

芹菜品种‘津南实芹’*AgICE1* 基因的克隆及其对非生物胁迫的响应

杨青青, 刘洁霞, 徐志胜, 冯 凯, 黄 莹, 熊爱生^①

(南京农业大学园艺学院 作物遗传与种质创新国家重点实验室 农业部华东地区园艺作物生物学与种质创制重点实验室, 江苏 南京 210095)

摘要: 从芹菜 (*Apium graveolens* Linn.) 品种‘津南实芹’ (‘Jinnan Shiqin’) 叶片 RNA 中克隆获得 1 个转录因子基因, 命名为 *AgICE1*。序列分析结果显示: *AgICE1* 基因含有 1 个长度为 1 455 bp 的开放阅读框 (ORF), 编码 484 个氨基酸。 *AgICE1* 转录因子氨基酸序列的理论相对分子质量为 53 140, 理论等电点为 pI 5.09, 为亲水性蛋白。 *AgICE1* 转录因子的氨基酸组成中脂肪族氨基酸的比例最高, 酸性氨基酸的比例次之, 碱性氨基酸的比例较低, 芳香族氨基酸的比例最低。序列比对与系统进化分析结果表明: *ICE1* 转录因子在不同植物中高度保守。实时荧光定量 PCR 检测结果表明: *AgICE1* 基因在叶片中的相对表达水平显著高于在根和叶柄中的相对表达水平; 在高温 (38 °C)、低温 (4 °C)、干旱 (质量体积分数 20% PEG6000) 和高盐 (0.2 mol · L⁻¹ NaCl) 处理下, *AgICE1* 基因的相对表达水平总体上升高。研究结果表明: *AgICE1* 转录因子在芹菜非生物胁迫调控中起重要作用。

关键词: 芹菜; *AgICE1* 转录因子; 基因克隆; 非生物胁迫; 相对表达水平

中图分类号: Q943.2; S636.3 文献标志码: A 文章编号: 1674-7895(2019)01-0016-09

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7895.2019.01.03

Cloning of *AgICE1* gene from cultivar ‘Jinnan Shiqin’ of *Apium graveolens* and its response to abiotic stresses YANG Qingqing, LIU Jiexia, XU Zhisheng, FENG Kai, HUANG Ying, XIONG Aisheng^① (State Key Laboratory of Crop Genetics and Germplasm Enhancement, Ministry of Agriculture Key Laboratory of Biology and Germplasm Enhancement of Horticultural Crops in East China, College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China), *J. Plant Resour. & Environ.*, 2019, 28(1): 16-24

Abstract: A transcription factor gene was cloned from RNA in leaf blade of cultivar ‘Jinnan Shiqin’ of *Apium graveolens* Linn., which was named *AgICE1*. Sequence analysis result shows that there is an open reading frame (ORF) in *AgICE1* gene with length of 1 455 bp, which encodes 484 amino acids. Theoretical relative molecular mass of amino acid sequence of transcription factor *AgICE1* is 53 140, theoretical isoelectric point is pI 5.09, and amino acid sequence of transcription factor *AgICE1* is a hydrophilic protein. The percentage of aliphatic amino acid is the highest in amino acid composition of transcription factor *AgICE1*, that of acidic amino acid comes second, that of basic amino acid is relatively low, and that of aromatic amino acid is the lowest. Sequence alignment and phylogenetic analysis results show that transcription factor *ICE1* is highly conserved in different species. Real-time fluorescence quantitative PCR determination result shows that relative expression level of *AgICE1* gene in leaf blade is significantly higher than that in root and petiole, and its relative expression level increases in general in treatments of high temperature (38 °C), low temperature (4 °C), drought (mass volume fraction of 20% PEG6000), and high salt (0.2 mol · L⁻¹ NaCl). It is suggested that transcription factor *AgICE1* plays an important role in regulation of abiotic stresses of *A. graveolens*.

收稿日期: 2018-05-25

基金项目: 江苏省农业科技自主创新资金项目 (CX18-2007); 国家自然科学基金资助项目 (31272175); 国家教育部新世纪优秀人才支持计划项目 (NCET-11-0670); 江苏高校优势学科建设项目 (PAPD)

作者简介: 杨青青 (1994—), 女, 河南洛阳人, 硕士研究生, 主要从事蔬菜分子生物学方面的研究。

^①通信作者 E-mail: xiongaisheng@njau.edu.cn

Key words: *Apium graveolens* Linn; transcription factor *AgICE1*; gene cloning; abiotic stress; relative expression level

芹菜 (*Apium graveolens* Linn.) 隶属于伞形科 (Apiaceae) 芹属 (*Apium* Linn.), 是一种重要的叶菜类蔬菜作物。芹菜原产于地中海和中东地区, 在中国有着悠久的栽培历史^[1]。芹菜具有较高的营养和药用价值, 富含类胡萝卜素、维生素、类黄酮以及挥发性芳香成分, 全株可入药^[2]。非生物胁迫是影响芹菜生长发育、产量和品质的重要因子, 如高温、低温、干旱和盐胁迫会破坏芹菜细胞的膜结构, 打乱植株自身的水分平衡, 对芹菜植株的生长发育产生较大的影响, 进而影响芹菜的产量和品质^[3]。

ICE (*inducer of CBF expression*) 基因是诱导 *CBF* 基因家族表达的转录激活因子, 在植物中普遍存在。已有研究结果^[4]表明: *ICE* 蛋白定位于细胞核中, 在低温条件下, *ICE* 蛋白被激活, 达到活跃状态, 可以和 *CBF* 基因启动子区的顺式作用元件有效结合, 激活植物体内响应冷胁迫相关的代谢来抵御寒冷胁迫。对植物抗寒分子机制的研究结果^[5]表明: 冷胁迫会诱导植物体内抗冻相关基因的表达, 并且冷诱导基因 (*COR*) 在高等植物体内普遍存在。*ICE* 基因在植物遭遇低温胁迫时, 能够识别 *CBF* 基因启动子中的冷调控元件 *ICE box*, 诱导 *CBF/DREB* 调控下游基因的转录表达, 从而提高植物的抗寒性^[6-7]。*ICE* 蛋白可以通过多种方式调控不同低温应答基因^[7]。近年来, 人们对植物抗寒基因 *ICE* 的研究取得了一定的进展, *ICE1* 基因的发现为提高植物的抗寒性提供了新的途径。目前, 已经从茶树 [*Camellia sinensis* (Linn.) O. Ktze.]^[4]、拟南芥 [*Arabidopsis thaliana* (Linn.) Heynh.]^[8]、异色菊 [*Chrysanthemum dichrum* (C. Shih) H. Ohashi et Yonek.]^[9]、萝卜 (*Raphanus sativus* Linn.)^[10]、苹果 (*Malus pumila* Mill.)^[11] 和胡萝卜 (*Daucus carota* var. *sativa* Hoffm.)^[12] 等植物中分离鉴定出 *ICE* 基因, 且通过转基因验证发现, 转入 *ICE* 基因的植物抗逆性均有提高^[13]。

