

# 橄榄 *CaICE1* 基因的克隆和表达分析

赖瑞联<sup>1</sup>, 陈瑾<sup>1</sup>, 冯新<sup>1</sup>, 程春振<sup>2</sup>, 韦晓霞<sup>1</sup>, 陈义挺<sup>1\*</sup>, 吴如健<sup>1\*</sup>

(1. 福建省农业科学院果树研究所, 福州 350013; 2. 福建农林大学园艺植物生物工程研究所, 福州 350002)

**摘要:** 为了解橄榄(*Canarium album*)抗寒相关转录因子 ICE1 的调控功能, 采用 RT-PCR 技术克隆了‘福榄 1 号’的 *ICE1*, 命名为 *CaICE1*, 并进行生物信息学、qRT-PCR 表达模式和相关 miRNA 预测分析。结果表明, *CaICE1* cDNA 序列的开放阅读框长度为 1 650 bp, 可编码 549 个氨基酸(GenBank 登录号 MG459422)。CaICE1 为不稳定亲水性蛋白质, 含有跨膜结构、磷酸化位点以及 HLH 保守结构域, 定位于细胞核, 与枳的 ICE1 亲缘关系较近。*CaICE1* 密码子偏好性较弱, AGA、AGG、TGG 和 CCA 可能为其最优密码子群。*CaICE1* 主要在橄榄花、种子和叶中大量表达, -3℃低温胁迫下 *CaICE1* 表达水平比常温显著上升。psRNAtarget 预测结果表明, *CaICE1* 可能是 miR825、miR477、miR5658、miR1436 和 miR394 等多个逆境响应 miRNA 的靶基因。因此, *CaICE1* 可能在橄榄低温胁迫过程中发挥重要调控作用, 且可能受 miRNA 的调控。

**关键词:** 橄榄; 抗寒; 转录因子; *ICE1*; 克隆; 基因表达

doi: 10.11926/jtsb.3877

## Cloning and Expression Analysis of the *CaICE1* Gene in *Canarium album*

LAI Rui-lian<sup>1</sup>, CHEN Jin<sup>1</sup>, FENG Xin<sup>1</sup>, CHENG Chun-zhen<sup>2</sup>, WEI Xiao-xia<sup>1</sup>, CHEN Yi-ting<sup>1\*</sup>, WU Ru-jian<sup>1\*</sup>

(1. Fruit Research Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350013, China; 2. Institute of Horticultural Biotechnology, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

**Abstract:** To understand the regulatory function of cold resistance transcription factor ICE1 in *Canarium album*, one *ICE1* gene, named *CaICE1*, was cloned from ‘Fulan-1’ by using RT-PCR, and its bioinformatic characteristic, expression pattern and predicted targeting miRNAs were studied. The results showed that the length of open reading frame of *CaICE1* was 1 650 bp, encoding 549 amino acids (GenBank accession No. MG459422). The *CaICE1* was an unstable and hydrophilic protein located at nucleus, with transmembrane structure, phosphorylation sites and conserved HLH domains, and which had close relationship with ICE1 of *Citrus trifoliata*. Although the codon bias level was low, AGA, AGG, TGG and CCA would be optimal codons of *CaICE1*. The expression of *CaICE1* was high in flower, seed and leaf, and which was significantly up-regulated under -3℃ compared with room temperature. Additionally, *CaICE1* was predicted to be targeted by several stress responsive miRNAs, such as miR825, miR477, miR5658, miR1436 and miR394. Therefore, it was suggested that *CaICE1* might play important regulation roles in low temperature stress of *C. album*, and its expression might be regulated by some stress responsive miRNAs.

**Key words:** *Canarium album*; Cold resistant; Transcription factor; *ICE1*; Clone; Gene expression

收稿日期: 2018-01-12 接受日期: 2018-03-06

基金项目: 福建省属公益类科研院所基本科研专项(2018R1013-3, 2016R1013-15); 农业部品种资源保护费(热带作物)项目(151721301354051701)资助

This work was supported by the Project for Basic Science and Technology of Public Welfare Scientific Research Institution in Fujian Province (Grant No. 2018R1013-3, 2016R1013-15), and the Project of Species and Varieties Protection (Tropical Crops) of Agriculture Ministry (Grant No. 151721301354051701).

作者简介: 赖瑞联(1990-), 研究实习员, 研究方向为果树生物技术与遗传资源。E-mail: lair0618@163.com

\* 通信作者 Corresponding author. E-mail: chyiting@163.com; wurujian@126.com

橄榄[*Canarium album* (Lour.) Raeusch.]又称青果,为橄榄科(Burseraceae)橄榄属常绿乔木果树,是我国热带亚热带地区特色名贵经济作物,在福建、广东、广西、云南、海南和台湾等南部地区均有种植。橄榄果实营养价值高,富含多酚、多糖、氨基酸、膳食纤维和矿质元素等多种药理活性物质,是广受欢迎的药食同源作物。然而,橄榄抗寒能力差,气温低于 $-2^{\circ}\text{C}$ 时叶片开始受冻,低于 $-2.7^{\circ}\text{C}$ 时末一级枝条受冻,而低于 $-3^{\circ}\text{C}$ 时末二级枝条受冻,因此通常认为 $-3^{\circ}\text{C}$ 是橄榄所能承受的极限临界低温<sup>[1-2]</sup>。在我国南部橄榄种植区,尤其在福建省闽侯、闽清、尤溪、连江和上杭等地区均发生过橄榄大规模冻害,导致产量和种植面积锐减,成为制约橄榄产业稳定发展的重要限制因素<sup>[3]</sup>。

