

文章编号: 1674-7054(2017)02-0133-08

# 巴西橡胶树 *HbICE2* 基因的克隆及表达分析

全彩虹<sup>1</sup> 李言<sup>2</sup> 田维敏<sup>2</sup>

(1. 海南大学 热带农林学院, 海口 570228; 2. 中国热带农业科学院 橡胶研究所/农业部橡胶树生物学与遗传资源利用重点实验室/海南省热带作物栽培生理学重点实验室 海南 儋州 571737)

**摘要:** ICE(inducer of CBF expression)介导的非依赖ABA信号传导途径在植物应对低温胁迫反应中起重要的调节作用。采用RT-PCR技术从橡胶树无性系热研8-79的叶片中扩增到1条全长cDNA,共1 677 bp,包括1 593 bp的开放阅读框,编码530个氨基酸,含有bHLH结构域,其中包含19个特征性的保守KMDRASILGDAI(D/E)YLKELL氨基酸序列,命名为*HbICE2*(GeneBank登陆号: KY406163)。该基因编码的蛋白分子质量为58.02 kDa,理论等电点为5.95。荧光定量PCR分析结果表明,*HbICE2*主要在叶片和树皮中表达,而且在原生皮中的表达量显著高于再生皮。在抗寒性较强的橡胶树无性系PR107的树皮中表达量显著高于抗寒性弱的橡胶树无性系热研8-79。*HbICE2*可能在橡胶树树皮应对低温胁迫的反应中起重要的调节作用。

**关键词:** 巴西橡胶树; *HbICE2*; 树皮; 抗寒性; 荧光定量PCR

中图分类号: S 794.1 文献标志码: A DOI: 10.15886/j.cnki.rdsxb.2017.02.001

ICE(inducer of CBF expression)是诱导CBF表达的MYC(Myelocytomatosis)类转录因子,可以特异性地结合到CBF启动子的MYC识别序列,激活CBF的转录,从而调节植物对低温应答。ICE蛋白含螺旋-环-螺旋(bHLH)结构域(含有19个保守的KMDRASILGDAI(D/E)YLKELL氨基酸),还存在富S区、NLS区和转膜区<sup>[1]</sup>。ICE可以应答多种植物激素,在植物环境胁迫反应中起着重要的转录调控作用<sup>[2-5]</sup>。研究表明,ICEs介导的JAZ-ICE-CBF/DREB1信号途径在温带植物抗寒性调节中有重要作用<sup>[6-7]</sup>。在拟南芥中,AtICE1和AtICE2蛋白是植物低温胁迫反应的正调控因子<sup>[8-10]</sup>。在常温条件下,AtICE1蛋白处于无活性状态,低温下被活化,特异性结合到CBF启动子的顺式作用元件(CANNTG)上,以主效开关的作用控制着CBF信号转导途径各组分的表达水平<sup>[11]</sup>。AtICE1蛋白能够结合到CBF3的启动子区,调节CBF3的表达。ice1的功能缺失突变体表现冷敏感和抗寒能力下降的表型。低温时,突变体中的CBF3基因的表达量明显低于野生型,而过表达AtICE1基因能够增强植物抗冻性<sup>[8]</sup>。AtICE2是AtICE1的同源基因,通过调节CBF1/CBF3的表达正调控植物对低温的响应<sup>[12-13]</sup>。此外,在西红柿<sup>[14]</sup>、黄瓜<sup>[15]</sup>、烟草<sup>[16]</sup>和麻风树<sup>[17]</sup>中也分离鉴定了ICE家族的一些成员。这些基因能够响应低温诱导,与植物的抗寒性有关。

在我国,橡胶树(*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.)种植区因位于热带北缘,经常性遭遇寒流侵袭,橡胶树容易受到寒害,导致枯枝、树干割面树皮坏死,甚至整株死亡,影响橡胶树的高产和稳产。目前,主要依靠抗寒梯度前哨圃评价橡胶树种质的抗寒性,筛选到一些抗寒性有明显差异的种质。一些无性系的抗寒性已在多年的生产性胶园得到验证<sup>[18-19]</sup>。这些种质材料为研究橡胶树的抗寒机制打下了良好基础。最近,Deng等从橡胶树中克隆和鉴定了ICE家族的1个成员*HbICE1*<sup>[20]</sup>,在低温胁迫下,该基因在抗寒性强的橡胶树无性系93-114叶片中的表达量显著高于不抗寒无性系热垦501,而且该基因可增强酵母的

收稿日期: 2017-01-20

修回日期: 2017-03-12

基金项目: 国家天然橡胶产业技术体系分子育种岗位科学家项目(CARS-34); 中国热带农业科学院橡胶研究所基本科研业务费项目(1630022014002)

作者简介: 全彩虹(1992-),女,海南大学热带农林学院2014级硕士研究生, E-mail: iris199210@163.com

通信作者: 田维敏(1965-),男,研究员,研究方向: 植物学, E-mail: wmtian@163.com

抗低温胁迫能力<sup>[20]</sup>。此外,橡胶树的 *HbCBF1* 可增强拟南芥的抗寒性<sup>[21]</sup>。笔者从橡胶树叶片中分离鉴定了 ICE 家族的一个成员 *HbICE2*,通过荧光定量 PCR 技术,分析了该基因在抗寒性强的橡胶树无性系 PR107 和抗寒性弱的橡胶树无性系热研 8-79 的原生皮和再生皮中的表达模式,旨在为解析该信号传导途径提供理论依据。