芹菜品种‘津南实芹’ (‘Jinnan Shiqin’) 植株紧凑直立、分枝少、颜色淡绿、叶片肥大、不易先期抽薹, 在中国南北地区四季均可以栽培^[14]。本研究从芹菜品种‘津南实芹’中克隆得到 *AgICE1* 基因, 对该基因进行生物信息学分析, 利用实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 检测 *AgICE1* 基因在高温、低温、干旱及高盐

4 种非生物胁迫下的相对表达水平, 以期为进一步开展芹菜 *ICE* 转录因子的逆境调控机制研究奠定基础, 并为深入了解 *AgICE1* 基因在芹菜抵御非生物胁迫的功能提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料

芹菜品种‘津南实芹’由南京农业大学作物遗传与种质创新国家重点实验室提供。供试材料栽植于昼温 25 °C、夜温 18 °C、光照时间 16 h · d⁻¹、光照强度 300 μmol · m⁻² · s⁻¹、空气相对湿度 60%~70% 的人工气候室内。采集 4 月龄植株的根、叶柄和叶片, 样品采集后立即用液氮速冻后置于 -80 °C 冰箱, 用于总 RNA 提取、cDNA 合成及基因表达分析^[15]。此外, 选取长势均一的 4 月龄植株进行高温 (38 °C)、低温 (4 °C)、干旱 (质量体积分数 20% PEG6000) 和高盐 (0.2 mol · L⁻¹ NaCl) 4 种非生物胁迫处理, 对照组用 ddH₂O 处理, 每个处理设置 3 组生物学重复。分别取处理 0、1、2、4、8 和 24 h 植株上部生长健康的叶片, 采用上述方法速冻, 用于总 RNA 提取、cDNA 合成及基因表达分析。

大肠杆菌菌株 DH5α 为南京农业大学作物遗传与种质创新国家重点实验室保存; 凝胶回收试剂盒购自康宁生命科学 (吴江) 有限公司; 引物合成由南京金斯瑞生物科技有限公司完成; pMD19-T 质粒载体、*Taq* DNA 聚合酶、DNA marker DL2000、SYBR[®] Premix Ex *Taq*[™] 试剂盒均购自宝生物工程 (大连) 有限公司。

1.2 方法

1.2.1 基因克隆 基于作者所在课题组保存的芹菜转录组和基因组数据库^[16], 通过与其他物种 *ICE* 基因序列 BLAST 比对分析获得芹菜品种‘津南实芹’*ICE1* 基因的序列。根据开放阅读框 (ORF) 序列设计扩增引物, 芹菜品种‘津南实芹’*ICE1* 基因正向引物 *AgICE1-F* 的序列为 5'-ATGCTCCCCACCTCAAACGACGT-3', 反向引物 *AgICE1-R* 的序列为 5'-CTA AATTGCGCCATGAAAACCAG-3'。以‘津南实芹’叶片的 cDNA 为模板进行 PCR 反应, PCR 反应程序

为:94 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 变性 30 s,54 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 60 s,34 个循环;72 ℃ 延伸 10 min。PCR 反应体系总体积 20 μL ,包含 cDNA 模板 1 μL 、正向引物和反向引物各 1 μL 、ddH₂O 7 μL 以及 *Ex Taq* 酶 10 μL 。PCR 反应产物用质量浓度 12 g · L⁻¹ 的琼脂糖凝胶电泳进行分离检测,回收产物连接 pMD19-T 质粒载体,并转化到大肠杆菌菌株 DH5 α 中,挑取单菌落摇菌,经 PCR 检测后交由南京金斯瑞生物科技有限公司进行测序验证。

1.2.2 氨基酸序列分析 各植物 ICE 转录因子氨基酸序列均来自 NCBI 数据库,采用 ExPASy 网站 (<https://web.expasy.org/protparam/>) 的相关软件对芹菜品种‘津南实芹’ICE1 转录因子的氨基酸组成、理论相对分子质量和理论等电点 (pI) 进行分析^[17];采用 DNAMAN 软件进行 ICE1 转录因子氨基酸序列的多重比对及蛋白质的亲水性和疏水性预测,利用 Blast Conserved Domains Search (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 对芹菜品种‘津南实芹’ICE1 转录因子氨基酸序列进行保守域预测,采用 MEGA5 对进化树进行测试和编辑,生成报告图形^[18]。

1.2.3 RT-qPCR 根据 SYBR[®] *Premix Ex Taq*[™] 试剂盒操作说明进行 RT-qPCR,然后通过 IQTM5 Real-time PCR System 完成 RT-qPCR 检测。相对表达水平的计算采用参照基因的 ΔC_T 法,相对表达水平是基于处理组与对照组之间目标基因相对内参基因表达量的比较^[19]。以芹菜的 *actin* 基因作为内参基因,该基因正向引物的序列为 5'-AGAAGTCCTGTTCCA GCCGTCTT-3',反向引物的序列为 5'-CGAACCAC CACTGAGCACTATGTT-3'。用于 *AgICE1* 基因表达分析的正向引物 *AgICE1*-qF 的序列为 5'-CTGCTTT ATCCCCTGCATTTTCCT-3',反向引物 *AgICE1*-qR 的序列为 5'-CAGTACTAGTTAACAAAGCTAA-3'。同时扩增内参基因与目标基因,每个样品分别设置 3 个生物学重复和 3 个技术重复。PCR 反应体系总体积 20.0 μL ,包含 ddH₂O 7.2 μL 、SYBR Green I mix 10.0 μL ,cDNA 模板 2.0 μL 以及正向荧光定量引物和反向荧光定量引物各 0.4 μL 。RT-qPCR 反应程序为:95 ℃ 预变性 30 s;95 ℃ 变性 5 s,60 ℃ 退火延伸 20 s,共 40 个循环;通过从 65 ℃ 至 95 ℃ 逐步扩增加热获得溶解曲线。

