作为内参基因, 以内参基因对表达量进行归一化。利用LightCycler® 96

表1 qRT-PCR相关引物

Table 1 The related primers for qRT-PCR

Primer name	Sequence (5'→ 3')
miR1314-y-F	GCCGGTCTCCAATGTTAGG
miR1151-y-F	ATCTGGTTGTGGGACCCG
miR5156-x-F	GCGAGACTGTGAACTGCAAA
miR6483-y-F	GCGTTGTAGAAATTTTCAGGATCA
JcXBCP3L-F	TCTGTGGGTATGGATGGTTCTGC
JcXBCP3L-R	ACCCCAGTCAGTACCCACGA
JcRD21B-F	CAACGCTTTAGGAGAGAAGGAA
JcRD21B-R	ACGCAACTTGTTCCTCCTGAC
JcDEK1-F	TGCTGGGAAATTCTGGTG
JcDEK1-R	AGCCGTCAAACCCACCA
Reverse primer	GCTGTCAACGATACGCTACGTAACG
U6-F	GGAACGATACAGAGAAGATT
GAPDH-F	TGAAGGACTGGAGAGGTGGAAGAGC
GAPDH-R	ATCAACAGTTGGAACACGGAAAGCC

System (Roche, Switzerland)进行qRT-PCR反应。qRT-PCR最终体积为10  $\mu\text{L}$ : 1  $\mu\text{L}$  cDNA模板、正反向引物各0.4  $\mu\text{L}$  ( $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )、5  $\mu\text{L}$  TB Green Premix Ex Taq II和3.2  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O。qRT-PCR反应程序为95°C预变性30秒; 95°C变性5秒, 55°C退火5秒, 2步扩增45个周期; 最后一步进行60–97°C熔解曲线分析。qRT-PCR数据处理参照孔春艳等(2019)的方法。

## 2 结果与讨论

### 2.1 小桐子半胱氨酸蛋白酶基因家族成员的鉴定

基于从MEROPS数据库(Release 12.0) (<http://www.ebi.ac.uk/merops>)中下载的拟南芥、水稻、蓖麻、杨

树和番茄的半胱氨酸蛋白酶氨基酸序列, 以及本实验室获得的小桐子在正常培养和低温锻炼下的转录组数据(PRJNA661688), 进行NCBI数据库比对和对小桐子蛋白质数据库进行BLAST检索, 结合MEME、CDD和HMM分析了半胱氨酸蛋白酶候选序列及结构域, 共鉴定到39个小桐子半胱氨酸蛋白酶基因, 分析了本研究中鉴定的半胱氨酸蛋白酶的部分理化特征(表2)。序列分析结果显示, 半胱氨酸蛋白酶肽链的长度范围为181 (JcSAG12H6)–2 158 aa (JcDEK1), 平均为404.33 aa。分子质量(Mw)的范围在20 779.04 (JcSAG12H6)–239 010.06 (JcDEK1) Da之间。理论等电点(pI)范围在4.66 (JcUCH3)–9.49 (JcSAG12H7)之间。39个成员分别定位于11条染色体上(表2)。

**表2** 小桐子中已鉴定的半胱氨酸蛋白酶的理化性质

**Table 2** Physicochemical properties of identified cysteine proteins in *Jatropha curcas*

Locus ID	Gene name	Subgroup	Chr.	Size (aa)	Mw (Da)	pI
XM_012209792.1	<i>JcRD21A</i>	C1A	Chr. 10	475	52682.16	5.39
XM_012221410.1	<i>JcSAG12H4</i>	C1A	Chr. 4	340	37417.89	5.13
XM_012226309.1	<i>JcSAG12H1</i>	C1A	Chr. 3	311	34256.46	6.89
XM_012216029.1	<i>JcSAG12H2</i>	C1A	Chr. 7	268	28610.75	4.66
XM_012216557.1	<i>JcXBCP3</i>	C1A	Chr. 4	441	48817.81	6.06
XM_012218796.1	<i>JcRD21A1</i>	C1A	Chr. 10	358	40417.25	5.10
XM_012223641.1	<i>JcALP1</i>	C1A	Chr. 7	347	38935.92	8.43
XM_012225588.1	<i>JcRD19B</i>	C1A	Chr. 10	409	44955.43	6.71
XM_012230158.1	<i>JcCEP2</i>	C1A	Chr. 7	358	39943.84	6.19
XM_012233098.1	<i>JcSAG12H5</i>	C1A	Chr. 9	340	37592.12	5.01
XM_012236390.1	<i>JcXBCP3L</i>	C1A	Chr. 3	524	58042.85	5.24
XM_012219020.1	<i>JcXCP1</i>	C1A	Chr. 5	349	39054.13	5.59
XM_012211812.1	<i>JcRD19A</i>	C1A	Chr. 2	370	40564.71	5.95
XM_012212907.1	<i>JcRD21B</i>	C1A	Chr. 4	466	51785.03	5.28
XM_012213199.1	<i>JcSAG12H3</i>	C1A	Chr. 2	339	37598.38	5.94
XM_012216569.1	<i>JcRD19C</i>	C1A	Chr. 4	368	40923.12	5.81
XM_012218200.1	<i>JcXCP2</i>	C1A	Chr. 4	350	39176.15	5.40
XM_012221663.1	<i>JcTHI1</i>	C1A	Chr. 11	358	39435.49	5.88
XM_012223907.1	<i>JcRD21C</i>	C1A	Chr. 7	366	41119.35	5.40
XM_012224546.1	<i>JcCEP1</i>	C1A	Chr. 5	360	40142.92	5.69
XM_020685390.1	<i>JcSAG12H6</i>	C1A	Chr. 3	181	20779.04	9.49
XM_020685389.1	<i>JcSAG12H7</i>	C1A	Chr. 3	181	20779.04	9.49
XM_012227664.1	<i>JcCTB1</i>	C1A	Chr. 8	358	39709.10	6.07
XM_012225478.1	<i>JcDEK1</i>	C2	Chr. 1	2158	239010.06	6.03
XM_012224060.1	<i>JcUCH2</i>	C12	Chr. 4	337	38597.28	6.43
XM_012214672.1	<i>JcUCH3</i>	C12	Chr. 9	236	26006.51	4.66
XM_012231737.1	<i>JcVPE2</i>	C13	Chr. 9	495	55104.34	5.58
XM_012221936.1	<i>JcVPE1</i>	C13	Chr. 11	493	54253.23	5.93
XM_012232060.1	<i>JcVPE3</i>	C13	Chr. 5	485	54983.84	6.22
XM_012229170.1	<i>JcAMC4G</i>	C14	Chr. 5	418	45953.22	5.18

表 2 (续)  
Table 2 (continued)

Locus ID	Gene name	Subgroup	Chr.	Size (aa)	Mw (Da)	pI
XM_012227353.1	<i>JcAMC9A</i>	C14	Chr. 3	317	35221.20	5.84
XM_012213747.1	<i>JcAMC3B</i>	C14	Chr. 2	374	41063.04	5.71
XM_012213748.1	<i>JcAMC1C</i>	C14	Chr. 2	330	37646.13	8.05
XM_012213889.1	<i>JcAMC2D</i>	C14	Chr. 2	406	45165.20	8.65
XM_012213890.1	<i>JcAMC1E</i>	C14	Chr. 2	335	37746.43	8.10
XM_012228350.1	<i>JcAMC1F</i>	C14	Chr. 8	362	39681.00	6.41
XM_012235144.1	<i>JcAMC1H</i>	C14	Chr. 5	370	40503.80	6.34
XM_012230023.1	<i>JcPCP1</i>	C15	Chr. 7	217	23577.96	6.07
XM_012233456.1	<i>JcPCP2</i>	C15	Chr. 6	219	23969.43	6.08

2.2 系统发育进化分析

根据已发表文献和MEROPS数据库获得水稻和蓖麻的半胱氨酸蛋白酶序列(Zou et al., 2018; Niño et al., 2020), 利用Clustal X Ver. 1.81对水稻、蓖麻和小桐子的半胱氨酸蛋白酶氨基酸序列进行多重比对,