## 1 材料与方法

**1.1 材料及处理** 供试的巴西橡胶树无性系热研 8-79 和 PR107 2010 年种植于中国热带农业科学院实验农场,实验树已开割 1 年。RNAprep Pure 多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒, DNase I 购自天根公司;反转录试剂盒 RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit 购自 Ferments 公司; DNA 凝胶回收试剂盒购自 OMEGA 公司; Pyrobest™ DNA Polymerase、实时荧光定量 PCR 试剂 SYBR Premix Ex Taq II (TliRNaseH Plus) 购自大连宝生物公司; pEASY-Blunt Simple Cloning Kit 购自北京全式金公司;其他生化试剂均为进口或国产分析纯试剂;引物合成和 DNA 测序由 Invitrogen 公司完成。

选取长势大致相同的橡胶树无性系热研 8-79 和 PR107 各 10 株,分别取距地面 1 m 处的再生皮和距地面 2 m 处的原生皮,每块皮又分为内层皮(主要包括水囊皮和形成层)和外层皮(主要包括粗皮、砂皮和黄皮)2 个部分。内层皮是有功能韧皮部,外层皮是无功能韧皮部。把 10 株树的对应树皮样品混合研磨,共 4 个混合样,用于提取 RNA 和分析基因表达模式。细根、树皮、胶乳、稳定期叶片的 RNA 用于 *HbICE2* 的组织特异性相对表达分析。

**1.2 总 RNA 的提取与 cDNA 的合成** 橡胶树不同组织 RNA 的提取参照 RNAprep Pure 多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒的操作说明进行。用 DNase I 柱上消化 RNA 样品中残留的微量 DNA, cDNA 第 1 链的合成根据 Ferments 公司试剂盒的操作步骤进行。

**1.3 *HbICE2* 的全长 cDNA 扩增** 搜索本实验室的转录组数据库,获得 1 个注释为 ICE 的 Unigene,借助橡胶树基因组数据库搜索到 ICE 基因序列,在 NCBI 数据库中搜索比对,确定是 1 条完整的基因序列。在基因两端分别设计引物,引物序列为: ICE2-F: 5'-TTCTCTTTATCTCACCCTTTTCTCA 3'; ICE2-R: 5'-AGT-TCCAAGTTCTGCAA GACCG 3'。利用 RT-PCR 技术,在橡胶树树叶中进行基因全长 cDNA 扩增。cDNA 模板制备: 1 μg 叶片 RNA, 20 μL 反应体系, 逆转录合成 cDNA 第 1 链, 稀释 5 倍后用作 PCR 扩增。全长 cDNA 扩增体系: Pyrobest DNA Polymerase (5 U · μL<sup>-1</sup>) 0.25 μL, 10 × Pyrobest Buffer II 5 μL, dNTP Mixture (2.5 mmol · L<sup>-1</sup>) 4 μL, ICE2-F (10 μmol · L<sup>-1</sup>) 2.5 μL, ICE2-R (10 μmol · L<sup>-1</sup>) 2.5 μL, cDNA 模版 1 μL, 灭菌水补足 50 μL。扩增程序: 95 °C 预变性 3 min; 95 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 2 min, 共 32 个循环; 72 °C 延伸 10 min。0.2% 的琼脂糖凝胶电泳分离 PCR 扩增产物,回收纯化目的条带,克隆到 pEASY-Blunt Simple Cloning Vector 载体上,送 Invitrogen 公司进行测序。利用 BLAST 检索 GenBank 数据库进行同源性分析。

**1.4 生物信息学分析** 利用 DNAMAN 软件对 *HbICE2* 全长 cDNA 序列进行比对分析,利用 NCBI 网站 ORF Finder 软件进行开放阅读框(ORF)预测,同时翻译成蛋白序列。从 NCBI 数据库下载不同植物的 ICE 蛋白序列,利用 MEGA 5.1 软件,选择 neighbour-joining(NJ)模型,并进行 1 000 次 bootstrap 统计学检验,构建包括 *HbICE2* 蛋白序列在内的植物 ICE 蛋白的系统进化树。采用 ScanProsite 软件分析该蛋白的相对分子质量与等电点; SOPMA SECONDARY STRUCTURE PREDICTION METHOD 在线软件预测蛋白的 2 级结构; KinasePhos 2.0 在线软件分析该蛋白的磷酸化位点。PSORT 在线软件对该蛋白进行亚细胞定位预测; NLStradamus 在线软件分析该蛋白序列的核定位信号;采用 MEME 软件分析该蛋白序列的 motifs;依据橡胶树基因组数据和 *HbICE2* 基因的阅读框序列,采用 GSDS 软件分析该基因的内含子。

**1.5 荧光实时定量 PCR 分析** 采用 Bio-Rad 公司的 CFX 实时荧光定量 PCR 系统,实验操作按仪器使用说明进行。取 1 μg RNA 样品,逆转录合成 cDNA 第 1 链,稀释 10 倍后作为实时定量 PCR 分析模板。20 μL 反应体系中,包含 2 μL 模板, 10 μL 2 × SYBR Premix 和 10 μmol · L<sup>-1</sup> 的每条引物 0.6 μL(引物终浓度为 0.3 μmol · L<sup>-1</sup>)。引物序列为: qPCR-ICE2-F: 5'-CGATCTTCCCTTTCCAACCTACCT 3'; qPCR-ICE2-R: 5'-CAAAAATAGCGTATTCCTGAGC 3'。PCR 反应程序: 95 °C 变性 30 s; 95 °C 10 s, 60 °C 20 s, 72 °C 20 s, 共 40 个循环。40 个循环后进行溶解曲线分析。利用 CFX manager 3.0 软件自动进行基线和 Cq 值分