采用 Duncan's 新复极差法对数据进行多重比较,采用 one-way ANOVA 对数据进行差异显著性分

析,采用 EXCEL 2007 和 SPSS 20.0 统计分析软件分析 RT-qPCR 数据。

2 结果和分析

2.1 芹菜品种‘津南实芹’*ICE1* 基因的克隆

以芹菜品种‘津南实芹’未经胁迫处理叶片的 cDNA 为模板,用引物 *AgICE1*-F 和 *AgICE1*-R 进行 PCR 扩增,得到 1 条长约 1 400 bp 的目的片段(图 1),片段大小与预期一致。将回收产物依次进行连接、转化及测序,获得芹菜品种‘津南实芹’*ICE1* 基因的开放阅读框(ORF)序列,命名为 *AgICE1* 基因。测序结果(图 2)显示:克隆得到的 *AgICE1* 基因含有 1 个长度为 1 455 bp 的开放阅读框,编码 484 个氨基酸。

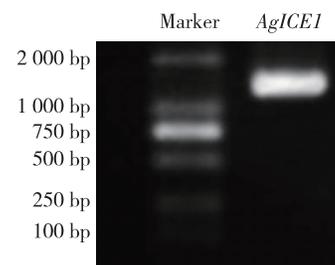


图 1 芹菜品种‘津南实芹’*AgICE1* 基因的 PCR 扩增图谱

Fig. 1 PCR amplification pattern of *AgICE1* gene from cultivar ‘Jinnan Shiqin’ of *Apium graveolens* Linn.

2.2 芹菜品种‘津南实芹’*AgICE1* 转录因子的氨基酸序列及其理化性质分析

通过 DNAMAN 软件对氨基酸序列进行比对,结果表明:芹菜品种‘津南实芹’*AgICE1* 转录因子的氨基酸序列与大豆 [*Glycine max* (Linn.) Merr.]、拟南芥和欧洲油菜 (*Brassica napus* Linn.) 等植物的 ICE1 转录因子的氨基酸序列一致性较高(图 3)。

氨基酸组成及理化性质分析结果(表 1)显示:芹菜品种‘津南实芹’*AgICE1* 转录因子和其他植物 ICE1 转录因子的氨基酸序列的理论相对分子质量在 36 000~59 000 之间,氨基酸残基数在 340~540 之间,脂肪族氨基酸的比例明显高于芳香族氨基酸的比例,芹菜品种‘津南实芹’*AgICE1* 转录因子中酸性氨基酸的比例高于碱性氨基酸的比例,而其他植物 ICE1 转录因子中的碱性氨基酸的比例均高于酸性氨基酸的比例。

```

1 atgctcccactcaaacgagctggtttggttaccocctcaagaccaccaccataacaatcaacctcaacaacaagcaacaactatca
M L P T S N D V V W L P P Q D T T I N N Q P Q Q Q Q Q L S
91 ttggagacatgttagatatacaaaaataaccctttttctctctctcaactcaccagttttaaactccttctgaaatgattggttt
L E T C L D T K I N P F S S S S S L T S F K S L L E N D W F
181 tctaataattatctgtaataagcaacaacttagattctcatctctctctcaactcagccctcactcttgacctttacactca
S N N Y L A N S T N L D F S S S S S Q S Q P P T L D P L H S
271 cactctcattttttacccecaactctgctctctcctgatgcttaactctctgataatgggttcaactgggttggaccgcaat
H S H F F H P K S C F S P M L N L S Y D N G F H L G C D P N
361 ttccaacgggtcgaatttgggtgggtgactctgtgcctaatgggatgggttctgttttgaggtcgggtggaccgcttggag
F S N G S N F G G L T S V P N L D M G S V L E F G G T R F E
451 aatgaccgggtgggtgctgaggttcaaccgggtgggtatgaggtctgtttgagagctggtaataatgtagatgaggggttg
N D P V G V E F N P V G Y D G S C L G A G N D N V D D E G L
541 tttgtaataggagtaaggtagtagatgtaaggccactgaagttcacaagtggtgacagagcctactctttatcaaaagag
F C N R S N G S E M L R P L E V S P S V G T E P T L Y Q K R
631 gctgctttacgacaagctgtggtgagggcgaatggggagtttaggaagatgagggttgggaaggaagagatgaggaattgagt
A A L R Q G C G E G E M G S L G K I E G L G R K R M R N L S
721 gagatggtagatgaattgtagatgggagtaggggtttcgggtcttttaataatgtagcggatgagttgatacaaaatgagac
E D G D E F D D G S M G V S G S F N Y D S D E F D T K N E
811 gagggttgtagggatgggaggttcaaatcagtaaggtggagatcgcaagaaagaaagggatctctgtaagaattgag
E G C G D G D G S N S V K V G D R K G K K G F P A K N L M
901 gctgagacacggaggaagaacttaacgataggtttacatgcttaggtctgttttcgaagatcagcaagatggaccgagcttc
A E R R R R K K L N D R L Y M L R S V V P K I S K M D R A S
991 atactggagatgctattgatttgaaggatctctgacagagataaatgatctcataatgaactcagggcagttccactgctcc
I L G D A I D Y L K D L L Q R I N D L H N E L E A V P P V S
1 081 tggtaacgcagctcaagctacaaccattgaactgcactctactaccaccacatctgtgaaggaagaataactcaagttca
S V T P A S S Y N P L T R T P T T H P H P V K E E I Y S S S
1 171 ttccctagtcacaagaacatctgcaaggtcgaggttaaggcaagagaggggggctgcaacatccacatgtttgtgcacgag
L P S P Q S T S A R V E V R A R E G R A V N I H M F C A R R
1 261 cctgctcttctgctccacatgagggccttgacaacttagggttagacatccagcaagctgctcagctgttcaatgggtttgct
P G L L L S T M R A L D N L G L D I Q Q A V I S C F N G F A
1 351 atggatgattctgctgagcaatgcagtgagaacgagagcttttgcctgatcagatcaaacagcttctctagatcagctggttt
M D V F R A E Q C S E N E D V L P D Q I K A V L L D S A G F
1 441 catggcgaatttag
H G A I *

```

*: 终止密码子 Stop codon.

图 2 芹菜品种‘津南实芹’*AgICE1* 基因的核苷酸序列及其编码的氨基酸序列

Fig. 2 Nucleotide acid sequence and its deduced amino acid sequence of *AgICE1* gene from cultivar ‘Jinnan Shiqin’ of *Apium graveolens* Linn.