构建无根系统进化树, 探究小桐子半胱氨酸蛋白酶家族的进化关系(图1)。结果表明, 小桐子半胱氨酸蛋白酶家族可分为6个亚家族, 分别为C1A、C2、C12、C13、C14和C15。其中, C13和C15亚家族成员聚类紧密, 小桐子和蓖麻在各亚家族数量上基本保持一

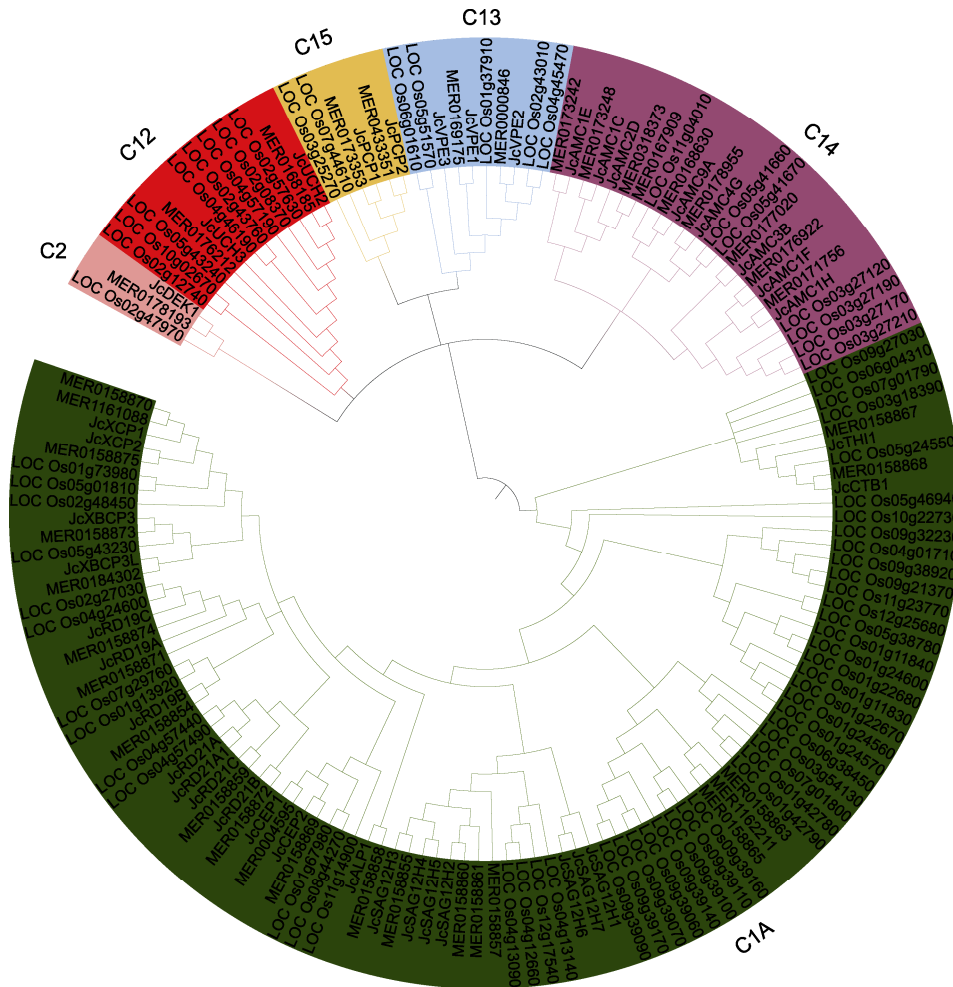


图1 小桐子、水稻和蓖麻半胱氨酸蛋白酶家族的系统发育进化树

Figure 1 Phylogenetic tree of cysteine protease family in *Jatropha curcas*, *Oryza sativa* and *Ricinus communis*

致; C1A亚家族成员最多(23个), C2亚家族小桐子和蓖麻各仅有1个成员, C12亚家族有2个成员(JcUCH2和JcUCH3), C13亚家族有3个成员(JcVPE2、JcVPE1和JcVPE3), C14亚家族有8个成员, C15亚家族有JcPCP1和JcPCP2两个成员。

### 2.3 小桐子半胱氨酸蛋白酶家族的蛋白结构域分析

基于MEROPs数据库分析, 得到C1A、C2、C12、C13、C14和C15六个亚家族的蛋白结构(图2)。结果表明, 小桐子半胱氨酸蛋白酶家族的6个亚家族成员均具有Cys和His的共同活性位点, 这是半胱氨酸蛋白酶的特征(Ahmad et al., 2014), 同一亚家族的成员大多数在基序组成上有相似之处(图2)。

为探明小桐子半胱氨酸蛋白酶的特征基序, 使用MEME搜索工具, 确定了9个最重要的基序, 得到小桐子半胱氨酸蛋白酶保守基序结构域前体序列为ExxxRxxxxxxN/VxxxNx (图3)。其中WRxxGAV和LSEoxLVD基序均显示在图3的第1行。

### 2.4 染色体定位及基因重复事件分析

基于Wu等(2015)构建小桐子遗传连锁图谱, 对小桐子半胱氨酸蛋白酶家族基因进行染色体定位, 并利用

TBtools软件绘图(图4)。结果表明, 39个半胱氨酸蛋白酶基因分别位于11条染色体(Chr. 1–Chr. 11)上。每条染色体上的半胱氨酸蛋白酶基因数目不等, 有的成簇分布在不同的染色体上。其中Chr. 11上有2个, Chr. 2和Chr. 4上各有6个, Chr. 3、Chr. 5和Chr. 7上各有5个, Chr. 11和Chr. 8上各有2个, Chr. 9和Chr. 10上各有3个半胱氨酸蛋白酶基因。上述结果表明, 半胱氨酸蛋白酶基因在不同染色体上分布不均, 而且每个亚家族的基因在不同染色体上也分布不均(图4)。进一步对蛋白序列同源性和基因重复性进行比较, 表明在小桐子半胱氨酸蛋白酶基因家族中, 有18对基因发生了基因重复事件, 其中有7对同源性达90%以上, *JcRD21A*和*JcRD21A1*、*JcSAG12H6*和*JcSAG12H7*的同源性分别为95.60%和95.87%, 且位于同一条染色体上, 在染色体上的位置紧密相邻排列, 可能是这2对基因发生了串联重复。*JcSAG12H5*和*JcSAG12H4*、*JcSAG12H3*和*JcSAG12H4*、*JcSAG12H5*和*JcSAG12H3*的同源性分别达92.70%、90.2%和90.20%, 且分布于不同染色体上, 这可能是发生了染色体异位重复所致。在发生片段重复的半胱氨酸蛋白酶基因中, 有一些基因(如*JcSAG12H6*和*JcSAG12H7*)来自同一亚家族, 可能是进化过程中发生复制, 产生了串联重复(图4)。

