

陈 露,杨立明,罗玉明. 植物 ICE 蛋白基因家族的系统进化分析[J]. 江苏农业科学,2016,44(2):42-47.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.02.011

植物 ICE 蛋白基因家族的系统进化分析

陈 露^{1,2}, 杨立明², 罗玉明^{1,2}

(1. 南京师范大学生命科学学院, 江苏南京 210046;

2. 淮阴师范学院生命科学学院/江苏省环洪泽湖生态农业生物技术重点实验室, 江苏淮安 223300)

摘要:ICE 是植物体内的一类 bHLH 转录因子,在植物低温胁迫中发挥重要作用。本研究利用来自不同物种包括苔藓、蕨类、裸子、被子植物的 ICE 蛋白序列,用 Clustal X 程序对其氨基酸序列进行比对,并用邻近法构建系统进化树,进一步了解 ICE 家族在植物界的分子进化情况。结果表明,ICE 蛋白家族基本上按苔藓、蕨类、裸子、单子叶和双子叶植物而分别聚类,尽管不同来源的 ICE 序列有一定差异,但 HLH 结构域在各植物物种中具有很好的保守性,这说明 ICE 蛋白在进化上具有保守性;被子植物的 ICE 形成不同的分支,单子叶植物和双子叶植物原始的 ICE 蛋白有可能不同。

关键词:植物;ICE;序列比对;系统进化分析

中图分类号: Q943.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)02-0042-06

ICE(inducer of CBF expression)是 CBF[C-repeat-binding factors, 又称 DREBs(dehydration responsive element factors)]冷响应通道的上游调控因子,目前主要在拟南芥中发现 *ICE1* 和 *ICE2* 这 2 种 ICE 基因。*ICE* 一般为组成型表达,常温下没有活性,低温诱导可使 *ICE1* 成活性状态,编码一个类似 MYC 的螺旋-环-螺旋型(bHLH)转录激活因子,诱导 *CBF* 基因的表达,从而提高植物的抗寒性,在转基因植株生长发育过程中没有异常表现^[1]。研究表明,ICE2 可以直接影响 *CBF1* 基因的表达,将 *ICE2* 基因转入拟南芥发现,拟南芥体内 *CBF1* 基因表达量明显上升,转基因拟南芥可在 -20℃ 环境下正常生长^[2-3]。由此可见,ICE 在植物低温抗性中有着重要的作用。有研究证明,ICE1-CBF 转录级联反应在植物响应低温胁迫过程中发挥着至关重要的作用^[4]。

目前,依赖 CBF 的信号转导通路被视为植物低温胁迫应答的主要途径^[4-7]。在 ICE1-CBF 的调控路径中,ICE1 在低温诱导下与 CBF3 启动子顺式作用元件相互结合,并激活 CBF3 转录,调控 CBF 及下游抗冷相关基因的转录,也可以与 R2R3 型 MYB 转录因子 AtMYB15 相互作用,负调控 CBF 基因的表达^[2,8]。ICE1 蛋白的磷酸化可能涉及到低温胁迫过程中 ICE1 的活性调控。另外,HOS1 编码一种 E3 连接酶,参与 ICE1 蛋白的泛素化降解,在低温胁迫过程中,HOS1 与 ICE1 相互作用并降解 ICE1,通过 ICE1 调节 CBF 的转录。有研究表明,ICE1 蛋白在冷胁迫时明显降解,而在 HOS1 突变体中,ICE1 蛋白受冷胁迫降解的程度明显降低^[9-10]。

收稿日期:2015-02-27

基金项目:国家高技术研究发展计划(编号:2013AA102705);国家自然科学基金(编号:30900871);江苏省自然科学基金(编号: BK2011409)。

作者简介:陈 露(1989—),女,江苏靖江人,硕士研究生,从事植物生物技术研究。E-mail:chenlu1201@163.com。

通信作者:罗玉明(1963—),男,江苏涟水人,教授,研究生导师,主要从事植物生物技术研究。Tel:(0517)83525128;E-mail:yumingluo@163.com。

