

低温胁迫后抗寒茶树品种‘紫阳圆叶’的 基因差异表达分析

程国山¹, 游新才², 武艳¹, 张今今^{1,①}

(1. 陕西师范大学生命科学学院, 陕西 西安 710062; 2. 陕西省紫阳县茶叶研究所, 陕西 紫阳 725300)

摘要: 采用 DDRT-PCR 技术, 对低温(4 °C)胁迫处理不同时间(0、8、12、24 和 48 h)后茶树[*Camellia sinensis* (Linn.) O. Ktze.]抗寒品种‘紫阳圆叶’(‘Ziyangyuanye’)叶片中差异表达的基因进行分离和测序, 并采用半定量 RT-PCR 对差异表达基因的表达特性进行了比较。结果表明: 有 12 个引物对扩增出有明显差异的 cDNA 片段, 其中 3 个片段是与抗寒性相关的差异片段, 分别被命名为 *Csgsf*、*Cscsf1* 和 *Cscsf2*, 碱基数分别为 217、316 和 232 bp。比对结果显示: *Csgsf* 与茶树品种‘安吉白茶’(‘Anjibaicha’)和‘龙井 43’(‘Longjing 43’)的谷氨酰胺合成酶基因的同源性分别为 96% 和 91%, 与菜豆(*Phaseolus vulgaris* Linn.)、蒺藜苜蓿(*Medicago truncatula* Gaertn.)、油棕(*Elaeis guineensis* Jacq.)、西洋参(*Panax quinquefolius* Linn.) 和 水稻(*Oryza sativa* Linn.) 等植物的谷氨酰胺合成酶的基因序列同源性均达到 90% 以上, 因此, *Csgsf* 应为茶树谷氨酰胺合成酶基因片段; *Cscsf2* 与干旱胁迫条件下茶树表达的 cDNA 的同源性为 100%, 为茶树应答干旱和低温胁迫的基因片段; *Cscsf1* 未检索出同源序列, 推测其为与冷胁迫相关的未知基因片段。半定量 RT-PCR 分析结果表明: *Csgsf* 和 *Cscsf1* 在低温胁迫的初始期即开始表达且表达量随低温胁迫时间延长逐渐下调; 而 *Cscsf2* 的表达量随低温胁迫时间延长逐渐上调并在胁迫 48 h 后达到最大, 3 个片段的表达特性均与差异扩增结果相符。

关键词: 茶树; 抗寒性; DDRT-PCR; 低温胁迫; 基因差异表达; 谷氨酰胺合成酶基因片段

中图分类号: Q786; S571.1 文献标志码: A 文章编号: 1674-7895(2013)04-0038-06

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7895.2013.04.05

Analysis on gene differential expression of cold-resistance cultivar ‘Ziyangyuanye’ of *Camellia sinensis* after low temperature stress CHENG Guoshan¹, YOU Xincan², WU Yan¹, ZHANG Jinjin^{1,①}

(1. College of Life Sciences, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China; 2. Tea Institute of Ziyang County in Shaanxi Province, Ziyang 725300, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2013, 22(4): 38-43

Abstract: Using DDRT-PCR technique, differential expression genes in leaf of cold-resistance cultivar ‘Ziyangyuanye’ of *Camellia sinensis* (Linn.) O. Ktze. under low temperature (4 °C) stress for different times (0, 8, 12, 24 and 48 h) were separated and sequenced. And their expression characteristics were compared by semi-quantitative RT-PCR. The results show that twelve primer pairs can amplify cDNA segments with obvious difference, in which, three segments are differential segments related to cold-resistance and are named *Csgsf*, *Cscsf1* and *Cscsf2* with base number of 217, 316 and 232 bp, respectively. The alignment results reveal that the homology of *Csgsf* with glutamine synthetase gene of *C. sinensis* cultivars ‘Anjibaicha’ and ‘Longjing 43’ is 96% and 91%, respectively, and the homology of *Csgsf* with gene sequence of glutamine synthetase of *Phaseolus vulgaris* Linn., *Medicago truncatula* Gaertn., *Elaeis guineensis* Jacq., *Panax quinquefolius* Linn. and *Oryza sativa* Linn. is more than 90%, therefore, *Csgsf* should be glutamine synthetase gene segment of *C. sinensis*. The homology of *Cscsf2* with cDNA of *C. sinensis* expressed under drought stress condition is 100%, so *Cscsf2* is an responded gene