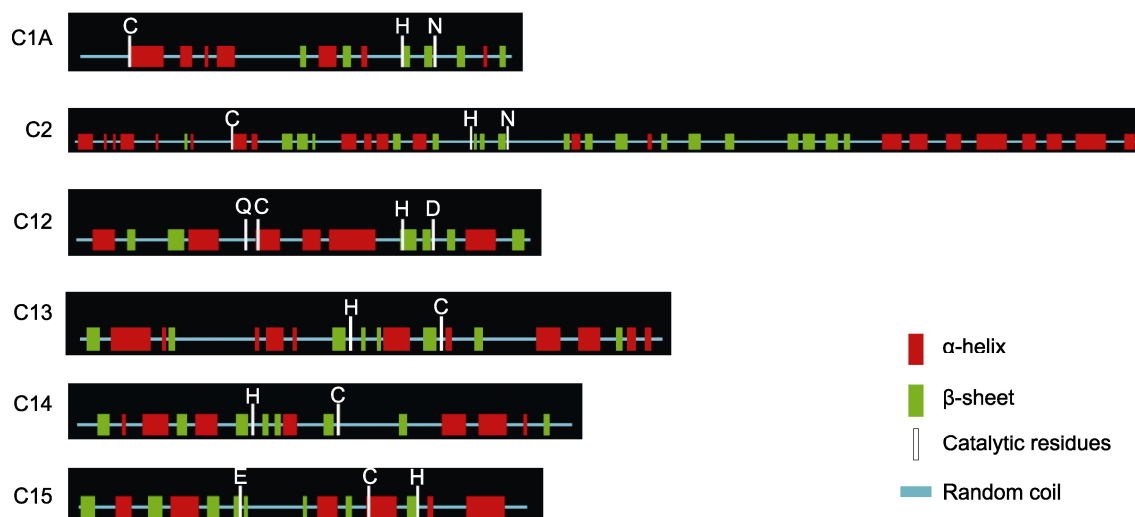


图2 小桐子6个半胱氨酸蛋白酶亚家族的蛋白结构

C: 半胱氨酸; D: 天冬氨酸; E: 谷氨酸; H: 组氨酸; N: 天冬酰胺; Q: 谷氨酰胺

Figure 2 Protein structure of the six cysteine protease subfamilies in *Jatropha curcas*

C: Cys; D: Asp; E: Glu; H: His; N: Asn; Q: Gln

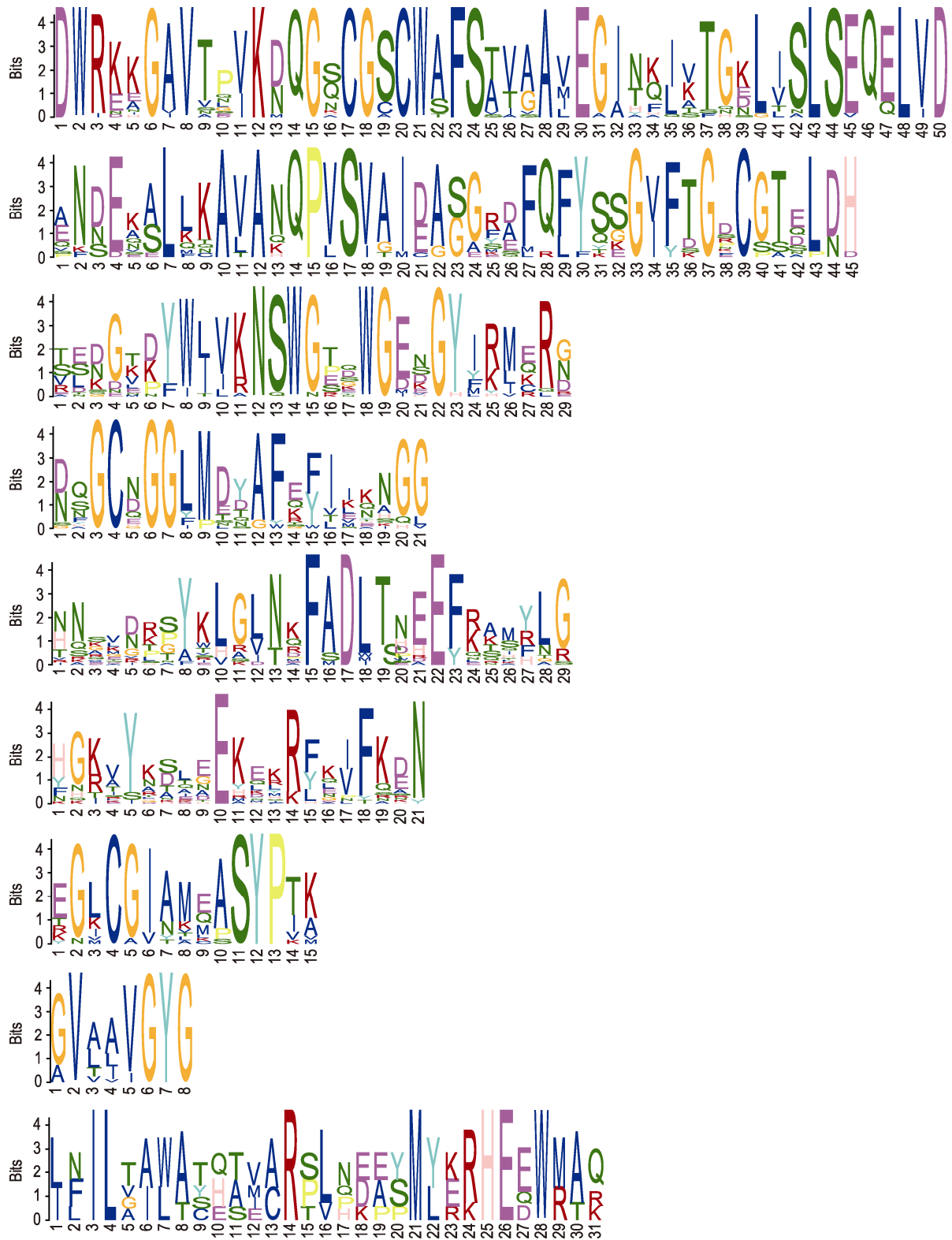


图3 使用MEME软件确定的小桐子半胱氨酸蛋白酶家族9个重要的基序  
横坐标表示基序的长度；纵坐标表示基序的保守程度。

Figure 3 The top nine motifs of cysteine protease family in *Jatropha curcas* identified using the MEME software  
The abscissa represents the length of the motif; the ordinate indicates the conservatism of the motif.



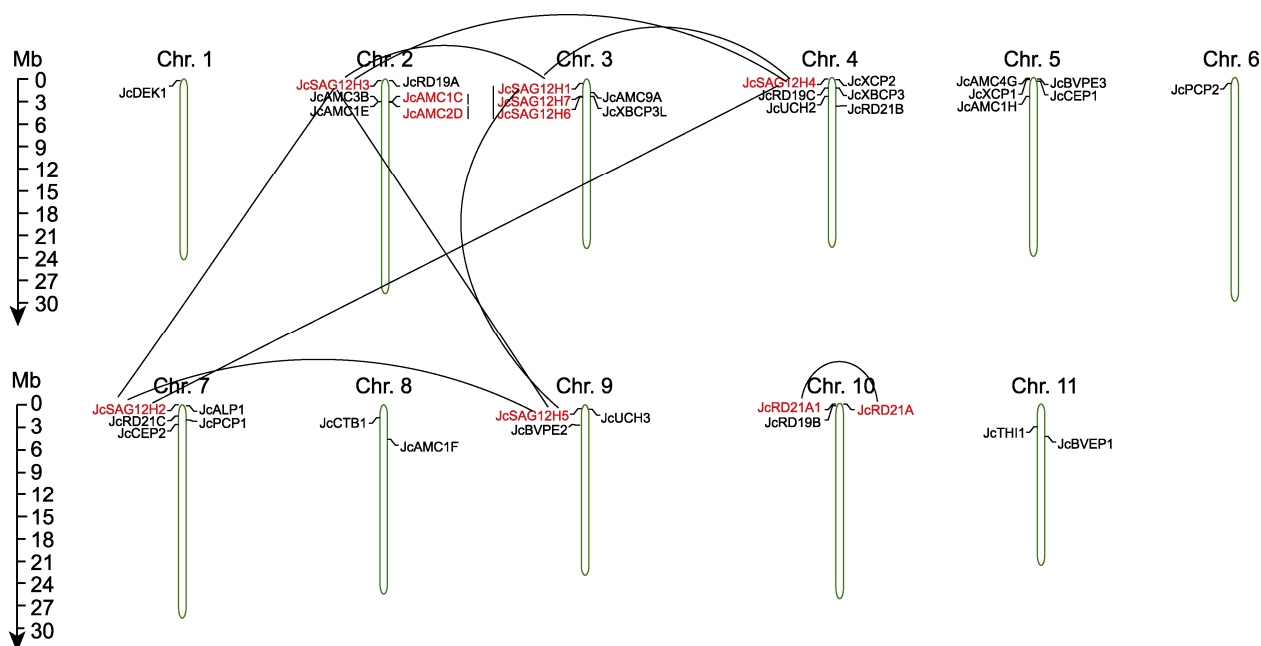


图4 小桐子半胱氨酸蛋白酶基因染色体定位及成对发生的重复事件  
重复基因对用线显示和连接。

Figure 4 Chromosome location and repetitive events of cysteine protease gene pairs in *Jatropha curcas*  
Repeated gene pairs are shown and linked by the lines.