析,以 HbActin7a 作为内参基因,算法为  $2^{-\Delta\Delta C_q}$  法。

1.6 数据处理 采用 T-test 方法对处理与对照的基因表达水平进行差异显著性分析( $P < 0.05$  为显著性差异; $P < 0.01$  为极显著差异)。

## 2 结果与分析

2.1 *HbICE2* 全长 cDNA 克隆 通过 RT-PCR 方法及测序从巴西橡胶树叶中分离得到 *HbICE2* 全长 cDNA 1 677 bp,其中,包括 1 593 bp 的开放阅读框,68 bp 的 5'非翻译区,16 bp 的 3'非翻译区,该基因编码 530 个氨基酸(图 1)

```

1      tttctcaacaattttgcttcttcctcactttccagagaaatataacagaaatcagaacgaaa
69    ATGCTATCTGGAATAATGGCACTGTCTGGATGGAGATAAAGAACGACGAGACTCCAAAC
1      M L S G L N G T V W M E D K E A R D S N
129    ACAACAACAACATTAACAATAGCTGTGTGTGATGGAGCAAGCAAGAGATGGGTTTCG
21     T N N N I N N S C V V M E S K Q E M G S
189    ATTTCTAACTTCAAATCCATGCTCGATGTAGAAGACGACTGGTACGTCACTAATACTACT
41     I S N F K S M L D V E D D W Y V T N T T
249    ATCCATAATCATCATGATACTATCAGAGACATCAATTTTACCAAATCTTGTCTAGGCCA
61     I H N H H D T I R D I T F S P N L A E P
309    GATAATCTCTTTCTTCACTCTGTGGATTCTCTCTCTTGTCTACCAACCTCTCTGTGT
81     D N L F L H S V D S S S S C S P T S S V
369    TTCAATAATCTAGACCCCTTCTACGTCGACTACTTTATGCACTCGAAGCCTACCTTATCT
101    F N N L D P S H V H Y F M H S K P T L S
429    TCGCTCCTTAACGTTGTCTCTAACCAACCTTTAGAGCATGGCTTTGATTGGGCGGAAATT
121    S L L N V V S N N P L E H G F D L G E I
489    GGGTTCCTTGAGAACGAGGCACTGCTCTACAAACAACAACGAGCTCGCCTTTTGCTA
141    G F L E N Q A T A P T T T T T N A S P L L
549    AACAGGGGAGCTGGGGTCTTAGGCACTACATTGATTTTAGCTCGAATAATCAAATTAGC
161    N R G A G V L G S Y I D F S S N N Q I S
609    ACTTCTAATTATGCTCCGATCTTCCCTTTCCAACTACCTGTCATGCTCAATGCGCGAA
181    T S N L C S D L P F F P T T C M L Q L P E
669    AATGGTCCAGGGTTAAACAGGATTAGGGGTTCTGATGAGAGCTCAGGGAATAACGCTATT
201    N G P G L T G F R G S D E S S G N T L F
729    TTGAATAGGTCCAAAGTTGTGAGGCTCTTGAAACCTTTCTCTCAATGGGTGACAGGCT
221    L N R S K L L R P L E T F P S M G A Q P
789    ACTTTGTTTCAAAAGAGAGCAGCTTTGAGGAAGATTGGGGGATTGAGTGGGATTGAG
241    T L F Q K R A A L R K N L G D L S G I E
849    ATTGATAAAGGAAAGAGAGAAATTGATCTAGTTGGGCAAGAGAAAGAAAGAGAGAAA
261    I D K G K R E L T Q L G K E N E K R K
909    ATGGGTAAACGTGGATGACATTGTGGAGGATGTAAGCATGATGGGTGGGGTTAAATTAT
281    M G N V D D I V E D V S I D G S G L N Y
969    GATTCTGATGATTAACGGGAGAAATACTAAATGGAGGAGATTGGTAAATGGAGGGAAT
301    D S D E L T E N T K M E E I G K N G G N
1029   AGCTCAAATGCAAAATAGCAAGTGTCACTGGCGGTGGTGTGGGGTCAAGAGGAAAGAAAG
321    S S N A N S S V T G G G V G G Q K G K K
1089   AAGGGGCTTCTGCTAAGAATTGATGGCAGAAAGGAGGCGCGGAGAAAGAGCTCAATGAT
341    K G L P A K N L M A E R R R R K K L N D
1149   GGCTATACATGCTAAGGTCTGTAGTTCCAAAGATAAGCAAGATGGATAGGGCATCAATC
361    R L Y M L R S V V P K I S K M D R A S I
1209   CTGGGGATGCAATTGAGTACITGAAGGAACITCTGCAAGGATCAACGACCTCCATAAT
381    L G D A I E Y L K E L L Q R I N D L H N
1269   GAATTGGAGTCAACTCTCCAGGCTCTTCTTGACTCTCAAGTTTTCACCCCTTTGACA
401    E L E S T P P G S S L T P T S F H P L T
1329   CCCACTCCATCAACCCCTGTCCAGTGTATCAAGGATAAACTCTGCCCCAGCCCATGCCA
421    P T P S T L S S R I K D K L C P S P L P
1389   AGTCCAAATGGTCAACCAAGGAGGTTGAAAGTAAGAGTGAGAGAAGGAAGAGCTGTAAAC
441    S P N G Q P A R V E V R V R E G R A V N
1449   TTCACATGTTTTGTGGCCGAGACCTGGTCTCTCTGCTCCACCATGAGGGCCTTTGGAT
461    I H M F C G R R P G L L L S T M R A L D
1509   AACCTTGGCATAATATCGAGCAAGCTGTCTCATGTTTCAATGGTTTTGCCATGGAT
481    N L G I D I E Q A V I S C F N G F A M D
1569   ATCTTCAAGCTGAGCAAAAGGGCAGGACGTGCATCTGAGCAATTAGAGCAGTACTC
501    I F Q A E Q K G Q D V H P E Q I R A V L
1629   CTGGATTCAGCAGGCTTCCATGGAATGATATAGcggtcttgcagaactt
521    L D S A G F H G M I *