鉴于 ICE 在植物低温抗性中的重要作用,本研究通过对来源于植物的 ICE 蛋白进行同源比对,分析系统发生关系,拟找出 ICE 基因在植物界的系统进化关系,为研究该基因的功能进化提供参考。

1 材料与方法

1.1 序列信息的获取与筛选

为获得 ICE 家族各成员,分别以拟南芥 ICE 基因的蛋白质序列 AtICE1、AtICE2,使用 Blastp 程序搜索绿色植物数据(<http://blast.be-md.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>),database 选择为 non-redundant protein sequences(nr),organism 选择为 plants(taxid:3193),max target sequences 设置为 250,其余均为默认参数。对获得的搜索结果用 Pfam(<http://pfam.xfam.org/>)进行分析,把具有与拟南芥 ICE 基本结构特征的序列保留下来做后续分析。

1.2 多序列比对及系统进化树的构建

以氨基酸全序列比对结果为基础,用 Mega 5.10 软件构建系统进化树^[11]。采用 Neighbor-joining 法运行相应参数^[12];Poisson model 模式,缺口设置为 Pairwise deletion;校验参数为 bootstrap = 1 000。系统发生树中,ICE 家族各亚族的分组是在相似理论和分类学基础上完成,并用 Clustal X 软件^[13]进行检验。

1.3 模体识别

使用 MEME 模体搜索工具以识别 ICE 家族相关蛋白质所共有的模体,并对相关参数进行修改,将可找到的模体最大值调整为 25,每个模体的最大宽度调整为 100,其他均为默认值;MEME 在线软件识别的模体通过 Smart 和 Pfam 模体识别工具^[14-15]进行进一步检验。

2 结果与分析

2.1 植物 ICE 基因的鉴定

利用模式植物拟南芥中已测序的 2 个 ICE 蛋白基因序列,执行 Blastp 搜索、关键词搜索、结构域搜索等,以在植物中

获得更多的 ICE 基因;将得到的初始目标序列经过整理、合并、筛选,通过 Mega 5.10 软件构建系统进化树,并进行逐一比对分析,去除不符合条件的序列,最终确定 33 个植物(表 1)基因组中的 65 个 ICE 蛋白质基因(表 2)用于分析,其中包括拟南芥 2 个模板 ICE 蛋白基因。按照从低等植物到高等植物的顺序依次为:2 条来自苔藓植物,即藓纲的小立碗藓;2 条来自蕨类植物,即石松纲的江南卷柏;1 条来自裸子植物,即

松柏纲的北美云杉;21 条来自单子叶植物的禾本科和芭蕉科,包括山羊草、小麦、乌拉尔图小麦、水稻、二穗短柄草、大麦、玉米、芭蕉共 8 种植物;39 条来自双子叶植物,包括芥菜、欧洲油菜、蓖麻、大白菜、山嵛菜、板蓝根、芥菜、拟南芥、萝卜、白刺、桉树、蓝桉树、葡萄、鹰嘴豆、大豆、野茶树、番茄、黄瓜、野草莓、榛子、甜杨、毛果杨共 22 种植物。