CBF 信号转导途径是植物感知和响应外界低温环境的关键信号通路,当植物遭遇低温胁迫时,ICE1 转录因子能够结合在 *CBF3* 启动子特定区域,诱导 *CBF3* 大量表达,进而激活下游的抗寒关键基因 *COR* 上调表达以提高植物抗寒能力,在植物冷驯化和低温胁迫响应过程中发挥重要作用<sup>[4-6]</sup>。此外,ICE1 也是 HOS1 (high expression of osmotically responsive gene 1)<sup>[7]</sup>、SIZ1 (SAP and Miz 1)<sup>[8]</sup>、OST1 (open stomata 1)<sup>[9-10]</sup>、MAPK (mitogen-activated protein kinase)<sup>[11-12]</sup>和精氨酸脱羧酶(arginine decarboxylase)<sup>[13]</sup>等参与调节植物抗寒能力的桥梁,是植物抗寒调控网络的关键转录因子之一。目前,ICE1 转录因子在白菜(*Brassica campestris*)<sup>[14]</sup>、秋子梨(*Pyrus ussuriensis*)<sup>[15]</sup>、番茄(*Lycopersicon esculentum*)<sup>[16]</sup>和葡萄(*Vitis amurensis*)<sup>[17]</sup>等作物抗寒过程中的调控功能和作用机理已有大量研究,而在橄榄上未见报道。本文以‘福榄 1 号’橄榄为材料,对其 ICE1 转录因子进行基因克隆和生物信息学分析,同时分析了 *CaICE1* 在组织器官和低温胁迫下的表达模式,为橄榄抗寒分子育种提供科学依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

以福建省农业科学院果树研究所选育的橄榄鲜食品种‘福榄 1 号’[*Canarium album* (Lour.) Raeusch. ‘Fulan-1’]为材料。于 2017 年 3 月播种,同年 7 月选取长势健壮一致且无病虫害的幼苗分别置于 $-3^{\circ}\text{C}$ 、 $4^{\circ}\text{C}$ 和 $25^{\circ}\text{C}$ 下处理 24 h,采集幼苗第 3 和 4

叶,置于液氮中速冻,保存于 $-80^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱中备用,每个处理重复 3 次。于 2016 年 11 月采集 15 年生‘福榄 1 号’橄榄成熟果肉和种子,于 2017 年 5 月上旬采集同一植株健康无损伤的根、茎、叶和花,液氮速冻后超低温保存备用。

### 1.2 *CaICE1* 克隆

采用植物多糖多酚试剂盒 E.Z.N.A.TM Plant RNA Kit (OMEGA bio-tek)分别提取橄榄根、茎、叶、花、果实和种子的总 RNA,经琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测质量和浓度。将不同组织器官的总 RNA 等量混合,用 Thermo Scientific RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit 逆转录 cDNA 用于 PCR 扩增。以橄榄转录组数据为参考,通过序列预测和 NCBI BLAST 序列比对,选取 *CaICE1* 转录因子可能的 cDNA 序列,采用 DNAMAN 设计引物,上游引物 *CaICE1*-F: 5'-CTCTCTCTTTTCCCAACAA-ACT-3',下游引物 *CaICE1*-R: 5'-TCTACATCATGC-CATGGAAG-3'。PCR 扩增体系包含 2×TransTaq High Fidelity PCR SuperMix 12.5  $\mu\text{L}$ , cDNA 模板 50 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ ,上下游引物各 0.4  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ,补足无菌 ddH<sub>2</sub>O 至终体积 25  $\mu\text{L}$ 。PCR 反应程序为:预变性 95 $^{\circ}\text{C}$  4 min,变性 95 $^{\circ}\text{C}$  30 s,退火 55 $^{\circ}\text{C}$  30 s,延伸 72 $^{\circ}\text{C}$  75 s,共 35 个循环,延伸 72 $^{\circ}\text{C}$  10 min。扩增结束后,利用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳进行目的条带检测,采用 EasyPure<sup>®</sup> Quick Gel Extraction Kit 进行胶回收,并将目的条带连接 pEASY<sup>®</sup>-T5 Zero Cloning Kit 转化到 *Trans1*-T1 感受态细胞中,置于 37 $^{\circ}\text{C}$  恒温培养箱中培养 12 h 后挑取单克隆子进行 PCR 检测,选取阳性克隆子送北京六合华大基因科技有限公司进行测序。

### 1.3 *CaICE1* 生物信息学分析

采用生物信息学软件(表 1)对 *CaICE1* 转录因子的基本理化性质、结构、亲缘关系、密码子偏好性和调控 miRNA 等进行预测和分析。

### 1.4 *CaICE1* 表达模式分析

分别提取不同温度处理后的橄榄的总 RNA,检测合格后经 TransScript All-in-One First-Strand cDNA Synthesis SuperMix for qPCR (One-Step gDNA Removal; TransGen Biotech, Beijing)逆转录 cDNA 后用于 qRT-PCR 试验。以橄榄 *ACTB7* 和 *TUB5* 为

表 1 *CaICE1* 转录因子生物信息学分析Table 1 Bioinformatic analysis of *CaICE1* transcription factor

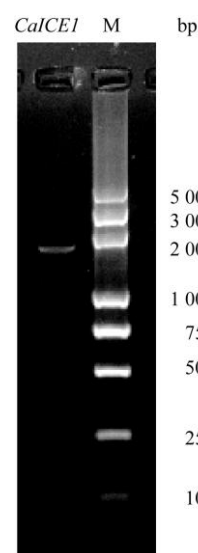
	软件 Software
基本理化性质 Basic physicochemical property	ExPASy ProtParam: <a href="http://web.expasy.org/protparam/">http://web.expasy.org/protparam/</a>
信号肽 Signal peptide	SignalP-4.1: <a href="http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/">http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/</a>
蛋白质二级结构 Secondary protein structure	PredictProtein: <a href="https://www.predictprotein.org">https://www.predictprotein.org</a>
磷酸化位点 Phosphorylation site	NetPhos 2.0: <a href="http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/">http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/</a>
亚细胞定位 Subcellular localization	PSORT Prediction: <a href="http://psort1.hgc.jp/form.html">http://psort1.hgc.jp/form.html</a>
保守结构域 Conserved domain	NCBI Conserved Domain Search: <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi</a>
蛋白质三维结构 Three dimensional protein structure	SWISS-MODEL: <a href="https://www.swissmodel.expasy.org">https://www.swissmodel.expasy.org</a>
调控 miRNA Regulatory miRNA	psRNATarget: <a href="http://plantgrn.noble.org/psRNATarget/">http://plantgrn.noble.org/psRNATarget/</a>
密码子偏好性 Codon bias	EMBOSS: <a href="http://emboss.sourceforge.net/">http://emboss.sourceforge.net/</a>
系统发育树 Phylogenetic tree	MEGA5.2.2