```

图1 橡胶树 *HbICE2* 核苷酸序列及推导的氨基酸序列

Fig. 1 Nucleotide and deduced amino acid sequences of *HbICE2*

2.2 *HbICE2* 生物信息学分析 生物信息学分析结果表明,*HbICE2* 的相对分子质量为 58.02 KDa,理论等电点为 5.95。在该蛋白的 2 级结构中,由 29.43% 的氨基酸残基构成  $\alpha$ -螺旋、19.06% 的氨基酸残基构成延伸链、11.7% 的氨基酸残基构成  $\beta$ -转角和 39.81% 的氨基酸残基构成随机卷曲。 $\alpha$ -螺旋和无规则卷曲是其主要的结构元件,在 bHLH 结构域中最集中,而  $\beta$ -转角和延伸链则散布于整个蛋白质中。疏水性/亲水性分析结果显示,多肽链第 276 位的 Glu 具有最低的分值(-3.444),亲水性最强;第 122 位的 Leu 具有最高的分值(1.556),疏水性最强。但从整体来看,亲水性氨基酸均匀分布在整条肽链中,且存在多个明显的亲水区域。因此,该蛋白整条多肽链表现为亲水性。该蛋白定位于细胞核的概率为 98%,定位于

细胞微体的概率为 30% 定位于线粒体的概率为 10% 因此,该蛋白最有可能定位在细胞核内。磷酸化位点预测结果显示,该蛋白共有 93 个磷酸化位点,其中,丝氨酸位点 55 个、苏氨酸位点 32 个、酪氨酸位点 6 个。

**2.2 核苷酸序列和氨基酸序列分析及进化树构建** *HbICE2* 与麻风树 (*Jatropha curcas*) JcICE1 (NP\_001306859)、蓖麻 (*Ricinus communis*) RcICE1 (XP\_002511101)、毛果杨 (*Populus trichocarpa*) PtICE1 (XP\_002318166)、甜杨 (*Populus suaveolens*) PsICE2 (ADK91821)、水稻 (*Oryza sativa*) OsMYC2 (XP\_015614012) 的氨基酸序列同源性分别为 83.98% 82.15% 76.73% 76.36% 和 13.49%。它们均具有保守螺旋-环-螺旋 (bHLH) 结构域,此结构域含有 19 个保守的 KMDRASILGDAI (D/E) YLKELL 氨基酸 (图 2)。根据 *HbICE2* 序列推导的氨基酸序列与其他植物同源基因的氨基酸序列构建系统进化树,聚类结果显示,橡胶树 *HbICE2* 与麻风树 (*Jatropha curcas*) JcICE1 (NP\_001306859) 的亲缘关系最近 (图 3A)。*HbICE2* 蛋白质序列的 motifs 的分析结果显示: motif 5 对应该蛋白 N 端酸性结构域, motif 9 对应该蛋白的富 S 区, motif 1 和 motif 7 对应该蛋白的 bHLH 结构域,并且 motif 7 中还含有核定位信号 KKKKKGLPAKNLMAERRRRKK, motif 1 中还含有 ZIP 结构 (图 3B 和 2)。基因序列的分析结果显示,该基因不含内含子 (图 3C)。