表 1 33 种植物的中文名、拉丁名及缩写对照

缩写	拉丁名	中文名	缩写	拉丁名	中文名
Mu	<i>Musa basjoo</i>	芭蕉	Eg	<i>Eucalyptus globulus</i>	蓝桉树
Hv	<i>Hordeum vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i>	大麦	Es	<i>Eutrema salsugineum</i>	山嵛菜
Bd	<i>Brachypodium distachyon</i>	二穗短柄草	Rs	<i>Raphanus sativus</i>	萝卜
Ta	<i>Triticum aestivum</i>	小麦	Bn	<i>Brassica napus</i>	欧洲油菜
Zm	<i>Zea mays</i>	玉米	Vv	<i>Vitis vinifera</i>	葡萄
Ec	<i>Eucalyptus camaldulensis</i>	桉树	Cb	<i>Capsella bursa – pastoris</i>	芥菜
It	<i>Isatis tinctoria</i>	板蓝根	Nt	<i>Nitraria sibirica</i>	白刺
Rc	<i>Ricinus communis</i>	蓖麻	Psu	<i>Populus suaveolens</i>	甜杨
Br	<i>Brassica rapa</i> subsp. <i>chinensis</i>	大白菜	Ca	<i>Cicer arietinum</i>	鹰嘴豆
Gm	<i>Glycine max</i>	大豆	Csi	<i>Camellia sinensis</i>	野茶树
Sl	<i>Solanum lycopersicum</i>	番茄	Ch	<i>Corylus heterophylla</i>	榛子
Csa	<i>Cucumis sativus</i>	黄瓜	At	<i>Arabidopsis thaliana</i>	拟南芥
Fv	<i>Fragaria vesca</i> subsp. <i>vesca</i>	野草莓	Os	<i>Oryza sativa</i>	水稻
Bj	<i>Brassica juncea</i>	芥菜	Psi	<i>PICEa sitchensis</i>	北美云杉
Pt	<i>Populus trichocarpa</i>	毛果杨	Sm	<i>Selaginella moellendorffii</i>	江南卷柏
Ata	<i>Aegilops tauschii</i>	山羊草	Pp	<i>Physcomitrella patens</i> subsp. <i>patens</i>	小立碗藓
Tu	<i>Triticum urartu</i>	拉乌尔图小麦			

表 2 33 种植物 65 条 ICE 序列的基因名称及其简称

基因名称	简称	NCBI 登录号	种
inducer of CBF expression 1	> BjICE1	gi 403054815	芥菜
ICE1	> BnICE1	gi 342731393	欧洲油菜
ICE1	> BrICE1 – 1	gi 172053609	大白菜
inducer of CBF expression 1 protein	> BrICE1 – 2	gi 325514349	大白菜
ICE – like protein	> EsICE – like	gi 254575636	山嵛菜
inducer of CBF expression 1 protein	> ItICE1	gi 381415424	板蓝根
inducer of CBF expression 1 protein	> CbICE1	gi 45934582	芥菜
transcription factor ICE1	> AtICE1	gi 145322914	拟南芥
inducer of CBF expression	> BjICE2	gi 332083019	芥菜
inducer of CBF expression 1 protein	> RsICE1	gi 324983869	萝卜
SCRm ² (SCREAM 2) ;DNA binding/transcription factor	> AtICE2	gi 15222101	拟南芥
PREDICTED;inducer of CBF expression	> NtICE2	> Unigene1485_PPC	白刺
inducer of CBF expression 1 protein	> EcICE1	gi 324983879	桉树
ICE transcription factor 1	> EgICE1	gi 333470596	蓝桉树
inducer of CBF expression 1	> VvICE1 – 1	gi 385251598	葡萄
PREDICTED;transcription factor ICE1 isoform 1	> VvICE1 – 2	gi 225451593	葡萄
PREDICTED;transcription factor ICE1 – like isoform X1	> CaICE1 – likeX1	gi 502106825	鹰嘴豆
inducer of CBF expression 5	> GmICE5	gi 213053820	大豆
inducer of CBF expression 6	> GmICE6	gi 213053822	大豆
transcription factor ICE1 – like	> GmICE1 – like1	gi 359806583	大豆
inducer of CBF expression 2	> GmICE2	gi 351723971	大豆
inducer of CBF expression 1	> GmICE1	gi 351723481	大豆
ICEb	> GmICEb	gi 318056133	大豆
inducer of CBF expression 4	> GmICE4	gi 351727749	大豆
ICEd	> GmICEd	gi 318056135	大豆