收稿日期: 2013-05-08

基金项目: 中央高校基本科研业务费项目(GK201002026)

作者简介: 程国山(1985—), 男, 甘肃酒泉人, 硕士研究生, 主要从事植物分子遗传学方面的研究。

①通信作者 E-mail: zhangjinjin@snnu.edu.cn

segment of *C. sinensis* to drought and low temperature stresses. No homology sequence with *Cscaf1* is detected, and it is conjectured that *Cscaf1* is an unknown gene segment related to cold stress. The analysis result of semi-quantitative RT-PCR shows that *Csgsf* and *Cscaf1* begin to express at initial period of low temperature stress and their expression amount is down-regulated with prolonging of low temperature stress time, while expression amount of *Cscaf2* is up-regulated with prolonging of low temperature stress time and reaches to the highest after 48 h of low temperature stress. The expression characteristics of three segments are consistent with the result of their differential amplification.

Key words: *Camellia sinensis* (Linn.) O. Ktze.; cold-resistance; DDRT-PCR; low temperature stress; gene differential expression; glutamine synthetase gene segment

茶树 [*Camellia sinensis* (Linn.) O. Ktze.] 隶属于山茶科 (Theaceae) 山茶属 (*Camellia* Linn.), 为多年生喜温叶用经济植物, 原产于中国云南, 自然分布于中国西南和华南, 在东南亚北部也有分布。随着人类的引种栽培活动范围扩大, 茶树的种植区域也由南向北逐渐迁移。近年来由于全球气温变化不稳定, “倒春寒”和“霜冻”等低温寒害在中国茶区频繁发生, 严重影响茶叶的产量和品质, 低温已经成为制约茶叶产业发展的最主要的气象灾害^[1]。因此, 研究茶树的抗寒机制、筛选优良的茶树抗寒基因、提高茶树抵御低温灾害的能力, 已经成为茶叶科学领域重要的研究课题之一。

陕西省秦巴山区种茶产茶历史悠久, 茶树资源分布广泛, 遗传多样性丰富^[2]。陕南茶区作为中国茶树适宜生长区的最北缘, 较南方茶区纬度高且年平均气温低。在经历漫长的繁衍和进化过程后, 长期处于低温环境中的秦巴山区地方茶树种质有可能产生对低温胁迫耐受的形态和生理生化特征, 具备一定的抗寒性。鉴于此, 在前期对 23 个陕西地方茶树品种以及 6 个外地引进茶树品种的抗寒性进行综合评价的基础上, 作者所在的研究小组筛选出了包括‘紫阳圆叶’(‘Ziyangyuanye’) 在内的陕西省特有的优良抗寒茶树品种^[3]。

早期茶树抗寒性研究多集中在茶树叶片解剖结构与抗寒性关系以及低温胁迫下叶片细胞原生质膜透性、水分含量、抗氧化酶类活性和光合作用或呼吸作用强度等生理生化指标的变化方面^[4-6]。随着分子生物学理论和技术的不断发展, 有关茶树低温胁迫和抗寒性分子机制的研究取得了显著进展。目前, 通过对低温和常温下基因表达差异进行比较以分离茶树在低温胁迫下差异表达的基因是茶树抗寒性分子机制研究的主要方法^[7-8]。在用于克隆差异表达基因的方法中, DDRT-PCR 技术所需的 RNA 量少、重复性