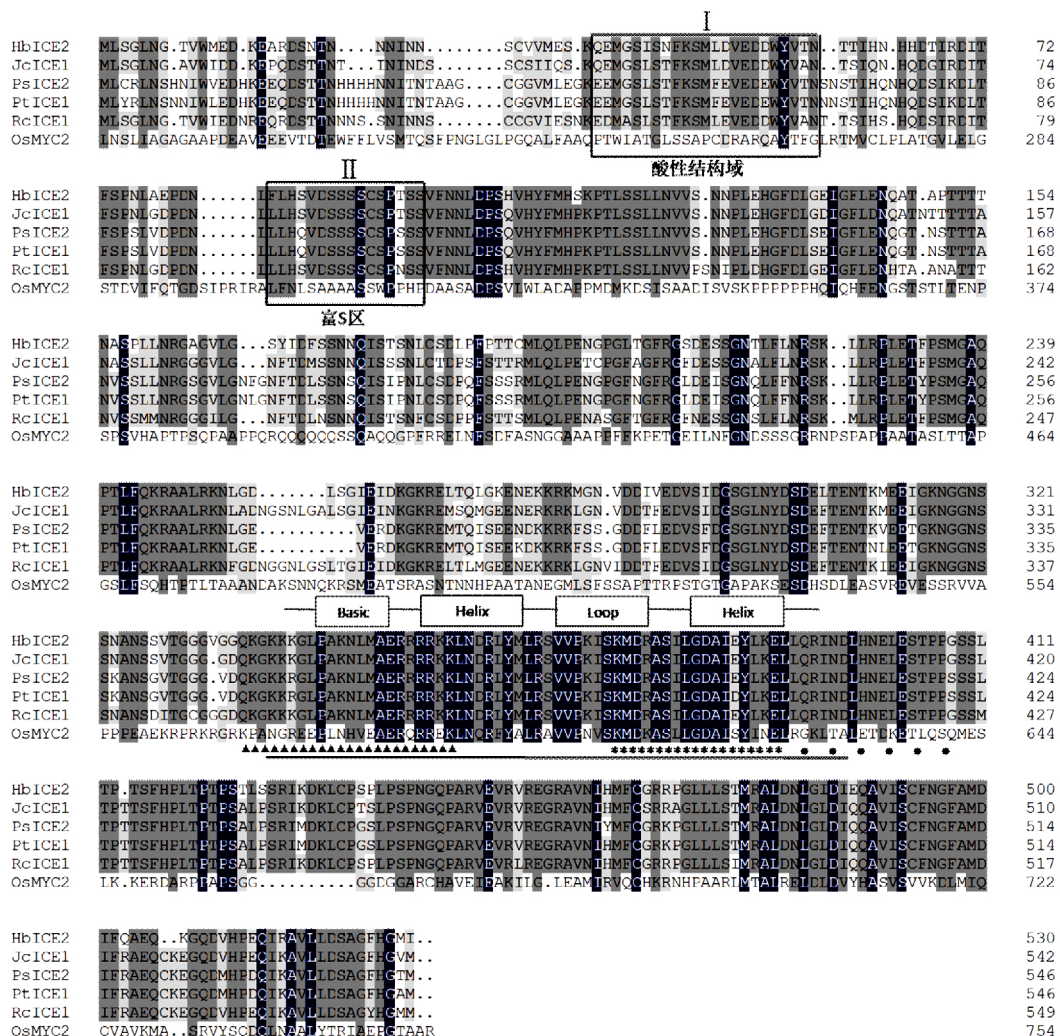
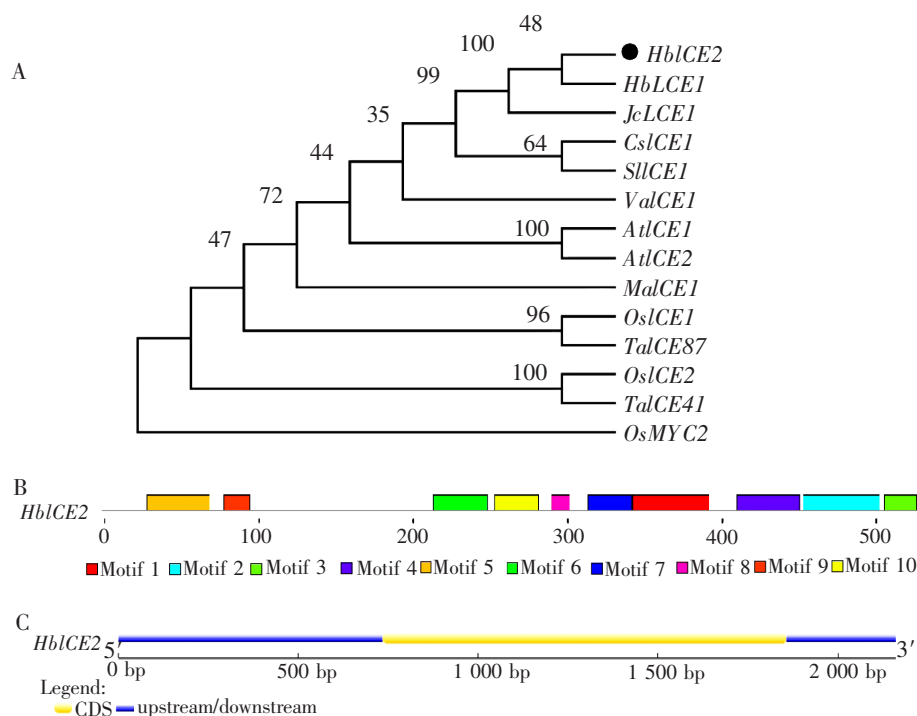


图 2 *HbICE2* 推导氨基酸序列和其他植物 ICEs 氨基酸序列的比对

黑框 I 表示推测的酸性结构域,黑框 II 表示富 S 区,黑色下划线表示 bHLH 结构域,▲显示 NLS 区,\* 显示氨基酸序列 KMDRASILGDAI (D/E) YLKELL 保守区,●显示 ZIP 结构域。RcICE1 (XP\_002511101); JcICE1 (NP\_001306859); PtICE1 (XP\_002318166); PsICE2 (ADK91821); OsMYC2 (XP\_015614012)

Fig. 2 Blast analysis of the deduced amino acid sequences of *HbICE2* against the ICEs from other plants

Box I indicates putative acidic domain; Box II the serine-rich region; the underlined bHLH domain; ▲ the nuclear localization sequence (NLS); \* the specific highly conserved amino acid motif (KMDRASILGDAI (D/E) YLKELL); ● the zipper region

图 3 *HbICE2* 的生物信息学分析图 3 *HbICE2* 的生物信息学分析

A: *HbICE2* 与其他植物 ICE 蛋白的进化树分析。HbICE1 ( KY406162 ); JcICE1 ( NP\_001306859 ); CsICE1 ( ACT90640 ); SlICE2 ( AGG38826 ); ValICE1 ( AGP04217 ); AtICE1 ( AT3G26744 ); AtICE2 ( AT1G12860 ); MalICE1 ( AKH87500 ); OsICE1 ( BAT14228 ); OsICE2 ( BAG95628 ); TalICE41 ( ACB69501 ); TalICE87 ( ACB69502 ); OsMYC ( XP\_015614012 ); B: *HbICE2* 蛋白序列 motifs 的分析; C: *HbICE2* 基因序列的结构特征分析