内参基因<sup>[18]</sup>, 采用 TransStart® Top Green qPCR SuperMix 试剂盒对 *CaICE1* 的表达模式进行检测。将橄榄不同处理的 cDNA 样品进行等量混合, 随后进行 ×10、×40、×160 和 ×640 梯度稀释用于绘制标准曲线, 根据扩增效率筛选合适的退火温度。采用 Eppendorf Realplex<sup>4</sup> 荧光定量 PCR 仪检测样品中 *CaICE1* 的相对表达量。qRT-PCR 扩增程序为: 94℃ 预变性 30 s; 94℃ 变性 10 s, 退火 15 s, 72℃ 延伸 10 s, 循环 40 次; 94℃ 保持 15 s, 60℃ 保持 15 s, 再以 0.11 °C s<sup>-1</sup> 速度升温至 94℃ 保持 15 s, 绘制融解曲线。qRT-PCR 反应体系为: 2 × TransStart® Top Green qPCR SuperMix 10 μL, Passive Reference Dye (50 ×) 0.4 μL, 上下游引物各 0.2 μmol L<sup>-1</sup>, 模板 0.5 μmol L<sup>-1</sup>, 引物序列为 *CaICE1*-qF: 5'-GGATGGAAGACAAA-GACGATG-3' 和 *CaICE1*-qR: 5'-TGTTGCTGCTGT-TGATGATG-3'。采用 Excel 2003 和 SPSS 19.0 进行数据统计和差异显著性分析。

## 2 结果和分析

### 2.1 *CaICE1* 的克隆

根据橄榄转录组数据库筛选橄榄 *ICE1* cDNA 序列并设计引物, 使用 RT-PCR 法克隆 *CaICE1* 序列并进行测序验证。获得的 cDNA 序列为 1 743 bp, 其中开放阅读框(open reading frame, ORF)长度为 1 650 bp, 编码 549 个氨基酸, 起始密码子和终止密码子分别为 ATG 和 TAG (图 1, 2)。通过 NCBI 比对, *CaICE1* 与枳(*Citrus trifoliata*)的 *ICE1* 氨基酸序列相似度达 71%, 表明所获得的序列为橄榄 *CaICE1* 基因, GenBank 登录号为 MG459422。

图 1 橄榄 *CaICE1* 的扩增。M: 5 000 bp Plus DNA Marker。Fig. 1 Amplification of *CaICE1*. M: 5 000 bp Plus DNA Marker.

### 2.2 *CaICE1* 生物信息学分析

生物信息学分析结果表明, *CaICE1* 有 549 个氨基酸, 分子式为 C<sub>2588</sub>H<sub>4115</sub>N<sub>755</sub>O<sub>850</sub>S<sub>27</sub>, 原子总数和分子量分别为 8.335 和 60.272 kD, pI 等电点为 5.29, 不稳定系数、脂肪系数和亲水性系数分别为 48.62、73.15 和 -0.581, 说明 *CaICE1* 为不稳定亲水酸性蛋白质, 其中亮氨酸(Leu)和丝氨酸(Ser)含量最多, 均占总数的 10.4%。进一步分析表明, *CaICE1* 可能定位于细胞核, 不含信号肽, 含有 56 个磷酸化位点(酪氨酸、苏氨酸和丝氨酸磷酸化位点分别为 3、14 和 39 个), 此外含有 2 个由内向外和 1 个由外向内的跨膜螺旋, 推测为跨膜蛋白。保守结构域预测表明, *CaICE1* 包含有 *ICE1* 蛋白家族保守的螺旋-环-螺旋结构域(helix loop helix domain, HLH)和 ACT 保守

域,能够特异结合具有调控酶活性的氨基酸或小配体(图 2)。此外, *CaICE1* 存在  $\alpha$ -螺旋、 $\beta$ -折叠和无规则卷曲 3 种二级结构,比重分别占 12.39%、6.01% 和 81.60%。SWISS-MODEL 预测表明 *CaICE1* 三维结构与 PDB5gnj.1.B 相似度达到 48.44% (图 3)。采用 MEGA 5.2.2 基于邻近归并法对物种间的 *ICE1* 进行聚类分析,除番木瓜(*Carica papaya*)和核桃(*Juglans regia*)外,总体上物种间的 *ICE1* 可分为 4 个大类(图 4),其中橄榄的 *CaICE1* 与枳(*Citrus trifoliata*)的 *ICE1* 亲缘关系最近,这说明物种间的 *ICE1* 存在多样性。

采用 psRNATarget 预测可能靶定 *CaICE1* 的 miRNA,结果表明 *CaICE1* 可能与 20 个 miRNA 存在靶向关系,其中 miR2938、miR6464、miR5537 和 miR437b 的数学期望值为 3.0, UPE 均低于 20,是最可能调控 *CaICE1* 的 miRNA (表 2)。从作用方式上看,这些 miRNA 对 *CaICE1* 的调控方式可能主要包括裂解和翻译抑制 2 类(均为 10 个)。

### 2.3 *CaICE1* 密码子偏好性分析

密码子偏好性分析表明, *CaICE1* 有效密码子数(ENc)和密码子适应指数(CAI)分别为 51.54 和 0.203,表明其密码子偏好性较弱。密码子第三位 GC 含量和总 GC 含量分别为 0.440 和 0.445,说明其偏好使用含有 A 和 T 并以 A 或 T 结尾的密码子。同义密码子相对使用度分析表明, *CaICE1* 偏好性较强的密码子(RSCU  $\geq$  2.0)仅有 4 个,分别为 AGA、AGG、TTG 和 CCA,可能作为其最优密码子群,也进一步验证 *CaICE1* 密码子偏好性较弱(表 3)。

### 2.4 *CaICE1* 的表达模式分析

*CaICE1* 在橄榄各组织器官中均有表达,以花中的表达量最高,其次是种子和叶,而在根、茎和果实中的表达量相对较低(图 5)。此外,差异显著性分析表明, *CaICE1* 的表达存在组织器官特异性表达,暗示其可能在不同组织器官抗寒过程中发挥调控作用。