续表 2

基因名称	简称	NCBI 登录号	种
PREDICTED;transcription factor ICE1 – like	> CaICE1 – like	gi 502133394	鹰嘴豆
PREDICTED; LOW QUALITY PROTEIN; transcription factor ICE1 – like	> GmICE1 – like2	gi 356527542	大豆
inducer of CBF expression 3	> GmICE3	gi 351724377	大豆
ICE1	> CsiICE1	gi 399145795	野茶树
inducer of CBF expression	> CsiICE2	gi 317016596	野茶树
PREDICTED;transcription factor ICE1 – like	> SlICE1 – like	gi 460392085	番茄
PREDICTED; LOW QUALITY PROTEIN; transcription factor ICE1 – like	> CsaICE1 – like	gi 449523427	黄瓜
PREDICTED;transcription factor ICE1 – like	> FvICE1 – like	gi 470122941	野草莓
ICE – like protein	> ChICE – like	gi 325976998	榛子
PREDICTED;inducer of CBF expression	> NtICE1	> Unigene12024_PPC	白刺
Transcription factor ICE1 ,putative	> RcICE1	gi 255540073	蓖麻
inducer of CBF expression 1 protein	> PsuICE1	gi 95106187	甜杨
inducer of CBF expression 2 protein	> PsuICE2	gi 302030865	甜杨
inducer of CBF expression 1	> PtICE1	gi 125863280	毛果杨
Transcription factor ICE1	> AtaICE1 – 2	gi 475625407	山羊草
ICE87	> TaICE87	gi 172034194	小麦
Transcription factor ICE1	> TuICE1 – 2	gi 474153506	乌拉尔图小麦
Transcription factor ICE1	> AtaICE1 – 1	gi 475567554	山羊草
Os11g0523700	> OsICE1	gi 297611917	水稻
Transcription factor ICE1	> TuICE1 – 1	gi 474400428	乌拉尔图小麦
transcription factor ICE1 – like	> BdICE1 – like1	gi 357152141	二穗短柄草
inducer of CBF expression 2	> HvICE2 – 3	gi 75706692	大麦
transcription factor ICE1 – like	> BdICE1 – like2	gi 357131605	二穗短柄草
inducer of CBF expression 2	> ZmICE2	gi 195654251	玉米
Os01g0928000	> OsICE2	gi 115441985	水稻
inducer of CBF expression 2	> HvICE2 – 2	gi 74136903	大麦
inducer of CBF expression 2	> HvICE2 – 1	gi 75706690	大麦
inducer of CBF expression 2	> HvICE2 – 4	gi 75706690	大麦
ICE41	> TaICE41	gi 172034192	小麦
inducer of CBF expression 1 – 4	> MuICE1 – 4	gi 449811529	芭蕉
inducer of CBF expression 1 – 3	> MuICE1 – 3	gi 449811527	芭蕉
inducer of CBF expression 1 – 2	> MuICE1 – 2	gi 449811525	芭蕉
inducer of CBF expression 1 – 1	> MuICE1 – 1	gi 449811523	芭蕉
inducer of CBF expression 1 – 6	> MuICE1 – 6	gi 449811533	芭蕉
inducer of CBF expression 1 – 5	> MuICE1 – 5	gi 449811531	芭蕉
unknown	> PsiICE1	gi 294460964	北美云杉
Hypothetical protein SELMODRAFT _91237	> SmICE1	gi 302772472	江南卷柏
Hypothetical protein SELMODRAFT _94010	> SmICE2	gi 302774999	江南卷柏
predicted protein	> PpICE1	gi 168018611	小立碗藓
predicted protein	> PpICE2	gi 168018611	小立碗藓