## 2.5 小桐子半胱氨酸蛋白酶家族基因在不同器官中的表达谱分析

基于小桐子数据库中公开的RNA-seq数据, 对半胱氨酸蛋白酶基因家族在小桐子不同器官中的表达量进行数字表达谱分析。结果表明, 小桐子半胱氨酸蛋白酶家族基因在花蕾、种子、茎端和叶片中均有表达(图5), 其中, *JcRD21B*、*JcRD19A*、*JcBVPE2*、*JcRD21C*、*JcCEP1*、*JcRD21A*、*JcUCH2*、*JcCTB1*、*JcRD19C*和*JcAMC1F*这10个基因在花、种子、茎端和叶片中表达丰度较高, 而*JcAMC1H*、*JcXBCP3L*、*JcAMC3B*、*JcDEK1*、*JcBVPE3*、*JcSAG12H*、*JcAMC1E*、*JcSAG12H1*、*JcRD19B*、*JcXCP1*、*JcSAG12H7*、*JcALP1*、*JcPCP1*、*JcPCP2*、*JcSAG12H6*、*JcAMC9A*、*JcSAG12H4*、*JcXCP2*、*JcAMC1C*、*JcSAG12H3*和*JcAMC2D*在花、种子、茎端和叶片中的表达丰度相对较低。

## 2.6 低温锻炼期间小桐子半胱氨酸蛋白酶家族基因的数字表达谱分析

前期研究表明, 12°C低温锻炼48小时可显著增强小

桐子在1°C下的耐冷性(Ao et al., 2013a, 2013b)。利用本实验室测序获得的小桐子在低温锻炼过程中的转录组数据(PRJNA661688), 对半胱氨酸蛋白酶家族基因的表达谱进行分析(图6)。结果表明, 该家族大部分成员在12°C低温锻炼期间均明显上调表达, 其中*JcAMC1H*在6小时表达量最高; 而*JcCEP2*、*JcSAG12H7*和*JcSAG12H4*在低温锻炼前期呈下调表达趋势。

## 2.7 小桐子靶向半胱氨酸蛋白酶家族基因的miRNAs鉴定

基于本实验室测序数据, 通过筛选降解组(PRJNA661178)和miRNA组(PRJNA660857)中小桐子半胱氨酸蛋白酶基因家族中对应的miRNAs, 共预测到14个半胱氨酸蛋白酶基因受283个miRNAs调控(图7)。其中, *JcRD21C*受139个miRNAs调控, *JcDEK1*、*JcXBCP3L*和*JcRD21B*分别受34、30和17个miRNAs调控, *JcRD19A*、*JcAMC4G*和*JcXCP2*分别受5、3和2个miRNAs调控, *JcXCP1*、*JcALP1*、*JcRD19B*、*JcSAG12H1*、*JcAMC9A*、*JcAMC2D*和*JcRD19C*均只受1个miRNA调控。



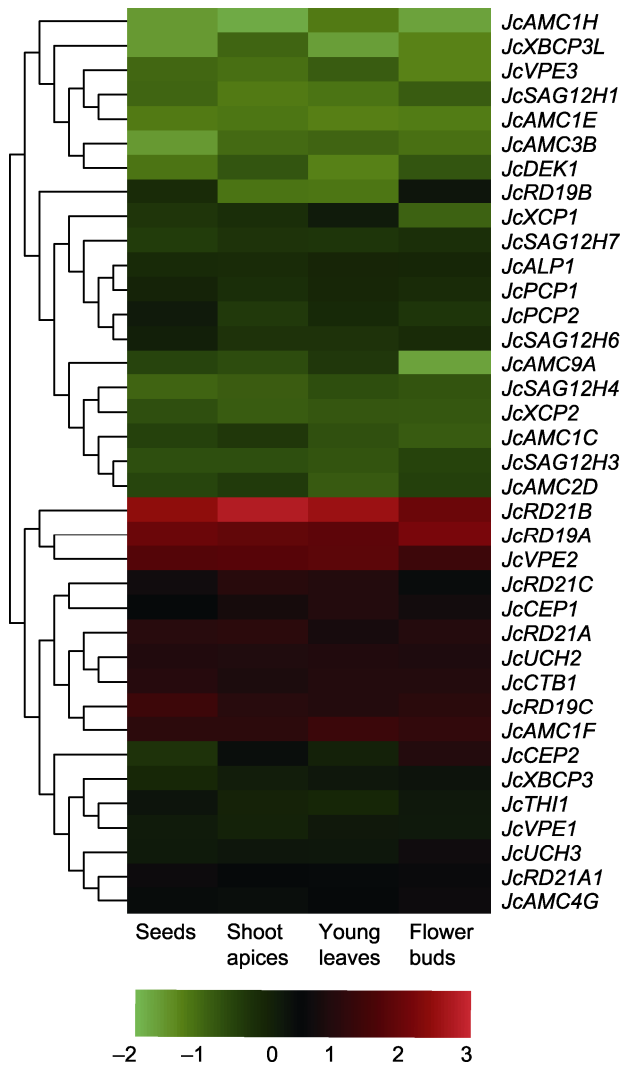


图5 小桐子半胱氨酸蛋白酶家族基因在不同器官中的表达热图

Figure 5 Heatmap of gene expression of cysteine protease family in different organs of *Jatropha curcas*

### 2.8 低温锻炼期间靶向小桐子半胱氨酸蛋白酶家族基因的miRNAs数字表达谱及qRT-PCR分析

基于前述靶向半胱氨酸蛋白酶家族基因miRNAs的鉴定结果, 利用本实验室在小桐子低温锻炼期间测序获得的miRNA组数据, 挑选40个差异倍数在2.5以上的miRNAs进行数字表达谱分析(图8)。结果表明, miR1314-y、miR7736-y、miR3630-y、miR1039-x和miR5168-x在12℃低温锻炼下表达显著下调, miR1215-x和miR5278-y均在低温锻炼6和12小时后表达显著上调, miR6485-x、novel-m0130-5p、

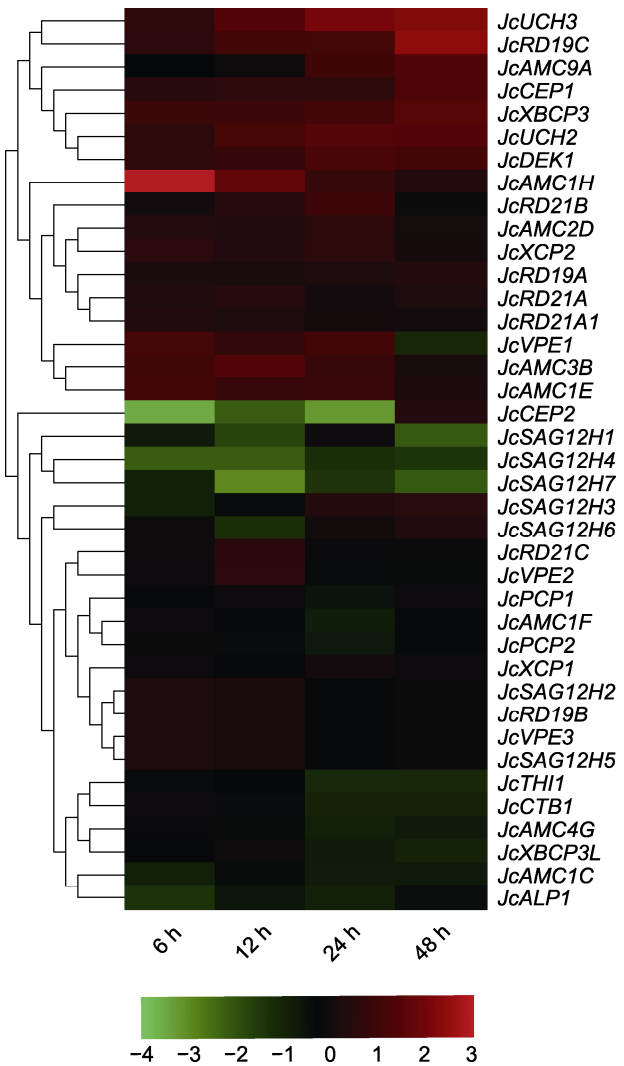


图6 小桐子幼苗叶片半胱氨酸蛋白酶家族基因在12℃低温锻炼期间基因表达的热图

Figure 6 Heatmap of gene expression of cysteine protease family in leaves of *Jatropha curcas* seedlings during chill-hardening at 12℃