好, 是分析植物基因差异表达的有利工具, 已被广泛应用于植物抗逆性研究^[9]。

近年来, 以陕西地方茶树种质为材料的抗寒性研究也有报道, 但仅局限于叶片解剖结构和低温胁迫下茶树叶片生理生化指标的变化等方面^[3,10], 而对低温胁迫诱导下茶树特异基因的表达和茶树抗寒性分子机制的研究尚未见报道。为了更全面地发掘和了解陕西特有的茶树抗寒种质中的相关基因及其功能, 作者利用 DDRT-PCR 技术, 分析了经低温胁迫不同时间后抗寒茶树品种‘紫阳圆叶’基因差异表达的结果, 并通过半定量 RT-PCR 验证差异表达基因的表达特性, 以期揭示茶树抗寒性的分子机制, 为通过基因工程技术提高中国北方茶区茶树的抗寒性奠定理论基础。

1 材料和方法

1.1 材料

供试材料为优良抗寒茶树品种‘紫阳圆叶’(‘Ziyangyuanye’), 取自陕西省安康市紫阳县茶叶试验站。锚定引物和随机引物为上海生工生物工程技术服务有限公司产品; DNase I (RNase-free)、M-MLV 反转录酶、*Taq* DNA 聚合酶、*dNTPs* 和 DL2000 Marker 等购自宝生物工程(大连)有限公司。所用仪器为 PTC-200 PCR 仪和 Sequi-Gen GT 测序电泳仪 (Bio-Rad)、Microfuge 22R 离心机 (Beckman Coulter)、Tanon-1600 全自动凝胶成像系统 (上海天能科技有限公司)、NanoDrop 2000 超微量紫外分光光度计 (Thermo Scientific)。

1.2 方法

1.2.1 低温处理方法 挖取长势良好、无病虫害、株高约 30 cm 的 2 年生扦插苗, 移栽至陕西师范大学遗传学实验室的人工气候箱 (温度 25 °C、空气相对湿度

65%)中培养,并按统一标准进行水肥管理。待茶树苗生长稳定后置于人工气候箱中于4℃进行低温处理,处理时间分别为0、8、12、24和48 h,每一处理组4株扦插苗,3次重复。低温处理结束后在扦插苗对应位置上取当年生新梢第2和第3枚真叶,迅速置于液氮中冷冻后,于-80℃冰箱中保存、备用。

1.2.2 总RNA提取和cDNA第1链合成 取冻存叶片约500 mg,采用改良的SDS-酚法^[11]提取总RNA;用质量体积分数1.0%的琼脂糖凝胶电泳检测总RNA完整性,并用超微量紫外分光光度计测定其纯度和浓度。反转录引物分别为B0327、B0328和B0329(序列见表1),以总RNA为模板,参照Reverse Transcriptase M-MLV(RNase H)使用说明书合成cDNA第1链。

1.2.3 DDRT-PCR分析 以反转录合成的cDNA第1链为模板,用3条锚定引物(B0327、B0328和B0329)与7条随机引物(B0305~B0311)(序列见表1)组成21个引物对组合,分别进行RT-PCR扩增反应,重复2次。扩增程序为:94℃预变性1 min;94℃变性30 s,45℃退火2 min,72℃延伸30 s,共40个循环;最后于72℃延伸10 min。取扩增产物4 μL,加入3 μL上样缓冲液于95℃变性5 min,冰浴3 min后用质量体积分数6%的变性聚丙烯酰胺凝胶电泳,银染显色,拍照记录实验结果。

表1 用于茶树品种‘紫阳圆叶’基因DDRT-PCR的引物序列
Table 1 Primer sequences used for DDRT-PCR of *Camellia sinensis* ‘Ziyangyuanye’ gene

引物编号 No. of primer	5'→3'序列 5'→3' sequence	引物编号 No. of primer	5'→3'序列 5'→3' sequence
B0305	GGAACCAATC	B0310	GGTACATTGG
B0306	AAACTCCGTC	B0311	TACCTAAGCG
B0307	TCGATACAGG	B0327	AAGCTTTTTTTTTG
B0308	TGGTAAAGGG	B0328	AAGCTTTTTTTTTTA
B0309	TCGGTCATAG	B0329	AAGCTTTTTTTTTTC

1.2.4 cDNA差异片段的回收、测序及分析 挑选差异片段,采用煮沸法回收并二次扩增,所用的引物对组合及扩增条件与上述DDRT-PCR分析相同;扩增产物用质量体积分数1.4%的琼脂糖凝胶电泳检测,筛选仅有1条扩增产物且与DDRT-PCR扩增结果长度一致的片段,交由上海生工生物工程技术服务有限公司测序。测序结果经GenBank和EST等数据库