Ag	GFFAENLAEERRRKKLNDRLYMLRS.VVVERISKMDRASILGDAIDYLKDLLQRINDLHNELEAVFPVSSVTFAS	109
Gm	GLEPKNLAEERRRKKLNDRLYMLRS.VVVERISKMDRASILGDAIDYKELLQRINDLHNELESTPPGSLITPSS	331
At	GMEPKNLAEERRRKKLNDRLYMLRS.VVVERISKMDRASILGDAIDYKELLQRINDLHNELESTPPGS.LPPTS	375
Bn	GMPAENLAEERRRKKLNDRLYMLRS.VVVERISKMDRASILGDAIDYKELLQRINDLHNELESTPPSGS.LPPTS	380
Sl	GLEPKNLAEERRRKKLNDRLYMLRS.VVVERISKMDRASILGDAIEYLKELLQRINDLHNELESTPPSSSITQIT	409
Mp	GLEPKNLAEERRRKKLNDRLYMLRS.VVVERISKMDRASILGDAIEYLKELLQRINNHLNELESTPPGSALTPTG	412
Rs	GMPAENLAEERRRKKLNDRLYMLRS.VVVERISKMDRASILGDAIDYKELLQRINDLHNELESTPPGS.LPPTS	302
La	GMEPKNLAEERRRKKLNDRLYMLRS.VVVERISKMDRASILGDAIDYKELLQRINDLHNELESTPPGS.LPPLAS	378
Bro	GMKFKCPQIVITAAASIKTIPAAKNLRPCLPAKLVVIGMLGMAENVPLGVVREHTKFSASWFLHAAVFFIG	247
	g k a r p k l g a	
Ag	.SYNPLTRFTTHFHVKEEIIYSSSLES...FCSTSRVEVRAAREGRAVNIHMFCARRPGLLISIMRALDNLGL	179
Gm	TSFQPLTPTLPTLFCRVKEEIIYFGLLES...FKNCAKVEVVRVREGRAVNIHMFCRRPGLLISIMRALDNLGL	402
At	SSFHPLTPTLPTLSCRVKEEIIYCPSSLES...PKGQCARVEVRLREGRAVNIHMFCRRPGLLISIMRALDNLGL	446
Bn	SSFHPLTPTLPTLSCRVKEEIIYCPSSLES...PKGQCARVEVRFMEGRAVNIHMFCRRPGLLISIMRALDNLGL	451
Sl	.SEYPLTPTGPAIPGRIKEEIIYSSSFP...FPLSSFTGQCARVEVRAAREGRAVNIHMFCRRPGLLISIMRALDNLGL	483
Mp	NTFHLPTPTLPTLFPNRIKEEIIYCLSSLES...FNGQAAVEVRLREGRAVNIHMFCRRPGLLISIMRTLDNLGL	483
Rs	SSFHPLTPTLPTLSCRVKEEIIYCPSSLES...PKDQCARVEVRLREGRAVNIHMFCRRPGLLISIMRALDNLGL	373
La	SSFHPLTPTLPTLSCRVKEEIIYCPSSLES...PKGQCARVEVRLREGRAVNIHMFCRRPGLLISIMRALDNLGL	449
Bro	ILRKSIVLMPKTAIVFTIAASVILGQVIGS...RAERRRISKVAEKKLTLEVFNPFSSVEALQHQFAGVSSVGR..	315
	s d	
Ag	LIQQAVISCFNGFALDVFAEQCEGQDVLPEQIKAVILLSAGFHGA	226
Gm	IVQQAVISCFNGFALDVFAEQCEGQDVLPEQIKAVILLSAGFHGM	449
At	IVQQAVISCFNGFALDVFAEQCEGQDVLPEQIKAVILLSAGFHGM	493
Bn	IVQQAVISCFNGFALDVFAEQCEGQDVLPEQIKAVILLSAGFHGM	498
Sl	LIQQAVISCFNGFALDVFAEQCEGQDVLPEQIKAVILLSAGFHGM	530
Mp	LIQQAVISCFNGFALDVFAEQCEGQDVLPEQIKAVILLSAGFHGM	530
Rs	LIQQAVISCFNGFALDVFAEQCEGQDVLPEQIKAVILLSAGFHGM	420
La	IVQQAVISCFNGFALDVFAEQCEGQDVLPEQIKAVILLSAGFHGM	496
Bro	.CGLRVVMKINPMMLVASEVSSGAAITVVC.....	344

Ag: 芹菜品种‘津南实芹’ Cultivar ‘Jinnan Shiqin’ of *Apium graveolens* Linn.; Gm: 大豆 *Glycine max* (Linn.) Merr.; At: 拟南芥 *Arabidopsis thaliana* (Linn.) Heynh.; Bn: 欧洲油菜 *Brassica napus* Linn.; Sl: 番茄 *Solanum lycopersicum* Linn.; Mp: 苹果 *Malus pumila* Mill.; Rs: 萝卜 *Raphanus sativus* Linn.; La: 独行菜 *Lepidium apetalum* Willd.; Bro: *Brassica rapa* subsp. *oleifera* (DC.) Metzg.

图 3 芹菜品种‘津南实芹’*AgICE1* 转录因子与其他植物 *ICE1* 转录因子的氨基酸序列的多重比对

Fig. 3 Multiple alignment of amino acid sequences of *AgICE1* transcription factor from cultivar ‘Jinnan Shiqin’ of *Apium graveolens* Linn. and *ICE1* transcription factors from other species

表 1 芹菜品种‘津南实芹’ AgICE1 转录因子和其他植物 ICE1 转录因子的氨基酸组成及理化性质

Table 1 Amino acid composition and physicochemical property of AgICE1 transcription factor from cultivar ‘Jinnan Shiqin’ of *Apium graveolens* Linn. and ICE1 transcription factors from other species