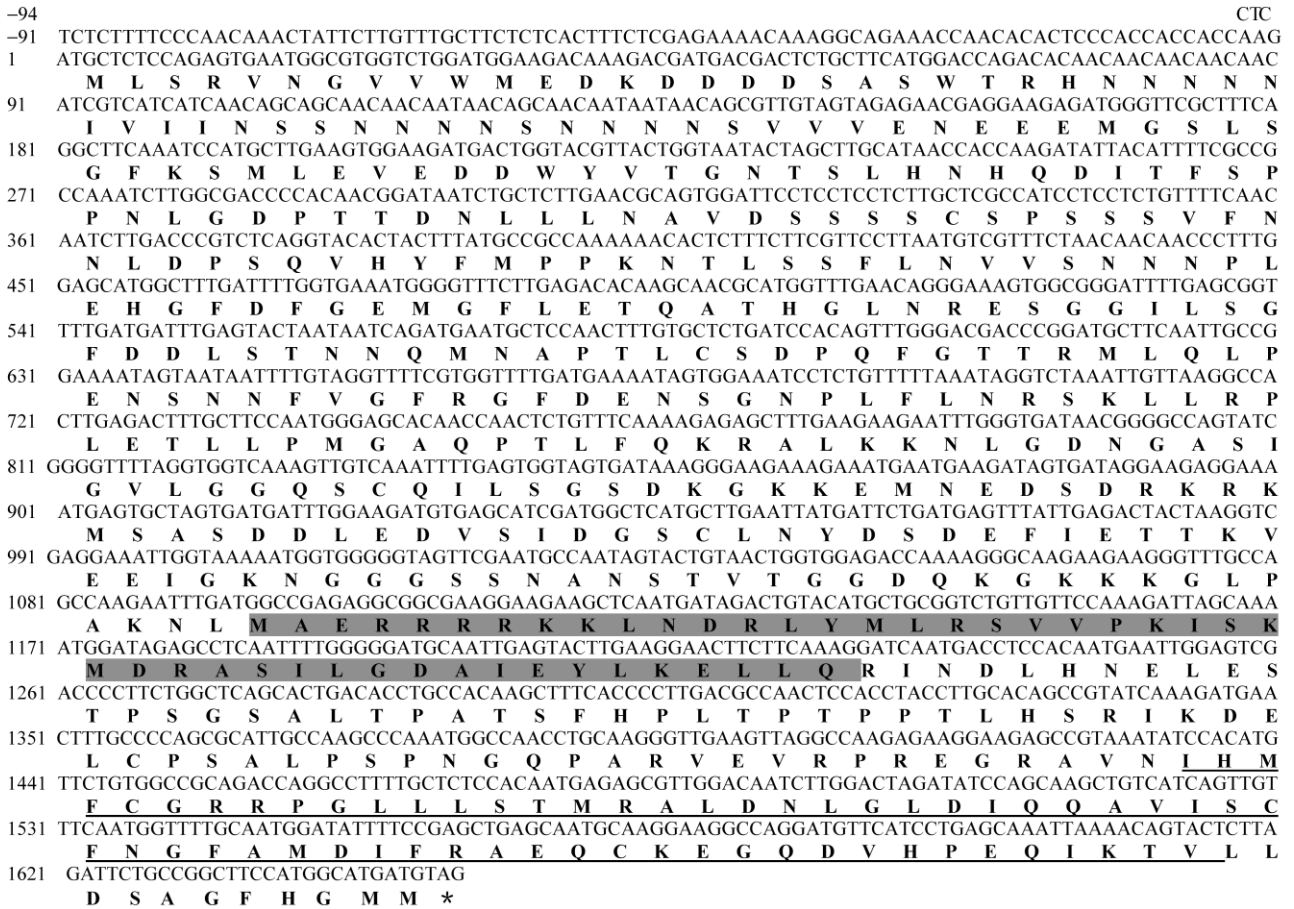


图 2 *CaICE1* 的 cDNA 序列和推测的氨基酸序列。阴影和下划线分别表示 HLH 结构域和 ACT\_UUR-ACR-like。

Fig. 2 Sequences of *CaICE1* and encoding amino acids. The shade and underline indicate HLH domain and ACT\_UUR-ACR-like, respectively.