Fig. 3 Bioinformatic analysis of *HbICE2*

A: Phylogenetic relationship between *HbICE2* and other plant ICEs; B: Motif analysis of *HbICE2* protein; C: Structural features of the *HbICE2* gene

**2.3 *HbICE2* 组织特异性表达** *HbICE2* 基因的组织特异性表达分析结果显示, *HbICE2* 在橡胶树的细根、叶片、树皮和胶乳中均有表达, 其中胶乳中的表达量极低, 细根中次之, 叶片和树皮中的表达量最高( 图 4 )。

**2.4 在不同橡胶树无性系间的差异表达** 橡胶树无性系热研 8-79 的抗寒性弱于 PR107, 而且剖面( 再生皮) 比原生皮更容易受到寒害( 图 5A)。

为此, 笔者分析了 *HbICE2* 在这两个无性系剖面的再生皮和剖面上方的原生皮中的表达模式。结果表明, *HbICE2* 在热研 8-79 原生皮的内层树皮和外层树皮中的表达量都显著高于再生皮, 而且在原生皮和再生皮的内层树皮中的表达量都显著低于外层树皮( 图 5B)。*HbICE2* 在 PR107 中的表达模式与热研 8-79 有差别。虽然在原生皮的外层树皮中的表达量最高, 但是在内层树皮中的表达量显著低于再生皮的内层树皮, 且在再生皮的内层和外层树皮中的表达量没有显著差异( 图 5B)。在 2 个无性系间, *HbICE2* 无论在 PR107 原生皮, 还是再生皮的内层和外层树皮中的表达量都显著高于热研 8-79( 图 5B)。这种差异表达可能与再生皮和原生皮的抗寒性差异有关。

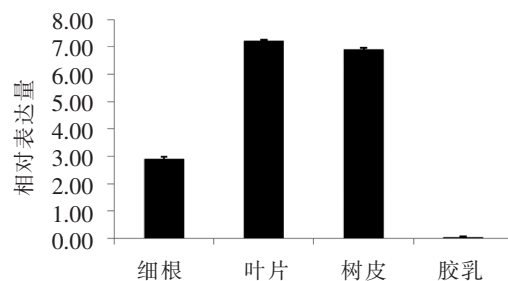


图 4 *HbICE2* 基因的组织特异性表达分析  
Fig.4 Expression of *HbICE2* in different tissues from *Hevea brasiliensis*

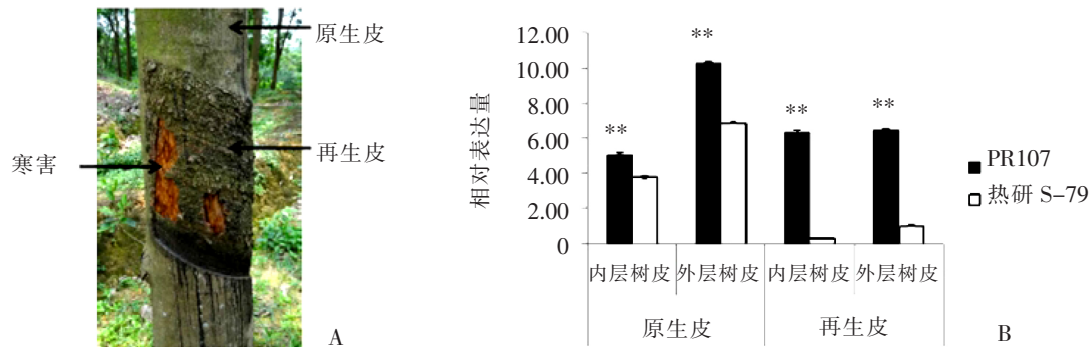


图5 *HbICE2* 基因在橡胶树无性系 PR107 和热研 8-79 树皮中的差异表达分析

A: 橡胶树无性系热研 8-79 剖面寒害照片; B: *HbICE2* 表达分析

Fig.5 Differential expression of *HbICE2* in the bark tissues of rubber tree clones PR107 and Reyan8-79

A: Cold injury of the regenerated bark of rubber clone Reyan8-79; B: Analysis of *HbICE2* expression