种类 ¹⁾ Species ¹⁾	登录号 Accession No.	氨基酸 残基数 Number of amino acid residue	理论相对 分子质量 Theoretical relative molecular mass	理论等电点 Theoretical isoelectric point	比例/% Percentage				总平均疏水性 Grand average of hydrophobicity
					碱性 氨基酸 Basic amino acid	酸性 氨基酸 Acidic amino acid	脂肪族 氨基酸 Aliphatic amino acid	芳香族 氨基酸 Aromatic amino acid	
Ag	Agr22229	484	531 361	5.09	11.6	13.0	56.4	7.5	-0.533
Gm	NM_001254339.1	531	494 147	5.41	12.6	10.2	74.4	6.5	-0.524
At	AY195621.1	404	535 389	5.53	11.6	9.6	69.3	6.7	-0.519
Bn	JF268687.1	499	532 141	5.05	11.4	8.8	68.2	6.4	-0.415
Sl	JX625139.1	531	583 371	5.38	11.8	9.6	69.0	7.0	-0.569
Mp	EF495202.1	531	574 001	5.51	12.0	10.1	72.2	5.5	-0.532
Rs	HQ891287.1	421	457 954	5.41	12.8	12.1	73.3	6.9	-0.444
La	AGZ13680.1	344	368 359	9.72	13.2	7.3	80.0	7.3	-0.032
Bro	ADZ24264.1	497	530 494	5.11	11.4	9.0	71.7	6.2	-0.417

¹⁾ Ag: 芹菜品种‘津南实芹’ Cultivar ‘Jinnan Shiqin’ of *Apium graveolens* Linn.; Gm: 大豆 *Glycine max* (Linn.) Merr.; At: 拟南芥 *Arabidopsis thaliana* (Linn.) Heynh.; Bn: 欧洲油菜 *Brassica napus* Linn.; Sl: 番茄 *Solanum lycopersicum* Linn.; Mp: 苹果 *Malus pumila* Mill.; Rs: 萝卜 *Raphanus sativus* Linn.; La: 独行菜 *Lepidium apetalum* Willd.; Bro: *Brassica rapa* subsp. *oleifera* (DC.) Metzg.

利用 Blast Conserved Domains Search 分析芹菜品种‘津南实芹’ AgICE1 转录因子氨基酸序列的保守

域,结果(图 4)显示:AgICE1 转录因子氨基酸序列在第 300 位至第 346 位氨基酸间含有 bHLH 保守域。

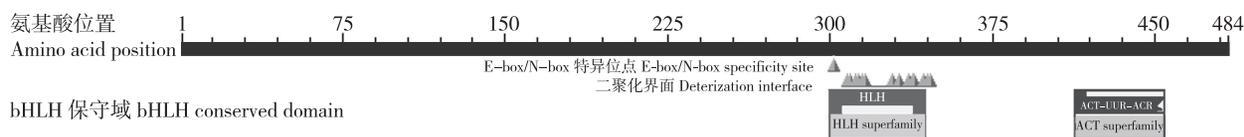


图 4 芹菜品种‘津南实芹’ AgICE1 转录因子氨基酸序列的保守域预测
Fig. 4 Prediction of conserved domain for amino acid sequence of AgICE1 transcription factor from cultivar ‘Jinnan Shiqin’ of *Apium graveolens* Linn.

2.3 芹菜品种‘津南实芹’ AgICE1 转录因子的进化分析

根据芹菜品种‘津南实芹’ AgICE1 转录因子与其他植物的 ICE1 转录因子的氨基酸序列构建系统进化树。

结果(图 5)显示:伞形科的芹菜品种‘津南实芹’与蔷薇科(Rosaceae)的苹果的进化关系最近。十字花科(Brassicaceae)的欧洲油菜、*Brassica rapa* subsp. *oleifera* (DC.) Metzg.、拟南芥和萝卜聚为同一分支,茄科(Solanaceae)的番茄(*Solanum lycopersicum* Linn.)以及芹菜品种‘津南实芹’和苹果聚为同一分支,但是豆科(Fabaceae)的大豆和十字花科的独行菜(*Lepidium apetalum* Willd.)分别聚为单独的分支。总体上看,ICE1 转录因子在不同植物间呈现明显的种属特性,同科植物的亲缘关系更近。

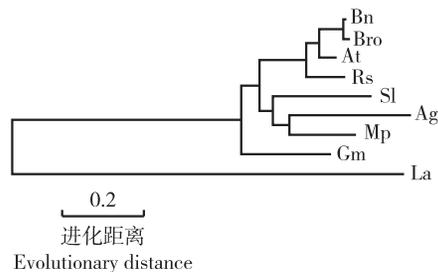


图 5 芹菜品种‘津南实芹’ AgICE1 转录因子与其他植物 ICE1 转录因子的氨基酸序列的系统进化树
Fig. 5 Phylogenetic tree of amino acid sequences of AgICE1 transcription factor from cultivar ‘Jinnan Shiqin’ of *Apium graveolens* Linn. and ICE1 transcription factors from other species

2.4 芹菜品种‘津南实芹’*AgICE1* 转录因子氨基酸序列的亲水性和疏水性分析

采用 DNAMAN 软件对芹菜品种‘津南实芹’*AgICE1* 转录因子氨基酸序列进行亲水性和疏水性分析, 结果(图 6)表明:*AgICE1* 转录因子氨基酸序列的

亲水性区域中, 第 300 位至第 312 位氨基酸亲水性最强; 疏水性区域中, 第 441 位至第 447 位氨基酸疏水性最强。总体上看,*AgICE1* 转录因子氨基酸序列的亲水性区域多于疏水性区域, 为亲水性蛋白。