BLASTn和BLASTx检索,分析同源性。

1.2.5 半定量RT-PCR分析与验证 参照Prime Script[®] RT reagent Kit说明书反转录合成cDNA第1链。根据BLAST检索结果并采用Primer Premier 5.0软件设计相应引物,选择功能明确的差异片段进行半定量RT-PCR,扩增产物经质量体积分数1.4%的琼脂糖凝胶电泳检测。

2 结果和分析

2.1 总RNA提取及检测结果

经质量体积分数1.0%的琼脂糖凝胶电泳检测,从经过4℃低温处理不同时间的茶树2年生扦插苗叶片中提取的总RNA的28S、18S和5S带型清晰、锐度好且无弥散(图1)。说明其总RNA较完整且无降解。用超微量紫外分光光度计测定吸光度(A),结果显示: A_{260}/A_{280} 为1.9~2.0, A_{260}/A_{230} 大于2.0,表明获得的RNA纯度较高,可以用作反转录反应的模板。

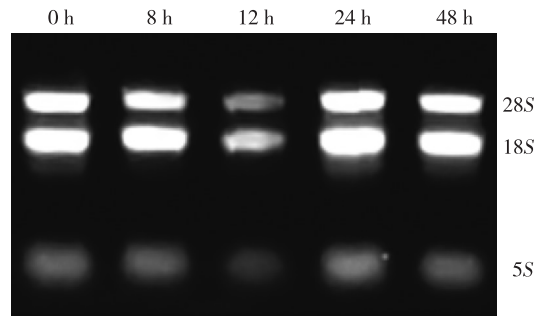


图1 低温(4℃)胁迫不同时间后茶树品种‘紫阳圆叶’叶片总RNA的电泳结果

Fig. 1 Electrophoresis result of total RNA of *Camellia sinensis* ‘Ziyangyuanye’ leaf after treated by low temperature (4℃) stress for different times

2.2 mRNA差异显示结果

在4℃低温条件下对茶树品种‘紫阳圆叶’2年生扦插苗分别处理0、8、12、24和48 h,对5个处理组扦插苗叶片的反转录产物进行DDRT-PCR扩增,其中部分引物对的扩增结果见图2。扩增结果显示:共有12个引物对扩增出有明显差异的cDNA片段。这些差异片段在低温胁迫条件下表现为2种类型:第1类为抑制表达片段,即随胁迫时间延长cDNA片段的强度呈减弱趋势,如差异片段DF-8(图2-A)和DF-2(图2-B);第2类为诱导表达片段,在处理的开始阶