miR8639-y、miR3522-x和miR6112-y在12℃低温锻炼6小时后表达显著上调。值得注意的是, miR1314-y、miR7736-y、miR3630-y、miR1039-y、miR5168-x、novel-m0074-3p和miR5156-x在低温锻炼期间表达明显下调(图8), 而这些miRNAs靶向的半胱氨酸蛋白酶基因JcDEK1在低温锻炼期间表达逐渐上调(图6), 它们之间呈现明显的负相关。与之类似, JcRD21C在低温锻炼期间表达下调(图6), 而靶向其基因的novel-m0113-3p在低温锻炼12–48小时期间表达上调, miR1215-x在低温锻炼6–12小时期间表达上调,

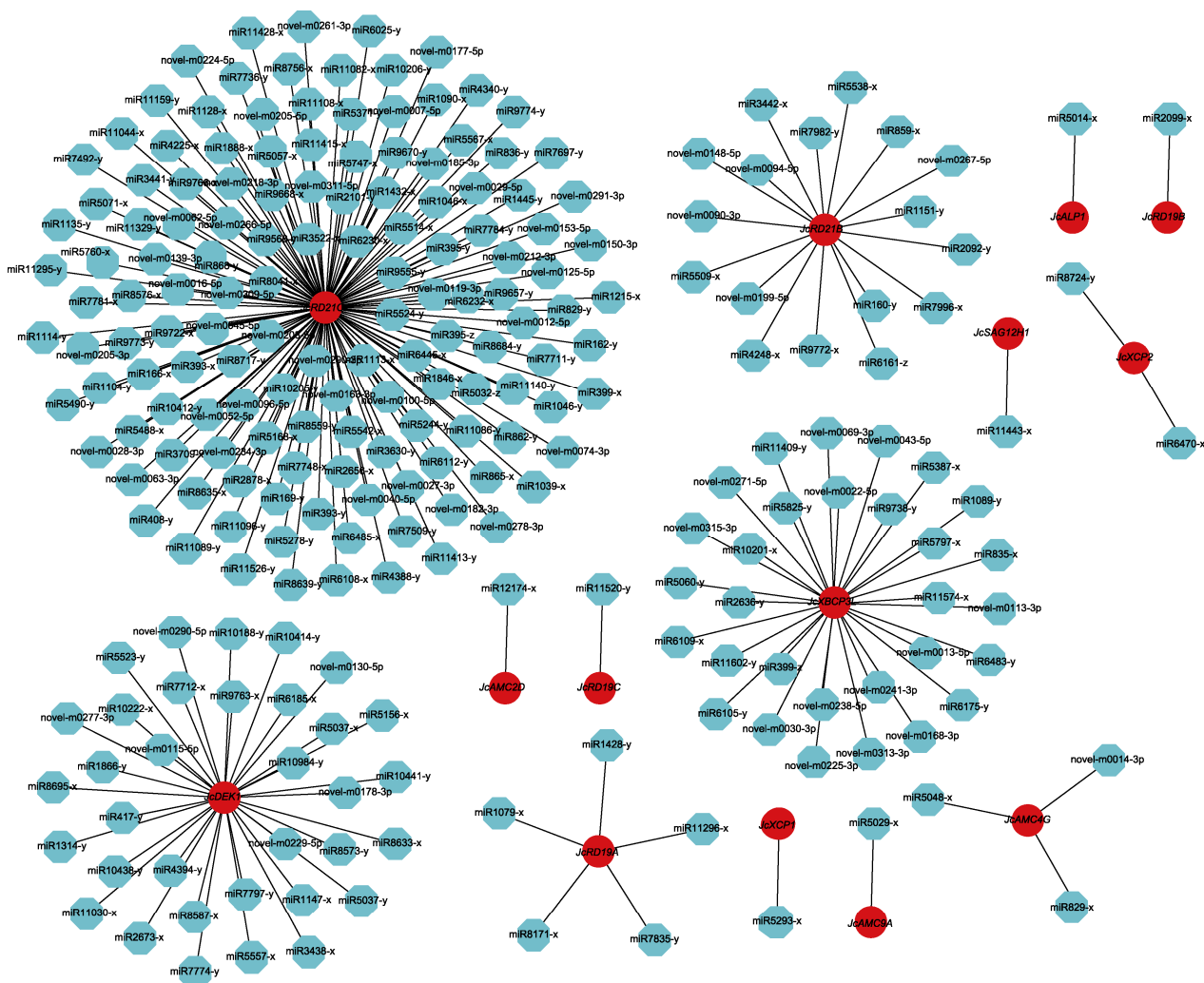


图7 miRNAs靶向调控小桐子半胱氨酸蛋白酶家族基因的网络图  
红色代表半胱氨酸蛋白酶基因, 蓝色代表miRNAs。

**Figure 7** Networks of targeted regulation among miRNAs and their corresponding cysteine protease family genes in *Jatropha curcas*  
Red represents cysteine protease gene and blue represents miRNAs.

miR8639-y、miR3522-y和miR6112-y在低温锻炼6小时后表达明显上调(图8)。这些miRNAs与靶向的*JcRD21C*总体呈负调控趋势, 表明miRNAs与其靶向的半胱氨酸蛋白酶基因存在负调控关系。

为进一步证实靶向半胱氨酸蛋白酶家族基因的miRNAs与其靶基因的互作关系, 以及在小桐子低温响应中的作用, 我们挑选在低温锻炼期间差异表达的3个半胱氨酸蛋白酶基因(*JcDEK1*、*JcRD21B*和*JcXBCP3*)与靶向它们的miR1314-y、miR5156-x、miR6483-y和miR1151-y进行qRT-PCR共表达分析(图9)。结果表明, 在12°C低温锻炼期间, 3个半胱氨酸

蛋白酶基因在12小时后表达量明显上调, 而后逐渐下降, 到48小时均下降到较低的水平(图9)。而靶向这3个基因的miR1314-y、miR5156-x、miR6483-y和miR1151-y的表达都呈一定的上升趋势, 在48小时尤为显著。在整个12°C低温锻炼过程中, *JcDEK1*与miR1314-y、miR5156-x呈负相关, 相关系数分别为 $R=-0.665\ 0$ 和 $R=-0.369\ 6$  (图9A, B); *JcRD21B*与miR1151-y在12、24和48小时呈负调控趋势, 相关系数 $R=-0.755\ 2$  (图9C); *JcXBCP3*与miR6483-y在6、12和24小时呈明显负相关, 相关系数 $R=-0.929\ 5$  (图9D)。上述结果进一步表明, 小桐子miRNAs对其