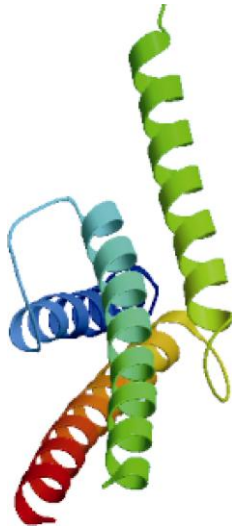
表 2 预测获得的靶向 *CalCE1* 的 miRNA

Table 2 Predicted miRNAs targeting *CalCE1*

miRNA	数学期望 Mathematical expect	UPE	序列比对 Alignment	抑制方式 Inhibition type
ath-miR2938	3.0	18.77	miRNA 21 GACCUUGGAGAGUUUUCUAG 1 : : : : : . . . : : : : : : : : : : Target 1306 AAGGAACUUCUCAAAGGAUC 1326	裂解 Cleavage
ptc-miR6464	3.0	16.10	miRNA 21 UAUAUAGGUUGUUCGUUAGU 1 : : : : : : : : : : : . : : : : Target 1595 UAGAUUCCAGCAAGCUGUCA 1615	裂解 Cleavage
rgl-miR5573	3.0	8.04	miRNA 21 AGGUAGAGUCCAGCUGAUGAG 1 : . . : : : : : : : : : : : : : : : Target 462 CCCGUCUCAGGUACACUACUU 482	翻译 Translation
ssp-miR437b	3.0	15.29	miRNA 21 UACAGUUUGAACAGAUUGAAA 1 : : : : : : : : : : : : : : : : : : Target 915 UGGUCAAAAGUUGUCAAUUUU 935	裂解 Cleavage
aly-miR825-3p	3.5	13.59	miRNA 21 CAAGUACGUGGAAGAGCUCUU 1 : : : : : : : : : : : : : : : : : : Target 34 CUUCUCUCACUUUCUCGAGAA 54	裂解 Cleavage
aqc-miR477d	3.5	17.17	miRNA 20 AUCUUCGGAACUUCUCUC 1 : : : . : : : : : : : : : : : : : : Target 859 AAGAGAGCUUUGAAGAAGAA 878	裂解 Cleavage
ath-miR5658	3.5	10.38	miRNA 21 AAAGUAGUAGUAGUAGUAGUA 1 : : : : : : : : : : : : : : : : : : Target 177 CAACAACAUCGUCAUCAUCA 197	裂解 Cleavage
cre-miR9897-3p	3.5	19.39	miRNA 21 CGGCUAUUCUCCUCGCAUU 1 : : : : : : : : : : : : : : : : : : Target 1502 CAAGAGAAGGAAGAGCCGUAA 1522	翻译 Translation
ghr-miR7489	3.5	7.09	miRNA 24 UGCAAGAGGACAUAACCGUUGUUA 1 : : : : : : : : : : : : : : : : : : Target 433 CCAUCCUCCUCUGUUUCAACAAU 456	翻译 Translation
gra-miR8743c	3.5	17.79	miRNA 24 UACUGGUAAAACAUUGAAAAGUUA 1 : . : . : : : : : : : : . : : : : : . Target 731 GUAAUAAUUUUGUAGGUUUUCGUG 754	翻译 Translation
gra-miR8743d	3.5	17.79	miRNA 24 UACUGGUAAAACAUUGAAAAGUUA 1 : . : . : : : : : : : . : : : : : . Target 731 GUAAUAAUUUUGUAGGUUUUCGUG 754	翻译 Translation
gra-miR8743e	3.5	17.79	miRNA 24 UACUGGUAAAACAUUGAAAAGUUA 1 : . : . : : : : : : : . : : : : : . Target 731 GUAAUAAUUUUGUAGGUUUUCGUG 754	翻译 Translation
gra-miR8762a	3.5	15.14	miRNA 24 CAGUCGUUCAAUUGUUUACA 1 : : . : : : : : : . : : : : : : : : : Target 914 GUGGUCAAAGUUGUCAAAUUUGA 937	翻译 Translation
hvu-miR1436	3.5	12.95	miRNA 21 UGAGGGAGGCAGGGUUAUACA 1 : : : : : : : : : : : : : : : : : : Target 501 UCUUUCUUCGUUCCUUAUGU 521	裂解 Cleavage
osa-miR1436	3.5	12.95	miRNA 21 UGAGGGAGGCAGGGUUAUACA 1 : : : : : : : : : : : : : : : : : : Target 501 UCUUUCUUCGUUCCUUAUGU 521	裂解 Cleavage
pab-miR3702	3.5	15.12	miRNA 21 CGCUUAUUCGUGGUUCUCUAA 1 : . : : : : : : : : : : : : : : : : : Target 331 UUGCAUAACCACCAAGAUAAU 351	裂解 Cleavage
stu-miR8047	3.5	15.65	miRNA 21 CCAGAUAAAAGCUUUUUUACC 1 : : : : : : : : : . . : : : : : : : : Target 551 GCUUUGAUUUUGGUGAAAUGG 571	裂解 Cleavage
ahy-miR394	4.0	12.40	miRNA 20 CCUCCACCUGUCUACGGUU 1 : : : : : : : . : : : : : : : : : : Target 1105 GGGGUAGUUCGAAUGCCAA 1124	翻译 Translation
aly-miR394a-5p	4.0	12.40	miRNA 20 CCUCCACCUGUCUACGGUU 1 : : : : : : : . : : : : : : : : : : Target 1105 GGGGUAGUUCGAAUGCCAA 1124	翻译 Translation
aly-miR394b-5p	4.0	12.40	miRNA 20 CCUCCACCUGUCUACGGUU 1 : : : : : : : . : : : : : : : : : : Target 1105 GGGGUAGUUCGAAUGCCAA 1124	翻译 Translation

表 3 *CaICE1* 同义密码子相对使用度Table 3 Relative synonymous codon usage of *CaICE1*

氨基酸 Amino acid	密码子 Codon	CaICE1	氨基酸 Amino acid	密码子 Codon	CaICE1	氨基酸 Amino acid	密码子 Codon	CaICE1
Ala	GCT	1.04	Gly	GGT	1.55	Pro	CCC	0.40
	GCC	1.39		GGC	1.27		CCA	2.13
	GCA	1.39		GGA	0.45		CCG	0.53
	GCG	0.17		GGG	0.73	Ser	TCT	1.26
Arg	CGT	0.44	His	CAT	0.83		TCC	0.84
	CGC	0.22		CAC	1.17		TCA	0.53
	CGA	0.44	Ile	ATT	1.50		TCG	0.63
	CGG	0.67		ATC	1.50	AGT	1.47	
	AGA	2.00		ATA	0.00	AGC	1.26	
	Asn	AGG	2.22	Leu	TTA	0.42	Thr	ACT
AAT		1.21	TTG		2.63	ACC		0.59
AAC		0.79	CTT		1.58	ACA	1.04	
Asp	GAT	1.47	Lys	CTC	0.63	Tyr	ACG	0.59
	GAC	0.53		CTA	0.11		TAT	0.40
Cys	TGT	0.75		CTG	0.63		TAC	1.60
	TGC	1.25		Phe	AAA	0.81	Val	GTT
Gln	CAA	1.44	AAG		1.19	GTC		0.74
	CAG	0.56	Pro	TTT	1.36	GTA		1.04
Glu	GAA	1.13		TTC	0.64	GTG	0.74	
	GAG	0.88	CCT	0.93				

图 3 *CaICE1* 的三维结构Fig. 3 Three-dimensional structure of *CaICE1*

qRT-PCR 结果表明, 与 25°C 对照相比, 4°C 处理的 *CaICE1* 表达出现稍微下调, 说明 4°C 低温处理时 *CaICE1* 并未被激活, 这可能与植株并未受到显著寒害有关。而 -3°C 处理 24 h 后, *CaICE1* 的表达水平急剧上升, 为对照的 3.8 倍, 说明 -3°C 低温冻害后橄榄 *CaICE1* 基因被诱导显著表达, 从而迅速激活其介导的抗寒系统以维持机体正常生长代谢。