### 3 讨论

我国的植胶区位于热带北缘, 寒流经常性侵袭生产性胶园, 因此, 低温胁迫是限制天然橡胶生产的主要逆境因子。ICEs 介导的 ICE-CBF/DREB1-COR 信号途径在温带植物抗寒性调节中有重要作用<sup>[6-7, 22]</sup>, 在拟南芥中, AtICE1 和 AtICE2 蛋白是低温胁迫下的正调控因子<sup>[8-10]</sup>。目前, 已从橡胶树中分离鉴定了一些响应低温胁迫的基因, 如 *HbICE1*<sup>[20]</sup>, *HbCBF1*<sup>[21]</sup>, *HbMT2a*<sup>[23]</sup>, *HbMAPK*<sup>[24]</sup> 等。ICE-CBF/DREB 信号途径可能在橡胶树低温胁迫反应中起重要的调节作用。橡胶树 *HbICE1* 响应低温胁迫, 在抗寒性不同的品系中的表达量差异显著, 而且该基因可增强酵母的抗低温胁迫能力<sup>[20]</sup>。橡胶树 *HbCBF1* 可增强拟南芥的抗寒性<sup>[21]</sup>。橡胶树 *HbICE2* 和 *HbICE1* 与麻风树 (*Jatropha curcas* L.) *JcICE1* 的亲缘关系比较近, 蛋白相似性分别为 86.3% 和 83.98%。比较转录组分析结果表明, 麻风树的 ICE-CBF/DREB 信号途径参与低温胁迫反应<sup>[17]</sup>。推测橡胶树 *HbICE2* 可能与 *HbICE1* 和 *JcICE1* 有相似的功能。橡胶树无性系热研 8-79 的再生皮在低温胁迫下易受寒害, 其抗寒性弱于 PR107<sup>[25]</sup>。本研究结果表明, *HbICE2* 在橡胶树无性系热研 8-79 原生皮中的表达量显著高于再生皮, 而且在 PR107 中的表达量显著高于热研 8-79。这种差异表达说明, *HbICE2* 基因可能在橡胶树皮应对低温胁迫的反应中起重要的调节作用。*HbICE2* 蛋白有 93 个潜在的磷酸化位点, 磷酸化修饰对 *HbICE2* 蛋白的稳定性和活性可能起着重要的调节作用。在拟南芥中, E3 泛素连接酶 HOS1 (high osmotic expression) 通过泛素化 ICE1, 参与 ICE1 的降解<sup>[26-27]</sup>, 而 E3 SUMO 连接酶 SIZ1 (SAP and Miz1) 能将 ICE1 蛋白 SUMO 化, 抑制 HOS1 对 ICE1 泛素化, 从而稳定 ICE1 蛋白, 提高植物的抗寒性<sup>[28-29]</sup>。蛋白质的 SUMO 化通常与蛋白质的磷酸化有关, 磷酸化的蛋白更容易 SUMO 化<sup>[30]</sup>。OST1 能够磷酸化 ICE1 第 278 位的 Ser, 进而抑制 HOS1 对 ICE1 的泛素化修饰, 增强 ICE1 蛋白的稳定性和转录活性, 与提高植物的抗寒性有关<sup>[31]</sup>。橡胶树 *HbMAPK1* 编码丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶。低温条件下, 该基因在抗寒性强的橡胶树无性系 93-114 中上调表达, 而在抗寒弱的橡胶树无性系热研 501 中下调表达<sup>[24]</sup>。因此, *HbMAPK1* 可能通过磷酸化 *HbICE* 这类蛋白质, 增强橡胶树的抗寒性。

### 参考文献:

- [1] Nakamura J, Yuasa T, Huong T T, et al. Rice homologs of inducer of CBF expression (*OsICE*) are involved in cold acclimation [J]. *Plant Biotechnology*, 2011, 28(3): 303-309.
- [2] Viswanathan C, Jianhua Z, Jiankang Z. Cold stress regulation of gene expression in plant [J]. *Trends in Plant Science*, 2007, 12(10): 444-451.
- [3] González-Aguilar G A, Fortiz J, Cruz R, et al. Methyl jasmonate reduces chilling injury and maintains postharvest quality of mango fruit [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2000, 48(2): 515-519.
- [4] Niu Y, Figueroa P, Browse J. Characterization of JAZ interacting bHLH transcription factors that regulate jasmonate responses