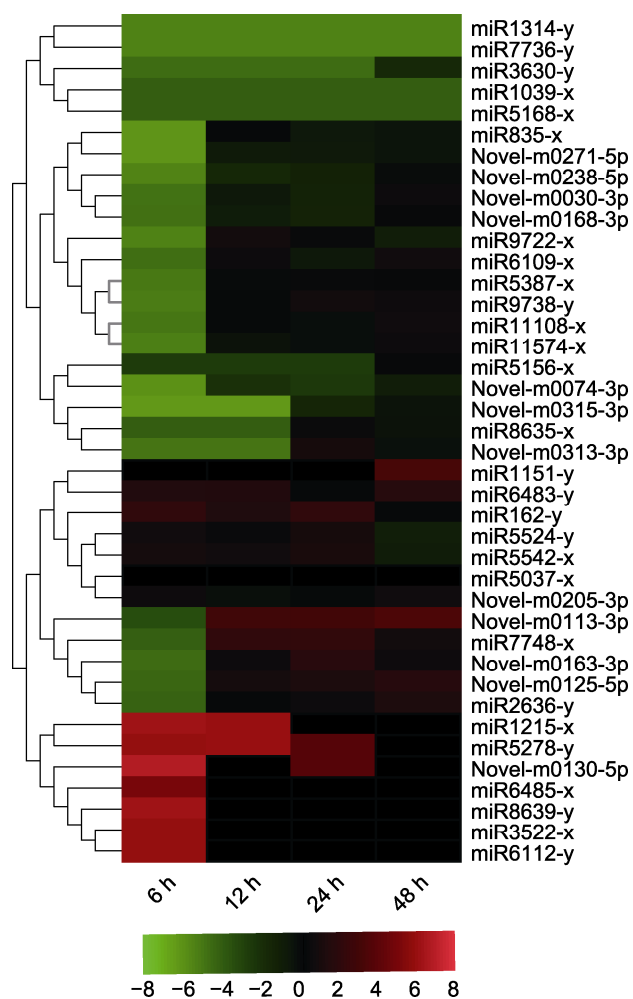


图8 靶向调控小桐子半胱氨酸蛋白酶家族基因的miRNAs在12°C低温锻炼期间的热图

Figure 8 Heatmap of miRNAs targeting cysteine protease family genes in *Jatropha curcas* during 12°C chill-hardening

靶向的半胱氨酸蛋白酶基因有负调控作用。

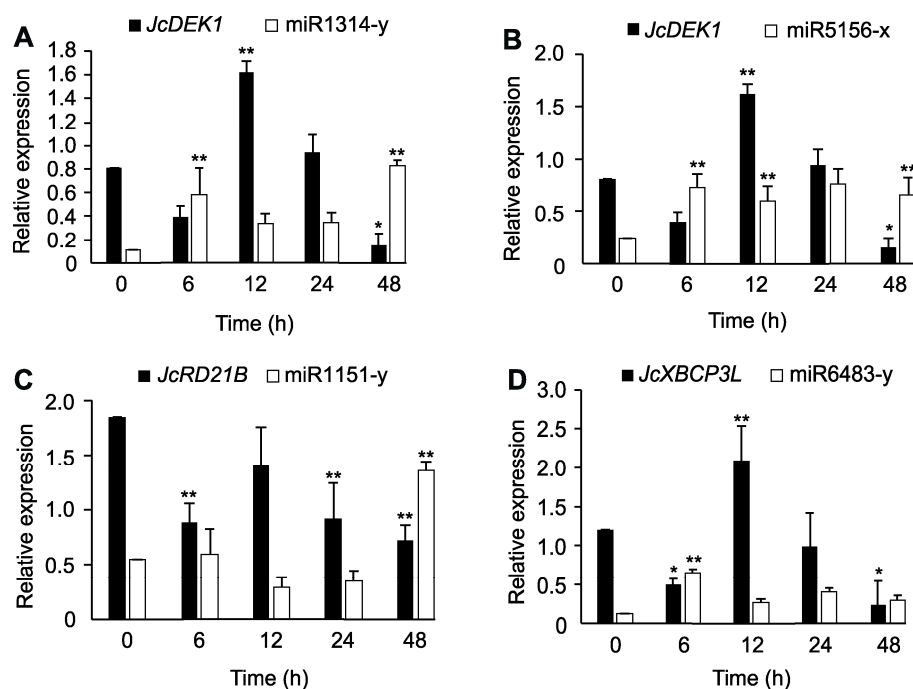
## 2.9 讨论

关于半胱氨酸蛋白酶全基因家族分析与鉴定目前仅在水稻中有正式报道(Niño et al., 2020), 更多研究则聚焦于半胱氨酸蛋白酶家族下各亚家族的分析与鉴定。其中, C1A木瓜类半胱氨酸蛋白酶亚家族已经在多种植物中得到鉴定, 如拟南芥(Richau et al., 2012)、水稻(Wang et al., 2018b)、柑橘(*Citrus reticulata*) (Clark et al., 2018)、蓖麻和小桐子(Zou et al., 2018)。其中, Zou等(2018)对蓖麻和小桐子半胱氨酸蛋白酶家族中的C1A亚家族进行了详细鉴定。本研究进一步对小桐子半胱氨酸蛋白酶全基因家族进

行解析, 增加了对其它5个亚家族成员的分析, 并对靶向该家族基因成员的miRNA进行鉴定与qRT-PCR验证, 使我们对这一基因家族及其表达调控有了更完整的认识。

本研究在基因组层面上对小桐子半胱氨酸蛋白酶全基因家族进行了生物信息学分析, 共鉴定到39个家族成员, 可分为C1A、C2、C12、C13、C14和C15共6个亚家族, 定位于11条染色体上, 部分基因之间发生了片段重复, 如*JcRD21A*和*JcRD21A1*, *JcSAG12H6*和*JcSAG12H7*, 而*JcSAG12H5*和*JcSAG12H4*、*JcSAG12H3*和*JcSAG12H4*、*JcSAG12H5*和*JcSAG12H3*之间的氨基酸同源性达90%以上, 位于不同染色体之间, 推测可能是发生了染色体异位重复(图1, 图4)。蛋白结构域分析结果表明, 小桐子半胱氨酸蛋白酶家族均具有共同的Cys和His活性位点, 保守基序结构域前体序列为ExxxRxxxxxxN/VxxxNx (图2, 图3)。基于RNA-seq的研究结果表明, 小桐子半胱氨酸蛋白酶基因家族的39个成员在植株的不同组织/器官及在低温锻炼过程中均呈现空间和时间的差异化表达(图5, 图6)。Zou等(2018)研究表明, C1A家族大部分成员在小桐子叶片中表达量较高, 根据本研究结果及与其它5个亚家族成员进行横向比较, 我们发现在种子、花蕾、茎端和叶片中表达量占比较大的基本是C1A亚家族成员, 表明该基因家族不同成员的表达水平在小桐子生长发育的不同阶段及对不同外界环境刺激过程中存在差异化响应。这些结果对我们深入理解小桐子半胱氨酸蛋白酶家族各成员在生长发育过程和对环境变化响应中的作用具有参考价值。

研究证明, 逆境胁迫下细胞内变性或失活蛋白的标记、定向降解及其调控在植物响应和适应逆境胁迫过程中起重要作用, 而半胱氨酸蛋白酶家族作为植物蛋白水解酶的主要组分, 其家族不同成员参与植物多种抗逆调控。例如, 甘蓝型油菜(*Brassica napus*) 在4°C低温下, 其编码半胱氨酸蛋白酶的*bcp-15*转录本积累最多; 置于4°C的第1天, 转录水平增加了8.5倍, 4天后, 转录水平下降到基础水平的6.4倍(Stroeher et al., 1997)。在PEG、盐和冷胁迫下, 小麦(*Triticum aestivum*) PLCP基因(*TaCP*)表达显著上调(Zang et al., 2010)。过表达旱柳(*Salix matsudana*)半胱氨酸蛋白酶基因*SmCP*可提高转基因拟南芥的耐盐性



**图9** 小桐子幼苗在12℃低温锻炼期间半胱氨酸蛋白酶基因*JcDEK1*、*JcRD21B*、*JcXBCP3L*以及靶向这些基因miRNAs的qRT-PCR共表达分析

\*与\*\*分别表示不同时间的表达量与对照0小时在 $P<0.05$ 与 $P<0.01$ 水平差异显著。

**Figure 9** Co-expression analysis by qRT-PCR of the cysteine protease genes *JcDEK1*, *JcRD21B* and *JcXBCP3L* as well as the miRNAs targeting these genes in *Jatropha curcas* seedlings during chill-hardening at 12°C

\* and \*\* indicated the significant differences between the expression level at different time and control 0 h at  $P<0.05$  and  $P<0.01$  level, respectively.