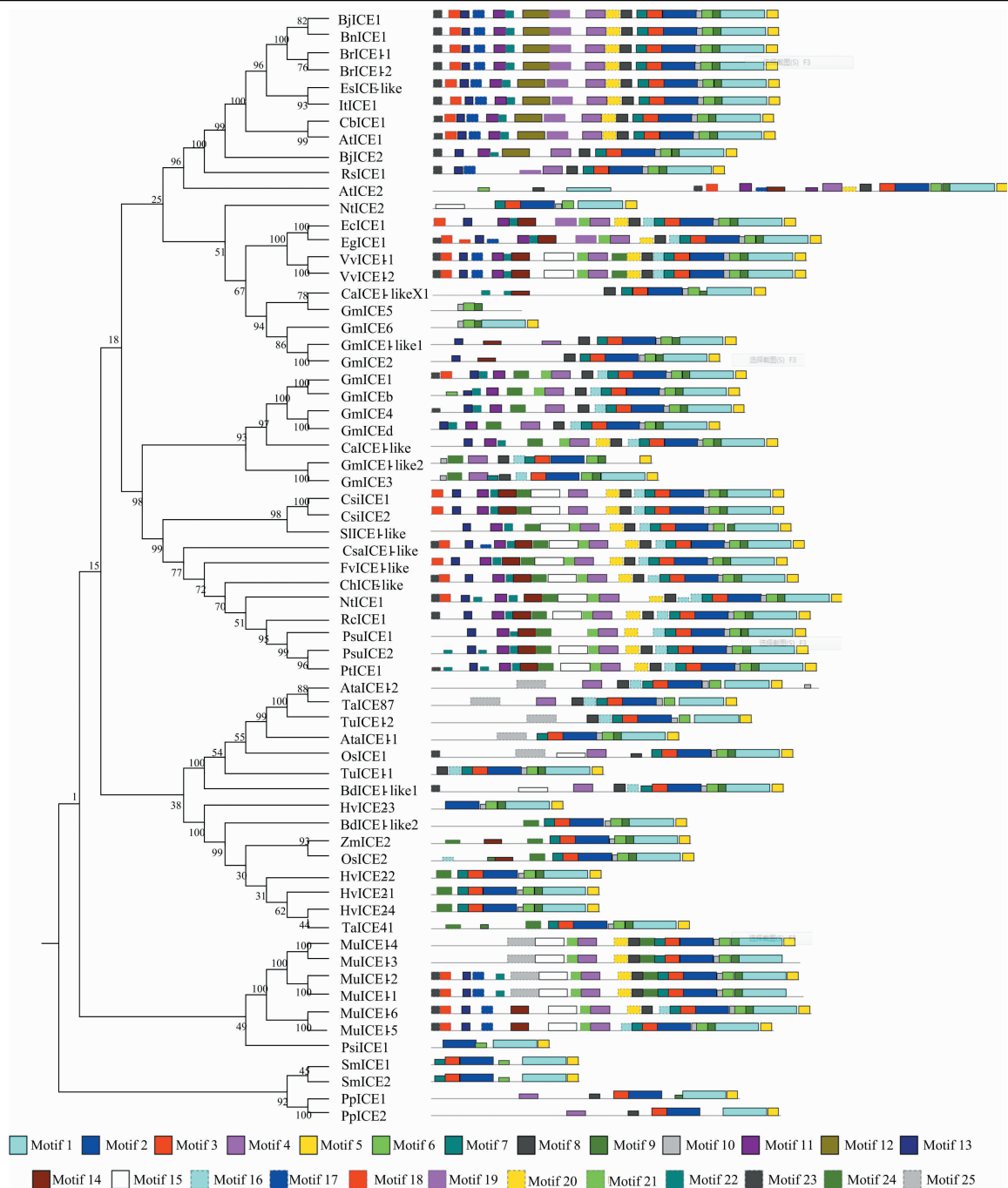
2.2 序列特异性分析

由图 1 可见,65 个 ICE 蛋白质基因中,有 63、63、61、62、63 个基因分别包含模体 1、模体 2、模体 3、模体 5 和模体 6;基因 GmICE5、GmICE1 – like2 缺失模体 1,基因 GmICE5、GmICE6 缺失模体 2,基因 GmICE5、GmICE6、HvICE2 – 3、PsiICE1 缺失模体 3,基因 GmICE5、MuICE1 – 3、MuICE1 – 1 缺失模体 5,PpICE1、PpICE2 缺失模体 6。利用 NCBI 中 Blastp 对 65 个植物的 ICE 氨基酸序列进行结构域搜索,结合 MEME 做出蛋白序列 25 个模体(表 3)中的模体 2、模体 3 序列进行分析,并用 Smart 和 Pfam 进行检验,结果表明,不同来源的 ICE 氨基

酸序列有一定的差异,但仍有一个保守结构域 HLH 存在,HLH 是 ICE 氨基酸序列的功能区域,包含 3 个功能位点,分别为 DNA 结合区域(核酸结合位点)、E – box (5 – CANNTG – 3)/N – box (5 – CACGC/AG – 3)的特异性位点、二聚接口(多肽结合位点)。