### 3 讨论

#### 3.1 *CaICE1* 参与橄榄低温胁迫响应过程

植物 *ICE1* 是一类含有 bHLH 保守结构域的 MYC 组成型表达基因, 通常在细胞中处于无活性状态, 低温活化后能够与 *CBF* 启动子特定区域结合并以‘主效开关’的身份激活 *CBF* 信号途径<sup>[19]</sup>。在拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 中, 约 40% 的抗寒关键基因和 46% 的冷响应基因均受 *ICE1* 调控, 说明 *ICE1* 在植物抗寒过程中发挥至关重要的作用<sup>[8,20]</sup>。本研究表明, *CaICE1* 含有植物典型的 HLH 保守结构域, 且与其他物种的 *ICE1* 均保持较近的亲缘关系, 说明其为橄榄的抗寒调控转录因子。生物信息学分析表明, *CaICE1* 可能受一系列 miRNA 转录后水平或翻译水平抑制调控, 其中已有报道 miR825<sup>[21]</sup>、miR477<sup>[22]</sup>、miR5658<sup>[23]</sup>、miR1436<sup>[24]</sup> 和 miR394<sup>[25]</sup> 等均为植物逆境胁迫响应 miRNA, 尤其 miR394 直接参与了拟南芥冷胁迫应答, 可见 *CaICE1* 可能与橄榄逆境胁迫密切相关。进一步的 qRT-PCR 分析表明, -3°C 处理后 *CaICE1* 的表达量急剧上升, 说明冻害后 *CaICE1* 介导的抗寒调控网络迅速启动以维持橄榄正常生理代谢。此外, 橄榄 *CaICE1* 在不同组织器官中均维持一定的表达水平以随时应对外

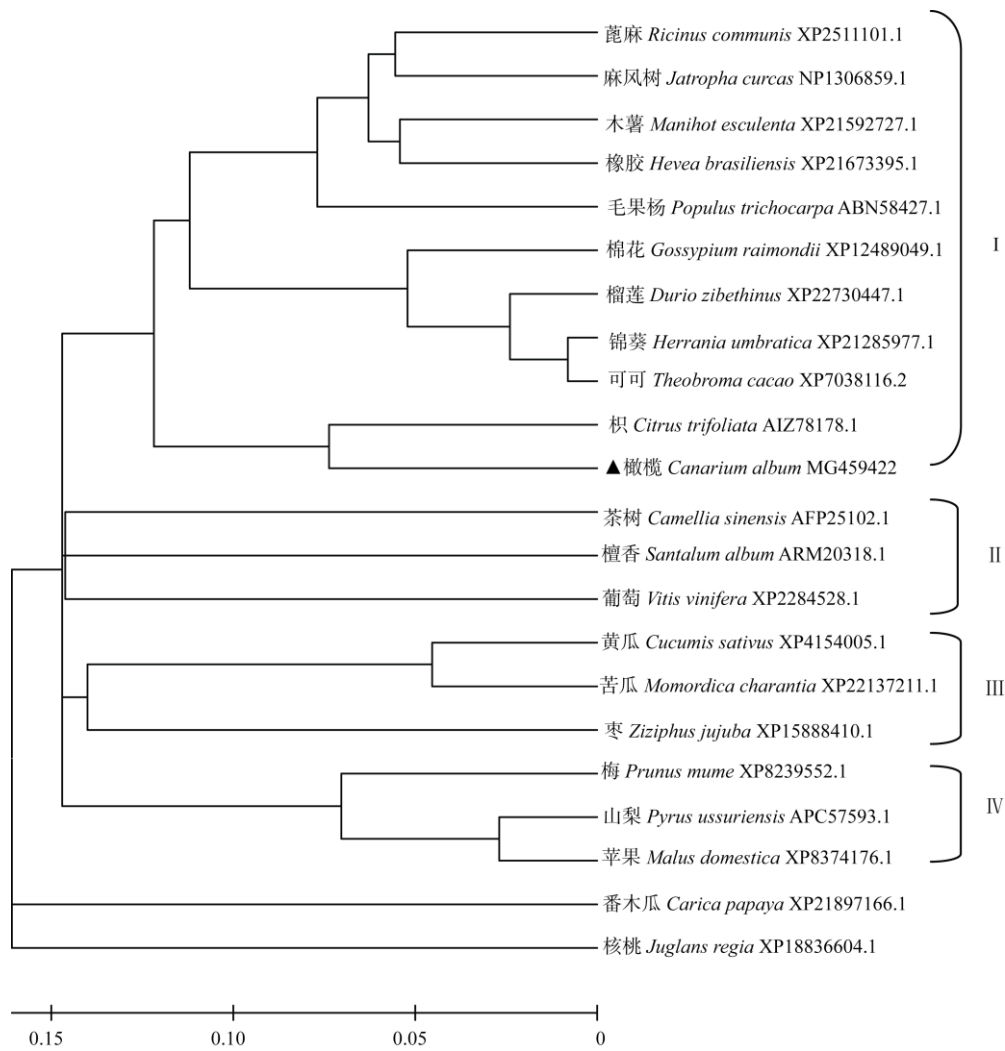


图 4 ICE1 的系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree of ICE1

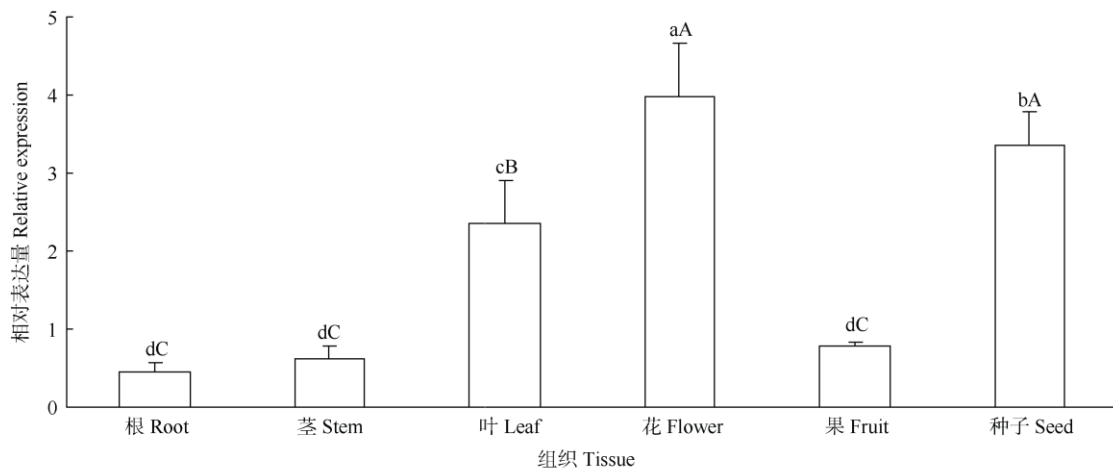


图 5 *CaICE1* 在组织中的表达。柱上不同大写和小写字母分别表示差异极显著( $P < 0.01$ )和显著( $P < 0.05$ )。下同。

Fig. 5 Relative expression of *CaICE1* in tissues. Different capital and small letters upon column indicate significant differences at 0.01 and 0.05 levels, respectively. The same is following Figure.