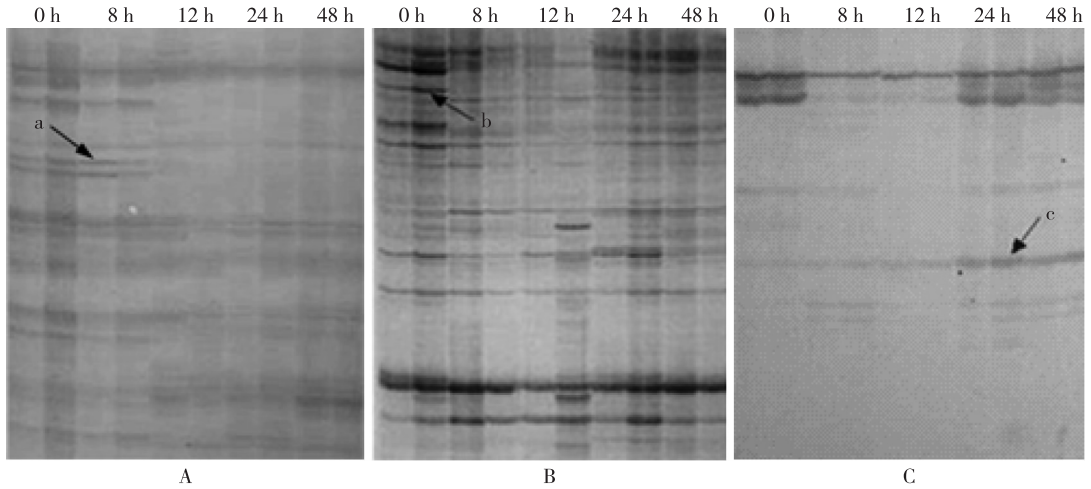


图2 经低温(4℃)胁迫不同时间后茶树品种‘紫阳圆叶’的部分 DDRT-PCR 扩增图谱
Fig. 2 A part of amplification pattern of DDRT-PCR of *Camellia sinensis* ‘Ziyangyuanye’ after treated by low temperature (4℃) stress for different times

A: 用引物对 B0329/B0311 进行的 DDRT-PCR 扩增结果, 图中“a”表示差异片段 DF-8 Amplification result of DDRT-PCR by primer pair B0329/B0311, and “a” in this figure showing the differential fragment DF-8; B: 用引物对 B0329/B0305 进行的 DDRT-PCR 扩增结果, 图中“b”表示差异片段 DF-2 Amplification result of DDRT-PCR by primer pair B0329/B0305, and “b” in this figure showing the differential fragment DF-2; C: 用引物对 B0328/B0305 进行的 DDRT-PCR 扩增结果, 图中“c”表示差异片段 DF-3 Amplification result of DDRT-PCR by primer pair B0328/B0305, and “c” in this figure showing the differential fragment DF-3.

段(0 h)即表达但强度较弱, 随低温处理时间延长这些片段的强度递增, 至处理 24 h 后达到最强, 如差异片段 DF-3(图 2-C)。

2.3 差异片段的二次 PCR 扩增结果

通过上述 DDRT-PCR 扩增获得差异片段, 对差异片段回收后进行二次 PCR 扩增, 扩增产物的电泳检测结果显示(图 3): 差异片段 DF-8、DF-2 和 DF-3 的二次 PCR 扩增产物均为 1 条片段, 且分子量与变性

聚丙烯酰胺凝胶电泳中一致。说明 3 条差异片段均为阳性。

2.4 差异片段测序结果及同源性比对

差异片段 DF-8、DF-2 和 DF-3 经测序并通过 BLASTn 进行同源性比对, 结果表明: 差异片段 DF-8 长度为 217 bp, 与多个茶树品种的谷氨酰胺合成酶基因片段有很高的同源性, 与‘安吉白茶’(*Camellia sinensis* ‘Anjibaicha’)和‘龙井 43’(*C. sinensis* ‘Longjing 43’)的谷氨酰胺合成酶基因的同源性分别为 96% 和 91%; 与茶树谷氨酰胺合成酶基因、‘安吉白茶’谷氨酰胺合成酶基因、茶树细胞质谷氨酰胺合成酶基因和‘龙井 43’细胞质谷氨酰胺合成酶基因的同源性序列 mRNA 的期望值分别为 $1e-76$ 、 $7e-75$ 、 $3e-28$ 和 $2e-26$; 故以“茶树谷氨酰胺合成酶基因片段(*Csgsf*, *Camellia sinensis* glutamine synthetase fragment)”命名。相关序列同源性的 BLASTx 比对结果显示: *Csgsf* 与多种植物谷氨酰胺合成酶基因高度同源, 与菜豆(*Phaseolus vulgaris* Linn.)、蒺藜苜蓿(*Medicago truncatula* Gaertn.)、油棕(*Elaeis guineensis* Jacq.)、西洋参(*Panax quinquefolius* Linn.)和水稻(*Oryza sativa* Linn.)谷氨酰胺合成酶基因的同源性分别达到 100%、97%、97%、97% 和 93%, 因此推测该片段即为‘紫阳圆叶’谷氨酰胺合成酶基因片段。