2.3 植物 ICE 基因家族的系统发生关系

由图 2 可见,ICE 蛋白家族基本按苔藓、蕨类、裸子、单子叶和双子叶植物而分别聚类,说明该基因在进化上具有保守性;大部分允许 ICE 蛋白亚族分离的节点,自展值都比较小;自上往下,将 ICE 家族分为 4 个亚组,分别被称为 I、II、III、



IV, 其中第 I 大亚组包含所有双子叶植物, 第 II 大亚组全部为单子叶植物, 第 III 大亚组可分为 2 个小亚组 A、B, 其中, 小亚组 A 全部为单子叶植物, 小亚组 B 为裸子植物, 第 IV 大亚组可分为 2 个小亚组 C、D, 其中, 小亚组 C 为蕨类植物, 小亚组 D 为苔藓类植物; III 和 IV 位于系统发生树的基部, 其在进化地位上是最原始的类型。

3 结论

对植物 ICE 蛋白基因家族进行分析发现, 尽管不同来源

的 ICE 序列表现出一定的差异, 但 HLH 结构域在各植物物种中都有很好的保守性, 这说明该基因在进化上具有保守性。对双子叶植物来说, 大多数同源基因聚类到一起, 如 BrICE1-1 和 BrICE1-2, VvICE1-1 和 VvICE1-2, GmICE5、GmICE6、GmICE1-like1、GmICE2、GmICE1、GmICEb、GmICE4 和 GmICEd, GmICE1-like2 和 GmICE3, CsiICE1 和 CsiICE2, PsuICE1 和 PsuICE1; 对单子叶植物、蕨类植物、苔藓植物来说, 也发生同样的现象。这说明植物 ICE 蛋白基因家族的进化模式, 应归因于物种特定的扩张, 也可以说, 植物进化历程

表 3 ICE 基因 MEME/MAST 结构域分析结果

编号	序列标志
1	RVEVR[LV]REGRAVNIHMFC[AG]RRPGLLLSTM[RK]ALD[NS]LGLD[IV]QQAIVISCFNGFA[LM]D[VI]FRAEQC[KR] [ED]G
2	RSVVPKISKMDRASILGDAI[ED]YLKELLQRINDLHNELESTP[SP][GS]S[SL]L[PT]P
3	PAKNLMAERRRRKKLNDRLYM
4	VL[RK]PLE[VS][FL][PA][SP]SGAQPTLFQKRAA[LM]R[KQ][NS]
5	P[ED][QE]IKAVLL[DH][ST]AG[FY]H
6	PT[PL][PQ]TL[PS][CS]R[VI]KEELC
7	[ST][GT][VG][CT]GGD[GQ]KGKKKG[ML]
8	[ED][TV][SG][IFV]D[GV]SGLNY[DE]SD[ED]
9	SSLPSP[NK]GQ[PQ]A
10	[SA][TS]SFHPLT
11	[LN]LL[LQ][HQ][SP][VI]DSSSSCSPS
12	PSSANPFDNAFEFGS[DE]SGFLNQI[QH]AP[VI]SMGFGSLTQLG
13	S[TQ]FK[SP]ML[ED][GV][DE][DW]
14	F[LM][PH][PS]K[PS][TCS][LF]SSLNVV[SC][NS]NP[LF][DE][HN]GFD
15	[GFT][GN]F[TV][DG][LI][SG][ST][NQG][SG]Q[ML][GS][TC]P[NE]L[CNS]S[DA][PS][QE]F[SP][GS][AST] [RHL][LM]L[PQ][LP][PSA][EG][NS][CTG]S[GV][SFL][SG][SG][GF]
16	[VE]EESG[KR]NGGN[SN]SNAN
17	[PA][HA][PH][QH]D[LF][QH][MA][LF]Q[SNT][QH][QH]D[FL]
18	[DQE][GRE][ED][ED][NE][DE][EA][AV]SW[TGA]RN[NQ][EA]
19	[SG]S[VG][PS][DE][FL]L[SP][AV][RP]S[LR]L[PAV]P[EL][NG][NE]N[STA][TAN][PQ]L[CLP][GC]GG [GF]G
20	SKMG[NE][ES]E[SN][ES][KG][KM]R[KR]L[SN][DE][DGV][DG]
21	[GF][FD][ED][GS][SL][GE]N[SP][LP]FLNRSK
22	[AF][NF][NS]LDPSQVH[YF]
23	[MV]L[SD][GR]N[GN]G[GAV]VW[LM]
24	[GC][ED]xGFL[DE]PQ[AS]S[NS][SAV][SAL][ST]LG[GVN]S[SG]S
25	[PA][LRS][DNT][IVH][PFS][GA][FLV][GD][VL]D[LI][RS][GS]D[AL][PS][GA]FL[GP]A[AG][NP][AV][LP] N[PAT][PS][DL]L[MP][NH]G[GN][GT][GD][AF][IL][DG][GS][FV]