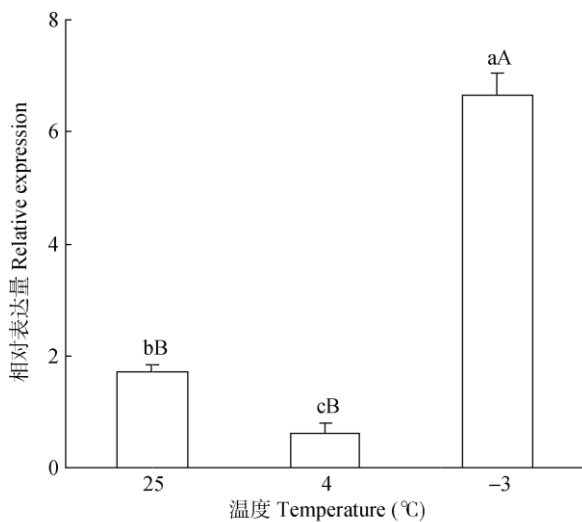


图 6 *CaICE1* 在低温胁迫下的表达

Fig. 6 Expression of *CaICE1* under low temperature stress

界低温胁迫。由此看来, *CaICE1* 可能在橄榄低温胁迫过程中发挥了重要的调控作用。

### 3.2 *CaICE1* 的密码子选择偏好性较弱

物种或基因在长期进化过程中往往形成特定的密码子偏好性规律, 密码子偏好性分析可为揭示基因的分子功能和进化规律提供科学依据<sup>[26-27]</sup>。本研究中, 橄榄 *CaICE1* 的密码子偏好性较弱, 但偏好使用含有 A 和 T 并以 A 或 T 结尾的密码子, 这与对茶树(*Camellia sinensis*) *ICE1*<sup>[28]</sup>的研究结果一致, 且符合双子叶植物<sup>[29]</sup>基本特征, 但橄榄 *CaICE1* 密码子的具体进化过程、进化方式和关键作用力等仍需进一步研究。

### 参考文献

[1] LAI Z X, CAI Y Q, XU W D, et al. Quality Cultivating and Integrated Utilization of Chinese Olive [M]. Beijing: Chinese Sanxia Press, 2007: 14-17.  
赖钟雄, 蔡英卿, 许伟东, 等. 橄榄优质栽培与综合利用 [M]. 北京: 中国三峡出版社, 2007: 14-17.

[2] CAI W H, CHEN H, LI W, et al. Investigation of low air temperature and preliminary study of indexes of olive freeze harm in the winter of 2004/2005 in Lianjiang County [J]. Chin J Agrometeorol, 2006, 27(3): 200-203. doi: 10.3969/j.issn.1000-6362.2006.03.010.  
蔡文华, 陈惠, 李文, 等. 2004/2005 年冬季连江县低温考察和橄榄树冻害指标初探 [J]. 中国农业气象, 2006, 27(3): 200-203. doi: 10.3969/j.issn.1000-6362.2006.03.010.

[3] LAI R L, CHEN J, FENG X, et al. Advances on germplasm resource evaluation and cold resistance research in Chinese olive of China [J]. Chin J Trop Crop, 2017, 38(11): 2188-2194.  
赖瑞联, 陈瑾, 冯新, 等. 中国橄榄种质资源评价与抗寒性研究进展 [J]. 热带作物学报, 2017, 38(11): 2188-2194.

[4] THOMASHOW M F. Plant cold acclimation: Freezing tolerance genes and regulatory mechanisms [J]. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 1999, 50: 571-599. doi: 10.1146/annurev.arplant.50.1.571.

[5] KIM Y S, LEE M, LEE J H, et al. The unified ICE-CBF pathway provides a transcriptional feedback control of freezing tolerance during cold acclimation in *Arabidopsis* [J]. Plant Mol Biol, 2015, 89(1/2): 187-201. doi: 10.1007/s11103-015-0365-3.

[6] WANG D Z, JIN Y N, DING X H, et al. Gene regulation and signal transduction in the ICE-CBF-COR signaling pathway during cold stress in plants [J]. Biochemistry, 2017, 82(10): 1103-1117. doi: 10.1134/S0006297917100030.

[7] DONG C H, AGARWAL M, ZHANG Y Y, et al. The negative regulator of plant cold responses, HOS1, is a RING E3 ligase that mediates the ubiquitination and degradation of ICE1 [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103(21): 8281-8286. doi: 10.1073/pnas.0602874103.

[8] MIURA K, JIN J B, LEE J, et al. SIZ1-mediated sumoylation of ICE1 controls *CBF3/DREB1A* expression and freezing tolerance in *Arabidopsis* [J]. Plant Cell, 2007, 19(4): 1403-1414. doi: 10.1105/tpc.106.048397.

[9] DING Y L, LI H, ZHANG X Y, et al. OST1 kinase modulates freezing tolerance by enhancing ICE1 stability in *Arabidopsis* [J]. Dev Cell, 2015, 32(3): 278-289. doi: 10.1016/j.devcel.2014.12.023.

[10] LANG Z B, ZHU J K. OST1 phosphorylates ICE1 to enhance plant cold tolerance [J]. Sci China Life Sci, 2015, 58(3): 317-318. doi: 10.1007/s11427-015-4822-7.

[11] ZHAO C Z, WANG P C, SI T, et al. MAP kinase cascades regulate the cold response by modulating ICE1 protein stability [J]. Dev Cell, 2017, 43(5): 618-629. doi: 10.1016/j.devcel.2017.09.024.

[12] LIU Y K, ZHOU J. MAPping kinase regulation of ICE1 in freezing tolerance [J]. Trends Plant Sci, 2018, 23(2): 91-93. doi: 10.1016/j.tplants.2017.12.002.