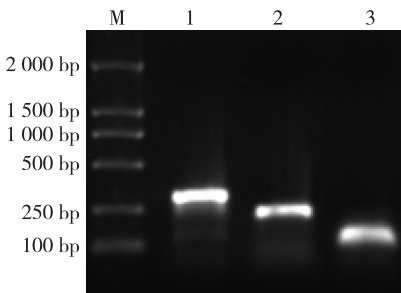


图3 经低温(4℃)胁迫不同时间后茶树品种‘紫阳圆叶’差异片段的二次 PCR 扩增图谱
Fig. 3 Amplification pattern of the second PCR of differential fragments of *Camellia sinensis* ‘Ziyangyuanye’ after treated by low temperature (4℃) stress for different times

M: Marker; 1: 差异片段 DF-8 Differential fragment DF-8; 2: 差异片段 DF-2 Differential fragment DF-2; 3: 差异片段 DF-3 Differential fragment DF-3.

差异片段 DF-2 和 DF-3 的碱基数分别为 316 和 232 bp, 均为低温胁迫下差异表达的片段, 故命名为“茶树冷诱导基因片段 (*Cscsf*, *Camellia sinensis* cold acclimation fragment)”, 分别用 *Cscsf1* 和 *Cscsf2* 表示。EST 数据库的检索结果显示: *Cscsf2* 与茶树干旱胁迫诱导表达的 cDNA 的同源性为 100%, 与茶树干旱抑制消减杂交文库保守假定蛋白相似 cDNA (CsSSHFD946) 和茶树干旱抑制消减杂交文库未命名蛋白相似 cDNA (CsSSHFD600) 的期望值分别为 $1e-106$ 和 $1e-101$; 而 *Cscsf1* 未能检出同源序列, 推测其为与冷胁迫相关的未知基因。

2.5 半定量 RT-PCR 结果

选择经 4 °C 低温胁迫后茶树叶片的下调表达片段 *Csgsf* 和 *Cscsf1* 及上调表达片段 *Cscsf2* 进行 RT-PCR 验证。结果见图 4。由图 4 可见: *Csgsf* 和 *Cscsf1* 在胁迫初始即表达, 并随着低温胁迫时间的延长表达量逐渐降低; 而 *Cscsf2* 在 0 h 表达较弱, 随着低温胁迫时间的延长表达量逐渐增加, 在胁迫 48 h 后达到最大。

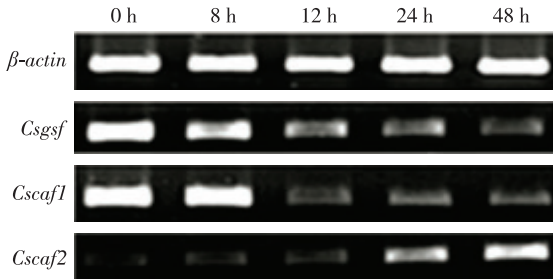


图 4 经低温 (4 °C) 胁迫不同时间后茶树品种‘紫阳圆叶’差异片段 *Csgsf*、*Cscsf1* 和 *Cscsf2* 的半定量 RT-PCR 结果
Fig. 4 Semi-quantitative RT-PCR result of differential fragments *Csgsf*, *Cscsf1* and *Cscsf2* of *Camellia sinensis* ‘Ziyangyuan’ after treated by low temperature (4 °C) stress for different times

3 讨 论

本研究采用 mRNA 差异显示技术, 对陕西地方抗寒性茶树种质‘紫阳圆叶’在 5 个不同时间段低温胁迫处理下的 cDNA 进行分析, 并通过差异 cDNA 片段的克隆、测序和功能分析, 最终获得 3 个与低温胁迫相关的片段, 分别为谷氨酰胺合成酶基因片段 *Csgsf* 和在低温胁迫下表现应答的茶树冷诱导基因片段 *Cscsf1* 和 *Cscsf2*。