中,细胞扩增过程中的基因复制及细胞分化是 ICE 蛋白基因家族的主要进化模式。因此,进化树分支末端的基因可能是代表最近复制过程中突变的基因^[16],这为物种特定扩张学说提供了有力支持。同时,研究发现,被子植物中的 ICE 基因形成不同的分支,这表明单子叶植物和双子叶植物可能有不同的原始 ICE 蛋白基因。

参考文献:

[1]郑银英,崔百明,常明进,等. 转拟南芥 ICE1 基因增强烟草抗寒性的研究[J]. 西北植物学报,2009,29(1):75-79.

[2]Chinnusamy V, Ohta M, Kanrar S, et al. ICE1: a regulator of cold-induced transcriptome and freezing tolerance in *Arabidopsis* [J]. Genes & Development, 2003, 17(8): 1043-1054.

[3]王翠花,刘 沙,张瑞富,等. 植物抗寒分子生物学研究概况及展望[J]. 辽宁农业科学, 2014(1): 45-48.

[4]Chinnusamy V, Zhu J H, Zhu J K. Cold stress regulation of gene expression in plants[J]. Trends in Plant Science, 2007, 12(10): 444-451.

[5]Zhu J H, Dong Ch H, Zhu J K. Interplay between cold-responsive gene regulation, metabolism and RNA processing during plant cold acclimation[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2007, 10(3): 290-295.

[6]Chinnusamy V, Zhu J K, Sunkar R. Gene regulation during cold stress

acclimation in plants[J]. Methods in Molecular Biology, 2010, 639: 39-55.

[7]Zhou M Q, Shen C, Wu L H, et al. CBF-dependent signaling pathway: a key responder to low temperature stress in plants[J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2011, 31(2): 186-192.

[8]Agarwal M, Hao Y J, Kapoor A, et al. A R2R3 type MYB transcription factor is involved in the cold regulation of CBF genes and in acquired freezing tolerance [J]. Journal of Biological Chemistry, 2006, 281(49): 37636-37645.

[9]Dong C H, Hu X Y, Tang W P, et al. A putative Arabidopsis nucleoporin, AtNUP160, is critical for RNA export and required for plant tolerance to cold stress[J]. Molecular and Cellular Biology, 2006, 26(24): 9533-9543.

[10]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]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006, 103(21): 8281-8286.

[11]蒋 瑶,陈其兵. 植物 CBF1 转录因子的生物信息学分析[J]. 林业科学, 2010, 46(6): 43-50.

[12]王 波,孙君社,翟玉盼,等. 植物Ⅲ型聚酮合酶基因家族的分子进化分析[J]. 生物技术通报, 2011(1): 83-89, 94.

[13]金谷雷,汪旭升,朱 军. 水稻 14-3-3 蛋白家族的生物信息学分析[J]. 遗传学报, 2005, 32(7): 726-732.