- in *Arabidopsis* [J]. Journal Experimental Botany ,2011 ,62( 6) : 2143 – 2154.
- [5] Miura K , Furumoto T. Cold signaling and cold response in plants [J]. International Journal of Molecular Sciences ,2013 ,14 ( 3) : 5312 – 5337.
- [6] Hu Y , Jiang L , Wang F , et al. Jasmonate regulates the inducer of cbf expression-c-repeat binding factor/dre binding factor1 cascade and freezing tolerance in *Arabidopsis* [J]. Plant Cell ,2013 ,25( 8) : 2907 – 2924.
- [7] Shi Y T , Ding Y L , Yang S H. Cold Signal Transduction and its Interplay with phytohormones during cold acclimation [J]. Plant and Cell Physiology ,2014 ,56( 1) : 7 – 15.
- [8] 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.
- [9] Doherty C J , Van Buskirk H A , Myers S J , et al. Roles for *Arabidopsis* CAMTA transcription factors in cold regulated gene expression and freezing tolerance [J]. Plant Cell ,2009 ,21( 3) : 972 – 984.
- [10] Fursova O V , Pogorelko G V , Tarasov V A. Identification of ICE2 , a gene involved in cold acclimation which determines freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana* [J]. Gene ,2009 ,429( 1/2) : 98 – 103.
- [11] Daniel G Z , Jonathan T V , Daniel C. 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.
- [12] 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 Molecular Biology ,2015 ,89( 1/2) : 187 – 201.
- [13] Lee H G , Seo P J. The MYB96-HHP module integrates cold and abscisic acid signaling to activate the CBF-COR pathway in *Arabidopsis* [J]. Plant Journal ,2015 ,82( 6) : 962 – 77.
- [14] Yu X H , Juan J X , Gao Z L , et al. Cloning , transformation of inducer of cbf expression1 ( *ICE1* ) in tomato [J]. Genetics Molecular Research ,2015 ,14( 4) : 13131 – 13143.
- [15] Liu L Y , Duan L S , Zhang J C , et al. Cucumber ( *Cucumis sativus* L. ) over-expressing cold-induced transcriptome regulator *ICE1* exhibits changed morphological characters and enhances chilling tolerance [J]. Scientia Horticulturae ,2010 ,124( 1) : 29 – 33.
- [16] Dong C L , Zhang Z , Ren J , et al. Stress-responsive gene *ICE1* from *Vitis amurensis* increases cold tolerance in tobacco [J]. Plant Physiology and Biochemistry ,2013 ,71( 2) : 212 – 217.
- [17] Wang H , Zou Z , Wang S , et al. Global analysis of transcriptome responses and gene expression profiles to cold stress of *Jatropha curcas* L [J]. PLoS One ,2013 ,8( 12) : e82817.
- [18] 王树明 , 李芹 , 钱云 , 等. 2009 年滇东南植胶区橡胶树寒害回访调查报告 [J]. 2010 ,33( 3) : 16 – 22.
- [19] 高新生 , 张晓飞 , 黄华孙 , 等. 橡胶树品系在广东抗寒前哨点寒害调查初报 [J]. 中国农学通报 ,2013 ,29( 25) : 1 – 5.
- [20] Deng X M , Wang J X , Li Y , et al. Characterization of a cold responsive *HbICE1* gene from rubber trees [J]. Trees ,2017 ,31( 1) : 137 – 147.
- [21] Cheng H , Cai H B , Fu H T , et al. Functional characterization of *Hevea brasiliensis* CRT/DRE binding factor 1 gene revealed regulation potential in the CBF pathway of tropical perennial tree [J]. PLoS One ,2015 ,10( 9) : e0137634.
- [22] Peng P H , Lin C H , Tsai H W , et al. Cold response in *Phalaenopsis aphrodite* and characterization of *PaCBF1* and *PaICE1* [J]. Plant and Cell Physiology ,2014 ,55( 9) : 1623 – 35.
- [23] Li Y , Chen Y Y , Yang S G , et al. Cloning and characterization of *HbMT2a* , a metallothionein gene from *Hevea brasiliensis* Muell. Arg differently responds to abiotic stress and heavy metals [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications ,2015 ,461( 1) : 95 – 101.
- [24] 吴绍华 , 王健霄 , 陈月异 , 等. 巴西橡胶树 *HbMAPK1* 基因的克隆及表达分析 [J]. 热带作物学报 ,2015 ,36( 9) : 1580 – 1586.
- [25] 叶德林 , 袁红章 , 李艳明 , 等. 橡胶树品种热研 8 – 79 区域性试种初报 [J]. 热带农业科学 ,2016 ,35( 7) : 1 – 4.
- [26] Jung J H , Park C M. HOS1-mediated activation of FLC via chromatin remodeling under cold stress [J]. Plant Signaling and Behavior ,2013 ,8( 12) : e27342.
- [27] Jung J H , Lee H J , Park M J , et al. Beyond ubiquitination: proteolytic and nonproteolytic roles of HOS1 [J]. Trends in Plant Science ,2014 ,19( 8) : 538 – 45.
- [28] Dong C H , Agarwal M , Zhang Y , et al. The 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 Science of the United States of America ,

- 2006 , 103( 21) : 8281 – 8286.
- [29] Miura K , Jin J B , Lee J , et al. SIZ1-mediated sumoylation of ICE1 controls CBF/DREB1A expression and freezing tolerance in *Arabidopsis* [J]. *Plant cell* , 2007 , 19( 4) : 1403 – 1414.
- [30] Mohideen F , Capili A D , Bilimoria P M , et al. A molecular basis for phosphorylation-dependent SUMO conjugation by the E2 UBC9 [J]. *Nature Structural and Molecular Biology* , 2009 , 16( 9) : 945 – 952.
- [31] Yanglin D , Hui L , Xiaoyan Z , et al. OST1 kinase modulates freezing tolerance by enhancing ICE1 stability in *Arabidopsis* [J]. *Developmental Cell* , 2015 , 32( 3) : 278 – 289.

## Molecular Cloning and Expression Analysis of *HbICE2* in Rubber Tree ( *Hevea brasiliensis* Muell. Arg. )

QUAN Caihong<sup>1</sup> , LI Yan<sup>2</sup> , TIAN Weimin<sup>2</sup>

( 1. Institute of Tropical Agriculture and Forestry , Hainan University , Haikou , Hainan 570228 , China; 2. Ministry of Agriculture Key Laboratory of Biology and Genetic Resources of Rubber Tree / Hainan Key Laboratory for Cultivation & Physiology of Tropical Crops , Rubber Research Institute , CATAS , Danzhou , Hainan 571737 , China)

**Abstract:** ICE ( inducer of CBF expression) -mediated ABA-independent signal transduction plays an important role in regulating the responses of plants to cold stress. A cDNA of *HbICE2* ( GeneBank Accession No. : KY406163) was cloned from the leaf samples of rubber tree clone Reyan 8-79 by using RT-PCR. The *HbICE2* was 1 677 base pairs ( bp) in length , containing a 1 593 bp open reading frame ( ORF) . The encoded protein , *HbICE2* , contained 530 amino acid residues with a predicted molecular mass of 58.02 KDa and a pI of 5.95. The *HbICE2* had a bHLH domain with a specific highly conserved amino acid motif ( KMDRASILGDAI( D/E) YLKELL) . Real-time quantitative PCR analysis showed that *HbICE2* was mainly expressed in the leaf and bark among the samples tested. Its expression level was significantly higher in the original bark than in the regenerated bark , and significantly higher in the bark of the highly cold tolerant rubber clone PR107 than in that of the less cold tolerant clone Reyan 8-79. This suggests that *HbICE2* may be crucial in regulating the cold tolerance of the bark of the rubber tree.

**Keywords:** *Hevea brasiliensis* Muell. Arg. ; *HbICE2*; bark; cold tolerance; real-time quantitative PCR