(Zheng et al., 2018)。本实验室前期研究表明, 12℃低温锻炼48小时可显著提高小桐子幼苗在1℃低温胁迫下的耐冷性, 这涉及抗氧化防御系统的激活、渗透调节能力增强及膜质脂肪酸组分改变(Ao et al., 2013a, 2013b; Li et al., 2014)。在本研究中, 12℃低温锻炼的早期阶段, *JcUCH3*、*JcRD19C*、*JcXBCP3*、*JcUCH2*、*JcDEK1*和*JcAMC1H*等明显上调表达(图6, 图9), 暗示半胱氨酸蛋白酶基因家族的部分成员可能参与小桐子对低温的早期响应及信号转导过程。但半胱氨酸蛋白酶是一个大家族, 由许多成员组成, 其成员如何差异化地响应植物生长发育的各个阶段及多种环境刺激与胁迫尚不清楚, 值得深入研究。挑选该基因家族中对低温胁迫高响应的基因, 通过基因组编辑、RNA干扰以及过表达等手段进一步进行基因功能鉴定, 将有助于阐明半胱氨酸蛋白酶基因家族特定成员参与植物对低温的响应及调控植物耐冷性的机理。

已有研究表明, 大量miRNAs参与众多生物基因表达的调控(Wani et al., 2020; 郝大海和龚明, 2020;

张翠桔等, 2020), 但miRNAs是否参与调控半胱氨酸蛋白酶家族基因尚未见明确报道。本研究基于小桐子miRNA组和降解组测序结果, 发现有14个半胱氨酸蛋白酶基因受283个miRNAs靶向调控(图7)。比较低温锻炼过程中miRNAs与其靶向的半胱氨酸蛋白酶基因的表达谱(图6, 图8), 发现许多miRNAs与其靶向基因存在负调控关系。对*JcDEK1*、*JcRD21B*和*JcXBCP3L*及靶向它们的miRNAs的qRT-PCR共表达分析结果也表明, 这些半胱氨酸蛋白酶基因与miRNAs之间存在负调控关系, 在低温锻炼12–48小时期间尤为明显(图8), 表明这些miRNAs参与半胱氨酸蛋白酶基因的调控, 且其调控作用与低温锻炼诱导的小桐子耐冷性有关, 但具体调控哪些生化与分子途径还有待深入研究。后续可通过多组学联合分析, 解析基因组中编码半胱氨酸蛋白酶基因的转录因子与miRNA的关系, 有望进一步阐明miRNAs与半胱氨酸蛋白酶基因互作调控基因表达的具体机制, 以及这种互作如何参与调控植物对低温的响应与适应。

综上所述,本研究从全基因组水平对小桐子半胱氨酸蛋白酶基因家族成员进行鉴定,并阐明了其系统发育关系、染色体定位、基因结构、蛋白质结构域及基因表达模式;此外,鉴定了靶向半胱氨酸蛋白酶基因家族成员的miRNAs并进行共表达分析。研究结果将有助于深入理解小桐子半胱氨酸蛋白酶基因家族及其与相应miRNAs的互作,以及这种互作如何调控小桐子对低温的响应。

## 参考文献

- 郝大海, 龚明 (2020). miRNA作用机制研究进展. 基因组学与应用生物学 **39**, 3647–3657.
- 孔春艳, 陈永坤, 王莎莎, 郝大海, 杨宇, 龚明 (2019). 小桐子低温胁迫下microRNA实时荧光定量PCR内参的筛选与比较. 生物技术通报 **35**(7), 25–31.
- 李忠光, 龚明 (2011). 不同化学消毒剂对小桐子种子萌发和幼苗生长的影响. 种子 **30**(2), 4–7, 12.
- 宋敏, 张瑶, 王丽莹, 彭向永 (2020). 甘蓝型油菜ZF-HD基因家族的鉴定与系统进化分析. 植物学报 **54**, 699–710.
- 王海波, 郭俊云, 唐利洲 (2019). 小桐子MAPKKKK基因家族的全基因组鉴定及表达分析. 植物生理学报 **55**, 367–377.
- 王劲东, 周豫, 余佳雯, 范晓磊, 张昌泉, 李钱峰, 刘巧泉 (2020). miR172-AP2模块调控植物生长发育及逆境响应的研究进展. 植物学报 **55**, 205–215.
- 吴丹丹, 陈永坤, 杨宇, 孔春艳, 龚明 (2021). 小桐子cystatin家族基因和相应miRNAs的鉴定及其在低温响应中可能的作用. 植物生理学报 **57**, 347–361.
- 闫晨阳, 陈赢男 (2020). 4种模式植物LRR VIII-2亚家族基因的鉴定和进化历史分析. 植物学报 **55**, 442–456.
- 张翠桔, 莫蓓莘, 陈雪梅, 崔洁 (2020). 植物miRNA作用方式的分子机制研究进展. 生物技术通报 **36**(7), 1–14.
- Ahmad R, Zuily-Fodil Y, Passaquet C, Bethenod O, Roche R, Repellin A (2014). Identification and characterization of MOR-CP, a cysteine protease induced by ozone and developmental senescence in maize (*Zea mays* L.) leaves. *Chemosphere* **108**, 245–250.
- Ao PX, Li ZG, Fan DM, Gong M (2013a). Involvement of antioxidant defense system in chill hardening-induced chilling tolerance in *Jatropha curcas* seedlings. *Acta Physiol Plant* **35**, 153–160.
- Ao PX, Li ZG, Gong M (2013b). Involvement of compatible solutes in chill hardening-induced chilling tolerance in *Jatropha curcas* seedlings. *Acta Physiol Plant* **35**, 3457–3464.
- Chen C, Yu Y, Ding XD, Liu BD, Duanmu H, Zhu D, Sun XL, Cao L, Nisa ZU, Li Q, Zhu YM (2018). Genome-wide analysis and expression profiling of PP2C clade D under saline and alkali stresses in wild soybean and *Arabidopsis*. *Protoplasma* **255**, 643–654.
- Chen CJ, Chen H, Zhang Y, Thomas HR, Frank MH, He YH, Xia R (2020). TBtools: an integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data. *Mol Plant* **13**, 1194–1202.
- Clark K, Franco JY, Schwizer S, Pang Z, Hawara E, Liebrand T (2018). An effector from the huanglongbing-associated pathogen targets citrus proteases. *Nat Commun* **9**, 1718.
- Dando PM, Fortunato M, Strand GB, Smith TS, Barrett AJ (2003). Pyroglutamyl-peptidase I: cloning, sequencing, and characterisation of the recombinant human enzyme. *Protein Expr Purif* **28**, 111–119.
- Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH (1999). Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem* **68**, 383–424.
- Finn RD, Penelope C, Eberhardt RY, Eddy SR, Jaina M, Mitchell AL, Potter SC, Marco P, Matloob Q, Amaia SV (2016). The Pfam protein families database: towards a more sustainable future. *Nucleic Acids Res* **44**, D279–D285.
- Grudkowska M, Zagdanska B (2004). Multifunctional role of plant cysteine proteinases. *Acta Biochim Pol* **51**, 609–624.
- Hara-Nishimura I (1995). Vacuolar processing enzyme responsible for maturation of vacuolar proteins. *Seikagaku* **67**, 372–377.
- Hatsugai N, Kuroyanagi M, Nishimura M, Hara-Nishimura I (2006). A cellular suicide strategy of plants: vacuole-mediated cell death. *Apoptosis* **11**, 905–911.
- Kuroyanagi M, Yamada K, Hatsugai N, Kondo M, Nishimura M, Hara-Nishimura I (2005). Vacuolar processing enzyme is essential for mycotoxin-induced cell death in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* **280**, 32914–32920.
- Li ZG, Zeng HZ, Ao PX, Gong M (2014). Lipid response to short-term chilling shock and long-term chill hardening in *Jatropha curcas* L. seedlings. *Acta Physiol Plant* **36**, 2803–2814.
- Liu HJ, Hu MH, Wang Q, Cheng L, Zhang ZB (2018). Role of papain-like cysteine proteases in plant development. *Front Plant Sci* **9**, 1717.
- Megha S, Basu U, Kav NNV (2018). Regulation of low