谷氨酰胺合成酶 (GS) 为高等植物氮同化的关键

酶。当 ATP 供能时, GS 将 NH_4^+ 催化还原为谷氨酰胺。GS 的表达受组织器官特异性以及光照、温度、盐离子、土壤重金属、水分胁迫及氮源形式等因素的影响^[12-13]。Teixeir 等^[14]的研究结果表明: 经盐胁迫处理后, 马铃薯 (*Solanum tuberosum* Linn.) 叶片中的 GS 表达下调, 根部的 GS 表达上调, 说明盐胁迫对马铃薯各器官中的 GS 含量有影响, 其中叶片中的 GS 对盐胁迫的敏感性较根部更强。此外, 低温也会明显影响植物 GS 等氮素同化酶的活性。陆彬彬等^[15]的研究结果表明: 相对低温会抑制水稻叶片中 GS 的活性; 本研究结果也显示: 在低温胁迫过程中 *Csgsf* 强度随胁迫时间延长逐渐变弱; 在低温胁迫处理过程中的前 8 h, *Csgsf* 表达活性较高, 但随胁迫时间的延长, 至胁迫 16 h 时其表达量明显下降。据此可推测: 低温胁迫过程中茶树叶片中谷氨酰胺合成酶基因的表达量随胁迫时间的延长逐渐降低, 呈下调趋势, 这与 Rana 等^[16]对 4 °C 低温处理后茶树叶芽中 GS 的表达状况的研究结果一致。Rana 等^[16]的研究结果还表明: GS 除对低温胁迫有响应外, 在经过干旱和高温等非生物因子胁迫处理后, 茶树叶芽中 GS 的表达量也均下调。推测茶树 GS 基因启动子区域可能有胁迫响应元件, 从而导致基因表达量降低。

大多数植物叶片中包含 2 类 GS, 即胞液型 GS (GS1) 和叶绿体型 GS (GS2), 其中 GS1 主要同化内源性蛋白质降解和氨基酸分解代谢产生的氨^[17]。本研究结果和 Rana 等^[16]的研究结果均表明: 经低温胁迫后茶树叶片中的 GS 表达均减弱。其原因可能是: 在温度下降后叶片细胞中蛋白质分解代谢和光呼吸作用均减弱, 导致内源性蛋白质和由光呼吸产生的 NH_4^+ 均减少, 进一步引起 GS 表达量下调、酶活性下降。相关的具体生化途径和基因表达调控机制尚待进一步深入研究。

干旱胁迫与低温胁迫对植物生理生化过程以及基因表达等的影响作用相似^[18], 植物抗寒相关基因包括冷胁迫专一诱导基因和低温诱导基因, 其中, 专一诱导基因只能被冷处理诱导^[19], 而低温诱导基因不仅能对低温处理快速应答还能被水胁迫、短日照和 ABA 等胁迫诱导, 如拟南芥 [*Arabidopsis thaliana* (Linn.) Heynh.] 的 *RC12A* 和 *RC12B* 等基因^[20]。本研究中, 茶树冷诱导基因片段 *Cscsf2* 与茶树干旱胁迫诱导下表达的 cDNA 同源性高达 100%, 由此可推测 *Cscsf2* 是对干旱和低温等胁迫均有表现应答的基因

片段。在基因数据库中未能检出茶树冷诱导基因片段 *Cscaf1* 的同源序列,推测其可能是与冷胁迫相关的基因片段,具体功能还有待进一步研究。

低温是影响茶树生长发育、制约茶叶产业发展的最重要的非生物因子之一。陕西地方茶树品种主要种植于秦巴山区,因长期适应低温环境,比南方种植的茶树品种的抗寒性相对更强。由于差异显示技术的局限性,本研究未能从抗寒茶树品种‘紫阳圆叶’中克隆获得与茶树抗寒直接有关的基因。但根据研究结果并结合相关文献,*Csgsf*、*Cscaf1* 和 *Cscaf2* 这3个cDNA片段的确参与了茶树对低温胁迫的应答,这3个片段的获得不仅有助于茶树抗寒性分子机制的深入研究,也为今后地方优良茶树种质资源的合理利用以及遗传改良奠定了一定的研究基础。

参考文献:

- [1] 邹中伟,房婉萍,张定,等. 低温胁迫下茶树基因表达的差异分析[J]. 茶叶科学, 2008, 28(4): 249-254.
- [2] 胡歆. 陕西茶树种质资源研究进展[J]. 安徽农业科学, 2012, 40(1): 51-52, 57.
- [3] 武艳,肖斌,游新才,等. 陕西茶树种质资源抗寒性综合评价[J]. 热带作物学报, 2012, 33(5): 792-798.
- [4] 侯渝嘉,唐敏,胡翔. 茶树种质资源的抗寒性鉴定[J]. 西南农业学报, 2010, 23(1): 137-140.
- [5] 罗军武,唐和平,黄意欢. 茶树不同抗寒性品种间保护酶类活性的差异[J]. 湖南农业大学学报:自然科学版, 2001, 21(2): 94-96.
- [6] KORNIEYEV D, LOGAN B A, PAYTON P, et al. Enhanced photochemical light utilization and decreased chilling-induced photoinhibition of photosystem II in cotton overexpressing genes encoding chloroplast-targeted antioxidant enzymes[J]. *Physiologia Plantarum*, 2001, 113(3): 323-331.
- [7] WANG Y, JIANG C J, LI Y Y, et al. CsICE1 and CsCBF1: two transcription factors involved in cold responses in *Camellia sinensis* [J]. *Plant Cell Reports*, 2012, 31(1): 27-34.
- [8] PAUL A, LAL L, AHUJA P S, et al. *Alpha*-tubulin (*CsTUA*) up-regulated during winter dormancy is a low temperature inducible gene in tea [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze][J]. *Molecular Biology Reports*, 2012, 39(4): 3485-3490.
- [9] 贺滢,郭安平,孔华,等. mRNA差异显示技术的研究进展及其在植物研究中的应用[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(5): 1307-1309, 1321.
- [10] 李剑,余有本,周天山,等. 陕西茶树品种的抗寒性研究[J]. 西北农业学报, 2009, 18(1): 262-266.
- [11] 王梦娜,武艳,程国山,等. 茶树叶片总RNA提取方法的比较研究[J]. 植物生理学报, 2013, 49(1): 95-99.
- [12] SINGH K K, GHOSH S. Regulation of glutamine synthetase isoforms in two differentially drought tolerant rice (*Oryza sativa* L.) cultivars under water deficit conditions [J]. *Plant Cell Reports*, 2013, 32(2): 183-193.
- [13] OLIVERIRA I C, BREARS T, KNIGHT T J, et al. Overexpression of cytosolic glutamine synthetase. Relation to nitrogen, light, and photorespiration[J]. *Plant Physiology*, 2002, 129(3): 1170-1180.
- [14] TEIXEIRA A J, FIDALGO F. Salt stress affects glutamine synthetase activity and mRNA accumulation on potato plants in an organ-dependent manner[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2009, 47(9): 807-813.
- [15] 陆彬彬,周卫,张吉,等. 温度对水稻谷氨酰胺合成酶和NADH-谷氨酰胺合成酶表达的影响[J]. 武汉大学学报:理学版, 2002, 48(2): 239-242.
- [16] RANA N K, MOHANPURIA P, YADAV S K. Expression of tea cytosolic glutamine synthetase is tissue specific and induced by cadmium and salt stress[J]. *Biologia Plantarum*, 2008, 52(2): 361-364.
- [17] 袁永泽,林清华,张楚富,等. 蔗糖对水稻幼苗叶片谷氨酰胺合成酶和1,5-二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶的影响[J]. 武汉植物学研究, 2002, 20(3): 219-222.
- [18] 秦嗣军,赵德英,吕德国,等. 水分胁迫对寒富苹果叶片碳氮代谢的影响[J]. 吉林农业大学学报, 2010, 32(4): 402-406, 412.
- [19] VANNINI C, LOCATELLI F, BRACALE M, et al. Over expression of the rice *Osmyb4* gene in cases chilling and freezing tolerance of *Arabidopsis thaliana* plants [J]. *The Plant Journal*, 2004, 37(1): 115-127.
- [20] MEDINA J, CATALÁ R, SALINAS J. Developmental and stress regulation of *RCI2A* and *RCI2B*, two cold-inducible genes of *Arabidopsis* encoding highly conserved hydrophobic proteins [J]. *Plant Physiology*, 2001, 125(4): 1655-1666.

(责任编辑:张明霞)