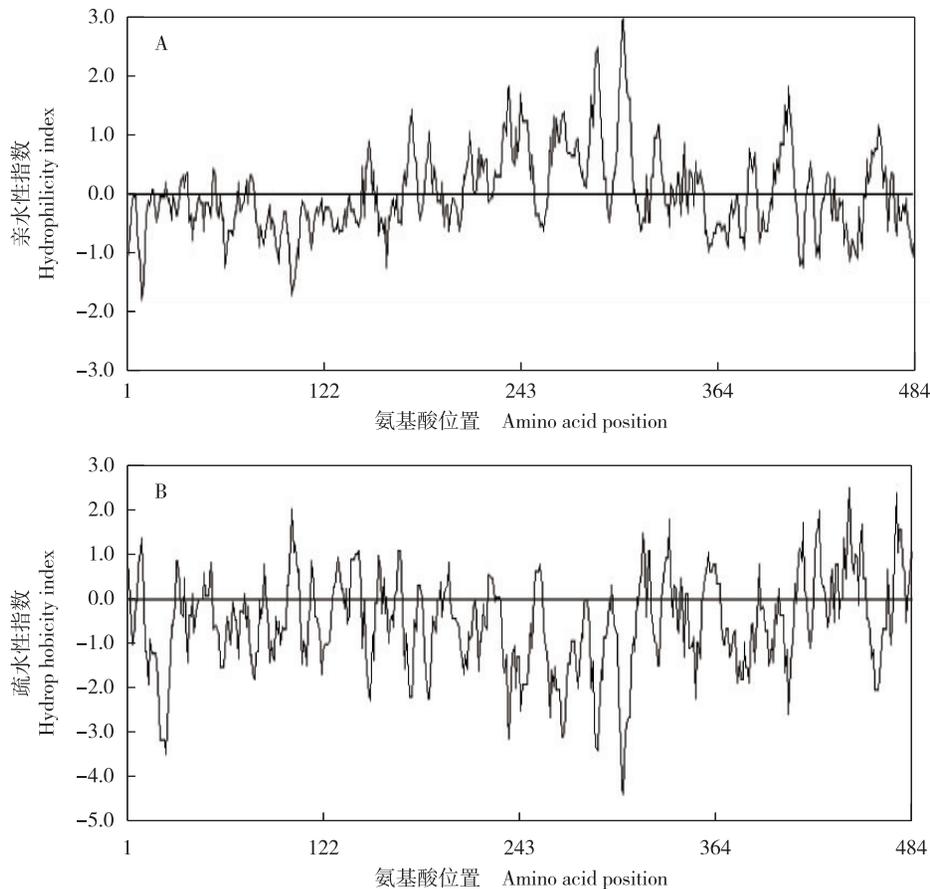


图 6 芹菜品种‘津南实芹’*AgICE1* 转录因子氨基酸序列的亲水性(A)和疏水性(B)
Fig. 6 Hydrophilicity (A) and hydrophobicity (B) of amino acid sequence of *AgICE1* transcription factor from cultivar ‘Jinnan Shiqin’ of *Apium graveolens* Linn.

2.5 芹菜品种‘津南实芹’*AgICE1* 基因在不同组织和逆境处理下的表达特性分析

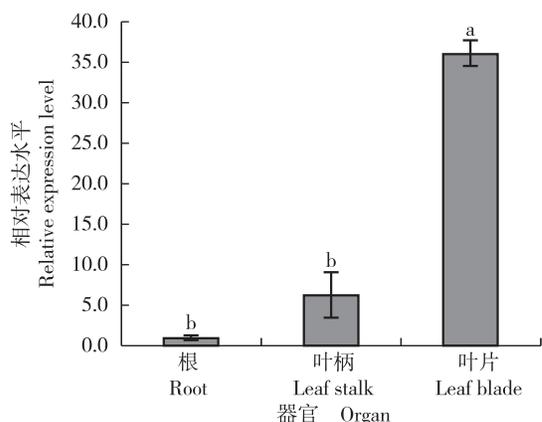
RT-qPCR 检测结果(图 7)表明:芹菜品种‘津南实芹’根、叶柄以及叶片中均能够检测到 *AgICE1* 基因的表达, 但其在不同组织中相对表达水平的差异较大。*AgICE1* 基因在叶片中的相对表达水平显著高于根和叶柄中的相对表达水平, 且根和叶柄间相对表达水平的差异不显著。

高温(38 °C)、低温(4 °C)、干旱(质量体积分数 20% PEG6000)和高盐(0.2 mol · L⁻¹ NaCl)4 种非生物胁迫处理下芹菜品种‘津南实芹’叶片中 *AgICE1*

基因的相对表达水平见图 8。结果表明:不同非生物胁迫处理下芹菜品种‘津南实芹’叶片中 *AgICE1* 基因的相对表达水平差异较大。

高温处理 1 h, *AgICE1* 基因的相对表达水平较处理 0 h 略有降低; 高温处理 2、4 和 8 h, *AgICE1* 基因的相对表达水平较处理 0 h 有所升高, 分别为处理 0 h 的 2.48、4.67 和 2.61 倍; 高温处理 24 h, *AgICE1* 基因的相对表达水平较处理 0~8 h 显著升高, 为处理 0 h 的 9.45 倍。

低温处理 1 h, *AgICE1* 基因的相对表达水平较处理 0 h 升高, 为处理 0 h 的 1.66 倍; 低温处理 4 h,



不同的小写字母表示在 0.05 水平上差异显著 Different lowercases indicate the significant difference at 0.05 level.

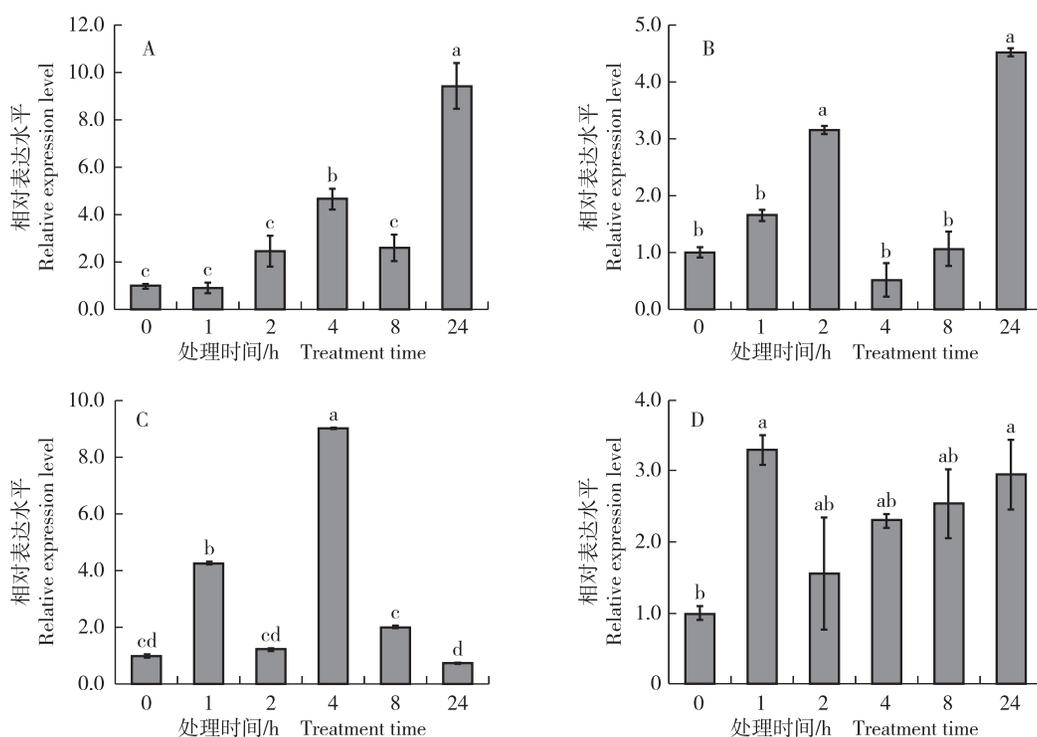
图 7 芹菜品种‘津南实芹’不同组织中 *AgICE1* 基因的相对表达水平

Fig. 7 Relative expression level of *AgICE1* gene in different tissues of cultivar ‘Jinnan Shiqin’ of *Apium graveolens* Linn.