[13] HUANG X S, ZHANG Q, ZHU D, et al. *ICE1* of *Poncirus trifoliata* functions in cold tolerance by modulating polyamine levels through interacting with arginine decarboxylase [J]. J Exp Bot, 2015, 66(11): 3259-3274. doi: 10.1093/jxb/erv138.

[14] XIANG D J, CHAI Y S, MAN L L, et al. Overexpression of a heading Chinese cabbage *ICE1* gene confers freezing tolerance in transgenic rice [J]. Plant Cell Tiss Org Cult, 2017, 128(1): 43-54. doi: 10.1007/s11240-016-1080-8.



- [15] HUANG X S, LI K Q, JIN C, et al. *ICE1* of *Pyrus ussuriensis* functions in cold tolerance by enhancing *PuDREB*a transcriptional levels through interacting with *PuHHP1* [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 17620. doi: 10.1038/srep17620.
- [16] YU X H, JUAN J X, GAO Z L, et al. Cloning and transformation of inducer of CBF expression1 (*ICE1*) in tomato [J]. *Genet Mol Res*, 2015, 14(4): 13131–13143. doi: 10.4238/2015.
- [17] DONG C, ZHANG Z, REN J P, et al. Stress-responsive gene *ICE1* from *Vitis amurensis* increases cold tolerance in tobacco [J]. *Plant Physiol Bioch*, 2013, 71: 212–217. doi: 10.1016/j.plaphy.2013.07.012.
- [18] HUANG M J, WEN Z F, CHI Y B, et al. Molecular cloning and expression analysis of flavonoids 3'-hydroxylase (*CaF3'H*) in *Canarium album* [J]. *Mol Plant Breed*, 2017, 15(3): 839–847. doi: 10.13271/j.mpb.015.000839.  
黄敏杰, 文志丰, 池毓斌, 等. 橄榄类黄酮3'-羟化酶 *CaF3'H* 基因的克隆及其表达特性分析 [J]. *分子植物育种*, 2017, 15(3): 839–847. doi: 10.13271/j.mpb.015.000839.
- [19] WEI J Y, ZHAO J, ZHAO S Q, et al. Activation and regulation on the cold response pathway of *ICE1*-CBF in plants [J]. *Biotechnol Bull*, 2015, 31(6): 8–12. doi: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2015.06.016.  
魏俊燕, 赵佳, 赵仕琪, 等. 植物 *ICE1*-CBF 冷反应通路的激活与调控研究进展 [J]. *生物技术通报*, 2015, 31(6): 8–12. doi: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2015.06.016.
- [20] HAAKE V, COOK D, RIECHMANN J L, et al. Transcription factor CBF4 is a regulator of drought adaptation in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiol*, 2002, 130(2): 639–648. doi: 10.1104/pp.006478.
- [21] NIU D D, XIA J, JIANG C H, et al. *Bacillus cereus* AR156 primes induced systemic resistance by suppressing miR825/825\* and activating defense-related genes in *Arabidopsis* [J]. *J Integr Plant Biol*, 2016, 58(4): 426–439. doi: 10.1111/jipb.12446.
- [22] ZHOU J. Expression profile of miRNA of *Populus cathayana* Rehd and *Salix matsudana* Koidz under salt stress [D]. Beijing: Chinese Academy of Forestry, 2010: 38–51.
- 周婧. 盐胁迫条件下青杨和旱柳 miRNA 表达变化研究 [D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2010: 38–51.
- [23] SINGH N, SRIVASTAVA S, SHARMA A. Identification and analysis of miRNAs and their targets in ginger using bioinformatics approach [J]. *Gene*, 2016, 575(2 Pt 2): 570–576. doi: 10.1016/j.gene.2015.09.036.
- [24] MANGRAUTHIA S K, BHOGIREDDY S, AGARWAL S, et al. Genome-wide changes in microRNA expression during short and prolonged heat stress and recovery in contrasting rice cultivars [J]. *J Exp Bot*, 2017, 68(9): 2399–2412. doi: 10.1093/jxb/erx111.
- [25] SONG J B, GAO S, WANG Y, et al. miR394 and its target gene *LCR* are involved in cold stress response in *Arabidopsis* [J]. *Plant Gene*, 2016, 5: 56–64. doi: 10.1016/j.plgene.2015.12.001.
- [26] LAI R L, LIN Y L, ZHONG C S, et al. Analysis of codon bias of auxin receptor gene *TIR1* in *Dimocarpus longan* [J]. *Acta Hort Sin*, 2016, 43(4): 771–780. doi: 10.16420/j.issn.0513-353x.2015-0662.  
赖瑞联, 林玉玲, 钟春水, 等. 龙眼生长素受体基因 *TIR1* 密码子偏好性分析 [J]. *园艺学报*, 2016, 43(4): 771–780. doi: 10.16420/j.issn.0513-353x.2015-0662.
- [27] LAI R L, FENG X, CHEN J, et al. Codon usage pattern of chalcone isomerase gene (*CHI*) in *Canarium album* (Lour.) Raeusch. [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2017, 23(5): 945–951. doi: 10.3724/SPJ.1145.2016.11037.  
赖瑞联, 冯新, 陈瑾, 等. 橄榄查尔酮异构酶基因 *CHI* 的密码子偏好模式 [J]. *应用与环境生物学报*, 2017, 23(5): 945–951. doi: 10.3724/SPJ.1145.2016.11037.
- [28] SHI H, WANG Y, YANG L C, et al. Analysis of codon bias of the cold regulated transcription factor *ICE1* in tea plant [J]. *Acta Hort Sin*, 2012, 39(7): 1341–1352. doi: 10.16420/j.issn.0513-353x.2012.07.002.  
时慧, 王玉, 杨路成, 等. 茶树抗寒调控转录因子 *ICE1* 密码子偏性分析 [J]. *园艺学报*, 2012, 39(7): 1341–1352. doi: 10.16420/j.issn.0513-353x.2012.07.002.
- [29] MURRAY E E, LOTZER J, EBERLE M. Codon usage in plant genes [J]. *Nucl Acids Res*, 1989, 17(2): 477–498. doi: 10.1093/nar/17.2.477.