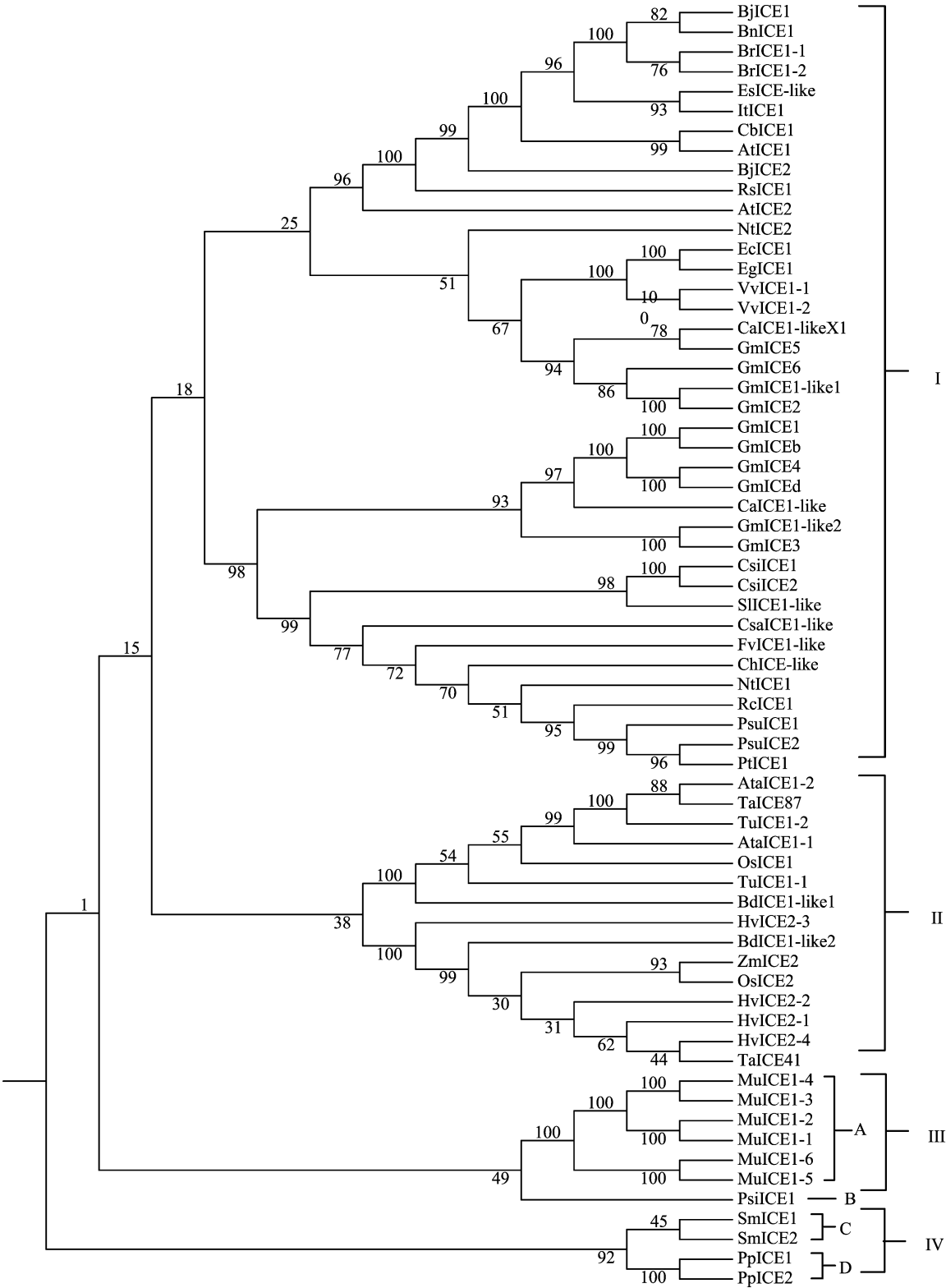


图2 使用 N-J 方法构建的植物 ICE 家族基因序列系统发生树

[14]Schultz J C R, Bork P. Smart: a web - based tool for the study of genetically mobile domains[J]. Nucleic Acids Research, 2000, 28 (1): 231 - 234.

[15]Sonnhammer E R, Durbin R. Pfam: a comprehensive database of protein domain families based on seed alignments [J]. Proteins, 1997, 28(3): 405 - 420.

[16]Xiong Y Q, Liu T Y, Tian C G, et al. Transcription factors in rice: a genome - wide comparative analysis between monocots and eudicots [J]. Plant Molecular Biology, 2005, 59(1): 191 - 203.