AgICE1 基因的相对表达水平较处理 0 h 有所降低; 低温处理 8 h, *AgICE1* 基因的相对表达水平与处理 0 h 相比无明显变化; 低温处理 2 和 24 h, *AgICE1* 基因的相对表达水平均显著增加, 分别为处理 0 h 的 3.17 和 4.53 倍。

干旱处理 1 h, *AgICE1* 基因的相对表达水平较处理 0 h 显著升高, 为处理 0 h 的 4.29 倍; 干旱处理 2 和 8 h, *AgICE1* 基因的相对表达水平均较处理 0 h 有所升高, 分别为处理 0 h 的 1.24 和 2.02 倍; 干旱处理 4 h, *AgICE1* 基因的相对表达水平最高, 为处理 0 h 的 9.03 倍; 干旱处理 24 h, *AgICE1* 基因的相对表达水平较处理 0 h 略有降低。

高盐处理 1~24 h, *AgICE1* 基因的相对表达水平均较处理 0 h 有不同程度的升高, 分别为处理 0 h 的 3.30、1.55、2.30、2.54 和 2.95 倍, 其中, 高盐处理 1 h *AgICE1* 基因的相对表达水平最高。



不同的小写字母表示在 0.05 水平上差异显著 Different lowercases indicate the significant difference at 0.05 level.

A: 高温 (38 °C) High temperature (38 °C); B: 低温 (4 °C) Low temperature (4 °C); C: 干旱 (质量体积分数 20% PEG6000) Drought (mass volume fraction of 20% PEG6000); D: 高盐 (0.2 mol · L⁻¹ NaCl) High salt (0.2 mol · L⁻¹ NaCl).

图 8 不同非生物胁迫处理下芹菜品种‘津南实芹’叶片中 *AgICE1* 基因的相对表达水平

Fig. 8 Relative expression level of *AgICE1* gene in leaf blade from cultivar ‘Jinnan Shiqin’ of *Apium graveolens* Linn. under different abiotic stress treatments

3 讨论和结论

低温胁迫是植物生长发育过程中常见的一种非生物胁迫, 不仅会导致作物产量降低, 严重时还会导致植株死亡^[20]。芹菜作为重要的叶菜类蔬菜作物, 在其栽培过程中经常受到因气候变化及不良土壤环境引起的非生物胁迫, 严重影响芹菜的正常生长发育。本研究从芹菜品种‘津南实芹’中克隆获得 *AgICE1* 基因。该基因的开放阅读框编码 484 个氨基酸, 其氨基酸序列的第 300 位至第 346 位氨基酸间包含 bHLH 保守域。与其他植物 ICE1 转录因子的氨基酸序列的多重比对结果表明: ICE1 转录因子在进化上具有保守性。通过系统进化树的分析可发现, ICE1 转录因子在同科植物间的亲缘关系更近。RT-qPCR 结果显示: 芹菜品种‘津南实芹’*AgICE1* 基因在根、叶柄和叶片中均可表达但是相对表达水平差异较大, 其在叶片中的相对表达水平显著高于根和叶柄, 说明该基因的表达存在明显的组织特异性。高温 (38 ℃)、低温 (4 ℃)、干旱 (质量体积分数 20% PEG6000) 和高盐 (0.2 mol · L⁻¹ NaCl) 4 种非生物胁迫处理下芹菜品种‘津南实芹’*AgICE1* 基因的相对表达水平总体上有不同程度的升高, 说明 *AgICE1* 转录因子与非生物胁迫调控相关。

已有研究表明: 植物中许多基因家族的转录因子与植物的抗逆性有关, 这些转录因子通过特异性识别并结合下游基因启动子中的顺式作用元件来调控植物的抗逆应答, 如 CBF/DREB 是一类可以调控多个与干旱、高盐及低温胁迫相关的功能基因表达的转录因子家族, 在植物抵抗非生物胁迫中起重要作用^[21-22]。ICE1 转录因子可以与 *CBF3* 基因上游启动子结合从而激活 *CBF3* 基因的表达。黄莹等^[12] 认为, 缺失 *ICE1* 基因的拟南芥会引起 *CBF3* 基因表达变化, 使植物丧失抗寒能力; 但在高温条件下, 拟南芥中 *CBF3* 基因未被激活, 由此推测 ICE1 转录因子与 *CBF3* 基因上游启动子的结合存在低温诱导型的修饰调控。也有研究发现, 与对照组相比, 过量表达 *CBF3* 基因的转基因拟南芥不仅抗寒性增强, 而且对干旱和高盐胁迫也具有一定的抗性^[23]。目前对 ICE 转录因子激活 CBF 类转录因子家族的研究多集中于其在抗低温胁迫中的重要作用, 而对其他非生物胁迫响应的研究报道较少, 因此, 关于 *ICE1* 基因在非生物

胁迫中具体的作用机制还有待进一步的深入研究^[24]。

高等植物抵抗非生物胁迫的生理生化过程非常复杂, 有研究认为, 植物的耐受性与其体内的抗氧化酶活性相关^[25]。当植物受到逆境胁迫时, 体内会产生过量的活性氧毒害细胞, 植物本身可以通过产生抗氧化酶来清除这些有害物质, 从而增强其抗逆能力^[26-27]。已有的抗逆性相关研究结果^[28] 表明: 植物在抵抗逆境过程中有着复杂的分子调控网络。本文研究了芹菜品种‘津南实芹’*AgICE1* 基因对非生物胁迫的响应, 对了解 *AgICE1* 基因在芹菜抗逆境胁迫中发挥的作用提供了参考, 但对芹菜的抗逆性研究还需从分子及生理生化等方面进行深入探讨。

参考文献:

- [1] 王克勤, 陈亮, 刘仲华, 等. 芹菜综合加工及其功能成分研究进展[J]. 食品与机械, 2006, 22(3): 57-61.
- [2] 李梦瑶, 王枫, 侯喜林, 等. 芹菜过敏原蛋白 *Api g 1* 基因的克隆与表达分析[J]. 南京农业大学学报, 2013, 36(2): 13-19.
- [3] 杨献光, 梁卫红, 齐志广, 等. 植物非生物胁迫应答的分子机制[J]. 麦类作物学报, 2006, 26(6): 158-161.
- [4] 尹盈, 张玥, 胡靖妍, 等. 茶树低温胁迫转录因子 *CsICE* 的亚细胞定位及表达分析[J]. 园艺学报, 2013, 40(10): 1961-1968.
- [5] GUY C L, NIEMI K J, BRAMBL R. Altered gene expression during cold acclimation of spinach [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1985, 82(11): 3673-3677.
- [6] 张丽丽, 李景富, 王傲雪. 转录激活因子 *CBF* 基因在植物抗冷分子机制中的作用[J]. 园艺学报, 2008, 35(5): 765-771.
- [7] CHINNUSAMY V, OHTA M, KANRAR S, et al. ICE1: a regulator of cold-induced transcriptome and freezing tolerance in *Arabidopsis* [J]. Genes and Development, 2003, 17(8): 1043-1054.
- [8] ZARKA D G, VOGEL J T, COOK D, et al. Cold induction of *Arabidopsis CBF* genes involves multiple ICE (inducer of *CBF* expression) promoter elements and a cold-regulatory circuit that is desensitized by low temperature [J]. Plant Physiology, 2003, 133(2): 910-918.
- [9] CHEN Y, JIANG J, SONG A, et al. Ambient temperature enhanced freezing tolerance of *Chrysanthemum dichrum CdiICE1* *Arabidopsis* via miR398 [J]. BMC Biology, 2013, 11(1): 121.
- [10] 向殿军, 殷奎德, 满丽莉, 等. 萝卜低温胁迫转录因子的克隆及遗传转化[J]. 西北植物学报, 2011, 31(10): 1933-1941.
- [11] FENG X M, ZHAO Q, ZHAO L L, et al. The cold-induced basic helix-loop-helix transcription factor gene *MdC1bHLH1* encodes an ICE-like protein in apple [J]. BMC Plant Biology, 2012, 12(1): 22.

- [12] 黄莹, 徐志胜, 王枫, 等. 胡萝卜低温胁迫转录因子 *DcICE1* 基因克隆与非生物逆境响应分析[J]. 西北植物学报, 2015, 35(1): 30-36.
- [13] 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.
- [14] 李海燕. 芹菜品种——津南实芹[J]. 天津农林科技, 2004(4): 21.
- [15] 却枫, 黄莹, 王枫, 等. 胡萝卜中 *DcDofD1* 转录因子的克隆及其对非生物逆境胁迫的响应分析[J]. 植物遗传资源学报, 2015, 16(5): 1073-1079.
- [16] FENG K, HOU X L, LI M Y, et al. CeleryDB: a genomic database for celery [J]. Database: The Journal of Biological Databases and Curation, 2018; bay070.
- [17] GASTEIGER E, GATTIKER A, HOOGLAND C, et al. ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis [J]. Nucleic Acids Research, 2003, 31(13): 3784-3788.
- [18] TAMURA K, PETERSON D, PETERSON N, et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods [J]. Molecular Biology and Evolution, 2011, 28(10): 2731-2739.
- [19] 谭国飞, 王枫, 王广龙, 等. 鸭儿芹肉桂酸 4-羟化酶基因的克隆与不同温度下的表达分析[J]. 西北植物学报, 2014, 34(7): 1298-1304.
- [20] 李合生. 现代植物生理学[M]. 2版. 北京: 高等教育出版社, 2006: 342.
- [21] SAKUMA Y, LIU Q, DUBOUZET J G, et al. DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of *Arabidopsis* DREBs, transcription factors involved in dehydration- and cold-inducible gene expression [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2002, 290(3): 998-1009.
- [22] 邵天恒, 孙曙光, 许海峰, 等. 芹菜中转录因子基因 *AgDREB1* 的分离与表达研究[J]. 南京农业大学学报, 2014, 37(6): 19-27.
- [23] 李瑞梅, 惠杜娟, 刘姣, 等. 植物抗寒转录因子 CBF 和 ICE 研究进展[J]. 广东农业科学, 2012, 39(23): 132-135, 138.
- [24] 甄伟, 陈溪, 孙思洋, 等. 冷诱导基因的转录因子 CBF1 转化油菜和烟草及抗寒性鉴定[J]. 自然科学进展, 2000, 10(12): 1104-1108.
- [25] 王建华, 刘鸿先, 徐同. 超氧化物歧化酶(SOD)在植物逆境和衰老生理中的作用[J]. 植物生理学通讯, 1989(1): 1-7.
- [26] MITTLER R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance [J]. Trends in Plant Science, 2002, 7(9): 405-410.
- [27] CHAPARZADEH N, D'AMICO M L, KHAVARI-NEJAD R-A, et al. Antioxidative responses of *Calendula officinalis* under salinity conditions[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2004, 42(9): 695-701.
- [28] 邵常荣, 张旸, 解莉楠, 等. 植物对非生物逆境响应的转录调控和代谢谱分析的研究进展[J]. 植物生理学报, 2011, 47(5): 443-451.

(责任编辑: 张明霞)

《植物资源与环境学报》2018 年审稿专家名单

《植物资源与环境学报》2018 年审稿专家名单如下(按姓氏的汉语拼音排序):

陈国元 陈儒钢 陈卫民 陈学林 丁炳扬 方炎明 房伟民 冯建孟 冯守千 高彩球 高南 郭海林
 郝成元 郝德君 何森 胡春梅 华建峰 贾晓东 金孝锋 李键 李建宏 李晓军 李亚 李媛媛
 李月丛 梁呈元 刘金福 刘启新 刘旭 卢传礼 陆长梅 陆婷 马风云 马英姿 马永鹏 缪绅裕
 聂永心 彭东辉 彭福田 彭明春 蒲高忠 仇硕 权秋梅 任强 阮成江 单宇 邵剑文 盛婧
 宋春风 宋希强 苏仕林 孙菁 孙小芹 孙翊 田代科 田敏 田淑芬 王长庭 王凤兰 王广东
 王金彦 王康才 王奇志 王友保 卫海燕 温国胜 闻志彬 翁庆北 吴宝成 吴统贵 谢春平 许岳飞
 徐迎春 徐增莱 杨途熙 杨志玲 殷云龙 余坤勇 于水强 原海燕 张国防 张救 张钦弟 张志明
 张子山 赵宏波 郑健 朱颢东

本刊对各位审稿专家的支持表示诚挚的感谢!