- temperature stress in plants by microRNAs. *Plant Cell Environ* **41**, 1–15.
- Montes JM, Melchinger AE** (2016). Domestication and breeding of *Jatropha curcas* L. *Trend Plant Sci* **21**, 1045–1057.
- Niño MC, Kim MS, Kang KK, Cho YG** (2020). Genome-wide identification and molecular characterization of cysteine protease genes in rice. *Plant Biotechnol Rep* **14**, 69–87.
- Rawlings ND, Barrett AJ, Bateman A** (2010). MEROPS: the peptidase database. *Nucl Acids Res* **38**, D227–D233.
- Rawlings ND, Salvesen G** (2013). Handbook of Proteolytic Enzymes. Salt Lake City: Academic Press. pp. 1253–1257.
- Richau KH, Kaschani F, Verdoes M, Pansuriya TC, Niesen S, Stüber K, Colby T, Overkleeft HS, Bogyo M, Van der Hoorn RAL** (2012). Subclassification and biochemical analysis of plant papain-like cysteine proteases displays subfamily-specific characteristics. *Plant Physiol* **158**, 1583–1599.
- Shimada T, Yamada K, Kataoka M, Nakaune S, Koumoto Y, Kuroyanagi M, Tabata S, Kato T, Shinozaki K, Seki M, Kobayashi M, Kondo M, Nishimura M, Hara-Nishimura I** (2003). Vacuolar processing enzymes are essential for proper processing of seed storage proteins in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* **278**, 32292–32299.
- Stroeher VL, Maclagan JL, Good AG** (1997). Molecular cloning of a *Brassica napus* cysteine protease gene inducible by drought and low temperature stress. *Physiol Plant* **101**, 389–397.
- Vorster BJ, Cullis CA, Kunert KJ** (2019). Plant vacuolar processing enzymes. *Front Plant Sci* **10**, 479.
- Wang HB, Gong M, Guo JY, Xin H, Gao Y, Liu C, Dai DQ, Tang LZ** (2018a). Genome-wide Identification of *Jatropha curcas* MAPK, MAPKK, and MAPKKK gene families and their expression profile under cold stress. *Sci Rep* **8**, 16163.
- Wang HB, Zou ZR, Wang SS, Gong M** (2013a). Global analysis of transcriptome responses and gene expression profiles to cold stress of *Jatropha curcas* L. *PLoS One* **8**, e82817.
- Wang SS, Wang HB, Gong M** (2013b). Identification of microRNAs involved in chilling response by deep sequencing of *Jatropha curcas* L. small RNAs at the global genome level. In: Proceedings of the 21st European Biomass Conference and Exhibition. Copenhagen: European Union. pp. 356–363.
- Wang W, Zhou XM, Xiong HX, Mao WY, Zhao P, Sun MX** (2018b). Papain-like and legumain-like proteases in rice: genome-wide identification, comprehensive gene feature characterization and expression analysis. *BMC Plant Biol* **18**, 87.
- Wani SH, Kumar V, Khare T, Tripathi P, Shah T, Ramakrishna C, Aglawe S, Mangrauthia SK** (2020). miRNA applications for engineering abiotic stress tolerance in plants. *Biologia* **75**, 1063–1081.
- Wilkinson KD, Laleli-Sahin E, Urbauer J, Larsen CN, Shih GH, Haas AL, Walsh STR, Wand AJ** (1999). The binding site for UCH-L3 on ubiquitin: mutagenesis and NMR studies on the complex between ubiquitin and UCH-L3. *J Mol Biol* **291**, 1067–1077.
- Wu PZ, Zhou CP, Cheng SF, Wu ZY, Lu WJ, Han JL, Chen YB, Chen Y, Ni PX, Wang Y, Xu X, Huang Y, Song C, Wang ZW, Shi N, Zhang XD, Fang XH, Yang Q, Jiang HW, Chen YP, Li MR, Wang Y, Chen F, Wang J, Wu GJ** (2015). Integrated genome sequence and linkage map of physic nut (*Jatropha curcas* L.), a biodiesel plant. *Plant J* **81**, 810–821.
- Zang QW, Wang CX, Li XY, Guo ZA, Jing RL, Zhao J, Chang XP** (2010). Isolation and characterization of a gene encoding a polyethylene glycol-induced cysteine protease in common wheat. *J Biosci* **35**, 379–388.
- Zhang X, Pan BZ, Chen MS, Chen W, Li J, Xu ZF, Liu CN** (2019). JCDB: a comprehensive knowledge base for *Jatropha curcas*, an emerging model for woody energy plants. *BMC Genomics* **20**, 958.
- Zheng L, Chen SS, Xie LH, Lu ZC, Liu MY, Han XJ, Qiao GR, Jiang J, Zhuo RY, Qiu WM, He ZQ** (2018). Overexpression of cysteine protease gene from *Salix matsudana* enhances salt tolerance in transgenic *Arabidopsis*. *Environ Exp Bot* **147**, 53–62.
- Zou Z, Huang QX, Xie GS, Yang LF** (2018). Genome-wide comparative analysis of papain-like cysteine protease family genes in castor bean and physic nut. *Sci Rep* **8**, 331.



## Identification of the Cysteine Protease Family and Corresponding miRNAs in *Jatropha curcas* and Their Response to Chill-hardening

Dandan Wu<sup>1</sup>, Yongkun Chen<sup>1,2</sup>, Yu Yang<sup>1</sup>, Chunyan Kong<sup>1</sup>, Ming Gong<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Key Laboratory of Biomass Energy and Environmental Biotechnology of Yunnan Province, Engineering Research Center of Sustainable Development and Utilization of Biomass Energy, Ministry of Education, School of Life Sciences, Yunnan Normal University, Kunming 650500, China; <sup>2</sup>School of Life Sciences, Xinjiang Normal University, Urumqi 830054, China

**Abstract** *Jatropha curcas* is a kind of promising energy plants, but also a chilling-sensitive plant, which can be chill-hardening at 12°C with significant improvement of its chilling tolerance. In this study, the cysteine protease gene family of *J. curcas* and their corresponding miRNAs were identified at the genome-wide level. The results showed that a total of 39 cysteine protease genes were identified in *J. curcas* genome, which were located on 11 chromosomes and could be divided into six subfamilies (C1A, C2, C12, C13, C14 and C15); all encoding 181–2 158 amino acids with Cys and His active sites. Based on the sequencing results of miRNAome and degradome, 283 miRNAs were found to be targeted to 14 members of cysteine protease gene family. In addition, the co-expression analysis of those miRNAs targeting to *JcDEK1*, *JcRD21B* and *JcXBCP3L* during chill-hardening demonstrated significantly negative correlation during the chill-hardening at 12°C, suggesting that these miRNAs are involved in the regulation of the cysteine protease genes, and this regulation should be related to the enhancement of chilling tolerance induced by the chill-hardening. This study will be helpful for better understanding the function of cysteine protease gene family in *J. curcas* and the interaction of the family genes with their corresponding miRNAs, and how this interaction regulates the response of *J. curcas* to low temperature.

**Key words** *Jatropha curcas*, cysteine protease, gene family, microRNAs, low temperature response

**Wu DD, Chen YK, Yang Y, Kong CY, Gong M** (2021). Identification of the cysteine protease family and corresponding miRNAs in *Jatropha curcas* and their response to chill-hardening. *Chin Bull Bot* **56**, 544–558.

---

\* Author for correspondence. E-mail: gongming6307@163.com

(责任编辑: 朱亚娜)